

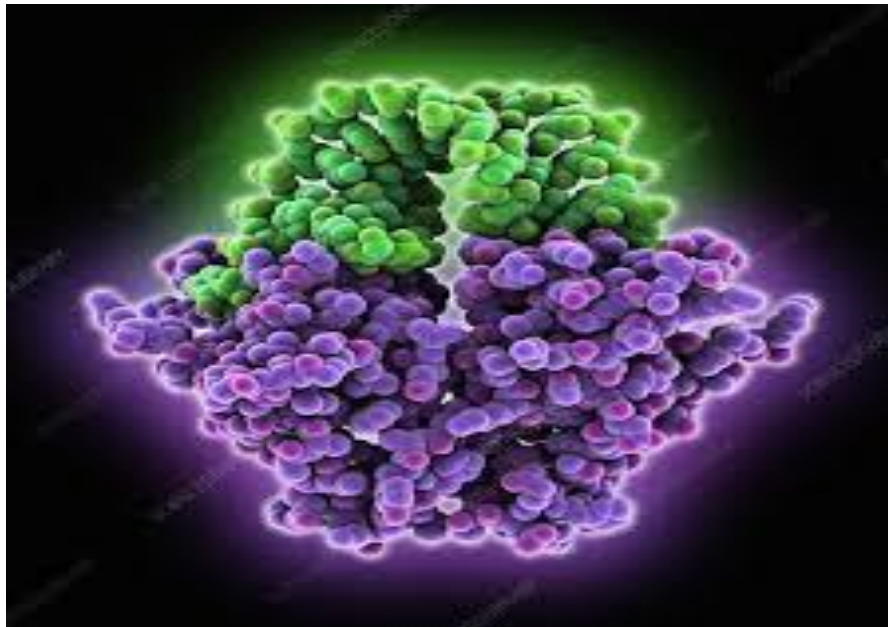


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη του ανερχόμενου ρόλου των μορίων miRNA
στην ανθρώπινη ασθένεια**



Όνοματεπώνυμο Φοιτήτριας (ΑΜ)

Ναταλία Ταταλιά (62113065)

Όνοματεπώνυμο Επιβλέποντα

Δρ. Άννα Κολλιοπούλου

Αθήνα, 2021

Πηγή εικόνας εξωφύλλου:

<https://www.sciencephoto.com/media/516297/view>



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
Section of Medical Laboratories



DISSERTATION

Study of the rising role of piRNAs in human disease



Student Name (CM)

Natalia Tatalia

Name of Supervisor

Dr. Anna Kolliopoulou

Athens, 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Άννα Κολλιοπούλου

Ακαδημαϊκή Υπότροφος, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών,
Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Απόστολος Μπελούκας

Επίκουρος Καθηγητής και Διευθυντής του Εργαστηρίου
Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα
Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων,
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Χρυσάνθη Βογιατζάκη

Λέκτορας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας
Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

EXAMINATION COMMITTEE

Anna Kolliopoulou

Academic Fellow, Department of Biomedical Sciences,
Section of Medical Laboratories, University of West Attica

Apostolos Beloukas

Assistant Professor and Director of the Laboratory of
Molecular Microbiology and Immunology, Department of
Biomedical Sciences, Section of Medical Laboratories,
University of West Attica

Chrysanthi Voyiatzaki

Lecturer, Department of Biomedical Sciences, Section of
Medical Laboratories, University of West Attica

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη ΝΑΤΑΛΙΑ ΤΑΤΑΛΙΑ του ΜΙΧΑΗΛ, με αριθμό μητρώου 62113065 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ του Τμήματος ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα



Ευχαριστίες

Για την διπλωματική εργασία με θέμα «Μελέτη του ανερχόμενου ρόλου των μορίων piRNA στην ανθρώπινη ασθένεια» θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευχαρίστησή μου στην επιβλέπουσα και Ακαδημαϊκή Υπότροφο του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, Δρ. Άννα Κολλιοπούλου, πρωτίστως για την εμπιστοσύνη της στην ανάθεση ενός απαιτητικού και συνάμα ενδιαφέροντος θέματος αλλά φυσικά και για τη συμβολή και υπομονή της στη διεκπεραίωσή της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, την οικογένειά μου και κυρίως την μητέρα μου που στάθηκαν και στέκονται δίπλα μου, που με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα και που μου δίνουν δύναμη να συνεχίζω να προσπαθώ.

Συντομογραφίες

5mC: 5-methylcytosine, 5-μεθυλοκυτοσίνη

AATF: Apoptosis Antagonizing Transcription Factor, ανταγωνιστικός της απόπτωσης μεταγραφικός παράγοντας

A-MYB: A-Myoblastosis, α-μυελοβλάστωση

αSMA: α smooth muscle actin, λεία μυϊκή ίνα α

ABC-like DLBCL: activated B-cell like DLBCL, ενεργοποιημένα B κύτταρα σαν DLBCL

ACTR10: Actin related protein 10, πρωτεΐνη 10 που σχετίζεται με την ακτίνη

AD: Alzheimer's disease, νόσος Alzheimer

Adh: alcoholic dehydrogenase, αλκοολική αφυδρογονάση

AGO proteins: Argonaute proteins, πρωτεΐνες Αργοναύτες

AKA P79 / 150: A-kinase anchoring protein 79 / 150, πρωτεΐνη αγκύρωσης Α-κινάσης 79 / 150

Akt / PKB: protein kinase B, πρωτεΐνη κινάση Β ή σερίνης / θρεονίνης

ALDH1: Aldehyde dehydrogenase 1, αλδεϋδική αφυδρογονάση 1

ALS: amyotrophic lateral sclerosis, αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση

APOE: Apolipoprotein E, Απολιποπρωτεΐνη Ε

ARHGAP11A: Rho GTPase Activating Protein 11A, μεθυλίωσης του παρεμβαλλόμενου γονιδίου ενεργοποίησης της Rho GTPase πρωτεΐνης 11A

ARPE19: adult retinal pigment epithelial cells, ενήλικα κύτταρα επιθηλίου χρωστικής αμφιβληστροειδούς

ATF3: activating transcription factor 3, ενεργοποιητικός παράγοντας μεταγραφής

Aub: Aubergine

BACE1: Beta-secretase 1, Β-εκκριτάση 1

Bax: Bcl-2 associated X, σχετιζόμενος με το Bcl2 X

Bcl-2: B-cell lymphoma 2, Β κυτταρικό λέμφωμα 2

Bcl-X: B-cell lymphoma X, Β κυτταρικό λέμφωμα X

BKV: BK virus, ο ιός ΒΚ

bp: base pair, ζεύγη βάσεων

BRCA1: Breast Cancer 1, καρκίνος του μαστού 1

BTB: blood tumor barrier, φραγμός αίματος-όγκου

BTG1: B-cell translocation gene 1, γονίδιο μετατόπισης Β-κυττάρων

c-met: tyrosine-protein kinase Met

CAF1: Chromatin assembly factor 1, παράγοντας συναρμολόγησης χρωματίνης 1

Cas 9: CRISPR associated protein 9, συνδεδεμένη με CRISPR πρωτεΐνη 9

CB: chromatoid body, χρωματοειδές σωματίο

ccRCC: clear cell renal cell carcinoma, διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού

CD: cluster of differentiation, σύμπλεγμα διαφοροποίησης

CDK: cyclin dependent kinase 1, εξαρτώμενη από κυκλίνη κινάση 1

Cdk5rap1: CDK5 Regulatory Subunit Associated Protein 1, πρωτεΐνη 1 που σχετίζεται με τη ρυθμιστική υπομονάδα CDK5

CEA: carcinoembryonic antigen, καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο

CEBPA: CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha, πρωτεΐνη A δέσμησης CCAAT-ενισχυτή

CHL: classical Hodgkin lymphoma, κλασσικό Hodgkin λέμφωμα

COVID-19: Coronavirus disease 2019, νόσος του κοροναϊού 2019

CpG: cytosine-guanine, κυτοσίνη-γουανίνη

CRC: colorectal cancer, καρκίνος του παχέος εντέρου

CREB2: cAMP-response element binding protein 2, πρωτεΐνη 2 σύνδεσης στοιχείου απόκρισης cAMP

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, ομαδοποιημένες κανονικά κατανεμημένες παλινδρομικές επαναλήψεις

CVB3: Coxsackievirus B3, ιός Coxsackie B3

CYCS: Cytochrome C, Somatic, Κυτόχρωμα C, σωματικό

DDX4: DEAD-Box Helicase 4, Ελικάση 4 της οικογένειας DEAD-Box

DEET: N, N-Diethyl-meta-toluamide, N, N-διαιθυλ-3-μεθυλ-βενζαμίδη

DFS: disease-free survival, επιβίωση χωρίς ασθένειες

DIO3: Iodothyronine Deiodinase 3, Ιωδοθυρονίνη Δειοδινάση 3

DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, διάχυτο λέμφωμα μεγάλων κυττάρων B

DLK1: Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1

DmGTSF1: *D. melanogaster* gametocyte-specific factor 1, παράγοντας 1 ειδικός για γαμετοκύτταρα της *D. melanogaster*

DmHen1: *D. melanogaster* Hen1

DNA: deoxyribonucleic acid, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

DNMT: DNA methyltransferase enzym, ένζυμο DNA μεθυλοτρανσφεράσης

dNTPs: deoxyribonucleotide triphosphate, τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο

DR: diabetic retinopathy, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια

dsRNA: double stranded RNA, δίκλωνο RNA

DUSP1: Dual specificity protein phosphatase 1, πρωτεϊνική φωσφατάση διπλής εξειδίκευσης 1

EBV: Epstein - Barr virus, ιός Epstein - Barr

EIF2S3: Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Subunit Gamma, ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης μετάφρασης 2 γάμα υπομονάδας

EMT: epithelial to mesenchymal transition, επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση

ENOCa: endometrioid ovarian cancer, ενδομητριοειδής καρκίνος ωοθηκών

EOCa: Epithelial Ovarian Cancer, επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών

ERK1 / 2: Extracellular signal-regulated kinases1 / 2, κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυτταρικά σήματα 1 / 2

ERM: ezrin-radixin-moesin, εζρίνη-ακτιζίνη-μεζίνη

EVs: extracellular vesicles, εξωκυτταρικά κυστίδια

FOXG1: forkhead box G1

G-MDSCs: granulocytic myeloid-derived suppressor cells, μυελοειδή κατασταλτικά κοκκιοκύτταρα

GAS5: Growth Arrest-Specific 5

GASZ: germ cell protein with Ankyrin repeats, sterile α motif [SAM], and leucine zipper, πρωτεΐνη βλαστικών κυττάρων με επαναλήψεις Αγκυρίνης, αποστειρωμένο μοτίβο α [SAM] και φερμουάρ λευκίνης

GBM: glioblastoma multiform, πολύμορφο γλοιοβλάστωμα

GCB-like DLBCL: germinal center B cell, B κύτταρα τύπου βλαστικού κέντρου

GSK3a / b: Glycogen Synthase Kinase 3 Alpha, Κινάση 3a συνθάσης γλυκογόνου

H3K9me3: trimethylation of lysine 9 on histone H3, τριμεθυλίωση της ιστόνης 3 στη λυσίνη 9

HCC: hepatocellular carcinoma, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

HERV-K: human endogenous retrovirus type K, ανθρώπινος ενδογενής ρετροϊός τύπου K

HGF: Hepatocyte growth factor, παράγοντας ανάπτυξης ηπατοκυττάρων

HMGB1: High Mobility Group Box 1, Πλαίσιο ομάδας υψηλής κινητικότητας 1

HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και λαιμού

HP1: Heterochromatin Protein 1, πρωτεΐνη ετεροχρωματίνης 1

HPV: Human Papilloma Virus, ιός ανθρώπινου θηλώματος

HSF-1: heat shock factor 1, μεταγραφικός παράγοντας θερμικού σοκ-1

HTS: high throughput screening, έλεγχος υψηλής απόδοσης

i-body (εφόσον αποτελούν την κύρια κυτταροπλασματική τοποθεσία εντοπισμού των πρωτεϊνών του μονοπατιού piRNA), του piP-body

ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1, μόριο διακυτταρικής πρόσφυσης
IL-4 ή 6: interleukin 4 ή 6, ιντερλευκίνη 4 ή 6
IMC: intermitochondrial cement, ενδομιτοχονδριακό «τσιμέντο»
IPI: International Prognostic Index, Διεθνής Προγνωστικός Δείκτης
iPSC: Induced Pluripotent Stem Cell, επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα
iRBCs: infected red blood cells, μολυσμένα ερυθρά αιμοσφαίρια
JCV: John Cunningham virus, ιός John Cunningham
KPNA6: Karyopherin Subunit Alpha 6, Υπομονάδα Καρυοφερίνης Άλφα 6
LIAS: Lipoic Acid Synthetase, Συνθετάση λιποϊκού οξέος
LINE: long interspersed nuclear elements, μακρά διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία
LNCaP: Lymph Node Carcinoma of the Prostate, Καρκίνωμα λεμφαδένα του προστάτη
lncRNA: long non coding RNA, μακρά μη κωδικοποιητικά RNA
LRAT: Lecithin Retinol Acyltransferase, Ακυλοτρανσφεράση λεικιθίνης ρετινόλης
LTR: long terminal repeats, μακρές τελικές επαναλήψεις
m6A: N6-methyladenosine, N6 μεθυλοαδενοσίνη
MAMs: mitochondria associated membranes, μεμβράνες σχετιζόμενες με μιτοχόνδρια
MAPK: mitogen-activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα
Mark: microtubule affinity regulating kinase, κινάση που ρυθμίζει τη συγγένεια μικροσωληναρίων
MCF7: Michigan Cancer Foundation-7, Ίδρυμα καρκίνου του Michigan-7
MDA-MB-231: MD Anderson MB-231
MECP2: methyl-CpG binding protein 2, πρωτεΐνης 2 πρόσδεσης σε μέθυλο-CpG
MEG3: maternally expressed gene 3, μητρικώς εκφραζόμενο γονίδιο 3
MERCs: mitochondria endoplasmic reticulum contacts, επαφές ενδοπλασματικού δικτύου μιτοχονδρίων
miRNA: microRNA, μικρό μη-κωδικοποιό RNA
MITOPLD: Mitochondria Phospholipase D, μιτοχονδριακή φωσφολιπάση D
MM: multiple myeloma, πολλαπλούν μυέλωμα
MMP9: matrix metalloproteinase 9, μεταλλοπεπτιδάση μήτρας 9
MMSCs: multiple myeloma stem cells, βλαστοκύτταρα πολλαπλού μυελώματος
MOV10L1: Moloney Leukemia Virus 10 like 1
MPC: mesoderm progenitor cell, μεσοδερμικό προγονικό κύτταρο
MPHOSPH8: M-Phase Phosphoprotein 8, Φωσφοπρωτεΐνη Μ-Φάσης 8
mRNA: messenger RNA, αγγελιοφόρο RNA

MTR: 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase, 5-μεθυλοτετραϋδροφολική-ομοκυστεϊνική μεθυλοτρανσφεράση

MVH: mouse vasa homolog, ομόλογο VASA ποντικού

NCCN: National Comprehensive Cancer Network Εθνικού Γενικού Δικτύου Καρκίνου

ncRNA: noncoding RNA, μη κωδικοποιητικά RNA

NFATC2: Nuclear Factor of Activated T Cells 2, Πυρηνικός φάκελος ενεργοποιημένων T2 κυττάρων

NFKBIA: Nuclear factor kappa B inhibitor alpha, Αναστολέας άλφα του πυρηνικού παράγοντα κάππα Β

NLPHL: nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma, οζώδες Hodgkin λέμφωμα με λεμφοκυτταρική επικράτηση

NMD: nonsense-mediated RNA decay

NPC: neural progenitor cell, νευρωνικά προγονικά κύτταρα

NSC Ex / Mv: neural stem-cells exosomes / microvesicles, εξωσώματα / μικροσωληνίδια νευρικών βλαστικών κυττάρων

NSCLC: non small cell lung cancer, μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα

nt: nucleotide, νουκλεοτίδιο

NUDT4: Nudix Hydrolase 4,

OA: osteoarthritis, οστεοαρθρίτιδα

OASF: αρθρικό υγρό στην οστεοαρθρίτιδα

OCa: Ovarian Cancer, καρκίνος των ωοθηκών

Oct4: octamer binding transcription factor 4, οκταμερής μεταγραφικός παράγοντας 4

OIP5: Ora Interacting Protein 5, πρωτεΐνη 5 που αλληλεπιδρά με Ora

OS: Overall Survival, συνολική επιβίωση

p53: Tumor protein P53, Πρωτεΐνη όγκου P53

PAX8: paired box gene 8, γονίδιο 8 ζευγαρωμένου πλαισίου

PD: Parkinson's disease, νόσος Parkinson

PDAC: pancreatic ductal adenocarcinoma, αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου

PDR: proliferative diabetic retinopathy, πολλαπλασιαστική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια

PGCs: primordial germ cells, αρχέγονα γαμετικά κύτταρα

PHCM: primary human cardiac myocytes, πρωτογενή ανθρώπινα καρδιομυοκύτταρα

PI3K / Akt: phosphatidylinositol 3 kinase /protein kinase B, κινάση φωσφατιδυλινοσιτόλης 3 / πρωτεϊνική κινάση Β

PLEKHA5: Pleckstrin homology domain containing family A member 5, Οικογένεια που περιέχει περιοχή ομολογίας Pleckstrin Ένα μέλος 5

Pimet: piRNA methyltransferase, piRNA μεθυλοτρανσφεράση

piRISC: piRNA-induced silencing complex, σύμπλοκο αποσιώπησης που επάγεται μέσω piRNA

piRNA: Piwi-interacting RNA, RNA που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες Piwi

PNPLA7: Patatin Like Phospholipase Domain Containing Protein 7, Πρωτεΐνη 7 που μοιάζει με πατατίνη που περιέχει τομέα φωσφολιπάσης

Poly (I:C): Polyinosinic: polycytidylic acid, υποδοχέας του πολυϊνοσικού: πολυκυτταριδικού οξέος

pRb: retinoblastoma protein, πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος

PRDM9: PR/SET Domain 9, περιοχή 9 PR/SET

PSC H9: pluripotent stem cells H9, ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα H9

PTEN: Phosphatase and tensin, Φωσφατάση και τενσίνη RA: rheumatoid arthritis, ρευματοειδής αρθρίτιδα

RAB11A: Ras-related protein Rab-11A, σχετιζόμενη με Ras πρωτεΐνη Rab-11A

rasiRNAs: repeat-associated small interfering RNAs

RASSF1C: Ras-association domain family 1, Οικογένεια 1 τομέα συσχέτισης Ras

RCC: renal cell carcinoma, καρκίνος των νεφρικών κυττάρων

RFS: relapse-free survival, επιβίωση χωρίς υποτροπές

RIP: RNA binding protein immunoprecipitation, ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών δέσμευσης RNA

RISC: RNA-induced silencing complex, σύμπλοκο αποσιώπησης που επάγεται μέσω RNA

RNA: ribonucleic acid, ριβονουκλεϊκό οξύ

RNAi: RNA interference, παρεμβολή RNA

RNAse: RNase: ribonuclease, ριβονουκλεάση

RRM2: ribonucleotide reductase subunit M2, υπομονάδας M2 της αναγωγάσης ριβονουκλεοσιδίων

RT-qPCR: reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, ποσοτική PCR αντίστροφης μεταγραφής

SARS-CoV-2: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο του κοροναϊού 2

SEPW1: Selenoprotein W, Σεληνοπρωτεΐνη W

SERCA2a: Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a, Σαρκοπλασματικό / ενδοπλασματικό δίκτυο ασβεστίου ATPase 2a

SERPINA1: Serpin Family A Member 1, μέλος 1 οικογένειας A σερπίνης

SESN2: Sestrin-2

SetDB1: SET Domain Bifurcated Histone Lysine Methyltransferase 1

SF: synovial fibroblasts, αρθρικοί ινοβλάστες

SINE: short interspersed nuclear elements, βραχεία διάσπαρτα πυτηνικά στοιχεία

siRNA: small ή short interfering RNA, μικρά παρεμβαλλόμενα RNA

snoRNA: small nucleolar RNA, μικρά πυρηνισκικά RNA

SNP: single nucleotide polymorphism, μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός

snRNA: small nuclear RNA, μικρά πυρηνικά RNA

snRNA: small noncoding RNA, μικρά μη κωδικοποιητικά RNA

SOCa: Serous Ovarian Cancer, ορογονικός καρκίνος ωοθηκών

SoYb: Sister of Yb, αδερφές σωματίων Yb

ssRNA: single stranded RNA, μονόκλωνο RNA

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3, μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 3

SV40: simian vacuolating virus 40, ιός simian 40 ή ιός του πιθήκου 40

MAP1B: Microtubule Associated Protein 1B, Πρωτεΐνη 1B που σχετίζεται με μικροσωληνίσκους

TCC: transitional cell carcinoma, μεταβατικό κυτταρικό καρκίνωμα

TDRD: Tudor domain-containing protein, πρωτεΐνη που περιέχει περιοχή πρόσδεσης Tudor

TDRKH: Tudor and KH domain containing protein, πρωτεΐνη που περιέχει περιοχές πρόσδεσης Tudor και KH

TE: Transposable Elements, Μεταθετά Στοιχεία

TGCT: testicular germ cell tumor, όγκος όρχεως γαμετικών κυττάρων

TGF-β1: Transforming growth factor beta 1, Μετασηματίζων αυξητικός παράγοντας βήτα 1

TJ: tight junction, πρωτεΐνες στενής σύνδεσης

TRAF4: TNF receptor associated factor 4, παράγοντας 4 συνδεδεμένος με τον TNF

TP53INP1: Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 1, Πρωτεΐνη όγκου P53 επαγωγίμη από πυρηνική πρωτεΐνη 1

TRAF4: TNF Receptor Associated Factor 4, παράγοντας 4 σχετιζόμενος με τον υποδοχέα του TNF

TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand, Συνδέτης σχετιζόμενος με τον TNF που επάγει απόπτωση

tRNA: transfer RNA, μεταφορικό RNA

TTR: time to relapse, χρόνος έως την υποτροπή

UMSCC-10B: University of Michigan Squamous Cell Carcinoma - 10B, Πλακώδες καρκίνωμα του Πανεπιστημίου του Μίσιγκαν - 10B

UPP1: Uridine phosphorylase 1, Φωσφορυλάση ουριδίνης 1

UTR: untranslated regions, αμετάφραστες περιοχές

VEGF: vascular endothelial growth factor, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

vRNA: Vault-RNA

Wde: Wndei

WTAP: Wilms' tumor 1-associating protein, Πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον όγκο του Wilms 1

ZO-1: zonula occludens 1

Zuc: Zucchini

Περιεχόμενα

Περίληψη – Summary.....	1
1 Εισαγωγή.....	3
Σκοπός.....	4
Σύντομη ιστορική ανασκόπηση.....	5
2 Γενικό μέρος.....	7
2.1 Παρεμβολή RNA (RNAi).....	7
2.2 Μικρά μη κωδικοποιητικά RNA.....	7
2.3 Τα μόρια miRNA και οι λειτουργίες τους.....	9
2.4 Βιογένεση των miRNA.....	11
2.4.1 Πρωτογενής οδός.....	11
2.4.2 Επιγενετική αποσιώπηση των μεταφερόμενων στοιχείων από miRNA.....	13
2.4.3 Δευτερογενής οδός.....	13
2.5 Φυσιολογικοί ρόλοι των μορίων miRNA.....	15
2.5.1 Ο ρόλος των μορίων miRNA στη σπερματογένεση.....	15
I. Τα miRNA στα μιτοχόνδρια των γαμετικών κυττάρων.....	17
II. Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν άμεσα με τα miRNA και εμπλέκονται στη σπερματογένεση.....	19
2.5.2 Ο ρόλος των μορίων miRNA στο νευρικό σύστημα.....	19
2.5.3 Ο ρόλος των μορίων miRNA στο καρδιαγγειακό σύστημα.....	22
3 Ειδικό μέρος: Ο ρόλος των miRNA στις ανθρώπινες νόσους.....	24
3.1 Κακοήθη νοσήματα.....	24
3.1.1 Γενικά.....	24
3.1.2 Πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και λαιμού.....	29
3.1.3 Καρκίνος του πνεύμονα.....	30
3.1.4 Καρκίνος του στομάχου (γαστρικός καρκίνος).....	33
3.1.5 Καρκίνος παχέος εντέρου.....	35
3.1.6 Καρκίνος του ήπατος.....	37
3.1.7 Καρκίνος των νεφρών.....	38
3.1.8 Καρκίνος ουροδόχου κύστης.....	38
3.1.9 Αιματολογικές κακοήθειες.....	39
I. Πολλαπλούν μύελωμα.....	39

II. Λέμφωμα Hodgkin.....	40
III. Λέμφωμα Non Hodgkin.....	41
3.1.10 Νευρολογικοί καρκίνοι.....	42
3.1.11 Καρκίνος γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος.....	43
I. Καρκίνος του μαστού.....	43
II. Καρκίνος ωοθηκών.....	46
III. Καρκίνος τραχήλου της μήτρας.....	47
3.1.12 Καρκίνος ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος.....	47
I. Καρκίνος προστάτη.....	47
II. Καρκίνος των όρχεων.....	48
3.1.13 Άλλα κακοήθη νοσήματα.....	48
I. Καρκίνος του παγκρέατος.....	48
II. Ινοσάρκωμα.....	49
3.2 Νοσήματα του νευρικού συστήματος.....	49
3.2.1 Νευροαναπτυξιακές διαταραχές.....	50
I. Σύνδρομο Rett.....	50
3.2.2 Νευροεκφυλιστικές διαταραχές.....	50
I. Αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση.....	50
II. Άνοιες με συναθροίσεις παθολογικής πρωτεΐνης Ταυ.....	51
III. Εγκεφαλικό επεισόδιο.....	53
3.3 Νοσήματα του καρδιαγγειακού συστήματος.....	54
3.4 Αυτοάνοσα νοσήματα.....	56
3.4.1 Ρευματικά νοσήματα.....	56
3.5 Μεταβολικά νοσήματα.....	57
3.5.1 Σακχαρώδης διαβήτης.....	57
3.6 Λοιμώδη νοσήματα.....	58
3.6.1 Φυματίωση.....	58
3.6.2 Ελονοσία.....	59
3.6.3 Νόσος Chagas.....	60
3.6.4 Ιογενής μυοκαρδίτιδα.....	60
3.6.5 Νόσος του κοροναϊού 2019.....	61
3.7 Ανδρική υπογονιμότητα – Στείρωση.....	62
3.8 Γήρανση.....	63

4	Συζήτηση.....	65
4.1	Αρχική ανακάλυψη και συσχέτιση με την ανδρική υπογονιμότητα.....	65
4.2	Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των ρiRNA.....	65
4.3	Βάσεις δεδομένων και υπολογιστικά εργαλεία για τη μελέτη των μορίων ρiRNA.....	67
4.4	Η δυνατότητα χρήσης των μορίων ρiRNA ως μέσον πρόγνωσης, διάγνωσης ή θεραπείας.....	68
4.5	Συσχέτιση των ρiRNA με κακοήθεις νόσους του ανθρώπου.....	70
4.6	Συσχέτιση των ρiRNA με λοιπές ανθρώπινες νόσους.....	71
4.7	Πλεονεκτήματα χρήσης των ρiRNA ως διαγνωστικών δεικτών και εν δυνάμει θεραπευτικών εργαλείων.....	73
5	Συμπεράσματα.....	76
6	Βιβλιογραφία.....	78

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα RNA που αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες Piwi (Piwi-interacting RNA, piRNA) αποτελούν μία κατηγορία μικρών ρυθμιστικών RNA μεγέθους 21-35 νουκλεοτιδίων τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Αρχικά, λόγω της ανακάλυψής τους στα κύτταρα της γαμετικής οδού, είχε προταθεί η συμβολή τους αποκλειστικά στη λειτουργία της σπερματογένεσης. Πλέον όμως έχει αποδειχθεί η βιολογική σημασία της οδού piRNA/PIWI, πέραν των γαμετικών κυττάρων, και στα σωματικά κύτταρα, ως ρυθμιστών της γονιδιακής ακεραιότητας μέσω της καταστολής επιβλαβών μεταθετών στοιχείων σε επιγενετικό, μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Δυσλειτουργίες και απορρύθμιση του συμπλόκου piRNA/PIWI φανερώνουν την πιθανή εμπλοκή τους στην ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων στον άνθρωπο, με τα περισσότερα ευρήματα να αφορούν καρκινοπάθειες ποικίλων τύπων. Μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες σχετιζόμενες με το μονοπάτι των piRNA διαταράσσουν την έκφραση αυτών των ρυθμιστικών RNA με αποτέλεσμα την απορρύθμιση της έκφρασης ογκογόνων και ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, και ως εκ τούτου, την ενεργοποίηση ή καταστολή ρυθμιστικών μηχανισμών της καρκινογένεσης. Παράλληλα, οι πρωτεΐνες PIWI φαίνεται πως ασκούν κυρίως ογκογόνο ρόλο και πως συσχετίζονται με κακή πρόγνωση για τη νόσο. Η τροποποιημένη έκφραση των piRNA αλλά και των πρωτεϊνών PIWI μπορεί να έχει υψηλή προγνωστική αξία, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα χρήσης τους ως σημαντικών μοριακών δεικτών στη διάγνωση και τη θεραπεία στην κλινική πράξη του καρκίνου. Επιπλέον, τα piRNA έχουν συσχετιστεί με νοσήματα του νευρικού και του καρδιαγγειακού συστήματος, καθώς και με ορισμένα μεταβολικά, αυτοάνοσα και λοιμώδη νοσήματα. Συνεπώς, η παρούσα ανασκόπηση αποσκοπεί στην κατανόηση της εμπλοκής των piRNA σε μοριακό επίπεδο στους μηχανισμούς της παθολογίας νοσημάτων με σημαντικό αντίκτυπο στη δημόσια υγεία, καθώς επίσης και στην κλινική χρησιμότητα των piRNA/PIWI για τη βελτίωση της ποιότητας της ζωής του ανθρώπου.

SUMMARY

Piwi-interacting RNAs (piRNAs) are a class of 21-35 nt long, small regulatory, but not protein coding, RNAs. Initially, due to the fact that they were discovered in gamete cells, they were thought to be exclusively involved into spermatogenesis. However, in addition to their role in gamete cells, the biological significance of the piRNA / PIWI pathway has now been well established in somatic cells as well, being regulators of gene integrity through the suppression of harmful transposable elements at epigenetic, transcriptional and posttranscriptional level. Dysfunctions and deregulation of the piRNA / PIWI complex reveal the possible involvement of piRNAs in the development of pathological conditions in humans, with most of the findings concerning several types of cancer. Mutations in piRNA pathway-associated proteins disrupt the expression of these regulatory RNAs by deregulating the expression of oncogenic and tumor suppressor proteins, thus activating or suppressing tumorigenic regulatory mechanisms. In parallel, PIWI proteins appear to play a predominantly oncogenic role and to be associated with a bad prognosis for disease. Modified expression of piRNAs and PIWI proteins may have high prognostic value, resulting in their potential to be used as important molecular markers in the diagnosis and treatment of cancer in clinical practice. In addition, piRNAs have been linked to diseases of the nervous and cardiovascular systems, as well as certain metabolic, autoimmune and infectious diseases. Therefore, the present review aims to understand the involvement of piRNAs at the molecular level in the pathology mechanisms of diseases showing a significant impact on public health, as well as the clinical utility of piRNA / PIWI in the improvement of human life quality.

Όλοι οι γνωστοί και μη οργανισμοί, με την πάροδο του χρόνου, την προσαρμογή στο περιβάλλον τους και την εξέλιξη, έχουν αναπτύξει ποικίλους μηχανισμούς προστασίας και αντιμετώπισης ενδογενών και εξωγενών επιβλαβών παραγόντων. Μία κατηγορία ρυθμιστικών μη κωδικοποιητικών RNA που δραστηριοποιείται έναντι της γονιδιωματικής ακεραιότητας, για την προστασία των περισσότερων οργανισμών του ζωικού βασιλείου στα πλαίσια του μηχανισμού της παρεμβολής του RNA (RNA interference, RNAi) είναι τα PIWI-interacting RNA (piRNA). Στα πρώτα στάδια ανακάλυψης των piRNA, υπήρχε η υπόθεση ότι αποτελούσαν άχρηστο γενετικό υλικό και γι' αυτό είχαν χαρακτηριστεί ως «junk DNA». Ωστόσο, όσο συνεχίζονταν οι έρευνες τόσο ανακαλύπτονταν δεδομένα που αποκάλυπταν την αλληλεπίδρασή τους με διάφορα γονίδια και τη συσχέτισή τους με επιβλαβείς παράγοντες για το γονιδίωμα. Η διαδικασία παραγωγής των τελικώς διαφοροποιούμενων RNA αποτελείται από δύο φάσεις ανάπτυξης, ταξινομώντας τα σε πρωτογενή και δευτερογενή piRNA, ενώ ανάλογα με το εξελικτικό στάδιο των γαμετοκυττάρων ταξινομούνται στα προπαχυταινικά και παχυταινικά piRNA. Τα piRNA συνεργάζονται με τις πρωτεΐνες PIWI σχηματίζοντας σύμπλοκα αποσιώπησης γονιδίων και κινητοποιούνται όχι μόνο σε κύτταρα της γαμετικής σειράς, όπως αρχικώς είχε προταθεί, αλλά και σε σωματικά κύτταρα. Τα piRNA αποτελούν ένα εκ των τριών σημαντικότερων ρυθμιστικών RNA (συμπεριλαμβανομένων των miRNA και siRNA) που προστατεύουν τον ανθρώπινο οργανισμό από φθορές που προκαλούν τα τρανσποζόνια και από γονιδιωματικές αλληλουχίες οι οποίες οδηγούν σε διαταραχές στην υγεία ενός οργανισμού. Αυτό επιτυγχάνεται με αρκετούς τρόπους, όπως για παράδειγμα με τη διακοπή της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Ο καρκίνος είναι μία πολυπαραγοντική ασθένεια, που αποτελεί ένα μείζον πρόβλημα υγείας και έναν μεγάλο γρίφο για την επιστημονική κοινότητα όσον αφορά την αντιμετώπιση και την πλήρη εξάλειψή του. Στα πλαίσια αυτής της έρευνας, έχει παρατηρηθεί αποκλίνουσα έκφραση στα επίπεδα των piRNA και των πρωτεϊνών PIWI αναζητώντας μία συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής αυτών των μορίων και του καρκίνου. Άλλα νοσήματα που έχουν βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν με τα piRNA είναι ορισμένα νευρολογικά, καρδιαγγειακά, αυτοάνοσα, μεταβολικά και λοιμώδη νοσήματα. Ακόμη, τα piRNA διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και στη διατήρηση των γαμετοκυττάρων, και ως εκ τούτου η διαφορική έκφρασή τους συνδέεται με υπογονιμότητα στο ανδρικό φύλο.

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα μελέτη εστιάζει το ενδιαφέρον της στην παρουσίαση αναλυτικών δεδομένων αναφορικά με τη βιολογική σημασία των piRNA σε επιγενετικό, μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο, στα πλαίσια της ρύθμισης παραγόντων που σχετίζονται με γονιδιακές λειτουργίες, οι οποίοι ενδέχεται να επηρεάσουν αρνητικά την ποιότητα της ζωής του ανθρώπου, ενώ δεν αποκλείεται να οδηγήσουν σε σημαντική μείωση του προσδόκιμου ζωής του. Η εξέταση των παραπάνω θα έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη κατανόηση της οδού piRNA/PIWI και του φυσιολογικού τρόπου σύμφωνα με τον οποίο δραστηριοποιείται σε διάφορα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού.

Επιπλέον, καθώς η τροποποιημένη έκφραση του συστήματος piRNA / PIWI συνδέεται με ποικίλες παθολογικές καταστάσεις, γίνεται προσπάθεια αποκωδικοποίησης των μοτίβων έκφρασης των piRNA / PIWI που συσχετίζονται με διάφορα νοσήματα τα οποία συζητούνται στην παρούσα μελέτη, με αποτέλεσμα τη διευκρίνιση της συμβολής τους στην ανάπτυξη ή / και στην εξέλιξή τους. Η κατανόηση των ρόλων και της συμπεριφοράς αυτών των μορίων, καθώς επίσης και η γνώση σχετικά με τυχόν οφέλη τους ως προς την ανθρώπινη υγεία μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές λύσεις σχετικά με τη δυνατότητα αξιοποίησης των piRNA και των εμπλεκόμενων με αυτά πρωτεϊνών, για την έγκαιρη διάγνωση και τη θεραπεία ασθενειών με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα, χρησιμοποιώντας παράλληλα λιγότερο επεμβατικές μεθόδους. Τέλος, επιδιώκεται να προκύψουν απαντήσεις σχετικά με το πώς θα μπορούσε εν γένει να βελτιωθεί το βιοτικό επίπεδο των ανθρώπων σύμφωνα με τα στοιχεία που προκύπτουν για τον ανερχόμενο ρόλο των piRNA.

ΣΥΝΤΟΜΗ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Τη δεκαετία του 1950, η Barbara McClintock ανακάλυψε για πρώτη φορά την παρουσία μεταθετών στοιχείων ή τρανσποζονίων (Transposable Elements, TE) στο γονιδίωμα του καλαμποκιού. Ειδικότερα, παρατήρησε την ύπαρξη γενετικών μηχανισμών ελέγχου της αστάθειας που προσδίδει η κινητικότητα αυτών των TE μέσα στο γονιδίωμα, και πως οποιαδήποτε δυσλειτουργία αυτών των μηχανισμών αυξάνει αυτήν την κινητοποίηση^[1].

Μετέπειτα, στις αρχές της δεκαετίας του 1980, αναφέρθηκε για πρώτη φορά η ύπαρξη του γενετικού τόπου *flamenco* (*flam*) στο γονιδίωμα της *Drosophila melanogaster*, ο οποίος ελέγχει τις αστάθειες που προέρχονται από διάφορες οικογένειες TE. Συγκεκριμένα εντός του γενετικού τόπου *flam* με μήκος αλληλουχίας πάνω από 200 ζεύγη βάσεων (base pair, bp), το 2002, εντοπίστηκαν θραύσματα μεταθετών στοιχείων σε μεγάλη πυκνότητα, με 104 ενθέσεις από 42 διαφορετικές οικογένειες τρανσποζονίων. Αυτό οδήγησε, το 2007, στην ανακάλυψη διακριτών γονιδιωματικών τόπων παραγωγής RNA, συμπεριλαμβανομένου του *flam*, οι οποίοι αποκαλούνται ομάδες ή συστάδες piRNA (piRNA clusters). Τα RNA που παράγονται από αυτούς τους τόπους συνεργάζονται με πρωτεΐνες της οικογένειας Argonaute και διαχειρίζονται την κινητικότητα των TE προκαλώντας την υποβάθμισή τους^[1].

Αναφορικά με τις πρωτεΐνες PIWI, ήδη από το 1997 είχε ανακαλυφθεί ο σημαντικός τους ρόλος στη διατήρηση των γαμετικών κυττάρων^[2]. Στη συνέχεια, αυτή η διαπίστωση επιβεβαιώθηκε όχι μόνο σε γαμετικά αλλά και σε σωματικά κύτταρα ^[2].

Η πρωταρχική ανακάλυψη των piRNA επιτεύχθηκε στους όρχεις της *D. melanogaster*, όπου φάνηκε να προκαλούν αποσιώπηση ενός γονιδίου που επηρεάζει τη γονιμότητα, το *Stellate*, στο χρωμόσωμα X. Αυτά τα piRNA παράγονταν από το γενετικό τόπο *Suppressor of Stellate* του χρωμοσώματος Y. Τα piRNA με τις πρωτεΐνες PIWI έχουν πλέον ταυτοποιηθεί στην πλειονότητα του ζωικού βασιλείου, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου^[3].

