



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΣΤΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ

Διερεύνηση του ρόλου των μικρών RNAs ικής προέλευσης

Ειρήνη Παπαβασιλείου

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
Άρτεμις Χατζηγεωργίου

Λαμία, 2022



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ
ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ**

Διερεύνηση του ρόλου των μικρών RNAs ιικής προέλευσης

Ειρήνη Παπαβασιλείου

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Επιβλέπουσα
Άρτεμις Χατζηγεωργίου
Καθηγήτρια**

Λαμία, 2022

Με ατομική μου ευθύνη και γνωρίζοντας τις κυρώσεις ⁽¹⁾, που προβλέπονται από της διατάξεις της παρ. 6 του άρθρου 22 του Ν. 1599/1986, δηλώνω ότι:

1. Δεν παραθέτω κομμάτια βιβλίων ή άρθρων ή εργασιών άλλων αυτολεξεί **χωρίς να τα περικλείω σε εισαγωγικά** και χωρίς να αναφέρω το συγγραφέα, τη χρονολογία, τη σελίδα. Η αυτολεξεί παράθεση χωρίς εισαγωγικά χωρίς αναφορά στην πηγή, είναι λογοκλοπή. Πέραν της αυτολεξεί παράθεσης, λογοκλοπή θεωρείται και η παράφραση εδαφίων από έργα άλλων, συμπεριλαμβανομένων και έργων συμφοιτητών μου, καθώς και η παράθεση στοιχείων που άλλοι συνέλεξαν ή επεξεργάστηκαν, χωρίς αναφορά στην πηγή. Αναφέρω πάντοτε με πληρότητα την πηγή κάτω από τον πίνακα ή σχέδιο, όπως στα παραθέματα.
2. Δέχομαι ότι η αυτολεξεί **παράθεση χωρίς εισαγωγικά**, ακόμα κι αν συνοδεύεται από αναφορά στην πηγή σε κάποιο άλλο σημείο του κειμένου ή στο τέλος του, είναι αντιγραφή. Η αναφορά στην πηγή στο τέλος π.χ. μιας παραγράφου ή μιας σελίδας, δεν δικαιολογεί συρραφή εδαφίων έργου άλλου συγγραφέα, έστω και παραφρασμένων, και παρουσίασή τους ως δική μου εργασία.
3. Δέχομαι ότι υπάρχει επίσης περιορισμός στο μέγεθος και στη συχνότητα των παραθεμάτων που μπορώ να εντάξω στην εργασία μου εντός εισαγωγικών. Κάθε μεγάλο παράθεμα (π.χ. σε πίνακα ή πλαίσιο, κλπ), προϋποθέτει ειδικές ρυθμίσεις, και όταν δημοσιεύεται προϋποθέτει την άδεια του συγγραφέα ή του εκδότη. Το ίδιο και οι πίνακες και τα σχέδια
4. Δέχομαι όλες τις συνέπειες σε περίπτωση λογοκλοπής ή αντιγραφής.

Ημερομηνία:/...../20.....

Ο – Η Δηλ.

(Υπογραφή)

(1) «Όποιος εν γνώσει του δηλώνει ψευδή γεγονότα ή αρνείται ή αποκρύπτει τα αληθινά με έγγραφη υπεύθυνη δήλωση του άρθρου 8 παρ. 4 Ν. 1599/1986 τιμωρείται με φυλάκιση τουλάχιστον τριών μηνών. Εάν ο υπαίτιος αυτών των πράξεων σκόπευε να προσπορίσει στον εαυτόν του ή σε άλλον περιουσιακό όφελος βλάπτοντας τρίτον ή σκόπευε να βλάψει άλλον, τιμωρείται με κάθειρξη μέχρι 10 ετών.

Διερεύνηση του ρόλου των μικρών RNAs υκής προέλευσης

Ειρήνη Παπαβασιλείου

Τριμελής Επιτροπή:

Άρτεμις Χατζηγεωργίου, Καθηγήτρια (επιβλέπουσα)

Παντελής Μπάγκος, Καθηγητής

Γεωργία Μπράλιου, Επίκουρος Καθηγήτρια

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα microRNAs (miRNAs) είναι μικρά μη κωδικοποιά RNAs μεγέθους μεταξύ 18-24 νουκλεοτιδίων. Τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, μέσω τέλειου/ατελούς ζευγαρώματος των βάσεων τους με συμπληρωματικές αλληλουχίες κυρίως της 3' αμετάφραστης περιοχής (UTR) των αγγελιοφόρων RNAs (mRNAs) και άλλων RNAs. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη γονιδιακή αποσιώπηση μέσω της διάσπασης της αλυσίδας του RNA στόχου ή της αποσταθεροποίησης του μεταγράφου μέσω κατάτμησης της πολυ(A) ουράς ή της αναστολής της μετάφρασής του. Μέσω της δράσης τους, τα miRNAs είναι σημαντικοί ρυθμιστές των μεταγραφικών προγραμμάτων διαφορετικών κυττάρων και συνθηκών.

Είναι εντυπωσιακό ότι πέρα από τα miRNAs που φέρουν ζωικοί και φυτικοί οργανισμοί, γονίδια που κωδικοποιούν miRNAs ανευρίσκονται και μία σειρά από ιούς, όπως ο Epstein-Barr (EBV) και άλλοι ερπετοϊοί. Τα miRNAs των ιών επηρεάζουν τόσο τα μετάγραφα των ίδιων των ιών όσο και του ξενιστή τους. Πληθώρα από πειραματικές δοκιμασίες και έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί ώστε να αναδειχθούν οι αλληλεπιδράσεις των ιικών miRNAs με μετάγραφα, ενώ υπολογιστικές βάσεις δεδομένων έχουν αναπτυχθεί για την καταχώριση των αλληλεπιδράσεων αυτών.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήσαμε συγκριτική μελέτη των αλληλεπιδράσεων ιικών miRNAs που βρίσκονται στις βάσεις δεδομένων αναφοράς, VIRmiRNA και DIANA-TarBase v8. Έπειτα, καταγράφοντας πληροφορία από διαθέσιμες μελέτες, καταλήξαμε σε σειρά συγκρίσεων μεταξύ καταστάσεων στις οποίες εκφράζεται διαφορετικό υποσύνολο από miRNAs του EBV. Προχωρήσαμε στην υπολογιστική μελέτη των βιολογικών λειτουργιών που φαίνεται να ρυθμίζουν τα miRNAs του EBV, με χρήση του εργαλείου DIANA-miRPath v4. Η ανάλυση μονοπατιών ανέδειξε πως στις υπό μελέτη συνθήκες τα miRNAs του EBV επιδρούν με διαφορετικό τρόπο στη γονιδιακή ρύθμιση και επηρεάζουν διαφορετικά μοριακά μονοπάτια. Η εργασία αυτή αναδεικνύει ότι σε διαφορετικές συνθήκες τα ιικά miRNAs επιτελούν διαφορετικό ρόλο. Τέλος, υπογραμμίζει πως, σε μια σειρά καταστάσεων, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη η πληροφορία για την έκφραση και τους στόχους των ιικών miRNAs, καθώς προσφέρει μια πληρέστερη εικόνα των υφιστάμενων μοριακών μηχανισμών.

SUMMARY

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs ranging in length between 18 and 24nt. miRNAs post-transcriptionally regulate gene expression, via partial/perfect base pairing with complementary sequences mainly in the 3' untranslated region (UTR) of messenger RNAs (mRNAs) and other RNAs. This interaction results in gene silencing through cleavage of the target RNA chain, destabilization by fragmentation of its poly(A) tail or inhibition of its translation. Through their action, miRNAs are important regulators of the transcriptional programs of different cells and conditions.

Remarkably beyond miRNA genes that are encoded inside animal and plant genomes, miRNA genes are also found in the genomes of several viruses, including Epstein-Barr (EBV) and other herpesviruses. Viral miRNAs affect both viral and host transcripts. A plethora of experimental assays and studies have been carried out to elucidate the interactions of viral miRNAs with transcripts, while computational databases have been developed to record these interactions.

In this thesis, we carried out a comparative study of the interactions of viral miRNAs found in the reference databases, VIRmiRNA and DIANA-TarBase v8. Subsequently, we recorded information on viral miRNA expression from available literature and designed a series of pair-wise comparisons between conditions in which different subsets of EBV miRNAs are expressed. We proceeded to the computational study of the biological functions that appear to regulate EBV miRNAs, using the DIANA-miRPath v4 tool. The pathway analyses showed that under distinct conditions EBV miRNAs act differently upon gene regulation and affect different molecular pathways. Our work demonstrates that viral miRNAs exhibit expression plasticity, underlining the importance of including information on the expression and targets of viral miRNAs, in relevant cases, to obtain a more complete picture of the underlying molecular mechanisms.

Πίνακας Περιεχομένων

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 microRNAs	10
1.1.1 Βιογένεση των miRNAs	10
1.1.2 Λειτουργία των miRNAs	12
1.1.3 Αναγνώριση στόχου από τα miRNAs	12
1.2 Ιοί.....	13
1.2.1 DNA ιοί	13
1.2.2 RNA ιοί	15
1.2.3 Ιικός κύκλος.....	16
1.2.3.1 Λανθάνουσα φάση	17
1.3 Ιικά miRNAs.....	18
1.4 Βάσεις δεδομένων ικών miRNAs και στόχων τους.....	20
1.4.1 VIRmiRNA	20
1.4.2 DIANA-TarBase.....	21
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
2.1 Σύγκριση βάσεων δεδομένων με στόχους ικών miRNAs	22
2.2 Λειτουργικές αναλύσεις στόχων των miRNAs του ιού EBV.....	22
2.2.1 Αναζήτηση για εκφραζόμενα υποσύνολα των ικών miRNAs στη βιβλιογραφία.....	22
2.2.2 Ανάλυση εμπλουτισμού μονοπατιών από στόχους ικών miRNAs	23
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	24
3.1 Σύγκριση βάσεων δεδομένων με στόχους ικών miRNAs	24
3.2 Λειτουργικές αναλύσεις	26
3.2.1 Σύγκριση 1: ασθενείς PA με έναντι χωρίς θεραπεία μεθοτρεξάτης	28
3.2.2 Σύγκριση 2: κυτταρική σειρά ρινοφαρυγγικού καρκίνου (C666) έναντι ξενομοσχευμάτων ρινοφαρυγγικού καρκίνου (NPC xenografts)	31
3.2.3 Σύγκριση 3: κυτταρική σειρά λεμφώματος Burkitt (Mutu III) έναντι κυτταρικής σειράς ρινοφαρυγγικού καρκίνου (C666-1)	33
3.2.4 Σύγκριση 4: κυτταρική σειρά ρινοφαρυγγικού καρκίνου (C666-1) έναντι μη καρκινικής ρινοφαρυγγικής κυτταρικής σειράς (NP460-TERT) .	35
3.2.5 Σύγκριση 5: Βιοψίες γαστρικού καρκίνου έναντι βιοψιών ρινοφαρυγγικού καρκίνου	37
3.2.6 Σύγκριση 6: Λυτικός κύκλος έναντι λανθάνουσας φάσης II.....	40
3.2.7 Σύγκριση 7: Λυτικός κύκλος έναντι λανθάνουσας φάσης III	41
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	45
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	46

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 microRNAs

Τα μικρά RNAs (microRNAs, miRNAs) είναι μονόκλωνα μη κωδικοποιά μόρια RNA που αποτελούνται συνήθως από περίπου 22 νουκλεοτίδια και εμπλέκονται στην αποσιώπηση του RNA και στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Τα miRNAs λειτουργούν μέσω πρόσδεσης σε συμπληρωματικές αλληλουχίες (Στοιχεία Αναγνώρισης από miRNAs, miRNA Recognition Elements, MREs) μέσα στην αλληλουχία μεταγράφων (πρωτίστως αγγελιαφόρου RNA, mRNAs). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί περισσότερα από 10.000 miRNAs σε 96 είδη ενώ συγκεκριμένα στον άνθρωπο έχουν βρεθεί περισσότερα από 700 miRNAs. Η ταξινόμησή τους σε οικογένειες γίνεται σύμφωνα με την ομολογία τους.

1.1.1 Βιογένεση των miRNAs

Τα γονίδια των miRNAs διαφέρουν ανάλογα με τη θέση τους στο γονιδίωμα. Στον άνθρωπο έχουν εντοπιστεί σε όλα τα χρωμοσώματα εκτός του χρωμοσώματος Y. Η πλειονότητα των ανθρωπίνων miRNAs βρίσκεται στα ιντρόνια άλλων γονιδίων των οποίων τα RNA μετάγραφα είτε κωδικοποιούν (mRNAs) είτε δεν κωδικοποιούν (long non-coding RNAs, lncRNAs) πρωτεΐνες. Τα υπόλοιπα miRNAs βρίσκονται είτε στα εξόνια των RNA γονιδίων, εμφανίζοντας όμως αντινοσηματικό (αντίθετο) προσανατολισμό σε σχέση με το εκάστοτε γονίδιο, ή στην 3' αμετάφραστη περιοχή άλλων γονιδίων ή ομαδοποιημένα σε ειδικά γονίδια miRNA, ανεξάρτητα από άλλα μεταγραφόμενα στοιχεία. Η μεταγραφή των γονιδίων των miRNAs μπορεί να γίνει από την RNA πολυμεράση II ή την RNA πολυμεράση III, καθώς η κάθε μία αναγνωρίζει ειδικούς υποκινητές και περιοχές λήξης και υφίσταται ειδική ρύθμιση.

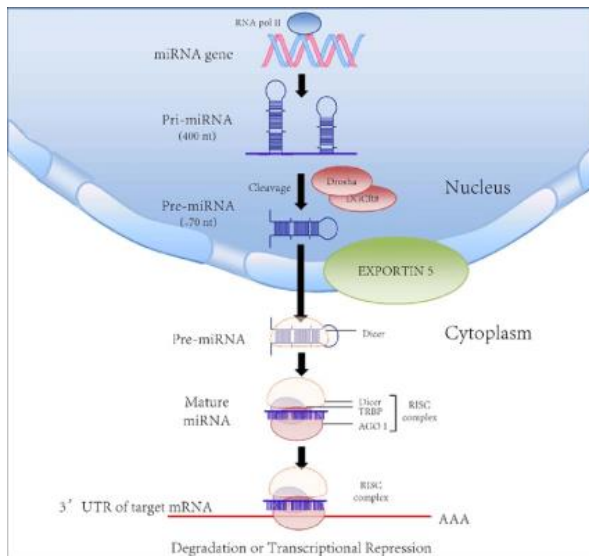
Συνολικά, η βιογένεση (**Εικόνα 1**) είναι μία διαδικασία που περιλαμβάνει (**α**) τη μεταγραφή των πρωτογενών miRNAs (pri-miRNAs) από τα γονίδια που κωδικοποιούν για miRNAs, (**β**) την παραγωγή των μερικώς επεξεργασμένων πρόδρομων (pre-miRNAs) στον πυρήνα και (**γ**) τέλος την παραγωγή των ώριμων miRNAs στο κυτταρόπλασμα.

Αρχικά, τα miRNAs μεταγράφονται ως μέρος ενός πολύ μεγαλύτερου πρωταρχικού μετάγραφου, το οποίο είναι προϊόν της RNA πολυμεράσης II/III και το οποίο φέρει 5' -καλύπτρα και 3' -πολυ(A)ουρά. Μέσα στον πυρήνα, το pri-miRNA επεξεργάζεται από το σύμπλοκο επεξεργασίας των πρωταρχικών μεταγράφων των miRNAs (microprocessormachinery) με τη βοήθεια της πρωτεΐνης Drosha, ενδονουκλεάσης που ανήκει στην οικογένεια των RNA πολυμερασών III. Η Drosha αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη DGCR8 που είναι συμπαραγόντάς της. Το σύμπλοκο αυτών των δύο πρωτεϊνών ευθύνεται για τη δημιουργία ενός μορίου μήκους 60-100 νουκλεοτιδίων, του pre-miRNA, το οποίο έχει σχήμα φουρκέτας.

Στη συνέχεια, η Drosha κόβει και τους δύο κλώνους του στελέχους του pri-miRNA και δημιουργεί ένα 5' φωσφορικό άκρο και αφήνει περίπου δύο προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' υδροξυλικό άκρο, στη βάση του στελέχους του pre-miRNA. Ο πρωτεϊνικός συμπαραγόντας DGCR8 είναι αυτός που θα τοποθετήσει σωστά τις καταλυτικές της υπομονάδες επάνω στο pre-miRNA καθώς κόβει πολύ συγκεκριμένα σε απόσταση

περίπου 11 νουκλεοτιδίων από το σημείο ένωσης του δίκλωνου στελέχους με το μονόκλωνο RNA. Από αυτό το πρώτο κόψιμο δημιουργείται το ένα άκρο του ώριμου miRNA. Με την βοήθεια της πρωτεΐνης Exportin-5 (Exp5) και του συμπαράγοντά της RAN-GTP προσδένεται ισχυρά το pre-miRNA και μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Το σύμπλοκο Exp5/RAN-GTP εμφανίζει μεγάλη συγγένεια για τα pre-miRNAs, καθώς η αλληλεπίδρασή τους μπορεί εύκολα να αποδειχτεί *in vitro*. Αφού απομακρυνθούν από τον πυρήνα, τα pre-miRNAs δέχονται επιπλέον επεξεργασία μέσω της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης Dicer. Η Dicer διαθέτει 5 διακριτές περιοχές, 2 περιοχές με δραστικότητα ενδονουκλεάσης III, μία περιοχή πρόσδεσης σε δίκλωνο RNA, μία περιοχή RNA ελικάσης, μία DUF283 περιοχή και μία PAZ περιοχή. Η περιοχή PAZ αποτελείται από περίπου 130 αμινοξέα και προσδένεται σε RNAs, σε 3' μονόκλινα άκρα γειτονικά από δίκλωνες περιοχές. Το pre-miRNA που προκύπτει από τη Drosha διαθέτει 2 προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του και έτσι η Dicer μπορεί και το αναγνωρίζει εύκολα ως υπόστρωμα. Αφού το αναγνωρίσει, το κόβει σε απόσταση 20 νουκλεοτιδίων από το 3' άκρο, παράγοντας ένα δίκλωνο miRNA με 2 προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο και των δύο κλώνων. Αποτέλεσμα της δράσης της Dicer είναι επομένως το σύμπλοκο του δίκλωνου miRNA μήκους περίπου 22 νουκλεοτιδίων (miRNA:miRNA*).

