ΤΜΗΜΑ Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
DEPARTMENT OF Biochemistry & Biotechnology UNIVERSITY OF THESSALY

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΖΑΚΑ ΑΝΤΖΕΛΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2022

Εφαρμογές της βιολογίας RNA στη διαγνωστική

Applications of RNA biology in diagnostics

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ματθίοπουλος Κωνσταντίνος (Επιβλέπων): Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γιακουντής Αντώνης: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μπαλατσός Νικόλαος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας-Γενετικής-Διαγνωστικοί Δείκτες», του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η συμβολή ορισμένων ατόμων υπήρξε καθοριστική για την υλοποίηση της μελέτης αυτής.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Ματθιόπουλο που με δέχθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής για την εκπόνηση της προπτυχιακής και μεταπτυχιακής μου εργασίας. Ήταν μεγάλη χαρά να συνεχίσω το project στο οποίο συμμετείχα και στο προπτυχιακό κύκλο σπουδών μου. Επίσης, ιδιαίτερα ευγνώμων είμαι στον κ. Γιακουντή για το συνεχές ενδιαφέρον του στην πορεία των πειραμάτων και τη καθοδήγηση του στη συγγραφή της μελέτης. Η εργατικότητα, η επιμονή, η υπομονή και η κριτική του σκέψη τον καθιστούν πρότυπο για εμένα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μπαλατσό που δέχθηκε να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου. Διευκόλυναν τη προσαρμογή μου στο εργαστήριο και ήταν πάντοτε πρόθυμοι να προσφέρουν τη βοήθεια τους μέσα σε ένα ευχάριστο και φιλικό κλίμα.

Περίληψη

Ο κόσμος του RNA ταξινομείται σε κωδικοποιητικά και μη κωδικοποιητικά RNA, ενώ στην περίπτωση των ιών μπορεί να λειτουργήσει ακόμη και ως γονιδίωμα μεταφέροντας πληροφορία για κωδικοποιητικά και μη μετάγραφα. Σήμερα είναι γνωστό ότι μη κωδικοποιητικά RNA επιτελούν πολλαπλούς βιολογικούς ρόλους. Μια από τις πιο άφθονες ομάδες θεωρούνται τα miRNAs, μη κωδικοποιητικά μετάγραφα μήκους 20-24 νουκλεοτιδίων που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες που μπορεί να αφορούν την φυσιολογία, παθολογία, γενετική, επιγενετική, ογκολογία και ανάπτυξη, ενώ έχει δειχθεί ότι παίζουν ρόλο ακόμη και σε ιϊκές λοιμώξεις.

Πέρα από το ρόλο του στην παθολογία, το RNA φέρει επιπλέον χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδανικό βιοδείκτη στη διαγνωστική μολυσματικών και μη ασθενειών. Οι RNA δείκτες επιτυγχάνουν υψηλότερη ευαισθησία και εξειδίκευση σε σχέση με πρωτεϊνικούς ανοσολογικούς δείκτες στην περίπτωση αρκετών ιϊκών λοιμώξεων και κλασσικών πρωτεϊνικών μη επεμβατικών δεικτών για διάφορους τύπους καρκίνου. Προτείνεται, λοιπόν, η αξιοποίηση του RNA για διάγνωση λοιμογόνων (ιός του Δυτικού Νείλου) και μη (γαστρικός καρκίνος) νόσων. Πρόκειται για ασθένειες των οποίων η αξιόπιστη και έγκαιρη διάγνωση είναι κρίσιμη. Στην περίπτωση του ιού του Δυτικού Νείλου, ο εύκολος τρόπος μετάδοσης μέσω κουνουπιών και οι σοβαρές κλινικές εκδηλώσεις που προκαλεί τον έχουν ανάγει σε δημόσια απειλή με την ανάγκη επιδημιολογικής παρακολούθησης του να εντείνεται λόγω έλλειψης εμβολίου και κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής. Από την άλλη, η ασυμπτωματική φύση του γαστρικού καρκίνου και η μειωμένη αποτελεσματικότητα θεραπειών λόγω διάγνωσης σε προχωρημένο σταδίου υπογραμμίζει την ανάγκη προσυμπτωματικού ελέγχου. Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις οι υφιστάμενες μέθοδοι διάγνωσης δε μπορούν να εξυπηρετήσουν τις ανάγκες αυτές λόγω υψηλού κόστους και πολυπλοκότητας. Στη παρούσα πτυχιακή, εξετάζεται η προοπτική ενσωμάτωσης της βιολογίας RNA και της συνθετικής βιολογίας για την ανάπτυξη ενός πλήρους πρωτοκόλλου που θα δύνανται να ανταποκριθεί στη διαγνωστική τελικής φροντίδας. Παράλληλα, διερευνάται η προοπτική αξιοποίησης των μεταφραστικών Toehold ριβοδιακοπτών για την μελλοντική ανάπτυξη συστημάτων διαγνωστικού ελέγχου στο πεδίο.

Στο πειραματικό σκέλος εξετάστηκε η απόδοση Toehold ριβοδιακοπτών με γονίδιο αναφοράς τη GFP για την ανίχνευση του γονιδιώματος του ιού του Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 1 και 2. Επίσης, σχεδιάστηκαν 2 ζεύγη εκκινητών για την εξειδικευμένη ανίχνευση των γενεαλογιών 1 και 2, ενώ παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα για την απόλυτη ποσοτικοποίηση του ιϊκού φορτίου μέσω qPCR ως επιβεβαιωτική μέθοδος στα πλαίσια ανάπτυξης ολοκληρωμένου πρωτοκόλλου εργαστηριακής διάγνωσης. Όσον αφορά το γαστρικό καρκίνο, εξετάστηκε η υπογραφή 9 όγκο-εκφραζόμενων και 7 όγκο-κατεσταλμένων miRNAs σε γαστρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές καθώς και σε κλινικό δείγμα βιοψίας στομάχου και αίματος εθελοντή με εντερική μεταπλασία έναντι δείγματος υγιούς ατόμου (αίμα) στα πλαίσια έναρξης κλινικής μελέτης. Παράλληλα, επιλύθηκαν τεχνικά ζητήματα για το χειρισμό αίματος και τη βέλτιστη ποσότητα RNA που χρειάζεται για την αξιόπιστη ανίχνευση miRNAs. Ακόμη, αξιολογήθηκαν 5 miRNAs και το U6 ως κανονικοποιητές των αποτελεσμάτων των qPCR σε πλάσμα και κύτταρα του αίματος. Τέλος, στα πλαίσια πιλοτικών δοκιμών κατασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα για την απόλυτη ποσοτικοποίηση συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου παρόμοιου μήκους με miRNAs και ελέχθηκε η απόδοση Toehold ριβοδιακόπτη στην *in vitro* ανίχνευση συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου.

Λέξεις κλειδιά: RNA διαγνωστική, RNA γονιδίωμα, miRNAs, ιός Δυτικού Νείλου, γαστρικός καρκίνος, Toehold ριβοδιακόπτες

Summary

The RNA world is classified into coding and non-coding RNA, and in the case of viruses it can even function as a genome carrying information about coding and non-coding transcripts. It is now known that non-coding RNAs perform a variety of biological roles. One of the most abundant groups is considered to be miRNAs, non-coding transcripts of 20-24 nucleotides that regulate gene expression at the post-transcriptional level. They have been shown to contribute to any abnormality that may involve physiology, pathology, genetics, epigenetics, oncology and development, and have even been shown to play a role in viral infections.

Apart from its role in pathology, RNA has additional features that make it an ideal biomarker in the diagnosis of infectious and non-infectious diseases. RNA markers achieve higher sensitivity and specificity than protein immunological markers in the case of several viral infections and standard non-invasive protein markers for various types of cancer. In the current study, it is proposed to utilize RNA in the diagnosis of infectious (West Nile virus infection) and non (gastric cancer) infections. The early and valid diagnosis of these particular diseases is critical. In the case of West Nile virus, it has emerged as a public threat due to the easy mode of transmission through mosquitoes and the severe clinical manifestations that can cause. The need of epidemiological surveillance is becoming more urgent due to lack of vaccine and appropriate treatment. On the other hand, the asymptomatic nature of gastric cancer and the reduced effectiveness of treatments due to diagnosis in advanced stages highlight the demand of screening. However, in both cases the existing diagnostic methods can not meet these requirements due to high cost and complexity. The present study examines the prospect of integrating RNA biology and synthetic biology into the development of a complete protocol that can respond to point of care diagnostics. At the same time, the use of translational Toehold riboswitches is explored aiming to future development of diagnostic control systems in the field.

Concerning the experimental part of the study, the performance of Toehold riboswitch coding for GFP in the detection of West Nile virus genome of lineages 1 and 2 was evaluated. Also, 2 pairs of primers were designed for the specific detection of lineages 1 and 2, while standard solutions were prepared for the absolute quantification of viral load by qPCR as a confirmatory method in the context of developing a comprehensive diagnostic protocol. Regarding gastric cancer, a signature of 9 tumor-expressed and 7 tumor-suppressed miRNAs was examined in gastric cancer cell lines as well as in a stomach and blood biopsy of a volunteer with intestinal metaplasia and a healthy individual (blood) in the context of a clinical study initiation. Moreover, technical issues related to handling of blood and optimization of RNA amount needed for reliable miRNA detection were resolved. In addition, 5 miRNAs and U6 were evaluated as normalizers of qPCR data in plasma and blood cells. Absolute quantification of synthetic oligonucleotides of similar length to miRNAs was demonstrated. Finally, the performance of a Toehold switch in detecting synthetic oligonucleotide was tested.

Keywords: RNA diagnostics, RNA genome, miRNAs, West Nile virus, gastric cancer, Toehold riboswitches

Περιεχόμενα

Πίνακας Περιεχόμενων για τους πίνακες

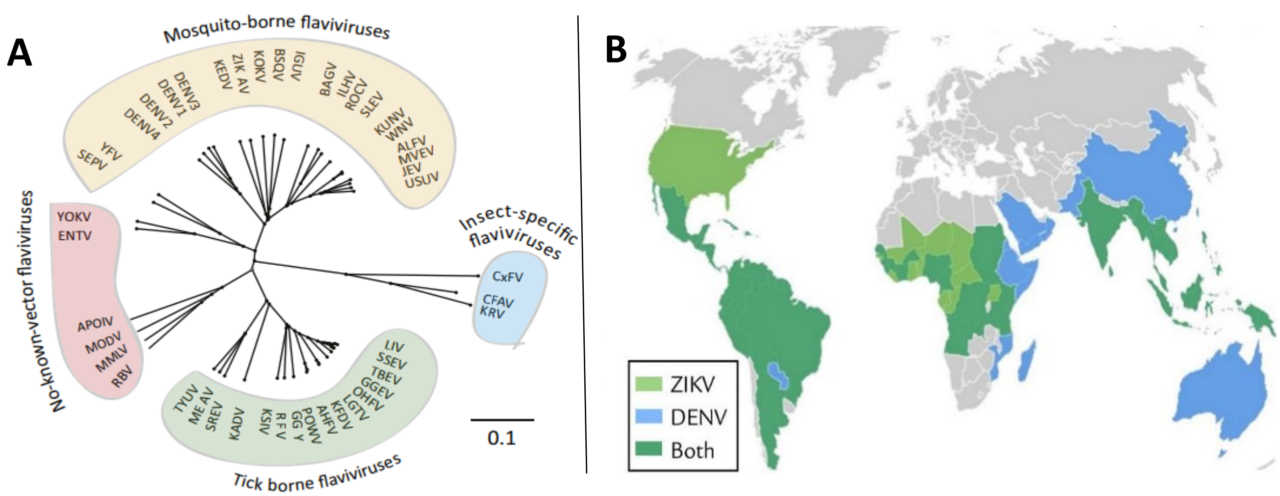
Πίνακας Περιεχόμενων για τις εικόνες

Κεφάλαιο 1: Ιός του Δυτικού Νείλου

1.1 Ταξινόμηση του ιού του Δυτικού Νείλου – Συγγενικοί ιοί

Ο ιός του Δυτικού Νείλου ανήκει στους αρμποϊούς, μια ετερογενή ομάδα περίπου 537 ιών με RNA γονιδίωμα που στην πλειοψηφία τους μεταδίδονται μέσω αιματοφάγων αρθρόποδων στα σπονδυλωτά. Ο ιός του Δυτικού Νείλου ταξινομείται στο γένος *Flavivirus* της οικογένειας *Flaviviridae*, η οποία συγκροτείται από ιούς με γονιδίωμα RNA θετικής πολικότητας των 11 kb. Το γένος *Flavivirus* οργανώνεται σε περισσότερους από 66 ιούς με τους ξενιστές και τη μεταδοτικότητα τους να διαφέρει. Ανάλογα με τον φορέα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 4 οικολογικές ομάδες: ομάδα με φορέα μετάδοσης τα κουνούπια (συμπεριλαμβανομένου του ιού του Δυτικού Νείλου), με φορέα μετάδοσης τα τσιμπούρια, ομάδα φλαβοϊών που συναντάται μόνο σε σπονδυλωτά και ομάδα που έχει απομονωθεί αποκλειστικά από έντομα (Εικ. 1Α). Μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω με βάση αντιγόνα που εκφράζουν με τον ιό του Δυτικού Νείλου να κατατάσσεται στην ορολογική ομάδα των ιών της ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας [2, 3].

Στενά συγγενικοί ιοί με τον ιό του Δυτικού Νείλου που ανήκουν στην ίδια ορολογική ομάδα είναι οι παθογόνοι ιοί Zika και ο ιός του Δάγκειου πυρετού (Dengue). Πρόκειται για 3 από τους 5 επιδημικούς αρμποϊούς (ιός του Δυτικού Νείλου, Zika, Dengue, ιός του κίτρινου πυρετού και Chikungunya) που έχουν κυκλοφορήσει και επανακυκλοφορήσει και στα 2 ημισφαίρια τις τελευταίες δεκαετίες συνιστώντας σοβαρές απειλές για τη δημόσια υγεία (Εικ. 1Β) [4]. Όσον αφορά στον Dengue, είναι ενδημικός σε πάνω από 100 κράτη κατανεμημένα σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές και ιδιαίτερα στην Νοτιοανατολική Ασία και Δυτικό Ειρηνικό. Προσβολή από τον ιό μπορεί να προκαλέσει ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, από δάγκειο πυρετό, μια ήπια ασθένεια με συμπτώματα παρόμοια με το κρύωμα, μέχρι αιμορραγικό πυρετό και σύνδρομο κλονισμού του Dengue που μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο. Ο Dengue απειλεί να προσβάλει τα 2/3 του παγκόσμιου πληθυσμού με τα κρούσματα να έχουν αυξηθεί 30 φορές τα τελευταία 50 χρόνια. Από την άλλη πλευρά, ο Zika προκάλεσε επιδημίες το 2007 σε νήσους στην Ασία και στην Αφρική και έκτοτε έχει εξαπλωθεί σε Νότια και κεντρική Αμερική. Η σημαντικότερη επιδημία που προκάλεσε ήταν το 2016 στη λατινική Αμερική όπου τα κρούσματα εκτιμούνται σε 4 εκατομμύρια (Εικ. 1Β). Έχει συσχετιστεί με σοβαρές νευρολογικές ασθένειες, το σύνδρομο Gullain Barre σε ενήλικους και νευροαναπτυξιακές ανωμαλίες νεογνών που είχαν μολυνθεί κατά την κυοφόρηση τους [5, 6].



B.Collins, M.H. and S.W. Metz, *Progress and Works in Progress: Update on Flavivirus Vaccine Development.* Clin Ther, 2017. 39(8): p. 1519-1536.

Εικόνα 1: Φλαβοϊοί. Α) Κατηγοριοποίηση των ιών του γένους *Flavivirus με βάση το φορέα μετάδοσης τους [3]. Β) Γεωγραφική κατανομή Zika και Dengue, στενά συγγενικών ιών με τον ιό του Δυτικού Νείλου [6].*

1.2 Φυλογένεση και επιδημιολογία ιού Δυτικού Νείλου

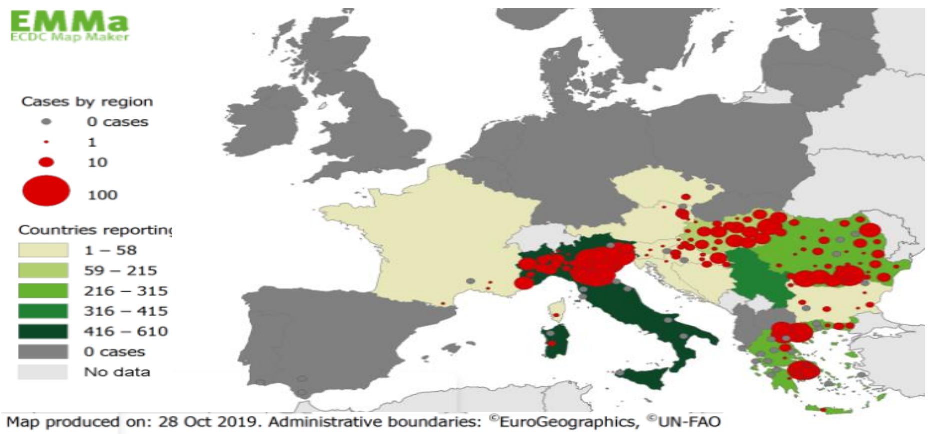
Από την ανακάλυψη του το 1937, ο ιός του Δυτικού Νείλου έχει εξαπλωθεί σε όλες τις ηπείρους πέρα από την Ανταρκτική εμφανίζοντας γενετική παραλλακτικότητα. Φυλογενετικές αναλύσεις υποδεικνύουν την ύπαρξη 5 γενεαλογιών με την κατανομή τους να συνάδει με τις περιοχές από τις οποίες απομονώθηκαν αρχικά, ενώ τα γονιδιώματα των γενεαλογιών διαφέρουν πάνω από 20 – 25%. Μόνο οι γενεαλογίες 1, 2 και 5 έχουν συσχετιστεί με παθογένεια στον άνθρωπο. Στελέχη της γενεαλογίας 1 και 2 φαίνεται να έχουν αποκτήσει πιο παθογόνο φαινότυπο αυξάνοντας τον αριθμό των μολύνσεων σε πτηνά, ανθρώπους και ιπποειδή [7].

1.2.1 Γενεαλογία 1

Έχει ευρεία κατανομή παγκοσμίως και συγκροτείται από 2 κλάδους: 1a and 1b. Ο κλάδος 1a σήμερα περιλαμβάνει απομονώσεις από την Αφρική, την Ευρώπη, τη Μέση Ανατολή, την Ασία και την Αμερική. Προήρθε από την υποσαχάρια ή Βόρεια Αφρική στις αρχές του 20ου αιώνα. Στη συνέχεια εξαπλώθηκε προς τα βόρεια τη δεκαετία του 1970-1980 μέσω μεταναστευτικών πτηνών που ακολουθούσαν διαδρομή που συνδέει τη Βόρεια Αφρική και το Ισραήλ με τη Ρωσία και την Κεντρική Ευρώπη. Τη δεκαετία του 1990, εμφανίστηκε στο Μαρόκο και τη Δυτική Ευρώπη, όπου προκάλεσε μικρές σποραδικές εξάρσεις. Το 1999 ο ιός του Δυτικού Νείλου διέσχισε το Δυτικό ημισφαίριο, καθώς στέλεχος της γενεαλογίας 1a εντοπίστηκε στη Νέα Υόρκη όπου προκάλεσε σοβαρές νευρολογικές διαταραχές και θανάτους σε ανθρώπους, άλογα και πτηνά επηρεάζοντας άγριους πληθυσμούς πτηνών. Εξαπλώθηκε στη βόρεια και στη συνέχεια στη νότια Αμερική, ενώ αναδείχθηκε σε παγκόσμια απειλή για τη δημόσια υγεία. Όσον αφορά στο κλάδο 1b, εκπροσωπείται από τον αλλιώς λεγόμενο ιό Kunjin της Αυστραλίας που έχει προκαλέσει εξάρσεις στην Αυστραλία, την Νοτιοανατολική Ασία και Παπούα της Νέας Γουινέας [8, 9]. Σε ορισμένα φυλογενετικά δέντρα η γεναλογία 1 παρουσιάζεται και με τον επιπλέον κλάδος c ο οποίος άλλοτε κατηγοριοποιείται ως γενεαλογία 5. Εκπροσωπείται από απομονώσεις σε κουνούπια και ανθρώπους από την δεκαετία του 1950 και 1980 αντίστοιχα.

1.2.2 Γενεαλογία 2

Η γενεαλογία 2 έχει εντοπιστεί σε Αφρική, Μαδαγασκάρη, Μέση Ανατολή και Ευρώπη με την προέλευση της να είναι από την Αφρική. Μάλιστα, το στέλεχος που απομονώθηκε για πρώτη φορά στην Uganda το 1937 εντάσσεται στη γενεαλογία 2 [10]**.** Παρότι αρχικά θεωρήθηκε λιγότερο παθογόνος από την 1, αποδείχθηκε ότι είναι υπεύθυνη για τις αυξημένες εξάρσεις του ιού σε ανθρώπους και ιπποειδή στη νότια Αφρική, την Ανατολική και Νότια Ευρώπη έχοντας εκτοπίσει τη γενεαλογία 1 από την Ευρώπη. Η πλειονότητα των περιπτώσεων ανθρώπων με νευρολογικές διαταραχές στην Ευρώπη από το 2010 και ύστερα σχετίζονται με μολύνσεις από στελέχη γενεαλογίας 2. Πιο συγκεκριμένα, μόνο η γενεαλογία 1 κυκλοφορούσε στην κεντρική Ευρώπη μέχρι το 2004, όταν στέλεχος γενεαλογίας 2 απομονώθηκε για πρώτη φορά στην Ουγγαρία και άλλο στέλεχος γενεαλογίας 2 στη Ρωσία. Το ρωσικής προέλευσης στέλεχος εξακολουθεί να κυκλοφορεί στην Ανατολική Ευρώπη, ενώ της ουγγρικής προέλευσης έχει εξαπλωθεί στη κεντρική και νότια Ευρώπη. Έχει προκαλέσει την πλειονότητα των εξάρσεων στην Ευρώπη συμπεριλαμβάνοντας της Ελλάδας το 2010 και τα επόμενα χρόνια Σερβία, Κροατία, Ιταλία και Ρουμανία, με ακόλουθη εξάπλωση στην Αυστρία, την Τσεχία και τη Γερμανία (Εικ. 3) [11, 12] Η μεγαλύτερη έξαρση που έχει καταγραφεί στην Ευρώπη τόσο σε αριθμό μολύνσεων όσο και γεωγραφική έκταση ήταν το 2018 (Εικ. 2). Σημειώθηκαν 2083 μολύνσεις σε ανθρώπους με 181 θανάτους (ποσοστό θνησιμότητας 9%), αύξηση που κυμαίνεται 7,2 φορές πιο πάνω από το 2017. Το πρώτο περιστατικό καταγράφηκε στην Ελλάδα, ενώ τα 2/3 των περιστατικών εντοπίστηκαν στην Μεσόγειο με την Ελλάδα να συγκεντρώνει το δεύτερο υψηλότερο αριθμό κρουσμάτων [11]**.** Όσον αφορά στην Ελλάδα, το πρώτο κρούσμα ιού του Δυτικού Νείλου σε άνθρωπο καταγράφηκε το 2010 με το στέλεχος να κατατάσσεται στην γενεαλογία 2. Συνεχίστηκαν να σημειώνονται περιστατικά μέχρι το 2014, ακολούθησε μια παύση μέχρι 2017 και έκτοτε καταγράφονται έως και σήμερα. Τα περιστατικά κατανέμονται σε διάφορες περιοχές της χώρας κατά τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες, ενώ ο ιός κυκλοφορεί σε όλες σχεδόν τις περιφέρειες. Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι ο ιός του Δυτικού Νείλου έχει εγκατασταθεί στην Ελλάδα με τον συνολικό αριθμό κρουσμάτων και θανάτων κατά τη περίοδο 2010-2020 να ισούται με 1361 και 193 αντίστοιχα σύμφωνα με τον εθνικό οργανισμό δημόσιας υγείας (https://eody.gov.gr/). Στο σημείο αυτό να υπογραμμιστεί ότι τα κρούσματα έχουν υποεκτιμηθεί καθώς η πλειονότητα είναι ασυμπτωματικοί με αποτέλεσμα να μην διαγιγνώσκονται. Ενδεικτικά να σημειωθεί ότι κατά τη περίοδο 2010-2018 στην Ευρώπη επίσημα ανιχνεύτηκαν 3.849 άτομα που νόσησαν από τον ιό του Δυτικού Νείλου με εκτιμήσεις να κάνουν λόγο για συνολικά τουλάχιστον 280.400 νοσούντες στην πραγματικότητα [13]



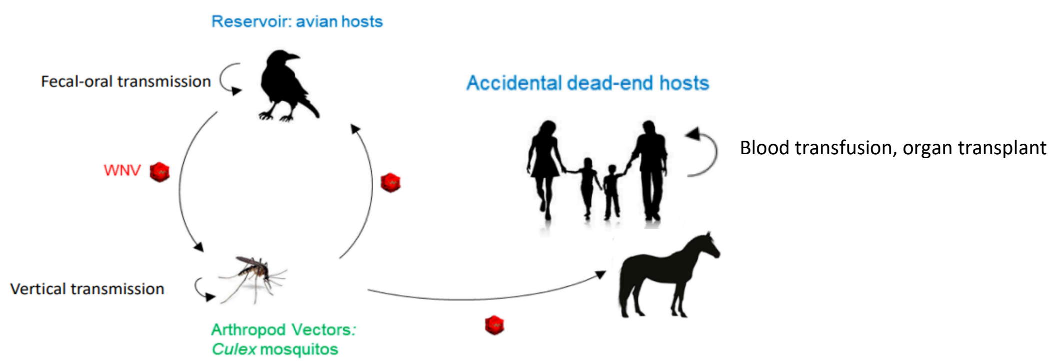
Camp, J.V. and N. Nowotny, *The knowns and unknowns of West Nile virus in Europe: what did we learn from the 2018 outbreak?* Expert Rev Anti Infect Ther, 2020. **18**(2): p. 145-154.

Εικόνα 2: *Χάρτης της Ευρωπαϊκής Ένωσης με τα κράτη που καταγράφηκαν κρούσματα ιού του Δυτικού Νείλου σε ανθρώπους το 2018. Ανάλογα με τον αριθμό των κρουσμάτων, οι χώρες σημειώνονται με διαφορετικό χρώμα, ενώ το μέγεθος των κόκκινων είναι ανάλογο με τον αριθμό των κρουσμάτων στην εκάστοτε περιοχή [11].*

1.3 Κύκλος μετάδοσης ιού του Δυτικού Νείλου

Σημαντικό ρόλο στην ευρεία γεωγραφική κατανομή του ιού του Δυτικού Νείλου έχει διαδραματίσει ο ενδοζωικός κύκλος μετάδοσης του με τον ιό να προσβάλλει > 300 είδη πτηνών από τουλάχιστον 20 οικογένειες, > 150 είδη κουνουπιών από τουλάχιστον 11 γένη, > 30 είδη θηλαστικών, αρκετά ερπετά και αμφίβια, σε αντίθεση με άλλους αρμποϊούς. Αρχικά, πραγματοποιείται κύκλος ενίσχυσης στον οποίο συμμετέχουν πτηνά και κουνούπια κυρίως του γένους *Culex*. Τα πτηνά λειτουργούν ως ξενιστές δεξαμενή με την τάξη των στρουθιόμορφων και κυρίως την οικογένεια των κορακίδων να αποτελούν τις σημαντικότερες δεξαμενές. Ο τίτλος αυτός αποδίδεται στα πτηνά, καθώς ο ιός επιτυγχάνει επίπεδα ιαιμίας τουλάχιστον 10^5 pfu/ml που θεωρούνται ικανά για τη μετάδοση του σε άλλους φορείς που λαμβάνουν γεύμα αίματος από μολυσμένα πτηνά. Στα κουνούπια μετά τη λήψη αίματος ο ιός πολλαπλασιάζεται και εντοπίζεται στις εκκρίσεις των σιελογόνων αδένων μέσω των οποίων μεταδίδεται σε άλλους ξενιστές όταν λαμβάνουν γεύμα αίματος. Στην Ευρώπη κύριοι φορείς είναι τα κουνούπια του είδους *Culex pipiens,* που ταξινομούνται περαιτέρω στους βιοτύπους *Cx. p. pipiens* και *Cx. p. molestus*. Έχουν διαφορετική συμπεριφορά συμπεριλαμβανομένου των διατροφικών συνηθειών τους. Τα *Cx. p. pipiens* λαμβάνουν γεύματα αίματος κυρίως από πτηνά μεταδίδοντας τον ιό στον πληθυσμό των πτηνών και χαρακτηρίζονται ως φορείς ενίσχυσης. Τα *Cx. p. Molestus,* που προτιμούν να λαμβάνουν γεύμα αίματος από θηλαστικά συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου μολύνοντας τους με τον ιό, χαρακτηρίζονται ως φορείς γέφυρα. Γενικότερα, τα κουνούπια είναι κομβικής σημασίας για τη συμπεριφορά του ιού. Στον κύκλο μετάδοσης ο άνθρωπος και τα άλογα λειτουργούν ως τελικοί ξενιστές καθώς, παρότι προσβάλλονται από τον ιό και μπορεί να νοσήσουν, αναπτύσσουν χαμηλά επίπεδα ιαιμίας που δεν αρκούν για τη μετάδοση του ιού σε άλλους ξενιστές [14-16]. Τέλος, να σημειωθεί ότι ανάλογα με το κλίμα της εκάστοτε περιοχής, η περίοδος μετάδοσης μεταβάλλεται με τις εύκρατες περιοχές να καταγράφουν κρούσματα αρχές καλοκαιριού και να κορυφώνονται τον Αύγουστο, ενώ περιοχές με πιο ήπια κλίμα καθ' όλη τη διάρκεια της χρονιάς [17].