Το 2006, τέσσερις διαφορετικές ομάδες ερευνητών αναγνώρισαν τα πιο άφθονα RNA, ανάμεσα στα μικρά ρυθμιστικά RNA, σε όρχεις ποντικού. Αυτά ήταν τα piRNA και αρχικώς υπήρχε η πεποίθηση ότι αποτελούν μέρος των σχετιζόμενων με επαναλήψεις siRNA (repeat-associated small interfering RNAs, rasiRNAs). Ωστόσο, η ανεξάρτητη της Dicer βιογένεση των piRNA και η αλληλεπίδρασή τους με τις πρωτεΐνες PIWI κατέρριψε αυτή την υπόθεση, με αποτέλεσμα να διαφοροποιηθούν από τα υπόλοιπα μικρά ρυθμιστικά RNA και να ονομαστούν RNA που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες PIWI ή piRNA^[2].

Τα ανθρώπινα miRNA εντοπίστηκαν μέσω αναλύσεων ανοσοκατακρήμνισης και στυπώματος Northern σε δείγματα από ωοθήκες και όρχεις εμβρύων και ενηλίκων ατόμων, που διέθεταν χαρακτηριστικά αντίστοιχα με αυτά των ποντικών. Τα miRNA κατανέμονται σε αυτοσωμικά και φυλετικά χρωμοσώματα, με χαμηλότερη συγκέντρωση στους όρχεις εμβρύων. Επιπρόσθετα, παρατηρούνται διαφορούμενα μοτίβα ως προς τη μορφολογία των miRNA μεταξύ όρχεων και ωοθηκών. Τα miRNA στον άνθρωπο χαρτογραφούνται κυρίως σε μεσογονιδιακές περιοχές και λιγότερο στα μεταθετά στοιχεία, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως η ρύθμιση των τρανσποζονίων αποτελεί δευτερεύουσα λειτουργία σε σχέση με τη γονιδιακή ρύθμιση. Όπως φαίνεται, εντοπίζονται στις 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές (untranslated regions, UTRs), όμως παρουσιάζονται ιδιαίτερος εμπλουτισμένα στις 3' UTR. Άλλες πιθανές πηγές προέλευσης αυτών των μορίων είναι οι κωδικοποιητικές περιοχές των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (long non coding RNA, lncRNA), καθώς και τα μικρά πυρηνικά RNA (small nuclear RNA, snRNA)^[2].

2 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Παρεμβολή RNA (RNAi)

Ο φαινότυπος ενός οργανισμού και τα χαρακτηριστικά που τον διέπουν οφείλονται στην κωδικοποίηση γονιδίων από το γονιδίωμά του και την έκφρασή τους μέσω σύνθετων ενδοκυτταρικών διαδικασιών. Ωστόσο, υπάρχουν γενετικά στοιχεία τα οποία διαταράσσουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος, όπως τρανσποζόνια και ιικά γονιδιώματα, και γι' αυτό οι περισσότεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει μεθόδους καταστολής τους. Η παρεμβολή RNA λοιπόν, είναι μία σημαντική ρυθμιστική οδός που προκαλεί την αποσιώπηση γονιδίων, επιστρατεύοντας συμπληρωματικές ως προς αυτά αλληλουχίες, και επηρεάζοντας έτσι τη γονιδιακή έκφραση^[4]. Οι προσπάθειες ανακάλυψης του μηχανισμού RNAi ξεκίνησαν από το 1990, ενώ το 1998 οι Fire και Mello διαπίστωσαν ότι το δίκλωνο RNA (double-stranded RNA, dsRNA) είχε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην αποσιώπηση γονιδίων σε σχέση με τον κάθε κλώνο μεμονωμένα, αποκαλώντας το φαινόμενο αυτό «παρεμβολή RNA» ή «RNAi» και κερδίζοντας το βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας ή Ιατρικής το 2006^[5]. Η οδός αυτή παρουσιάζει ποικιλομορφία, καθώς δρα επί του mRNA (messenger RNA, αγγελιοφόρο RNA), είτε αναστέλλοντας τη μετάφρασή του, είτε προκαλώντας την αποικοδόμησή του^[6]. Απαραίτητη προϋπόθεση για αυτόν τον ρυθμιστικό μηχανισμό αποσιώπησης αποτελεί η δημιουργία μικρών τμημάτων RNA, μεγέθους 20-31 νουκλεοτιδίων (nucleotide, nt), από δίκλωνο ή μονόκλωνο μόριο RNA (single stranded RNA, ssRNA) με τη συμμετοχή ειδικών ενζύμων τεμαχισμού^[4]

2.2 Μικρά μη κωδικοποιητικά RNA

Μία ομάδα RNA που δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες αλλά μπορεί να κατευθύνει τη μεταγραφή και τη μετάφραση έχει αναγνωρισθεί ότι εμπλέκεται σε φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες που αφορούν την υγεία του ανθρώπου. Έτσι λοιπόν, τα μη κωδικοποιητικά RNA (non coding RNA, ncRNA) αποτελούν ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης και ταξινομούνται σε δύο μεγάλες ομάδες σύμφωνα με το μέγεθός τους. Η πρώτη κατηγορία είναι τα lncRNA, τα οποία ξεπερνούν τα 200 νουκλεοτίδια, ενώ η δεύτερη κατηγορία είναι τα μικρά μη κωδικοποιητικά RNA (small non coding RNAs, sncRNA) τα οποία αποτελούνται από λιγότερα από 200 νουκλεοτίδια.

Οι βασικότερες υποκατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται τα sncRNA είναι τα microRNA (miRNA), τα RNA που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες PIWI (PIWI-interacting RNA, piRNA), τα μεταφορικά RNA (transfer RNA, tRNA), τα μικρά πυρηνισκικά RNA (small nucleolar RNA, snoRNA), τα μικρά πυρηνικά RNA (snRNA) και τα μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (small ή short interfering RNA, siRNA). Ωστόσο, μόνο τα miRNA, τα siRNA και τα piRNA ταξινομούνται ως ρυθμιστικά RNA, ενώ παρουσιάζουν ορισμένες διαφορές και ομοιότητες μεταξύ τους, τόσο ως προς τη βιογένεση, όσο και ως προς τον τρόπο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Για παράδειγμα, τα miRNA και τα piRNA μπορούν να δράσουν είτε μέσω αποικοδόμησης του mRNA-στόχου είτε μέσω αναστολής της μετάφρασης, ενώ τα siRNA δρουν μόνο μέσω του πρώτου τρόπου αποσιώπησης. Επίσης, τα miRNA και piRNA αποσιωπούν κυρίως στόχους διαφορετικούς από τα γονίδια από τα οποία προέρχονται, ενώ αντίθετα τα siRNA στοχεύουν γονίδια ίδια με αυτά από τα οποία προέρχονται^[2]. Τέλος, η ωρίμανση και οι λειτουργίες των piRNA λαμβάνουν χώρα ανεξάρτητα από τη δράση του ενζύμου Dicer, σε αντίθεση με τα miRNA και siRNA όπως θα εξηγηθεί ακολούθως^[7].

Αυτά τα μικρά ρυθμιστικά RNA δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αλλά αντίθετα δρουν ως ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση (μεταγραφικά και μετα-μεταγραφικά) μέσω της πρόσδεσής τους στο γονίδιο-στόχο λόγω συμπληρωματικότητας. Ωστόσο, αυτό από μόνο του δεν αρκεί, καθώς αυτά τα τμήματα RNA χρειάζεται να δεσμεύσουν ειδικές πρωτεΐνες της οικογένειας των Αργοναυτών (Argonaute family) σχηματίζοντας έτσι μία μοριακή «μηχανή» που ονομάζεται «σύμπλοκο αποσιώπησης που επάγεται μέσω RNA» (RNA-induced silencing complex, RISC)^[8].

Τα miRNA είναι μονόκλιωνα RNA με μέγεθος περίπου 19-24 nt, που εντοπίζονται σε ένα μεγάλο ποσοστό σε χρωμοσωμικές περιοχές οι οποίες παρουσιάζουν αυξημένες δομικές αλλαγές και ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων τους σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Τα μόρια αυτά παράγονται ενδογενώς από τα γονίδια, και αποτελούνται από ένα μερικώς δίκλινο RNA σε σχήμα φουρκέτας, το οποίο υπόκειται σε δύο διαδοχικά στάδια διάσπασης από δύο ένζυμα του τύπου RNase III, τη Drosha και τη Dicer^{[7],[9]}. Τα miRNA δρουν μέσω ατελούς ή πλήρους συμπληρωματικότητάς τους με τις πρωτεΐνες AGO και τις 3'-UTR του mRNA-στόχου τους. Το τμήμα ενός miRNA που στοχεύει σε κάποιο mRNA αποτελείται από 6-7 νουκλεοτίδια, βρίσκεται μεταξύ των θέσεων των νουκλεοτιδίων 2-7 από το 5' άκρο, καλείται «περιοχή υβριδισμού» (seed region) και αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την επιλογή του mRNA-στόχου. Τα miRNA συμμετέχουν επίσης στην επιγενετική ρύθμιση, όπως στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης μέσω ρύθμισης της τροποποίησης των ιστονών, και στον επιγενετικό έλεγχο της έκφρασης ενός γονιδίου μέσω της μεθυλίωσης του DNA^{[7],[10]}.

Τα siRNA έχουν μέγεθος 21-23 nt, φέρουν προεξέχοντα νουκλεοτίδια στα 3' και 5' άκρα τους, τα οποία φωσφορυλιώνονται, και δρουν ως επί το πλείστον στο κυτταρόπλασμα^[5]. Τα μόρια αυτά αποτελούν θραύσματα RNA που προκύπτουν από μακρά δίκλινα μόρια RNA εξαιτίας της δράσης του ενζύμου Dicer. Η προέλευση των θραυσμάτων αυτών μπορεί να είναι ενδογενής, όπως τρανσποζόνια, ή εξωγενής, όπως είναι το RNA ιών. Στη συνέχεια φορτώνονται στην πρωτεΐνη Ago2 και είναι έτοιμα για τη μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίων^[7].

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Argonaute ταξινομούνται σε δύο μεγάλες υποοικογένειες, τις πρωτεΐνες AGO και τις πρωτεΐνες PIWI, καθμία από τις οποίες αλληλεπιδρά με διαφορετικά sncRNA. Η υποοικογένεια των AGO λοιπόν, αποτελείται από τις πρωτεΐνες: Ago1, Ago2, Ago3 και Ago4 στα θηλαστικά, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τα miRNA και τα siRNA. Απεναντίας, η υποοικογένεια των PIWI αποτελείται από τις εξής πρωτεΐνες: PIWIL1 (HIWI στον άνθρωπο, ομόλογο του piwi), PIWIL2 (HILI στον άνθρωπο, Miwi-like και Mili στο ποντίκι), PIWIL3 (HIWI3 στον άνθρωπο), και PIWIL4 (HIWI2 στον άνθρωπο, MIWI2 στο ποντίκι), οι οποίες αλληλεπιδρούν με τα piRNA^{[8],[11]} (Πίνακας 1).

Άνθρωπος	Ποντίκι	<i>Drosophila</i>	<i>C. elegans</i>
PIWIL1 (HIWI)	PIWIL1 (MIWI)	PIWI	PRG-1
PIWIL2 (HILI)	PIWIL2 (MILI)	Aubergine (Aub)	-
PIWIL3 (HIWI3)	-	-	-
PIWIL4 (HIWI2)	PIWIL4 (MIWI2)	Argonaute 3 (Ago3)	-

Πίνακας 1 Η αντιστοιχία των PIWI ομολόγων σε διάφορα είδη.

2.3 Τα μόρια piRNA και οι λειτουργίες τους

Τα piRNA έχουν μέγεθος 21-35 nt και φέρουν 2'-O-μεθυλο-τροποποιημένα 3' άκρα, ενώ ταξινομούνται σε 3 ομάδες ανάλογα με την πηγή προέλευσής τους, δηλαδή σε εκείνα που προέρχονται από τρανσποζόνια, από lncRNA ή από mRNA, και παρέχουν ένα είδος ανοσίας στον οργανισμό. Επίσης, υποβάλλονται σε επεξεργασία από πρόδρομα μονόκλινα μετάγραφα και προστατεύουν το γονιδίωμα των κυττάρων της γαμετικής σειράς από τα τρανσποζόνια^{[3],[12]}.

Τα τρoσποζόνια ή μεταθετά στοιχεία είναι κινητά επαναλαμβανόμενα γενετικά στοιχεία που εμφανίζονται σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ενώ επηρεάζουν τη βιολογία και τη ζωή του ανθρώπου σε πολλά επίπεδα^[13]. Ταξινομούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: α) τα τάξης I ή ρετροτρoσποζόνια, τα οποία μετακινούνται μέσω αντίστροφης μεταγραφής, όπως οι ρετροϊοί, και β) τα τάξης II ή DNA τρoσποζόνια που δρουν με τον μηχανισμό «αποκοπής-επικόλλησης»^{[14],[15]}. Τα ρετροτρoσποζόνια διακρίνονται στα LTR (long terminal repeats, μακρές τελικές επαναλήψεις) και τα non-LTR, στα οποία περιλαμβάνονται τα LINE (long interspersed nuclear elements, μακρά διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία) και SINE (short interspersed nuclear elements, βραχεία διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία)^[16].

Τα τρoσποζόνια είναι ιδιαίτερα μεταλλαξιγόνα και μπορούν να βλάψουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος μέσω παράτυπων ανασυνδυασμών, διάσπασης της δίκλωνης αλυσίδας DNA μετά την αντιγραφή τους και διατάραξης της γονιδιακής έκφρασης. Γι' αυτό λοιπόν, σε διάφορους οργανισμούς έχουν αναπτυχθεί μηχανισμοί καταστολής των τρoσποζονίων χρησιμοποιώντας piRNA, με ξεχωριστούς τρόπους για τον κάθε οργανισμό, προκειμένου να διατηρηθεί η γενετική του ακεραιότητα. Ο κύριος μηχανισμός αποσιώπησης τρoσποζονίων μέσω του μονοπατιού piRNA/PIWI, που χρησιμοποιούν κυρίως τα θηλαστικά, λειτουργεί είτε με την καταστολή της μεταγραφής τους είτε με τη διάσπαση των mRNA τους. Η καταστολή της μεταγραφής μπορεί να συμβεί με τη μεθυλίωση του DNA και της ιστόνης H3K9me2. Από την άλλη πλευρά, στη *Drosophila* τα piRNA χρησιμοποιούνται επίσης για τη διατήρηση των τελομερών, ενώ στις μύγες από τις οποίες απουσιάζουν οι τελομεράσες παρέχεται προστασία της ετεροχρωματίνης στα άκρα των χρωμοσωμάτων μέσω της αποσιώπησης των τρoσποζονίων των τελομερών που ενσωματώνονται σε αυτές τις περιοχές^{[3],[13]}.

Βασική ιδιότητα των piRNA είναι η καταστολή των τρoσποζονίων, η οποία συμπεριφέρεται όπως και το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς κατευθύνεται από έμφυτα ή επίκτητα χαρακτηριστικά. Ένας καινούριος οργανισμός, όπως είναι ένα έμβρυο, μπορεί να φέρει μητρικής προέλευσης piRNA που εξειδικεύονται έναντι απειλητικών τρoσποζονίων, αναγνωρίζοντας γνωστούς και νέους εισβολείς μέσω συμπληρωματικότητας των αλληλουχιών τους. Απεναντίας, μπορεί να μην έχουν μεταβιβαστεί piRNA στους απογόνους από τους γονείς, αλλά ωστόσο να αποκτηθούν κατά την ενηλικίωση μέσω ενσωμάτωσης ενός νεοεισαχθέντος τρoσποζονίου σε τόπους παραγωγής piRNA και τελικά να ανοσοποιηθούν μελλοντικές γενιές.

Εκτός όμως από την καταστολή των τρoσποζονίων, στις ιδιότητες των piRNA συμπεριλαμβάνεται ακόμη η ικανότητα διάκρισης εαυτών (κωδικοποιητικά και βασικά γονίδια) και μη εαυτών (τρoσποζόνια και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες) γονιδίων, δηλαδή μία ιδιότητα

την οποία διαθέτει ο *Caenorhabditis elegans*, ένα είδος νηματώδους σκώληκα, για την αποσιώπηση μη εαυτών μεταγράφων, όπως είναι τα διαγονίδια και οι εισβολές από τρανσποζόνια, και τη διατήρηση των μεταγράφων της γαμετικής σειράς. Επιπλέον, τα piRNA παρέχουν προστασία από ιούς σε ασπόνδυλους οργανισμούς, αν και η αντιμετώπιση των ιογενών λοιμώξεων αφορά κυρίως τα siRNA, ενώ επίσης συμμετέχουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στη φάση της παχυταινίας της μείωσης I σε αρσενικά βλαστικά κύτταρα θηλαστικών για την εξασφάλιση φυσιολογικής σπερματογένεσης, στην αναγέννηση των γαμετικών κυττάρων με την αφαίρεση της αμινοτελικής περιοχής της πρωτεΐνης, και στη ρύθμιση σε μικρό βαθμό του εμβρυϊκού ανασυνδυασμού^{[3],[4]}.

Ωστόσο, τα επιμέρους χαρακτηριστικά των piRNA ποικίλλουν στα διάφορα είδη, αξιοποιώντας διαφορετικά μονοπάτια, ενεργοποιώντας διαφορετικούς μηχανισμούς και αλληλεπιδρώντας με διαφορετικά μόρια και στοιχεία^[3].

2.4 Βιογένεση των piRNA

Τα piRNA ταξινομούνται σε πρωτογενή και δευτερογενή με βάση τα εξελικτικά στάδια επεξεργασίας που υφίστανται προκειμένου να πάρουν τη τελική τους ενεργή μορφή. Οι γνώσεις μας για το μηχανισμό σχηματισμού των πρωτογενών piRNA προς το παρόν δεν είναι πλήρεις, ενώ ο μηχανισμός για τα δευτερογενή piRNA που ονομάζεται βρόχος ενίσχυσης ring-rong (ring-rong amplification loop) στοχεύει στην ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών των piRNA που είναι ειδικά ως προς συγκεκριμένα μεταθετά στοιχεία υψηλής κινητικότητας, τα οποία επηρεάζουν την ακεραιότητα του γονιδιώματος^[17] (Εικόνα 1).

2.4.1 Πρωτογενής οδός

Η πρωτογενής οδός ρύθμισης των piRNA λαμβάνει χώρα τόσο σε κύτταρα της βλαστικής σειράς όσο και σε περιφερικά σωματικά κύτταρα. Ύστερα από μελέτες, παρατηρήθηκε ότι στις ωοθήκες της *Drosophila*, στα σωματικά κύτταρα εκφράζονται μόνο τα γονίδια Piwi από την υποοικογένεια των PIWI, τα οποία έπειτα μεταγράφονται από συστάδες piRNA, όπως είναι ο γενετικός τόπος *flam*, και εν τέλει εξάγονται στο κυτταρόπλασμα για περαιτέρω επεξεργασία. Γενικά, έχει διαπιστωθεί μια σημαντική μιτοχονδριακή δραστηριότητα ως προς την πρωτογενή επεξεργασία των μορίων piRNA, όπως είναι η συμμετοχή της επιφανειακής μιτοχονδριακής ενδονουκλεάσης Zucchini (Zuc)

που είναι υπεύθυνη για την αρχική διάσπαση των μακρών προδρομών piRNA με μέγεθος 43-46 nt, επιτρέποντας έτσι τη φόρτωση της πρωτεΐνης Piwi στο 5' άκρο τους^[17]. Η συμμετοχή επίσης των μιτοχondριακών σωματίων Yb (Yb bodies) με τα διάφορα συστατικά από τα οποία απαρτίζονται, όπως τα fs(1)Yb (Yb), Armitage (Armi), Vreteno (Vret), Shutdown, και Sister of Yb (SoYb), είναι στοιχειώδης για τα επακόλουθα βήματα φόρτωσης αλλά και για την ωρίμανσή τους. Άλλες πρωτεΐνες που επίσης εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια και συμμετέχουν στην πρωτογενή ρύθμιση των piRNA είναι οι Minotaur (Mino) και GasZ^[4]. Οι πρωτεΐνες Mino και Zuc παίζουν ρόλο στην πρωτογενή βιογένεση των piRNA και η τοποθέτησή τους μεταξύ των κυττάρων-τροφών (nurse cells) και των ωοκυττάρων (egg cells) έχει συνδεθεί με τη διαδικασία της μεταβίβασης επιγενετικών πληροφοριών σχετικά με τα τρoσποζόνια από τη μητέρα στο έμβρυο^[18]. Η πρωτεΐνη GasZ είναι ένας παράγοντας βιογένεσης μιτοχondριακού piRNA που συμμετέχει στον εντοπισμό και την πρόσληψη της Armi από την επιφάνεια των μιτοχondρίων δίπλα στην ενδονουκλεάση Zuc, ενώ μπορεί να επηρεάσει τη μορφολογία των μιτοχondρίων. Αυτή η διαδικασία είναι σημαντική για την εξασφάλιση της παραγωγικότητας της διάσπασης της ενδονουκλεάσης Zuc και την παράδοση των προ-piRNA μεταγράφων στην ενδονουκλεάση Zuc, ούτως ώστε να μπορέσει να ξεκινήσει ο κύκλος παραγωγής των piRNA^[19]. Το τελικό στάδιο για την παραγωγή ώριμων μορίων περιλαμβάνει τον τεμαχισμό των προ-piRNA από μία άγνωστη 3'-5' εξωνουκλεάση, δημιουργώντας έτσι το τελικό μέγεθος των ώριμων piRNA, καθώς και την 2'-Ο-μεθυλίωση των 3' άκρων των piRNA από τη μεθυλοτρανσφεράση DmHen1 / Pimet για την παραγωγή ώριμων συμπλόκων Piwi-piRNA ή Piwi-piRISC, τα οποία εν τέλει εισάγονται στον πυρήνα για τη μεταγραφική ρύθμιση (αποσιώπηση) των γονιδίων-στόχων^[4].

Η πρωτογενής επεξεργασία των piRNA στα κύτταρα της γαμετικής σειράς πραγματοποιείται στα σωματία τύπου nuage («σύννεφο») στη *Drosophila*, και τα piRNA φορτώνονται στις πρωτεΐνες Piwi και Aub για το σχηματισμό του piRISC, αξιοποιώντας παρόμοιους μηχανισμούς με αυτούς που περιγράφηκαν παραπάνω σε σχέση με τα σωματικά κύτταρα. Ωστόσο οι λεπτομέρειες παραμένουν άγνωστες προς το παρόν^{[4],[20]}.

Τα θηλαστικά ακολουθούν επίσης παρόμοιο μονοπάτι παραγωγής πρωτογενών piRNA με τη *Drosophila*, αξιοποιώντας τις αντίστοιχες ορθόλογες πρωτεΐνες χωρίς όμως εμπεριστατωμένη διερεύνηση. Αυτό που είναι γνωστό είναι πως ο παράγοντας μεταγραφής A-MYB δίνει σήμα για την έναρξη της μεταγραφής των προδρομών piRNA και των γονιδίων που αφορούν την οδό piRNA/PIWI, δηλαδή την πρωτεΐνη που περιέχει περιοχή πρόσδεσης Tudor (Tudor domain-containing 1, Tdrd1), την Miwi και τη MitoPLD (Mitochondria Phospholipase D, Μιτοχondριακή Φωσφολιπάση D). Στο ποντίκι τα πρόδρομα piRNA διασπώνται από την αντίστοιχη ενδονουκλεάση Zuc, την MitoPLD, σε

ενδιάμεσα μόρια των οποίων τα μήκη ενδεχομένως μεταβάλλονται, με προτίμηση για μια ουριδίνη στο 5' άκρο (5' uridine, 5' U) και με δέσμευση των πρωτεϊνών MILI και MIWI. Στη συνέχεια, τα ενδιάμεσα piRNA τεμαχίζονται περαιτέρω με τη βοήθεια της Trimmer, μιας πρωτεΐνης εξαρτώμενης από Mg^{2+} , η οποία επιδεικνύει 3' εξωνουκλεολυτική δραστηριότητα, σε μήκος που οδηγεί στα ώριμα piRNA. Η πρωτεΐνη δέσμευσης τομέα Tudor και KH (Tudor and KH domain containing protein, TDRKH) επίσης, δημιουργεί 3' άκρα για τη 2'-O-μεθυλίωση από τη HEN1 και την ενσωμάτωση στην περιοχή PAZ της πρωτεΐνης PIWI^{[4], [21]}. Επίσης, η πρωτεΐνη MOV10L1 στο ποντίκι και τον άνθρωπο ισοδυναμεί με την πρωτεΐνη Armi της *Drosophila*^{[4], [22]}.

2.4.2 Επιγενετική αποσιώπηση των μεταφερόμενων στοιχείων από piRNA

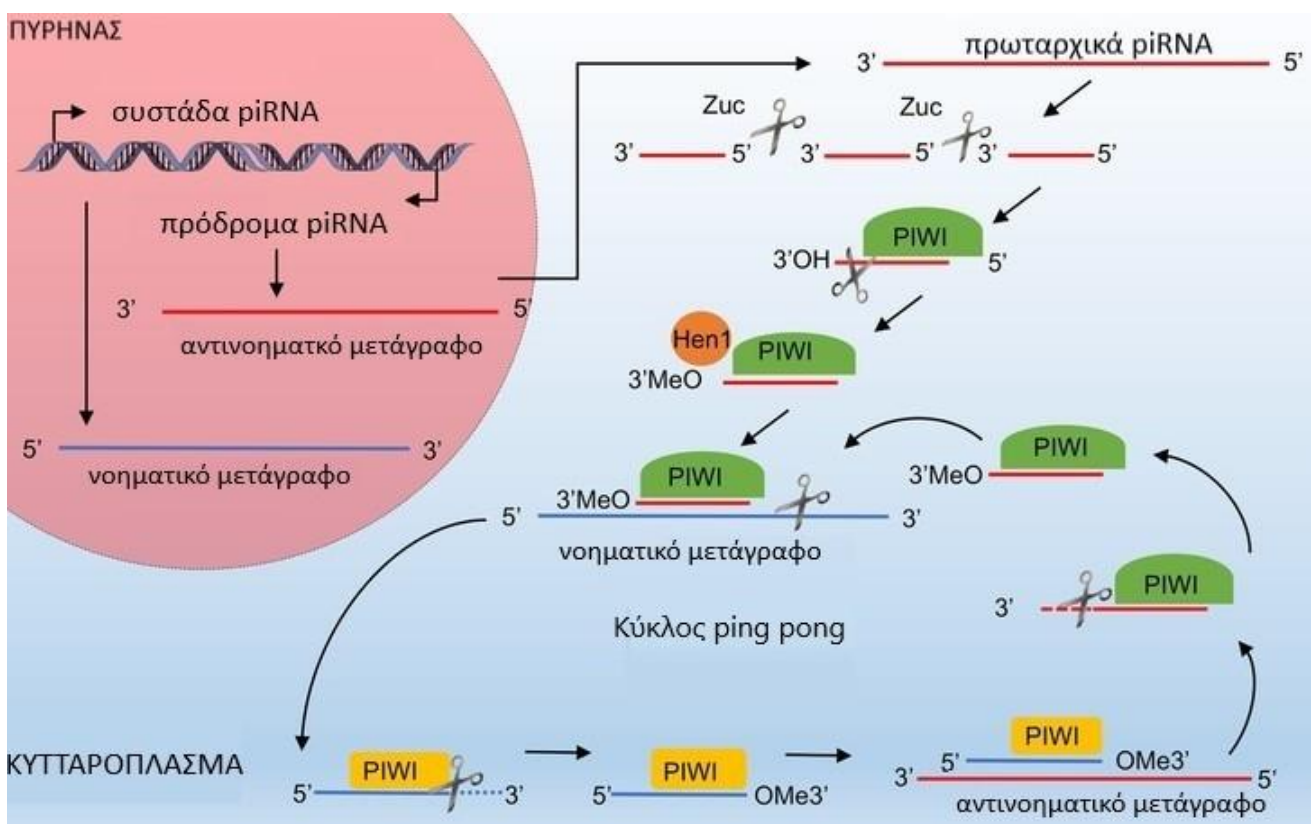
Εντός του πυρήνα λαμβάνει χώρα η επιγενετική αποσιώπηση των τρανσποζονίων, ξεκινώντας από την κατευθυνόμενη μεθυλίωση της ιστόνης 3 στη λυσίνη 9 (trimethylation of lysine 9 on histone H3, H3K9me3) της χρωματίνης στα τρανσποζόνια-στόχους για να προκληθεί ο σχηματισμός ετεροχρωματίνης από το σύμπλοκο Piwi-piRISC. Η διεργασία ολοκληρώνεται με τη συμμετοχή της πυρηνικής πρωτεΐνης Asterix / DmGTSF1, η οποία αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο Piwi-piRISC για την παροχή του σήματος αποσιώπησης της ιστόνης. Σε όλη τη διαδικασία συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες όπως οι Maelstrom (Mael), οι μεθυλοτρανσφεράσες Eggless (Egg) / SetDB1 και Su (var) 3-9, καθώς και η πρωτεΐνη ετεροχρωματίνης HP1a, με τους ακριβείς μηχανισμούς να παραμένουν άγνωστοι^[4].

2.4.3 Δευτερογενής οδός

Η δευτερογενής οδός, γνωστή και ως κύκλος ή βρόχος ring rong, λαμβάνει χώρα αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα των γαμετικών κυττάρων, και συγκεκριμένα σε κοκκία με πυκνή ηλεκτρονιακή, μη μεμβρανώδη, πυρηνική δομή γνωστή ως «σύννεφο» με τη συμβολή των Aub-piRISC και AGO3. Οι πρωτεΐνες Aub και AGO3, με τις ιδιότητες τεμαχισμού (Slicer) που διαθέτουν, κατακερματίζουν τα αντίγραφα των τρανσποζονίων. Τα piRNA που προκύπτουν μεταβιβάζονται στο έμβρυο, όπου ενισχύεται η παραγωγή περισσότερων μορίων ξεκινώντας νέο κύκλο στις ωοθήκες του απογόνου.

Μέσω της ενεργότητας τεμαχισμού λοιπόν, κατευθύνεται η διάσπαση του RNA-στόχου μεταξύ των νουκλεοτιδίων 10 και 11, και καθορίζονται τα 5' άκρα των δευτερογενών piRNA. Καθώς τα πρωτογενή piRNA που συνδέονται με τις πρωτεΐνες Aub έχουν αντινοσηματικό (antisense) προσανατολισμό σε σχέση με τα τρανσποζόνια, κατευθύνουν την απομάκρυνση και την

καταστροφή των συμπληρωματικών TE mRNA, και συνήθως παρουσιάζουν προτίμηση για την ύπαρξη ουρακίλης στην πρώτη θέση του μορίου (1U-bias). Τα δευτερογενή piRNA που φορτώνονται στις πρωτεΐνες Ago3 παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα με τα 10 πρώτα νουκλεοτίδια των piRNA που είναι συνδεδεμένα με τις πρωτεΐνες Aub και εμφανίζουν προτίμηση για την ύπαρξη αδενίνης στο δέκατο νουκλεοτίδιό τους (10A-bias). Το μοτίβο 1U/10A χαρακτηρίζει τα piRNA και αποκαλείται ως «υπογραφή ring pong». Τα piRNA που προκύπτουν έχουν τον ίδιο προσανατολισμό με τα τρανσποζόνια, διασπών τα νέα πρόδρομα μετάγραφα και φορτώνονται στις πρωτεΐνες AUB ξεκινώντας έναν νέο κύκλο. Ο κύκλος του ring pong μπορεί επίσης να συμμετέχει στη μετα-μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων^{[4],[20]}.



Εικόνα 1 Βιογένεση των piRNA. Τα piRNA παράγονται από πρωτογενείς και δευτερογενείς οδούς (κύκλος Ping-Rong). Στην πρωτογενή οδό, τα πρόδρομα piRNA μεταγράφονται από συστάδες piRNA. Τα πρωταρχικά αντινοηματικά piRNA διασπώνται, κόβονται σε μικρά θραύσματα που φέρουν μεθυλιωμένα 2'-O 3' άκρα, και στη συνέχεια φορτώνονται στις πρωτεΐνες της οικογένειας Piwi. Στον κύκλο Ping-Rong, οι πρωτεΐνες PIWI που σχετίζονται με το αντινοηματικό piRNA διασπών τα πρόδρομα piRNA στον νοηματικό κλώνο, ή οι πρωτεΐνες PIWI που σχετίζονται με το νοηματικό piRNA αποκόπτουν τα αντινοηματικά πρόδρομα piRNA στον νοηματικό κλώνο. Το ενσωματωμένο RNA συνεπώς υποβάλλεται σε επεξεργασία ώστε να προκύψει ένα ώριμο δευτερογενές piRNA με κοπή και τροποποίηση πιθανότατα μέσω των ίδιων μηχανισμών που δημιούργησαν ένα πρωτογενές piRNA. (Προσαρμογή από [15])

2.5 Φυσιολογικοί ρόλοι των μορίων piRNA

2.5.1 Ο ρόλος των μορίων piRNA στη σπερματογένεση

Η σπερματογένεση στα θηλαστικά είναι μια διαδικασία κυτταρικής διαίρεσης και διαφοροποίησης που ρυθμίζεται με πολύπλοκους μηχανισμούς, και περιλαμβάνει την ωρίμανση των διπλοειδών σπερματογόνιων σε απλοειδείς γαμέτες έτοιμους προς γονιμοποίηση. Η εξελικτική πορεία για την παραγωγή ώριμων σπερματοζωαρίων περιλαμβάνει τα σπερματογόνια, τα απλοειδή γαμετικά κύτταρα και τις σπερματίδες, οι οποίες διαφοροποιούνται και ωριμάζουν σε έτοιμα σπερματοζώαρια, τα οποία είναι πλέον ικανά από δομικής άποψης να γονιμοποιήσουν το ωάριο. Τα ξεχωριστά αναπτυξιακά στάδια του σχηματισμού των αρσενικών γαμετικών κυττάρων απαιτούν αυστηρή χωρική και χρονική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, η οποία λαμβάνει χώρα σε επιγενετικό, μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο^[23].

Τα piRNA που προέρχονται από ορισμένα είδη ζώων όπως μύγες, νηματώδεις σκώληκες και το ψάρι-ζέβρα εντοπίζονται στα γαμετικά κύτταρα και των δύο φύλων, δηλαδή σε όρχεις και ωοθήκες, με διαφορετικά εξελικτικά στάδια. Αντίθετα, τα piRNA των θηλαστικών παρουσιάζουν εξειδίκευση μόνο ως προς τους όρχεις, και ταξινομούνται σε προπαχυταινικά και παχυταινικά, ανάλογα με τη φάση ανάπτυξης των γαμετικών κυττάρων κατά την οποία εκφράζονται^[24]. Ειδικότερα, τα προπαχυταινικά piRNA δρουν σε προμειωτικά γαμετικά κύτταρα και κατευθύνουν τις πρωτεΐνες MILI και MIWI2 για να επιτύχουν την αποικοδόμηση και την αποσιώπηση των TE. Απεναντίας, τα παχυταινικά piRNA προέρχονται από διαφορετικούς γενετικούς τόπους, ενώ δρουν κατά τη μείωση και στο στάδιο των απλοειδών σπερματίδων, και εμπλουτίζουν τα γαμετικά κύτταρα, με αριθμούς που εκτιμάται ότι αγγίζουν το ένα εκατομμύριο piRNA ανά σπερματοκύτταρο / σπερματίδα ^{[12],[23]}.

Ειδικότερα, κατά τη σπερματογένεση τα piRNA συμμετέχουν σε συγκεκριμένες διεργασίες, όπως είναι:

α) Η αποσιώπηση μεταθετών στοιχείων

Η αποσιώπηση των TE μέσω των piRNA μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε επιγενετικό είτε σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, στο οποίο το μονοπάτι piRNA / PIWI σχετίζεται με τη φάση της προπαχυταινίας και τη δημιουργία δευτερογενών piRNA. Απαραίτητο ρόλο στην καταστολή των TE έχει πρωταρχικώς η MILI και δευτερευόντως η MIWI2, στα πλαίσια του κύκλου ping pong. Σε αντίθεση με το στάδιο της προπαχυταινίας, τα piRNA στο στάδιο της παχυταινίας παράγονται σε μικρότερες ποσότητες. Ωστόσο, οι MILI και MIWI καταστέλλουν τα TE, με τη MILI να παραμένει κυρίαρχη στη μετα-μεταγραφική αποσιώπηση των L1 ρετροτρανσποζονίων. Εξαίρεση αποτελούν

τα μεταμειωτικά σπερματοκύτταρα όπου η MIWI παρουσιάζεται δραστικότερη στη διάσπαση των L1 TE.

Σε επιγενετικό επίπεδο, τα piRNA και οι πρωτεΐνες PIWI απενεργοποιούν μεταγραφικά τις DNA αλληλουχίες-στόχους και αποσιωπούν τα TE επίσης με τη διαδικασία της μεθυλίωσης ως προς τα ρετροτρανσποζόνια LINE. Τα γαμετικά κύτταρα των θηλαστικών θα υποβληθούν σε μια μοναδική διαδικασία επαναπρογραμματισμού της μεθυλίωσης, η οποία ταυτόχρονα ανοίγει ένα παράθυρο για την έκφραση των TE. Συνεπώς, σε γόνιμους άνδρες, το προφίλ μεθυλίωσης του DNA σε διάφορους υποπληθυσμούς σπέρματος είναι εξαιρετικά ομοιόμορφο. Απεναντίας, σε άνδρες που παρουσιάζουν στειρότητα, η σχετιζόμενη με το piRNA μεθυλίωση του DNA χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική παραγωγή piRNA, αποσιώπηση των TDRD1 και MILI, σε συνδυασμό με απελευθέρωση των L1 ρετροτρανσποζονίων (**Εικόνα 2**).

Γενικότερα ωστόσο, η αποσιώπηση των TE σε αρσενικά γαμετικά κύτταρα μέσω piRNA και άλλων μονοπατιών μικρών RNA γίνεται ανεξάρτητα από τις ιδιότητές τους στη σπερματογένεση^[24]. Παράδειγμα αποτελούν τα Nct1 και Nct2 που θεωρούνται ως μία κατηγορία προδρόμων piRNA, και εντοπίζονται κυρίως στα παχυνταϊκά σπερματοκύτταρα με ρόλους που σχετίζονται με την ανάπτυξη των αρσενικών γαμετικών κυττάρων και την αποσιώπηση των TE ^[25]. Ωστόσο, η ενεργότητα τεμαχισμού των πρωτεϊνών Piwi δεν είναι απαραίτητη στη *Drosophila*, καθώς η λειτουργία της αποσιώπησης των TE εκπληρώνεται μέσω άλλων μηχανισμών όπως η στρατολόγηση πρωτεϊνών με στόχο την καταστολή της χρωματίνης^[24].