Στο επόμενο στάδιο της βιογένεσης, τα σύμπλοκα miRNA:miRNA* μεταφέρονται στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο επεξεργασίας RISC (RNA-induced silencing complex), ώστε να πραγματοποιηθεί το ξεδίπλωμα του δίκλωνου RNA και τελικά η επιλογή ενός εκ των δύο κλώνων και η ενσωμάτωσή του στο σύμπλοκο RISC. Βασικό συστατικό του συμπλόκου RISC αποτελούν οι πρωτεΐνες Argonaute (AGO). Στον άνθρωπο εντοπίζονται 4 μέλη και συχνά αποκαλούνται PPD πρωτεΐνες, επειδή περιέχουν τις PAZ και PIWI περιοχές. Για τη δημιουργία του συμπλόκου RISC ενσωματώνεται το miRNA:miRNA* σύμπλοκο στις πρωτεΐνες AGO, μία διαδικασία που απαιτεί ενέργεια. Αφού φορτωθεί το miRNA:miRNA* σύμπλοκο στο RISC αρχίζει να ξετυλίγεται, μία διαδικασία που θεωρείται ότι πραγματοποιείται μέσω ενός ενζύμου με δραστικότητα ελικάσης, το οποίο αλληλοεπιδρά και απελευθερώνει το άκρο του κλώνου προς επιλογή. Στη συνέχεια γίνεται η επιλογή της ενεργούς αλυσίδας του δίκλωνου RNA συμπλόκου από το miRISC. Το miRISC στον άνθρωπο αποτελείται από τις πρωτεΐνες AGO, με κυριότερη την Ago2 και από τις ελικάσες Gemin3 και Gemin4. Ο κλώνος επιλέγεται κυρίως με βάση τις θερμοδυναμικές ιδιότητες του συμπλόκου RNA. Συνήθως επιλέγεται ο κλώνος με τη μικρότερη θερμοδυναμική σταθερότητα στο 5' άκρο. Κατά την αρχική ονοματοδοσία των miRNAs, ο κλώνος που συσχετίζεται με τις Ago πρωτεΐνες, ονομαζόταν miRNA κλώνος, ενώ ο άλλος miRNA* κλώνος. Στην πορεία αναδείχθηκαν περιπτώσεις όπου και οι δύο κλώνοι είναι δυνατόν να είναι δραστικοί, οπότε πλέον διακρίνονται σε "5p" (προς το 5' άκρο της φουρκέτας pre-miRNA) και "3p" (προς το 3' άκρο). Ο δραστικός κλώνος κατευθύνει το σύμπλοκο miRISC προς mRNA-στόχους, ενώ ο μη-δραστικός αποικοδομείται.[1]



Εικόνα 1. Συνοπτική απεικόνιση της βιογένεσης των miRNAs. (Εικόνα προσαρμοσμένη από τη μελέτη των [2].

1.1.2 Λειτουργία των miRNAs

Μέσω της πρόσδεσής τους στην 3' αμετάφραστη περιοχή των (μη-) κωδικών μεταγράφων των ευκαρυωτικών κυττάρων, τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση, είτε αναστέλλοντας τη μετάφραση, είτε προάγοντας την αποικοδόμηση των μεταγράφων-στόχων. Μέσω της μετα-μεταγραφικής σίγασης διαφορετικών γονιδίων σε κάθε κυτταρικό τύπο και συνθήκη, τα miRNAs ελέγχουν διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, όπως η αυτό-ανανέωση, η διαφοροποίηση και η διαίρεση των κυττάρων. Έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν, μεταξύ άλλων, τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων, τη μορφογένεση των επιθηλιακών ιστών, την οργανογένεση, τις μεταβολικές διαδικασίες, τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση. Επιπλέον συνεισφέρουν στην καθιέρωση μυϊκών φαινοτύπων και συμμετέχουν στην έμφυτη ανοσοαπόκριση μέσω της στόχευσης ιικών μεταγράφων και της καταστολής της σύνθεσης ιικών πρωτεϊνών. Μοναδικό ρόλο φαίνεται ότι έχουν τα miRNAs και στην ρύθμιση των στελεχιαίων κυττάρων καθώς παρατηρήθηκε ότι σε αυτά τα κύτταρα η έκφρασή τους είναι διαφορετική σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς.[3]

1.1.3 Αναγνώριση στόχου από τα miRNAs

Στο πλαίσιο του συμπλόκου επαγόμενης αποσιώπησης miRNA (miRISC), το ώριμο miRNA καθοδηγεί την Argonaute (AGO) να προσδεθεί σε συγκεκριμένες θέσεις-στόχους (MREs), με βάση τη συμπληρωματικότητα των βάσεων. Η τέλεια συμπληρωματικότητα του miRNA με τα MREs, η οποία είναι κοινή στα φυτά αλλά πιο σπάνια στα ζώα, έχει ως αποτέλεσμα την ενδονουκλεολυτική διάσπαση του RNA-στόχου από την AGO. Η σύζευξη των νουκλεοτιδίων 2-7 του miRNA, περιοχής του που αποκαλείται ακολουθία "seed", με τη θέση-στόχο του έχει γενικά θεωρηθεί το βασικότερο στοιχείο που απαιτείται για την αλληλεπίδραση ενός mRNA με ένα στόχο. Σύμφωνα με δομικές μελέτες, μόνο οι αλληλουχίες εντός της περιοχής seed του miRNA που είναι προσδεμένο στην AGO είναι διαθέσιμες για την αρχική σύζευξη με μια θέση-στόχο. Επιπλέον, μελέτες μεμονωμένων μορίων έχουν καταδείξει τη σημασία της περιοχής seed στη σταθερή δέσμευση της θέσης στόχου. Είναι ενδιαφέρον ότι μόλις το miRISC δεσμεύσει το RNA-στόχο, η AGO μπορεί να υποστεί μια διαμορφωτική

αλλαγή που επιτρέπει την εκτεταμένη σύζευξη της seed sequence και την έκθεση μέρους της 3' περιοχής του miRNA για πρόσθετες αλληλεπιδράσεις με το στόχο.[4]

1.2 Ιοί

Ο ιός είναι ένας μολυσματικός παράγοντας που πολλαπλασιάζεται μόνο μέσα στα ζωντανά κύτταρα ενός οργανισμού. Οι ιοί μολύνουν όλες τις μορφές ζωής, από τα ζώα και τα φυτά μέχρι τους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων και των αρχαίων. Όταν ένα κύτταρο-ξενιστής μολύνεται συχνά παράγει γρήγορα χιλιάδες αντίγραφα του αρχικού ιού. Όταν δε βρίσκονται μέσα σε ένα μολυσμένο κύτταρο ή στη διαδικασία μόλυνσης ενός κυττάρου, οι ιοί υπάρχουν με τη μορφή ανεξάρτητων ιικών σωματιδίων (virions), που αποτελούνται από: (**α**) το γενετικό υλικό, δηλαδή μακρά μόρια DNA ή RNA που κωδικοποιούν τη δομή των πρωτεϊνών με τις οποίες δρα ο ιός, (**β**) ένα πρωτεϊνικό περίβλημα, το ιικό καψίδιο, που περιβάλλει και προστατεύει το γενετικό υλικό, και (**γ**) σε ορισμένες περιπτώσεις ένα εξωτερικό περίβλημα λιπιδικής φύσης. Τα σχήματα αυτών των σωματιδίων του ιού κυμαίνονται από απλές ελικοειδείς και εικοσαεδρικές μορφές έως πιο πολύπλοκες δομές. Τα περισσότερα είδη ιών έχουν ιούς πολύ μικρούς για να γίνουν αντιληπτοί με οπτικό μικροσκόπιο και έχουν το ένα εκατοστό του μεγέθους των περισσότερων βακτηρίων. Οι ιοί αποτελούν ίσως την πιο πολυπληθή βιολογική οντότητα, που είναι γνωστή και ως ιόσφαιρα. Ταξινομούνται ανάλογα με το γενετικό τους υλικό σε 2 ομάδες.

1.2.1 DNA ιοί

Ο DNA ιός είναι ένας ιός που έχει γονιδίωμα από δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) το οποίο αντιγράφεται από μια DNA πολυμεράση. Οι DNA ιοί μπορούν να έχουν δίκλωνο (dsDNA) ή μονόκλωνο (ssDNA) γονιδίωμα. Οι dsDNA ιοί ανήκουν κυρίως σε δύο κατηγορίες, τα *Duplodnaviria* και τα *Varidnaviria*, ενώ οι ssDNA ιοί ανήκουν σχεδόν αποκλειστικά στην οικογένεια *Monodnaviria*, η οποία περιλαμβάνει επίσης και ιούς dsDNA. Επιπλέον, πολλοί DNA ιοί δεν έχουν ταξινομηθεί σε ανώτερες ταξινομικές ομάδες (αταξινόμητοι). Οι ιοί που έχουν γονιδίωμα DNA το οποίο αναπαράγεται μέσω ενός ενδιάμεσου RNA από μια αντίστροφη μεταγραφάση χαρακτηρίζονται ξεχωριστά ως ιοί αντίστροφης μεταγραφής και αποδίδονται στο βασίλειο *Pararnavirae* της οικογένειας *Riboviria*.

1.2.1.1 dsDNA ιοί

Οι dsDNA ιοί χρησιμοποιούν διάφορους μηχανισμούς για την αναπαραγωγή του γονιδιώματός τους. Αυτή που χρησιμοποιείται πιο συχνά είναι η αμφίδρομη αντιγραφή, στην οποία δύο διχάλες αναδιπλασιασμού εγκαθίστανται σε μια θέση έναρξης αναπαραγωγής και κινούνται σε αντίθετες κατευθύνσεις η μία από την άλλη. Επιπλέον μπορεί να εφαρμοστεί ένας μηχανισμός κυλιόμενου κύκλου που παράγει γραμμικούς κλώνους, ενώ προχωρά σε βρόχο γύρω από το κυκλικό γονιδίωμα. Ορισμένοι dsDNA ιοί χρησιμοποιούν μια μέθοδο μετατόπισης κλώνου όπου ένας κλώνος συντίθεται από έναν μητρικό κλώνο και στη συνέχεια συντίθεται ο συμπληρωματικός κλώνος από τον νεοσυντιθέμενο κλώνο, σχηματίζοντας έτσι το dsDNA γονιδίωμα. Τέλος, ορισμένοι dsDNA ιοί αντιγράφονται ως μέρος μιας διαδικασίας που ονομάζεται αντιγραφική

μετάθεση, κατά την οποία ένα ικό γονιδίωμα στο DNA ενός κυττάρου ξενιστή αντιγράφεται σε ένα άλλο μέρος του γονιδιώματος του ξενιστή. Οι dsDNA ιοί μπορούν να υποδιαιρεθούν σε εκείνους που πολλαπλασιάζονται στον πυρήνα, και ως εκ τούτου εξαρτώνται σχετικά από τους μηχανισμούς του κυττάρου ξενιστή για τη μεταγραφή και την αντιγραφή, και σε εκείνους που πολλαπλασιάζονται στο κυτταρόπλασμα, οπότε έχουν αναπτύξει ή αποκτήσει τα δικά τους μέσα εκτέλεσης της μεταγραφής και της αντιγραφής. Οι dsDNA ιοί διαχωρίζονται επίσης συνήθως σε ιούς dsDNA με ουρά, που αναφέρονται σε μέλη του βασιλείου *Duplodnaviria*, συνήθως τους βακτηριοφάγους με ουρά της τάξης *Caudovirales*, και σε ιούς dsDNA χωρίς ουρά ή με ουρά του βασιλείου *Varidnaviria*.

1.2.1.2 ssDNA ιοί

Οι ssDNA ιοί έχουν τον ίδιο τρόπο μεταγραφής με τους dsDNA ιούς. Ωστόσο, επειδή το γονιδίωμα είναι μονόκλωνο, μετατρέπεται πρώτα σε δίκλωνη μορφή από μία DNA πολυμεράση κατά την είσοδο του σε ένα κύτταρο ξενιστή. Στη συνέχεια, το mRNA συντίθεται από τη δίκλωνη μορφή. Η δίκλωνη μορφή των ιών ssDNA μπορεί να παραχθεί είτε απευθείας μετά την είσοδο σε ένα κύτταρο είτε ως συνέπεια της αντιγραφής του ικού γονιδιώματος. Οι ευκαρυωτικοί ssDNA ιοί αντιγράφονται στον πυρήνα. Οι περισσότεροι ssDNA ιοί περιέχουν κυκλικά γονιδιώματα που αναπαράγονται μέσω αντιγραφής κυλιόμενου κύκλου (RCR). Το ssDNA RCR ξεκινά από μια ενδονουκλεάση που συνδέεται και διασπά το θετικό κλώνο, επιτρέποντας σε μια DNA πολυμεράση να χρησιμοποιήσει τον αρνητικό κλώνο ως πρότυπο για αντιγραφή. Η αντιγραφή προχωρά σε έναν βρόχο γύρω από το γονιδίωμα μέσω της επέκτασης του 3'-άκρου του θετικού κλώνου, μετατοπίζοντας τον προηγούμενο θετικό κλώνο, και η ενδονουκλεάση διασπά τον θετικό κλώνο ξανά για να δημιουργήσει ένα αυτόνομο γονιδίωμα που συνδέεται σε έναν κυκλικό βρόχο. Το νέο ssDNA μπορεί να συσκευαστεί σε ισσωμάτια ή να αντιγραφεί από μία DNA πολυμεράση για να σχηματίσει μια δίκλωνη μορφή για μεταγραφή ή συνέχιση του κύκλου αντιγραφής.

1.2.1.3 Parvoviruses

Οι *Parvoviruses* (παρβοϊοί) περιέχουν γραμμικά ssDNA γονιδιώματα που αντιγράφονται μέσω κυλιόμενης αντιγραφής με φουρκέτες (RHR), η οποία είναι παρόμοια με την RCR. Τα γονιδιώματα των παρβοϊών έχουν βρόχους φουρκέτας σε κάθε άκρο του γονιδιώματος που επανειλημμένα ξεδιπλώνονται και αναδιπλώνονται κατά τη διάρκεια της αντιγραφής για να αλλάξουν την κατεύθυνση της σύνθεσης του DNA ώστε να κινηθούν μπρος και πίσω κατά μήκος του γονιδιώματος, παράγοντας πολλά αντίγραφα του γονιδιώματος σε μια συνεχή διαδικασία. Στη συνέχεια, τα μεμονωμένα γονιδιώματα αποκόπτονται από αυτό το μόριο από την ική ενδονουκλεάση. Για τους παρβοϊούς, είτε η νοηματική (sense) είτε η αντινοηματική (antisense) αλυσίδα μπορεί να συσκευάζεται σε καψίδια, που ποικίλλουν από ιό σε ιό.

Σχεδόν όλοι οι ιοί ssDNA έχουν γονιδίωμα θετικής πολικότητας, αλλά υπάρχουν εξαιρέσεις και ιδιαιτερότητες. Η οικογένεια *Anelloviridae* είναι η μόνη οικογένεια ssDNA ιών της οποίας τα μέλη έχουν γονιδιώματα αρνητικής πολικότητας και μάλιστα

κυκλικά. Τέλος, οι *bidensovirus* συσκευάζουν στο ίδιο καψίδιο ταυτόχρονα και την αλυσίδα θετικής, αλλά και την αλυσίδα αρνητικής πολικότητας.

1.2.2 RNA ιοί

Οι RNA ιοί έχουν ως γενετικό υλικό το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA). Μπορούν να έχουν δίκλωνο (dsRNA), μονόκλωνο θετικής (ssRNA+), ή μονόκλωνο αρνητικής πολικότητας (ssRNA-) γονιδίωμα. Υπάρχουν και ιοί που έχουν ως γενετικό υλικό RNA ωστόσο χρησιμοποιούν ενδιάμεσα προϊόντα DNA στον κύκλο ζωής τους: αυτοί ονομάζονται ρετροϊοί, συμπεριλαμβανομένων και των HIV-1 και HIV-2 που προκαλούν το AIDS. Όλοι οι γνωστοί RNA ιοί που κωδικοποιούν μια RNA-κατευθυνόμενη RNA πολυμεράση πιστεύεται ότι σχηματίζουν μια μονοφυλετική ομάδα, γνωστή ως βασιλείο *Riboviria*. Η πλειονότητα αυτών των RNA ιών υπάγεται στο βασιλείο *Orthornavirae* και οι υπόλοιποι έχουν μια τοποθέτηση που δεν έχει ακόμη καθοριστεί.

