



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ microRNA ΣΤΗΝ ΑΙΤΙΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ
ΑΝΕΥΡΥΣΜΑΤΟΣ ΚΟΙΛΙΑΚΗΣ ΑΟΡΤΗΣ»

ΑΕΡΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΑΠΟΦΟΙΤΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΟΥ
ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΡΑΚΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ ,2014

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Α. ΤΣΕΖΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ (**Επιβλέπουσα**)

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΑΛΙΖΟΣ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΓΚΡΕΤΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Γ' ΕΚΕΤΑ

Νιώθω την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην Καθηγήτρια κα. Τσέζου Ασπασία, υπεύθυνη του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Γενετική του Ανθρώπου» και επιβλέπουσα της διπλωματικής μου, για την ουσιαστική και λεπτομερή επιμέλεια της παρούσας εργασίας και την βοήθεια που έλαβα από μέρους της για να μπορέσω να την ολοκληρώσω. Η κυρία Τσέζου μου παρείχε πλούσιο υλικό για την εκτενή μελέτη του θέματος που μου ανατέθηκε καθώς και κατευθυντήριες γραμμές που ενέπνευσαν τη διπλωματική μου εργασία ενώ η συμβολή της στην παρουσίαση της εργασίας μου στην τριμελή επιτροπή, υπήρξε καθοριστική.

Επίσης, να ευχαριστήσω πολύ την υποψήφια Διδάκτορα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Εύη Μουρμούρα, για την εξίσου πολύτιμη βοήθεια και στήριξη που μου παρείχε στην κατανόηση του θέματος της παρούσας βιβλιογραφικής ανασκόπησης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και όσους συμμετείχαν με το δικό τους τρόπο στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας που φέρει τον τίτλο: «Ο ρόλος των microRNAs στην αιτιοπαθογένεια του Ανευρύσματος Κοιλιακής Αορτής».

Αέρης Κωνσταντίνος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|--------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | σελ.6 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | σελ.7 |
| ΜΕΡΟΣ Α' | σελ.8 |
| 1η Ενότητα: <u>Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής</u> | σελ.8 |
| 1.1: Παράγοντες κινδύνου που προδιαθέτουν για εμφάνιση Ανευρύσματος Κοιλιακής Αορτής | σελ.9 |
| 1.2: Παθογένεια της διαταραχής | σελ.10 |
| 1.3: Πρωτεόλυση της Εξωκυττάριας Ουσίας..... | σελ.10 |
| 1.4: Φλεγμονώδης απόκριση | σελ.12 |
| 1.5: Μοριακή σηματοδότηση στο Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής | σελ.13 |
| 2η Ενότητα: <u>Πολυπαραγοντική φύση του Ανευρύσματος Κοιλιακής Αορτής - Γενετικές Μελέτες</u> | σελ.14 |
| 2.1: Συσχέτιση γονιδίων με το ΑΚΑ..... | σελ.14 |
| 2.2: Μελέτες Έκφρασης..... | σελ.16 |
| ΜΕΡΟΣ Β' | σελ.18 |
| 1η Ενότητα: <u>Τα microRNA</u> | σελ.18 |
| 1.1: Βιογένεση των microRNA | σελ.19 |
| 1.2: Διαφορική έκφραση των microRNA..... | σελ.21 |
| 1.3: Μηχανισμός Δράσης - Σύμπλοκο αποσιώπησης επαγόμενο από RNA..... | σελ.22 |
| 1.4: Οι λειτουργίες των microRNAs | σελ.23 |
| 1.5: Η συμμετοχή των microRNA στις ασθένειες | σελ.24 |
| ΜΕΡΟΣ Γ' | σελ.26 |
| 1η Ενότητα: <u>microRNA-επαγόμενη γονιδιακή ρύθμιση στο Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής</u> | σελ.26 |
| 1.1: miR-21 | σελ.26 |
| 1.2: miR-26a | σελ.32 |
| 1.3: miR-29b | σελ.36 |
| 1.4: miR-133a/b και miR-204..... | σελ.45 |
| 1.5: miR-516a-5p και miR-1260..... | σελ.49 |

| | |
|---------------------------|--------|
| 1.6: miR-205 | σελ.53 |
| ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | σελ.54 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | σελ.57 |