Πέρα από τη μετάδοση του ιού μέσω τσιμπήματος κουνουπιών, έχουν δειχθεί και άλλοι οδοί. Συγκεκριμένα, έχει καταγραφεί απευθείας μετάδοση μεταξύ των πτηνών μέσω κατανάλωσης ή στενής επαφής με υγρά από το στόμα ή την κλοάκη λόγω υψηλού ιϊκού φορτίου. Στα κουνούπια ο ιός επιτυγχάνει κάθετη μεταφορά στους απογόνους του μολυσμένου θηλυκού κουνουπιού. Επιπλέον, η μετάδοση του ιού στον άνθρωπο είναι δυνατή μέσω μετάγγισης αίματος, μεταμόσχευσης οργάνων, μέσω του πλακούντα στο έμβρυο και του θηλασμού (Εικ. 3) [16].



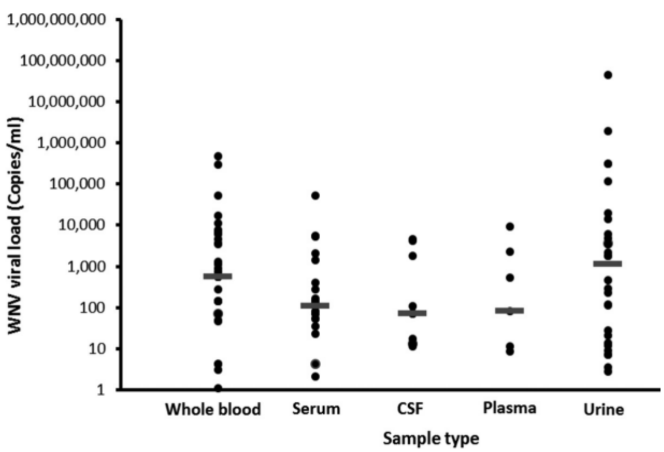
Τροποποίηση από Fiacre, L., et al., *Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(23).

Εικόνα 3: *Κύκλος μετάδοσης του ιού του Δυτικού Νείλου. Ο ιός του Δυτικού Νείλου διατηρείται στη φύση σε έναν ενζωϊκό κύκλο μεταξύ πτηνών και κουνουπιών κυρίως του γένους Culex. Οι άνθρωποι και τα θηλαστικά λειτουργούν ως τελικοί ξενιστές [24].*

1.4 Διακυμάνσεις κλινικών εκδηλώσεων – ιϊκού φορτίου

1.4.1 Άνθρωπος

Κατά το τσίμπημα ενός μολυσμένου κουνουπιού, μέσω του σιέλου ο ιός του Δυτικού Νείλου εναποτίθεται στο δέρμα και μολύνει τα δερματικά κύτταρα Langerhans. Τα κύτταρα μετακινούνται σε τοπικούς λεμφαδένες όπου ο ιός πολλαπλασιάζεται και επιτυγχάνει χαμηλή ιαιμία. Ο ιός στη συνέχεια μολύνει πολλά όργανα (όπως τον σπλήνα, το ήπαρ, τους νεφρούς και σπανιότερα το κεντρικό νευρικό σύστημα). Σε υγιείς ανθρώπους το ιϊκό φορτίο στο αίμα κορυφώνεται μεταξύ 2-4 ημερών, ενώ ο ιός μπορεί να ανιχνευτεί σε ούρα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η ιαιμία μειώνεται με την έναρξη κλινικών συμπτωμάτων και διαρκεί για 8-10 μέρες [9, 17, 18]. Το 80% των προσβεβλημένων ατόμων παραμένουν ασυμπτωματικοί, ενώ το ϊικό φορτίο εντοπίζεται συχνά μόνο στο αίμα σε χαμηλά επίπεδα, που εκτιμάται ότι μπορεί να είναι ακόμη και 100 αντίγραφα/ml [19]. Περίπου το 20% βιώνουν μια ήπια συμπτωματολογία, γνωστή ως πυρετός του Δυτικού Νείλου που χαρακτηρίζεται από μια ποικιλία μη ειδικών συμπτωμάτων όπως απότομη έναρξη πυρετού, κεφαλαλγία, μυαλγία, ναυτία, κόπωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η διάγνωση να μην είναι εφικτή μόνο με βάση τη κλινική εικόνα. Έχει δειχθεί ότι σε ασθενείς που εμφανίζουν τα συμπτώματα αυτά, το ϊικό φορτίο ανιχνεύεται πιο συχνά σε ούρα σε σχέση με το αίμα. Ωστόσο, περίπου 1 στις 150 μολύνσεις καταλήγει σε νευρολογικές ασθένειες που αφορούν σε εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα και οξεία χαλαρή παράλυση. Στις περιπτώσεις αυτές πάνω από το 50% εκδηλώνουν μακροχρόνιες νευρολογικές διαταραχές, ενώ το 10% εκτιμάται ότι καταλήγει [14]. Άτομα άνω των 50 χρόνων, ανοσοκατασταλμένα ή με χρόνια νοσήματα εμφανίζουν υψηλότερο κίνδυνο να παρουσιάσουν σοβαρά συμπτώματα [20]. Σε ασθενείς με προσβολή του νευρικού συστήματος, το γονιδιωματικό RNA του ιού ανιχνεύεται συχνά σε αίμα και ούρα [21]. Γενικότερα σε συμπτωματικούς ασθενείς, η διάμεση τιμή του ϊικού φορτίου στα δείγματα ούρων εκτιμάται σε 1100 αντίγραφα/ml, σε ολικό αίμα στα 550 αντίγραφα/ml και σε ορό, πλάσμα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό λιγότερο από 100 αντίγραφα/ml (Εικ. 4)[22].



Lustig, Y., et al., *Superiority of West Nile Virus RNA Detection in Whole Blood for Diagnosis of Acute Infection.* J Clin Microbiol, 2016. **54**(9): p. 2294-7.

Εικόνα 4: *Ιικό φορτίο ιού Δυτικού Νείλου σε δείγματα ασθενών με οξεία μόλυνση. Παρατίθεται το ιικό φορτίο σε ορό (20 δείγματα), πλάσμα (7 δείγματα), εγκεφαλονωτιαίο υγρό (11 δείγματα), ολικό αίμα (33 δείγματα), και ούρα (28 δείγματα) όπως υπολογίστηκε μέσω RT-PCR [22].*

1.4.2 Πτηνά

Στην περίπτωση των πτηνών η ευαισθησία στην προσβολή από τον ιό και η σοβαρότητα της λοίμωξης ποικίλλει ανάλογα με το είδος με τη θνητότητα να κυμαίνεται από 0 – 100%. Η νόσος που προκαλεί ο ιός περιλαμβάνει μια ποικιλία συμπτωμάτων που περιλαμβάνουν νευρολογικές διαταραχές όπως αταξία, παράλυση, καθώς και άλλες κλινικές εκδηλώσεις όπως απώλεια βάρους και ανορθωμένα φτερά, ενώ προσβάλλονται ζωτικά συστήματα οργάνων. Η λοίμωξη διαρκεί έως μια βδομάδα, ενώ συχνά τα πτηνά καταλήγουν το πρώτο εικοσιτετράωρο από την εκδήλωση κλινικών συμπτωμάτων. Η ιαιμία διαρκεί λίγες μέρες με τα επίπεδα της να διαφέρουν ανάλογα το είδος με ορισμένα είδη να εμφανίζουν υψηλότερο ϊικό φορτίο από τα θηλαστικά. Παρόλα αυτά έχει δειχθεί ότι ο ιός μπορεί να παραμείνει για βδομάδες σε κάποια άγρια πτηνά. Στα Στρουθιόμορφα σημειώνεται την υψηλότερη ιαιμία και θνητότητα [14, 23, 24]. Πιο συγκεκριμένα, μελέτη που διεξήχθει σε *Corvus corone*, μέλος της οικογένειας των κορακοειδών της τάξης των στρουθιόμορφων, υπέδειξε ότι ο ϊικός τίτλος στο αίμα έπειτα από μόλυνση με το στέλεχος της Ελλάδας (GRE10) εκτιμάται στα $10^{10.3}$ αντίγραφα/ml. Βιοψία πτηνών που εμφάνισαν συμπτώματα αποκάλυψε ότι υψηλότερο ιϊκό φορτίο εντοπίζεται σε συκώτι, σπλήνα και μυελό των οστών (περίπου 10^9 -10^{10} αντίγραφα/g), ακολουθούν νεφρά και καρδιά (περίπου 10^8 αντίγραφα/g), ενώ ο χαμηλότερος τίτλος εντοπίζεται στον εγκέφαλο (περίπου 10^7 αντίγραφα/g) [25]. Επιπλέον, μελέτη σε πτώματα κορακοειδών υπέδειξε ότι το γονιδίωμα του ιού είναι ανιχνεύσιμο ακόμη και σε περιττώματα καθώς και φτερά σε ακόμη υψηλότερη ποσότητα [26].

1.5 Υπάρχουσες διαγνωστικές μέθοδοι και μειονεκτήματα

Η εργαστηριακή διάγνωση του ιού του Δυτικού Νείλου πραγματοποιείται μέσω ανίχνευσης, γενετικού υλικού, ιοσωμάτων, αντιγόνων ή αντισωμάτων σε δείγματα ιστών ή βιολογικών υγρών. Τα βιολογικά δείγματα που μπορεί να χρησιμοποιηθούν είναι αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ούρα, ομογενοποιημένοι ιστοί, κουνούπια καθώς και επιχρίσματα από τη στοματική κοιλότητα, την κλοάκη και φτερά από νεκρά πτηνά [27]. Στην Ευρωπαϊκή ένωση για να χαρακτηριστεί ένα κρούσμα ως επιβεβαιωμένο έχει οριστεί ότι απαιτείται τουλάχιστον ένα από τα εξής εργαστηριακά ευρήματα: απομόνωση του ιού ή ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος του ιού στο αίμα ή στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ή ανίχνευση εξειδικευμένων IgM αντισωμάτων για τον ιό στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ή υψηλός τίτλος IgM, ανίχνευση IgG καθώς και επαλήθευση με οροεξουδετέρωση. Παρακάτω αναλύονται οι διαγνωστικές προσεγγίσεις σε συνδυασμό με τις υφιστάμενες πειραματικές μεθόδους ανίχνευσης του ιού, οι οποίες φέρουν μειονεκτήματα που δεν επιτρέπουν την μαζική και οικονομικά βιώσιμη εφαρμογή τους.

1.5.1 Τεχνικές ενίσχυσης γονιδιώματος

Η ανίχνευση του γονιδιώματος πραγματοποιείται με τεχνικές ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων οι οποίες προσφέρουν υψηλή ευαισθησία, εξειδίκευση και παρέχουν αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η προσέγγιση αυτή προτιμάται για τον έλεγχο σε τράπεζες αίματος και οργάνων μεταμόσχευσης. Σχετικά με τις τεχνικές ενίσχυσης, η ανίχνευση του γονιδιώματος του ιού από ιστούς πτηνών και βιολογικά υγρά νεκρών πτηνών μπορεί να γίνει μέσω συμβατικής αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερισμού (RT-PCR). Ωστόσο, για κλινικά δείγματα από ανθρώπους απαιτείται υψηλότερη ευαισθησία λόγω των χαμηλών επιπέδων και σύντομης διάρκειας ιαιμίας. Υψηλότερη ευαισθησία μπορεί να επιτευχθεί με RT-qPCR. Μειονεκτήματα των τεχνικών αυτών είναι το υψηλό κόστος και η ανάγκη για ειδικό εξοπλισμό και κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό με αποτέλεσμα να μην βρίσκουν μαζική εφαρμογή εκτός του εργαστηρίου [9, 27-30].

1.5.2 Καλλιέργεια του ιού σε κυτταρικές σειρές

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην παρουσία ιοσωματίων στο κλινικό δείγμα το οποίο προστίθεται σε κατάλληλες κυτταρικές σειρές θηλαστικών ή κουνουπιών. Πραγματοποιούνται αραιώσεις και ακολουθεί επώαση με την κυτταροπαθογόνο δράση του ιού να εμφανίζεται σε 2-7 μέρες ανάλογα τον τίτλο του. Συνεπώς, πρόκειται για μια χρονοβόρο μέθοδο σε σχέση με άλλες. Ένα ακόμη μειονέκτημα είναι ότι για την καλλιέργεια του ιού απαιτείται εργαστήριο επιπέδου βιοασφάλειας 3 και εξειδικευμένο προσωπικό αυξάνοντας το κόστος της. Ως εκ τούτου εφαρμόζεται μόνο σε εργαστήρια αναφοράς και ερευνητικά κέντρα [9, 28].

1.5.3 Ανοσολογική μέθοδος

Η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ιού του Δυτικού Νείλου σε αίμα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό μέσω ανοσοφθοριζουσών καθώς και ανοσοενζυμικών δοκιμασιών είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη. Οι ανοσοσφαιρίνες M και G βρίσκονται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα 4 και 8 μέρες από την έναρξη των συμπτωμάτων αντίστοιχα και παραμένουν στον ορό για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αυτό συνεπάγεται ότι ανίχνευσή τους στον ορό μπορεί να οφείλεται σε πρόσφατη ή παλαιότερη μόλυνση με την δοκιμασία αφθονίας των IgG να μην διευκρινίζει ποια περίπτωση ισχύει. Το πρόβλημα αυτό είναι ιδιαίτερα έντονο σε περιοχές που ο ιός ανακυκλώνεται. Αντίθετα, η παρουσία IgM στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό υποδηλώνει πρόσφατη μόλυνση, καθώς IgM του αίματος δεν διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Από την άλλη πλευρά, η ανίχνευση αντιγόνων του ιού του Δυτικού Νείλου χρησιμοποιείται συνήθως σε δείγματα κουνουπιών και πτηνών στα οποία ο ιός επιτυγχάνει υψηλό πολλαπλασιασμό. Ωστόσο, το κύριο μειονέκτημα των ανοσολογικών μεθόδων προκύπτει από την υψηλή συντήρηση της αμινοξικής αλληλουχίας των αντιγόνων μεταξύ των φλαβοϊών. Επακόλουθο της υψηλής ομοιότητας των αντιγόνων είναι οι διασταυρούμενες αντιδράσεις των αντισώματων συγγενικών φλαβοϊών οδηγώντας σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Το πρόβλημα αυτό εντείνεται σε περιοχές που συνεντοπίζονται ο ιός του Δυτικού Νείλου, Zika και Dengue, καθώς και σε περιπτώσεις ατόμων που έχουν εμβολιαστεί έναντι κάποιου φλαβοϊού λόγω της παρουσίας αντισωμάτων που μπορεί να εμπλακούν σε διασταυρούμενες αντιδράσεις [9, 27, 28, 30].

1.5.4 Οροεξουδετέρωση

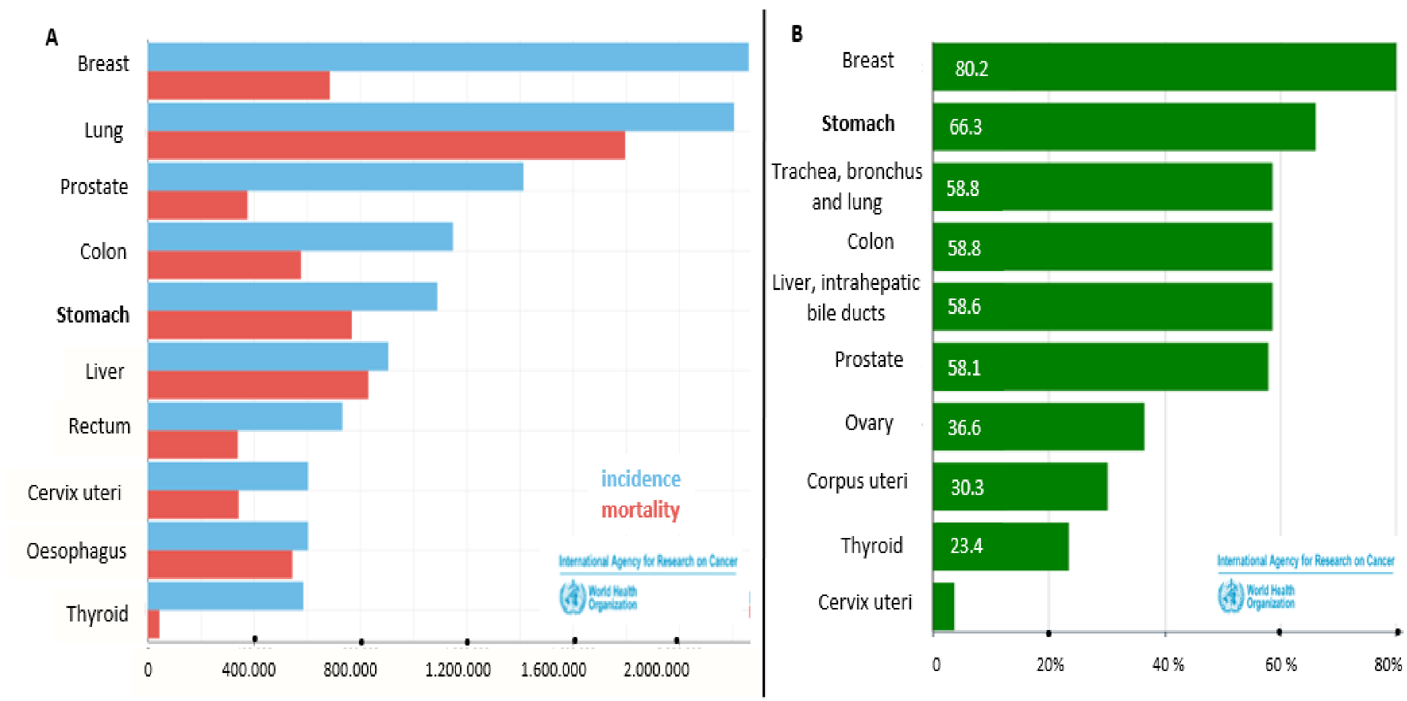
Σε περιπτώσεις που το αποτέλεσμα με τις προαναφερθείσες ανοσολογικές μεθόδους είναι θετικό, αναγκαία κρίνεται η διεξαγωγή οροεξουδετέρωσης με την παρατήρηση σχηματισμού πλακών για να ελεγχθεί αν το αποτέλεσμα οφείλεται σε διασταυρούμενες αντιδράσεις αντισωμάτων των φλαβοϊών. Προκειμένου να καταστεί εφικτή η διάκριση, η οροεξουδετέρωση πρέπει να γίνει παράλληλα σε συγγενικούς ιούς της ίδιας αντιγονικής ομάδας που κυκλοφορούν στην περιοχή με τη διαφορά μεταξύ του τίτλου οροεξουδετέρωσης των στενά συγγενικών ιών να χρησιμοποιείται ως κριτήριο για διάγνωση. Ωστόσο, ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν σε ασθενείς που η μόλυνση είναι σε τόσο αρχικό στάδιο που τα αντισώματα δεν έχουν παραχθεί ακόμη. Επιπλέον, η δοκιμασία οροεξουδετέρωσης παρέχει απάντηση σε τουλάχιστον 5 μέρες και συνεπώς πρόκειται για χρονοβόρα διαδικασία. Ακόμη ένα μειονέκτημα είναι ότι η χρήση κυτταροκαλλιεργιών του ιού απαιτεί επίπεδο βιοασφάλειας 3, εξειδικευμένο προσωπικό και είναι εργαστηριακά έντονη [9, 27, 28, 30].

Είναι εμφανές ότι απουσιάζει μια διαγνωστική μέθοδος που να είναι ικανή να καλύψει την ανάγκη για ταχεία και οικονομική ανίχνευση του ιού. Εμφανές, επίσης, είναι το γεγονός ότι η μέγιστη ευαισθησία και εξειδίκευση επιτυγχάνεται με τεχνικές ενίσχυσης του γονιδιώματος που προσφέρουν ακόμη και τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ των γενεαλογιών. Ως εκ τούτου, για την ανάπτυξη ενός ολοκληρωμένου πρωτοκόλλου διάγνωσης του ιού του Δυτικού Νείλου απαιτείται η ένταξη μιας τέτοια μεθόδου ως συνοδευτική μέθοδο επιβεβαίωσης.

Κεφάλαιο 2: Γαστρικός καρκίνος

2.1 Επιδημιολογία γαστρικού καρκίνου

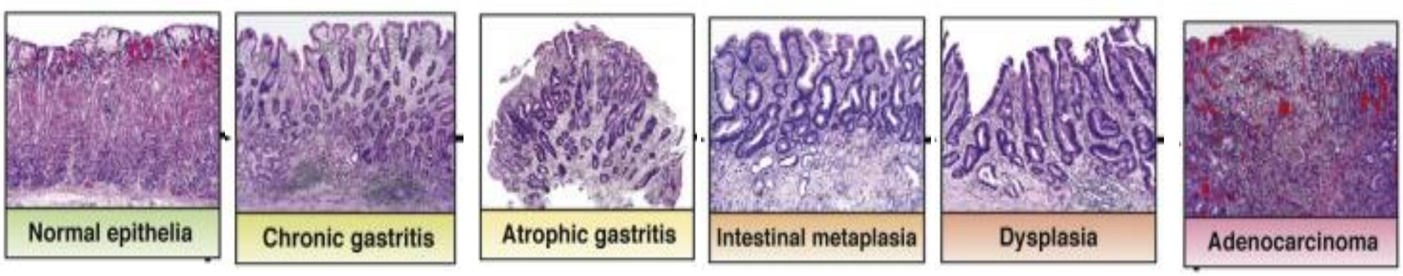
Παρότι η συχνότητα και η θνητότητα του γαστρικού καρκίνου έχει μειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες [31], σύμφωνα με δεδομένα από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (https://gco.iarc.fr/today/home) η συγκεκριμένη νεοπλασία εξακολουθεί να είναι ο πέμπτος συχνότερος και τρίτος πιο θανατηφόρος καρκίνος (Εικ. 5Α). Μάλιστα η συχνότητα εμφάνισης του είναι διπλάσια στους άντρες με αποτέλεσμα κατατάσσεται ως ο τρίτος πιο συχνός και θανατηφόρος καρκίνος για τους άνδρες. Το 2020 διαγνώστηκαν 1 εκατομμύριο άτομα με τον αριθμό αυτό να εκτιμάται ότι μέχρι το 2040 θα αυξηθεί σημαντικά, κατά 66,3%, σε σχέση με άλλους κοινούς καρκίνους (Εικ. 5Β). Η γεωγραφική κατανομή των κρουσμάτων είναι εξαιρετικά ετερογενής. Ο γαστρικός καρκίνος εμφανίζεται με υψηλότερη συχνότητα στην Ασία συγκεντρώνοντας το 75,3% των διαγνώσεων, ενώ ακολουθούν Λατινική Αμερική και Ανατολική Ευρώπη με την Ελλάδα να συγκεντρώνει το 0,2%. Το 2020 προκάλεσε το θάνατο 700.000 ανθρώπων με τη διάγνωση να γίνεται συνήθως σε προχωρημένα στάδια λόγω της ασυμπτωματικής φύσης των αρχικών σταδίων της ασθένειας με αποτέλεσμα να μειώνεται η απόδοση των θεραπειών. Ενδεικτικά να αναφερθεί ότι στις ΗΠΑ το ποσοστό επιβίωσης 5 ετών για άτομα που διαγιγνώσκονται με γαστρικό καρκίνο χωρίς μετάσταση υπολογίστηκε σε 65% σε αντίθεση με προχωρημένα στάδια που εκτιμάται σε 30% [32]. Αντίθετα, στις ανεπτυγμένες χώρες, όπως η Ιαπωνία, όπου η έγκαιρη διάγνωση φτάνει το 50%, το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης φτάνει το 90% αποδεικνύοντας ότι η έγκαιρη διάγνωση παίζει σημαντικό ρόλο στην έκβαση της πορείας του ασθενούς [33]. Ωστόσο, με εξαίρεση την Ιαπωνία και τη Νότια Κορέα, η πλειοψηφία των κρατών δεν έχουν συγκροτήσει προγράμματα ελέγχου για γαστρικό καρκίνο λόγω υψηλού κόστους [31].



Εικόνα 5: *Στατιστικά δεδομένα περιπτώσεων γαστρικού καρκίνου το 2020 από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας* (https://gco.iarc.fr/today). *A) Εκτιμώμενος αριθμός περιστατικών και θανάτων παγκοσμίως κατά το έτος 2020. B) Εκτιμήσεις για την αύξηση των ασθενών με καρκίνων από το 2020 μέχρι το 2040.*

2.2 Κλινικές εκδηλώσεις γαστρικού καρκίνου

Ο γαστρικός καρκίνος είναι εξαιρετικά ετερογενής όσον αφορά σε πρότυπα αρχιτεκτονικής και ανάπτυξης, κυτταρικής διαφοροποίησης, ιστογένεσης και μοριακής παθογένεσης [34]. Η γαστρική καρκινογένεση είναι μια διαδικασία με πολλά βήματα που, στις περισσότερες περιπτώσεις, προϋποθέτει χρόνια γαστρίτιδα (χρόνια φλεγμονή του γαστρικού βλεννογόνου), ατροφία (απώλεια γαστρικών αδένων), εντερική μεταπλασία (υποκατάσταση του γαστρικού επιθηλίου από εντερικό επιθήλιο), δυσπλασία (ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία) και τέλος αδενοκαρκίνωμα (Εικ. 6) [35, 36]. Η προκαρκινική εξέλιξη είναι χρονοβόρα, διαρκώντας περίπου 10 - 20 χρόνια [34] με την κατηγοριοποίηση του γαστρικού καρκίνου να πραγματοποιείται μέσω TNM. Πιο συγκεκριμένα, το κριτήριο T περιγράφει το βάθος του όγκου στο τοίχωμα του στομάχου, το N την εξάπλωση σε κοντινούς λεμφαδένες και το M την μετάσταση σε άλλα μέρη του σώματος [37]. Στο αρχικό στάδιο ο όγκος περιορίζεται στον βλεννογόνο και τον υποβλεννογόνο, ανεξάρτητα από το μέγεθος του όγκου ή την παρουσία/απουσία μετάστασης στους λεμφαδένες με το 80% των ασθενών να είναι ασυμπτωματικοί. Η θεραπεία που προτείνεται είναι η εκτομή μέσω ενδοσκόπισης. Σε προχωρημένο στάδιο τα κύτταρα του όγκου έχουν μετακινηθεί στο επίπεδο του υποορίου ή πέρα από αυτό για να διεισδύσουν στα γύρω όργανα με συχνά συμπτώματα να είναι δυσπεψία, επιγαστρικό άλγος, κοιλιακή μάζα, ενώ ως συμπτώματα συναγερμού χαρακτηρίζονται η δυσφαγία, απώλεια βάρους, γαστρεντερική αιμορραγία και εμετός. Η θεραπεία που προτείνεται είναι η χειρουργική αφαίρεση του όγκου, εάν εφικτή, χημειοθεραπείες και ακτινοθεραπεία [32, 38, 39]. Μάλιστα έχει δειχθεί ότι ασθενείς με προχωρημένο γαστρικό καρκίνο έχουν πιο σοβαρά συμπτώματα σε σύγκριση με ασθενείς με άλλους καρκίνους. Η ποιότητα ζωής επιδεινώνεται καθώς η νόσος εξελίσσεται, ενώ το κόστος της θεραπείας είναι υψηλότερο καθώς εξελίσσεται η νόσος και σε σχέση με άλλους καρκίνους [40].



Tan, P. and K.G. Yeoh, *Genetics and Molecular Pathogenesis of Gastric Adenocarcinoma.* Gastroenterology, 2015. **149**(5): p. 1153-1162 e3.

