



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ
ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ**

**Ανάλυση της έκφρασης των miRNAs και των αντίστοιχων στόχων
τους στο Alzheimer.**

Διολέττα Ελπίδα

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Υπεύθυνος

Χατζηγεωργίου Άρτεμις

Βαθμίδα Α

Λαμία, 2023-2024

Περίληψη

Η παρούσα εργασία υπάγεται στο διεπιστημονικό πεδίο της Βιοπληροφορικής. Σκοπός της εργασίας είναι η ανάλυση της έκφρασης των miRNAs και των αντίστοιχων στόχων τους στο Αλτσχάιμερ, αλλά και η κατανόηση των βιολογικών δεδομένων και μηχανισμών της νόσου. Αυτό επιτυγχάνεται με την εύρεση και ανάλυση υψηλής διεκπεραιωτικής ικανότητας διαθέσιμων δεδομένων από μεγάλες μελέτες και βάσεις για τον προσδιορισμό της διαφοροποιημένης έκφρασης των miRNAs στο Alzheimer, όπως επίσης και με την εύρεση μορίων που αυτά επηρεάζουν.

Η εργασία, λοιπόν, επικεντρώνεται στις μοριακές αλληλουχίες και μηχανισμούς του εγκεφάλου τόσο σε φυσιολογική όσο και σε ΝΑ κατάσταση. Υπάρχουν πολλές αναλύσεις στις σύγχρονες έρευνες που υποστηρίζουν υποθέσεις μοριακών μηχανισμών του εγκεφάλου που οδηγούν στη νόσο. Ωστόσο, αυτές οι συσχετίσεις εξακολουθούν να απαιτούν επικύρωση σε διαχρονικές μελέτες που χρησιμοποιούν μεγαλύτερα μεγέθη δειγμάτων. Στη προσπάθεια να εξαχθούν συμπεράσματα για τη νόσο του Αλτσχάιμερ, θα αναλυθούν διαθέσιμα δεδομένα με διαφορετικά εργαλεία και μεθόδους.

Τα επίπεδα στα οποία πραγματοποιείται η αλληλούχιση και η σύγκριση των μορίων είναι δύο: RNA και microRNA. Έτσι, λοιπόν, γίνεται εφικτή και η ανάλυση της συσχέτισης των παραγόμενων αποτελεσμάτων.

Τόσο οι μέθοδοι, όσο και εργαλεία λογισμικού που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της εργασίας εμπεριέχουν μεθόδους στατιστικής, τα οποία έχουν εφαρμογή στον τομέα της μοριακής βιολογίας και της υπολογιστικής επιστήμης. Τα βιολογικά δεδομένα επεξεργάστηκαν με τη χρήση διαφόρων αλγορίθμων, έτσι ώστε να παραχθούν συμπεράσματα με τον πιο αποδοτικό τρόπο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	2
Εισαγωγή	4
Νόσος Αλτσχάιμερ	4
microRNAs και στόχοι τους	5
microRNAs στη ΝΑ	5
Απορρυθμισμένοι μοριακοί μηχανισμοί στη ΝΑ	6
Υλικά και μέθοδοι	7
Ανάλυση των microRNAs	7
Ανάλυση των mRNAs	9
Ανάλυση μονοπατιών	11
Βάσεις Δεδομένων	12
Στατιστικές μεθοδολογίες	12
Αποτελέσματα	13
Ανάλυση των microRNAs	13
Ανάλυση των mRNAs	20
Ανάλυση μονοπατιών	29
Συμπεράσματα	40
Αναφορές	41

Εισαγωγή

Νόσος Αλτσχάιμερ

Η νόσος Αλτσχάιμερ είναι μια σταδιακή και προοδευτική νευροεκφυλιστική νόσος που προκαλείται από το θάνατο νευρωνικών κυττάρων. Συνήθως ξεκινά από τον ενδορινικό φλοιό στον ιππόκαμπο. Αρκετοί παράγοντες έχουν συσχετιστεί με τη νόσο του Αλτσχάιμερ. Η αύξηση της ηλικίας είναι ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για τη νόσο. Τραυματισμός στο κεφάλι, κατάθλιψη, καρδιαγγειακή και εγκεφαλοαγγειακή νόσος, υψηλότερη γονική ηλικία, κάπνισμα, οικογενειακό ιστορικό άνοιας, αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης και παρουσία αλληλόμορφου ApoE ε (ApoE) είναι γνωστό ότι αυξάνουν τον κίνδυνο για τη νόσο του Αλτσχάιμερ. Η έναρξη της πριν από την ηλικία των 65 ετών (πρώιμη έναρξη) είναι ασυνήθιστη και παρατηρείται σε λιγότερο από το 10% των ασθενών. Ωστόσο, η πρώιμη έναρξη των συμπτωμάτων που εντοπίστηκε σε μεμονωμένες οικογένειες και γεωγραφικές περιοχές επέτρεψε τον εντοπισμό κρίσιμων γενετικών μεταλλάξεων σε τρία βασικά γονίδια που επιταχύνουν ή επιβραδύνουν την πορεία της νόσου της AD. Η νόσος είναι μη θεραπεύσιμη και θανατηφόρα αποτελώντας το μεγαλύτερο ποσοστό περιπτώσεων άνοιας. Αυτή η νευροεκφυλιστική διαταραχή επηρεάζει περίπου 50 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως και ο αριθμός αυτός αναμένεται να τριπλασιαστεί μέχρι το 2050, λόγω της γήρανσης του πληθυσμού. Παρόλη την αυξανόμενη ανάγκη για την αντιμετώπιση της νόσου, δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία ή κάποιος τρόπος να αποτραπεί η εκδήλωσή της. Αν και πολλά εγκεκριμένα φάρμακα είναι διαθέσιμα στην αγορά, η χρήση τους μειώνει μόνο τα συμπτώματα της νόσου, αλλά αποτυγχάνει να θεραπεύσει την ίδια τη νόσο.

Τα κύρια κλινικά συμπτώματα της NA περιλαμβάνουν προοδευτική μείωση της μνήμης και δυσκολίες στην εκτέλεση των καθημερινών δραστηριοτήτων. Τα πρώιμα συμπτώματα της έναρξης της AD περιλαμβάνουν αλλαγές στη σκέψη ή αλλαγές στη συμπεριφορά, εξασθένηση της μνήμης σε σχέση με νέες πληροφορίες και δυσκολίες στην ομιλία. Επιπλέον, το 20-30% των ασθενών που φέρουν τη νόσο σε αρχικά στάδια εμφανίζουν σημαντικώς καταθλιπτικά συμπτώματα και αλλαγές στη διάθεση. Οι ασθενείς σε προχωρημένα στάδια της NA υποφέρουν από σοβαρή απώλεια μνήμης, παραισθήσεις, αποπροσανατολισμό και έλλειψη αυτάρκειας, όπου τα άτομα τελικά πεθαίνουν λόγω αναπνευστικού συνδρόμου, μόλυνσης ή λόγω αφαγίας. Τα κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά της NA περιλαμβάνουν τις πλάκες Αβ, τα νευροϊνιδικά μπερδέματα (NFTs), τη γλοίωση και την απώλεια νευρώνων, που συνοδεύονται από εγκεφαλοαγγειακή αμυλοείδωση, φλεγμονή και σημαντικές συναπτικές αλλαγές. [1]

Το Αλτσχάιμερ χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες ανωμαλίες που εμφανίζονται σε συστηματικά, ιστολογικά, μακρομοριακά και βιοχημικά επίπεδα. Εκτός από τα καλώς αναλυμένα μέχρι σήμερα νευροϊνιδικά μπερδέματα, δυστροφικούς νευρίτες και αμυλοειδή Αβ, η παθολογία του NA περιλαμβάνει σημαντική νευρωνική απώλεια, φλεγμονή, εκτεταμένη βλάβη του DNA, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, μειωμένο ενεργειακό μεταβολισμό και χρόνια οξειδωτική στρες. Αυτά τα γνωρίσματα είναι χαρακτηριστικά της νόσου και σε πολλές περιπτώσεις κάποια από αυτά μπορούν να εντοπιστούν δεκαετίες πριν την εκδήλωση της.

Οι επαναλαμβανόμενες αποτυχίες που αποσκοπούσαν στην εύρεση μιας αποτελεσματικής θεραπείας κατά του Αβ42 (αμυλοειδούς) ή του Ταυ, οδήγησε στην υπόθεση ότι οι υπερφωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες Ταυ και οι πρωτεΐνες Αβ είναι χαρακτηριστικά γνωρίσματα και όχι οι τελικές αιτίες της νόσου. Κατά συνέπεια, το σύγχρονο επιστημονικό έργο της αιτιολογίας και της παθογένειας της νόσου πρέπει να φτάσει πέρα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα και να αναζητήσει εναλλακτικές στρατηγικές και τομείς έρευνας. [2]

microRNAs και στόχοι τους

Η πιο καλώς αναλυμένη κατηγορία μικρών μη-κωδικών RNA (ncRNA) είναι τα miRNA. Τα microRNAs (miRNAs) είναι ενδογενή μονόκλιωνα μόρια μήκους 20-25 νουκλεοτιδίων που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση. Αυτά τα μόρια έχουν σημαντικό ρόλο στον ευρύτερο μηχανισμό ρύθμισης της έκφρασης, χωρίς τα ίδια να παράγουν πρωτεΐνες. Έχει αποδειχθεί ότι ένα μεμονωμένο miRNA είναι σε θέση να ελέγχει την έκφραση περισσότερων του ενός mRNA-στόχων και ότι κάθε mRNA μπορεί να ρυθμίζεται από πολλαπλά miRNA. Η δημιουργία των μορίων αυτών από το κύτταρο προϋποθέτει την εκτέλεση της μεταγραφής, η οποία είναι δυνατή λόγω της ύπαρξης ενός αντίστοιχου ενεργού γονιδίου. Ωστόσο, για την σωστή λειτουργία των πολύπλοκων διακυτταρικών μηχανισμών θα πρέπει όλα τα γονίδια που σχετίζονται με αυτόν να είναι ενεργά, αλλά και οι μηχανισμοί που τα ρυθμίζουν να εκτελούν σωστά τις λειτουργίες τους. Η συμπληρωματικότητα των miRNAs με ειδικές θέσεις της 3' αμετάφραστης περιοχής συγκεκριμένων γονιδίων σε συνδυασμό με άλλους μοριακούς παράγοντες καθορίζουν τον βαθμό έκφρασης των γονιδίων αυτών, με κύρια λειτουργία την αρνητική ρυθμιστική δράση. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί πως αυξάνονται οι έρευνες που υποστηρίζουν πως τα miRNAs έχουν και άλλες ειδικές λειτουργίες. Είναι γνωστό, λοιπόν, πως τα μόρια αυτά έχουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των βιολογικών μονοπατιών, και η εσφαλμένη ρύθμιση έχει σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία. Η κατανόηση του ευρύτερου μηχανισμού των miRNAs είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση των μοριακών ανισορροπιών που οδηγούν σε νόσους όπως το Αλτσχάιμερ.

microRNAs στη ΝΑ

Παρόλο που ο διαχωρισμός των αιτιών και των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων της νόσου αποτελεί μέχρι και σήμερα πρόκληση, είναι φανερό πως τα miRNAs έχουν καθοριστικό ρόλο σε όλα τα στάδια της παθοβιολογίας της ΝΑ. Η συμμετοχή των μορίων έχει περιγραφεί σε διαφορετικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην νόσο, μεταξύ των οποίων οι πιο καλώς αναλυμένοι είναι ο μεταβολισμός του Αβ αμυλοειδούς και η μη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης Tau. Οι μοριακές δυσλειτουργίες που έχουν συσχετιστεί με τη νόσο φαίνεται να εκτείνονται σε ένα μεγάλο εύρος μηχανισμών που μπορούν να χαρακτηριστούν ως προς την έκταση σε κυτταρικό, διακυτταρικό και βιοενεργητικό επίπεδο. Αυτό αυξάνει τη δυσκολία ερευνών της ΝΑ καθώς η εστίαση σε μεμονωμένες απορρυθμισμένες διαδικασίες δεν μπορεί να αιτιολογήσει την παθογένεια της. Αυξανόμενα δεδομένα σύγχρονων ερευνών υποστηρίζουν πως τα μικρά αυτά μόρια συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως η συναπτική πλαστικότητα, η νευρωνική διαφοροποίηση και ανάπτυξη, και διαμεμβρανικές λειτουργίες. Επίσης, ένα μεγάλο μέρος των mRNAs σε συνδυασμό με miRNAs έχουν τη δυνατότητα να ρυθμίζουν το μεγαλύτερο μέρος των βιολογικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένων της απόπτωσης, της νευρογένεσης, της φλεγμονής και της παραγωγής οξειδωτικού στρες. Μπορεί τα παραπάνω να αποτελούν υπό μελέτη χαρακτηριστικά της νόσου, αλλά αποτελεί γεγονός πως τα miRNAs παίρνουν μέρος σε μηχανισμούς που φαίνεται να δυσλειτουργούν και να καταρρέουν με ταχύ ρυθμό κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου.

Απορρυθμισμένοι μοριακοί μηχανισμοί στη ΝΑ

Έως σήμερα, έχουν περιγραφεί δυσλειτουργίες σε πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς που σχετίζονται με τη ΝΑ. Παρόλο που υπάρχουν πολλές έρευνες που προσπαθούν να ερμηνεύσουν την παθολογία της ΝΑ καμία δεν έχει αποδώσει κάποια επικυρωμένη υπόθεση των αιτιών, δηλαδή των συνολικών απορρυθμίσεων που οδηγούν τελικά σε αυτή. Αυτό φυσικά οφείλεται στη πολυπλοκότητα των μηχανισμών του εγκεφάλου, αλλά και στο γεγονός πως μόνο ένα μικρό μέρος των μηχανισμών αυτών είναι γνωστό μέχρι σήμερα. Ένα χαρακτηριστικό των υπό μελέτη υποθέσεων είναι η έκταση, κάποιες περιορίζονται σε επίπεδο κυττάρων ενώ άλλες σε επίπεδο ιστών του εγκεφάλου. Αξίζει σε αυτό το σημείο να αναφερθεί πως η έκταση της παθολογίας της ΝΑ δεν περιορίζεται μόνο σε επίπεδο εγκεφάλου, αλλά κάποιες υποθέσεις συνδέουν και άλλους ιστούς και συστήματα του οργανισμού.

Τα παθολογικά χαρακτηριστικά της ΝΑ στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) είναι: (i) η εξωκυττάρια συσσώρευση ολιγομερών Αβ που προέρχονται από APP και άλλων υλικών σε πυκνές δομές. (ii) την ενδονευρική υπερφωσφορλίωση της πρωτεΐνης tau που δεσμεύει μικροσωληνίσκους, η οποία επάγει τη συσσώρευση της σε νευροϊνιδιακά μπερδέματα (NFTs), και (iii) χρόνια φλεγμονή. Ο συνδυασμός αυτών των πολύπλοκων και αλληλεπικαλυπτόμενων παθολογιών προκαλεί συναπτική απώλεια και νευρωνικό θάνατο, ο οποίος επιδεινώνει περαιτέρω κάθε παθολογία, σχηματίζοντας έτσι έναν χρόνιο βρόχο ανάδρασης που δεν μπορεί να σταματήσει.