Ευρετήριο Πινάκων/Εικόνων

| | |
|---|--------|
| Πίνακας 1. Υποψήφια γονίδια για το Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής που ερευνήθηκαν μέσω αλληλούχησης του DNA | σελ.14 |
| Πίνακας 2. Γενετικοί τόποι Ανευρύσματος Κοιλιακής Αορτής που ανακαλύφθηκαν μέσω GWAS | σελ.15 |
| Πίνακας 3. Γονίδια διαφορετικά εκφραζόμενα σε αορτές ποντικών με Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής | σελ.16 |
| Πίνακας 4. Προφίλ έκφρασης microRNA στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής μέσω ανάλυσης μικροσυστοιχιών..... | σελ.50 |
| Πίνακας 5. Γονίδια που σχετίζονται με την αορτή και βρέθηκαν ως πιθανοί στόχοι του miR-516a-5p..... | σελ.51 |
| Πίνακας 6. Γονίδια που σχετίζονται με την αορτή και βρέθηκαν ως πιθανοί στόχοι του miR-1260..... | σελ.52 |
| Εικόνα 1. Επιδράσεις της νικοτίνης και των ρυθμιστικών μορίων του miR-21 στο ΑΚΑ ποντικών..... | σελ.28 |
| Εικόνα 2. Επίπεδα έκφρασης PTEN, φωσφορυλιωμένης AKT και μη φωσφορυλιωμένης AKT..... | σελ.29 |
| Εικόνα 3. Υπερέκφραση του miR-21 και υποέκφραση του <i>PTEN</i> σε ανθρώπινο ιστό ανευρύσματος κοιλιακής αορτής προερχόμενο από ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική αποκατάσταση σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου από δωρητές οργάνων..... | σελ.31 |
| Εικόνα 4. Πιθανοί στόχοι του miR-26a..... | σελ.33 |
| Εικόνα 5. Ανθρώπινα αορτικά λεία μυϊκά κύτταρα που δεν εκφράζουν miR-26a παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση των SMAD-1 και SMAD-4, ενώ η υπερέκφραση του miR-26a οδηγεί σε μείωση των επιπέδων έκφρασης της SMAD-1 | σελ.34 |
| Εικόνα 6. Το miR-26a είναι υποεκφρασμένο στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής | σελ.35 |
| Εικόνα 7. Προφίλ έκφρασης microRNA σε αορτικό ιστό | σελ.37 |
| Εικόνα 8. Η αναστολή των miR-29 επάγει την έκφραση των γονιδίων της εξωκυττάριας ουσίας και εμποδίζει την επαγόμενη από την αγγειοτενσίνη II, διαστολή της αορτής | σελ.39 |
| Εικόνα 9. Επίπεδα έκφρασης των <i>Mmp2</i> , <i>Mmp9</i> σε ποντίκια επαγόμενου ανευρύσματος μέσω διάχυσης ελαστάσης με ρύθμιση του miR-29b από τα anti-29 και pre-29 | σελ.42 |
| Εικόνα 10. Οι επιδράσεις του anti-29b και του pre-29b σε ποντίκια επαγόμενου ανευρύσματος μέσω διάχυσης ελαστάσης | σελ.43 |
| Εικόνα 11. Επικύρωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης μικροσυστοιχιών μέσω qRT-PCR πραγματικού χρόνου | σελ.46 |
| Εικόνα 12. Το γονιδιακό δίκτυο των miR-133a, miR-133b, miR-331-3p και miR-204 με τα προβλεπόμενα γονίδια-στόχους τους | σελ.47 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ανάμεσα στους παθολογικούς φαινότυπους του ιστού της αορτής, ο διαχωρισμός και το ανεύρυσμα αποτελούν παθήσεις που χαρακτηρίζουν τόσο γενετικά σύνδρομα αλλά και «σιωπηλές» ασθένειες με μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας όπως είναι το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής και ανευρύσματα του θώρακα καθώς και ενδοκρανιακά.

Στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής, η παροδική αύξηση της διαμέτρου της αορτής λόγω αποικοδόμησης δομικών συστατικών του αορτικού τοιχώματος όπως η ελαστίνη και το κολλαγόνο μέσω πρωτεόλυσης της εξωκυττάριας ουσίας, η απόπτωση κυτταρικών πληθυσμών όπως των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων και η επαγόμενη φλεγμονή του ιστού λόγω της εισβολής κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, οδηγούν στην αποδυνάμωση και διαστολή του σημείου της αορτής όπου αναπτύσσεται το ανεύρυσμα. Η πιθανή ρήξη των ανευρυσμάτων αποτελεί αναπόφευκτη έκβαση των ανωτέρω διαδικασιών, η οποία συνοδεύεται από υψηλό ποσοστό θανάτων.

Στην παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση, διερευνώνται οι μηχανισμοί της παθοφυσιολογίας του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής, παρουσιάζονται οι γενετικές μελέτες που συσχετίζουν γονίδια και πολυμορφισμούς με την ασθένεια και οι πειραματικές μελέτες που έχουν γίνει βασιζόμενες σε ζωικά μοντέλα επαγόμενου ανευρύσματος καθώς και φαρμακευτικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής. Στο δεύτερο μέρος, αναφέρεται η επιγενετική ρύθμιση μέσω μικρών μη κωδικών μορίων RNA, των microRNA, τα οποία έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων τα τελευταία χρόνια, λόγω της γονιδιακής αποσιώπησης που επάγουν καθώς και του πολύπλοκου γονιδιακού δικτύου αλληλεπίδρασης που τα χαρακτηρίζει.

