



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη του ρόλου της ενζυμικής πρωτεΐνης IRE1 στον καρκίνο
με μεθόδους βιοπληροφορικής ανάλυσης

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Γ. ΒΟΥΤΕΤΑΚΗΣ
Βιολόγος-Βιοπληροφορικός MSc

Λάρισα, Νοέμβριος 2021

Μελέτη του ρόλου της ενζυμικής πρωτεΐνης IRE1 στον καρκίνο
με μεθόδους βιοπληροφορικής ανάλυσης

©Κωνσταντίνος Γ. Βουτετάκης, Διδακτορική Διατριβή, Λάρισα 2021

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- **Δρ. Αριστοτέλης Χατζηγιάννου (Διευθυντής Ερευνών - Επιβλέπων)**
Κέντρο Βιολογίας Συστημάτων, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημία Αθηνών.
- **Δρ. Δημήτριος Λεωνίδας (Καθηγητής - Συνεπιβλέπων)**
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **Δρ. Νίκη Χονδρογιάννη (Διευθύντρια Ερευνών)**
Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Υπόλοιπα Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

- **Δρ. Παντελής Μπάγκος (Καθηγητής)**
Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στην Βιοϊατρική, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **Δρ. Ηλίας Μαγκλογιάννης (Καθηγητής)**
Τμήμα Ψηφιακών Συστημάτων, Πανεπιστήμιο Πειραιά.
- **Δρ. Βασιλική Α. Οικονομίδου (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια)**
Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- **Δρ. Χαράλαμπος Καρανίκας (Επίκουρος Καθηγητής)**
Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στην Βιοϊατρική, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Γ. ΒΟΥΤΕΤΑΚΗΣ

Μελέτη του ρόλου της ενζυμικής πρωτεΐνης IRE1 στον καρκίνο
με μεθόδους βιοπληροφορικής ανάλυσης

Περίληψη

Η διαταραχή της πρωτεόστασης έχει αναδειχθεί ως κύριο χαρακτηριστικό του καρκίνου, προσδιορίζοντας την επιθετικότητα των όγκων. Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι το Ενδοπλασματικό Δίκτυο (Ε.Δ.), το κύριο κυτταρικό διαμέρισμα για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών και τον έλεγχο ποιότητας, διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου. Η διαπίστωση αυτή ισχύει σε σημαντικό βαθμό και για το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (GBM), τον πιο θανατηφόρο πρωτοπαθή καρκίνο του εγκεφάλου χωρίς αποτελεσματική θεραπεία. Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι ο αισθητήρας στρες Ε.Δ. IRE1α (αναφέρεται και ως IRE1) συμβάλλει στην εξέλιξη του GBM, μέσω του μη συμβατικού ματίσματος του mRNA του XBP1 και της εξαρτώμενης από την IRE1 αποικοδόμησης (RIDD) του RNA. Εδώ, αποδεικνύουμε για πρώτη φορά την σημασία της IRE1 σηματοδότησης στην ανάπτυξη και εξέλιξη του ανθρώπινου GBM και εξάγουμε συγκεκριμένη γονιδιακή υπογραφή (IRE1sign38) που αποτελείται από δύο συνιστώσες 19 γονιδίων η κάθε μια, αντιπροσωπεύοντας την XBP1s και RIDD σηματοδοτική ενεργότητα, αντίστοιχα, με άμεση εφαρμογή σε ανθρώπινα μεταγραφικά GBM δεδομένα. Η αξιολόγηση της δραστηριότητας των δύο κύριων σηματοδοτικών αξόνων και η συσχέτισή τους με βιοχημικά, κλινικά, ανοσολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά μας επέτρεψε να αναδείξουμε τον ανταγωνιστικό τους ρόλο στην αύξηση και εξέλιξη του όγκου, κυρίως μέσω επιλεκτικής αναδιαμόρφωσης του στρώματος του. Επιπλέον, χαρτογραφήσαμε για πρώτη φορά το δίκτυο των miRNAs που εμπλέκεται στην ρύθμιση των δύο σηματοδοτικών αξόνων και ταυτοποιήσαμε 11 υποψήφια miRNAs που ελέγχουν την IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα τόσο στο GBM όσο και στον Τριπλά Αρνητικό Καρκίνο του Μαστού (TNBC), ρυθμίζοντας λειτουργίες που καθορίζουν την κυτταρική διήθηση/εισβολή, μετανάστευση και μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων αλλά και τον επαναπρογραμματισμό τους σε βλαστικά κύτταρα. Στη συνέχεια, αποκρυπτογραφήσαμε τα νουκλεοτιδικά και δομικά μοτίβα 2ταγούς RNA δομής που χαρακτηρίζουν τους RIDD στόχους και κατασκευάσαμε *in silico* δύο πρότυπες RNA ακολουθίες που αναδιπλώνονταν σε δομή στελέχους-βρόχου και εσωτερικού βρόχου, αντίστοιχα, κατόπιν ενσωμάτωσης των ταυτοποιημένων νουκλεοτιδικών μοτίβων αποκοπής από την IRE1 στην περιοχή των βρόχων. Με βάση τις πρότυπες RNA ακολουθίες συντέθηκαν ολιγονουκλεοτίδια RNA – πιθανοί RIDD στόχοι, οι οποίοι επιβεβαιώθηκαν με *in vitro* πειράματα αποκοπής. Παράλληλα, αναπτύξαμε μια μεθοδολογία βιοπληροφορικής για την ταυτοποίηση υποψήφιων νουκλεοτιδικών μοτίβων αποκοπής από την IRE1 σε περιοχές βρόχων φουρκέτας και εσωτερικών βρόχων εξετάζοντας το σύνολο των ανθρώπινων

πρόδρομων miRNA μορίων της βάσης miRBase, αναδεικνύοντας υποψήφιους RIDD miRNA (ή miRIDD) στόχους. Επίσης, με βάση την ανάλυση των RNA ακολουθιών αναπτύξαμε μεθοδολογία για τον εντοπισμό και την ποσοτική εκτίμηση των μοτίβων αποκοπής σε RNAseq δεδομένα. Επιπρόσθετα, η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε για την εκτίμηση της IRE1 ενεργότητας στο GBM, εφαρμόστηκε σε 11 ακόμη συμπαγείς όγκους του TCGA προγράμματος και οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε υπότυπους υψηλής και χαμηλής IRE1/XBP1s/RIDD σηματοδοτικής ενεργότητας με άμεση συσχέτιση με μοριακούς, κλινικούς και ανοσολογικούς δείκτες αλλά και με σημαντικό αντίκτυπο στα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών. Αυτή η μελέτη παρέχει την πρώτη απόδειξη ενός διπλού ρόλου της IRE1 σηματοδότησης στον καρκίνο και ανοίγει ένα νέο θεραπευτικό παράθυρο για την παρεμπόδιση της εξέλιξης της νόσου.

Τέλος, στο πλαίσιο της μεταφραστικής έρευνας και της ιατρικής ακριβείας αναπτύξαμε μια φιλική προς τον χρήστη (σε γραφικό περιβάλλον) R Shiny υπολογιστική πλατφόρμα που επιτρέπει 1) την ανάκτηση μοριακών και κλινικών δεδομένων του προγράμματος TCGA, 2) την επεξεργασία και το φιλτράρισμα των μοριακών δεδομένων μέσω τεχνικών που αυξάνουν το βιολογικό σήμα έναντι του θορύβου, 3) την ανάλυση και ενσωμάτωση γονιδιωματικών δεδομένων μεγάλης κλίμακας από διαφορετικές πλατφόρμες μέσω τεχνικών ομαλοποίησης, 4) την εξαγωγή γονιδιακών υπογραφών σημαντικών βιοδεικτών που χαρακτηρίζουν τον εξεταζόμενο φαινότυπο, 5) την ανάλυση διαφορικής έκφρασης και την λειτουργική ανάλυση εμπλουτισμού σε λίστες γονιδίων, 6) τον χαρακτηρισμό των ασθενών μιας κοόρτης με βάση το πρότυπο έκφρασης της γονιδιακής υπογραφής αλλά και την 7) οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων με μια σειρά εκλεπτυσμένων μεθόδων απεικόνισης που περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τους χάρτες θερμικής έντασης με την ιεραρχική ομαδοποίηση ασθενών και γενετικών οντοτήτων, τα διαγράμματα ανάλυσης κύριων συνιστωσών, τις καμπύλες ολικής επιβίωσης, τα διαγράμματα oncoplot, τα διαγράμματα Volcano και τις αναπαραστάσεις δικτύων γονιδιακών αλληλεπιδράσεων.

Λέξεις-Κλειδιά

Ενδοπλασματικό Δίκτυο (Ε.Δ.), UPR, Καρκίνος, IRE1, XBP1, RIDD, Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα (GBM), TCGA, μοτίβα, δευτεροταγή RNA δομή, miRNAs, IRE1sign38, R Shiny.

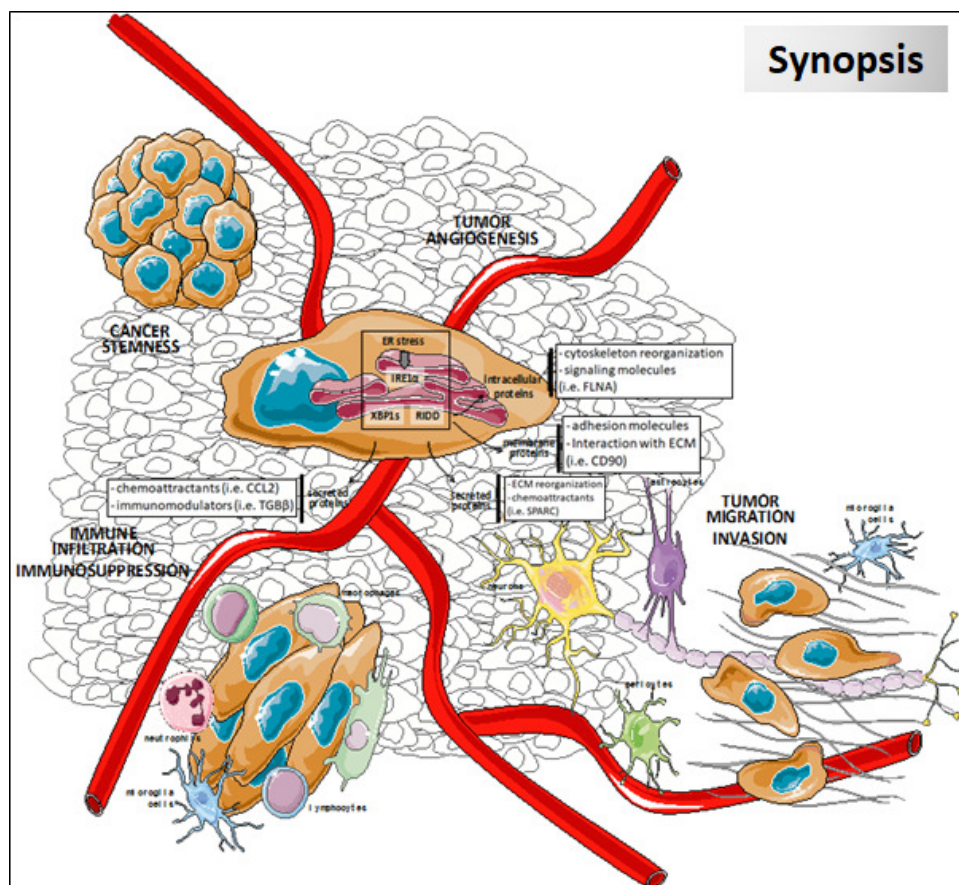
Abstract

Proteostasis imbalance is emerging as a major hallmark of cancer, driving tumor aggressiveness. Evidence suggests that the endoplasmic reticulum (ER), a major site for protein folding and quality control, plays a critical role in cancer development. This concept is valid in glioblastoma multiform (GBM), the most lethal primary brain cancer with no effective treatment. Previous studies demonstrated that the ER stress sensor IRE1 α (also referred to as IRE1) contributes to GBM progression, through XBP1 mRNA splicing and regulated IRE1-dependent decay (RIDD) of RNA. Here, we first demonstrated IRE1 signaling significance to human GBM and defined specific IRE1-dependent gene expression signature of two main components with 19 genes each, reflecting the XBP1s and RIDD signaling activity, respectively, that were confronted to human GBM transcriptomes. The activity assessment of both signaling axes and their correlation with biochemical, clinical, immunological and phenotype characteristics allowed us to demonstrate the antagonistic roles of XBP1 mRNA splicing and RIDD on tumor outcomes, mainly through selective remodeling of the tumor stroma. Moreover, we mapped the miRNA network involved in the regulation of the two signaling axes for the first time and identified 11 candidate miRNAs that control IRE1 signaling activity in both GBM and Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) by controlling biological processes involved in the infiltration/invasion, migration and metastasis of tumor cells and the cancer stem cell reprogramming as well. Next, we deciphered the nucleotide sequence and RNA secondary structure motifs of RIDD targets and we constructed *in silico* two scaffold RNA sequences (probes) folding in stem-loop and internal loop, respectively, after the encapsulation of identified IRE1 cleavage site motifs in the loops' region. Based on the RNA probes constructed *in silico*, RNA oligos were synthesized biochemically, and were validated as RIDD targets by an IRE1-mediated cleavage assay. In parallel, we developed a bioinformatics methodology for the identification of cleavage site motifs in the sequences of hairpin and internal loops in the precursor miRNAs of human miRBase, highlighting candidate miRIDD targets as well. The findings of RNA motif sequence and structure analysis helped us to develop a new methodology for the identification and quantification of cleavage site motifs in RNAseq data. Moreover, the computational methodologies that were utilized throughout the GBM for the evaluation of IRE1 activity was applied to other 11 solid tumors of Cancer Genome Atlas (TCGA) and their patients were grouped into high and low IRE1/XBP1s/RIDD molecular subtypes with a direct impact on patient survival rates, while significant correlation was demonstrated with specific molecular, clinical and immunological markers. This study

provides the first demonstration of a dual role of IRE1 downstream signaling in cancer and opens a new therapeutic window to abrogate tumor progression. The IRE1 α -centric landscape of tumor microenvironment is summarized in the “Synopsis” figure which highlights the pivotal role of IRE1 protein in cancer.

Finally, for the sake of translational research and precision medicine we developed a GUI (graphical user interface) R Shiny platform that allows users to i) retrieve molecular and clinical TCGA data, ii) process and filter molecular data by increasing the ratio between signal to noise, iii) analyze and integrate NGS data from different platforms by using cross-platform harmonization, iv) derive gene signatures with potential biomarkers that characterize the phenotype under study, v) perform differential expression analysis and functional enrichment analysis, vi) stratify cancer patients based on the gene signature expression profile and vii) visualize their results with a series of sophisticated ways including hierarchical clustering heatmaps, PCA plots, survival plots, oncoplots, Volcano plots and gene network representations.

Keywords: Endoplasmic Reticulum (E.R.), UPR, Cancer, IRE1, XBP1, RIDD, GBM, TCGA, motifs, miRNAs, RNA secondary structure, IRE1sign38, R Shiny.



Πρόλογος

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής ξεκίνησε τον Οκτώβριο του 2017 στο Εργαστήριο Μεταβολικής Μηχανικής και Βιοπληροφορικής του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών υπό την επίβλεψη του Ερευνητή Β' Βαθμίδας Δρ. Αριστοτέλη Χατζηγιάννου και πρόσφατα εκλεγμένου Ερευνητή Α' στο Κέντρο Βιολογίας Συστημάτων του Ινστιτούτου Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, σε συνεργασία με το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την συνεπίβλεψη του Καθηγητή Βιοχημείας Δρ. Δημητρίου Λεωνίδα.

Η πλειονότητα των *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων που αφορούσαν στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (GBM) διεξήχθη στο εργαστήριο Ογκογένεσης και Σηματοδότησης λόγω Στρες του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας και Ιατρικής Έρευνας της Γαλλίας (INSERM) (<https://www.inserm.fr>), κάτω από την καθοδήγηση του Διευθυντή Ερευνών Δρ. Eric Chevet. Βιοχημικές και ανοσολογικές δοκιμασίες που αφορούσαν στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του κακοήθους μελανώματος και των φυσικών κυττάρων-«φονιάδων» (Natural Killer cells ή NKs) έλαβαν χώρα στο εργαστήριο Σηματοδότησης λόγω Στρες του Ινστιτούτου Φαρμακευτικής Έρευνας του Τμήματος Ιατρικής (<https://medicine.ekmd.huji.ac.il/en/pages/default.aspx>) στη Φαρμακευτική Σχολή του Εβραϊκού Πανεπιστημίου της Ιερουσαλήμ στο Ισραήλ, κάτω από την καθοδήγηση του Καθηγητή Boaz Tirosh. Τέλος, βιοχημικά και μεταγραφικά πειραματικά δεδομένα που αφορούσαν στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB-231 προέρχονταν από το Κέντρο Έρευνας για την Απόπτωση (Apoptosis Research Center) του Τμήματος Φυσικών Επιστημών του Εθνικού Πανεπιστημίου της Ιρλανδίας στο Γκάλγουεϊ (<https://www.nuigalway.ie>), υπό την καθοδήγηση του Καθηγητή Βιολογίας του Καρκίνου, Afshin Samali.

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας το συναρπαστικό αυτό ταξίδι στην γνώση και την επιστήμη και πριν αρχίσει κάποιο επόμενο.. νοιώθω βαθύτατα την ανάγκη να ευχαριστήσω τους ανθρώπους εκείνους που συνέβαλαν ο καθένας ξεχωριστά από την θέση του να πραγματοποιηθεί ένας διακαής μου πόθος. Εξέχουσα θέση στην λίστα αυτή κατέχει ο κύριος επιβλέπων της διδακτορικής μου διατριβής Δρ. Αριστοτέλης Χατζηγιάννου που με δέχτηκε στην ερευνητική του ομάδα, μου προσέφερε τα απαραίτητα μέσα για την πραγματοποίηση της διατριβής, με εμπιστεύτηκε, με στήριξε και με καθοδήγησε με τις πάντα εύστοχες παρατηρήσεις του. Ελπίζω και εύχομαι η συνεργασία μας να κρατήσει για πολλά χρόνια ακόμα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Δημήτρη Λεωνίδα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναλαμβάνοντας ως συνεπιβλέπων Καθηγητής της διδακτορικής διατριβής, αποδεικνύοντας ότι σε έναν τόσο ανταγωνιστικό χώρο υπάρχουν άνθρωποι του πνεύματος που στηρίζουν κάθε προσπάθεια εξέλιξης και προόδου χωρίς να έχουν αποκλειστικό τους γνώμονα το ατομικό τους συμφέρον. Φυσικά, δεν θα μπορούσα να παραλείψω την Διευθύντρια Ερευνών κ. Νίκη Χονδρογιάννη, μια επιστήμονα που θαυμάζω, η οποία με μεγάλη προθυμία αποτέλεσε μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, προσφέροντας πάντα απλόχερα την βοήθεια και υποστήριξή της όποτε την χρειαζόμουνα. Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στην Λειτουργική Επιστήμονα Β' βαθμίδας του Εργαστηρίου Μεταβολικής Μηχανικής και Βιοπληροφορικής κ. Όλγα Παπαδόδημα, μια φίλη που όλα αυτά τα χρόνια ήταν πάντα πρόθυμη να συζητήσουμε επιστημονικά θέματα, να βρούμε λύσεις σε προβλήματα που προέκυπταν στο εργαστήριο αλλά και να ακούσει τις ανησυχίες μου. Επίσης, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή Δρ. Ευστάθιο-Ιάσωνα Βλαχάβα, έναν φίλο που απέκτησα στο ξεκίνημα της διατριβής καθώς και εκείνος εκπονούσε την διδακτορική του διατριβή στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Ανήσυχο πνεύμα που πάντα κάποιο νέο επιστημονικό ερώτημα είχε να θέσει και έτσι να ξεκινούν πολύωρες επιστημονικές συζητήσεις που διακόπτονταν από απολαυστικές κουβέντες επί παντός επιστητού. Έναν άλλο φίλο που απέκτησα στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και νοιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω είναι ο Ειδικός Τεχνικός Επιστήμονας Γιώργος Σωτηρούδης, έναν οξυδερκή άνθρωπο με τον οποίο μοιραζόμαστε το ίδιο γραφείο τα τελευταία 2 χρόνια, έναν καλοπροαίρετο συνάδελφο με τον οποίο επικοινωνούμε πνευματικά σε πολλά θέματα, στηρίζοντας ψυχολογικά ο ένας τον άλλον στην ρουτίνα της καθημερινότητας. Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου μας, Γεωργία Κοντογιάννη και Έλενα-Φανή Γκότση για την άριστη μέχρι τώρα συνεργασία μας καθώς και τα μέλη της εταιρείας e-NIOS

Applications (e-Noesis Inspired Operational Systems) Θοδωρή Κουτσανδρέα, Μαριάνθη Λογοθέτη και τον συνιδρυτή Ελευθέριο Πιλάλη με τον οποίο έχουμε μια εξαιρετική συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια, βοηθώντας με να γνωρίσω ένα διαφορετικό κομμάτι της ερευνητικής διαδικασίας που είναι η πρακτική εφαρμογή της βιοπληροφορικής έρευνας στον τομέα της εξατομικευμένης ιατρικής παρέμβασης.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Βιοπληροφορικής κ. Παντελή Μπάγκο, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοφυσικής - Μοριακής Βιοφυσικής κ. Βασιλική Α. Οικονομίδου, τον Καθηγητή Υπολογιστικής Βιοϊατρικής κ. Ηλία Μαγκλογιάννη καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Πληροφορικής κ. Χαράλαμπο Καρανίκα που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην επταμελή εξεταστική επιτροπή. Επίσης δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ στον Καθηγητή και Διευθυντή Ερευνών Δρ. Eric Chevet στο Κέντρο για την Καταπολέμηση του Καρκίνου (Eugène Marquis) στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Ρεν (Γαλλία), και να τον ευχαριστήσω θερμά για τις εποικοδομητικές συζητήσεις μας, την αμέριστη εμπιστοσύνη που μου έδειξε να συμμετέχω ενεργά στις ερευνητικές μελέτες του εργαστηρίου του αλλά και για τα όσα διδάχτηκα από αυτόν στα τέσσερα χρόνια συνεργασίας μας. Τέλος, ένα άλλο πρόσωπο που νοιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω είναι ο Διευθυντής Ερευνών και Επικεφαλής της Μονάδας Βιοϊατρικών Εφαρμογών του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος κ. Βασίλης Ζουμπουρλής ο οποίος είναι αρωγός σε κάθε προσπάθεια εξέλιξης και προόδου νέων επιστημόνων, παροτρύνοντάς με από την αρχή να ακολουθήσω τα όνειρά μου, να μην το βάζω κάτω και να αγωνίζομαι με γνώμονα τον άνθρωπο.

Η διεκπεραίωση όμως μιας διδακτορικής διατριβής είναι μια ιδιαίτερα επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία η οποία κρύβει συνεχώς προκλήσεις, δυσκολίες και απαιτεί μεγάλη προσπάθεια με σημαντικό προσωπικό κόστος ιδιαίτερα όταν υπάρχει μια οικογένεια με μια σύζυγο και δύο παιδιά ηλικίας 8 και 12 ετών που σε έχουν μεγάλη ανάγκη και προσπαθείς να είσαι παρών όποτε σε χρειάζονται. Μια δύσκολη εξίσωση αν αναλογιστούμε ότι τα δύο τελευταία χρόνια η πανδημία δυσχαίρεινε ακόμη περισσότερο την ζωή όλων μας. Όμως ο στόχος επετεύχθη επειδή η οικογένειά μου ήταν και είναι πάντα εκεί να με στηρίζει και να μου δίνει θάρρος να συνεχίσω. Σε αυτούς εξέχουσα θέση κατέχει η σύζυγός μου Όλγα με την οποία συνδεόμαστε σε μια κοινή πορεία ζωής εδώ και 13 χρόνια, τα δύο πιο γλυκά πλασματάκια του κόσμου, οι γιοί μου Γιώργος και Αχιλλέας, Αχιλλέας και Γιώργος (που χάσανε πολύτιμο χρόνο με τον μπαμπά τους αλλά υπόσχομαι θα προσπαθήσω όσο μπορώ να τον αναπληρώσω), καθώς και οι γονείς μου Γιώργος-Ευγενία και η αδελφή μου Κυριακή Βουτετάκη.

Αφιέρωση

Στη σύζυγό μου Όλγα και τους γιούς μου Γιώργο και Αχιλλέα

Διάχυση των αποτελεσμάτων

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά

- *Lhomond, S., *T. Avril, **N. Dejeans, ****K. Voutetakis**, D. Doultinos, M. McMahon, R. Pineau, J. Obacz, O. Papadodima, F. Jouan, H. Bourien, M. Logotheti, G. Jegou, N. Pallares-Lupon, K. Schmit, P. J. Le Reste, A. Etcheverry, J. Mosser, K. Barroso, E. Vauleon, M. Maurel, A. Samali, J. B. Patterson, O. Pluquet, C. Hetz, V. Quillien, A. Chatziioannou and E. Chevet (2018). "Dual IRE1 RNase functions dictate glioblastoma development." EMBO Mol Med 10(3). [*first authors, **second authors]
- Rubio-Patino, C., J. P. Bossowski, G. M. De Donatis, L. Mondragon, E. Villa, L. E. Aira, J. Chiche, R. Mhaidly, C. Lebeauvin, S. Marchetti, **K. Voutetakis**, A. Chatziioannou, F. A. Castelli, P. Lamourette, E. Chu-Van, F. Fenaille, T. Avril, T. Passeron, J. B. Patterson, E. Verhoeyen, B. Bailly-Maitre, E. Chevet and J. E. Ricci (2018). "Low-Protein Diet Induces IRE1alpha-Dependent Anticancer Immunosurveillance." Cell Metab 27(4): 828-842 e827.
- Sauzay, C., **K. Voutetakis**, A. Chatziioannou, E. Chevet and T. Avril (2019). "CD90/Thy-1, a Cancer-Associated Cell Surface Signaling Molecule." Front Cell Dev Biol 7: 66.
- Obiedat, A., E. Seidel, M. Mahameed, O. Berhani, P. Tsukerman, **K. Voutetakis**, A. Chatziioannou, M. McMahon, T. Avril, E. Chevet, O. Mandelboim and B. Tirosh (2019). "Transcription of the NKG2D ligand MICA is suppressed by the IRE1/XBP1 pathway of the unfolded protein response through the regulation of E2F1." FASEB J 33(3): 3481-3495.
- Le Reste PJ*, Pineau R*, **Voutetakis K**, Samal J, Jégou G, Lhomond S, Gorman AM, Samali A, Patterson JB, Zeng Q, Pandit A, Aubry M, Soriano N, Etcheverry A, Chatziioannou A, Mosser J, Avril T, Chevet E. "Local intracerebral inhibition of IRE1 by MKC8866 sensitizes glioblastoma to irradiation/chemotherapy in vivo". Cancer Lett. 2020 Dec 1;494:73-83. doi: 10.1016/j.canlet.2020.08.028. Epub 2020 Sep 1. PMID: 32882336. [*equal contribution]
- J. Obacz, J. Archambeau*, **K. Voutetakis***, R. Pineau, R. Boniface, D. Sicari, E. McGrath, S. Martin, E. Vlachavas, K. Barroso , P. J. Le Reste, T. Fainsod-Levi, A. Obiedat, Z. Granot, B. Tirosh, E. Lafont, J. Samal, A. Pandit, J. Patterson, Q. Zheng, L. Négroni, A. Monnier, J. Mosser, A. Chatziioannou, V. Quillien, E. Chevet and T. Avril (2021). "Tumor myeloid infiltration is regulated by a novel proinflammatory IRE1-UBE2D3 signaling axis in human glioblastoma." [*equal contribution] **[re-submitted in EMBO Reports after review - waiting for final decision]**

- Doultinos D, McMahon M*, **Voutetakis K***, Obacz J, Pineau R, Le Reste P-J, et al. "Constitutive UPRER activation sustains tumor cell differentiation." bioRxiv. 2019 Oct 22. doi: <https://doi.org/10.1101/59463>. [pre-print research paper] [***equal contribution**]
- Mansier, O. P.-M., V.; Jégou, G.; Barroso, K.; Raymundo, D.P.; Chauveau, A.; Dumas, P.-Y.; Lagarde, V.; Turcq, B.; Pasquet, J.-M.; Viillard, J.-F.; James, C.; Praloran, V.; **Voutetakis, K.**; Chatziioannou, A.; Mahon, F.-X.; Chevet, E.; Lippert, E. (2019). "The Expression of Myeloproliferative Neoplasm-Associated Calreticulin Variants Depends on the Functionality of ER-Associated Degradation." *Cancers* 11(12):1921.
- Aktypi, F., Papaevgeniou, N., **Voutetakis, K.**, Chatziioannou, A., Grune, T., and Chondrogianni, N.. "Network analysis in aged *C. elegans* reveals candidate regulatory genes of ageing". *Biogerontology* 22, 345–367 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10522-021-09920-3>.
- Helena Dragic, Sofiane Belfeki, §, Audrey Barthelaix, Virginie Barbet, Simon Le Goupil, Manon Nivet, Christelle Machon, Jerome Guitton, Justine Rudewicz, **Konstantinos Voutetakis**, Aristotelis Chatziioannou, Paul Hofman, Carole Ferraro-Peyret, Toufic Renno and Serge N. Manié. "Distinctive Upregulation of The Hexosamine Pathway and Coat Complex II in Lung Adenocarcinoma" (2021). *Translational Oncology* (manuscript ID:TRANON-D-21-01133). [**waiting for final decision**]
- **Voutetakis K.**, Doultinos D., Vlachavas E.-I., Demetres D. Leonidas, Chevet E. & Chatziioannou A. (2021). "Computational approach decodes the sequence and structure signals of RNA transcripts for *in vitro* and *in vivo* IRE1-dependent RNA decay (RIDD) evaluation in cancer". [**under submission**]
- **Voutetakis K.**, Pilalis E., Koutsandreas T., Papadodima O. & Chatziioannou A. (2021). "TCGABioTranslator: an R shiny based graphical user interface for Cancer Translational Medicine". [**under submission**]

Προφορικές- Αναρτημένες Ανακοινώσεις

- Workshop on Computational Cell Biology – focus on proteostasis ("Targeting IRE1 in disease" - INSPIRED-RISE Programme), Antigon Urban Chic Hotel, Thessaloniki, Greece, December 2-3, 2018. "IRE1 signatures and biological meanings in brain tumors", Speakers: Tony Avril & **Konstantinos Voutetakis**. (oral)

- Workshop on Computational Cell Biology – focus on proteostasis ("Targeting IRE1 in disease" - INSPIRED-RISE Programme), Antigon Urban Chic Hotel, Thessaloniki, Greece, December 2-3, 2018. "Absolute quantitation of IRE1 signaling in RNAseq data", Speakers: Eric Chevet & **Konstantinos Voutetakis**. (oral)
- Workshop on Computational Cell Biology – focus on proteostasis ("Targeting IRE1 in disease" - INSPIRED-RISE Programme), Antigon Urban Chic Hotel, Thessaloniki, Greece, December 2-3, 2018. "IRE1 signatures and biological meanings in brain tumors", Speakers: Tony Avril & **Konstantinos Voutetakis**. (oral)
- 25th Meeting of the EAU(European Association of Urology) Section of Urological Research (ESUR18), 4-6 October, 2018, Athens, Greece, "Consolidating the system-level understanding of clinical pathologies through data integration and biomarker-aided rational interpretation", Speaker: Aristotelis Chatziioannou. (oral)
- Workshop on Computational Cell Biology – focus on proteostasis ("Targeting IRE1 in disease" - INSPIRED-RISE Programme), Antigon Urban Chic Hotel Thessaloniki, Greece, December 2-3, 2018. "IRE1-signaling centric view of cancers", Speakers: **Konstantinos Voutetakis** & Efstathios-Iason Vlachavas. (oral)
- 14th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology & Bioinformatics (HSCBB 2019), FORTH/ICE - HT, Patras, December 8th-10th 2019. "Evolutionary analysis of the proteostatic profile of different tumors upon IRE1 signature-oriented, intelligent semantic clustering". Thodoris Koutsandreas (speaker), **Konstantinos Voutetakis**, Eleftherios Pilalis, Eric Chevet and Aristotelis Chatziioannou. (oral)
- 12th Conference of the Hellenic Society for Computational Biology & Bioinformatics (HSCBB 2017), Hellenic Pasteur Institute, Athens, October 11th-13th 2017. "Investigating the role of regulated IRE1 dependent decay (RID) of miRNAs in glioblastoma multiforme through a translational bioinformatic approach". **Voutetakis Konstantinos**, Vlachavas Efstathios-Iason, Papadodima Olga, Dejeans Nicolas, Chevet Eric, and Chatziioannou Aristotelis. (poster)
- 68th Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB 2017), Eugenides Foundation, Athens, Attica, Greece, November 10-12, 2017. "Mapping the regulated IRE1- dependent decay (RID) of miRNAs in glioblastoma multiforme (GBM) through a translational bioinformatic workflow, a therapeutic perspective". **Konstantinos Voutetakis**, Olga Papadodima, Nicolas Dejeans, Eric Chevet, and Aristotelis Chatziioannou. (poster)

- 69th Panhellenic Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB 2018), Larissa, November 23-25, 2018. "Profiling of Regulated IRE1-dependent mRNA degradation (RIDD) cleavage sites by motif discovery and RNA structure prediction". **Konstantinos Voutetakis**, Efstathios-Jason Vlachavas, Dimitrios Doultinos, Eric Chevet, Aristotelis Chatziioannou. (poster)
- EMBO Workshop, "Endoplasmic reticulum function in health and disease", 21–25 October 2018, Lucca, Italy. "IRE1 signaling impedes glioblastoma cell reprogramming", Doultinos D., McMahon M., Obacz J., **Voutetakis K.**, Jouan F., Pineau R. 1,2, Samali A., Chatziioannou A., Chevet E., Avril T. (poster)
- Swedish Symposium on Prostate Cancer Research, 3-4 February 2020, Göteborg, Sweden. "Novel IRE1 Inhibitors may impact Prostate Cancer treatment resistance", D. Doultinos; C. Haughey; D. Pelizzari Raymundo; A. Carlesso; **K. Voutetakis**; E. Pilalis; T. Avril; A. Chatziioannou; L. A. Eriksson; E. Chevet; I. G. Mills. (poster)

Κατάλογος εικόνων

ΕΙΚΟΝΑ 1.1. ΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΤΟΥ UPR AND ΟΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΙ ΑΞΟΝΕΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	- 34 -
ΕΙΚΟΝΑ 1.2. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΣΘΗΤΗΡΑ IRE1Α ΚΑΙ ΜΑΤΙΣΜΑ ΤΟΥ ΧΒΡ1 ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΥ.....	- 36 -
ΕΙΚΟΝΑ 1.3. ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ ΣΕ ΣΤΡΕΣ Ε.Δ.....	- 41 -
ΕΙΚΟΝΑ 1.4. ΔΟΜΗ ΤΗΣ IRE1 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ.....	- 44 -
ΕΙΚΟΝΑ 1.5. ΜΟΝΤΕΛΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ IRE1	- 45 -
ΕΙΚΟΝΑ 1.6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΜΑΤΙΣΜΑΤΟΣ MRNA ΑΠΟ ΤΗΝ IRE1.....	- 49 -
ΕΙΚΟΝΑ 1.7. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ RIDD.....	- 54 -
ΕΙΚΟΝΑ 1.8. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΤΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΤΗΣ IRE1 RNAΣΗΣ ΣΥΝΑΡΤΗΣΕΙ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ Ε.Δ.....	- 60 -
ΕΙΚΟΝΑ 1.9. ΤΟ UPRΟΣΩΜΑ ΤΗΣ IRE1 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ.....	- 63 -
ΕΙΚΟΝΑ 1.10. ΣΤΡΕΣ Ε.Δ. ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.....	- 66 -
ΕΙΚΟΝΑ 1.11. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ UPR ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	- 71 -
ΕΙΚΟΝΑ 1.12. ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗΝ ΔΟΜΗ ΤΟΥ Ε.Δ. ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	- 84 -
ΕΙΚΟΝΑ 1.13. Ο ΚΟΜΒΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΑΝΑΥΞΗ ΚΑΙ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΟΥ GBM	- 85 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.1. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΩΝ AGILENT ΚΑΙ AFFYMETRIX ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ	- 86 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.2. ΣΩΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΗΣ IRE1Α ΣΤΟ ΠΟΛΥΜΟΡΦΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ	- 90 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.3. ΙN VITRO ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΠΟΚΟΠΗΣ ΤΟΥ RNA ΑΠΟ ΤΗΝ IRE1 ΣΕ ΣΥΖΕΥΞΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ RIDD ΣΤΟΧΩΝ.....	- 96 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.4. ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΜΑΤΟΣ AFFY HTA 2.0	- 97 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.5. ΣΤΙΓΜΙΟΤΥΠΟ ΤΗΣ ΠΛΑΤΦΟΡΜΑΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ AFFYMETRIX (TAC).....	- 98 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.6. ΤΥΠΙΚΗ ΡΟΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ RNA (RNA-SEQ).....	- 103 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.7. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ RNA ΜΕΣΩ ΤΗΣ NGS ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ ILLUMINA.....	- 104 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.8. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΡΟΕΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ (MI)RNASEQ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	- 109 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.9. ΣΤΙΓΜΙΟΤΥΠΟ ΤΟΥ ΑΡΧΕΙΟΥ ΕΞΟΔΟΥ ΤΗΣ TarBASE v.7.0 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΜΙΑ ΑΠΛΗ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΕΝΟΣ ΜΟΡΙΟΥ miRNA.....	- 118 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.10. ΣΤΙΓΜΙΟΤΥΠΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΞΑΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΠΛΑΤΦΟΡΜΑΣ BIOINFORMINER.....	- 120 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.11. ΣΤΙΓΜΙΟΤΥΠΟ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΤΥΑΚΗΣ ΠΛΑΤΦΟΡΜΑΣ CBIOPORTAL	- 122 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.12. ΕΞΟΡΥΞΗ RNA-SEQ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΟ R ΠΑΚΕΤΟ TCGABIOLINKS ΑΠΟ ΤΟ GDC DATA PORTAL	- 123 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.13. ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΙΝΑΚΩΝ LOG ₂ CPM ΓΙΑ 20 ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΟΚΟΥΣ ΤΗΣ TCGA	- 125 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.14. ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΕΥΡΩΣΤΩΝ ΣΥΝΟΛΩΝ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ RIDD ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ -	129 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.15. ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΕΥΡΩΣΤΩΝ ΣΥΝΟΛΩΝ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΧΒΡ1S-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ- ΣΤΟΧΩΝ	- 130 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.16. ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ DE ΝΟΝΟ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΑΛΛΑ ΚΑΙ ΤΟΝ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΜΟΤΙΒΩΝ 6-8 ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΣΤΙΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΕΣ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ.....	- 131 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.17. ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ DE ΝΟΝΟ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΑΛΛΑ ΚΑΙ ΤΟΝ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΜΟΤΙΒΩΝ ΣΕ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΔΟΜΙΚΑ ΜΟΤΙΒΑ 2ΤΑΓΟΥΣ RNA ΔΟΜΗΣ	- 132 -
ΕΙΚΟΝΑ 2.18. ΒΑΣΙΚΑ ΔΟΜΙΚΑ ΜΟΤΙΒΑ 2ΤΑΓΟΥΣ RNA ΔΟΜΗΣ	- 133 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.1. ΕΞΑΓΩΓΗ IRE1 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ 38 ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟ GBM.....	- 136 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.2. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ IRE1SIGN38.....	- 137 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ 1141 ΙN VITRO ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ RIDD ΣΤΟΧΩΝ	- 139 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ 9 miRIDD ΚΑΙ 11 miRΧΒΡ1S ΩΡΙΜΩΝ miRNAs ΣΤΟ GBM	- 141 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ IRE1-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΜΟΡΙΩΝ miRNA ΣΤΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ, ΟΠΟΥ ΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ ΔΕΝ ΑΚΟΛΟΥΘΕΙ ΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΜΕΤΑΒΟΛΗΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΩΡΙΜΩΝ miRNA ΤΟΥΣ.....	- 141 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΕΩΝ (NOVEL) miRNA ΜΟΡΙΩΝ ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ IRE1 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	- 143 -

ΕΙΚΟΝΑ 3.7. ΘΕΡΜΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ (HEATMAP) ΙΕΡΑΡΧΙΚΗΣ ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ (BPs) ΚΑΙ ΤΩΝ miRNA ΤΗΣ miRIDD ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ ΠΟΥ ΤΑ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ	- 145 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.8. ΘΕΡΜΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ (HEATMAP) ΙΕΡΑΡΧΙΚΗΣ ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ (BPs) ΚΑΙ ΤΩΝ miRNA ΤΗΣ miRXBP1S ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ ΠΟΥ ΤΑ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ	- 146 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.9. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ KEGG ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΑΝ ΝΑ ΥΠΕΡΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ-ΣΤΟΧΟΥΣ ΤΗΣ miRXBP1S ΚΑΙ miRIDD ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ	- 146 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.10. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ IRE1SIGN38 ΣΕ GBM ΑΣΘΕΝΕΙΣ.....	- 151 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.11. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΟΛΩΝ ΤΩΝ TCGA-GBM ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ AFFYMETRIX	- 154 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.12. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ ΑΞΟΝΩΝ ΔΡΑΣΗΣ (XBP1S ΚΑΙ RIDD) ΤΗΣ IRE1 ΣΕ GBM ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕΣΩ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ ΤΗΣ IRE1 ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ.....	- 155 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.13. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ IRE1 ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗΝ IRE1 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ	- 160 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.14. XBP1S ΚΑΙ (mi)RIDD ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΣΤΟ GBM.....	- 161 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.15. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ IRE1/XBP1S ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ GBM ΟΓΚΩΝ ΜΕ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΥΠΟΓΡΑΦΩΝ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ MM, PN ΚΑΙ T ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	- 164 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.16. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ IRE1SIGN38 ΣΤΗΝ GBM ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ RADH87	- 167 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.17. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ IRE1/XBP1S ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ GBM ΟΓΚΩΝ ΜΕ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΟΚΙΝΩΝ/ΧΗΜΕΙΟΚΙΝΩΝ ΣΤΑ MM ΚΑΙ PN ΑΝΟΣΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	- 168 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.18. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΟΥ NFκB ΜΕ ΤΗΝ IRE1 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΣΕ GBM ΟΓΚΟΥΣ	- 169 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.19. IRE1/XBP1S-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ UBE2D3 ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΕΤΑΙ ΣΤΗΝ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ NFκB.....	- 170 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.20. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ UBE2D3 ΚΑΙ Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΤΗΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΟΥ NFκB	- 172 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.21. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ UBE2D3 ΣΤΗΝ ΦΛΕΓΜΟΝΗ IN VIVO.....	- 173 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.22. ΠΡΟΦΙΛ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ IRE1SIGN38 ΣΤΟΥΣ TCGA-GBM ΟΓΚΟΥΣ (154 ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ)	- 175 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.23. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΣΗΜΕΙΑΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΑΓΩΝ ΣΤΟΝ ΑΡΙΘΜΟ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ GBM.....	- 176 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.24. ΔΙΚΤΥΟ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΗΣ ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ IRE1SIGN38 ΜΕ ΤΑ ΠΙΟ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΑ ΓΕΙΤΟΝΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΟ GBM	- 178 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.25. ΦΑΡΜΑΚΟΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ IRE1SIGN38.....	- 179 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.26. IRE1-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟ ΔΙΚΤΥΟ miRNAs ΣΕ GBM ΑΣΘΕΝΕΙΣ	- 181 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.27. Η IRE1 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ GBM ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ..	- 185 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.28. Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΟΥ XBP1S ΣΤΟΝ GBM ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ miR148A	- 187 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.29. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΗΣ GL261 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΩΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟΥ-ΑΝΑΛΟΓΟΥ ΤΗΣ U87 ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ IRE1 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΣΤΟ GBM	- 189 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.30. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΝΕΟΥ GBM ΣΥΓΓΕΝΙΚΟΥ ΠΡΟΚΛΙΝΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ IRE1 ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΣΤΙΣ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΕΣ ΑΠΟ ΤΗΝ GL261 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ, ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ IN VIVO ΘΕΡΑΠΕΙΩΝ	- 191 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.31. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ DE NOVO ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΜΟΤΙΒΩΝ ΣΕ ΥΠΟΨΗΦΙΕΣ cDNA RIDD ΑΚΟΛΟΥΘΙΕΣ	- 193 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.32. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ DE NOVO ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΜΟΤΙΒΩΝ ΣΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ RIDD1c ΚΑΙ RIDD2c ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΣΥΝΑΙΝΕΤΙΚΟΥ (CONSENSUS) ΜΟΤΙΒΟΥ.....	- 194 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.33. ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΤΟΥ 5'-CUGCAG-3' ΜΟΤΙΒΟΥ ΣΤΙΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΕΣ ΤΩΝ RIDD ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ....	- 195 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.34. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΞΑΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΜΟΤΙΒΩΝ ΣΕ ΜΟΝΟΚΛΩΝΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΩΝ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ RIDD ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ	- 197 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.35. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΜΟΤΙΒΩΝ ΣΕ ΔΟΜΕΣ ΒΡΟΧΟΥ ΦΟΥΡΚΕΤΑΣ ΚΑΙ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΒΡΟΧΟΥ ΣΤΙΣ ΑΚΟΛΟΥΘΙΕΣ ΤΩΝ RIDD ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ	- 198 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.36. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΩΝ ΜΟΤΙΒΩΝ ΠΟΥ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ RIDD ΚΑΙ XBP1S-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ mRNA ΣΤΟΧΩΝ.....	- 200 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.37. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΩΝ ΕΞΑΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΥΠΕΡ-ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΟΝΤΑΙ ΣΕ ΔΟΜΕΣ ΒΡΟΧΟΥ ΦΟΥΡΚΕΤΑΣ ΚΑΙ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΒΡΟΧΟΥ ΣΤΑ RIDD ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ	- 202 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.38. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ 2 «ΕΚΦΥΛΙΣΜΕΝΩΝ» ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ-ΟΔΗΓΩΝ ΠΟΥ ΔΙΠΛΩΝΟΥΝ ΣΕ ΔΟΜΗ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ-ΒΡΟΧΟΥ ΚΑΙ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΒΡΟΧΟΥ, ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ, ΚΑΙ ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΥΝ ΕΞΑΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΥ CUGCAG	- 203 -

ΕΙΚΟΝΑ 3.39. IN VITRO ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΠΟΚΟΠΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ IRE1 ΣΕ 6 ΥΠΟΨΗΦΙΑ RIDD PROBES ΠΟΥ ΔΙΠΛΩΝΟΥΝ ΣΕ ΔΟΜΗ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ-ΒΡΟΧΟΥ	- 205 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.40. IN VITRO ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΠΟΚΟΠΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ IRE1 ΣΕ 5 ΥΠΟΨΗΦΙΑ RIDD PROBES ΠΟΥ ΔΙΠΛΩΝΟΥΝ ΣΕ ΔΟΜΗ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΒΡΟΧΟΥ.....	- 205 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.41. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΙΣΟΜΟΡΦΩΝ ΤΩΝ RIDD ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ IRE1SIGN38 ΣΕ GBM ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΥΨΗΛΗ ΚΑΙ ΧΑΜΗΛΗ RIDD ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ	- 207 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.42. ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ IN VITRO ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΩΝ TORHITS ΣΤΑ ΥΠΟ-ΕΚΦΡΑΣΜΕΝΑ RIDD ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΤΩΝ RIDD+ GBM ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΑΥΤΩΝ ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ GBM ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΔΙΑΜΟΛΥΣΜΕΝΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΕΝΕΡΓΗ IRE1 ΙΣΟΜΟΡΦΗ Q*.....	- 208 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.43. ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΟΡΥΞΗ ΤΩΝ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ ΠΟΥ ΕΝΤΟΠΙΖΟΝΤΑΙ ΣΕ ΔΟΜΗ ΒΡΟΧΟΥ-ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΚΑΙ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΒΡΟΧΟΥ ΣΕ ΠΡΟΔΡΟΜΑ ΜΙRΝΑ ΜΟΡΙΑ	- 210 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.44. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ DE NOVO ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΜΟΤΙΒΩΝ ΣΕ ΒΡΟΧΟ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΚΑΙ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΒΡΟΧΟ ΣΕ ΠΡΟΔΡΟΜΑ ΜΙRΝΑ ΜΟΡΙΑ ΠΟΥ ΑΝΑΔΕΙΧΘΗΚΑΝ ΩΣ ΥΠΟΨΗΦΙΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ RIDD ΔΡΑΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ U87 ΜΙRΝΑΣΕQ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	- 211 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.45. Η ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΤΟΙΧΙΣΗ ΤΩΝ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ ΤΩΝ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΜΙRIDD ΣΤΟΧΩΝ, ΜΕ ΤΗΝ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΨΤΑΓΗ ΤΟΥΣ ΔΟΜΗ ΑΠΟΚΑΛΥΠΤΕΙ ΤΟΝ ΥΨΗΛΟ ΒΑΘΜΟ ΤΗΣ ΤΟΠΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΔΕΙΚΝΥΕΙ ΥΠΟΨΗΦΙΕΣ ΘΕΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΝΟΥΚΛΕΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ IRE1	- 212 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.46. ΥΠΟΨΗΦΙΕΣ ΘΕΣΕΙΣ ΤΗΣ ΜΙRIDD ΔΡΑΣΗΣ ΣΤΑ ΠΡΟΔΡΟΜΑ ΜΙRΝΑ ΜΟΡΙΑ, ΚΟΙΝΟΥΣ ΔΥΝΗΤΙΚΟΥΣ ΣΤΟΧΟΥΣ ΣΕ TNBC ΚΑΙ GBM ΚΥΤΤΑΡΑ	- 213 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.47. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΡΟΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΟΥ ΑΚΟΛΟΥΘΗΘΗΚΕ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ IRE1 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΣΕ 12 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΤΥΠΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ TCGA ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ	- 216 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.48. ΘΕΡΜΙΚΟΣ ΧΑΡΤΗΣ ΙΕΡΑΡΧΙΚΗΣ ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΤΗΣ ΚΟΟΡΤΗΣ TCGA-STAD ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ IRE1SIGN38 ΟΠΟΥ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΕΤΑΙ Η ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ, ΤΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΥΠΟΤΥΠΟΥΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ.	- 218 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.49. Η ΜΗ ΕΠΙΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΙΕΡΑΡΧΙΚΗ ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ TCGA-STAD ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΧBP1s ΚΑΙ RIDD ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΑΝΑΔΕΙΚΝΥΕΙ 3 ΚΥΡΙΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΟΠΟΥ ΟΙ ΔΥΟ ΣΥΝΙΣΤΩΣΕΣ ΑΣΚΟΥΝ ΑΝΤΙΘΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΠΟΣΟΣΤΑ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ, ΓΕΓΟΝΟΣ ΠΟΥ ΣΥΜΒΑΔΙΖΕΙ ΚΑΙ ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟ ΠΡΟΦΙΛ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ.....	- 220 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.50. Η ΜΗ ΕΠΙΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΙΕΡΑΡΧΙΚΗ ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ TCGA-LUAD ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΧBP1s/RIDD ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΑΝΑΔΕΙΚΝΥΕΙ 3 ΚΥΡΙΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΟΠΟΥ Η ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ ΑΣΚΕΙ ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΠΟΣΟΣΤΑ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ, ΓΕΓΟΝΟΣ ΠΟΥ ΑΝΤΙΚΑΤΟΠΤΡΙΖΕΤΑΙ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ, ΤΟΝ ΒΑΘΜΟ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ ΚΑΙ ΤΟΝ ΜΟΡΙΑΚΟ ΥΠΟΤΥΠΟ	- 222 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.51. Η ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ IRE1SIGN38 ΣΤΟΥΣ ΧBP1s±/RIDD± ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΕΝΟΥΣ TCGA-LUAD ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΑΝΑΔΕΙΚΝΥΕΙ ΕΚΤΟΣ ΑΠΟ ΤΟ ΜΙΚΡΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΠΟΥ ΦΕΡΟΥΝ ,ΤΗΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ-ΟΔΗΓΟΥΣ ΣΕ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ.	- 223 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.52. ΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ 4 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΤΥΠΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΟΥΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ (PRAD, BLCA, KIRC, OV) ΚΑΤΑΤΑΣΣΟΝΤΑΙ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ IRE1SIGN38 ΚΑΙ ΤΟΝ ΒΑΘΜΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΧBP1s ΚΑΙ RIDD ΣΥΝΙΣΤΩΣΑΣ, ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΣΥΝΟΔΕΥΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΥΠΟΤΥΠΟΥΣ	- 225 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.53. ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ ΧBP1s ΚΑΙ RIDD ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΚΑΤΑΤΑΣΣΟΥΝ ΤΟΥΣ ΟΓΚΟΥΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΟΥΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ (BLCA, RCC ΚΑΙ PRAD) ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ (STAGE I-IV ΚΑΙ T0-TX) ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΝ ΤΥΠΟ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	- 227 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.54. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΟΥΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ (BLCA, OV, RCC) ΕΜΦΑΝΙΖΟΥΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΠΟΣΟΣΤΑ ΟΛΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΧBP1s ΚΑΙ RIDD ΔΡΑΣΗΣ.....	- 228 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.55. ΤΟ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ Η ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ IRE1SIGN38 ΔΙΑΦΕΡΕΙ ΣΤΟΥΣ 4 ΟΥΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ (BLCA, RCCC, OV ΚΑΙ PRAD)	- 229 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.56. ΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΑΛΛΑΓΩΝ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ (CNAs) ΤΗΣ ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ IRE1SIGN38 ΚΑΤΑΤΑΣΣΕΙ 4 ΟΥΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ (BLCA, RCCC, OV ΚΑΙ PRAD) ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ	- 231 -

ΕΙΚΟΝΑ 3.57. ΘΕΡΜΙΚΟΙ ΧΑΡΤΕΣ ΙΕΡΑΡΧΙΚΗΣ ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΤΡΙΩΝ ΤΥΠΩΝ ΚΑΡΚΙΝΟΥ(CRC, SKCM ΚΑΙ GBM) ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ TCGA ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ IRE1SIGN38...	- 233 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.58. Η ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ IRE1 ΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ Τ-ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ (CRC), ΣΤΟ ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ (ΜΕΛΑΝΩΜΑ) ΚΑΙ ΣΤΟ ΠΟΛΥΜΟΡΦΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ (ΓΛΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ).....	- 235 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.59. ΠΡΟΦΙΛ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΤΗΣ CD90 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.....	- 237 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.60. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CD90 ΜΕ ΤΗΝ IRE1 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΑΓΚΡΕΑΤΟΣ	- 239 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.61. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CD90 ΜΕ ΤΗΝ IRE1 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ.....	- 240 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.62. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ CD90 ΜΕ ΤΗΝ IRE1 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΝΕΦΡΟΥ.....	- 241 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.63. Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ MIR-520 ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΕΙ ΔΡΑΜΑΤΙΚΑ ΧΑΜΗΛΟΤΕΡΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΤΑ U87 ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΗΝ IRE1-DN ΠΑΡΑΛΛΑΓΗ (U87-DN) ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ IRE1 (U87-WT).....	- 243 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.64. ΣΧΕΤΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ MIR-520Α-Η (ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΚΑΙ ΩΡΙΜΩΝ) ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΚΟΗΘΕΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑ (TCGA-SKCM).....	- 244 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.65. Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ E2F1 ΚΑΙ MICA ΣΥΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΜΕ ΕΚΕΙΝΗ ΤΟΥ ΧBP1S ΣΕ ΟΓΚΟΥΣ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ	- 244 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.66. ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ miR-520 ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΠΑΡΕΧΟΥΝ ΤΟΝ ΣΥΝΔΕΣΜΟ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΝ ΧBP1S ΚΑΙ MICA	- 246 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.67. ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ miR-520 ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΠΑΡΕΧΟΥΝ ΤΟΝ ΣΥΝΔΕΣΜΟ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΝ ΧBP1S ΚΑΙ E2F1	- 247 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.68. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ 11 ΚΟΙΝΩΝ miRNA ΜΟΡΙΩΝ (6 ΧBP1S-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΑ ΚΑΙ 5 miRIDD) ΤΩΝ ΟΠΩΙΩΝ Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΡΥΘΜΙΖΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ IRE1 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ GBM ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ U87 ΚΑΙ ΤΗΝ TNBC ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ MDA-MB-231	- 249 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.69. ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΟ ΑΠΟ ΤΗΝ IRE1 ΔΙΚΤΥΟ miRNAs-mRNAs ΣΕ GBM ΚΑΙ TNBC ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	- 252 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.70. KEGG ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΟΝΤΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΑΠΟ ΤΑ 11 ΚΟΙΝΑ miRNAs ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΑΝ ΝΑ ΕΛΕΓΧΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ IRE1 ΣΕ GBM ΚΑΙ TNBC ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	- 254 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.71. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΤΗΣ GO (GENE ONTOLOGY) ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΟΝΤΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΑΠΟ ΤΑ 11 ΚΟΙΝΑ miRNAs ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΑΝ ΝΑ ΕΛΕΓΧΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ IRE1 ΣΕ GBM ΚΑΙ TNBC ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΥ «DIANA-miRPATH».....	- 256 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.72. ΚΟΜΒΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΜΕ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗΝ ΕΠΙΘΕΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ GBM ΚΑΙ TNBC ΟΓΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟ ΔΙΚΤΥΟ ΤΩΝ 11 IRE1-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ miRNAs.....	- 257 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.73. ΣΤΙΓΜΙΟΤΥΠΟ ΤΗΣ ΣΕΛΙΔΑΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΣΤΗΝ R SHINY GUI ΕΦΑΡΜΟΓΗ TCGABIOTRANSLATOR	- 258 -
ΕΙΚΟΝΑ 3.74. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΩΝ ΤΟΥ ΕΡΓΑΛΕΙΟΥ TCGABIOTRANSLATOR.....	- 260 -

Κατάλογος πινάκων

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ U87 ΚΛΩΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ 2.3.1.1....	- 91 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ 2.3.1.2.	- 94 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ RNA-SEQ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ, RNS ΚΑΙ RADH, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ.	- 106 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 4. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΣΑΝ ΣΤΑ U87 miRNA-SEQ ΔΕΔΟΜΕΝΑ..	- 108 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 5. ΓΟΝΙΔΙΑ-ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ miRIDD ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΣΤΑ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗΝ miRIDD ΥΠΟΓΡΑΦΗ KEGG ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ	- 148 -

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ IRE1SIGN38 ΓΟΝΙΔΙΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ ΤΗΣ MIRIDD ΚΑΙ MIRXBP1S ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ	- 149 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 7. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ IRE1/XBP1S ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ GBM ΟΓΚΩΝ ΜΕ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΥΠΟΓΡΑΦΩΝ (C7) ΤΗΣ MSIGDB.....	- 166 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 8. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ MIRNA ΜΟΡΙΩΝ ΤΗΣ MIRBASE (RELEASE 22.1) ΠΟΥ ΦΕΡΟΥΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΑ ΜΟΤΙΒΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΥ 5'-CUGCAG-3' ΣΕ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΒΡΟΧΟ Η/ΚΑΙ ΒΡΟΧΟ-ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ	- 215 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 9. ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ XBP1S ΚΑΙ RIDD ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΤΑ ΠΟΣΟΣΤΑ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΓΙΑ 12 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ TCGA ..	- 232 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 10. ΛΙΣΤΑ ΥΠΟ- ΚΑΙ ΥΠΕΡ-ΕΚΦΡΑΣΜΕΝΩΝ IRE1-ΕΞΑΡΤΟΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΙΝΑΙ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΑ ΚΑΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΜΕΝΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΩΝ 11 ΚΟΙΝΩΝ MIRNAS ΠΟΥ ΒΡΕΘΗΚΑΝ ΣΕ U87 ΚΑΙ MDA-MB-231 ΚΥΤΤΑΡΑ. ΔΕΝ ΒΡΕΘΗΚΑΝ ΚΟΙΝΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΓΙΑ ΤΟ HSA-MIR-92B-5P ΚΑΙ HSA-MIR-345-5P	- 251 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 11. Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΗΣ IRE1 ΣΕ GBM ΚΑΙ TNBC ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΑΝΑΔΕΙΚΝΥΕΙ ΤΗΝ ΥΠΕΡΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ ΤΗΣ GO (GENE ONTOLOGY) ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΔΙΗΘΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΛΑΤΦΟΡΜΑΣ «BIOINFORMINER»	- 253 -
ΠΙΝΑΚΑΣ 12. Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΕΚΦΡΑΖΟΝΤΑΝ ΕΞΑΙΤΙΑΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ IRE1 ΣΕ GBM ΚΑΙ TNBC ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΑΝΑΔΕΙΚΝΥΕΙ ΤΗΝ ΥΠΕΡΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ ΤΗΣ GO (GENE ONTOLOGY) ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΔΙΗΘΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΛΑΤΦΟΡΜΑΣ «BIOINFORMINER»	- 254 -

Κατάλογος συντομογραφιών

E.Δ.: Ενδοπλασματικό Δίκτυο	IRE1: Inositol-Requiring Enzyme 1
RIDD: Regulated IRE1-dependent decay	XBP1s: spliced (X-Box Binding Protein 1)
miRIDD: RIDD of miRNAs	miRXBP1s: XBP1s-regulated miRNAs
XBP1u: unspliced (X-Box Binding Protein 1)	UPR: Unfolded Protein Response
TN/tn/tun: τουνικαμυκίνη	GBM: Glioblastoma Multiforme
EV: Empty Vector	WT: Wild Type
DN/dn: Dominant Negative	F.C.: Fold Change
Limma: linear models for microarray data	PSR: Probe Selection Region
RNS: Retinal Neurospheres	RADH: Retinal Adherent Neurospheres
CPM: Counts Per Million	LRT: Likelihood Ratio Test
PCA: Principal Component Analysis	miRs: miRNAs/microRNAs
BIM: BioInfoMiner	GO: Gene Ontology
HPO: Human Phenotype Ontology	MGI: Mouse Genome Informatics
GSCs: Glioblastoma Stem Cells	CSCs: Cancer Stem Cells
MSigDB: Molecular Signatures Database	MEME: Multiple Expectation maximizations for Motif Elicitation
FIMO: Find Individual Motif Occurrences	MEMERIS: Multiple Em for Motif Elicitation in Rna's Including Secondary Structures
HL: Hairpin Loop	DREME: Discriminative Regular Expression Motif Elicitation
IL: Internal Loop	NES: Normalized Enrichment Score or Nestin
CNAs: Copy Number Alterations	AMP/amp: Amplification
DEL/del: Deletion	RBPs: RNA-binding Proteins
GUI: Graphical User Interface	GSEXA: Gene Signature Expression Analysis
CPLHAR: Cross-platform Harmonization	FGSEA: Fast preranked Gene Set Enrichment Analysis
Δ.B.K: Διαφοροποίηση Βλαστικών Κυττάρων	ROAST: Rotation Gene Set Testing
BK: βλαστοκυτταρικότητα	COAD: Colon Adenocarcinoma
GEO: Gene Expression Omnibus	TAC: Transcriptome Analysis Console

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TNBC: Triple-Negative Breast Cancer

CRC: Colorectal Cancer

STAD: Stomach Adenocarcinoma

KIRC/RCC: Kidney Renal Clear Cell Carcinoma

PRAD: Prostate Adenocarcinoma

NGS: Next-Generation Sequencing

GDC: Genomic Data Commons

GSEA: Gene Set Enrichment Analysis

SKCM: Skin Cutaneous Melanoma

BRCA: Breast Cancer

LUAD: Lung Adenocarcinoma

OV: Ovarian Cancer

PAAD: Pancreatic Adenocarcinoma

MREs: miRNA Recognition Elements

Βασικοί Ερευνητικοί Στόχοι

Ο κύριος σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση του διττού ρόλου της IRE1α (ή IRE1 για λόγους απλούστευσης) πρωτεΐνης στον καρκίνο και κυρίως στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα μέσα από την συστηματική μελέτη των κύριων σηματοδοτικών της αξόνων, IRE1-XBP1s και IRE1-RIDD. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού επιχειρήθηκε η εφαρμογή και η ανάπτυξη μιας σειράς διαφορετικών ρών Βιοπληροφορικής ανάλυσης με την ενσωμάτωση ποικιλίας μεθόδων και εργαλείων της Υπολογιστικής Βιολογίας, που στόχο είχαν:

- Την εξαγωγή γονιδιακής υπογραφής που να χαρακτηρίζει την σηματοδοτική δράση της IRE1 πρωτεΐνης στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, και η οποία να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως βιοδείκτης για την κατάταξη των ασθενών σε μοριακούς υπότυπους με ξεχωριστά κλινικά χαρακτηριστικά.
- Την αξιολόγηση της IRE1 γονιδιακής υπογραφής και σε άλλους τύπους καρκίνου με σκοπό την γενικότερη εκτίμηση του βαθμού της διακριτικής της ικανότητας στον διαχωρισμό των ασθενών σε συγκεκριμένα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης, ώστε να αναζητηθούν περαιτέρω συσχετίσεις που αφορούν σε συγκεκριμένα κλινικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Αυτό θα βοηθούσε στον καλύτερο κλινικό χαρακτηρισμό των ασθενών και θα συνέβαλε αποφασιστικά στον σχεδιασμό νέων αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων στο πλαίσιο της εξατομικευμένης ιατρικής παρέμβασης.
- Την ταυτοποίηση μεταγράφων mRNAs και miRNAs που να αποτελούν δυνητικούς RIDD στόχους.
- Τον προσδιορισμό νουκλεοτιδικών ή/και δομικών μοτίβων δευτεροταγούς RNA δομής στα υποψήφια RIDD μετάγραφα-στόχους και ποσοτική αποτίμηση των μοτίβων αυτών στο μεταγράψωμα ασθενών με καρκίνο.
- Την αξιολόγηση των επιδράσεων σημειακών μεταλλάξεων της IRE1 πρωτεΐνης, σε ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, σε σχέση με την σηματοδοτική δράση του IRE1-XBP1s και IRE1-RIDD άξονα.

- Την ταυτοποίηση του δικτύου των miRNAs που ρυθμίζουν την έκφραση κομβικών γονιδίων και λειτουργιών του σηματοδοτικού άξονα IRE1-XBP1s και IRE1-RIDD ώστε να σχηματιστεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για το κύκλωμα σηματοδότησης της IRE1 πρωτεΐνης όχι μόνο στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα αλλά και σε άλλους επιθετικούς τύπους καρκίνου.
- Την ανάπτυξη μιας φιλικής προς τον χρήστη υπολογιστικής πλατφόρμας ανάλυσης καρκινικών μοριακών και κλινικών δεδομένων μεγάλης κλίμακας κυρίως του TCGA προγράμματος με άμεση εφαρμογή στην καθημερινή κλινική πράξη στο πλαίσιο της εξατομικευμένης ιατρικής παρέμβασης.

Περιεχόμενα

Περίληψη	5 -
Λέξεις-Κλειδιά	6 -
Abstract	7 -
Πρόλογος	9 -
Ευχαριστίες	10 -
Αφιέρωση	12 -
Διάχυση των αποτελεσμάτων	13 -
Κατάλογος εικόνων	17 -
Κατάλογος πινάκων	20 -
Κατάλογος συντομογραφιών	22 -
Βασικοί Ερευνητικοί Στόχοι	24 -
1 Εισαγωγή	31 -
1.1 Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου (Ε.Δ.) και ο Αισθητήρας IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme 1)	31 -
1.1.1 Το Στρες Ε.Δ. και ο Μηχανισμός Απόκρισης στις Μη-διπλωμένες Πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response – UPR).....	33 -
1.1.2 Η Ενζυμική Πρωτεΐνη IRE1 και ο Πολυδιάστατος Μοριακός Μηχανισμός Δράσης της	42 -
1.1.2.1 Η Δομή της IRE1 Πρωτεΐνης και Μοντέλα Ενεργοποίησης.....	43 -
1.1.2.2 Το Μη Συμβατικό Μάτισμα του Μεταγραφικού Παράγοντα XBP1 (X-box Binding Protein 1).....	48 -
1.1.2.3 Η Ρυθμιζόμενη από την IRE1 Νουκλεολυτική Αποικοδόμηση Μεταγράφων (RIDD δράση - Regulated IRE1-Dependent Decay)	52 -
1.1.2.4 Ο Διττός Λειτουργικός Ρόλος της Σηματοδοτικής Δράσης της IRE1 Πρωτεΐνης στον Καθορισμό του Κυτταρικού Πεπρωμένου.....	56 -
1.1.2.4.1 Η RIDD Ενεργότητα Αυξάνει σε Συνθήκες Στρες Ε.Δ. και Επάγει τον Κυτταρικό Θάνατο.....	56 -
1.1.2.4.2 Η Ήπια RIDD Δράση είναι Απαραίτητη για την Ομοίωση του Ε.Δ.....	57 -
1.1.2.4.3 Ο XBP1 Μεταγραφικός Παράγοντας ως «Καθοριστής» του Κυτταρικού Πεπρωμένου.....	61 -
1.1.2.4.4 Το UPRόσωμα ως Ρυθμιστικός Παράγοντας της IRE1 Σηματοδοτικής Δράσης	62 -
1.2 Ο Ρόλος του UPR Μηχανισμού και Ιδιαίτερα της IRE1 στην Καρκινογένεση	66 -
1.2.1 Ο Ρόλος της IRE1 Σηματοδότησης στην Ογκογένεση, την Ανάπτυξη και την Εξέλιξη του Καρκίνου	69 -

1.2.1.1	Συμμετοχή της IRE1 Σηματοδότησης στον Κυτταρικό Μετασχηματισμό-	70 -
1.2.1.2	Συμμετοχή της IRE1 Σηματοδότησης στην Ρύθμιση της Αύξησης του Όγκου	- 73 -
1.2.1.3	Συμμετοχή της IRE1 Σηματοδότησης στην Ρύθμιση του Μεταβολισμού του Όγκου – Επιβίωση σε Περιβάλλον Υποξίας και Έλλειψης Θρεπτικών Συστατικών	- 74 -
1.2.1.4	Συμμετοχή της IRE1 Σηματοδότησης στην Ρύθμιση της Φλεγμονώδους Αντίδρασης και Ανοσοαπόκρισης στην Περιοχή του Όγκου.	- 75 -
1.2.1.5	Συμμετοχή της IRE1 Σηματοδότησης στην Καρκινική Αγγειογένεση.....	- 76 -
1.2.1.6	Συμμετοχή της IRE1 Σηματοδότησης στην Κυτταρική Διήθηση και Μετάσταση.....	- 77 -
1.2.1.7	Συμμετοχή της IRE1 Σηματοδότησης στην Αντίσταση σε Χημειοθεραπείες..	- 79 -
1.3	Το Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα (GBM) ως Πρότυπο Καρκινικό Μοντέλο στην Μελέτη του Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου και του Μηχανισμού Δράσης της IRE1 Πρωτεΐνης στον Καρκίνο	- 82 -
2	Υλικά και Μέθοδοι	- 86 -
2.2	Πειραματικό Βιολογικό Υλικό.....	- 88 -
2.3	Πειράματα Μεγάλης Κλίμακας και Υπολογιστικές Μέθοδοι Ανάλυσης	- 89 -
2.3.1	Μικροσυστοιχίες Μεταγραφώματος (Affymetrix και Agilent)	- 89 -
2.3.1.1	Μικροσυστοιχία HT_HG-U133_Plus_PM (Affymetrix) – Υπολογιστική Ροή Εργασίας για την Επεξεργασία και Ανάλυση Μεταγραφικών Δεδομένων των Μεταλλαγμένων για την IRE1 Κλώνων της Κυτταρικής Σειράς U87	- 89 -
2.3.1.2	Μικροσυστοιχία HG-U133A_2.0 (Affymetrix) – Ανάλυση Μεταγραφικών Δεδομένων της Κυτταρικής Σειράς U87 κάτω από Διάφορες Συνθήκες Στρες Ε.Δ. -	94 -
2.3.1.3	Μικροσυστοιχία Human Transcriptome Array (HTA) 2.0 (Affymetrix) – Ανάλυση Μεταγραφικών Δεδομένων της Κυτταρικής Σειράς U87 για τον Εντοπισμό και την Ταυτοποίηση in vitro RIDD μεταγράφων-στόχων	- 95 -
2.3.1.3.1	Υπολογιστική Ανάλυση Εναλλακτικού Ματίσματος Μεταγραφικών Δεδομένων με την πλατφόρμα <i>Affymetrix Transcriptome Analysis Console</i>	- 96 -
2.3.1.4	Μικροσυστοιχία Human Gene 2.0 ST Array [transcript (gene) version] (Affymetrix) – Ανάλυση Μεταγραφικών Δεδομένων για την Ταυτοποίηση IRE1- Εξαρτώμενων Γονιδίων στην Κυτταρική Σειρά του Τριπλά Αρνητικού Καρκίνου του Μαστού (TNBC), MDA-MB-231	- 99 -
2.3.1.5	Μικροσυστοιχία SurePrint G3 Human GE v2 8x60k (Agilent) – Ανάλυση Μεταγραφικών δεδομένων για τον Χαρακτηρισμό Ασθενών της in-house Κοόρτης GBMmark με βάση την IRE1 Σηματοδοτική Δραστικότητα	- 100 -
2.3.1.6	Μικροσυστοιχία Whole Human Genome 4 x 44 K Microarray Kit (Agilent) – Ανάλυση Μεταγραφικών Δεδομένων για την Αξιολόγηση της IRE1 Σηματοδοτικής Δραστικότητας σε Νευροσφαίρες (RNS) Προερχόμενες από Όγκους Ασθενών με Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα.....	- 101 -
2.3.2	Αλληλούχιση RNA-Seq – <i>Τεχνολογία NGS της Illumina</i>	- 103 -

2.3.2.1	Συνοπτική Περιγραφή των Πειραμάτων Αλληλούχισης (mi)RNA-Seq..	- 105 -
2.3.2.2	Υπολογιστικές Ροές Εργασίας για την Επεξεργασία και Ανάλυση (mi)RNAseq Δεδομένων	- 108 -
2.3.3	Συστημική Πολυεπίπεδη Λειτουργική Ανάλυση των Μεταγραφικών Δεδομένων Μέσω της Πλατφόρμας <i>BioInfoMiner</i>	- 119 -
2.3.4	Ανάκτηση, Επεξεργασία και Ανάλυση Μεταγραφικών και Κλινικών Δεδομένων της Βάσης TCGA (The Genome Cancer Atlas).....	- 121 -
2.3.4.1	Κατασκευή Αμερόληπτου Συστήματος Βαθμολόγησης Ασθενών με Βάση την Σηματοδοτική Δραστικότητα της IRE1 Πρωτεΐνης	- 125 -
2.3.5	Ανάλυση Εμπλουτισμού Συνόλου Γονιδίων (Gene Set Enrichment Analysis) για την Αξιολόγηση των Γονιδιακών Υπογραφών.....	- 127 -
2.3.6	Αναζήτηση Νουκλεοτιδικών και Δομικών Μοτίβων Ζταγούς RNA Δομής σε Υποψήφια Μετάγραφα-Στόχους της RIDD Δράσης	- 128 -
3	Αποτελέσματα	- 134 -
3.1	Αξιολόγηση της Δράσης της IRE1 Πρωτεΐνης στο Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα (GBM)	- 134 -
3.1.1	Εξαγωγή Γονιδιακής Υπογραφής 38 Γονιδίων (IRE1sign38) για την Αποτίμηση του Βαθμού Λειτουργικής Ενεργότητας της IRE1 Πρωτεΐνης.....	- 134 -
3.1.2	Λειτουργικός Χαρακτηρισμός της Γονιδιακής Υπογραφής (IRE1sign38) ..	- 136 -
3.1.3	Ταυτοποίηση 1141 <i>in vitro</i> Μεταγραφικών Συνόλων ως Υποψήφιοι Στόχοι της RIDD Δράσης.....	- 137 -
3.1.4	Ταυτοποίηση Εξαρτώμενων από την Δράση της IRE1 miRNA Μορίων σε U87 Κύτταρα	- 139 -
3.1.5	Λειτουργικός Χαρακτηρισμός των miRIDD και XBP1s- εξαρτώμενων miRNA (miRXBP1s) Μορίων	- 143 -
3.1.6	Αξιολόγηση της Γονιδιακής Υπογραφής (IRE1sign38) σε Ασθενείς με GBM	- 149 -
3.1.7	Αύξηση της Διακριτικής Ικανότητας και Ευαισθησίας της IRE1 Γονιδιακής Υπογραφής μέσω του Χαρακτηρισμού των GBM Ασθενών με Βάση το Σύστημα Βαθμολόγησης της Ενότητας 2.3.4.1 για την Αποτίμηση του Βαθμού Ενεργότητας της XBP1s και RIDD Δραστικότητας.....	- 152 -
3.1.8	Αξιολόγηση της IRE1 Σηματοδοτικής Δραστικότητας σε Βασικούς Τύπους Μεταλλάξεων της IRE1 στο GBM	- 156 -
3.1.9	Ο Ρόλος ενός Νέου Προ-Φλεγμονώδη IRE1-UBE2D3 Σηματοδοτικού Άξονα στην Διήθηση του GBM Όγκου	- 163 -
3.1.10	Προφίλ Μεταλλάξεων της Γονιδιακής Υπογραφής (IRE1sign38) σε GBM Ασθενείς	- 174 -
3.1.11	Δίκτυο Αλληλεπιδράσεων της Γονιδιακής Υπογραφής (IRE1sign38) με Μεταλλαγμένα Γονίδια-Οδηγούς και Φαρμακογονιδιωματική Ανάλυση σε GBM Ασθενείς	- 177 -

3.1.12	Ταυτοποίηση ενός Εξαρτώμενου από την Δράση της IRE1 miRNA Δικτύου σε GBM Ασθενείς	- 180 -
3.1.13	Ανάδειξη του Ρόλου της IRE1 Πρωτεΐνης στον Επαναπρογραμματισμό των Διαφοροποιημένων Καρκινικών Κυττάρων σε Βλαστικά Κύτταρα	- 182 -
3.1.14	Πιστοποίηση της Κυτταρικής Σειράς GBM του Ποντικού GL261 ως Ανάλογου Μοντέλου του GBM στον Άνθρωπο για <i>in vivo</i> Μελέτες.....	- 188 -
3.1.15	Η Συνδυασμένη Θεραπεία του STUPP Πρωτοκόλλου μαζί με τον Αναστολέα της IRE1 Πρωτεΐνης MKC8866 Ενισχύει τον Περιορισμό του Καρκινικού Όγκου	- 190 -
3.2	Αποκρυπτογράφηση των Νουκλεοτιδικών/Δομικών Μοτίβων Αναγνώρισης για IRE1 Αποκοπή σε Υποψήφιους (mi)RIDD Στόχους	- 192 -
3.2.1	Προσδιορισμός <i>de novo</i> Νουκλεοτιδικών Μοτίβων στους Υποψήφιους RIDD Στόχους	- 192 -
3.2.2	Εντοπισμός Νουκλεοτιδικών Παραλλαγών του Εξανουκλεοτιδίου 5'-[CUGCAG]-3' στους Υποψήφιους RIDD Στόχους.....	- 195 -
3.2.3	Ταυτοποίηση των Δομικών Μοτίβων 2ταγούς RNA Δομής που Εντοπίζονται τα Νουκλεοτιδικά Μοτίβα Αναγνώρισης για Αποκοπή από την IRE1 Πρωτεΐνη	- 196 -
3.2.4	<i>In silico</i> Κατασκευή Πρότυπων Ακολουθιών (probes) που Διπλώνουν σε Δομή Στελέχους-Βρόχου ή Εσωτερικού Βρόχου για <i>in vitro</i> Έλεγχο της Αποκοπής τους από την IRE1 Πρωτεΐνη	- 201 -
3.2.5	<i>In vitro</i> IRE1 Αποκοπή 5 Πρότυπων Ακολουθιών (probes) με Δομή Στελέχους-Βρόχου και 1 Πρότυπη Ακολουθία με δομή Εσωτερικού Βρόχου.....	- 204 -
3.2.6	Υπεραντιπροσώπευση των <i>in vitro</i> Επιβεβαιωμένων probes σε RIDD Μεταγραφικές Ισομορφές που είναι Υποεκφρασμένες σε GBM Ασθενείς με Αυξημένη RIDD Ενεργότητα	- 206 -
3.2.7	Προσδιορισμός <i>de novo</i> Νουκλεοτιδικών Μοτίβων σε Υποψήφια Πρόδρομα miRNA Μόρια, Δυνητικούς Στόχους της RIDD Δράσης σε GBM Κύτταρα	- 209 -
3.2.8	Εντοπισμός <i>de novo</i> Νουκλεοτιδικών Μοτίβων και Αναλόγων του Εξανουκλεοτιδίου 5'-[CUGCAG]-3' σε Πρόδρομα miRNA Μόρια, Κοινούς Δυνητικούς Στόχους της RIDD Δράσης σε MDA-MB-231 και U87 Κύτταρα	- 211 -
3.2.9	Ταυτοποίηση Πρόδρομων miRNA Μορίων της miRBase που Φέρουν Νουκλεοτιδικά Μοτίβα Ανάλογα του 5'-CUGCAG-3' σε Εσωτερικό βρόχο ή/και Βρόχο-Στελέχους.....	- 214 -
3.3	Αξιολόγηση της IRE1 Σηματοδοτικής Δραστικότητας σε 12 Διαφορετικούς Τύπους Καρκίνου του Προγράμματος TCGA.....	- 215 -
3.3.1	Τα Παραδείγματα του STAD και LUAD.....	- 217 -
3.3.2	Συγκριτική Μελέτη Τεσσάρων Ουρογεννητικών Τύπων Καρκίνου του Προγράμματος TCGA με Βάση την Αξιολόγηση της IRE1 Σηματοδοτικής Δραστικότητας.	- 224 -
3.3.3	Διαφορετικά Ποσοστά Επιβίωσης σε Ασθενείς με Πρωτοπαθείς Όγκους του Προγράμματος TCGA όταν Παρουσιάζουν Διαφορετική XBP1s ή/και RIDD Σηματοδοτική Ενεργότητα	- 231 -

3.3.4	Η Αυξημένη Σηματοδοτική Δράση της IRE1 Πρωτεΐνης Σχετίζεται με Αυξημένη Ανοσοαπόκριση στην Περίπτωση Ασθενών με α) Αδενοκαρκίνωμα του Παχέος Εντέρου Σταδίου Ι (CRC-I), β) Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα (GBM) και γ) Κακοήθες Μελάνωμα (SKCM)	- 232 -
3.3.5	Συσχέτιση της IRE1 Σηματοδοτικής Δραστικότητας με το Προφίλ Έκφρασης της Πρωτεΐνης CD90/Thy-1 σε Διάφορους Τύπους Καρκίνου	- 236 -
3.3.6	IRE1/ΧBP1s-εξαρτώμενη Ρύθμιση της Κυτταροτοξικότητας των NK Κυττάρων στο Πρωτογενές Μελάνωμα μέσω Ρύθμισης των Επιπέδων Έκφρασης του NKG2D-Συνδέτη MICA και του Μεταγραφικού Παράγοντα E2F1 με την Μεσολάβση της Οικογένειας των miR-520.....	- 242 -
3.3.7	Κοινό IRE1-εξαρτώμενο Δίκτυο miRNA-mRNA στο Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα και τον Τριπλά Αρνητικό Καρκίνο του Μαστού με Κυρίαρχο Ρόλο στην Κυτταρική Διηθητικότητα και Μεταστατικότητα του Όγκου	- 248 -
3.4	Ανάπτυξη μιας Φιλικής προς τον Χρήστη R Shiny Πλατφόρμας για την Αναζήτηση, Ανάκτηση και Ανάλυση NGS Δεδομένων κυρίως του TCGA Προγράμματος	- 258 -
4	Συζήτηση.....	- 262 -
5	Συμπεράσματα Μελέτης – Μελλοντικοί Στόχοι.....	- 278 -
6	Βιβλιογραφία.....	- 281 -

1 Εισαγωγή

1.1 Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου (Ε.Δ.) και ο Αισθητήρας IRE1 (Inositol- Requiring Enzyme 1)

Το Ενδοπλασματικό Δίκτυο (Ε.Δ.) είναι ένα πολυδαίδαλο σύνολο αγωγών και κύστεων το οποίο διασχίζει το κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων και είναι υπεύθυνο για την σύνθεση, το δίπλωμα και την επεξεργασία ενός μεγάλου ποσοστού (> 1/3) των κυτταρικών πρωτεϊνών. Οι περισσότερες πρωτεΐνες που προορίζονται για το Ε.Δ., την πλασματική μεμβράνη, το σύμπλεγμα Golgi και τα λυσοσώματα συντίθενται στα ριβοσώματα που είναι συνδεδεμένα στη μεμβράνη του Ε.Δ ενώ τα νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια εισέρχονται για ωρίμανση στο εσωτερικό του Ε.Δ, τον αποκαλούμενο αυλό. Ομοίως, οι περισσότερες πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το κύτταρο ξεκινούν το ταξίδι τους από το Ε.Δ. Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για το Ε.Δ. έχουν στην αμινοξική τους ακολουθία ένα πεπτίδιο οδηγητή που τις κατευθύνει στην μεμβράνη του Ε.Δ. ενώ παραμένουν ακόμη προσδεδεμένες στο ριβόσωμα. Το πεπτίδιο οδηγητής αποκόπτεται από μια πρωτεάση, τυπικά πριν ολοκληρωθεί η μετάφραση του πολυπεπτιδίου. Καθώς οι πρωτεΐνες εισέρχονται στον αυλό του Ε.Δ. διπλώνουν στην τελική τρισδιάστατη δομή τους ενώ ταυτόχρονα υφίστανται διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως είναι η Ν-γλυκοζυλίωση και ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών. Αυτές οι διαδικασίες καταλύονται από ένα μηχανισμό πρωτεϊνικής αναδίπλωσης και τροποποίησης στο Ε.Δ. που συγκροτείται από ένα δίκτυο μοριακών συνοδών (τσαπερόνες), ένζυμα γλυκοζυλίωσης, και οξειδοαναγωγάσες [1]. Το ιοντικό και ηλεκτρονιακό περιβάλλον του Ε.Δ. είναι κατάλληλο για την διεξαγωγή της διαδικασίας του διπλώματος των πρωτεϊνών. Συγκριτικά με το κυτοσόλιο, το Ε.Δ. διατηρεί μια σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση ασβεστίου και ένα περισσότερο οξειδωτικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό [2]. Τα κύτταρα καταναλώνουν τεράστια ποσά ενέργειας για να διατηρούν το μοναδικό περιβάλλον και τις λειτουργίες του Ε.Δ. Οι μοριακοί συνοδοί συνδέονται και βοηθούν στο δίπλωμα των εκκριτικών πρωτεϊνών εμποδίζοντας την συσσωμάτωση των νεοεισερχομένων πρωτεϊνών κατά την διάρκεια της δομικής τους ωρίμανσης. Σε πολλές περιπτώσεις το δίπλωμα και η δομική τους ωρίμανση συνοδεύεται και από την ομοιοπολική προσθήκη και αποκοπή σακχάρων. Συνολικά, αυτές οι ενζυμικές διεργασίες εξασφαλίζουν την κατάλληλη πρωτεϊνική αναδίπλωση, τροποποίηση και συγκρότησή τους σε πολύ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα στο εσωτερικό του Ε.Δ. πριν κατευθυνθούν σε μεταγενέστερα στάδια του εκκριτικού μονοπατιού των πρωτεϊνών.

Παρόλη την λειτουργία όλων αυτών των μηχανισμών που συμμετέχουν ή/και συμβάλλουν στο πρωτεϊνικό δίπλωμα, το ποσοστό επιτυχίας για ορθή αναδίπλωση είναι συχνά αρκετά χαμηλό για πολλές εκκριτικές πρωτεΐνες. Όσες δεν κατορθώσουν να διπλώσουν πλήρως αναγνωρίζονται από το κύτταρο και απομακρύνονται από συστήματα αυστηρού ποιοτικού ελέγχου. Μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται Αποικοδόμηση Συνδεδεμένη με το Ε.Δ. (ERAD-ER-associated degradation), οι μη-διπλωμένες πρωτεΐνες επιστρέφουν στο κυτοσόλιο για ουμπικιτινυλίωση και αποικοδόμηση από το 26S πρωτεάσωμα [3]. Η ικανότητα αναδίπλωσης των πρωτεϊνών εντός του Ε.Δ. ποικίλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Κύτταρα που προορίζονται να εκκρίνουν μεγάλα πρωτεϊνικά φορτία διαθέτουν και ένα μεγάλο και καλά αναπτυγμένο Ε.Δ. Για παράδειγμα, κάθε β κύτταρο της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος είναι ικανό να συνθέτει και να εκκρίνει πάνω από ένα εκατομμύριο μόρια ινσουλίνης το λεπτό, ενώ σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη, αυτό το ήδη τεράστιο πρωτεϊνικό φορτίο γίνεται ακόμη μεγαλύτερο. Επιπλέον, τα πλασματοκύτταρα μπορούν να εκκρίνουν το δικό τους ποσοστό σε αντισώματα κάθε μέρα.

Παρά την ευρωστία του Ε.Δ., τα κύτταρα συχνά λειτουργούν κοντά στα όρια της εκκριτικής τους δυνατότητας. Ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διαταραχών μπορεί να διαταράξει την αποτελεσματικότητα του διπλώματος των πρωτεϊνών στο Ε.Δ. και να οδηγήσει στην συσσώρευση λανθασμένα διπλωμένων και μη-διπλωμένων πρωτεϊνών στο εσωτερικό του, μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται ως «στρες Ε.Δ.» [4]. Συνθήκες που προάγουν το στρες Ε.Δ. μπορεί να είναι η ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών, η υποξία, οι σημειακές μεταλλάξεις σε εκκρινόμενες πρωτεΐνες που σταθεροποιούν ενδιάμεσους τύπους αναδίπλωσης ή προκαλούν την συσσωμάτωση των πρωτεϊνών, καθώς και η απώλεια της ομοιόστασης των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}), με άμεσο αρνητικό αντίκτυπο στην λειτουργία των ασβέστιο-εξαρτώμενων μοριακών συνοδών του Ε.Δ.. Στη περίπτωση των παγκρεατικών β κυττάρων, το στρες Ε.Δ. μπορεί να προκληθεί από την ανικανότητά τους να διπλώσουν τα αυξημένα επίπεδα των (προ) ινσουλινικών ενδιάμεσων μορίων που απαιτούνται για την διατήρηση της σταθερής συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Σε άλλους κυτταρικούς τύπους όπως οι νευρώνες, η χρόνια έκφραση εκκρινόμενων πρωτεϊνών με λανθασμένη αναδίπλωση οδηγεί σε μη βιώσιμες απαιτήσεις του μηχανισμού πρωτεϊνικής αναδίπλωσης, προκαλώντας χρόνια στρες Ε.Δ. Επομένως, τα κύτταρα έχουν εξελίξει ένα εκλεπτυσμένο σύστημα επιτήρησης να αντιλαμβάνονται και να ανταποκρίνονται στο στρες Ε.Δ. πριν αυτό αποτελέσει απειλή για την επιβίωσή τους.

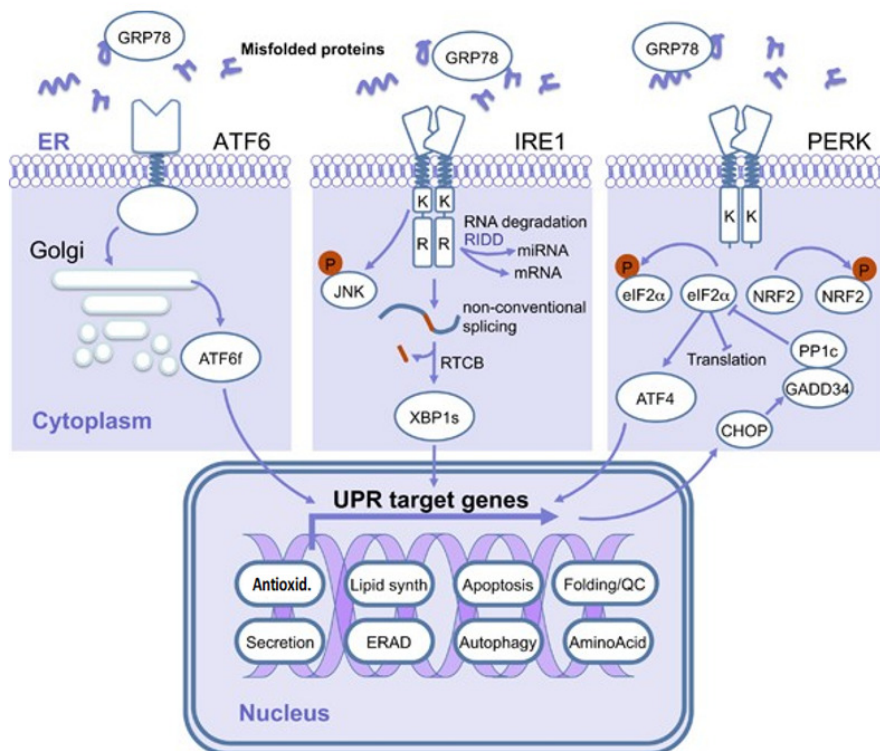
1.1.1 Το Στρες Ε.Δ. και ο Μηχανισμός Απόκρισης στις Μη-διπλωμένες Πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response – UPR)

Τα κύτταρα για να εξασφαλίσουν την ισορροπία ανάμεσα στο διαθέσιμο δυναμικό των μηχανισμών αναδίπλωσης των πρωτεϊνών και των κυτταρικών απαιτήσεων για αναδίπλωση διαρκώς παρακολουθούν το ποσό των λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών στον αυλό του Ε.Δ. Όταν οι λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες συσσωρευτούν πάνω από ένα κρίσιμο όριο, τότε ενεργοποιείται ένας ενδοκυτταρικός μηχανισμός επαγωγής σήματος που ονομάζεται μηχανισμός Απόκρισης στις Μη-διπλωμένες Πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response – UPR) [5-7] με σκοπό να αποκατασταθεί η κυτταρική ομοιόσταση. Η επικοινωνία ανάμεσα στο Ε.Δ. και τον πυρήνα σε κύτταρα που υφίστανται την συσσώρευση μη-διπλωμένων πρωτεϊνών αναφέρθηκε στα θηλαστικά για πρώτη φορά το 1988 [8]. Το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίστηκε στη συνέχεια γενετικά στον ζαχαρομύκητα *S. cerevisiae*, οδηγώντας στην ταυτοποίηση ενός γραμμικού σηματοδοτικού μονοπατιού καθοδηγούμενο από τον μεταγωγέα σήματος λόγω στρες Ε.Δ., Ire1p (Inositol-requiring protein-1), και ένα μεταγραφικό παράγοντα στον οποίο επιδρά στη συνέχεια, γνωστό ως Hac1 (ομόλογο των μεταγραφικών παραγόντων ATF/CREB1) [9, 10]. Στη ζύμη, το στρες Ε.Δ. επάγει την αύξηση της έκφρασης μιας μεγάλης ομάδας γονιδίων που εμπλέκονται στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών, τον ποιοτικό έλεγχο και την έκκριση. Στα σπονδυλωτά, ο UPR μηχανισμός έχει εξελιχθεί προς την εγκαθίδρυση ενός πολύπλοκου δικτύου διασυνδεδεμένων σηματοδοτικών μονοπατιών που ξεκινούν με την διέγερση τριών αισθητήρων του στρες Ε.Δ. και μεταγωγέων σήματος, εγκατεστημένων στη μεμβράνη του Ε.Δ., που είναι αντίστοιχα ο ενεργοποιητικός μεταγραφικός παράγοντας-6 (ATF6-activating transcription factor 6) (α και β), η πρωτεϊνική κινάση PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase) και η ενζυμική πρωτεΐνη 1 που απαιτεί ινοσιτόλη (IRE1-Inositol Requiring Enzyme 1)(α και β) **(Εικόνα 1.1)** [11].

Η ενεργοποίηση του UPR μηχανισμού επάγει δύο χρονικά διακριτά κυτταρικά γεγονότα για να μετριάσει την λανθασμένη πρωτεϊνική αναδίπλωση: μια αρχική αντίδραση να ελαττώσει την πρωτεϊνοσύνθεση και να ενισχύσει την αποικοδόμηση των λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών, και ένα δεύτερο κύμα με την μεταγραφική επαγωγή της έκφρασης εκατοντάδων γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται συνολικά στον έλεγχο της πρωτεόστασης **(Εικόνα 1.1)**.

Η PERK είναι μια διαμεμβρανική κινάση τύπου I η οποία κάτω από συνθήκες στρες Ε.Δ. ολιγομερίζεται και έτερο-φωσφορυλιώνεται, αναστέλλοντας γενικά την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω φωσφορυλίωσης του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης της

μετάφρασης 2 (eIF2α) στη σερίνη 51 [4]. Αυτό το γεγονός ελαττώνει την υπερφόρτωση των πρωτεϊνών στο εσωτερικό του Ε.Δ. ενώ παράλληλα επιτρέπει την επιλεκτική μετάφραση του mRNA που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα ATF4 συμβάλλοντας έτσι στην ενίσχυση μιας αντιοξειδωτικής απόκρισης, στην ενίσχυση της ικανότητας διπλώματος των πρωτεϊνών στο Ε.Δ., και αύξηση της μακροαυτοφαγίας [12, 13].



Εικόνα 1.1. Οι αισθητήρες του UPR and οι σηματοδοτικοί άξονες δράσης

Κατά την διάρκεια του στρες Ε.Δ., η GRP78 απελευθερώνεται από τους αισθητήρες IRE1α, PERK και ATF6, επιτρέποντας τον διμερισμό/ολιγομερισμό τους ή την έξοδο στο σύμπλεγμα Golgi. Η ενεργοποίηση της PERK οδηγεί σε φωσφορυλίωση τον NRF2 και eIF2α. Η φωσφορυλίωση του eIF2α επάγει συνολικά επιβράδυνση της μεταφραστικής δραστηριότητας ενώ προωθεί την μετάφραση του ATF4. Ο ATF4 και NRF2 μεταγραφικοί παράγοντες επάγουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική απόκριση, το δίπλωμα των πρωτεϊνών, τον μεταβολισμό των αμινοξέων, την αυτοφαγία και την απόπτωση. Η ενεργοποίηση του βρόχου αρνητικής ανάδρασης καθοδικά της PERK αποφωσφορυλιώνει τον eIF2α για να αποκαταστήσει τον μηχανισμό της μετάφρασης. Η ενεργοποίηση του IRE1α οδηγεί σε φωσφορυλίωση την MAP κινάση JNK (c-Jun N-terminal protein kinase), σε ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από την IRE1 αποικοδόμησης του RNA (RIDD) και το μάτισμα του XBP1 που με την σειρά του επάγει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο δίπλωμα των πρωτεϊνών, την έκκριση, την αποικοδόμηση που σχετίζεται με το Ε.Δ. (ERAD) και την σύνθεση λιπιδίων. Ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα ATF6 οδηγεί σε έξοδό του στο σύμπλεγμα Golgi όπου η κυτοσολική του υπομονάδα απελευθερώνεται για να μετατοπιστεί στον πυρήνα και να ενεργοποιήσει την μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην πρωτεϊνική αναδίπλωση και την ERAD. Antioxid., αντιοξειδωτική απόκριση (antioxidant response); Lipid synth., σύνθεση λιπιδίων (lipid synthesis); QC, ποιοτικός έλεγχος (quality control).

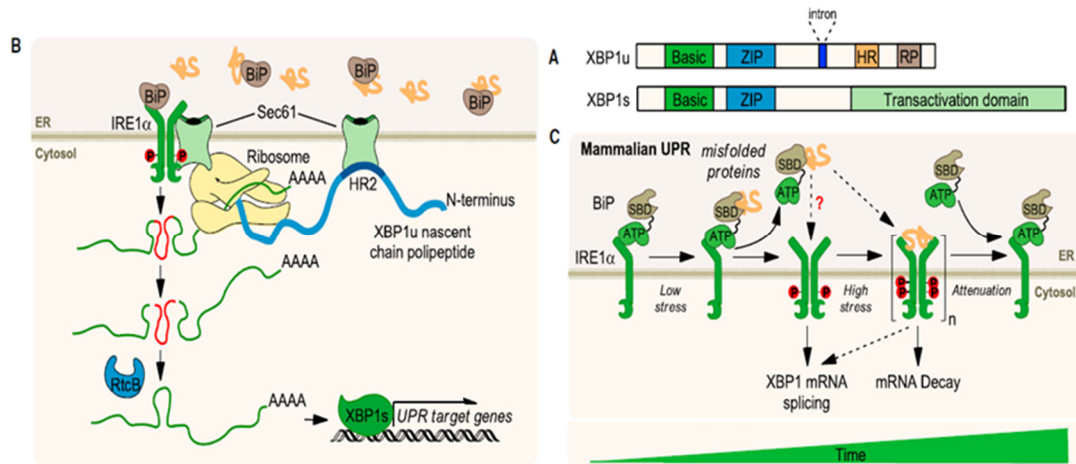
Σε χρόνιο στρες Ε.Δ., η παρατεταμένη έκφραση του ATF4 συνεισφέρει στην επαγωγή της απόπτωσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η φωσφορυλίωση του eIF2α αντιπροσωπεύει ένα σημείο σύγκλισης διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών εξαιτίας στρες, που

αποκαλούνται συνολικά «ενσωματωμένη απόκριση στο στρες» και που διεξάγεται από συγκεκριμένες κινάσες που ενεργοποιούνται κατά την φλεγμονή, τις ιϊκές μολύνσεις, την έλλειψη θρεπτικών συστατικών, και την ανεπάρκεια αίμης [14].

Η IRE1α πρωτεΐνη αποτελεί τον πιο συντηρημένο σηματοδοτικό άξονα του UPR μηχανισμού. Το γονίδιο σηματοδότησης από το Ε.Δ. στον πυρήνα 1 (ERN1-endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1) αποτελεί το ευρέως εκφρασμένο παράλογο γονίδιο υπεύθυνο για την σύνθεση της IRE1α διαμεμβρανικής πρωτεΐνης τύπου I που περιέχει μια υπομονάδα κινάσης σερίνης/θρεονίνης και μια υπομονάδα ενδοριβονουκλεάσης (RNάση) στη κυτοσολική της περιοχή. Ως απόκριση στην συσσώρευση μη-διπλωμένων πρωτεϊνών στον αυλό του Ε.Δ., η υπομονάδα που εντοπίζεται στον αυλό του Ε.Δ. αποδεσμεύεται από την μοριακή συνοδό της, την ρυθμιζόμενη από την γλυκόζη πρωτεΐνη 78/πρωτεΐνη συνδεδεμένη σε ανοσοσφαιρίνη (GRP78/BiP), ακολουθεί διμερισμός της πρωτεΐνης και ετερο-αυτοφωσφορυλίωση της υπομονάδας κινάσης η οποία επιφέρει μια στερεοδομική μεταβολή που ενεργοποιεί την υπομονάδα RNάσης η οποία με την σειρά της καταλύει την αποκοπή ενός 26-νουκλεοτιδίων εσωνίου σε δομή φουρκέτας (στελέχους-βρόχου) από το mRNA του XBP1 μεταγραφικού παράγοντα (**Εικόνα 1.1**) [15-17]. Αυτό το μη συμβατικό μάτισμα αλλάζει το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του μη ματισμένου μεταγράφου XBP1u και παράγεται ο σταθερός και ενεργός μεταγραφικός παράγοντας XBP1s (**Εικόνα 1.1**). Το είδος των γονιδίων-στόχων του XBP1 μπορεί να ποικίλει ανάλογα το είδος του ιστού και των κυτταρικών ερεθισμάτων, αφού ο XBP1s έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μέσω σχηματισμού ετεροδιμερών [6]. Σε κυτταρικά μοντέλα με στρες Ε.Δ., ο XBP1s ελέγχει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν παράγοντες που ρυθμίζουν το πρωτεϊνικό δίπλωμα, την έκκριση, τον ERAD μηχανισμό, την μετατόπιση των πρωτεϊνών στο Ε.Δ. και την σύνθεση λιπιδίων [18, 19]. Η υπομονάδα RNάσης της IRE1α πρωτεΐνης ρυθμίζει επίσης την σταθερότητα πολλών διαφορετικών RNA μορίων μέσω μιας άμεσης ενδονουκλεολυτικής αντίδρασης αποκοπής αναγνωρίζοντας συγκεκριμένες ακολουθίες και στοιχεία δευτεροταγούς RNA δομής, μια διαδικασία που είναι γνωστή ως «ρυθμιζόμενη και εξαρτώμενη από την IRE1 αποικοδόμηση» ή RIDD (Regulated IRE1-dependent decay) [20]. Η δράση αυτή έχει συσχετιστεί με την αποικοδόμηση χιλιάδων μεταγράφων στο Ε.Δ. και κυττασόλιο, ριβοσωμικών μεταγράφων, και microRNAs και παίζει σημαντικό βιολογικό ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού της γλυκόζης, της φλεγμονής και της απόπτωσης [21].

Η κινητική της RIDD δράσης έναντι του ματίσματος στο mRNA του XBP1 είναι διαφορετική υποδηλώνοντας την ύπαρξη διαφορετικών ρυθμιστικών μηχανισμών της RNάσης ενεργότητας ή/και της απόδοσης των RNA υποστρωμάτων στην IRE1α πρωτεΐνη. Παρόλο που

η μοριακή βάση του φαινομένου δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη και βρίσκεται υπό συζήτηση, η αλλαγή αυτή μπορεί να εξαρτάται και από την διαφορετική κατάσταση ολιγομερισμού της IRE1α πρωτεΐνης [22-25].



Εικόνα 1.2. Ρύθμιση της ενεργοποίησης του αισθητήρα IRE1α και μάτισμα του XBP1 μεταγράφου

(A) Η ακολουθία των δομικών στοιχείων των μεταγράφων XBP1u και XBP1s. Σημειώνονται η υδρόφοβη περιοχή (HR), η αλληλουχία παύσης του ριβοσώματος (RP) καθώς και οι υπομονάδες που εμπλέκονται στην μεταγραφική ρύθμιση. (B) Καθώς το μη ματισμένο μεταγράφο του XBP1 μεταφράζεται στα θηλαστικά, η υδρόφοβη περιοχή του νεοσυντιθέμενου πεπτιδίου οδηγεί το μεταφρασμένο μεταγράφο στη μεμβράνη του Ε.Δ., ενισχύοντας την επεξεργασία του από την ενεργή IRE1α, σε μια αντίδραση που ολοκληρώνεται από την tRNA λιγάση RtcB. Η στόχευση του mRNA του XBP1 στην μεμβράνη του Ε.Δ. εξαρτάται από την φυσική αλληλεπίδραση της IRE1α και του συμπλόκου μετατόπισης Sec61. (C) Στα κύτταρα των θηλαστικών, η IRE1α διατηρείται σε μια απενεργοποιημένη μονομερή κατάσταση μέσω της σύνδεσής της με την υπομονάδα ATPάσης της μοριακής συνοδού BiP [26]. Κάτω από στρες Ε.Δ., οι λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες αγκιστρώνονται στην υπομονάδα σύνδεσης υποστρώματος (SBD) της BiP, προκαλώντας την αποδέσμευσή της από την IRE1 μέσω αλλοστερικής μεταβολής. Το γεγονός αυτό προκαλεί διμερισμό της IRE1α και ετερο-αυτοφωσφορυλίωση, επάγοντας μια στερεοδομική αλλαγή στην υπομονάδα RNάσης η οποία επιτρέπει την ενεργοποίησή της. Η IRE1α μπορεί επίσης να συνδεθεί με τις λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες, προκαλώντας αλλοστερικές αλλαγές που επάγουν τον ολιγομερισμό της [27].

Η αποδοτικότητα του ματίσματος του μεταγράφου του XBP1 ρυθμίζεται σε διαφορετικά επίπεδα. Για παράδειγμα, η παράδοση κάθε μεταγράφου του στην μεμβράνη του Ε.Δ. ρυθμίζεται από την παροδική έκφραση της μη ματισμένης μορφής του XBP1 (XBP1u). Παρόλο που η μη-ματισμένη μορφή είναι πολύ ασταθής και αποικοδομείται ταχύτατα από το 26S πρωτεάσωμα, κατά την διάρκεια της μετάφρασής του, η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα αγκιστρώνει το ριβόσωμα στην μεμβράνη του Ε.Δ. μέσω μιας υψηλά συντηρημένης υδρόφοβης υπομονάδας [26, 27] η οποία μαζί με μια αλληλουχία παύσης της μετάφρασης [28] (**Εικόνα 1.2A**) επιτρέπει την αποδοτική επεξεργασία του mRNA του XBP1 στο κυττοσόλιο (**Εικόνα 1.2B**). Επιπλέον, η επιλεκτική στόχευση του μη ματισμένου μεταγράφου XBP1u στην μεμβράνη του Ε.Δ. διαμεσολαβείται από μια απευθείας αλληλεπίδραση της IRE1α με το σύμπλοκο μετατόπισης (translocon) Sec61 [28]. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι το μη

ματισμένο μετάγραφο XBP1u αποδίδεται στο σύμπλοκο IRE1/Sec61 μέσω αγκυροβόλησης της νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης του στο κλασικό μονοπάτι του σωματιδίου αναγνώρισης-σήματος (Signal-Recognition Particle-SRP) μέσω της υδρόφοβης υπομονάδας (**Εικόνα 1.2B**). Μετά το κόψιμο στο mRNA του XBP1 η tRNA λιγάση RtcB (RNA 2',3'-cyclic phosphate and 5'-OH ligase) ολοκληρώνει την διαδικασία ματίσματος στο κυτοσόλιο, προκαλώντας την έκφραση του XBP1s [29-31]. Μια πρόσφατη μελέτη επίσης έδειξε ότι ο Αδενοϊός (AdV) ενεργοποιεί ειδικά το μονοπάτι IRE1-XBP1, το οποίο με την σειρά του προωθεί την λυτική μόλυνση μέσω ενός προωθητικού μεταγραφικού βρόχου [32]. Στα παγκρεατικά β-κύτταρα έχει μελετηθεί ο ρόλος του άξονα IRE1-RIDD, όπου εξαιτίας του στρες Ε.Δ. προκαλείται στοχευμένη αποικοδόμηση του μεταγράφου της ινσουλίνης μέσω της RIDD δράσης και θάνατος των παγκρεατικών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης του φλεγμονοσώματος NLRP3 (NLR Family Pyrin Domain Containing 3) [33]. Το RIDD μονοπάτι έχει επίσης συνδεθεί με την ενεργοποίηση του NF-κΒ και των μονοπατιών της ιντερφερόνης μέσω του επαγόμενου γονιδίου 1 από το ρετινοϊκό οξύ RIG-1 (retinoic acid-inducible gene 1) [34].

Η ATF6α είναι επίσης μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη του Ε.Δ. που περιέχει ένα bZIP μεταγραφικό παράγοντα στη κυτοσολική της υπομονάδα. Σε συνθήκες στρες Ε.Δ. ο ATF6 μετατοπίζεται στο σύμπλεγμα Golgi, όπου κόβεται από τις πρωτεάσες S1P και S2P, απελευθερώνοντας την κυτοσολική του υπομονάδα (ATF6f) [35]. Ο ATF6f προκαλεί αύξηση της έκφρασης ενός συνόλου γονιδίων του UPR, περιλαμβάνοντας γονίδια που ενισχύουν το ERAD μονοπάτι [36]. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ο ATF6f μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον XBP1s μέσω σχηματισμού ετεροδιμερών, τα οποία μπορούν να καθοδηγήσουν συγκεκριμένα προγράμματα γονιδιακής έκφρασης [37]. Συνολικά, τα προγράμματα μεταγραφικής ρύθμισης του UPR λειτουργούν σαν ένα πολύπλοκο δίκτυο σηματοδότησης με πολλαπλές εξόδους με τελικό στόχο την αποκατάσταση της πρωτεόστασης του Ε.Δ. και συνεπώς την διατήρηση της κυτταρικής λειτουργίας.

Οι μηχανισμοί ανίχνευσης ή επιτήρησης των λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών στον αυλό του Ε.Δ. δεν έχουν προσδιοριστεί πλήρως μέχρι σήμερα. Στα θηλαστικά, η τσαπερόνη BiP/Grp78 έχει δειχθεί ότι είναι απολύτως απαραίτητη για την ενεργοποίηση και των τριών αισθητήρων του Ε.Δ. (**Εικόνα 1.2C**). Σε ήρεμες συνθήκες, η BiP συνδέεται με την υπομονάδα αυλού της PERK και IRE1 πρωτεΐνης μέσω της υπομονάδας ΑΤΡάσης, διατηρώντας τις σε μια ανενεργή μονομερή κατάσταση [26, 38]. Όμως σε συνθήκες στρες Ε.Δ. η BiP συνδέεται στις λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες μέσω της υπομονάδας της για σύνδεση υποστρώματος λειτουργώντας σαν αλλοστερικός ρυθμιστής που απελευθερώνει τους αισθητήρες και επιτρέπει τον διμερισμό τους [26]. Παρόλο που αυτό το μοντέλο έχει

ανασυσταθεί *in vitro*, η συμμετοχή της σύνδεσης της BiP πρωτεΐνης για την ενεργοποίηση της IRE1α και PERK στηρίζεται αποκλειστικά σε συσχετιστικά δεδομένα και μόνο μια μελέτη έχει δείξει ότι η αφαίρεση της θέσης σύνδεσης της BiP στον αισθητήρα IRE1 ενισχύει την βασική κατάσταση ενεργοποίησής του [39] **(Εικόνα 1.2C)**. Η ATF6 επίσης αλληλεπιδρά με την BiP στο Ε.Δ. καλύπτοντας μια θέση σύνδεσης στα κυστίδια της πρωτεΐνης καλύμματος II (COP-II). Έτσι, η απελευθέρωση της BiP σε συνθήκες στρες Ε.Δ. επιτρέπει την μετατόπιση της ATF6 στο σύμπλεγμα Golgi για περαιτέρω επεξεργασία και ενεργοποίηση. Πάντως η ύπαρξη μοντέλου για άμεση αναγνώριση των λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών από την IRE1α πρωτεΐνη στα θηλαστικά είναι υπό συζήτηση γιατί η ανασυνδυασμένη υπομονάδα αυλού δεν συνδέεται με λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες *in vitro* και η κρυσταλλική δομή αυτής της περιοχής φαίνεται να μην είναι συμβατή με την σύνδεση ενός πεπτιδίου στην αύλακα εξαιτίας χωρικών περιορισμών [40]. Όμως πρόσφατη μελέτη πρότεινε ότι οι μη διπλωμένες πρωτεΐνες μπορεί να συνδέονται στην IRE1α, επάγοντας αλλοστερικές αλλαγές που προκαλούν τον ολιγομερισμό της [27]. Επομένως, στα θηλαστικά η ενεργοποίηση των αισθητήρων στρες Ε.Δ. μπορεί να περιλαμβάνει την BiP σε συνδυασμό με την σύνδεση λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών για την επίτευξη μιας ολοκληρωμένης UPR απόκρισης. Επίσης αξίζει να αναφέρουμε ότι εκτός από την μοριακή συνοδό BiP έχουν προσδιοριστεί και άλλες τσαπερόνες του Ε.Δ. που ρυθμίζουν τον UPR μηχανισμό. Για παράδειγμα, η πρωτεϊνική δισουλφιδική ισομεράση A6 (PDIA6-Protein disulfide isomerase A6) συνδέεται και ελέγχει την απόσβεση της IRE1α και PERK σηματοδότησης αλλά όχι της ATF6. Σε μοριακό επίπεδο, η PDIA6 συνδέεται με την IRE1, πιθανόν μέσω συγκεκριμένων κυστεϊνών στην υπομονάδα που εντοπίζεται στον αυλό του Ε.Δ.[41]. Επίσης η πρωτεϊνική δισουλφιδική ισομεράση A5 (PDIA5) ρυθμίζει επιλεκτικά την ενεργοποίηση του ATF6 [42], που συνάδει με το γεγονός ότι οι δισουλφιδικοί δεσμοί στον αυλό του ATF6 ρυθμίζουν την μετατόπισή του στο σύμπλεγμα Golgi. Συνεπώς όλα αυτά τα ευρήματα συνηγορούν στην ύπαρξη ενός πολύπλοκου δικτύου από πρωτεΐνες-μοριακές συνοδούς και αναδιπλάσες (foldases) που συγκροτούν ένα μηχανισμό επιτήρησης της πρωτεόστασης του Ε.Δ., συνδέοντας αυτή την διαδικασία ευαισθητοποίησης με γεγονότα επαγωγής σήματος που ενισχύουν προγράμματα προσαρμογής.

Το κυτταρικό πεπρωμένο καθορίζεται από έναν διαρκή αγώνα ζωής και θανάτου που ελέγχεται συνεχώς και μάλιστα αυστηρά. Η επικράτηση κυττάρων που δεν λειτουργούν σωστά εξαιτίας του στρες Ε.Δ. που δεν επιδιορθώνεται συνεισφέρει σημαντικά σε σοβαρές ασθένειες που περιλαμβάνουν τον καρκίνο και τον σακχαρώδη διαβήτη. Αντίθετα, η υπερβολική δέσμευση για κυτταρικό θάνατο μπορεί να οδηγήσει σε οργανική βλάβη ή

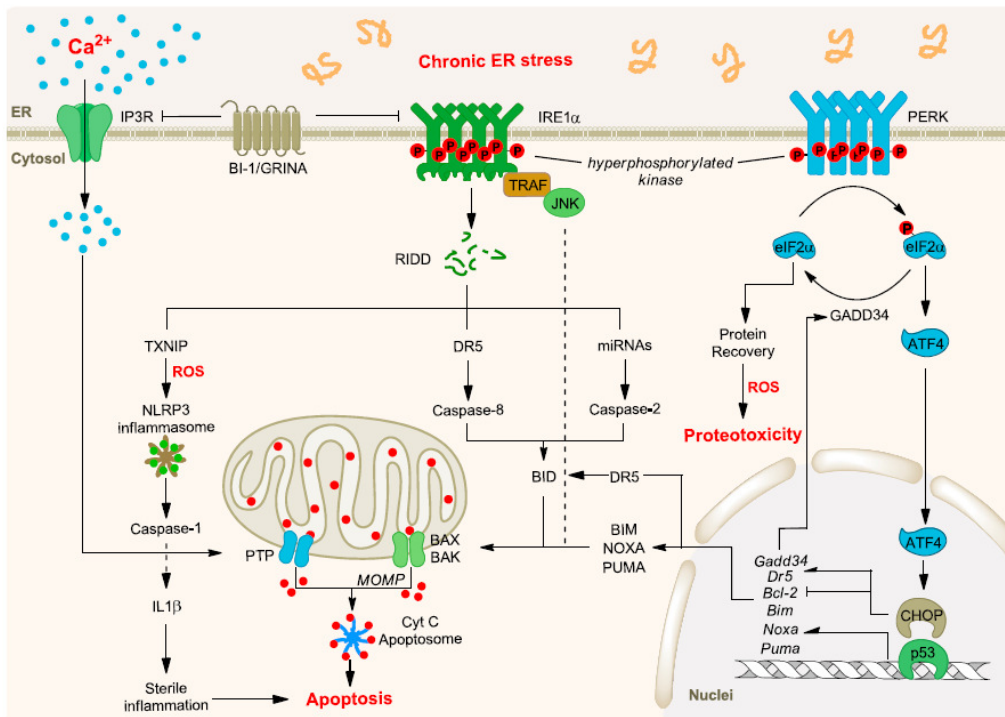
κυτταρικές εκφυλιστικές ασθένειες [11, 43-45]. Για να επιτευχθεί η βέλτιστη λειτουργικότητα σε συνθήκες στρες Ε.Δ. το κυτταρικό πεπρωμένο καθορίζεται από την στενή συνεργασία προσαρμοστικών και αποπτωτικών αποκρίσεων [46-48]. Σε περίπτωση που οι προσαρμοστικοί μηχανισμοί αποτύχουν να αποκαταστήσουν την ομοιόσταση στο δίπλωμα των πρωτεϊνών, η UPR σηματοδότηση συνεχίζει να εκδηλώνει την δράση της και τελικά μεταμορφώνεται σε εναλλακτικά προγράμματα σηματοδότησης που αποκαλούνται συνολικά «τελικό UPR πρόγραμμα» το οποίο προωθεί την απόπτωση (**Εικόνα 1.3**) [46]. Πληθώρα επιστημονικών δεδομένων υποστηρίζει ότι οι δύο UPR κινάσες, PERK και IRE1α, εμπλέκουν ένα συγκεκριμένο σύνολο προ-αποπτωτικών σημάτων που συνεισφέρουν στον κυτταρικό εκφυλισμό και τον θάνατο εφόσον το στρες Ε.Δ. δεν αποκαθίσταται. Για παράδειγμα ενώ μια προσωρινή διακοπή της πρωτεϊνσύνθεσης εξαιτίας της φωσφορυλίωσης του eIF2α μπορεί να είναι ευεργετική λόγω μείωσης του φορτίου για έκκριση, μια παρατεταμένη διακοπή στη μετάφραση από την αδιάκοπη PERK σηματοδότηση είναι ασύμβατη με την επιβίωση [48]. Επιπλέον, η υπέρ-ενεργοποίηση της PERK μπορεί να αυξήσει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα CHOP/GADD153 (C/EBP homologous protein), ο οποίος αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη BCL-2 (B-cell lymphoma 2) για να επιταχύνει τον κυτταρικό θάνατο ενώ επίσης ενισχύει την έκφραση των προ-αποπτωτικών μελών της BCL-2 οικογένειας όπως την BH3-protein BIM, καθώς και την βελτίωση της πρωτεϊνικής σύνθεσης και του οξειδωτικού στρες [48]. Ομοίως, όταν η υπέρ-ενεργοποιημένη εξαιτίας χρόνιου στρες Ε.Δ., φωσφορυλιωμένη IRE1α συγκροτεί υψηλής τάξεως ολιγομερή, επιτρέπει στην RNάση υπομονάδα να αποκτήσει συγγένεια για πολλαπλά RIDD υποστρώματα και να προκαλεί μαζικά ενδονουκλεολυτική αποικοδόμηση εκατοντάδων μεταγράφων που εντοπίζονται στο Ε.Δ., ελαττώνοντας σημαντικά το φορτίο του Ε.Δ. και των συστατικών που απαιτούνται για δίπλωμα των πρωτεϊνών, κάτι που όμως δυσχεραίνει το στρες Ε.Δ. σε μεταγενέστερα στάδια [20, 24]. Επίσης, ενώ οι προαναφερθείσες μελέτες έδειξαν ότι ενδιάμεσες καταστάσεις στρες Ε.Δ. μπορεί είτε μέσω της PERK είτε μέσω της IRE1α να οδηγήσουν σε αποκλίνουσα κυτταρική μοίρα, ο ολιγομερισμός της IRE1α υπό την συνεχιζόμενη παρουσία υψηλών επιπέδων στρες Ε.Δ. επάγει ενεργοποίηση ή αύξηση προ-φλεγμονωδών και προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, όταν υπέρ-ενεργοποιείται η IRE1α, η δράση της RNάσης μειώνει τα επίπεδα συγκεκριμένων microRNAs (πιθανόν μέσω απευθείας αποκοπής των πρόδρομων μορίων τους στη μεμβράνη του Ε.Δ.) τα οποία φυσιολογικά καταστέλλουν προ-αποπτωτικούς στόχους, όπως η προ-οξειδωτική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την θειορεδοξίνη TXNIP (thioredoxin-interacting protein), προκαλώντας την ταχεία αύξησή τους [49, 50]. Τα

αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα της TXNIP στη συνέχεια ενεργοποιούν το φλεγμονόσωμα NLRP3 και το προ-θανάτου μονοπάτι του, εξαρτώμενου από την κασπάση 1, προκαλώντας στείρα φλεγμονή και πυροπρωτικό κυτταρικό θάνατο [49] **(Εικόνα 1.3)**. Τέλος, συνεχόμενη σηματοδοτική δράση της IRE1α μπορεί να λειτουργεί σαν μια πλατφόρμα ενεργοποίησης για την κινάση 1 που ρυθμίζει το σήμα για απόπτωση, ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), και του καθοδικού στόχου της JNK [51, 52], μια διαδικασία που μπορεί να ρυθμίζει την απόπτωση κάτω από στρες που δεν μπορεί να ελεγχθεί.

Πολλά από τα προ-αποπτωτικά σήματα των αισθητήρων του UPR συγκλίνουν γενικά στο ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι που επάγεται όταν συγκεκριμένες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες όπως το κυτόχρωμα c και ο 2^{ος} ενεργοποιητής των κασπασών, προερχόμενος από τα μιτοχόνδρια, δηλαδή την πρωτεΐνη Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI), απελευθερώνονται βίαια στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιώντας άλλες κασπάσες (π.χ. την κασπάση 3)[53]. Η οικογένεια των BCL-2, μια μεγάλη κλάση από προ- και αντί-αποπτωτικές πρωτεΐνες, ελέγχει αυτό το «ενδογενές» αποπτωτικό μονοπάτι, που περιλαμβάνει το στρες Ε.Δ. μέσω ρύθμισης της ακεραιότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το ενδογενές μιτοχονδριακό αποπτωτικό μονοπάτι εμπλέκεται όταν κάποιος κυτταρικός τραυματισμός οδηγήσει στην έκφραση και/ή στην μετα-μεταφραστική ενεργοποίηση ενός ή περισσότερων BH3-μόνο πρωτεϊνών, μια δομικά ποικίλη συλλογή από προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες που περιέχουν μια μικρή α-έλικα γνωστή σαν υπομονάδα 3 ομόλογη της BCL-2 (BH3) απαραίτητη για τον κυτταρικό θάνατο. Τουλάχιστον 4 ξεχωριστές BH3-μόνο πρωτεΐνες (π.χ. BID, BIM, NOXA, PUMA) ενεργοποιούνται κατά το τελικό UPR πρόγραμμα [54]. Κάθε μια από αυτές τις πρωτεΐνες ενεργοποιείται σε στρες Ε.Δ. με έναν μοναδικό τρόπο. Η BIM, για παράδειγμα, αυξάνεται μεταγραφικά μέσω PERK και το πρωτεϊνικό της προϊόν σταθεροποιείται ως απόκριση στο στρες. Καθώς ενεργοποιούνται οι BH3-μόνο πρωτεΐνες ανταγωνίζονται μιτοχονδριακές προστατευτικές πρωτεΐνες όπως η BCL-2, η BCL-XL, ή απευθείας επάγουν τις προαποπτωτικές BAX και BAK πρωτεΐνες αυξάνοντας την διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων μέσω μιας διαδικασίας γνωστής ως MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization).

Επίσης η RIDD ενεργότητα της IRE1α ελέγχει τα επίπεδα mRNA της κασπάσης-2 μέσω αποικοδόμησης συγκεκριμένων miRNAs όπως το miR-17, προκαλώντας ενεργοποίηση της BID πρωτεΐνης που επάγει την διαδικασία MOMP [50] **(Εικόνα 1.3)**. Παρόλα αυτά η ρύθμιση της επαγόμενης από στρες Ε.Δ. απόπτωσης δεν ελέγχεται από ένα μόνο μοριακό μονοπάτι

και είναι το αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης πολλών διαφορετικών μηχανισμών που μπορεί ακόμη και να εξειδικεύονται ανάλογα τον κυτταρικό τύπο.



Εικόνα 1.3. Αποπτωτικά μοριακά μονοπάτια επαγόμενα σε στρες Ε.Δ.

Η χρόνια έκθεση σε υψηλά επίπεδα στρες Ε.Δ. επάγει μέσω της PERK και IRE1α πρωτεΐνης την ενεργοποίηση μιας σειράς σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν σε κυτταρική δυσλειτουργία, ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος και της απόπτωσης. Κρίσιμο βήμα στην ρύθμιση της απόπτωσης είναι η «συνομιλία» ανάμεσα στο Ε.Δ. και τα μιτοχόνδρια μέσω μεταγραφικών και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων σε μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών BCL-2. Επιπλέον η απελευθέρωση ασβεστίου από το Ε.Δ., η δυσχερής πρωτεϊνική σύνθεση και η παραγωγή ROS μπορούν να επηρεάσουν την επαγωγή της απόπτωσης.

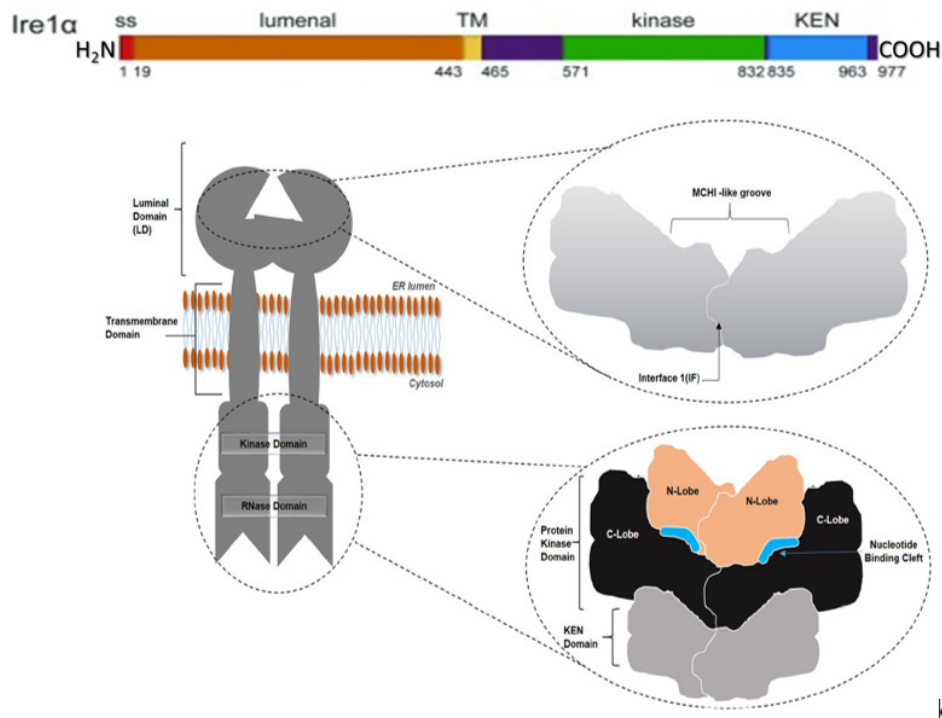
1.1.2 Η Ενζυμική Πρωτεΐνη IRE1 και ο Πολυδιάστατος Μοριακός Μηχανισμός Δράσης της

Η διαλεύκανση του τρόπου με τον οποίο γίνεται η ανίχνευση του στρες πρωτεϊνικού διπλώματος στο Ε.Δ. πραγματοποιήθηκε περίπου πριν τρεις δεκαετίες, όταν η Mary-Jane Gething και ο Joseph Sambrook, καθώς και ο Mark Rose ανέφεραν σε ανεξάρτητες μελέτες ότι στη ζύμη, στον σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, υπάρχει ένα δυναμικό μονοπάτι που ρυθμίζει την ομοιόσταση της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης – ένα μεταγραφικό πρόγραμμα επαγωγής σε σύζευξη με την ενδοκυτταρική σηματοδότηση από το Ε.Δ. προς τον πυρήνα [8]. Γενετικές μελέτες οδήγησαν στην ανακάλυψη της IRE1 πρωτεΐνης ως κύριου παράγοντα της UPR σηματοδότησης [55]. Ανάμεσα στους μοριακούς διακόπτες του UPR, η IRE1 είναι ο μόνος αισθητήρας στρες Ε.Δ. που ταυτοποιήθηκε στη ζύμη και είναι απαραίτητος για την λειτουργία του UPR στα ζώα και τα φυτά. Εξαιτίας της συντήρησής του στη ζύμη, η μοριακή ρύθμιση του σηματοδοτικού του άξονα έχει μελετηθεί διεξοδικά σε αυτό το σύστημα. Εργασίες από άλλες δύο ερευνητικές ομάδες ταυτοποίησαν το ομόλογό του γονίδιο στα θηλαστικά [56, 57]. Σε αντίθεση με την ζύμη, η IRE1 πρωτεΐνη των θηλαστικών έχει δύο ισομορφές: την IRE1α και IRE1β. Η IRE1α εκφράζεται παντού, ανεξάρτητα από τον κυτταρικό τύπο, ενώ η IRE1β εκφράζεται αποκλειστικά στο γαστρεντερικό επιθήλιο. Επίσης, η εξάλειψη της IRE1β ισομορφής δεν προκαλεί θνησιμότητα σε αντίθεση με την IRE1α ισομορφή που η εξάλειψή της σε μοντέλα ποντικών προκαλεί εμβρυική θνησιμότητα [58]. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την IRE1α πρωτεΐνη των θηλαστικών ονομάζεται Ern1 (endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1) και εδράζεται στον μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 17 στον άνθρωπο (Chr17q23.3). Η παραγόμενη ανθρώπινη πρωτεΐνη έχει μήκος 977 αμινοξέων και μέγεθος ~110kDa. Η IRE1β ισομορφή, μήκους 926 αμινοξικών καταλοίπων κωδικοποιείται στον άνθρωπο από το γονίδιο Ern2 που εδράζεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 16 (Chr16p12.2). Στη ζύμη, η IRE1 πρωτεΐνη δρα σε ένα γραμμικό μονοπάτι με τον μεταγραφικό παράγοντα Hac1, τον ομόλογο του XBP1 των θηλαστικών, που είναι ο άμεσος παράγοντας στον οποίο εκδηλώνει την δράση της. Οι μεταγραφικοί στόχοι του Hac1 αφορούν κυρίως σε γονίδια των οποίων η κύρια λειτουργία είναι η αναγέννηση των μεμβρανών του Ε.Δ. και η εξομάλυνση του στρες που υφίσταται [59]. Όμως, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, στα θηλαστικά η κύρια σηματοδοτική δράση της IRE1 πρωτεΐνης εκδηλώνεται μέσα από δύο κύριους άξονες που αφορούν είτε στο μη συμβατικό μάτισμα του μεταγράφου του XBP1 είτε στην αποικοδόμηση συγκεκριμένων μορίων (mi)RNAs μέσω RIDD [60]. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη διαθέτει μια ιδιαίτερη δομή και λειτουργία που είναι πολύ σημαντική όσον αφορά στον μηχανισμό ενεργοποίησής της [61,

62]. Εντούτοις, παρά την συντηρημένη δομή και συνολική λειτουργία της από την ζύμη μέχρι τον άνθρωπο, οι κύριες διαφορές πηγάζουν από την επιτέλεση των καθοδικών μονοπατιών σηματοδότησης και των μικρών δομικών διαφοροποιήσεων που όμως ευθύνονται για τους διαφορετικούς τρόπους ενεργοποίησης σε αυτούς τους εξελικτικά διαφορετικούς οργανισμούς [39, 61, 62].

1.1.2.1 Η Δομή της IRE1 Πρωτεΐνης και Μοντέλα Ενεργοποίησης

Η δομή της IRE1 πρωτεΐνης αποτελείται από τα ακόλουθα τμήματα: μια αμινοτελική υπομονάδα στον αυλό του Ε.Δ., ένα διαμεμβρανικό τμήμα α-έλικας τύπου I και μια κυτοπλασμική περιοχή που υποδιαιρείται σε μια υπομονάδα πρωτεϊνικής κινάσης Σερίνης/Θρεονίνης και μια καρβοξυτελική υπομονάδα ενδοριβονουκλεάσης (RNάση) **(Εικόνα 1.4)**. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η απελευθέρωση της μοριακής συνοδού BiP είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της IRE1 πρωτεΐνης. Εντούτοις η απελευθέρωση της BiP δεν μπορεί να είναι το πρωταρχικό βήμα ενεργοποίησης διότι μεταλλαγμένη μορφή της IRE1 πρωτεΐνης με μειωμένη προσδετικότητα στην BiP μπορεί να ανταποκρίνεται στο στρες Ε.Δ. [61]. Μελέτες της κρυσταλλικής δομής έχουν υποδείξει ένα μοντέλο άμεσης σύνδεσης, όπου η συντηρημένη κύρια περιοχή της υπομονάδας αυλού (LD) συνδέεται απευθείας στις λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες οδηγώντας στον ολιγομερισμό της IRE1. Έχει βρεθεί ότι η LD περιέχει δύο διεπαφές· την διεπαφή 1 (IF1) που δημιουργεί ένα διπλό συμμετρικό διμερές το οποίο περιέχει μια βαθιά αύλακα, και την διεπαφή 2 (IF2) που επιτρέπει τον περαιτέρω ολιγομερισμό της πρωτεΐνης. Η αύλακα που σχηματίζεται κατά μήκος της IF1 συνιστά την κύρια περιοχή ανίχνευσης στρες (CSSR) του διμερούς η οποία έχει αρχιτεκτονική συμμετρία με το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας I (MHC-I) **(Εικόνα 1.4)**.

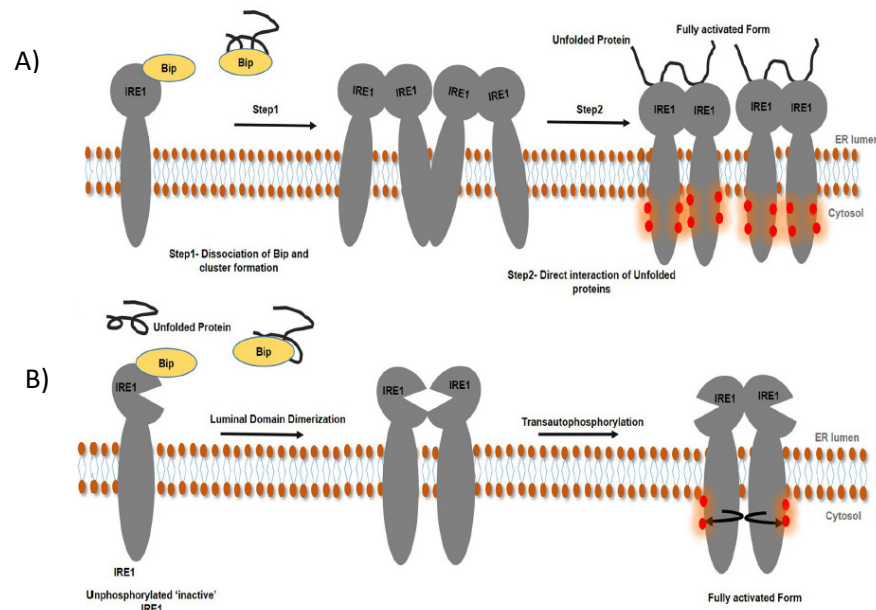


Εικόνα 1.4. Δομή της IRE1 πρωτεΐνης

Δομικά, η IRE1 διαιρείται σε τρεις περιοχές: την υπομονάδα αυλού (LD) που εντοπίζεται στον αυλό του Ε.Δ., μια διαμεμβρανική υπομονάδα (TM) στην μεμβράνη του Ε.Δ. και μια κυτοπλασμική υπομονάδα στο κυτόπλασμα. Η υπομονάδα αυλού συγκροτείται σε μια συμπαγή δομή με τον σχηματισμό δύο διεπαφών · Διεπαφή 1 (IF1) και Διεπαφή 2 (IF2). Η υπομονάδα αυλού σημειώνεται με μια βαθιά κεντρική σχισμή κατά μήκος της Διεπαφής 1 (Interface 1). Η κυτοπλασμική υπομονάδα χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο υπό-υπομονάδων, μια υπομονάδα πρωτεϊνικής κινάσης και μια KEN υπομονάδα. Η πρωτεϊνική κινάση διπλώνει σε μια δίλοβη δομή που περιέχει τον Ν-λοβό, τον C-λοβό και μια σχισμή νουκλεοτιδικής σύνδεσης. Η KEN υπομονάδα σχηματίζει μια τρίλοβη δομή μέσω αλληλεπίδρασης με τον C-λοβό της υπομονάδας πρωτεϊνικής κινάσης. [ss: ακολουθία σήματος (signal sequence) στην αμινοτελική περιοχή για στόχευση της IRE1 πρωτεΐνης στο Ε.Δ. Οι αριθμοί υποδεικνύουν την θέση των αμινοξικών καταλοίπων που οριοθετούν κάθε δομική περιοχή της IRE1α ισομορφής].

Η ιδέα που προερχόταν από αυτές τις μελέτες υποστήριζε ότι εκτός της ρύθμισης από την BiP η αύλακα στην LD περιοχή μπορεί να ανιχνεύει απευθείας τις λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες και ότι η σύνδεση αυτή αυξάνει τον ολιγομερισμό της IRE1 [61]. Περαιτέρω μελέτες πρότειναν ένα μοντέλο δύο βημάτων για ενεργοποίηση της IRE1 σύμφωνα με το οποίο η απελευθέρωση της BiP από την IRE1 οδηγεί σε ολιγομερισμό της η οποία ακολουθείται από μια πιθανή αλληλεπίδρασή της με τις μη διπλωμένες πρωτεΐνες μέσω της αύλακας τύπου MHC-I επάγοντας την πλήρη ενεργοποίησή της (Εικόνα 1.5A) [63]. Στην πραγματικότητα μια αξιολογική *in vivo* μελέτη στη ζύμη επιβεβαίωσε αυτό το μοντέλο [64]. Εκτός από το μοντέλο των δύο βημάτων, μια άλλη μελέτη πάλι στη ζύμη έδειξε ότι κάποιο άγνωστο γεγονός που μπορεί να είναι είτε στερεοδομικές αλλαγές στην περιοχή του αυλού είτε μετάβαση της IRE1 από την διμερή στη πολυμερή κατάσταση, πράγματι διευκολύνει την επιτέλεση των γεγονότων που ακολουθούν στην κυτοσολική περιοχή [65].

Παρόλο που η ακολουθία της LD είναι συντηρημένη από την ζύμη μέχρι τα θηλαστικά, η κύρια διαφορά οφείλεται στον τρόπο ανίχνευσης των μη διπλωμένων πρωτεϊνών.



Εικόνα 1.5. Μοντέλα ενεργοποίησης της IRE1

A) Ενεργοποίηση της IRE1 στη ζύμη ακολουθεί ένα μοντέλο δύο βημάτων. Το 1^ο βήμα περιλαμβάνει την αποδέσμευση της BiP εκθέτοντας την υπομονάδα αυλού της IRE1 με τρόπο που προάγει τον σχηματισμό ολιγομερών. Στη συνέχεια ακολουθεί το 2^ο βήμα όπου επάγεται μια στερεοδομική αναδιευθέτηση μέσω της απευθείας σύνδεσης μη διπλωμένων πρωτεϊνών, επιφέροντας πλήρη ενεργοποίηση της IRE1. B) Η ενεργοποίηση της IRE1 στον άνθρωπο ακολουθεί ένα διαφορετικό μοντέλο που αντικατοπτρίζεται στις διαφορές που υπάρχουν στην κρυσταλλική δομή. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η IRE1 τοποθετείται σε μια πρόσωπο με πρόσωπο διευθέτηση μετά την απελευθέρωση της BiP από την υπομονάδα αυλού. Η θέση αυτή αντιπαραβάλλει τα καταλυτικά κέντρα των IRE1 μορίων για να ξεκινήσει η trans-αυτοφωσφορυλίωση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να αλλάζει στερεοδομικά η διευθέτηση των μορίων και τα καταλυτικά κέντρα να βρίσκονται σε μια διευθέτηση τύπου «πλάτη με πλάτη» που είναι ενεργή.

Στηριζόμενοι στην κρυσταλλική δομή, προτάθηκε ένα διαφορετικό μοντέλο ανίχνευσης των μη διπλωμένων πρωτεϊνών από την ανθρώπινη υπομονάδα ανίχνευσης της IRE1. Με βάση την δομή, όπως και στη ζύμη, η υπομονάδα ανίχνευσης σχηματίζει ένα διμερές αλλά όχι ένα ολιγομερές όπως στη ζύμη. Όμως τα διμερή που σχηματίζονται πράγματι πακετάρονται σε ένα πλέγμα όπου η ένωση επιτυγχάνεται μέσω μιας μικρότερης κρυσταλλικής διεπαφής της οποίας η βιολογική λειτουργία δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Όπως εξάγεται από την κρυσταλλική δομή, η αύλακα που σχηματίζεται είναι στενή και περιορίζεται στο κέντρο από δύο αλληλεπιδρούσες πλευρικές αλυσίδες γλουταμίνης, και από τις πλευρικές έλικες που είναι πολύ κοντά για να επιτρέψουν τη σύνδεση των μη διπλωμένων πρωτεϊνών [62]. Το εύρημα αυτό υποστηρίχτηκε αργότερα από προηγούμενα

δεδομένα όπου οι μη διπλωμένες πρωτεΐνες δεν συνδέονται με την υπομονάδα αισθητήρα αλλά αντίθετα φαίνεται να δεσμεύονται και να δεσμεύουν την BiP, η οποία μαζί με την ERdj4 συνδέεται με την IRE1 κάτω από συνθήκες έλλειψης στρες [38, 66]. Μαζί αυτές οι μελέτες προβλέπουν ότι υψηλά επίπεδα μη διπλωμένων πρωτεϊνών μέσα στο Ε.Δ. προωθούν την αποδέσμευση της BiP από την υπομονάδα αυλού της IRE1, και αυτό είναι αρκετό για να προκαλέσει διμερισμό και ενεργοποίηση της ανθρώπινης IRE1 (**Εικόνα 1.5B**). Παρόλο που οι ενδείξεις υποστηρίζουν ένα διαφορετικό μοντέλο ενεργοποίησης για την IRE1 των θηλαστικών, υπάρχει ένας αριθμός μελετών που επαναπροσδιορίζει αυτό το δόγμα. Για παράδειγμα, η ανθρώπινη IRE1 επίσης συγκροτεί δομές ολιγομερών υψηλότερου βαθμού μέσω δυναμικής συσταδοποίησης παρόμοια με την αντίστοιχη στη ζύμη [67, 68]. Μια άλλη μελέτη ανέφερε ότι η σύνδεση των λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών στην IRE1 μπορεί να εμπλέκεται στην πρόκληση αλλοστερικών αλλαγών που προκαλούν τον ολιγομερισμό της [27]. Επιπλέον, μια ποσοτική μικροσκοπική ανάλυση αποκάλυψε ότι η φύση των ολιγομερών της IRE1 είναι πιο περίπλοκη και όχι απλώς πακετάρονται σε πλέγμα. Υπάρχει ένας διάχυτα περιορισμένος πυρήνας ολιγομερών της IRE1 αλλά τα μονομερή διαχέονται και ανταλλάσσονται ελεύθερα με την δεξαμενή των IRE1 μορίων που είναι παρόντα στο Ε.Δ., αν και όχι με τρόπο διαχωρισμού φάσης υγρού-υγρού [67].

Μελέτες κρυσταλλικής δομής που διεξήχθησαν ανεξάρτητα στην IRE1 της ζύμης και του ανθρώπου αποκάλυψαν ποικίλα δομικά στοιχεία και αναδιατάξεις για την μετέπειτα σηματοδότηση μετά την ενεργοποίηση της RNάσης. Η κυτοπλασμική περιοχή της IRE1 στην ζύμη διαθέτει μια υπομονάδα κινάσης και μια σφαιρική υπομονάδα γνωστή ως υπομονάδα νουκλεάσης επέκταση κινάσης (KEN- kinase-extension nuclease). Παρόμοια με άλλες τυπικές κινάσες, περιέχει μια δίλοβη αναδίπλωση που εκτείνεται από τον αμινοτελικό λοβό (N-lobe) προς τον καρβοξυτελικό λοβό (C-lobe). Η υπομονάδα KEN περιέχει αποκλειστικά α έλικες που αλληλοσυνδέονται με μικρούς βρόχους και έναν θύλακα σύνδεσης του ATP που απλώνεται ανάμεσα στον N- και C-λοβό (**Εικόνα 1.4**) [69]. Σε αυτή την κρυσταλλική δομή, η υπομονάδα κινάσης του ομοδιμερούς της IRE1 ακολουθείται από μια διευθέτηση «πλάτη με πλάτη» με μια διπλή συμμετρία, στην οποία το διμερές προσανατολίζεται αντίθετα το ένα με το άλλο, με τρόπο που τα ενεργά κέντρα της κινάσης κοιτούν προς τα έξω, εμποδίζοντας την trans-φωσφορυλίωση, δημιουργώντας ένα ολιγομερικό ενεργό σύμπλοκο RNάσης [69, 70]. Η κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης IRE1 έδειξε παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά, όμως υπήρχε και η παρουσία μιας επιπλέον ελικοειδούς υπομονάδας ενωμένης με τον C-λοβό. Επίσης, φανέρωσε μια διευθέτηση «πρόσωπο με πρόσωπο», όταν παγιδεύτηκε με ADP στο ενεργό κέντρο [71]. Αυτό το μοντέλο προτείνει ότι η απελευθέρωση της BiP τοποθετεί την

κυτοπλασμική υπομονάδα κινάσης σε μια διευθέτηση «πρόσωπο με πρόσωπο». Σε αυτή την διευθέτηση, το ευκίνητο τμήμα ενεργοποίησης του ενός μονομερούς μπορεί πιθανόν να διασχίζει το καταλυτικό κέντρο ενός παρακείμενου μονομερούς [71]. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση προέρχεται από δομικές μελέτες που διεξήχθησαν με την ανθρώπινη αποπρωτεΐνη IRE1. Στις μελέτες αυτές φάνηκε ότι όπως και με την IRE1 της ζύμης, η ανθρώπινη IRE1 τοποθετείται σε μια διευθέτηση «πλάτη με πλάτη», όμως με κάποιες δομικές διαφορές [72].

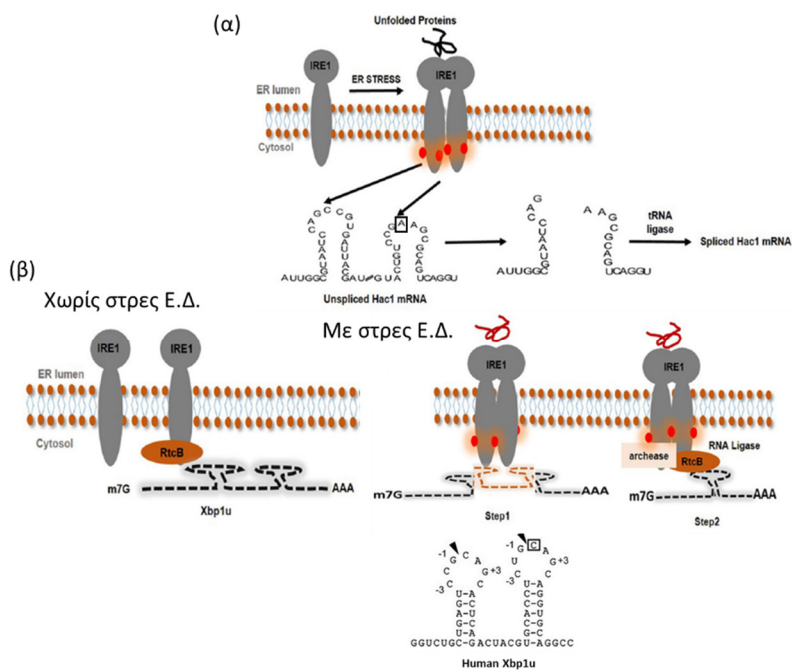
Παρόλο που τα μοντέλα που προτείνονται για τον μηχανισμό ανίχνευσης των μη διπλωμένων πρωτεϊνών παρουσιάζουν μια απόκλιση από την ζύμη στον άνθρωπο, επειδή υπάρχει συντήρηση στον μηχανισμό δράσης, είναι πιθανό οι μέθοδοι ανίχνευσης του στρες Ε.Δ. να ακολουθούν ένα παρόμοιο πρόγραμμα. Αυτή η απόκλιση εξομαλύνεται μερικώς από ένα νέο μοντέλο, που ενοποιεί τα μοντέλα ενεργοποίησης και που προτάθηκε από την ομάδα του Peter Walter [27]. Το μοντέλο αυτό προτείνει ότι οι διαφορετικές δομές που προέκυψαν από την ζύμη και τον άνθρωπο αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια της δυναμικής ολιγομερισμού της IRE1. Με την διενέργεια βιοχημικών και δομικών προσεγγίσεων, έδειξαν ότι όπως και στη ζύμη έτσι και η ανθρώπινη IRE1 αλληλεπιδρά απευθείας με πεπτίδια μέσω της αύλακας τύπου παρόμοιου της MHC-I. Σύνδεση των πεπτιδίων σε μια υδρόφοβη περιοχή της αύλακας επάγει στερεοδομικές αλλαγές και προάγει τον ολιγομερισμό. Όλα αυτά τα αποτελέσματα μαζί με άλλα προκρίνουν ένα μοντέλο όπου η διευθέτηση του διμερούς «πρόσωπο με πρόσωπο» αντιπροσωπεύει μια ενδιάμεση κατάσταση, ενώ ως ενεργή κατάσταση της IRE1 ορίζεται η διευθέτηση «πλάτη με πλάτη».

Ο ολιγομερισμός της IRE1 πρωτεΐνης ρυθμίζει απευθείας την trans-αυτοφωσφορυλίωσή της και η ενεργοποίησή της αυτή, συζευγμένη με την ενεργοποίηση της RNάσης επάγει στερεοδομικές αλλαγές και δομικές αναδιευθετήσεις της υπομονάδας της RNάσης που τελικά οδηγούν στην ενεργοποίησή της [72]. Οι δομικές μελέτες του ολιγομερούς της IRE1 αποκάλυψαν τον σχηματισμό δύο επιπλέον διεπαφών: η Διεπαφή 2 (IF2), όπου οι υπομονάδες RNάσης των μονομερών έρχονται σε επαφή σε μια διπλή συμμετρία και η Διεπαφή 3 (IF3) που δημιουργείται από μια νηματώδη διευθέτηση των υπομονάδων κινάσης των μονομερών. Το ολιγομερές της IRE1 παρουσιάζει ομοιότητες με μια διπλή έλικα DNA όπου οι διεπαφές IF1 και IF3 αντιπροσωπεύουν το ζευγάρωμα των νουκλεοτιδίων και των φωσφοδιεστερικών δεσμών, αντίστοιχα [70]. Επιπλέον, η τρισδιάστατη απεικόνιση του IRE1 ολιγομερούς ανέδειξε επιπρόσθετα δομικά στοιχεία όπως κλειστούς βρόχους, σημεία διακλάδωσης και χαρακτηριστικά παρόμοια με δακτυλίδι [67]. Η υπομονάδα RNάσης περιέχει ένα δομικό στοιχείο, που είναι σημαντικό για την καταλυτική

της ενεργότητα το οποίο χαρακτηρίζεται ως στοιχείο έλικας-βρόχου (HLE-helix loop element). Η σταθερότητα των μοτίβων HLE ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών δομών του IRE1 διμερούς. Σε κάποιες δομές είναι παραμορφωμένα ενώ σε άλλες είναι άλυτα. Όμως σε μια ολιγομερική κατάσταση το HLE μοτίβο βρίσκεται σε μια πολύ σταθερή και λυμένη δομή που είναι προσβάσιμη στο υπόστρωμα [27, 69].

1.1.2.2 Το Μη Συμβατικό Μάτισμα του Μεταγραφικού Παράγοντα XBP1 (X-box Binding Protein 1)

Όπως γνωρίζουμε η διαδικασία ματίσματος του RNA καταλύεται στο κύτταρο των ευκαρυωτικών οργανισμών από το ματισματόσωμα (spliceosome), ένα μεγάλο νουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο RNA-πρωτεϊνών [73]. Όμως η IRE1 πρωτεΐνη έχει την δυνατότητα να καταλύει αυτή την διαδικασία με έναν ανεξάρτητο από το ματισματόσωμα τρόπο που χαρακτηρίζεται ως «μη συμβατικό μάτισμα» (unconventional splicing). Ως υποστρώματά της έχουν ανεξάρτητα ταυτοποιηθεί το mRNA του μεταγραφικού παράγοντα Hac1 στη ζύμη και το mRNA μετάγραφο του XBP1 στα θηλαστικά [9, 15, 17, 74]. Και στις δύο περιπτώσεις ακολουθούνται παρόμοιοι μηχανισμοί ματίσματος, επειδή όμως υπάρχουν διαφοροποιήσεις στην αρχιτεκτονική των εσώνίων, διαφορετικές μέθοδοι και παράγοντες εμπλέκονται στη καταλυτική οδό. Για παράδειγμα, σε αντίθεση με τους ανθρώπους, μη ματισμένο πρωτεϊνικό προϊόν δεν σχηματίζεται στη ζύμη από το μη ματισμένο μετάγραφο. Το εσώνιο του Hac1 έχει μέγεθος 252 νουκλεοτίδια και σχηματίζει μια παρόμοια με βρόχο δομή που εμποδίζει την μετάφραση, ενώ το εσώνιο του XBP1 έχει μήκος μόνο 26 νουκλεοτίδια και επομένως δεν μπορεί να σχηματίσει κανενός είδους βρόχο που να μπλοκάρει την μετάφραση [75].



Εικόνα 1.6. Μηχανισμός ματίσματος mRNA από την IRE1

α) Το Hac1 mRNA ακολουθεί ένα μη συμβατικό μονοπάτι, όπου η ενεργοποιημένη IRE1 κόβει το αριστερό και δεξί στέλεχος-βρόχο ανάμεσα στα νουκλεοτίδια GC και GA, αφαιρώντας το εσώνιο. Στη συνέχεια τα προϊόντα αποκοπής υφίστανται την δράση μιας tRNA λιγάσης και έτσι σχηματίζεται το ματισμένο Hac1 mRNA. β) Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (χωρίς στρες Ε.Δ.), η μη ματισμένη μορφή του XBP1 mRNA (XBP1u) και η RtcB, μια tRNA λιγάση, σχηματίζουν ένα τριαδικό σύμπλοκο με την κυτοσολική υπομονάδα της IRE1. Καθώς μη διπλωμένες πρωτεΐνες αρχίζουν να συσσωρεύονται στον αυλό του Ε.Δ. (με στρες Ε.Δ.) η IRE1 μέσω της ενεργότητας ενδοριβονουκλεάσης κόβει το XBP1 mRNA. Στη συνέχεια η RtcB λιγάση συνδέει τα προϊόντα αποκοπής και έτσι σχηματίζεται το λειτουργικό XBP1 mRNA που θα δώσει την πληροφορία για την έκφραση του ενεργού μεταγραφικού παράγοντα XBP1. Απεικονίζεται επίσης η νουκλεοτιδική ακολουθία του μη ματισμένου XBP1 mRNA στον άνθρωπο (Human XBP1u) ενώ σημειώνονται οι θέσεις νουκλεολυτικής δράσης της IRE1 στην 5' και 3' θέση ματίσματος (μαύρα βέλη), οι θέσεις των νουκλεοτιδίων που επηρεάζουν την διαδικασία ματίσματος καθώς και το συντηρημένο νουκλεοτίδιο στη θέση +1 (C) του οποίου μεταβολή ακυρώνει εντελώς το μάτισμα του XBP1 mRNA. Η αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου της αδενίνης (A) από κυτοσίνη (C) στο ανθρώπινο μη ματισμένο XBP1 μετάγραφο είναι απαραίτητη για το κόψιμο του XBP1 από την IRE1 πρωτεΐνη.

Οι αρχικές μελέτες που έγιναν από τον Yoshida και τους συνεργάτες του ταυτοποίησαν ότι στα θηλαστικά το υπόστρωμα για μάτισμα από την IRE1 πρωτεΐνη είναι ο XBP1 [17]. Στη προσπάθειά τους να ανακαλύψουν αν η διαδικασία ματίσματος είναι αντίστοιχη με εκείνη του mRNA του Hac1 (Εικόνα 1.6α) διεξήγαγαν ανάλυση ακολουθιών μετά από μεταλλάξεις που προκαλούσαν γύρω από τις θέσεις ματίσματος 5' και 3'. Μεταλλάξεις δημιουργήθηκαν στα νουκλεοτίδια -3, -2, -1, +1 και +3 στην 5' και 3' θέση ματίσματος. Αλλαγές στις θέσεις -3, -1, +3 επηρέασαν το μάτισμα του XBP1 mRNA, ενώ αλλαγή στη θέση -2 είτε στη 5' είτε στη 3' θέση ματίσματος δεν επηρέασε την διαδικασία ματίσματος. Επιπλέον, μεταβολή στη θέση +1 ματαίωσε εντελώς το μάτισμα, καθώς η θέση αυτή (G) αντιπροσωπεύει την θέση αποκοπής όπως και στην περίπτωση του Hac1 mRNA (Εικόνα 1.6α). Σε συμφωνία με αυτή την μελέτη, μια άλλη επίσης έρευνα επιβεβαίωσε ότι το

μάτισμα του XBP1 mRNA είναι πολύ όμοιο με αυτό του Hac1 mRNA στην ζύμη [76]. Επίσης ανέφερε ότι η IRE1 που στερείται την υπομονάδα αυλού θα μπορούσε να κάνει μάτισμα στο XBP1 mRNA, δείχνοντας ότι η IRE1 μπορεί να καταλύσει το μάτισμα χωρίς ενεργοποίηση του UPR. Επιπλέον, η μελέτη τους συμπέρανε ότι το μάτισμα του XBP1 μπορεί να συμβεί στο κυτταρόπλασμα, αλλά απαιτεί μεταγραφή εν εξελίξει για την αρχική φάση. Μια μελέτη που περιλάμβανε αναζήτηση ομόλογων ακολουθιών και mRNA στοίχιση έδειξε ότι τα χαρακτηριστικά των εσωνίων του XBP1 είναι παρόμοια με εκείνα του Hac1 mRNA [77]. Όλα αυτά τα αποτελέσματα μαζί δείχνουν ότι το μάτισμα του XBP1 mRNA είναι παρόμοιο σε υψηλό βαθμό με εκείνο του Hac1 mRNA.