1.2.2.1 Μονόκλωνοι RNA ιοί

Το ικό RNA θετικής πολικότητας είναι παρόμοιο με το mRNA και συνεπώς μπορεί να μεταφραστεί αμέσως από το κύτταρο ξενιστή. Το ικό RNA αρνητικής πολικότητας είναι συμπληρωματικό του mRNA και συνεπώς πρέπει να μετατραπεί σε νοσηματικό RNA από μια RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση πριν από τη μετάφραση. Το απομονωμένο RNA ενός ιού θετικής πολικότητας μπορεί να προκαλέσει άμεσα λοίμωξη, αν και είναι λιγότερο μολυσματικό από ολόκληρο το σωματίο του ιού. Αντίθετα, το απομονωμένο RNA ενός ιού αρνητικής αίσθησης δεν είναι μολυσματικό από μόνο του, καθώς πρέπει να μεταγραφεί σε RNA θετικής πολικότητας - κάθε ιός μπορεί να μεταγραφεί σε πολλά RNA θετικής πολικότητας. Οι RNA ιοί με αμφίδρομη πολικότητα μοιάζουν με τους ιούς RNA αρνητικής πολικότητας, με τη διαφορά ότι μεταφράζουν γονίδια από την αρνητική και τη θετική τους αλυσίδα.

1.2.2.2 Δίκλωνοι RNA ιοί

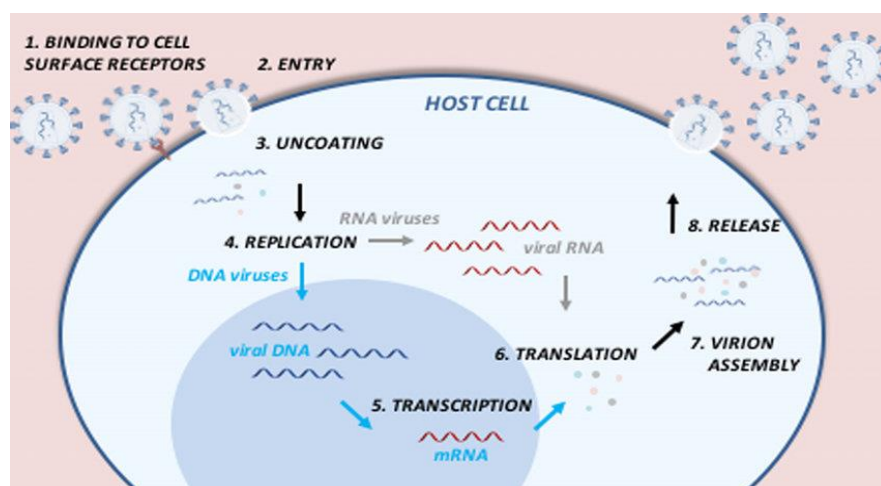
Οι δίκλωνοι (ds)RNA ιοί αντιπροσωπεύουν μια ποικιλόμορφη ομάδα ιών που ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό ως προς το εύρος των ξενιστών (άνθρωποι, ζώα, φυτά, μύκητες και βακτήρια), τον αριθμό των τμημάτων του γονιδιώματος (ένα έως δώδεκα) και την οργάνωση του ικού σωματίου στο χώρο (αριθμός εδρών, στρώματα καψιδίου, αιχμές, πυργίσκοι κ.λπ.). Το δίκλωνο γονιδίωμα χρησιμοποιείται για τη μεταγραφή ενός RNA με θετική αλυσίδα από την ική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp). Το RNA θετικής έλικας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως mRNA το οποίο μπορεί να μεταφραστεί σε ικές πρωτεΐνες από τα ριβοσώματα του κυττάρου ξενιστή. Το RNA της θετικής αλυσίδας μπορεί επίσης να αναπαραχθεί από την RdRp για τη δημιουργία ενός νέου δίκλωνου ικού γονιδιώματος.

Οι RNA ιοί έχουν γενικά πολύ υψηλά ποσοστά μεταλλάξεων σε σύγκριση με τους ιούς DNA, επειδή οι ικές RNA πολυμεράσες δεν έχουν την αξιοπιστία ανάγνωσης που παρατηρείται στις DNA πολυμεράσες. Η γενετική ποικιλομορφία των RNA ιών είναι ένας λόγος για τον οποίο είναι δύσκολο να κατασκευαστούν αποτελεσματικά εμβόλια

εναντίον τους. Οι ρετροϊοί εμφανίζουν επίσης υψηλό ποσοστό μεταλλάξεων, παρόλο που το ενδιάμεσο DNA τους ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή (και συνεπώς υπόκειται σε διορθωτική ανάγνωση του DNA του ξενιστή μόλις ενσωματωθεί), επειδή τα σφάλματα κατά την αντίστροφη μεταγραφή ενσωματώνονται και στις δύο αλυσίδες του DNA πριν από την ενσωμάτωση.

1.2.3 Ιικός κύκλος

Ο ιικός κύκλος μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια - είσοδος, αντιγραφή του γονιδιώματος και έξοδος (**Εικόνα 2**). Το πρώτο στάδιο είναι η είσοδος. Η είσοδος περιλαμβάνει την προσκόλληση, κατά την οποία ένα σωματίδιο του ιού συναντά το κύτταρο ξενιστή και προσκολλάται στην κυτταρική επιφάνεια, τη διείσδυση, κατά την οποία ένα σωματίδιο του ιού διαπερνά στο κυτταρόπλασμα, και την αποκόλληση, κατά την οποία ο ιός αποβάλλει το καψίδιο του. Μετά την απέκδυση, το γυμνό ιικό γονιδίωμα αξιοποιείται για την έκφραση γονιδίων και/ή την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος. Τέλος, όταν οι ιικές πρωτεΐνες και τα ιικά γονιδιώματα έχουν παραχθεί, συναρμολογούνται, σχηματίζοντας ένα σωματίδιο θυγατρικού ιού, και στη συνέχεια απελευθερώνονται εξωκυτταρικά. Η συναρμολόγηση του ιού και η απελευθέρωση από το κύτταρο συνιστούν την έξοδο.



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του ιικού κύκλου [5]

Ωστόσο, ο ιικός κύκλος δεν πραγματοποιείται πάντα πλήρως, επειδή ο εισβολέας ιός συναντά πολλά εμπόδια, όπως η ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και οι παράγοντες του ξενιστή, που περιορίζουν τον ιικό πολλαπλασιασμό. Ανάλογα με το αν παράγεται ή όχι ένας ιός, η μόλυνση από ιό μπορεί να διαχωριστεί σε "παραγωγική μόλυνση" ή "μη παραγωγική μόλυνση". Η παραγωγική μόλυνση αναφέρεται στην επιτυχή εκτέλεση της μόλυνσης από τον ιό που οδηγεί στην παραγωγή ιού απογόνου. Η παραγωγική μόλυνση περιλαμβάνει τη λυτική και την επίμονη μόλυνση. Συγκεκριμένα, η λυτική μόλυνση παράγει έναν ιό μέσω της λύσης του κυττάρου, οπότε η αναπαραγωγή του γονιδιώματος του ιού δεν μπορεί να επιμείνει (π.χ. αδενοϊός και ιός της γρίπης). Αντίθετα, η επίμονη μόλυνση συνεχίζει να παράγει έναν ιό για μεγάλο χρονικό διάστημα, είτε χωρίς κυτταρικό θάνατο είτε με κυτταρικό θάνατο, αλλά αφήνοντας μακροχρόνια κύτταρα-δεξαμενές ιικών σωματιδίων.

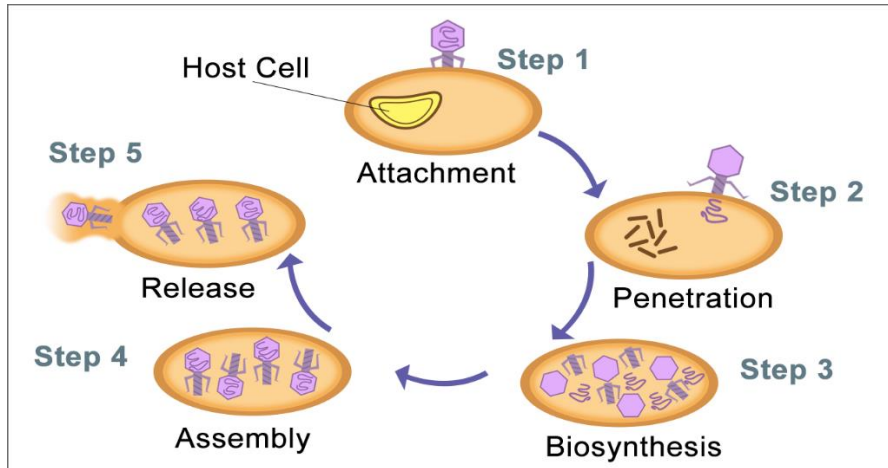
1.2.3.1 Λανθάνουσα φάση

Οι ιοί συχνά αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους. Η μη παραγωγική μόλυνση μπορεί να είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων παραγόντων περιορισμού του κυττάρου ξενιστή, ανεπαρκών πόρων του ξενιστή, ελαττωματικής αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος ή προγραμματισμένων καθυστερήσεων στον κύκλο μόλυνσης. Παρόλο που η λανθάνουσα κατάσταση μπορεί να διακριθεί από την ανεπιτυχή λυτική μόλυνση, οι ίδιοι παράγοντες που περιορίζουν και ματαιώνουν την παραγωγική λοίμωξη μπορούν να συμβάλλουν θετικά και ουσιαστικά στη δημιουργία λανθάνουσας φάσης. Μπορούν επίσης να υπάρχουν διαφορετικοί τύποι λανθάνουσας φάσης, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου-ξενιστή και τον συγκεκριμένο ιό ή στέλεχος. Η λανθάνουσα φάση μπορεί να κυμαίνεται από επιλεκτική έκφραση ιικών γονιδίων με μερική αντιγραφή έως πλήρη ηρεμία χωρίς ανιχνεύσιμη έκφραση ιικών γονιδίων ή αντιγραφή. [6]

1.2.3.2 Λυτικός και λυσογονικός κύκλος

Ο λυτικός κύκλος είναι ο ένας από τους δύο κύκλους της αναπαραγωγής των ιών (αναφερόμενος σε βακτηριακούς ιούς ή βακτηριοφάγους), ενώ ο άλλος είναι ο λυσογονικός κύκλος. Ο λυτικός κύκλος (**Εικόνα 3**) έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του μολυσμένου κυττάρου και της μεμβράνης του. Οι βακτηριοφάγοι που χρησιμοποιούν μόνο το λυτικό κύκλο ονομάζονται ιογόνοι φάγοι (σε αντίθεση με τους εύκρατους φάγους). Στο λυτικό κύκλο, το ιικό DNA υφίσταται ως ξεχωριστό ελεύθερο αιωρούμενο μόριο εντός του βακτηριακού κυττάρου και πολλαπλασιάζεται χωριστά από το βακτηριακό DNA του ξενιστή, ενώ στον λυσογόνο κύκλο, το ιικό DNA βρίσκεται εντός του DNA του ξενιστή. Αυτή είναι η βασική διαφορά μεταξύ του λυτικού και του λυσογόνου (βακτηριο)φαγικού κύκλου. Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις ο ιός/φάγος αναπαράγεται χρησιμοποιώντας τον μηχανισμό του DNA του ξενιστή.

Κατά τη διάρκεια των σταδίων της μεταγραφής και της βιοσύνθεσης, ο ιός καταλαμβάνει τους μηχανισμούς αντιγραφής και μετάφρασης του κυττάρου, χρησιμοποιώντας τους για τη δημιουργία περισσότερων ιών. Το νουκλεϊκό οξύ του ιού χρησιμοποιεί τους μεταβολικούς μηχανισμούς του κυττάρου-ξενιστή για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ιικών συστατικών.



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση του λυτικού κύκλου μόλυνσης και διασποράς των ιών. (εικόνα προσαρμοσμένη από τη μελέτη των [5]).

1.3 Ιικά miRNAs

Συγκεκριμένοι ιοί έχει αναδειχθεί ότι έχουν την ικανότητα να εκφράζουν λειτουργικά miRNAs. Τα miRNAs αποτελούν ιδιαίτερα χρήσιμα εργαλεία ώστε ένας ιός να απορρυθμίσει τη γονιδιακή έκφραση προς όφελός του. Σε αυτό συμβάλλει το γεγονός ότι, σε αντίθεση με τις ιικές πρωτεΐνες, τα miRNAs δεν είναι ανοσογόνα, απαιτούν λιγότερη ικανότητα κωδικοποίησης και έτσι εξελίσσονται πιο γρήγορα για να στοχεύσουν τόσο ιικά όσο και κυτταρικά μετάγραφα.

Το κύτταρο ξενιστής διαθέτει ένα καλά συντηρημένο μηχανισμό γονιδιακής ρύθμισης τον οποίο εκμεταλλεύονται τα ιικά miRNAs δημιουργώντας έτσι ένα κυτταρικό περιβάλλον που ευνοεί τον πολλαπλασιασμό του ιού. Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι αρκετοί DNA ιοί παράγουν τα δικά τους miRNAs καθώς διαθέτουν πολλά χαρακτηριστικά που μπορεί να οδήγησαν αυτούς τους συγκεκριμένους πυρηνικούς ιούς DNA να εξελίξουν ιικά miRNAs. Ένα από αυτά είναι ότι αυτοί οι ιοί έχουν πρόσβαση στους πυρηνικούς παράγοντες επεξεργασίας Drosha και DGCR8 pri-miRNA. Επιπλέον, αυτοί οι ιοί dsDNA εμφανίζουν αμφίδρομη μεταγραφή και επομένως η ειδική ρύθμιση της αλληλουχίας των ιικών μεταγραφών επιτυγχάνεται εύκολα με την έκφραση miRNAs από τον αντίθετο κλώνο.

Στον **Πίνακα 1** αναφέρονται ιοί που έχει βρεθεί ότι παράγουν τα δικά τους miRNAs, ο αριθμός των miRNAs που παράγει ο καθένας από αυτούς καθώς και το είδος του γονιδιώματος που έχουν.

Πίνακας 1 Ιικά miRNAs όπως προέκυψαν από την VIRmiRNA.

Οικογένεια	Ιός (ονομασία)	Τύπος	Καταγεγραμμένα miRNAs
α-herpesviruses	Herpes Simplex Virus 1	dsDNA	48
	Herpes Simplex Virus 2	dsDNA	24
	Mareks disease virus type 1	dsDNA	35
	Mareks disease virus type 2	dsDNA	40
	Herpesvirus of turkeys	dsDNA	28
	Bovine herpesvirus 1	dsDNA	12

	Bovine herpesvirus 5	dsDNA	5
	Herpes B virus	dsDNA	74
	Pseudorabies virus	dsDNA	287
	Infectious laryngotracheitis virus	dsDNA	10
β-herpesviruses	Human cytomegalovirus	dsDNA	28
	Mouse cytomegalovirus	dsDNA	28
	Rat Cytomegalovirus	dsDNA	60
	Rhesus cytomegalovirus	dsDNA	17
	Human herpesvirus 6B	dsDNA	8
γ-herpesviruses	Epstein Barr virus	dsDNA	52
	Rhesus lymphocryptovirus	dsDNA	111
	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	dsDNA	30
	Rhesus monkey rhadinovirus	dsDNA	97
	Herpesvirus saimiri strain A11	dsDNA	6
	Mouse gamma herpesvirus 68	dsDNA	29
	Bovine herpesvirus 2	dsDNA	35
Polyomaviruses	Simian virus 40	dsDNA	2
	JC polyomavirus	dsDNA	2
	BK polyomavirus	dsDNA	2
	Murine polyomavirus	dsDNA	2
	Merkel cell polyomavirus	dsDNA	2
	SA12	dsDNA	1
Circoviridae	Torque teno virus	ssDNA	4
Ascoviruses	Heliothis virescens ascovirus	dsDNA	1
Baculoviridae	Bombyx mori nucleopolyhedrosis virus	dsDNA	5
Iridoviridae	Singapore Grouper Iridovirus	dsDNA	16
Alphaherpesvirinae	Duck enteritis virus	dsDNA	33
Papillomaviridae	Human papillomavirus	dsDNA	9
Nimaviridae	White spot syndrome virus	dsDNA	40
Unclassified	Bandicoot papillomatosis carcinomatosis virus type 1	dsDNA	1
	Bandicoot papillomatosis carcinomatosis virus type 2	dsDNA	1
Retroviridae	Bovine leukemia virus	ssRNA(+)	15
	Bovine foamy virus	ssRNA(+)	20
Lentivirus	Human immunodeficiency virus 1	ssRNA(+)	4
Filoviridae	Ebola virus	ssRNA	10
Flaviviridae	West Nile virus	ssRNA(+)	1
	Hepatitis C virus	ssRNA(+)	1
Alphavirus	Semliki Forest virus	ssRNA(+)	1
Potyviridae	Turnip mosaic virus	ssRNA(+)	82

Τα υκά miRNAs εμπλέκονται στο κυτταρικό επαναπρογραμματισμό με στόχο την ρύθμιση του διακόπτη μεταξύ λανθάνουσας και λυτικής φάσης, την υποστήριξη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ευνοώντας την κυτταρική επιβίωση, τον

πολλαπλασιασμό ή/και τη διαφοροποίηση και τέλος την διαμόρφωση των ανοσολογικών αποκρίσεων. Αξίζει ακόμα να σημειωθεί ότι η παρουσία μεταλλάξεων στην ακολουθία seed των miRNAs μπορεί να μεταβάλλει το ρεπερτόριο στόχευσής τους, ενώ αν συμβούν μεταλλάξεις εντός του pre-miRNA μπορεί να επηρεαστεί η δέσμευση του λειτουργικού κλώνου από το σύμπλοκο RISC.