β) Ρύθμιση της μετάφρασης

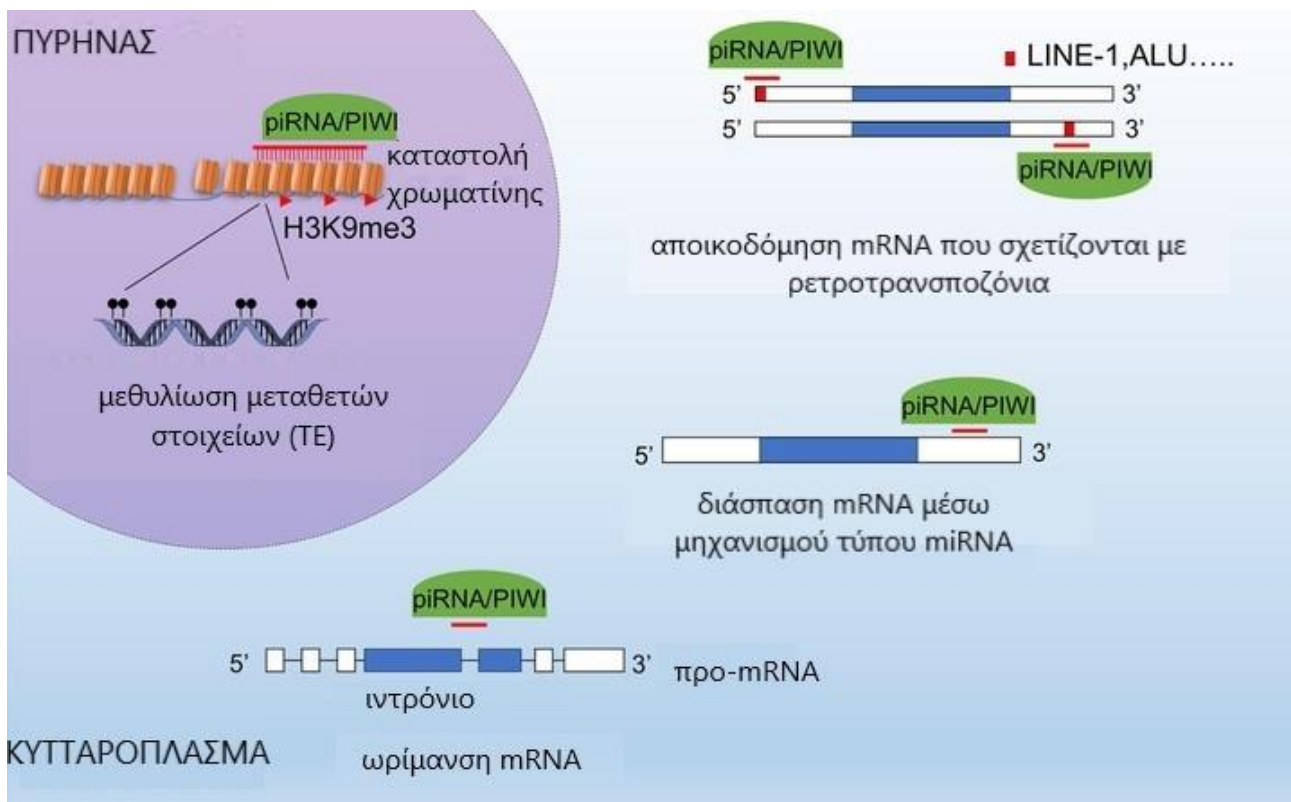
Αναφορικά με τις πρωτεΐνες MIWI, αποκαλύφθηκε πως ασκούν λειτουργικό ρόλο στη σταθερότητα και τη μετάφραση του mRNA-στόχους τους, ενώ από την άλλη πλευρά προκαλούν αποικοδόμησή του με τη βοήθεια της αποαδενυλάσης που ονομάζεται παράγοντας συναρμολόγησης χρωματίνης 1 (Chromatin assembly factor-1, CAF1) στις σπερματίδες^[24].

γ) Συντήρηση αρχέγονων γαμετικών κυττάρων

Η αυτοανανέωση και συντήρηση των γαμετικών κυττάρων αποτελεί μία επιπλέον υποθετική λειτουργία των piRNA/PIWI, στην οποία κεντρικό ρόλο φαίνεται ότι κατέχει η MILI. Η MILI βρίσκεται στα εμβρυικά αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (primordial germ cell, PGC), ενώ συμμετέχει στην αυτοανανέωση και διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων, καθώς επίσης και στην επάρκεια και μετανάστευσή τους^[24].

δ) Αποικοδόμηση RNA

Τα piRNA και οι MIWI μπορούν να διασπάσουν τα mRNA-στόχους μέσω της καταλυτικής τους ικανότητας, ενώ τα TE και τα ψευδογονίδια διασπούν τα mRNA και τα lncRNA των σπερματοκυττάρων στα ποντίκια μέσω των piRNA^[24].



Εικόνα 2 Οι βιολογικές λειτουργίες των μορίων piRNA. Στον πυρήνα, τα σύμπλοκα Piwi-piRNA μπορούν να καταστείλουν την έκφραση τρανσποζονίων με μεθυλίωση της περιοχής του τρανσποζονίου ή τροποποίηση της χρωματίνης γύρω από την περιοχή αυτή. Στο κυτταρόπλασμα, τα piRNA μπορούν να αποικοδομήσουν mRNA που σχετίζονται με ρετροτρανσποζόνια, να προκαλέσουν διάσπαση των mRNA μέσω ενός μηχανισμού τύπου miRNA και να διευκολύνουν την ωρίμανση του mRNA. (Προσαρμογή από [15]).

ε) Κυτταρική άμυνα

Μια άλλη πιθανή λειτουργία των piRNA είναι η άμυνα των κυττάρων της βλαστικής σειράς μέσω της ανακάλυψης και εξάλειψης εξωγενών γονιδίων^[24].

Ι. Τα piRNA στα μιτοχόνδρια των γαμετικών κυττάρων

Στο κυτταρόπλασμα των γαμετικών κυττάρων, οι πολλαπλές κοκκιώδεις δομές τύπου nuage εντοπίζονται κοντά στον πυρήνα ή/και τα μιτοχόνδρια, και χαρακτηρίζονται από άμορφο σχήμα, με πλούσια ηλεκτρονιακή μη μεμβρανώδη διάταξη, και αφθονία σε RNA και πρωτεΐνες. Οι δομές τύπου nuage, ανάλογα με τις ανάγκες κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, παρουσιάζουν διαφορετική δυναμική, ενώ ανάλογα με την υποκυτταρική εντόπισή τους αποτελούνται από

διαφορετικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένου του διαμιτοχονδριακού «τσιμέντου» (intermitochondrial cement, IMC) ή αλλιώς pi-body (εφόσον αποτελούν την κύρια κυτταροπλασματική τοποθεσία εντοπισμού των πρωτεϊνών του μονοπατιού piRNA), του σωματίου piP (piP-body) και του χρωματοειδούς σωματίου (chromatoid body, CB).

Το IMC, που είναι και το πιο σχετικό με τα μιτοχόνδρια, εμπλουτίζεται με διάφορες πρωτεΐνες του μονοπατιού piRNA (TDRD1 και MILI), ενώ παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον για τη βιογένεση των piRNA, την αποσιώπηση των τρικοζονίων, τη μετάφραση του mRNA και τη σύντηξη των μιτοχονδρίων. Οι κύριες ρυθμιστικές πρωτεΐνες των piRNA που περιλαμβάνονται στα piP-bodies είναι οι MIWI2, MAEL και TDRD9^[26].

Από την άλλη πλευρά, το CB εντοπίζεται αρχικά στα διάκενα μεταξύ μιτοχονδρίων και περιπυρηνικής περιοχής των σπερματοκυττάρων της όψιμης παχυταινίας με τη μορφή πυκνών κυτταροπλασματικών ινών και κοκκιδώδους υλικού. Κατά τη μείωση όμως, το CB συμπυκνώνεται και αποσυναρμολογείται, και επομένως συμμετέχει στην αποσύνθεση των piRNA αλλά και στην αποθήκευση μορίων mRNA μέσω εμπλουτισμού τους με πρωτεΐνες που δεσμεύουν mRNA, miRNA, piRNA και RNA.

Άλλες σημαντικές δομές που αλληλεπιδρούν έμμεσα με τα piRNA για τη σπερματογένεση είναι αυτές του τύπου των μεμβρανών που σχετίζονται με μιτοχόνδρια [mitochondria associated membrane (MAM)] ή των επαφών μεταξύ μιτοχονδρίων και ενδοπλασματικού δικτύου (mitochondria-endoplasmic reticulum contact, MERC), οι οποίες είναι άφθονες στο κυτταρόπλασμα ορισμένων τύπων γαμετικών κυττάρων, ενώ είναι εμπλουτισμένες με κρίσιμες πρωτεΐνες για το μονοπάτι piRNA όπως οι MIWI, MILI, GASZ και TDRKH. Ωστόσο, αν και οι λειτουργίες τους στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες και τον καρκίνο είναι γνωστές, ο ρόλος τους στη σπερματογένεση εξακολουθεί να είναι μυστηριώδης.

Επιπλέον, οι πρωτεΐνες MIWI και MILI, αλλά όχι η MIWI2, διαθέτουν ενεργότητα τεμαχισμού του RNA, η οποία είναι απαραίτητη για τη βιογένεση των piRNA και την αποσιώπηση των ρετροτρονικοζονίων. Αρκετές πρωτεΐνες είναι επίσης ζωτικής σημασίας για το σχηματισμό και τη διατήρηση του IMC και εμπλέκονται στην οδό piRNA, παρά το γεγονός ότι δεν συνδέονται άμεσα με τα piRNA, και σε αυτές περιλαμβάνονται το ομόλογο VASA του ποντικού [mouse vasa homolog (MVH)] / DDX4, η MITOPLD, και η GASZ.

Όλες οι παραπάνω δομές και λειτουργίες είναι άξιες αναφοράς, καθώς είναι βασικές για τη διασφάλιση της ακεραιότητας του γονιδιώματος αλλά και της ανδρικής γονιμότητας^[26].

II. Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν άμεσα με τα piRNA και εμπλέκονται στη σπερματογένεση

Υπάρχει ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών λειτουργιών των πρωτεϊνών Tudor στις οποίες περιλαμβάνεται η αποσιώπηση των TE, η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, η ανάπτυξη των γαμετικών κυττάρων, η απόκριση σε βλάβες του DNA, η τροποποίηση των ιστονών και ο μεταβολισμός του RNA. Αυτές όμως που έχουν μεγαλύτερη σημασία για την αποσιώπηση των TE στη σπερματογένεση είναι οι TDRD1 και TDRD6. Επίσης, οι πρωτεΐνες MILI ανιχνεύονται και στα δύο φύλα ήδη από τα μεταναστευτικά PGCs έως και τα σπερματοκύτταρα των ενηλίκων μέσω της σπερματογένεσης, και μέσα σε αυτό το διάστημα, οι πρωτεΐνες MIWI και MILI εκφράζονται με σκοπό τη δέσμευση άφθονης ποσότητας παχυταινικών piRNA [26].

2.5.2 Ο ρόλος των μορίων piRNA στο νευρικό σύστημα

Αν και αρχικά η οδός PIWI/piRNA είχε εντοπιστεί στα κύτταρα της γαμετικής σειράς όπου τα piRNA εμφανίζονται σε αφθονία, εντούτοις φαίνεται ότι παίζει ρόλο και στην ανάπτυξη του εγκεφάλου, ενώ επίσης συμμετέχει σε διάφορες άλλες διεργασίες στα νευρικά κύτταρα και τον εγκέφαλο, όπως είναι η νευρογένεση και η μνήμη. Ωστόσο, σε σχέση με τη γαμετική σειρά, τα piRNA ανιχνεύονται σε χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης (1:10), με τον υπόκαμπο να αποτελεί τον πρώτο σωματικό ιστό με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις PIWI και piRNA^{[27],[28]}. Το piRNA με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στον υπόκαμπο φαίνεται να είναι το DQ541777, το οποίο επεκτείνεται στους δενδρίτες των νευρικών κυττάρων και πιθανότατα ρυθμίζει τη μετάφραση. Αλλαγές στη μεταφραστική ρύθμιση των δενδριτών και του DQ541777 επιφέρουν αλλαγές και στις άκανθες τους^[29]. Τα piRNA στον εγκέφαλο εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα βιογένεσης, με το βασικό τόπο δράσης τους να είναι ο πυρήνας^[28].

Στις βασικές λειτουργίες των PIWI και των piRNA στα νευρικά κύτταρα περιλαμβάνονται:

α) Η αναγέννηση των αξόνων

Παρά τη χαμηλή έκφραση των PIWI και των piRNA, αυτά ασκούν αυτόνομα την ανασταλτική τους ιδιότητα ως προς την αναγέννηση των αξόνων στους νευρώνες. Κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία έχει η ενεργότητα ενδονουκλεάσης των πρωτεϊνών PIWI για τον κατακερματισμό των mRNA-στόχων των αξόνων στο κυτταρόπλασμα, και όχι τόσο η μεταγραφική αποσιώπηση μέσω των piRNA στον πυρήνα. Σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν, κυρίαρχο ρόλο φαίνεται να έχει η PIWIL1 (MIWI) στην αναστολή των αξόνων. Επίσης, η PIWIL1 (MIWI) φαίνεται ότι εκφράζεται στα κύτταρα Schwann και μειώνεται μετά από τραυματισμό του ισχιακού νεύρου. Αντιστοίχως, πολλά piRNA

μεταβάλλουν τα πρότυπα έκφρασής τους, όπως το piR-1199, ενώ το piR-009614 βρέθηκε να ενισχύει τη μετανάστευση των κυττάρων Schwann ύστερα από τραυματισμό^[27].

Ακόμη, έχουν βρεθεί σε αισθητήριους νευρώνες αξονικά piRNA που μοιάζουν με sncRNA (piRNA-like sncRNA), και ορισμένα από αυτά αποκρίνονται σε τοπικά εξωκυττάρια σήματα, όπως είναι ο τραυματισμός των νευρώνων. Η απόκριση αυτών των μορίων μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσω της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης στο κυτταρικό σώμα, είτε μέσω διαφορικής μεταφοράς τους στους άξονες. Γενικά, sncRNA αυτού του τύπου αφθονούν στους απομακρυσμένους άξονες προκειμένου να ρυθμίσουν την έκφραση των mRNA-στόχων, καθιστώντας τα σημαντικά για την σωστή βιογένεση των αξόνων. Μέχρι στιγμής έχει αναγνωριστεί η δράση των piR-1199, piR-5567 και piR-4288. Σε τραυματισμό του ισχιακού νεύρου για παράδειγμα, τα piRNA-like sncRNA εμπλουτίζονται, ενώ τα mRNA μεταφέρονται στους άξονες επάγοντας ενδοαξονική μετάφραση από το κυτταρικό σώμα προς όφελος της αναγέννησης των αξόνων. Συνεπώς, η οδός PIWI/piRNA αναλαμβάνει επιδιορθωτικό ρόλο στις βλάβες των αξόνων^[30].

β) Η συμπεριφορά συλλογής τροφής

Η συμπεριφορά αυτή εντοπίζεται στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans*. Σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες οι νηματώδεις *C. elegans* μεταβαίνουν σε εναλλακτικό αναπτυξιακό στάδιο, το οποίο ονομάζεται «dauer» ή «διάπαυση», σύμφωνα με το οποίο αναζητούν τροφή στο περιβάλλον τους αλλά δεν τρέφονται. Στα πλαίσια αυτής της δραστηριότητας παρουσιάζουν μία ιδιαίτερη συμπεριφορά (nictation) κατά την οποία αιωρείται η κεφαλή τους και στέκονται στην ουρά με σκοπό την προσκόλληση τους σε κινούμενα ζώα για τη μετάβασή τους σε νέο περιβάλλον. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης του Εθνικού Πανεπιστημίου της Σεούλ εντοπίστηκαν συστάδες piRNA υπεύθυνες για αυτή τη συμπεριφορά^[27].

γ) Η μάθηση και η μνήμη

Πειράματα στο κεντρικό νευρικό σύστημα της *Aplysia* έδειξαν πως τα piRNA (PiR-F) μπορούν να βελτιώσουν τη μακροπρόθεσμη συναπτική πλαστικότητα της μνήμης και της μάθησης μέσω της εξαρτώμενης από τη σεροτονίνη μεθυλίωσης της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου *CREB2*. Η σεροτονίνη συμμετέχει σε γνωστικές λειτουργίες όπως η μνήμη και η μάθηση, ενώ η πρωτεΐνη 2 σύνδεσης στοιχείου απόκρισης cAMP (cAMP-response element binding protein 2, CREB2) στους νευρώνες αποτελεί τον κύριο ανασταλτικό περιορισμό της μνήμης. Πειράματα με knock-out ποντίκια για την πρωτεΐνη PIWIL2 (MILI) στον υπόκαμπο έδειξαν πως η απώλεια αυτή υπομεθυλιώνει την περιοχή του υποκινητή των LINE1 και προκαλεί συμπεριφορικά ελλείμματα, όπως υπερδραστηριότητα και μειωμένο άγχος^{[27],[28],[31]}.

δ) Η διαγενεακή επιγενετική κληρονομικότητα

Σύμφωνα με το φαινόμενο της διαγενεακής επιγενετικής κληρονομικότητας (ΔΕΚ), παρατηρείται συντήρηση των επιγενετικών πληροφοριών για πολλές γενιές παρά την απουσία των παραγόντων εμφάνισης των πληροφοριών. Μεταξύ αυτών των παραγόντων περιλαμβάνονται και οι περιβαλλοντικές προκλήσεις που σχετίζονται με την ανάπτυξη μνήμης, όπως το τραυματικό στρες, οι οποίες δημιουργούν αποκρίσεις που μεταβιβάζονται στους απογόνους. Το φαινόμενο αυτό, όπως είναι αυτονόητο, προσφέρει το πλεονέκτημα της επιβίωσης στους διάφορους οργανισμούς. Οι μέχρι τώρα γνωστοί μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί που μεσολαβούν στη ΔΕΚ είναι η μεθυλίωση του DNA, η τροποποίηση των ιστονών, και η ρύθμιση μέσω siRNA και piRNA. Επιπλέον, για την εκμάθηση προσαρμοστικών συμπεριφορών της ΔΕΚ στις επόμενες γενιές απαιτείται ενεργή συμμετοχή από το νευρικό σύστημα και ενδεχόμενη μεσολάβηση των PIWI στα τροποποιημένα προφίλ γονιδιακής έκφρασης στους νευρώνες. Τέλος, για την κληρονομικότητα σωματικών φαινοτύπων είναι αναγκαία η επικοινωνία του νευρικού με το γεννητικό σύστημα, επιτρέποντας στα νευρωνικά piRNA να ρυθμίσουν τα γονίδια των γαμετικών κυττάρων για τη τροποποίηση συγκεκριμένων συμπεριφορών^[27].

ε) Άλλες λειτουργίες

Το σύμπλοκο Piwi / piRNA εμπλέκεται επίσης στη μετάφραση και την ανάπτυξη των δενδριτικών ακανθών, στη νευρωνική μετανάστευση με τη βοήθεια της αστροτακτίνης, και στη ρύθμιση γενικότερα γονιδίων που σχετίζονται με τη λειτουργία του νευρικού συστήματος. Ορισμένα από αυτά τα γονίδια είναι το *Cdk5rap1*, το γονίδιο της κινάσης που ρυθμίζει τη σχέση μικροσωληναρίων (microtubule affinity regulating kinase, Mark1/2) και την πρωτεΐνη αγκύρωσης A-κινάσης 79 /150 (A-kinase anchoring protein 79 / 150, AKA P79 / 150), τα οποία σχετίζονται με τις δενδριτικές άκανθες, καθώς και το *Myosin Va* για τη μετασυναπτική πυκνότητα και την αποσιώπηση του γονιδίου της αλκοολικής αφυδρογονάσης.

Τέλος, υπάρχει η υπόθεση πως τα piRNA εμπλέκονται στην ανάπτυξη του όγκου του εγκεφάλου, όπως αναφέρεται στην παράγραφο §3.1.10. Πιθανές ενδείξεις είναι η καταστολή του όγκου σε τεχνητή απενεργοποίηση των Piwi ή του Aub και παρουσία των L1 ρετροτρανσποζονίων στον ανθρώπινο εγκέφαλο^[28]. L1 ρετροτρανσποζόνια ανευρίσκονται στα νευρωνικά προγονικά κύτταρα του εγκεφάλου (neural progenitor cell, NPC) κυρίως κατά τη νευρωνική δέσμευση. Η ένθεση L1 σε NPC αρουραίου έδειξε την αλλαγή στην έκφραση κοντινών γονιδίων, αλλά και στη γονιδιακή έκφραση *in vivo*, επηρεάζοντας πρωτίστως τη δημιουργία των αξόνων, των δενδριτών και της σύναψης. Επίσης, τα ρετροτρανσποζόνια LTR και LINE παρατηρείται να αυξορυθμίζονται συχνότερα σε ηλικιωμένα άτομα, καθώς επίσης και σε διάφορες ανθρώπινες παθήσεις, όπως η εγκεφαλική

ισχαιμία, και γι' αυτό ήταν αναγκαία η εξελικτική ανάπτυξη ενός μηχανισμού αποσιώπησης όπως αυτός της RNA παρεμβολής^[32]. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα miRNA, τα piRNA δεν φαίνεται να έχουν συντηρημένους ρόλους στα σωματικά κύτταρα, υποδηλώνοντας τον περιορισμό των στόχων τους^[29].

2.5.3 Ο ρόλος των μορίων piRNA στο καρδιαγγειακό σύστημα

Η καρδιά αποτελεί το πρώτο όργανο που σχηματίζεται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη των θηλαστικών μέσω της ενεργοποίησης ενός γονιδίου για τις φυσιολογικές λειτουργίες της, όπως είναι η μυογένεση, η μορφογένεση και η συσταλτικότητα. Από την άλλη, στην παθοφυσιολογία της καρδιάς εκφράζεται ένα εμβρυϊκό γονίδιο που αφορά την ίνωση και την απόπτωση των μυοκυττάρων. Ένας ζωτικής σημασίας μηχανισμός για την καρδιακή λειτουργία και την παθολογία είναι η σηματοδότηση της κινάσης σερίνης / θρεονίνης (Akt). Η οδός σηματοδότησης Akt περιλαμβάνει μία στοιχειώδη ομάδα πρωτεϊνών που συνεργάζεται με ένα περίπλοκο σύστημα, στο οποίο εμπλέκονται shcRNA για λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός των νεογνών, η υπερτροφία και ο κυτταρικός μηχανισμός επιβίωσης στον καρδιακό μυ. Τα piRNA μπορούν να τροποποιήσουν τη σηματοδότηση Akt και να οδηγήσουν σε διάφορες καρδιαγγειακές διαταραχές^[33].

Μεταξύ των σωματικών κυττάρων, piRNA εντοπίζονται και στην καρδιά, τα οποία πιθανόν εμπλέκονται σε κρίσιμες βιολογικές διεργασίες όπως η συστολή, η ανάπτυξη και η αναγέννηση καρδιακών μυών με σκοπό την τελειοποίηση της έκφρασης γονιδίων που αφορούν τη διαφοροποίηση πολυδύναμων κυττάρων σε καρδιομυοκύτταρα. Τα μικρά RNA, συμπεριλαμβανομένων των piRNA, μπορούν να περάσουν από τρία στάδια κυτταρικής διαφοροποίησης τα οποία είναι τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (pluripotent stem cells, PSC H9), τα μεσοδερμικά προγονικά κύτταρα (mesoderm progenitor cell, MPC) και τα καρδιακά προγονικά κύτταρα (cardiac progenitor cells, CPC). Έχει αναφερθεί μεγάλο εύρος ποικιλομορφίας ως προς το μέγεθος των piRNA σε αυτά τα σωματικά κύτταρα, πιθανόν λόγω δράσης των πρωτεϊνών και των ενζύμων που συμμετέχουν στη βιογένεση των piRNA. Επίσης, έχει βρεθεί ότι παράγονται μόνο πρωτογενή piRNA στα σωματικά κύτταρα από όχι ιδιαίτερα κατανοητούς μηχανισμούς. Αυτό που είναι ενδιαφέρον όμως, είναι ότι αυτά τα piRNA παρουσιάζουν διαφορετικά προφίλ έκφρασης ανάλογα με το στάδιο της διαφοροποίησης κατά το οποίο παρουσιάζονται, με το τελικό στάδιο διαφοροποίησης, τα CPC, να εκφράζονται λιγότερο. Αυτό πιθανόν υποδηλώνει τη μικρότερη συσχέτιση των piRNA με τα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα. Συνεπώς, ο μηχανισμός δράσης

των miRNA δρα ως ένας αντισταθμιστικός παράγοντας σε κύτταρα με υψηλούς λειτουργικούς ρυθμούς με σκοπό τη μείωση της αστάθειας του γονιδιώματος^[34].

Αν και παρατηρείται διακύμανση στην έκφραση των miRNA μεταξύ κυτταρικών σειρών και ζωικών ιστών λόγω διαφορετικής προέλευσης, ορισμένα χαρακτηριστικά των καρδιακών miRNA περιλαμβάνουν: την επικράτηση των miRNA μήκους 24-25 nt, την ασθενή μεροληψία υπέρ του 1U και την ισχυρή μεροληψία υπέρ του 10A, με το 90% αυτών να προέρχεται από κοινό χρωμόσωμα και κοινούς γονιδιωματικούς τόπους, ενώ η πλειονότητα των εκφραζόμενων miRNA προέρχεται κυρίως από τα ρετροτρανσποζόνια LINE-1 και ERVL μεταξύ των συνολικών ρετροτρανσποζονίων^[35].

Τα ρετροτρανσποζόνια στην καρδιά ακολουθούν παρόμοιο τρόπο δράσης με τα υπόλοιπα συστήματα, καθώς περιορίζονται σε φυσιολογικές καταστάσεις, όπως για παράδειγμα η καταστολή του LINE1 έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την ισχαιμική καρδιακή βλάβη με ενεργοποίηση της σηματοδότησης Akt / PKB. Το μονοπάτι PIWI-miRNA ενεργοποιείται σε καταστολή της πρωτεΐνης 2 πρόσδεσης σε μέθυλο-CpG (methyl-CpG binding protein 2, MeCP2), μιας πρωτεΐνης που εκφράζεται στην καρδιά και αναστέλλει το LINE1, για την έναρξη της σηματοδότησης Akt στο καρδιακό σύστημα και τη διατήρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας^{[33],[35],[36]}.

3 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ piRNA ΣΤΙΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΝΟΣΟΥΣ

3.1 Κακοήθη νοσήματα

3.1.1 Γενικά

Ο καρκίνος είναι μια σημαντική αιτία θανάτου για τον άνθρωπο παγκοσμίως, και γι' αυτό τις τελευταίες δεκαετίες υπήρξε μεγάλη ανάγκη για την κατανόηση της ανάπτυξης και της εξέλιξής του. Παρά το γεγονός ότι τα piRNA ανακαλύφθηκαν αρχικά ως ρυθμιστές της διατήρησης κυττάρων της γαμετικής σειράς, θεωρήθηκε επίσης πιθανή η εμπλοκή τους στην καρκινογένεση. Αυτή η υπόθεση βασίζεται στα κοινά βιολογικά χαρακτηριστικά των καρκινικών, των βλαστικών και των γαμετικών κυττάρων, καθώς και στους κοινούς μηχανισμούς αυτοανανέωσης και ταχείας εξάπλωσής τους^{[15],[37]}.

Είναι γνωστό πως τα piRNA επιδρούν στα τρανσποζόνια με σκοπό την αποσιώπησή τους. Ωστόσο, μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μονοπάτι των piRNA μπορεί να προκαλέσουν μεταγραφική ενεργοποίηση στοιχείων ρετροτρανσποζονίων που οδηγούν σε αυξημένες βλάβες του DNA στα βλαστικά κύτταρα, ενώ επίσης μπορούν να επηρεάσουν άλλους σημαντικούς επιγενετικούς μηχανισμούς και μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις^[15]. Επιπλέον, τα piRNA στον καρκίνο μπορούν να επιδράσουν ρυθμιστικά τόσο στα ογκογονίδια όσο και στα αντι-ογκογονίδια^[12].

Παρά το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας PIWI εμφανίζονται αρκετά δραστήριες σε καρκινικούς όγκους και συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με κακή πρόγνωση, το πεδίο αυτό προς το παρόν τελεί υπό διερεύνηση. Μέχρι τώρα έχουν γίνει πολλές έρευνες πάνω στην ογκογόνο συμπεριφορά των πρωτεϊνών PIWI^[15]. Ωστόσο, γνωρίζουμε ότι προκαλούν αποσιώπηση των τρανσποζονίων κατά τη διάρκεια της μείωσης και δρουν ως διαμεσολαβητές σε έναν μηχανισμό σηματοδότησης στα σωματικά κύτταρα για τη διατήρηση και διαιώνιση των βλαστικών κυττάρων^[38]. Έτσι λοιπόν, αναλύοντας την κάθε πρωτεΐνη ξεχωριστά, βλέπουμε ότι η PIWIL1, που σχετίζεται με τη βλαστική ικανότητα, υπερεκφράζεται κυρίως σε όγκους με μεγάλο κακόηθες δυναμικό, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο του ενδομητρίου, ενισχύοντας τη βλαστική συμπεριφορά, τη μακρά διάρκεια ζωής και τη μετανάστευση των κυττάρων. Οι μηχανισμοί που βασίζονται στον επαναπρογραμματισμό, την υπομεθυλίωση του DNA ή την υπερμεθυλίωση συγκεκριμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων επάγονται από την ενεργοποίηση της PIWIL1. Όπως μάλιστα αποδείχθηκε πειραματικά, κύτταρα στα οποία υπερεκφράζεται η PIWIL1 παρουσιάζουν

αυξορύθμιση των δεικτών καρκινικών βλαστικών κυττάρων CD44 και της αλδεϋδικής αφυδρογονάσης 1 (Aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1), καθώς και των δεικτών βλαστικών κυττάρων, στους οποίους ανήκει ο οκταμερής μεταγραφικός παράγοντας 4 (octamer binding transcription factor 4, Oct4) και ο Nanog^[15].

Διφορούμενη συμπεριφορά φαίνεται να έχει η πρωτεΐνη PIWIL2 η οποία επηρεάζει τα καρκινικά κύτταρα μέσω της ρύθμισης της απόπτωσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, η παρεμπόδιση της PIWIL2 προκαλεί καταστολή της έκφρασης του γονιδίου ρύθμισης της απόπτωσης *Bcl-X*, και του μεταγωγέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3, *STAT3*). Παράλληλα, η PIWIL2 αυξάνει την έκφραση των ογκογονιδίων *c-MYC*, *CDK2* και *Cyclin A*, και ενεργοποιεί την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT), με αποτέλεσμα να προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση. Από την άλλη, η απομάκρυνση της PIWIL2 από τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη εξασθενεί τη μεταναστευτική τους ικανότητα, ενώ η υψηλή της έκφραση στον καρκίνο του παχέος εντέρου και του τραχήλου της μήτρας λόγω του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (Human Papilloma Virus, HPV) συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση. Απεναντίας, οι πρωτεΐνες PIWIL3 και PIWIL4 πιθανόν δεν ασκούν σημαντική επίδραση στους διάφορους καρκίνους, με εξαίρεση το ρόλο τους στους καρκίνους του τραχήλου της μήτρας, του στομάχου και του μεταστατικού μελανώματος^[15].

Ενώ οι πρωτεΐνες PIWI ρυθμίζουν την καρκινογένεση μέσω επιγενετικών μηχανισμών, τα piRNA κατευθύνουν τις PIWI μαζί με άλλους επιγενετικούς μηχανισμούς ώστε να επέμβουν στο γονιδίωμα προκαλώντας αποσιώπηση γονιδίων. Το σύμπλοκο piRNA / PIWI σε μία καρκινοπάθεια μπορεί να δρα είτε κατασταλτικά είτε διεγερτικά, και αυτή η τροποποιημένη έκφραση των piRNA στον καρκίνο έχει σοβαρές συνέπειες για τη βιολογική εξέλιξή του (**Εικόνα 3**). Ειδικότερα, τα μόρια piRNA συμμετέχουν στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος μέσω της αποσιώπησης των μεταθετών στοιχείων ούτως ώστε να ελεγχθεί κατά το δυνατόν η τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης και η πρόκληση μη αναστρέψιμης βλάβης στο γονιδίωμα από τις επαναλαμβανόμενες διαδικασίες αντιγραφής ή «αποκοπής-επικόλλησης» των μεταθετών στοιχείων, οι οποίες μπορούν να αυξήσουν τις πιθανότητες καρκινογένεσης. Όταν το σύμπλοκο PIWI-piRNA εντοπίζεται εντός του πυρήνα προκαλεί καταστολή της χρωματίνης, ενώ όταν βρίσκεται εκτός αυτού αλληλεπιδρά με κατασταλτικά σήματα χρωματίνης, όπως η πρωτεΐνη ετεροχρωματίνης 1 (Heterochromatin Protein 1, HP1) και το υπόστρωμα δέσμευσής της, η H3K9me3, βοηθώντας έτσι στην αποσιώπηση τρανσποζονίων που διαθέτουν ισχυρό ογκογονικό ρόλο, όπως για παράδειγμα το LINE-1^[15]. Ένας τρόπος αναστολής της καρκινογένεσης είναι η ενεργοποίηση του *TRAIL*, ενός ογκοκατασταλτικού

γονιδίου, μέσω αλληλεπίδρασης μορίων piRNA που βρίσκονται σε εσωτερικές περιοχές του γονιδίου *Growth Arrest Specific 5* (GAS5) με τις PIWIL1 / 4 αλλά και με τη μεθυλίωση της H3K4 και την απομεθυλίωση της H3K2^[39]. Βέβαια, τα piRNA συμβάλλουν στην ογκογένεση μέσω ρύθμισης της μεθυλίωσης DNA.

Ένας ακόμη επιγενετικός μηχανισμός των piRNA, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, δεν είναι μόνο η αποσιώπηση τρανσποζονίων, αλλά και συγκεκριμένων γονιδίων που εντοπίζονται σε γενετικούς τόπους εκτός της περιοχής των τρανσποζονίων, μέσω της προώθησης της *de novo* DNA μεθυλίωσης^[15]. Η μεθυλίωση του DNA στα θηλαστικά πραγματοποιείται με την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στην πέμπτη θέση του άνθρακα της κυτοσίνης (5-methylcytosine, 5mC) μεταξύ των νουκλεοτιδίων κυτοσίνης-γουανίνης (CpG), με τη συμμετοχή των ενζύμου DNA μεθυλοτρανσφεράση (DNA methyltransferase enzyme, DNMT). Οι κυριότερες μεθυλοτρανσφεράσες των θηλαστικών είναι: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B και DNMT3L. Η μεθυλίωση του DNA είναι ένας σημαντικός μηχανισμός σε κυτταρικές λειτουργίες, όπως η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, η αδρανοποίηση των χρωμοσωμάτων X, η αποσιώπηση ρετροστοιχείων, η σταθερότητα των κεντρομερών, ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων, και η αποσιώπηση εντυπωμένων γονιδίων. Μεταβολές στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA παρατηρούνται συχνά σε κακοήγη νοσήματα και μπορεί να σχετίζονται με την απενεργοποίηση κρίσιμων γονιδιακών ρυθμιστικών στοιχείων^{[13],[40]}. Η μεθυλίωση του DNA στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να επανενεργοποιήσει τρανσποζόνια όπως το LINE1 και το Alu, και εξαιτίας αυτού να διαταραχθεί η γονιδιωματική ακεραιότητα. Επίσης, με την εξέλιξη της κακοήθειας αυξάνεται και ο βαθμός υπομεθυλίωσης του DNA, η οποία είναι ικανή να προκαλέσει χρωμοσωμικές αναδιατάξεις μέσω του αυξημένου μιτωτικού ανασυνδυασμού^[41]. Οπότε, η συμβολή τους στην καρκινογένεση περιλαμβάνει πιθανώς τη μεθυλίωση του DNA γονιδίων με ογκοκατασταλτικό ρόλο και την ενίσχυση των μηχανισμών της άναρχης λειτουργίας των κυττάρων^[15].

Ακόμη τα piRNA συμμετέχουν στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Ειδικότερα, στους όρχεις του ανθρώπου, έχει βρεθεί ότι τα piRNA εμφανίζονται εμπλουτισμένα στις 3'-UTR περιοχές σε αντίθεση με τις κωδικοποιητικές και τις 5'-UTR περιοχές. Ακόμη, οι πρωτεΐνες PIWI τεμαχίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες mRNA που προέρχονται από ρετροτρανσποζόνια, ενώ απουσία αυτών τα mRNA που αποτελούν στόχο των piRNA παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση, με τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων. Έχει βρεθεί επίσης πως οι 3'-UTR σε αρκετά mRNA φέρουν περιοχές με ρετροτρανσποζόνια, καθιστώντας τα εύκολους στόχους αποικοδόμησης από τα piRNA και για τον περιορισμό των όγκων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το piR-30840, το οποίο ρυθμίζει την

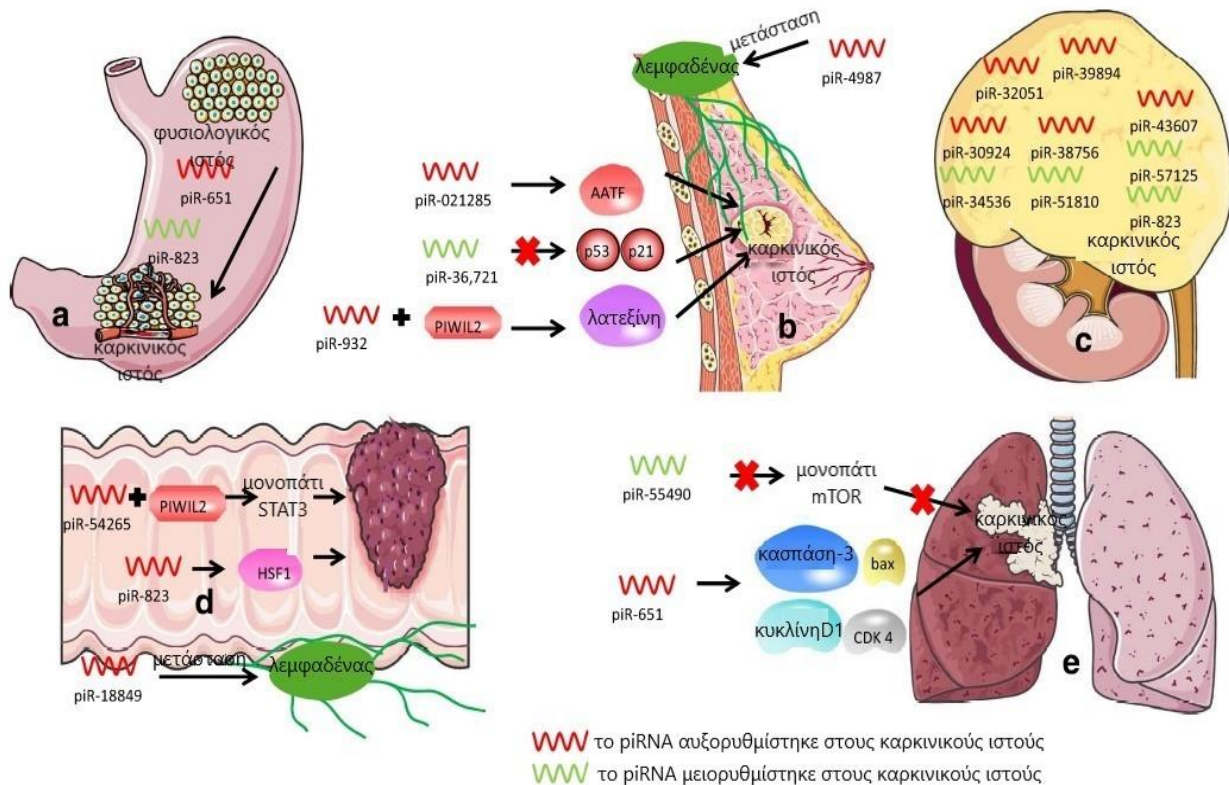
ανάπτυξη των Th2 λεμφοκυττάρων μέσω καταστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης της Ιντερλευκίνης 4 (Interleukin 4, IL-4)^[15].