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν αναπτυχθεί αρκετές θεωρίες για να εξηγήσουν την αιτιολογία της ΝΑ, οι οποίες μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες. Πρώτον, ορισμένες θεωρίες εξηγούν πιθανές αιτίες της ΝΑ, όπως η υπόθεση της χολινεργικής, η υπόθεση της φλεγμονής, η υπόθεση του λεμφικού συστήματος, η υπόθεση των μεταλλικών ιόντων και η υπόθεση της αγγειακής δυσλειτουργίας. Δεύτερον, ορισμένες θεωρίες επικεντρώνονται περισσότερο στα παθολογικά συμβάντα που λαμβάνουν χώρα μετά την έναρξη της AD και περιλαμβάνουν την υπόθεση του αμυλοειδούς, την υπόθεση της ομοιόστασης του ασβεστίου, την υπόθεση της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων και την υπόθεση της διάδοσης tau. [3]

Είναι φανερό λοιπόν, πως η παθογένεια της ΝΑ παρουσιάζει μια εκτεταμένη πολυπλοκότητα. Λόγω αυτής, οι σύγχρονες έρευνες προσπαθούν να αποδώσουν ερμηνεία στους επιμέρους μηχανισμούς. Τα επίπεδα μελέτης των μηχανισμών αυτών αποτελούν ένα ανοικτό ερευνητικό πεδίο και αποσκοπούν στην κατανόηση της απορρυθμισμένης λειτουργίας σε κατάσταση ΝΑ.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η διαχείριση των διαθέσιμων δεδομένων από υγιή εγκεφαλικό ιστό και από εγκεφαλικό ιστό ατόμων που φέρουν τη ΝΑ, με εργαλεία ανάλυσης και η απόδοση ερμηνείας για τα παραγόμενα βιολογικά αποτελέσματα. Ειδικότερα, οι διαφοροποιήσεις των μορίων σε επίπεδο miRNAs, η πρόβλεψη των στόχων και των μονοπατιών τους σε σύγκριση με άλλες έρευνες και βάσεις δεδομένων ενδεχομένως να συμβάλουν περαιτέρω στην αποσαφήνιση της παθογένειας της ΝΑ.

Υλικά και μέθοδοι

Ανάλυση των microRNAs

Πρώτο και βασικότερο βήμα για την ανάλυση των microRNAs είναι η εύρεση των δεδομένων από διαθέσιμα αποθετήρια (NCBI - GEO / National Center for Biotechnology Information - Gene Expression Omnibus). Το σύνολο δεδομένων με κωδικό αναφοράς GSE48552 [4], αναλύθηκε με χρήση του αυτοματοποιημένου υπολογιστικού εργαλείου DIANA-microRNA-Analysis-Pipeline (DIANA-mAP). Μία σειρά διαδικασιών εκτελεί αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS data analysis) επιτρέποντας έτσι την εξαγωγή αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης και διαφορικής έκφρασης από ακατέργαστα δεδομένα. Τα δεδομένα εισόδου προέκυψαν από απομόνωση του συνολικού RNA από ιστό μετωπιαίου φλοιού από 6 δείγματα που φέρουν την νόσο, και από 6 υγιή (AD=6, NC=6). [5]

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα δεδομένα εισόδου που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των μικρών RNA. Τα δείγματα ανακτήθηκαν από ιστό προμετωπιαίου εγκεφαλικού φλοιού. NC (normal controls) θεωρήθηκαν αυτά τα οποία δεν φέρουν τη νόσο (healthy/early stage), ενώ AD αυτά που είναι σε προχωρημένο στάδιο της νόσου (late stage).

Samples	Condition	Age	Sex
SRR1103937	NC	80	male
SRR1103938	NC	78	male
SRR1103939	NC	52	female
SRR1103940	NC	74	female
SRR1103941	NC	83	male
SRR1103942	NC	78	female
SRR1103943	AD	79	male
SRR1103944	AD	80	female
SRR1103945	AD	67	male
SRR1103946	AD	67	female
SRR1103947	AD	68	female
SRR1103948	AD	72	female

Πίνακας 1

Δεύτερο βήμα της ανάλυσης αποτελεί ο ποιοτικός έλεγχος. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως τα σύνολα δεδομένων που ήταν διαθέσιμα για τη παρούσα ανάλυση ήταν λίγα, και αρκετά από αυτά απορρίφθηκαν σε αυτό το στάδιο καθώς κρίθηκαν μη αξιόπιστα. Επόμενο βήμα είναι η ανίχνευση και η αφαίρεση του προσαρμογέα από τα δεδομένα. Ως προσαρμογέας αναφέρονται οι αλληλουχίες οι οποίες δεν υπάρχουν φυσιολογικά στα άκρα των miRNAs, αλλά είναι απαραίτητες για την απομόνωση τους στις εργαστηριακές διαδικασίες. Στη συνέχεια παίρνει μέρος μία διαδικασία που αφαιρεί κατακερματισμένα τμήματα της ακολουθίας του προσαρμογέα. Χρησιμοποιούνται όλες οι υποαλληλουχίες του του προσαρμογέα ως αναφορά για τον εντοπισμό, με τελικό σκοπό τον «καθαρισμό» των εναπομεινάντων υποτμημάτων από τα δεδομένα. Με τη χρήση του γονιδιώματος αναφοράς πραγματοποιείται η ευθυγράμμιση. Οι πλέον «καθαρές» αναγνώσεις των αλληλουχιών αρχικά αντιστοιχίζονται για σκοπούς επαλήθευσης, και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται εργαλεία χαρτογράφησης για στοίχιση. Τέλος, πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση των δεδομένων. Με τη χρήση των προηγούμενων δεδομένων από τη διαδικασία της ευθυγράμμισης, τα δεδομένα χαρτογραφούνται σε γνωστά ώριμα και πρόδρομα miRNAs, με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων miRBase. Έτσι, τα δεδομένα μας μετατρέπονται σε ακατέργαστες κανονικοποιημένες αναγνώσεις. Αφού ολοκληρωθούν τα παραπάνω βήματα ανάλυσης, πραγματοποιείται χρήση του λογισμικού DESeq με σκοπό τον εντοπισμό των διαφορετικά εκφρασμένων μορίων. [6]

Ανάλυση των mRNAs

Το σύνολο δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των mRNAs λήφθηκε από την έρευνα με κωδικό αναφοράς GSE174367. [4]

Δεδομένου πως στην ανάλυση των μικρών RNA χρησιμοποιήθηκαν 12 δείγματα (6 NA & 6 Control), θεωρήθηκε αρχικά λογικό να επιλεχθούν αναλογικά 24 δείγματα (12 NA & 12 Control) για την RNA ανάλυση (Πίνακας 2). Καθώς η επιλογή αυτών έγινε από ένα μεγαλύτερο σύνολο δεδομένων, τέθηκαν ορισμένα κριτήρια, έτσι ώστε να τα τελικά δείγματα να έχουν τη μεγαλύτερη αντιστοιχία βάσει ηλικίας και φύλου. [7]

Samples	Condition	Age	Sex
SRR14514163	NC	79	male
SRR14514164	NC	74	female
SRR14514184	AD	79	male
SRR14514205	AD	83	female
SRR14514246	AD	79	female
SRR14514276	AD	82	female
SRR14514278	AD	82	female
SRR14514281	AD	78	male
SRR14514284	AD	66	male
SRR14514285	AD	58	male
SRR14514288	AD	79	female
SRR14514292	AD	76	female
SRR14514299	AD	77	female
SRR14514312	NC	82	male
SRR14514313	NC	83	male
SRR14514319	NC	82	male
SRR14514324	NC	79	male
SRR14514331	AD	82	female
SRR14514333	NC	78	female
SRR14514334	NC	79	male
SRR14514335	NC	73	female

SRR14514337	NC	64	female
SRR14514342	NC	79	female
SRR14514350	NC	74	female

Πίνακας 2

Το εργαλείο που χρησιμοποιήθηκε για τη παρούσα ανάλυση είναι το Diana-Rseq. Επίσης, η χρήση των DESeq και EdgeR βοήθησαν στην πραγματοποίηση της ανάλυσης διαφοροποιημένης έκφρασης.

Η ανάλυση διαφοροποιημένης έκφρασης εκτελείται βάσει συγκεκριμένης μεθοδολογίας με τα εξής στάδια: i). εύρεση αξιόπιστων δεδομένων και προετοιμασία βιβλιοθηκών, ii). μέτρηση των αναγνώσεων αλληλούχισης, iii). χαρτογράφηση και ποσοτικοποίηση δεδομένων, iv). χρήση του πακέτου R για πραγματοποίηση της ανάλυσης διαφοροποιημένης έκφρασης και άλλων λειτουργιών. Πριν την εκτέλεση διαφορετικής έκφρασης πραγματοποιείται έλεγχος ποιότητας των δεδομένων με χρήση των μεθόδων κανονικοποίησης και ομαδοποίησης. Η κανονικοποίηση πραγματοποιείται σε ακατέργαστα δεδομένα και επιτρέπει την ακριβή σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης των δειγμάτων με τη βοήθεια παραγόντων όπως ο βαθμός αλληλούχισης, το μήκος του γονιδίου και η σύνθεση του RNA. Η κανονικοποίηση δεν είναι μόνο απαραίτητη για την ανάλυση, αλλά και για την οπτικοποίηση των δεδομένων. Περισσότερες πληροφορίες για τον έλεγχο ποιότητας των δεδομένων και των αντίστοιχων αναλύσεων θα αναφερθούν στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων.

Βέλτιστη προσέγγιση στην ανάλυση αποδείχθηκε η κατά ζεύγη ανάλυση (paired analysis). Τα δείγματα μειώθηκαν σε 8 (4 NA & 4 Control) καθώς διατηρήθηκαν μόνο τα δείγματα που μπορούσαν να αντιστοιχηθούν στο ζευγάρι τους με βέλτιστο τρόπο βάσει ηλικίας και φύλου. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα δεδομένα εισόδου που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των mRNA. Τα δείγματα ανακτήθηκαν από ιστό προμετωπιαίου εγκεφαλικού φλοιού. NC (normal controls) θεωρήθηκαν αυτά τα οποία δεν φέρουν τη νόσο (healthy/early stage), ενώ AD αυτά που είναι σε προχωρημένο στάδιο της νόσου (late stage).

Samples	Condition	Age	Sex
SRR14514292	AD	76	female
SRR14514350	NC	74	female
SRR14514281	AD	78	male
SRR14514334	NC	79	male
SRR14514184	AD	79	male
SRR14514163	NC	79	male
SRR14514288	AD	79	female
SRR14514342	NC	79	female

Πίνακας 3

Ανάλυση μονοπατιών

Έχοντας στη διάθεση μας τα διαφοροποιημένα γονίδια, ακολουθεί η ανάλυση μονοπατιών. Η ανάλυση μονοπατιών (Pathway Analysis), επίσης γνωστή ως ανάλυση εμπλουτισμού, γίνεται γρήγορα ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία της έρευνας Omics (συμπεριλαμβάνονται οι εξής κλάδοι της βιολογίας: γονιδιωματική, πρωτεϊνοματική, μεταβολική, μεταγονιδιωματική, φαινοτυπική και μεταγραφική). Ο κύριος σκοπός των εργαλείων αυτών είναι η ανάλυση δεδομένων που λαμβάνονται από τεχνολογίες υψηλής απόδοσης, ανιχνεύοντας σχετικές ομάδες συσχετιζόμενων γονιδίων που μεταβάλλονται σε δείγματα περιπτώσεων σε σύγκριση με ένα υγιές υποκείμενο-αναφορά. Με αυτόν τον τρόπο, οι μέθοδοι ανάλυσης μονοπατιών επιδιώκουν να ξεπεράσουν το πρόβλημα της ερμηνείας των μεγάλων συνόλων δεδομένων, αλλά και το πρόβλημα των απομονωμένων γονιδίων που αποσπώνται από το βιολογικό πλαίσιο, τα οποία είναι το κύριο αποτέλεσμα της βασικής ανάλυσης δεδομένων υψηλής απόδοσης, ως ανάλυση διαφορικής έκφρασης. Κατά τη διεξαγωγή της ανάλυσης μονοπατιών δηλαδή, ποσοτικοποιούμε τη συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας σε μια βιολογική οδό και μιας αλλαγής στον φαινότυπο, με στόχο να αποδοθεί τελικά μια συνολική ερμηνεία εντάσσοντας τα διαφοροποιημένα αποτελέσματα στα αντίστοιχα βιολογικά τους μονοπάτια.

Βάσεις Δεδομένων

Στο πλαίσιο του συγκεκριμένου ερευνητικού έργου, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες βάσεις δεδομένων για την εξαγωγή πληροφοριών και την ανάλυση των δεδομένων. Η βάση GEO (Gene Expression Omnibus) χρησιμοποιήθηκε για την ανάκτηση δεδομένων ανάλυσης της έκφρασης της νόσου. Η βάση δεδομένων miRBase [8] χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των microRNA που εντοπίστηκαν στα δείγματά μας. Η βάση miRPath χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των miRNA που συνδέονται με τα γονίδια των βιολογικών μονοπατιών.

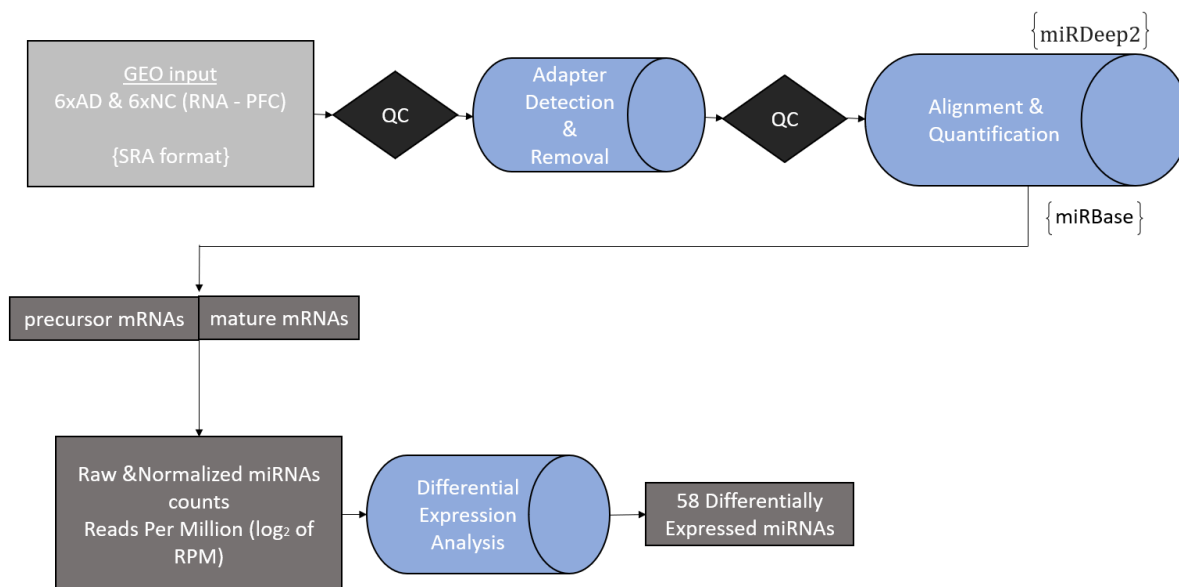
Στατιστικές μεθοδολογίες

Για την εκτέλεση του έργου αυτού χρησιμοποιήσαμε διάφορα στατιστικά εργαλεία. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούμε το Diana-Rseq για την ανάλυση της RNA-seq δεδομένων, το DIANA_mAP για τη λειτουργική ανάλυση των γονιδίων που εμπλέκονται στις βιολογικές διεργασίες που μελετάμε, καθώς και το edgeR και το DESeq για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Το Diana-Rseq επιτρέπει την εκτέλεση της προ-επεξεργασίας των RNA-seq δεδομένων, ενώ το DIANA_mAP επιτρέπει την ανάλυση των δεδομένων μας σε σχέση με τις βιολογικές διεργασίες και τις συναφείς λειτουργίες. Το edgeR και το DESeq είναι εργαλεία για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων και την εύρεση των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων, καθιστώντας εφικτή την κατανόηση των βιολογικών διεργασιών που σχετίζονται με την υπό μελέτη νόσο.

Αποτελέσματα

Ανάλυση των microRNAs

Έχοντας στη διάθεση μας αξιόπιστα δεδομένα, αλλά και με τη βοήθεια του DIANA-mAP [9] ολοκληρώθηκε η ανάλυση των microRNA. Στην *Εικόνα 1* απεικονίζεται η ροή των δεδομένων της ανάλυσης.



Εικόνα 1

Σε κομβικά σημεία της εκτέλεσης του εργαλείου ανάλυσης microRNA πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι ποιότητας, και με τη βοήθεια των αντίστοιχων γραφημάτων, οι επιμέρους εκτελέσεις των διαφορετικών σταδίων επί των δεδομένων μας κρίθηκαν αξιόπιστες.