Όπως και στην περίπτωση του Hac1 το μάτισμα του XBP1 δημιουργεί 2', 3' κυκλική φωσφορική ομάδα στη 5' θέση ματίσματος και ένα ελεύθερο -OH στο 3' άκρο [78], και ως εκ τούτου είναι αναγκαία η ύπαρξη μιας tRNA λιγάσης για να ολοκληρωθεί το μάτισμα του XBP1 mRNA. Για να ταυτοποιήσουν την tRNA λιγάση των θηλαστικών, ο Lu και οι συνεργάτες του εφάρμοσαν μια προσέγγιση συνθετικής βιολογίας. Σε μια συνθετική γενετική αναζήτηση έναντι του XBP1, εντόπισαν την ποντικίσια RtcB, ένα ένζυμο του E.Δ., ως την κύρια tRNA λιγάση των θηλαστικών που εμπλέκεται στην ολοκλήρωση του ματίσματος του XBP1 mRNA [31]. Ανέφεραν ότι η RtcB θα μπορούσε να σχηματίσει σύμπλοκο με την IRE1 και πιθανόν εντοπίζεται στο E.Δ. Εξαιτίας της στενής σχέσης μεταξύ της IRE1 και της RtcB, τα δύο βήματα του ματίσματος του XBP1 mRNA είναι σε σύζευξη και το πιθανότερο λαμβάνουν χώρα στο E.Δ. Σε μια άλλη μελέτη, βρέθηκε ότι η RtcB συνδέεται αποδοτικά στο XBP1u mRNA [79]. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα προτάθηκε ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο πριν την ενεργοποίηση της IRE1, η RtcB θα μπορούσε να είναι συνδεδεμένη με την IRE1 και το XBP1 mRNA σε ένα τριαδικό σύμπλοκο. Μετά την ενεργοποίησή της η IRE1 κόβει το XBP1 mRNA και η RtcB συνδέει τα δύο άκρα (**Εικόνα 1.6β**) [31, 79]. Επίσης ένας συμπαράγοντας του συμπλόκου της tRNA λιγάσης, η αρχεάση βρέθηκε να είναι σημαντική για το μάτισμα του XBP1 mRNA. Αυτή η μελέτη συμπέρανε ότι για την πλήρη ακύρωση του ματίσματος απαιτείται η απουσία και της RtcB και της αρχεάσης [29]. Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε με ένα μεταλλαγμένο στέλεχος ζύμης το *rlg1-100* με σκοπό να χαρακτηριστεί λειτουργικά η tRNA λιγάση των θηλαστικών, βρέθηκε ότι μόνο κάτω από την έκφραση και των δύο δηλαδή και της RtcB και της αρχεάσης, θα μπορούσε η tRNA λιγάση των θηλαστικών να ολοκληρώσει αποδοτικά το μάτισμα σε κύτταρα ζύμης. Το σύστημα αυτό της tRNA λιγάσης θα μπορούσε επιτυχώς να συνδέσει τα εξώνια του Hac1 mRNA χωρίς το XBP1 mRNA, αν και το Hac1 mRNA δεν περιέχει καμία πιθανή θέση σύνδεσης για την RtcB. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις tRNA λιγάσες και στα

αντίστοιχα υποστρώματά τους ίσως δεν είναι ειδικές ως προς την ακολουθία αλλά περισσότερο πραγματοποιούνται μέσω της IRE1 [80].

Το XBP1 mRNA όπως το αντίστοιχο στη ζύμη, θα πρέπει να εντοπίζεται στο Ε.Δ. για να μπορέσει να γίνει το μάτισμα αφού η IRE1 πρωτεΐνη κυρίως εντοπίζεται στο Ε.Δ. . Αρχικά, είχε παρατηρηθεί ότι αρκετά mRNAs συμπεριλαμβανομένου του XBP1 βρίσκονται στην μεμβράνη του Ε.Δ. [81]. Η ιδιότητα εντοπισμού στη μεμβράνη βρίσκεται στην πρωτεϊνική έκδοση του μη ματισμένου XBP1 mRNA (XBP1u – unspliced). Η XBP1u πρωτεΐνη περιέχει μια υδρόφοβη περιοχή που ονομάζεται HR2 η οποία είναι σημαντική για την σύνδεσή της με την μεμβράνη [82]. Καθώς η πρωτεΐνη τοποθετείται στο Ε.Δ. οδηγεί σε πρόσληψη του μη ματισμένου XBP1 mRNA στην μεμβράνη. Διαγραφή της HR2 περιοχής οδήγησε όχι μόνο σε μη διανομή της XBP1u πρωτεΐνης στη μεμβράνη αλλά ανέστειλε και την πρόσληψη του XBP1 mRNA στη μεμβράνη. [82, 83]. Το μοντέλο που προτάθηκε υποστηρίζει ότι το XBP1 mRNA προσλαμβάνεται στη μεμβράνη σαν κομμάτι του νεοσυντιθέμενου συμπλόκου mRNA-ριβόσωμα (R-RNC) μέσω της μετάφρασης του XBP1u. Έχει δειχθεί ότι η HR2 διαθέτει χαρακτηριστικά παρόμοια με μια τύπου II διαμεμβρανική υπομονάδα που έχει σαν αποτέλεσμα την είσοδο της XBP1u πρωτεΐνης μέσα στην μεμβράνη του Ε.Δ. [84, 85]. Εκτός από αυτό βρέθηκε ότι η παύση της μετάφρασης είναι σημαντική για την πρόσληψη του συμπλόκου XBP1u R-RNC στη μεμβράνη [86]. Η καρβοξυτελική περιοχή της XBP1u πρωτεΐνης περιέχει ένα συντηρημένο πεπτίδιο 26 αμινοξέων που είναι σημαντικό για το μεταφραστικό σταμάτημα. Οι συγγραφείς παρατήρησαν ότι παραλλαγές του μεταφραστικού σταματήματος μείωσαν το μάτισμα του XBP1 mRNA. Έτσι, συμπέραναν ότι η μεταφραστική παύση είναι σημαντική για την πρόσληψη και το αποδοτικό μάτισμα του XBP1 mRNA [86]. Η πέψη με τρυψίνη παρεμπόδισε την πρόσληψη του συμπλόκου XBP1u R-RNC στη μεμβράνη, γεγονός που υποδεικνύει ότι κάποιοι πρωτεϊνικοί παράγοντες του Ε.Δ. πιθανόν εμπλέκονται [28]. Ο παράγοντας που εμπλέκεται βρέθηκε ότι είναι η πρωτεΐνη αναγνώρισης σήματος SRP η οποία πιάνει στην HR2 περιοχή της XBP1u πρωτεΐνης και στη συνέχεια μετατοπίζει το σύμπλοκο XBP1u R-RNC στο σύμπλοκο μετατόπισης Sec61 που είναι συνδεδεμένο στην IRE1 πρωτεΐνη. Αυτή η συν-μεταφραστική μετατόπιση του XBP1u mRNA στο σύμπλοκο IRE1-Sec61 ίσως ενισχύει την αποδοτικότητα του ματίσματος [28]. Σε παρόμοια μελέτη παρατηρήθηκε ότι το σύμπλοκο XBP1u R-RNC μεταβιβάζεται στο σύμπλοκο μετατόπισης Sec61 μέσω μιας αλληλεπίδρασης με την SRP. Η μεταφραστική παύση εκθέτει την HR2 της XBP1u πρωτεΐνης και επιτρέπει την σύνδεσή της με την SRP [87]. Είναι αξιοσημείωτο ότι το σημαντικό κριτήριο για επιτυχή σύνδεση της SRP με την HR2 του XBP1u R-RNC είναι η συγκεκριμένη απόσταση της HR2 από την θέση μεταφραστικής παύσης και την ειδική διαμόρφωση του ριβοσώματος

εξαιτίας της παύσης αυτής. Επίσης προτάθηκε ότι το μάτισμα του XBP1u mRNA συμβαίνει πάνω στο σύμπλοκο μετατόπισης [87].

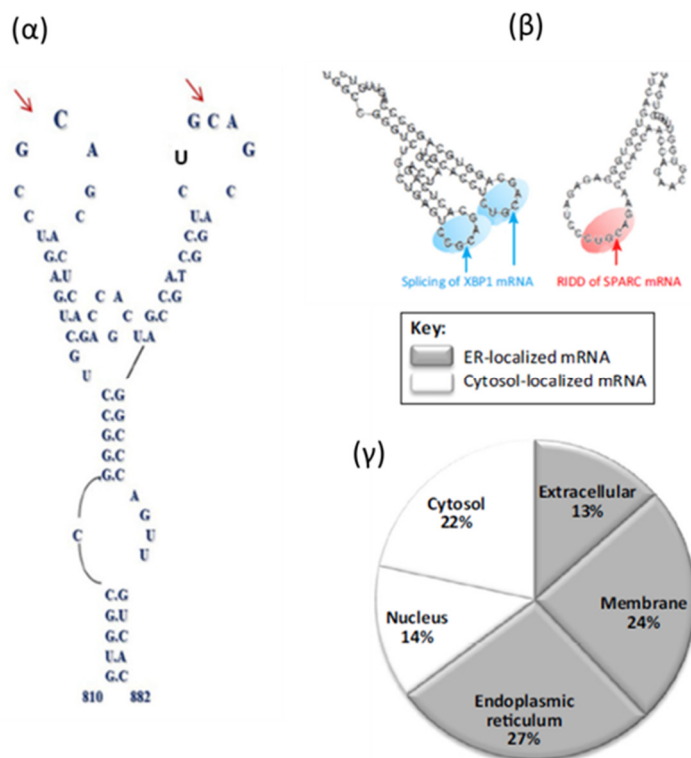
1.1.2.3 Η Ρυθμιζόμενη από την IRE1 Νουκλεολυτική Αποικοδόμηση Μεταγράφων (RIDD δράση - Regulated IRE1-Dependent Decay)

Η ανεξάρτητη από το μάτισμα του XBP1 mRNA, η RNάση ενεργότητα της IRE1 πρωτεΐνης είναι γνωστή ως RIDD δράση, ένα φαινόμενο κατά το οποίο ένα σύνολο από εντοπισμένα στο Ε.Δ. mRNAs και miRNAs (miRIDD) αποικοδομείται από την IRE1 σε συνθήκες στρες Ε.Δ. [21, 50, 60, 88]. Η RIDD δράση αρχικά περιγράφηκε σε S2 κύτταρα της Δροσόφιλας, όπου ένα σύνολο γονιδίων ήταν υποεκφρασμένο σε συνθήκες στρες με έναν IRE1-εξαρτώμενο τρόπο που όμως δεν επηρεαζόταν από τον XBP1 [20]. Τα αποικοδομημένα mRNA μόρια κωδικοποιούσαν κυρίως πρωτεΐνες με σηματοδοτικό πεπτίδιο και διαμεμβρανικές υπομονάδες και τα επίπεδα έκφρασής τους μειώνονταν 5-10 φορές. RIDD δράση έχει καταγραφεί επιπλέον σε κύτταρα ζύμης [89, 90] και σε κύτταρα θηλαστικών [24, 60], ενώ πειραματικά δεδομένα σε ποντίκια αναφέρουν υποεκφρασμένα RIDD υποστρώματα μετά από χορήγηση τουνικαμυκίνης (Tm) ή υπερενεργοποιημένου IRE1 εξαιτίας ελλείψεως του XBP1 [91, 92]. Αξίζει να σημειωθεί ότι στα θηλαστικά η δράση αυτή επιφέρει μικρότερες μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση που είναι της τάξεως περίπου των δύο φορών ή και λιγότερο για κάποιους στόχους [60]. Και οι δύο IRE1 ισομορφές, α και β των θηλαστικών μπορούν να εκδηλώσουν RIDD δράση όπως και το μάτισμα του XBP1, αλλά η IREβ ισομορφή επιφέρει ισχυρότερη RIDD δράση σε σχέση με την παράλογη ισομορφή IRE1α [89]. Χρησιμοποιώντας μια «νεκρή» έκδοση κινάσης της IRE1 (I642G) βρέθηκε ότι μπορεί να ενεργοποιηθεί η RNάση με τρόπο που καταλύει μόνο το μάτισμα του XBP1 αλλά όχι την RIDD αποικοδόμηση. Η σύνδεση του αναστολέα των κινασών 1NM-PP1 [1-τετρα-βουτυλ-3-(ναφθαλιν-1-υλμεθυλ)-1H-πυραζολο[3,4-δι]πυρομιδινό-4-αμίνη] (ATP ανάλογο) σε αυτή τη μεταλλαγμένη μορφή της IRE1 έδειξε ότι παρακάμπτει την αυτοφωσφορλίωση για το μάτισμα του XBP1 που λαμβάνει χώρα ανεξάρτητα από το στρες Ε.Δ. και την RIDD δράση. Όμως, η RIDD δράση είναι λειτουργική μόνο μετά από επαγωγή εξαιτίας στρες Ε.Δ., αναδεικνύοντας μια πιθανή διαφορά ανάμεσα στο μάτισμα του XBP1 και τη RIDD δράση [24].

Η RIDD στόχευση έχει αποκλειστικά αφιερωθεί στον εντοπισμό μεταγράφων που αφορούν σε πρωτεΐνες του Ε.Δ. επειδή η συν-μεταφραστική μετατόπιση αυτών των πρωτεϊνών θα φέρει τα mRNA τους κοντά στην IRE1, αυξάνοντας τις πιθανότητες για αποικοδόμηση [20, 93]. Μέχρι σήμερα, έχουν περίπου δημοσιευθεί 37 υποστρώματα της IRE1 και οι θέσεις αποκοπής έχουν χαρτογραφηθεί. Όλες αυτές οι θέσεις μοιάζουν με την

αντίστοιχη του XBP1, δείχνοντας ότι η RIDD δράση αποτελεί μια διαδικασία εξειδικευμένη ως προς την ακολουθία [96]. Ανάμεσα στα 37 δυνητικά RIDD υποστρώματα, μεταξύ των οποίων τα πιο κοινά είναι το BLOS-1, το SCARA3, το COL6a1, το HGSNAT, το SPARC, το SUMO, και το 28s rRNA [21, 60]. Η πλειονότητα των RIDD υποστρωμάτων (~64%) εντοπίζονται στο Ε.Δ. ενώ το υπόλοιπο 36% περιλαμβάνει κυτοσολικά και πυρηνικά κλάσματα [21, 50] **(Εικόνα 1.7γ)**. Η αποτελεσματικότητα της RIDD στόχευσης προσδιορίζει μια συσχέτιση με βάση τον κυτταρικό τύπο και επίσης με βάση τον επαγωγέα του στρες Ε.Δ. [88]. Για παράδειγμα, το Blos1 mRNA αποικοδομείται πιο αποτελεσματικά σε κύτταρα που επωάζονται με διθειοθρεϊτόλη (DTT) σε σύγκριση με κύτταρα που επωάζονται με θαψιγαργίνη (Tg). Επιπλέον, ο Blos1 στόχος έδειξε διαφορετικά επίπεδα αποικοδόμησης ανάμεσα στις Hek293 και HepG2 κυτταρικές σειρές [88]. Όπως ήδη αναφέραμε η πλειονότητα των mRNAs που στοχεύονται για RIDD ανήκουν στην οικογένεια των πεπτιδίων-οδηγητών και των διαμεμβρανικών υπομονάδων που θα αποτελούσαν ένα επιπλέον φορτίο για τον μηχανισμό αναδίπλωσης των πρωτεϊνών στο Ε.Δ. κάτω από στρες. Η διαγραφή του πεπτιδίου-οδηγητή από γνωστούς RIDD στόχους εμποδίζει την αποικοδόμησή τους, ενώ η προσθήκη του ίδιου πεπτιδίου ακόμη και στην πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP προωθεί την αποικοδόμηση της μέσω RIDD [93]. Όμως υπάρχουν μερικές εξαιρέσεις, όπως το mRNA της Πλεξίνης Α (PlexinA) που ενώ συνδέεται ισχυρά με την μεμβράνη του Ε.Δ. προστατεύεται από την RIDD αποικοδόμηση ακόμη και σε στρες Ε.Δ.. Το mRNA μεταφράζεται συνεχώς και προστατεύεται από αποικοδόμηση εξαιτίας της παρουσίας ενός ρυθμιστικού ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης που βρίσκεται ανοδικά [93]. Παρόμοια, το Smt3 mRNA που είναι ομόλογο του μικρού τροποποιητή, όμοιου της ουμπικιτίνης, SUMO, παρόλο που δεν συνδέεται με την μεμβράνη του Ε.Δ., αποτελεί στόχο για RIDD και κόβεται στη δομή στελέχους-βρόχου που διαθέτει το mRNA του [94]. Ενώ επίσης πρόσφατες σχετικά μελέτες έχουν ταυτοποιήσει και αρκετά πρόδρομα μόρια miRNAs (pre-miRNAs) τα οποία κόβονται από την IRE1 RNάση [50]. Εξαιτίας όμως της ποικιλίας των mRNAs και pre-miRNAs που εκφράζονται σε διαφορετικά συστήματα και την μαζική αναδιαμόρφωση της μεταγραφής που προκαλείται κατά τον UPR μηχανισμό, η σύνταξη μιας ολοκληρωμένης λίστας RIDD στόχων παραμένει ως και σήμερα ζητούμενο.

Έχει προταθεί ότι η ειδικότητα της RNάσης υπομονάδας μειώνεται προϊόντος του χρόνου κατά την RIDD δράση, οδηγώντας σε αποκοπή υποστρωμάτων σε πολλαπλές θέσεις, που μπορεί να έχουν ακόμα και μικρή δομική ομολογία με τις φουρκέτες της XBP1u ισομορφής [24, 91, 92, 96-100].



Εικόνα 1.7. Χαρακτηριστικά υποστρωμάτων RIDD

(α) Η δομή στελέχους-βρόχου όπως στο XBP1 mRNA είναι απαραίτητη προϋπόθεση για RIDD στα κύτταρα των θηλαστικών. RNA μετάγραφα των Hgsnat, Blos1, αλλά και άλλων RIDD στόχων περιέχουν αυτή τη χαρακτηριστική δομή. (β) Η RNA δευτεροταγή δομή του XBP1 mRNA με τις θέσεις αποκοπής (μπλε βέλη) και το SPARC mRNA με την θέση αποκοπής (κόκκινο βέλος) όπως προβλεφθήκανε με το πρόγραμμα πρόγνωσης CentroidFold [95]. (γ) Ο κυτταρικός εντοπισμός των mRNAs για τα δημοσιευμένα 37 RIDD υποστρώματα στα Μετάζωα σημειώνεται με διαφορετικό χρώμα και η τελική τοποθεσία των παραγόμενων πρωτεϊνών τους σημειώνεται μέσα σε κάθε κομμάτι του διαγράμματος πίτας.

Εντούτοις, στα κύτταρα των θηλαστικών, οι περισσότεροι RIDD στόχοι περιέχουν θέσεις κοψίματος με κοινά χαρακτηριστικά με την θέση αποκοπής του XBP1 mRNA (**Εικόνα 1.7α και β**). Για παράδειγμα, η αποικοδόμηση του Blos1 εξαρτάται από μια δομή στελέχους-βρόχου αντίστοιχη με αυτή που αναγνωρίζει ο IRE1 στο mRNA του XBP1. Η δομή αυτή απαρτίζεται από μια ακολουθία επτά νουκλεοτιδίων (5'C|U|G CAGC3') που περιέχει 4 συντηρημένα νουκλεοτίδια (σημειώνονται με έντονο μαύρο χρώμα) η οποία ακολουθείται από ένα μικρότερο στέλεχος τεσσάρων διαδοχικών βάσεων που επιτρέπουν το ζευγάρωμα AU, GC και GU [24, 91, 96] (**Εικόνα 1.7α και β**). Έλλειψη της δομής στελέχους-βρόχου ή μεταλλαγές των συντηρημένων νουκλεοτιδίων οδήγησε σε απώλεια της RIDD δράσης [96]. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στη περίπτωση της υπομονάδας 1 του συμπλόκου 1 βιογένεσης των λυσοσωμάτων (BLOC1S1) και της πρωτεΐνης 3 της όμοιας με αγγειοποιητίνη (Angptl3) κατόπιν μετάλλαξης του νουκλεοτιδίου G σε C στη θέση κοψίματος [92, 97]. Το BLOC1S1 κόβεται ειδικά στη γουανίνη 444 αλλά όχι σε δύο άλλες παρόμοιες

ακολουθίες που στερούνται την δομή φουρκέτας [100]. Επιπρόσθετα, η σύνδεση μιας δομής φουρκέτας στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA της GFP οδήγησε σε αποικοδόμηση του mRNA από την IRE1 πρωτεΐνη. Όμως, υπάρχουν και εξαιρέσεις του κανόνα όπως στη περίπτωση του Hgsnat (N-ακετυλοτρανσφεράση ηπαράνης-α-γλυκοζαμινιδίου), όπου μεταλλαξογένεση στη 2^η φουρκέτα δεν επηρεάζει την αποικοδόμησή του [88]. Αυτή η σταθερότητα στο Hgsnat mRNA μπορεί να οφείλεται σε ένα μικρότερο στέλεχος-βρόχο και λιγότερα ζεύγη GC σε σχέση με το 1^ο στέλεχος-βρόχο. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η ακολουθία νουκλεοτιδίων και η σταθερότητα της δομής στελέχους-βρόχου παρόμοιας του XBP1 είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την RIDD αποικοδόμηση.

Στο σημείο αυτό αξίζει να υπενθυμίσουμε ότι η IRE1 μπορεί επίσης να αποικοδομεί αρκετά pre-miRNAs και ότι η έκφραση πολλών miRNAs τα οποία μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση εκατοντάδων mRNA στόχων, αλλάζει σε συνθήκες στρες Ε.Δ. [102]. Επομένως εκτός από τους άμεσους RIDD στόχους υπάρχουν επίσης και έμμεσοι στόχοι, των οποίων τα επίπεδα των mRNAs ρυθμίζονται μετα-μεταγραφικά με εξαρτώμενο από την RIDD δράση τρόπο.

Τέλος, η επιλεκτική RIDD δράση εξαρτάται επίσης σε σημαντικό βαθμό και από την κατάσταση ολιγομερισμού της IRE1α πρωτεΐνης, τον κυτταρικό τύπο αλλά και την δράση της PERK πρωτεΐνης. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η PERK λειτουργεί ως θετικός ρυθμιστής της RIDD [88, 94]. Καταστολή της PERK μέσω αποσιώπησης με siRNA προκάλεσε αναστολή της RIDD για το Blos1 και Col6a1 mRNA. Αυτό το αποτέλεσμα αντιστράφηκε με τεχνητή εξασθένηση της μετάφρασης, δείχνοντας ότι η εξασθένηση της έναρξης της μετάφρασης μέσω της PERK, δημιουργεί μια συνθήκη στην οποία οι RIDD mRNA στόχοι είναι περισσότερο προσιτοί για αποικοδόμηση από την IRE1. Από την άλλη πλευρά, κάτω από συνθήκες εξάντλησης της PERK, η μετάφραση αποκαθίσταται και τα ριβοσώματα κανονικά προσδένονται στο mRNA, όπου έμμεσα περιορίζουν την πρόσβαση από την IRE1 και έτσι εμποδίζουν την αποικοδόμησή του [94, 98]. Συνολικά, θα λέγαμε ότι η PERK επηρεάζει την RIDD δράση, εξασθενώντας την μεταφραστική δραστηριότητα είτε με το να μειώνει τον βαθμό πρόσδεσης των ριβοσωμάτων σε mRNA στόχους είτε με το να σταματά τα ριβοσώματα πάνω στους στόχους, εμποδίζοντας την επιμήκυνση της μετάφρασης [88, 94]. Μια άλλη μελέτη επίσης έδειξε ότι η PERK μπορεί να έχει ακριβώς και το αντίθετο αποτέλεσμα πάνω στην RIDD [99]. Συγκεκριμένα, η PERK είναι υπεύθυνη για την αποφωσφορυλίωση της IRE1 κατά την διάρκεια των τελικών σταδίων του στρες Ε.Δ.. Η δράση αυτή της PERK είναι ανεξάρτητη από την ATF4 αλλά λειτουργεί μέσω της RPAP2 φωσφατάσης η οποία αποφωσφορυλιώνει την IRE1 και προκαλεί αναστολή της RIDD ενεργότητας.

Λαμβάνοντας υπόψη αυτές της αντίθετες δράσεις της PERK πάνω στη RIDD, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η δράση της PERK εξαρτάται από την ισχύ και την χρονική διάρκεια του στρες Ε.Δ. [100].

1.1.2.4 *Ο Διπτός Λειτουργικός Ρόλος της Σηματοδοτικής Δράσης της IRE1 Πρωτεΐνης στον Καθορισμό του Κυτταρικού Πεπρωμένου*

Η IRE1 πρωτεΐνη έχει καθιερωθεί ως κρίσιμος παράγοντας στη ρύθμιση της κυτταρικής ομοιόστασης, ως απόκριση στο στρες Ε.Δ. [4]. Αυτό όμως το σηματοδοτικό μονοπάτι πρέπει να τερματιστεί για να λάβει χώρα η απόπτωση [99], κάτι το οποίο συμβαίνει σε συνθήκες χρόνιου στρες Ε.Δ., όπου η IRE1 είναι υπεύθυνη για την έναρξη του μονοπατιού που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο [24, 50]. Αυτή η διττή λειτουργία της IRE1 οφείλεται στην ενεργότητα της RNάσης η οποία επιφέρει διαφορετικά αποτελέσματα που δρουν άλλοτε με συνεργιστικό και άλλοτε με ανταγωνιστικό τρόπο, κάτι που εξαρτάται από την έκταση και την διάρκεια του στρες Ε.Δ., καθορίζοντας έτσι το κυτταρικό πεπρωμένο [101]. Η διττή αυτή λειτουργικότητα της IRE1 πρωτεΐνης καθορίζεται επίσης από την κατάσταση των κυττάρων και ελέγχεται από διάφορους πρωτεϊνικούς παράγοντες που επικοινωνούν με διάφορα κυτταρικά μονοπάτια [102]. Κάτω από συνθήκες ήπιου στρες Ε.Δ., η ενεργοποίηση του ματίσματος του XBP1 mRNA είναι παροδική, οδηγώντας στην εξασθένηση του φαινομένου μετά από παρατεταμένη διέγερση, η οποία πιθανόν ευαισθητοποιεί τα κύτταρα να οδηγηθούν σε απόπτωση [103]. Αντιθέτως, η RIDD δράση κάτω από αυξημένο ολιγομερισμό της IRE1 ενισχύεται προϊόντος του χρόνου συμβάλλοντας στον κυτταρικό θάνατο [23].

1.1.2.4.1 Η RIDD Ενεργότητα Αυξάνει σε Συνθήκες Στρες Ε.Δ. και Επάγει τον Κυτταρικό Θάνατο.

Τα μέχρι σήμερα δεδομένα που έχουμε από πληθώρα μελετών μας δείχνουν ότι διαφορετικές δράσεις της IRE1 μπορούν να πυροδοτηθούν από διαφορετικούς ενεργοποιητές, σαν ένας τρόπος προσαρμογής των βιολογικών λειτουργιών της IRE1. Έτσι, ενώ ο σηματοδοτικός άξονας ματίσματος του XBP1 έχει δειχθεί ότι συμβάλλει στην κυτταρική επιβίωση με το να αυξάνει την προσαρμοστική ικανότητα των κυττάρων στο στρες [104], η RIDD δράση φαίνεται περισσότερο να μειώνει την κυτταρική αύξηση με έναν κύτταρο-ειδικό τρόπο μέσω αποικοδόμησης των mRNAs που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που προάγουν την αύξηση, οδηγώντας έτσι σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο [6, 23]. Με βάση την ευφυή ανάλυση των μοριακών λειτουργιών (Ingenuity Pathway Analysis – IPA) το 53% των πιθανών RIDD

υποστρωμάτων που έχουν προσδιοριστεί στα Μετάζωα κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον κυτταρικό θάνατο και την επιβίωση ενώ το 50% συνδέονται με την κυτταρική αύξηση και τον πολλαπλασιασμό. Επιπλέον, ο Urton και οι συνεργάτες του πρότειναν ένα προ-αποπτωτικό μονοπάτι που εξαρτάται από την RIDD δράση πάνω σε πρόδρομα miRNA μόρια. Βρήκαν ότι η RIDD αποικοδόμηση μειώνει την έκφραση του miR-17, miR-34a, miR-96 και miR-125b μέσω αποικοδόμησης των αντίστοιχων πρόδρομων μορίων τους [50]. Αυτά τα miRNAs φυσιολογικά καταστέλλουν την μετάφραση του mRNA της Κασπάσης-2 και επομένως η αποικοδόμησή τους οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της αντίστοιχης Κασπάσης που είναι απαραίτητη για την έναρξη της απόπτωσης. Ένας άλλος προ-αποπτωτικός μηχανισμός που ήδη αναφέρθηκε και εξαρτάται από την RIDD δράση στο miRNA-17 αφορά στην αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με την προ-οξειδωτική θειορεδοξίνη (TXNIP) η οποία αποτελεί επίσης στόχο του miR-17 [49]. Η TXNIP με την σειρά της συμβάλλει στην ενεργοποίηση του φλεγμονοσώματος NLRP3 όπου με την ακόλουθη αποκοπή της προκασπάσης-1 και την έκκριση της ιντερλευκίνης 1β, αυξάνει την συστηματική ή τοπική φλεγμονώδη αντίδραση και προάγεται ο κυτταρικός θάνατος. Γενικά, υπάρχουν επιβεβαιωτικά πειράματα που δείχνουν ότι η επαγόμενη από στρες Ε.Δ. απόπτωση εξαρτάται από τη RIDD αποικοδόμηση πρόδρομων miRNAs, αν και οι μηχανισμοί που λαμβάνουν χώρα δεν έχουν ακόμη πλήρως χαρακτηριστεί [49, 50].

Αναλύσεις μέτρησης του ματίσματος του XBP1 mRNA προϊόντος του χρόνου και της έκφρασης RIDD υποστρωμάτων έχουν δείξει ότι κατά το στρες Ε.Δ. όταν το μάτισμα του XBP1 mRNA είναι μέγιστο, η έκφραση των RIDD υποστρωμάτων έχει ήδη αρχίσει να μειώνεται, και συνεχίζει να φθίνει για αρκετές ώρες πριν επέλθει ο κυτταρικός θάνατος [24, 49, 50]. Αυτό που φαίνεται είναι ότι η RIDD ενεργότητα αυξάνεται ανάλογα με την ένταση του στρες Ε.Δ. και οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο αν το στρες δεν μετριάζεται. Συνεπώς θα μπορούσαμε να πούμε ότι (α) η RIDD δράση είναι απαραίτητη για να επέλθει κυτταρικός θάνατος, παρόλο που ο μηχανισμός που εκκινεί την απόπτωση παραμένει αδιευκρίνιστος [49, 50, 105], και (β) η RIDD δράση μπορεί να επιτελεί και άλλες λειτουργίες εκτός από την προαγωγή του κυτταρικού θανάτου [24, 49, 50].

1.1.2.4.2 Η Ήπια RIDD Δράση είναι Απαραίτητη για την Ομοιόσταση του Ε.Δ.

Τα τελευταία χρόνια, πολλές μελέτες που έγιναν σε διάφορους οργανισμούς έχουν δείξει ότι η IRE1 πρωτεΐνη έχει μια βασική RIDD ενεργότητα που είναι απαραίτητη για την διατήρηση της ομοιόστασης του Ε.Δ. . Ως βασική RIDD λειτουργία ορίζουμε την RIDD δράση που ανιχνεύουμε χωρίς επαγωγή του ματίσματος του XBP1 mRNA, δηλαδή κάτω από χαμηλά

επίπεδα ή απουσία στρες Ε.Δ. αφού το μάτισμα του XBP1 mRNA αποτελεί δείκτη στρες Ε.Δ. . Πολλαπλοί μηχανισμοί υποδεικνύουν ότι απαιτείται η RIDD δράση για την ομοίωση του Ε.Δ. Για παράδειγμα, στα Μετάζωα, η RIDD δρατικότητα ελαττώνει το φορτίο των πρωτεϊνών που προορίζονται για το Ε.Δ. μέσω της αποικοδόμησης των mRNA μεταγράφων [20, 24, 60] και μέσω αναστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης συνολικά, κάτι που επιτυγχάνεται με το κόψιμο του 28s rRNA [106] το οποίο αποτελεί υπόστρωμα και για τις δύο IRE1 ισομορφές. Επιπλέον, το 21% περίπου των πρωτεϊνών που αφορούν σε χαρακτηρισμένα RIDD υποστρώματα σχετίζονται με την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης που θα μπορούσαν επομένως να συμμετέχουν στην συνολική μείωση της πρωτεϊνικής παραγωγής. Μελέτες στην ζύμη σχάσης, *Schizosaccharomyces pombe*, έχουν δείξει ότι η RIDD δράση βοηθάει στην μείωση της εισροής πρωτεϊνών στο εσωτερικό του Ε.Δ. σε ποσοστό περίπου κατά 15% [89], συμβάλλοντας στην αποσυμφόρηση του Ε.Δ. από το πρωτεϊνικό φορτίο. Περαιτέρω στοιχεία για το ρόλο της RIDD στη διατήρηση της κυτταρικής ομοίωσης παρέχονται και από μελέτες μεταλλάξεων. Στον νηματοειδή γαιοσκώληκα *Caenorhabditis elegans* έχειδειχθεί ότι η ομοίωση του Ε.Δ. άλλαξε τόσο σε μεταλλαγμένες μορφές του XBP1 όσο και της IRE1 αλλά η έκταση της μεταβολής ήταν μεγαλύτερη στη 2^η περίπτωση υποδεικνύοντας τον ρόλο της RIDD στην διατήρηση της ομοίωσης του Ε.Δ. [107]. Περαιτέρω έμμεσες ενδείξεις προέρχονται και από την εργασία των Sakaki και συνεργατών, όπου απέδειξαν ότι γονίδια που εμπλέκονται στην επιτήρηση του RNA όπως οι υπομονάδες του συμπλόκου του εξωσώματος και των πρωτεϊνών του μηχανισμού της μη νοηματικά διαμεσολαβούμενης αποικοδόμησης του mRNA συνεισφέρουν επίσης στην ομοίωση του Ε.Δ. [108]. Το γεγονός ότι η RIDD δρατικότητα εξαρτάται από τις κυτταρικές εξωριβονουκλεάσες όπως το εξώσωμα για να επάγει ταχεία αποικοδόμηση των RNA στόχων, δείχνει ότι η απαίτηση επιτήρησης του RNA για ομοίωση στο Ε.Δ. μπορεί να προϋποθέτει την RIDD δράση. Εκτός όμως από αυτό, διάφορες μελέτες αποδίδουν και έναν κυτταροπροστατευτικό ρόλο της RIDD στα Μετάζωα. Για παράδειγμα, η RIDD προστατεύει τα ηπατικά κύτταρα από την τοξικότητα που επάγεται από την ακεταμινοφαίνη μέσω αποικοδόμησης των παραλλαγών του κυτοχρώματος P450 [91] και προστατεύει τα β-κύτταρα του παγκρέατος μέσω ρύθμισης των επιπέδων ινσουλίνης κατά την υπεργλυκαιμία [109]. Στα δενδριτικά κύτταρα η RIDD εκδηλώνει τον κυτταροπροστατευτικό της ρόλο μέσω της μείωσης των επιπέδων των υποστρωμάτων της μετάφρασης [110]. Η RIDD δράση προάγει επίσης την κυτταρική επιβίωση στη περίπτωση κυττάρων με έλλειψη του XBP1 μετά από μόλυνση είτε από τον ιό που προκαλεί φυσαλιδώδη στοματίτιδα (VSV) είτε από τον ιό του απλού έρπητα (HSV) [111]. Σημαντικές εργασίες έχουν επιβεβαιώσει μια υπερδρατικότητα του RIDD μονοπατιού ελλείψει XBP1, προτείνοντας

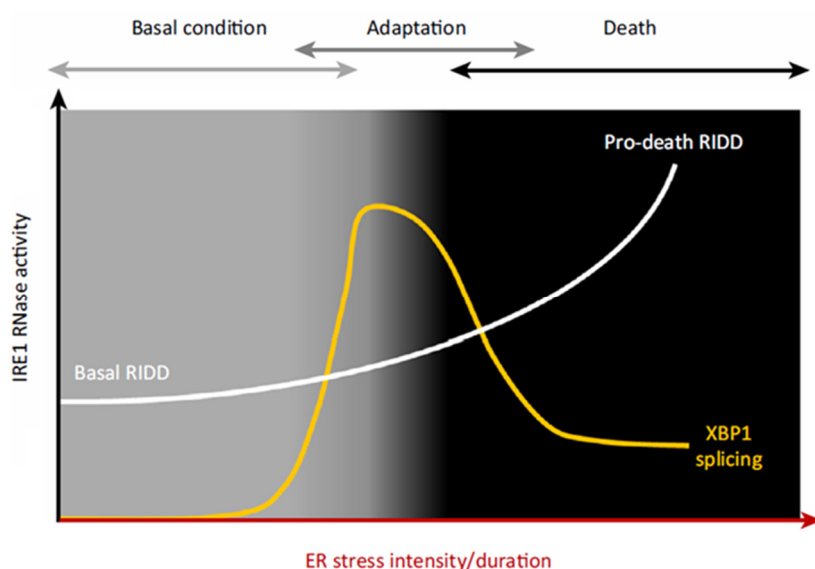
μηχανισμούς ανάδρασης που ρυθμίζουν την RNάση ενεργότητα (είτε προς την κατεύθυνση ματίσματος του XBP1 mRNA είτε προς τον RIDD άξονα) [92, 112].

Σε αντίθεση με το μάτισμα του XBP1 mRNA, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι α) διάφοροι RIDD στόχοι παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης κάτω από φυσιολογικές συνθήκες όταν η έκφραση της IRE1α αποσιωπάται ή η ενεργότητα της IRE1 μειώνεται [92, 93, 113-115], β) η RIDD μπορεί να εκδηλωθεί τόσο παρουσία όσο και απουσία στρες Ε.Δ. [34, 93, 116] και γ) η RIDD δραστηριότητα αυξάνει προοδευτικά σε σχέση με την ένταση του στρες Ε.Δ. [60, 113, 115] υποδηλώνοντας ότι το στρες Ε.Δ. δεν είναι απαραίτητο για την RIDD δράση αλλά κυρίως την ενισχύει. Συμπερασματικά, όλες αυτές οι μελέτες που αναφέρθηκαν αναδεικνύουν την διττή δράση της IRE1 στον καθορισμό του κυτταρικού πεπρωμένου. Πράγματι η RIDD λειτουργία είναι συστηματικά ενεργή και η ενεργότητά της αυξάνει σταδιακά συναρτήσει της έντασης ή/και της διάρκειας του στρες, ενώ το μάτισμα του XBP1 mRNA ενεργοποιείται παροδικά σε στρες Ε.Δ. μόνο κατά τη διάρκεια της προσαρμοστικής/προεπιβιωτικής φάσης (**Εικόνα 1.8**). Και οι δύο δράσεις της RNάσης έχουν κυτταροπροστατευτικούς ρόλους, αλλά κατόπιν παρατεταμένης και έντονης έκθεσης σε στρες Ε.Δ. η RIDD δραστηριότητα γίνεται κυτταροτοξική. Ο μηχανισμός που ελέγχει την μετάβαση από την μια κατάσταση στην άλλη παραμένει υπό διερεύνηση. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι όταν η ένταση του στρες Ε.Δ. ξεπερνάει ένα όριο αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε επαγωγή κυτταροτοξικών δράσεων της RIDD.

Επίσης, μια άλλη σημαντική παρατήρηση που έχει καταγραφεί είναι ότι το 24% περίπου των επιβεβαιωμένων πειραματικά RIDD υποστρωμάτων στα Μετάζωα, σχετίζεται με τον μεταβολισμό των λιπιδίων [21]. Το γεγονός ότι η χοληστερόλη μειώνει την κρίσιμη ελεύθερη ποσότητα που επιτρέπει την μοριακή κίνηση στον υδρόφοβο πυρήνα της λιπιδικής διπλοστιβάδας, επηρεάζει την λειτουργία των πρωτεϊνών που αγκυροβολούν στη μεμβράνη. Η αναλογία χοληστερόλης προς φωσφολιπίδια είναι μικρή στη μεμβράνη του Ε.Δ. και αυξάνει σε όλη την εκκριτική οδό. Η μεμβράνη του Ε.Δ. χρειάζεται ρευστότητα για να μπορούν μερικές πρωτεΐνες του Ε.Δ. να υφίστανται στερεοδομική αλλαγή και επομένως παρουσιάζει ευαισθησία στις τοξικές επιδράσεις του εμπλουτισμού με ελεύθερη χοληστερόλη, γεγονός που επάγει τον UPR μηχανισμό [117]. Η κυτοσολική υπομονάδα (και ίσως και η διαμεμβρανική υπομονάδα) της IRE1 φαίνεται να ανιχνεύει την μεμβρανική εκτροπή. Έτσι, η εξάντληση ινοσιτόλης ή η αλλοίωση γονιδίων που εμπλέκονται στον λιπιδικό μεταβολισμό μπορούν να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση της IRE1 [118]. Επιπλέον, μια αύξηση της ανελαστικότητας της μεμβράνης του Ε.Δ. έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την μετατόπιση των πρωτεϊνών στο Ε.Δ. [119-121]. Βασισμένοι σε αυτά τα δεδομένα, ο Kimmig και οι

συνεργάτες έχουν δημοσιεύσει ότι η RIDD δράση θα μπορούσε να συμπεριληφθεί στην διατήρηση της ομοιόστασης της μεμβράνης του Ε.Δ. .

Με βάση την πληροφορία που έχουμε ήδη αναφέρει προτάθηκε ένα μοντέλο ενεργοποίησης και των δύο δράσεων της IRE1 RNάσης σε σχέση με την ένταση/διάρκεια του στρες Ε.Δ. που απεικονίζεται στο διάγραμμα της **Εικόνα 1.8**. Κάτω από συνήθεις φυσιολογικές συνθήκες (βασική κατάσταση) το mRNA μετάγραφο του XBP1 δεν υφίσταται μάτισμα. Κάτω από χαμηλά επίπεδα στρες Ε.Δ., το μάτισμα του XBP1 mRNA αυξάνει προοδευτικά για να φθάσει σε μια κορύφωση και στη συνέχεια φθίνει μετά από παρατεταμένο στρες. Αντίθετα, ο RIDD άξονας εκδηλώνει μια σταθερή δραστηριότητα στη βασική κατάσταση που ονομάζεται βασική RIDD δράση (basal RIDD).



Εικόνα 1.8. Διάγραμμα μεταβολής των δράσεων της IRE1 RNάσης συναρτήσει του στρες Ε.Δ.

Η RIDD είναι σταθερά ενεργή και η ενεργότητά της αυξάνει προοδευτικά με την ένταση ή/και την διάρκεια του στρες Ε.Δ., οδηγώντας τελικά σε κυτταρικό θάνατο, ενώ το μάτισμα του XBP1 mRNA ενεργοποιείται παροδικά στο στρες Ε.Δ. μόνο κατά την φάση προσαρμογής/προεπιβιωτική φάση.

Η δραστηριότητα αυτή αυξάνεται σταδιακά με την ένταση ή/και την διάρκεια του στρες. Συνεπώς, η μείωση της έκφρασης των RIDD υποστρωμάτων εμφανίζεται πολλές ώρες πριν την είσοδο των κυττάρων σε απόπτωση, δείχνοντας ότι η RIDD δράση αρχικά διατηρεί την ομοιόσταση του Ε.Δ. κάτω από ήπιο/χρόνιο στρες Ε.Δ. και στη συνέχεια επάγει την απόπτωση όταν πλέον η κατάσταση είναι μη αναστρέψιμη. Επομένως ο πρώτος εξαρτώμενος από την IRE1 μηχανισμός που διατηρεί την ομοιόσταση του Ε.Δ. είναι η βασική RIDD δράση, η οποία μπορεί να προσφέρει κάποια άμεση ανάπαυλα μειώνοντας τόσο την είσοδο πρωτεϊνών στο Ε.Δ. όσο και το φορτίο των λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών. Όμως, εάν

αυτός ο μηχανισμός δεν καταφέρει να διατηρήσει την ομοιόσταση, οι μη διπλωμένες πρωτεΐνες συσσωρεύονται στο Ε.Δ. προκαλώντας την ενεργοποίηση του ματίσματος του ΧΒΡ1 και την αύξηση της RIDD δράσης. Εάν αυτά τα μέτρα αποδώσουν η ομοιόσταση του Ε.Δ. αποκαθίσταται και τα ολιγομερή της IRE1 αποσυναρμολογούνται ταυτόχρονα με την αποφωσφορυλίωσή της. Όταν οι μηχανισμοί αυτοί κορένονται εξαιτίας της ολοένα αυξανόμενης συσσώρευσης μη διπλωμένων πρωτεϊνών, το μάτισμα του ΧΒΡ1 mRNA φθίνει ενώ η RIDD δράση συνεχίζει να αυξάνεται και τελικά επάγει την κυτταρική απόπτωση μέσω αποικοδόμησης πρόδρομων μορίων miRNAs και mRNA μορίων που κωδικοποιούν προεπιβιωτικές πρωτεΐνες. Τότε μιλάμε για την προ-νεκρωτική RIDD (prodeath RIDD). Ανάμεσα στα ήδη επιβεβαιωμένα RIDD υποστρώματα των Μεταζώων, το 53% περίπου σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο και την κυτταρική επιβίωση ενώ το 21% συσχετίζεται με την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, γεγονός που είναι σύμφωνο με τους διττούς ρόλους της βασικής και προνεκρωτικής RIDD.

1.1.2.4.3 Ο ΧΒΡ1 Μεταγραφικός Παράγοντας ως «Καθοριστής» του Κυτταρικού Πεπρωμένου

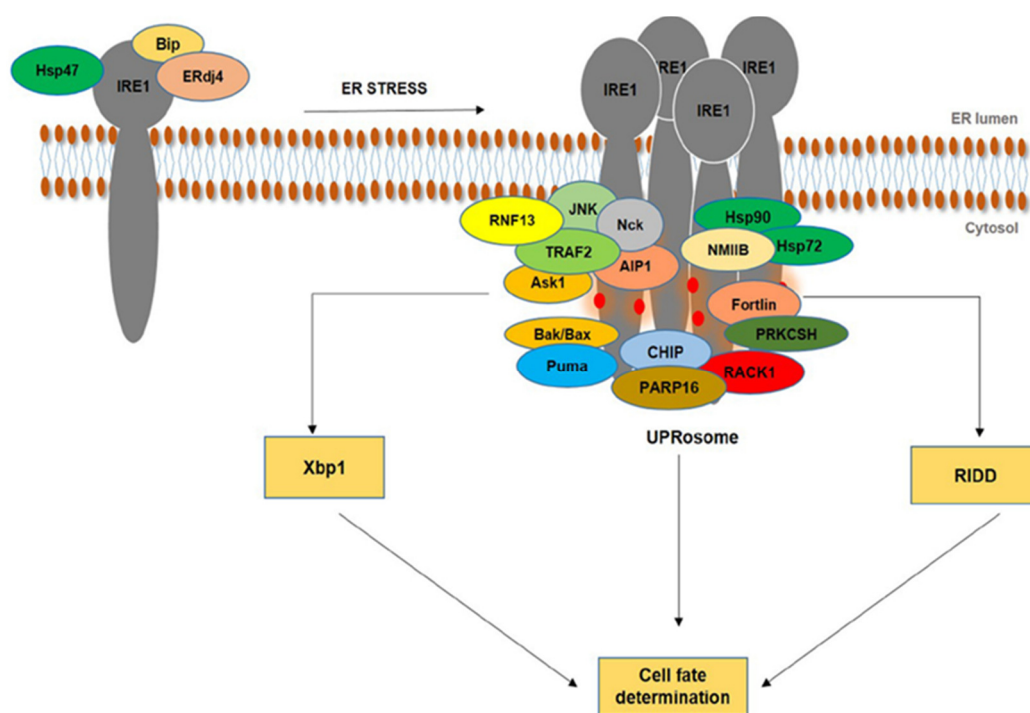
Ο ενεργός ΧΒΡ1 μετατοπίζεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί μια πληθώρα γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική ομοιόσταση [15]. Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση που σχετίζεται με το Ε.Δ. (ERAD), για πρωτεΐνες συνοδούς, για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην σύνθεση των λιπιδίων και την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, ενώ η ωρίμανση του ΧΒΡ1 αποτελεί έναν καθιερωμένο ομοιοστατικό ρυθμιστή του μονοπατιού σηματοδότησης της IRE1 πρωτεΐνης [47, 122]. Για παράδειγμα, το ήπαρ ποντικών με έλλειψη του ΧΒΡ1 (ΧΒΡ1 $-/-$) εκδηλώνει αυξημένη απόπτωση ενώ τα ΧΒΡ1 $-/-$ έμβρυα ποντικών εμφανίζουν εμβρυϊκή θνησιμότητα [123, 124]. Η θνησιμότητα μπορεί να αποφευχθεί με την εισαγωγή του διαγονιδίου ΧΒΡ1 [123]. Παρόμοια, τα χιμαιρικά ποντίκια ΧΒΡ1 $-/-$ Rag2 $-/-$ πάσχουν από έλλειψη δενδριτικών κυττάρων [125]. Ωστόσο, ο ΧΒΡ1 έχει δειχθεί ότι εμφανίζει ένα ασυνήθιστο χαρακτηριστικό σε συνθήκες χρόνιου στρες Ε.Δ. [126]. Ο ΧΒΡ1 γενικά συνδέεται στην ακολουθία TGACGTGG του στοιχείου απόκρισης μη διπλωμένων πρωτεϊνών (UPRE-unfolded protein response element) και ενεργοποιεί τους συνήθεις καθοδικούς στόχους [127], ενώ κατόπιν συσσωρεύεται μη διπλωμένων πρωτεϊνών αλλάζει την ειδικότητα σύνδεσής του στον υποκινητή και προσδέεται σε μια μη-κανονική ακολουθία υποκινητή TGACGTGA που είναι παρούσα στο γονίδιο KLF9 [126]. Στη συνέχεια η KLF9 πρωτεΐνη ενεργοποιεί την διαμεμβρανική πρωτεΐνη 38B (TMEM38B) και τα γονίδια των μεμβρανικών ιοντικών

καναλιών του υποδοχέα τύπου 1 της 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (ITPR1). Αυτές οι πρωτεΐνες συγκεντρώνουν τα επίπεδα ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων αφού η εξάντληση οποιασδήποτε από τις πρωτεΐνες είχε ως αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα κυτταροπλασματικού ασβεστίου [126, 128, 129]. Επίσης από προηγούμενες μελέτες ήταν ήδη γνωστό ότι η απελευθέρωση ασβεστίου από το Ε.Δ. στο κυτταρόπλασμα προάγει τον κυτταρικό θάνατο [130]. Κύτταρα που επώαστηκαν με τουνικαμυκίνη απουσία της TMEM38B ή του ITPR1 έδειξαν μειωμένα επίπεδα κυτταρικού θανάτου. Επιπρόσθετα, KLF9 knockout ποντίκια έδειξαν μείωση στους δείκτες στρες Ε.Δ. όταν εκτέθηκαν σε τουνικαμυκίνη σε σύγκριση με τον άγριο τύπο [126]. Αυτά τα αποτελέσματα αναδεικνύουν ότι ο ΧΒΡ1 εμφανίζει διαφορετική δραστηριότητα ως απόκριση στη διαφορετική ένταση του στρες Ε.Δ. Ο ιός της ασθένειας του Νιούκαστλ (ψευδοπανώλη των πτηνών) επάγει την απόπτωση μέσω της επαγωγής του UPR. Ενδιαφέρον είναι ότι το μάτισμα του ΧΒΡ1 mRNA παραμένει ενεργό, και η αναστολή του οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή των δεικτών της απόπτωσης [131]. Σε συμφωνία με το παραπάνω εύρημα είναι επίσης η παρατήρηση ότι η μόλυνση τόσο από τον ιό της φυσαλιδώδους στοματίτιδας όσο και από τον ιό του απλού έρπητα χρειάζεται ενεργό ΧΒΡ1 για να επάγει κυτταρικό θάνατο, κάτι που αναστρέφεται σε συνθήκες knockout για τον ΧΒΡ1 [111]. Η χορήγηση ΧΒΡ1s σε ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της αγγειοενδοθηλιακής VE-καντερίνης και έτσι επάγεται η απόπτωση [132]. Ο ΧΒΡ1 επιτυγχάνει αυτή την δράση μέσω τροποποίησης της ακετυλίωσης και της μεθυλίωσης του υποκινητή της VE-καντερίνης. Η επαγόμενη από τον ΧΒΡ1 απόπτωση μπορεί μερικώς να αποφευχθεί με αναστολείς κασπασών στα ενδοθηλιακά κύτταρα [132]. Επίσης μακροφάγα παρουσίασαν επαγωγή του σηματοδοτικού άξονα IRE1-ΧΒΡ1 ως απόκριση στο νιτρώδες οξειδίο (NO) που συνοδεύεται από μειωμένη βιωσιμότητα [133]. Επιπρόσθετα, η απόσβεση του ΧΒΡ1 σε ώριμα μακροφάγα ελαττώνει την απόπτωση [134]. Μειωμένα επίπεδα του ΧΒΡ1 επιφέρουν μια ελάττωση στην παραγωγή της ΒiΡ η οποία οδηγεί τελικά σε μια υπερενεργοποίηση της IRE1. Εξαιτίας άγνωστων μηχανισμών, αυτή η υπερενεργοποιημένη IRE1 είναι σημαντική για την διατήρηση των ώριμων μακροφάγων [134].

1.1.2.4.4 Το UPRόσωμα ως Ρυθμιστικός Παράγοντας της IRE1 Σηματοδοτικής Δράσης

Αρχικά, η σηματοδότηση μέσω του UPR μηχανισμού είχε θεωρηθεί ως μια άμεση και γραμμική μεταγωγή των επιπέδων στρες του Ε.Δ. . Όμως πρόσφατα δεδομένα μας δείχνουν ότι οι τρεις κύριοι αισθητήρες του UPR ρυθμίζονται αυστηρά μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και σύνδεσης συμπαραγόντων. Συγκεκριμένα στην περίπτωση της IRE1 πρωτεΐνης έχει φανεί ότι λειτουργεί ως πλατφόρμα όπου γίνεται η ενορχήστρωση με άλλα

σηματοδοτικά μονοπάτια [135-137]. Αρκετές πρωτεΐνες που δρουν είτε ως αναστολείς είτε ως συμπαραγόντες της IRE1 έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν και ρυθμίζουν το σηματοδοτικό της μονοπάτι, εισάγωντας τον όρο «UPRόσωμα» για την περιγραφή της πλατφόρμας σηματοδότησης (**Εικόνα 1.9**) [102]. Το UPRόσωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως όρος για να δηλώσει την γενικότερη συνεισφορά της IRE1 σε διάφορα κυτταρικά μονοπάτια, όπως επίσης να μεταδώσει πληροφορία ανεξαρτήτως της RNάσης ενεργότητας της IRE1. Η σηματοδότηση της IRE1 κινάσης είναι ένα γραμμικό μονοπάτι που εξαρτάται αποκλειστικά από την ενεργότητα της RNάσης. Η ιδέα του UPRόσωματος βλέπει την IRE1 πρωτεΐνης ως ένα ικρίωμα για την αλληλεπίδραση με πολλές πρωτεΐνες, όπου με τον ένα ή τον άλλο τρόπο ρυθμίζει την δράση της ή την συνδέει με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια ώστε να ρυθμιστούν αποκλίνουσες σηματοδοτικές δράσεις [138].



Εικόνα 1.9. Το UPRόσωμα της IRE1 πρωτεΐνης

Ένα σύνολο πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν με φυσικό τρόπο με την IRE1 πρωτεΐνη λειτουργώντας είτε ως ρυθμιστές ή ενδιάμεσες λειτουργικές συνδέσεις με άλλα μοριακά μονοπάτια είτε ως απλοί δομικοί σταθεροποιητές. Έτσι σχηματίζεται μια δυναμική ρυθμιστική πλατφόρμα γνωστή ως UPRόσωμα (UPRosome). Το UPRόσωμα ανταποκρίνεται στο στρες Ε.Δ. είτε μέσω της ενεργότητας RNάσης της IRE1 που εκδηλώνεται είτε με το μάτισμα του XBP1 mRNA και της RIDD είτε μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Έτσι, το UPRόσωμα λειτουργεί ως ένα δυναμικό κέντρο που ρυθμίζει δράσεις που καθορίζουν το εξαρτώμενο από την IRE1 κυτταρικό πεπρωμένο.

Αξίζει να αναφερθεί η αλληλεπίδραση της IRE1 με την JNK και την συνδεόμενη πρωτεΐνη της όπου μεσολαβεί για την εξαρτώμενη από την IRE1 απόπτωση. Η κυτσοσολική περιοχή της ενεργοποιημένης IRE1 αλληλεπιδρά με τον συνδεδεμένο παράγοντα 2 στον

υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TRAF2-TNF Receptor Associated Factor 2), πυροδοτώντας την ενεργοποίηση της κινάσης 1 που ρυθμίζει το σήμα απόπτωσης (ASK1) και το JNK μονοπάτι, οδηγώντας έτσι το κύτταρο σε απόπτωση κάτω από ανεπανόρθωτες συνθήκες βλάβης [51, 52]. Ένα άλλο επίσης χαρακτηριστικό που προστέθηκε στον άξονα IRE1-TRAF2 είναι η αλληλοεπιδρώσα με την ASK1 πρωτεΐνη 1 (AIP1-ASK1-interacting protein 1), η οποία αλληλεπιδρά και με την IRE1 και την TRAF2. Η AIP1 προωθεί τον διμερισμό της IRE1 μέσω σύνδεσης με την PH (Pleckstrin Homology) υπομονάδα της και διευκολύνει την απόπτωση μέσω της ASK1-JNK ενεργοποίησης [137]. Η καθοδηγούμενη από την JNK αποπτωτική ενεργοποίηση επηρεάζεται επίσης από μια λιγάση της ουμπικιτίνης, την RNF13 και την Ουμπικιτίνη D μέσω αλληλεπίδρασής της με την IRE1 [139, 140]. Η IRE1 μέσω αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη προσαρμογέα Nck επικοινωνεί επίσης με το σηματοδοτικό μονοπάτι του Πυρηνικού Παράγοντα κΒ (NF-κΒ) ενισχύοντας έτσι την έναρξη της απόπτωσης κατά τη διάρκεια αυξημένου στρες [141]. Επιπλέον, οι κυτοσολικές ABL κινάσες όσο εντοπίζονται κοντά στην μεμβράνη του Ε.Δ. συνδέονται με την IRE1 και ενισχύουν ρεοστατικά την ενεργότητα RNάσης, ενισχύοντας έτσι την επαγόμενη απόπτωση από στρες Ε.Δ. [142]. Τα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών παίζουν ένα προωθητικό ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι της IRE1. Τα μέλη BAX, BAK, BIM και PUMA είναι γνωστό ότι αυξάνουν το εύρος του σήματος της IRE1 [143, 144]. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις πιθανόν λειτουργούν ως οδηγός που κατευθύνει τον ομοιοστατικό-αποπτωτικό διακόπτη της IRE1 σε συνθήκες χρόνιου στρες Ε.Δ. [143].

Ένα άλλο σύνολο πρωτεϊνών εμπλέκεται με την IRE1 για να προωθηθεί η προεπιβιωτική της λειτουργία. Η Φορτιλίνη, ένα προ-επιβιωτικό μόριο, αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική υπομονάδα της IRE1α, αναστέλλοντας την ενεργότητα κινάσης και ενδοριβονουκλεάσης και ως εκ τούτου προστατεύει τα κύτταρα από απόπτωση [145]. Το υπόστρωμα 80K-H της Πρωτεϊνικής Κινάσης C (PRKCSH) αλληλεπιδρά με την IRE1 για να επιτρέψει τον ολιγομερισμό και την ενεργοποίησή της. Η PRKCSH προκαλεί την συνεχόμενη ενεργοποίηση του ματίσματος του XBP1 mRNA για να προωθηθεί η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων έναντι της τοξικότητας του στρες Ε.Δ. [146]. Εκτός αυτού, ορισμένες πρωτεΐνες έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται με την IRE1 με φυσικό τρόπο, βοηθώντας στην δομική της σταθερότητα. Κυτοσολικές πρωτεΐνες συνοδοί όπως η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 72 (HSP72) [147] και 90 (HSP90) [148], και οι πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, ακτίνη και μη-μυϊκή μιοσίνη IIB (NMIIIB) παίζουν ρόλο στην σταθεροποίηση της δομής της IRE1 [149]. Μια άλλη μοριακή συνοδός, η HSP47 συνδέεται στην αυλική υπομονάδα της IRE1, διευκολύνοντας τον ολιγομερισμό της στην προσαρμοστική φάση του UPR. Η HSP47 ενεργεί ως φρουρός του

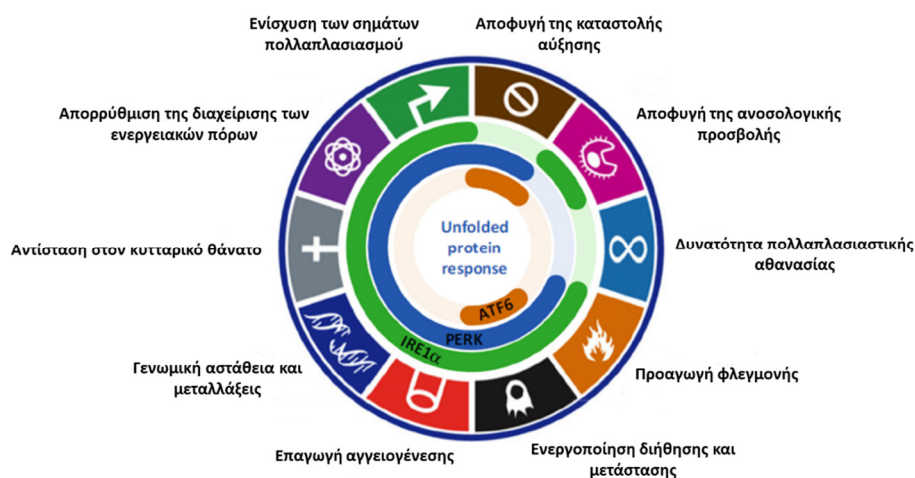
στρες, ορίζοντας έτσι ένα κατώφλι για την ενεργοποίηση του UPR [150]. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις επίσης ρυθμίζουν την IRE1 ενεργότητα σύμφωνα με το κυτταρικό σενάριο. Η φωσφορυλίωση της IRE1 μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) [151] μπορεί να κινητοποιήσει την RNάση υπομονάδα απουσία στρες Ε.Δ. ενώ η αποφωσφορυλίωσή της θα μπορούσε να επιτευχθεί από την PP2A με την βοήθεια της πρωτεΐνης ικριώματος RACK1 [152]. Η PARP16 έχει δειχθεί ότι επιτελεί ADP-ριβοζυλίωση της IRE1 ενισχύοντας την ενεργότητά της ακόμη και απουσία στρες Ε.Δ. [153], ενώ η E3 λιγάση CHIP επάγει την ουμπικιτινίωση της IRE1α επηρεάζοντας επιλεκτικά την φωσφορυλίωσή της, την σύνδεση της TRAF2 και την ενεργοποίηση της JNK [154]. Αυτές οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις λειτουργούν **(Εικόνα 1.9)** ως σημείο σύγκλισης διαφορετικών μονοπατιών που αθροιστικά στέλνουν προ-θανατηφόρα ή προ-επιβιωτικά σήματα. Επομένως, υπάρχουν πολλαπλά σημεία ελέγχου που βελτιστοποιούν την ενεργότητα της IRE1 και τις λειτουργίες της σύμφωνα με τις κυτταρικές συνθήκες.

1.2 Ο Ρόλος του UPR Μηχανισμού και Ιδιαίτερα της IRE1 στην Καρκινογένεση

Στις μέρες μας, η κακοήθης νεοπλασματική νόσος ή καρκίνος, αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες ασθένειες σε όλο τον κόσμο και την δεύτερη κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως με περίπου 18.1 εκατομμύρια καταγεγραμμένες περιπτώσεις και 9.6 εκατομμύρια θανάτους το 2018 [155]. Με βάση την προβλεπόμενη γήρανση και αύξηση του πληθυσμού, η παγκόσμια επιβάρυνση της δημόσιας υγείας υπολογίζεται ότι θα αυξηθεί πάνω από 60% έως το 2040, φτάνοντας τις 29,4 εκατομμύρια περιπτώσεις [155].

Η παθολογική εκδήλωση της νόσου είναι επώδυνη και συχνά μακροχρόνια, επιβαρύνοντας σημαντικά την ποιότητα ζωής των πασχόντων, καθώς και τη λειτουργία των υγειονομικών συστημάτων [156]. Τα αίτια εκδήλωσής της δεν έχουν ακόμη διερευνηθεί πλήρως αφού κάθε τύπος καρκίνου παρουσιάζει μια ιδιαίτερη παθοφυσιολογία που χρήζει διαφορετικό τρόπο μελέτης και θεραπευτικής προσέγγισης [157]. Επιπλέον, η απόκριση κάθε οργανισμού στην φαρμακευτική αγωγή που ακολουθείται, παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια γεγονός που κάνει επιτακτική την ανάγκη εφαρμογής εξατομικευμένης θεραπείας [158-160].

Όπως γνωρίζουμε, τα καρκινικά κύτταρα εκτίθενται σε πληθώρα ενδογενών και περιβαλλοντικών διαταραχών που αυξάνουν την πίεση της φυσικής επιλογής για την ανάπτυξη προσαρμοστικών μηχανισμών που θα τους επιτρέπουν τον κυτταρικό μετασχηματισμό και θα προωθούν την υιοθέτηση ογκογονικών χαρακτηριστικών απαραίτητων για την εξέλιξη του καρκίνου [161]. Ανάμεσα σε αυτά τα χαρακτηριστικά που ονομάζονται «Χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου» (Hallmarks of Cancer) (**Εικόνα 1.10**), ο έλεγχος της πρωτεϊνικής ομοιόστασης που συχνά περιγράφεται με τον όρο Πρωτεόσταση, αποτελεί μια από τις αναδυόμενες διαδικασίες που εμπλέκονται στην καρκινογένεση.



Εικόνα 1.10. Στρες Ε.Δ. και Χαρακτηριστικά γνωρίσματα του Καρκίνου

Στην Εικόνα 1.10 απεικονίζονται τα κύρια χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων που ευθύνονται για την δημιουργία, αύξηση και εξέλιξη του καρκίνου. Ο UPR μηχανισμός εμπλέκεται στα περισσότερα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου [161]. Ο ATF6 μεταγραφικός παράγοντας συνδέεται κυρίως με την μετάσταση και την αδράνεια των καρκινικών κυττάρων, ενώ ο IRE1 έχει συνδεθεί με την πλειονότητα των γνωρισμάτων του καρκίνου με εξαίρεση την αδράνεια του όγκου. Με βάση τα πιο πρόσφατα διαθέσιμα δεδομένα, ο αισθητήρας PERK έχει πιο ποικίλες λειτουργίες στις διαδικασίες που σχετίζονται με την αύξηση του όγκου και την εξέλιξη του καρκίνου.

Εξωγενείς παράγοντες όπως η υποξία, η ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών, οι αλλαγές στο pH, οι ιϊκές μολύνσεις, οι διαταραχές στο ισοζύγιο Ca²⁺ στο Ε.Δ. και η οξέωση μεταβάλλουν την φυσιολογική λειτουργία του Ε.Δ. που αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα και σημαντικότερα διαμερίσματα που εμπλέκονται στην πρωτεϊνοσύνθεση του κυττάρου [162]. Από την άλλη πλευρά, ενδογενείς παράγοντες στρες στους οποίους οι συμπαγείς όγκοι εκτίθενται όπως η ενεργοποίηση ογκογονιδίων, η αλλαγή στον αριθμό των χρωμοσωμάτων [163] και η επιδεινούμενη εκκριτική ικανότητα [164], προκαλούν υψηλή ζήτηση για παραγωγή πρωτεϊνών. Αν σε αυτά προσθέσουμε επιπλέον και την γενωμική αστάθεια, το αυξημένο ποσοστό μεταλλάξεων και την οξειδοαναγωγική ανισορροπία η συνολική πρωτεόσταση διαταράσσεται σε πολύ μεγάλο βαθμό. Όλοι αυτοί οι παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του καρκίνου έχουν ως αποτέλεσμα την συσσώρευση λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών στον αυλό του Ε.Δ. προκαλώντας στρες Ε.Δ. με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του UPR μηχανισμού [6].

Κατά την ογκογένεση, η ανάγκη για πρωτεϊνοσύνθεση είναι άμεση και ιδιαίτερα αυξημένη έτσι ώστε να πραγματοποιηθούν οι διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες που αποβλέπουν στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την μετανάστευση και την διαφοροποίηση, που συχνά καθοδηγούνται από την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων [165]. Το μικροπεριβάλλον επίσης του όγκου μπορεί να παρέχει περιορισμένες συνθήκες αύξησης/ανάπτυξης του όγκου εξαιτίας υψηλών απαιτήσεων σε οξυγόνο και θρεπτικών συστατικών ή/και ανεπαρκούς αγγειοποίησης. Επομένως τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να προσαρμοστούν σε ένα σύνολο διαφορετικών συνθηκών που προάγουν το στρες Ε.Δ. Αξίζει να αναφερθεί ότι ήδη από το 2004 [162] είχε επισημανθεί ο καθοριστικός ρόλος του στρες Ε.Δ. και του UPR μηχανισμού στην καρκινογένεση ενώ πλέον έχει γίνει ευρέως αποδεκτό από την επιστημονική και ιατροφαρμακευτική κοινότητα ότι αποτελεί ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της καρκινογένεσης [45, 161] (**Εικόνα 1.10**). Επιπλέον, η σηματοδότηση που επάγεται εξαιτίας του στρες Ε.Δ. που προκαλείται εξωγενώς με τις αντικαρκινικές θεραπείες (ακτινοβολία και χημειοθεραπείες), προσδίδει ανθεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα έναντι των θεραπειών [166-170], μια κατάσταση που περιγράφεται από τον όρο χημειοαντοχή.

Η ενεργοποίηση του UPR έχει περιγραφεί σε διάφορους τύπους καρκίνου του ανθρώπου αλλά και σε πολλά κυτταρικά και ζωικά μοντέλα [171]. Σε καρκινικούς όγκους,

παρατηρείται επίσης αύξηση της έκφρασης των δεικτών του UPR, υποδεικνύοντας την παρουσία στρες Ε.Δ. ενώ η μεταφραστική δραστηριότητα μεταβάλλεται σε υποξικούς όγκους [172]. Για παράδειγμα, αυξημένα επίπεδα του IRE1α, της ματισμένης και μη ματισμένης ισομορφής του μεταγραφικού παράγοντα XBP1, της PERK και του ATF6 έχουν καταγραφεί σε όγκους από μια πληθώρα καρκίνων όπως του εγκεφάλου, του μαστού, των νεφρών, του ήπατος, του γαστρεντερικού σωλήνα, των πνευμόνων και του παγκρέατος [173]. Επιπρόσθετα, οι συμπαγείς όγκοι συχνά εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα στις μοριακές συνοδούς του Ε.Δ. όπως η GRP78 και η GRP94 οι οποίες επίσης αποτελούν κλασικούς δείκτες του UPR μηχανισμού [174]. Αυξημένη έκφραση της GRP78 σχετίζεται με αυξημένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό και διηθητικότητα, και συνδέεται με κακή πρόγνωση σε διάφορους τύπους καρκίνου [175]. Επιπλέον, η συνεισφορά συγκεκριμένων κρίσιμων συστατικών του UPR μηχανισμού στην αύξηση του όγκου έχει προσδιοριστεί και υποστηρίζεται από πολλές λειτουργικές μελέτες σε προκλινικά μοντέλα [176].

Στην περίπτωση της IRE1 έχει δειχθεί ότι η ενεργότητά της είναι σημαντική όχι μόνο για την ογκογένεση αλλά και την επιθετικότητα που παρουσιάζουν πολλοί διαφορετικοί τύποι καρκίνου, όπως η λευχαιμία, το γλοιοβλάστωμα, το μύελωμα, ο καρκίνος του νεφρού και ο καρκίνος του μαστού, ενώ έχει συνδεθεί με κακή πρόγνωση [166, 177-179]. Επίσης αρκετοί καρκίνοι που εμφανίζουν υψηλά επίπεδα του σηματοδοτικού άξονα IRE1/XBP1 έχουν χειρότερη πρόγνωση από εκείνους με χαμηλότερη ενεργότητα ενώ ο XBP1 προάγει την διεισδυτικότητα του όγκου και την αντοχή στα φάρμακα [168]. Η ματισμένη μορφή XBP1s υπερέκφραζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου και η υπερέκφραση αυτή συνδέεται άμεσα με την ογκογένεση, υποδεικνύοντας μια πρώτο-ογκογονική δραστικότητα [180]. Επιπλέον, ο άξονας IRE1-XBP1s βρέθηκε ότι ρυθμίζει την έκφραση του c-Myc, συνεισφέροντας στην ογκογονικότητα του καρκίνου του προστάτη [166, 177]. Σε αντίθεση με τον IRE1-XBP1 άξονα που εκδηλώνει προ-ογκογονικά χαρακτηριστικά σηματοδότησης, η RIDD δράση πιθανόν ανταγωνίζεται την διεισδυτικότητα του όγκου και την αγγειογένεση χωρίς σημαντική επίδραση στην διήθηση των ανοσοκυττάρων στη περίπτωση του γλοιοβλαστώματος [179]. Στόχοι της RIDD όπως miRNAs, ριβοσωμικό RNA, mRNA και μόρια mRNA εντοπισμένα στο Ε.Δ. που κωδικοποιούν για μεμβρανικές και εκκριτικές πρωτεΐνες, πιστεύεται ότι αποικοδομούνται για να ελαττώσουν το φορτίο στο Ε.Δ. σε συνθήκες στρες. Επιπλέον, η IRE1 ανήκει σε εκείνες τις ανθρώπινες κινάσες που ενδέχεται να οδηγούν την ογκογένεση όταν μεταλλάσσονται [181]. Το ενδιαφέρον είναι ότι παρόλο που κάποιες από αυτές τις μεταλλάξεις διατηρούν μια λειτουργική ενεργότητα κινάσης και ενδοριβονουκλεάσης, η ικανότητά τους να επάγουν την απόπτωση σε κυτταροκαλλιέργειες χάνεται [23, 182]. Επίσης,

εξαιτίας του πλειοτροπικού ρόλου της IRE1 πρωτεΐνης σε διαφορετικές πτυχές της εξέλιξης του καρκίνου, αποτελεί πλέον έναν ελκυστικό υποψήφιο για στοχευμένη θεραπευτική προσέγγιση [167, 183-186].

Εν κατακλείδι, οι περισσότερες μελέτες συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι η σηματοδότηση εξαιτίας του στρες Ε.Δ. εμπλέκεται στην επιβίωση και προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων. Όμως, νέα δεδομένα προσάπτουν στον UPR μηχανισμό πολυποίκιλους ρόλους που αφορούν και σε άλλες σημαντικές πτυχές της βιολογίας του καρκίνου. Στην πραγματικότητα, συγκεκριμένοι παράγοντες του UPR έχουν συνδεθεί λειτουργικά με τον κυτταρικό μετασχηματισμό, την αδράνεια, την αγγειογένεση, την ανοσογονικότητα, την γενωμική αστάθεια, την μετάσταση και την ανθεκτικότητα στη θεραπεία [187] **(Εικόνα 1.10)**. Συμπερασματικά, θα λέγαμε ότι τα τελευταία χρόνια ο UPR μηχανισμός έχει αναδειχθεί ως ένας κεντρικός μηχανισμός στην ανάπτυξη του καρκίνου [188], ενώ ταυτόχρονα αντιπροσωπεύει έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο για πολλούς συμπαγείς όγκους και αιματολογικούς καρκίνους [189].

1.2.1 Ο Ρόλος της IRE1 Σηματοδότησης στην Ογκογένεση, την Ανάπτυξη και την Εξέλιξη του Καρκίνου

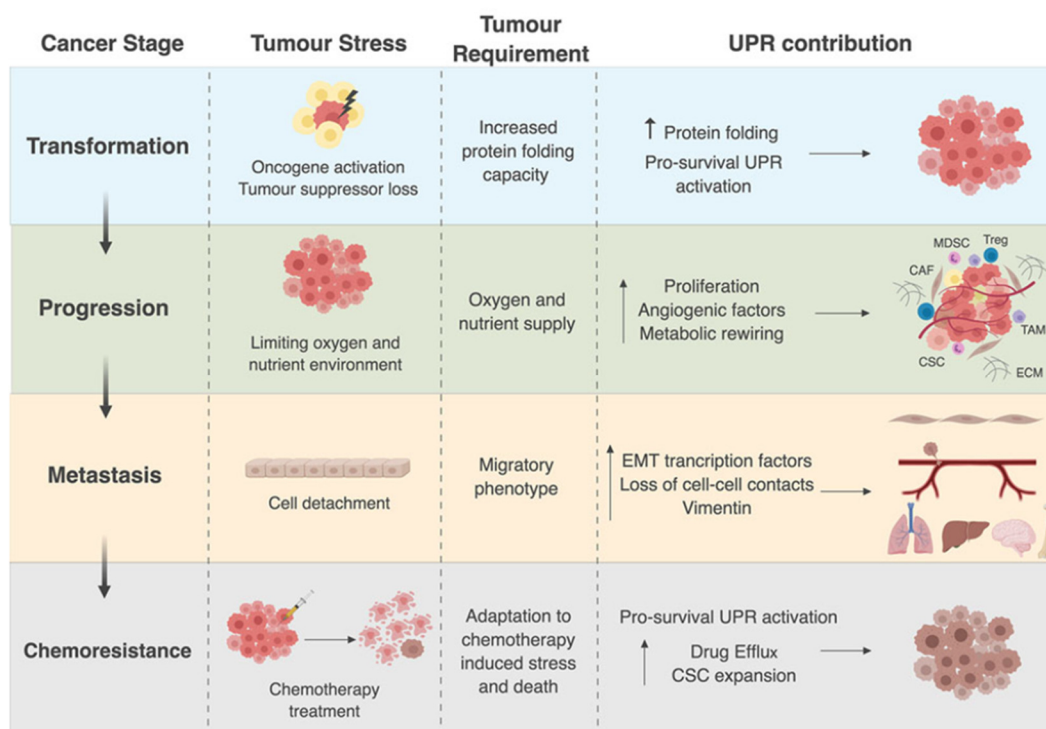
Κατά την διάρκεια των τελευταίων 15 ετών πληθώρα μελετών έχει αναδείξει την UPR σηματοδότηση ως έναν από τους βασικότερους παράγοντες που συνεισφέρουν στην ανάπτυξη του όγκου. Είναι πλέον καθόλα αποδεκτό ότι το στρες Ε.Δ. και η ενεργοποίηση του UPR μηχανισμού συμβάλλει στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου σε πολλούς διαφορετικούς τύπους καρκίνου όπως ήδη έχουμε αναφέρει. Όμως για την καλύτερη μελέτη της καρκινογένεσης και του τρόπου με τον οποίο εξελίσσεται θα μπορούσαμε να εστιάσουμε διεξοδικά στα διάφορα στάδια που την χαρακτηρίζουν όπως είναι ο κυτταρικός μετασχηματισμός ο οποίος ακολουθείται από τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων, η αγγειογένεση, η διήθηση και η μεταστατική εξάπλωση του όγκου, η καταστολή της ανοσοαπόκρισης και η επιβίωση κάτω από συνθήκες υποξίας και ανεπάρκειας θρεπτικών συστατικών, η χημειοαντοχή και η ρύθμιση του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων κ.ά. Το αξιοσημείωτο όμως είναι ότι ο UPR μηχανισμός κάνει έκδηλη την παρουσία του σε κάθε ένα από τα προαναφερθέντα στάδια με την IRE1 πρωτεΐνη να κατέχει εξέχουσα θέση που χρήζει ενδελεχούς διερεύνησης.

1.2.1.1 Συμμετοχή της IRE1 Σηματοδότησης στον Κυτταρικό Μετασχηματισμό

Ο νεοπλασματικός μετασχηματισμός των κυττάρων συνήθως αρχίζει είτε από την έλλειψη κάποιου ογκοκατασταλτικού γονιδίου όπως το p53 είτε από την ενεργοποίηση ογκογονιδίων που περιλαμβάνουν το BRAFV600E, το c-MYC και το H-RAS. Ανεξάρτητα όμως από τον μηχανισμό έναρξης, ο κυτταρικός μετασχηματισμός σχετίζεται με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τυπικά, αυτή η διαδικασία κατακλύζει το Ε.Δ. με μη διπλωμένες πρωτεΐνες φτάνοντας σε κατάσταση κορεσμού που πυροδοτεί την ενεργοποίηση του UPR μηχανισμού (**Εικόνα 1.11**). Η δραστηριοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών της PERK, της IRE1 και σε λιγότερη έκταση του ATF6 έχουν αναφερθεί σε διάφορους καρκίνους εξαιτίας της ενεργοποίησης ογκογονιδίων. Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο BRAFV600E επέφερε ενεργοποίηση της IRE1 και του ATF6 σε κύτταρα μελανώματος [190], ενώ Β-κύτταρα ασθενών με λέμφωμα Μπέρκετ (Burkitt) που υπερεκφράζουν το c-MYC, παρουσιάζουν αυξημένη φωσφορυλίωση της PERK και του eIF2α και αυξημένα επίπεδα του XBP1s και του ATF4 σε σχέση με τα Β-κύτταρα από υγιείς δότες [191]. Επιλεκτική ενεργοποίηση του c-MYC σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικών (MEFs) που εκφράζουν το επαγόμενο με ταμοξιφαίνη c-MYC (mycER) επίσης οδηγεί σε ενεργοποίηση της PERK και της IRE1. Ομοίως, ενεργοποίηση του UPR μηχανισμού έχει αναφερθεί σε κύτταρα μελανώματος και κερατινοκύτταρα μετά από ενεργοποίηση του H-RAS [192]. Ο Blazanin και οι συνεργάτες παρατήρησαν ότι η μακράς διάρκειας καταστολή της IRE1 μείωσε την επαγόμενη από το H-RAS γήρανση ενώ η αποσιώπηση του XBP1 την αύξησε, υποδεικνύοντας την συμβολή του IRE1-RIDD σηματοδοτικού άξονα. Πράγματι, σε αυτό το μοντέλο, ο ID1, ένας μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται με την διαφυγή από την γήρανση και την ανάπτυξη του καρκίνου, ταυτοποιήθηκε ως RIDD στόχος. Η παρατήρηση αυτή προσθέτει άλλο ένα επίπεδο πολυπλοκότητας για τον ρόλο της UPR σηματοδότησης στην ογκογένεση, και δείχνει ότι ανάλογα το κυτταρικό μοντέλο ή το στάδιο της ογκογένεσης, μπορεί να εκδηλώνονται αντίθετες δράσεις στην ισορροπία ανάμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την γήρανση. Στην περίπτωση του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος (GBM) πρόσφατα χαρακτηρίσαμε [179] κάποιες μεταλλάξεις στην IRE1 πρωτεΐνη όπου μια εξ αυτών συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα RIDD ενεργότητας και μειωμένη ικανότητα σχηματισμού όγκων *in vivo*. Εντούτοις δεν έχει διερευνηθεί αν η ανικανότητα αυτού του μεταλλαγμένου τύπου να σχηματίζει όγκους συνδέεται με ενισχυμένη γήρανση.

Έλλειψη της έκφρασης του p53 σε MEFs και διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές έχει συσχετιστεί με την ταυτόχρονη αύξηση της έκφρασης της IRE1 και ενεργοποίηση του σηματοδοτικού άξονα IRE1-XBP1. Η αγρίου τύπου p53 αποδείχτηκε ότι ρυθμίζει την

σταθερότητα της IRE1 προωθώντας την πρωτεασωμική της αποικοδόμηση μέσω αλληλεπίδρασης της IRE1 με την συνοβιολίνη, μια E3 λιγάση της ουμπικιτίνης [193]. Όμως όταν το p53 χάνεται, η προκύπτουσα σταθεροποίηση της IRE1 αυξάνει την ικανότητα του Ε.Δ. να εκκρίνει πρωτεΐνες, οι οποίες μπορούν να επιτρέψουν στα μετασχηματισμένα κύτταρα να διατηρούν υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού. Πράγματι, σε *in vivo* όγκους ξενομοσχεύματος HCT116 που στερούνται το p53 ογκοκατασταλτικό γονίδιο, εμφάνισαν αυξημένο καρκινικό όγκο συγκριτικά με τα p53 αγρίου τύπου ξενομοσχεύματα HCT116. Θεραπεία με τον αναστολέα της IRE1 RNάσης STF-083010 οδήγησε σε μειωμένη αύξηση του όγκου τόσο στα HCT116p53^{-/-} όσο και στα p53^{+/+} ξενομοσχεύματα. Όμως, η καταστολή της αύξησης του όγκου ήταν πιο έντονη στα HCT116p53^{-/-} σε σχέση με τα HCT116p53^{+/+} ξενομοσχεύματα, δείχνοντας ότι η στόχευση της IRE1 σε καρκίνους που στερούνται πλήρως την p53 θα μπορούσε να έχει θεραπευτικό όφελος.



Εικόνα 1.11. Ο ρόλος του UPR στα διαφορετικά στάδια εξέλιξης του καρκίνου

Στρες Ε.Δ. επάγεται κατά τον κυτταρικό μετασχηματισμό εξαιτίας των αυξημένων αναγκών για πρωτεΐνες ώστε να επιτευχθεί κυτταρική αύξηση. Αυξημένη δυνατότητα για το δίπλωμα των πρωτεϊνών εξασφαλίζεται από ένα προ-επιβιωτικό UPR. Η UPR σηματοδότηση υποστηρίζει την εγκαθίδρυση του όγκου προωθώντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και τα μονοπάτια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η ταχεία αύξηση ελαττώνει την διαθεσιμότητα οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στον όγκο, οδηγώντας σε επιπλέον στρες Ε.Δ. . Το UPR προωθεί την έκφραση προ-αγγειογενετικών παραγόντων ως απόκριση στην υποξία, επάγοντας την αγγειογένεση. Η ανακατεύθυνση των μεταβολικών μονοπατιών με την μεσολάβηση του UPR επιτρέπει επίσης στον όγκο να εξουδετερώνει την ανεπάρκεια θρεπτικών συστατικών. Διάφοροι κυτταρικοί τύποι προσελκύονται στην περιοχή του όγκου για να προωθήσουν την ανάπτυξή του και να αποφύγουν την ανοσολογική καταστροφή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό του μικροπεριβάλλοντος του όγκου (TME – Tumour microenvironment). Μόλις το μικροπεριβάλλον εγκαθιδρυθεί, το UPR βοηθά τα κύτταρα του όγκου στην EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) ξεπερνώντας το στρες της κυτταρικής αποκόλλησης και επίσης αυξάνει την έκφραση μεταγραφικών

παραγόντων της EMT ελαττώνοντας τους δείκτες διακυτταρικής σύνδεσης, προωθώντας την μετάσταση. Κατά την χημειοθεραπεία, ένα προσαρμοστικό UPR επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να επιβιώσουν και να προωθήσουν την εκροή του φαρμάκου από το κύτταρο, προκαλώντας χημειοαντοχή. Η επαγόμενη από το UPR αυτοφαγία στα καρκινικά κύτταρα και η διαμεσολαβούμενη από το UPR εξάπλωση των θλαστικών καρκινικών κυττάρων υποστηρίζει την επαναύξηση του όγκου. Όπου CAF: ινοβλάστης σχετιζόμενος με τον καρκίνο, ECM: εξωκυτταρική μήτρα, TAM: μακροφάγο σχετιζόμενο με τον όγκο, Treg: ρυθμιστικό T-λεμφοκύτταρο, MDSC: κατασταλτικό κύτταρο που προέρχεται από τα μυελοειδή κύτταρα, EMT: επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση.

Επίσης η προκαλούμενη από το UPR θανάτωση των κυττάρων μπορεί να εξαλείφει κύτταρα που παρουσιάζουν υψηλή ενεργοποίηση ογκογονιδίων και να επιλέγει εκείνα τα κύτταρα που εμφανίζουν είτε χαμηλότερη ενεργοποίηση ογκογονιδίων είτε ελλαττωματικά μονοπάτια κυτταρικού θανάτου. Σε ένα μοντέλο ογκογένεσης κατευθυνόμενο από το ογκογονίδιο H-RAS^{V12}, η μακράς διάρκειας καταστολή της IRE1, του ATF6, του XBP1 ή του ATF4 προκάλεσε επαγωγή του κυτταρικού θανάτου και επίσης οδήγησε στην επιλογή κυττάρων που εκφράζουν χαμηλότερα επίπεδα της ενεργοποίησης του ογκογονιδίου και δυσλειτουργικά μονοπάτια σηματοδότησης του XBP1s και του ATF4 [194].

Εκτός από τους προαναφερθέντες κλασικούς ρόλους για στρες Ε.Δ./ενεργοποίηση UPR στον καρκίνο, πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει επίσης την πιθανότητα ότι μεταλλάξεις στους βασικούς διαμεσολαβητές της UPR σηματοδότησης θα μπορούσαν εν δυνάμει να κατευθύνουν την ανάπτυξη του καρκίνου. Η αλληλούχιση του γονιδιώματος ασθενών από διάφορους τύπους καρκίνου ανέδειξε ότι το γονίδιο ERN1 που κωδικοποιεί την IRE1 είναι ένα από τα 20 κορυφαία μεταλλαγμένα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεϊνικές κινάσες και φέρουν τουλάχιστον μια οδηγό μετάλλαξη [181]. Ο Chevet και οι συνεργάτες [176] σε αναθεώρηση του 2015 παραθέτουν δεδομένα από τις βάσεις COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), cBioPortal και IntOGen όπου φαίνεται ότι κάθε ένας από τους κύριους μεταγωγείς σήματος του UPR εμφανίζει μεταλλάξεις σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Παρόλο αυτά, η λειτουργική σημασία αυτών των μεταλλάξεων δεν έχει μέχρι σήμερα διερευνηθεί εκτενώς.

Συμπερασματικά, η ενεργοποίηση του UPR μηχανισμού αντιπροσωπεύει μια διαδικασία που μπορούν να χρησιμοποιούν τα καρκινικά κύτταρα για να διασφαλίζουν την συνεχιζόμενη επιβίωσή τους. Ωστόσο, η ενεργοποίηση αυτού του μηχανισμού πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά ώστε να εξασφαλίζεται η προσαρμοστική, προ-επιβιωτική φάση και να μην επέρχεται κυτταρικός θάνατος. Κατά αυτό τον τρόπο, ο κυτταρικός μετασχηματισμός μπορεί να θεωρηθεί ως ένα φίλτρο που επιλέγει με θετικό τρόπο τα καρκινικά κύτταρα που έχουν είτε το σωστό επίπεδο στρες Ε.Δ. που μπορεί να αντισταθμιστεί από ένα προσαρμοστικό UPR μηχανισμό ή κύτταρα τα οποία έχουν επανασυνδέσει το δίκτυο

σηματοδότησης του UPR ώστε να καταστέλλει ενεργά την τελική σηματοδότηση πριν τον κυτταρικό θάνατο.

1.2.1.2 Συμμετοχή της IRE1 Σηματοδότησης στην Ρύθμιση της Αύξησης του Όγκου

Μετά τον επιτυχή μετασχηματισμό των κυττάρων σε καρκινικά η επόμενη πρόκληση για τους συμπαγείς όγκους είναι να εξασφαλίσουν την συνεχιζόμενη αύξηση και την εξάπλωσή τους σε άλλα μέρη του σώματος. Το σηματοδοτικό μονοπάτι IRE1-XBP1s έχει συνδεθεί με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε αρκετούς καρκίνους που περιλαμβάνουν τον καρκίνο του παχέος εντέρου, του μαστού, του προστάτη και το μελάνωμα. Η καταστολή της έκφρασης της IRE1 σε ένα σύνολο καρκινικών κυτταρικών σειρών του παχέος εντέρου μείωσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [195]. Ομοίως, η αναστολή της ενεργότητας της IRE1 RNάσης μείωσε το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων του μαστού *in vitro* [178]. Η μείωση αυτή στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό δεν σχετίζεται με αυξημένο κυτταρικό θάνατο αλλά συνδέεται *in vitro* με το σταμάτημα των κυττάρων στην φάση G1 [178, 195], δείχνοντας ότι η IRE1 σηματοδότηση μπορεί να επιδράσει πάνω στην δυναμική του κυτταρικού κύκλου. Το σύμπλοκο Κυκλίνης D1:CDK4 προωθεί την κίνηση μέσω της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου μέσω αναστολής της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος. Καταστολή της IRE1 σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου οδήγησε σε ενεργοποίηση της PERK η οποία προκάλεσε σταμάτημα στην μετάφραση μέσω φωσφορυλίωσης του eIF2α. Η προκύπτουσα μείωση στην μετάφραση της β-κατενίνης ελάττωσε την έκφραση της κυκλίνης D1 [195], παρέχοντας ένα σκεπτικό για την μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Παρόμοια στον καρκίνο του προστάτη, η έκφραση της IRE1 έχει συνδεθεί με την διατήρηση ενός άλλου μέλους της οικογένειας των κυκλινών, την κυκλίνη A1, ενισχύοντας την σημασία της IRE1 σηματοδότησης για την διατήρηση της κυτταρικής διαίρεσης στα καρκινικά κύτταρα [196]. Παρόλο αυτά, ενώ ο άξονας δράσης της IRE1 έχει δειχθεί ότι προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η σχέση ανάμεσα στον UPR μηχανισμό και τον κυτταρικό κύκλο είναι αρκετά πολύπλοκη.

1.2.1.3 Συμμετοχή της IRE1 Σηματοδότησης στην Ρύθμιση του Μεταβολισμού του Όγκου – Επιβίωση σε Περιβάλλον Υποξίας και Έλλειψης Θρεπτικών Συστατικών

Εκτός από την διατήρηση του υψηλού πολλαπλασιαστικού δυναμικού στα καρκινικά κύτταρα, κυρίως στα πρώτα στάδια της εγκαθίδρυσης του όγκου, μια άλλη πρόκληση που πρέπει να αντιμετωπιστεί είναι η διατήρηση του πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας σε ένα υποξικό και στερούμενο θρεπτικών συστατικών περιβάλλον. Οι όγκοι ξεπερνούν γρήγορα την διαθέσιμη αιματική παροχή τους με αποτέλεσμα να εμφανίζουν ετερογενή διαθεσιμότητα οξυγόνου σε όλο τον όγκο, με κάποιες περιοχές να έχουν λίγο ή καθόλου οξυγόνο. Τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS-Reactive oxygen species) αυξάνονται εντός των κυττάρων που εκτίθενται σε υποξία, ενισχύοντας το στρες Ε.Δ. και την ενεργοποίηση του UPR [13, 197]. Η ενεργοποίηση των δράσεων τόσο της IRE1 όσο και της PERK βοηθούν στην κυτταρική επιβίωση σε υποξικές συνθήκες (**Εικόνα 1.11**). Κύτταρα χωρίς XBP1 παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα επιβίωσης *in vitro* μετά από έκθεση σε συνθήκες υποξίας [198]. Επιπλέον, μετασηματοδοτούμενα MEFs χωρίς καθόλου XBP1 εμφάνισαν μειωμένο σχηματισμό ξενομοσχεύματος *in vivo* όταν συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου [198], επισημαίνοντας τον ρόλο της XBP1s σηματοδότησης στην προσαρμογή των κυττάρων σε υποξικές συνθήκες. Με ποιον ακριβώς τρόπο ο σηματοδοτικός άξονας IRE1-XBP1s συμβάλλει σημαντικά στην κυτταρική επιβίωση κατά την υποξία δεν έχει κατανοηθεί πλήρως αλλά μια πρόσφατη σχετικά αναφορά προτείνει ότι πιθανόν συμβαίνει μέσω αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα 1α τον επαγόμενο από την υποξία (HIF1α) [199]. Σε ένα μοντέλο τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού (TNBC), ο Chen και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι ο HIF1α εξαρτάται από τον XBP1s για την αποδοτική μεταγραφή των γονιδίων στόχων του HIF1α. Οι συγγραφείς έδειξαν ότι ο σχηματισμός του συμπλόκου XBP1s-HIF1α στους υποκινητές των γονιδίων στόχων ήταν κρίσιμος για την μεταγραφή τους, μέσω της πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης II. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, φαίνεται ότι ο άξονας IRE1-XBP1s τουλάχιστον στον TNBC συμβάλλει στην διατήρηση του μεταγραφικού προγράμματος του HIF1α προωθώντας έτσι προσαρμοστικές αποκρίσεις που βοηθούν στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.

Εκτός όμως από την προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων σε υποξικές συνθήκες, τα κύτταρα θα πρέπει επίσης να αντιμετωπίσουν την περιορισμένη παροχή θρεπτικών συστατικών μέχρι να υπάρξει ικανοποιητική αγγείωση του όγκου. Για να αντισταθμίσουν αυτές τις συνθήκες των περιορισμένων θρεπτικών τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν διάφορους τρόπους που περιλαμβάνουν την επανασύνδεση των εξαρτώμενων από το UPR μεταβολικών τους οδών (**Εικόνα 1.11**). Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της εξοζαμίνης (HBP)

παράγει την διφωσφορική ουριδίνη της N-ακετυλογλυκοζαμίνης (O-GlcNAc), η οποία δρα ως υπόστρωμα για την αντίστοιχη τρανσφεράση (OGT) η οποία διευκολύνει την μεταφορά του τμήματος της N-ακετυλογλυκοζαμίνης στο ελεύθερο –OH επιλεγμένων καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης σε μια πρωτεΐνη στόχο [200]. Η αυξημένη δράση του HBP έχει αναφερθεί σε αρκετούς καρκίνους [201]. Πρόσφατα, δείχτηκε ότι στον καρκίνο του μαστού η διατήρηση των επιπέδων της OGT χρειάζεται για την συντήρηση της έκφρασης του HIF1α ενώ η καταστολή της OGT μείωσε την έκφραση του HIF1α προκαλώντας διαταραχές στην γλυκόλυση [202]. Συνεπώς η αύξηση της δραστηριότητας του HBP βοηθά στον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό των καρκινικών κυττάρων, ενώ πρόσφατα ταυτοποιήθηκε το UPR ως ανοδικός ενεργοποιητής του HBP [203, 204]. Υπερέκφραση του XBP1 ή επαγωγή της UPR απόκρισης είτε εξαιτίας φυσιολογικού στρες είτε εξαιτίας χορήγησης φαρμάκων, αύξησε τα επίπεδα των κυριότερων ενζύμων που σχετίζονται με το HBP [204]. Αντιστρόφως, η καταστολή του XBP1 εμπόδισε την επαγόμενη από αστία αύξηση της O-GlcNAc τροποποίησης [204]. Παρόλο αυτά μέχρι σήμερα είναι σχετικά μικρός ο αριθμός των μελετών που έχουν επικεντρωθεί στην διερεύνηση της εξάρτησης των καρκινικών κυττάρων από τον έλεγχο του HBP που εξαρτάται από το UPR.

1.2.1.4 Συμμετοχή της IRE1 Σηματοδότησης στην Ρύθμιση της Φλεγμονώδους Αντίδρασης και Ανοσοαπόκρισης στην Περιοχή του Όγκου.

Εκτός όμως από την εξεύρεση τρόπων για την παράκαμψη των προκλήσεων που σχετίζονται με την περιορισμένη παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών, τα κύτταρα του όγκου πρέπει επίσης να μετριάσουν την αντικαρκινική ανοσοαπόκριση για να εξασφαλίσουν τη συνεχιζόμενη αύξησή τους. Αυτό μπορούν να το επιτύχουν μέσω παραγωγής ανοσοκατασταλτικών παραγόντων που μειώνουν την αντικαρκινική ανοσοαπόκριση [205], αλλά και με τον επαναπρογραμματισμό των διηθητικών ανοσοκυττάρων [206] (**Εικόνα 1.11**). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εκκρίνουν παράγοντες που μεταβιβάζουν το στρες Ε.Δ. σε κύτταρα του ανοσοποιητικού μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται «Διαβιβάσιμο στρες Ε.Δ. (TERS – Transmissible ER Stress)». Μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα (DCs) που εκτέθηκαν σε TERS εμφάνισαν μια κατάσταση ενεργοποίησης που σχετίζεται με την παραγωγή προ-ογκογονικών κυτοκινών και αυξημένων επιπέδων του ενζύμου αργινάση που καταστέλλει τα T-λεμφοκύτταρα [207]. *In vitro*, ενεργοποιημένα με TERS DCs παρουσίασαν μειωμένη ικανότητα διασταυρούμενης αντιγονοπαρουσίασης και ενεργοποίησης CD8+ T-λεμφοκυττάρων [207]. Ενώ ο συνδυασμός *in vivo* ενεργοποιημένων με TERS DCs με καρκινικά κύτταρα σε εκ γενετής

ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια οδήγησε σε επιταχυνόμενη αύξηση του όγκου που σχετιζόταν με μειωμένη διήθηση των CD8+ T-λεμφοκυττάρων. Μια πρόσφατα σχετικά μελέτη δείχνει ότι δενδριτικά κύτταρα που διηθούνται στον όγκο έχουν υψηλά επίπεδα του ματισμένου XBP1, επιταχύνοντας έτσι την εξέλιξη του πρωτοπαθούς και μεταστατικού καρκινώματος των ωοθηκών [208]. Συνεπώς, η ενεργοποίηση του UPR μηχανισμού στα δενδριτικά κύτταρα του όγκου προκαλεί εξασθενημένη ανοσολογική απόκριση που συνοδεύεται από μειωμένο μεταβολισμό λιπιδίων και επακόλουθη μείωση της αντικαρκινικής ανοσίας των T-λεμφοκυττάρων. Η παραγωγή ROS στα σχετιζόμενα με τον όγκο δενδριτικά κύτταρα επάγει ενεργοποίηση της IRE1 και της έκφρασης του XBP1s, προκαλώντας την μη φυσιολογική συσσώρευση λιπιδίων, σχηματίζοντας σταγονίδια λιπιδίων που αναστέλλουν την λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων [208]. Επομένως, η στόχευση του XBP1 στα δενδριτικά κύτταρα αποκαθιστά την ανοσοδιεγερτική λειτουργία τους και επιμηκύνει την επιβίωσή τους στην περιοχή του όγκου προκαλώντας μια προστατευτική ανοσολογική απόκριση που δρα με αντικαρκινικό τρόπο [208]. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν επίσης αναφερθεί με μακροφάγα, όπου η επώασή τους σε μέσο εμπλουτισμένο με παράγοντες από καρκινικά κύτταρα κάτω από στρες Ε.Δ., αύξησε την έκφραση γονιδίων απόκρισης σε στρες Ε.Δ. και προ-φλεγμονωδών κυτοκινών [209, 210].

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι εκτός από την ρύθμιση της λειτουργίας των ανοσοκυττάρων μέσω του TERS, η UPR σηματοδότηση έχει αναφερθεί ότι μειώνει την έκφραση συνδετών στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων όπως του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας τάξεως Ι και των συνδετών MICA/B για την ενεργοποίηση των υποδοχέων των κυττάρων φυσικών φονιάδων (NK) [211-213].

1.2.1.5 Συμμετοχή της IRE1 Σηματοδότησης στην Καρκινική Αγγειογένεση

Οι καρκινικοί όγκοι μπορούν να ξεπεράσουν μερικώς τους περιορισμούς και το στρες που προέρχεται από την ανεπάρκεια οξυγόνου και θρεπτικών μέσω επαγωγής του σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων για την αιμάτωση του όγκου, μια διαδικασία γνωστή ως αγγειογένεση. Η αγγειογένεση λαμβάνει χώρα μέσω της βλάστησης, μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών κυττάρων, και ρυθμίζεται μέσω της έκκρισης διαλυτών παραγόντων που περιλαμβάνουν τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα Α (VEGFA), τον αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (FGF) και τον προερχόμενο από τα αιμοπετάλια αυξητικό παράγοντα (PDGF), με τον VEGFA να είναι ένας από τους πιο καλά χαρακτηρισμένους προ-αγγειογενετικούς παράγοντες [214]. Η σταθεροποίηση του HIF1α αποτελεί έναν καλά μελετημένο μηχανισμό που διευκολύνει της παραγωγή του VEGFA σε

συνθήκες υποξίας. Στον TNBC, η έκφραση του XBP1s ήταν απαραίτητη για να επιτευχθεί η αποδοτική παραγωγή του VEGFA μέσω του HIF1α και να επιτευχθεί η αγγειογένεση [199]. Κύτταρα στα οποία έγινε αποσιώπηση του XBP1 μέσω shRNA προκάλεσε μειωμένη παραγωγή του VEGFA μεταγράφου μετά από επαγωγή υποξίας, και *in vivo* ξеноμοσχεύματα προερχόμενα από αυτά τα κύτταρα εμφάνισαν μειωμένη αγγειογένεση σε σχέση με τα αντίστοιχα αγρίου-τύπου [199]. Έκθεση σε στρες Ε.Δ. που προκλήθηκε είτε με φάρμακα είτε φυσιολογικά π.χ. με στέρηση γλυκόζης, επίσης έχει δειχθεί ότι επάγεται η παραγωγή του VEGFA με έναν τρόπο που δεν εξαρτάται από τον HIF1α (**Εικόνα 1.11**) [215, 216]. IRE1^{-/-} MEFs παρουσίασαν μειωμένη παραγωγή του VEGFA μετά από πρόκληση στρες Ε.Δ. μέσω μιας σειράς φυσιολογικών και φαρμακολογικών επαγωγών [215]. Έκφραση μιας αρνητικά επικρατούσας ισομορφής της IRE1α μέσω διαμόλυνσης σε A549/8 και U87 κύτταρα επίσης περιόρισε την αύξηση του VEGFA που προκλήθηκε μέσω στέρησης γλυκόζης [217]. *In vivo* ξеноμοσχεύματα όγκου από U87 κύτταρα που εκφράζουν την κυρίαρχα αρνητικού τύπου ισομορφή της IRE1α, ήταν μικρότερα σε μέγεθος και χαρακτηρίζονταν από μειωμένο σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων, υπογραμμίζοντας περαιτέρω την εξάρτηση αυτών των όγκων από την IRE1 σηματοδότηση για την επιτυχή αγγειογένεση. Εκτός από τον VEGFA, αναστολή του IRE1 μονοπατιού έχει συνδεθεί με μειωμένη έκφραση και άλλων προ-αγγειογενετικών διαμεσολαβητών όπως η ιντερλευκίνη 6 και η ιντερλευκίνη 8 [218]. Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις παρατηρήσεις, μπορούμε να πούμε ότι η IRE1 σηματοδότηση λειτουργεί κατά κύριο λόγο με προ-αγγειογενετικό τρόπο. Παρόλο αυτά, πρόσφατη εργασία μας που χαρακτηρίζει διάφορους μεταλλαγμένους τύπους της IRE1α στο ανθρώπινο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, δείχνει ότι μεταλλάξεις που οδηγούν σε αυξημένη IRE1-XBP1s σηματοδότηση επάγουν την αγγειογένεση ενώ μεταλλάξεις που ενισχύουν τον IRE1-RIDD σηματοδοτικό άξονα την καταστέλλουν [179]. Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι η ισορροπία ανάμεσα στους δύο σηματοδοτικούς άξονες της IRE1 θα μπορούσε να επηρεάσει εάν τελικά προτιμηθεί ένα προ-αγγειογενετικό ή ένα αντι-αγγειογενετικό αποτέλεσμα.

1.2.1.6 Συμμετοχή της IRE1 Σηματοδότησης στην Κυτταρική Διήθηση και Μετάσταση

Η αγγειογένεση παρέχει στα καρκινικά κύτταρα του όγκου μια λεωφόρο διαφυγής που τους επιτρέπει να δίνουν μεταστάσεις σε άλλα όργανα αλλά πριν αποκτήσουν την ικανότητα να εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να αποκτήσουν ένα διηθητικό μεταναστευτικό φαινότυπο. Η μετάβαση των κυττάρων από την επιθηλιακή προς τη μεσεγχυματική κατάσταση (EMT) είναι μια απαραίτητη κυτταρική διαδικασία κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, που παίζει σημαντικό ρόλο στο

σχηματισμό του μεσοδέρματος και στη μετανάστευση των κορυφαίων νευρικών κυττάρων [219]. Όμως στον καρκίνο, η μη φυσιολογική ενεργοποίηση της EMT κάνει τα καρκινικά κύτταρα του όγκου να χάνουν τις διακυτταρικές επαφές, υιοθετώντας ένα διηθητικό, μεταναστευτικό φαινότυπο που ευνοεί την μετάσταση. Η διαδικασία της EMT καθοδηγείται από αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο Snail1, ο Snail2, ο Zeb1, ο Zeb2 και ο Twist1 [220]. Η ενεργοποίηση αυτών των μεταγραφικών παραγόντων οδηγεί την EMT μέσω της υποέκφρασης δεικτών κυτταρικής προσκόλλησης όπως η E-καντχερίνη και μέσω αύξησης της έκφρασης μεσεγχυματικών δεικτών όπως η βιμεντίνη, με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός μεταναστευτικού φαινοτύπου [220].

Επαγωγή στρες Ε.Δ. έχει αναφερθεί ότι προκαλεί EMT τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [221-224], με άμεση συμμετοχή των μονοπατιών σηματοδότησης IRE1-XBP1s και PERK-eIF2α-ATF4 [223, 225, 226]. Χορήγηση θαψιγαργίνης στην κυψελιδική επιθηλιακή κυτταρική σειρά του αρουραίου RLE6TN έδειξε ότι επάγει την EMT με τρόπο εξαρτώμενο από τους μεταγραφικούς παράγοντες SMAD2/3 και Src [223]. Καταστολή της IRE1 εμπόδισε την ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών. Από την άλλη, αποσιώπηση του XBP1 στην κυτταρική σειρά μεσεγχυματικού τύπου MDA-MB-231 που αφορά στον TNBC επαναφέρει τον φαινότυπό τους σε έναν περισσότερο επιθηλιακού τύπου φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από την αυξημένη έκφραση της E-καντχερίνης και την αποκατάσταση του σχηματισμού διακυτταρικών συνδέσεων [227]. Ο σηματοδοτικός άξονας IRE1-XBP1s έχει επίσης εμπλακεί στην EMT που επάγεται από ένα μέλος της οικογένειας των λυσυλοξειδασών, την όμοια με την λυσυλοξειδάση 2 (LOXL2) [225, 228]. Η ενεργοποίηση της IRE1 εξαρτιόταν από την απομόνωση της GRP78 από την LOXL2 η οποία είχε ως αποτέλεσμα την εξαρτώμενη από τον XBP1s αυξημένη έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Snail1, Snail2, Zeb2 και Tcf3. Αναστολή της ενεργότητας της IRE1 RNάσης από τον μικρομοριακό αναστολέα 4μ8c, μείωσε την διαμεσολαβούμενη από την LOXL2 έλλειψη της E-καντχερίνης και εμπόδισε την μετάβαση σε μια μορφολογία ατράκτου που είναι χαρακτηριστική των κυττάρων μετά την EMT [225]. Αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ότι η έλλειψη της IRE1 σηματοδότησης θα έπρεπε να μειώνει την δυνατότητα των κυττάρων να αποκτήσουν διηθητικό και μεταναστευτικό φαινότυπο μέσω καταστολής της EMT. Όμως, η καταστολή της IRE1 σε κυτταρικές σειρές γλοιώματος έχει συσχετιστεί με αυξημένη διήθηση. Σταθερή έκφραση μιας κυρίαρχα αρνητικού τύπου ισομορφής της IRE1 σε διαμολυσμένα κύτταρα U87 αύξησε την κυτταρική μετανάστευση, η οποία συνδέθηκε με την ενισχυμένη έκφραση της πρωτεΐνης της εξωκυτταρικής μήτρας SPARC που αποτελεί και RIDD στόχο [113]. Σε ανάλογα συμπεράσματα καταλήξαμε και στην πρόσφατη εργασία μας [179] όπου όγκοι ασθενών με πολύμορφο

γλοιοβλάστωμα, χαρακτηρισμένοι ως XBP1+/RIDD- δηλαδή με υψηλή XBP1s και χαμηλή RIDD σηματοδοτική ενεργότητα, παρουσίαζαν ένα περισσότερο μεσεγχυματικού τύπου φαινότυπο συγκρινόμενοι με όγκους που χαρακτηρίστηκαν ως XBP1-/RIDD+.

Μόλις τα καρκινικά κύτταρα περάσουν στην κυκλοφορία του αίματος, η επόμενη πρόκληση που έχουν να αντιμετωπίσουν είναι να διατηρήσουν την επιβίωσή τους κάτω από διαφορετικές συνθήκες αγκυροβόλησης. Η αποκόλληση από την εξωκυτταρική μήτρα έχει αναφερθεί ότι πυροδοτεί μια πτώση στα επίπεδα ATP, οδηγώντας σε ταχεία αύξηση της παραγωγής σε ROS [229]. Για να εξουδετερώσουν τα κύτταρα τα στρεσογόνα ερεθίσματα αυτής της αποκόλλησης χρησιμοποιούν προσαρμοστικούς μηχανισμούς όπως το UPR **(Εικόνα 1.11)**. Καταστολή του XBP1 έχει αναφερθεί ότι ελαττώνει τον σχηματισμό αποικιών σε μαλακό άγαρ σε ένα σύνολο κυτταρικών σειρών του καρκίνου του μαστού [199]. Επίσης σε κυτταρικές σειρές του καρκίνου του παχέος εντέρου, αποσιώπηση της IRE1 οδήγησε σε καταστολή του σχηματισμού σφαιριδίων και μείωσε την αύξηση των εντερικών οργανοειδών [195].

1.2.1.7 Συμμετοχή της IRE1 Σηματοδότησης στην Αντίσταση σε Χημειοθεραπείες

Οι ασθενείς που υφίστανται χημειοθεραπείες αρχικά ανταποκρίνονται στην αγωγή όπως φαίνεται από την συρρίκνωση του όγκου. Όμως, πολλοί αναπτύσσουν σχετικά σύντομα αντίσταση στην χημειοθεραπεία (χημειοαντίσταση) που οφείλεται στο γεγονός ότι ένας μικρός πληθυσμός των καρκινικών κυττάρων προσαρμόζεται ενδογενώς για να εξουδετερώσει αυτό το επιπλέον στρες. Προσαρμογή στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα μπορεί να συμβεί λόγω διαφόρων παραγόντων όπως είναι η αυξημένη εκροή του φαρμάκου, η ενεργοποίηση/απενεργοποίηση και οι μεταβολές στους στόχους των φαρμάκων που εν τέλει προάγουν την αποβολή του φαρμάκου από τον όγκο [230]. Η ετερογένεια των όγκων επίσης αποτελεί μια πρόκληση, που οφείλεται σε έναν φαινοτυπικά διαφορετικό πληθυσμό κυττάρων που μπορεί να ανταποκριθεί διαφορετικά στην ίδια θεραπεία [231]. Για παράδειγμα, οι χημειοθεραπείες τείνουν να στοχεύουν τον ταχέως διαιρούμενο κυτταρικό πληθυσμό, αλλά έχουν μικρή επίδραση στον σχετικά αδρανή πληθυσμό των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSCs). Τα CSCs τείνουν να είναι εγγενώς ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία λόγω της αυξημένης έκφρασης α) μεταβολικών ενζύμων όπως η αφυδρογονάση της αλδεΐδης, β) μελών της οικογένειας των αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών BCL2 [230, 232] και γ) παραγόντων που επάγονται από την υποξία [233].

Η προσαρμοστική ισχύς του UPR αξιοποιείται από τα καρκινικά κύτταρα για την διασφάλιση της επιβίωσής τους κατά την έκθεση σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, με

εμπλοκή και των τριών αξόνων του **(Εικόνα 1.11)**. Καταστολή των GRP78, ATF6, ATF4 και XBP1s έχει συνδεθεί με την επανευαισθητοποίηση των χημειοανθεκτικών κυττάρων [234-236]. Ο XBP1s έχει εμπλακεί στην προώθηση της υποτροπής όγκων του TNBC *in vivo*. Μετά την χορήγηση δοξορουβικίνης, ξενομοσχεύματα της κυτταρικής σειράς MDA-MB-231 αρχικά παρουσίασαν μια μείωση στο μέγεθος του όγκου η οποία όμως ακολουθήθηκε από μια εκ νέου αύξηση μετά την διακοπή της θεραπείας [199]. Σταθερή όμως καταστολή του XBP1s σε αυτά τα ξενομοσχεύματα εμπόδισε την εκ νέου αύξηση του όγκου μετά την διακοπή της δοξορουβικίνης. Επιπλέον, αναστολή της ενεργότητας της IRE1 RNάσης μέσω του μικρομοριακού αναστολέα MKC8866 εμπόδισε την επαναύξηση των ξενομοσχευμάτων της κυτταρικής σειράς MDA-MB-231 μετά την διακοπή της πακλιταξέλης [178], αναδεικνύοντας μια σχέση εξάρτησης ανάμεσα στην XBP1s σηματοδότηση και την επαναύξηση του όγκου. Εξέταση συνόλου δεδομένων από ασθενείς με TNBC υποστηρίζει μια τέτοιου είδους σχέση, με αυξημένη έκφραση μιας γονιδιακής υπογραφής εξαρτώμενης του XBP1 η οποία συσχετίζεται με θετικό τρόπο με μικρότερα ποσοστά επιβίωσης ελεύθερα υποτροπής [199]. Η εξάπλωση των CSCs που καθοδηγείται από την χημειοθεραπεία αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό με τον οποίο θα μπορούσε να υποκινηθεί η υποτροπή του όγκου. Τα CSCs χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να σχηματίζουν σφαίρες όγκων/μαστοσφαίρες και από το χαρακτηριστικό μοτίβο χρώσης CD44^{high}/CD24^{low}. Καταστολή του XBP1 μείωσε το ποσοστό των CD44^{high}/CD24^{low} κυττάρων μετά την χημειοθεραπεία και ελάττωσε την ικανότητά τους να σχηματίζουν μαστοσφαίρες *in vitro* [199]. Ομοίως, αναστολή της IRE1 RNάσης ενεργότητας εξασθένησε την ικανότητα των MDA-MB-231 κυττάρων να σχηματίζουν μαστοσφαίρες μετά την χορήγηση πακλιταξέλης, η οποία αποδόθηκε στη μεσολαβούμενη από τον IRE1, μείωση προ-ογκογενετικών παραγόντων [178].

Στην περίπτωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας έχει δειχθεί ότι τα CSCs είναι ανθεκτικά στην επαγόμενη από στρες Ε.Δ. απόπτωση και καθοδηγούνται αποκλειστικά από την ενεργοποίηση της PERK [237]. Αυτή η επίδραση φαίνεται να είναι ειδική για την PERK καθώς η φαρμακολογική αναστολή της PERK και όχι της IRE1, ευαισθητοποιεί τα CSCs στην επαγόμενη από στρες Ε.Δ. απόπτωση. Όμως, όταν αυτά τα CSCs εκτίθενται σε σισπλατίνη τότε αλλάζουν την σχέση εξάρτησης με την PERK και εμφανίζουν εξάρτηση από την IRE1, η οποία αποδεικνύεται από την επαγωγή της απόπτωσης όταν χορηγηθεί ένας συνδυασμός σισπλατίνης με τον αναστολέα 4μ8C. Αυτό θα μπορούσε να υποδηλώνει ότι τα CSCs ξεπερνούν τα στρεσογόνα ερεθίσματα που προκαλούνται κατά την εξέλιξη του όγκου, ενεργοποιώντας την PERK. Ωστόσο, η έκθεσή τους στο επιπλέον στρες της χημειοθεραπείας

αναγκάζει τα CSCs να αλλάζουν εξάρτηση από την PERK στην IRE1 για να αποφύγουν πιθανόν τον επαγόμενο από την CHOP κυτταρικό θάνατο.

Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα CSCs και τα πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιούν διαφορετικούς άξονες του UPR για να συμπληρώσουν τους δικούς τους καθιερωμένους ογκογενετικούς μηχανισμούς για να ξεπεράσουν την χημειοθεραπεία. Η επιλεκτική ενεργοποίηση ενός άξονα του UPR μπορεί να εξαρτάται όμως και από άλλους ενδογενείς μηχανισμούς που οδηγούν τελικά σε χημειοαντοχή.

1.3 Το Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα (GBM) ως Πρότυπο Καρκινικό Μοντέλο στην Μελέτη του Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου και του Μηχανισμού Δράσης της IRE1 Πρωτεΐνης στον Καρκίνο

Το πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (GBM) αποτελεί τον πιο διαδεδομένο και θανάσιμο τύπο καρκίνου του εγκεφάλου σε ενήλικες αφού η πλειονότητα των ασθενών αποβιώνει κατά μέσο όρο εντός 15 μηνών από την στιγμή της διάγνωσης ενώ το ποσοστό επιβίωσης στην 5ετία είναι μικρότερο του 5% [238, 239]. Πρόκειται για μια πολύ επιθετική και μη-θεραπεύσιμη μορφή γλιώματος (βαθμού IV αστροκύτωμα σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας) με μεγάλη ετερογένεια στους κυτταρικούς τύπους που περιλαμβάνει ο καρκινικός όγκος, ο οποίος επίσης παρουσιάζει μεγάλο βαθμό διηθητικότητας γεγονός που δυσχεραίνει τα οφέλη της χειρουργικής επέμβασης και της στοχευμένης ακτινοθεραπείας [240]. Για να περιοριστούν οι υποτροπές του όγκου από την διήθηση των κυττάρων, η χημειοθεραπεία με Τεμοζολομίδη (TMZ) εφαρμόζεται μετά την χειρουργική επέμβαση μαζί με την χρήση ακτινοβολίας [241]. Παρόλο που αυτή η συνδυαστική θεραπεία έχει επιδείξει κάποια θετικά αποτελέσματα, η μόνη αύξηση που επιφέρει στη διάμεση επιβίωση των ασθενών είναι από τους 12.1 στους 14.6 μήνες. Συνεπώς η κατανόηση των βιολογικών διαδικασιών της εξέλιξης του όγκου και της αντοχής στην θεραπεία αποτελεί μια μεγάλη πρόκληση για να μπορέσουν να αναπτυχθούν περισσότερο αποδοτικές θεραπείες.

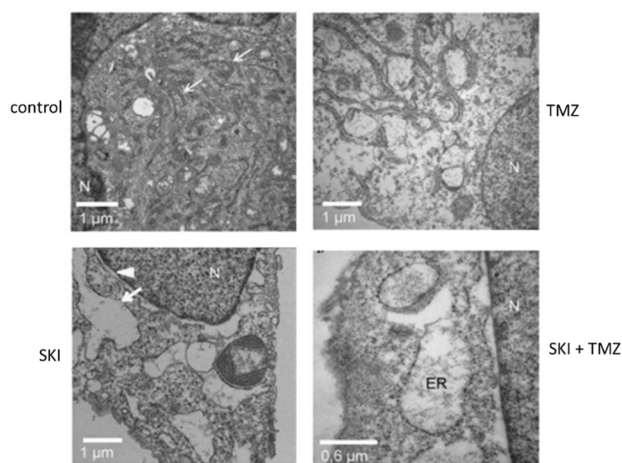
Γονιδιακές μεταλλάξεις οδηγιοί (driver mutations) έχουν ταυτοποιηθεί στο GBM σε ογκογενετικά γονίδια όπως το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος, της p53, και του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης, επηρεάζοντας την σηματοδοτική τους δράση, αλλά η στόχευση αυτών των μονοπατιών δεν έχει ακόμη οδηγήσει σε αποτελεσματική θεραπεία [240, 242]. Η αποτύπωση του μεταγραφικού προφίλ των GBM όγκων οδήγησε επίσης στην ταυτοποίηση αρκετών υποτύπων, όπως ο προνευρωνικός (PN), ο κλασικός και ο μεσεγχυματικός (MES). Ο PN και ο MES εμφανίζονται πιο διακριτοί ενώ ο MES GBM είναι ο πιο επιθετικός με την χειρότερη πρόγνωση [243]. Πρόσφατα η μεταλλακτική κατάσταση του γονιδίου της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (IDH) και η κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή του MGMT γονιδίου αποτέλεσαν προγνωστικούς δείκτες του GBM [244].

Όπως ήδη έχουμε αναφέρει στην ενότητα 1.2 οι συμπαγείς όγκοι όπως και το GBM αναπτύσσονται κάτω από ιδιαίτερα αυξημένο στρες Ε.Δ. τόσο εξαιτίας ενδογενών όσο και εξωγενών παραγόντων που διαταράσσουν την πρωτεόσταση του Ε.Δ. και κατ' επέκταση όλου του κυττάρου. Εντούτοις τα στρεσογόνα ερεθίσματα αναγκάζουν τους όγκους να στρατολογήσουν προς όφελός τους μηχανισμούς και μοριακά μονοπάτια που προορίζονται για κυτταροπροστασία και κυρίως για το δίπλωμα των πρωτεϊνών και την δομική σταθεροποίησή

τους. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την αύξηση της έκφρασης των συνοδών πρωτεϊνών/πρωτεϊνών θερμικού σοκ στο κυτταρόπλασμα (και σε κυτταρικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια και το Ε.Δ.), συμπεριλαμβανομένου των σηματοδοτικών αξόνων του UPR [162, 245]. Παρόλο που η μελέτη του UPR δεν έχει ακόμη μελετηθεί εκτενώς στο GBM υπάρχουν πολλές ενδείξεις που μας δείχνουν ότι πρόκειται για έναν τύπο καρκινικού όγκου με ιδιαίτερα ενεργοποιημένο UPR μηχανισμό. Αναφορικά θα λέγαμε ότι α) τα καρκινικά κύτταρα του GBM πολλαπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό [246, 247], γεγονός που απαιτεί την βιοσύνθεση και την κινητοποίηση μεγάλων ποσοτήτων λιπιδίων αλλά και την παραγωγή μεγάλης ποσότητας πρωτεϊνών που πρέπει να διπλώσουν και να τροποποιηθούν κατάλληλα, β) τα κύτταρα του όγκου μπορούν να μεταναστεύουν και είναι διηθητικά σε μεγάλο βαθμό με ισχυρές αγγειογενετικές ιδιότητες [248, 249], έχοντας έτσι την ανάγκη για μια ενεργή εξωκυτταρική εκκριτική διαδικασία και ένα δυναμικό μικροπεριβάλλον στην επιφάνεια των κυττάρων και γ) πρόκειται για όγκους που είναι εγγενώς ή προσαρμοστικά ανθεκτικοί σε όλες ουσιαστικά τις χημειοθεραπευτικές ουσίες και μπορούν να ανεχθούν υψηλή δόση ακτινοβολίας [173, 250, 251], εμφανίζοντας αυξημένες αποκρίσεις στο στρες έναντι ενδογενών και εξωγενών απειλών [252, 253]. Όλα αυτά τα απειλητικά για την ζωή ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των GBM όγκων αποκτώνται κυρίως μέσω της σηματοδοτικής δράσης του UPR, το οποίο εξασφαλίζει αφενός την λειτουργία της εκκριτικής οδού και αφετέρου προάγει την αντοχή στο στρες μέσω τροποποίησης του κυτταρικού μεταβολισμού [253-255].

Η σημαντική συμβολή του UPR στην δημιουργία, αύξηση και εξέλιξη του GBM είχε προταθεί αρκετά χρόνια πριν τόσο σε πρωτογενείς καρκινικές κυτταρικές σειρές όσο και σε ξеноμοσχεύματα αλλά και βιοψίες ασθενών μετά από χειρουργική εκτομή [256]. Σε όλα αυτά τα δείγματα είχε δειχθεί ότι πολλά στοιχεία του UPR ήταν ιδιαίτερα αυξημένα και τα επίπεδα mRNA της GRP78, GRP94 καθώς και του XBP1s σχετίζονταν ανάλογα με την κακή πρόγνωση. Από την άλλη πλευρά, αρκετές λειτουργικές μελέτες έχουν δείξει ότι η στόχευση της έκφρασης της IRE1 ή της IRE1 RNάσης ενεργότητας ελαττώνει την εξέλιξη ποικίλων τύπων καρκίνου, κυρίως λόγω της απώλεσης των προεπιβιωτικών δράσεων του XBP1 στην αύξηση του όγκου [176, 251], σημειώνοντας την λειτουργική εμπλοκή της IRE1 σε διάφορα πειραματικά μοντέλα του GBM [113, 115, 217, 218, 257]. Χαρακτηριστική είναι η μεταβολή που παρατηρείται στη δομή του Ε.Δ. στο GBM σε εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, κάτω από συνθήκες αυξημένου στρες Ε.Δ. λόγω χημειοθεραπειών, όπου απεικονίζονται έντονα οι διογκωμένοι μεμβρανώδεις αγωγοί που το απαρτίζουν (**Εικόνα 1.12**). Επιπρόσθετα, κύτταρα GBM που υφίστανται στρες Ε.Δ. σταμάτησαν αρχικά την παραγωγή πρωτεϊνών, αλλά εντός μίας ώρας είχαν ξαναρχίσει την πρωτεϊνοσύνθεση, φθάνοντας σε σχεδόν φυσιολογικά

επίπεδα εντός 4 ωρών – παρά το γεγονός ότι ο στρεσογόνος παράγοντας παραμένει στην καλλιέργεια αυτές τις 4 ώρες. Η επαναφορά της πρωτεϊνοσύνθεσης οδήγησε τελικά σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των GBM κυττάρων μετά από στρες Ε.Δ. λόγω του UPR μηχανισμού, μαζί με μια ισχυρή αντίσταση στην χημειοθεραπεία.

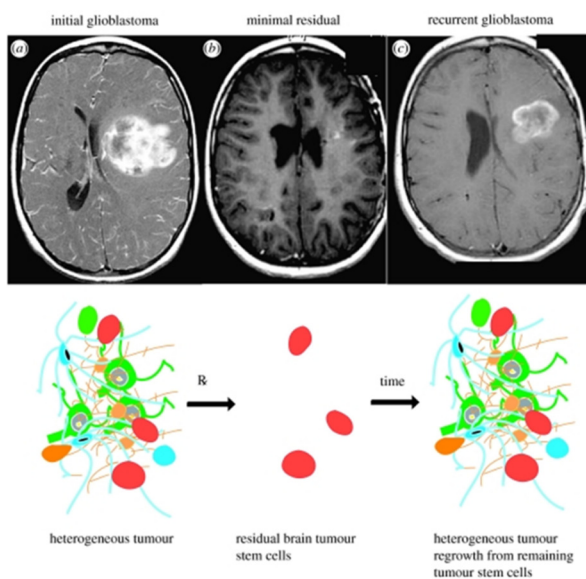


Εικόνα 1.12. Μεταβολές στην δομή του Ε.Δ. κάτω από χημειοθεραπευτικό στρες

Η χορήγηση του αναστολέα της κινάσης της σφιγγοσίνης (SKI) σε κύτταρα GBM, NCH82, είτε ως μονοθεραπεία είτε ως συνδυασμός με την τεμοζολομίδη (TMZ) επάγει στρες Ε.Δ. και οδηγεί σε διόγκωση των αγωγών του Ε.Δ. Τα κύτταρα επώαστηκαν με 10 μ M SKI, 500 μ M TMZ είτε συνδυασμό τους και παρατηρήθηκαν 48 ώρες αργότερα με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα βέλη υποδεικνύουν αγωγούς του αδρού Ε.Δ. ενώ μια κεφαλή βέλους δείχνει την πυρηνική μεμβράνη του πυρήνα (N) του κυττάρου. Τα επίπεδα της GRP78 (BiP) αυξήθηκαν ακολουθώντας χρονοεξαρτώμενη μεταβολή ως απόκριση στον SKI ή (SKI+TMZ), ενώ ο προ-αποπτωτικός παράγοντας CHOP του UPR μετατοπίστηκε στον πυρήνα μετά την χορήγηση SKI και SKI+TMZ. Σημειώνεται α) ότι δεν παρατηρήθηκαν άλλες ανωμαλίες σε ενδοκυτταρικά οργανίδια και β) η κινάση της σφιγγοσίνης υπερεκφράζεται συνήθως σε GBM όγκους και συνεισφέρει στην αύξηση του όγκου και την μετανάστευση [258].

Επίσης ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό των GBM όγκων που αξίζει να επισημανθεί είναι η κυτταρική τους ετερογένεια. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του γλοιοβλαστώματος (GSCs) αποτελούν σημαντικό στοιχείο του όγκου που εντοπίζεται κυρίως στον αγγειακό θώκο και έχει δειχθεί ότι διαθέτουν έντονη την ικανότητα ανανέωσης και διαφοροποίησης, και θεωρούνται οδηγοί της αύξησης, της αντίστασης στις χημειοθεραπείες και την ακτινοβολία αλλά και της υποτροπής των GBM όγκων (**Εικόνα 1.13**) [259, 260]. Νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν αποτελεσματικά τα GSCs έχουν κριθεί απαραίτητες για την βελτίωση της πρόγνωσης των ασθενών. Είναι αξιοσημείωτο ότι το UPR έχει συνδεθεί με τον επαναπρογραμματισμό της γονιδιακής έκφρασης κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του όγκου και με την ρύθμιση των ιδιοτήτων υγιών και νεοπλασματικών βλαστικών κυττάρων [176, 261]. Στηριζόμενοι σε αυτές τις παρατηρήσεις έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια καινοτόμες θεραπευτικές στρατηγικές που στοχεύουν στην επιδείνωση των προϋπαρχόντων (χρόνιων) συνθηκών στρες Ε.Δ. των καρκινικών κυττάρων είτε μέσω

ενίσχυσης του στρες Ε.Δ. είτε μέσω αναστολής των προσαρμοστικών UPR αποκρίσεων επιβίωσης [262-264].

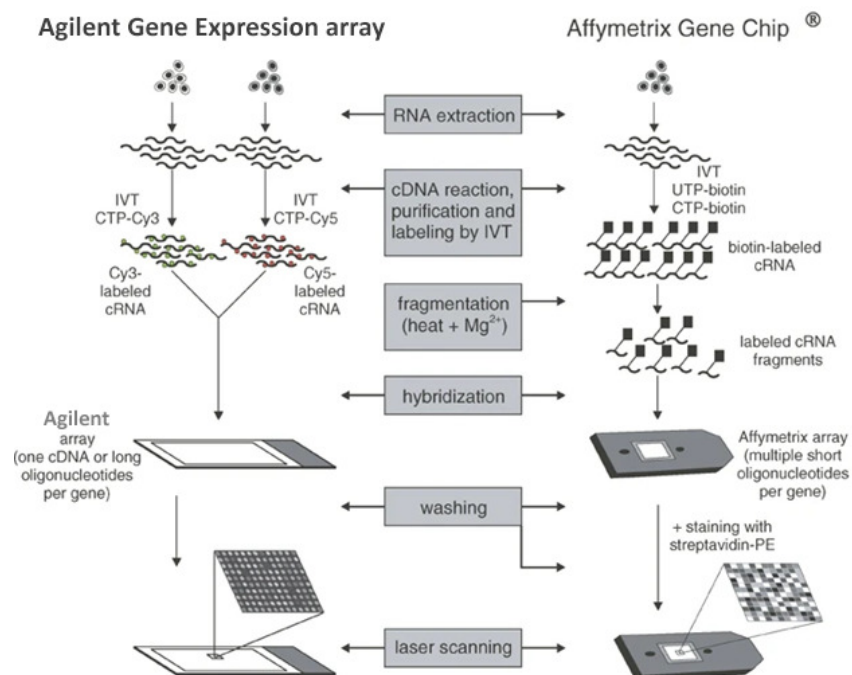


Εικόνα 1.13. Ο κομβικός ρόλος των καρκινικών βλαστικών κυττάρων στην επαναύξηση και εξάπλωση του GBM

Η μέχρι τώρα μελέτη των καρκινικών βλαστικών κυττάρων δείχνει ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα είναι ανθεκτικά στις συμβατικές θεραπείες και ευθύνονται σε σημαντικό βαθμό για την αναγέννηση του όγκου. Στο πάνω μέρος της εικόνας απεικονίζονται οι μαγνητικές τομογραφίες ενός γλοιοβλαστώματος στο αριστερό ημισφαίριο του εγκεφάλου που αφορούν (α) στην αρχική απεικόνιση του όγκου, (β) στην κατάσταση μετά από πολυτροπική θεραπεία και (γ) στην επανεμφάνιση του όγκου. Υποστηρίζεται ότι η θεραπεία εξάλειψε το μεγαλύτερο μέρος του όγκου, αλλά τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του όγκου διέφυγαν (στο κάτω μέρος της εικόνας απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα). Αυτά τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα αναγεννούν τον ετερογενή όγκο οδηγώντας σε κλινική επανεμφάνισή του.

2 Υλικά και Μέθοδοι

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής διεξήχθη ανάλυση μεταγραφικών δεδομένων μικροσυστοιχιών Affymetrix (<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/microarray-analysis.html>) και Agilent (<https://www.agilent.com>) (Εικόνα 2.1) καθώς και δεδομένων αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS-Next generation data), RNA-seq και miRNAseq δεδομένα [265, 266], που προέρχονταν είτε από μεγάλα δημόσια αποθετήρια ασθενών με καρκίνο, είτε από *in-house* βάσεις δεδομένων που αφορούσαν σε βιοψίες ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα ή σε πειραματικά κυτταρικά και ζωικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται στη μελέτη του ανθρώπινου γλοιοβλαστώματος αλλά και άλλων τύπων καρκίνου εν γένει. Επιχειρήθηκε η ταυτοποίηση συσχετίσεων και λειτουργικών κυκλωμάτων της IRE1 πρωτεΐνης μέσω της χαρτογράφησης του μεταγραφικού προφίλ των δειγμάτων και της εκτίμησης του βαθμού σύνδεσης των μεταγραφικών προτύπων τόσο μεταξύ τους όσο και με πληθώρα βιοχημικών, ανοσολογικών, κλινικών και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, που πηγάζουν από διάφορες πειραματικές δοκιμασίες που συνόδευαν τα προαναφερθέντα γενωμικά δεδομένα.



Εικόνα 2.1. Αρχή μεθόδων Agilent και Affymetrix μικροσυστοιχιών

Σύγκριση της αρχής μεθόδου των μικροσυστοιχιών της Agilent και της Affymetrix που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γονιδιακής έκφρασης των δειγμάτων. Για τα πειράματα των Agilent μικροσυστοιχιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ένας είτε συνήθως δύο κυτταρικοί πληθυσμοί, όπως για παράδειγμα καρκινικά και φυσιολογικά κύτταρα. Ακολουθεί απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA που χρησιμοποιείται για *in vitro* μεταγραφή (IVT) με ιχνηθετημένα νουκλεοτίδια με Κυανίνη3 (Cy3) ή Κυανίνη5 (Cy5). Τα σημασμένα cRNA δείγματα αναμιγνύονται και υβριδοποιούνται στην μικροσυστοιχία, η οποία σαρώνεται με laser scanner για την καταγραφή των επιπέδων έντασης της εικόνας. Στις Affymetrix μικροσυστοιχίες, ένας αρχικός κυτταρικός

πληθυσμός χρησιμοποιείται για την απομόνωση του RNA και την σύνθεση cDNA. Το cDNA χρησιμοποιείται σε μια IVT αντίδραση για την παραγωγή βιοτινυλιωμένου cRNA. Μετά την τμηματοποίηση συτό το cRNA υβριδοποιείται στις μικροσυστοιχίες, ξεπλένεται και βάφεται με στρεπταβιδίνη συζευγμένη με φυκοερυθρίνη, ενώ στη συνέχεια η εικόνα των εντάσεων σαρώνεται με laser scanner για την καταγραφή των τιμών έντασης (Επεξεργασμένη πληροφορία από την δημοσίευση [267]).

Η πλειονότητα των *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων που αφορούσαν στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα διεξήχθη στο εργαστήριο Ογκογένεσης και Σηματοδότησης λόγω Στρες του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας και Ιατρικής Έρευνας της Γαλλίας (INSERM) (<https://www.inserm.fr>), κάτω από την καθοδήγηση του Καθηγητή και Διευθυντή Ερευνών Eric Chevet. Βιοχημικές και ανοσολογικές δοκιμασίες που αφορούσαν στις καρκινικές κυτταρικές σειρές του κακοήθους μελανώματος και στα φυσικά κύτταρα-φονιάδες (Natural Killer cells ή NKs) έλαβαν χώρα στο εργαστήριο Σηματοδότησης λόγω Στρες του Ινστιτούτου Φαρμακευτικής Έρευνας του Τμήματος Ιατρικής (<https://medicine.ekmd.huji.ac.il/en/pages/default.aspx>) στη Φαρμακευτική Σχολή του Εβραϊκού Πανεπιστημίου της Ιερουσαλήμ στο Ισραήλ, κάτω από την καθοδήγηση του Καθηγητή Boaz Tirosh. Τέλος, βιοχημικά και μεταγραφικά πειραματικά δεδομένα που αφορούσαν στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB-231 προέρχονταν από το Κέντρο Έρευνας για την Απόπτωση (Apoptosis Research Center) του Τμήματος Φυσικών Επιστημών του Εθνικού Πανεπιστημίου της Ιρλανδίας στο Γκάλγουεϊ (<https://www.nuigalway.ie>), υπό την καθοδήγηση του Καθηγητή Βιολογίας του Καρκίνου, Afshin Samali.

2.2 Πειραματικό Βιολογικό Υλικό

Τα βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραματικών δοκιμασιών και την παραγωγή δεδομένων αφορούσε α) πρωτογενείς καλλιέργειες γλοιοβλαστώματος της κυτταρικής σειράς U-251 MG (RRID:CVCL_0021) (Sigma, St Louis, MO, USA) και U-87 MG (RRID:CVCL_0022) (ATCC), άγριου τύπου (WT) αλλά και μεταλλαγμένων κλώνων (P336L, A414T, S769F, or Q780*) για την IRE1 πρωτεΐνη, β) νευροσφαίρες (ή νευροσφαιρίδια) RNS, πλούσιες σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενες από όγκους ανθρώπινου γλοιοβλαστώματος μετά από τον μηχανικό διαχωρισμό των καρκινικών ιστών, την κυτταρική απομόνωση και ανάπτυξή τους σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο για την δημιουργία αιωρούμενων νευροσφαιριδίων, αλλά και των προερχόμενων από αυτές διαφοροποιημένων νευροσφαιριδίων RADH κάτω από συνθήκες κυτταρικής προσκόλλησης [268, 269], γ) το ορθοτοπικό μοντέλο ξενομοσχεύματος ποντικού κατόπιν εμφύτευσης με πρωτογενείς κυτταρικές σειρές ανθρώπινου γλοιοβλαστώματος (CLX-Cell Line Xenograft) [270], δ) το προκλινικό μοντέλο ποντικού αλλομοσχεύματος (συγγενικό μοντέλο) με γλοιοβλάστωμα προερχόμενο από την κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος του ποντικού GL261 [271], ε) πρωτογενείς καλλιέργειες της κυτταρικής σειράς MDA-MB-231 (RRID:CVCL_0062) (<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/mda-mb-231-cell-line>) που χρησιμοποιείται για την μελέτη του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού (TNBC) (<https://www.cdc.gov/cancer/breast/triple-negative.htm>) [272] και στ) βιοψίες καρκινικών όγκων, ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (GBM), δερματικό μελάνωμα (Skin Cutaneous Melanoma - SKCM, εξαιρώντας το μελάνωμα των άκρων λόγω διαφορετικού φαινοτυπικού προφίλ και χαμηλού ποσοστού ασθενών), αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου (Colorectal Cancer - CRC, εξαιρώντας το αδενοκαρκίνωμα του ορθού λόγω του μικρότερου αριθμού ασθενών), ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης (Bladder Urothelial Carcinoma - BLCA), καρκίνο του μαστού (Breast invasive carcinoma - BRCA), αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα (Lung adenocarcinoma - LUAD), καρκίνωμα πλακώδους κυττάρου του πνεύμονα (Lung squamous cell carcinoma - LUSC), αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος (Pancreatic adenocarcinoma - PAAD), ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Liver hepatocellular carcinoma - LIHC), διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού (Kidney renal clear cell carcinoma - KIRC), αδενοκαρκίνωμα του προστάτη (Prostate adenocarcinoma - PRAD), καρκίνο ωοθηκών (Ovarian serous cystadenocarcinoma - OV) και αδενοκαρκίνωμα του στομάχου (Stomach adenocarcinoma - STAD), εγγεγραμμένων είτε σε *in-house* είτε σε δημόσιες βάσεις δεδομένων.

2.3 Πειράματα Μεγάλης Κλίμακας και Υπολογιστικές Μέθοδοι Ανάλυσης

2.3.1 Μικροσυστοιχίες Μεταγραφώματος (Affymetrix και Agilent)

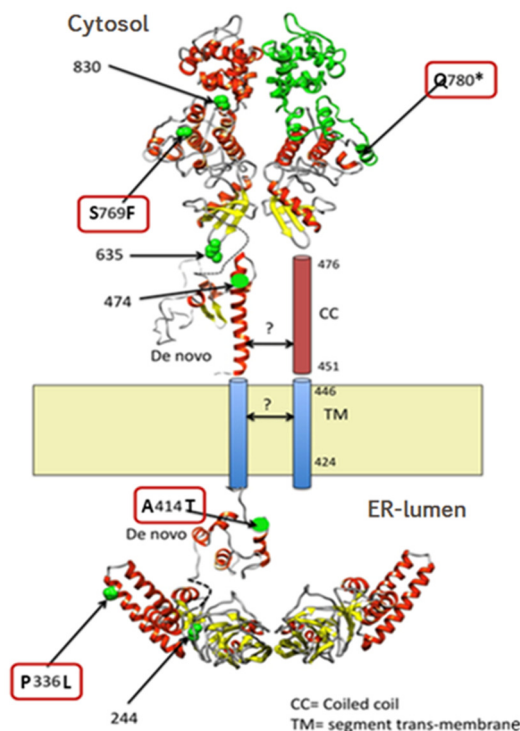
Στο πλαίσιο της λειτουργικής γονιδιωματικής διερευνήσαμε την δυναμική σχέση ανάμεσα στο γονιδίωμα και μεταγράψωμα του βιολογικού υλικού και στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που αντικατοπτρίζουν την δράση της IRE1 πρωτεΐνης στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου, αξιοποιώντας πειραματικά δεδομένα εξαγόμενα από δοκιμασίες μεγάλης κλίμακας που μας παρέχουν οι “omics” τεχνολογίες [273], με κυρίαρχες τις μικροσυστοιχίες μεταγραφώματος και την RNA-αλληλούχιση. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν μεταγραφικά δεδομένα από πειράματα μικροσυστοιχιών που έλαβαν χώρα κατά την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής αλλά και αξιοποιήθηκαν τα μεταγραφικά δεδομένα μικροσυστοιχιών που ήταν ήδη καταχωρημένα σε γνωστές βάσεις δεδομένων.

2.3.1.1 Μικροσυστοιχία HT_HG-U133_Plus_PM (Affymetrix) – Υπολογιστική Ροή Εργασίας για την Επεξεργασία και Ανάλυση Μεταγραφικών Δεδομένων των Μεταλλαγμένων για την IRE1 Κλώνων της Κυτταρικής Σειράς U87

Πρόκειται για μια *in situ* μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων που επιτρέπει την ποσοτική εκτίμηση της γονιδιακής έκφρασης του ανθρώπινου γονιδιώματος για περισσότερα από 47.000 μετάγραφα και παραλλαγών τους, τα οποία αντιστοιχούν σε περισσότερα από 33.000 καλά χαρακτηρισμένα γονίδια και Unigene clusters (<http://www.bioinfo.org.cn/relative/NCBI-UniGene.htm>) ανα δείγμα. Αντιπροσωπεύεται στην βάση Gene Expression Omnibus (GEO) [274] του NCBI με τον αναγνωριστικό κωδικό πλατφόρμας GPL13158.

Η συγκεκριμένη μικροσυστοιχία χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του μεταγραφώματος κυττάρων γλοιοβλαστώματος U87-MG μετά από διαμόλυνση τόσο με τις μεταλλαγμένες μορφές (P336L, Q780*- stop mutation, S769F και A414T) (**Εικόνα 2.2**) της IRE1α πρωτεΐνης όσο και με την αγρίου-τύπου (WT- wild type) αλλά και την κυρίαρχα αρνητική μορφή (DN-dominant negative) [141]. Κύτταρα διαμολυσμένα με τον άδειο φορέα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες και εφαρμόστηκαν τόσο φυσιολογικές (basal) συνθήκες όσο και συνθήκες στρες μετά από χορήγηση τουνικαμικίνης (0.5 μg/mL) για 16 ώρες. Το αντιβιοτικό τουνικαμικίνη αποτελεί αναστολέα της N-γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών και επάγει στρες Ε.Δ. Κάθε συνθήκη αντιπροσωπευόταν από τρία βιολογικά δείγματα με εξαίρεση τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με την κυρίαρχα αρνητική παραλλαγή που

αντιπροσωπευόταν από δύο δείγματα (**Πίνακας 1**). Το συγκεκριμένο πείραμα υποβλήθηκε στην Gene Expression Omnibus και φέρει σειρά κατάθεσης GSE107859 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE107859>) [179].



Εικόνα 2.2. Σωματικές μεταλλάξεις της IRE1α στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα

Μοντέλο στερεοδομικής απεικόνισης των υπομονάδων της ανθρώπινης IRE1α πρωτεΐνης στον αυλό του ΕΔ και το κυτοσόλιο όπου απεικονίζονται οι βασικές θέσεις μετάλλαξης. Σε κόκκινο πλαίσιο καταγράφονται εκείνες που αφορούν στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα και εξετάζονται για την επίδρασή τους στην σηματοδοτική δράση της IRE1α. Οι «κυτοσολικές» μεταλλάξεις S769F and Q780* εντοπίζονται στην υπομονάδα κίνησης της IRE1 ενώ οι αποκαλούμενες «αυλικές» μεταλλάξεις P336L and A414T εντοπίζονται θεωρητικά σε α-ελικοειδείς υπομονάδες. Η μετάλλαξη A414T ταυτοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, κατόπιν αλληλούχισης των εξωνίων του IRE1 γονιδίου (ERN1) σε 23 δείγματα ασθενών με GBM. Αυτή η σωματική μετάλλαξη προήλθε από έναν επιθετικό, μεσεγχευματικού τύπου όγκο που είχε αναπτυχθεί σε μια γυναίκα 70 ετών.

Για την επεξεργασία και ανάλυση των πρωτογενών δεδομένων έντασης της μικροσυστοιχίας (CEL files) χρησιμοποιήθηκαν αλγόριθμοι και υπολογιστικά πακέτα μεταφραστικής βιοπληροφορικής του λογισμικού Bioconductor [275, 276] μέσα στο ανοιχτό (open-source) περιβάλλον της πλατφόρμας Rstudio (<https://www.rstudio.com>) όπου υλοποιείται η στατιστική γλώσσα προγραμματισμού R (<https://www.r-project.org>), σε λειτουργικό σύστημα Windows 7 και Ubuntu 16.04. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα πακέτα λογισμικού «affy» [277] και «affyPLM» [278] για την διόρθωση υποβάθρου με την μέθοδο Robust Multi-Array Average (RMA) [279] και έγινε κανονικοποίηση μεταξύ των arrays/δειγμάτων με την κανονικοποίηση σε ποσοστημόρια (Quantile normalization) ώστε να

έχουμε συγκρίσιμες κατανομές. Στη συνέχεια εφαρμόσαμε φιλτράρισμα των τιμών έντασης για την απομάκρυνση α) probe sets που έχουν ρόλο μαρτύρων (control probes) αλλά και β) probe sets που δεν εκφράζονται συστηματικά στην πλειονότητα των δειγμάτων. Για την υλοποίηση του 2^{ου} κριτηρίου κατασκευάσαμε το διάγραμμα πυκνότητας (density plot) της έντασης (γονιδιακής έκφρασης) των probe sets για κάθε μικροσυστοιχία ξεχωριστά, και ορίσαμε ως κριτήριο φιλτραρίσματος την υψηλότερη κορυφή της κατανομής. Στη συνέχεια, απομακρύναμε όλα τα probe sets που είχαν τιμή έντασης μικρότερη από την τιμή κατωφλίου (σε κάθε μικροσυστοιχία/δείγμα) δηλαδή δεν εκφράζονταν σε περισσότερα από το 50% των αντιγράφων των βιολογικών δειγμάτων κάθε εξεταζόμενης πειραματικής συνθήκης με βάση την φαινοτυπική μεταβλητή «group» (Πίνακας 1).

Sample	description	group	conditions
3 n_rep1	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing S769F mutation, basal conditions	S769F_b	basal
3 n=2	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing S769F mutation, basal conditions	S769F_b	basal
3 n=3	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing S769F mutation, basal conditions	S769F_b	basal
3 TUN n=1	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing S769F mutation, stress conditions	S769F_s	stress
3 TUN n=2	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing S769F mutation, stress conditions	S769F_s	stress
3 TUN n=3	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing S769F mutation, stress conditions	S769F_s	stress
4 n=1	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing Q780Stop mutation, basal conditions	Q780Stop_b	basal
4 n=2	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing Q780Stop mutation, basal conditions	Q780Stop_b	basal
4 n=3	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing Q780Stop mutation, basal conditions	Q780Stop_b	basal
4 TUN n=1	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing Q780Stop mutation, stress conditions	Q780Stop_s	stress
4 TUN n=2	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing Q780Stop mutation, stress conditions	Q780Stop_s	stress
4 TUN n=3	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing Q780Stop mutation, stress conditions	Q780Stop_s	stress
6 n=1	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing P336L mutation, basal conditions	P336L_b	basal
6 n=2	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing P336L mutation, basal conditions	P336L_b	basal
6 n=3	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing P336L mutation, basal conditions	P336L_b	basal
6 TUN n=1	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing P336L mutation, stress conditions	P336L_s	stress
6 TUN n=2	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing P336L mutation, stress conditions	P336L_s	stress
6 TUN n=3	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing P336L mutation, stress conditions	P336L_s	stress
7 n=1	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing A414T mutation, basal conditions	A414T_b	basal
7 n=2	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing A414T mutation, basal conditions	A414T_b	basal
7 n=3	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing A414T mutation, basal conditions	A414T_b	basal
7 TUN n=1	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing A414T mutation, stress conditions	A414T_s	stress
7 TUN n=2	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing A414T mutation, stress conditions	A414T_s	stress
7 TUN n=3	U87-MG glioblastoma cells overexpressing IRE1a bearing A414T mutation, stress conditions	A414T_s	stress
DN n=2	U87-MG glioblastoma cells overexpressing dominant negative form of IRE1a, basal conditions	DN_b	basal
DN n=3	U87-MG glioblastoma cells overexpressing dominant negative form of IRE1a, basal conditions	DN_b	basal
DN TUN n=2	U87-MG glioblastoma cells overexpressing dominant negative form of IRE1a, stress conditions	DN_s	stress
DN TUN n=3	U87-MG glioblastoma cells overexpressing dominant negative form of IRE1a, stress conditions	DN_s	stress
EV n=1	U87-MG glioblastoma cells overexpressing an empty vector of IRE1a, basal conditions	EV_b	basal
EV n=2	U87-MG glioblastoma cells overexpressing an empty vector of IRE1a, basal conditions	EV_b	basal
EV n=3	U87-MG glioblastoma cells overexpressing an empty vector of IRE1a, basal conditions	EV_b	basal
EV TUN n=1	U87-MG glioblastoma cells overexpressing an empty vector of IRE1a, stress conditions	EV_s	stress
EV TUN n=2	U87-MG glioblastoma cells overexpressing an empty vector of IRE1a, stress conditions	EV_s	stress
EV TUN n=3	U87-MG glioblastoma cells overexpressing an empty vector of IRE1a, stress conditions	EV_s	stress
WT n=1	U87-MG glioblastoma cells overexpressing wild type IRE1a, basal conditions	WT_b	basal
WT n=2	U87-MG glioblastoma cells overexpressing wild type IRE1a, basal conditions	WT_b	basal
WT n=3	U87-MG glioblastoma cells overexpressing wild type IRE1a, basal conditions	WT_b	basal
WT TUN n=1	U87-MG glioblastoma cells overexpressing wild type IRE1a, stress conditions	WT_s	stress
WT TUN n=2	U87-MG glioblastoma cells overexpressing wild type IRE1a, stress conditions	WT_s	stress
WT TUN n=3	U87-MG glioblastoma cells overexpressing wild type IRE1a, stress conditions	WT_s	stress

Πίνακας 1. Συνοπτική περιγραφή των U87 κλώνων και των εξεταζόμενων συνθηκών του πειράματος 2.3.1.1

Για τον σχολιασμό (annotation) των probe sets και την αντιστοίχισή τους σε γονίδια με το επίσημο HUGO συμβολικό όνομα [280] χρησιμοποιήθηκε τόσο το csv (comma-separated values) αρχείο σχολιασμού «HT_HG-U133_Plus_PM.na31.annot.csv» από το επίσημο site της Affymetrix

http://www.affymetrix.com/support/technical/byproduct.affx?product=ht_hg-u133_pm_ap αλλά και η βάση σχολιασμού της μικροσυστοιχίας «hgu133plus2.db» [281] από την πλατφόρμα Bioconductor ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο αριθμός των ασχολίαστων probe sets.

Στη συνέχεια, επιχειρήσαμε να ταυτοποιήσουμε τα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια, τόσο σε βασικές συνθήκες (basal) όσο και συνθήκες στρες (stress), μεταξύ του κάθε μεταλλαγμένου κυτταρικού κλώνου (μεταλλαγμένες παραλλαγές και κυρίαρχα-αρνητικός κλώνος) σε σχέση είτε με τον διαμολυσμένο με τον κενό φορέα (EV) κλώνο είτε σε σχέση με τον κλώνο άγριου-τύπου, χρησιμοποιώντας τον διαμολυσμένο με τον κενό φορέα (EV) κλώνο και τον κλώνο άγριου-τύπου, ως intercept, αντίστοιχα, στις δυο διαφορετικού τύπου συγκρίσεις για τις εξεταζόμενες συνθήκες (basal και stress). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε το λογισμικό πακέτο `limma` της R [282], το οποίο μας επιτρέπει να κατασκευάσουμε διαφόρων τύπων γραμμικά μοντέλα παλινδρόμησης της γονιδιακής έκφρασης, παραμετροποιώντας μεταβλητές/επιδράσεις στο εξεταζόμενο σύστημα τις οποίες ορίζουμε με την συνάρτηση `factor()`, και στη συνέχεια εισάγουμε στη συνάρτηση `model.matrix()` για να ορίσουμε την μεταβλητή `design` δηλαδή να υποδείξουμε στο μοντέλο μας τον αριθμό των δειγμάτων και των συνθηκών στις οποίες αντιστοιχούν αλλά και τον τρόπο αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Οι κλώνοι `EV_b`, `WT_b` και `EV_s`, `WT_s` (**Πίνακας 1**) χρησιμοποιήθηκαν, αντίστοιχα, ως συντελεστές εκτίμησης της μέσης λογαριθμικής (\log_2) γονιδιακής έκφρασης και έπαιξαν τον ρόλο του intercept στα δύο διαφορετικά γραμμικά μοντέλα που κατασκευάσαμε τόσο για τις «basal» όσο και τις «stress» συνθήκες, ενώ η συνάρτηση `makeContrasts()` μας επέτρεψε να συγκρίνουμε όλους τους κλώνους μεταξύ τους. Τα δείγματά μας προσαρμόστηκαν σε γραμμικό μοντέλο σύμφωνα με το `design` και το βασικό στατιστικό κριτήριο που εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων ήταν το μετριασμένο T-στατιστικό κριτήριο (moderated t-statistic), και υπολογίζεται για κάθε ανιχνευτή (probe) και για κάθε σύγκριση. Το κριτήριο αυτό ερμηνεύεται με τον ίδιο τρόπο όπως και το τυπικό t-στατιστικό μέτρο εκτός απ' το ότι τα τυπικά σφάλματα έχουν μετριαστεί στα διάφορα δείγματα, δηλαδή έχουν συρρικνωθεί προς μια κοινή τιμή, χρησιμοποιώντας ένα απλό Μπαγεσιανό μοντέλο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται πληροφορία από το σύνολο των γονιδίων για να βοηθηθεί η εξαγωγή συμπεράσματος για κάθε μεμονωμένο γονίδιο. Το σκεπτικό για να επιτευχθεί κάτι τέτοιο

πηγάζει από το γεγονός ότι η δειγματική διακύμανση δεν είναι ένα αποτελεσματικό στατιστικό κριτήριο, πράγμα που σημαίνει ότι παίρνει έναν ορισμένο αριθμό παρατηρήσεων πριν από τη σύγκλιση της τιμής της προς την πραγματική διακύμανση που απαιτείται να εκτιμηθεί. Οι περισσότερες αναλύσεις μικροσυστοιχιών έχουν συνήθως πολύ λιγότερες παρατηρήσεις απ' ότι πραγματικά απαιτείται για να έχουμε μια αξιόπιστη εκτίμηση της διακύμανσης, επομένως οποιαδήποτε μεθοδολογία αυξάνει την ακρίβεια της εκτίμησης είναι απαραίτητη. Επομένως, ένας προτεινόμενος τρόπος θα ήταν να υπολογιστεί μια αναμενόμενη διακύμανση που θα μπορούσε να έχει μεγάλη πιθανότητα να είναι αντιπροσωπευτική της πραγματικής διακύμανσης και στη συνέχεια να γίνει προσαρμογή των παρατηρούμενων τιμών προς την αναμενόμενη διακύμανση. Αυτό ακριβώς επιτυγχάνεται με την συνάρτηση eBayes() που εφαρμόσαμε στο γραμμικό μας μοντέλο, ως βασικό στάδιο της Limma μεθοδολογίας. Αρχικά, υπολογίζεται μια μέση διακύμανση με βάση όλα τα γονίδια στο πείραμα και στη συνέχεια για κάθε γονίδιο υπολογίζεται η δειγματική διακύμανση η οποία με την σειρά της προσαρμόζεται με βάση την αναμενόμενη διακύμανση που υπολογίστηκε για όλα τα εξεταζόμενα γονίδια. Στην περίπτωση που επεκτείναμε τις συγκρίσεις μας σε περισσότερους από δύο διαφορετικούς κλώνους, εφαρμόσαμε το μετριασμένο στατιστικό κριτήριο F (moderated F-statistic) που συνδυάζει το t-στατιστικό μέτρο όλων των δυαδικών συγκρίσεων σε ένα συνολικό στατιστικό έλεγχο σημαντικότητας για κάθε γονίδιο. Πρόκειται για ένα ισοδύναμο στατιστικό έλεγχο με την Ανάλυση Διασποράς κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA) για κάθε γονίδιο με εξαίρεση ότι τα υπολειμματικά μέσα τετράγωνα έχουν μετριαστεί ανάμεσα στα γονίδια. Συνεπώς, το στατιστικό κριτήριο F ελέγχει αν οποιαδήποτε από τις συγκρίσεις δεν αποδίδει μηδενική τιμή για κάποιο γονίδιο, δηλαδή εάν το γονίδιο αυτό είναι διαφορετικά εκφρασμένο σε κάθε σύγκριση. Ο παρονομαστής που εκφράζει τους βαθμούς ελευθερίας είναι ο ίδιος με αυτόν του μετριασμένου T στατιστικού κριτηρίου. Επίσης, για την διόρθωση των πολλαπλών στατιστικών ελέγχων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ελέγχου του ποσοστού των εσφαλμένων εκτιμήσεων των Benjamini και Hochberg [283], αποδίδοντας τις σταθμισμένες (adjusted) p-value τιμές (adj.P.Value) σε κάθε γονίδιο.