Το μονοπάτι PIWI συνδέεται επίσης με τη διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης στον καρκίνο και το σύμπλοκο PIWI-ριRNA παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση των ιδιοτήτων των αρχέγονων κυττάρων, ακόμα και κατά τη διάρκεια της θεραπείας του καρκίνου με χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Ως αποτέλεσμα της ανθεκτικότητας στη χημειοθεραπεία μπορεί να σχηματιστούν σφαιρικοί όγκοι, καθώς και να παρατηρηθεί αυξημένη ογκογονικότητα *in vivo*, μαζί με την ενεργοποίηση αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με βλαστικά κύτταρα^[15].

Τα ριRNA όμως, πέρα από την επιγενετική ρύθμιση του καρκίνου, ασκούν καθοριστικό ρόλο και στον κυτταρικό κύκλο, όπως για παράδειγμα συμβαίνει με το ριR-L-163 στον καρκίνο του πνεύμονα^[39]. Επιπλέον, παρατηρείται διαφοροποιημένη έκφραση ορισμένων ριRNA στους όγκους, δηλαδή παρουσιάζουν ετερογένεια ως προς τα πρότυπα έκφρασής τους ανάλογα με το είδος του ιστού. Το αίτιο αυτής της συμπεριφοράς δεν έχει εξακριβωθεί ακόμα^[39].

Τέλος, οι επιγενετικές μεταβολές σχετίζονται και με τη μετάσταση του καρκίνου, εκ των οποίων οι σημαντικότερες είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και ορισμένα προφίλ έκφρασης του RNA, διεγείροντας στοιχεία επαναλαμβανόμενου γονιδιωματικού DNA. Συνήθως, παρατηρείται εκτεταμένη υπομεθυλίωση του DNA καθώς οι όγκοι εξελίσσονται και υπόκεινται σε μεταστάσεις. Ένα αντίστοιχο παράδειγμα είναι η υπομεθυλίωση του LINE1, το οποίο αποτελεί δείκτη καρκίνου και μετάστασης λεμφαδένων. Η τροποποίηση της ιστόνης είναι σημαντική για την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, σε σωματικά και γαμετικά κύτταρα. Η πυρηνική χρωματίνη διακρίνεται στην ετεροχρωματίνη, η οποία φυσιολογικά παραμένει αμετάβλητη σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και απενεργοποιείται κατά τη μεταγραφή, και την ευχρωματίνη, η οποία επιτρέπει την ενεργή μεταγραφή των γονιδίων. Η ιστόνη H3 μπορεί να διαμορφώσει τη χρωματίνη. Συγκεκριμένα, η σταθερότητα του γονιδιώματος στην ετεροχρωματίνη ρυθμίζεται από την H3K9me3, αποτρέποντας την υπερβολικά περιττή μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο. Επίσης, οι H3K9me3, H3K36me3 και πιθανώς η H3K79me3 διευκολύνουν το σχηματισμό της ευχρωματίνης, και οι H3K9me3 και H3K27me3 δημιουργούν κατάλληλες συνθήκες ούτως ώστε η ετεροχρωματίνη να προκαλέσει αποσιώπηση γονιδίων. Υπάρχουν αρκετές πρωτεΐνες οι οποίες προσελκύουν μεταγραφικούς παράγοντες στην ευχρωματίνη, ενώ η μεθυλίωση και η ακετυλίωση μπορούν να ρυθμίσουν τη λειτουργία των ιστονών και στη συνέχεια τη μεταγραφή γονιδίων. Η ιστόνη H3K9me3, από την άλλη, αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα καρκινικού φαινοτύπου σε ανθρώπους, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε παθολογική δραστικότητα των μεθυλοτρανσφερασών ή των διμεθυλασών H3K9. Για

παράδειγμα, η υπερέκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης DNMT3Ab στο γαστρικό καρκίνωμα ρυθμίζει γονίδια που εμπλέκονται στη μετάσταση, όπως το γονίδιο E-καντερίνη. Άλλα γονίδια που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη των όγκων μέσω των επιγενετικών τροποποιήσεων από τα piRNA είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας C (vascular endothelial growth factor C, VEGF-C), ο PAX8, η Κερατίνη 7, η CD13, η λαμινίνη, η ουροκινάση, η υπομονάδα $\alpha 3$ -ιντεγκρίνης και η c-met^[41].



Εικόνα 3 Μη φυσιολογική έκφραση των piRNA σε καρκινικούς ιστούς και σχετικοί μηχανισμοί για την προώθηση ή την αναστολή του καρκίνου. (Α) Μη φυσιολογική έκφραση των piR-651 και piR-823 στον καρκίνο του στομάχου. (Β) Το piR-021285 προωθεί τη μεθυλίωση του ανταγωνιστικού της απόπτωσης μεταγραφικού παράγοντα AATF (Apoptosis Antagonizing Transcription Factor) και άλλων σχετικών ογκογονιδίων, γεγονός που οδηγεί σε μετάσταση του καρκίνου του μαστού. Η μειωμένη έκφραση του piR-36721 έχει ως αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα έκφρασης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p53 και P21, τα οποία προάγουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Το piR-932 συνδέεται με την PIWIL2 για την προώθηση της μεθυλίωσης της λατεξίνης, προάγοντας έτσι την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Το piR-4987 προάγει τη μετάσταση των λεμφαδένων του καρκίνου του μαστού. (Γ) Μη φυσιολογική έκφραση διαφορετικών piRNA στον καρκίνο των νεφρών. (Δ) Το piR-54265 σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη PIWIL2, ενεργοποιεί την οδό σηματοδότησης STAT3 και προωθεί τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Το piR-823 δρα ως προαγωγός όγκου ρυθμίζοντας τη φωσφορυλίωση και τη μεταγραφική δράση του HSF 1. Το piR-188489 προάγει τη μετάσταση των λεμφαδένων στον καρκίνο του παχέος εντέρου. (Ε) Το piR-55490 εμποδίζει την ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση της οδού mTOR σε κύτταρα του καρκίνου του πνεύμονα. Με την αλλαγή των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών caspase-3 και bax, που σχετίζονται με την απόπτωση, το piR-651 επάγει την έκφραση της κυκλίνης 1 και του CDK 4, ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και έτσι προάγει τη μετάσταση του όγκου του πνεύμονα. (Προσαρμογή από [37]).

3.1.2 Πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και λαιμού

Το πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και λαιμού (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) είναι ένα σύνολο κακοηθειών των βλεννογόνων επιφανειών της άνω αναπνευστικής οδού όπως του ρινοφάρυγγα, του στοματοφάρυγγα, του λάρυγγα, των παραρρίνιων κόλπων και της στοματικής κοιλότητας. Αντιπροσωπεύει τον έκτο πιο θανατηφόρο καρκίνο παγκοσμίως με μικρή πρόοδο στην επιβίωση των ασθενών, ωστόσο η συχνότητα εμφάνισής του ποικίλλει ανάλογα με την ανατομική και γεωγραφική εντόπιση του όγκου.

Ο κυριότερος αιτιολογικός παράγοντας παραμένει το κάπνισμα, με 25 φορές περισσότερες πιθανότητες ανάπτυξης HNSCC σε καπνίζοντες. Παλαιότερες μελέτες υποδεικνύουν την ύπαρξη συστατικών του καπνού με τοξική επίδραση επί των γονιδίων, όπως νιτροζαμίνες και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, τα οποία επεμβαίνουν στο DNA, προκαλώντας μεταλλάξεις και διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης σε ομάδες όγκων ανάλογα με τη συχνότητα καπνίσματος. Η κατανάλωση οινοπνευματωδών ποτών και η μόλυνση από τον HPV συμπεριλαμβάνονται επίσης στους παράγοντες κινδύνου του HNSCC. Για την ακρίβεια, ο HPV είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη πλακώδους καρκινώματος κυρίως στον στοματοφάρυγγα σε ποσοστό 47% μεταξύ των HNSCC που προκαλούνται από HPV, ο οποίος μολύνει στρωματοποιημένα πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα σε δέρμα και βλεννογόνους. Οι αμυγδαλές, ως φυσικοί ξενιστές λοιμώξεων, αποτελούν θέση εμμενουσών λοιμώξεων και, επομένως, την περιοχή με την υψηλότερη ευαισθησία στην καρκινική εξαλλαγή των κυττάρων από τύπους HPV υψηλού κινδύνου (HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59 και HPV68). Ο μηχανισμός της ογκογένεσης περιλαμβάνει την απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών όγκου όπως η TP53 (Tumor protein P53, Πρωτεΐνη όγκου p53) και ρετινοβλαστώματος (retinoblastoma protein, pRb) μέσω των βοηθητικών πρωτεϊνών του ιού E6 και E7, την ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος στο DNA του ξενιστή και την εξέλιξη στη μη παραγωγική φάση της λοίμωξης, η οποία αποτελεί το κλειδί της καρκινογένεσης. Άλλοι ογκογόνοι ιοί για το HNSCC είναι ο ιός Epstein - Barr (Epstein - Barr virus, EBV), ο ιός BK (BK virus, BKV), ο ιός John Cunningham (John Cunningham virus, JCV) και ο ιός SV40 (simian vacuolating virus 40, SV40)^{[42],[43]}.

Διάφορα πρότυπα έκφρασης piRNA έχουν παρατηρηθεί στο HNSCC, τα οποία όμως σχετίζονται με την κατάσταση και τον τύπο του HPV. Τα piRNA FR018916, FR140858, FR197104, FR237180 και FR298757 εκφράζονται σε HPV θετικούς ασθενείς με HNSCC δίνοντας χειρότερη συνολική επιβίωση (Overall Survival, OS), δηλαδή τη χρονική περίοδο από τη στιγμή που οι ασθενείς που διεγνώσθησαν με τον καρκίνο ή που ξεκίνησαν θεραπεία παρέμειναν ζωντανοί, όπως και τα piR-

35953, piR-36984, piR-39592, piR-36715 και piR-305065, τα οποία όμως ανήκουν στα 11 από τα 41 piRNA που υπερεκφράζονται σε όγκους που επάγονται μέσω των HPV-16 ή HPV-18, βοηθώντας έτσι στη διαφορική διάγνωση των HPV-θετικών και HPV-αρνητικών HNSCC δειγμάτων. Αυτή η μοριακή υπογραφή σε HPV-θετικούς όγκους συσχετίστηκε με ένα δυσμενές ποσοστό επιβίωσης. Επιπλέον, εντοπίστηκε ένα σύνολο από 30 piRNA που σχετίζονται με τον HPV σε HNSCC-HPV-16 θετικά και HPV-αρνητικά φυσιολογικά κύτταρα, όπως επίσης και τα NONHSAT077364, NONHSAT102574 και NONHSAT128479^{[44],[45],[46]}.

Σε έρευνα για το HNSCC που προκαλείται από το κάπνισμα εντοπίστηκαν τέσσερα piRNA (τα NONHSAT113708, NONHSAT081250, NONHSAT123636 και NONHSAT015828), τα οποία σχετίζονται με το στάδιο του όγκου, τη μετάσταση και / ή την ανατομική του θέση, καθώς και ένα ακόμη (NONHSAT067200) που συνδέεται με την επιβίωση των ασθενών. Επιπλέον, εντοπίστηκαν άλλα οκτώ piRNA που πιθανώς εμπλέκονται στην παθογένεση του HNSCC που σχετίζεται με το κάπνισμα, αλλά με μικρότερη κλινική σημασία^[42]. Σε μία άλλη έρευνα όπου διερευνήθηκαν οι μηχανισμοί δράσης των piRNA στο HNSCC διαπιστώθηκε ότι το piR-34736 συσχετίστηκε με τη μετάλλαξη PRDM9, με μείωση του λόγου των γονιδίων Bax / Bcl2, ενώ βρέθηκε ότι επάγει την αυξημένη έκφραση βιμεντινίνης σε κύτταρα UMSSC-10B και HN-30^[44]. Διαπιστώθηκε επίσης ότι αρκετά piRNA προκαλούν γονιδιωματικές αλλοιώσεις που επηρεάζουν την έκφραση της πρωτεΐνης PIWIL1, οι οποίες συχνά εντοπίζονται στο HNSCC που σχετίζεται με το κάπνισμα, συμπεριλαμβανομένης της μετάλλαξης της TP53, της συν-εμφάνισης της TP53-3p και της ενίσχυσης των χρωμοσωμάτων 3q26, 8q24 και 11q13^[44].

3.1.3 Καρκίνος του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μία από τις σοβαρότερες και πιο ύπουλες κακοήθειες, καθώς η ανίχνευσή του είναι δύσκολη πριν το τελικό στάδιο, με κακή πρόγνωση, με αποτέλεσμα να καταλήγει σε πολύ υψηλή θνησιμότητα με μέσο όρο επιβίωσης τα 5 έτη. Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (non-small cell lung cancer, NSCLC) είναι γνωστός ως κύριος τύπος καρκίνου του πνεύμονα που αντιστοιχεί στο 85% των καρκίνων του πνεύμονα και ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα είναι ο πιο σπάνιος τύπος καρκίνου του πνεύμονα που αντιστοιχεί στο 15% αυτών.

Τα αίτια της παθογένεσης του καρκίνου του πνεύμονα είναι ως επί το πλείστον άγνωστα, ωστόσο γίνονται μεγάλες προσπάθειες ανάπτυξης καινοτόμων μεθόδων διάγνωσης και θεραπείας. Αυτές οι προσπάθειες οδήγησαν στο συσχετισμό εσωτερικών (γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών) και εξωτερικών παραγόντων ως αιτίων για την παθογένεια της νόσου, με τους

επιγενετικούς μηχανισμούς να αποτελούν έναν εκ των σημαντικότερων παραγόντων για την εισβολή και την εξέλιξη του όγκου. Οι πρωτεΐνες PIWI και τα piRNA συμμετέχουν σε σημαντικούς επιγενετικούς μηχανισμούς στην πορεία του καρκίνου, καθώς επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων. Όπως παρατηρείται, μεταβολές στη συγκέντρωσή τους προάγουν την καρκινογένεση, καθιστώντας τα λοιπόν βασικούς βιοδείκτες στη διάγνωση και τη θεραπεία^{[47],[48]}.

Όπως συμβαίνει σε όλους τους τύπους καρκίνου, οι πρωτεΐνες PIWI που αλληλεπιδρούν με τα piRNA σχηματίζουν το σύμπλοκο piRISC και στον καρκίνο του πνεύμονα, παρεμποδίζοντας τα κατασταλτικά σήματα της ανάπτυξης και απόπτωσης των κυττάρων, της μετάλλαξης και της αστάθειας του γονιδιώματος, πυροδοτώντας τελικά την ογκογένεση και τη μετάσταση. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών PIWI παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης μεταξύ των διάφορων σταδίων της εμβρυογένεσης των πνευμόνων σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό, σύμφωνα με έρευνα σε δείγματα εμβρυϊκού ιστού που λήφθηκαν από ασθενείς με NSCLC. Για παράδειγμα, ανευρέθηκαν χαμηλά επίπεδα των πρωτεϊνών PIWIL4 σε καρκινικούς ιστούς, και μικρότερος χρόνος έως την υποτροπή (time to relapse, TTR) και OS σε αυτούς τους ασθενείς αντίθετα από τους υγιείς, με τροποποίηση της χρωματίνης μέσω μεθυλίωσης του γενετικού τόπου p16Ink4a. Αντίθετα, η έκφραση των πρωτεϊνών PIWIL2, οι οποίες επάγουν τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλουν την απόπτωση στις κυτταρικές σειρές H460 και A549, την αυξημένη έκφραση των CDK2 και της κυκλίνης A (σε επίπεδα πρωτεΐνης και mRNA που σχετίζονται με ογκογένεση) σε ασθενείς με NSCLC, ήταν υψηλή. Αυτοί οι ασθενείς παρουσιάζουν μικρότερη OS και μικρότερη επιβίωση χωρίς ασθένειες ή υποτροπές (disease-free survival ή relapse-free survival, DFS ή RFS), δηλαδή μικρότερο χρονικό διάστημα κατά το οποίο ο ασθενής δεν παρουσιάζει καμία συμπτωματολογία ύστερα από την θεραπεία. Τέλος, το γονίδιο *PIWIL1* παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης φυσιολογικά σε έμβρυα 7 εβδομάδων με επακόλουθη μειορύθμιση κατά την ωρίμανση του εμβρύου, και ανευρίσκεται σε καρκινικούς ιστούς, οδηγώντας σε μικρότερο TTR και OS σε σχέση με ασθενείς στους οποίους δεν εκφράζεται το *PIWIL1*. Οι επιπτώσεις της υπερέκφρασης της *PIWIL1* οφείλονται στην ιδιότητά της να διευκολύνει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την εισβολή καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα, μια διαδικασία που υποβοηθείται από την υπομεθυλίωση του DNA^[47]. Όπως διαπιστώθηκε, η υψηλή έκφραση του γονιδίου *PIWIL1* μπορεί να εξαρτάται από τη μεθυλίωση του υποκινητή του, αλλά δεν εξαρτάται από μεταλλάξεις, όπως αυτές που αφορούν την κινάση σερίνης / θρεονίνης 11 (STK11) ή του παράγοντα ανάπτυξης ηπατοκυττάρων (Hepatocyte growth factor, HGF). Ωστόσο, σε καταστολή της έκφρασης των πρωτεϊνών *PIWIL1* περιορίζεται ο

κυτταρικός πολλαπλασιασμός των βλαστικών καρκινικών κυττάρων, καθιστώντας τα σημαντικούς θεραπευτικούς βιοδείκτες^{[46],[47]}.

Παρά τον σημαντικό ρόλο των πρωτεϊνών PIWI, τα μόρια τα οποία έχουν πιο δραστικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα είναι τα piRNA που σχετίζονται περισσότερο με διεργασίες επιγενετικής ρύθμισης, στις οποίες παρεμβαίνοντας μπορούν να προκαλέσουν ογκογένεση και αποσιώπηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα κυρίαρχα piRNA που ανευρέθηκαν σε καρκίνους του πνεύμονα είναι τα piR-932, piR-823, piR-651, piR-55490, piR-52200, piR-34871, piR-46545 και piR-35127^[47].

Τα piRNA διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαίρεση και την αυτοανανέωση των κυττάρων, και διαταραχές σε αυτά τα μόρια προάγουν την ανάπτυξη καρκίνου. Ειδικότερα, το piR-651 φαίνεται να εμπλέκεται στην καρκινογένεση μέσω αλληλεπίδρασης με την HIWI, ενώ ο αναστολέας του piR-651 σταματά τα καρκινικά κύτταρα στη φάση G2/M. Μελέτες με τεχνικές όπως η RT-qPCR, ο *in situ* υβριδισμός και το στύπωμα Northern αποκάλυψαν συσχέτιση των piR-651 με όγκους από ασθενείς με NSCLC. Ειδικότερα, η υπερέκφραση του piR-651 σχετίζεται με αθανатоποίηση και υψηλά ποσοστά μετάστασης των καρκινικών κυττάρων, καθώς και με αυξημένη έκφραση της κυκλίνης D1/CDK4, που προάγει στη συνέχεια την ογκογένεση. Ο ρυθμιστικός ρόλος του piR-651 στα κύτταρα μπορεί να ελεγχθεί με την εφαρμογή αναστολέων του piR-651 σε κυτταρικές σειρές^[47]. Όπως προκύπτει, το piR-651 συνδέεται με όλες τις φάσεις του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, και άρα μπορεί πιθανώς να αποτελέσει ένα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο^[37].

Αντίθετη δράση μπορεί να παρουσιάσουν ορισμένα μόρια piRNA, όπως το piR-55490, με την καταστολή του μορίου να οδηγεί σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Το piR-55490 στοχεύει την περιοχή 3'-UTR του mTOR, μειώνοντας την αποικοδόμησή του και καταστέλλοντας τη λειτουργία της οδού σηματοδότησης Akt / mTOR, που είναι σημαντική για τη βιολογία του καρκίνου στα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα^{[47],[48]}. Κατά συνέπεια, το piR-55490 θεωρείται ως ένας σημαντικός καταστολέας όγκου από τα πρώτα κίονα στάδια του καρκίνου του πνεύμονα^[37].

Σύμφωνα με άλλη έρευνα, τα piRNA που κωδικοποιούνται από το γενετικό τόπο DLK1-DIO3 αυξάνουν την προγνωστική ικανότητα για τον καρκίνο του πνεύμονα. Ακόμη, ο γενετικός τόπος RASSF1C υπερεκφράζεται από κύτταρα αδενοκαρκινώματος των πνευμόνων ρυθμίζοντας θετικά την έκφραση των piR-52200 και piR-34871, και αρνητικά των piR-46545 και piR-35127 μέσω του άξονα RASSF1C-PIWIL1-piRNA για την προώθηση του πολλαπλασιασμού των βλαστοκυττάρων LC, του σχηματισμού αποικιών και της EMT. Αντίθετη δράση των παραπάνω piRNA οδηγεί σε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων H1299 και A549, συμπεραίνοντας ότι αυτά

τα piRNA μπορούν να εμπλέκονται στη ρύθμιση του μετασχηματισμού και της ογκογένεσης των πνευμονικών κυττάρων^{[47],[48]}.

Επιπλέον τα μόρια piR-L (piRNA-like) που σχετίζονται με τις πρωτεΐνες PIWI διαδραματίζουν το δικό τους ρόλο στην καρκινογένεση και την αντίσταση στη χημειοθεραπεία, και γι' αυτό χρειάζεται καλύτερη κατανόησή τους. Τα piR-L είναι γενετικά στοιχεία που μπορούν να ρυθμίζουν τις φωσφοπρωτεΐνες-στόχους τους (p-πρωτεΐνη) στα κύτταρα των πνευμόνων με έναν όχι ιδιαίτερα κατανοητό μηχανισμό δράσης. Η βασική διαφορά τους με τα υπόλοιπα μη κωδικοποιητικά piRNA είναι η άμεση πρόσδεση των piR-L στις p-πρωτεΐνες που αποτελούν τους στόχους τους χωρίς να τηρούν τους κανόνες συμπληρωματικότητας, ενώ επίσης η διαφορά τους σε σχέση με τα piRNA βασίζεται στο μέγεθός τους και στις νέες αλληλουχίες των piR-L οι οποίες ανευρίσκονται σε ιστούς ενηλίκων. Όσον αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα, σε μελέτη που διεξήχθη σε κύτταρα επιθηλιακού βρογχικού πνεύμονα ανθρώπου και NSCLC αποδείχθηκε ότι το piR-L-163 εμπλέκεται στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την εισβολή και τη μετανάστευση των κυττάρων μέσω απευθείας σύνδεσής του με τις φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες ERM (ezrin-radixin-moesin), που είναι μια ομάδα πρωτεϊνών τοποθετημένων στην κυτταρική μεμβράνη με βασικό ρόλο στη ρύθμιση των οδών μεταγωγής σήματος, ρυθμίζοντας τη λειτουργία τους, ενώ το piR-L-138 αυξορυθμίστηκε σε περιπτώσεις ανθεκτικότητας στη χημειοθεραπεία με βάση τη σισπλατίνη (CDDP) *in vitro* και *in vivo*^[47].

Συνεπώς, η απορρύθμιση των piRNA και των πρωτεϊνών PIWI, καθώς και η εμπλοκή τους σε κυτταρικές διεργασίες καρκινικής φύσεως, καθιστούν το μονοπάτι piRNA / PIWI ως χρήσιμους βιοδείκτες στη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα^[47].

3.1.4 Καρκίνος του στομάχου (γαστρικός καρκίνος)

Ο καρκίνος του στομάχου αποτελεί μία από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες κακοήθειες και κατατάσσεται πέμπτος κατά σειρά διάγνωσης και τρίτος ως αίτιο θανάτου από καρκίνο. Η συχνότητα με την οποία εμφανίζεται είναι διπλάσια στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες, αλλά διαφέρει μεταξύ διαφορετικών κρατών. Η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του στομάχου αυξάνεται ύστερα από μόλυνση με το *Helicobacter pylori*, ενώ σχετίζεται με την προχωρημένη ηλικία, με τις διατροφικές συνήθειες αλλά και με την κληρονομικότητα^[49]. Το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα αποτελεί έναν κληρονομικό υπότυπο του καρκίνου του στομάχου και παρουσιάζει πενταετή επιβίωση, με υψηλά ποσοστά υποτροπής, αναδεικνύοντας την ύπαρξη επείγουσας ανάγκης για ανακάλυψη βιοδεικτών^{[49],[50]}. Τα piRNA που είναι χρήσιμα για τη

φυσιολογική διαφοροποίηση των γαμετικών κυττάρων μπορεί να συμβάλουν στην ανάπτυξη ενός καρκινικού όγκου όταν δοκιμαστούν σε καρκινικά κύτταρα για την αποσιώπηση διαφορετικών τμημάτων του γονιδιώματος^[48].

Όπως αποδεικνύεται, υφίσταται αλληλεπίδραση των miRNA με τον καρκίνο του στομάχου. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε υπερέκφραση του miR-651 σε καρκινικούς ιστούς του στομάχου εισάγοντας τα καρκινικά κύτταρα στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου, ενώ υπό την παρουσία αναστολέα του miR-651 παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων στο ίδιο σημείο του κυτταρικού κύκλου. Ταυτόχρονα, το miR-823 εκφράζεται σε μειωμένα επίπεδα σε καρκινικούς γαστρικούς ιστούς παρέχοντας εύφορο έδαφος για την έναρξη ανάπτυξης του όγκου, εφόσον παρουσιάζει ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του στομάχου. Αντιστοίχως, το miR-923 συμβάλλει στο προκαρκινικό στάδιο της καρκινογένεσης του στομάχου μέσω των χαμηλών επιπέδων του και με την πρόκληση παρεκκλίνουσας μεθυλίωσης του DNA, οδηγώντας έτσι σε ενεργοποίηση γονιδιωματικών περιοχών που προωθούν την ογκογένεση^{[37],[48]}. Υπάρχουν ακόμη και άλλα miRNA, όπως τα miR-59056, miR-32105 και miR-58099, που εκφράζονται στον γαστρικό καρκίνο και επηρεάζουν την εξέλιξη της νόσου^[44].

Αναφορικά με την πρωτεΐνη PIWIL1, αυτή δίνει κακή πρόγνωση σε ασθενείς με τη νόσο όταν τα επίπεδα έκφρασής της είναι υπερβολικά αυξημένα. Ειδικότερα, όταν το γονίδιο της PIWIL1 είχε κατασταλεί σε γαστρικά καρκινικά κύτταρα, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης ορισμένων ογκογονιδίων και αύξηση της έκφρασης ορισμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, ελέγχοντας με αυτό τον τρόπο την πορεία του καρκίνου και την έκφραση καρκινικών και αντικαρκινικών γονιδίων^[37].

Σε σχέση με την ελλιπή OS, μόνο το miRNA FR222326 παρουσιάζει θετική συσχέτιση, αν και τα miRNA FR004819, FR290353, FR064000 και FR387750 / FR157678 σχετίζονται και αυτά με την OS και την επιβίωση χωρίς υποτροπή (recurrence free survival, RFS). Επίσης το σύμπλεγμα των τριών miRNA FR290353, FR064000 και FR387750 / FR157678 κατηγοριοποιεί τους ασθενείς με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα σε ομάδες χαμηλού και υψηλού κινδύνου σε σχέση με την πιθανότητα υποτροπής^{[44],[50]}. Συμπερασματικά λοιπόν, αν και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση των δεδομένων, όλα τα προαναφερθέντα miRNA αποτελούν σημαντικούς βιοδείκτες για την πρόγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του στομάχου^[44].

3.1.5 Καρκίνος παχέος εντέρου

Όντας ένα σημαντικό ζήτημα για τη δημόσια υγεία, ο καρκίνος του παχέος εντέρου (colorectal cancer, CRC) είναι ένας από τους καρκίνους με υψηλά ποσοστά διάγνωσης και μείζων αιτία θανάτου, καθώς αποτελεί τον τέταρτο κατά σειρά θανατηφόρο καρκίνο, ενώ είναι ο τρίτος συχνότερος καρκίνος στους άνδρες και ο δεύτερος στις γυναίκες σε παγκόσμιο επίπεδο. Παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο παχέος εντέρου αποτελούν η μεγάλη ηλικία, οι διατροφικές συνήθειες, η παχυσαρκία, το κάπνισμα και η καθιστική ζωή. Σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου έχει η ανάπτυξη πολύποδα, ο οποίος στη συνέχεια εξελίσσεται σε καρκίνο από βλαστοκύτταρα που διαθέτουν ενεργοποιημένα ογκογονίδια ή απενεργοποιημένα ογκοκατασταλτικά γονίδια^{[44],[48],[51]}.

Μελέτες έχουν δείξει τη σημασία των miRNA για την κλινική διάγνωση και τη θεραπεία ασθενών με CRC. Ειδικότερα, τα miR-54265 και miR-823 εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου εν συγκρίσει με τα φυσιολογικά κύτταρα. Το miR-54265 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες PIWIL2 για την ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης STAT3 και το σχηματισμό του συμπλόκου PIWIL2 / STAT3 / p-SRC, προκειμένου να αναστείλει την απόπτωση και να προωθήσει την εισβολή και τη μετάσταση του καρκίνου του παχέος εντέρου, ενώ η υπερέκφραση του ίδιου miRNA μπορεί να προκαλέσει χημειοαντοχή σε φάρμακα όπως η οξαλιπλατίνη και η 5-φθοροουρακίλη. Από την άλλη πλευρά, το miR-823 προάγει τον όγκο ρυθμίζοντας τη φωσφορυλίωση της Ser326 μέσω της μεταγραφικής δραστηριότητας του μεταγραφικού παράγοντα θερμικού σοκ-1 (heat shock factor 1, HSF-1), ο οποίος είναι ένας ισχυρός παράγοντας καρκινογένεσης. Επιπλέον, το miR-823 μπορεί να βοηθήσει στην περαιτέρω εξέλιξη του CRC μέσω φωσφορυλίωσης της STAT3 που προκαλείται από το σύμπλοκο miR-823 / piwil2 και ενεργοποίησης της οδού σηματοδότησης STAT3 / BCL-xI / cyclinD1, η οποία μπορεί να προκαλέσει την έκφραση του αναστολέα της CDK (cyclin dependent kinase 1, CDK1) και να ρυθμίσει με αυτόν τον τρόπο την εξέλιξη της φάσης G1. Συνεπώς, σε αναστολή της έκφρασης αφενός του miR-823 θα μπορούσε να επέλθει απόπτωση και διακοπή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου, και αφετέρου του miRNA-54265 θα μπορούσε να κατασταλεί σημαντικά η ανάπτυξη του όγκου και η μετάσταση.

Επίσης, η έκφραση του miR-015551 ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε ιστούς CRC από ό,τι σε φυσιολογικούς ιστούς, και συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του lncRNA LNC009643, η οποία περιελάμβανε την αλληλουχία miR-015551, ενώ η παραλλαγή miR-015551 rs11776042 (θυμίνη προς κυτοσίνη, T> C) επιφέρει τροποποίηση της δευτεροταγούς δομής του miRNA με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η επίδρασή του στην ανάπτυξη του CRC^{[37],[44],[48]}.

Ορισμένοι ακόμη σημαντικοί μοριακοί δείκτες για την πρόγνωση των ασθενών με CRC είναι τα piR-18849, piR-19521, piR-1245, η PIWIL1 και Piwil2, καθώς η υψηλή έκφραση αυτών των μορίων δίνει κακή πρόγνωση σε ασθενείς με CRC ευνοώντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, το piR-18849 προάγει τη μετάσταση των λεμφαδένων, ενώ το piR-1245 επιταχύνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων CRC, προάγει τη μετανάστευση και την εισβολή και περιορίζει την απόπτωση δεσμεύοντας συγκεκριμένες περιοχές των mRNA-στόχων τους (ATF3, BTG1, DUSP1, FAS, NFKBIA, UPP1, SESN2, TP53INP1 και MDX1). Αυτά τα mRNA σχετίζονται με ογκοκατασταλτικές οδούς, και με τη βοήθεια του piR-1245 προάγεται η διάσπαση του mRNA μέσω πυρηνικών εξωσωμάτων. Αναφορικά με το piR-1245, συνήθως εντοπίζεται σε καρκινικούς ιστούς με υψηλό κακόηθες δυναμικό όπως κακή διαφοροποίηση, προχωρημένο T στάδιο και μεταστάσεις σε λεμφαδένες και απομακρυσμένους ιστούς μειώνοντας σημαντικά τον συνολικό χρόνο επιβίωσης των ασθενών^{[37],[48]}.

Σημαντικός προγνωστικός δείκτης κακής επιβίωσης για τον CRC μπορεί επίσης να είναι και η πρωτεΐνη Piwil2, η οποία υπερεκφράζεται στους καρκινικούς ιστούς του παχέος εντέρου. Ειδικότερα, η παρεκκλίνουσα έκφραση της Piwil2 σχετίζεται με τη μεταναστευτική ικανότητα και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου, αφού πρώτα ενεργοποιηθεί η μεταλλοπεπτιδάση μήτρας 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9), με το προχωρημένο κλινικό στάδιο και τη μετάσταση λεμφαδένων, ενώ σε αναστολή της πρωτεΐνης Piwil2 ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων μειώνεται και η απόπτωση αυξάνεται, συμπεραίνοντας τελικά την σημαντικότητα της Piwil2 στην εξέλιξη και τη μετάσταση του όγκου^[52].

Επιπλέον μόρια, όπως τα piR-5937 και piR-28876, μειορυθμίζονται και παρουσιάζουν υψηλότερη προγνωστική αξία (λόγω ευαισθησίας και εξειδίκευσης) για την ανίχνευση ασθενών με CRC σταδίου I σε σχέση με τους ήδη υπάρχοντες βιοδείκτες (carcinoembryonic antigen, CEA, CA19-9) που ανιχνεύονται σε ποσοστό μικρότερο του 50% των ασθενών με CRC, ενώ τα επίπεδα των piR-5937 και piR-28876 που παρατηρούνται είναι χαμηλά σχεδόν στο 70% των δειγμάτων που ελέγχθηκαν. Μάλιστα, τα piR-5937 και piR-28876 βρέθηκαν μειωμένα όχι μόνο σε καρκινικούς ιστούς αλλά και δείγματα ορού ασθενών με CRC, όπου επίσης μειωμένα ανιχνεύθηκαν και τα piR-23210 και piR-32159 σε προχωρημένο κλινικό στάδιο. Ωστόσο, τα πιο άφθονα piRNA στον ορό ασθενών ήταν τα piR-28131 (DQ597916), piR-1207 (DQ570956) και piR-28877 (DQ598677)^[53].

Τέλος, τα piR-hsa-25447, piR-hsa-23992, και piR-hsa-1043 βρέθηκαν να αυξορυθμίζονται, ενώ το piR-hsa-28876 να μειορυθμίζεται σε ιστούς CRC. Ακόμη, η απορρύθμιση του piR-019825 (DQ597218) συνέβαλε στη διάκριση ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου από τους υγιείς μάρτυρες^{[37],[44],[53]}.

Όλοι οι προαναφερόμενοι βιοδείκτες είναι σημαντικοί για την έγκαιρη διάγνωση και την επιβίωση των ασθενών με CRC. Δυστυχώς όμως ο συνολικός μοριακός μηχανισμός του καρκίνου του παχέος εντέρου δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί και κατανοηθεί πλήρως^[37].

3.1.6 Καρκίνος του ήπατος

Ο καρκίνος του ήπατος αποτελεί τον έκτο πιο κοινό καρκίνο και την τέταρτη αιτία θνησιμότητας που σχετίζονται με τον καρκίνο παγκοσμίως, ενώ όσον αφορά τον ανδρικό πληθυσμό όπου εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα συγκριτικά με τον γυναικείο πληθυσμό, αποτελεί τη δεύτερη και την έκτη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στις αναπτυσσόμενες και τις ανεπτυγμένες χώρες, αντίστοιχα^{[48],[54],[55]}. Ύστερα από τη συνεχή και απότομη αύξηση των περιστατικών καρκίνου του ήπατος στους άνδρες, η συχνότητα εμφάνισής του έχει πλέον σταθεροποιηθεί. Ο γυναικείος πληθυσμός όμως, παρουσιάζει συνεχή αύξηση με ποσοστό >2%^[56]. Ανάμεσα στους πρωτοπαθείς καρκίνους του ήπατος, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (hepatocellular carcinoma, HCC) υπερτερεί και αντιπροσωπεύει την πλειονότητα αυτών. Παράγοντες κινδύνου του HCC είναι ο ιός της ηπατίτιδας Β και C, η μεγάλη κατανάλωση αλκοόλ, ο διαβήτης και η μη αλκοολική λιπώδης ηπατική νόσος^[57].

Αρκετά miRNA έχουν αναφερθεί ότι συμμετέχουν στην ανάπτυξη HCC μέσω διαφορετικών οδών σηματοδότησης και μηχανισμών. Υπερέκφραση παρατηρείται στα miR-651, miR-32299, miR-23670, miR-24684, miR-28488 και miR-7239, ενώ τα miR-952, miR820, miR-28525, miR-5938 και miR-5937 μειορρυθμίζονται σε ιστούς HCC. Το miR-Hep1 που εμφανίζει υψηλή έκφραση στο HCC, προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του ήπατος και την εισβολή στους ιστούς, ενδεχομένως μέσω της δέσμευσης της PIWIL2 ώστε να αυξορρυθμιστεί η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη AKT στο μονοπάτι σηματοδότησης PI3K / AKT, ένα βασικό μονοπάτι ογκογένεσης στο HCC, ενώ σε αποσιώπηση του miR-Hep1 αναστέλλεται η κυτταρική βιωσιμότητα, η κινητικότητα και η επεμβατικότητα του HCC. Ακόμη, τα αυξημένα επίπεδα του miR_LLi_24.894 υποδηλώνουν αλλοιώσεις τύπου HCC χαμηλού βαθμού. Επιπλέον, σημαντική συσσώρευση των hsa_miR_013306, hsa_miR_00823, hsa_miR_020498 και miR_LLi_30552, όπου αποδείχθηκε ότι στοχεύουν τους παράγοντες p53, PI3K / Akt, HMGB1, PTEN και TNF, οι οποίοι εμπλέκονται στην καρκινογένεση στο ήπαρ και στην ανάπτυξη HCC, υποδηλώνοντας την άμεση ή έμμεση συμμετοχή αυτών των miRNA στην ηπατική καρκινογόνο διαδικασία^{[44],[48]}.

3.1.7 Καρκίνος των νεφρών

Το νεφρικό καρκίνωμα είναι δύσκολο να ανιχνευθεί και να αντιμετωπιστεί, και είναι ελάχιστα κατανοητό. Ο καρκίνος των νεφρικών κυττάρων (renal cell carcinoma, RCC) διακρίνεται σε τρεις υποτύπους σε ιστοπαθολογικό επίπεδο (από διαυγή, θηλώδη και χρωμόφοβα κύτταρα) με χειρότερη πρόγνωση αυτή της πρώτης κατηγορίας καθώς εντοπίζεται συνήθως σε προχωρημένο στάδιο. Αντιπροσωπεύει το 2,4% όλων των κακοηθειών σε ενήλικους παγκοσμίως, με συνεχώς αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης και υψηλά ποσοστά θνησιμότητας που κυμαίνονται πάνω από 40%^{[48],[58],[59]}.