Εφαρμόστηκαν ορισμένα φίλτρα για την εξαγωγή των στατιστικά σημαντικότερων αποτελεσμάτων (Πίνακας 4). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τις τιμές των p-value και τα False Discovery Rate (FDR), τέθηκαν κατώφλια τα οποία βασίστηκαν στο πλήθος και τη σημαντικότητα των δειγμάτων. Τα αποδεκτά microRNAs βρίσκονται εντός των ορισμένων τιμών p-value <0.05 και FDR <0.1. Οι στατιστικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν είναι αξιόπιστες και οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στα δείγματα είναι στατιστικά σημαντικές. Τα αποτελέσματα δείχνουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο συνόλων δειγμάτων (AD / NC). Από αυτά, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι μεταβλητές που εξετάστηκαν ενδέχεται να συνδέονται με τη ΝΑ.

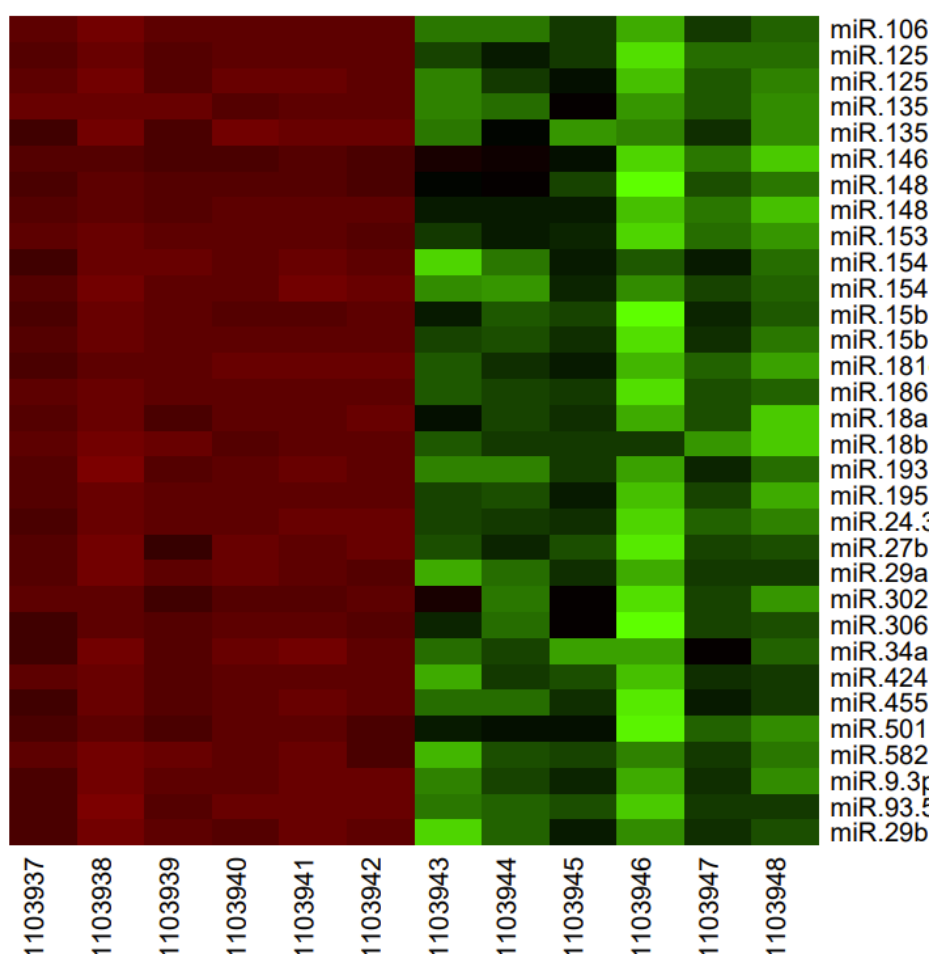
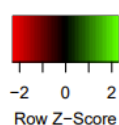
miRNA_name	log2FoldChange	pvalue	padj
hsa-miR-132-3p	-1.931867084	8.49E-18	3.14E-15
hsa-miR-424-5p	1.068382158	6.30E-15	1.17E-12
hsa-miR-153-3p	1.701220084	2.69E-12	3.32E-10
hsa-miR-212-3p	-1.718112584	2.24E-10	9.94E-09
hsa-miR-106b-5p	0.8236948044	5.41E-11	3.34E-09
hsa-miR-186-5p	0.9188981258	4.96E-11	3.24E-09
hsa-miR-29a-3p	0.6253506017	3.41E-08	7.57E-07
hsa-miR-18a-5p	1.565366442	9.09E-09	2.52E-07
hsa-miR-148b-3p	1.351129148	8.85E-09	2.52E-07
hsa-miR-15b-5p	0.9349101743	6.47E-09	1.94E-07
hsa-miR-132-5p	-1.855697928	6.37E-09	1.94E-07
hsa-miR-212-5p	-1.828161661	5.13E-09	1.73E-07
hsa-miR-125b-1-3p	0.9117328941	5.59E-07	8.50E-06
hsa-miR-195-5p	0.9333649171	1.12E-07	1.97E-06
hsa-miR-146b-3p	-0.8845769535	3.76E-06	4.53E-05
hsa-miR-128-1-5p	-0.9202460456	3.60E-06	4.40E-05
hsa-miR-24-3p	0.763709744	3.31E-06	4.09E-05
hsa-miR-138-1-3p	-0.664281829	2.57E-06	3.28E-05
hsa-miR-501-3p	1.377495442	1.05E-06	1.49E-05
hsa-miR-193b-3p	0.5289811302	9.89E-06	0.0001026591237
hsa-miR-154-5p	0.6068359779	2.42E-05	0.0002257156221
hsa-miR-9-3p	0.5698046267	2.44E-05	0.0002262529756
hsa-miR-125b-5p	0.5560804488	3.82E-05	0.0003318300984
hsa-miR-146a-5p	1.431686521	4.15E-05	0.0003542675839
hsa-miR-342-5p	-0.7106124151	4.62E-05	0.0003861451473
hsa-miR-3065-5p	0.9955047246	4.83E-05	0.0003976927658
hsa-miR-29b-1-5p	-1.125385395	4.91E-05	0.00040076843
hsa-miR-148a-3p	1.014716124	6.22E-05	0.0004862627456
hsa-miR-154-3p	0.9358002965	6.39E-05	0.0004965563394
hsa-miR-135a-5p	0.7762806672	0.000145600526	0.001036937079
hsa-miR-339-3p	-0.9396113463	0.0001693406193	0.001173205816
hsa-miR-93-5p	0.4020748141	0.0001841972859	0.00125547966
hsa-miR-107	-0.4419845216	0.0003120086598	0.001980809263
hsa-miR-138-5p	-1.15273763	0.000339826358	0.002109201585
hsa-miR-181c-3p	-0.3497721104	0.0005529799312	0.003150567711
hsa-miR-101-3p	-0.2410012074	0.0008653554799	0.004783134021
hsa-miR-302b-3p	2.559188181	0.001249374149	0.006578458199

hsa-miR-135a-2-3p	-0.8999290485	0.001327749187	0.006958157294
hsa-miR-582-5p	0.4990577453	0.001388294799	0.007137783986
hsa-miR-342-3p	-0.591662354	0.001607184763	0.00807955779
hsa-miR-15b-3p	0.8636610896	0.001872245254	0.00928600213
hsa-miR-18b-5p	1.235403757	0.001974151851	0.009704790736
hsa-miR-181a-5p	-0.5189855486	0.002031980778	0.009945068918
hsa-miR-137-5p	-1.042845982	0.002313575683	0.01107923528
hsa-miR-455-3p	0.5216850937	0.002406020469	0.01137484571
hsa-miR-181c-5p	-0.3905814894	0.002426623446	0.01142363834
hsa-miR-106b-3p	-0.3937360551	0.004830917712	0.02048530373
hsa-miR-29b-3p	0.3378334663	0.005238207285	0.02187837704
hsa-miR-193a-3p	-1.048574711	0.005543559554	0.02288154173
hsa-miR-424-3p	-0.6807736978	0.006504589327	0.02606572522
hsa-miR-181d-5p	0.49508555	0.006940172434	0.02753761277
hsa-miR-219a-2-3p	-0.659730288	0.007060845276	0.02778147697
hsa-miR-29b-2-5p	-0.4395763917	0.007833670262	0.0300110609
hsa-miR-27b-3p	0.4945343557	0.008062997104	0.0306780472
hsa-miR-181b-3p	-0.5597573629	0.00829667748	0.03135241048
hsa-miR-101-5p	-0.4282599342	0.009320732462	0.03463322329
hsa-miR-135b-5p	0.8358636557	0.01146332063	0.04134983514
hsa-miR-34a-3p	0.6640702532	0.01255341452	0.04484515604

Πίνακας 4

Στο πλαίσιο της μελέτης μας, εφαρμόζουμε την τεχνική των heatmaps για να οπτικοποιήσουμε τις διάφορες μετρήσεις που συλλέχθηκαν. Τα αποτελέσματα χωρίστηκαν ως προς την κατεύθυνση της έκφρασης σε δύο υποσύνολα (up-regulated & down-regulated) των αρχικών αποτελεσμάτων.

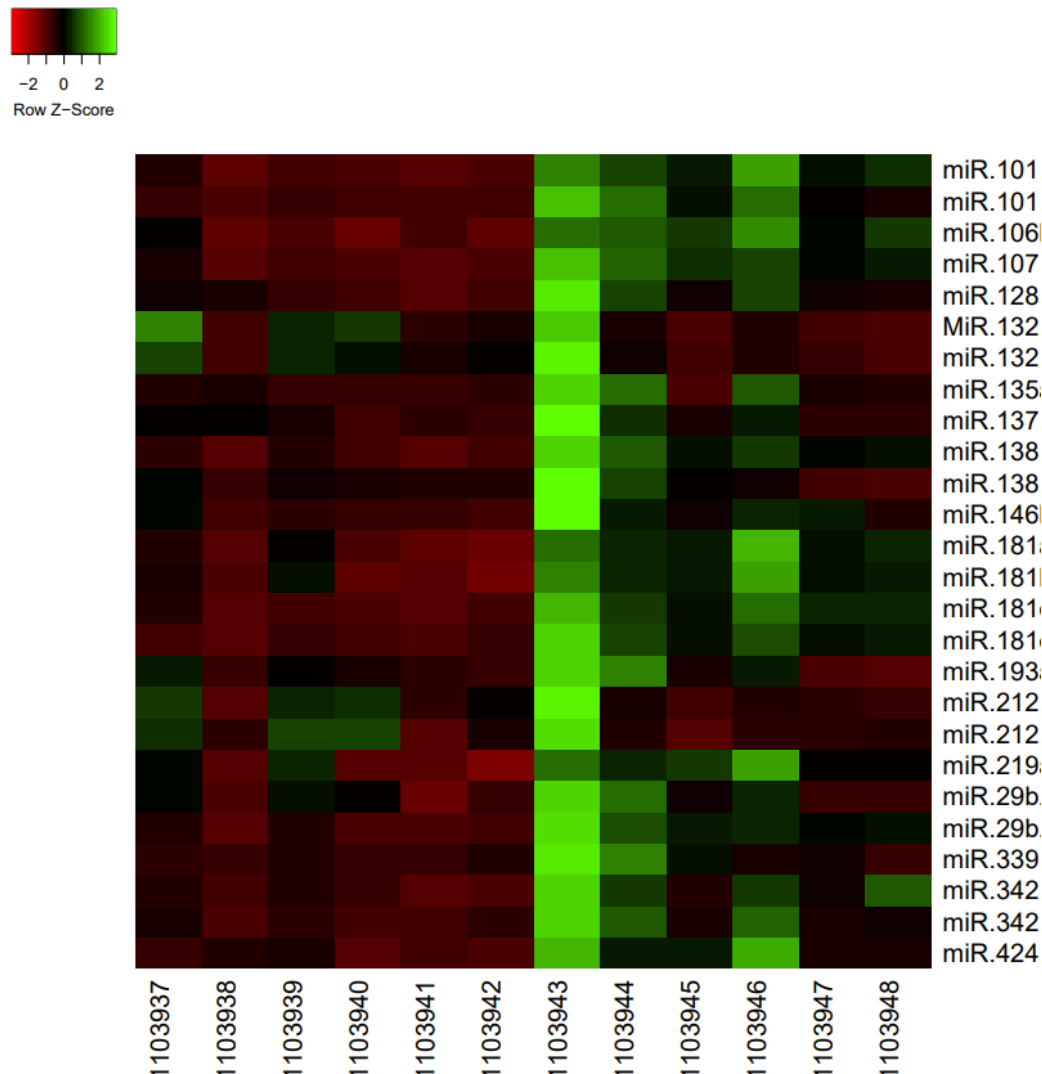
Η Εικόνα 2 παρουσιάζει ένα heatmap με το σύνολο δεδομένων των microRNAs που έχουν εντοπιστεί ως υπερ-εκφρασμένα (up-regulated), χρησιμοποιώντας το row z-score για την οπτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των μορίων.



Εικόνα 2

Παρατηρείται πως οι μετρήσεις που αντιστοιχούν στον μέσο όρο έκφρασης (κελιά μαύρου χρώματος) είναι λίγα. Αυτό συμβαίνει γιατί ανάμεσα στις δύο ομάδες υπάρχει μεγάλη απόκλιση έκφρασης με τα δείγματα AD να έχουν θετικές τιμές Z-score, ενώ τα δείγματα NC αρνητικές. Επομένως, η νόσος φαίνεται να έχει οδηγήσει σε υπερ-έκφραση των microRNAs στην περίπτωση των up-regulated για τα υπό μελέτη δείγματα.

Η Εικόνα 3 παρουσιάζει ένα heatmap με το σύνολο δεδομένων των microRNAs που έχει εντοπιστεί ως υπό-εκφρασμένα (down-regulated), χρησιμοποιώντας το row z-score για την οπτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των μορίων.



Εικόνα 3

Παρατηρούμε πως οι μετρήσεις που αντιστοιχούν στον μέσο όρο έκφρασης (κελιά μαύρου χρώματος) είναι αρκετές. Ωστόσο, παρατηρείται απόκλιση έκφρασης ανάμεσα στις δύο ομάδες με τα δείγματα AD να έχουν περισσότερες θετικές τιμές Z-score, ενώ τα δείγματα NC έχουν περισσότερες αρνητικές. Επομένως, η νόσος φαίνεται να έχει οδηγήσει σε υπερ-έκφραση των microRNAs και στην περίπτωση των down-regulated για τα υπό μελέτη δείγματα.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως ένα δείγμα φαίνεται να παρουσιάζει υπερ-έκφραση σε βαθμό τέτοιο έτσι ώστε να μην παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με αυτά της κατηγορίας του (AD). Αυτό μπορεί να προκύπτει ενδεχομένως είτε από την ποιότητα του δείγματος, είτε από την ίδια τη νόσο. Το δείγμα αυτό έχει επίσης ορίσει την μέγιστη τιμή Z-score των περισσότερων γραμμών, καθιστώντας έτσι τις υπόλοιπες αποκλίσεις λιγότερο εμφανείς στη χρωματική αναπαράσταση. [10]

Τα αποτελέσματα μας, αν και διεξήχθησαν με διαφορετικές μεθόδους και εργαλεία, είναι αντίστοιχα με αυτά της αρχικής έρευνας με τίτλο «Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease». Αναλύθηκαν κοινά δεδομένα εισόδου με την έρευνα-αναφορά, και οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στην έκφραση έχουν κοινή κατεύθυνση. Πιο αναλυτικά, τα hsa-miR-132-3p, miR-132-5p, hsa-miR-212-3p, hsa-miR-212-5p, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-339-3p, hsa-miR-146b-3p φαίνεται να έχουν σημαντικά μειωμένη έκφραση, ενώ τα hsa-miR-153-3p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-186-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-424-5p, hsa-miR-148b-3p είναι υπέρ-εκφρασμένα.