Εικόνα 6: *Συχνά στάδια γαστρικής καρκινογένεσης [36].*

2.3 Υπάρχουσες διαγνωστικές μέθοδοι

Σε προγράμματα προσυμπτωματικού ελέγχου για γαστρικό καρκίνο έχουν χρησιμοποιηθεί οι απεικονιστικές μέθοδοι της ακτινογραφίας και της ενδοσκόπησης καθώς και το πεψινογόνο, ένας βιοδείκτης που μπορεί να ανιχνευτεί στο αίμα [41]. Στα πλαίσια του μη επεμβατικού ελέγχου έχουν προταθεί και κλασικοί καρκινικοί δείκτες [42]. Η καθιερωμένη μέθοδος διάγνωσης είναι η ενδοσκόπηση λόγω της υψηλής ευαισθησίας από την οποία χαρακτηρίζεται. Ωστόσο, η διάρκεια της διαδικασίας, ο φόρτος εργασίας, η περιορισμένη τεχνογνωσία, το υψηλό κόστος για τη πλειονότητα των χωρών, οι παρενέργειες και η επεμβατική φύση της δεν καθιστούν εφικτή την εφαρμογή της ως μαζικό έλεγχο ρουτίνας στον πληθυσμό [43]. Από την άλλη πλευρά, η χρήση μη επεμβατικών βιοδεικτών είναι πιο απλή στην εφαρμογή της, πιο οικονομική και πιο ασφαλής, καθώς αποφεύγεται η ακτινοβολία και τυχόν ενοχλήσεις από επεμβατικές μεθόδους [44]. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν τους δείκτες που κυκλοφορούν σε βιολογικά υγρά ιδανικούς για προσυμπτωματικό έλεγχο. Όμως, οι παρόντες βιοδείκτες επιδεικνύουν χαμηλή ευαισθησία και εξειδίκευση με αποτέλεσμα να αποκλείεται η εκμετάλλευση τους στον έλεγχο ρουτίνας υπογραμμίζοντας την ανάγκη για την ανάπτυξη καινοτόμων αποτελεσματικών δεικτών διάγνωσης του γαστρικού καρκίνου [42, 45].

2.3.1 Απεικονιστικές μέθοδοι

Ακτινογραφία

Η έμμεση ακτινογραφία με γεύμα βαρίου επιτρέπει την ανίχνευση κακοήθων γαστρικών ελκών και βλαβών, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων πρώιμων γαστρικών καρκίνων. Η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται από 60% έως 80%, ενώ η ειδικότητα 90%. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή δεν έχει ιδιαίτερη απήχηση στο πληθυσμό λόγω φόβου έκθεσης σε ακτινοβολία, προβλήματα κατάποσης, δυσκοιλιότητα και πιο σοβαρές επιπλοκές όπως εντερική απόφραξη. Ακόμη, ο έλεγχος με τη μέθοδο αυτή δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός, αφού από το 10% των ατόμων που παροτρύνονται για περαιτέρω εξετάσεις μόνο το 1.5% όντως πάσχουν από καρκίνο του στομάχου [44].

Ενδοσκόπηση

Είναι η μόνη διαθέσιμη μέθοδος για άμεση οπτική εξέταση του γαστρικού βλεννογόνου και επιτρέπει τη λήψη βιοψίας με την ευαισθησία της μεθόδου να κυμαίνεται από 78% έως 84% [45]. Έτσι, μπορεί να πραγματοποιηθεί ιστολογική αξιολόγηση, που είναι απαραίτητη για τη διάγνωση, και στη συνέχεια κατάταξη του όγκου σε στάδιο μέσω αξονικής τομογραφίας, ενδοσκοπικού υπερηχογραφήματος, τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων και λαπαροσκόπηση [46]. Η συμβατική μέθοδος ενδοσκόπησης χρησιμοποιεί λευκό φως χωρίς, όμως, να μπορεί να διαφοροποιήσει με ακρίβεια γαστρικές προνεοπλασματικές αλλοιώσεις. Πλέον, χρησιμοποιούνται πιο προηγμένες τεχνικές ενδοσκοπικής απεικόνισης για την πιο αποτελεσματική ανίχνευση και χαρακτηρισμό της ιστολογικής αλλοίωσης. Πιο συγκεκριμένα, η χρωμοενδοσκόπηση είναι πιο αποτελεσματική στην ανίχνευση του πρώιμου γαστρικού καρκίνου και προκαρκινικών γαστρικών αλλοιώσεων και ιδιαίτερα της δυσπλασίας. Ωστόσο, η απαίτηση για χρώση έχει περιορίσει τη μαζική χρήση της. Άλλες ακόμη πιο εξελιγμένες απεικονιστικές μέθοδοι που δεν απαιτούν χρώση είναι η εικονική χρωμοενδοσκόπηση με απεικόνιση στενής ζώνης και η συνεστιακή ενδομικροσκόπηση με λέιζερ που επιτρέπει την υψηλής ευκρίνειας ενδοσκοπική ιστολογική αξιολόγηση [43, 47]. Κίνδυνοι που εγκυμονεί η ενδοσκόπηση είναι λοίμωξη καθώς και ανεπιθύμητες παρενέργειες με τις πιο συχνές να είναι η ρινική αιμορραγία και η ρήξη του γαστρικού βλεννογόνου[48].

2.3.2 Μη επεμβατικοί βιοδείκτες

Ανοσολογική ανίχνευση *Helicobacter pylori*

Η ανίχνευση αντιγόνων ή αντισωμάτων έναντι του βακτηρίου *H. pylori* στο αίμα ως διαγνωστικό τεστ για το γαστρικό καρκίνο χαρακτηρίζεται από χαμηλή ευαισθησία. Επι του παρόντος η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι ικανή να ανιχνεύσει προκαρκινικές αλλοιώσεις, ενώ συχνά το αποτέλεσμα είναι αρνητικό ακόμη και σε περιπτώσεις ατροφικής γαστρίτιδας ή εντερικής μεταπλασίας [45].

Πεψινογόνο

Το πεψινογόνο είναι πρόδρομος του πρωτεολυτικού ενζύμου πεψίνη που παράγεται από το γαστρικό βλεννογόνο. Εκφράζεται σε 2 ισομορφές με την Ι να εκκρίνεται από συγκεκριμένα τμήματα του στομάχου, πυθμένα και σώμα, ενώ η ΙΙ σε όλο το στομάχι. Τα επίπεδά του πεψινογόνου στον ορό αντανακλούν έμμεσα την έκκριση στο στομάχι με τα χαμηλά επίπεδα του πεψινογόνου Ι και την χαμηλή αναλογία Ι/ΙΙ να αποτελούν δείκτες ατροφίας στο σώμα του στομάχου [45]. Έχει δειχθεί ότι εξετάζοντας το πεψινογόνο η ατροφία του γαστρικού βλεννογόνου ανιχνεύεται με ευαισθησία 66,7%-84,6% και ειδικότητα 73,5%-87,1%. Ωστόσο, η ευαισθησία για ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου κυμαίνεται χαμηλά από 36,8%-62,3% [49]. Επιπλέον, οι φυσιολογικές τιμές του πεψινογόνου μεταβάλλονται ανάλογα ηλικίας, φύλου και εθνικότητας μειώνοντας την διαγνωστική αξία του [45].

Καρκινικοί βιοδείκτες

Οι παραδοσιακοί καρκινικοί δείκτες παράγονται κυρίως από τον όγκο ή εμβρυικούς ιστούς. Απουσιάζουν ή εντοπίζονται σε μικρή ποσότητα σε ιστούς και το αίμα υγιών ενηλίκων. Θεωρούνται γενικά βιοδείκτες ευρέος φάσματος για τη διάγνωση διαφόρων τύπων καρκίνου [50]. Συγκεκριμένα το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA) και τα υδατανθρακικά αντιγόνα 19-9 (CA19-9) και 72-4 (CA72-4) έχουν χρησιμοποιηθεί ως μη επεμβατικοί βιοδείκτες στη διάγνωση διαφορετικών καρκίνων μεταξύ των οποίων και του γαστρικού καρκίνου [42]. Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι οι CEA, CA19-9 και CA72-4 έχουν ανιχνευτεί σε 29.9 %, 27% και 24 % αντίστοιχα σε άτομα που πάσχουν από γαστρικό καρκίνο, ενώ ανιχνεύονται σε ασθενείς με γαστρικό καρκίνο αρχικού σταδίου σε ποσοστό κάτω από 20% [51].

Κεφάλαιο 3: miRNAs και η προοπτική τους ως διαγνωστικοί δείκτες στο γαστρικό καρκίνο

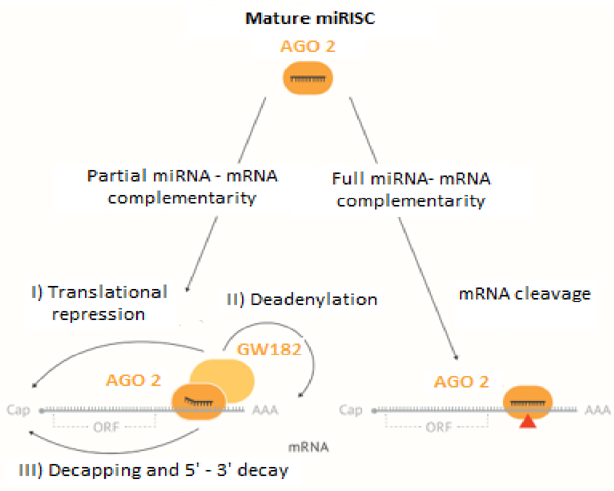
3.1 Μη κωδικοποιητικά RNA

Τα μη κωδικοποιητικά RNA κατηγοριοποιούνται σε housekeeping, που περιλαμβάνουν ριβοσωμικά και μεταφορικά RNA, και ρυθμιστικά με την πλειονότητα των μη κωδικοποιητικών RNA που σχετίζονται με καρκίνο να ανήκουν στη κατηγορία αυτή. Τα ρυθμιστικά RNA χωρίζονται περαιτέρω με βάση το μήκος τους σε μικρά RNA (< 50 βάσεις), μεσαία RNA (50 – 200 βάσεις) και μακριά RNA (> 200 βάσεις) [52]. Στην κατηγορία των μικρών RNA κατατάσσονται τα microRNA συνιστώντας την ομάδα των μη κωδικοποιητικών RNA που έχει μελετηθεί περισσότερο στο καρκίνο [42]. Πρόκειται για συντηρημένα μη κωδικοποιητικά μετάγραφα μήκους 20-24 νουκλεοτιδίων που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο αποτελώντας μια από τις μεγαλύτερες κατηγορίες μορίων γονιδιακής ρύθμισης στα ζώα [53, 54]. Εκφράζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης [53], ενώ ο αριθμός τους στο γονιδίωμα φαίνεται να συσχετίζεται με την πολυπλοκότητα του αναπτυξιακού προγράμματος, με τα θηλαστικά να έχουν τον μεγαλύτερο αριθμό miRNA [55]. Υπολογίζεται ότι συνιστούν πάνω από το 5% του γονιδιώματος των θηλαστικών. Στον άνθρωπο μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 2.654 microRNA [56] με εκτιμήσεις να κάνουν λόγο για 50.000 [57].

3.2 Δράση miRNAs

Μια συχνή λειτουργία των miRNA στα θηλαστικά είναι η μετα-μεταγραφική σίγηση γονιδίων στο κυτταρόπλασμα, ενώ έχουν παρατηρηθεί και περιπτώσεις μεταγραφικής αποικοδόμησης έπειτα από miRNA στόχευση. Υπολογίζεται ότι ένα miRNA μπορεί να καταστείλει περισσότερα από 100 mRNA, ενώ το 60% των κωδικοποιητικών γονιδίων μπορεί να στοχευτεί από τουλάχιστον ένα miRNA παίζοντας σημαντικό ρόλο σχεδόν σε κάθε βιολογική διαδικασία [54]. Οι λειτουργίες τους εμπίπτουν σε 2 κύριες κατηγορίες: (i) ομοιόσταση στη γονιδιακή έκφραση, μέσω «λεπτής ρύθμισης» της μετάφρασης σύμφωνα με τις κυτταρικές απαιτήσεις και (ii) ευρωστία στις κυτταρικές αποκρίσεις, με τα microRNA να δύνανται να παίξουν σημαντικό ρόλο στην έκβαση της κυτταρικής διαφοροποίησης και στην προσαρμογή σε παροδικές αλλαγές στο μικροπεριβάλλον των κυττάρων όπως το στρες [58].

Τα miRNA επιτελούν τη βιολογική δράση τους μέσω του επαγώμενου από miRNA συμπλέγματος σίγησης (miRISC: miRNA-induced gene silencing complex) που περιλαμβάνει τη Dicer, καθώς και την πρωτεΐνη 2 της οικογένειας αργοναύτη (AGO) στην οποία φορτώνεται η μια αλυσίδα miRNA. Να σημειωθεί ότι οι περιοχές στις οποίες υβριδίζουν τα microRNA εντοπίζονται συνήθως στις 3’ αμετάφραστες περιοχές των mRNA. Κάθε mRNA μπορεί να φέρει 1 ή περισσότερες θέσεις πρόσδεσης για ένα ή περισσότερα miRNA [59]. Στην περίπτωση απόλυτης συμπληρωματικότητας, η AGO2 έχοντας ενδονουκλεολυτική δράση εισάγει ρήξη στο mRNA με αποτέλεσμα τα 2 τμήματα που προκύπτουν να αποικοδομούνται άμεσα από κυτταροπλασματικές ενδονουκλεάσες. Όταν πρόκειται για ατελή συμπληρωματικότητα, που συνιστά και τη πλειοψηφία των περιπτώσεων, η πρωτεΐνη της οικογένειας AGO στρατολογεί πρωτεΐνες της οικογένειας GW182 που συνδέονται με πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την πολυA ουρά παρεμποδίζοντας την δράση τους ως επαγωγείς της μετάφρασης και ενισχύοντας τη συγγένεια του RISC για το mRNA. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες της οικογένειας GW182 στρατολογούν απαδενυλάσες που υδρολύουν την πολυA ουρά των mRNA, ενώ η 5’ καλύπτρα απομακρύνεται και τελικά αποικοδομούνται από 5’ και 3΄ εξωριβονουκλεάσες (Εικ. 7).



Makarova, J.A., et al., *Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role.* Prog Histochem Cytochem, 2016. **51**(3-4): p. 33-49.

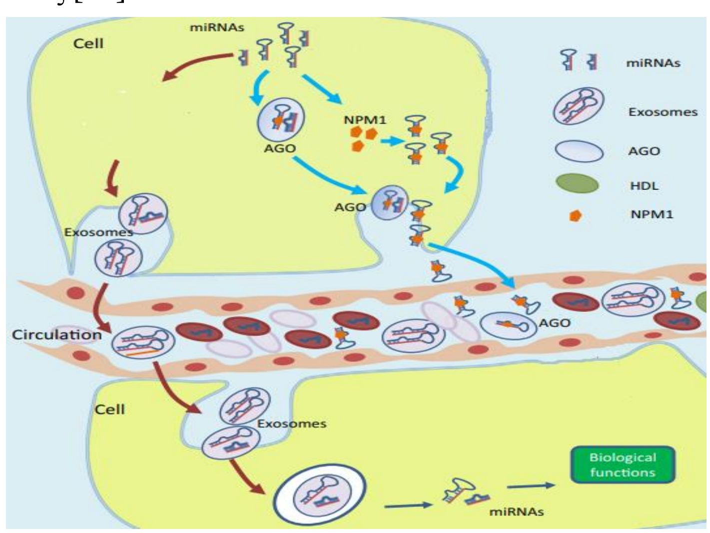
Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης miRNAs. Τα miRNA επιτελούν τη βιολογική λειτουργίας μέσω του επαγώμενου από miRNA συμπλέγματος σίγησης (miRISC). Στην *περίπτωση πλήρους συμπληρωματικότητας του miRNA με το mRNA-στόχο, η AGO2 διασπά το mRNA σε δύο μέρη που αποικοδομούνται από εξωνουκλεάσες. Στην περίπτωση της μερικής συμπληρωματικότητας, η πρωτεΐνη της οικογένειας GW182 επάγει μεταφραστική καταστολή, αποαδενυλίωση, απομάκρυνση της 5’ καλύπτρας και αποικοδόμηση του mRNA [59].*

3.3 Εκκρινόμενα miRNAs

Μολονότι η πλειοψηφία των miRNAs παραμένουν ενδοκυτταρικά, έχουν ανακαλυφθεί και miRNAs που εκκρίνονται στον εξωκυτταρικό χώρο και μεταφέρονται συστημικά μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, με το 10% των γνωστών miRNA να εκτιμάται ότι ανιχνεύονται στο πλάσμα [50], καθώς και σε άλλα βιολογικά υγρά (πίνακας 1) [60]. Η παρουσία τους μπορεί να αποδοθεί σε παθητική διαρροή σε περιπτώσεις νέκρωσης, απόπτωσης, φλεγμονής αλλά και ενεργής έκκρισης. Τα εκκρινόμενα miRNAs συναντώνται σε σύμπλοκα με πρωτεΐνες Αργοναύτες, πρωτεΐνες που προσδένουν RNA όπως η νουκλεοφοσμίνη 1 (NPM1), λιποπρωτεΐνες, όπως HDL, καθώς και σε εξωσώματα (Εικ. 8) [61]. Παρότι η πλειοψηφία των ελεύθερα μετακινούμενων miRNAs εντοπίζεται σε σύμπλοκα με πρωτεΐνες, δεν έχει ανακαλυφθεί μηχανισμός πρόσληψης τους από κύτταρα. Αντίθετα, τα miRNAs που μεταφέρονται μέσω εξωσωμάτων φαίνεται να επιτελούν βιολογικές λειτουργίες [61, 62].Τα κυτταρικά miRNAs ταξινομούνται επιλεκτικά στα εξωσώματα κατά τον σχηματισμό τους με αποτέλεσμα το περιεχόμενο τους να αντανακλά τη φύση και ακόμη και την κατάσταση του κυττάρου παραγωγής. Ο ρόλος που επιτελούν τα εξωσώματα είναι η επικοινωνία μεταξύ των γειτονικών ή μακρινών κυττάρων. Συνεπώς, τα miRNAs των εξωσωμάτων μπορούν να δρουν ως αυτοκρινής, παρακρινής ή ενδοκρινείς παράγοντες ομοιάζοντας κατά κάποιο τρόπο τις ορμόνες [63].

Πίνακας 1: miRNAs στα βιολογικά υγρά [60].

sample	Detectable miRNAs
Amniotic fluid	359
Breast milk	429
Bronchial lavage	260
Cerebrospinal fluid	212
Colostrum	386
Peritoneal fluid	397
Plasma	349
Pleural fluid	210
Saliva	458
Seminal fluid	436
Tears	320
Urine	204



Weber, J.A., et al., The microRNA spectrum in 12 body fluids. Clin Chem, 2010. 56(11): p. 1733-41. Τροποποίηση από Cheng, G., *Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy.* Adv Drug Deliv Rev, 2015. **81**: p. 75-93.

Εικόνα 8: *Έκκριση miRNAs εξωκυτταρικά. Τα εκκρινόμενα miRNAs συναντώνται σε σύμπλοκα με πρωτεΐνες Αργοναύτες, πρωτεΐνες που προσδένουν RNA όπως η νουκλεοφοσμίνη 1 (NP1), λιποπρωτεΐνες, όπως HDL, καθώς και σε εξωσώματα στη κυκλοφορία του αίματος. Τα εξωσώματα μεταφέρουν στο κύτταρο αποδέκτη miRNAs τα οποία στη συνέχεια επιφέορυν τη σίγηση των mRNA στόχων τους. Μέχρι σήμερα μόνο για τα miRNAs στα εξωσώματα έχει αποδειχθεί ο βιολογικός τους ρόλος [61].*

3.4 Απορρύθμιση miRNAs σε γαστρικό καρκίνο

Απορρυθμισμένη έκφραση των miRNAs έχει βρεθεί ότι παίζει ρόλο στην ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνων, μεταξύ των οποίων και ο γαστρικός καρκίνος [64]. Συχνό φαινόμενο στα καρκινικά κύτταρα αποτελεί η γενικευμένη μειορρύθμιση ώριμων miRNAs που μπορεί να ερμηνευτεί ως απόρροια της λιγότερο διαφοροποιημένης κατάστασης ενός καρκινικού κυττάρου, δεδομένου ότι η έκφραση των miRNA αυξάνεται καθώς το κύτταρο διαφοροποιείται [65]. Η απορρυθμισμένη έκφραση τους οδηγεί σε μεταβολές στα επίπεδα των μεταγράφων-στόχων τους στα οποία συγκαταλέγονται και γονίδια που κωδικοποιούν για ογκοεπαγωγείς και ογκοκαταστολείς. Έτσι, εμπλέκονται σε ζωτικής σημασίας πτυχές της καρκινογένεσης του στομάχου που περιλαμβάνουν κυτταρικό πολλαπλασιασμό, απόπτωση, αγγειογένεση και μετάσταση. Μάλιστα ανάλογα με τους στόχους τους μπορούν να χαρακτηριστούν ως ογκοεπαγωγικά ή ογκοκατασταλτικά miRNA. Συγκεκριμένα, τα ογκοεπαγωγικά miRNA αφορούν miRNA που στοχεύουν ογκοκατασταλτικά κωδικοποιητικά γονίδια και υπερεκφράζονται στο καρκίνο. Από την άλλη, τα ογκοκατασταλτικά miRNA, που συνιστούν τη πλειοψηφία των απορρυθμισμένων miRNA, οδηγούν σε σίγηση ογκογονιδίων με τα επίπεδα των ίδιων να μειώνονται σε καρκινικούς όγκους [66, 67].

3.5 miRNA ως διαγνωστικοί δείκτες για το γαστρικό καρκίνο

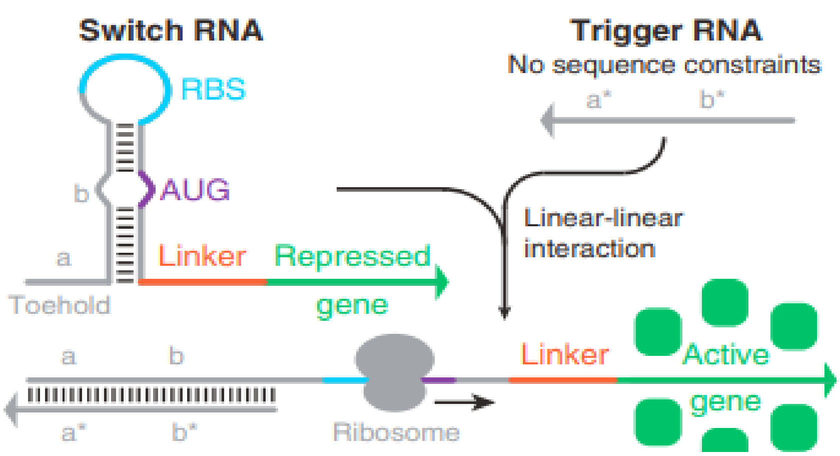
Τα miRNAs έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον ως βιοδείκτες για το γαστρικό καρκίνο καθώς φέρουν χαρακτηριστικά που υπερτερούν έναντι των υφιστάμενων βιοδεικτών. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζουν ιστοεξειδίκευση και συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης τόσο αναπτυξιακά όσο και κατά την εξέλιξη της νόσου. Συνεπώς επιτρέπουν την εξειδικευμένη και ευαίσθητη διάκριση τύπων και υπότυπων όγκων καθώς και των σταδίων στην εξέλιξη της νόσου ακόμη και σε αρχικά στάδια [68, 69]. Ακόμη μεγαλύτερη εξειδίκευση μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση miRNA υπογραφών έναντι μεμονωμένων miRNA καθώς αντιπροσωπεύουν τη πολυπλοκότητα και ετερογένεια τόσο της νόσου όσο και των ασθενών [70]. Επιπλέον, τα miRNA εκκρίνονται σε ποικίλα βιολογικά υγρά, στα οποία συμπεριλαμβάνονται πλάσμα, ούρα και σίελα με τη σύσταση και τα επίπεδα τους να αντικατοπτρίζουν την έκφραση τους στον όγκο παρέχοντας τη δυνατότητα για μη επεμβατική διάγνωση [71, 72]. Η προοπτική τους ως μη επεμβατικοί βιοδείκτες ενισχύεται και από τη σταθερότητα που επιδεικνύουν στα βιολογικά υγρά καθώς είναι ανθεκτικά σε RNases, και σε αλλαγές στη φυσική τους κατάστασης (π.χ. μεταβολές θερμοκρασίας, pH, επαναλαμβανόμενους κύκλους απόψυξης-κατάψυξης) χάρη στη προστασία που τους προσφέρει η αλληλεπίδραση τους με πρωτεΐνες, λιπίδια και εξωσώματα. Να σημειωθεί ότι, πέρα από τα βιολογικά υγρά, τα συγκεκριμένα miRNA διατηρούν τη σταθερότητα τους ακόμη και σε ιστούς που έχουν υποστεί μονιμοποίηση σε παραφίνη [62]. Επίσης, η ανίχνευση τους είναι σχετικά απλή μέσω συμβατικών μεθόδων όπως stem loop RT-PCR [68].

Κεφάλαιο 4: Toehold ριβοδιακόπτες στη μοριακή διαγνωστική

Στο τομέα της συνθετικής βιολογίας, οι συνθετικοί ριβοδιακόπτες έχουν συγκεντρώσει αρκετό ενδιαφέρον και θεωρούνται ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο με εφαρμογές σε ποικίλα πεδία συμπεριλαμβανομένης της μοριακής διαγνωστικής [73]. Πρόκειται για αλυσίδες RNA που ρυθμίζουν τη μεταγραφή ή μετάφραση γονιδίων μέσω αλλαγών στη τρισδιάστατη διαμόρφωση τους ως απόκριση της πρόσδεσης ενός μικρού μορίου [74]. Η παρούσα εργασία εστιάζει στους Toehold μεταφραστικούς ριβοδιακόπτες.

4.1 Toehold ριβοδιακόπτες

Το σύστημα του ριβοδιακόπτη toehold αποτελείται από 2 αλυσίδες RNA με την μια αλυσίδα να λειτουργεί ως διακόπτης και η άλλη ως σηματοδότης. Ο σηματοδότης είναι συμπληρωματικός με το γραμμικό τμήμα του 5΄ άκρου του διακόπτη. Ακολουθεί μια δευτεροταγής δομή, και καθοδικά εντοπίζεται η κωδική περιοχή ενός γονιδίου αναφοράς, τη μετάφραση και κατά επέκταση την έκφραση του οποίου ρυθμίζει ο διακόπτης. Μεταξύ αυτών των αλληλουχιών παρεμβάλλεται η περιοχή του συνδέτη που κωδικοποιεί για αμινοξέα χαμηλού μοριακού βάρους που προστίθενται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης του γονιδίου αναφοράς χωρίς να επηρεάζουν τη λειτουργία της. Στην ενεργοποίηση της μετάφρασης του γονιδίου αναφοράς μείζων ρόλο παίζει η δευτεροταγής δομή. Πρόκειται για μια δομή φουρκέτας στην θηλιά της οποίας εντοπίζεται η αλληλουχία πρόσδεσης του ριβοσώματος με το κωδικόνιο έναρξης να βρίσκεται καθοδικά της στο δίκλωνο τμήμα της φουρκέτας χωρίς να υβριδίζει ενδομοριακά. Η δευτεροταγής δομή εμποδίζει τη πρόσδεση του ριβοσώματος στην θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος με αποτέλεσμα να μη μεταφράζεται το γονίδιο αναφοράς καθιστώντας το ριβοδιακόπτη ανενεργό. Παρουσία, όμως, του σηματοδότη, αυτός αλληλεπιδρά *in trans* με το γραμμικό συμπληρωματικό του διακόπτη με αποτέλεσμα να παύει να υφίσταται η δομή φουρκέτας. Έτσι, ο ριβοδιακόπτης μεταπίπτει από την ανενεργή στην βιολογικά ενεργή κατάσταση στην οποία το ριβόσωμα προσδένεται επάγωντας τη μετάφραση (Εικ. 9) [75].

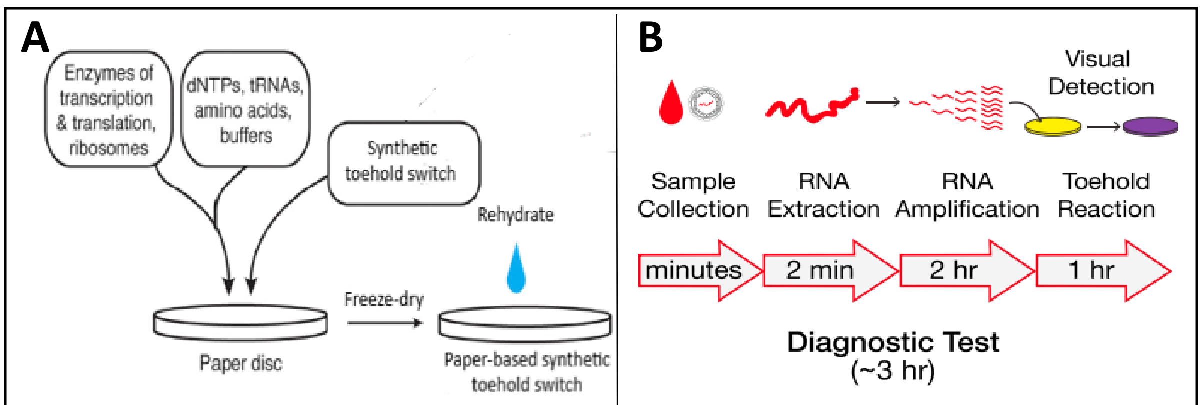


Green, A.A., et al., *Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression.* Cell, 2014. 159(4): p. 925-39.

