



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ – ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ ΠΑΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΦΗΒΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη των πολυμορφισμών  
στα γονίδια της οδού βιογένεσης των microRNAs *DICER1* και *AGO1*  
στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία παιδιών και εφήβων**

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΥΡΙΑΚΙΔΗΣ**

Παιδίατρος – Διευθυντής Υγειονομικού ΣΕΑΠ

Ηράκλειο, Φεβρουάριος 2024

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΥΤΥΧΙΑ ΣΤΕΙΑΚΑΚΗ

Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΤΡΑΓΙΑΝΝΙΔΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Παιδιατρικής - Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Α.Π.Θ.

ΙΩΑΝΝΑ ΚΕΚΛΙΚΟΓΛΟΥ

Επίκουρη Καθηγήτρια Τομέα Βιοχημείας, Μοριακής Βιολογίας & Βιολογίας Κυττάρου & Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή

Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης

© 2024

Ιωάννης Κυριακίδης  
ALL RIGHTS RESERVED

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ολοκληρώνοντας τη συγγραφή της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Τριμελή Επιτροπή και πρωτίστως στην επιβλέπουσά μου, Καθηγήτρια κα Ευτυχία Στειακάκη, για την πολύτιμη βοήθειά της, τη συνολική καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω σύντροφο, οικογένεια και φίλους που επέδειξαν όλο αυτό το διάστημα αμέριστη αγάπη και μακροθυμία.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	5
Abstract	7
Συνοπτομογραφίες	9
1. Εισαγωγή	11
1.1. Τα μη-κωδικά μόρια RNA και η παρεμβολή RNA	11
1.2. Βιογένεση και μηχανισμοί δράσης των microRNAs	13
1.3. Βιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά της ΟΜ	22
1.4. Ο ρόλος των microRNAs στην ΟΜ	33
1.5. SNPs στα γονίδια της οδού βιογένεσης των microRNAs και νεοπλασία	35
2. Υλικό και Μεθοδολογία	45
2.1. Πληθυσμός μελέτης	46
2.2. Μέθοδοι	47
2.2.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα	47
2.2.2. Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα	53
2.2.3. Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του εκχυλισμένου γενωμικού DNA	55
2.2.4. Προσδιορισμός γονοτύπου με RT-qPCR	58
2.2.5. Στατιστική ανάλυση	65
3. Αποτελέσματα	65
4. Συζήτηση	75
5. Συμπεράσματα	81
Βιβλιογραφία	83

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Εισαγωγή:** Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) αποτελεί τη συχνότερη νεοπλασία στα παιδιά και στους έφηβους. Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί επιβίωση ελεύθερη συμβαμάτων και συνολική επιβίωση άνω του 85 % και 90 %, αντίστοιχα. Η υποτροπή παραμένει ένα μεγάλο πρόβλημα και σχετίζεται με υψηλά ποσοστά θνητότητας. Στην προσπάθεια έγκαιρης διάγνωσης της νόσου, αλλά και της πρώιμης ανίχνευσης των περιπτώσεων που θα υποτροπιάζουν ή θα έχουν δυσμενή κατάληξη, τα microRNAs έχουν επιστρατευτεί πρόσφατα ως βιοδείκτες. Τα microRNAs είναι μικρά ρυθμιστικά μη κωδικά μόρια RNA με διακριτούς γονιδιακούς στόχους και βιολογική συμπεριφορά και με ενεργό ρόλο στη διαφοροποίηση της λεμφικής σειράς και τη λευχαιμογένεση. Η ωρίμανση των miRNAs περιλαμβάνει επεξεργασία του πρωτογενούς pri-miRNA μεταγράφου προς πρόδρομο pre-miRNA από το σύμπλοκο του μικροεπεξεραστή, εξαγωγή στο κυτταρόπλασμα και επεξεργασία του pre-miRNA από την Dicer προς την ώριμη μορφή του. Η κύρια λειτουργία των miRNAs επιτελείται μέσω της σύνδεσής τους με το σύμπλοκο επαγόμενης από το RNA σίγησης (RNA-induced silencing complex ή RISC), κύριο ρόλο στο οποίο έχουν οι πρωτεΐνες Αργοναύτες (AGO). Τα κριτήρια με τα οποία επιλέχθηκαν οι πολυμορφισμοί rs3742330 στο γονίδιο *DICER1* και rs636832 στο γονίδιο *AGO1* ήταν το πλήθος των δημοσιευμένων μελετών ασθενών-μαρτύρων και η τεκμηρίωση της σχέσης των γονοτύπων τους με τα επίπεδα των microRNAs και τη λειτουργικότητα του RISC. Η συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για τους δύο πολυμορφισμούς επιβεβαίωσε τη στατιστικώς σημαντική συσχέτιση των γονοτύπων τους με διάφορους τύπους νεοπλασιών.

**Σκοπός** της παρούσας μελέτης ασθενών-μαρτύρων ήταν να διερευνηθεί η συχνότητα των αλληλόμορφων στους πολυμορφισμούς rs3742330 στο γονίδιο *DICER1* και rs636832 στο γονίδιο *AGO1* και να μελετηθεί η σχέση τους με την ΟΛΛ σε παιδιά και εφήβους. Πρόκειται για την πρώτη μελέτη των πολυμορφισμών αυτών στην Ελλάδα, ενώ αποτελεί και την πρώτη μελέτη στη βιβλιογραφία για τον rs3742330 στο γονίδιο *DICER1* στην ΟΛΛ. Επιπλέον, διερευνήθηκε η σχέση των πολυμορφισμών αυτών με την εμφάνιση υποτροπής και την έκβαση της νόσου.

**Μέθοδοι:** Μελετήθηκαν 216 δείγματα, εκ των οποίων τα 99 δείγματα προήλθαν από υγιή παιδιά, εφήβους και νεαρούς ενήλικες και τα 117 δείγματα αντιστοιχούν σε παιδιά και έφηβους με ΟΛΛ (διάμεση ηλικία 4,25 έτη, 57,3 % αγόρια) που έχουν διαγνωστεί και έχουν λάβει θεραπεία στην Κλινική Αιματολογίας – Ογκολογίας Παίδων του

Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠαΓΝΗ). Η γονοτύπηση έγινε με TaqMan® SNP Genotyping Assay και RT-qPCR σε εξοπλισμό BioRad CFX96.

**Αποτελέσματα:** Το έλασσον αλληλίο του πολυμορφισμού rs3742330 στο γονίδιο *DICER1* συσχετίστηκε σημαντικά με την εμφάνιση της ΟΜ σε παιδιά και εφήβους με OR 9,2 με 95 % CI 1,126 έως 75,154 και  $p = 0,019$  (υπολειπόμενο γενετικό μοντέλο GG έναντι AA+AG). Η παρουσία του ελάσσονος αλληλόμορφου G προσδίδει από μόνη της κίνδυνο για την ανάπτυξη της νόσου ( $p = 0,048$ ). Ομοζυγώτες του ελάσσονος αλληλόμορφου A για τον rs636832 του *AGO1* βρέθηκαν μόνο μεταξύ των ασθενών με ΟΜ και ο λόγος πιθανοτήτων σύμφωνα με το υπολειπόμενο γενετικό μοντέλο (AA έναντι GG+AG) ήταν 26,516 με 95 % CI 1,538 έως 457,288 και  $p = 0,024$ . Στην περίπτωση του rs636832, ο γονότυπος AG φάνηκε να δρα προστατευτικά έναντι της νόσου (ετεροζυγωτικό γενετικό μοντέλο σύγκρισης AG έναντι GG: OR 0,292 με 95 % CI 0,111 έως 0,769 και  $p = 0,006$ ). Η παρουσία του AA/AA συνδυασμού γονότυπων (σε rs3742330 και rs636832, αντίστοιχα) συσχετίστηκε σημαντικά με τη διάγνωση της ΟΜ (OR 31,075 με 95 % CI 1,772 έως 544,863 και  $p = 0,0187$ ), ενώ ο συνδυασμός AG/GG συνδέθηκε με τη διάγνωση της ΟΜ σε μεγαλύτερη ηλικία ( $10,6 \pm 2,6$  έτη και  $p = 0,042$ ). Οι γονότυποι των δύο πολυμορφισμών δε συσχετίστηκαν σημαντικά ούτε με την υποτροπή, ούτε με τις περιπτώσεις που υπέκυψαν στην ΟΜ.

**Συμπεράσματα:** Οι φορείς του ελάσσονος αλληλόμορφου G στον rs3742330 (AG+GG) αναμένεται να έχουν σημαντικά χαμηλότερη έκφραση mRNA της Dicer και συσχετίστηκαν με ΟΜ. Οι ομοζυγώτες του ελάσσονος αλληλομόρφου A στον rs636832 που συσχετίστηκαν με τη νόσο δεν αναμένεται να έχουν χαμηλότερη έκφραση *AGO1*, αλλά μειωμένη λειτουργικότητα του RISC και αυξημένα Th17. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη βιβλιογραφία πως τα microRNAs μπορούν να προκύψουν με εναλλακτική Dicer-ανεξάρτητη οδό, όμως η μείωση της καταστροφής των mRNA-στόχων από τις πρωτεΐνες Αργοναύτες σχετίζεται σημαντικά με την εμφάνιση της ΟΜ. Περαιτέρω μελέτες με ικανό αριθμό συμμετεχόντων δύνανται να επιβεβαιώσουν τα ευρήματα της παρούσας έρευνας και να διερευνήσουν τη σχέση των πολυμορφισμών αυτών με την υποτροπή της νόσου και τους δείκτες επιβίωσης.

**Λέξεις-κλειδιά:** οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, microRNA, πολυμορφισμός, Dicer, Argonaute, παιδιά, έφηβοι, υποτροπή, επιβίωση

## ABSTRACT

**Background:** Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most prevalent neoplasia of childhood. During the last decades, event-free and overall survival have exceeded 85% and 90%, respectively. Nevertheless, relapsed ALL remains a major issue and has been linked with high mortality rates. MicroRNAs have been recently utilized as biomarkers of relapsed/refractory disease and adverse outcomes. MicroRNAs are regulatory small non-coding RNAs with distinct gene targets and biological features (exhibiting oncogenic or tumor-suppressor functions). MicroRNAs were recently identified as key regulators of lymphoid differentiation, playing a significant role in leukemia biology, whereas miRNA signatures can be used to recognize ALL patients, discriminate high-risk subtypes, and define prognosis, thus enhancing our ability to predict and improve outcomes and survival. Maturation of miRNAs involves the processing of pri-miRNAs to pre-miRNAs by the Microprocessor complex, their export to the cytoplasm, and their subsequent processing by Dicer within the RNA-induced silencing complex (RISC), which initiates the RNA interference process mediated by Argonaute (AGO) proteins. The systematic review of the literature revealed that specific genotypes of SNPs rs3742330 in *DICER1* and rs636832 in *AGO1* have been associated significantly with the occurrence of several cancers.

**Aims:** The present case-control study investigated the frequencies of genotypes in rs3742330 *DICER1* and rs636832 *AGO1* and their association with relapsed ALL and mortality. This is the first study of both SNPs in the Greek population, while it is the first study in the literature to investigate the role of *DICER1* rs3742330 in ALL.

**Methods:** 216 individuals participated in the study. The control group consisted of 99 healthy children, adolescents, and young adults, while 117 children and adolescents with ALL were included in the ALL group. Genotyping was performed using RT-qPCR and TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assay in CFX96.

**Results:** Minor G allele of rs3742330 in *DICER1* has been associated with ALL occurrence, described best by the recessive genetic model (GG vs. AA+AG) OR 9.2 (95% CI: 1.1–75.2; p=0.019). Minor allele A homozygotes of rs636832 in *AGO1* have been only identified among ALL patients, and OR under the recessive model (AA vs. GG+AG) was 26.5 (95% CI: 1.5–457.3; p=0.024). Moreover, the AG genotype of rs636832 seems protective against ALL (heterozygote model AG vs. GG) with OR 0.3 (95% CI: 0.1–0.8; p=0.006). The combination of genotypes AA/AA in rs3742330 and rs636832, respectively, was associated with ALL diagnosis: OR 31.1 (95% CI: 1.8–

544.9;  $p=0.0187$ ), while the AG/GG combination was associated with ALL onset at higher age ( $10.6 \pm 2.6$  years old;  $p=0.042$ ). Both relapsed and deceased cases failed to correlate significantly with a specific genotype.

**Conclusion:** Minor allele G carriers in rs3742330 (AG+GG) are expected to have lower Dicer mRNA levels and have been associated with ALL. AA genotype carriers of rs636832, who were significantly correlated with the disease, are not expected to have lower levels of AGO1, but lower RISC functionality and high Th17 populations are anticipated. More studies in the field are needed to confirm the observed associations and investigate the role of these SNPs in relapse and survival rates.

**Keywords:** acute lymphoblastic leukemia; microRNA; polymorphism; Dicer; DICER1; Argonaute; AGO1; RISC; rs3742330; rs636832; relapse; survival



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

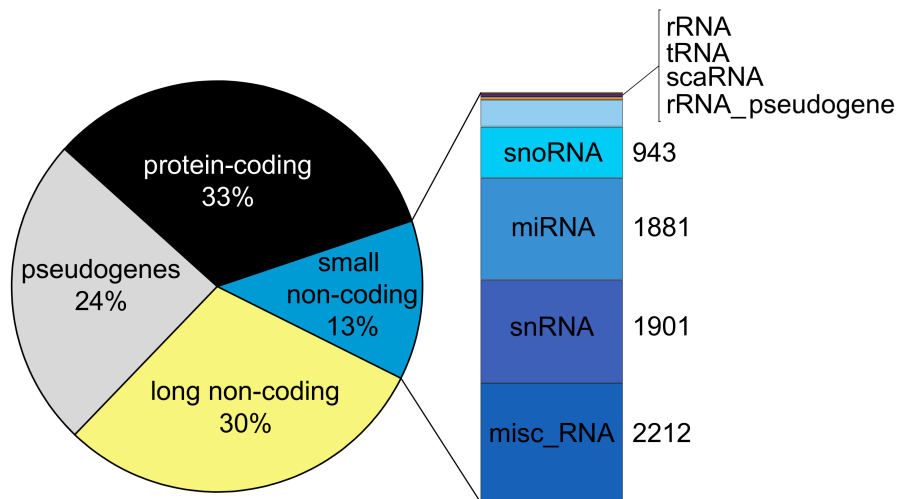
- ΟΛΛ = οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία  
ΧΛΛ = χρόνια λεμφοβλαστική λευχαιμία  
ΧΜΘ = χημειοθεραπεία  
ΧΜΛ = χρόνια μυελογενής λευχαιμία  
Α, C, T, G βάσεις = οι βάσεις αδερίνη, κυτοσίνη, θυμίνη, γουανίνη  
AGO = Argonaute ή πρωτεΐνη Αργοναύτης  
AYA = adolescents and young adults  
CI = confidence interval ή διάστημα εμπιστοσύνης  
Cq = quantification cycle ή κύκλος στην ποσοτικοποίηση  
DGCR8 = DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8 (υπομονάδα μικροεπεξεργαστή)  
DNA = deoxyribonucleic acid ή δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ  
EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid ή αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ  
eIF = eukaryotic initiation factor ή παράγοντας έναρξης της μετάφρασης  
EIF2C1 = Eukaryotic Translation Initiation Factor 2C, 1 –παλαιότερη ονομασία AGO1  
FISH = fluorescence *in situ* hybridization ή φθορίζων *in situ* υβριδισμός  
gDNA = γενωμικό DNA  
GTP = guanosine-5'-triphosphate ή τριφωσφορική γουανοσίνη  
GWAS = Genome-Wide Association Study ή μελέτη συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος  
HWE = Hardy–Weinberg equilibrium ή ισορροπία Hardy–Weinberg  
lncRNA = long non-coding RNA ή μακρύ μη-κωδικό RNA  
MAF = minor allele frequency ή συχνότητα του ελάσσονος αλληλίου  
miR = microRNA ή miRNA  
mRNA = messenger RNA ή αγγελιαφόρο RNA  
ncRNA = non-coding RNA ή μη-κωδικό RNA  
NGS = next-generation sequencing ή (μαζική παράλληλη) αλληλούχιση νέας γενιάς  
NTC = no template controls ή δείγμα ελέγχου χωρίς υπόστρωμα DNA  
OD = optical density (absorbance) ή οπτική πυκνότητα (απορρόφηση)  
OR = odds ratio ή σχετικός λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων (λόγος αναλογιών)  
PBS = phosphate-buffered saline ή φυσιολογικός ορός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων  
PCR = polymerase chain reaction ή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης  
piRNA = piwi-interacting RNA ή piwi-αλληλεπιδρών RNA

pre-miRNA = precursor miRNA ή πρόδρομο miRNA  
pri-miRNA = primary miRNA ή πρωτογενές miRNA  
RCF = relative centrifugal force ή σχετική φυγόκεντρος δύναμη  
RFU = relative fluorescence unit ή μονάδα σχετικού φθορισμού  
RISC = RNA-induced silencing complex ή σύμπλοκο επαγόμενης από το RNA σίγησης  
RNA = ribonucleic acid ή ριβονουκλεϊκό οξύ  
RNAi = RNA interference ή παρεμβολή RNA  
RNase = ribonuclease ή ριβονουκλεάση  
rpm = rotations per minute ή περιστροφές ανά λεπτό  
RT-qPCR = real-time quantitative PCR ή ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο  
rRNA = ribosomal RNA ή ριβοσωμικό RNA  
SDS = sodium dodecyl sulfate ή δωδεκυλ-θειικό νάτριο  
siRNA = small interfering RNA ή μικρό παρεμβαλλόμενο RNA  
snoRNA = small nucleolar RNA ή μικρό πυρηνισκικό RNA  
SNP = single-nucleotide polymorphism ή μονήρης γενετικός πολυμορφισμός  
SNV = single-nucleotide variant  
snRNA = small nuclear RNA ή μικρό πυρηνικό RNA  
TRBP = Trans-Activation-Responsive RNA-Binding Protein (υπομονάδα RISC)  
tRNA = transfer RNA ή μεταφορικό RNA  
UTR = untranslated region ή αμετάφραστη περιοχή  
WFI = water for injection ή ενέσιμο ύδωρ  
XPO = exportin ή εξπορτίνη

## 1. Εισαγωγή

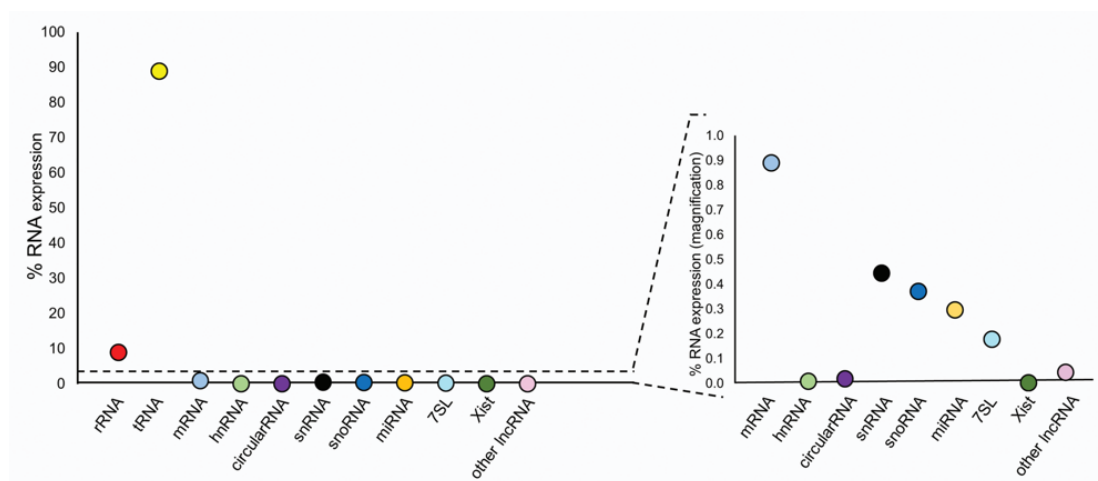
### 1.1. Τα μη-κωδικά μόρια RNA και η παρεμβολή RNA

Σύμφωνα με το κεντρικό δόγμα, η ροή της γενετικής πληροφορίας προχωρά από το DNA μέσω του RNA στην πρωτεΐνη. Τα μόρια RNA δεν περιορίζονται στην λειτουργία ως ενδιάμεσων φορέων της γενετικής πληροφορίας (1). Στα μη-κωδικά RNA (non-coding RNA ή ncRNA) συγκαταλέγονται τα μόρια ριβοσωμικού και μεταφορικού RNA (rRNA και tRNA, αντίστοιχα). Άλλα χαρακτηριστικά παραδείγματα μη-κωδικών μορίων RNA αποτελούν το RNA στοιχείο της τελομεράσης (telomerase RNA component ή TERC), που χρησιμεύει ως εκμαγείο για την αντιγραφή των χρωμοσωμικών άκρων, αλλά και το ειδικό μετάγραφο του ανενεργού χρωμοσώματος X (X-inactive specific transcript ή Xist), το οποίο παίζει κείμερο ρόλο στην απενεργοποίηση του ενός ομολόγου χρωμοσώματος X στις γυναίκες μέσω του αντίστοιχου κέντρου XIC (X-inactivation center). Τα δύο προηγούμενα παραδείγματα αποτελούν αντιπροσώπους των μακρών μη-κωδικών RNA (long non-coding RNAs ή lncRNAs). Επίσης, τα μικρά πυρηνισκικά RNAs (small nucleolar RNAs ή snoRNAs) τροποποιούν το ριβοσωμικό RNA, ενώ το μικρό πυρηνικό RNA (small nuclear RNA ή snRNA) συμμετέχει στη διαδικασία συρραφής του RNA. Πρόσφατες δημοσιεύσεις έχουν αποκαλύψει πολυάριθμα ncRNAs και σήμερα είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και στην προστασία του γονιδιώματος από ιούς και μεταθετά στοιχεία (1–3). Στην Εικόνα 1 απεικονίζεται η ποσόστωση των γονιδίων των ncRNAs στο ανθρώπινο γονιδίωμα, ενώ στην Εικόνα 2 απεικονίζεται η εκτιμώμενη ποσόστωση της έκφρασης των διαφορετικών τύπων RNA σε τυπικά κύτταρα θηλαστικών, με τα miRNAs να αντιπροσωπεύουν μόλις το 0,3 % της συνολικής έκφρασης RNA [τροποποίηση από (4)]. Τα μη-κωδικά μόρια διερευνώνται εντατικά τα τελευταία χρόνια για το ρόλο τους στις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, αλλά και στη νόσο.



**Εικόνα 1.** Ποσόστωση των ncRNA γονιδίων στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

Ανάκτηση δεδομένων από τη βάση GENCODE έκδοση 36 (<https://www.genencodegenes.org/human/>, τελευταία πρόσβαση 29 Ιανουαρίου 2024). Στη δεξιά στήλη απεικονίζεται ο αριθμός των γονιδίων μικρών μη-κωδικών RNA με την ποσόστωσή τους –σύμφωνα με το έργο HGNC (<https://www.genenames.org/download/statistics-and-files/>, HUGO Gene Nomenclature Committee του Ευρωπαϊκού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής EMBL-EBI, τελευταία πρόσβαση 29 Ιανουαρίου 2024). Επεξήγηση: scaRNA = Small Cajal body-specific RNA, misc\_RNA = miscellaneous RNA.



**Εικόνα 2.** Ποσόστωση της έκφρασης των διαφορετικών ειδών RNA (4).

Η παρεμβολή RNA (RNA interference ή RNAi) αναφέρεται στη διαδικασία ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στην οποία βραχέα μονόκλινα RNA μετάγραφα μήκους 20-30 νουκλεοτιδίων χρησιμεύουν ως RNA οδηγοί (guide RNA) που αναγνωρίζουν επιλεκτικά και συνδέονται μέσω ζευγαρώματος βάσεων με άλλα RNA μόρια εντός του κυττάρου. Στο παρελθόν, η διαδικασία αυτή ήταν γνωστή και ως μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση (post-transcriptional gene silencing ή PTGS) και αποτελεί μια συντηρημένη βιολογική απόκριση σε δίκλινα μόρια RNA παρασιτικών και εξωγενών παθογόνων νουκλεϊκών οξέων. Όταν ο στόχος είναι ένα ώριμο mRNA (messenger RNA ή αγγελιαφόρο RNA), τα μικρά μη-κωδικά μόρια RNA μπορούν να εμποδίσουν τη μετάφρασή του ή ακόμα και να καταλύσουν την αποικοδόμησή του. Εάν ο RNA-στόχος βρίσκεται στη διαδικασία της μεταγραφής, το μικρό μη-κωδικό RNA μπορεί να δεσμευτεί και να κατευθύνει το σχηματισμό ορισμένων τύπων κατασταλτικής χρωματίνης (repressive chromatin) στο εκμαγείο DNA που συνδέεται. Συνοπτικά, κατά τη διαδικασία της παρεμβολής RNA, μονόκλινα παρεμβαλλόμενα RNA μόρια παράγονται από δίκλινα μόρια RNA, τα οποία συνδέονται με ριwi πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες Αργοναύτες (Argonaute) και εντοπίζουν RNA-στόχους μέσω ζευγαρώματος βάσεων. Το τελικό αποτέλεσμα της RNAi είναι είτε η αποικοδόμηση του RNA-στόχου με ή χωρίς την καταστολή της μετάφρασης, είτε ο σχηματισμός ετεροχρωματίνης στην περιοχή DNA από την οποία μεταγράφεται ο RNA-στόχος. Υπάρχουν τρεις ομάδες μη-κωδικών μορίων RNA που λειτουργούν κατά αυτόν τον τρόπο: τα microRNAs, τα μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (small interfering RNA ή siRNA) και τα ρiwi-αλληλεπιδρώντα (ρiwi-interacting ή ρiRNA). Αν και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον τρόπο παραγωγής των βραχέων τμημάτων μονόκλινου RNA, και οι τρεις ομάδες αυτές ακολουθούν τους κανόνες τις συμπληρωματικότητας των βάσεων και οδηγούν στην ελάττωση της γονιδιακής έκφρασης (5,6). Να σημειωθεί πως οι Andrew Fire και Craig Mello τιμήθηκαν με το βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής το 2006 για τη δουλειά τους σχετικά με την RNAi (7).

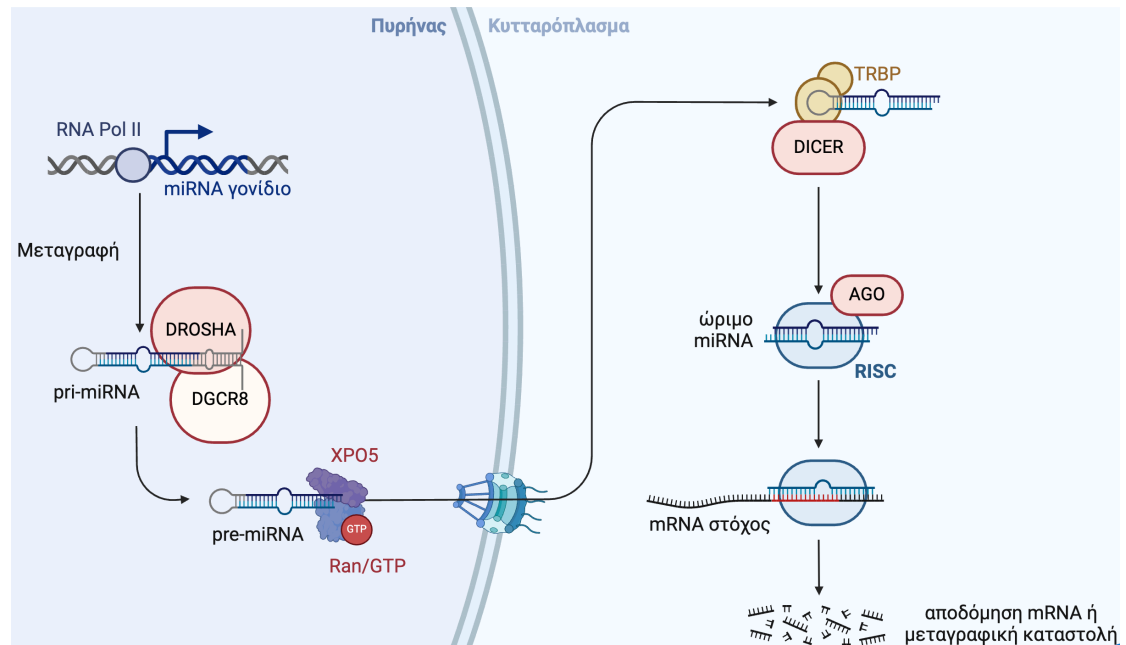
## **1.2. Βιογένεση και μηχανισμοί δράσης των microRNAs**

Την ανακάλυψη του πρώτου microRNA (ή miRNA ή απλούστερα miR) το 1993 διαδέχθηκε μία πληθώρα επιστημονικών δημοσιεύσεων που διερευνούσαν το ρόλο των miRs στον υγιή οργανισμό και στη νόσο. Τα miRs είναι ρυθμιστικά μη κωδικά μόρια

ριβονουκλεϊκού οξέος (ribonucleic acid ή RNA) και η ώριμη μορφή τους έχει μήκος κατά μέσο όρο 22 νουκλεοτίδια. Σύμφωνα με την πλέον πρόσφατη καταγραφή της αντίστοιχης βάσης δεδομένων, έχουν καταγραφεί μέχρι σήμερα 1.917 miRs στον άνθρωπο (<http://mirbase.org/>, τελευταία πρόσβαση: 29 Ιανουαρίου 2024). Τα περισσότερα από αυτά τα microRNAs έχουν διακριτούς βιολογικούς ρόλους και συγκεκριμένα γονίδια-στόχους. Τα miRs έχουν αναγνωρισθεί πρόσφατα ως σημαντικοί επιγενετικοί ρυθμιστές της διαφοροποίησης των κυττάρων της λεμφικής σειράς, παίζοντας ένα σημαντικό ρόλο στη βιολογία της λευχαιμογένεσης. Η αυξορρύθμιση και η μειορρύθμιση των microRNAs φαίνεται να επισύρει τις ίδιες επιπτώσεις στο κύτταρο με τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, αντίστοιχα (8). Η Εικόνα 3 παρουσιάζει την οδό της βιογένεσης των microRNAs, όπως συμβαίνει κατά κανόνα, ενώ οι προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης τους συνοψίζονται στις εξής κατηγορίες (9):

- (1) Αναστολή της καλύπτρας που οδηγεί σε αναστολή της έναρξης της μετάφρασης μέσω αλληλεπίδρασης της 5' καλύπτρας με τη ριβοσωμική υπομονάδα 40S και καταστολή της αναγνώρισης του eIF4E από την καλύπτρα –προτού στρατολογηθεί ο eIF4G
- (2) Αναστολή πρόσδεσης στη ριβοσωμική υπομονάδα 60S που οδηγεί σε αναστολή της έναρξης της μετάφρασης λόγω αδυναμίας σάρωσης του mRNA για το πρώτο κωδικόνιο έναρξης AUG και της αδυναμίας σχηματισμού του συμπλόκου 40S-AUG-60S
- (3) Αναστολή της επιμήκυνσης
- (4) Πρώιμος τερματισμός μέσω μείωσης των λειτουργικών ριβοσωμάτων
- (5) Αποδόμηση της σχηματιζόμενης πρωτεΐνης κατά ή αμέσως μετά τη μετάφραση με καθίζηση των mRNA μαζί με τα σύμπλοκα miRNA-RISC των πολυσωματίων που εμπλέκονται ενεργά στη μετάφραση
- (6) Απομόνωση σε P-σωμάτια (processing, P-bodies), όπου αναστέλλεται η μετάφραση και προωθείται η αποδόμηση του mRNA ως συνέπεια της miRNA-επαγόμενης μεταφραστικής αναστολής
- (7) Αποσύνθεση του mRNA μέσω αποδόμησης και αποσταθεροποίησης που περιλαμβάνει αποαδενυλίωση του mRNA, αφαίρεση της καλύπτρας και 5'→3' αποδόμηση του mRNA
- (8) Διάσπαση του mRNA σε πλήρη συμπληρωματικότητα miRNA-mRNA και με μειορρύθμιση του mRNA στόχου

(9) Μεταγραφική αναστολή μέσω miRNA-επαγόμενης αναδιοργάνωσης της χρωματίνης και γονιδιακή αποσιώπηση

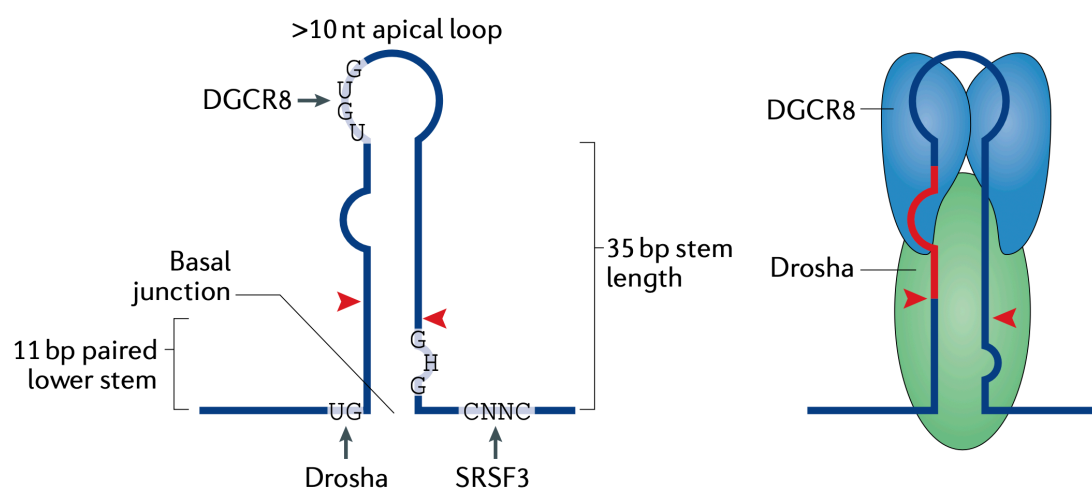


**Εικόνα 3.** Η κλασική οδός βιογένεσης των microRNAs.

AGO = Argonaute RISC Catalytic Component, DGCR8 = DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8 Microprocessor Complex Subunit, GTP = Guanosine-5'-triphosphate, TRBP = Trans-Activation Responsive TARBP2 RNA-Binding Protein Subunit of RISC Loading Complex, Ran = RAN Member RAS Oncogene Family, XPO5 = Exportin 5. Η εικόνα σχεδιάστηκε στην πλατφόρμα BioRender (<https://www.biorender.com/>, τελευταία πρόσβαση 29 Ιανουαρίου 2024) ενσωματώνοντας πληροφορίες από (10).