Ορισμένα από τα miRNAs που εντοπίστηκαν, όπως τα hsa-miR-132-5p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-212-5p, hsa-miR-212-3p και hsa-miR-181c-5p έχουν συσχετιστεί με τη νόσο του Alzheimer σε αντίστοιχες μελέτες. Αυτά τα miRNAs φαίνεται να επηρεάζουν διάφορες μοριακές διαδικασίες που συνδέονται με την παθογένεια της νόσου.

Σύγχρονες μελέτες συσχετίζουν την ραγδαία γνωστική εξασθένηση με την υποέκφραση του hsa-miR-132-3p, αλλά και με την υπερέκφραση του hsa-miR-29a-3p στον προμετωπιαίο φλοιό. Η γνωστική εξασθένηση κατά την γήρανση του εγκεφάλου διαφέρει σημαντικά στους νοσούντες με Αλτσχάιμερ σε σχέση με τους υγιείς. Είναι ενδιαφέρον ότι το miR-132-3p συσχετίστηκε επίσης σημαντικά με το β-αμυλοειδές και τα μπερδέματα, στην ανάλυση συσχέτισης miRNA. Μαζί, τα miR-132-3p και miR-29a-3p καταγράφουν ένα εντυπωσιακό ποσοστό, 19,8%, της διακύμανσης της γνωστικής τροχιάς-εξασθένησης. Επιπλέον, τόσο το miR-132-3p όσο και το miR-29a-3p σχετίζονται με τη γνωστική εξασθένηση ανεξάρτητα από οκτώ κοινές εγκεφαλικές παθολογίες που εξετάστηκαν και εξηγούν το 13,7% της διακύμανσης στη γνωστική τροχιά αφού ληφθούν υπόψη αυτές οι παθολογίες. Η παρουσία πολλαπλών παθολογιών του εγκεφάλου είναι συχνή σε προχωρημένες ηλικίες και η γνωστική εξασθένηση πιθανότατα αποτελεί το συνολικό αποτέλεσμα γνωστών και άγνωστων παθολογιών, συμπεριλαμβανομένων των δυνητικά προστατευτικών βιολογικών διεργασιών. [11]

Αντίστοιχη μελέτη που εξετάζει διαφορετικούς εγκεφαλικούς ιστούς εξήγαγε πως τα δύο miRNAs (hsa-miR-212-5p και hsa-miR-132-5p) είχαν σημαντική διαφορά στην έκφραση (μειωμένη έκφραση) μεταξύ AD & NC και τα hsa-miR-212-3p, hsa-miR-132-3p εκφράστηκαν επίσης διαφορετικά (μειωμένη έκφραση) στην έσω μετωπιαία έλικα. Στην έσω μετωπιαία έλικα, το hsa-miR-212-5p/-3p ρυθμίστηκε σημαντικά προς τα κάτω σε δείγματα AD σε σύγκριση με γνωστικά φυσιολογικούς ελέγχους. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε στην άνω ανώτερη μετωπιαία έλικα για το hsa-miR-212-5p. [12]

Τα hsa-miR-132-3p, hsa-miR-132-5p, hsa-miR-212-3p, hsa-miR-212-5p παρουσιάζουν υποέκφραση και σε άλλους ιστούς του εγκεφάλου όπως ο υπόκαμπος, η μέση εγκεφαλική έλικα και η μετωπιαία. [13]

Τα miR-132 και miR-212 εκφράζονται από έναν δισιστρονικό τόπο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 στον άνθρωπο. Και τα δύο miRNA έχουν παρόμοιες ώριμες αλληλουχίες και μοιράζονται την ίδια περιοχή σπόρου, αν και το miR-132 είναι το κύριο λειτουργικό είδος στον εγκέφαλο. Ενώ ο ρόλος του miR-132 (και του miR-212) στο κεντρικό νευρικό σύστημα δεν είναι πλήρως κατανοητός, προτείνεται ότι η λειτουργία του σχετίζεται με την ανάπτυξη νευριτών, τη συναπτική μετάδοση και πλαστικότητα, τη μάθηση, τη μνήμη, την απόπτωση, και τη νευροπροστασία. Είναι ενδιαφέρον ότι το σύμπλεγμα miR-132/212 συχνά ρυθμίζεται προς τα κάτω στην NA και σε άλλες ταυοπάθειες. [14]

Το miR-181c αποδείχθηκε ότι ρυθμίζεται προς τα κάτω στους εγκεφαλικούς ιστούς, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στο αίμα ασθενών με ΝΑ. Επιπλέον, η απώλεια αυτού του miRNA αυξάνει τα επίπεδα της παλμιτοϋλτρανσφεράσης σερίνης, του πρώτου ενζύμου περιορισμού έκφρασης στην de novo σύνθεση κεραμιδίου, το οποίο με τη σειρά του αυξάνει τα επίπεδα της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (Αβ). Ο ρόλος των άλλων μελών της οικογένειας miR-181 στην AD είναι πιο αμφιλεγόμενος, καθώς ανεξάρτητες αναφορές δείχνουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τη διαφορική έκφρασή τους σε ασθενείς.

Μία ακόμη παθογένεια που έχει συσχετιστεί με την ΝΑ είναι η δυσλειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Αρκετές μελέτες έχουν αναλύσει τη λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και τονίζουν ότι η διαρροή αυτού είναι ουσιαστικό μέρος της παθολογίας της AD και η αποκατάσταση της διαρροής αυτή ενδέχεται να βοηθήσει στην επιβράδυνση της γνωστικής εκφύλισης. [15]

Τα miRNAs μπορούν είτε να στοχεύσουν άμεσα μόρια ενδοθηλιακής σύνδεσης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB) είτε να ρυθμίσουν τη φλεγμονή, την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, την απόπτωση, τον κυτταροσκελετό ακτίνης και άλλες οδούς για να επηρεάσουν έμμεσα τις σφιχτές συνδέσεις στο BBB, οδηγώντας σε αλλαγή στην ακεραιότητα του BBB. Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του BBB είναι η ύπαρξη εξαιρετικά ισχυρών συνδέσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων του εγκεφάλου. Τα hsa-miR-107, hsa-miR-501-3p φαίνεται να έχουν αρνητική επίπτωση στην ακεραιότητα των ισχυρών αυτών συνδέσεων που συντελούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. [16]

Ανάλυση των mRNAs

Η πρώτη σειρά αποτελεσμάτων δεν έδειξε να υπάρχει διαφοροποίηση βάσει ηλικίας-φύλου. Προκειμένου να εξάγουμε έγκυρα αποτελέσματα που θα συμβάλλουν περαιτέρω στην ευρύτερη έρευνα του μηχανισμού NA, ακολουθήθηκε μία διαφορετική μεθοδολογία επιλογής των δειγμάτων και των παραγόντων που τα επηρεάζουν. Είναι απαραίτητο να αναφερθεί πως η όποια τυχόν διαφορά παρατηρηθεί στην έκφραση θα οφείλεται μόνο στο υπό μελέτη φαινόμενο, και όχι λόγω επιλογής των δειγμάτων και των παραγόντων που τα επηρεάζουν (ηλικία, φύλο). Ενσωματώθηκαν, λοιπόν, οι παράγοντες στο μοντέλο ανάλυσης, ώστε να εκτιμηθεί η διασπορά με μεγαλύτερη ακρίβεια. Η ίδια μέθοδος επιλογής δειγμάτων πραγματοποιήθηκε και στην ανάλυση διαφοροποιημένης έκφρασης, καθώς τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά. Αυτό μπορεί να προκύπτει διότι μεταξύ των δύο βιολογικών φύλων ή των επιλεγμένων ηλικιών εμφανίζεται τέτοια διαφορά που καθιστά αδύνατη την εμφάνιση της επίδρασης της NA ανάμεσα στους υγιείς και τους νοσούντες.

Στη δεύτερη ανάλυση υπήρξαν ορισμένα αποτελέσματα, κυρίως από την EdgeR, χωρίς όμως αυτά να είναι ικανοποιητικά. Έγιναν, λοιπόν, οι εξής παρατηρήσεις: i). Ένα από τα επιλεγμένα δείγματα απείχε πολύ από την κατανομή των υπολοίπων, ii). Οι δυο υπό σύγκριση ομάδες δεν είχαν διακριτές διαφορές, δεν υπήρξε ικανοποιητική διαφοροποίηση, iii). Η κοινή διασπορά (common dispersion trend) παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές από τις αναμενόμενες.

Σχετικά με το παρεκκλίνον δείγμα είναι σημαντικό να αναφερθεί πως παρόλο που αποτελεί μεταθανάτιο ιστό προμετωπιαίου φλοιού του εγκεφάλου NA -όπως και τα υπόλοιπα της κατηγορίας του-, δεν είχε κανένα κοινό με αυτά. Απείχε πολύ από την κανονική κατανομή, γεγονός το οποίο το καθιστά αναξιόπιστο ως δεδομένο και οδήγησε τελικά στην απόρριψη του από την ανάλυση.

Πραγματοποιήθηκαν και αλλαγές στα αρχικά στάδια της μεθόδου ανάλυσης, δηλαδή στην επιλογή/συνδυασμό των i).δειγμάτων και ii).των παραγόντων που τα επηρεάζουν. Σκοπός των ανωτέρω αλλαγών είναι η εύρεση της βέλτιστης προσέγγισης ανάλυσης των δειγμάτων.

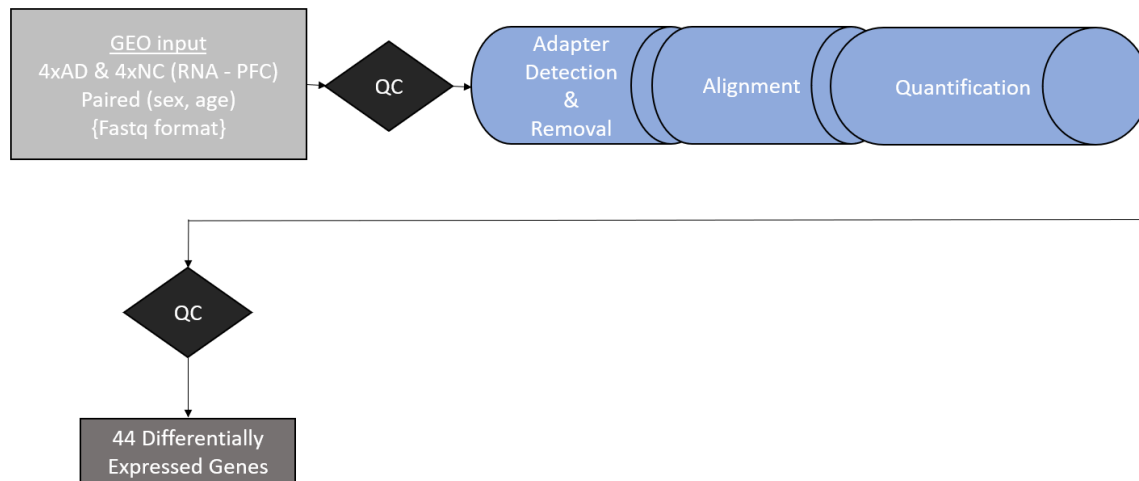
Καθοριστικό παράγοντα για την εκ νέου προσέγγιση ανάλυσης αποτέλεσε το effective size του προμετωπιαίου φλοιού. Το effective size ή αλλιώς, η ποσοτικοποίηση του σθένους της συσχέτισης των δύο υπό μελέτη ομάδων, σε κάποιους ιστούς -συμπεριλαμβανομένων των εγκεφαλικών- είναι μικρό. Αυτό σημαίνει πως (λαμβάνοντας υπόψη το πλήθος των δειγμάτων και των παρατηρήσεων) η διαφορά στην έκφραση φαίνεται αμυδρά. Σε μία μικρού μεγέθους ανάλυση, όπως αυτή, αναμένεται αυξημένη τιμή του ES (small-study size effect). Ωστόσο, παρατηρήθηκε πως δεν υπήρξε μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων και μικρό size effect. Αυτό μπορεί να έχει προκύψει λόγω της επιλογής των δειγμάτων, της κατεργασίας τους, ή λόγω της βιολογίας τους.

Ensemble Gene ID	GeneID	logFC	PValue	FDR
ENSG000001475715	CRH	4.032992506	6.27E-06	0.029419518
ENSG000000959327	SMIM24	1.668165386	0.000126125	0.084400922
ENSG0000013999816	RAB15	1.008182991	0.000190545	0.090798355
ENSG000001607166	CHRNA2	1.000462099	0.000166013	0.088879968
ENSG0000015409614	THY1	0.983090081	0.000232441	0.099098944
ENSG000002036683	CHML	0.918749488	0.00016338	0.088879968
ENSG0000014913117	SERPING1	-0.983057406	0.000134977	0.084400922
ENSG0000018411310	CLDN5	-1.165780241	7.22E-05	0.06538779
ENSG000001228625	SRGN	-1.168829267	0.000229212	0.099098944
ENSG0000002602516	VIM	-1.199485005	5.74E-05	0.056700351
ENSG0000001840815	WWTR1	-1.224762152	0.000124991	0.084400922
ENSG0000010532911	TGFB1	-1.267725119	0.000183176	0.090798355
ENSG0000013138620	GALNT15	-1.297255949	2.54E-05	0.043315017
ENSG0000016249317	PDPN	-1.353358585	7.32E-05	0.06538779
ENSG0000008207419	FYB1	-1.354899761	3.54E-05	0.044548048
ENSG0000010621110	HSPB1	-1.414198546	0.000186052	0.090798355
ENSG0000014067817	ITGAX	-1.442490582	0.000162275	0.088879968
ENSG0000016891814	INPP5D	-1.460398602	1.69E-05	0.040856093
ENSG0000012966713	RHBDF2	-1.462736215	3.56E-05	0.044548048
ENSG0000010662411	AEBP1	-1.46869208	4.98E-05	0.054901866
ENSG0000014208917	IFITM3	-1.507357043	8.76E-06	0.032881125
ENSG0000016025518	ITGB2	-1.514297806	0.000167136	0.088879968
ENSG0000012573017	C3	-1.520585017	0.000123895	0.084400922
ENSG0000002813719	TNFRSF1B	-1.567547168	2.96E-05	0.044548048
ENSG0000018581120	IKZF1	-1.582629277	0.000224032	0.099098944
ENSG0000001032710	STAB1	-1.622013654	5.57E-05	0.056700351
ENSG000002137198	CLIC1	-1.626904907	2.47E-05	0.043315017
ENSG0000008123720	PTPRC	-1.630990316	0.000118574	0.084400922

ENSG0000016322011	S100A9	-1.634309443	9.56E-05	0.077971078
ENSG0000011953518	CSF3R	-1.71599418	9.50E-05	0.077971078
ENSG000001977479	S100A10	-1.754353444	0.000105738	0.082647413
ENSG0000014322615	FCGR2A	-1.823007226	2.16E-05	0.043315017
ENSG0000015562915	PIK3AP1	-1.863050012	0.00019361	0.090798355
ENSG0000019724914	SERPINA1	-1.908983689	0.000130867	0.084400922
ENSG0000018520118	IFITM2	-1.923586095	3.48E-05	0.044548048
ENSG0000010226512	TIMP1	-1.957030352	1.12E-05	0.034903067
ENSG0000010133618	HCK	-1.985777594	0.000170568	0.088879968
ENSG0000013481712	APLNR	-2.065224532	2.63E-06	0.016418253
ENSG0000003894515	MSR1	-2.069177628	4.84E-05	0.054901866
ENSG0000016264513	GBP2	-2.105497892	0.000142079	0.085976135
ENSG000001296548	FOXJ1	-2.201944625	0.000215462	0.098581675
ENSG0000013304813	CHI3L1	-2.266949282	2.45E-06	0.016418253
ENSG0000012070817	TGFBI	-2.333047403	1.74E-05	0.040856093
ENSG000002753957	FCGBP	-2.550128394	2.94E-07	0.005511973

Πίνακας 5

Έχοντας στη διάθεση μας αξιόπιστα δεδομένα, αλλά και με τη βοήθεια του DIANA-RSeq [17] ολοκληρώθηκε η ανάλυση των RNA-Seq. Στην *Εικόνα 4* απεικονίζεται η ροή των δεδομένων της ανάλυσης.



