



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ

ΕΥΡΕΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΣΕ ΚΩΔΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΟ ALZHEIMER ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ
ΤΗΝ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΩΝ miRNAs

Καμπάνταη Αναστασία

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Υπεύθυνος

ΧΑΤΖΗΓΕΩΡΓΙΟΥ ΑΡΤΕΜΙΣ

Α' Βαθμίδα

Λαμία, 2023-2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ

ΕΥΡΕΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΣΕ ΚΩΔΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΟ ALZHEIMER ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ
ΤΗΝ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΩΝ miRNAs

Καμπάνταη Αναστασία

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Υπεύθυνος

ΧΑΤΖΗΓΕΩΡΓΙΟΥ ΑΡΤΕΜΙΣ

Α΄ Βαθμίδα

Λαμία, 2023-2024

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

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

Ημερομηνία: 20/06/2024

Ο – Η Δηλ.

Καμπάνταη Αναστασία

(Υπογραφή)

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

ΕΥΡΕΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΩΝ ΣΕ ΚΩΔΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΟ ALZHEIMER ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ
ΤΗΝ ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΩΝ miRNAs

Καμπάντα Αναστασία

Τριμελής Επιτροπή:

Χατζηγεωργίου Άρτεμις, Α' Βαθμίδα (επιβλέπων/σα)

Μπάγκος Παντελής, Α' Βαθμίδα

Μπράλιου Γεωργία, Επίκουρος Καθηγήτρια

Περίληψη

Η νόσος Alzheimer είναι μία χρόνια εκφυλιστική νόσος του εγκεφάλου. Το βασικό χαρακτηριστικό της είναι η απώλεια μνήμης. Ωστόσο, όσο η νόσος εξελίσσεται επηρεάζει και άλλες λειτουργίες του εγκεφάλου, όπως την δυνατότητα παραγωγής ολοκληρωμένου λόγου, υπολογισμού απλών αριθμητικών πράξεων, προσανατολισμού και άλλων καθημερινών διαδικασιών. Τα συμπτώματα δεν είναι πάντα ίδια και ξεκάθαρα, αφού υπάρχουν πολλοί παράγοντες που οδηγούν στη νόσο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, όχι μόνο να μη μπορεί να διαγνωσθεί σε πρώιμο στάδιο η νόσος, αλλά και να μην μπορεί να δοθεί κάποια θεραπεία. Έτσι, μεγάλη μερίδα ηλικιωμένων χάνει τη ζωή του πάσχοντας από Alzheimer ή κάποιο άλλο είδος άνοιας.

Όπως για κάθε ασθένεια, έτσι και στο Alzheimer, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να μπορεί να διεξαχθεί σωστή και έγκαιρη διάγνωση, και ακόμα σημαντικότερο να βρεθεί ένας τρόπος να θεραπευτούν αποτελεσματικά οι ασθενείς. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι βιοχημικές αλλαγές στον εγκέφαλο, οι οποίες οδηγούν στην ανάπτυξη του Alzheimer. Εάν λυθεί ο γρίφος που κρύβουν αυτές οι αλλαγές και τι είναι αυτό που τις πυροδοτεί, ίσως η επιστημονική κοινότητα να βρεθεί ένα βήμα πιο κοντά στην έγκαιρη παρέμβαση της νόσου. Σε αυτή την πτυχιακή εργασία, θα μελετηθεί η διαφοροποιημένη έκφραση μορίων microRNA και RNA σε ιστούς του προμετωπιαίου φλοιού του εγκεφάλου, τις μεταλλάξεις που διαμορφώνουν αυτές τις διαφοροποιημένες εκφράσεις, καθώς και πώς επηρεάζεται η γονιδιακή έκφραση.

Abstract

Alzheimer's disease is a chronic degenerative disease of the brain. Its main characteristic is memory loss. However, as the disease progresses, it affects other brain functions such as the ability to produce complete speech, calculate simple arithmetic operations, orientation and other everyday processes. Symptoms are not always the same and clear-cut, as there are many factors that lead to the disease. As a result, not only can the disease not be diagnosed at an early stage, but also no treatment can be given. Thus, a large proportion of elderly people lose their lives suffering from Alzheimer's or some other type of dementia.

As with any disease, in Alzheimer's, it is particularly important to be able to carry out a correct and timely diagnosis, and even more importantly to find a way to treat patients effectively. Of particular interest are the biochemical changes in the brain that lead to the development of Alzheimer's disease. If the puzzle of what these changes are and what triggers them is solved, the scientific community may be one step closer to early intervention in the disease. In this thesis, we will study the differential expression of microRNA and RNA molecules in prefrontal cortex tissues of the brain, the mutations that modulate these differential expressions, and how gene expression is affected.

Περίληψη.....	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή	10
1.1 Γνωρίζοντας τη Νόσο Alzheimer	10
1.2 Ριβονουκλεϊκές αλυσίδες και Πρωτεΐνες.....	11
1.3 Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί	12
1.4 Στόχοι της Εργασίας	13
2. Υλικά και Μέθοδοι	14
2.1 Βάσεις Δεδομένων και Εργαλεία	14
2.1.1 Βάση Δεδομένων miRbase	14
2.1.2 Βάση Δεδομένων dbSNP	14
2.1.3 Βάση Δεδομένων ClinVar	15
2.1.4 Βάση Δεδομένων microT-CDS.....	15
2.1.5 Εργαλείο FastQC.....	15
2.1.6 Εργαλείο miRDeep2	16
2.1.7 Εργαλείο Bowtie.....	16
2.1.8 Εργαλείο DESeq2.....	16
2.1.9 Εργαλείο EdgeR	17
2.2 Ανάλυση Διαφοροποιημένης Γονιδιακής Έκφρασης σε microRNAs	17
2.3 Ανάλυση Διαφοροποιημένης Γονιδιακής Έκφρασης σε mRNAs	19
2.4 Εύρεση Μονονουκλεοτιδικών Πολυμορφισμών	21
3. Αποτελέσματα	22
3.1 Ανάλυση Διαφοροποιημένης Έκφρασης microRNA	22
3.2 Ανάλυση Διαφοροποιημένης Έκφρασης mRNA	27
4. Συμπεράσματα	36
5. Βιβλιογραφία.....	37

Εικόνα 1 : MDS plots για τις DGEA αναλύσεις του mRNA 20

Εικόνα 2 : MA-plot on condition AD vs NC , microRNA DGE Analysis 22

Εικόνα 3 : Principal Component Analysis on condition AD vs NC, microRNA DGE Analysis 23

Εικόνα 4 : MAplots τυπικών δειγμάτων

Εικόνα 5 : MAplots ασθενών δειγμάτων

Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.

Πίνακας 1 : Το σύνολο των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε για τη DGEA του microRNA 18

Πίνακας 2 : Το σύνολο δειγμάτων που επιλέχθηκε αρχικά για την DGEA του mRNA 19

**Πίνακας 3 : Αποτελέσματα Ανάλυσης DGE στα microRNA. Εμφάνιση με σειρά σημαντικότητας
βάσει P-adjusted. 25**

**Πίνακας 4 : Αποτελέσματα Ανάλυσης DGE στα mRNA. Εμφάνιση με σειρά σημαντικότητας βάσει P-
Value 31**

Πίνακας 5 Πολυμορφισμοί στη κωδική περιοχή του γονιδίου RAB15 33

Πίνακας 6 Πολυμορφισμοί στη κωδική περιοχή του γονιδίου CHRN2 34

Πίνακας 7 Πολυμορφισμοί στη κωδική περιοχή του γονιδίου THY1 35

1. Εισαγωγή

1.1 Γνωρίζοντας τη Νόσο Alzheimer

Η νόσος Alzheimer (NA) είναι μία χρόνια νευροεκφυλιστική νόσος που επηρεάζει τον εγκέφαλο και προκαλεί σταδιακή απώλεια της νοητικής λειτουργίας, καθώς αποτελεί και την πιο συχνή μορφή άνοιας. [1] Υπάρχουν πάνω από 50 εκατομμύρια άτομα που πάσχουν από τη νόσο, με τον αριθμό αυτό να αυξάνεται σημαντικά σε βάθος χρόνου. Στη δομή του εγκεφάλου ενός ασθενούς παρατηρείται συρρίκνωση του εγκεφαλικού φλοιού και του υποκάμπου και ταυτόχρονα μεγέθυνση των κοιλοτήτων του εγκεφάλου. Τα αίτια στα οποία οφείλεται η εμφάνιση της νόσου είναι ακόμα ασαφή. Ωστόσο, μελέτες δείχνουν πως οφείλεται στο περιβάλλον που ζει ο ασθενής και στον τρόπο ζωής του, αλλά ακόμα σημαντικότερο ρόλο στην εμφάνιση της νόσου έχει η γενετική του πληροφορία. [2]

Στις πρώτες υποθέσεις σχετικά με τη NA, υποστηρίζεται πως η νόσος οφείλεται στα νευροϊνιδιακά συμπλέγματα συσσωρευμένης φωσφορυλιωμένης Ταυ-πρωτεΐνης (P-tau) και στη συσσώρευση της πρωτεΐνης β-αμυλοειδούς (Αβ40/Αβ42). Οι νευροϊνιδιακές δεσμίδες που δημιουργούνται από την P-tau στο κυτταρόπλασμα των νευρικών περικαρυών, των αξόνων και των δενδριτών μπορούν να οδηγήσουν σε καταστροφή του κυτταρικού σκελετού και απώλεια σημαντικών πρωτεϊνών. Ο βασικός παράγοντας που οδηγεί στην παθολογία της P-tau είναι η αύξηση του ποσοστού πρωτεΐνης Αβ42/Αβ40.

Αναλυτικότερα, με τη πάροδο των χρόνων, η αποικοδόμηση της β-αμυλοειδούς πρωτεΐνης από τα πρωτεολυτικά ένζυμα διάσπασης, όπως η β-σεκρετάση (BACE1) και η γ-σεκρετάση (GS), μειώνεται με αποτέλεσμα την δημιουργία αμυλοειδών πλακών. Οι πρωτεΐνες Αβ40 και Αβ42 αποτελούν την ώριμη μορφή της διαμεμβρανικής πρόδρομης πρωτεΐνης αμυλοειδούς (APP). Η αυξημένη ποσότητα της Αβ40/Αβ42 πρωτεΐνης στον υποκάμφο, την αμυγδαλή και τον εγκεφαλικό φλοιό οδηγούν βραχυπρόθεσμα σε απώλεια συνάψεων, νοητικές διαταραχές και διέγερση των αστροκυττάρων και της μικρογλοίας. Οι δύο τελευταίοι τύποι κυττάρων είναι οι πιο σημαντικοί για τη δημιουργία φλεγμονής στο ΚΝΣ. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η μικρογλοία βοηθάει στη δημιουργία και συντήρηση των νευρώνων, ενώ τα αστροκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία συνάψεων και νευρώνων, συμμετέχουν στη συναπτική μετάδοση, καθώς και στον σχηματισμό και διατήρηση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (Blood-brain barrier ή BBB). [3] Όταν ενεργοποιηθούν, όμως, ως φαγοκύτταρα, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν αρκετή ποσότητα νευροτοξικών παραγόντων που μπορεί να δημιουργήσει βλάβη στο ΚΝΣ. Μία υπόθεση αρκετά καινούρια, υποστηρίζει πως η χαλάρωση των συνδέσεων του BBB επιτρέπει σε αιματικά κύτταρα και πλάσμα να εισέρχονται στο ΚΝΣ προκαλώντας φλεγμονές και χαλώντας την ομοιόσταση του εγκεφάλου. [4]

Τέλος, άλλοι παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν τη νόσο είναι το οξειδωτικό στρες και ο τραυματισμός των χολινεργικών νευρώνων. Εν συντομία, η ακετυλοχολίνη συντίθεται στο κυτταρόπλασμα των χολινεργικών νευρώνων. Φυσιολογικά, η ακετυλοχολίνη εμπλέκεται σε διάφορες γνωστικές διαδικασίες, όπως η μάθηση, η μνήμη, η συγκέντρωση κλπ. Το Β-αμυλοειδές πιστεύεται ότι επηρεάζει τη χολινεργική νευροδιαβίβαση και προκαλεί μείωση της πρόσληψης χολίνης και απελευθέρωση ακετυλοχολίνης.

Όπως φαίνεται από τις βασικές υποθέσεις, η ΝΑ είναι μία πολυδιάστατη ασθένεια. Όλες οι υποθέσεις αλληλοεπηρεάζονται και δε μπορεί να οριστεί η προγενέστερη. Έτσι, το ερώτημα που δημιουργείται σε αυτό το σημείο είναι, τι πυροδοτεί την αλυσίδα αυτών των πρωτεϊνικών αλλαγών;

1.2 Ριβονουκλεϊκές αλυσίδες και Πρωτεΐνες

Οι ριβονουκλεϊκές αλυσίδες (RNA) είναι ένας τύπος νουκλεϊκού οξέος, που σημαίνει ότι αποτελείται από νουκλεοτίδια. Ένα νουκλεοτίδιο αποτελείται από ένα μόριο σακχάρου, μια αζωτούχο βάση και μια φωσφορική ομάδα. Στο RNA, το μόριο σακχάρου είναι η ριβόζη, η οποία διαφέρει από το δεοξυριβοζικό σάκχαρο που βρίσκεται στο DNA.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι RNA που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση. Το Messenger RNA (mRNA) μεταφέρει τις γενετικές πληροφορίες από το DNA στα ριβοσώματα, τα οποία είναι ο κυτταρικός μηχανισμός, υπεύθυνος για τη σύνθεση των πρωτεϊνών. Κατά τη διάρκεια της μεταγραφής, ένα ένζυμο που ονομάζεται RNA πολυμεράση διαβάζει το πρότυπο DNA και συνθέτει ένα μόριο mRNA που είναι συμπληρωματικό ως προς την αλληλουχία του DNA. Στη συνέχεια, το mRNA μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου μεταφράζεται σε πρωτεΐνη από τα ριβοσώματα.

Το transfer RNA (tRNA) είναι ένας άλλος τύπος RNA που παίζει κρίσιμο ρόλο στην πρωτεϊνοσύνθεση. Τα μόρια tRNA μεταφέρουν συγκεκριμένα αμινοξέα στο ριβόσωμα, όπου προστίθενται στην αναπτυσσόμενη πρωτεϊνική αλυσίδα. Κάθε μόριο tRNA έχει μια συγκεκριμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων που αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο αμινοξύ και περιέχει επίσης μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων που ονομάζεται αντικωδικόνιο και μπορεί να ζευγαρώσει με το αντίστοιχο κωδικόνιο στο μόριο mRNA.