Τα miRNA στον καρκίνο των νεφρών σχετίζονται κυρίως με τη μετάσταση και τη πρόγνωση του. Ορισμένα miRNA όπως τα miR-32051, miR-39894, miR43607 που προέρχονται από μια ομάδα miRNA στο χρωμόσωμα 17, αλλά και τα miR-30924 και miR-38756, παρουσιάζουν αυξημένους ρυθμιστικούς ρόλους στο διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) και σχετίζονται με χαμηλό ποσοστό επιβίωσης. Αντίθετα, τα μιτοχονδριακά miR-34536 και miR-51810 μειορυθμίζονται στο ccRCC συμβάλλοντας στην πρόγνωση της νόσου, όπως και το miR-57125 που βρέθηκε μειωμένο σε μεταστατικούς πρωτογενείς όγκους και σε οστικές μεταστάσεις, σε σύγκριση με μη μεταστατικούς πρωτογενείς όγκους. Επιπλέον, το miR-823, το οποίο έχει αναφερθεί στην ογκογένεση και άλλων καρκίνων, απορρυθμίστηκε σε ιστούς όγκου, σε ορό αίματος και σε ούρα ασθενών με RCC, με τα επίπεδά του να εμφανίζονται μειωμένα στους ιστούς και αυξημένα σε ορό αίματος και στα ούρα, αποτελώντας έναν άριστο διαγνωστικό δείκτη για χρήση ούρων ασθενών με RCC, καθώς συσχετίζονται άμεσα με κακή πρόγνωση.

Επιπλέον, με το RCC σχετίζονται στενά και οι πρωτεΐνες PIWI, καθώς οι PIWIL1, PIWIL2 και PIWIL4 μειώνονται σταδιακά ενόσω αυξάνεται το κλινικό στάδιο και δυσχεραίνεται η πρόγνωση των ασθενών, αλλά και η PIWI-like 1 protein σχετίζεται επίσης με κακή πρόγνωση για ασθενείς με RCC^{[37],[44]}.

3.1.8 Καρκίνος ουροδόχου κύστης

Μεταξύ των καρκίνων του ουροποιητικού συστήματος, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι ο πιο συνηθισμένος, με το μεταβατικό καρκίνωμα των κυττάρων (transitional cell carcinoma, TCC) να αποτελεί τον κυριότερο ιστοπαθολογικό τύπο σε ποσοστό 90% όλων των περιπτώσεων. Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια και είναι μία πολυπαραγοντική

νόσος, με το κάπνισμα και τις περιβαλλοντικές συνθήκες να είναι αποδεδειγμένα βασικοί παράγοντες κινδύνου του συγκεκριμένου καρκίνου.

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε μικροσυστοιχία piRNA για τη διερεύνηση της οικουμενικής έκφρασης των piRNA στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, τα ευρήματα δείχνουν μειωμένη έκφραση του piRNA DQ594040 (piRABC), ενώ όταν αυτό υπερεκφράζεται προάγει την απόπτωση των κυττάρων, και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον *in vitro* σχηματισμό αποικιών, μία ποσοτική τεχνική στην οποία ελέγχεται αν ένα μεμονωμένο κύτταρο έχει την ικανότητα κλωνικού πολλαπλασιασμού ανάμεσα σε μια μεγάλη αποικία. Ομοίως, η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης PIWIL1 / HIWI μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο καρκίνου της ουροδόχου κύστης, κυρίως μέσω αλληλεπίδρασής της με το piRABC. Όπως υποστηρίζεται, ο πιθανός στόχος του piRABC είναι το γονίδιο *TNFSF4* ή *OX40L*, το οποίο ανήκει στην υπεροικογένεια του παράγοντα νέκρωσης και εκφράζεται κυρίως από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, για την ρύθμιση της αυτοανοσίας στη θεραπεία του καρκίνου. Συνεπώς, το piRABC αυξορρυθμίζει μέσω συμπληρωματικότητας το γονίδιο-στόχο του, προάγοντας έτσι την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστης^{[60],[61]}.

3.1.9 Αιματολογικές κακοήθειες

I. Πολλαπλούν μύελωμα

Το πολλαπλούν μύελωμα (multiple myeloma, MM) αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη αιματολογική κακοήθεια και οφείλεται σε πολλαπλασιαστική διαταραχή των πλασματοκυττάρων. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία κακόηθων πλασματοκυττάρων εντός του μυελού των οστών και από τη συγκέντρωση μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης ή μονοκλωνικών ελεύθερων ελαφριών αλυσιδών στον ορό του αίματος και / ή στα ούρα του ασθενούς. Η νόσος παρουσιάζει υψηλή συχνότητα υποτροπής, ενώ οι κλινικές εκδηλώσεις όπως βλάβες στα όργανα, αναιμία, νεφρική ανεπάρκεια, παθολογικά κατάγματα και υπερασβεστιαϊμία οφείλονται στην έκκριση μυελωματικής πρωτεΐνης και κυτοκινών από τα μυελωματικά κύτταρα^{[48],[62]}.

Το piRNA-823 εμφανίζεται αυξημένο σε ασθενείς με MM και σχετίζεται άμεσα με τις *de novo* DNA μεθυλοτρανσφεράσες DNMT3A και 3B σε πρωτογενή CD138 μυελωματικά κύτταρα. Όταν εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα οδηγεί σε υπομεθυλίωση του DNA λόγω μείωσης των mRNA και των μεθυλοτρανσφερασών DNMT3A και 3B, σε εκ νέου έκφραση του ογκοκαταστολέα p16^{INK4A} ύστερα από αποσιώπηση με μεθυλίωση και σε ελαττωμένη έκφραση του VEGF. Ως εκ τούτου, το piRNA-823 ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο των μυελωματικών κυττάρων, τη μεθυλίωση του DNA και

την αγγειογένεση. Τα μυελωματικά κύτταρα καταφέρνουν να επιβιώσουν και να διατηρήσουν την βλαστική τους ικανότητα μέσω της έκφρασης των miR-823 και DNMT3B, διαδικασία που ενισχύεται από τα μυελοειδή κατασταλτικά κοκκιοκύτταρα (granulocytic myeloid-derived suppressor cells, GMDSs) και από τα βλαστοκύτταρα πολλαπλού μυελώματος (multiple myeloma stem cells, MMSCs). Επίσης, τα μυελωματικά κύτταρα παράγουν εξωκυτταρικά κυστίδια (extracellular vesicles, EVs) προκειμένου να μεταφέρουν το miRNA-823 στα ενδοθηλιακά κύτταρα και να υποστηρίξουν την έκκριση των VEGF, της ιντερλευκίνης 6 (interleukin 6, IL-6), του ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), και του υποδοχέα χημειοκινών C-X-C τύπου 4 (C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4) με σκοπό την κακοήγη εξαλλαγή των κυττάρων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα που σχετίζονται με τον όγκο υιοθετούν πολύ εύκολα συμπεριφορές που σχετίζονται με την καρκινογένεση, και γι' αυτό επανεκπαιδεύονται από τα miRNA-823 που μεταφέρονται από τα EV των MM κυττάρων, ώστε να αποκτήσουν εκ νέου βιολογικά χαρακτηριστικά μυελωματικών κυττάρων^[48].

II. Λέμφωμα Hodgkin

Το λέμφωμα Hodgkin είναι μία κακοήθεια των B λεμφοκυττάρων, με τα καρκινικά κύτταρα να καταλαμβάνουν το 1% του συνολικού όγκου εξαιτίας της παρουσίας των κυττάρων Hodgkin και των πολυπύρηνων κυττάρων Reed Stenberg. Ιστοπαθολογικά, ο όγκος χαρακτηρίζεται από ένα προστατευτικό δίκτυο κυττάρων όπως ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα, ινοβλάστες, πλασματοκύτταρα, ιστιοκύτταρα και στρωματικά κύτταρα, τα οποία περιβάλλουν τα κακοήγη κύτταρα.

Το λέμφωμα Hodgkin διακρίνεται στο οζώδες λέμφωμα Hodgkin με λεμφοκυτταρική επικράτηση (nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma, NLPHL) και στο κλασσικό λέμφωμα Hodgkin (classical Hodgkin lymphoma, cHL) με περαιτέρω ιστολογικούς υποτύπους. Το cHL αντιστοιχεί στο 11% όλων των λεμφωμάτων.

Κατά το λέμφωμα Hodgkin ανευρίσκονται ρυθμιστικά μόρια RNA, sncRNA ή lncRNA. Αναφορικά με το μονοπάτι miRNA, ανιχνεύθηκαν σε κυτταρικές σειρές miRNA (miR-651, miR-20365 και miR-20582) και πρωτεΐνες PIWI (PIWIL1, PIWIL2 και PIWIL4), ενώ βρέθηκε ότι υπερεκφράζονται σε ασθενείς με λέμφωμα κλασσικού τύπου. Επιπλέον, τα χαμηλά επίπεδα του miR-651 συσχετίστηκαν με βραχύτερα DFS και OS, καθώς και με έλλειψη απόκρισης στη θεραπεία πρώτης γραμμής. Βέβαια, αν και το miR-651 ανιχνεύθηκε σε χαμηλά επίπεδα σε δείγματα ορού, στην πορεία ανήλθε σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα μετά από μια πλήρη ανοσοαπόκριση^{[48],[63]}.

III. Λέμφωμα Non-Hodgkin

Το διάχυτο λέμφωμα μεγάλων κυττάρων B (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) είναι ο συχνότερος υπότυπος λεμφοειδούς κακοήθειας και παρουσιάζει ετερογένεια όσον αφορά την κλινική εικόνα, τη μορφολογία και τη βιολογία του. Ο κλινικός προγνωστικός δείκτης που αντιστοιχεί στον Διεθνή Προγνωστικό Δείκτη (International Prognostic Index, IPI) του Εθνικού Γενικού Δικτύου Καρκίνου (National Comprehensive Cancer Network - International Prognostic Index, NCCN) οδηγεί στη διάκριση υποομάδων χαμηλού και υψηλού κινδύνου. Σύμφωνα με το προφίλ γονιδιακής έκφρασης έχουν ταυτοποιηθεί οι εξής μοριακοί υπότυποι: B κύτταρα τύπου βλαστικού κέντρου (germinal center B cell, GCB-like DLBCL), ενεργοποιημένα B κύτταρα (activated B-cell, ABC-like DLBCL) και οι μη ταξινομημένες περιπτώσεις που εμπίπτουν στην ομάδα «τύπου 3» (“type 3” group και ABC-like DLBCL) με τη χειρότερη πρόγνωση.

Η έκφραση του *miR-30473* φαίνεται ότι συσχετίζεται με την επιγενετική ρύθμιση στον καρκίνο, και ειδικότερα εδώ επηρεάζει την έναρξη και την εξέλιξη του DLBCL. Απαραίτητο δείκτη του DLBCL αποτελεί η N^6 μεθυλοαδενοσίνη (N^6 -methyladenosine, m^6A), που παρατηρείται σε τροποποιημένα ευκαρυωτικά mRNA στα πλαίσια της βιοεπεξεργασίας των γονιδίων-στόχων αλλά με ασαφή λειτουργία. Όπως αποδείχθηκε σε μοντέλα ξενομοσχευμάτων, το *miR-30473* εμπλέκεται στην ογκογένεση του DLBCL καθώς η υψηλή έκφρασή του ενισχύει τον επιθετικό φαινότυπο του DLBCL, σε αντίθεση με τη μειωμένη έκφρασή του η οποία μειώνει τον πολλαπλασιασμό και προκαλεί τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα DLBCL. Επιπλέον, το ίδιο *miR-30473* συσχετίζεται σημαντικά με τη OS και ασκεί τον ογκογονικό του ρόλο μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την αύξηση της ρύθμισης της WTAP, μιας m^6A mRNA μεθυλάσης με ισχυρή καρκινογόνο δράση, και τη διατήρηση της βιωσιμότητας των DLBCL κυττάρων, ενισχύοντας έτσι το οικουμενικό επίπεδο των m^6A . Περαιτέρω αναλύσεις έδειξαν ότι το *miR-30473* ενισχύει τη σταθερότητα της WTAP στοχεύοντας μια συμπληρωματική αλληλουχία στην 3'-UTR του mRNA της. Με τη βοήθεια της ανάλυσης μεταγραφώματος και του m^6A -seq αποκαλύπτεται ότι η WTAP αυξάνει την έκφραση του κρίσιμου γονιδίου στόχου *HK2* ενισχύοντας τα επίπεδα των $HK2$ m^6A , ενώ σε συνδυασμό με το *miR-30473* προωθείται η ογκογένεση του DLBCL και ρυθμίζεται η m^6A μεθυλίωση του RNA. Η *HK2* είναι μία βασική κινάση που εμπλέκεται στο μεταβολισμό της γλυκόζης και σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μέσω της ενισχυμένης αερόβιας γλυκόλυσης^[64].

3.1.10 Νευρολογικοί καρκίνοι

Υπάρχουν διάφοροι τύποι νευρολογικών καρκίνων όπως είναι τα γλοιώματα και το νευροβλάστωμα. Τα γλοιώματα αφορούν το ΚΝΣ, ανήκουν στους πρωτοπαθείς όγκους του εγκεφάλου και σε αυτά κατατάσσονται το αστροκύτωμα, ολιγοδενδρογλοίωμα και το επενδύωμα. Απεναντίας, το νευροβλάστωμα, είναι ένας εμβρυϊκός εξωκρανιακός όγκος που προσβάλλει το συμπαθητικό του περιφερικού νευρικού συστήματος^{[65],[66]}.

Το νευρογλοίωμα κατατάσσεται ως ο κυριότερος πρωτογενής κακοήθης όγκος του εγκεφάλου σε ενήλικες και ταξινομείται σε τέσσερις φάσεις (I-IV). Μέχρι τώρα έχουν αναγνωρισθεί τέσσερα piRNA που θεωρείται ότι ελέγχουν τη συμπεριφορά του όγκου. Αυτά είναι τα piR-598, piR-DQ593109, piR-39980 και piR-8041. Τα piR-598 και piR-8041 δρουν ως ογκοκατασταλτικά, το piR-DQ593109 ρυθμίζει τη διαπερατότητα του BTB μέσω του άξονα MEG3 / miR-330-5p / RUNX3, ενώ το piR-39980 διεγείρει την πορεία του καρκίνου και εμποδίζει τη δράση των φαρμάκων^[67].

Το γλοιοβλάστωμα, το οποίο είναι αστροκύτωμα τέταρτου βαθμού, προέρχεται από το νευροεπιθήλιο, και αποτελεί τον πιο κακοήθη και διεισδυτικό ενδοκρανιακό όγκο με τη χειρότερη πρόγνωση. Το piR-30188 είναι ένα piRNA το οποίο καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό, την εισβολή και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και προάγει την απόπτωση στοχεύοντας το γονίδιο-στόχο *OIP5-AS1*. Η ελαττωμένη έκφραση των piR-30188 και PIWIL3 συσχετίζεται αρνητικά με την παθολογική εξέλιξη του γλοιοβλαστώματος και ρυθμίζει τον κακοήθη φαινότυπο μέσω της οδού *OIP5 AS1 / miR-367 / CEBPA / TRAF4*. Το piR-8041 ελαττώνεται έως και 10,3 φορές περισσότερο στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα (glioblastoma multiform, GBM) και ελέγχει την καρκινογένεση μέσω της αλληλεπίδρασής του με το mRNA της πρωτεϊνικής κινάσης ενεργοποιούμενης από μιτογόνα ERK1 / 2 (mitogen-activated protein kinase, MAPK), αλλά και με αρκετά μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών HSP και DNAJ, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και προάγοντας τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Το σύμπλοκο piRNA-DQ593109 / PIWIL1 δεσμεύει το μητρικώς εκφραζόμενο 3 (maternally expressed gene 3, MEG3) lncRNA του άξονα MEG3 / miR-330-5p / RUNX3, το οποίο οδηγεί σε υπερέκφραση του RUNX3 και αύξηση της διαπερατότητας του φραγμού αίματος-όγκου (blood tumour barrier, BTB) στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω αρνητικής ρύθμισης του miR-330-5p. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών zonula occludens 1 (ZO-1), occludin και claudin-5 επιτρέποντας την απορρόφηση του υδρόφιλου φαρμάκου. Με παρόμοιο τρόπο δρα και το piR-DQ590027 ως προς τον άξονα piR-DQ590027/MIR17HG/miR-153 (miR377)/FOXR2, καθιστώντας έτσι το σύμπλοκο piRNA-

DQ593109/PIWIL1 και το piR-DQ590027 χρήσιμα εργαλεία στη θεραπεία έναντι του γλοιοβλαστώματος^{[48],[65],[68]}.

Το νευροβλάστωμα είναι ένα επιθετικό νεόπλασμα κυρίως στα παιδιά, καθώς αποτελεί τον δεύτερο συνηθέστερο, και τον τρίτο μετά τη λευχαιμία και τους καρκίνους του ΚΝΣ στερεού όγκου σε παιδιά. Η δημιουργία ενός μεταγραφικού ρυθμιστικού κυκλώματος με sncRNA που προκαλείται μέσω του ογκογονιδίου *MYCN* οδήγησε στην υπόθεση ότι τα piRNA πιθανόν παίζουν ρόλο στην παθογένεση του νευροβλαστώματος. Δεδομένα από δύο γνωστές κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος αποκάλυψαν ότι τα piR-52205, piR-52206, piR-57816, piR-38581, piR-32512 και piR36095 φαίνεται να στοχεύουν γονίδια τα οποία εμπλέκονται με ποικίλους τρόπους στην ογκογένεση, ενώ ταυτόχρονα υπερεκφράζονται. Τα piRNA αυτά προέρχονται από διάφορους γενετικούς τόπους και συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές διεργασίες^[69].

3.1.11 Καρκίνοι γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος

I. Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι ένας από τους πιο κοινούς καρκίνους (25%), αποτελεί τη βασική αιτία θανάτου παγκοσμίως (15%), και είναι επομένως μείζον πρόβλημα υγείας. Παρά τις τεράστιες προσπάθειες διάγνωσης και θεραπείας του, υπάρχουν ακόμα αρκετά εμπόδια λόγω της μεγάλης ετερογένειάς του. Ο καρκίνος του μαστού ταξινομείται σε επιμέρους κατηγορίες με βάση τα πρότυπα έκφρασης των υποδοχέων των οιστρογόνων, της προγεστερόνης και του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, αποσκοπώντας στην έγκαιρη διάγνωση και τη χορήγηση της αποτελεσματικότερης θεραπείας. Μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα γονιδιωματικής αστάθειας και αποτελούν τη σημαντικότερη αιτία καρκίνου του μαστού. Ως εκ τούτου, η μελέτη της παθογένεσης του καρκίνου του μαστού θα μπορούσε να συμβάλει στην ανάπτυξη νέων θεραπειών^{[12],[44],[48]}.

Στα πλαίσια λοιπόν κατανόησης της παθογένεσης της νόσου, η παθολογική έκφραση των piRNA εντοπίζεται ως ένας σημαντικός παράγοντας που εμπλέκεται σε επιγενετικούς μηχανισμούς, όπως επίσης στον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Σύμφωνα με ευρήματα από την καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MCF7, το piR-021285, όπως και ορισμένα άλλα piRNA, στοχεύει πιθανώς σε πολλαπλά γονίδια και ρυθμίζει την πρόκληση καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο μέσω της μεθυλίωσης του παρεμβαλλόμενου γονιδίου ενεργοποίησης της Rho GTPase πρωτεΐνης-11A (Rho GTPase Activating Protein 11A, *ARHGAP11A*) στις θέσεις των νησίδων CpG που υπάρχουν στην περιοχή της 5'-UTR και του πρώτου εξωνίου. Κατά συνέπεια, η

έκφραση του προ-αποπτωτικού mRNA του γονιδίου *ARHGAP11A* μειώνεται και η απόπτωση αναστέλλεται^{[12],[44]}.

Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, το *miR-36712* χαρακτηρίζεται ως ένα νέο ογκοκατασταλτικό μόριο, καθώς τα επίπεδά του σε καρκινικούς ιστούς από μαστό είναι εμφανώς χαμηλότερα σε σχέση με τους υγιείς ιστούς. Όταν δε η έκφρασή του αυξορρυθμίζεται στα καρκινικά κύτταρα, τα επίπεδα έκφρασης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων *p53* και *P21* αυξάνονται, οδηγώντας σε παύση του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών κυττάρων στη φάση G₀ / G₁, με συμπέρασμα ότι το *miR-36712* μπορεί να διαδραματίσει αντικαρκινικό ρόλο και να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης ή θεραπευτικός στόχος για τον καρκίνο του μαστού^{[12],[37]}. Όπως διαπιστώθηκε, το *miR-36712* αλληλεπιδρά με RNA που παράγονται από την σεληνοπρωτεΐνη W (Selenoprotein W, *SEPW1P*), ένα επανεπεξεργασμένο ψευδογονίδιο του *SEPW1*, και στη συνέχεια αναστέλλει την έκφραση του *SEPW1* μέσω ανταγωνισμού του *SEPW1* mRNA με το *SEPW1P* RNA για το *miR-7* και το *miR-324*. Έτσι λοιπόν, η ελαττωμένη έκφραση του *miR-36712* πυροδοτεί ένα σύνολο αλυσιδωτών αντιδράσεων, δηλαδή αύξηση της έκφρασης του *SEPW1*, αναστολή του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *p53*, αυξορύθμιση του γονιδίου *Slug* και μείωση των επιπέδων του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *P21* και της E-καντερίνης, οδηγώντας έτσι στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την εισβολή και τη μετανάστευση^[12]. Αναφορικά με το γονίδιο *Slug*, γνωρίζουμε πως αποτελεί έναν παράγοντα μεταγραφής με αντιαποπτωτικές ιδιότητες και προκαλεί μετατροπή στα επίπεδα έκφρασης της E-καντερίνης, συνδέοντας το γονίδιο αυτό με την εξέλιξη επιθετικών καρκίνων^[70]. Επιπλέον, το ίδιο *miR-36712* μπορεί να ενισχύσει την επίδραση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων πακλιταξέλη και δοξορουβικίνη στον καρκίνο του μαστού^{[12],[71]}.

Πολλά άλλα *miRNA* εκφράζονται σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού, εμφανίζοντας διακυμάνσεις στα επίπεδα έκφρασής τους, συμπεριλαμβανομένων των DQ596670, DQ598183, DQ597341, DQ598252 και DQ596311 που εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς, και των DQ598677, DQ597960 και DQ570994 που εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα, αντίστοιχα^[12]. Σε μια άλλη έρευνα, υποδεικνύεται ότι τα *miRNA* στοχεύουν σε mRNA πρωτεϊνών που δραστηριοποιούνται σε βιολογικές διαδικασίες ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου του μαστού. Συμπληρωματικοί στόχοι των *miRNA* σε αυτούς του καρκινικούς ιστούς βρέθηκαν να είναι επίσης μετάγραφα ψευδογονιδίων και lncRNA. Σε μία αξιολόγηση φυσιολογικών και καρκινικών ιστών μέσω RT-PCR, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα *miR-4987*, *miR-20365*, *miR-20485* και *miR-20582* ήταν αυξημένα στον καρκίνο του μαστού. Από τα παραπάνω, η αυξημένη έκφραση του *miR-4987* συνδέθηκε με μετάσταση στους λεμφαδένες και, όπως είναι γνωστό, η κατάσταση των μασχαλιαίων λεμφαδένων χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της μετάστασης. Επομένως, το

miR-4987 αποτελεί βασικό παράγοντα στην εξέλιξη του όγκου και η υπερέκφρασή του οδηγεί σε μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα miR-35127, miR-46545 και miR-52200 θα μπορούσαν να διαθέτουν ρυθμιστικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού^{[12],[44]}.

Ανάμεσα σε άλλα μόρια piRNA που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες στον καρκίνο του μαστού, τα οποία παρουσιάζουν υψηλότερη συγκέντρωση στους καρκινικούς ιστούς σε σχέση με τους φυσιολογικούς, ανήκουν ακόμα το piR-651, το σύμπλοκο ανοσοκατακρήμνισης piR-932-PIWIL2 το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον αποκλεισμό της μετάστασης στον καρκίνο του μαστού επηρεάζοντας τα επίπεδα της ογκοκατασταλτικής λατεξίνης, και το piR-021285 το οποίο προάγει την εξέλιξη του όγκου και πιθανόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θετικός ρυθμιστής του διηθητικού καρκίνου του μαστού^{[12],[37],[48]}. Όσον αφορά το piR-021285, σε γονοτυπικό έλεγχο ενός συνόλου μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (single-nucleotide polymorphism, SNP) που περιείχαν piRNA βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του SNP rs1326306 G>T στο piR-021285 και της αυξημένης πιθανότητας καρκίνου του μαστού λόγω ρύθμισης της μεθυλίωσης του προεπεμβατικού γονιδίου *ARHGAP11A*^[44]. Ακόμη, το piR-021285 που περιείχε τον SNP rs1326306 σε καρκινικά κύτταρα μαστού μείωσε τη μεθυλίωση στη θέση CpG εντός της περιοχής 5'-UTR και του πρώτου εξωνίου του γονιδίου *ARHGAP11A*, με αποτέλεσμα να παρατηρείται αυξημένη ικανότητα μετανάστευσης σε σύγκριση με τους μάρτυρες^[44].

Επιπλέον, το pi-sno75, ένα piRNA που βρίσκεται σε ιντρονικές περιοχές του γονιδίου *GAS5*, βρέθηκε ότι αυξάνει τη παραγωγή μιας προαποπτωτικής πρωτεΐνης που σχετίζεται με τον TNF, την TRAIL, μέσω της απομεθυλίωσης H3K27 και της μεθυλίωσης H3K4, και κατά συνέπεια οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Τέλος, ύστερα από μοριακή ανάλυση βρέθηκε ότι το piR-36026, σε συνδυασμό με τα ογκοκατασταλτικά γονίδια *SERPINA1* και *LRAT*, μπορεί να προάγει την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού στα κύτταρα MCF7 ^[44].

Ομοίως, οι πρωτεΐνες PIWI διαθέτουν επίσης σημαντική δραστηριότητα στον καρκίνο του μαστού, ίσως με μη φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης, με τις PIWIL1, PIWIL2, PIWIL3 και PIWIL4 να κατέχουν τον πρωταγωνιστικό ρόλο. Συγκεκριμένα, ύστερα από μελέτη που διεξήχθη σε έξι διαφορετικούς τύπους κυτταρικών σειρών στον καρκίνο του μαστού, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης της PIWIL1 είναι σημαντικά υψηλότερα σε τέσσερις καρκινικές κυτταρικές σειρές, η PIWIL2 υπερεκφράζεται σε δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές και η PIWIL4 έχει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε πέντε κυτταρικές σειρές σε σχέση με τη φυσιολογική κυτταρική σειρά του μαστού^{[12],[37]}.

Έχει προταθεί επίσης ότι η έκφραση της PIWIL4 ρυθμίζει κατά κάποιον τρόπο τη μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του μαστού μέσω γονιδίων που αφορούν τον υποδοχέα των οιστρογόνων. Οι στεροειδείς ορμόνες που εξαρτώνται από το φύλο μπορούν να καθορίσουν την ανάπτυξη και το μηχανισμό του καρκίνου στο αναπαραγωγικό σύστημα, ιδιαίτερα στον καρκίνο του μαστού και της μήτρας στις γυναίκες. Όπως έχει δειχθεί, οι ορμόνες μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα των miRNA που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού, καθώς παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων των piR-651 και piR-823 στα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 και MDA-MB-231 που υποβλήθηκαν σε αγωγή με οιστρογόνα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ορμονοθεραπεία και την εμφάνιση αντοχής στη θεραπευτική φαρμακευτική αγωγή σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού που παρουσιάζονται θετικοί στον υποδοχέα των οιστρογόνων^{[37],[48],[72]}.

II. Καρκίνος ωοθηκών

Ο καρκίνος των ωοθηκών (Ovarian Cancer, OCa) αποτελεί το 3,4% των διαγνωσμένων καρκίνων και το 4,4% αιτιών θανάτου στις γυναίκες. Μεταξύ των OCa, οι δύο συχνότερα εντοπιζόμενοι και πιο θανατηφόροι είναι ο ενδομητριοειδής καρκίνος ωοθηκών (endometrioid ovarian cancer, ENOCa) και ο ορογονικός καρκίνος ωοθηκών (Serous Ovarian Cancer, SOCa) του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών (Epithelial Ovarian Cancer, EOCa)^[48].

Σε μελέτη όπου διερευνήθηκε η απόκριση των miRNA σε δείγματα ιστού από ανθρώπινες ωοθήκες, και συγκεκριμένα από OCa και EOCa, αναφέρεται η έκφραση τριών γονιδίων του ανθρώπου και των πρωτεϊνών PIWIL, εκτός της PIWIL3. Όπως προέκυψε, το 84% των miRNA που εντοπίστηκαν είναι πρωτογενή miRNA, γεγονός που καταδεικνύει τη συντηρημένη φύση του μηχανισμού βιογένεσης. Σημαντικό είναι το εύρημα πως πολλά από τα miRNA προέρχονται από tRNA, υποδηλώνοντας ότι το μονοπάτι miRNA θα μπορούσε να εμπλέκεται στην πρωτεϊνοσύνθεση σε ιστούς ωοθηκών. Ακόμη, τα 111 miRNA που παρουσίασαν διαφορετική έκφραση και στους δύο τύπους κακοήθων επιθηλιακών κυττάρων των ωοθηκών αντικατοπτρίζουν ότι αυτές οι δύο κακοήθειες μοιράζονται πιθανώς κοινές ογκογονικές διεργασίες που ρυθμίζονται από miRNA. Επίσης, παρατηρήθηκε αυξορύθμιση του piR-52207 στο ENOCa, το οποίο στοχεύει την 3'-UTR περιοχή των γονιδίων-στόχων του *NUDT4*, *MTR*, *EIF2S3* και *MPHOSPH8*, και προάγει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την ογκογένεση των κυττάρων ENOCa. Όσον αφορά τα κύτταρα SOCa, η αυξορύθμιση των piR-52207 και piR-33733, σε συνδυασμό με την πρόσδεση του piR-33733 στην περιοχή 3'-UTR του *LIAS* και του piR-52207 στις περιοχές 5'-UTR και 3'-UTR των *ACTR10* και *PLEKHA5* οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων ορισμένων αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών και

μείωση αντίστοιχα των επιπέδων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, υποδηλώνοντας τον ρόλο των piRNA στην καρκινογένεση^{[48],[73]}.

Ακόμη βρέθηκε ότι οι πρωτεΐνες L1, PIWIL1, PIWIL2 και MAEL υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα ωοθηκών με EOCa, με τις PIWIL2 και MAEL να εκφράζονται κυρίως σε στρωματικά κύτταρα που καλύπτουν τους καρκινικούς ιστούς^[74], ενώ στην περίπτωση του EOC σταδίου III παρατηρήθηκε πως οι πρωτεΐνες PIWI αυξάνονται στους πρωτογενείς όγκους των ασθενών αυτών, και επίσης σχετίζονται με τη μετάσταση στους λεμφαδένες^[11].

III. Καρκίνος τραχήλου της μήτρας

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί μείζον πρόβλημα υγείας στο γυναικείο πληθυσμό κατατάσσοντας τον τέταρτο κατά σειρά εμφάνισης καρκίνων στις γυναίκες παγκοσμίως. Κύριος αιτιολογικός παράγοντας είναι η μόλυνση από τον HPV. Η έκθεση στην διαιθυλστυλβεστρόλη, η ανοσοκαταστολή και οι πολλές εναλλαγές ερωτικών συντρόφων μπορούν επίσης να αποτελέσουν παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου τραχήλου της μήτρας^[75].

Στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας παρατηρήθηκε υπερέκφραση του piR-651, βελτίωση της συνολικής επιβίωσης με το FR090905 και κακή πρόγνωση με το FR027884. Σε πείραμα με κύτταρα HeLa, παρατηρήθηκε υπερέκφραση των πρωτεϊνών HILI, τα επίπεδα των οποίων συνδυάζονται με το piR-49322 και προκαλούν μείωση στα επίπεδα των ρετροτρανσποζονίων LINE1 και LINE1 που σχετίζονται με μικρά RNA^[44].

3.1.12 Καρκίνοι ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος

I. Καρκίνος προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη παραμένει ο πιο κοινός καρκίνος των ανδρών και, με περισσότερους από 28.000 θανάτους ετησίως, κατατάσσεται δεύτερος σε θνησιμότητα παγκοσμίως. Ο καρκίνος του προστάτη αναπτύσσεται με δύο τρόπους, είτε ως εξαρτώμενος από ανδρογόνα, είτε ως ανεξάρτητος από ανδρογόνα. Σήμερα, τα μέτρα για τη διάγνωση και την πρόγνωση του καρκίνου του προστάτη έχουν βελτιωθεί αρκετά, αν και χρήζουν ακόμα μεγάλης βελτίωσης ως προς την ακρίβειά τους.

Σε έρευνα όπου αξιολογήθηκε η έκφραση των piRNA που σχετίζονται με τον όγκο, εντοπίστηκαν τα hsa_pir_000627, hsa_pir_005553 και hsa_pir_019346, εκ των οποίων τα δύο πρώτα παρουσιάζουν αλληλεξάρτηση. Τα piRNA στοχεύουν σε 343 γονίδια, τα οποία σχετίζονται κυρίως με το νουκλεόπλασμα και την ενδοκυτταρική μεταφορά, και αποτελούν κατά 92,45%

στόχους του has_pir_005553. Από την άλλη, το has_pir_019346 παρουσιάζει μικρό αριθμό γονιδίων-στόχων, με κυριότερο το *PNPLA7*. Τέλος, βρέθηκαν τέσσερα διαφορετικά piRNA με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης σε ασθενείς που βρίσκονταν στο στάδιο Gleason 3 + 4 και 4 + 3.

Όπως αναφέρεται παραπάνω, στον καρκίνο του μαστού, οι στεροειδείς ορμόνες που εξαρτώνται από το φύλο μπορούν να επηρεάσουν τον καρκίνο του αναπαραγωγικού συστήματος. Επομένως, το ίδιο φαινόμενο εντοπίζεται και στον καρκίνο του προστάτη, όπου σε χορήγηση ανδρογόνων στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη LNCaP και PC-3 παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων των piR-651 και piR-823. Όπως αποδεικνύεται, η έκφραση των piRNA ποικίλλει ανάλογα με τα επίπεδα των ορμονών και τον τύπο των καρκινικών κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου^{[72],[76]}.

II. Καρκίνος των όρχεων

Παρά το γεγονός ότι οι ανθρώπινοι όρχεις είναι άφθονοι σε miRNA, piRNA και tRNA που προέρχονται από μικρά RNA, τα περισσότερα piRNA δεν ρυθμίζονται με οικουμενικό τρόπο ή χάνονται εντελώς σε όλους τους ιστολογικούς υποτύπους όγκου όρχεος γαμετικών κυττάρων (testicular germ cell tumor, TGCT), πιθανώς γιατί ο καρκινικός ιστός έχει λιγότερα διαφοροποιημένα γαμετικά κύτταρα τα οποία είναι αυτά που παράγουν κυρίως μόρια piRNA σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς όρχεις. Ουσιαστικά, συμβαίνει μία επιγενετική απενεργοποίηση των γονιδίων των πρωτεϊνών PIWI (PIWIL1, PIWIL2 και PIWIL4) και της σχετιζόμενης με αυτές πρωτεΐνης TDRD1 που εμπλέκεται στην ογκογένεση των όρχεων του ανθρώπου, επιφέροντας μείωση της έκφρασης των piRNA και υπομεθυλίωση του DNA του LINE1. Αυτή η επιγενετική διαταραχή εμφανίζεται και στα σύνδρομα μη γενετικής στειρότητας στους άνδρες, παρουσιάζοντας μία επιδημιολογική συσχέτιση στην ανάπτυξη των δύο παθολογιών^{[77],[78]}.

3.1.13 Άλλα κακοήθη νοσήματα

I. Καρκίνος του παγκρέατος

Ο καρκίνος του παγκρέατος είναι μία κακοήθης νόσος με ιδιαίτερα υψηλή θνησιμότητα καθώς οι περισσότεροι ασθενείς παραμένουν ασυμπτωματικοί έως ότου η νόσος φτάσει σε προχωρημένο στάδιο^[48]. Το piR-017061, που βρίσκεται στο σύμπλοκο sno-HBII-296A RNA, μειορυθμίζεται στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC), αν και ο μηχανισμός μέσω του οποίου συμβαίνει αυτό παραμένει ασαφής^[79].

II. Ινοσάρκωμα

Το ινοσάρκωμα αποτελεί μία σπάνια και πολύ επιθετική κακοήθεια των μαλακών ιστών προερχόμενο από τους ενδομυϊκούς ινώδεις ιστούς, την περιτονία και τους τένοντες. Επίσης, παρουσιάζει γενετικές πολυπλοκότητες και μεταστάσεις από τα αρχικά κιάλας στάδια^[48]. Σε έρευνα εντοπίστηκε το piR-39980, ένα ογκοκατασταλτικό piRNA, και γι' αυτό εντοπίζεται μειωμένο στο ινοσάρκωμα σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Όπως παρατηρήθηκε, όταν αποσιωπείται το piR-39980 υποβοηθείται η βιωσιμότητα, ο πολλαπλασιασμός και η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του ινοσαρκώματος HT1080. Ο τρόπος δράσης του piR-39980 γίνεται μέσω δέσμησης της 3'-UTR της υπομονάδας M2 της αναγωγάσης ριβονουκλεοτιδίων (ribonucleotide reductase subunit M2, RRM2) η οποία έχει ρυθμιστικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων μέσω κατάλυσης του σχηματισμού των dNTPs για τη σύνθεση του DNA, αλλά και στα επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) η οποία προκαλεί αθανатоποίηση των κυττάρων. Επομένως, το piR-39980 στοχεύει στην αποσιώπηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την ογκογόνο RRM2, με αποτέλεσμα να είναι πολλά υποσχόμενο λόγω της πιθανής χρησιμότητάς του σε μελλοντική θεραπευτική αγωγή^[80].

3.2 Νοσήματα του νευρικού συστήματος

Η οδός PIWI / piRNA και η συσσώρευση μεταθέσεων μπορεί να αποτελεί πιθανό αίτιο για την ανάπτυξη νευρολογικών ασθενειών. Μείωση της έκφρασης και μεταλλάξεις της πρωτεΐνης PIWIL1 δείχθηκε ότι επηρεάζουν τις λειτουργίες του εγκεφαλικού φλοιού, προκαλώντας δυσλειτουργίες στην ανάπτυξη των νευρώνων, στην ακτινωτή μετανάστευση και στον αριθμό των πρωτεϊνών των μικροσωληνίσκων (Tau, MAP1B)^[31].

Ένα παράδειγμα αποτελεί η νόσος Gulf War η οποία αποτελεί μία χρόνια διαταραχή στρατιωτών των ΗΠΑ και προκαλεί διαταραχές της μνήμης, κατάθλιψη, και μείωση της φαιάς και λευκής ουσίας στο φλοιό του εγκεφάλου. Σε αυτή την ασθένεια εντοπίζονται αλλαγές στη μεθυλίωση και στην έκφραση των miRNA, αλλά και αύξηση των επιπέδων των piRNA. Πιθανά αίτια είναι η έκθεση των στρατιωτών σε βρωμιούχο πυριδοστιγμίνη, εντομοαπωθητικά και φυτοφάρμακα, όπως N, N-δισουλ-3-μεθυλ-βενζαμίδη (N, N-Diethyl-3-methyl-benzamide, DEET) και περμεθρίνη^[31].