Εικόνα 4

Τα αποτελέσματα σε επίπεδο RNA εξήχθησαν τελικά με χρήση του EdgeR, κρατώντας μόνο μία οκτάδα (4 ζεύγη NA & Control) από τα πιο κοντινά δείγματα βάσει ηλικίας και φύλου. Η ανάλυση κατά ζεύγη μας έδωσε 44 διαφοροποιημένα γονίδια για $FDR < 0.1$ (*Πίνακας 5*). Αυτό το κατώφλι θεωρήθηκε ανάλογο του αριθμού των δειγμάτων, καθώς η χρήση πιο αυστηρού FDR αντανάκλα αντίστοιχα σε μεγαλύτερο σύνολο δεδομένων, χωρίς να μας δίνει αρκετά αποτελέσματα.

Στη παρούσα ανάλυση, η διαφοροποιημένη έκφραση των mRNAs είναι αναμενόμενη καθώς και η έκφραση των microRNAs παρουσίασε εξίσου σημαντικές διαφοροποιήσεις στη προηγούμενη ανάλυση. Στα αποτελέσματα παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση σε αρκετά γονίδια που παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη στόχευση, ενώ αυτά που παρουσιάζουν αυξημένη στόχευση είναι λιγότερα.

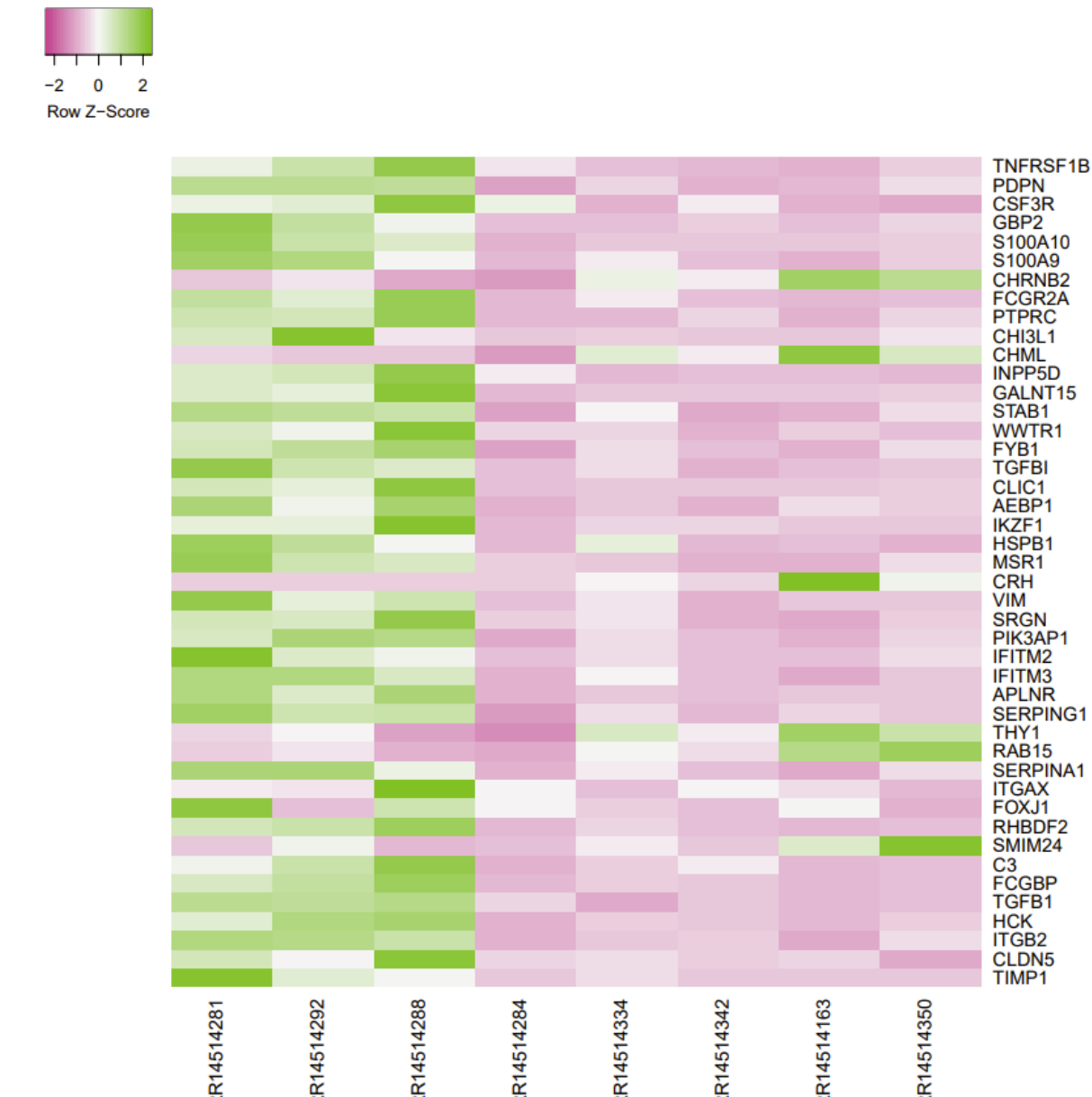
Αλλαγές στην έκφραση των microRNAs μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των mRNAs με διάφορους τρόπους. Η ρύθμιση του miRNA έχει τη δυνατότητα να καταστείλει την έκφραση των γονιδίων-στόχων. Σε αντίθεση με τη γενική υπόθεση ότι η κατασταλτική ρύθμιση των miRNA είναι μια μονόδρομη διαδικασία και οδηγεί σε μειωμένη σταθερότητα του mRNA ή/και μεταφραστική αναστολή, η κατασταλτική ρύθμιση miRNA έχει αποδειχθεί αναστρέψιμη. Επιπλέον, ένα μεμονωμένο miRNA μπορεί να ρυθμίσει προς τα πάνω αλλά και προς τα κάτω. Ομοίως, ένα συγκεκριμένο γονίδιο θα μπορούσε να συναντήσει και τις δύο κατευθύνσεις ρύθμισης βάση συγκεκριμένων συνθηκών και παραγόντων. Υπάρχουν ενδείξεις που υποδηλώνουν ότι τα miRNA μπορεί να ρυθμίζουν άλλα μη κωδικά RNA σε μετα-μεταγραφικά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένων των δικών τους πρωτογενών μεταγραφών, και τα αποτελέσματα υποστηρίζουν το ενδεχόμενο πως οι ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις των miRNA δεν περιορίζονται σε μεταγραφές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. [18]

Αποτελέσματα ερευνών υποδεικνύουν επίσης ότι ένας μεγάλος αριθμός cis-στοιχείων (μη κωδική αλληλουχία DNA μέσα ή κοντά σε ένα γονίδιο που απαιτείται για τη έκφραση του ίδιου του γονιδίου, που συχνά περιέχει θέσεις δέσμησης για μεταγραφικούς παράγοντες) αναδιαμορφώνουν τα ρυθμιστικά δίκτυα miRNA και ως εκ τούτου επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μέσω μηχανισμών στόχευσης. [19]

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα ανωτέρω, είναι δύσκολο να αποδοθεί ερμηνεία στην απορρύθμιση της έκφρασης του εκάστοτε mRNA, και των αντίστοιχων μοριακών αλληλεπιδράσεων.

Ακολουθώντας όμοιο λογισμό με αυτόν της προηγούμενης ανάλυσης, κάναμε στατιστικό έλεγχο βάσει των p-value και FDR. Στη συνέχεια χωρίσαμε τα δεδομένα ως προς την κατεύθυνση της έκφρασης σε δύο υποσύνολα δεδομένων (up-regulated & down-regulated).

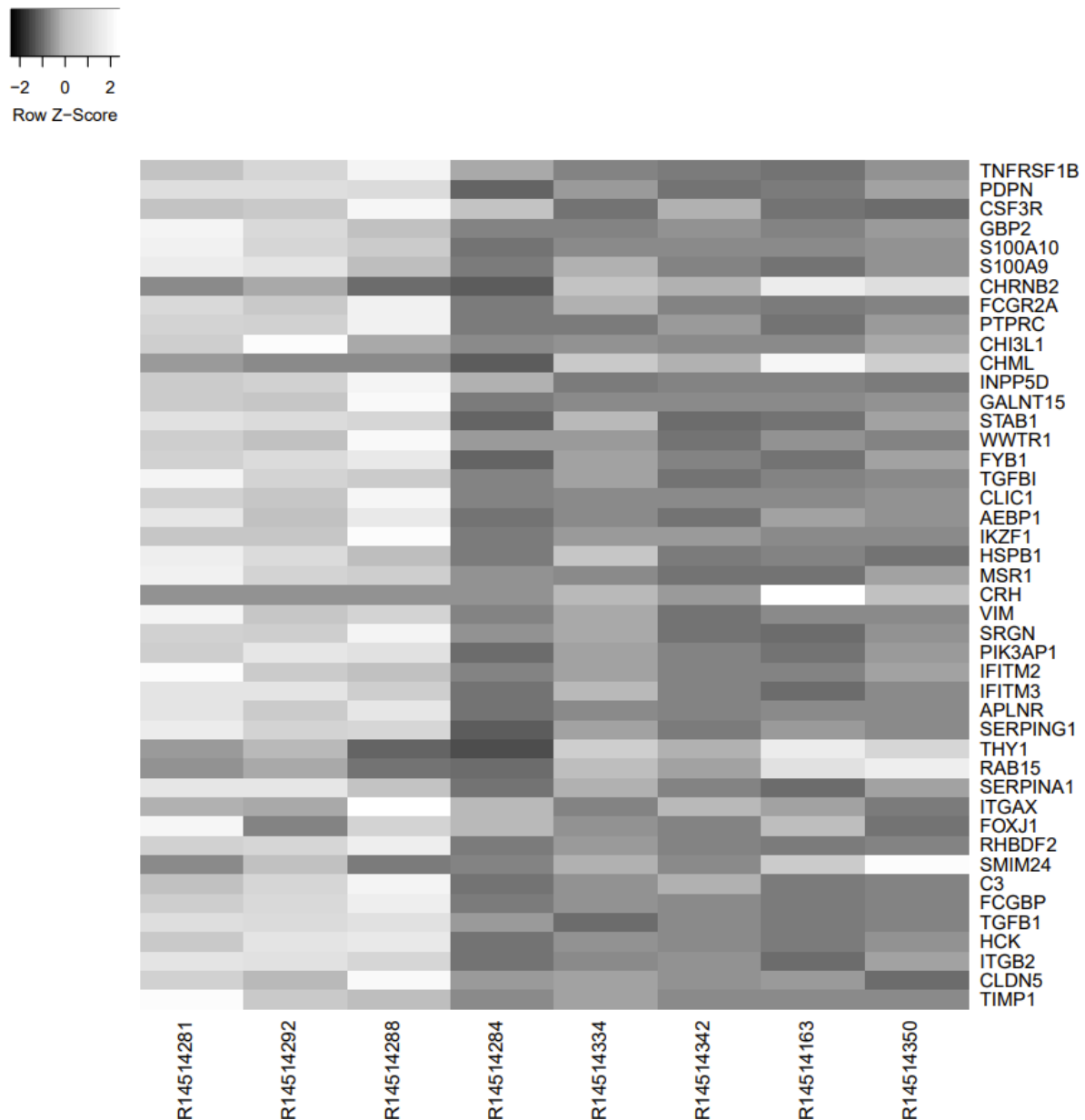
Η Εικόνα 5 παρουσιάζει ένα heatmap με το σύνολο δεδομένων των mRNAs που έχει τελικά χρησιμοποιηθεί στη παρούσα ανάλυση, χρησιμοποιώντας το row z-score για την οπτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων.



Εικόνα 5

Παρατηρούμε πως οι μετρήσεις που αντιστοιχούν στον μέσο όρο έκφρασης (κελιά άσπρου χρώματος) είναι αρκετές. Ωστόσο, η απόκλιση έκφρασης ανάμεσα στις δύο ομάδες είναι προφανής με τα δείγματα AD να έχουν περισσότερες θετικές τιμές Z-score, ενώ τα δείγματα NC έχουν περισσότερες αρνητικές. Επομένως, η νόσος φαίνεται να έχει οδηγήσει σε διαφοροποίηση της έκφρασης των mRNA στα δείγματα μας.

Είναι σημαντικό να αναφερθούν οι προβληματισμοί που προέκυψαν από την οπτικοποίηση του δείγματος SRR14514284, το οποίο φέρει τη νόσο. Είναι πιθανό για ένα δείγμα να αποκλίνει από τα υπόλοιπα της κατηγορίας του και αυτό μπορεί να οφείλεται είτε από την ποιότητα των δειγμάτων, είτε από το υπό μελέτη φαινόμενο (απορρύθμιση που προκύπτει από την ίδια τη νόσο). Για τη περίπτωση που τα αποτελέσματα πράγματι αντιπροσωπεύουν την βιολογία της ΝΑ, παρουσιάζεται ένα heatmap (Εικόνα 4) με ίδια δεδομένα εισόδου με τον προηγούμενο (Εικόνα 5).



Εικόνα 5

Σε αυτή την απεικόνιση είναι εμφανές ότι όχι μόνο το υπό μελέτη δείγμα δεν παρουσιάζει ομοιότητα με αυτά της κατηγορίας του (AD), αλλά και το ότι αποκλίνει και από την άλλη κατηγορία (NC) αφού παρουσιάζει τις μέγιστες αρνητικές τιμές του Z-score για πολλές από τις γραμμές. [10]

Η ανάλυση με τίτλο «Single-nucleus chromatin accessibility and transcriptomic characterization of Alzheimer's Disease» χρησιμοποιεί κοινά δεδομένα με αυτά της παρούσας ανάλυσης όπως περιγράφεται παραπάνω. Παρόλο που χρησιμοποιήσαμε μικρότερο μέρος των δεδομένων ανάλυσης, και διαφορετικά εργαλεία διαφορεικής ανάλυσης, πολλοί στόχοι εμφανίζονται και στις δύο αναλύσεις. Συγκεκριμένα, στην έρευνα αναφορά πραγματοποιήθηκε διαφορεική ανάλυση για τη γονιδιακή έκφραση χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο «MAST». [20]

Οι κοινοί στόχοι των δύο αναλύσεων είναι οι εξής: THY1, FYB1, HSPB1, INPP5D, AEBP1, C3, CSF3R, PIK3AP1, CH13L1, TGFBI. Ωστόσο, λόγω της ανάλυσης διαφορετικού αριθμού δειγμάτων αλλά και των διαφορετικών εργαλείων ανάλυσης, τα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια ως προς την ίδια κατεύθυνση είναι τα FYB1, INPP5D, C3, CSF3R. Άλλοι στόχοι από τα αποτελέσματα της παρούσας ανάλυσης έχουν συσχετιστεί με τη ΝΑ σε άλλες μελέτες.