Το ριβοσωμικό RNA (rRNA) παρέχει το δομικό πλαίσιο για το ριβόσωμα και συμβάλλει επίσης στην κατάλυση των χημικών αντιδράσεων που εμπλέκονται στη σύνθεση των πρωτεϊνών. [5]

Εκτός από αυτούς τους τρεις κύριους τύπους RNA, υπάρχουν και άλλοι τύποι ρυθμιστικών RNA που κατέχουν σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή έκφραση. Για παράδειγμα, τα μακρά μη κωδικά RNAs (lncRNAs) είναι ένας άλλος τύπος ρυθμιστικού RNA που μπορεί να επηρεάσει τη γονιδιακή έκφραση αλληλεπιδρώντας με το DNA, το RNA ή τις πρωτεΐνες. Τα microRNAs (miRNAs) είναι μικρά μόρια RNA που μπορούν να συνδεθούν με μόρια mRNA και να τα εμποδίσουν να μεταφραστούν σε πρωτεΐνες, κατακτώντας βασικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων σε μεταγραφικό επίπεδο. [6]

Τα miRNAs είναι μία αρκετά πρόσφατη ανακάλυψη, η οποία βοήθησε την επιστημονική κοινότητα να κατανοήσει αποτελεσματικότερα τη λειτουργία του κυττάρου και να δοθεί εξήγηση στις διαφορές έκφρασης των πρωτεϊνών ανάμεσα σε υγιή και ασθενή άτομα. Όπως προαναφέρθηκε, είναι μικρά μόρια, αποτελούμενα κατά μέσο όρο από 18-22 βάσεις και συνήθως προσδένονται στην 3' αμετάφραστη περιοχή. Υπάρχουν, όμως, κι άλλα σημεία στα οποία προσδένονται τα miRNAs και ίσως με διαφορετική δράση, αλλά θεωρούμε την πιο διαδεδομένη δράση τους την καταστολή της έκφρασης των mRNA. Αξιοσημείωτο, επίσης, είναι το γεγονός ότι ένα miRNA μπορεί να προσδεθεί σε πολλές διαφορετικές

αλυσίδες mRNA, με αποτέλεσμα να ρυθμίζει την έκφραση πολλών διαφορετικών πρωτεϊνών. [7]

Οι πρωτεΐνες είναι μακρομόρια που αποτελούνται από αλυσίδες αμινοξέων. Οι χημικές ιδιότητες των 20 διαφορετικών αμινοξέων καθορίζουν τις ιδιότητες της πρωτεϊνικής αλυσίδας, συμπεριλαμβανομένης της διαλυτότητας, του σχήματος και της αντιδραστικότητάς της. Η πρωτογενής δομή μιας πρωτεΐνης αφορά τη γραμμική αλληλουχία των αμινοξέων, ενώ η δευτερογενής δομή αναφέρεται σε τοπικές περιοχές αναδίπλωσης, όπως οι άλφα έλικες ή η βήτα πτυχωτή επιφάνεια. Η τριτογενής δομή παρουσιάζει το συνολικό τρισδιάστατο σχήμα της πρωτεΐνης, το οποίο σταθεροποιείται από διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, όπως οι δεσμοί υδρογόνου, οι δυνάμεις van der Waals και οι δισουλφιδικοί δεσμοί. Ορισμένες πρωτεΐνες έχουν τεταρτοταγή δομή, κατά την οποία πολλαπλές πρωτεϊνικές υπομονάδες διατάσσονται, δημιουργώντας μία νέα πρωτεΐνη.

Το σχήμα και η δομή μιας πρωτεΐνης είναι κρίσιμα για τη λειτουργία της, καθώς διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης μπορεί να έχουν διαφορετικές χημικές ιδιότητες που της επιτρέπουν να αλληλεπιδρά με άλλα μόρια στο κυτταρικό περιβάλλον. Για παράδειγμα, τα ένζυμα διαθέτουν συγκεκριμένους θύλακες ή ενεργά κέντρα που τους επιτρέπουν να συνδέονται με τα μόρια υποστρώματος και να καταλύουν χημικές αντιδράσεις. Οι δομικές πρωτεΐνες, όπως το κολλαγόνο ή η κερατίνη, έχουν μακρύ, ινώδες σχήμα που τους επιτρέπει να παρέχουν στήριξη και σταθερότητα στα κύτταρα και τους ιστούς. Οι σηματοδοτικές πρωτεΐνες, όπως οι ορμόνες ή οι αυξητικοί παράγοντες, μπορεί να έχουν συγκεκριμένο σχήμα ή χημική τροποποίηση που τους επιτρέπει να συνδέονται με συγκεκριμένους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων.

Οι αλλαγές στο κυτταρικό περιβάλλον μπορούν να διαταράξουν τη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών, γεγονός που μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες για την κυτταρική λειτουργία και την υγεία. Για παράδειγμα, οι αλλαγές στη θερμοκρασία, το pH ή τη συγκέντρωση αλάτων μπορούν να διαταράξουν τους δεσμούς υδρογόνου και άλλες αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν τη δομή των πρωτεϊνών, οδηγώντας σε μετουσίωση ή κακή αναδίπλωση. Οι δυσμορφικές πρωτεΐνες μπορούν να σχηματίσουν συσσωματώματα, τα οποία έχουν την ικανότητα να παρεμβαίνουν στις φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες και να οδηγούν σε ασθένειες.

Συνολικά, η μελέτη των πρωτεϊνών είναι απαραίτητη για την κατανόηση της κυτταρικής λειτουργίας και των μηχανισμών των ασθενειών. Τεχνικές όπως η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και η φασματομετρία μάζας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών και των αλληλεπιδράσεών τους με άλλα μόρια. Υπολογιστικές μέθοδοι, όπως προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών. [8]

1.3 Μονονουκλεοτιδικοί Πολυμορφισμοί

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) είναι ο πιο κοινός τύπος γενετικής παραλλαγής που απαντάται στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Εμφανίζονται όταν μια απλή νουκλεοτιδική βάση (A, C, T ή G) σε μια συγκεκριμένη θέση στην αλληλουχία του DNA

αντικαθίσταται από μια διαφορετική βάση. Τα SNPs κληρονομούνται με Μεντελικό τρόπο, δηλαδή μεταβιβάζονται από τους γονείς στους απογόνους τους.

Τα SNPs μπορούν να εμφανιστούν σε κωδικές ή μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος και μπορούν να έχουν διαφορετικές επιπτώσεις στη λειτουργία και την έκφραση των γονιδίων. Ορισμένα SNPs που εμφανίζονται σε περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγή της αλληλουχίας αμινοξέων της πρωτεΐνης που παράγεται. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να επηρεάσουν τη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών και μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ασθενειών. Άλλα SNPs, που εμφανίζονται σε μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος, μπορούν να επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση μεταβάλλοντας θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, σήματα ωρίμανσης ή άλλα ρυθμιστικά στοιχεία.

Τα SNPs ερευνώνται συνήθως σε μελέτες γενετικής συσχέτισης, οι οποίες εξετάζουν τη σχέση μεταξύ των SNPs και ενός συγκεκριμένου χαρακτηριστικού ή ασθένειας. Οι μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος (GWAS) έχουν εντοπίσει χιλιάδες SNPs που σχετίζονται με ένα ευρύ φάσμα ασθενειών και χαρακτηριστικών, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις και οι νευρολογικές διαταραχές. Οι μελέτες GWAS περιλαμβάνουν συνήθως τη δημιουργία γονότυπου για μεγάλο αριθμό ατόμων μελετώντας χιλιάδες SNPs και τη σύγκριση των συχνοτήτων των αλληλομόρφων μεταξύ των ατόμων με την ασθένεια ή το χαρακτηριστικό που ενδιαφέρει και των τυπικών (άτομα χωρίς την ασθένεια ή το χαρακτηριστικό).

Με την εξέλιξη της τεχνολογίας, έχουμε τη δυνατότητα αναγνώρισης των SNPs που παρατηρούνται σε διάφορες αναλύσεις. Πλέον, υπάρχουν εκατοντάδες βάσεις δεδομένων με μεγάλο σύνολο μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών, με λίγες να είναι επαρκώς ενημερωμένες. [9]

Δυστυχώς, οι αναφορές που υπάρχουν σχετικά με τη ΝΑ είναι πολύ περιορισμένες σε αυτό το κομμάτι. Λόγω της θέσης της ασθένειας, η δειγματοληψία ασθενούς εγκεφαλικού ιστού δεν είναι εύκολη, οπότε οι γενετικές αναλύσεις που πραγματοποιούνται είναι ελάχιστες. Επιπλέον, υπάρχουν πολλές πρωτεΐνες για τις οποίες δε γνωρίζουμε τη δράση τους και δεν μπορούμε ξεκάθαρα να τις συσχετίσουμε με κάποια διαδικασία ή πάθηση.

1.4 Στόχοι της Εργασίας

Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης, πραγματοποιήθηκαν δύο αναλύσεις διαφοροποιημένης γονιδιακής έκφρασης (DGEA) για να διερευνήσουμε τις γενετικές βάσεις της νόσου του Alzheimer. Η πρώτη DGEA επικεντρώθηκε στα μόρια microRNA, τα μικρά μη κωδικά RNA μόρια, που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω σύνδεσης σε μόρια mRNA-στόχους και είτε προάγουν την αποικοδόμησή τους είτε αναστέλλουν τη μετάφρασή τους. Η δεύτερη DGEA επικεντρώθηκε στα μόρια mRNA, τα οποία είναι οι πρωταρχικοί φορείς της γενετικής πληροφορίας και διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη σύνθεση των πρωτεϊνών.

Μετά τις αναλύσεις DGEA, τα αποτελέσματα και των δύο πειραμάτων συλλέχθηκαν και φιλτραρίστηκαν σύμφωνα με γνωστούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς. Όπως έχει ήδη αναλυθεί, τα SNPs μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία και την έκφραση των

γονιδίων και έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη πολλών σύνθετων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της ΝΑ.

Ο απώτερος στόχος της μελέτης είναι η πειραματική διερεύνηση του γενετικού υπόβαθρου της ΝΑ και ο εντοπισμός των πρωτεϊνών που επηρεάζονται σημαντικά στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) των ατόμων με ΝΑ. Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών αυτών, θα μπορούσε να παράσχει πληροφορίες για την υποκείμενη παθοφυσιολογία της νόσου και ενδεχομένως να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων για αυτή την, έως τώρα, ανίατη ασθένεια.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Βάσεις Δεδομένων και Εργαλεία

Για την παρούσα διατριβή, εκμεταλλευτήκαμε δωρεάν διαδεδομένες βάσεις δεδομένων και εργαλεία. Η χρήση αυτών των εργαλείων αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την πραγμάτωση των αναλύσεων μας. Οι αλγόριθμοι που αναπτύχθηκαν από την ερευνητική ομάδα υιοθέτησαν ως βασική γλώσσα προγραμματισμού την R. Επιπλέον, ορισμένες βασικές λειτουργίες διαχείρισης δεδομένων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της Python. Στο πλαίσιο της παρούσας ενότητας, θα αναλυθούν λεπτομερώς οι βάσεις δεδομένων, τα εργαλεία και οι βιβλιοθήκες της R που χρησιμοποιήθηκαν για την υλοποίηση των αναλύσεων.

2.1.1 Βάση Δεδομένων miRbase

Η βάση δεδομένων miRbase αποτελεί έναν ευρύ πόρο πληροφοριών σχετικά με τα microRNAs. Παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες τόσο για την αλληλουχία του κάθε microRNA, όσο και για τους δυνητικούς στόχους τους. Επιπλέον, παρέχει διεπαφές προγραμματισμού εφαρμογών (APIs) οι οποίες επιτρέπουν την πρόσβαση σε αποθετήρια με σχόλια σχετικά με τα microRNA, δίνοντας τη δυνατότητα στους χρήστες να ανακαλύπτουν τις γνώσεις που έχουν συγκεντρωθεί γι' αυτά. Η ευρεία προσβασιμότητά της και η απλότητα στη χρήση της την καθιστούν προσιτή σε ερευνητές και μη. Επιπλέον, η δυνατότητα των ερευνητών να προσθέτουν νέες αλληλουχίες μορίων στη βάση δεδομένων και να τους αναθέτουν ονόματα αποτελεί ουσιαστική πτυχή για τη συνεχή εξέλιξη και ενημέρωση της miRbase. Αυτό επιτρέπει την καλύτερη κατανόηση και ερμηνεία των μηνυμάτων που μεταφέρουν τα microRNAs στα βιολογικά συστήματα. [10]

2.1.2 Βάση Δεδομένων dbSNP

Η δημιουργία της βάσης δεδομένων dbSNP ανήκει στο έργο ομάδας του Εθνικού Κέντρου Πληροφοριών Βιοτεχνολογίας (NCBI). Κυρίαρχος τύπος γενετικών παραλλαγών είναι οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, καθώς αποτελούν την πιο συχνά εμφανιζόμενη

κατηγορία σε συγκρίσεις ανθρώπινων γονιδιωμάτων. Η έρευνα και η ανακάλυψη SNPs παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον, καθώς η δημιουργία ενός καταλόγου τέτοιων πολυμορφισμών διευκολύνει μελέτες μεγάλης κλίμακας σε πεδία όπως η γενετική συσχέτιση, η λειτουργική και φαρμακογονιδιωματική ανάλυση, η γενετική πληθυσμού και η εξελικτική βιολογία. Οι καταχωρήσεις στο dbSNP υπόκεινται σε έλεγχο έναντι άλλων εσωτερικών πηγών πληροφοριών προκειμένου να διασφαλιστεί η ορθότητα των παρεχόμενων δεδομένων. Οι χρήστες έχουν τη δυνατότητα να ανατρέξουν απευθείας στο dbSNP ή να πραγματοποιήσουν αναζήτηση σε οποιοδήποτε τμήμα του NCBI για να εντοπίσουν καταχωρήσεις dbSNP που ανταποκρίνονται στις δικές τους ανάγκες. Επιπλέον, οι καταχωρήσεις συνδέονται με εξωτερικούς πόρους μέσω υπερσυνδέσμων URL, προσφέροντας στους χρήστες του dbSNP τη δυνατότητα να εξερευνήσουν λεπτομερείς πληροφορίες που υπερβαίνουν το πλαίσιο της ίδιας της βάσης δεδομένων. [11]

2.1.3 Βάση Δεδομένων ClinVar

Η βάση δεδομένων ClinVar αποτελεί έναν δημόσιο και ελεύθερα προσβάσιμο αποθετήριο αναφορών ανθρώπινων μεταβολών, ταξινομημένες ανά νόσους και αντιδράσεις σε φάρμακα μαζί με σχετικά στοιχεία τεκμηρίωσης. Η ClinVar επεξεργάζεται υποβολές που παραθέτουν μεταβολές που βρέθηκαν σε δείγματα ασθενών, ταξινομήσεις για νοσήματα και ανταποκρίσεις σε φάρμακα, πληροφορίες σχετικά με τον υποβάλλοντα και άλλα υποστηρικτικά δεδομένα. Επιπλέον, δέχεται μεταβολές σε οποιοδήποτε μέρος του γονιδιώματος, από μονονουκλεοτιδικές μεταβολές (SNPs) και μικρές εισαγωγές/διαγραφές έως μεγάλες μεταβολές στον αριθμό αντιγράφων. Αυτές οι μεταβολές μπορούν να ταξινομηθούν για μενδηλικά νοσήματα, καρκίνο ή ανταποκρίσεις σε φάρμακα. [12]

2.1.4 Βάση Δεδομένων microT-CDS

Η εν λόγω βάση δεδομένων αποτελεί την προηγμένη έκδοση της DIANA-microT, όπου με την ενσωμάτωση των miRbase και Ensembl, κατορθώνει να αναγνωρίσει τους στόχους microRNA σε περιοχές 3'UTR και CDS με εξαιρετική ακρίβεια. Οι χρήστες έχουν τη δυνατότητα να εφαρμόζουν διάφορες μεθόδους φιλτραρίσματος των δεδομένων σε πολλά επίπεδα, βασιζόμενοι, για παράδειγμα, σε ιστούς έκφρασης, νόσους κλπ. Επιπλέον, οι χρήστες έχουν τη δυνατότητα να περιορίσουν τις προβλέψεις μεταξύ μεταφορτωμένων λιστών εκφρασμένων γονιδίων και/ή miRNAs. [13]

2.1.5 Εργαλείο FastQC

Το εργαλείο FastQC είναι μία εφαρμογή της Java που αποσκοπεί στον έλεγχο ποιότητας δεδομένων ακολουθίας υψηλής απόδοσης (high throughput sequence data). Ως δεδομένα εισόδου δέχεται αρχεία BAM, SAM και FastQ και ως έξοδο παρέχει ένα HTML. Εκεί ο χρήστης μπορεί να ενημερωθεί για τα αποτελέσματα μέσω μιας μικρής επισκόπησης σχετικά με πιθανές προβληματικές περιοχές και συνοπτικών διαγραμμάτων και πινάκων με την αξιολόγηση των δεδομένων εισόδου. [14]