Στο τρίτο μέρος, παρουσιάζεται ο ρόλος των microRNA στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής. Παρατίθενται οι σχετικές δημοσιευμένες εργασίες πάνω σε αυτόν τον τομέα ενώ προτείνονται και θεραπευτικές στρατηγικές για την χρήση τους στην κλινική διάγνωση και αντιμετώπιση του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αορτή είναι το αγγείο που είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά του αίματος από την καρδιά στη συστηματική κυκλοφορία και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ελαστικότητα και σταθερότητα οι οποίες βοηθούν στο να αντέξει τις μεγάλες πιέσεις που αναπτύσσει η διέλευση του αίματος στην πορεία του προς τα υπόλοιπα όργανα του οργανισμού. (Westerhof et. al, 2005) Ιστολογικά, το αορτικό τείχος συντίθεται από τρεις στοιβάδες: Τον έσω χιτώνα (intima) ο οποίος περιλαμβάνει μια στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων και περιβάλλει τον αυλό, τον μέσο/μεσαίο χιτώνα (media) που περιλαμβάνει αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα τα οποία περικλείονται σε εξωκυττάρια ουσία από ελαστικές ίνες δημιουργημένες από την ελασίνη και σχετιζόμενων με εκείνη πρωτεϊνών και τον έξω χιτώνα (adventitia) που περιέχει κυρίως ινοβλάστες και κολλαγόνο. (Sakalihan et. al, 2005)

Ανεύρυσμα χαρακτηρίζεται η διαστολή της διαμέτρου και γενικότερη αύξηση κάποιων αρτηριών, που οδηγεί σε φαινοτυπικές αλλαγές και προοδευτικές ανεπάρκειες ακόμα και της αορτής. Οι πιο κοινές μορφές ανευρύσματος είναι στην κοιλιακή αορτή ενώ αρκετά συχνά εμφανίζονται και τα θωρακικά και ενδοκρανιακά ανευρύσματα. (Svensson et. al, 1997)

Οι πιο συχνές γενετικές διαταραχές που συνδέονται με σχηματισμό ανευρύσματος και οξεία αορτικά σύνδρομα όπως ο αορτικός διαχωρισμός, είναι το σύνδρομο Marfan, το σύνδρομο Ehlers-Danlos, το σύνδρομο Loeys-Dietz καθώς και η διάταση αορτικού δακτυλίου καθώς και ο οικογενής αορτικός διαχωρισμός. (Steinmann et. al, 1993 , Nienaber et. al, 2003 , Loeys et. al, 2006)

ΜΕΡΟΣ Α΄

Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής

Το Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής (ΑΚΑ) είναι μια εκφυλιστική νόσος της κοιλιακής αορτής η οποία χαρακτηρίζεται από προοδευτική διαστολή και τελικά ρήξη της, η οποία σχετίζεται με ποσοστό θνησιμότητας 90%. (Van der Vliet & Boll, 1997). Το ΑΚΑ αποτελεί το 14^ο αίτιο θανάτου με αναφορά 15.000 θανάτων ετησίως στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Gillum, 1995) και 5.000 θανάτων ετησίως σε Αγγλία και Ουαλία, (Office for National Statistics, 2006) είναι μη αντιστρεπτή πάθηση και η εμφάνιση του ανευρύσματος εντοπίζεται συχνότερα κάτω από τις νεφρικές αρτηρίες. (Lillvis et. al, 2011) Η μη επεμβατική και ακριβής ανίχνευση του ΑΚΑ επιτυγχάνεται μέσω κοιλιακού υπέρηχου και αποτελεί μέχρι και σήμερα μια υψηλά προτιμώμενη μέθοδο διάγνωσης. (Lederle, 2009)

Ως ανεύρυσμα ορίζεται η εντοπισμένη αύξηση της διαμέτρου ενός αγγείου κατά 50% σε σύγκριση με τη φυσιολογική διάμετρο αυτού. Τα ΑΚΑ είναι ο συχνότερος τύπος αρτηριακού ανευρύσματος και στην κλινική πράξη χρησιμοποιείται ως πρακτικότερος ορισμός, η διάμετρος της κοιλιακής αορτής κάτωθι των νεφρών να είναι μεγαλύτερη των 3cm. (Moll et. al, 2011)

Η πιο διαδεδομένη αντιμετώπιση που εφαρμόζεται για τα ΑΚΑ είναι η χειρουργική προσέγγιση. Συνήθως χρησιμοποιείται η ενδοαγγειακή επιδιόρθωση (EVAR) (Parodi et. al, 1991), στην οποία προστίθεται λεπτό συνθετικό μόσχευμα ενώ περιπτώσεις μεγάλων ανευρυσμάτων υπόκεινται σε ανοιχτή χειρουργική αποκατάσταση όταν η διάμετρος της αορτής ξεπερνά τα 5.5cm καθώς σε αυτές τι περιπτώσεις η πιθανότητα ρήξης του αγγίζει το 20%. (United Kingdom Small Aneurysm Trial Participants, 1998 , Henebiens et. al, 2008)

Όσο αφορά στη φαρμακευτική αντιμετώπιση της νόσου, αυτή περιλαμβάνει κυρίως τη χορήγηση δοξυκυκλίνης, ανταγωνιστές του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης καθώς και αντιφλεγμονωδών φαρμάκων. Στόχος της φαρμακευτικής θεραπευτικής προσέγγισης είναι η καταστολή της δράσης μορίων-κλειδί στην παθογένεια της νόσου με σκοπό τη διατήρηση της