Εικόνα 9: *Δομή ριβοδιακόπτη toehold. Τα γκρι τμήματα αντιστοιχούν στις μεταβλητές περιοχές που είναι συμπληρωματικές με τον εκάστοτε RNA-σηματοδότη, το γαλάζιο τμήμα στην αλληλουχία πρόσδεσης του ριβοσώματος, το μωβ στο κωδικόνιο έναρξης, το πορτοκαλί τμήμα στην αλληλουχία σύνδεσης και το πράσινο στο γονίδιο αναφοράς. Οι γραμμικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις συμπληρωματικές περιοχές RNA-σηματοδότη και διακόπτη οδηγούν στην κατάργηση της φουρκέτας και πρόσδεση του ριβοσώματος με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του διακόπτη [75].*

4.2 Αξιοποίηση toehold ριβοδιακοπτών σε πλατφόρμα έκφρασης πρωτεϊνών *in vitro*

Παρότι μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμοι ειδικά στο πλαίσιο της διαγνωστικής σε σημεία φροντίδας (point of care diagnostics), η αξιοποίηση των ριβοδιακοπτών σε πλατφόρμες έκφρασης πρωτεϊνών απουσία κυττάρων δεν έχει λάβει τόση προσοχή όσο η *in vivo* εφαρμογή τους [76]. Μια τέτοια πλατφόρμα *in vitro* έκφρασης πρωτεΐνών ενσωματωμένη σε χαρτί ανέπτυξαν ο Pardee και την ομάδα του το 2014. Πιο συγκεκριμένα, ριβοδιακόπτες, ριβοσώματα, ένζυμα απαραίτητα για τη μεταγραφή και μετάφραση και συστατικά που χρειάζονται για την μετάφραση ενσωματώνονται σε λυοφιλιωμένη μορφή σε χαρτί ή άλλο πορώδες υλικό. Το σύστημα είναι σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ για την ανασύσταση του απαιτείται μόνο η προσθήκη νερού (εικ. 10Α). Μπορεί να αποθηκευτεί και να διανεμηθεί με ευκολία. Πρόκειται, λοιπόν, για ένα αποστειρωμένο σύστημα ελεύθερο από βακτηριακά κύτταρα που μπορεί να διεκπεραιώσει *in vitro* τις διαδικασίες της μεταγραφής και μετάφρασης. Καταργεί την ανάγκη για ακριβό εξοπλισμό, εξασφαλίζει χαμηλό κόστος και απλότητα στη χρήση. Μάλιστα δίνεται ακόμη και η δυνατότητα ποσοτικοποίησης του σηματοδότη, καθώς δείχθηκε ότι το σήμα που παράγεται είναι ανάλογο της ποσότητας του αηματοδότη. Επιπλέον, η απουσία κυττάρων από το σύστημα προσδίδει ασφάλεια για χρήση έξω από το εργαστήριο [77]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα εφαρμογής της τεχνολογίας αυτής σε συνδυασμό με τους toehold ριβοδιακόπτες αποτελεί το διαγνωστικό τεστ για τον Zika από τον Pardee το 2016 αναδεικνύοντας τη δυναμική του συστήματος στο τομέα της διάγνωσης. Αρχικά, εκχύλισμα RNA από κλινικό δείγμα αίματος υφίσταται ενίσχυση του γονιδιώματος του ιού μέσω NASBA. Στη συνέχεια το δείγμα επωάζεται στο χαρτί με την in vitro πλατφόρμα στην οποία έχει ενσωματωθεί ο toehold ριβοδιακόπτης ο οποίος κωδικοποιεί για την β-γαλακτοζιδάση. Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μετατροπή καταλύει τη μετατροπή του ερυθρού της χλωροφαινόλης-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη, ενός κίτρινου υποστρώματος, σε μωβ προϊόν, το ερυθρό της φαινόλης. Τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα σε σύντομο χρονικό διάστημα και ορατά ακόμη και με γυμνό μάτι (Εικ. 10Β) [78].



Pardee, K., et al., *Paper-based synthetic gene networks.* Cell, 2014. 159(4): p. 940-54

Pardee, K., et al., *Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components.* Cell, 2016. 165(5): p. 1255-1266.

Εικόνα 10: *Αξιοποίηση toehold ριβοδιακοπτών in vitro. Α) Πλατφόρμα έκφρασης πρωτεϊνών in vitro ενσωματωμένη σε χαρτί [77]. Β) Διαγνωστικό τεστ για την ανίχνευση του Zika που βασίζεται σε toehold ριβοδιακόπτη ενσωματωμένο in vitro πλατφόρμα έκφρασης πρωτεϊνών [78].*

Κεφάλαιο 5: Σκοπός μεταπτυχιακής διατριβής

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή έχει ως πρωταρχικό σκοπό την αξιοποίηση του RNA ως βιοδείκτη για την ανάπτυξη ευαίσθητων και ολοκληρωμένων συστημάτων εργαστηριακής διάγνωσης μολυσματικών και μη ασθενειών. Απώτερος σκοπός είναι η διερεύνηση της χρήσης διαφορετικών RNA μορίων ως σηματοδότες των βιοαισθητήρων Toehold ριβοδιακοπτών υπό το πρίσμα της μελλοντικής ανάπτυξης οικονομικά βιώσιμων, μη επεμβατικών μεθόδων μοριακής διαγνωστικής εκτός του εργαστηρίου. Η προοπτική αυτή επιλέχθηκε να διερευνηθεί στο πλαίσιο διάγνωσης του ιού του Δυτικού Νείλου με προτεινόμενο βιοδείκτη το RNA γονιδίωμα του και του γαστρικού καρκίνου με προτεινόμενο βιοδείκτη τα microRNAs.

Η διάγνωση σε επίπεδο RNA των συγκεκριμένων παθολογιών είναι κρίσιμη για διαφορετικούς λόγους. Ως παθολογικό αίτιο μιας μολυσματικής νόσου, το RNA γονιδίωμα του ιού του Δυτικού Νείλου έχει αναδειχθεί σε σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία λόγω της ευρείας γεωγραφικής κατανομής του ιού, της παθογόνου δράσης του και του ενδοζωϊκού κύκλου μετάδοσης του που διευκολύνει τη διάδοση του. Η απουσία αποτελεσματικής θεραπευτικής αγωγής και εμβολίου υπογραμμίζουν την ανάγκη για συνεχή τη επιδημιολογική παρακολούθηση του σε πληθυσμούς πτηνών, κουνουπιών και ανθρώπων που είναι ξενιστές τους. Παράλληλα, ως μη μολυσματικού τύπου νόσο, ο γαστρικός καρκίνος είναι ο πέμπτος πιο συχνός καρκίνος και τρίτος πιο θανατηφόρος παγκοσμίως. Η ασυμπτωματική φύση του στα αρχικά στάδια έχει ως επακόλουθο τη διάγνωση του σε προχωρημένα στάδια μειώνοντας την αποτελεσματικότητα των θεραπειών υπογραμμίζοντας τη σημασία της έγκαιρης διάγνωσης. Αυτό συνεπάγεται την ανάγκη για εφαρμογή προσυμπτωματικού ελέγχου, με τη γαστροσκόπηση να μην είναι επιλογή λόγω της επεμβατικής φύσης και του υψηλού κόστους της, ενώ συμβατικοί μη επεμβατικοί βιοδείκτες αποκλείονται λόγω της χαμηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης τους. Τέτοιοι περιορισμοί δεν τίθενται στη περίπτωση της χρήσης μοριακών υπογραφών που στηρίζονται σε κυκλοφορούντα miRNAs. Για το σκοπό αυτό, από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έχει συγκροτηθεί μια μοριακή υπογραφή που συνίσταται από 9 όγκο-εκφραζόμενα και 7 όγκο-κατεσταλμένα miRNAs που εξετάζεται σε κυτταρικές σειρές και κλινικό δείγμα βιοψίας στομάχου και αίματος ασθενούς με εντερική μεταπλασία.

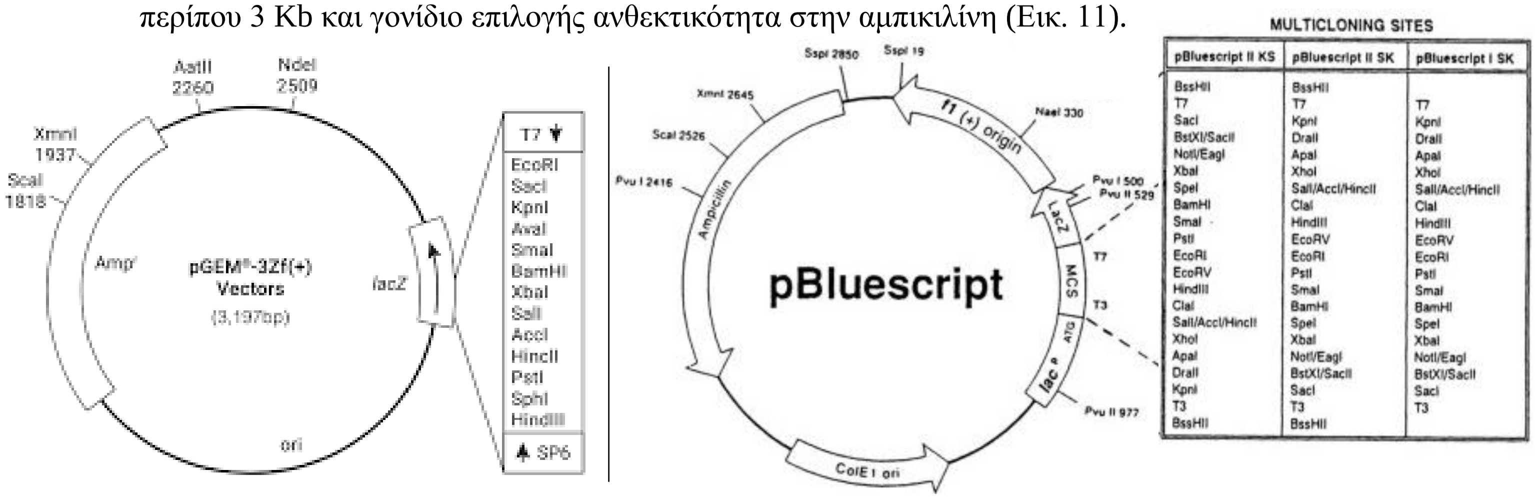
Και οι δύο περιπτώσεις απαιτούν την ύπαρξη μιας μεθόδου διάγνωσης που να είναι απλή στη χρήση της, αξιόπιστη και οικονομική ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί σε μαζική κλίμακα. Οι προοπτικές μελλοντικής επέκτασης της ριβοδιάγνωσης σε συνδυασμό με συνθετικούς Toehold ριβοδιακόπτες δύναται να επεκτείνει τις διαγνωστικές εφαρμογές ακόμα και εκτός εργαστηρίου. Επί του παρόντος έχουν ήδη σχεδιαστεί πιλοτικά Toehold ριβοδιακόπτες που ανιχνεύουν το RNA γονιδίωμα του ιού του Δυτικού Νείλου, ενώ δοκιμάζεται και η ανίχνευση ενός συνθετικού miRNA ως πιλοτική δοκιμή για τον σχεδιασμό microRNA Toeholds.

Κεφάλαιο 6: Υλικά και μέθοδοι

6.1 Υλικά

6.1.1 Πλασμιδιακοί φορείς

Αξιοποιήθηκαν τα πλασμίδια pBluescript και pGEM. Πρόκειται για πλασμίδια με μικρό μέγεθος περίπου 3 Kb και γονίδιο επιλογής ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη (Εικ. 11).



Εικόνα 11: *Χάρτες πλασμιδίων pGEM και pBluescript.*

6.1.2 Κυτταρικές σειρές

Στα πλαίσια μελέτης της έκφρασης των miRNAs στο γαστρικό καρκίνο, χρησιμοποιήθηκαν 5 κυτταρικές σειρές, HFE45, AGS, NUGC4, KATOIII και MKN45. Τα HFE45 αφορούν σε φυσιολογική γαστρική επιθηλιακή κυτταρική σειρά που έχει υποστεί αθανατοποίηση. Τα AGS είναι καρκινική γαστρική κυτταρική σειρά από πρωτεύοντα όγκο που αντιπροσωπεύει αρχικό στάδιο της ασθένειας. Σχετικά με τα NUGC4, πρόκειται για καρκινική γαστρική κυτταρική σειρά από παραγαστρικούς αδένες που έχει υποστεί λεμφική διήθηση. Τα KATOIII είναι καρκινική γαστρική κυτταρική σειρά που απομονώθηκε από πλευρική διήθηση, ενώ τα MKN45 καρκινική γαστρική κυτταρική σειρά που απομονώθηκε από το συκώτι ύστερα από μετάσταση αντιπροσωπεύοντας το τελικό στάδιο της ασθένειας.

6.1.3 Δείγματα

Στο εργαστήριο παραχωρήθηκαν δείγματα RNA από κυτταροκαλλιέργεια ιού του Δυτικού Νείλου και κλινικά δείγματα RNA των ιών του Δάγκειου Πυρετού και Zika. Ακόμη, παραχωρήθηκαν δείγματα πλάσματος και κυττάρων αίματος υγιών ατόμων, δείγματα RNA ριζών *Lotus Japonecus* από τα εργαστήρια φυσιολογίας ζωικών οργανισμών και βιοτεχνολογίας φυτών & περιβάλλοντος του τμήματος βιοχημείας και βιοτεχνολογίας του πανεπιστήμιου Θεσσαλίας αντίστοιχα. Τέλος, παραχωρήθηκε δείγμα βιοψίας στομάχου και αίματος από εθελοντή με εντερική προκαρκινική μεταπλασία και δείγμα αίματος από υγιές άτομο.

6.2 Πειραματικές μέθοδοι

6.2.1 Κλινικά δείγματα αίματος: Διαχωρισμός πλάσματος

Συλλέχθηκε φλεβικό αίμα σε σωλήνα με τον αντιπηκτικό παράγοντα EDTA. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 1380g για 10 λεπτά στους 4^{oC} σε φυγόκεντρο Hermle Z323K και προσεκτική συλλογή του πλάσματος. Το πλάσμα φυγοκεντρήθηκε ξανά για 1380g για 10 λεπτά στους 4^{oC} με αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρού ιζήματος κυττάρων. Στη συνέχεια, συλλέχθηκε προσεκτικά. Τα κύτταρα του αίματος από την πρώτη φυγοκέντρηση αναδεύτηκαν με vortex. Τέλος, κλάσματα 200μl πλάσματος και κυττάρων αίματος αποθηκεύτηκαν στους – 80^{oC}.

6.2.2 Εκχύλιση RNA

Διεξήχθη απομόνωση RNA από δείγματα κυτταρικών σειρών, πλάσματος και κυττάρων αίματος με μικρές τροποποιήσεις. Προστέθηκε 1 ml TRI και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό για τα δείγματα κυτταρικών σειρών, ενώ για τα δείγματα πλάσματος και κυττάρων αίματος η διάρκεια της επώασης ήταν 15 λεπτά με έντονο vortex ανά 5 λεπτά. Ύστερα, προστέθηκαν 200 μl χλωροφόρμιο, το διάλυμα αναμείχθηκε με καλό vortex. Στην περίπτωση των κλινικών δειγμάτων ακολούθησε επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου με συχνό έντονο vortex και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 14000 rpm στους $4^{o}C$ σε φυγόκεντρο Eppendorf 5804R, ενώ στη περίπτωση των δειγμάτων κυτταροκαλλιέργειας έγινε απευθείας φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε προσεκτικά και μεταφέρθηκε σε νέο tube όπου προστέθηκαν 5 μl γλυκογόνο και 500 μl ή 700 μl ισοπροπανόλης για τα δείγματα κυτταροκαλλιέργειας και τα κλινικά δείγματα αντίστοιχα. Ακολούθησε επώαση 10 λεπτών στο πάγο και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 14000 rpm στους $4^{o}C$. Έπειτα, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 500 μl κρύας αιθανόλης. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά σε 14000 rpm στους $4^{o}C$. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε με πιπέτα η ποσότητα αιθανόλης που προστέθηκε προηγουμένως, με προσοχή ώστε να μην διαταραχθεί το ίζημα, και το tube αφέθηκε με ανοιχτό καπάκι για 15 περίπου λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να εξατμιστούν τυχόν υπολείμματα αιθανόλης. Ακολούθησε προσθήκη 50μl RNase free H_2O, επώαση για 5 λεπτά στους $65^{o}C$ και vortex για την επαναδιάλυση του ιζήματος. Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους - $80^{o}C$. Να σημειωθεί ότι με το πρωτόκολλο που παρατέθηκε δεν έχει απομονωθεί αποκλειστικά RNA, αλλά και γονιδιωματκό DNA.

6.2.3 Επεξεργασία με DNase

Προκειμένου να απομακρυνθούν τα κατάλοιπα DNA από τα δείγματα εκχύλισης RNA, επεξεργάστηκαν με το ένζυμο DNase. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30 μl που απαρτιζόταν από 1 μl DNase I, 3 μl 10X buffer (Thermoscientific), 1 μl RNase out (Invitrogen) και 25 μl δείγματος. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους $37^{o}C$.

6.2.4 Κατακρήμνιση RNA

Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση, προστέθηκαν 40 μl οξικό νάτριο 3 M με pH = 5.6, H_2O μέχρι να συμπληρωθεί όγκος ίσος με 400 μl και 5 μl γλυκογόνου. Για να επιτευχθεί καθίζηση του RNA, προστέθηκε 400 μl διαλύματος φαινόλης, χλωροφορμίου και ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25:24:1 pH=5 και έγινε καλό vortex. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 14.000 rpm στους $4^{o}C$ στη φυγόκεντρο Eppendorf 5804R. Έπειτα, το υπερκείμενο συλλέχθηκε προσεκτικά και μεταφέρθηκε σε άλλο tube όπου αναμείχθηκε με 1ml 100% κρύας αιθανόλης. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -$80^{o}C$ για τουλάχιστον 1 ώρα ή έως την επόμενη μέρα. Φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά σε 14.000 rpm στους $4^{o}C$. Αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 500 μl 70% κρύας αιθανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 14.000 rpm στους $4^{o}C$. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο με προσοχή ώστε να μην διαταραχθεί η πελλέτα, και το tube αφέθηκε με ανοιχτό καπάκι για 15 περίπου λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η πελλέτα επαναδιαλύθηκε σε H_2O με επώαση 5 λεπτών στους 65^oC και έντονο vortex. Τέλος, το δείγμα αποθηκεύτηκε στους -80^oC.

6.2.5 Αντίστροφη μεταγραφή

Πραγματοποιήθηκε σύνθεση cDNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής από RNA δείγματα με τη ποσότητα RNA να διαφέρει. Σε κάθε περίπτωση, προστέθηκε H_2O, αν χρειαζόταν, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 10,5 μl. Ακολούθως προστέθηκαν 1 μl εκκινητών καθώς και 1 μl dNTPs 10mM (Thermoscientific). Η χρήση stem loop εκκινητών αποσκοπεί στην αντίστροφη μεταγραφή εξειδικευμένων miRNAs, ενώ των τυχαίων εξαμερών στο σύνολο των RNAs. Στο πίνακα παρακάτω αναγράφονται πληροφορίες για τη ποσότητα του RNA και το είδος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη παρασκευή κάθε δείγματος. Ακολούθησε επώαση 5 λεπτών στους 65^oC. Στη συνέχεια, σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 4 μl 5X buffer, 1 μl M-MLV, 0,5 μl RNase out καθώς και 2 μl DTT 0,1 M (Invitrogen). Τα δείγματα επωάστηκαν για 2 ώρες στους 37^oC. Τέλος, κάθε δείγμα αραιώθηκε με την προσθήκη 380 μl H_2O.

Πίνακας 2: *Δείγματα cDNA φλαβοϊών για μελέτη εξειδίκευσης εκκινητών ιού Δυτικού Νείλου*

	WNV Lin. 1	WNV Lin. 2	Zika plasma	Zika Blood cells	Dengue plasma	Dengue Blood cells	Plasma	Blood cells
Primer	1μl random hexamers (Takara)							
RNA quantity	150 ng	150 ng	Zika 100ng Plasma 100ng	Zika 100ng Blood cells 800ng	Dengue 100ng Plasma 100ng	Dengue 100ng Blood cells 800ng	400 ng	150 ng

Πίνακας 3 *: Δείγματα cDNA για μελέτη miRNA υπογραφών σε κυτταρικές σειρές, κανονικοποιητών και βέλτιστης ποσότητας RNA σε πλάσμα και κύτταρα αίματος*

	Cell lines	Plasma	Blood cells
Primer	0,5 μl random hexamers (Takara) & 0,5 μl mix stem loop primers of onco-expressed miRNAs / onco-suppressed miRNAs	1μl mix stem loops of onco-expressed miRNAs and normalizer candidates / onco-suppressed miRNAs and normalizer candidates	
RNA quantity	1000 ng	250 ng - 1400 ng	250 ng - 750 ng

Πίνακας 4 : *Δείγματα cDNA για μελέτη miRNA υπογραφών σε κλινικά δείγματα.*

	Plasma	Blood cells	Stomach biopsy
Primers	0,5 μl oligodTT (NEB) & 0,5 μl mix stem loop of onco-expressed miRNAs and normalizer candidates / onco-suppressed miRNAs and normalizer candidates		0,5 μl random hexamers (Takara) & 0,5 μl mix stem loop onco-expressed miRNAs and normalizer candidates / onco-suppressed miRNAs and normalizer candidates
RNA quantity	750 ng	1000 ng	500 ng

6.2.6 PCR πραγματικού χρόνου

Για κάθε δείγμα δημιουργήθηκε αντίδραση όγκου 20 μl από την ανάμειξη 10 μl 2X SYBR Green (Thermoscientific ή Kappa), 4 μl μείγματος εκκινητών 10 μM, 2 μl H_2O και 4 μl cDNA. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε παρατίθεται παρακάτω:

1. 95^oC, 3:00
2. 95^oC, 0:10

3. 58ºC, 0:20
4. 72ºC, 0:15
5. GOTO 2, 44 more times
6. Melt Curve Analysis: 55ºC to 95ºC , increment 0.5ºC for 0:05
7. 12ºC , ∞

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System της εταιρίας Bio-Rad.

6.2.7 Συμβατική PCR για τον έλεγχο της εξειδίκευσης των εκκινητών για τις γενεαλογίες 1 & 2 ιού του Δυτικού Νείλου

Τα ζεύγη εκκινητών LIN1 και SW41 F/R σχεδιάστηκαν για την εξειδικευμένη ενίσχυση του ιού του Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 1 και 2. Πέρα από PCR πραγματικού χρόνου αξιολογήθηκαν και με συμβατική PCR σε δείγματα φλαβοϊών, πλάσματος και κυττάρων αίματος. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκε 0,5μl dNTPs 10 mM (Thermoscientific), 1μl πρόσθιου και 1μl ανάστροφου εκκινητή 10 μM, 5 μl Kapa buffer 10X, 0,15μl Kapa taq και 4 μl cDNA. Τέλος, προστέθηκε H_20 μέχρι να συμπληρωθεί τελικός όγκος 50μl. Οι συνθήκες των αντιδράσεων περιγράφονται παρακάτω. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%.

1. 95^{oC} για 5:OO
2. 95^{oC} για 0:20
3. 60^{oC} για 0:20 x 26 κύκλοι με LIN1 F/R
4. 72^{oC} για 0:15

1. 95^{oC} για 5:OO
2. 95^{oC} για 0:20
3. 58^{oC} για 0:20 x 20 κύκλοι με SW41 F/R
4. 72^{oC} για 0:15

6.2.8 Κατασκευή πλασμιδίων για παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων για απόλυτη ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων qPCR

6.2.8.1 Ενίσχυση ενθέματος μέσω PCR με εκκινητές εξειδικευμένους για τη γενεαλογία 1 και 2 του ιού του Δυτικού Νείλου

Επαναλήφθηκαν οι αντιδράσεις που παρατέθηκαν στην ενότητα 6.2.8 με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκαν 0.15μl Kapa HiFi και 10μl Kapa buffer HiFi 5x. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν ίδιες με της ενότητας 6.2.7 με τη διαφορά ότι οι κύκλοι αυξήθηκαν σε 40.

6.2.8.2 Απομόνωση και καθαρισμός προϊόντων PCR από γέλη αγαρόζης

Το προϊόντα της αντιδράσεων PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 1%. Απομονώθηκε η ζώνη που αντιστοιχούσε στο εκάστοτε προϊόν και καθαρίστηκε με το Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up kit σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχει η κατασκευάστρια εταιρία.

6.2.8.3 Φωσφορυλίωση ενθέματος

Στη συνέχεια, ακολούθησε φωσφορυλίωση των άκρων των προϊόντων απομόνωσης από τη γέλη. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 2,5 μl PNK buffer 10x, 1μl T4 PNK (takara), 1 μl ATP 10mM και 700 – 1000 ng υποστρώματος με τελικό όγκο αντίδρασης 20μl. Ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στους 37^{oC} και καθαρισμός όπως περιγράφεται στην ενότητα 6.2.4.

6.2.8.4 Αντίδραση λιγάσης

Επόμενο βήμα αποτελεί η αντίδραση λιγάσης με σκοπό την εισαγωγή των ενθεμάτων στον πλασμιδιακό φορέα pBluescript ο οποίος είχε υποστεί πέψη με ECORV και αποφωσφορυλίωση. Για κάθε αντίδραση προστέθηκαν 2μl Buffer 10x (NEB), 1 μl T4 ligase (enzyQuest), 80ng πλασμιδίου, 2000-3000 ng φωσφορυλιωμένου ενθέματος και H_20 μέχρι να συμπληρωθεί τελικός όγκος 20 μl. Παράλληλα, για κάθε αντίδραση παρασκευάστηκε κι δείγμα-μάρτυρας στο οποίο αντί για ένθεμα προστέθηκε H_2O. Ακολούθησε επώαση στους 16^oC για 16 ώρες.

6.2.8.5 Μετασχηματισμός *E. coli* DH5a με τα προϊόντα των αντιδράσεων λιγάσης

Αρχικά, για κάθε αντίδραση, αναμείχθηκαν υπό φλόγα 50 μl δεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a με 5 μl από το προϊόν αντίδρασης της λιγάσης παράλληλα με τον αρνητικό μάρτυρα. Στη συνέχεια, τα βακτήρια υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ κατά το οποίο επωάστηκαν 20 λεπτά στο πάγο, 50 δευτερόλεπτα στους 42^oC και κατευθείαν 2 λεπτά στο πάγο. Στη συνέχεια, προστέθηκε θρεπτικό LB ώστε να συμπληρωθεί 1 ml όγκου υγρής καλλιέργειας. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες με τις υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους 37^oC υπό ανάδευση 160 rpm για 50 λεπτά. Έπειτα, 300 μl από κάθε καλλιέργεια επιστρώθηκε σε τρυβλία με LB άγαρ που περιείχαν αμπικιλλίνη σε συγκέντρωση 100μg/ml. Τα τρυβλία επωάστηκαν ολονυχτίς (περίπου 16 ώρες) στους 37^oC. Την επόμενη μέρα, επιλέχθηκε 1 μεμονωμένη αποικία από το τρυβλίο με τον αρνητικό μάρτυρα και αρκετές μεμονομένες αποικίες από τα βακτήρια που είχαν μετασχηματιστεί με την αντίδραση λιγάσης που περιείχε το πλασμίδιο και το ένθεμα. Οι αποικίες που συλλέχθηκαν επανακαλλιεργήθηκαν σε 2 ml υγρής καλλιέργειας LB που περιείχε 100μg/ml αμπικιλλίνης και επωάστηκαν ολονυχτίως (περίπου 16 ώρες) στους 37^oC υπό ανάδευση 210 rpm.