Τα επίπεδα των miRNAs καθορίζονται μέσα από 6 διακριτές διαδικασίες: (1) μεταγραφή του πρωτογενούς miRNA (primary, pri-miRNA), (2) επεξεργασία του πρωτογενούς miRNA μεταγράφου προς πρόδρομο miRNA (precursor, pre-miRNA), (3) εξαγωγή του πρόδρομου miRNA στο κυτταρόπλασμα, (4) επεξεργασία του πρόδρομου miRNA προς την ώριμη μορφή του, (5) αναγνώριση, αναστολή ή κοπή των μεταγράφων-στόχων και (6) μηχανισμοί ρύθμισης της σταθερότητας και της αποσύνθεσης των ώριμων miRNAs (11).

Τα πρωτογενή miRNAs συντίθενται κατά κύριο λόγο με τη βοήθεια της RNA πολυμεράσης II και προστίθεται η καλύπτρα και η πολυ(A) ουρά (12). Το pre-miRNA σχηματίζει μια δομή φουρκέτας που αναγνωρίζεται και κόβεται από σύμπλοκο του μικροεπεξεργαστή (Microprocessor complex), το οποίο αποτελείται από το ένζυμο Drosha (μια ριβονουκλεάση III) και το συμπαραγοντά του DGCR8, και έτσι προκύπτει το pre-miRNA –ομοίως με δομή φουρκέτας. (13). Ο μικροεπεξεργαστής περιλαμβάνει και τις πρωτεΐνες DDX5 (DEAD box RNA helicases p68) και DDX17 (γνωστή και ως p72), των οποίων η ακριβής δράση παραμένει αδιευκρίνιστη. Στην Εικόνα 4 απεικονίζεται σχηματικά η αλληλεπίδραση του μικροεπεξεργαστή με το πρωτογενές miRNA (14).



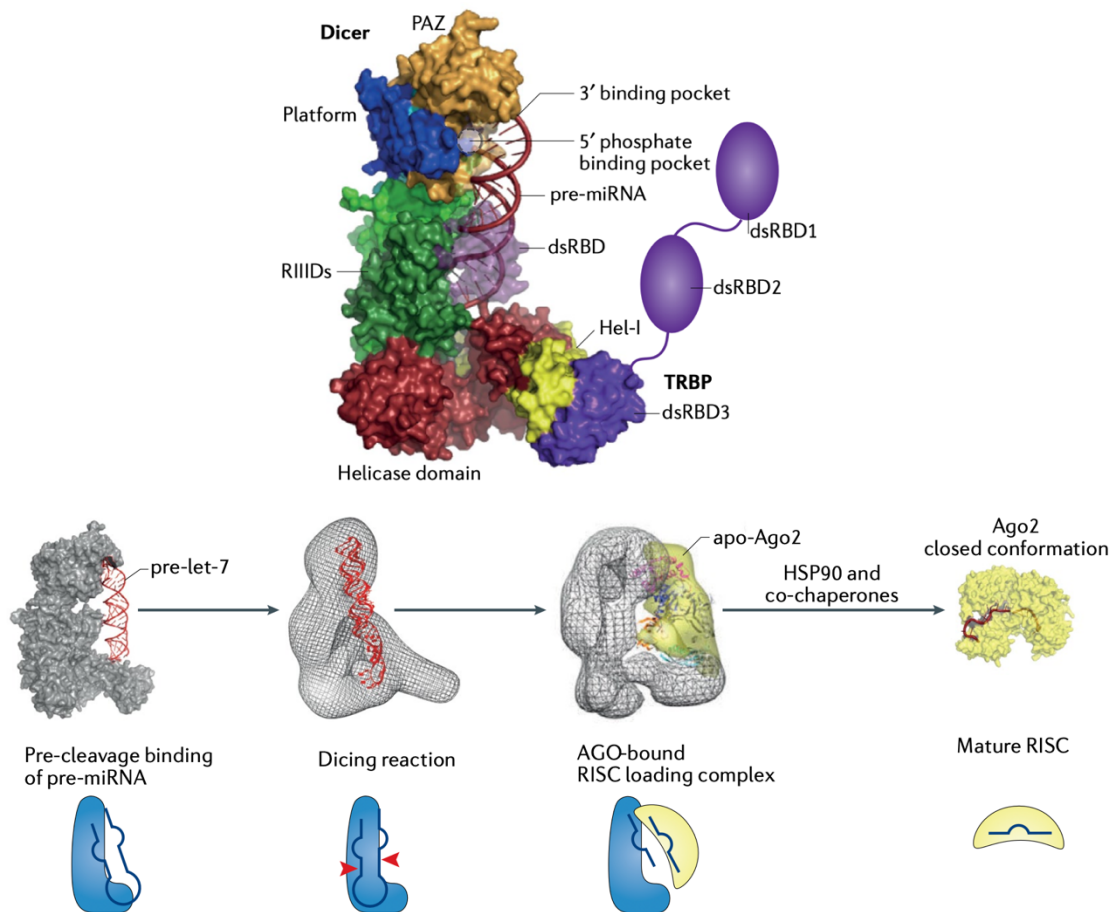
**Εικόνα 4.** Τα στοιχεία των pri-miRNAs που είναι απαραίτητα για την αναγνώριση και κοπή από το μικροεπεξεργαστή (14).

Τα νουκλεοτίδια (nt) αναπαριστώνται με τα γράμματα A, C, U (αδενίνη, κυτοσίνη και ουρακίλη, αντίστοιχα). Όπου «N», μπορεί να είναι οποιοδήποτε nt. Το στέλεχος του pri-miRNA βρίσκεται κυρίως σε επαφή με τη Drosha και ο βρόγχος σε επαφή με τη DGCR8. SRSF3 = Serine- and Arginine-rich Splicing Factor 3.

Η εξπορτίνη 5 (XPO5) με τη βοήθεια της Ran GTPασης εξάγει το pre-miRNA στο κυτταρόπλασμα, όπου και υπόκειται σε επεξεργασία από μια ακόμα ριβονουκλεάση III, το ένζυμο Dicer, και το συμπαραγοντά της TRBP. Το υπόστρωμα της Dicer είναι κατά προτίμηση ένα pre-miRNA με μίσχο μεγέθους 21 – 25 ζευγών



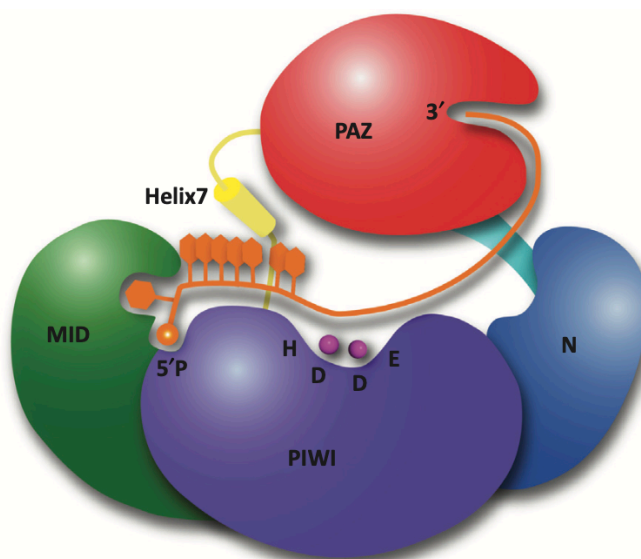
βάσεων και μία 5' φωσφορική ομάδα, ένα βρόγχο και ένα μονόκλωνο τμήμα 2 νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο. Η Dicer κόβει και τους δύο κλώνους RNA κοντά στο βρόγχο σχηματίζοντας ένα δίκλωνο μόριο RNA (miRNA αλυσίδα οδηγός / miRNA\* αλυσίδα επιβάτης) (15). Στη συνέχεια, τα miRNAs παραμένουν ξετυλιγμένα και υποβάλλονται σε ειδική επεξεργασία μετά από την οποία συνδέονται με μια ομάδα πρωτεϊνών για το σχηματισμό ενός συμπλόκου επαγόμενης από το RNA σίγησης (RNA-induced silencing complex ή RISC). Το ώριμο miRNA συνδέεται στο RISC με τις δυο αλυσίδες του και στη συνέχεια το σύμπλοκο διασπά και απορρίπτει τη μία από αυτές. Η επιλογή της αλυσίδας-οδηγού συνδέεται, μεταξύ άλλων θεωριών, με τη θερμοδυναμική σταθερότητα στο 5' άκρο (χαμηλότερες τιμές) ή με την παρουσία μιας 5' ουρακίλης στη θέση 1. Η εναπομείνασα αλυσίδα του miRNA οδηγεί το RISC στην αναζήτηση mRNA-στόχων, ερευνώντας για συμπληρωματικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (16). Η επιλογή είτε της 5' εγγύς ή της 3' άπω έλικας δίνει αντίστοιχα γένεση στα επονομαζόμενα 5p και 3p miRNAs, αντίστοιχα. Το ξεδίπλωμα των δίκλωνων miRNAs και η επακόλουθη επιλογή της έλικας αποτελούν καίριας σημασίας διαδικασίες που επηρεάζουν τις ιδιότητες των παραγόμενων miRNAs (17). Η Εικόνα 5 αναπαριστά τις δομικές περιοχές της Dicer σε σχέση με το προσδεμένο pre-miRNA και τη διαδικασία που ακολουθείται στο RISC.



**Εικόνα 5.** Η Dicer και οι αναδιατάξεις της με την πρόσδεση του pre-miRNA και με τη φόρτωση της AGO για το σχηματισμό του RISC (14).

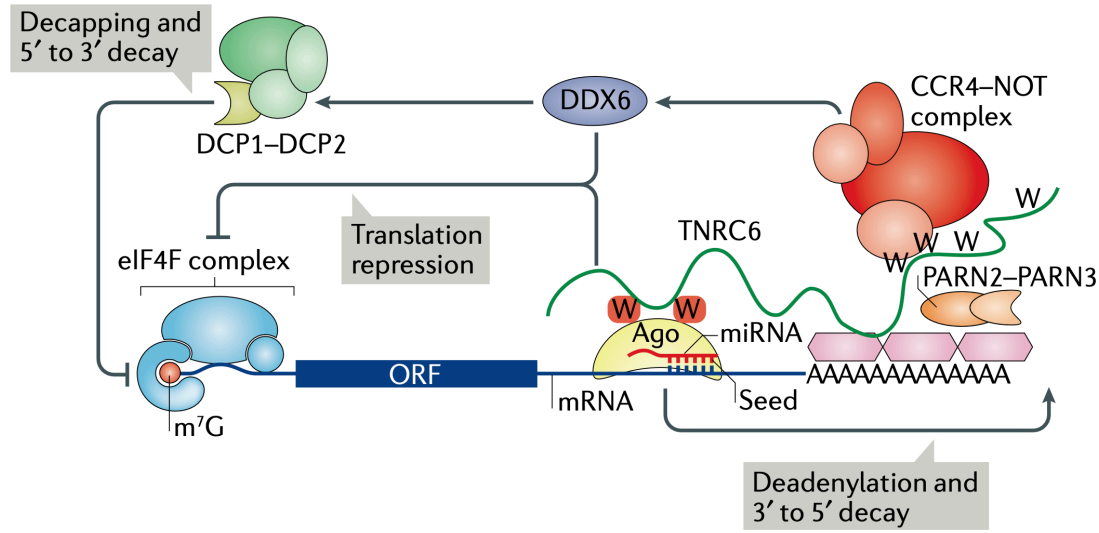
Η αναζήτηση mRNA-στόχων διαμεσολαβείται από μια πρωτεΐνη Αργοναύτη (Argonate ή AGO) του RISC και η οποία δεσμεύει την 5' περιοχή του miRNA, έτσι ώστε να είναι εφικτό το ζευγάρωμα των βάσεων με ένα άλλο μόριο RNA. Η έκταση του ζευγαρώματος των βάσεων είναι τυπικά μήκους  $\geq 7$  ζευγών νουκλεοτιδίων και επισυμβαίνει συνήθως στην 3' αμετάφραστη περιοχή (untranslated region ή UTR) του mRNA στόχου. Στην περίπτωση εκτεταμένου ταιριάσματος, που είναι πιο συχνό στα φυτά παρά στον άνθρωπο, επέρχεται ρήξη του mRNA, απομάκρυνση της πολυ(Α) ουράς και ταχεία αποικοδόμηση του mRNA από εξωνουκλεάσες με απελευθέρωση του RISC (που είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί ξανά). Στην περίπτωση λιγότερο εκτεταμένου ταιριάσματος, που είναι το πιο πιθανό ενδεχόμενο, το mRNA υφίσταται ταχεία μεταφραστική καταστολή, οδηγούμενο σε βαθμιαία αποικοδόμηση στα P-

σωμάτια με απομάκρυνση από τα ριβοσώματα, βράχυνση της πολυ(A) ουράς, απομάκρυνση της καλύπτρας και, τελικώς, αποικοδόμηση. Η Εικόνα 6 απεικονίζει την πρωτεΐνη AGO2, τη μόνη από 4 πρωτεΐνες Αργοναύτες στον άνθρωπο που έχει τη δυνατότητα κοπής του mRNA (18). Η Εικόνα 7 αναπαριστά τη διαδικασία με την οποία το miRNA οδηγεί το RISC στις συμπληρωματικές αλληλουχίες των 3' UTR των mRNA-στόχων του και τους μηχανισμούς με τους οποίους επάγει την αποδόμηση αυτών (14).



**Εικόνα 6.** Η πρωτεΐνη AGO2 σε σύμπλοκο με ένα miRNA (18).

Οι δομικές περιοχές της AGO2 αποτυπώνονται με διαφορετικά χρώματα. Το ενεργό κέντρο που τεμαχίζει το mRNA είναι εκτεταμένα ενωμένο μέσω ζευγών βάσεων με το mRNA. Τα μωβ σφαιρίδια στο ενεργό κέντρο αναπαριστούν τα δύο ιόντα  $Mg^{2+}$  που απαιτούνται για την κοπή (στη θέση των γραμμάτων «D»). Το 5' άκρο του mRNA αγκυρώνεται μεταξύ των Mid και PIWI περιοχών, ενώ η έλικα 7 δημιουργεί μια τσάκιση και κλειδώνει την πρωτεΐνη στο ύψος του διαστήματος μεταξύ της έκτης και έβδομης βάσης του συνδεδεμένου mRNA.



**Εικόνα 7.** Σχηματική απεικόνιση της πορείας από την ενεργοποίηση του RISC μέχρι την αποδόμηση των mRNA-στόχων (14).

CCR4 = carbon catabolite repressor 4 (C-C Motif Chemokine Receptor 4), DCP = mRNA-decapping enzyme, DDX6 = DEAD-Box Helicase 6, eIF = eukaryotic translation initiation factor,  $m^7G$  = 7-methylguanylate, NOT = negative regulator of transcription, ORF = open reading frame, PARN = Poly(A)-specific Ribonucleases (σύμπλοκα αποαδενυλίωσης), PIWI = P element-induced wimpy testes, TNRC6 = trinucleotide repeat-containing gene 6 proteins της οικογένειας GW που χαρακτηρίζεται από επαναλήψεις γλυκίνης-τρυπτοφάνης. Το απροστάτευτο 5' άκρο του mRNA αποικοδομείται από μια 5'-3' εξωριβονουκλεάση 1.

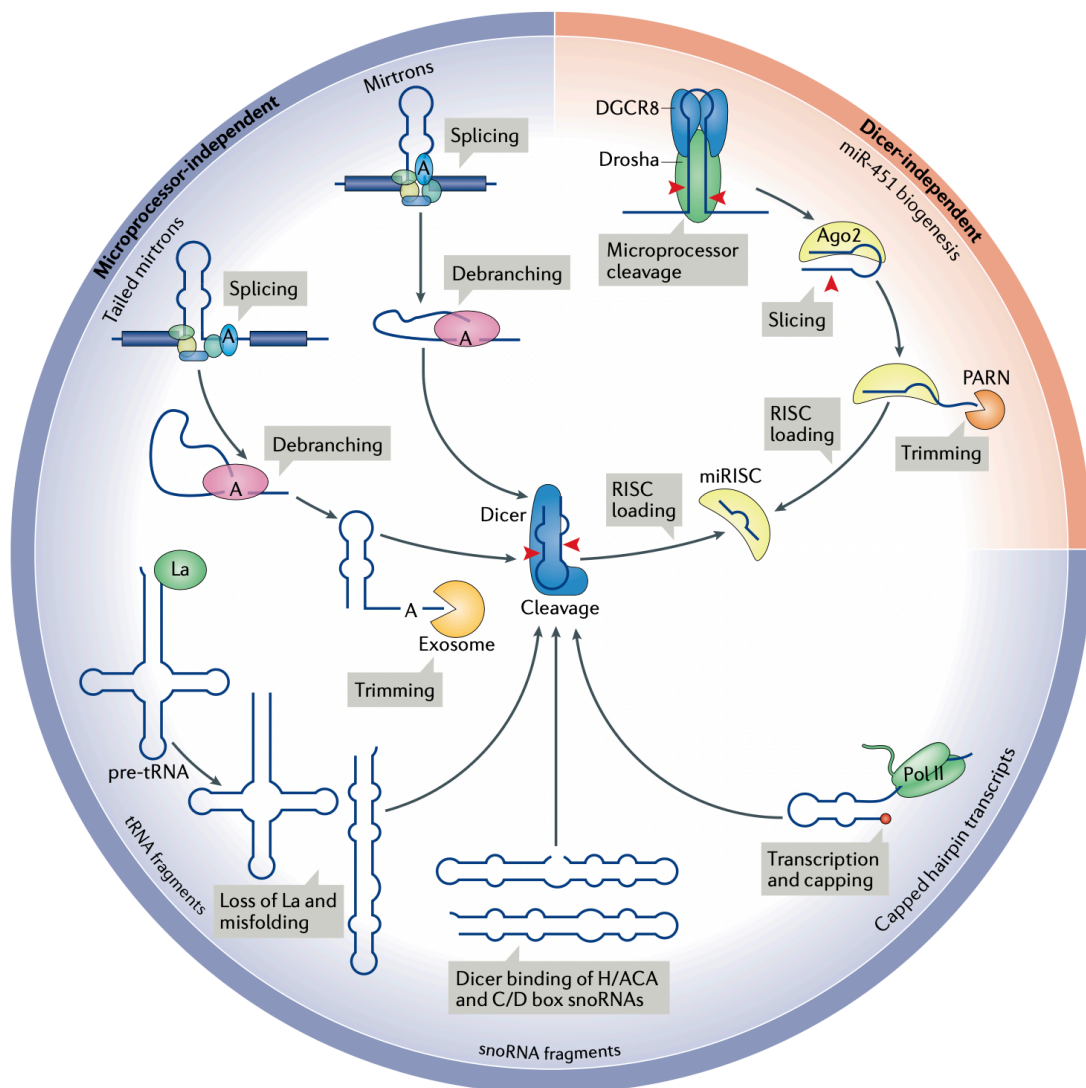
Να σημειωθεί πως η TRBP είναι αυτή που φορτώνει το ώριμο miRNA στην AGO και πως οι δυο αυτές πρωτεΐνες μαζί με τη Dicer σχηματίζουν ουσιαστικά το σταθερό σύμπλοκο του RISC. Η HSP90 (heat shock protein 90) σε σύμπλοκο με την HSC70 (heat shock protein family A Hsp70 member 8 ή HSPA8) μαζί με τις πρωτεΐνες-συνοδούς της (μεταξύ των οποίων οι RPAP3 and UNC45) διατηρούν τις AGO στην κατάσταση «απο-» («apo»), ειδάλως θα ήταν ασταθείς. Η απο-AGO κατάσταση είναι μια κατάσταση υψηλής ενέργειας, η οποία μεταπίπτει σε χαμηλής ενέργειας, όταν ενσωματώνεται ένα ώριμο miRNA. Επειδή ακριβώς το ξεδίπλωμα δεν απαιτεί ενέργεια (ATP), η μετάβαση αυτή μπορεί να παράσχει την απαιτούμενη ενέργεια για ξεδίπλωμα και φόρτωση (14).

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε πως, πέρα από την κλασική οδό βιογένεσης των miRNAs, υπάρχουν και εναλλακτικά μονοπάτια. Η διαγραφή των γονιδίων των

πρωτεϊνών Drosha, Dicer και της εξπορτίνης 5 από κυτταρικές σειρές ανθρώπου δε μηδένισε την παραγωγή miRNAs. Ειδικότερα, η διαγραφή του *DROSHA* είχε τη μεγαλύτερη επίδραση στην παραγωγή miRNAs, μηδενίζοντας την παραγωγή τους, αλλά επάγοντας ταυτόχρονα την παραγωγή άλλων μη-κανονικών miRNAs (miR-7706, miR-3615, και miR-1254). Αντίθετα, η διαγραφή του *DICER1* δεν επηρέασε σημαντικά τον αριθμό των παραγόμενων miRNAs, αλλά μόνο οδήγησε σε δραματική μείωση των επιπέδων τους. Σε απουσία Dicer, τα pre-miRNAs φορτώνονται απευθείας στην AGO και κόβονται στο 3' άκρο τους, δίνοντας γένεση σε miRNAs του 5' κλώνου (-5p miRNAs). Η διαγραφή του *XPO5* οδηγεί σε ήπια μόνο διαταραχή της παραγωγής miRNAs, υποδεικνύοντας ότι η παρουσία της εξπορτίνης 5 δεν είναι αποφασιστικής σημασίας για την ωρίμανση των miRNAs (19). Η Εικόνα 8 παρουσιάζει τις οδούς βιογένεσης των microRNAs πέραν της κλασικής.

Η βιογένεση microRNAs ανεξάρτητα της παρουσίας μικροεπεξεργαστή έχει επιβεβαιωθεί στον άνθρωπο και αφορά στη παραγωγή mirtrons. Τα mirtrons είναι microRNAs που προέρχονται από εσώνια και τα οποία μετά το μάτισμά τους λειτουργούν ως pre-miRNAs κι ως εκ τούτου δε χρειάζονται την κοπή τους από το μικροεπεξεργαστή, υπόκεινται αποδιακλάδωση δίκην λάσου, ενώ μπορούν αμέσως να εξαχθούν στο κυτταρόπλασμα για επεξεργασία από τη Dicer. Mirtrons με ουρά (tailed mirtrons) είναι η υποκατηγορία mirtrons που έχει πλευρικές περιοχές ή επεκτάσεις τόσο στο 3' όσο και στο 5' άκρο και που κόβονται πριν εξαχθούν στο κυτταρόπλασμα από το πυρηνικό εξωσωμάτιο –τουλάχιστον στο 3' άκρο τους (14). Η μελέτη των microRNAs σε εμβρυονικά αρχέγονα κύτταρα ή μετα-μιτωτικούς νευρώνες που είχε διαγραφεί είτε το γονίδιο *DGCR8*, είτε το *DICER1* απέδειξε πως υπάρχουν microRNAs που δεν εξαρτώνται από το μικροεπεξεργαστή, αλλά χρειάζονται τη Dicer για το σχηματισμό τους. Να σημειωθεί πως πολλά από αυτά miRNAs προήλθαν από άλλα ncRNAs, όπως snoRNAs (και των δύο μεγάλων οικογενειών: H/ACA και C/D box snoRNAs) ή tRNAs (20). Ενώ τα tRNAs έχουν πολλές και γνωστές λειτουργίες που είναι ανεξάρτητες των miRNAs, έχουν βρεθεί σε αρκετές μελέτες tRNAs που φορτώνονται στο σύμπλοκο RISC. Η αιτία πίσω από αυτή τη διαδικασία είναι ότι συγκεκριμένες αλληλουχίες tRNA προδιαθέτουν στη διαμόρφωση δομής φουρκέτας που μιμείται τα pre-miRNAs, ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες η πρωτεΐνη συνοδός (και αυτοαντιγόνο του λύκου) La αποτρέπει το σχηματισμό αυτών των δομών και προάγει το τυπικό δίπλωμα των tRNAs (21). Επιπλέον, microRNAs μπορεί να προέλθουν από δομές φουρκέτας που προκύπτουν απευθείας από την RNA πολυμεράση II σε συγκεκριμένα σημεία έναρξης της μεταγραφής. Αυτά τα miRNAs έχουν μία 5' 7-

μεθυλγουανυλική ( $m^7G$ ) καλύπτρα, η οποία δεν απομακρύνεται από το μικροεπεξεργαστή και έτσι εξέρχονται του πυρήνα μέσω του συμπλόκου της εξπορτίνης 1 (22). Τέλος, το μόνο γνωστό miRNA που προέρχεται από την εναλλακτική οδό βιογένεσης των miRNAs που είναι ανεξάρτητη της Dicer είναι το miR-451 που ανευρίσκεται ειδικά στα ερυθροκύτταρα, είναι εξαιρετικά μικρό και το οποίο κόβεται αρχικά από την AGO2 και στη συνέχεια από την πολυ(A)-ειδική ριβονουκλεάση PARN (23).



**Εικόνα 8.** Εναλλακτικές (non-canonical) οδοί βιογένεσης των microRNAs (14).

### 1.3. Βιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά της ΟΛΛ

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) αποτελεί τη συχνότερη νεοπλασματική νόσο της παιδικής ηλικίας και η πενταετής επιβίωσή της προσεγγίζει το 90 %, ενώ για τους εφήβους και τους νεαρούς ενήλικες (15 – 29 ετών ή AYA ALL) το ποσοστό αυτό κυμαίνεται από 75 – 85 %. Η ΟΛΛ στους ενήλικες χαρακτηρίζεται από αρκετές βιολογικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με την ΟΛΛ στα παιδιά και στους εφήβους, αλλά και πενταετή επιβίωση που δεν ξεπερνά το 35 – 55 % στους μεσήλικες και το 30% στους ενήλικες άνω των 60 ετών (24). Η αρχή της νόσου έγκειται στη νεοπλασματική εξαλλαγή των πρόδρομων B- και T-κυττάρων της λεμφικής σειράς, ενώ σε μοριακή βάση εμπλέκονται χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, ανευπλοειδίες και μεταλλάξεις σε γονίδια υπεύθυνα για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την ανάπτυξη των λεμφοκυττάρων (25). Οι υπότυποι της B-ΟΛΛ και T-ΟΛΛ φέρουν διακριτά μοτίβα γενωμικών αλλαγών και γονιδιακής έκφρασης και η ταυτοποίηση των τελευταίων ανέβασε τα τελευταία 60 χρόνια την επιβίωση από το 10 % στο 90 %. Παρόλα αυτά, το 20 % των παιδιών με ΟΛΛ θα εμφανίσει υποτροπή της νόσου με εμφάνιση αντίστασης στη χημειοθεραπεία, αποτυχία της θεραπείας και τελικά θα οδηγηθεί στο θάνατο. Οι σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις στην ΟΛΛ της παιδικής και εφηβικής ηλικίας περιλαμβάνουν πληθώρα χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, μονοκλωνικά αντισώματα και ανοσοτροποποιητές, ενώ στις περιπτώσεις με ανθεκτικότητα ή υποτροπή επιστρατεύεται η εγκεκριμένη τον Αύγουστο του 2017 από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) ανοσοθεραπεία με χιμαιρικά T κύτταρα που φέρουν υποδοχείς αντιγόνων (CAR-T), όταν πριν από 7 χρόνια η μόνη επιλογή στις περιπτώσεις αυτές ήταν η μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (26).

Με τα σημερινά δεδομένα, ο προσδιορισμός της ομάδας κινδύνου της ΟΛΛ στην παιδική και εφηβική ηλικία, αλλά και ο αλγόριθμος της θεραπείας βασίζονται σε παραμέτρους όπως η ηλικία εμφάνισης, το φύλο, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων στο περιφερικό αίμα κατά τη διάγνωση, συγκεκριμένες κυτταρογενετικές αλλαγές (βασιζόμενες σε καρύοτυπο από μυελό των οστών και FISH για εντοπισμό συγκεκριμένων συντήξεων) και τον προσδιορισμό της μετρήσιμης υπολειπόμενης νόσου (measurable residual disease ή MRD) (27). Την τελευταία δεκαετία, η αλληλούχιση του DNA και η περαιτέρω μελέτη (ποσοτικοποίηση γονιδιακής έκφρασης, ανάλυση των παραλλαγών αριθμού αντιγράφων DNA, διερεύνηση επιγενετικών αλλαγών, ο προσδιορισμός αλλαγών σε μη κωδικά μόρια και μελέτες

φαρμακογενετικής) μεγάλων δειγμάτων παιδιών και εφήβων με ΟΛΛ έφερε επαναστατικές αλλαγές ως προς την κατανόηση της γενετικής βάσης της νόσου με ταυτόχρονο καθορισμό υποτύπων, την αναγνώριση απορρυθμισμένων σηματοδοτικών οδών και τον καθορισμό νέων θεραπευτικών στόχων, βελτιώνοντας τις στρατηγικές θεραπείας και τελικά την επιβίωση (25,27). Στον Πίνακα 1 καταγράφονται οι υπότυποι της ΟΛΛ με τις γενωμικές αλλαγές που παρατηρούνται κατά περίπτωση και τη μέση ηλικία διάγνωσης κάθε υπότυπου με τα κλινικά χαρακτηριστικά του. Επιπρόσθετα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization ή WHO) κατανοώντας τη συμβολή του γενετικού υπόβαθρου στη θεραπεία της ΟΛΛ κατάρτισε ένα νέο σύστημα ταξινόμησης (προσαρμοσμένος Πίνακας 2) που περιλαμβάνει τις παρατηρούμενες γενετικές τροποποιήσεις (28).