Τέλος, σε όλους τους στατιστικούς ελέγχους χρησιμοποιήθηκαν ως τιμές κατωφλίου, $FDR < 0.05$ και $|\log_2\text{-fold change}| > 1$, για το ποσοστό των εσφαλμένων εκτιμήσεων (FDR) και την λογαριθμική μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης, αντίστοιχα.

2.3.1.2 Μικροσυστοιχία HG-U133A_2.0 (Affymetrix) – Ανάλυση Μεταγραφικών Δεδομένων της Κυτταρικής Σειράς U87 κάτω από Διάφορες Συνθήκες Στρες Ε.Δ.

Πρόκειται για μια *in situ* μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων που επιτρέπει την ποσοτική εκτίμηση της της γονιδιακής έκφρασης του ανθρώπινου γονιδιώματος για 18.400 μετάγραφα και παραλλαγές τους τα οποία αντιστοιχούν σε 14.500 καλά χαρακτηρισμένα γονίδια. Συνίσταται από περισσότερα των 22.000 συνόλων ανιχνευτών (probe sets) και 500.000 διακριτών χαρακτηριστικών ολιγονουκλεοτιδίων. Αντιπροσωπεύεται στην βάση GEO με τον αναγνωριστικό κωδικό πλατφόρμας GPL571.

Η μικροσυστοιχία αυτή χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση της επίδρασης της IRE1 σηματοδότησης στην μεταβολή του μεταγραφώματος των U87 κυττάρων κάτω από διάφορες συνθήκες στρες Ε.Δ αλλά και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (basal conditions). Εν συντομία, το πείραμα που είχε διεξαχθεί αφορούσε σε κύτταρα διαμολυσμένα με τον κενό πλασμιδιακό φορέα της Invitrogen, pcDNA3.1, που εξέφραζαν την αγρίου τύπου IRE1α (WT) πρωτεΐνη αλλά και σε κύτταρα διαμολυσμένα με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3.1 που έφερε μια κυτταροπλασματική ανενεργή παραλλαγή γνωστή ως κυρίαρχη, αρνητικού τύπου (DN) πρωτεΐνη [141], εκτεθειμένα σε μια σειρά περιβαλλοντικών (υποξία-HX, στέρση γλυκόζης-HG, στέρση γλουταμίνης-GLUT) και χημικών ερεθισμάτων (χορήγηση τουνικαμυκίνης-tun) όπως αναφέρονται στον **Πίνακα 2**. Το συγκεκριμένο πείραμα είχε καταχωρηθεί στην Gene Expression Omnibus με τον κωδικό κατάθεσης GSE27306 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE27306>) [115].

Sample	Cell_line	IRE1_status	Treatment
T1P5Contr	U87-MG	WT	under basal conditions
T1P5HX	U87-MG	WT	under hypoxia
T1P5HG	U87-MG	WT	under glucose deprivation
T1P5GLUT	U87-MG	WT	under glutamine deprivation
T1P5_tun	U87-MG	WT	upon tunicamycin treatment
1C5Contr	U87-MG	DN	under basal conditions
1C5HX	U87-MG	DN	under hypoxia
1C5HG	U87-MG	DN	under glucose deprivation
1C5GLUT	U87-MG	DN	under glutamine deprivation
1C5_tun	U87-MG	DN	upon tunicamycin treatment

Πίνακας 2. Συνοπτική περιγραφή των δειγμάτων και των εξεταζόμενων συνθηκών του πειράματος 2.3.1.2.

Ακολουθώντας την ανάλογη διαδικασία επεξεργασίας και ανάλυσης των πρωτογενών δεδομένων (CEL αρχεία) όπως στην ενότητα **2.3.1.1** χρησιμοποιήσαμε το

πακέτο Limma της R για να αξιολογήσουμε την μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των δύο διαφορετικών καταστάσεων της IRE1α πρωτεΐνης ανεξαρτήτως περιβαλλοντικών συνθηκών όπως δηλώνεται αποκλειστικά στην μεταβλητή «IRE1_status» στον **Πίνακα 2**. Δηλαδή στη μεταβλητή design του γραμμικού μας μοντέλου χρησιμοποιήσαμε ως μοναδικό παράγοντα την «IRE1_status» χωρίς την χρήση intercept όπως δηλώνεται στις ακόλουθες γραμμές R κώδικα:

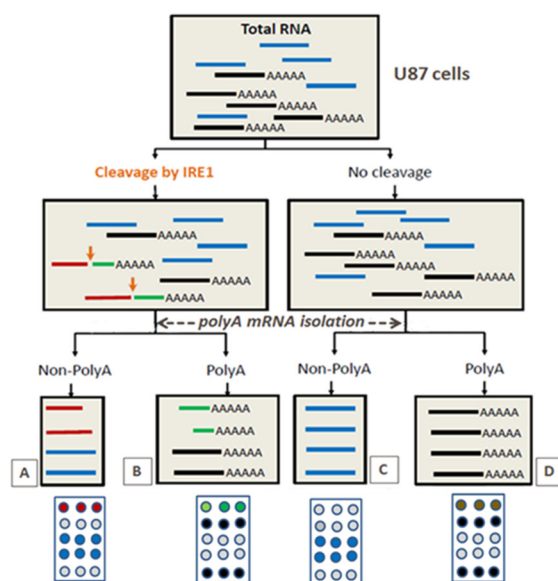
```
> Group <- factor(sample_table$IRE1_status, levels=c("WT", "DN"))  
> design <- model.matrix(~0+Group)
```

Για τον στατιστικό έλεγχο εφαρμόστηκε το moderated t-test και χρησιμοποιήθηκαν ως τιμές κατωφλίου οι ακόλουθες: FDR<0.05 και $|\log_2\text{-fold change}| \geq 1.5$. Η λίστα των διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων (1051 σε σύνολο) χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια ως αρχείο εισόδου για την εξαγωγή γονιδιακής υπογραφής που χαρακτηρίζει την σηματοδοτική δράση της IRE1α πρωτεΐνης στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα αλλά και σε άλλους τύπους καρκίνου.

2.3.1.3 Μικροσυστοιχία Human Transcriptome Array (HTA) 2.0 (Affymetrix) – Ανάλυση Μεταγραφικών Δεδομένων της Κυτταρικής Σειράς U87 για τον Εντοπισμό και την Ταυτοποίηση *in vitro* RIDD μεταγράφων-στόχων

Πρόκειται για μια *in situ* μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων υψηλής ανάλυσης που επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης της συντριπτικής πλειοψηφίας των μεταγραφικών ισομορφών των γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος. Περιέχει >6.0 εκατομμύρια διακριτούς ανιχνευτές ολιγονουκλεοτιδίων (ή απλά ανιχνευτές) για την κάλυψη των κωδικοποιών και μη-κωδικοποιών μεταγράφων. Το ~70% των ανιχνευτών καλύπτει τις περιοχές εξωνίων για τα πρωτεϊνικά μετάγραφα και το υπόλοιπο ~30% καλύπτει τις συνδέσεις ματίσματος εξωνίου-εξωνίου καθώς και τα μη κωδικοποιά μετάγραφα. Χρησιμοποιεί περίπου 10 ανιχνευτές ανα εξώνιο και 4 ανιχνευτές για κάθε σύνδεση ματίσματος εξωνίου-εξωνίου. Καλύπτει συνολικά >245.000 κωδικοποιά μετάγραφα και >40.000 μη-κωδικοποιά. Αντιπροσωπεύεται στην βάση GEO με τον αναγνωριστικό κωδικό πλατφόρμας GPL17586.

Η εν λόγω μικροσυστοιχία χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση *in vitro* RIDD μεταγράφων-στόχων (poly-A και non-polyA RNAs) σε δείγματα RNA που προέκυψαν κατόπιν *in vitro* δοκιμασίας αποκοπής του ολικού RNA που απομονώθηκε από U87 κύτταρα. Τα βασικά στάδια της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζονται στην **Εικόνα 2.3** [179].



“Affymetrix GeneChip HTA 2.0”

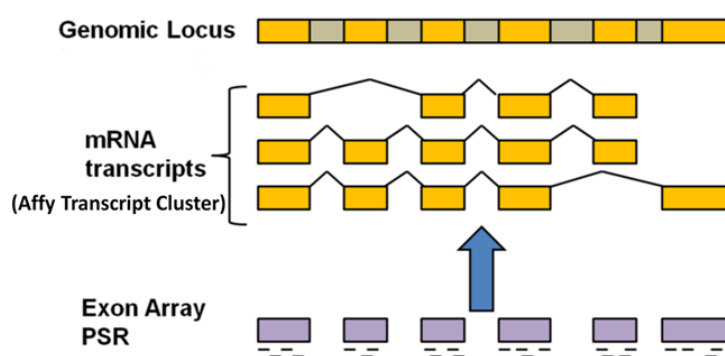
Εικόνα 2.3. *In vitro* δοκιμασία αποκοπής του RNA από την IRE1 σε σύζευξη με μικροσυστοιχίες για την ταυτοποίηση RIDD στόχων

Το ολικό RNA που απομονώθηκε από U87 κύτταρα 1) αποκόπηκε *in vitro* με μια ανασυνδυασμένη IRE1 πρωτεΐνη και 2) παρέμεινε ανέπαφο σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια ακολούθησε διαχωρισμός των polyA μεταγράφων από τα μη-polyA μεταγράφα χρησιμοποιώντας το kit καθαρισμού Dynabeads® mRNA DIRECT™ Purification Kit (Ambion) ακολουθώντας τις οδηγίες του προμηθευτή. 250 ng ολικού RNA από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή πολλαπλασιασμένων και βιοτινυλιωμένων μονόκλωνων μορίων cDNA σύμφωνα με το AMBION WT Expression kit (P/N 4425209 Rev. D) και τον οδηγό χρήσης για την τερματική ιχνηθέτηση και υβριδοποίηση νουκλεοτιδίων, Affymetrix WT GeneChip® (P/N 702808 Rev. 7). Κατόπιν τμηματοποίησης και τερματικής σήμανσης, 5,5 µg μονόκλωνου cDNA υβριδοποιήθηκαν πάνω στην μικροσυστοιχία Affymetrix GeneChip HTA 2.0 για 16 ώρες στους 45 °C. Οι μικροσυστοιχίες ξεπλύθηκαν και βάφτηκαν στον σταθμό Affymetrix Fluidics Station 450 με το HWS kit και η ένταση φθορισμού μετρήθηκε με το Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G.

2.3.1.3.1 Υπολογιστική Ανάλυση Εναλλακτικού Ματίσματος Μεταγραφικών Δεδομένων με την πλατφόρμα Affymetrix Transcriptome Analysis Console

Τα δεδομένα έντασης της μικροσυστοιχίας Affymetrix GeneChip HTA 2.0 καταγράφηκαν με την βοήθεια της πλατφόρμας Affymetrix Expression Console (v1.2.1) και αφορούσαν στα μεταγραφικά δεδομένα τεσσάρων διαφορετικών καταστάσεων που απεικονίζονται με τα γράμματα A, B, C και D στην **Εικόνα 2.3**. Η πρώτη κατάσταση (A) αφορά όλα τα Μη-Πολυαδενυλιωμένα (Non-PolyA) μεταγράφα μαζί με τα κομμάτια (θραύσματα) των PolyA μεταγράφων που δεν περιλάμβαναν την polyA ουρά και τα οποία προέκυψαν από την αποκοπή με την IRE1α πρωτεΐνη. Η δεύτερη συνθήκη (B) αφορούσε σε όλα τα PolyA μεταγράφα συμπεριλαμβανομένου των κομματιών αποκοπής από την IRE1α τα οποία έφεραν την polyA ουρά. Η τρίτη κατάσταση (C) περιλάμβανε όλα τα Μη-PolyA μεταγράφα

και τέλος η συνθήκη D αναφέρεται σε όλα τα PolyA μετάγραφα. Κάθε συνθήκη/κατάσταση αντιπροσωπεύεται από δύο αντίγραφα δειγμάτων. Όλοι οι ανιχνευτές (probes) οργανώθηκαν σε κοινά σύνολα (probe sets) τα οποία σχολιάστηκαν και ομαδοποιήθηκαν σε επίπεδο γονιδίου (gene-level), επίπεδο εξωνίου (exon-level) και τέλος σε επίπεδο σύνδεσης ματίσματος εξωνίων (splice-junction). Τα πρωτογενή δεδομένα (*.CEL αρχεία) εισήχθησαν στην πλατφόρμα Affymetrix Expression Console Software (version 1.4; Build1.4.1.46)(<http://www.affymetrix.com/support/technical/byproduct.affx?product=expressionconsole>) και επιλέχθηκε από το μενού των επιλογών η ανάλυση σε επίπεδο εξωνίων (Exon Level Analysis). Αρχικά, οι πρωτογενείς τιμές έντασης των ανιχνευτών κανονικοποιήθηκαν και ομαδοποιήθηκαν για την δημιουργία δεικτών έκφρασης ανα Περιοχή Επιλογής Ανιχνευτή (PSR - Probe Selection Region) (**Εικόνα 2.4**) και ανα περιοχή Σύνδεσης των εξωνίων (Junctions) εφαρμόζοντας την μέθοδο GC-RMA [279, 284] όπου περιλάμβανε α) την GC διόρθωση υποβάθρου (GC background correction) που κανονικοποιεί τις εντάσεις σε σχέση με την διαφορά συγγενείας του κάθε ανιχνευτή σε σχέση με το περιεχόμενό του σε νουκλεοτίδια Γουανίνης και Κυτοσίνης, β) την κανονικοποίηση με την μέθοδο quantile normalization μεταξύ των μικροσυστοιχιών ώστε να έχουμε την ίδια κατανομή έντασης, γ) τον υπολογισμό της έντασης σε επίπεδο ανιχνευτή με την χρήση γραμμικού μοντέλου και δ) την ομαδοποίηση των τιμών έντασης των ανιχνευτών σε συγκεκριμένα probe sets που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα εξώνια και κατ' επέκταση γονίδια, με την μέθοδο του median polish κατά Tukey ώστε η ένταση σήματος των probe sets να συγκλίνει στην διάμεση τιμή έντασης αποφεύγοντας τις έκτοπες τιμές.

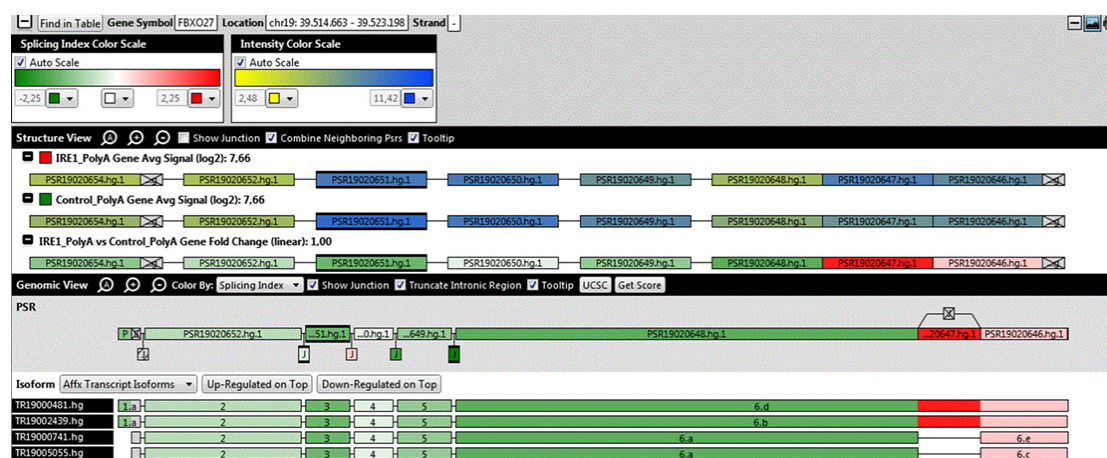


Εικόνα 2.4. Επίπεδα οργάνωσης των ανιχνευτών της μικροσυστοιχίας μεταγραφώματος Affy HTA 2.0

Η Εικόνα 2.4 υποδεικνύει την ιεραρχική οργάνωση των ανιχνευτών της μικροσυστοιχίας μεταγραφώματος σε επίπεδο εξωνίου, μεταγράφου και γονιδίου. Οι περιοχές με το χρυσαφένιο χρώμα αντιπροσωπεύουν εξώνια ενώ οι γκρι περιοχές αντιστοιχούν σε εσώνια τα οποία απομακρύνονται κατά την διαδικασία του ματίσματος. Οι μικρές παύλες κάτω από τις περιοχές εξωνίων αντιπροσωπεύουν συγκεκριμένους ανιχνευτές ολιγονουκλεοτιδίων (probes) που οργανώνονται σε σύνολα (probe sets) τα οποία αντιπροσωπεύουν ένα PSR (μωβ χρώμα). Δηλαδή ένα PSR αντιπροσωπεύει μια περιοχή του γονιδιώματος που προβλέπεται να λειτουργεί σαν μια αναπόσπαστη, συνεκτική μονάδα της μεταγραφικής συμπεριφοράς. Στις περισσότερες περιπτώσεις, κάθε PSR είναι ένα εξώνιο; ενώ σε ορισμένες άλλες που υπάρχουν πιθανές αλληλοκαλύψεις μεταξύ των εξωνίων, μερικά PSRs μπορεί να

σηματίζουν συνεχόμενα, μη επικαλυπτόμενα υποσύνολα ενός πραγματικού εξωνίου. Περίπου το 90% των probe sets των εξωνίων περιέχουν 4 probes για κάθε PSR. Στο υπόλοιπο 10% των probe sets τα probes μοιράζονται ισοδύναμα ώστε να έχουμε probe sets με 3, 2, και 1 probe, αντίστοιχα. Τα εξώνια με την σειρά τους διαμορφώνουν σύνολα μεταγραφικών ισομορφών λόγω εναλλακτικού ματίσματος, που το καθένα χαρακτηρίζεται ως Affymetrix Transcript Cluster (Επεξεργασμένη πληροφορία από το Affymetrix technical report και την δημοσίευση [285]).

Στη συνέχεια, εφαρμόσαμε ανάλυση εναλλακτικού ματίσματος ανάμεσα στις τέσσερις εξεταζόμενες συνθήκες, τόσο σε επίπεδο PSRs (εξωνίων) όσο και σε επίπεδο περιοχών σύνδεσης μεταξύ των εξωνίων, χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Affymetrix Transcriptome Analysis Console (TAC) (v3.0) (<http://www.affymetrix.com/support/technical/byproduct.affx?product=tac>) η οποία επιπλέον επιτρέπει την οπτικοποίηση των δεδομένων με χρωματικές διαβαθμίσεις που αντιπροσωπεύουν μεταβολές στην έκφραση τόσο σε επίπεδο γονιδίου όσο και σε επίπεδο εξωνίων καθώς και μεταβολές στην θέση των εξεταζόμενων μεταγραφικών οντοτήτων εξαιτίας εναλλακτικού ματίσματος των εξωνίων.



Εικόνα 2.5. Στιγμιότυπο της Πλατφόρμας Ανάλυσης Μεταγραφώματος της Affymetrix (TAC)

Στην Εικόνα 2.5 απεικονίζονται τα τρία βασικά παράθυρα της Πλατφόρμας Ανάλυσης του Μεταγραφώματος της Affymetrix (TAC) μετά από την Ανάλυση Εναλλακτικού Ματίσματος μεταξύ των συνθηκών B και D (Εικόνα 2.3) για την περίπτωση του γονιδίου FBXO27. Στο παράθυρο «Structure View», στις 2 πρώτες σειρές απεικονίζονται τα επιλεχθέντα PSRs του γονιδίου όπου με αποχρώσεις της κλίμακας κίτρινο-μπλε απεικονίζονται οι τιμές έκφρασης (Intensity values) στις δύο διαφορετικές συνθήκες. Η τρίτη σειρά απεικονίζει τα ίδια PSRs αλλά χρωματισμένα με βάση την τιμή του Δείκτη Ματίσματος (Splicing Index) στην κλίμακα πράσινο-κόκκινο. Στο τρίτο παράθυρο (Genomic View) απεικονίζεται η οργάνωση των PSRs με τρόπο ανάλογο της οργάνωσης των εξωνίων του γονιδίου καθώς και η δομή των μεταγραφικών ισομορφών του γονιδίου σε εξώνια που αντιπροσωπεύονται από τα αντίστοιχα PSRs.

Η παρουσία των PSRs και των Junctions ανα δείγμα ελέγχθηκε με τον αλγόριθμο Ανίχνευσης Πάνω από την στάθμη Υποβάθρου (DABG - Detection Above Background Algorithm) [286]. Ένα PSR/Junction θεωρήθηκε ότι εκφράζεται σε μια συνθήκη όταν $\geq 50\%$ των δειγμάτων που εκπροσωπούσαν την συγκεκριμένη συνθήκη είχε DABG p-value < 0.05 .

Ένα PSR θεωρήθηκε σημαντικό για να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση της έκφρασης ενός γονιδίου εάν ήταν παρόν σε $\geq 50\%$ των μεταγραφικών ισομορφών ενώ ένα γονίδιο θεωρήθηκε ότι εκφράζεται σε ένα δείγμα εάν $\geq 50\%$ των σημαντικών του PSRs είχε DABG p-value < 0.05 . Ανάλογα, το γονίδιο αυτό θεωρήθηκε ότι εκφράζεται σε μια συγκεκριμένη συνθήκη εάν $\geq 50\%$ των δειγμάτων που αντιστοιχούσαν στην συγκεκριμένη συνθήκη είχαν το γονίδιο αυτό εκφρασμένο. Ως ανώτερη τιμή κατωφλίου για το ποσοστό FDR με την μέθοδο Benjamini και Hochberg καθορίστηκε η τιμή 0.05. Τα ποσοστά έντασης (έκφρασης) για κάθε PSR ή Junction σε μια συνθήκη υπολογίστηκαν με τον αλγόριθμο «Tukey's Bi-weight Average Algorithm» [Affymetrix (2002), http://media.affymetrix.com/support/technical/whitepapers/sadd_whitepaper.pdf] που επιτρέπει τον προσδιορισμό ενός εύρους μέσου όρου έκφρασης που δεν επηρεάζεται από ακραίες τιμές. Στη συνέχεια για κάθε probe set εξωνίου υπολογίστηκε αρχικά μια κανονικοποιημένη τιμή έντασης (NI) που προκύπτει από την διαίρεση της έκφρασής του με την εκτιμώμενη τιμή έκφρασης ολόκληρου του γονιδίου, και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο Δείκτης Ματίσματος (Splicing Index - SI) που ορίζεται ως:

$$\text{Splicing Index (SI)} = \log_2 (NI_{\text{Condition1}} / NI_{\text{Condition2}})$$

Για τις συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών συνθηκών εφαρμόστηκε η «One-way Between-Subject ANOVA». Ως κατώτερη τιμή κατωφλίου για το κριτήριο τόσο του επιπέδου μεταβολής (Fold Change) της έκφρασης όσο και του Δείκτη Ματίσματος θέσαμε την τιμή των 1.5 φορές σε γραμμική φυσική κλίμακα, ενώ το αποτέλεσμα μας κρίθηκε ως στατιστικό σημαντικό για ANOVA p-value < 0.05 .

2.3.1.4 *Μικροσυστοιχία Human Gene 2.0 ST Array [transcript (gene) version] (Affymetrix) – Ανάλυση Μεταγραφικών Δεδομένων για την Ταυτοποίηση IRE1-Εξαρτώμενων Γονιδίων στην Κυτταρική Σειρά του Τριπλά Αρνητικού Καρκίνου του Μαστού (TNBC), MDA-MB-231*

Πρόκειται για μια *in situ* μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων που περιλαμβάνει ανιχνευτές για την ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων κωδικοποιών μεταγράφων (mRNAs) και μακρών, μεταξύ των γονιδίων, μη-κωδικοποιών μορίων RNA (lincRNA). Συγκεκριμένα, πρόκειται για μια μικροσυστοιχία που ανιχνεύει περισσότερα από 30.000 πρωτεϊνικά μετάγραφα και πάνω από 11.000 lincRNAs. Αντιπροσωπεύεται στην GEO με τον αναγνωριστικό κωδικό πλατφόρμας GPL16686.

Η μικροσυστοιχία HuGene-2_0-st είχε χρησιμοποιηθεί για την καταγραφή των επιπέδων έκφρασης του μεταγραφώματος της κυτταρικής σειράς του Τριπλά Αρνητικού

Καρκίνου του Μαστού (TNBC), MDA-MB-231, κατόπιν χορήγησης του αναστολέα της IRE1 RNάσης, MKC-8866 [287], για 4 και 24 ώρες σε νορμοξικές και υποξικές (1% O₂) συνθήκες. Τα log₂ κανονικοποιημένα με τον RMA αλγόριθμο μεταγραφικά δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή Ανάλυσης της Διαφορικής Έκφρασης των γονιδίων με το πακέτο Limma της R. Η σύγκρισή μας εστιάστηκε κυρίως στα δείγματα που τους είχε χορηγηθεί DMSO (αντιπροσωπεύουν την αγρίου-τύπου κατάσταση για την IRE1 πρωτεΐνη) και σε εκείνα στα οποία είχε χορηγηθεί ο αναστολέας MKC-8866 για 24 ώρες ώστε να υπάρχει πλήρης αποσιώπηση της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας σε αντιστοιχία με την κυρίαρχα-αρνητικού τύπου κατάσταση της IRE1 των U87 κυττάρων που έχουμε ήδη αναφέρει. Τα επεξεργασμένα αλλά και τα πρωτογενή μεταγραφικά δεδομένα της μικροσυστοιχίας είχαν κατατεθεί στην βάση GEO με τον κωδικό πειράματος GSE99766 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE99766>).

2.3.1.5 Μικροσυστοιχία SurePrint G3 Human GE v2 8x60k (Agilent) – Ανάλυση Μεταγραφικών δεδομένων για τον Χαρακτηρισμό Ασθενών της in-house Κοόρτης GBMmark με βάση την IRE1 Σηματοδοτική Δραστικότητα

Πρόκειται για μια *in situ* μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων υψηλής ανάλυσης για την καταγραφή των επιπέδων έκφρασης του ανθρώπινου μεταγραφώματος. Έχει Agilent design ID: 039494 και GridName: 039494_D_F_20120628. Η 2^η αυτή έκδοση της μικροσυστοιχίας περιέχει εκτός από τους ανιχνευτές υβριδοποίησης των mRNA μεταγράφων και ανιχνευτές για τον υβριδισμό μακρών, μεταξύ των γονιδίων, μη-κωδικοποιών μορίων RNA (lincRNA). Οι ανιχνευτές αυτοί σχεδιάστηκαν σύμφωνα με τον κατάλογο των ανθρώπινων lincRNAs του Broad Institute [Broad Institute Human lincRNA catalog (Nov 2011)] [288]. Η μικροσυστοιχία περιέχει ανιχνευτές για τον εντοπισμό περίπου 25.000 γονιδίων, >37.000 γνωστών πρωτεϊνικών μεταγράφων, >8.000 γνωστών μη-κωδικοποιών μεταγράφων και >30.000 μακρών μη-κωδικοποιών RNAs (lincRNAs). Αντιπροσωπεύεται στην βάση γενωμικών δεδομένων μεγάλης απόδοσης του EMBL-EBI «ArrayExpress» (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) [289] με τον αναγνωριστικό κωδικό πλατφόρμας A-MEXP-2320.

Η μικροσυστοιχία αυτή χρησιμοποιήθηκε για να διερευνηθεί το μεταγραφικό προφίλ ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα και να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα που είχαμε εξάγει από πειράματα μεγάλης απόδοσης στην κυτταρική σειρά U87. Συγκεκριμένα καταγράψαμε το μεταγραφικό προφίλ 117 πρωτογενών όγκων από ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα μετά από χειρουργική αφαίρεση του όγκου, σε σχέση με την IRE1 γονιδιακή

υπογραφή που είχαμε ταυτοποιήσει από την ανάλυση των μεταγραφικών δεδομένων της μικροσυστοιχίας HG-U133A_2.0. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι κανονικοποιημένες και μετασχηματισμένες σε κλίμακα \log_2 τιμές έντασης όπως υπολογίστηκαν με τον RMA αλγόριθμο του πακέτου της R Limma.

Οι ασθενείς της κοόρτης αποτελούν καταγραφές μιας *in-house* βάσης ασθενών του Νευροχειρουργικού Τμήματος του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Ρεν (Rennes) στη Γαλλία, την GBMmark, την οποία διαχειρίζεται το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας και Ιατρικής Έρευνας της Γαλλίας (National Institute for Health and Medical Research - INSERM) με το οποίο το Εργαστήριο Μεταβολικής Μηχανικής και Βιοπληροφορικής του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών έχει συμπράξει μια διεθνής συνεργασία, συμμορφούμενο με τα διεθνή πρωτόκολλα και τους κανόνες Βιοηθικής για την διατήρηση και επεξεργασία ευαίσθητων προσωπικών δεδομένων.

Οι όγκοι που εξήχθησαν με χειρουργική αφαίρεση καταψύχθηκαν άμεσα σε υγρό άζωτο (snap-freezing) και διατηρήθηκαν στους -80°C . Το ολικό RNA απομονώθηκε με το NucleoSpin RNAII Kit (Macherey- Nagel), ιχνηθετήθηκε με το Agilent Low Input Quick Amp Labeling kit και υβριδοποιήθηκε στην μικροσυστοιχία με το Agilent Gene Expression Hybridization kit. Τέλος η μικροσυστοιχία σαρώθηκε με το Agilent Scanner G2505B και οι εντάσεις καταγράφηκαν με το λογισμικό Agilent Feature Extraction Software. Το συγκεκριμένο πείραμα υποβλήθηκε στην ArrayExpress και φέρει κωδικό καταχώρησης E-MTAB-6326 (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-6326/>) [179].

2.3.1.6 Μικροσυστοιχία Whole Human Genome 4 x 44 K Microarray Kit (Agilent) – Ανάλυση Μεταγραφικών Δεδομένων για την Αξιολόγηση της IRE1 Σηματοδοτικής Δραστηριότητας σε Νευροσφαίρες (RNS) Προερχόμενες από Όγκους Ασθενών με Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα

Πρόκειται για μια *in situ* μικροσυστοιχία ολιγονουκλεοτιδίων υψηλής ανάλυσης (catalog number: G4112F, Agilent-014850) για την ανάλυση του ανθρώπινου μεταγραφώματος. Χρησιμοποιεί 60-μερείς ανιχνευτές για την ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης περισσότερων των 33.000 γνωστών και νέων ανθρώπινων γονιδίων (~41.000 ανθρώπινα γονίδια και μετάγραφα). Αντιπροσωπεύεται στην GEO με τον αναγνωριστικό κωδικό πλατφόρμας GPL4133.

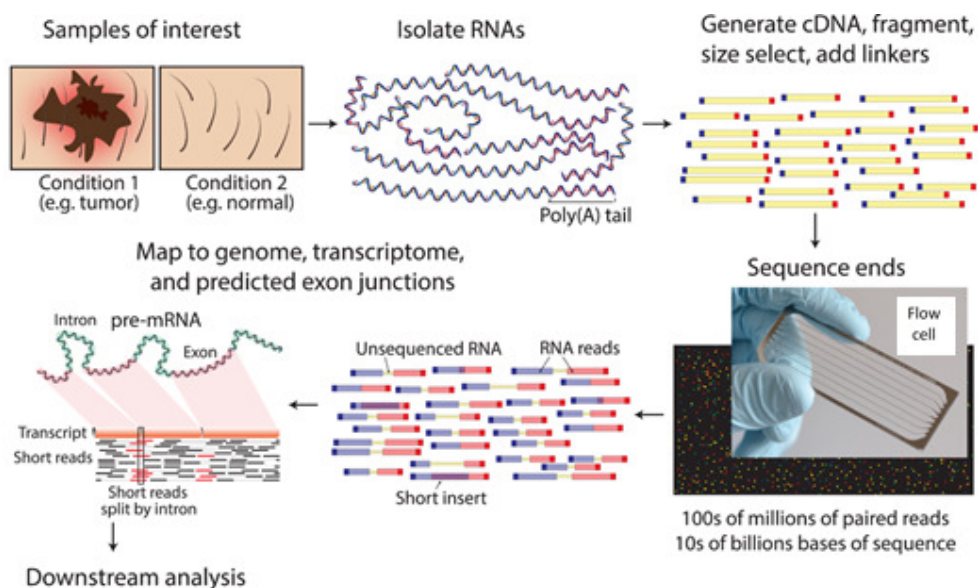
Η μικροσυστοιχία αυτή είχε χρησιμοποιηθεί για την ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης του μεταγραφώματος πρωτογενών κυτταρικών σειρών γλοιοβλαστώματος, προερχόμενων από όγκους ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα.

Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι μετά από τον μηχανικό διαχωρισμό των ιστών του όγκου χρησιμοποιώντας τον διαχωριστή gentleMACS (Miltenyi Biotec, Paris, France), τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε συνθήκες δημιουργίας νευροσφαιρών (NS) εμπλουτισμένων σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα αλλά και σε συνθήκες κυτταρικής προσκόλλησης (Adh). Στην περίπτωση των νευροσφαιρών (RNS), τα κύτταρα αναπτύχθηκαν αρχικά στους 37°C σε υγρή ατμόσφαιρα με 5% CO₂, σε θρεπτικό μέσο DMEM/Ham's F12 (Lonza, Verviers, Belgium) που συμπληρώνεται με τα πρόσθετα B27 και N2 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), EGF (20 ng/mL) και FGF (20 ng/mL) (Peprotech, Tebu-Bio). Μόλις οι νευροσφαίρες σχηματίστηκαν, απομονώθηκαν, διαχωρίστηκαν με θρυψίνη [1:10 αραίωση σε PBS (phosphate-buffered saline)] και απλώθηκαν σε 1×10⁴ κύτταρα/κυψέλη σε πιάτο 24 κυψελών, σε φρέσκο θρεπτικό μέσο για 14 μέρες. Ανάμεσα σε κάθε πέρασμα (passage), το μισό υλικό καλλιέργειας αντικαθίστανται με φρέσκο μέσο, περίπου κάθε 2-3 μέρες. Για την περίπτωση των καλλιιεργειών σε συνθήκες προσκόλλησης, οι πρωτογενείς κυτταρικές σειρές δημιουργήθηκαν όπως περιγράφεται στην δημοσίευση [268]. Εν συντομία, αναφέρεται ότι τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε DMEM που συμπληρώνεται με 10% FCS (fetal calf serum) και μόλις επήλθε κυτταρική συμβολή, τα κύτταρα θρυψινοποιήθηκαν και απλώθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό μέσο.

Ολικό RNA απομονώθηκε με το Rneasy Mini kit της Qiagen (Courtaboeuf, France) και η ακεραιότητα του RNA (RNA Integrity Number \geq 8) επιβεβαιώθηκε με τον αναλυτή Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Το ολικό RNA που απομονώθηκε από 12 RNS κυτταρικές σειρές, ιχνηθετήθηκε με Κυανίνη 3 και υβριδοποιήθηκε στην μικροσυστοιχία σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή [232]. Τα κανονικοποιημένα μεταγραφικά δεδομένα (log₂ RMA τιμές) των 12 RNS πρωτογενών κυτταρικών σειρών γλοιοβλαστώματος χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας.

2.3.2 Αλληλούχιση RNA-Seq – Τεχνολογία NGS της Illumina

Σε αντίθεση με τις μικροσυστοιχίες, την τελευταία 10ετία έχουν αναπτυχθεί σε σημαντικό βαθμό οι τεχνολογίες αλληλούχισης νουκλεϊκών οξέων μεγάλης απόδοσης ή επόμενης γενιάς (NGS) με κυρίαρχη την αλληλούχιση RNA (RNA-Seq) (γνωστή επίσης ως Αλληλούχιση Ολόκληρου του Μεταγραφώματος). Η τεχνολογία αυτή μας επιτρέπει άμεσα να αναλύσουμε ποιοτικά την cDNA ακολουθία ενδιαφέροντος και να ποσοτικοποιήσουμε το μεταγραφικό προφίλ χιλιάδων δειγμάτων ή ακόμη και μοναδικών κυττάρων. Ο όρος RNA-Seq είναι ένας γενικευμένος όρος που περιλαμβάνει όλες τις τεχνικές καταγραφής των cDNA ακολουθιών χρησιμοποιώντας αλληλούχιση υψηλής απόδοσης [265]. Πρόσφατα το RNA-Seq έχει γίνει το gold standard για την χαρτογράφηση του μεταγραφικού προφίλ βιολογικών δειγμάτων καθώς συγκεντρώνει μια σειρά σημαντικών πλεονεκτημάτων σε σχέση με τις παλαιότερες τεχνολογίες. Συγκεκριμένα, σε αντίθεση με τις DNA μικροσυστοιχίες που προϋποθέτουν ότι τα μετάγραφα ενδιαφέροντος προκύπτουν από γνωστές γονιδιωματικές αλληλουχίες (συνεπώς η γνώση των μεταγραφικών αλληλουχιών είναι υποχρεωτική), η τεχνολογία RNA-Seq επιτρέπει την ανακάλυψη νέων μεταγραφικών ισομορφών και συμβάλει στον εντοπισμό διαφορικών μοτίβων ματίσματος. Επιπλέον, το τυπικό αποτέλεσμα ενός RNA-Seq πειράματος είναι διακριτές (ψηφιακές) τιμές ανάγνωσης (read counts) με βάση την στοίχιση των εγγραφών των αλληλουχιών του δείγματος με μια σχετικά γνωστή αλληλουχία αναφοράς (π.χ. γονιδίωμα ή μετάγραφωμα αναφοράς του είδους του οργανισμού) (Εικόνα 2.6).

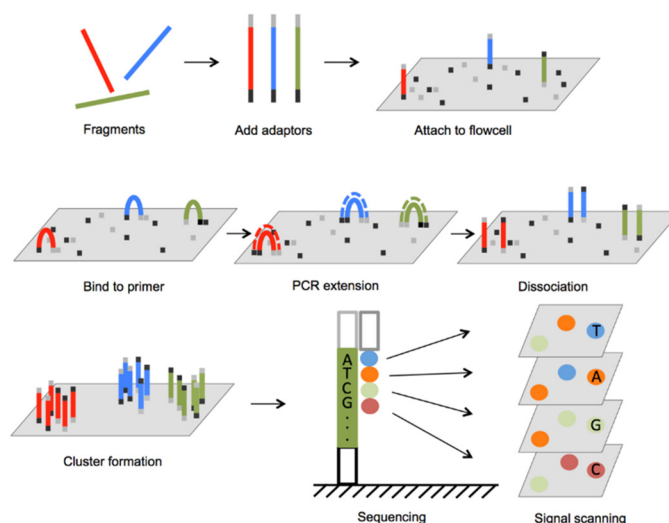


Εικόνα 2.6. Τυπική ροή πειράματος αλληλούχισης RNA (RNA-Seq)

Απεικόνιση των βασικών σταδίων του πειραματικού πρωτοκόλλου που ακολουθείται για την διεξαγωγή ενός τυπικού πειράματος RNA-Seq. Η ροή εργασίας περιλαμβάνει συνοπτικά 4 στάδια: Απομόνωση ολικού RNA από τα δείγματα ενδιαφέροντος (εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες), κατασκευή βιβλιοθήκης για αλληλούχιση [μέσω σύνθεσης cDNA με καλούπι το RNA, κατακερματισμός, επιλογή κομματιών συγκεκριμένου μεγέθους ή/και είδους (π.χ. polyA-μετάγραφα) και πρόσδεση προσαρμογέων αλληλούχισης], αλληλούχιση των cDNA βιβλιοθηκών μέσω μιας πλατφόρμας αλληλούχισης [π.χ. Illumina, Ion Torrent (ThermoFisher), Nanopore κ.ά.] και υπολογιστική ανάλυση των παραγόμενων εγγραφών των αλληλουχιών της βιβλιοθήκης με σκοπό κυρίως τον ποσοτικό προσδιορισμό της γονιδιακής έκφρασης. (Πληροφορία επεξεργασμένη από την δημοσίευση [290]).

Με άλλα λόγια, ρυθμίζοντας τον συνολικό αριθμό των εγγραφών/αναγνώσεων και το μέγεθος ανάγνωσης, η ευαισθησία του αντίστοιχου πειράματος μπορεί να μεταβληθεί για να ικανοποιήσει διαφορετικούς ερευνητικούς στόχους. Με τον τρόπο αυτό, το RNA-Seq μπορεί να καλύψει ένα πολύ εκτεταμένο δυναμικό φάσμα της γονιδιακής έκφρασης, σε αντίθεση με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών όπου στερείται γενικά υψηλής ευαισθησίας και αδυνατεί να ανιχνεύσει τόσο τα πολύ χαμηλά όσο και τα πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης. Παρόλο αυτά, η απόκτηση RNA-Seq δεδομένων είναι επίπονη και πρέπει να ξεπεραστούν αρκετές δυσκολίες που κυρίως σχετίζονται με α) την υπολογιστική ισχύ και τους πόρους που απαιτούνται για την διαχείριση και επεξεργασία μεγάλου όγκου δεδομένων, β) το υψηλό κόστος αλληλούχισης και αναλωσίμων και γ) την εκτέλεση εξειδικευμένων πειραματικών πρωτοκόλλων (όπως για την κατασκευή των cDNA βιβλιοθηκών και άλλων σχετικών με την αλληλούχιση διαδικασιών που μπορούν να εισάγουν θόρυβο στην ανάλυσή μας όπως είναι τα πολλαπλά αντίγραφα ακολουθιών ή μεροληψίες λόγω του περιεχομένου των ακολουθιών σε GC νουκλεοτίδια) για την παραγωγή ορθών και αμερόληπτων δεδομένων [266, 290].

Το βασικό πρωτόκολλο RNA-Seq που εφαρμόστηκε στα πειράματα που έλαβαν χώρα κατά την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής αφορούσε στην NGS Illumina τεχνολογία της οποίας τα βασικά στάδια συνοψίζονται στην **Εικόνα 2.7**.



Εικόνα 2.7. Αλληλούχιση RNA μέσω της NGS τεχνολογίας της Illumina

Στην Εικόνα 2.7 απεικονίζονται τα βασικά στάδια για την αλληλούχιση μικρού μήκους εγγραφών με την τεχνολογία της Illumina. Τα στάδια αυτά είναι: α) Η σύνδεση των προσαρμογέων στα τμήματα cDNA που έχουν συντεθεί από το εξαγόμενο RNA, β) Η πρόσδεση των DNA τμημάτων σε μια κυψέλη ροής (flow cell) που φέρει προσδεσμένα ολιγονουκλεοτίδια-πρωταρχικά τμήματα, γ) Η δημιουργία συστάδων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (clusters) μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων ενίσχυσης/πολλαπλασιασμού (μέσω γεφύρωσης) και αποδιάταξης, και δ) Η αλληλούχιση μέσω σύνθεσης (SBS), σε κύκλους σύνθεσης του συμπληρωματικού κλώνου και διέγερσης με laser των σηματοδοτημένων με φθορίζουσα χρωστική 4 νουκλεοτιδικών βάσεων που φέρουν αναστρέψιμους τερματιστές (Επεξεργασμένη Πληροφορία από τον οδηγό εισαγωγής της Illumina στην NGS τεχνολογία https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf).

Η αλληλούχιση του RNA πραγματοποιήθηκε από την βιοτεχνολογική εταιρεία Integragen (<https://www.integragen.com/fr/>) στη Γαλλία και τα πρωτογενή δεδομένα των εγγραφών παρελήφθησαν σε μορφή συμπιεσμένων αρχείων fastq.gz σε εξωτερικό σκληρό δίσκο.

2.3.2.1 Συνοπτική Περιγραφή των Πειραμάτων Αλληλούχισης (mi)RNA-Seq

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αναλύθηκαν υπολογιστικά τα πρωτογενή δεδομένα αλληλούχισης (mi)RNA-Seq που αφορούσαν σε:

- **Πρωτογενείς κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος RNS και RADH**

Ολικό RNA που απομονώθηκε από πρωτογενείς κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος RNS και RADH προερχόμενες από δύο ασθενείς (S85 και S87) με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα [με την διαδικασία που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.3.1.6] κατασκευάστηκαν cDNA βιβλιοθήκες με το NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Illumina. Τα βασικά στάδια που έλαβαν χώρα ήταν α) καθαρισμός των polyA mRNA μορίων από 1μg ολικού RNA χρησιμοποιώντας μαγνητικά σφαιρίδια με προσκολλημένα poly-T ολιγονουκλεοτίδια (με το αντίστοιχο Magnetic mRNA Isolation Kit της NEB), β) τμηματοποίηση των RNA μορίων χρησιμοποιώντας δισθενή κατιόντα σε υψηλή θερμοκρασία για να ληφθούν περίπου τμήματα των 300bp, γ) Σύνθεση δίκλωνων μορίων cDNA, και δ) Πρόσδεση των προσαρμογέων της Illumina και ενίσχυση της cDNA βιβλιοθήκης με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για να ακολουθήσει η αλληλούχιση μέσω σύνθεσης (Sequencing by Synthesis – SBS).

Διεξήχθησαν συνολικά δύο διαφορετικές παρτίδες (batches) πειραμάτων αλληλούχισης (**Πίνακας 3**) σε ζευγαρωτά άκρα (paired-end) μεγέθους 74 και 100 βάσεων (2*100 βάσεων και 2*74 με δείκτη (index) 8bp εντός των προσαρμογέων), αντίστοιχα, με την πλατφόρμα της Illumina HiSeq4000 (**Εικόνα 2.7**). Η ανάγνωση/αναφορά των βάσεων αλληλούχισης (base calling) διεξήχθη με το λογισμικό Real-Time Analysis software

sequence pipeline (έκδοση 2.7.7) με τις προκαθορισμένες παραμέτρους. Τα πρωτογενή μη επεξεργασμένα δεδομένα αλληλούχισης κάθε δείγματος αποθηκεύτηκαν σε δύο αρχεία αλληλούχισης FastQ [291], ως R1_fastq και R2_fastq που αντιστοιχούσαν στις 5' - > 3'(forward) και 3' <- 5'(reverse) εγγραφές, αντίστοιχα, των κλώνων της cDNA βιβλιοθήκης. Η περιγραφή των δειγμάτων και οι εξεταζόμενες συνθήκες απεικονίζονται στον Πίνακα 3.

sample_id	replicates	origin	growth	IRE1_status	condition	batch
SAMPLE1	RADH85par1	S85	ADH	WT	parental	2
SAMPLE2	RADH85par2	S85	ADH	WT	parental	2
SAMPLE3	RADH85par3	S85	ADH	WT	parental	1
SAMPLE4	RADH87par	S87	ADH	WT	parental	1
SAMPLE5	RADH85WT1	S85	ADH	activated_IRE1	WT	2
SAMPLE6	RADH85WT2	S85	ADH	activated_IRE1	WT	2
SAMPLE7	RADH85WT3	S85	ADH	activated_IRE1	WT	1
SAMPLE8	RADH87WT	S87	ADH	activated_IRE1	WT	1
SAMPLE9	RADH85Q1	S85	ADH	inactivated_IRE1	Q	2
SAMPLE10	RADH85Q2	S85	ADH	inactivated_IRE1	Q	2
SAMPLE11	RADH85Q3	S85	ADH	inactivated_IRE1	Q	1
SAMPLE12	RADH87Q	S87	ADH	inactivated_IRE1	Q	1
SAMPLE13	RNS85par1	S85	NS	WT	parental	2
SAMPLE14	RNS85par2	S85	NS	WT	parental	2
SAMPLE15	RNS85par3	S85	NS	WT	parental	1
SAMPLE16	RNS87par	S87	NS	WT	parental	1
SAMPLE17	RNS85WT1	S85	NS	activated_IRE1	WT	2
SAMPLE18	RNS85WT2	S85	NS	activated_IRE1	WT	2
SAMPLE19	RNS85WT3	S85	NS	activated_IRE1	WT	1
SAMPLE20	RNS87WT	S87	NS	activated_IRE1	WT	1
SAMPLE21	RNS85Q1	S85	NS	inactivated_IRE1	Q	2
SAMPLE22	RNS85Q2	S85	NS	inactivated_IRE1	Q	2
SAMPLE23	RNS85Q3	S85	NS	inactivated_IRE1	Q	1
SAMPLE24	RNS87Q	S87	NS	inactivated_IRE1	Q	1

Πίνακας 3. Συνοπτική περιγραφή των RNA-Seq δειγμάτων αλληλούχισης, RNS και RADH, καθώς και των πειραματικών συνθηκών που μελετήθηκαν.

Τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν σε τρία βιολογικά αντίγραφα (replicates) για τις κυτταρικές σειρές RNS85/RADH85 (από τον ασθενή S85) και σε μοναδικά αντίγραφα για τις κυτταρικές σειρές RNS87/RADH87 (από τον ασθενή S87). Συνολικά μελετήθηκαν τρεις εξεταζόμενες συνθήκες σύμφωνα με την IRE1 ενεργότητα: α) WT [βασική IRE1 ενεργότητα – κύτταρα πατρικής προέλευσης (parental)], β) activated_IRE1 [ενεργοποιημένη IRE1 – κύτταρα διαμολυσμένα με την αγρίου τύπου IRE1 (WT)] και γ) inactivated_IRE1 [απενεργοποιημένη IRE1 - κύτταρα διαμολυσμένα με την ανενεργή ισομορφή Q780* (Q)]. Το RNA-Seq πείραμα διεξήχθη σε δύο διαφορετικές παρτίδες δειγμάτων (1 και 2). ADH: διαφοροποιημένες νευροσφαίρες σε συνθήκες κυτταρικής προσκόλλησης (*adherent*), NS: δημιουργία νευροσφαιρών (*neurospheres*).

- **Συγγενικό Μοντέλο Ποντικού για την μελέτη του Γλοιοβλαστώματος**

Για την *in vivo* μελέτη της επίδρασης του αναστολέα της RNάσης ενεργότητας της IRE1 πρωτεΐνης, MKC8866, στην εξέλιξη αλλά και στην ευαισθητοποίηση σε ακτινοβολίες/χημειοθεραπεία του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος αναλύθηκαν

πρωτογενή δεδομένα αλληλούχισης του ευρύτατα διαδεδομένου ανοσοϊκανού προκλινικού μοντέλου ποντικού αλλομοσχεύματος (συγγενικό μοντέλο) με γλοιοβλάστωμα προερχόμενο από την κυτταρική σειρά γλιώματος του ποντικού GL261 (mouse glioma 261) [292]. Τα συγγενικά (syngeneic) μοντέλα ποντικών είναι μοντέλα που βασίζονται σε αλλομοσχεύματα αθανатоποιημένων καρκινικών κυττάρων από το ίδιο στέλεχος ποντικού από το οποίο προέρχεται το μοντέλο. Αυτό επιτρέπει την εμφύτευση (μεταμόσχευση) όγκων στον εγκέφαλο χωρίς άμεση απόρριψη από το ανοσοποιητικό σύστημα, γεγονός που τα προκρίνει κυρίως για την μελέτη ανοσολογικών θεραπειών στον καρκίνο. Η ποσοτικοποίηση των γονιδιακών οντοτήτων τόσο σε επίπεδο μεταγραφικών ισομορφών όσο και σε επίπεδο γονιδίων στους εμφυτευμένους όγκους της κυτταρικής σειράς GL261 πραγματοποιήθηκε για 7 διαφορετικές πειραματικές συνθήκες: 1) NR: μη αφαιρεθέντες όγκοι, 2) R: αφαιρεθέντες όγκοι χωρίς θεραπεία, 3) MKC: όγκοι που τους χορηγήθηκε ο αναστολέας MKC8866; 4) STUPP: όγκοι που τους εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο STUPP [241], 5) STUPP_MKC: όγκοι που τους εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο STUPP σε συνδυασμό με τον αναστολέα MKC8866, 6) PARENTAL: GL261 κύτταρα της πατρικής σειράς, και 7) STUPP_GEL: όγκοι που τους εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο STUPP σε συνδυασμό με την εμφύτευση γέλης ινώδους-κωλαγόνου απουσία του MKC8866 αναστολέα. Η αλληλούχιση διεξήχθη σε ζευγαρωτά άκρα (paired-end) μεγέθους 75 βάσεων με την πλατφόρμα της Illumina HiSeq4000 (**Εικόνα 2.7**). Ως γονιδίωμα αναφοράς του ποντικού χρησιμοποιήθηκε το GRCm38.p6 (Release M23) της βάσης GENCODE [293] ενώ ο μετασχηματισμός των Ensembl Gene Ids στα συνήθη Gene Symbols πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του πακέτου σχολιασμού της R, «org.Mm.eg.db» [294]. Για την μετατροπή των γονιδιακών συμβόλων του ποντικού (mgi_symbol) στα αντίστοιχα σύμβολα του ανθρώπινου γονιδιώματος (hgnc_symbol) χρησιμοποιήσαμε την συνάρτηση getLDS() του πακέτου της R, biomaRt [295, 296], η οποία μας επέτρεψε την ανάκτηση των ομόλογων γονιδίων στον άνθρωπο από την βάση Ensembl (<https://www.ensembl.org>) μετά την σύνδεση των δύο γονιδιακών συνόλων «mmusculus_gene_ensembl» και «hsapiens_gene_ensembl».

- **U87-MG κύτταρα γλοιοβλαστώματος (miRNAseq δεδομένα)**

Ολικό RNA απομονώθηκε με το αντιδραστήριο TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) από πρωτογενή κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87-MG και ποιοτικός έλεγχος του RNA διεξήχθη με τον Αναλυτή της Agilent, Bioanalyzer 6000 Nano assay (Santa Clara, CA, USA) ο οποίος υπολόγισε τον δείκτη ακεραιότητας RIN (RNA Integrity Number) για κάθε δείγμα. Με χρήση του miRNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) απομονώθηκε το σύνολο των miRNAs

από 1 µg ολικού RNA και οι βιβλιοθήκες κατασκευάστηκαν με το TruSeq Small RNA Library Prep Kit που επιτρέπει την πολυπλεξική αλληλούχιση [297]. Η τελευταία πραγματοποιήθηκε με το MiniSeq System της Illumina. Η επεξεργασία και ανάλυση των πρωτογενών miRNAseq δεδομένων αλληλούχισης διεξήχθη τόσο σε επίπεδο ώριμων (mature) όσο και σε επίπεδο πρόδρομων (pre-mature or hairpin) miRNAs με την βοήθεια κυρίως της πλατφόρμας miARma-Seq [298] (**Ενότητα 2.3.2.2**) σε περιβάλλον Linux (Ubuntu 16.04.6 LTS). Η ανάλυσή μας περιλάμβανε τόσο κύτταρα αγρίου-τύπου (WT-wild type) όσο και κύτταρα διαμολυσμένα με την κυρίαρχη-αρνητικού τύπου (DN-dominant negative) IRE1 ισομορφή, σε φυσιολογικές συνθήκες αλλά και σε συνθήκες στρες Ε.Δ. με την χορήγηση του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου τουνικαμυκίνη. Τα δείγματα που αναλύθηκαν καθώς και οι εξεταζόμενες συνθήκες συνοψίζονται στον **Πίνακα 4**.

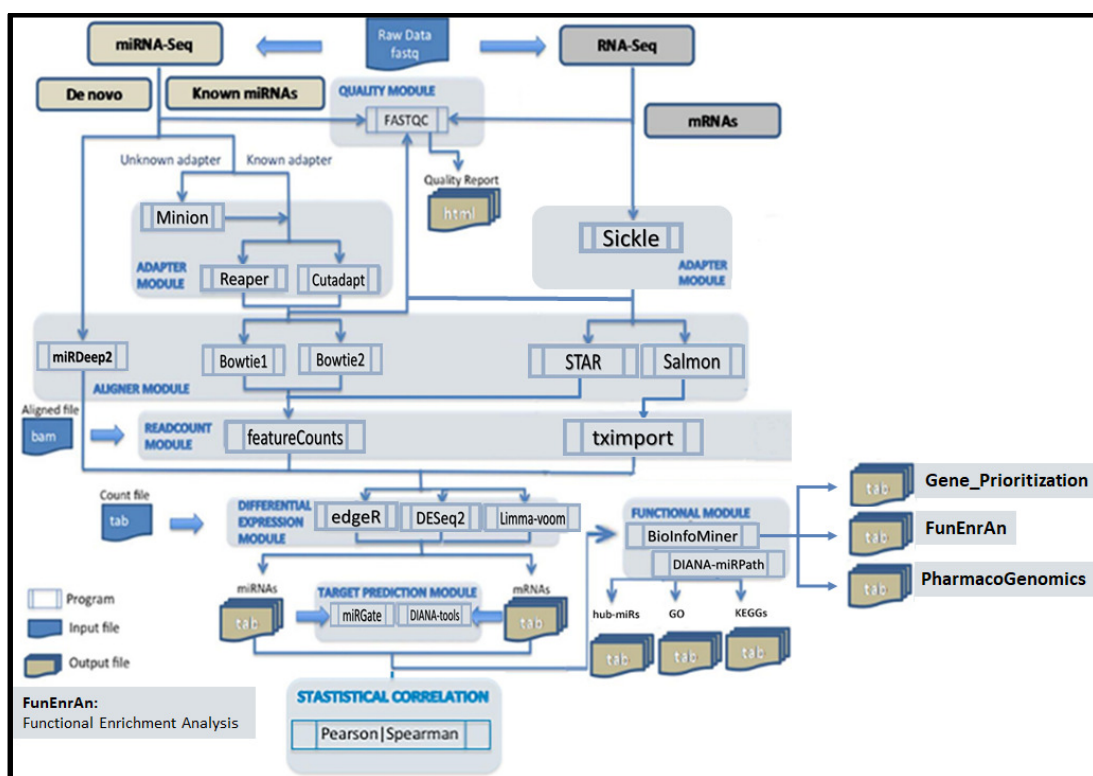
No.	Cell line	IRE1	Tunicamycin
1	U87	Wild type (WT)	-
2	U87	Wild type (WT)	-
3	U87	Wild type (WT)	-
4	U87	Wild type (WT_TN)	+
5	U87	Wild type (WT_TN)	+
6	U87	Wild type (WT_TN)	+
7	U87	Dominant negative (DN)	-
8	U87	Dominant negative (DN)	-
9	U87	Dominant negative (DN)	-
10	U87	Dominant negative (DN_TN)	+
11	U87	Dominant negative (DN_TN)	+
12	U87	Dominant negative (DN_TN)	+

Πίνακας 4. Συνοπτική περιγραφή των πειραματικών συνθηκών που αφορούσαν στα U87 miRNA-Seq δεδομένα.

2.3.2.2 Υπολογιστικές Ροές Εργασίας για την Επεξεργασία και Ανάλυση (mi)RNAseq Δεδομένων

Η επεξεργασία και ανάλυση των RNAseq δεδομένων που αφορούσαν τόσο σε mRNA όσο και σε miRNA μετάγραφα πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή με τις υπολογιστικές ροές εργασίας που απεικονίζονται στην **Εικόνα 2.8**. Τα πειράματα αλληλούχισης διεξήχθησαν σε ζευγαρωτά άκρα (paired-end) με μήκη εγγραφών 74 και 100 βάσεων και δείκτη εγγραφών (index) 8bp εντός των προσαρμογών, χρησιμοποιώντας την

πλατφόρμα της Illumina HiSeq4000 και το σύστημα MiniSeq (Illumina) για τα miRNAseq δεδομένα.



Εικόνα 2.8. Υπολογιστικές Ροές Εργασίας για την Επεξεργασία και Ανάλυση (mi)RNAseq δεδομένων

Οι ροές εργασίας περιλαμβάνουν κυρίως έξι βασικά στάδια ανάλυσης (modules) (Εικόνα 2.8) μέχρι την ταυτοποίηση διαφορικά εκφρασμένων γονιδιωματικών οντοτήτων, τα οποία υλοποιήθηκαν από διαφορετικά σύνολα υπολογιστικών εργαλείων. Τα στάδια αυτά είναι τα ακόλουθα: 1^ο Ποιοτικός έλεγχος των εγγραφών αλληλούχισης (QUALITY MODULE) ο οποίος υλοποιήθηκε με το λογισμικό εργαλείο FastQC (v.0.11.8) (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) εφαρμόζοντας συνήθως ως κατώτερη τιμή κατωφλίου για το ποιοτικό σκορ Phred (Q score) [299] την τιμή Q30 που ισοδυναμεί με πιθανότητα εσφαλμένης ανάγνωσης μιας βάσης 1/1000 (δηλαδή η πιθανότητα ορθής ανάγνωσης μιας βάσης είναι 99.9%). Η ανάλυση αυτή μας επιτρέπει να εξάγουμε μια λεπτομερή αναφορά ποιοτικού ελέγχου της αλληλούχισης και να εξάγουμε πολύ χρήσιμα συμπεράσματα για τις πιθανές πηγές τεχνικού θορύβου στα δεδομένα, 2^ο Έλεγχος εντοπισμού και αποκοπής των προσαρμογέων και δεικτών (barcodes) αλληλούχισης αλλά και των εγγραφών κακής ποιότητας (ADAPTER MODULE). Στην περίπτωση των mRNAseq δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό εργαλείο Sickle (v.1.33) (<https://github.com/najoshi/sickle>) το οποίο χρησιμοποιεί κυλιόμενα παράθυρα μαζί

με τιμές κατωφλίου για την αποδεκτή ποιότητα και το μήκος των εγγραφών για να προσδιορίσει πότε η ποιότητα είναι αρκετά χαμηλή για να περικόψει στο 3' άκρο και επίσης πότε η ποιότητα είναι αρκετά υψηλή για να περικόψει στο 5' άκρο των εγγραφών. Επίσης ο αλγόριθμος μας επέτρεψε να αφαιρέσουμε εγγραφές με βάση το όριο μήκους που είχαμε θέσει αρχικά για την αλληλούχιση. Στη περίπτωση των miRNAseq δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα ανάλυσης miARma-Seq [298] η οποία χρησιμοποιεί διαφορετικά εργαλεία για προσαρμογή των εγγραφών με βάση προκαθορισμένα κριτήρια ποιότητας. Η miARma-Seq εγκαταστάθηκε ως αυτόνομο λογισμικό σε περιβάλλον Ubuntu 16.04 LTS. Το Cutadapt [300] και το Reaper [301] χρησιμοποιούνται κυρίως για την αποκοπή των προσαρμογών από τις εγγραφές αλλά και των περιοχών χαμηλής πολυπλοκότητας ενώ ο αλγόριθμος Minion [301] επιτρέπει την πρόβλεψη των ακολουθιών του προσαρμογέα. όταν δεν τον γνωρίζουμε, μέσω στοίχισης των ακολουθιών των εγγραφών και εύρεσης της ακολουθίας με την μεγαλύτερη συχνότητα στο 3' άκρο. Επίσης, η πλατφόρμα miARma-Seq περιλαμβάνει ένα ενσωματωμένο εργαλείο που μπορεί να απομακρύνει συγκεκριμένο αριθμό νουκλεοτιδίων από τα 3' και 5' άκρα των εγγραφών τα οποία συνήθως περιέχουν χαμηλής ποιότητας πληροφορία. Ως τελικό αποτέλεσμα μετά την περικοπή των εγγραφών ήταν η δημιουργία γραφημάτων με την κατανομή του μήκους των εγγραφών σε κάθε δείγμα αλλά και η δυνατότητα εκ νέου ποιοτικού ελέγχου με το FastQC. Στην περίπτωση των U87 miRNA-Seq δεδομένων οι ακολουθίες του προσαρμογέα αποκόπηκαν με το εργαλείο Cutadapt και οι αναγνώσεις με μέγεθος μικρότερο των 16 βάσεων αφαιρέθηκαν, ενώ σαν τιμή κατωφλίου για το ποιοτικό σκορ Phred, χρησιμοποιήθηκε η τιμή Q25, 3^ο **Στοίχιση των εγγραφών αλληλούχισης σε γονιδίωμα αναφοράς (ALIGNER MODULE)** με σκοπό την χαρτογράφηση των εγγραφών και την μετέπειτα ποσοτικοποίησή τους σε αντίστοιχες γονιδιωματικές οντότητες. Ως γονιδίωμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ως επι το πλείστον το Ανθρώπινο Γονιδίωμα Αναφοράς (Human Reference Genome - Release 28 - GRCh38.p12) της βάσης GENCODE [293] ενώ στην περίπτωση των U87 miRNA-Seq δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το προ-κατασκευασμένο (pre-built) ευρετήριο του ανθρώπινου γονιδιώματος «H.sapiens UCSC hg38». Η πλατφόρμα miARma-seq χρησιμοποιεί διαφορετικούς ευθυγραμμιστές ανάλογα το είδος των δεδομένων που αναλύονται. Για τα miRNAseq δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν οι ευθυγραμμιστές Bowtie1 [302] και Bowtie2 [303] με τον πρώτο να προκρίνεται για εγγραφές μήκους <50 ζευγών βάσεων. Εντούτοις το Bowtie2 μπορεί να καλύψει πλήρως και στοίχιση με κενά κάνοντας χρήση βαθμών ποινής για τα κενά. Ο αριθμός των κενών και των μηκών τους δεν υπόκεινται σε περιορισμούς εκτός και αν ο χρήστης εισάγει κάποιο σύστημα βαθμολόγησης. Από την άλλη πλευρά, το Bowtie1 εντοπίζει

μόνο στοιχίσεις χωρίς κενά. Για την περίπτωση πρόβλεψης νέων μορίων miRNAs που δεν έχουν ακόμη χαρακτηριστεί αλλά και για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που αφορούσαν ήδη γνωστά miRNAs, χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος miRDeer2 [304] που συλλέγει τα μη-στοιχισμένα miRNAseq δεδομένα για να προβλέψει νέα miRNAs με βάση την εκτίμηση διαφορετικών δομικών χαρακτηριστικών και χαρακτηριστικών ακολουθίας όπως είναι η ικανότητα ενός πρόδρομου miRNA (pre-miRNA) να σχηματίζει την δομή φουρκέτας (hairpin structure) ή να ακολουθεί το πρότυπο επεξεργασίας από την Dicer [305]. Δηλαδή ο miRDeer2 αλγόριθμος χρησιμοποιεί ένα πιθανοθεωρητικό μοντέλο της βιογένεσης των miRNAs για να εκτιμά την συμβατότητα της θέσης και της συχνότητας του αλληλουχημένου RNA με την 2ταγή δομή του πρόδρομου (precursor) miRNA. Για την στοιχίση των mRNAseq δεδομένων στο γονιδίωμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί ευθυγραμμιστές, ο πολυδύναμος και απαιτητικός σε μνήμη STAR (Spliced Transcripts Alignment to a Reference - Version 2.7.8a) [306] που επιτρέπει την χαρτογράφηση εγγραφών που εκτείνονται ακόμη και πέρα από τις θέσεις ματίσματος για την ανάλυση κυρίως σε επίπεδο γονιδίου, και ο ταχύτατος και πολύ λιγότερο απαιτητικός σε υπολογιστικούς πόρους, Salmon (v.1.0.0) [307] ο οποίος επιτρέπει την ταχεία ποσοτικοποίηση των μεταγράφων με βάση ένα προκαθορισμένο σύνολο μεταγραφικών στόχων. Η εκδοχή του Salmon (<https://salmon.readthedocs.io/en/latest/salmon.html#using-salmon>) που υλοποιήθηκε ήταν η στηριζόμενη στην χαρτογράφηση (mapping-based mode) η οποία τρέχει σε δύο διαδοχικές ξεχωριστές φάσεις. Η 1^η περιλαμβάνει την κατασκευή ευρετηρίου (indexing) με βάση κάποιο προκαθορισμένο μεταγράφο αναφοράς σε μορφοποίηση fasta, και η 2^η φάση που περιλαμβάνει την ποσοτικοποίηση των εγγραφών/αναγνώσεων με βάση τις προκαθορισμένες μεταγραφικές οντότητες του ευρετηρίου. Στη περίπτωση του ευθυγραμμιστή STAR, το fasta γονιδίωμα αναφοράς μετατρέπεται σε συστοιχία καταλήξεων suffix array, και η διαδικασία χαρτογράφησης εκτελείται δύο φορές (2-pass). Οι θέσεις ματίσματος που εντοπίστηκαν στην 1^η αναζήτηση εισάγονται στο ευρετήριο του γονιδιώματος και γίνεται επαναχαρτογράφησή τους κατά την 2^η αναζήτηση, γεγονός που επιτρέπει την χαρτογράφηση περισσότερων εγγραφών ματίσματος σε καινούριες θέσεις, 4^ο) **Ποσοτικοποίηση των εγγραφών ανα γονιδιωματική οντότητα (π.χ. γονίδιο, εξώνιο, μετάγραφο) (READCOUNT MODULE)**. Το γεγονός ότι ο αριθμός των εγγραφών ενός RNA μεταγράφου (counts) είναι ανάλογος με τα επίπεδα έκφρασής του, ο αριθμός των counts συνοψίζεται σε συγκεκριμένες βιολογικές οντότητες. Οι στοιχισμένες αναγνώσεις όπως προέκυψαν με τους ευθυγραμμιστές STAR και Bowtie1/2 συνοψίστηκαν σε μετρήσεις (counts) γνωστών γονιδίων και μορίων miRNAs, αντίστοιχα, με τον αλγόριθμο featureCounts

[308] που υπολογίζει ποσοτικά τις εγγραφές ανα γονιδιωματική οντότητα με βάση το αντίστοιχο αρχείο σχολιασμού του γονιδιώματος αναφοράς που είναι ένα GTF (Gene Transfer Format) αρχείο με χρήσιμη πληροφορία για την χαρτογράφηση των χαρακτηριστικών που μετράμε την έκφρασή τους. Για την σύνοψη των εγγραφών σε ώριμα και πρόδρομα μόρια miRNA που αφορούσαν στα U87 miRNA-Seq δεδομένα χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο αρχείο σχολιασμού «hsa.gff3» της βάσης miRBase v21 & v22 κατόπιν μετασχηματισμού του σε αρχείο gtf με το πρόγραμμα gffread [309]. Επίσης με την εντολή sed αντικαταστήσαμε την ένδειξη «exon» στο αρχείο σχολιασμού με την ένδειξη «miRNA» έτσι ώστε στο τέλος της ποσοτικοποίησης να έχουμε tab delimited αρχεία εγγραφών με counts είτε για τα ώριμα είτε για τα πρόδρομα (hairpin) miRNAs. Στη περίπτωση ταυτοποίησης νέων (novel) μορίων miRNA, η ποσοτικοποίηση αυτή υλοποιήθηκε με τον αλγόριθμο miRDeep2. Ένα πολύ χρήσιμο R/Bioconductor πακέτο που χρησιμοποιήσαμε για την σύνοψη των μετρήσεων των εγγραφών των μεταγράφων με Salmon ήταν το tximport [310] το οποίο εισάγει και συνοψίζει εκτιμήσεις της αφθονίας των μεταγραφικών ισομορφών για περαιτέρω ανάλυση τόσο σε επίπεδο μεταγράφων όσο και σε επίπεδο γονιδίων. Συγκεκριμένα το πακέτο tximport εισάγει εκτιμήσεις της αφθονίας σε επίπεδο μεταγράφων, εκτιμώμενες τιμές counts και μήκη μεταγραφικών ισομορφών και συνοψίζει σε πίνακες που μπορούν να αξιοποιηθούν από αλγόριθμους στατιστικής ανάλυσης στη συνέχεια για συγκριτικές μελέτες. Το μέσο μήκος μεταγράφου, σταθμισμένο με εκτιμήτριες της αφθονίας των μεταγράφων σε κάθε δείγμα παρέχεται ως πίνακας και χρησιμοποιήθηκε ως αντιστάθμισμα (offset) για την διαφορετική έκφραση των counts σε επίπεδο γονιδίου. Συνεπώς αυτή η προσέγγιση διορθώνει για πιθανές αλλαγές στο μήκος των γονιδίων μεταξύ των δειγμάτων (π.χ. από την έκφραση διαφορετικών μεταγραφικών ισομορφών), **5°) Διαφορική έκφραση γονιδίων (DIFFERENTIAL EXPRESSION MODULE)**. Σε αυτό το στάδιο της ανάλυσης αναζητήσαμε γονίδια ή miRNAs των οποίων η έκφραση διαφέρει μεταξύ των εξεταζόμενων πειραματικών συνθηκών και τα υπολογιστικά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το edgeR [311], το DESeq2 [312], η Limma-voom [313] και το NOISeq [314]. Ουσιαστικά πρόκειται για διαφορετικές προσεγγίσεις στην εκτίμηση της γονιδιακής έκφρασης που ακολουθούν όμως τα ίδια βασικά βήματα ανάλυσης, όπως α) *φιλτράρισμα των εγγραφών με μηδενικά ή πολύ χαμηλά counts* στην πλειονότητα των δειγμάτων, β) *κανονικοποίηση των τιμών έκφρασης* ώστε να διορθωθούν αποκλίσεις κυρίως λόγω του διαφορετικού μεγέθους των βιβλιοθηκών αλληλούχισης και των μεροληψιών στη σύνθεση του RNA που προκαλούνται από τον τρόπο δειγματοληψίας και επεξεργασίας των δειγμάτων, γ) *εκτίμηση της διασποράς της έκφρασης ανα γονιδιωματική οντότητα* η οποία

παρουσιάζει εξάρτηση με την μέση τιμή προκαλώντας ετεροσκεδαστικότητα στα δεδομένα, δ) *στατιστικό έλεγχο* σύγκρισης για τον προσδιορισμό στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδιωματικών οντοτήτων. Η έκφραση κάθε γονιδίου ή μεταγράφου μοντελοποιείται συνήθως με γενικευμένα γραμμικά μοντέλα σαν γραμμικός συνδυασμός διαφορετικών παραγόντων που μπορεί να περιλαμβάνουν την κατηγορία (π.χ. υγιής/ασθενής), τον χρόνο (π.χ. χορήγηση φαρμάκου) και γενικότερα οποιαδήποτε παράμετρο που εκτιμήθηκε από τα δεδομένα. Ονομάζεται γενικευμένο γραμμικό μοντέλο και η κατανομή της τιμής έκφρασης μπορεί να διαφέρει από την κανονική κατανομή (Limma) και να ακολουθεί την αρνητική διωνυμική κατανομή (Negative Binomial Distribution) (edgeR, DESeq2) υποθέτοντας μια τετραγωνική σχέση μέσης τιμής-διασποράς και ϵ διόρθωση πολλαπλών δοκιμών για τον περιορισμό του ποσοστού των θετικά εσφαλμένων εκτιμήσεων (false positives). Εν συντομία, θα λέγαμε ότι τόσο το edgeR όσο και το DESeq2 στηρίζονται στην υπόθεση ότι τα περισσότερα γονίδια δεν είναι διαφορικά εκφρασμένα ενώ αυτά που εμφανίζουν διαφορική έκφραση κατανέμονται ισοδύναμα μεταξύ αυτών που υπέρ- και υπό-εκφράζονται. Στο DESeq2 ο παράγοντας κανονικοποίησης για ένα συγκεκριμένο δείγμα υπολογίζεται ως η διάμεσος της αναλογίας που προκύπτει για κάθε γονίδιο κατόπιν σύγκρισης της μέτρησης των εγγραφών του σε σχέση με τον γεωμετρικό μέσο της έκφρασής του σε όλα τα δείγματα. Η βασική ιδέα είναι ότι τα μη διαφορικά εκφρασμένα γονίδια θα πρέπει να έχουν παρόμοιες μετρήσεις εγγραφών μεταξύ των δειγμάτων, δίνοντας μια αναλογία ίση με 1. Υποθέτοντας ότι τα περισσότερα γονίδια δεν είναι διαφορικά εκφρασμένα, η διάμεσος αυτής της αναλογίας για το δείγμα παρέχει μια εκτιμήτρια του διορθωτικού παράγοντα που πρέπει να εφαρμόζεται σε όλες τις μετρήσεις αυτού του δείγματος για να πληρείται η αρχική υπόθεση. Τόσο οι συντελεστές βιολογικής μεταβλητότητας (coefficients) όσο και οι παράμετροι διακύμανσης στην αρνητική διωνυμική κατανομή εκτιμώνται από την Μπαγεσιανή προσέγγιση συρρίκνωσης [315]. Ομοίως το edgeR, βασίζεται στην υπόθεση ότι τα περισσότερα γονίδια δεν είναι διαφορικά εκφρασμένα και χρησιμοποιεί τον παράγοντα κανονικοποίησης TMM (Trimmed Mean of M-values). Ο παράγοντας αυτός υπολογίζεται για κάθε δείγμα, θεωρώντας κάθε φορά, ένα δείγμα σαν δείγμα αναφοράς (reference sample) και τα υπόλοιπα σαν δείγματα δοκιμής (test samples). Για κάθε δείγμα δοκιμής, ο TMM υπολογίζεται ως ο σταθμισμένος μέσος των log ratios ανάμεσα σε αυτό το δείγμα και το δείγμα αναφοράς μετά από αποκλεισμό των πιο εκφρασμένων γονιδίων και των γονιδίων με τα μεγαλύτερα log ratios. Σύμφωνα με την αρχική υπόθεση του μικρού αριθμού διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων, ο παράγοντας TMM θα πρέπει να είναι κοντά στο 1. Σε αντίθετη περίπτωση, η τιμή του παρέχει μια εκτιμήτρια

του διορθωτικού παράγοντα που πρέπει να εφαρμοστεί στα μεγέθη των βιβλιοθηκών (και όχι των πρωτογενών μετρήσεων) προκειμένου να πληρείται η αρχική υπόθεση. Για να προκύψουν κανονικοποιημένες μετρήσεις εγγραφών, οι παράγοντες κανονικοποίησης TMM επανασταθμίζονται με την μέση τιμή των κανονικοποιημένων μεγεθών των βιβλιοθηκών και στη συνέχεια οι πρωτογενείς μετρήσεις εγγραφών διαιρούνται με αυτούς τους επανασταθμισμένους παράγοντες κανονικοποίησης. Όσον αφορά στην εκτίμηση της διασποράς το edgeR θεωρεί ότι η διασπορά των counts εξαρτάται από δύο παραμέτρους διακύμανσης που ονομάζονται διακύμανση αρνητικής διωνυμικής και διακύμανση οιοειή πιθανότητας (quasi-likelihood dispersion). Η πρώτη εκτιμάται προσαρμόζοντας μια προσέγγιση μέσης διασποράς σε όλα τα γονίδια ενώ η δεύτερη εκτιμάται από την Μπαγεσιανή μέθοδο συρρίκνωσης. Η γραμμική μοντελοποίηση με την limma διεξήχθη σε μετασχηματισμένες log-CPM (counts per million) τιμές που υπολογίστηκαν με το edgeR λογισμικό ακολουθώντας την TMM κανονικοποίηση. Στη περίπτωση αυτή υποθέτουμε ότι οι τιμές έκφρασης ακολουθούν κανονική κατανομή και η σχέση μεταξύ μέσης τιμής-διακύμανσης σταθμίζεται με την χρήση βαρών ακριβείας που εκτιμώνται με την συνάρτηση voom(). Έτσι το βάρος κάθε παρατήρησης εισήχθη στη συνέχεια στην εμπειρική κατά Bayes ανάλυση της limma. Η μέθοδος NOISeq διαφέρει από τις προηγούμενες μεθόδους γιατί είναι μια μη παραμετρική μέθοδος που δεν στηρίζεται σε υποθέσεις σχετικά με την κατανομή που ακολουθούν τα δεδομένα. Μας επιτρέπει να διεξάγουμε ανάλυση διαφορικής έκφρασης είτε στις πρωτογενείς μετρήσεις ή σε ήδη κανονικοποιημένα ή μετασχηματισμένα δεδομένα από διαφορετικές μεθόδους. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του NOISeq είναι ότι μπορεί να διεξάγει ανάλυση διαφορικής έκφρασης ακόμη και χωρίς καθόλου αντίγραφα τεχνικών δειγμάτων (replicates) μέσω της μεθόδου NOISeq-sim όπου μέσω προσομοίωσης δημιουργεί τεχνικά αντίγραφα. Όσον αφορά στους στατιστικούς ελέγχους που διεξήχθησαν για τον εντοπισμό των στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων πρέπει να αναφέρουμε ότι στη περίπτωση του DESeq2, δύο διαφορετικά είδη υποθέσεων διεξήχθησαν ανάλογα με το πλήθος των παραγόντων (coefficients) που εισαγάγαμε στο design matrix για την ερμηνεία της βιολογικής μεταβλητότητας. Η δοκιμασία Wald εφαρμόστηκε στην περίπτωση ελέγχου ενός παράγοντα/συνθήκης με δύο διαφορετικές καταστάσεις όπου χρησιμοποιήσαμε το εκτιμώμενο τυπικό σφάλμα του log₂ fold change για να ελέγξουμε αν είναι ίσο με μηδέν, και την δοκιμασία του λόγου πιθανότητας (likelihood ratio test - LRT) [316, 317]. Η τελευταία εξετάζει δύο μοντέλα για τα counts, ένα πλήρες (full) μοντέλο με ένα συγκεκριμένο αριθμό παραγόντων και ένα περιορισμένο (reduced) μοντέλο στο οποίο έχουν αφαιρεθεί κάποιοι από τους όρους του πλήρες μοντέλου. Η δοκιμασία ελέγχει αν η αυξημένη

πιθανότητα μεταβολής της έκφρασης με την χρήση των επιπλέον παραγόντων του πλήρες μοντέλου είναι μεγαλύτερη από την αναμενόμενη εάν αυτοί οι επιπλέον όροι είναι πράγματι ίσοι με μηδέν. Συνεπώς η LRT είναι χρήσιμη για να εξετάσουμε πολλαπλούς παράγοντες ταυτόχρονα, για παράδειγμα παράγοντες με 3 ή περισσότερες καταστάσεις, ή όλες τις συσχετίσεις ανάμεσα σε δύο μεταβλητές. Η LRT για τα count δεδομένα είναι εννοιολογικά παρόμοια με την ανάλυση διασποράς (ANOVA) στην γραμμική παλινδρόμηση, με εξαίρεση ότι στο γενικευμένο γραμμικό μοντέλο της αρνητικής διωνυμικής, χρησιμοποιούμε την ανάλυση της απόκλισης (ANODEV) όπου η απόκλιση αποτυπώνει την διαφορά πιθανότητας μεταξύ του πλήρες και του περιορισμένου μοντέλου. Με παρόμοιο τρόπο στο edgeR οι στατιστικοί έλεγχοι περιλαμβάνουν το exact test για ζευγαρωτές συγκρίσεις σε αντιστοιχία με το Fisher's exact test και το LRT ή το quasi-likelihood F-test (QL F-test) [318] για πιο πολύπλοκα πειράματα με περισσότερες από δύο παραμέτρους και αλληλεπιδράσεις συντελεστών. Ενώ το LRT χρησιμοποιείται ευρέως για την στατιστική συμπερασματολογία όταν εφαρμόζουμε γενικευμένα γραμμικά μοντέλα (GLMs), το QL F-test προτιμάται καθώς αντικατοπτρίζει την αβεβαιότητα στην εκτίμηση της διακύμανσης κάθε γονιδίου. Έτσι, παρέχει έναν πιο εύρωστο και αξιόπιστο έλεγχο του ποσοστού σφάλματος όταν ο αριθμός των replicates είναι μικρός.

Στο σημείο αυτό είναι επίσης πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι πριν την διεξαγωγή της Ανάλυσης Διαφορικής Γονιδιακής Έκφρασης πραγματοποιήθηκε και ένας τρίτος ποιοτικός έλεγχος που αφορούσε στην ποιοτική εκτίμηση των δεδομένων (π.χ. απομάκρυνση μη ικανοποιητικών ποιοτικά δεδομένων) μέσω της περιγραφικής διερευνητικής ανάλυσης των δειγμάτων (**6^ο στάδιο ανάλυσης - EXPLORATORY MODULE**). Η συγκριτική επισκόπηση μεταξύ των δειγμάτων μας επέτρεψε να ελέγξουμε τον βαθμό διαχωρισμού των πειραματικών συνθηκών, να εντοπίσουμε κάποιο ιδιαίτερο παράγοντα που πρέπει να συμπεριλάβουμε στις στατιστικές μας αναλύσεις αλλά και να ανιχνεύσουμε κάποιο τεχνικό θόρυβο (batch effect) στα δείγματα (π.χ. μόλυνση) που έπρεπε να εξαλειφθεί για την διεξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τόσο θηκογράμματα και διαγράμματα πυκνότητας των κανονικοποιημένων και μη-κανονικοποιημένων δεδομένων για τον έλεγχο της κατανομής των μετρήσεων αναγνώσεων όσο και μέθοδοι μείωσης των διαστάσεων και ομαδοποίησης των δειγμάτων με απεικόνιση των αποτελεσμάτων. Στις μεθόδους αυτές περιλαμβάνονται η Πολυδιάστατη Κλιμακοποίηση (MDS - Multidimensional Scaling) [319] που υλοποιήθηκε με το λογισμικό του edgeR και της Limma μέσω της συνάρτησης plotMDS(), η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA - Principal Components Analysis) [320] η οποία υλοποιήθηκε με το λογισμικό του DESeq2 μέσω της

συνάρτησης `plotPCA()` καθώς και οι θερμικοί χάρτες (Heatmaps) [321] με τα διαγράμματα μη εποπτευόμενης ιεραρχικής ομαδοποίησης στηριζόμενα σε πίνακες μετρικών αποστάσεων (π.χ. Ευκλείδεια απόσταση, Manhattan, Pearson) για την εκτίμηση της ομοιότητας ή της ανομοιότητας μεταξύ των δειγμάτων και των παρατηρήσεων. Για την δημιουργία θερμικών χαρτών χρησιμοποιήθηκαν πακέτα της R όπως το "ComplexHeatmap" [321] και το `rheatmap()`. Για την μοντελοποίηση και αφαίρεση του batch effect αλλά και οποιουδήποτε μη επιθυμητού τεχνικού θορύβου που εντοπίσαμε στα MDS και PCA γραφήματα χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση `svaseq()` [322] του Bioconductor R πακέτου `sva` [323] μέσω της εκτίμησης υποκατάστατων μεταβλητών (surrogate variables) που εισήχθησαν στη συνέχεια στον πίνακα μοντελοποίησης. Στη περίπτωση της ανάλυσης των miRNAs με την πλατφόρμα miARma-Seq, τα προαναφερόμενα γραφήματα της περιγραφικής ανάλυσης των δεδομένων περιλαμβάνονται σε μια εκτενή αναφορά που δημιουργείται σε pdf μορφοποίηση.

Όμως οι περισσότερες στατιστικές μέθοδοι που εφαρμόζονται για την περιγραφική ανάλυση των πολυδιάστατων δεδομένων, όπως η ομαδοποίηση ή η PCA αποδίδουν καλύτερα όταν γενικά υπάρχει το ίδιο εύρος διακύμανσης στα διαφορετικά εύρη μεταβολής των μέσων τιμών. Δηλαδή όταν η αναμενόμενη τιμή διακύμανσης είναι περίπου η ίδια μεταξύ των διαφορετικών μέσων τιμών, οπότε τα δεδομένα θεωρούνται ομοσκεδαστικά. Όμως στην περίπτωση των πρωτογενών counts στα RNA-Seq δεδομένα, η διακύμανση αυξάνεται σε σχέση με την μέση τιμή. Για παράδειγμα, εάν επιχειρήσουμε μια PCA ανάλυση απευθείας στον πίνακα των κανονικοποιημένων read counts με βάση το μέγεθος της βιβλιοθήκης, το αποτέλεσμα συνήθως εξαρτάται αποκλειστικά από λίγα γονίδια, τα πιο ισχυρά εκφρασμένα επειδή αυτά εμφανίζουν τις μεγαλύτερες απόλυτες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Ένας απλός και συχνά συνήθης τρόπος που εφαρμόζεται για την αποφυγή αυτού του φαινομένου είναι να χρησιμοποιούμε τον λογάριθμο των κανονικοποιημένων count τιμών συν μια μικρή θετική σταθερά (pseudocount). Εντούτοις, ενέχεται ο κίνδυνος στα αποτελέσματά μας να κυριαρχούν τα γονίδια με τις πιο χαμηλές τιμές counts, αφενός λόγω του ισχυρού θορύβου Poisson που είναι εγγενής στις μικρές τιμές των counts και αφετέρου επειδή η λογαριθμοποίηση ενισχύει τις διαφορές για τις μικρότερες τιμές, με αποτέλεσμα τα γονίδια με τα χαμηλά counts να εμφανίζουν τις ισχυρότερες σχετικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Ένας παρόμοιος τρόπος μετασχηματισμού των δεδομένων είναι ο logCPM μετασχηματισμός που υλοποιήσαμε με το πακέτο edgeR κάνοντας χρήση της συνάρτησης `cpm()`, θέτοντας στην παράμετρο `prior.count` τιμές συνήθως 3-5. Οι σχετικά ψηλές τιμές της `prior.count` συρρικνώνουν τις log διαφορές κοντά στο μηδέν για να μειωθεί

η επίδραση των χαμηλών counts. Μια άλλη εναλλακτική προσέγγιση που χρησιμοποιήσαμε επειδή προσφέρει καλύτερο θεωρητικό υπόβαθρο με έναν περισσότερο ορθολογικό τρόπο εκτίμησης της παραμέτρου pseudocount ήταν ο Μετασχηματισμός Σταθεροποίησης της Διακύμανσης (VST - Variance Stabilizing Transformation) [324-326] που υλοποιείται με την συνάρτηση vst() του πακέτου DESeq2. Και οι δύο μετασχηματισμοί παράγουν δεδομένα στην κλίμακα log2 τα οποία έχουν κανονικοποιηθεί σε σχέση με το μέγεθος της βιβλιοθήκης ή άλλους παράγοντες κανονικοποίησης. Ο βασικός στόχος είναι να εξαλειφθεί η εξάρτηση της διακύμανσης πάνω στην μέση τιμή, κυρίως όταν η μέση τιμή είναι μικρή όπου υπάρχει υψηλή διακύμανση των log2 counts.

Τελευταίο αλλά όχι λιγότερο σημαντικό στάδιο στην ανάλυση των RNA-Seq δεδομένων είναι ο λειτουργικός χαρακτηρισμός (**FUNCTIONAL MODULE**) των ταυτοποιημένων διαφορικά εκφρασμένων μορίων mRNA ή miRNA όπως αναδείχθηκαν από το DIFFERENTIAL EXPRESSION MODULE. Όμως για να επιτευχθεί το στάδιο αυτό στην περίπτωση των miRNAs πρέπει αρχικά να προβλεφθούν τα γονίδια-στόχοι των σημαντικών miRNAs ή ακόμη να αναδειχθούν miRNAs που ελέγχουν την έκφραση των σημαντικών mRNAs (**TARGET PREDICTION MODULE**) (Εικόνα 2.8). Μέσω της βάσης miRGate, η πλατφόρμα miARma-Seq προσφέρει την δυνατότητα πρόβλεψης miRNA-mRNA στόχων για διαφορικά εκφρασμένα miRNAs ή γονίδια [327]. Αξίζει να αναφερθεί, ότι η πλατφόρμα miARma-Seq όχι μόνο αναδεικνύει τους πιθανούς στόχους των διαφορικά εκφρασμένων miRNAs ή mRNAs αλλά όταν παρέχονται και τα δύο σύνολα δεδομένων στην ανάλυση, μπορούν να διεξαχθούν αρνητικές συσχετίσεις των επιπέδων έκφρασης μέσω υπολογισμού του Pearson και Spearman συντελεστή συσχέτισης ώστε να εξαχθούν διαφορικά εκφρασμένα mRNAs που αποτελούν στόχους των διαφορικά εκφρασμένων miRNAs. Μια άλλη σημαντική πλατφόρμα που χρησιμοποιήσαμε για την επαλήθευση, ενίσχυση και επέκταση των αποτελεσμάτων μας ήταν ο web server των DIANNA tools (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>) [328] που παρέχει αλγόριθμους, βάσεις δεδομένων και λογισμικό για την ανάλυση και ερμηνεία των δεδομένων με συστημικό τρόπο. Περιλαμβάνει μεταξύ άλλων, την ανάλυση της έκφρασης των δεδομένων νέας γενιάς αλληλούχισης, τον λειτουργικό σχολιασμό των ρυθμιστικών miRNA μορίων και των γονιδίων-στόχων τους καθώς και την ερμηνεία του ρόλου των μη-κωδικοποιών RNAs σε διάφορες ασθένειες και μοριακά μονοπάτια. Για την ταυτοποίηση των πειραματικά επιβεβαιωμένων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των miRNAs και των γονιδίων-στόχων τους χρησιμοποιήσαμε την βάση DIANA-TarBase v7.0 [329] για το είδος Homo Sapiens εισάγοντας είτε τα διαφορικά εκφρασμένα miRNAs στο πεδίο αναζήτησης είτε τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια (Εικόνα

2.9). Η διερεύνησή μας αυτή επεκτάθηκε όμως και στον εντοπισμό υποψηφίων γονιδίων-στόχων των σημαντικών miRNAs μέσω του αλγορίθμου πρόγνωσης DIANA-microT-CDS [328, 330] ο οποίος έχει εκπαιδευτεί ειδικά σε ένα θετικό και αρνητικό σύνολο Στοιχείων Αναγνώρισης των miRNAs (MREs - miRNA Recognition Elements) που βρίσκονται τόσο στην 3'-UTR περιοχή όσο και στις CDS περιοχές των γονιδίων. Στα αποτελέσματα της αναζήτησης περιλαμβάνονται σύνδεσμοι που παραπέμπουν σε πειράματα τα οποία πιστοποιούν την προβλεφθείσα αλληλεπίδραση αλλά και σε άλλα προγράμματα πρόγνωσης που αναδεικνύουν την ίδια αλληλεπίδραση. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι υπάρχει απεικόνιση των προτεινόμενων περιοχών πρόσδεσης των γονιδίων-στόχων με την αντίστοιχη περιοχή του miRNA καθώς και το σκορ αντιστοίχισης αλλά και συντήρησης των νουκλεοτιδικών καταλοίπων που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση miRNA-γονιίου στόχου.

The screenshot displays the TarBase v7.0 search results for hsa-miR-34a-5p. The search bar at the top contains 'hsa-miR-34a-5p'. Below it, a table lists target genes with columns for Gene name, miRNA name, Methods, and Pred. Score. The first row shows ZFP37 (hsa) with hsa-miR-34a-5p and a score of 1.000. The second row shows NOTCH1 (hsa) with hsa-miR-34a-5p and a score of 0.985. The third row shows MCM7 (hsa) with hsa-miR-34a-5p and a score of 0.985. Below the table, there is a section for Publication, Methods, Tissue, Cell line, Tested, and Exp. cell line condition. The first entry is Ashish Lal et al. 2011, with methods B, Q, M, and tissue Cervix. The second entry is Ashish Lal et al. 2011, with methods B, Q, W, M, tissue Intestine, and cell line HCT116. The third entry is TJP1 (hsa) with hsa-miR-34a-5p and methods O, W. The fourth entry is TAF5 (hsa) with hsa-miR-34a-5p and methods B, M. The fifth entry is NYFC (hsa) with hsa-miR-34a-5p and methods B, M. On the right side, there are filters for Species, Method, Regulation type, Validation type, Validated as, and Source. The Publication year filter is set to 1900. Green arrows and text annotations highlight various features: '1. Database Search Terms' points to the search bar, '4. Click (!) for further info' points to the exclamation mark icons, '2. Interaction Info' points to the interaction icons, '3. Filters' points to the filter dropdowns, and '5. Methods' points to the method icons.

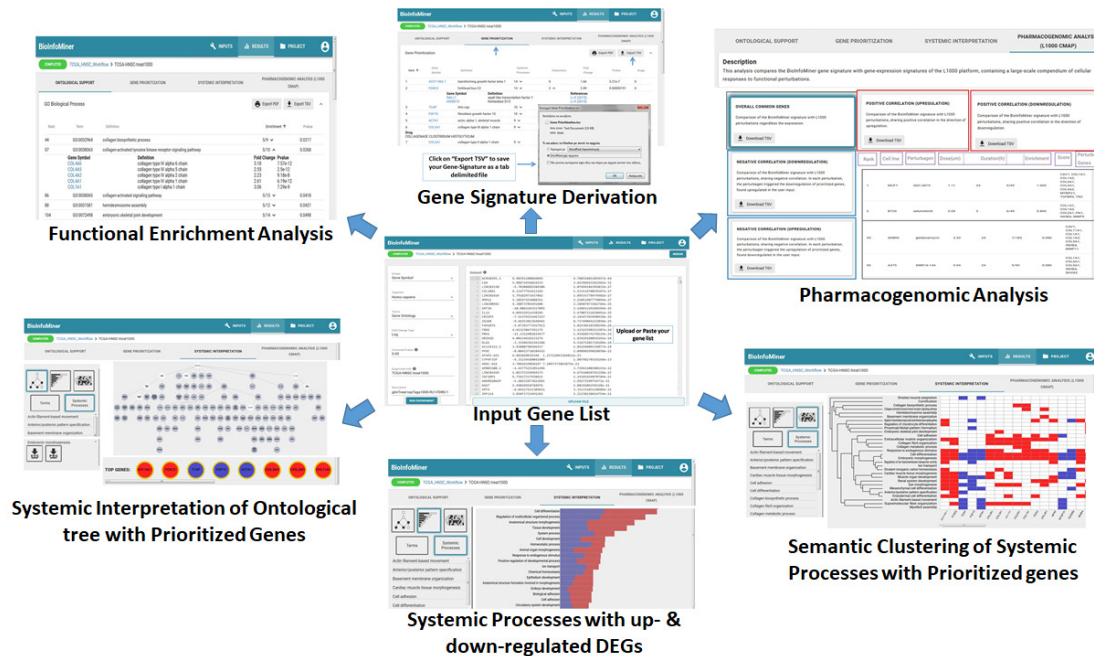
Εικόνα 2.9. Στιγμιότυπο του αρχείου εξόδου της TarBase v.7.0 μετά από μια απλή αναζήτηση ενός μορίου miRNA.

Η TarBase v7.0 είναι η μεγαλύτερη διαθέσιμη βάση δεδομένων, μη-αυτόματα επιμελημένη, με περισσότερες από μισό εκατομμύριο πειραματικά επαληθευμένες αλληλεπιδράσεις miRNA-γονιδίων στόχων, που αφορούν σε 356 διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους από 24 διαφορετικά είδη οργανισμών και ποικίλες πειραματικές μεθόδους όπως π.χ. μικροσυστοιχίες, δοκιμασίες ανοσοκατακρήμνισης, qPCR, RNA-Seq, PAR-CLIP κ.ά. Η βάση προσφέρει πολύ χρήσιμες πληροφορίες στον χρήστη που περιλαμβάνουν την λεπτομερή περιγραφή των miRNAs και των γονιδίων-στόχων, λίστα με δημοσιεύσεις που υποστηρίζουν κάθε αλληλεπίδραση, τις πειραματικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση της αλληλεπίδρασης, την κυτταρική σειρά και ιστό που διεξήχθη η πειραματική δοκιμασία καθώς και το είδος της αλληλεπίδρασης (θετική ή αρνητική συσχέτιση). Τέλος η βάση παρέχει συνδέσμους σε σχετιζόμενα KEGG pathways καθώς και άλλες εξωτερικές βάσεις όπως η Ensembl, η UniProt και η RefSeq. (Επεξεργασμένη πληροφορία από τον ιστότοπο <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index>).

2.3.3 Συστημική Πολυεπίπεδη Λειτουργική Ανάλυση των Μεταγραφικών Δεδομένων Μέσω της Πλατφόρμας *BioInfoMiner*

Για την διεξαγωγή της Λειτουργικής Ανάλυσης Εμπλουτισμού των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων αλλά και για την ιεράρχηση και ταυτοποίηση των μεταβαλλόμενων σημαντικότερων βιολογικών διεργασιών-μοριακών μονοπατιών, καθώς και των αντίστοιχων κομβικών-γονιδίων (hub-genes) που κατευθύνουν αυτές τις μεταβολές, χρησιμοποιήθηκε η διαδικτυακή υπολογιστική πλατφόρμα BioInfoMiner (BIM) (<https://bioinforminer.com>) [331]. Πρόκειται για ένα λογισμικό που αναπτύχθηκε στην εταιρεία-τεχνοβλαστό (spin-off) e-NIOS (<https://e-nios.com/products/bioinforminer>) από την ομάδα μας με στόχο την εξαγωγή κρίσιμης πληροφορίας από πειράματα μεγάλης-κλίμακας, χαρτογραφώντας τα γονιδιακά/λειτουργικά δίκτυα που χαρακτηρίζουν ποικίλα βιολογικά φαινόμενα όπως ο καρκίνος, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες κ.ά. Ο BIM αποτελεί προέκταση και βελτιστοποίηση δύο άλλων σημαντικών αλγορίθμων λειτουργικής ανάλυσης που είχαν αναπτυχθεί στο παρελθόν, του StRAnGER [332] και του GOrevenge [333], και μας επιτρέπει την μη-επιβλεπόμενη, ταχεία, καθοδηγούμενη από τα δεδομένα ολοκληρωμένη ερμηνεία πολύ-ωμικών δεδομένων, ενσωματώνοντας με ευφυείς αλγορίθμους δικτύωσης, κρίσιμη βιολογική πληροφορία από διαφορετικά επίπεδα ανάλυσης. Εισάγοντας την λίστα των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων που έχει εξαχθεί με τις μεθόδους που αναφέραμε παραπάνω, το εργαλείο ιεραρχεί τις βιολογικές διεργασίες που συνδέονται με τα υποψήφια γονίδια και εξάγει μια συμπαγή υπογραφή λειτουργιών και γονιδίων που αποτελείται από λίγες συστημικές βιολογικές διεργασίες με τα αντίστοιχα γονίδια-οδηγούς (driver genes) που τις συνδέουν. Επίσης εκτελείται παράλληλα φαρμακογονιδιωματική ανάλυση της γονιδιακής υπογραφής που έχει εξαχθεί χρησιμοποιώντας δεδομένα από την βάση γονιδιακών υπογραφών L1000 Connectivity Map (L1000 CMAP)[334, 335] (**Εικόνα 2.10**). Η πολυεπίπεδη συστημική ανάλυση μιας λίστας γονιδίων-εισόδου περιλαμβάνει συνοπτικά τα ακόλουθα στάδια. Στο πρώτο στάδιο, πραγματοποιείται ανάλυση μονοπατιών (pathway analysis) αξιοποιώντας τους οντολογικούς όρους (ontological terms) που συνδέονται με τα υποψήφια γονίδια και περιλαμβάνονται σε διάφορα ιεραρχικά δομημένα οντολογικά λεξικά-δέντρα όπως η Gene Ontology (GO) [336], η Mouse Genome Informatics (MGI) [337], η Human Phenotype Ontology (HPO) [338] και η Reactome Pathway Database (Reactome) [339]. Συγκεκριμένα διεξάγεται Λειτουργική Ανάλυση Εμπλουτισμού (Functional Enrichment Analysis) με στατιστικούς ελέγχους υπεραντιπροσώπευσης όπως το υπεργεωμετρικό τεστ. Ενώ όμως οι περισσότεροι συντηρητικές στατιστικές μέθοδοι χρησιμοποιούν συνήθως αυθαίρετα στατιστικά κατώφλια που βασίζονται αποκλειστικά στον έλεγχο υποθέσεων και

στις πολλαπλές συγκρίσεις διαφορετικών μεθοδολογιών, ο BIM εφαρμόζει νεοφυή φιλτραρίσματα που στηρίζονται στο πληροφοριακό περιεχόμενο που φέρουν οι οντολογικοί όροι, εκμεταλλευόμενο αρχές της θεωρίας γράφων και της δικτύωσης.



Εικόνα 2.10. Στιγμιότυπα των αποτελεσμάτων που εξάγονται από τα διαφορετικά επίπεδα ανάλυσης της πλατφόρμας BioInfoMiner

Εισάγοντας μια λίστα γονιδίων και επιλέγοντας κάποιο οντολογικό λεξικό (π.χ. GO, HPO, MGI, Reactome) πραγματοποιείται ανάλυση μονοπατιών και σημασιολογική συσταδοποίηση με ευφυείς αλγορίθμους δικτύωσης που στηρίζονται στην θεωρία γράφων και την εξόρυξη κρίσιμης πληροφορίας. Το αποτέλεσμα περιλαμβάνει την λειτουργική ανάλυση εμπλουτισμού, την ανάδειξη συστημικών βιολογικών διαδικασιών, την εξαγωγή γονιδιακής υπογραφής με προτεραιοποίηση γονιδίων, καθώς και φαρμακογονιδιωματική ανάλυση που στηρίζεται στην ενίσχυση ή/και αναστολή της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων-οδηγών κατόπιν συσχέτισής τους με την βάση «L1000 Connectivity Map».

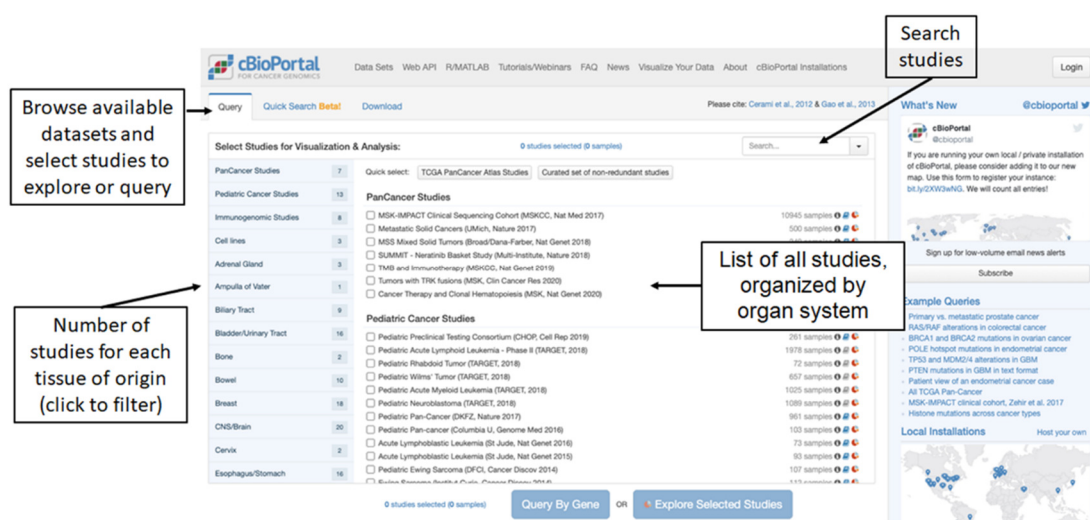
Αρχικά, πραγματοποιείται διόρθωση της χαρτογράφησης, εξαλείφοντας σφάλματα της διαδικασίας άμεσου σχολιασμού, κάτι που αποτελεί κοινό πρόβλημα των οντολογικών δέντρων. Στη συνέχεια, μετά την ανάλυση εμπλουτισμού εφαρμόζεται μια διαδικασία bootstrapping με την μέθοδο Monte Carlo που διορθώνει την κατανομή των p-values, φιλτράροντας τους δυνητικά θορυβώδεις οντολογικούς όρους ενώ συγχρόνως προκρίνει όρους με μεγαλύτερη συστημική δράση. Παράλληλα, εφαρμόζεται σημασιολογική συσταδοποίηση (semantic clustering) των οντολογικών όρων εξαλείφοντας πιθανούς πλεονασμούς στους γράφους αλληλεπιδράσεων, υπολογίζοντας ένα βέλτιστο σύνολο από συστάδες οντολογιών (semantic components). Έπειτα, με βάση τις εμπλουτισμένες οντολογικές διαδικασίες ή μοριακά μονοπάτια, ταυτοποιούνται τα υψηλού βαθμού διασυνδεδεμένα γονίδια στο δίκτυο των συστημικών οντολογικών ομάδων (systemic

processes), συμπεριλαμβανομένου των γονιδίων με τα οποία αλληλεπιδρούν άμεσα σε πρωτεϊνικό επίπεδο (interactors). Η ιεραρχικοποίηση βασίζεται σε τεχνολογίες εξόρυξης πληροφορίας (information mining) μέσω εκμετάλλευσης της δενδροειδούς δομής των οντολογιών η οποία επιτρέπει τον σχεδιασμό και τη μοντελοποίηση διμερών (όρων-μορίων) δικτύων μέσω γραφικών αναπαραστάσεων. Συμπερασματικά, θα λέγαμε ότι η ενσωμάτωση της ανάλυσης δεδομένων με την σημασιολογική επεξεργασία (διόρθωση, συσταδοποίηση, διόρθωση συστάδων και τοπολογική ανάλυση) επιτρέπει την μηχανιστική ιεραρχικοποίηση των συστημικών συνόλων λειτουργιών μαζί με τους κύριους ρυθμιστές τους, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ο μικρότερος βαθμός πλεονασμού και το μεγαλύτερο πληροφοριακό περιεχόμενο. Η μεθοδολογία αυτή μας επιτρέπει να εξάγουμε μικρού σχετικά μεγέθους γονιδιακές υπογραφές που σχετίζονται σε πολύ μεγάλο βαθμό με τον εξεταζόμενο φαινότυπο και την φυσιολογία που τον διέπει, ακόμη και αν η μεταβολή της γονιδιακής τους έκφρασης δεν παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις. Η πλατφόρμα BioInfoMiner μας επέτρεψε να εξάγουμε μια γονιδιακή υπογραφή 38 γονιδίων (IRE1sign38) της οποίας η δράση αντικατοπτρίζει σε υψηλό βαθμό την σηματοδοτική δραστικότητα της IRE1 πρωτεΐνης στα κύτταρα. Πρόκειται για μια υπογραφή που αποτελείται από δύο κύριες συνιστώσες, 19 γονιδίων η κάθε μια που λειτουργούν ως «αισθητήρες» της XBP1s και RIDD ενεργότητας, αντίστοιχα.

2.3.4 Ανάκτηση, Επεξεργασία και Ανάλυση Μεταγραφικών και Κλινικών Δεδομένων της Βάσης TCGA (The Genome Cancer Atlas)

Για να αξιολογήσουμε την σηματοδοτική δραστικότητα της IRE1 πρωτεΐνης στο Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα αλλά και σε άλλους τύπους καρκίνου ανατρέξαμε επίσης σε «ανοικτά» αποθετήρια ασθενών με καρκίνο όπως το Πρόγραμμα TCGA (Cancer Genome Atlas Program) <https://cancergenome.nih.gov/> [242] του Εθνικού Ινστιτούτου για τον Καρκίνο (NCI) υπό την αιγίδα του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας (NIH) των Η.Π.Α. Πρόκειται για μια κοινοπραξία μεγάλης κλίμακας που επιτρέπει την ελεγχόμενη πρόσβαση σε μοριακά δεδομένα όπως είναι τα δεδομένα εξώματος (exome data), οι Σημειακοί Πολυμορφισμοί (SNPs), τα δεδομένα DNA μεθυλίωσης, τα RNA-Seq μεταγραφικά δεδομένα (mRNA και miRNAs), τα δεδομένα πρωτεόματος, καθώς και κλινικά δεδομένα ασθενών που αφορούν σε περισσότερους από 33 διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Η πρόσβαση σε αυτά τα δεδομένα επιτυγχάνεται μέσω τριών πυλών εισόδου, το GDC (Genomic Data Commons) Data Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>), το GDC Legacy Archive και το Broad Institute GDAC Firehose (<https://gdac.broadinstitute.org/>). Η 1^η πύλη εισόδου (GDC Data Portal) αποτελεί την

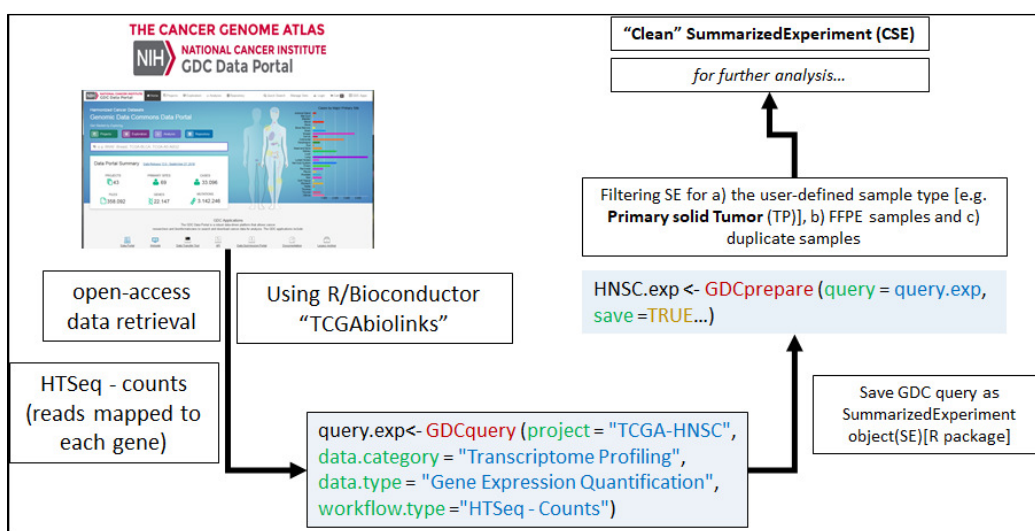
ενημερωμένη έκδοση των βάσεων δεδομένων, τα οποία έχουν εναρμονιστεί με την πρόσφατη έκδοση του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (hg38) ενώ η 2^η και 3^η πύλη εισόδου επιτρέπουν την πρόσβαση σε δεδομένα της προηγούμενης έκδοσης (hg19). Επίσης το GDC Data Portal έχει ενσωματώσει δεδομένα και από άλλα projects όπως το CPTAC, MMRF, TARGET, με αποτέλεσμα σήμερα (Data Release 29.0 - March 31, 2021) να περιλαμβάνει 68 projects, 67 διαφορετικούς τύπους καρκίνου και πάνω από 84 χιλιάδες περιπτώσεις ασθενών [340]. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι πρόσβαση στα TCGA δεδομένα μπορεί να επιτευχθεί και μέσω της υπολογιστικής πλατφόρμας "cBioportal" (<https://www.cbioportal.org/>) (Εικόνα 2.11) κάνοντας χρήση του πακέτου της R «cgdsr» (http://www.cbioportal.org/cgds_r.jsp). Το cBioportal φιλοξενείται στο Κέντρο για τον Καρκίνο «MSK» (Memorial Sloan Kettering) της Νέας Υόρκης (Η.Π.Α.), και προσφέρει επιπλέον την δυνατότητα για *in situ* αναλύσεις. Η συγκεκριμένη πλατφόρμα μας επέτρεψε να εξορύξουμε και δεδομένα μεταλλάξεων (driver και passenger μεταλλάξεις) καθώς και αλλαγές στον αριθμό των γονιδιακών αντιγράφων (Copy Number Alterations – CNAs) κατόπιν εκτιμήσεως με τον αλγόριθμο GISTIC2.0 [341].



Εικόνα 2.11. Στιγμιότυπο της διαδικτυακής πλατφόρμας cBioPortal

Η ανάκτηση, επεξεργασία και ανάλυση τόσο των RNA-Seq όσο και των κλινικών δεδομένων από το GDC Data Portal που αφορούσαν σε ασθενείς της TCGA για διάφορους τύπους καρκίνου, επιτεύχθηκε μέσω της ανάπτυξης υπολογιστικής ροής εργασίας που ενσωματώνει υπολογιστικά πακέτα του ανοιχτού λογισμικού σε R/Bioconductor, στο περιβάλλον του Rstudio. Συγκεκριμένα, με την βοήθεια του πακέτου «TCGAbiolinks» [342] και των συναρτήσεων που το συνοδεύουν, έγινε αρχικά αναζήτηση των HTSeq counts [343] για τους ασθενείς (solid primary tumors) κάθε κοόρτης ξεχωριστά και ανακτήθηκαν τα αρχεία των εγγραφών τους, τα οποία συνοψίστηκαν σε συγκεκριμένη δομή δεδομένων που είναι

γνωστή ως «SummarizedExperiment» (SE). Οι προαναφερθείσες ενέργειες υλοποιήθηκαν μέσω τριών βασικών συναρτήσεων του TCGAbiolinks που είναι η GDCquery(), η GDCdownload() και η GDCprepare(). Ακολούθησε φιλτράρισμα των δειγμάτων για να αποφευχθούν α) διπλές εγγραφές, β) σταθεροποιημένα με φορμαλίνη και ενσωματωμένα σε παραφίνη (FFPE) δείγματα αλλά και γ) δείγματα χαμηλής ποιότητας με σκοπό το τελικό SE (Clean SE) να περιέχει μοναδικές εγγραφές πρωτογενών συμπαγή όγκων, υψηλής ποιότητας (Εικόνα 2.12).



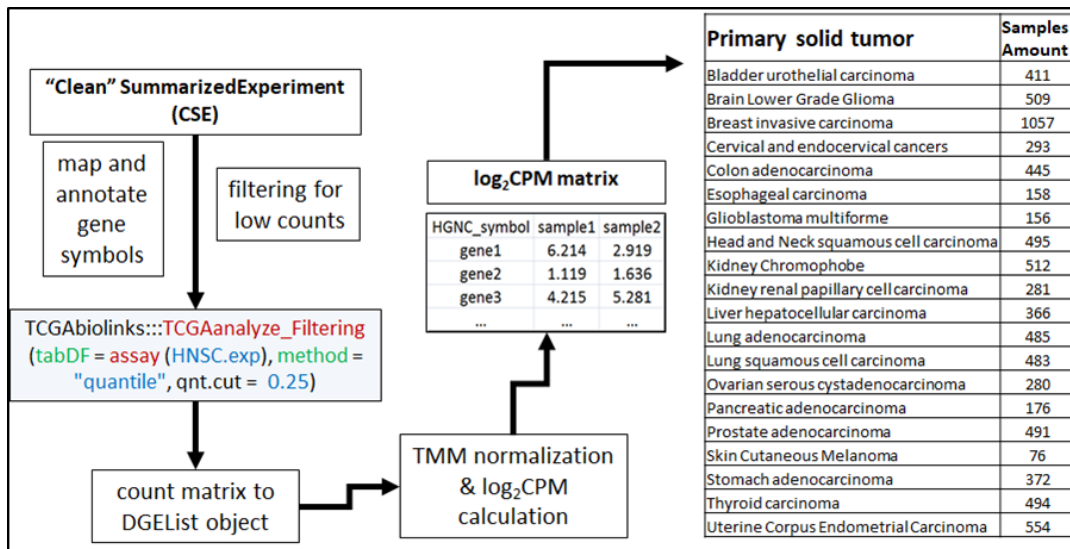
Εικόνα 2.12. Εξόρυξη RNA-Seq δεδομένων με το R πακέτο TCGAbiolinks από το GDC Data Portal

Σύνοψη της ροής εργασίας που εφαρμόσαμε για την ανάκτηση των HTSeq-counts των TCGA RNA-Seq δεδομένων που αφορούσαν σε διάφορους τύπους καρκίνου από την πύλη GDC Data Portal. Τόσο τα μοριακά δεδομένα αλληλούχισης όσο και τα κλινικά δεδομένα των ασθενών αποθηκεύτηκαν στην δομή δεδομένων «SummarizedExperiment» κατόπιν φιλτραρίσματος για την απαλοιφή δεδομένων που αφορούσαν σε διπλοεγγραφές ασθενών, δείγματα FFPE, χαμηλής ποιότητας δεδομένα αλλά και βιοψιών που δεν αφορούσαν πρωτογενείς συμπαγείς όγκους.

Στη συνέχεια ακολούθησε χαρτογράφηση και σχολιασμός των γονιδίων με τα επίσημα γονιδιακά σύμβολα, απομάκρυνση των απροσδιόριστων γονιδιωματικών οντοτήτων, φιλτράρισμα των χαμηλών counts με έλεγχο της κατανομής τους σε ποσοστημόρια, TMM κανονικοποίηση και υπολογισμός των \log_2 CPM για κάθε γονίδιο (Εικόνα 2.13). Στην περίπτωση των TCGA-GBM miRNA-Seq δεδομένων (πρόδρομα και ώριμα miRNAs) επειδή υπήρχε διαθέσιμος, περιορισμένος αριθμός καταχωρήσεων που αντιστοιχούσε σε μικρό αριθμό ασθενών, ανατρέξαμε στα κανονικοποιημένα (\log_2) και διορθωμένα για batch effect miRNA δεδομένα μικροσυστοιχιών (Agilent H-miR_8x15K/H-miR_8x15Kv2) τα οποία ήταν διαθέσιμα από το Broad Institute GDAC Firehose. Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την ομαδοποίηση των δειγμάτων (ασθενών) σε συναινετικά σύνολα (ομάδες) με βάση το πρότυπο έκφρασης των miRNA δεδομένων (890 σημαντικά

εκφρασμένα miRs). Εφαρμόσαμε την συναινετική ιεραρχική ομαδοποίηση (consensus hierarchical clustering) [344] με το μέτρο σύνδεσης ward για τα δείγματα και για τα miRNAs που προηγουμένως είχαμε ταυτοποιήσει ως τα πιο διαφοροποιημένα στην έκφρασή τους μέσω υπολογισμού της Διάμεσης Απόλυτης Απόκλισης (Median Absolute Deviation - MAD). Για την υλοποίηση της συναινετικής ιεραρχικής ομαδοποίησης χρησιμοποιήσαμε το R/Bioconductor πακέτο ConsensusClusterPlus(v1.56.0) [345]. Οι συντελεστές συσχέτισης cophenetic και οι μέσες τιμές του πλάτους σιλουέτας (silhouette width) χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του αριθμού των clusters (k) με τις πιο ισχυρές ομαδοποιήσεις. Από το διάγραμμα του συντελεστή συσχέτισης cophenetic έναντι του k, επιλέξαμε εκείνο το σημείο που προηγείται της μεγαλύτερης μείωσης στον συντελεστή συσχέτισης cophenetic και επιλέξαμε εκείνο το k με την υψηλότερη μέση τιμή σιλουέτας. Τα πιο αντιπροσωπευτικά δείγματα των ομάδων, προσδιορίστηκαν με βάση την θετική τιμή του πλάτους σιλουέτας, δείχνοντας την μεγαλύτερη ομοιότητα με την δικιά τους ομάδα σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο μέλος της ίδιας ομάδας. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή των διαφορικά εκφρασμένων σημαντικών miRNAs για κάθε μοριακό υπότυπο, συγκρίνοντας την υποομάδα έναντι των άλλων υποομάδων με Student's t-test. Τέλος, εφαρμόσαμε την μέθοδο γραμμικής παλινδρόμησης (regularization) Lasso για την επιλογή χαρακτηριστικών (feature selection) υψηλής διακριτικής ικανότητας με σκοπό την ανάδειξη των πιο σημαντικών miRNAs που είναι υπεύθυνα για την κατάταξη των ασθενών σε συγκεκριμένους μοριακούς υπότυπους. Το τελικό υποσύνολο προέκυψε από τα συνολικά συγκεντρωτικά αποτελέσματα με χρήση του πακέτου της R, glmnet (100 κύκλοι των 10-fold διασταυρούμενης επαλήθευσης με συντελεστή $\alpha=1$ και $\lambda=\lambda_{1se}$ για κάθε τυχαίο κύκλο) [346].

Για να αξιολογήσουμε την επίδραση της IRE1 σηματοδοτικής δραστηριότητας μέσω του XBP1s και RIDD άξονα, στο προσδόκιμο ζωής των διαφορετικών ομάδων ασθενών που προέκυψαν τόσο μετά από την βαθμολόγησή τους (Ενότητα 2.3.4.1) όσο και μετά από τις μεθόδους ιεραρχικής ομαδοποίησης με βάση το πρότυπο έκφραση της IRE1 γονιδιακής υπογραφής, εφαρμόσαμε ανάλυση ολικής επιβίωσης κατά Kaplan-Meier κάνοντας χρήση της συνάρτησης TCGAanalyze_survival() του πακέτου TCGAbiolinks. Επιπλέον, οι εκτιμήσεις των ποσοστών επιβίωσης για τα διαφορετικά σύνολα ασθενών συγκρίθηκαν με log-rank δοκιμασίες (pairwise_survdif) μέσω της συνάρτησης Surv() του πακέτου της R survminer.



Εικόνα 2.13. Ροή εργασίας για την δημιουργία πινάκων $\log_2\text{CPM}$ για 20 πρωτογενείς συμπαγείς όγκους της TCGA

2.3.4.1 Κατασκευή Αμερόληπτου Συστήματος Βαθμολόγησης Ασθενών με Βάση την Σηματοδοτική Δραστικότητα της IRE1 Πρωτεΐνης

Για να αξιολογήσουμε την σηματοδοτική δραστικότητα της IRE1 πρωτεΐνης μέσω του XBP1s και RIDD άξονα δράσης τόσο σε δείγματα ασθενών με καρκίνο όσο και σε δείγματα κυτταρικών σειρών αναπτύξαμε ένα σύστημα βαθμολόγησης με βάση το μεταγραφικό προφίλ και τα επίπεδα έκφρασης της IRE1 γονιδιακής υπογραφής των 38 γονιδίων που είχαμε εξάγει. Για να αποφύγουμε αφενός φαινόμενα batch effect και αφετέρου κάποια πιθανή επίδραση από συγχύζουσες (confounder) μεταβλητές εξετάσαμε κάθε δείγμα μέσα στην κοόρτη ξεχωριστά. Αρχικά κατασκευάσαμε για κάθε δείγμα έναν πίνακα με τις $\log_2\text{CPM}$ τιμές των 38 γονιδίων της υπογραφής. Στη συνέχεια με βάση την κατανομή έκφρασης που ακολουθεί το κάθε γονίδιο της υπογραφής στην συγκεκριμένη κοόρτη του καρκινικού τύπου ή της κυτταρικής σειράς που εξετάζεται, υπολογίσαμε την τιμή έκφρασης για τα τεταρτημόρια Q1 (25° εκατοστιαίο σημείο), Q2 (διάμεσος ή 50° εκατοστιαίο σημείο) και Q3 (75° εκατοστιαίο σημείο), αντίστοιχα. Στη συνέχεια αποδώσαμε σε κάθε δείγμα, γραμμικά βάρη για κάθε γονίδιο της XBP1s (19 γονίδια) και RIDD (19 γονίδια) συνιστώσας, ξεχωριστά, με βάση την έκφρασή του σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασής του σε ολόκληρη την κοόρτη. Συγκεκριμένα για κάθε γονίδιο από τα 19 γονίδια της XBP1s συνιστώσας αποδώσαμε σε κάθε δείγμα ξεχωριστά: α) την τιμή 1 όταν η τιμή έκφρασής του στο δείγμα ήταν μικρότερη ή ίση από την Q1 τιμή στην κοόρτη, β) την τιμή 2 αν το επίπεδο έκφρασής του ήταν μεγαλύτερο της Q1 τιμής και μικρότερο ή ίσο της Q2, γ) την τιμή 3 αν η έκφρασή του ήταν μεγαλύτερη της Q2 τιμής και μικρότερη ή ίση της Q3 και δ) την τιμή 4 αν η έκφρασή του ήταν μεγαλύτερη

της Q3 τιμής. Στη περίπτωση των 19 γονιδίων της RIDD συνιστώσας ακολουθήσαμε την αντίστροφη διαδικασία βαθμολόγησης γιατί η υψηλή RIDD δραστηριότητα συνεπάγεται χαμηλά επίπεδα έκφρασης για τα αντίστοιχα RIDD γονίδια. Συνεπώς τα μεγαλύτερα βάρη αποδόθηκαν σε τιμές έκφρασης που αφορούν δείγματα με πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης σε σχέση με την υπόλοιπη κοόρτη. Συγκεκριμένα αποδώσαμε: α) την τιμή βάρους 4 σε γονίδια που η τιμή έκφρασής τους στο δείγμα ήταν μικρότερη ή ίση με την Q1 τιμή στην κοόρτη, β) την τιμή 3 αν η το επίπεδο έκφρασης του RIDD γονιδίου ήταν μεγαλύτερο της Q1 τιμής και μικρότερο ή ίσο της Q2, γ) την τιμή 2 αν η έκφραση του γονιδίου ήταν μεγαλύτερη της Q2 τιμής και μικρότερη ή ίση της Q3 και δ) την τιμή 1 αν η έκφραση του RIDD γονιδίου ήταν μεγαλύτερη της Q3 τιμής. Στη συνέχεια, για κάθε δείγμα υπολογίσαμε ένα κανονικοποιημένο σκορ βαρών (sample score) για κάθε συνιστώσα της IRE1 γονιδιακής υπογραφής, ξεχωριστά, αθροίζοντας τα αντίστοιχα βάρη και διαιρώντας με το σύνολο των γονιδίων της αντίστοιχης συνιστώσας. Τέλος με βάση την κατανομή των sample scores για την XBP1s και RIDD συνιστώσα, ξεχωριστά, υπολογίστηκαν οι τιμές των τεταρτημορίων Q1 και Q3 και τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν σε «Υψηλής (High)», «Μέσης (Mod or Med)» και «Χαμηλής (Low)» XBP1s ή RIDD ενεργότητας κατόπιν συγκρίσεως του sample score με τις τιμές Q1 και Q3 της κατανομής τους (π.χ. Low XBP1s ή RIDD χαρακτηρίζεται ένα δείγμα όταν το XBP1s ή RIDD sample score είναι μικρότερο ή ίσο της τιμής Q1 των XBP1s ή RIDD sample scores, High όταν το XBP1s ή RIDD sample score είναι μεγαλύτερο ή ίσο της τιμής Q3 των XBP1s ή RIDD sample scores, ενώ οι ενδιάμεσες τιμές ($> Q1$ και $< Q3$) των sample scores χαρακτηρίστηκαν ως ενδιάμεσες καταστάσεις (Mod ή Med). Στην προσπάθειά μας να αυξήσουμε τον αριθμό των χαρακτηρισμένων δειγμάτων στις ομάδες υψηλής και χαμηλής IRE1 ενεργότητας, εφαρμόστηκαν και διαφορετικές τιμές ποσοστημορίων με την γενικότερη που περιλαμβάνει το σύνολο των δειγμάτων της κοόρτης να στηρίζεται στην διάμεση τιμή Q2.

Ο χαρακτηρισμός των δειγμάτων με βάση το σύστημα βαθμολόγησης που μόλις περιγράψαμε (XBP1shigh/RIDDhigh ή XBP1s+/RIDD+, XBP1shigh/RIDDlow ή XBP1s+/RIDD-, XBP1slow/RIDDhigh ή XBP1s-/RIDD+ και XBP1slow/RIDDlow ή XBP1s-/RIDD-) μας επέτρεψε να εισάγουμε ένα δείκτη εκτίμησης της σηματοδοτικής δραστηριότητας των δύο κύριων δράσεων (XBP1s και RIDD) της IRE1 πρωτεΐνης, κάτι που διευκόλυνε σε σημαντικό βαθμό την περαιτέρω διενέργεια δοκιμασιών συσχέτισης αλλά και στατιστικών δοκιμασιών σύγκρισης (παραμετρικών ή/και μη-παραμετρικών) με βάση διάφορες μεταβλητές που είτε αφορούσαν συγκεκριμένα κλινικά δεδομένα είτε άλλα μοριακά, βιοχημικά και ανοσολογικά δεδομένα.

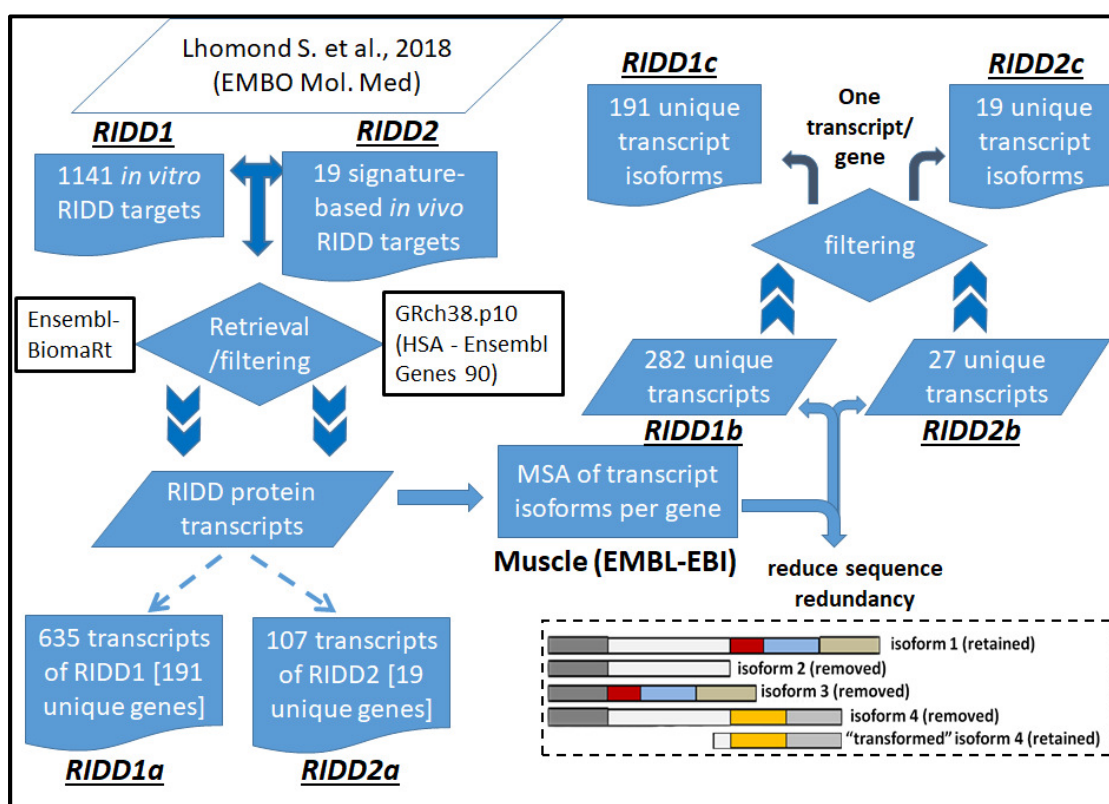
2.3.5 Ανάλυση Εμπλουτισμού Συνόλου Γονιδίων (Gene Set Enrichment Analysis) για την Αξιολόγηση των Γονιδιακών Υπογραφών

Στην προσπάθειά μας να κατανοήσουμε σε ποια μοριακά μονοπάτια ή δίκτυα γονιδίων εμπλέκονται τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια ή συγκεκριμένα γονιδιακά σύνολα (γονιδιακές υπογραφές) καθώς και τον βαθμό μεταβολής αυτών των υπογραφών μεταξύ των συγκρινόμενων συνθηκών που εξετάζουμε κάθε φορά (π.χ. καρκινικά δείγματα σε σχέση με υγιή, δείγματα με υψηλή IRE1 ενεργότητα σε σχέση με δείγματα χαμηλής ενεργότητας), εφαρμόσαμε επίσης μεθόδους εμπλουτισμού γονιδιακών συνόλων (Gene Set Enrichment Analysis). Ο έλεγχος γονιδιακών συνόλων (υπογραφών) και όχι μεμονωμένων γονιδίων επιτρέπει πιο άμεση ερμηνεία των υποκείμενων βιολογικών διεργασιών καθώς και περισσότερη ισχύ για τον εντοπισμό πιο δυσδιάκριτων επιδράσεων [347]. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή για να εκτιμήσουμε την συσχέτιση γονιδιακών υπογραφών που είχαμε εξάγει με συγκεκριμένους φαινοτύπους που αφορούν στην δράση της IRE1 πρωτεΐνης, εφαρμόσαμε τόσο μεθόδους που ελέγχουν την «ανταγωνιστικού τύπου» μηδενική υπόθεση (competitive gene set tests) εάν τα γονίδια της υπογραφής ενδιαφέροντος είναι πιο συχνά ενεργά (μεταβαλλόμενα) από τα γονίδια εκτός της υπογραφής, όσο και μεθόδους που ελέγχουν την «αυτόνομου τύπου» μηδενική υπόθεση (self-contained gene set tests) εάν υπάρχουν ενεργά γονίδια εντός της υπογραφής ενδιαφέροντος. Στην πρώτη περίπτωση (competitive gene set test) εφαρμόσαμε την μέθοδο fgsea (fast preranked gene set enrichment analysis) [347] και camera [348] των πακέτων της R, fgsea και edgeR, αντίστοιχα. Η camera χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των γονιδιακών υπογραφών (hallmark gene sets) που είναι κατατεθειμένες στην βάση MSigDB (Molecular Signatures Database) [349] καθώς είναι μια μέθοδος που υλοποιείται γρήγορα και έχει το πλεονέκτημα ότι υπολογίζει τη συσχέτιση μεταξύ γονιδίων για κάθε σύνολο γονιδίων που ελέγχει. Στη δεύτερη περίπτωση (self-contained gene set test) εφαρμόσαμε την μέθοδο roast() [rotation gene set testing] [350] του πακέτου edgeR για να απαντήσουμε στο ερώτημα εάν τα γονίδια μιας γονιδιακής υπογραφής/μονοπατιού είναι διαφορικά εκφρασμένα ως σύνολο στις συνθήκες που συγκρίνονται. Η μέθοδος roast χρησιμοποιεί περιστροφή (rotation) αντί για μετάθεση (permutation), μια μέθοδο Monte Carlo για πολυμεταβλητή παλινδρόμηση, η οποία δεν εξαρτάται από το μέγεθος του δείγματος [350].

2.3.6 Αναζήτηση Νουκλεοτιδικών και Δομικών Μοτίβων 2ταγούς RNA Δομής σε Υποψήφια Μετάγραφα-Στόχους της RIDD Δράσης

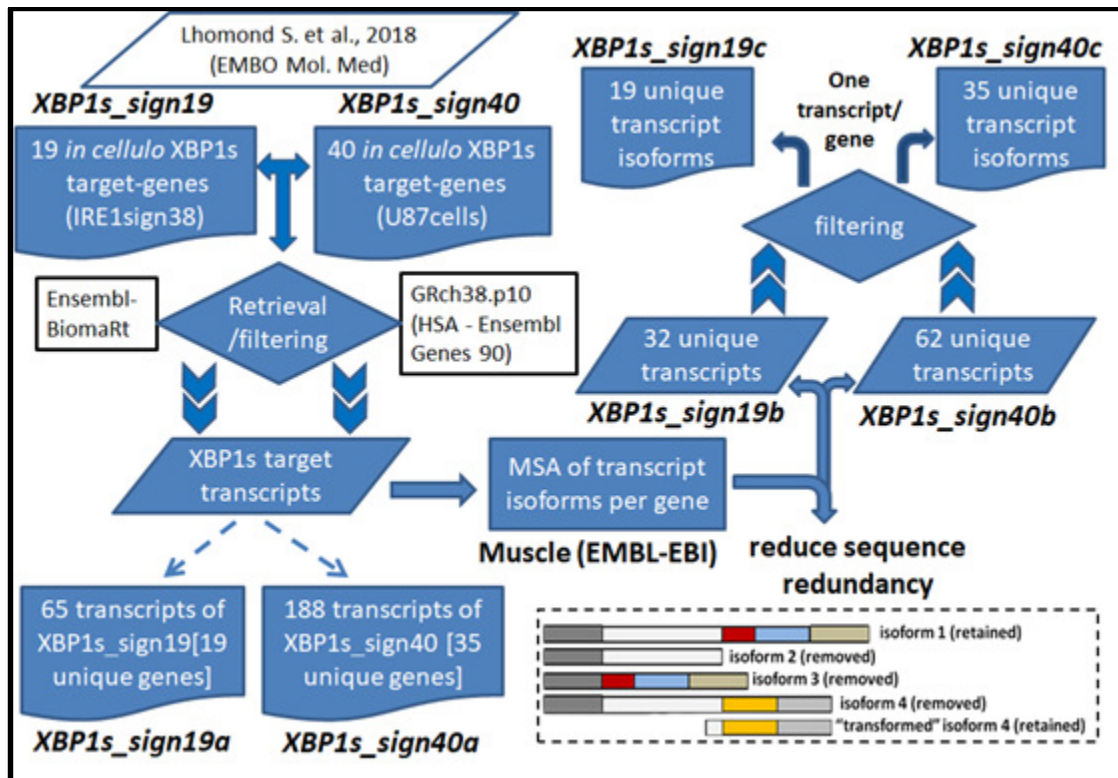
Μετά την ανάδειξη 1141 υποψήφια *in vitro* RIDD στόχων που ταυτοποιήθηκαν μέσα από μεθοδολογίες εναλλακτικού ματίσματος και ανάλυσης μικροσυστοιχιών (Ενότητα 2.3.1.3.1), καθώς και 19 *in cellulo* RIDD γονιδίων της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38, προσπαθήσαμε να αναζητήσουμε νουκλεοτιδικά μοτίβα αλληλουχιών ανάλογα του ομόφωνου εξανουκλεοτιδικού μοτίβου 5'-[CUGCAG]-3' κοψίματος από τον IRE1 που απαντά στην μη-ματισμένη XBP1u mRNA ισομορφή και που θα μπορούσαν να αποτελέσουν θέσεις νουκλεολυτικής δράσης για την RNάση ενεργότητα της IRE1 πρωτεΐνης. Για τον σκοπό αυτό αναπτύξαμε την ακόλουθη μεθοδολογία που απαρτίζεται από τρία διακριτά επίπεδα αναλύσεων. Το 1^ο επίπεδο περιλαμβάνει την δημιουργία εύρωστων, καλά σχολιασμένων και υψηλής ποιότητας συνόλων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών γονιδίων-στόχων της IRE1-RIDD (**Εικόνα 2.14**) και IRE1-XBP1s δραστηριότητας (**Εικόνα 2.15**), το 2^ο αποσκοπεί τόσο στην αναζήτηση *de novo* νουκλεοτιδικών μοτίβων μήκους 6-8 νουκλεοτιδίων στις αλληλουχίες ενδιαφέροντος όσο και στον εντοπισμό νουκλεοτιδικών μοτίβων ομόφωων του μοτίβου αποκοπής 5'-[CUGCAG]-3' (**Εικόνα 2.16**) και τέλος στο 3^ο στάδιο γίνεται αναζήτηση νουκλεοτιδικών και δομικών μοτίβων 2ταγούς RNA δομής στις ακολουθίες ενδιαφέροντος εισάγοντας επιπλέον πληροφορία για τον τρόπο αναδίπλωσης των RNA μεταγράφων, αντιμετωπίζοντας την IRE1 πρωτεΐνη σαν μια πρωτεΐνη πρόσδεσης σε RNA (RNA Binding Protein) (**Εικόνα 2.17**). Τα στάδια του 1^{ου} επιπέδου περιλαμβάνουν: Α) Φιλτράρισμα των υποψήφια RIDD στόχων για την δημιουργία, αντίστοιχα, δύο συνόλων αποκλειστικά με πρωτεϊνικά μετάγραφα που είχαν προκριθεί ως οι ισχυρότεροι RIDD στόχοι και που συνοδεύονταν από πλήρη σχολιασμό στη νουκλεοτιδική βάση ENSEMBL [GRch38.p10 (HSA - Ensembl Genes 90)] με καταχωρημένη πλήρως την νουκλεοτιδική τους ακολουθία, λαμβάνοντας υπόψιν τους δείκτες ποιότητας (transcription flags) που συνοδεύουν τα μετάγραφα (π.χ. MANE Select, TSL1-3, APPRIS (P3, ALT2), CCDS). Για την εξόρυξη των cDNA αλληλουχιών χρησιμοποιήσαμε το πακέτο R/Bioconductor biomaRt [295, 296] το οποίο αποτελεί wrapper της υπολογιστικής σουίτας BioMart της ENSEMBL, Β) Πολλαπλή στοίχιση των φιλτραρισμένων μεταγραφικών παραλλαγών του κάθε RIDD γονιδίου-στόχου με τον αλγόριθμο Muscle (EMBL-EBI) [351] με σκοπό να διατηρηθούν οι μοναδικές μόνο αλληλουχίες των εξωνίων σε κάθε μετάγραφο εκτοπίζοντας κοινά εξώνια μεταξύ των μεταγραφικών ισομορφών και γενικότερα αλληλουχικές επαναλήψεις/πλεονασμούς (sequence redundancy). Παράλληλα δημιουργήσαμε και δύο σύνολα υποψήφια RIDD μεταγράφων (για τα *in vitro* και *in cellulo*, αντίστοιχα) με ένα αντιπροσωπευτικό μετάγραφο

για κάθε γονίδιο-στόχο, επιλέγοντας την πιο συχνά εκφρασμένη ισομορφή στους ανθρώπινους ιστούς (Εικόνα 2.14). Οι διαδικασίες (A) και (B) . εφαρμόστηκαν επίσης και για τους υποψήφιους 19 *in cellulo* XBP1s στόχους της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38 καθώς και για τους 40 *in cellulo* XBP1s στόχους που είχαν ταυτοποιηθεί βιοχημικά στο εργαστήριο Ογκογένεσης και Σηματοδότησης λόγω Στρες του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας και Ιατρικής Έρευνας της Γαλλίας (INSERM) και που περιγράφονται στην δημοσίευση [179] (Εικόνα 2.15). Το σύνολο των XBP1s γονιδίων-στόχων χρησιμοποιήθηκε ως υποψήφιος αρνητικός μάρτυρας (negative control) λόγω της υπερέκφρασης των στόχων αυτών παρουσία της IRE1 πρωτεΐνης.



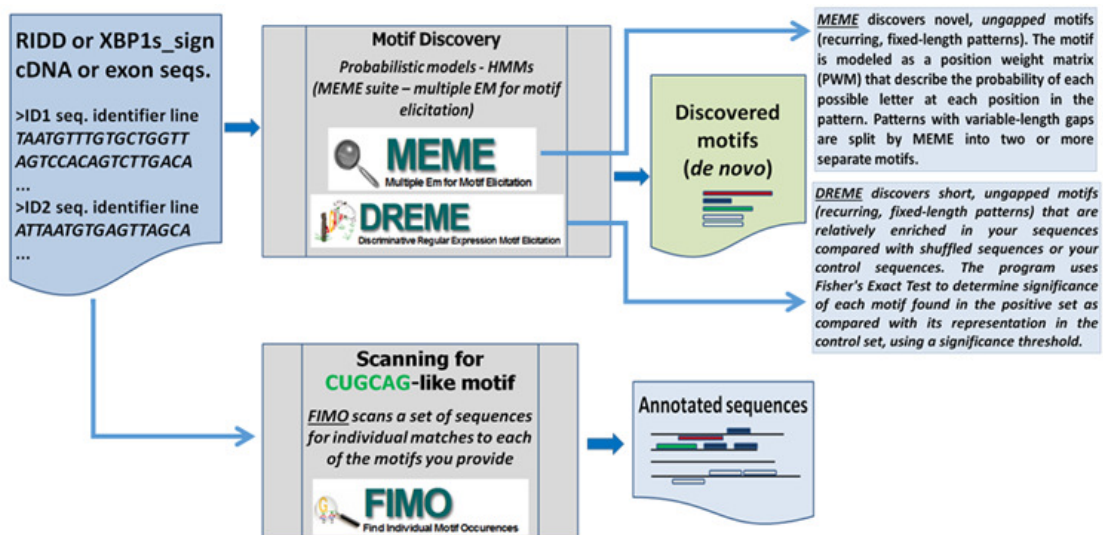
Εικόνα 2.14. Ροή εργασίας για την δημιουργία εύρωστων συνόλων υποψηφίων RIDD μεταγράφων-στόχων

1.141 πιθανοί RIDD στόχοι (RIDD1) που είχαν ταυτοποιηθεί *in vitro* από τον συνδυασμό μικροσυστοιχιών με μια δοκιμασία αποκοπής από την IRE1 *in vitro*, καθώς και τα 19 *in cellulo* RIDD γονίδια σηματοδότησης (RIDD2) της υπογραφής IRE1sign38 φιλτραρίστηκαν για να διατηρηθούν μόνο τα πρωτεϊνικά μετάγραφα που συνοδεύονταν από πλήρεις cDNA ακολουθίες και επαρκή σχολιασμό στην βάση ENSEMBL [GRCh38.p10 (HSA - Ensembl Genes 90)]. Για αυτό το στάδιο επιλογής χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες υψηλής ποιότητας μεταγράφων όπως MANE Select, TSL1-3, APPRIS (P3, ALT2) και CCDS. Για την ανάκτηση των cDNA ακολουθιών αξιοποιήθηκε το R/Bioconductor πακέτο "biomaRt". Έτσι προέκυψε το σύνολο των RIDD1a και RIDD2a ακολουθιών. Στη συνέχεια, με πολλαπλή στοιχίση αυτών των ακολουθιών με τον αλγόριθμο Muscle του EMBL-EBI διατηρήθηκαν από τις μεταγραφικές ισομορφές (σημειώνονται ως isoform1, isoform2,...κλπ.) κάθε γονιδίου μόνο οι περιοχές που αντιστοιχούσαν σε μοναδικές ακολουθίες εξώνων. Η γραφική αναπαράσταση των μεταγραφικών ισομορφών ενός υποθετικού γονιδίου απεικονίζεται στο πλαίσιο με την διακεκομμένη γραμμή. Με διαφορετικά χρώματα αναπαρίστανται τα διαφορετικά εξώνια των μεταγράφων. Έτσι, παρήχθησαν οι RIDD1b και RIDD2b ακολουθίες. Τέλος, το 3^ο σετ ακολουθιών (RIDD1c and RIDD2c) προέκυψε από φιλτράρισμα των RIDD1a and RIDD2a cDNA ακολουθιών, διατηρώντας το πιο αντιπροσωπευτικό μετάγραφο (συστηματικά εκφρασμένο στην πλειονότητα των ανθρώπινων ιστών ή/και του νευρικού συστήματος) από κάθε γονίδιο.



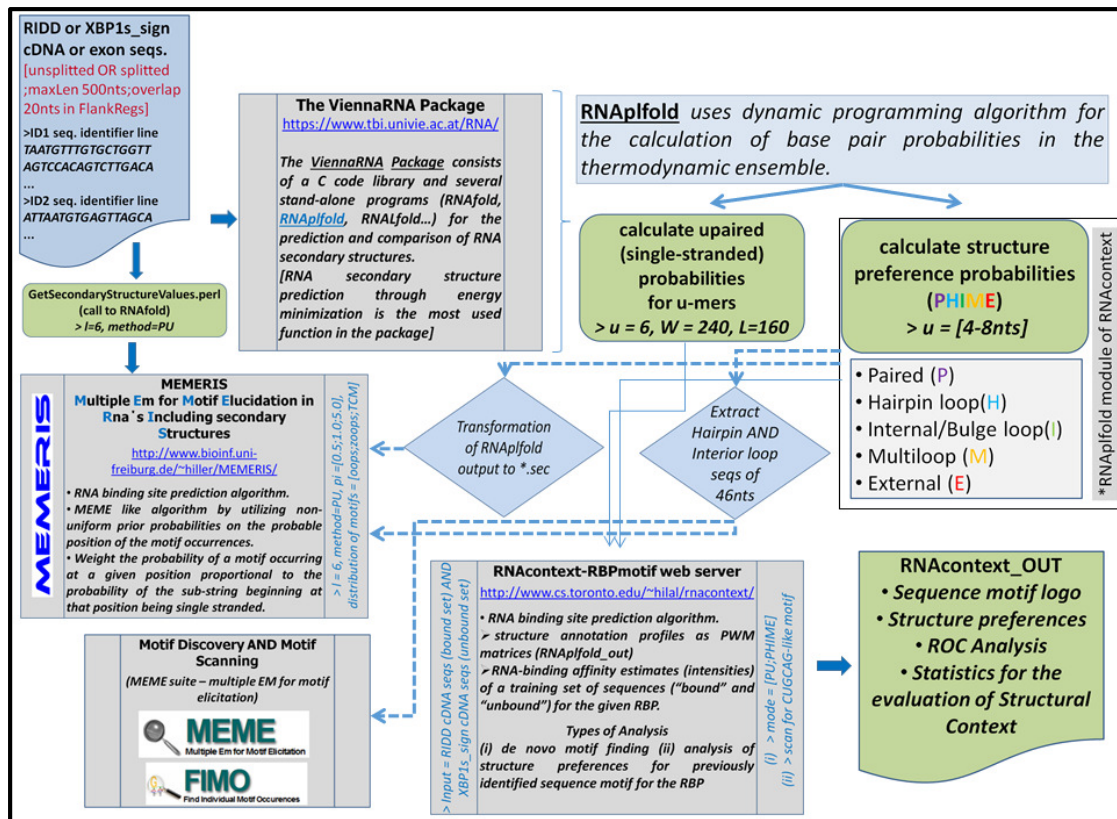
Εικόνα 2.15. . Ροή εργασίας για την δημιουργία εύρωστων συνόλων υποψηφίων XBP1s-εξαρτώμενων μεταγράφων-στόχων

Στο 2^ο επίπεδο αναλύσεων οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των RIDD και XBP1s υποψηφίων μεταγράφων-στόχων του 1^{ου} επιπέδου, χρησιμοποιήθηκαν Α) ως είσοδο (input) στον αλγόριθμο MEME (multiple EM for motif elicitation) [352] και DREME (Discriminative Regular Expression Motif Elicitation) [353] για την αναζήτηση *de novo* νουκλεοτιδικών μοτίβων 6-10 νουκλεοτιδίων ως πιθανές περιοχές αναγνώρισης για αποκοπή από την IRE1 πρωτεΐνη. Ως ακολουθίες μάρτυρες (control sequences) χρησιμοποιήθηκαν είτε οι ίδιες ακολουθίες εισόδου μετά από τυχαίο «ανακάτεμα» (shuffling) είτε οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των XBP1s γονιδίων-στόχων (discriminative mode) και Β) ως είσοδο στον αλγόριθμο FIMO (Find Individual Motif Occurrences) [354] για τον εντοπισμό νουκλεοτιδικών αναλόγων του ομόφωνου εξανουκλεοτιδικού μοτίβου αποκοπής 5'-[CUGCAG]-3'. Οι αλγόριθμοι αυτοί υλοποιήθηκαν μέσα από την σουίτα λογισμικού MEME (<http://meme-suite.org/index.html>) [355].



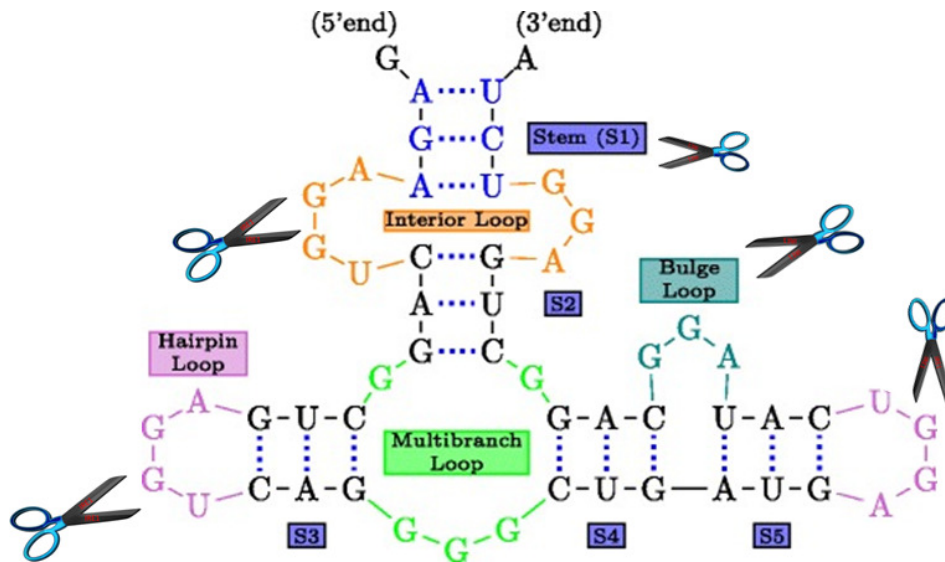
Εικόνα 2.16. Ροή εργασίας για την *de novo* αναζήτηση αλλά και τον εντοπισμό νουκλεοτιδικών μοτίβων 6-8 νουκλεοτιδίων στις ακολουθίες ενδιαφέροντος

Στη συνέχεια, στο 3^ο επίπεδο ανάλυσης εφαρμόσαμε τόσο αλγόριθμους τοπικής πρόγνωσης της 2ταγούς RNA δομής των υποψηφίων RIDD μεταγράφων-στόχων, ώστε να προσδιορίσουμε τα δομικά μοτίβα μέσα στα οποία απαντούν τα νουκλεοτιδικά μοτίβα ενδιαφέροντος ή να ταυτοποιήσουμε συναινετικά μοτίβα που απαντούν στα διαφορετικά δομικά μοτίβα της 2ταγούς RNA δομής, όσο και αλγόριθμους εντοπισμού νουκλεοτιδικών μοτίβων εισάγοντας την πληροφορία πρόγνωσης της 2ταγούς τους RNA δομής. Συγκεκριμένα, οι cDNA ακολουθίες των υποψηφίων RIDD (αλλά και XBP1s) γονιδίων-στόχων (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/fastafomat/>) ανάλογα το μήκος τους διασπάστηκαν αρχικά σε τμήματα με μέγιστο μήκος 500 νουκλεοτιδίων (διατηρώντας 20 νουκλεοτίδια ως επικάλυψη μεταξύ των τμημάτων) για να μπορούν να είναι διαχειρίσιμες (ώστε οι αλγόριθμοι να παρέχουν ασφαλέστερη πρόγνωση και να διαθέτουν την υπολογιστική ισχύ που απαιτείται) από αλγόριθμους ολικής πρόγνωσης της 2ταγούς RNA δομής όπως είναι ο αλγόριθμος RNAfold [356, 357] του πακέτου «ViennaRNA (v.2.0)» (<https://www.tbi.univie.ac.at/RNA/>) [358].



Εικόνα 2.17. Ροή εργασίας για την *de novo* αναζήτηση αλλά και τον εντοπισμό νουκλεοτιδικών μοτίβων σε συγκεκριμένα δομικά μοτίβα 2ταγούς RNA δομής

Στη συνέχεια αναζητήσαμε νουκλεοτιδικά μοτίβα 6-8 νουκλεοτιδίων που να βρίσκονται σε αζευγάρωτη κατάσταση μέσα στις ακολουθίες ώστε να είναι εύκολα προσβάσιμες για αποκοπή, μέσω του αλγορίθμου MEMERIS (v.1.0) [359], ο οποίος συχνά χρησιμοποιείται για την πρόγνωση θέσεων πρόσδεσης του RNA σε πρωτεΐνες. Ο αλγόριθμος MEMERIS υπολόγισε αρχικά τις πιθανότητες εντοπισμού των νουκλεοτιδίων της ακολουθίας σε μονόκλωνη περιοχή μέσω κλίσης του script «GetSecondaryStructureValues.perl» του RNAfold και στη συνέχεια αναζήτησε νουκλεοτιδικά μοτίβα (l=6-8) σε μονόκλωνες περιοχές της δευτεροταγούς δομής των RNA μεταγράφων (method=PU) εφαρμόζοντας εναλλακτικά τα τρία διαφορετικά μοντέλα κατανομής των μοτίβων (**oops**; one occurrence per sequence, **zoops**; zero or one occurrence per sequence και **TCM-anr**; any number of occurrences). Παράλληλα υλοποιήσαμε έναν αλγόριθμο τοπικής αναδίπλωσης των ακολουθιών, τον RNAplfold [358, 360] του πακέτου ViennaRNA για την αναζήτηση τοπικά σταθερών δομών 2ταγούς RNA δομής με προσδιορισμό της πιθανότητας κάθε νουκλεοτιδικού καταλοίπου να συμμετέχει είτε γενικά σε αζευγάρωτη κατάσταση ($u=6$, $W=240$ και $L=160$) ή πιο συγκεκριμένα σε κάποιο εκ των PHIME (**P**aired, **H**airpin loop, **I**nternal/Bulge loop, **M**ultiloop, **E**xternal) δομικών μοτίβων (Εικόνα 2.18).