2.1.6 Εργαλείο miRDeep2

Η βασική λειτουργία της miRDeep2 είναι η αναγνώριση κανονικών και μη κανονικών microRNAs σε δεδομένα υψηλής απόδοσης δίνοντας και των χαρακτηρισμό τους. Δεδομένα εισόδου είναι και πάλι αρχεία όπως FastQ. Πριν ξεκινήσει η ανάλυση των δεδομένων, πραγματοποιείται μία επεξεργασία των δεδομένων, αφαιρώντας ακατάλληλες ακολουθίες και περιοχές χαμηλής ποιότητας. Στη συνέχεια, μέσω ενός συνόλου αλγορίθμων και στατιστικών μεθόδων αναγνωρίζει τις ακολουθίες που αντιστοιχούν σε microRNAs. Παράλληλα, το λογισμικό αναθέτει βαθμολογίες αξιοπιστίας σε κάθε αναγνωρισμένο microRNA, λαμβάνοντας υπόψη διάφορες παραμέτρους όπως η συχνότητα εμφάνισης, η παρόμοια δομή με γνωστά microRNAs κ.λπ. Στο τέλος, παράγεται μία αναλυτική αναφορά με όλα τα δεδομένα που υπολογίστηκαν. Επίσης, το miRDeep2 μπορεί να ανιχνεύσει νέα microRNAs που δεν έχουν προηγουμένως προσδιοριστεί, βοηθώντας έτσι στην επέκταση του καταλόγου των microRNAs που είναι γνωστά σε ένα είδος ή σε μια κατηγορία. [15]

2.1.7 Εργαλείο Bowtie

Το λογισμικό Bowtie είναι ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται για τη στοίχιση ακολουθιών DNA ή RNA σε ένα αναφορικό γονιδίωμα (reference genome). Αυτό που κάνει το λογισμικό τόσο αποδοτικό είναι η δημιουργία δεικτών στο γονιδίωμα αναφοράς χρησιμοποιώντας ένα σχήμα βασισμένο στον μετασχηματισμό Burrows-Wheeler (BWT) και τον δείκτη FM. Αυτή η διαδικασία διευκολύνει τις αναζητήσεις στο γονιδίωμα, εξοικονομώντας μνήμη και χρόνο κατά τη στοίχιση. Στη συνέχεια, με τη χρήση των δεικτών γίνεται αναζήτηση ακολουθιών στο γονιδίωμα αναφοράς που ταιριάζουν με τις εισαγόμενες ακολουθίες. [16]

2.1.8 Εργαλείο DESeq2

Το εργαλείο DESeq2 είναι υλοποιημένο στην προγραμματιστική γλώσσα R. Η R είναι γλώσσα και περιβάλλον για στατιστικούς υπολογισμούς και γραφήματα. Επομένως, το DESeq2 είναι ένα στατιστικό εργαλείο, το οποίο χρησιμοποιείται στην ανάλυση δεδομένων αλληλουχίας RNA. Με τη χρήση αυστηρών στατιστικών μεθόδων εντοπίζονται τα διαφορετικώς εκφραζόμενα γονίδια μεταξύ πειραματικών συνθηκών.

Το DESeq2 ξεκινά με την κανονικοποίηση των ακατέργαστων μετρήσεων RNA-seq για να ληφθούν υπόψη οι διαφορές στο μέγεθος της βιβλιοθήκης και στο βάθος αλληλούχισης μεταξύ των δειγμάτων. Η κανονικοποίηση διασφαλίζει ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων είναι συγκρίσιμα μεταξύ των δειγμάτων. Στη συνέχεια, εκτιμάται η μεταβλητότητα, ή αλλιώς διασπορά, της γονιδιακής έκφρασης σε όλα τα δείγματα. Αυτό το βήμα είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς βοηθά στη μοντελοποίηση της σχέσης μεταξύ της μέσης έκφρασης και της διακύμανσης, λαμβάνοντας υπόψη τις βιολογικές και τεχνικές πηγές διακύμανσης. Έπειτα, μοντελοποιεί τα read counts χρησιμοποιώντας μια αρνητική διωνυμική κατανομή, η οποία είναι κατάλληλη για δεδομένα RNA-seq λόγω της ικανότητάς

της να προσαρμόζει την υπερδιασπορά που παρατηρείται συνήθως σε τέτοια σύνολα δεδομένων. Αυτή η κατανομή αποτυπώνει τόσο τα μέσα επίπεδα έκφρασης όσο και τη διασπορά κάθε γονιδίου. Αφού ολοκληρωθούν οι διαδικασίες μορφοποίησης των δεδομένων, ξεκινάει η ανάλυσή τους. Μέσω στατιστικών δοκιμών, όπως η δοκιμή Wald ή η δοκιμή αναλογίας πιθανότητας, εντοπίζονται τα διαφορετικώς εκφραζόμενα γονίδια (Differentially Expressed Genes ή DEG). Για να ληφθεί υπόψη το ζήτημα του πολλαπλού ελέγχου υποθέσεων, το DESeq2 εφαρμόζει μεθόδους όπως η διαδικασία Benjamini-Hochberg για τον έλεγχο του ποσοστού ψευδούς ανακάλυψης (FDR). Αυτή η διόρθωση συμβάλλει στην ελαχιστοποίηση της πιθανότητας ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Γι' αυτό το λόγο θεωρείται κρίσιμη η τιμή αυτού του δείκτη, ώστε να θεωρηθεί ένα γονίδιο στατιστικά σημαντικά διαφοροποιημένο.

Τέλος, το DESeq2 παρέχει διάφορα εργαλεία οπτικοποίησης, όπως heatmaps, volcano plots και MA plots, για τη διευκόλυνση της ερμηνείας των αποτελεσμάτων. Αυτές οι οπτικοποιήσεις βοηθούν τους ερευνητές στον εντοπισμό μοτίβων και τάσεων στα δεδομένα και στην ιεράρχηση γονιδίων για περαιτέρω διερεύνηση. [17]

2.1.9 Εργαλείο EdgeR

Όπως η DESeq2, έτσι και η EdgeR είναι ένα στατιστικό εργαλείο, υλοποιημένο στο περιβάλλον της R, για την ανάλυση δεδομένων αλληλουχίας RNA. Η αρχιτεκτονική των δύο εργαλείων είναι αρκετά κοινή, με τις στατιστικές μεθόδους να τις διαφοροποιούν. Για παράδειγμα, ενώ και τα δύο χρησιμοποιούν μοντέλα με βάση την αρνητική διωνυμική κατανομή για να λάβει υπόψη την εγγενή μεταβλητότητα των δεδομένων RNA-seq, το EdgeR χρησιμοποιεί εμπειρικές μεθόδους Bayes για την εκτίμηση της παραμέτρου διασποράς, η οποία αντιπροσωπεύει τη μεταβλητότητα της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ βιολογικών επαναλήψεων. Από την άλλη, το DESeq2 εκτιμά τις διασπορές ανά γονίδιο, γεγονός που επιτρέπει μεγαλύτερη ευελιξία στο χειρισμό γονιδίων με διαφορετικά επίπεδα μεταβλητότητας, χρησιμοποιώντας τοπική παλινδρόμηση για τη μοντελοποίηση της σχέσης μεταξύ της μέσης έκφρασης και της διασποράς. Αντίστοιχες διαφοροποιήσεις κατά την κανονικοποίηση και τον χειρισμό της βιολογικής διακύμανσης καθιστούν το κάθε εργαλείο καλύτερο ανάλογα τις συνθήκες της μελέτης, το πλήθος δειγμάτων και άλλων παραμέτρων. [18]

2.2 Ανάλυση Διαφοροποιημένης Γονιδιακής Έκφρασης σε microRNAs

Για την DGEA των microRNA χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από προμετωπιαίο φλοιό του εγκεφάλου. [19] Τα δείγματα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, 6 υγιείς και 6 ασθενείς, με μέσο όρο ηλικίας 74 και 72 ετών, αντιστοίχως. Τα δεδομένα που δίνονται είναι αλληλουχίες μικρών μορίων RNA που βρέθηκαν σε κάθε δείγμα. Τα αρχεία με μορφή .fastq της μελέτης έγιναν εισαγωγή στο εργαλείο DIANA-mAP. [20]

SRA ID	Group
SRR1103937	Control / Τυπικό
SRR1103938	Control / Τυπικό
SRR1103939	Control / Τυπικό
SRR1103940	Control / Τυπικό
SRR1103941	Control / Τυπικό
SRR1103942	Control / Τυπικό
SRR1103943	AD / Ασθενές
SRR1103944	AD / Ασθενές
SRR1103945	AD / Ασθενές
SRR1103946	AD / Ασθενές
SRR1103947	AD / Ασθενές
SRR1103948	AD / Ασθενές

Πίνακας 1 : Το σύνολο των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε για τη DGEA του microRNA

Σε πρώτη φάση, στο εργαλείο γίνεται ο έλεγχος ποιότητας των δεδομένων. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της εφαρμογής FastQC. Εάν τα δεδομένα δεν πληρούν κάποιες προϋποθέσεις, η διαδικασία θα τερματιστεί. Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες που έχουν εισαχθεί από τα αρχεία θα επεξεργαστούν, με σκοπό την απομόνωση των κωδικών περιοχών microRNA από τα 3' και 5' άκρα. Σε αυτό το σημείο, διενεργείται εκ νέου ένας έλεγχος ποιότητας των δεδομένων.

Έπειτα, πραγματοποιείται στοίχιση και ποσοτικοποίηση των τελικών αλληλουχιών. Για την στοίχιση χρησιμοποιείται τα εργαλεία miRDeep2 και Bowtie. Οι στοιχισμένες αλληλουχίες αντιστοιχίζονται με γνωστά και ώριμα microRNAs, τα οποία παρέχονται από τη βιβλιοθήκη της miRBase. Τελευταίο βήμα της επεξεργασίας των αλληλουχιών είναι η κανονικοποίησή τους σε αναγνώσεις ανά εκατομμύριο (Reads Per Million) και log2 του RPM. Είναι σημαντικό να πραγματοποιηθεί αυτή η επεξεργασία των δεδομένων, ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε μεροληψία κατά τη διεξαγωγή των αναλύσεων.

Τα δεδομένα είναι έτοιμα να υποβληθούν στην Ανάλυση Διαφοροποιημένης Γονιδιακής Έκφρασης μέσω του λογισμικού DESeq2. Για να ξεκινήσει η διαδικασία χρειάζεται να εισαχθεί ένα αρχείο που περιέχει τον πίνακα συνθηκών. Αυτό παρέχει στο σύστημα τη συνθήκη που εκπροσωπεί κάθε δείγμα, χωρίζοντάς τα στις ομάδες ελέγχου (Normal Control) και ασθενών (Alzheimer Disease). Με την ολοκλήρωση της ανάλυσης, το εργαλείο παρέχει τα στατιστικά αποτελέσματα συνοδευόμενα από γραφήματα. Αυτά θα αναλυθούν περαιτέρω στη συνέχεια.

Μελετώντας τα δεδομένα εξόδου, απομονώθηκαν τα πιο σημαντικά διαφοροποιημένα microRNAs. Ένας δείκτης αυτής της διαφοροποίησης είναι η προσαρμοσμένη τιμή p (Adjusted p-value), η οποία μας φανερώνει ποιες συγκρίσεις σε επίπεδο παραγόντων εντός μιας οικογένειας συγκρίσεων διαφέρουν σημαντικά. Το όριο που τέθηκε στον δείκτη ήταν μικρότερο του 0,05. Τέλος, διαχωρίστηκαν σε up-regulated (υπερεκφραζόμενα) και down-regulated (υποεκφραζόμενα), βάσει το log2-Fold Change. Αυτός ο λογάριθμος υποδηλώνει κατά πόσο το εκάστοτε μόριο διαφοροποιείται στα ασθενή άτομα σε σχέση με τα υγιή. Παραδείγματος χάρη, εάν η τιμή του log2-Fold Change του hsa-miR-146a-5p είναι 1.43, δηλαδή η έκφρασή του αυξάνεται κατά $2^{1.43}$ ή περίπου 2.7 φορές σε σχέση με ένα υγιές άτομο.

2.3 Ανάλυση Διαφοροποιημένης Γονιδιακής Έκφρασης σε mRNAs

Σε αυτή την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μέρος του αποθετηρίου μίας αντίστοιχης μελέτης. [21] Επιλέχθηκαν αρχικά 24 δείγματα, 12 υγιείς και 12 ασθενείς, με κριτήριο την ηλικία. Οι επιλεγθέντες είχαν ανά ζεύγη, ασθενών και υγιών ατόμων, κοινή ηλικία με ένα δείγμα του πρώτου πειράματος. Τα δεδομένα, σε αυτή την περίπτωση, αποτελούνται από το πλήθος των εμφανίσεων κάθε γονιδίου στο εκάστοτε δείγμα.

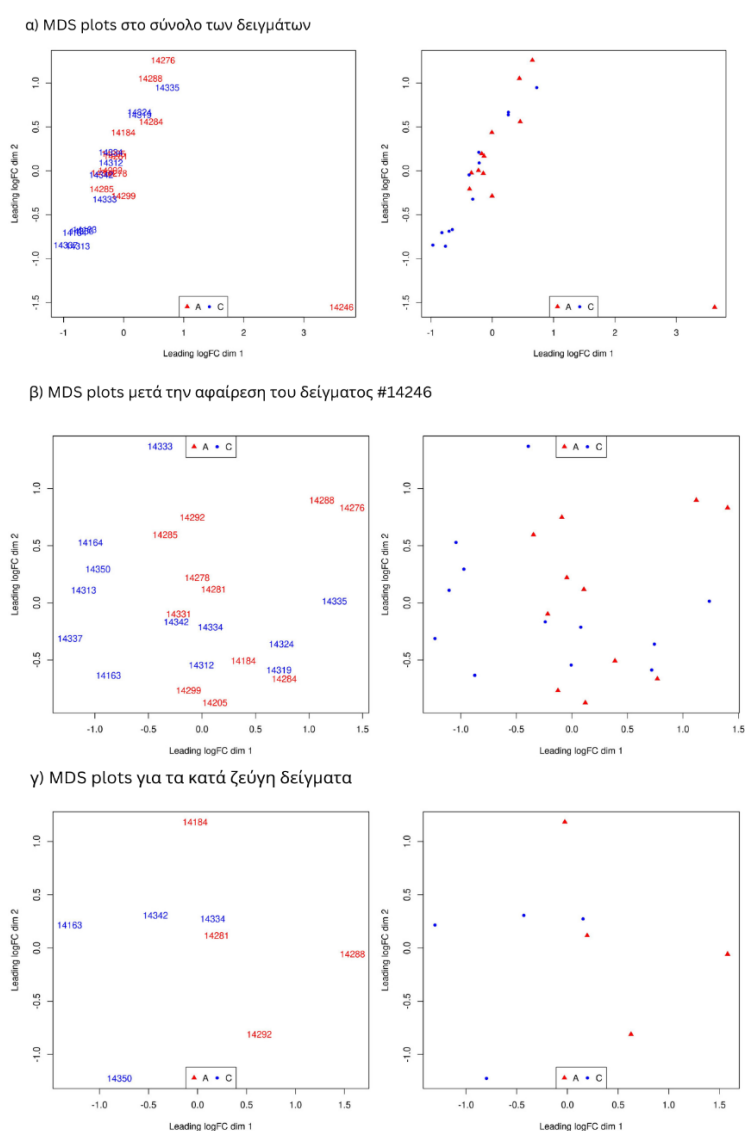
SRA ID	Group
SRR14514163	Control / Τυπικό
SRR14514164	Control / Τυπικό
SRR14514184	AD / Ασθενές
SRR14514205	AD / Ασθενές
SRR14514246	AD / Ασθενές
SRR14514276	AD / Ασθενές
SRR14514278	AD / Ασθενές
SRR14514281	AD / Ασθενές
SRR14514284	AD / Ασθενές
SRR14514285	AD / Ασθενές
SRR14514288	AD / Ασθενές
SRR14514292	AD / Ασθενές
SRR14514299	AD / Ασθενές
SRR14514312	Control / Τυπικό
SRR14514313	Control / Τυπικό
SRR14514319	Control / Τυπικό
SRR14514324	Control / Τυπικό
SRR14514331	AD / Ασθενές
SRR14514333	Control / Τυπικό
SRR14514334	Control / Τυπικό
SRR14514335	Control / Τυπικό
SRR14514337	Control / Τυπικό
SRR14514342	Control / Τυπικό
SRR14514350	Control / Τυπικό

Πίνακας 2 : Το σύνολο δειγμάτων που επιλέχθηκε αρχικά για την DGEA του mRNA

Όλη η διαδικασία υλοποιήθηκε μέσω αλγόριθμου στη γλώσσα R, ο οποίος δημιουργήθηκε για τις ανάγκες αυτής της εργασίας. Αφού εισαχθήκαν όλα τα αρχεία στο περιβάλλον, δημιουργήθηκε ένας πίνακας με περιεχόμενες όλες τις καταμετρήσεις κάθε δείγματος για κάθε γονίδιο, αντιστοίχως. Στη συνέχεια, τα δείγματα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες με γνώμονα τη συνθήκη τους (NC ή AD).