**Πίνακας 1.** Υπότυποι ΟΛΛ ανάλογα με το γενετικό τους υπόβαθρο (25,27,29).

Υπότυπος ΟΛΛ	Γενωμικές αλλαγές	Μέση ηλικία διάγνωσης (έτη)	Κλινικά χαρακτηριστικά
<b>B-ΟΛΛ</b>			
Ανευπλοειδίες			
Υπερδιπλοειδία (> 50 χρωμοσώματα)	RTK-Ras σηματοδοτικό μονοπάτι, επιγενετικοί τροποποιητές ιστονών	4	Εξαιρετική πρόγνωση, υψηλής συχνότητας στα παιδιά (20 – 30 %)
Χαμηλή υποδιπλοειδία (32 – 39 χρωμοσώματα)	Διαγραφή του <i>IKZF2</i> , μετάλλαξη του <i>TP53</i> ή του <i>RB1</i>	47	Εξαιρετικά πτωχή πρόγνωση, υψηλής συχνότητας στους ενήλικες, < 1 % στα παιδιά
Σχετική απλοειδία (24 – 31 χρωμοσώματα)	Ενεργοποίηση Ras σηματοδοτικού	5	Πτωχής πρόγνωσης, 2 % σε παιδιά και εφήβους



	μονοπατιού, διαγραφή του <i>IKZF3</i>		
Αύξηση αριθμού αντιγράφων DNA			
iAMP21	Περίπλοκες δομικές ανωμαλίες στο χρωμόσωμα 21, σπάνια συσχέτιση με Robertsonian μετάθεση rob(15;21)(q10;q10)c	10	Καλής πρόγνωσης με εντατική θεραπεία, χαμηλά λευκά αιμοσφαίρια, αφορά στο 2 % ΟΜ στα παιδιά, πτωχή πρόγνωση για τη Robertsonian μετάθεση
Αναδιάταξη μεταγραφικών παραγόντων (ΜΠ)			
<i>ETV6-RUNX1</i> t(12;21)(p13;q22)	Διαγραφή του <i>PAX5</i> , μετάλλαξη του <i>WHSC1</i>	4	Εξαιρετική πρόγνωση, υψηλής συχνότητας στα παιδιά (15 – 30 %)
<i>ETV6-RUNX1</i> -ομοιάζουσα ΟΜ	Συντήξεις ή διαγραφή του <i>ETV6</i> , συντήξεις ή διαγραφή του <i>IKZF1</i>	3	Άγνωστης πρόγνωσης, αφορά στο 3 % ΟΜ παιδιών και εφήβων
Αναδιάταξη του <i>DUX4</i> ή ΟΜ με δυσλειτουργικό <i>ERG</i>	Διαγραφή του <i>ERG</i> , διαγραφή του <i>IKZF1</i> , Ras σηματοδοτικό μονοπάτι, υπερέκφραση <i>DUX4</i>	14	Εξαιρετική πρόγνωση, συχνότερη σε ΑΥΑ, στο 5 – 10 % ΟΜ παιδιών, στο 40 % συνύπαρξη μεταλλάξεων <i>IKZF1</i>
<i>KMT2A-AFF1</i> ή <i>MLL-AF4</i> t(4;11)(q21;q23)	PI3K-Ras σηματοδοτικό μονοπάτι (συνήθως όχι σε όλους του κλώνους)	40	Πτωχή πρόγνωση, ευαίσθητη σε θεραπεία με μπορτεζομίμη ή αναστολή της DOT1L, υψηλής συχνότητας σε βρέφη (80 – 90 %) και ενήλικες (15 %)

<i>TCF3-PBX1</i> t(1;19)(q23;p13)	Άγνωστος μηχανισμός	8	Καλή πρόγνωση, συνδέεται με υποτροπή σε ΚΝΣ, στο 2 – 6 % ΟΜ παιδιών, σπάνια σε ενήλικες, συχνότερα σε Αφροαμερικάνους
Αναδιάταξη του <i>ZNF384</i>	Επιγενετικοί τροποποιητές, Ras σηματοδοτικό μονοπάτι, αναδιάταξη <i>ZNF384</i> με μεταγραφικό ρυθμιστή ή τροποποιητή χρωματίνης ( <i>EP300, CREBBP, TAF15, SYNRG, EWSR1, TCF3, ARID1B, BMP2K</i> ή <i>SMARCA2</i> )	15	Ενδιάμεσης πρόγνωσης, κορύφωση συχνότητας σε ΑYA, 5 % παιδιών με ΟΜ
Αναδιάταξη του <i>MEF2D</i>	Ras σηματοδοτικό μονοπάτι, σύντηξη του <i>MEF2D</i> με <i>BCL9</i> (πιο συχνά), <i>HNRNPUL1, SS18, FOXJ2, CSF1R</i> ή <i>DAZAP1</i>	14	Πτωχής πρόγνωσης, ευαίσθητη σε αναστολή των HDAC, συχνότερα σε ΑYA, 4 % παιδιών με ΟΜ
Αναδιάταξη του <i>NUTM1</i> και σύντηξη με άλλα γονίδια	Άγνωστος μηχανισμός	3	Εξαιρετικής πρόγνωσης, αποκλειστικά σε παιδιά (1 %)
<i>TCF3-HLF</i> t(17;19)(q22;p13)	Μετάλλαξη του <i>TCF3</i> , διαγραφή του <i>PAX5</i> , Ras σηματοδοτικό μονοπάτι	15	Πτωχή πρόγνωση, ευαίσθητη σε αναστολή της Bcl2, πολύ σπάνια σε όλες τις ηλικίες (< 1%)
Καθοδηγούμενες από άλλες διαταραχές ΜΠ			

PAX5alt	Σύντηξη ή μετάλλαξη ή ενίσχυση του <i>PAX5</i>	10	Ενδιάμεσης πρόγνωσης, υψηλής συχνότητας στα παιδιά (11 %)
PAX5 P80R	Αλλαγές σηματοδότησης	22	Άγνωστης πρόγνωσης, πιο συχνή στους ενήλικες
Αναδιάταξη PAX	Συνήθως από δικεντρικά χρωμοσώματα dic(7;9), dic(9;12), and dic(9;20)	M/Δ	Άγνωστης πρόγνωσης, στο 2 % παιδιών με ΟΛΛ
Αναδιάταξη <i>BCL2/MYC</i>	Άγνωστος μηχανισμός	48	Πτωχής πρόγνωσης, σχεδόν αποκλειστικά σε ΑΥΑ και ενήλικες
Αναδιάταξη <i>MYC</i> με t(8;14)(q24;q32) ή t(2;8)(q12;q24) ή t(2;8)(q12;q24)	Άγνωστος μηχανισμός	M/Δ	Καλή πρόγνωση με σύντομης διάρκειας και υψηλής δόσης ΧΜΘ, στο 2 % παιδικής ΟΛΛ
Καθοδηγούμενες από κινάσες			
Ph-ομοιάζουσα	Πολλαπλές αλλαγές σε κινάσες, διαγραφή και μετάλλαξη του <i>IKZF1</i> , διαγραφή του <i>CDKN2A/B</i> . Αναδιάταξη σε <i>CRLF2</i> (50 %), γονίδια τυροσινικών κινασών ABL τάξης (12 %) ή <i>JAK2</i> (10 %), μεταλλάξεις <i>EPOE</i> (3 – 10 %), μεταλλάξεις που ενεργοποιούν τη JAK-STAT (10 %) ή τη Ras	21	Πτωχής πρόγνωσης, επιδέχεται TKI θεραπείας, υψηλής συχνότητας σε ΑΥΑ (25 – 30 %), αλλά και σε 10 – 15 % παιδιών με ΟΛΛ

	(2 – 8%) σηματοδοτική οδό		
<i>BCR-ABL1</i> t(9;22)(q34;q11.2)	Διαγραφή και μετάλλαξη του <i>IKZF1</i> , διαγραφές στα <i>CDKN2A/B</i> και <i>PAX5</i>	40 – 45	Πτωχής πρόγνωσης, βελτίωση με TKI θεραπεία, 2 – 5 % στα παιδιά – υψηλότερης συχνότητας στους ενήλικες (40 – 50 %)
Αναδιάταξη <i>CRLF2</i> με προϊόν <i>IGH-CRLF2</i> ή <i>P2RY8-CRLF2</i>	Διαγραφή και μετάλλαξη του <i>IKZF1</i> , μετάλλαξη των <i>JAK1/2</i>	M/Δ	Κοινή σε ΟΛΛ συνδρόμου Down και σε Ph-ομοιάζουσα ΟΛ (50 % σε κάθε κατηγορία), πτωχή πρόγνωση όταν δε συνοδεύεται από σύνδρομο Down, στο 5 – 7 % παιδιών με ΟΛΛ
<b>Γενετικά αταξινόμητες Β-ΟΛΛ</b>			
Άλλες ΟΛΛ	Άγνωστος μηχανισμός	16	Ενδιάμεσης πρόγνωσης, 5 % στα παιδιά – 10 % σε ΑΥΑ και ενήλικες
<b>T-ΟΛΛ</b>			
Δυσλειτουργικό <i>TAL1</i>	Μεταθέσεις t(1;7)(p32;q35) και t(1;14)(p32;q11) ή διαγραφή εντός του 1p32		Γενικά καλής πρόγνωσης, επιπολασμός 15 – 18 %
Δυσλειτουργικό <i>LMO2</i>	Μετάθεση t(11;14)(p15;q11) ή 5' διαγραφή στο <i>LMO2</i>		Γενικά καλής πρόγνωσης, επιπολασμός 10 %
Δυσλειτουργικό <i>TLX1</i> (ή <i>HOX11</i> )	Μετάθεση t(10;14)(q24;q11) ή t(7;10)(q35;q24)		Καλής πρόγνωσης, επιπολασμός 7 %

Δυσλειτουργικό <i>TLX3</i>	Μετάθεση t(5;14)(q35;q32), συνήθως σύντηξη με <i>BCL11B</i> , διαγραφή και μετάλλαξη <i>TLX3</i>	Πτωχής πρόγνωσης, επιπολασμός 20 %
<i>PICALM-MLLT10</i> ή <i>CALM-AF10</i>	Μετάθεση t(10;11)(p13;q14)	Περισσότερο πτωχής πρόγνωσης, επιπολασμός 10 %
<i>KMT2A-MLLT1</i> ή <i>MLL-ENL</i>	Μετάθεση t(11;19)(q23;p13.3)	Καλύτερη πρόγνωση από τις λοιπές λευχαιμίες αναδιάταξης του <i>KMT2A</i> , επιπολασμός 2 – 3 %
<i>NUP214-ABL1</i>	Ενίσχυση του 9q34	Επιδέχεται θεραπείας με TKI, ανευρίσκεται και σε υψηλού κινδύνου B-ΟΛΛ, επιπολασμός 6 %
Συντήξεις κινασών	<i>EML1-ABL1</i> , <i>ETV6-JAK2</i> και <i>ETV6-ABL1</i>	Επιδέχονται θεραπείας με TKI, μικρός επιπολασμός
Αναδιάταξη <i>NOTCH1</i>	Μετάθεση t(7;9)(q34;q34)	Επιπολασμός < 1 %
Πρώιμη ΟΛΛ από πρόδρομα T-κύτταρα	Γενετική ετερογένεια με μεταλλάξεις σε ρυθμιστές αιμοποίησης, κυτοκίνες, επιγενετικούς τροποποιητές και στη Ras σηματοδοτική οδό	Ανώριμος ανοσοφαινότυπος, έκφραση μυελικών και βλαστοκυτταρικών δεικτών, γενικά πτωχής πρόγνωσης, επιπολασμός 10 – 15 %

ΚΝΣ = κεντρικό νευρικό σύστημα, Μ/Δ = μη διαθέσιμα δεδομένα, ΧΜΘ = χημειοθεραπεία, ABL = Abelson Proto-Oncogene, AFF1 = ALF Transcription Elongation Factor 1 ή AF4, ARID1B = AT-Rich Interaction Domain 1B, BCL = B-Cell CLL/Lymphoma Transcription Coactivator, BCR = Breakpoint Cluster Region Activator Of RhoGEF And GTPase, BMP2K = BMP2 Inducible Kinase, CDKN = Cyclin Dependent Kinase Inhibitor, CREBBP = Cyclic AMP-Responsive Element-Binding Binding Protein, CRLF2 = Cytokine Receptor Like Factor 2, CSF1R = Colony Stimulating Factor 1 Receptor, DAZAP1 = Deleted In Azoospermia-Associated Protein 1, DOT1L = DOT1-Like Histone Lysine Methyltransferase, DUX4 = Double Homeobox 4 Protein, EML1 = Echinoderm Microtubule-Associated Protein-Like 1, EP300 = E1A Binding Protein P300, EPOR = Erythropoietin Receptor, ERG = ETS Transcription Factor, ETV6 = ETS Variant

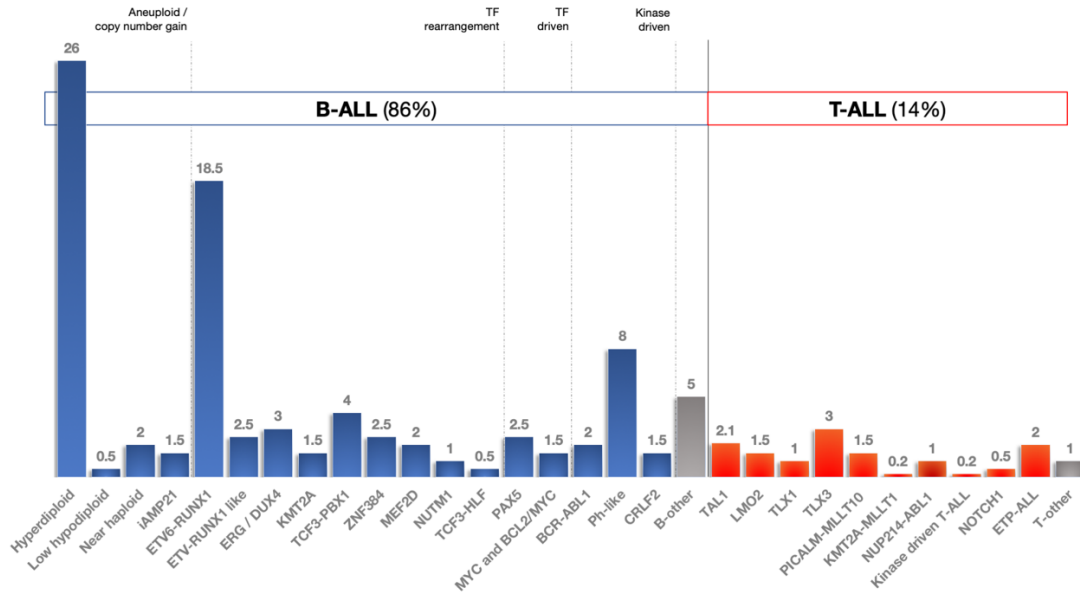
Transcription Factor 6 ή TEL Oncogene, FOXJ2 = , Forkhead Box J2 protein, EWSR1 = Ewing Sacroma RNA Binding Protein 1, HDAC = Histone deacetylases, HLF = Hepatic Leukemia Factor Transcription Factor PAR BZIP Family Member, HNRNPUL1 = Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U Like 1, iAMP = intrachromosomal amplification ή ενδοχρωμοσωμική ενίσχυση, IGH = Immunoglobulin Heavy Locus, IKZF = IKAROS Family Zinc Finger protein, JAK = Janus Kinase, KMT2A = Lysine Methyltransferase 2A ή MLL, LMO2 = LIM Domain Only 2, MEF2D = Myocyte Enhancer Factor 2D, MLLT1 = ENL Super Elongation Complex Subunit, MLLT10 = Histone Lysine Methyltransferase DOT1L Cofactor, MYC = MYC Proto-Oncogene BHLH Transcription Factor, NOTCH1 = Notch Receptor 1, NUP214 = Nucleoporin 214, NUTM1 = Nuclear Protein In Testis Midline Carcinoma Family Member 1, P2RY8 = Purinergic P2Y Receptor Family Member 8, PAX5 = Paired Box 5 protein, PBX1 = PBX Homeobox 1 ή Pre-B-Cell Leukemia Transcription Factor 1, PI3K = Phosphoinositide 3-kinase, PICALM = Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein, RB1 = Retinoblastoma-Associated Transcriptional Corepressor 1, RTK = Receptor Tyrosine Kinase ή υποδοχέας τυροσινικής κινάσης, RUNX1 = Runt-Related Family Transcription Factor 1 ή AML1, SMARCA2 = SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member 2, SS18 = SS18 Subunit Of BAF Chromatin Remodeling Complex, STAT = Signal Transducer And Activator Of Transcription, SYNRG = Synergin Gamma, TAF15 = TATA-Box Binding Protein Associated Factor 15, TAL1 = T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia BHLH Transcription Factor 1 Erythroid Differentiation Factor, TCF3 = Transcription Factor 3, TKI = tyrosine kinase inhibitor ή αναστολέας τυροσινικής κινάσης, TLX = T Cell Leukemia Homeobox, TP53 = tumor suppressor protein p53, WHSC1 = Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 2 (NSD2) ή Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 1 Protein, ZNF384 = Zinc Finger Protein 384.

**Πίνακας 2.** Υπότυποι ΟΜ σύμφωνα με τον WHO (28).

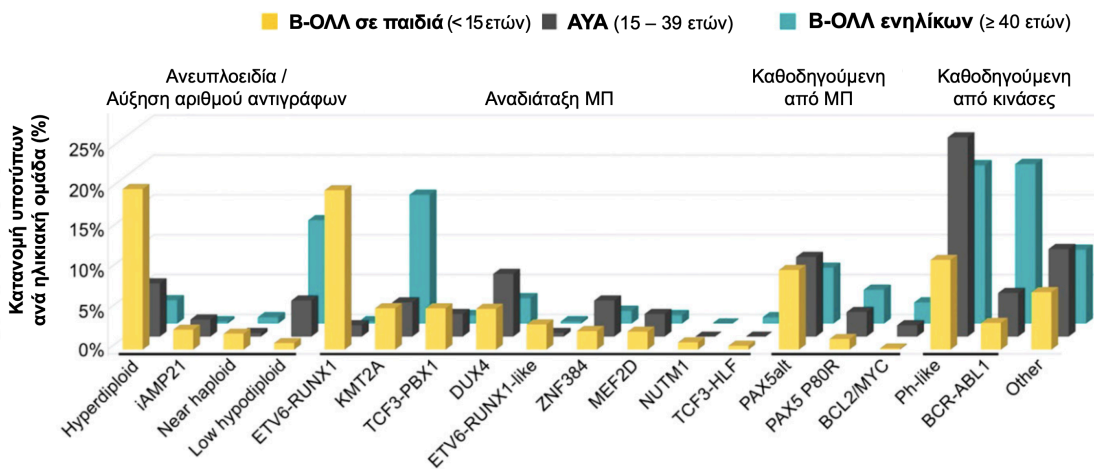
<b>B-ΟΜ</b>
B-ΟΜ, αταξινόμητη (NOS)
B-ΟΜ με επαναλαμβανόμενες γενετικές ανωμαλίες
B-ΟΜ με t(9;22)(q34.1;q11.2) μετάθεση ή <i>BCR-ABL1</i>
B-ΟΜ με t(v;11q23.3) ή αναδιάταξη <i>KMT2A</i>
B-ΟΜ με t(12;21)(p13.2;q22.1) μετάθεση ή <i>ETV6-RUNX1</i>
B-ΟΜ με υπερδιπλοειδία
B-ΟΜ με υποδιπλοειδία
B-ΟΜ με t(5;14)(q31.1;q32.3) μετάθεση ή <i>IL3-IGH</i>
B-ΟΜ με t(1;19)(q23;p13.3) μετάθεση ή <i>TCF3-PBX1</i>

B-ΟΛΛ BCR-ABL1–ομοιάζουσα
B-ΟΛΛ με iAMP21
<b>T-ΟΛΛ</b>
Πρώιμη λεμφοβλαστική λευχαιμία από πρόδρομα T-κύτταρα
T-ΟΛΛ από κύτταρα φυσικούς φονείς (NK)

Η ανευπλοειδία είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της ΟΛΛ στην παιδική ηλικία, ενώ οι χρωμοσωμικές αναδιατάξεις αφορούν επίσης σε ένα μεγάλο μέρος των παιδιών και εφήβων με ΟΛΛ (25). Η υπερδιπλοειδία (> 50 χρωμοσώματα) αφορά στο 25 – 30 % της παιδικής Β-ΟΛΛ και έχει εξαιρετική πρόγνωση, ενώ η υποδιπλοειδία με > 44 χρωμοσώματα είναι σπανιότερη (2 – 3 %) και σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση. Η υπερδιπλοειδία σχετίζεται με μεταλλάξεις στη Ras σηματοδοτική οδό (*KRAS*, *NRAS* και *PTPN11*), αλλά και με επιγενετικές τροποποιήσεις. Η υποδιπλοειδία έχει δύο υπότυπους με ξεχωριστά μεταγραφικά χαρακτηριστικά και γενετικές αλλαγές: (i) οι ασθενείς με χαμηλή υποδιπλοειδία (30 – 39 χρωμοσώματα) φέρουν διαγραφές του *IKZF2* και μεταλλάξεις στο *TP53*, αλλαγές που συχνά κληρονομούνται, εμφανίζεται εξαιρετικά σπάνια στα παιδιά (< 1 %), ενώ αυξάνεται δραματικά με την ηλικία κι εμφανίζεται στο 5 % των ΑΥΑ ALL και στο 10 % της Β-ΟΛΛ των ενηλίκων, σχετιζόμενη με πολύ πτωχή πρόγνωση, (ii) οι ασθενείς με σχετική απλοειδία (24 – 30 χρωμοσώματα) αφορούν στο 2 % των παιδιών με Β-ΟΛΛ, < 1 % των περιπτώσεων Β-ΟΛΛ σε ΑΥΑ και ενήλικες, ενώ χαρακτηρίζονται από Ras-ενεργοποιητικές μεταλλάξεις και αλλαγές στο γονίδιο *IKZF3*. Σημαντική είναι η αναγνώριση συγκεκριμένης υποδιπλοειδίας, η οποία προκύπτει συχνά μετά από διπλασιασμό του υποδιπλοειδικού κλώνου στις αντίστοιχες ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας, οδηγώντας σε αριθμό χρωμοσωμάτων στο φάσμα της υπερδιπλοειδίας –γεγονός που πρέπει να αποσαφηνίζεται για τη σωστή διαστρωματοποίηση του κινδύνου και τη μην αποφυγή αντιμετώπισης του παιδιού ως χαμηλού κινδύνου (25,27). Η Εικόνα 9 καταγράφει τη σχετική συχνότητα κάθε υπότυπου της ΟΛΛ στην παιδική και εφηβική ηλικία (30), ενώ στην Εικόνα 10 καταγράφεται η διαφορά που υπάρχει στην κατανομή των περιπτώσεων Β-ΟΛΛ αναλόγως ηλικιακής ομάδας και γενετικού υπόβαθρου.



**Εικόνα 9.** Η συχνότητα των υποτύπων της ΟΛΛ παιδιών και εφήβων.



**Εικόνα 10.** Κατανομή υποτύπων της Β-ΟΛΛ αναλόγως ηλικιακής ομάδας και αρχής.

ΜΠ = μεταγραφικός παράγοντας. Προσαρμοσμένη από (27).

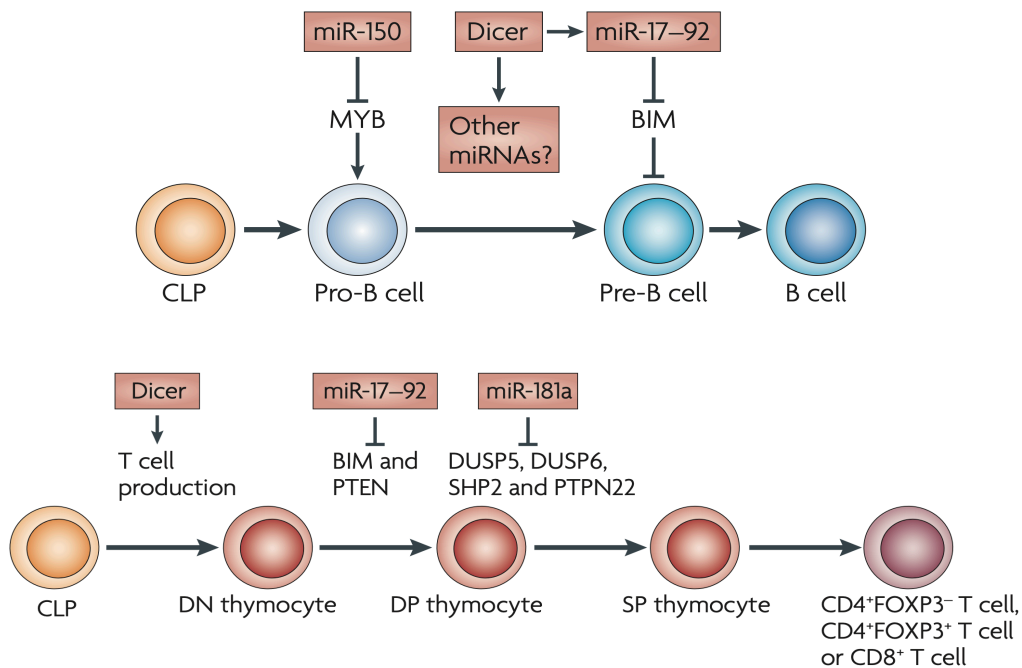


#### 1.4. Ο ρόλος των microRNAs στην ΟΛΛ

Τα miRNAs αναγνωρίστηκαν πρόσφατα ως ρυθμιστές της διαφοροποίησης της λεμφικής σειράς, διαδραματίζοντας έναν καίριο ρόλο στη βιολογία της λευχαιμογένεσης. Η αυξορρύθμιση και η μειορρύθμιση των microRNAs φαίνεται πως λειτουργεί ακριβώς όπως την έκφραση των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, ενώ συγκεκριμένες «υπογραφές» (miRNA signatures) έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση ασθενών με ΟΛΛ, αλλά και για τη διάκριση των υποτύπων της νόσου (30).

Από την αξιολόγηση των δημοσιευμένων δεδομένων για τη διαφορική έκφραση των miRNAs σε παιδιά και εφήβους με ΟΛΛ προκύπτουν μερικά αξιολογικά ευρήματα: (i) υπάρχουν μεγάλες διαφορές στο σχεδιασμό των μελετών που καθιστούν πρακτικά αδύνατη τη μετα-ανάλυση, (ii) η αυξορρύθμιση της οικογένειας του miR-128, της οικογένειας του miR-130, του miR-155, της οικογένειας του miR-181, του miR-210, του miR-222, του miR-363 και του miR-708, παράλληλα με τη μειορρύθμιση των miR-143 και miR-148a, φαίνεται να παίζει ένα καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της ΟΛΛ στην παιδική και εφηβική ηλικία, (iii) υπάρχουν επιπλέον miRNAs που φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεση της ΟΛΛ λόγω της διαφορικής τους έκφρασης: let-7e, let-7f, miR-24, miR-99a, miR-100, miR-125b, miR-145, miR-146a, miR-182, miR-196b, miR-199b, miR-223 και miR-335, (iv) η αυξορρύθμιση των miR-130b, miR-181a και miR-181b, όπως και η μειορρύθμιση των miR-145 και miR-574 επιβεβαιώθηκαν ως βιοδείκτες της Τ-ΟΛΛ σε παιδιά και εφήβους (30). Ειδικότερα για την Τ-ΟΛΛ, τα hsa-miR-128-3p και hsa-miR-181b-5p ως κύριοι ρυθμιστές της πρώιμης διαφοροποίησης της λεμφικής σειράς αποτρέπουν την ωρίμανση των αντίστοιχων αρχέγονων κυττάρων και συμβάλλουν στη διαφυγή από την ανοσολογική επιτήρηση (31,32). Το hsa-miR-130a-3p έχει τη δυνατότητα να τροποποιεί τα προγράμματα επιβίωσης του κυττάρου μέσω ρύθμισης της αυτοφαγίας και της αναστολής της Dicer, που αποτελεί το κύριο συστατικό του συμπλόκου RISC (33). Επίσης, τα hsa-miR-106a-5p και hsa-miR-20b-5p, που σχηματίζουν συστάδα, είναι μέλη της οικογένειας του miR-17 family και αποτελούν οδηγούς της καρκινογένεσης (34). Το hsa-miR-30a-5p, του οποίου η μειορρύθμιση οδηγεί σε αναστολή της απόπτωσης, προάγει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη μετάσταση μέσω των PI3K/AKT/mTOR και miR-30a/NOTCH1/MYC σηματοδοτικών οδών (35). Το hsa-miR-24-3p, του οποίου η μειορρύθμιση συσχετίστηκε με διαγραφή του *PAX5*, έχει αντίκτυπο στην έκφραση των *MYC*, *BCL2* and *HIF1A* (που κωδικοποιεί την hypoxia-

inducible factor 1 subunit alpha) ογκογονιδίων, αλλά και στα επίπεδα των p21 και p53 ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών (36). Το hsa-miR-143-3p επάγει τη διαγραφή της συστάδας miR-143~145 και έχει αναγνωριστεί ως ορόσημο νεοπλασίας σε διάφορους τύπους καρκίνου (34). Η μείωση της έκφρασης του hsa-miR-574-3p προάγει τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλει την απόπτωση στα λευχαιμικά κύτταρα στοχεύοντας την IL6/JAK/STAT3 σηματοδοτική οδό (37). Ομοίως, η μειορρύθμιση του hsa-miR-618 εμπλέκεται στη λευχαιμογένεση στα παιδιά, αλλά και στην παθογένεση των λεμφωμάτων μέσω της έκφρασης των p53, *STAT3*, *HDAC3* (histone deacetylase 3), *CUL4A* (cullin 4A) και *FKBP3* (38,39). Η Εικόνα 11 απεικονίζει σχηματικά τα σημεία στα οποία υπάρχουν γνωστές αλληλεπιδράσεις miRNAs κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων της λεμφικής σειράς.



**Εικόνα 11.** Τα miRNAs στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων (40).

CLP = common lymphoid progenitor, DN = (CD4/CD8) double-negative, DP = double-positive, SP = single-positive

Πρόσφατα έγινε διαθέσιμη η πλατφόρμα ALLSorts που χρησιμοποιεί δεδομένα RNA-seq για την ταξινόμηση δειγμάτων B-ΟΛΛ από παιδιά και εφήβους σε 18

υπότυπους και 5 μετα-υπότυπους, ενώ το εργαλείο RNAseqCNV έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει μεγάλης κλίμακας παραλλαγές αριθμού αντιγράφων από RNA-seq δεδομένα. Να σημειωθεί πως επί του παρόντος υπάρχουν περιορισμένες στρατηγικές miRNA-μιμητικών και -αναστολέων για τη θεραπεία της ΟΛΛ στα παιδιά *in vitro*, ενώ υπάρχουν λόγοι ανησυχίας ως προς την ταχύτητα αποδόμησης, την ασφάλεια και τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις τέτοιων παρεμβάσεων *in vivo* (30). Το cobomarsen, ένας ολιγονουκλεοτιδικός αναστολέας του miR-155, είναι το πρώτο φάρμακο αυτής της κατηγορίας που έχει λάβει έγκριση από τον FDA (2020) για λεμφώματα από T-κύτταρα (41).