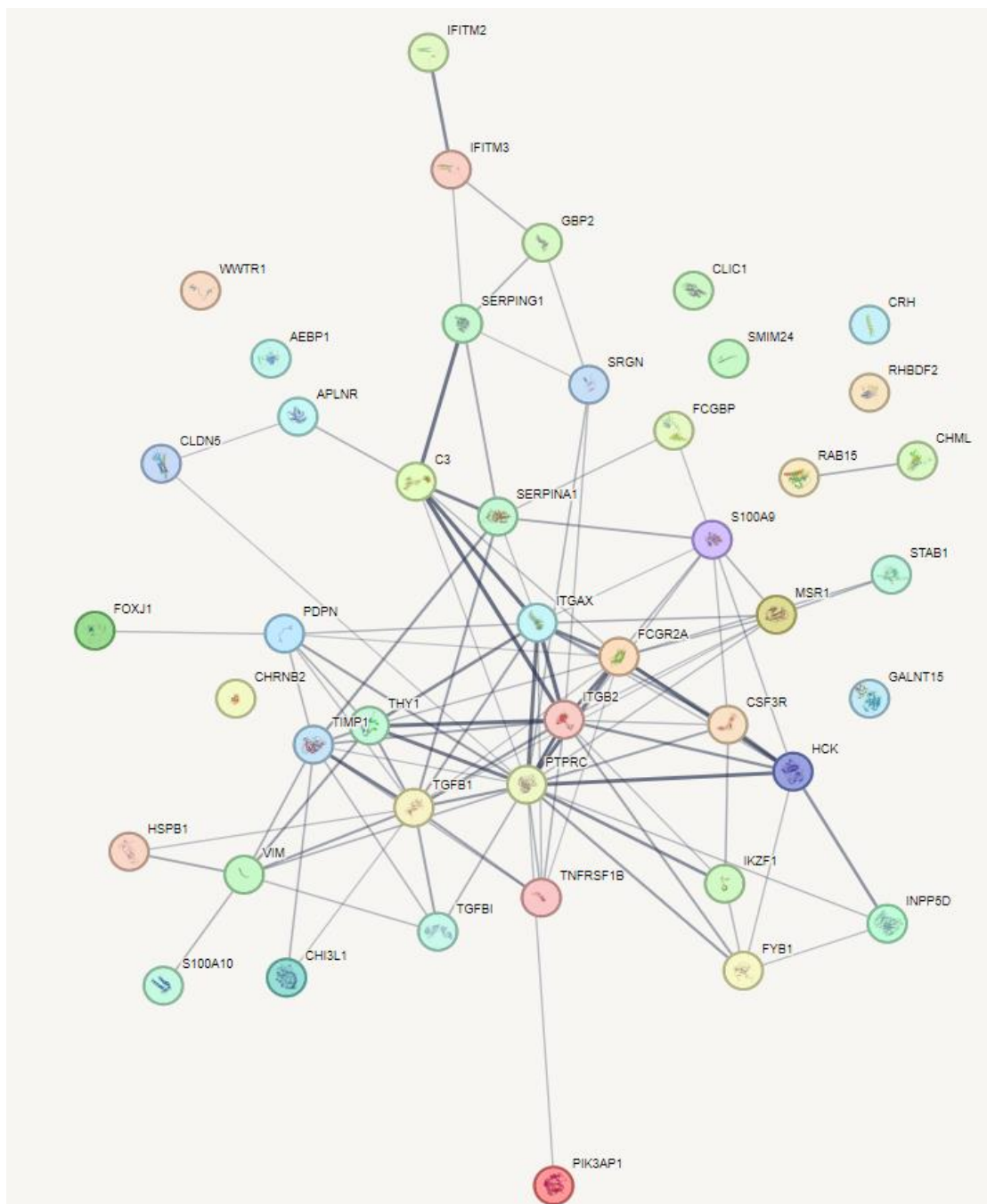
Σε άλλες αναλύσεις έχει αναφερθεί πως η προφλεγμονώδης πρωτεΐνη S100A9 αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στον νευροεκφυλισμό που σχετίζεται με τη φλεγμονή. Το S100A9 παρατηρήθηκε σε ορισμένους ΝΑ νευρώνες του ιππόκαμπου και του φλοιού. Εκτός από τις Αβ πλάκες και τις γύρω περιοχές τους, παρατηρήθηκε επίσης η παρουσία S100A9 στα νευρικά κύτταρα ΝΑ. Όλα τα θετικά σε S100A9 κύτταρα εμφάνισαν ειδική νευρωνική μορφολογία. Κατά τον σχηματισμό πλάκας AD, μικρογλοία ενεργοποιούνται και εναποτίθενται στις θέσεις εναπόθεσης της πλάκας, προκαλώντας μικρογλοιώσεις. Η ενεργοποιημένη μικρογλοία εκκρίνει το S100A9 καθώς και μια σειρά άλλων προ- και αντι- φλεγμονωδών μεσολαβητών. Αυτό μπορεί να συμβάλει σε αλλαγές στην ομοιόσταση του ασβεστίου των νευρώνων και να επιταχύνει τη νευριτική και συναπτική δυσλειτουργία. [21]

Στον μετωπιαίο λοβό των εγκεφάλων ΝΑ υπάρχει αύξηση τόσο των C3 όσο και των S100A10 ανοσοθετικών κυττάρων που μοιάζουν με αστροκύτταρα (ASLC) σε σύγκριση με τους υγιείς, αλλά στην περίπτωση του C3 αυτή η αύξηση είναι εμφανής μόνο στον άνω μετωπιαίο φλοιό ενώ με το S100A10 παρατηρείται στον μετωπιαίο άνω και κάτω φλοιό και τη λευκή ουσία. [22]

Η διαφορετική μεθυλίωση του CLDN5, μιας σημαντικής πρωτεΐνης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, σχετίζεται με γνωστική εξασθένηση πέρα από τις παραδοσιακές παθολογίες και υποθέσεις της Νόσου Alzheimer (AD). Η συσχέτιση μεταξύ του CLDN5 και της γνωστικής εξασθένησης σε άτομα με χαμηλή παθολογία υποδηλώνει έναν πρώιμο ρόλο για τη δυσλειτουργία του CLDN5 και του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στη γνωστική εκφύλιση του εγκεφάλου στην ΝΑ. [23]

Με τη βοήθεια του εργαλείου STRING (v12.0) εκτελέσθηκε μια ανάλυση πρόβλεψης για τους στόχους των mRNAs. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιώντας όλες τις μεθόδους εύρεσης αλληλεπιδράσεων του εργαλείου εξήχθησε μια οπτικοποίηση του δικτύου αλληλεπίδρασης των παραγόμενων πρωτεϊνών. Στα αποτελέσματα της ανάλυσης παρατηρείται πως οι πρωτεΐνες έχουν περισσότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους από ό,τι θα υπήρχαν για ένα τυχαίο σύνολο πρωτεϊνών του ίδιου μεγέθους και βαθμού κατανομής που προέρχεται από το γονιδίωμα. Ένας τέτοιος εμπλουτισμός δείχνει ότι οι πρωτεΐνες είναι τουλάχιστον εν μέρει βιολογικά συνδεδεμένες, ως ομάδα.

Το πάχος της κάθε γραμμής υποδηλώνει την ισχύ των δεδομένων που υποστηρίζουν την εκάστοτε πρωτεϊνική συσχέτιση. [24]



Ανάλυση μονοπατιών

Στη μελέτη μας πραγματοποιήσαμε ανάλυση μονοπατιών χρησιμοποιώντας το εργαλείο miRPath [25], στο οποίο χρησιμοποιήσαμε μέρος των διαφοροποιημένων miRNAs ως δεδομένα εισόδου. Επιλέξαμε την προσέγγιση ένωσης γονιδίων γιατί θέλαμε να λάβουμε υπόψη μας όλα τα δυνητικά μονοπάτια που σχετίζονται με τα διαφοροποιημένα miRNAs, ανεξαρτήτως του αν αυτά σχετίζονται με μεμονωμένα γονίδια ή με ομάδες γονιδίων. Αυτό μας βοήθησε να ανακαλύψουμε περισσότερα πιθανά μονοπάτια που σχετίζονται με τη λειτουργικότητα των miRNAs και να κατανοήσουμε καλύτερα τη συνεισφορά τους στην παθογένεια της νόσου.

Στις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν εντοπίστηκαν μονοπάτια που ενδεχομένως σχετίζονται με απορρυθμισμένες λειτουργίες του εγκεφάλου στη νόσο Αλτσχάιμερ. Τα δεδομένα χωρίστηκαν αρχικά σε δύο σύνολα δεδομένων, up-regulated και down-regulated mRNAs. Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν τα miRNAs με το μεγαλύτερο βαθμό διαφοροποίησης ως προς τη κάθε κατεύθυνση αντίστοιχα, και λαμβάνοντας υπόψη τις μεταβλητές στατιστικής σημαντικότητας.

miRNA_name	baseMean	log2FoldChange	pvalue	padj
hsa-miR-132-3p	6541,757866	-1,931867084	8,49E-18	3,14E-15
hsa-miR-132-5p	631,6954017	-1,855697928	6,37E-09	1,94E-07
hsa-miR-212-5p	95,76026061	-1,828161661	5,13E-09	1,73E-07

Πίνακας 6

miRNA_name	baseMean	log2FoldChange	pvalue	padj
hsa-miR-302b-3p	5,003092787	2,559188181	0,001249374149	0,006578458199
hsa-miR-153-3p	7753,835745	1,701220084	2,69E-12	3,32E-10
hsa-miR-18a-5p	136,3826707	1,565366442	9,09E-09	2,52E-07

Πίνακας 7

Στους ανωτέρω πίνακες παρουσιάζονται τα miRNAs που χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου για την ανάλυση μονοπατιών. Τα επιλεγμένα miRNAs είναι αποτέλεσμα επιλογής βάσει του μεγαλύτερου βαθμού διαφοροποίησης και της στατιστικής σημαντικότητας, με στόχο την εξερεύνηση των δυνητικών μονοπατιών που σχετίζονται με τη νόσο Αλτσχάιμερ.

Η ανάλυση μονοπατιών που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εργαλείου miRPath και της βάσης δεδομένων KEGG αναδεικνύει τη σημαντική συμβολή των επιλεγμένων miRNAs σε διάφορες διεργασίες του ανθρώπινου οργανισμού. Το εργαλείο παρουσιάζει όλα τα μονοπάτια που εμπλέκονται με τα επιλεγμένα miRNAs και εμπλουτίζονται, καθιστώντας δυνατή την κατανόηση της συνολικής επίδρασής τους στον οργανισμό. Τα όρια των παραμέτρων σημαντικότητας έχουν τεθεί ως εξής: FDR<0.05, P-value<0.01.

Cellular Function	Term Name	P-value	FDR
regulatory	Ubiquitin mediated proteolysis	0.00000009361786634	0.00003192369242
regulatory	Cell cycle	0.000003165031808	0.0003676850189
regulatory	FoxO signaling pathway	0.000003234765562	0.0003676850189
regulatory	Neurotrophin signaling pathway	0.000005931566088	0.000505666009
regulatory	Autophagy - animal	0.000007589087894	0.0005175757944
regulatory	Renal cell carcinoma	0.00003185259765	0.0018102893
metabolic	Protein processing in endoplasmic reticulum	0.00003802426038	0.001852324684
regulatory	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	0.00006904385404	0.002942994278
regulatory	Chronic myeloid leukemia	0.0001277905829	0.004357658876
regulatory	Colorectal cancer	0.0001170965667	0.004357658876
regulatory	MicroRNAs in cancer	0.0001551643398	0.004409253322
regulatory	Pathogenic Escherichia coli infection	0.0001473882272	0.004409253322
regulatory	Oocyte meiosis	0.0001982632637	0.005200597917
regulatory	Cellular senescence	0.000286880371	0.0065217471
regulatory	Shigellosis	0.0002847992136	0.0065217471
regulatory	Spinocerebellar ataxia	0.0005507890787	0.007954674423
regulatory	Rap1 signaling pathway	0.0004772208101	0.007954674423
regulatory	Hepatocellular carcinoma	0.0004394592613	0.007954674423
regulatory	Prostate cancer	0.0005542955649	0.007954674423
regulatory	Ras signaling pathway	0.0005598597835	0.007954674423
regulatory	mTOR signaling pathway	0.0004394592613	0.007954674423
structural	Adherens junction	0.0004703337325	0.007954674423
regulatory	Small cell lung cancer	0.0004974107082	0.007954674423
regulatory	MAPK signaling pathway	0.0005146276741	0.007954674423
regulatory	Non-small cell lung cancer	0.0006027518721	0.008221535535
regulatory	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	0.0006799644398	0.008917995152
structural	Focal adhesion	0.001030843721	0.01255420388
regulatory	Hippo signaling pathway	0.001004252026	0.01255420388
regulatory	ErbB signaling pathway	0.001077369064	0.01266837416
regulatory	Glioma	0.001588235964	0.01805294879
regulatory	PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	0.001666804251	0.01833484676
regulatory structural metabolic	Amyotrophic lateral sclerosis	0.001778685781	0.01895412035
regulatory	Hepatitis C	0.001937345637	0.02001923825

regulatory	Endometrial cancer	0.002141377712	0.02086313713
regulatory	Pathways of neurodegeneration - multiple diseases	0.00210868275	0.02086313713
metabolic	Choline metabolism in cancer	0.002647444309	0.02507718081
neurodegenerative	Alzheimer disease	0.003768428043	0.03294958879
regulatory	Melanoma	0.003619931014	0.03294958879
regulatory	Pathways in cancer	0.003745834876	0.03294958879
regulatory	Pancreatic cancer	0.004438513043	0.03783832369
regulatory	Gastric cancer	0.004881718379	0.04060160895
regulatory	TGF-beta signaling pathway	0.005491325164	0.0445843305
regulatory	Progesterone-mediated oocyte maturation	0.005960103604	0.04624801595
regulatory	Huntington disease	0.00596748593	0.04624801595
regulatory	Endocrine resistance	0.0000008866441338	0.0001007818832
regulatory	p53 signaling pathway	0.00001221305967	0.0003786048496
regulatory	Salmonella infection	0.00001916190865	0.0005026316039
regulatory	Thyroid hormone signaling pathway	0.00004660189704	0.001080477811
regulatory	Proteoglycans in cancer	0.00008029390669	0.001461120872
structural	Tight junction	0.0001539698122	0.002500176474
regulatory	Breast cancer	0.0003268772416	0.00473045415
regulatory	Bladder cancer	0.0003329351894	0.00473045415
regulatory	Hepatitis B	0.0005247973	0.00662799553
regulatory	Apoptosis	0.0005771526383	0.007028894631
regulatory	cGMP-PKG signaling pathway	0.0009885975718	0.009915052117
regulatory	Prolactin signaling pathway	0.001288867649	0.0123434275
regulatory	Measles	0.001454233004	0.01340252579
regulatory	Mitophagy - animal	0.00192858452	0.01730650845
regulatory	Acute myeloid leukemia	0.002242087595	0.0196038941
metabolic			
regulatory	AMPK signaling pathway	0.002401355556	0.02046428546
regulatory	Viral carcinogenesis	0.002499017146	0.02046428546
regulatory	Apoptosis - multiple species	0.002520527828	0.02046428546
regulatory	Vasopressin-regulated water reabsorption	0.002800419808	0.02170325351
neurodegenerative	Prion disease	0.003301258085	0.02419488393
regulatory	Long-term depression	0.003405731462	0.02419488393
regulatory	Dopaminergic synapse	0.003367990986	0.02419488393
regulatory	Wnt signaling pathway	0.003833886391	0.02589856285
metabolic	Thermogenesis	0.003873392097	0.02589856285
regulatory	Parkinson disease	0.003776144869	0.02589856285

regulatory	Platelet activation	0.004095087955	0.02685432678
regulatory	Regulation of actin cytoskeleton	0.004410603096	0.0273457392
regulatory	Yersinia infection	0.004683440595	0.02851880791
regulatory	Cushing syndrome	0.004782669993	0.02861211347
regulatory	Growth hormone synthesis, secretion and action	0.004981636075	0.02928858451
regulatory	Human papillomavirus infection	0.005876082942	0.03396176751
regulatory	Oxytocin signaling pathway	0.006573726954	0.03736068152
regulatory	GnRH signaling pathway	0.007617363438	0.04123049099
regulatory	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	0.008470619449	0.04513251925
regulatory	mRNA surveillance pathway	0.009002304536	0.04722747457
regulatory	Transcriptional misregulation in cancer	0.009399148655	0.04856226805

Πίνακας 8

Η ανάλυση για τα δύο διαφορετικά σύνολα δεδομένων (up-regulated και down-regulated) έδειξε την ύπαρξη επικάλυψης στα αποτελέσματα, όπως αναμενόταν, δεδομένου ότι χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος "ένωσης γονιδίων". Αυτή η προσέγγιση συνένωσης γονιδίων σημαίνει ότι λαμβάνουμε υπόψη όλα τα γονίδια που σχετίζονται με τα μελετημένα miRNAs, ανεξαρτήτως του εάν ανήκουν στα up-regulated ή στα down-regulated δεδομένα, επιτρέποντας μια πληρέστερη εικόνα των πιθανών μονοπατιών που συνδέονται με την πάθηση.