Για την Ανάλυση Διαφοροποιημένης Έκφρασης εφαρμόστηκε ο βασικός αλγόριθμος της EdgeR. [18] Πρώτο βήμα ήταν ο έλεγχος ποιότητας των δεδομένων μέσω των συναρτήσεων `filterByExpr()` και `calcNormFactors()`. Η πρώτη συνάρτηση φιλτράρει τον πίνακα σύμφωνα με τα επίπεδα έκφρασης, δηλαδή κρατάει όσα γονίδια έχουν αρκετά μεγάλο αριθμό εμφάνισης (count), ώστε να θεωρηθούν σημαντικά στη στατιστική ανάλυση. Στη δεύτερη συνάρτηση, υπολογίζονται οι συντελεστές κανονικοποίησης για την κλιμάκωση των counts με σκοπό την ελαχιστοποίηση του log2-Fold Change.

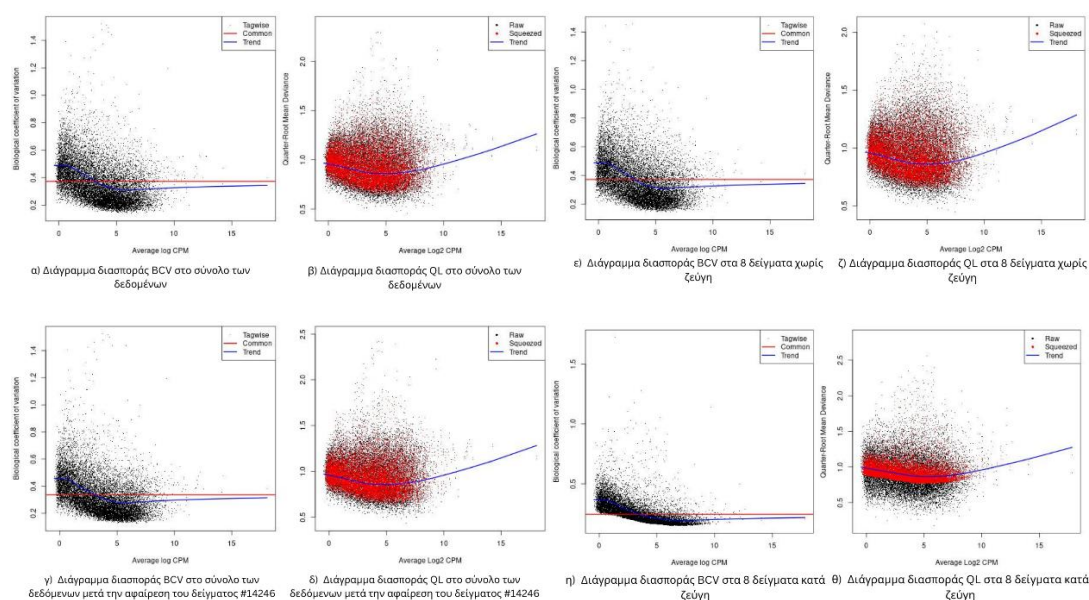
Εκτελώντας απλή DGEA δεν βρέθηκε κανένα σημαντικά διαφοροποιημένο γονίδιο, οπότε τα δεδομένα δοκιμάστηκαν ξανά, αυτή τη φορά χρησιμοποιώντας ως παράγοντες κατηγοριοποίησης την ηλικία και το φύλλο. Ούτε σε αυτή την ανάλυση, όμως, βρέθηκαν γονίδια που να θεωρούνται στατιστικά σημαντικά. Σε κάθε ανάλυση παραγόταν ένα διάγραμμα Πολυδιάστατης Κλιμάκωσης (MDS plot) στο οποίο αναπαρίσταται η σχέση που έχουν τα δείγματα μεταξύ τους, ανάλογα με τους παράγοντες ανάλυσης. Σε αυτά, παρατηρήθηκε πως ένα δείγμα, το #14246, παρέκκλινε εντελώς από τα υπόλοιπα. Η εικόνα των δειγμάτων όταν αφαιρέθηκε μόνο αυτό το δείγμα δε βελτιώθηκε. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 1.β, δε γίνεται κάποιος ευδιάκριτος διαχωρισμός των δύο ομάδων. Για αυτό το λόγο, το σύνολο των δειγμάτων μας περιορίστηκε σε 4 υγιή άτομα και 4 ασθενή, με βάσει την ηλικία και το φύλλο, αφήνοντας εκτός το προβληματικό δείγμα.



Εικόνα 1 : MDS plots για τις DGEA αναλύσεις του mRNA

Για να αποφανθεί ποιο σύνολο δεδομένων είναι πιο έμπιστο για την ανάλυση μελετήθηκαν τα διαγράμματα διασποράς QL (quasi-likelihood) και βιολογικού συντελεστή διακύμανσης

(Biological coefficient of Variance ή BCV). Για τα διαγράμματα BCV υπολογίζεται η ποικιλομορφία μεταξύ των δειγμάτων και υπολογίζεται με βάση την παρατηρούμενη διασπορά των μετρήσεων μεταξύ των επαναλήψεων. Οι τιμές αυτές για κάθε γονίδιο αποτελούν τον y άξονα του διαγράμματος, ενώ στον x εισάγεται η μέση τιμή του λογάριθμου με βάση το 2 σε CPM (counts per million) για το αντίστοιχο γονίδιο. Για να θεωρηθεί έμπιστο ένα σύνολο δεδομένων θα πρέπει οι τιμές BCV του διαγράμματος να είναι όσο το δυνατόν μειωμένες και η διασπορά των σημείων ομοιόμορφη γύρω από τη κοινή τάση. Αντίστοιχα, στο διάγραμμα διασποράς QL στον y άξονα αναπαρίστανται η τετραγωνική ρίζα της μέσης απόκλισης του εκάστοτε γονιδίου από τη τάση, καθώς ο x άξονας είναι ίδιος με τα διαγράμματα BCV. Σε αυτά τα διαγράμματα αναμένεται μία ομαλή καμπύλη τάσης, χωρίς απότομες κορυφές και οι εκτιμήσεις της διασποράς θα πρέπει να ακολουθούν την καμπύλη αυτή. Έτσι, διαπιστώθηκε πως το σύνολο των δειγμάτων που απομονώθηκε για την ανάλυση κατά ζεύγη με τα 8 δείγματα έχει και τη καλύτερη ποιότητα δεδομένων. Σε αυτό το σύνολο εφαρμόστηκε Ανάλυση Διαφοροποιημένης Έκφρασης Γονιδίων με και χωρίς ζεύγη (paired Differential Gene Expression Analysis).



Εικόνα 2 : Διαγράμματα διασποράς στο σύνολο των δεδομένων (α,β), στο σύνολο των δεδομένων μετά την αφαίρεση του δείγματος #14246 (γ,δ), στα 8 δείγματα χωρίς ζεύγη (ε,ζ), και στα κατά ζεύγη (η,θ).

Σε αυτή την ανάλυση, τα αποτελέσματα εξόδου περιορίστηκαν με πιο χαλαρά κριτήρια, κρατώντας όσα μόρια είχαν FDR μικρότερο του 0.1. Ο δείκτης FDR (false discovery rate - ποσοστό ψευδούς ανακάλυψης) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ποσοστού σφάλματος, όπως το Adjusted p-value. Η ειδοποιός διαφορά βρίσκεται στο γεγονός πως το FDR συνδυάζει συμπληρωματικές πληροφορίες ως παραμέτρους για την ταξινόμηση, τη βαρύτητα και την ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων.

2.4 Εύρεση Μονονουκλεοτιδικών Πολυμορφισμών

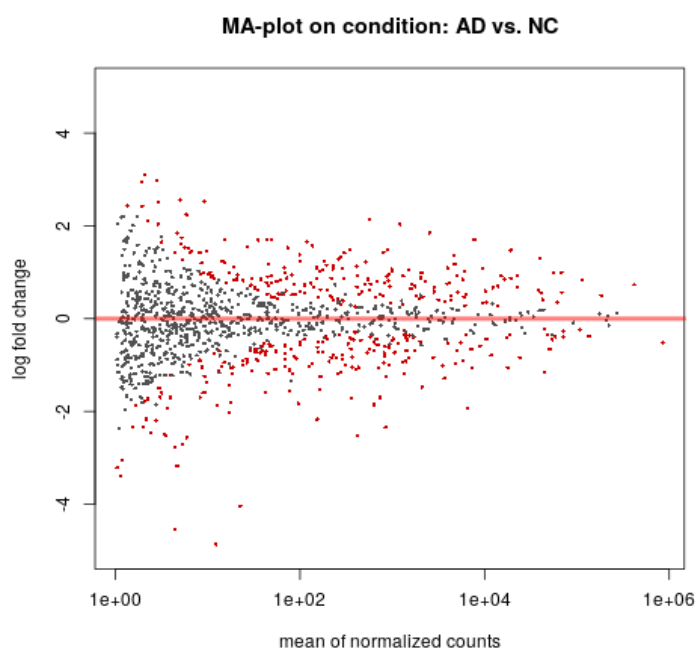
Σε αυτό το μέρος της έρευνας, όλες οι διαδικασίες έγιναν αλγοριθμικά. Για να βρεθούν οι SNPs χρειάστηκαν δύο αρχεία, τα οποία αφορούν τις μονονουκλεοτιδικές μεταλλάξεις. Το

ένα αρχείο προέρχεται από την βάση δεδομένων dbSNP, η οποία είναι μία καλά εδραιωμένη και έμπιστη βάση δεδομένων, και περιέχει όλες τα γνωστά SNPs που έχουν παρατηρηθεί στο ανθρώπινο γενετικό υλικό. Το δεύτερο αρχείο περιέχει τα SNPs τα οποία έχουν συσχετιστεί με τη NA και προήλθε από την ClinVar. Χρειάστηκε, επίσης, ένα αρχείο από τη βάση δεδομένων microT-CDS, το οποίο περιείχε τις προβλέψεις στόχων του ανθρώπινου γονιδιώματος, δηλαδή όλες τις 3'UTR περιοχές πίσω από κάθε γονίδιο. Το τελευταίο, φιλτραρίστηκε για αρχή με τα DE mRNAs που απομονώθηκαν από τη δεύτερη ανάλυση και στη συνέχεια με τα DE miRNAs, με σκοπό να περιορισθεί το μέγεθος των αρχείων που θα χρησιμοποιηθούν. Στη συνέχεια, με μία τεχνική αντιστοίχισης, επιλέχθηκαν τα SNPs τα οποία ταίριαζαν με τις θέσεις πρόσδεσης (binding sites) των DE miRNAs και αποθηκεύτηκαν σε 2 αρχεία, ανάλογα τη βάση δεδομένων στην οποία αναφερόταν η μετάλλαξη. Η τελευταία επεξεργασία των αρχείων που έγινε, αφορούσε τη διαλογή των πολυμορφισμών μέσω των σχολιασμών που υπάρχουν στις βάσεις δεδομένων για την παθογένεια τους, καθώς και με τον συσχετισμό τους με τη NA. Αργότερα θα συζητηθούν με περισσότερη λεπτομέρεια τα αποτελέσματα των αναλύσεων.

3. Αποτελέσματα

3.1 Ανάλυση Διαφοροποιημένης Έκφρασης microRNA

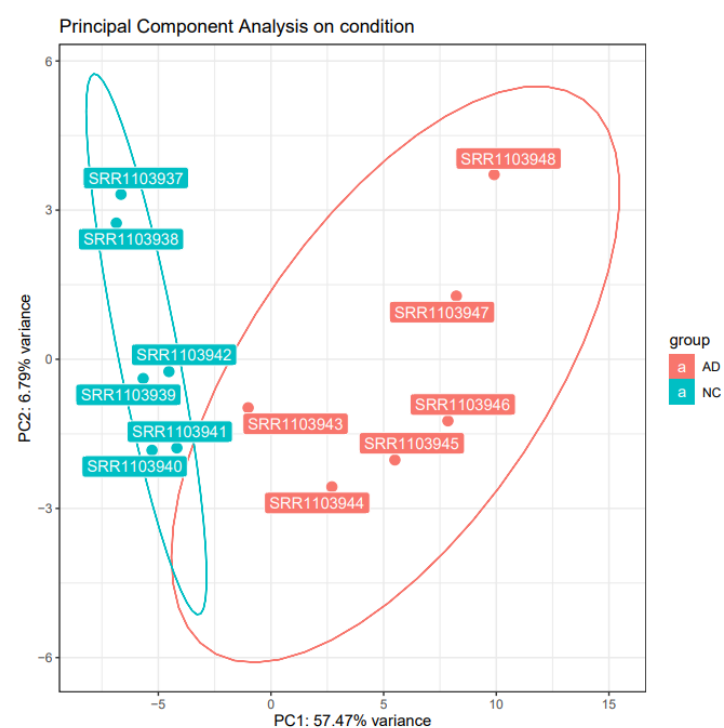
Τα αποτελέσματα του εργαλείου που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνται από ένα φάκελο για κάθε δείγμα, ο οποίος περιείχε όλες τις πληροφορίες για την επεξεργασία του δείγματος (mapping, quantification, trimming etc.) και έναν φάκελο με διάφορες αναλύσεις των αποτελεσμάτων, καθώς, φυσικά, περιείχε και τα αποτελέσματα. Μία από τις αναλύσεις φαίνεται στο παρακάτω MAplot.



Εικόνα 3 : MA-plot on condition AD vs NC , microRNA DGE Analysis

Ο γ άξονας του διαγράμματος παρουσιάζει την λογαριθμική αναλογία μεταξύ των δειγμάτων και ο x άξονας την μέση τιμή των κανονικοποιημένων μετρήσεων κάθε αλληλουχίας. Στις αντίστοιχες θέσεις τοποθετούνται τα γονίδια τα οποία φέρουν τις σχετικές τιμές. Η κόκκινη ευθεία γραμμή στη θέση 0 του άξονα γ υποδεικνύει πώς τα δεδομένα έχουν υποστεί κανονικοποίηση. Όσο πιο κοντά στο 0 είναι η λογαριθμική τιμή του γονιδίου και όσο πιο δεξιά βρίσκεται στο γράφημα, δηλαδή μικρότερη μέση τιμή αναγνώσεων, τόσο μικρότερη και η πιθανότητα το συγκεκριμένο γονίδιο να εμφανίζει διαφοροποιημένη έκφραση. Με άλλα λόγια, τα γονίδια που βρίσκονται υψηλότερα από την τιμή 1 του γ άξονα υπερεκφράζονται στο σύνολο των ασθενών, ενώ αυτά που βρίσκονται χαμηλότερα από την τιμή -1 του άξονα υποεκφράζονται. Με αυτό ως γνώμονα, καθορίζεται το χρώμα της κουκίδας που αναπαριστά το εκάστοτε γονίδιο. Επομένως, οι κόκκινες κουκίδες αντιστοιχούν σε γονίδια που πιθανότατα θα θεωρηθούν στατιστικά σημαντικά διαφοροποιημένα όσον αφορά την έκφρασή τους. Με αυτή την οπτικοποίηση των δεδομένων, γίνεται ευδιάκριτο το κατά πόσο τα δεδομένα θα φέρουν αποτελέσματα και γίνεται μία σχετική πρόβλεψη αυτών. [22]

Ένα άλλο διάγραμμα που παράγεται είναι το Principal Component Analysis (PCA) plot. Αυτού του είδους η οπτικοποίηση χρησιμοποιείται για την μείωση των διαστάσεων ενός μεγάλου συνόλου δεδομένων, κρατώντας όσο δυνατόν περισσότερες πληροφορίες. Κατά αυτή τη διαδικασία, θυσιάζεται ένα μέρος της ακρίβειας για την απλότητα, ώστε να γίνει η ανάλυση πιο εύκολα και γρήγορα. Στα PCA διαγράμματα παρουσιάζονται οι ομαδοποιήσεις των δεδομένων και γίνονται ξεκάθαρα τα δείγματα που αντιστοιχούν σε κάθε ομάδα.