διαμέτρου της αορτής σε σταθερό μέγεθος. (Petrinec et. al, 1996 , Baxter et. al, 2002 , King et. al, 2006 , Iida et. al, 2012)

Παράγοντες κινδύνου που προδιαθέτουν για εμφάνιση Ανευρύσματος Κοιλιακής Αορτής

Το ΑΚΑ εμφανίζεται συχνότερα στους άντρες και ειδικότερα μεγάλης ηλικίας, παρά στις γυναίκες. Άντρες άνω των 60 έχουν υψηλό ρίσκο εμφάνισης ανευρύσματος 5% έως 8%, ενώ για τις γυναίκες το ποσοστό φτάνει το 1% με 2%. (Pleumeekers et. al, 1995 , Sakalihan et. al, 2005)

Εκτός της ηλικίας και του φύλου, ανάμεσα στους παράγοντες κινδύνου συγκαταλέγεται και το κάπνισμα καθώς φαίνεται να εμπλέκεται στην παθογένεια του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής για παράδειγμα με την επαγωγή iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) (Sadamas et. al, 2003), ή λόγω της ικανότητας της οξειδωσης της α1-αντιθρυψίνης. Το κάπνισμα αυξάνει όχι μόνο την πιθανότητα δημιουργίας του ανευρύσματος, αλλά και της ταχείας ανάπτυξής του, αυξάνοντας έτσι το ρίσκο ρήξης. (United Kingdom Small Aneurysm Trial Participants, 2000 , Brady et. al, 2004)

Η αθηρομάτωση και η υπέρταση, είναι χρόνιες αγγειοπάθειες οι οποίες είναι τις περισσότερες φορές παρούσες σε ασθενείς με ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής, χωρίς όμως οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που ίσως εξηγούν την πιθανολογούμενη αλληλεπίδραση όλων αυτών των παθολογικών καταστάσεων, να έχουν διασαφηνιστεί. Σίγουρα όμως «προετοιμάζουν» τον ιστό για την πιθανή ανάπτυξη του ανευρύσματος όπως για παράδειγμα μέσω του υπερλιπιδαιμικού περιβάλλοντος που εγκαθιστά η αθηροσκλήρωση στα αγγεία. (Lederle et. al, 2000)

Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι υπάρχει γενετική προδιάθεση στην εμφάνιση της νόσου καθώς εκτιμάται ότι ένα ποσοστό ασθενών (15-20%) παρουσιάζει οικογενειακό ιστορικό ανευρύσματος. (Alcorn et. al, 1996 , Wahlgren et. al, 2010) Η συμβολή των γενετικών παραγόντων στην αιτιολογία του ΑΚΑ περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1977 όπου τρία αδέρφια ανέπτυξαν ανευρύσματα. Πλέον το

οικογενειακό ιστορικό αποτελεί αποδεδειγμένο παράγοντα κινδύνου της νόσου δεδομένου ότι οι συγγενείς πρώτου βαθμού εμφανίζουν κίνδυνο ανάπτυξης ΑΚΑ 8 φορές από ότι στο γενικό πληθυσμό. (Golledge et. al, 2009) ενώ σύμφωνα με μελέτες διδύμων εκτιμάται ότι η πιθανότητα κληρονομησης επέρχεται στο 70%. (Wahlgren et. al, 2010)

Παθογένεια της διαταραχής

Η παθογένεια του ανευρύσματος είναι πολύπλοκη και πολυπαραγοντική. Σύμφωνα με μελέτες φαίνεται ότι στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό του ΑΚΑ ενέχεται η χρόνια φλεγμονή που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση στο αορτικό τοίχωμα φλεγμονωδών κυττάρων τα οποία εκκρίνουν κυτοκίνες όπως ιντερλευκίνες (IL-1β, IL-4, IL-5, IL-10) και αυξητικούς παράγοντες (TNF-α). Σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου διαδραματίζει και η αποδόμηση του αορτικού τοιχώματος λόγω ενεργοποίησης των πρωτεολυτικών μηχανισμών και δράσης αποικοδομητικών ενζύμων όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες και οι ελαστάσες. (Shimizu et. al, 2004)

Αποτέλεσμα των ανωτέρω είναι αφενός η αποικοδόμηση του κολλαγόνου και της ελαστίνης που ευθύνονται για την ελαστικότητα και δυναμική του αορτικού τοιχώματος (Hellenthal et. al, 2008) και αφετέρου η απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων της μεσαίας στοιβάδας της αορτής. (Curci et. al, 2009) Συνέπεια των παραπάνω είναι η τοπική λέπτυνση και εξασθένηση της αορτής, η οποία με τη ροή του αίματος αυτή διευρύνεται και δημιουργείται το ανεύρυσμα.