Εικόνα 2.18. Βασικά δομικά μοτίβα 2ταγούς RNA δομής

Το ψαλίδι υποδεικνύει υποψήφιες μονόκλωνες περιοχές όπου η RE1α πρωτεΐνη μπορεί να εκδηλώσει την RIDD δράση της αφενός εξαιτίας της μεγαλύτερης ελεύθερης ενέργειας που εμφανίζουν (αυξημένη κινητικότητα) αλλά και λόγω της μεγαλύτερης προσβασιμότητας που έχουν για αλληλεπίδραση με άλλα μόρια. Είναι γνωστό ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες πρόσδεσης σε RNA (RBPs - RNA Binding Proteins) συνήθως αλληλεπιδρούν με το RNA μέσω του βρόχου φουρκέτας (Hairpin Loop) ή κάποιου εσωτερικού (Interior Loop) ή προεξέχοντος βρόχου (Bulge Loop) της 2ταγούς RNA δομής. Τα βασικά μοτίβα 2ταγούς RNA δομής απεικονίζονται με διαφορετικό χρώμα. Στέλεχος: μπλε, Βρόχος Φουρκέτας: ροζ, Εσωτερικός βρόχος: πορτοκαλί, Προεξέχον Βρόχος: πετρόλ, Πολυκλαδικός Βρόχος: πράσινο. S1-S5: τα 1-5 στέλεχη του RNA μορίου.

Για την τελευταία περίπτωση χρησιμοποιήσαμε τα RNAplfold scripts του προγράμματος RNAcontext [361] που υπολογίζουν τις PHIME πιθανότητες, καθώς και το python script «combine_letter_profiles.py» το οποίο ενσωματώνει τα προφίλ των διαφορετικών δομικών καταστάσεων σε ένα τελικό προφίλ «combined_profile.txt» σε fasta format. Ακολουθίες που περιείχαν τμήματα 6-8 νουκλεοτιδίων σε αζευγάρωτη κατάσταση ή που εντοπιζόνταν σε δομή εσωτερικού βρόχου ή βρόχου φουρκέτας (με πιθανότητα >50%) τροφοδότησαν εκ νέου τον αλγόριθμο MEMERIS όσο και το πρόγραμμα MEME για την αναζήτηση πιθανών συναινετικών μοτίβων. Τέλος χρησιμοποιήσαμε και τον αλγόριθμο RNAcontext, ο οποίος εφαρμόζεται τόσο για την αναζήτηση νουκλεοτιδικών/δομικών μοτίβων πρόσδεσης RNA σε πρωτεΐνες όσο και για την ταυτοποίηση των δομικών μοτίβων στα οποία εντοπίζονται συγκεκριμένα νουκλεοτιδικά μοτίβα που εισάγονται από τον χρήστη. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της σύγκρισης δύο συνόλων ακολουθιών που δίνονται ως είσοδο στον αλγόριθμο, όπου το ένα σύνολο (bound set) περιλαμβάνει ακολουθίες για τις οποίες υπάρχουν πειραματικά δεδομένα ότι προσδένονται στην πρωτεΐνη πρόσδεσης σε RNA (RBP) και το άλλο σύνολο (unbound set) περιλαμβάνει ακολουθίες που έχει δείχθει ότι δεν προσδένονται. Ο αλγόριθμος RNAcontext [361] υλοποιήθηκε και στον web server «RBPmotif» (<http://www.rnamotif.org/>).

Τέλος, με βάση τα βνουκλεοτιδικά μοτίβα που βρέθηκαν να εντοπίζονται σε δομή βρόχου φουρκέτας (ή βρόχου-στελέχους) και εσωτερικού βρόχου και που απαντούσαν σε μεγάλη συχνότητα στα υποψήφια RIDD μετάγραφα-στόχους κατασκευάσαμε *in silico* μετά από πολλαπλή στοίχιση των υποψήφια ακολουθιών, που περιλάμβαναν επιπλέον 20 νουκλεοτίδια εκατέρωθεν του κάθε εξανουκλεοτιδίου, έξι και πέντε πρότυπες RNA ακολουθίες (probes) που να διπλώνουν στην χαρακτηριστική 2ταγή δομή στελέχους-βρόχου και εσωτερικού βρόχου, αντίστοιχα. Για την βελτιστοποίηση της αναδίπλωσης των πρότυπων αυτών ακολουθιών στις επιθυμητές δομές χρησιμοποιήσαμε επίσης τον αλγόριθμο RNAinverse [358] του πακέτου ViennaRNA ώστε να μας δώσει υποψήφιας ακολουθίες που να διπλώνουν στις χαρακτηριστικές δομές που επιθυμούσαμε θέτοντας τα υποψήφια νουκλεοτιδικά μοτίβα ως constraints τα οποία θα πρέπει οπωσδήποτε να εντοπίζονται στην περιοχή του βρόχου. Ακολούθησε σύνθεση των *in silico* υποψήφιας RIDD probes από την εταιρεία Invitrogen στη Γαλλία και επιβεβαίωση για αποκοπή από την IRE1 πρωτεΐνη *in vitro* στο εργαστήριο Ογκογένεσης και Σηματοδότησης λόγω στρες του Ινστιτούτου INSERM της Γαλλίας μέσω μια *in vitro* δοκιμασίας αποκοπής με ποσοτική μέτρηση του υποστρώματος της ενζυμικής αντίδρασης απευθείας σε γέλη αγαρόζης παρουσία και απουσία της IRE1 πρωτεΐνης [179].

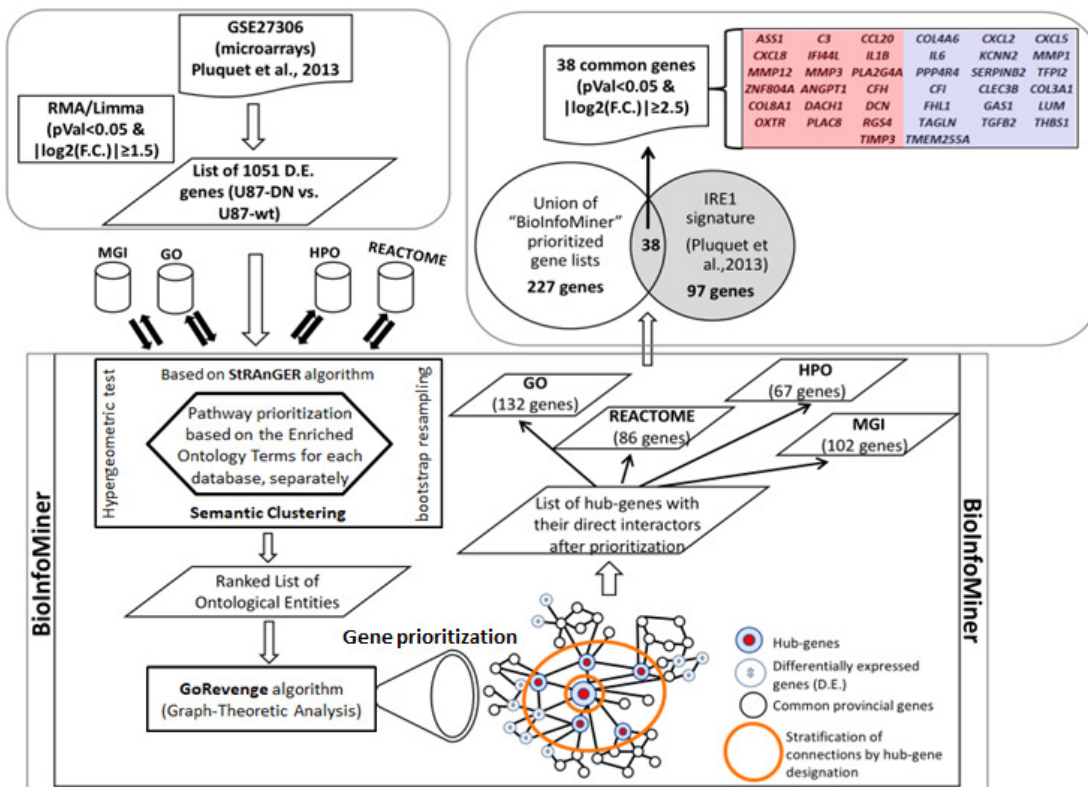
3 Αποτελέσματα

3.1 Αξιολόγηση της Δράσης της IRE1 Πρωτεΐνης στο Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα (GBM)

3.1.1 Εξαγωγή Γονιδιακής Υπογραφής 38 Γονιδίων (IRE1sign38) για την Αποτίμηση του Βαθμού Λειτουργικής Ενεργότητας της IRE1 Πρωτεΐνης

Για να αξιολογήσουμε την σηματοδοτική δραστηριότητα της IRE1 πρωτεΐνης μέσω των κύριων αξόνων δράσης της, IRE1-XBP1s και IRE1-RIDD στο Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα (GBM), επιχειρήσαμε να εξάγουμε ένα μικρό σχετικά σύνολο γονιδίων (γονιδιακή υπογραφή) του οποίου τα επίπεδα έκφρασης θα μεταβάλλονται με συστηματικό τρόπο, σε άμεση συνάρτηση με τον βαθμό λειτουργικής ενεργότητας της IRE1 πρωτεΐνης. Για τον σκοπό αυτό ανακτήσαμε μεταγραφικά δεδομένα έκφρασης από μικροσυστοιχίες Affymetrix (Ενότητα 2.3.1.2) που αφορούν σε πρωτογενή κύτταρα γλοιοβλαστώματος U87 άγριου τύπου αλλά και διαμολυσμένα με την κυρίαρχη αρνητικού τύπου IRE1 ισομορφή (DN κύτταρα), κάτω από φυσιολογικές και συνθήκες στρες Ε.Δ. όπως σε ανεπάρκεια γλυκόζης, ανεπάρκεια

γλουταμίνης, σε υποξία καθώς και σε έκθεση των κυττάρων στο αντιβιοτικό τουνικαμυκίνη που επάγει στρες Ε.Δ. λόγω αναστολής του μηχανισμού της Ν-γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών. Από την ανάλυση της διαφορικής έκφρασης γονιδίων με Limma μεταξύ των κυττάρων αγρίου τύπου και των DN κυττάρων, προέκυψε μια λίστα 1051 διαφορικά εκφρασμένων (Δ.Ε) γονιδίων με $p\text{value} < 0.05$ και $|\log_2 F.C| \geq 1.5$ εκ των οποίων συνολικά 97 γονίδια παρουσίαζαν την μεγαλύτερου μεγέθους μεταβολή στην έκφρασή τους (49 κορυφαία υπέρ-εκφρασμένα και 48 κορυφαία υπό-εκφρασμένα γονίδια, αντίστοιχα). Η λίστα των 1051 Δ.Ε γονιδίων εισήχθη στη συνέχεια στην πλατφόρμα λειτουργικής υπολογιστικής ανάλυσης BioInfoMiner (Ενότητα 2.3.3), όπου έγινε αναζήτηση των σημαντικότερων γονιδίων (Gene Prioritization) συμπεριλαμβανομένου των άμεσα αλληλοεπιδρώντων πρωτεϊνικών τους μορίων, μέσω της εξόρυξης και σύνθεσης χρήσιμης πληροφορίας από τις βιολογικές διαδικασίες και τα μοριακά μονοπάτια των οντολογικών δικτύων GO, Reactome, MGI και HPO. Οι λίστες των προτεραιοποιημένων γονιδίων από τις 4 διαφορετικές αναλύσεις συγκρίθηκαν μεταξύ τους και η ένωση των αντίστοιχων συνόλων γονιδίων ανέδειξε μια λίστα 227 σημαντικών γονιδίων που εκπροσωπούσαν σε υψηλό βαθμό τους ρυθμιστικούς παράγοντες του λειτουργικού δικτύου που διαταράσσεται από την δράση της IRE1 πρωτεΐνης στα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος. Για να περιορίσουμε τον αριθμό των γονιδίων και να αποφύγουμε biases προς συγκεκριμένες οικογένειες γονιδίων έγινε ομαδοποίηση και ιεράρχηση της λίστας των 227 γονιδίων λαμβάνοντας υπόψη το μέγεθος μεταβολής της γονιδιακής τους έκφρασης. Έτσι οδηγηθήκαμε στην εξαγωγή μιας γονιδιακής υπογραφής 38 γονιδίων (IRE1sign38) η οποία συνίστατο από δύο συνιστώσες/υποσύνολα γονιδίων. Η μια συνιστώσα αφορούσε στα 19 υπέρ-εκφρασμένα γονίδια (ASS1, C3, CCL20, COL4A6, CXCL2, CXCL5, CXCL8, IFI44L, IL1B, IL6, KCNN2, MMP1, MMP12, MMP3, PLA2G4A, PPP4R4, SERPINB2, TFPI2, ZNF804A) παρουσία της IRE1 πρωτεΐνης και η άλλη αφορούσε στα 19 υπό-εκφρασμένα γονίδια (ANGPT1, CFH, CFI, CLEC3B, COL3A1, COL8A1, DACH1, DCN, FHL1, GAS1, LUM, OXTR, PLAC8, RGS4, TAGLN, TGFB2, THBS1, TIMP3, TMEM255A) παρουσία της IRE1 πρωτεΐνης. Με τον τρόπο αυτό εξήχθη μια μικρού μεγέθους γονιδιακή υπογραφή με δύο ισοδύναμες λειτουργικά συνιστώσες η οποία θα μπορούσε εν δυνάμει να αποτυπώσει την διττή σηματοδοτική δράση της IRE1 πρωτεΐνης, με το σύνολο των 19 υπέρ-εκφρασμένων γονιδίων να αντικατοπτρίζει τον άξονα δράσης IRE1-XBP1s (ή απλούστερα XBP1s συνιστώσα) και το σύνολο των υπολοίπων 19 υπό-εκφρασμένων γονιδίων να αντικατοπτρίζει την RIDD δράση (ή απλούστερα RIDD συνιστώσα). Η διαδικασία που εφαρμόστηκε καθώς και τα γονίδια της γονιδιακής υπογραφής απεικονίζονται στην **Εικόνα 3.1**.



Εικόνα 3.1. Εξαγωγή IRE1 γονιδιακής υπογραφής 38 γονιδίων στο GBM

Συνοπτική περιγραφή της ροής εργασίας που εφαρμόστηκε για την εξαγωγή μιας μικρού μεγέθους γονιδιακής υπογραφής 38 γονιδίων (IRE1sign38) στο ανθρώπινο γλοιοβλάστωμα. Τα μεταγραφικά δεδομένα που αξιοποιήθηκαν αφορούσαν στην πρωτογενή κυτταρική σειρά του γλοιοβλαστώματος U87 και η ανάλυση έγινε με την υπολογιστική πλατφόρμα BioInfoMiner. Η γονιδιακή υπογραφή αποτελείται από δύο συνιστώσες 19 γονιδίων η κάθε μια. Η XBP1s συνιστώσα περιλαμβάνεται στο πλαίσιο με το ανοιχτό κόκκινο χρώμα ενώ η RIDD συνιστώσα περιλαμβάνεται στο πλαίσιο με το ανοιχτό μωβ χρώμα.

3.1.2 Λειτουργικός Χαρακτηρισμός της Γονιδιακής Υπογραφής (IRE1sign38)

Στην προσπάθειά μας να διερευνήσουμε τα σύνολα των λειτουργιών που ελέγχουν τα γονίδια της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38 που είχαμε εξάγει ώστε να αποκαλυφθούν πιθανές βασικές βιολογικές διαδικασίες-μοριακά μονοπάτια που περιγράφουν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του γλοιοβλαστώματος, διεξήγαμε Λειτουργική Ανάλυση και Σηματολογική Ομαδοποίηση αποκλειστικά για τα γονίδια της υπογραφής με την πλατφόρμα BioInfoMiner. Οι σημαντικότερες λειτουργίες καθώς και τα αποτελέσματα της συστημικής ερμηνείας αυτών μέσω της σηματολογικής ιεράρχησης και ομαδοποίησης απεικονίζονται στην **Εικόνα 3.2**. Οι πέντε βασικές κατηγορίες λειτουργιών που αναδείχτηκαν αφορούν α) στην διευθέτηση της εξωκυτταρικής μήτρας με κύριο ρόλο τον μεταβολισμό του κολλαγόνου για την ανασύσταση των ινών κολλαγόνου, β) στην διακυτταρική επικοινωνία και την απόκριση σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα με κύριο ρόλο την απόκριση σε λιποπολυσακχαρίτες

καθώς και την βιοσύνθεση γλυκοζαμινογλυκανών και αμινογλυκανών, γ) στην μετανάστευση ανοσοκυττάρων κυρίως της έμφυτης μη ειδικής ανοσίας όπως είναι τα κοκκιοκύτταρα (granulocytes) που περιλαμβάνουν τα ουδετερόφιλα, τα βασεόφιλα και τα ηωσινόφιλα, δ) στην κυτταρική κινητικότητα μέσω προσέλκυσης κυρίως κυττάρων του ανοσοποιητικού και ε) στην φλεγμονώδη αντίδραση ή φλεγμονή με κυρίαρχο τον ρόλο των κυτοκινών. Συνεπώς, όπως καταλαβαίνουμε πρόκειται για διαδικασίες που σχετίζονται άμεσα με τα κύρια χαρακτηριστικά των επιθετικών μορφών καρκίνου που περιλαμβάνουν την κυτταρική διήθηση και μεταστατικότητα καθώς και την αυξημένη φλεγμονώδη αντίδραση.

Extracellular matrix rearrangement	Gene Ontological Terms	Enrichment of IRE1sign38 genes in each function	pvalue
	extracellular matrix organization	10/310	0.0012
collagen catabolic process	6/65	0.0014	
collagen metabolic process	6/81	0.0021	
extracellular structure organization	10/354	0.0042	
extracellular matrix disassembly	4/76	0.0298	
collagen fibril organization	3/40	0.0437	

Response to stimuli; cell-cell communication	Gene Ontological Terms	Enrichment of IRE1sign38 genes in each function	pvalue
	response to lipopolysaccharide	8/298	0.008
cellular response to lipopolysaccharide	5/146	0.0396	
glycosaminoglycan biosynthetic process	4/100	0.0444	
aminoglycan biosynthetic process	4/101	0.0496	
positive regulation of response to external stimulus	7/283	0.0216	

Cell motility	Gene Ontological Terms	Enrichment of IRE1sign38 genes in each function	pvalue
	positive regulation of cell motility	9/489	0.029
positive regulation of locomotion	9/519	0.038	
regulation of cell motility	12/879	0.038	

immune cells migration	Gene Ontological Terms	Enrichment of IRE1sign38 genes in each function	pvalue
	positive regulation of leukocyte chemotaxis	5/86	0.0068
regulation of granulocyte chemotaxis	4/47	0.0081	
regulation of leukocyte chemotaxis	5/108	0.0131	
neutrophil chemotaxis	4/63	0.0159	
granulocyte chemotaxis	4/69	0.0175	
regulation of neutrophil chemotaxis	3/35	0.0352	
positive regulation of leukocyte migration	6/121	0.0053	
myeloid leukocyte migration	5/104	0.0078	
regulation of leukocyte migration	6/174	0.0143	
positive regulation of cell migration	9/473	0.0188	
neutrophil migration	4/71	0.0233	
regulation of cell migration	12/827	0.0245	
granulocyte migration	4/78	0.0296	
positive regulation of neutrophil migration	3/33	0.0324	
regulation of neutrophil migration	3/39	0.0427	
leukocyte migration	7/353	0.0492	

Inflammation -cytokines	Gene Ontological Terms	Enrichment of IRE1sign38 genes in each function	pvalue
	inflammatory response	9/464	0.0179
positive regulation of acute inflammatory response	3/29	0.0211	
response to cytokine	14/1075	0.0254	
chemokine-mediated signaling pathway	4/75	0.0289	
regulation of acute inflammatory response	5/149	0.0341	
acute-phase response	3/42	0.0412	
regulation of cytokine biosynthetic process	4/97	0.0466	

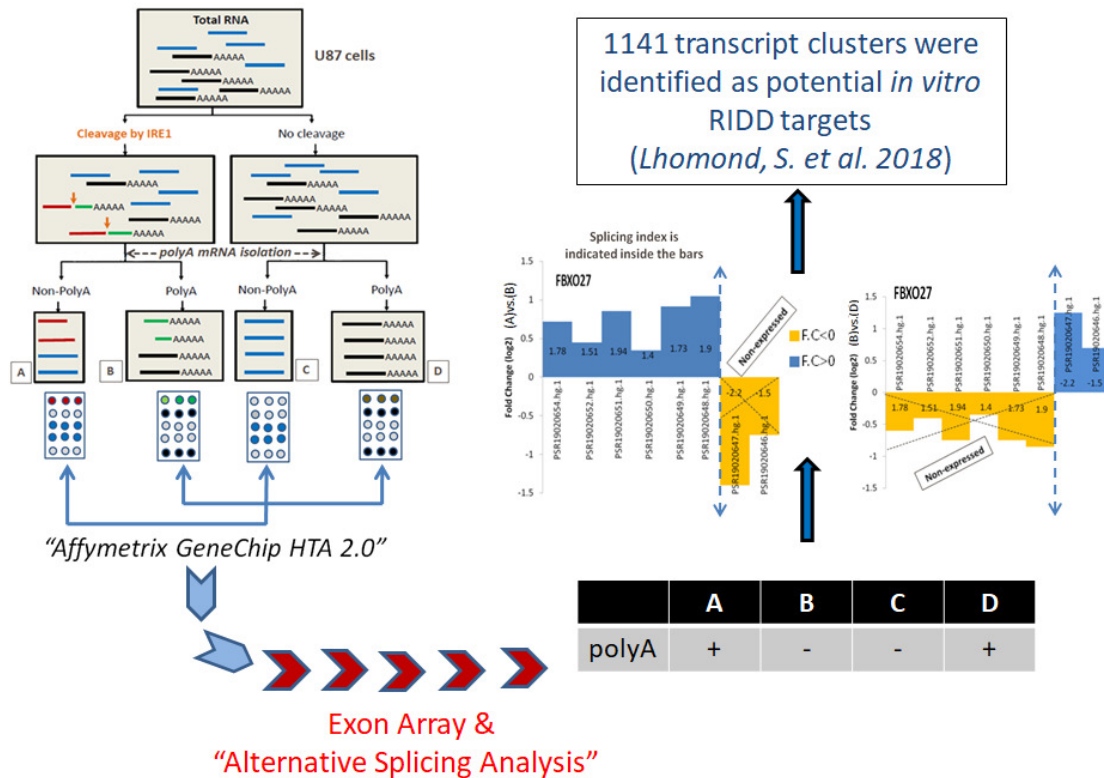
Εικόνα 3.2. Λειτουργικός χαρακτηρισμός της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38

Με διαφορετικό χρώμα απεικονίζονται οι πέντε βασικές κατηγορίες λειτουργιών στις οποίες τα γονίδια της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38 έχουν κομβικό ρόλο.

3.1.3 Ταυτοποίηση 1141 *in vitro* Μεταγραφικών Συνόλων ως Υποψήφιοι Στόχοι της RIDD Δράσης

Ένας άλλος πολύ σημαντικός μας στόχος ήταν επίσης να ταυτοποιήσουμε τόσο mRNA όσο και miRNA μετάγραφα που να είναι υποψήφιοι στόχοι της RIDD δράσης. Για τον *in vitro* προσδιορισμό RIDD mRNA μεταγράφων-στόχων εφαρμόστηκε αρχικά μια *in vitro* δοκιμασία αποκοπής του ολικού mRNA των U87 κυττάρων από την IRE1 πρωτεΐνη, ακολούθησε διαχωρισμός των polyA από τα μη polyA μετάγραφα ή τμήματά τους και υβριδοποίησή τους στην μικροσυστοιχία Affymetrix GeneChip HTA 2.0. Με την βοήθεια της Affymetrix Expression Console (v1.2.1) καταγράφηκαν τα δεδομένα έντασης των τεσσάρων διαφορετικών καταστάσεων του πειράματος που απεικονίζονται με τα γράμματα A, B, C και

D στην **Εικόνα 3.3**. Η πρώτη κατάσταση (A) περιλάμβανε όλα τα Μη-Πολυαδενυλιωμένα (Non-PolyA) μετάγραφα μαζί με τα κομμάτια (θραύσματα) των PolyA μεταγράφων που δεν περιλάμβαναν την polyA τους ουρά και τα οποία είχαν προκύψει με αποκοπή από την IRE1 πρωτεΐνη. Η δεύτερη συνθήκη (B) αφορούσε σε όλα τα PolyA μετάγραφα συμπεριλαμβανομένου των κομματιών αποκοπής από την IRE1 τα οποία έφεραν την polyA ουρά. Η τρίτη κατάσταση (C) περιλάμβανε όλα τα Μη-PolyA μετάγραφα και τέλος η συνθήκη D περιλάμβανε όλα τα PolyA μετάγραφα. Όλοι οι ανιχνευτές (probes) οργανώθηκαν σε κοινά σύνολα (probe sets) τα οποία σχολιάστηκαν και ομαδοποιήθηκαν σε επίπεδο γονιδίου (gene-level), σε επίπεδο εξωνίου (exon-level) και τέλος σε επίπεδο σύνδεσης ματίσματος εξωνίων (splice-junction). Μετά την ανάλυση της μικροσυστοιχίας σε επίπεδο εξωνίων εφαρμόσαμε μια τροποποιημένη ανάλυση εναλλακτικού ματίσματος (Ενότητα 2.3.1.3.1) που βασίζεται στον δείκτη εναλλακτικού ματίσματος (splicing index) και στα επίπεδα μεταβολής έκφρασης (fold-change) μεταξύ των εξεταζόμενων συνθηκών. Συγκεκριμένα, polyA μετάγραφα των οποίων τα PSRs (εξώνια) χαρακτηρίστηκαν ως απόντα ή υπό-εκφρασμένα από ένα συγκεκριμένο εξώνιο και μετά κατά μήκος του μεταγράφου κατά την σύγκριση της B έναντι της D συνθήκης ενώ ταυτόχρονα τα εξώνια αυτά ήταν παρόντα ή υπέρ-εκφρασμένα κατά την σύγκριση της A έναντι της B συνθήκης χαρακτηρίστηκαν ως υποψήφιοι RIDD στόχοι. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίσαμε 1141 *in vitro* σύνολα μεταγράφων (Transcript Clusters) που πιθανόν υφίστανται την RIDD δράση. Συνοπτικά η ροή εργασίας, καθώς και η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε για την ταυτοποίηση των 1141 υποψήφιων RIDD μεταγράφων-στόχων απεικονίζονται στην **Εικόνα 3.3**.



Εικόνα 3.3. Ταυτοποίηση 1141 *in vitro* υποψήφιων RIDD στόχων

Η ανάλυση των δεδομένων έντασης της Affymetrix μικροσυστοιχίας GeneChip HTA 2.0 σε επίπεδο εξωνίων και η εφαρμογή μιας παραλλαγμένης διαδικασίας εναλλακτικού ματίσματος μας επέτρεψε την ταυτοποίηση 1141 υποψήφιων *in vitro* μεταγραφικών συνόλων. polyA μεταγράφα γονιδίων (όπως π.χ. του γονιδίου FBXO27) των οποίων τα εξώνια ήταν παρόντα ή υπέρ-εκφρασμένα κατά μήκος του μορίου μέχρι ένα συγκεκριμένο εξώνιο (PSRs που σημειώνονται με μπλε χρώμα στο διάγραμμα) κατά την σύγκριση της A έναντι (vs.) της B συνθήκης, και τα οποία ήταν απόντα ή υπό-εκφρασμένα συνολικά (PSRs που σημειώνονται με κίτρινο χρώμα στο διάγραμμα) κατά την σύγκριση της B έναντι (vs.) της D συνθήκης, καταχωρήθηκαν ως υποψήφιοι RIDD στόχοι.

3.1.4 Ταυτοποίηση Εξαρτώμενων από την Δράση της IRE1 miRNA Μορίων σε U87 Κύτταρα

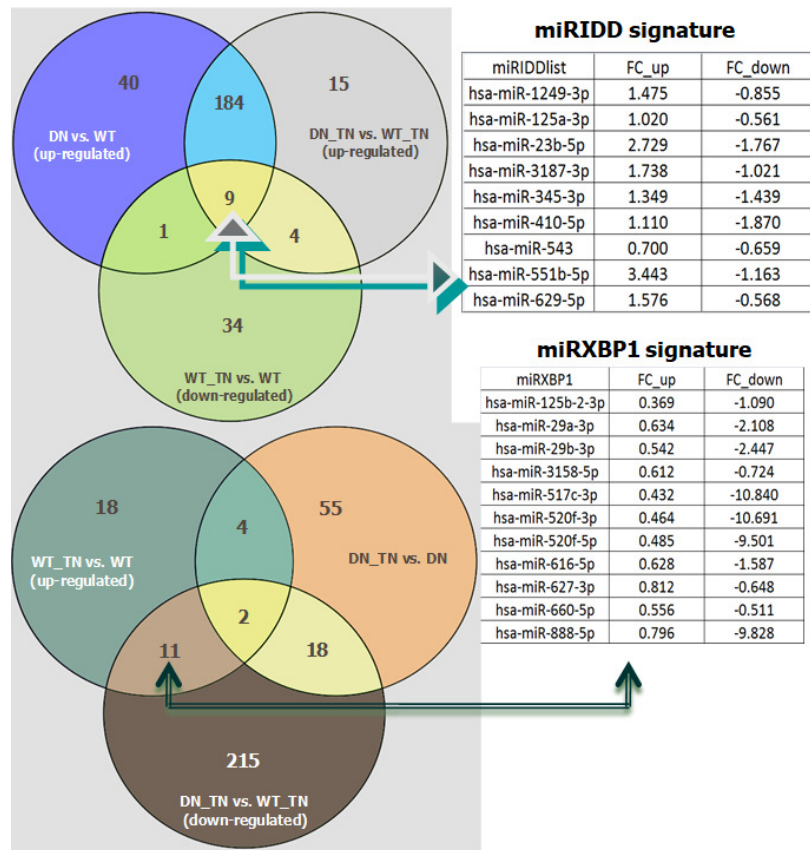
Η επεξεργασία και ανάλυση πρωτογενών miRNAseq δεδομένων αλληλούχισης (Ενότητα 2.3.2.2) τόσο στο επίπεδο των ώριμων (mature) όσο και στο επίπεδο των πρόδρομων (pre-mature ή hairpin) miRNAs, που παρήχθησαν από την αγρίου-τύπου (WT-wild type) αλλά και την κυρίαρχη αρνητική (DN-dominant negative) ισομορφή της IRE1 πρωτεΐνης στην πρωτογενή κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος U87-MG [Ενότητα 2.3.2.1 - U87-MG κύτταρα γλοιοβλαστώματος (miRNAseq δεδομένα)], τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες στρες Ε.Δ. λόγω τουνικαμυκίνης (TN) ανέδειξε 9 διαφορετικά ώριμα miRNAs ως πιθανούς RIDD στόχους της IRE1 πρωτεΐνης (miRIDD υπογραφή) και 11 διαφορετικά ώριμα miRNAs των οποίων τα γονίδια θα μπορούσαν να ήταν δυνητικοί στόχοι του μεταγραφικού παράγοντα XBP1s (miRXBP1s υπογραφή) των οποίων η μεταγραφική

έκφραση αυξάνεται παρουσία του IRE1 (**Εικόνα 3.4**). Συγκεκριμένα, miRNAs που βρέθηκαν από κοινού υπέρ-εκφρασμένα κατά την διαφορική ανάλυση γονιδιακής έκφρασης στις συγκρίσεις DN έναντι (vs.) WT και DN_TN (DN υπό στρες Ε.Δ. λόγω TN) vs. WT_TN ενώ ήταν υπό-εκφρασμένα κατά την σύγκριση των WT_TN vs. WT χαρακτηρίστηκαν ως υποψήφιοι στόχοι της RIDD δράσης (miRIDD). Αντίστοιχα, miRNAs που βρέθηκαν υπέρ-εκφρασμένα κατά την σύγκριση WT_TN vs. WT και υπό-εκφρασμένα κατά την σύγκριση DN_TN vs. WT_TN αλλά δεν υπήρξε μεταβολή στην έκφρασή τους κατά την σύγκριση DN_TN vs. DN χαρακτηρίστηκαν ως δυνητικοί στόχοι του XBP1s (miRXBP1s).

Η παραπάνω ανάλυση πραγματοποιήθηκε επίσης σε επίπεδο πρόδρομων miRNA μορίων, η οποία επιβεβαίωσε τα αποτελέσματά μας σε επίπεδο ώριμων miRNAs αλλά ανέδειξε και μερικά πρόδρομα miRNA μόρια των οποίων η έκφραση δεν ακολούθησε το πρότυπο μεταβολής των αντίστοιχων παραγόμενων από αυτά ώριμων miRNAs. Δηλαδή η πιθανή RIDD δράση που υφίστανται οδηγεί σε αντίθετα αποτελέσματα από τα αναμενόμενα. Έτσι, παρόλο που η έκφραση των πρόδρομων miRNAs παρουσίασε σημαντική μείωση παρουσία της IRE1 πρωτεΐνης, τα αντίστοιχα ώριμα miRNAs είχαν βρεθεί εκφρασμένα ή/και υπέρ-εκφρασμένα στις αντίστοιχες συγκρίσεις. Τα αποτελέσματα αυτών των συγκρίσεων απεικονίζονται στην **Εικόνα 3.5**.

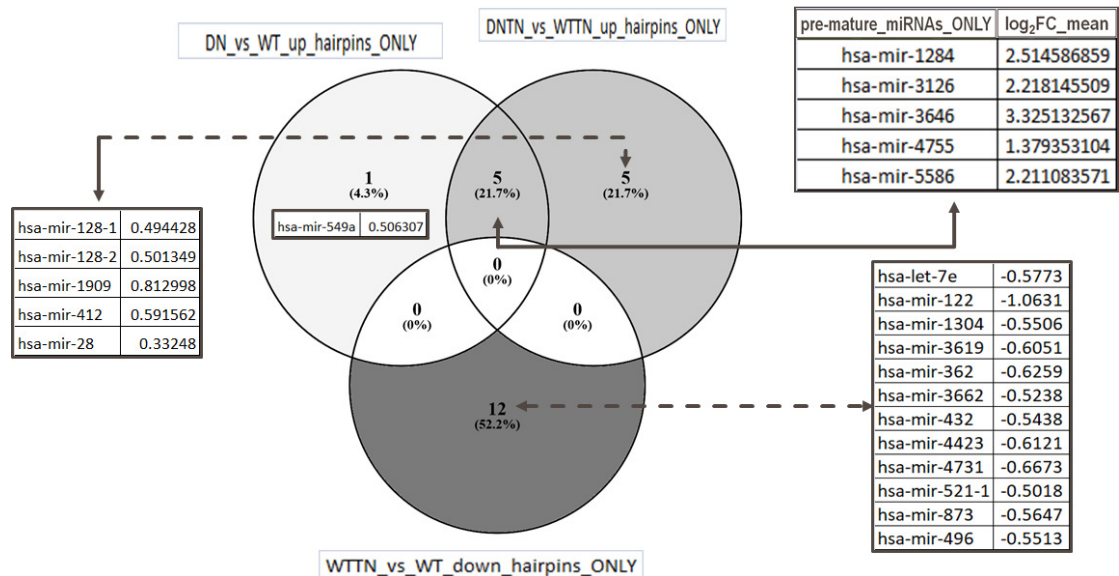
Αξίζει να αναφερθεί ότι η διαπίστωσή μας αυτή υπέδειξε για πρώτη φορά και έναν άλλο πιθανό μηχανισμό δράσης της IRE1 πρωτεΐνης, ανάλογο της Dicer για την ωρίμανση των πρόδρομων μορίων miRNAs, γεγονός που ενισχύεται σημαντικά από πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα.

Τέλος η ανάλυσή μας επεκτάθηκε και στην αναζήτηση νέων (novel) miRNA μορίων στο γονιδίωμα που δεν έχουν ακόμα χαρακτηριστεί επισήμως και των οποίων η έκφραση επηρεάζεται από την δράση της IRE1 πρωτεΐνης στα U87 κύτταρα του γλοιοβλαστώματος. Με την βοήθεια του αλγορίθμου miRDeep2 (Ενότητα 2.3.2.2) καταγράψαμε σε κάθε συνθήκη (WT, DN, WT_TN, DN_TN) τα προτεινόμενα νέα μόρια miRNA για τα οποία προβλέφθηκε με σημαντική αξιοπιστία ότι οι εγγραφές αλληλούχισής τους ακολουθούν το αναμενόμενο μοντέλο κατανομής με βάση τον μηχανισμό ωρίμανσης των miRNAs.



Εικόνα 3.4. Ταυτοποίηση 9 miRIDD και 11 miRXP1s ώριμων miRNAs στο GBM

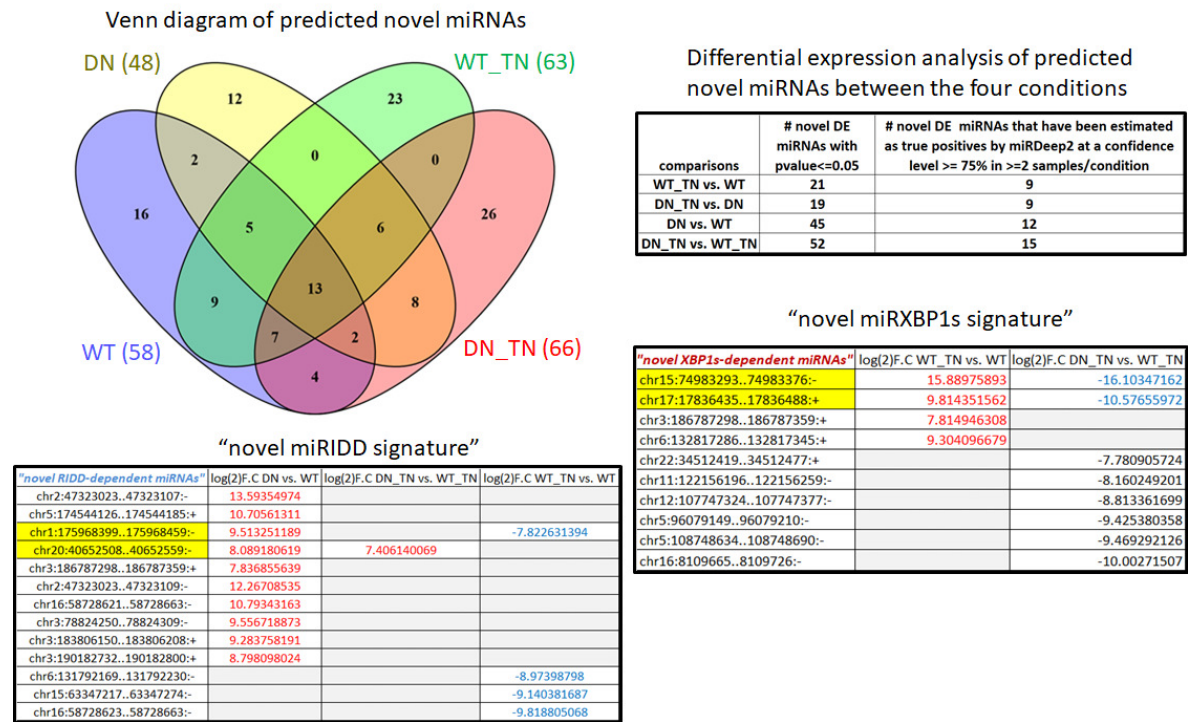
Η επεξεργασία και ανάλυση πρωτογενών miRNAseq δεδομένων αλληλούχισης σε U87 κύτταρα άγριου τύπου (WT) και διαμολυσμένων με την αρνητικά κυρίαρχη IRE1 ισομορφή (DN) κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες στρες Ε.Δ. λόγω τιουνικαμικίνης (TN), οδήγησε στην ταυτοποίηση 9 και 11 ώριμων μορίων miRNA ως υποψήφιους στόχους της RIDD και XBP1s δράσης, αντίστοιχα. Η μεταβολή στην έκφραση των miRNAs ($\log_2\text{FoldChange}$) απεικονίζεται στις στήλες FC_up και FC_down.



Εικόνα 3.5. Ταυτοποίηση IRE1-εξαρτώμενων πρόδρομων μορίων miRNA στο γλοιοβλάστωμα, όπου το πρότυπο μεταβολής της έκφρασής τους δεν ακολουθεί το πρότυπο μεταβολής της έκφρασης των παραγόμενων ώριμων miRNA τους

Από την ανάλυση διαφορικής γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των συνθηκών που απεικονίζονται, σε επίπεδο πρόδρομων μορίων (*pre-mature* ή *hairpins*) miRNAs, αναδείχτηκαν κάποια μόρια των οποίων τα επίπεδα έκφρασης μειώνονται σημαντικά παρουσία της IRE1 πρωτεΐνης ενώ τα παραγόμενα από αυτά ώριμα miRNAs παρουσίαζαν σταθερά σχετικά επίπεδα έκφρασης μεταξύ των αντίστοιχων, συγκρινόμενων συνθηκών. Στο Venn διάγραμμα περιλαμβάνονται αποκλειστικά μόνο τα πρόδρομα miRNA μόρια των οποίων τα αντίστοιχα ώριμα miRNAs δεν βρέθηκαν διαφορικά εκφρασμένα στις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες. Στα 5 πρόδρομα miRNAs που περιλαμβάνονται στο πλαίσιο πάνω-δεξιά, βρέθηκε να αυξάνεται από κοινού η έκφρασή τους απουσία της IRE1 τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες στρες Ε.Δ. υποδεικνύοντας έναν πιθανό διαφορετικό μηχανισμό δράσης του IRE1-RIDD άξονα.

Συγκεκριμένα, διατηρήσαμε μόνο τα μόρια miRNA που εντοπίστηκαν σε τουλάχιστον 2 δείγματα ανα συνθήκη με τιμή κατωφλίου εκτιμώμενης πιθανότητας αληθούς πρόβλεψης (estimated probability that the miRNA candidate is a true positive) το 75%. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήσαμε ένα εύρωστο σύνολο ασχολίαστων μορίων miRNA τα οποία ελέγξαμε στη συνέχεια για διαφορική έκφραση μεταξύ των εξεταζόμενων συνθηκών του πειράματος. Στην **Εικόνα 3.6** περιλαμβάνεται τόσο ο αριθμός των νέων μορίων miRNA που προβλέφθηκαν με υψηλό δείκτη εμπιστοσύνης σε κάθε συνθήκη (διάγραμμα Venn) όσο και ο αριθμός των διαφορικά εκφρασμένων miRNAs όπως προέκυψε από τις τέσσερις συγκρίσεις που πραγματοποιήσαμε. Με την διαδικασία αυτή αναδείχτηκαν συνολικά 13 νέα μόρια miRNA τα οποία θα μπορούσαν δυνητικά να αποτελούν υποψήφιους στόχους της RIDD δράσης (novel miRIDD signature) με δύο απ' αυτά να προκύπτουν και από διαφορετικές συγκρίσεις. Το 1^ο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 (chr1:175968399..175968459:-) και το 2^ο στο χρωμόσωμα 20 (chr20:40652508..40652559:-). Αντίστοιχα, εντοπίσαμε και 10 νέα μόρια miRNA τα οποία θα μπορούσαν να είναι πιθανοί στόχοι του άξονα IRE1-XBP1s (novel miRXBP1s signature) αφού η έκφρασή τους αυξάνει σε συνθήκες στρες Ε.Δ., παρουσία της IRE1 ή/και μειώνεται η έκφρασή τους απουσία της. Από το σύνολο αυτό, δύο μετάγραφα που προκύπτουν από το χρωμόσωμα 15 (chr15:74983293..74983376:-) και το χρωμόσωμα 17 (chr17:17836435..17836488:+), αντίστοιχα, προκρίθηκαν ως πιθανότεροι XBP1s στόχοι.



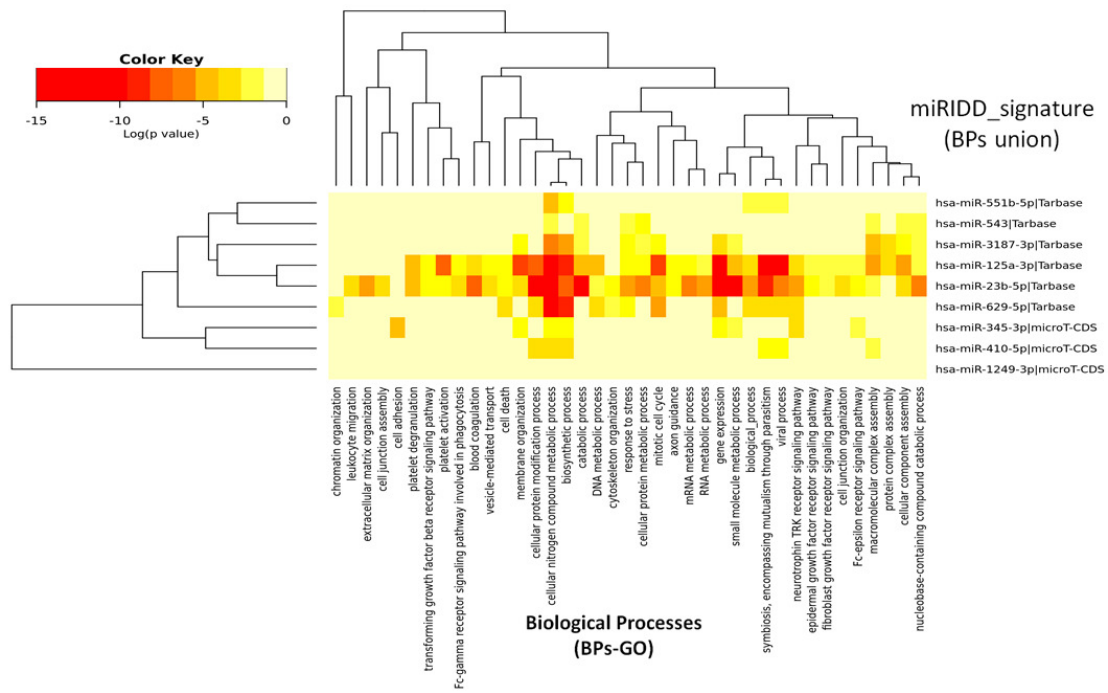
Εικόνα 3.6. Προσδιορισμός νέων (novel) miRNA μορίων εξαρτώμενων από την σηματοδοτική δράση της IRE1 πρωτεΐνης

Για την αναζήτηση πιθανών νέων μορίων miRNA που δεν έχουν ακόμη χαρακτηριστεί χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος miRDeep2 ενώ με ανάλυση διαφορικής γονιδιακής έκφρασης σε κύτταρα U87 κάτω από φυσιολογικές και συνθήκες στρες Ε.Δ. προσδιορίστηκαν miRNAs των οποίων το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης εξαρτάται από την XBP1s (“novel miRXP1s signature”) και RIDD (“novel miRIDD signature”) δράση, αντίστοιχα. Οι χρωμοσωμικές περιοχές που σημειώνονται με κίτρινο χρώμα αποτελούν τους πιο ισχυρούς υποψήφιους για την έκφραση των αντίστοιχων miRNAs.

3.1.5 Λειτουργικός Χαρακτηρισμός των miRIDD και XBP1s- εξαρτώμενων miRNA (miRXP1s) Μορίων

Για να χαρακτηρίσουμε αφενός λειτουργικά τις miRIDD και miRXP1s miRNA υπογραφές που είχαμε εξάγει και αφετέρου για να αξιολογήσουμε και την πιθανή αλληλεπίδρασή τους με τα γονίδια της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38 ώστε να χαρτογραφηθεί το δίκτυο των mRNA-miRNA αλληλεπιδράσεων που εμπλέκεται στην ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης της IRE1sign38, αναζητήσαμε αρχικά τα γονίδια στόχους των υποψήφιων μορίων miRNA στην πλατφόρμα Diana tools (2.3.2.2) χρησιμοποιώντας τόσο την TarBase (v7.0 & v8.0) όσο και τον αλγόριθμο DIANA-microT-CDS για την πρόβλεψη υποψήφιων-στόχων (μέσω πρόγνωσης της αλληλεπίδρασής τους μέσω της CDS ή/και της 3' UTR περιοχής) στην περίπτωση που δεν υπήρχαν πειραματικά επιβεβαιωμένες αλληλεπιδράσεις για τα υπό μελέτη miRNAs. Στη συνέχεια εφαρμόσαμε λειτουργική ανάλυση εμπλουτισμού για κάθε υπογραφή ξεχωριστά, χρησιμοποιώντας την ένωση των

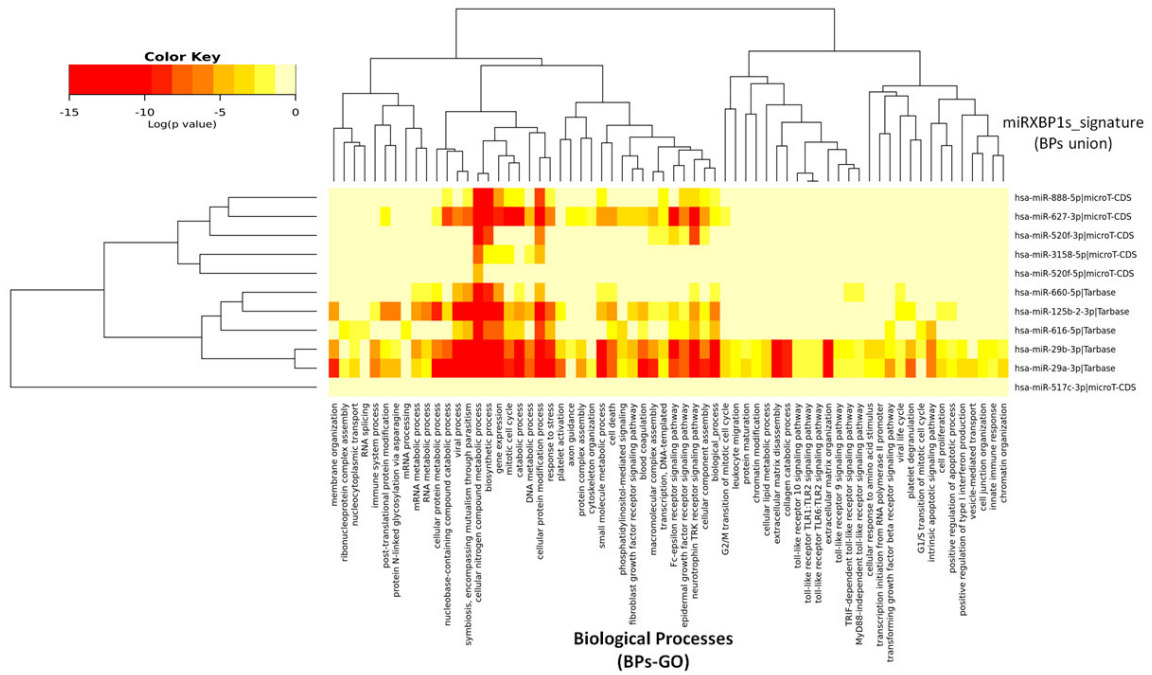
γονιδίων-στόχων (Union) των αντίστοιχων miRNAs, εντοπίζοντας τις σημαντικότερες βιολογικές διαδικασίες με βάση την Gene Ontology καθώς και τα σημαντικότερα KEGG μονοπάτια (**Εικόνα 3.9**). Η ανάλυση αυτή επιβεβαίωσε την ενεργή συμμετοχή των εξεταζόμενων miRNAs σε λειτουργίες και μοριακά μονοπάτια με κεντρικό ρόλο στον καρκίνο, με τα miRNA της miRXPB1s υπογραφής να στοχεύουν περισσότερα γονίδια που εμπλέκονται σε μεγαλύτερο αριθμό βιολογικών διεργασιών και μοριακών μονοπατιών. Η miRIDD υπογραφή φαίνεται να επηρεάζει συστημικά μεγαλύτερα σύνολα διαδικασιών και μονοπατιών με λιγότερο εξειδικευμένο τρόπο, επηρεάζοντας σημαντικά τον μεταβολισμό του RNA και των πρωτεϊνών, την προσκόλληση των κυττάρων στην εξωκυττάρια μήτρα και την διακυτταρική επικοινωνία. Από την άλλη, η miRXPB1s υπογραφή εκδηλώνει μια πιο εξειδικευμένη δράση, στοχεύοντας συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια που αφορούν κυρίως το σηματοδοτικό μονοπάτι του FOXO, του PI3K-Akt, του mTOR, του TGF-β, του Wnt, του AMPK και του p53 που ως γνωστό παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής αύξησης και αναγέννησης, τον κυτταρικό μεταβολισμό και την κυτταρική επιβίωση. Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε «miRNA pathway analysis» με τον αλγόριθμο DIANA-mirPath ο οποίος μπορεί να αξιοποιήσει τόσο τα προβλεπόμενα γονίδια-στόχους των miRNAs όσο και τις πειραματικά επιβεβαιωμένες αλληλεπιδράσεις που είναι καταχωρημένες στην βάση DIANA-TarBase. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε επίσης τόσο σε επίπεδο βιολογικών διεργασιών της Gene Ontology (GO) όσο και σε επίπεδο μοριακών μονοπατιών της βάσης KEGG. Για τον σκοπό αυτό εφαρμόσαμε την posteriori στατιστική μέθοδο του αλγορίθμου χρησιμοποιώντας την ένωση (Union) των λειτουργιών και μοριακών μονοπατιών, αντίστοιχα. Δηλαδή ο server αρχικά ταυτοποίησε όλες τις στατιστικά σημαντικές βιολογικές διαδικασίες/μονοπάτια που διαθέτουν γονίδια-στόχους των IRE1-εξαρτώμενων miRNAs και πραγματοποίησε λειτουργική ανάλυση εμπλουτισμού υπολογίζοντας τα επίπεδα σημαντικότητας (p-values) ανάμεσα σε κάθε miRNA και κάθε λειτουργία/μονοπάτι. Στη συνέχεια, για κάθε μονοπάτι εξήχθη ένα ενοποιημένο p-value από τον συνδυασμό των επιπέδων σημαντικότητας που υπολογίσαμε προηγουμένως εφαρμόζοντας μετανάλυση Fisher. Το τελικό p-value εκφράζει την πιθανότητα $1 - q$, όπου q η πιθανότητα το υπό εξέταση μονοπάτι/λειτουργία να είναι σημαντικά εμπλουτισμένο με γονίδια-στόχους ενός τουλάχιστον miRNA. Με άλλα λόγια, οι ενοποιημένες τιμές p-values δείχνουν εάν μια συγκεκριμένη λειτουργία/μονοπάτι στοχεύεται από τουλάχιστον ένα miRNA του αρχείου-εισόδου. Τα σημαντικότερα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής περιλαμβάνονται στην **Εικόνα 3.7** και **Εικόνα 3.8**.



Εικόνα 3.7. Θερμικός χάρτης (Heatmap) ιεραρχικής ομαδοποίησης των βιολογικών διεργασιών (BPs) και των miRNA της miRIDD υπογραφής που τα στοχεύουν

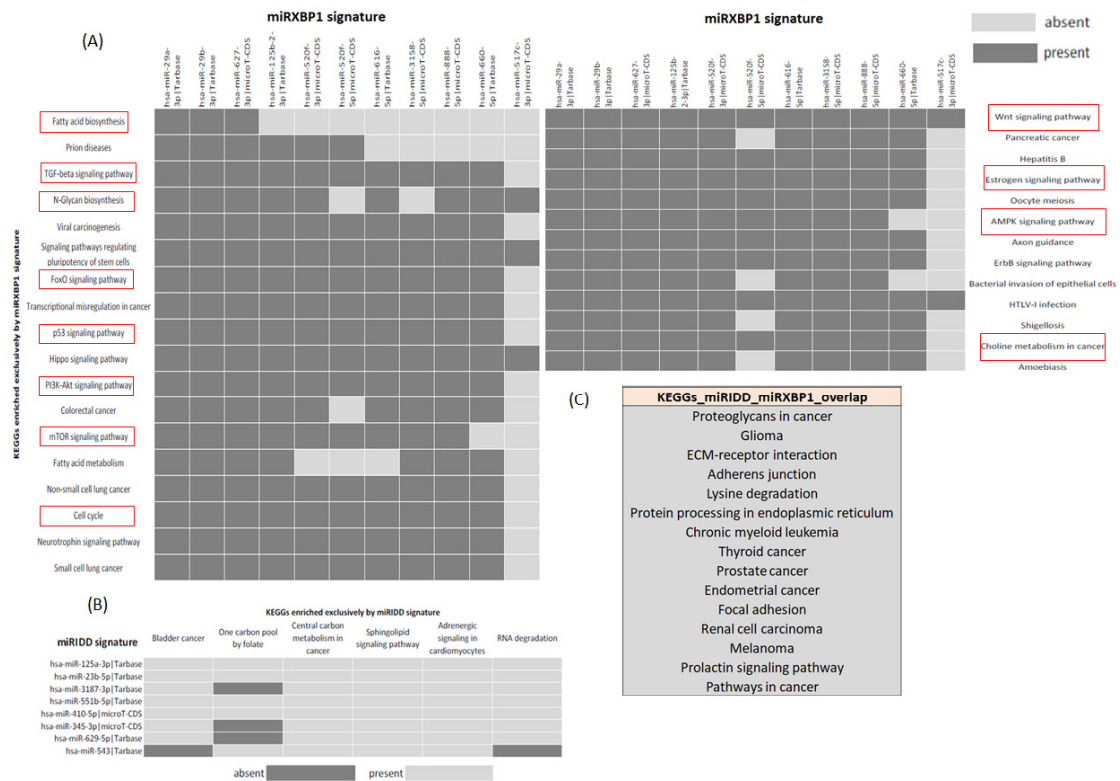
Χρησιμοποιώντας τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας που εξήχθησαν από την λειτουργική ανάλυση εμπλουτισμού που πραγματοποιήσαμε για την ένωση όλων των γονιδίων-στόχων των miRNA της miRIDD υπογραφής με βάση τις βιολογικές διεργασίες (BPs) της GO, πραγματοποιήθηκε ιεραρχική ομαδοποίηση των λειτουργιών που είναι σημαντικά εμπλουτισμένες με γονίδια-στόχους των εξεταζόμενων miRNAs αλλά και ιεραρχική ομαδοποίηση των miRNAs, σημειώνοντας την πιθανότητα μια βιολογική διαδικασία να στοχεύεται τουλάχιστον από ένα miRNA της miRIDD υπογραφής με διαφορετική χρωματική κλίμακα. Τα σημαντικότερα miRNA μόρια που φαίνονται να εμπλέκονται στην πλειονότητα των βιολογικών διεργασιών είναι το miR-125a-3p, το miR-23b-5p και το miR-629-5p τα οποία διαθέτουν πειραματικά επιβεβαιωμένα γονίδια-στόχους. Τα σημαντικότερα σύνολα των διαδικασιών που στοχεύονται κυρίως από αυτά τα miRNAs περιλαμβάνουν την κυτταρική προσκόλληση και διακυτταρική επικοινωνία με αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και της εξωκυττάριας μήτρας, τον μεταβολισμό και την τροποποίηση των πρωτεϊνών, τον μεταβολισμό του RNA, την ανταπόκριση στο στρες, την δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων και τον κυτταρικό θάνατο αλλά και τα σηματοδοτικά μονοπάτια των αυξητικών παραγόντων EGF και FGF.

Αξίζει να αναφερθεί ότι τα miRNAs και των δύο υπογραφών εμπλέκονται σημαντικά σε καταβολικές και αναβολικές διαδικασίες του RNA και των πρωτεϊνών με την miRIDD να δείχνει μια μεγαλύτερη προτίμηση για διαδικασίες που αφορούν στην κυτταρική προσκόλληση και την διακυτταρική σύνδεση, ενώ η miRXP1s ελέγχει σε μεγαλύτερο βαθμό γονίδια που εμπλέκονται στην προσέλκυση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και στην δράση κυρίως των μηχανισμών δράσης της μη ειδικής (έμφυτης) ανοσίας. Η τελευταία παρατήρηση ενισχύεται έντονα και από την παρουσία μιας συστάδας που αναφέρεται στην σηματοδοτική δράση του Toll-like υποδοχέα.



Εικόνα 3.8. Θερμικός χάρτης (Heatmap) ιεραρχικής ομαδοποίησης των βιολογικών διεργασιών (BPs) και των miRNA της miRXPBP1s υπογραφής που τα στοχεύουν

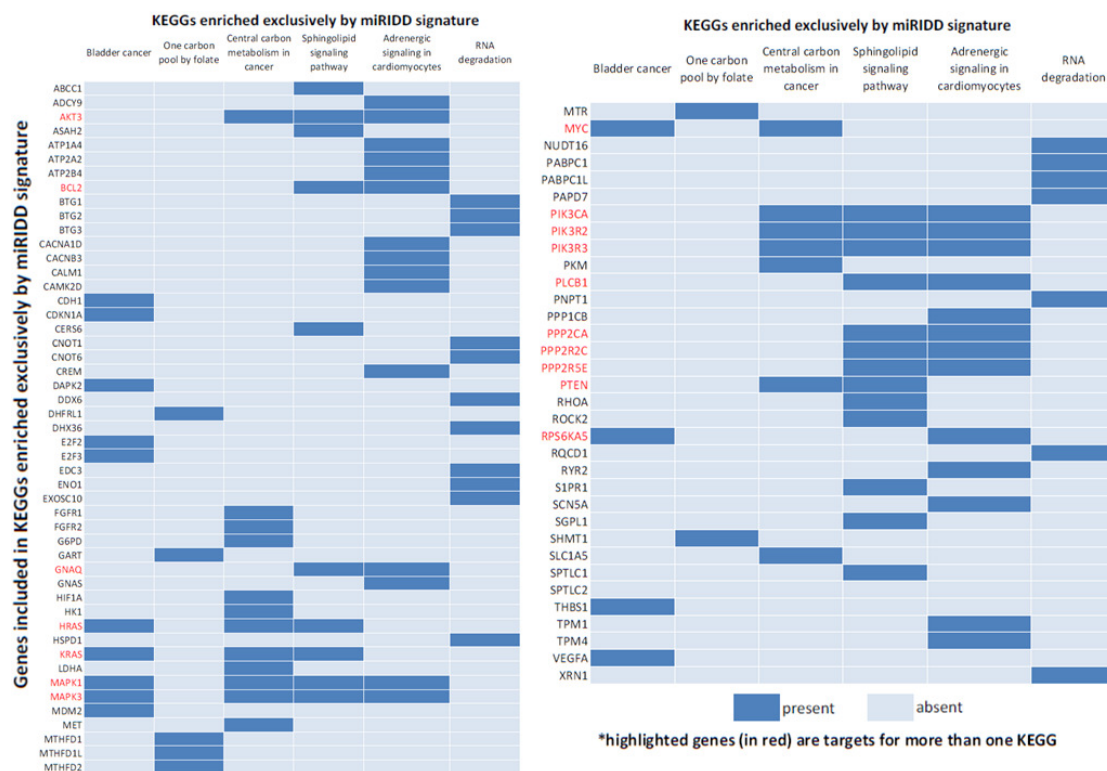
Χρησιμοποιώντας τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας που εξήχθησαν από την λειτουργική ανάλυση εμπλουτισμού που πραγματοποιήσαμε για την ένωση όλων των γονιδίων-στόχων των miRNA της miRXPBP1s υπογραφής με βάση τις βιολογικές διεργασίες (BPs) της GO, πραγματοποιήθηκε ιεραρχική ομαδοποίηση των λειτουργικών που είναι σημαντικά εμπλουτισμένες με γονίδια-στόχους των εξεταζόμενων miRNAs αλλά και ιεραρχική ομαδοποίηση των miRNAs, σημειώνοντας την πιθανότητα μια βιολογική διαδικασία να στοχεύεται τουλάχιστον από ένα miRNA της miRXPBP1s υπογραφής με διαφορετική χρωματική κλίμακα.



Εικόνα 3.9. Απεικόνιση των KEGG μονοπατιών που βρέθηκαν να υπεραντιπροσωπεύονται από τα γονίδια-στόχους της miRXPBP1s και miRIDD υπογραφής

Τα KEGG μονοπάτια που βρέθηκαν εμπλουτισμένα από γονίδια-στόχους αποκλειστικά της miRXBP1s υπογραφής απεικονίζονται ως στήλες αριστερά και δεξιά στο τμήμα (A) της εικόνας ενώ στη περίπτωση της miRIDD υπογραφής τα μονοπάτια που βρέθηκαν εμπλουτισμένα από γονίδια-στόχους αποκλειστικά των miRIDD miRNAs απεικονίζονται στο τμήμα (B). Στην περίπτωση των μονοπατιών της miRXBP1s υπογραφής το σκούρο γκρι χρώμα δηλώνει την στόχευσή των γονιδίων του μονοπατιού από το αντίστοιχο miRNA μόριο ενώ το ανοιχτό γκρι χρώμα την μη συμμετοχή του. Αντίθετη χρωματική κλίμακα έχει εφαρμοστεί στην απεικόνιση της miRIDD υπογραφής. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνονται μοριακά μονοπάτια που παίζουν κεντρικό ρόλο στην δημιουργία, ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου, ενώ στο τμήμα (C) απεικονίζονται τα KEGGs που βρέθηκαν να υπεραντιπροσωπεύονται και τόσο από την miRIDD όσο και από την miRXBP1s υπογραφή.

Επίσης, πραγματοποιήσαμε ανάλυση ταυτοποίησης και ομαδοποίησης γονιδίων-στόχων για κάθε υπογραφή ξεχωριστά, λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα KEGG μονοπάτια που υπεραντιπροσωπεύονταν αποκλειστικά από κάθε υπογραφή (**Πίνακας 5**). Η διαδικασία αυτή μας επέτρεψε να απομονώσουμε στην περίπτωση της miRIDD υπογραφής, οικογένειες γονιδίων-στόχων αλλά και μεμονωμένα γονίδια με κεντρικό ρόλο στην καρκινογένεση όπως το BCL2, το PTEN, το MYC, το KRAS και HRAS, το MDM2, τα γονίδια των MAPK και PI3K κινασών καθώς και γονίδια των Πρωτεϊνικών Φωσφατασών τύπου 2A και 1CB. Από την άλλη πλευρά, στην περίπτωση της miRXBP1s υπογραφής, αναδείχτηκαν 32 γονίδια-στόχοι που αλληλεπιδρούν με περισσότερα από τρία miRNAs όπως τα γονίδια ACVR2B, APC, AR, BCL2L11, CANX, CCNT2, CDC42, CDK6, CLTC, CPEB3, CPEB4, CREB5, DDX3X, DDX5, DPYSL2, ELK4, FZD3, GSK3B, KCNJ6, KMT2A, LATS2, MDM2, MEF2C, MSH6, NRAS, REST, RICTOR, RPS6KA3, RUNX1T1, SOS1, VCL και ZFH3. Η ταυτοποίηση των γονιδιακών-στόχων των δύο miRNA υπογραφών μας οδήγησε επίσης και σε ένα άλλο σημαντικό εύρημα που ήταν η έντονη αλληλεπίδραση τους με την πλειονότητα των γονιδίων της IRE1sign38 υπογραφής, αναδεικνύοντας ένα κλειστό κύκλωμα αλληλεπιδράσεων που μπορεί να ελέγχει με μεγάλη ακρίβεια την έκφραση και των δύο κύριων αξόνων δράσης (RIDD και XBP1s) της IRE1 πρωτεΐνης (**Πίνακας 6**). Είναι αξιοσημείωτο επίσης ότι αρκετά miRNAs όπως το miR-543, miR-551b-5p, miR-520f-3p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-616-5p, miR-627-3p και miR-888-5p στοχεύουν περισσότερα από τρία γονίδια-στόχους της υπογραφής. Τέλος, η ενσωμάτωση των μεταγραφικών δεδομένων των mRNAs και η συσχέτισή τους με τα miRNA δεδομένα επιβεβαίωσε αφενός το γεγονός ότι μικρές αλλαγές στην έκφραση των miRNAs μπορεί να επιφέρουν πολύ μεγαλύτερου μεγέθους μεταβολές στο επίπεδο των mRNA μορίων, και αφετέρου την υψηλού βαθμού ρύθμιση της έκφρασης κομβικών γονιδίων με ενισχυτικά ή/και αντίρροπα κυκλώματα miRNAs.



Πίνακας 5. Γονίδια-στόχοι της miRIDD υπογραφής που περιλαμβάνονται αποκλειστικά στα εμπλουτισμένα από την miRIDD υπογραφή KEGG μονοπάτια

Έξι KEGG μονοπάτια (Καρκίνος Ουροδόχου κύστης, Μεταβολισμός φυλλικού οξέος, Βασικός μεταβολισμός του άνθρακα στον καρκίνο, Σηματοδοτικό μονοπάτι των σφιγγολιπιδίων, η Αδρενεργική σηματοδότηση των καρδιομυοκυττάρων και η Αποικοδόμηση του RNA) βρέθηκαν εμπλουτισμένα αποκλειστικά από τα γονίδια-στόχους της miRIDD υπογραφής. Τα γονίδια-στόχοι της miRIDD υπογραφής που περιλαμβάνονται στα αντίστοιχα μονοπάτια απεικονίζονται ως στήλες, σημειώνοντας με κόκκινο χρώμα εκείνα τα γονίδια που συμμετέχουν τουλάχιστον σε δύο μονοπάτια. Το μπλε σκούρο χρώμα αντικατοπτρίζει την παρουσία του αντίστοιχου γονιδίου σε κάποιο KEGG μονοπάτι ενώ το ανοιχτό μπλε χρώμα υποδεικνύει την απουσία του.

IRE1sign38_XBP1s_genes														
miRIDD	SERPINB2	ZNF804A	PLA2G4A	IFI44L	TFPI2	COL4A6	IL8	ZNF804A	IFI44L	IL1B	IL6	CXCL8	ASS1	MMP1
hsa-miR-1249-3p														
hsa-miR-125a-3p														
hsa-miR-23b-5p														
hsa-miR-3187-3p														
hsa-miR-345-3p														
hsa-miR-410-5p														
hsa-miR-543														
hsa-miR-551b-5p														
hsa-miR-629-5p														
miRXBP1s														
hsa-miR-125b-2-3p														
hsa-miR-29a-3p														
hsa-miR-29b-3p														
hsa-miR-3158-5p														
hsa-miR-517c-3p														
hsa-miR-520f-3p														
hsa-miR-520f-5p														
hsa-miR-616-5p														
hsa-miR-627-3p														
hsa-miR-660-5p														
hsa-miR-888-5p														
IRE1sign38_RIDD_genes														
miRIDD	COL8A1	THBS1	DACH1	LUM	TMEM255A	DCN	ANGPT1	TGF2	COL3A1	OXTR	TIMP3	PLAC8	CFH	RGS4
hsa-miR-1249-3p														
hsa-miR-125a-3p														
hsa-miR-23b-5p														
hsa-miR-3187-3p														
hsa-miR-345-3p														
hsa-miR-410-5p														
hsa-miR-543														
hsa-miR-551b-5p														
hsa-miR-629-5p														
miRXBP1s														
hsa-miR-125b-2-3p														
hsa-miR-29a-3p														
hsa-miR-29b-3p														
hsa-miR-3158-5p														
hsa-miR-517c-3p														
hsa-miR-520f-3p														
hsa-miR-520f-5p														
hsa-miR-616-5p														
hsa-miR-627-3p														
hsa-miR-660-5p														
hsa-miR-888-5p														

experimentally validated
predicted

Πίνακας 6. Ταυτοποίηση IRE1sign38 γονιδίων-στόχων της miRIDD και miRXBP1s υπογραφής

Τα γονίδια-στόχοι της miRIDD και miRXBP1s υπογραφής που είναι μέλη των δύο συνιστωσών της IRE1sign38 σημειώνονται με κίτρινο χρώμα όταν η αλληλεπίδραση προβλέφθηκε από τον αλγόριθμο DIANA-microT-CDS (>70% αξιοπιστία) και με μπλε χρώμα όταν η αλληλεπίδραση έχει ήδη επιβεβαιωθεί πειραματικά (TarBase v8.0). Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται τα miRNAs που στοχεύουν τα γονίδια της IRE1sign38.

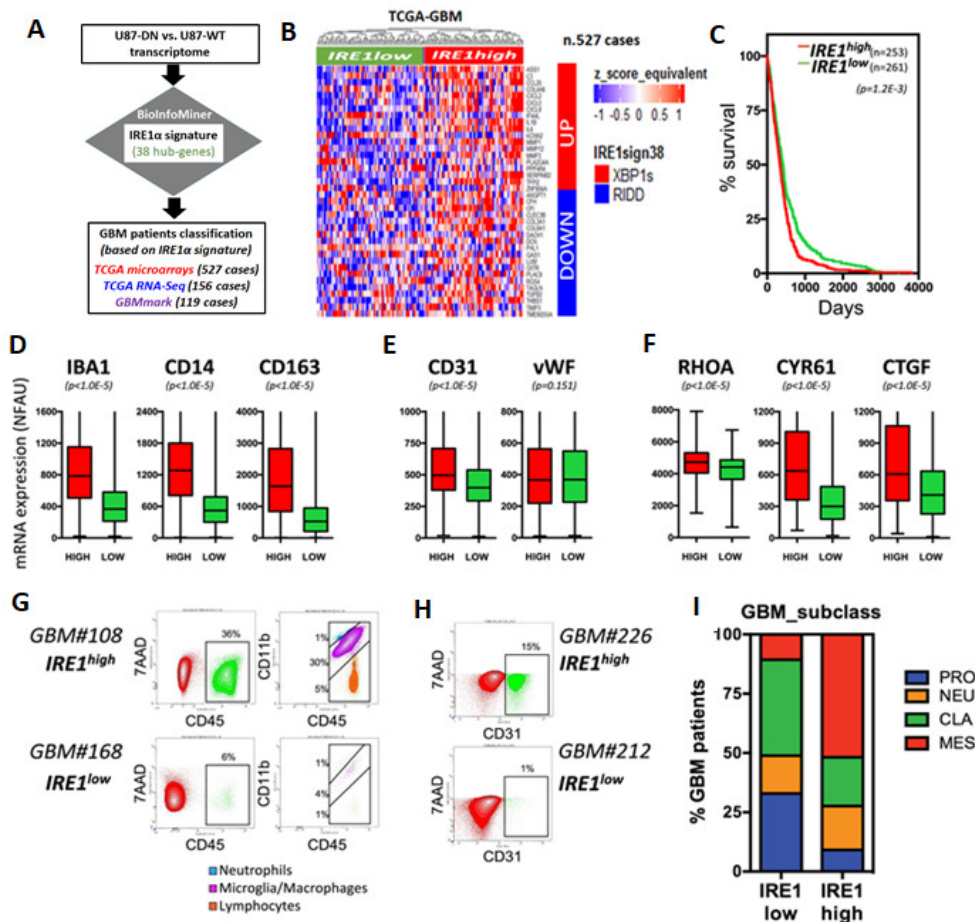
3.1.6 Αξιολόγηση της Γονιδιακής Υπογραφής (IRE1sign38) σε Ασθενείς με GBM

Για να αξιολογήσουμε την ευαισθησία και την διακριτική ικανότητα της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38 που είχαμε εξάγει σε άλλα μοντέλα κυτταρικών σειρών αλλά και σε επίπεδο ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, ανατρέξαμε σε δημόσιες ανοικτές βάσεις μεταγραφικών δεδομένων με Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα αλλά και σε *in house* αποθετήρια. Συγκεκριμένα ανακτήσαμε δεδομένα των μικροσυστοιχειών της Agilent από το *in house* αποθετήριο του INSERM, την αποκαλούμενη GBMmark κοόρτη (Ενότητα 2.3.1.5) η οποία είχε 119 καταχωρημένες περιπτώσεις ασθενών με γλοιοβλάστωμα καθώς και RNA-Seq (156 κλινικές περιπτώσεις) και Affymetrix U133 δεδομένα μικροσυστοιχιών (527 κλινικές περιπτώσεις) από την δημόσια βάση TCGA για την GBM κοόρτη (TCGA-GBM). Για τα RNA-Seq δεδομένα ανακτήθηκαν οι HTSeq-Counts τιμές και τελικά υπολογίστηκαν οι κανονικοποιημένες τιμές γονιδιακής έκφρασης log₂CPM για κάθε ασθενή σύμφωνα με την

μεθοδολογία που περιγράψαμε εκτενώς στην Ενότητα 2.3.4. Στην περίπτωση των μικροσυστοιχιών της TCGA-GBM ανακτήθηκαν οι κανονικοποιημένες τιμές γονιδιακής έκφρασης ως προς την διάμεση τιμή (median mRNA expression z-score) από την βάση γενωμικών δεδομένων για τον καρκίνο «cBioPortal» (<http://www.cbioportal.org>) που αφορούσαν σε σχετικές τιμές έκφρασης σε σχέση με τον πληθυσμό αναφοράς που στη συγκεκριμένη περίπτωση συγκροτείται από όλους τους ασθενείς της κοόρτης. Συνεπώς το z-score αντιπροσωπεύει τον αριθμό των τυπικών αποκλίσεων που παρουσιάζει η τιμή έκφρασης του γονιδίου από την διάμεση τιμή έκφρασής τους στον πληθυσμό αναφοράς. Από την επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων, προσδιορίσαμε τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των ασθενών για τα εκφρασμένα γονίδια, αποτυπώσαμε το προφίλ έκφρασης της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38 και διεξήγαμε διερευνητική ανάλυση δεδομένων μέσω της ιεραρχικής ομαδοποίησης των ασθενών (ανάλυση συστάδων) χρησιμοποιώντας τις κανονικοποιημένες τιμές έκφρασης, υπολογίζοντας τον συντελεστή συσχέτισης του Pearson για την συσχέτιση του μεταγραφικού προφίλ της XBP1s και RIDD συνιστώσας με το αντίστοιχο προφίλ όπως προέκυψε από την σύγκριση των WT vs. DN U87 κυττάρων (Ενότητα 3.1.1). Με την διαδικασία αυτή παρατηρήσαμε ότι η γονιδιακή μας υπογραφή διακρίνει γενικά σε πολύ υψηλό βαθμό δύο μεγάλα σύνολα (clusters) ασθενών τα οποία εμφανίζουν διαφορετικό προφίλ έκφρασης της IRE1 γονιδιακής υπογραφής και τα οποία θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως σύνολα υψηλής (IRE1high) και χαμηλής (IRE1low) IRE1 δραστηριότητας, αντίστοιχα (**Εικόνα 3.10**). Ο χαρακτηρισμός αυτός ακολουθεί τον συμβατικό χαρακτηρισμό που χρησιμοποιούν οι ερευνητές μέχρι σήμερα ο οποίος στηρίζεται κυρίως στην έκφραση και σηματοδοτική δραστηριότητα του XBP1s για την αξιολόγηση της δράσης της IRE1 πρωτεΐνης.

Οι όγκοι που προέρχονταν από ασθενείς που εμφάνιζαν υψηλή IRE1 ενεργότητα βρέθηκε να σχετίζονται επίσης με πιο δυσμενή ποσοστά επιβίωσης (**Εικόνα 3.10C**). Όταν επίσης ελέγχθηκε από τους ερευνητές του Ινστιτούτου INSERM η επίδραση της IRE1 σηματοδότησης α) στα επίπεδα έκφρασης των βιοδεικτών φλεγμονής/ανοσολογικής απόκρισης IBA1, CD14, και CD163 (**Εικόνα 3.10D**), β) στα επίπεδα των CD31 και vWF για τον έλεγχο της αγγειογένεσης (**Εικόνα 3.10E**), ή γ) στα επίπεδα έκφρασης των δεικτών διήθησης του όγκου RHOA, CYR61, και CTGF (**Εικόνα 3.10F**), οι όγκοι που εμφάνιζαν υψηλή IRE1 ενεργότητα παρουσίαζαν επίσης δείκτες μαζικής διήθησης από μακροφάγα, έντονη αγγειογενετική δραστηριότητα και ιδιότητες διείσδυσης. Παρόμοιες παρατηρήσεις παρατηρήθηκαν και στην αντίστοιχη ανάλυση της *in house* κοόρτης GBMmark (Appendix Fig S2B–D, [179]). Η ενεργοποίηση του άξονα δράσης IRE1/XBP1 επιβεβαιώθηκε στους

αντίστοιχους όγκους μέσω ανάλυσης της έκφρασης των γονιδίων-στόχων του XBP1s, ERDJ4 και EDEM1 (Appendix Fig S2E [179]). Για την επιβεβαίωση των παρατηρήσεων και σε πρωτεϊνικό επίπεδο στο GBM, φρέσκοι όγκοι που παρουσίαζαν υψηλή και χαμηλή IRE1 ενεργότητα και είχαν χαρακτηριστεί γι' αυτό αντίστοιχα, διαχωρίστηκαν και αναλύθηκαν για έκφραση των δεικτών CD45 και CD11b με την μέθοδο FACS. Αυτή η ανάλυση αποκάλυψε ότι η υψηλή IRE1 σηματοδότηση σχετίζεται με ισχυρή διήθηση από μακροφάγα (**Εικόνα 3.10G**). Επιπλέον, η παρουσία ενδοθηλιακών κυττάρων στους όγκους ανιχνεύθηκε με FACS κατόπιν σήμανσης με CD31 και παρατηρήθηκε αύξησή τους σε GBM όγκους με υψηλή IRE1 δραστικότητα (**Εικόνα 3.10H**). Τέλος, οι όγκοι που χαρακτηρίστηκαν για υψηλή IRE1 σηματοδοτική δραστικότητα ταξινομήθηκαν κυρίως ως μεσεγχυματικού τύπου ενώ εκείνοι που χαρακτηρίστηκαν για χαμηλή IRE1 σηματοδοτική δραστικότητα κυρίως εντάχθηκαν στους προ-νευρωνικούς και κλασσικούς τύπους (**Εικόνα 3.10I**). Συνολικά, τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η ενεργοποίηση της IRE1 σηματοδοτικής δραστικότητας εντοπίζεται σε ανθρώπινους όγκους και σχετίζεται με πιο επιθετικές μορφές καρκίνου που συνοδεύονται από μικρότερη επιβίωση των ασθενών.



Εικόνα 3.10. Αξιολόγηση της IRE1sign38 σε GBM ασθενείς

Η εξόρυξη, επεξεργασία και ανάλυση μεταγραφικών δεδομένων ασθενών με GBM (A) επέτρεψε την καταγραφή του μεταγραφικού προφίλ της IRE1sign38, όπου η ιεραρχική ομαδοποίηση των ασθενών με βάση τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων της υπογραφής ανέδειξε γενικά δύο μεγάλα σύνολα ασθενών που σημειώνονται ως IRE1high και IRE1low, αντίστοιχα (B). Η συσχέτιση κατά Pearson χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο ομοιότητας μεταξύ των ασθενών. Η XBP1s συνιστώσα της υπογραφής απεικονίζεται με την κόκκινη στήλη που περιλαμβάνει τα γονίδια που είχαν βρεθεί συστηματικά υπέρ-εκφρασμένα (UP) παρουσία της IRE1 πρωτεΐνης ενώ η μπλε στήλη αντιστοιχεί στην RIDD συνιστώσα της υπογραφής η οποία περιλαμβάνει τα γονίδια που είχαν βρεθεί συστηματικά υπό-εκφρασμένα (DOWN) παρουσία της IRE1 πρωτεΐνης. Στη περίπτωση του XBP1s άξονα το κόκκινο χρώμα στον θερμικό χάρτη υποδηλώνει την υψηλή σηματοδοτική του δράση ενώ στη περίπτωση του RIDD άξονα, η αυξημένη δράση του περιγράφεται από το μπλε χρώμα αφού κυριαρχεί η υποέκφραση των RIDD γονιδίων-στόχων. Η ανάλυση ολικής επιβίωσης κατά Kaplan-Meier (C) ανάμεσα στα σύνολα των GBM ασθενών που είχαν χαρακτηριστεί ως IRE1high (κόκκινο χρώμα) και ως IRE1low (πράσινο χρώμα) έδειξε στατιστική σημαντική διαφορά στα ποσοστά επιβίωσης που εκτιμήθηκε με το log-rank test. Στο τμήμα D-F απεικονίζεται η μεταγραφική έκφραση βιοδεικτών μικρογλοίας/μονοκυττάρων/μακροφάγων (IBA1, CD14, CD163) (D), αγγειογένεσης (CD31, VWF) (E), και μετανάστευσης/διήθησης (RHOA, CYR61, CTGF) (F) στους πληθυσμούς των IRE1high και IRE1low ασθενών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βάση τα δεδομένα 258 and 265 όγκων των ασθενών IRE1high και IRE1low, αντίστοιχα. Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν την διάμεσο ενώ οι γραμμές των θηκογραμμάτων το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο της κατανομής έκφρασης. Για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας χρησιμοποιήθηκε το Student t-test με την διόρθωση του Welch όταν η τυπική απόκλιση (SD) ήταν διαφορετική. Στο τμήμα (G) απεικονίζονται τα αποτελέσματα της FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) ανάλυσης των κυττάρων με τους δείκτες CD45/CD11b σε πρόσφατα διαχωρισμένους GBM όγκους που εκδήλωναν υψηλή ή χαμηλή IRE1 ενεργότητα. Αντίστοιχα, στο τμήμα (H) απεικονίζονται τα αποτελέσματα της FACS ανάλυσης των κυττάρων με τον δείκτη CD31 σε πρόσφατα διαχωρισμένους GBM όγκους που εκδήλωναν υψηλή ή χαμηλή IRE1 ενεργότητα. Και στις δύο περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκε η 7-AAD ((7-amino-actinomycin D) για την απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων. Τέλος στο τμήμα (I) της εικόνας απεικονίζεται η σχετική κατανομή των διαφορετικών κυτταρικών τύπων του GBM—προ-νευρωνικά(pro-neural (μπλε)), νευρωνικά (neural (πορτοκαλί)), κλασσικά (πράσινο), και μεσεγχυματικά (κόκκινο) στις δύο ομάδες ασθενών (IRE1high και IRE1low).

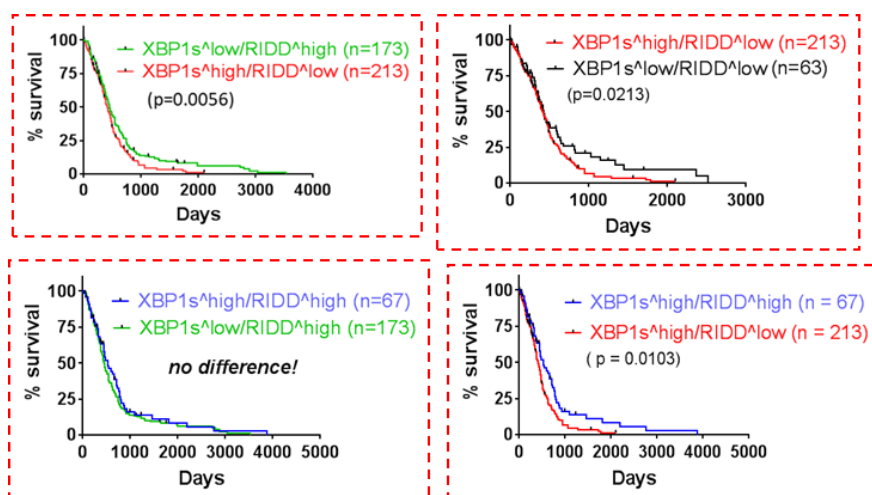
Επιπλέον τα δύο αυτά μεγάλα σύνολα ασθενών που αναδείχθηκαν ως προς την IRE1 ενεργότητα χαρακτηρίζονται κυρίως από διαφορετικά επίπεδα RIDD δραστηριότητας, με την χαμηλή RIDD ενεργότητα (αυξημένη έκφραση των RIDD γονιδίων) να συνοδεύει την υψηλή XBP1s σηματοδοτική δραστηριότητα και το αντίστροφο. Όμως αξίζει να αναφερθεί ότι αν παρατηρήσουμε προσεχτικά τον θερμικό χάρτη έντασης της γονιδιακής έκφρασης παρατηρούμε ότι τα δύο αυτά clusters περιλαμβάνουν και μια σειρά από υπό-συστάδες με διαφορετικά πρότυπα έκφρασης για τις δύο συνιστώσες της υπογραφής (XBP1s και RIDD), υποδηλώνοντας ότι υπάρχει μια μεγαλύτερη μεγέθους διακύμανση και πλαστικότητα στα επίπεδα έκφρασης των δύο κύριων αξόνων δράσης της γονιδιακής υπογραφής.

3.1.7 Αύξηση της Διακριτικής Ικανότητας και Ευαισθησίας της IRE1 Γονιδιακής Υπογραφής μέσω του Χαρακτηρισμού των GBM Ασθενών με Βάση το Σύστημα Βαθμολόγησης της Ενότητας 2.3.4.1 για την Αποτίμηση του Βαθμού Ενεργότητας της XBP1s και RIDD Δραστηριότητας

Για να αυξήσουμε την διακριτική ικανότητα της γονιδιακής μας υπογραφής και να αποτυπώσουμε καλύτερα την φασματική μεταβλητότητα που παρουσίαζε, αποκαλύπτοντας όλες τις πιθανές ομάδες ασθενών σε σχέση με την διττή δράση της IRE1 πρωτεΐνης, ποσοτικοποιήσαμε την ενεργότητα κάθε συνιστώσας της γονιδιακής υπογραφής με μια τιμή

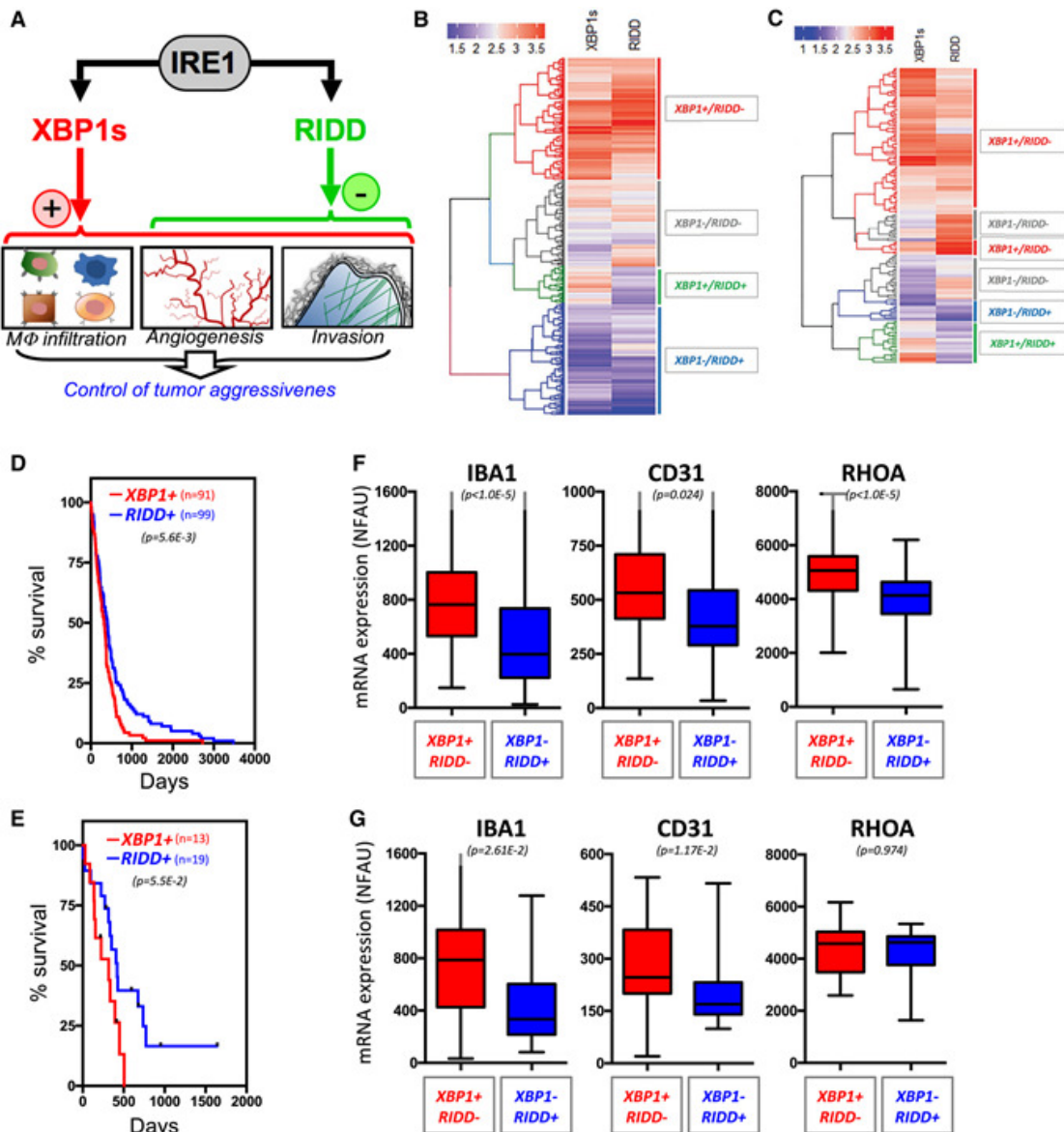
έντασης ξεχωριστά. Έτσι οδηγηθήκαμε στην δημιουργία ενός XBP1s και RIDD σκορ για κάθε δείγμα/ασθενή, στο πλαίσιο κάθε κοόρτης που εξετάζαμε. Η διαδικασία βαθμολόγησης που εφαρμόστηκε περιγράφηκε λεπτομερώς στην Ενότητα 2.3.4.1. Στη συνέχεια, με βάση την συνολική κατανομή των XBP1s και RIDD σκορ της κοόρτης, κατατάξαμε τον κάθε GBM ασθενή ξεχωριστά σε ομάδες υψηλής και χαμηλής XBP1s και RIDD ενεργότητας, αντίστοιχα, συγκρίνοντάς το σκορ της κάθε συνιστώσας του είτε με την διάμεση τιμή των σκορ της αντίστοιχης συνιστώσας για ολόκληρη την κοόρτη (διαχωρισμός όλων των ασθενών) είτε με την τιμή του 1^{ου} (25th) και 3^{ου} τεταρτημόριου (75th) της κατανομής των σκορ της κοόρτης για την αντίστοιχη συνιστώσα της υπογραφής (διαχωρισμός μικρότερου αριθμού ασθενών). Επομένως με βάση αυτό το κριτήριο, δεν είχαμε απλώς τον γενικό διαχωρισμό των δειγμάτων σε υψηλής και χαμηλής IRE1 ενεργότητας αλλά τον διαχωρισμό τους σε 4 διαφορετικές ομάδες (XBP1s-/RIDD+, XBP1s+/RIDD-, XBP1s+/RIDD+ και XBP1s-/RIDD-), ένας διαχωρισμός που αποτύπωνε καλύτερα την πλαστικότητα στην αποτίμηση της IRE1 δράσης και η οποία επαληθεύταν και από αντίστοιχα βιοχημικά δεδομένα. Επίσης γινόταν φανερό ότι οι ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα δεν κατανέμονταν ομοιόμορφα στα διαφορετικά γκρουπ αλλά κυριαρχούσαν 2 κυρίως υπότυποι, ο XBP1s+/RIDD- και ο XBP1s-/RIDD+ (**Εικόνα 3.12B και C**), όπου το (+) και (-) δηλώνουν την υψηλή και χαμηλή σηματοδοτική δραστηριότητα, αντίστοιχα. Παράλληλα, η βιοχημική, κυτταρική, ανοσολογική και μορφολογική αποτίμηση της XBP1s και RIDD ενεργότητας τόσο σε επίπεδο κυτταρικών σειρών (μεταλλαγμένων και μη) όσο και σε επίπεδο GBM όγκων ασθενών που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ογκογένεσης και Σηματοδότησης λόγω Στρες του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας και Ιατρικής Έρευνας της Γαλλίας (INSERM) αναδείκνυε τον άξονα δράσης IRE1/XBP1s ως άξονα που προωθεί την επιθετικότητα του GBM μέσω ενίσχυσης της ανοσολογικής διήθησης του όγκου και της αγγειογένεσης, καθώς και των ιδιοτήτων της κυτταρικής διεισδυτικότητας. Από την άλλη πλευρά, η RIDD δράση (mRNA και miRNA) φαινόταν να παίζει ένα περισσότερο αντικαρκινικό ρόλο με το να μειώνει επιλεκτικά τόσο την αγγειογενετική δραστηριότητα όσο και την κυτταρική διεισδυτικότητα (**Εικόνα 3.12A**). Επίσης η ανάλυση ολικής επιβίωσης των ασθενών που ανήκαν στις δύο κυρίαρχες ομάδες, XBP1-/RIDD+ και XBP1+/RIDD- αποκάλυψε ένα σαφή διαχωρισμό στις καμπύλες επιβίωσης, με το 1^ο γκρουπ να επιβιώνει στατιστικά σημαντικά περισσότερο από το 2^ο γκρουπ κάτι που ερχόταν σε απόλυτη συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα (**Εικόνα 3.12D και E**). Επιπλέον, όπως αναμενόταν, η ομάδα GBM ασθενών XBP1+/RIDD- εμφάνιζε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των δεικτών BA1, CD31, και RHOA σε σχέση με τους όγκους XBP1-/RIDD+ (**Εικόνα 3.12F και G**). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε επίσης από το γεγονός ότι ο πληθυσμός

των XBP1+/RIDD- ήταν εμπλουτισμένος σε όγκους μεσεγχυματικού τύπου ενώ ο πληθυσμός των XBP1-/RIDD+ συνίστατο περισσότερο από όγκους προ-νευρωνικούς και νευρωνικούς (Appendix Fig S7C [179]). Αξίζει να αναφερθεί ότι όταν συγκρίθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της ματισμένης μορφής του XBP1 (XBP1s) στα TCGA RNAseq δεδομένα των XBP1s+ ομάδων επιβεβαίωσαν τα πειραματικά και υπολογιστικά αποτελέσματα (Appendix Fig S7D [179]). Τέλος, οποιεσδήποτε διαφορές στην επιβίωση των ασθενών που ανήκαν στα «ενδιάμεσα» γκρουπ (π.χ. XBP1-/RIDD-, XBP1+/RIDD+) δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Appendix Fig S7E [179]). Λαμβάνοντας υπόψη όλες αυτές τις παρατηρήσεις, γίνεται φανερό ότι υπάρχει μια ανταγωνιστική αλληλεπίδραση μεταξύ της XBP1s και της RIDD σηματοδοτικής δραστηριότητας στο GBM ειδικά για χαρακτηριστικά όπως η κυτταρική μετανάστευση και αγγειογένεση. Αυτή η ανταγωνιστική δράση αποτυπώθηκε επίσης έντονα στην ανάλυση επιβίωσης των TCGA-GBM δεδομένων που αφορούσαν στις μικροσυστοιχίες όταν ομαδοποιήθηκαν όλοι οι ασθενείς χρησιμοποιώντας ως τιμή διαχωρισμού την διάμεση τιμή των XBP1s και RIDD σκορ (Εικόνα 3.11). Από την σύγκριση των καμπυλών επιβίωσης γίνεται φανερό ότι υπάρχει μια ανταγωνιστική σχέση μεταξύ της XBP1s και της RIDD σηματοδοτικής δραστηριότητας, όπου ο ενισχυμένος XBP1s άξονας δράσης (+) δυσχεραίνει τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών ενώ η ενίσχυση του RIDD άξονα τα βελτιώνει.



Εικόνα 3.11. Καμπύλες επιβίωσης όλων των TCGA-GBM ασθενών με βάση τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών Affymetrix

Οι GBM ασθενείς της TCGA κόρτης των μικροσυστοιχιών Affymetrix αξιολογήθηκαν με βάση το σύστημα βαθμολόγησης της Ενότητας 2.3.4.1 για την σηματοδοτική δραστηριότητα του XBP1s και RIDD άξονα και ταξινομήθηκαν σε σύνολα υψηλής (high ή +) και χαμηλής ενεργότητας (low ή -) με βάση την διάμεση τιμή των XBP1s και RIDD σκορ της κόρτης, αντίστοιχα. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται το γκρουπ ασθενών XBP1s-/RIDD+, με κόκκινο χρώμα το γκρουπ XBP1s+/RIDD-, με μπλε χρώμα το γκρουπ XBP1s+/RIDD+ και με μαύρο χρώμα το γκρουπ XBP1s-/RIDD-. Για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας των ποσοστών επιβίωσης στις υπό σύγκριση ομάδες εφαρμόστηκε το log-rank test.



Εικόνα 3.12. Αξιολόγηση των κύριων αξόνων δράσης (XBP1s και RIDD) της IRE1 σε GBM ασθενείς μέσω αποτίμησης της ενεργότητας των συστασίων της IRE1 γονιδιακής υπογραφής

(A) Σχηματική αναπαράσταση των ανταγωνιστικών XBP1s και RIDD σημάτων σε GBM όγκους και η βιολογική τους επίδραση στην επιθετικότητα του όγκου (με κόκκινο χρώμα σημειώνεται η ενίσχυση (+) των αντίστοιχων βιολογικών φαινομένων ενώ με πράσινο χρώμα δηλώνεται η επιβράδυνσή τους(-)). (B),(C) Ιεραρχική ομαδοποίηση των GBM ασθενών (TCGA κόρτη—μικροσυστοιχίες, B; TCGA κόρτη—RNAseq, C) με βάση το κανονικοποιημένο XBP1s και RIDD σκορ (Ενότητα 2.3.4.1) που δηλώνεται με την χρωματική κλίμακα μπλε-κόκκινο. (D),(E) Καμπύλες ολικής επιβίωσης κατά Kaplan–Meier των XBP1+/RIDD- (κόκκινο) και XBP1-/RIDD+ (μπλε) GBM ασθενών με βάση τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών (D) και τα RNAseq δεδομένα (E), αντίστοιχα. Για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας (p) εφαρμόστηκε το log-rank test. (F),(G) Επίπεδα έκφρασης mRNA των βιοδεικτών για δράση μονοκυττάρων (IBA1), αγγειογένεσης (CD31), και μετανάστευσης/διήθησης (RHOA) στις δύο κύριες ομάδες των GBM ασθενών όπως αναδείχτηκαν από την βαθμολόγηση της XBP1s και RIDD σηματοδοτικής τους δραστηριότητας. Τα θηκογράμματα αναπαριστούν την κατανομή των επιπέδων έκφρασης των βιοδεικτών με τις οριζόντιες γραμμές να δηλώνουν την διάμεσο το 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο ενώ τα άκρα των θηκογραμμάτων δείχνουν την μέγιστη και ελάχιστη τιμή έκφρασης. Οι συγκρίσεις για τον έλεγχο στατιστικής σημαντικότητας πραγματοποιήθηκαν με Student t-test.

3.1.8 Αξιολόγηση της IRE1 Σηματοδοτικής Δραστηριότητας σε Βασικούς Τύπους Μεταλλάξεων της IRE1 στο GBM

Επίσης στο πλαίσιο της μελέτης αυτής, προσπαθήσαμε να αξιολογήσουμε τόσο σε κυτταρικό μοντέλο GBM όπως είναι η πρωτογενής ανθρώπινη κυτταρική σειρά U87, όσο και σε ορθοτοπικό μοντέλο ξενομοσχεύματος ποντικού την επίδραση των βασικών σωματικών μεταλλάξεων που έχουν ταυτοποιηθεί σε ασθενείς με GBM και αφορούν στο IRE1 γονίδιο (ERN1), αλλά είναι περιορισμένη η πληροφορία που έχουμε για τις συνέπειές τους στις δύο κύριες σηματοδοτικές δράσεις της IRE1 πρωτεΐνης, δηλ. τη RIDD και το μάτισμα του XBP1, σε σχέση με την ανάπτυξη και εξάπλωση του GBM. Μέχρι πρόσφατα, από πειράματα αλληλούχισης είχαν ταυτοποιηθεί IRE1 μεταλλάξεις με ρόλο οδηγού (driver) σε διάφορους καρκίνους ενώ μόνο τρεις (P336L, S769F και Q780*) εντοπίζονταν στο GBM [181, 362]. Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής ταυτοποιήθηκε με αλληλούχιση των εξωνίων του IRE1 γονιδίου (ERN1) στο Ινστιτούτο INSERM και μια 4^η σωματική μετάλλαξη (A414T) η οποία εντοπίστηκε σε έναν επιθετικό, μεσεγχευματικού τύπου όγκο που αφορούσε σε μια γυναίκα ηλικίας 70 ετών. Η πολλαπλή στοίχιση των πρωτεϊνικών ακολουθιών των ορθόλογων του IRE1 γονιδίων σε βασικά μοντέλα-πρότυπα ευκαρυωτικών οργανισμών (Χιμπαντζής, Σκύλος, Ποντικός, Αρουραίος, Δροσόφιλα, Σακχαρομύκητας, Γαιοσκώληκας) έδειξε ότι ενώ οι μεταλλάξεις P336L, S769F, και Q780* επηρεάζουν συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα στα περισσότερα είδη, η μετάλλαξη A414T αλλάζει ένα λιγότερο συντηρημένο αμινοξικό κατάλοιπο το οποίο διατηρείται μόνο στον σκύλο, τον χιμπαντζή και τον άνθρωπο αλλά όχι στα τρωκτικά (**Εικόνα 3.13A**). Οι μεταλλάξεις αυτές δεν έδειξαν να μπορούν να ομαδοποιηθούν ούτε με βάση την 2ταγή δομή των αμινοξικών ακολουθιών ούτε ακόμα και με το είδος των IRE1 καταλυτικών υπομονάδων που εντοπίζονται. Εντούτοις, οι «κυτοσολικές» μεταλλάξεις S769F και Q780* εντοπίζονται στην υπομονάδα κινάσης της IRE1 πρωτεΐνης ενώ οι «αυλικές» μεταλλάξεις P336L και A414T εντοπίζονται σε καθαρά δομές α-έλικας (**Εικόνα 2.2**). Για να αξιολογήσουμε την επίδραση των τεσσάρων μεταλλάξεων στο GBM αναλύσαμε αρχικά τα δεδομένα μικροσυστοιχιών όπως περιγράφηκε λεπτομερώς στην Ενότητα 2.3.1.1. Αξίζει επίσης να αναφέρουμε ότι η διαμόλυνση των U87 κυττάρων με τον ιϊκό φορέα που φέρει την μετάλλαξη πρόωρης λήξης Q780* οδηγεί σε υπερέκφραση μιας μικρότερου μεγέθους IRE1 πρωτεΐνης (80 kDa αντί 110 kDa). Επίσης δοκιμασίες ανοσοφθορισμού έδειχναν τον συντοπισμό της IRE1 πρωτεΐνης με βασικό δείκτη του Ε.Δ (KDEL staining), επιβεβαιώνοντας έτσι ότι οι μεταλλάξεις αυτές δεν επηρέαζαν τον εντοπισμό της IRE1 στο Ε.Δ.

Όπως έχει αναφερθεί και σε άλλο κυτταρικό σύστημα [24], η υπερέκφραση της αγρίου-τύπου (WT) ισομορφής της IRE1 (WT-IRE1) στα U87 ήταν αρκετή για να ενεργοποιήσει την ενδογενή IRE1 σε βασικές συνθήκες συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου που περιείχαν μόνο τον κενό φορέα (EV), κάτι που αποδεικνύεται από τη βασική φωσφορυλίωση της IRE1, όσο και από το μάτισμα του XBP1 mRNA (Fig 2A και B [179]). Όπως ήταν αναμενόμενο, η Q780* αντιστοιχούσε σε μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας όσον αφορά στο μάτισμα του XBP1 mRNA ενώ ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και για την μετάλλαξη S769F που εντοπίζεται επίσης στην υπομονάδα κινάσης οδηγώντας σε απώλεια της ενεργότητας κινάσης και συνεπώς και ενδοριβονουκλεάσης. Εντούτοις, η απώλεια του τελευταίου τμήματος της υπομονάδας κινάσης καθώς και ολόκληρης της υπομονάδας RNάσης και του καρβοξυτελικού άκρου στην περίπτωση της Q780* δεν επηρέασε τον ολιγομερισμό της IRE1, αλλά εξασθένησε την προκύπτουσα trans-αυτοφωσφορυλίωση (Fig 2B και Appendix Fig S4C [179]) καθώς και το μάτισμα του XBP1 mRNA (Fig 2B [179]). Η έκφραση της παραλλαγής Q780* εμπόδισε επίσης το μάτισμα του XBP1 mRNA από την ενδογενή IRE1 ως απόκριση στην θεραπεία με τουνικαμυκίνη (Appendix Fig S4D [179]). Επιπλέον, οι μεταλλάξεις P336L και A414T αύξησαν την ικανότητα ολιγομερισμού της IRE1 οδηγώντας σε υπερφωσφορυλίωσή της και ενισχυμένο μάτισμα του XBP1 (Fig 2A και B [179]). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η υπερέκφραση της WT-IRE1 αύξησε αποτελεσματικά τη RIDD δραστηριότητα έναντι συγκεκριμένων mRNA όπως του PERIOD1 (PER1), COL6A1 και SCARA3, ενώ μικρή επίδραση παρατηρήθηκε σε άλλα RIDD υποστρώματα όπως τα mRNA των SPARC, PDGFR-β και VEGF-A, γεγονός που δείχνει μια επιλεκτικότητα της RIDD δράσης που φαίνεται να σχετίζεται με διαφορετικές παραλλαγές της IRE1. Ως εκ τούτου, οι τέσσερις μεταλλάξεις είχαν διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με το στοχευμένο mRNA. Αυτή η επιλεκτικότητα υποστρώματος μπορεί να προκύπτει από τροποποιήσεις στην σύνδεση της IRE1 με τους «αυλικούς» ή «κυτοσολικούς» της εταίρους λόγω υπερέκφρασης ή μεταλλάξεων της IRE1 (δηλαδή, μεταβαλλόμενες ιδιότητες ολιγομερισμού ή σηματοδότησης). Για να μπορέσουμε να εκτιμήσουμε *in silico* την επίδραση αυτών των μεταλλάξεων στην IRE1 σηματοδοτική δραστηριότητα χρησιμοποιήσαμε επίσης την IRE1sign38 γονιδιακή υπογραφή αποτυπώνοντας αρχικά το μεταγραφικό της προφίλ σε κάθε κυτταρική παραλλαγή σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα που έφεραν τον κενό φορέα (κύτταρα ελέγχου) **(Εικόνα 3.13B)**. Στη συνέχεια με βάση το σύστημα βαθμολόγησης της XBP1s και RIDD σηματοδοτικής δραστηριότητας που είχαμε αναπτύξει (Ενότητα 2.3.4.1), χαρακτηρίσαμε τον κάθε μεταλλαγμένο κυτταρικό τύπο ως προς την XBP1s και RIDD συνιστώσα **(Εικόνα 3.13C)**. Ήταν πράγματι πολύ ενθαρρυντικό ότι η ο χαρακτηρισμός αυτός

ήταν σύμφωνος με τις προϋπάρχουσες πειραματικές παρατηρήσεις που έδειχναν αφενός ότι η μετάλλαξη P336L δεν αναστέλλει την δράση της IRE1 πρωτεΐνης και μάλιστα συνοδεύεται από ενισχυμένο μάτισμα του XBP1 (χαρακτηρίστηκε *in silico* ως XBP+/RIDD-), και αφετέρου ότι οι μεταλλάξεις S769F και Q780* αφορούν σε μεταλλαγμένες μορφές της IRE1 πρωτεΐνης όπου αναστέλλεται η δράση κινάσης η οποία οδηγεί με την σειρά της και σε απώλεια της RNάσης ενεργότητας (χαρακτηρίστηκαν *in silico* και οι δύο μεταλλάξεις ως XBP1-/RIDD-). Όλα τα μεταγραφικά δεδομένα του πειράματος των μικροσυστοιχειών καθώς και η ροή εργασίας που εφαρμόσαμε κατατέθηκαν στην βάση GEO (Gene Expression Omnibus) του NCBI (GSE107859).

Για να αξιολογήσουμε περαιτέρω την IRE1-εξαρτώμενη σηματοδοτική δράση στο GBM εξορύξαμε επίσης το KEGG μονοπάτι του Γλιώματος (hsa05214) που περιλαμβάνει τους βασικούς συντελεστές που εμπλέκονται στην δημιουργία του πρωτογενούς GBM από νευρογλοιακά προγονικά κύτταρα (De Novo pathway) και ταυτοποιήσαμε εκείνους τους παράγοντες που είχαν προκριθεί από την πλατφόρμα BioInfoMiner με την διαδικασία του Gene Prioritization ότι ρυθμίζονται άμεσα ή έμμεσα από την IRE1. Έτσι, παρατηρήσαμε ότι το 45% των συντελεστών αυτού του μονοπατιού ελέγχεται μέσω μηχανισμών που εξαρτώνται από την δράση της IRE1 (Appendix Fig S5C [179]). Η λειτουργική επίσης ανάλυση (Reactome pathways) των διαφορεικά εκφρασμένων γονιδίων που είχαν προκύψει από την σύγκριση των U87 κυττάρων που έφεραν τις μεταλλαγμένες μορφές της IRE1 σε σχέση με τα WT κύτταρα, και η συστημική έπειτα ομαδοποίηση των εμπλουτισμένων μονοπατιών ανέδειξε ότι στην περίπτωση της μετάλλαξης A41AT οι βασικές λειτουργίες που επηρεάζονται περιλαμβάνουν τον έλεγχο του μεταβολισμού, την οργάνωση της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM), την διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης και την σηματοδότηση μέσω υποδοχέων. Αντίστοιχο προφίλ παρατηρήθηκε και στα DN κύτταρα όπου προκρίθηκαν λειτουργίες όπως η οργάνωση της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM), η κυτταρική ομοιόσταση και η ανοσολογική απόκριση. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην περίπτωση των άλλων μεταλλάξεων δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στις αντίστοιχες κυτταρικές λειτουργίες σε σχέση με την IRE1 A41AT και DN έκφραση (Εικόνα 3.13D και Appendix Table S1 [179]).

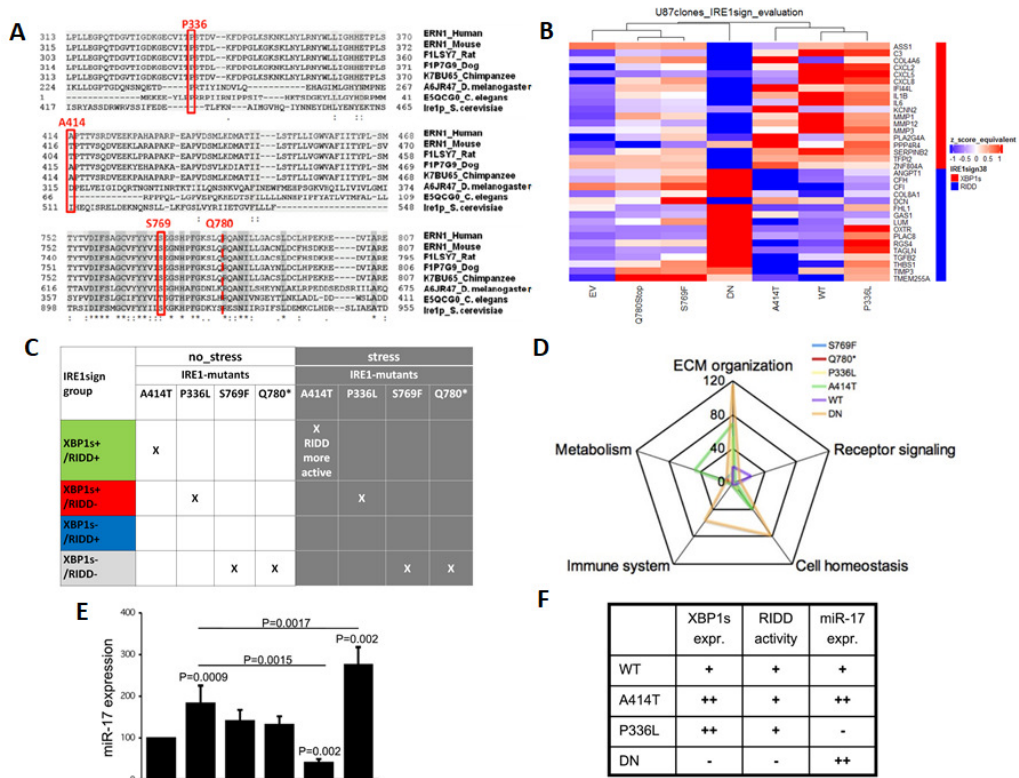
Επίσης από *in vivo* πειράματα που διεξάχθηκαν στο Ινστιτούτο INSERM σε ορθοτοπικό μοντέλο ξеноμοσχεύματος ποντικού στο οποίο είχε γίνει εμφύτευση U87 κυττάρων αγρίου-τύπου αλλά και των μεταλλαγμένων μορφών της IRE1, δείχθηκε ότι η υπερέκφραση της IRE1 επηρεάζει την αύξηση του όγκου και την αγγειογένεση, ενώ η σίγαση της IRE1 σηματοδότησης (IRE1-DN) μείωσε και το μέγεθος αλλά και την αγγειογενετική

δραστηριότητα των όγκων (Fig 3A [179]). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα που προέκυψαν ενίσχυαν την άποψη ότι επιλεκτικές σημειακές μεταλλάξεις που επηρεάζουν την IRE1 ενεργότητα μπορούν να έχουν σημαντικό αντίκτυπο σε χαρακτηριστικά όπως η αύξηση του όγκου, η επιβίωση, η αγγειογένεση και η διήθηση του όγκου από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Τέλος, στηριζόμενοι στην παρατήρηση του Urton και των συνεργατών [50] ότι η παρατεταμένη ενεργοποίηση της IRE1 RNάσης προκαλεί ταχεία αποικοδόμηση επιλεγμένων miRNAs (miRs -17, -34a, -96 και -125b) που κανονικά καταστέλλουν τη μετάφραση του mRNA της Κασπάσης-2, η οποία είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του μιτοχονδριακού αποπτωτικού μηχανισμού, ελέγξαμε αν τα επίπεδα έκφρασης κάποιου από αυτά τα miRNAs παρουσιάζει ισχυρή συσχέτιση με τις παραλλαγμένες μορφές της IRE1 RIDD ενεργότητας. Έτσι, διαπιστώσαμε ότι η παραλλαγμένη ενεργότητα της IRE1 RNάσης ελέγχει την έκφραση του miR-17 (miR-17-5p) στο GBM. Πράγματι, η παραλλαγή A414T οδήγησε σε αυξημένη έκφραση του miR-17 υπό βασικές συνθήκες, ενώ η παραλλαγή P336L οδήγησε σε χαμηλά επίπεδα του miR-17 (**Εικόνα 3.13E και F**). Η αναστολή της IRE1 RNάσης με τη μεσολάβηση του αναστολέα MKC4485 [287] αποκατέστησε την έκφραση του miR-17 στον παραλλαγμένο τύπο των U87 κυττάρων που έφερε την P336L IRE1 μετάλλαξη, επιβεβαιώνοντας έτσι τη συμμετοχή της IRE1 RNάσης στην έκφραση του miR-17. Επίσης η πρόκληση στρες Ε.Δ. με την τουνικαμυκίνη οδήγησε σε ενεργοποίηση της IRE1 και οδήγησε σε περαιτέρω αποικοδόμηση του miR-17 (Appendix Fig S4F [179]).

Για να αναλύσουμε περαιτέρω τη συμβολή των σημάτων που παράγονται μετά την δράση της IRE1 στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των GBM όγκων, εκμεταλλευτήκαμε τις ιδιότητες των παραλλαγών της IRE1. Η σφαιρική ανάλυση των αποτελεσμάτων μας αναδείκνυε τις διαφορές σηματοδότησης που καθοδηγούνται από τις μεταλλαγμένες IRE1 μορφές με την WT, P336L και A414T παραλλαγές να παρουσιάζουν αυξημένο μάτισμα του mRNA του XBP1 και της RIDD δραστηριότητας, ενώ η έκφραση του miR-17 έδειχνε να αυξάνεται τόσο σε κύτταρα που έφεραν την WT ή IRE1-DN μορφή όσο και σε εκείνα που έφεραν την παραλλαγή A414T (**Εικόνα 3.13F και Εικόνα 3.14A**). Με βάση αυτήν την ανάλυση, σκεφτήκαμε ότι τα γονίδια των οποίων η έκφραση ήταν αυξημένη σε WT, P336L και A414T θα μπορούσαν εν δυνάμει να αντικατοπτρίζουν στόχους υπό τον έλεγχο του XBP1s. Χρησιμοποιώντας τα διαφορικά υπέρ-εκφρασμένα γονίδια των WT, P336L, και A414T (συγκριτικά με το μεταγραφικό προφίλ-αναφοράς των διαμολυσμένων κυττάρων με τον κενό φορέα) εντοπίσαμε μια κοινή λίστα 40 γονιδίων (κατόπιν προτεραιοποίησης) που υπό-εκφράζονται στα IRE1-DN κύτταρα (**Εικόνα 3.14B και Appendix Table S2 [179]**). Στη συνέχεια

χρησιμοποιήσαμε την γονιδιακή XBP1s υπογραφή των 40 γονιδίων για να ταξινομήσουμε τους όγκους της GBMmark κούρτης (**Εικόνα 3.14C**) ενώ η ανάλυση της έκφρασης των δεικτών IBA1, CD31 και RHOA ανέδειξε στατιστικά σημαντική αυξημένη έκφρασή τους σε όγκους με υψηλή έκφραση των υποψηφίων γονιδίων-στόχων του XBP1s (Fig 4C [179]).

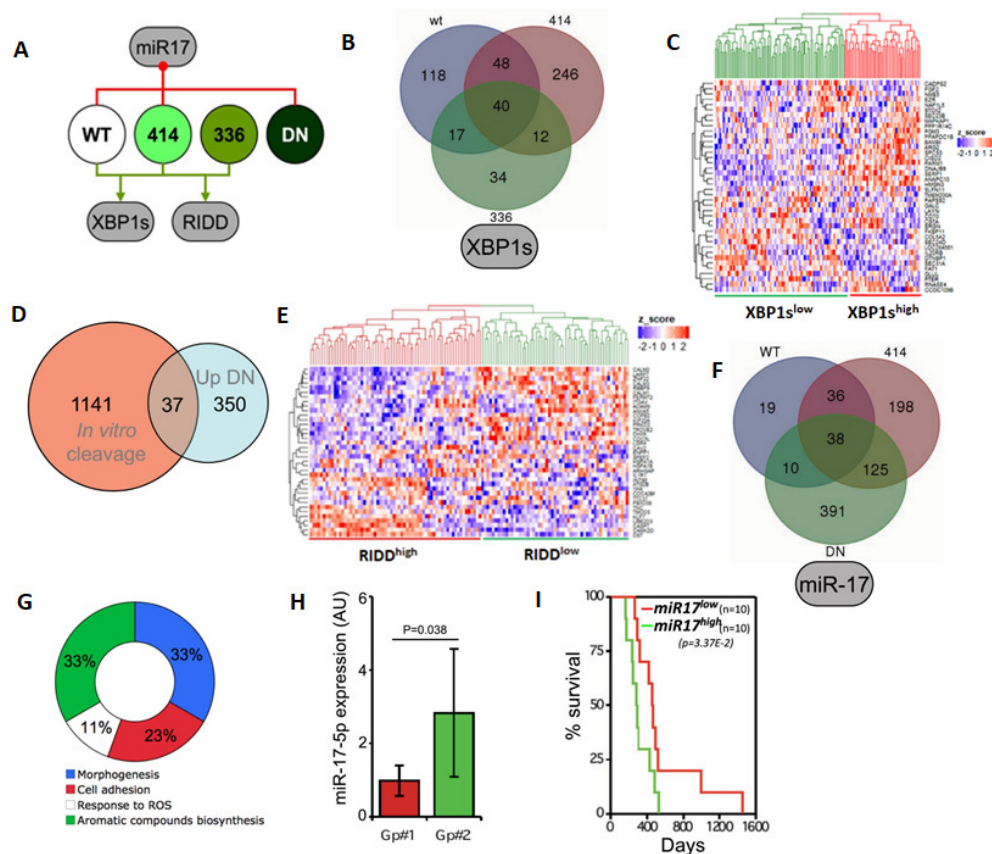


Εικόνα 3.13. Επίδραση των IRE1 σωματικών μεταλλάξεων στην IRE1 σηματοδότηση

(A) Η πολλαπλή στοίχιση κατά ClustalW με τον αλγόριθμο Clustal Omega των IRE1 πρωτεϊνών αναδεικνύει ότι η Pro³³⁶ και η Ser⁷⁶⁹ είναι καλά συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα ενώ η Ala⁴¹⁴ δεν είναι συντηρημένη στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η Q⁷⁸⁰ δεν είναι συντηρημένη στους οργανισμούς *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis. elegans* και *Saccharomyces. cerevisiae* Τα νούμερα αναφέρονται στην θέση των αμινοξικών καταλοίπων της ανθρώπινης IRE1 πρωτεΐνης (ERN1). (B) Θερμικός χάρτης της των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38 και ιεραρχική ομαδοποίηση των διαμολυσμένων U87 κυττάρων με τις μεταλλαγμένες μορφές της IRE1 πρωτεΐνης αλλά και της IRE1-DN, IRE1-WT καθώς και του κενού φορέα (EV). (C) Χαρακτηρισμός των IRE1 μεταλλαγμένων U87 κυτταρικών τύπων κάτω από βασικές (no_stress) αλλά και συνθήκες στρες E.Δ. (stress) με βάση την αξιολόγηση της XBP1s και RIDD σηματοδοτικής δραστηριότητας όπως προέκυψε κατόπιν βαθμολόγησης των κυτταρικών σειρών με βάση το μεταγραφικό προφίλ της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38. Με (+) και (-) δηλώνεται η υψηλή και η χαμηλή ενεργότητα, αντίστοιχα. (D) Σχηματική αναπαράσταση των συστημικών Reactome μονοπατιών που αναδείχθηκαν από τα μεταγραφικά δεδομένα των υπό σύγκριση διαμολυσμένων U87 κυττάρων με διάφορες παραλλαγές της IRE1 πρωτεΐνης. (E) Ανάλυση της έκφρασης του miR-17-5p με RT-qPCR στα διαμολυσμένα U87 κύτταρα με τις διάφορες παραλλαγές της IRE1 πρωτεΐνης κάτω από βασικές συνθήκες. Τα δεδομένα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα και απεικονίζονται ως μέσες τιμές ± SD. Για την στατιστική σημαντικότητα των συγκρίσεων εφαρμόστηκε Student t-test. (F) Συνοπτικός πίνακας των ιδιοτήτων σηματοδότησης των παραλλαγών IRE1 WT, DN, P336L και A414T.

Αυτό επιβεβαιώθηκε περαιτέρω στο Ινστιτούτο INSERM χρησιμοποιώντας και ανοσοϊστοχημεία με χρήση αντισωμάτων έναντι των XBP1s και IBA1. Συνολικά 35 GBM

περιπτώσεις αναλύθηκαν με αντι-XBP1s αντίσωμα και το αποτέλεσμα ήταν είτε να μην παρατηρηθεί καμία χρώση (Fig 4D–1) είτε να παρατηρηθεί χρώση στον πυρήνα (Fig 4D–2) και στο κυτταρόπλασμα (Fig 4D–3/4) [179]. Ένα υποσύνολο αυτών των όγκων (n=24) αναλύθηκε στη συνέχεια για έκφραση του IBA1 (Appendix Fig S6B) και μια συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας του IBA1 και εκείνης του XBP1s επιβεβαιώθηκε, υποδεικνύοντας έτσι ότι τα υψηλά XBP1s επίπεδα στον όγκο είναι πιθανό να ελέγχουν την διήθηση των ανοσοκυττάρων (μακροφάγων).



Εικόνα 3.14. XBP1s και (mi)RIDD σηματοδότηση στο GBM

(A) Σχηματική αναπαράσταση των χαρακτηριστικών σηματοδότησης των παραλλαγών της IRE1 με βάση τα αποτελέσματα της Εικόνας 3.13, σε σχέση με το μάτισμα του XBP1 mRNA, την RIDD δράση για mRNA, και την RIDD δράση για το miR-17. (B) Τομή των υπέρ-εκφρασμένων γονιδίων σε κύτταρα που εκφράζουν την WT, P336L, και A414T IRE1 μετάλλαξη ως γονιδιακή υπογραφή που ελέγχεται από την έκφραση του XBP1s. Μια λίστα 40 γονιδίων δημιουργήθηκε και εξετάστηκε το μεταγραφικό της προφίλ στο μεταγράφημα των όγκων της GBMmark κοόρτης (Appendix Table S2, [179]). Οι όγκοι χαρακτηρίστηκαν ως XBP1s^{high} και XBP1s^{low} με βάση τα επίπεδα έκφρασης της υπογραφής των 40 γονιδίων. Τα επίπεδα έκφρασης των 40 γονιδίων καθώς και η ιεραρχική ομαδοποίησή τους απεικονίζεται στο τμήμα (C). (D) Τομή του συνόλου των mRNA που είχαν ταυτοποιηθεί ως *in vitro* RIDD στόχοι (Appendix Table S3 [179]) και του συνόλου των mRNA που ήταν υπέρ-εκφρασμένα στα IRE1-DN κύτταρα κάτω από βασικές συνθήκες. (E) Θερμικός χάρτης ιεραρχικής ομαδοποίησης των όγκων της GBMmark κοόρτης με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της λίστας των 37 υποψήφιων RIDD γονιδίων. RIDD^{high} και RIDD^{low} ομάδες ταυτοποιήθηκαν κατόπιν βαθμολόγησης των όγκων (Ενότητα 2.3.4.1). (F) Η τομή του συνόλου των υπό-εκφρασμένων γονιδίων μεταξύ των κυττάρων που φέρουν την WT, DN, και A414T IRE1 μετάλλαξη (υψηλά επίπεδα έκφρασης για το miR-17) υπέδειξε μια λίστα 38 γονιδίων. (G) Τα 38 γονίδια ελέγχθηκαν *in silico* αν αποτελούν υποψήφιους στόχους του miR-17 και ταυτοποιήθηκαν 12 γονίδια (Appendix Table S5 [179]). Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός τους απεικονίζεται με γράφημα πίτας. (H) Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του

miR-17-5p σε 30 GBM όγκους που χαρακτηρίστηκαν ως χαμηλής (κόκκινο) και υψηλής (πράσινο) miR-17-5p έκφρασης. Για τον έλεγχο της στατιστικής σημαντικότητας της σύγκρισης πραγματοποιήθηκε Student t-test. (I) Kaplan–Meier καμπύλες επιβίωσης των όγκων χαμηλής (κόκκινο) και υψηλής (πράσινο) miR-17-5p έκφρασης.

Στη συνέχεια, διερευνήσαμε πως η RIDD ενεργότητα θα μπορούσε να επηρεάσει τα χαρακτηριστικά του όγκου. Για τον σκοπό αυτό εκμεταλλευτήκαμε τους υποψήφιους *in vitro* RIDD mRNA στόχους που είχαμε ταυτοποιήσει (Ενότητα 3.1.3) και κατόπιν σύγκρισής τους με τα υπέρ-εκφρασμένα γονίδια των IRE1-DN κυττάρων απομονώσαμε ένα κοινό υποσύνολο 37 υποψήφιων, ειδικών στο GBM, RIDD στόχων (**Εικόνα 3.14D** και Appendix Table S4 [179]). Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός τους ανέδειξε το NOD μονοπάτι, την αλληλεπίδραση με το περιβάλλον, την οργάνωση/βιογένεση κυτταρικών διαμερισμάτων και τις συμβιωτικές αλληλεπιδράσεις (Appendix Fig S7B [179]). Έπειτα, το σύνολο αυτό των mRNAs χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση RIDD+ and RIDD- όγκων της GBMmark κοόρτης (**Εικόνα 3.14E**). Η έκφραση δεικτών ανοσολογικής διήθησης, αγγειογένεσης και δεικτών διείσδυσης σε αυτούς τους πληθυσμούς επιβεβαίωσε τα προηγούμενα αποτελέσματα και απέκλεισε την RIDD δράση του όγκου για τα mRNAs στην πρόσληψη ανοσοκυττάρων. Συνοψίζοντας, σε αντίθεση με τον άξονα IRE1/XBP1s που παρουσιάζει χαρακτηριστικά προ-ογκογενετικής σηματοδότησης, η RIDD δράση σε επίπεδο mRNA μπορεί να ανταγωνίζεται την διήθηση και αγγειογένεση του όγκου χωρίς σημαντική επίδραση στην διήθηση των ανοσοκυττάρων.

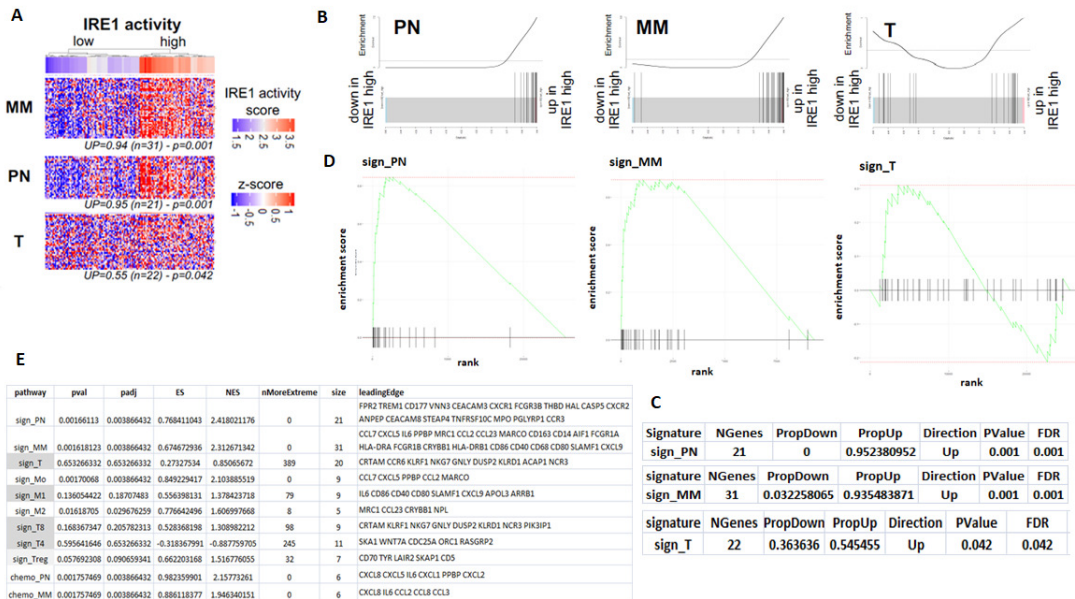
Στη συνέχεια, εξετάσαμε τον ρόλο του άξονα IRE1/miR-17 στην εξέλιξη του καρκίνου. Για τον σκοπό αυτό, αξιοποιήσαμε τις ιδιότητες των WT, DN και P336L IRE1 παραλλαγών προς το miR-17 (**Εικόνα 3.14A**) και ταυτοποιήσαμε ένα μικρό σχετικά σύνολο υπό-εκφρασμένων γονιδίων (38 γονίδια) των οποίων η έκφραση θα μπορούσε δυνητικά να ελέγχεται από το miR-17 (**Εικόνα 3.14F** και Appendix Table S5 [179]). Τα γονίδια αυτά ελέγχθηκαν αν αποτελούν πειραματικά επιβεβαιωμένους ή υποψήφιους (πρόβλεψη) στόχους του miR-17 και με τον αλγόριθμο DIANA-microT-CDS ταυτοποιήθηκαν 12 πιθανά γονίδια-στόχοι. Η λειτουργική ανάλυση αυτών των γονιδίων ανέδειξε λειτουργίες που αφορούν σε μορφογενετικά προγράμματα, κυτταρική προσκόλληση, σύνθεση αρωματικών συστατικών και σε μικρότερο βαθμό στην απόκριση στο οξειδωτικό στρες (**Εικόνα 3.14G**). Η λίστα των 12 γονιδίων-στόχων χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τον διαχωρισμό της GBMmark κοόρτης σε ομάδες υψηλής και χαμηλής IRE1/miR-17 σηματοδοτικής δραστηριότητας με βάση τα επίπεδα έκφρασής της (Ενότητα 2.3.4.1) και οι χαρακτηρισμένοι όγκοι ελέγχθηκαν ως προς τα επίπεδα έκφρασης των βιοδεικτών IBA1, CD14, CD31, vWF, RHOA, και CTGF (Fig 5C [179]).

Όπως και στην περίπτωση της RIDD για mRNA μόρια, οι παρατηρήσεις αυτές υπέδειξαν ότι η RIDD δράση για το miR-17 έχει αντι-αγγειογενετική και αντί-μεταναστευτική επίδραση. Αυτό μας οδήγησε να επιχειρήσουμε να συσχετίσουμε την υψηλή RIDD δραστικότητα, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλή έκφραση του miR-17, και με την καλύτερη επιβίωση των GBM ασθενών. Για να ελέγξουμε την υπόθεσή μας αυτή αξιολογήσαμε την έκφραση του miR-17-5p σε 30 GBM όγκους και διαχωρίσαμε τους ασθενείς σε ομάδες υψηλής και χαμηλής έκφρασης για το miR-17-5p (**Εικόνα 3.14H**). Τέλος η ανάλυση επιβίωσης στις δύο ομάδες ασθενών όντως ανέδειξε ότι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του miR-17-5p στους όγκους σχετίζονται με καλύτερη επιβίωση σε σχέση με εκείνους τους ασθενείς που είχαν όγκους με υψηλά επίπεδα του miR-17-5p (**Εικόνα 3.14I**). Τα αποτελέσματα της Ενότητας 3.1.8 περιλαμβάνονται στην δημοσίευση [179].

3.1.9 Ο Ρόλος ενός Νέου Προ-Φλεγμονώδη IRE1-UBE2D3 Σηματοδοτικού Άξονα στην Διήθηση του GBM Όγκου

Πρόσφατα δείξαμε ότι η IRE1 πρωτεΐνη, ένας μεταγωγέας σήματος του στρες Ε.Δ., προάγει την GBM κυτταρική διείσδυση, αγγειογένεση και διήθηση από μακροφάγα. Ως εκ τούτου, η αυξημένη IRE1 δραστικότητα στον όγκο προέβλεπε χειρότερη έκβαση *in vivo* με αυξημένη την παρουσία ανοσοκυττάρων της μη ειδικής άμυνας στην περιοχή του όγκου. Στην προσπάθειά μας να μελετήσουμε περαιτέρω την σχέση αυτή της IRE1 σηματοδότησης με το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον του όγκου αναλύσαμε δεδομένα μικροσυστοιχιών (GBMmark) και RNAseq δεδομένα (TCGA-GBM), ασθενών με γλοιοβλάστωμα, αποτυπώσαμε το μεταγραφικό προφίλ της IRE1 γονιδιακής υπογραφής (IRE1sign38) στους ασθενείς, χαρακτηρίσαμε τους όγκους με βάση την XBP1s και RIDD σηματοδοτική ενεργότητα (Ενότητα 2.3.4.1) και διεξήγαμε ανάλυση διαφορικής έκφρασης γονιδίων ανάμεσα στις 2 κύριες ομάδες ασθενών με υψηλή και χαμηλή IRE1/XBP1s σηματοδοτική δράση, αντίστοιχα. Στη συνέχεια εξετάσαμε την συσχέτιση μεταξύ των ομάδων διαφορετικής IRE1/XBP1s σηματοδότησης με μια σειρά από ανοσολογικές κυτταρικές γονιδιακές υπογραφές που έχουν ήδη δημοσιευτεί και αφορούν στην δράση της μικρογλοίας/μακροφάγων (MM), των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων (PN) αλλά και των Τ λεμφοκυττάρων (T). Μέσα από την διεξαγωγή ανάλυσης εμπλουτισμού γονιδιακού συνόλου (αυτοδύναμου και ανταγωνιστικού τύπου) (Ενότητα 2.3.5) για τις ανοσολογικές γονιδιακές υπογραφές MM, PN και T, της μυελικής και λεμφικής σειράς, αντίστοιχα, παρατηρήσαμε ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που αφορούν στην μυελική σειρά (MM και PN υπογραφή), με στατιστικά σημαντική υπεραντιπροσώπηση στους IRE1high/XBP1s GBM όγκους, ενώ κάτι

αντίστοιχο δεν παρατηρήθηκε για την υπογραφή της λεμφικής σειράς των T-λεμφοκυττάρων (ειδική άμυνα) όπου τα γονίδια της εμφάνιζαν ετερόπλευρη μεταβολή.



Εικόνα 3.15. Συσχέτιση της IRE1/XBP1s σηματοδοτικής ενεργότητας των GBM όγκων με τα επίπεδα έκφρασης των ανοσολογικών υπογραφών της δράσης των MM, PN και T ανοσοκυττάρων

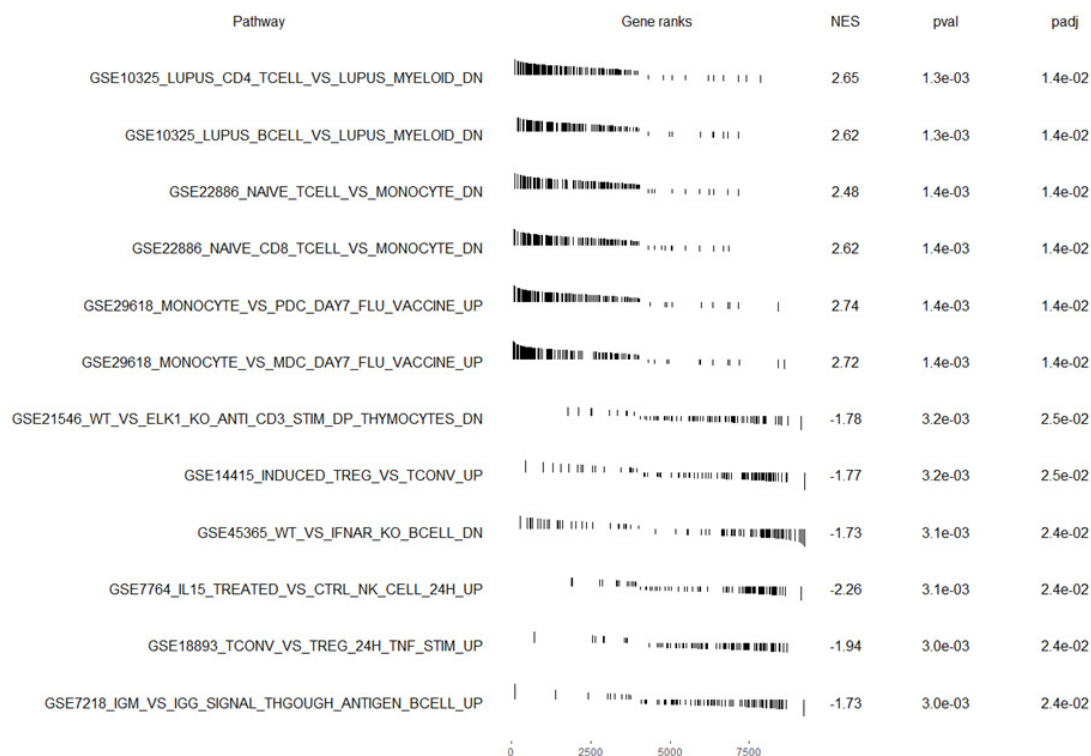
(A) Ιεραρχική ομαδοποίηση GBM ασθενών (TCGA GBM κοόρτη) χαρακτηρισμένων για την υψηλή (high) και χαμηλή (low) IRE1 σηματοδοτική δραστηριότητα (κατόπιν υπολογισμού του IRE1sign38/XBP1s σκορ όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 2.3.4.1), σε σχέση με το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης των ανοσολογικών υπογραφών που αφορούν στην δράση της μικρογλοίας/μακροφάγων (MM), των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων (PN) και των T-λεμφοκυττάρων (T) με βάση την βιβλιογραφία. Τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν με βάση την ευκλίδεια απόσταση χρησιμοποιώντας την πλήρη σύνδεση. Οι τιμές «UP» και «p» αντιστοιχούν στις τιμές «PropUp» και «PValue» του αποτελέσματος του αυτοδύναμου ελέγχου γονιδιακού συνόλου roast (Ενότητα 2.3.5) (C), όπου η πρώτη αναφέρει το ποσοστό των γονιδίων της υπογραφής που βρέθηκαν υπέρ-εκφρασμένα μεταξύ των ομάδων που μελετήθηκαν και η 2η τιμή (p) την αμφίπλευρη εκτιμώμενη στατιστική σημαντικότητα p-value του τεστ. Δηλαδή το PValue μας δείχνει για το εάν η πλειονότητα των γονιδίων της υπογραφής ήταν όντως διαφορετικά εκφρασμένα (Δ.Ε.) ως προς την συγκεκριμένη κατεύθυνση που καταγράφεται. Το n αναφέρει τον αριθμό των γονιδίων της υπογραφής. (B) Γράφημα γραμμοκώδικα (barcode plot) [363] που οπτικοποιεί τα αποτελέσματα του αυτοδύναμου ελέγχου γονιδιακού συνόλου roast για τις ανοσολογικές υπογραφές PN, MM και T των TCGA-GBM όγκων. Τα γραφήματα αυτά κατασκευάστηκαν με την συνάρτηση barcodeplot() του R πακέτου limma. Τα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια από την σύγκριση των IRE1high vs. IRE1low όγκων κατατάχθηκαν από αριστερά προς τα δεξιά κατά αυξανόμενο log-fold-change στο background του γραφήματος. Η μπλε γραμμή στα αριστερά ορίζει την κατεύθυνση των υπό-εκφρασμένων γονιδίων στους IRE1high GBM όγκους ενώ η κόκκινη γραμμή στα δεξιά ορίζει την κατεύθυνση των υπέρ-εκφρασμένων γονιδίων. Η καμπύλη πάνω από τον γραμμοκώδικα δείχνει το σκορ εμπλουτισμού των κάθετων μαύρων γραμμών (γονίδια υπογραφής) που δείχνουν τα χαμηλής ή υψηλής κατάταξης γονίδια των GBM-όγκων. Η διακεκομμένη οριζόντια γραμμή δείχνει ουδέτερο εμπλουτισμό ενώ η καμπύλη που βρίσκεται από κάτω δείχνει εξασθένιση/ελάττωση του εμπλουτισμού. Στον X-άξονα η κατάταξη έχει γίνει με βάση το log₂F.C των Δ.Ε. γονιδίων (IRE1high vs. IRE1low). (C) Συνοπτικός πίνακας των αποτελεσμάτων της μεθόδου roast για τις ανοσολογικές υπογραφές PN, MM και T των TCGA-GBM όγκων. Οι στήλες «PropDown» και «PropUp» περιέχουν τα ποσοστά γονιδίων της κάθε υπογραφής που ήταν υπό- και υπέρ-εκφρασμένα, αντίστοιχα. Η συνολική κατεύθυνση της μεταβολής προσδιορίζεται από την σημαντικότητα των αλλαγών προς κάθε κατεύθυνση και δηλώνεται στην στήλη «Direction». Το PValue αποτελεί ένδειξη για το εάν η πλειονότητα των γονιδίων της υπογραφής ήταν όντως Δ.Ε. ως προς την κατεύθυνση που δηλώνεται στην στήλη «Direction». (D) Γράφημα σκορ εμπλουτισμού (enrichment score plot) που οπτικοποιεί τα αποτελέσματα της ανάλυσης εμπλουτισμού γονιδιακού συνόλου (GSEA) (Ενότητα 2.3.5) για τις ανοσολογικές υπογραφές PN, MM και T των TCGA-GBM όγκων. Συγκεκριμένα, δείχνει την κατανομή των γονιδίων κάθε υπογραφής στην λίστα των Δ.Ε. γονιδίων όπως προέκυψαν από την σύγκριση μεταξύ των IRE1high και IRE1low GBM όγκων, κατόπιν κατάταξης των γονιδίων με βάση την μεταβολή της έκφρασής τους (log₂F.C) σε σχέση με την IRE1 ενεργότητα. Όπως και στην περίπτωση του barcode plot κάθε κάθετη «μαύρη γραμμή» αντιστοιχεί σε κάθε γονίδιο της υπογραφής, ορίζοντας την θέση κατάταξής του

στο σύνολο των Δ.Ε. γονιδίων ενώ η πράσινη καμπύλη την μεταβολή της τιμής εμπλουτισμού. Το σκορ εμπλουτισμού (ES) αντικατοπτρίζει τον βαθμό στον οποίο η γονιδιακή υπογραφή υπέρ-εκφρασμένα στα άκρα (δηλ. είτε στην κορυφή/υπέρ-εκφρασμένα είτε στην βάση/ υπό-εκφρασμένα) με βάση ολόκληρη την κατάταξη των Δ.Ε. γονιδίων από την σύγκριση μεταξύ των IRE1high vs. IRE1low GBM όγκων. Συγκεκριμένα, για να υπολογιστεί το σκορ εμπλουτισμού διατρέχεται προς τα κάτω η λίστα των Δ.Ε., αυξάνοντας ένα τρέχον στατιστικό αθροίσματος όταν συναντάμε γονίδιο που ανήκει στην υπογραφή του γονιδίου και μειώνοντας το όταν συναντάμε γονίδια που δεν ανήκουν στην υπογραφή. Το μέγεθος της αύξησης εξαρτάται από τη συσχέτιση του γονιδίου με τον εξεταζόμενο φαινότυπο (IRE1high ή IRE1low). Το σκορ εμπλουτισμού είναι η τελικά η μέγιστη απόκλιση του στατιστικού αθροίσματος από το μηδέν που αντιστοιχεί στην τυχαία κατανομή. (E) Συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων της ανάλυσης εμπλουτισμού γονιδιακών συνόλων (GSEA) για μια σειρά από ανοσολογικές υπογραφές που αφορούν στην δράση της μικρογλοίας/μακροφάγων (MM), πολυπορφοπούρηνων ουδετερόφιλων (PN), T-λεμφοκυττάρων (T), κατηγορίες μονοκυττάρων (M0, M1, M2), βοηθητικών (CD4+) λεμφοκυττάρων (T4), κυτταροτοξικών (CD8+) λεμφοκυττάρων (T8) και ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων (Treg). Το κανονικοποιημένο σκορ εμπλουτισμού (NES) προκύπτει από το σκορ εμπλουτισμού (ES) κανονικοποιημένο ως προς την μέση τιμή εμπλουτισμού των τυχαίων δειγμάτων του ίδιου μεγέθους. Η τιμή «nMoreExtreme» αντικατοπτρίζει τον αριθμό των φορών που ένα τυχαίο σύνολο γονιδίων είχε μεγαλύτερη τιμή εμπλουτισμού από την παρατηρούμενη για την γονιδιακή υπογραφή που μελετάμε. Η παράμετρος «size» δείχνει τον αριθμό των γονιδίων της υπογραφής μετά την αφαίρεση όσων δεν ήταν Δ.Ε. στατιστικώς σημαντικά. Η τελευταία στήλη (leadingEdge) περιλαμβάνει τα γονίδια της υπογραφής που συνέβαλαν ουσιαστικά στην διαμόρφωση του σκορ εμπλουτισμού της γονιδιακής υπογραφής δηλαδή πρόκειται για γονίδια «αυξημένου ενδιαφέροντος».

Για την περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης της IRE1 σηματοδοτικής δραστηριότητας με τα κύτταρα της μυελικής και λεμφικής σειράς διεξήγαμε GSEA ανάλυση (Ενότητα 2.3.5) στην λίστα των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων της σύγκρισης των IRE1high vs. IRE1low GBM όγκων για ένα σύνολο 4872 καλά επιμελημένων ανοσολογικών υπογραφών [immunologic signatures (C7)] της βάσης MSigDB του Broad Institute. Η ανάλυση αυτή επιβεβαίωσε την ιδιαίτερα μειωμένη έκφραση γονιδίων της δράσης των T- και B-λεμφοκυττάρων συγκριτικά με τα μυελοειδή ανοσοκύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα) στους χαρακτηρισμένους IRE1high όγκους (**Πίνακας 7**). Στον πίνακα 5 απεικονίζονται οι ανοσολογικές υπογραφές που υπέρ-αντιπροσωπεύονται στα κορυφαία υπέρ-εκφρασμένα και υπό-εκφρασμένα, αντίστοιχα, γονίδια της λίστας μας (IRE1high vs. IRE1low). Οι τέσσερις υπογραφές που βρίσκονται στην κορυφή του πίνακα περιλαμβάνουν γονίδια υπέρ-εκφρασμένα στα κύτταρα της μυελικής σειράς και στα μονοκύτταρα σε σχέση με τα βοηθητικά και κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα αλλά και τα B-λεμφοκύτταρα.

Επίσης στο πλαίσιο της εργασίας αυτής η ερευνητική ομάδα του INSERM ανέπτυξε μια GBM πρωτογενή κυτταρική σειρά από ασθενή, την RADH87 στην οποία επιτεύχθηκε είτε σταθερή υπέρ-έκφραση της WT-IRE1 είτε υπέρ-έκφραση της μικρότερου μεγέθους IRE1 παραλλαγής Q780*. Η τελευταία δείχθηκε πειραματικά να επιβραδύνει την IRE1 σηματοδότηση με άμεσο αντίκτυπο στο μάτισμα του XBP1, παρουσιάζοντας χαρακτηριστικά παρόμοια με τα U87-DN κύτταρα. Στην προσπάθειά μας να αξιολογήσουμε *in silico* το μεταγραφικό προφίλ της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38 στην κυτταρική σειρά RADH87 (parental, WT και Q780*) (RNAseq δεδομένα) καθώς και να την συγκρίνουμε με την κυτταρική σειρά U87 (WT, DN και WT_TN, DN_TN) (δεδομένα μικροσυστοιχιών) (GSE107859)

εφαρμόσαμε κανονικοποίηση μεταξύ των διαφορετικών πλατφορμών (cross-platform normalization) χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Shambhala με το πακέτο της R HARMONY (<https://github.com/oncobox-admin/harmony>) για ένα κοινό σύνολο 7115 γονιδίων.



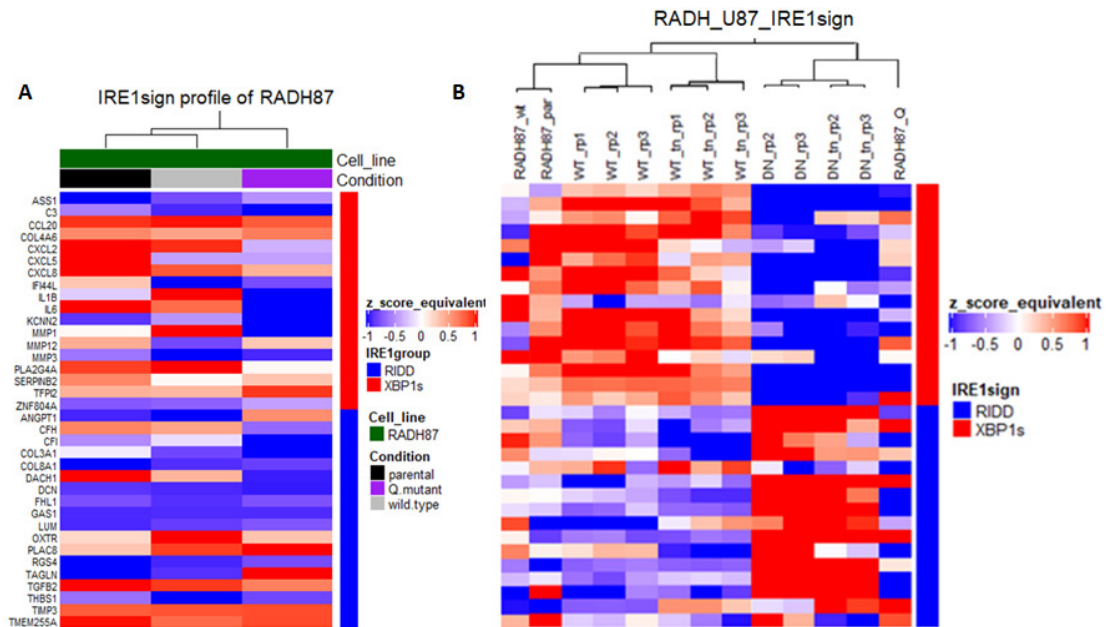
Πίνακας 7. Συσχέτιση της *IRE1/XBP1s* σηματοδοτικής ενεργότητας των GBM όγκων με τα επίπεδα έκφρασης των ανοσολογικών υπογραφών (C7) της MSigDB

Στον πίνακα 7 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της GSEA ανάλυσης των Δ.Ε. γονιδίων της σύγκρισης *IRE1high vs. IRE1low* GBM όγκων έναντι των ανοσολογικών υπογραφών C7 της βάσης MSigDB. Το θετικό κανονικοποιημένο σκορ εμπλουτισμού (NES) για ένα σύνολο γονιδίων/υπογραφή υποδεικνύει ότι τα γονίδια που υπέρ-εκπροσωπούνται σε αυτό το σύνολο γονιδίων είναι υπέρ-εκφρασμένα στη σύγκρισή μας (*IRE1high* έναντι *IRE1low*). Το αρνητικό NES δηλώνει το αντίθετο. Στον πίνακα απεικονίζονται μόνο οι ανοσολογικές υπογραφές που έδωσαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

Για την διερεύνηση των σχέσεων ανάμεσα στα δείγματα έγινε ιεραρχική ομαδοποίηση με κατασκευή δενδρογραμμάτων και η στατιστική σημαντικότητα της ομαδοποίησης ελέγχθηκε με bootstrapping χρησιμοποιώντας το πακέτο της R, rnclust. Από την σύγκριση αυτή διαπιστώσαμε ότι πράγματι η RADH87 συμπεριφέρεται παρόμοια με την κυτταρική σειρά U87 αποτυπώνοντας στην γονιδιακή μας υπογραφή τα χαρακτηριστικά της *IRE1* σηματοδότησης που καταγράφονταν σε πειραματικό επίπεδο (Εικόνα 3.16).

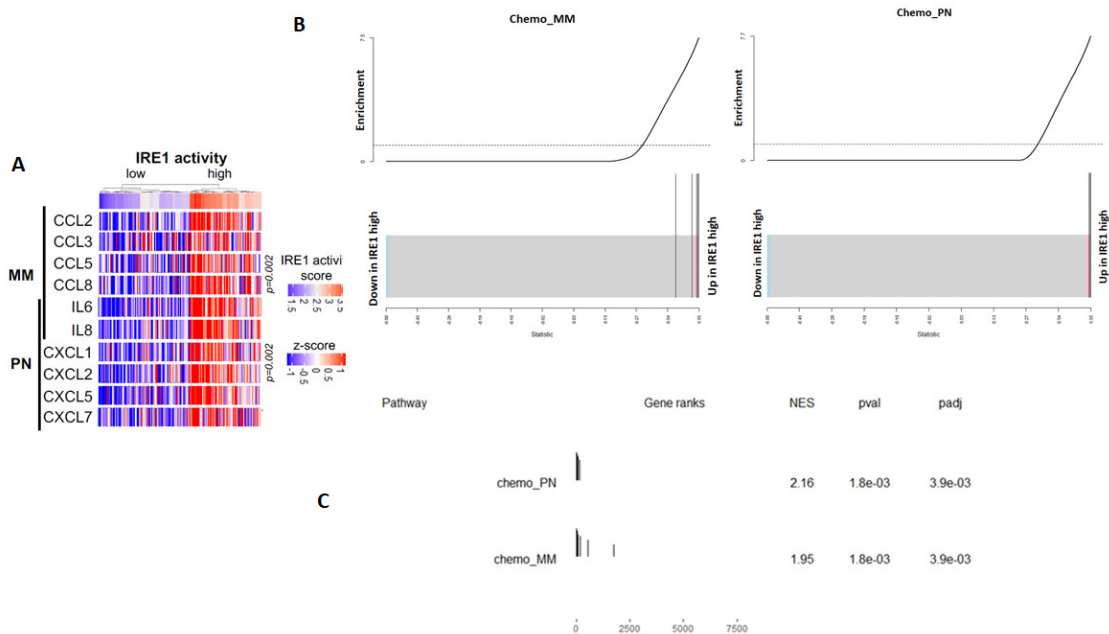
Έπειτα, υποθέσαμε ότι η *IRE1* ενεργότητα στα κύτταρα του όγκου θα μπορούσε να ελέγχει την έκφραση συγκεκριμένων χημειοκινών με αποτέλεσμα να προκαλείται η προσέλκυση των μυελοειδών κυττάρων. Ο χημειοτακτισμός των μυελοειδών κυττάρων μέσω

κυτοκινών/χημειοκινών έχει περιγραφεί σε διάφορα καρκινικά μοντέλα. Αυτές περιλαμβάνουν τα μόρια CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL7, IL6 και IL8 για τα PN κύτταρα [364] και CCL2, CCL3, CCL5, CCL8, IL6 και IL8 για τα MM [365, 366]. Χρησιμοποιώντας το σετ δεδομένων των TCGA GBM ασθενών, διαπιστώσαμε ότι όγκοι με υψηλή IRE1 σηματοδοτική δραστηριότητα είχαν υψηλά mRNA επίπεδα των MM και PN κυτοκινών/χημειοκινών που μόλις προαναφέραμε (Εικόνα 3.17).



Εικόνα 3.16. Αξιολόγηση της υπογραφής IRE1sign38 στην GBM κυτταρική σειρά RADH87

(A) Θερμικός χάρτης ιεραρχικής ομαδοποίησης των διαφορετικών τύπων (πατρική σειρά – parental, υπέρ-έκφραση της WT-IRE1 –wild.type και υπέρ-έκφραση της Q780* - Q.mutant) της GBM κυτταρικής σειράς RADH87 με βάση το μεταγραφικό προφίλ της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38. (B) Θερμικός χάρτης ιεραρχικής ομαδοποίησης των διαφορετικών τύπων της GBM κυτταρικής σειράς RADH87 (RADH87_par -πατρική σειρά, RADH87_wt - υπέρ-έκφραση της WT-IRE1 και RADH87_Q - υπέρ-έκφραση της IRE1 μεταλλαγμένης μορφής Q780*) και της αντίστοιχα διαμολυσμένης U87 κυτταρικής σειράς με την WT-IRE1 ισομορφή (WT) αλλά και την IRE1-DN (DN) σε βασικές συνθήκες και συνθήκες στρες E.Δ. με χορήγηση του νικαμυκίνης (tn). Η σύγκρισή τους βασίστηκε στο μεταγραφικό προφίλ της υπογραφής IRE1sign38. Η αυξημένη RIDD συνιστώσα της υπογραφής αντιπροσωπεύεται από το μπλε χρώμα ενώ η αυξημένη XBP1s συνιστώσα αντιπροσωπεύεται με το κόκκινο χρώμα. Αντίστροφο χρωματικό πρότυπο ακολουθείται για την εξασθενημένη δραστηριότητα.