6.2.8.6 Απομόνωση πλασμιδίων από υγρές καλλιέργειες μετασχηματισμένων βακτηρίων *E. coli* DH5a

Για την απομόνωση των πλασμιδίων φυγοκεντρήθηκε η ποσότητα των υγρών καλλιεργειών για 2 λεπτά σε 12.000 rpm στους 4^oC σε φυγόκεντρο Hermle Z233-MK2 και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Ακολούθησε προσθήκη σε κάθε δείγμα 100 μl κρύου διαλύματος I [50mM Tris, 10mM EDTA, 100ug/ml RNaseA] και ανάδευση σε Vortex μέχρι να διαλυθεί η πελλέτα που σχηματίστηκε. Έπειτα, προστέθηκαν 200 μl διαλύματος II [1% SDS που προστέθηκε τελευταία στιγμή, 0.2M NaOH], ακολούθησε ελάφρια ανάμειξη (x5) και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 150 μl κρύου διαλύματος III [3.0M potassium Asc, pH 5.5], ελαφριά ανάμειξη και επώαση για 5 λεπτά σε πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 12.000 rpm στους 4^oC , ανάκτηση του υπερκειμένου, προσθήκη 1 ml αιθανόλης και ανάδευση. Τα δείγματα επωάστηκαν για 20 λεπτά στους -80^oC και ύστερα φυγοκεντρίθηκαν για 20 λεπτά σε 12.000 rpm στους 4^oC, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 500 μl 70% αιθανόλης. Πραγματοποιήθηκε ξανά φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 12.000 rpm στους 4^oC. Απομακρύνθηκε προσεκτικά η ποσότητα αιθανόλης από κάθε δείγμα με πιπέτα χωρίς να διαταραχθεί η πελλέτα. Αφέθηκαν με ανοιχτά καπάκια για περίπου 15 λεπτά ώστε να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης. Η πελλέτα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 100 μl H_2O και ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά στους 65^oC και vortex. Εάν παρέμεναν υπολείμματα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 14.000 rpm και συλλογή του υπερκειμένου Στη συνέχεια, λήφθηκε 1μl από κάθε απομόνωση και αραιώθηκε 30 φορές ώστε να χρησιμοποιηθεί σε επόμενες αντιδράσεις.

6.2.8.7 Διαγνωστική PCR

Για να προσδιοριστούν οι κλώνοι που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο με το επιθυμητό ένθεμα, πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές PCR με τα ζεύγη εκκινητών SW41 και LIN1. Τα συστατικά κάθε αντίδρασης αποτελούνται από 0,5μl dNTPs 10 mM (Thermoscientific)**,** 0,5 μl πρόσθιου και 0,5 μl ανάστροφου εκκινητή 10 μM, 5 μl Kapa buffer 10X, 0,1 μl Kapa taq και 1 μl αραιωμένου 1/30 πλασμιδίου. Τέλος, προστέθηκε H_20 μέχρι να συμπληρωθεί τελικός όγκος 20μl. Οι συνθήκες της αντίδρασης παρατίθενται παρακάτω. Τα προϊόντα των αντιδράσεων ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 1%.

1. 95^{oC} για 1:OO
2. 95^{oC} για 0:05
3. 60^{oC} για 0:05 x 20 κύκλοι
4. 72^{oC} για 0:10

6.2.8.8 Απομόνωση πλασμιδίων θετικών κλώνων, προετοιμασία για αλληλούχηση

Οι θετικοί κλώνοι επανακαλλιεργήθηκαν σε 3 ml LB με αμπικιλλίνη. Ποσότητα 250 μl από κάθε υγρή καλλιέργεια αποθηκεύτηκε σε γλυκερόλη στους -80^{oC}. Η υπόλοιπη ποσότητα υγρής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του πλασμιδίου με το Macherey-Nagel™ NucleoSpin Plasmid QuickPure™ Kit. Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που παρέχεται από την εταιρία με τις διαφορές ότι στο πρώτο βήμα η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στα 11.000x g, ενώ στο βήμα 3 για 10 λεπτά στα 11.000 g. Η ποσοτικοποίηση του πλασμιδίου έγινε στο φασμαφωτόμετρο Quawell. Για την αλληλούχηση προετοιμάστηκαν δείγματα με τελική συγκέντρωση του πλασμιδίου να ισούται με 100 ng/μl.

6.2.8.9 Κατασκευή πρότυπων διαλυμάτων για απόλυτη ποσοτικοποίηση μέσω qPCR

Πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν τόσο στο πλαίσιο της διάγνωσης του ιού του Δυτικού Νείλου όσο και την ανίχνευση των miRNAs. Όσον αφορά στο κομμάτι του ιού του Δυτικού Νείλου, αξιοποιήθηκαν τα πλασμίδια pBluescript στα οποία κλωνοποιήθηκαν τα προϊόντα ενίσχυσης των εκκινητών LIN1 F/R και SW41 F/R με υποστρώματα τα cDNA γονιδίωμα του ιού του Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 1 και 2. Διαδοχικές αραιώσεις από έκαστο πλασμίδιο προστέθηκαν σε 900ng RNA κυττάρων αίματος έπειτα από την αντίστροφη μεταγραφή. Σχετικά με τα miRNAs, τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν προσθέτοντας αραιώσεις από ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο με παρόμοιο μήκος με τα miRNAs σε 800ng RNA ριζών *L. Japonecus*. Ύστερα ακολούθησε αντίστροφη μεταγραφή με stem loop εκκινητή ειδικό για το ολιγονουκλεοτίδιο.

6.2.9 Επεξεργασία αποτελεσμάτων qPCR

Στα πλαίσια της απόλυτης ποσοτικοποίησης του ϊικού φορτίου, υπολογίστηκε ο αρχικός αριθμός πλασμιδίων σε κάθε πρότυπο διάλυμα μέσω του εργαλείου Weight to Molar Quantity (for nucleic acids) – Bioline (https://www.bioline.com/media/calculator/01_07.html). Με βάση τα δεδομένα αυτά, υπολογίζεται αυτόματα η πρότυπη καμπύλη στην οποία βασίζεται η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων.

Για τα αποτελέσματα των qPCRs που αφορούσαν στις υπογραφές miRNAs σε κυτταρικές σειρές υπολογίστηκε το Z score για κάθε miRNA στο σύνολο των κυτταρικών σειρών. Τέλος, για την εκτίμηση των Z-score των υπογραφών των όγκο-εκφραζόμενων και όγκο-κατεσταλμένων miRNAs, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των Z-scores των επιμέρους miRNA για κάθε υπογραφή. Θετικό Z-score υποδηλώνει τιμή πάνω από το μέσο όρο, ενώ αρνητικό τιμή κάτω από τον μέσο όρο.

6.2.10 Κατασκευή Toehold ριβοδιακοπτών

6.2.10.1 Προετοιμασία ενθέματος: Φωσφορυλίωση αλυσίδων toehold ριβοδιακόπτη

Για τη φωσφορυλίωση των συμπληρωματικών αλυσίδων του Toehold ριβοδιακόπτη, παρασκευάστηκε η αντίδραση που περιείχε 2μl Ligase Buffer T4 ligase (NEB), 1μl PNK kinase (Takara), 2μl 100μM έκαστης αλυσίδας και H2O μέχρι να συμπληρωθούν 20μL. Επωάστηκε για 60 λεπτά στους 37^{oC} και 20 λεπτά στους 65^{oC} με σκοπό την απενεργοποίηση της κινάσης.

6.2.10.2 Προετοιμασία ενθέματος: Υβριδοποίηση DNA αλυσίδων Toehold ριβοδιακόπτη

Για την υβριδοποίηση των αλυσίδων του Toehold ριβοδιακόπτη που δεν έχουν υποβληθεί σε φωσφορυλίωση, η σύσταση της αντίδρασης είναι 96μl Annealing buffer oligo (100mM KOAc, 30 mM Hepes, 2mM MgAc) και 2 μL 100μM έκαστης αλυσίδας. Το διάλυμα τοποθετήθηκε για 5 λεπτά σε ποτήρι ζέσεως με νερό σε θερμοκρασία βρασμού και αφέθηκε στο πάγκο για 1:30 περίπου ώρα έως ότου η θερμοκρασία σταδιακά μειωθεί κάτω από 35^{oC}. Η διαδικασία για την υβριδοποίηση των φωσφορυλιωμένων αλυσίδων διαφέρει. Η αντίδραση που παρασκευάστηκε περιέχει 5μl 10x annealing buffer (Tris 1M pH 8, EDTA 0,5M pH 8, NaCl 2.5M) και 5 μl έκαστης αλυσίδας από το διάλυμα φωσφορυλίωσης, με τη σύσταση του διαλύματος να μεταβάλλεται. Η επώαση γίνεται σε θερμοκυκλοποιητή στους 95^{oC} για 3 λεπτά και στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώνεται σταδιακά ανά 1^{oC} για 60 κύκλους και παραμένει στους 25^{oC} για 5 λεπτά.

6.2.10.3 Αντίδραση λιγάσης και κλωνοποίηση

Πραγματοποιούνται 2 αντιδράσεις λιγάσης με σκοπό τη δημιουργία πλασμιδίων που θα κωδικοποιούν τον ίδιο ριβοδιακόπτη με γονίδιο αναφοράς τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP στη μια περίπτωση και τη GFP χωρίς το ενδογενές κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης στην άλλη περίπτωση. Για τη παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν 1μl Buffer 10x NEB, T4 Ligase (EnzyQuest), 50ng του κατάλληλου φορέα και 2μl από την αντίδραση υβριδοποίησης του ριβοδιακόπτη. Τα διαλύματα παρασκευάζονται σύμφωνα με το παρακάτω πίνακα και επωάζονται 16^{o}C για 16 ώρες. Τα προϊόντα των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν για τη κλωνοποίηση τους σε βακτήρια DH5a με την ακριβή διαδικασία να έχει περιγραφεί στις ενότητες 6.2.9.5-6.

6.2.10.4 Διαγνωστική PCR

Για τη διαγνωστική PCR χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών T7 και Linker R που υβριδίζουν στον υποκινητή T7 και το ριβοδιακόπτη αντίστοιχα. Η σύσταση της αντίδρασης περιγράφεται στην ενότητα 6.2.9.7, ενώ οι συνθήκες της PCR σημειώνονται παρακάτω. Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 1%.

1. 95^{oC} for 1:OO
2. 95^{oC} for 0:10
3. 60^{oC} for 0:05 x 20 κύκλοι
4. 72^{oC} for 0:10
5. 72^{oC} for 0:30

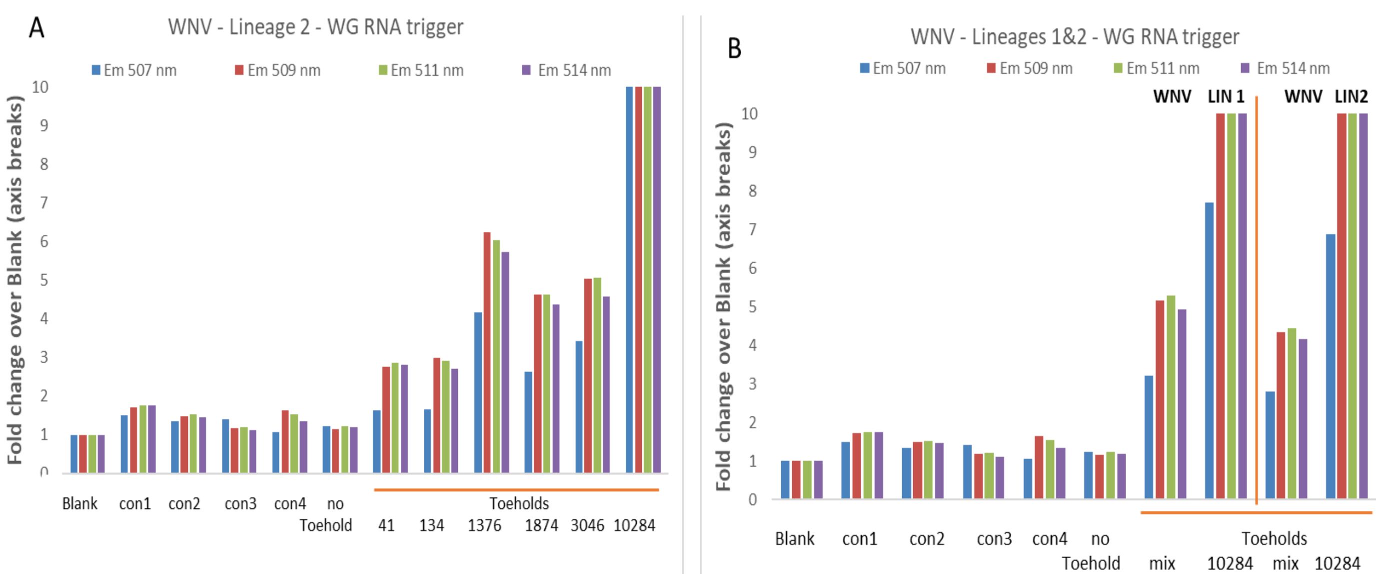
6.2.11 *In vitro* μεταγραφή μετάφραση ριβοδιακοπτών

Για τη δοκιμή της απόδοσης των ριβοδιακοπτών χρησιμοποιήθηκε το PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis Kit (New England Biolabs) σύμφωνα με τις υποδείξεις της κατασκευάστριας εταιρίας με τη διαφορά ότι ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20 μl. Όσον αφορά το σκέλος του ιού του Δυτικού Νείλου, οι ριβοδιακόπτες είχαν ήδη κλωνοποιηθεί στον φορέα pGEM που κωδικοποιεί για το γονίδιο αναφοράς GFP. Ως σηματοδότης χρησιμοποιήθηκαν 100 ng RNA από καλλιέργεια του ιού γενεαλογίας 1 ή 2. Σχετικά με τη πιλοτική δοκιμή για το σκέλος των microRNAs, χρησιμοποιήθηκαν 70ng του φορέα pGEM-GFP που κωδικοποιεί για τον ριβοδιακόπτη. Να σημειωθεί ότι από την αλληλουχία της GFP έχει αφαιρεθεί η αλληλουχία που αντιστοιχεί στο κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. Ο ριβοδιακόπτης επωάστηκε με το συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο - σηματοδότη σε ποσότητες 1nmol, 1pmol, 1 fmol. Επίσης, ίδια ποσότητα ριβοδιακόπτη επωάστηκε παρουσία 0,5 μl αιμολυμμένου πλάσματος με 0,5 fmol σηματοδότη και μείγμα σηματοδότη - ανταγωνιστής σε ποσότητα 0,5 fmol. Για τη ποσοτικοποίηση του φθορισμού της GFP, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Varioskan LUX. Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης ρυθμίστηκε στα 480 nm, ενώ της απορρόφησης γύρω από το φάσμα εκπομπής, 507-515 nm και ο χρόνος των μετρήσεων ρυθμίστηκε στα 500 msec.

Κεφάλαιο 7: Αποτελέσματα

7.1 Απόδοση Toehold ριβοδιακόπτη στην ανίχνευση RNA γονιδιώματος του ιού

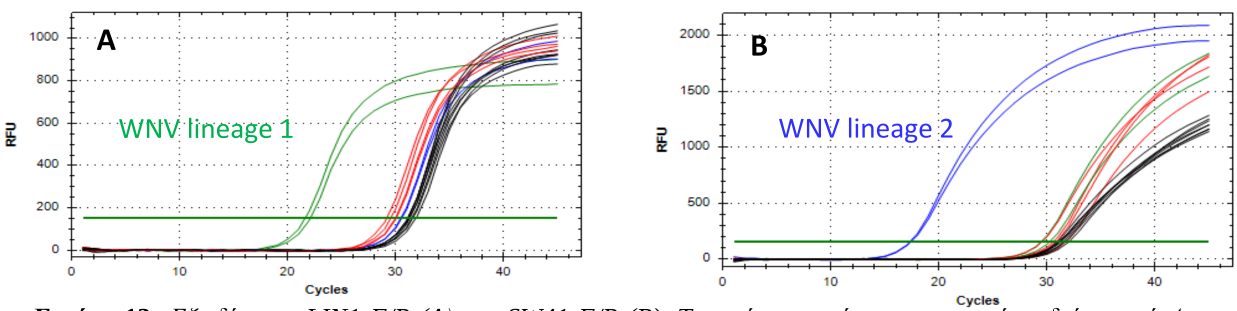
Στα πλαίσια ανάπτυξης μιας οικονομικής και απλουστευμένης μεθόδου που θα καταστήσει εφικτή την παρακολούθηση του ιού σε πληθυσμούς πτηνών, κουνουπιών και ανθρώπων, είχαν ήδη σχεδιαστεί και κατασκευαστεί 5 Toehold ριβοδιακόπτες με γονίδιο αναφοράς τη φθορίζουσα πρωτεϊνη GFP. Εξετάστηκε η απόδοση τους παρουσία RNA γονιδιώματος του ιού του Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 2 (Εικ. 12). Παράλληλα, παρασκευάστηκαν δείγματα ελέγχου στα οποία προστέθηκε μείγμα των ριβοδιακοπτών απουσία του ιού (4 βιολογικές επαναλήψεις) και 1 δείγμα στο οποίο προστέθηκε μόνο ο ιός απουσία ριβοδιακοπτών. Τα επίπεδα έκφρασης της GFP στα δείγματα ελέγχου ήταν παρόμοια με του τυφλού μάρτυρα που περιείχε H_2O. Αυτό αποδεικνύει ότι οι ριβοδιακόπτες δεν ενεργοποιούνται ανεξάρτητα από την αλληλουχία σηματοδότη και αποκλείει το ενδεχόμενο η αλληλουχία σηματοδότη να επάγει τη παραγωγή GFP με μέσο διαφορετικό από τους ριβοδιακόπτες. Όλοι οι ριβοδιακόπτες που εξετάστηκαν ενεργοποιήθηκαν παρουσία του γονιδιώματος του ιού του Δυτικού Νείλου με το σήμα που παράγεται να κυμαίνεται από 3 έως πάνω από 10 φορές υψηλότερο σε σχέση με το τυφλό. Ο ριβοδιακόπτης 10284 σημείωσε την υψηλότερη επίδοση (Εικ. 12Α). Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η απόκριση μείγματος των ριβοδιακοπτών και του ριβοδιακόπτη 10284 μεμονωμένα παρουσία 30 fmol RNA ιού του Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 1 και 2 (Εικ. 12Β). Παρατηρείται ότι ανεξάρτητα από τη γενεαλογία του ιού η επίδοση τους κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα. Συγκεκριμένα, το μείγμα επιτυγχάνει σήμα 5 φορές πάνω από το τυφλό, ενώ το 10284 εξακολουθεί να επιτυγχάνει τα υψηλότερα επίπεδα παρόμοια με τη προηγούμενη δοκιμή.



Εικόνα 12*:* *Αξιολόγηση των Toehold ριβοδιακοπτών με γονίδιο αναφοράς GFP στην ανίχνευση γονιδιώματος του ιού του Δυτικού Νείλου. Η διέγερση της GFP πραγματοποιήθηκε στα 480 nm και οι μετρήσεις καταγράφηκαν γύρω από το φάσμα εκπομπής της GFP, στα 507 nm, 509 nm, 511 nm και 514 nm. A) Πολλαπλασιαστική μεταβολή της τιμής φθορισμού της GFP των 5 Toehold ριβοδιακόπτων παρουσία γονιδιώματος ιού του Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 2 σε σχέση με τυφλό μάρτυρα. B) Πολλαπλασιαστική μεταβολή της τιμής φθορισμού της GFP μείγματος Toehold και του Toehold 10284 μεμονωμένα παρουσία 30 fmol γονιδιώματος του ιού γενεαλογίας 1 ή 2.*

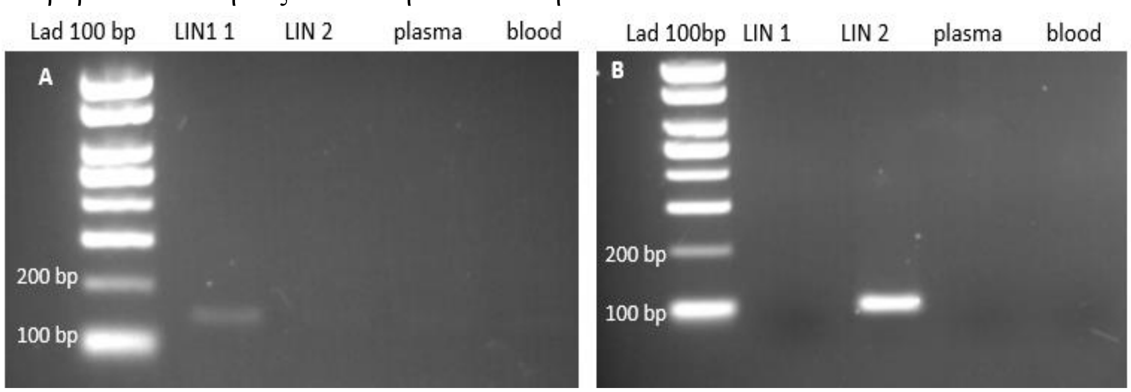
7.2 Έλεγχος εξειδίκευσης εκκινητών για ανίχνευση του ιού του Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 1 και 2 μέσω qPCR

Λόγω της υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης που χαρακτηρίζει τη μέθοδο της qPCR, η διάγνωση μέσω Toehold ριβοδιακοπτών δεν δύνανται να την αντικαταστήσει πλήρως. Είναι απαραίτητο τα δείγματα τα οποία οι ριβοδιακόπτες υποδεικνύουν θετικά να επανεξετάζονται με qPCR στα πλαίσια ενός ολοκληρωμένου πρωτοκόλλου διάγνωσης. Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές για τις παθογόνες γενεαλογίες 1 και 2 προσφέροντας τη δυνατότητα επιδημιολογικής παρακολούθησης. Αρχικά, ελέγχθηκε η εξειδίκευση των εκκινητών για τις γενεαλογίες καθώς και έναντι των στενά συγγενικών ιών του Δάγκειου πυρετού και Zika. Πιο συγκεκριμένα, το ζεύγος εκκινητών LIN1 F/R ανιχνεύει τη γενεαλογία 1 στους 21.85 κύκλους, ενώ τη 2 στους 30.5 κύκλους αποδεικνύοντας την εξειδίκευση του μεταξύ των δύο επικρατέστερων γενολογιών (Εικ. 13Α). Όσον αφορά το ζεύγος εκκινητών SW41 ανιχνεύει τη γενεαλογία 2 στους 17.3 κύκλους, ενώ την 1 στους 29.8 κύκλους υποδεικνύοντας και πάλι την εξειδίκευση του ως προς την γενεολογία (Εικ. 13Β). Και για τα 2 ζεύγη εκκινητών στα δείγματα πλάσματος και αίματος σήμα εμφανίζεται στους 29-30 κύκλους, σήμα αρκετά χαμηλό λαμβάνοντας υπόψη μας τους κύκλους ανίχνευσης των γενεαλογιών. Στα δείγματα πλάσματος και αίματος που έχει προστεθεί εξωγενώς ιός του Δάγκειου πυρετού ή Zika σήμα ανιχνεύεται στους 31-32 κύκλους. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα ζεύγη των εκκινητών δεν ενισχύουν γονιδιώματα συγγενικών ιών. Οι καμπύλες τήξης έχουν οξείες κορυφές στους 82^{oC} και 78^{oC} για τους εκκινητές LIN1 και SW41 αντίστοιχα φανερώνοντας ότι πρόκειται για κύριο προϊόν.



Εικόνα 13: *Εξειδίκευση LIN1 F/R (A) και SW41 F/R (B). Το πράσινο χρώμα αντιστοιχεί σε δείγμα ιού Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 1, το μπλε σε γενεαλογία 2, το κόκκινο σε cDNA πλάσματος και κυττάρων αίματος, ενώ το μαύρο σε cDNA πλάσματος και κυττάρων αίματος που έχουν προστεθεί εξωγενώς γονιδίωμα Dengue ή Zika.*

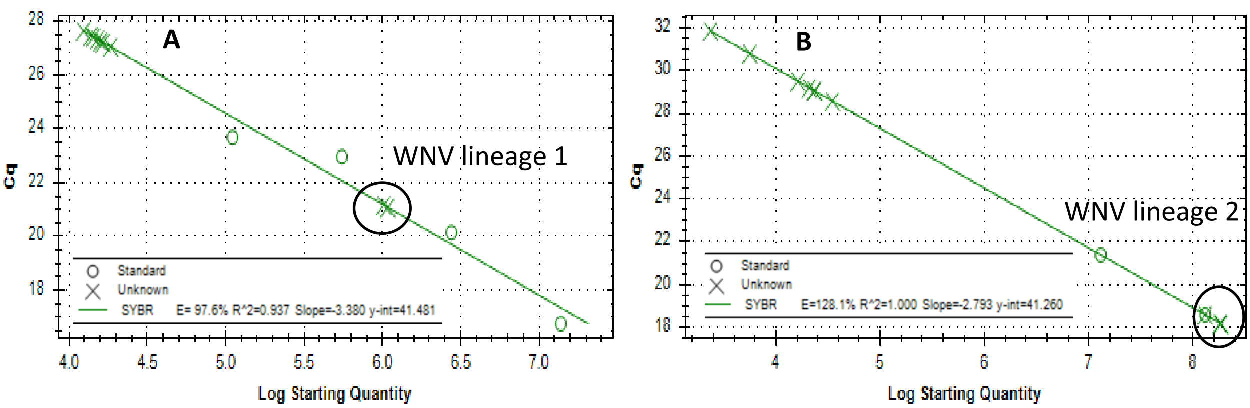
Επιπροσθέτως, διεξήχθησαν συμβατικές PCR με τα 2 ζεύγη εκκινητών και τα προϊόντα των PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη 2%. Σχετικά με το ζεύγος εκκινητών LIN1 το προϊόν εμφανίζεται μόνο στη περίπτωση που το υπόστρωμα είναι cDNA γονιδίωμα ιού του Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 1 (Εικ. 14Α), ενώ για τους εκκινητές SW41 ιός Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 2 (Εικ. 14Β). Και στις περιπτώσεις διακρίνεται μόνο μια ζώνη μεταξύ 100 – 200 ζεύγη βάσεων που είναι η επιθυμητή. Σε δείγματα πλάσματος και αίματος δεν παρατηρούνται ζώνες. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την εξειδίκευση των εκκινητών



Εικόνα 14 : *Ηλεκτροφόρηση προϊόντων* συμβατικής *PCR με εκκινητές LIN1 F/R (A) και SW41 F/R (B).*

7.3 Απόλυτη ποσοτικοποίηση ιϊκού φορτίου με qPCR

Στα πλαίσια διάγνωσης του ιού του Δυτικού Νείλου, είναι αναγκαία η δυνατότητα απόλυτης ποσοτικοποίησης του ιϊκού φορτίου. Για να καταστεί αυτό εφικτό χρειάζεται να παρασκευαστούν πρότυπα διαλύματα για την qPCR. Για τη δημιουργία των διαλυμάτων αυτών, επιλέχθηκε τα προϊόντα των PCR με ζεύγη εκκινητών LIN1 και SW41 με υποστρώματα το cDNA γονιδίωμα ιού του Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 1 και 2 αντίστοιχα να κλωνοποιηθούν στο πλασμίδιο pBluescript. Αφού κλωνοποιήθηκαν επιτυχώς, διαδοχικές αραιώσεις από έκαστο πλασμίδιο προστέθηκαν εξωγενώς σε cDNA από περίπου 900ng RNA κυττάρων του αίματος. Παράλληλα, ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pBluescript χωρίς ένθεμα που επίσης αναμείχθηκε με ισόποσο RNA κυττάρων αίματος. Στη συνέχεια στα δείγματα του ιού του Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 1 και 2, δείγματα πλάσματος και αίματος επαναλήφθηκε η qPCR συμπεριλαμβάνοντας και τα πρότυπα διαλύματα. Αρχικά, να σημειωθεί ότι οι κύκλοι μεταξύ κυττάρων αίματος και του αρνητικού μάρτυρα ήταν παρόμοιοι και με τα 2 ζεύγη εκκινητών, πράγμα που σημαίνει ότι οι εκκινητές δεν ενισχύουν μη ειδικά αλληλουχία από τον φορέα. Οι πρότυπες καμπύλες που προέκυψαν παρατίθενται στην Εικόνα 15. Η απόδοση (Ε) είναι σημαντική για την αξιολόγηση της αντίδρασης qPCR με τις τιμές να κυμαίνονται ιδανικά μεταξύ 90 – 110%. Η απόδοση της πρότυπης καμπύλης του ζεύγους εκκινητών LIN1 F/R είναι 97,6%, τιμή ικανοποιητική. Στην περίπτωση της qPCR με το ζεύγος εκκινητών LIN1, η απόδοση είναι στα επιθυμητά όρια. Ωστόσο, στην περίπτωση του SW41 η απόδοση είναι 128.1 και πιθανώς πρόκειται για τεχνικό λάθος κατά το πιπετάρισμα. Στη προκειμένη τα αποτελέσματα είναι εμπιστεύσιμα καθώς οι κύκλοι μεταξύ του πρότυπου διαλύματος και του δείγματος ιού του Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 2 είναι πολύ κοντά. Τα πρότυπα διαλύματα με τα χαμηλότερα αριθμό αντιγράφων πλασμιδίου που χρησιμοποιήθηκαν για τη κατασκευή των πλασμιδίων υπολογίζονται στα 10^5 αντίγραφα για τη καμπύλη του LIN1 και 10^7 για τη καμπύλη με ζεύγος εκκινητών SW41. Οι πρότυπες λοιπόν καμπύλες υπέδειξαν ότι το δείγμα ιού γενεαλογίας 1 και το δείγμα γενεαλογίας 2 περιέχουν αντίγραφα της τάξης των 10^6 και 10^8 αντίστοιχα.