Πρωτεόλυση της Εξωκυττάριας Μάζας

Ιστολογικά το ΑΚΑ χαρακτηρίζεται από πρωτεολυτική διάσπαση του αορτικού τοιχώματος που χαρακτηρίζεται από αποδόμηση του κολλαγόνου και της ελαστίνης κυρίως στον εσωτερικό και εξωτερικό χιτώνα της αορτής. Επιστημονικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι παρατηρείται αυξημένη έκφραση

αποικοδομητικών ενζύμων όπως οι μεταλλοπρωτεϊνασών (Matrix Metalloproteinases, MMPs), καθεψινών και διάφορων σερινοπρωτεασών.

Οι MMPs ανήκουν σε μια οικογένεια ενδοπεπτιδασών που περιέχουν μια προπεπτιδική και μια καταλυτική περιοχή. Αρχικά, οι MMPs εντοπίζονται σε πρόδρομες μορφές ενώ η απομάκρυνση ενός συντηρημένου καταλοίπου κυστεΐνης από την καταλυτική τους περιοχή συντελεί στην τελική τους ενεργοποίηση. (Miller et. al, 2002) Η φυσιολογική τους λειτουργία στον οργανισμό έγκειται στην ισορροπημένη δράση μεταξύ των MMPs και των φυσικών αναστολέων τους, των TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases). (Papadaki et. al, 1998 , Nelson & Melendez, 2004) Έρευνες που αφορούν στην παθογένεια της νόσου έχουν συσχετίσει την αποδόμηση πρωτεϊνών του συνδετικού ιστού και της θεμέλιας ουσίας, τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά ευρήματα αορτής με ΑΚΑ, με την αυξημένη δραστηριότητα των MMPs, Συγκεκριμένα μελέτες έκφρασης σε ανθρώπινο ιστό, ανέδειξαν αυξημένη έκφραση στο ΑΚΑ κυρίως της ελαστάσης MMP12 και των κολλαγενασών MMP1, MMP2, MMP8, MMP9 και MMP13.(Irizarry et. al, 1993 , Curci et. al, 1998 , Petersen et. al, 2000)

Η συμβολή τους στην παθογένεια της νόσου ενισχύεται με μελέτες σε πειραματικά μοντέλα ανευρύσματος τα οποία δεν ανέπτυξαν ΑΚΑ όταν σε αυτά πραγματοποιήθηκε knock out του γονιδίου της MMP9. (Longo et. al, 2002) Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο οι MMPs συμβάλλουν στην έναρξη και εξέλιξη της νόσου παραμένει άγνωστος.

Επιπρόσθετα, μελέτες υποστηρίζουν ότι στο ΑΚΑ η αποικοδόμηση του αορτικού τοιχώματος σχετίζεται με αυξημένη δράση των πρωτεασών κυστεΐνης όπως οι καθεψίνες και σερινοπρωτεασών. Ομοίως με τη λειτουργία των MMPs, η φυσιολογική δράση των καθεψινών αφορά στην ισορροπία τους με τους αναστολείς τους. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα της συστατίνης C (Cystatin C), βασικού ενδογενή αναστολέα των καθεψινών, είναι μειωμένα σε ασθενείς με ΑΚΑ. (Liu et. al, 2004 , Sukhova et. al, 2006)

Επιπλέον η πρωτεολυτική δράση της πλασμίνης, η οποία ανήκει στην οικογένεια των σερινοπρωτεασών –ενζύμων που ενέχονται στην πήξη του

αίματος- έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη ΑΚΑ καθώς συμβάλλει στην αποδόμηση μορίων της εξωκυττάριας ουσίας του αορτικού τοιχώματος και την ενεργοποίηση των MMPs. (Murphy et. al, 1992)

Φλεγμονώδης απόκριση

Επιπλέον χαρακτηριστικό του ΑΚΑ αποτελεί η κατάσταση χρόνιας φλεγμονής που παρατηρείται στο αορτικό τοίχωμα. Η συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων όπως μακροφάγων, ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων, κυρίως στον έξω χιτώνα της αορτής αλλά και πολλές φορές στους παρακείμενους ιστούς, επιφέρει την έκκριση των προαναφερθέντων πρωτεασών καθώς επίσης και πολλών κυτοκινών. (Ernst et. al, 1993) Τα φλεγμονώδη αυτά μόρια, παρουσιάζονται αυξημένα στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής και δρουν πολυεπίπεδα για την ρύθμιση του μεταβολισμού της εξωκυττάριας ουσίας των μεσεγχυματικών κυττάρων, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, την ενεργοποίηση λεμφοκυττάρων, την έκφραση των μορίων μείζονος ιστοσυμβατότητας τάξεως II (MHC class II), την έκφραση μορίων αγγειακής προσκόλλησης και την έκφραση πρωτεασών της εξωκυττάριας ουσίας από τα περιβάλλοντα κύτταρα. (Wills et. al, 1996)