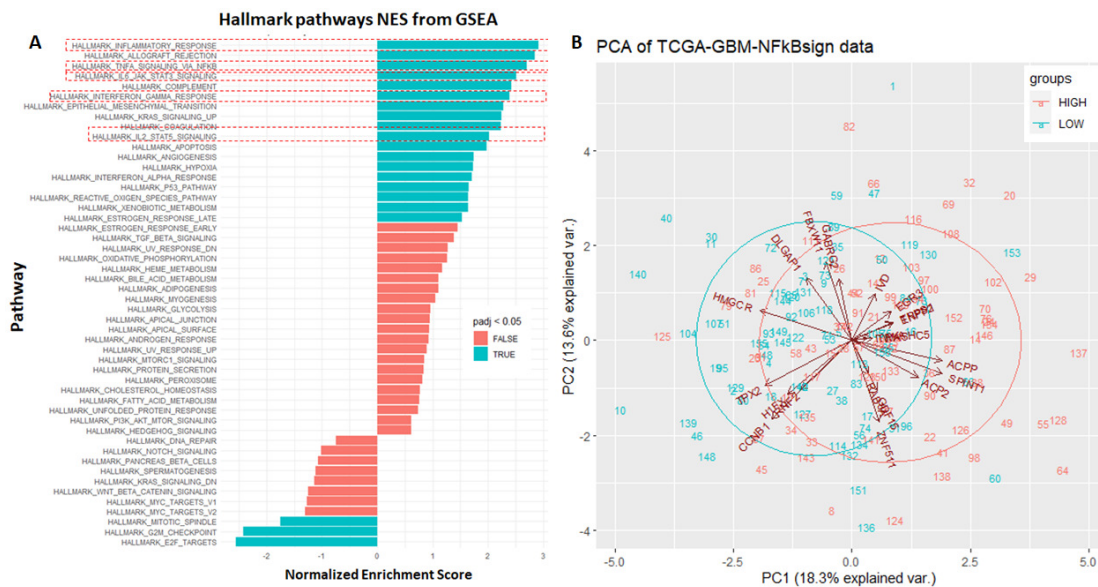
Εικόνα 3.17. Συσχέτιση της IRE1/XBP1s σηματοδοτικής ενεργότητας των GBM όγκων με τα επίπεδα έκφρασης των κυτοκινών/χημειοκινών στα MM και PN ανοσοκύτταρα

(A) Θερμικός χάρτης ιεραρχικής ομαδοποίησης των GBM ασθενών (TCGA κόρρη) με βάση το σκορ της IRE1/XBP1s σηματοδοτικής ενεργότητας όπου απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης των κυτοκινών/χημειοκινών που εμπλέκονται στον χημειοτακτισμό των μυελοειδών κυττάρων MM και PN. Η τιμή «p» αντιστοιχεί στην τιμή στατιστικής σημαντικότητας «PValue» του αποτελέσματος του αυτοδύναμου ελέγχου γονιδιακού συνόλου roast (Ενότητα 2.2.5) για την αντίστοιχη υπογραφή των κυτοκινών/χημειοκινών. Δηλαδή μας δείχνει για το εάν η πλειονότητα των γονιδίων της υπογραφής των κυτοκινών/χημειοκινών ήταν όντως στα κορυφαία διαφορικά εκφρασμένα (Δ.Ε.) γονίδια μεταξύ των IRE1high vs. IRE1low GBM όγκων. (B) Γράφημα γραμμοκώδικα (barcode plot) [363] που οπτικοποιεί τα αποτελέσματα του αυτοδύναμου ελέγχου γονιδιακού συνόλου roast για τις υπογραφές των κυτοκινών/χημειοκινών που εμπλέκονται στον χημειοτακτισμό των μυελοειδών κυττάρων MM και PN σε TCGA-GBM όγκους. Τα γραφήματα αυτά κατασκευάστηκαν με την συνάρτηση barcodeplot() του R πακέτου limma. Τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια από την σύγκριση των IRE1high vs. IRE1low όγκων κατατάχθηκαν από αριστερά προς τα δεξιά κατά αυξανόμενο log₂-fold-change στο background του γραφήματος. Η μπλε γραμμή στα αριστερά ορίζει την κατεύθυνση των υπό-εκφρασμένων γονιδίων στους IRE1high GBM όγκους ενώ η κόκκινη γραμμή στα δεξιά ορίζει την κατεύθυνση των υπέρ-εκφρασμένων γονιδίων. Η καμπύλη πάνω από τον γραμμοκώδικα δείχνει το σκορ εμπλουτισμού των κάθετων μαύρων γραμμών (γονίδια υπογραφής) που δείχνουν τα χαμηλής ή υψηλής κατάταξης γονίδια των GBM-όγκων. Η διακεκομμένη οριζόντια γραμμή δείχνει ουδέτερο εμπλουτισμό ενώ η καμπύλη που βρίσκεται από κάτω δείχνει εξασθένιση/ελάττωση του εμπλουτισμού. Στον X-άξονα η κατάταξη έχει γίνει με βάση το log₂F.C των Δ.Ε. γονιδίων (IRE1high vs. IRE1low). (C) Αποτελέσματα της GSEA ανάλυσης των Δ.Ε. γονιδίων της σύγκρισης IRE1high vs. IRE1low GBM όγκων έναντι των υπογραφών των κυτοκινών/χημειοκινών που εμπλέκονται στον χημειοτακτισμό των μυελοειδών κυττάρων MM και PN.

Αξίζει να αναφέρουμε, ότι η εξαρτώμενη ρύθμιση των CXCL2, CXCL5, IL6 και IL8 από την IRE1 ήταν αναμενόμενη καθώς τα γονίδια αυτά αποτελούν μέρος της IRE1 γονιδιακής υπογραφής, ενώ αυξημένα επίπεδα mRNA για αυτές τις κυτοκίνες/χημειοκίνες συσχετίστηκαν με αυξημένη έκφραση των δεικτών εντοπισμού CD14 και CD15/CD16 για τα MM και PN κύτταρα, αντίστοιχα (Fig.2B και S2A [367]).

Επειδή γνωρίζαμε ότι η έκφραση των προαναφερόμενων προ-φλεγμονωδών χημειοκινών ελέγχεται από τον μεταγραφικό παράγοντα NFκB [368, 369] ελέγξαμε αρχικά την ενεργοποίηση του NFκB σε σχέση με την IRE1 σηματοδότηση μεταξύ των U87 DN και U87

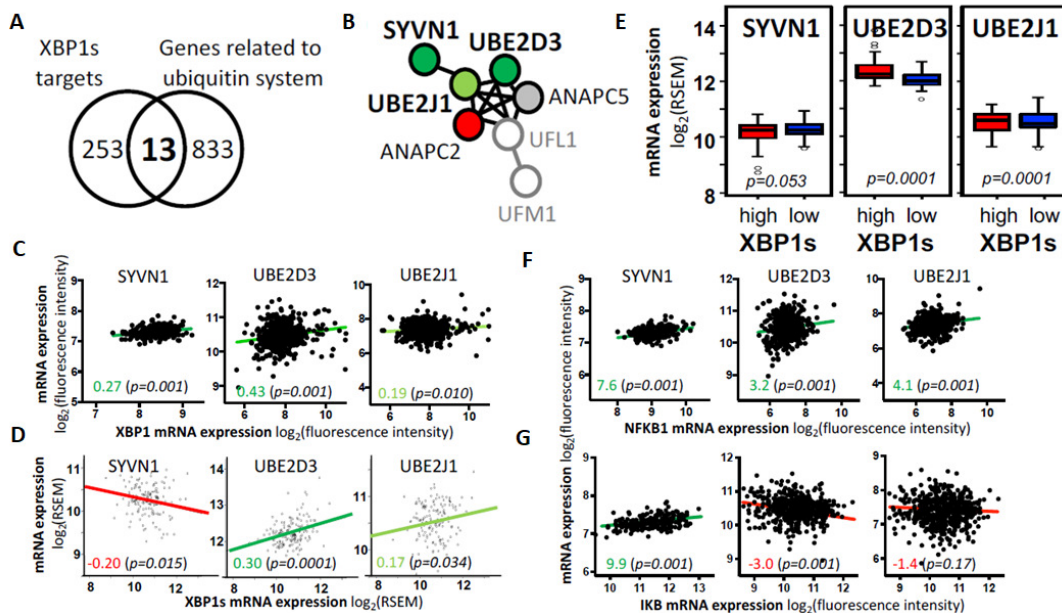
πατρικής προέλευσης κύτταρα. Η έκφραση και φωσφορυλίωση του NFκB ήταν χαμηλότερη στα U87 DN κύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες δείχνοντας ότι υπάρχει όντως μια λειτουργική σχέση ανάμεσα στην IRE1 σηματοδότηση και τον NFκB. Η λειτουργική ανάλυση εμπλουτισμού γονιδιακών συνόλων (GSEA) (Ενότητα 2.2.5) της λίστας των διαφορεικά εκφρασμένων γονιδίων της σύγκρισης των IRE1^{high} vs. IRE1^{low} TCGA-GBM όγκων έναντι 50 καλά επιμελημένων γονιδιακών υπογραφών-αναφοράς (Hallmark-50 gene sets) της βάσης MSigDB του Broad Institute, ανέδειξε τα μονοπάτια της φλεγμονώδους αντίδρασης, της σηματοδότησης του TNF-α μέσω του NFκB και τα σηματοδοτικά μονοπάτια IL6-JAK-STAT3 και IL2-STAT5 ως τα κορυφαία στατιστικά σημαντικά εμπλουτισμένα μονοπάτια με γονίδια υπέρ-εκφρασμένα στους GBM όγκους με υψηλή IRE1/XBP1s ενεργότητα (**Εικόνα 3.18A**). Επιπλέον η PCA ανάλυση των TCGA-GBM-RNAseq δεδομένων με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της NFκB γονιδιακής υπογραφής (NARP21) [370] διαχώρισε τους GBM όγκους κυρίως σε δύο ομάδες με διαφορετική IRE1/XBP1s σηματοδότηση, IRE1^{high} και IRE1^{low}, επιβεβαιώνοντας τα δεδομένα που έδειχναν την ισχυρή συσχέτιση της σηματοδότησης του NFκB με την IRE1 ενεργότητα (**Εικόνα 3.18B**).



Εικόνα 3.18. Συσχέτιση της φλεγμονώδους απόκρισης και της σηματοδότησης του NFκB με την IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα σε GBM όγκους

(A) GSEA ανάλυση με τον αλγόριθμο CAMERA (Ενότητα 2.3.5) των διαφορεικά εκφρασμένων (Δ.Ε.) γονιδίων της σύγκρισης IRE1^{high} vs. IRE1^{low} έναντι των 50 γονιδιακών υπογραφών-αναφοράς της βάσης MSigDB. Οι εγχρωμες στήλες δείχνουν εάν η αντίστοιχη γονιδιακή υπογραφή/μονοπάτι ήταν στατιστικά σημαντικό (μπλε χρώμα) ή όχι (κόκκινο χρώμα). Το θετικό κανονικοποιημένο σκορ εμπλουτισμού (NES) για μια γονιδιακή υπογραφή δείχνει ότι τα γονίδια που υπέρ-αντιπροσωπεύονται σε αυτό το σύνολο είναι υπέρ-εκφρασμένα στην λίστα των Δ.Ε. γονιδίων της σύγκρισης IRE1^{high} vs. IRE1^{low}. Αρνητικό NES -> το αντίθετο. (B) Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) των TCGA-GBM-RNAseq δεδομένων με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της NFκB γονιδιακής υπογραφής (NARP21) [370]. Με κόκκινο χρώμα αναπαρίστανται οι GBM όγκοι με αυξημένη IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα και με μπλε χρώμα οι όγκοι με χαμηλή IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα. Τα γονίδια της NFκB υπογραφής που διαχωρίζουν κυρίως τα δύο σύνολα ασθενών απεικονίζονται ως συνιστώσες με καφέ χρώμα.

Καθώς όμως υπήρχε θετική συσχέτιση μεταξύ της XBP1s ενεργότητας και των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη κυτοκινών/χημειοκινών, υποθέσαμε ότι ο XBP1s θα μπορούσε να ρυθμίσει μοριακούς παράγοντες του συστήματος ουμπικιτίνης που ελέγχουν την ενεργοποίηση του NFκB μέσω αποικοδόμησης του IκB. Για να ελέγξουμε αυτή την υπόθεση συγκρίναμε τα άμεσα γονίδια-στόχους του XBP1s όπως είχαν ταυτοποιηθεί από την αλληλούχιση κλασμάτων ανοσοκατακρήμνισης [199] με γονίδια που σχετίζονται με το σύστημα της ουμπικιτίνης. Από την συσχέτιση αυτή ταυτοποιήθηκαν 13 γονίδια (**Εικόνα 3.19A**) μεταξύ των οποίων 7 ήταν λειτουργικά αλληλοσυνδεόμενα (**Εικόνα 3.19B**). Όμως μόνο τρία από αυτά, οι λιγάσες E2 της ουμπικιτίνης της UBE2D3 και UBE2J1, καθώς και E3 λιγάση SYVN1, σχετίζονταν θετικά με την mRNA έκφραση του XBP1 στα GBM δείγματα (**Εικόνα 3.19C**). Χρησιμοποιώντας τα TCGA GBM RNAseq δεδομένα επιβεβαιώσαμε ότι η μεταγραφική έκφραση των UBE2D3 και UBE2J1 συσχετίζεται θετικά με την XBP1s σηματοδότηση (**Εικόνα 3.19E,D**) και τα επίπεδα mRNA του NFκB (**Εικόνα 3.19F**). Εντούτοις, μόνο η έκφραση του UBE2D3 σχετιζόταν αντίστροφα με τα επίπεδα έκφρασης του IκB (**Εικόνα 3.19G**) ενώ η αποσιώπηση του SYVN1 ή του UBE2J1 δεν επηρέασε την έκφραση του IκB.



Εικόνα 3.19. IRE1/XBP1s-εξαρτώμενη ρύθμιση του UBE2D3 που εμπλέκεται στην ρύθμιση του NFκB

(A) Venn διάγραμμα που απεικονίζει την τομή των XBP1s γονιδίων-στόχων που ταυτοποιήθηκαν με αλληλούχιση χρωματίνης από ανοσοκατακρήμνιση [199], με γονίδια που σχετίζονται με το σύστημα ουμπικιτίνης (GO term: 0016567). (B) Δίκτυο λειτουργικών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης των 7 από τα 13 γονίδια όπως προσδιορίστηκε με την βάση STRING (<https://string-db.org/>). Γονίδια/πρωτεΐνες με θετική ή αρνητική συσχέτιση με την έκφραση του XBP1s σημειώνονται με πράσινο ή κόκκινο χρώμα, αντίστοιχα. (C) και (D) Συσχέτιση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των SYVN1, UBE2D3 και UBE2J1 με την mRNA έκφραση του XBP1 (C) και του XBP1s (D) σε GBM δείγματα από το μεταγράφημα και τα RNAseq δεδομένα της TCGA κοόρτης, αντίστοιχα. Με κόκκινο και πράσινο σημειώνονται οι τιμές του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης Pearson ενώ μέσα στις

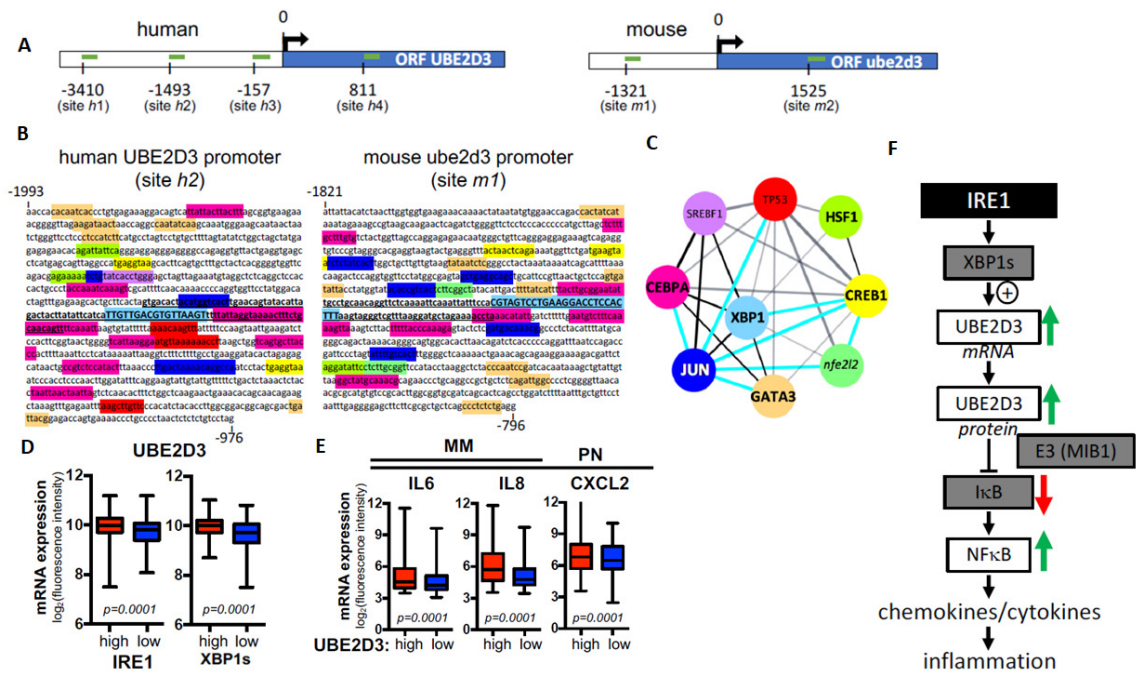
παρενθέσεις απεικονίζεται το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας. (E) Επίπεδα mRNA έκφρασης (\log_2 RSEM) των SYVN1, UBE2D3 και UBE2J1 σε χαρακτηρισμένους XBP1s low και high GBM όγκους της TCGA. (F) και (G) Συσχέτιση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των SYVN1, UBE2D3 και UBE2J1 με την mRNA έκφραση του NFκB1 και IκB mRNA expression σε GBM δείγματα της TCGA κοόρτης.

Έτσι, αποφασίσαμε να εστιάσουμε την προσοχή μας στο UBE2D3 το οποίο είχε προηγουμένως περιγραφεί ότι συνεισφέρει στην αποικοδόμηση του IκB [371, 372]. Χρησιμοποιώντας τα εργαλεία MatInspector [373] και TFBIND [374] ψάξαμε για θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή του UBE2D3 και βρήκαμε πολλαπλές πιθανές θέσεις για τον XBP1s τόσο στον άνθρωπο όσο και στο ποντίκι (**Εικόνα 3.20A**). Οι θέσεις πρόσδεσης στον υποκινητή του UBE2D3 τόσο στον άνθρωπο όσο και στο ποντίκι περιστοιχίζονται από θέσεις πρόσδεσης και άλλων μεταγραφικών παραγόντων, μερικοί από τους οποίους έχει δείχθει ότι σχετίζονται με τον XBP1s (**Εικόνα 3.20B,C**). Συνεπώς δεν θα μπορούσε να αποκλειστεί και ο έμμεσος έλεγχος της μεταγραφής του UBE2D3 από τον XBP1s. Επομένως θα χρειαστούν περαιτέρω έρευνες για την αποσαφήνιση του μηχανισμού ρύθμισης. Στη συνέχεια επιβεβαιώσαμε ότι η έκφραση του UBE2D3 ήταν σημαντικά αυξημένη σε όγκους με υψηλή IRE1 και XBP1s ενεργότητα (**Εικόνα 3.20D**). Επίσης από την διεξαγωγή ανάλυσης ποσοτικής φασματομετρίας μάζας (MS/MS) χωρίς σήμανση χρησιμοποιώντας κύτταρα με σταθερή υπερέκφραση του UBE2D3 έγινε ταυτοποίηση της E3 λιγάσης MIB1 ως υποψήφιας E3 λιγάσης για την αποικοδόμηση του IκB και/ή την ενεργοποίηση της σηματοδότησης του NFκB. Αξίζει να αναφερθεί ότι η λιγάση MIB1 έχει αναφερθεί ότι συμμετέχει στον έλεγχο της ενεργοποίησης του NFκB [375] καθώς επίσης ότι αλληλεπιδρά με το E2 ένζυμο UBE2D3 [376]. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν την παρουσία ενός άξονα σηματοδότησης που περιλαμβάνει την δράση του IRE1-XBP1s, UBE2D3 και MIB1, ικανού να πυροδοτεί την εξαρτώμενη από τον NFκB ενεργοποίηση της προ-φλεγμονώδους απόκρισης στο GBM.

Για να επιβεβαιώσουμε τα παραπάνω αποτελέσματα και να παράξουμε περισσότερες ενδείξεις για τον ρόλο του UBE2D3 στην μεσολαβούμενη από τα μυελοειδή κύτταρα ανοσία, ομαδοποιήσαμε την TCGA-GBM κοόρτη με βάση τα mRNA επίπεδα του UBE2D3 και ελέγξαμε τα μεταγραφικά επίπεδα έκφρασης των κύριων κυτοκινών/χημειοκινών που επάγουν την προσέλκυση των μυελοειδών κυττάρων. Έτσι, παρατηρήσαμε ότι οι όγκοι με αυξημένα επίπεδα έκφρασης του UBE2D3 εκφράζουν σημαντικά υψηλότερα mRNA επίπεδα για τους προ-φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές CXCL2, IL6 και IL8 (**Εικόνα 3.20E**) των οποίων η έκφραση ελέγχεται από τον NFκB [368, 369]. Επομένως, με τον τρόπο αυτό δείχθηκε ότι το στενά ρυθμιζόμενο κύκλωμα σηματοδότησης

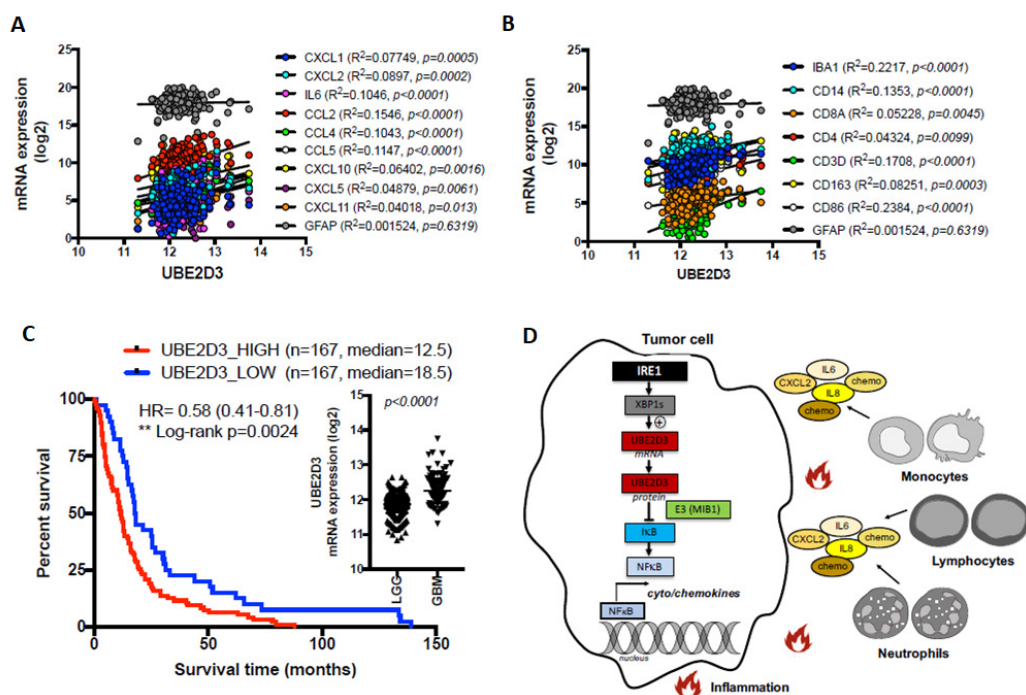
που περιλαμβάνει IRE1/XBP1s/UBE2B3/MIB1 ελέγχει την διαμεσολαβούμενη από τον NFκB σύνθεση των χημειοκινών και την φλεγμονώδη απόκριση στο GBM (Εικόνα 3.20F).

Χρησιμοποιώντας τα μεταγραφικά δεδομένα από δύο άλλες επίσης ανεξάρτητες κοόρτες ασθενών με γλοιώμα, την GBMmark (GBM) και την TCGA_LGG (low-grade gliomas), επίσης παρατηρήσαμε μια ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα έκφρασης του UBE2D3 και την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού από τις προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες/χημειοκίνες (Εικόνα 3.21A,B). Ενώ όταν συγκρίθηκαν τα επίπεδα επιβίωσης των ασθενών που είχαν χαρακτηριστεί οι όγκοι τους με βάση την υψηλή ή χαμηλή έκφραση του UBE2D3 παρατηρήσαμε ότι η υψηλότερη έκφραση του UBE2D3 οδηγεί σε χειρότερη πρόγνωση (Εικόνα 3.21C).



Εικόνα 3.20. Ρύθμιση της έκφρασης του UBE2D3 και η επίδρασή του στην σηματοδότηση του NFκB

(A) Γραφική αναπαράσταση των προβλεπόμενων XBP1s θέσεων πρόσδεσης (οριοθετημένως με πράσινο χρώμα) στον υποκινητή του UBE2D3 στον άνθρωπο και τον ποντικό όπως αναλύθηκαν με το λογισμικό MatInspector και TFBIND. (B) Νουκλεοτιδικές περιοχές στον υποκινητή του ανθρώπινου και του ποντικού UBE2D3 που προβλέφθηκαν ως θέσεις πρόσδεσης και άλλων μεταγραφικών παραγόντων πλησίον της θέσης εντοπισμού του XBP1s (ανοιχτό γαλάζιο) επισημαίνονται με διάφορα χρώματα. Το χρωματικό πρότυπο είναι σύμφωνο με εκείνο των υποψήφιων μεταγραφικών παραγόντων που παρουσιάζονται στο πρωτεϊνικό δίκτυο της εικόνας C. (C) Δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ του XBP1s και των άλλων μεταγραφικών παραγόντων που προβλέφθηκαν ότι προσδένονται στην περιοχή του υποκινητή του UBE2D3 χρησιμοποιώντας την Cytoscape εφαρμογή stringApp [377]. Οι μαύρες και μπλε γραμμές αντιστοιχούν σε αλληλεπιδράσεις που περιγράφηκαν σε πειράματα συνέκφρασης και σύνολα δεδομένων, αντίστοιχα. (D) mRNA έκφραση του UBE2D3 σε δείγματα GBM της TCGA κοόρτης ομαδοποιημένα σε σχέση με την IRE1 και XBP1s ενεργότητα. (E) mRNA έκφραση των IL6, IL8 και CXCL2 σε δείγματα GBM της TCGA κοόρτης ομαδοποιημένα με βάση την έκφραση του UBE2D3 (υψηλή έκφραση: κόκκινο χρώμα και χαμηλή έκφραση: μπλε χρώμα). (F) Σχηματική αναπαράσταση του υποθετικού μοντέλου που περιγράφει τον άξονα IRE1-UBE2D3 και την επίδρασή του στην φλεγμονώδη απόκριση στο GBM. Η IRE1 μέσω του XBP1s ελέγχει την έκφραση του UBE2D3, το οποίο με την σειρά του μαζί με την E3 λιγάση που συσπείρει της ομπικτινής (που περιλαμβάνει την MIB1) αποκκοδομεί άμεσα τον IκB, οδηγώντας σε ενεργοποίηση την σηματοδότηση του NFκB και των μετέπειτα στόχων του.



Εικόνα 3.21. Επίδραση της υπερέκφρασης του UBE2D3 στην φλεγμονή *in vivo*

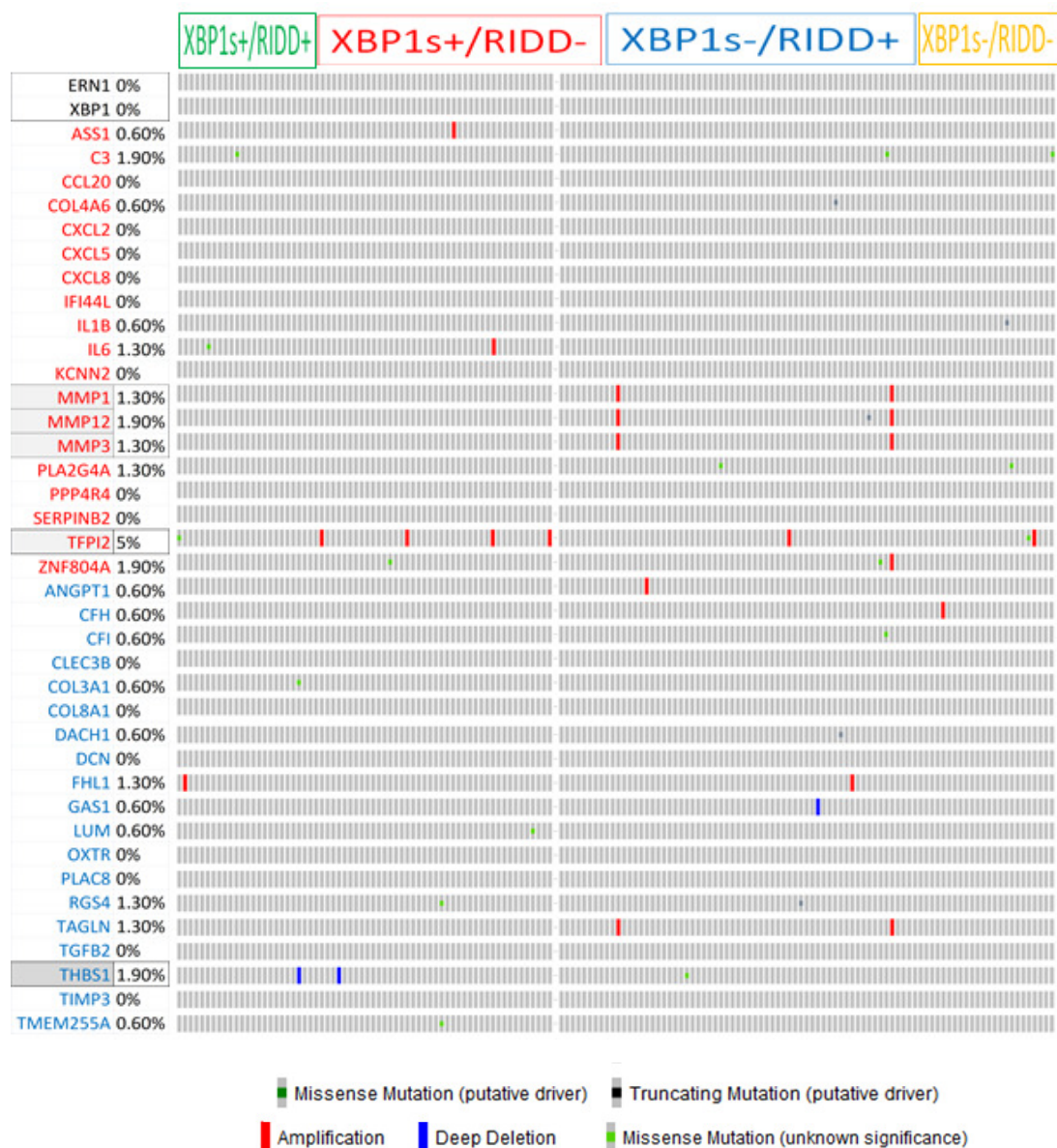
(A) Γραμμική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης (mRNA) του UBE2D3 με την έκφραση των εικονιζόμενων κυτοκινών/χημειοκινών σε GBM όγκους της TCGA κοόρτης. Η έκφραση του GFAP (αστροκυτταρικός δείκτης) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. (B) Γραμμική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης (mRNA) του UBE2D3 με την έκφραση των εικονιζόμενων ανοσοκυτταροειδικών υποδοχέων σε GBM όγκους της TCGA κοόρτης. Η έκφραση του GFAP (αστροκυτταρικός δείκτης) χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. (C) Σύγκριση της έκφρασης του UBE2D3 σε όγκους ασθενών με χαμηλού βαθμού γλοιώμα (LGG) και γλοιοβλάστωμα (GBM) της TCGA κοόρτης και η επίδρασή του στα ποσοστά επιβίωσης. (D) Σχηματική αναπαράσταση του άξονα IRE1-UBE2D3 στην ρύθμιση της προ-ογκογονικής φλεγμονής.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, γίνεται φανερό ότι τα ευρήματά μας αποκαλύπτουν ένα νέο εξαρτώμενο από την IRE1 μηχανισμό που προωθεί την προ-ογκογονική φλεγμονή, η οποία ενσωματώνει την UPR σηματοδότηση και το σύστημα της ομπικιτίνης. Συγκεκριμένα, δείξαμε ότι ο άξονας IRE1-UBE2D3 ελέγχει την σύσταση του GBM πρωτεϊνικού εκκρινώματος μέσω ενεργοποίησης της NF κ B σηματοδότησης (Εικόνα 3.21D).

Τα σημαντικότερα αποτελέσματα αυτής της εργασίας περιλαμβάνονται στην προ-δημοσίευση (preprint) [367].

3.1.10 Προφίλ Μεταλλάξεων της Γονιδιακής Υπογραφής (IRE1sign38) σε GBM Ασθενείς

Στην προσπάθειά μας να διερευνήσουμε το προφίλ μεταλλάξεων της IRE1 γονιδιακής υπογραφής (IRE1sign38) στο GBM εκμεταλλευτήκαμε την διαδικτυακή πλατφόρμα για την γονιδιωματική ανάλυση του καρκίνου, cBioPortal (Ενότητα 2.3.4) και αναζητήσαμε τα δεδομένα μεταλλάξεων των ασθενών της TCGA-GBM κοόρτης της οποίας είχαμε ανακτήσει προηγουμένως τα RNAseq δεδομένα. Για να ελέγξουμε κατά πόσο ο χαρακτηρισμός των GBM ασθενών σε ομάδες υψηλής και χαμηλής XBP1s και RIDD ενεργότητας είναι αποτέλεσμα αποκλειστικά των επιπέδων μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων των συνιστωσών της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38 αλλά και αν υπάρχει κάποια συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης με μεταλλάξεις ή/και αλλαγές στον αριθμό των γονιδιακών αντιγράφων (CNAs), κατασκευάσαμε γράφημα oncoprint όπου απεικονίζονται τόσο οι προβλεπόμενες μεταλλάξεις οδηγοί (driver mutations) όσο και οι ενισχύσεις (amplifications) και διαγραφές (deletions) των γονιδίων της υπογραφής **(Εικόνα 3.22)**. Η χαρτογράφηση αυτή των μεταλλάξεων ανέδειξε ότι τα γονίδια της IRE1 γονιδιακής υπογραφής που είχαμε εξάγει φέρουν ένα πολύ μικρό ποσοστό μεταλλάξεων, της τάξεως του 0.6 – 1.9% για μερικά μόνο από αυτά ενώ σε αρκετά δεν έχουν καταγραφεί καθόλου μεταλλάξεις. Αυτό αποτέλεσε ένα σημαντικό εύρημα γιατί όντως διαπιστώσαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης αυτών των γονιδίων καθορίζονται σχεδόν αποκλειστικά σε μεταγραφικό επίπεδο στο GBM και δεν οφείλονται σε γονιδιακές ενισχύσεις ή ελλείψεις.



TCGA-GBM RNAseq data

Summary for Glioblastoma Multiforme

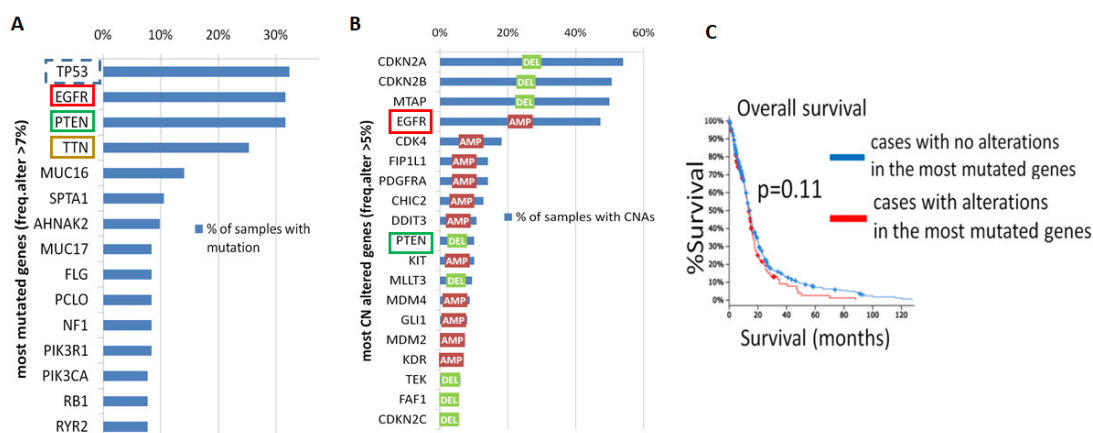
Gene altered in 22.08% of 154 cases

Alteration	Frequency
Mutation	11.69% (18 cases)
Amplification	8.44% (13 cases)
Deep Deletion	1.3% (2 cases)
Multiple Alterations	0.65% (1 case)

Εικόνα 3.22. Προφίλ μεταλλάξεων της IRE1sign38 στους TCGA-GBM όγκους (154 περιπτώσεις)

Γράφημα oncoprint των μεταλλάξεων και των μεταβολών στον αριθμό των γονιδιακών αντιγράφων (CNAs) της IRE1 γονιδιακής υπογραφής (38 γονίδια) όπως αξιολογήθηκαν με την COSMIC και τον αλγόριθμο GISTIC 2.0. Το “deep deletion” περιγράφει των ομόζυγη διαγραφή ενός γονιδίου. Με διαφορετικό χρώμα στην κορυφή του oncoprint χαρακτηρίζονται οι περιπτώσεις των ασθενών με βάση το επίπεδο ενεργότητας της XBP1s και RIDD συνιστώσας της υπογραφής IRE1sign38 κατόπιν βαθμολόγησής τους με βάση το σύστημα της Ενότητας 2.3.4.1. Στην κάθετη στήλη των γονιδίων της υπογραφής με κόκκινο και μπλε χρώμα απεικονίζονται τα γονίδια της XBP1s και RIDD συνιστώσας, αντίστοιχα. Τα γονίδια που σημειώνουν τα υψηλότερα ποσοστά μεταλλάξεων βρίσκονται σε γκρι πλαίσιο.

Στη συνέχεια αναζητήσαμε να βρούμε γενικά ποια είναι τα γονίδια εκείνα που συσσωρεύουν τον μεγαλύτερο αριθμό μεταλλάξεων και CNAs στους ασθενείς με GBM και αν υπάρχει κάποια αλληλεπίδρασή τους με τα γονίδια της IRE1 γονιδιακής υπογραφής (IRE1sign38). Χρησιμοποιώντας την διαδικτυακή πλατφόρμα cBioPortal για την TCGA-GBM κούρτη καταγράψαμε τα κορυφαία γονίδια που φέρουν συχνότερα σημειακές μεταλλάξεις (συχνότητα μεταβολής > 7%) αλλά και εκείνα τα γονίδια που φέρουν συχνότερα αλλαγές στον αριθμό των αντιγράφων τους (συχνότητα μεταβολής > 5%). Έτσι παρατηρήσαμε ότι στα κορυφαία μεταλλαγμένα γονίδια περιλαμβάνονται τέσσερα γονίδια με κομβικό ρόλο στην καρκινογένεση και την κυτταρική ομοίωση όπως το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 το οποίο ως γνωστόν είναι μεταλλαγμένο σε όλους σχεδόν τους τύπους καρκίνου, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN, όπου οι μεταλλάξεις του είναι καθοριστικές για την ανάπτυξη και εξάπλωση του γλοιοβλαστώματος, του καρκίνου του πνεύμονα, του καρκίνου του μαστού και του καρκίνου του προστάτη [378], ο υποδοχέας EGFR του οποίου επίσης οι μεταλλάξεις έχουν χαρακτηριστεί ως οδηγοί για την ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα ενώ την τελευταία δεκαετία αποτελεί και σημαντικό θεραπευτικό στόχο στο GBM [379], αλλά και το γονίδιο TTN του οποίου τυχαίες μεταλλάξεις αντιπροσωπεύουν υψηλό φορτίο μεταλλάξεων για τους όγκους (tumor mutation burden) [380]. Τέλος όταν επιχειρήσαμε να συγκρίνουμε τα ποσοστά επιβίωσης των GBM ασθενών που δεν έφεραν αλλαγές στα πιο μεταλλαγμένα γονίδια με εκείνους που έφεραν παρατηρήσαμε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των καμπυλών ολικής επιβίωσης κατά Kaplan-Meier, γεγονός που επιβεβαίωσε την πολυπλοκότητα της καρκινογένεσης και την πολυεπίπεδη εξέλιξη του όγκου, η οποία δεν αντικατοπτρίζεται απλώς στο φορτίο των μεταλλάξεων που φέρει αλλά απαιτεί όσο γίνεται την καλύτερη καταγραφή της δραστηριότητας μηχανισμών που παίζουν κομβικό ρόλο στην κυτταρική ομοίωση όπως είναι π.χ. η απόκριση στο στρες και η πρωτεόσταση.

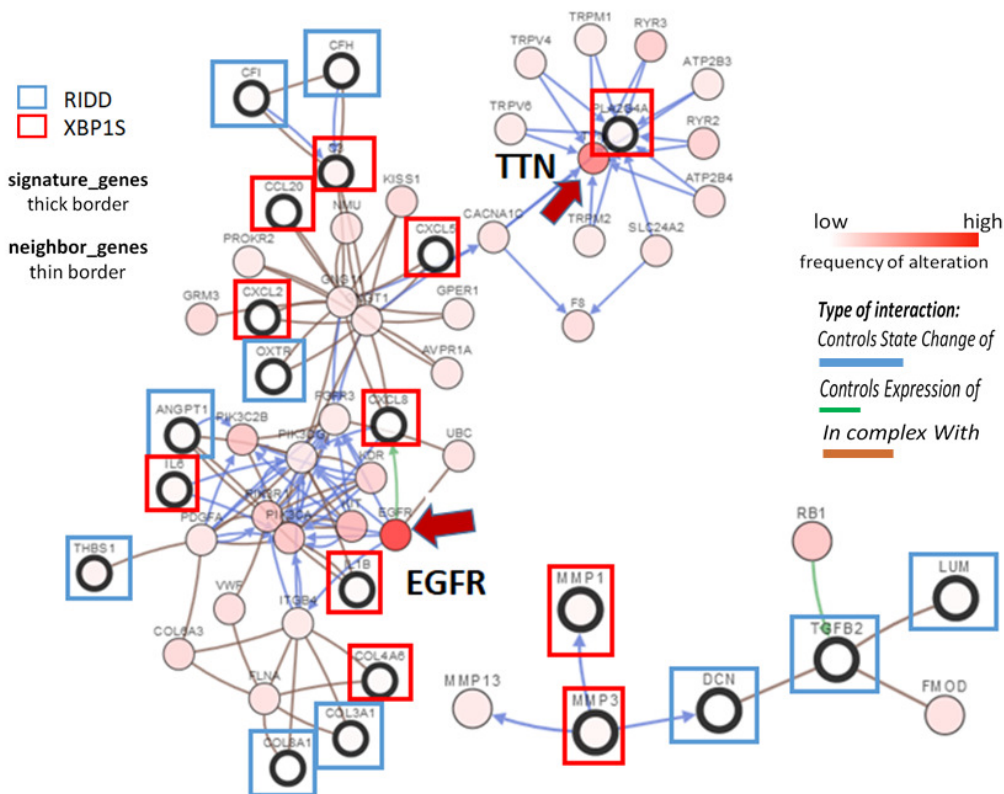


Εικόνα 3.23. Συχνότητα σημειακών μεταλλάξεων και αλλαγών στον αριθμό των γονιδιακών αντιγράφων σε ασθενείς με GBM

(A) Ραβδόγραμμα της συχνότητας σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια ασθενών με GBM. Τα γονίδια που απεικονίζονται εμφανίζουν συχνότητα μετάλλαξης >7 %. Τα τέσσερα κορυφαία μεταλλαγμένα γονίδια βρίσκονται σε πλαίσιο με διαφορετικό χρώμα. (B) Ραβδόγραμμα της συχνότητας των CNAs στα γονίδια ασθενών με GBM. Τα γονίδια που απεικονίζονται εμφανίζουν συχνότητα αλλαγών >5 %. Με DEL (πράσινο χρώμα) σημειώνονται οι διαγραφές γονιδιακών αντιγράφων (deletions) και με AMP (κόκκινο χρώμα) οι ενισχύσεις γονιδίων (συνήθως διπλασιασμοί). (C) Καμπύλες ολικής επιβίωσης κατά Kaplan-Meier των ασθενών που δεν είχαν μεταλλάξεις στα πιο μεταλλαγμένα γονίδια και εκείνων που είχαν. Η στατιστική σημαντικότητα της σύγκρισής τους πραγματοποιήθηκε με το log-rank test και η τιμή p-value (p) σημειώνεται στην εικόνα.

3.1.11 Δίκτυο Αλληλεπιδράσεων της Γονιδιακής Υπογραφής (IRE1sign38) με Μεταλλαγμένα Γονίδια-Οδηγούς και Φαρμακογονιδιωματική Ανάλυση σε GBM Ασθενείς

Όταν όμως αναπαραστήσαμε το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των γονιδίων της IRE1sign38 υπογραφής με τα 50 πιο συχνά γειτονικά μεταλλαγμένα γονίδια στο GBM διαπιστώσαμε την άμεση ή έμμεση αλληλεπίδρασή τους με μερικά από τα κορυφαία μεταλλαγμένα γονίδια στο GBM, όπως είναι το EGFR και το TTN. Είναι επίσης σημαντικό να σημειώσουμε ότι το δίκτυο αυτό ανέδειξε και την σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των γονιδίων της υπογραφής που αντιστοιχούν και στις δύο συνιστώσες, δημιουργώντας τοπικά κλειστά κυκλώματα στα οποία μπορεί να επιτευχθεί υψηλού βαθμού ρύθμιση είτε μέσω πρωτεϊνικών συμπλόκων (π.χ. δίκτυο CFI-CFH-C3, COLBA1-COL3A1-COL4A6, DCN-TGFB2-LUM) που δημιουργούνται μεταξύ τους, είτε μέσω ελέγχου της κατάστασης ενεργοποίησης πρωτεϊνών (ενεργοποίηση-απενεργοποίηση) (π.χ. η αλληλεπίδραση PLA2G4A-TTN μέσω εμπλοκής και του CXCL5) ή μέσω ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων όπως είναι η ρύθμιση του CXCL8 από τον EGFR ή ο έλεγχος του TGFB2 από το RB1. Επίσης η ανάλυση του δικτύου ανέδειξε δύο σημαντικά κυκλώματα εμπλουτισμένα με γονίδια που φέρουν μεταλλάξεις-οδηγούς στο GBM όπως το μονοπάτι του RB και του PI3K. Για την κατασκευή του δικτύου των αλληλεπιδράσεων χρησιμοποιήθηκε μια java εφαρμογή (NetBox) (<http://www.mybiosoftware.com/netbox-1-0-perform-network-analysis-human-interaction-networks.html>) η οποία έχει ενσωματωμένη μια βάση αλληλεπιδράσεων, την Human Interaction Network (HIN), που προέρχεται από τέσσερις βάσεις με βιβλιογραφικά επιμελημένα δεδομένα όπως η Human Protein Reference Database (HPRD), η Reactome, η NCI-Nature Pathway Interaction Database (PID) και η MSKCC Cancer Cell Map. Τα δεδομένα αυτά έχουν πλέον ενσωματωθεί στο project «Pathway Commons» (<https://www.pathwaycommons.org/>). Η οπτικοποίηση του δικτύου έγινε με το λογισμικό Cytoscape.

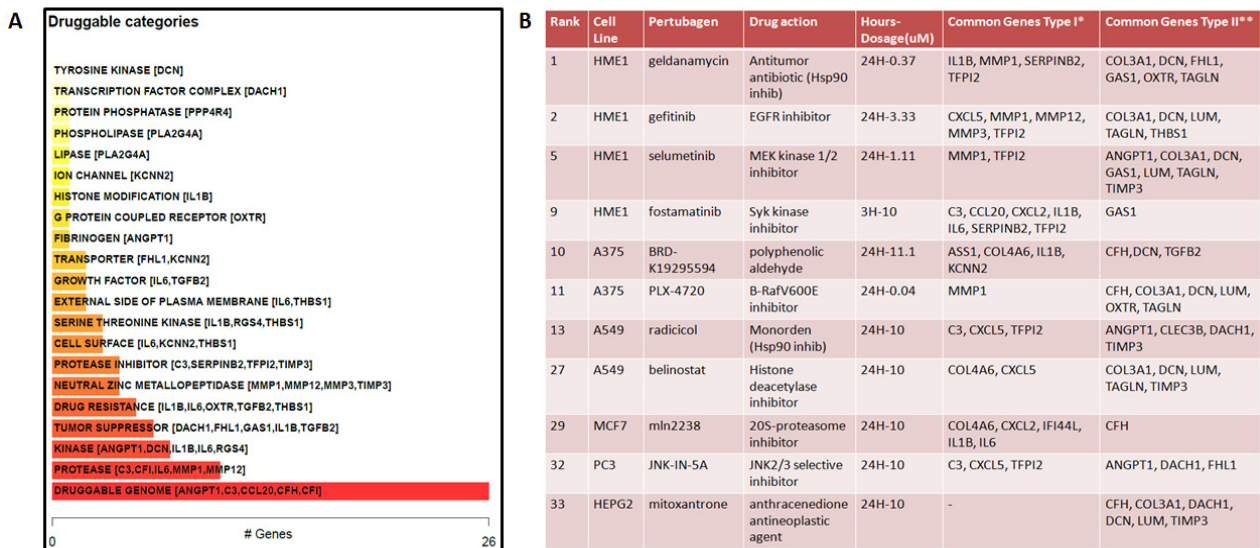


Εικόνα 3.24. Δίκτυο αλληλεπιδράσεων της υπογραφής IRE1sign38 με τα πιο μεταλλαγμένα γειτονικά γονίδια στο GBM

Στιγμιότυπο του δικτύου αλληλεπιδράσεων (88 nodes) της IRE1 γονιδιακής υπογραφής των 38 γονιδίων (IRE1sign38) με τα 50 πιο συχνά μεταλλαγμένα γειτονικά γονίδια. Το όριο των 50 γονιδίων χρησιμοποιήθηκε απλά για λόγους ευκρινέστερης απεικόνισης. Η συχνότητα των μεταλλάξεων για κάθε γονίδιο απεικονίζεται με διαβαθμισμένη χρωματική κλίμακα του κόκκινου χρώματος. Τα γονίδια της XBP1s συστασώςας βρίσκονται εντός κόκκινου πλαισίου ενώ της RIDD συστασώςας εντός μπλε πλαισίου. Η περιφέρεια του κύκλου που ορίζει το κάθε γονίδιο της υπογραφής έχει έντονο μαύρο χρώμα ενώ τα γειτονικά γονίδια έχουν μικρού πάχους περιφέρεια καφέ χρώματος. Το χρώμα των ακμών που αναπαριστούν τις αλληλεπιδράσεις απεικονίζει τρεις διαφορετικούς τύπους αλληλεπιδράσης. Το μπλε χρώμα αναπαριστά ρύθμιση της κατάστασης ενός μορίου (π.χ. ενεργοποίηση-απενεργοποίηση), το πράσινο χρώμα αναπαριστά τον έλεγχο της έκφρασης και το καφέ χρώμα την δημιουργία συμπλόκου.

Στη συνέχεια προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσο τα γονίδια της IRE1 υπογραφής θα μπορούσαν να αποτελέσουν φαρμακευτικούς στόχους με βάση το προφίλ των σημειακών μεταλλάξεων που αυτές φέρουν αλλά και τα επίπεδα έκφρασής τους στους ασθενείς με GBM. Για τον σκοπό αυτό αρχικά ανατρέξαμε στην βάση DGIdb (Drug-Gene Interaction database) (<https://www.dgidb.org>) [381] που περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις γονιδίων-φαρμάκων με βάση τις μεταλλάξεις των υπό μελέτη γονιδίων και αναζητήσαμε ποια γονίδια της υπογραφής επιδέχονται φαρμακευτική στόχευση με βάση το μεταλλακτικό τους προφίλ, στους ασθενείς της TCGA-GBM κούρτης (393 περιπτώσεις με δεδομένα μεταλλάξεων). Έτσι παρατηρήσαμε ότι 26 γονίδια από τα 38 είναι αυτά που εμπίπτουν σε 21 σημαντικές κατηγορίες γονιδίων για τις οποίες έχουν αναπτυχθεί φάρμακα, με εξαίρεση τα γονίδια CXCL5 και CXCL8 όπου δεν βρέθηκαν να φέρουν καθόλου μεταλλάξεις στην TCGA-GBM κούρτη (Εικόνα 3.25A).

Στη συνέχεια διεξάγοντας φαρμακογονιδιωματική ανάλυση για τα γονίδια της υπογραφής με την πλατφόρμα BioInfoMiner, εστιάζοντας στον «αντίστροφο» τύπο ανάλυσης (reverse mode), αναζητήσαμε φαρμακευτικές ουσίες οι οποίες έχει δειχθεί σε κυτταρικά μοντέλα ότι αντιστρέφουν το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης των γονιδίων της υπογραφής στο GBM. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής συνοψίζονται στον πίνακα Β της **Εικόνα 3.25**.



Εικόνα 3.25. Φαρμακογονιδιωματική ανάλυση της υπογραφής IRE1sign38

(A) Γράφημα που απεικονίζει μεταλλαγμένα γονίδια της IRE1 γονιδιακής υπογραφής, υποψήφια για φαρμακευτική στόχευση με βάση την πληροφορία που υπάρχει στη βάση αλληλεπιδράσεων γονιδίων-φαρμάκων DGIdb. Η χρωματική κλίμακα κίτρινο-κόκκινο αναπαριστά των αριθμό των γονιδίων που περιλαμβάνονται σε κάθε κατηγορία. Κίτρινο: μικρός αριθμός γονιδίων, κόκκινο: μεγάλος αριθμός γονιδίων. (B) Φαρμακογονιδιωματική ανάλυση της IRE1sign38 για την ταυτοποίηση φαρμακευτικών ουσιών (pertubagens) που αντιστρέφουν το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης των γονιδίων της υπογραφής. Η στήλη «Common Genes Type I*» περιλαμβάνει γονίδια που ήταν υπέρ-εκφρασμένα στο GBM (XBP1s συνιστώσα) και υποεκφράζονται κατόπιν χορήγησης της αντίστοιχης φαρμακευτικής ουσίας στην κυτταρική σειρά που αναφέρεται στην στήλη «Cell Line» για χρόνο και δόση που αναφέρεται στην στήλη «Hours-Dosage(μM)». Η στήλη «Common Genes Type II**» περιλαμβάνει γονίδια που ήταν υπό-εκφρασμένα στο GBM (RIDD συνιστώσα) και υπερεκφράζονται κατόπιν χορήγησης της φαρμακευτικής ουσίας στην κυτταρική σειρά που αναγράφεται. Η ιεράρχηση των ουσιών με βάση τον βαθμό επίδρασης δηλώνεται στην 1^η στήλη (Rank). Για όλες τις ουσίες η χορήγηση έχει γίνει για 24 ώρες.

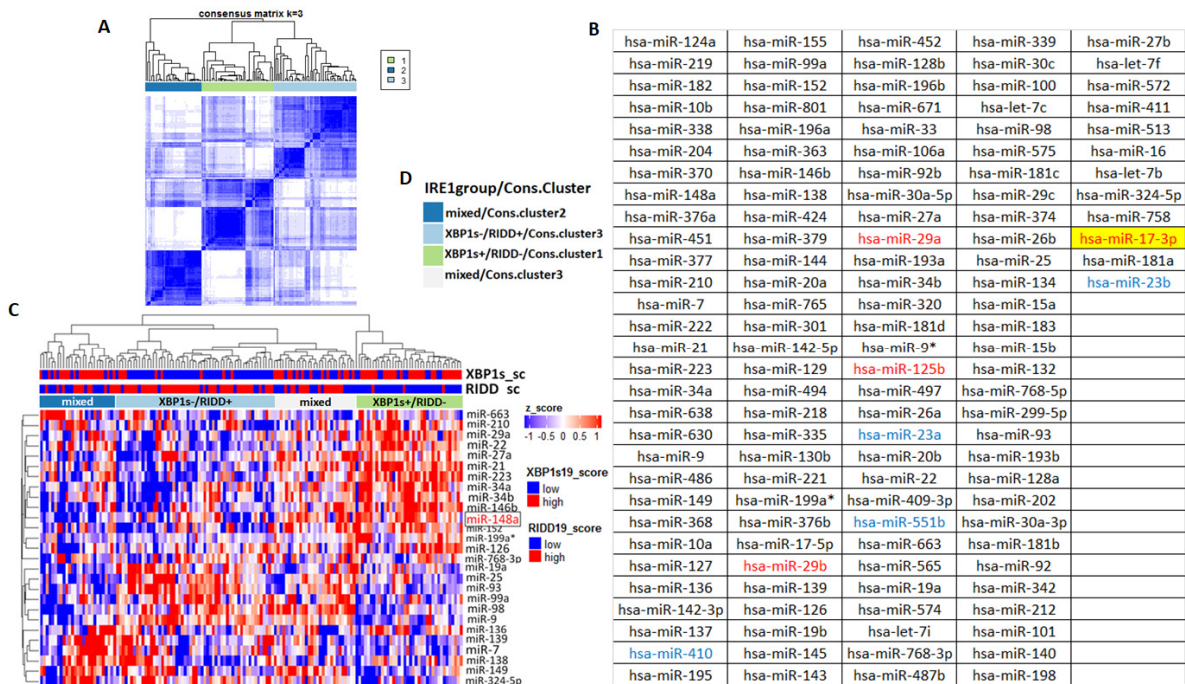
Οι κυτταρικές σειρές που αναδείχθηκαν ως κύρια μοντέλα μελέτης φαρμακευτικών ουσιών που επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων της υπογραφής αφορούν κυρίως στην κυτταρική σειρά για την μελέτη του καρκίνου του μαστού HME1, την κυτταρική σειρά του μελανώματος A375 και την κυτταρική σειρά του καρκίνου του πνεύμονα (αδενοκαρκίνωμα) A549. Πρόκειται δηλαδή για τρεις κυτταρικές σειρές με ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού περιγράφουν επιθετικούς τύπους καρκίνου, παρόμοιους με το GBM κυρίως όσον αφορά σε χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την επιθετικότητα του όγκου όπως είναι η έντονη

φλεγμονή, η ανοσολογική επιτήρηση από τους μη ειδικούς μηχανισμούς άμυνας, η αγγειογενετική δραστικότητα και η κυτταρική διήθηση/μεταστατικότητα. Χαρακτηριστικά τα οποία αναδείξαμε και εμείς μέσα από την μελέτη της IRE1 πρωτεΐνης η οποία φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη αυτών των τύπων καρκίνου. Σε χαμηλότερες θέσεις αποκαλύφθηκαν κυτταρικές σειρές με παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά που προαναφέραμε όπως η κυτταρική σειρά του καρκίνου του μαστού MCF7, η μεταστατική κυτταρική σειρά του καρκίνου του προστάτη PC3 καθώς και η κυτταρική σειρά του καρκίνου του ήπατος HEPG2. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι οι φαρμακευτικές ουσίες που αναδείχθηκαν αφορούν κυρίως σε σημαντικούς αναστολείς σηματοδοτικών μονοπατιών με κεντρικό ρόλο στην καρκινογένεση. Έτσι βλέπουμε να προκρίνονται οι αναστολείς του EGFR, της MEK κινάσης 1/2, του BRAFV600, της HDAC (Histone deacetylase), του 20S Πρωτεασώματος καθώς και η επιλεκτική αναστολή της JNK2/3.

3.1.12 Ταυτοποίηση ενός Εξαρτώμενου από την Δράση της IRE1 miRNA Δικτύου σε GBM Ασθενείς

Μετά την ταυτοποίηση του δικτύου των miRNAs που η δράση τους εξαρτάται από την IRE1 σηματοδοτική δραστικότητα, με άμεσο ή έμμεσο έλεγχο των επιπέδων έκφρασης της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38, όπως αποκαλύφθηκε με την ανάλυση των miRNAseq δεδομένων της GBM κυτταρικής σειράς U87, αναζητήσαμε τον εντοπισμό του αντίστοιχου δικτύου miRNAs σε επίπεδο GBM ασθενών. Για τον λόγο αυτό αναλύσαμε τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών (Agilent H-miR_8x15K/H-miR_8x15Kv2) της TCGA-GBM κοόρτης που είναι διαθέσιμα για μεγάλο αριθμό ασθενών (565 περιπτώσεις) ώστε να έχουμε αξιόπιστα αποτελέσματα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται λεπτομερώς στην Ενότητα 2.3.4. Συνοπτικά αναφέρουμε ότι οι κανονικοποιημένες και φιλτραρισμένες τιμές έκφρασης 132 ώριμων miRNAs (εκφρασμένες σε \log_2 RPM - reads per million) επιλέχθηκαν ως οι πιο μεταβαλλόμενες μεταξύ των δειγμάτων, από μια δεξαμενή 470 ώριμων miRNAs, που αφορούσαν σε 156 περιπτώσεις ασθενών, τους οποίους επιλέξαμε επειδή συνοδεύονταν και από RNAseq δεδομένα. Η επιλογή αυτών των 132 μορίων βασίστηκε στην κατάταξη των 470 miRNAs με βάση την διάμεση απόλυτη απόκλιση (Median absolute deviation - MAD) ενώ τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για έλεγχο του διαχωρισμού των ασθενών σε διαφορετικές ομάδες. Η συναινετική ιεραρχική ομαδοποίηση των 156 δειγμάτων και των 132 miRNAs με βάση το κριτήριο σύνδεσης Ward οδήγησε στην ταυτοποίηση τριών μοριακών υποτύπων με υψηλό συντελεστή συσχέτισης (κατά Spearman) με τις δύο κύριες κατηγορίες ασθενών, όπως προηγουμένως είχαν προκύψει με βάση την

εκτίμηση της IRE1 ενεργότητας (υψηλή, χαμηλή). (Ενότητα 2.3.4.1). Επίσης εφαρμόσαμε παλινδρόμηση Lasso (glmnet() –R) με σκοπό να περιορίσουμε ακόμη περισσότερο την διαστασιμότητα των δεδομένων και να αναδείξουμε εκείνα τα miRNAs που φαίνεται να είναι τα πιο αντιπροσωπευτικά για να περιγράψουν την μεταβλητότητα των δεδομένων μας. Από την διαδικασία αυτή προέκυψαν 27 miRNAs ιδιαίτερου ενδιαφέροντος τα οποία εξετάσαμε περαιτέρω γιατί αφενός συνδέονταν στενά με το προφίλ έκφρασης της IRE1 υπογραφής και αφετέρου γιατί υπάρχουν σημαντικά πειραματικά δεδομένα που τα συνδέουν με βασικά χαρακτηριστικά των GBM όγκων αλλά και άλλων επιθετικών μορφών καρκίνου όπως το κακοήθες μελάνωμα και ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού. Μεταξύ αυτών των miRNAs περιλαμβανόταν και το miR148a (με κόκκινο χρώμα στην Εικόνα 3.26), που φαίνεται να εμπλέκεται στον επαναπρογραμματισμό των διαφοροποιημένων κυττάρων σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα (CSCs - cancer stem cells) όπως θα δούμε στην επόμενη ενότητα.



Εικόνα 3.26. IRE1-εξαρτώμενο δίκτυο miRNAs σε GBM ασθενείς

(A) Ο συναινετικός πίνακας συσχέτισης των TCGA-GBM όγκων μετά την συναινετική ιεραρχική ομαδοποίηση των ασθενών με βάση το μεταγραφικό προφίλ των 132 πιο μεταβαλλόμενων στην έκφρασή τους ώριμων miRNAs. Με αριθμό συστάδων k=3 επιτεύχθηκε διαχωρισμός των δειγμάτων σε τρεις ομάδες με περιορισμένη επικάλυψη μεταξύ τους. Ο βαθμός συσχέτισης των δειγμάτων αναπαρίσταται με την χρωματική διαβάθμιση του μπλε χρώματος. Έντονο μπλε χρώμα υποδεικνύει ισχυρή συσχέτιση ενώ το λευκό χρώμα καθόλου συσχέτιση. (B) Πίνακας με τα 132 miRNAs που διαχωρίζουν τους GBM ασθενείς σε τρεις μοριακούς υπότυπους εξαρτώμενους από την δράση της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας. Με μπλε και κόκκινο χρώμα σημειώνονται τα ώριμα miRNAs που είχαν ταυτοποιηθεί ως μέλη της miRIDD και miRXP1s υπογραφής, αντίστοιχα, στα U87 κύτταρα. Με κίτρινο χρώμα σημειώνεται το miR-17 του οποίου την δράση αναλύσαμε διεξοδικά στην Ενότητα 3.1.8. (C) Θερμικός χάρτης της ιεραρχικής ομαδοποίησης των 156 TCGA-GBM ασθενών με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης των 27 ώριμων miRNAs που ευθύνονται κυρίως για την δημιουργία των τριών βασικών μοριακών υποτύπων που ανέδειξε η συναινετική ομαδοποίηση των ασθενών στο GBM. Στην κορυφή του χάρτη έντασης απεικονίζεται επίσης το XBP1s (XBP1s_sc ή XBP1s19_score) και RIDD σκορ (RIDD_sc ή RIDD19_score) για κάθε ασθενή έπειτα από

βαθμολόγηση της XBP1s και RIDD σηματοδοτικής ενεργότητας, αντίστοιχα, με βάση την υπογραφή IRE1sign38 (Ενότητα 2.3.4.1). Οι συστάδες ασθενών που περιλαμβάνουν όγκους υψηλής και χαμηλής IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας χαρακτηρίζονται ως «ανάμεικτες» (mixed). Ο χρωματισμός των ομάδων ασθενών έχει γίνει με βάση το χρωματικό πρότυπο του απεικονίζεται στο τμήμα D της εικόνας για να δηλωθεί επίσης ο αριθμός του γκρουπ (μοριακού υποτύπου) στον οποίο ανήκουν με βάση την συναινετική ομαδοποίηση. (D) Ο υπότυπος 1 (πράσινο, βλέπε A) περιλαμβάνει όγκους χαρακτηρισμένους σαν XBP1s+/RIDD-, ο υπότυπος 2 (σκούρο μπλε) περιλαμβάνει όγκους και από τις τέσσερις κατηγορίες ασθενών με βάση την XBP1s και RIDD ενεργότητα και ο υπότυπος 3 (ανοιχτό μπλε) περιλαμβάνει στην πλειονότητά του (> 70%) όγκους XBP1s-/RIDD+ και ένα μικρό ποσοστό από τις άλλες κατηγορίες.

3.1.13 Ανάδειξη του Ρόλου της IRE1 Πρωτεΐνης στον Επαναπρογραμματισμό των Διαφοροποιημένων Καρκινικών Κυττάρων σε Βλαστικά Κύτταρα

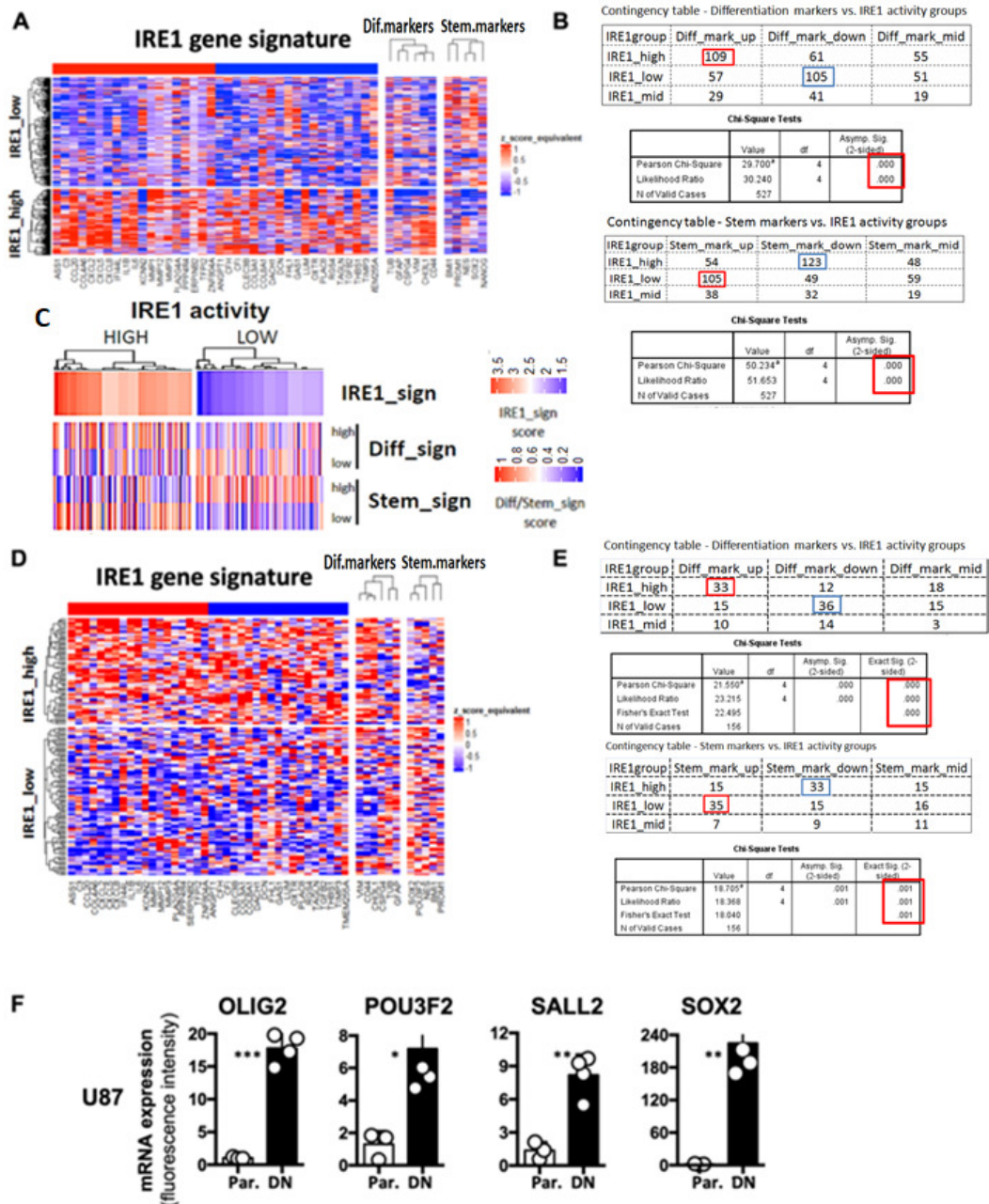
Όπως ήδη έχουμε αναφέρει στην εισαγωγή της διδακτορικής διατριβής (Ενότητα 1.3) ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του GBM που συνοδεύει την επιθετικότητά του είναι επίσης η επανεμφάνιση του όγκου (υποτροπή) μετά την χειρουργική αφαίρεση αλλά και η ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στις ιδιότητες των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (GSCs – Glioblastoma Stem Cells) και στη δυνατότητα επαναπρογραμματισμού των διαφοροποιημένων καρκινικών κυττάρων σε βλαστοκύτταρα (CCR - Cancer cell reprogramming), κάτι που βοηθά τα GBM κύτταρα να προσαρμοστούν σε ένα εχθρικό μικροπεριβάλλον [382]. Τα βασικά γενετικά χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν τα βλαστικού τύπου καρκινικά κύτταρα από τα διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα αφορούν κυρίως στην έκφραση της νεστίνης (nestin/νευροεπιθηλιακή πρωτεΐνη των βλαστοκυττάρων), έναν σημαντικό βιοδείκτη παράλληλα με το SOX2 για τα βλαστικά κύτταρα [383] και το GFAP, VIM και YKL40 για τα διαφοροποιημένα [384].

Αξίζει να αναφερθεί ότι η νεστίνη έχει δείχθει ότι υπερεκφράζεται σε GBM κύτταρα που εκφράζουν την κυρίαρχη αρνητική παραλλαγή της IRE1 (IRE1-DN) [218]. Εντούτοις, παρόλο που τα GBM κύτταρα υπόκεινται σε αυξημένες μεταβολικές ανάγκες, υποξικό στρες, επιταχυνόμενα γεγονότα του κυτταρικού κύκλου αλλά και σε διαφοροποίηση των GSCs και επαναπρογραμματισμό, ξεπερνούν αυτά τα είδη στρες εν μέρει μέσω της IRE1 σηματοδότησης [251], η οποία προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα επιθετικά χαρακτηριστικά που περιλαμβάνουν α) την προ-ογκογονική αναδιαμόρφωση του στρώματος του όγκου με κύτταρα του ανοσοποιητικού και ενδοθηλιακά κύτταρα και β) χαρακτηριστικά αυξημένης μετανάστευσης/εισβολής [179] όπως έχουμε ήδη δείξει. Από την άλλη πλευρά, η στόχευση της RNάσης ενεργότητας της IRE1 επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη του όγκου λόγω παρεμπόδισης των προ-ογκογονικών κυτταρικών μηχανισμών που εξαρτώνται κυρίως από την δράση του άξονα IRE1-XBP1s που εμπλέκεται στην εισβολή, την ανάπτυξη και την αγγείωση του όγκου[113, 115].

Εφόσον η IRE1 και ο μεταγραφικός παράγοντας-στόχος της, XBP1s, έχει δειχθεί ότι παίζουν κυρίαρχους ρόλους στην κυτταρική διαφοροποίηση [385] και εμπλέκονται στην ανάπτυξη του GBM, υποθέσαμε ότι η IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα μπορεί να συνεισφέρει στην ρύθμιση της κυτταρικής βλαστοκυτταρικότητας του GBM όγκου και έτσι διερευνήσαμε τον αντίκτυπο της αναστολής της δράσης της IRE1 στην κατάσταση διαφοροποίησης των GBM κυττάρων, με την προϋπόθεση ότι ο επαναπρογραμματισμός συμβάλλει στην αντοχή έναντι της αντί-νεοπλασματικής θεραπείας και στην υποτροπή της νόσου μέσω των καρκινικών βλαστικών κυττάρων.

Αρχικά για να ελέγξουμε την εν δυνάμει εξάρτηση των δεικτών διαφοροποίησης και βλαστοκυτταρικότητας από την σηματοδοτική δράση της IRE1, ανατρέξαμε στο μεταγράφημα ασθενών της TCGA-GBM κοόρτης και αναλύσαμε ξεχωριστά τόσο τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών (527 περιπτώσεις) όσο και τα RNAseq δεδομένα (156 περιπτώσεις). Συγκεκριμένα αποτυπώσαμε το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της IRE1 υπογραφής (IRE1sign38) στους ασθενείς, αξιολογήσαμε την IRE1, XBP1s και RIDD σηματοδοτική ενεργότητα με βάση το σύστημα αξιολόγησης της Ενότητας 2.3.4.1 και στη συνέχεια προβάλλαμε τα επίπεδα mRNA για δύο γονιδιακές υπογραφές που χαρακτηρίζουν την διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων (Δ.Β.Κ) (VIM, CD44, CHI3L1, CSPG4, TUB, SMA, YKL40, GFAP) και την βλαστοκυτταρικότητα (BK) (SOX2, POU3F2, NES, PROM1, POU5F1, CD133, BMI1). Από την συσχέτιση των διαφορετικών ομάδων ασθενών με βάση την IRE1 ενεργότητα και τα επίπεδα έκφρασης των δεικτών Δ.Β.Κ και BK βρήκαμε ότι οι δείκτες BK υπερεκφράζονταν σε GBM όγκους με χαμηλή IRE1 ενεργότητα ενώ οι δείκτες Δ.Β.Κ ήταν υποεκφρασμένοι. Το αντίστροφο ακριβώς πρότυπο έκφρασης ακολουθούσαν οι όγκοι με αυξημένη IRE1 ενεργότητα (**Εικόνα 3.27A-E**). Το πρότυπο αυτό ήταν περισσότερο αντιπροσωπευτικό κυρίως στην περίπτωση των δεικτών BK BMI1, CD133, και nestin και των δεικτών διαφοροποίησης SMA, vimentin και YKL40 (Figure 1B, [386]). Τα ευρήματα αυτά μας ώθησαν να υποθέσουμε ότι η IRE1 θα μπορούσε να παίζει έναν αιτιώδη ρόλο στην διατήρηση του φαινοτύπου διαφοροποίησης των καρκινικών βλαστοκυττάρων. Στη συνέχεια ελέγξαμε εάν η IRE1 ενεργότητα θα μπορούσε να επηρεάσει την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων (TFs) που εμπλέκονται στην CCR του GBM. Ως εκ τούτου, παρατηρήσαμε ότι οι σχετιζόμενοι με την BK TFs ήταν σημαντικά μειωμένοι στην έκφρασή τους σε GBM όγκους με υψηλή IRE1 ενεργότητα (Figure 1C, [386]). Μεταξύ αυτών ξεχώρισαν οι μεταγραφικοί παράγοντες OLIG2, POU3F2, SALL2 και SOX2 (Figure 1D, [386]). Για να τεκμηριώσουμε περαιτέρω αυτό το φαινόμενο ελέγξαμε κατά πόσο οι παρατηρήσεις μας επαληθεύονται σε διαφορετικές GBM κυτταρικές σειρές.

Για τον σκοπό αυτό, εκμεταλλευτήκαμε τις κοινές διαθέσιμες κυτταρικές σειρές U251 και U87 καθώς και τις πρωτογενείς GBM κυτταρικές σειρές RADH87 και RADH85 [270] (Ενότητα 2.3.2.1) που είχαν τροποποιηθεί γενετικά στο Ινστιτούτο INSERM για την IRE1. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει κάποιες από αυτές εκφράζαν την κυρίαρχη αρνητική παραλλαγή (DN) [115] ή τον μεταλλαγμένο τύπο στο κατάλοιπο Q780 (Q*) [179], που και στις δύο περιπτώσεις χάνεται οποιαδήποτε ενεργότητα ριβονουκλεάσης. Έτσι, παρατηρήσαμε μια αξιοσημείωτη αύξηση στην έκφραση των OLIG2, POU3F2, SALL2 και SOX2 στις κυτταρικές σειρές που στερούνταν την IRE1 δράση σε σχέση με τα κύτταρα πατρικής προέλευσης (**Εικόνα 3.27F**) ή εκείνα που υπερέκφραζαν την WT IRE1 (Figure 1E [386]). Επομένως επιβεβαιώσαμε ότι η συσχέτιση της υψηλής IRE1 ενεργότητας με το χαμηλό επίπεδο έκφρασης των παραγόντων επαναπρογραμματισμού στους GBM όγκους των ασθενών, λαμβάνει χώρα και σε κοινά κυτταρικά μοντέλα αλλά και σε πρωτογενείς GBM κυτταρικές σειρές.



Εικόνα 3.27. Η IRE1 ενεργότητα σχετίζεται με την κατάσταση διαφοροποίησης των GBM καρκινικών κυττάρων

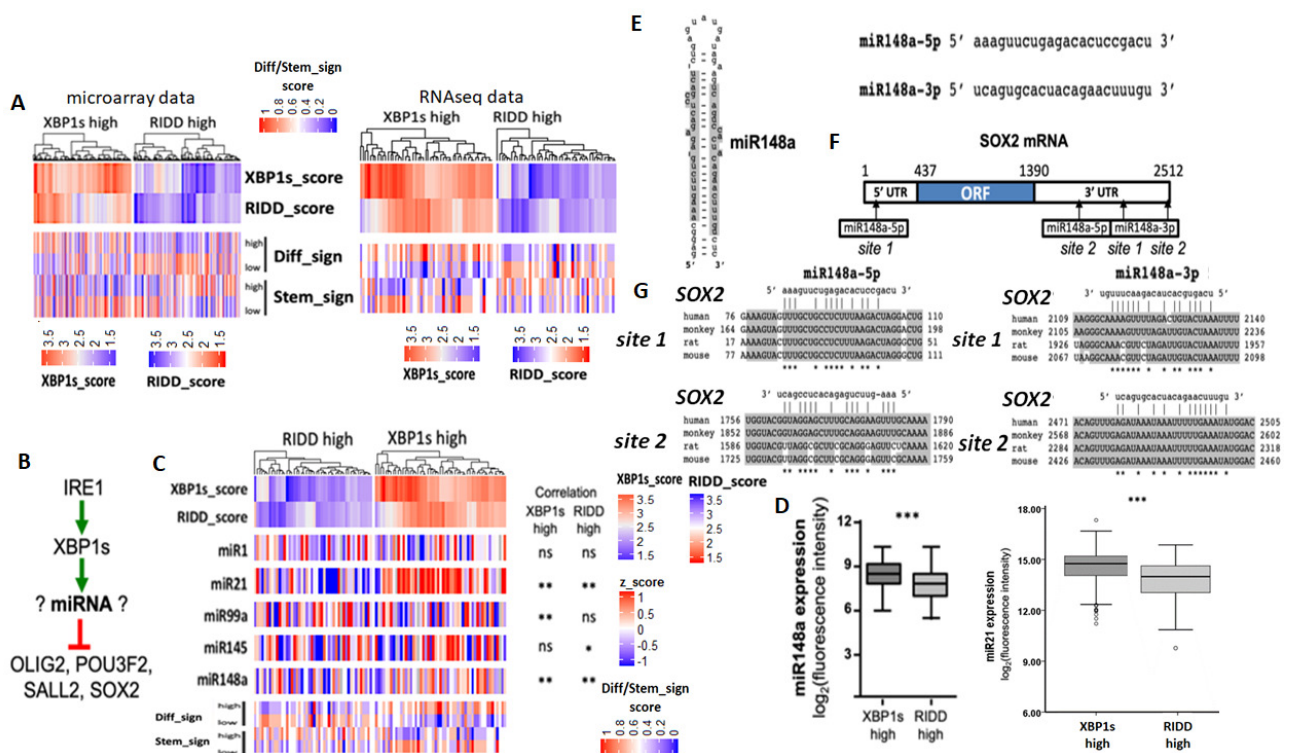
Διερευνητική ανάλυση μεταγραφικών δεδομένων της IRE1 γονιδιακής υπογραφής (IRE1sign38) σε σχέση με τα mRNA επίπεδα έκφρασης γονιδίων που χαρακτηρίζουν την διαφοροποίηση (Δ.Β.Κ) και την βλαστοκυτταρικήτητα (BK) των καρκινικών βλαστικών GBM κυττάρων της TCGA-GBM κοόρτης ασθενών. Κανονικοποιημένες τιμές έκφρασης της μικροσυστοιχίας Affymetrix U133 (527 περιπτώσεις) και σταθμισμένες ανα γονίδιο τιμές log₂CPM από RNAseq δεδομένα (156 περιπτώσεις) αναλύθηκαν για το μεταγραφικό τους προφίλ. Α) Θερμικός χάρτης μη-επιβλεπόμενης ιεραρχικής ομαδοποίησης των ασθενών της TCGA-GBM κοόρτης (μικροσυστοιχίες) χρησιμοποιώντας την πλήρη σύνδεση κατά Pearson, συσχετίζοντας το μεταγραφικό προφίλ της IRE1sign38 με τα επίπεδα έκφρασης των δεικτών διαφοροποίησης (Dif.markers) και βλαστοκυτταρικότητας (Stem.markers). Η XBP1s συνιστώσα της υπογραφής αντιπροσωπεύεται με κόκκινο χρώμα ενώ η RIDD συνιστώσα με μπλε. Β) Πίνακες συνάφειας της κατανομής των διαφορετικών ομάδων με βάση την εκτίμηση της IRE1 ενεργότητας (ομάδες στις γραμμές) σε σχέση με την κατανομή των ασθενών σε ομάδες διαφορετικής ενεργότητας ως προς την έκφραση των δεικτών Δ.Β.Κ και BK (ομάδες στις στήλες), αντίστοιχα. Η ομαδοποίηση των ασθενών με βάση την έκφραση των Δ.Β.Κ και BK έγινε με βάση το σκορ εμπλουτισμού « Diff/Stem_sign score». Το τελευταίο εκφράζει το ποσοστό των υπέρ- (ή υπό-εκφρασμένων) δεικτών Δ.Β.Κ ή BK σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των δεικτών Δ.Β.Κ ή BK των υπογραφών που εξετάστηκαν, αντίστοιχα. Κάθε δείκτης Δ.Β.Κ ή BK σημειώθηκε ως υπέρ- ή υπό-εκφρασμένος όταν η έκφρασή του στο δείγμα ήταν μεγαλύτερη ή μικρότερη από την διάμεση τιμή έκφρασης του γονιδίου στην

κοόρτη. Η κατάσταση «Mid» αντιπροσωπεύει την ίση κατανομή ανάμεσα στα υπό- και υπέρ-εκφρασμένα γονίδια της υπογραφής. Chi-square (χ^2) τεστ υποθέσεων ανεξαρτησίας πραγματοποιήθηκαν για να διερευνηθούν την ύπαρξη ή μη σχέσης ανάμεσα στην IRE1 ενεργότητα και την ενεργότητα των δεικτών Δ.Β.Κ και ΒΚ. Η τιμή στατιστικής σημαντικότητας p -value κάθε στατιστικού ελέγχου περικλείεται σε κόκκινο πλαίσιο C) Θερμικός χάρτης ιεραρχικής ομαδοποίησης των TCGA-GBM ασθενών με βάση το σκορ της IRE1 ενεργότητας όπως προέκυψε κατόπιν αξιολόγησης των συνιστωσών XBP1s και RIDD (Ενότητα 2.3.4.1) για κάθε GBM όγκο. Η ομαδοποίηση αυτή απεικονίστηκε σε αντιπαραβολή με το σκορ εμπλουτισμού των δεικτών Δ.Β.Κ και ΒΚ. Τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν με βάση την ευκλείδεια απόσταση και την σύνδεση (linkage) Ward.D2. D) Θερμικός χάρτης μη-επιβλεπόμενης ιεραρχικής ομαδοποίησης των ασθενών της TCGA-GBM κοόρτης (RNAseq) χρησιμοποιώντας την πλήρη σύνδεση κατά Pearson, συσχετίζοντας το μεταγραφικό προφίλ της IRE1sign38 με τα επίπεδα έκφρασης των δεικτών διαφοροποίησης (Dif.markers) και βλαστοκυτταρικότητας (Stem.markers). E) Πίνακες συνάφειας της κατανομής των διαφορετικών ομάδων των TCGA-GBM-RNAseq με βάση την εκτίμηση της IRE1 ενεργότητας (ομάδες στις γραμμές) σε σχέση με την κατανομή των ασθενών σε ομάδες διαφορετικής ενεργότητας ως προς την έκφραση των δεικτών Δ.Β.Κ και ΒΚ (ομάδες στις στήλες). Για τον στατιστικό έλεγχο της σύγκρισης πραγματοποιήθηκε και Fisher's Exact Test εξαιτίας του μικρού αριθμού των περιπτώσεων. Η τιμή στατιστικής σημαντικότητας p -value <0.0001 και p -value <0.001 δηλώνεται ως .000 and .001, αντίστοιχα, από το στατιστικό πρόγραμμα SPSS. F) Επίπεδα έκφρασης του mRNA των μεταγραφικών παραγόντων (TFs) που εμπλέκονται στον επαναπρογραμματισμό των καρκινικών κυττάρων στα U87 κύτταρα που εκφράζουν την κυρίαρχη αρνητική παραλλαγή της IRE1 σε σχέση με τα κύτταρα πατρικής σειράς.

Στη συνέχεια, έχοντας υπόψη μας τον διττό ρόλο της IRE1 RNάσης υπομονάδας στο GBM, ελέγξαμε κατά πόσο η έκφραση των δεικτών διαφοροποίησης και βλαστοκυτταρικότητας σχετίζεται με την XBP1s ή/και την RIDD σηματοδοτική ενεργότητα. Έτσι, μετά την αξιολόγηση των κύριων συνιστωσών της IRE1sign38 υπογραφής στους ασθενείς της TCGA-GBM κοόρτης, ελέγξαμε την συσχέτιση της δράσης των δύο αξόνων με τα επίπεδα έκφρασης των δεικτών Δ.Β.Κ και ΒΚ. Με τον τρόπο αυτό βρήκαμε ότι οι όγκοι που εμφάνιζαν αυξημένη XBP1s σηματοδοτική ενεργότητα συνοδεύονταν από χαμηλά επίπεδα έκφρασης των δεικτών ΒΚ και υψηλά επίπεδα για τους δείκτες Δ.Β.Κ. **(Εικόνα 3.28A)**. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και από την μέτρηση των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων όπως των δεικτών ΒΚ BMI1, CD133 και NES (nestin) οι οποίοι δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους όγκους με υψηλή XBP1s και RIDD ενεργότητα ενώ οι δείκτες Δ.Β.Κ SMA, VIM (vimentin) και YKL40 ήταν στατιστικά σημαντικά υποεκφρασμένοι στους RIDD high όγκους σε σχέση με τους XBP1s high (Figure 5B, [386]). Η παρατήρηση αυτή μας οδήγησε να υποθέσουμε ότι η XBP1s ενεργότητα και όχι η RIDD πιθανόν είναι ο περιοριστικός παράγοντας που διατηρεί τον διαφοροποιημένο GBM κυτταρικό φαινότυπο. Στη συνέχεια, ελέγχοντας την έκφραση 15 γονιδίων που εμπλέκονται στον επαναπρογραμματισμό, στους XBP1s high ή RIDD high όγκους, μπορέσαμε να διακρίνουμε ότι οι παράγοντες επαναπρογραμματισμού ήταν υποεκφρασμένοι στους TCGA-GBM όγκους με υψηλή XBP1s ενεργότητα (Figure 5C, [386]). Όταν συγκρίθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των OLIG2, POU3F2, SALL2 και SOX2 προέκυψαν επίσης στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα (Figure 5D, [386]).

Στη συνέχεια, επιδιώξαμε να εντοπίσουμε τον παράγοντα διαμεσολάβησης μεταξύ της επαγωγής του XBP1s και της υποέκφρασης των TFs του επαναπρογραμματισμού και

υποθέσαμε ότι αυτοί οι παράγοντες μπορεί να είναι μόρια miRNA (Εικόνα 3.28B, [387]). Ήδη από την ταυτοποίηση του δικτύου των IRE1-εξαρτώμενων miRNAs στους TCGA-GBM όγκους (Ενότητα 3.1.12) είχαμε αναδείξει κάποια υποψήφια μόρια των οποίων η έκφραση εξαρτιόταν ισχυρά από τον άξονα σηματοδότησης IRE1-XBP1s. Μεταξύ αυτών, η μεγαλύτερη έκφραση σε όγκους με υψηλή XBP1s ενεργότητα αφορούσε στο miR-21 και το miR-148a. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι το miR-148a είχε αναγνωριστεί προηγουμένως ως μεταγραφικός στόχος του XBP1s με ανοσοκατακρήμνιση χρωματινής [388] ενώ μέσω ανάλυσης της αλληλουχίας του είχαμε εντοπίσει ισχυρές πιθανές θέσεις πρόσδεσης του miR148a στο SOX2 (Εικόνα 3.28E-G).



Εικόνα 3.28. Η συμμετοχή του XBP1s στον GBM κυτταρικό επαναπρογραμματισμό και ο ρόλος του miR148a

(A) Θερμικός χάρτης ιεραρχικής ομαδοποίησης των GBM όγκων της TCGA-GBM κοόρτης (δεδομένα μικροσυστοιχιών και RNAseq δεδομένα) με βάση την υψηλή ενεργότητα του XBP1s και της RIDD σε συνάρτηση με το σκορ εμπλουτισμού των υπέρ- και υπό-εκφρασμένων γονιδίων που εμπλέκονται στην διαφοροποίηση και την βλαστοκυτταρικότητα στο GBM (μπλε: μειωμένο ποσοστό υπέρ- ή υπό-εκφρασμένων δεικτών Δ.Β.Κ ή ΒΚ, κόκκινο: αυξημένο ποσοστό υπέρ- ή υπό-εκφρασμένων δεικτών Δ.Β.Κ ή ΒΚ). Η υψηλή XBP1s και RIDD ενεργότητα αναπαριστάται με κόκκινο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα. (B) Σχηματική αναπαράσταση του υποθετικού μοντέλου επίδρασης της IRE1 σηματοδότησης στον επαναπρογραμματισμό των μεταγραφικών παραγόντων. (C) Θερμικός χάρτης ιεραρχικής ομαδοποίησης των TCGA-GBM όγκων με βάση την υψηλή ενεργότητα του XBP1s (κόκκινο) και της RIDD (μπλε) σε συνάρτηση με τα 5 προκρινόμενα IRE1-εξαρτώμενα miRNA μόρια. Στη βάση του χάρτη απεικονίζεται και το σκορ εμπλουτισμού των δεικτών Δ.Β.Κ και ΒΚ. Η στατιστική σημαντικότητα της συσχέτισης κατά Pearson των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των υποψήφιων miRNAs με την υψηλή XBP1s και RIDD ενεργότητα καταγράφεται στα δεξιά του χάρτη. ns: μη στατιστικά σημαντική συσχέτιση, *: στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε επίπεδο σημαντικότητας 0.05 (ετερόπλευρη ανάλυση), **: στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε επίπεδο σημαντικότητας 0.01 (ετερόπλευρη ανάλυση). (D) Επίπεδα έκφρασης mRNA του miR148a και miR21 στους όγκους υψηλής XBP1s και RIDD ενεργότητας με βάση τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών της TCGA-GBM κοόρτης. (E) Δευτεροταγή δομή (δομή φουρκέτας) του πρόδρομου μορίου miR-148a και οι ακολουθίες των

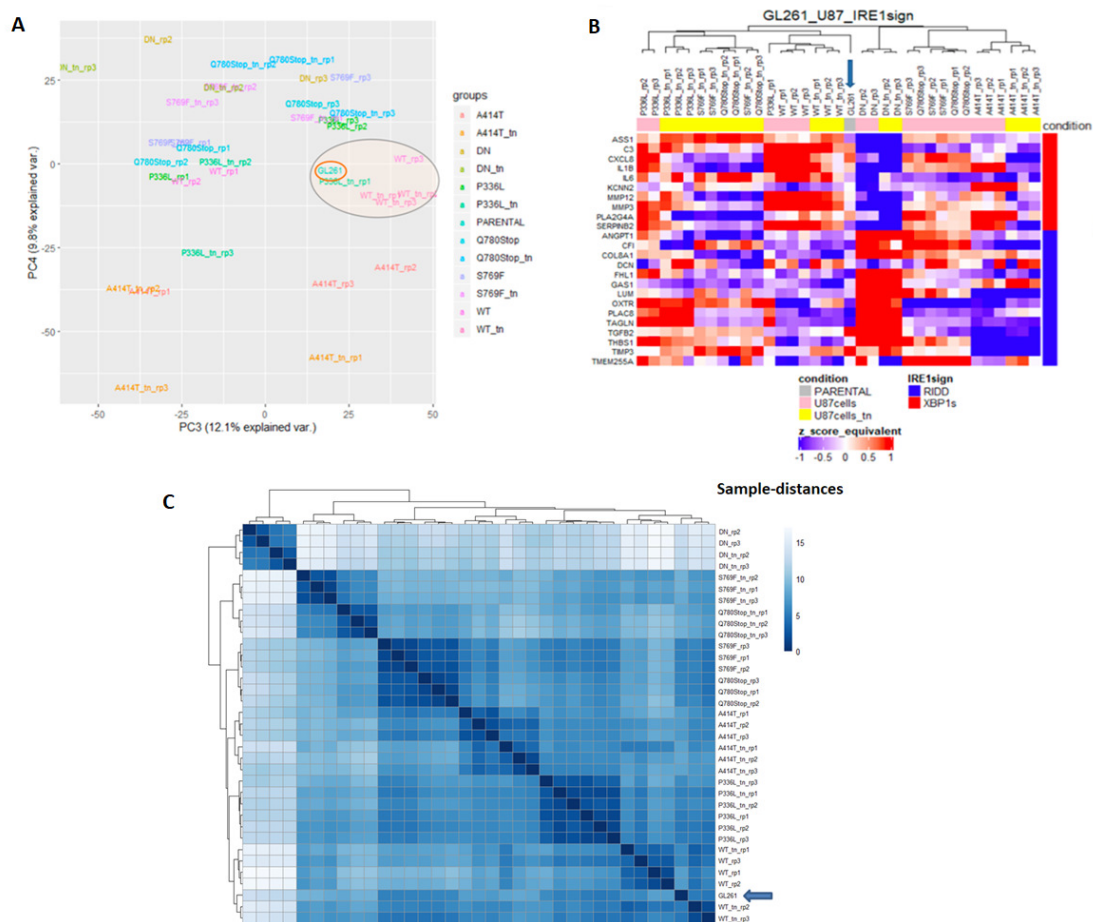
ώριμων 5' και 3' βραχιόνων (κλώνων) του. F) Χαρτογράφηση του SOX2 μεταγράφου όπου σημειώνονται οι πιθανές θέσεις πρόσδεσης των 5' και 3' βραχιόνων του miR-148a. Δύο θέσεις πρόσδεσης εντοπίστηκαν για κάθε βραχίονα, με τον 5' κλώνο να μπορεί να συνδεθεί και στην 5' και 3' UTR του SOX2 mRNA ενώ ο 3' κλώνος μπορεί να υβριδοποιηθεί με δύο περιοχές της 3' UTR. G) Πολλαπλή στοίχιση των τεσσάρων περιοχών υβριδοποίησης του SOX2 και του miR-148a (βλέπε F) στον άνθρωπο, την μαϊμού, τον αρουραίο και τον ποντικό. Με * σημειώνονται οι θέσεις της στοίχισης όπου υπήρχε πλήρης ομολογία (ταυτόσημα κατάλοιπα).

3.1.14 Πιστοποίηση της Κυτταρικής Σειράς GBM του Ποντικού GL261 ως Ανάλογου Μοντέλου του GBM στον Άνθρωπο για *in vivo* Μελέτες

Αφού προηγουμένως είχαμε δείξει ότι η ενεργοποίηση της IRE1 σηματοδότησης (μέσω κυρίως του IRE1-XBP1s άξονα) συνδέεται με την επιθετικότητα στο GBM που την χαρακτηρίζουν η προσέλκυση ανοσοκυττάρων στην περιοχή του όγκου, η προαγωγή της φλεγμονής, η αγγειογένεση και η μετανάστευση/διήθηση των καρκινικών κυττάρων, σκεφτήκαμε ότι ένα ανάλογο *in vivo* GBM μοντέλο ποντικού θα έπρεπε: α) να χρησιμοποιεί GBM κύτταρα που να εμφανίζουν υψηλή IRE1 ενεργότητα, β) να είναι ανοσοεπαρκές και γ) να μπορεί να υφίσταται θεραπείες παρόμοιες με το πρωτόκολλο θεραπειών που εφαρμόζεται στους ανθρώπους. Για αυτό και ο πρώτος μας στόχος ήταν να ταυτοποιήσουμε μια GBM κυτταρική σειρά ποντικού η οποία θα μπορούσε να προσομοιάσει τις αντίστοιχες GBM κυτταρικές σειρές του ανθρώπου. Για τον σκοπό αυτό διερευνήσαμε την κατάσταση ενεργοποίησης του σηματοδοτικού άξονα της IRE1 στην κυτταρική σειρά του ποντικού GL261. Συγκρίναμε την ποντικίσια σειρά με την ανθρώπινη U87 ως προς τις διάφορες μεταλλαγμένες καταστάσεις της IRE1, τόσο σε βασικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες στρες Ε.Δ. με το αντιβιοτικό τουνικαμυκίνη (**Εικόνα 3.29**) [257]. Αρχικά, χαρτογραφήσαμε και συγκρίναμε με μεθόδους ιεραρχικής ομαδοποίησης το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της υπογραφής IRE1sign38 στους U87 κυτταρικούς κλώνους (GSE107859) α) αγρίου τύπου U87-MG, β) μεταλλαγμένων IRE1 κλώνων (A414T, P336L, Q780Stop, S769F) και γ) κυρίαρχου αρνητικού κλώνου IRE1-DN, με το αντίστοιχο προφίλ έκφρασης της ποντικίσιας GL261 πατρικής κυτταρικής σειράς. Επειδή όμως τα μεταγραφικά δεδομένα της U87 κυτταρικής σειράς και των παραλλαγών της αφορούσαν σε δεδομένα μικροσυστοιχιών ενώ της GL261 σε RNAseq δεδομένα εφαρμόσαμε κανονικοποίηση (ομαλοποίηση) στις σταθμισμένες τιμές έκφρασης των γονιδίων μεταξύ των διαφορετικών πλατφορμών (cross-platform harmonization). Για την διαδικασία αυτή εκτελέστηκε στο περιβάλλον Rstudio, ο αλγόριθμος Shambhala με χρήση της συνάρτησης «HARMONY» (<https://github.com/oncobox-admin/harmony>) για ένα κοινό σύνολο 6546 γονιδίων που ταυτοποιήθηκαν μεταξύ των δύο πλατφορμών (Affymetrix microarrays και Illumina RNAseq). Ακολούθησε εκτίμηση της IRE1

σηματοδοτικής ενεργότητας σε κάθε κυτταρικό κλώνο και αξιολογήθηκε η ΧΒΡ1s και RIDD συνιστώσα ξεχωριστά.

Μέσω της ανάλυσης κύριων συνιστωσών στους χαρακτηρισμένους με βάση την IRE1 ενεργότητα κλώνους αποκαλύψαμε ότι η κυτταρική σειρά GL261 ομαδοποιείται μαζί με την U87, η οποία υπερεκφράζει την αγρίου τύπου IRE1 ή την μεταλλαγμένη μορφή P336L (στην οποία η IRE1 είναι συστηματικά ενεργοποιημένη) (Ενότητα 3.1.8) τόσο σε βασικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες στρες Ε..Δ. με τουνικαμυκίνη (tn), γεγονός που υποδεικνύει ότι η IRE1 σηματοδότηση θα μπορούσε να είναι συστηματικά ενεργοποιημένη στα GL261 κύτταρα όπως προηγουμένως είχε παρατηρηθεί στις ανθρώπινες GBM κυτταρικές σειρές (**Εικόνα 3.29A**). Επίσης με μεθόδους ιεραρχικής ομαδοποίησης επιβεβαιώσαμε ότι τα GL261 κύτταρα εκδηλώνουν ένα προφίλ ενεργοποίησης της IRE1 παρόμοιο με εκείνο των ΧΒΡ1+/RIDD+ κυττάρων όπως προκύπτει από την σύγκριση της ΧΒΡ1s και RIDD σηματοδοτικής τους δράσης με τις αντίστοιχες των ανθρώπινων U87 κυττάρων (**Εικόνα 3.29B και C**).



Εικόνα 3.29. Επιλογή της GL261 κυτταρικής σειράς ως κυτταρικού μοντέλου-αναλόγου της U87 για έλεγχο της αναστολής της IRE1 σηματοδότησης στο GBM

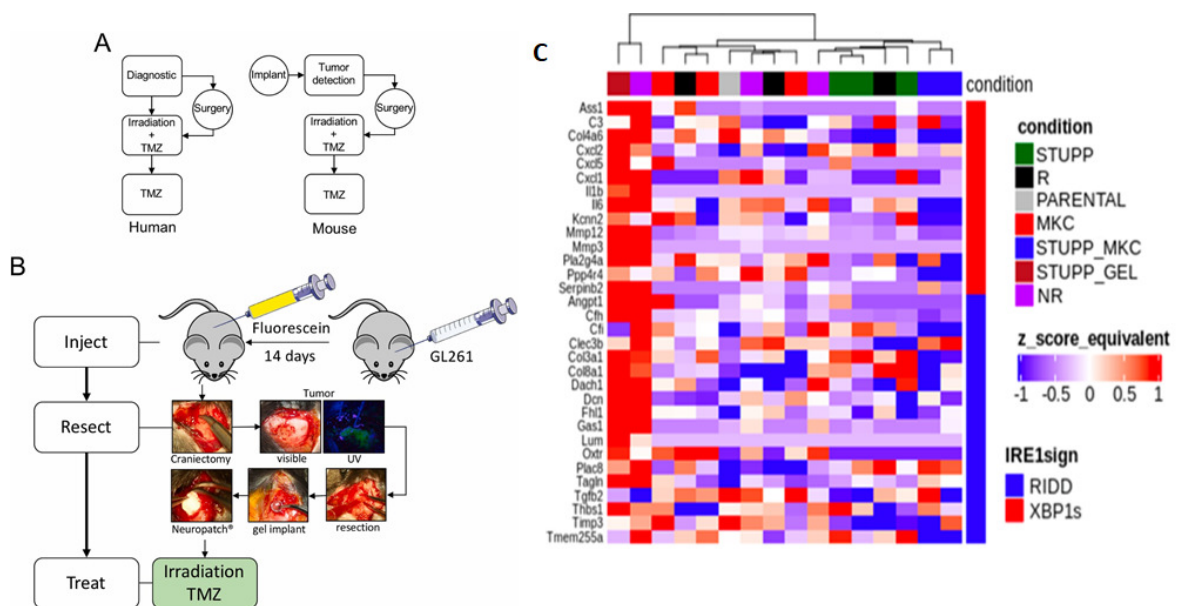
(A) Γράφημα της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA) του μεταγραφικού προφίλ έκφρασης των διαφορετικών ως προς την έκφραση παραλλαγών της IRE1, U87 κλώνων και της ποντικίσιας GBM κυτταρικής σειράς GL261. Σύνολο

δειγμάτων/κυτταρικών σειρών που βρίσκονται σε κοντινές θέσεις μεταβάλλονται ομόρροπα πάνω σε κοινές συστατώσεις, αποτυπώνοντας τα επίπεδα ομοιότητάς τους. (B) Θερμικός χάρτης ιεραρχικής ομαδοποίησης των διαφορετικών κυτταρικών σειρών U87 και GL261 με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της υπογραφής IRE1sign38. Επειδή στα ποντίκια δεν υπάρχουν γονίδια δομικά ομόλογα των ανθρώπινων γονιδίων CXCL8 και MMP1, χρησιμοποιήθηκαν τα λειτουργικά ομόλογα γονίδια Cxcl1, Mmp1a & Mmp1b [257, 389, 390]. Η στατιστική σημαντικότητα των δένδρογραμμάτων ομαδοποίησης αξιολογήθηκε με bootstrapping κάνοντας χρήση του πακέτου της R rpvclust. (C) Πίνακας απόστασης των δειγμάτων/κυτταρικών σειρών με βάση τον συντελεστή συσχέτισης pearson από την σύγκριση της XBP1s και RIDD σηματοδοτικής τους ενεργότητας και ιεραρχική ομαδοποίησή τους χρησιμοποιώντας την ευκλείδεια απόσταση ανάμεσα στα δείγματα με ελαχιστοποίηση της συνολικής εντός της συστάδας διασποράς κατά Ward (ward.D2). Για την ομαδοποίηση εφαρμόσαμε την συνάρτηση της R rheatmap(). Με μπλε βέλος σημειώνεται η κυτταρική σειρά του ποντικού GL261.

3.1.15 Η Συνδυασμένη Θεραπεία του STUPP Πρωτοκόλλου μαζί με τον Αναστολέα της IRE1 Πρωτεΐνης MKC8866 Ενισχύει τον Περιορισμό του Καρκινικού Όγκου

Εξαιτίας της έλλειψης ενός προκλινικού μοντέλου στα ποντίκια που να προσομοιώνει την όλη διαχείριση του GBM σε ασθενείς, στο Ινστιτούτο INSERM σκεφτήκανε να αναπτύξουν ένα νέο μοντέλο που θα συνδύαζε την χειρουργική αφαίρεση με την ακτινο/χημειοθεραπεία παρόμοια με το κλινικό πρωτόκολλο που εφαρμόζεται στον άνθρωπο **(Εικόνα 3.30A)**. Έτσι σχεδιάσανε ένα πειραματικό πρωτόκολλο που βασίζεται στην GBM κυτταρική σειρά του ποντικού GL261 **(Εικόνα 3.30B)** την οποία προηγουμένως τροποποίησαν για να εκφράζει σταθερά το ένζυμο της λουσιφεράσης προκειμένου να μπορούν να απεικονίσουν ζωντανά τον όγκο (live tumor imaging). Τα κύτταρα στη συνέχεια εγχύθηκαν ορθοτοπικά στον εγκέφαλο των ποντικών και αφέθηκαν να αναπτυχθούν 12–13 ημέρες. Στη τέλος της φάσης ανάπτυξης, ακολούθησε χειρουργική αφαίρεση του όγκου με χρήση φλουορεσκεΐνης (ιχνηθέτης του όγκου) σε κάποια ποντίκια (R: resected tumors), ενώ κάποια άλλα δεν χειρουργήθηκαν για να αποτελέσουν ποντίκια-μάρτυρες (NR: no resected tumors). Η κενή κοιλότητα που σχηματίστηκε με την αφαίρεση του όγκου καλύφθηκε με μια γέλη (gel) ινώδους-κολλαγόνου που είτε εμποτίστηκε με τον αναστολέα της IRE1 RNάσης MKC8866 (MKC) είτε τοποθετήθηκε χωρίς τον αναστολέα (GELL). Τα χειρουργημένα ποντίκια αφέθηκαν να επανέλθουν σε φυσιολογικούς ρυθμούς από την επέμβαση για 1 εβδομάδα και στη συνέχεια ακολουθήθηκε το θεραπευτικό πρωτόκολλο Stupp σε κάποια από τα NR ποντίκια (STUPP), σε κάποια MKC ποντίκια (STUPP_MKC) και στα ποντίκια που τους τοποθετήθηκε μόνο το gel (STUPP_GELL). Μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας τα ποντίκια θυσιάστηκαν όταν εμφανίστηκαν τα πρώτα κρίσιμα κλινικά ευρήματα ή παρατηρήθηκε απώλεια βάρους >15% **(Εικόνα 3.30B)**. Οι όγκοι του εγκεφάλου αφαιρέθηκαν και ένα μέρος τους διαχωρίστηκε σε κύτταρα τα οποία αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια για να απομονωθούν κυτταρικές σειρές προερχόμενες από την GL261. Οι διαφορετικές κυτταρικές σειρές με βάση τις θεραπείες που είχαν λάβει οι αντίστοιχοι όγκοι χρησιμοποιήθηκαν για RNA-Seq

αλληλούχιση (Ενότητα 2.3.2.1). Από την ανάλυση των RNAseq δεδομένων (Ενότητα 2.3.2.1) εκτιμήσαμε τα επίπεδα μεταγραφικής έκφρασης της υπογραφής IRE1sign38 για τις 7 διαφορετικές πειραματικές συνθήκες (Εικόνα 3.30C) και παρατηρήσαμε ότι: α) η STUPP_GEL κυτταρική σειρά εμφάνιζε έντονη IRE1/XBP1s δραστικότητα πιθανόν λόγω στρες από την γέλη που χρησιμοποιήθηκε, β) η συνδυασμένη θεραπεία του Stupp πρωτοκόλλου μαζί με τον αναστολέα της IRE1 πρωτεΐνης MKC8866 ενίσχυσε την σίγαση της IRE1 πρωτεΐνης βελτιώνοντας τα θεραπευτικά αποτελέσματα που επέφεραν μεμονωμένα το πρωτόκολλο Stupp ή ο αναστολέας MKC8866, γ) η R σειρά εμφάνιζε ήπια προς εξασθενημένη κατάσταση ενεργοποίησης του άξονα IRE1/XBP1s σε σχέση με την NR όπου ένα δείγμα της εμφάνιζε υψηλή ενεργοποίηση, γεγονός που μπορεί να συνδέει την κατάσταση ενεργοποίησης της IRE1 με το χρονικό διάστημα που έγινε η χειρουργική αφαίρεση του όγκου και δ) η πατρική σειρά GL261 παρουσίαζε ένα παρόμοιο προφίλ έκφρασης με την NR. Εντούτοις πρέπει να σημειωθεί ότι τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν περιορισμένα για κάποιες πειραματικές συνθήκες ενώ ο τεχνικός θόρυβος ήταν δύσκολο να περιοριστεί σημαντικά σε μια τόσο επίπονη, χρονοβόρα και πολύπλοκη διαδικασία. Επομένως θα χρειαστεί περαιτέρω διερεύνηση για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 3.30. Δημιουργία νέου GBM συγγενικού προκλινικού μοντέλου και αξιολόγηση της IRE1 ενεργότητας στις προερχόμενες από την GL261 κυτταρικές σειρές, έπειτα από την εφαρμογή *in vivo* θεραπειών

(A) Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού σχεδιασμού που εφαρμόστηκε και σύγκριση μεταξύ του GBM θεραπευτικού μοντέλου στον άνθρωπο και τον ποντικό. Β) Σχηματική αναπαράσταση του συγγενικού προκλινικού μοντέλου ποντικού με τα 3 βασικά βήματα που περιλάμβαναν «έγχυση» (Inject) των GL261 κυττάρων (ορθοτοπική προσέγγιση), 14-ημέρες μετά «χειρουργική αφαίρεση» (Resect) του όγκου με χρήση σήμανσης με φλουορεσκεΐνη και τελικά «θεραπεία» (Treat) με εφαρμογή του ανάλογου του Stupp θεραπευτικού πρωτοκόλλου. (C) Θερμικός χάρτης ιεραρχικής ομαδοποίησης των προερχόμενων από την GL261 κυτταρικών σειρών με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της υπογραφής IRE1sign38 (κόκκινο: XBP1s συνιστώσα, μπλε: RIDD συνιστώσα), για τις 7 διαφορετικές πειραματικές συνθήκες με βάση τις θεραπείες που έλαβαν οι όγκοι προέλευσης. NR: όγκοι χωρίς

χειρουργική αφαίρεση, R: όγκοι που αφαιρέθηκαν πριν την εφαρμογή κάποιας θεραπείας, MKC: όγκοι με θεραπεία με τον αναστολέα MKC8866, STUPP: όγκοι που τους εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο Stupp, STUPP_MKC: όγκοι που τους εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο Stupp σε συνδυασμό με τον MKC8866 αναστολέα, PARENTAL: GL261 κύτταρα της πατρικής σειράς, STUPP_GELL: όγκοι που τους εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο Stupp σε συνδυασμό με εμφύτευση γέλης ινώδους-κολλαγόνου χωρίς τον MKC8866 αναστολέα.

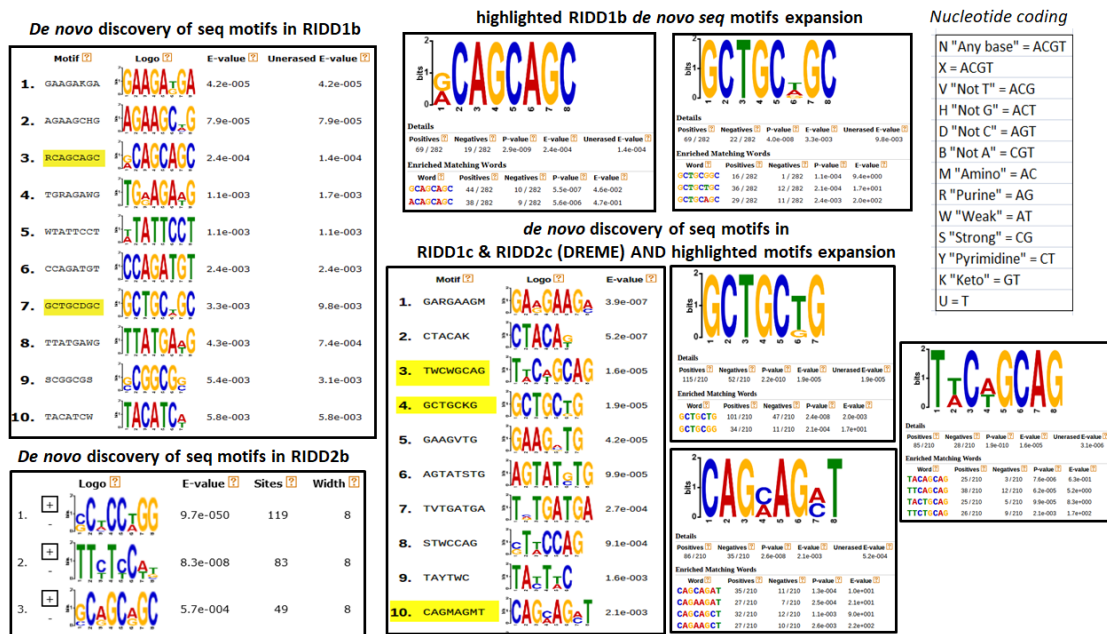
3.2 Αποκρυπτογράφηση των Νουκλεοτιδικών/Δομικών Μοτίβων Αναγνώρισης για IRE1 Αποκοπή σε Υποψήφιους (mi)RIDD Στόχους

Μετά την ανάδειξη των *in vitro* υποψήφιων RIDD στόχων που ταυτοποιήθηκαν μέσα από μεθοδολογίες εναλλακτικού ματίσματος και ανάλυσης μικροσυστοιχιών (Ενότητα 2.3.1.3.1 και 3.1.3), αλλά και των 19 *in cellulo* γονιδίων της RIDD συνιστώσας της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38 (Ενότητα 3.1.1), προσπαθήσαμε να αναζητήσουμε νουκλεοτιδικά μοτίβα αλληλουχιών, ανάλογα του ομόφωνου εξανουκλεοτιδικού μοτίβου 5'-[CUGCAG]-3' κοψίματος από την IRE1, το οποίο απαντά στο μη-ματισμένο XBP1u mRNA μετάγραφο και που θα μπορούσαν αυτές οι περιοχές να αποτελέσουν θέσεις νουκλεολυτικής δράσης για την RNάση ενεργότητα της IRE1 πρωτεΐνης. Η προσέγγιση αυτή θα μας επέτρεπε σε σημαντικό βαθμό να εκτιμήσουμε ποσοτικά την IRE1-RIDD ενεργότητα με έναν πιο άμεσο τρόπο, σε άμεση συνάρτηση με την χωροχρονική «συγκέντρωση» των υποψήφιων για προσβολή από την IRE1 RNάση υπομονάδα υποστρωμάτων. Επειδή όμως η «συγκέντρωση» αυτή είναι άμεσα εξαρτώμενη της πρωτοταγούς και δευτεροταγούς δομής των περιοχών αναγνώρισης των RNA μεταγράφων, προσπαθήσαμε αρχικά να ταυτοποιήσουμε νουκλεοτιδικά και δομικά μοτίβα 2ταγούς RNA δομής που θα μπορούσαν να αποτελέσουν υποψήφιες περιοχές για την νουκλεολυτική δράση της IRE1.

3.2.1 Προσδιορισμός *de novo* Νουκλεοτιδικών Μοτίβων στους Υποψήφιους RIDD Στόχους

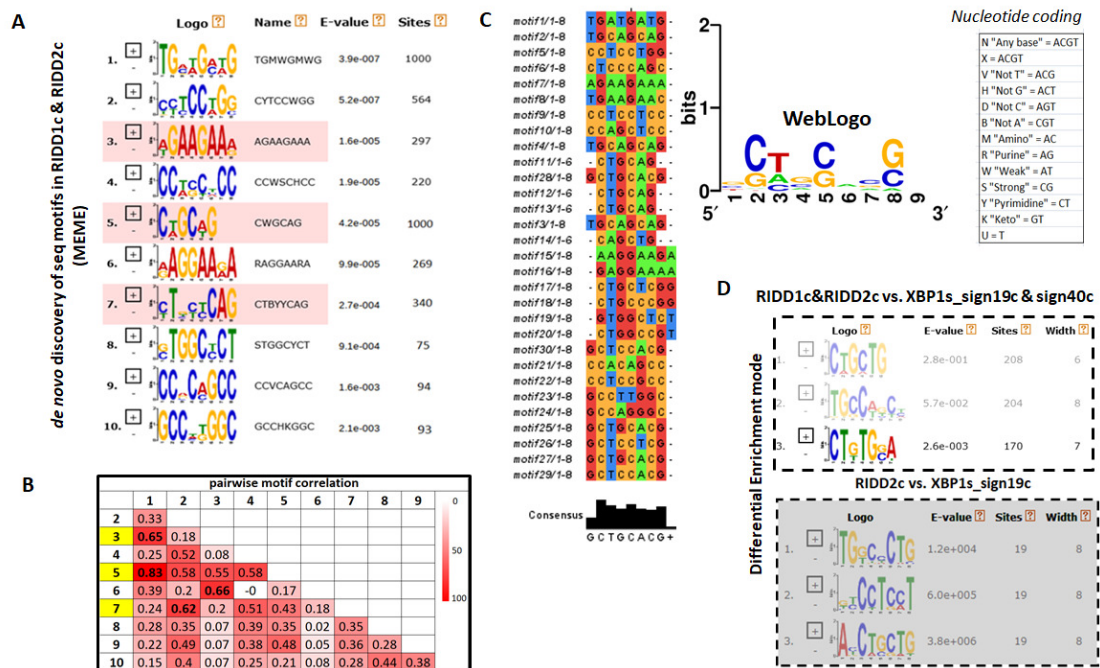
Η *de novo* αναζήτηση νουκλεοτιδικών μοτίβων στις υποψήφιες RIDD cDNA νουκλεοτιδικές ακολουθίες (RIDD1b, RIDD1c, RIDD2b και RIDD2c) (Ενότητα 2.3.6) (**Εικόνα 3.31** και **Εικόνα 3.32**) ανέδειξε νουκλεοτιδικά μοτίβα, ανάλογα του 5'-[CUGCAG]-3' μοτίβου αναγνώρισης από την IRE1 στην μη ματισμένη μορφή του XBP1 (XBP1u), τα οποία εντοπίζονταν σε πολλές διαφορετικές θέσεις κατά μήκος των RNA μεταγράφων. Εάν εξαιρέσουμε νουκλεοτιδικά μοτίβα με υψηλού βαθμού πλεονασμό (redundancy) που στερούνταν σημαντικό πληροφοριακό περιεχόμενο (π.χ. GAAGAGGA, TATTCCT, GCGGCGG κ.λ.π), τα μοτίβα που προκρίνονταν εμφάνιζαν μια συντήρηση καταλοίπων σε συγκεκριμένες θέσεις. Συγκεκριμένα, είχαμε την συνήθη παρουσία ενός ισχυρού (strong κατά IUPAC)

καταλοίπου G ή C που το ακολουθούσε συνήθως ένα «αδύναμο» (weak κατά IUPAC) νουλεοτίδιο (T/U ή A) ενώ στις θέσεις 3 και 4 υπήρχε κυρίως το δινουκλεοτίδιο CG, GG, GC ή CC. Στη συνέχεια (θέση 5) είχαμε συνήθως την εμφάνιση T/U ή A (και σε μικρότερο βαθμό το G) ενώ στην 6^η θέση κυριαρχούσε το νουκλεοτίδιο της γουανίνης (G). Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι την περίπτωση της αναζήτησης *de novo* μοτίβων στα RIDD μετάγραφα (RIDD2b και 2c) της υπογραφής IRE1sign38 είχαμε την κυριαρχία του μοτίβου [CG]C[TA]CC[TA]GG σε όλα σχεδόν τα μετάγραφα (119 sites) το οποίο επίσης βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με το CUGCAG μοτίβο. Σημαντική επίσης ήταν η παρουσία του νουκλεοτιδικού μοτίβου CAGCAGC, το οποίο και αυτό παρουσίαζε την περιοδικότητα των καταλοίπων που ήδη αναφέραμε. Όταν εφαρμόσαμε τον αλγόριθμο MEME στο σύνολο των RIDD1c και RIDD2c ακολουθιών (Εικόνα 3.32) επαναλήφθηκε το ίδιο μοτίβο αποτελεσμάτων ενώ η ανα δύο σύγκριση των νουκλεοτιδικών μοτίβων (πίνακας συσχέτισης) ανέδειξε την υψηλή συσχέτιση μεταξύ τριών νουκλεοτιδικών μοτίβων (>0.6) που αποτελούν ανάλογα του CUGCAG εξανουκλεοτιδίου. Έτσι μετά από την πολλαπλή στοίχιση των υποψήφιων 6-8 νουκλεοτιδικών ακολουθιών που συνέβαλλαν στην κατασκευή των μοτίβων που χαρακτηρίζουν τους RIDD στόχους, παρατηρήσαμε την ύπαρξη ενός ομόφωνου (consensus) μοτίβου ανάλογου του CUGCAG. Αξιοσημείωτο ήταν επίσης το γεγονός ότι παρόμοια νουκλεοτιδικά μοτίβα εντοπίστηκαν και στους δυνητικά ΧBP1s στόχους ενώ δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση με τα αντίστοιχα μοτίβα των RIDD στόχων όταν οι cDNA ακολουθίες των ΧBP1s στόχων χρησιμοποιήθηκαν ως ακολουθίες-μάρτυρες (control) (Εικόνα 3.32).



Εικόνα 3.31. Ταυτοποίηση *de novo* νουκλεοτιδικών μοτίβων σε υποψήφιες cDNA RIDD ακολουθίες

Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα της *de novo* αναζήτησης νουκλεοτιδικών μοτίβων 6-8 νουκλεοτιδίων στις *cDNA* ακολουθίες των *RIDD1b*, *RIDD2b* και *RIDD1c*, *RIDD2c* με τον αλγόριθμο MEME και DREME [353, 355, 391]. Τα νουκλεοτιδικά μοτίβα απεικονίζονται με λογότυπα (logos) όπου οι στήλες των γραμμάτων υπολογίζονται με βάση τις εξισώσεις των Schneider και Stephens [392] προσαρμοσμένες στο πρότυπο του webLogo [393]. Η τιμή «E-value» στην περίπτωση των *RIDD1b* ακολουθιών (DREME output) αντιστοιχεί στην τιμή *p-value* (P-value) της ανάλυσης εμπλουτισμού (Fisher's Exact Test) του αντίστοιχου μοτίβου στο σύνολο των ακολουθιών που εντοπίστηκε (θετικές ακολουθίες-positives), επί τον αριθμό των υποψηφίων μοτίβων που δοκιμάστηκαν. Λάβετε υπόψη ότι οι μετρήσεις που χρησιμοποιούνται στο Fisher's Exact Test γίνονται μετά τη διαγραφή θέσεων που εντοπίστηκαν μοτίβα που είχαν θρεθεί προηγουμένως. Ενώ η μη διορθωμένη τιμή «Unperased E-value» αντιστοιχεί στην τιμή *p-value* χωρίς την διαγραφή των θέσεων που προηγουμένως είχαν εντοπιστεί μοτίβα. Όμως η τιμή E-value στην περίπτωση των *RIDD2b* ακολουθιών (MEME output) βασίζεται στον έλεγχο του λόγου πιθανοφαινών (log likelihood ratio), λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των νουκλεοτιδίων του μοτίβου, τον αριθμό των θέσεων που εμφανίζεται, τις συχνότητες εμφάνισης υποβάθρου των νουκλεοτιδίων, καθώς και το μέγεθος του συνόλου εκπαίδευσης (training set/ακολουθίες εισόδου). Η παράμετρος «Sites» δηλώνει τον αριθμό των θέσεων που συνέβαλλαν στην κατασκευή του μοτίβου. Στην αναπτυγμένη μορφή (expansion) απεικόνισης των νουκλεοτιδικών μοτίβων που σημειώνονται με κίτρινο χρώμα η παράμετρος «positives» (θετικές ακολουθίες) εκφράζει τον λόγο του αριθμού των θετικών ακολουθιών για το αντίστοιχο μοτίβο προς τον συνολικό αριθμό των ακολουθιών που εξετάστηκαν. Αντίστοιχα, οι «αρνητικές» (negatives) ακολουθίες εκφράζουν τον λόγο του αριθμού των αρνητικών ακολουθιών (δεν εντοπίστηκε το αντίστοιχο μοτίβο) προς τον συνολικό αριθμό των ακολουθιών που εξετάστηκαν. Στον πίνακα «nucleotide coding» απεικονίζεται ο συμβολισμός των νουκλεοτιδίων κατά IUPAC.



Εικόνα 3.32. Ταυτοποίηση *de novo* νουκλεοτιδικών μοτίβων στο σύνολο των *RIDD1c* και *RIDD2c* μεταγράφων και δημιουργία συναινετικού (consensus) μοτίβου

(A) Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα της *de novo* αναζήτησης νουκλεοτιδικών μοτίβων 6-8 νουκλεοτιδίων στις *cDNA* ακολουθίες των *RIDD1c* και *RIDD2c* με τον αλγόριθμο MEME. Τα σημειωμένα με ροζ χρώμα νουκλεοτιδικά μοτίβα παρουσιάζουν υψηλού βαθμού συσχέτιση μεταξύ τους (βλέπε πίνακα B). (B) Πίνακας συσχέτισης των *de novo* νουκλεοτιδικών μοτίβων ανα δύο. Ο δείκτης συσχέτισης ανάμεσα σε δύο μοτίβα που καταγράφεται στον πίνακα B αντιστοιχεί στο μέγιστο άθροισμα των συντελεστών συσχέτισης του Pearson για τις στοιχισμένες στήλες κατά την ευθυγράμμιση, διαιρεμένου με το μήκος του μικρότερου μοτίβου. Η μέγιστη τιμή υπολογίστηκε από όλες τις πιθανές στοιχίσεις μεταξύ των δύο μοτίβων. (C) Πολλαπλή στοιχίση (ClustalW) των νουκλεοτιδικών περιοχών που συνέβαλλαν στην κατασκευή των νουκλεοτιδικών μοτίβων της εικόνας (A) και απεικόνιση του συναινετικού μοτίβου. Η οπτικοποίηση και ο χρωματισμός των νουκλεοτιδίων της πολλαπλούς στοιχίσης έγινε με το λογισμικό Jalniew [394] ενώ το χρωματισμένο logo του συναινετικού μοτίβου στα δεξιά της εικόνας κατασκευάστηκε με το εργαλείο WebLogo. (D) Αποτελέσματα από την συγκριτική αναζήτηση (differential enrichment mode) *de novo* νουκλεοτιδικών μοτίβων που υπέρ-αντιπροσωπεύονται στους *RIDD* στόχους σε σχέση με τις αλληλουχίες των μεταγράφων των *XBP1s* υποψηφίων στόχων (*XBP1s_sign19* και *XBP1s_sign40*). Ο λευκός και γκρι

«εξασθενημένος» χρωματισμός απεικονίζει μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα, δηλαδή μοτίβα που ήταν παρόντα και στα δύο σύνολα ακολουθιών που εξετάστηκαν.

3.2.2 Εντοπισμός Νουκλεοτιδικών Παραλλαγών του Εξανουκλεοτιδίου 5’-[CUGCAG]-3’ στους Υποψήφιους RIDD Στόχους

Στη συνέχεια πραγματοποιήσαμε την στοχευμένη αναζήτηση του εξανουκλεοτιδίου 5’-[CUGCAG]-3’ στις ακολουθίες των υποψήφιων RIDD μεταγράφων-στόχων ώστε να επιβεβαιώσουμε αφενός τα προηγούμενα αποτελέσματα αλλά και να εκτιμήσουμε ακόμη περισσότερο τον βαθμό εμπλουτισμού του συγκεκριμένου μοτίβου αναδεικνύοντας πιθανές παραλλαγές του που συμμετέχουν στα *de novo* ταυτοποιημένα νουκλεοτιδικά μοτίβα. Τα αποτελέσματα της αναζήτησης αυτής ανέδειξαν την παρουσία του εξανουκλεοτιδίου σε ποσοστά που κυμαίνονταν μεταξύ του 77%-79% ενώ οι πιο παρόμοιες εκδοχές του αφορούσαν στις CTGCGG, CTGCCG και CTGCTG με την τελευταία να είναι παρούσα σε όλα σχεδόν τα μετάγραφα αλλά και να εμφανίζει το υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης ανακολουθία.

Scan for CUGCAG-like motif in RIDD1b					Scan for CUGCAG-like motif in RIDD2b				
Motif	Number of motif sites	Number of genes	pValue (<0.001)	%Enrichment_genes	Motif	Number of motif sites	Number of genes	pValue (<0.001)	%Enrichment_genes
CTGCAG	405	148	0.000195	148/193 (76.68%)	CTGCAG	27	15	0.000195	15/19 (78.95%)
CTGCGG	96	62	0.00069	62/193 (32.12%)	CTGCGG	9	6	0.00069	6/19 (31.58%)
CTGCCG	81	56	0.00069	56/193 (29.02%)	CTGCCG	6	5	0.00069	5/19 (26.32%)
CTGCTG	431	149	0.00069	149/193 (77.20%)	CTGCTG	44	15	0.00069	15/19 (78.95%)

Scan for CUGCAG-like motif in RIDD2c				
Motif	Number of motif sites	Number of Transcripts (genes)	pValue (<0.001)	%Enrichment_genes
CTGCAG	27	15	0.000195	15/19 (78.95%)
CTGCGG	9	6	0.00069	6/19 (31.58%)
CTGCCG	6	5	0.00069	5/19 (26.32%)
CTGCTG	44	15	0.00069	15/19 (78.95%)

Scan for CUGCAG-like motif in RIDD1c & RIDD2c				
Motif	Number of motif sites	Number of Transcripts (genes)	pValue (<0.001)	%Enrichment_genes
CTGCAG	429	163	0.000195	163/210 (77.62%)
CTGCGG	104	68	0.00069	68/210 (32.38%)
CTGCCG	85	60	0.00069	60/210 (28.57%)
CTGCTG	470	162	0.00069	162/210 (77.14%)

Εικόνα 3.33. Αναζήτηση του 5’-CUGCAG-3’ μοτίβου στις ακολουθίες των RIDD μεταγράφων-στόχων

Στους πίνακες απεικονίζονται συνοπτικά τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα της αναζήτησης του εξανουκλεοτιδίου 5’-CUGCAG-3’ στις cDNA ακολουθίες των υποψήφιων RIDD μεταγράφων-στόχων με τον αλγόριθμο FIMO (Ενότητα 2.3.6). Οι τέσσερις εκδοχές του εξανουκλεοτιδίου που διακρίνονται καταγράφονται στην στήλη «Motif». Στη στήλη «Number of genes» καταγράφεται ο αριθμός των γονιδίων στα οποία εντοπίστηκαν τα αντίστοιχα ολιγονουκλεοτίδια. Ο αριθμός αυτός ταυτίζεται με τον αριθμό των μεταγράφων (transcripts) όταν το κάθε γονίδιο αντιπροσωπευόταν από ένα μόνο μετάγραφο. Η στατιστική σημαντικότητα αλλά και το ποσοστό των γονιδίων στα οποία εντοπίστηκε το αντίστοιχο εξανουκλεοτίδιο σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των γονιδίων που εξετάστηκαν περιλαμβάνονται στις στήλες «pValue» και «%Enrichment_genes», αντίστοιχα. Με κόκκινο απεικονίζονται οι παραλλαγές του CUGCAG μοτίβου που εμφανίστηκαν με την μεγαλύτερη συχνότητα δηλαδή αφενός εντοπιζόνταν σε πολλές θέσεις κατά μήκος των ακολουθιών και αφετέρου ήταν παρούσες στην πλειονότητα των μεταγράφων.

3.2.3 Ταυτοποίηση των Δομικών Μοτίβων 2ταγούς RNA Δομής που Εντοπίζονται τα Νουκλεοτιδικά Μοτίβα Αναγνώρισης για Αποκοπή από την IRE1 Πρωτεΐνη

Το γεγονός ότι τα νουκλεοτιδικά μοτίβα που αναδείχθηκαν στους RIDD στόχους ήταν παρόντα και στους XBP1s στόχους προξένησε το εύλογο ερώτημα: «Ποιο είναι το κριτήριο με το οποίο η IRE1 επιλέγει να κόψει συγκεκριμένα RNA μετάγραφα ενώ δεν εκδηλώνει την νουκλεολυτική της δράση σε μετάγραφα που φέρουν τις ίδιες ή παρόμοιες ακολουθίες;». Έτσι, οδηγηθήκαμε στην υπόθεση εργασίας ότι η διαφορική επιλεκτική δράση θα μπορούσε να εξηγείται σε δομικό επίπεδο δηλαδή από το είδος των δομικών μοτίβων της 2ταγούς RNA δομής (**Εικόνα 2.18**) στα οποία εντοπίζονται τα συγκεκριμένα νουκλεοτιδικά μοτίβα που αναγνωρίζει η IRE1 πρωτεΐνη. Για τον σκοπό αυτό εφαρμόσαμε την ροή εργασίας που περιγράφεται στην Ενότητα 2.3.6 δηλαδή αρχικά υλοποιήσαμε τον αλγόριθμο ολικής αναδίπλωσης των RNA μεταγράφων, RNAfold, σε ακολουθίες μέγιστου μήκους 500 νουκλεοτιδίων με επικάλυψη 20 νουκλεοτιδίων στα άκρα τους, αποκλείοντας μετάγραφα με μέγεθος >10.000 νουκλεοτίδια, ώστε να περιοριστεί ο βαθμός πλεονασμού και να υπάρχει μεγαλύτερη αξιοπιστία στα αποτελέσματά μας, μιας και μεγαλύτερου μεγέθους ακολουθίες δυσχεραίνουν σημαντικά την ασφαλή πρόγνωση. Στη συνέχεια, στις «διαιρεμένες» ακολουθίες των RIDD μεταγράφων αναζητήσαμε νουκλεοτιδικά μοτίβα 6-8 νουκλεοτιδίων που να βρίσκονται σε αζευγάρωτη κατάσταση μέσω του αλγορίθμου MEMERIS, ο οποίος συχνά χρησιμοποιείται για την πρόγνωση θέσεων σύνδεσης RNA σε πρωτεΐνες. Η διερεύνησή μας επικεντρώθηκε στις μονόκλωνες περιοχές λόγω του γεγονότος ότι η σύνδεση των περισσότερων πρωτεϊνών που προσδένονται σε RNA (RBPs), επιλέγουν περιοχές του RNA μορίου που είναι αζευγάρωτες γιατί εμφανίζουν μεγαλύτερη κινητικότητα/ευκαμψία (flexibility) και είναι περισσότερο προσβάσιμες [395, 396]. Από την ανάλυση αυτή παρατηρήσαμε ότι για σχετικά χαμηλές τιμές του pi (pseudocount) (0.01-0.5) (ώστε να διατηρηθεί σχετικά υψηλά ο δείκτης μέσης αζευγάρωτης κατάστασης) υπήρχε μια υπεραντιπροσώπηση μοτίβων σε μονόκλωνες περιοχές, με χαμηλό σχετικά πληροφοριακό περιεχόμενο του τύπου [CA][AT]GAAG ή [GC][AC]AGAA (τα κατάλοιπα με έντονο μαύρο χρώμα είχαν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης), αλλά αναδεικνύονταν και εξανουκλεοτίδια αναλογα του CUGCAG με συχνότητα εμφάνισης που κυμαινόταν περίπου στο 50-60% (**Εικόνα 3.34**).

RIDD1b [1230 splitted Transcripts in total]

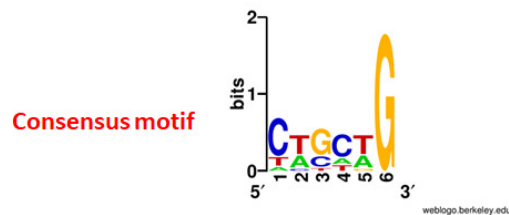
Motifs	width of motif (maxw)	P-value	number of motifs (nmotifs)	Total number of transcripts [unique] (secstruct > 0.6)	Total number of genes (secstruct > 0.6)
[GC][AC]AGAA	6	4.37E-04 - 4.78E-02	3	270 [119]	191 [119]
CT[GC]C[TA]G	6	1.68E-04 - 4.71E-02	3	270 [23]	191 [23]
T[CG]C[AT]G[AG]	6	2.49E-04 - 4.99E-02	3	270 [44]	191 [44]

[pseudocount (pi): 0.5] [mode:oops]

RIDD1c + RIDD2c [1147 splitted Transcripts in total]

motifs	width of motif (maxw)	P-value	number of motifs (nmotifs)	Total number of transcripts/genes [unique] (secstruct >= 0.5)
C[TA]GC[TA]G	6nts	1.71E-04 - 3.23E-02	5	210[22]
[CA][AT]GAAG	6nts	3.30E-04 - 4.84E-02	5	210[114]
[CT][TC][CT]TGG	6nts	1.71E-04 - 4.74E-02	5	210[21]
[CA]AG[AT]TG	6nts	2.72E-04 - 4.63E-02	5	210[42]
[CT]T[CT]C[AT]G	6nts	1.57E-04 - 4.03E-02	5	210[39]

[pseudocount (pi): 0.5] [mode:oops]

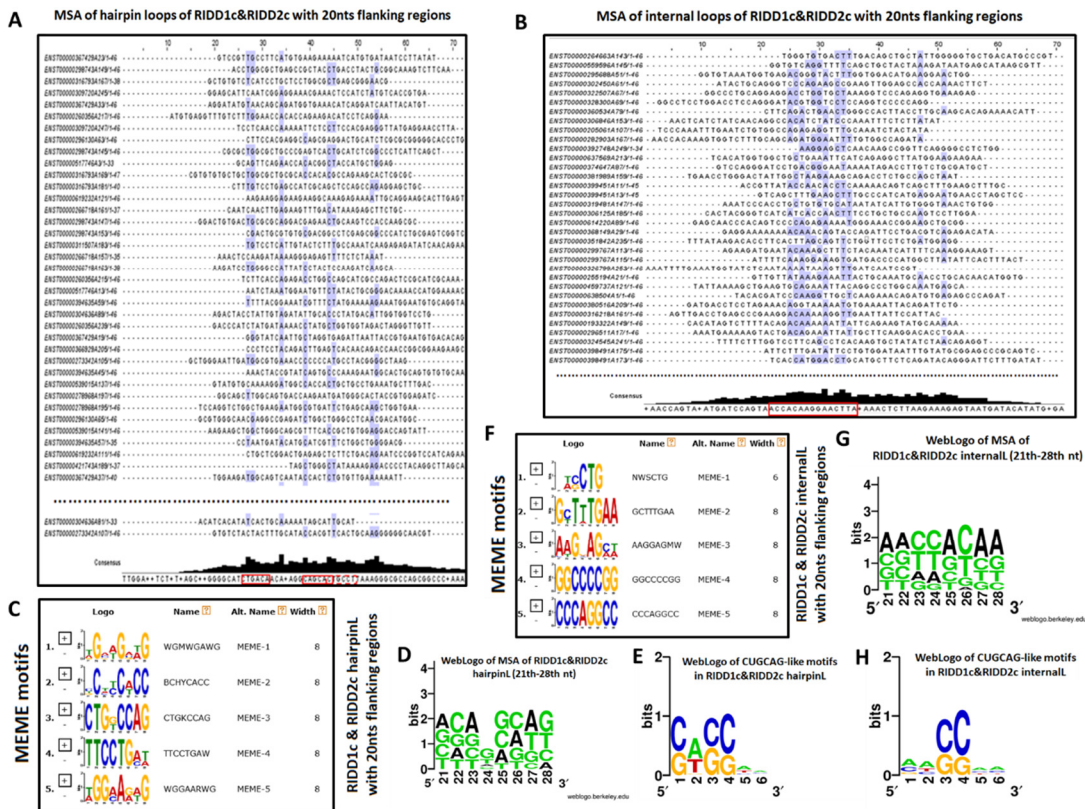


Εικόνα 3.34. Ταυτοποίηση εξανουκλεοτιδικών μοτίβων σε μονόκλωνες περιοχές των υποψήφιων RIDD μεταγράφων-στόχων

Στους πίνακες απεικονίζονται τα νουκλεοτιδικά μοτίβα που εντοπίστηκαν ως στατιστικά σημαντικά σε αζευγάρωτες περιοχές (μονόκλωνες) των RNA μεταγράφων των υποψήφιων RIDD1b και RIDD1c & RIDD2c στόχων, αντίστοιχα, με το πρόγραμμα MEMERIS. Οι ακολουθίες των μεταγράφων διαρέθηκαν σε υπό-ακολουθίες (splitted sequences) μεγέθους 500 περίπου νουκλεοτιδίων η κάθε μια με επικάλυψη 20 νουκλεοτιδίων στα άκρα τους. Ο συνολικός αριθμός των «διαρεμένων» ακολουθιών που εξετάστηκαν καταγράφεται στην κορυφή του κάθε πίνακα. Η παράμετρος «*pi*» (pseudocount) αντικατοπτρίζει την πιθανότητα υβριδοποίησης μακρινών σχετικά περιοχών της ακολουθίας του μεταγράφου λόγω συμπληρωματικότητας των βάσεων και συνεπώς αποτελεί περιοριστικό παράγοντα εντοπισμού μονόκλωνων περιοχών. Όσο αυξάνεται η τιμή της η πιθανότητα εντοπισμού των νουκλεοτιδίων σε μονόκλωνες περιοχές φθίνει αλλά αυξάνεται το πληροφοριακό περιεχόμενο των νουκλεοτιδικών μοτίβων. Η παράμετρος «*mode*» καθορίζει το μοντέλο κατανομής των μοτίβων πάνω στις ακολουθίες. Το μοντέλο «*oops*» (one occurrence per sequence) αναζητά μια εμφάνιση του μοτίβου σε κάθε μετάγραφο που εξετάζεται. Στην 1η στήλη κάθε πίνακα σημειώνονται τα νουκλεοτιδικά μοτίβα σε μορφή regular expressions όπου στις αγκύλες σημειώνονται τα νουκλεοτιδικά που μπορούν να καταλαμβάνουν την αντίστοιχη θέση ενώ με κόκκινο σημειώνονται τα νουκλεοτιδικά με την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης. Οι παράμετροι «*maxw*» και «*nmotifs*» καθορίζουν το μέγιστο αριθμό νουκλεοτιδίων των υπό αναζήτηση μοτίβων και τον συνολικό αριθμό των μοτίβων που αναζητήθηκαν, αντίστοιχα. Στην 5^η στήλη κάθε πίνακα καταγράφεται ο αριθμός των μεταγραφικών ισομορφών που αναλύθηκαν ενώ μέσα στις αγκύλες καταγράφεται ο αριθμός των γονιδίων τα οποία εκπροσωπούσαν. Στην τελευταία στήλη του 1^{ου} πίνακα καταγράφεται ο συνολικός αριθμός των γονιδίων που αναλύθηκαν ενώ μέσα στις αγκύλες σημειώνεται ο αριθμός των γονιδίων που εντοπίστηκε το αντίστοιχο μοτίβο. Η παράμετρος «*secstruct*» εκφράζει την πιθανότητα εντοπισμού του μοτίβου σε αζευγάρωτη κατάσταση. Στην βάση της εικόνας απεικονίζεται το συναινετικό μοτίβο των εξανουκλεοτιδίων που αναδείχθηκαν σε μορφή WebLogo.

Η ύπαρξη όμως μιας σειράς περιορισμών που υπεισέρχονται στην ανάλυση που μόλις προαναφέραμε και που αφορούν κυρίως α) στο όριο του μήκους των υπό εξέταση ακολουθιών ώστε να έχουμε αξιόπιστα αποτελέσματα και β) στην προσπάθεια αναδίπλωσης ολόκληρου του RNA μεταγράφου και όχι τοπικά περιοχών του, με το τελευταίο να είναι πιο σύνθηρες για mRNA μετάγραφα των οποίων το μήκος είναι μεγάλο (συνήθως μακρύτερα από

rRNA μόρια) [397], όπως συμβαίνει στην πλειονότητα των RIDD μεταγράφων-στόχων, μας ώθησε να ακολουθήσουμε και έναν διαφορετικό τρόπο προσέγγισης εφαρμόζοντας τον αλγόριθμο τοπικής αναδιπλώσης των ακολουθιών, RNAfold με σκοπό την αναζήτηση τοπικά σταθερών δομών 2ταγούς RNA δομής (Ενότητα 2.3.6). Από την ανάλυση των ακολουθιών που προβλέφθηκαν ότι βρίσκονται σε δομή βρόχου φουρκέτας και εσωτερικού βρόχου [hairpin Loop (HL) και Internal/Interior Loop (IL)] (Εικόνα 2.18) αναδείχθηκαν συναινετικά μοτίβα 6-8 νουκλεοτιδίων, τα οποία περιείχαν χαμηλό πληροφοριακό περιεχόμενο και υψηλό βαθμό πλεονασμού (Εικόνα 3.35). Εντούτοις τόσο στις δομές HL όσο και στις δομές IL εντοπίστηκαν ανάλογα του CUGCAG μοτίβου με αυξημένη συντήρηση καταλοίπων κυρίως στις θέσεις 2,3 και 4, με την δομή IL να εμφανίζει ως κορυφαίο μοτίβο το [TA][CG]CTG (T≡U στο mRNA). Η πολλαπλή επίσης στοίχιση των ακολουθιών που εντοπίστηκαν στις δομές HL και IL μετά την πλευρική επιμήκυνσή τους με την προσθήκη 20 επιπλέον νουκλεοτιδίων της ακολουθίας (flanking regions) επιβεβαίωσε την συντήρηση συγκεκριμένων καταλοίπων σε θέσεις των βρόχων με μεγαλύτερο βαθμού συντήρηση κυρίως στην περίπτωση των ILs. Η ύπαρξη «ασθενούς» (weak) νουκλεοτιδικού καταλοίπου που ακολουθείται από δύο «ισχυρά» (strong) κατάλοιπα κατά IUPAC ήταν χαρακτηριστική και στις δύο δομές. Η θέση των ισχυρών καταλοίπων καταλαμβάνονταν κυρίως από το δινουκλεοτίδιο CC και σε μικρότερο βαθμό από το GG (Εικόνα 3.35).

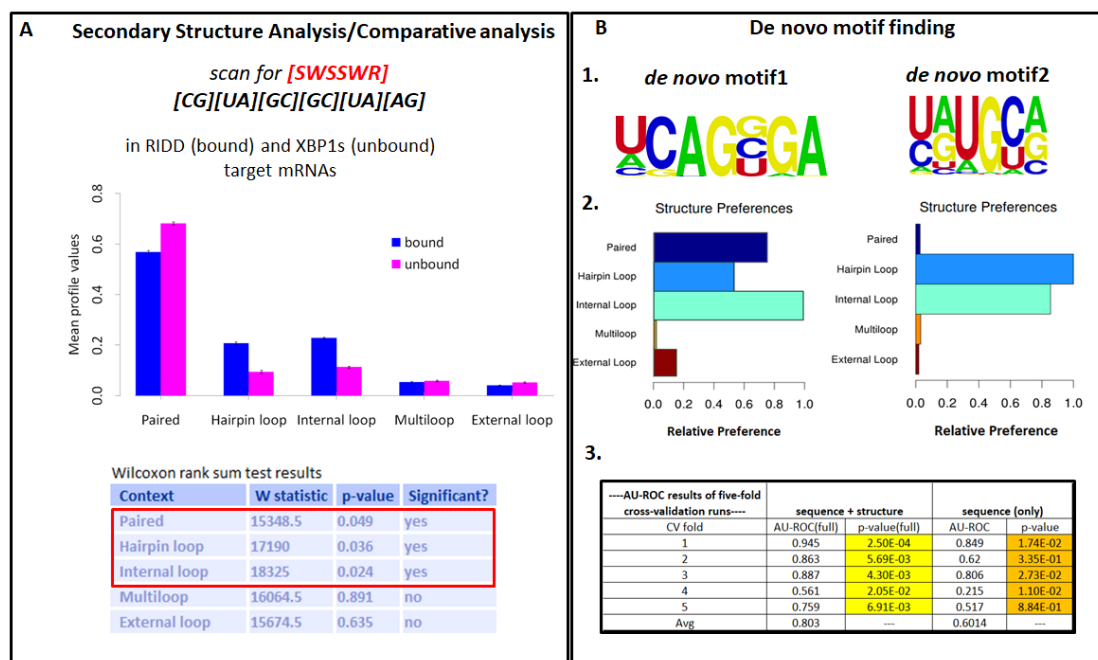


Εικόνα 3.35. Ταυτοποίηση νουκλεοτιδικών μοτίβων σε δομές βρόχου φουρκέτας και εσωτερικού βρόχου στις ακολουθίες των RIDD μεταγράφων-στόχων

(A),(B) Μέρος της πολλαπλής στοίχισης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που εντοπίζονταν σε δομή βρόχου φουρκέτας (*hairpin loop*) και εσωτερικού βρόχου (*internal loop*), αντίστοιχα, επιμηκυμένων παράπλευρα κατά 20 νουκλεοτίδια (20nts) διαμορφώνοντας τις πλευρικές περιοχές των ακολουθιών ενδιαφέροντος. Με μωβ χρώμα σημειώνονται οι συντηρημένες θέσεις καταλοίπων μεταξύ των ακολουθιών. Στη βάση της στοίχισης απεικονίζεται το συναινετικό μοτίβο που προέκυψε ενώ με κόκκινο σημειώνονται περιοχές με υψηλό βαθμό συντήρησης που περιείχαν ανάλογα του CUGCAG μοτίβου. Η απεικόνιση έγινε με το πρόγραμμα Jalview. (C),(F) Τα MEME μοτίβα με τα οποία ήταν εμπλουτισμένες οι ακολουθίες των βρόχων φουρκέτας και των εσωτερικών βρόχων, αντίστοιχα, επιμηκυμένες παράπλευρα κατά 20 νουκλεοτίδια (20nts). (G),(D) WebLogo της περιοχής πολλαπλής στοίχισης που απεικονίζεται στα A και B, αντίστοιχα, και που αφορά στο τμήμα μεταξύ του 21^{ου} έως 28^{ου} νουκλεοτιδίου (κεντρικές περιοχές στοίχισης). (E),(H) Απεικόνιση των νουκλεοτιδικών μοτίβων που εντοπίζονταν στους βρόχους φουρκέτας και εσωτερικούς βρόχους, αντίστοιχα, και τα οποία ήταν σύμφωνα με το CUGCAG-like μοτίβο.

Επίσης με την χρήση του αλγορίθμου RNAcontext προσπαθήσαμε 1ον) να συγκρίνουμε μεταξύ τους τις ακολουθίες των XBP1s και RIDD μεταγράφων για να δούμε κατά πόσο τα ήδη ταυτοποιημένα νουκλεοτιδικά μοτίβα διαφοροποιούνται ως προς τα δομικά μοτίβα 2ταγούς RNA δομής στα οποία εντοπίζονται και 2ον) να εντοπίσουμε εκείνο το συναινετικό μοτίβο που διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ των δύο συνόλων ακολουθιών και να ελέγξουμε αν θα μπορούσε να αποτελέσει θέση πιθανής δράσης της IRE1 (**Εικόνα 3.36**). Για τον σκοπό αυτό εισάγαμε το σύνολο των XBP1s-εξαρτώμενων ακολουθιών στόχων (XBP1s_sign19 και XBP1s_sign40) (Ενότητα 2.3.6) ως σύνολο «μη-συνδεόμενων» (unbound) με την IRE1 RNA μορίων και το σύνολο των RIDD ακολουθιών (RIDD1c και RIDD2c) (Ενότητα 2.3.6) ως σύνολο «συνδεόμενων» (bound) ακολουθιών. Από το 1^ο είδος ανάλυσης παρατηρήσαμε ότι το συναινετικό μοτίβο που «υπάκουε» στο εξανουκλεοτίδιο CUGCAG (SWSSWR, κατά IUPAC) εντοπιζόταν σε όλα σχεδόν τα δομικά μοτίβα της 2ταγούς RNA δομής (PHIME - Paired, Hairpin loop, Internal/Bulge loop, Multiloop, External) με μεγαλύτερη συχνότητα σε δίκλωνες περιοχές. Όμως από την συγκριτική ανάλυση των XBP1s-εξαρτώμενων και RIDD ακολουθιών φαινόταν να υπάρχει μια στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο στα ποσοστά εμφάνισης του μοτίβου στις ζευγαρωμένες περιοχές (όπου κυριαρχούσε στα XBP1s-εξαρτώμενα μετάγραφα) όσο και στις περιοχές των βρόχων φουρκέτας και εσωτερικών βρόχων όπου τα ποσοστά εμφάνισης ήταν υψηλότερα στους RIDD στόχους, γεγονός που ερχόταν να απαντήσει εν μέρει στο αρχικό μας ερώτημα δηλαδή ποιο είναι το κριτήριο επιλογής για αποκοπή από την IRE1 όταν υπάρχουν μετάγραφα που μοιράζονται κοινά νουκλεοτιδικά μοτίβα αποκοπής. Συνεπώς γίνεται φανερό ότι δεν έχει σημασία μόνο η ακολουθία των νουκλεοτιδίων στις θέσεις αποκοπής αλλά και το είδος του δομικού μοτίβου μέσα στο οποίο εντοπίζεται. Τέλος από το 2^ο είδος ανάλυσης, που αφορούσε στην *de novo* εξεύρεση μοτίβων που διαφοροποιούνται μεταξύ των RIDD και XBP1s-εξαρτώμενων μεταγράφων αναδείχθηκαν δύο συναινετικά μοτίβα μήκους 7 (*de novo motif1*) και 6 (*de novo motif2*) νουκλεοτιδίων (**Εικόνα 3.36**), που συμφωνούσαν με τα αποτελέσματα της **Εικόνα 3.35** αλλά παρουσίαζαν και κάποιες διαφοροποιήσεις μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, στην 1^η

περίπτωση όπου συγκρίθηκαν ουσιαστικά οι δύο συνιστώσες (RIDD και XBP1s) της υπογραφής IRE1sign38 προέκυψε μοτίβο υψηλής συσχέτισης με το SWSSWR (σύμφωνο του CUGCAG), με ισχυρή συντήρηση καταλοίπων στις θέσεις 2,3,4,6 και 7 ενώ στη 2^η περίπτωση όπου συγκρίθηκαν συνολικά οι RIDD υπογραφές έναντι των XBP1s προέκυψε μοτίβο της μορφής YRWGYV με μικρότερου βαθμού συντήρηση καταλοίπων που εντοπιζόταν κυρίως στις θέσεις 3, 4 και 5. Επίσης στην 1^η περίπτωση το μοτίβο εντοπιζόταν κυρίως στην δομή εσωτερικού βρόχου αλλά και σε υψηλά ποσοστά σε δίκλωνη κατάσταση (75%) και δομή βρόχου φουρκέτας (58%) ενώ στην 2^η περίπτωση εντοπιζόταν συντριπτικά σε δομή βρόχου φουρκέτας και εσωτερικού βρόχου. Συνεπώς βλέπουμε να επιβεβαιώνεται η αρχική μας υπόθεση για την επιλογή θέσης αποκοπής από την IRE1 που βασίζεται σε νουκλεοτιδικά μοτίβα, ανάλογα του CUGCAG που όμως πρέπει να εμπλουτίζουν συγκεκριμένους τύπους 2^{ου} RNA δομής με επικράτηση της δομής βρόχου φουρκέτας και εσωτερικού βρόχου. Επιπρόσθετα, από την ROC ανάλυση του μοντέλου πρόβλεψης για 5 «τρεξίματα» του RNAcontext, παρατηρήσαμε την μεγάλη σημασία της προστιθέμενης αξίας που αποκτά το μοντέλο στην διακριτική του ικανότητα όταν λαμβάνονται υπόψη και οι δομικές παράμετροι (μέση τιμή AU-ROC: 0.8) εκτός από τις παραμέτρους που βασίζονται αποκλειστικά στην νουκλεοτιδική πληροφορία (μέση τιμή AU-ROC: 0.6).