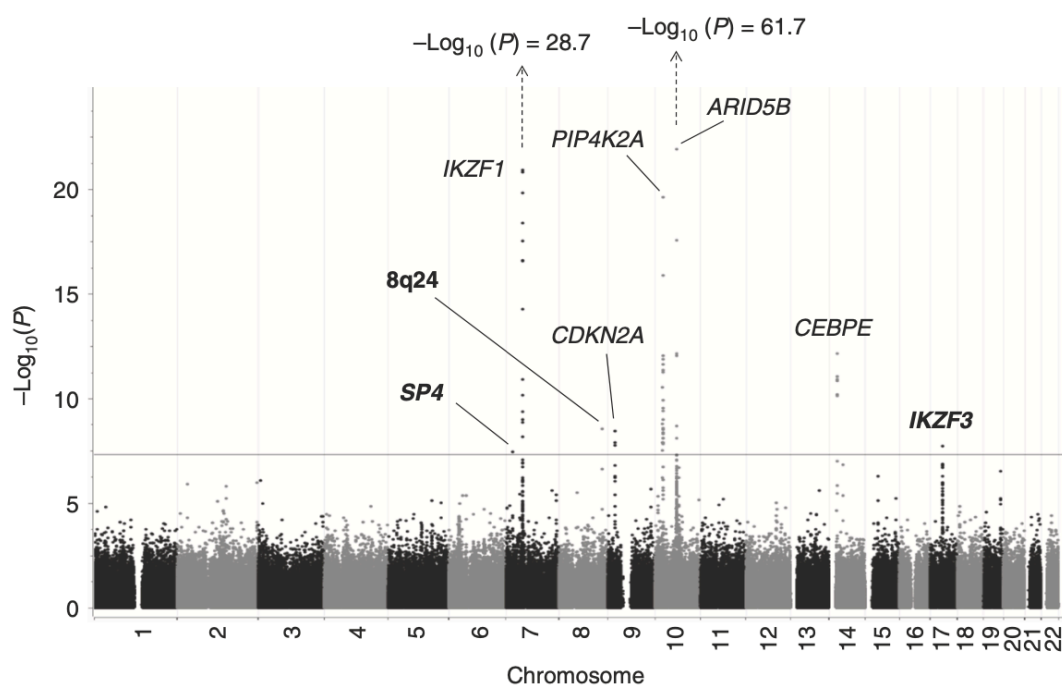
### **1.5. SNPs στα γονίδια της οδού βιογένεσης των microRNAs και νεοπλασία**

Μέχρι πρόσφατα υπήρχε η θεωρία ότι δεν υπάρχει κληρονομική βάση για την ΟΛΛ της παιδικής και εφηβικής ηλικίας. Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι βλαστικές (germline) μεταλλάξεις ευθύνονται για το 3 – 4 % των περιπτώσεων, υποδεικνύοντας την αξία του προσδιορισμού της γενετικής προδιάθεσης για τη νόσο με προεκτάσεις ακόμα και στο πεδίο της πρόληψης (42). Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms ή SNPs) είναι η πλέον συχνή μορφή παραλλαγής στο DNA, αφορούν σε μία και μόνο βάση (συνήθως από αντικατάσταση μιας βάσης αδενίνης A, θυμίνης T, κυτοσίνης C ή γουανίνης G) και απαντώνται αδρά ανά 1.000 ζεύγη βάσεων. Εξ ορισμού οι SNPs εμφανίζονται στο γενικό πληθυσμό με συχνότητα > 1 %, κληρονομούνται και ευθύνονται για το 90 – 95% της ποικιλομορφίας του ανθρώπινου DNA. Στην περίπτωση που ο SNP βρίσκεται στην περιοχή ενός γονιδίου, αυτός μπορεί να διαταράσσει τη λειτουργία του, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις ο SNP βρίσκεται εκτός γονιδίων και συσχετίζεται με άλλους τύπους παραλλαγών του DNA. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι SNPs χρησιμεύουν ως δείκτες και τυπικά είναι διαλληλικοί, ενώ σπάνια είναι τρι- ή τετρα-αλληλικοί. Οι SNPs εντός των γονιδίων ή των ρυθμιστικών περιοχών τους έχουν συχνά ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της λειτουργίας του γονιδίου, επηρεάζουν μεταβολικά μονοπάτια και κατά συνέπεια μπορούν να επηρεάσουν την εμφάνιση και την πορεία μιας νόσου. Με αυτόν τον τρόπο, οι SNPs αυτοί χρησιμεύουν ως βιολογικοί δείκτες για την ταυτοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με την εμφάνιση και τον κίνδυνο εμφάνισης μιας νόσου, ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην πρόβλεψη της απόκρισης στη θεραπεία και πιθανών ανεπιθύμητων ενεργειών (10).

Τα τελευταία χρόνια, σημαντικές πληροφορίες σε σχέση με τους SNPs στη νόσο έχουν προκύψει από μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-Wide Association Study ή GWAS). Στη GWAS σαρώνονται δείκτες από ολόκληρο το γονιδίωμα (> 0,5 εκατομμύριο) σε δείγματα πολλών ατόμων (συνήθως χιλιάδων ασθενών και υγιών ατόμων), ώστε να εντοπιστούν γενετικές παραλλαγές (variations) που μπορεί να σχετίζονται με την υπό μελέτη ασθένεια. Οι GWAS έχουν ως κεντρική υπόθεση την «κοινή παραλλαγή – κοινή ασθένεια», δηλαδή ότι τα συχνά νοσήματα θα οφείλονται και σε παραλλαγές του γονιδιώματος που απαντώνται συχνά στον πληθυσμό. Επίσης, καθίστανται δυνατές χάρη στην δομή του γονιδιώματος και την ιδιότητα της ανισορροπίας σύνδεσης που παρατηρείται ανάμεσα στις παραλλαγές του DNA (μη τυχαία συσχέτιση αλληλόμορφων). Με την ολοκλήρωση του Human Genome Project το 2003 και του International HarMap Project το 2005, ένα σύνολο εργαλείων κατέστησε δυνατή τη διεξαγωγή μελετών GWAS: ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων με την αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδιώματος, χάρτες των ανθρώπινων γενετικών παραλλαγών και νέες τεχνολογίες / αλγόριθμοι που μπορούν με ταχύτητα και ακρίβεια να αναλύουν δείγματα ολόκληρου του γονιδιώματος για γενετικές παραλλαγές που συνοδεύουν την εμφάνιση μιας νόσου (43–45).

Η μεγαλύτερη GWAS στο πεδίο της ΟΜ της παιδικής και εφηβικής ηλικίας μέχρι σήμερα περιλάμβανε 3.263 παιδιά από την Καλιφόρνια των ΗΠΑ. Εκτός από το μεγάλο μέγεθος δείγματος, η συγκεκριμένη GWAS ήταν η πρώτη καλά σταθμισμένη μελέτη, καθώς όλες οι προηγούμενες σχετικές μελέτες αφορούσαν λευκούς μη Λατινοαμερικάνικους πληθυσμούς, ενώ συμμετείχαν 1.949 παιδιά Λατινοαμερικάνικης καταγωγής, που εμφανίζουν επιδημιολογικά μεγαλύτερη επίπτωση ΟΜ. Ελέγχθηκαν 757.935 SNPs και βρέθηκαν γενετικοί τόποι προδιάθεσης στα γονίδια *ARID5B*, *CEBPE*, *IKZF1*, *CDKN2A*, *PIP4K2A*, αλλά και στα *GATA3*, *LHPP* και *ELK3* που είχαν προσδιοριστεί σε προηγούμενες μελέτες. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκαν αλληλόμορφα κινδύνου στα 8q24.1 (rs4617118) και *IKZF3* (rs2290400), όπως απεικονίζονται σχηματικά στην Εικόνα 12. Οι πολυμορφισμοί στις θέσεις αυτές σχετίζονται με μεταγραφικούς παράγοντες της αιμοποίησης, με αλλαγές στις θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στους υποκινητές των γονιδίων τους, αλλά και με ρυθμιστές της ανοσιακής απάντησης, της φλεγμονής και της πυρόπτωσης –της προγραμματισμένης νέκρωσης μέσω φλεγμονής (44). Μια άλλη GWAS σε 1.191 παιδιά με Τ-ΟΜ κατέδειξε τη συσχέτιση των πολυμορφισμών rs2188127 στο *CDKN2A* και rs74010351 στο *USP7* –που κωδικοποιεί μια πρωτεάση που συμμετέχει στην ουβικουιτίνωση και βρίσκεται συχνά (12 %) μεταλλαγμένη στην Τ-ΟΜ, ενώ

ακόμα πιο συχνά σε παιδιά Αφρικανικής καταγωγής (43). Μία επιπλέον GWAS σε 527 παιδιά με Β-ΟΜ από την Ιαπωνία επιβεβαίωσε στατιστικώς σημαντικούς συσχετισμούς κινδύνου για τον rs10821936 του *ARID5B*, τον rs7088318 του *PIP4K2A* και τον rs1451367 του *IKZF1*, ενώ δεν επιβεβαιώθηκε η συσχέτιση με τον πολυμορφισμό στο γονίδιο *WVOX* που έχει συσχετιστεί με την ΟΜ σε παιδιά Κινέζικης καταγωγής (46). Η εντελώς διαφορετική βιολογική βάση της ΟΜ των παιδιών με την ΟΛ των εφήβων και νεαρών ενηλίκων (AYAs) επιβεβαιώθηκε από αντίστοιχη GWAS, όπου η στη μελέτη 308 AYAs με ΟΛ ταυτοποιήθηκαν μόλις δύο στατιστικώς σημαντικές περιοχές κινδύνου εντοπιζόμενες και οι δύο στο γονίδιο *GATA3* (rs3824662 και rs3781093), με τον rs3824662 σημαντικά πιο συχνό στον υπότυπο Ph-like (ομοιάζων με χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας) (47).



**Εικόνα 12.** Διάγραμμα Manhattan P τιμών από τη μεγαλύτερη GWAS σε παιδιά με ΟΜ (44).

Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας αποκάλυψε μόλις 3 μελέτες με τη συχνότητα των SNPs σε γονίδια της οδού βιογένεσης των microRNAs σε παιδιά και έφηβους με ΟΜ και σε υγιή παιδιά και τα αποτελέσματά τους παρατίθενται στον

Πίνακα 3 . Καμία από τις μελέτες αυτές δε συμπεριέλαβε τον rs3742330 στο γονίδιο *DICER1*. Δύο από τις μελέτες αυτές διερεύνησαν τον πολυμορφισμό rs636832 στο γονίδιο του *AGO1* σε σχέση με την εμφάνιση Β-ΟΜ στην παιδική ηλικία και κατέληξαν και οι δύο πως ο γονότυπος AA ήταν πιο συχνός μεταξύ των ασθενών παρά μεταξύ της ομάδας ελέγχου, αλλά η διαφορά αυτή δεν ήταν στο σύνολο στατιστικά σημαντική (48–50).

**Πίνακας 3.** SNPs στα γονίδια βιογένεσης των miRNAs και προδιάθεση για ΟΜ στην παιδική ηλικία.

Γονίδιο	SNP	Ευρήματα	Ασθενείς / Μάρτυρες	Χώρα
<i>AGO1</i> (ή <i>EIF2C1</i> )	rs636832	NS για Β-ΟΜ	75 / 100	Βραζιλία
		AA γονότυπος = κίνδυνος για Β-ΟΜ	201 / 347	Ισπανία
	rs595961	GG γονότυπος = κίνδυνος για Β-ΟΜ	195 / 339	Ισπανία
<i>CNOT1</i>	rs11866002	CT+TT γονότυποι = προστατευτικοί έναντι Β-ΟΜ	197 / 346	Ισπανία
<i>CNOT6</i>	rs6877400	CT+CC γονότυποι = προστατευτικοί έναντι Β-ΟΜ	200 / 349	Ισπανία
<i>DGCR8</i>	rs9606248	AG+GG γονότυποι προστατευτικοί έναντι Β-ΟΜ	199 / 348	Ισπανία
	rs1640299	TT γονότυπος = προστατευτικός έναντι Β-ΟΜ	199 / 349	Ισπανία
<i>DROSHA</i>	rs10035440	TT γονότυπος = κίνδυνος για Β-ΟΜ	198 / 339	Ισπανία
		NS για Β-ΟΜ	80 / 148	Βραζιλία

	rs3805500	AA γονότυπος = κίνδυνος για Β-ΟΜ	74 / 159	Βραζιλία
	rs642321	T αλλήλιο = προστατευτικό έναντι Β-ΟΜ	75 / 115	Ιράν
<i>TNRC6B</i>	rs139919	CC γονότυπος = κίνδυνος για Β-ΟΜ	189 / 343	Ισπανία

NS = not significant ή χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά

#### Νεοπλασίες και rs3742330 στο γονίδιο *DICER1*

Όπως προαναφέρθηκε, η Dicer είναι μια ελικάση με μοτίβο ριβονουκλεάσης που κόβει τα διπλής έλικας RNA και pre-miRNA σε μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs και ώριμα miRNAs, αντίστοιχα. Τα θραύσματα αυτά έχουν μήκος 20 – 25 ζεύγη βάσεων με μια περίσσεια δύο βάσεων στο 3'-άκρο τους. Από εκεί κι έπειτα, η Dicer ενεργοποιεί το σύμπλοκο RISC, το οποίο είναι απαραίτητο για τη διαδικασία της RNAi (51). Ο πολυμορφισμός rs3742330 A>G στην 3'-UTR του γονιδίου *DICER1* οδηγεί σε μη κωδική παραλλαγή (non-coding variant). Ο Πίνακας 4 περιγράφει τη συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων στον rs3742330. Η συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας ανέδειξε 17 μελέτες που περιλάμβαναν δεδομένα σχετικά με τη μελέτη του rs3742330 στο γονίδιο *DICER1* σε πάσχοντες από καρκίνο και υγιείς μάρτυρες (Πίνακας 5). Ο Πίνακας 6 αφορά στη μετα-ανάλυση των δεδομένων από αυτές τις μελέτες ανά νεοπλασία. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το λογισμικό Review Manager version 5.4.1 (RevMan, The Cochrane Collaboration, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο) και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι, παρόλο που υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις σε μερικές νεοπλασίες, ο SNP rs3742330 δε φάνηκε να σχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με την εμφάνιση νεοπλασιών γενικά –με εξαίρεση τους ομοζυγώτες GG που φαίνεται να προστατεύονται έναντι των νεοπλασιών συγκρινόμενοι με τους ομοζυγώτες AA: (i) OR 0,974 με 95 % CI 0,889 έως 1,066 και  $p = 0,562$  για το μοντέλο αλληλόμορφων G έναντι A με Q test 34,92 ,  $p = 0,003$  και  $I^2$  57,04% ως προς την ετερογένεια και Egger's  $p = 0,942$  ως προς τη μεροληψία, (ii) OR 0,892 με 95 % CI 0,794 έως 1,003 και  $p = 0,055$  για το υπολειπόμενο μοντέλο του γονότυπου GG έναντι των AA+AG με Q test 12,88 ,  $p = 0,611$  και  $I^2$  0 % ως προς την

ετερογένεια και Egger's  $p = 0,308$  ως προς τη μεροληψία, (iii) OR 0,979 με 95 % CI 0,856 έως 1,12 και  $p = 0,761$  για το επικρατές μοντέλο των γονότυπων AG+GG έναντι του AA με Q test 51,99 ,  $p < 0,001$  και  $I^2 71,15$  % ως προς την ετερογένεια και Egger's  $p = 0,758$  ως προς τη μεροληψία, (iv) OR 0,997 με 95 % CI 0,866 έως 1,147 και  $p = 0,964$  για το ετεροζυγωτικό μοντέλο AG έναντι AA με Q test 52,15 ,  $p < 0,001$  και  $I^2 71,23$  % ως προς την ετερογένεια και Egger's  $p = 0,754$  ως προς τη μεροληψία, και (v) OR 0,878 με 95 % CI 0,744 έως 0,998 και  $p = 0,046$  για το ομοζυγωτικό μοντέλο των γονότυπων GG έναντι AA με Q test 18,31 ,  $p = 0,247$  και  $I^2 18,08$  % ως προς την ετερογένεια και Egger's  $p = 0,644$  ως προς τη μεροληψία.

**Πίνακας 4.** Η συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων στον rs3742330 της Dicer.

	<b>Αλληλόμορφο αναφοράς</b>	<b>Εναλλακτικό αλληλόμορφο</b>
Ευρωπαίοι (n =174798)	A = 0.909278	G = 0.090722
Παγκόσμια (n = 202072)	A = 0.905964	G = 0.094036

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3742330>, τελευταία πρόσβαση: 29 Ιανουαρίου 2024

**Πίνακας 5.** Οι δημοσιευμένες μελέτες συσχέτισης του rs3742330 στο γονίδιο *DICER1* με διάφορους τύπους καρκίνου.

<b>Μελέτη</b>	<b>Ασθενείς</b>	<b>Ομάδα ελέγχου</b>	<b>Χώρα</b>	<b>Μέθοδος</b>
Θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς (52)	120	130	Ιράν	PCR-RFLP
Καρκίνος παχέος εντέρου (53)	700	1400	Νότια Κορέα	MassARRAY iPLEX Gold
Καρκίνος ενδομητρίου (54)	80	79	Τουρκία	TaqMan genotyping
Καρκίνος τραχήλου μήτρας (55)	296	296	Κίνα	MALDI-TOF MS
Γαστρικός καρκίνος (56)	628	502	Κίνα	HRMA
Καρκίνος προστάτη (57)	353	318	Σερβία	HRMA



Καρκίνος κεφαλής – τραχήλου (58)	575	1551	Κίνα	Illumina Infmium BeadChip
NHL (59)	180	529	ΗΠΑ	Fluidigm Dynamic HB 96.96
Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (60)	147	209	Νότια Κορέα	PCR-RFLP
Καρκίνος λάρυγγα (61)	123	170	Πολωνία	TaqMan genotyping
Καρκίνος παχέος εντέρου (62)	408	400	Νότια Κορέα	PCR-RFLP
Καρκίνος οισοφάγου (63)	380	380	Κίνα	MALDI-TOF MS
Καρκίνος ουροδόχου κύστης (64)	683	727	Κίνα	TaqMan genotyping
Καρκίνος πνεύμονα (65)	100	100	Νότια Κορέα	SMSG
Καρκίνος ουροδόχου κύστης (66)	727	724	ΗΠΑ	SNPlex
Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (67)	277	278	ΗΠΑ	SNPlex
Γαστρικός καρκίνος (68)	137	142	Κίνα	PCR-ligase detection reaction

HRMA = high-resolution melting analysis, MALDI-TOF MS = matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometer, NHL = non-Hodgkin lymphoma ή λέμφωμα μη-Hodgkin, SMSG = SNP mass spectrometry genotyping, PCR-RFLP = PCR restriction fragment length polymorphism

**Πίνακας 6.** Μετα-ανάλυση των δεδομένων της συστηματικής ανασκόπησης της βιβλιογραφίας ανά νεοπλασία για το μοντέλο αλληλόμορφων G έναντι A του rs3742330 στο γονίδιο *DICER1*.

<b>Νεοπλασία</b>	<b>OR (95 % CI)</b>	<b>p</b>
Καρκίνος παχέος εντέρου	1,002 (0,822 – 1,220)	0,987
Καρκίνος ουροδόχου κύστης	1,034 (0,905 – 1,182)	0,619
<b>Θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς</b>	<b>0,553 (0,342 – 0,894)</b>	<b>0,016</b>
Καρκίνος ενδομητρίου	0,626 (0,333 – 1,174)	0,144
<b>Προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις τραχήλου</b>	<b>0,730 (0,578 – 0,924)</b>	<b>0,009</b>
<b>Γαστρικός καρκίνος</b>	<b>0,762 (0,642 – 0,905)</b>	<b>0,002</b>
Καρκίνος προστάτη	1,029 (0,723 – 1,462)	0,875
Καρκίνωμα κεφαλής – τραχήλου	0,998 (0,867 – 1,149)	0,979
NHL	0,883 (0,580 – 1,345)	0,563
Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα	1,020 (0,755 – 1,378)	0,900
<b>Καρκίνος λάρυγγα</b>	<b>1,413 (1,005 – 1,987)</b>	<b>0,047</b>
Καρκίνος οισοφάγου	1,117 (0,909 – 1,373)	0,293
Καρκίνος πνεύμονα	1,359 (0,914 – 2,023)	0,130
Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα	0,863 (0,555 – 1,341)	0,512

OR = odds ratio ή σχετικός λόγος συμπληρωματικών πιθανοτήτων (λόγος απόδοσης), CI = confidence interval ή διάστημα εμπιστοσύνης

#### Νεοπλασίες και rs636832 στο γονίδιο *AGO1*

Η πρωτεΐνη AGO1, όπως προαναφέρθηκε, προσδένει μικρά μη-κωδικά μόρια RNA (miRNAs, piRNAs και siRNAs) και αποτελεί απαραίτητο συστατικό του RISC συμπλόκου, δια μέσου του οποίου επιτελείται η RNAi. Ο πολυμορφισμός rs636832 βρίσκεται σε εσώνιο του γονιδίου *AGO1* και οδηγεί σε παραλλαγή εσωνίου. Η παλαιότερη ονομασία του AGO1 είναι EIF2C1 (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2C, 1) και η υψηλού βαθμού συντήρησή του κατά τη διάρκεια της εξέλιξης υποδηλώνει ότι διαδραματίζει ένα σημαντικό φυσιολογικό ρόλο. Να σημειωθεί πως διαγραφή του γονιδίου *AGO1* παρατηρείται συχνά σε διάφορες νεοπλασίες, όπως στον όγκο του Wilms (νεφροβλάστωμα), στο νευροβλάστωμα και σε νεοπλασίες του μαστού, του

ήπατος και του παχέος εντέρου (69). Ο Πίνακας 7 περιγράφει τη συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων στον rs636832. Η συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας ανέδειξε 9 μελέτες που περιλάμβαναν δεδομένα σχετικά με τη μελέτη του rs636832 στο γονίδιο *AGO1* σε πάσχοντες από καρκίνο και υγιείς μάρτυρες (Πίνακας 8). Ο Πίνακας 9 αφορά στη μετα-ανάλυση των προηγούμενων δεδομένων ανά νεοπλασία. Η επεξεργασία των δεδομένων της συστηματικής ανασκόπησης κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο SNP rs636832 δε σχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με την εμφάνιση νεοπλασιών γενικά –με εξαίρεση ίσως τους φορείς του αλληλόμορφου A που φαίνεται πως προστατεύονται έναντι του καρκίνου του πνεύμονα συγκρινόμενοι με τους φορείς του αλληλόμορφου G: (i) OR 0,967 με 95 % CI 0,866 έως 1,080 και  $p = 0,556$  για το μοντέλο αλληλόμορφων A έναντι G με Q test 8,727 ,  $p = 0,12$  και  $I^2 42,7 \%$  ως προς την ετερογένεια και Egger's  $p = 0,035$  ως προς τη μεροληψία, (ii) OR 1,048 με 95 % CI 0,813 έως 1,352 και  $p = 0,717$  για το υπολειπόμενο μοντέλο του γονότυπου AA έναντι των GG+GA με Q test 3,726 ,  $p = 0,589$  και  $I^2 0 \%$  ως προς την ετερογένεια και Egger's  $p = 0,167$  ως προς τη μεροληψία, (iii) OR 0,941 με 95 % CI 0,819 έως 1,081 και  $p = 0,392$  για το επικρατές μοντέλο των γονότυπων GA+AA έναντι του GG με Q test 8,968 ,  $p = 0,11$  και  $I^2 44,25 \%$  ως προς την ετερογένεια και Egger's  $p = 0,224$  ως προς τη μεροληψία, (iv) OR 0,940 με 95 % CI 0,814 έως 1,085 και  $p = 0,397$  για το ετεροζυγωτικό μοντέλο GA έναντι GG με Q test 8,321 ,  $p = 0,139$  και  $I^2 39,91 \%$  ως προς την ετερογένεια και Egger's  $p = 0,341$  ως προς τη μεροληψία, και (v) OR 1,090 με 95 % CI 0,816 έως 1,456 και  $p = 0,561$  για το ομοζυγωτικό μοντέλο των γονότυπων AA έναντι GG με Q test 4,571 ,  $p = 0,47$  και  $I^2 0 \%$  ως προς την ετερογένεια και Egger's  $p = 0,111$  ως προς τη μεροληψία.

**Πίνακας 7.** Η συχνότητα εμφάνισης των αλληλόμορφων στον rs636832 του *AGO1*.

	<b>Αλληλόμορφο αναφοράς</b>	<b>Εναλλακτικό αλληλόμορφο</b>
Ευρωπαίοι (n = 220040)	G = 0.919296	A = 0.080704
Παγκόσμια (n = 248504)	G = 0.884738	A = 0.115262

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs636832>, τελευταία πρόσβαση: 29 Ιανουαρίου 2024

**Πίνακας 8.** Οι δημοσιευμένες μελέτες συσχέτισης του rs636832 στο γονίδιο AGO1 με διάφορους τύπους καρκίνου.

<b>Μελέτη</b>	<b>Ασθενείς</b>	<b>Ομάδα ελέγχου</b>	<b>Χώρα</b>	<b>Μέθοδος</b>
Γαστρικός καρκίνος (56)	628	502	Κίνα	HRMA
ΧΜΛ (70)	312	469	Μεξικό	TaqMan genotyping
ΧΛΛ (71)	105	347	Ισπανία	TaqMan OpenArray Genotyping
Καρκίνος πνεύμονα (65)	98	97	Νότια Κορέα	TaqMan genotyping
Καρκίνος ουροδόχου κύστης (66)	738	736	ΗΠΑ	SNPlex technology
Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (67)	277	277	ΗΠΑ	SNPlex technology
Καρκίνος μαστού (72)	93	93	Αίγυπτος	TaqMan genotyping
Καρκίνος οισοφάγου (73)	346	346	ΗΠΑ	SNPlex technology
Καρκίνος παχέος εντέρου (74)	1115	1173	ΗΠΑ	Illumina HumanHap 550
B-ΟΜΛ (48)	213	387	Ισπανία	TaqMan OpenArray Genotyping
B-ΟΜΛ (49)	75	150	Βραζιλία	TaqMan OpenArray Genotyping

ΧΛΛ = χρόνια λεμφοβλαστική λευχαιμία, ΧΜΛ = χρόνια μυελογενής λευχαιμία

**Πίνακας 9.** Μετα-ανάλυση των δεδομένων της συστηματικής ανασκόπησης της βιβλιογραφίας ανά νεοπλασία για το μοντέλο αλληλόμορφων A έναντι G του rs636832 στο γονίδιο *AGO1*.

<b>Νεοπλασία</b>	<b>OR (95 % CI)</b>	<b>p</b>
Καρκίνος ουροδόχου κύστης	0,828 (0,642 – 1,069)	0,147
ΧΜΛ	0,720 (0,402 – 1,289)	0,269
ΧΜΛ	1,103 (0,901 – 1,352)	0,342
Γαστρικός καρκίνος	1,063 (0,882 – 1,280)	0,522
<b>Καρκίνος πνεύμονα</b>	<b>0,614 (0,380 – 0,994)</b>	<b>0,047</b>
Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα	0,867 (0,583 – 1,289)	0,480
Καρκίνος μαστού	0,714 (0,439 – 1,162)	0,175
B-ΟΜ	1,081 (0,896 – 1,303)	0,417

**Σκοπός** της παρούσας μελέτης ασθενών-μαρτύρων είναι να διερευνηθεί η συχνότητα των αλληλόμορφων στους πολυμορφισμούς rs3742330 στο γονίδιο *DICER1* και rs636832 στο γονίδιο *AGO1* και να μελετηθεί η σχέση τους με την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία σε παιδιά και εφήβους. Πρόκειται για την πρώτη μελέτη των πολυμορφισμών αυτών στην Ελλάδα, ενώ αποτελεί και την πρώτη μελέτη στη βιβλιογραφία για τον SNP rs3742330 στο γονίδιο *DICER1* στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία. Επιπλέον, θα διερευνηθεί η σχέση των πολυμορφισμών αυτών με την εμφάνιση υποτροπής και την έκβαση της νόσου.

## **2. Υλικό και Μεθοδολογία**

Η διάκριση δύο αλληλόμορφων ενός συγκεκριμένου SNP σε μελέτες γονοτύπησης μπορεί να γίνει με τρία είδη τεχνικών: (α) με τεχνικές που βασίζονται στην PCR, (β) με ανάλυση μικροσυστοιχιών και (γ) με NGS. Κάθε μέθοδος έχει τα δυνατά και τα αδύνατα σημεία της και εφαρμόζεται σε διαφορετικές περιπτώσεις. Οι τεχνικές που βασίζονται σε PCR προσφέρουν την υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα σε χαμηλότερο κόστος σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μεθόδους (75). Η μέθοδος RT-qPCR επιλέχθηκε με γνώμονα τα προαναφερθέντα και την ύπαρξη

διαθέσιμου εξοπλισμού στο Εργαστήριο Βιολογίας Αιματολογικών Νόσων και Καρκίνου στα Παιδιά.

Για τη διασφάλιση επαρκούς ακρίβειας, οι SNPs που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα μελέτη ικανοποιούσαν τα εξής κριτήρια: (i) είχαν MAF (minor allele frequency ή συχνότητα του ελάσσονος αλληλίου)  $\geq 0.05$ , (ii) είχαν ποσοστό γονοτύπησης  $\geq 80$  %, και (iii) ο έλεγχος για απόκλιση της ισορροπίας στην κατανομή των γονοτύπων στην ομάδα ελέγχου με βάση την αρχή των Hardy–Weinberg (Hardy–Weinberg equilibrium ή HWE) διορθωμένος μέσω πολλαπλών συγκρίσεων και τη μέθοδο Bonferroni να έχει αποβεί αρνητικός. Κάθε δείγμα στη μελέτη δουλεύτηκε δύο φορές (τουλάχιστον).

## 2.1. Πληθυσμός μελέτης

Το υλικό της μελέτης αφορά σε 216 συνολικά δείγματα, εκ των οποίων τα 99 δείγματα προήλθαν από υγιή παιδιά, εφήβους και νεαρούς ενήλικες και τα 117 δείγματα αντιστοιχούν σε παιδιά και έφηβους με ΟΛΛ που έχουν διαγνωστεί στην Κλινική Αιματολογίας – Ογκολογίας Παίδων του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠαΓΝΗ) και προτού λάβουν θεραπεία. Τα στοιχεία των μαρτύρων και του υπό μελέτη πληθυσμού με ΟΛΛ περιγράφονται στον Πίνακα 10.

**Πίνακας 10.** Επιδημιολογικά στοιχεία των παιδιών και εφήβων με ΟΛΛ και της ομάδας ελέγχου.

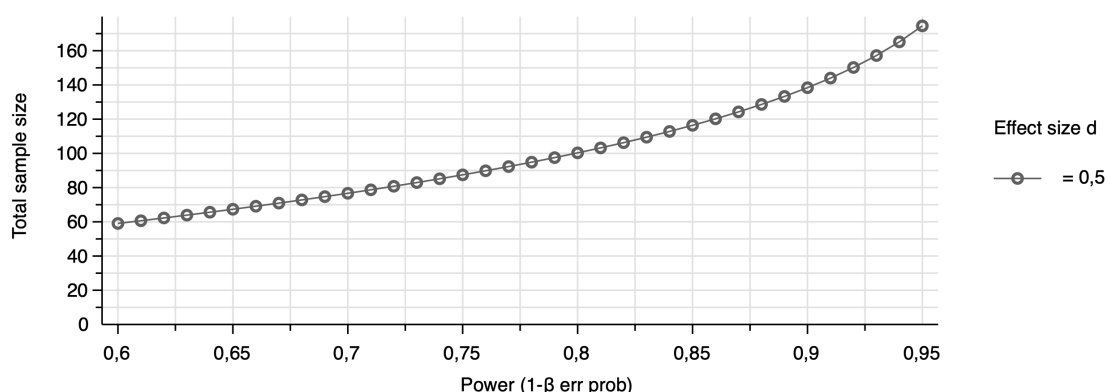
	<b>ΟΛΛ</b> (n = 117)	<b>Ομάδα ελέγχου</b> (n = 99)
Διάμεση ηλικία σε έτη (εύρος)	4,25 (1,2 – 18,1)	18,5 (1,3 – 37)
Φύλο κορίτσια : αγόρια	50 (42,7 %) : 67 (57,3 %)	49 (49,5 %) : 50 (50,5 %)

Για τις ανάγκες της μελέτης μελετήθηκαν τόσο κύτταρα από το αρχειακό υλικό της Κλινικής, όσο και ολικό αίμα σε σωληνάρια γενικής αίματος με EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid ή αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ). Η συμμετοχή στη

μελέτη προϋπέθετε την έγγραφη συναίνεση μετά από ενημέρωση. Για τα παιδιά κάτω των 10 ετών ενημερώθηκαν μόνο οι νόμιμοι εκπρόσωποί τους, για τους έφηβους 10 – 18 ετών χορηγήθηκε το Έντυπο Πληροφόρησης Ανηλίκων, αλλά η ενυπόγραφη συγκατάθεση δόθηκε μόνο από τους νόμιμους εκπροσώπους τους, ενώ οι νεαροί ενήλικες έδωσαν οι ίδιοι την ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους.