1.4 Βάσεις δεδομένων ικών miRNAs και στόχων τους

Τα ικά microRNAs (miRNAs) ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση των γονιδίων του ιού ή/και του ξενιστή προς όφελος του ιού. Ως εκ τούτου, τα miRNAs διαδραματίζουν βασικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή και ιού και στην παθογένεια των ικών ασθενειών. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητη η καταγραφή των αλληλεπιδράσεων των ικών miRNAs με μετάγραφα (ιών και ξενιστή) ώστε να καταλάβουμε καλύτερα τη δράση τους, τους μηχανισμούς με τους οποίους προκαλούν παθολογικές αποκρίσεις, τη ρύθμιση και απορρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης, και να σχεδιάσουμε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Για το λόγο αυτό μια σειρά ΒΔ είναι διαθέσιμες και μέσα από διάφορες δυνατότητες που διαθέτουν, μας βοηθούν να κατανοήσουμε και να αξιοποιήσουμε έναν μεγάλο όγκο πληροφορίας

1.4.1 VIRmiRNA

Η βάση δεδομένων VIRmiRNA[7] είναι η πρώτη εξιδεικευμένη πηγή για πειραματικά επιβεβαιωμένα ικά miRNAs και τους στόχους τους. Είναι οργανωμένη σε τρεις κατηγορίες δηλαδή VIRmiRNA, VIRmiRtar και AVIRmir για να παρέχει πειραματικά επικυρωμένες πληροφορίες για τα ικά miRNA, τους στόχους τους και τα αντι-ικα miRNA αντίστοιχα. Η VIRmiRNA περιέχει αποτελέσματα και από το εργαλείο αναζήτησης BLAST γεγονός που μας επιτρέπει να γνωρίζουμε εάν αυτή η αλληλουχία miRNA έχει αναφερθεί ξανά σε βιβλιογραφία ή όχι. Στις επιμέρους βάσεις δεδομένων VIRmiRtar και AVIRmir, σημαντικές πληροφορίες, όπως το όνομα του γονιδίου-στόχου, η περιοχή δέσμευσης του miRNA, δηλαδή η αμετάφραστη περιοχή ή οι κωδικοποιητικές αλληλουχίες και η θέση της seed περιοχής δίνονται επίσης όπου είναι διαθέσιμα. Η βάση δεδομένων διαθέτει υπερσυνδέσμους προς άλλους χρήσιμους πόρους, όπως την UniProt, το GO, το GenBank και την PubMed. Αυτός ο πόρος ικών miRNA μπορεί να είναι χρήσιμος για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ξενιστή και ιού και τον εντοπισμό νέων στόχων για την ανάπτυξη αντι-ικών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Τα δεδομένα αυτής της βάσης προέκυψαν μετά από αναζήτηση βιβλιογραφίας για την εύρεση άρθρων σχετικά με ικά miRNA, ικά isomiR (παραλλαγές miRNA), στόχους ικών miRNA και αντιικά miRNA από το PubMed/Patent Lens. Η αναζήτηση στην PubMed έγινε με βάση το ερώτημα:

(((virus) OR viruses) OR virus) OR viral)) AND (((microrna) OR microrna*) OR mirna) OR mirna*) OR isomir) OR isomir*)*

Αυτό το ερώτημα ανέκτησε 3472 άρθρα τον Ιούλιο του 2014 που περιέχει 703 άρθρα ανασκόπησης, τα οποία δεν συμπεριλήφθηκαν. Εν τέλει από αυτά διατηρήθηκαν περισσότερα από 600, ενώ δεν ελήφθησαν υπόψη άρθρα που περιέχουν πληροφορίες σχετικά με προβλεπόμενα miRNAs (υπολογιστική πρόβλεψη στόχων), τροποποιημένα νουκλεοτίδια, μελέτες γενικού μηχανισμού/έκφρασης, δομικές μελέτες κ.λπ. και αντλήθηκαν δεδομένα και από 204 ερευνητικά άρθρα με τις απαιτούμενες πληροφορίες.

1.4.2 DIANA-TarBase

Η DIANA-TarBase v8 [8] είναι μια βάση δεδομένων αναφοράς που στοχεύει στην εύρεση πειραματικά υποστηριζόμενων στόχων miRNA σε πολλά είδη. Η όγδοη έκδοσή της είναι η πρώτη βάση δεδομένων που εντοπίζει περισσότερες από ένα εκατομμύριο εγγραφές, που αντιστοιχούν σε ~670.000 μοναδικά ζεύγη miRNA-στόχων. Ενσωματώνει πληροφορίες σχετικά με τη ρύθμιση miRNA-γονιδίων ειδικά για κυτταρικούς τύπους, ενώ αναφέρονται εκατοντάδες χιλιάδες θέσεις πρόσδεσης των miRNAs (MREs). Η περιήγηση στη βάση TarBase διευκολύνεται μέσω της εφαρμογής διαφορετικών συνδυασμών φιλτραρίσματος που καθιστούν εύκολη την ανάκτηση θετικών και αρνητικών στόχων miRNA ανά είδος, μεθοδολογία, κυτταρικό τύπο και ιστό. Ένα ενσωματωμένο σύστημα κατάταξης χρησιμοποιείται για την εμφάνιση αλληλεπιδράσεων με βάση την αξιοπιστία των μεθοδολογιών που τις υποστηρίζουν. Στατιστικά στοιχεία, κυκλικά διαγράμματα και διαδραστικά ραβδογράμματα που απεικονίζουν το περιεχόμενο της βάσης δεδομένων είναι διαθέσιμα μέσω μιας ειδικής σελίδας αποτελεσμάτων.

Στην ενημερωμένη έκδοση της βάσης δεδομένων, έχουν επιμεληθεί και προστεθεί χειροκίνητα ~419 δημοσιεύσεις, ενώ έχουν συλλεχθεί ή/και αναλυθεί >245 σύνολα δεδομένων υψηλής απόδοσης (high-throughput) που περιέχουν άμεση/μη-άμεση υποστήριξη για αλληλεπιδράσεις. Έμφαση δόθηκε στην εξαγωγή εκτεταμένων μετα-δεδομένων που συνοδεύουν τις καταχωρίσεις που έχουν καταχωρηθεί. Κάθε αλληλεπίδραση miRNA-στόχου συνδυάζεται με πληροφορίες σχετικά με τις σχετικές δημοσιεύσεις και μεθοδολογίες, τους ιστούς, τους τύπους κυττάρων καθώς και τον θετικό ή αρνητικό τύπο ρύθμισης. Στην περίπτωση των άμεσων τεχνικών, έχουν αρχειοθετηθεί οι ακριβείς θέσεις πρόσδεσης miRNA και περιλαμβάνονται συμπληρωματικές πληροφορίες για τους εκκινητές κλωνοποίησης και τις στοχευόμενες ρυθμιστικές περιοχές στα μετάγραφα (π.χ. 3' αμετάφραστη περιοχή - 3' UTR, κωδικοποιητική αλληλουχία - CDS). Οι αλληλεπιδράσεις που υποστηρίζονται από πειράματα υψηλής απόδοσης, έχουν εξαχθεί είτε από σχετικές δημοσιεύσεις είτε από την ανάλυση ακατέργαστων βιβλιοθηκών που ανακτήθηκαν από τα αποθετήρια Gene Expression Omnibus (GEO) και DNA Data Bank of Japan (DDBJ). Οι περιγραφές σχετικά με τις πειραματικές διαδικασίες/συνθήκες είναι επίσης διαθέσιμες στους χρήστες. Αναφορικά με ιούς, η TarBase καταχωρεί αλληλεπιδράσεις που έχουν εξαχθεί από άμεσες τεχνικές υψηλής απόδοσης κυτταρικών σειρών επιμολυσμένων με EBV και KSHV.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Σύγκριση βάσεων δεδομένων με στόχους ικόν miRNAs

Η πιο πρόσφατη έκδοση της VIRmiRNA (2014) ανακτήθηκε τοπικά από τον ιστότοπό της (<http://crdd.osdd.net/servers/virmirna/>). Απαραίτητοι πίνακες από τη βάση δεδομένων DIANA-TarBase v8.0 (<http://microrna.gr/tarbase/?r=tarbasev8>) ανακτήθηκαν, για τις ανάγκες της εργασίας, από τοπικά αποθετήρια του εργαστηρίου.

Αρχείο που αντιστοιχίζει τα αναγνωριστικά ώριμων miRNAs της miRBase (MIMAT IDs) με τις ονομασίες των miRNAs κάθε έκδοσης της miRBase[9] χρησιμοποιήθηκε για να επισημειωθούν οι δύο βάσεις στο επίπεδο του MIMAT ID. Αντίστοιχα για τα γονίδια,) δημιουργήθηκε και ανακτήθηκε από τη διεπαφή BioMart της πηγής Ensembl[10] αρχείο με αναγνωριστικά γονιδίων (ENSG IDs), σύμβολα γονιδίων (Gene Symbol) και συνώνυμα σύμβολα γονιδίων (Gene Synonym).

Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε σε περιβάλλον Linux, αξιοποιώντας τη συναρτησιακή γλώσσα R v4.03 και το RStudio (v1.3.1093). Τα (tab-delimited) αρχεία φορτώθηκαν σε αντικείμενα τύπου *data.table*. Η μελέτη των εκδόσεων miRBase που αξιοποιεί κάθε βάση, η επισημείωση αναγνωριστικών έγιναν με χρήση βασικών συναρτήσεων (base R, π.χ. *merge()*) και συναρτήσεων που προσφέρονται στο πακέτο *data.table*. Η τελική σύγκριση πραγματοποιήθηκε δημιουργώντας αναγνωριστικά των αλληλεπιδράσεων της μορφής “MIMAT_ID_GENE_ID”, για τους ιούς EBV και KSHV. Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε το διάγραμμα Venn από το πακέτο της R, *VennDiagram*.

2.2 Λειτουργικές αναλύσεις στόχων των miRNAs του ιού EBV

2.2.1 Αναζήτηση για εκφραζόμενα υποσύνολα των ικόν miRNAs στη βιβλιογραφία

Πραγματοποιήθηκαν αναζητήσεις στις υποδομές PubMed και PubMed Central (PMC) με στόχο να βρεθούν έρευνες που (α) σχετίζουν τον ιό EBV με διάφορες ασθένειες και καταστάσεις (β) έχουν χρησιμοποιήσει πειραματικές μεθοδολογίες για να ποσοτικοποιήσουν την έκφραση των ικόν miRNAs στις υπό μελέτη συνθήκες. Διατηρήθηκαν 4 πρωτογενείς μελέτες, καθώς και μία ανασκόπηση που σχολίαζε την έκφραση των ικόν miRNAs κατά το λυτικό κύκλο και κατά τις λανθάνουσες φάσεις (latency II και III). Συμπληρωματικά, από ανεξάρτητη μελέτη του εργαστηρίου διατηρήθηκαν ικά miRNAs που ήταν υψηλά εκφρασμένα σε B λεμφοκύτταρα ασθενών με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (ΡΑ) που είχαν ή δεν είχαν λάβει θεραπεία μεθοτρεξάτης.[11]

Από τις μελέτες σημειώθηκαν και διατηρήθηκαν σε λίστες τα ικά miRNAs που εκφράζονται. Ανάλογα τη μεθοδολογία (αλληλούχηση small RNA-Seq, ποσοτική PCR) και το σχολιασμό των συγγραφέων, τα miRNAs επισημειώθηκαν συμπληρωματικά ως υψηλά/χαμηλά εκφρασμένα. Για τη συνολική οπτικοποίηση των miRNAs ως προς τις συνθήκες, δημιουργήθηκε διάγραμμα heatmap[12] με το πακέτο

της R *pretty heatmap* (*rheatmap*), ταξινομώντας τα miRNAs και τις συνθήκες με βάση την Ευκλείδεια απόστασή τους με τη default μέθοδο (Ward).

2.2.2 Ανάλυση εμπλουτισμού μονοπατιών από στόχους ικών miRNAs

Οι λίστες των ικών miRNAs υποβλήθηκαν σε ανάλυση χρησιμοποιώντας την επερχόμενη έκδοση του εργαλείου DIANA-miRPath (v4.0, υπό δημοσίευση). Το miRPath παραμετροποιήθηκε ώστε να κάνει ανάλυση εμπλουτισμού μονοπατιών (pathway enrichment analysis) χρησιμοποιώντας πληροφορία για τους στόχους των miRNAs από τη βάση TarBase v8.0, έναντι των πηγών μονοπατιών KEGG[13] και Reactome[14]. Ως μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε η *Pathways union* και ως κατώφλι σημαντικότητας (διορθωμένης με τη μέθοδο FDR) το, αυστηρό, 0.0005.

Για τις λειτουργικές αναλύσεις δημιουργήθηκαν σύνολα συγκρίσεων ανά ζεύγη, τα οποία περιγράφονται στην Ενότητα 3.2. Σε κάθε ζεύγος, από τα αποτελέσματα του miRPath επικεντρωθήκαμε σε μονοπάτια που εμφανίζονται ως στατιστικά σημαντικά μοναδικά στη μία ή στην άλλη συνθήκη της σύγκρισης, τα οποία και σχολιάστηκαν.

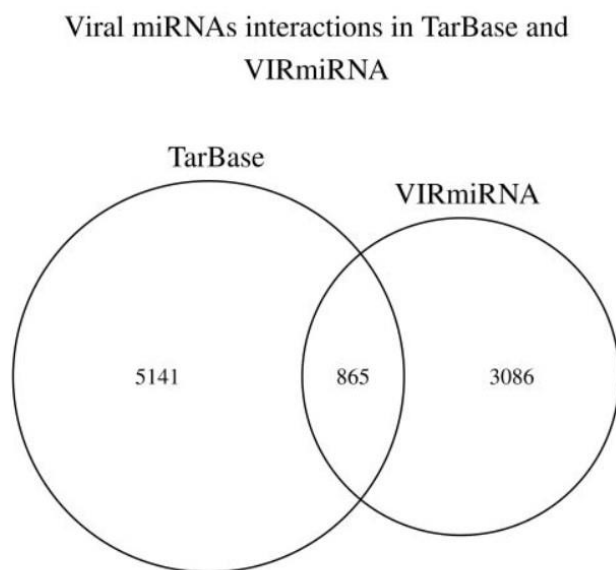
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Σύγκριση βάσεων δεδομένων με στόχους ιικών miRNAs

Για να μελετήσουμε μοριακούς μηχανισμούς του ξενιστή που επηρεάζονται από ιικά miRNAs, αρχικά πραγματοποιήσαμε αξιολόγηση και σύγκριση δύο βάσεων δεδομένων αιχμής που καταγράφουν στόχους ιικών miRNAs. Μας ενδιέφεραν τα ιικά miRNAs, που είναι σχετικά υπομελετημένα, για αυτό κάναμε μια πρώτη ανάλυση στις VIRmiRNA που είναι αφιερωμένη μόνο σε ιικά miRNAs και στόχους στις, καθώς και του DIANA-TarBase, και εντοπίσαμε ομοιότητες και διαφορές.

Για να διασφαλιστεί μια κατά το δυνατόν δίκαιη σύγκριση μεταξύ των δύο βάσεων, χρησιμοποιήθηκε αρχείο που αντιστοιχίζει τα αναγνωριστικά ώριμων miRNAs της miRBase (MIMAT IDs) με τις ονομασίες των miRNAs κάθε έκδοσης της miRBase. Μελετώντας στις δύο βάσεις φάνηκε ότι η VIRmiRNA ήταν επισημειωμένη με ονομασίες miRBase v18, ενώ το TarBase με ονομασίες v20. Αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας αρχείο με αναγνωριστικά της Ensembl v105, περιπτώσεις όπου γονίδια μπορεί να αναγράφονταν με το συνώνυμό τους στη μία ή την άλλη βάση εξαλείφθηκαν.

Από το διάγραμμα Venn (**Εικόνα 4**), βλέπουμε ότι οι δύο βάσεις δεδομένων περιέχουν συνολικά 9092 μοναδικές αλληλεπιδράσεις των miRNAs του EBV. Το DIANA-TarBase περιέχει > 2000 παραπάνω αλληλεπιδράσεις των miRNAs του EBV από τη VIRmiRNA. Έχει ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο αριθμός των κοινών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο βάσεων είναι σχετικά μικρός σε σύγκριση με το συνολικό αριθμό (14% του TarBase και 21% της VIRmiRNA).



Εικόνα 4 Διάγραμμα Venn που δείχνει τις αλληλεπιδράσεις των EBV miRNAs στις ΒΔ VIRmiRNA και TarBase

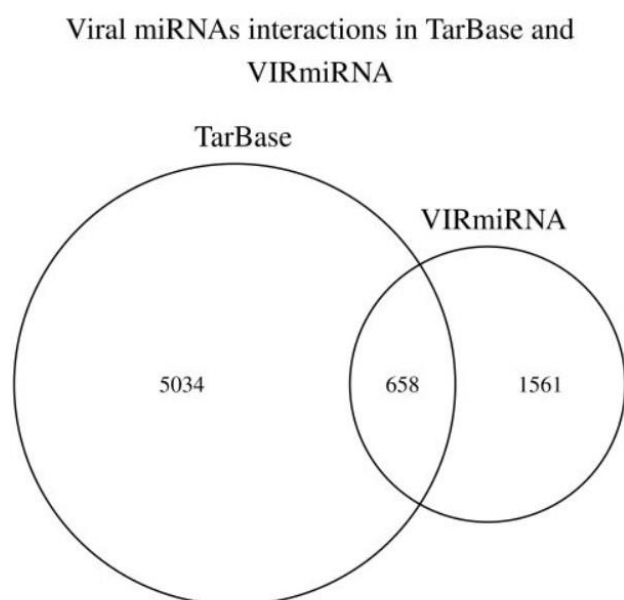
Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις αφορούν 3012 και 47 μοναδικά γονίδια και miRNAs στην περίπτωση της VIRmiRNA και 3117 και 44 μοναδικά γονίδια και miRNAs στην περίπτωση του TarBase, αντίστοιχα. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα πρώτα 10

miRNAs, με βάση τον αριθμό μοναδικών αλληλεπιδράσεων σε κάθε βάση, εκ των οποίων, 6 miRNAs (έντονη γραφή, bold) είναι κοινά.