3.2.1. Νευροαναπτυξιακές διαταραχές

I. Σύνδρομο Rett

Η οδός PIWI / piRNA εμπλέκεται σε διάφορες νευροαναπτυξιακές ασθένειες. Για παράδειγμα, μία σοβαρή νευροαναπτυξιακή διαταραχή είναι το σύνδρομο Rett (RTT), το οποίο προκαλεί διανοητική και αναπτυξιακή αναπηρία σε θηλυκά άτομα, με τα πρώτα σημεία και συμπτώματα να γίνονται εμφανή σε ηλικία 6 και 18 μηνών. Η διαταραχή χαρακτηρίζεται από στερεοτυπικές κινήσεις των χεριών, και απώλεια αποκτηθέντων δεξιοτήτων σε κινήσεις και επικοινωνία. Σύμφωνα με τα δεδομένα της έρευνας, στο RTT παρατηρείται αυξημένη έκφραση των piRNA στην παρεγκεφαλίδα, με αποτέλεσμα μεταλλάξεις, όπως στο γονίδιο *MECP2*, στο *CDKL5* ή στο *FOXP1*, ενώ η απουσία λειτουργικού *MeCP2* έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη κινητικότητα επαναλαμβανόμενων στοιχείων όπως το LINE-1 και την ευαισθησία στη μεταφορά^[27]. Μεταξύ των πιο πολυεκφρασμένων piRNA βρέθηκε να είναι και το DQ541777, το οποίο παίζει ρόλο στη ρύθμιση του μεγέθους των δενδριτικών σπονδυλικών ακανθών. Σε απουσία ή έλλειψη αυτού προκαλείται μείωση της πυκνότητας της σπονδυλικής στήλης, ενώ σε υπερέκφραση δεν είναι γνωστό ακόμα αν μπορεί να τροποποιήσει αντιστοίχως τον εγκέφαλο^[81]. Επίσης, παρατηρείται αυξημένη δραστηριότητα και κινητικότητα και στα TE, δεδομένου ότι τα piRNA παράγονται από αυτά^[31]. Ένα ακόμη παράδειγμα αποτελεί η σημαντική συσχέτιση των *de novo* μεταλλάξεων των PIWIL2 (MILI) και PIWIL4 (MIWI2) με διαταραχές του αυτισμού^[27].

3.2.2. Νευροεκφυλιστικές διαταραχές

Απορρύθμιση των οδών piRNA με παθολογική έκφραση των PIWI οδηγεί σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές όπως η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) και οι άνοιες με συναθροίσεις παθολογικής πρωτεΐνης Tau (Tauopathies, Tau-πάθειες).

I. Αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση

Στην ALS δημιουργούνται διαταραχές στους κινητικούς νευρώνες, με την προσβολή των νευρώνων να οφείλεται στην άτυπη μετατόπιση και συσσώρευση των προ-piRNA στο κυτταρόπλασμα των προσβεβλημένων νευρώνων^[27]. Η ALS είναι μία προοδευτική νόσος που προκαλεί διαταραχές στην κίνηση, όπου παρατηρούνται ελαττώματα των νευρομυϊκών συνδέσεων

στους κινητικούς νευρώνες. Στη νόσο αυτή συσσωρεύονται οι πρωτεΐνες FUS, Cabeza (Caz, ορθόλογο της FUS) και TDP-43 που φυσιολογικά εντοπίζονται στον πυρήνα και συμμετέχουν στο μεταβολισμό του RNA. Η πρωτεΐνη Caz εμπλέκεται σε μηχανισμούς που αφορούν τη δυσλειτουργία στην κίνηση με διαταραχή των νευρομυϊκών συνδέσμων, αλληλεπιδρά με γονίδια που σχετίζονται με το μονοπάτι piRNA (Aub, Ago3, Wde και Rhino) και συνδέεται με μεταγραφόμενα προ-piRNA για την καταστολή της έκφρασής τους στο ΚΝΣ. Στην παθολογία της νόσου, ύστερα από μελέτη σε τεχνητή απενεργοποίηση της πρωτεΐνης Caz στη *Drosophila*, ανακαλύφθηκε πως τα προ-piRNA υπερεκφράζονται διεγείροντας τη συσσώρευση των Caz και Aub στο κυτταρόπλασμα και οδηγώντας σε μορφολογικά και κινητικά ελαττώματα των νευρομυϊκών διασταυρώσεων [31].

II. Άνοιες με συναθροίσεις παθολογικής πρωτεΐνης Ταυ

Οι άνοιες με συναθροίσεις παθολογικής πρωτεΐνης Ταυ αποτελούν ένα σύνολο νευροεκφυλιστικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από παθολογική εναπόθεση της πρωτεΐνης Ταυ στον εγκέφαλο. Στους επιγενετικούς μηχανισμούς των Ταυ-παθειών περιλαμβάνεται η αποσυμπύκνωση της ετεροχρωματίνης, η παρεκκλίνουσα ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου, η εξάντληση των Piwi και των piRNA, και η επακόλουθη δυσλειτουργία των μεταθετών στοιχείων, κάτι το οποίο αποδεικνύεται καταστροφικό για τους νευρώνες. Η αποσυμπύκνωση της ετεροχρωματίνης ως στοιχειώδες γεγονός για την καταστροφή των νευρώνων πιθανόν προκαλεί επιγενετική απενεργοποίηση των TE στη νόσο Alzheimer αλλά και στις υπόλοιπες Ταυ-πάθειες. Επίσης, παρατηρείται αυξημένη έκφραση των TE της κατηγορίας των μεταγράφων από ρετροϊούς στην AD και την προοδευτική υπερπυρηνική παράλυση, με την έκτοπη έκφραση του ανθρώπινου ενδογενούς ρετροϊού τύπου K (human endogenous retrovirus type K, HERV-K) να έχει βρεθεί ότι προκαλεί προοδευτική κινητική δυσλειτουργία σε ποντίκια^[14].

Η νόσος Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) είναι μία πολυπαραγοντική, ετερογενής και προοδευτική και η πιο κοινή νευροεκφυλιστική διαταραχή, και αποτελεί το συνηθέστερο αίτιο άνοιας στην τρίτη ηλικία. Η AD χαρακτηρίζεται από: 1) σταδιακή μείωση της εκτελεστικής λειτουργίας (σχεδιασμός και επίλυση προβλημάτων), αλλά και των διαστάσεων γνωστικής απόδοσης (όπως χωρική επίγνωση και επεισοδιακή μνήμη), 2) διαταραχές στις επικοινωνιακές δεξιότητες όπως στην κατανόηση αλλά στην προφορική και γραπτή έκφραση, 3) διαταραχές κοινωνικής συμπεριφοράς, δηλαδή κοινωνική απομόνωση και ελαττωματική κοινωνική γνώση, και 4) σύγχυση και ψυχιατρικά συμπτώματα, όπως ψύχωση, απάθεια, κατάθλιψη και επιθετικότητα. Η παθολογία της AD βασίζεται στην εναπόθεση πλακών β-αμυλοειδούς, στα νευροϊνιδιακά

πλέγματα που αποτελούνται από υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Ταυ, στη νευροφλεγμονή και στο θάνατο των νευρικών κυττάρων. Οι παθολογικές αλλοιώσεις αναπτύσσονται με την πάροδο του χρόνου, σταδιακά, και όχι κατά την περίοδο εμφάνισης των κλινικών συμπτωμάτων. Ως εκ τούτου η διάγνωση της νόσου είναι δύσκολη στο προκλινικό στάδιο, και γι' αυτό έχει προκύψει μεγάλο ενδιαφέρον για μοριακούς βιοδείκτες όπως είναι τα ρiRNA^{[82],[83]}.

Παθολογική συμπεριφορά της πρωτεΐνης Ταυ παρατηρήθηκε όταν ανιχνεύθηκε επαρκής ποσότητα ρiRNA σε εξωσώματα που προέρχονταν από εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY). Τα ρiRNA αυτά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αστάθεια του γονιδιώματος και επομένως στην παθογένεση της νόσου. Τροποποιήσεις των ρiRNA αντικατοπτρίζουν το βαθμό αστάθειας του γονιδιώματος των νευρικών κυττάρων και αλλαγές στην κυτταρική σηματοδότηση. Ωστόσο, ο συνολικός τρόπος δράσης αυτών των μικρομορίων δεν είναι πλήρως διασαφηνισμένος και απαιτείται περισσότερη έρευνα^[82].

Γενικά, τα ρiRNA είναι άφθονα στον ανθρώπινο εγκέφαλο εμπλουτίζοντας τον φλοιό και τον υπόκαμπο, και αλληλεπιδρώντας με το CREB και το miR-124 στον έλεγχο του σχηματισμού μνήμης που εξαρτάται από την εμπειρία. Βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτά τα ρiRNA με τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σχετιζόμενες με ποικίλες νευροεκφυλιστικές και νευροψυχιατρικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένης της AD, και με την έκφραση του γονιδίου *APOE* στους εγκεφάλους. Το γονίδιο *APOE* αποτελεί το πιο ισχυρό και καλά αναγνωρισμένο γονίδιο-δείκτη κινδύνου της AD, ενώ το *BACE1* εμπλέκεται και αυτό στη νόσο^{[83],[84]}. Επιπλέον, η ελαττωμένη έκφραση των ρiRNA επιτρέπει την ενεργοποίηση των TE με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη μετακίνησή τους, και την αποσταθεροποίηση σε γονιδιωματικό και κυτταρικό επίπεδο. Ο επιγενετικός μηχανισμός πρόκλησης της AD στηρίζεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου *Tau* και ο θάνατος των νευρώνων στον υπόκαμπο οφείλεται στα νευρωνικά έγκλειστα σωμάτια Ταυ. Όταν δημιουργούνται συσσωματώματα Ταυ, προκαλείται αποσυμπύκνωση της ετεροχρωματίνης και τελικά εξάντληση των Ρiwi. Επίσης, μεταλλάξεις στο γονίδιο *flam* που κωδικοποιεί κάποιο παθολογικό ρiRNA, μαζί με την παθολογική έκφραση του TauR406W, ενεργοποιούν τον κυτταρικό κύκλο και το θάνατο νευρωνικών κυττάρων με κάποιες αποκλίσεις^{[31],[84]}.

Ένας ακόμα μηχανισμός πρόκλησης της AD πιθανόν προέρχεται από το συσχετισμό του συμπλόκου Ρiwi / ρiRNA, όπως το ρiRNA DQ541777, με τη διαμόρφωση των ακανθών των δένδριτών του νευρικού συστήματος, και συγκεκριμένα με αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη Αστροτακτίνη (για μετανάστευση) αλλά και με διάφορες άλλες πρωτεΐνες που βρίσκονται υπό τον έλεγχο των miRNA^{[83],[84]}.

Κατά τη μελέτη των στόχων των piRNA στον εγκέφαλο, βρέθηκε πως αυτοί αφορούν την απόπτωση και τον νευροεκφυλισμό από την οξειδωτική καταπόνηση (στρες). Τέλος, παρατηρήθηκε αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης τριών piRNA (piR-38240, piR-34393, piR-40666) και τριών γονιδίων στόχων (*CYCS*, *KPNA6*, *RAB11A*) που παίζουν ρόλο στην AD^[85].

Η νόσος Parkinson (Parkinson's disease, PD) αποτελεί μία σύνθετη, και τη δεύτερη κοινή, νευροεκφυλιστική νόσο μεταξύ των ατόμων της τρίτης ηλικίας, προκαλώντας διαταραχές στους νευρώνες, οι οποίες οδηγούν σε προοδευτική διαταραχή της κίνησης, αν και η εμφάνιση συμπτωμάτων που δε σχετίζονται με την κίνηση μπορεί επίσης να είναι σοβαρή. Οι κινητικές διαταραχές θεωρείται ότι προέρχονται από μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες ή/και από τη συσσώρευση της προσυναπτικής πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης των σωματίων Lewy στον μέσο εγκέφαλο.

Η ρύθμιση των piRNA στον εγκέφαλο ασθενών με PD παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων και το επίπεδο διαφοροποίησής τους. Δηλαδή, ορισμένα piRNA που προέρχονται από τα SINE και τα LINE εκφράζονται λιγότερο σε ινοβλάστες, σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (Induced Pluripotent Stem Cell, iPSC) και σε διαφοροποιημένα νευρωνικά κύτταρα, ενώ τα piRNA σε νευρώνες που διαφοροποιήθηκαν από iPSC και τους εγκεφαλικούς ιστούς υπερεκφράζονται και χαρακτηρίζονται από αυξημένη περιεκτικότητα σε κυτοσίνη εντός των πρώτων 2-9 bp. Αυτές οι διαταραχές στην έκφραση των piRNA υποδηλώνουν την αδυναμία των νευρώνων να αποσιωπήσουν σωστά τα προαναφερόμενα μεταθετά στοιχεία.

Πιθανή εμπλοκή των piRNA παρατηρείται στη μεθυλίωση της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου *CREB2*, μέσω του οποίου ρυθμίζεται η συναπτική πλαστικότητα των νευρώνων της *Aplysia* κατά το σχηματισμό της μνήμης και σε απόκριση της σεροτονίνης, αλλά και στην απενεργοποίηση των γονιδίων της οδού CREB. Ωστόσο δεν υπάρχει ακόμα πλήρης εικόνα για τον τρόπο δράσης των piRNA ως προς τη PD, και χρειάζεται περισσότερη έρευνα ^{[31],[86],[87]}.

III. Εγκεφαλικό επεισόδιο

Στο εγκεφαλικό επεισόδιο, όπως και σε όλες τις οξείες βλάβες του ΚΝΣ, εντοπίζεται τροποποίηση στην έκφραση γονιδίων με ρυθμιστικούς ρόλους σε διεργασίες που προωθούν το θάνατο των νευρώνων ή/ και την πλαστικότητα μετά από τραυματισμό, όπως η φλεγμονή, η νευρογένεση και η οξειδωτική καταπόνηση. Διάφορα πειράματα που αφορούν το ισχαιμικού τύπου αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο έδειξαν σημαντική μεταβολή στα πρότυπα έκφρασης των piRNA στον εγκέφαλο (είτε αυξήθηκαν, είτε μειώθηκαν). Σκοπός αυτής της έκφρασης αποτελεί η ρύθμιση

των τρoνσποζονίων και η διατήρηση της γονιδιακής ακεραιότητας του εγκεφάλου^[88]. Επίσης, αποκαλύφθηκε πως διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες ελέγχουν την έκφραση των ρiRNA που ανταποκρίνονται στο εγκεφαλικό επεισόδιο^[89].

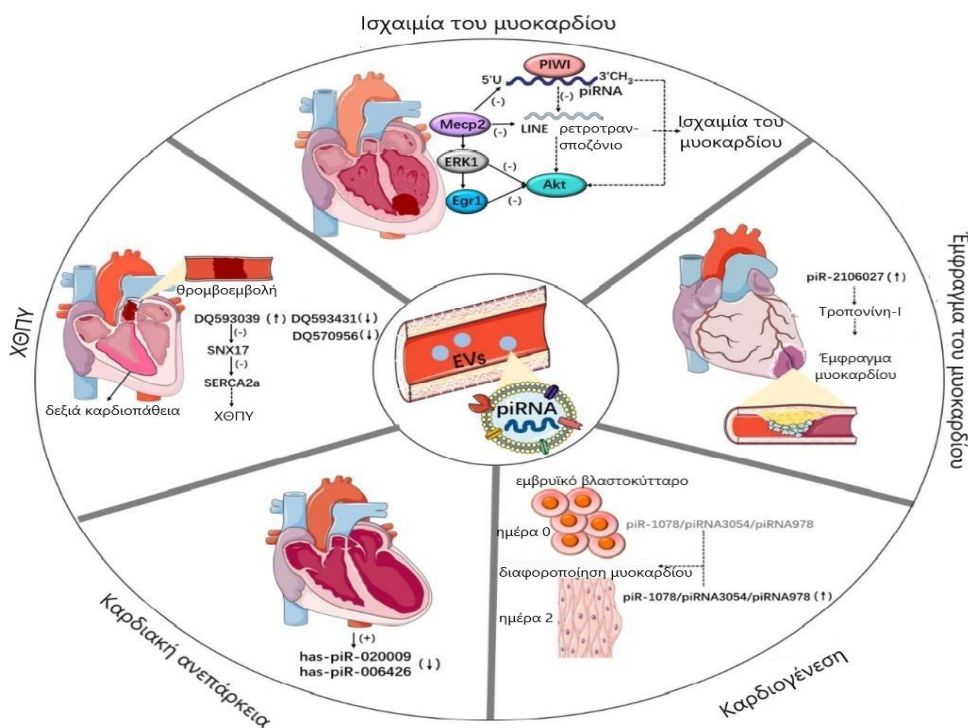
3.3 Νοσήματα του καρδιαγγειακού συστήματος

Τα εκφραζόμενα στα καρδιακά κύτταρα ρiRNA μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της υπερτροφικής καταπόνησης. Επίσης, η πρωτεΐνη PIWIL2 επηρεάζει την έκφραση της οδού σηματοδότησης Stat3 / Bcl-X, ενώ μειώνει την έκφραση του γονιδίου Akt. Η οδός αυτή σχετίζεται με την καρδιακή παθοφυσιολογία. Άλλοι ρόλοι του μονοπατιού ρiRNA/PIWI περιλαμβάνουν την αποπτωτική ρύθμιση στην καρδιακή υπερτροφία, τη σηματοδότηση Akt, την αναστολή των LINE και την έκφραση του DNMT3A / B (όπως το ρiRNA-823). Μέσω του τελευταίου μηχανισμού ρυθμίζεται η σηματοδότηση του DNMT3A/B RASSF1A-ERK1/2. Το RASSF1A είναι μία ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που παράγεται κατά τη διάρκεια καρδιακών παθήσεων. Επιπλέον, υπάρχει μία κατηγορία sncRNA στα καρδιακά υπερτροφικά κύτταρα, τα οποία, αν και μοιάζουν με ρiRNA, παρουσιάζουν μειωμένη προτίμηση για 1U και αυξημένη για 10A. Ορισμένα είδη ρiRNA, πιθανόν, παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς συγκεκριμένα όργανα ή καταστάσεις, και μεταβάλλονται υπό συνθήκες καταπόνησης. Τα ρiRNA στον καρδιακό μυ γενικά παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων, όπου παρουσιάζεται ένα μοναδικό μοτίβο κατά τη διάρκεια της εγκάρσιας συστολής της αορτής στην καρδιακή υπερτροφία, και τέλος διαφοροποιείται σε σχέση με άλλα όργανα^{[33],[36]}.

Κατόπιν μελέτης εξωσωμάτων ορού από ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια και από υγιείς εθελοντές, παρατηρήθηκε δραματική διαφορά στην έκφραση των ρiRNA των εξωσωμάτων, και ειδικότερα 585 ρiRNA αυξορυθμίστηκαν και 4.623 ρiRNA μειορυθμίστηκαν σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια. Μεταξύ εκείνων που μειορυθμίστηκαν, τα has-ρiR-020009 και has-ρiR-006426 ήταν τα πιο μειωμένα^[90]. Τα εξωσώματα είναι μικρά οργανίδια, διαμέτρου 30-200 nm, τα οποία απελευθερώνονται από κάποιο κύτταρο και εμπλουτίζονται από εξειδικευμένα νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια και γλυκοσυζεύγματα. Τα εξωσώματα είναι χρήσιμα για διακυτταρικές μεταφορές μορίων και εμπλέκονται στην ανθρώπινη υγεία αλλά και σε παθήσεις^[91].

Η χρόνια θρομβοεμβολική πνευμονική υπέρταση ταξινομείται ως τέταρτου βαθμού πνευμονική υπέρταση και είναι μια διαταραχή των πνευμονικών αγγείων. Η παθοφυσιολογία της νόσου βασίζεται στην σταδιακή θρομβοεμβολική απόφραξη των πνευμονικών αρτηριών και αύξηση της μέσης πνευμονικής αρτηριακής πίεσης οδηγώντας τους πάσχοντες σε καρδιακή

ανεπάρκεια. Όπως παρατηρήθηκε, η συγκέντρωση των piRNA σε ομάδα ατόμων με χρόνια θρομβοεμβολική πνευμονική υπέρταση ήταν υψηλή. Συγκεκριμένα, 21 piRNA ή συστάδες piRNA, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα DQ593039, DQ593431, DQ593431 και DQ570956, βρέθηκαν να απορρυθμίζονται. Επιπλέον βρέθηκε ότι το DQ593039, ένα piRNA το οποίο σχετίζεται με εξωκυτταρικά κυστίδια και υπερεκφράζεται στη χρόνια θρομβοεμβολική πνευμονική υπέρταση, ρυθμίζει την έκφραση της πρωτεΐνης sorting nexin 17 (SNX17), η οποία εκφράζεται αντιρροπιστικά ως προς την αρρυθμία με συντήρηση της πρωτεΐνης SERCA2a στο έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η συνύπαρξη της παθολογικής έκφρασης του DQ593039 με άλλες κλινικά σημαντικές παραμέτρους, όπως η πνευμονική αγγειακή αντίσταση και η συστολική πίεση δεξιάς κοιλίας, καθιστούν το συγκεκριμένο piRNA ως έναν πολλά υποσχόμενο μη επεμβατικό βιοδείκτη για την αξιολόγηση του βαθμού νοσηρότητας σε ασθενείς με καρδιολογικές και πνευμονικές παθήσεις^[92]. Ακόμη, το piR_2106027 αυξορρυθμίζεται σημαντικά σε ασθενείς που έχουν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου και φαίνεται να συσχετίζεται με την τροπονίνη I που εκλύεται λόγω βλάβης του μυοκαρδίου^[35] (Εικόνα 4).



Εικόνα 4 Τα piRNA ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι για καρδιαγγειακά νοσήματα. Τα piRNA μπορούν να ρυθμίσουν την ισχαιμία του μυοκαρδίου στην οδό Akt. Το piRNA DQ593039 αναγνωρίστηκε ότι δυνητικά μπορεί να παίζει κάποιον ρόλο στη ρύθμιση της εξέλιξης της χρόνιας θρομβοεμβολικής πνευμονικής υπέρτασης (ΧΘΠΥ) μέσω του SNX17 και τη μειорύθμιση του SERCA. Κατά τη διαδικασία της καρδιακής ανάπτυξης βρέθηκε ότι τα piRNA εκφράζονται διαφορετικά, όπως για παράδειγμα ισχύει για τα piR-1078, oocyte piR-3054 και oocyte piR-978. Επιπλέον, το piR-2106027 φαίνεται να προκαλεί την εμφάνιση και ανάπτυξη εμφράγματος του μυοκαρδίου μέσω της τροπονίνης-1. Ομοίως, η μειорύθμιση των hsa-piR-020009 και hsa-piR-006426 συμμετέχει επίσης ενδεχομένως στην πρόκληση καρδιακής ανεπάρκειας. (Προσαρμογή από [93]).

3.4 Αυτοάνοσα νοσήματα

3.4.1 Ρευματικά νοσήματα

Οι ρευματικές ασθένειες αποτελούν ένα σύνολο χρόνιων αυτοάνοσων φλεγμονωδών διαταραχών ως αποτέλεσμα διαταραχών του ανοσοποιητικού συστήματος, οι οποίες προκαλούν τελικά εκτεταμένες ιστικές βλάβες. Οι κύριοι εκπρόσωποι των ρευματικών ασθενειών είναι: η ρευματοειδής αρθρίτιδα (rheumatoid arthritis, RA), ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (systemic lupus erythromatosus, SLE), η ιδιοπαθής φλεγμονώδης μυοπάθεια (idiopathic inflammatory myopathy, IIM), η συστηματική σκλήρυνση (systemic sclerosis, SSc) και το σύνδρομο Sjogren (Sjögren's syndrome, pSS). Τα αίτια των νοσημάτων δεν έχουν προσδιοριστεί, ωστόσο εμπλέκονται επιγενετικοί μηχανισμοί μεταξύ των οποίων και τα piRNA.

Στην RA εντοπίζονται συστηματική φλεγμονή και καταστροφή των αρθρώσεων κυρίως από τους αρθρικούς ινοβλάστες (synovial fibroblasts, SF). Οι SF εκκρίνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, προσελκύοντας φλεγμονώδη κύτταρα, και καταστρέφοντας αρθρώσεις και χόνδρους^{[94],[95]}. Τα piRNA εκφράζονται σε ασθενείς με RA και οστεοαρθρίτιδα (osteoarthritis, OA) σε αρθρικούς ιστούς και αρθρικούς ινοβλάστες, με το piR-16735 να αντιστοιχεί έως και στο 20% των συνολικά εκφραζόμενων piRNA, και τα piR-18570, piR-17724 και piR-20388 στο 5% το καθένα. Ωστόσο, δεν φαίνεται να συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό των αρθρικών ινοβλαστών στην RA^[94].

Όπως αποδείχθηκε, οι πρωτεΐνες PIWIL2 και PIWIL4 εκφράζονται στην RA, και στο αρθρικό υγρό στην οστεοαρθρίτιδα (OASF), ενώ υφίστανται ρύθμιση στα αρθρικά υγρά (ή στους ινοβλάστες) της RA (RASf) και της OA. Η αυξημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με φλεγμονή στους RASf και τους OASF υποδηλώνει ότι αυτά τα γονίδια μπορεί να εμπλέκονται σε οδούς σηματοδότησης για την άμυνα του ξενιστή και τη φλεγμονή. Ωστόσο, δεν παρατηρούνται αλλαγές στον πολλαπλασιασμό των RASf, αλλά ούτε και στη μεθυλίωση και την έκφραση του LINE-1 στους RASf κατά την αποσιώπηση των PIWIL2 και 4 από άλλα πιθανά αίτια.

Στην ίδια έρευνα επίσης παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης 300 piRNA με κάποιον πιθανό κοινό μηχανισμό ρύθμισης, καθώς επίσης και διαφορετική ρύθμιση των piRNA-823, -4153 και -16659 στους RASf συγκριτικά με τους OASF. Επιπλέον, παρατηρείται επαγωγή του piR-16659 από τον υποδοχέα του πολυϊνσινικού: πολυκυτιδικού οξέος [Polyinosinic:polycytidylic acid, Poly(I:C)], υποδεικνύοντας έναν γενικότερο ρόλο στη σηματοδότηση του υποδοχέα TLR και την εμπλοκή των piRNA στην ανοσία και στην ανάπτυξη της RA^[95].

3.5 Μεταβολικά νοσήματα

3.5.1 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης (diabetes mellitus, DM) τύπου II χαρακτηρίζεται από μειωμένη απόκριση των κυττάρων-στόχων της ινσουλίνης και από ελαττωμένη έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα των νησίδων Langerhans του παγκρέατος. Οι νησίδες του παγκρέατος φυσιολογικά εκκρίνουν ορμόνες ως απόκριση σε διάφορες διατροφικές καταστάσεις. Μία ομάδα κυττάρων των νησίδων, τα β-κύτταρα, εκκρίνουν ινσουλίνη, και όταν αυτά απορρυθμίζονται οδηγούν στην ανάπτυξη διαβήτη υπό συνθήκες μειωμένης ανοχής στη γλυκόζη.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η συμμετοχή των piRNA στη λειτουργία των β-κυττάρων και στην ανάπτυξη του διαβήτη τύπου II, έγιναν πειράματα σε αρουραίους που αποκάλυψαν την παρουσία 18.000 piRNA στις νησίδες του παγκρέατος, τα οποία παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση στη φάση του διαβήτη. Παρατηρήθηκε επίσης, ελαττωμένη έκφραση των επιπέδων των piRNA μέσω καταστολής των γονιδίων *Piwi2* ή *Piwi4*. Η αποσιώπηση των γονιδίων αυτών οδήγησε επιπλέον σε δυσλειτουργική έκκριση ινσουλίνης και αυξημένη αντίσταση των κυττάρων στον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από κυτταροκίνη, υποδηλώνοντας ότι αυτές οι πρωτεΐνες συμβάλλουν στην εκκριτική ικανότητα των β-κυττάρων. Αδυναμία απελευθέρωσης επαρκούς ποσότητας ινσουλίνης που προκαλείται από γλυκόζη προκλήθηκε επίσης και από τον εμπλουτισμό των piRNA DQ732700 και DQ746748 σε διαβητικούς αρουραίους, μέσω όχι ιδιαίτερα κατανοητών μηχανισμών. Πιθανόν, αυτά τα piRNA στοχεύουν γονίδια που αφορούν τις λειτουργίες της ινσουλίνης ή την πέψη των υδατανθράκων^[96]. Ακόμη, ένα επιπλέον piRNA, το piRNA-48383, επίσης παίζει ρόλο στην αντίσταση στην ινσουλίνη σε ασθενείς με μεταβολικά νοσήματα^[97].

Μία ιδιαίτερως σοβαρή μικροαγγειακή επιπλοκή του σακχαρώδη διαβήτη είναι η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (diabetic retinopathy, DR) η οποία χαρακτηρίζεται από διάσπαση του φραγμού αμφιβληστροειδούς-αίματος και υπερβολική νεοαγγείωση, οδηγώντας σε ολική τύφλωση σε ενήλικες. Η παθογένεση της DR είναι πολυπαραγοντική και έχουν αναγνωριστεί ελάχιστοι επιγενετικοί μηχανισμοί όπως η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και η ρύθμιση μέσω miRNA και piRNA. Η οδός piRNA/PIWI φαίνεται ότι εκτός από την εμπλοκή της σε λειτουργίες των β-κυττάρων των νησίδων του παγκρέατος και στην παθογένεια του σακχαρώδη

διαβήτη τύπου II, συμμετέχει και στην ανάπτυξη του φακού του αμφιβληστροειδούς χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί η παθοφυσιολογία της DR ως προς τα piRNA^{[98],[99]}.

Η πρωτεΐνη HIWI2 είναι σημαντική για τη διατήρηση της επιθηλιακής ακεραιότητας, καθώς σε καταστολή της διαταράσσονται τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών στενής σύνδεσης (tight junction, TJ) μέσω παρατεταμένης φωσφορυλίωσης των οδών σηματοδότησης Akt και GSK3a / b. Οι TJ σχηματίζουν τον εξωτερικό φραγμό αμφιβληστροειδούς-αίματος, οπότε όταν παρεκκλίνουν από το φυσιολογικό προκαλούνται και οι αντίστοιχες παθήσεις όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και ο εκφυλισμός της ωχράς κηλίδας^[100].

Όταν μελετήθηκε η συμπεριφορά της πρωτεΐνης HIWI2 (PIWIL4) στην πολλαπλασιαστική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (proliferative DR, PDR), αναφέρθηκε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης HIWI2 στο υαλώδες σώμα ασθενών με PDR. Η HIWI2 φαίνεται να επηρεάζεται θετικά από την παρουσία των ενήλικων κυττάρων επιθηλίου χρωστικής αμφιβληστροειδούς (adult retinal pigment epithelial cells, ARPE19), και όταν αυτά τα κύτταρα εκτίθενται σε οξειδωτική καταπόνηση και από τον VEGF, ο οποίος σχετίζεται με την πρόκληση αγγειογένεσης στην DR. Τροποποιήσεις στα επίπεδα έκφρασης της HIWI2 μπορούν να επηρεάσουν παραμέτρους που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου, όπως αλλαγές στην έκφραση των αυξητικών παραγόντων VEGF και TGFβ1 σε ARPE19, των δεικτών EMT E-καντερίνη και αSMA, του MMP9 (που σχετίζεται και αυτό με την αγγειογένεση) στα κύτταρα Si-HIWI2, και στη μετανάστευση των κυττάρων ARPE19. Επομένως, η πλήρης κατανόηση της λειτουργίας της HIWI2 στον αμφιβληστροειδή θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο της αμφιβληστροειδοπάθειας. Η πρωτεΐνη HIWI2 ασκεί μεγάλη επιρροή σε βασικούς παράγοντες για την DR και την αγγειογένεση, και γι' αυτό πρέπει να μελετηθεί περισσότερο η χρήση τους σε θεραπευτικές μεθόδους^[99].

3.6 Λοιμώδη νοσήματα

3.6.1 Φυματίωση

Η φυματίωση, με τον αιτιολογικό παράγοντα *Mycobacterium tuberculosis*, είναι μία ασθένεια με υψηλό μολυσματικό φορτίο, γεγονός που την καθιστά για χιλιάδες χρόνια έως και σήμερα μία από τις δέκα κορυφαίες αιτίες θανάτου σε παγκόσμιο επίπεδο. Η μετάδοση του μικροβίου επιτυγχάνεται μέσω της αναπνευστικής οδού, από μολυσματικά σταγονίδια που αποβάλλονται

από το φορέα, προσβάλλοντας έτσι το αναπνευστικό σύστημα και άλλα όργανα. Επομένως, υπάρχει ακόμα μεγάλη ανάγκη ανεύρεσης διαγνωστικών βιοδεικτών για τη λανθάνουσα και την ενεργή φάση της λοίμωξης. Τα μόρια RNA είναι πολλά υποσχόμενα σε αυτήν την αναζήτηση, με τα miRNA να επικρατούν, και τα snoRNA και piRNA να ακολουθούν. Τα μόρια αυτά παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ υγιών και νοσούντων ατόμων. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις των piRNA στα μολυσμένα κύτταρα των ξενιστών δημιουργούνται είτε ως μηχανισμός παράκαμψης των μικροβίων, είτε λόγω κυτταρικής καταπόνησης. Θεωρείται πιθανή η διαμεσολάβηση των piRNA σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών, χωρίς όμως να υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες^{[101],[102]}.

3.6.2 Ελονοσία

Η ελονοσία είναι μία λοιμώδης ασθένεια που προσβάλλει τον άνθρωπο και έχει παγκόσμια επίπτωση. Προκαλείται από το πρωτόζωο του γένους *Plasmodium*, με το είδος *Plasmodium falciparum* να προκαλεί τη σοβαρότερη κλινική εικόνα. Η μετάδοση πραγματοποιείται μέσω των θηλυκών κουνουπιών του γένους *Anopheles*, προσβάλλοντας τα ερυθρά αιμοσφαίρια του οργανισμού-ξενιστή. Η λοίμωξη αναπτύσσεται σε δύο φάσεις: την εξωερυθροκυτταρική ή ηπατική φάση και την ερυθροκυτταρική φάση. Το πρωτόζωο *P. falciparum* χρησιμοποιεί ποικίλους μηχανισμούς προκειμένου να διαφοροποιηθεί, να εξελιχθεί και να μολύνει νέα κύτταρα^[103]. Ένας από τους μηχανισμούς που έχουν μελετηθεί είναι η απελευθέρωση μικρών εξωκυτταρικών κυστιδίων από μολυσμένα ερυθρά αιμοσφαίρια (infected red blood cells, iRBCs) *in vitro*, τα οποία διακινούν φορτία μεταξύ των κυττάρων και είναι απαραίτητα για την επικοινωνία των παρασίτων, με άγνωστη ωστόσο σύσταση^[104]. Τα εξωκυτταρικά κυστίδια συμβάλλουν στην πρόσληψη των ασεξουαλικών μορφών του πλασμοδίου από το κουνούπι. Σε εξωκυτταρικά κυστίδια μετά από καλλιέργεια μολυσμένων ερυθροκυττάρων ανιχνεύθηκε RNA ανθρώπινης προέλευσης, και συγκεκριμένα ρυθμιστικά RNA των κατηγοριών miRNA, tRNA, Y-RNA, vRNA, snoRNA και piRNA, καθώς επίσης και 120 RNA πλασμοδικής προέλευσης, καθιστώντας τα χρήσιμα για την παρακολούθηση και την πορεία της ασθένειας ως βιοδείκτες, διότι η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα είναι αναλογικά αυξημένη σε σχέση με τη σοβαρότητα της νόσου. Τα τελικά αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία 44 piRNA, με τα PIR13807, PIR58593 και PIR57690 να καταλαμβάνουν το 33% του συνόλου^[103].

3.6.3 Νόσος Chagas

Το *Trypanosoma cruzi*, ο παρασιτικός παράγοντας της καρδιακής νόσου Chagas προκαλεί σοβαρή νοσηρότητα και θνησιμότητα παγκοσμίως. Το πρωτόζωο μπορεί να προσβάλει την καρδιά, το νευρικό σύστημα ή τη γαστρεντερική οδό, οδηγώντας σε αντίστοιχα συμπτώματα και δυσλειτουργίες. Κάποιες από τις καρδιακές παθήσεις που σχετίζονται με τη νόσο είναι η μυοκαρδίτιδα, η υπερτροφία του μυοκαρδίου, η αγγειΐτιδα και η ίνωση, οδηγώντας τελικά σε καρδιακή ανεπάρκεια. Το *T. cruzi* επεμβαίνει στη λειτουργία των πρωτογενών ανθρώπινων καρδιομυοκυττάρων (primary human cardiac myocytes, PHCM), απορρυθμίζοντας το προφίλ γονιδιακής έκφρασης από τα αρχικά κιάλας στάδια της μόλυνσης. Ειδικότερα, η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται μέσω της απορρύθμισης των piRNA, και κυρίως εκείνων που προέρχονται από LTR και LINE, στα πρώιμα στάδια της τρυπανοσωμίας, για την απόκτηση ενός εξελικτικού πλεονεκτήματος. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι το *T. cruzi* απορρύθμισε το προφίλ έκφρασης των piRNA στα PHCM και προκάλεσε διαφορετική έκφραση 217 μοναδικών piRNA, με κάποια από αυτά να είναι γνωστά και άλλα νέα, κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης της μόλυνσης. Επίσης, αυτά τα piRNA ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων, όπως τα *NFATC2*, *FOS* και *TGF-β1*, που έχουν βιολογική σημασία για την πορεία της λοίμωξης, καθιστώντας τα σημαντικούς βιοδείκτες τουλάχιστον για τα πρώιμα στάδια της λοίμωξης^[105].

3.6.4 Ιογενής μυοκαρδίτιδα

Ο ιός Coxsackie B3 (Coxsackievirus B3, CVB3) είναι ένας RNA ιός θετικής πολικότητας, ανήκει στην οικογένεια των Picornaviridae και το γονιδιώμά του πακετάρεται σε εικοσαεδρική συμμετρία χωρίς φάκελο. Ο CVB3 αποτελεί το αίτιο της μυοκαρδίτιδας σε βρέφη και εφήβους.

Όταν κύτταρα HeLa μολύνθηκαν με τον ιό παρατηρήθηκε τροποποίηση των επιπέδων έκφρασης 13 piRNA στην καρδιά και το πάγκρεας με σκοπό τη διακοπή του ιικού πολλαπλασιασμού. Τέσσερα από αυτά παρουσίασαν υψηλότερη έκφραση σε σχέση με το φυσιολογικό, όπως τα hsa_piR_019914 και hsa_piR_014620, ενώ τα hsa_piR_001169, hsa_piR_017458, hsa_piR_020365 και hsa_piR_018570 μειορρυθμίστηκαν. Γνωρίζοντας πως οι πηγές των piRNA μπορεί να είναι RNA των τύπων lncRNA, snRNA και rRNA, θεωρείται πως δύο νέα piRNA, τα novel_pir193625 και novel_pir154199, παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της ωρίμανσης του ριβοσώματος ή της πρωτεϊνοσύνθεσης σε κύτταρα μολυσμένα με CVB3. Επομένως, τα περισσότερα από τα

προαναφερθέντα ριRNA, συμπεριλαμβανομένου και του novel_pir72009, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικοί βιοδείκτες μόνο στο CVB3 μεταξύ των εντεροϊών.

Όπως διαπιστώθηκε, τα novel_pir223178 και novel_pir193625 αναγνώρισαν το επαναλαμβανόμενο στοιχείο LINE-1 υποθέτοντας πως επιδιώκεται ο έλεγχος της μεταγραφής των L1 σε μόλυνση με τον CVB3. Ωστόσο, δεν έγινε γνωστό πώς θα μπορούσε να εξελιχθεί σε δυσλειτουργία των ριRNA στα μολυσμένα από CVB3 κύτταρα HeLa και 293T. Από την άλλη, τα novel_pir154199 και novel_pir72009 συσχετίστηκαν με τα ρετροτρανσποζόνια LTR / ERVK και LTR / ERVI αντίστοιχα, και τα επίπεδα έκφρασης των ριRNA διαφοροποιήθηκαν μετά από τη μόλυνση με τον ιό με σκοπό τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Ωστόσο, δεν υπάρχουν δεδομένα αν ο σκοπός είναι η διαίωσιση του ιού ή όχι^[106].