Η παρούσα μελέτη έχει διεξαχθεί σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι και το πρωτόκολλό της έχει εγκριθεί από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας της Έρευνας (ΕΗΔΕ) του Πανεπιστημίου Κρήτης με αριθμό απόφασης 128/07.11.2023.

Όπως απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 13, το λογισμικό G\*Power 3.1 Statistical Power Analyses for Mac (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Γερμανία, <https://bit.ly/3ubiGF8> τελευταία πρόσβαση 29 Ιανουαρίου 2024) κατέδειξε στην εκ των προτέρων (*a priori*) ανάλυση ότι απαιτείται μέγεθος δείγματος -τουλάχιστον- 88 παιδιών και εφήβων με ΟΜ και 88 υγιών μαρτύρων για την ανάδειξη στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των ομάδων αυτών (actual power 95,1% με effect size  $d$  0,5).



**Εικόνα 13.** Ο υπολογισμός του απαιτούμενου δείγματος με G\*Power.

## 2.2. Μέθοδοι

### 2.2.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από περιφερικό αίμα

Προς αξιοποίηση των διαθέσιμων πόρων του Εργαστηρίου Βιολογίας Αιματολογικών Νόσων και Καρκίνου στα Παιδιά, χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά

πακέτα αντιδραστηρίων. Όλα τα δείγματα αίματος στην ομάδα των παιδιών με ΟΛΛ επεξεργάστηκαν με τα αντιδραστήρια του InstaGene™ Matrix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, ΗΠΑ), ενώ για τα δείγματα της ομάδας ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, ΗΠΑ) και PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, ΗΠΑ). Τα πληροφοριακά δελτία του παραπάνω εξοπλισμού αντιδραστηρίων μπορεί να ανακτηθεί στους ιστοτόπους <https://bit.ly/3taB2Wl>, <https://bit.ly/47Pu0FA> και <https://bit.ly/41hlFqx>, αντίστοιχα (τελευταία πρόσβαση 29 Ιανουαρίου 2024). RCF (relative centrifugal force) είναι η σχετική φυγόκεντρος δύναμη και διαφέρει από τις περιστροφές ανά λεπτό rpm (rotations per minute), ενώ ο αλγόριθμος που συνδέει τις δύο αυτές έννοιες είναι ο  $RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times r \times rpm^2$ , όπου r είναι η ακτίνα του ρότορα της φυγοκέντρου σε εκατοστά.

( i ) Απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα με InstaGene™ Matrix

- Προσθήκη 3 – 6 µL ολικού αίματος σε 1 mL διπλά αποσταγμένο νερό και μετά από κλιβανισμό αποστείρωσης μέσα σε πλαστικό σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης τύπου Eppendorf χωρητικότητας 1,5 mL
- Ανακατεύουμε αναποδογυρίζοντας το σωληνάριο μερικές φορές
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 – 30 λεπτά
- Φυγοκέντρωση σε 10.000 – 12.000 rpm για 2 – 3 λεπτά
- Προσεκτική απομάκρυνση όλου του υπερκείμενου εκτός από 20 – 30 µL στο τέλος και χωρίς να πειραχτεί το σφαιρίδιο της πελέτας
- Προσθήκη 200 µL InstaGene Matrix στην πελέτα και επώαση στους 56° C για 15 – 30 λεπτά \*το Matrix θα πρέπει πρώτα να έχει ανακινηθεί σε μαγνητικό αναδευτήρα και όχι σε μεγάλη ταχύτητα και η λήψη του να γίνεται με ρύγχος πιπέτας με μεγάλη οπή (π.χ. 1.000 µL)
- Περιδίνηση σε Vortex με μεγάλη ταχύτητα για 10 δευτερόλεπτα και τοποθέτηση του σωληναρίου σε σύστημα θέρμανσης ή υδατόλουτρο στους 100° C για 8 λεπτά



- Περιδίνηση σε Vortex με μεγάλη ταχύτητα για 10 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση σε 10.000 – 12.000 rpm για 2 – 3 λεπτά
- Χρήση 20 μL του υπερκείμενου για κάθε 50 μL αντίδρασης PCR
- Αποθήκευση της υπόλοιπης ποσότητας στους –20° C και επανάληψη σε κάθε επόμενη χρήση του υλικού του βήματος περιδίνησης σε Vortex με μεγάλη ταχύτητα για 10 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρησης σε 10.000 – 12.000 rpm για 2 – 3 λεπτά

( ii ) Απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα με Wizard Genomic DNA Purification Kit

- Καλή ανάδευση στο φιαλίδιο συλλογής, για να ομογενοποιηθεί
- 900 μL Cell Lysis Solution σε πλαστικά φιαλίδια μικροφυγοκέντρησης τύπου Eppendorf και κατόπιν προσθήκη 300 μL ολικού αίματος
- Ήπια ανάδευση των Eppendorfs με το χέρι 5 – 6 φορές
- Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, κατά τη διάρκεια της οποίας αναδεύουμε ήπια με το χέρι 2-3 φορές → λύση ερυθρών
- Φυγοκέντρηση RCF 13.000 – 16.000 x g για 1 λεπτό
- Απόρριψη όσο περισσότερου υπερκείμενου γίνεται, χωρίς να ακουμπήσουμε την πελέτα –που αποτελούν τα λευκά αιμοσφαίρια
- Περιδίνηση σε Vortex για 15 δευτερόλεπτα, μέχρι να διαλυτοποιηθεί η πελέτα, ώστε να αρχίσουν να σπάνε τα κύτταρα
- Προσθήκη 300 μL Nuclei Lysis Solution στα Eppendorfs και πιπετάρουμε καλά μέχρι να διαλυθεί εντελώς η πελέτα, ώστε να σπάσει τελείως τα κύτταρα
- Προσθήκη 1,5 μL RNase Solution και ήπια ανάδευση με το χέρι 2 – 5 φορές
- Επώαση για 15 λεπτά στους 37° C, κατά τη διάρκεια της οποίας και ανά 5 λεπτά αναδεύουμε ήπια με το χέρι
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Προσθήκη 100 μL Protein Precipitation Solution και περιδίνηση σε Vortex για 10 – 20 δευτερόλεπτα, μέχρι να σχηματιστούν μαύρα συσσωματώματα, τα οποία είναι οι πρωτεΐνες
- Φυγοκέντρηση RCF 16.000 x g για 3 λεπτά → η σκουρόχρωμη πελέτα είναι οι πρωτεΐνες

- Προσθήκη 300  $\mu\text{L}$  ισοπροπανόλης σε καθαρά Eppendorfs και κατόπιν προσθήκη του υπερκείμενου από τη φυγοκέντρηση –χωρίς να ακουμπήσουμε ή να πλησιάσουμε πολύ την πελέτα
- Ήπια ανάδευση με το χέρι (κουνάμε ελαφρώς και μετά χτυπάμε ελαφρά με την άκρη του δακτύλου) μέχρι να δούμε την άσπρη πελέτα, που είναι το DNA, σαν κλωστή
- Φυγοκέντρηση RCF 16.000 x g για 1 λεπτό
- Απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη πολύ σιγά και ακουμπώντας στο απέναντι τοίχωμα 300  $\mu\text{L}$  αιθανόλη 70%
- Φυγοκέντρηση RCF 16.000 x g για 1 λεπτό
- Απόρριψη όσο περισσότερου υπερκείμενου γίνεται, προσέχοντας να μην ακουμπήσουμε την πελέτα
- Στέγνωμα στον αέρα με ανοιχτά τα καπάκια των Eppendorfs για 10 – 15 λεπτά
- Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  DNA Rehydration Solution στα Eppendorfs (απλή προσθήκη, ΟΧΙ ανακάτεμα) και αφήνουμε για τη νύχτα στους 4° C
- Χρήση των δειγμάτων ή αποθήκευση στους –20° C για μετέπειτα χρήση

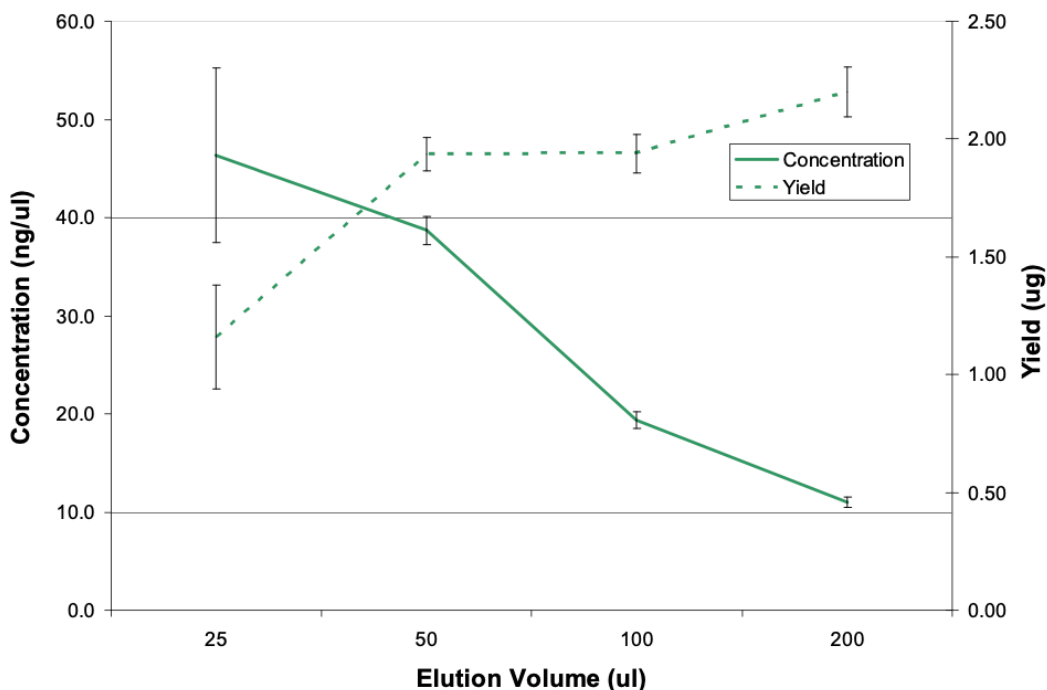
( iii ) Απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα με PureLink Genomic DNA

Mini Kit

- Τοποθέτηση σε υδατόλουτρο ή σύστημα θέρμανσης στους 55° C, για την προετοιμασία του λύματος από ολικό αίμα
- Προσθήκη  $\leq 200 \mu\text{L}$  του δείγματος αίματος σε αποστειρωμένο πλαστικό σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης τύπου Eppendorf \*αν χρησιμοποιηθεί δείγμα < 200  $\mu\text{L}$  προσαρμογή του όγκου δείγματος στα 200  $\mu\text{L}$  με προσθήκη του ανάλογου όγκου PBS (φυσιολογικός ορός στον οποίο έχει προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων), ενώ για την επεξεργασία δειγμάτων > 200  $\mu\text{L}$  και  $\leq 1 \text{ mL}$  θα πρέπει να κλιμακωθούν ανάλογα οι όγκοι των αντιδραστηρίων
- Προσθήκη 20  $\mu\text{L}$  πρωτεϊνάσης K
- Προσθήκη 20  $\mu\text{L}$  RNase A και καλό ανακάτεμα με ήπια περιδίνηση σε Vortex και κατόπιν επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά

- Προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  PureLink<sup>®</sup> Genomic Lysis/Binding Buffer και περιδίνηση σε Vortex, ώστε να προκύψει ομοιογενές διάλυμα
- Επώαση στους 55° C για 10 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η πέψη των πρωτεϊνών
- Προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  96 – 100% αιθανόλης στο λύμα και περιδίνηση με Vortex για 5 δευτερόλεπτα, ώστε να προκύψει ομοιογενές διάλυμα
- Άμεση μετάβαση στο στάδιο πρόσδεσης του DNA. Προσοχή στην προετοιμασία των αντιδραστηρίων: προσθήκη 96 – 100% αιθανόλης στο PureLink<sup>®</sup> Genomic Wash Buffer 1 και στο PureLink<sup>®</sup> Genomic Wash Buffer 2 σύμφωνα με τις αντίστοιχες οδηγίες στις ετικέτες των φιαλιδίων των αντιδραστηρίων, καλή ανακίνηση και επισήμανση στις ετικέτες ότι προστέθηκε ήδη η αιθανόλη
- Τοποθέτηση του λύματος (όγκου ~640  $\mu\text{L}$ ) σε στήλη φυγοκέντρησης PureLink<sup>®</sup> Spin Column που έχουμε εφαρμόσει ήδη σε ένα από τα σωληνάρια συλλογής από τη συσκευασία του πακέτου
- Φυγοκέντρηση της στήλης RCF 10.000  $\times$  g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του σωληναρίου συλλογής και τοποθέτηση της στήλης σε ένα καθαρό σωληνάριο συλλογής
- Μετάβαση στο στάδιο έκπλυσης του DNA με προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  Wash Buffer 1 στη στήλη
- Φυγοκέντρηση της στήλης RCF 10.000  $\times$  g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του σωληναρίου συλλογής και τοποθέτηση της στήλης σε ένα καθαρό σωληνάριο συλλογής
- Προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  Wash Buffer 2 στη στήλη
- Φυγοκέντρηση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του σωληναρίου συλλογής
- Μετάβαση στην έκλυση DNA με τοποθέτηση της κάθε στήλης σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης τύπου Eppendorf χωρητικότητας 1,5 mL
- Προσθήκη 25 – 200  $\mu\text{L}$  PureLink<sup>®</sup> Genomic Elution Buffer στη στήλη
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό
- Φυγοκέντρηση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου

- Το σωληνάριο πια θα περιέχει καθαρό γενωμικό DNA. Για την ανάκτηση μεγαλύτερης ποσότητας DNA προτείνεται ακόμη ένας κύκλος έκλουσης και αυτό διαπιστώθηκε και στην πράξη. Σύμφωνα με τις παραμέτρους έκλουσης του κατασκευαστή (Εικόνα 14) και τις αντίστοιχες μετρήσεις σε φασματοφωτόμετρο, η κατάλληλη δόση καθορίστηκε στα 50  $\mu\text{L}$  σε δύο κύκλους έκλουσης. Για το δεύτερο κύκλο έκλουσης χρησιμοποιείται καθαρό Eppendorf 1,5 mL με την ίδια ποσότητα PureLink® Genomic Elution Buffer που χρησιμοποιήθηκε στον πρώτο κύκλο και ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης στη μέγιστη ταχύτητα και σε θερμοκρασία δωματίου για 1,5 λεπτό.
- Απόρριψη της στήλης και αποθήκευση των σωληναρίων με το γενωμικό DNA στους  $-20^{\circ}\text{C}$  ή απευθείας χρήση του για PCR. Αποφυγή χρήσης νερού για τη φύλαξη του υλικού αυτού λόγω ενδεχόμενης οξειδωτικής υδρόλυσης. Για την αποφυγή πολλών κύκλων κατάψυξης και απόψυξης των δειγμάτων προτιμήθηκε η κλασματοποίηση των δειγμάτων για βραχυχρόνια ( $4^{\circ}\text{C}$ ) και μακροχρόνια ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) αποθήκευση.



**Εικόνα 14.** Γενωμικό υλικό που εκχυλίστηκε από 100  $\mu\text{L}$  δείγματος ολικού αίματος χρησιμοποιώντας διαφορετικούς όγκους εκλούσεως, σύμφωνα με τον κατασκευαστή.

### 2.2.2. Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα

Το αρχειακό υλικό των ΟΛΛ της Κλινικής Αιματολογίας – Ογκολογίας Παίδων του ΠαΓΝΗ φυλάσσεται κυρίως με τη μορφή μονοπύρηνων κυττάρων. Ο διαχωρισμός των μονοπύρηνων κυττάρων ακολουθεί τα εξής στάδια:

- Αραίωση με το καλλιεργητικό μέσο RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) 1:2 όταν έχουμε δείγμα μυελού οστών και 1:1 όταν έχουμε περιφερικό αίμα
- Καλή ανάδευση
- Επίστρωση σε φικόλη (Ficoll-Ηγραque) 1:1
- Φυγοκέντρηση σε 1.800 rpm για 30 λεπτά χωρίς φρένο (πρόγραμμα 2)
- Μεταφορά της στιβάδας σε καθαρό σωληνάριο τύπου Falcon και προσθήκη 5 – 10 mL RPMI
- Ήπια ανάδευση
- Φυγοκέντρηση σε 1.600 rpm για 10 λεπτά (πρόγραμμα 1)
- Απόρριψη του υπερκείμενου
- Επαναδιάλυση της πελέτας σε RPMI ανάλογα με το μέγεθός της
- Μεταφορά 10  $\mu$ L σε σωληνάριο Eppendorf για μέτρηση κυττάρων –συνήθως με προσθήκη 90  $\mu$ L οξικού οξέος
- Διαχωρισμός όγκων σε σωληνάρια, ώστε η συγκέντρωση των κυττάρων να είναι: (α) για κατάψυξη  $3 \times 10^6$  / σωληνάριο (συνήθως 6 σωληνάρια), (β) για TRIzol  $2 \times 10^6$  / σωληνάριο (συνήθως 2 σωληνάρια) και (γ) για cytospin  $10^5$  / πλακάκι (2 πλακάκια)
- Για τα δείγματα κυττάρων που προορίζονται για κατάψυξη ακολουθείται η σειρά: φυγοκέντρηση σε 1.600 rpm για 10 λεπτά (πρόγραμμα 1), απόρριψη του υπερκείμενου, επαναδιάλυση της πελέτας με μέσον κατάψυξης (1 mL ανά σωληνάριο) και μοίρασμα σε αποστειρωμένα σωληνάρια
- Για τα δείγματα κυττάρων που προορίζονται για φύλαξη σε TRIzol™ ακολουθείται η σειρά: φυγοκέντρηση σε 1.600 rpm για 10 λεπτά (πρόγραμμα 1), απόρριψη του υπερκείμενου, επαναδιάλυση της πελέτας με 1 mL PBS, φυγοκέντρηση σε 1.600 rpm για 10 λεπτά, απόρριψη του υπερκείμενου, επαναδιάλυση της πελέτας σε TRIzol (0,5 mL ανά σωληνάριο) και μοίρασμα σε σωληνάρια τύπου Eppendorf

- Για τα δείγματα κυττάρων που προορίζονται για κυτταροφυγόκεντρο cytospin ακολουθείται η σειρά: μεταφορά σε πλακάκια, φυγοκέντρηση 500 rpm για 5 λεπτά και στέγνωμα στον πάγκο μέχρι την επόμενη μέρα

Η απομόνωση του gDNA από κύτταρα που έχουν φυλαχθεί στην κατάψυξη προκύπτει μετά από τα εξής βήματα:

- Ξεπάγωμα σε υδατόλουτρο των κυττάρων που βγαίνουν από τον καταψύκτη των  $-80^{\circ}\text{C}$
- Μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάριο τύπου Falcon των 15 mL και προσθήκη 5 mL RPMI
- Φυγοκέντρηση σε 1.600 – 1.800 rpm για 10 λεπτά
- Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση της πελέτας σε 1 mL PBS
- Μεταφορά των δειγμάτων σε σωληνάρια τύπου Eppendorf
- Φυγοκέντρηση σε 1.800 rpm για 10 λεπτά
- Απόρριψη του υπερκείμενου, αφήνοντας  $\approx 200$   $\mu\text{L}$  στα Eppendorfs
- Περιδίνηση με Vortex μέχρι να διαλυθεί η πελέτα ή να αρχίσουν να σπάνε τα κύτταρα
- Προσθήκη 600  $\mu\text{L}$  Nuclei Lysis Solution στα Eppendorfs και ανακατεύουμε καλά χρησιμοποιώντας την πιπέτα μέχρι να διαλυθεί εντελώς η πελέτα. Μόλις διαλυθεί η πελέτα, πρέπει να σταματήσει αυτός ο χειρισμός, ώστε να μην κατακερματιστεί το DNA
- Προσθήκη 3  $\mu\text{L}$  RNase Solution και ήπια ανάδευση με το χέρι 2 – 5 φορές
- Επώαση για 30 λεπτά στους  $37^{\circ}\text{C}$ , κατά τη διάρκεια της οποίας προβαίνουμε ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε ήπια ανάδευση με το χέρι
- Επώαση των Eppendorfs σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  Protein Precipitation Solution και περιδίνηση σε Vortex για  $\approx 20$  δευτερόλεπτα
- Επώαση για 5 λεπτά σε πάγο
- Φυγοκέντρηση σε RCF 16.000 X g για 4 λεπτά (πελέτα = πρωτεΐνες)
- Τοποθέτηση 600  $\mu\text{L}$  ισοπροπανόλης σε καθαρά Eppendorfs και σε αυτά προσθέτουμε το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης
- Ήπια ανακίνηση με το χέρι (με ελαφρές κινήσεις και μετά χτυπάμε ελαφρά με την άκρη του δακτύλου) μέχρι να δούμε την άσπρη πελέτα, που είναι το DNA, σαν κλωστή
- Φυγοκέντρηση σε RCF 16.000 x g για 1 λεπτό

- Πετάμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε ΠΟΛΥ ΣΙΓΑ και ακουμπώντας στο απέναντι τοίχωμα 600  $\mu\text{L}$  αιθανόλη 70% (χωρίς ανάδευση)
- Φυγοκέντρηση σε RCF 16.000 x g για 1 λεπτό
- Απόρριψη του υπερκείμενου και προσθήκη πολύ σιγά και ακουμπώντας στο απέναντι τοίχωμα 300  $\mu\text{L}$  αιθανόλη 70%
- Φυγοκέντρηση σε RCF 16.000 x g για 1 λεπτό
- Απόρριψη όσο περισσότερου υπερκείμενου γίνεται, προσέχοντας να μην ακουμπήσουμε την πελέτα
- Στέγνωμα στον αέρα με ανοιχτά τα καπάκια των Eppendorfs για 10 – 15 λεπτά. Μόλις στεγνώσει η πελέτα, αποκτά το ίδιο χρώμα με το σωληνάριο. Αν η πελέτα έχει ένα ελαφρώς άσπρο χρώμα, σημαίνει ότι έχουν μείνει άλατα στο DNA.
- Προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  DNA Rehydration Solution στα Eppendorfs (απλή προσθήκη, ΟΧΙ ανακάτεμα) και αφήνουμε για τη νύχτα στους 4° C
- Χρήση των δειγμάτων ή αποθήκευση στους -20° C για μετέπειτα χρήση

### 2.2.3. Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του εκχυλισμένου γενωμικού DNA

Σύμφωνα με τους προαναφερθέντες κατασκευαστές αντιδραστηρίων εκχύλισης γενωμικού DNA, η μέση αναμενόμενη ποσότητα DNA είναι 3 – 10  $\mu\text{g}$  για κάθε δείγμα 200  $\mu\text{L}$  ολικού αίματος. Στις περιπτώσεις που δε μετρήθηκε ικανή ποσότητα γενωμικού DNA σε ng/ $\mu\text{L}$ , έγινε ξανά η διαδικασία από την αρχή (n=7, τρεις φορές σε μία περίπτωση).

Ο ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του γενωμικού DNA που εκχυλίστηκε διενεργήθηκε στο Εργαστήριο Βασικών Νευροεπιστημών της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης (επικεφαλής: Καραγωγέως Δόμνα, Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας – Αναπτυξιακής Νευροβιολογίας) με φασματοφωτόμετρο τύπου NanoDrop. Η μεταφορά των δειγμάτων γινόταν μέσα σε πάγο και η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- (1) Απαλό καθάρισμα των κεφαλών με χαρτί
- (2) Τοποθέτηση 2  $\mu\text{L}$  WFI (water for injection) ή Thermo Scientific™ Barnstead™ Nanopure™ νερό με προσοχή να μην αγγίζεται ο ευαίσθητος αισθητήρας
- (3) Απαλό καθάρισμα με χαρτί

- (4) Τοποθέτηση 2  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα που είναι διαλυμένο το gDNA (Elution Buffer, DNA Rehydration Solution ή InstaGene Matrix) και επιλογή «Blank»
- (5) Απαλό καθάρισμα με χαρτί
- (6) Φόρτωση 2  $\mu\text{L}$  του δείγματος gDNA και επιλογή «Measure»
- (7) Απαλό καθάρισμα των κεφαλών από δείγμα σε δείγμα. Στην περίπτωση που πρέπει να μετρηθούν πολλά δείγματα, ακολουθείται η διαδικασία από την αρχή ανά δέκα δείγματα
- (7) Στο τέλος τοποθέτηση 2  $\mu\text{L}$  WFI ή Nanopure νερό χωρίς να ακολουθήσει σκούπισμα και κλείσιμο του λογισμικού και της συσκευής

Ο σκοπός της ποσοτικοποίησης του DNA στο δείγμα είναι η επιβεβαίωση της ύπαρξης DNA στο δείγμα και η καθαρότητά του, αλλά και ο ακριβής υπολογισμός της ποσότητας του δείγματος που θα χρειαστεί για τις επακόλουθες αντιδράσεις PCR. Η καθαρότητα του DNA διαπιστώνεται με φωτομέτρηση στα 260 nm και στα 280 nm (που απορροφά το DNA και οι πρωτεΐνες, αντίστοιχα), ενώ η φασματοφωτομετρία στα 230 nm μας δείχνει την απορρόφηση από τα άλατα στο δείγμα, αλλά και την παρουσία φαινολών στο δείγμα. Ο λόγος  $OD_{260}/OD_{280}$  έχει υψηλή ευαισθησία στον προσδιορισμό της επιμόλυνσης του DNA με πρωτεΐνες (Πίνακας 11).

**Πίνακας 11.** Αντιστοίχιση των τιμών του λόγου  $OD_{260}/OD_{280}$  με την ποσοστιαία νοκλειϊκών οξέων και πρωτεϊνών στο υπό μέτρηση δείγμα.

% πρωτεΐνες	% νοκλειϊκά οξέα	λόγος $OD_{260}/OD_{280}$
100	0	0,57
95	5	1,06
90	10	1,32
70	30	1,73
30	70	1,94
10	90	1,98
5	95	1,99
0	100	2



Για όλες τις μετρήσεις έχει καταγραφεί η ποσότητα του DNA σε ng/μL και ο λόγος  $OD_{260}/OD_{280}$ . Προτιμήθηκε η ανάλυση των δειγμάτων με λόγο  $OD_{260}/OD_{280} \geq 1,8$  που υποδηλώνει καθαρό DNA. Στην πράξη, το εύρος των μετρήσεων της υπεριώδους φασματοσκοπίας στα 260 nm πρέπει να είναι 0,1 – 0,999, τιμές που αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις gDNA μεταξύ 4 ng/μL και 50 ng/μL. Μεγαλύτερες ή μικρότερες τιμές από αυτές στο Nanodrop βρίσκονται εκτός του γραμμικού εύρους που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων και, για την ακρίβεια των ποσοτικών μετρήσεων, θα πρέπει το δείγμα να διαλυθεί, ώστε οι μετρήσεις στα 260 nm να βρίσκονται εντός του εύρους 0,1 – 0,999. Επιπλέον, να σημειωθεί πως αναστολείς της PCR δύναται να υπάρχουν στο δείγμα και προέρχονται είτε από τον ιστό που προέλευσης του δείγματος DNA, είτε από τη διαδικασία κάθαρσης. Πρωταρχικός σκοπός είναι η αποφυγή της αποδόμησης του DNA, αλλά και η απομάκρυνση τυχόν αναστολέων της PCR. Οι αναστολείς PCR που προέρχονται από το δείγμα είναι η ηπαρίνη, οι πρωτεΐνες και η αίμη, ενώ στους αναστολείς που προέρχονται από την προετοιμασία του DNA συγκαταλέγονται οι φαινόλες, οι πρωτεάσες, ανιονικά απορρυπαντικά τύπου SDS (sodium dodecyl sulfate) και τα άλατα (EDTA από τα φιαλίδια των γενικών αίματος και κιτρικό οξύ από τα φιαλίδια της πήξης). Η παρουσία ανασταλτών της PCR μειώνει την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης και οδηγεί σε υστερούντα συμπλέγματα στο γράφημα διάκρισης των αλληλόμορφων (trailing clusters) και σε απουσία ενίσχυσης –παρόμοια με αυτή των δειγμάτων ελέγχου χωρίς DNA (no template controls ή NTCs). Σε υποψία παρουσίας ανασταλτών PCR αραιώνουμε το δείγμα και επαναλαμβάνουμε τη μέτρηση. Αν η αναστολή μειώνεται, τότε επιβεβαιώνεται και η παρουσία ανασταλτών στο δείγμα. Αν όχι, μια πιο πιθανή λύση του προβλήματος των ανασταλτών PCR μπορεί να επιτευχθεί με τη διενέργεια της διαδικασίας κάθαρσης του DNA από την αρχή –και με δεδομένο ότι υπάρχει αρκετό διαθέσιμο δείγμα για ανάλυση. Επιπλέον, υπάρχει η δυνατότητα επιλογής Master Mix που είναι ανεκτικοί στους ανασταλτές PCR (όπως του TaqPath™ ProAmp™ Master Mix ή του TaqMan® Genotyping Master Mix που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή).

Στην παρούσα μελέτη, οι κατάλληλες συγκεντρώσεις του gDNA συνδέονται με ακριβή και αναπαραξιμα αποτελέσματα και διασφαλίζεται η αποτελεσματική χρήση των πολύτιμων δειγμάτων του αρχειακού υλικού. Η ανωτέρω διαδικασία για το χειρισμό και τις ποσοτικές–ποιοτικές μετρήσεις του gDNA προ των πειραμάτων με PCR αποτρέπει λάθη που θα επέφεραν σπατάλη των αντιδραστηρίων και της ποσότητας των δειγμάτων. Η ποικίλες τιμές συγκέντρωσης gDNA μπορούν να

επιφέρουν πειραματικές ανωμαλίες στις TaqMan® SNP Genotyping Assays με αντίκτυπο στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της γονοτύπησης. Οι ανωτέρω μετρήσεις γίνονται για τη διασφάλιση αποτελεσμάτων με μεγάλη ακρίβεια και πρέπει να δίνεται η δέουσα προσοχή, ώστε να χρησιμοποιείται η προτεινόμενη ποσότητα gDNA ανά δείγμα (1–20 ng) και να χρησιμοποιείται πάντα η ίδια ποσότητα gDNA για όλα τα δείγματα σε κάθε πείραμα PCR.