Πίνακας 2 Παρουσιάζονται τα miRNAs του EBV με τις περισσότερες αλληλεπιδράσεις σε κάθε ΒΔ

VIRmiRNA		DIANA-TarBase	
miRNA	#	miRNA	#
BART19-3p	401	BART2-5p	807
BART2-5p	289	BART19-3p	448
BART22	268	BART14-3p	376
BART7	252	BART22	354
BART5-1-5p	180	BART1-3p	306
BART3-3p	177	BART15	273
BART5-5p	176	BART1-5p	265
BART15	173	BART20-3p	250
BART6-5p	167	BART3-3p	238
BART14-3p	135	BART10-3p	235

Αντίστοιχο διάγραμμα Venn έγινε και για τον ιό KSHV. Οι δύο βάσεις δεδομένων έχουν συνολικά 7.253 μοναδικές αλληλεπιδράσεις των miRNAs του KSHV. Παρατηρούμε ότι το DIANA-TarBase περιέχει > 3000 παραπάνω αλληλεπιδράσεις των miRNAs του KSHV από τη VIRmiRNA. Οι κοινές αλληλεπιδράσεις αποτελούν το 12% του DIANA-TarBase και το 30% της VIRmiRNA.



Εικόνα 5 Διάγραμμα Venn που δείχνει τις αλληλεπιδράσεις των KSHV miRNAs στις ΒΔ VIRmiRNA και TarBase

Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις αφορούν 1919 και 28 μοναδικά γονίδια και miRNAs στην περίπτωση της VIRmiRNA και 3282 και 25 μοναδικά γονίδια και miRNAs στην περίπτωση του TarBase, αντίστοιχα. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα πρώτα 10

miRNAs, με βάση τον αριθμό μοναδικών αλληλεπιδράσεων σε κάθε βάση, εκ των οποίων, 3 miRNAs (έντονη γραφή, bold) είναι κοινά.

Πίνακας 3 Παρουσιάζονται τα miRNAs του KSHV με τις περισσότερες αλληλεπιδράσεις σε κάθε ΒΔ

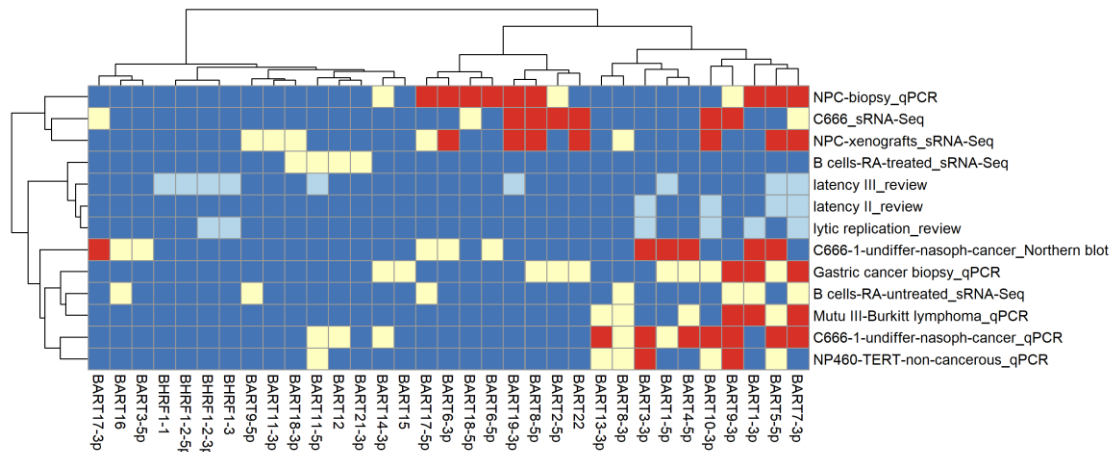
VIRmiRNA		DIANA-TarBase	
miRNA	#	miRNA	#
miR-K12-11	240	miR-K12-10a-3p	900
miR-K12-4-3p	233	miR-K12-11-3p	659
miR-K12-1	226	miR-K12-1-5p	638
miR-K12-6-3p	179	miR-K12-4-3p	601
miR-K12-2	171	miR-K12-3-5p	507
miR-K12-5	164	miR-K12-6-3p	449
miR-K12-10a	142	miR-K12-6-5p	438
miR-K12-9	123	miR-K12-2-5p	418
miR-K12-6-5p	115	miR-K12-5-5p	311
miR-K12-7	107	miR-K12-5-3p	304

3.2 Λειτουργικές αναλύσεις

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας στις στόχους που είναι καταγεγραμμένοι στο DIANA-TarBase, επιχειρήσαμε να διακρίνουμε σε μια σειρά από συγκρίσεις πώς τα miRNAs επηρεάζουν διεργασίες του ξενιστή (του *Homo sapiens*), ανάλογα με το ποια από αυτά τελικά εκφράζονται.

Αναζητήσαμε στη βιβλιογραφία και βρήκαμε έρευνες στις οποίες γινόταν αναφορά στην έκφραση ικών miRNAs. Διατηρήσαμε την πληροφορία για την έκφραση των miRNAs, η οποία παρουσιάζεται παρακάτω σε διάγραμμα τύπου heatmap (**Εικόνα 5**)

Στο heatmap παρατηρούμε ότι τα miRNAs BART9-3p και BART7-3p έχουν υψηλή έκφραση στις περισσότερες περιπτώσεις. Βλέπουμε ακόμη ότι υπάρχουν αρκετά κοινά miRNAs στις 3 πρώτες έρευνες (καρκινικοί ιστοί/κύτταρα ρινοφάρυγγα). Ανάλογο πρότυπο έκφρασης παρατηρείται και στις τελευταίες 2 έρευνες (καρκινικά/μη-καρκινικά κύτταρα ρινοφάρυγγα).



Εικόνα 6 Διάγραμμα Heatmap στο οποίο παρουσιάζονται συνοπτικά οι έρευνες και τα miRNAs που εκφράζονται σε κάθε κατάσταση. Το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί σε υψηλή έκφραση των miRNAs, το κίτρινο χρώμα σε χαμηλή έκφραση, το σκούρο μπλε σε άγνωστη/μηδενική έκφραση και το ανοιχτό μπλε αντιστοιχεί στις ανασκοπήσεις.

Συνδυάσαμε την πληροφορία από τις έρευνες με βάση τα πειράματα που εφαρμόστηκαν σε αυτές προκειμένου να εντοπιστούν τα ικά miRNAs και τις συγκρίναμε ώστε να δούμε τελικά ποιες διεργασίες επηρεάζονται από τα miRNAs που εκφράζονται. Στις έρευνες εντοπίσαμε δύο κατηγορίες πειραμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα μετρήσεων από αλληλούχηση sRNA-Seq [15] και ποσοτική PCR (qPCR) [16]. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα από μία ανασκόπηση και in-house αποτελέσματα από μια μελέτη έκφρασης ικών miRNAs σε ασθενείς με Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (ΡΑ). Οι συγκρίσεις που σχεδιάστηκαν, και τα αντίστοιχα miRNAs σε κάθε συνθήκη παρατίθενται συνολικά:

I. Μελέτες με μετρήσεις από sRNA-Seq

a. Σύγκριση 1: ασθενείς ΡΑ με έναντι χωρίς θεραπεία μεθοτρεξάτης

Με θεραπεία: BART18-3p, BART21-3p, BART12, BART11-5p

Χωρίς θεραπεία: BART7-3p, BART9-5p, BART8-3p, BART9-3p, BART17-5p, BART16, BART1-3p

b. Σύγκριση 2: κυτταρική σειρά ρινοφαρυγγικού καρκίνου (C666) έναντι ξеноμοσχευμάτων ρινοφαρυγγικού καρκίνου (NPC xenografts)

C666: BART10-3p, BART19-3p, BART22, BART2-5p, BART8-5p, BART9-3p, BART7-3p, BART17-3p, BART18-5p

NPC xenografts: BART5-5p, BART6-3p, BART7-3p, BART8-5p, BART10-3p, BART19-3p, BART22, BART17-5p, BART18-3p, BART8-3p, BART9-5p, BART11-3p

II. Μελέτες με μετρήσεις από qPCR

a. Σύγκριση 3: κυτταρική σειρά λεμφώματος Burkitt (Mutu III) έναντι κυτταρικής σειράς ρινοφαρυγγικού καρκίνου (C666-1)

Mutu III: BART1-3p, BART4-5p, BART5-5p, BART7-3p, BART8-3p, BART9-3p, BART13-3p

C666-1: BART1-5p, BART3-3p, BART4-5p, BART5-5p, BART7-3p, BART8-3p, BART9-3p, BART10-3p, BART11-5p, BART12, BART13-3p, BART14-3p

b. Σύγκριση 4: κυτταρική σειρά ρινοφαρυγγικού καρκίνου (C666-1) έναντι μη καρκινικής ρινοφαρυγγικής κυτταρικής σειράς (NP460-TERT)

C666-1: BART1-5p, BART3-3p, BART4-5p, BART5-5p, BART7-3p, BART8-3p, BART9-3p, BART10-3p, BART11-5p, BART12, BART13-3p, BART14-3p

NP460-TERT: BART3-3p, BART5-5p, BART8-3p, BART9-3p, BART10-3p, BART11-5p, BART13-3p

c. **Σύγκριση 5: Βιοψίες γαστρικού καρκίνου έναντι βιοψιών ρινοφαρυγγικού καρκίνου**

Βιοψίες γαστρικού καρκίνου: BART4-5p, BART1-5p, BART1-3p, BART15, BART5-5p, BART7-3p, BART8-5p, BART9-3p, BART22, BART10-3p, BART14-3p, BART2-5p

Βιοψίες ρινοφαρυγγικού καρκίνου: BART6-5p, BART6-3p, BART1-3p, BART5-5p, BART17-5p, BART8-5p, BART7-3p, BART14-3p, BART18-5p, BART19-3p, BART9-3p, BART2-5p

III. **Ανασκόπηση:**

d. **Σύγκριση 6: Λυτικός κύκλος έναντι λανθάνουσας φάσης II**

Λυτικός κύκλος: BART1-3p, BART3-3p, BART7-3p, BART10-3p, BHRF1-2-3p, BHRF1-3

Λανθάνουσα φάση II: BART3-3p, BART5-5p, BART7-3p, BART10-3p

e. **Σύγκριση 7: Λυτικός κύκλος έναντι λανθάνουσας φάσης III**

Λυτικός κύκλος: BART1-3p, BART3-3p, BART7-3p, BART10-3p, BHRF1-2-3p, BHRF1-3

Λανθάνουσα φάση III: BART7-3p, BART5-5p, BART11-5p, BART1-5p, BART19-3p, BHRF1-1, BHRF1-2-5p, BHRF1-2-3p, BHRF1-3

Έπειτα χρησιμοποιήσαμε το DIANA-mirPath αξιοποιώντας τους στόχους του DIANA-TarBase. Και στις δύο περιπτώσεις θέσαμε ως merging method την *Pathways union* [17].

Pathways union: Σε αυτή τη λειτουργία, ο διακομιστής εντοπίζει όλα τα σημαντικά στοχευμένα μονοπάτια από τα επιλεγμένα microRNAs. Ο διακομιστής εκτελεί αρχικά την ανάλυση εμπλουτισμού και υπολογίζει τα επίπεδα σημαντικότητας (p-values) μεταξύ των στόχων κάθε miRNA και των γονιδίων κάθε μονοπατιού. Στη συνέχεια, για κάθε μονοπάτι εξάγεται μια συγχωνευμένη τιμή p-value που υποδηλώνει εάν ένα συγκεκριμένο μονοπάτι στοχεύεται από τουλάχιστον ένα miRNA από την αρχικά επιλεγμένη ομάδα. Πρόκειται για μια μέθοδο ανάλυσης *a posteriori*.

3.2.1 Σύγκριση 1: ασθενείς PA με έναντι χωρίς θεραπεία μεθοτρεξάτης

Στην πρώτη σύγκριση τα δεδομένα προέκυψαν από την έρευνα των Heinicke *et al*, η οποία αναφέρεται στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (PA). Δεδομένης της αυτοάνοσης φύσης της PA με την παρουσία αυτοαντισωμάτων, τα CD19+ B κύτταρα αποτελούν βασικό τύπο κυττάρων στην παθογένειά της και έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στους υποπληθυσμούς των CD19+ B κυττάρων στο αίμα των ασθενών. Πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση μικρών RNA σε CD19+ B κύτταρα νεοδιαγνωσθέντων, μη θεραπευμένων, ασθενών με PA, ασθενών με PA σε ύφεση που έλαβαν επιτυχή θεραπεία με μεθοτρεξάτη (MTX) και υγιών ατόμων. Στο εργαστήριο έγινε ποσοτικοποίηση των miRNAs του EBV στις εν λόγω καταστάσεις και ανευρέθηκαν ποσότητες miRNAs σε μερικούς ασθενείς από όλες τις κατηγορίες. Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας συγκρίναμε τα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης από τους

νεοδιαγνωσθέντες, μη θεραπευμένους, ασθενείς και τους ασθενείς με PA σε ύφεση που έλαβαν επιτυχή θεραπεία με μεθοτρεξάτη [11, 18] και προχωρήσαμε σε ανάλυση μονοπατιών (Πίνακες 2-3).

Πίνακας 4 Μονοπάτια KEGG που ρυθμίζονται μοναδικά μεταξύ των ασθενών με PA και χωρίς θεραπεία μεθοτρεξάτης

	Συνολικά// Κοινά μονοπάτια	miRNAs
<i>treated</i>	6//2	
Renal cell carcinoma (p=0.000308)		BART11-5p
Glioma (p=0.000308)		BART11-5p
Non-small cell lung cancer (p=0.000308)		BART11-5p
Prostate cancer (p=0.000478)		BART11-5p
<i>untreated</i>	9//2	
Oocyte meiosis (p=0.000131)		BART17-5p
Viral carcinogenesis (p=0.000131)		BART1-3p
FoxO signaling pathway (p=0.000185)		BART7-3p
Gastric cancer (p=0.000185)		BART1-3p
MicroRNAs in cancer (p=0.000205)		BART1-3p
Human papillomavirus infection (p=0.000244)		BART1-3p
Transcriptional misregulation in cancer (p=0.000451)		BART1-3p

Πίνακας 5 Μονοπάτια Reactome που ρυθμίζονται μοναδικά μεταξύ των ασθενών με PA και χωρίς θεραπεία μεθοτρεξάτης

	Συνολικά// Κοινά μονοπάτια	miRNAs
<i>treated</i>	32//3	
Signaling by FGFR4 in disease (p=6.98E-05)		BART11-5p
Signaling by FGFR3 fusions in cancer (p=6.98E-05)		BART11-5p
Activated NTRK2 signals through FRS2 and FRS3 (p=6.98E-05)		BART11-5p
Signaling by FGFR1 (p=0.000161)		BART11-5p
FRS-mediated FGFR1 signaling (p=0.000185)		BART11-5p
FRS-mediated FGFR2 signaling (p=0.000185)		BART11-5p
FRS-mediated FGFR3 signaling (p=0.000185)		BART11-5p
Downstream signaling of activated FGFR3 (p=0.000185)		BART11-5p
FRS-mediated FGFR4 signaling (p=0.000185)		BART11-5p
Signaling by FGFR3 in disease (p=0.000185)		BART11-5p
Regulation of TP53 Expression (p=0.000185)		BART21-3p
Signaling by FGFR3 point mutants in cancer (p=0.000185)		BART11-5p
Signaling by NTRK2 (TRKB) (p=0.000185)		BART11-5p
Downstream signaling of activated FGFR4 (p=0.000215)		BART11-5p
Downstream signaling of activated FGFR2 (p=0.000274)		BART11-5p
Downstream signaling of activated FGFR1 (p=0.000282)		BART11-5p
Signalling to ERKs (p=0.000335)		BART11-5p
Signaling by FGFR (p=0.000335)		BART11-5p
SOS-mediated signalling (p=0.0004)		BART11-5p
Cytokine Signaling in Immune system (p=0.0004)		BART11-5p
Signaling by FGFR3 (p=0.0004)		BART11-5p
Signaling by FGFR4 (p=0.0004)		BART11-5p

Signaling by FGFR1 in disease (p=0.0004)		BART11-5p
RAS signaling downstream of NF1 loss-of-function variants (p=0.0004)		BART11-5p
Signaling by FGFR2 in disease (p=0.000414)		BART11-5p
Activated NTRK3 signals through RAS (p=0.000414)		BART11-5p
EGFR Transactivation by Gastrin (p=0.000442)		BART11-5p
SHC-related events triggered by IGF1R (p=0.000442)		BART11-5p
Activated NTRK2 signals through RAS (p=0.000442)		BART11-5p
<i>untreated</i>	21//3	
Gene expression (Transcription) (p=1.2E-09)		BART1-3p, BART7-3p
Transcriptional Regulation by TP53 (p=4.3E-06)		BART7-3p
Regulation of TP53 Activity (p=1.5E-05)		BART7-3p
Diseases of signal transduction by growth factor receptors and second messengers (p=6.3E-05)		BART1-3p
CD28 dependent Vav 1 pathway (p=0.00012)		BART9-3p
Epigenetic regulation of gene expression (p=0.00017)		BART1-3p
Chromatin modifying enzymes (p=0.00025)		BART1-3p
Chromatin organization (p=0.00025)		BART1-3p
Constitutive Signaling by AKT1 E17K in Cancer (p=0.00025)		BART1-3p
Regulation of glycolysis by fructose 2.6-bisphosphate metabolism (p=0.00025)		BART17-5p
Regulation of TP53 Activity through Phosphorylation (p=0.0003)		BART7-3p
AKT phosphorylates targets in the cytosol (p=0.00033)		BART7-3p
TP53 Regulates Transcription of Cell Cycle Genes (p=0.00033)		BART1-3p
Signaling by TGFB family members (p=0.00033)		BART9-3p
TP53 Regulates Transcription of Genes Involved in G1 Cell Cycle Arrest (p=0.00037)		BART1-3p
RORA activates gene expression (p=0.00042)		BART16
Signaling by NTRKs (p=0.00045)		BART1-3p
Signaling by Interleukins (p=0.00045)		BART9-3p

Η μεθοτρεξάτη (MTX) είναι παράγοντας χημειοθεραπείας και κατασταλτικό του ανοσοποιητικού συστήματος. Αναστέλλει την βιοσύνθεση των πουρινών, τον πολλαπλασιασμό του ιικού RNA, τη σύνθεση των ιικών πρωτεϊνών και την απελευθέρωση του ιού [19]. Στα αποτελέσματα των ασθενών με PA παρατηρούμε ότι όλα τα μονοπάτια που επηρεάζονται σχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνου. Σε αυτή την περίπτωση έχουμε έντονη ρύθμιση της σηματοδότησης των FGFRs που έχει σχετιστεί με αντιφλεγμονώδη δράση.[20]

Στα άτομα χωρίς θεραπεία με μεθοτρεξάτη παρατηρείται έντονη συμμετοχή/απορυθμιστική δράση από τα EBV miRNAs σε διαδικασίες της μεταγραφικής ρύθμισης, του κυτταρικού κύκλου και της κρίσιμης ανοσολογικής σηματοδότησης των ιντερλευκινών καθώς και διαδικασιών που επάγονται από μόλυνση από ιό από την KEGG, η οποία δεν διακρίνεται παρουσία θεραπείας.