Εικόνα 3.36. Ταυτοποίηση νουκλεοτιδικών και δομικών μοτίβων που διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ των RIDD και XBP1s-εξαρτώμενων mRNA στόχων

(A) Δομικό προφίλ της 2^{ταγούς} RNA δομής των αναλόγων του CUGCAG μοτίβου στις RIDD και XBP1s-εξαρτώμενες ακολουθίες μεταγράφων-στόχων. Απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης για 5 δομικά μοτίβα (PHIME) με το πρόγραμμα RNAcontext εισάγοντας ως υποψήφιο κατά IUPAC μοτίβο αναζήτησης το SWSSWR. Τα νουκλεοτιδία που μπορούν να βρεθούν σε κάθε θέση του μοτίβου σημειώνονται εντός των αγκυλών της «κανονικής έκφρασης»

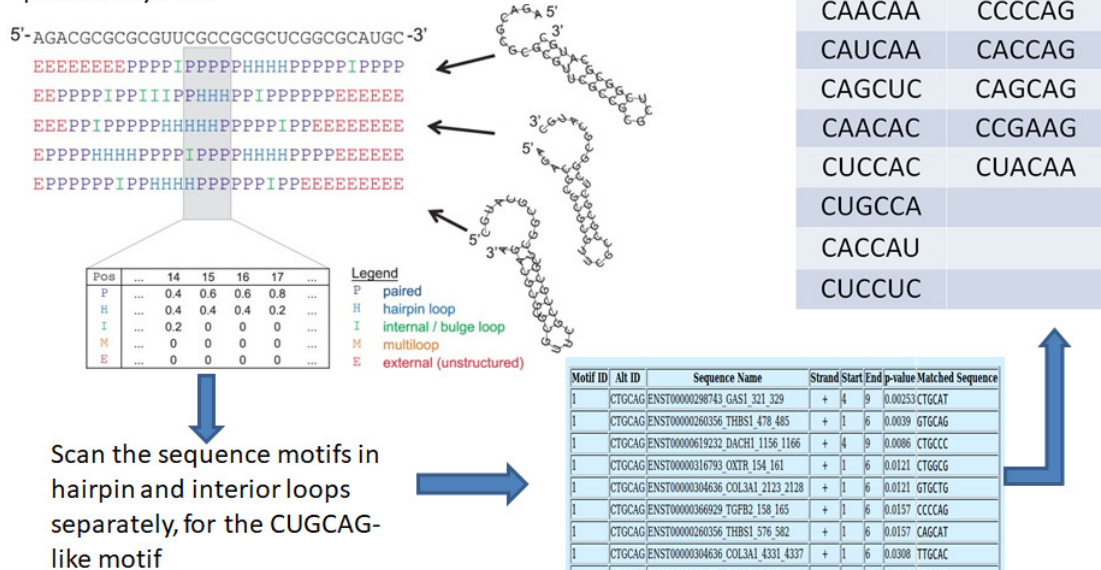
(regular expression). Ως ακολουθίες σύνδεσης (bound) στην IRE1 χρησιμοποιήθηκαν οι RIDD1c και RIDD2c ενώ ως ακολουθίες που δεν συνδέονται (unbound) οι XBP1s_sign19 και XBP1s_sign40. Το ιστόγραμμα απεικονίζει για κάθε δομικό μοτίβο, την μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα της κατανομής των πιθανοτήτων θέσης ή συχνότητας εμφάνισης του μοτίβου στις bound και unbound ακολουθίες. Wilcoxon rank sum test εφαρμόστηκε για να εντοπιστούν εκείνα τα δομικά μοτίβα στα οποία υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην εμφάνιση του νουκλεοτιδικού μοτίβου μεταξύ των bound και unbound ακολουθιών. Τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα περικλείονται σε κόκκινο πλαίσιο. (B) Απεικονίζονται τα αποτελέσματα της de novo αναζήτησης νουκλεοτιδικών μοτίβων στα δύο διαφορετικά σύνολα ακολουθιών που εισήχθησαν στο πρόγραμμα RNAcontext. Συγκεκριμένα, υλοποιήσαμε τον αλγόριθμο για δύο διαφορετικές ομάδες συνόλων. Στην 1^η περίπτωση (αριστερά της εικόνας) εισάγαμε τις RIDD2c και XBP1s_sign19 ακολουθίες ως bound και unbound, αντίστοιχα, και στην 2^η περίπτωση (δεξιά της εικόνας) εισάγαμε τις RIDD1c και RIDD2c ως bound και τις XBP1s_sign19 και XBP1s_sign40 ως unbound.

1. Τα νουκλεοτιδικά μοτίβα που εντοπίστηκαν από τις 2 διαφορετικές υλοποιήσεις κατασκευάστηκαν με το λογισμικό EnoLOGOS [398]. Το βέλτιστο μήκος του μοτίβου προσδιορίζεται από την διασταυρούμενη περιοχή επικύρωσης κάτω από την καμπύλη ROC (Receiver Operating Characteristic) που απεικονίζει τη διαγνωστική ικανότητα του μοντέλου να διακρίνει τις bound από τις unbound ακολουθίες. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε εκείνο το μήκος μοτίβου που μεγιστοποιεί την περιοχή αυτή (AU-ROC). Το ύψος ενός νουκλεοτιδίου σε μια θέση αντικατοπτρίζει την συχνότητα εμφάνισής του στην αντίστοιχη θέση.
2. Απεικόνιση της σχετικής προτίμησης-πιθανότητας του νουκλεοτιδικού μοτίβου να βρίσκεται σε κάθε ένα από τα υπό εξέταση δομικά μοτίβα 2ταγούς RNA δομής. Οι πιθανότητες αυτές σταθμίζονται έτσι ώστε η δομή που προτιμάται κυρίως να ισοδυναμεί με 1 δηλ. 100% πιθανότητα. 3. Προκειμένου να εκτιμηθεί η προγνωστική απόδοση του μοντέλου που προέκυψε με το RNAcontext, εφαρμόστηκαν 5 έλεγχοι διασταυρούμενης επικύρωσης και υπολογίστηκε η περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC (AU-ROC) για κάθε μία από τις πέντε εκτελέσεις. Για την σύγκριση της πιθανής προστιθέμενης προγνωστικής αξίας των προτιμήσεων δομής, οι ακολουθίες εισόδου βαθμολογήθηκαν με δύο τρόπους: είτε χρησιμοποιώντας μόνο τις παραμέτρους της ακολουθίας είτε λαμβάνοντας υπόψη και τις παράμετρους της δομής. Επίσης, υπολογίστηκαν οι τιμές p-value των AU-ROCs όπως περιγράφεται στην δημοσίευση [399]. Ο πίνακας δείχνει τα αποτελέσματα της ανάλυσης για το de novo motif2.

3.2.4 *In silico* Κατασκευή Πρότυπων Ακολουθιών (probes) που Διπλώνουν σε Δομή Στελέχους-Βρόχου ή Εσωτερικού Βρόχου για *in vitro* Έλεγχο της Αποκοπής τους από την IRE1 Πρωτεΐνη

Για να επιβεβαιώσουμε πειραματικά τα αποτελέσματά μας σχετικά με τα νουκλεοτιδικά και δομικά μοτίβα αναγνώρισης για αποκοπή από την IRE1 RNάση, επιχειρήσαμε αρχικά να εξορύξουμε τα πιο αντιπροσωπευτικά (δηλαδή που απαντούν σε μεγαλύτερη αφθονία) εξανουκλεοτίδια των υποψηφίων RIDD μεταγράφων-στόχων που αφενός ήταν σύμφωνα με το CUGCAG-like μοτίβο και αφετέρου επικρατούσαν σε δομές βρόχου φουρκέτας (hairpin loop) και εσωτερικού βρόχου (internal loop) όπως είχαμε παρατηρήσει από την προηγούμενή μας ανάλυση. Με την διαδικασία αυτή προέκυψαν 6 και 9 σε αριθμό υποψήφια εξανουκλεοτίδια που υπέρ-αντιπροσωπεύονταν στα mRNA μετάγραφα των RIDD στόχων, σε δομή εσωτερικού βρόχου και βρόχου φουρκέτας, αντίστοιχα (**Εικόνα 3.37**).

For each RIDD target (RIDD1c+RIDD2c) we retrieved all sequence motifs that belong to hairpin and interior loops with mean probability >0.5

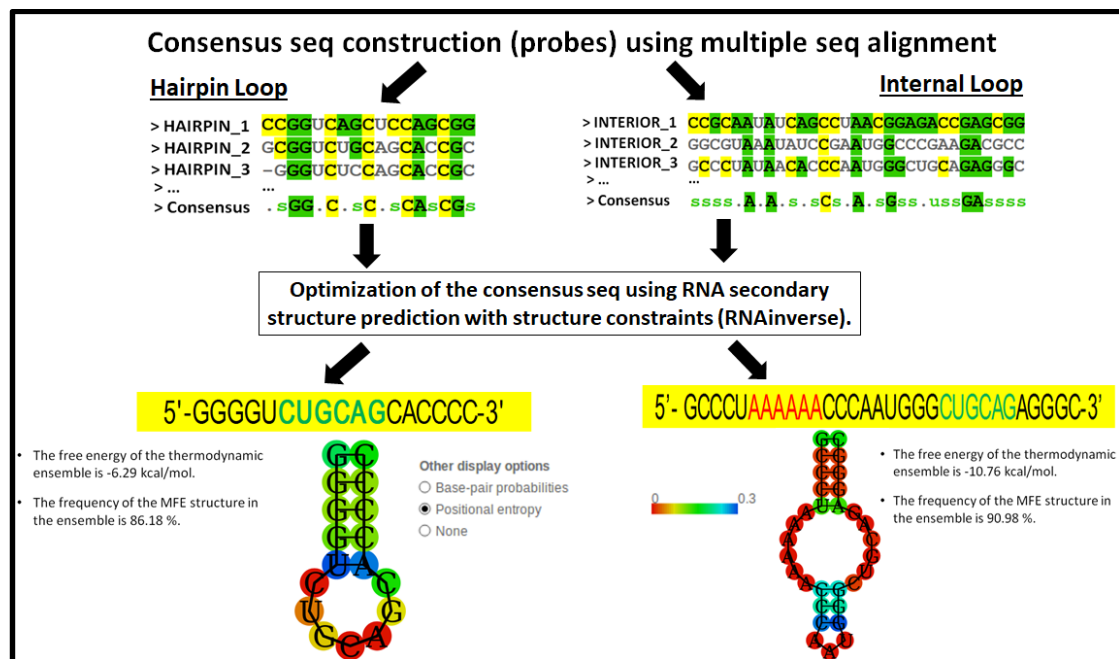


Εικόνα 3.37. Προσδιορισμός αντιπροσωπευτικών εξανουκλεοτιδίων που υπέρ-αντιπροσωπεύονται σε δομές βρόχου φουρκέτας και εσωτερικού βρόχου στα RIDD μετάγραφα

Στην εικόνα απεικονίζεται η ροή εργασίας που ακολουθήθηκε για την ταυτοποίηση 9 (Hairpin loop motifs) και 6 (Interior loop motifs) αντιπροσωπευτικών εξανουκλεοτιδίων που κυριαρχούσαν στις mRNA ακολουθίες των RIDD μεταγράφων-στόχων σε δομή βρόχου φουρκέτας και εσωτερικού βρόχου, αντίστοιχα. Κάθε νουκλεοτίδιο θεωρήθηκε ότι ανήκει στις δομές που προαναφέραμε εάν η μέση πιθανότητα (mean probability) εντοπισμού του στο αντίστοιχο δομικό μοτίβο ήταν >0.5 με βάση τον αλγόριθμο τοπικής πρόγνωσης RNAfold. Χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο FIMO αναζητήσαμε όλα τα νουκλεοτιδικά ανάλογα του CUGCAG μοτίβου στις 2 δομές και καταγράφηκαν τα εξανουκλεοτίδια που υπέρ-αντιπροσωπεύονται.

Από τα ταυτοποιημένα εξανουκλεοτίδια που απαντούσαν σε αφθονία σε δομή βρόχου φουρκέτας και εσωτερικού βρόχου αλλά και από τα αποτελέσματα της πολλαπλής στοίχισης των υποψήφιων ακολουθιών, επιμηκυμένες πλευρικά εκατέρωθεν κατά 20 νουκλεοτίδια (Εικόνα 3.35A και B) κατασκευάσαμε *in silico* δύο πρότυπες RNA ακολουθίες (probes) που να διπλώνουν στην χαρακτηριστική 2ταγή RNA δομή στελέχους-βρόχου και εσωτερικού βρόχου, αντίστοιχα (Εικόνα 3.38). Για την βελτιστοποίηση της αναδίπλωσης των πρότυπων αυτών ακολουθιών στις επιθυμητές δομές χρησιμοποιήσαμε και τον αλγόριθμο RNAinverse [400] του πακέτου ViennaRNA ώστε να μας προβλέψει υποψήφιες ακολουθίες που να διπλώνουν σε δομή φουρκέτας και εσωτερικού βρόχου θέτοντας την περιοχή των μοτίβων βρόχου και τις συντηρημένες θέσεις των καταλοίπων στις πλευρικές περιοχές ως constraints τα οποία θα πρέπει οπωσδήποτε να βρίσκονται στο κατάλληλο δομικό πλαίσιο που είχαμε ορίσει. Με την διαδικασία αυτή προέκυψαν 2 «εκφυλισμένες» (degenerate) ακολουθίες-οδηγοί (σημειώνονται μέσα σε κίτρινο πλαίσιο στην Εικόνα 3.38) όπου δίπλωναν σταθερά στις αντίστοιχες υπό μελέτη δομές όταν περιλάμβαναν στη κατάλληλη περιοχή

(σημειώνεται με πράσινο χρώμα μέσα στο κίτρινο πλαίσιο) κάποιο από τα υποψήφια ταυτοποιημένα εξανουκλεοτιδία (probes). Οι δομές με την ελάχιστη ελεύθερη ενέργεια (MFE) χαρακτηρίζονταν από υψηλή θερμοδυναμική σταθερότητα (π.χ. $\Delta G_{HL}^{CUGCAG} = -6.29 \text{ kcal/mol}$ και $\Delta G_{IL}^{CUGCAG} = -10.76 \text{ kcal/mol}$) και υψηλή συχνότητα εμφάνισης στο σύνολο των δομών αναδίπλωσης (π.χ. $\text{freq}_{HL}^{CUGCAG} = 86.18\%$ και $\text{freq}_{IL}^{CUGCAG} = 90.98\%$, στο ensemble).



Εικόνα 3.38. Κατασκευή 2 «εκφυλισμένων» ακολουθιών-οδηγών που διπλώνουν σε δομή στελέχους-βρόχου και εσωτερικού βρόχου, αντίστοιχα, και μπορούν να περιλαμβάνουν εξανουκλεοτιδία ανάλογα του CUGCAG

Με κίτρινο χρώμα στην πολλαπλή στοίχιση απεικονίζονται τα νουκλεοτιδία της κυτοσίνης (C) ενώ με πράσινο χρώμα τα νουκλεοτιδία πουρίνης (A,G). Με s συμβολίζονται τα strong κατά IUPAC νουκλεοτιδία (G,C) και με «.» τα weak νουκλεοτιδία (A,U). Με πράσινο χρώμα σημειώνεται επίσης το εξανουκλεοτιδίο CUGCAG μέσα στις «εκφυλισμένες» ακολουθίες-οδηγούς που βρίσκονται σε κίτρινο πλαίσιο. Με κόκκινο χρώμα σημειώνεται το εξανουκλεοτιδίο Αδενίνης (A) το οποίο χρησιμοποιήθηκε για να μπορέσει η ακολουθία οδηγός να αναδιπλωθεί στην δομή εσωτερικού βρόχου. Στην απεικόνιση της 2ταγούς RNA δομής του στελέχους-βρόχου ή φουρκέτας και εσωτερικού βρόχου, αντίστοιχα, τα νουκλεοτιδία είναι χρωματισμένα με βάση την χρωματική κλίμακα που απεικονίζει την εντροπία λόγω θέσης.

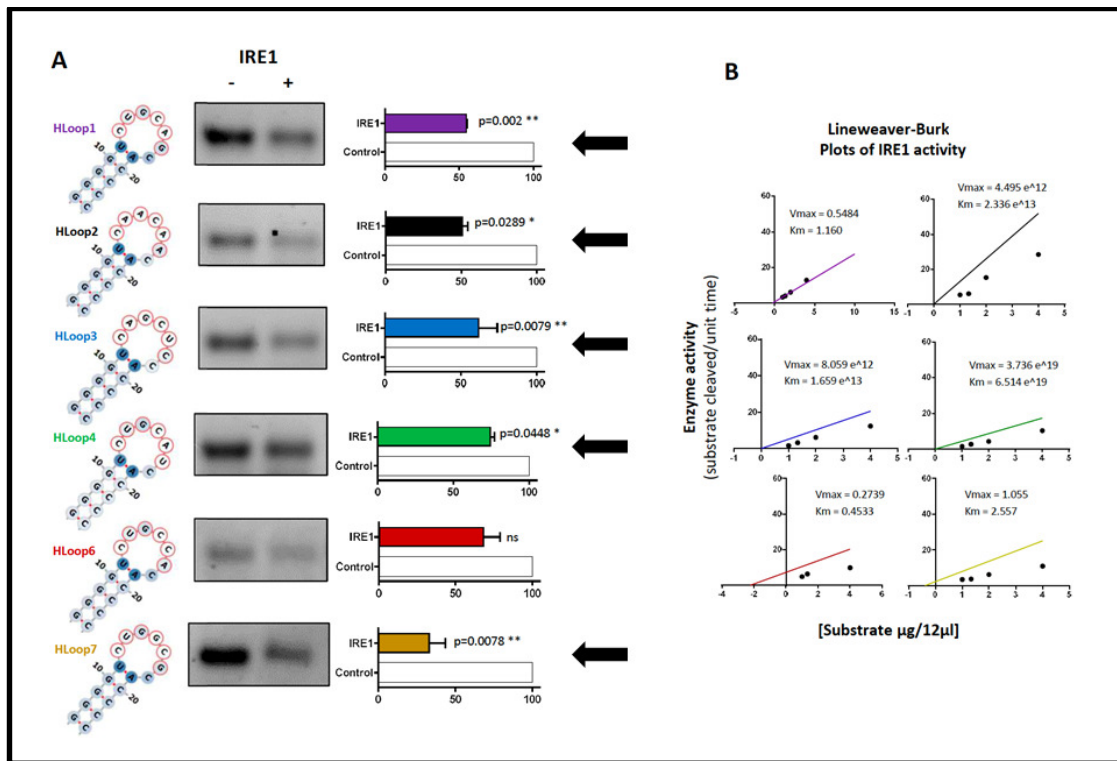
Τέλος αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι στην περίπτωση του εσωτερικού βρόχου ήταν πολύ δυσκολότερο να προσδιοριστεί κάποια ακολουθία-οδηγός, λόγω μεγαλύτερης δυσκολίας να προσδιοριστούν κατάλληλες πλευρικές περιοχές γιατί όπως γνωρίζουμε στην δημιουργία αυτής της δομής συνεισφέρουν περιοχές που μπορεί να βρίσκονται σε πολύ απομακρυσμένες θέσεις κατά μήκος του RNA μορίου και κατόπιν τοπικής αναδίπλωσής του να μπορέσουν τελικά να υβριδοποιηθούν για να δημιουργήσουν τα συμπληρωματικά στελέχη που περιβάλλουν τον εσωτερικό βρόχο. Αυτός ήταν και ο λόγος που ενσωματώσαμε

τεχνητά στην ακολουθία-οδηγό και έξι κατάλοιπα αδενίνης (A) ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή αναδίπλωση του μορίου.

3.2.5 *In vitro* IRE1 Αποκοπή 5 Πρότυπων Ακολουθιών (probes) με Δομή Στελέχους-Βρόχου και 1 Πρότυπη Ακολουθία με δομή Εσωτερικού Βρόχου

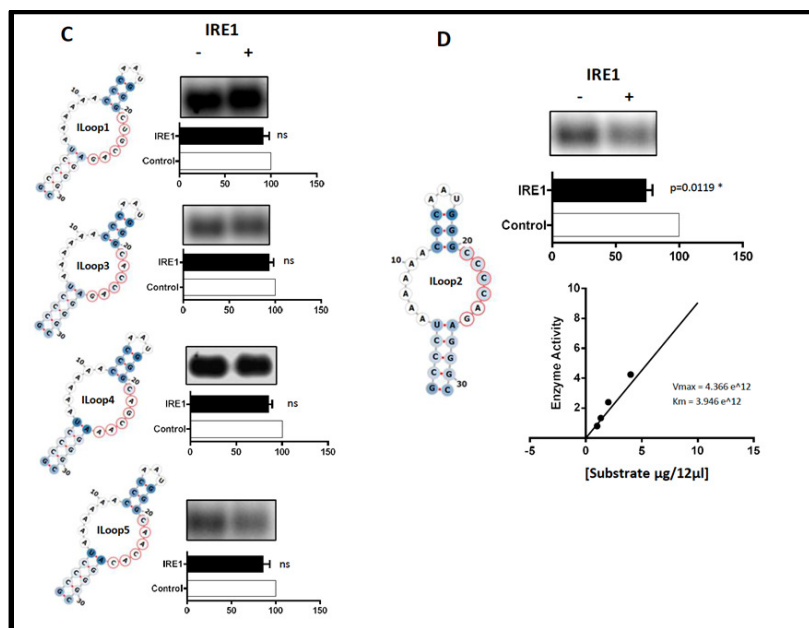
Στη συνέχεια ακολούθησε σύνθεση των *in silico* «εκφυλισμένων» ακολουθιών-οδηγών με τα υποψήφια RIDD probes από την εταιρεία Invitrogen στη Γαλλία και *in vitro* επιβεβαίωση για αποκοπή από την IRE1 πρωτεΐνη στο εργαστήριο Ογκογένεσης και Σηματοδότησης λόγω στρες (Oncogenesis Stress Signaling) του Ινστιτούτου INSERM της Γαλλίας μέσω μια *in vitro* δοκιμασίας αποκοπής (IRE1-mediated cleavage assay) με μέτρηση του υποστρώματος απευθείας σε gel αγαρόζης [179]. Συγκεκριμένα συντέθηκαν και ελέγχθηκαν 6 RNA ακολουθίες που δίπλωναν σε δομή στελέχους-βρόχου και 5 ακολουθίες που δίπλωναν σε δομή εσωτερικού βρόχου.

Οι πέντε από τις έξι ακολουθίες-πρότυπα με δομή στελέχους-βρόχου αποδείχθηκε *in vitro* ότι αποτελούν IRE1 υποστρώματα και δέχτηκαν την νουκλεολυτική της δράση, ενώ μόνο μια από τις 5 ακολουθίες-πρότυπα με δομή εσωτερικού βρόχου αποκόπηκαν. Το μικρό ποσοστό επιβεβαίωσης των ακολουθιών με δομή εσωτερικού βρόχου μπορεί να εξηγηθεί αφενός από το υψηλό ποσοστό αβεβαιότητας που υπεισέρχεται στην πρόβλεψή τους αφού τέτοιου είδους δομές σχηματίζονται από αρκετά απομακρυσμένες περιοχές του RNA μορίου κατά την αναδίπλωσή του, και αφετέρου από την αδυναμία προσέγγισης της IRE1 στην περιοχή δράσης λόγω εντοπισμού τους σε εσωτερικές περιοχές των μεταγράφων. Τα αποτελέσματα της *in vitro* δοκιμασίας για την δομή στελέχους-βρόχου και εσωτερικού βρόχου περιλαμβάνονται στην **Εικόνα 3.39** και **Εικόνα 3.40**, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.39. *In vitro* δοκιμασία αποκοπής από την IRE1 σε 6 υποψήφια RIDD probes που διπλώνουν σε δομή στελέχους-βρόχου

(A) 5 από τις 6 ακολουθίες RNA (αριστερά της εικόνας σε δομή στελέχους-βρόχου) που ελέγχθηκαν υφίσταντο την RIDD δράση (υποδεικνύονται με μαύρο βέλος). Κάθε ακολουθία που ελέγχθηκε σημειώνεται με διαφορετικό χρώμα. Οι ζώνες του gel αγαρόζης απεικονίζουν την ποσότητα του υποστρώματος/RNA ακολουθίας παρουσία (+) και απουσία (-) της IRE1 πρωτεΐνης. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων απεικονίζεται στα γραφήματα στήλης και η στατιστική σημαντικότητα της σύγκρισης σε σχέση με το δ/μα ελέγχου (ρυθμιστικό δ/μα) καταγράφεται με την τιμή p -value (p). (B) Απεικόνιση των γραφημάτων κινητικής Lineweaver-Burk της ενζυμικής αντίδρασης αποκοπής από την IRE1 για κάθε υποψήφια ακολουθία που σημειώνεται με το αντίστοιχο χρώμα.



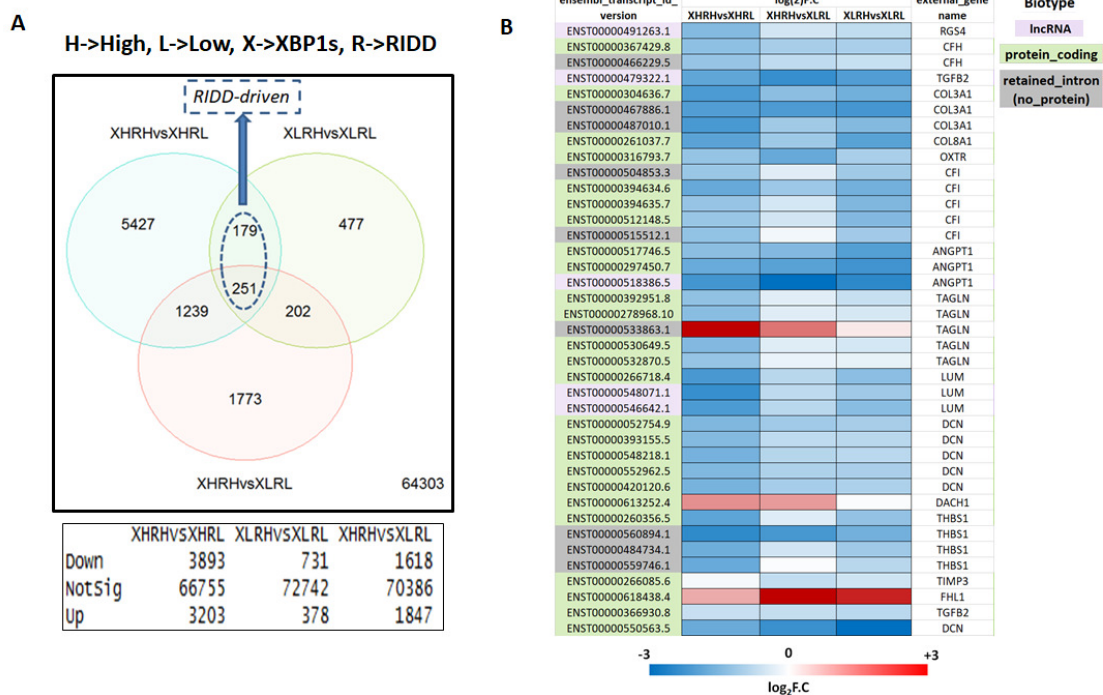
Εικόνα 3.40. *In vitro* δοκιμασία αποκοπής από την IRE1 σε 5 υποψήφια RIDD probes που διπλώνουν σε δομή εσωτερικού βρόχου

(C) Οι 4 από τις 5 RNA ακολουθίες (αριστερά της εικόνας σε δομή εσωτερικού βρόχου) που ελέγχθηκαν δεν υφίσταντο την RIDD δράση *in vitro*. Οι ζώνες του gel αγαρόζης απεικονίζουν την ποσότητα του υποστρώματος/ακολουθίας παρουσία (+) και απουσία (-) της IRE1 πρωτεΐνης. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων απεικονίζεται στα γραφήματα στήλης και δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά (*ns*) σε σχέση με το $\delta/\mu\alpha$ μάρτυρα (*control*). (D) Απεικόνιση της RNA ακολουθίας με δομή εσωτερικού βρόχου που έδωσε θετικό αποτέλεσμα. Απεικονίζεται επίσης το αντίστοιχο κομμάτι του gel με τις ζώνες που αντιστοιχούν στην ποσότητα του υποστρώματος/ακολουθίας παρουσία (+) και απουσία (-) της IRE1 πρωτεΐνης, η ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος, η στατιστική σημαντικότητα *p* και το γράφημα κινητικής Lineweaver-Burk της ενζυμικής αντίδρασης.

3.2.6 Υπεραντιπροσώπωση των *in vitro* Επιβεβαιωμένων probes σε RIDD Μεταγραφικές Ισομορφές που είναι Υποεκφρασμένες σε GBM Ασθενείς με Αυξημένη RIDD Ενεργότητα

Στην προσπάθειά μας να διερευνήσουμε την συσχέτιση ή αλληλεξάρτηση που μπορεί να υπάρχει μεταξύ της RIDD σηματοδοτικής δράσης (όπως αξιολογήθηκε από την καταγραφή των επιπέδων μεταγραφικής έκφρασης των υποψήφιων RIDD γονιδίων-στόχων) και της διαφορικής έκφρασης των RIDD μεταγραφικών ισομορφών, σε συνάρτηση με τον βαθμό εμπλουτισμού τους στα *in vitro* επιβεβαιωμένα νουκλεοτιδικά μοτίβα (**Εικόνα 3.39**) (TopHits) αναγνώρισης για αποκοπή από την IRE1, αναλύσαμε σε επίπεδο μεταγράφων τα RNAseq δεδομένα της TCGA-GBM κοόρτης (156 ασθενείς με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα) από την ανοιχτή βάση recount2 [401] η οποία παρέχει ποσοτικές εκτιμήσεις (counts) των εγγραφών της RNAseq αλληλούχισης σε επίπεδο γονιδίων, μεταγραφικών ισομορφών και εξωνίων ενώ περιλαμβάνει και bigwig αρχεία (<http://genome.ucsc.edu/goldenPath/help/bigWig.html>) κάλυψης του γονιδιώματος για πάνω από 2041 διαφορετικές μελέτες/projects. Συγκεκριμένα, κατεβάσαμε από την βάση recount2 τα counts των εγγραφών για τις μεταγραφικές ισομορφές που αφορούσαν σε ασθενείς με καρκίνο του εγκεφάλου (*rse_tx_brain.RData*) και στη συνέχεια εξορύξαμε τα δεδομένα που αφορούσαν μόνο στην TCGA-GBM κοόρτη. Διεξάγοντας ανάλυση διαφορικής έκφρασης με την μέθοδο limma-voom (Ενότητα 2.3.2.2) σε επίπεδο μεταγράφων για τις διαφορετικές ομάδες ασθενών ως προς την XBP1s και RIDD σηματοδοτική δραστηριότητα [υψηλή (high ή +) και χαμηλή (low ή -)] όπως είχαν προκύψει με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της IRE1sign38 γονιδιακής υπογραφής και το σκοράρισμα των ασθενών (Ενότητα 2.3.4.1), προσδιορίσαμε αρχικά τα RNA μετάγραφα που είχαν στατιστικά σημαντικά διαφορετικά επίπεδα έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων ασθενών (**Εικόνα 3.41A**). Από τον χαρακτηρισμό των μεταγράφων με την βοήθεια της βάσης ENSEMBL παρατηρήσαμε ότι περιλαμβάνονται μέσα σε αυτά μεταγραφικές ισομορφές των γονιδίων της RIDD συνιστώσας οι οποίες αντιστοιχούν στην πλειονότητα των RIDD γονιδίων και είναι

συστηματικά υπό-εκφρασμένες στους RIDD+ ασθενείς, ενώ επίσης καταγράψαμε τον βαθμό υποέκφρασής τους ($\log_2 F.C.$) σε σχέση με τους RIDD- GBM όγκους. Με τον τρόπο αυτό, αν εξαιρέσουμε 2 πρωτεϊνικά μετάγραφα που αντιστοιχούσαν στα γονίδια DACH1 και FHL1, καθώς και το μετάγραφο που περιέχει εσώνιο και δεν παράγει πρωτεΐνη του γονιδίου TAGLN, παρατηρήθηκε ένα παρόμοιο προφίλ υπό-εκφρασμένων μεταγράφων σε όλες τις συγκρίσεις (**Εικόνα 3.41B**), γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει την ανεξάρτητη δράση της IRE1 RNάσης σε σχέση με το μάτισμα και την δράση του XBP1s. Επιπρόσθετα, αξίζει να αναφερθεί ότι μεταξύ των μεταγράφων που ήταν σημαντικά υπό-εκφρασμένα στους RIDD+ ασθενείς υπήρχαν και κάποια που έχουν ρόλο lncRNA (long coding RNA) και που ο βαθμός υποέκφρασής τους ήταν μεγαλύτερος όταν συνοδεύονταν και από υψηλή XBP1s σηματοδοτική ενεργότητα. Τα μετάγραφα αυτά αφορούσαν στα γονίδια RGS4, ANGPT1 και LUM. Συνεπώς η IRE1 πρωτεΐνη θα μπορούσε να εκδηλώνει την RIDD δράση της σε διάφορους τύπους RNA μεταγράφων που περιλαμβάνουν εκτός από τα miRNA και mRNA και τα lncRNA μόρια.

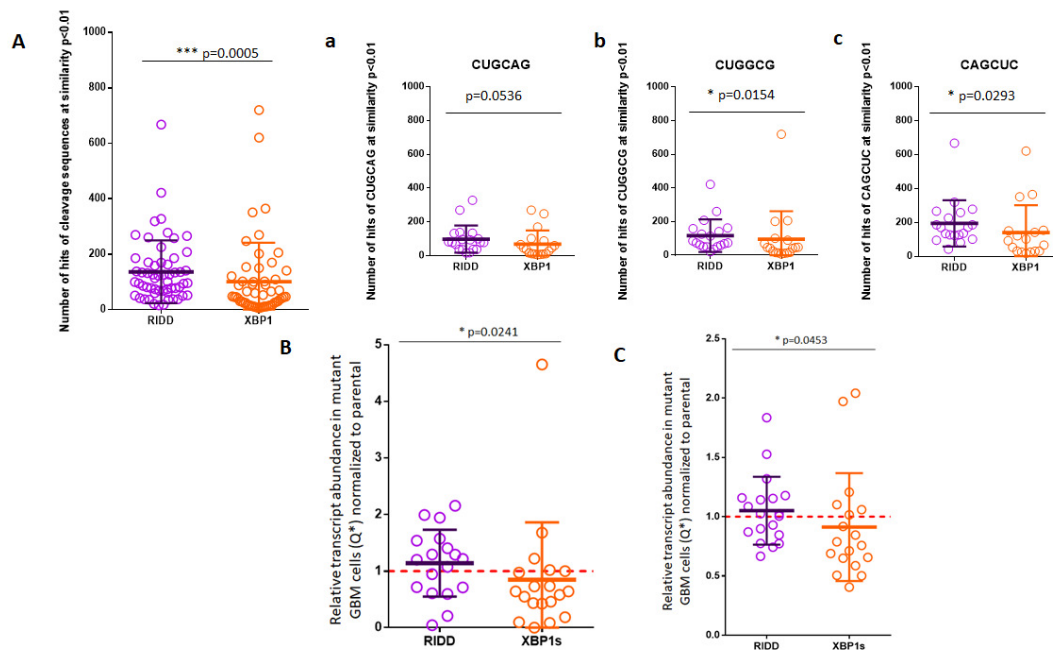


Εικόνα 3.41. Συγκριτικά αποτελέσματα της ανάλυσης διαφορικής έκφρασης των μεταγραφικών ισομορφών των RIDD γονιδίων της υπογραφής IRE1sign38 σε GBM ασθενείς με υψηλή και χαμηλή RIDD σηματοδοτική ενεργότητα

(A) Διάγραμμα Venn που απεικονίζει τον αριθμό των διαφορικά εκφρασμένων (Δ.Ε) μεταγράφων από τις συγκρίσεις 1) των XHRH με τους XHRL (μπλε κύκλος), 2) τους XHRH με τους XLRL (ροζ κύκλος), 3) τους XLRH με τους XLRL (πράσινο κύκλος) καθώς και τον αριθμό των κοινών μεταγράφων που ήταν Δ.Ε. σε όλες τις συγκρίσεις (επικαλύψεις). Ο αριθμός των μεταγράφων που δεν βρέθηκαν Δ.Ε. σε οποιαδήποτε σύγκριση σημειώνεται στην βάση του διαγράμματος (δεξιά), ενώ με διακεκομμένη μπλε γραμμή περιβάλλεται ο αριθμός των μεταγράφων που ήταν υποψήφια για RIDD στόχευση. Ο αριθμός των υπό- και υπέρ-εκφρασμένων μεταγράφων αλλά και αυτών που δεν έδωσαν στατιστικά σημαντική μεταβολή για τις συγκρίσεις του Venn διαγράμματος καταγράφονται στον πίνακα κάτω από το διάγραμμα Venn. (B) Πίνακας θερμικής έντασης που απεικονίζει τον βαθμό διαφορικής

έκφρασης ($\log_2 F.C$) των RIDD μεταγράφων της υπογραφής IRE1sign38 που αναδείχτηκαν ως RIDD-driven, μεταξύ των διαφορετικών ομάδων ως προς την XBP1s και RIDD σηματοδοτική δραστικότητα των TCGA-GBM όγκων. Ο τύπος κάθε RNA μεταγράφου (biotype) προέρχεται από τον αντίστοιχο σχολιασμό του στην βάση ENSEMBL και απεικονίζεται με διαφορετικό χρώμα.

Όταν συγκρίναμε το σύνολο των υπό-εκφρασμένων RIDD μεταγράφων στους RIDD+ ασθενείς με τις μεταγραφικές ισομορφές των XBP1s-εξαρτώμενων γονιδίων σε επίπεδο νουκλεοτιδικών μοτίβων παρατηρήσαμε μια στατιστικά σημαντική υπεραντιπροσώπωση των TopHits στα RIDD μετάγραφα (**Εικόνα 3.42A**) που οφειλόταν κυρίως στην ενισχυμένη παρουσία των εξανουκλεοτίδων 5'-CUGGCG-3', 5'-CAGCUC-3' και 5'-CUGCAG-3' (κατά σειρά προτεραιότητας) (**Εικόνα 3.42abc**). Τέλος, για να διερευνήσουμε αν τα αποτελέσματά μας επαληθεύονταν και σε επίπεδο κυτταρικών σειρών όπου είχε τροποποιηθεί η δράση της IRE1, ανατρέξαμε στις πρωτογενείς GBM κυτταρικές σειρές ασθενών RADH/RNS 85 και 87 (Ενότητα 2.3.2.1) για τις οποίες είχαμε διαθέσιμα RNAseq δεδομένα. Εκτιμώντας την ποσοτική αφθονία των RNA μεταγράφων με τα υπολογιστικά εργαλεία Kallisto [402] και Salmon [307], παρατηρήσαμε ότι όντως τα RIDD μετάγραφα που ήταν εμπλουτισμένα σε TopHits βρίσκονταν σε σημαντικά μεγαλύτερη αφθονία στα GBM κύτταρα που ήταν διαμολυσμένα με την ανενεργή IRE1 παραλλαγή (Q*) σε σχέση με τα αντίστοιχα XBP1s-εξαρτώμενα μετάγραφα όταν συγκρίθηκαν και κανονικοποιήθηκαν ως προς τα κύτταρα της πατρικής σειράς (**Εικόνα 3.42B και C**).



Εικόνα 3.42. Αυξημένη παρουσία των *in vitro* επιβεβαιωμένων TopHits στα υπό-εκφρασμένα RIDD μετάγραφα των RIDD+ GBM όγκων και αυξημένη έκφραση των μεταγράφων αυτών σε πρωτογενείς GBM κυτταρικές σειρές ασθενών διαμολυσμένες με την ανενεργή IRE1 ισομορφή Q*

(A) Συγκριτική απεικόνιση του βαθμού εμπλουτισμού των *in vitro* επιβεβαιωμένων νουκλεοτιδικών μοτίβων (TopHits) στα υπό-εκφρασμένα RIDD μετάγραφα των RIDD+ TCGA-GBM όγκων και των XBP1s-εξαρτώμενων μεταγράφων της υπογραφής IRE1sign38, με επίπεδο σημαντικότητας κατά την αναζήτηση των TopHits $p < 0.01$. Στα *a*, *b* και *c* απεικονίζεται η αντίστοιχη ανάλυση για τα εξανουκλεοτίδια CUGCAG, CUGGCG και CAGCUC. (B),(C) Συγκριτική απεικόνιση της σχετικής αφθονίας των RIDD μεταγράφων που είχαν υψηλό βαθμό εμπλουτισμού στα topHits (υπό-εκφρασμένα στους RIDD+ TCGA-GBM όγκους) και των XBP1s-εξαρτώμενων μεταγράφων, σε πρωτογενείς GBM κυτταρικές σειρές ασθενών που υπερέκφραζαν την ανενεργή μεταλλαγμένη IRE1 ισομορφή Q*, με τα υπολογιστικά εργαλεία Salmon και Kallisto, αντίστοιχα.

3.2.7 Προσδιορισμός *de novo* Νουκλεοτιδικών Μοτίβων σε Υποψήφια Πρόδρομα miRNA Μόρια, Δυνητικούς Στόχους της RIDD Δράσης σε GBM Κύτταρα

Έχοντας ήδη ταυτοποιήσει και επιβεβαιώσει πειραματικά νουκλεοτιδικά μοτίβα αλλά και δομικά στοιχεία 2ταγούς RNA δομής μέσα στα οποία εδράζονται τα μοτίβα αυτά, ως υποψήφιες θέσεις αναγνώρισης και άσκησης της RIDD δράσης σε mRNA μετάγραφα, επεκτείναμε την ανάλυσή μας και στα υποψήφια πρόδρομα miRNA μόρια τα οποία είχαν προσδιοριστεί στα U87 κύτταρα ως δυνητικοί miRIDD στόχοι (Ενότητα 2.3.2.1 και 3.1.4). Για τον σκοπό αυτό εξορύξαμε αρχικά τις προβλεφθείσες με τον αλγόριθμο RNAfold 2ταγείς RNA δομές με την ελάχιστη ελεύθερη ενέργεια (MFE) των πρόδρομων miRNA μορίων, σε μορφή «τελείας-αγκύλης» (dot-bracket) (**Εικόνα 3.43**), και με την βοήθεια της rython βιβλιοθήκης για χειρισμό και οπτικοποίηση της 2ταγούς RNA δομής, forgi (2.0.0) (<https://viennarna.github.io/forgi/index.html>) αναπτύξαμε την κάθε δομή σε ξεχωριστό forgi αρχείο ορίζοντας τις συντεταγμένες κάθε δομικού στοιχείου. Στη συνέχεια με κατάλληλα rython scripts ανακτήσαμε τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που περιέχονται σε δομή βρόχου-στελέχους και εσωτερικού βρόχου (**Εικόνα 3.43**), αντίστοιχα, και διεξήγαμε ανάλυση ακολουθιών για τον εντοπισμό *de novo* νουκλεοτιδικών μοτίβων αλλά και αναλόγων του 5'-CUGCAG-3' εξανουκλεοτιδίου (**Εικόνα 3.44**). Η ανάλυσή μας περιλάμβανε εκτός από την miRIDD υπογραφή και όλη την λίστα (LIST1) των πρόδρομων miRNAs που βρέθηκαν από κοινού υπέρ-εκφρασμένα στα U87 κύτταρα κατά τις συγκρίσεις DN vs.WT και DNTN vs. WTTN. Στην περίπτωση αναζήτησης *de novo* νουκλεοτιδικών μοτίβων στην LIST1 σε δομή βρόχου-στελέχους (**Εικόνα 3.44A**) προέκυψαν 2 στατιστικά σημαντικά μοτίβα με υψηλό ποσοστό εμφάνισης μεταξύ των ακολουθιών ($\geq 50\%$) εκ των οποίων το ένα ακολουθούσε το πρότυπο του CUGCAG εξανουκλεοτιδίου με συντελεστή συσχέτισης της τάξεως του 0.71, ενώ το άλλο περιλάμβανε την επικράτηση του τρινουκλεοτιδίου UGA με επανάληψη καταλοίπων U και A, σε αντιστοιχία με τα νουκλεοτιδικά μοτίβα που κυριαρχούσαν και στην περίπτωση των mRNA RIDD στόχων, όπου χαρακτηριζόνταν από χαμηλό πληροφοριακό περιεχόμενο. Στην περίπτωση των ακολουθιών εσωτερικού βρόχου (**Εικόνα 3.44B**) το μοτίβο που διακρίθηκε παρουσίαζε μεγαλύτερου βαθμού συντήρηση καταλοίπων στις 2 πρώτες

[ΑήU][GήU]) και στις 2 τελευταίες θέσεις [G ή C][A] ενώ παρουσίαζε σημαντική συσχέτιση και με τα δύο μοτίβα του βρόχου-στελέχους. Όταν όμως η ανάλυση περιορίστηκε στα miRNAs της miRIDD υπογραφής για την δομή βρόχου-στελέχους (**Εικόνα 3.44C**) τότε αναδείχθηκε για άλλη μια φορά η έντονη παρουσία του προτύπου κατά IUPAC SWSSWS με τα 4 πρώτα κατάλοιπα να είναι απόλυτα σύμφωνα ενώ τα 2 τελευταία μοιράζονταν μεταξύ των C ή A και U ή G, αντίστοιχα. Στην περίπτωση του εσωτερικού βρόχου δεν βρέθηκε κάποιο κοινό μοτίβο.

RNAfold_output1 (ss.dotbracket)

```
>hsa_let_7e_MI0000066
ccccgggcugagguaggagguuguaugagggaggacaccaaggagaucaacuacggccuccuagcuiuuccccagg
(((.....((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((.....))))))))))))))))))))))))))))))))))))))))))))))))) (-36.70)
```

RNAfold_output2 (MI0000066_ss.ps)



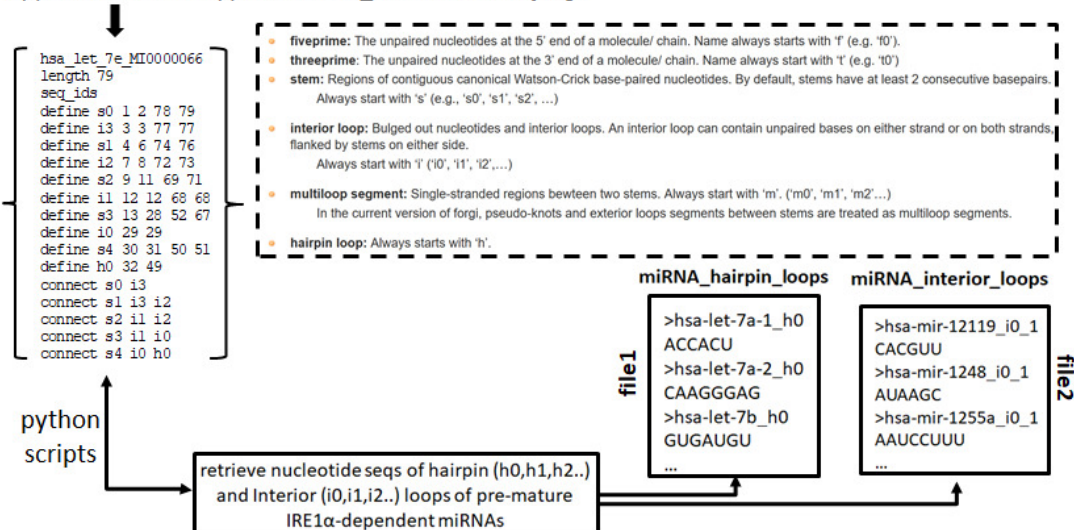
miRBase (Stem-loop sequence)

```

          c  cu  g          u  ---gga  a
5' cc ggg gag uaggagguuguaugu ga      gg c
   ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
3' gg ccc uuc auccuccggcauaua cu      cc a
          a  cu  g          -  agaggaa  c
```

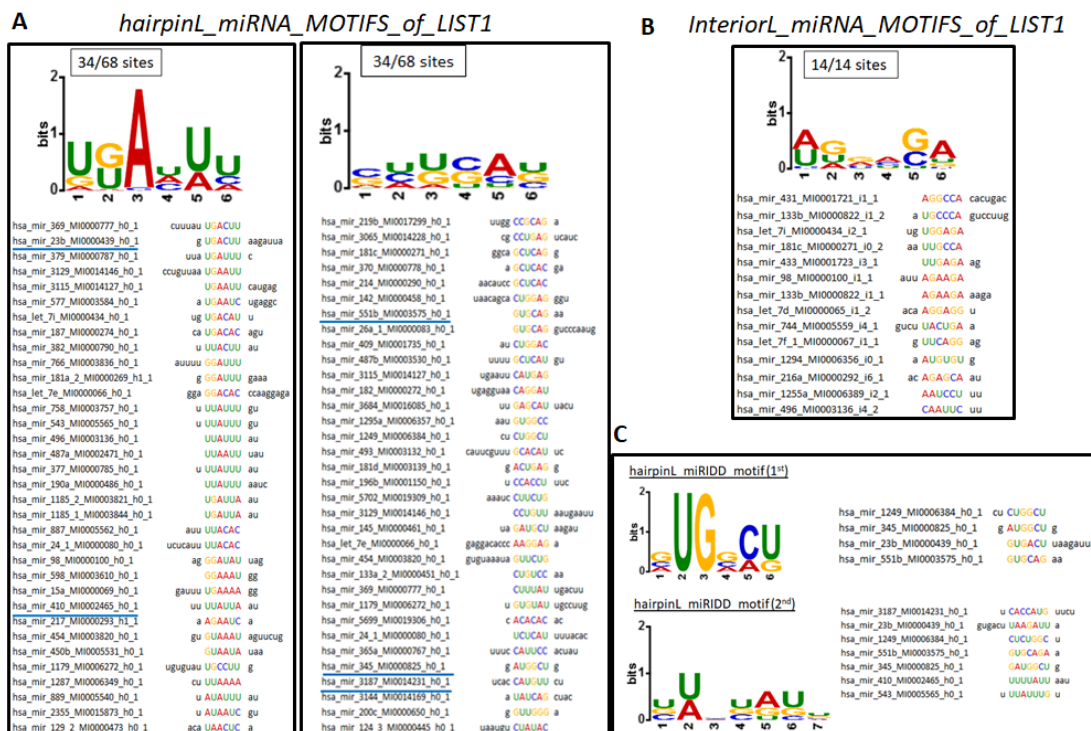
Forgi Python Library

```
$ python rnaConvert.py MI0000066_ss.dotbracket -T forgi
```



Εικόνα 3.43. Ροή εργασίας για την εξόρυξη των ακολουθιών που εντοπίζονται σε δομή βρόχου-στελέχους και εσωτερικού βρόχου σε πρόδρομα miRNA μόρια

Η ροή εργασίας περιλαμβάνει την δημιουργία των *ss.dotbracket* αρχείων με την υλοποίηση του αλγορίθμου πρόγνωσης 2ταγούς RNA δομής, *RNAfold*, την μετατροπή κάθε αρχείου σε *forgi* με το *rpython script* «*rnaConvert.py*» και στη συνέχεια ανάκτηση των νουκλεοτιδικών ακολουθιών που περιέχονται σε δομή βρόχου-στελέχους (h0, h1,h2..) και εσωτερικού βρόχου (i0, i1, i2..), δημιουργώντας αντίστοιχα 2 αρχεία *fasta*. Στο μπλέ πλαίσιο απεικονίζεται η ακολουθία του ανθρώπινου πρόδρομου (*pre-mature*, *precursor* ή *hairpin*) miRNA «*hsa-let-7e*» στην βάση miRBase (ακολουθία στελέχους-βρόχου). Εκτός από την 2ταγή RNA δομή του πρόδρομου miRNA σε απεικόνιση «τελείας-αγκύλης» σημειώνεται και η τιμή της ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας (MFE) που αντιστοιχεί στην πιο σταθερή θερμοδυναμικά δομή.



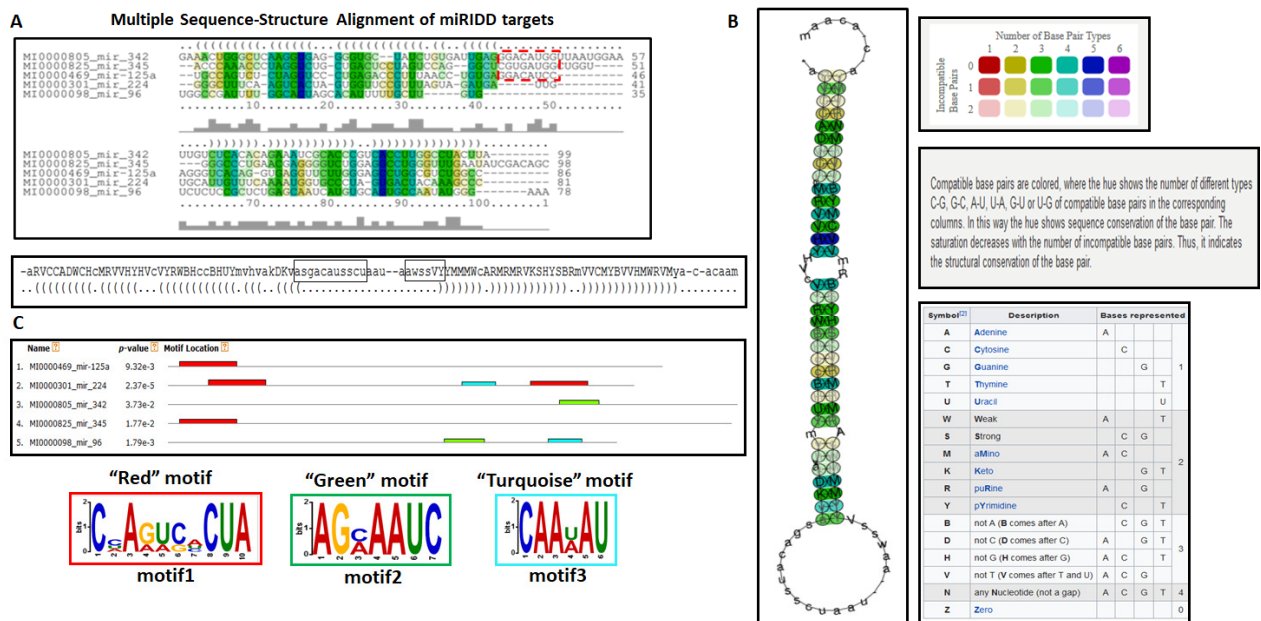
Εικόνα 3.44. Προσδιορισμός *de novo* νουκλεοτιδικών μοτίβων σε βρόχο στελέχους και εσωτερικό βρόχο σε πρόδρομα miRNA μόρια που αναδείχθηκαν ως υποψήφιοι στόχοι της RIDD δράσης από την ανάλυση των U87 miRNAseq δεδομένων

(A) MEME *de novo* motifs που αναδείχθηκαν ως στατιστικά σημαντικά στην λίστα των miRNA ακολουθιών (LIST1) που περιέχονται σε δομή βρόχου-στελέχους και πολλαπλή στοίχιση των υποψήφιων ακολουθιών. Με μπλε χρώμα έχουν υπογραμμιστεί τα miRNAs που αποτελούν μέλη της miRIDD υπογραφής. (B) MEME *de novo* motif που αναδείχθηκε ως στατιστικά σημαντικό στην λίστα των miRNA ακολουθιών (LIST1) που περιέχονται σε δομή εσωτερικού βρόχου και πολλαπλή στοίχιση των υποψήφιων ακολουθιών. (C) MEME *de novo* motifs που αναδείχθηκαν ως στατιστικά σημαντικά σε δομή βρόχου-στελέχους στα miRNA της miRIDD υπογραφής και πολλαπλή στοίχιση των υποψήφιων ακολουθιών.

3.2.8 Εντοπισμός *de novo* Νουκλεοτιδικών Μοτίβων και Αναλόγων του Εξανουκλεοτιδίου 5'-[CUGCAG]-3' σε Πρόδρομα miRNA Μόρια, Κοινούς Δυνητικούς Στόχους της RIDD Δράσης σε MDA-MB-231 και U87 Κύτταρα

Η ανάλυση των ακολουθιών των πρόδρομων miRNA μορίων λαμβάνοντας υπόψη την δομική πληροφορία της 2ταγούς RNA δομής τους όπως απορρέει από την προβλεφθείσα αναδίπλωση του μορίου πραγματοποιήθηκε και για ένα σύνολο miRNA μορίων που είχαν χαρακτηριστεί ως κοινός υποψήφιος στόχος της RIDD δράσης στην κυτταρική σειρά του TNBC, MDA-MB-231 και στην κυτταρική σειρά του GBM, U87 (**Ενότητα 3.3.7**). Κάνοντας χρήση του αλγορίθμου LocARNA (<https://rna.informatik.uni-freiburg.de/LocARNA/Input.jsp>) [403] που επιτρέπει την ταυτόχρονη αναδίπλωση και στοίχιση RNA ακολουθιών αναζητήθηκε στα πρόδρομα miRNA μόρια η δημιουργία μιας ομόφωνης πρότυπης 2ταγούς RNA δομής στην οποία αφενός θα «υπακούουν» οι επιμέρους δομές και αφετέρου θα αναδεικνύονται

πιθανές περιοχές με υψηλό βαθμό συντήρησης και εμπλουτισμό σε νουκλεοτιδικά μοτίβα ανάλογα των ήδη ταυτοποιημένων υποψήφιων για την miRIDD δράση. Η πολλαπλή στοίχιση των ακολουθιών (**Εικόνα 3.45A**) ανέδειξε τον υψηλό βαθμό ομολογίας μεταξύ των περιοχών που εδράζονται κυρίως στις δίκλωνες περιοχές των μορίων ενώ στον μεγάλο βρόχο στελέχους (**Εικόνα 3.45A και B**) που διαθέτουν αυτά τα μόρια παρατηρήσαμε την παρουσία του μοτίβου [GC]G[AU][CG]AU[GC][GC] (στις αγκύλες καταγράφονται τα υποψήφια νουκλεοτιδία για την συγκεκριμένη θέση ενώ αυτά που αναφέρονται πρώτα έχουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης) με την παρουσία διπλών «ισχυρών» καταλοίπων (συνδυασμό GC) που συνήθως ακολουθούν ένα «ασθενές» κατάλοιπο (U ή A) και λιγότερο συχνά ακολουθούνται από επίσης ασθενές κατάλοιπο. Η αναζήτηση νουκλεοτιδικών μοτίβων σε επίπεδο ακολουθίας χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η δομική πληροφορία (**Εικόνα 3.45C**) ανέδειξε 3 μοτίβα με το 1^ο (motif1) και το 2^ο (motif2) να εμπεριέχουν το πρότυπο των 2 ισχυρών καταλοίπων που ακολουθούν ή/και ακολουθούνται από ασθενές νουκλεοτίδιο. Εντούτοις δεν παρατηρήθηκε κάποιο στατιστικά σημαντικό μοτίβο κοινό σε όλες τις υποψήφιες ακολουθίες.

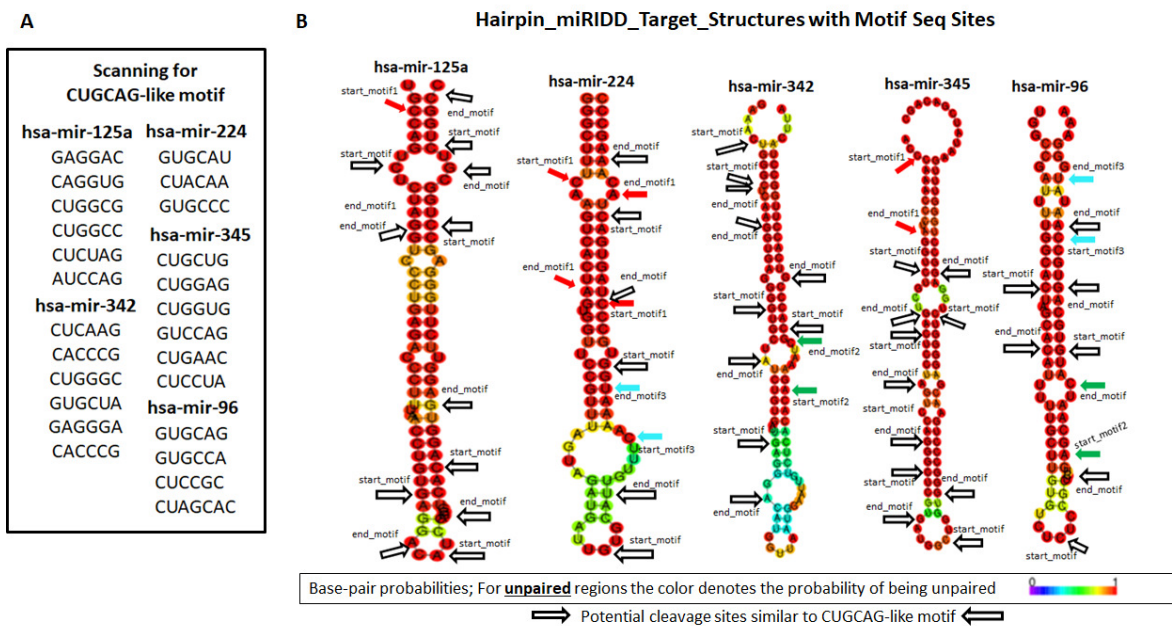


Εικόνα 3.45. Η πολλαπλή στοίχιση των ακολουθιών των πρόδρομων miRIDD στόχων, με την ενσωμάτωση της πληροφορίας για την 2ταγή τους δομή αποκαλύπτει τον υψηλό βαθμό της τοπικής τους ομολογίας και αναδεικνύει υποψήφιες θέσεις για την νουκλεολυτική δράση της IRE1

(A) Πολλαπλή στοίχιση των ακολουθιών των πρόδρομων miRNAs (υποψήφιοι στόχοι της miRIDD δράσης) με ταυτόχρονη αναδίπλωση των μορίων με τον αλγόριθμο LocARNA. Τα συμβατά ζεύγη νουκλεοτιδίων είναι χρωματισμένα ενώ η διαφορετική απόχρωση αντικατοπτρίζει και τον διαφορετικό τύπο ζευγαρώματος στις αντίστοιχες στήλες π.χ. C-G, G-C, A-U, U-A, G-U ή U-G. Με τον τρόπο αυτό η απόχρωση δείχνει την νουκλεοτιδική συντήρηση του νουκλεοτιδικού ζεύγους. Η ένταση του χρώματος φθίνει με τον αριθμό των ασύμβατων ζευγαριών, κάτι που υποδεικνύει την συντήρηση του νουκλεοτιδικού ζεύγους σε δομικό επίπεδο. Σε κόκκινο πλαίσιο με διακεκομμένη γραμμή σημειώνεται το νουκλεοτιδικό μοτίβο που εντοπίζεται σε μονόκλωνη κατάσταση (βρόχο-

στελέχους) στα υποψήφια miRNAs. Κάτω από την πολλαπλή στοίχιση απεικονίζεται η παραγόμενη συναινετική νουκλεοτιδική ακολουθία και δομή. Σε μαύρο πλαίσιο σημειώνονται τα νουκλεοτιδικά μοτίβα που συμφωνούν με το CUGCAG και εντοπίζονται στον βρόχο-στελέχους. (B) Απεικονίζεται η προερχόμενη από την πολλαπλή στοίχιση ομόφωνη 2ταγή δομή όπως προέκυψε από τον αλγόριθμο RNAalifold [404]. (C) MEME de novo μοτίβα που προέκυψαν ως στατιστικά σημαντικά λαμβάνοντας υπόψη μόνο τις ακολουθίες των πρόδρομων miRNA μορίων. Κάθε μοτίβο απεικονίζεται με διαφορετικό χρώμα ενώ η σχετική του θέση πάνω στην ακολουθία απεικονίζεται με κουτιά του αντίστοιχου χρώματος.

Όταν όμως αναζητήσαμε τα εξανουκλεοτιδικά ανάλογα του 5'-CUGCAG- 3' που είχαμε ταυτοποιήσει στα RIDD mRNA μετάγραφα παρατηρήσαμε την ισχυρή τους παρουσία (Εικόνα 3.46A) σε πολλές θέσεις του μορίου (Εικόνα 3.46B) με την πλειονότητα αυτών να συμπεριφέρονται ως «συνδετήρες» (linker regions) μονόκλωνων και δίκλωνων περιοχών, συνδέοντας βρόχους-στελεχών και κυρίως εσωτερικούς βρόχους με δίκλινα τμήματα. Αξίζει να σημειωθεί όταν εφαρμόσαμε αυτού του είδους την ανάλυση και για τα XBP1s-εξαρτώμενα miRNAs τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με έντονη την παρουσία των νουκλεοτιδικών μοτίβων αναγνώρισης για IRE1 αποκοπή σε αντίστοιχες θέσεις των μορίων. Συνεπώς, στην περίπτωση της miRIDD δράσης τα πράγματα φαίνονται περισσότερο πολύπλοκα για τον μηχανισμό αναγνώρισης και αποκοπής των πρόδρομων miRNA μορίων, έναν μηχανισμό στον οποίο μπορεί να υπεισέρχονται και πολλοί άλλοι παράγοντες που θα μπορούσαν ανάλογα τις συνθήκες να «εκθέτουν» ή να «προστατεύουν», αντίστοιχα, τα miRNAs από την νουκλεολυτική δράση. Εντούτοις δεν μπορούμε να μην επισημάνουμε ότι τα IRE1-εξαρτώμενα πρόδρομα miRNAs που ταυτοποιήσαμε ήταν εμπλουτισμένα σε νουκλεοτιδικά ανάλογα του CUGCAG εξανουκλεοτιδίου και μάλιστα εδράζονταν τόσο σε δίκλωνες όσο και σε μονόκλωνες περιοχές των μορίων.



Εικόνα 3.46. Υποψήφιες θέσεις της miRIDD δράσης στα πρόδρομα miRNA μόρια, κοινούς δυνητικούς στόχους σε TNBC και GBM κύτταρα

(A) Λίστα με τα εξανουκλεοτιδικά ανάλογα του CUGCAG εξανουκλεοτιδίου που βρέθηκαν σε κάθε πρόδρομο miRNA μόριο κατά την αναζήτηση με τον αλγόριθμο FIMO. (B) Απεικόνιση της προβλεφθείσας με το RNAfold 2ταγούς RNA δομής κάθε πρόδρομου miRNA. Για τον χρωματισμό της ακολουθίας χρησιμοποιήθηκε το perl script «teIplot.pl» όπου προσθέτει αξιοπιστία στην προβλεφθείσα δομή, απεικονίζοντας την πιθανότητα των νουκλεοτιδικών καταλοίπων να βρίσκονται ή να μην βρίσκονται σε ζευγαρωμένη κατάσταση με χρωματική κλίμακα. Σε κάθε δομή έχουν σημειωθεί με βέλη τόσο οι θέσεις αρχής και τέλους των νουκλεοτιδικών αναλόγων του CUGCAG εξανουκλεοτιδίου όσο και οι αντίστοιχες θέσεις των de novo ταυτοποιημένων νουκλεοτιδικών μοτίβων της Εικόνα 3.45.

3.2.9 Ταυτοποίηση Πρόδρομων miRNA Μορίων της miRBase που Φέρουν Νουκλεοτιδικά Μοτίβα Ανάλογα του 5'-CUGCAG-3' σε Εσωτερικό βρόχο ή/και Βρόχο-Στελέχους

Τέλος, επεκτείναμε την αναζήτηση των υποψήφια ταυτοποιημένων νουκλεοτιδικών μοτίβων αναγνώρισης για αποκοπή από την IRE1 RNάση σε όλα τα πρόδρομα miRNA μόρια που αφορούσαν στο ανθρώπινο είδος (hsa) και είναι κατατεθειμένα στην βάση miRBase (Release 22.1) (<https://www.mirbase.org/>). Εφαρμόζοντας την ροή εργασίας που απεικονίζεται στην **Εικόνα 3.43** αναζητήσαμε εξανουκλεοτιδικά ανάλογα του 5'-CUGCAG-3' σε δομές βρόχου-στελέχους (hairpin ή stem-loop) και εσωτερικού βρόχου (internal/bulge/interior loop), διευρύνοντας την λίστα των υποψήφια miRIDD στόχων για περαιτέρω πειραματική διερεύνηση. Η αναζήτησή μας έγινε με δύο διαφορετικούς τρόπους όπου στον 1^ο δεν συμπεριλάβαμε καθόλου τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται σε ζευγαρωμένη κατάσταση στην βάση των βρόχων (ένα νουκλεοτιδικό ζεύγος για τους βρόχους-στελεχών και 2 νουκλεοτιδικά ζεύγη εκατέρωθεν των εσωτερικών βρόχων) ενώ στον 2^ο τρόπο τα συμπεριλάβαμε. Όπως ήταν αναμενόμενο, ο 2^{ος} τρόπος ανέδειξε περισσότερα υποψήφια πρόδρομα miRNAs και για τις 2 δομές (βρόχος-στελέχους και εσωτερικός βρόχος) τα οποία απεικονίζονται στους Πίνακες 8A και 8B, αντίστοιχα.

A

CUGCAG-like motifs	pre-mature human miRNAs with hairpin loop seqs matched to the CUGCAG-like candidate IRE1α cleavage motifs									
CUGCAG	hsa-mir-6730_h0	hsa-mir-4524a_h0	hsa-mir-548a_h1	hsa-mir-4524b_h0						
CAACAA	hsa-mir-550b_2_h0	hsa-mir-550b_1_h0	hsa-mir-103b_1_h0	hsa-mir-5708_h0						
CAUCA	hsa-mir-10393_h0	hsa-mir-4735_h0	hsa-mir-485_h0							
CAGCUC	hsa-mir-3937_h0	hsa-mir-370_h0	hsa-mir-181c_h0	hsa-mir-6829_h0	hsa-mir-6794_h0					
CAACAC	hsa-mir-3664_h0	hsa-mir-4635_h0								
CUCCAC	hsa-mir-4436a_h0	hsa-mir-499a_h0								
CUGCCA	hsa-mir-7114_h0	hsa-mir-8089_h0	hsa-mir-505_h0							
CACCAU	hsa-mir-492_h0	hsa-mir-3187_h0	hsa-mir-3118-1_h0							
CUGCAG	hsa-mir-6889_h0	hsa-mir-6165_h1	hsa-mir-191_h0	hsa-mir-936_h0	hsa-mir-1267_h0	hsa-mir-6829_h0	hsa-mir-3170_h0	hsa-mir-4267_h0	hsa-mir-3197_h0	hsa-mir-4666a_h0
CUCCUC	hsa-mir-6809_h0	hsa-mir-3174_h0	hsa-mir-4274_h0	hsa-mir-499a_h0	hsa-mir-3651_h0	hsa-mir-4674_h0	hsa-mir-8081_h0			
CUGCAU	hsa-mir-6762_h0									
CUGGCG	hsa-mir-6886_h0									
CUGAAG	hsa-mir-3140_h0	hsa-mir-6883_h0	hsa-mir-601_h1							
CCCCAG	hsa-mir-4271_h0	hsa-mir-6751_h0	hsa-mir-3196_h0	hsa-mir-6513_h0						
CACCAU	hsa-mir-371b_h0	hsa-mir-4534_h0	hsa-mir-6767_h0	hsa-mir-4433b_h0						
CAGCAG	hsa-mir-6863_h0	hsa-mir-6501_h0	hsa-mir-6516_h0	hsa-mir-6751_h0	hsa-mir-6780a_h0					
CUACAA	hsa-mir-4666a_h0	hsa-mir-4512_h0	hsa-mir-2861_h0	hsa-mir-561_h0	hsa-mir-4426_h0	hsa-mir-103b-2_h0				
CUGGAG	hsa-mir-10226_h0	hsa-mir-4313_h0	hsa-mir-324_h0	hsa-mir-132_h0	hsa-mir-142_h0					
CUGGUC	hsa-mir-6133_h0									
CUGGAC	hsa-mir-409_h0									

B

CUGCAG-like motifs	pre-mature human miRNAs with internal loop seqs matched to the CUGCAG-like candidate IRE1α cleavage motifs			
CUGCAG	hsa-mir-3621_i1_1	hsa-mir-6787_i1_1	hsa-mir-6716_i0_2	
CAACAA	hsa-mir-492_i3_2	hsa-mir-1285-2_i2_2	hsa-mir-4709_i0_1	
CAUCA	hsa-mir-34b_i1_2			
CUCCAC	hsa-mir-8078_i0_2	hsa-mir-545_i0_2		
CUGCCA	hsa-mir-6125_i3_1			
CACCAU	hsa-mir-187_i0_1	hsa-mir-5579_i0_1		
CUGCAG	hsa-mir-4493_i0_2	hsa-mir-4324_i2_1	hsa-mir-4251_i0_1	hsa-mir-3176_i0_1
CUCCUC	hsa-mir-4268_i2_2	hsa-mir-6857_i5_1		hsa-mir-5090_i0_2
CUGCAU	hsa-mir-6738_i0_2			
CUGAAG	hsa-mir-6753_i3_1	hsa-mir-744_i4_1		
CCCCAG	hsa-mir-202_i0_2	hsa-mir-940_i2_1		
CACCAU	hsa-mir-5194_i1_2	hsa-mir-4764_i2_1	hsa-mir-4764_i2_2	hsa-mir-550b-1_i1_2
CAGCAG	hsa-mir-4435-2_i1_2	hsa-mir-4435-1_i1_2		
CUACAA	hsa-mir-664a_i0_2			
CUGGAG	hsa-mir-4725_i0_1	hsa-mir-765_i5_1		
CUGGAC	hsa-mir-622_i0_1			

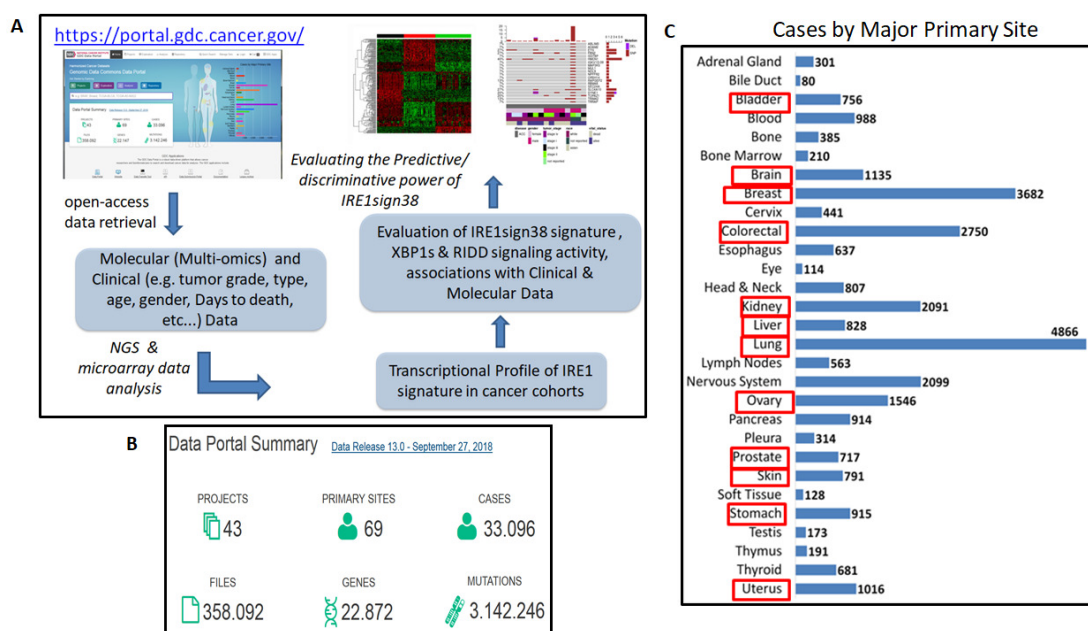
Πίνακας 8. Ταυτοποίηση πρόδρομων miRNA μορίων της miRBase (Release 22.1) που φέρουν νουκλεοτιδικά μοτίβα ανάλογα του 5'-CUGCAG-3' σε εσωτερικό βρόχο ή/και βρόχο-στελέχους

(A) Απεικόνιση των πρόδρομων miRNAs που περιλαμβάνουν κάποιο(α) από τα υποψήφια εξανουκλεοτίδια που αναφέρονται στην 1^η στήλη του πίνακα σε κάποιο(ους) βρόχους-στελεχών (h0, h1..). Με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα miRNAs που προστέθηκαν στην λίστα όταν συμπεριλάβαμε στην αναζήτησή μας και το νουκλεοτιδικό ζεύγος στην βάση των βρόχων. Με κόκκινο χρώμα σε ροζ πλαίσιο σημειώνονται τα miRNAs που περιλαμβάνουν περισσότερα του ενός από τα εξανουκλεοτίδια της στήλης «CUGCAG-like motifs». miRNAs που περιέχουν κάποιο (α) από τα υποψήφια μοτίβα τόσο σε δομή βρόχου-στελέχους όσο και σε δομή εσωτερικού βρόχου περικλείονται σε πράσινο πλαίσιο. (B) Απεικόνιση των πρόδρομων miRNAs που περιλαμβάνουν κάποιο(α) από τα υποψήφια εξανουκλεοτίδια που αναφέρονται στην 1^η στήλη του πίνακα σε κάποιο(ους) εσωτερικούς βρόχους (i0_1 – i0_2, i1_1-i1_2..). Οι δύο μονόκλωνες περιοχές ενός εσωτερικού βρόχου σημειώνονται με 1 και 2 μετά τον αύξοντα αριθμό που ορίζει κάθε εσωτερικό βρόχο π.χ. i0, i1, κ.ο.κ. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα miRNAs που προστέθηκαν στην λίστα όταν συμπεριλάβαμε στην αναζήτησή μας και τα 2 νουκλεοτιδικά ζεύγη εκατέρωθεν του εσωτερικού βρόχου. Με κόκκινο χρώμα σε ροζ πλαίσιο σημειώνονται τα miRNAs που περιλαμβάνουν περισσότερα του ενός από τα εξανουκλεοτίδια της στήλης «CUGCAG-like motifs».

3.3 Αξιολόγηση της IRE1 Σηματοδοτικής Δραστηριότητας σε 12 Διαφορετικούς Τύπους Καρκίνου του Προγράμματος TCGA

Η αξιολόγηση της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας όπως εκδηλώνεται μέσα από τους δύο κύριους άξονες δράσης της, τον άξονα του XBP1s και τον άξονα της RIDD νουκλεολυτικής αποικοδόμησης δεν εστιάστηκε μόνο στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (GBM) αλλά επεκτάθηκε και σε 11 ακόμη πρωτογενείς συμπαγείς καρκινικούς τύπους (Εικόνα 3.47C) ασθενών του TCGA προγράμματος όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 2.2, οι οποίοι καλύπτουν περίπου το 65% των καταχωρημένων περιπτώσεων. Μέσω του gdc portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) (Εικόνα 3.47B) και ακολουθώντας την ροή εργασίας που περιγράψαμε στην Ενότητα 2.3.4 ανακτήσαμε αρχικά τα υψηλής ποιότητας RNAseq και

microarray δεδομένα των πρωτοπαθών όγκων και στη συνέχεια χαρτογραφήσαμε το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης των γονιδίων της υπογραφής IRE1sign38 στους ασθενείς της κάθε κόρτης ξεχωριστά. Η XBP1s-εξαρτώμενη σηματοδοτική ενεργότητα αλλά και η RIDD δράση βαθμολογήθηκαν σε κάθε τύπο καρκίνου με βάση το σύστημα βαθμολόγησης που περιγράψαμε στην Ενότητα 2.3.4.1 και οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε σύνολα υψηλής, μέτριας και χαμηλής ενεργότητας τόσο για την XBP1s και RIDD δράση όσο και για την IRE1 δραστικότητα συνολικά. Στη συνέχεια για να αξιολογήσουμε αφενός την διακριτική ικανότητα της IRE1 γονιδιακής υπογραφής στις διαφορετικές ομάδες ασθενών και αφετέρου για να εκτιμήσουμε την πιθανή συσχέτισή της με μοριακά ή/και κλινικά δεδομένα διεξήγαμε μια σειρά από αναλύσεις που περιλάμβαναν την ανάλυση ολικής επιβίωσης κατά Kaplan Meier, την απεικόνιση του προφίλ μεταλλάξεων των ασθενών και την συσχέτισή του (συμφάνιση ή απόκλιση) με το προφίλ μεταλλάξεων-οδηγών σε σημαντικά ογκοκατασταλτικά γονίδια και ογκογονίδια που χαρακτηρίζουν τον κάθε τύπο καρκίνου, την συσχέτιση των επιπέδων μεταγραφικής έκφρασης και ενεργότητας της IRE1sign38 με κλινικά χαρακτηριστικά όπως ο τύπος (tumor type), το στάδιο (tumor stage), ο βαθμός (tumor grade) του καρκίνου ή/και ο μοριακός υπότυπος έκφρασης (π.χ. PP: εγγύς πολλαπλασιαστικός, TRU: τελικής αναπνευστικής μονάδας και PI: εγγύς φλεγμονώδης στο Αδενοκαρκίνωμα του Πνεύμονα-LUAD), κ.ά. Η ροή εργασίας που εφαρμόστηκε απεικονίζεται συνοπτικά στην **Εικόνα 3.47A**.



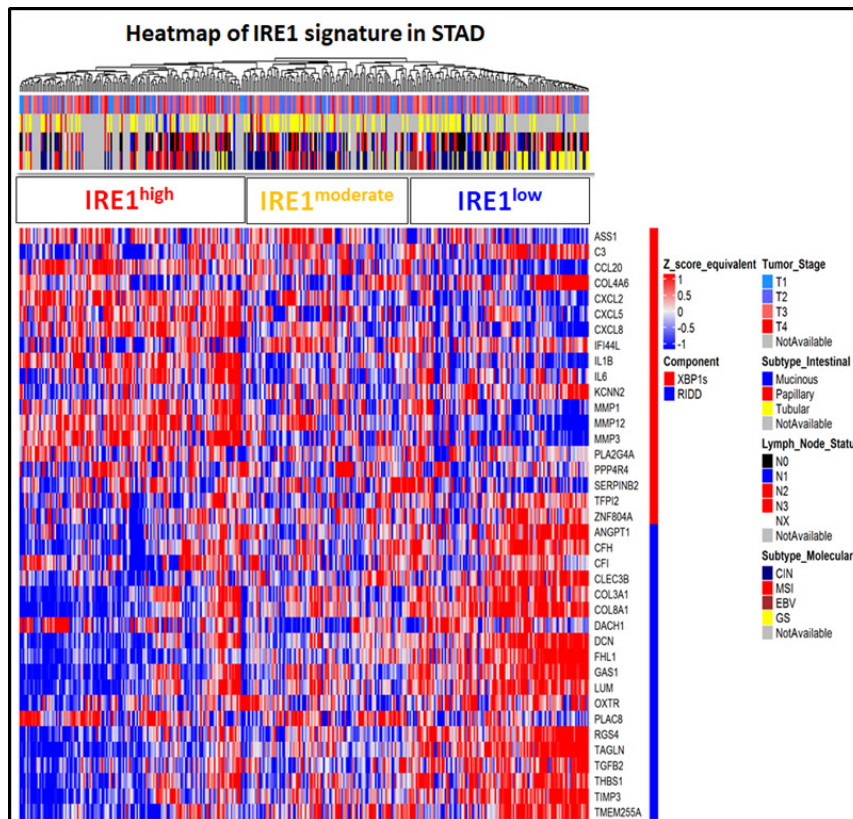
Εικόνα 3.47. Συνοπτική περιγραφή της ροής εργασίας που ακολουθήθηκε για την αξιολόγηση της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας σε 12 διαφορετικούς πρωτογενείς τύπους καρκίνου του TCGA προγράμματος

(B) Συνοπτικός πίνακας στον οποίο απεικονίζονται ο αριθμός των projects, ο αριθμός των πρωτογενών θέσεων καρκίνου, ο αριθμός των περιπτώσεων, ο αριθμός των αρχείων, το σύνολο των εξεταζόμενων γονιδίων και ο συνολικός καταγεγραμμένος αριθμός γονιδιακών μεταλλάξεων. (C) Ιστόγραμμα με τον αριθμό των περιπτώσεων που αναφέρονται σε κάθε πρωτοπαθή όγκο του TCGA προγράμματος. Με κόκκινο πλαίσιο σημειώνονται οι τύποι καρκίνου στους οποίους αξιολογήσαμε την IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα.

3.3.1 Τα Παραδείγματα του STAD και LUAD

Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα καρκινικών τύπων που μελετήθηκαν διεξοδικά για την αξιολόγηση της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας ήταν το Αδενοκαρκίνωμα του Στομάχου (STAD) και το Αδενοκαρκίνωμα του Πνεύμονα (LUAD). Το αδενοκαρκίνωμα του στομάχου αποτελεί τον συχνότερο κακοήγη όγκο του στομάχου, τον τέταρτο συχνότερο καρκίνο παγκοσμίως μετά τον καρκίνο του πνεύμονα, του μαστού και του παχέος εντέρου και την δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου από καρκίνο στον κόσμο μετά τον καρκίνο του πνεύμονα [405].

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ) έχει κατηγοριοποιήσει το αδενοκαρκίνωμα του στομάχου σε υπότυπους ανάλογα με τον βαθμό εντερικής μετάπλασης που περιλαμβάνουν το βλεννώδες (Mucinous), το σωληνώδες (Tubular) και το θηλώδες (Papillary) αδενοκαρκίνωμα, ενώ το TCGA πρόγραμμα έχει καθιερώσει και μια μοριακή ταξινόμηση του γαστρικού καρκίνου σε 4 υπότυπους [406] που είναι οι ακόλουθοι: α) όγκοι θετικοί για τον ιό Epstein-Barr (EBV), οι οποίοι εμφανίζουν επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις στο PIK3CA, ακραία υπερμεθυλίωση του DNA και ενίσχυση των JAK2, CD274 (επίσης γνωστό ως PD-L1) και PDCD1LG2 (επίσης γνωστό ως PD-L2). Β) μικροδορυφορικοί ασταθείς όγκοι (MSI), οι οποίοι εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά μεταλλάξεων, συμπεριλαμβανομένου μεταλλάξεων σε γονίδια που κωδικοποιούν σημαντικές ογκογονικές πρωτεΐνες σηματοδότησης, γ) γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι (GS), οι οποίοι είναι εμπλουτισμένοι με την διάχυτη ιστολογική παραλλαγή (diffuse adenocarcinoma) και τις μεταλλάξεις του RHOA γονιδίου ή τις συντήξεις που περιλαμβάνουν πρωτεΐνες ενεργοποίησης της οικογένειας των GTPασών RHO και δ) όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια (CIN), που εμφανίζουν σημαντική ανευπλοειδία και εστιακή ενίσχυση του υποδοχέα των κινασών τυροσίνης. Η αναγνώριση αυτών των υποτύπων έχει παίξει πολύ σημαντικό ρόλο γιατί παρέχει ένα κριτήριο ταξινόμησης των ασθενών που σχετίζεται άμεσα με τις διαθέσιμες στοχευμένες θεραπείες.



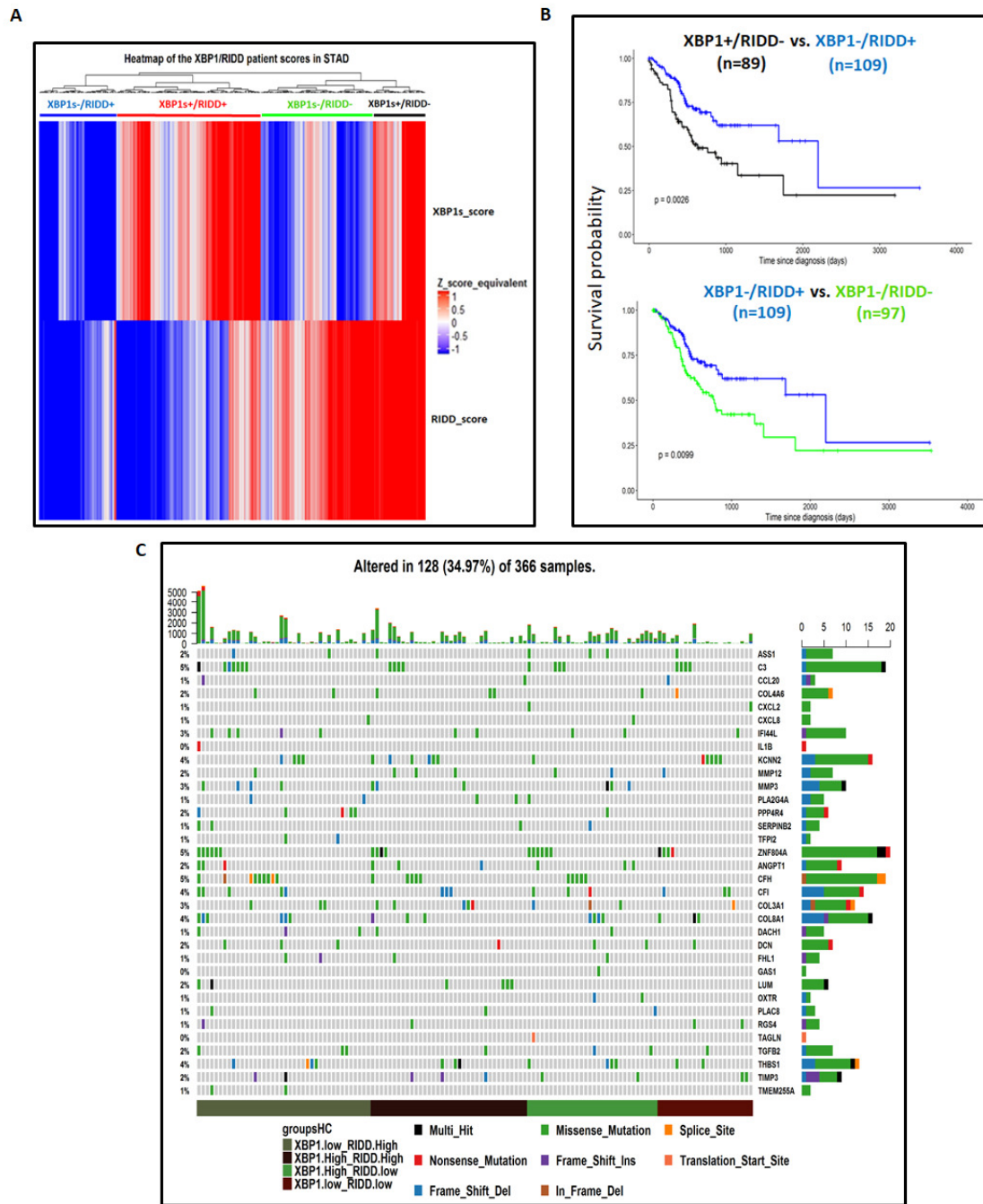
Εικόνα 3.48. Θερμικός χάρτης ιεραρχικής ομαδοποίησης των ασθενών της κοόρτης TCGA-STAD με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της υπογραφής IRE1sign38 όπου απεικονίζεται η συσχέτισή του με το στάδιο του όγκου, τους μοριακούς υπότυπους και την κατάσταση μεταστατικότητας σε λεμφαδένες.

Οι διαφορετικές συστάδες των ασθενών έχουν χαρακτηριστεί με βάση τα επίπεδα μεταγραφικής έκφρασης (σταθμισμένες $\log_2\text{CPM}$ τιμές) της XBP1s (κόκκινη στήλη) και RIDD συνιστώσας (μπλε στήλη) της IRE1 υπογραφής. Η ιεραρχική ομαδοποίηση των ασθενών/δειγμάτων έχει γίνει με βάση τον συντελεστή συσχέτισης του Pearson, χρησιμοποιώντας την μέση σύνδεση (average linkage) ως απόσταση ανάμεσα στις συστάδες. Επίσης στον σχημασμό του θερμικού χάρτη έχει συμπεριληφθεί επιπρόσθετη πληροφορία που αφορά στο στάδιο του όγκου (tumor stage), στον υπότυπο ανάλογα με τον βαθμό εντερικής μετάπλασης (Subtype_Intestinal: βλεννώδεις, θηλωδείς και σωληνώδεις αδενοκαρκίνωμα σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ.), στον δείκτη μεταστατικότητας σε λεμφαδένες (Lymph_Node_Status) και στον μοριακό υπότυπο (Subtype_Molecular). Τα T1, T2, T3, T4 αναφέρονται στο μέγεθος ή/και την έκταση του πρωτοπαθούς όγκου. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός μετά το T, τόσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος ή περισσότερο έχει αναπτυχθεί σε κοντινούς ιστούς. NX: η ύπαρξη καρκίνου στους κοντινούς λεμφαδένες δεν μπορεί να μετρηθεί, N0: δεν υπάρχει καρκίνος στους κοντινούς λεμφαδένες και τα N1, N2, N3 αναφέρονται στον αριθμό και τη θέση των λεμφαδένων που υπάρχει κακοήθεια. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός μετά το N, τόσο περισσότεροι λεμφαδένες εμπλέκονται. CIN: όγκοι με χρωμοσωμική αστάθεια, MSI: μικροδορυφορικοί ασταθείς όγκοι, EBV: όγκοι θετικοί για τον ιό Epstein-Barr και GS: γονιδιωματικά σταθεροί όγκοι.

Όπως γίνεται φανερό από την **Εικόνα 3.48** το μεταγραφικό προφίλ της υπογραφής IRE1sign38 διαχωρίζει τους TCGA-STAD ασθενείς σε τρεις κύριες ομάδες με βάση την IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα. Η ομάδα των IRE1^{high} χαρακτηρίζεται από τους XBP1s+/RIDD+ όγκους, η ομάδα των IRE1^{low} τους XBP1s-/RIDD- όγκους ενώ η ενδιάμεση κατάσταση IRE1^{moderate} περιλαμβάνει τους XBP1s+/RIDD- και XBP1s-/RIDD+ όγκους (**Εικόνα 3.49A**). Η ανάλυση ολικής επιβίωσης ανέδειξε τον άξονα RIDD ως την κύρια συνιστώσα που επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα επιβίωσης των ασθενών. Συγκεκριμένα η ενίσχυση της RIDD

σηματοδοτικής ενεργότητας βελτιώνει σημαντικά τα επίπεδα επιβίωσης των ασθενών, ενώ η ενίσχυση της XBP1s συνιστώσας τα δυσχεραίνει. Πρόκειται δηλαδή για μια ανταγωνιστικού τύπου αλληλεπίδραση ανάλογη της περίπτωσης που είχαμε καταγράψει στο GBM **(Εικόνα 3.49B)**. Επίσης ο θηλώδης υπότυπος αδενοκαρκινώματος απουσιάζει πλήρως από τους IRE1^{low} όγκους οι οποίοι περιλάμβαναν κυρίως τον σωληνώδη και σε μικρότερο ποσοστό τον βλεννώδη υπότυπο **(Εικόνα 3.48)** ενώ παρουσίαζε μια θετική συσχέτιση με την αυξημένη XBP1s σηματοδοτική ενεργότητα. Όσον αφορά στη συσχέτιση της IRE1 δραστηριότητας με τον μοριακό υπότυπο, παρατηρήθηκε μια υψηλού βαθμού συσχέτιση των XBP1s-/RIDD- (IRE1^{low}) όγκων με τον GS υπότυπο ενώ ο MSI φάνηκε να συμβαδίζει με την αυξημένη IRE1 δραστηριότητα. Ο υπότυπος CIN ήταν συχνότερος στους XBP1s- όγκους ενώ τέλος οι XBP1s+/RIDD- όγκοι περιλάμβαναν κυρίως περιπτώσεις ασθενών με αυξημένη μεταστατικότητα σε γειτονικούς λεμφαδένες (N2,N3) **(Εικόνα 3.48)**. Η δυσμενής επίδραση της αυξημένης XBP1s σηματοδοτικής ενεργότητας στην εξέλιξη αυτού του τύπου καρκίνου και η βελτίωση της κατάστασης όταν υπήρχε ενισχυμένη RIDD δράση αντικατοπτρίζεται και στο προφίλ των μεταλλάξεων **(Εικόνα 3.49C)** που εμφάνιζαν οι διαφορετικά χαρακτηρισμένοι ως προς την XBP1s/RIDD ενεργότητα, ασθενείς. Συγκεκριμένα, οι XBP1s-/RIDD- (χαμηλή IRE1 ενεργότητα) είχαν το μικρότερο ποσοστό μεταλλάξεων ενώ η ομάδα των XBP1+/RIDD- το μεγαλύτερο ποσοστό μεταλλάξεων σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι ένα σχετικά μικρό ποσοστό ασθενών έφεραν μεταλλάξεις στα γονίδια της υπογραφής IRE1sign38 (34.97%) ενώ σε κανένα γονίδιο της δεν παρατηρήθηκε συχνότητα μετάλλαξης >5% στο σύνολο της κοόρτης **(Εικόνα 3.49C)**, γεγονός που επιβεβαιώνει για άλλη μια φορά την άμεση συσχέτιση του σημαντικού ρυθμιστικού της ρόλου με τα επίπεδα έκφρασής της σε μεταγραφικό επίπεδο.

Ένας άλλος σημαντικός τύπος καρκίνου στον οποίο αξιολογήθηκε η IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα και διερευνήθηκε η συσχέτισή της με μια σειρά κλινικών και μοριακών παραμέτρων ήταν το Αδενοκαρκίνωμα του Πνεύμονα που αντιπροσωπεύεται στο πρόγραμμα TCGA από την TCGA-LUAD κοόρτη. Το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα ανήκει στον μη μικροκυτταρικό τύπο καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC) που είναι και ο συχνότερος στον πληθυσμό με ποσοστό περίπου 85-90% [407]. Το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα συνήθως εξελίσσεται από τους βλεννογόνους αδένες και αντιπροσωπεύει περίπου το 40% όλων των καρκίνων του πνεύμονα, ενώ είναι ο πιο συχνός ακόμη και στα άτομα που δεν έχουν καπνίσει ποτέ. Στην Ελλάδα, αποτελεί τον συχνότερο τύπο καρκίνου στους άνδρες και τον δεύτερο σε συχνότητα στις γυναίκες. Κάθε χρόνο, περισσότερα από 3.000 άτομα προσβάλλονται από καρκίνο του πνεύμονα.



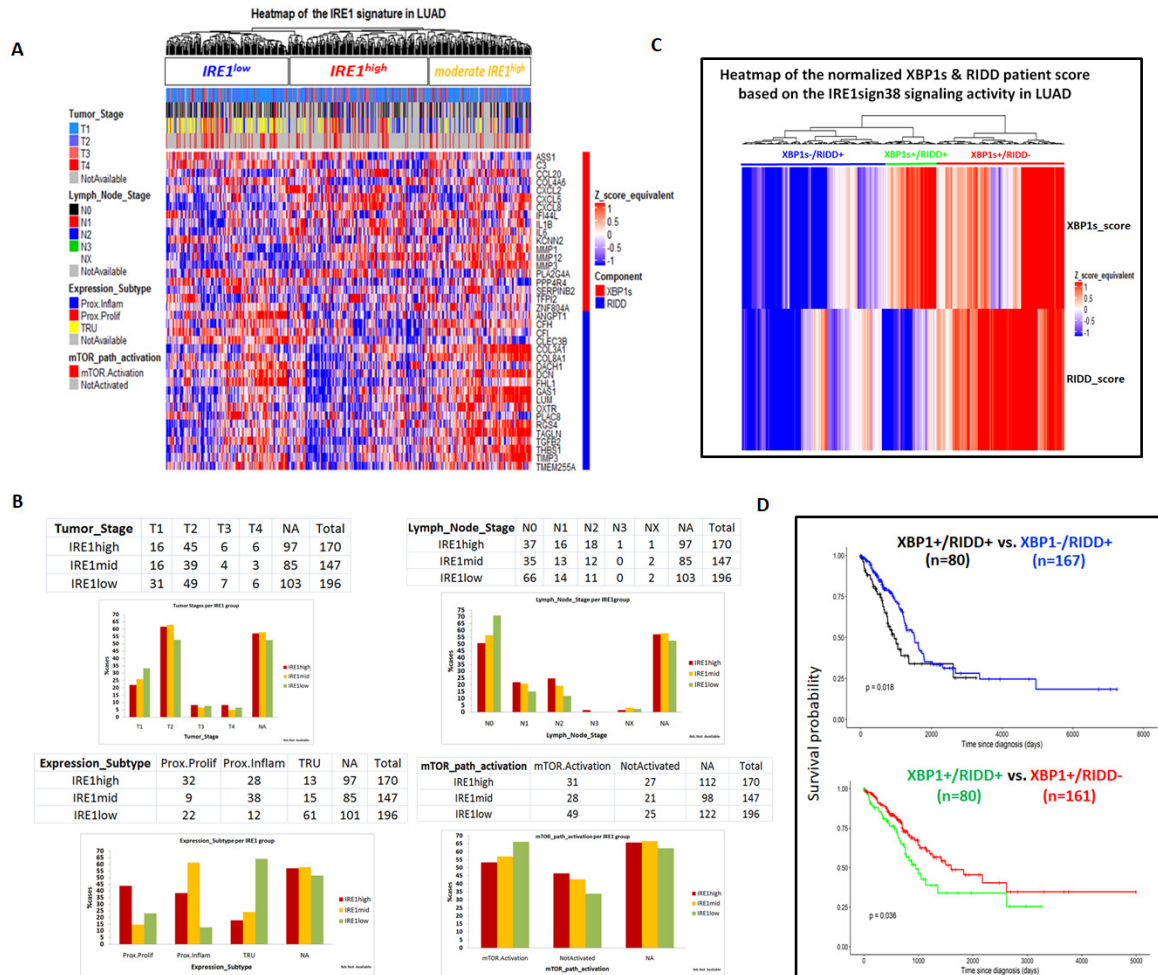
Εικόνα 3.49. Η μη επιβλεπόμενη ιεραρχική ομαδοποίηση των TCGA-STAD ασθενών με βάση την XBP1s και RIDD σηματοδοτική ενεργότητα αναδεικνύει 3 κύριες ομάδες όπου οι δύο συνιστώσες ασκούν αντίθετη επίδραση στα ποσοστά επιβίωσης, γεγονός που συμβαδίζει και με το αντίστοιχο προφίλ μεταλλάξεων

(Α) Μη επιβλεπόμενη ιεραρχική ομαδοποίηση των ασθενών με βάση το κανονικοποιημένο XBP1s και RIDD σκορ. Η αύξηση της έντασης του κόκκινου χρώματος αντικατοπτρίζει την αύξηση της XBP1s ενεργότητας και την μείωση της RIDD ενεργότητας, ενώ η αύξηση του μπλε χρώματος αντιστοιχεί σε μειωμένη XBP1s και αυξημένη RIDD ενεργότητα. Οι διαφορετικές συστάδες αντιστοιχούν σε ομάδες ασθενών με διαφορετική XBP1s ή/και RIDD σηματοδοτική ενεργότητα και απεικονίζονται με διαφορετικά χρώματα. (Β) Καμπύλες ολικής επιβίωσης των χαρακτηρισμένων ασθενών με βάση την XBP1s/RIDD ενεργότητα. Ο αριθμός των ασθενών που ανήκει σε κάθε ομάδα περιλαμβάνεται στις παρενθέσεις. (Γ) Γράφημα oncoplot που απεικονίζει το προφίλ μεταλλάξεων των γονιδίων της IRE1sign38 στις διαφορετικά χαρακτηρισμένες ομάδες ασθενών με το υπολογιστικό εργαλείο *varscan2* [408]. Στο κάθετο ιστόγραμμα δεξιά του γραφήματος απεικονίζεται η κατανομή του αριθμού των μεταλλάξεων στο σύνολο των ασθενών της κοόρτης ανα γονίδιο της υπογραφής IRE1sign38, ενώ στο οριζόντιο

ιστόγραμμα, στην κορυφή του γραφήματος, απεικονίζεται η κατανομή του συνολικού αριθμού των μεταλλάξεων ανα ασθενή. Η χρωματική μπάρα στην βάση του γραφήματος απεικονίζει τις διαφορετικές ομάδες ασθενών με βάση την XBP1s/RIDD ενεργότητα (groupsHC). Ο συμβολισμός των μεταλλάξεων έγινε με βάση την ορολογία της έκδοσης MAF 2.4.1 (Mutation_Annotation_Format_TCGAv2).

Για την επίτευξη καλύτερης σύγκλισης μεταξύ των μεταγραφικών υποτύπων που παρουσιάζουν οι όγκοι στο LUAD και των ιστοπαθολογικών, ανατομικών και προτύπων μεταλλάξεων έχει προταθεί μια ενημερωμένη ταξινομική ονοματολογία που περιλαμβάνει: τον μοριακό υπότυπο της τελικής αναπνευστικής μονάδας (TRU: Terminal Respiratory Unit), τον εγγύς-φλεγμονώδη (PI:Proximal-Inflammatory) και τον εγγύς-πολλαπλασιαστικό (PP:Proximal-Proliferative) υπότυπο έκφρασης [409]. Ο PP υπότυπος χαρακτηρίζεται από μεγάλη συχνότητα μεταλλάξεων στο KRAS σε συνδυασμό με απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου STK11 εξαιτίας χρωμοσωμικής έλλειψης, μετάλλαξης και μειωμένης γονιδιακής έκφρασης. Από την άλλη πλευρά ο PI υπότυπος χαρακτηρίζεται από συμπαγή ιστοπαθολογία και συν-μετάλλαξη των NF1 και TP53. Τέλος, ο TRU υπότυπος περιλαμβάνει την πλειοψηφία των μεταλλαγμένων EGFR όγκων καθώς και εκείνων με γονιδιακή σύντηξη της κινάσης. Η εμφάνιση του TRU υπότυπου είναι προγνωστικά ευνοϊκή για τους ασθενείς [409] και βρέθηκε να υπέρ-αντιπροσωπεύεται στους όγκους με χαμηλή IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα (IRE1^{low}) (64.2% έναντι 17.8% στους IRE1^{high}) **(Εικόνα 3.50A και B)**. Η ενίσχυση της IRE1 ενεργότητας μέσω όμως του XBP1s άξονα συμβαδίζει με την αυξημένη παρουσία του PI υπότυπου (49.5% έναντι 12.6%) και σε μικρότερη κλίμακα του PP (43.8% έναντι 23.2%), επίσης. Η θετική συσχέτιση της IRE1 ενεργότητας με την επιθετικότητα και την εξέλιξη αυτού του τύπου καρκίνου αντικατοπτρίζεται επίσης και σε επίπεδο σταδίου της νόσου (TNM ταξινόμηση) (<https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>) αλλά και στον δείκτη του βαθμού μεταστατικότητας του όγκου σε γειτονικούς ή/και απομακρυσμένους λεμφαδένες. Συγκεκριμένα, το T1 στάδιο είναι συχνότερο στους IRE1^{low} όγκους (33.3%) σε σχέση με τους IRE1^{high} (21.9%) ενώ η κατάσταση αντιστρέφεται για τα πιο προχωρημένα στάδια T2, T3 και T4 όπου είναι συχνότερα στους IRE1^{high} όγκους. Όσον αφορά στο «Lymph_Node_Stage» το στάδιο N0 κυριαρχεί στους IRE1^{low} (71%) έναντι 50.7% στους IRE1^{high} με τους τελευταίους να παρουσιάζουν μεγαλύτερο βαθμό εμπλουτισμού από τους IRE1^{low} για τα στάδια N2 και N3. Αξίζει να σημειωθεί ότι κανένας όγκος IRE1^{low} δεν εμφάνιζε N3 στάδιο **(Εικόνα 3.50A και B)** ενώ οι δοκιμασίες συσχέτισης της XBP1s και RIDD σηματοδοτικής ενεργότητας με τους δείκτες που προαναφέραμε ανέδειξαν μια εξίσου σημαντικά θετική συσχέτιση σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 0.05. Οι παρατηρήσεις αυτές ήρθαν να επιβεβαιωθούν σε σημαντικό βαθμό και με την ανάλυση ολικής επιβίωσης των XBP1s/RIDD χαρακτηρισμένων ασθενών όπου φάνηκε η δυσμενής

επίδραση κυρίως του RIDD αλλά και του XBP1s άξονα στα ποσοστά επιβίωσης (Εικόνα 3.50D). Τέλος δεν καταγράφηκε κάποια σημαντική συσχέτιση της IRE1 ενεργότητας με την κατάσταση ενεργοποίησης του mTOR μονοπατιού το οποίο ήταν ενεργοποιημένο εξίσου στην πλειονότητα των IRE1^{high} και IRE1^{low} όγκων (Εικόνα 3.50B).

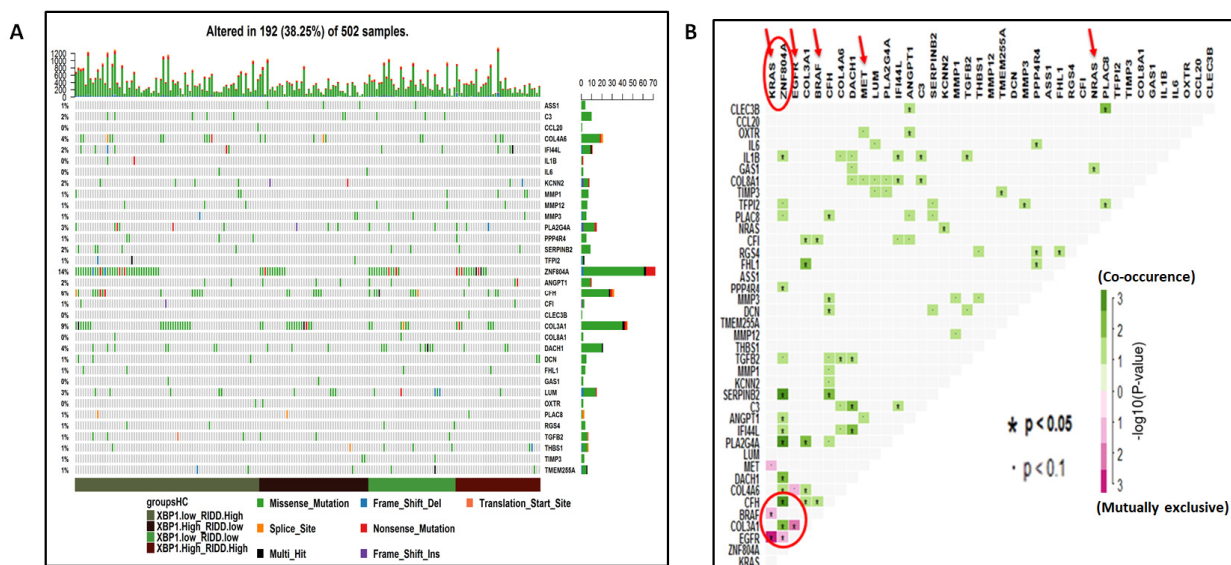


Εικόνα 3.50. Η μη επιβλεπόμενη ιεραρχική ομαδοποίηση των TCGA-LUAD ασθενών με βάση την XBP1s/RIDD σηματοδοτική ενεργότητα αναδεικνύει 3 κύριες ομάδες όπου η ενίσχυση των δύο συνιστωσών ασκεί αρνητική επίδραση στα ποσοστά επιβίωσης, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στο στάδιο του όγκου, τον βαθμό μεταστατικότητας σε λεμφαδένες και τον μοριακό υπότυπο

(A) Θερμικός χάρτης ιεραρχικής ομαδοποίησης των TCGA-LUAD ασθενών με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της IRE1sign38. Η XBP1s και RIDD συνιστώσα απεικονίζονται με κόκκινο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα, στην κάθετη στήλη δεξιά. Η ιεραρχική ομαδοποίηση των ασθενών/δειγμάτων έχει γίνει με βάση τον συντελεστή συσχέτισης του Pearson, χρησιμοποιώντας την μέση σύνδεση (average linkage) ανάμεσα στις συστάδες. Επίσης στον σχολιασμό του θερμικού χάρτη έχει συμπεριληφθεί επιπρόσθετη πληροφορία που αφορά στο στάδιο του όγκου (Tumor_Stage), στον δείκτη μεταστατικότητας σε γειτονικούς λεμφαδένες (Lymph_Node_Stage), στον μοριακό υπότυπο (Expression_Subtype) και στο αν υπάρχει ενεργοποίηση ή όχι του mTOR σηματοδοτικού μονοπατιού. Οι μοριακοί υπότυποι περιλαμβάνουν τον εγγύς-φλεγμονώδη (PI), τον εγγύς-πολλαπλασιαστικό (PP) και εκείνον της τελικής αναπνευστικής μονάδας (TRU). Τα T1, T2, T3, T4 αναφέρονται στο μέγεθος ή/και την έκταση του πρωτοπαθούς όγκου. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός μετά το T, τόσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος ή περισσότερο έχει αναπτυχθεί σε κοντινούς ιστούς. NX: η ύπαρξη όγκου στους κοντινούς λεμφαδένες δεν μπορεί να αξιολογηθεί λόγω ελλειπούς πληροφορίας, N0: ο όγκος δεν έχει επεκταθεί στους κοντινούς λεμφαδένες. N1: Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί επίσης στους λεμφαδένες μέσα στον πνεύμονα ή/και στην περιοχή όπου οι βρόγχοι εισέρχονται στον πνεύμονα. Αυτοί οι λεμφαδένες βρίσκονται στην ίδια πλευρά με τον κύριο όγκο, N2: ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες γύρω από την σπονδυλική στήλη (το σημείο όπου η τραχεία διακλαδίζεται στον

αριστερό και δεξί βρόγχο) ή στη περιοχή μεταξύ των πνευμόνων (μεσοθωράκιο). Αυτοί οι λεμφαδένες βρίσκονται στην ίδια πλευρά με τον κύριο όγκο του πνεύμονα, N3: ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες κοντά στην κλείδα εκατέρωθεν του σώματος ή/και έχει εξαπλωθεί σε λεμφαδένες που βρίσκονται στο σημείο εισόδου του βρόγχου στον πνεύμονα ή στους μεσοθωρακικούς λεμφαδένες, στην άλλη πλευρά του σώματος σε σχέση με τον κύριο όγκο. (B) Πίνακες συνάφειας και ραβδογράμματα με ομαδοποιημένες στήλες για την ανάδειξη συσχετίσεων μεταξύ του διαφορετικού βαθμού έντασης της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας και των δεικτών *Tumor_Stage*, *Lymph_Node_Stage*, *Expression_Subtype* και *mTOR_path_activation*. Τα διαφορετικά επίπεδα ενεργότητας της IRE1 απεικονίζονται με κόκκινο (υψηλή ενεργότητα), πορτοκαλί (μέτρια ενεργότητα) και πράσινο (χαμηλή ενεργότητα) χρώμα. (C) Μη επιβλεπόμενη ιεραρχική ομαδοποίηση των ασθενών με βάση το κανονικοποιημένο *XBP1s* και *RIDD* σκορ. Η αύξηση της έντασης του κόκκινου χρώματος αντικατοπτρίζει την αύξηση της *XBP1s* ενεργότητας και την μείωση της *RIDD* ενεργότητας, ενώ η αύξηση του μπλε χρώματος αντιστοιχεί σε μειωμένη *XBP1s* και αυξημένη *RIDD* ενεργότητα. Οι διαφορετικές συστάδες αντιστοιχούν σε ομάδες ασθενών με διαφορετική *XBP1s* ή/και *RIDD* σηματοδοτική ενεργότητα και απεικονίζονται με διαφορετικά χρώματα. (D) Καμπύλες ολικής επιβίωσης των χαρακτηρισμένων ασθενών με βάση την *XBP1s/RIDD* ενεργότητα. Ο αριθμός των ασθενών που ανήκει σε κάθε ομάδα περιλαμβάνεται στις παρενθέσεις.

Όταν χαρτογραφήσαμε το προφίλ μεταλλάξεων των γονιδίων της υπογραφής IRE1sign38 στις *XBP1s/RIDD* χαρακτηρισμένες ομάδες ασθενών παρατηρήσαμε επίσης ότι μόνο σε ένα μικρό ποσοστό της τάξεως του 38.25% (192 ασθενείς) παρουσιάζονται μεταλλάξεις και μάλιστα σε πολύ μικρό ποσοστό σε σχέση με τον συνολικό αριθμό μεταλλάξεων που φέρουν οι ασθενείς σε αυτόν τον τύπο καρκίνου. Από τα γονίδια της *XBP1s* συνιστώσας αξίζει να αναφερθεί το ZNF804A με συχνότητα μετάλλαξης στην κοόρτη 14% ενώ από τα *RIDD* γονίδια ξεχωρίζουν το CFH και COL3A1 με συχνότητα μετάλλαξης 6% και 9%, αντίστοιχα (Εικόνα 3.51A). Αυτό όμως που χρίζει ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι η συνύπαρξη ή ακόμη περισσότερο η αμοιβαίως αποκλειόμενη συνύπαρξη μεταλλάξεων μεταξύ των γονιδίων της υπογραφής με μερικά από τα κορυφαία μεταλλαγμένα γονίδια της κοόρτης με κομβικό ρόλο στην ογκογένεση γενικότερα (Εικόνα 3.51B).



Εικόνα 3.51. Η χαρτογράφηση του προφίλ μεταλλάξεων των γονιδίων της υπογραφής IRE1sign38 στους *XBP1s*±/*RIDD*± χαρακτηρισμένους TCGA-LUAD ασθενείς αναδεικνύει εκτός από το μικρό ποσοστό μεταλλάξεων που φέρουν, την σημαντική αλληλεπίδραση ορισμένων με μεταλλάξεις-οδηγούς σε ογκογονίδια.

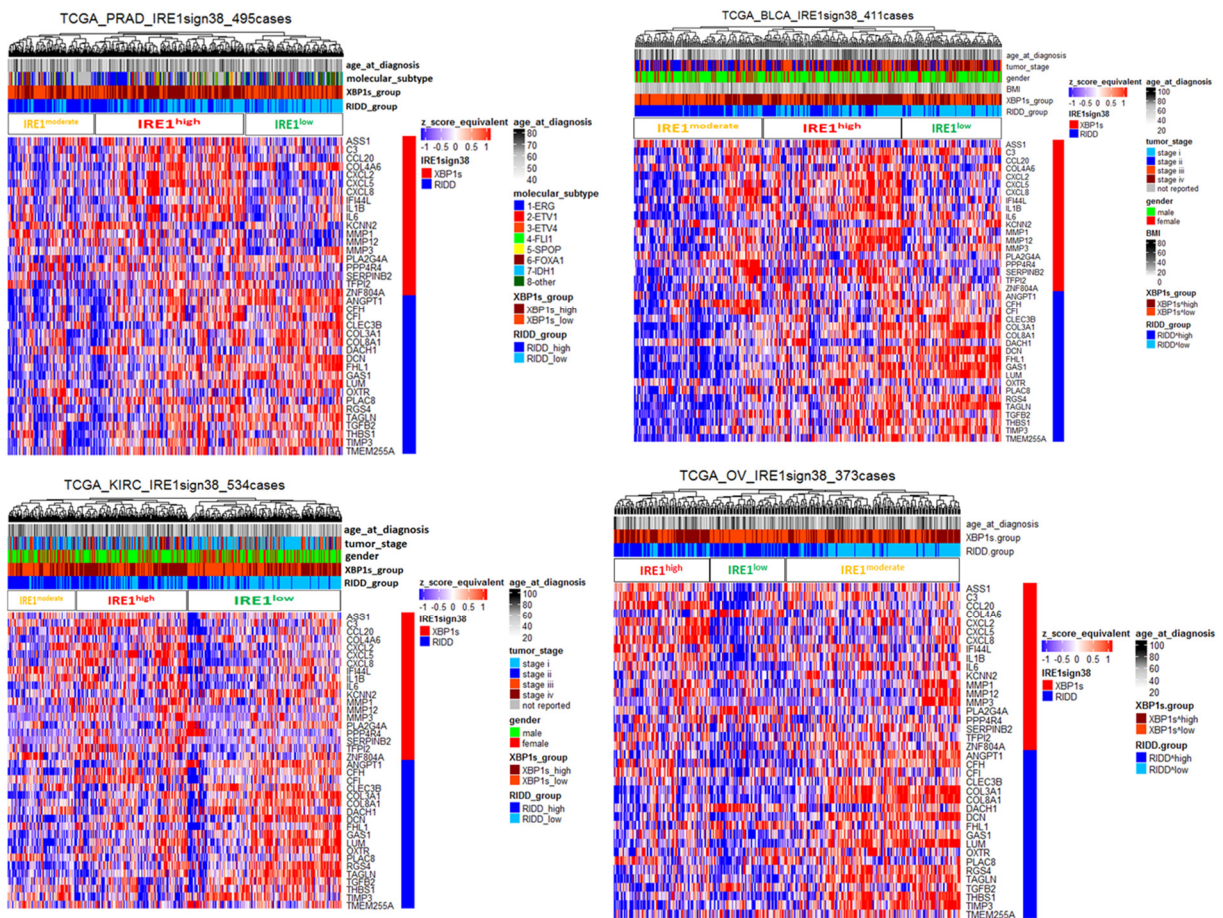
(A) Γράφημα oncoplot που απεικονίζει το προφίλ μεταλλάξεων των γονιδίων της IRE1sign38 στις διαφορετικά χαρακτηρισμένες ομάδες ασθενών με το υπολογιστικό εργαλείο varscan2 [408]. Στο κάθετο ιστόγραμμα δεξιά του γραφήματος απεικονίζεται η κατανομή του αριθμού των μεταλλάξεων στο σύνολο των ασθενών της κοόρτης ανα γονίδιο της υπογραφής IRE1sign38, ενώ στο οριζόντιο ιστόγραμμα στην κορυφή του γραφήματος απεικονίζεται η κατανομή του συνολικού αριθμού των μεταλλάξεων ανα ασθενή. Η χρωματική μπάρα στην βάση του γραφήματος απεικονίζει τις διαφορετικές ομάδες ασθενών με βάση την XBP1s/RIDD ενεργότητα (groupsHC). Ο συμβολισμός των μεταλλάξεων έγινε με βάση την ορολογία της έκδοσης MAF 2.4.1 (Mutation_Annotation_Format_TCGAv2). (B) Γράφημα που απεικονίζει αμοιβαίως αποκλειόμενα ή συν-εμφανιζόμενα πρότυπα μεταλλάξεων μεταξύ των γονιδίων της IRE1sign38 και των 25 πιο μεταλλαγμένων γονιδίων στο LUAD. Η δοκιμασία ελέγχου διεξήχθη με την συνάρτηση somaticInteractions() των Maftools [410] και η στατιστική σημαντικότητα αξιολογήθηκε με Fisher's exact test. Με κόκκινο βέλος υποδεικνύονται τα πιο σημαντικά μεταλλαγμένα γονίδια στο LUAD ενώ σε κόκκινο κύκλο περιλαμβάνονται γονίδια της υπογραφής που εμφανίζουν αμοιβαίως αποκλειόμενα πρότυπα μεταλλάξεων σε σχέση με μερικά από τα πιο σημαντικά μεταλλαγμένα γονίδια.

Έτσι από το γράφημα αλληλεπίδρασης σωματικών μεταλλάξεων παρατηρούμε την στατιστικά σημαντική συνύπαρξη μεταλλάξεων στα γονίδια NRAS και MET με τα γονίδια της RIDD συνιστώσας GAS1 και OXTR, COL8A1, ANGPT1, αντίστοιχα, ενώ στο BRAF έχουμε την συνύπαρξη μεταλλάξεων με τα RIDD γονίδια CFI και CFH. Από την άλλη πλευρά το γονίδιο EGFR εμφανίζει αμοιβαίως αποκλειόμενες μεταλλάξεις με τα γονίδια της υπογραφής COL4A6 (XBP1s), ZNF804A (XBP1s) και COL3A1 (RIDD). Τέλος το KRAS πρώτο-ογκογονίδιο εμφανίζει αμοιβαίως αποκλειόμενες μεταλλάξεις με τα γονίδια MET, BRAF και EGFR (**Εικόνα 3.51B**).

3.3.2 Συγκριτική Μελέτη Τεσσάρων Ουρογεννητικών Τύπων Καρκίνου του Προγράμματος TCGA με Βάση την Αξιολόγηση της IRE1 Σηματοδοτικής Δραστηριότητας

Μεταξύ των πρωτοπαθών τύπων καρκίνου που περιλαμβάνονται στο πρόγραμμα TCGA και στους οποίους αξιολογήθηκε η σηματοδοτική δραστηριότητα της IRE1 ήταν και 4 όγκοι του ουρογεννητικού συστήματος όπως το αδενοκαρκίνωμα του προστάτη (PRAD), το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (KIRC ή RCC), το ορώδες καρκίνωμα των ωοθηκών (OV) και το ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης (BLCA). Στις αναλύσεις μας χρησιμοποιήσαμε τα εύρωστα σύνολα ασθενών που είχαν χρησιμοποιηθεί και στην ερευνητική πρωτοβουλία για την συγκριτική μελέτη των διαφορετικών τύπων καρκίνου και έχουν κατατεθεί στην TCGA ως «Pan-Cancer Atlas» δεδομένα [411]. Η μη επιβλεπόμενη ιεραρχική ομαδοποίηση των ασθενών (**Εικόνα 3.52**) σε κάθε τύπο καρκίνου με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της υπογραφής IRE1sign38 ανέδειξε τρεις κύριες ομάδες με διαφορετική IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα (IRE1^{high}, IRE1^{low} και IRE1^{moderate}) όπου η κάθε μια χαρακτηρίζεται από ασθενείς με διαφορετικά επίπεδα ενεργότητας για την XBP1s και RIDD δράση. Συγκεκριμένα στην TCGA-PRAD κοόρτη, η κυρίαρχη ομάδα των IRE1^{high} χαρακτηρίζεται κυρίως από την ενισχυμένη δράση του XBP1s άξονα ο οποίος είναι πιο

εξασθενημένος στην ενδιάμεση κατάσταση (moderate) η οποία χαρακτηρίζεται από την ενισχυμένη δράση της RIDD συνιστώσας (κυρίως XBP1s-/RIDD+ όγκοι). Ανάλογο ήταν και το πρότυπο κατανομής στην TCGA-BLCA κούρτη με μια μεγαλύτερη ακόμη ενίσχυση της RIDD συνιστώσας για την ενδιάμεση κατάσταση. Αντιθέτως, στην περίπτωση του RCC καρκινώματος (KIRC) ουσιαστικά είχαμε δύο κυρίαρχες συστάδες (IRE1^{high} και IRE1^{low}) με την πρώτη να καθοδηγείται κυρίως από την υψηλή XBP1s δραστηριότητα και σε μικρότερο βαθμό από την RIDD η οποία όμως ήταν κυρίαρχη τόσο στους IRE1^{high} όσο και στους IRE1^{low} ΟV όγκους (Εικόνα 3.52).



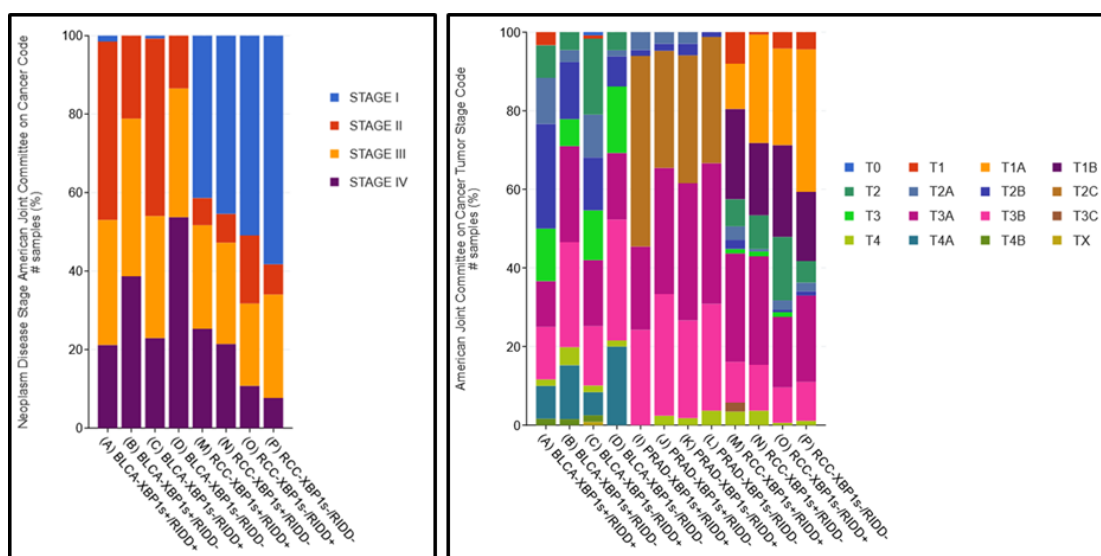
Εικόνα 3.52. Οι ασθενείς 4 διαφορετικών τύπων καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος (PRAD, BLCA, KIRC, OV) κατατάσσονται σε διαφορετικές κατηγορίες με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της υπογραφής IRE1sign38 και τον βαθμό σηματοδοτικής ενεργότητας της XBP1s και RIDD συνιστώσας, οι οποίες συνοδεύονται από διαφορετικά στάδια του όγκου και μοριακούς υπότυπους

Θερμικοί χάρτες ιεραρχικής ομαδοποίησης των TCGA-PRAD, TCGA-KIRC, TCGA-BLCA και TCGA-OV ασθενών με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της IRE1sign38. Η XBP1s και RIDD συνιστώσα απεικονίζονται με κόκκινο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα, στην κάθετη στήλη δεξιά. Η ιεραρχική ομαδοποίηση των ασθενών έχει γίνει με βάση τον συντελεστή συσχέτισης του Pearson, χρησιμοποιώντας την μέση σύνδεση (average linkage) ανάμεσα στις συστάδες. Ο χαρακτηρισμός των ασθενών σε υψηλή, χαμηλή και ενδιάμεση IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα έγινε με αξιολόγηση της XBP1s και RIDD δραστηριότητας.

Επίσης, επιχειρήσαμε να συσχετίσουμε τα επίπεδα ενεργότητας της IRE1/XBP1s/RIDD δράσης με μια σειρά ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά όπως είναι η ηλικία διάγνωσης, το φύλο (στην περίπτωση των BLCA και KIRC) και ο δείκτης μάζας σώματος (στην περίπτωση του BLCA). Όσον αφορά στην ηλικία διάγνωσης η δοκιμασία Kruskal Wallis ανέδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ($P=1.348e-3$) μόνο για την περίπτωση του RCC με την μεγαλύτερη διαφορά να καταγράφεται μεταξύ των XBP1s-/RIDD- (διάμεση ηλικία διάγνωσης: 58 έτη) και των XBP1s+/RIDD+ όγκων (διάμεση ηλικία διάγνωσης: 65 έτη) ενώ η μεταβολή αυτή φάνηκε να καθοδηγείται από την δραστικότητα της RIDD συνιστώσας. Στην περίπτωση του φύλου παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μεταβολή (χ^2 , $p=0.0268$) του ποσοστού των αρρένων και των θήλυ ατόμων με αύξηση των αρρένων στους XBP1s+ RCC όγκους και αντίστοιχα, ελάττωση των θηλέων ενώ η μεταβολή αυτή ήταν μεγαλύτερου βαθμού όταν συνοδευόταν από χαμηλή RIDD ενεργότητα. Αντιθέτως, στην TCGA-BLCA κοόρτη, το ποσοστό των αρρένων αυξήθηκε στα XBP1s- άτομα ανεξαρτήτως της RIDD δραστικότητας ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον δείκτη μάζας σώματος (BMI) **(Εικόνα 3.52)**. Επιπρόσθετα, στο αδενοκαρκίνωμα του προστάτη εντοπίστηκε και μια σημαντική διαφοροποίηση (χ^2 , $p=2.48e-3$), στους μοριακούς υπότυπους που περιλαμβάνονται στις διαφορετικά χαρακτηρισμένες ως προς την XBP1s/RIDD δραστικότητα ομάδες. Σύμφωνα με την ενδεδειγμένη μοριακή ανάλυση 333 πρωτογενών δειγμάτων καρκίνου του προστάτη (περίπου το 74% της κοόρτης) το πρόγραμμα TCGA έχει αποκαλύψει γονιδιωματικά επτά διακριτούς υπότυπους που βασίζονται σε συγκεκριμένα ογκογενετικά φαινόμενα που περιλαμβάνουν: συντήξεις των γονιδίων 1) ERG, 2) ETV1, 3) ETV4, ή 4) FLI1 (46, 8, 4, και 1% αντίστοιχα), ή μεταλλάξεις στα 5) SPOP, 6) FOXA1, ή 7) IDH1 (11, 3, και 1% αντίστοιχα) [412]. Έτσι, παρατηρήσαμε ότι ο 1-ERG υπότυπος είναι ο κυρίαρχος στην ομάδα των IRE1^{high} (XBP1s+/RIDD+) (65.22%) στους οποίους απαντάται και το υψηλότερο ποσοστό του 6-FOXA1 (6.52%) ενώ στους IRE1^{low} (XBP1s-/RIDD-) εμφανιζόταν μόνο σε ποσοστό 30.16%. Από την άλλη πλευρά, η ομάδα των XBP1s-/RIDD+ εμφάνιζε το μεγαλύτερο ποσοστό σε 2-ETV1 και 5-SPOP όγκους, ενώ ο χαμηλής συχνότητας 4-FLI1 εμφανιζόταν μόνο στους RIDD- όγκους και απουσίαζε εντελώς από τους RIDD+. Τέλος, ο 3-ETV4 απαντούσε σε μεγαλύτερο ποσοστό στους IRE1^{low} (XBP1s-/RIDD-) ενώ απουσίαζε εντελώς από τους IRE1^{high} (XBP1s+/RIDD+) **(Εικόνα 3.52)**.

Όταν επίσης καταγράψαμε τα διαφορετικά στάδια του όγκου (TNM ταξινόμηση) (<https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>) στους χαρακτηρισμένους XBP1s/RIDD ασθενείς (Stage I-IV και T0-TX) **(Εικόνα 3.53)** παρατηρήσαμε ότι ανάλογα τον καρκινικό τύπο η σηματοδοτική ενεργότητα των δύο κύριων αξόνων δράσης της IRE1

συσχετίζεται με διαφορετικά στάδια εξέλιξης της νόσου που άλλοτε αντικατοπτρίζουν ευνοϊκότερη εξέλιξη και άλλοτε δυσμενέστερη, γεγονός που αναδεικνύει τον ιστοειδικό πολυποίκιλο τρόπο δράσης της. Έτσι, στην περίπτωση του RCC τα στάδια IV (χ^2 , $p=5.481e-4$) και αντίστοιχα T3A-C και T4 (χ^2 , $p=1.786e-3$) κυριαρχούσαν στην ομάδα των XBP1s+/RIDD+ (25.29% στάδιο IV) παρουσιάζοντας μια θετική συσχέτιση των προχωρημένων σταδίων εξέλιξης της νόσου με την ενίσχυση της XBP1s δραστικότητας, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στους XBP1s-/RIDD- όγκους κυμαινόταν στο 7.69%. Στους τελευταίους κυριαρχούσαν τα στάδια I και II με το πρώτο να βρίσκεται σε ποσοστό 58.24%. Οι XBP1s- RCC όγκοι χαρακτηρίζονταν από το T1A στάδιο. Αντίθετο πρότυπο κατανομής των ασθενών στα στάδια εξέλιξης του όγκου παρατηρήθηκε για τον τύπο BLCA όπου το στάδιο I βρισκόταν σε μηδαμινά σχεδόν ποσοστά (1 μόνο άτομο) στους RIDD+ όγκους ενώ τα στάδια IV και T4A κυριαρχούσαν στους XBP1s-/RIDD- όγκους (53.73% στάδιο IV)(χ^2 , $p=1.001e-6$). Τα πιο προχωρημένα στάδια της ασθένειας συνοδεύονταν από μειωμένη RIDD ενεργότητα ενώ οι RIDD+ όγκοι εμφάνιζαν το υψηλότερο ποσοστό στο στάδιο II (Εικόνα 3.53).

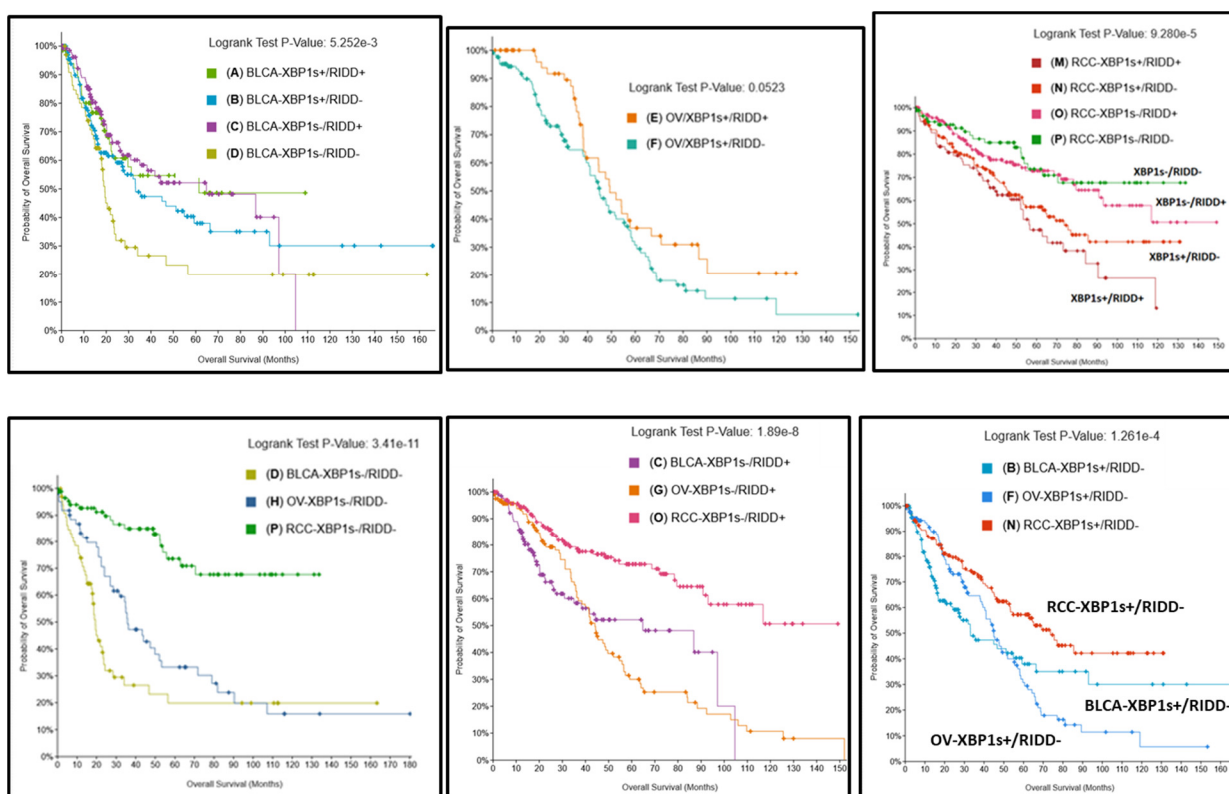


Εικόνα 3.53. Τα επίπεδα της XBP1s και RIDD σηματοδοτικής ενεργότητας κατατάσσουν τους όγκους ασθενών με καρκίνο του ουρογεννητικού συστήματος (BLCA, RCC και PRAD) σε διαφορετικά στάδια (STAGE I-IV και T0-TX) ανάλογα τον τύπο καρκίνου

Στοιβαγμένα ραβδογράμματα σχετικών συχνοτήτων που απεικονίζουν την σχετική κατανομή των χαρακτηρισμένων ως προς την XBP1s/RIDD ενεργότητα ασθενών με καρκίνο του ουρογεννητικού συστήματος (BLCA, RCC και PRAD) στα διαφορετικά στάδια (STAGE I-IV) εξέλιξης της νόσου (T0-TX). Η σχετική συχνότητα έχει υπολογισθεί με βάση το συνολικό αριθμό των ασθενών για τους οποίους υπήρχε καταγραφή του σταδίου και δεν είχαν χαρακτηριστεί ως NA (ελλιπή δεδομένα).

Τα αποτελέσματα αυτά αντικατοπτρίζονται και στις καμπύλες ολικής επιβίωσης των χαρακτηρισμένων XBP1s/RIDD ασθενών στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου του

ουρογεννητικού συστήματος (Εικόνα 3.54). Συγκεκριμένα στην περίπτωση του RCC έχουμε μια καθοδηγούμενη κυρίως από τον XBP1s άξονα επίδραση στα ποσοστά επιβίωσης όπου η ενίσχυση και των δύο αξόνων οδηγεί σε δυσμενέστερη επιβίωση. Αντιθέτως στην περίπτωση του BLCA και OV έχουμε μια καθοδηγούμενη κυρίως από τον RIDD άξονα επίδραση στα ποσοστά επιβίωσης. Οι RIDD+ όγκοι έχουν καλύτερη πρόγνωση στους δύο αυτούς τύπους καρκίνου ενώ η ταυτόχρονη ενίσχυση και της XBP1s δράσης βελτιώνει ακόμη περισσότερο τα ποσοστά επιβίωσης στον BLCA (Εικόνα 3.54).

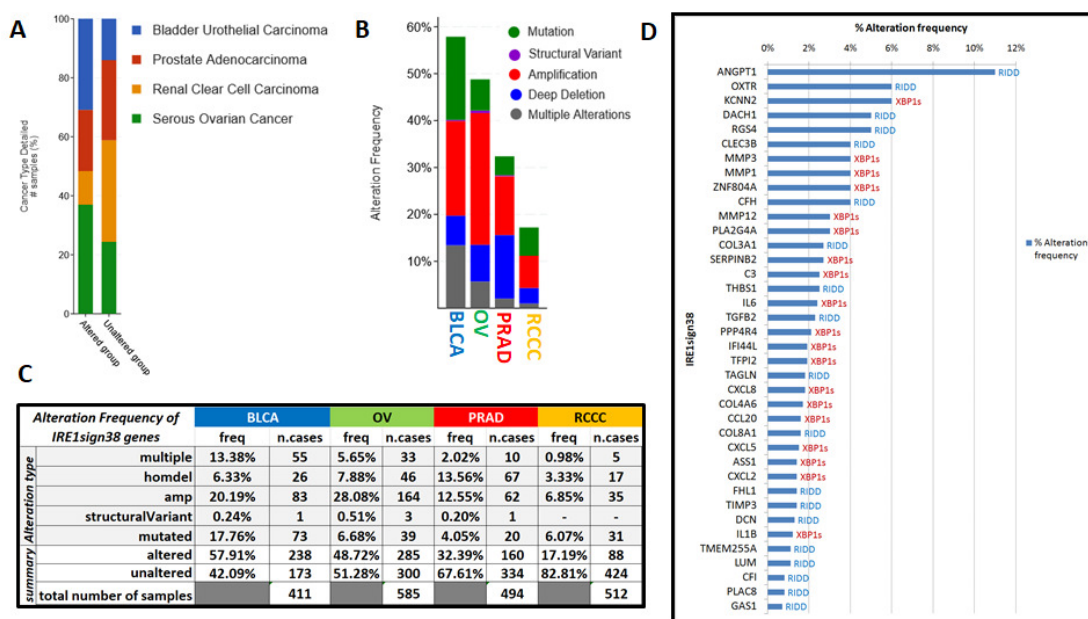


Εικόνα 3.54. Ασθενείς με καρκίνο του ουρογεννητικού συστήματος (BLCA, OV, RCC) εμφανίζουν διαφορετικά ποσοστά ολικής επιβίωσης ανάλογα με τα επίπεδα ενεργότητας της XBP1s και RIDD δράσης

Καμπύλες ολικής επιβίωσης κατά Kaplan-Meier των χαρακτηρισμένων ως προς την XBP1s/RIDD ενεργότητα ασθενών με καρκίνο του ουρογεννητικού συστήματος (BLCA, RCC και OV). Η σύγκριση των ποσοστών επιβίωσης έγινε με το log-rank test και η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων απεικονίζεται στο πλαίσιο κάθε σύγκρισης.

Στη συνέχεια χαρτογραφήσαμε το είδος και την συχνότητα των μεταλλάξεων στα γονίδια της υπογραφής IRE1sign38 για τους 4 ουρογεννητικούς τύπους καρκίνου (Εικόνα 3.55B,C και D) αλλά και την συσχέτισή τους με μεταλλάξεις στα κορυφαία μεταλλαγμένα γονίδια κάθε τύπου. Η ανάλυσή μας αυτή ανέδειξε ένα διαφορετικό πρότυπο μεταλλάξεων στους υπό μελέτη καρκίνους αλλά με σχετικά χαμηλά ποσοστά εμφάνισης γεγονός που για άλλη μια φορά αποδεικνύει τον ισχυρό ρυθμιστικό ρόλο της υπογραφής ο οποίος καθορίζεται κυρίως από τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων της. Έτσι, σε ένα σύνολο 2002

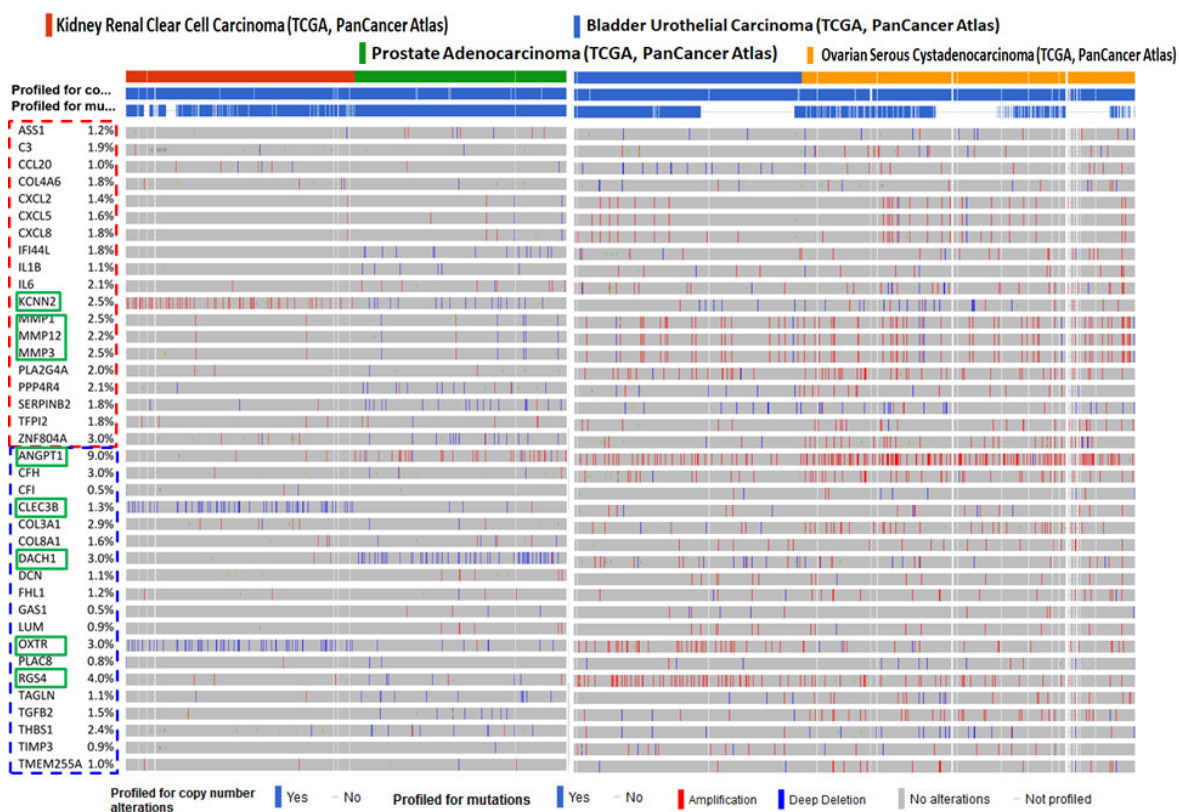
ασθενών τα υπό μελέτη γονίδια άλλαξαν στους 771, ένα ποσοστό της τάξης του 39%. Όπως γίνεται φανερό τόσο από την συχνότητα των μεταλλάξεων όσο και από το είδος και τον αριθμό των αλλαγών γονιδιακών αντιγράφων (**Εικόνα 3.55C**) οι καρκινικοί τύποι BLCA και OV ακολουθούν ένα παρόμοιο πρότυπο μεταβολής ενώ οι RCC και PRAD εμφανίζουν μια μέτριο βαθμού ομοιότητα, με τον πρώτο (RCC) να παρουσιάζει πολύ χαμηλά ποσοστά μεταλλαγών. Αυτό όμως που χρίζει ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι τα υψηλά σχετικά ποσοστά ενίσχυσης (amp) και διαγραφής (homdel) σε συγκεκριμένα γονίδια κυρίως στην περίπτωση των BLCA, OV και PRAD. Έτσι στον PRAD έχουμε διαγραφές γονιδίων σε συνολικό ποσοστό που κυμαίνεται στο 13.5% ενώ στην περίπτωση του BLCA και OV υπάρχει σημαντική ενίσχυση γονιδίων σε ποσοστό που αγγίζει το 20.19% και 28.08%, αντίστοιχα. Στον BLCA έχουμε επίσης την μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων (ποσοστό 57.91%) ενώ στον RCC έχουμε την μικρότερη (ποσοστό 17.19%) (**Εικόνα 3.55C**). Το αξιοσημείωτο είναι ότι μεταξύ των γονιδίων που εμφάνιζαν την μεγαλύτερη συχνότητα αλλαγών σε αριθμό αντιγράφων (>4%) περιλαμβάνονται γονίδια που έχουν χαρακτηριστεί ως σημαντικοί βιοδείκτες σε διάφορους τύπους καρκίνου. Το κορυφαίο μεταξύ αυτών είναι το RIDD προ-αγγειογενετικό γονίδιο ANGPT1 (**Εικόνα 3.55D και Εικόνα 3.56**) που στον OV παρουσιάζει ενίσχυση σε ποσοστό 16% όπως και τα γονίδια των μεταλλοπεπτιδασών της εξωκυτταρικής μήτρας MMP1 (4%), MMP12 (4%) και MMP3 (4%) καθώς και το κολλαγονικό γονίδιο COL3A1 (5%) (**Εικόνα 3.56**). Τα γονίδια αυτά έχουν αποτελέσει γονίδια ιδιαίτερου ενδιαφέροντος στον OV γιατί σχετίζονται σημαντικά με την ανταπόκριση αλλά και την αντίσταση σε χημειοθεραπείες [413, 414].



Εικόνα 3.55. Το είδος και η συχνότητα των μεταλλάξεων της υπογραφής IRE1sign38 διαφέρει στους 4 ουρογεννητικούς τύπους καρκίνου (BLCA, RCC, OV και PRAD)

(A) Στοιβαγμένο ραβδόγραμμα που απεικονίζει το % ποσοστό των ασθενών/δειγμάτων στους οποίους υπήρξε (*altered*) και δεν υπήρξε (*unaltered*), αντίστοιχα, μετάλλαξη σε κάποιο(α) από τα γονίδια της υπογραφής *IRE1sign38*, για κάθε έναν από τους 4 τύπους καρκίνου. (B) Στοιβαγμένο ραβδόγραμμα που απεικονίζει την % σχετική συχνότητα μετάλλαξης στους ασθενείς των 4 τύπων καρκίνου για τα εικονιζόμενα 5 είδη μεταλλάξεων. Η σχετική συχνότητα έχει υπολογισθεί με βάση το σύνολο των «*altered*» ασθενών. (C) Συνοπτικός πίνακας συχνότητων που απεικονίζει την σχετική συχνότητα αλλά και τον αριθμό των ασθενών που φέρουν τα διαφορετικά είδη μεταλλάξεων για τα γονίδια της υπογραφής *IRE1sign38*, όπως έχουν υπολογιστεί για τους 4 διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Όπου *homdel*: ομόζυγη διαγραφή γονιδίου, *amp*: ενίσχυση γονιδιακού αντιγράφου, *multiple*: συνδυασμός διαφόρων ειδών μεταλλάξεων, *structuralVariant*: μεγάλης έκτασης (συνήθως >50ζ.βάσεων) δομικές αλλαγές στο γονιδίωμα που περιλαμβάνουν ενθέσεις, αναστροφές και μετατοπίσεις ή συνδυασμό τους, *mutated*: σημειακές γονιδιακές μεταλλάξεις αποκλείοντας γενικά τις αλλαγές μεγάλης έκτασης (*structuralVariant*, *amp*, *homdel*). (D) Ιστόγραμμα συχνότητων μετάλλαξης στα *XBP1s* και *RIDD* γονίδια της υπογραφής *IRE1sign38*.

Ομοίως, και στην περίπτωση του BLCA το *ANGPT1* εμφανίζει ενίσχυση (6.81%) όπως και τα γονίδια *MMP1* (3.65%), *MMP12* (3.41%) και *MMP3* (3.41%), ενώ επίσης ενίσχυση παρουσιάζουν τα γονίδια *OXTR* (7.3%) και *RGS4* (11.44%) (**Εικόνα 3.56**). Ο υποδοχέας της οξυτοκίνης έχει συμπεριληφθεί στα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια που σχετίζονται με την δράση του ανοσοποιητικού συστήματος στο BLCA και μάλιστα με πιθανό προγνωστικό χαρακτήρα αφού σχετίζεται σημαντικά με την ολική επιβίωση των BLCA ασθενών [415]. Επίσης το *RGS4* ως μέλος των γονιδίων που σχετίζονται με τους υποδοχείς-συζευγμένους με G πρωτεΐνες θα μπορούσε να αποτελέσει υποψήφιο γονίδιο για σχεδιασμό φαρμάκων αφού πρόσφατα η αναζήτηση γονιδίων που σχετίζονται με τους υποδοχείς-συζευγμένους με G πρωτεΐνες σε ολόκληρο το γονιδίωμα ανέδειξε το *RGS19* ως υποψήφιο θεραπευτικό στόχο στο BLCA [416]. Τέλος, και στο PRAD το *ANGPT1* παρουσιάζει ενίσχυση της τάξεως του 7.69% ενώ το αμέσως επόμενο γονίδιο είναι το *DACH1* με ομόζυγη διαγραφή σε συχνότητα 5.06% (**Εικόνα 3.56**). Η στοχευμένη διαγραφή του γονιδίου *DACH1* στον προστάτη του ποντικού έχει δείξει ενίσχυση της εξέλιξης της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας του προστάτη (PIN), η οποία σχετίζεται με αυξημένο πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του προστάτη, επιθηλιακή μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), βλάβη στο DNA και φλεγμονή [417]. Στο RCC τα ποσοστά μεταλλάξεων ήταν πολύ χαμηλά με το *OXTR* να παρουσιάζει ομόζυγη διαγραφή σε ποσοστό 2.54% (13/511) και το *CLEC3B* με συχνότητα 2.35% (12/511) (**Εικόνα 3.56**).



Εικόνα 3.56. Το προφίλ αλλαγών γονιδιακών αντιγράφων (CNAs) της υπογραφής IRE1_{sign38} κατατάσσει 4 ουρογεννητικούς τύπους καρκίνου (BLCA, RCCC, OV και PRAD) σε διαφορετικές ομάδες

Διάγραμμα οσκορπλοτ για τις μεταβολές στον αριθμό των γονιδιακών αντιγράφων της υπογραφής IRE1_{sign38} στους 4 διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Τα γονίδια της XBP1s και RIDD συνιστώσας περιβάλλονται σε κόκκινο και μπλε πλαίσιο, αντίστοιχα. Τα γονίδια σε πράσινο πλαίσιο παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές μεταξύ των διαφορετικών τύπων καρκίνου και σχολιάζονται ιδιαίτερα μέσα στο κυρίως κείμενο. Κάθε τύπος καρκίνου αντιπροσωπεύεται με διαφορετικό χρώμα στην κορυφή του γραφήματος.

3.3.3 Διαφορετικά Ποσοστά Επιβίωσης σε Ασθενείς με Πρωτοπαθείς Όγκους του Προγράμματος TCGA όταν Παρουσιάζουν Διαφορετική ΧBP1s ή/και RIDD Σηματοδοτική Ενεργότητα

Η αξιολόγηση της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας αλλά και των κύριων αξόνων δράσης της XBP1s και RIDD πραγματοποιήθηκε συνολικά για τους 12 διαφορετικούς τύπους καρκίνου που αναφέραμε στην Ενότητα 2.2 και απεικονίζονται στην **Εικόνα 3.47C**, ακολουθώντας παρόμοιου τύπου αναλύσεις με αυτές που πραγματοποιήσαμε για την συγκριτική ανάλυση των 4 τύπων καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος (Ενότητα 3.3.2) αλλά και των TCGA-STAD και TCGA-LUAD (Ενότητα 3.3.1). Από την ανάλυση ολικής επιβίωσης κατά Kaplan-Meier μεταξύ των διαφορετικά χαρακτηρισμένων ως προς την ΧBP1s και RIDD σηματοδοτική ενεργότητα ασθενών και λαμβάνοντας υπόψη και την συσχέτισή τους με μοριακές και κλινικές παραμέτρους, προέκυψε ο συνοπτικός **Πίνακας 9**.

TCGA cohort	Type of cancer	Total number of cases	n.cases by IRE1group coupled with survival data				Dominant component	XBP1s/RIDD component effect on survival rates		Type of coupled effect
			XBP1s+/RIDD+	XBP1s+/RIDD-	XBP1s-/RIDD+	XBP1s-/RIDD-		↑XBP1s activity	↑RIDD activity	
TCGA-GBM (microarrays)	Glioblastoma multiforme	516	67	213	173	63	XBP1s-driven	poor prognosis	good prognosis	antagonistic effect
TCGA-GBM (RNAseq)	Glioblastoma multiforme	155	22	55	54	24		RIDD-driven	poor prognosis	good prognosis
TCGA-COAD (RNAseq)	Colon Adenocarcinoma	462	96	140	138	88	XBP1s-driven		poor prognosis	poor prognosis
TCGA-KIRC (RNAseq)	Kidney Renal Clear Cell Carcinoma	508	87	163	167	91		RIDD-driven	poor prognosis	good prognosis
TCGA-OV (RNAseq)	Ovarian Serous Cystadenocarcinoma	367	59	125	121	62	RIDD-driven		poor prognosis	poor prognosis
TCGA-SKCM (RNAseq)	Skin Cutaneous Melanoma	102	24	28	30	20		RIDD-driven	good prognosis	poor prognosis
TCGA-SKCM (microarrays)	Skin Cutaneous Melanoma	439	68	143	145	83	RIDD-driven		good prognosis	good prognosis
TCGA-BLCA (RNAseq)	Bladder Urothelial Carcinoma	407	67	137	136	67		XBP1s-driven	poor prognosis	good prognosis
TCGA-PAAD (RNAseq)	Pancreatic Adenocarcinoma	177	37	53	56	31	XBP1s-driven		good prognosis	good prognosis
TCGA-BRCA (RNAseq)	Breast Invasive Carcinoma	1083	199	361	355	168		RIDD-driven	poor prognosis	good prognosis
TCGA-STAD (RNAseq)	Stomach Adenocarcinoma	371	99	107	92	73	XBP1s-driven		poor prognosis	poor prognosis
TCGA-LIHC (RNAseq)	Liver Hepatocellular Carcinoma	370	52	134	138	46		RIDD-driven	poor prognosis	poor prognosis
TCGA-LUAD (RNAseq)	Lung Adenocarcinoma	513	104	169	159	81	no survival analysis - the majority of cases are alive			
TCGA-PRAD (RNAseq)	Prostate Adenocarcinoma	491	67	172	171	81				
Total		5961	1048	2000	1935	978				

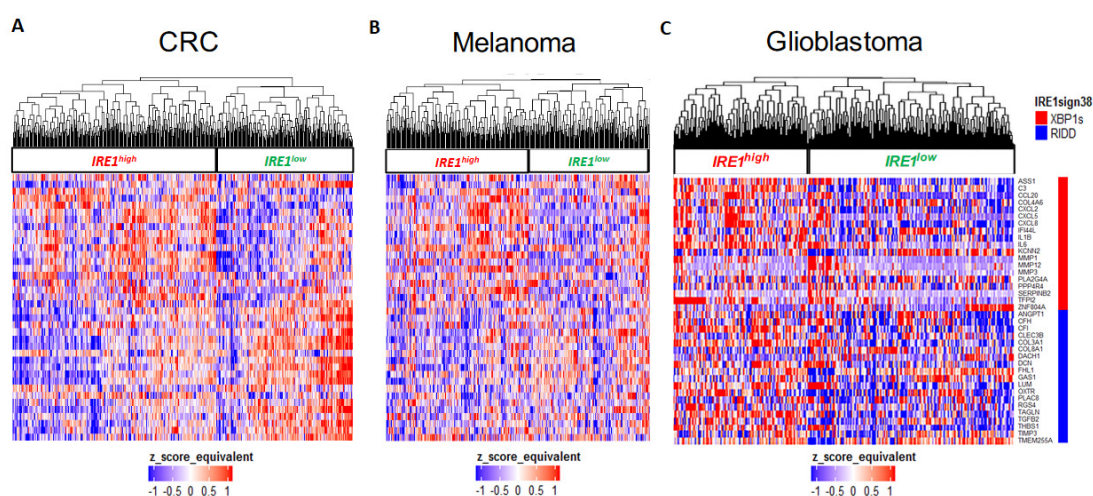
Πίνακας 9. Συνοπτικός πίνακας αξιολόγησης της επίδρασης της XBP1s και RIDD σηματοδοτικής δράσης στα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών για 12 διαφορετικούς τύπους καρκίνου του προγράμματος TCGA

Στον πίνακα απεικονίζεται τόσο ο συνολικός αριθμός των ασθενών κάθε TCGA-κοόρτης που αναλύθηκε όσο και ο αριθμός των ασθενών που περιλάμβανε η κάθε ομάδα με βάση την αξιολόγηση της XBP1s και RIDD σηματοδοτικής δράσης. Στην στήλη «Dominant component» καταγράφεται ο άξονας που φαίνεται να είναι ο κυρίαρχος για την εξέλιξη της νόσου και τα ποσοστά επιβίωσης ενώ στις δύο επόμενες στήλες αναφέρεται το αποτέλεσμα της αυξημένης XBP1s και RIDD ενεργότητας στην επιβίωση των ασθενών. Στην τελευταία στήλη του πίνακα έχει σημειωθεί το είδος της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο σηματοδοτικών αξόνων στην έκβαση της νόσου.