Στις 7 περιπτώσεις που χρειάστηκε να γίνει επανάληψη του πειράματος και λόγω πιθανότητας αλλοίωσης του γενωμικού DNA (παλαιότητα δείγματος, πιθανότητα πολλών κύκλων κατάψυξης και απόψυξης κ.α.), διενεργήθηκε έλεγχος του εκχυλίσματος σε πηκτή αгарόζης 1% (E-Gel™ EX Agarose Gels 1%, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, ΗΠΑ) μέσω του Invitrogen E-Gel Power Snap Electrophoresis System, το οποίο περιλαμβάνει μια συσκευή ηλεκτροφόρησης και μια κάμερα, ώστε να διαχωρίζεται και να αναλύεται ταχέως η πηκτή αгарόζης. Οι μπάντες και στις 7 περιπτώσεις ήταν συγκεντρωμένες σε υψηλό μοριακό βάρος και αποκλείστηκε η αποδόμηση του DNA, παρ' όλα αυτά αποφασίστηκε η εκ νέου εκχύλιση gDNA από τα δείγματα αυτά, οπότε και δεν υπήρξε αντίστοιχο πρόβλημα.

#### **2.2.4. Προσδιορισμός γονοτύπου με RT-qPCR**

Για τον προσδιορισμό των γονοτύπων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν TaqMan® Predesigned SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, ΗΠΑ) και για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε το TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, CA, ΗΠΑ) – σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε ο εξοπλισμός του Εργαστηρίου Βιολογίας Αιματολογικών Νόσων και Καρκίνου στα Παιδιά της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης Bio-Rad® CFX96 Real-Time PCR Detection System συνοδευόμενο από τον C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ΗΠΑ). Στην Εικόνα 15 φαίνεται η συμβατότητα που εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των πολυμορφισμών, σύμφωνα με το αντίστοιχο έγγραφο που χορηγήθηκε από την κατασκευάστρια εταιρεία. Στον Πίνακα 12 καταγράφονται οι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη μαζί με χρήσιμες πληροφορίες και συνδέσμους για τα χαρακτηριστικά των αντιδραστηρίων.

Real-time PCR master mixes and instrument compatibility

Applications	TaqMan® and TaqPath real-time PCR master mixes										One-step real-time RT-PCR master mixes				
	Gene expression/ small RNA	Genotyping/ CNV	Gene expression/ genotyping	Gene expression/ genotyping	Gene expression	Genotyping/ SNP	Genotyping/ SNP	Gene expression	Gene expression/ pathogen detection	Gene expression/ pathogen detection	Gene expression/ pathogen detection	Gene expression/ for 1-step and multiplex	Gene expression/ pathogen detection	Gene expression/ pathogen detection	
TaqMan Fast Advanced Master Mix	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
TaqPath ProAmp Master Mix	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
TaqMan Universal PCR Master Mix	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
TaqMan Universal PCR Master Mix II	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
TaqMan Gene Expression Master Mix	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
TaqMan Multiplex Master Mix	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
TaqMan GT Express Master Mix	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
TaqMan RNA-to-C <sub>T</sub> 1-Step Kit	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Power SYBR Green RNA-to-C <sub>T</sub> 1-Step Kit	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
TaqPath 1-Step Multiplex Master Mix	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
SuperScript III Platinum One-Step RT-PCR Kit	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
SuperScript III Platinum One-Step RT-PCR Kit w/ROX	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	

√ - Indicates preferred kit and tested on this instrument.  
 ◊ - Indicates kit should work, but has not been tested on this instrument.  
 \* - Not compatible with multiplexing. The QuantStudio 3 system can be used for limited multiplexing; it is not compatible with Mustang Purple or Cy5 dyes. The QuantStudio 5 system is compatible with multiplexing.

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

Εικόνα 15. Τεκμηρίωση της συμβατότητας του εξοπλισμού με τα αντιδραστήρια από τον κατασκευαστή.

Πίνακας 12. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

Γονίδιο	Πολυμορφισμός	Κωδικός ανάλυσης	Αλληλουχία [VIC/FAM]	Σύνδεσμος
AGO1	rs636832 Chr.1: 35897874 - 35897874 on Build GRCh38	C__1079151_10	TCTGATTCAG ACATATCACTCC T[A/G]AAAGAAA GCCTGTATTCAT TAGCAG	<a href="https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C_1079151_10">https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C_1079151_10</a>
DICER1	rs3742330 Chr.14: 95087025 - 95087025 on Build GRCh38	C__27475447_10	CTTCAATCTTGT GTAAAGGGATTA G[A/G]CACCTA ACAGAGCAAGA TCCAATA	<a href="https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C_27475447_10">https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C_27475447_10</a>

Η PCR είναι μια ισχυρή και ευέλικτη μέθοδος για την ενίσχυση του DNA και παρέχει μια γρήγορη και απλή προσέγγιση για την κλωνοποίηση του DNA, ιδιαίτερα σε δείγματα από ανθρώπους –όπου η αλληλουχία του συνολικού τους γονιδιώματος είναι γνωστή. Ως μέθοδος εφευρέθηκε τη δεκαετία του 1980 και άλλαξε το τοπίο στον τρόπο ανάλυσης των μορίων DNA και RNA. Η τεχνική μπορεί να ενισχύσει επιλεκτικά οποιαδήποτε νουκλεοτιδική αλληλουχία και εκτελείται εξ ολοκλήρου σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα. Αποφεύγοντας τη χρήση βακτηρίων, η PCR λογίζεται ως εύκολη και γρήγορη μέθοδος, καθώς δισεκατομμύρια αντίγραφα ενός νουκλεοτιδίου μπορούν να παραχθούν μέσα σε λίγες ώρες (76).

Το TaqMan® Genotyping Master Mix εμπεριέχει τα αντιδραστήρια:

- Ultra Pure (UP) AmpliTaq Gold® DNA πολυμεράση
- Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs ή deoxyribonucleotide triphosphates)
- ROX™ Passive Reference
- Συστατικά ρυθμικού διαλύματος για τη βελτιστοποίηση της πρόσδεσης των συμπλεγμάτων φθορισμού, την αναπαράξιμη διάκριση των αλληλόμορφων και την εξασφάλιση της σταθερότητας στον πάγκο εργασίας

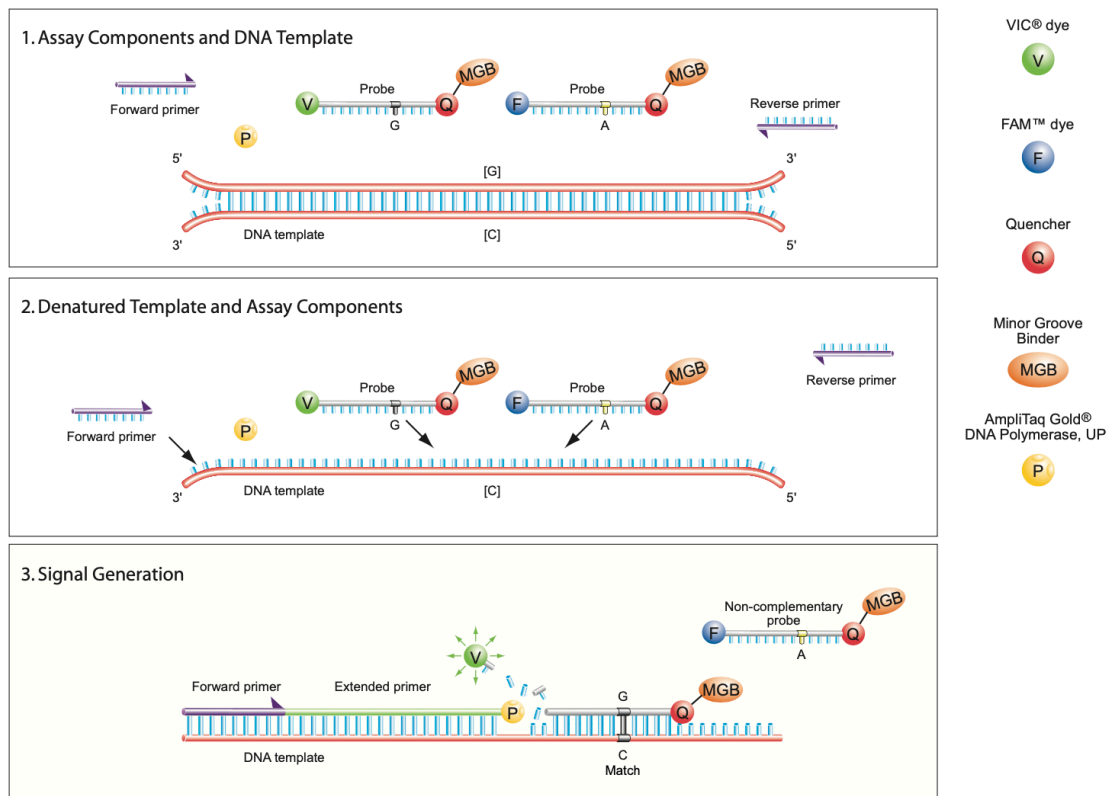
Τα TaqMan® SNP Genotyping Assays εμπεριέχουν:

- Ειδικούς για την αλληλουχία πρόσθιους και ανάστροφους εκκινητές
- Δύο TaqMan® ανιχνευτές πρόσδεσης στην ελάσσονα αύλακα του DNA (MGB ή minor groove binder probes) με μη φθορίζοντες αποσβέστες (NFQ ή nonfluorescent quenchers)
- Έναν ανιχνευτή σημασμένο με VIC™ για την αλληλουχία του πρώτου αλληλόμορφου
- Έναν ανιχνευτή σημασμένο με FAM™ για την αλληλουχία του δεύτερου αλληλόμορφου

Τα πληροφοριακά δελτία των παραπάνω αντιδραστηρίων μπορούν να ανακτηθούν από τους αντίστοιχους συνδέσμους <https://bit.ly/3O1IKta> και <https://bit.ly/41W1G20> (τελευταία πρόσβαση 29 Ιανουαρίου 2024). Το TaqMan® SNP Genotyping Assay που χρησιμοποιήθηκε (Cat. No. 4351379) είναι σύστασης 40X και για την αποφυγή επηρεασμού του αντιδραστηρίου από επαναλαμβανόμενους κύκλους παγώματος–ξεπαγώματος (>10) και την έκθεση στο φως, έγινε αραιώση σε

20X με τη βοήθεια διαλύματος 1X TE buffer με χαρακτηριστικά: 10-mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 σε DNase-ελεύθερο, αποστειρωμένο και φιλτραρισμένο νερό. Το TE buffer παρασκευάστηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης (επικεφαλής: Παπακωνσταντή Ευαγγελία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας).

Το TaqMan® SNP Genotyping Assay χρησιμοποιείται για τη διάκριση δύο αλληλόμορφων ενός συγκεκριμένου SNP σε μελέτες γονοτύπησης. Η μέθοδος λειτουργεί μέσω της χρήσης πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών για την ενίσχυση της αλληλουχίας ενδιαφέροντος μαζί με δύο ανιχνευτές σημασμένους με φθοριοχρώματα για αλληλοειδική ανίχνευση. Οι ανιχνευτές είναι σημασμένοι στο 5' άκρο τους με τα φθοριοχρώματα VIC και FAM για τον εντοπισμό του πρώτου και του δεύτερου αλληλόμορφου, αντίστοιχα. Το VIC (phosphoramidite) εκπέμπει στο κίτρινο μέρος του ορατού φάσματος, ενώ το FAM (6'-carboxyfluorescein) στο πράσινο. Με βάση τις αρχές της μεταφοράς ενέργειας στο συντονισμό φθορισμού, οι αποσβέστες στο 3'-άκρο των ανιχνευτών απορροφούν την ενέργεια των φθοριοχρωμάτων στο 5'-άκρο για όσο βρίσκονται και τα δύο συνδεδεμένα με τον ανιχνευτή και ως εκ τούτου βρίσκονται σε χωρική εγγύτητα (Εικόνα 16). Οι προσδέτες της ελάσσονας αύλακας πάνω στο 3'-άκρο του ανιχνευτή εξασφαλίζουν τη σταθερότητα της σύνδεσης του συμπλόκου του ανιχνευτή με το DNA, ενώ οι αποσβέστες, που βρίσκονται στο ίδιο 3'-άκρο του ανιχνευτή, ουσιαστικά εξαλείφουν το φθορισμό στο παρασκήνιο και παρέχουν μια εξαιρετική αναλογία σήματος-θορύβου και υψηλότερη ευαισθησία στην ανάλυση. Επιπλέον, παρέχεται από τον κατασκευαστή και εγγύηση των αντιδραστηρίων για τη διενέργεια RT-qPCR για SNP γονοτύπηση (<https://bit.ly/47Eu2z4>, τελευταία πρόσβαση 29 Ιανουαρίου 2024).



**Εικόνα 16.** Οι αρχές της διάκρισης των αλληλόμορφων: (1) τα στοιχεία της ανάλυσης, (2) η μετουσίωση του προτύπου DNA και ο υβριδισμός με τα στοιχεία της ανάλυσης, (3) ο πολυμερισμός και η γένεση του σήματος.

Θεωρητικά, 10 µL του εκχλισμένου DNA είναι κατάλληλα για μια αντίδραση PCR των 25 µL. Στην πραγματικότητα, γίνεται προσαρμογή του υλικού με βάση τις μετρήσεις του NanoDrop και αντίστοιχα προσθήκη DNase-ελεύθερου νερού, ώστε κάθε πηγάδι να περιέχει την ίδια περίπου ποσότητα δείγματος. Ο στόχος είναι να τοποθετηθούν 1 – 20 ng γενωμικού DNA σε κάθε πηγάδι με τελική συγκέντρωση  $\geq 0.2$  ng/µL. Στον Πίνακα 13 φαίνονται οι ποσότητες κάθε αντιδραστήριου ανά πηγάδι αντίδρασης. Αρχικά, υπολογίζεται ο αριθμός των αντιδράσεων, περιλαμβάνοντας τα απαραίτητα δείγματα ομάδας ελέγχου. Πρώτα μπαίνουν στα πηγάδια τα αντιδραστήρια, γίνεται ήπια ανακίνηση και ακολουθεί ήπια φυγοκέντρηση, ώστε το μίγμα της αντίδρασης να βρεθεί στο κάτω μέρος του σωληναρίου και να φύγουν τυχόν φυσαλίδες αέρα. Ασφαλίζουμε τα σωληνάρια με τα καπάκια τους και ετοιμάζουμε τα δείγματα προς εξέταση. Στη συνέχεια προστίθενται τα δείγματα γενωμικού DNA στα πηγάδια, αφήνοντας δύο πηγάδια κενά ή με DNase-ελεύθερο νερό ως σημείο ελέγχου για επιπλέον φθορισμό ή επιμόλυνση με DNA. Σε αυτό το στάδιο πρέπει να υπάρχει

προσοχή, ώστε να μην υπάρξει «επιμόλυνση» μεταξύ των πηγαδιών. Εφαρμόζουμε ξανά ήπια φυγοκέντρηση, ώστε να έρθει το μίγμα της αντίδρασης στο κάτω μέρος του σωληναρίου και να φύγουν τυχόν φυσαλίδες αέρα. Βάσει σύστασης από τον κατασκευαστή, έχει προηγηθεί ένα διάβασμα των πηγαδιών για φθορισμό στο παρασκήνιο (pre-PCR plate read). Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να αφαιρεθεί η παρουσία επιπλέον φθορισμού, διασφαλίζοντας την ακρίβεια των αποτελεσμάτων στις PCR αντιδράσεις των δειγμάτων.

**Πίνακας 13.** Τα συστατικά της κάθε αντίδρασης ανά πηγάδι.

Συστατικό	96 πηγάδια (αντίδραση των 25 µL)
2X TaqMan® Master Mix	12,5 µL
20X TaqMan® SNP Genotyping Assay	1,25 µL
Δείγμα gDNA	11,25 µL
Συνολικός όγκος ανά πηγάδι	25 µL

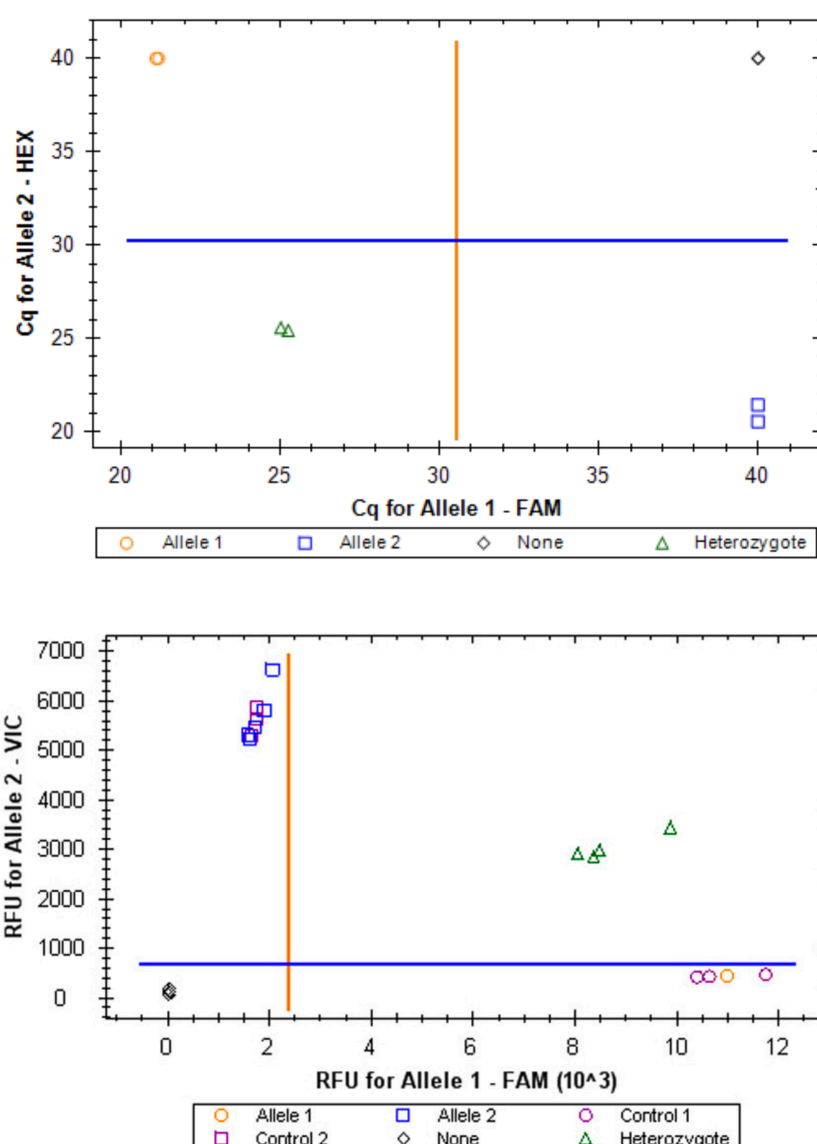
Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, μια ανάγνωση της κενής οπτικής πλάκας προηγήθηκε των μετρήσεων (pre-PCR plate read) και στην οποία καταγράφηκε ο φθορισμός παρασκηνίου για κάθε πηγάδι. Αφαιρώντας το φθορισμό του παρασκηνίου προ της ενίσχυσης, η κάθε επόμενη μέτρηση της PCR είναι περισσότερο ακριβής.

Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι παράμετροι του Πίνακα 14.

**Πίνακας 14.** Οι συνθήκες PCR στις οποίες προγραμματίστηκε το CFX96.

Βήμα	TaqMan® SNP Genotyping Assay		
	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Ενεργοποίηση πολυμεράσης	95°C	10 λεπτά	40
Μετουσίωση	95°C	15 δευτερόλεπτα	
Υβριδισμός & Επιμήκυνση	60°C	1 λεπτό	

Το Bio-Rad® CFX96 Real-Time PCR Detection System διαθέτει δικό του λογισμικό για τη διάκριση των αλληλόμορφων (CFX Manager™ Software, <https://bit.ly/3Uinrrd>, τελευταία πρόσβαση 29 Ιανουαρίου 2024). Με την επιλογή «Allelic Discrimination» μπορούν να αντιστοιχιστούν οι γονότυποι στα πηγάδια των υπό μελέτη δειγμάτων χρησιμοποιώντας συνήθως τις τιμές RFU (relative fluorescence unit) ή Cq θετικών δειγμάτων ελέγχου. Εννοείται πως δεδομένα για τη διάκριση των αλληλόμορφων μπορούν να προκύψουν μόνο με την ύπαρξη τουλάχιστον δύο φθοριοφόρων σε κάθε πηγάδι, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως. Τυπικά γραφήματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 17.



**Εικόνα 17.** Τυπικά γραφήματα διάκρισης των αλληλόμορφων με τις μεθόδους Cq και RFU στο BioRad CFX Manager.



### 2.2.5. Στατιστική ανάλυση

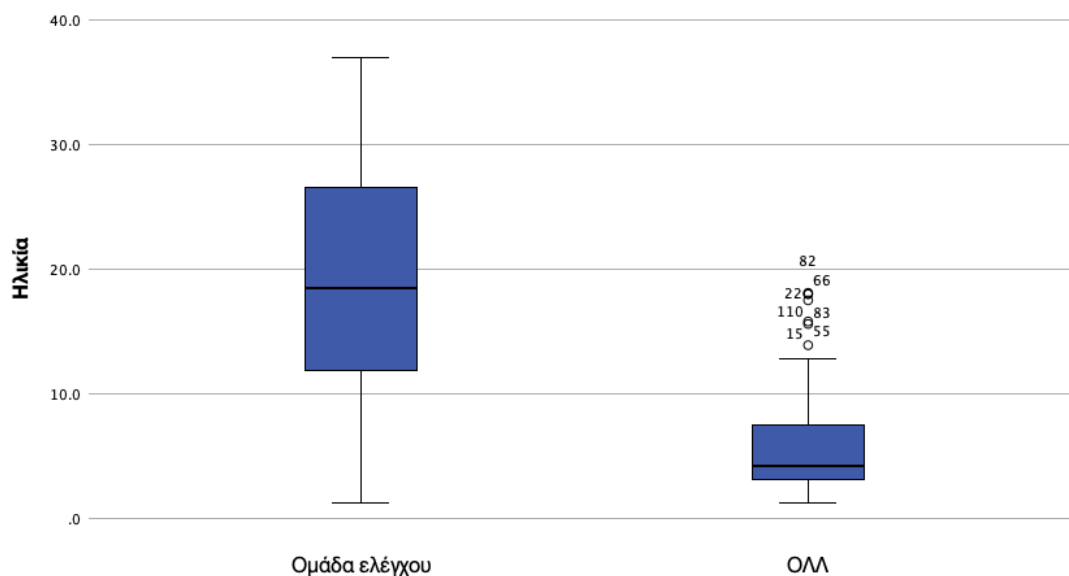
Η αρχή HWE επισημαίνει ότι σε έναν πληθυσμό ο οποίος δεν υπόκειται σε εξωτερικές εξελικτικές επιρροές (όπως η μεταλλαξιγένεση, η μετανάστευση και η φυσική επιλογή) οι συχνότητες των γονότυπων επιτυγχάνουν κατάσταση ισορροπίας μετά από μία γενεά τυχαίου ζευγαρώματος. Μόλις η ισορροπία επιτευχθεί, οι συχνότητες των γονότυπων θα εξαρτώνται μόνο από τη συχνότητα των αλληλόμορφων. Στην απλούστερη περίπτωση, ένας γενετικός τόπος έχει δύο αλληλόμορφα π.χ. A και a με  $f(A) = p$  και  $f(a) = q$ , αντίστοιχα. Οι αναμενόμενες συχνότητες των γονότυπων μετά από ένα τυχαίο ζευγάρωμα θα είναι  $f(AA) = p^2$  για τους AA ομοζυγώτες και  $f(aa) = q^2$  για τους aa ομοζυγώτες, ενώ  $f(Aa) = 2pq$  θα είναι η συχνότητα των ετεροζυγωτών. Αποκλίσεις από την παραπάνω ισορροπία οφείλονται συνήθως σε εργαστηριακά σφάλματα γονοτύπησης, σε πληθυσμιακή διαστρωμάτωση, σε σφάλματα κατά την επιλογή της ομάδας ελέγχου, καθώς και στην ύπαρξη στατιστικής συσχέτισης μεταξύ της νόσου και του ελεγχόμενου γενετικού τόπου. Ο τελευταίος λόγος είναι εκείνος για τον οποίο στις μελέτες γενετικής συσχέτισης προτιμάται να ελέγχεται μόνο η ομάδα των μαρτύρων για απόκλιση από την ισορροπία Hardy–Weinberg, και όχι και εκείνη των ασθενών (10). Η αιμομιξία μπορεί να είναι άλλη μια αιτία αποκλίσεων από την HWE (77).

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις στην παρούσα μελέτη διενεργήθηκαν στο στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics version 29.0.1.0 (IBM Corp., Armonk, NY, ΗΠΑ). Για μεγαλύτερη ακρίβεια και αποφυγή τύπου I λαθών, ο έλεγχος δεν έγινε μόνο με τη δοκιμασία  $\chi^2$ , αλλά και με το Fisher's exact test (77). Τόσο ο rs3742330 στο *DICER1*, όσο και ο rs636832 στο *AGO1* δεν εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές από την HWE (two-tailed  $p = 0,8246$  και  $0,778$ , αντίστοιχα).

### 3. Αποτελέσματα

Στη μελέτη έλαβαν μέρος συνολικά 216 άτομα: 117 παιδιά και έφηβοι με ΟΛΛ και 99 παιδιά, έφηβοι και νεαροί ενήλικες στην ομάδα ελέγχου. Ο έλεγχος κανονικότητας (Kolmogorov-Smirnov Test of Normality) έδειξε πως η ηλικία ήταν κανονικά κατανομημένη μόνο για τους μάρτυρες, ενώ, όπως ήταν αναμενόμενο, η ηλικία στην την ομάδα των ασθενών δεν ήταν κανονικά κατανομημένη ( $p < 0,001$ ) και

ως εκ τούτου για την περιγραφή της ενδείκνυται η χρήση της διάμεσης τιμής και του εύρους. Στην Εικόνα 18 φαίνεται η ηλικιακή κατανομή του δείγματος.



**Εικόνα 18.** Η ηλικιακή κατανομή των συμμετεχόντων στη μελέτη.

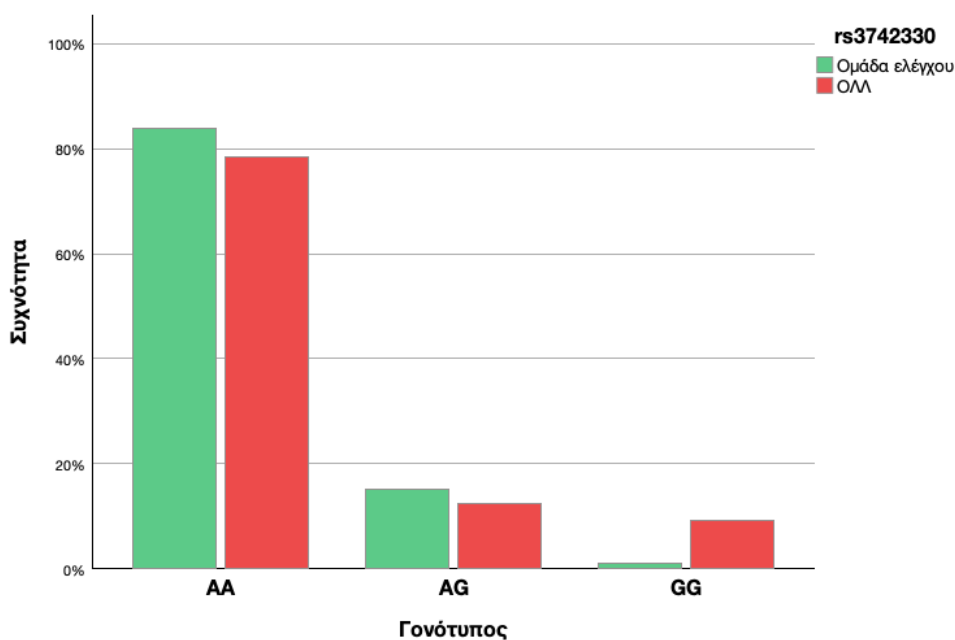
#### rs3742330 στο γονίδιο *DICER1*

Οι γονότυποι μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων διέφεραν στατιστικώς σημαντικά ( $p = 0,048$  με Pearson Chi-Square και  $p = 0,046$  με Fisher-Freeman-Halton Exact Test, two-sided,  $df = 2$ ,  $\chi^2 = 6,222$ ) και η συχνότητά τους καταγράφεται στον Πίνακα 15 και στην Εικόνα 19. Και οι δύο προαναφερθείσες μέθοδοι επιτρέπουν τη σύγκριση της παρατηρούμενης με την αναμενόμενη συχνότητα για κάθε κελί του πίνακα και ελέγχουν τη μη συσχέτιση των σειρών με τις στήλες ως μηδενική υπόθεση. Με τον ίδιο πίνακα συνάφειας και την εφαρμογή λογιστικής παλινδρόμησης, υπολογίστηκε ο γενικευμένος λόγος αναλογιών (generalized odds ratio ή  $OR_G$ ) ως μέτρο της ισχύος της συσχέτισης μεταξύ του εκάστοτε γονοτύπου με την ΟΛΜ. Το επικρατές μοντέλο συγκρίνει τους φορείς του ελάσσονος αλληλίου έναντι των ομοζυγωτών του μείζονος αλληλίου, το υπολειπόμενο μοντέλο συγκρίνει τους ομοζυγώτες του ελάσσονος αλληλίου έναντι των φορέων του μείζονος αλληλίου και

το μοντέλο αντίθεσης αλληλίων συγκρίνει το σύνολο των ελασσόνων αλληλίων έναντι του συνόλου των μειζόνων αλληλίων για κάθε πολυμορφισμό. Στην παρούσα ανάλυση, ο γονότυπος GG, αλλά και το αλληλόμορφο G, βρέθηκαν σημαντικά πιο συχνά μεταξύ των παιδιών και εφήβων με ΟΛΛ.

**Πίνακας 15.** Κατανομή και συγκρίσεις των γονοτύπων στον rs3742330 του *DICER1*.

<b>Γονότυπος</b>	<b>Ομάδα ελέγχου</b> n = 93	<b>ΟΛΛ</b> n = 88	<b>p</b>
AA	78 (84,9 %)	69 (78,4 %)	0,046
AG	14 (15,1 %)	11 (12,5 %)	
GG	1 (1,1 %)	8 (9,1 %)	
<b>Αλληλόμορφο</b>	n = 186	n = 176	
A	170 (91,4 %)	149 (84,7 %)	0,048
G	16 (8,6 %)	27 (15,3 %)	
<b>Μοντέλο σύγκρισης</b>	<b>OR</b>	<b>95 % CI</b>	<b>p</b>
Επικρατές: AA vs. AG+GG	0,698	(0,330 – 1,479)	0,174
Υπολειπόμενο: GG vs. AA+AG	9,2	(1,126 – 75,154)	0,019
Υπερ-επικρατές: AA+GG vs. AG	1,241	(0,530 – 2,902)	0,310
Ομοζυγωτικό: GG vs. AA	9,04	(1,103 – 74,142)	0,02
Έτεροζυγωτικό: AG vs. AA	0,888	(0,378 – 2,085)	0,393



**Εικόνα 19.** Η συχνότητα των γονοτύπων στον rs3742330 του *DICER1*.

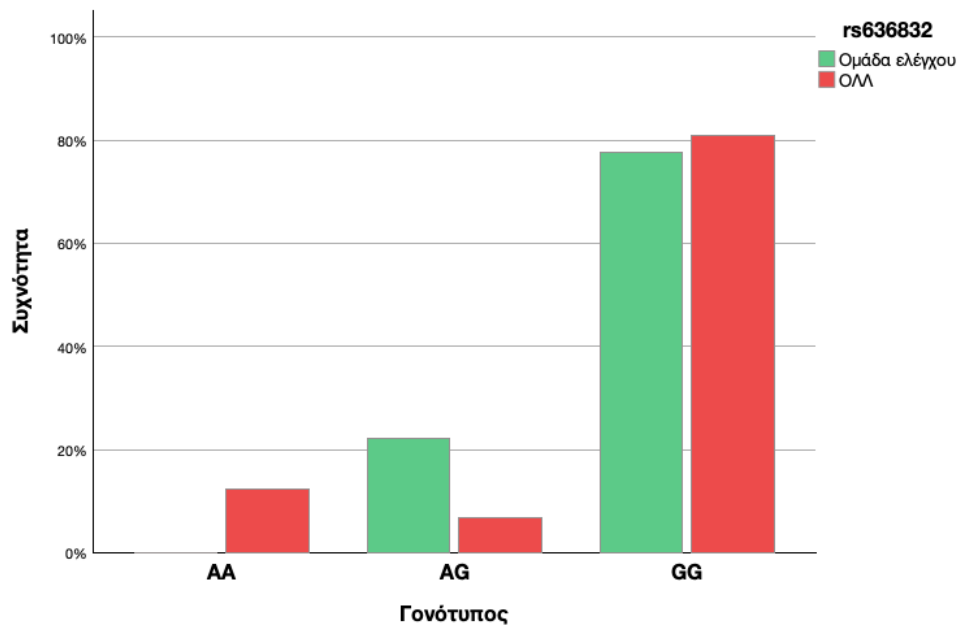
rs636832 στο γονίδιο *AGO1*

Οι γονότυποι μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων διέφεραν στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,001$  τόσο με Pearson Chi-Square όσο και με Fisher-Freeman-Halton Exact Test, two-sided,  $df = 2$ ,  $\chi^2 = 18,562$ ) και η συχνότητά τους καταγράφεται στον Πίνακα 16 και στην Εικόνα 20. Ο γονότυπος AA βρέθηκε σημαντικά πιο συχνά μεταξύ των παιδιών και εφήβων με ΟΛΛ, ενώ ο γονότυπος AG σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο.