Δηλαδή απουσία θεραπείας διακρίνουμε πιθανή συμμετοχή των ιικών miRNAs σε διεργασίες που χαρακτηρίζουν τις ιικές μολύνσεις και στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ παρουσία MTX τα ιικά miRNAs διαφοροποιούνται

και μεταβάλλεται αντίστοιχα η στόχευση των miRNAs προς διεργασίες σχετικές με την αντιφλεγμονώδη δράση της MTX.

3.2.2 Σύγκριση 2: κυτταρική σειρά ρινοφαρυγγικού καρκίνου (C666) έναντι ξενομοσχευμάτων ρινοφαρυγγικού καρκίνου (NPC xenografts)

Τα δεδομένα σε αυτήν την περίπτωση προέκυψαν από δύο διαφορετικές έρευνες:

Η μία αναφορά σχετίζεται με τους καρκίνους επιθηλιακής προέλευσης που προκαλούνται από τον EBV και με τα miRNAs που εκφράζονται σε αυτούς. Παρουσιάζεται μια ανάλυση της ικανότητας μεμονωμένων προ-miRNAs (BARTs, BamHI A rightward transcripts) να προσδίδουν έναν αντι-αποπτωτικό φαινότυπο και αναφέρεται ότι πέντε από τα 22 miR-BARTs επιδεικνύουν αυτή την ικανότητα. Προκειμένου να αναλύσουν το επίπεδο έκφρασης κάθε miR-BART miRNA σε κάθε μεταγωγέα AGS, συνέλεξαν ολικό RNA από κάθε καλλιέργεια και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε sRNA-Seq και σύγκριση των επιπέδων έκφρασης με εκείνα που παρατηρούνται στην ρινοφαρυγγική καρκινική κυτταρική σειρά C666 που φέρει EBV σε λανθάνουσα φάση II[21].

Η δεύτερη μελέτη αναφέρεται σε ένα ολοκληρωμένο μεταγραφικό προφίλ, με αλληλούχηση μικρών RNA, των κωδικοποιούμενων από τον EBV miRNAs σε μια ομάδα ξενομοσχευμάτων που προέρχονται από ασθενείς με ρινοφαρυγγικό καρκίνο [17].

Λήφθηκε πληροφορία για την έκφραση των miRNAs από την κυτταρική σειρά C666 από την πρώτη μελέτη και από τα ξενομοσχεύματα από τη δεύτερη για να μελετηθεί κατά πόσο εμφανίζονται αντίστοιχες διαδικασίες στα δύο αυτά μοντέλα μελέτης του καρκίνου.

Στην περίπτωση των KEGG μονοπατιών (Πίνακας 6) παρατηρούμε ότι στα αποτελέσματα υπάρχουν μοναδικά εμπλουτισμένα μονοπάτια μόνο στην κυτταρική σειρά C666. Αυτό μας δείχνει ότι τα ιικά miRNAs αυτών των δύο καταστάσεων δρουν με παρόμοιο τρόπο και επηρεάζουν πολλά ίδια μονοπάτια.

Πίνακας 6 Μονοπάτια KEGG που ρυθμίζονται μοναδικά μεταξύ της κυτταρικής σειράς C666 και των ξενομοσχευμάτων ρινοφαρυγγικού καρκίνου

	<i>Συνολικά// Κοινά μονοπάτια</i>	<i>miRNAs</i>
C666	20//16	
ErbB signaling pathway (p=0.000216)		BART9-3p
Longevity regulating pathway (p=0.00033)		BART17-3p
Viral carcinogenesis (p=0.00033)		BART2-5p
Hepatitis B (p=0.000418)		BART2-5p

Πίνακας 7 Μονοπάτια Reactome που ρυθμίζονται μοναδικά μεταξύ της κυτταρικής σειράς C666 και των ξενομοσχευμάτων ρινοφαρυγγικού καρκίνου

	Συνολικά// Κοινά μονοπάτια	miRNAs
C666	49//35	
Circadian Clock (p=4.7E-07)		BART2-5p, BART18-5p
RORA activates gene expression (p=0.000111)		BART18-5p
CD28 dependent Vav 1 pathway (p=0.000118)		BART9-3p
BMAL1:CLOCK.NPAS2 activates circadian gene expression (p=0.000256)		BART18-5p
Regulation of PTEN mRNA translation (p=0.000264)		BART18-5p
Signaling by Hippo (p=0.00031)		BART2-5p
SUMO E3 ligases SUMOylate target proteins (p=0.000351)		BART2-5p
Signaling by TGFB family members (p=0.000351)		BART9-3p
Diseases of signal transduction by growth factor receptors and second messengers (p=0.000355)		BART18-5p
Activation of caspases through apoptosome-mediated cleavage (p=0.000372)		BART2-5p
SUMOylation (p=0.000395)		BART2-5p
Signaling by Interleukins (p=0.00047)		BART9-3p
Signaling by FGFR1 in disease (p=0.00047)		BART2-5p
TRAF3-dependent IRF activation pathway (p=0.000484)		BART2-5p
NPC-xenografts	46//35	
TP53 Regulates Transcription of Cell Cycle Genes (p=3.93E-07)		BART5-5p
HuR (ELAVL1) binds and stabilizes Mrna (p=2.36E-06)		BART5-5p
TP53 regulates transcription of additional cell cycle genes whose exact role in the p53 pathway remain uncertain (p=2.67E-05)		BART5-5p
Deadenylation of Mrna (p=5.4E-05)		BART5-5p
Regulation of glycolysis by fructose 2.6-bisphosphate metabolism (p=0.000186)		BART17-5p
Oncogenic MAPK signaling (p=0.000258)		BART5-5p
Loss of Function of SMAD4 in Cancer (p=0.000319)		BART5-5p
SMAD4 MH2 Domain Mutants in Cancer (p=0.000319)		BART5-5p
SMAD2/3 MH2 Domain Mutants in Cancer (p=0.000319)		BART5-5p
TGF-beta receptor signaling activates SMADs (p=0.000323)		BART5-5p
Oncogene Induced Senescence (p=0.000392)		BART5-5p

Μια σειρά από διεργασίες σχετικές με τον καρκίνο και τις ιικές μολύνσεις, καθώς και κάποιες διεργασίες ρύθμισης του ημερήσιου ρυθμού και της παραγωγής πρωτεϊνών, διακρίνονται στην κυτταρική σειρά C666 (Πίνακας 6). Η ρύθμιση διαδικασιών σχετικών με τον καρκίνο είναι ιδιαίτερα πιο προφανής στο μοντέλο ξενομοσχεύματος όπου σχεδόν όλες οι σημαντικές διεργασίες αφορούν κρίσιμα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια [22] (Πίνακας 7). Υποδηλώνεται έτσι και η υπεροχή που εμφανίζει το είδος αυτού δείγματος, συγκριτικά με τις κυτταρικές σειρές, ως ένα μοντέλο για την πιο αξιόπιστη μελέτη της επίδρασης του EBV σε καρκινικές διεργασίες.

3.2.3 Σύγκριση 3: κυτταρική σειρά λεμφώματος Burkitt (Mutu III) έναντι κυτταρικής σειράς ρινοφαρυγγικού καρκίνου (C666-1)

Η έρευνα αυτή σχετίζεται με το ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα (NPC). Ο NPC είναι ένας όγκος σχετιζόμενος με τον ιό Epstein-Barr (EBV), στον οποίο ανιχνεύονται μόνο λίγες ικές πρωτεΐνες, αλλά περισσότερα από 20 BART miRNAs, σε υψηλά επίπεδα. Πραγματοποίησαν συστηματική ανάλυση στις κυτταρικές σειρές λεμφώματος Burkitt, Mutu III, που είναι μολυσμένες από τον EBV σε λανθάνουσα φάση, σε κύτταρα NPC που υποφέρουν από EBV (C666-1) και σε μη καρκινικά κύτταρα ρινοφαρυγγικού επιθηλίου (NP460-TERT) [23]. Στους Πίνακες 8-9 παρουσιάζεται η σύγκριση των διεργασιών που ρυθμίζουν EBV miRNAs στα δύο μοντέλα διαφορετικών καρκίνων.

Πίνακας 8 Μονοπάτια KEGG που ρυθμίζονται μοναδικά μεταξύ των καταστάσεων Mutu III- C666-1

	Συνολικά// Κοινά μονοπάτια	miRNAs
Mutu III	9//4	
Viral carcinogenesis (p=0.00017)		BART1-3p
MicroRNAs in cancer (p=0.0002)		BART1-3p
Gastric cancer (p=0.0002)		BART1-3p
Human papillomavirus infection (p=0.00024)		BART1-3p
Transcriptional misregulation in cancer (p=0.00045)		BART1-3p
C666-1	9//4	
p53 signaling pathway (p=3.5E-08)		BART3-3p, BART14-3p
Renal cell carcinoma (p=2.03E-06)		BART1-5p, BART11-5p
Glioma (p=0.00023)		BART11-5p
Non-small cell lung cancer (p=0.00023)		BART11-5p
Prostate cancer (p=0.00047)		BART11-5p

Πίνακας 9 Μονοπάτια Reactome που ρυθμίζονται μοναδικά μεταξύ των καταστάσεων Mutu III- C666-1

	Συνολικά// Κοινά μονοπάτια	miRNAs
Mutu III	33//26	
Diseases of signal transduction by growth factor receptors and second messengers (p=4.9E-05)		BART1-3p
Epigenetic regulation of gene expression (p=0.00014)		BART1-3p
Chromatin modifying enzymes (p=0.00029)		BART1-3p
Chromatin organization (p=0.00029)		BART1-3p
Constitutive Signaling by AKT1 E17K in Cancer (p=0.00029)		BART1-3p
TP53 Regulates Transcription of Genes Involved in G1 Cell Cycle Arrest (p=0.0004)		BART1-3p
Signaling by NTRKs (p=0.00048)		BART1-3p
C666-1	68//26	
Signaling by FGFR3 fusions in cancer (p=2.04E-07)		BART10-3p, BART11-5p
Signaling by FGFR4 in disease (p=2.04E-07)		BART10-3p, BART11-5p

Activated NTRK2 signals through FRS2 and FRS3 (p=2.04E-07)		BART10-3p, BART11-5p
SUMO E3 ligases SUMOylate target proteins (p=1.01E-05)		BART1-5p, BART3-3p
Signaling by FGFR1 in disease (p=1.01E-05)		BART1-5p, BART11-5p
Signaling by FGFR1 (p=8.05E-05)		BART11-5p
FRS-mediated FGFR3 signaling (p=0.00013)		BART11-5p
PIP3 activates AKT signaling (p=0.00014)		BART10-3p
FRS-mediated FGFR4 signaling (p=0.00015)		BART11-5p
Signaling by FGFR3 in disease (p=0.00015)		BART11-5p
Signaling by FGFR3 point mutants in cancer (p=0.00015)		BART11-5p
FRS-mediated FGFR1 signaling (p=0.00016)		BART11-5p
FRS-mediated FGFR2 signaling (p=0.00018)		BART11-5p
Downstream signaling of activated FGFR3 (p=0.00018)		BART11-5p
Signaling by NTRK2 (TRKB) (p=0.00018)		BART11-5p
Downstream signaling of activated FGFR4 (p=0.000228)		BART11-5p
MET activates RAP1 and RAC1 (p=0.000263)		BART1-5p
Downstream signaling of activated FGFR2 (p=0.000291)		BART11-5p
Downstream signaling of activated FGFR1 (p=0.000309)		BART11-5p
Intracellular signaling by second messengers (p=0.000309)		BART10-3p
Signalling to ERKs (p=0.000366)		BART11-5p
Signaling by FGFR (p=0.000366)		BART11-5p
SOS-mediated signalling (p=0.00039)		BART11-5p
Disease (p=0.00039)		BART3-3p
SUMOylation (p=0.00039)		BART3-3p
PKMTs methylate histone lysines (p=0.00039)		BART14-3p
Glycogen storage disease type II (GAA) (p=0.00039)		BART14-3p
RAS signaling downstream of NF1 loss-of-function variants (p=0.00039)		BART11-5p
Suppression of autophagy (p=0.00039)		BART10-3p
Signaling by FGFR3 (p=0.000405)		BART11-5p
Cytokine Signaling in Immune system (p=0.000409)		BART11-5p
Signaling by FGFR4 (p=0.000409)		BART11-5p
PTEN Regulation (p=0.000409)		BART10-3p
Small interfering RNA (siRNA) biogenesis (p=0.000412)		BART14-3p
ESR-mediated signaling (p=0.000412)		BART10-3p
Activated NTRK3 signals through RAS (p=0.000416)		BART11-5p
TET1.2.3 and TDG demethylate DNA (p=0.000416)		BART3-3p
Signaling by FGFR2 in disease (p=0.000416)		BART11-5p
RHO GTPase Effectors (p=0.000457)		BART14-3p
EGFR Transactivation by Gastrin (p=0.000463)		BART11-5p
SHC-related events triggered by IGF1R (p=0.000463)		BART11-5p
Activated NTRK2 signals through RAS (p=0.000463)		BART11-5p

Στο μοντέλο ρινοφαρυγγικού καρκίνου αναδεικνύονται διεργασίες που μέσα από τη σηματοδότηση των EBV miRNAs μπορεί να καθιστούν τον αντίστοιχο όγκο πιο ανθεκτικό στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος (αρνητική ρύθμιση της αυτοφαγίας και ρύθμιση της σηματοδότησης της φλεγμονής (σηματοδότηση

κυτοκινών). Εξίσου σημαντική η αφθονία των μονοπατιών σχετικών με FGFRs, που σχετίζονται με την απορρύθμιση πρωτεϊνών προσκόλλησης (CAMs) και της εξωκυττάριας ουσίας (ECM), επομένως συσχετίζονται με το μεταστατικό δυναμικό των όγκων [24].

Στο μοντέλο για λέμφωμα φαίνεται πιο ήπια ρύθμιση από τα EBV miRNAs που αφορά άλλες διεργασίες, την AKT1 E17K, βοηθητική για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση των καρκινικών κυττάρων[25]. Είναι αξιοσημείωτο επίσης ότι αναδεικνύεται ρύθμιση και σε διεργασίες σχετικές με το μεταγραφικό πρόγραμμα των κυττάρων (οργάνωση-ρύθμιση χρωματίνης, επιγενετικές ρυθμίσεις) και τον κυτταρικό κύκλο.

3.2.4 Σύγκριση 4: κυτταρική σειρά ρινοφαρυγγικού καρκίνου (C666-1) έναντι μη καρκινικής ρινοφαρυγγικής κυτταρικής σειράς (NP460-TERT)

Στους Πίνακες 10-11 παρουσιάζεται η σύγκριση των διεργασιών που ρυθμίζουν EBV miRNAs στο μοντέλο ρινοφαρυγγικού καρκίνου, σε σύγκριση με μη καρκινικά κύτταρα ρινοφαρυγγικού επιθηλίου (NP460-TERT), από την ίδια μελέτη που αξιοποιήθηκε στη Σύγκριση 3 [23].