3.6.5 Νόσος του κοροναϊού 2019 (COVID-19)

Η νόσος του κοροναϊού 2019 (Coronavirus disease 2019, COVID-19) αποτελεί μία σύγχρονη πανδημία στην παγκόσμια ιστορία και προκαλείται από το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο του κοροναϊού 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2). Ο SARS-CoV-2, που αποτελεί μέλος του γένους Beta-coronavirus της οικογένειας Coronaviridae, περιβάλλεται από φάκελο και περιλαμβάνει ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας με μέγεθος από 25 έως 32 kb. Η ταχεία εξάπλωση του ιού από τα τέλη του 2019 αποτελεί μείζον πρόβλημα υγείας και γι' αυτόν το λόγο καταβάλλονται υπεράνθρωπες προσπάθειες περιορισμού του^[107]. Σε μία πρόσφατη έρευνα πάνω σε εξωσώματα / μικροκυτίδια νευρικών βλαστικών κυττάρων (neural stem-cells exosomes / microvesicles, NSC Ex / Mn) ποντικών έγινε μία προσπάθεια απόδειξης της ύπαρξης έμφυτων και προσαρμοστικών αντικών δράσεων από τον υποθάλαμο του εγκεφάλου προς το εγκεφαλονωτιαίο υγρό έναντι του ιού SARS-CoV-2. Δεδομένου ότι τα NSC είναι ικανά να παράγουν άφθονα Ex / Mn, τα ευρήματα χρησιμοποιούνται με σκοπό τη θεραπευτική χρήση των Ex / Mn, καθώς τα NSC Ex / Mn κατέχουν πληθώρα πλεονεκτημάτων, όπως σε θανατηφόρες παθήσεις. Ανακαλύφθηκε επίσης, ένας τεράστιος και ετερογενής αριθμός ριRNA, με ενδεχόμενο ρόλο στη ρύθμιση γονιδίων RNA αλλά και DNA ιών. Ως εκ τούτου, η ανοσία που πιθανόν προκαλείται με τη βοήθεια των ριRNA ως προέκταση της προσαρμοστικής ανοσίας και οι αντικές δράσεις των NSC Ex / Mn παρέχουν χρήσιμα εργαλεία για τη μελλοντική ανάπτυξη ενός εμβολίου RNA^[108].

3.7 Ανδρική υπογονιμότητα - Στειρότητα

Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μία πολυδιάστατη ανωμαλία της φυσιολογικής ανδρικής διαδικασίας σπερματογένεσης που μπορεί να οφείλεται σε ποικίλους παράγοντες, κληρονομικούς, επιγενετικούς ή περιβαλλοντικούς, ενώ μπορεί να είναι και ιδιοπαθής. Η άμυνα του γονιδιώματος έναντι της παρεκκλίνουσας έκφρασης των TE επιτυγχάνεται μέσα από προσαρμοστικές στρατηγικές σε μεταγραφικό επίπεδο, όπως οι τροποποιήσεις της μεθυλίωσης του DNA και των ιστονών, αλλά και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, όπως το σύστημα RNAi. Η ωρίμανση των αρσενικών γαμετικών κυττάρων στους όρχεις υφίσταται επιγενετικές διαδικασίες που περιλαμβάνουν την απαλοιφή - επανεγγραφή, όπως για παράδειγμα, οι μεταλλάξεις απαλοιφής στα γονίδια *Piwi1 / Miwi*, αλλά και άλλων γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Tudor, οδηγούν σε αναστολή της σπερματογένεσης των αρσενικών γαμετικών κυττάρων στο στάδιο των στρογγυλών σπερματίδων και υπόκεινται σε μείωση χωρίς επιμήκεις σπερματίδες ή ώριμη παραγωγή σπερματοζωαρίων.

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, ποντίκια knockout για τις *Mili* και *Miwi2* παρουσιάζουν διακοπή της σπερματογένεσης στα στάδια των σπερματοκυττάρων της παχυταινίας και του λεπτοταινίας, με διακοπή της μείωσης αντίστοιχα. Στη συνέχεια, στα στάδια της προ-σπερματογονίας / γονοκυττάρων, όταν πραγματοποιείται ο επαναπρογραμματισμός ανιχνεύονται TE λόγω έλλειψης σημάτων αποσιώπησης. Αν αυτό δεν διορθωθεί, το αποτέλεσμα είναι είτε η μεταβίβαση τροποποιημένου γονιδιώματος στην επόμενη γενιά, είτε η καταστροφή των γαμετικών κυττάρων και η πρόκληση στειρότητας^{[25],[109]}.

Τέλος, ανιχνεύονται piRNA εκτός κυττάρων στο ανθρώπινο σπέρμα, τα οποία συσχετίζονται με τη βιωσιμότητα του σπέρματος και μειώνονται σταδιακά από τους γόνιμους ασθενείς έως και τους ασθενείς με αζωοσπερμία. Έχουν προσδιοριστεί συνολικά 5 μόρια piRNA (*piR-31068*, *piR-31925*, *piR-43771*, *piR-43773* και *piR-30198*), τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν ως ειδικοί μη επεμβατικοί βιοδείκτες για την ανδρική υπογονιμότητα. Νέες μελέτες για τα piRNA θα πρέπει να ανοίξουν νέους δρόμους στην έρευνα και τη διάγνωση, καθώς μπορούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τις γονιδιακές διαταραχές και τη δυσλειτουργία στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα^[110].

3.8 Γήρανση

Ως γήρανση μπορεί να οριστεί η προοδευτική αύξηση της πιθανότητας θανάτου που προκαλείται από την έκπτωση σχεδόν όλων των σωματικών λειτουργιών. Πρόκειται για μία πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διαδικασία, με τα σωματικά κύτταρα να υφίστανται προοδευτική επιδείνωση, σε αντίθεση με τα κύτταρα της γαμετικής σειράς, τα οποία αντέχουν σε βάθος χρόνου λόγω διαιώνισης των ειδών. Μεταξύ των μοριακών μηχανισμών που ευθύνονται για τη γήρανση και συμμετέχουν σε αυτήν, συμπεριλαμβάνεται η οδός piRNA / PIWI και τα μεταθετά στοιχεία, όμως ο ακριβής ρόλος τους δεν έχει ερευνηθεί επαρκώς^{[111],[112]}.

Είναι γνωστό ότι η μετάθεση γενετικών στοιχείων επιταχύνει τη γήρανση μέσω των βλαβών που δημιουργούνται στο DNA, των μεταλλάξεων και των αλλαγών στη δομή της χρωματίνης, ενώ η έκφραση των PIWI μπορεί να περιορίσει τα ρετροτρανσποζόνια που σχετίζονται με την ηλικία και όλες τις επικείμενες γενετικές και επιγενετικές επιπλοκές. Επίσης, στα σωματικά κύτταρα, εν απουσία των piRNA/PIWI αυξάνεται η έκφραση των TE με την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης καθώς αυξάνεται η ηλικία του οργανισμού.

Βλάβες μπορούν να προκληθούν στο DNA λόγω είτε γενετικών είτε περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως είναι για παράδειγμα τα σύνδρομα επιταχυνόμενης γήρανσης και η ιονίζουσα ακτινοβολία. Τα σύνδρομα αυτά καταστρέφουν ουσιαστικά το γονιδίωμα είτε με μεταλλάξεις, είτε παρεμβαίνοντας στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Μελέτες που σχετίζονται με την επιμήκυνση της ζωής βασίζονται στον έλεγχο αυτών των βλαβών^{[111],[112]}.

Οι μεταλλάξεις προκαλούνται από λάθη κατά την αντιγραφή του DNA ή από τη μετάθεση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Μία ενδιαφέρουσα υπόθεση είναι ότι αυτές οι ενθέσεις των TE, όπως αυτή που οφείλεται στην αυξημένη κινητικότητα των LINE1 σε σωματικά κύτταρα με τη γήρανση, αποτελεί πρωταρχικό παράγοντα μεταλλάξεων και η αποσιώπηση αυτών από το σύμπλεγμα piRNA/PIWI θα μπορούσε να οδηγήσει στην αθανασία. Η γονιδιωματική αστάθεια λόγω μεταλλάξεων αυξάνεται με την ηλικία, επεμβαίνοντας κυρίως σε κωδικοποιητικές ή ρυθμιστικές αλληλουχίες. Ωστόσο, μεταλλάξεις συμβαίνουν έτσι και αλλιώς, ανεξάρτητα από τη δράση των TE, και επιδιορθώνονται επιτυχώς από τους κυτταρικούς μηχανισμούς. Παρόλα αυτά, ο ρυθμός μεταλλάξεων στα γαμετικά κύτταρα είναι διαφορετικός από τα σωματικά κύτταρα. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη δραστηριότητα των piRNA/PIWI έναντι των TE, αποτρέποντας τη συσσώρευση μεταλλάξεων με την ενηλικίωση^{[111],[112]}. Κατά την εισβολή ενός ιικού γονιδιώματος τύπου TE σε έναν ξενιστή, αυτό μεταφέρεται σε ομάδες piRNA εντός του DNA για τη διατήρηση αντιγράφων, ως μια γενετική βιβλιοθήκη, και την αξιοποίησή του σε μελλοντική εισβολή. Το

σύστημα αυτό, που μοιάζει με το ανοσοποιητικό, συγκρίνεται με το CRISPR/Cas που προστατεύει τα βακτήρια από τους φάγους^[113].

Η μεθυλίωση του DNA είναι μία διαδικασία που συνεισφέρει στη διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Με την αύξηση της ηλικίας, παρατηρούνται διαφορές στα πρότυπα έκφρασης της μεθυλίωσης, και με αυτή τη γνώση μπορεί να αξιολογηθεί η ηλικία των ιστών καθώς επίσης και η πρόγνωση της θνησιμότητας από οποιοδήποτε αίτιο. Τα piRNA είναι μόρια που καθοδηγούν τη διαδικασία της μεθυλίωσης και επομένως την προστασία του DNA από μεταβολές που εξαρτώνται από την γήρανση. Για παράδειγμα παρατηρήθηκε υπομεθυλίωση στις αλληλουχίες Alu (το πιο συνηθισμένο SINE στα πρωτεύοντα) με την αύξηση της ηλικίας. Όπως υποστηρίζεται, η οδός των piRNA/PIWI επιδρά και στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών, οι οποίες σχετίζονται με αρκετές φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες του DNA όπως είναι η αντιγραφή, η επιδιόρθωση και γήρανση. Τέλος, η διατήρηση των επιπέδων του H3K9me3 με τη βοήθεια των piRNA/PIWI μπορεί να ρυθμίσει το ρυθμό της γήρανσης.

Οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις επηρεάζουν τον τρόπο έκφρασης του συμπλόκου piRNA/PIWI αλλά και εμπλέκονται στην υπερδραστηριότητα των ρετροτρανσποζονίων. Αυτό συμβαίνει γιατί οι περιβαλλοντικές καταπονήσεις επιδρούν στην πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 (Hsp90) ενισχύοντας τις αναδιατάξεις του γονιδιώματος. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως η Hsp90 συμμετέχει στη βιογένεση των εμβρυϊκών piRNA. Ωστόσο, η σύνδεση της καταπόνησης με τη γήρανση, με τη μεσολάβηση των μεταθετών στοιχείων και τη βλάβη του γονιδιώματος, απαιτεί εκτενέστερη μελέτη. Οι συνθήκες καταπόνησης οδηγούν σε φθορά του DNA, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο την κυτταρική ομοιότητα και επιταχύνοντας τη διαδικασία της γήρανσης.

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές προσπάθειες κατανόησης και επιβράδυνσης της γήρανσης με σκοπό τη μακροζωία σε ποικίλους οργανισμούς. Υπάρχουν οργανισμοί πάνω στη γη, κυρίως κατώτεροι ευκαρυώτες που ανήκουν στα Κνιδόζωα, όπως η μέδουσα *Turritopsis nutricula*, το υδρόζωο *Podocoryne carnea* και η ύδρα του γλυκού νερού *Hydra vulgaris*, οι οποίοι παρουσιάζουν φαινόμενα αθανασίας. Ο κοινός παρονομαστής αυτών των οργανισμών είναι η αφθονία των συστατικών του μονοπατιού piRNA/PIWI και ο περιορισμένος αριθμός TE, δίνοντας πιθανώς σε αυτούς τους οργανισμούς την επιθυμητή αναγεννητική ικανότητα και μακροζωία. Επιπλέον, σε καταστολή του Alu από γηρασμένα γαμετικά κύτταρα παρατηρήθηκε αντιστροφή της γήρανσης και επαναφορά της αυτοανανέωσης των κυττάρων^{[111],[112]}.

Εν ολίγοις, η οδός piRNA/PIWI μέσω του σημαντικού ρόλου της στη ρύθμιση των TE και της κυτταρικής αθανασίας μπορεί να αποδειχθεί στο μέλλον και κύρια οδός για τους γενετικούς καθοριστικούς παράγοντες της γήρανσης^[113].

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Αρχική ανακάλυψη και συσχέτιση με την ανδρική υπογονιμότητα

Η πρωταρχική ανακάλυψη των piRNA έγινε σε κύτταρα της γαμετικής σειράς των ανδρών, όπου αποκαλύφθηκε ότι διαδραματίζουν φυσιολογικά πολλούς και σημαντικούς ρόλους στη διαδικασία της σπερματογένεσης όπως είναι η καταστολή των TE, η διαδικασία της μετάφρασης και η αποικοδόμηση του RNA. Οι ρόλοι των piRNA στο αναπαραγωγικό σύστημα των ανδρών, όπως είναι η αποσιώπηση των μεταθετών στοιχείων, η συντήρηση των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων, η αποικοδόμηση του RNA και η κυτταρική άμυνα συμβάλλουν στην ωρίμανση και δραστηριότητα των σπερματοζωαρίων. Όπως αποδεικνύεται, παρατηρούνται διαφορές των επιπέδων έκφρασης των piRNA κατόπιν σύγκρισης μεταξύ γόνιμων και στείρων ανδρών. Η υπογονιμότητα τις τελευταίες δεκαετίες επιδιώκεται να αντιμετωπιστεί μέσω τεχνητής υποβοηθούμενης αναπαραγωγής [114]. Ωστόσο, η μεγάλη δραστηριότητα και έκφραση των piRNA σε αρσενικά γαμετικά κύτταρα, η εμπλοκή τους στην επιγενετική κληρονομιά των επίκτητων χαρακτηριστικών και ο ρόλος τους στη σπερματογένεση δημιουργούν την ανάγκη ανάπτυξης τεχνολογιών κατανόησης και μελλοντικής ρύθμισης της λειτουργικότητας των μορίων ως προς τη αντιμετώπιση της στειρότητας [109],[115].

4.2 Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των piRNA

Ύστερα από την ανακάλυψη των piRNA το 2006, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες κατανόησης της ύπαρξης και της δράσης των συγκεκριμένων μορίων. Ωστόσο, είναι δύσκολο να αναπτυχθεί ένα ολοκληρωμένο πλαίσιο γνώσης και κατανόησης των μηχανισμών βιογένεσης και λειτουργίας των piRNA και των πρωτεϊνών PIWI. Με τη συνεχή ανάπτυξη τεχνολογιών αλληλούχησης επόμενης γενιάς και Βιοπληροφορικής αναδύονται κρίσιμοι ρόλοι των ncRNA, και συγκεκριμένα και των piRNA, για την υγεία και τις ασθένειες^{[15],[37],[38]}. Κάποιες από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται στη μελέτη των piRNA είναι:

- Ο έλεγχος υψηλής απόδοσης (*high throughput screening, HTS*) για τον προσδιορισμό είτε γνωστών είτε νέων piRNA. Ο HTS αποτελεί μία σύγχρονη διαδικασία για την ανεύρεση φαρμάκων μέσω αλληλεπιδράσεων συγκεκριμένου βιολογικού στόχου με χημική ουσία με σκοπό τον προσδιορισμό αυτών των χημικών ενώσεων μέσα από καθορισμένους μηχανισμούς δράσης όπως

διαμόρφωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ μακρομορίων, ενεργοποίηση ή αναστολή ενζύμων και παρεμβολή με ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος. Μετά από την ταυτοποίηση, οι ενώσεις υποβάλλονται σε περαιτέρω τροποποιήσεις με στόχο την αποτελεσματικότητα των ιδιοτήτων τους ως φάρμακα^{[38],[116]}.

- Ο έλεγχος υψηλής απόδοσης RNAi (*HTS-RNAi*) είναι μία τεχνολογία που χρησιμοποιείται στη Γενετική για τον εντοπισμό γονιδίων σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την τροποποιημένη έκφραση γονιδίων, την αποσιώπηση ή την τεχνητή απενεργοποίηση, με σκοπό την ανακάλυψη της επίδρασής τους στις βιολογικές διεργασίες^[117].

- Η ποσοτική PCR αντίστροφης μεταγραφής (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR*) όπου προσδιορίζεται με ακρίβεια ο αριθμός αντιγράφων piRNA σε κάθε κύτταρο συνδυαστικά με τη σχετική έκφρασή τους. Η RT-qPCR αποτελεί αντίδραση που βασίζεται στη μέθοδο PCR από πρότυπο RNA για τη δημιουργία συμπληρωματικού DNA (*complementary DNA, cDNA*) μέσω της αντίστροφης μεταγραφής. Στη συνέχεια, το DNA που δημιουργείται λειτουργεί ως πρότυπο για την PCR και τη δημιουργία αντιγράφων. Η RT-qPCR είναι μία αρκετά ευαίσθητη μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμα και με πολύ μικρές ποσότητες δείγματος^{[38],[118]}.

- Η ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών που προσδέονται σε RNA (*RNA binding protein immunoprecipitation, RIP*) για τον προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και piRNA. Σύμφωνα με την ανοσοκατακρήμνιση RNA ταυτοποιούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και RNA *in vivo* με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Η διαδικασία περιλαμβάνει ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα που ανοσοκατακρημνίζονται με τη βοήθεια αντισωμάτων. Επομένως, τα RNA που προκύπτουν από αυτή τη διαδικασία απομονώνονται και εξετάζονται εκτενέστερα^{[38],[119]}.

- Το σύστημα αναφοράς της λουσιφεράσης (*Luciferase*) για τον προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ RNA-στόχου και piRNA. Η βιοφωταύγεια είναι το αποτέλεσμα μιας χημικής αντίδρασης σε έναν ζωντανό οργανισμό όπου εκπέμπονται φωτόνια. Τα ηλεκτρικώς διεγερμένα προϊόντα που προκύπτουν παράγουν ορατό φως, είτε μέσω αποσύνθεσής τους, είτε μεταδίδοντας ενέργεια σε κάποια διαφορετική χημική ομάδα. Οι λουσιφεράσες αποτελούν πληθώρα βιοφωταυγών ενζύμων που προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς. Οι μετρήσεις βιοφωταύγειας χρησιμοποιούνται ευρέως στη Μοριακή Βιολογία για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης και ρύθμισης, όπως και για την ανίχνευση στόχων *in vitro* αλλά και *in vivo*^{[38],[120]}.

4.3 Βάσεις δεδομένων και υπολογιστικά εργαλεία για τη μελέτη των μορίων piRNA

Η ανάπτυξη της Βιοπληροφορικής προωθεί κατά ένα μεγάλο ποσοστό την έρευνα αναφορικά με τα piRNA. Η δημιουργία βάσεων δεδομένων ειδικά για τα piRNA αφενός συμβάλλει στην έρευνα, αφετέρου έχει περιορισμένη χρησιμότητα λόγω προβληματισμών όπως η παρεμβολή μορίων, τα οποία δημιουργούν σύγχυση σε σχέση με τα piRNA, σε ποσοστά κάτω από το 1% των αλληλουχιών, και η ανεπαρκής επικαιροποίηση των στοιχείων αυτών. Στα μόρια αυτά ανήκουν για παράδειγμα ενδιάμεσες μορφές RNA που προκύπτουν κατά τη βιογένεση των miRNA και των ncRNA σε σωματικούς ιστούς εκτός των γονάδων στα θηλαστικά.

Οι βάσεις δεδομένων των piRNA κατηγοριοποιούνται στις ακόλουθες τρεις μεγάλες ομάδες.

α) Πλήρως υπομνηματισμένες βάσεις δεδομένων^[121]:

- [piRNABank \(http://pirnabank.ibab.ac.in/\)](http://pirnabank.ibab.ac.in/): αποτελεί την πρωταρχική βάση δεδομένων piRNA με πλήρως εμπεριστατωμένες πληροφορίες. Παρόλα αυτά, διαθέτει μόνο πέντε είδη και η ενημέρωση είναι ανεπαρκής.

- [piRBase \(http://regulatoryrna.org/database/piRNA/\)](http://regulatoryrna.org/database/piRNA/): ξεκίνησε το 2014 και αναβαθμίστηκε το 2018 και αποτελεί τη μεγαλύτερη βάση δεδομένων ως προς τα piRNA, καθώς περιλαμβάνει 264 σύνολα δεδομένων από 21 οργανισμούς και 173.000.000 piRNA. Οι στόχοι και οι ασθένειες στις οποίες εμπλέκονται τα piRNA συλλέγονται στην παρούσα βάση δεδομένων. Το βασικό μειονέκτημα του piRBase είναι πως υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα σχετικά με τα ανθρώπινα piRNA και πως περιλαμβάνονται παρεμβαλλόμενα μόρια.

- [piRNAQuest \(http://bicre_source.icbose.ac.in/zhumur/pirnaquest/\)](http://bicre_source.icbose.ac.in/zhumur/pirnaquest/): διαθέτει πληροφορίες υπομνηματισμού τριών ειδών, στα οποία περιλαμβάνονται ο άνθρωπος, το ποντίκι και ο αρουραίος, κυρίως για ψευδογονίδια, ενώ υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με το προφίλ έκφρασης των piRNA.

- [piRNADB \(https://www.pirnadb.org/\)](https://www.pirnadb.org/): αφορά διάφορα είδη και συλλέγει ολοκληρωμένες πληροφορίες για τα piRNA όπως συστάδες, αλληλουχίες, συσχετιζόμενα γονίδια κλπ.

β) Άλλες ειδικές βάσεις δεδομένων οι οποίες αφορούν τους στόχους των piRNA:

- [piRNA target \(https://120.108.102.11/~sophia//piRNATarget/\)](https://120.108.102.11/~sophia//piRNATarget/): το οποίο δεν είναι ευρέως προσβάσιμο.

- [piRTarBase \(http://cosbi6.ee.ncku.edu.tw/piRTarBase/\)](http://cosbi6.ee.ncku.edu.tw/piRTarBase/): το οποίο κοινοποιήθηκε το 2019 σε πειραματικό επίπεδο από το piRScan και στο οποίο εμπλέκονται μόνο τα είδη *C. elegans* και *C. briggsae*.

- [piRNAclusterDB \(https://www.smallrnagroup.uni-mainz.de/piCdb/\)](https://www.smallrnagroup.uni-mainz.de/piCdb/): αφορά τις συστάδες piRNA, καλύπτει 51 είδη, ενημερώνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα, ενώ απορρίπτονται προβληματικά piRNA λόγω των αυστηρών κριτηρίων.
- [IsopirBank \(https://mcq.ustc.edu.cn/bsc/isopir/index.html\)](https://mcq.ustc.edu.cn/bsc/isopir/index.html): είναι μία πλήρως ενημερωμένη βάση δεδομένων ως προς τα ισόμορφα piRNA και ταυτοποιούνται 8.749.139 ισόμορφα piRNA από 2.154 σύνολα δεδομένων. Η παρούσα βάση δεδομένων αποτελεί σημαντικό εργαλείο για τους ερευνητές, ωστόσο διαθέτει πληροφορίες μόνο από τέσσερα είδη με ασαφή λειτουργία των ισομόρφων.
- [piRNApiRDisease \(http://lilab2.sysu.edu.cn/ncrpheno/\)](http://lilab2.sysu.edu.cn/ncrpheno/): είναι και αυτή μία μη προσβάσιμη βάση δεδομένων η οποία συσχετίζει piRNA και ασθένειες σε πειραματικό επίπεδο.

γ) Βάσεις δεδομένων για ncRNA που σχετίζονται με piRNA:

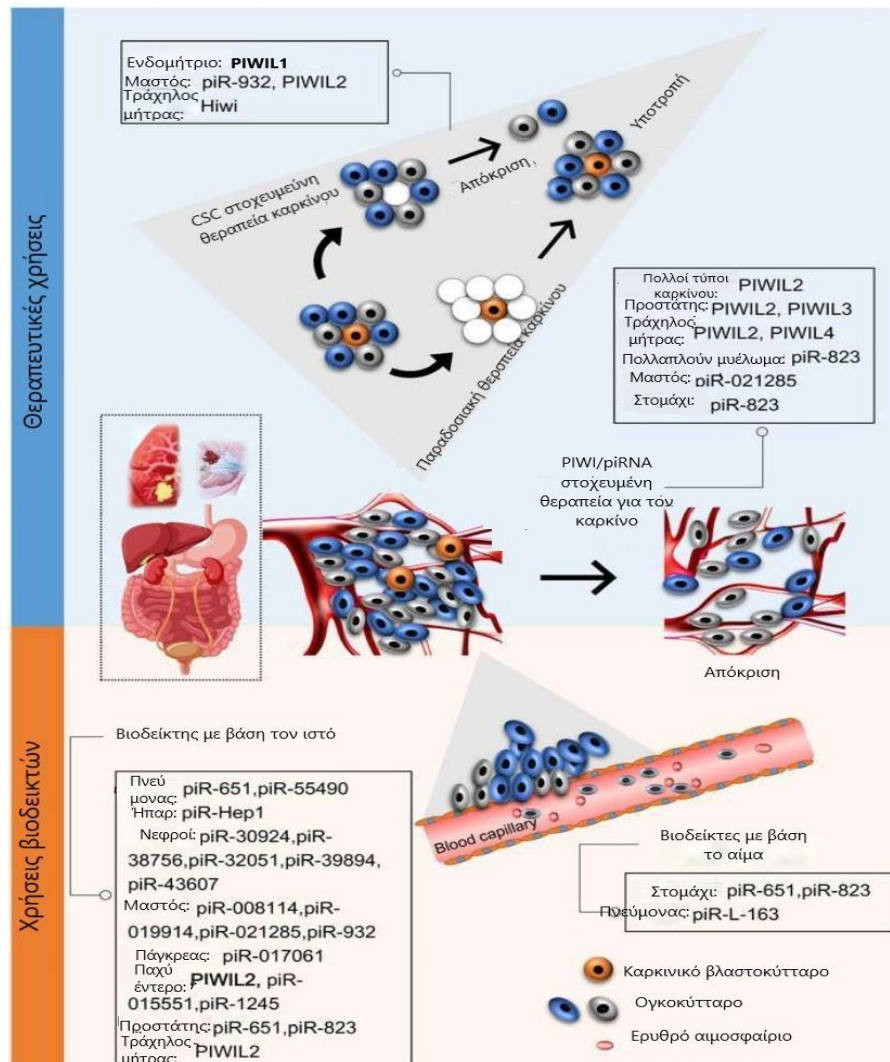
Αυτή η κατηγορία αφορά βάσεις δεδομένων των ncRNA στις οποίες αποθηκεύονται περιορισμένες κυρίως πληροφορίες για ερευνητικό σκοπό σχετικά με τα piRNA και είναι οι: RNAcentral, IRNdb, deepBase, BBCancer, NONCODE, NCBI SRA, ncRPheno, MNDR και ncRPheno^[121].

4.4 Η δυνατότητα χρήσης των μορίων piRNA ως μέσων πρόγνωσης, διάγνωσης ή θεραπείας

Τα piRNA και οι πρωτεΐνες PIWI θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ήδη, και ακόμα περισσότερο στο μέλλον, ως εξαιρετικοί βιοδείκτες στην πρόγνωση και τη διάγνωση των νοσημάτων που αναλύθηκαν στην παρούσα Διπλωματική εργασία. Η ενδεδειγμένη μελέτη στα μοτίβα έκφρασης των μορίων piRNA και των πρωτεϊνών PIWI σε φυσιολογικούς ιστούς *in vitro* αλλά και σε υγιείς οργανισμούς *in vivo*, καθώς επίσης και η σύγκριση με τα τροποποιημένα προφίλ και μοτίβα έκφρασής τους σε παθολογικές καταστάσεις θα μπορούσε να αποτελέσει ένα σύγχρονο τύπο μη επεμβατικού εργαλείου στην πρόληψη μη αναστρέψιμων καταστάσεων ή στην έγκαιρη διάγνωση αυτών. Τα piRNA ωστόσο, για να μπορούν να θεωρηθούν ως πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες, θα πρέπει να αξιολογηθούν σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων, με παρεμφερείς ασθένειες και με σαφείς διαφορές στην έκφραση μεταξύ υγιών και παθολογικών μαρτύρων και ιστών^[110].

Ακόμη, αναφέρθηκαν πολλά piRNA και συνδυασμοί αυτών ως προς τον τρόπο που ρυθμίζουν διάφορες βιολογικές οδούς και επηρεάζουν τη συνολική επιβίωση των ασθενών όταν απορρυθμίζονται. Επομένως, εφόσον τα μόρια αυτά έχουν ρυθμιστικούς ρόλους και μπορούν να επηρεάσουν την πορεία μίας ασθένειας θετικά ή αρνητικά με την αυξορύθμιση ή τη μειορύθμισή

τους θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον ως χρήσιμα εργαλεία θεραπείας ή σε συνδυασμό με τις κλασικές μεθόδους χημειοθεραπείας, με την εισαγωγή ή την κατευθυνόμενη ρύθμιση των μορίων αυτών έως ότου επέλθουν τα επιθυμητά αποτελέσματα και βελτιώσουν την ποιότητα ζωής των ασθενών (Εικόνα 5).



Εικόνα 5 Πιθανές κλινικές εφαρμογές της οδού PIWI-piRNA. Η δυσλειτουργία της οδού PIWI-piRNA και ο συσχετισμός της με διάφορα χαρακτηριστικά σε ασθενείς με καρκίνο υποδηλώνει ότι στοιχεία αυτής μπορούν να έχουν σημαντική κλινική σημασία ως βιοδείκτες ή θεραπευτικοί στόχοι. Για σκοπούς θεραπείας, οι χειρισμοί των πρωτεϊνών PIWI ή της έκφρασης των piRNA μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της ανάπτυξης όγκου ή μετάστασης, επηρεάζοντας διάφορες βασικές βιολογικές διεργασίες όπως τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση ή την ικανότητα εισβολής. Δεδομένου ότι οι υποπληθυσμοί βλαστικών κυττάρων συμβάλλουν στη χημειοαντίσταση του όγκου και τελικά σε υποτροπιάζουσες ασθένειες, η στόχευση στις πρωτεΐνες PIWI ή στα σχετικά piRNA είναι ίσως μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για χημειοθεραπεία. Παρά τους ρόλους τους ως φαρμακευτικοί στόχοι, αξίζει να σημειωθεί ότι οι πρωτεΐνες PIWI ή τα piRNA θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν είτε ως βιοδείκτες που βασίζονται σε ιστούς, είτε ως κυκλοφορούντες δείκτες για προγνωστικούς ή διαγνωστικούς σκοπούς. (Προσαρμογή από [15]).

4.5 Συσχέτιση των piRNA με κακοήθεις νόσους του ανθρώπου

Η έκφραση των piRNA εμφανίζει αποκλίσεις σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα σε ένα μεγάλο εύρος καρκινικών όγκων, καθώς λειτουργούν ως διακόπτες της γονιδιακής ρύθμισης, και γι' αυτό τα piRNA θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως στοιχειώδεις διαγνωστικοί και θεραπευτικοί βιοδείκτες στην κλινική πράξη του καρκίνου^[41]. ^[67].

Οι κακοήθειες οι οποίες έχουν αναφερθεί στην παρούσα ανασκόπηση και είναι περισσότερο μελετημένες ως προς τα piRNA/PIWI είναι:

α) Καρκίνος του μαστού: Παρουσιάζει διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των piRNA στις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ενδεικτικά, αναφέρεται το piR-36712, το οποίο είναι ένας καταστολέας όγκου και χαρακτηρίζεται για την αντικαρκινική του ιδιότητα, ενώ άλλα όπως το piR-651, το ανοσοσύμπλοκο piR-932 / PIWIL2 και το piR-021285 φαίνεται να προάγουν την καρκινική συμπεριφορά των κυττάρων του μαστού, και με τη μειορύθμισή τους να περιορίζουν την εξέλιξη του όγκου.

β) Καρκίνος του πνεύμονα: Φαίνεται πάλι η ογκογόνος δράση του piR-651, ενώ υπάρχει μεγάλη πιθανότητα περιορισμού του καρκίνου χρησιμοποιώντας αναστολείς έναντι του piR-651. Παρατηρείται επίσης αυξορύθμιση και στα piR-52200 και piR-34871, αντίθετα από τα PIWIL4, piR-46545 και piR-35127, με το piR-55490 να θεωρείται σημαντικός αντικαρκινικός παράγοντας του καρκίνου του πνεύμονα.

γ) Γαστρικό καρκίνωμα: Η ανασταλτική δράση του piR-823 στο γαστρικό καρκίνωμα θα μπορούσε να κατευθύνει τους ερευνητές στο δρόμο για τη θεραπεία, ενώ τα υψηλά επίπεδα των piR-651 και PIWIL1 δίνουν κακή πρόγνωση και γι'αυτό θα πρέπει να μειωθεί η έκφρασή τους με ειδικούς αναστολείς.

δ) Καρκίνος παχέος εντέρου: Αντίθετα με το γαστρικό καρκίνωμα, το piR-823 στον καρκίνο παχέος εντέρου μαζί με το piR-54265 και το PIWIL2 είναι εμφανώς αυξημένα, και πέραν της προαγωγής του καρκίνου μπορεί να οδηγήσει σε χημειαντοχή σε ορισμένες θεραπευτικές μεθόδους. Έτσι λοιπόν, προτείνεται αναστολή η οποία θα μπορούσε να εμποδίσει σημαντικά την ενυπάρχουσα ανάπτυξη του όγκου. Άλλοι χρήσιμοι βιοδείκτες για τον καρκίνο του παχέος εντέρου στο στάδιο I με υψηλή προγνωστική αξία είναι τα piR-5937 και piR-28876 τα οποία μειορυθμίζονται.

ε) Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα: Παρατηρείται υπερέκφραση των piR-651, piR-32299, piR-23670, piR-24684, piR-28488 και piR-7239, ενώ υπάρχει μείωση στα piR-952, piR-820, piR-28525, piR-5938 και piR-5937.

στ) Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα: Το piR-823 παρουσιάζει υψηλή διαγνωστική αξία και σε αυτή την περίπτωση, όπου παρατηρείται θετική συσχέτιση με κακή πρόγνωση. Η υψηλή έκφραση των piR-30924 και piR-38756 σχετίζεται με μικρό ποσοστό επιβίωσης, ενώ αντίθετα το piR-57125 παρουσιάζεται μειωμένο σε μεταστάσεις.

ζ) Πολλαπλούν μυέλωμα: Βασικό μοριακό δείκτη αποτελεί το piR-823, το οποίο προάγει τον πολλαπλασιασμό των μυελωματικών κυττάρων.

η) Άλλοι καρκίνοι που έχουν συσχετισθεί με την οδό piRNA/PIWI είναι ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας και των ωοθηκών, της ουροδόχου κύστεως, των όρχεων και του προστάτη, της κεφαλής, του παγκρέατος, του νευρικού συστήματος, τα λεμφώματα και, τέλος, το ινοβλάστωμα και το γλοιοβλάστωμα.

Συγκεντρωτικά λοιπόν, η βιολογία του καρκίνου εμπλέκει πολλούς μοριακούς δείκτες και πρωτίστως τα διάφορα piRNA τα οποία αφορά η Διπλωματική αυτή εργασία, επιβεβαιώνοντας τη σπουδαιότητά τους και την ανάγκη που δημιουργείται να μελετηθούν περισσότερο και να αξιοποιηθούν στην πρόληψη και την αντιμετώπιση του καρκίνου.

4.6 Συσχέτιση των piRNA με λοιπές ανθρώπινες νόσους

Το μονοπάτι piRNA/PIWI αποδεδειγμένα είναι γνωστό ότι εμπλέκεται και σε λειτουργίες του νευρικού συστήματος, όπως στη γονιδιωματική ετερογένεια, τη διαγενεακή επιγενετική κληρονομιά, τη νευρωνική απόκριση μετά από τραυματισμό, την ανάπτυξη του εγκεφάλου, το σχηματισμό μνήμης και τη συμπεριφορά. Για παράδειγμα, τα piR-1199, piRs-5567, 4288 και 1200 δείχνουν ενεργό δράση στην αναγέννηση τραυματισμένων νευραξόνων. Το piRNA που εκφράζεται περισσότερο στον ιππόκαμπο είναι το DQ541777 στους δενδρίτες των νευρώνων, υποδηλώνοντας το ρυθμιστικό του ρόλο στη μετάφραση. Συνεπώς, τα piRNA μπορεί να συμμετέχουν σε διάφορες ασθένειες του νευρικού συστήματος, όπως στις νευροαναπτυξιακές και νευροεκφυλιστικές παθήσεις, και με τη γνώση ότι υπάρχουν ενσωματωμένα TE στο 45% των ανθρώπινων γονιδιωμάτων, το σύμπλοκο piRNA/PIWI αποτελεί στόχο διαγνωστικών και θεραπευτικών μεθόδων [27],[29], [30],[31].

Ο βασικός διαχωρισμός που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν οι νευροαναπτυξιακές και νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Στις νευροαναπτυξιακές κατατάσσεται το σύνδρομο Rett με το piRNA DQ541777 να υπερτερεί σε έκφραση. Στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες αναφέρονται οι αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση και οι Ταυ-πάθειες. Στις Ταυ-πάθειες

περιλαμβάνονται η νόσος Alzheimer και Parkinson. Στη νόσο Alzheimer τα ευρήματα ENY έδειξαν πως τα piRNA παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση και στην ανάπτυξη της νόσου^[82]. Τα γονίδια *CYCS*, *KPNA6*, *RAB11A* που παίζουν σημαντικούς ρόλους στην AD ρυθμίζονται από τα piR-38240, piR-34393 και piR-40666 μέσω εκτεταμένης συμπληρωματικότητας^[85]. Επίσης, τα piRNA πιθανόν συμβάλλουν στη διατήρηση των εγκεφαλικών λειτουργιών στην AD μέσω ρύθμισης των L1 ρετροτρανσποζονίων και των συναφών μεταλλάξεων^[84]. Στη νόσο Parkinson παρατηρείται επίσης απορρύθμιση των piRNA σε συνδυασμό με επιγενετικές και μεταγραφικές μεταβολές. Τροποποίηση στα πρότυπα έκφρασης των piRNA εντοπίζεται και στο εγκεφαλικό επεισόδιο και, παρόλο που δεν αποτελούν καλά μελετημένα πεδία, είναι η βάση για την έρευνα γύρω από αυτά τα μόρια προκειμένου να αναπτυχθούν νέες διαγνωστικές και θεραπευτικές μέθοδοι για περίπλοκες και ανίατες μέχρι τώρα ασθένειες.