Εικόνα 4 : Principal Component Analysis on condition AD vs NC, microRNA DGE Analysis

Πρώτο βήμα για τη δημιουργία του διαγράμματος είναι η τυποποίηση των συνεχών τιμών σε διακριτές τιμές βάσει της τυπικής απόκλισης. Στη συνέχεια, δημιουργείται ο πίνακας συνδιακύμανσης. Οι διαστάσεις του πίνακα καθορίζονται από το σύνολο των μεταβλητών.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο συμμετρικός πίνακας που δημιουργήθηκε ήταν 12x12 . Επειδή, η συνδιακύμανση είναι αντιμεταθετική πράξη, οι τιμές του πίνακα συνδιακύμανσης είναι συμμετρικές ως προς την κύρια διαγώνιο, δηλαδή το άνω και κάτω τριγωνικό τμήμα του πίνακα είναι ίσα. Αυτό, λοιπόν που έχει σημασία είναι το πρόσημο κάθε θέσης, το οποίο δηλώνει αν τα δύο δείγματα συσχετίζονται. Επομένως, στα αρνητικά πρόσημα, όταν το ένα δείγμα αυξάνει την τιμή του το άλλο τη μειώνει, ενώ στα θετικά πρόσημα τα δύο δείγματα αυξάνονται ή μειώνονται κοινά. Αφού δημιουργηθεί ο πίνακας, υπολογίζονται τα ιδιοδιανύσματα και οι ιδιοτιμές του, με σκοπό τον προσδιορισμό των κύριων συνιστωσών των δεδομένων. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η μείωση των διαστάσεων, χωρίς να χαθεί μεγάλο μέρος της πληροφορίας. Οι κύριες συνιστώσες παράγονται με τέτοιο τρόπο, ώστε η πρώτη κύρια συνιστώσα να περιέχει τη μεγαλύτερη διακύμανση των δεδομένων. Αυτή αποτελεί και τον x άξονα του διαγράμματος. Αντιστοίχως, υπολογίζεται και η δεύτερη κύρια συνιστώσα, με μόνο κριτήριο να μη συσχετίζεται με την πρώτη συνιστώσα και να αντιπροσωπεύει τη δεύτερη μεγαλύτερη διακύμανση. Έτσι, η δεύτερη συνιστώσα είναι κάθετη στην πρώτη και αποτελεί τον y άξονα του διαγράμματος.

Μετά τη δημιουργία των πρώτων διαγραμμάτων και την ολοκλήρωση της DGEA, παρήχθησαν τα αποτελέσματα. Όπως αναλύθηκε νωρίτερα, τα δεδομένα περιορίστηκαν βάσει του Adjusted P-value, ώστε να απομονωθούν τα στατιστικά σημαντικά διαφοροποιημένα μόρια micro-RNA. Αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

miRNA_name	log2FoldChange	pvalue	Padj	Expression State
hsa-miR-132-3p	-1.93186708428909	8.48966157812815e-18	3.14400467110012e-15	Down-regulated
hsa-miR-424-5p	1.06838215758743	6.30253475756876e-15	1.16701935260981e-12	Up-regulated
hsa-miR-153-3p	1.70122008430759	2.69018380537409e-12	3.32088245307847e-10	Up-regulated
hsa-miR-212-3p	-1.71811258376749	2.23699166293822e-10	9.94119095009746e-09	Down-regulated
hsa-miR-106b-5p	0.823694804380463	5.40528015847468e-11	3.33625903114743e-09	Up-regulated
hsa-miR-186-5p	0.918898125784615	4.95528536521981e-11	3.23842472985836e-09	Up-regulated
hsa-miR-29a-3p	0.625350601658038	3.4083176517828e-08	7.57328182226138e-07	Up-regulated
hsa-miR-18a-5p	1.5653664421317	9.08631799121194e-09	2.52372482205912e-07	Up-regulated
hsa-miR-148b-3p	1.35112914846132	8.85492665809095e-09	2.52251885054847e-07	Up-regulated
hsa-miR-15b-5p	0.934910174339654	6.46936796909135e-09	1.94255886855689e-07	Up-regulated
hsa-miR-132-5p	-1.85569792833105	6.37096996646395e-09	1.94255886855689e-07	Down-regulated
hsa-miR-212-5p	-1.82816166134334	5.1283383899164e-09	1.72654059127186e-07	Down-regulated
hsa-miR-125b-1-3p	0.911732894148657	5.58598734602143e-07	8.501413618397e-06	Up-regulated
hsa-miR-195-5p	0.933364917146474	1.11640343035156e-07	1.9687685890803e-06	Up-regulated
hsa-miR-146b-3p	-0.884576953456818	3.75948605172309e-06	4.52729547877104e-05	Down-regulated
hsa-miR-128-1-5p	-0.920246045566334	3.60094472856018e-06	4.39631823453886e-05	Down-regulated
hsa-miR-24-3p	0.763709743970701	3.31408278981989e-06	4.09105108832211e-05	Up-regulated
hsa-miR-138-1-3p	-0.664281828960638	2.56769522402814e-06	3.27897631482214e-05	Down-regulated
hsa-miR-501-3p	1.37749544209708	1.04704708410893e-06	1.49137091082696e-05	Up-regulated
hsa-miR-193b-3p	0.528981130239332	9.88706232156126e-06	0.000102659123731351	Up-regulated
hsa-miR-154-5p	0.606835977888292	2.41765607848485e-05	0.000225715622117367	Up-regulated
hsa-miR-9-3p	0.569804626679711	2.44377651465632e-05	0.000226252975648598	Up-regulated
hsa-miR-125b-5p	0.556080448750483	3.8230650402534e-05	0.000331830098415745	Up-regulated
hsa-miR-146a-5p	1.43168652084681	4.14534526660963e-05	0.000354267583938715	Up-regulated
hsa-miR-342-5p	-0.7106124150677	4.62261967500826e-05	0.000386145147288284	Down-regulated
hsa-miR-3065-5p	0.995504724602952	4.83245034955923e-05	0.000397692765804467	Up-regulated
hsa-miR-29b-1-5p	-1.12538539458232	4.90589617225008e-05	0.000400768429953665	Down-regulated
hsa-miR-148a-3p	1.01471612372682	6.2150593944545e-05	0.000486262745580208	Up-regulated
hsa-miR-154-3p	0.93580029649355	6.39131921983212e-05	0.000496556339386957	Up-regulated
hsa-miR-135a-5p	0.776280667223516	0.000145600525961022	0.00103693707911984	Up-regulated
hsa-miR-339-3p	-0.939611346292124	0.000169340619315296	0.00117320581555486	Down-regulated
hsa-miR-93-5p	0.402074814109686	0.000184197285870819	0.00125547966013792	Up-regulated
hsa-miR-107	-0.441984521552789	0.000312008659832119	0.00198080926327705	Down-regulated
hsa-miR-138-5p	-1.15273763043509	0.000339826358043289	0.00210920158539717	Down-regulated
hsa-miR-181c-3p	-0.349772110432679	0.000552979931203451	0.00315056771060017	Down-regulated
hsa-miR-101-3p	-0.241001207421354	0.000865355479857944	0.00478313402050834	Down-regulated
hsa-miR-302b-3p	2.5591881805728	0.00124937414944915	0.00657845819923226	Up-regulated
hsa-miR-135a-2-3p	-0.89992904853869	0.00132774918652122	0.00695815729351453	Down-regulated
hsa-miR-582-5p	0.499057745334918	0.00138829479897211	0.00713778398568152	Up-regulated
hsa-miR-342-3p	-0.591662354025888	0.00160718476283832	0.00807955778965327	Down-regulated
hsa-miR-15b-3p	0.863661089588574	0.00187224525401564	0.00928600213040792	Up-regulated
hsa-miR-18b-5p	1.23540375656342	0.00197415185092878	0.00970479073620298	Up-regulated
hsa-miR-181a-5p	-0.51898554859131	0.00203198077798677	0.00994506891781191	Down-regulated
hsa-miR-137-5p	-1.04284598236504	0.00231357568335383	0.0110792352767505	Down-regulated
hsa-miR-455-3p	0.521685093735057	0.00240602046895489	0.0113748457064208	Up-regulated
hsa-miR-181c-5p	-0.39058148943719	0.00242662344551086	0.0114236383388244	Down-regulated
hsa-miR-106b-3p	-0.393736055136622	0.00483091771214467	0.02048530373356	Down-regulated
hsa-miR-29b-3p	0.337833466257733	0.00523820728487051	0.0218783770431998	Up-regulated
hsa-miR-193a-3p	-1.04857471109798	0.00554355955365429	0.022881541725282	Down-regulated
hsa-miR-424-3p	-0.680773697789503	0.00650458932683211	0.0260657252164072	Down-regulated
hsa-miR-181d-5p	0.495085550007359	0.00694017243445587	0.027537612766716	Up-regulated
hsa-miR-219a-2-3p	-0.659730287950194	0.00706084527602464	0.0277814769692652	Down-regulated
hsa-miR-29b-2-5p	-0.439576391743387	0.00783367026158314	0.0300110608986858	Down-regulated
hsa-miR-27b-3p	0.494534355724163	0.00806299710443974	0.0306780472021663	Up-regulated
hsa-miR-181b-3p	-0.559757362907373	0.00829667748031879	0.0313524104783475	Down-regulated
hsa-miR-101-5p	-0.428259934194041	0.00932073246157297	0.0346332232936708	Down-regulated
hsa-miR-135b-5p	0.835863655658997	0.0114633206338211	0.0413498351434261	Up-regulated
hsa-miR-34a-3p	0.664070253162115	0.0125534145179496	0.0448451560432217	Up-regulated

Πίνακας 3 : Αποτελέσματα Ανάλυσης DGE στα microRNA. Εμφάνιση με σειρά σημαντικότητας βάσει P-adjusted.

Ένας τρόπος να μελετήσουμε τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων μας με τη ΝΑ είναι μέσω της βάσης δεδομένων Plasmir. Η Plasmir περιέχει εκατοντάδες βιοδείκτες αίματος για 112 ασθένειες. [23] Οι συσχετίσεις που βρέθηκαν με τα αποτελέσματά μας ήταν 2 μορίων miRNA, του hsa-miR-15b-5p και του hsa-miR-18a-5p. Ως βιοδείκτες αίματος στη βάση και τα δύο μόρια βρίσκονται υποεκφραζόμενα και αποτελούν διαγνωστικούς δείκτες της νόσου. Αντίθετα, στην ανάλυση διαφοροποιημένης έκφρασης έχουν θετικό πρόσημο, το οποίο υποδεικνύει υπερέκφραση στα ασθενή άτομα. Η αλληλουχία του μορίου hsa-miR-15b-5p

βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3, ενώ του hsa-miR-18a-5p στο χρωμόσωμα 13, όπως φαίνεται στη βάση δεδομένων miRBase. [24]

Μερικά ακόμα σημαντικά διαφοροποιημένα μόρια miRNA που παρουσίασαν υπερέκφραση είναι τα miR-125b, miR-146a, miR-34a. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη μελέτη των Akihiko Nunomura και George Perry "RNA and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Focus on microRNAs". [25] Σε αυτή τη μελέτη αναφέρεται πως το miR-125b όταν υπερεκφράζεται προάγει την έκφραση των πρωτεϊνών APP και BACE1, την παραγωγή Αβ Αμυλλοειδούς και την απόπτωση μέσω φλεγμονής. Επιπλέον, βοηθάει την παραγωγή της Ταυ πρωτεΐνης.

Την παραγωγή της BACE1, σε φυσιολογικές συνθήκες, μειώνει το miR-107 στοχεύοντας το 3'UTR άκρο του γονιδίου. Η ύπαρξη οξειδωτικού στρες λειτουργεί ως βασικό έναυσμα στην μείωση έκφρασης του miR-107, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη έκφραση της BACE1. Αυτό αποδεικνύεται και στις δύο μελέτες βάσει των αποτελεσμάτων, αφού είναι ένα από τα σημαντικά υποεκφραζόμενα στελέχη. Με τη σειρά του, το μόριο miR-34a στοχεύει έναν μεγάλο αριθμό γονιδίων που συμβάλουν στον ενεργειακό μεταβολισμό του εγκεφάλου και τη συναπτική πλαστικότητα. [26] Το μόριο miR-146a κατέχει έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη φλεγμονών στον εγκέφαλο. [27] Μέσα από πολλές μελέτες έχει αποδειχθεί πως η διαφοροποιημένη έκφραση του miR-146a επηρεάζει ζωτικής σημασίας για το κύτταρο διαδικασίες, όπως η απόπτωση, το οξειδωτικό στρες και ο νευροεκφυλισμός.

Μία ακόμα μελέτη που κάνει αναφορά στην αυξημένη έκφραση του miR-146a, σε συνδυασμό με την υπερέκφραση του miR-501, επιβεβαιώνει τη σύνδεσή τους με τον νευροεκφυλισμό κατά τη ΝΑ. [28] Στην μελέτη, ωστόσο, τα πιο σημαντικά διαφοροποιημένα μόρια αναδόχθηκαν τα miR-132-5p, miR-132-3p, miR-212-5p και miR-212-3p, μα σημαντικά μειωμένη έκφραση στα ασθενή άτομα. Αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Η έλλειψη αυτών των microRNA μορίων έχει ως άμεσο αποτέλεσμα στην αυξημένη έκφραση και φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Ταυ. Επιπλέον, το miR-132 είναι παράγοντας της νευρογένεσης και της νευρωνικής διαφοροποίησης. Η μειωμένη έκφραση των miR-132-5p, miR-132-3p, miR-212-5p και miR-212-3p αναφέρεται και σε άλλη μελέτη, μαζί με τα υποεκφραζόμενα miR-138-1-3p, miR-138-5p και miR-128-1-5p. [29] Στην αναφερόμενη έρευνα μελετώνται οι κοινές διαφοροποιήσεις των miRNAs ασθενών ατόμων, τα οποία πάσχουν είτε από τη νευροεκφυλιστική ασθένεια του Alzheimer είτε του Parkinson. Στην έρευνα παρατηρήθηκαν, επίσης, αυξημένα ποσοστά έκφρασης του miR-148a-3p, το οποίο επηρεάζει τα βιολογικά μονοπάτια ανάπτυξης του νευρικού συστήματος και συνάψεων, βάσει της GO. [30]

Κοινά αποτελέσματα, βρέθηκαν και στην μελέτη των Prashanth Gowda, P. Hemachandra Reddy & Subodh Kumar "Deregulated mitochondrial microRNAs in Alzheimer's disease: Focus on synapse and mitochondria". [31] Ομοίως με την προηγούμενη έρευνα, τα μόρια miR-34a, miR-125b παρουσιάζουν υπερέκφραση. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, το μόριο miR-137 υποεκφράζεται στα κύτταρα, με αποτέλεσμα να προάγει πιθανόν τη μιτοφαγία. Αντίθετα, το μόριο miR-455-3p έχει αυξημένη έκφραση στις δύο μελέτες. Φυσιολογικά, αυτό το μόριο micro-RNA αναστέλλει την έκφραση της πρωτεΐνης APP προάγοντας την έκφραση της Αβ αμυλλοειδούς.