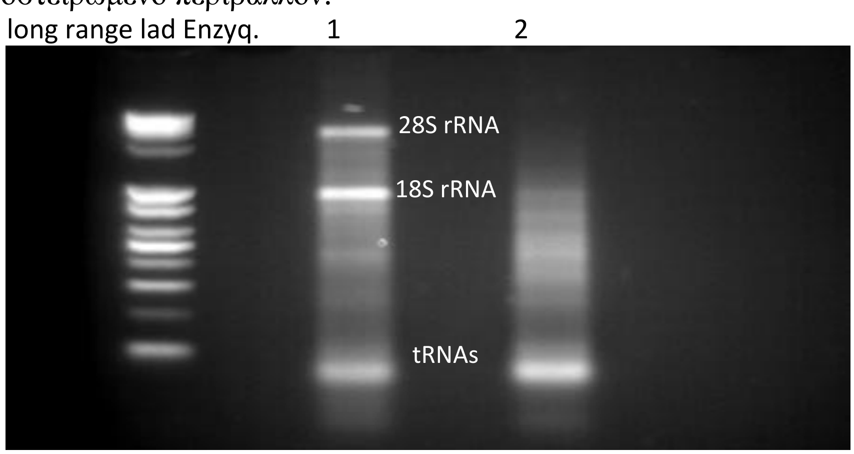


Εικόνα 15: *Απόλυτη ποσοτικοποίηση του ιού γενεαλογίας 1 και 2 με βάση τις πρότυπες καμπύλες για τα ζεύγη εκκινητών LIN1 F/R (A) και SW41 (B).*

7.4 Υπογραφή miRNA στο γαστρικό καρκίνο: Τεχνικά ζητήματα

7.4.1 Ποιότητα RNA από κλινικά δείγματα αίματος

Για την αξιολόγηση της ποιότητας του RNA που απομονώθηκε, 500ng RNA κυττάρων αίματος ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 1%. Το πρώτο δείγμα προήλθε από αιμοληψία που είχε διεξαχθεί πρόσφατα και η επεξεργασία του δείγματος για τον διαχωρισμό του πλάσματος πραγματοποιήθηκε άμεσα. Στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους -80^{oC}. Οι 2 έντονες ζώνες με τα μεγαλύτερα μοριακά βάρη αντιστοιχούν στα 28S, 18S rRNAs ενώ η διάχυτη ζώνη με το μικρότερο μοριακό βάρος σε μεταφορικά RNAs. Ωστόσο, παρατηρείται ένα διάχυτο αχνό σήμα μεταξύ των ζωνών που θα μπορούσε να προέρχεται από θραύσματα DNA εξαιτίας της επεξεργασίας με DNase. Λαμβάνοντας, όμως, υπόψη το γεγονός ότι η ένταση των ζωνών 28S:18S rRNA δεν είναι 2:1, ένδειξη πλήρως ακέραιου RNA, πιθανώς το σήμα αυτό να προέρχεται από μερικώς αποικοδομημένο RNA. Παρόλα αυτά, πρόκειται για ένα δείγμα με καλή ποιότητα RNA. Το δεύτερο δείγμα RNA διατηρήθηκε στους -20^{oC}, ενώ είχε μεσολαβήσει πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από την αιμοληψία. Η εικόνα που παρουσιάζει είναι χαρακτηριστική πλήρους αποικοδομημένου RNA, καθώς εμφανίζεται αχνό διάχυτο σήμα από το οποίο απουσιάζουν οι ζώνες των 28S, 18S rRNAs. Ωστόσο, το RNA από τα δείγματα αυτά αξιοποιήθηκε σαν πιο ρεαλιστικός μάρτυρας κλινικών δειγμάτων με απόσταση από τον χρόνο συλλογής. Καθώς το RNA είναι ασταθές, η αποθήκευση στους -20^{oC} για μεγάλο χρονικό διάστημα συνέβαλε στην αποικοδόμηση του. Η αποθήκευση και γενικότερα ο χειρισμός των δειγμάτων είναι κρίσιμα για την απομόνωση καλής ποιότητας RNA. Σε αυτό το σημείο να τονιστεί ότι ο χειρισμός βιολογικών υγρών συμπεριλαμβανομένου του αίματος, χαρακτηρίζεται από προκλήσεις, όπως η ενδογενής παρουσία RNases, σε αντίθεση με δείγματα κυτταρικών σειρών που αναπτύσσονται σε ελεγχόμενο και αποστειρωμένο περιβάλλον.



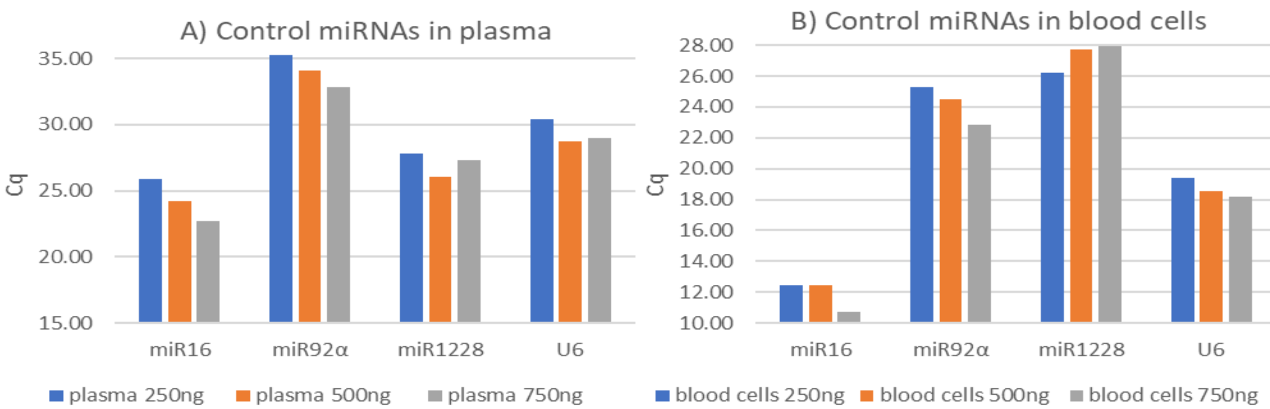
Εικόνα 16*: Ηλεκτροφόρηση RNA από κύτταρα αίματος***.**

7.4.2 Κανονικοποίηση αποτελεσμάτων qPCR

Ένα άλλο ερώτημα που τέθηκε αφορούσε στη κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων των qPCR. Στη περίπτωση των miRNAs δεν έχουν καθιερωθεί καθολικοί miRNA κανονικοποιητές όπως έχει συμβεί για τα mRNAs. Έπειτα από βιβλιογραφική ανασκόπηση [79-81] και λαμβάνοντας υπόψη πειραματικά δεδομένα, εξετάστηκαν 6 υποψήφιοι κανονικοποιητές που ενδείκνυται για μελέτη σε αίμα ασθενών με γαστρικό καρκίνο. Παράλληλα, μελετήθηκε το ενδεχόμενο απόλυτης ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων. Στα πλαίσια πιλοτικής δοκιμής, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη για την απόλυτη ποσοτικοποίηση του συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου με ίδιο μήκος και τεχνική ανίχνευσης με τα miRNA.

7.4.2.1 Σχετική κανονικοποίηση

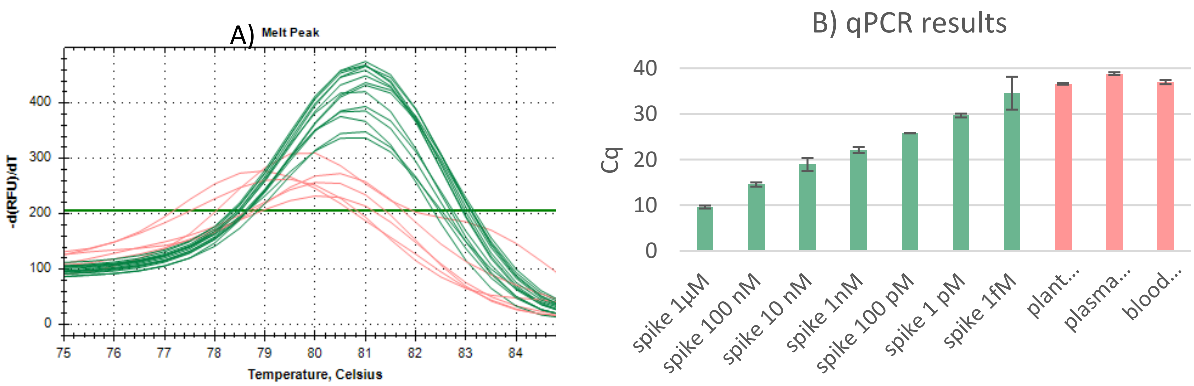
Οι κανονικοποιητές που προτάθηκαν είναι το miR16, miR1228, miR92a, miR93**,** miR26a και U6, ένα μικρό πυρηνικό RNA. Ελέγχθηκε η παρουσία τους σε αυξανόμενες ποσότητες πλάσματος (Εικ. 17Α) και κυττάρων αίματος υγιών ατόμων (Εικ. 17Β). Τα miRNA miR93**,** miR26a δεν ανιχνεύτηκαν οπότε απορρίφθηκαν. Όσον αφορά τον υποψήφιο κανονικοποιητή miR16 τα επίπεδα του αυξάνονται αναλογικά με την αύξηση του αρχικού υποστρώματος στο πλάσμα και τα κύτταρα του αίματος, ενώ οι καμπύλες τήξης υποδεικνύουν κύριο προϊόν. Στην υψηλότερη ποσότητα πλάσματος και κυττάρων αίματος οι κύκλοι που σημειώνονται είναι 22.7 και 10.7 αντίστοιχα, επίπεδα ικανοποιητικά για έναν κανονικοποιητή. Ομοίως, τα επίπεδα του miR92α συμβαδίζουν με την αύξηση του αρχικού υποστρώματος στο πλάσμα και τα κύτταρα του αίματος, ενώ η καμπύλη τήξης φανερώνει την ανίχνευση εξειδικευμένου προϊόντος. Οι κύκλοι στα 750ng RNA ισούνται με 22.85 στα κύτταρα αίματος και 32.87 στο πλάσμα, ίσως ελαφρώς χαμηλή έκφραση για κανονικοποιητή. Ωστόσο, να τονιστεί ότι είναι αναμενόμενο λόγω της φύσης του πλάσματος, ενώ περαιτέρω αύξηση του αρχικού υποστρώματος θα μπορούσε να βελτιώσει τα επίπεδα του υποψήφιου κανονικοποιητή. Δυστυχώς, το miR1228 δεν ανταποκρίθηκε όπως αναμενόταν στην αύξηση του υποστρώματος. Μάλιστα, στα δείγματα κυττάρων αίματος η καμπύλη τήξης υπέδειξε την ενίσχυση παραπροϊόντων συμβάλλοντας ίσως εν μέρει στην ανώμαλη συμπεριφορά του. Στις ποσότητες των 750 ng RNA πλάσματος και αίματος, ανιχνεύτηκε στους 27.73 και 27.93 αντίστοιχα με υψηλότερα επίπεδα να ανιχνεύονται σε χαμηλότερες ποσότητες. Παρόλα αυτά, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα επίπεδα του είναι παρόμοια σε πλάσμα και κύτταρα αίματος. Αυτό συνεπάγεται ότι υψηλότερα επίπεδα στο πλάσμα θα μπορούσε να είναι ένδειξη αιμόλυσης. Τέλος, το μικρό πυρηνικό RNA U6 στο πλάσμα δεν ακολουθεί τάση αύξησης στα 500 και 750ng σε αντίθεση με τα δείγματα κυττάρων αίματος. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει την άποψη που έχει διατυπωθεί από μέρος της επιστημονικής κοινότητας ότι δεν είναι σταθερός και κατάλληλος κανονικοποιητής για το πλάσμα. Όμως, για την ολοκληρωμένη αξιολόγηση τους ως γονίδια αναφοράς, είναι απαραίτητο να επιβεβαιωθεί η σταθερή και υψηλή έκφραση τους σε δείγματα περισσότερων ατόμων. Προκειμένου να συλλεχθούν τα δεδομένα αυτά αποφασίστηκε στα μετέπειτα δείγματα να ελέγχονται τα miR16, miR1228, miR92a. Επιπλέον, το U6 θα εξακολουθήσει να ελέγχεται, καθώς είναι διαδεδομένο γονίδιο αναφοράς στην ανίχνευση μη κωδικοποιητικών RNA. Για την κανονικοποίηση, η χρήση του μέσου όρου τους ίσως παρέχει πιο ακριβή και έγκυρα αποτελέσματα με τη δυνατότητα αναπροσαρμογής ανάλογα των δεδομένων που θα προκύψουν.



Εικόνα 17: *Δεδομένα από qPCR υποψήφιων κανονικοποιητών σε αυξανόμενες ποσότητες RNA πλάσματος (A) και κυττάρων αίματος υγιών ατόμων (B).*

7.4.2.2 Απόλυτη ποσοτικοποίηση

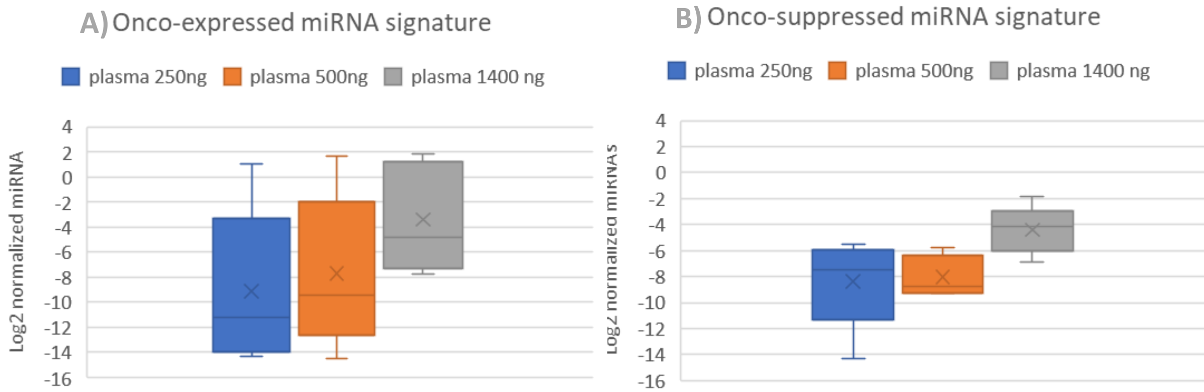
Στα πλαίσια πιλοτικής δοκιμής δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη για ποσοτικοποίηση συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν με τη προσθήκη διάφορων αραιώσεων του ολιγονουκελοτιδίου από 1μmol έως 1fmol σε 800 ng RNA ρίζας *L. Japonecus*. Παράλληλα, RNA από ρίζα, πλάσμα και κύτταρα αίματος χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Στους αρνητικούς μάρτυρες το σήμα ανιχνεύεται έπειτα από τους 36 κύκλους με τις καμπύλες τήξης να αποκαλύπτουν ότι το προϊόν ενίσχυσης έχει διαφορετική θερμοκρασία τήξης από το κύριο προϊόν αποδεικνύοντας την εξειδίκευση των εκκινητών (Εικ. 18Α). Επίσης, αυτό συνεπάγεται ότι ακόμη και ένα δείγμα με κύκλους παρόμοιους με των αρνητικών μαρτύρων θα μπορούσε να διαχωριστεί χάρη στη καμπύλη τήξης επιτρέποντας τη ποσοτικοποίηση του στόχου ακόμη και σε μικρές ποσότητες. Όσον αφορά στα πρότυπα διαλύματα, παρατηρείται ότι οι κύκλοι αυξάνονται με ρυθμό που συμβαδίζει με τη μείωση της ποσότητας του στόχου, δηλαδή μείωση του στόχου κατά 10 φορές μεταφράζονται σε αύξηση των κύκλων κατά 3.3 (Εικ. 18Β). Να σημειωθεί ότι σε όλα τα δείγματα υπάρχει επαναληψιμότητα με εξαίρεση το πρότυπο διάλυμα που περιέχει 1fmol του στόχου. Η ευαισθησία της μεθόδου εκτιμάται μεταξύ 1 pmol – 1 fmol.



Εικόνα 18: *Πρότυπα διαλύματα για απόλυτη ποσοτικοποίηση συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου. Α) Καμπύλες τήξης πρότυπων διαλυμάτων και αρνητικών μαρτύρων. Β) Δεδομένα qPCR πρότυπων διαλυμάτων και αρνητικών μαρτύρων*

7.4.3 Επίδραση αρχικής ποσότητας RNA σε συμπεριφορά miRNA υπογραφών

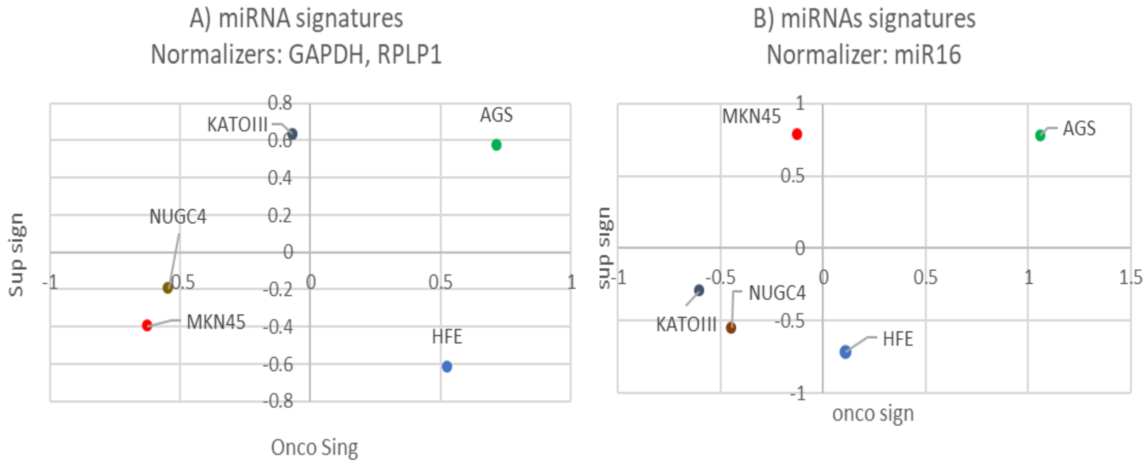
Από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έχει συγκροτηθεί μια υπογραφή από 9 miRNAs που τα επίπεδα τους αυξάνονται στο γαστρικό καρκίνο και μια υπογραφή από 7 miRNAs που η έκφραση τους μειώνεται. Εξετάστηκε η έκφραση των miRNA υπογραφών σε αυξανόμενες ποσότητες RNA πλάσματος υγιών ατόμων (250ng, 500ng, 1400ng). Τα γραφήματα προέκυψαν από λογαρίθμιση της σχετικής έκφρασης των miRNAs με βάση το 2 αφού είχε προηγηθεί η κανονικοποίηση με το μέσο όρο των miR16, miR92a, miRNA 1228 και U6. Από την υπογραφή των όγκοεκφραζόμενων miRNAs δεν ανιχνεύτηκε το O5, ενώ από τα όγκο-κατεσταλμένα δεν ανιχνεύτηκαν τα S1 και S7. Να σημειωθεί ότι από τα γραφήματα εξαιρέθηκαν τα miRNA O2, O3 και O6 των οποίων η καμπύλη τήξης δεν βελτιώθηκε ή ανιχνεύτηκαν σε πάνω από 40 κύκλους, αφού ουσιαστικά δεν εκφράζονται. Στην εικόνα 19 παρατηρείται και για τις 2 υπογραφές ότι αύξηση της αρχικής ποσότητας RNA συμβάλλει επίσης στη βελτίωση των ανίχνευσης τους όπως αναμένεται. Μάλιστα, τα επίπεδα των όγκο-κατεσταλμένων miRNAs είναι υψηλότερα σε σχέση με τα όγκο-εκφραζόμενα. Λαμβάνοντας υπόψη μας ότι πρόκειται για πλάσμα από υγιή άτομα αναμένουμε υψηλή έκφραση όγκο-κατεσταλμένων και χαμηλή των όγκο-εκφραζόμενων miRNAs. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα όγκο-κατεσταλμένα miRNAs παρουσιάζουν πιο συμπαγή υπογραφή, χαρακτηριστικό θεμιτό για έναν δείκτη.



Εικόνα 19: *Γραφήματα box plot των όγκο-εκφραζόμενων και όγκο-κατεσταλμένων υπογραφών miRNAs σε αυξανόμενες ποσότητες πλάσματος. Ο άξονας των y αναπαριστά τις τιμές που προέκυψαν από κανονικοποίηση έκαστου miRNA με το μέσο όρο των κανονικοποιητών miR16, miR1228, miR92a και U6 και στη συνέχεια λογαρίθμιση του με βάση το 2.*

7.5 Υπογραφή miRNAs σε κυτταρικές σειρές

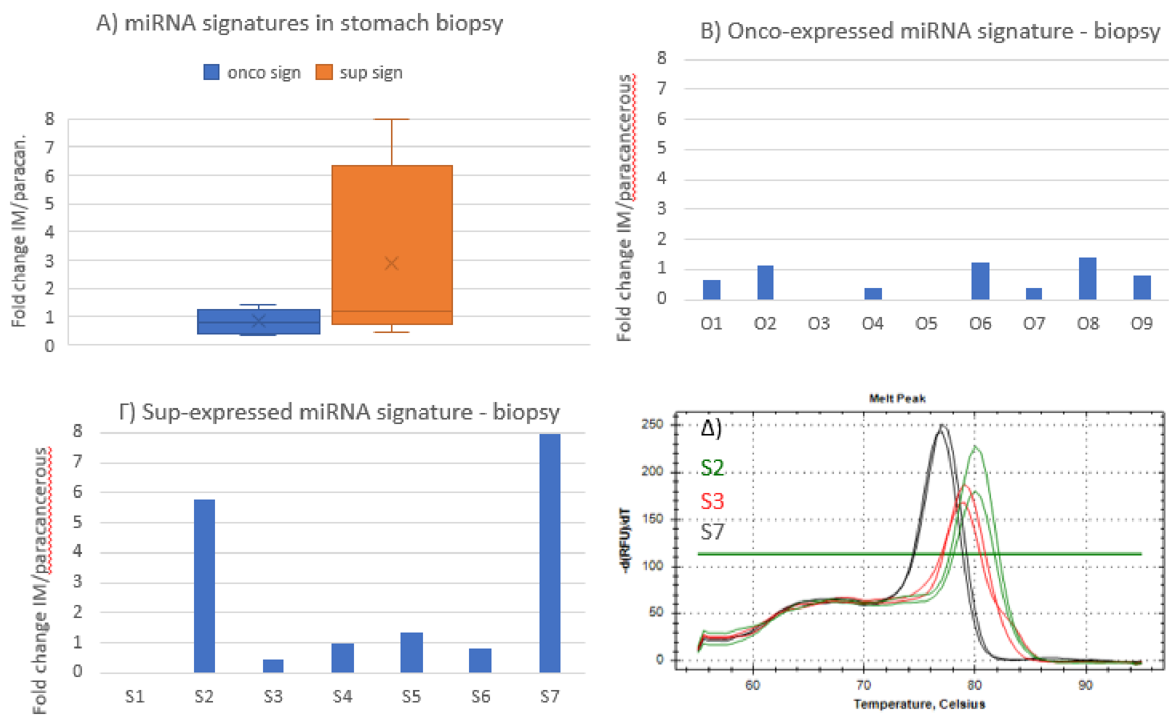
Εξετάστηκε η συμπεριφορά των ογκο-εκφραζόμενων και ογκο-κατεσταλμένων miRNA υπογραφών σε 5 καρκινικές κυτταρικές σειρές. Τα miRNAs O5, S1, S6 και S7 δεν ανιχνεύτηκαν. Αρχικά, ως κανονικοποιητές χρησιμοποιήθηκαν τα κωδικοποιητικά γονίδια GAPDH και RPLP1, καθώς δεν είχαν επιλεχθεί ακόμη miRNA κανονικοποιητές. Στην εικόνα 20A παρατίθενται τα αποτελέσματα του μέσου όρου των Z score έπειτα από κανονικοποίηση με κωδικοποιητικά γονίδια GAPDH και RPLP1. Παρατηρείται ότι τα HFE, φυσιολογικά κύτταρα του στομάχου που έχουν υποστεί αθανατοποίηση, ταξινομούνται στο πρώτο τεταρτημόριο του γραφήματος με θετική τιμή της υπογραφής των ογκο-κατεσταλμένων και αρνητική των όγκο-εκφραζόμενων όπως αναμένεται. Αντίθετα, στα AGS που προέρχονται από κύτταρα του πρωτεύοντος όγκου οι 2 υπογραφές εκφράζονται σε πολύ υψηλότερα επίπεδα από το μέσο όρο. Τα NUGC4 αντιπροσωπεύουν επόμενο στάδιο της νόσου κατά το οποίο τα καρκινικά κύτταρα εντοπίζονται σε παραγαστρικούς αδένες έπειτα από λεμφική διήθηση. Στο στάδιο αυτό οι τιμές και των 2 υπογραφών έχουν μειωθεί ταξινομώντας τα NUGC4 στο τέταρτο τεταρτημόριο. Ακολουθώντας ην εξέλιξη της νόσου, τα KATOIII έχουν προέρθει από κύτταρα του όγκου σε απομακρυσμένους λεμφαδένες. Η κυτταρική αυτή σειρά χαρακτηρίζεται από την υψηλότερη τιμή των όγκο-εκφραζόμενων και αρνητική τιμή των όγκο-κατεσταλμένων miRNAs. Στο τελευταίο στάδιο της ασθένειας ο όγκος έχει εξαπλωθεί σε άλλα όργανα με τη κυτταρική σειρά MKN45 να αποτελείται από κύτταρα του γαστρικού καρκινικού όγκου που έχουν μεταναστεύσει στο συκώτι. Τα MKN45 εμφανίζουν τις χαμηλότερες τιμές και των 2 υπογραφών. Αργότερα, εξετάστηκαν τα επίπεδα των υποψήφιων κανονικοποιητών miR16 και miR1228, που ήταν άμεσα διαθέσιμα, στις κυτταρικές σειρές. Επαναλήφθηκε η ανάλυση με τη κανονικοποίηση να γίνεται μόνο με το miR16 καθώς η καμπύλη τήξης του miR1228 υποδεικνύει παραπροϊόντα (Εικ. 20B). Διαπιστώνεται ότι τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με εξαίρεση τη κυτταρική σειρά KATOIII και MKN45. Τα KATOIII εμφανίζουν αρνητικές τιμές των 2 υπογραφών. Τα MKN45 χαρακτηρίζονται από εξίσου υψηλά επίπεδα των όγκο-εκφραζόμενων miRNAs όσο και τα AGS, αλλά αρνητική τιμή όγκο-κατεσταλμένων miRNAs όπως αναμένεται.