**Πίνακας 16.** Κατανομή και συγκρίσεις των γονοτύπων στον rs636832 του *AGO1*.

Γονότυπος	Ομάδα ελέγχου n = 90	ΟΛΛ n = 89	p
GG	70 (77,8 %)	72 (80,9 %)	< 0,001
AG	20 (22,2 %)	6 (6,7 %)	
AA	0	11 (12,4 %)	
<b>Αλληλόμορφο</b>	n = 180	n = 178	

G	160 (88,9 %)	150 (84,3 %)	0,199
A	20 (11,1 %)	28 (15,7 %)	
<b>Μοντέλο σύγκρισης</b>	<b>OR</b>	<b>95 % CI</b>	<b>p</b>
Επικρατές: GG vs. AG+AA	1,21	(0,586 – 2,5)	0,303
Υπολειπόμενο: AA vs. GG+AG	26,516	(1,538 – 457,288)	0,024
Υπερ-επικρατές: GG+AA vs. AG	3,952	(1,504 – 10,386)	0,003
Ομοζυγωτικό: AA vs. GG	22,366	(1,293 – 386,802)	0,033
Ετεροζυγωτικό: AG vs. GG	0,292	(0,111 – 0,769)	0,006

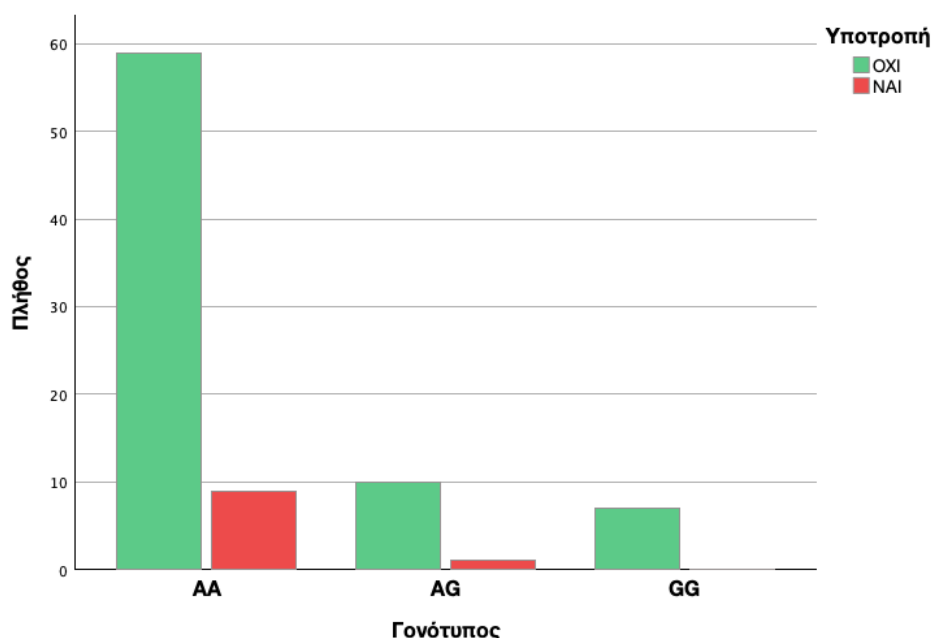


**Εικόνα 20.** Η συχνότητα των γονοτύπων στον rs636832 του AGO1.

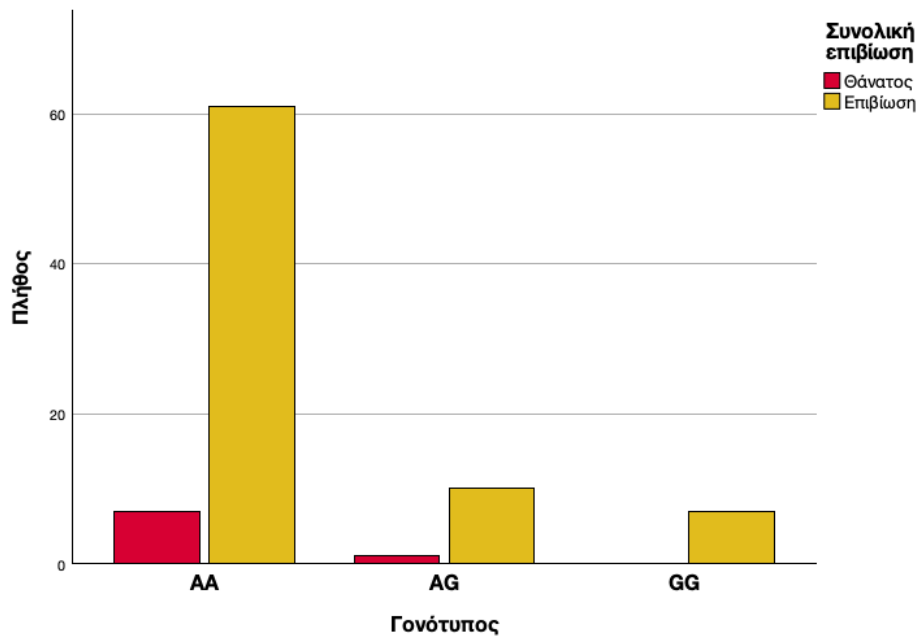
## Υποτροπή και επιβίωση ανάλογα με το γονότυπο του rs3742330 στο γονίδιο *DICER1*

Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 21, παρόλο που τα παιδιά και οι έφηβοι ΟΜ βρέθηκαν με στατιστικώς σημαντικά πιο συχνό το γονότυπο GG στον rs3742330 του γονιδίου *DICER1*, οι υποτροπές συνέβησαν σχεδόν αποκλειστικά στους ασθενείς με γονότυπο AA (90 %) και ακολούθως τους ασθενείς με γονότυπο AG (10 %). Και οι 7 ασθενείς με γονότυπο GG δεν υποτροπίασαν (100 %). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτών με Fisher-Freeman-Halton Exact Test δεν είχε στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα ( $p = 0,839$ ). Να σημειωθεί πως οι υποτροπές αφορούσαν στο 11 % του συνόλου των ασθενών.

Ομοίως, οι ασθενείς που υπέκυψαν στη νόσο ( $n = 8$  ή 9% επί του συνόλου των ασθενών) είχαν πρωτίστως γονότυπο AA (87,5 %) και κατά δεύτερο λόγο AG (12,5 %), ενώ κανένα από αυτά τα παιδιά δεν είχε γονότυπο GG (Εικόνα 22). Και σε αυτή την περίπτωση, δεν προέκυψαν από την ανάλυση στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα ( $p = 0,841$ ). Όπως ήταν αναμενόμενο, οι υποτροπές εμφάνισαν ισχυρή συσχέτιση με το θάνατο των ασθενών (Pearson Chi-Square 49,413 με  $p < 0,001$ ), με το 70 % των υποτροπών να καταλήγουν σε άλλοτε άλλο χρονικό διάστημα.



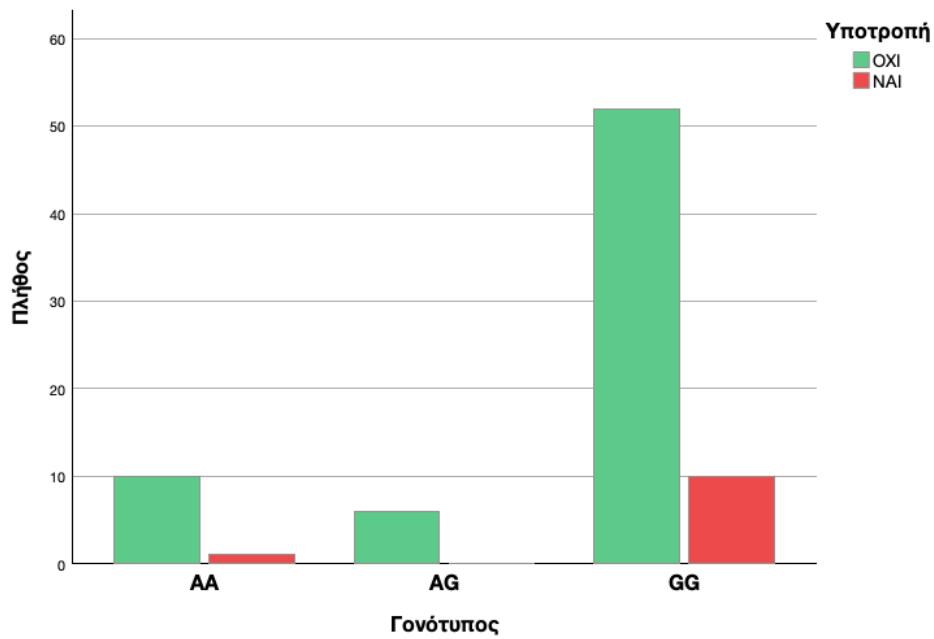
**Εικόνα 21.** Κατανομή των ασθενών με ΟΜ που υποτροπίασαν ανά γονότυπο του rs3742330 στο *DICER1*.



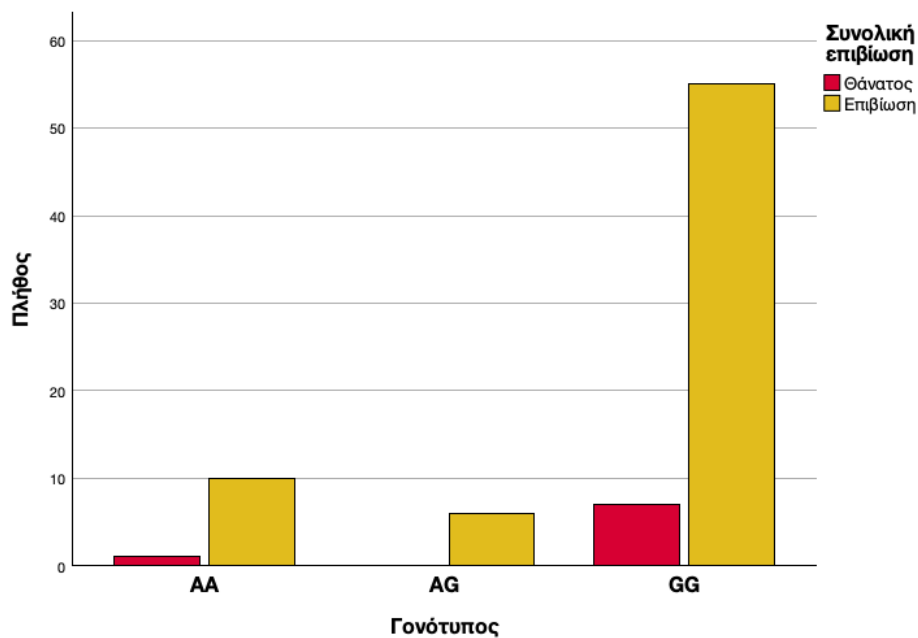
**Εικόνα 22.** Κατανομή των θανόντων ασθενών με ΟΛΛ ανά γονότυπο του rs3742330 στο *DICER1*.

Υποτροπή και επιβίωση ανάλογα με το γονότυπο του rs636832 στο γονίδιο *AGO1*

Παρόμοια αποτελέσματα υπήρξαν από τη μελέτη των γονοτύπων του rs636832 στο γονίδιο *AGO1* σε σχέση με την εμφάνιση υποτροπής ή θανάτου. Παρόλο που ο γονότυπος AA συσχετίστηκε με την εμφάνιση της νόσου, οι περισσότερες περιπτώσεις υποτροπής είχαν γονότυπο GG (90,9 %) με μόλις μία περίπτωση με γονότυπο AA (9,1 %). Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων υποτροπής μεταξύ των ασθενών με Fisher-Freeman-Halton Exact Test δεν έδειξε στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα ( $p = 0,852$ ). Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα από την ανάλυση των γονοτύπων στα παιδιά που κατέληξαν (όλοι οι θάνατοι πλην ενός καταγράφηκαν με GG γονότυπο). Η Εικόνα 23 παρουσιάζει το πλήθος των περιπτώσεων που υποτροπίασαν αναλόγως του γονοτύπου τους, ενώ η Εικόνα 24 παρουσιάζει το πλήθος των ασθενών που υπέκυψαν από την ΟΛΛ ανά γονότυπο.



**Εικόνα 23.** Κατανομή των ασθενών με ΟΜ που υποτροπίασαν ανά γονότυπο του rs636832 στο *AGO1*.

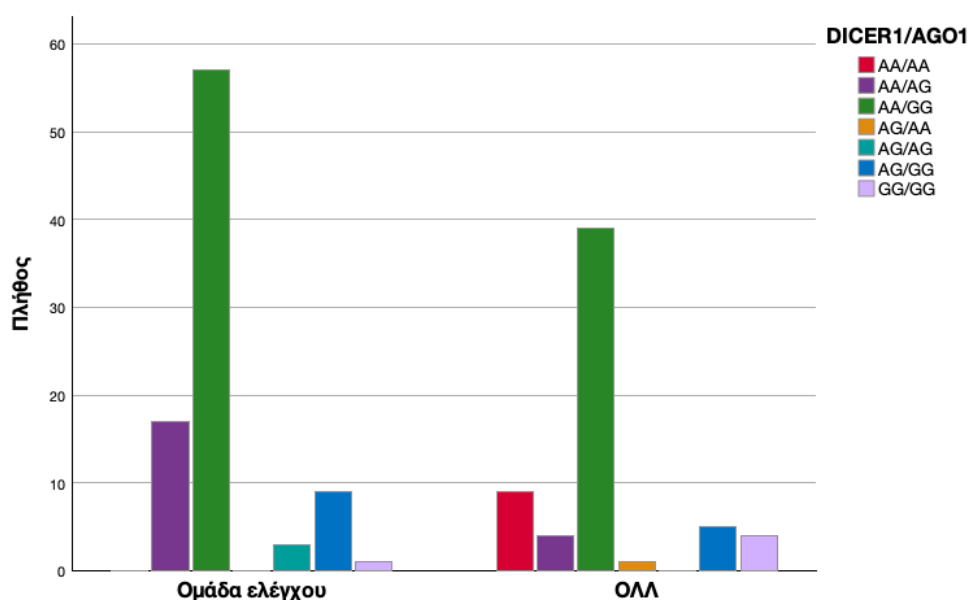


**Εικόνα 24.** Κατανομή των θανόντων ασθενών με ΟΜ ανά γονότυπο του rs636832 στο *AGO1*.



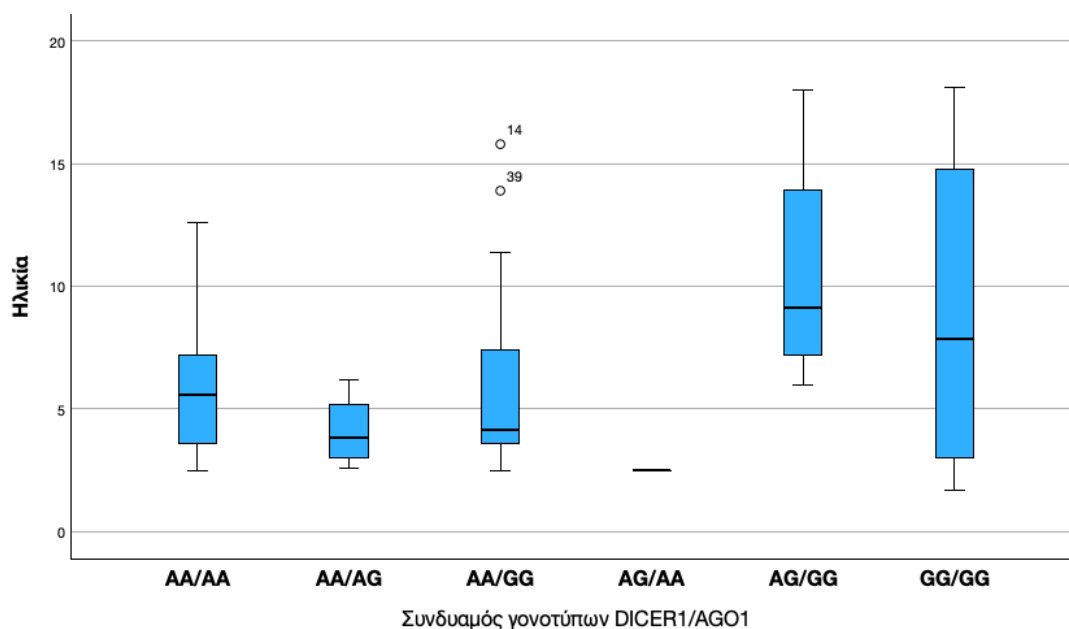
## Μελέτη του συνδυασμού των γονοτύπων σε rs3742330 και rs636832

Ο συνδυασμός των γονοτύπων GG/AA στους SNPs των *DICER1* και *AGO1* αντίστοιχα, όπως και ο GG/AG, δεν εμφανίστηκαν καθόλου στην παρούσα ανάλυση. Ένας προφανής λόγος είναι η σπανιότητα των αλληλόμορφων αυτών σε συνδυασμό με το μέγεθος του δείγματος στη μελέτη αυτή. Επιπλέον, μια υπόθεση θα μπορούσε να είναι ότι η ομοζυγωτία στα ελάσσονα αλληλία δεν είναι συμβατή. Οι συνδυασμοί AA/AA και AG/AA εμφανίστηκαν μόνο σε ασθενείς με ΟΛ, ενώ ο συνδυασμός AG/AG αποκλειστικά στην ομάδα ελέγχου. Η στατιστική ανάλυση κατέληξε πως μόνο η παρουσία του AA/AA συνδυασμού γονοτύπων συσχετίζεται σημαντικά με τη διάγνωση της ΟΛ (OR 31,075 με 95 % CI 1,772 έως 544,863 και  $p = 0,0187$ ). Αντίστοιχα, το Fisher-Freeman-Halton Exact Test έδειξε πως υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην κατανομή των γονοτύπων ( $p < 0,001$ ). Η ίδια δοκιμασία έδειξε πως δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική σχέση του συνδυασμού των γονοτύπων με την υποτροπή ή το θάνατο μεταξύ των ασθενών ( $p = 0,846$  και  $0,94$ , αντίστοιχα). Στην Εικόνα 25 παρουσιάζεται η κατανομή των συνδυασμών των γονοτύπων στην παρούσα μελέτη.



**Εικόνα 25.** Ο συνδυασμός των γονοτύπων στους rs3742330 *DICER1* και rs636832 *AGO1*.

Η ηλικία κατά τη διάγνωση της ΟΜ, παρόλο που παίζει ρόλο στη διαστρωμάτωση του κινδύνου, δε συσχετίστηκε σημαντικά ούτε με την εμφάνιση υποτροπής της νόσου, αλλά ούτε και με μειωμένη επιβίωση. Ένα ενδιαφέρον εύρημα στη μελέτη αυτή ήταν ότι η ηλικία κατά τη διάγνωση της ΟΜ εμφανίστηκε μια μικρή θετική, αλλά στατιστικώς σημαντική, συσχέτιση με το συνδυασμό των γονοτύπων στους υπό μελέτη πολυμορφισμούς (Pearson Correlation  $r = 0,273$  με  $p = 0,042$ ). Ειδικότερα, ο συνδυασμός AG/GG συνδέθηκε με τη διάγνωση της ΟΜ σε μεγαλύτερη ηλικία (10,6 έτη, τυπική απόκλιση 2,6). Στην Εικόνα 26 φαίνεται η ηλικιακή κατανομή των ασθενών με ΟΜ ανά συνδυασμό γονοτύπων.



**Εικόνα 26.** Κατανομή των ηλικιών κατά τη διάγνωση της ΟΜ ανά συνδυασμό γονοτύπων στους πολυμορφισμούς *DICER1/AGO1*.

#### Περιορισμοί της μελέτης

Περιορισμοί της παρούσας μελέτης είναι (α) το σχετικά μικρό μέγεθος του δείγματος, παρόλο που η *a priori* ανάλυση για τον υπολογισμό του κατέδειξε πως ο πληθυσμός που μελετήθηκε ήταν ικανός για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών διαφορών, (β) η προέλευση της συντριπτικής πλειοψηφίας των δειγμάτων ασθενών

από την ίδια γεωγραφική περιοχή, την Κρήτη, παρόλο που δε διαπιστώθηκε απόκλιση της ισορροπίας στην κατανομή των γονοτύπων στην ομάδα ελέγχου με βάση την αρχή HWE, και (γ) αναλυτικού τύπου –ότι όντως δηλαδή οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές που παρατηρήθηκαν εξηγούν και τη διαφορά ασθενών και μαρτύρων, ενώ η παραγοντική ανάλυση (factor και principal components analysis) έδειξε πως καμία μεταβλητή δεν εξηγεί > 30% της διακύμανσης. Να σημειωθεί πως στη βιβλιογραφία έχει αποδειχτεί ο αυξημένος κίνδυνος για εμφάνιση ΟΜ σε παιδιά και εφήβους μόνο για παραλλαγές της βλαστικής σειράς στα γονίδια *ARID5B*, *IKZF1*, *CEBPE*, *CDKN2A*, *PIP4K2A*, *GATA3* και *TP63* (78).

#### 4. Συζήτηση

Η ΟΜ είναι η πιο συχνή νεοπλασία της παιδικής ηλικίας και αφορά 1 στις 4 νεοπλασίες σε παιδιά και εφήβους με επίπτωση που ανέρχεται σε 1:30.000 ανά έτος στον αντίστοιχο πληθυσμό. Οι περισσότεροι ασθενείς διαγιγνώσκονται μεταξύ 2 και 5 ετών, γεγονός που αποτυπώθηκε και στην κοόρτη των ασθενών της παρούσας μελέτης (διάμεση ηλικία 4,25 έτη), όπως και η προτίμηση της νόσου στα αγόρια (λόγος αγοριών : κοριτσιών 1,3). Η κοόρτη των ασθενών με ΟΜ είχε συνολική επιβίωση στο 91 %. Να σημειωθεί πως στο 11 % των ασθενών εμφανίστηκε υποτροπή της νόσου και πως το 70 % των υποτροπών είχε δυσμενή κατάληξη σε άλλοτε άλλο χρονικό διάστημα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα σύγχρονα δεδομένα για τη νόσο, παρόλο που η κοόρτη αφορά σε διαγνώσεις των τελευταίων 25 ετών (79).

Η επιλογή των rs3742330 του *DICER1* και rs636832 στο *AGO1* έγινε σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συστηματικής ανασκόπησης της βιβλιογραφίας και με βάση την σχέση των γονοτύπων με τα επίπεδα των παραγόμενων microRNAs και τη λειτουργικότητα του RISC, όπως αναλύθηκε στην Εισαγωγή. Πρόκειται για την πρώτη μελέτη των πολυμορφισμών αυτών στην Ελλάδα. Το έλασσον αλληλόμορφο του πολυμορφισμού rs3742330 στο γονίδιο *DICER1* συσχετίστηκε σημαντικά με την εμφάνιση της ΟΜ σε παιδιά και εφήβους με το υπολειπόμενο γενετικό μοντέλο (GG έναντι AA+AG) να περιγράφει καλύτερα τη σχέση αυτή: OR 9,2 με 95 % CI 1,126 – 75,154 και  $p = 0,019$ . Η παρουσία του ελάσσονος αλληλόμορφου G προσδίδει από μόνη της κίνδυνο για την ανάπτυξη της νόσου, αν και η σχέση αυτή ήταν οριακά στατιστικώς σημαντική ( $p = 0,048$ ). Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη μελέτη στη βιβλιογραφία για τον SNP rs3742330 στο γονίδιο *DICER1* στην οξεία

λεμφοβλαστική λευχαιμία. Μια μελέτη του συγκεκριμένου πολυμορφισμού έδειξε πως οι φορείς του ελάσσονος αλληλόμορφου G (δηλαδή των γονοτύπων AG+GG) είχαν και στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη έκφραση mRNA της Dicer. Η ίδια μελέτη έδειξε μειωμένη σύνδεση πως με το G αλληλίο στον rs3742330 προβλέπεται η δημιουργία 3 νέων θέσεων σύνδεσης για miRNAs στο 3'-UTR του γονιδίου *DICER1* (hsa-miR-3622a-5p, hsa-miR-4423-3p και hsa-miR-5582-5p), με το hsa-miR-5582-5p (αλληλόμορφο C) να εμφανίζει τη χαμηλότερη απαιτούμενη ενέργεια σύνδεσης της τάξεως των  $-0,097$  kcal/mol (80). Ομοίως, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων dbSNP, ο rs3742330 μπορεί να οδηγήσει κυρίως σε παραλλαγή της 3'-UTR, αλλά σπάνια και σε παραλλαγή μη κωδικοποιητικού μεταγράφου (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs3742330>, τελευταία πρόσβαση 30 Ιανουαρίου 2024). Μόλις μία περίπτωση G>A στον rs3742330 έχει συσχετιστεί με το αντίστοιχο οικογενές σύνδρομο προδιάθεσης για εμφάνιση καρκίνου, το «DICER1 σύνδρομο», μεταξύ 5,616 καταχωρίσεων (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=dicer1+syndrome>, τελευταία πρόσβαση 30 Ιανουαρίου 2024). Το DICER1 σύνδρομο χαρακτηρίζεται από απώλεια της έκφρασης της Dicer και ακολουθεί το αυτοσωματικό επικρατές μοντέλο κληρονόμησης με μια ετερόζυγο βλαστική μετάλλαξη στο *DICER1* να αρκεί για την εμφάνισή του. Το 2022 ο WHO συμπεριέλαβε το DICER1 σύνδρομο στα οικογενή σύνδρομα όγκων των ενδοκρινών αδένων και οι φαινότυποί του καταγράφονται στον Πίνακα 17 (81). Εννοείται πως δεν υπονοείται η ένταξη της ΟΜ στο φάσμα του φαινοτύπου του DICER1 συνδρόμου, αλλά δεν αποκλείεται η σύνδεση του συνδρόμου με την αυξημένη επίπτωση ενδοκρινικών διαταραχών (και ειδικά της θυρεοειδοπάθειας) στους επιζώντες της ΟΜ –πέραν της επίδρασης των ΧΜΘ φαρμάκων.

**Πίνακας 17.** Φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου DICER1 (81).

Φαινότυποι DICER1 συνδρόμου	Ηλικιακό εύρος διάγνωσης σε έτη (κορύφωση)	Ειδικότητα για DICER1 σύνδρομο
Περισσότερο συχνόι φαινότυποι		
Πλευροπνευμονικό βλάστωμα	(0 – 8)	Υψηλή
- τύπου I (κυστικό)	(0 – 2)	

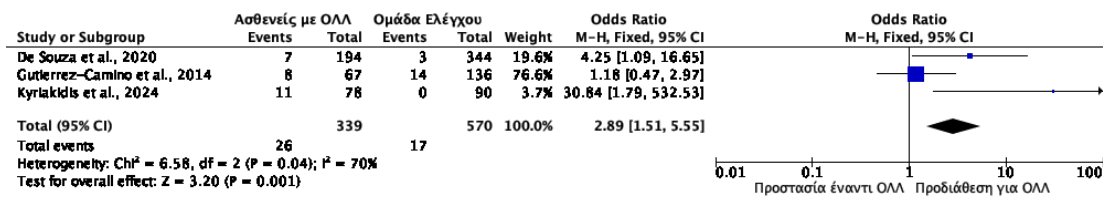
- τύπου II (κυστικό και συμπαγές)	(1 – 5)	
- τύπου III (συμπαγές)	(1,5 – 6)	
- τύπου Ir (κυστικό)	οποιαδήποτε ηλικία	
Κυστικό νέφρωμα	0 – 15 (0 – 4)	
Ωθητικός όγκος από κύτταρα Sertoli-Leydig	2 – 40 (10 – 25)	
Πολυοζώδης υπερπλασία θυρεοειδούς	2 – 40 (10 – 25)	Χαμηλή *εκτός αν είναι οικογενής ή < 18 ετών
Μέτρια συχνόι φαινότυποι		
Εμβρυονικό ραβδομυοσάρκωμα του τραχήλου της μήτρας	4 – 45 (10 – 20)	Υψηλή
Χονδρομεσεγγυματικό αμάρτωμα της ρινός	5 – 25 (8 – 20)	Μέτρια
Διαφοροποιημένο καρκίνωμα του θυρεοειδούς	5 – 45 (10 – 30)	Χαμηλή *εκτός αν είναι < 18 ετών
Σπάνιοι φαινότυποι		
Βλάστωμα υπόφυσης	0 – 2	Πολύ υψηλή
Αναπλαστικό νεφρικό σάρκωμα	2 – 20	Υψηλή
Βλάστωμα επίφυσης (κωναρίου)	2 – 25 (2 – 10)	Μέτρια
Μυελοεπιθηλίωμα των κροσσών	3 – 10	Μέτρια
Νεανικοί αμαρτωματώδεις πολύποδες εντέρου	0 – 20 (0 – 4)	Χαμηλή
Όγκος Wilms'	3 – 8	Χαμηλή
Εμβρυονικό ραβδομυοσάρκωμα της ουροδόχου κύστης	0 – 12	Αδιευκρίνιστη
Σάρκωμα εγκεφάλου	οποιαδήποτε ηλικία	Αδιευκρίνιστη
Πολύ σπάνιοι φαινότυποι		
Βρεφικός παρεγκεφαλιδικός εμβρυονικός όγκος	0 – 1	Υψηλή
Εμβρυονικό ραβδομυοσάρκωμα των ωοθηκών	οποιαδήποτε ηλικία	Υψηλή
Γυνανδροβλάστωμα	οποιαδήποτε ηλικία	Υψηλή

Προϊερός κακοήθης τερατοειδής όγκος	οποιαδήποτε ηλικία	Υψηλή
Περιτοναιικό σάρκωμα ομοιάζον με πλευροπνευμονικό βλάστωμα	οποιαδήποτε ηλικία	Πολύ υψηλή
Καλά διαφοροποιημένο εμβρυϊκό αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα	οποιαδήποτε ηλικία	Χαμηλή
Παραορχικό σάρκωμα	οποιαδήποτε ηλικία	Χαμηλή
Καρκίνωμα θυρεοειδούς πτωχής διαφοροποίησης	οποιαδήποτε ηλικία	Αδιευκρίνιστη
Όγκος όρχεων από στρωματικά κύτταρα	οποιαδήποτε ηλικία	Αδιευκρίνιστη
Μεσεγγυματικό αμάρτωμα του ήπατος	0 – 8 (0 – 3)	Αδιευκρίνιστη

Όπως σχολιάστηκε στη μετα-ανάλυση της Εισαγωγής, το έλασσον G αλληλόμορφο του rs3742330 φάνηκε να προστατεύει έναντι συγκεκριμένων νεοπλασιών (θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς, προκαρκινωμάτωδεις αλλοιώσεις τραχήλου, γαστρικός καρκίνος), αλλά και να προδιαθέτει σε άλλους (καρκίνος του λάρυγγα). Η μελέτη του SNP σε ασθενείς προσβεβλημένους από τον ιό HIV (Human Immunodeficiency Virus ή ιός ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου) που ανέπτυξαν NHL και σε υγιείς μάρτυρες δεν έδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές, παρόλο που το αλληλόμορφο G -όπως συνέβη και στην παρούσα μελέτη- εντοπίστηκε πιο συχνά μεταξύ των ασθενών (59). Πέραν του αυξημένου κινδύνου για εμφάνιση νεοπλασιών, αξίζει να αναφερθούμε σε μια μελέτη που συσχέτισε στατιστικώς σημαντικά το γονότυπο GG του πολυμορφισμού rs3742330 στο *DICER1* με αυξημένη συνολική επιβίωση μεταξύ των ασθενών με λέμφωμα από T-κύτταρα (82). Ομοίως και στην παρούσα μελέτη, παρόλο που τα παιδιά και οι έφηβοι ΟΜ βρέθηκαν με στατιστικώς σημαντικά πιο συχνό το γονότυπο GG στον rs3742330 του γονιδίου *DICER1* συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, οι υποτροπές συνέβησαν σχεδόν αποκλειστικά στους ασθενείς με γονότυπο AA (90 %) και ακολούθως τους ασθενείς με γονότυπο AG (10 %), ενώ και οι 7 ασθενείς με γονότυπο GG δεν υποτροπίασαν (100 %). Αντίστοιχα, οι ασθενείς που υπέκυψαν στη νόσο στην κοόρτη της παρούσας μελέτης είχαν πρωτίστως γονότυπο AA (87,5 %) και κατά δεύτερο λόγο AG (12,5 %), ενώ κανένα από αυτά τα παιδιά δεν είχε γονότυπο GG. Με βάση τα παραπάνω, μένει να

αποσαφηνιστεί αν η Dicer-ανεξάρτητη βιογένεση miRNAs διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεση των νεοπλασιών, αλλά και της πρόγνωσής τους. Να σημειωθεί πως είναι γνωστό ότι η διαγραφή του *DICER1* αναστέλλει την ανάπτυξη των μακροφάγων και προκαλεί μυελοδυσπλασία, κατάσταση που νοείται ως προλευχαιμική. Παρόλα αυτά, τα κύτταρα που στερούνται Dicer δεν εμφανίζουν λευχαιμία σε μοντέλα επίμυων, υποδεικνύοντας ότι η δραματική μείωση των επιπέδων των miRNAs δεν είναι αρκετή από μόνη της για τη λευχαιμογένεση. Στην ίδια μελέτη, η ετερόζυγος διαγραφή του *DICER1*, αλλά όχι η ομόζυγος, εμφάνισε συνέργεια με τη διαγραφή της p53 ως προς την εξέλιξη προς λευχαιμία, υποδηλώνοντας πως το *DICER1* είναι ένα απλοανεπαρκές ογκοκατασταλτικό γονίδιο για τις νεοπλασίες του αιμοποιητικού συστήματος και συνάδει με τη μειορρύθμιση των περισσότερων miRNAs σε δείγματα λευχαιμίας (83). Επιπλέον, η διαγραφή του *DICER1* από τα μεγακαρυοκύτταρα επίμυων συνδέθηκε τόσο με ήπια θρομβοπενία, όσο και με αυξημένη έκφραση των mRNAs των υπομονάδων Itga2b (αIIb) και Itgb3 (β3) του υποδοχέα του ινωδογόνου, γεγονός που προδιαθέτει σε θρομβώσεις (84).