Μεταξύ των σωματικών κυττάρων όπου εκφράζονται τα piRNA ανήκουν και τα καρδιομυοκύτταρα, με διαφορετικά προφίλ έκφρασης ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης στο οποίο βρίσκονται. Κατά συνέπεια, τα piRNA επιδιώκουν τη βελτιστοποίηση της μεταγραφής των ενδογενών δικτύων στην έκφραση των γονιδίων^[34]. Τα piRNA επίσης, μπορούν να τροποποιήσουν τη σηματοδότηση Akt οδηγώντας εν τέλει σε καρδιακές παθήσεις^[33]. Νοσήματα του καρδιαγγειακού συστήματος στα οποία αναφέρθηκε η συμμετοχή των piRNA είναι η χρόνια θρομβοεμβολική πνευμονική υπέρταση με την υψηλή έκφραση του piRNA DQ593039, η καρδιακή ανεπάρκεια και η υπερτροφία της καρδιάς στην οποία ελαττώνεται η ισχαιμική βλάβη με την αναστολή των ρετροτρανσποζονίων L1. Αυτά τα δεδομένα καθιστούν τα piRNA ως έναν χρήσιμο βιοδείκτη στη διάγνωση και τη θεραπεία καρδιακών και πνευμονικών νοσημάτων^[92].

Υπάρχει πιθανή εμπλοκή των piRNA και σε λιγότερο κατανοητά νοσήματα, όπως τα αυτοάνοσα και συγκεκριμένα η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Τα piRNA που εκφράζονται περισσότερο στο αρθρικό υγρό είναι τα piR-16735, piR-18570, piR-17724 και piR-20388, σε ένα σύνολο 300 περίπου εκφρασμένων μορίων. Δεδομένης της απορρύθμισης των piRNA που παρατηρείται με την πιθανή εμπλοκή τους στην έμφυτη ανοσία, θα μπορούσαν να αναπτυχθούν μέθοδοι αξιοποίησης των ncRNA στο σύνολό τους για νέες διαγνωστικές προσεγγίσεις και θεραπευτικούς στόχους^{[94],[95]}.

Επιπροσθέτως, η αποσιώπηση των γονιδίων *Piwil2* ή *Piwil4* που προκαλεί ελάττωση των piRNA, συμβάλλει σε διαταραχές που εμπλέκονται στην ανάπτυξη σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. Ενδεικτικά αναφέρονται τα piRNA DQ732700 και DQ746748 και piRNA48383 τα οποία επηρεάζουν τη δράση ή την έκφραση της ινσουλίνης. Όσον αφορά τη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, υπάρχει υψηλή συσχέτιση με την πρωτεΐνη HIWI2, η οποία μπορεί να επηρεάσει την παθογένεια της νόσου. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η HIWI2 μπορεί να εμπλακεί στη νόσο είναι αντίστοιχοι

με αυτούς του καρκίνου του μαστού και μπορούν να δείξουν το δρόμο για ενδεχόμενες θεραπευτικές δυνατότητες αυτών.

Τέλος, τροποποιημένη έκφραση των *miRNA* παρατηρείται και σε ορισμένα λοιμώδη νοσήματα ως ένας επιπλέον μηχανισμός άμυνας του οργανισμού έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών. Τέτοιοι μικροοργανισμοί είναι τα: *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Coxsackievirus B3* και *SARS-CoV-2*. Η σχέση των *miRNA* με τις λοιμώξεις αποτελεί ένα ενδιαφέρον αλλά όχι ιδιαίτερα μελετημένο πεδίο το οποίο θα μπορούσε στο μέλλον να θεραπεύσει σοβαρές λοιμώξεις που προκαλούν υγειονομική υποβάθμιση της ανθρωπότητας.

Η γήρανση αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της ζωής, φθάνοντας όλους τους ζωντανούς οργανισμούς στην ολοκλήρωση της ύπαρξής τους. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες οι οποίοι ευθύνονται για την προοδευτική εκφύλιση των οργανισμών. Ορισμένοι παράγοντες εκ των οποίων συμμετέχουν στη γήρανση σε επιγενετικό επίπεδο είναι οι βλάβες και οι μεταλλάξεις στο DNA, οι αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης της χρωματίνης, η χρόνια φθορά των τελομερών στα χρωμοσώματα και η γονιδιωματική αστάθεια που προκαλείται από τη συσσώρευση των TE. Τα ncRNA και ειδικά τα *miRNA* αποτελούν ρυθμιστικά μόρια τα οποία εμπλέκονται στην αποκατάσταση φθορών και στη διατήρηση της γονιδιωματικής ακεραιότητας από επιβλαβείς παράγοντες σε επιγενετικό, μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Η επιβράδυνση της γήρανσης ή η επιμήκυνση της ζωής αποτελεί ένα πεδίο με το οποίο «φλερτάρουν» οι επιστήμονες και, προς το παρόν, ανήκει στα πλαίσια της επιστημονικής φαντασίας, ωστόσο το μονοπάτι *miRNA*/PIWI θα μπορούσε να δείξει τον δρόμο για την αθανασία.

4.7 Πλεονεκτήματα χρήσης των *miRNA* ως διαγνωστικών δεικτών και εν δυνάμει θεραπευτικών εργαλείων

Ως θεραπευτικοί στόχοι των *miRNA* για τον περιορισμό του πολλαπλασιαστικού δυναμικού και για την ενεργοποίηση της απόπτωσης αναφέρονται ήδη τα siRNA, τα αντι-νοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια και το σύστημα CRISPR/Cas9 μεσολάβησης γονιδιώματος^[48]. Επί του παρόντος, η εκτενέστερη έρευνα σε θεραπείες αφορά την ανοσοθεραπεία^[37]. Εντούτοις, η πιο σημαντική θεραπευτική στρατηγική φαίνεται να είναι η χρήση συνθετικών *miRNA*, σύμφωνα με την οποία δρουν όπως τα *miRNA*, έχοντας όμως περισσότερα πλεονεκτήματα, όπως είναι η εξειδίκευση και η

απουσία ανάγκης για δράση ενζύμων Dicer. Ειδικότερα, τα piRNA θα στοχεύουν συμπληρωματικά mRNA αποτρέποντας τη σύνθεση πρωτεϊνών και συστατικών που εμπλέκονται στην ογκογένεση.

Συγκριτικά με τους γνωστούς καρκινικούς δείκτες, τα piRNA πιθανόν παρουσιάζουν μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία^[48]. Συνεπώς, η ανάγκη χρήσης λιγότερο επεμβατικών μεθόδων στη διάγνωση και τη θεραπεία καθιστά τα piRNA πολύ ελκυστικά θεραπευτικά εργαλεία μέσω της ρύθμισης των ογκογόνων γονιδίων-στόχων^[39].

Ένας άλλος τρόπος θεραπευτικής αντιμετώπισης του καρκίνου θα μπορούσε να είναι η ελεγχόμενη ρύθμιση των πρωτεϊνών PIWI σε μεταγραφικό επίπεδο μέσω των piRNA ή η χρήση αντισωμάτων PIWI, οδηγώντας σε διακοπή του άναρχου κυτταρικού πολλαπλασιασμού στη φάση G2/M, με αποτέλεσμα την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και την ενισχυμένη δράση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53^{[44],[122],[123]}. Συγκεκριμένα, επιδιώκεται η αναστολή των πρωτεϊνών PIWI που έχει αποδειχθεί πως παρουσιάζουν καρκινογόνο συμπεριφορά ενώ μπορούν να συνεισφέρουν στην εξέλιξη των όγκων μέσω της χημειοαντίστασης που προκαλούν σε φάρμακα όπως σισπλατίνη. Αυτό που επιδιώκεται εν ολίγοις, είναι η αναστροφή του παθολογικού φαινοτύπου σε επιγενετικό, μεταγραφικό ή μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Για παράδειγμα, η χρήση αντισωμάτων PIWI και συνθετικών piRNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία κατά του καρκίνου μέσω των στρατηγικών παράδοσης φαρμάκων απευθείας στα καρκινικά κύτταρα, και σε συνδυασμό με συμβατικές θεραπείες. Στόχος αυτής της μεθόδου, είναι η βέλτιστη ανταπόκριση στις διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις και η μείωση των παρενεργειών από κυτταροτοξικά φάρμακα. Αν και η έρευνα για τη θεραπευτική χρήση των piRNA βρίσκεται ακόμα σε αρχικά στάδια, η μελλοντική κατανόηση των λειτουργιών των piRNA στην ανάπτυξη του καρκίνου θα μπορούσε να προσφέρει αποτελεσματικά θεραπευτικά επιτεύγματα^{[44],[122],[124]}.

Απορρύθμιση των piRNA παρουσιάζεται σε μεγάλο εύρος νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένων των λοιμώξεων. Οι λοιμωξιολογικές καταστάσεις απαιτούν έναν εξωγενή παράγοντα για την αρχική αποδιοργάνωση ενός υγιούς οργανισμού και την πρόκληση των εκάστοτε νοσημάτων, με αποτέλεσμα την κινητοποίηση μηχανισμών, όπως είναι ο μηχανισμός RNAi και ειδικότερα τα piRNA, για τη διατήρηση της ομοιόστασής του. Θα μπορούσε λοιπόν να υποθεθεί, πως σε εξίσου περίπλοκες και ετερογενείς καταστάσεις όπως ο καρκίνος και τα αυτοάνοσα νοσήματα, η απορρύθμιση των piRNA δεν αποτελεί πρωταρχικό αίτιο έναρξης της ασθένειας, αλλά σημαντικό ρυθμιστή στην πορεία και την εξέλιξή τους, όπως φαίνεται και από τη χρήση αναστολέων piRNA σε πειράματα. Παρόλα αυτά, λόγω της απαιτητικά μεγάλης ποσότητας δεδομένων, της πολύπλοκης φύσης των piRNA και της ελλιπούς κατανόησης των μηχανισμών και των ρόλων των piRNA, δεν είναι εύκολο να απαντηθούν με σαφήνεια ερωτήματα που σχετίζονται με την παρεκκλίνουσα

έκφραση των miRNA, με το εάν αυτή αποτελεί αίτιο καρκινογένεσης ή αποτέλεσμα άλλων μοριακών γεγονότων, αλλά και με όλους τους πιθανούς στόχους αυτών των μορίων. Περαιτέρω έρευνα θα μπορούσε να γίνει επίσης και σχετικά με την ακριβή δράση του συμπλόκου miRNA/RISC στα σωματικά κύτταρα πάρα την ελάχιστη ποσότητά τους σε αυτά, και σχετικά με τα όρια που μπορούν να θεωρούνται ασφαλή ώστε να διακρίνονται τα υγιή άτομα από τους νοσούντες^{[15],[67]}

Οι παραπάνω προβληματισμοί, σε συνδυασμό με τις συνεχόμενες προσπάθειες των επιστημόνων για την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών, θα μπορέσουν να πυροδοτήσουν τη συνέχιση της έρευνας για την πλήρη κατανόηση και χρησιμότητα των miRNA στην κλινική πράξη^{[38],[48]}.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συσχέτιση των μορίων piRNA με το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα αποτελούσε την επικρατέστερη αντίληψη από τη στιγμή που τα piRNA ξεκίνησαν να μελετώνται για πρώτη φορά, καθώς αποδείχθηκε πως διαδραματίζουν σπουδαίους ρόλους στη φυσιολογία της σπερματογένεσης. Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί μεγάλες προσπάθειες κατανόησης της βιολογίας των ρυθμιστικών RNA και ειδικότερα των piRNA, καθώς έχει αποδειχθεί η παρουσία τους και στα σωματικά κύτταρα, για την επίλυση προβλημάτων υγείας που απασχολούν την ανθρωπότητα εδώ και χιλιάδες χρόνια.

Η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών επιτρέπει την εμβάθυνση των υλοποιούμενων ερευνών στον τομέα της Μοριακής Βιολογίας και της Βιοτεχνολογίας αναφορικά με την εμπλοκή των μορίων piRNA σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Μεταξύ των δοκιμασιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη των μορίων piRNA είναι ο HTS, η RT-qPCR, η RIP και το σύστημα αναφοράς της λουσιφεράσης. Τα τελευταία χρόνια επίσης, έχουν ιδρυθεί βάσεις δεδομένων στις οποίες μπορεί να ανατρέξει το κοινό και οι οποίες παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τα μόρια piRNA στον άνθρωπο και σε άλλα είδη. Παρέχουν επίσης πληροφορίες για piRNA σχετιζόμενα με ασθένειες, τους στόχους αυτών και γενικότερα επιγενετικά και μετα-μεταγραφικά δεδομένα ρύθμισης.

Ο μηχανισμός RNAi, και ειδικότερα η κατηγορία των μορίων piRNA με τις αντίστοιχες πρωτεΐνες PIWI, καταγράφονται από πληθώρα επιστημονικών άρθρων σε συσχέτιση με πολλές και διαφορετικές ασθένειες στον άνθρωπο μέσα από πειραματικά δεδομένα. Ο καρκίνος, ο οποίος αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αιτίες θνησιμότητας σε παγκόσμιο επίπεδο, καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος των ερευνών. Η ετερογένεια αυτής της ομάδας νοσημάτων αποτελεί μία ιδιαίτερος περίπλοκη και δύσκολα αντιμετωπίσιμη κατάσταση, οι μηχανισμοί πρόκλησης, εξέλιξης και καταπολέμησης της οποίας χρήζουν πλήρους κατανόησης. Κατά την παρούσα ανασκόπηση αναφέρθηκαν piRNA, όπως τα piR-823 και piR-651, τα οποία ασκούν αντίθετους ρυθμιστικούς ρόλους ανάλογα με το είδος του καρκίνου.

Σύμφωνα με έγκυρες επιστημονικές πηγές, ο ρυθμιστικός ρόλος στο μονοπάτι piRNA/PIWI έχει μελετηθεί και σε πολλά άλλα νοσήματα που αφορούν το νευρικό και το καρδιαγγειακό σύστημα, αυτοάνοσα, μεταβολικά ακόμη και λοιμώδη νοσήματα, και επομένως η τροποποιημένη έκφραση αυτών των μορίων συσχετίζεται με τα αντίστοιχα νοσήματα. Λόγω του έντονου ρυθμιστικού ρόλου που παρουσιάζουν, τα piRNA αποκαθιστούν γονιδιωματικές βλάβες που προκαλούνται από

επιβλαβείς παράγοντες, οι οποίοι με τη σειρά τους φθείρουν το γονιδίωμα και οδηγούν με την πάροδο του χρόνου σε γήρανση του οργανισμού.

Ως εκ τούτου, τα μόρια miRNA μπορούν να θεωρηθούν σημαντικοί προγνωστικοί βιοδείκτες καθώς μπορούν να δώσουν σημαντικές πληροφορίες για την κατάσταση ενός οργανισμού και την εξέλιξη της πορείας μίας ασθένειας και κυρίως στον καρκίνο. Στην παρούσα εργασία προτάθηκε η εν δυνάμει αξιοποίηση αυτών των μορίων ως θεραπευτικά εργαλεία για τον καρκίνο, όπως η χρήση συνθετικών miRNA, η ελεγχόμενη ρύθμιση των πρωτεϊνών PIWI σε μεταγραφικό επίπεδο μέσω των miRNA ή η χρήση αντισωμάτων PIWI οδηγώντας σε διακοπή του άναρχου κυτταρικού πολλαπλασιασμού με απώτερο στόχο τη βελτίωση της ποιότητας ζωής και κατά συνέπεια την επιμήκυνσή της. Υπάρχουν ακόμα πολλά ερωτήματα που δεν έχουν απαντηθεί γύρω από τη βιογένεση και τους μηχανισμούς δράσης των miRNA, καθώς επίσης σχετικά με το κατά πόσο η απορρύθμιση των miRNA είναι υπαίτια για τις διαταραχές του ανθρώπινου οργανισμού, και ποια θα μπορούσαν να είναι τα αποτελέσματα και οι επιπτώσεις που θα προέκυπταν ύστερα από μία στοχευμένη θεραπεία σε μοριακό και γενετικό επίπεδο. Στα επόμενα χρόνια, με τη συνεχή προσπάθεια των ερευνητών και με την προοδευτική εξέλιξη της τεχνολογίας πολλά ερωτήματα ενδεχομένως να απαντηθούν.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 Goriaux C., Theron E., Brassat E., Vaury C. History of the discovery of a master locus producing piRNAs: the flamenco / COM locus in *Drosophila melanogaster*. *Front Genet.* 2014. 5:257.
- 2 Krishnan P., Damaraju S. The Challenges and Opportunities in the Clinical Application of Noncoding RNAs: The Road Map for miRNAs and piRNAs in Cancer Diagnostics and Prognostics. *Int J Genomics.* 2018. 2018: 5848046.
- 3 Ozata D.M., Gainetdinov I., Zoch A., O'Carroll D., Zamore P.D. PIWI-interacting RNAs: Small RNAs with big functions. *Nat. Rev. Genet.* 2019. 20:89–108.
- 4 Iwasaki Y. W., Siomi M. C., Siomi H. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annu. Rev. Biochem.* 2015. 84:405–433.
- 5 Hu B., Weng Y., Xia X. H., Liang X., Huang Y. Clinical advances of siRNA therapeutics. *The journal of Gene Medicine.* 2019.21.
- 6 Watson J. D., Baker T. A., Bell S. P., Gann A., Levine M., Losick R. Μοριακή βιολογία του γονιδίου. 6η Αμερικάνικη έκδοση, 1η Ελληνική έκδοση. *Utopia Εκδόσεις ΕΠΕ.* Αθήνα. 2011: 854-868.
- 7 Wei J. W., Huang K., Yang C., Kang C. S. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. *Spandidos Publications.* 2016. 3-9.
- 8 Kobayashi H., Tomari Y. RISC assembly: coordination between small RNAs and argonaute proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1859. 2016. 71–81.
- 9 Li S., Patel D. J. Drosha and Dicer: Slicers cut from the same cloth. *Cell Research.* 2016. 26: 511-512.
- 10 Lu T. X., Rothenberg M. E. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol.* 2017. 141(4): 1202-1207.
- 11 Chen C, Liu JH, Xu GX. Overexpression of PIWI proteins in human stage III epithelial ovarian cancer with lymph node metastasis. *Cancer Biomark.* 2013. 13:315-321.
- 12 Maleki Dana P, Mansournia MA, Mirhashemi SM. PIWI-interacting RNAs: new biomarkers for diagnosis and treatment of breast cancer. *Cell Biosci.* 2020. 10:44.
- 13 Kumar A. Jump around: transposons in and out of the laboratory. *F1000Research.* 2020. 9: F1000 Faculty Rev-135.
- 14 Sun W, Samimi H, Gamez M, Zare H, Frost B. Pathogenic tau-induced piRNA depletion promotes neuronal death through transposable element dysregulation in neurodegenerative tauopathies. *Nat Neurosci.* 2018. 21(8):1038.

- 15 Weng W., Li H. and Goel A. Piwi-interacting RNAs (piRNAs) and cancer: Emerging biological concepts and potential clinical implications. *Biochim Biophys Acta Rev. Cancer*. 2019. 1871(1): 160PERL..
- 16 Makalowska I., Kubiak M. G. Protein-Coding genes' Retrocopies and their Functions. *Viruses*. 2017. 9(4): 80.
- 17 Tóth K., Pezic D., Stuwe E., Webster A. The piRNA pathway guards the germline genome against transposable elements. *Non-Coding RNA Reprod. Syst.* 2015. 886:51–77.
- 18 Vagin V. V. et al. Minotaur is critical for primary piRNA biogenesis. *RNA*. 19 (8): 1064-1077.
- 19 Manelli V. et al. Daedalus and Gasz recruit Armitage to mitochondria, bringing piRNA precursors to the biogenesis machinery. *Genes Dev.* 2019. 33(13-14): 844-856.
- 20 Pippadpally S., Venkatesh T. Deciphering piRNA biogenesis through cytoplasmic granules, mitochondria and exosomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2020. 695.
- 21 Fu Q., Wang J. Mammalian piRNAs Biogenesis, function, and mysteries. *Spermatogenesis*. 2014. 4: e27889.
- 22 Zhu X., Zhi E., Li H. MOV10L1 in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons during spermatogenesis. *Reproduction*. 2015. 149: R229-R235.
- 23 Holt JE, Stanger SJ, Nixon B, McLaughlin EA. Non-coding RNA in spermatogenesis and epididymal maturation. *Adv Exp Med Biol*. 2016. 886:95–120.
- 24 Luo L.F., Hou C.C., Yang W.X. Small non-coding RNAs and their associated proteins in spermatogenesis. *Gene*. 2016. 578(2):141–157.
- 25 Tahmasbpour E., Balasubramanian D., Agarwal A. A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART) *J. Assist. Reprod. Genet.* 2014. 31:1115–1137.
- 26 Wang X, Lv C, Guo Y, Yuan S. Mitochondria Associated Germinal Structures in Spermatogenesis: piRNA Pathway Regulation and Beyond. *Cells*. 2020. 9(2):399.
- 27 Kim W. K. PIWI Proteins and piRNAs in the Nervous System. *Mol Cells*. 2019. 42(12):828-835.
- 28 Zuo L, Wang Z, Tan Y, Chen X, Luo X. piRNAs and their functions in the brain. *Int J Hum Genet*. 2016. 16(1–2):53–60.
- 29 Lee EJ, Banerjee S, Zhou H, Jammalamadaka A, Arcila M, Manjunath B, Kosik KS. Identification of piRNAs in the central nervous system. *Rna*. 2011. 17(6):1090–1099.
- 30 Phay M, Kim HH, Yoo S. Analysis of piRNA-Like Small Non-coding RNAs Present in Axons of Adult Sensory Neurons. *Mol Neurobiol*. 2018. 55(1):483–494.

- 31 Imai Y., Wakisaka T. K., The dawn of piRNA research in various neuronal disorders. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2019. 24:1440-1451.
- 32 Rajan K. S., Ramasamy S. Retrotransposons and piRNA: the missing link in central nervous system. *Neurochem. Int*. 2014. 77, 94–102.
- 33 Rajan K.S., Velmurugan G., Pandi G., Ramasamy S. miRNA and piRNA mediated Akt pathway in heart: antisense expands to survive. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2014. 55:153–156.
- 34 Colli C. et al. PIWI-interacting RNAs are differentially expressed during cardiac differentiation of human pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2020. 5(5):e0232715.
- 35 Rajan K.S., Velmurugan G., Gopal P., Ramprasath T., Babu D.D., Krithika S., Jenifer Y.C., Freddy A., William G.J., Kalpana K., et al. Abundant and Altered Expression of PIWI-Interacting RNAs during Cardiac Hypertrophy. *Heart Lung Circ*. 2016. 25:1013–1020.
- 36 Rajan KS, Ramasamy S, George-William JN, Rajendhran J. Emerging cardiac non-coding landscape: The importance of meta-analysis. *Biochimie*. 2017. 133:87–94.
- 37 Guo B., Li D., Du L., Zhu X. piRNAs: biogenesis and their potential roles in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2020. 39(2):567-575.
- 38 Cheng Y., Wang Q., Jiang W., Bian Y., Zhou Y., Gou A., Zhang W., Fu K., Shi W. Emerging roles of piRNAs in cancer: Challenges and prospects. *Aging*. 2019. 11:9932–9946.
- 39 Ng K.W., Anderson C., Marshall E.A., Minatel B.C., Enfield K.S., Saprunoff H.L., Lam W.L., Martinez V.D. Piwi-interacting RNAs in cancer: Emerging functions and clinical utility. *Mol. Cancer*. 2016. 15:5–19.
- 40 Skvortsova K., Stirzaker C., Taberlay P. The DNA methylation landscape in cancer. *Essays Biochem*. 2019. 63(6): 797-811.
- 41 Liu J, Zhang S, Cheng B. Epigenetic roles of PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in cancer metastasis. *Oncol Rep*. 2018. 40:2423–2434.
- 42 Krishnan AR, Korrapati A, Zou AE, Qu Y, Wang XQ, Califano JA, Wang-Rodriguez J, Lippman SM, Hovell MF, Ongkeko WM. Smoking status regulates a novel panel of PIWI-interacting RNAs in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2017. 65:68–75.
- 43 Sabatini M. E., Chiocca S. Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *Br J Cancer*. 2020. 122(3): 306-314.
- 44 Yu Y., Xiao J., Hann S.S. The emerging roles of PIWI-interacting RNA in human cancers. *Cancer Manag. Res*. 2019. 11:5895–5909.

- 45 Irimie A.I., Braicu C., Sonea L., Zimta A.A., Cojocneanu-Petric R., Tonchev K., Mehterov N., Diudea D., Buduru S., Berindan-Neagoe I. A Looking-Glass of Non-coding RNAs in oral cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. 18:2620.
- 46 Dictionary of Cancer Terms. National Cancer Institute.
- 47 Fathizadeh H., Asemi Z. Epigenetic roles of PIWI proteins and piRNAs in lung cancer. *Cell Biosci.* 2019. 9:102.
- 48 Liu Y., Dou M., Song X., Dong Y., Liu S., Liu H., Tao J., Li W., Yin X., Xu W. The emerging role of the piRNA/piwi complex in cancer. *Mol. Cancer.* 2019. 18:123.
- 49 Lordick F. et al. Gastric cancer. *Lancet.* 2020. 396 (10251): 635-648.
- 50 Martinez VD, Enfield KSS, Rowbotham DA, Lam WL. An atlas of gastric PIWI-interacting RNA transcriptomes and their utility for identifying signatures of gastric cancer recurrence. *Gastric Cancer.* 2016. 19:660-665.
- 51 Dekker E. et al. Colorectal cancer. *The Lancet.* 2019. 394 (10207): 1467-1480.
- 52 Li D., Sun X., Yan D., Huang J., Luo Q., Tang H., Peng Z. Piwil2 modulates the proliferation and metastasis of colon cancer via regulation of matrix metalloproteinase 9 transcriptional activity. *Exp. Boil. Med.* 2012. 237:1231–1240.
- 53 Vychytilova-Faltejskova P, Stitkovcova K, Radova L, Sachlova M, Kosarova Z, Slaba K, et al. Circulating PIWI-Interacting RNAs piR-5937 and piR-28876 Are Promising Diagnostic Biomarkers of Colon Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018. 27((9)):1019–28.
- 54 Villanueva A. Hepatocellular carcinoma. *The new England journal of Medicine.* 2019. 380(15): 1450-1462.
- 55 Dasgupta P. et al. Global Trends in Incidence Rates of Primary Adult Liver Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology.* 2020. 10:171.
- 56 Siegel R. L. et al. Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2021. 71. 7-33.
- 57 Kulik L., El-Serag H. B. Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology.* 2019. 156(2). 477-491.
- 58 Iliev R., Fedorko M., Machackova T., Mlcochova H., Svoboda M., Pacik D., Dolezel J., Stanik M., Slaby O. Expression levels of PIWI-interacting RNA, piR-823, are deregulated in tumor tissue, blood serum and urine of patients with renal cell carcinoma. *Anticancer. Res.* 2016. 36:6419.
- 59 Gray R E, Harris G T. Renal cell carcinoma: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician.* 2019. 99(3): 179-184.
- 60 Chu H., Hui G., Yuan L., Shi D., Wang Y., Du M., Zhong D., Ma L., Tong N., Qin C., et al. Identification of novel piRNAs in bladder cancer. *Cancer Lett.* 2015. 356:561–567.

- 61 Rajendran V., Jain M. V. In Vitro Tumorigenic Assay: Colony Forming Assay for Cancer Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2018. 1692:89-95.
- 62 Kumar S K. et al. Multiple myeloma. *Nature Reviews Disease Primers.* 2017. 3: 17046.
- 63 Cordeiro A., Monzó M., Navarro A. Non-Coding RNAs in Hodgkin Lymphoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2017. 18:1154.
- 64 Han H., Fan G., Song S., Jiang Y., Qian C., Zhang W., Su Q., Xue X., Zhuang W., Li B. piRNA-30473 contributes to tumorigenesis and poor prognosis by regulating m6A RNA methylation in DLBCL. *Blood.* 2020. 2019003764.
- 65 McFaline-Figuera J R, Lee E Q. Brain Tumors. *The American Journal of Medicine.* 2018. 131 (8): 874-882.
- 66 Mahapatra S., Challagundla B. K. Neuroblastoma. *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.* 2020.
- 67 Wu X., Pan Y., Fang Y., Zhang J., Xie M., Yang F., Yu T., Ma P., Li W., Shu Y. The Biogenesis and Functions of piRNAs in Human Diseases. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2020. 21: 108-120.
- 68 Shen S., Yu H., Liu X., Liu Y., Zheng J., Wang P., Gong W., Chen J., Zhao L., Xue Y. PIWIL1/piRNA-DQ593109 Regulates the Permeability of the Blood-Tumor Barrier via the MEG3/miR-330-5p/RUNX3 Axis. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2018. 10:412–425.
- 69 Roy J., Mallick B. Investigating piwi-interacting RNA regulome in human neuroblastoma. *Genes Chromosom. Cancer.* 2018. 57:339–349.
- 70 Ganesan R., Mallets E., Gomez-Cambronero J. The transcription factors Slug (SNAI2) and Snail (SNAI1) regulate phospholipase D (PLD) promoter in opposite ways towards cancer cell *invasion*. *Molecular Oncology.* 2016. 10(5): 663-676.
- 71 Tan L, Mai D, Zhang B, Jiang X, Zhang J, Bai R, Ye Y, Li M, Pan L, Su J, et al. PIWI-interacting RNA-36712 restrains breast cancer progression and chemoresistance by interaction with SEPW1 pseudogene SEPW1P RNA. *Mol Cancer.* 2019. 18(1):9.
- 72 Oner C, Turgut Cosan D, Colak E. Estrogen and androgen hormone levels modulate the expression of Piwi interacting rna in prostate and breast cancer. *PLoS One.* 2016. 11(7):e0159044.
- 73 Singh G., Roy J., Rout P., Mallick B.A.-O. Genome-wide profiling of the piwi-interacting rna-mrna regulatory networks in epithelial ovarian cancers. *PLoS ONE.* 2018. 13:e0190485.
- 74 Lim S.L., Ricciardelli C., Oehler M.K., Tan I.M.D.D.A., Russell D., Grützner F. Overexpression of piRNA Pathway Genes in Epithelial Ovarian Cancer. *PLoS ONE.* 2014. 9:e99687.
- 75 PDQ Adult Treatment Editorial Board. Cervical Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. 2021.

- 76 Zuo Y., Liang Y., Zhang J., Hao Y., Li M., Wen Z., Zhao Y. Transcriptome Analysis Identifies Piwi-Interacting RNAs as Prognostic Markers for Recurrence of Prostate Cancer. *Front Genet.* 2019. 10: 1018.
- 77 Ferreira HJ, Heyn H, Garcia del Muro X, Vidal A, Larriba S, Muñoz C, et al. Epigenetic loss of the PIWI/piRNA machinery in human testicular tumorigenesis. *Epigenetics.* 2014. 9:113–118.
- 78 Rounge TB, Furu K, Skotheim RI, Haugen TB, Grotmol T, Enerly E. Profiling of the small RNA populations in human testicular germ cell tumors shows global loss of piRNAs. *Mol Cancer.* 2015. 14:153.
- 79 Müller S, et al. Next-generation sequencing reveals novel differentially regulated mRNAs, lncRNAs, miRNAs, sdRNAs and a piRNA in pancreatic cancer. *Mol. Cancer.* 2015. 14:94.
- 80 Das et al. Das B, Roy J, Jain N, Mallick B. Tumor suppressive activity of PIWI-interacting RNA in human fibrosarcoma mediated through repression of RRM2. *Molecular Carcinogenesis.* 2019. 58(3):344–357.
- 81 Saxena A., Tang D., Carninci P. piRNAs warrant investigation in Rett syndrome: an omics perspective. *Dis Markers.* 2012. 33:261–275.
- 82 Jain G., Stuebel A., Rao P., et al. A combined miRNA-piRNA signature to detect Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry.* 2019. 9(1):p. 250.
- 83 Millan J M., Linking deregulation of non-coding RNA to the core pathophysiology of Alzheimer's disease: An integrative review. *Prog Neurobiol.* 2017. 156:1-68.
- 84 Qiu W, Guo X, Lin X, Yang Q, Zhang W, Zhang Y, Zuo L, Zhu Y, Li CR, Ma C, et al. Transcriptome-wide piRNA profiling in human brains of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2017. 57:170–177.
- 85 Roy J., Sarkar A., Parida S., Ghosh Z., Mallick B. Small RNA sequencing revealed dysregulated piRNAs in Alzheimer's disease and their probable role in pathogenesis. *Mol. Biosyst.* 2017. 13:565–576.
- 86 Blauwendraat C., Nalls M. A., Singleton A. B. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2020.19 170–178.
- 87 Schulze M., Sommer A., Plotz S., Farrell M., Winner B., Grosch J., Winkler J., Riemenschneider M.J. Sporadic Parkinson's disease derived neuronal cells show disease-specific mRNA and small RNA signatures with abundant deregulation of piRNAs. *Acta Neuropathol. Commun.* 2018. 6:58.
- 88 Chandran R, Mehta SL, Vemuganti R. Non-coding RNAs and neuroprotection after acute CNS injuries. *Neurochem Int.* 2017. 111:12–22.
- 89 Saugstad JA. Non-Coding RNAs in Stroke and Neuroprotection. *Front Neurol.* 2015. 6:50.

- 90 Yang J., Xue F.T., Li Y.Y., Liu W., Zhang S. Exosomal piRNA sequencing reveals differences between heart failure and healthy patients. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2018. 22:7952–7961.
- 91 Pegtel D M., Gould S J. Exosomes. *Annual Review of Biochemistry.* 2019. 88: 487-514.
- 92 Lipps C. et al. Non-Invasive Approach for Evaluation of Pulmonary Hypertension Using Extracellular Vesicle-Associated Small Non-Coding RNA. *Biomolecules.* 2019. 9(11): 666.
- 93 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33011960/>
- 94 Chen W, Liu D, Li QZ, Zhu H. The function of ncRNAs in rheumatic diseases. *Epigenomics.* 2019. 11:821–833.
- 95 Pleštilová L, Neidhart M, Russo G, Frank-Bertoncelj M, Ospelt C, Ciurea A, Kolling C, Gay RE, Michel BA, Vencovský J, et al. Expression and regulation of PIWIL-proteins and PIWI-interacting RNAs in rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2016. 11(e0166920).
- 96 Henaoui I.S., Jacovetti C., Guerra Mollet I., Guay C., Sobel J., Eliasson L., Regazzi R. PIWI-interacting RNAs as novel regulators of pancreatic beta cell function. *Diabetologia.* 2017. 17:4368–4376.
- 97 Shah R., Murthy V., Pacold M., Danielson K., Tanriverdi K., Larson M.G., Hanspers K., Pico A., Mick E., Reis J. Extracellular RNAs are associated with insulin resistance and metabolic phenotypes. *Diabetes Care.* 2017. 40:546–553.
- 98 Chen S., Yuan M., Liu Y., Zhao X., Lian P., Chen Y., Liu B., Lu L. Landscape of microRNA in the aqueous humour of proliferative diabetic retinopathy as assessed by next-generation sequencing. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 2019. 47:925–936.
- 99 Sivagurunathan S., Raman R., Chidambaram S. PIWI-like protein, HIWI2: A novel player in proliferative diabetic retinopathy. *Exp. Eye Res.* 2018. 177:191–196.
- 100 Sivagurunathan S., Palanisamy K., Arunachalam J.P., Chidambaram S. Possible role of HIWI2 in modulating tight junction proteins in retinal pigment epithelial cells through Akt signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 2017. 427:145–156.
- 101 de Araujo L.S., Ribeiro-Alves M. and Leal-Calvo T. et al. Reprogramming of small noncoding RNA populations in peripheral blood reveals host biomarkers for latent and active *Mycobacterium tuberculosis* infection. *mBio* 2019.10, e01037–19.
- 102 WHO. 2020. Global tuberculosis report.
- 103 Babatunde K. A., Mbagwu S., Hernandez-Castaneda M. A., Adapa S. R., Walch M., Filgueira L., et al. Malaria infected red blood cells release small regulatory RNAs through extracellular vesicles. *Sci. Rep.* 2018. 8, 884.

- 104 Babatunde K. A., Subramanian B. Y., Ahouidi A. D., Murillo P. M., Walch M., Mantel P. Y. Role of Extracellular Vesicles in Cellular Cross Talk in Malaria. *Front. Immunol.* 2020.11, 22.
- 105 Arun A. et al., Trypanosoma cruzi Modulates PIWI-Interacting RNA Expression in Primary Human Cardiac Myocytes during the Early Phase of Infection. *Int J Mol Sci.* 2020. 21(24):9439.
- 106 Yao H, Wang X, Song J, Wang Y, Song Q, Han J. Coxsackievirus B3 infection induces changes in the expression of numerous piRNAs. *Arch Virol.* 2020. 165(1):105–14.
- 107 Liu X., Liu C., Liu G., Luo W., Xia N. COVID-19: Progress in diagnostics, therapy and vaccination. *Theranostics.* 2020. 10 (17): 7821-7835.
- 108 Cai D. et al., Innate and Adaptive Immunity of Murine Neural Stem Cell-Derived piRNA Exosomes/Microvesicles against Pseudotyped SARS-CoV-2 and HIV-Based Lentivirus. *iScience.* 2020. 23(12):101806.
- 109 Mukherjee A, Koli S, Reddy K. Regulatory non-coding transcripts in spermatogenesis: shedding light on 'dark matter'. *Andrology.* 2014. 2: 360–369.
- 110 Boissiere A, Gala A, Ferrieres-Hoa A, Mullet T, Baillet S, Petiton A, Torre A, Hamamah S. Cell-free and intracellular nucleic acids: new non-invasive biomarkers to explore male infertility. *Basic Clin Androl.* 2017. 27:7–15.
- 111 Lenart P, Novak J, Bienertova-Vasku J. PIWI-piRNA pathway: setting the pace of aging by reducing DNA damage. *Mechan Ageing Develop.* 2018. 173:29–38.
- 112 Sturm A, Ivics Z, Vellai T. The mechanism of ageing: primary role of transposable elements in genome disintegration. *Cellular and molecular life sciences: CMLS.* 2015. 72(10):1839–1847.
- 113 Sturm A., Perczel A., Ivics Z., Vellai T., The Piwi-piRNA pathway: road to immortality. *Aging Cell.* 2017. 16(5): 906–911.
- 114 Rajender S., Meador C., Agarwal A. Small RNA in spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Shol Ed).* 2012. 4:1266-74.
- 115 Lehtiniemi T., Kotaja N. Germ granule-mediated RNA regulation in male germ cells. *Reproduction.* 2018. 155(2):R77-R91.
- 116 Overview of High-Throughput Screening, Michael Entzeroth,¹ Horst Flotow,¹ and Peter Condron¹
- 117 Data Analysis for High-Throughput RNAi Screening David O. Azorsa, Megan A. Turnidge, and Shilpi Arora
- 118 Reverse-Transcription PCR (RT-PCR) Julia Bachman¹
- 119 RIP: RNA Immunoprecipitation Miriam Gagliardi and Maria R. Matarazzo

- 120 Luciferase Genes as Reporter Reactions: How to Use Them in Molecular Biology? L. Cevenini, M.M. Calabretta, D. Calabria, A. Roda and E. Michelini
- 121 Computational Methods and Online Resources for Identification of piRNA-Related Molecules
- 122 Assumpção C.B., Calcagno D.Q., Araújo T.M.T., Batista dos Santos S.E., Ribeiro dos Santos Â.K.C., Riggins G.J., Burbano R.R., Assumpção P.P. The role of piRNA and its potential clinical implications in cancer. *Epigenomics*. 2015. 7:975–984.
- 123 Han Y-N, Li Y, Xia S-Q, Zhang Y-Y, Zheng J-H, Li W. PIWI Proteins and PIWI-Interacting RNA: Emerging Roles in Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2017. 44(1):1–20.
- 124 Martinez V.D., Vucic E.A., Thu K.L., Hubaux R., Enfield K.S., Pikor L.A., Becker-Santos D.D., Brown C.J., Lam S., Lam W.L. Unique somatic and malignant expression patterns implicate PIWI-interacting RNAs in cancer-type specific biology. *Sci. Rep.* 2015. 5:10423.