Πίνακας 10 Μονοπάτια KEGG που ρυθμίζονται μοναδικά μεταξύ των καταστάσεων C666-1- NP460-TERT

	Συνολικά// Κοινά μονοπάτια	miRNAs
C666-1	9//4	
p53 signaling pathway (p=3.51E-08)		BART3-3p, BART14-3p
Renal cell carcinoma (p=2.03E-06)		BART1-5p, BART11-5p
Glioma (p=0.000231)		BART11-5p
Non-small cell lung cancer (p=0.000231)		BART11-5p
Prostate cancer (p=0.000478)		BART11-5p
NP460-TERT	9//4	
Viral carcinogenesis(p=0.000176)		BART1-3p
MicroRNAs in cancer (p=0.000205)		BART1-3p
Gastric cancer (p=0.000205)		BART1-3p
Human papillomavirus infection (p=0.000244)		BART1-3p
Transcriptional misregulation in cancer (p=0.000451)		BART1-3p

Πίνακας 11 Μονοπάτια Reactome που ρυθμίζονται μοναδικά μεταξύ των καταστάσεων C666-1- NP460-TERT

	Συνολικά// Κοινά μονοπάτια	miRNAs
C666-1	68//26	
Signaling by FGFR3 fusions in cancer (p=2.04E-07)		BART10-3p, BART11-5p
Signaling by FGFR4 in disease (p=2.05E-07)		BART10-3p, BART11-5p
Activated NTRK2 signals through FRS2 and FRS3 (p=2.05E-07)		BART10-3p, BART11-5p
SUMO E3 ligases SUMOylate target proteins (p=1.01E-05)		BART1-5p, BART3-3p
Signaling by FGFR1 in disease (p=1.01E-05)		BART1-5p, BART11-5p

Deadenylation of mRNA (p=7.57E-05)		BART5-5p
Signaling by FGFR1 (p=8.05E-05)		BART11-5p
FRS-mediated FGFR3 signaling (p=0.000139)		BART11-5p
PIP3 activates AKT signaling (p=0.000141)		BART10-3p
FRS-mediated FGFR4 signaling (p=0.000152)		BART11-5p
Signaling by FGFR3 in disease (p=0.000152)		BART11-5p
Signaling by FGFR3 point mutants in cancer (p=0.000152)		BART11-5p
FRS-mediated FGFR1 signaling (p=0.000166)		BART11-5p
FRS-mediated FGFR2 signaling (p=0.000189)		BART11-5p
Downstream signaling of activated FGFR3 (p=0.000189)		BART11-5p
Signaling by NTRK2 (TRKB) (p=0.000189)		BART11-5p
Downstream signaling of activated FGFR4 (p=0.000228)		BART11-5p
MET activates RAP1 and RAC1 (p=0.000263)		BART1-5p
Downstream signaling of activated FGFR2 (p=0.000291)		BART11-5p
Downstream signaling of activated FGFR1 (p=0.000309)		BART11-5p
Intracellular signaling by second messengers (p=0.000309)		BART10-3p
Signalling to ERKs (p=0.000366)		BART11-5p
Signaling by FGFR (p=0.000366)		BART11-5p
SOS-mediated signalling (p=0.00039)		BART11-5p
Disease (p=0.00039)		BART3-3p
SUMOylation (p=0.00039)		BART3-3p
PKMTs methylate histone lysines (p=0.00039)		BART14-3p
Glycogen storage disease type II (GAA) (p=0.00039)		BART14-3p
RAS signaling downstream of NF1 loss-of-function variants (p=0.00039)		BART11-5p
Suppression of autophagy (p=0.00039)		BART10-3p
Signaling by FGFR3 (p=0.000405)		BART11-5p
Cytokine Signaling in Immune system (p=0.000409)		BART11-5p
Signaling by FGFR4 (p=0.000409)		BART10-3p
PTEN Regulation (p=0.000409)		BART/10-3p
Small interfering RNA (siRNA) biogenesis (p=0.000412)		BART14-3p
ESR-mediated signaling (p=0.000412)		BART10-3p
Activated NTRK3 signals through RAS (p=0.000416)		BART11-5p
TET1.2.3 and TDG demethylate DNA (p=0.000416)		BART3-3p
Signaling by FGFR2 in disease (p=0.000416)		BART11-5p
RHO GTPase Effectors (p=0.000457)		BART14-3p
EGFR Transactivation by Gastrin (p=0.000463)		BART11-5p
SHC-related events triggered by IGF1R (p=0.000463)		BART11-5p
Activated NTRK2 signals through RAS (p=0.000463)		BART11-5p
<i>NP460-TERT</i>	34/26	
Diseases of signal transduction by growth factor receptors and second messengers (p=4.9E-05)		BART1-3p
Deadenylation of mRNA (p=5.3E-05)		BART5-5p

Epigenetic regulation of gene expression (p=0.00014)		BART1-3p
Chromatin modifying enzymes (p=0.0003)		BART1-3p
Chromatin organization (p=0.0003)		BART1-3p
Constitutive Signaling by AKT1 E17K in Cancer (p=0.0003)		BART1-3p
TP53 Regulates Transcription of Genes Involved in G1 Cell Cycle Arrest (p=0.00041)		BART1-3p
Signaling by NTRKs (p=0.00048)		BART1-3p

Εντοπίζουμε σημαντική διαφορά στις διαδικασίες μεταξύ καρκινικών και μη-καρκινικών κυττάρων: Ενώ στα μη-καρκινικά διακρίνεται επιγενετική ρύθμιση από τα EBV miRNAs και κάποιες διαδικασίες σχετικές με κυτταρικό πολλαπλασιασμό που αναφέρθηκαν και στη **Σύγκριση 3**, στα καρκινικά κύτταρα επάγεται η έκφραση EBV miRNAs που πολύ πιο έντονα σχετίζονται με καρκινικές διεργασίες. Υποδηλώνεται ότι η γονιδιακή έκφραση κατά τον καρκίνο επιδρά και αλλάζει την έκφραση των ικών miRNAs, τα οποία με τη σειρά τους (απο-)ρυθμίζουν επίσης περισσότερες διεργασίες που σχετίζονται με την πορεία του καρκίνου και τη μετάσταση, δημιουργώντας έναν «κύκλο ρύθμισης» από την καρκινική βιολογία προς τα ικά miRNAs και πάλι προς την καρκινική βιολογία.

3.2.5 Σύγκριση 5: Βιοψίες γαστρικού καρκίνου έναντι βιοψιών ρινοφαρυγγικού καρκίνου

Και στην περίπτωση αυτή έχουμε χρησιμοποιήσει δεδομένα από δύο διαφορετικές έρευνες. Η μία έρευνα σκιαγραφεί διεξοδικά την έκφραση 44 γνωστών miRNAs του EBV σε δείγματα ιστών από ασθενείς με γαστρικό καρκίνωμα που σχετίζεται με τον EBV. Αρκετά miRNAs εκφράστηκαν υψηλά στο γαστρικό καρκίνωμα που σχετίζεται με τον EBV και η υπολογιστική ανάλυση αποκάλυψε ότι τα γονίδια-στόχοι αυτών των miRNAs του EBV είχαν λειτουργίες που σχετίζονται με τον καρκίνο, ιδίως με τη ρύθμιση της απόπτωσης [26].

Η δεύτερη έρευνα αναφέρεται στα miRNAs του EBV τα οποία είναι άφθονα στους όγκους του ρινοφαρυγγικού καρκινώματος (NPC). Η περαιτέρω διερεύνηση των πιθανών γονιδίων-στόχων των miRNAs του EBV αποκάλυψε την αναστολή ογκοκατασταλτικών γονιδίων (π.χ. PTEN) και την εκτεταμένη απορρύθμιση διαφόρων μονοπατιών που εμπλέκονται συχνά στον NPC (π.χ. σηματοδότηση Wnt) [27].

Ο συνδυασμός αυτών των δύο μελετών μας έδωσε τη δυνατότητα να συγκρίνουμε την επίδραση των ικών miRNAs σε βιοψίες ασθενών με δύο διαφορετικούς τύπους καρκίνου: το γαστρικό και το ρινοφαρυγγικό (**Πίνακες 12-13**).

Πίνακας 12 Μονοπάτια KEGG που ρυθμίζονται μοναδικά μεταξύ των καταστάσεων Gastric cancer- NPC cancer biopsy

	<i>Συνολικά// Κοινά μονοπάτια</i>	<i>miRNAs</i>
<i>Gastric cancer biopsy</i>	23//13	
Hepatocellular carcinoma (p=7.58E-05)		BART22

Salmonella infection (p=8.52E-05)		BART22
Glioma (p=8.52E-05)		BART22
Pathways of neurodegeneration - multiple diseases (p=9.67E-05)		BART22
Wnt signaling pathway (p=0.000183)		BART22
Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection (p=0.000229)		BART22
Breast cancer (p=0.000379)		BART22
Ubiquitin mediated proteolysis (p=0.000456)		BART15
Endocytosis (p=0.000467)		BART22
Renal cell carcinoma (p=0.000467)		BART1-5p
<i>NPC cancer biopsy</i>	<i>16//13</i>	
Hippo signaling pathway (p=5.91E-06)		BART19-3p
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells (p=0.000399)		BART6-5p
Proteoglycans in cancer (p=0.000497)		BART6-5p

Πίνακας 13 Μονοπάτια Reactome που ρυθμίζονται μοναδικά μεταξύ των καταστάσεων Gastric cancer- NPC cancer biopsy

	<i>Συνολικά// Κοινά μονοπάτια</i>	<i>miRNAs</i>
<i>Gastric cancer biopsy</i>	<i>70//42</i>	
Membrane Trafficking (p=1.85E-06)		BART15, BART22
Regulation of MECP2 expression and activity (p=8.51E-05)		BART15
PIP3 activates AKT signaling (p=0.000146)		BART10-3p
Post-transcriptional silencing by small RNAs (p=0.000168)		BART15
Ca2+ pathway (p=0.00021)		BART22
Competing endogenous RNAs (ceRNAs) regulate PTEN translation (p=0.00021)		BART15
MET activates RAPI and RAC1 (p=0.000302)		BART1-5p
Signaling by NTRK1 (TRKA) (p=0.00032)		BART22
Signaling by FGFR3 fusions in cancer (p=0.000325)		BART10-3p
Intracellular signaling by second messengers (p=0.000325)		BART10-3p
Signaling by FGFR4 in disease (p=0.000356)		BART10-3p
Activated NTRK2 signals through FRS2 and FRS3 (p=0.000356)		BART10-3p
Vesicle-mediated transport (p=0.000381)		BART15
Cellular Senescence (p=0.000392)		BART15
Gastrin-CREB signalling pathway via PKC and MAPK (p=0.000392)		BART22
Rab regulation of trafficking (p=0.000392)		BART15
Suppression of autophagy (p=0.000393)		BART10-3p
Nef Mediated CD4 Down-regulation (p=0.000401)		BART22
Calcineurin activates NFAT (p=0.000401)		BART22
TP53 Regulates Metabolic Genes (p=0.000401)		BART15
PTEN Regulation (p=0.000401)		BART10-3p

RAB GEFs exchange GTP for GDP on RABs (p=0.000401)		BART15
ESR-mediated signaling (p=0.00041)		BART10-3p
Beta-catenin independent WNT signaling (p=0.000439)		BART22
Diseases of mitotic cell cycle (p=0.000485)		BART15
Aberrant regulation of mitotic cell cycle due to RB1 defects (p=0.000485)		BART15
SMAC (DIABLO) binds to IAPs (p=0.000493)		BART4-5p
SMAC(DIABLO)-mediated dissociation of IAP:caspase complexes (p=0.000493)		BART4-5p
<i>NPC cancer biopsy</i>	<i>56/42</i>	
Cell Cycle (p=2.32E-07)		BART6-5p, BART19-3p
Cell Cycle. Mitotic (p=6.07E-07)		BART6-5p, BART19-3p
FOXO-mediated transcription (p=1.76E-05)		BART19-3p
SMAD2/SMAD3:SMAD4 heterotrimer regulates transcription (p=2.02E-05)		BART6-5p
RORA activates gene expression (p=6.34E-05)		BART18-5p
Transcriptional activity of SMAD2/SMAD3:SMAD4 heterotrimer (p=8.11E-05)		BART6-5p
Potential therapeutics for SARS (p=0.000153)		BART19-3p
SARS-CoV Infections (p=0.000163)		BART19-3p
Regulation of localization of FOXO transcription factors (p=0.000173)		BART19-3p
BMAL1:CLOCK.NPAS2 activates circadian gene expression (p=0.000245)		BART18-5p
RUNX1 regulates transcription of genes involved in BCR signaling (p=0.000245)		BART19-3p
Regulation of glycolysis by fructose 2.6-bisphosphate metabolism (p=0.000245)		BART17-5p
Platelet sensitization by LDL (p=0.000446)		BART6-5p
Signaling by TGF-beta Receptor Complex (p=0.000484)		BART6-5p

Όσον αφορά το γαστρικό καρκίνο παρατηρούμε διαδικασίες σχετικές με μόλυνση (μόλυνση, ενδοκύττωση), με καταβολισμό πρωτεϊνών (πρωτεόλυση) και με καρκίνους. Ενδιαφέρον είναι και ότι ο EBV επαναπρογραμματίζει το μονοπάτι Wnt, επάγοντας τη διεισδυτικότητα (invasiveness, infiltration) καρκίνων του επιθηλίου [28], όμως η συνεισφορά των miRNAs του σε αυτό δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί. Όπως και στην ανάλυση KEGG έτσι και στην Reactome, διαδικασίες με μεταφορά ουσιών από τις μεμβράνες (membrane trafficking, Vesicle-mediated transport), το ανοσοποιητικό (Suppression of autophagy) και διαδικασίες που η απορρύθμισή τους σχετίζεται με την πορεία νεοπλασιών φαίνεται να επηρεάζονται από τα EBV miRNAs.

Στις βιοψίες από ρινοφαρυγγικό καρκίνο εντοπίζουμε ρυθμιστική δράση στο μονοπάτι Hippo, που έχει βρεθεί ότι μόριά του (YAP, TAZ, TEADs) αλληλεπιδρούν με ρυθμιστικές περιοχές-υποκινητές στο EBV γονιδίωμα επάγοντας τη λυτική επανενεργοποίησή του [29]. Πέρα από διαδικασίες που έχουν ήδη αναφερθεί σε ένα βαθμό παραπάνω, ενδιαφέρον εμφανίζει μια σειρά από διαδικασίες που σχετίζονται με μόλυνση και μονοπάτια σχετικά με θεραπευτικές εφαρμογές σε ιούς SARS-CoV. Η

αλληλεπίδραση μεταξύ ρινοφαρυγγικού καρκίνου και SARS-CoV-2 έχει αναφερθεί ήδη [30] και η πιθανή επανενεργοποίηση του EBV προσθέτει ένα ακόμα επίπεδο πολυπλοκότητας στα υφιστάμενα ρυθμιστικά δίκτυα.

Εν ολίγοις, και στις βιοψίες διακρίνουμε πως σε διαφορετικούς καρκίνους εκφράζονται διαφορετικά EBV miRNAs και διαφορετικές διαδικασίες του ξενιστή καταλήγουν να βρίσκονται υπό ρύθμιση.

3.2.6 Σύγκριση 6: Λυτικός κύκλος έναντι λανθάνουσας φάσης II

Η ανασκόπηση αναφέρεται στα miRNAs του EBV που εμπλέκονται στις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή. Ο EBV μπορεί να προκαλέσει ισόβια λανθάνουσα λοίμωξη στον ξενιστή λόγω της ισορροπίας μεταξύ EBV και ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Τέσσερις τύποι λανθάνουσας κατάστασης (0, I, II, III) ορίζονται ανάλογα με το πρότυπο έκφρασης των λανθανόντων γονιδίων του EBV και ταυτόχρονα συνδέονται με έναν συγκεκριμένο τύπο όγκου. Στην παρούσα σύγκριση συγκρίναμε το λυτικό κύκλο με τη λανθάνουσα κατάσταση II [31] (Πίνακες 16-17). Λόγω συνάφειας, ο σχολιασμός των αποτελεσμάτων θα γίνει στην επόμενη ενότητα όπου συγκρίνονται ο λυτικός κύκλος με τη λανθάνουσα κατάσταση τύπου III.

Πίνακας 14 Μονοπάτια KEGG που ρυθμίζονται μοναδικά μεταξύ των καταστάσεων lytic cycle-latency II

	Συνολικά// Κοινά μονοπάτια	miRNAs
Lytic cycle	10//3	
Viral carcinogenesis (p=0.000196)		BART1-3p
Measles (p=0.000217)		BHRF1-2-3p
Chronic myeloid leukemia (p=0.000217)		BART1-3p
Gastric cancer (p=0.000217)		BART1-3p
MicroRNAs in cancer (p=0.000265)		BART1-3p
Human papillomavirus infection (p=0.000284)		BART1-3p
Transcriptional misregulation in cancer (p=0.000451)		BART1-3p

Πίνακας 15 Μονοπάτια Reactome που ρυθμίζονται μοναδικά μεταξύ των καταστάσεων lytic cycle-latency II

	Συνολικά// Κοινά μονοπάτια	miRNAs
Lytic cycle	33//21	
G1/S-Specific Transcription (p=4.74E-05)		BHRF1-2-3p
Diseases of signal transduction by growth factor receptors and second messengers (p=6.17E-05)		BART1-3p
Epigenetic regulation of gene expression (p=0.000182)		BART1-3p
PI3K/AKT Signaling in Cancer (p=0.000217)		BART1-3p
Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF) (p=0.000297)		BHRF1-3

Chromatin modifying enzymes (p=0.000297)		BART1-3p
Mitotic G1 phase and G1/S transition(p=0.000297)		BHRF1-2-3p
Chromatin organization (p=0.000297)		BART1-3p
Constitutive Signaling by AKT1 E17K in Cancer (p=0.000297)		BART1-3p
G0 and Early G1 (p=0.000339)		BHRF1-2-3p
TP53 Regulates Transcription of Genes Involved in G1 Cell Cycle Arrest (p=0.000354)		BART1-3p
Signaling by NTRKs (p=0.000425)		BART1-3p
<i>Latency II</i>	<i>31//21</i>	
HuR (ELAVL1) binds and stabilizes mRNA (p=2.37E-06)		BART5-5p
Regulation of RUNX1 Expression and Activity (p=2.37E-06)		BART5-5p
TP53 regulates transcription of additional cell cycle genes whose exact role in the p53 pathway remain uncertain (p=2.52E-05)		BART5-5p
Deadenylation of Mrna (p=5.02E-05)		BART5-5p
TGF-beta receptor signaling activates SMADs (p=0.000323)		BART5-5p
Loss of Function of SMAD4 in Cancer (p=0.000323)		BART5-5p
SMAD4 MH2 Domain Mutants in Cancer (p=0.000323)		BART5-5p
SMAD2/3 MH2 Domain Mutants in Cancer (p=0.000323)		BART5-5p
Oncogenic MAPK signaling (p=0.000323)		BART5-5p
Oncogene Induced Senescence (p=0.000392)		BART5-5p

3.2.7 Σύγκριση 7: Λυτικός κύκλος έναντι λανθάνουσας φάσης III

Από την ίδια ανασκόπηση με της **Σύγκρισης 6**, εδώ συγκρίναμε το λυτικό κύκλο με τη λανθάνουσα κατάσταση III (**Πίνακες 18-19**) [31].