Αναστολή της δράσης των ανοσολογικών κυττάρων αποτελεί θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση του ανευρύσματος. Φάρμακα όπως η κυκλοσπορίνη μειώνουν το μέγεθος του ανευρύσματος σε πειραματικά μοντέλα ζώων, (Dobrin et. al, 1996) ενώ μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα έχουν συνδεθεί με την μείωση του ρυθμού αύξησης τους ανευρύσματος στον άνθρωπο. (Walton et. al, 1999 , Vammen et. al, 2001)

Παρόλο που δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο αν η φλεγμονή προηγείται της πρωτεόλυσης της εξωκυττάριας ουσίας, ακολουθεί ή εμφανίζεται σε ταυτόχρονο χρόνο, το σίγουρο είναι πως οι δύο αυτές καταστάσεις επιφέρουν συνεργατικά, την αποδυνάμωση του αορτικού τοιχώματος την διαστολή και τελικά την ρήξη του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής μέσω πολυάριθμων μοριακών επιδράσεων.

Μοριακή σηματοδότηση στο Ανεύρησμα Κοιλιακής Αορτής

Όσο αφορά τη γονιδιακή διερεύνηση του ανευρύσματος, λίγα είναι τα δεδομένα για τους μοριακούς μηχανισμούς που ενέχονται στο σχηματισμό του, καθώς οι περισσότερες έρευνες εστιάζονται σε γονίδια που συμβάλλουν στην ανάπτυξη και ρήξη του. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια αλλά και σε ανθρώπινο ιστό επιβεβαιώνουν τη συμβολή του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS) στο σχηματισμό ανευρύσματος επηρεάζοντας στην έκφραση διαφόρων γονιδίων. (Lu et. al, 2012)

Επιπλέον μελέτες έκφρασης αναφέρουν ότι στην ανάπτυξη του ανευρύσματος συμβάλλουν παράγοντες όπως ο αυξητικός παράγοντας TGF-β καθώς η δράση μορίων που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά του μονοπάτια καθώς και μεταλλάξεις στα μόρια αυτά έχουν συσχετιστεί με την παθοφυσιολογία των ανευρυσμάτων. (Bobik, 2006) Επίσης μελέτες σε μοντέλα ζώων με ΑΚΑ έχουν αναφέρει αυξημένα επίπεδα mRNA του TGF-β και συσχετιζόμενων γονιδίων μετά από επαγωγή με έγχυση αγγειοτενσίνης II. (Liu et. al, 1997 , Spin et. al, 2011 , Subramanian et. al, 2012) Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ανευρύσματος διαδραματίζουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν οι MAPK κινάσες (ERK-1/2, JNK, ERK5, p38) οι οποίες αφενός είναι σημαντικοί ρυθμιστές της δράσης των MMPs, όπως η φωσφορυλιωμένη JNK κινάση που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της MMP9 (Chakraborti et. al, 2003) και αφετέρου ενέχονται στην στρατολόγηση ουδετερόφιλων κυττάρων και την απελευθέρωση κυτταροκινών σε φλεγμονώδεις περιοχές όπως η ERK κινάση. (Yu et. al, 2007)

Συγκεκριμένα μελέτη σε ζωικό μοντέλο ανευρύσματος έδειξε ότι απώλεια της ERK-1 κατέστειλε τον σχηματισμό του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής ενώ παράλληλα είχε ως αποτέλεσμα, μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα των MMP2 και MMP9. Σε ανθρώπινα δείγματα ανευρύσματος κοιλιακής αορτής, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων MEK και ERK σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου γεγονός που τα καθιστά πιθανό θεραπευτικό στόχο. (Ghosh et. al, 2012)

Πολυπαραγοντική φύση του Ανευρύσματος Κοιλιακής Αορτής – Γενετικές Μελέτες

Συσχέτιση γονιδίων με το ΑΚΑ

Μελέτες συσχέτισης και ανάλυσης σύνδεσης αναδεικνύουν τη γενετική συνιστώσα της νόσου. Στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία αναφέρονται περίπου 100 μελέτες συσχέτισης (Genetic Association Studies) χρησιμοποιώντας μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς ή SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) που αφορούν το ΑΚΑ. (Hinterseher et. al, 2011) Δεδομένου ότι η αποικοδόμηση του αορτικού τοιχώματος και η φλεγμονή συντελούν στη δημιουργία του ανευρύσματος, οι περισσότερες μελέτες επικεντρώθηκαν σε γονίδια που ενέχονται στους ανωτέρω μηχανισμούς.