Η πλειονότητα των μονοπατιών που αναδείχθηκαν διαθέτουν ρυθμιστικές λειτουργίες, ενώ λίγα εξ αυτών εμφανίζουν δομικές ή μεταβολικές ιδιότητες, καθώς και νευροεκφυλιστικά μονοπάτια. Αυτό υποδηλώνει τη σημαντική συμμετοχή των επιλεγμένων miRNAs στη ρύθμιση της λειτουργίας των παραγόντων που εμπλέκονται σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες. Σημαντικό ποσοστό των μονοπατιών που εντοπίστηκαν φαίνεται να σχετίζονται με τον καρκίνο, μια παρατήρηση που είναι αναμενόμενη λαμβάνοντας υπόψη την πληθώρα των στόχων που περιλαμβάνουν αυτά τα μονοπάτια. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα της ανάλυσης αναδεικνύουν αρκετά μονοπάτια που συμμετέχουν σε βασικές κυτταρικές διαδικασίες, και οποιαδήποτε ανισορροπία σε αυτά τα μονοπάτια μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις.

Τα μονοπάτια που αναδείχθηκαν στην ανάλυσή μας, συμπεριλαμβάνουν βασικούς βιολογικούς μηχανισμούς που συνδέονται με την εξέλιξη της ΝΑ.

- i. Η "Ubiquitin mediated proteolysis" αναφέρεται στη διαδικασία που εμπλέκεται στην καταστροφή πρωτεϊνών που δεν είναι πλέον απαραίτητες για τη λειτουργία του κυττάρου. Στην ΝΑ, συσσωρεύονται ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες και έτσι γίνεται αντιληπτό πως το πρωτεολυτικό σύστημα στους νευρώνες ενδεχομένως κατακλύζεται από τη συσσώρευση πρωτεϊνών. [26]
- ii. Το μονοπάτι "Cell cycle" αφορά τη σειρά των γεγονότων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της διαίρεσης του κυττάρου, διαδικασία η οποία απορρυθμίζεται στην ΝΑ. Πιο αναλυτικά, η μη φυσιολογική επανείσοδος στον κυτταρικό κύκλο εκκινεί την οδό με αποτέλεσμα τη δημιουργία νευροϊνιδικών μπερδεμάτων, την αποπτωτική αποφυγή και την παραγωγή Αβ. [27]

Έχει επίσης περιγραφεί πώς ακόμη και τα στοιχεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Cdk4, p16 και p21) συμπεριφέρονται ως ογκοπρωτεΐνες σε νευρώνες ΝΑ. [28]

- iii. Η λειτουργία "Autophagy - animal" αναφέρεται στη διαδικασία καθαρισμού των κυττάρων από παθογόνους οργανισμούς και άλλων μορίων. Αυξανόμενα στοιχεία δείχνουν ότι η αυτοφαγία παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της ΝΑ μέσω της ρύθμισης του μεταβολισμού του αμυλοειδούς-βήτα (Αβ) και του tau, και ότι η δυσλειτουργία της αυτοφαγίας επιδεινώνει περαιτέρω την κατάσταση του ΝΑ εγκεφάλου. [29]
- iv. Η "Protein processing in endoplasmic reticulum" αποτελεί σημαντική διαδικασία για τη σωστή λειτουργία των πρωτεϊνών. Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών υποδηλώνει ότι το Αβ οδηγεί σε στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, λειτουργία η οποία εντοπίζεται στα πρώιμα στάδια της εξέλιξης της ΑΔ. [30]
- v. Το μονοπάτι "Transcriptional misregulation in cancer" σχετίζεται με την μειωμένη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων, μια χαρακτηριστική παθογένεια σε πολλούς τύπους καρκίνου. Η δυσλειτουργία της συγκεκριμένης διαδικασίας φαίνεται να εμπλέκεται και στη παθογένεια ΝΑ. Αν και είναι σαφές ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ΝΑ είναι σημαντικά στην αιτιολογία της ΑΔ, πολλά παραμένουν άγνωστα σχετικά με τη ρύθμισή τους. Η μελέτη των ρυθμιστικών στοιχείων των γονιδίων της νόσου και των αντίστοιχων παραγόντων μεταγραφής τους είναι επομένως εξαιρετικά σημαντική για την αποσαφήνιση των διαδικασιών της νόσου. Η εσφαλμένη ρύθμιση των γονιδίων αυτών ενδεχομένως να οδηγεί σε ΝΑ κατάσταση. [31]

Ορισμένα μονοπάτια συμβάλλουν σε διάφορες πτυχές της λειτουργίας, της επιβίωσης και της παθολογίας των νευρώνων στην ΝΑ. Μεταξύ των μονοπατιών που βρέθηκαν να στοχεύονται σημαντικά από τα miRNAs, ορισμένα σχετίζονται άμεσα με υποθέσεις στη νόσο του Alzheimer.

- vi. Neurotrophin signaling pathway: Οι νευροτροφίνες είναι ουσιώδεις για την επιβίωση και τη λειτουργία των νευρώνων. Η δυσλειτουργία της νευροτροφικής σήμανσης έχει συσχετιστεί με νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η ΝΑ. Η υπόθεση των νευροτροφινών προτείνει ότι οι νευροτροφίνες συμμετέχουν στην επαγόμενη από τη δραστηριότητα τροποποίηση της συναπτικής μετάδοσης. Όλο και περισσότερο, τα στοιχεία δείχνουν ότι η σύνθεση, η έκκριση και οι δράσεις των νευροτροφινών στη συναπτική μετάδοση ρυθμίζονται από την ηλεκτρική δραστηριότητα και ότι οι ίδιες οι νευροτροφίνες μπορούν να τροποποιήσουν έντονα τη συναπτική αποτελεσματικότητα. [32]
- vii. FoxO signaling pathway: Οι μεταγραφικοί παράγοντες FoxO συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης, της αντίδρασης στο οξειδωτικό στρες και του κύκλου ζωής των κυττάρων. Η δυσλειτουργία του μονοπατιού FoxO έχει συσχετιστεί με νευροεκφυλιστικές παθήσεις και με τη παθολογία στη ΝΑ. Αρκετές μελέτες συσχετίζουν το FoxO στην παθοφυσιολογία της ΑΔ. Ωστόσο, άλλες αναφορές κατέδειξαν προστατευτικό ρόλο του FoxO στον εγκέφαλο. Το FoxO έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει τους νευρώνες από την επαγόμενη από το Αβ τοξικότητα ρυθμίζοντας προς τα πάνω τα γονίδια αντίστασης στο στρες. Ο ακριβής ρόλος του μονοπατιού παραμένει αμφιλεγόμενος. [33]
- viii. mTOR signaling pathway: Το μονοπάτι mTOR ρυθμίζει την ανάπτυξη των κυττάρων, το μεταβολισμό και την αυτοφαγία. Η δυσλειτουργία της σήμανσης mTOR έχει συσχετιστεί με

την παθογένεια της ΝΑ και τη νευρονική δυσλειτουργία. Συγκεκριμένα, η αναστολή της σηματοδότησης mTOR μπορεί να προκαλέσει νευροεκφυλισμό. Από την άλλη πλευρά, η υπερενεργοποίηση σηματοδότησης mTOR μπορεί να βλάψει την ανάπτυξη των νευρώνων και της γλοίας και να οδηγήσει σε δυσπλασία του εγκεφάλου. [34]

- ix. Hippo signaling pathway: Το μονοπάτι Hippo ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την ομοιόσταση των ιστών. Η δυσλειτουργία της σήμανσης Hippo έχει συσχετιστεί με νευροεκφυλιστικές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένης της ΝΑ. Μη φυσιολογική ενεργοποίηση της σηματοδότησης Hippo έχει παρατηρηθεί στον ενδορινικό φλοιό - ο οποίος εμπλέκεται στο σχηματισμό και την εδραίωση της μνήμης - σε ασθενείς με AD. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος αυτής της οδού στην ΝΑ είναι ασαφής.

Χρησιμοποιώντας το ίδιο εργαλείο και τη μέθοδο συγχώνευσης "genes union", πραγματοποιήσαμε μια ανάλυση biasedURN χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων MSigDB (Hallmark gene sets). Η κύρια διαφορά αυτής της ανάλυσης σε σύγκριση με την προηγούμενη προέρχεται από τη χρήση μιας διαφορετικής βάσης δεδομένων, η οποία περιλαμβάνει σύνολα γονιδίων που σχετίζονται με συγκεκριμένα βιολογικά κύρια σημεία (Hallmarks), παρέχοντας έτσι ένα διαφορετικό επίπεδο κατανόησης της βιολογικής σημασίας των αποτελεσμάτων.

Η βελτιστοποίηση της σημαντικότητας στα αποτελέσματα της ανάλυσης οφείλεται στη μέθοδο που χρησιμοποιείται στη biased URN ανάλυση. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην χρήση του αλγορίθμου Fisher's exact test για τον υπολογισμό της στατιστικής σημαντικότητας. Ο αλγόριθμος αυτός λαμβάνει υπόψη τον αριθμό των επιλεγμένων γονιδίων και των μονοπατιών που σχετίζονται με αυτά, καθώς και τον τυχαίο πληθυσμό, για να καθορίσει τη σημαντικότητα των συσχετίσεων.

Για την πραγματοποίηση της biased URN ανάλυσης, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά σύνολα δεδομένων εισόδου. Το πρώτο σύνολο δεδομένων περιείχε τα υπερ-εκφραζόμενα miRNAs, ενώ το δεύτερο σύνολο περιείχε τα υπό-εκφραζόμενα miRNAs. Η χρήση δύο διαφορετικών συνόλων δεδομένων επέτρεψε την αξιολόγηση των διαφορών στη ρύθμιση της έκφρασης των miRNAs ανάμεσα στις δύο κατευθύνσεις, και την ανάλυση τους για την εκτίμηση της σημαντικότητας των αποτελεσμάτων.

Υπερ-εκφρασμένα miRNAs - Δεδομένα εισόδου

miRNA_name	baseMean	log2FoldChange	pvalue	padj
hsa-miR-302b-3p	5,003092787	2,559188181	0,001249374149	0,006578458199
hsa-miR-153-3p	7753,835745	1,701220084	2,69E-12	3,32E-10
hsa-miR-18a-5p	136,3826707	1,565366442	9,09E-09	2,52E-07
hsa-miR-146a-5p	806,0691805	1,431686521	4,15E-05	0,0003542675839
hsa-miR-501-3p	99,20673607	1,377495442	1,05E-06	1,49E-05
hsa-miR-148b-3p	4640,337237	1,351129148	8,85E-09	2,52E-07
hsa-miR-18b-5p	14,48110884	1,235403757	0,001974151851	0,009704790736
hsa-miR-424-5p	228,2069886	1,068382158	6,30E-15	1,17E-12
hsa-miR-148a-3p	6010,130772	1,014716124	6,22E-05	0,0004862627456
hsa-miR-3065-5p	69,4704007	0,9955047246	4,83E-05	0,0003976927658
hsa-miR-154-3p	49,03157135	0,9358002965	6,39E-05	0,0004965563394
hsa-miR-15b-5p	421,9200135	0,9349101743	6,47E-09	1,94E-07
hsa-miR-195-5p	5011,268811	0,9333649171	1,12E-07	1,97E-06
hsa-miR-186-5p	15137,9279	0,9188981258	4,96E-11	3,24E-09
hsa-miR-125b-1-3p	871,3794407	0,9117328941	5,59E-07	8,50E-06
hsa-miR-15b-3p	30,28157616	0,8636610896	0,001872245254	0,00928600213
hsa-miR-135b-5p	19,00448584	0,8358636557	0,01146332063	0,04134983514

hsa-miR-106b-5p	905,525551	0,8236948044	5,41E-11	3,34E-09
hsa-miR-135a-5p	814,5974843	0,7762806672	0,000145600526	0,001036937079
hsa-miR-24-3p	4185,990247	0,763709744	3,31E-06	4,09E-05
hsa-miR-34a-3p	32,12334516	0,6640702532	0,01255341452	0,04484515604
hsa-miR-29a-3p	38596,61124	0,6253506017	3,41E-08	7,57E-07
hsa-miR-154-5p	198,8097907	0,6068359779	2,42E-05	0,0002257156221
hsa-miR-9-3p	5081,831215	0,5698046267	2,44E-05	0,0002262529756
hsa-miR-125b-5p	40635,26509	0,5560804488	3,82E-05	0,0003318300984
hsa-miR-193b-3p	736,8499825	0,5289811302	9,89E-06	0,0001026591237
hsa-miR-455-3p	88,29001076	0,5216850937	0,002406020469	0,01137484571
hsa-miR-582-5p	789,5003131	0,4990577453	0,001388294799	0,007137783986
hsa-miR-181d-5p	4362,918966	0,49508555	0,006940172434	0,02753761277
hsa-miR-27b-3p	183400,1753	0,4945343557	0,008062997104	0,0306780472
hsa-miR-93-5p	4348,188126	0,4020748141	0,0001841972859	0,00125547966
hsa-miR-29b-3p	9421,544544	0,3378334663	0,005238207285	0,02187837704

Πίνακας 9

Τα αποτελέσματα του συνόλου δεδομένων που περιλαμβάνει τα υπερ-εκφραζόμενα miRNAs ανέδειξαν τα ακόλουθα μονοπάτια:

Term Name	Term Genes	Target Genes (n)	miRNAs (n)	P-value	FDR
HALLMARK_MTORC1_SIGNALING	210	166	32	0.00008309516616	0.003369568182
HALLMARK_ANDROGEN_RESPONSE	102	85	32	0.0001639329035	0.003369568182
HALLMARK_G2M_CHECKPOINT	203	163	32	0.0002021740909	0.003369568182
HALLMARK_E2F_TARGETS	218	166	31	0.0002933292009	0.003666615011
HALLMARK_UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE	115	92	32	0.001172154519	0.01172154519
HALLMARK_PROTEIN_SECRETION	97	81	31	0.001682458791	0.01382609078
HALLMARK_UV_RESPONSE_DN	152	120	30	0.001935652709	0.01382609078
HALLMARK_MITOTIC_SPINDLE	211	159	32	0.003135357045	0.01959598153
HALLMARK_MYC_TARGETS_V2	60	45	28	0.006158519378	0.03421399654

Πίνακας 10

1. HALLMARK_MTORC1_SIGNALING: Το σύνολο αυτό συμπεριλαμβάνει γονίδια που ρυθμίζονται προς τα πάνω μέσω της ενεργοποίησης του συμπλέγματος mTORC1.
2. HALLMARK_ANDROGEN_RESPONSE: Αποτελείται από γονίδια που καθορίζουν την απόκριση στα ανδρογόνα.
3. HALLMARK_G2M_CHECKPOINT: Γονίδια που εμπλέκονται στο σημείο ελέγχου G2/M, όπως σε εξέλιξη μέσω του κύκλου κυτταρικής διαίρεσης.

4. HALLMARK_E2F_TARGETS: Αφορά γονίδια που κωδικοποιούν στόχους που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο των παραγόντων μεταγραφής E2F.
5. HALLMARK_UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE: Τα στοχευμένα γονίδια ρυθμίζονται προς τα πάνω κατά την απόκριση της ξεδιπλωμένης πρωτεΐνης, μια απόκριση κυτταρικού στρες που σχετίζεται με το ενδοπλασματικό δίκτυο.
6. HALLMARK_PROTEIN_SECRETION: Γονίδια που εμπλέκονται στην οδό έκκρισης πρωτεϊνών. Η στόχευση σε γονίδια τα οποία ενεργοποιούν αυτό το μονοπάτι είναι αναμενόμενη όπως και στο μονοπάτι "Ubiquitin mediated proteolysis", λόγω της συσσώρευσης μη αξιοποιήσιμων πρωτεϊνών στον εγκέφαλο NA.
7. HALLMARK_UV_RESPONSE_DN: Αποτελείται από γονίδια ρυθμίζονται προς τα κάτω ως αντίδραση στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Ωστόσο, τα δεδομένα εισόδου της παρούσας ανάλυσης παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση.
8. HALLMARK_MITOTIC_SPINDLE: Το σύνολο αυτό συμπεριλαμβάνει γονίδια σημαντικά για τη συναρμολόγηση της μιτωτικής ατράκτου. Όπως αναφέρθηκε και στο μονοπάτι "Cell cycle" της προηγούμενης ανάλυσης μονοπατιών, η μιτωτική διαδικασία προκαλείται εσφαλμένα λόγω τη ενεργοποίησης των αντίστοιχων γονιδίων.
9. HALLMARK_MYC_TARGETS_V2: Μια υποομάδα γονιδίων που ρυθμίζεται από MYC (μια οικογένεια γονιδίων ρυθμιστών και πρωτο-ογκογονιδίων που κωδικοποιούν τους παράγοντες μεταγραφής).