Πίνακας 16 Μονοπάτια KEGG που ρυθμίζονται μοναδικά μεταξύ των καταστάσεων lytic cycle-latency III

	<i>Συνολικά// Κοινά μονοπάτια</i>	<i>miRNAs</i>
<i>Lytic cycle</i>	<i>10//4</i>	
Viral carcinogenesis (p=0.000196)		BART1-3p
Gastric cancer (p=0.000217)		BART1-3p
MicroRNAs in cancer (p=0.000265)		BART1-3p
p53 signaling pathway (p=0.000284)		BART3-3p
Human papillomavirus infection (p=0.000284)		BART1-3p
Transcriptional misregulation in cancer (p=0.000451)		BART1-3p
<i>Latency III</i>	<i>10//4</i>	
Renal cell carcinoma (p=4.51E-06)		BART1-5p, BART11-5p
Hippo signaling pathway (p=6.15E-06)		BART19-3p
Glioma (p=0.000257)		BART11-5p

Non-small cell lung cancer (p=0.000257)		BART11-5p
ErbB signaling pathway (p=0.000287)		BART11-5p
Prostate cancer (p=0.000478)		BART11-5p

Πίνακας 17 Μονοπάτια Reactome που ρυθμίζονται μοναδικά μεταξύ των καταστάσεων *lytic cycle-latency III*

	Συνολικά// Κοινά μονοπάτια	miRNAs
<i>Lytic cycle</i>	33//21	
Diseases of signal transduction by growth factor receptors and second messengers (p=6.2E-05)		BART1-3p
PIP3 activates AKT signaling (p=0.00015)		BART1-3p
Constitutive Signaling by AKT1 E17K in Cancer (p=0.0003)		BART1-3p
Intracellular signaling by second messengers (p=0.0003)		BART10-3p
SUMOylation (p=0.00033)		BART3-3p
Disease (p=0.00034)		BART3-3p
Suppression of autophagy (p=0.00034)		BART10-3p
PTEN Regulation (p=0.00035)		BART10-3p
TP53 Regulates Transcription of Genes Involved in G1 Cell Cycle Arrest (p=0.00035)		BART1-3p
ESR-mediated signaling (p=0.00037)		BART10-3p
TET1.2.3 and TDG demethylate DNA (p=0.00038)		BART3-3p
Signaling by NTRKs (p=0.00043)		BART1-3p
<i>Latency III</i>	66//21	
Regulation of RUNX1 Expression and Activity (p=4.3E-08)		BART5-5p, BART19-3p
HuR (ELAVL1) binds and stabilizes mrna (p=3.4E-06)		BART5-5p
FOXO-mediated transcription (p=2.7E-05)		BART19-3p
Cell Cycle (p=2.8E-05)		BART19-3p
TP53 regulates transcription of additional cell cycle genes whose exact role in the p53 pathway remain uncertain (p=3E-05)		BART5-5p
Deadenylation of mRNA (p=5.9E-05)		BART5-5p
Signaling by FGFR1 (p=6.3E-05)		BART11-5p
Cell Cycle. Mitotic (p=9E-05)		BART19-3p
FRS-mediated FGFR3 signaling (p=0.00011)		BART11-5p
FRS-mediated FGFR4 signaling (p=0.00013)		BART11-5p
Signaling by FGFR3 in disease (p=0.00013)		BART11-5p
Signaling by FGFR3 point mutants in cancer (p=0.00013)		BART11-5p
FRS-mediated FGFR1 signaling (p=0.00014)		BART11-5p
FRS-mediated FGFR2 signaling (p=0.00016)		BART11-5p
Downstream signaling of activated FGFR3 (p=0.00016)		BART11-5p
Signaling by NTRK2 (TRKB) (p=0.00016)		BART11-5p
Potential therapeutics for SARS (p=0.00016)		BART19-3p
SARS-CoV Infections (p=0.00017)		BART19-3p
Downstream signaling of activated FGFR4 (p=0.00018)		BART11-5p
Regulation of localization of FOXO transcription factors (p=0.00018)		BART19-3p
MET activates RAP1 and RAC1 (p=0.00021)		BART1-5p

Downstream signaling of activated FGFR2 (p=0.00023)		BART11-5p
Downstream signaling of activated FGFR1 (p=0.00025)		BART11-5p
RUNX1 regulates transcription of genes involved in BCR signaling (p=0.00025)		BART19-3p
Oncogenic MAPK signaling (p=0.00026)		BART5-5p
Signalling to ERKs (p=0.00028)		BART11-5p
Signaling by FGFR (p=0.00028)		BART11-5p
SOS-mediated signalling (p=0.00035)		BART11-5p
TGF-beta receptor signaling activates SMADs (p=0.00035)		BART5-5p
Loss of Function of SMAD4 in Cancer (p=0.00035)		BART5-5p
SMAD4 MH2 Domain Mutants in Cancer (p=0.00035)		BART5-5p
SMAD2/3 MH2 Domain Mutants in Cancer (p=0.00035)		BART5-5p
RAS signaling downstream of NF1 loss-of-function variants (p=0.00035)		BART11-5p
TFAP2 (AP-2) family regulates transcription of cell cycle factors (p=0.00035)		BHRF1-2-5p
Signaling by FGFR3 (p=0.00036)		BART11-5p
Cytokine Signaling in Immune system (p=0.00037)		BART11-5p
Signaling by FGFR4 (p=0.00037)		BART11-5p
Activated NTRK3 signals through RAS (p=0.0004)		BART11-5p
Signaling by FGFR2 in disease (p=0.0004)		BART11-5p
Oncogene Induced Senescence (p=0.00042)		BART5-5p
Signaling by Interleukins (p=0.00043)		BHRF1-2-5p
EGFR Transactivation by Gastrin (p=0.00045)		BART11-5p
SHC-related events triggered by IGF1R (p=0.00045)		BART11-5p
Activated NTRK2 signals through RAS (p=0.00045)		BART11-5p

Οι δύο τελευταίες Συγκρίσεις είναι σχετικές με τη λυτική φάση και διαφορετικές εκδοχές της λανθάνουσας φάσης. Είναι ήδη γνωστό ότι η λυτική φάση αναδεικνύει την ιική καρκινογένεση και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό και την εξέλιξη των όγκων, ενώ έχουν βρεθεί και μηχανισμοί με τους οποίους τα λυτικά προϊόντα του EBV ρυθμίζουν ογκογενετικά μονοπάτια [32]. Τα παραπάνω αναδεικνύονται και σε επίπεδο ρύθμισης από τα ιικά miRNAs.

Στις λανθάνουσες φάσεις, ενδιαφέρον εμφανίζουν κάποιες ανοσολογικές διαδικασίες, όπως η «RUNX1 regulates transcription of genes involved in BCR signaling». Αφενός, αναδεικνύεται η δυνατότητα του EBV να επηρεάζει την κυτταρική αύξηση (growth) των Β-κυττάρων μέσω του ελέγχου της μεταγραφής από τον παράγοντα RUNX. Η χειραγώγηση των πρωτεϊνών RUNX από τον EBV έχει ήδη χαρακτηριστεί σχετικά με μοριακές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τη δημιουργία αθανατοποιημένων κυτταρικών σειρών προερχόμενων από Β κύτταρα (Lymphoblastoid Cell Lines. LCLs) [33]. Ενδιαφέρουσα είναι και η σηματοδότηση των κυτοκινών στο ανοσοποιητικό σύστημα, αφού έχει βρεθεί ότι η LMP1 και άλλες λανθάνουσες πρωτεΐνες του EBV ρυθμίζουν κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτοκρινείς και παρακρινείς βρόχους που είναι πιθανό να προάγουν τον κυτταρικό μετασχηματισμό και να διαμορφώνουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις [34].

Μέσα από τις τελευταίες αυτές συγκρίσεις αναδεικνύεται η συνέργεια μεταξύ καλά χαρακτηρισμένων ικών προϊόντων και των ικών miRNAs, τόσο στη ρύθμιση σε καρκινογενετικά, όσο και σε ανοσολογικά μοριακά μονοπάτια.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Πρόσφατα έχουν εντοπιστεί miRNAs στο γονιδίωμα πολλών ιών. Η συντριπτική πλειονότητα των ικών miRNAs κωδικοποιείται από την οικογένεια των ερπητοϊών, συμπεριλαμβανομένων παθογόνων, όπως ο EBV και οι ιοί του απλού έρπητα (HSVs). Αυτοί οι ιοί κωδικοποιούν τα δικά τους miRNAs και/ή χειραγωγούν την έκφραση των ανθρώπινων miRNAs για να διευκολύνουν τους αντίστοιχους κύκλους μόλυνσης. Έχει βρεθεί ότι αυτά τα ικά miRNAs ρυθμίζουν θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες.

Συγκεκριμένα ο EBV έχει βρεθεί ότι παράγει πολλαπλά miRNAs σε όλη την διάρκεια της λανθάνουσας φάσης, συμπεριλαμβανομένων δύο ομάδων miRNAs: BART miRNAs και BHRF1 miRNAs. Μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί 44 ώριμα miRNAs του EBV τα οποία στοχεύουν ικά και κυτταρικά γονίδια. Ορισμένα ικά miRNAs φαίνεται ότι ασκούν σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση μιας λανθάνουσας ιικής λοίμωξης μέσω της καταστολής μιας αποτελεσματικής ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή ή μέσω του αποκλεισμού των αποπτωτικών διαδικασιών στα μολυσμένα κύτταρα.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου των μικρών RNAs ικής προέλευσης και πιο συγκεκριμένα αυτών του ιού EBV. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε το DIANA-miRPath ώστε να κάνουμε αναλύσεις εμπλουτισμού των μονοπατιών αξιοποιώντας τα miRNAs του EBV. Με βάση τα αποτελέσματα διαφαίνεται ότι υπάρχει συμμετοχή των EBV miRNAs στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων του ξενιστή στις καταστάσεις που επιλέχθηκαν για μελέτη. Η έκφραση δεν επηρεάζεται απόλυτα, αλλά εμφανίζονται κάποιες διαφορές οι οποίες θα μπορούσαν να είναι ενδεικτικές και να αξίζουν περεταίρω διερεύνηση. Προκύπτει ότι ο EBV έχει εξελιχθεί ώστε να εκμεταλλεύεται τα δικά του miRNAs για να μεταβάλλει την έκφραση μιας ποικιλίας γονιδίων που σχετίζονται με την ιική λανθάνουσα κατάσταση, την καταστολή του όγκου, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τον μετασχηματισμό. Το πιο σημαντικό είναι ότι τα miRNAs του EBV παίζουν ισχυρό ρόλο στην υπονόμηση των ανοσολογικών αποκρίσεων του ξενιστή. Ενδιαφέρουσα είναι και η συσχέτισή του και με τον SARS-CoV.

Εν κατακλείδι, ο ακριβής ρόλος των ικών miRNAs δεν είναι ακόμη αποσαφηνισμένος. Για τον λόγο αυτό σημαντικό θα ήταν να εντοπιστούν περισσότεροι στόχοι των ικών και των απορυθμισμένων κυτταρικών miRNAs. Από τις συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν διαφαίνεται ότι διαφορετικά miRNAs παίζουν ρόλο στη ρύθμιση ξεχωριστών μονοπατιών ανά υπό μελέτη συνθήκη και κυτταρικό τύπο. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι, ενώ αυτό μέχρι στιγμής δεν συμβαίνει, θα ήταν χρήσιμο να ενσωματώνονται από κοινού miRNAs και του ιού και του ξενιστή σε αναλύσεις μονοπατιών σε ασθένειες που σχετίζονται με μόλυνση από EBV.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. O'Brien, J., et al., *Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation*. *Frontiers in endocrinology*, 2018. **9**: p. 402.
2. Lorenzo Pisarello, M.J., et al., *MicroRNAs in the cholangiopathies: pathogenesis, diagnosis, and treatment*. *Journal of Clinical Medicine*, 2015. **4**(9): p. 1688-1712.
3. Suh, M.-R., et al., *Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs*. *Developmental biology*, 2004. **270**(2): p. 488-498.
4. Riolo, G., et al., *miRNA targets: from prediction tools to experimental validation*. *Methods and protocols*, 2020. **4**(1): p. 1.
5. Ruggiero, E. and S.N. Richter, *G-quadruplexes and G-quadruplex ligands: targets and tools in antiviral therapy*. *Nucleic acids research*, 2018. **46**(7): p. 3270-3283.
6. Lieberman, P.M., *Epigenetics and genetics of viral latency*. *Cell host & microbe*, 2016. **19**(5): p. 619-628.
7. Qureshi, A., et al., *VIRmiRNA: a comprehensive resource for experimentally validated viral miRNAs and their targets*. *Database*, 2014. **2014**.
8. Karagkouni, D., et al., *DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions*. *Nucleic acids research*, 2018. **46**(D1): p. D239-D245.
9. Kozomara, A., M. Birgaoanu, and S. Griffiths-Jones, *miRBase: from microRNA sequences to function*. *Nucleic acids research*, 2019. **47**(D1): p. D155-D162.
10. Birney, E., et al., *An overview of Ensembl*. *Genome research*, 2004. **14**(5): p. 925-928.
11. Heinicke, F., et al., *MicroRNA expression differences in blood-derived CD19+ B cells of methotrexate treated rheumatoid arthritis patients*. *Frontiers in immunology*, 2021. **12**: p. 663736.
12. Pryke, A., S. Mostaghim, and A. Nazemi. *Heatmap visualization of population based multi objective algorithms*. in *International conference on evolutionary multi-criterion optimization*. 2007. Springer.
13. Kanehisa, M. and S. Goto, *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes*. *Nucleic acids research*, 2000. **28**(1): p. 27-30.
14. Fabregat, A., et al., *The reactome pathway knowledgebase*. *Nucleic acids research*, 2016. **44**(D1): p. D481-D487.
15. Pantaleao, L.C. and S.E. Ozanne, *Small RNA sequencing: a technique for miRNA profiling*, in *Investigations of Early Nutrition Effects on Long-Term Health*. 2018, Springer. p. 321-330.
16. Forero, D.A., et al., *qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs*. *Biotechniques*, 2019. **67**(4): p. 192-199.
17. Vlachos, I.S., et al., *DIANA miRPath v. 2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways*. *Nucleic acids research*, 2012. **40**(W1): p. W498-W504.
18. Lo, A.K.F., et al., *Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. **104**(41): p. 16164-16169.
19. Caruso, A., et al., *Methotrexate inhibits SARS-CoV-2 virus replication “in vitro”*. *Journal of medical virology*, 2021. **93**(3): p. 1780-1785.

20. Easter, M., et al., *Fibroblast growth factor receptor 4 deficiency mediates airway inflammation in the adult healthy lung?* *Frontiers in Medicine*, 2020. **7**: p. 317.
21. Kang, D., R.L. Skalsky, and B.R. Cullen, *EBV BART microRNAs target multiple pro-apoptotic cellular genes to promote epithelial cell survival.* *PLoS pathogens*, 2015. **11**(6): p. e1004979.
22. Luo, Y., et al., *Signaling pathways of EBV-induced oncogenesis.* *Cancer Cell International*, 2021. **21**(1): p. 1-11.
23. Zhang, G., et al., *Circulating Epstein-Barr virus microRNAs miR-BART7 and miR-BART13 as biomarkers for nasopharyngeal carcinoma diagnosis and treatment.* *International journal of cancer*, 2015. **136**(5): p. E301-E312.
24. Ferguson, H.R., M.P. Smith, and C. Francavilla, *Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) and noncanonical partners in cancer signaling.* *Cells*, 2021. **10**(5): p. 1201.
25. Wu, W., et al., *Effects of AKT1 E17K mutation hotspots on the biological behavior of breast cancer cells.* *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2020. **13**(3): p. 332.
26. Shinozaki-Ushiku, A., et al., *Profiling of virus-encoded microRNAs in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and their roles in gastric carcinogenesis.* *Journal of virology*, 2015. **89**(10): p. 5581-5591.
27. Wong, A.M.G., et al., *Profiling of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs in nasopharyngeal carcinoma reveals potential biomarkers and oncomirs.* *Cancer*, 2012. **118**(3): p. 698-710.
28. Birdwell, C.E., et al., *Epstein-Barr virus stably confers an invasive phenotype to epithelial cells through reprogramming of the WNT pathway.* *Oncotarget*, 2018. **9**(12): p. 10417.
29. Van Sciver, N., et al., *Hippo signaling effectors YAP and TAZ induce Epstein-Barr Virus (EBV) lytic reactivation through TEADs in epithelial cells.* *PLoS Pathogens*, 2021. **17**(8): p. e1009783.
30. Qiu, W., et al., *Case Report: a nasopharyngeal cancer patient got COVID-19 during radiochemotherapy in Wuhan.* *Frontiers in Oncology*, 2020. **10**: p. 1755.
31. Wang, M., et al., *Epstein-Barr virus-encoded microRNAs as regulators in host immune responses.* *International journal of biological sciences*, 2018. **14**(5): p. 565.
32. Rosemarie, Q. and B. Sugden, *Epstein-Barr Virus: How Its Lytic Phase Contributes to Oncogenesis.* *Microorganisms*, 2020. **8**(11): p. 1824.
33. Gunnell, A., et al., *RUNX super-enhancer control through the Notch pathway by Epstein-Barr virus transcription factors regulates B cell growth.* *Nucleic acids research*, 2016. **44**(10): p. 4636-4650.
34. Mosialos, G., *Cytokine signaling and Epstein-Barr virus-mediated cell transformation.* *Cytokine & growth factor reviews*, 2001. **12**(2-3): p. 259-270.