Συγκεκριμένα, μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός στο γονίδιο της ελαστίνης ELN (nt 422 G>A) συσχετίστηκε με υπο-ομάδα με θετικό οικογενειακό ιστορικό, ως προς την πάθηση αυτή, (Massart et. al, 2004 , Ogata et. al, 2005) ενώ επίσης πολυμορφισμός του γονιδίου της Cystatin C, *CST3*, συνδέθηκε με πιο αργό ρυθμό ανάπτυξης του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής. (Eriksson et. al, 2004)

| Gene | Sequence variant | Number of AAA patients/controls | |
|---------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| | | with mutations | without mutations |
| <i>COL3A1</i> | G619R | 1 Family ¹⁵ | |
| | G136R, T501P | 1 Family ¹⁶ | 49 Families ¹⁶ |
| | 607 C>T | 1 ¹³ | 39/29 ¹³ |
| | G+1 IVS20 | 1 Family ¹⁴ | |
| <i>FBLN2</i> | 1203 G>A, 1295 C>T, 500/502 G>A, 1115 G>A, 1150 A>G, 1229 A>C, 1278 A>G, 1779 C>T, 2574 G>A, 2629 G>A, 2754 C>T, 3408 G>A, 3540 T>C | | 11/2 ²⁸ |
| <i>MMP2</i> | IVS1+31 C>G, IVS7-18 G>A, IVS10+26 C>T, 124 G>A, 1368 C>T, 1860 C>T, -1586 C>T, -1070 T>G, -61 G>C, 228 G>A, 678 G>C, 750 C>T, IVS512 C>T, C1149 C>T, 1380 G>A, rs243834, rs11541998, rs10775332 | | 51/48 ³² |
| <i>TIMP1</i> | 434 C>T | 6/0 ³⁶ | 64/29 (only males) ³⁷ |
| | | 20/22 (only females) ³⁷ | |
| | rs4898 | 50/44 ³⁸ | 96/89 ³⁸ |
| | rs1043428, 328+16 C>T | | 50/44 ³⁸ |
| | 323 C>T | | 84/51 ³⁷ |
| <i>TIMP2</i> | 573 G>A | 64/29 (only males) ³⁷ | 20/22 (only females) ³⁷ |
| | 306 C>T | | 84/51 ³⁷ |
| | -621 C>T, -596 A>C, rs8179096, -261 G>A, 231+23 C>T, rs2277698 | | 50/41 ⁴¹ |
| <i>CETP</i> | 4 microsatellite loci | | 82/79 ⁴² |
| | Exon 9 nt 170 A>T, Intron 12 nt 312 C>T, Exon 14 nt 16 G>A, Intron 15 nt 151 G>A | | 85/34 ⁴³ |

Υποψήφια γονίδια για το Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής που ερευνήθηκαν μέσω αλληλούχισης του DNA. (Hinterseher et. al, 2011)

Επιπλέον έρευνες συσχέτισαν την ανάπτυξη ανευρύσματος με πολυμορφισμούς σε γονίδια του καρδιαγγειακού συστήματος, (Giusti et. al, 2008) σε γονίδια των χυμοκινών όπως το γονίδιο *CCR5* (Chemokine [C-C motif] Receptor 5) που εκφράζεται στα μακροφάγα, Τ-λεμφοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα της στεφανιαίας αρτηρίας (Schechter et. al, 2000 , Ghilardi et. al, 2004) καθώς επίσης και με πολυμορφισμούς σε γονίδια αυξητικών παραγόντων όπως ο αυξητικός παράγοντας TGF- β (Baas et. al, 2009 , Thompson et. al, 2010) και τέλος σε γονίδια που ενέχονται στο σύστημα ανθρωπίνων λευκοκυτταρικών αντιγόνων (HLA system). (Ogata et. al, 2006) Η ανάδειξη προσδιαθεσικών γονιδίων για το ΑΚΑ βασίζεται επίσης σε μελέτες ανάλυσης σύνδεσης (family-based DNA linkage analysis) οι οποίες αναφέρουν συσχέτιση του ΑΚΑ με δύο γενετικοί τόποι: 19q13 (AAA1 - OMIM) και η 4q31 (AAA2 - OMIM) με την πρώτη να θεωρείται πιο σημαντική. (Shibamura et. al, 2004)

Η γενετική συνιστώσα του ΑΚΑ ενισχύεται και με μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS, Genome-Wide Association Studies) οι οποίες αναδεικνύουν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ πολυμορφισμών στον γενετικό τόπο 9p33, όπου και εντοπίζεται το γονίδιο *DA2BIP* που κωδικοποιεί μια GTP-άση, αναστολέα της κυτταρικής αύξησης και επιβίωσης. (Gretarsdottir et. al, 2010) Επίσης μελέτες έχουν συσχετίσει πολυμορφισμούς του γονιδίου *CDKN2BAS* (ή *ANRIL*) που εντοπίζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 9p21 και κωδικοποιεί ένα antisense-RNA, ρυθμιστή της έκφρασης αναστολέων των cdk κινασών, των *CDKN2A* και *CDKN2B*. (Helgadottir et. al, 2008)

TABLE 2: AAA genetic loci discovered using genome-wide association studies.