Ταυτόχρονα, παρουσιάζονται και ασυμφωνίες μεταξύ των αποτελεσμάτων. Για παράδειγμα, το miR-15b, το οποίο στην παρούσα μελέτη βρέθηκε με αυξημένη έκφραση

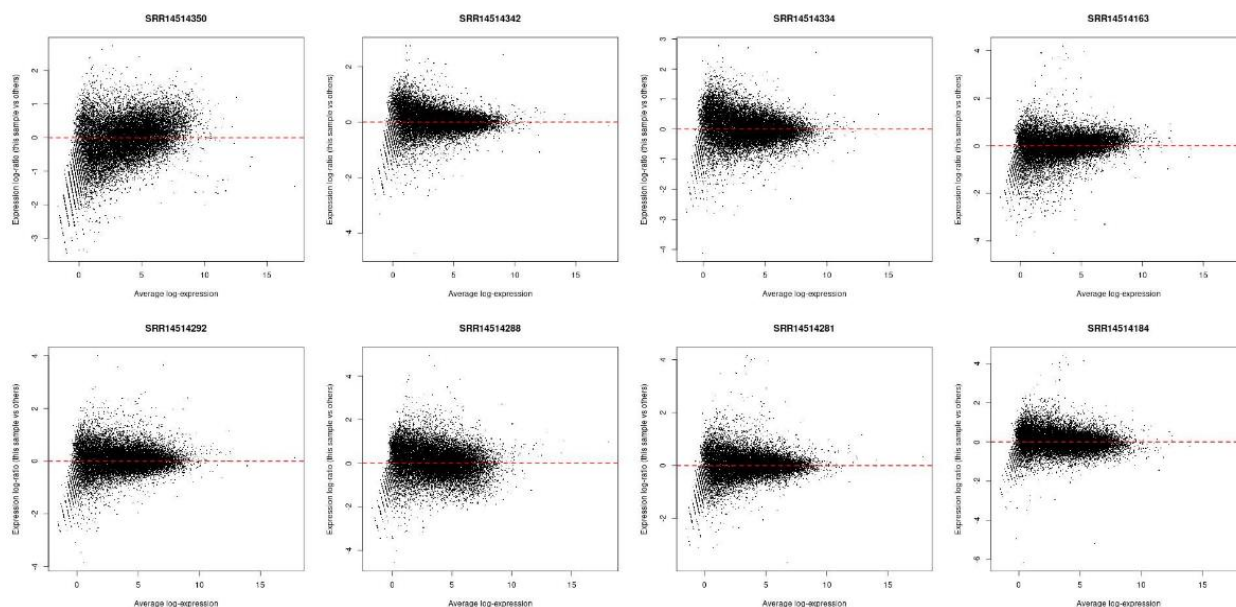
μεταξύ των ασθενών δειγμάτων, αναφέρεται πως επηρεάζει την ομοιόσταση της οξειδοαναγωγής και την εξουδετέρωση της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων λόγω γήρανσης. Αντίστοιχα, τα μόρια miR-29a και miR-29b καταστέλλουν την παραγωγή αποπτωτικών πρωτεϊνών και στην παρούσα ανάλυσή παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης. Αυτό έρχεται ενάντια σε πολλές αντίστοιχες μελέτες, όπου σε άτομα που πάσχουν από AD παρατηρείται μείωση της έκφρασης των miR-29a και miR-29b. [32]

Τέλος, η αναστολή του μορίου miR-195 χαρακτηρίζεται ως πιθανή θεραπεία για τη νόσο, καθώς επηρεάζει αρνητικά το δυναμικό και τη δραστηριότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το miR-195, στοχεύοντας στην 3'-UTR περιοχή του β-ενζύμου διάσπασης του APP 1 (BACE1), αναστέλλει την έκφρασή της. [33] Στην παρούσα ανάλυσή, εμφανίζει αυξημένη έκφραση στους ασθενείς.

Υπερέκφραση εμφανίζει και το miR-424-5p, κατά την οποία κατεφέρει να αναστείλει τη απόπτωση των νευρώνων και την ενεργοποίηση της μικρογλοίας. [34] Καταστολή της μικρογλοίας επιτυγχάνεται και από το miR-181c στοχεύοντας την πρωτεΐνη TLR4. Επιπλέον, το μόριο miR-181c ασκεί πρόσθετη ανασταλτική επίδραση στην παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών μέσω του μονοπατιού NF-κΒ, καθώς σε πολλές έρευνες επιβεβαιώνεται η ανασταλτική σύνδεση του μορίου με αποπτωτικά μονοπάτια. Η έκφραση του μορίου βρέθηκε μειωμένη στην παρούσα μελέτη. Στην ίδια ανάλυση, αναφέρεται πως το miR-93 δρα ως αναστολέας της έκφρασης του IRAK4 και άλλων προφλεγμονωδών γονιδίων στη μικρογλοία, εμποδίζοντας τη ανάπτυξη φλεγμονών. Παρατηρείται αυξημένη έκφραση μεταξύ των ασθενών, όπως φαίνεται και στα αποτελέσματα της παρούσας ανάλυσης, σηματοδοτώντας μία πιθανή προστατευτική αντίδραση του οργανισμού.

3.2 Ανάλυση Διαφοροποιημένης Έκφρασης mRNA

Στην ανάλυση διαφοροποιημένης έκφρασης mRNA, τα MAplots δημιουργήθηκαν ξεχωριστά για κάθε δείγμα, συγκρίνοντάς το με τα υπόλοιπα δείγματα του συνόλου. Παρατηρείται πως η λογαριθμική αναλογία έκφρασης συγκριτικά με τα άλλα δείγματα στον άξονα y των ασθενών δειγμάτων εμφανίζει μεγαλύτερες τιμές σε σχέση με τα τυπικά δείγματα. Λόγω αυτού αναμένεται να βρεθούν γονίδια με διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων.



Εικόνα 5 : MAplots για κάθε δείγμα της DGEA του mRNA. Στην πρώτη γραμμή βρίσκονται τα τυπικά δείγματα, ενώ στην δεύτερη τα ασθενή.

Στη συνέχεια, μελετώντας τα αποτελέσματα της ανάλυσης του Πίνακα 4, διαπιστώνεται πως το μεγαλύτερο ποσοστό των DEG είναι down-regulated, δηλαδή παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση στην ομάδα των ασθενών δειγμάτων. Για να αποφασίσουμε εάν αυτό είναι αποτέλεσμα της αυξημένης έκφρασης κάποιων microRNA θα πρέπει να γίνει μελέτη μονοπατιών, τα οποία θα αναδείξουν τον τρόπο με τον οποίο τα microRNAs επηρεάζουν το εκάστοτε γονίδιο. Αυτό, όμως, δεν είναι μια διαδικασία που θα μελετήσουμε σε αυτή την εργασία. Θα αναλυθεί, όμως, στη συνέχεια εάν μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στις θέσεις στόχους για τα miRNAs έχουν επηρεάσει την έκφραση των γονιδίων και ποιοι είναι αυτοί.

Για το σκοπό της παρούσας εργασίας, θα μελετηθεί, επιπλέον, τη φύση των διαφοροποιημένων εκφραζόμενων γονιδίων και τη πιθανή τους συσχέτιση με τη ΝΑ, καθώς και με τις υποθέσεις γύρω από αυτή. Παραδείγματος χάρη, το πλέον στατιστικά σημαντικά διαφοροποιημένο γονίδιο είναι το FCGBP, το οποίο σε φυσιολογικές συνθήκες εκφράζεται κυρίως στο παχύ έντερο, στον θυροειδή και το στομάχι. Εμπλέκεται στην παραγωγή και έκκριση βλεννογόνου, η οποία συμβάλλει στη διατήρηση της ακεραιότητας του βλεννογονικού φραγμού στο στομάχι και το έντερο. Ενώ ακόμα μελετώνται οι ακριβείς μηχανισμοί τους οποίους επηρεάζει η παραγόμενη πρωτεΐνη, έχει προταθεί ότι διαδραματίζει ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση, στην επούλωση πληγών, την προφλεγμονή και στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων στο έντερο. [35] Ωστόσο, σε ανάλυση εγκεφαλικού ιστού μεσαίου μετωπιαίου νεοφλοιού, όταν γίνεται σύγκριση δυστροφικών και ομοιοστατικών μικρογλοιακών κυττάρων, παρατηρείται διαφοροποιημένη έκφραση της πρωτεΐνης FCGBP, καθώς και των RHBDF2, STAB1, HSPB1, C3, SRGN. [36] Ενδιαφέρον παρουσιάζει η κατεύθυνση αυτής της διαφοροποίησης. Στην παρούσα εργασία όλα αυτά τα γονίδια είναι υπο-εκφραζόμενα, ενώ στην αναφερόμενη μελέτη μόνο το γονίδιο SRGN παρουσιάζει μειωμένη έκφραση.

Η διαμεμβρανική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο STAB1 έχει αποδειχθεί ότι ενδοκυτταρώνει συνδέτες, όπως λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας και τελικά προϊόντα

προχωρημένης γλυκοζυλίωσης, ενώ εκφράζεται κυρίως στα φλεβοκομβικά ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος, του σπλήνα και του λεμφαδένα. [37]

Το σύμπλεγμα C3 είναι απαραίτητο συστατικό για την ενεργοποίηση του συμπληρωματικού συστήματος, μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος. Η κωδικοποιημένη προπρωτεΐνη υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία για τη δημιουργία α και β υπομονάδων που σχηματίζουν την ώριμη πρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία για τη δημιουργία πολυάριθμων πεπτιδικών προϊόντων. Το πεπτίδιο C3a ρυθμίζει τη φλεγμονή και διαθέτει αντιμικροβιακή δράση. Οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο σχετίζονται με το άτυπο αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας σε ανθρώπινους ασθενείς. [37] Πρόσφατες έρευνες συσχετίζουν το σύμπλεγμα C3 με τη νευροφλεγμονή και τη NA, με κυρίαρχο ρόλο την προστασία του εγκεφάλου από τον νευροεκφυλισμό. [38] [39] Μάλιστα, ενώ στις περισσότερες σύγχρονες μελέτες παρατηρείται αυξημένη έκφραση του συμπλέγματος C3, η απώλειά του φαίνεται να ενισχύει τον σχηματισμό αμυλοειδούς πλάκας και τον νευρωνικό εκφυλισμό σε ασθενή άτομα. [40] Αυτό μπορεί να αιτιολογεί την αρνητική έκφραση που βρέθηκε στην παρούσα εργασία.

Το κωδικό γονίδιο RHBD2 ενεργοποιεί πρωτεϊνικούς μεταφορείς, καθώς εμπλέκεται στην αρνητική ρύθμιση έκκρισης πρωτεϊνών και τη ρύθμιση της οδού σηματοδότησης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα. [41] Βάσει μελετών, είναι συνδεδεμένο με το σύνδρομο Keratoderma-esophageal Carcinoma και θεωρείται σημαντικό για την απελευθέρωση του παράγοντα νέκρωσης όγκων, μιας σημαντικής φλεγμονώδους κυτταροκίνης που σχετίζεται με τη νευροφλεγμονή που παρατηρείται στη NA. Δεν υπάρχουν, όμως, ισχυρές ενδείξεις για τη συσχέτισή του με τη NA.

Από γονίδιο HSPB1 κωδικοποιείται ένα μέλος της οικογένειας μικρών πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Small Heat Shock Proteins). Οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας, όταν υπάρχει στρες στο περιβάλλον τους, μεταφέρονται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και εξασφαλίζει τη σωστή αναδίπλωση άλλων πρωτεϊνών. [42] Το γονίδιο έχει βρεθεί πως μπορεί να ενισχύσει τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων, καθώς επίσης είναι συσχετισμένο με την άπω κληρονομική κινητική νευροπάθεια. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες, αναφέρουν πολλές μεταλλάξεις του γονιδίου οι οποίες οδηγούν σε κληρονομικές περιφερικές νευροπάθειες. [43] Τέλος, έχει αναφερθεί πως νευρώνες με ανεπάρκεια του HSPB1 είναι πιο ευαίσθητοι στην τοξικότητα που προκαλούν τα Αβ ολιγομερή και λιγότερο προστατευμένοι έναντι της παθολογία της P-tau.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το δεύτερο πιο σημαντικά διαφοροποιημένο γονίδιο, CHI3L1. Η πρωτεΐνη, με κύριο τόπο έκφρασης τον εγκέφαλο, θεωρείται ότι διαδραματίζει ρόλο στη διαδικασία της φλεγμονής και της αναδιαμόρφωσης των ιστών. [44] Πέρα των αστροκυττάρων, τον βασικό κυτταρικό τύπο που εκφράζει το γονίδιο, η CHI3L1 εκφράζεται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, όπως οι μακροφάγοι, τα δένδριτικά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα κ.α., ενώ η έκφραση και έκκρισή της ρυθμίζεται κυρίως από κυτοκίνες. Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα πως το γονίδιο CHI3L1 συμμετέχει στην ανοσολογική απόκριση και τη φλεγμονή. [45] Η αυξημένη έκκριση τη πρωτεΐνης φαίνεται να ενισχύει την επιβίωση του κυττάρου αυξάνοντας τη σύνθεση και τον πολλαπλασιασμό του DNA, αναστέλλοντας έτσι την απόπτωσή του. Επιπλέον, η έκφραση του στους μακροφάγους αναστέλλει την πυροπρωτική τους δράση. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις για την επίδραση του γονιδίου CHI3L1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, συσχετίζοντάς

το με το BBB. Η μειωμένη έκφρασή του γονιδίου στην παρούσα εργασία ενδεχομένως σηματοδοτεί έναν από τους λόγους που οδηγούνται τα κύτταρα σε εκτεταμένης φλεγμονής και τελικά σε απόπτωση.

Ένα γονίδιο στενά συνδεδεμένο με τη NA είναι το APLNR, το κωδικό γονίδιο του υποδοχέα της απελίνης. Ο υποδοχέας συνδέεται με ετερογενείς πρωτεΐνες που δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης, ρυθμίζοντας έτσι διάφορα ενδοκυτταρικά μονοπάτια. [47] Επίσης, είναι πιθανό να συνδέεται με ανασταλτικές G-coupled πρωτεΐνες. Η μειωμένη έκφραση του γονιδίου, που παρατηρείται στην ανάλυση, υποδεικνύει τη μειωμένη αλληλεπίδραση των κυττάρων με την ορμόνη της απελίνης, μέλος της οικογένειας των λιποκινών. Η απελίνη παράγεται από μία προ-προπρωτεΐνη η οποία διασπάται, δημιουργώντας μία σειρά πεπτιδίων που προσδένονται στην APLNR. Το πεπτίδιο απελίνης που φαίνεται να επηρεάζει μονοπάτια συσχετισμένα με τη NA είναι η Apelin-13 και αναδεικνύεται ως ένας θεραπευτικός παράγοντας στη νόσο. Μάλιστα, μελέτες που υλοποιήθηκαν σε μοντέλα ποντικών δείχνουν μείωση στην απώλεια μνήμης, στη δραστηριότητα του μονοπατιού της αυτοφαγίας και της απόπτωσης, καθώς αυξήθηκε η δραστηριότητα της αυτοφαγικής εκκαθάρισης και της επιβίωσης των νευρώνων μέσω της οδού mTOR. Η οδός mTOR αποτελεί βασικό ρυθμιστή του μεταβολισμού και της φυσιολογίας στα θηλαστικά, όπως στη λειτουργία των ιστών του ήπαρ, των μυών και του εγκεφάλου. Επιπλέον, υπό τη παρουσία της Apelin-13 ενισχύεται η μικρογλοιακή και αστρογλοιακή ενεργοποίηση και η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. [48]

Το γονίδιο CRH (corticotropin releasing hormone) κωδικοποιεί ένα μέλος της οικογένειας του παράγοντα απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης, η οποία, έπειτα από πρωτεόλυση, παράγει ώριμη νευροπεπτιδική ορμόνη. [49] Υπό την ύπαρξη στρες, η ορμόνη εκκρίνεται στον υποθάλαμο και φαίνεται να ενεργοποιεί τη μικρογλοία, χωρίς να έχουν επιβεβαιωθεί οι μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτό το αποτέλεσμα. [50] Σε διάφορες μελέτες έχει παρατηρηθεί μειωμένη έκφραση του γονιδίου μεταξύ ασθενών της NA σε σύγκριση με τυπικά άτομα. Ωστόσο, στη δεδομένη εργασία παρουσιάζει σημαντικά αυξημένη έκφραση στα ασθενή άτομα.