Εικόνα 20: *Μέσος όρος Z-score κανονικοποιημένων όγκο-εκφραζόμενων και όγκο-κατεσταλμένων miRNA υπογραφών. A) Κανονικοποίηση με GAPDH και RPLP1. B) Κανονικοποίηση υπογραφών με miR16.*

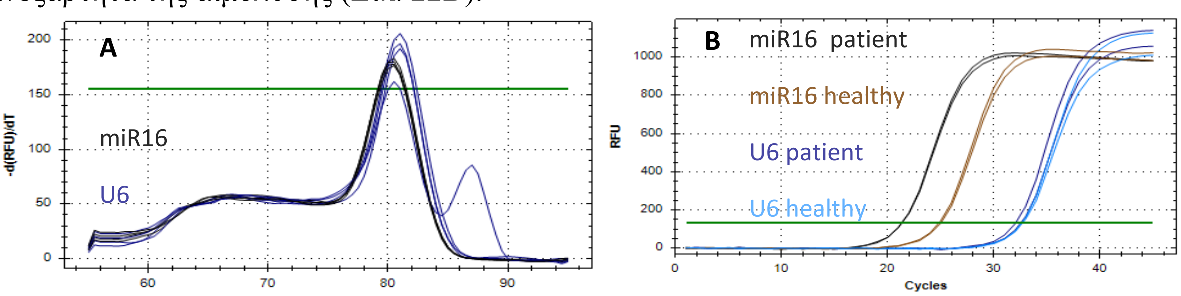
7.6 Υπογραφή miRNAs σε κλινικά δείγματα βιοψίας στομάχου και αίματος

Στα πλαίσια έναρξης κλινικής δοκιμής, εθελοντής με εντερική μεταπλασία παραχώρησε δείγμα συμπαγούς βιοψίας στομάχου και αίματος ώστε να εξεταστούν οι υπογραφές των 9 όγκο-εκφραζόμενων και 7 όγκο-κατεσταλμένων miRNAs. Παράλληλα, εξετάστηκαν και τα επίπεδα των υποψήφιων miRNAs 16, 1228, 92a και το snRNA U6. Στη βιοψία ως κανονικοποιητής χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των miRNA16 και U6 των οποίων η καμπύλη τήξης υποδείκνυε την ενίσχυση εξειδικευμένου προϊόντος. Επίσης, τα miRNAs που ανιχνεύτηκαν από 40 κύκλους και πάνω αφαιρέθηκαν από την ανάλυση (O3, O5 και S1). Στην εικόνα 21A παρατηρείται ότι οι λόγοι των επιπέδων της υπογραφής των όγκο-εκφραζόμενων miRNAs στον ιστό με εντερική μεταπλασία σε σχέση με το παρακαρκινικό ιστό κατανέμονται γύρω από το 1 με μέσο όρο 0,85. Αυτό συνεπάγεται ότι το σύνολο της υπογραφής εκφράζεται σε περίπου ίδια επίπεδα στους 2 ιστούς. Αντίθετα, η υπογραφή των όγκο-κατεσταλμένων miRNAs εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στον ιστό με την εντερική μεταπλασία σε σχέση με το παρακαρκινικό ιστό με μέσο όρο 2.89 φορές. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά την υπογραφή των όγκο-εκφραζόμενων miRNAs παρατηρείται ότι τα επίπεδα των miRNAs O2, O6, O8 και O9 είναι παρόμοια σε εντερική μεταπλασία και παρακαρκινικό ιστό (Εικ. 21B). Αυτό σημαίνει ότι στο στάδιο της προκαρκινικής αλλοίωσης τουλάχιστον δεν μπορούν να λειτουργήσουν ως διαγνωστικοί βιοδείκτες. Αντίθετα, τα επίπεδα των O1, O4 και O7 είναι χαμηλότερα στη προκαρκινική αλλοίωση αφήνοντας ανοιχτό το ενδεχόμενο αξιοποίησης τους ως δείκτες προκαρκινικής αλλοίωσης. Βέβαια οι καμπύλες τήξης τους δεν είναι ικανοποιητικές οπότε υπάρχουν επιφυλάξεις για την εγκυρότητα του αποτελέσματος. Σχετικά με την υπογραφή των όγκο-κατεσταλμένων miRNAs, τα S4, S5 και S6 εκφράζονται στα ίδια επίπεδα στον ιστό με εντερική μεταπλασία και στο παρακαρκινικό ιστό. Τα επίπεδα του S3 υποδιπλασιάζονται στον ιστό με εντερική μεταπλασία, ενώ τα S2 και S7 εκφράζονται 6 και 8 φορές πιο υψηλά στη προκαρκινική αλλοίωση (Εικ. 21Γ). Οι καμπύλες τήξης των S2, S3 και S7 είναι αξιόπιστες (εικ. 21Δ). Η μεταβολή της έκφρασης ακόμη και από το στάδιο της εντερικής μεταπλασίας προκαλεί ενδιαφέρον για τη προοπτική χρήσης ως διαγνωστικούς δείκτες. Εάν η μεταβολή στα επίπεδείκτες. Εάν η μεταβολή στα επίπεδα των miRNAs στη βιοψία ανακατοπτρίζεται και στα βιολογικά υγρά, μπορούν να αξιοποιηθούν ως μη επεμβατικοί βιοδείκτες.



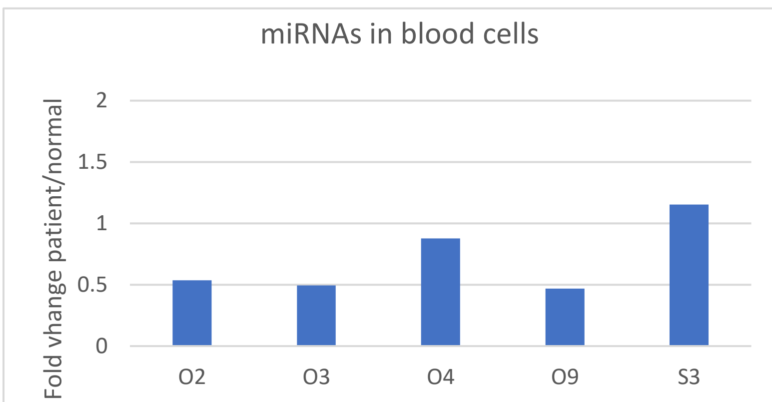
Εικόνα 21: *Πολλαπλασιαστική μεταβολή υπογραφών miRNAs στον ιστό με εντερική μεταπλασία (IM) σε σχέση με παρακαρκινικό ιστό. A) Σύνολο όγκο-εκφραζόμενης και όγκο-κατεσταλμένης υπογραφής miRNAs. B) Υπογραφή όγκο-εκφραζόμενων miRNAs. Γ) Υπογραφή όγκο-κατεσταλμένων miRNAs. Για τη σχετική κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των miR16 και U6.Δ) Καμπύλες τήξης miRNAs S2, S3 και S7*

Σε επόμενη φάση εξετάστηκαν τα επίπεδα των υπογραφών miRNAs σε πλάσμα και κύτταρα αίματος του ασθενούς και υγιούς ατόμου. Τα miRNAs O2-O5, S1 και S7 ανιχνεύτηκαν κοντά στους 40 κύκλους, πράγμα που σημαίνει ότι στα 2 άτομα υπό εξέταση δεν εκκρίνονται στη κυκλοφορία του αίματος αποκλείοντας τους από μη επεμβατικούς βιοδείκτες. Γενικότερα η ανίχνευση των miRNAs στο πλάσμα αποδείχθηκε μεγάλη πρόκληση, καθώς οι καμπύλες τήξης της πλειοψηφίας των miRNAs υποδεικνύουν διμερή εκκινητών ή παραπροϊόντα. Εξαίρεση αποτελούν τα miRNAs S2, S4, S5 και S6 με το τελευταίο να παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της μεταβολής των επίπεδων του στη βιοψία. Δυστυχώς, όμως η σύγκριση των επίπεδων του S6 στο πλάσμα ασθενούς και υγιή ατόμου δεν είναι εφικτή λόγω αιμόλυσης του πλάσματος του ασθενούς. Το πείραμα, όμως, αυτό παρείχε σημαντικές πληροφορίες για τους υποψήφιους κανονικοποιητές με τα miR16 και U6 να εμφανίζουν αξιόπιστες καμπύλες τήξης (Εικ. 22A). Τα επίπεδα του miR16 μεταβάλλονται από 24.89 στον υγιή σε 21.30 στον ασθενή, πράγμα που σημαίνει ότι επηρεάζεται από την αιμόλυση. Αντίθετα, το U6 ανιχνεύεται στους 32 κύκλους ανεξάρτητα της αιμόλυσης (Εικ. 22B).



Εικόνα 22: *Δεδομένα qPCR miRNA κανονικοποιητών σε πλάσμα. B) Καμπύλη τήξης υποψήφιων κανονικοποιητών miR16 και U6. B) Κύκλοι των υποψήφιων κανονικοποιητών miR16 και U6 στο πλάσμα.*

Τέλος, εξετάστηκαν οι υπογραφές των miRNAs και σε κύτταρα αίματος. Ιδανική είναι η περίπτωση στην οποία τα miRNAs δεν εκφράζονται στα κύτταρα του αίματος καθώς με αυτό το τρόπο αποκλείεται το ενδεχόμενο να επηρεάζουν τα επίπεδα στο πλάσμα. Παρότι η πλειοψηφία των miRNAs ανιχνευόταν κάτω από 35 κύκλους, επίπεδα υψηλότερα από το πλάσμα, οι καμπύλες τήξης εξακολουθούν να υποδεικνύουν την απουσία εξειδικευμένων προϊόντων. Να σημειωθεί, επίσης, ότι για το αποτέλεσμα αυτό δεν ευθύνεται η ποιότητα του RNA, καθώς ηλεκτροφόρηση υπέδειξε καλή ποιότητα. Εξαίρεση, όμως, αποτελούν τα O2, O3, O4, O9 και S3, καθώς και οι υποψήφιοι κανονικοποιητές miR16, miR92a και U6. Ακολούθησε κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με το μέσο όρο των 3 κανονικοποιητών. Όπως φαίνεται στην εικόνα 23, τα επίπεδα των S3 και O4 είναι παρόμοια σε ασθενή και υγιή, ενώ των O2, O3 και O9 υποδιπλασιάζονται. Δεδομένου ότι κανένα από τα δύο δείγματα δεν αφορούν στάδιο που θα δικαιολογούσε τη παρουσία στο αίμα καρκινικών κυττάρων με προέλευση από το στομάχι οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται σε παραλλακτικότητα. Ασθενής και υγιές άτομο είναι 2 ανεξάρτητοι άνθρωποι του ίδιου φύλου αλλά από διαφορετικές ηλικιακές ομάδες με διαφορετικό τρόπο ζωής και συνήθειες που ενδεχομένως επηρεάζουν το μεταγράφωμα τους.

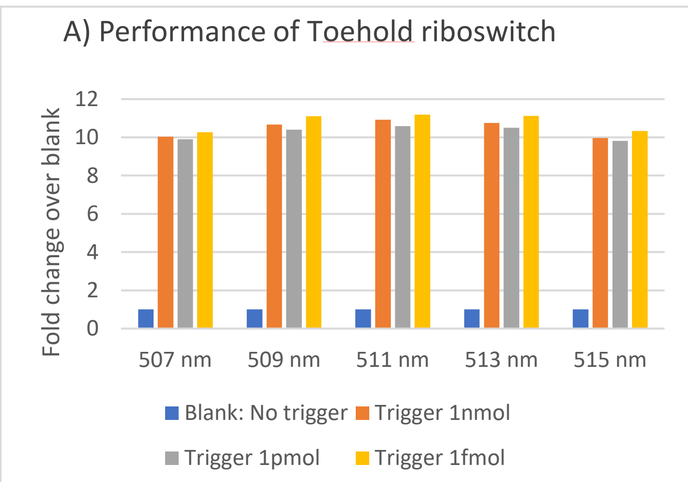


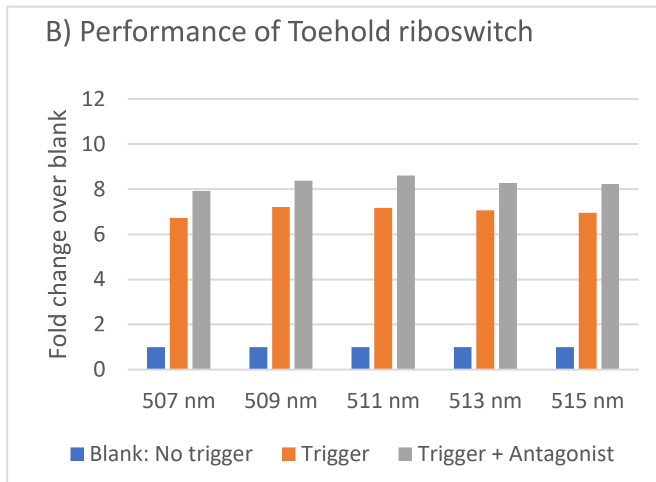
Εικόνα 23: *Πολλαπλασιαστική μεταβολή των όγκο-εκφραζόμενων και όγκο-κατεσταλμένων miRNA υπογραφών σε κύτταρα αίμαοτος του ασθενή σε σχέση με φυσιολογικό άτομο. Για τη σχετική κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των miR16, miR92a και U6.*

7.7 Πιλοτική δοκιμή toehold ριβοδιακοπτών για την ανίχνευση των miRNAs

Προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα ανίχνευσης miRNA με ριβοδιακόπτες, κατασκευάστηκε ένας Toehold ριβοδιακόπτης με γονίδιο αναφοράς τη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP από την οποία έχει αφαιρεθεί το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. Αξιολογήθηκε η απόδοση του απουσία και παρουσία της miRNA αλληλουχίας σηματοδότη σε διαφορετικές ποσότητες (1nm, 1 pmol, 1 fmol) (Εικ. 24A). Το σήμα πολλαπλασιάστηκε κατά 10-12 φορές σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή απουσία του σηματοδότη. Το σήμα φθορισμού διαφέρει ελαφρώς στις διαφορετικές ποσότητες αλληλουχίας σηματοδότη με τη χαμηλότερη ποσότητα (1fmol) να επιτυγχάνει την ενεργοποίηση του ριβοδιακόπτη σε μεγαλύτερο βαθμό. Άρα, ο ριβοδιακόπτης δεν ανταποκρίνεται αναλογικά στη μείωση της ποσότητας της αλληλουχίας σκανδάλης.

Τέλος, διεξήχθη μια επιπλέον δοκιμή στην οποία ο ριβοδιακόπτης αξιολογήθηκε σε 3 συνθήκες (εικ. 25B). Στη πρώτη συνθήκη προστέθηκε ποσότητα πλάσματος που είχε υποστεί αιμόλυση, πράγμα που σημαίνει ότι το περιεχόμενο του σε νουκλεϊκά οξέα έχει εμπλουτιστεί λόγω της ρήξης των κυττάρων του αίματος. Στη δεύτερη συνθήκη, πέρα από πλάσμα, ο ριβοδιακόπτης επωάστηκε με 0,5 fmol της αλληλουχίας σκανδάλης (0,5 pmol/ml πλάσματος). Στη τρίτη συνθήκη προστέθηκε επιπλέον ίση ποσότητα ανταγωνιστή, αλληλουχίας δηλαδή που είναι συμπληρωματική με την αλληλουχία της σκανδάλης. Αρχικά, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι απουσία του σηματοδότη το σήμα φθορισμού παραμένει στα ίδια χαμηλά επίπεδα παρότι έχει προστεθεί πλάσμα. Αυτό σημαίνει ότι δεν ενεργοποιείται από αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων που περιέχονται στο πλάσμα αποδεικνύοντας την εξειδίκευση του για την αλληλουχία σηματοδότη. Επίσης, ο ριβοδιακόπτης εξακολουθεί να ενεργοποιείται από την αλληλουχία σηματοδότη σε υψηλό βαθμό, κατά 7 φορές, παρότι η αντίδραση δυσχεραίνεται λόγω του πλάσματος. Το δεδομένο αυτό είναι ιδιαίτερα θετικό, καθώς προσεγγίζει τη κλινική πρακτική. Ωστόσο, ιδιαίτερη εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι το υψηλότερο σήμα φθορισμού (αύξηση κατά 8.3 φορές) επιτυγχάνεται ύστερα από επώαση με μείγμα των αλληλουχιών σηματοδότη και ανταγωνιστή. Στο σημείο αυτό να διευκρινιστεί ότι δεν προηγήθηκε επώαση των αλληλουχιών προκειμένου να εξασφαλιστεί υβριδισμός μεταξύ τους πριν την επώαση με το ριβοδιακόπτη. Λαμβάνοντας υπόψη μας αυτό, η αλληλουχία του ανταγωνιστή θα μπορούσε πέρα από το σηματοδότη, να υβριδίζει μερικώς με το ριβοδιακόπτη ενεργοποιώντας τον.





Εικόνα 24: *Απόδοση του Toehold ριβοδιακόπτη με γονίδιο αναφοράς την πρωτεΐνη GFP μετά από απαλοιφή του ενδογενούς κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης. Η διέγερση της GFP πραγματοποιήθηκε στα 480 nm και οι μετρήσεις καταγράφηκαν γύρω από το φάσμα εκπομπής της GFP, στα 507 nm, 509 nm, 511 nm και 513 nm. Α) Πολλαπλασιαστική μεταβολή της τιμής φθορισμού της GFP παρουσία 1nmol, 1pmol και 1 fmol της αλληλουχίας σκανδάλης σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή απουσία σκανδάλης. Β) Πολλαπλασιαστική μεταβολή της τιμής φθορισμού της GFP παρουσία 0,5 fmol αλληλουχίας σκανδάλης και μείγματος σκανδάλης και ανταγωνιστή σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή απουσία τους. Να σημειωθεί ότι και στις 3 συνθήκες προστέθηκε ποσότητα πλάσματος που είχε υποστεί αιμόλυση.*

Κεφάλαιο 8: Συζήτηση και συμπεράσματα

Παρά τις ραγδαίες εξελίξεις που έχουν σημειωθεί στην βιολογία τα τελευταία έτη, η κοινωνία ακόμη πασχίζει να αντιμετωπίσει ορισμένες μεταδοτικές και μη ασθένειες [82]. Μάλιστα εκτιμάται ότι οι μεταδοτικές ασθένειες απειλούν πάνω από το μισό πληθυσμό παγκοσμίως με αποτέλεσμα να συγκαταλέγονται στις πιο επικίνδυνες απειλές για την ανθρωπότητα. Ωστόσο, για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας αλλά και για την παρεμπόδιση εξάπλωσης του παθογόνου στην περίπτωση μολυσματικών ασθενειών απαιτείται αξιόπιστη και έγκαιρη διάγνωση. Αυτό προϋποθέτει την επιλογή του κατάλληλου βιοδείκτη και εργαστηριακής μεθόδου για τη διάγνωση του. Όσον αφορά το βιοδείκτη, το RNA έχει αναδειχθεί σε ευαίσθητο και εξειδικευμένο βιοδείκτη για μολυσματικές και μη ασθένειες. Όσον αφορά τις διαγνωστικές μεθόδους, εφαρμόζονται κυρίως ανοσοδοκιμασίες για την ανίχνευση πρωτεϊνικών δεικτών και διάφορες παραλλαγές της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων [83]. Η πρόσφατη πανδημία που προκάλεσε ο ιός SARS-CoV-2 ανέδειξε την αδυναμία των υφιστάμενων μεθόδων για άμεση, οικονομική, αξιόπιστη διάγνωση χωρίς την ανάγκη εξειδικευμένου προσωπικού [84]. Η ενσωμάτωση εργαλείων που προσφέρει η συνθετική βιολογία στη διαγνωστική, όπως οι συνθετικοί Toehold ριβοδιακόπτες είναι πολλά υποσχόμενη [85].

8.1 Μεταδοτικές ασθένειες: Ιός του Δυτικού Νείλου & RNA γονιδίωμα

Στα πλαίσια μελέτης μιας μεταδοτικής ασθένειας επιλέχθηκε ο ιός του Δυτικού Νείλου με προτεινόμενο διαγνωστικό βιοδείκτη το RNA γονιδίωμα του ιού με σκοπό την ανάπτυξη ενός ολοκληρωμένου πρωτοκόλλου διάγνωσης που ανταποκρίνεται στη διάγνωση τελικής φροντίδας. Εξετάστηκε, λοιπόν, η προοπτική χρήσης των Toehold ριβοδιακοπτών για την επίτευξη του στόχου αυτού. Η προσέγγιση αυτή εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 2014 από τον Pardee για τη διάγνωση του RNA ιού Ebola. Συγκεκριμένα κατασκευάστηκαν 2 σειρές Toehold ριβοδιακοπτών με γονίδιο αναφοράς τη β-γαλακτοζιδάση που ενεργοποιούνται από mRNA του στελέχους Sudan και Zaire αντίστοιχα επιτρέποντας παράλληλα την ταυτοποίηση τους. Το όριο ανίχνευσης είναι 30nM του RNA σηματοδότη [77]. Αργότερα, ο Pardee και η ομάδα του κατασκεύασαν Toehold ριβοδιακόπτες με το ίδιο γονίδιο αναφοράς που ανιχνεύουν το RNA γονιδίωμα του ιού Zika όπως περιγράφθηκε στην ενότητα 4.2. Το μέγιστο δυναμικό εύρος ισούται με 34, ενώ επιτρέπει τον ημιποσοτικό προσδιορισμό του ιικού φορτίου. Το όριο ανίχνευσης εκτιμήθηκε στα 30 nM της αλληλουχίας σηματοδότη, πράγμα που συνεπάγεται ότι η μέθοδος δεν είναι αρκετά ευαίσθητη για να ανιχνεύσει τα femtomol του ιού που συναντώνται στα κλινικά δείγματα. Ωστόσο, η ενσωμάτωση βήματος ισόθερμης ενίσχυσης της περιοχής σηματοδότη του γονιδιώματος του Zika μέσω NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), το όριο ανίχνευσης μειώθηκε στα 3 fM επιτυγχάνοντας τη ζητούμενη ευαισθησία [78]. Επιπλέον, μόλις το 2021 κατασκευάστηκαν αντίστοιχοι ριβοδιακόπτες για την ανίχνευση 2 στελεχών των κορονοϊών, του MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) και SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). Δείχθηκε ότι για την ενεργοποίηση των ριβοδιακοπτών απαιτούνται 250 nM RNA σηματοδότη. Ωστόσο και σε αυτή τη περίπτωση το ϊκό φορτίο είναι της τάξης των attomole και femtomol σε κλινικά δείγματα της άνω και κάτω αναπνευστικής οδού αντίστοιχα. Για το λόγο αυτό, προτάθηκε η ενίσχυση του γονιδιώματος με την μέθοδο RT-LAMP (Reverse Transcription Loop-Mediated Amplification) πριν την επώαση με το ριβοδιακόπτη. Με τη τροποποίηση αυτή κατέστη εφικτή η ενεργοποίηση των ριβοδιακοπτών με αρχικό υπόστρωμα 1200 αντίγραφα/μl ή 12 aM με το σήμα να αυξάνεται πάνω από 10 φορές σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Με το πρωτόκολλο αυτό σημειώθηκε υψηλότερη ευαισθησία και πιο σύντομη χρονική διάρκεια σε σχέση με το πρωτόκολλο που παρατέθηκε για την ανίχνευση του Zika [86].

Στη παρούσα πτυχιακή ελέγχθηκε η επίδοση Toehold ριβοδιακοπτών με γονίδιο αναφοράς την GFP για την ανίχνευση του ιού του Δυτικού Νείλου. Δείχθηκε ότι οι ριβοδιακόπτες ενεργοποιούνται από RNA γονιδίωμα των γενεαλογιών 1 και 2. Πρόκειται για γενεαλογίες που είναι ευρέως διαδεδομένες και οι μοναδικές στελέχη των οποίων έχουν συσχετιστεί με παθογένεια προς το παρών. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι, σε αντίθεση με τις δημοσιεύσεις που παρατέθηκαν, ως αλληλουχία σηματοδότης λειτούργησε το γονιδίωμα του ιού και όχι συνθετική αλληλουχία μικρού μήκους που ενδεχομένως ευνοεί την απόδοση του ριβοδιακόπτη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκέντρωσε ο Toehold ριβοδιακόπτης 10284 καθώς το σήμα της γονιδίου αναφοράς αυξήθηκε πάνω από 10 φορές ακόμη και παρουσία 30 fmol γονιδιώματος. Η ποσότητα ιϊκού φορτίου που χρησιμοποιήθηκε αντιστοιχεί σε αντίγραφα της τάξης 10^9, μια ρεαλιστική τιμή για δείγματα πτηνών δίνοντας πολλές υποσχέσεις για πιθανή εφαρμογή του σε πρώτη φάση μαζικής δειγματοληψίας. Ωστόσο, για την εφαρμογή τους στη διάγνωση του ιού σε κλινικά δείγματα ανθρώπων που αναπτύσσουν το χαμηλότερο ιϊκό φορτίο σε σχέση με πτηνά και κουνούπια, απαιτείται πολύ υψηλότερη ευαισθησία.

Παρόλα αυτά η μέθοδος της PCR πραγματικού χρόνου εξακολουθεί να χαρακτηρίζεται από υψηλότερη ευαισθησία και εξειδίκευση σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους συμπεριλαμβανομένου των ριβοδιακοπτών. Για το λόγο αυτό προτείνεται η ένταξη της PCR πραγματικού χρόνου στο πρωτόκολλο διάγνωσης του ιού του Δυτικού Νείλου ως επιβεβαιωτική μέθοδος. Οι τεχνικές που έχουν εδραιωθεί για τη ποσοτικοποίηση του προϊόντος ενίσχυσης είναι οι ανιχνευτές TaqMan και η χρωστική SYBR Green η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλότερο κόστος και ευκολίας στο σχεδιασμό των εκκινητών. Στη παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε η προσέγγιση της SYBR Green qPCR. Σχεδιάστηκαν 2 ζεύγη εκκινητών για την ανίχνευση των παθογόνων γενεαλογιών 1 και 2 του ιού του Δυτικού Νείλου καθιστώντας έτσι εφικτή και την επιδημιολογική παρακολούθηση των γενεαλογιών με τους ριβοδιακόπτες να αδυνατούν να τις διαχωρίσουν. Παράλληλα, κατασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα επιτρέποντας την απόλυτη ποσοτικοποίηση του ιϊκού φορτίου. Η ευαισθησία της μεθόδου που έχει επιτευχθεί σε προηγούμενες παρόμοιες μελέτες κυμαίνεται από 100 μέχρι 20 αντίγραφα/ml [87-89]. Τα επίπεδα αυτά είναι ικανοποιητικά για να την διάγνωση του ιού του Δυτικού Νείλου σε κλινικά δείγματα πτηνών, κουνουπιών καλύπτοντας ακόμη και τους ανθρώπους στους οποίους παρατηρούνται τα χαμηλότερα επίπεδα. Στη περίπτωση των ανθρώπων, όμως, πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή του κατάλληλου κλινικού δείγματος λαμβάνοντας υπόψη και τη συμπτωματολογία του ασθενούς. Σε ασθενείς με προσβεβλημένο νευρικό σύστημα ο ιός ανιχνεύεται σε ούρα και αίμα, σε ασθενείς με πυρετό του ιού του Δυτικού Νείλου συνήθως ανιχνεύεται στα ούρα και όχι στο αίμα και σε ασυμπτωματικούς μόνο στο αίμα [21]. Ακόμη, σε συμπτωματικούς ασθενείς το γονιδίωμα του ιού απομονώνεται με μεγαλύτερη συχνότητα από το ολικό αίμα (86,8% για το ολικό αίμα και 58,3% για τα ούρα). Ωστόσο, το υψηλότερο ικό φορτίο καταγράφεται στα ούρα και μάλιστα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (1.100 αντίγραφα/ml στα ούρα και 550 αντίγραφα/ml στο ολικό αίμα) υποδεικνύοντας ότι για την επιλογή του κατάλληλου κλινικού δείγματος είναι κρίσιμος που ο χρόνος που μεσολαβεί μέχρι τη λήψη κλινικού δείγματος [22].

Για τον πιο ολοκληρωμένο χαρακτηρισμό των δυνατοτήτων του συστήματος αυτού χρειάζονται περαιτέρω πειράματα. Μελλοντικά, θα διερευνηθεί η επίδοση των ριβοδιακοπτών με γονίδιο αναφοράς ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις μεταβολής χρώματος, καθώς συνοδεύονται από διάφορα πλεονεκτήματα. Πιο συγκεκριμένα, η αλλαγή του χρώματος είναι ορατή με γυμνό μάτι, ενώ η φωτομέτρηση για τη ποσοτικοποίηση της έντασης γίνεται με οικονομικό εξοπλισμό [90]. Επιπλέον, η αλλαγή του γονιδίου αναφοράς πιθανόν οδηγήσει και σε βελτίωση της ευαισθησίας. Ακόμα, θα είχε ενδιαφέρον η δοκιμή των ριβοδιακοπτών σε κλινικά δείγματα πτηνών αλλά και κουνουπιών. Όσον αφορά τη προσέγγιση κλινικών δειγμάτων ανθρώπων, θα μπορούσε να εξεταστεί το ενδεχόμενο ένταξης βήματος ενίσχυσης των νουκλεϊκών οξέων πριν την αντίδραση του ριβοδιακόπτη, αν και αυτό θα αύξανε σημαντικά το κόστος αλλά και θα δυσκόλευε την αποθήκευση του ενζυμικού μείγματος εκτός ψυγείου.