3.3.4 Η Αυξημένη Σηματοδοτική Δράση της IRE1 Πρωτεΐνης Σχετίζεται με Αυξημένη Ανοσοαπόκριση στην Περίπτωση Ασθενών με α) Αδενοκαρκίνωμα του Παχέος Εντέρου Σταδίου I (CRC-I), β) Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα (GBM) και γ) Κακοήθες Μελάνωμα (SKCM)

Μέσα από την διαδικασία της αξιολόγησης της IRE1 σηματοδοτικής δραστηριότητας και την αναζήτηση συσχετίσεων της με μια σειρά μοριακών και κλινικών παραμέτρων που χαρακτηρίζουν τους διαφορετικούς τύπους καρκίνου οδηγηθήκαμε σε ένα άλλο επίσης πολύ σημαντικό εύρημα που ήταν το παρόμοιο ανοσολογικό προφίλ με το GBM δύο άλλων χαρακτηριστικών τύπων καρκίνου, με υψηλή βαθμού συσχέτιση της ανοσολογικής τους δράσης με την σηματοδοτική ενεργότητα της IRE1 πρωτεΐνης και κυρίως με την ενεργότητα του XBP1s σηματοδοτικού άξονα. Αυτοί οι δύο τύποι καρκίνου ήταν το κακοήθες δερματικό μελάνωμα (TCGA-SKCM ή Melanoma) και το αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου (TCGA-COAD ή CRC) κυρίως σταδίου I που αντιστοιχούσε σε ποσοστό 22.22% και 9.77% στους IRE1+ και IRE1- όγκους, αντίστοιχα. Οι ασθενείς κάθε κοόρτης ξεχωριστά (TCGA-GBM, TCGA-SKCM και TCGA-COAD) ομαδοποιήθηκαν σε ομάδες υψηλής (IRE1 high) και χαμηλής (IRE1 low) IRE1

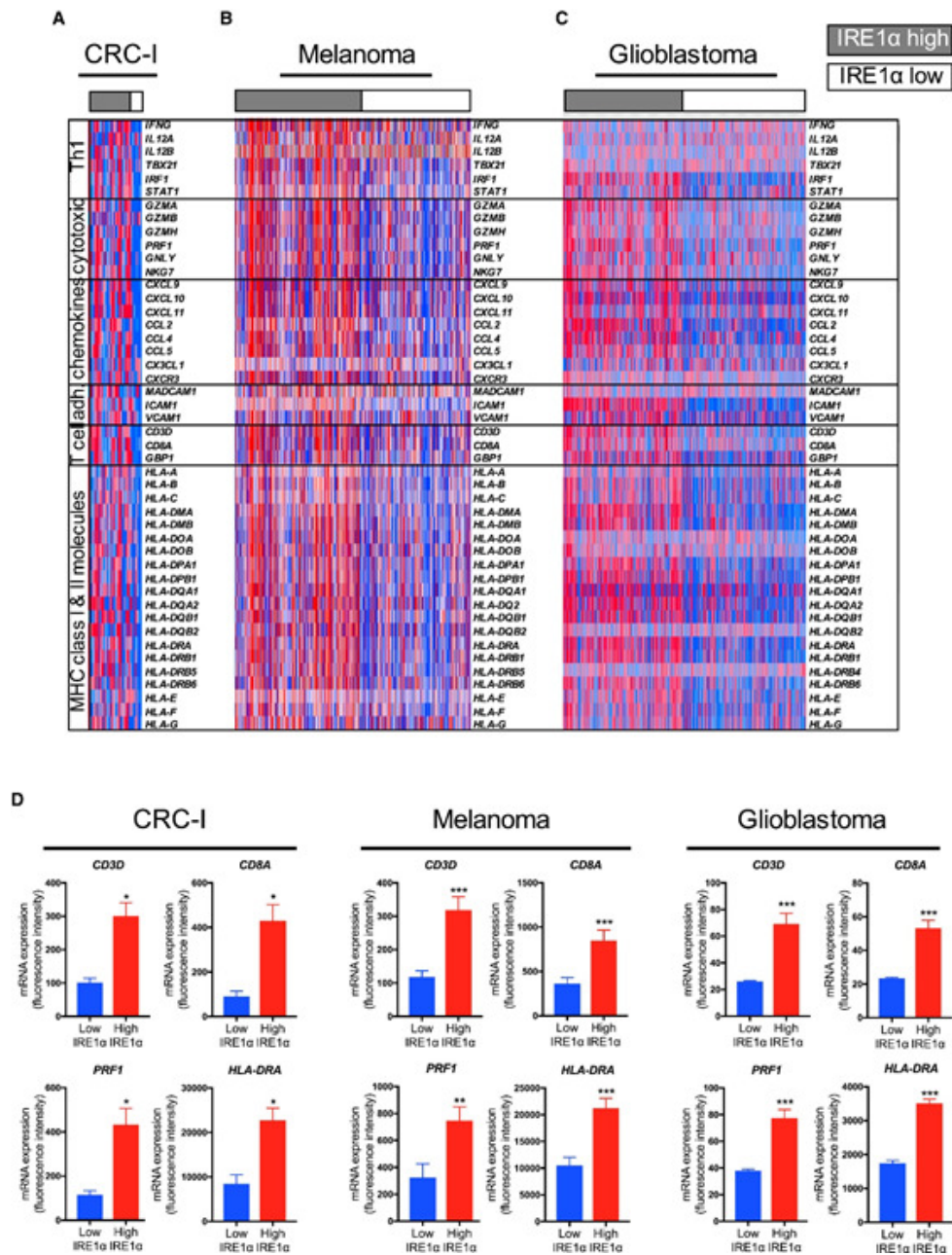
ενεργότητας με βάση την αξιολόγηση της ΧΒΡ1s και RIDD συνιστώσας της υπογραφής IRE1sign38 και στη συνέχεια κάθε χαρακτηρισμένη ομάδα ασθενών ελέγχθηκε για το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης σε μεταγραφικό επίπεδο για μια σειρά βιοδεικτών δράσης των Τ-λεμφοκυττάρων (IFNG, IL12, TBX21, IRF1, STAT1, GZMA, GZMB, GZMH, PRF1, GNLY, NKG7, CXCL9, CXCL10, CCL5, CX3CL1, CXCR3, CCL2, CCL4, CXCL11, MADCAM1, ICAM1, VCAM1, CD3D, CD8A, GBP1) αλλά και όλων των HLA (αντιγόνα των ανθρώπινων λευκοκυττάρων) αντιγόνων, των οποίων τα γονίδια εκφράζονταν σε κάθε κοόρτη. Οι βιοδείκτες αυτοί χαρακτηρίζουν επιμέρους δράσεις των Τ- και Β-λεμφοκυττάρων και κατ' επέκταση του ανοσοποιητικού συστήματος και για τον λόγο αυτό ομαδοποιήθηκαν αντίστοιχα α) σε μόρια δράσης των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων (Th1), β) σε μόρια που συμμετέχουν σε μηχανισμούς κυτταροτοξικότητας, γ) σε μόρια χημειοκινών, γ) σε μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, δ) σε μόρια γλυκοπρωτεϊνών της επιφάνειας των Τ-λεμφοκυττάρων αλλά και ε) σε μόρια του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας, τάξης I και II. Ακολούθησε ανάλυση εμπλουτισμού γονιδίων για τα διαφορετικά σύνολα γονιδίων/υπογραφές αλλά και Student t test για κάθε δείκτη ξεχωριστά μεταξύ των IRE1^{high} και IRE1^{low} ασθενών κάθε κοόρτης και από την ανάλυση αυτή παρατηρήσαμε ότι οι ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα του παχέος εντέρου, σταδίου I, που παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα σηματοδοτικής δράσης της IRE1 (IRE1^{high}), η οποία καθοδηγείται κυρίως από την αυξημένη ενεργότητα της ΧΒΡ1s συνιστώσας, παρουσίαζαν σημαντικό εμπλουτισμό ($P = 8.944e-3$) των αντί-καρκινικών αποκρίσεων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως αποτυπώνονταν από την αυξημένη έκφραση των βιοδεικτών που προαναφέραμε. Εντούτοις, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση για ασθενείς που ανήκαν στα στάδια εξέλιξης της νόσου II έως IV.



Εικόνα 3.57. Θερμικοί χάρτες ιεραρχικής ομαδοποίησης των ασθενών τριών τύπων καρκίνου (CRC, SKCM και GBM) του προγράμματος TCGA με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της υπογραφής IRE1sign38

Στην ανάλυση συσταδοποίησης συμμετείχαν 456 περιπτώσεις της TCGA-COAD κοόρτης (A), 293 περιπτώσεις της TCGA-SKCM κοόρτης (B) και 523 περιπτώσεις της TCGA-GBM κοόρτης (C) με βάση την υψηλή ή χαμηλή IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα όπως αξιολογήθηκε από το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης των γονιδίων της υπογραφής IRE1sign38. Για την ομαδοποίηση των ασθενών χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson, χρησιμοποιώντας την μέση σύνδεση (average linkage) ανάμεσα στις συστάδες. Με μπλε απεικονίζονται τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων της υπογραφής και με κόκκινο τα υψηλά επίπεδα έκφρασης.

Αξιοσημείωτο ήταν επίσης το γεγονός ότι η αυξημένη σηματοδοτική δράση της IRE1 σχετιζόταν ομοίως με έντονη ανοσολογική απόκριση και στην περίπτωση των ασθενών με πολύμορφο γλοιοβλάστωμα ($P=3.212e-3$) και κακοήθες μελάνωμα ($P=2.103e-3$), αναδεικνύοντας για άλλη μια φορά τον κεντρικό και συντηρημένο ρόλο της IRE1 πρωτεΐνης στην ρύθμιση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και κατ' επέκταση του οργανισμού. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονταν σε συμφωνία με πειραματικά επίσης δεδομένα σε συγγενικά ανοσοϊκανά ποντίκια τα οποία όταν ακολουθούσαν διατροφή χαμηλή σε πρωτεΐνη φαινόταν να υπάρχει μια ενισχυμένη ανοσοεπιτήρηση εξαρτώμενη από την IRE1 πρωτεΐνη, τον υποδοχέα RIG1 (retinoic acid-inducible gene 1) και τον καταρράκτη κυτοκινών, η οποία οδηγούσε σε ελάττωση του όγκου και σε επιμήκυνση του προσδόκιμου ζωής ενώ η αποσιώπηση αυτών των παραγόντων με τεχνολογία CRISPR επέφερε αναστολή της ανοσοεπιτήρησης και αύξηση του όγκου. Τα σημαντικότερα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής περιλαμβάνονται στην δημοσίευση [418].



Εικόνα 3.58. Η αυξημένη σηματοδοτική δραστικότητα της IRE1 σχετίζεται με αυξημένη αντικαρκινική ανταπόκριση των T-λεμφοκυττάρων στον καρκίνο του παχέος εντέρου (CRC), στο κακοήδες μελάνωμα (Melanoma) και στο πολύμορφο γλιοβλάστωμα (Glioblastoma)

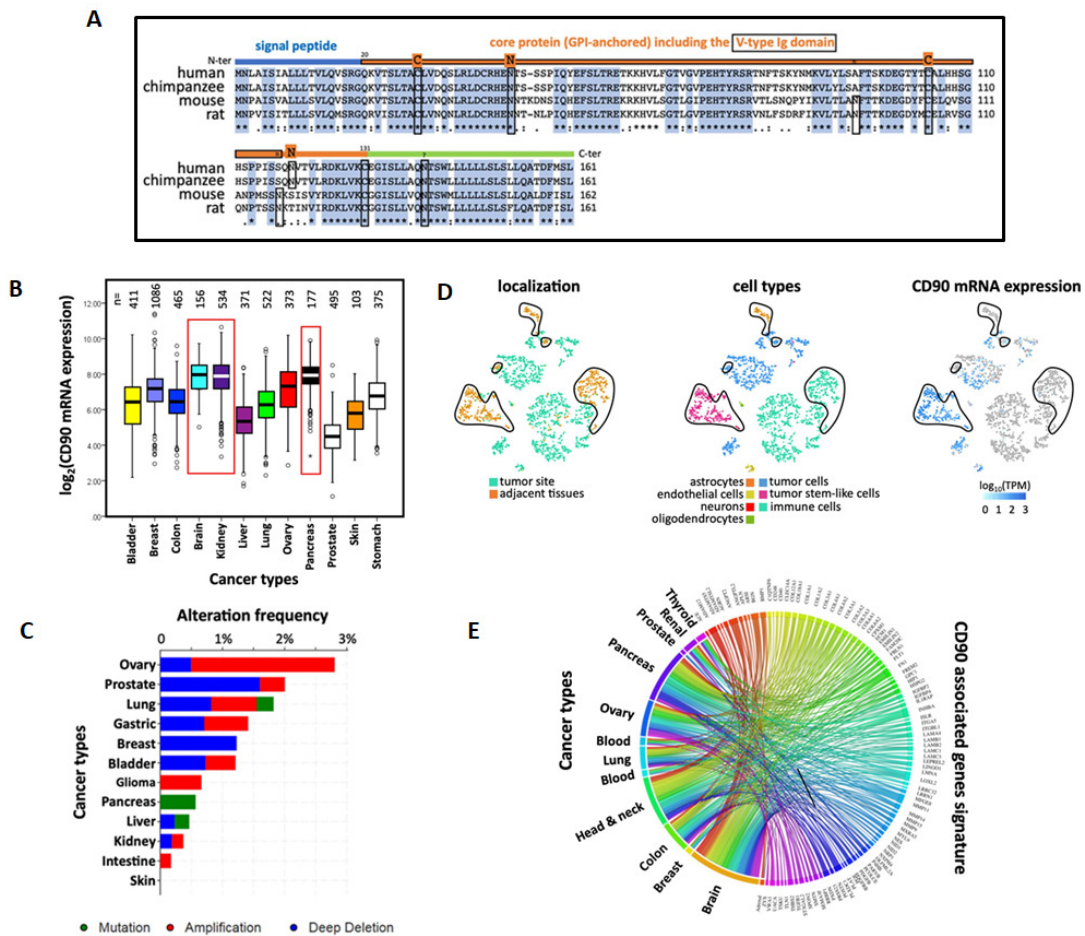
(A–C) Θερμικοί χάρτες των επιπέδων έκφρασης του mRNA για γονίδια δράσης των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων (Th1), γονίδια που συμμετέχουν σε μηχανισμούς κυτταροτοξικότητας, γονίδια χημειοκινών, γονίδια κυτταρικής προσκόλλησης, γονίδια γλυκοπρωτεϊνών της επιφάνειας των T-λεμφοκυττάρων αλλά και γονίδια του Μείζονος Συμπλέγματος Ισοσυμβατότητας, τάξης I και II, με βάση τις προκαθορισμένες ομάδες ασθενών όπως προέκυψαν από την αξιολόγηση της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας (υψηλή-High ή χαμηλή-Low). Η ομάδα των IRE1 high απεικονίζεται με οριζόντια γκρι στήλη ενώ οι IRE1 low ασθενείς με λευκή. (D) Σημαντικά αντιπροσωπευτικά γονίδια με διαφορετική έκφραση μεταξύ των όγκων χαμηλής (IRE1 low) και υψηλής (IRE1 high) ενεργότητας. PRF1: Περφορίνη-1, HLA-DRA: άλφα αλυσίδα του DR του HLA αντιγόνου ιστοσυμβατότητας κλάσης II, CD3D: δέλτα αλυσίδα της CD3 γλυκοπρωτεΐνης στην επιφάνεια των T κυττάρων, CD8A: άλφα αλυσίδα της CD8 γλυκοπρωτεΐνης στην επιφάνεια των T κυττάρων. Η στατιστική σημαντικότητα δηλώνεται ως εξής: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Οι γραμμές σφάλματος υποδεικνύουν την τιμή SEM (Standard Error of Mean).

3.3.5 Συσχέτιση της IRE1 Σηματοδοτικής Δραστικότητας με το Προφίλ Έκφρασης της Πρωτεΐνης CD90/Thy-1 σε Διάφορους Τύπους Καρκίνου

Μέσα από την συστηματική ανάλυση της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου, ένα από τα γονίδια που μας προξένησε ιδιαίτερο ενδιαφέρον και διερευνήσαμε περαιτέρω την σχέση του με την IRE1 πρωτεΐνη ήταν και το Thy-1 ή CD90 (Cluster of Differentiation 90) το οποίο συμπεριλαμβανόταν συστηματικά στα κορυφαία διαφορικά εκφρασμένα γονίδια όταν συγκρίναμε τους IRE1^{high} με τους IRE1^{low} όγκους ασθενών. Πρόκειται για μια γλυκοζυλιωμένη, αγκυροβολημένη μέσω γλυκοφωσφατίδυλο-ινοσιτόλης (GPI) μεμβρανική πρωτεΐνη που φέρει μια V-τύπου υπομονάδα ανοσοσφαιρίνης και που αρχικά περιγράφηκε στα Τ κύτταρα του ποντικού [419, 420]. Έκτοτε, περισσότερες από 10.000 δημοσιεύσεις αναφέρονται στην CD90 κυρίως σε είδη τρωκτικών αλλά και στον άνθρωπο. Πρόκειται για ένα συντηρημένο γονίδιο από τα ψάρια μέχρι τα θηλαστικά ενώ ομόλογα γονίδια έχουν περιγραφεί ακόμη και σε ορισμένα ασπόνδυλα όπως τα καλαμάρια, οι χιτώνες και τα σκουλήκια [421]. Είναι σημαντικό ότι ο υποκινητής του γονιδίου συχνά θεωρείται ότι ενεργοποιείται ειδικά στον εγκέφαλο και γι' αυτό χρησιμοποιείται συνήθως για να καθοδηγήσει την «ειδική στον εγκέφαλο» έκφραση πρωτεϊνών σε ποντίκια [422]. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι πρόκειται για μια υψηλού βαθμού συντηρημένη πρωτεΐνη στον άνθρωπο και το ποντίκι αφού παρουσιάζουν ταυτότητα αμινοξικών καταλοίπων της τάξεως του 66% (**Εικόνα 3.59A**).

Παρόλο που το χαρακτηριστικό πρότυπο έκφρασης της CD90 καθώς και το σύνολο των λειτουργιών στις οποίες εμπλέκεται σε φυσιολογικούς ιστούς, όπως σε νευρώνες, ινοβλάστες και Τ κύτταρα, έχουν μελετηθεί διεξοδικά, τα τελευταία χρόνια αυξάνουν συνεχώς οι ενδείξεις εμπλοκής της στον καρκίνο. Από την ανάλυση των RNA-Seq δεδομένων σε 12 πρωτογενείς συμπαγείς καρκινικούς τύπους ασθενών του TCGA προγράμματος χαρτογραφήσαμε το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της CD90 (**Εικόνα 3.59B**) και παρατηρήσαμε ότι τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασής της εντοπίζονται στο γλοιοβλάστωμα (GBM), το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού (KIRC) και στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος (PAAD) (**Εικόνα 3.59B**). Τα τελευταία χρόνια, η CD90 έχει αναφερθεί ως δείκτης των ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων του GBM (GSC) [423] ενώ επίσης εκφράζεται σε στρωματικά κύτταρα που σχετίζονται με GBM (GASCs) [424] όσο και σε περικύτταρα που μοιάζουν με τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα [425], αντανακλώντας έτσι την GBM κυτταρική ετερογένεια. Επίσης, πρόσφατα δείχθηκε ότι η έκφραση της CD90 δεν περιορίζεται μόνο σε βλαστικά κύτταρα που μοιάζουν με GBM αλλά παρατηρείται επίσης και σε πιο διαφοροποιημένα GBM κύτταρα (πρωτογενείς κυτταρικές σειρές προσκόλλησης) και σε

φρέσκα διαχωρισμένα GBM δείγματα [270]. Χρησιμοποιώντας τα πρόσφατα σύνολα RNAseq δεδομένων μοναδικών κυττάρων (single-cell) από GBM κύτταρα που μοιάζουν α) με βλαστικά, β) GBM κύτταρα μη-βλαστικά και γ) μεταναστευτικά κύτταρα του όγκου [426, 427] επιβεβαιώσαμε ότι η CD90 εκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα στην θέση του κύριου όγκου καθώς και σε μεταναστευτικά καρκινικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα που σχετίζονται με τον όγκο και γειτονικά νευρωνικά κύτταρα (Εικόνα 3.59D).



Εικόνα 3.59. Προφίλ έκφρασης και μεταλλάξεων της CD90 σε διάφορους τύπους καρκίνου

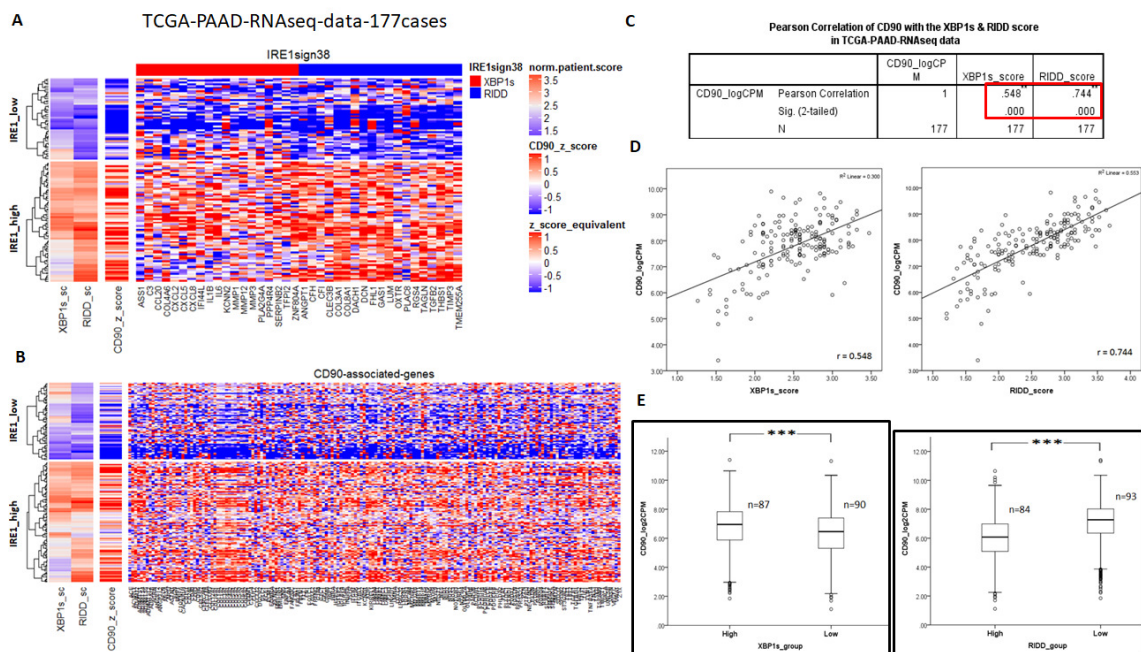
(A) Πολλαπλή στοίχιση των πρωτεϊνικών ακολουθιών της CD90 στον άνθρωπο, τον χιμπατζή, τον ποντίκι και τον αρουραίο όπου αναδεικνύεται ο υψηλός βαθμός ομολογίας. Επίσης σημειώνονται τα κύρια χαρακτηριστικά της CD90 πρωτεΐνης που περιλαμβάνουν το πεπτιδιο-οδηγητή (μπλε γραμμή), την υπομονάδα ανοσοσφαιρίνης V-τύπου (πορτοκαλί οριζόντια γραμμή σε πλαίσιο), τις θέσεις N-γλυκοζυλίωσης (n σε τρωκτικά και N σε πρωτεύοντα) και τα κατάλοιπα κυστεΐνης που συμμετέχουν σε θειογέφυρες (C). (B) Τα επίπεδα mRNA (\log_2 CPM) της CD90 αναλύθηκαν μεταξύ των διαφόρων τύπων καρκίνου του προγράμματος TCGA. Ο αντίστοιχος αριθμός δειγμάτων όγκου που εξετάστηκαν απεικονίζεται στην κορυφή των θηκογραμμάτων. (C) Η συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου CD90 που αφορούσαν σε σημειακές μεταλλάξεις (mutation), σε μεταλλάξεις ενίσχυσης (Amplification) και ομόζυγης διαγραφής (Deep Deletion) για 12 διαφορετικούς τύπους καρκίνου. (D) Τα επίπεδα mRNA της CD90 αναλύθηκαν στα RNAseq δεδομένα μοναδικού κυττάρου (single-cell) σε GBM δείγματα [427] χρησιμοποιώντας την βάση «Single Cell Expression Atlas» του EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/sc/home>). Απεικονίζονται επίσης οι θέσεις εντοπισμού της CD90 και οι διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι που την εκφράζουν. (E) Μετανάλυση της σχετιζόμενης με την έκφραση της CD90 γονιδιακής υπογραφής που εξάχθηκε από GBM δείγματα [270] σε 12 διαφορετικούς τύπους καρκίνου με το εργαλείο CancerMA [428]. Το κυκλοειδές διάγραμμα (circos plot) δείχνει την μετά-αλλαγή στην γονιδιακή έκφραση της σχετιζόμενης με την CD90 υπογραφής, σε σχέση με τους 12 τύπους καρκίνου. Κάθε σύνδεση μεταξύ ενός γονιδίου και ενός τύπου καρκίνου υποδηλώνει μια στατιστικά σημαντική

μέση υπέρ-ή υπό-έκφραση του γονιδίου για αυτόν τον τύπο καρκίνου και προκύπτει από μια σειρά συνδυασμένων πειραμάτων μικροσυστοιχιών για καρκινικούς ιστούς έναντι του φυσιολογικού ιστού. Το βάρος (πλάτος) της σύνδεσης αντιστοιχεί στο μέγεθος της μετά-αλλαγής στην γονιδιακή έκφραση.

Επίσης, από την χαρτογράφηση του προφίλ μεταλλάξεων του γονιδίου της CD90 διαπιστώσαμε την πολύ χαμηλή συχνότητα μεταλλάξεων που φέρει σε όλους τους τύπους καρκίνου κάτι που ερχόταν σε συμφωνία με την μελέτη του Kumar και συνεργατών [429] όπου ανέφεραν ότι «καμία μελέτη δεν έχει αναφέρει ακόμη μεταλλάξεις στο γονίδιο CD90 ή σε ρυθμιστικά στοιχεία που σχετίζονται με το CD90 σε οποιονδήποτε τύπο καρκίνου». Σύμφωνα με τον «Κατάλογο των σωματικών μεταλλάξεων στον καρκίνο» (COSMIC; n = 47210 δείγματα) και cBioPortal (n = 52770 δείγματα), η συχνότητα μετάλλαξης του CD90 στον καρκίνο ήταν πολύ χαμηλή (0.001% με 51 και 54 μεταλλάξεις στην COSMIC και cBioPortal, αντίστοιχα). Οι περισσότερες CD90 μεταλλάξεις ήταν παρανοηματικές (60.8% και 92.6% στην COSMIC και cBioPortal, αντίστοιχα) και συνώνυμες υποκαταστάσεις (35.3%, COSMIC) που απαντούν κυρίως σε καρκίνους του εντέρου, του πνεύμονα και του δέρματος (**Εικόνα 3.59C**). Η μεγαλύτερη ενίσχυση παρατηρήθηκε στον καρκίνο των ωοθηκών (2.2% στο cBioPortal) ενώ ομόζυγη διαγραφή του γονιδίου έχει εντοπιστεί στον καρκίνο του προστάτη (1.6% στο cBioPortal) και του μαστού (1.3% στο cBioPortal) (**Εικόνα 3.59C**).

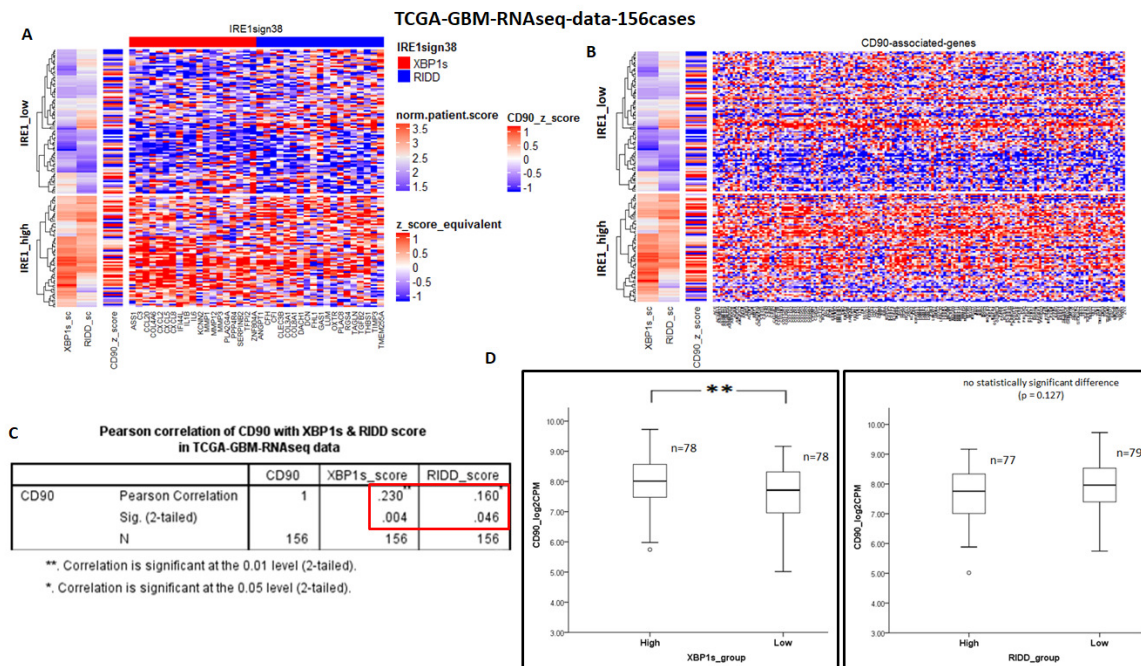
Στη συνέχεια, διερευνήσαμε την σχέση της IRE1 σηματοδοτικής δραστηριότητας με την έκφραση της CD90 στους καρκινικούς τύπους στους οποίους είχαμε εντοπίσει τα υψηλότερα επίπεδα mRNA έκφρασης που ήταν το γλοιοβλάστωμα (GBM), το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού (KIRC) και ο καρκίνος του παγκρέατος (PAAD). Γι' αυτούς τους τύπους έγινε πλήρης χαρακτηρισμός των ασθενών με βάση το προφίλ έκφρασης της IRE1 γονιδιακής υπογραφής καθώς και αξιολόγηση της RIDD και XBP1s δράσης αλλά και συσχέτισή τους με τα επίπεδα έκφρασης της CD90. Όπως γίνεται φανερό και στις **Εικόνες Εικόνα 3.60, Εικόνα 3.61 και Εικόνα 3.62** υπήρξε μια σημαντικά θετική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της CD90 με την υψηλή IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα και στους τρεις τύπους καρκίνου όπου στην περίπτωση του καρκίνου του παγκρέατος αποκτούσε ακόμη και γραμμικό χαρακτήρα. Στην περίπτωση του PAAD και KIRC η συσχέτιση αυτή εκδηλώνεται μέσα και από τους δύο άξονες δράσης XBP1s και RIDD ενώ στο GBM καθοδηγείται κυρίως από την XBP1s σηματοδοτική ενεργότητα. Στη συνέχεια, για κάθε χαρακτηρισμένη με βάση την IRE1 δράση ομάδα ασθενών ελέγχθηκε το πρότυπο γονιδιακής έκφρασης ενός συνόλου/υπογραφής 168 γονιδίων (CD90 associated gene signature) που είχαν βρεθεί αρχικά ως σημαντικά διαφορετικά εκφρασμένα σε ασθενείς και κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος, σε στρωματοποιημένα δείγματα με βάση την έκφραση της CD90. Από

μετανάλυση των γονιδίων της υπογραφής στους 12 καρκινικούς τύπους (Εικόνα 3.59E) παρατηρήσαμε την ομόρροπη σημαντική διαφορική έκφρασή της στο γλοιοβλάστωμα, στον καρκίνο του νεφρού και του παγκρέατος ενώ ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των γονιδίων της ανέδειξε κυρίως λειτουργίες που εμπλέκονταν στην κυτταρική μετανάστευση και την διηθητικότητα των καρκινικών κυττάρων. Στις Εικόνες Εικόνα 3.60, Εικόνα 3.61, και Εικόνα 3.62 απεικονίζεται επίσης το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της CD90 υπογραφής στους IRE1^{high} και IRE1^{low} όγκους, όπου φαίνεται ξεκάθαρα η αυξημένη έκφραση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων της στους IRE1^{high} έναντι των IRE1^{low} καθώς και η σχέση της με την σηματοδοτική ενεργότητα των XBP1s και RIDD αξόνων.



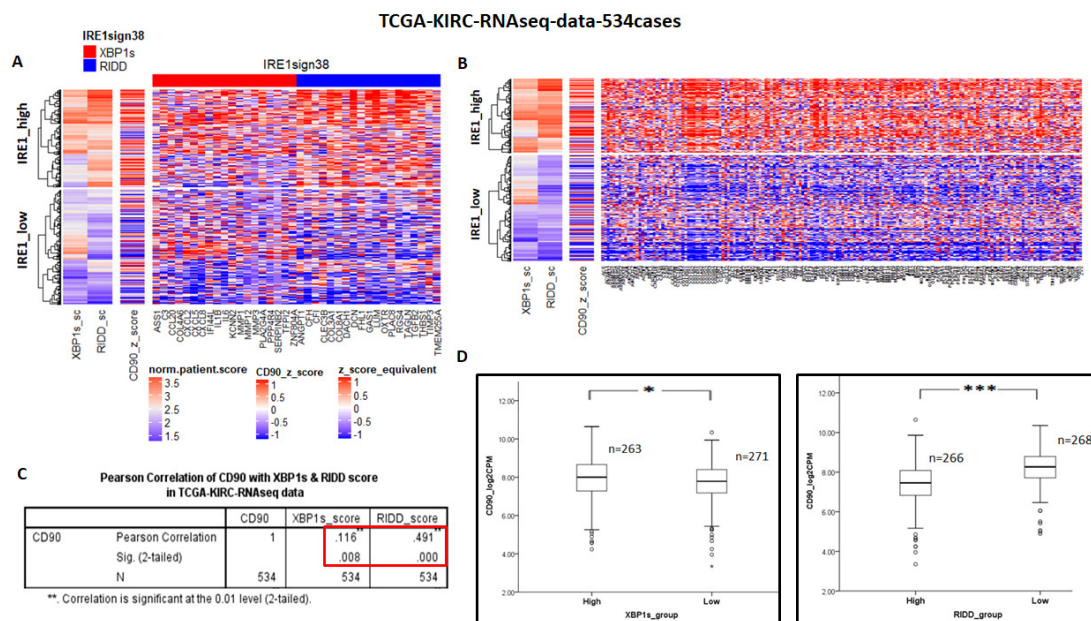
Εικόνα 3.60. Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της CD90 με την IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα στον καρκίνο του παγκρέατος

(A) Ιεραρχική μη επιβλεπόμενη ομαδοποίηση των ασθενών υψηλής και χαμηλής IRE1 δραστικότητας της TCGA-PAAD κούρτης με βάση την XBP1s και RIDD σηματοδοτική ενεργότητα όπως αξιολογήθηκε με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της υπογραφής IRE1sign38. Στον θερμικό χάρτη απεικονίζονται επίσης τα κανονικοποιημένα επίπεδα mRNA της CD90 (CD90_z_score). Με κόκκινο χρώμα υποδεικνύονται τα υψηλά επίπεδα έκφρασης ενώ με μπλε τα χαμηλά. (B) Ιεραρχική μη επιβλεπόμενη ομαδοποίηση των ασθενών υψηλής και χαμηλής IRE1 δραστικότητας της TCGA-PAAD κούρτης με βάση την XBP1s και RIDD σηματοδοτική ενεργότητα όπου απεικονίζονται και τα επίπεδα έκφρασης των 168 γονιδίων που σχετίζονται με την έκφραση της CD90. Η υψηλή IRE1 ενεργότητα συνοδεύεται από υψηλά επίπεδα έκφρασης (κόκκινο χρώμα) αυτών των γονιδίων ενώ η χαμηλή IRE1 ενεργότητα συνοδεύεται από μειωμένα επίπεδα έκφρασης (μπλε χρώμα). (C) Συσχέτιση Pearson των επιπέδων έκφρασης της CD90 με τους δείκτες αξιολόγησης της XBP1s και RIDD σηματοδοτικής ενεργότητας. Εκτός από τον συντελεστή συσχέτισης r υποδεικνύεται και η στατιστική σημαντικότητα του ελέγχου συσχέτισης μέσα στο κόκκινο πλαίσιο. (D) Γραμμική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της CD90 και των δεικτών αξιολόγησης της XBP1s και RIDD σηματοδοτικής ενεργότητας. Το γραμμικό μοντέλο που περιγράφει την εξάρτηση των επιπέδων έκφρασης της CD90 (εξαρτημένη μεταβλητή) από το XBP1s και RIDD σκορ (ανεξάρτητες μεταβλητές) εμφανίζει $\text{adj.}R^2 = 0.580$ και $p=0.0001$. (E) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της CD90 σε ασθενείς με υψηλή και χαμηλή XBP1s και RIDD ενεργότητα, αντίστοιχα. Η σύγκριση των μέσων τιμών έγινε με Student t-test. *** $p<0.0001$.



Εικόνα 3.61. Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της CD90 με την IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα στο γλοιοβλάστωμα

(A) Ιεραρχική μη επιβλεπόμενη ομαδοποίηση των ασθενών υψηλής και χαμηλής IRE1 δραστηριότητας της TCGA-GBM κοόρτης με βάση την XBP1s και RIDD σηματοδοτική ενεργότητα όπως αξιολογήθηκε με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της υπογραφής IRE1sign38. Στον θερμικό χάρτη απεικονίζονται επίσης τα κανονικοποιημένα επίπεδα mRNA της CD90 (CD90_z_score). Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα υψηλά επίπεδα έκφρασης ενώ με μπλε τα χαμηλά. (B) Ιεραρχική μη επιβλεπόμενη ομαδοποίηση των ασθενών υψηλής και χαμηλής IRE1 δραστηριότητας της TCGA-GBM κοόρτης με βάση την XBP1s και RIDD σηματοδοτική ενεργότητα όπου απεικονίζονται και τα επίπεδα έκφρασης των 168 γονιδίων που σχετίζονται με την έκφραση της CD90. Η υψηλή IRE1 ενεργότητα συνοδεύεται από υψηλά επίπεδα έκφρασης (κόκκινο χρώμα) αυτών των γονιδίων ενώ η χαμηλή IRE1 ενεργότητα συνοδεύεται από μειωμένα επίπεδα έκφρασης (μπλε χρώμα). (C) Συσχέτιση Pearson των επιπέδων έκφρασης της CD90 με τους δείκτες αξιολόγησης της XBP1s και RIDD σηματοδοτικής ενεργότητας. Εκτός από τον συντελεστή συσχέτισης r υποδεικνύεται και η στατιστική σημαντικότητα του ελέγχου συσχέτισης μέσα στο κόκκινο πλαίσιο. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (D) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της CD90 σε ασθενείς με υψηλή και χαμηλή XBP1s και RIDD ενεργότητα, αντίστοιχα. Η σύγκριση των μέσων τιμών έγινε με Student t-test. ** $p < 0.01$.



Εικόνα 3.62. Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της CD90 με την IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα στον καρκίνο του νεφρού

(A) Ιεραρχική μη επιβλεπόμενη ομαδοποίηση των ασθενών υψηλής και χαμηλής IRE1 δραστικότητας της TCGA-KIRC κοόρτης με βάση την XBP1s και RIDD σηματοδοτική ενεργότητα όπως αξιολογήθηκε με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της υπογραφής IRE1sign38. Στον θερμικό χάρτη απεικονίζονται επίσης τα κανονικοποιημένα επίπεδα mRNA της CD90 (CD90_z_score). Με κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύονται τα υψηλά επίπεδα έκφρασης ενώ με μπλε τα χαμηλά. (B) Ιεραρχική μη επιβλεπόμενη ομαδοποίηση των ασθενών υψηλής και χαμηλής IRE1 δραστικότητας της TCGA-KIRC κοόρτης με βάση την XBP1s και RIDD σηματοδοτική ενεργότητα όπου απεικονίζονται και τα επίπεδα έκφρασης των 168 γονιδίων που σχετίζονται με την έκφραση της CD90. Η υψηλή IRE1 ενεργότητα συνοδεύεται από υψηλά επίπεδα έκφρασης (κόκκινο χρώμα) αυτών των γονιδίων ενώ η χαμηλή IRE1 ενεργότητα συνοδεύεται από μειωμένα επίπεδα έκφρασης (μπλε χρώμα). (C) Συσχέτιση Pearson των επιπέδων έκφρασης της CD90 με τους δείκτες αξιολόγησης της XBP1s και RIDD σηματοδοτικής ενεργότητας. Εκτός από τον συντελεστή συσχέτισης r υποδεικνύεται και η στατιστική σημαντικότητα του ελέγχου συσχέτισης μέσα στο κόκκινο πλαίσιο. ** $p < 0.01$. (D) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της CD90 σε ασθενείς με υψηλή και χαμηλή XBP1s και RIDD ενεργότητα, αντίστοιχα. Η σύγκριση των μέσων τιμών έγινε με Student t-test. *** $p < 0.0001$, * $p < 0.05$.

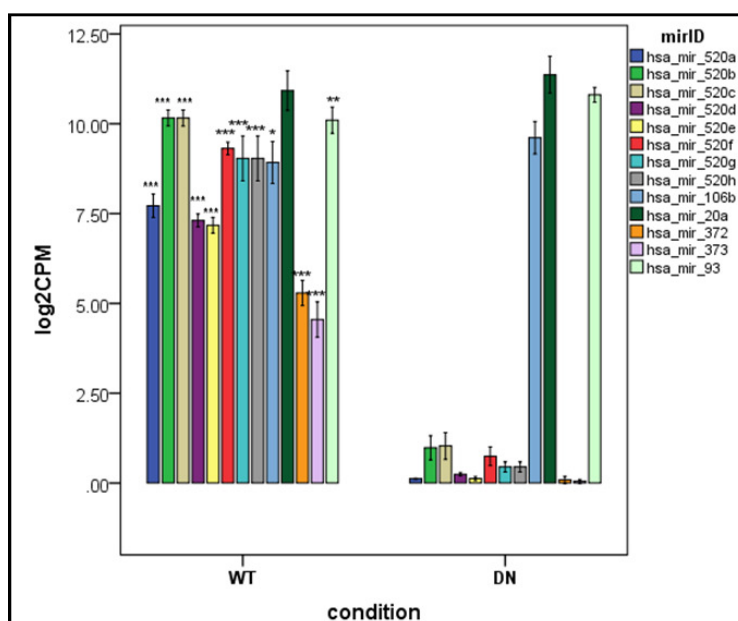
Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι η ανάλυσή μας ανέδειξε τον σημαντικό ρόλο της CD90 πρωτεΐνης στον καρκίνο που εκτός από δείκτης της καρκινικής βλαστοκυτταρικότητας που σχετίζεται άμεσα με την επιθετικότητα και την μεταστατικότητα σε ορισμένες μορφές καρκίνου, εκδηλώνει και μια νέα συσχέτιση με το στρες Ε.Δ. και τον UPR μηχανισμό μέσω κυρίως του IRE1-XBP1s σηματοδοτικού μονοπατιού. Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε καθώς και τα σημαντικότερα αποτελέσματα περιλαμβάνονται στην δημοσιευμένη ανασκόπηση [430].

3.3.6 IRE1/XBP1s-εξαρτώμενη Ρύθμιση της Κυτταροτοξικότητας των NK Κυττάρων στο Πρωτογενές Μελάνωμα μέσω Ρύθμισης των Επιπέδων Έκφρασης του NKG2D-Συνδέτη MICA και του Μεταγραφικού Παράγοντα E2F1 με την Μεσολάβηση της Οικογένειας των miR-520

Μια άλλη σημαντική σχέση που αναδείχτηκε στο πλαίσιο της διερεύνησης της συσχέτισης της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας με το ανοσολογικό προφίλ του κακοήθους μελανώματος (Ενότητα 3.3.4), το οποίο παρουσίαζε σημαντικές ομοιότητες με το GBM ήταν η IRE1/XBP1s-εξαρτώμενη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης MICA (Ακολουθία A σχετιζόμενη με το πολυπεπτίδιο του MHC τάξεως I) η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των κυττάρων-φυσικών φονιάδων (Natural Killer cells ή NK) στο μελάνωμα. Συγκεκριμένα, αποκαλύψαμε ένα IRE1/XBP1s-εξαρτώμενο κύκλωμα ρύθμισης της MICA μέσω του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 (E2F μεταγραφικός παράγοντας 1) [431] (υπό-εκφρασμένο γονίδιο κάτω από στρες Ε.Δ. [432] στα IRE1+/XBP1s+ GBM δείγματα) με την μεσολάβηση της οικογένειας των miR-520, μέλη της οποίας είχαμε ήδη ταυτοποιήσει ως miRXBP1s μόρια σε GBM όγκους και πρωτογενή κύτταρα (U87). Η ερευνητική ομάδα του Boaz Tirosch [Εργαστήριο Σηματοδότησης λόγω Στρες του Ινστιτούτου Φαρμακευτικής Έρευνας του Τμήματος Ιατρικής (<https://medicine.ekmd.huji.ac.il/en/pages/default.aspx>) στη Φαρμακευτική Σχολή του Εβραϊκού Πανεπιστημίου της Ιερουσαλήμ στο Ισραήλ] που ασχολείται με την αναζήτηση αντικαρκινικών φαρμάκων στην περίπτωση του κακοήθους μελανώματος, είχε παρατηρήσει ότι η κυτταροτοξικότητα των κυττάρων-φυσικών φονιάδων έναντι των καρκινικών κυττάρων του μελανώματος ενεργοποιείται από την σύνδεση της MICA πρωτεΐνης στον υποδοχέα NKG2D, της CD94/NKG2 οικογένειας των C-τύπου υποδοχέων παρόμοιων της λεκτίνης, στην επιφάνεια των NK κυττάρων. Επίσης από *in vitro* πειράματα σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μελανώματος 624 (MEL624) και 579A2 είχε φανεί ότι η έκφραση του συνδέτη MICA καταστέλλεται από τον άξονα του UPR μηχανισμού, IRE1-XBP1s, ενώ η αποσιώπηση του γονιδίου της IRE1 ή του XBP1 ήταν αρκετή για να επάγει αύξηση των επιπέδων του MICA γονιδίου τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο στην επιφάνεια των κυττάρων. Τέλος, από την βιοχημική ανάλυση που είχε διεξαχθεί στις κυτταρικές σειρές μελανώματος, είχε ταυτοποιηθεί ο μεταγραφικός παράγοντας E2F1 (E2F μεταγραφικός παράγοντας 1) σαν υποψήφιο μόριο-ενεργοποιητής της μεταγραφής του MICA γονιδίου .

Από την ανάλυση και ενσωμάτωση των miRNAseq δεδομένων με τα mRNAseq δεδομένα (Illumina-Hiseq) 470 ασθενών με πρωτοπαθές μελάνωμα της TCGA-SKCM κοόρτης που είναι κατατεθειμένα στο αποθετήριο του Broad Institute GDAC Firehose

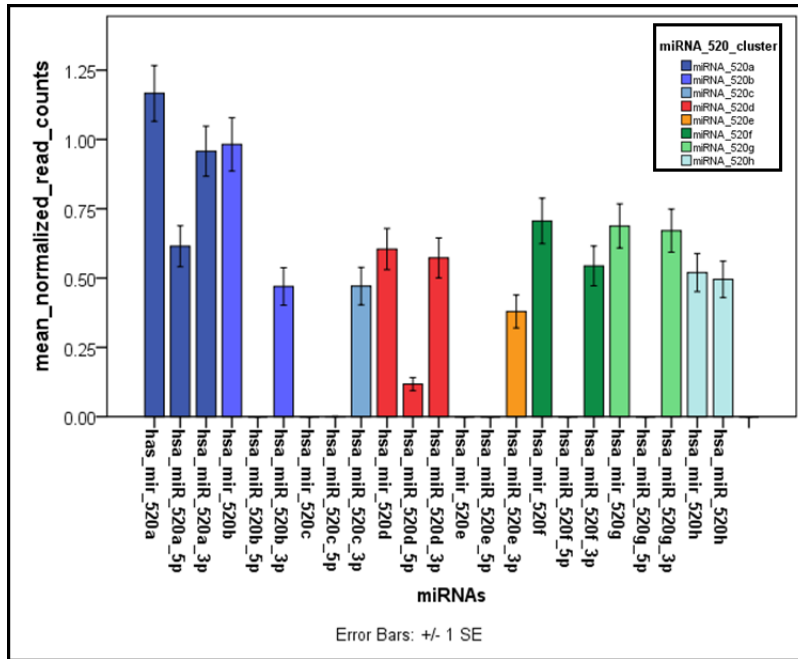
(<http://firebrowse.org/>) αποκαλύφθηκαν miRNAs και γονίδια-στόχοι με σημαντικό βαθμό επικάλυψης με τα αντίστοιχα ευρήματά μας στη περίπτωση του GBM (Εικόνα 3.63).



Εικόνα 3.63. Η οικογένεια των miR-520 παρουσιάζει δραματικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στα U87 κύτταρα που εκφράζουν την IRE1-DN παραλλαγή (U87-DN) σε σχέση με τα κύτταρα που εκφράζουν την αγρίου τύπου IRE1 (U87-WT)

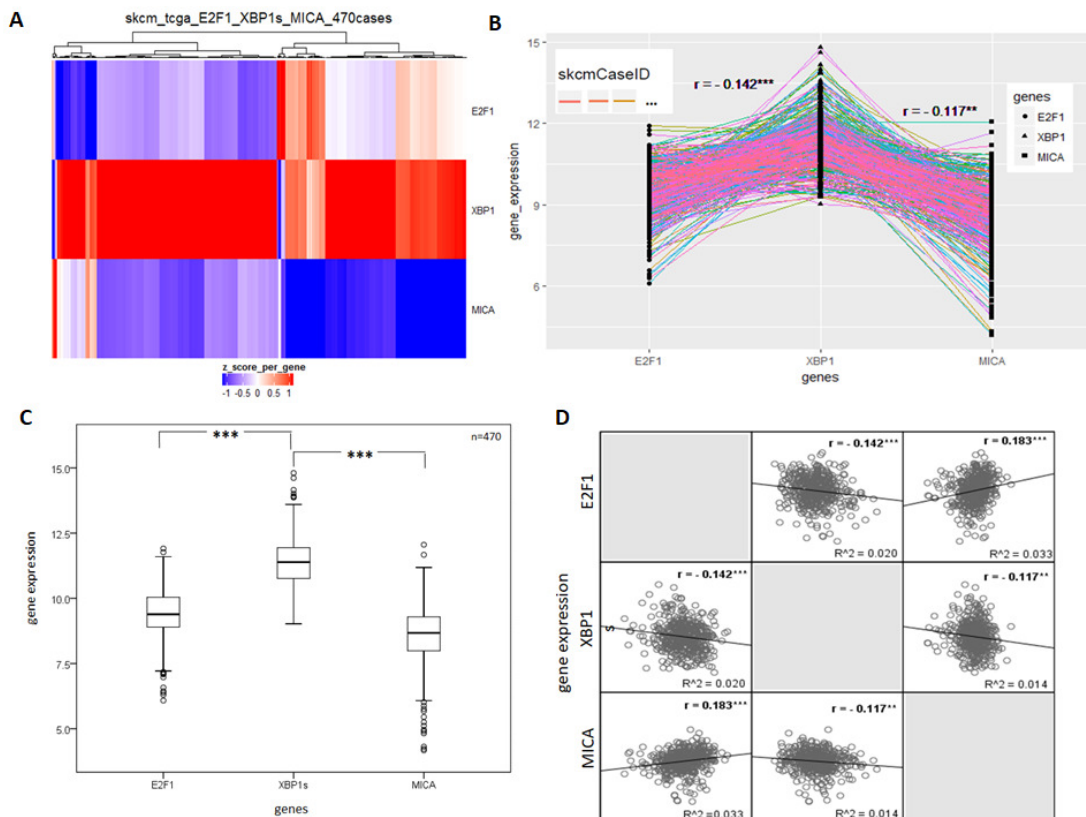
Στα ραβδογράμματα απεικονίζεται η μέση τιμή των $\log_2\text{CPMs}$ για 13 miRNAs (*hsa-mir-520a-h*, *hsa-mir-106b*, *hsa-mir-20a*, *hsa-mir-372-373*, *hsa-mir-93*) όπως υπολογίστηκαν από την ανάλυση των miRNAseq δεδομένων στα U87-WT και U87-DN κύτταρα, αντίστοιχα. Οι στήλες σφάλματος αντιστοιχούν στο τυπικό σφάλμα ($\pm\text{SD}$) για τρία βιολογικά αντίγραφα ανά συνθήκη. Τα σημαντικά διαφορικά εκφρασμένα miRNAs προέκυψαν με exact test του R Bioconductor πακέτου edgeR. Οι αστερίσκοι στην κορυφή των στηλών σφάλματος αντιπροσωπεύουν τα επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$ και $***p < 0.001$).

Η αντίστροφη συσχέτιση των επιπέδων μεταγραφικής έκφρασης του XBP1s με τον E2F1 και την MICA επιβεβαιώθηκε και στα RNA-seq δεδομένα των SKCM ασθενών (Εικόνα 3.65) αλλά αναδείχτηκε και η οικογένεια των miR-520 (Εικόνα 3.64) ως ισχυρός υποψήφιος που θα μπορούσε να λειτουργεί ως ενδιάμεσος παράγοντας που επάγεται από τον XBP1s και εν συνεχεία καταστέλλει την έκφραση του MICA αλλά και του E2F1 μέσω ισχυρής πρόσδεσης στην 3' UTR περιοχή των μεταγράφων τους (Εικόνα 3.66 και Εικόνα 3.67).



Εικόνα 3.64. Σχετικά επίπεδα έκφρασης της οικογένειας των miR-520a-h (πρόδρομων και ώριμων) σε ασθενείς με κακοήθες μελάνωμα (TCGA-SKCM)

Στα ραβδογράμματα απεικονίζεται η μέση τιμή έκφρασης (\log_2 RSEM) των μελών της οικογένειας των miR-520 (hsa-mir-520a-h) τόσο των πρόδρομων (mir) όσο και των ώριμων (miR) όπως υπολογίστηκαν από την ανάλυση των miRNAseq δεδομένων της TCGA-SKCM κοόρτης. Οι στήλες σφάλματος αντιστοιχούν στο τυπικό σφάλμα (\pm SD) για το σύνολο των 470 ασθενών.



Εικόνα 3.65. Η έκφραση των γονιδίων E2F1 και MICA συσχετίζεται αρνητικά με εκείνη του XBP1s σε όγκους μελανώματος

Η ανάλυση δεν συμπεριέλαβε τις περιπτώσεις «ακραίου» (*acral*) μελανώματος λόγω του διαφορετικού μοριακού τους προφίλ και της ιδιαίτερης παθοφυσιολογίας που εμφανίζουν. (A) Θερμικός χάρτης ιεραρχικής ομαδοποίησης των TCGA-SKCM ασθενών με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης ($\log_2\text{CPM}$) των γονιδίων *E2F1*, *XBP1s*, και *MICA*. Για την ομαδοποίηση χρησιμοποιήθηκε η ευκλείδεια απόσταση με το κριτήριο Ward (*Ward.D2*). Το κόκκινο χρώμα αναπαριστά υψηλά επίπεδα έκφρασης ενώ το μπλε χρώμα υποδεικνύει χαμηλή έκφραση. (B) Γράφημα πολλαπλών γραμμών (*multiline*) που απεικονίζει τα επίπεδα έκφρασης σε ζεύγη του *XBP1s* με το *E2F1* και *MICA*, αντίστοιχα. Κάθε γραμμή με διαφορετικό χρώμα είναι αντιπροσωπευτική για κάθε ασθενή. Οι τιμές γονιδιακής έκφρασης απεικονίζονται με 3 διαφορετικούς δείκτες σημείων για τα 3 διαφορετικά γονίδια. (C) Θηκογράμματα της mRNA έκφρασης των *E2F1*, *XBP1s*, και *MICA*. Τα κουτιά αναπαριστούν την κατανομή των τιμών από το 25^ο μέχρι το 75^ο ποσοστημόριο ενώ οι έντονες μαύρες οριζόντιες γραμμές στο εσωτερικό τους αναπαριστούν τις διάμεσες τιμές. Τα όρια του θηκογράμματος ορίζονται από μικρές οριζόντιες γραμμές που αντιπροσωπεύουν το $1.5 \times$ ενδοτεταρτημοριακό εύρος. D) Διαγράμματα διασποράς που δείχνουν την αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην γονιδιακή έκφραση του *XBP1s* και του *E2F1* ή του *MICA*. Το *r* αποδίδει την τιμή του συντελεστή συσχέτισης Pearson και οι *P-values* υπολογίστηκαν με βάση την αμφίπλευρη δοκιμασία συσχέτισης του Pearson. Σε κάθε διάγραμμα διασποράς η μαύρη γραμμή υποδεικνύει την μέση τάση μεταβολής όπως αξιολογήθηκε μετά από ανάλυση γραμμικής συσχέτισης με ανεξάρτητη μεταβλητή (*x*) την *XBP1s* γονιδιακή έκφραση και εξαρτημένη μεταβλητή (*y*) είτε την γονιδιακή έκφραση του *E2F1* είτε του *MICA*. Οι συντελεστές προσδιορισμού (R^2) σημειώνονται κάτω δεξιά. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο *E2F1* μεταγραφικός παράγοντας είχε ταυτοποιηθεί στο GBM ως γονίδιο-στόχος της οικογένειας των miR-520, 2 μέλη της οποίας συμπεριλαμβάνονταν στην miRXBP1s υπογραφή που είχαμε εξάγει στα U87 κύτταρα. Τέλος, εξαιτίας του πολύ σημαντικού ρόλου του *E2F1* και της *MICA* στην εξέλιξη του καρκίνου και στην αναγνώρισή του από το ανοσοποιητικό σύστημα, τα ευρήματα αυτά χρησιμοποιούνται ήδη για την θεραπευτική αντιμετώπιση του μελανώματος μέσω ρύθμισης του UPR μηχανισμού στα καρκινικά κύτταρα. Η μεθοδολογία που εφαρμόσαμε καθώς και τα σημαντικότερα αποτελέσματα περιλαμβάνονται στην δημοσίευση [433].

miR_id	miRNA sequence:	Target Gene	Ensembl Transcript ID
hsa-miR-520d-3p	5' - aaagucuuuccuuugggggu - 3'	MICA	ENST00000421350
Chromosome position 6:31382947-31382972	(Transcript) 5' AUU UG CU UCUCAC 3' - AAGCACUU GGG G UCU UUCGUGAAA	Chromosome position 6:31383007-31383026	(Transcript) 5' CUAUGAA AAAUAA A3' CAGAGA AAGCACUU G UUCGUGAA A5'
Transcript position 187-212	(miRNA) 3' U UG UU C 5'	Transcript position 247-266	(miRNA) 3' G C UUCGUGAA A5'
miTG*: 0.9544			
hsa-miR-520a-3p	5' - aaagucuuuccuuuggagacu - 3'	MICA	ENST00000421350
Chromosome position 6:31382947-31382972	(Transcript) 5' AUUCCUG U AUCUCAC 3' CC GG AAGCACUU UUCGUGAAA	Chromosome position 6:31383006-31383026	(Transcript) 5' CUAUGAA AGA UAA A3' ACAG AAA AAGCACUU UUC UUC UUCGUGAA
Transcript position 192-212	(miRNA) 3' A UUU C 5'	Transcript position 246-266	(miRNA) 3' AGG CCC A5'
miTG*: 0.94510			
hsa-miR-520f-3p	5' - aagucuuuccuuuagaggggu - 3'	MICA	ENST00000421350
Chromosome position 6:31382947-31382971	(Transcript) 5' AAUU GC UCUCAC 3' CCCU CUGGA AAGCACUU .. UUCGUGAAA	Chromosome position 6:31383005-31383026	(Transcript) 5' CUAUGA AGAG UAA 3' AAC AAA AAGCACUU UUC UUC UUCGUGAA
Transcript position 187-211	(miRNA) 3' U UCC 5'	Transcript position 245-266	(miRNA) 3' GGAGA CC A5'
miTG*: 0.87000			
hsa-miR-520c-3p	5' - aaagucuuuccuuuagaggggu - 3'	MICA	ENST00000421350
Chromosome position 6:31382947-31382972	(Transcript) 5' AUU GC UCUCAC 3' CCCU CUGGA AAGCACUU GGGA GAUUU UUCGUGAAA	Chromosome position 6:31383006-31383026	(Transcript) 5' CUAUGAA AGAG UAA A3' AC AAA AAGCACUU UG UUU UUCGUGAA
Transcript position 187-212	(miRNA) 3' U UCC 5'	Transcript position 246-266	(miRNA) 3' GGAGA CC A5'
miTG*: 0.89748			

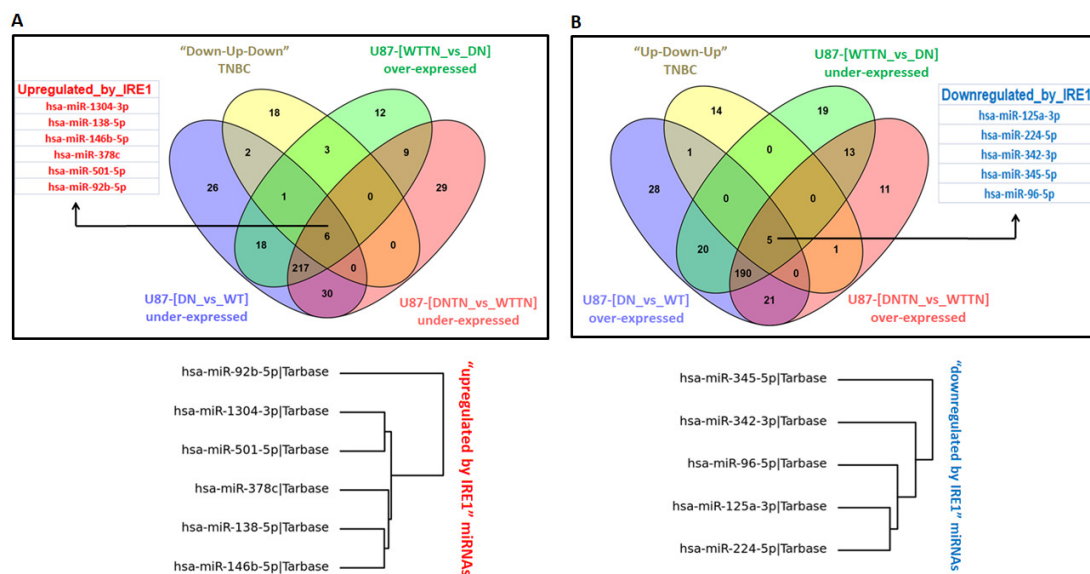
Εικόνα 3.66. Μέλη της οικογένειας των miR-520 μπορεί να παρέχουν τον σύνδεσμο ανάμεσα στον XBP1s και MICA

Λίστα των 3p-βραχιόνων των ώριμων μελών της οικογένειας των miR-520 με το υποψήφιο γονίδιο-στόχο MICA όπως ταυτοποιήθηκαν με τον αλγόριθμο DIANA-microT-CDS (www.microrna.gr/microT-CDS) και TargetScan (www.targetscan.org). Στον πίνακα απεικονίζονται: α) οι συντεταγμένες του γονιδίου MICA στο χρωμόσωμα 6 απ' όπου προκύπτει η περιοχή υβριδοποίησης του μεταγράφου του ENST00000421350 με το αντίστοιχο ώριμο miRNA, β) οι συντεταγμένες του μεταγράφου που ορίζουν την περιοχή υβριδοποίησης, γ) η νουκλεοτιδική ακολουθία του ώριμου miRNA και δ) η υποψήφια υβριδοποίηση του miRNA με το mRNA μεταγράφο.* Το miTG (miRNA target gene score) αντιστοιχεί στο σταθμισμένο άθροισμα όλων των MREs (miRNA Recognition Elements) που εντοπίστηκαν στην 3' UTR του γονιδίου-στόχου.

3.3.7 Κοινό IRE1-εξαρτώμενο Δίκτυο miRNA-mRNA στο Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα και τον Τριπλά Αρνητικό Καρκίνο του Μαστού με Κυρίαρχο Ρόλο στην Κυτταρική Διηθητικότητα και Μεταστατικότητα του Όγκου

Ένας άλλος τύπος καρκίνου που έχει συσχετιστεί σημαντικά η εκδήλωση των επιθετικών χαρακτηριστικών του όγκου με την IRE1 σηματοδοτική δραστικότητα είναι ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TNBC) [178] ο οποίος μελετάται διεξοδικά από την ομάδα του Καθηγητή Βιολογίας του Καρκίνου, Afshin Samali, στο Κέντρο Έρευνας για την Απόπτωση (Apoptosis Research Center) του Τμήματος Φυσικών Επιστημών του Εθνικού Πανεπιστημίου της Ιρλανδίας στο Γκάλγουεϊ (<https://www.nuigalway.ie>). Έτσι στο πλαίσιο της συνεργασίας της ερευνητικής μας ομάδας με την ομάδα του Καθηγητή, αναζητήσαμε να βρούμε αν υπάρχουν κοινά δίκτυα miRNA-mRNA μορίων στο GBM και τον TNBC που φαίνεται να συμμετέχουν ενεργά στην κυτταρική διηθητικότητα και την μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων, χαρακτηριστικά της επιθετικότητας και των δύο τύπων καρκίνου. Έτσι, έχοντας ήδη ταυτοποιήσει δίκτυα αλληλεπιδράσεων miRNAs-mRNAs που τα επίπεδα έκφρασής τους σχετίζονταν σημαντικά με τους δύο άξονες δράσης, XBP1s και RIDD της IRE1 σηματοδοτικής δραστικότητας στα U87 κύτταρα (Ενότητες 2.3.1.1, 2.3.1.2 και 2.3.2.1) πραγματοποιήσαμε ανάλογη ανάλυση και σε μεταγραφικά δεδομένα miRNAseq και mRNA δεδομένα μικροσυστοιχειών που αφορούσαν στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB-231. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα της ανάλυσης miRNAseq δεδομένων στα MDA-MB-231 κύτταρα (TNBC κυτταρική σειρά με υψηλή IRE1 ενεργότητα σε βασικές συνθήκες) από την σύγκριση 4 διαφορετικών πειραματικών συνθηκών για 8 και 24 ώρες (επίσωση σε DMSO, χορήγηση του IRE1 αναστολέα MKC8866, χορήγηση του χημειοθεραπευτικού που επάγει στρες Ε.Δ. Paclitaxel (πακλιταξέλη) και συνδυασμός Paclitaxel+MKC8866), προσομοιάζοντας έτσι τις πειραματικές συνθήκες WT, DN, WT_TN και DN_TN των U87 κυττάρων, αντίστοιχα. Όμως η ανάλυση διαφορικής έκφρασης με edgeR που πραγματοποιήθηκε με χρήση των συνήθη τιμών κατωφλίου για την στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ($P\text{value} \leq 0.05$; $FDR \leq 0.1$) και για το μέγεθος της μεταβολής ($\log FC \geq |0.5|$) ανέδειξε ένα πολύ μικρό αριθμό διαφορικά εκφρασμένων miRNAs με μικρό βαθμό επικάλυψης μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών. Κατά κάποιον τρόπο αυτό ήταν αναμενόμενο αν λάβουμε υπόψη μας ότι εύρωστες στατιστικές μέθοδοι όπως αυτές που εφαρμόζει ο αλγόριθμος edgeR προϋποθέτουν συνθήκες που είναι ανταλλάξιμες και σταθερές και ως εκ τούτου θυσιάζουν δύναμη και ακρίβεια όταν εφαρμόζονται σε ευαίσθητα, διατεταγμένα στον χρόνο ή/και τον χώρο RNAseq δεδομένα. Για τον λόγο αυτό, εφαρμόστηκε μια Μπαγεσιανή (Bayesian) προσέγγιση με χρήση ενός

αυτο-παλίνδρομου κρυμμένου Μαρκοβιανού μοντέλου (auto-regressive hidden Markov model) για να καταγραφούν αλλαγές γονιδιακής έκφρασης στα διαφορετικά χρονικά σημεία (8 και 24 ώρες) κάτω από την δράση διαφορετικών ουσιών. Συγκεκριμένα, οι κανονικοποιημένες και φιλτραρισμένες τιμές εγγραφών μοντελοποιήθηκαν με το EBSeqHMM [434] πακέτο της R. Το είδος αυτό ανάλυσης επέτρεψε τις πολλαπλές συγκρίσεις και την ταυτοποίηση ώριμων miRNA μορίων των οποίων το προφίλ έκφρασης ήταν διαφορετικό μεταξύ των 4 συνθηκών και ισχυρά συσχετισμένο με την ενεργοποίηση ή αναστολή της IRE1 πρωτεΐνης. Με τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις, η ταυτοποίηση ενός miRNA θεωρούνταν εκτίμηση υψηλής εμπιστοσύνης, εάν η ύστερη μέγιστη πιθανότητα του να ακολουθεί ένα συγκεκριμένο πρότυπο μεταβολής ήταν μεγαλύτερη από 0.5. Ακολουθώντας την μετάβαση των διαδοχικών πειραματικών συνθηκών (DMSO, MKC8866, Paclitaxel και Paclitaxel+MKC8866) στις 8- και 24-ώρες, δύο συγκεκριμένα πρότυπα έκφρασης των miRNAs αναδείχθηκαν. Το 1ο αφορούσε στην μετάβαση «Down-Up-Down» που αντιστοιχούσε στην αυξημένη έκφρασή τους, επαγόμενη από τον IRE1-XBP1s άξονα και το 2ο στην μετάβαση «Up-Down-Up» η οποία σχετιζόταν με τον IRE1-RIDD άξονα (δηλαδή υπό-εκφρασμένα miRNAs παρουσία της IRE1). Τελικά, δύο κοινές λίστες υποψήφιων miRIDD (5 miRNAs) (**Εικόνα 3.68A**) και miRXBP1s μορίων (6 miRNAs) (**Εικόνα 3.68B**) ταυτοποιήθηκαν στις GBM και TNBC κυτταρικές σειρές.



Εικόνα 3.68. Ταυτοποίηση 11 κοινών miRNA μορίων (6 XBP1s-εξαρτώμενα και 5 miRIDD) των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται από την IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα στην GBM κυτταρική σειρά U87 και την TNBC κυτταρική σειρά MDA-MB-231

(A) Διάγραμμα Venn που απεικονίζει το σύνολο των ώριμων miRNAs που βρέθηκαν υπέρ-ή υπό-εκφρασμένα όπως σημειώνεται κάτω από κάθε σύγκριση. 6 ώριμα miRNAs σε κόκκινο πλαίσιο αντιστοιχούν στο σύνολο των miRNAs των οποίων τα επίπεδα έκφρασης βρέθηκαν να αυξάνονται από την δράση της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας τόσο στα U87 κύτταρα όσο και στα MDA-MB-231 κάτω από βασικές συνθήκες αλλά και συνθήκες στρες Ε.Δ. Κάτω από το Venn διάγραμμα απεικονίζεται η ιεραρχική ομαδοποίηση των 6 IRE1/XBP1s – εξαρτώμενων miRNAs με

βάση τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των γονιδίων-στόχων τους. (B) Διάγραμμα Venn που απεικονίζει το σύνολο των ώριμων miRNAs που βρέθηκαν υπό-ή υπέρ-εκφρασμένα στις εικονιζόμενες συγκρίσεις. 5 ώριμα miRNAs σε μπλε πλαίσιο αντιστοιχούν στο σύνολο των miRNAs των οποίων τα επίπεδα έκφρασης βρέθηκαν να μειώνονται σημαντικά από την δράση της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας τόσο στα U87 κύτταρα όσο και στα MDA-MB-231 κάτω από βασικές συνθήκες αλλά και συνθήκες στρες E.Δ. Κάτω από το Venn διάγραμμα απεικονίζεται η ιεραρχική ομαδοποίηση των 5 miRIDD με βάση τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των γονιδίων-στόχων τους

Προκειμένου να αναδείξουμε πειραματικά επιβεβαιωμένα γονίδια-στόχους των 11 κοινών miRNAs χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικές προσεγγίσεις, αναζητώντας την τομή των αποτελεσμάτων τους. Σύμφωνα με την 1^η προσέγγιση, στην περίπτωση των U87 κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν τα ευρήματα της ανάλυσης των Affymetrix μικροσυστοιχειών GSE27306 (Ενότητα 2.3.1.2) και GSE107859 (Ενότητα 2.3.1.1) ενώ στα MDA-MB-231 κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν τα XBP1s-εξαρτώμενα mRNA και RIDD υποψήφια μετάγραφα που παρήχθησαν από την ανάλυση διατεταγμένων mRNAseq δεδομένων ακολουθώντας την ανάλογη διαδικασία που αναφέραμε στην περίπτωση των miRNAseq δεδομένων. Για περαιτέρω ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η ένωση των ταυτοποιημένων mRNAs στις 8 και 24-ώρες. Με την διαδικασία αυτή ταυτοποιήσαμε τελικά 122 XBP1s γονίδια-στόχους (υπέρ-εκφρασμένα παρουσία της IRE1 και υπό-εκφρασμένα απουσία της) και 37 RIDD γονίδια (υπό-εκφρασμένα παρουσία της IRE1 και υπέρ-εκφρασμένα απουσία της) κοινά στις κυτταρικές σειρές U87 και MDA-MB-231, των οποίων τα επίπεδα έκφρασης παρουσίαζαν αφενός σημαντική αρνητική συσχέτιση με αυτά των IRE1-εξαρτόμενων miRNAs, και αφετέρου ήταν σημαντικά διαφορετικά εκφρασμένα στις εξεταζόμενες συνθήκες. Η 2^η προσέγγιση περιλάμβανε την αναζήτηση πειραματικά επιβεβαιωμένων γονιδίων-στόχων των 11 κοινών miRNAs στην βάση Diana-TarBase v.7 & v.8 [329, 435]. Τέλος, η τομή των διαφορετικών συνόλων γονιδίων-στόχων των 11 κοινών miRNAs όπως προέκυψαν από τις 2 προσεγγίσεις (**Πίνακας 10**) αποκάλυψε ένα δίκτυο miRNAs-mRNAs, κοινό σε κύτταρα TNBC και GBM, το οποίο βρίσκεται κάτω από τον αυστηρό έλεγχο της IRE1 μέσω των δύο κύριων αξόνων δράσης της XBP1s και RIDD. Όπως γίνεται φανερό στην **Εικόνα 3.69** η IRE1 σηματοδοτική δράση εκδηλώνεται μέσω ενισχυτικών, ανασταλτικών και αναδραστικών βρόχων μέσω της συνδυαστικής δράσης α) miRNA μορίων και αποικοδόμησης mRNA μορίων (RIDD δράση) προωθώντας επιλεκτικά την υποέκφραση συγκεκριμένων συνόλων γονιδίων-στόχων και β) αποικοδόμησης συγκεκριμένων miRNA μορίων (miRIDD δράση) και επαγωγής της έκφρασης γονιδίων από την XBP1s δράση, επιφέροντας αυξημένη γονιδιακή έκφραση. Έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι το IRE1 miRNA-mRNA κύκλωμα δράσης στον καρκίνο έχει εξελιχθεί ως ένα βιολογικό σύστημα αυτορρύθμισης που επιτρέπει στο καρκινικό κύτταρο να ανταπεξέρχεται στις διάφορες περιβαλλοντικές προκλήσεις, εμποδίζοντάς το να

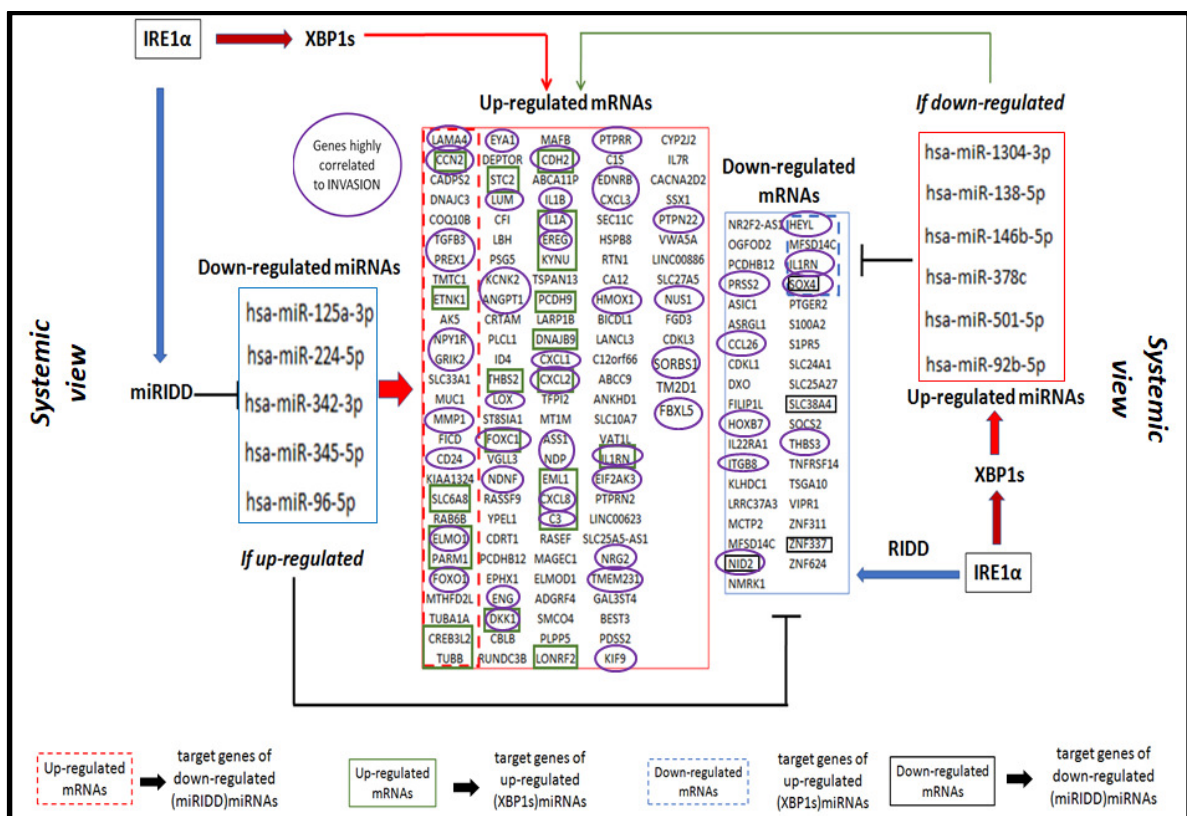
υπεραντιδρά σε στρεσογόνες καταστάσεις, διαφεύγοντας την κυτταρική απόπτωση και τον κυτταρικό θάνατο.

miRNAs UP-REGULATED BY IRE1α									
hsa-miR-1304-3p target genes		hsa-miR-138-5p target genes		hsa-miR-146b-5p target genes		hsa-miR-378c target genes		hsa-miR-501-5p target genes	
(mRNAs up-regulated by IRE1α)	(mRNAs down-regulated by IRE1α)	(mRNAs up-regulated by IRE1α)	(mRNAs down-regulated by IRE1α)	(mRNAs up-regulated by IRE1α)	(mRNAs down-regulated by IRE1α)	(mRNAs up-regulated by IRE1α)	(mRNAs down-regulated by IRE1α)	(mRNAs up-regulated by IRE1α)	(mRNAs down-regulated by IRE1α)
C3	HEYL MFSD14C	CXCL2 STC2	IL1RN SOX4	EML1 ETNK1	SOX4	FOXC1 DNAJB9	none	ETNK1 LONRF2	none
		IL1A KYNU		CREB3L2		SLC6A8		PCDH9 DKK1 FOXC1	
		CTGF EREG							
		IL1RN ELMO1							
		PARM1 CXCL8							
		CDH2 PCDH9							
		THBS2 TUBB FOXC1							
miRNAs DOWN-REGULATED BY IRE1α									
hsa-miR-125a-3p target genes		hsa-miR-224-5p target genes		hsa-miR-342-3p target genes		hsa-miR-96-5p target genes			
(mRNAs up-regulated by IRE1α)	(mRNAs down-regulated by IRE1α)	(mRNAs up-regulated by IRE1α)	(mRNAs down-regulated by IRE1α)	(mRNAs up-regulated by IRE1α)	(mRNAs down-regulated by IRE1α)	(mRNAs up-regulated by IRE1α)	(mRNAs down-regulated by IRE1α)		
LAMA4	none	CADPS2	NID2	KIAA1324	SLC38A4	KIAA1324	SOX4		
CTGF FOXC1		DNAJC3 COQ10B		CTGF PREX1		FOXO1 MTHFD2L	ZNF337		
YPEL1		CTGF TGFB3		SLC6A8 RAB6B		TUBA1A CREB3L2			
		PREX1 TMTC1		ELMO1 PARM1		TUBB LOX			
		ETNK1 AK5		ID4 PTPRN2					
		NPY1R GRIK2							
		SLC33A1 MUC1							
		MMP1 FICD							
		CD24 LONRF2							
		VGLL3							

Πίνακας 10. Λίστα υπό- και υπέρ-εκφρασμένων IRE1-εξαρτόμενων γονιδίων που είναι ταυτόχρονα και επιβεβαιωμένοι πειραματικοί στόχοι των 11 κοινών miRNAs που βρέθηκαν σε U87 και MDA-MB-231 κύτταρα. Δεν βρέθηκαν κοινοί στόχοι για το hsa-miR-92b-5p και hsa-miR-345-5p

Στη συνέχεια, διεξάγοντας λειτουργική ανάλυση των υπό- και υπέρ-εκφρασμένων γονιδίων-στόχων των 11 κοινών miRNAs σε GBM και TNBC κύτταρα με την πλατφόρμα «BioInfoMiner» (Ενότητα 2.3.3) (Πίνακας 11 και Πίνακας 12) αλλά και την posteriori στατιστική μέθοδο του αλγορίθμου Diana-mirPath v.3 [436] για τα υπό μελέτη miRNAs χρησιμοποιώντας την ένωση (Union) των βιολογικών διαδικασιών και μοριακών μονοπατιών

της βάσης Gene Ontology και KEGG, αντίστοιχα, αναδείξαμε λειτουργίες/μονοπάτια που στοχεύονταν σημαντικά από τα 11 IRE1-εξαρτούμενα miRNAs (Εικόνα 3.70 και Εικόνα 3.71). Αξίζει να αναφερθεί ότι τα υπό μελέτη miRNAs εμπλέκονταν σημαντικά σε καταβολικές και αναβολικές διαδικασίες του RNA και των πρωτεϊνών με τα miRIDD να δείχνουν μια μεγαλύτερη προτίμηση για διαδικασίες που αφορούν στην κυτταρική προσκόλληση και την διακυτταρική σύνδεση, ενώ τα miRXP1s έδειξαν να ελέγχουν σε μεγαλύτερο βαθμό την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην προσέλκυση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και την δράση κυρίως των μηχανισμών μη ειδικής (έμφυτης) άμυνας. Η τελευταία παρατήρηση ενισχύεται έντονα και από την παρουσία μιας μεγάλης συστάδας που αναφέρεται στην σηματοδοτική δράση του Toll-like υποδοχέα. Συμπερασματικά, η ιεραρχική ομαδοποίηση των λειτουργιών/μοριακών μονοπατιών που ήταν εμπλουτισμένα σε γονίδια-στόχους των 11 miRNAs ανέδειξε σύνολα βιολογικών διαδικασιών/μονοπατιών, ισχυρά συσχετιζόμενων με λειτουργίες όπως η κυτταρική μετανάστευση, η διήθηση και η κυτταρική προσκόλληση.



Εικόνα 3.69. Ελεγχόμενο από την IRE1 δίκτυο miRNAs-mRNAs σε GBM και TNBC κυτταρικές σειρές

Τέλος, χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα miRNet (<https://www.mirnet.ca/>) κατασκευάσαμε το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των 11 miRNAs με το σύνολο των γονιδίων-

στόχων τους από την βάση TarBase v.8. Για την οπτικοποίηση του δικτύου εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος κατευθυνόμενης δύναμης «Force Atlas» [437], ο οποίος μας βοήθησε να διακρίνουμε τον κεντρικό ρόλο του miR-224-5p, να αναδείξουμε συνδέσεις των υπό μελέτη miRNAs με κομβικά γονίδια-στόχους στην καρκινογένεση όπως τα TP53NP1, EGFR, MYC, BCL2, TGFB3, FGFBP1, INSIG1, JUN, MDM2, IGF1R αλλά και να εμπλουτίσουμε το δίκτυό μας με επιπλέον miRNA μόρια (miR-24-3p, miR-98-5p και miR-335-5p) που φαίνεται να ελέγχουν σημαντικό αριθμό των IRE1-εξαρτώμενων γονιδίων. Συνολικά το ανεπτυγμένο δίκτυο που δημιουργήθηκε αρχικά περιλάμβανε 4261 γονίδια (κόμβοι/nodes) και 6039 συνδέσεις/edges, ενώ έπειτα από φιλτράρισμα των nodes με βάση τον βαθμό σύνδεσης (degree filter) για τα γονίδια-στόχους και όχι για τα miRNAs απέδωσε ένα δίκτυο με 1230 γονίδια-στόχους και 3008 συνδέσεις (Εικόνα 3.72).

Η δομική και νουκλεοτιδική ανάλυση της ακολουθίας των 11 πρόδρομων miRNAs για τον εντοπισμό θέσεων αναγνώρισης για πιθανή αποκοπή από την IRE1 RNάση περιγράφεται λεπτομερώς στην Ενότητα 3.2.8.

Term id	Term Definition	Enrichment	Corrected pvalue	Term id	Term Definition	Enrichment	Corrected pvalue
GO:0001944	vasculature development	17/517	0.0008	GO:0050900	leukocyte migration	10/367	0.0244
GO:0072358	cardiovascular system development	17/527	0.0016	GO:0010714	positive regulation of collagen metabolic process	3/27	0.0255
GO:1990266	neutrophil migration	7/92	0.0026	GO:0031620	regulation of fever generation	2/8	0.0256
GO:0030593	neutrophil chemotaxis	7/83	0.0029		negative regulation of cytokine production involved in immune response	3/25	0.026
GO:0071621	granulocyte chemotaxis	7/89	0.0031	GO:0002719	positive regulation of cytokine biosynthetic process	4/63	0.027
GO:0097529	myeloid leukocyte migration	8/128	0.0039	GO:0041208	cell migration	18/935	0.0281
GO:0071216	cellular response to biotic stimulus	10/222	0.0046	GO:0016477	ERBB2 signaling pathway	3/32	0.0285
GO:0030595	leukocyte chemotaxis	8/142	0.0066	GO:0038128	cell surface receptor signaling pathway	36/2439	0.029
GO:0097530	granulocyte migration	7/100	0.0069	GO:0001659	temperature homeostasis	3/30	0.0296
GO:0001568	blood vessel development	15/496	0.0077	GO:0080135	regulation of cellular response to stress	15/746	0.0307
GO:0070417	cellular response to cold	3/9	0.0082	GO:0030198	extracellular matrix organization	9/334	0.0323
GO:0071222	cellular response to lipopolysaccharide	9/193	0.0085	GO:0034405	response to fluid shear stress	3/37	0.0323
GO:0071219	cellular response to molecule of bacterial origin	9/200	0.0089	GO:0032496	response to lipopolysaccharide	9/323	0.0329
GO:0010575	positive regulation of vascular endothelial growth factor production	4/27	0.0091		antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide	4/71	0.0345
GO:0006986	response to unfolded protein	8/157	0.0107	GO:0061844	peptide	14/680	0.0345
GO:0034620	cellular response to unfolded protein	7/121	0.0124	GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	3/40	0.0345
GO:0060326	cell chemotaxis	9/205	0.0129	GO:0006953	acute-phase response	2/11	0.0351
GO:0048514	blood vessel morphogenesis	13/411	0.0138	GO:0045080	positive regulation of chemokine biosynthetic process	16/850	0.0351
GO:0010574	regulation of vascular endothelial growth factor production	4/32	0.0146	GO:0035295	tube development	6/175	0.0361
GO:0035966	response to topologically incorrect protein	8/179	0.0146	GO:0009266	response to temperature stimulus	28/1820	0.0368
GO:0035967	cellular response to topologically incorrect protein	7/141	0.0148	GO:0051240	positive regulation of multicellular organismal process	10/425	0.0382
GO:0030968	endoplasmic reticulum unfolded protein response	6/100	0.0151	GO:0001933	negative regulation of protein phosphorylation	14/713	0.0401
GO:0010469	regulation of signaling receptor activity	15/600	0.0153	GO:0007167	enzyme linked receptor protein signaling pathway	7/241	0.0407
GO:0072359	circulatory system development	19/872	0.0176	GO:0073032	regulation of stress-activated protein kinase signaling cascade	7/239	0.0413
GO:2000826	regulation of heart morphogenesis	4/41	0.0184	GO:0032872	regulation of stress-activated MAPK cascade	11/505	0.0418
GO:0070098	chemokine-mediated signaling pathway	5/81	0.0192	GO:0007169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	2/14	0.0419
GO:0031649	heat generation	2/5	0.0201	GO:0045073	regulation of chemokine biosynthetic process	7/243	0.0433
GO:0001525	angiogenesis	10/315	0.0202	GO:0034976	response to endoplasmic reticulum stress	16/879	0.0439
GO:0010718	positive regulation of epithelial to mesenchymal transition	4/50	0.0207	GO:0033993	response to lipid	13/655	0.0443
GO:0002237	response to molecule of bacterial origin	10/338	0.0209	GO:0035239	tube morphogenesis	4/83	0.0454
GO:0051781	positive regulation of cell division	5/86	0.022	GO:1905897	regulation of response to endoplasmic reticulum stress	3/44	0.0459
GO:0032967	positive regulation of collagen biosynthetic process	3/26	0.0224	GO:0032965	regulation of collagen biosynthetic process	4/86	0.0459
				GO:0002718	regulation of cytokine production involved in immune response	6/187	0.0465
				GO:0046328	regulation of JNK cascade	10/446	0.0474
				GO:0001819	positive regulation of cytokine production	2/15	0.0491
				GO:0034616	response to laminar fluid shear stress		

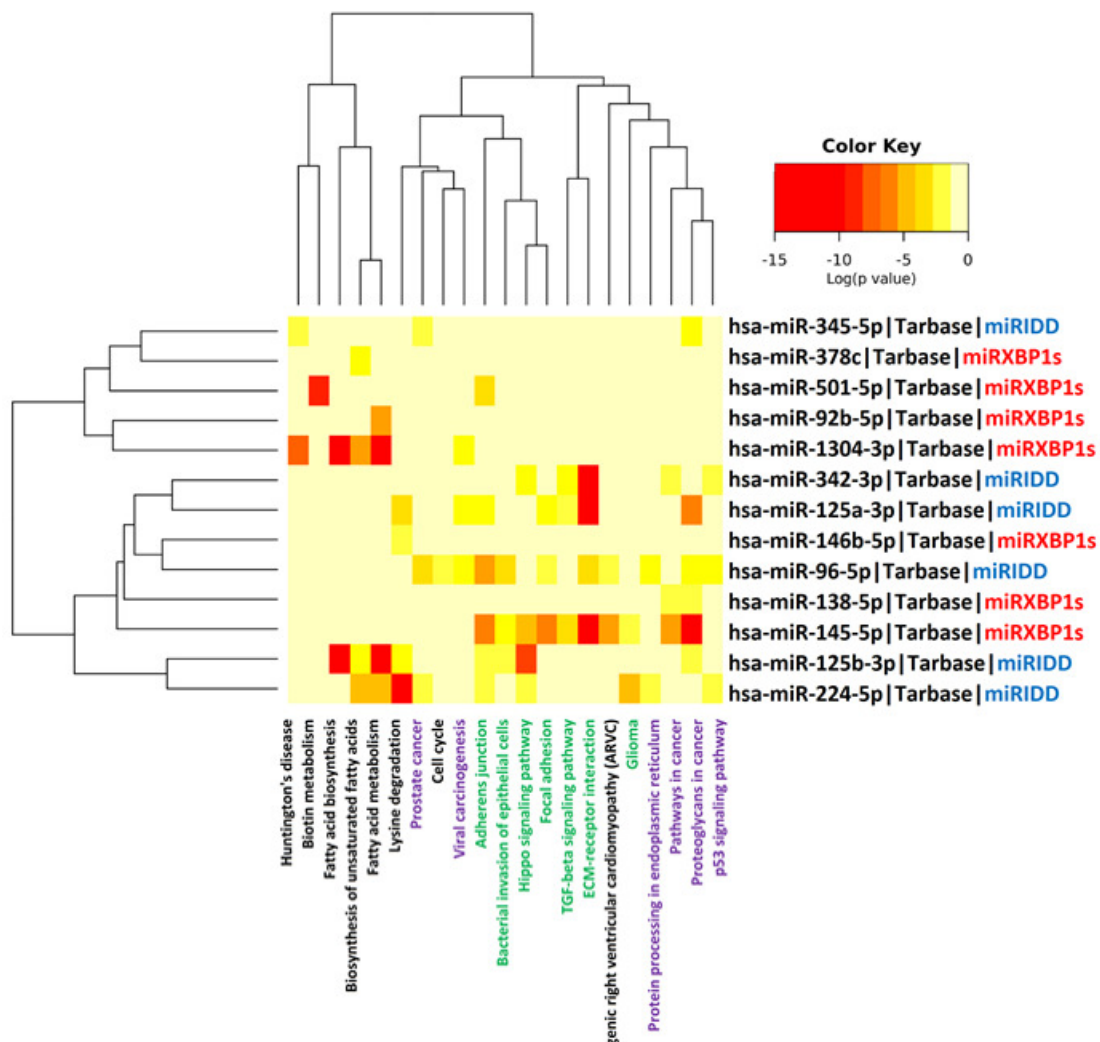
GO terms highly correlated to INVASION/MIGRATION

Πίνακας 11. Η λειτουργική ανάλυση των γονιδίων που υπερεκφράζονταν παρουσία της IRE1 σε GBM και TNBC κυτταρικές σειρές αναδεικνύει την υπεραντιπροώθηση βιολογικών διαδικασιών της GO (Gene Ontology) που σχετίζονται σημαντικά με την διήθηση και την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Αποτελέσματα της πλατφόρμας «BioInfoMiner»

Term id	Term Definition	Enrichment	Corrected pvalue	Term id	Term Definition	Enrichment	Corrected pvalue
GO:0003171	atrioventricular valve development	2/26	0.0024	GO:0001501	skeletal system development	4/494	0.0255
GO:0003181	atrioventricular valve morphogenesis	2/24	0.0028	GO:0003284	septum primum development	1/6	0.0258
GO:0007160	cell-matrix adhesion	3/127	0.0046	GO:0097530	granulocyte migration	2/100	0.0283
GO:0006814	sodium ion transport	3/152	0.0065	GO:0003279	cardiac septum development	2/112	0.0287
GO:0060412	ventricular septum morphogenesis	2/44	0.0068	GO:0030198	extracellular matrix organization	3/334	0.0287
GO:0031589	cell-substrate adhesion	3/173	0.0089	GO:0046642	negative regulation of alpha-beta T cell proliferation	1/9	0.0301
GO:0003179	heart valve morphogenesis	2/52	0.0098	GO:0097529	myeloid leukocyte migration	2/128	0.0318
GO:0003170	heart valve development	2/61	0.0098	GO:0051707	response to other organism	6/1301	0.0362
GO:1905674	regulation of adaptive immune memory response	1/3	0.0115	GO:0003206	cardiac chamber morphogenesis	2/130	0.0371
GO:0050805	negative regulation of synaptic transmission	2/63	0.0132	GO:0003231	cardiac ventricle development	2/131	0.0392
GO:0015672	monovalent inorganic cation transport	4/405	0.0134	GO:0030595	leukocyte chemotaxis	2/142	0.0394
GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	5/680	0.015	GO:0009607	response to biotic stimulus	6/1326	0.0424
GO:0003208	cardiac ventricle morphogenesis	2/72	0.0166	GO:0043207	response to external biotic stimulus	6/1303	0.0429
GO:0003281	ventricular septum development	2/75	0.0177	GO:0009617	response to bacterium	4/692	0.0436
GO:0030593	neutrophil chemotaxis	2/83	0.0224	GO:0006952	defense response	6/1319	0.0438
GO:0060411	cardiac septum morphogenesis	2/76	0.0227	GO:0043062	extracellular structure organization	3/380	0.0448
GO:0050829	defense response to Gram-negative bacterium	2/88	0.0248	GO:0006874	cellular calcium ion homeostasis	3/428	0.048
GO:1990266	neutrophil migration	2/92	0.0248	GO:0051216	cartilage development	2/174	0.0487
				GO:0071345	cellular response to cytokine stimulus	5/1018	0.0489

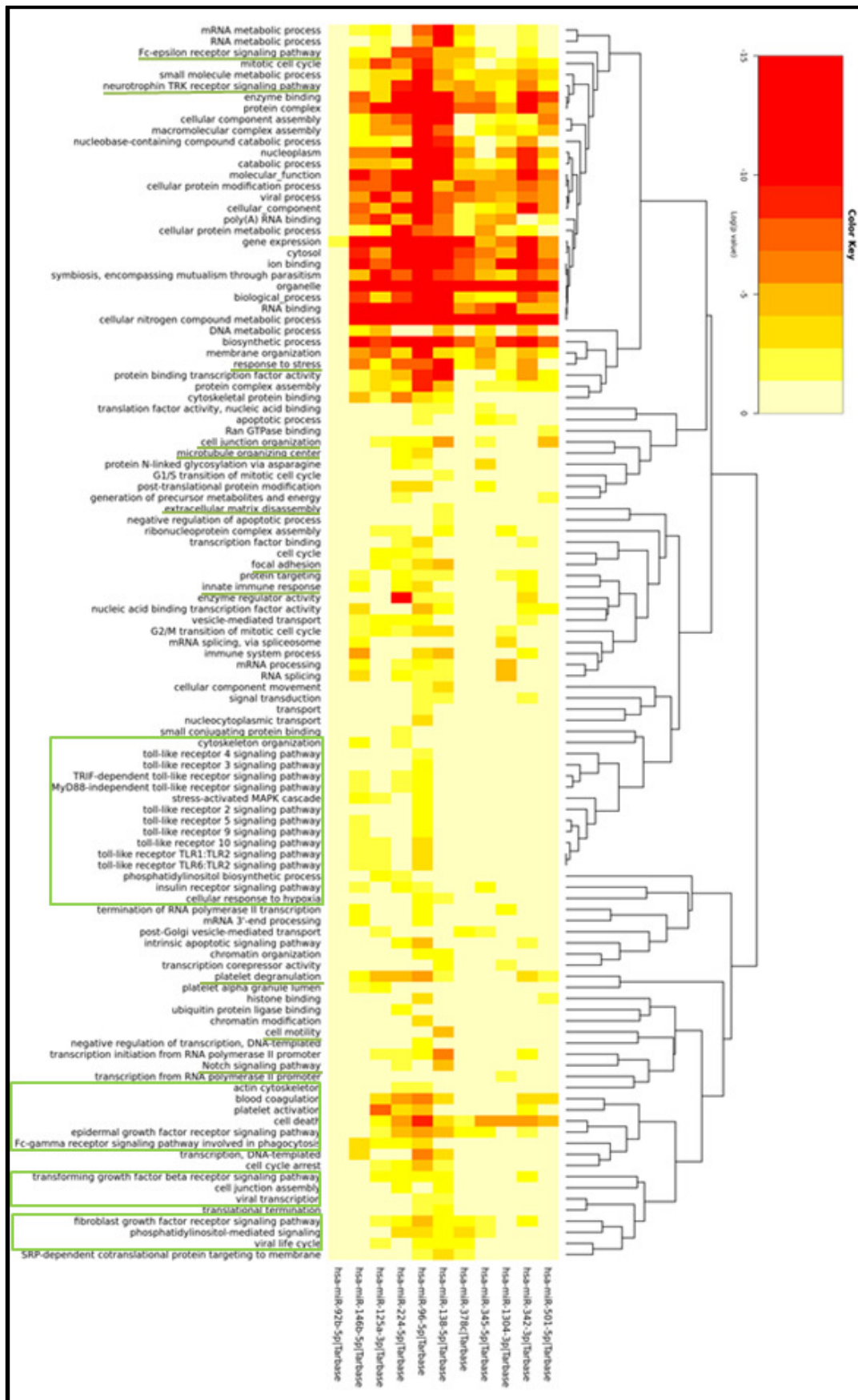
GO terms highly correlated to INVASION/MIGRATION

Πίνακας 12. Η λειτουργική ανάλυση των γονιδίων που υποεκφράζονταν εξαιτίας της δράσης της IRE1 σε GBM και TNBC κυτταρικές σειρές αναδεικνύει την υπεραντιπροσώπηση βιολογικών διαδικασιών της GO (Gene Ontology) που σχετίζονται σημαντικά με την διήθηση και την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Αποτελέσματα της πλατφόρμας «BioInfoMiner»



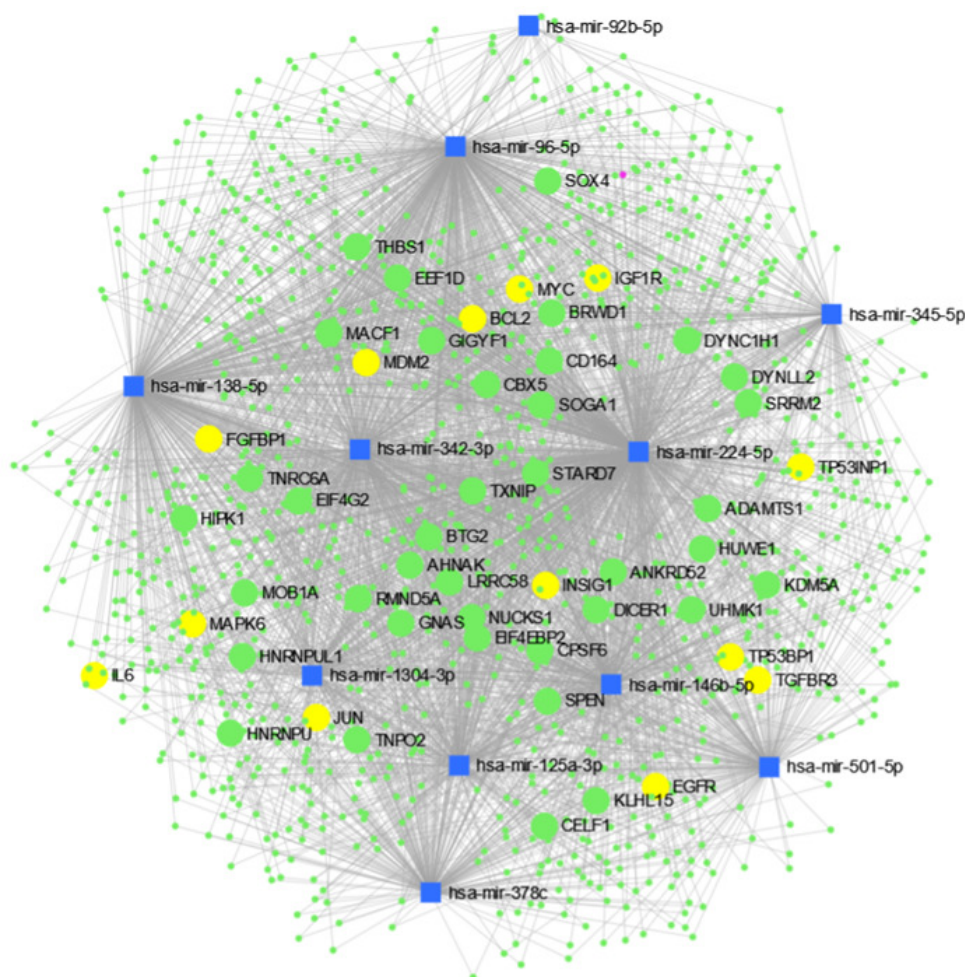
Εικόνα 3.70. KEGG μονοπάτια που στοχεύονται σημαντικά από τα 11 κοινά miRNAs που βρέθηκαν να ελέγχονται από την IRE1 σε GBM και TNBC κυτταρικές σειρές

Ιεραρχική ομαδοποίηση των 21 σημαντικών KEGG μοριακών μονοπατιών και των 11 miRNAs που τα στοχεύουν εφαρμόζοντας την Posteriori μέθοδο ανάλυσης του αλγορίθμου DIANA-mirPath. Στην βάση του θερμικού χάρτη απεικονίζονται τα σημαντικά KEGG μονοπάτια. Με πράσινο χρώμα σημειώνονται αυτά που σχετίζονταν σημαντικά με την κυτταρική προσκόλληση και διήθηση ενώ με μωβ χρώμα υποδεικνύονται μονοπάτια που εμπλέκονται άμεσα στην καρκινογένεση και την λειτουργία του Ε.Δ. Τα υπέρ-εκφρασμένα miRNAs από την IRE1 χαρακτηρίζονται ως miRXBP1s και σημειώνονται με κόκκινο χρώμα ενώ τα υπό-εκφρασμένα miRNAs χαρακτηρίζονται ως miRIDD και σημειώνονται με μπλε χρώμα. Η χρωματική κλίμακα (color key) μετξ-κόκκινο απεικονίζει την στατιστική σημαντικότητα *p-value* της μετανάλυσης Fisher. Όσο μικρότερη η τιμή *p-value* (αυξημένη στατιστική σημαντικότητα) τόσο πιο κόκκινο το χρώμα στον θερμικό χάρτη.



Εικόνα 3.71. Βιολογικές διαδικασίες της GO (Gene Ontology) που στοχεύονται σημαντικά από τα 11 κοινά miRNAs που βρέθηκαν να ελέγχονται από την IRE1 σε GBM και TNBC κυτταρικές σειρές. Αποτελέσματα του αλγορίθμου «DIANA-mirPath»

Ιεραρχική ομαδοποίηση των GO βιολογικών διαδικασιών που ήταν σημαντικά εμπλουτισμένες με γονίδια-στόχους των 11 miRNAs, εφαρμόζοντας την Posteriori μέθοδο ανάλυσης του αλγορίθμου DIANA-mirPath. Στην βάση του θερμικού χάρτη απεικονίζονται τα εξεταζόμενα miRNAs. Η χρωματική κλίμακα (color key) μπλε-κόκκινο απεικονίζει την στατιστική σημαντικότητα p-value της μετανάλυσης Fisher. Όσο μικρότερη η τιμή p-value (αυξημένη στατιστική σημαντικότητα) τόσο πιο κόκκινο το χρώμα στον θερμικό χάρτη. Βιολογικές διαδικασίες/σηματοδοτικά μονοπάτια με σημαντική συμβολή στην κυτταρική προσκόλληση, διακυτταρική επικοινωνία, και διήθηση είναι υπογραμμισμένα με πράσινο χρώμα ή βρίσκονται σε πράσινο πλαίσιο. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται επίσης η ανοσολογική απόκριση, η απόκριση στο στρες, η αναδιοργάνωση της εξωκυτταρικής μήτρας και του κυτταροσκελετού καθώς και η σηματοδότηση μέσω υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων EGF, TGF-β και FGF.

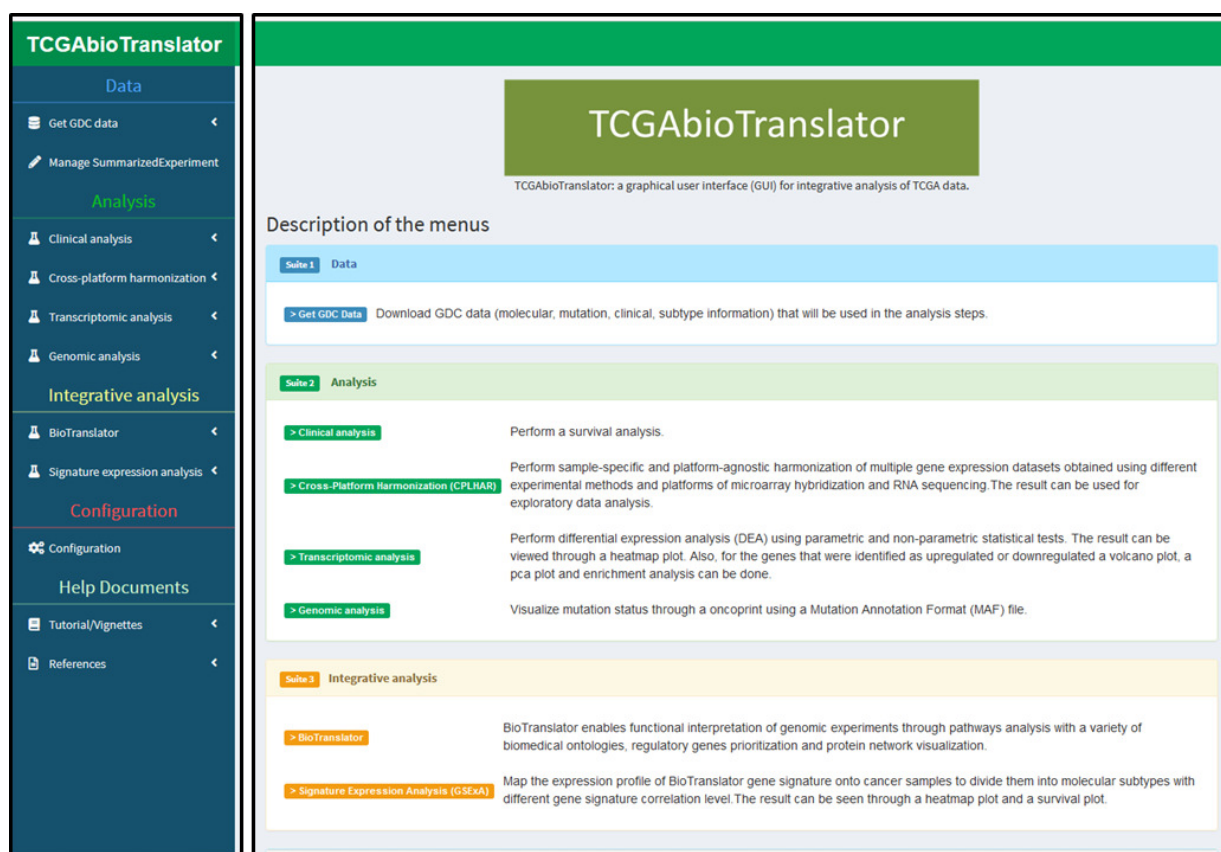


Εικόνα 3.72. Κομβικά γονίδια στην καρκινογένεση με σημαντική συμβολή στην επιθετικότητα των GBM και TNBC όγκων αλληλεπιδρούν με το δίκτυο των 11 IRE1-εξαρτώμενων miRNAs

Με μπλε τετράγωνα αναπαρίστανται τα 11 miRNAs που βρέθηκαν να ελέγχονται από την δράση της IRE1 στα U87 και MDA-MB-231 κύτταρα. Με πράσινους κύκλους αναπαρίστανται τα γονίδια-στόχοι των miRNAs όπως προέκυψαν από αναζήτηση στην βάση TarBase v.8.0. Το μέγεθος των κύκλων αντιπροσωπεύει τον βαθμό σύνδεσης του γονιδίου δηλαδή όσο μεγαλύτερος ο κύκλος τόσο μεγαλύτερος ο αριθμός των συνδέσεών του με άλλους κόμβους. Με κίτρινο χρώμα σημειώνονται γονίδια-στόχοι με σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση και την επιθετικότητα των όγκων. Οι γκρι συνδέσεις μεταξύ των κόμβων αναπαριστούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων-στόχων και των εξεταζόμενων miRNAs. Για την οπτικοποίηση του δικτύου χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος «κατευθυνόμενης δύναμης» (force-directed network layout) Force Atlas.

3.4 Ανάπτυξη μιας Φιλικής προς τον Χρήστη R Shiny Πλατφόρμας για την Αναζήτηση, Ανάκτηση και Ανάλυση NGS Δεδομένων κυρίως του TCGA Προγράμματος

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής αναπτύξαμε μια φιλική προς τον χρήστη υπολογιστική πλατφόρμα αναζήτησης, ανάκτησης και ανάλυσης NGS δεδομένων που αφορά κυρίως σε κούρτες ασθενών με καρκίνο του TCGA προγράμματος. Η πλατφόρμα ονομάζεται «TCGAbioTranslator» (**Εικόνα 3.73**) και προσφέρει στον χρήστη μια γραφικού τύπου διεπαφή (GUI) για χρήση κυρίως του πακέτου της R/Bioconductor, TCGAbiolinks [342], δίνοντας την δυνατότητα άμεσης πρόσβασης στο αποθετήριο γενωμικών δεδομένων (GDC- Genome Data Commons) του Εθνικού Ινστιτούτου για τον Καρκίνο των Η.Π.Α. (NCI - National Cancer Institute) μέσω της GDC διεπαφής προγραμματισμού εφαρμογών.

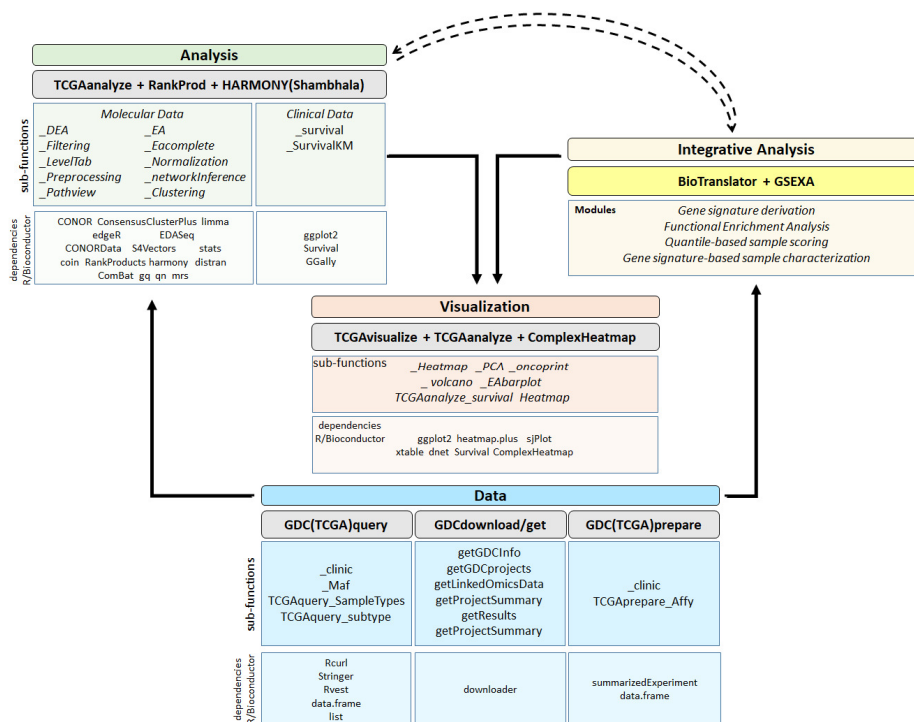


Εικόνα 3.73. Στιγμιότυπο της σελίδας εισόδου στην R shiny GUI εφαρμογή TCGAbioTranslator

Η γραφικού τύπου πλατφόρμα αναπτύχθηκε με το πακέτο Shiny (<https://shiny.rstudio.com/>) [438], ένα πλαίσιο web εφαρμογών σε περιβάλλον R που χρησιμοποιεί αρκετά πακέτα για να παρέχει ανεπτυγμένου τύπου χαρακτηριστικά που ενισχύουν τις Shiny εφαρμογές όπως είναι το shinyjs για την προσθήκη JavaScript ενεργειών,

το shinydashboard για την προσθήκη πινάκων ελέγχου, το shinyFiles για την παροχή διεπαφής προγραμματισμού εφαρμογών (API) για πρόσβαση του χρήστη (client) στο σύστημα αρχείων του διακομιστή (server) κ.ά. Αυτό το εργαλείο στηρίζεται στην αρχιτεκτονική του πακέτου TCGAbiolinksGUI [439] και επιτρέπει στους χρήστες να αναβαθμίσουν την ανάλυση δεδομένων της γονιδιωματικής του καρκίνου, αξιοποιώντας επιπλέον πακέτα του Bioconductor επιτρέποντας έτσι την πρόσβαση σε μεγάλο αριθμό στατιστικών μεθοδολογιών και αλγορίθμων. Επιπλέον, οι χρήστες είναι σε θέση να πραγματοποιήσουν μια ολοκληρωμένη ανάλυση μεγάλης κλίμακας δεδομένων ενσωματώνοντας διαφορετικούς τύπους πειραματικών δεδομένων, όπως για παράδειγμα δεδομένα μεταλλάξεων και δεδομένα γονιδιακής έκφρασης. Η κύρια γραφικού τύπου διεπαφή με τον χρήστη περιλαμβάνει κυρίως τρία GUI μενού : Α) το μενού Data που παρέχει μια καθοδηγούμενη διαδικασία για την αναζήτηση «ανοιχτών» μοριακών και κλινικών δεδομένων μέσω του GDC Data Portal. Τα δεδομένα αυτά αποθηκεύονται τοπικά και οργανώνονται σε δομές δεδομένων (αντικείμενα) της R τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω αναλύσεις, Β) το μενού Analysis που περιλαμβάνει τέσσερα υπό-μενού (Clinical Analysis, Cross-Platform Harmonization (CPLHAR), Transcriptomic analysis και Genomic analysis) για την διεξαγωγή διαφορετικού είδους αναλύσεων. Συγκεκριμένα το 1^ο υπό-μενού πραγματοποιεί ανάλυση ολικής επιβίωσης κατά Kaplan-Meier για να ποσοτικοποιήσει και να συγκρίνει τις διαφορές επιβίωσης μεταξύ δύο ή περισσότερων ομάδων ασθενών καθώς και να σχεδιάζει τις καμπύλες επιβίωσης μαζί με τον πίνακα του «αριθμού ασθενών σε κίνδυνο», τον αθροιστικό πίνακα συμβάντων και τον αθροιστικό πίνακα των censored ασθενών χρησιμοποιώντας το πακέτο της R/CRAN survminer. Το 2^ο υπό-μενού (CPLHAR) επιτρέπει την κανονικοποίηση μεταξύ δεδομένων γονιδιακής έκφρασης που προέκυψαν από διαφορετικές πειραματικές πλατφόρμες μικροσυστοιχειών ή/και RNA-Seq, ώστε να είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους. Ο χρήστης έχει την δυνατότητα να επιλέξει μεταξύ έξι διαφορετικών αλγορίθμων κανονικοποίησης (DisTran, HARMONY/Shambhala, ComBat, Gene Quantiles, Quantile Normalization και Median Rank Scores) [440] ενώ τα αποτελέσματα της ανάλυσης μπορούν να οπτικοποιηθούν με την κατασκευή θερμικών χαρτών αλλά και PCA γραφημάτων. Το 3^ο υπό-μενού (Transcriptomic analysis) παρέχει την δυνατότητα για την διεξαγωγή ανάλυσης διαφορικής έκφρασης (DEA) μέσω του πακέτου edgeR (μέθοδοι: exactTest() και glmLRT()) αλλά και της μη-παραμετρικής μεθόδου RankProducts [441], ενώ τα αποτελέσματα μπορούν να οπτικοποιηθούν είτε με γραφήματα volcano είτε με θερμικούς χάρτες. Επίσης, με βάση τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια (DEGs) μπορεί να πραγματοποιηθεί Pathway analysis, επισημαίνοντας τα DEGs πάνω σε συγκεκριμένα KEGG

μοριακά μονοπάτια που επιλέγει ο χρήστης με την βοήθεια του πακέτου της R/Bioconductor pathview [442]. Το 4^ο υπό-μενού (Genomic analysis) οπτικοποιεί και συνοψίζει τις μεταλλάξεις από αρχεία MAF (Mutation Annotation Format) μέσω συνοπτικών γραφημάτων και oncoplots χρησιμοποιώντας το πακέτο R/Bioconductor maftools [410], και Γ) το μενού Integrative analysis διαθέτει τα υπό-μενού «BioTranslator» και «Signature expression analysis (GSEXA)» τα οποία μας επιτρέπουν αφενός την πραγματοποίηση μιας πολυεπίπεδης λειτουργικής συστημικής ανάλυσης των DEGs (μέσω της πλατφόρμας BioInfoMiner) για την εξαγωγή γονιδιακής υπογραφής και αφετέρου την κατάταξη των δειγμάτων/ασθενών σε ομάδες υψηλής, μέσης και χαμηλής συσχέτισης σε σύγκριση με το προφίλ έκφρασης της γονιδιακής υπογραφής ακολουθώντας το σύστημα βαθμολόγησης των ασθενών που περιγράψαμε στην Ενότητα 2.3.4.1. Τα αποτελέσματα της GSEXA μπορούν να οπτικοποιηθούν με την κατασκευή χαρτών θερμικής έντασης αλλά και να αποτελέσουν δεδομένα-εισόδου για την διεξαγωγή ανάλυσης ολικής επιβίωσης μεταξύ των διαφορετικών ομάδων ασθενών. Οι κύριες λειτουργίες του εργαλείου TCGAbioTranslator καθώς και τα βασικά πακέτα R/Bioconductor που υλοποιούνται για τις επιμέρους αναλύσεις απεικονίζονται στην **Εικόνα 3.74**.



Εικόνα 3.74. Συνοπτική περιγραφή των λειτουργιών του εργαλείου TCGAbioTranslator

Το υπολογιστικό εργαλείο TCGAbioTranslator οργανώνεται σε τέσσερις κατηγορίες. Η 1^η κατηγορία (Data) διαθέτει συναρτήσεις για την αναζήτηση, εξόρυξη, αποθήκευση αλλά και οργάνωση των μοριακών και κλινικών δεδομένων της βάσης TCGA σε δομή κατάλληλη για περαιτέρω ανάλυση. Η 2^η κατηγορία (Analysis) περιλαμβάνει λειτουργίες που επιτρέπουν στον χρήστη να διεξάγει διαφορετικά είδη αναλύσεων όπως είναι η ανάλυση

διαφορικής έκφρασης (TCGAanalyze_DEA), η λειτουργική ανάλυση εμπλουτισμού (TCGAanalyze_EA), η ιεραρχική συσταδοποίηση (TCGAanalyze_Clustering), η κανονικοποίηση (TCGAanalyze_Normalizatio), η κατασκευή δικτύου γονιδιακών αλληλεπιδράσεων (TCGAanalyze_networkInference), η ενσωμάτωση και απεικόνιση γονιδιακών δεδομένων σε KEGG μοριακά μονοπάτια (TCGAanalyze_Pathview), η ανάλυση ολικής επιβίωσης κατά Kaplan-Meier (TCGAanalyze_SurvivalKM). Η 3^η κατηγορία (Integrative Analysis) περιλαμβάνει τον BioTranslator που είναι ένας wrapper του BioInfoMiner με σκοπό την διεξαγωγή λειτουργικής ανάλυσης και την εξαγωγή γονιδιακής υπογραφής, καθώς και την συνάρτηση GSEXA που επιτρέπει την συσχέτιση και τον χαρακτηρισμό των ασθενών με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της γονιδιακής υπογραφής που έχει εξαχθεί. Τέλος, τα παραγόμενα αποτελέσματα μπορούν να οπτικοποιηθούν με λειτουργίες της 4^{ης} κατηγορίας (Visualization) που περιλαμβάνουν την ανάλυση κύριων συνιστωσών και την δημιουργία αντίστοιχων γραφημάτων (TCGAVisualize_PCA), την δημιουργία γραφημάτων volcano (TCGAVisualize_volcano), την δημιουργία χαρτών θερμικής έντασης (TCGAVisualize_Heatmap), την απεικόνιση της λειτουργικής ανάλυσης εμπλουτισμού με ραβδογράμματα (TCGAVisualize_EAbarplot), την κατασκευή καμπυλών επιβίωσης (TCGAanalyze_survival) καθώς και την κατασκευή χαρτών μεταλλάξεων (oncoprint) (TCGAVisualize_oncoprint). Οι κύριες λειτουργίες του πακέτου TCGAbiolinks καθώς και τα βασικά πακέτα R/Bioconductor που επιτελούν τις αναλύσεις περιλαμβάνονται σε γκρι πλαίσιο. Οι διαφορετικές εξαρτήσεις λογισμικού και πακέτων της R/Bioconductor για τις κατηγορίες Data, Analysis και Visualization καταγράφονται στο αντίστοιχο 4^ο σε σειρά πλαίσιο (dependencies-R/Bioconductor).

4 Συζήτηση

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αναδεικνύει τον σημαντικό ρόλο της IRE1 πρωτεΐνης στον καρκίνο με ιδιαίτερη έμφαση στο Πολύμορφο Γλοιοβλάστωμα (GBM), κυρίως μέσα από τους δύο βασικούς σηματοδοτικούς άξονες δράσης της που περιλαμβάνουν το μάτισμα του XBP1 mRNA και την στοχευμένη νουκλεολυτική αποικοδόμηση mRNA και miRNA μορίων (RIDD), διαμορφώνοντας σε σημαντικό βαθμό όχι μόνο τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των όγκων, αλλά και καθορίζοντας την εξέλιξη της ασθένειας στους πάσχοντες. Αρχικά, δείξαμε την σημασία της σηματοδοτικής δράσης της IRE1 στο GBM μέσα από την ανάλυση NGS δεδομένων σε δύο ανεξάρτητες κοόρτες ασθενών (TCGA και GBMmark) και διαπιστώσαμε ότι η υψηλή IRE1 δραστηριότητα σχετίζεται με συντομότερη επιβίωση των ασθενών, αυξημένη διήθηση του όγκου από τα ανοσοκύτταρα, αυξημένη αγγειογένεση του όγκου και ενίσχυση των ιδιοτήτων εισβολής/μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων (**Εικόνα 3.10**). Παρόλο που προηγούμενες μελέτες είχαν υποδείξει την σημασία της IRE1 σηματοδότησης για την επιθετικότητα των όγκων, ωστόσο δεν παρείχαν καμία πληροφορία για τους υποκείμενους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται σε αυτό το φαινόμενο. Επίσης, ενώ προηγούμενη μελέτη είχε προσδιορίσει μια μοριακή υπογραφή 100 περίπου γονιδίων ως άμεσα ελεγχόμενη από την δράση της IRE1, εφαρμόζοντας ποικίλα εξωγενή ερεθίσματα άμεσου στρες, όπως είναι η υποξία και η στέρηση θρεπτικών συστατικών [115], η χρήση τέτοιου είδους μικροπεριβαλλοντικών προκλήσεων δεν μπορούσε να ενσωματώσει την πολυπλοκότητα του καρκίνου του εγκεφάλου ως πειραματικό μέσο για τον προσδιορισμό των μοριακών μηχανισμών που επάγονται από την IRE1 και που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του όγκου. Σημαντική λύση στο πρόβλημα αυτό έδωσε η εξαγωγή μιας εύρωστης μικρότερου μεγέθους γονιδιακής υπογραφής 38 γονιδίων (IRE1sign38) μέσα από την πολυεπίπεδη συστημική λειτουργική ανάλυση που διεξήχθη με την βοήθεια της υπολογιστικής πλατφόρμας BioInfoMiner (**Εικόνα 3.1**). Η υπογραφή αυτή όχι μόνο συγκροτείται από δύο ξεχωριστά, αυτόνομα σύνολα 19 γονιδίων που λειτουργούν ως συνιστώσες των IRE1-XBP1s και IRE1-RIDD σηματοδοτικών αξόνων, αντίστοιχα, αλλά απαρτίζεται και από γονίδια με κεντρικό ρυθμιστικό ρόλο σε πολλές και σημαντικές λειτουργίες που συνιστούν τα βασικά χαρακτηριστικά της καρκινογένεσης όπως είναι η ανοσολογική απόκριση και η φλεγμονή, η αναδιοργάνωση της εξωκυτταρικής μήτρας και η κυτταρική προσκόλληση, η διακυτταρική επικοινωνία και η αγγειογένεση (**Εικόνα 3.2**). Επίσης, η υπογραφή IRE1sign38 μας βοήθησε να αξιολογήσουμε τα επίπεδα της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας σε μεταλλαγμένες μορφές της IRE1 στο GBM και να συμβάλλουμε στον λειτουργικό χαρακτηρισμό τους (**Εικόνα**

3.13), αναδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο που μπορεί να παίξουν ως χρήσιμα εργαλεία για την αποσαφήνιση της δράσης συγκεκριμένων IRE1-εξαρτώμενων σηματοδοτικών μονοπατιών στον έλεγχο των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών των όγκων τόσο σε επίπεδο βασικών κυττάρων όσο και σε επίπεδο κυττάρων του στρώματος. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της IRE1 (ERN1) στο GBM είχαν αναφερθεί στο παρελθόν [176], αλλά οι λειτουργικές συνέπειες αυτών των μεταλλάξεων στην IRE1 σηματοδότηση δεν είχαν προσδιοριστεί.

Στην παρούσα μελέτη, χαρακτηρίσαμε επίσης λειτουργικά μια νέα μετάλλαξη της IRE1 στο αμινοξικό κατάλοιπο A414 (αλανίνη->θρεονίνη), όπως προέκυψε από την αλληλούχηση 23 GBM όγκων ασθενών. Η έκφραση αυτής της παραλλαγής σε κύτταρα U87 οδήγησε σε εξαιρετικά επιθετικό καρκίνο με ενισχυμένη αγγείωση και μειωμένη διείσδυση μακροφάγων σε ορθοτοπικούς όγκους ποντικών ενώ ο λειτουργικός χαρακτηρισμός της είχε ορθώς αναδείξει την παρουσία αυξημένης σηματοδοτικής δραστηριότητας και για τους δύο άξονες δράσης XBP1s και RIDD. Εκμεταλλευόμενοι τόσο τα χαρακτηριστικά σηματοδότησης των IRE1 παραλλαγών που σχετίζονταν με το GBM όσο και τον λειτουργικό συγκριτικό χαρακτηρισμό του μεταγραφώματος των GBM κυττάρων U87 που εκφράζουν αυτές τις παραλλαγές κάτω από βασικές συνθήκες αλλά και συνθήκες στρες Ε.Δ., καταφέραμε να εξάγουμε επιπλέον συγκεκριμένες κυτταροειδικές γονιδιακές υπογραφές ξεχωριστά για κάθε σηματοδοτικό άξονα της IRE1. Αυτή η ανάλυση αποκάλυψε ότι ο άξονας σηματοδότησης IRE1-XBP1s προωθεί την διήθηση του όγκου από τα ανοσοκύτταρα, αυξάνει την αγγειογενετική δραστηριότητα και ενισχύει την έκφραση των δεικτών κυτταρικής μετανάστευσης/εισβολής. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι αυτές οι ιδιότητες επιβεβαιώθηκαν επίσης χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις που βασίζονταν σε ανοσοϊστοχημικές και βιοχημικές αναλύσεις σε διαφορετικό υποσύνολο όγκων (**Εικόνα 3.14**). Αντίθετα, η RIDD δραστηριότητα (για τα mRNAs ή το miR-17) εξασθένησε τόσο την αγγειογενετική απόκριση όσο και τις ιδιότητες μετανάστευσης/εισβολής των κυττάρων του όγκου (**Εικόνα 3.14**). Επιπρόσθετα, αναπτύξαμε ένα σύστημα αξιολόγησης/βαθμολόγησης των δύο κύριων συνιστωσών/δράσεων της υπογραφής IRE1sign38 στηριζόμενο στην κατανομή των επιπέδων μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων που συγκροτούν κάθε συνιστώσα σταθμίζοντας τις κανονικοποιημένες τιμές έκφρασής τους σε σχέση με τις τιμές των ποσοστημορίων της συνολικής κατανομής κάθε γονιδίου στο πλαίσιο της κοόρτης που εξεταζόταν κάθε φορά. Το σύστημα αυτό μας επέτρεψε να εγκαθιδρύσουμε δύο δείκτες/σκορ ενεργότητας για την XBP1s και RIDD συνιστώσα, αντίστοιχα, χαρακτηρίζοντας κάθε δείγμα ξεχωριστά. Έτσι, παρατηρήσαμε ότι αντίθετα σήματα που προέρχονται από την XBP1s και RIDD δραστηριότητα προσδίδουν συγκεκριμένα επιθετικά χαρακτηριστικά σε όγκους XBP1+/RIDD- που σχετίζονταν με

χειρότερο προγνωστικό αποτέλεσμα επιβίωσης από όγκους με ιδιότητες XBP1⁻/RIDD⁺ (**Εικόνα 3.10, Εικόνα 3.11, Εικόνα 3.12 και Εικόνα 7 [179]**). Είναι ενδιαφέρον ότι οι όγκοι ασθενών με χαμηλή XBP1s/RIDD ενεργότητα και εκείνοι με υψηλή XBP1s/RIDD δεν έδωσαν διαφορετικά ποσοστά επιβίωσης από την μεταξύ τους σύγκριση (Παράρτημα, Εικόνα S6 [179]), πιθανότατα είτε λόγω της σημαντικής συμβολής άλλων μοριακών μονοπατιών που δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί (όπως π.χ. του EGFR ή/και του p53) είτε λόγω αντισταθμιστικών μηχανισμών και των δύο αξόνων, αντίστοιχα. Εκτός από τον χαρακτηρισμό αυτών των ιδιοτήτων σηματοδότησης σε κύτταρα U87 και σε ανθρώπινους όγκους, αποδείξαμε επίσης ότι οι δύο κύριοι άξονες XBP1s και RIDD είναι υψηλά συντηρημένοι σε πρωτογενείς GBM κυτταρικές σειρές και ότι η ρύθμισή τους έχει σημαντικό αντίκτυπο στον φαινότυπο των κυττάρων του όγκου (**Εικόνα 7 και 8 [179]**).

Εκτός όμως από την αξιολόγηση της σηματοδοτικής IRE1 ενεργότητας, η μελέτη μας αναζήτησε και την δημιουργία ενός ποσοτικού κριτηρίου εκτίμησης της RIDD δραστηριότητας που η έλλειψή του είχε αποτελέσει μέχρι σήμερα τροχοπέδη στην αξιολόγηση της συνολικής IRE1 δραστηριότητας ενώ περιορισμένη ήταν η πληροφορία [21, 443, 444] που αφορούσε στο είδος και τον ρόλο των RNA μεταγράφων που φαίνεται να επιλέγει η IRE1 για να ασκήσει την νουκλεολυτική της δράση. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιχειρήσαμε να αποκρυπτογραφήσουμε τα νουκλεοτιδικά και δομικά μοτίβα 2ταγούς RNA δομής που πιθανόν αναγνωρίζει η IRE1 για να κόψει τόσο σε mRNA μετάγραφα όσο και σε μόρια miRNA. Εφαρμόζοντας αρχικά μια διαφοροποιημένη ανάλυση εναλλακτικού ματίσματος σε μεταγραφικά δεδομένα μικροσυστοιχιών που αποτύπωναν τα αποτελέσματα μιας *in vitro* δοκιμασίας αποκοπής ολικού mRNA από την IRE1 σε U87 κύτταρα (**Εικόνα 3.3**) καταφέραμε να ταυτοποιήσουμε ένα σύνολο RIDD στόχων *in vitro* το οποίο αποτέλεσε μια σημαντική δεξαμενή mRNA μεταγράφων για την αναγνώριση κοινών χαρακτηριστικών σε υποψήφιες θέσεις δράσης της IRE1 RNάσης. Το σύνολο των υποψήφιων RIDD στόχων συμπληρώθηκε με την συμμετοχή και των 19 *in cellulo* γονιδίων της RIDD συνιστώσας της υπογραφής IRE1sign38. Η αναζήτηση *de novo* νουκλεοτιδικών μοτίβων με τα οποία ήταν εμπλουτισμένες οι RNA ακολουθίες των RIDD μεταγράφων ανέδειξε εξανουκλεοτιδικά μοτίβα σύμφωνα με το εξανουκλεοτίδιο δράσης της IRE1 στην μη ματισμένη μορφή του XBP1 (XBP1u), 5'-[CUGCAG]-3', σε ένα ποσοστό της τάξεως του 75% τα οποία επιπλέον εντοπίζονταν σε πολλές διαφορετικές θέσεις κατά μήκος των ακολουθιών (**Εικόνα 3.31 και Εικόνα 3.33**). Τα μοτίβα αυτά εμφάνιζαν μια συντήρηση καταλοίπων σε συγκεκριμένες θέσεις, όπως ήταν η παρουσία ενός «strong» καταλοίπου G ή C στην 1^η θέση το οποίο ακολουθούσε συνήθως ένα «weak» νουκλεοτίδιο (U ή A) ενώ στις θέσεις 3 και 4 διακρινόταν κάποιο από τα δινουκλεοτίδια CG,

GG, GC ή CC. Στη θέση 5 είχαμε συνήθως την εμφάνιση U ή A (και σε μικρότερο βαθμό G) ενώ στην 6η θέση κυριαρχούσε το νουκλεοτίδιο της γουανίνης (G). Όταν όμως διεξήγαμε τον ίδιο τύπο ανάλυσης σε υποψήφια XBP1s-εξαρτώμενα mRNA μετάγραφα, διαπιστώσαμε την παρουσία αντίστοιχων νουκλεοτιδικών μοτίβων χωρίς να υπάρχει κάποια σημαντική διαφοροποίηση με τους RIDD στόχους (**Εικόνα 3.32**), γεγονός που μας οδήγησε να διεξάγουμε συγκριτική ανάλυση και σε επίπεδο δομικών μοτίβων 2ταγούς RNA δομής. Συγκεκριμένα χαρακτηρίσαμε δομικά τις θέσεις που εντοπίζονταν τα νουκλεοτιδικά ανάλογα του εξανουκλεοτιδίου 5'-[CUGCAG]-3' τόσο στα RIDD όσο και στα XBP1s μετάγραφα-στόχους και διαπιστώσαμε ότι υπήρχε μεταξύ τους σημαντική διαφοροποίηση σε δομές βρόχου φουρκέτας (στελέχους-βρόχου) και εσωτερικού βρόχου. Δηλαδή τα νουκλεοτιδικά μοτίβα βρίσκονταν σε υψηλότερο ποσοστό σε αυτά τα 2 δομικά μοτίβα στα RIDD μετάγραφα συγκριτικά με τα XBP1s, παρόλο που η παρουσία των νουκλεοτιδικών μοτίβων ήταν κυρίαρχη, σε ποσοστό >60% σε δίκλωνες περιοχές και στα δύο σύνολα μεταγράφων (**Εικόνα 3.36**). Αξιοσημείωτο ήταν επίσης το γεγονός ότι καταφέραμε να κατασκευάσουμε *in silico* πρότυπες RNA ακολουθίες (probes) που έφεραν τα βνουκλεοτιδία που είχαν διακριθεί ως υποψήφια RIDD θέσεις σε δομή βρόχου-στελέχους και εσωτερικού βρόχου, αντίστοιχα, (**Εικόνα 3.38**) οι οποίες όταν ελέγχθηκαν *in vitro* επιβεβαιώθηκε ότι πράγματι αναγνωρίζονται και κόβονται από την IRE1 (**Εικόνα 3.39** και **Εικόνα 3.40**). Τα *in vitro* επιβεβαιωμένα probes βρέθηκε επίσης ότι υπέρ-αντιπροσωπεύονταν σε RIDD mRNA ισομορφές που ήταν υπό-εκφρασμένες σε GBM ασθενείς με ενισχυμένη RIDD ενεργότητα ενώ τρία από αυτά παρουσίαζαν σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των RIDD και XBP1s-εξαρτώμενων mRNAs (**Εικόνα 3.42**), αναδεικνύοντας έτσι ένα ποσοτικό κριτήριο εκτίμησης της RIDD ενεργότητας που μπορεί να εκτιμηθεί σε RNAseq δεδομένα με βάση το ποσοστό των μεταγραφικών ισομορφών των RIDD γονιδίων-στόχων που υπέρ- και υπό-εκφράζονται, αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, ο τύπος των δομικών μοτίβων στα οποία εντοπίζονταν τα νουκλεοτιδικά μοτίβα αναγνώρισης για αποκοπή μπορεί να εξηγήσει εν μέρει την επιλεκτικότητα της IRE1 RNάσης να τα αποκόπτει και να τα «ξεχωρίζει» από τα υπόλοιπα μετάγραφα. Εντούτοις η αναδίπλωση των RNA μορίων είναι μια δυναμική κατάσταση που μπορεί να δημιουργεί τοπικά δομές τύπου στελέχους-βρόχου ή εσωτερικού βρόχου, τοποθετώντας κάποιες φορές τα υποψήφια νουκλεοτιδικά μοτίβα μέσα σε αυτές και άλλες φορές όχι. Οι παράγοντες επομένως που επηρεάζουν ή ακόμα και επιτηρούν την αναδίπλωση των RNA μορίων μπορεί να ιχνηθετούν σε ένα προγενέστερο στάδιο τα μετάγραφα για αποκοπή από την IRE1. Έτσι, ενώ η παρουσία συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών

μοτίβων είναι βασική προϋπόθεση για δράση της IRE1, αυτό που ίσως εν μέρει θα καθορίσει την πιθανότητα να αποτελέσει RIDD στόχο είναι η παρουσία των σημάτων αλληλουχίας σε συγκεκριμένες δομές. Κάτι που θα μπορούσε όμως να καθορίζεται από την ένταση του στρες ή/και την διάρκεια αφού η IRE1 είναι ικανή να οδηγεί τα κύτταρα σε επιβίωση ή κυτταρικό θάνατο ενισχύοντας άλλοτε τον XBP1s και άλλοτε τον RIDD σηματοδοτικό άξονα [4] με τον τελευταίο να εκδηλώνει έντονη δράση σε ιδιαίτερα αυξημένο στρες. Επιπλέον, τόσο η ένταση όσο και η διάρκεια της IRE1 σηματοδότησης έχειδειχθεί ότι ρυθμίζονται από την συναρμολόγηση μιας πρωτεϊνικής πλατφόρμας, που ονομάζεται UPRόσωμα (UPRosome) και στην οποία συγκεντρώνονται διαφορετικοί πρωτεϊνικοί τροποποιητές και προσαρμογείς για την ρύθμιση της κινητικής αλλά και του εύρους των UPR αποκρίσεων [138, 445]. Επομένως οι παράγοντες αυτοί θα μπορούσαν να επηρεάζουν ή/και να τροποποιούν την πρόσδεση της RNάσης υπομονάδας στα υποψήφια υποστρώματα ενώ πρόσφατα έχει βρεθεί και ρύθμιση της IRE1 RNάσης ενεργότητας από τον Αναστολέα της Ριβονουκλεάσης 1 (RNH1) [446] με τον οποίο αλληλεπιδρά η RNάση υπομονάδα. Ομοίως, μπορεί να απαιτούνται συν-ενεργοποιητές για τη RIDD δραστικότητα. Επιπλέον, καθώς η προ-κυτταρικού θανάτου RIDD απαιτεί IRE1 ενεργότητα φωσφομεταφοράς [24], μια αύξηση της RIDD μπορεί να εξαρτάται από γεγονότα cis- ή trans-φωσφορυλίωσης. Επομένως, η ταυτοποίηση παραγόντων που αλληλεπιδρούν με την IRE1 και ρυθμίζουν την RIDD ενεργότητα καθώς και η διεξαγωγή δομικών μελετών που θα εστιάζουν στην χαρτογράφηση της περιοχής πρόσδεσης των υποστρωμάτων στην RNάση υπομονάδα θα αυξήσει το ποσοστό κατανόησής μας για την RIDD δραστικότητα.

Όμως δεν θα πρέπει να παραλείψουμε ότι ενεργή συμμετοχή στην δράση αυτών των δύο κύριων αξόνων έχουν και τα κυκλώματα των miRNAs τα οποία είτε εκφράζονται κάτω από τον έλεγχο του XBP1s και στοχεύουν γονίδια που υπέρ ή υπό-εκφράζονται εξαιτίας της δράσης της IRE1 είτε αποτελούν τα ίδια υποστρώματα της miRIDD δραστικότητας. Από την ανάλυση miRNAseq δεδομένων σε U87 κύτταρα σε βασικές συνθήκες αλλά και σε συνθήκες στρες, ταυτοποιήσαμε 11 miRNAs (**Εικόνα 3.4**) των οποίων τα επίπεδα έκφρασης αυξάνονταν από την IRE1-XBP1s ενεργότητα (miRXBP1s υπογραφή) και 9 miRNAs που υποεκφράζονταν κάτω από την δράση της miRIDD δραστικότητας. Μεταξύ των miRXBP1s μορίων περιλαμβανόταν και ένα μέλος (miR-520f) της οικογένειας των miR-520 που όπως αναδείξαμε στο κακοήθες μελάνωμα, αποτελεί έναν υποψήφιο σύνδεσμο αλληλεπίδρασης της IRE1-XBP1s σηματοδότησης με την ειδική άμυνα και συγκεκριμένα την ενεργοποίηση των NK κυττάρων, μέσω ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης του NKG2D-συνδέτη MICA και του μεταγραφικού παράγοντα E2F1 (**Εικόνα 3.63**, **Εικόνα 3.66** και **Εικόνα 3.67**). Όμως το miR-

520f έχει ήδη αναφερθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου. Για παράδειγμα, αποσιώπηση του σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα *in vitro* οδηγεί σε υπερβολικά αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό προβάλλοντας τις κατασταλτικές του ιδιότητες έναντι της ανάπτυξης και της εξέλιξης του καρκίνου [447], ενώ πρόσφατα ταυτοποιήθηκε ως βιοδείκτης για την διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα στον άνθρωπο [448]. Προηγουμένως είχε επίσης αποδειχθεί σε μοντέλο ποντικού ότι η υπερέκφρασή του μπορούσε να αναστείλει την μετάσταση του καρκίνου του πνεύμονα [449]. Εκτός όμως από το miR-520f το δίκτυο των IRE1/XBP1s-εξαρτώμενων miRNAs που ταυτοποιήσαμε συμμετέχει σημαντικά στην ρύθμιση λειτουργιών και μοριακών μονοπατιών με κεντρικό ρόλο στον καρκίνο, στοχεύοντας γονίδια-στόχους με εξειδικευμένη δράση σε μονοπάτια όπως το σηματοδοτικό μονοπάτι του FOXO, του PI3K-Akt, του mTOR, του TGF-β, του Wnt, του AMPK και του p53 που ως γνωστό παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής αύξησης και αναγέννησης, τον κυτταρικό μεταβολισμό και την κυτταρική επιβίωση. Από την άλλη η miRIDD υπογραφή βρέθηκε να επηρεάζει συνολικά λειτουργίες και μονοπάτια με λιγότερο εξειδικευμένο τρόπο, επηρεάζοντας σημαντικά τον μεταβολισμό του RNA και των πρωτεϊνών, την προσκόλληση των κυττάρων στην εξωκυττάρια μήτρα και την διακυτταρική επικοινωνία (**Εικόνα 3.9**). Το αξιοσημείωτο ήταν ότι 11 miRNAs από το κύκλωμα αυτό στο GBM βρέθηκαν κοινά και στην TNBC κυτταρική σειρά MDA-MB-231 με έντονη εμπλοκή σε λειτουργίες που καθορίζουν την επιθετικότητα των όγκων όπως είναι η διακυτταρική επικοινωνία, η αγγειογενετική δραστηριότητα, η κυτταρική διήθηση και μετανάστευση, υποδεικνύοντας δίκτυα αλληλεπιδράσεων που θα μπορούσαν εν μέρει να δικαιολογούν και το αυξημένο μεταστατικό δυναμικό του TNBC στον εγκέφαλο [450]. Η αλληλεπίδραση των miRNAs με γονίδια-στόχους επίσης άμεσα ελεγχόμενους από την δράση των αξόνων σηματοδότησης της IRE1 υπόκεινται κάτω από αυστηρό αυτορυθμιστικό έλεγχο με κλειστά εσωτερικά κυκλώματα (**Εικόνα 3.69**) που θα μπορούσε κανείς να ισχυριστεί ότι συμβάλλουν στον έλεγχο της IRE1 σηματοδότησης σε συνάρτηση με το χρόνο και την ένταση του στρες, έτσι ώστε να διασφαλιστεί ότι αφενός δεν θα υπάρξει «υπερβολική» IRE1 σηματοδότηση ως απόκριση σε οξύ στρες Ε.Δ. που θα οδηγούσε σε κυτταρικό θάνατο αλλά ταυτόχρονα διατηρείται ένα βασικό επίπεδο IRE1 δραστηριότητας ικανό να προκαλέσει γρήγορη απόκριση όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε στρες. Όταν αναζητήθηκαν αντίστοιχα κυκλώματα miRNAs σε GBM ασθενείς αρχικά εντοπίστηκαν 132 σημαντικά miRNAs που διαχώριζαν σταθερά τους ασθενείς σε τρεις μοριακούς υπότυπους με σημαντική συσχέτισή τους με την IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα ενώ 27 από αυτά ήταν αρκετά για να εξηγήσουν την μεταβλητότητα των δεδομένων και να διατηρήσουν

το πρότυπο χαρακτηρισμού (**Εικόνα 3.26**). Εκτός από το γεγονός ότι στα 27 miRNA μόρια συγκαταλέγονταν και 8 miRNAs που είχαν ταυτοποιηθεί ως IRE1-εξαρτώμενα στα U87 κύτταρα (**Εικόνα 3.26**) αναδείχθηκαν και μόρια όπως το miR-29a, το miR-21, το miR-34a, το miR-146b και miR-148a με ήδη διαπιστωμένο σημαντικό ρόλο στο GBM [451, 452], στο κακοήθες μελάνωμα [453, 454] και τον καρκίνο του μαστού [455, 456]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον όμως χρήζει το IRE1/XBP1s-εξαρτώμενο miR-148a του οποίου η ρύθμιση από τον XBP1s όχι μόνο είχε δείχθει από τους Cho, Kim και συνεργάτες [388] αλλά είχε αναφερθεί και ως ογκοκατασταλτικό μόριο σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του γαστρεντερικού, του μαστού, των ωοθηκών, του παχέος εντέρου και του παγκρέατος [457-460]. Μερικά από τα γονίδια που στοχεύονται από το miR-148a και παίζουν κομβικό ρόλο στην διαδικασία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής απόπτωσης, της κυτταρικής μετανάστευσης και εισβολής, ανήκουν και τα CCKBR, ROCK1, DNMT1, SMAD2, MMP7, BCL-2, HPIP, MET, USP4, CDC2B, ERBB3, IGF-IR, IRS1, HOTAIR, HLA-G, CAND1, MSK1 και WNT1 [461]. Η μελέτη μας όμως υπέδειξε και μια άλλη συνιστώσα της ογκοκατασταλτικής του δράσης που είναι η εμπλοκή του στον επαναπρογραμματισμό των GBM κυττάρων με καταστολή της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων (TFs) του επαναπρογραμματισμού OLIG2, POU3F2, SALL2 και SOX2 (**Εικόνα 3.28** και **Εικόνα 6 [386]**). Η παρατήρησή μας αυτή έρχεται σε συμφωνία τόσο με προηγούμενη μελέτη που έδειξε ότι το miR148a προάγει την διαφοροποίηση των κυττάρων του πλάσματος στοχεύοντας τους κεντρικούς TFs των βλαστικών κυττάρων MITF και BACH2, κάτω από τον έλεγχο επίσης του XBP1s, ενός κομβικού παράγοντα σε αυτή την διαδικασία [462], όσο και με μια πιο πρόσφατη μελέτη στο Καρκίνωμα Πλακωδών Κυττάρων του Οισοφάγου (ESCC) όπου αναλύοντας την βλαστοκυτταρικότητα των ESCC βλαστικών κυττάρων παρατήρησαν ότι η υπερέκφραση του miR-148a μείωνε την έκφραση των ABCG2, KLF4, SOX2, OCT4 και Nanog, υποδεικνύοντας ότι το miR-148a μπορεί να ρυθμίσει την λειτουργία των βλαστικών κυττάρων [463]. Η εξάρτηση της βλαστοκυτταρικότητας των GBM καρκινικών κυττάρων από την IRE1 αποδείχθηκε τόσο σε GBM μεταγραφικά δεδομένα ασθενών όσο και σε κυτταρικές σειρές και ζωικά μοντέλα όπου η μειωμένη IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα σχετιζόταν θετικά με την ενισχυμένη έκφραση των βλαστοκυτταρικών δεικτών (**Εικόνα 3.27** και **Εικόνες 1-3 [386]**). Παρόλο που ο ρόλος των κλάδων του UPR μηχανισμού έχει αποδειχθεί σε διάφορα μοντέλα ότι συμμετέχει στην ρύθμιση του διαφοροποιημένου φαινοτύπου των βλαστοκυττάρων, με τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα να υφίστανται διάφορα είδη στρες που διαταράσσουν την πρωτεόσταση κατά τον επαναπρογραμματισμό τους, κάποιος θα μπορούσε να υποθέσει ότι παρόμοια μοριακά μονοπάτια θα μπορούσαν επίσης να συμβάλουν στην εμφάνιση κυττάρων

βλαστικού τύπου σε ασθένειες. Ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον έχει η συμβολή των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSCs) στην εξέλιξη και υποτροπή της νόσου [464] και σε αυτό το πλαίσιο, η UPR σηματοδότηση βρέθηκε να μεταβάλλει το ποσοστό των CSCs σε διάφορους συμπαγείς όγκους. Πράγματι, η συστηματική ενεργοποίηση του XBP1s στον τριπλό αρνητικό καρκίνο του μαστού (TNBC) αποδείχθηκε ότι αυξάνει το διαμέρισμα των CSCs [199]. Επιπλέον, στο GBM πρόσφατα αποδείχθηκε ότι ο βραχίονας PERK του UPR ήταν υπεύθυνος για την εξασθένηση της έκφρασης του SOX2 κατά το οξύ στρες Ε.Δ. και ως εκ τούτου διευκόλυνε την διαφοροποίηση των CSCs [263]. Ο ρόλος του UPR στα βλαστικού τύπου κύτταρα έναντι της διαφοροποιημένης κατάστασης των καρκινικών κυττάρων έχει συνδεθεί και με την συμμετοχή του βραχίονα ATF6, ο οποίος αποδείχθηκε ότι διατηρεί την επιβίωση των αδρανών κυττάρων μέσω συγκεκριμένων οδών, συμπεριλαμβανομένων των RHEB και AKT [465]. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η UPR σηματοδότηση μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ισορροπία μεταξύ των CSCs και των διαφοροποιημένων καρκινικών κυττάρων και να εκδηλώνει διαφορετικές ιδιότητες σε διάφορους τύπους καρκίνου καθώς και διαφορετική συμμετοχή των βασικών βραχιόνων της.

Η μελέτη μας για το κύκλωμα των IRE1-εξαρτόμενων miRNAs περιλάμβανε επίσης την αναζήτηση *de novo* νουκλεοτιδικών μοτίβων και αναλόγων του εξανουκλεοτιδίου 5'-[CUGCAG]-3' στα πρόδρομα miRNA μόρια που είχαμε χαρακτηρίσει ως υποψήφιους miRIDD στόχους. Στην περίπτωση αυτή διαπιστώσαμε ότι υπήρχε μεγαλύτερη ποικιλία υποψήφιων νουκλεοτιδικών μοτίβων σε σχέση με τα mRNA RIDD μετάγραφα, με μικρότερη συχνότητα συντήρησης καταλοίπων σε συγκεκριμένες θέσεις (**Εικόνα 3.44**). Εντούτοις, νουκλεοτιδικά ανάλογα του 5'-[CUGCAG]-3' βρέθηκαν να εντοπίζονται σε υψηλά ποσοστά στις δίκλωνες περιοχές αλλά και σε θέσεις σύνδεσης μονόκλωνων (βρόχοι) με δίκλωνες περιοχές στους miRIDD στόχους (**Εικόνα 3.46**).

Εκτός από την ανάδειξη των πρώτων σημαντικών ενδείξεων για την συνύπαρξη ανταγωνιστικών IRE1 καθοδικών σημάτων στο GBM και την συσχέτιση αυτών με χαρακτηριστικά επιθετικότητας του όγκου, η εργασία μας υποδεικνύει την πιθανότητα χρήσης στοχευμένων στην IRE1 θεραπειών σε διάφορες μορφές καρκίνου. Οι παρατηρήσεις μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η αναστολή της IRE1 και ιδιαίτερα η αναστολή του XBP1s σηματοδοτικού άξονα θα μπορούσε να προωθήσει την μετάβαση των διαφοροποιημένων κυττάρων του όγκου σε έναν βλαστοκυτταρικού τύπου φαινότυπο, αποτέλεσμα που έχει όμως συνδεθεί με την χημειοανθεκτικότητα και την ογκογένεση γενικά στο GBM [466]. Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν δύο ξεχωριστές επιλογές για την χρήση της IRE1 σηματοδότησης ως θεραπευτικού στόχου στο GBM. Πρώτον, ασθενείς με όγκους χαμηλής

XBP1s έκφρασης θα μπορούσαν να επωφεληθούν από την αναστολή της IRE1 καθώς τα GBM κύτταρα θα είχαν μικρή δυνατότητα να χρησιμοποιήσουν αυτήν την οδό σηματοδότησης για την επιστροφή σε φαινότυπο βλαστοκυττάρων ενώ η διακοπή αυτού του UPR άξονα θα επιβάρυνε ακόμη περισσότερο την απόκριση στο στρες το οποίο έτσι κι αλλιώς υφίστανται αφού πρέπει να αντιμετωπίσουν ένα εχθρικό μικροπεριβάλλον αλλά και τις αντικαρκινικές θεραπείες που εφαρμόζονται. Πράγματι, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο άξονας IRE1-XBP1s είναι σημαντικός για την προσαρμογή στο στρες των λευχαιμικών και υγιών αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, καθώς ενισχύει την ικανότητα αυτών των κυττάρων να ξεπερνούν το στρες του Ε.Δ. και να επιβιώνουν, προωθώντας την καρκινογένεση [467]. Αυτές οι πληροφορίες οδηγούν στην δεύτερη και δυνητικά πιο σημαντική θεραπευτική επιλογή που είναι η στόχευση της IRE1 ως βοηθητική/ενισχυτική θεραπεία παράλληλα με τον καθιερωμένο συνδυασμό χειρουργικής αφαίρεσης, χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας στο GBM. Το σκεπτικό είναι ότι η στόχευση της RE1 θα μπορούσε να ευαισθητοποιήσει τα GBM κύτταρα στην θεραπεία καθώς θα αποδυνάμωνε τις αποκρίσεις τους και θα περιοριζόταν ο χρόνος προσαρμογής τους στις εχθρικές συνθήκες που διαμορφώνει η χημειοθεραπεία. Συνεπώς οι ασθενείς θα επωφεληθούν όχι μόνο από την μείωση των ποσοστών επανεμφάνισης του όγκου αλλά και από την μειωμένη ανάγκη για επαναλαμβανόμενες δόσεις θεραπείας, οι οποίες εξ ορισμού δημιουργούν δυσμενή πρότυπα τοξικότητας.

Πράγματι, είναι πιθανό σε όγκους XBP1+/RIDD-, η αναστολή της IRE1 RNάσης με μικρά μόρια [189] ή η επιλεκτική αναστολή της XBP1 mRNA λιγάσης RtcB [29-31] να μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική παρεμπόδιση της αύξησης του όγκου. Αυτού του είδους η στρατηγική θα ήταν καθόλα χρήσιμη για καρκινικά κύτταρα που εμφανίζουν συστηματική έκφραση του XBP1s, όπως ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού [199]. Ομοίως, μια θεραπευτική προσέγγιση που θα στόχευε στην αύξηση της RIDD ενεργότητας σε όγκους XBP1-/RIDD+ για την επαγωγή μηχανισμών κυτταρικού θανάτου, προβλέπεται ότι θα ευαισθητοποιούσε τα GBM κύτταρα σε χημειοθεραπείες όπως η αγωγή με τεμοζολομίδη (TMZ). Αυτό θα μπορούσε για παράδειγμα να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας αναστολείς της HSPA5/BiP (Binding immunoglobulin protein) όπως δοκιμάστηκαν επιτυχώς σε μοντέλα μελανώματος [468]. Εκτός από την άμεση επίδραση των αναστολέων της IRE1 στα καρκινικά κύτταρα, θα μπορούσε κανείς επίσης να εξετάσει την χρήση τους σε συνδυασμό με τις τρέχουσες θεραπείες, η πιο κοινή από τις οποίες περιλαμβάνει τον συνδυασμό ακτινο- και χημειοθεραπείας (η τελευταία με τον παράγοντα αλκυλίωσης TMZ [241]). Το συνδυαστικό αυτό θεραπευτικό σχήμα με χρήση του IRE1 αναστολέα MKC-8866 εφαρμόστηκε με επιτυχία στο

GBM συγγενικό προκλινικό μοντέλο ποντικού με βάση την GL261 GBM κυτταρική σειρά **(Εικόνα 3.30)**. Λαμβάνοντας υπόψη ότι περίπου οι μισοί ασθενείς με GBM είναι ανθεκτικοί στην TMZ, η κατηγοριοποίησή τους με βάση την ευαισθητοποίηση σε TMZ μέσω επιλεκτικής αναστολής της IRE1 θα αντιπροσώπευε μια ελκυστική θεραπευτική εναλλακτική λύση. Όμως, ο σύνδεσμος μεταξύ της IRE1 σηματοδότησης και της πιο πρόσφατης ταξινόμησης του GBM [469] καθώς και εάν οι σηματοδοτικοί άξονες της IRE1 σχετίζονται ή όχι με τις GBM κατηγορίες που αφορούν στην δυσμενέστερη (μεσεγγχυματική) ή ευνοϊκότερη (προ-νευρωνική) πρόγνωση [470] απομένει να διευκρινιστούν.