Δύο ακόμα γονίδια με αυξημένη έκφραση στα αποτελέσματά μας είναι τα CHML και CHRN2. Δεν υπάρχουν πολλές γνωστές ιδιότητες για το γονίδιο CHML, ωστόσο πολλές μελέτες το συσχετίζουν με την ανάπτυξη διάφορων καρκινικών τύπων. Υπάρχουν ενδείξεις, όμως, πως ένας μεταγραφικός στόχος το γονιδίου είναι το NRF2, το οποίο, με τη μετατόπιση του mTOR στο λυσόσωμα, σημαίνει την έναρξη της πρωτεϊνικής μετάφρασης. [51] Λίγα είναι γνωστά και για τη λειτουργία του γονιδίου CHRN2, το οποίο μεταφράζεται σε χολινεργικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης και νικοτίνης. Όταν ανιχνευτεί ακετυλοχολίνη ή νικοτίνη στο περιβάλλον του υποδοχέα, επιτρέπει την εισροή νατρίου και καλίου από τη πλασματική μεμβράνη. Το γονίδιο έχει συνδεθεί στη πλειοψηφία των μελετών με την επιληψία.

Ensemble Gene ID	GeneID	log2FoldChange	P-value	FDR	Expression State
ENSG00000275395.7	FCGBP	-2.55012839390688	2.93830841787518E-07	0.005511972761092	Down-regulated
ENSG00000133048.13	CHI3L1	-2.26694928185926	2.45031861824558E-06	0.016418252906793	Down-regulated
ENSG00000134817.12	APLN	-2.06522453196448	2.62566014821571E-06	0.016418252906793	Down-regulated
ENSG00000147571.5	CRH	4.03299250632565	6.27315280302649E-06	0.029419518357994	Up-regulated
ENSG00000142089.17	IFITM3	-1.50735704253234	8.76409324350579E-06	0.032881125030985	Down-regulated
ENSG00000102265.12	TIMP1	-1.95703035162644	1.11636228950265E-05	0.0349030669813	Down-regulated
ENSG00000168918.14	INPP5D	-1.46039860233242	1.68708990570053E-05	0.04085609251537	Down-regulated
ENSG00000120708.17	TGFB	-2.33304740349996	1.74235694932009E-05	0.04085609251537	Down-regulated
ENSG00000143226.15	FCGR2A	-1.82300722593602	2.15612896572909E-05	0.043315016983271	Down-regulated
ENSG00000213719.8	CLIC1	-1.62690490730653	2.47368389093372E-05	0.043315016983271	Down-regulated
ENSG00000131386.20	GALNT15	-1.29725594925229	2.53992849733983E-05	0.043315016983271	Down-regulated
ENSG00000028137.19	TNFRSF1B	-1.56754716833831	2.95582501363224E-05	0.044548048448673	Down-regulated
ENSG00000185201.18	IFITM2	-1.92358609452646	3.47521042074289E-05	0.044548048448673	Down-regulated
ENSG00000082074.19	FYB1	-1.35489976106967	3.54211105519601E-05	0.044548048448673	Down-regulated
ENSG00000129667.13	RHBDP2	-1.46273621528337	3.5621340515491E-05	0.044548048448673	Down-regulated
ENSG00000038945.15	MSR1	-2.06917762762952	4.84384365655373E-05	0.054901865879399	Down-regulated
ENSG00000106624.11	AEBP1	-1.46869207971662	4.9753809901902E-05	0.054901865879399	Down-regulated
ENSG00000010327.10	STAB1	-1.62201365442882	5.56566040018328E-05	0.056700351108181	Down-regulated
ENSG00000026025.16	VIM	-1.19948500503915	5.74287899704376E-05	0.056700351108181	Down-regulated
ENSG00000184113.10	CLDN5	-1.16578024116651	7.22060555645105E-05	0.065387790480236	Down-regulated
ENSG00000162493.17	PDPN	-1.3533585849084	7.31991897267958E-05	0.065387790480236	Down-regulated
ENSG00000119535.18	CSF3R	-1.71599417982296	9.49667514615161E-05	0.077971078393114	Down-regulated
ENSG00000163220.11	S100A9	-1.63430944279758	9.55986354838537E-05	0.077971078393114	Down-regulated
ENSG00000197747.9	S100A10	-1.75435344368415	0.000105737935065	0.082647413495065	Down-regulated
ENSG00000081237.20	PTPRC	-1.63099031609872	0.000118574288052	0.084400921623625	Down-regulated
ENSG00000125730.17	C3	-1.52058501693519	0.000123895071122	0.084400921623625	Down-regulated
ENSG00000018408.15	WWTR1	-1.22476215158538	0.000124990548514	0.084400921623625	Down-regulated
ENSG00000095932.7	SMIM24	1.66816538648324	0.000126124774352	0.084400921623625	Up-regulated
ENSG00000197249.14	SERPINA1	-1.90898368886924	0.000130867145293	0.084400921623625	Down-regulated
ENSG00000149131.17	SERPING1	-0.983057406340688	0.000134976685789	0.084400921623625	Down-regulated
ENSG00000162645.13	GBP2	-2.1054978916234	0.000142079011359	0.085976134648023	Down-regulated
ENSG00000140678.17	ITGAX	-1.442490582345	0.000162274705403	0.088879967710775	Down-regulated
ENSG00000203668.3	CHML	0.918749487691467	0.000163379893899	0.088879967710775	Up-regulated
ENSG00000160716.6	CHRNA2	1.00046209890578	0.000166013067763	0.088879967710775	Up-regulated
ENSG00000160255.18	ITGB2	-1.51429780557963	0.000167135580859	0.088879967710775	Down-regulated
ENSG00000101336.18	HCK	-1.98577759409489	0.000170567665525	0.088879967710775	Down-regulated
ENSG00000105329.11	TGFB1	-1.26772511890769	0.000183175971894	0.090798354712368	Down-regulated
ENSG00000106211.10	HSPB1	-1.41419854566792	0.000186051518203	0.090798354712368	Down-regulated
ENSG00000139998.16	RAB15	1.00818299058312	0.000190545235209	0.090798354712368	Up-regulated
ENSG00000155629.15	PIK3AP1	-1.86305001180878	0.000193610223812	0.090798354712368	Down-regulated
ENSG00000129654.8	FOXJ1	-2.20194462479972	0.00021546184169	0.09858167532365	Down-regulated
ENSG00000185811.20	IKZF1	-1.58262927691086	0.000224032285841	0.099098944215104	Down-regulated
ENSG00000122862.5	SRGN	-1.16882926665371	0.000229212463332	0.099098944215104	Down-regulated
ENSG00000154096.14	THY1	0.983090081373484	0.000232440617595	0.099098944215104	Up-regulated

Πίνακας 4 : Αποτελέσματα Ανάλυσης DGE στα mRNA. Εμφάνιση με σειρά σημαντικότητας βάσει P-Value

3.3 Ανάλυση Εύρεσης Μονονουκλεοτιδικών Πολυμορφισμών

Σε αυτή την ανάλυση τα αποτελέσματα που αναμένουμε να δούμε είναι αυξημένη έκφραση στα γονίδια στόχους όπου βρέθηκαν πιθανοί πολυμορφισμοί. Τα αποτελέσματα από τη βάσει δεδομένων Clinvar, μετά την διαλογή τους σχετικά με τη πιθανή παθογένεια,

έδειξαν μόνο έναν πολυμορφισμό σε γονίδιο με αυξημένη έκφραση και ταυτόχρονα μειωμένη έκφραση του miRNA που το στοχεύει με Clinvar ID 41035. Όμως ο πολυμορφισμός αυτός εντοπίζεται στη κωδική περιοχή του γονιδίου και όχι στο σημείο πρόσδεσης του miRNA. Επομένως, δεν βρέθηκε κανένας παθογενής πολυμορφισμός στο σύνολο των δεδομένων που να ικανοποιεί τις απαιτούμενες συνθήκες. Αντίστοιχα, όταν εφαρμόστηκε και το φίλτρο συσχέτισης των παθογενών πολυμορφισμών με τη Νόσο Αλτσχάιμερ, δε βρέθηκε κανένας γνωστός πολυμορφισμός που να καλύπτει τα κριτήρια. Επομένως, οι υπόλοιποι πολυμορφισμοί που μελετήθηκαν είναι πιθανώς καλοηθής πολυμορφισμοί χωρίς άμεση συσχέτιση με τη νόσο.

Ξεκινώντας από τα γονίδια με μεγαλύτερη τιμή $\log_2(\text{Fold-change})$, παρατηρήθηκε πως ο πολυμορφισμός με dbSNP ID rs550245794 στο χρωμόσωμα 1 επηρεάζει το γονίδιο CRH και εμποδίζει την πρόσδεση των miRNAs hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-3065-5p, hsa-miR-181d-5p και hsa-miR-181a-5p, εκ των οποίων τα hsa-miR-3065-5p και hsa-miR-181d-5p παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση, ενώ τα άλλα δύο μειωμένη. Το γονίδιο έχει παρατηρηθεί πως στη νόσο έχει μειωμένη έκφραση, σε αντίθεση με τη παρούσα ανάλυση, όμως ο πολυμορφισμός πιθανόν να φανερώνει την αιτία της αυξημένης έκφρασής του στην παρούσα μελέτη. Παράλληλα, από την πλευρά των miRNAs, η μειωμένη έκφραση του hsa-miR-3065-5p έχει αναδειχθεί ως πιθανός βιοδείκτης της νόσου. [52] Αντίστοιχα, και η οικογένεια του miR-181 έχει συσχετιστεί πολλές φορές με τη νόσο, ενώ η μειωμένη έκφραση του hsa-miR-181d-5p δείχνει να επηρεάζει διάφορες παθογένειες, όπως την αγγειακή φλεγμονή, το σύνδρομο Sjögren και διάφορες μορφές καρκίνου.

Στη θέση πρόσδεσης των hsa-miR-138-5p και hsa-miR-342-5p στο γονίδιο SMIM24 βρέθηκαν οι πολυμορφισμοί με dbSNP ID rs10415828, rs56297958, rs551228432, rs551813679, rs1055392 και rs11540872. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις κατά τις οποίες το γονίδιο SMIM24 κατέχει παθογενετικό ρόλο στη ΝΑ, καθώς αποτελεί φορέα της APOE4, γονίδιο βαθιά συνδεδεμένο με τη νόσο Αλτσχάιμερ. Το ίδιο και τα miRNAs που στοχεύουν το SMIM24. Υπάρχουν αρκετές αναφορές που συσχετίζουν τη μειωμένη έκφραση του hsa-miR-138-5p [53] και του hsa-miR-342-5p [54] με τη νόσο, είτε ως βιοδείκτες είτε ως ρυθμιστές έκφρασης.

Πολλοί πολυμορφισμοί βρέθηκαν στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου RAB15. Το γονίδιο τυπικά βοηθάει στην πρόσδεση του GTP και εκφράζεται κατά βάση στον εγκέφαλο. [55] Οι πολυμορφισμοί που βρέθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα μαζί με το επηρεαζόμενο miRNA και τη θέση του στο γονιδίωμα. Τα miRNAs τα οποία έχουν σημαντικά μειωμένη έκφραση και βρίσκονται εντός των πλαισίων κάποιων πολυμορφισμών είναι τα hsa-miR-132-3p (rs10121), hsa-miR-29b-1-5p (rs3087955, rs2296325, rs118115391, rs2296326), hsa-miR-212-3p (rs10121), όλα miRNAs συνδεδεμένα με ταυοπάθειες, άρα και με το Αλτσχάιμερ. Από την άλλη πλευρά, σημαντικά αυξημένη έκφραση παρατηρήθηκε στα hsa-miR-148b-3p (rs570067195, rs73281761), hsa-miR-501-3p (rs137942279) και hsa-miR-424-5p (rs576678863, rs556254194, rs11540872), με το τελευταίο να παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική ζωή της μικρογλοίας.

miRNAs	SNP IDs	Position
hsa-miR-107	rs11540872	64948020
hsa-miR-148b-3p	rs570067195	64948098
hsa-miR-125b-5p	rs118115391	64947677
hsa-miR-29b-2-5p	rs2296326	64947654

hsa-miR-146b-3p	rs191126978	64948045
hsa-miR-455-3p	rs45603938	64947174
hsa-miR-148a-3p	rs73281761	64948091
hsa-miR-148a-3p	rs570067195	64948098
hsa-miR-107	rs113708067	64948041
hsa-miR-424-5p	rs8006570	64945992
hsa-miR-132-3p	rs10121	64946055
hsa-miR-29b-1-5p	rs3087955	64946030
hsa-miR-181b-3p	rs150710253	64947380
hsa-miR-424-5p	rs576678863	64945986
hsa-miR-24-3p	rs528338892	64947173
hsa-miR-501-3p	rs137942279	64948012
hsa-miR-342-3p	rs189644578	64945883
hsa-miR-212-5p	rs72625649	64946825
hsa-miR-342-5p	rs370219889	64948326
hsa-miR-148b-3p	rs73281761	64948091
hsa-miR-29b-2-5p	rs3087955	64946030
hsa-miR-101-3p	rs111598126	64945898
hsa-miR-29b-1-5p	rs2296325	64947661
hsa-miR-125b-5p	rs2296325	64947661
hsa-miR-424-5p	rs556254194	64945985
hsa-miR-125b-5p	rs2296326	64947654
hsa-miR-212-3p	rs10121	64946055
hsa-miR-195-5p	rs11540872	64948020
hsa-miR-29b-1-5p	rs118115391	64947677
hsa-miR-29b-1-5p	rs2296326	64947654
hsa-miR-424-5p	rs11540872	64948020
hsa-miR-339-3p	rs370061770	64946084
hsa-miR-15b-5p	rs11540872	64948020
hsa-miR-181c-3p	rs3759682	64946549
hsa-miR-24-3p	rs45603938	64947174
hsa-miR-29b-2-5p	rs118115391	64947677
hsa-miR-455-3p	rs528338892	64947173
hsa-miR-29b-2-5p	rs2296325	64947661

Πίνακας 5 Πολυμορφισμοί στη κωδική περιοχή του γονιδίου RAB15

Άλλο ένα γονίδιο με αρκετούς πολυμορφισμούς στα σημεία πρόσδεσης είναι το CHRNA2. Όπως έχει προαναφερθεί, δεν υπάρχει καμία ισχυρή ένδειξη που να το συνδέει με τη ΝΑ. Τα miRNAs με αυξημένη έκφραση που επηρεάζονται περισσότερο σε αυτή την περίπτωση είναι τα hsa-miR-195-5p (rs79916715, rs6680410, rs6680410, rs12125018, rs116171514), hsa-miR-15b-5p (rs2072661, rs116171514, rs6680410, rs12125018), hsa-miR-186-5p (rs149932359, rs12130403, rs139826441), hsa-miR-424-5p (rs116171514, rs6680410, rs79916715), ενώ με μειωμένη έκφραση μόνο τα hsa-miR-128-1-5p (rs6680410, rs79916715), hsa-miR-138-5p (rs45490696, rs115971480, rs191830859), hsa-miR-29b-1-5p (rs115971480), hsa-miR-212-3p (rs11264221) και hsa-miR-132-3p (rs11264221). Όπως έχει αναφερθεί και νωρίτερα στην εργασία όλα αυτά τα miRNAs έχουν συνδεθεί με τη ΝΑ με την ίδια ή με την αντίθετη φορά έκφρασης.