Για τον πολυμορφισμό rs636832 στο *AGO1* υπάρχουν λιγότερες μελέτες συγκριτικά με τον rs3742330. Η συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας στην Εισαγωγή έδειξε ότι ο SNP rs636832 δε σχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με την εμφάνιση νεοπλασιών γενικά –με εξαίρεση ίσως τους φορείς του ελάσσονος αλληλίου A που φαίνεται πως προστατεύονται έναντι του καρκίνου του πνεύμονα συγκρινόμενοι με τους φορείς του μείζονος αλληλόμορφου G (65). Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, έχουν δημοσιευτεί δύο μελέτες παιδιών με Β-ΟΛΛ και μαρτύρων για τον rs636832, ενώ η μετα-ανάλυση των δεδομένων τους δεν είχε στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα (Πίνακας 9). Με την προσθήκη των δεδομένων της παρούσας μελέτης προκύπτει το δενδρόγραμμα (forest plot) της Εικόνας 27, όπου φαίνεται ο γονότυπος AA να συσχετίζεται με αυξημένο λόγο πιθανοτήτων για εμφάνιση ΟΛΛ σε παιδιά και εφήβους (OR 2,89 με 95 % CI 1,51 έως 5,55 και  $p = 0,001$ ). Αντίθετα, ο γονότυπος AG σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο, όπως καταγράφηκε στο ετεροζυγωτικό γενετικό μοντέλο (Πίνακας 16).



**Εικόνα 27.** Δενδρόγραμμα των γονοτύπων AA έναντι AG+GG στον rs636832 του *AGO1* μεταξύ παιδιών και εφήβων με ΟΛΛ και της ομάδας ελέγχου.

Πολυμορφισμοί, όπως ο rs636832 στο *AGO1*, που επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης της παραγόμενης πρωτεΐνης Αργοναύτη 1 μπορεί να έχουν βλαπτικές συνέπειες στην αλληλεπίδραση miRNA-mRNA, ενώ η *AGO1* έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει ενεργά μεταγραφόμενα γονίδια που εμπλέκονται στην αύξηση, την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και την επιβίωση του κυττάρου με το να ασκεί κατασταλτικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγοντας την απόπτωση (72). Υπό αυτή την έννοια δεν είναι παράδοξο που επισυμβαίνει η διαγραφή του γονιδίου του σε διάφορες νεοπλασίες, όπως το νεφροβλάστωμα, το νευροβλάστωμα και νεοπλασίες του μαστού, του ήπατος και του παχέος εντέρου (69). Άλλες αναμενόμενες επιδράσεις του πολυμορφισμού αυτού, που οδηγεί σε παραλλαγή εσωνίου, είναι η επίδραση στη διαδικασία του ματίσματος και η δραστηριότητα ρυθμιστικών στοιχείων των εσωνίων (85). SNPs στο *AGO1* φαίνεται να ευθύνονται για τη διαταραχή της εύρυθμης λειτουργίας του συμπλόκου RISC και της γενικότερης ρύθμισης μέσω αποσιώπησης με συνεπακόλουθη αυξορρύθμιση ογκογονιδίων ή μειορρύθμιση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (72). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι ο rs636832 δε φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα της έκφρασης του *AGO1* στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος, ενώ τα επίπεδα του mRNA του συσχετίζονται θετικά και στατιστικώς σημαντικά με τον πληθυσμό των Th17 κυττάρων που παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και είναι υπεύθυνα για την ανοσολογική απόκριση σε διάφορα εξωκυττάρια παθογόνα (86).

Ένας ακόμη ρόλος της *AGO1* φαίνεται πως είναι στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων και δη των ιογενών. Οι φορείς του ελάσσονος G αλληλόμορφου επιτυγχάνουν μειωμένη κάθαρση του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV), ενώ η διαγραφή του *AGO1* έχει συνδεθεί στατιστικώς σημαντικά με τη θνητότητα σε λοιμώξεις γρίπης τύπου Α (87,88). Στο σημείο αυτό να σημειωθεί πως 1 από τους 11 ασθενείς με ΟΛΛ που κατέληξαν είχε γονότυπο GG και υπέκυψε πρώιμα σε λοίμωξη Η1Ν1. Ενδιαφέρον



παρουσιάζει το γεγονός πως στην παρούσα μελέτη οι ασθενείς που υπέκυψαν στη νόσο βρέθηκαν ως επί το πλείστον με γονότυπο GG (91 %) και όχι με τον «προδιαθεσικό» γονότυπο AA. Η συλλογή περισσότερων κλινικών πληροφοριών για σοβαρές λοιμώξεις θα ήταν χρήσιμη για τις περιπτώσεις που υπέκυψαν στη νόσο, ώστε να εξαχθούν περαιτέρω χρήσιμα συμπεράσματα.

Μελετώντας συνδυαστικά τους δύο πολυμορφισμούς, οι συνδυασμοί AA/AA και AG/AA (σε rs3742330 και rs636832, αντίστοιχα) εμφανίστηκαν μόνο σε ασθενείς με ΟΜ, ενώ ο συνδυασμός AG/AG αποκλειστικά στην ομάδα ελέγχου. Μετά από στατιστική ανάλυση, μόνο η παρουσία του AA/AA συνδυασμού γονότυπων φάνηκε να συσχετίζεται σημαντικά με τη διάγνωση της ΟΜ (OR 31,075 με 95 % CI 1,772 έως 544,863 και  $p = 0,0187$ ). Ένα ενδιαφέρον εύρημα από τη συνδυαστική ανάλυση ήταν ότι ο συνδυασμός AG/GG συνδέθηκε με τη διάγνωση της ΟΜ σε μεγαλύτερη ηλικία (10,6 έτη και  $p = 0,042$ ), γεγονός που αποτελεί παράγοντα αυξημένου κινδύνου για υποτροπή.

## 5. Συμπεράσματα

Η ΟΜ της παιδικής και εφηβικής ηλικίας αποτελεί ένα νόσημα που τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί επιβίωση ελεύθερη συμβαμάτων και συνολική επιβίωση άνω του 85 % και 90 %, αντίστοιχα. Η συμβολή των σύγχρονων θεραπευτικών προσεγγίσεων σε συνδυασμό με τη διαστρωμάτωση του κινδύνου (μέσω των γενετικών χαρακτηριστικών που προκύπτουν από την αλληλούχιση νέας γενιάς και τη μετρήσιμη υπολειπόμενη νόσο) έχει επιτύχει την ισορροπία μεταξύ εντατικής ΧΜΘ και πρόγνωσης, ώστε να ελαχιστοποιείται η υπο-θεραπεία των ασθενών με υψηλό κίνδυνο υποτροπής και να μειώνεται η ένταση της ΧΜΘ σε ασθενείς με ευνοϊκά χαρακτηριστικά. Παρόλα αυτά, η υποτροπή παραμένει ένα μεγάλο πρόβλημα στην ΟΜ της παιδικής και εφηβικής ηλικίας, αφού σχετίζεται με υψηλά ποσοστά θνητότητας.

Η συμμετοχή των βλαστικών μεταλλάξεων στην ΟΜ της παιδικής και εφηβικής ηλικίας είναι περιορισμένη και σε καμία περίπτωση δεν εξηγεί τον επιπολασμό της νόσου. Υπάρχουν, όμως, αρκετές περιπτώσεις που πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες μπορούν να εξηγήσουν την εμφάνιση της νόσου –πληροφορίες που μας δόθηκαν από GWAS μελέτες. Ειδικότερα, υπάρχουν SNPs που έχουν συσχετιστεί σημαντικά με την τοξικότητα και

την ανταπόκριση σε συγκεκριμένα ΧΜΘ φάρμακα. Από την άλλη πλευρά, ο αποδεδειγμένος ρόλος των microRNAs στη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων και στη λευχαιμία δεν αφήνουν αμφιβολίες για τη συμμετοχή των μη-κωδικοποιητικών αυτών RNAs στην παθογένεση και εξέλιξη της νόσου. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί τους γονότυπους σε δύο πολυμορφισμούς γονιδίων που κωδικοποιούν την Dicer και την πρωτεΐνη Αργοναύτη 1, πρωτεϊνών απαραίτητων στην κλασική οδό βιογένεσης των miRNAs, σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Η συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και η μετα-ανάλυση των δεδομένων κατέδειξαν το σημαντικό ρόλο και των δύο SNPs στην εμφάνιση συγκεκριμένων νεοπλασιών.

Τόσο για το *DICER1*, όσο και για το *AGO1*, οι ομοζυγώτες για το έλασσον αλληλόμορφο είχαν αυξημένο κίνδυνο για τη διάγνωση με ΟΛΛ. Μάλιστα οι ομοζυγώτες για το μείζον αλληλίλο στον rs3742330 του *DICER1* που ήταν ομοζυγώτες για το έλασσον αλληλίλο στον rs636832 του *AGO1* (AA/AA) είχαν 31-φορές περισσότερες πιθανότητες να διαγνωστούν με ΟΛΛ. Η περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων για συσχέτιση με υποτροπή της νόσου και τη συνολική επιβίωση δεν είχε στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα. Αντίθετα, μάλιστα, κανείς από τους ασθενείς που κατέληξαν δεν έφερε τους γονότυπους κινδύνου. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τη βιβλιογραφία πως τα microRNAs μπορούν να προκύψουν με εναλλακτική Dicer-ανεξάρτητη οδό, όμως η μείωση της καταστροφής των mRNA-στόχων από τις πρωτεΐνες Αργοναύτες σχετίζεται σημαντικά με την εμφάνιση της ΟΛΛ.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη μελέτη των πολυμορφισμών rs3742330 στο *DICER1* και rs636832 στο *AGO1* στην Ελλάδα, ενώ αποτελεί και την πρώτη μελέτη στη βιβλιογραφία για τον SNP rs3742330 στο γονίδιο *DICER1* στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία. Περαιτέρω μελέτες με ικανό αριθμό συμμετεχόντων δύνανται να επιβεβαιώσουν τα ευρήματα της παρούσας έρευνας και να διερευνηθούν τη σχέση των πολυμορφισμών αυτών με την υποτροπή της νόσου, τους δείκτες επιβίωσης και την επίπτωση σοβαρών λοιμώξεων.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Rodriguez PD, Paculova H, Kogut S, Heath J, Schjerven H, Fietze S. Non-Coding RNA Signatures of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 7;22(5):2683.
2. Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones. *Cell*. 2014 Mar 27;157(1):77–94.
3. Romano G, Veneziano D, Acunzo M, Croce CM. Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis*. 2017 May 1;38(5):485–91.
4. Palazzo AF, Lee ES. Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front Genet*. 2015 Jan 26;6:2.
5. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003 Dec;67(4):657–85.
6. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*. 2012 Feb 15;482(7385):331–8.
7. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806–11.
8. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*. 2019 Jan 8;47(D1):D155–62.
9. Morozova N, Zinovyev A, Nonne N, Pritchard LL, Gorban AN, Harel-Bellan A. Kinetic signatures of microRNA modes of action. *RNA*. 2012 Sep;18(9):1635–55.
10. Alberts B. *Molecular biology of the cell*. Seventh edition. New York: W. W. Norton & Company; 2022.
11. Bofill-De Ros X, Vang Ørom UA. Recent progress in miRNA biogenesis and decay. *RNA Biol*. 2024 Jan;21(1):1–8.
12. Georgakilas G, Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Yang P, Zhang Y, Economides AN, et al. microTSS: accurate microRNA transcription start site identification reveals a significant number of divergent pri-miRNAs. *Nat Commun*. 2014 Dec 10;5:5700.
13. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):235–40.
14. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Jan;20(1):5–20.
15. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018 Mar 22;173(1):20–51.

16. McGeary SE, Lin KS, Shi CY, Pham TM, Bisaria N, Kelley GM, et al. The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science*. 2019 Dec 20;366(6472):eaav1741.
17. Medley JC, Panzade G, Zinovyeva AY. microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2021 May;12(3):e1627.
18. Kuhn CD, Joshua-Tor L. Eukaryotic Argonautes come into focus. *Trends Biochem Sci*. 2013 May;38(5):263–71.
19. Kim YK, Kim B, Kim VN. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Mar 29;113(13):E1881–1889.
20. Babiarz JE, Hsu R, Melton C, Thomas M, Ullian EM, Blelloch R. A role for noncanonical microRNAs in the mammalian brain revealed by phenotypic differences in Dgcr8 versus Dicer1 knockouts and small RNA sequencing. *RNA*. 2011 Aug;17(8):1489–501.
21. Hasler D, Lehmann G, Murakawa Y, Klironomos F, Jakob L, Grässer FA, et al. The Lupus Autoantigen La Prevents Mis-channeling of tRNA Fragments into the Human MicroRNA Pathway. *Mol Cell*. 2016 Jul 7;63(1):110–24.
22. Martinez I, Hayes KE, Barr JA, Harold AD, Xie M, Bukhari SIA, et al. An Exportin-1-dependent microRNA biogenesis pathway during human cell quiescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Jun 20;114(25):E4961–70.
23. Jee D, Yang JS, Park SM, Farmer DT, Wen J, Chou T, et al. Dual Strategies for Argonaute2-Mediated Biogenesis of Erythroid miRNAs Underlie Conserved Requirements for Slicing in Mammals. *Mol Cell*. 2018 Jan 18;69(2):265–278.e6.
24. Coccaro N, Anelli L, Zagaria A, Specchia G, Albano F. Next-generation sequencing in acute lymphoblastic Leukemia. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. p. 2929.
25. Hunger SP, Mullighan CG. Redefining ALL classification: Toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. Vol. 125, *Blood*. American Society of Hematology; 2015. p. 3977–87.
26. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood cancer journal*. 2017 Jun 30;7(6):e577.
27. Roberts KG. Genetics and prognosis of ALL in children vs adults. *Hematology*. 2018 Nov 30;2018(1):137–45.
28. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Vol. 127, *Blood*. American Society of Hematology; 2016. p. 2391–405.
29. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2020 Apr 4;395(10230):1146–62.

30. Kyriakidis I, Kyriakidis K, Tsezou A. MicroRNAs and the Diagnosis of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Systematic Review, Meta-Analysis and Re-Analysis with Novel Small RNA-Seq Tools. *Cancers*. 2022 Jan;14(16):3976.
31. Markopoulos GS, Roupakia E, Tokamani M, Alabasi G, Sandaltzopoulos R, Marcu KB, et al. Roles of NF- $\kappa$ B Signaling in the Regulation of miRNAs Impacting on Inflammation in Cancer. *Biomedicines*. 2018 Jun;6(2):40.
32. Rzepiel A, Kutszegi N, Gézsi A, Sági JC, Egyed B, Péter G, et al. Circulating microRNAs as minimal residual disease biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Transl Med*. 2019 Nov 14;17(1):372.
33. Kovaleva V, Mora R, Park YJ, Plass C, Chiramel AI, Bartenschlager R, et al. miRNA-130a Targets ATG2B and DICER1 to Inhibit Autophagy and Trigger Killing of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Cancer Research*. 2012 Apr 1;72(7):1763–72.
34. Volinia S, Galasso M, Costinean S, Tagliavini L, Gamberoni G, Drusco A, et al. Reprogramming of miRNA networks in cancer and leukemia. *Genome Res*. 2010 May;20(5):589–99.
35. Ortega M, Bhatnagar H, Lin AP, Wang L, Aster JC, Sill H, et al. A microRNA-mediated regulatory loop modulates NOTCH and MYC oncogenic signals in B- and T-cell malignancies. *Leukemia*. 2015 Apr;29(4):968–76.
36. Mukherjee S, Shelar B, Krishna S. Versatile role of miR-24/24-1\*/24-2\* expression in cancer and other human diseases. *Am J Transl Res*. 2022 Jan 15;14(1):20–54.
37. Yang H, Zhang J, Li J, Zhao F, Shen Y, Xing X. Overexpression of miR-574-3p suppresses proliferation and induces apoptosis of chronic myeloid leukemia cells via targeting IL6/JAK/STAT3 pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018 Nov 1;16(5):4296–302.
38. Dawidowska M, Jaksik R, Drobna M, Szarzyńska-Zawadzka B, Kosmalka M, Sędek Ł, et al. Comprehensive Investigation of miRNome Identifies Novel Candidate miRNA-mRNA Interactions Implicated in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Neoplasia*. 2019 Mar 1;21(3):294–310.
39. Fu A, Hoffman AE, Liu R, Jacobs DI, Zheng T, Zhu Y. Targetome profiling and functional genetics implicate miR-618 in lymphomagenesis. *Epigenetics*. 2014 May;9(5):730–7.
40. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010 Feb;10(2):111–22.
41. Anastasiadou E, Seto AG, Beatty X, Hermreck M, Gilles ME, Stroopinsky D, et al. Cobomarsen, an Oligonucleotide Inhibitor of miR-155, Slows DLBCL Tumor Cell Growth In Vitro and In Vivo. *Clin Cancer Res*. 2021 Feb 15;27(4):1139–49.
42. Bloom M, Maciaszek JL, Clark ME, Pui CH, Nichols KE. Recent advances in genetic predisposition to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Expert Rev Hematol*. 2020 Jan;13(1):55–70.

43. Qian M, Zhao X, Devidas M, Yang W, Gocho Y, Smith C, et al. Genome-Wide Association Study of Susceptibility Loci for T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *J Natl Cancer Inst.* 2019 Dec 1;111(12):1350–7.
44. Wiemels JL, Walsh KM, de Smith AJ, Metayer C, Gonseth S, Hansen HM, et al. GWAS in childhood acute lymphoblastic leukemia reveals novel genetic associations at chromosomes 17q12 and 8q24.21. *Nat Commun.* 2018 Jan 18;9(1):286.
45. Defo J, Awany D, Ramesar R. From SNP to pathway-based GWAS meta-analysis: do current meta-analysis approaches resolve power and replication in genetic association studies? *Brief Bioinform.* 2023 Jan 19;24(1):bbac600.
46. Urayama KY, Takagi M, Kawaguchi T, Matsuo K, Tanaka Y, Ayukawa Y, et al. Regional evaluation of childhood acute lymphoblastic leukemia genetic susceptibility loci among Japanese. *Sci Rep.* 2018 Jan 15;8(1):789.
47. Perez-Andreu V, Roberts KG, Xu H, Smith C, Zhang H, Yang W, et al. A genome-wide association study of susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Blood.* 2015 Jan 22;125(4):680–6.
48. Gutierrez-Camino A, Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Piñan MA, Garcia-Miguel P, Sanchez-Toledo J, et al. Noncoding RNA-related polymorphisms in pediatric acute lymphoblastic leukemia susceptibility. *Pediatr Res.* 2014 Jun;75(6):767–73.
49. de Souza TP, de Carvalho DC, Wanderley AV, Fernandes SM, Rodrigues JCG, Cohen-Paes A, et al. Influence of variants of the drosha, mir499a, and mir938 genes on susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in an admixed population from the brazilian amazon. *Am J Transl Res.* 2020;12(12):8216–24.
50. Hashemi M, Hasani SS, Naderi M. DROSHA rs642321 Polymorphism Influence Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Preliminary Report. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2017 Dec;38(4):416–9.
51. Lee YY, Lee H, Kim H, Kim VN, Roh SH. Structure of the human DICER–pre-miRNA complex in a dicing state. *Nature.* 2023 Mar;615(7951):331–8.
52. Mohammadpour-Gharehbagh A, Heidari Z, Eskandari M, Aryan A, Salimi S. Association between Genetic Polymorphisms in microRNA Machinery Genes and Risk of Papillary Thyroid Carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2020 Apr;26(2):1235–41.
53. Kim J, Lee J, Oh JH, Chang HJ, Sohn DK, Kwon O, et al. Dietary Lutein Plus Zeaxanthin Intake and DICER1 rs3742330 A>G Polymorphism Relative to Colorectal Cancer Risk. *Sci Rep.* 2019 Mar 4;9(1):3406.
54. Oz M, Karakus S, Yildirim M, Bagci B, Sari I, Bagci G, et al. Genetic variants in the microRNA machinery gene (Dicer) have a prognostic value in the management of endometrial cancer. *J Cancer Res Ther.* 2018;14(6):1279–84.
55. Huang SQ, Zhou ZX, Zheng SL, Liu DD, Ye XH, Zeng CL, et al. Association of variants of miRNA processing genes with cervical precancerous lesion risk in a southern Chinese population. *Biosci Rep.* 2018 Jun 29;38(3):BSR20171565.

56. Song X, Zhong H, Wu Q, Wang M, Zhou J, Zhou Y, et al. Association between SNPs in microRNA machinery genes and gastric cancer susceptibility, invasion, and metastasis in Chinese Han population. *Oncotarget*. 2017 Oct 17;8(49):86435–46.
57. Nikolić Z, Savić Pavićević D, Vučić N, Cerović S, Vukotić V, Brajušković G. Genetic variants in RNA-induced silencing complex genes and prostate cancer. *World J Urol*. 2017 Apr;35(4):613–24.
58. Yuan WW, Hang D, Wang LH, Chen SH, Ding ZX, Hu ZB, et al. [Association between genetic variants in microRNA biosynthesis genes and the risk of head and neck squamous cell carcinoma]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2016 Aug 10;37(8):1069–73.
59. Peckham-Gregory EC, Thapa DR, Martinson J, Duggal P, Penugonda S, Bream JH, et al. MicroRNA-related polymorphisms and non-Hodgkin lymphoma susceptibility in the Multicenter AIDS Cohort Study. *Cancer Epidemiol*. 2016 Dec;45:47–57.
60. Kim MN, Kim JO, Lee SM, Park H, Lee JH, Rim KS, et al. Variation in the Dicer and RAN Genes Are Associated with Survival in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2016;11(9):e0162279.
61. Osuch-Wojcikiewicz E, Bruzgielewicz A, Niemczyk K, Sieniawska-Buccella O, Nowak A, Walczak A, et al. Association of Polymorphic Variants of miRNA Processing Genes with Larynx Cancer Risk in a Polish Population. *Biomed Res Int*. 2015;2015:298378.
62. Cho SH, Ko JJ, Kim JO, Jeon YJ, Yoo JK, Oh J, et al. 3'-UTR Polymorphisms in the MiRNA Machinery Genes DROSHA, DICER1, RAN, and XPO5 Are Associated with Colorectal Cancer Risk in a Korean Population. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131125.
63. Zheng Liang, G. H. Y. DICER rs3742330A> G polymorphism and risk of esophageal cancer. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*. 2013;20:1794–6.
64. Yuan L, Chu H, Wang M, Gu X, Shi D, Ma L, et al. Genetic variation in DROSHA 3'UTR regulated by hsa-miR-27b is associated with bladder cancer risk. *PLoS One*. 2013;8(11):e81524.
65. Kim JS, Choi YY, Jin G, Kang HG, Choi JE, Jeon HS, et al. Association of a common AGO1 variant with lung cancer risk: a two-stage case-control study. *Mol Carcinog*. 2010 Oct;49(10):913–21.
66. Yang H, Dinney CP, Ye Y, Zhu Y, Grossman HB, Wu X. Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer. *Cancer Res*. 2008 Apr 1;68(7):2530–7.
67. Horikawa Y, Wood CG, Yang H, Zhao H, Ye Y, Gu J, et al. Single nucleotide polymorphisms of microRNA-machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008 Dec 1;14(23):7956–62.

68. Xie Y, Wang Y, Zhao Y, Guo Z. Single-nucleotide polymorphisms of microRNA processing machinery genes are associated with risk for gastric cancer. *Onco Targets Ther.* 2015;8:567–71.
69. Koesters R, Adams V, Betts D, Moos R, Schmid M, Siermann A, et al. Human Eukaryotic Initiation Factor EIF2C1 Gene: cDNA Sequence, Genomic Organization, Localization to Chromosomal Bands 1p34–p35, and Expression. *Genomics.* 1999 Oct 15;61(2):210–8.
70. Gutiérrez-Malacatt H, Ayala-Sanchez M, Aquino-Ortega X, Dominguez-Rodriguez J, Martinez-Tovar A, Olarte-Carrillo I, et al. The rs61764370 Functional Variant in the KRAS Oncogene is Associated with Chronic Myeloid Leukemia Risk in Women. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(4):2265–70.
71. Martin-Guerrero I, Gutierrez-Camino A, Lopez-Lopez E, Bilbao-Aldaiturriaga N, Pombar-Gomez M, Ardanaz M, et al. Genetic variants in miRNA processing genes and pre-miRNAs are associated with the risk of chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One.* 2015;10(3):e0118905.
72. Fawzy MS, Toraih EA, Alelwani W, Kattan SW, Alnajeebi AM, Hassan R. The prognostic value of microRNA-biogenesis genes Argonaute 1 and 2 variants in breast cancer patients. *Am J Transl Res.* 2020;12(5):1994–2006.
73. Ye Y, Wang KK, Gu J, Yang H, Lin J, Ajani JA, et al. Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. *Cancer Prev Res (Phila).* 2008 Nov;1(6):460–9.
74. Mullany LE, Herrick JS, Wolff RK, Buas MF, Slattery ML. Impact of polymorphisms in microRNA biogenesis genes on colon cancer risk and microRNA expression levels: a population-based, case-control study. *BMC Med Genomics.* 2016 Apr 23;9(1):21.
75. Kockum I, Huang J, Stridh P. Overview of Genotyping Technologies and Methods. *Current Protocols.* 2023;3(4):e727.
76. Schleinitz D, DiStefano JK, Kovacs P. Targeted SNP Genotyping Using the TaqMan® Assay. In: DiStefano JK, editor. *Disease Gene Identification: Methods and Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [cited 2024 Jan 14]. p. 77–87. (Methods in Molecular Biology). Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-61737-954-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-61737-954-3_6)
77. Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR. A Note on Exact Tests of Hardy-Weinberg Equilibrium. *Am J Hum Genet.* 2005 May;76(5):887–93.
78. Moriyama T, Relling MV, Yang JJ. Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2015 Jun 25;125(26):3988–95.
79. Fish JD, Lipton JM, Lanzkowsky P. *Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology* [Internet]. Seventh Edition. Academic Press; 2022. Available from: <https://doi.org/10.1016/C2019-0-03654-0>
80. Eskandari F, Teimoori B, Rezaei M, Mohammadpour-Gharehbagh A, Narooei-Nejad M, Mehrabani M, et al. Relationships between Dicer 1 polymorphism and



expression levels in the etiopathogenesis of preeclampsia. *J Cell Biochem.* 2018 Jul;119(7):5563–70.

81. Nosé V, Gill A, Teijeiro JMC, Perren A, Erickson L. Overview of the 2022 WHO Classification of Familial Endocrine Tumor Syndromes. *Endocr Pathol.* 2022 Mar;33(1):197–227.
82. Li X, Tian X, Zhang B, Chen J. Polymorphisms in microRNA-related genes are associated with survival of patients with T-cell lymphoma. *Oncologist.* 2014 Mar;19(3):243–9.
83. Alemdehy MF, Erkeland SJ. Stop the dicing in hematopoiesis: what have we learned? *Cell Cycle.* 2012 Aug 1;11(15):2799–807.
84. Rowley JW, Chappaz S, Corduan A, Chong MMW, Campbell R, Khoury A, et al. Dicer1-mediated miRNA processing shapes the mRNA profile and function of murine platelets. *Blood.* 2016 Apr 7;127(14):1743–51.
85. Dobrijević Z, Matijašević S, Savić-Pavićević D, Brajušković G. Association between genetic variants in genes encoding Argonaute proteins and cancer risk: A meta-analysis. *Pathol Res Pract.* 2020 May;216(5):152906.
86. Tokiyoshi E, Watanabe M, Inoue N, Hidaka Y, Iwatani Y. Polymorphisms and expression of genes encoding Argonautes 1 and 2 in autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity.* 2018 Feb;51(1):35–42.
87. Van Stry M, Oguin TH, Cheloufi S, Vogel P, Watanabe M, Pillai MR, et al. Enhanced susceptibility of Ago1/3 double-null mice to influenza A virus infection. *J Virol.* 2012 Apr;86(8):4151–7.
88. Ellwanger JH, Zambra FMB, Guimarães RL, Chies JAB. MicroRNA-Related Polymorphisms in Infectious Diseases-Tiny Changes With a Huge Impact on Viral Infections and Potential Clinical Applications. *Front Immunol.* 2018;9:1316.