8.2 Μη μεταδοτικές ασθένειες: Γαστρικός καρκίνος & miRNA

Τα miRNAs συγκεντρώνουν πληθώρα χαρακτηριστικών που τα καθιστούν ιδανικούς βιοδείκτες για τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου. Διαδραματίζουν ρόλο στη παθολογία της νόσου, εμφανίζουν ιστοειδικότητα, ενώ υπογραφές miRNAs επιτυγχάνουν υψηλότερη ευαισθησία και εξειδίκευση σε σχέση με κλασσικούς καρκινικούς δείκτες. Επιπλέον, εκκρίνονται στη κυκλοφορία του αίματος επιδεικνύοντας εκπληκτική σταθερότητα, πράγμα που συνεπάγεται την δυνατότητα αξιοποίησης τους στη μη επεμβατική διάγνωση. Ο Tsujira για πρώτη φορά ανέδειξε την χρησιμότητα των κυκλοφορούντων στο αίμα miRNA στη διάγνωση και παρακολούθηση εξέλιξης του γαστρικού καρκίνου μελετώντας την έκφραση 5 miRNAs (miR-17-5p, miR-21, miR-106a, miR-106b και let-7a) στο πλάσμα ασθενών με γαστρικό καρκίνο. Ευρήματα της μελέτης υπέδειξαν ότι το miRNA let-7a υποεκφράζεται, ενώ τα υπόλοιπα 4 υπερεκφράζονται με το λόγο μάλιστα miR-106a/let-7a να διαχωρίζει ασθενείς από υγιής με AUC (Area under the curve) 0.879 [91]. Ακόμη, ο Liu έχει προσδιορίσει στον ορό μια υπογραφή 5 miRNA (miR-1, miR-20a, miR-27a, miR-34 και miR-423-5p) που σχετίζονται με το στάδιο του καρκίνου επιτυγχάνοντας AUC 0.8, τιμή πολύ υψηλότερη σε σχέση με CEA (AUC: 0.503) και CA19-9 (AUC: 0.6) [92]. Επιπλέον, το 2021 συγκροτήθηκε μια υπογραφή από 12 κυκλοφορούντα miRNAs από το So για τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου με την εξέταση ορού. Η υπογραφή των miRNAs ταυτοποίησε επιτυχώς 100 από τους 115 ασθενείς που είχαν διαγνωσθεί με γαστρικό καρκίνο με ενδοσκόπιση σημειώνοντας ευαισθησία 87%. Με τις τωρινές πρακτικές 1 άτομο διαγιγνώσκεται με γαστρικό καρκίνο ανά 40 βιοψίες. Εκτιμήθηκε, όμως, ότι αν ενταχθεί η υπογραφή στη κλινική πρακτική ως εξέταση μαζικού προσυμπτωματικού ελέγχου, 1 ασθενής θα εντοπίζεται ανά 15 βιοψίες. Επίσης, αποδείχθηκε η εξειδίκευση της συγκεκριμένης υπογραφής στην διάγνωση του γαστρικού καρκίνου έναντι 7 διαδεδομένων τύπων καρκίνου. Ωστόσο, η υπογραφή που αναπτύχθηκε δεν συγκέντρωσε αρκετά υψηλή εξειδίκευση με τους κλασσικούς καρκινικούς βιοδείκτες PG, CEA and CA19-9 να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές [93].

Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής εξετάστηκε μια υπογραφή από 9 όγκο-εκφραζόμενα και 7 όγκο-κατεσταλμένα miRNAs για την εξειδικευμένη ανίχνευση του γαστρικού καρκίνου. Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε δοκιμή σε γαστρικές καρκινικές σειρές στις οποίες δεν ανιχνεύτηκαν τα miRNAs O5, S1 και S7. Ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η υπογραφή διαχωρίζει επιτυχώς τα φυσιολογικά αθανατοποιημένα γαστρικά κύτταρα HFE από καρκινικές γαστρικές σειρές. Τα κύτταρα του πρωτεύοντος όγκου AGS εμφάνισαν την υψηλότερη έκφραση όγκο-εκφραζόμενων, αλλά και όγκο-κατεσταλμένων miRNAs. Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως ένας από τους τελευταίους μηχανισμούς του κυττάρου να διατηρήσει την ισορροπία με σκοπό να εμποδίζει τη περαιτέρω εξέλιξη της νόσου. Σε επόμενα στάδια της νόσου παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των όγκο-κατεσταλμένων miRNAs μειώνονται. Επίσης, παρατηρούμε τη σημαντική επίδραση που έχει η κανονικοποίηση στην ανάλυση των αποτελεσμάτων με δραματικές αλλαγές στις περιπτώσεις των KATOIII και MKN45. Για την διεξαγωγή, λοιπόν, ασφαλών συμπερασμάτων σκόπιμη κρίνεται η επανάληψη του πειράματος με κανονικοποιητή το μικρό πυρηνικό RNA U6 που έχει καθιερωθεί στη μελέτη μη κωδικοποιητικών RNA σε κυτταρικές σειρές.

Σε επόμενη φάση εξετάστηκε η υπογραφή των miRNAs σε βιοψία και αίμα εθελοντή με εντερική μεταπλασία, μια προκαρκινική αλλοίωση που θεωρείται κομβικό σημείο στην εξέλιξη του γαστρικού καρκίνου. Παρότι ιδιαίτερη βαρύτητα έχει δοθεί στη συγκρότηση υπογραφών miRNAs για τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου όπως και στη προκειμένη περίπτωση, έχουν καταγραφεί μελέτες που αποσκοπούν στην ταυτοποίηση miRNAs που έχουν προοπτική να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες προκαρκινικών αλλοιώσεων [94]. Ενδεικτικά, έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα του miRNA-196a στο πλάσμα είναι χαμηλότερα σε υγιή άτομα σε σχέση με άτομα με προκαρκινικές αλλοιώσεις και γαστρικό καρκίνο σε αρχικά στάδια, οι οποίοι εμφανίζουν παρόμοια επίπεδα. Η ευαισθησία και η εξειδίκευση που σημειώθηκε για την ταυτοποίηση ατόμων με εντερική μεταπλασία έναντι των υγιών ήταν 96.15% και 87.50% αντίστοιχα [95]. Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν η μελέτη του Li που αποκάλυψε ότι τα μέλη της τάξης miRNA17- 92 υπερεκφράζονται στον ορό ασθενών με γαστρικό καρκίνο αλλά και άτομα με εντερική μεταπλασία τα οποία εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα. Σε σχέση με τα άλλα μέλη, το miR-20a επιτυγχάνει την υψηλότερη ευαισθησία και εξειδίκευση στο διαχωρισμό ατόμων με εντερική μεταπλασία από υγιείς ή ασθενής, ενώ ο συνδυασμός της έκφρασης των μελών των miR-17-3p και miR-19a-3p επέδειξε την υψηλότερη προγνωστική αξία. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι η μείωση της έκφρασης της τάξης αυτής από τα υψηλά επίπεδα στην εντερική μεταπλασία ίσως σχετίζεται με την εξέλιξη σε καρκίνο [96].

Όσον αφορά τα ευρήματα της προκείμενης εργασίας είναι εντυπωσιακό ότι τα επίπεδα ορισμένων miRNAs που σχεδιάστηκαν για τη διάγνωση του γαστρικού καρκίνου μεταβάλλονται κιόλας από την εντερική μεταπλασία με την υπογραφή των όγκο-κατεσταλμένων miRNAs να εκφράζεται σε πιο υψηλά επίπεδα σε σχέση με τον παρακαρκινικό ιστό. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα του S3 υποδιπλασιάζονται στον ιστό με εντερική μεταπλασία σε σχέση με το παρακαρκινικό ιστό, ενώ τα S2 και S7 εκφράζονται 6 και 8 φορές πιο υψηλά στη προκαρκινική αλλοίωση. Από την υπογραφή των όγκο-εκφραζόμενων miRNAs που η έκφραση των O1, O4 και O7 μειώνεται. Λαμβάνοντας αυτό υπόψη μας ότι κύτταρα με εντερική μεταπλασία έχουν υποστεί αλλοιώσεις αλλά δεν έχουν μετατραπεί σε καρκινικά, τα ευρήματα θα μπορούσαν να ερμηνευτούν ως απόρροια μηχανισμών αντίστασης και διατήρησης της ομοιόστασης. Μάλιστα τα αποτελέσματα των υπογραφών των miRNAs στις κυτταρικές σειρές έδειξαν ότι ακόμη και γαστρικά καρκινικά κύτταρα μπορεί να έχουν μειωμένη έκφραση όγκο-εκφραζόμενων ή υψηλή όγκο-κατεσταλμένων miRNAs. Δεν αποκλείεται, όμως, τα επίπεδα των miRNAs να έχουν επηρεαστεί έμμεσα και από τη φαρμακευτική αγωγή που λαμβάνει ο ασθενής. Δυστυχώς, δεν κατέστη εφικτή η διεξαγωγή συμπερασμάτων για τα επίπεδα των miRNAs που επέδειξε η βιοψία στο πλάσμα λόγω αιμόλυσης στο πλάσμα του ασθενούς. Είναι αξιοσημείωτο, όμως, το εύρημα ότι στον ασθενή με εντερική μεταπλασία και στο υγιές άτομο το O2-O5, S1 και S7 δεν εκκρίνονται στο αίμα. Συνεπώς, το O4 και S7 δεν μπορούν να λειτουργήσουν ως μη επεμβατικοί βιοδείκτες σε μη καρκινικά δείγματα.

Η ανάλυση των υπογραφών σε κλινικά δείγματα απεδείχθη μεγάλη πρόκληση, καθώς πρόκειται για πολύπλοκες αντιδράσεις που αποσκοπούν στη ποσοτικοποίηση πολλών miRNAs από το ίδιο δείγμα. Αυτό σε συνδυασμό με τις περιορισμένες ποσότητες βιοψίας (500 ng RNA) και πλάσματος (750 ng RNA) αύξησε τη δυσκολία. Έχει δειχθεί ότι αύξηση του υποστρώματος RNA είναι ωφέλιμη προτείνοντας τη χρήση 1000 ng RNA. Για τη συγκέντρωση της ποσότητας αυτής απαιτούνται κατά προσέγγιση 500μl πλάσματος και 100μl κυττάρων αίματος. Ιδιαίτερα θετικό είναι το εύρημα ότι είναι δυνατή η ανίχνευση miRNAs ακόμη και σε δείγματα αίματος με κακή ποιότητα RNA επιβεβαιώνοντας τη βιβλιογραφία σχετικά με τη σταθερότητα τους στα βιολογικά υγρά. Όσον αφορά στην σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, προτείνονται τα miR16, miR92a (μόνο σε κύτταρα αίματος) και U6 με το πρώτο να εμφανίζει την υψηλότερη έκφραση, αξιόπιστη καμπύλη τήξης σε κλινικά δείγματα βιοψίας, πλάσματος και κυττάρων αίματος και να αυξάνεται με την αιμόλυση. Ακόμη, διερευνήθηκε με επιτυχία το ενδεχόμενο απόλυτης ποσοτικοποίησης των miRNAs που δείχθηκε ότι η ευαισθησία της μεθόδου να εκτιμάται μεταξύ 1 pmol – 1 fmol, τιμή ικανοποιητική δεδομένου ότι η συγκέντρωση των miRNA στο πλάσμα εκτιμάται στα 5-10 pM [97].

Τελευταίο σκέλος της εργασίας ήταν η πιλοτική δοκιμή Toehold ριβοδιακόπτη για την ανίχνευση miRNAs *in vitro* στα πλαίσια ανάπτυξης πιο οικονομικής και απλής μεθόδου ανίχνευσης τους. Το 2019 είχε προηγηθεί μελέτη για την απόδοση του Toehold διακόπτη στην ανίχνευση miR-155 *in vivo* με την μέγιστη μεταβολή του γονιδίου αναφοράς να είναι διπλάσια από το μάρτυρα. Ακόμη, δείχθηκε ότι ο ριβοδιακόπτης ανταποκρίνεται σε αυξανόμενες ποσότητες της αλληλουχίας σηματοδότη, ενώ παρουσία αναστολέα δεν αυξάνεται η έκφραση του γονιδίου αναφοράς [98]. Στη προκειμένη διατριβή, ο ριβοδιακόπτης παράγει σήμα 7 φορές υψηλότερο σε σχέση με το μάρτυρα έπειτα από επώαση με 0,5 fmol σηματοδότη διαλυμένο σε αιμολυμμένο πλάσμα. Η ποσότητα αυτή αντιστοιχεί σε 0,5 pmol/ml πλάσματος με τη μέθοδο να είναι αρκετά ευαίσθητη. Παράλληλα αποδείχθηκε ότι ο ριβοδιακόπτης δεν ενεργοποιείται μη εξειδικευμένα από RNA που συναντώνται σε πλάσμα που έχει υποστεί αιμόλυση. Ωστόσο, το σήμα που παράγει ο ριβοδιακόπτης δεν ανταποκρίνεται στη αύξηση της ποσότητας του σηματοδότη. Συγκρίνοντας την αναλογία σηματοδότη:ριβοδιακόπτη της μελέτης μας και της αντίστοιχης δημοσίευσης για το Zika [78], διαπιστώθηκε ότι η αναλογία αυτή ήταν 10 φορές χαμηλότερη στη δημοσίευση, πράγμα που υπονοεί ότι ίσως στη προκειμένη δοκιμή η αντίδραση είναι κορεσμένη. Επιπλέον, εντύπωση προκαλεί η περαιτέρω αύξηση του σήματος παρουσία μείγματος αναστολέα-σηματοδότη που ενδεχομένως οφείλεται στη παράληψη του βήματος επώασης αναστολέα-σηματοδότη για να εξασφαλιστεί υβριδισμός τους. Σε κάθε περίπτωση η ενσωμάτωση μιας επιπλέον συνθήκης κατά την οποία ο ριβοδιακόπτης επωάζεται μόνο με τον ανταγωνιστή θα ήταν ωφέλιμη.

Συνοψίζοντας, μελλοντικά πρόκειται να επαναληφθεί η ανάλυση των υπογραφών miRNAs σε καρκινικές γαστρικές σειρές με κανονικοποιητή το μικρό πυρηνικό RNA U6. Είναι μείζονος σημασίας η εξέταση των υπογραφών σε πολλά κλινικά δείγματα ασθενών σε διάφορα στάδια καρκίνου αλλά και υγιών ατόμων. Εξίσου σημαντικό είναι να εξεταστεί και η έκφραση των υποψήφιων miRNA κανονικοποιητών στα δείγματα ασθενών και υγιών ατόμων για να εξακριβωθεί η σταθερότητα των επιπέδων τους. Η ανάγκη αυτή εντείνεται δεδομένου ότι η σύγκριση των επιπέδων του ασθενούς δεν μπορεί να πραγματοποιείται σε σχέση μόνο με ένα υγιές άτομο. Επιπλέον, πρόκειται να κατασκευαστούν πρότυπες καμπύλες για τα miRNAs που εξετάζονται ώστε να καταστεί εφικτή η απόλυτη ποσοτικοποίηση τους. Τέλος, η αξιοποίηση του Toehold ριβοδιακόπτη στην ανίχνευση των miRNAs φαίνεται υποσχόμενη ωστόσο χρήζει περαιτέρω πειραμάτων για την βελτιστοποίηση της.

Βιβλιογραφία

1. Higuera, A. and J.D. Ramirez, *Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update.* Acta Trop, 2019. **190**: p. 99-111.
2. Go, Y.Y., U.B. Balasuriya, and C.K. Lee, *Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses.* Clin Exp Vaccine Res, 2014. **3**(1): p. 58-77.
3. Villordo, S.M., et al., *RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation.* Trends Microbiol, 2016. **24**(4): p. 270-283.
4. Harapan, H., et al., *Dengue: A Minireview.* Viruses, 2020. **12**(8).
5. Chong, H.Y., et al., *Flavivirus infection-A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis.* Virus Res, 2019. **274**: p. 197770.
6. Collins, M.H. and S.W. Metz, *Progress and Works in Progress: Update on Flavivirus Vaccine Development.* Clin Ther, 2017. **39**(8): p. 1519-1536.
7. McMullen, A.R., et al., *Molecular evolution of lineage 2 West Nile virus.* J Gen Virol, 2013. **94**(Pt 2): p. 318-325.
8. Chancey, C., et al., *The global ecology and epidemiology of West Nile virus.* Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 376230.
9. David, S. and A.M. Abraham, *Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen.* Infect Dis (Lond), 2016. **48**(8): p. 571-86.
10. Hernandez-Triana, L.M., et al., *Emergence of west nile virus lineage 2 in europe: a review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease.* Front Public Health, 2014. **2**: p. 271.
11. Camp, J.V. and N. Nowotny, *The knowns and unknowns of West Nile virus in Europe: what did we learn from the 2018 outbreak?* Expert Rev Anti Infect Ther, 2020. **18**(2): p. 145-154.
12. Popescu, C.P., S.A. Florescu, and S.M. Ruta, *West Nile virus in Central Europe - Pandora's box is wide open!* Travel Med Infect Dis, 2020. **37**: p. 101864.
13. Young, J.J., et al., *Epidemiology of human West Nile virus infections in the European Union and European Union enlargement countries, 2010 to 2018.* Euro Surveill, 2021. **26**(19).
14. Blitvich, B.J., *Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus.* Anim Health Res Rev, 2008. **9**(1): p. 71-86.
15. Kramer, L.D., L.M. Styer, and G.D. Ebel, *A global perspective on the epidemiology of West Nile virus.* Annu Rev Entomol, 2008. **53**: p. 61-81.
16. Saiz, J.C., et al., *Pathogenicity and virulence of West Nile virus revisited eight decades after its first isolation.* Virulence, 2021. **12**(1): p. 1145-1173.
17. Sejvar, J.J., *West Nile Virus Infection.* Microbiol Spectr, 2016. **4**(3).
18. Donadieu, E., et al., *Differential virulence and pathogenesis of West Nile viruses.* Viruses, 2013. **5**(11): p. 2856-80.
19. Sambri, V., et al., *Diagnosis of west nile virus human infections: overview and proposal of diagnostic protocols considering the results of external quality assessment studies.* Viruses, 2013. **5**(10): p. 2329-48.
20. Gyure, K.A., *West Nile virus infections.* J Neuropathol Exp Neurol, 2009. **68**(10): p. 1053-60.
21. Barzon, L., et al., *Excretion of West Nile virus in urine during acute infection.* J Infect Dis, 2013. **208**(7): p. 1086-92.

22. Lustig, Y., et al., *Superiority of West Nile Virus RNA Detection in Whole Blood for Diagnosis of Acute Infection.* J Clin Microbiol, 2016. **54**(9): p. 2294-7.
23. Duggal, N.K., et al., *On the Fly: Interactions Between Birds, Mosquitoes, and Environment That Have Molded West Nile Virus Genomic Structure Over Two Decades.* J Med Entomol, 2019. **56**(6): p. 1467-1474.
24. Fiacre, L., et al., *Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(23).
25. Lim, S.M., et al., *Susceptibility of Carrion Crows to Experimental Infection with Lineage 1 and 2 West Nile Viruses.* Emerg Infect Dis, 2015. **21**(8): p. 1357-65.
26. Docherty, D.E., et al., *Corvidae feather pulp and West Nile virus detection.* Emerg Infect Dis, 2004. **10**(5): p. 907-9.
27. Hirota, J., S. Shimizu, and T. Shibahara, *Application of West Nile virus diagnostic techniques.* Expert Rev Anti Infect Ther, 2013. **11**(8): p. 793-803.
28. Barzon, L., et al., *Latest developments and challenges in the diagnosis of human West Nile virus infection.* Expert Rev Anti Infect Ther, 2015. **13**(3): p. 327-42.
29. De Filette, M., et al., *Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination.* Vet Res, 2012. **43**: p. 16.
30. Lustig, Y., et al., *Surveillance and Diagnosis of West Nile Virus in the Face of Flavivirus Cross-Reactivity.* Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2421.
31. Kim, B. and S.J. Cho, *Endoscopic Screening and Surveillance for Gastric Cancer.* Gastrointest Endosc Clin N Am, 2021. **31**(3): p. 489-501.
32. Lyons, K., et al., *Gastric cancer: epidemiology, biology, and prevention: a mini review.* Eur J Cancer Prev, 2019. **28**(5): p. 397-412.
33. Luo, M. and L. Li, *Clinical utility of miniprobe endoscopic ultrasonography for prediction of invasion depth of early gastric cancer: A meta-analysis of diagnostic test from PRISMA guideline.* Medicine (Baltimore), 2019. **98**(6): p. e14430.
34. Lordick, F., et al., *Unmet needs and challenges in gastric cancer: the way forward.* Cancer Treat Rev, 2014. **40**(6): p. 692-700.
35. Correa, P., *Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention.* Cancer Res, 1992. **52**(24): p. 6735-40.
36. Tan, P. and K.G. Yeoh, *Genetics and Molecular Pathogenesis of Gastric Adenocarcinoma.* Gastroenterology, 2015. **149**(5): p. 1153-1162 e3.
37. Washington, K., *7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach.* Ann Surg Oncol, 2010. **17**(12): p. 3077-9.
38. Chen, Z.D., et al., *Recent Advances in the Diagnosis, Staging, Treatment, and Prognosis of Advanced Gastric Cancer: A Literature Review.* Front Med (Lausanne), 2021. **8**: p. 744839.
39. Gullo, I., et al., *Precancerous lesions of the stomach, gastric cancer and hereditary gastric cancer syndromes.* Pathologica, 2020. **112**(3): p. 166-185.
40. Casamayor, M., et al., *Targeted literature review of the global burden of gastric cancer.* Ecancermedicalscience, 2018. **12**: p. 883.
41. Xie, Y., et al., *Gastrointestinal cancers in China, the USA, and Europe.* Gastroenterol Rep (Oxf), 2021. **9**(2): p. 91-104.
42. Wan, Q.S. and K.H. Zhang, *Noninvasive detection of gastric cancer.* Tumour Biol, 2016. **37**(9): p. 11633-11643.
43. Compare, D., A. Rocco, and G. Nardone, *Screening for and surveillance of gastric cancer.* World J Gastroenterol, 2014. **20**(38): p. 13681-91.

44. Sugano, K., *Screening of gastric cancer in Asia.* Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2015. **29**(6): p. 895-905.
45. Kim, G.H., et al., *Screening and surveillance for gastric cancer in the United States: Is it needed?* Gastrointest Endosc, 2016. **84**(1): p. 18-28.
46. Smyth, E.C., et al., *Gastric cancer.* Lancet, 2020. **396**(10251): p. 635-648.
47. Young, E., H. Philpott, and R. Singh, *Endoscopic diagnosis and treatment of gastric dysplasia and early cancer: Current evidence and what the future may hold.* World J Gastroenterol, 2021. **27**(31): p. 5126-5151.
48. Hamashima, C., *Benefits and harms of endoscopic screening for gastric cancer.* World J Gastroenterol, 2016. **22**(28): p. 6385-92.
49. Kalnina, Z., et al., *Emerging blood-based biomarkers for detection of gastric cancer.* World J Gastroenterol, 2015. **21**(41): p. 11636-53.
50. Wang, H., et al., *Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage.* Clin Epigenetics, 2018. **10**: p. 59.
51. Shimada, H., et al., *Clinical significance of serum tumor markers for gastric cancer: a systematic review of literature by the Task Force of the Japanese Gastric Cancer Association.* Gastric Cancer, 2014. **17**(1): p. 26-33.
52. Li, P.F., et al., *Non-coding RNAs and gastric cancer.* World J Gastroenterol, 2014. **20**(18): p. 5411-9.
53. Bure, I.V. and M.V. Nemtsova, *Methylation and Noncoding RNAs in Gastric Cancer: Everything Is Connected.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(11).
54. Di Leva, G., M. Garofalo, and C.M. Croce, *MicroRNAs in cancer.* Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 287-314.
55. Allegra, A., et al., *Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review).* Int J Oncol, 2012. **41**(6): p. 1897-912.
56. Kozomara, A., M. Birgaoanu, and S. Griffiths-Jones, *miRBase: from microRNA sequences to function.* Nucleic Acids Res, 2019. **47**(D1): p. D155-D162.
57. Sohel, M.M.H., *Circulating microRNAs as biomarkers in cancer diagnosis.* Life Sci, 2020. **248**: p. 117473.
58. Hayes, J., P.P. Peruzzi, and S. Lawler, *MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy.* Trends Mol Med, 2014. **20**(8): p. 460-9.
59. Makarova, J.A., et al., *Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role.* Prog Histochem Cytochem, 2016. **51**(3-4): p. 33-49.
60. Weber, J.A., et al., *The microRNA spectrum in 12 body fluids.* Clin Chem, 2010. **56**(11): p. 1733-41.
61. Cheng, G., *Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy.* Adv Drug Deliv Rev, 2015. **81**: p. 75-93.
62. Larrea, E., et al., *New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies.* Int J Mol Sci, 2016. **17**(5).
63. Mills, J., et al., *Cancer-Derived Extracellular Vesicle-Associated MicroRNAs in Intercellular Communication: One Cell's Trash Is Another Cell's Treasure.* Int J Mol Sci, 2019. **20**(24).
64. Pan, H.W., S.C. Li, and K.W. Tsai, *MicroRNA dysregulation in gastric cancer.* Curr Pharm Des, 2013. **19**(7): p. 1273-84.
65. Lujambio, A. and S.W. Lowe, *The microcosmos of cancer.* Nature, 2012. **482**(7385): p. 347-55.
66. Petrovic, N., S. Ergun, and E.R. Isenovic, *Levels of MicroRNA Heterogeneity in Cancer Biology.* Mol Diagn Ther, 2017. **21**(5): p. 511-523.

67. Azarbarzin, S., et al., *Current perspectives on the dysregulated microRNAs in gastric cancer.* Mol Biol Rep, 2020. **47**(9): p. 7253-7264.
68. Mishra, S., T. Yadav, and V. Rani, *Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics.* Crit Rev Oncol Hematol, 2016. **98**: p. 12-23.
69. Yang, Q., et al., *Dysregulation of non-coding RNAs in gastric cancer.* World J Gastroenterol, 2015. **21**(39): p. 10956-81.
70. Backes, C., E. Meese, and A. Keller, *Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects.* Mol Diagn Ther, 2016. **20**(6): p. 509-518.
71. Liang, H., et al., *The origin, function, and diagnostic potential of extracellular microRNAs in human body fluids.* Wiley Interdiscip Rev RNA, 2014. **5**(2): p. 285-300.
72. Wang, J., et al., *Tumor-associated circulating microRNAs as biomarkers of cancer.* Molecules, 2014. **19**(2): p. 1912-38.
73. Rossetti, M., et al., *Programmable RNA-based systems for sensing and diagnostic applications.* Anal Bioanal Chem, 2019. **411**(19): p. 4293-4302.
74. Venkata Subbaiah, K.C., et al., *Mammalian RNA switches: Molecular rheostats in gene regulation, disease, and medicine.* Comput Struct Biotechnol J, 2019. **17**: p. 1326-1338.
75. Green, A.A., et al., *Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression.* Cell, 2014. **159**(4): p. 925-39.
76. Tabuchi, T. and Y. Yokobayashi, *Cell-free riboswitches.* RSC Chem Biol, 2021. **2**(5): p. 1430-1440.
77. Pardee, K., et al., *Paper-based synthetic gene networks.* Cell, 2014. **159**(4): p. 940-54.
78. Pardee, K., et al., *Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components.* Cell, 2016. **165**(5): p. 1255-1266.
79. Hu, J., et al., *Human miR-1228 as a stable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs in cancer patients.* Int J Cancer, 2014. **135**(5): p. 1187-94.
80. Song, J., et al., *Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients.* Dig Dis Sci, 2012. **57**(4): p. 897-904.
81. Xiang, M., et al., *U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs.* Biochem Biophys Res Commun, 2014. **454**(1): p. 210-4.
82. Kumar, S., et al., *Aspects of Point-of-Care Diagnostics for Personalized Health Wellness.* Int J Nanomedicine, 2021. **16**: p. 383-402.
83. Chen, H., et al., *Point of care testing for infectious diseases.* Clin Chim Acta, 2019. **493**: p. 138-147.
84. Wang, C., et al., *Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices.* Nano Today, 2021. **37**: p. 101092.
85. Chau, T.H.T., et al., *Developments of Riboswitches and Toehold Switches for Molecular Detection-Biosensing and Molecular Diagnostics.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(9).
86. Park, S. and J.W. Lee, *Detection of Coronaviruses Using RNA Toehold Switch Sensors.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(4).
87. Garcia-Ruiz, D., et al., *Detection of dengue, west Nile virus, rickettsiosis and leptospirosis by a new real-time PCR strategy.* Springerplus, 2016. **5**(1): p. 671.
88. Kumar, J.S., D. Saxena, and M. Parida, *Development and comparative evaluation of SYBR Green I-based one-step real-time RT-PCR assay for detection and quantification of West Nile virus in human patients.* Mol Cell Probes, 2014. **28**(5-6): p. 221-7.
89. Pripuzova, N., et al., *Development of real-time PCR array for simultaneous detection of eight human blood-borne viral pathogens.* PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43246.
90. Jiang, T., B. Xing, and J. Rao, *Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression.* Biotechnol Genet Eng Rev, 2008. **25**: p. 41-75.

91. Tsujiura, M., et al., *Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers.* Br J Cancer, 2010. **102**(7): p. 1174-9.
92. Liu, R., et al., *A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis.* Eur J Cancer, 2011. **47**(5): p. 784-91.
93. So, J.B.Y., et al., *Development and validation of a serum microRNA biomarker panel for detecting gastric cancer in a high-risk population.* Gut, 2021. **70**(5): p. 829-837.
94. Jonaitis, P., L. Kupcinskas, and J. Kupcinskas, *Molecular Alterations in Gastric Intestinal Metaplasia.* Int J Mol Sci, 2021. **22**(11).
95. Chen, T.H., et al., *Circulating microRNA-196a is an early gastric cancer biomarker.* Oncotarget, 2018. **9**(12): p. 10317-10323.
96. Li, H., et al., *The miR-17-92 cluster as a potential biomarker for the early diagnosis of gastric cancer: evidence and literature review.* Oncotarget, 2017. **8**(28): p. 45060-45071.
97. Max, K.E.A., et al., *Human plasma and serum extracellular small RNA reference profiles and their clinical utility.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(23): p. E5334-E5343.
98. Wang, S., N.J. Emery, and A.P. Liu, *A Novel Synthetic Toehold Switch for MicroRNA Detection in Mammalian Cells.* ACS Synth Biol, 2019. **8**(5): p. 1079-1088.