miRNAs	SNP IDs	Position
hsa-miR-101-3p	rs61682683	154579685
hsa-miR-101-3p	rs200473686	154579689
hsa-miR-195-5p	rs79916715	154578242
hsa-miR-195-5p	rs6680410	154578248
hsa-miR-125b-5p	rs151180783	154577897
hsa-miR-181d-5p	rs188276626	154577611
hsa-miR-15b-5p	rs2072661	154576404
hsa-miR-15b-5p	rs116171514	154576420
hsa-miR-128-1-5p	rs6680410	154578248
hsa-miR-138-5p	rs45490696	154576516
hsa-miR-186-5p	rs149932359	154579208
hsa-miR-424-5p	rs116171514	154576420
hsa-miR-29b-1-5p	rs115971480	154576163
hsa-miR-3065-5p	rs188276626	154577611
hsa-miR-212-3p	rs11264221	154579241
hsa-miR-181c-5p	rs188276626	154577611
hsa-miR-15b-5p	rs6680410	154578248
hsa-miR-138-5p	rs115971480	154576163
hsa-miR-107	rs6680410	154578248
hsa-miR-186-5p	rs12130403	154576994
hsa-miR-186-5p	rs139826441	154576995
hsa-miR-138-5p	rs191830859	154578788
hsa-miR-181a-5p	rs188276626	154577611
hsa-miR-107	rs116171514	154576420
hsa-miR-107	rs6680410	154578248
hsa-miR-24-3p	rs111787379	154576204
hsa-miR-424-5p	rs6680410	154578248
hsa-miR-424-5p	rs79916715	154578242
hsa-miR-128-1-5p	rs79916715	154578242
hsa-miR-107	rs2072661	154576404
hsa-miR-195-5p	rs12125018	154577015
hsa-miR-146b-3p	rs201074604	154577358
hsa-miR-3065-5p	rs115971480	154576163
hsa-miR-195-5p	rs116171514	154576420
hsa-miR-132-3p	rs11264221	154579241
hsa-miR-15b-5p	rs12125018	154577015
hsa-miR-181b-3p	rs4845653	154578892
hsa-miR-181c-3p	rs149932359	154579208

Πίνακας 6 Πολυμορφισμοί στη κωδική περιοχή του γονιδίου *CHRNA2*

Τέλος, ένα γονίδιο του οποίου η διαφοροποιημένη έκφραση έχει συσχετιστεί με το Αλτσχάιμερ είναι το *THY1*, το οποίο σε φυσιολογικές συνθήκες βοηθάει την ανάπτυξη

νευριτών. Σε αναλύσεις μελετών επιβεβαιώνεται η συμμετοχή της πρωτεΐνης στην εκτεταμένη ανάπτυξη ανώμαλων νευριτών στη ΝΑ. Οι πολλαπλοί πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν στο συγκεκριμένο γονίδιο, υποδηλώνουν τη πιθανή εμπλοκή τους στη νόσο. Και σε αυτή την περίπτωση, έχουν γίνει διάφορες αναφορές για τα miRNAs με θετική διαφοροποίηση στην έκφραση που επηρεάζονται από τους πολυμορφισμούς στο γονίδιο THY1, οι οποίες τα συσχετίζουν με τη νόσο. Παραδείγματος χάρη, το hsa-miR-27b-3p (rs560815102, rs140031650, rs373165027, rs141958103) αναφέρεται πως βρίσκεται στο ρυθμιστικό δίκτυο της νόσου, μαζί με το hsa-miR-181b-3p (rs185116789, rs180903776), το οποίο όμως στην παρούσα εργασία παρουσιάζει μειωμένη έκφραση.

miRNAs	SNP IDs	Position
hsa-miR-146a-5p	rs45505491	119417825
hsa-miR-27b-3p	rs560815102	119416021
hsa-miR-27b-3p	rs140031650	119418280
hsa-miR-339-3p	rs117867435	119416204
hsa-miR-27b-3p	rs373165027	119417021
hsa-miR-138-5p	rs111735149	119416626
hsa-miR-153-3p	rs60129325	119417850
hsa-miR-146a-5p	rs397897483	119417825
hsa-miR-212-5p	rs544554724	119417159
hsa-miR-27b-3p	rs141958103	119416025
hsa-miR-137-5p	rs145720229	119416465
hsa-miR-128-1-5p	rs11546395	119418403
hsa-miR-146a-5p	rs34024712	119417825
hsa-miR-339-3p	rs533414074	119416193
hsa-miR-132-5p	rs146047975	119418108
hsa-miR-186-5p	rs12291644	119419133
hsa-miR-342-3p	rs180903776	119416517
hsa-miR-181b-3p	rs185116789	119416565
hsa-miR-137-5p	rs549193693	119416473
hsa-miR-128-1-5p	rs374889233	119418404
hsa-miR-138-1-3p	rs138783091	119417635
hsa-miR-582-5p	rs111735149	119416626
hsa-miR-181b-3p	rs180903776	119416517
hsa-miR-153-3p	rs540803894	119417849
hsa-miR-342-3p	rs114703926	119416071
hsa-miR-24-3p	rs182215894	119418425
hsa-miR-342-5p	rs140982940	119419292

Πίνακας 7 Πολυμορφισμοί στη κωδική περιοχή του γονιδίου THY1

4.Συμπεράσματα

Στην δεδομένη έρευνα αναλύθηκαν γενετικά δεδομένα από ιστούς του από προμετωπιαίου φλοιού του εγκεφάλου ασθενών της νόσου Αλτσχάιμερ και μη, με σκοπό την εύρεση πολυμορφισμών σε θέσεις στόχους miRNAs. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση τόσο των γονιδίων σε mRNAs, όσο και των miRNAs. Επιπλέον, βρέθηκαν αρκετοί πολυμορφισμοί που πιθανόν επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων, καθώς έχουν τη δυνατότητα να εμποδίσουν την πρόσδεση των miRNAs. Συνολικά, τα αποτελέσματα της μελέτης επιβεβαιώνουν τις αρχικές υποθέσεις που τέθηκαν όσον αφορά τη παθογένεια της νόσου. Επίσης, επιβεβαιώνεται η πολυπλοκότητά της, καθώς επηρεάζονται σημαντικοί μηχανισμοί ομοιόστασης του εγκεφάλου. Ωστόσο, υπήρξαν διάφορες δυσκολίες, λόγω των οποίων τα αποτελέσματα δε μπορούν να θεωρηθούν ισχυρές αποδείξεις. Η κοορτή που αναλύθηκε ήταν αρκετά μικρή σε πλήθος, με αποτέλεσμα να υπάρξουν μεροληψίες. Το διαθέσιμο υλικό είναι ιδιαίτερα περιορισμένο, οπότε δεν υπήρχαν πολλά δείγματα που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις αναλύσεις. Σε μελλοντικές μελέτες, ενδιαφέρον παρουσιάζει η άμεση συσχέτιση των μεταλλαγών στο γονιδίωμα με τα προϊόντα της έκφρασης, αναλύοντας ένα σύνολο δεδομένων που περιέχει γονιδιωματικά και μεταγραφικά δεδομένα. Εν κατακλείδι, η παρούσα εργασία δίνει έναυσμα για περαιτέρω μελέτες σχετικά με τη νόσο, επαληθεύοντας τις διάφορες δυσλειτουργίες που δημιουργούνται κατά την ανάπτυξη της νόσου, με σκοπό την καλύτερη κατανόησή της και τη δημιουργία μίας αποτελεσματικής θεραπείας.

5. Βιβλιογραφία

- [1] Z. B. a. R. Karaman, "Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Cause and Treatment," *PubMed Central*, 8 December 2020.
- [2] C. d. M. G. L. L. C. V. A. L. C. d. S. K. B. G. B. M. d. G. C. Marcos Vinícius Ferreira Silva, «Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. Journal of Biomedical Science,» *Journal of Biomedical Science*, 9 May 2019.
- [3] P. E. Valeria Calsolaro, «Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions.,» *Alzheimer's and Dementia, the journal of the Alzheimer's association*, 12 June 2016.
- [4] Y. Y. a. T. Kanekiyo, «Blood-Brain Barrier Dysfunction and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease.,» *PubMed Central*, 18 September 2017.
- [5] A. F. David Wang, «Biochemistry, RNA Structure,» *StatPearls*, 29 July 2023.
- [6] H. H. Y. Z. a. C. P. Jacob O'Brien, «Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation.,» *Department of Biology, York University, Toronto, ON, Canada*, 3 August 2018.
- [7] c. a. ., W. W. a. B. W. R. Peter T. Nelson, «MicroRNAs (miRNAs) in Neurodegenerative Diseases.,» *Brain Pathology*, November 2007.
- [8] D. P. S. Elliott J Stollar, «Uncovering protein structure,» *Essays in Biochemistry*, 8 October 2020.
- [9] A. D. Johnson, «Single-Nucleotide Polymorphism Bioinformatics: A Comprehensive Review of Resources.,» *Circulation. Cardiovascular Genetics*, October 2009.
- [10] R. J. G. S. v. D. A. B. A. J. E. Sam Griffiths-Jones, «miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature,» *Nucleic Acids research*, January 2006.
- [11] M. H. W. M. K. J. B. L. P. E. M. S. K. S. S T Sherry, «dbSNP: the NCBI database of genetic variation,» *Nucleic Acids research*, January 2001.
- [12] «National Center of Biotechnology Information,» [Ηλεκτρονικό]. Available:
] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/intro/>.
- [13] G. G. N. K. I. S. V. T. V. M. R. C. F. T. D. A. G. H. Maria D Paraskevopoulou, «DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows,» *Nucleic Acids research*, 2013.
- [14] «Babraham Bioinformatics,» [Ηλεκτρονικό]. Available:
] <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

- [15 «GitHub,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://github.com/rajewsky-lab/mirdeep2/blob/master/TUTORIAL.md>.
]
- [16 C. T. M. P. & S. L. S. Ben Langmead, «Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome,» *Genome Biology*, March 2009.
]
- [17 Pluto Bio, «DESeq2: An Overview of a Popular RNA-Seq Analysis Package,» 2021.
]
- [18 D. M. P. B. M. R. M. R. e. Yunshun Chen, «edgeR: differential analysis of sequence read count data User's Guide.,» 2023. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/edgeR/inst/doc/edgeRUsersGuide.pdf>.
]
- [19 K. B. R. J. E. S. C. S. F. S. B. R. R. A. S. R. S. A. T. D. G. A. S. P. T. A. T. A. H. S. J. V. Pierre Lau, «Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease,» *EMBO Molecular Medecine*, October 2013.
]
- [20 D. Z. I. K. M. M. A. K. D. K. a. A. G. H. Athanasios Alexiou, «DIANA-mAP: Analyzing miRNA from Raw NGS Data to Quantification.,» *Genes (Basel)*, 2021.
]
- [21 E. M. N. M. S. S. A. C. M. E. H. J. S. K. L. M. P.-R. & V. S. Samuel Morabito, «Single-nucleus chromatin accessibility and transcriptomic characterization of Alzheimer's disease.,» *Nature Genetics*, July 2021.
]
- [22 B. M. J. Z. B. L. a. Q. M. Adam McDermaid, «Interpretation of differential gene expression results of RNA-seq data: review and integration,» *Briefings in Bioinformatics*, November 2019.
]
- [23 «PlasmiR,» DIANA lab, [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://dianalab.e-ce.uth.gr/plasmir/#/>.
]
- [24 «miRBase,» The University of Manchester, [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.mirbase.org/>.
]
- [25 c. a. a. G. P. Akihiko Nunomura, «RNA and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Focus on microRNAs,» *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
]
- [26 S. J. S. R. D. D. Q. J. Z. C. J. W. S. S Sarkar, «Expression of MicroRNA-34a in Alzheimer's Disease Brain Targets Genes Linked to Synaptic Plasticity, Energy Metabolism, and Resting State Network Activity,» *Brain research*, September 2016.
]
- [27 M. A. S. M. S. a. B. T. Navneet Ammal Kaidery, «An Emerging Role of miRNAs in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Perspectives on miR146a,» *Antioxidants & Redox Signaling*, September 2021.
]
- [28 D. C. Qingqin S Li, «Integrated miRNA-Seq and mRNA-Seq Study to Identify miRNAs Associated With Alzheimer's Disease Using Post-mortem Brain Tissue Samples,» *Frontiers in neuroscience*, March 2021.
]

- [29 J. K. A. W. J. L. C. R. K. E. S. G. Charlotte Hewel, «Common miRNA Patterns of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease and Their Putative Impact on Commensal Gut Microbiota,» *Frontiers in Neuroscience*, March 2019.
- [30 «miRPathDB,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://mpd.bioinf.uni-sb.de/mirna.html?mirna=hsa-miR-148a-3p&organism=hsa>.
- [31 P. H. R. a. S. K. Prashanth Gowda, «Deregulated mitochondrial microRNAs in Alzheimer's disease: Focus on synapse and mitochondria,» *Ageing Research Reviews*, January 2022.
- [32 V. B. P. M. P. B. a. E. M. Agnese Gugliandolo Luigi Chiricosta, «MicroRNAs Modulate the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An In Silico Analysis in the Human Brain,» *Genes (Basel)*, September 2020.
- [33 L.-M. W. M. W. B. S. S. T. J.-F. T. D.-X. D. Hong-Can Zhu, «MicroRNA-195 downregulates Alzheimer's disease amyloid- β production by targeting BACE1,» *Brain research Bulletin*, September 2012.
- [34 Z. L. M. Y. W. Y. R. L. J. Z. J. H. Z. S. a. S. C. Chunxiang He, «Non-Coding RNA in Microglia Activation and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease,» *Journal of Inflammation Research*, 2023.
- [35 «NCBI - Gene,» NIH, 3 April 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8857>.
- [36 K. W. G. H. X. W. Z. M. J. A. A. E. S. V. M. V. D. D. C. K. R. M. L. a. E. B. L. Aivi T. Nguyen, «APOE and TREM2 regulate amyloid responsive microglia in Alzheimer's disease,» *Acta Neuropathologica*, 2021.
- [37 «NCBI - Gene,» 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23166>.
- [38 «NCBI - Gene,» 7 4 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/718>.
- [39 M. D. S. J. J. T. G. M. T. A. C. K. M. M. D. K. D. J. Z. J. O. B. A. C. D. S. R. C. G. E. C. A. P. C. K. Marjan Gharagozloo, «Complement component 3 from astrocytes mediates retinal ganglion cell loss during neuroinflammation,» *Acta Neuropathologica*, 2022.
- [40 B. D. V. D. G. A. G. R. E. S. S. K. S. M. A. H. Y. W. T.-M. W. M. H. K. H. B. M. S. H. N. O. F. Tiffany Wu, «Complement C3 Is Activated in Human AD Brain and Is Required for Neurodegeneration in Mouse Models of Amyloidosis and Tauopathy,» *Cell Reports*, 2019.
- [41 B. P. Morgan, «Complement in the pathogenesis of Alzheimer's disease,» *Seminars in Immunopathology*, 2017.
- [42 «NCBI - Gene,» 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79651>.

- [43 «NCBI - Gene,» 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available:
] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3315>.
- [44 E. A. a. V. T. Leen Vendredy, «Small heat shock proteins in neurodegenerative
] diseases,» *Cell Stress and Chaperones*, Apri 2020.
- [45 «NCBI - Gene,» 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available:
] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1116>.
- [46 M. L. R. O. B. A. G. A. E. J. A. E. C. G. L. a. Y.-W. A. H. Kevin Connolly, «Potential Role of
] Chitinase-3-like Protein 1 (CHI3L1/YKL-40) in Neurodegeneration and Alzheimer's
Disease,» *Alzheimer's & Dementia: The journal of the Alzheimer's Association*, 2023.
- [47 D. S. S. S. P. P. a. A. B. T. Martin N. Ivanov, «Distribution, Function, and Expression of
] the Apelinergic System in the Healthy and Diseased Mammalian Brain,» *Genes*, 2022.
- [48 M. F. Y. J. W. J. P. L. a. S. Z. Teng Wan, «Research Progress on Mechanism of
] Neuroprotective Roles of Apelin-13 in Prevention and Treatment of Alzheimer's
Disease,» *NEurochemical Research*, 2022.
- [49 «NCBI -Gene,» 2024. [Ηλεκτρονικό]. Available:
] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1392>.