Μια άλλη σημαντική παράμετρος που εξετάσαμε και θα μπορούσε να ληφθεί σημαντικά υπόψη για την θεραπευτική αντιμετώπιση ενός τόσο επιθετικού τύπου καρκίνου όπως το GBM είναι το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον του όγκου. Εκτός από την εγγενή επιθετικότητα των GBM κυττάρων, το μικροπεριβάλλον του όγκου, που περιέχει μεταξύ άλλων ενδοθηλιακά κύτταρα και ανοσοκύτταρα, έχει αναδειχθεί ως ένας κρίσιμος ρυθμιστής της εξέλιξης του καρκίνου του εγκεφάλου [251, 471, 472]. Τα πιο άφθονα ανοσοκύτταρα στο μικροπεριβάλλον του GBM είναι τα σχετιζόμενα με τους όγκους μακροφάγα και τα μικρογλοιακά κύτταρα που μπορεί να φτάσουν έως και το 30% της μάζας του όγκου και έχουν συχνά συνδεθεί με την επιθετικότητα της νόσου [473, 474]. Ωστόσο, στους εγκεφαλικούς όγκους διεισδύουν επίσης και άλλα ανοσοκύτταρα όπως τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα (DCs), τα πλασματοκυτοειδή DCs, τα T-λεμφοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα [472]. Σε αυτήν την εργασία, αποδείξαμε ότι η IRE1 σηματοδότηση α) εμπλέκεται στην στρατολόγηση μακροφάγων και μικρογλοιακών κυττάρων στην περιοχή του όγκου, β) ελέγχει την έκφραση προφλεγμονωδών χημειοκινών και γ) παίζει βασικό ρόλο στην ρύθμιση του GBM μικροπεριβάλλοντος, προωθώντας την στρατολόγηση μυελοειδών κυττάρων. Επίσης, δείξαμε ότι η φαρμακολογική αναστολή της IRE1 σηματοδότησης μείωσε την έκταση της διήθησης των πολυπύρηνων ουδετερόφιλων (PN) στο GBM *in vivo* **(Εικόνα 3.15 και Εικόνα 1 [367])**. Διαπιστώσαμε επίσης ότι η ενεργοποίηση της IRE1 στα κύτταρα του όγκου συσχετίζεται με υψηλότερη έκφραση χημειοκινών που προσελκύουν τα μυελοειδή κύτταρα **(Εικόνα 3.17 και Εικόνα 2 [367])**. Για να χαρακτηρίσουμε τα καθοδικά σήματα της IRE1 που ήταν υπεύθυνα για αυτό το φαινόμενο, δείξαμε ότι η IRE1 ελέγχει αυστηρά την έκφραση του UBE2D3 γονιδίου σε GBM κύτταρα μέσω εμπλοκής του μη συμβατικού ματίσματος του XBP1 mRNA **(Εικόνα 3.19 και Εικόνα 3 [367])**. Στη συνέχεια, αποδείξαμε ότι η ενεργοποίηση του άξονα σηματοδότησης IRE1/XBP1s/UBE2D3 ήταν εν μέρει υπεύθυνη για τον χημειοτακτισμό των μυελοειδών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης του προφλεγμονώδους παράγοντα NFκB **(Εικόνα 3.18, Εικόνα 3.20 και Εικόνα 5 [367])**. Το UBE2D3 είναι ένα E2 ένζυμο συζευγμένο με

ουμπικιτίνη που μαζί με το ένζυμο ενεργοποίησης της ουμπικιτίνης (E1) και την λιγάση της ουμπικιτίνης (E3) μεσολαβεί στην πρόσδεση μορίων ουμπικιτίνης στις πρωτεΐνες-στόχους. Αυτή η μετα-μεταφραστική τροποποίηση επηρεάζει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου ποιότητας και διακίνησης των πρωτεϊνών, της διαφοροποίησης, της κυτταρικής διαίρεσης, της μεταγωγής σήματος αλλά και της φλεγμονής [475, 476]. Το UBE2D3 έχει φανεί ότι ελέγχει μεταξύ άλλων και την πρωτεασωμική αποικοδόμηση του p53 [477], της κυκλίνης D1 [478], της p12 υπομονάδας της DNA πολυμεράσης δ [479] και του IκBα [480]. Έχει αναφερθεί επίσης ότι μεσολαβεί στην ουμπικιτινίωση του RIG-I, γεγονός που απαιτείται για την ενεργοποίησή του μετά από ιογενή λοίμωξη ξεκινώντας την εξαρτώμενη από την ιντερφερόνη τύπου I, έμφυτη ανοσολογική απόκριση [481].

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αποδείξαμε περαιτέρω έναν κρίσιμο ρόλο του UBE2D3 στην ρύθμιση της ανοσίας/φλεγμονής σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος. Διαπιστώσαμε ότι το UBE2D3 υπερεκφράζεται στο GBM σε σύγκριση με γλοιώματα χαμηλού βαθμού και ότι η αυξημένη έκφρασή του συσχετίζεται με υψηλή αφθονία προφλεγμονωδών χημειοκινών. Χαρτογραφήσαμε έναν νέο IRE1-εξαρτώμενο μηχανισμό ενεργοποίησης του NFκB, ο οποίος περιλαμβάνει την αύξηση της έκφρασης του UBE2D3 που οδηγεί στην αποικοδόμηση του IκB, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω της E3 λιγάσης της ουμπικιτίνης MIB1, την επακόλουθη μετατόπιση του NFκB στον πυρήνα και την ενεργοποίηση της καθοδικής σηματοδότησής του (**Εικόνα 4 [367]**). Ως εκ τούτου, η IRE1 σηματοδότηση ελέγχει την παραγωγή προφλεγμονωδών χημειοκινών, συμπεριλαμβανομένου των CXCL2, IL6 και IL8. Μόλις εκκριθούν, όχι μόνο διατηρούν το προ-καρκινικό φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον, αλλά μπορούν επίσης να κινητοποιήσουν τη στρατολόγηση ανοσοκυττάρων στη θέση του όγκου προωθώντας περαιτέρω την εξέλιξη του καρκίνου. Επιπλέον *in vivo* πειράματα που διεξήχθησαν στο Ινστιτούτο INSERM της Γαλλίας έδειξαν ότι όγκοι που υπερέκφραζαν το UBE2D3 ήταν μεγαλύτεροι σε μέγεθος και εμφάνιζαν διήθηση από σημαντικά υψηλότερο αριθμό ανοσοκυττάρων, όπως μικρογλοία/μακροφάγα (MM) και PN (**Εικόνα 6 [367]**). Ωστόσο, τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι ο προαναφερθείς μηχανισμός μπορεί να εφαρμοστεί και στην διήθηση ενός μεγάλου αριθμού λεμφοκυττάρων, υπογραμμίζοντας την σημασία της κατανόησης του άξονα IRE1/XBP1s/UBE2D3 σε άλλα καρκινικά μοντέλα, ιδιαίτερα σε «ανοσοζεστούς» όγκους. Συνεπώς, η στόχευση της IRE1 σηματοδότησης όχι μόνο μπορεί να εμποδίσει την επιθετικότητα του γλοιοβλαστώματος μειώνοντας την μετανάστευση, την εισβολή και την αγγειογένεση των όγκων αλλά και να εξουδετερώσει την προ-ογκογονική φλεγμονή και

ανοσοποίηση, ανοίγοντας έτσι μια νέα οδό για θεραπευτικές προσεγγίσεις βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητα των σημερινών ανοσοθεραπειών.

Σημαντική συνεισφορά στην μελέτη του μηχανισμού δράσης αλλά και των συνεπειών της στόχευσης της IRE1 στις θεραπείες που εφαρμόζονται για το GBM θα έχει και η δημιουργία του GBM συγγενικού προ-κλινικού μοντέλου ποντικού που κατασκευάστηκε από την κυτταρική σειρά του ποντικού GL261. Τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν ένα γονιδίωμα που φιλοξενεί την πλειοψηφία, αν όχι όλες τις μεταλλάξεις, που οδηγούν σε δημιουργία γλοιώματος. Αυτές οι μεταλλάξεις ή/και παραλλαγές στον αριθμό γονιδιακών αντιγράφων παρατηρήθηκαν σε γονίδια που εμπλέκονται στα 3 κύρια μονοπάτια που επηρεάζονται στο GBM: το μονοπάτι του υποδοχέα της κινάσης τυροσίνης (RTK), του P53 και του RB1 (**Εικόνα 1 [482]**). Επιπλέον, τα σχετιζόμενα με GBM γονίδια που φιλοξενούν ένα SNV (Single-nucleotide variant) στα GL261 και δύο DNA αντίγραφα (Πίνακες S1-S3 [271]) είχαν μεταβλητές τιμές συχνότητας των αλληλομόρφων των μεταλλάξεων (MAF) που κυμαίνονταν από 6% έως 100%. Αυτή η MAF κατανομή υποδηλώνει έντονα ότι πολλοί, διαφορετικοί κλώνοι συνθέτουν την πατρική σειρά GL261 (μέχρι 5). Συνολικά αυτά τα χαρακτηριστικά των GL261 συγκεντρώνουν τα μοριακά χαρακτηριστικά που παρατηρήθηκαν στο πρωτοπαθές GBM κατά την διάγνωση με την παρουσία πολλαπλών μεταλλάξεων-οδηγών ή/και πολλών GBM κλώνων [483]. Με την βοήθεια της υπογραφής IRE1sign38, την αξιολόγηση των σηματοδοτικών αξόνων XBP1s και RIDD αλλά και την κανονικοποίηση/ομαλοποίηση των μεταγραφικών δεδομένων μεταξύ διαφορετικών πλατφορμών (cross-platform harmonization) δείξαμε ότι τα GL261 κύτταρα εμφάνιζαν μια συστηματική ενεργοποίηση της IRE1 σηματοδότησης, ακολουθώντας το πρότυπο της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας των U87 κυττάρων τα οποία υπερέκφραζαν την αγρίου τύπου IRE1 ή την μεταλλαγμένη μορφή P336L (στην οποία η IRE1 είναι συστηματικά ενεργοποιημένη) τόσο σε βασικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες στρες Ε..Δ. (**Εικόνα 3.29**). Επομένως, η κυτταρική σειρά GL261 θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολύτιμο GBM μοντέλο για προκλινικές μελέτες σε ποντίκια, και συγκεκριμένα για την μελέτη της δράσης αναστολέων της IRE1 πρωτεΐνης.

Συμπερασματικά, η εργασία μας στο GBM αποδεικνύει για πρώτη φορά την αποσυνδεδεμένη δράση των XBP1s και RIDD καθοδικών σημάτων της IRE1 με πολυποίκιλη την συμβολή τους στην ανάπτυξη του καρκίνου και προτείνει μια εναλλακτική θεραπευτική οδό σε συνδυασμό με την εξατομικευμένη μοριακή διάγνωση για (1) μείωση των προσαρμοστικών ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων, (2) ενίσχυση των μονοπατιών καταβολισμού του RNA που οδηγεί σε επιτάχυνση του κυτταρικού θανάτου των καρκινικών κυττάρων του όγκου και (3) ρύθμιση του στρώματος του όγκου μέσω μειωμένης

αγγειογένεσης και αυξημένης αντικαρκινικής ανοσίας. Αυτές οι προσεγγίσεις σε συνδυασμό με την καλύτερη γνώση των χαρακτηριστικών σηματοδότησης της IRE1 στο GBM μπορεί να συμβάλουν στην ανάπτυξη ενός νέου εργαλείου ιατρικής ακριβείας για την θεραπεία αυτού του τόσο επιθετικού τύπου καρκίνου.

Όμως ο σημαντικός ρόλος της IRE1 στον καρκίνο δεν περιορίζεται μόνο στο GBM αλλά όπως αναδείξαμε στην παρούσα διδακτορική διατριβή επεκτείνεται στην πλειονότητα των συμπαγών όγκων κάτι που αναμέναμε αν αναλογιστούμε τον κομβικό ρόλο του UPR μηχανισμού στην πρωτεόσταση και την κυτταρική ομοιόσταση γενικότερα. Πρόκειται για έναν συντηρημένο μηχανισμό απόκρισης στο στρες στα θηλαστικά που δεν θα μπορούσε να μην διαδραματίζει κομβικό ρόλο σε ασθένειες και επομένως και στον καρκίνο [184]. Έτσι, μέσα από την αξιολόγηση της IRE1 σηματοδοτικής ενεργότητας και των δύο κύριων αξόνων δράσης της, XBP1s και RIDD, σε 12 διαφορετικούς τύπους καρκίνου του προγράμματος TCGA (**Εικόνα 3.47**) διαπιστώσαμε ότι: α) η IRE1 ενεργότητα άλλοτε ενισχύει την ογκογονική και άλλοτε την αντικαρκινική δράση τροποποιώντας το ισοζύγιο δράσεων μεταξύ του XBP1s και RIDD σηματοδοτικού άξονα, οι οποίοι μπορούν να εμφανίζουν μεταξύ τους σχέση επικρατούς-υπολειπόμενου, σχέση ανταγωνιστική με αντίρροπες δράσεις, συνεργατική-ενισχυτική δράση προς όφελος του ασθενή ή συνεργατική-ενισχυτική δράση με δυσμενή αποτελέσματα (**Πίνακας 9**), β) συμμετέχει ενεργά στον καθορισμό των ποσοστών επιβίωσης των ασθενών (**Εικόνα 3.49, Εικόνα 3.50 και Εικόνα 3.54**) και γ) συσχετίζεται σημαντικά με μοριακούς υπότυπους που χαρακτηρίζουν διάφορους τύπους καρκίνου καθώς και με κλινικούς δείκτες αξιολόγησης της επιθετικότητας και της μεταστατικότητας των όγκων (**Εικόνα 3.48, Εικόνα 3.50 και Εικόνα 3.52**). Ο χαρακτηρισμός των ασθενών με βάση το μεταγραφικό προφίλ έκφρασης της υπογραφής IRE1sign38, η αξιολόγηση της XBP1s και RIDD δραστηριότητας με βάση την κατανομή έκφρασης των γονιδίων που συνιστούν τις δύο συνιστώσες της υπογραφής εντός της κοόρτης, η χαρτογράφηση του δικτύου των αλληλεπιδράσεων των γονιδίων της υπογραφής με σημαντικά ογκοκατασταλτικά γονίδια και ογκογονίδια αλλά και η ταυτοποίηση του κυκλώματος των IRE1-εξαρτούμενων miRNAs, η αποκρυπτογράφηση του προφίλ μεταλλάξεων της υπογραφής και η αποκάλυψη ότι εμφανίζει πολύ μικρή συχνότητα μεταλλάξεων και παραλλαγών γονιδιακών αντιγράφων με ισχυρό ρυθμιστικό μεταγραφικό ρόλο στην πλειονότητα των όγκων επέτρεψαν αφενός να αναδειχθούν νέοι μοριακοί υπότυποι εξαρτώμενοι από την συμπεριφορά της IRE1 πρωτεΐνης και αφετέρου αναδείχθηκαν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις αντιμετώπισης των διαφορετικών τύπων καρκίνου. Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που συνοδεύουν τις επιθετικές μορφές καρκίνου όπως είναι η αγγειογένεση, η κυτταρική εισβολή και διήθηση, η

μεταστατικότητα και ο επαναπρογραμματισμός των διαφοροποιημένων καρκινικών κυττάρων σε βλαστικού τύπου κύτταρα φαίνεται να αντικατοπτρίζονται στην σηματοδοτική δραστικότητα της IRE1, παρατήρηση που επιβεβαιώθηκε και με την υψηλού βαθμού συσχέτισή της με την καλά συντηρημένη πρωτεΐνη/βιοδείκτη βλαστοκυττάρων CD90 που εκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα στην θέση του κύριου όγκου αλλά και σε κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου όπως σε μεταναστευτικά καρκινικά και ενδοθηλιακά κύτταρα που σχετίζονται με τον όγκο (**Εικόνα 3.59**). Επομένως γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι η IRE1 θα πρέπει πλέον να αποτελέσει κεντρικό θεραπευτικό στόχο σε επιθετικούς καρκίνους όπως ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του παγκρέατος, το κακοήθες μελάνωμα και φυσικά το γλοιοβλάστωμα. Αξιοσημείωτο επίσης ήταν το γεγονός ότι εντοπίστηκε ένα παρόμοιο ανοσολογικό προφίλ για μια σειρά βιοδεικτών της δράσης των ανοσοκυττάρων ειδικής και μη ειδικής άμυνας μεταξύ των όγκων του GBM, του μελανώματος αλλά και του καρκίνου του παχέος εντέρου κυρίως σταδίου I (**Εικόνα 3.58**), το οποίο σχετιζόταν άμεσα με την IRE1 ενεργότητα, υπογραμμίζοντας για άλλη μια φορά τον ρόλο που μπορεί να διαδραματίσει στην αποτελεσματικότητα των ανοσοθεραπειών.

Όμως, δεν θα ήταν εφικτό να εξάγουμε τα παραπάνω αποτελέσματα αν δεν αξιοποιούσαμε τις δυνατότητες που μας παρέχει τα τελευταία χρόνια η Υπολογιστική Βιολογία και η Βιοπληροφορική. Οι ραγδαίες εξελίξεις που έχουν επιτελεστεί στην τεχνολογία και την υπολογιστική βιολογία την τελευταία 10ετία έχουν επιφέρει επανάσταση στις –omics τεχνολογίες με κυρίαρχο τον ρόλο των τεχνικών αλληλούχισης και ποσοτικοποίησης της βιολογικής πληροφορίας σε μεγάλη κλίμακα, συγκεντρώνοντας τεράστιο όγκο μοριακών δεδομένων από διαφορετικά επίπεδα της ροής της γενετικής πληροφορίας όπως είναι το γονιδίωμα, το μεταγράφημα, το πρωτόμα, το επιγένομα, το μεταβόλωμα κ.ο.κ. Η επιτυχημένη ενσωμάτωση αυτών των δεδομένων αλλά και ο συνδυασμός τους με κατάλληλες κλινικές παραμέτρους ανοίγει ένα νέο πεδίο έρευνας που μας δίνει την δυνατότητα να αποκαλύψουμε τους μοριακούς μηχανισμούς των οποίων οι διαταραχές είναι η γενεσιουργός δύναμη για την πρόκληση ασθενειών [273]. Η γνώση μας αυτή μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για την βελτίωση της διάγνωσης της ασθένειας, της πρόγνωσης, της πρόληψης αλλά και της θεραπευτικής αντιμετώπισής της. Αυτού του είδους η προσέγγιση έθεσε νέες βάσεις και στον τομέα της μεταφραστικής έρευνας για τον καρκίνο, αναδεικνύοντας την εξατομικευμένη ιατρική παρέμβαση ή την ιατρική ακριβείας ως μονόδρομο στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Εντούτοις, οι προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν για να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι πολλές και αφορούν κυρίως στον τρόπο κωδικοποίησης της πρωτογενούς πληροφορίας, στην προ-

επεξεργασία και το φιλτράρισμα των δεδομένων ώστε να ενισχυθεί το παραγόμενο σήμα και ταυτόχρονα να περιοριστεί ο εξωγενής θόρυβος αλλά και στην ανάλυση και ενσωμάτωση των δεδομένων που πρέπει να πραγματοποιείται με έναν άμεσα αποδοτικό τρόπο, εφαρμόζοντας εύρωστους υπολογιστικούς και στατιστικούς αλγορίθμους. Έτσι, στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής ένας βασικός μας στόχος ήταν και η ανάπτυξη μεθοδολογιών και ροών εργασίας που θα ενίσχυαν την αποτελεσματικότητα της μεταφραστικής βιοϊατρικής έρευνας για τον καρκίνο, μέσω ανάλυσης και ενσωμάτωσης μοριακών δεδομένων από διαφορετικές πηγές, πειραματικές συνθήκες και μοντέλα με απώτερο στόχο να μεταφραστούν γονιδιωματικά δεδομένα μεγάλης κλίμακας σε βιολογική γνώση σχετική με τους μηχανισμούς ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου, με άμεση εφαρμογή στην καθημερινή κλινική πράξη αλλά και σε επίπεδο πρόγνωσης και θεραπείας. Επιδιώκοντας αυτόν τον στόχο, αναπτύξαμε ένα ιεραρχημένο πολυεπίπεδο αναλυτικό πλαίσιο ενσωματώνοντας mRNA και miRNA μεταγραφικά RNAseq δεδομένα, μεταγραφικά δεδομένα μικροσυστοιχιών, δεδομένα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, τα οποία διερευνήσαμε σε λειτουργικό, μοριακό, δομικό επίπεδο αλλά και σε επίπεδο δικτύων/κυκλωμάτων με σκοπό την ανάδειξη προτύπων έκφρασης, γονιδίων-στόχων, νουκλεοτιδικών και δομικών μοτίβων αναγνώρισης για αποκοπή από την IRE1, βιολογικών διεργασιών/μονοπατιών-οδηγών, δεικτών αξιολόγησης της IRE1/XBP1s/RIDD σηματοδοτικής ενεργότητας, διαμορφώνοντας τελικά ένα αξιόπιστο σύστημα ταξινόμησης των όγκων σε μοριακούς IRE1-εξαρτώμενους μοριακούς υπότυπους που οι διαφορές τους είχαν άμεσο αντίκτυπο στα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών. Το πρωταρχικό όμως σημαντικό βήμα που μας επέτρεψε να αξιολογήσουμε την IRE1 σηματοδοτική ενεργότητα στον καρκίνο ήταν η εξαγωγή της γονιδιακής υπογραφής IRE1sign38 που λειτουργεί ως σύνολο υποψήφιων βιοδεικτών με αξιοσημείωτη μηχανιστική, αποδοτική ερμηνεία ως προς την μοριακή αποτύπωση του φαινοτύπου που εξετάζεται. Πρόκειται για υπογραφή που αποτελείται από γονίδια κομβικής σημασίας στην «συνομιλία» συστημικών κυτταρικών διεργασιών [418], όπως προκύπτουν από την πολυεπίπεδη συστημική λειτουργική ανάλυση με την πλατφόρμα BioInfoMiner. Η πληθώρα των σχολιασμών που συνοδεύουν τις εξεταζόμενες βιολογικές οντότητες (π.χ. γονίδια, πρωτεΐνες) και που αφορούν σε λειτουργίες και μοριακά μονοπάτια που τις χαρακτηρίζουν, με την μορφή ιεραρχημένων λεξιλογίων ή οντολογικών δέντρων, χρησίμευσαν ως οδηγοί στην αρχική διαδικασία επιλογής των γονιδίων η οποία δεν περιορίστηκε αποκλειστικά σε ποσοτικές, υπολογιστικές τεχνικές βασισμένες στην έκφραση, που συνήθως αδυνατούν να αναδείξουν το υποκείμενο μοριακό υπόβαθρο. Οι κλασικές μέθοδοι εξόρυξης δεδομένων που κυρίως στηρίζονται στην μείωση των διαστάσεων, όταν

εφαρμόζονται για την επιλογή βιοδεικτών, χωρίς προηγούμενη αξιοποίηση των βιολογικών πληροφοριών που χαρακτηρίζουν αυτούς τους βιοδείκτες, αποτυγχάνουν να συλλάβουν τις μοριακές αλληλεπιδράσεις και συνήθως οδηγούν σε φαινόμενα υπερβολικής προσαρμογής και απώλειας της ισχύος γενίκευσης.

Επίσης, η πλειονότητα των μεθοδολογιών και των υπολογιστικών αλγορίθμων που εφαρμόσαμε για την ανάλυση και ενσωμάτωση των μοριακών δεδομένων αλλά και την αποδοτική οπτικοποίησή τους, την ενσωματώσαμε σε μια R Shiny πλατφόρμα βιοπληροφορικής ανάλυσης γονιδιωματικών δεδομένων μεγάλης κλίμακας (**Εικόνα 3.73**) όπου σε ένα φιλικό προς τον χρήστη περιβάλλον παρέχεται η δυνατότητα ανάκτησης, επεξεργασίας και πολυεπίπεδης λειτουργικής ανάλυσης RNAseq δεδομένων και δεδομένων μικροσυστοιχιών κυρίως του προγράμματος TCGA, χωρίς να απαιτείται η γνώση κάποιας γλώσσας προγραμματισμού ή η ύπαρξη ιδιαίτερων ικανοτήτων πληροφορικής. Με την πλατφόρμα αυτή ο χρήστης μπορεί να ενσωματώσει μοριακά δεδομένα από διαφορετικές τεχνολογίες, να αναδείξει διαφορικά εκφρασμένα γονίδια μεταξύ των πειραματικών συνθηκών που εξετάζει, να εξάγει γονιδιακές υπογραφές, να αναδείξει βιολογικές λειτουργίες και μοριακά μονοπάτια με κυρίαρχο ρόλο στον καθορισμό του φαινοτύπου που εξετάζει, να ομαδοποιεί τους ασθενείς με καρκίνο σε διαφορετικούς μοριακούς υπότυπους, να συσχετίζει μοριακά με κλινικά δεδομένα και να διεξάγει εκτεταμένη περιγραφική/διερευνητική ανάλυση.

Εν κατακλείδι, η αρχή της μεθοδολογικής προσέγγισης που ακολουθήσαμε βασίζεται στην γενική διαπίστωση ότι οποιαδήποτε βιολογική κατάσταση ή ασθένεια, όπως ο καρκίνος, χαρακτηρίζεται από πολλαπλά μοριακά φαινόμενα και μόνο μέσω της λεπτομερούς κατανόησης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφορετικών επιπέδων της βιολογικής πληροφορίας, μπορεί κανείς να κατανοήσει ολιστικά τις σημαντικά διαταραγμένες βιολογικές διαδικασίες που χαρακτηρίζουν την παθολογία της νόσου.

5 Συμπεράσματα Μελέτης – Μελλοντικοί Στόχοι

Η παρούσα διδακτορική διατριβή συνέβαλε σημαντικά στην αποσαφήνιση του ρόλου του IRE1 σηματοδοτικού άξονα του UPR στο GBM και στον καρκίνο γενικότερα, αποδεικνύοντας για πρώτη φορά τον διττό ρόλο της IRE1 σηματοδότησης στον καρκίνο, ανοίγοντας ένα νέο θεραπευτικό παράθυρο που μπορεί να λειτουργήσει ανασταλτικά στην εξέλιξη του όγκου ή/και να ενισχύσει την ευαισθησία των θεραπειών που ήδη εφαρμόζονται. Μέσα από την αξιολόγηση της XBP1s και RIDD σηματοδοτικής ενεργότητας, την ταυτοποίηση IRE1-εξαρτώμενων miRNA δικτύων αλλά και την συσχέτισή τους με κύρια μοριακά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των όγκων αναδείχθηκε ο ρόλος του IRE1-XBP1s άξονα στον επαναπρογραμματισμό των καρκινικών κυττάρων που τα τελευταία χρόνια μελετάται εντόνως γιατί συμβάλλει στην ανθεκτικότητα του όγκου στην αντι-νεοπλασματική θεραπεία και στην υποτροπή της νόσου μέσω των καρκινικών βλαστικών κυττάρων.

Επίσης η εργασία μας συνέβαλλε στον προσδιορισμό ενός νέου άξονα προ-φλεγμονώδους σηματοδότησης, τον IRE1/UBE2D3, που φαίνεται να συμμετέχει ενεργά στην προ-ογκογονική ανοσολογική ρύθμιση του GBM ενώ παράλληλα αναδείχθηκε ο κομβικός ρόλος της IRE1 στην διαμόρφωση του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος των όγκων, ανοίγοντας νέους δρόμους στον τομέα των ανοσοθεραπειών. Στο ίδιο πλαίσιο συμπεριλαμβάνεται και η σύνδεση των E2F1 και MICA με τον IRE1-XBP1s άξονα, παρατηρήσεις που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την θεραπεία του καρκίνου με χειρισμό του UPR μηχανισμού στα καρκινικά κύτταρα.

Μέσα από την ανάπτυξη και εφαρμογή καινοτόμων υπολογιστικών μεθοδολογιών για την σύζευξη, ανάλυση και ερμηνεία ετερογενών γονιδιωματικών δεδομένων αλλά και την εξαγωγή εύρωστων μοριακών υπογραφών που αντικατοπτρίζουν τα επίπεδα λειτουργίας κρίσιμων βιολογικών διαδικασιών και μοριακών μονοπατιών αναδείχθηκαν μηχανισμοί και δίκτυα μοριακών αλληλεπιδράσεων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου με άμεσο αντίκτυπο στην επιβίωση των ασθενών, υποδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο που μπορούν να διαδραματίσουν στον τομέα της πρόγνωσης. Έτσι, δημιουργήθηκε και η IRE1 υπογραφή των 38 γονιδίων που στηρίζεται στην λειτουργική σημασιολογική σύνδεση IRE1-εξαρτώμενων hub-γονιδίων με ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή ιατρική πράξη γιατί αφενός εκδηλώνει έναν εξαιρετικά ισχυρό χαρακτήρα στρωματοποίησης των ασθενών σε πολλούς τύπους καρκίνου, επιτρέποντας τον καλύτερο διαχωρισμό των ασθενών σε συγκεκριμένους μοριακούς υπότυπους που χρήζουν διαφορετικής θεραπευτικής αντιμετώπισης, και αφετέρου

περιλαμβάνει έναν μηχανισμό «τραμπάλας» μεταξύ των XBP1s και RIDD δράσεων, που καθορίζει διαφορετικά κλινικά και μοριακά επίπεδα σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Τα δίκτυα αλληλεπίδρασης της IRE1 υπογραφής με υψηλού βαθμού μεταλλαγμένα (ή απλώς μεταλλαγμένα) γειτονικά γονίδια με κομβικό ογκογονικό ή/και ογκοκατασταλτικό ρόλο στον καρκίνο, ανέδειξαν όχι μόνο την ισχυρή λειτουργική σύνδεση του UPR μηχανισμού με μοριακά μονοπάτια που καθορίζουν την εξέλιξη της καρκίνου αλλά και έθεσαν εναλλακτικούς υποψήφιους θεραπευτικούς στόχους, όπως επιβεβαιώθηκε και με την φαρμακογονιδιωματική ανάλυση της IRE1 υπογραφής στο GBM μέσω της επανατοποθέτησης φαρμάκων που επιδρούν ομόρροπα ή αντίρροπα στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων της.

Η παρούσα ερευνητική εργασία περιγράφει επίσης για πρώτη φορά την μεθοδολογία που μπορεί να ακολουθηθεί για την εξαγωγή, ανάλυση αλλά και την αξιολόγηση της δράσης μιας γονιδιακής υπογραφής σε ασθενείς μιας κοόρτης ενσωματώνοντας ποικίλα μοριακά δεδομένα από διαφορετικές πλατφόρμες καταγραφής βιολογικού σήματος, παρέχοντας την δυνατότητα εφαρμογής τους σε ένα γραφικό φιλικό περιβάλλον που θα μπορούσε να χρησιμοποιήσει όχι μόνο ο μοριακός βιολόγος/ερευνητής αλλά και ο κλινικός γιατρός ή/και ογκολόγος για να εξάγει βιοδείκτες, να χαρακτηρίσει τους ασθενείς και να τους κατατάξει σε μοριακούς υπότυπους, να μελετήσει το πρότυπο μεταλλάξεων των ασθενών κ.ο.κ., με απώτερο σκοπό την συστημική/ολιστική μελέτη μιας τόσο ετερογενούς ασθένειας όπως είναι ο καρκίνος. Επίσης η ανάπτυξη της μεθοδολογίας που αναπτύξαμε για την ποσοτική εκτίμηση της RIDD ενεργότητας στο GBM μέσω της ταυτοποίησης νουκλεοτιδικών και δομικών μοτίβων σε RNA μετάγραφα που μπορεί να λειτουργούν ως θέσεις αναγνώρισης για αλληλεπίδραση με άλλα μόρια όπως οι πρωτεΐνες (RBPs), θα μπορούσε να εφαρμοστεί και σε οποιοδήποτε σύνολο RNAseq δεδομένων είτε για τον άμεσο προσδιορισμό της RIDD ενεργότητας σε άλλους τύπους καρκίνου ή γενικότερα για την εκτίμηση της έλλειψης ή πιθανής αύξησης του διαθέσιμου μοριακού φορτίου υποστρωμάτων αναγνώρισης από μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη σε συγκριτικές μελέτες (π.χ. RIDD+ έναντι RIDD-).

Ένας από τους κύριους μελλοντικούς μου στόχους είναι η αξιοποίηση και η μεγιστοποίηση της διακριτικής ικανότητας της IRE1 γονιδιακής υπογραφής μέσα από την προσαρμογή της στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου ενσωματώνοντας κρίσιμη πληροφορία που θα προέρχεται από γονιδιωματικά, πρωτεωμικά, επιγενωμικά αλλά και κλινικοπαθολογικά δεδομένα, ειδικά για τον κάθε τύπο καρκίνου ξεχωριστά. Αυτό θα μας επιτρέψει να χαρακτηρίσουμε καλύτερα τους μοριακούς υπότυπους που περιγράφουν όλο το φάσμα των όγκων, ενισχύοντας ακόμη περισσότερο την προσπάθεια που γίνεται να

αντιμετωπιστεί η ασθένεια φαρμακευτικά. Στην ίδια προοπτική εντάσσεται και η προσπάθειά μου για την κατασκευή ενός ταξινομητή τεχνητής νοημοσύνης που θα χαρακτηρίζει τα μετάγραφα σε υποψήφια ή μη για RIDD στόχευση ενσωματώνοντας την πρωτοταγή και δευτεροταγή δομική πληροφορία που παράχθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Επιπλέον, για την αξιολόγηση της XBP1s ενεργότητας θα επιχειρηθεί ο υπολογισμός του λόγου της ματισμένης (XBP1s) προς τη μη-ματισμένη μορφή του (XBP1u) σε RNAseq δεδομένα, κατασκευάζοντας κάποιο υπολογιστικό εργαλείο-ευθυγραμμιστή που θα διορθώνει τις εγγραφές στην περιοχή του XBP1 γονιδίου, ποσοτικοποιώντας τις μεταγραφικές ισομορφές που παράγονται. Η ανάγκη αυτή πηγάζει από το γεγονός ότι οι συνήθεις ευθυγραμμιστές που αποδίδουν τις μεταγραφικές ισομορφές ενός γονιδίου λόγω ματίσματος αναζητούν συμβατικές θέσεις ματίσματος όπως GT-AG, GC-AG και AT-AC (και των συμπληρωματικά αντίστροφων ζευγών δινουκλεοτιδίων), κάτι που αδυνατεί να εντοπίσει θέσεις ματίσματος τύπου CA-GC (όπως στην περίπτωση του XBP1s) που ακολουθούν μη-κανονικό πρότυπο. Έτσι εν τέλει θα μπορέσουμε να συνδέσουμε την XBP1s και RIDD σηματοδοτική ενεργότητα με δύο άμεσους ποσοτικούς δείκτες για την πιο αντιπροσωπευτική εκτίμηση των δύο αξόνων δράσης της IRE1.

Τέλος, η αποκρυπτογράφηση της «συνομιλίας» που διεξάγει ο IRE1 σηματοδοτικός άξονας με τους άλλους δύο βραχίονες του UPR μηχανισμού (PERK και ATF6) αποτελεί έναν ακόμη στόχο για την κατανόηση του πρωτεοστατικού μηχανισμού αλλά φυσικά πιο μακροπρόθεσμο αφού προηγουμένως έχουμε χαρτογραφήσει πλήρως τις κύριες δράσεις της IRE1 πρωτεΐνης.

Εν κατακλείδι, η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι το αποτέλεσμα της ισχυρής αλληλεπίδρασης της υπολογιστικής βιολογίας με την πειραματική βασική έρευνα, δημιουργώντας έναν συνεχή αναδραστικό βρόχο λειτουργίας που είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αποκρυπτογράφηση των φαινομένων που διέπουν την επιστήμη της Βιολογίας και της Ιατρικής Έρευνας ειδικότερα.

6 Βιβλιογραφία

1. Sevier, C.S. and C.A. Kaiser, *Formation and transfer of disulphide bonds in living cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(11): p. 836-47.
2. van Anken, E. and I. Braakman, *Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2005. **40**(4): p. 191-228.
3. Smith, M.H., H.L. Ploegh, and J.S. Weissman, *Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum*. Science, 2011. **334**(6059): p. 1086-90.
4. Walter, P. and D. Ron, *The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation*. Science, 2011. **334**(6059): p. 1081-6.
5. Gardner, B.M., D. Pincus, K. Gotthardt, C.M. Gallagher, and P. Walter, *Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(3): p. a013169.
6. Hetz, C., *The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(2): p. 89-102.
7. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 519-29.
8. Kozutsumi, Y., M. Segal, K. Normington, M.J. Gething, and J. Sambrook, *The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 462-4.
9. Cox, J.S. and P. Walter, *A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response*. Cell, 1996. **87**(3): p. 391-404.
10. Mori, K., W. Ma, M.J. Gething, and J. Sambrook, *A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus*. Cell, 1993. **74**(4): p. 743-56.
11. Wang, M. and R.J. Kaufman, *Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease*. Nature, 2016. **529**(7586): p. 326-35.
12. Harding, H.P., Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, and D. Ron, *Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response*. Mol Cell, 2000. **5**(5): p. 897-904.
13. Harding, H.P., Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P.D. Lu, M. Calfon, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D.F. Stojdl, J.C. Bell, T. Hettmann, J.M. Leiden, and D. Ron, *An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 619-33.
14. Pakos-Zebrucka, K., I. Koryga, K. Mnich, M. Ljujic, A. Samali, and A.M. Gorman, *The integrated stress response*. EMBO Rep, 2016. **17**(10): p. 1374-1395.
15. Calfon, M., H. Zeng, F. Urano, J.H. Till, S.R. Hubbard, H.P. Harding, S.G. Clark, and D. Ron, *IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA*. Nature, 2002. **415**(6867): p. 92-6.
16. Shen, X., R.E. Ellis, K. Lee, C.Y. Liu, K. Yang, A. Solomon, H. Yoshida, R. Morimoto, D.M. Kurnit, K. Mori, and R.J. Kaufman, *Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for C. elegans development*. Cell, 2001. **107**(7): p. 893-903.
17. Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada, and K. Mori, *XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor*. Cell, 2001. **107**(7): p. 881-91.
18. Acosta-Alvear, D., Y. Zhou, A. Blais, M. Tsikitis, N.H. Lents, C. Arias, C.J. Lennon, Y. Kluger, and B.D. Dynlacht, *XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 53-66.

19. Lee, A.H., N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher, *XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7448-59.
20. Hollien, J. and J.S. Weissman, *Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response*. Science, 2006. **313**(5783): p. 104-7.
21. Maurel, M., E. Chevet, J. Tavernier, and S. Gerlo, *Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation*. Trends Biochem Sci, 2014. **39**(5): p. 245-54.
22. Bouchecareilh, M., A. Higa, S. Fribourg, M. Moenner, and E. Chevet, *Peptides derived from the bifunctional kinase/RNase enzyme IRE1alpha modulate IRE1alpha activity and protect cells from endoplasmic reticulum stress*. FASEB J, 2011. **25**(9): p. 3115-29.
23. Ghosh, R., L. Wang, E.S. Wang, B.G. Perera, A. Igbaria, S. Morita, K. Prado, M. Thamsen, D. Caswell, H. Macias, K.F. Weiberth, M.J. Gliedt, M.V. Alavi, S.B. Hari, A.K. Mitra, B. Bhatarai, S.C. Schurer, E.L. Snapp, D.B. Gould, M.S. German, B.J. Backes, D.J. Maly, S.A. Oakes, and F.R. Papa, *Allosteric inhibition of the IRE1alpha RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress*. Cell, 2014. **158**(3): p. 534-48.
24. Han, D., A.G. Lerner, L. Vande Walle, J.P. Upton, W. Xu, A. Hagen, B.J. Backes, S.A. Oakes, and F.R. Papa, *IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates*. Cell, 2009. **138**(3): p. 562-75.
25. Tam, A.B., A.C. Koong, and M. Niwa, *Ire1 has distinct catalytic mechanisms for XBP1/HAC1 splicing and RIDD*. Cell Rep, 2014. **9**(3): p. 850-8.
26. Carrara, M., F. Prisch, P.R. Nowak, M.C. Kopp, and M.M. Ali, *Noncanonical binding of BiP ATPase domain to Ire1 and Perk is dissociated by unfolded protein CH1 to initiate ER stress signaling*. Elife, 2015. **4**.
27. Karagoz, G.E., D. Acosta-Alvear, H.T. Nguyen, C.P. Lee, F. Chu, and P. Walter, *An unfolded protein-induced conformational switch activates mammalian IRE1*. Elife, 2017. **6**.
28. Plumb, R., Z.R. Zhang, S. Appathurai, and M. Mariappan, *A functional link between the co-translational protein translocation pathway and the UPR*. Elife, 2015. **4**.
29. Jurkin, J., T. Henkel, A.F. Nielsen, M. Minnich, J. Popow, T. Kaufmann, K. Heindl, T. Hoffmann, M. Busslinger, and J. Martinez, *The mammalian tRNA ligase complex mediates splicing of XBP1 mRNA and controls antibody secretion in plasma cells*. EMBO J, 2014. **33**(24): p. 2922-36.
30. Kosmaczewski, S.G., T.J. Edwards, S.M. Han, M.J. Eckwahl, B.I. Meyer, S. Peach, J.R. Hesselberth, S.L. Wolin, and M. Hammarlund, *The RtcB RNA ligase is an essential component of the metazoan unfolded protein response*. EMBO Rep, 2014. **15**(12): p. 1278-85.
31. Lu, Y., F.X. Liang, and X. Wang, *A synthetic biology approach identifies the mammalian UPR RNA ligase RtcB*. Mol Cell, 2014. **55**(5): p. 758-70.
32. Prasad, V., M. Suomalainen, Y. Jasiqi, S. Hemmi, P. Hearing, L. Hosie, H.G. Burgert, and U.F. Greber, *The UPR sensor IRE1alpha and the adenovirus E3-19K glycoprotein sustain persistent and lytic infections*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 1997.
33. Huang, S., Y. Xing, and Y. Liu, *Emerging roles for the ER stress sensor IRE1alpha in metabolic regulation and disease*. J Biol Chem, 2019. **294**(49): p. 18726-18741.
34. Cho, J.A., A.H. Lee, B. Platzer, B.C.S. Cross, B.M. Gardner, H. De Luca, P. Luong, H.P. Harding, L.H. Glimcher, P. Walter, E. Fiebigler, D. Ron, J.C. Kagan, and W.I. Lencer, *The unfolded protein response element IRE1alpha senses bacterial proteins invading the ER to activate RIG-I and innate immune signaling*. Cell Host Microbe, 2013. **13**(5): p. 558-569.

35. Haze, K., H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, and K. Mori, *Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress*. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(11): p. 3787-99.
36. Yamamoto, K., T. Sato, T. Matsui, M. Sato, T. Okada, H. Yoshida, A. Harada, and K. Mori, *Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1*. *Dev Cell*, 2007. **13**(3): p. 365-76.
37. Shoulders, M.D., L.M. Ryno, J.C. Genereux, J.J. Moresco, P.G. Tu, C. Wu, J.R. Yates, 3rd, A.I. Su, J.W. Kelly, and R.L. Wiseman, *Stress-independent activation of XBP1s and/or ATF6 reveals three functionally diverse ER proteostasis environments*. *Cell Rep*, 2013. **3**(4): p. 1279-92.
38. Bertolotti, A., Y. Zhang, L.M. Hendershot, H.P. Harding, and D. Ron, *Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(6): p. 326-32.
39. Oikawa, D., Y. Kimata, K. Kohno, and T. Iwawaki, *Activation of mammalian IRE1alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins*. *Exp Cell Res*, 2009. **315**(15): p. 2496-504.
40. Kimata, Y. and K. Kohno, *Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells*. *Curr Opin Cell Biol*, 2011. **23**(2): p. 135-42.
41. Eletto, D., D. Dersh, T. Gidalevitz, and Y. Argon, *Protein disulfide isomerase A6 controls the decay of IRE1alpha signaling via disulfide-dependent association*. *Mol Cell*, 2014. **53**(4): p. 562-76.
42. Higa, A., S. Taouji, S. Lhomond, D. Jensen, M.E. Fernandez-Zapico, J.C. Simpson, J.M. Pasquet, R. Schekman, and E. Chevet, *Endoplasmic reticulum stress-activated transcription factor ATF6alpha requires the disulfide isomerase PDIA5 to modulate chemoresistance*. *Mol Cell Biol*, 2014. **34**(10): p. 1839-49.
43. Fu, S., L. Yang, P. Li, O. Hofmann, L. Dicker, W. Hide, X. Lin, S.M. Watkins, A.R. Ivanov, and G.S. Hotamisligil, *Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity*. *Nature*, 2011. **473**(7348): p. 528-31.
44. Hotamisligil, G.S., *Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 900-17.
45. Urra, H., E. Dufey, T. Avril, E. Chevet, and C. Hetz, *Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer*. *Trends Cancer*, 2016. **2**(5): p. 252-262.
46. Shore, G.C., F.R. Papa, and S.A. Oakes, *Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response*. *Curr Opin Cell Biol*, 2011. **23**(2): p. 143-9.
47. Tabas, I. and D. Ron, *Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress*. *Nat Cell Biol*, 2011. **13**(3): p. 184-90.
48. Urra, H., E. Dufey, F. Lisbona, D. Rojas-Rivera, and C. Hetz, *When ER stress reaches a dead end*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(12): p. 3507-3517.
49. Lerner, A.G., J.P. Upton, P.V. Praveen, R. Ghosh, Y. Nakagawa, A. Igbaria, S. Shen, V. Nguyen, B.J. Backes, M. Heiman, N. Heintz, P. Greengard, S. Hui, Q. Tang, A. Trusina, S.A. Oakes, and F.R. Papa, *IRE1alpha induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress*. *Cell Metab*, 2012. **16**(2): p. 250-64.
50. Upton, J.P., L. Wang, D. Han, E.S. Wang, N.E. Huskey, L. Lim, M. Truitt, M.T. McManus, D. Ruggero, A. Goga, F.R. Papa, and S.A. Oakes, *IRE1alpha cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2*. *Science*, 2012. **338**(6108): p. 818-22.
51. Nishitoh, H., A. Matsuzawa, K. Tobiume, K. Saegusa, K. Takeda, K. Inoue, S. Hori, A. Kakizuka, and H. Ichijo, *ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats*. *Genes Dev*, 2002. **16**(11): p. 1345-55.

52. Urano, F., X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H.P. Harding, and D. Ron, *Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1*. *Science*, 2000. **287**(5453): p. 664-6.
53. Wang, C. and R.J. Youle, *The role of mitochondria in apoptosis**. *Annu Rev Genet*, 2009. **43**: p. 95-118.
54. Pihan, P., A. Carreras-Sureda, and C. Hetz, *BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise*. *Cell Death Differ*, 2017. **24**(9): p. 1478-1487.
55. Cox, J.S., C.E. Shamu, and P. Walter, *Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase*. *Cell*, 1993. **73**(6): p. 1197-206.
56. Tirasophon, W., A.A. Welihinda, and R.J. Kaufman, *A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells*. *Genes Dev*, 1998. **12**(12): p. 1812-24.
57. Wang, X.Z., H.P. Harding, Y. Zhang, E.M. Jolicoeur, M. Kuroda, and D. Ron, *Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses*. *EMBO J*, 1998. **17**(19): p. 5708-17.
58. Tsuru, A., N. Fujimoto, S. Takahashi, M. Saito, D. Nakamura, M. Iwano, T. Iwawaki, H. Kadokura, D. Ron, and K. Kohno, *Negative feedback by IRE1beta optimizes mucin production in goblet cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(8): p. 2864-9.
59. Sriburi, R., S. Jackowski, K. Mori, and J.W. Brewer, *XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum*. *J Cell Biol*, 2004. **167**(1): p. 35-41.
60. Hollien, J., J.H. Lin, H. Li, N. Stevens, P. Walter, and J.S. Weissman, *Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells*. *J Cell Biol*, 2009. **186**(3): p. 323-31.
61. Credle, J.J., J.S. Finer-Moore, F.R. Papa, R.M. Stroud, and P. Walter, *On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(52): p. 18773-84.
62. Zhou, J., C.Y. Liu, S.H. Back, R.L. Clark, D. Peisach, Z. Xu, and R.J. Kaufman, *The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(39): p. 14343-8.
63. Kimata, Y., Y. Ishiwata-Kimata, T. Ito, A. Hirata, T. Suzuki, D. Oikawa, M. Takeuchi, and K. Kohno, *Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins*. *J Cell Biol*, 2007. **179**(1): p. 75-86.
64. Gardner, B.M. and P. Walter, *Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response*. *Science*, 2011. **333**(6051): p. 1891-4.
65. Oikawa, D., Y. Kimata, and K. Kohno, *Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 9): p. 1681-8.
66. Amin-Wetzel, N., R.A. Saunders, M.J. Kamphuis, C. Rato, S. Preissler, H.P. Harding, and D. Ron, *A J-Protein Co-chaperone Recruits BiP to Monomerize IRE1 and Repress the Unfolded Protein Response*. *Cell*, 2017. **171**(7): p. 1625-1637 e13.
67. Belyy, V., N.H. Tran, and P. Walter, *Quantitative microscopy reveals dynamics and fate of clustered IRE1alpha*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. **117**(3): p. 1533-1542.
68. Li, H., A.V. Korennykh, S.L. Behrman, and P. Walter, *Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(37): p. 16113-8.

69. Lee, K.P., M. Dey, D. Neculai, C. Cao, T.E. Dever, and F. Sicheri, *Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing*. Cell, 2008. **132**(1): p. 89-100.
70. Korennykh, A.V., P.F. Egea, A.A. Korostelev, J. Finer-Moore, C. Zhang, K.M. Shokat, R.M. Stroud, and P. Walter, *The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1*. Nature, 2009. **457**(7230): p. 687-93.
71. Ali, M.M., T. Bagratuni, E.L. Davenport, P.R. Nowak, M.C. Silva-Santisteban, A. Hardcastle, C. McAndrews, M.G. Rowlands, G.J. Morgan, W. Aherne, I. Collins, F.E. Davies, and L.H. Pearl, *Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response*. EMBO J, 2011. **30**(5): p. 894-905.
72. Joshi, A., Y. Newbatt, P.C. McAndrew, M. Stubbs, R. Burke, M.W. Richards, C. Bhatia, J.J. Caldwell, T. McHardy, I. Collins, and R. Bayliss, *Molecular mechanisms of human IRE1 activation through dimerization and ligand binding*. Oncotarget, 2015. **6**(15): p. 13019-35.
73. Will, C.L. and R. Luhrmann, *Spliceosome Structure and Function*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011. **3**(7).
74. Mori, K., T. Kawahara, H. Yoshida, H. Yanagi, and T. Yura, *Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway*. Genes Cells, 1996. **1**(9): p. 803-17.
75. Bernales, S., F.R. Papa, and P. Walter, *Intracellular signaling by the unfolded protein response*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 487-508.
76. Back, S.H., K. Lee, E. Vink, and R.J. Kaufman, *Cytoplasmic IRE1alpha-mediated XBP1 mRNA splicing in the absence of nuclear processing and endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem, 2006. **281**(27): p. 18691-706.
77. Hooks, K.B. and S. Griffiths-Jones, *Conserved RNA structures in the non-canonical Hac1/Xbp1 intron*. RNA Biol, 2011. **8**(4): p. 552-6.
78. Shinya, S., H. Kadokura, Y. Imagawa, M. Inoue, K. Yanagitani, and K. Kohno, *Reconstitution and characterization of the unconventional splicing of XBP1u mRNA in vitro*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(12): p. 5245-54.
79. Baltz, A.G., M. Munschauer, B. Schwanhausser, A. Vasile, Y. Murakawa, M. Schueler, N. Youngs, D. Penfold-Brown, K. Drew, M. Milek, E. Wyler, R. Bonneau, M. Selbach, C. Dieterich, and M. Landthaler, *The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts*. Mol Cell, 2012. **46**(5): p. 674-90.
80. Poothong, J., W. Tirasophon, and R.J. Kaufman, *Functional analysis of the mammalian RNA ligase for IRE1 in the unfolded protein response*. Biosci Rep, 2017. **37**(2).
81. Stephens, S.B., R.D. Dodd, J.W. Brewer, P.J. Lager, J.D. Keene, and C.V. Nicchitta, *Stable ribosome binding to the endoplasmic reticulum enables compartment-specific regulation of mRNA translation*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(12): p. 5819-31.
82. Yanagitani, K., Y. Imagawa, T. Iwawaki, A. Hosoda, M. Saito, Y. Kimata, and K. Kohno, *Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA*. Mol Cell, 2009. **34**(2): p. 191-200.
83. Ron, D., *Targeting of mRNAs to their sites of unconventional splicing in the unfolded protein response*. Mol Cell, 2009. **34**(2): p. 133-4.
84. Chen, C.Y., N.S. Malchus, B. Hehn, W. Stelzer, D. Avci, D. Langosch, and M.K. Lemberg, *Signal peptide peptidase functions in ERAD to cleave the unfolded protein response regulator XBP1u*. EMBO J, 2014. **33**(21): p. 2492-506.
85. Yucel, S.S., W. Stelzer, A. Lorenzoni, M. Wozny, D. Langosch, and M.K. Lemberg, *The Metastable XBP1u Transmembrane Domain Defines Determinants for Intramembrane Proteolysis by Signal Peptide Peptidase*. Cell Rep, 2019. **26**(11): p. 3087-3099 e11.

86. Yanagitani, K., Y. Kimata, H. Kadokura, and K. Kohno, *Translational pausing ensures membrane targeting and cytoplasmic splicing of XBP1u mRNA*. *Science*, 2011. **331**(6017): p. 586-9.
87. Kanda, S., K. Yanagitani, Y. Yokota, Y. Esaki, and K. Kohno, *Autonomous translational pausing is required for XBP1u mRNA recruitment to the ER via the SRP pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(40): p. E5886-E5895.
88. Moore, K. and J. Hollien, *Ire1-mediated decay in mammalian cells relies on mRNA sequence, structure, and translational status*. *Mol Biol Cell*, 2015. **26**(16): p. 2873-84.
89. Kimmig, P., M. Diaz, J. Zheng, C.C. Williams, A. Lang, T. Aragon, H. Li, and P. Walter, *The unfolded protein response in fission yeast modulates stability of select mRNAs to maintain protein homeostasis*. *Elife*, 2012. **1**: p. e00048.
90. Miyazaki, T., H. Nakayama, Y. Nagayoshi, H. Kakeya, and S. Kohno, *Dissection of Ire1 functions reveals stress response mechanisms uniquely evolved in *Candida glabrata**. *PLoS Pathog*, 2013. **9**(1): p. e1003160.
91. Hur, K.Y., J.S. So, V. Ruda, M. Frank-Kamenetsky, K. Fitzgerald, V. Koteliansky, T. Iwawaki, L.H. Glimcher, and A.H. Lee, *IRE1alpha activation protects mice against acetaminophen-induced hepatotoxicity*. *J Exp Med*, 2012. **209**(2): p. 307-18.
92. So, J.S., K.Y. Hur, M. Tarrio, V. Ruda, M. Frank-Kamenetsky, K. Fitzgerald, V. Koteliansky, A.H. Lichtman, T. Iwawaki, L.H. Glimcher, and A.H. Lee, *Silencing of lipid metabolism genes through IRE1alpha-mediated mRNA decay lowers plasma lipids in mice*. *Cell Metab*, 2012. **16**(4): p. 487-99.
93. Gaddam, D., N. Stevens, and J. Hollien, *Comparison of mRNA localization and regulation during endoplasmic reticulum stress in *Drosophila* cells*. *Mol Biol Cell*, 2013. **24**(1): p. 14-20.
94. Moore, K.A., J.J. Plant, D. Gaddam, J. Craft, and J. Hollien, *Regulation of sumo mRNA during endoplasmic reticulum stress*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e75723.
95. Sato, K., M. Hamada, K. Asai, and T. Mituyama, *CENTROIDFOLD: a web server for RNA secondary structure prediction*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(Web Server issue): p. W277-80.
96. Oikawa, D., M. Tokuda, A. Hosoda, and T. Iwawaki, *Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 alpha*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(18): p. 6265-73.
97. Bright, M.D., D.N. Itzhak, C.P. Wardell, G.J. Morgan, and F.E. Davies, *Cleavage of BLOC1S1 mRNA by IRE1 Is Sequence Specific, Temporally Separate from XBP1 Splicing, and Dispensable for Cell Viability under Acute Endoplasmic Reticulum Stress*. *Mol Cell Biol*, 2015. **35**(12): p. 2186-202.
98. Walters, R. and R. Parker, *Quality control: Is there quality control of localized mRNAs?* *J Cell Biol*, 2014. **204**(6): p. 863-8.
99. Chang, T.K., D.A. Lawrence, M. Lu, J. Tan, J.M. Harnoss, S.A. Marsters, P. Liu, W. Sandoval, S.E. Martin, and A. Ashkenazi, *Coordination between Two Branches of the Unfolded Protein Response Determines Apoptotic Cell Fate*. *Mol Cell*, 2018. **71**(4): p. 629-636 e5.
100. Lin, J.H., H. Li, Y. Zhang, D. Ron, and P. Walter, *Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability*. *PLoS One*, 2009. **4**(1): p. e4170.
101. Chen, Y. and F. Brandizzi, *IRE1: ER stress sensor and cell fate executor*. *Trends Cell Biol*, 2013. **23**(11): p. 547-55.
102. Hetz, C. and L.H. Glimcher, *Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome*. *Mol Cell*, 2009. **35**(5): p. 551-61.
103. Lin, J.H., H. Li, D. Yasumura, H.R. Cohen, C. Zhang, B. Panning, K.M. Shokat, M.M. Lavail, and P. Walter, *IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response*. *Science*, 2007. **318**(5852): p. 944-9.

104. Moenner, M., O. Pluquet, M. Bouchecareilh, and E. Chevet, *Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer*. *Cancer Res*, 2007. **67**(22): p. 10631-4.
105. Sandow, J.J., L. Dorstyn, L.A. O'Reilly, M. Tailler, S. Kumar, A. Strasser, and P.G. Ekert, *ER stress does not cause upregulation and activation of caspase-2 to initiate apoptosis*. *Cell Death Differ*, 2014. **21**(3): p. 475-80.
106. Iwawaki, T., A. Hosoda, T. Okuda, Y. Kamigori, C. Nomura-Furuwatari, Y. Kimata, A. Tsuru, and K. Kohno, *Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(2): p. 158-64.
107. Safra, M., S. Ben-Hamo, C. Kenyon, and S. Henis-Korenblit, *The ire-1 ER stress-response pathway is required for normal secretory-protein metabolism in C. elegans*. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 18): p. 4136-46.
108. Sakaki, K., S. Yoshina, X. Shen, J. Han, M.R. DeSantis, M. Xiong, S. Mitani, and R.J. Kaufman, *RNA surveillance is required for endoplasmic reticulum homeostasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(21): p. 8079-84.
109. Lipson, K.L., S.G. Fonseca, S. Ishigaki, L.X. Nguyen, E. Foss, R. Bortell, A.A. Rossini, and F. Urano, *Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1*. *Cell Metab*, 2006. **4**(3): p. 245-54.
110. Tavernier, S.J., F. Osorio, L. Vandersarren, J. Vettters, N. Vanlangenakker, G. Van Isterdael, K. Vergote, R. De Rycke, E. Parthoens, L. van de Laar, T. Iwawaki, J.R. Del Valle, C.C. Hu, B.N. Lambrecht, and S. Janssens, *Regulated IRE1-dependent mRNA decay sets the threshold for dendritic cell survival*. *Nat Cell Biol*, 2017. **19**(6): p. 698-710.
111. Fink, S.L., T.R. Jayewickreme, R.D. Molony, T. Iwawaki, C.S. Landis, B.D. Lindenbach, and A. Iwasaki, *IRE1alpha promotes viral infection by conferring resistance to apoptosis*. *Sci Signal*, 2017. **10**(482).
112. Osorio, F., S.J. Tavernier, E. Hoffmann, Y. Saeys, L. Martens, J. Vettters, I. Delrue, R. De Rycke, E. Parthoens, P. Pouliot, T. Iwawaki, S. Janssens, and B.N. Lambrecht, *The unfolded-protein-response sensor IRE-1alpha regulates the function of CD8alpha+ dendritic cells*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(3): p. 248-57.
113. Dejeans, N., O. Pluquet, S. Lhomond, F. Grise, M. Bouchecareilh, A. Juin, M. Meynard-Cadars, A. Bidaud-Meynard, C. Gentil, V. Moreau, F. Saltel, and E. Chevet, *Autocrine control of glioma cells adhesion and migration through IRE1alpha-mediated cleavage of SPARC mRNA*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 18): p. 4278-87.
114. Maurel, M., N. Dejeans, S. Taouji, E. Chevet, and C.F. Grosset, *MicroRNA-1291-mediated silencing of IRE1alpha enhances Glypican-3 expression*. *RNA*, 2013. **19**(6): p. 778-88.
115. Pluquet, O., N. Dejeans, M. Bouchecareilh, S. Lhomond, R. Pineau, A. Higa, M. Delugin, C. Combe, S. Lorient, G. Cubel, N. Dugot-Senant, A. Vital, H. Loiseau, S.J. Gosline, S. Taouji, M. Hallett, J.N. Sarkaria, K. Anderson, W. Wu, F.J. Rodriguez, J. Rosenbaum, F. Saltel, M.E. Fernandez-Zapico, and E. Chevet, *Posttranscriptional regulation of PER1 underlies the oncogenic function of IRE1alpha*. *Cancer Res*, 2013. **73**(15): p. 4732-43.
116. Mendez, R., Z. Zheng, Z. Fan, S. Rajagopalan, Q. Sun, and K. Zhang, *Exposure to fine airborne particulate matter induces macrophage infiltration, unfolded protein response, and lipid deposition in white adipose tissue*. *Am J Transl Res*, 2013. **5**(2): p. 224-34.
117. Feng, B., P.M. Yao, Y. Li, C.M. Devlin, D. Zhang, H.P. Harding, M. Sweeney, J.X. Rong, G. Kuriakose, E.A. Fisher, A.R. Marks, D. Ron, and I. Tabas, *The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages*. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(9): p. 781-92.
118. Promlek, T., Y. Ishiwata-Kimata, M. Shido, M. Sakuramoto, K. Kohno, and Y. Kimata, *Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1 in different ways*. *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(18): p. 3520-32.

119. Deguil, J., L. Pineau, E.C. Rowland Snyder, S. Dupont, L. Beney, A. Gil, G. Frapper, and T. Ferreira, *Modulation of lipid-induced ER stress by fatty acid shape*. Traffic, 2011. **12**(3): p. 349-62.
120. Nilsson, I., H. Ohvo-Rekila, J.P. Slotte, A.E. Johnson, and G. von Heijne, *Inhibition of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane by sterols*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 41748-54.
121. Pineau, L., J. Colas, S. Dupont, L. Beney, P. Fleurat-Lessard, J.M. Berjeaud, T. Berges, and T. Ferreira, *Lipid-induced ER stress: synergistic effects of sterols and saturated fatty acids*. Traffic, 2009. **10**(6): p. 673-90.
122. Iurlaro, R. and C. Munoz-Pinedo, *Cell death induced by endoplasmic reticulum stress*. FEBS J, 2016. **283**(14): p. 2640-52.
123. Lee, A.H., G.C. Chu, N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher, *XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands*. EMBO J, 2005. **24**(24): p. 4368-80.
124. Reimold, A.M., A. Etkin, I. Clauss, A. Perkins, D.S. Friend, J. Zhang, H.F. Horton, A. Scott, S.H. Orkin, M.C. Byrne, M.J. Grusby, and L.H. Glimcher, *An essential role in liver development for transcription factor XBP-1*. Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 152-7.
125. Iwakoshi, N.N., M. Pypaert, and L.H. Glimcher, *The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells*. J Exp Med, 2007. **204**(10): p. 2267-75.
126. Fink, E.E., S. Moparthy, A. Bagati, A. Bianchi-Smiraglia, B.C. Lipchick, D.W. Wolff, M.V. Roll, J. Wang, S. Liu, A.V. Bakin, E.S. Kandel, A.H. Lee, and M.A. Nikiforov, *XBP1-KLF9 Axis Acts as a Molecular Rheostat to Control the Transition from Adaptive to Cytotoxic Unfolded Protein Response*. Cell Rep, 2018. **25**(1): p. 212-223 e4.
127. Yamamoto, K., H. Yoshida, K. Kokame, R.J. Kaufman, and K. Mori, *Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II*. J Biochem, 2004. **136**(3): p. 343-50.
128. Cabral, W.A., M. Ishikawa, M. Garten, E.N. Makareeva, B.M. Sargent, M. Weis, A.M. Barnes, E.A. Webb, N.J. Shaw, L. Ala-Kokko, F.L. Lacbawan, W. Hogler, S. Leikin, P.S. Blank, J. Zimmerberg, D.R. Eyre, Y. Yamada, and J.C. Marini, *Absence of the ER Cation Channel TMEM38B/TRIC-B Disrupts Intracellular Calcium Homeostasis and Dysregulates Collagen Synthesis in Recessive Osteogenesis Imperfecta*. PLoS Genet, 2016. **12**(7): p. e1006156.
129. Taylor, C.W., A.A. Genazzani, and S.A. Morris, *Expression of inositol trisphosphate receptors*. Cell Calcium, 1999. **26**(6): p. 237-51.
130. Bahar, E., H. Kim, and H. Yoon, *ER Stress-Mediated Signaling: Action Potential and Ca(2+) as Key Players*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(9).
131. Li, Y., W. Jiang, Q. Niu, Y. Sun, C. Meng, L. Tan, C. Song, X. Qiu, Y. Liao, and C. Ding, *eIF2alpha-CHOP-BCI-2/JNK and IRE1alpha-XBP1/JNK signaling promote apoptosis and inflammation and support the proliferation of Newcastle disease virus*. Cell Death Dis, 2019. **10**(12): p. 891.
132. Zeng, L., A. Zampetaki, A. Margariti, A.E. Pepe, S. Alam, D. Martin, Q. Xiao, W. Wang, Z.G. Jin, G. Cockerill, K. Mori, Y.S. Li, Y. Hu, S. Chien, and Q. Xu, *Sustained activation of XBP1 splicing leads to endothelial apoptosis and atherosclerosis development in response to disturbed flow*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(20): p. 8326-31.
133. Martinet, W., V. Croons, J.P. Timmermans, A.G. Herman, and G.R. De Meyer, *Nitric oxide selectively depletes macrophages in atherosclerotic plaques via induction of endoplasmic reticulum stress*. Br J Pharmacol, 2007. **152**(4): p. 493-500.
134. Song, Y., H. Shen, W. Du, and D.R. Goldstein, *Inhibition of x-box binding protein 1 reduces tunicamycin-induced apoptosis in aged murine macrophages*. Aging Cell, 2013. **12**(5): p. 794-801.

135. Brown, M., N. Strudwick, M. Suwara, L.K. Sutcliffe, A.D. Mihai, A.A. Ali, J.N. Watson, and M. Schroder, *An initial phase of JNK activation inhibits cell death early in the endoplasmic reticulum stress response*. J Cell Sci, 2016. **129**(12): p. 2317-2328.
136. Gu, F., D.T. Nguyen, M. Stuibler, N. Dube, M.L. Tremblay, and E. Chevet, *Protein-tyrosine phosphatase 1B potentiates IRE1 signaling during endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem, 2004. **279**(48): p. 49689-93.
137. Luo, D., Y. He, H. Zhang, L. Yu, H. Chen, Z. Xu, S. Tang, F. Urano, and W. Min, *AIP1 is critical in transducing IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress response*. J Biol Chem, 2008. **283**(18): p. 11905-12.
138. Woehlbier, U. and C. Hetz, *Modulating stress responses by the UPosome: a matter of life and death*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(6): p. 329-37.
139. Brozzi, F., S. Gerlo, F.A. Grieco, M. Juusola, A. Balhuizen, S. Lievens, C. Gysemans, M. Bugliani, C. Mathieu, P. Marchetti, J. Tavernier, and D.L. Eizirik, *Ubiquitin D Regulates IRE1alpha/c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Protein-dependent Apoptosis in Pancreatic Beta Cells*. J Biol Chem, 2016. **291**(23): p. 12040-56.
140. Arshad, M., Z. Ye, X. Gu, C.K. Wong, Y. Liu, Li, L. Zhou, Y. Zhang, W.P. Bay, V.C. Yu, and P. Li, *RNF13, a RING finger protein, mediates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through the inositol-requiring enzyme (IRE1alpha)/c-Jun NH2-terminal kinase pathway*. J Biol Chem, 2013. **288**(12): p. 8726-8736.
141. Nguyen, D.T., S. Kebache, A. Fazel, H.N. Wong, S. Jenna, A. Emadali, E.H. Lee, J.J. Bergeron, R.J. Kaufman, L. Larose, and E. Chevet, *Nck-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-1 and regulation of cell survival during endoplasmic reticulum stress*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(9): p. 4248-60.
142. Morita, S., S.A. Villalta, H.C. Feldman, A.C. Register, W. Rosenthal, I.T. Hoffmann-Petersen, M. Mehdizadeh, R. Ghosh, L. Wang, K. Colon-Negron, R. Meza-Acevedo, B.J. Backes, D.J. Maly, J.A. Bluestone, and F.R. Papa, *Targeting ABL-IRE1alpha Signaling Spares ER-Stressed Pancreatic beta Cells to Reverse Autoimmune Diabetes*. Cell Metab, 2017. **25**(5): p. 1207.
143. Rodriguez, D.A., S. Zamorano, F. Lisbona, D. Rojas-Rivera, H. Urra, J.R. Cubillos-Ruiz, R. Armisen, D.R. Henriquez, E.H. Cheng, M. Letek, T. Vaisar, T. Irrazabal, C. Gonzalez-Billault, A. Letai, F.X. Pimentel-Muinos, G. Kroemer, and C. Hetz, *BH3-only proteins are part of a regulatory network that control the sustained signalling of the unfolded protein response sensor IRE1alpha*. EMBO J, 2012. **31**(10): p. 2322-35.
144. Hetz, C., P. Bernasconi, J. Fisher, A.H. Lee, M.C. Bassik, B. Antonsson, G.S. Brandt, N.N. Iwakoshi, A. Schinzel, L.H. Glimcher, and S.J. Korsmeyer, *Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha*. Science, 2006. **312**(5773): p. 572-6.
145. Pinkaew, D., A. Chattopadhyay, M.D. King, P. Chunchacha, Z. Liu, H.L. Stevenson, Y. Chen, P. Sinthujaroen, O.M. McDougal, and K. Fujise, *Fortilin binds IRE1alpha and prevents ER stress from signaling apoptotic cell death*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 18.
146. Shin, G.C., S.U. Moon, H.S. Kang, H.S. Choi, H.D. Han, and K.H. Kim, *PRKCSH contributes to tumorigenesis by selective boosting of IRE1 signaling pathway*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 3185.
147. Gupta, S., A. Deepti, S. Deegan, F. Lisbona, C. Hetz, and A. Samali, *HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1alpha-XBP1 signaling through a physical interaction*. PLoS Biol, 2010. **8**(7): p. e1000410.
148. Marcu, M.G., M. Doyle, A. Bertolotti, D. Ron, L. Hendershot, and L. Neckers, *Heat shock protein 90 modulates the unfolded protein response by stabilizing IRE1alpha*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(24): p. 8506-13.

149. He, Y., A. Beatty, X. Han, Y. Ji, X. Ma, R.S. Adelstein, J.R. Yates, 3rd, K. Kempfues, and L. Qi, *Nonmuscle myosin IIB links cytoskeleton to IRE1alpha signaling during ER stress*. Dev Cell, 2012. **23**(6): p. 1141-52.
150. Sepulveda, D., D. Rojas-Rivera, D.A. Rodriguez, J. Groenendyk, A. Kohler, C. Lebeaupin, S. Ito, H. Urra, A. Carreras-Sureda, Y. Hazari, M. Vasseur-Cognet, M.M.U. Ali, E. Chevet, G. Campos, P. Godoy, T. Vaisar, B. Bailly-Maitre, K. Nagata, M. Michalak, J. Sierralta, and C. Hetz, *Interactome Screening Identifies the ER Luminal Chaperone Hsp47 as a Regulator of the Unfolded Protein Response Transducer IRE1alpha*. Mol Cell, 2018. **69**(2): p. 238-252 e7.
151. Mao, T., M. Shao, Y. Qiu, J. Huang, Y. Zhang, B. Song, Q. Wang, L. Jiang, Y. Liu, J.D. Han, P. Cao, J. Li, X. Gao, L. Rui, L. Qi, W. Li, and Y. Liu, *PKA phosphorylation couples hepatic inositol-requiring enzyme 1alpha to glucagon signaling in glucose metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(38): p. 15852-7.
152. Qiu, Y., T. Mao, Y. Zhang, M. Shao, J. You, Q. Ding, Y. Chen, D. Wu, D. Xie, X. Lin, X. Gao, R.J. Kaufman, W. Li, and Y. Liu, *A crucial role for RACK1 in the regulation of glucose-stimulated IRE1alpha activation in pancreatic beta cells*. Sci Signal, 2010. **3**(106): p. ra7.
153. Jwa, M. and P. Chang, *PARP16 is a tail-anchored endoplasmic reticulum protein required for the PERK- and IRE1alpha-mediated unfolded protein response*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(11): p. 1223-30.
154. Zhu, X., J. Zhang, H. Sun, C. Jiang, Y. Dong, Q. Shan, S. Su, Y. Xie, N. Xu, X. Lou, and S. Liu, *Ubiquitination of inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) by the E3 ligase CHIP mediates the IRE1/TRAF2/JNK pathway*. J Biol Chem, 2014. **289**(44): p. 30567-30577.
155. WHO, *WHO -World Health Organization*. 2018.
156. McGuire, S., *World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015*. Adv Nutr, 2016. **7**(2): p. 418-9.
157. Nabavi, S., *Identifying candidate drivers of drug response in heterogeneous cancer by mining high throughput genomics data*. BMC Genomics, 2016. **17**(1): p. 638.
158. Gil, J., I. Laczmanska, K.A. Pesz, and M.M. Sasiadek, *Personalized medicine in oncology. New perspectives in management of gliomas*. Contemp Oncol (Pozn), 2018. **22**(1A): p. 1-2.
159. Maciejko, L., M. Smalley, and A. Goldman, *Cancer Immunotherapy and Personalized Medicine: Emerging Technologies and Biomarker-Based Approaches*. J Mol Biomark Diagn, 2017. **8**(5).
160. Verma, M., *Personalized medicine and cancer*. J Pers Med, 2012. **2**(1): p. 1-14.
161. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
162. Ma, Y. and L.M. Hendershot, *The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe?* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(12): p. 966-77.
163. Ruggero, D., *Translational control in cancer etiology*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(2).
164. Dejeans, N., S. Manie, C. Hetz, F. Bard, T. Hupp, P. Agostinis, A. Samali, and E. Chevet, *Addicted to secrete - novel concepts and targets in cancer therapy*. Trends Mol Med, 2014. **20**(5): p. 242-50.
165. Dejeans, N., K. Barroso, M.E. Fernandez-Zapico, A. Samali, and E. Chevet, *Novel roles of the unfolded protein response in the control of tumor development and aggressiveness*. Semin Cancer Biol, 2015. **33**: p. 67-73.
166. Zhao, N., J. Cao, L. Xu, Q. Tang, L.E. Dobrolecki, X. Lv, M. Talukdar, Y. Lu, X. Wang, D.Z. Hu, Q. Shi, Y. Xiang, Y. Wang, X. Liu, W. Bu, Y. Jiang, M. Li, Y. Gong, Z. Sun, H. Ying, B. Yuan, X. Lin, X.H. Feng, S.M. Hartig, F. Li, H. Shen, Y. Chen, L. Han, Q. Zeng, J.B. Patterson, B.A. Kaipparettu, N. Putluri, F. Sicheri, J.M. Rosen, M.T. Lewis, and X. Chen,

- Pharmacological targeting of MYC-regulated IRE1/XBP1 pathway suppresses MYC-driven breast cancer.* J Clin Invest, 2018. **128**(4): p. 1283-1299.
167. Sun, H., D.C. Lin, X. Guo, B. Kharabi Masouleh, S. Gery, Q. Cao, S. Alkan, T. Ikezoe, C. Akiba, R. Paquette, W. Chien, C. Muller-Tidow, Y. Jing, K. Agelopoulos, M. Muschen, and H.P. Koeffler, *Inhibition of IRE1alpha-driven pro-survival pathways is a promising therapeutic application in acute myeloid leukemia.* Oncotarget, 2016. **7**(14): p. 18736-49.
 168. Shi, W., Z. Chen, L. Li, H. Liu, R. Zhang, Q. Cheng, D. Xu, and L. Wu, *Unravel the molecular mechanism of XBP1 in regulating the biology of cancer cells.* J Cancer, 2019. **10**(9): p. 2035-2046.
 169. Leary, M., S. Heerboth, K. Lapinska, and S. Sarkar, *Sensitization of Drug Resistant Cancer Cells: A Matter of Combination Therapy.* Cancers (Basel), 2018. **10**(12).
 170. Amawi, H., N.A. Hussein, C.R. Ashby, Jr., R. Alnafisah, L.M. Sanglard, E. Manivannan, C. Karthikeyan, P. Trivedi, K.M. Eisenmann, R.W. Robey, and A.K. Tiwari, *Bax/Tubulin/Epithelial-Mesenchymal Pathways Determine the Efficacy of Silybin Analog HM015k in Colorectal Cancer Cell Growth and Metastasis.* Front Pharmacol, 2018. **9**: p. 520.
 171. Clarke, H.J., J.E. Chambers, E. Liniker, and S.J. Marciniak, *Endoplasmic reticulum stress in malignancy.* Cancer Cell, 2014. **25**(5): p. 563-73.
 172. Bi, M., C. Naczki, M. Koritzinsky, D. Fels, J. Blais, N. Hu, H. Harding, I. Novoa, M. Varia, J. Raleigh, D. Scheuner, R.J. Kaufman, J. Bell, D. Ron, B.G. Wouters, and C. Koumenis, *ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth.* EMBO J, 2005. **24**(19): p. 3470-81.
 173. Avril, T., E. Vauleon, and E. Chevet, *Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers.* Oncogenesis, 2017. **6**(8): p. e373.
 174. Lee, A.S., *Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential.* Nat Rev Cancer, 2014. **14**(4): p. 263-76.
 175. Lee, A.S., *GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications.* Cancer Res, 2007. **67**(8): p. 3496-9.
 176. Chevet, E., C. Hetz, and A. Samali, *Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis.* Cancer Discov, 2015. **5**(6): p. 586-97.
 177. Sheng, X., H.Z. Nenseth, S. Qu, O.F. Kuzu, T. Frahnnow, L. Simon, S. Greene, Q. Zeng, L. Fazli, P.S. Rennie, I.G. Mills, H. Danielsen, F. Theis, J.B. Patterson, Y. Jin, and F. Saatcioglu, *IRE1alpha-XBP1s pathway promotes prostate cancer by activating c-MYC signaling.* Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 323.
 178. Logue, S.E., E.P. McGrath, P. Cleary, S. Greene, K. Mnich, A. Almanza, E. Chevet, R.M. Dwyer, A. Oommen, P. Legembre, F. Godey, E.C. Madden, B. Leuzzi, J. Obacz, Q. Zeng, J.B. Patterson, R. Jager, A.M. Gorman, and A. Samali, *Inhibition of IRE1 RNase activity modulates the tumor cell secretome and enhances response to chemotherapy.* Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 3267.
 179. Lhomond, S., T. Avril, N. Dejeans, K. Voutetakis, D. Doultinos, M. McMahon, R. Pineau, J. Obacz, O. Papadodima, F. Jouan, H. Bourien, M. Logotheti, G. Jegou, N. Pallares-Lupon, K. Schmit, P.J. Le Reste, A. Etcheverry, J. Mosser, K. Barroso, E. Vauleon, M. Maurel, A. Samali, J.B. Patterson, O. Pluquet, C. Hetz, V. Quillien, A. Chatziioannou, and E. Chevet, *Dual IRE1 RNase functions dictate glioblastoma development.* EMBO Mol Med, 2018. **10**(3).
 180. Storm, M., X. Sheng, Y.J. Arnoldussen, and F. Saatcioglu, *Prostate cancer and the unfolded protein response.* Oncotarget, 2016. **7**(33): p. 54051-54066.
 181. Greenman, C., P. Stephens, R. Smith, G.L. Dalglish, C. Hunter, G. Bignell, H. Davies, J. Teague, A. Butler, C. Stevens, S. Edkins, S. O'Meara, I. Vastrik, E.E. Schmidt, T. Avis, S. Barthorpe, G. Bhamra, G. Buck, B. Choudhury, J. Clements, J. Cole, E. Dicks, S. Forbes,

- K. Gray, K. Halliday, R. Harrison, K. Hills, J. Hinton, A. Jenkinson, D. Jones, A. Menzies, T. Mironenko, J. Perry, K. Raine, D. Richardson, R. Shepherd, A. Small, C. Tofts, J. Varian, T. Webb, S. West, S. Widaa, A. Yates, D.P. Cahill, D.N. Louis, P. Goldstraw, A.G. Nicholson, F. Brasseur, L. Looijenga, B.L. Weber, Y.E. Chiew, A. DeFazio, M.F. Greaves, A.R. Green, P. Campbell, E. Birney, D.F. Easton, G. Chenevix-Trench, M.H. Tan, S.K. Khoo, B.T. Teh, S.T. Yuen, S.Y. Leung, R. Wooster, P.A. Futreal, and M.R. Stratton, *Patterns of somatic mutation in human cancer genomes*. *Nature*, 2007. **446**(7132): p. 153-8.
182. Xue, Z., Y. He, K. Ye, Z. Gu, Y. Mao, and L. Qi, *A conserved structural determinant located at the interdomain region of mammalian inositol-requiring enzyme 1alpha*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(35): p. 30859-30866.
183. Sustic, T., S. van Wageningen, E. Bosdriesz, R.J.D. Reid, J. Dittmar, C. Liefink, R.L. Beijersbergen, L.F.A. Wessels, R. Rothstein, and R. Bernards, *A role for the unfolded protein response stress sensor ERN1 in regulating the response to MEK inhibitors in KRAS mutant colon cancers*. *Genome Med*, 2018. **10**(1): p. 90.
184. Raymundo, D.P., D. Doultinos, X. Guillory, A. Carlesso, L.A. Eriksson, and E. Chevet, *Pharmacological Targeting of IRE1 in Cancer*. *Trends Cancer*, 2020. **6**(12): p. 1018-1030.
185. Rajapaksa, G., F. Nikolos, I. Bado, R. Clarke, J.A. Gustafsson, and C. Thomas, *ERbeta decreases breast cancer cell survival by regulating the IRE1/XBP-1 pathway*. *Oncogene*, 2015. **34**(31): p. 4130-41.
186. Jiang, D., M. Niwa, and A.C. Koong, *Targeting the IRE1alpha-XBP1 branch of the unfolded protein response in human diseases*. *Semin Cancer Biol*, 2015. **33**: p. 48-56.
187. Dufey, E., H. Urra, and C. Hetz, *ER proteostasis addiction in cancer biology: Novel concepts*. *Semin Cancer Biol*, 2015. **33**: p. 40-7.
188. Dufey, E., D. Sepulveda, D. Rojas-Rivera, and C. Hetz, *Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014. **307**(7): p. C582-94.
189. Hetz, C., E. Chevet, and H.P. Harding, *Targeting the unfolded protein response in disease*. *Nat Rev Drug Discov*, 2013. **12**(9): p. 703-19.
190. Croft, A., K.H. Tay, S.C. Boyd, S.T. Guo, C.C. Jiang, F. Lai, H.Y. Tseng, L. Jin, H. Rizos, P. Hersey, and X.D. Zhang, *Oncogenic activation of MEK/ERK primes melanoma cells for adaptation to endoplasmic reticulum stress*. *J Invest Dermatol*, 2014. **134**(2): p. 488-497.
191. Hart, L.S., J.T. Cunningham, T. Datta, S. Dey, F. Tameire, S.L. Lehman, B. Qiu, H. Zhang, G. Cerniglia, M. Bi, Y. Li, Y. Gao, H. Liu, C. Li, A. Maity, A. Thomas-Tikhonenko, A.E. Perl, A. Koong, S.Y. Fuchs, J.A. Diehl, I.G. Mills, D. Ruggero, and C. Koumenis, *ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(12): p. 4621-34.
192. Blazanin, N., J. Son, A.B. Craig-Lucas, C.L. John, K.J. Breech, M.A. Podolsky, and A.B. Glick, *ER stress and distinct outputs of the IRE1alpha RNase control proliferation and senescence in response to oncogenic Ras*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(37): p. 9900-9905.
193. Namba, T., K. Chu, R. Kodama, S. Byun, K.W. Yoon, M. Hiraki, A. Mandinova, and S.W. Lee, *Loss of p53 enhances the function of the endoplasmic reticulum through activation of the IRE1alpha/XBP1 pathway*. *Oncotarget*, 2015. **6**(24): p. 19990-20001.
194. Denoyelle, C., G. Abou-Rjaily, V. Bezrookove, M. Verhaegen, T.M. Johnson, D.R. Fullen, J.N. Pointer, S.B. Gruber, L.D. Su, M.A. Nikiforov, R.J. Kaufman, B.C. Bastian, and M.S. Soengas, *Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(10): p. 1053-63.

195. Li, X.X., H.S. Zhang, Y.M. Xu, R.J. Zhang, Y. Chen, L. Fan, Y.Q. Qin, Y. Liu, M. Li, and J. Fang, *Knockdown of IRE1 α inhibits colonic tumorigenesis through decreasing β -catenin and IRE1 α targeting suppresses colon cancer cells*. *Oncogene*, 2017. **36**: p. 6738.
196. Thorpe, J.A. and S.R. Schwarze, *IRE1 α controls cyclin A1 expression and promotes cell proliferation through XBP-1*. *Cell Stress Chaperones*, 2010. **15**(5): p. 497-508.
197. Bobrovnikova-Marjon, E., C. Grigoriadou, D. Pytel, F. Zhang, J. Ye, C. Koumenis, D. Cavener, and J.A. Diehl, *PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage*. *Oncogene*, 2010. **29**(27): p. 3881-95.
198. Romero-Ramirez, L., H. Cao, D. Nelson, E. Hammond, A.H. Lee, H. Yoshida, K. Mori, L.H. Glimcher, N.C. Denko, A.J. Giaccia, Q.T. Le, and A.C. Koong, *XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth*. *Cancer Res*, 2004. **64**(17): p. 5943-7.
199. Chen, X., D. Iliopoulos, Q. Zhang, Q. Tang, M.B. Greenblatt, M. Hatzia Apostolou, E. Lim, W.L. Tam, M. Ni, Y. Chen, J. Mai, H. Shen, D.Z. Hu, S. Adoro, B. Hu, M. Song, C. Tan, M.D. Landis, M. Ferrari, S.J. Shin, M. Brown, J.C. Chang, X.S. Liu, and L.H. Glimcher, *XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway*. *Nature*, 2014. **508**(7494): p. 103-107.
200. Hanover, J.A., M.W. Krause, and D.C. Love, *The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1800**(2): p. 80-95.
201. Slawson, C. and G.W. Hart, *O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology*. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(9): p. 678-84.
202. Ferrer, C.M., T.P. Lynch, V.L. Sodi, J.N. Falcone, L.P. Schwab, D.L. Peacock, D.J. Vocadlo, T.N. Seagroves, and M.J. Reginato, *O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway*. *Mol Cell*, 2014. **54**(5): p. 820-31.
203. Chaveroux, C., C. Sarcinelli, V. Barbet, S. Belfeki, A. Barthelaix, C. Ferraro-Peyret, S. Lebecque, T. Renno, A. Bruhat, P. Fafournoux, and S.N. Manie, *Nutrient shortage triggers the hexosamine biosynthetic pathway via the GCN2-ATF4 signalling pathway*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 27278.
204. Wang, Z.V., Y. Deng, N. Gao, Z. Pedrozo, D.L. Li, C.R. Morales, A. Criollo, X. Luo, W. Tan, N. Jiang, M.A. Lehrman, B.A. Rothermel, A.H. Lee, S. Lavandero, P.P.A. Mammen, A. Ferdous, T.G. Gillette, P.E. Scherer, and J.A. Hill, *Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway*. *Cell*, 2014. **156**(6): p. 1179-1192.
205. Balkwill, F., K.A. Charles, and A. Mantovani, *Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease*. *Cancer Cell*, 2005. **7**(3): p. 211-7.
206. Pollard, J.W., *Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(1): p. 71-8.
207. Mahadevan, N.R., V. Anufreichik, J.J. Rodvold, K.T. Chiu, H. Sepulveda, and M. Zanetti, *Cell-extrinsic effects of tumor ER stress imprint myeloid dendritic cells and impair CD8(+) T cell priming*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e51845.
208. Cubillos-Ruiz, J.R., P.C. Silberman, M.R. Rutkowski, S. Chopra, A. Perales-Puchalt, M. Song, S. Zhang, S.E. Bettigole, D. Gupta, K. Holcomb, L.H. Ellenson, T. Caputo, A.H. Lee, J.R. Conejo-Garcia, and L.H. Glimcher, *ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis*. *Cell*, 2015. **161**(7): p. 1527-38.
209. Cullen, S.J., S. Fatemie, and W. Ladiges, *Breast tumor cells primed by endoplasmic reticulum stress remodel macrophage phenotype*. *Am J Cancer Res*, 2013. **3**(2): p. 196-210.
210. Mahadevan, N.R., J. Rodvold, H. Sepulveda, S. Rossi, A.F. Drew, and M. Zanetti, *Transmission of endoplasmic reticulum stress and pro-inflammation from tumor cells to myeloid cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(16): p. 6561-6.

211. de Almeida, S.F., J.V. Fleming, J.E. Azevedo, M. Carmo-Fonseca, and M. de Sousa, *Stimulation of an unfolded protein response impairs MHC class I expression*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3612-9.
212. Fang, L., J. Gong, Y. Wang, R. Liu, Z. Li, Z. Wang, Y. Zhang, C. Zhang, C. Song, A. Yang, J.P. Ting, B. Jin, and L. Chen, *MICA/B expression is inhibited by unfolded protein response and associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma*. J Exp Clin Cancer Res, 2014. **33**: p. 76.
213. Granados, D.P., P.L. Tanguay, M.P. Hardy, E. Caron, D. de Verteuil, S. Meloche, and C. Perreault, *ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides*. BMC Immunol, 2009. **10**: p. 10.
214. Yancopoulos, G.D., S. Davis, N.W. Gale, J.S. Rudge, S.J. Wiegand, and J. Holash, *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 242-8.
215. Ghosh, R., K.L. Lipson, K.E. Sargent, A.M. Mercurio, J.S. Hunt, D. Ron, and F. Urano, *Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9575.
216. Wang, Y., G.N. Alam, Y. Ning, F. Visioli, Z. Dong, J.E. Nor, and P.J. Polverini, *The unfolded protein response induces the angiogenic switch in human tumor cells through the PERK/ATF4 pathway*. Cancer Res, 2012. **72**(20): p. 5396-406.
217. Drogat, B., P. Auguste, D.T. Nguyen, M. Bouche-careilh, R. Pineau, J. Nalbantoglu, R.J. Kaufman, E. Chevet, A. Bikfalvi, and M. Moenner, *IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo*. Cancer Res, 2007. **67**(14): p. 6700-7.
218. Auf, G., A. Jabouille, S. Guerit, R. Pineau, M. Delugin, M. Bouche-careilh, N. Magnin, A. Favereaux, M. Maitre, T. Gaiser, A. von Deimling, M. Czabanka, P. Vajkoczy, E. Chevet, A. Bikfalvi, and M. Moenner, *Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(35): p. 15553-8.
219. Thiery, J.P., H. Acloque, R.Y. Huang, and M.A. Nieto, *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
220. Puisieux, A., T. Brabletz, and J. Caramel, *Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(6): p. 488-94.
221. Lawson, W.E., P.F. Crossno, V.V. Polosukhin, J. Roldan, D.S. Cheng, K.B. Lane, T.R. Blackwell, C. Xu, C. Markin, L.B. Ware, G.G. Miller, J.E. Loyd, and T.S. Blackwell, *Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **294**(6): p. L1119-26.
222. Pallet, N., *New insights on stress-induced epithelial phenotypic changes*. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(2): p. 483-5.
223. Tanjore, H., D.S. Cheng, A.L. Degryse, D.F. Zoz, R. Abdolrasulnia, W.E. Lawson, and T.S. Blackwell, *Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem, 2015. **290**(6): p. 3277.
224. Zhong, Q., B. Zhou, D.K. Ann, P. Minoo, Y. Liu, A. Banfalvi, M.S. Krishnaveni, M. Dubourd, L. Demaio, B.C. Willis, K.J. Kim, R.M. duBois, E.D. Crandall, M.F. Beers, and Z. Borok, *Role of endoplasmic reticulum stress in epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells: effects of misfolded surfactant protein*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(3): p. 498-509.
225. Cuevas, E.P., P. Eraso, M.J. Mazon, V. Santos, G. Moreno-Bueno, A. Cano, and F. Portillo, *LOXL2 drives epithelial-mesenchymal transition via activation of IRE1-XBP1 signalling pathway*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 44988.

226. Feng, Y.X., E.S. Sokol, C.A. Del Vecchio, S. Sanduja, J.H. Claessen, T.A. Proia, D.X. Jin, F. Reinhardt, H.L. Ploegh, Q. Wang, and P.B. Gupta, *Epithelial-to-mesenchymal transition activates PERK-eIF2alpha and sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(6): p. 702-15.
227. Li, H., X. Chen, Y. Gao, J. Wu, F. Zeng, and F. Song, *XBP1 induces snail expression to promote epithelial- to-mesenchymal transition and invasion of breast cancer cells*. *Cell Signal*, 2015. **27**(1): p. 82-9.
228. Peinado, H., M. Del Carmen Iglesias-de la Cruz, D. Olmeda, K. Csiszar, K.S. Fong, S. Vega, M.A. Nieto, A. Cano, and F. Portillo, *A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression*. *EMBO J*, 2005. **24**(19): p. 3446-58.
229. Schafer, Z.T., A.R. Grassian, L. Song, Z. Jiang, Z. Gerhart-Hines, H.Y. Irie, S. Gao, P. Puigserver, and J.S. Brugge, *Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment*. *Nature*, 2009. **461**(7260): p. 109-13.
230. Holohan, C., S. Van Schaeybroeck, D.B. Longley, and P.G. Johnston, *Cancer drug resistance: an evolving paradigm*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(10): p. 714-26.
231. Dagogo-Jack, I. and A.T. Shaw, *Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018. **15**(2): p. 81-94.
232. Abdullah, L.N. and E.K. Chow, *Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells*. *Clin Transl Med*, 2013. **2**(1): p. 3.
233. Generali, D., A. Berruti, M.P. Brizzi, L. Campo, S. Bonardi, S. Wigfield, A. Bersiga, G. Allevi, M. Milani, S. Aguggini, V. Gandolfi, L. Dogliotti, A. Bottini, A.L. Harris, and S.B. Fox, *Hypoxia-inducible factor-1alpha expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(15): p. 4562-8.
234. Chen, D., M. Rauh, M. Buchfelder, I.Y. Eyupoglu, and N. Savaskan, *The oxido-metabolic driver ATF4 enhances temozolamide chemo-resistance in human gliomas*. *Oncotarget*, 2017. **8**(31): p. 51164-51176.
235. Kim, J.K., K.A. Kang, M.J. Piao, Y.S. Ryu, X. Han, P.M. Fernando, M.C. Oh, J.E. Park, K. Shilnikova, S.J. Boo, S.Y. Na, Y.J. Jeong, S.U. Jeong, and J.W. Hyun, *Endoplasmic reticulum stress induces 5-fluorouracil resistance in human colon cancer cells*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016. **44**: p. 128-33.
236. Wang, J., Y. Yin, H. Hua, M. Li, T. Luo, L. Xu, R. Wang, D. Liu, Y. Zhang, and Y. Jiang, *Blockade of GRP78 sensitizes breast cancer cells to microtubules-interfering agents that induce the unfolded protein response*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(9B): p. 3888-97.
237. Fujimoto, A., K. Kawana, A. Taguchi, K. Adachi, M. Sato, H. Nakamura, J. Ogishima, M. Yoshida, T. Inoue, H. Nishida, K. Tomio, A. Yamashita, Y. Matsumoto, T. Arimoto, O. Wada-Hiraike, K. Oda, T. Nagamatsu, Y. Osuga, and T. Fujii, *Inhibition of endoplasmic reticulum (ER) stress sensors sensitizes cancer stem-like cells to ER stress-mediated apoptosis*. *Oncotarget*, 2016. **7**(32): p. 51854-51864.
238. Ostrom, Q.T., L. Bauchet, F.G. Davis, I. Deltour, J.L. Fisher, C.E. Langer, M. Pekmezci, J.A. Schwartzbaum, M.C. Turner, K.M. Walsh, M.R. Wrensch, and J.S. Barnholtz-Sloan, *The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review*. *Neuro Oncol*, 2014. **16**(7): p. 896-913.
239. Anton, K., J.M. Baehring, and T. Mayer, *Glioblastoma multiforme: overview of current treatment and future perspectives*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2012. **26**(4): p. 825-53.
240. Bush, N.A., S.M. Chang, and M.S. Berger, *Current and future strategies for treatment of glioma*. *Neurosurg Rev*, 2017. **40**(1): p. 1-14.
241. Stupp, R., W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, R.O. Mirimanoff, R.

- European Organisation for, T. Treatment of Cancer Brain, G. Radiotherapy, and G. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
242. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061-8.
243. Verhaak, R.G., K.A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M.D. Wilkerson, C.R. Miller, L. Ding, T. Golub, J.P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O'Kelly, P. Tamayo, B.A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, L. Jakkula, H.S. Feiler, J.G. Hodgson, C.D. James, J.N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P.T. Spellman, R.K. Wilson, T.P. Speed, J.W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C.M. Perou, D.N. Hayes, and N. Cancer Genome Atlas Research, *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 98-110.
244. Weller, M., M. van den Bent, K. Hopkins, J.C. Tonn, R. Stupp, A. Falini, E. Cohen-Jonathan-Moyal, D. Frappaz, R. Henriksson, C. Balana, O. Chinot, Z. Ram, G. Reifenberger, R. Soffiatti, W. Wick, and G. European Association for Neuro-Oncology Task Force on Malignant, *EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma*. Lancet Oncol, 2014. **15**(9): p. e395-403.
245. Wang, S. and R.J. Kaufman, *The impact of the unfolded protein response on human disease*. J Cell Biol, 2012. **197**(7): p. 857-67.
246. Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P.L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schuler, N.M. Probst-Hensch, P.C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M.G. Yasargil, U.M. Lutolf, and P. Kleihues, *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6892-9.
247. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas*. Cancer Sci, 2009. **100**(12): p. 2235-41.
248. Berens, M.E. and A. Giese, *"...those left behind." Biology and oncology of invasive glioma cells*. Neoplasia, 1999. **1**(3): p. 208-19.
249. Goldbrunner, R.H., J.J. Bernstein, and J.C. Tonn, *ECM-mediated glioma cell invasion*. Microsc Res Tech, 1998. **43**(3): p. 250-7.
250. Chakravarti, A., A. Dicker, and M. Mehta, *The contribution of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway to radioresistance in human gliomas: a review of preclinical and correlative clinical data*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **58**(3): p. 927-31.
251. Obacz, J., T. Avril, P.J. Le Reste, H. Urra, V. Quillien, C. Hetz, and E. Chevet, *Endoplasmic reticulum proteostasis in glioblastoma-From molecular mechanisms to therapeutic perspectives*. Sci Signal, 2017. **10**(470).
252. Madden, E., S.E. Logue, S.J. Healy, S. Manie, and A. Samali, *The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance*. Biol Cell, 2019. **111**(1): p. 1-17.
253. Olivier, C., L. Oliver, L. Lalier, and F.M. Vallette, *Drug Resistance in Glioblastoma: The Two Faces of Oxidative Stress*. Front Mol Biosci, 2020. **7**: p. 620677.
254. Moore, K.A. and J. Hollien, *The unfolded protein response in secretory cell function*. Annu Rev Genet, 2012. **46**: p. 165-83.
255. Ward, C., S.P. Langdon, P. Mullen, A.L. Harris, D.J. Harrison, C.T. Supuran, and I.H. Kunkler, *New strategies for targeting the hypoxic tumour microenvironment in breast cancer*. Cancer Treat Rev, 2013. **39**(2): p. 171-9.
256. Epple, L.M., R.D. Dodd, A.L. Merz, A.M. Dechkovskaia, M. Herring, B.A. Winston, A.M. Lencioni, R.L. Russell, H. Madsen, M. Nega, N.L. Dusto, J. White, D.D. Bigner, C.V. Nicchitta, N.J. Serkova, and M.W. Graner, *Induction of the unfolded protein response*

- drives enhanced metabolism and chemoresistance in glioma cells.* PLoS One, 2013. **8**(8): p. e73267.
257. Jabouille, A., M. Delugin, R. Pineau, A. Dubrac, F. Soulet, S. Lhomond, N. Pallares-Lupon, H. Prats, A. Bikfalvi, E. Chevet, C. Touriol, and M. Moenner, *Glioblastoma invasion and cooption depend on IRE1alpha endoribonuclease activity.* Oncotarget, 2015. **6**(28): p. 24922-34.
 258. Noack, J., J. Choi, K. Richter, A. Kopp-Schneider, and A. Regnier-Vigouroux, *A sphingosine kinase inhibitor combined with temozolomide induces glioblastoma cell death through accumulation of dihydrosphingosine and dihydroceramide, endoplasmic reticulum stress and autophagy.* Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1425.
 259. Lathia, J.D., S.C. Mack, E.E. Mulkearns-Hubert, C.L. Valentim, and J.N. Rich, *Cancer stem cells in glioblastoma.* Genes Dev, 2015. **29**(12): p. 1203-17.
 260. Singh, S.K., C. Hawkins, I.D. Clarke, J.A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R.M. Henkelman, M.D. Cusimano, and P.B. Dirks, *Identification of human brain tumour initiating cells.* Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
 261. Yang, Y., H.H. Cheung, J. Tu, K.K. Miu, and W.Y. Chan, *New insights into the unfolded protein response in stem cells.* Oncotarget, 2016. **7**(33): p. 54010-54027.
 262. Maurel, M., E.P. McGrath, K. Mnich, S. Healy, E. Chevet, and A. Samali, *Controlling the unfolded protein response-mediated life and death decisions in cancer.* Semin Cancer Biol, 2015. **33**: p. 57-66.
 263. Penaranda-Fajardo, N.M., C. Meijer, Y. Liang, B.M. Dijkstra, R. Aguirre-Gamboa, W.F.A. den Dunnen, and F.A.E. Kruyt, *ER stress and UPR activation in glioblastoma: identification of a noncanonical PERK mechanism regulating GBM stem cells through SOX2 modulation.* Cell Death Dis, 2019. **10**(10): p. 690.
 264. Schonthal, A.H., *Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress signaling in cancer.* Biochem Pharmacol, 2013. **85**(5): p. 653-666.
 265. Cieslik, M. and A.M. Chinnaiyan, *Cancer transcriptome profiling at the juncture of clinical translation.* Nat Rev Genet, 2018. **19**(2): p. 93-109.
 266. Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder, *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.* Nat Rev Genet, 2009. **10**(1): p. 57-63.
 267. Staal, F.J., M. van der Burg, L.F. Wessels, B.H. Barendregt, M.R. Baert, C.M. van den Burg, C. van Huffel, A.W. Langerak, V.H. van der Velden, M.J. Reinders, and J.J. van Dongen, *DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor-B acute lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers.* Leukemia, 2003. **17**(7): p. 1324-32.
 268. Avril, T., S. Saikali, E. Vauleon, A. Jary, A. Hamlat, M. De Tayrac, J. Mosser, and V. Quillien, *Distinct effects of human glioblastoma immunoregulatory molecules programmed cell death ligand-1 (PDL-1) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) on tumour-specific T cell functions.* J Neuroimmunol, 2010. **225**(1-2): p. 22-33.
 269. Avril, T., E. Vauleon, A. Hamlat, S. Saikali, A. Etcheverry, C. Delmas, S. Diabira, J. Mosser, and V. Quillien, *Human glioblastoma stem-like cells are more sensitive to allogeneic NK and T cell-mediated killing compared with serum-cultured glioblastoma cells.* Brain Pathol, 2012. **22**(2): p. 159-74.
 270. Avril, T., A. Etcheverry, R. Pineau, J. Obacz, G. Jegou, F. Jouan, P.J. Le Reste, M. Hatami, R.R. Colen, B.L. Carlson, P.A. Decker, J.N. Sarkaria, E. Vauleon, D.C. Chiforeanu, A. Clavreul, J. Mosser, E. Chevet, and V. Quillien, *CD90 Expression Controls Migration and Predicts Dasatinib Response in Glioblastoma.* Clin Cancer Res, 2017. **23**(23): p. 7360-7374.
 271. Le Reste, P.J., R. Pineau, K. Voutetakis, J. Samal, G. Jegou, S. Lhomond, A.M. Gorman, A. Samali, J.B. Patterson, Q. Zeng, A. Pandit, M. Aubry, N. Soriano, A. Etcheverry, A.

- Chatziioannou, J. Mosser, T. Avril, and E. Chevet, *Local intracerebral inhibition of IRE1 by MKC8866 sensitizes glioblastoma to irradiation/chemotherapy in vivo*. *Cancer Lett*, 2020. **494**: p. 73-83.
272. Chavez, K.J., S.V. Garimella, and S. Lipkowitz, *Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer*. *Breast Dis*, 2010. **32**(1-2): p. 35-48.
273. Hasin, Y., M. Seldin, and A. Lusic, *Multi-omics approaches to disease*. *Genome Biol*, 2017. **18**(1): p. 83.
274. Edgar, R., M. Domrachev, and A.E. Lash, *Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(1): p. 207-10.
275. Gentleman, R.C., V.J. Carey, D.M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A.J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J.Y. Yang, and J. Zhang, *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. *Genome Biol*, 2004. **5**(10): p. R80.
276. Huber, W., V.J. Carey, R. Gentleman, S. Anders, M. Carlson, B.S. Carvalho, H.C. Bravo, S. Davis, L. Gatto, T. Girke, R. Gottardo, F. Hahne, K.D. Hansen, R.A. Irizarry, M. Lawrence, M.I. Love, J. MacDonald, V. Obenchain, A.K. Oles, H. Pages, A. Reyes, P. Shannon, G.K. Smyth, D. Tenenbaum, L. Waldron, and M. Morgan, *Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor*. *Nat Methods*, 2015. **12**(2): p. 115-21.
277. Gautier, L., L. Cope, B.M. Bolstad, and R.A. Irizarry, *affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level*. *Bioinformatics*, 2004. **20**(3): p. 307-15.
278. Bolstad, B. *Low-level Analysis of High-density Oligonucleotide Array Data: Background, Normalization and Summarization*. 2003.
279. Irizarry, R.A., B. Hobbs, F. Collin, Y.D. Beazer-Barclay, K.J. Antonellis, U. Scherf, and T.P. Speed, *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data*. *Biostatistics*, 2003. **4**(2): p. 249-64.
280. Braschi, B., P. Denny, K. Gray, T. Jones, R. Seal, S. Tweedie, B. Yates, and E. Bruford, *Genenames.org: the HGNC and VGNC resources in 2019*. *Nucleic Acids Res*, 2019. **47**(D1): p. D786-D792.
281. Carlson, M., *hgu133plus2.db: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array annotation data (chip hgu133plus2). R package version 3.2.3*. 2016.
282. Ritchie, M.E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C.W. Law, W. Shi, and G.K. Smyth, *limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(7): p. e47.
283. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, *Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing*. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 1995. **57**(1): p. 289-300.
284. Kapur, K., Y. Xing, Z. Ouyang, and W.H. Wong, *Exon arrays provide accurate assessments of gene expression*. *Genome Biol*, 2007. **8**(5): p. R82.
285. Laderas, T.G., N.A. Walter, M. Mooney, K. Vartanian, P. Darakjian, K. Buck, C.A. Harrington, J. Belknap, R. Hitzemann, and S.K. McWeeney, *Computational detection of alternative exon usage*. *Front Neurosci*, 2011. **5**: p. 69.
286. Clark, T.A., A.C. Schweitzer, T.X. Chen, M.K. Staples, G. Lu, H. Wang, A. Williams, and J.E. Blume, *Discovery of tissue-specific exons using comprehensive human exon microarrays*. *Genome Biol*, 2007. **8**(4): p. R64.
287. Volkmann, K., J.L. Lucas, D. Vuga, X. Wang, D. Brumm, C. Stiles, D. Kriebel, A. Der-Sarkissian, K. Krishnan, C. Schweitzer, Z. Liu, U.M. Malyankar, D. Chiovitti, M. Canny, D. Durocher, F. Sicheri, and J.B. Patterson, *Potent and selective inhibitors of the inositol-requiring enzyme 1 endoribonuclease*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(14): p. 12743-55.

288. Cabili, M.N., C. Trapnell, L. Goff, M. Koziol, B. Tazon-Vega, A. Regev, and J.L. Rinn, *Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses*. *Genes Dev*, 2011. **25**(18): p. 1915-27.
289. Kolesnikov, N., E. Hastings, M. Keays, O. Melnichuk, Y.A. Tang, E. Williams, M. Dylag, N. Kurbatova, M. Brandizi, T. Burdett, K. Megy, E. Pilicheva, G. Rustici, A. Tikhonov, H. Parkinson, R. Petryszak, U. Sarkans, and A. Brazma, *ArrayExpress update--simplifying data submissions*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(Database issue): p. D1113-6.
290. Griffith, M., J.R. Walker, N.C. Spies, B.J. Ainscough, and O.L. Griffith, *Informatics for RNA Sequencing: A Web Resource for Analysis on the Cloud*. *PLoS Comput Biol*, 2015. **11**(8): p. e1004393.
291. Cock, P.J., C.J. Fields, N. Goto, M.L. Heuer, and P.M. Rice, *The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(6): p. 1767-71.
292. Newcomb, E.W., C. Tamasdan, Y. Entzminger, E. Arena, T. Schnee, M. Kim, D. Crisan, Y. Lukyanov, D.C. Miller, and D. Zagzag, *Flavopiridol inhibits the growth of GL261 gliomas in vivo: implications for malignant glioma therapy*. *Cell Cycle*, 2004. **3**(2): p. 230-4.
293. Frankish, A., M. Diekhans, A.M. Ferreira, R. Johnson, I. Jungreis, J. Loveland, J.M. Mudge, C. Sisu, J. Wright, J. Armstrong, I. Barnes, A. Berry, A. Bignell, S. Carbonell Sala, J. Chrast, F. Cunningham, T. Di Domenico, S. Donaldson, I.T. Fiddes, C. Garcia Giron, J.M. Gonzalez, T. Grego, M. Hardy, T. Hourlier, T. Hunt, O.G. Izuogu, J. Lagarde, F.J. Martin, L. Martinez, S. Mohanan, P. Muir, F.C.P. Navarro, A. Parker, B. Pei, F. Pozo, M. Ruffier, B.M. Schmitt, E. Stapleton, M.M. Suner, I. Sycheva, B. Uszczyńska-Ratajczak, J. Xu, A. Yates, D. Zerbino, Y. Zhang, B. Aken, J.S. Choudhary, M. Gerstein, R. Guigo, T.J.P. Hubbard, M. Kellis, B. Paten, A. Reymond, M.L. Tress, and P. Flicek, *GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes*. *Nucleic Acids Res*, 2019. **47**(D1): p. D766-D773.
294. Carlson, M., *R package version 3.8.2-org.Mm.eg.db: Genome wide annotation for Mouse*. 2019.
295. Durinck, S., Y. Moreau, A. Kasprzyk, S. Davis, B. De Moor, A. Brazma, and W. Huber, *BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis*. *Bioinformatics*, 2005. **21**(16): p. 3439-40.
296. Durinck, S., P.T. Spellman, E. Birney, and W. Huber, *Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(8): p. 1184-91.
297. Vigneault, F., D. Ter-Ovanesyan, S. Alon, S. Eminaga, C.C. D, J.G. Seidman, E. Eisenberg, and M.C. G, *High-throughput multiplex sequencing of miRNA*. *Curr Protoc Hum Genet*, 2012. **Chapter 11**: p. Unit 11 12 1-10.
298. Andres-Leon, E., R. Nunez-Torres, and A.M. Rojas, *miARma-Seq: a comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 25749.
299. Ewing, B. and P. Green, *Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities*. *Genome Res*, 1998. **8**(3): p. 186-94.
300. Martin, M., *Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads*. 2011, 2011. **17**(1): p. 3.
301. Davis, M.P., S. van Dongen, C. Abreu-Goodger, N. Bartonicek, and A.J. Enright, *Kraken: a set of tools for quality control and analysis of high-throughput sequence data*. *Methods*, 2013. **63**(1): p. 41-9.
302. Langmead, B., C. Trapnell, M. Pop, and S.L. Salzberg, *Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome*. *Genome Biol*, 2009. **10**(3): p. R25.
303. Langmead, B. and S.L. Salzberg, *Fast gapped-read alignment with Bowtie 2*. *Nat Methods*, 2012. **9**(4): p. 357-9.

304. Friedlander, M.R., S.D. Mackowiak, N. Li, W. Chen, and N. Rajewsky, *miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(1): p. 37-52.
305. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(8): p. 509-524.
306. Dobin, A., C.A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, and T.R. Gingeras, *STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner*. *Bioinformatics*, 2013. **29**(1): p. 15-21.
307. Patro, R., G. Duggal, M.I. Love, R.A. Irizarry, and C. Kingsford, *Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression*. *Nat Methods*, 2017. **14**(4): p. 417-419.
308. Liao, Y., G.K. Smyth, and W. Shi, *featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features*. *Bioinformatics*, 2014. **30**(7): p. 923-30.
309. Pertea, G. and M. Pertea, *GFF Utilities: GffRead and GffCompare*. *F1000Res*, 2020. **9**.
310. Soneson, C., M.I. Love, and M.D. Robinson, *Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences*. *F1000Res*, 2015. **4**: p. 1521.
311. Robinson, M.D., D.J. McCarthy, and G.K. Smyth, *edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*. *Bioinformatics*, 2010. **26**(1): p. 139-40.
312. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. *Genome Biol*, 2014. **15**(12): p. 550.
313. Law, C.W., Y. Chen, W. Shi, and G.K. Smyth, *voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts*. *Genome Biol*, 2014. **15**(2): p. R29.
314. Tarazona, S., F. Garcia-Alcalde, J. Dopazo, A. Ferrer, and A. Conesa, *Differential expression in RNA-seq: a matter of depth*. *Genome Res*, 2011. **21**(12): p. 2213-23.
315. Robinson, M.D. and G.K. Smyth, *Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance*. *Bioinformatics*, 2007. **23**(21): p. 2881-7.
316. Chen, Y., A.T.L. Lun, and G.K. Smyth, *Differential Expression Analysis of Complex RNA-seq Experiments Using edgeR*, in *Statistical Analysis of Next Generation Sequencing Data*, S. Datta and D. Nettleton, Editors. 2014, Springer International Publishing: Cham. p. 51-74.
317. McCarthy, D.J., Y. Chen, and G.K. Smyth, *Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(10): p. 4288-97.
318. Lund, S.P., D. Nettleton, D.J. McCarthy, and G.K. Smyth, *Detecting differential expression in RNA-sequence data using quasi-likelihood with shrunken dispersion estimates*. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2012. **11**(5).
319. Borg, I. and P. Groenen, *Modern Multidimensional Scaling: Theory and Applications*. *Journal of Educational Measurement*, 2003. **40**(3): p. 277-280.
320. Abdi, H. and L.J. Williams, *Principal component analysis*. *WIREs Computational Statistics*, 2010. **2**(4): p. 433-459.
321. Gu, Z., R. Eils, and M. Schlesner, *Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data*. *Bioinformatics*, 2016. **32**(18): p. 2847-9.
322. Leek, J.T., *svaseq: removing batch effects and other unwanted noise from sequencing data*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(21).
323. Leek, J.T., W.E. Johnson, H.S. Parker, A.E. Jaffe, and J.D. Storey, *The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments*. *Bioinformatics*, 2012. **28**(6): p. 882-3.
324. Anders, S. and W. Huber, *Differential expression analysis for sequence count data*. *Genome Biol*, 2010. **11**(10): p. R106.

325. Huber, W., A. von Heydebreck, H. Sueltmann, A. Poustka, and M. Vingron, *Parameter estimation for the calibration and variance stabilization of microarray data*. Stat Appl Genet Mol Biol, 2003. **2**: p. Article3.
326. Tibshirani, R., *Estimating Transformations for Regression Via Additivity and Variance Stabilization*. Journal of the American Statistical Association, 1988. **83**(402): p. 394-405.
327. Andres-Leon, E., D. Gonzalez Pena, G. Gomez-Lopez, and D.G. Pisano, *miRGate: a curated database of human, mouse and rat miRNA-mRNA targets*. Database (Oxford), 2015. **2015**: p. bav035.
328. Paraskevopoulou, M.D., G. Georgakilas, N. Kostoulas, I.S. Vlachos, T. Vergoulis, M. Reczko, C. Filippidis, T. Dalamagas, and A.G. Hatzigeorgiou, *DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Web Server issue): p. W169-73.
329. Vlachos, I.S., M.D. Paraskevopoulou, D. Karagkouni, G. Georgakilas, T. Vergoulis, I. Kanellos, I.L. Anastasopoulos, S. Maniou, K. Karathanou, D. Kalfakakou, A. Fevgas, T. Dalamagas, and A.G. Hatzigeorgiou, *DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(Database issue): p. D153-9.
330. Reczko, M., M. Maragkakis, P. Alexiou, I. Grosse, and A.G. Hatzigeorgiou, *Functional microRNA targets in protein coding sequences*. Bioinformatics, 2012. **28**(6): p. 771-6.
331. Koutsandreas, T., I. Binenbaum, E. Pilalis, I. Valavanis, O. Papadodima, and A. Chatziioannou, *Analyzing and Visualizing Genomic Complexity for the Derivation of the Emergent Molecular Networks*. Int. J. Monit. Surveill. Technol. Res., 2016. **4**(2): p. 30-49.
332. Chatziioannou, A.A. and P. Moulos, *Exploiting Statistical Methodologies and Controlled Vocabularies for Prioritized Functional Analysis of Genomic Experiments: the StRANGER Web Application*. Front Neurosci, 2011. **5**: p. 8.
333. Moutselos, K., I. Maglogiannis, and A. Chatziioannou, *GOrevenge: a novel generic reverse engineering method for the identification of critical molecular players, through the use of ontologies*. IEEE Trans Biomed Eng, 2011. **58**(12): p. 3522-7.
334. Duan, Q., C. Flynn, M. Niepel, M. Hafner, J.L. Muhlich, N.F. Fernandez, A.D. Rouillard, C.M. Tan, E.Y. Chen, T.R. Golub, P.K. Sorger, A. Subramanian, and A. Ma'ayan, *LINCS Canvas Browser: interactive web app to query, browse and interrogate LINCS L1000 gene expression signatures*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Web Server issue): p. W449-60.
335. Subramanian, A., R. Narayan, S.M. Corsello, D.D. Peck, T.E. Natoli, X. Lu, J. Gould, J.F. Davis, A.A. Tubelli, J.K. Asiedu, D.L. Lahr, J.E. Hirschman, Z. Liu, M. Donahue, B. Julian, M. Khan, D. Wadden, I.C. Smith, D. Lam, A. Liberzon, C. Toder, M. Bagul, M. Orzechowski, O.M. Enache, F. Piccioni, S.A. Johnson, N.J. Lyons, A.H. Berger, A.F. Shamji, A.N. Brooks, A. Vrcic, C. Flynn, J. Rosains, D.Y. Takeda, R. Hu, D. Davison, J. Lamb, K. Ardlie, L. Hogstrom, P. Greenside, N.S. Gray, P.A. Clemons, S. Silver, X. Wu, W.N. Zhao, W. Read-Button, X. Wu, S.J. Haggarty, L.V. Ronco, J.S. Boehm, S.L. Schreiber, J.G. Doench, J.A. Bittker, D.E. Root, B. Wong, and T.R. Golub, *A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles*. Cell, 2017. **171**(6): p. 1437-1452 e17.
336. Ashburner, M., C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, M.A. Harris, D.P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J.C. Matese, J.E. Richardson, M. Ringwald, G.M. Rubin, and G. Sherlock, *Gene ontology: tool for the unification of biology*. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 25-9.
337. Eppig, J.T., C.L. Smith, J.A. Blake, M. Ringwald, J.A. Kadin, J.E. Richardson, and C.J. Bult, *Mouse Genome Informatics (MGI): Resources for Mining Mouse Genetic, Genomic, and*

- Biological Data in Support of Primary and Translational Research*. Methods Mol Biol, 2017. **1488**: p. 47-73.
338. Kohler, S., S.C. Doelken, C.J. Mungall, S. Bauer, H.V. Firth, I. Bailleul-Forestier, G.C. Black, D.L. Brown, M. Brudno, J. Campbell, D.R. FitzPatrick, J.T. Eppig, A.P. Jackson, K. Freson, M. Girdea, I. Helbig, J.A. Hurst, J. Jahn, L.G. Jackson, A.M. Kelly, D.H. Ledbetter, S. Mansour, C.L. Martin, C. Moss, A. Mumford, W.H. Ouwehand, S.M. Park, E.R. Riggs, R.H. Scott, S. Sisodiya, S. Van Vooren, R.J. Wapner, A.O. Wilkie, C.F. Wright, A.T. Vultovan Silfhout, N. de Leeuw, B.B. de Vries, N.L. Washington, C.L. Smith, M. Westerfield, P. Schofield, B.J. Ruef, G.V. Gkoutos, M. Haendel, D. Smedley, S.E. Lewis, and P.N. Robinson, *The Human Phenotype Ontology project: linking molecular biology and disease through phenotype data*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D966-74.
339. Croft, D., A.F. Mundo, R. Haw, M. Milacic, J. Weiser, G. Wu, M. Caudy, P. Garapati, M. Gillespie, M.R. Kamdar, B. Jassal, S. Jupe, L. Matthews, B. May, S. Palatnik, K. Rothfels, V. Shamovsky, H. Song, M. Williams, E. Birney, H. Hermjakob, L. Stein, and P. D'Eustachio, *The Reactome pathway knowledgebase*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D472-7.
340. Heath, A.P., V. Ferretti, S. Agrawal, M. An, J.C. Angelakos, R. Arya, R. Bajari, B. Baqar, J.H.B. Barnowski, J. Burt, A. Catton, B.F. Chan, F. Chu, K. Cullion, T. Davidsen, P.M. Do, C. Dompierre, M.L. Ferguson, M.S. Fitzsimons, M. Ford, M. Fukuma, S. Gaheen, G.L. Ganji, T.I. Garcia, S.S. George, D.S. Gerhard, F. Gerthoffert, F. Gomez, K. Han, K.M. Hernandez, B. Issac, R. Jackson, M.A. Jensen, S. Joshi, A. Kadam, A. Khurana, K.M.J. Kim, V.E. Kraft, S. Li, T.M. Lichtenberg, J. Lodato, L. Lolla, P. Martinov, J.A. Mazzone, D.P. Miller, I. Miller, J.S. Miller, K. Miyauchi, M.W. Murphy, T. Nullet, R.O. Ogwara, F.M. Ortuno, J. Pedrosa, P.L. Pham, M.Y. Popov, J.J. Porter, R. Powell, K. Rademacher, C.P. Reid, S. Rich, B. Rogel, H. Sahni, J.H. Savage, K.A. Schmitt, T.J. Simmons, J. Sislow, J. Spring, L. Stein, S. Sullivan, Y. Tang, M. Thiagarajan, H.D. Troyer, C. Wang, Z. Wang, B.L. West, A. Wilmer, S. Wilson, K. Wu, W.P. Wysocki, L. Xiang, J.T. Yamada, L. Yang, C. Yu, C.K. Yung, J.C. Zenklusen, J. Zhang, Z. Zhang, Y. Zhao, A. Zubair, L.M. Staudt, and R.L. Grossman, *The NCI Genomic Data Commons*. Nat Genet, 2021. **53**(3): p. 257-262.
341. Mermel, C.H., S.E. Schumacher, B. Hill, M.L. Meyerson, R. Beroukhim, and G. Getz, *GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers*. Genome Biol, 2011. **12**(4): p. R41.
342. Colaprico, A., T.C. Silva, C. Olsen, L. Garofano, C. Cava, D. Garolini, T.S. Sabedot, T.M. Malta, S.M. Pagnotta, I. Castiglioni, M. Ceccarelli, G. Bontempi, and H. Noushmehr, *TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(8): p. e71.
343. Anders, S., P.T. Pyl, and W. Huber, *HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data*. Bioinformatics, 2015. **31**(2): p. 166-9.
344. Monti, S., P. Tamayo, J. Mesirov, and T. Golub, *Consensus Clustering: A Resampling-Based Method for Class Discovery and Visualization of Gene Expression Microarray Data*. Machine Learning, 2003. **52**(1): p. 91-118.
345. Wilkerson, M.D. and D.N. Hayes, *ConsensusClusterPlus: a class discovery tool with confidence assessments and item tracking*. Bioinformatics, 2010. **26**(12): p. 1572-3.
346. Friedman, J., T. Hastie, and R. Tibshirani, *Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent*. J Stat Softw, 2010. **33**(1): p. 1-22.
347. Subramanian, A., P. Tamayo, V.K. Mootha, S. Mukherjee, B.L. Ebert, M.A. Gillette, A. Paulovich, S.L. Pomeroy, T.R. Golub, E.S. Lander, and J.P. Mesirov, *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15545-50.

348. Wu, D. and G.K. Smyth, *Camera: a competitive gene set test accounting for inter-gene correlation*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(17): p. e133.
349. Liberzon, A., C. Birger, H. Thorvaldsdottir, M. Ghandi, J.P. Mesirov, and P. Tamayo, *The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection*. Cell Syst, 2015. **1**(6): p. 417-425.
350. Wu, D., E. Lim, F. Vaillant, M.L. Asselin-Labat, J.E. Visvader, and G.K. Smyth, *ROAST: rotation gene set tests for complex microarray experiments*. Bioinformatics, 2010. **26**(17): p. 2176-82.
351. Edgar, R.C., *MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(5): p. 1792-7.
352. Bailey, T.L., N. Williams, C. Misleh, and W.W. Li, *MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Web Server issue): p. W369-73.
353. Bailey, T.L., *DREME: motif discovery in transcription factor ChIP-seq data*. Bioinformatics, 2011. **27**(12): p. 1653-9.
354. Grant, C.E., T.L. Bailey, and W.S. Noble, *FIMO: scanning for occurrences of a given motif*. Bioinformatics, 2011. **27**(7): p. 1017-8.
355. Bailey, T.L., J. Johnson, C.E. Grant, and W.S. Noble, *The MEME Suite*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(W1): p. W39-49.
356. McCaskill, J.S., *The equilibrium partition function and base pair binding probabilities for RNA secondary structure*. Biopolymers, 1990. **29**(6-7): p. 1105-19.
357. Zuker, M. and P. Stiegler, *Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information*. Nucleic Acids Res, 1981. **9**(1): p. 133-48.
358. Lorenz, R., S.H. Bernhart, C. Honer Zu Siederdisen, H. Tafer, C. Flamm, P.F. Stadler, and I.L. Hofacker, *ViennaRNA Package 2.0*. Algorithms Mol Biol, 2011. **6**: p. 26.
359. Hiller, M., R. Pudimat, A. Busch, and R. Backofen, *Using RNA secondary structures to guide sequence motif finding towards single-stranded regions*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(17): p. e117.
360. Bernhart, S.H., I.L. Hofacker, and P.F. Stadler, *Local RNA base pairing probabilities in large sequences*. Bioinformatics, 2006. **22**(5): p. 614-5.
361. Kazan, H., D. Ray, E.T. Chan, T.R. Hughes, and Q. Morris, *RNAcontext: a new method for learning the sequence and structure binding preferences of RNA-binding proteins*. PLoS Comput Biol, 2010. **6**: p. e1000832.
362. Parsons, D.W., S. Jones, X. Zhang, J.C. Lin, R.J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I.M. Siu, G.L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B.A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D.A. Busam, H. Tekleab, L.A. Diaz, Jr., J. Hartigan, D.R. Smith, R.L. Strausberg, S.K. Marie, S.M. Shinjo, H. Yan, G.J. Riggins, D.D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, and K.W. Kinzler, *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1807-12.
363. Lim, E., F. Vaillant, D. Wu, N.C. Forrest, B. Pal, A.H. Hart, M.L. Asselin-Labat, D.E. Gyorki, T. Ward, A. Partanen, F. Feleppa, L.I. Huschtscha, H.J. Thorne, kConFab, S.B. Fox, M. Yan, J.D. French, M.A. Brown, G.K. Smyth, J.E. Visvader, and G.J. Lindeman, *Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 907-13.
364. Powell, D.R. and A. Huttenlocher, *Neutrophils in the Tumor Microenvironment*. Trends Immunol, 2016. **37**(1): p. 41-52.
365. Guedes, J.R., T. Lao, A.L. Cardoso, and J. El Khoury, *Roles of Microglial and Monocyte Chemokines and Their Receptors in Regulating Alzheimer's Disease-Associated Amyloid-beta and Tau Pathologies*. Front Neurol, 2018. **9**: p. 549.

366. Turner, M.D., B. Nedjai, T. Hurst, and D.J. Pennington, *Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1843**(11): p. 2563-2582.
367. Obacz, J., J. Archambeau, D. Sicari, P.J. Le Reste, R. Pineau, S. Martin, K. Barroso, E. Vlachavas, K. Voutetakis, T. Fainsod-Levi, A. Obiedat, Z. Granot, B. Tirosh, J. Samal, A. Pandit, J. Patterson, Q. Zheng, L. Négroni, A. Chatziioannou, V. Quillien, T. Avril, and E. Chevet, *Novel IRE1-dependent proinflammatory signaling controls tumor infiltration by myeloid cells*. *bioRxiv*, 2020: p. 533018.
368. Kunsch, C. and C.A. Rosen, *NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(10): p. 6137-46.
369. Libermann, T.A. and D. Baltimore, *Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(5): p. 2327-34.
370. Jin, R., Y. Yi, F.E. Yull, T.S. Blackwell, P.E. Clark, T. Koyama, J.A. Smith, Jr., and R.J. Matusik, *NF-kappaB gene signature predicts prostate cancer progression*. *Cancer Res*, 2014. **74**(10): p. 2763-72.
371. Gonen, H., B. Bercovich, A. Orian, A. Carrano, C. Takizawa, K. Yamanaka, M. Pagano, K. Iwai, and A. Ciechanover, *Identification of the ubiquitin carrier proteins, E2s, involved in signal-induced conjugation and subsequent degradation of I kappa B alpha*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(21): p. 14823-30.
372. Yaron, A., A. Hatzubai, M. Davis, I. Lavon, S. Amit, A.M. Manning, J.S. Andersen, M. Mann, F. Mercurio, and Y. Ben-Neriah, *Identification of the receptor component of the I kappa B alpha-ubiquitin ligase*. *Nature*, 1998. **396**(6711): p. 590-4.
373. Cartharius, K., K. Frech, K. Grote, B. Klocke, M. Haltmeier, A. Klingenhoff, M. Frisch, M. Bayerlein, and T. Werner, *MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites*. *Bioinformatics*, 2005. **21**(13): p. 2933-42.
374. Tsunoda, T. and T. Takagi, *Estimating transcription factor bindability on DNA*. *Bioinformatics*, 1999. **15**(7-8): p. 622-30.
375. Liu, L.J., T.T. Liu, Y. Ran, Y. Li, X.D. Zhang, H.B. Shu, and Y.Y. Wang, *The E3 ubiquitin ligase MIB1 negatively regulates basal I kappa B alpha level and modulates NF-kappa B activation*. *Cell Res*, 2012. **22**(3): p. 603-6.
376. van Wijk, S.J., S.J. de Vries, P. Kemmeren, A. Huang, R. Boelens, A.M. Bonvin, and H.T. Timmers, *A comprehensive framework of E2-RING E3 interactions of the human ubiquitin-proteasome system*. *Mol Syst Biol*, 2009. **5**: p. 295.
377. Doncheva, N.T., J.H. Morris, J. Gorodkin, and L.J. Jensen, *Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data*. *J Proteome Res*, 2019. **18**(2): p. 623-632.
378. Milella, M., I. Falcone, F. Conciatori, U. Cesta Incani, A. Del Curatolo, N. Inzerilli, C.M. Nuzzo, V. Vaccaro, S. Vari, F. Cognetti, and L. Ciuffreda, *PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors*. *Front Oncol*, 2015. **5**: p. 24.
379. Taylor, T.E., F.B. Furnari, and W.K. Cavenee, *Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012. **12**(3): p. 197-209.
380. Oh, J.H., S.J. Jang, J. Kim, I. Sohn, J.Y. Lee, E.J. Cho, S.M. Chun, and C.O. Sung, *Spontaneous mutations in the single TTN gene represent high tumor mutation burden*. *NPJ Genom Med*, 2020. **5**: p. 33.
381. Freshour, S.L., S. Kiwala, K.C. Cotto, A.C. Coffman, J.F. McMichael, J.J. Song, M. Griffith, O.L. Griffith, and A.H. Wagner, *Integration of the Drug-Gene Interaction Database (DGIdb 4.0) with open crowdsourcing efforts*. *Nucleic Acids Res*, 2021. **49**(D1): p. D1144-D1151.
382. Hu, B., Q. Wang, Y.A. Wang, S. Hua, C.G. Sauve, D. Ong, Z.D. Lan, Q. Chang, Y.W. Ho, M.M. Monasterio, X. Lu, Y. Zhong, J. Zhang, P. Deng, Z. Tan, G. Wang, W.T. Liao, L.J. Corley, H. Yan, J. Zhang, Y. You, N. Liu, L. Cai, G. Finocchiaro, J.J. Phillips, M.S. Berger,

- D.J. Spring, J. Hu, E.P. Sulman, G.N. Fuller, L. Chin, R.G.W. Verhaak, and R.A. DePinho, *Epigenetic Activation of WNT5A Drives Glioblastoma Stem Cell Differentiation and Invasive Growth*. *Cell*, 2016. **167**(5): p. 1281-1295 e18.
383. Neradil, J. and R. Veselska, *Nestin as a marker of cancer stem cells*. *Cancer Sci*, 2015. **106**(7): p. 803-11.
384. Widestrand, A., J. Faijerson, U. Wilhelmsson, P.L. Smith, L. Li, C. Sihlbom, P.S. Eriksson, and M. Pekny, *Increased neurogenesis and astrogenesis from neural progenitor cells grafted in the hippocampus of GFAP^{-/-} Vim^{-/-} mice*. *Stem Cells*, 2007. **25**(10): p. 2619-27.
385. Bettigole, S.E., R. Lis, S. Adoro, A.H. Lee, L.A. Spencer, P.F. Weller, and L.H. Glimcher, *The transcription factor XBP1 is selectively required for eosinophil differentiation*. *Nat Immunol*, 2015. **16**(8): p. 829-37.
386. Doultzinos, D., M. McMahon, K. Voutetakis, J. Obacz, R. Pineau, P.-J. Le Reste, A. Obiedat, J. Samal, J.B. Patterson, Q. Zheng, A. Samali, A. Pandit, B. Tirosh, A. Chatziioannou, E. Chevet, and T. Avril, *Constitutive UPR^{ER} activation sustains tumor cell differentiation*. *bioRxiv*, 2019: p. 594630.
387. McMahon, M., A. Samali, and E. Chevet, *Regulation of the unfolded protein response by noncoding RNA*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2017. **313**(3): p. C243-C254.
388. Cho, Y.M., T.-M. Kim, D. Hun Kim, D. Hee Kim, S.-W. Jeong, and O.-J. Kwon, *miR-148a is a downstream effector of X-box-binding protein 1 that silences Wnt10b during adipogenesis of 3T3-L1 cells*. *Experimental & Molecular Medicine*, 2016. **48**(4): p. e226-e226.
389. Girbl, T., T. Lenn, L. Perez, L. Rolas, A. Barkaway, A. Thiriot, C. Del Fresno, E. Lynam, E. Hub, M. Thelen, G. Graham, R. Alon, D. Sancho, U.H. von Andrian, M.B. Voisin, A. Rot, and S. Nourshargh, *Distinct Compartmentalization of the Chemokines CXCL1 and CXCL2 and the Atypical Receptor ACKR1 Determine Discrete Stages of Neutrophil Diapedesis*. *Immunity*, 2018. **49**(6): p. 1062-1076 e6.
390. Shea-Donohue, T., K. Thomas, M.J. Cody, Z. Aiping, L.J. Detolla, K.M. Kopydlowski, M. Fukata, S.A. Lira, and S.N. Vogel, *Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1 (KC/GRO-alpha), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis*. *Innate Immun*, 2008. **14**(2): p. 117-24.
391. Bailey, T.L. and C. Elkan, *Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers*. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 1994. **2**: p. 28-36.
392. Schneider, T.D. and R.M. Stephens, *Sequence logos: a new way to display consensus sequences*. *Nucleic Acids Res*, 1990. **18**(20): p. 6097-100.
393. Crooks, G.E., G. Hon, J.M. Chandonia, and S.E. Brenner, *WebLogo: a sequence logo generator*. *Genome Res*, 2004. **14**(6): p. 1188-90.
394. Waterhouse, A.M., J.B. Procter, D.M. Martin, M. Clamp, and G.J. Barton, *Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(9): p. 1189-91.
395. Ray, D., H. Kazan, E.T. Chan, L. Pena Castillo, S. Chaudhry, S. Talukder, B.J. Blencowe, Q. Morris, and T.R. Hughes, *Rapid and systematic analysis of the RNA recognition specificities of RNA-binding proteins*. *Nat Biotechnol*, 2009. **27**(7): p. 667-70.
396. Ray, D., H. Kazan, K.B. Cook, M.T. Weirauch, H.S. Najafabadi, X. Li, S. Gueroussov, M. Albu, H. Zheng, A. Yang, H. Na, M. Irimia, L.H. Matzat, R.K. Dale, S.A. Smith, C.A. Yarosh, S.M. Kelly, B. Nabet, D. Mecnas, W. Li, R.S. Laishram, M. Qiao, H.D. Lipshitz, F. Piano, A.H. Corbett, R.P. Carstens, B.J. Frey, R.A. Anderson, K.W. Lynch, L.O. Penalva, E.P. Lei, A.G. Fraser, B.J. Blencowe, Q.D. Morris, and T.R. Hughes, *A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation*. *Nature*, 2013. **499**(7457): p. 172-7.
397. Mahen, E.M., P.Y. Watson, J.W. Cottrell, and M.J. Fedor, *mRNA secondary structures fold sequentially but exchange rapidly in vivo*. *PLoS Biol*, 2010. **8**(2): p. e1000307.

398. Workman, C.T., Y. Yin, D.L. Corcoran, T. Ideker, G.D. Stormo, and P.V. Benos, *enoLOGOS: a versatile web tool for energy normalized sequence logos*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Web Server issue): p. W389-92.
399. Hanley, J.A. and B.J. McNeil, *The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve*. Radiology, 1982. **143**(1): p. 29-36.
400. Lorenz, R., I.L. Hofacker, and P.F. Stadler, *RNA folding with hard and soft constraints*. Algorithms Mol Biol, 2016. **11**: p. 8.
401. Collado-Torres, L., A. Nellore, K. Kammers, S.E. Ellis, M.A. Taub, K.D. Hansen, A.E. Jaffe, B. Langmead, and J.T. Leek, *Reproducible RNA-seq analysis using recount2*. Nat Biotechnol, 2017. **35**(4): p. 319-321.
402. Bray, N.L., H. Pimentel, P. Melsted, and L. Pachter, *Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification*. Nat Biotechnol, 2016. **34**(5): p. 525-7.
403. Will, S., T. Joshi, I.L. Hofacker, P.F. Stadler, and R. Backofen, *LocARNA-P: accurate boundary prediction and improved detection of structural RNAs*. RNA, 2012. **18**(5): p. 900-14.
404. Bernhart, S.H., I.L. Hofacker, S. Will, A.R. Gruber, and P.F. Stadler, *RNAalifold: improved consensus structure prediction for RNA alignments*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 474.
405. Rawla, P. and A. Barsouk, *Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention*. Prz Gastroenterol, 2019. **14**(1): p. 26-38.
406. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
407. Chen, Z., C.M. Fillmore, P.S. Hammerman, C.F. Kim, and K.K. Wong, *Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(8): p. 535-46.
408. Koboldt, D.C., Q. Zhang, D.E. Larson, D. Shen, M.D. McLellan, L. Lin, C.A. Miller, E.R. Mardis, L. Ding, and R.K. Wilson, *VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing*. Genome Res, 2012. **22**(3): p. 568-76.
409. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma*. Nature, 2014. **511**(7511): p. 543-50.
410. Mayakonda, A., D.C. Lin, Y. Assenov, C. Plass, and H.P. Koefler, *Maftools: efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer*. Genome Res, 2018. **28**(11): p. 1747-1756.
411. Cancer Genome Atlas Research, N., J.N. Weinstein, E.A. Collisson, G.B. Mills, K.R. Shaw, B.A. Ozenberger, K. Ellrott, I. Shmulevich, C. Sander, and J.M. Stuart, *The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project*. Nat Genet, 2013. **45**(10): p. 1113-20.
412. Cancer Genome Atlas Research, N., *The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer*. Cell, 2015. **163**(4): p. 1011-25.
413. Januchowski, R., M. Swierczewska, K. Sterzynska, K. Wojtowicz, M. Nowicki, and M. Zabel, *Increased Expression of Several Collagen Genes is Associated with Drug Resistance in Ovarian Cancer Cell Lines*. J Cancer, 2016. **7**(10): p. 1295-310.
414. Mendiola, M., A. Redondo, V. Heredia-Soto, J. Herranz, A. Berjon, A. Hernandez, M. Miguel-Martin, R. Crespo, J. Barriuso, P. Cruz, L. Yebenes, A. Pelaez-Garcia, B. Castelo, D.E.M. AR, J. Feliu, and D. Hardisson, *Predicting Response to Standard First-line Treatment in High-grade Serous Ovarian Carcinoma by Angiogenesis-related Genes*. Anticancer Res, 2018. **38**(9): p. 5393-5400.
415. Guo, L., Q. Wu, Z. Ma, M. Yuan, and S. Zhao, *Identification of immune-related genes that predict prognosis and risk of bladder cancer: bioinformatics analysis of TCGA database*. Aging (Albany NY), 2021. **13**(15): p. 19352-19374.
416. Liu, Y., W. Lou, G. Chen, B. Ding, J. Kuang, Y. Zhang, C. Wang, S. Duan, Y. Deng, and X. Lu, *Genome-wide screening for the G-protein-coupled receptor (GPCR) pathway-related*

- therapeutic gene RGS19 (regulator of G protein signaling 19) in bladder cancer*. Bioengineered, 2021. **12**(1): p. 5892-5903.
417. Jiao, X., G.D. Sante, Z. Li, A.D. Rocco, M. Wang, A. Ertel, P.A. McCue, A.P. South, C. Cordon-Cardo, M.P. Stokes, M. Marra, S.J. Jones, A. Kossenkov, and R.G. Pestell, *Abstract 1730: DACH1 gene deletion extends portraits of human prostate cancer*. Cancer Research, 2019. **79**(13 Supplement): p. 1730-1730.
418. Rubio-Patino, C., J.P. Bossowski, G.M. De Donatis, L. Mondragon, E. Villa, L.E. Aira, J. Chiche, R. Mhaidly, C. Lebeaupin, S. Marchetti, K. Voutetakis, A. Chatziioannou, F.A. Castelli, P. Lamourette, E. Chu-Van, F. Fenaille, T. Avril, T. Passeron, J.B. Patterson, E. Verhoeyen, B. Bailly-Maitre, E. Chevet, and J.E. Ricci, *Low-Protein Diet Induces IRE1alpha-Dependent Anticancer Immunosurveillance*. Cell Metab, 2018. **27**(4): p. 828-842 e7.
419. Reif, A.E. and J.M. Allen, *The Akr Thymic Antigen and Its Distribution in Leukemias and Nervous Tissues*. J Exp Med, 1964. **120**: p. 413-33.
420. Reif, A.E. and J.M. Allen, *Immunological Distinction of Akr Thymocytes*. Nature, 1964. **203**: p. 886-7.
421. Cooper, E.L. and M.H. Mansour, *Distribution of Thy-1 in invertebrates and ectothermic vertebrates*. Immunol Ser, 1989. **45**: p. 197-219.
422. Feng, G., R.H. Mellor, M. Bernstein, C. Keller-Peck, Q.T. Nguyen, M. Wallace, J.M. Nerbonne, J.W. Lichtman, and J.R. Sanes, *Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP*. Neuron, 2000. **28**(1): p. 41-51.
423. Nitta, R.T., S. Gholamin, A.H. Feroze, M. Agarwal, S.H. Cheshier, S.S. Mitra, and G. Li, *Casein kinase 2alpha regulates glioblastoma brain tumor-initiating cell growth through the beta-catenin pathway*. Oncogene, 2015. **34**(28): p. 3688-99.
424. Clavreul, A., A. Etcheverry, A. Chassevent, V. Quillien, T. Avril, M.L. Jourdan, S. Michalak, P. Francois, J.L. Carre, J. Mosser, N. Grand Ouest Glioma Project, and P. Menei, *Isolation of a new cell population in the glioblastoma microenvironment*. J Neurooncol, 2012. **106**(3): p. 493-504.
425. Ochs, K., F. Sahm, C.A. Opitz, T.V. Lanz, I. Oezen, P.O. Couraud, A. von Deimling, W. Wick, and M. Platten, *Immature mesenchymal stem cell-like pericytes as mediators of immunosuppression in human malignant glioma*. J Neuroimmunol, 2013. **265**(1-2): p. 106-16.
426. Cook, C.E., R. Lopez, O. Stroe, G. Cochrane, C. Brooksbank, E. Birney, and R. Apweiler, *The European Bioinformatics Institute in 2018: tools, infrastructure and training*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(D1): p. D15-D22.
427. Darmanis, S., S.A. Sloan, D. Croote, M. Mignardi, S. Chernikova, P. Samghababi, Y. Zhang, N. Neff, M. Kowarsky, C. Caneda, G. Li, S.D. Chang, I.D. Connolly, Y. Li, B.A. Barres, M.H. Gephart, and S.R. Quake, *Single-Cell RNA-Seq Analysis of Infiltrating Neoplastic Cells at the Migrating Front of Human Glioblastoma*. Cell Rep, 2017. **21**(5): p. 1399-1410.
428. Feichtinger, J., R.J. McFarlane, and L.D. Larcombe, *CancerMA: a web-based tool for automatic meta-analysis of public cancer microarray data*. Database (Oxford), 2012. **2012**: p. bas055.
429. Kumar, A., A. Bhanja, J. Bhattacharyya, and B.G. Jaganathan, *Multiple roles of CD90 in cancer*. Tumour Biol, 2016. **37**(9): p. 11611-11622.
430. Sauzay, C., K. Voutetakis, A. Chatziioannou, E. Chevet, and T. Avril, *CD90/Thy-1, a Cancer-Associated Cell Surface Signaling Molecule*. Front Cell Dev Biol, 2019. **7**: p. 66.
431. Soriani, A., M.L. Iannitto, B. Ricci, C. Fionda, G. Malgarini, S. Morrone, G. Peruzzi, M.R. Ricciardi, M.T. Petrucci, M. Cippitelli, and A. Santoni, *Reactive oxygen species- and DNA damage response-dependent NK cell activating ligand upregulation occurs at*

- transcriptional levels and requires the transcriptional factor E2F1*. J Immunol, 2014. **193**(2): p. 950-60.
432. Pagliarini, V., P. Giglio, P. Bernardoni, D. De Zio, G.M. Fimia, M. Piacentini, and M. Corazzari, *Downregulation of E2F1 during ER stress is required to induce apoptosis*. J Cell Sci, 2015. **128**(6): p. 1166-79.
433. Obiedat, A., E. Seidel, M. Mahameed, O. Berhani, P. Tsukerman, K. Voutetakis, A. Chatziioannou, M. McMahon, T. Avril, E. Chevet, O. Mandelboim, and B. Tirosh, *Transcription of the NKG2D ligand MICA is suppressed by the IRE1/XBP1 pathway of the unfolded protein response through the regulation of E2F1*. FASEB J, 2019. **33**(3): p. 3481-3495.
434. Leng, N., Y. Li, B.E. McIntosh, B.K. Nguyen, B. Duffin, S. Tian, J.A. Thomson, C.N. Dewey, R. Stewart, and C. Kendzierski, *EBSeq-HMM: a Bayesian approach for identifying gene-expression changes in ordered RNA-seq experiments*. Bioinformatics, 2015. **31**(16): p. 2614-22.
435. Karagkouni, D., M.D. Paraskevopoulou, S. Chatzopoulos, I.S. Vlachos, S. Tastsoglou, I. Kanellos, D. Papadimitriou, I. Kavakiotis, S. Maniou, G. Skoufos, T. Vergoulis, T. Dalamagas, and A.G. Hatzigeorgiou, *DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D239-D245.
436. Vlachos, I.S., K. Zagkanas, M.D. Paraskevopoulou, G. Georgakilas, D. Karagkouni, T. Vergoulis, T. Dalamagas, and A.G. Hatzigeorgiou, *DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(W1): p. W460-6.
437. Jacomy, M., T. Venturini, S. Heymann, and M. Bastian, *ForceAtlas2, a continuous graph layout algorithm for handy network visualization designed for the Gephi software*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e98679.
438. Chang W, C.J., Allaire JJ, et al.; *shiny: Web Application Framework for R*. R package version 0.14. 2016.
439. Silva, T., A. Colaprico, C. Olsen, T. Malta, G. Bontempi, M. Ceccarelli, B. Berman, and H. Noushmehr, *TCGAbiolinksGUI: A graphical user interface to analyze cancer molecular and clinical data [version 1; peer review: 1 approved, 1 approved with reservations]*. F1000Research, 2018. **7**(439).
440. Borisov, N., I. Shabalina, V. Tkachev, M. Sorokin, A. Garazha, A. Pulin, Eremin, II, and A. Buzdin, *Shambhala: a platform-agnostic data harmonizer for gene expression data*. BMC Bioinformatics, 2019. **20**(1): p. 66.
441. Breitling, R., P. Armengaud, A. Amtmann, and P. Herzyk, *Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments*. FEBS Lett, 2004. **573**(1-3): p. 83-92.
442. Luo, W. and C. Brouwer, *Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization*. Bioinformatics, 2013. **29**(14): p. 1830-1.
443. Eletto, D., S. Boyle, and Y. Argon, *PDIA6 regulates insulin secretion by selectively inhibiting the RIDD activity of IRE1*. FASEB J, 2016. **30**(2): p. 653-65.
444. Gomora-Garcia, J.C., C. Geronimo-Olvera, X. Perez-Martinez, and L. Massieu, *IRE1alpha RIDD activity induced under ER stress drives neuronal death by the degradation of 14-3-3 theta mRNA in cortical neurons during glucose deprivation*. Cell Death Discov, 2021. **7**(1): p. 131.
445. Hetz, C. and F.R. Papa, *The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control*. Mol Cell, 2018. **69**(2): p. 169-181.
446. Tavernier, Q., E. Bennana, V. Poindessous, C. Schaeffer, L. Rampoldi, N. Pietrancosta, and N. Pallet, *Regulation of IRE1 RNase activity by the Ribonuclease inhibitor 1 (RNH1)*. Cell Cycle, 2018. **17**(15): p. 1901-1916.

447. Hong, S., M. Bi, S. Chen, P. Zhao, B. Li, D. Sun, and J. Tai, *MicroRNA-520f suppresses growth of gastric carcinoma cells by target ATPase family AAA domain-containing protein 2 (ATAD2)*. *Neoplasma*, 2016. **63**(6): p. 873-879.
448. Zhou, Y. and S. Shen, *MiR-520f acts as a biomarker for the diagnosis of lung cancer*. *Medicine (Baltimore)*, 2019. **98**(30): p. e16546.
449. van Kampen, J.G.M., O. van Hooij, C.F. Jansen, F.P. Smit, P.I. van Noort, I. Schultz, R.Q.J. Schaapveld, J.A. Schalken, and G.W. Verhaegh, *miRNA-520f Reverses Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Targeting ADAM9 and TGFBR2*. *Cancer Res*, 2017. **77**(8): p. 2008-2017.
450. Lv, Y., X. Ma, Y. Du, and J. Feng, *Understanding Patterns of Brain Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer and Exploring Potential Therapeutic Targets*. *Onco Targets Ther*, 2021. **14**: p. 589-607.
451. Cui, D., P. Sajan, J. Shi, Y. Shen, K. Wang, X. Deng, L. Zhou, P. Hu, and L. Gao, *MiR-148a increases glioma cell migration and invasion by downregulating GADD45A in human gliomas with IDH1 R132H mutations*. *Oncotarget*, 2017. **8**(15): p. 25345-25361.
452. Genovese, G., A. Ergun, S.A. Shukla, B. Campos, J. Hanna, P. Ghosh, S.N. Quayle, K. Rai, S. Colla, H. Ying, C.J. Wu, S. Sarkar, Y. Xiao, J. Zhang, H. Zhang, L. Kwong, K. Dunn, W.R. Wiedemeyer, C. Brennan, H. Zheng, D.L. Rimm, J.J. Collins, and L. Chin, *microRNA regulatory network inference identifies miR-34a as a novel regulator of TGF-beta signaling in glioblastoma*. *Cancer Discov*, 2012. **2**(8): p. 736-49.
453. Martin del Campo, S.E., N. Latchana, K.M. Levine, V.P. Grignol, E.T. Fairchild, A.C. Jaime-Ramirez, T.V. Dao, V.I. Karpa, M. Carson, A. Ganju, A.N. Chan, and W.E. Carson, 3rd, *MiR-21 enhances melanoma invasiveness via inhibition of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 expression: in vivo effects of MiR-21 inhibitor*. *PLoS One*, 2015. **10**(1): p. e0115919.
454. Neagu, M., C. Constantin, S.M. Cretoiu, and S. Zurac, *miRNAs in the Diagnosis and Prognosis of Skin Cancer*. *Front Cell Dev Biol*, 2020. **8**: p. 71.
455. Li, Y., Y. Xu, C. Yu, and W. Zuo, *Associations of miR-146a and miR-146b expression and breast cancer in very young women*. *Cancer Biomark*, 2015. **15**(6): p. 881-7.
456. Ma, W., G.G. Xiao, J. Mao, Y. Lu, B. Song, L. Wang, S. Fan, P. Fan, Z. Hou, J. Li, X. Yu, B. Wang, H. Wang, H. Wang, F. Xu, Y. Li, Q. Liu, and L. Li, *Dysregulation of the miR-34a-SIRT1 axis inhibits breast cancer stemness*. *Oncotarget*, 2015. **6**(12): p. 10432-44.
457. Song, P., H. Zhu, D. Zhang, H. Chu, D. Wu, M. Kang, M. Wang, W. Gong, J. Zhou, Z. Zhang, and Q. Zhao, *A genetic variant of miR-148a binding site in the SCR1 3'-UTR is associated with susceptibility and prognosis of gastric cancer*. *Sci Rep*, 2014. **4**: p. 7080.
458. Szafranska, A.E., T.S. Davison, J. John, T. Cannon, B. Sipos, A. Maghnouj, E. Labourier, and S.A. Hahn, *MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Oncogene*, 2007. **26**(30): p. 4442-52.
459. Tsai, H.L., I.P. Yang, C.W. Huang, C.J. Ma, C.H. Kuo, C.Y. Lu, S.H. Juo, and J.Y. Wang, *Clinical significance of microRNA-148a in patients with early relapse of stage II stage and III colorectal cancer after curative resection*. *Transl Res*, 2013. **162**(4): p. 258-68.
460. Xu, Q., L.Z. Liu, Y. Yin, J. He, Q. Li, X. Qian, Y. You, Z. Lu, S.C. Peiper, Y. Shu, and B.H. Jiang, *Regulatory circuit of PKM2/NF-kappaB/miR-148a/152-modulated tumor angiogenesis and cancer progression*. *Oncogene*, 2015. **34**(43): p. 5482-93.
461. Li, Y., X. Deng, X. Zeng, and X. Peng, *The Role of Mir-148a in Cancer*. *J Cancer*, 2016. **7**(10): p. 1233-41.
462. Iwakoshi, N.N., A.H. Lee, and L.H. Glimcher, *The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response*. *Immunol Rev*, 2003. **194**: p. 29-38.

463. Tan, Y., X. Lu, Z. Cheng, G. Pan, S. Liu, P. Apizajai, H. Wang, J. Zhang, and Y. Abulimiti, *miR-148a Regulates the Stem Cell-Like Side Populations Distribution by Affecting the Expression of ACVR1 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma*. *Onco Targets Ther*, 2020. **13**: p. 8079-8094.
464. Xiong, S., Y. Feng, and L. Cheng, *Cellular Reprogramming as a Therapeutic Target in Cancer*. *Trends in Cell Biology*, 2019. **29**(8): p. 623-634.
465. Schewe, D.M. and J.A. Aguirre-Ghiso, *ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(30): p. 10519-24.
466. Gargiulo, G., M. Cesaroni, M. Serresi, N. de Vries, D. Hulsman, S.W. Bruggeman, C. Lancini, and M. van Lohuizen, *In vivo RNAi screen for BMI1 targets identifies TGF- β /BMP-ER stress pathways as key regulators of neural- and malignant glioma-stem cell homeostasis*. *Cancer Cell*, 2013. **23**(5): p. 660-76.
467. Liu, L., M. Zhao, X. Jin, G. Ney, K.B. Yang, F. Peng, J. Cao, T. Iwawaki, J. Del Valle, X. Chen, and Q. Li, *Adaptive endoplasmic reticulum stress signalling via IRE1 α -XBP1 preserves self-renewal of haematopoietic and pre-leukaemic stem cells*. *Nature Cell Biology*, 2019. **21**(3): p. 328-337.
468. Cerezo, M., A. Lehraiki, A. Millet, F. Rouaud, M. Plaisant, E. Jaune, T. Botton, C. Ronco, P. Abbe, H. Amdouni, T. Passeron, V. Hofman, B. Mograbi, A.S. Dabert-Gay, D. Debayle, D. Alcor, N. Rabhi, J.S. Annicotte, L. Heliot, M. Gonzalez-Pisfil, C. Robert, S. Morera, A. Vigouroux, P. Gual, M.M.U. Ali, C. Bertolotto, P. Hofman, R. Ballotti, R. Benhida, and S. Rocchi, *Compounds Triggering ER Stress Exert Anti-Melanoma Effects and Overcome BRAF Inhibitor Resistance*. *Cancer Cell*, 2016. **30**(1): p. 183.
469. Louis, D.N., A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W.K. Cavenee, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, P. Kleihues, and D.W. Ellison, *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. *Acta Neuropathol*, 2016. **131**(6): p. 803-20.
470. Li, R., H. Li, W. Yan, P. Yang, Z. Bao, C. Zhang, T. Jiang, and Y. You, *Genetic and clinical characteristics of primary and secondary glioblastoma is associated with differential molecular subtype distribution*. *Oncotarget*, 2015. **6**(9): p. 7318-24.
471. Klemm, F., R.R. Maas, R.L. Bowman, M. Kornete, K. Soukup, S. Nassiri, J.P. Brouland, C.A. Iacobuzio-Donahue, C. Brennan, V. Tabar, P.H. Gutin, R.T. Daniel, M.E. Hegi, and J.A. Joyce, *Interrogation of the Microenvironmental Landscape in Brain Tumors Reveals Disease-Specific Alterations of Immune Cells*. *Cell*, 2020. **181**(7): p. 1643-1660 e17.
472. Quail, D.F. and J.A. Joyce, *The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors*. *Cancer Cell*, 2017. **31**(3): p. 326-341.
473. Hambardzumyan, D., D.H. Gutmann, and H. Kettenmann, *The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression*. *Nat Neurosci*, 2016. **19**(1): p. 20-7.
474. Obacz, J., T. Avril, C. Rubio-Patino, J.P. Bossowski, A. Igbaria, J.E. Ricci, and E. Chevet, *Regulation of tumor-stroma interactions by the unfolded protein response*. *FEBS J*, 2019. **286**(2): p. 279-296.
475. Glickman, M.H. and A. Ciechanover, *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(2): p. 373-428.
476. Mukhopadhyay, D. and H. Riezman, *Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling*. *Science*, 2007. **315**(5809): p. 201-5.
477. Saville, M.K., A. Sparks, D.P. Xirodimas, J. Wardrop, L.F. Stevenson, J.C. Bourdon, Y.L. Woods, and D.P. Lane, *Regulation of p53 by the ubiquitin-conjugating enzymes UbcH5B/C in vivo*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(40): p. 42169-81.

478. Hattori, H., X. Zhang, Y. Jia, K.K. Subramanian, H. Jo, F. Loison, P.E. Newburger, and H.R. Luo, *RNAi screen identifies UBE2D3 as a mediator of all-trans retinoic acid-induced cell growth arrest in human acute promyelocytic NB4 cells*. *Blood*, 2007. **110**(2): p. 640-50.
479. Zhang, S., Y. Zhou, A. Sarkeshik, J.R. Yates, 3rd, T.M. Thomson, Z. Zhang, E.Y. Lee, and M.Y. Lee, *Identification of RNF8 as a ubiquitin ligase involved in targeting the p12 subunit of DNA polymerase δ for degradation in response to DNA damage*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(5): p. 2941-50.
480. Wu, K., J. Kovacev, and Z.Q. Pan, *Priming and extending: a UbcH5/Cdc34 E2 handoff mechanism for polyubiquitination on a SCF substrate*. *Mol Cell*, 2010. **37**(6): p. 784-96.
481. Shi, Y., B. Yuan, W. Zhu, R. Zhang, L. Li, X. Hao, S. Chen, and F. Hou, *Ube2D3 and Ube2N are essential for RIG-I-mediated MAVS aggregation in antiviral innate immunity*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 15138.
482. Brennan, C.W., R.G. Verhaak, A. McKenna, B. Campos, H. Nounshmehr, S.R. Salama, S. Zheng, D. Chakravarty, J.Z. Sanborn, S.H. Berman, R. Beroukhim, B. Bernard, C.J. Wu, G. Genovese, I. Shmulevich, J. Barnholtz-Sloan, L. Zou, R. Vegesna, S.A. Shukla, G. Ciriello, W.K. Yung, W. Zhang, C. Sougnez, T. Mikkelsen, K. Aldape, D.D. Bigner, E.G. Van Meir, M. Prados, A. Sloan, K.L. Black, J. Eschbacher, G. Finocchiaro, W. Friedman, D.W. Andrews, A. Guha, M. Iacocca, B.P. O'Neill, G. Foltz, J. Myers, D.J. Weisenberger, R. Penny, R. Kucherlapati, C.M. Perou, D.N. Hayes, R. Gibbs, M. Marra, G.B. Mills, E. Lander, P. Spellman, R. Wilson, C. Sander, J. Weinstein, M. Meyerson, S. Gabriel, P.W. Laird, D. Haussler, G. Getz, L. Chin, and T.R. Network, *The somatic genomic landscape of glioblastoma*. *Cell*, 2013. **155**(2): p. 462-77.
483. Korber, V., J. Yang, P. Barah, Y. Wu, D. Stichel, Z. Gu, M.N.C. Fletcher, D. Jones, B. Hentschel, K. Lamszus, J.C. Tonn, G. Schackert, M. Sabel, J. Felsberg, A. Zacher, K. Kaulich, D. Hubschmann, C. Herold-Mende, A. von Deimling, M. Weller, B. Radlwimmer, M. Schlesner, G. Reifenberger, T. Hofer, and P. Lichter, *Evolutionary Trajectories of IDH(WT) Glioblastomas Reveal a Common Path of Early Tumorigenesis Instigated Years ahead of Initial Diagnosis*. *Cancer Cell*, 2019. **35**(4): p. 692-704 e12.