[35]

Υπο-εκφρασμένα miRNAs - Δεδομένα εισόδου

miRNA_name	baseMean	log2FoldChange	pvalue	padj
hsa-miR-132-3p	6541,757866	-1,931867084	8,49E-18	3,14E-15
hsa-miR-132-5p	631,6954017	-1,855697928	6,37E-09	1,94E-07
hsa-miR-212-5p	95,76026061	-1,828161661	5,13E-09	1,73E-07
hsa-miR-212-3p	365,0185151	-1,718112584	2,24E-10	9,94E-09
hsa-miR-138-5p	45112,22538	-1,15273763	0,000339826358	0,002109201585
hsa-miR-29b-1-5p	30,06156099	-1,125385395	4,91E-05	0,00040076843
hsa-miR-193a-3p	431,7100379	-1,048574711	0,005543559554	0,02288154173
hsa-miR-137-5p	18,76595749	-1,042845982	0,002313575683	0,01107923528
hsa-miR-339-3p	1310,189046	-0,9396113463	0,0001693406193	0,001173205816
hsa-miR-128-1-5p	1400,977851	-0,9202460456	3,60E-06	4,40E-05
hsa-miR-135a-2-3p	35,28085835	-0,8999290485	0,001327749187	0,006958157294
hsa-miR-146b-3p	290,4317373	-0,8845769535	3,76E-06	4,53E-05
hsa-miR-342-5p	157,8763603	-0,7106124151	4,62E-05	0,0003861451473
hsa-miR-424-3p	28,8324369	-0,6807736978	0,006504589327	0,02606572522
hsa-miR-138-1-3p	364,9547257	-0,664281829	2,57E-06	3,28E-05
hsa-miR-219a-2-3p	7161,632647	-0,659730288	0,007060845276	0,02778147697
hsa-miR-342-3p	8947,425436	-0,591662354	0,001607184763	0,00807955779
hsa-miR-181b-3p	100,8796763	-0,5597573629	0,00829667748	0,03135241048
hsa-miR-181a-5p	846612,1214	-0,5189855486	0,002031980778	0,009945068918
hsa-miR-107	10430,59456	-0,4419845216	0,0003120086598	0,001980809263
hsa-miR-29b-2-5p	194,769905	-0,4395763917	0,007833670262	0,0300110609
hsa-miR-101-5p	1030,439284	-0,4282599342	0,009320732462	0,03463322329
hsa-miR-106b-3p	572,6257263	-0,3937360551	0,004830917712	0,02048530373
hsa-miR-181c-5p	58100,74026	-0,3905814894	0,002426623446	0,01142363834
hsa-miR-181c-3p	6216,557768	-0,3497721104	0,0005529799312	0,003150567711
hsa-miR-101-3p	107271,4744	-0,2410012074	0,0008653554799	0,004783134021

Πίνακας 11

Τα μονοπάτια που προέκυψαν από το σύνολο δεδομένων των υπό-εκφραζόμενα miRNAs είναι τα εξής:

Term Name	Term Genes	Target Genes (n)	miRNAs (n)	P-value	FDR
HALLMARK_PROTEIN_SECRETION	97	76	21	0.00002270028292	0.001135014146
HALLMARK_UV_RESPONSE_DN	152	104	22	0.001253836801	0.03134592002

Πίνακας 12

Η εμφάνιση των διαδρομών HALLMARK_PROTEIN_SECRETION και HALLMARK_UV_RESPONSE_DN τόσο στο σύνολο δεδομένων των up-regulated όσο και των down-regulated miRNAs αποτελεί ένδειξη κοινής επίδρασης μεταξύ των διαφορετικά εκφρασμένων miRNAs σε κοινά μονοπάτια. Το σύνολο δεδομένων HALLMARK_UV_RESPONSE_DN αποτελείται από γονίδια στόχους τα οποία αναμένεται να βρίσκονται σε υπο-έκφραση. Ωστόσο κάποιοι στόχοι βρέθηκαν υπερεκφρασμένοι.

Αυτή η δυνιτική αλληλεπίδραση μπορεί να αποτελεί έναν κλειστό βρόχο μονοπατιών, όπου πολλαπλοί παράγοντες μπορούν να επιδράσουν και να προκαλέσουν ανεπιθύμητη ρύθμιση των διαδρομών προς την ίδια κατεύθυνση. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένη ανισορροπία, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός κύκλου αυξανόμενης παθολογίας στον εγκέφαλο. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ διαφορετικών μονοπατιών και η ανάπτυξη ενός αρνητικού κύκλου μπορεί να οδηγήσει σε προοδευτικό εκφυλισμό του εγκεφάλου, με αποτέλεσμα την εμφάνιση σοβαρών νευρολογικών ελλείψεων και επιδείνωση της νόσου.

Συμπεράσματα

Η πολυπλοκότητα και η ταχεία εξέλιξη της ΝΑ καθιστούν αδύνατη την θεραπεία της μέχρι και σήμερα. Είναι ξεκάθαρο πως οι αλληλοεξαρτώμενοι παράγοντες που οδηγούν σε αυτή είναι πολλοί και ο βαθμός απορρύθμισης του κάθε μηχανισμού διαφέρει ανά περίπτωση. Δεδομένου της ύπαρξης διαφορετικών φαινοτύπων που συγκαταλέγονται στην ΝΑ, είναι σημαντική η ανάπτυξη συνδυαστικών αλγορίθμων πρόβλεψης με σκοπό την ποσοτικοποίηση των ανισορροπιών που έχουν προκληθεί σε κάθε ένα από τα ήδη αναλυμένα μοριακά μονοπάτια. Επίσης, οι δυσκολίες που συνδέονται με την ανάλυση δεδομένων από εγκεφαλικό ιστό κάνουν το έργο της επιστημονικής κοινότητας ακόμα πιο δύσκολο καθιστώντας την περαιτέρω μελέτη των ειδικών χαρακτηριστικών εγκεφαλικών ιστών, τη χρήση αξιόπιστων δεδομένων και την χρήση ευαίσθητων εργαλείων αλληλούχισης απαραίτητες συνθήκες για την απόδοση ερμηνείας των αποτελεσμάτων. Υπάρχουν λίγες μελέτες που εστιάζουν στην ετερογένεια της ΝΑ τόσο σε γενετικό όσο και κλινικό επίπεδο, δημιουργώντας έτσι βασικές ελείψεις στην κατανόηση του μηχανισμού εξέλιξης της ΝΑ. Είναι σημαντική η μελέτη όλων των επιμέρους απορρυθμισμένων μοριακών αλληλεπιδράσεων, και η ένταξη τους σε ένα ενιαίο μοντέλο για την ανάδειξη του ευρύτερου συστήματος ρυθμιστικών μηχανισμών, του οποίου η ανισορροπία οδηγεί σε ΝΑ κατάσταση.

Αναφορές

- [1] T. Guo, D. Zhang, Y. Z. 2, T. Y. H. 3, H. X. 4 and Y. Zhao, "Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease," NCBI, 2020.
- [2] B. Polis and A. O. Samson, "A New Perspective on Alzheimer's Disease as a Brain Expression of a Complex Metabolic Disorder," NCBI, 2019.
- [3] P. Lau, K. Bossers, R. Janky, E. Salta, C. S. Frigerio, S. Barbash, R. Rothman, A. S. R. Sierksma, A. Thathiah, D. Greenberg, A. S. Papadopoulou, T. Achsel, T. Ayoubi, H. Soreq and J. Verhaagen, "Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease," NCBI, 2013.
- [4] "Gene Expression Omnibus," [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>.
- [5] N. Genet, "Single-nucleus chromatin accessibility and transcriptomic characterization of Alzheimer's Disease," NCBI, 2022.
- [6] A. Alexiou, D. Zisis, I. Kavakiotis, M. Miliotis, A. Koussounadis, D. Karagkouni and A. G. Hatzigeorgiou, "DIANA-mAP: Analyzing miRNA from Raw NGS Data to Quantification," NCBI, 2020 .
- [7] P. Lau, K. Bossers, R. Janky, E. Salta, C. S. Frigerio, S. Barbash, R. Rothman, A. S. R. Sierksma, A. Thathiah, D. Greenberg, A. S. Papadopoulou, T. Achsel, T. Ayoubi, H. Soreq and J. Verhaagen, "Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease," NCBI, 2013 .
- [8] "The microRNA database," [Online]. Available: <https://www.mirbase.org/>.
- [9] "DIANA-miRPath," [Online]. Available: <http://62.217.122.229:3838/app/miRPathv4>.
- [10] [Online]. Available: <http://heatmapper.ca/expression/>.
- [11] A. P. Wingo, M. Wang, J. Liu, M. S. Breen, H.-S. Yang, B. Tang, J. A. Schneider, N. T. Seyfried, J. J. Lah, A. I. Levey, D. A. Bennett, P. Jin, P. L. D. Jager and T. S. Wingocorresponding, "Brain microRNAs are associated with variation in cognitive trajectory in advanced age," NCBI, 2022.
- [12] Q. S. L. a. D. Cai, "Integrated miRNA-Seq and mRNA-Seq Study to Identify miRNAs Associated With Alzheimer's Disease Using Post-mortem Brain Tissue Samples," NCBI, 2021.
- [13] A. Annese, C. Manzari, C. Lionetti, E. Picardi, D. S. Horner, M. Chiara, M. F. Caratozzolo, A. Tullo, B. Fosso and G. P. & A. M. D'Erchia, "Whole transcriptome profiling of Late-Onset Alzheimer's Disease patients provides insights into the molecular changes involved in the disease," Nature, 2018.
- [14] P. Y. Smith, J. Hernandez-Rapp, F. Jolivet, C. Lecours, K. Bisht, C. Goupil, V. Dorval, S. Parsi, F. Morin, E. Planel, D. A. Bennett, F.-J. Fernandez-Gomez, N. Sergeant, L. Buée and Mari, "miR-132/212 deficiency impairs tau metabolism and promotes pathological aggregation in vivo," Oxford Academic, 2015.

- [15] G. Nehra, B. Bauer and a. A. M. Hartz, "Blood-Brain Barrier Leakage in Alzheimer's Disease: From Discovery to Clinical Relevance," NCBI, 2022 .
- [16] J. Wang, F. Xu, X. Zhu, X. Li, Y. Li and a. J. Li, "Targeting microRNAs to Regulate the Integrity of the Blood–Brain Barrier," 2021 .
- [17] "DIANA-RSeq," [Online]. Available: <https://github.com/athalexiou/DIANA-RSeq>.
- [18] Y. Cai, X. Yu, S. Hu and a. J. Yu, "A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation," NCBI, 2010 .
- [19] J. L. a. A. G. Clark, "Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression," NCBI, 2012 .
- [20] E. M. N. M. S. S. A. C. M. E. H. J. S. K. L. M. P.-R. V. S. Samuel Morabito, "NCBI," NCBI, 2021.
- [21] C. Wang, A. G. Klechikov, A. L. Gharibyan, S. K. T. S. Wärmländer, J. Jarvet, L. Zhao, X. Jia, 1. S. K. Shankar, A. Olofsson, T. Brännström, Y. Mu, A. Gräslund and a. L. A. Morozova-Roche, "The role of pro-inflammatory S100A9 in Alzheimer's disease amyloid-neuroinflammatory cascade," NCBI, 2013 .
- [22] A. King, B. Szekely, E. Calapkulu, H. Ali, F. Rios, S. Jones and a. C. Troakes, "The Increased Densities, But Different Distributions, of Both C3 and S100A10 Immunopositive Astrocyte-Like Cells in Alzheimer's Disease Brains Suggest Possible Roles for Both A1 and A2 Astrocytes in the Disease Pathogenesis," NCBI, 2020.
- [23] C. R. K. N. C. R. E. P. L. D. J. D. A. B. A. P. W. M. P. E. a. T. S. W. Anke Hüls, "Brain DNA Methylation Patterns in CLDN5 Associated with Cognitive Decline," NCBI, 2021 .
- [24] "STRING," [Online]. Available: <https://string-db.org/>.
- [25] T. S., S. G., M. M., K. D., K. I., K. A., K. F. and H. A., "DIANA-miRPath v4.0: expanding target-based miRNA functional analysis in cell-type and tissue contexts.," Europe PMC, 2023.
- [26] A. N. Hegde, S. G. Smith, L. M. Duke, A. Pourquoi and S. Vaz, "Perturbations of Ubiquitin-Proteasome-Mediated Proteolysis in Aging and Alzheimer's Disease," Front. Aging Neurosci., 2019.
- [27] C. Moh, J. Z. Kubiak, V. P. Bajic, X. Zhu, M. A. Smith and a. H.-g. Lee, "Cell Cycle Deregulation in the Neurons of Alzheimer's Disease," NCBI, 2018 .
- [28] A. K. Raina, X. Zhu, C. A. Rottkamp, M. Monteiro, A. Takeda and M. A. Smith, "Cyclin' toward dementia: cell cycle abnormalities and abortive oncogenesis in Alzheimer disease," NCBI, 2000 .
- [29] X.-W. Zhang, X.-X. Zhu, D.-S. Tang and J.-H. Lu, "Targeting autophagy in Alzheimer's disease: Animal models and mechanisms," 2023 .
- [30] A. I. Plácido, C. M. F. Pereira, A. I. Duarte, E. Candeias, S. C. Correia, R. X. Santos, C. Carvalho, S. Cardoso, C. R. Oliveira and P. I. Moreira, "The role of endoplasmic reticulum in amyloid precursor protein processing and trafficking: implications for Alzheimer's disease," NCBI, 2014 .

- [31] X.-F. Chen, Y.-w. Zhang, H. Xu and G. Bu, "Transcriptional regulation and its misregulation in Alzheimer's disease," 2013 .
- [32] A. F. Schinder and M. Poo, "The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity," NCBI, 2000.
- [33] S. D. & H. Zheng, "Role of FoxO transcription factors in aging and age-related metabolic and neurodegenerative diseases," Cell & Bioscience, 2021.
- [34] S. Davoody, A. A. Taei, P. Khodabakhsh and L. Dargahi, "mTOR signaling and Alzheimer's disease: What we know and where we are?," CNS Neuroscience & Therapeutics, 2023.
- [35] "MSigDB," GSEA, [Online]. Available: <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/index.jsp>.
- [36] Y. X. X.-Y. M. a. J.-S. K. Pei-Pei Liu, "History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease," 23 Aug 2019. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6799833/>.
- [37] "National Center for Biotechnology Information," [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς την κ. Χατζηγεωργίου Άρτεμις, για τη βοήθειά της στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους υποψήφιους Διδάκτορες της, Αλεξίου Αθανάσιος, Καραβαγγέλη Άννα, Μηλιώτης Μάριος, Τάσσογλου Σπύρος, για την πολύτιμη καθοδήγηση και υποστήριξη τους, καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ

**Ανάλυση της έκφρασης των miRNAs και των αντίστοιχων στόχων
τους στο Alzheimer.**

Διολέττα Ελπίδα

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 επεξεργάσθηκαν, 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: 21/06/2024

Η Δηλ.

Διολέττα Ελπίδα

(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.

**Ανάλυση της έκφρασης των miRNAs και των αντίστοιχων στόχων
τους στο Alzheimer.**

Διολέττα Ελπίδα

Τριμελής Επιτροπή:

Χατζηγεωργίου Άρτεμις, Βαθμίδα Α (επιβλέπων/σα)

Μπάγκος Παντελής, Βαθμίδα Α

Μπράλιου Γεωργία, Επίκουρος Καθηγήτρια