| Chromosomal location (study) | Nearest gene (gene symbol; gene ID) | Polymorphism | RAF | OR [95% CI] | Association <i>P</i> value ^a |
|------------------------------|--|--------------|------|------------------|---|
| 3p12.3 [42] | Contactin-3 (<i>CNTN3</i> ; 5067) | rs7635818 | 0.42 | 1.33 [1.10–1.21] | 0.0028 |
| 9p21.3 [44] | <i>CDKN2B</i> antisense RNA 1 (<i>CDKN2BAS1</i> ; 100048912) | rs10757278 | 0.45 | 1.31 [1.22–1.42] | 1.2×10^{-12} |
| 9q33.1 [43] | DAB2 interacting protein (<i>DAB2IP</i> ; 153090) | rs7025486 | 0.25 | 1.21 [1.14–1.28] | 4.6×10^{-10} |
| 12q13.3 [45] | Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (<i>LRP1</i> ; 4035) | rs1466535 | 0.68 | 1.15 [1.10–1.21] | 4.5×10^{-10} |
| 19p13.2 [41] | Low density lipoprotein receptor (<i>LDLR</i> ; 3949) | rs6511720 | 0.88 | 0.76 [0.70–0.83] | 2.1×10^{-10} |

Γενετικοί τόποι Ανευρύσματος Κοιλιακής Αορτής που ανακαλύφθηκαν μέσω GWAS. (Kuivaniemi et. al, 2013)

Μελέτες έκφρασης

Επιπλέον μελέτες έκφρασης ανέδειξαν διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης διαφόρων γονιδίων μεταξύ φυσιολογικού και ανευρυσματικού ιστού με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (microarray-based mRNA expression profile). Δύο τέτοιες μελέτες καταδεικνύουν μεταξύ άλλων και καινούργια γονίδια: *ADCY7*, *ARL5C*, *BLNK*, *FOSB*, *GATM*, *LYZ*, *MFGE8*, *PRUNE2*, *PTPRC*, *SMTN*, *TMOD1* και *TPM2*, με λόγο πιθανοτήτων 8,9 για την αλληλεπικάλυψη. [OR=8,6 (95% CI: 5.6-14.3) , $p < 2,2 \times 10^{-16}$]. (Lenk et. al, 2007)

| Gene symbol | Gene ID | Description; synonym | Fold increase cf no AAA | P value | Fold increase cf saline | P value |
|--------------------------------|---------|-----------------------------|-------------------------|----------|-------------------------|----------|
| MMPs | | | | | | |
| <i>Mmp2†</i> | 17390 | matrix metalloproteinase 2 | 2.513 | 0.000969 | 3.123 | 0.000609 |
| <i>Mmp12</i> | 17381 | matrix metalloproteinase 12 | 2.172 | 0.0232 | 7.993 | 0.00031 |
| <i>Mmp13</i> | 17386 | matrix metalloproteinase 13 | 6.428 | 0.02 | 13.62 | 0.00657 |
| <i>Mmp14</i> | 17387 | matrix metalloproteinase 14 | 2.345 | 0.00432 | 3.99 | 0.000764 |
| Cytokines and receptors | | | | | | |
| <i>Il6†</i> | 16193 | interleukin 6 | 2.61 | 0.0411 | 3.92 | 0.0136 |
| <i>Il1b†</i> | 16176 | interleukin 1 beta | 3.966 | 0.0158 | 5.89 | 0.00501 |

Γονίδια διαφορετικά εκφραζόμενα σε αρτηρίες ποντικών με ανεύρυσμα κοιλιακής αρτηρίας. (Rush et. al, 2009)

Λόγω του ρόλου τους στην κυτταρική διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό, ερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης και των ομοιωτικών γονιδίων *HOX* (homeobox-containing genes). Από τα 31 που βρέθηκαν να εκφράζονται σε διαφορετικά στον παθολογικό ανευρυσματικό ιστό και στον φυσιολογικό, τα 10 παρουσίαζαν μειωμένη έκφραση. Το *HOXA4*, ήταν εκείνο που εμφάνιζε τη μεγαλύτερη μείωση ακόμα περισσότερη σε σχέση με την μειωμένη του έκφραση στο θωρακικό ανεύρυσμα. Το mRNA αυτού του

γονιδίου εντοπίστηκε και σε καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων ανθρώπινης αορτής και ενδοθηλιακών αορτικών κυττάρων. (Lillvis et. al, 2011 *)

ΜΕΡΟΣ Β'

Τα microRNA

Το 1993, ο Lee και οι συνεργάτες του μελετούσαν τη ρύθμιση του κύκλου ανάπτυξη των νυμφών στον οργανισμό *C.elegans*. Οι μελέτες τους οδήγησαν στην διαπίστωση ότι το γονίδιο *lin-4* δεν παρήγαγε κάποια πρωτεΐνη όπως περίμεναν, αλλά αντί αυτού το συγκεκριμένο γονίδιο παρήγαγε μικρά μόρια RNA μήκους περίπου 22 νουκλεοτιδίων με αδιευκρίνιστο μηχανισμό λειτουργίας. (Lee et. al, 1993 , Bartel, 2004) Η ραγδαία πρόοδος στον τομέα των Βιοεπιστημών οδήγησε στην ανακάλυψη αρκετών νέων γονιδίων τα οποία δεν παρήγαγαν πρωτεΐνες αλλά μικρά μόρια μεγέθους περίπου 22 νουκλεοτιδίων. (Lagos-Quintana et. al, 2003) Εκτεταμένες έρευνες παρουσίασαν αυτά τα γονίδια συντηρημένα και ότι πολλά από αυτά δεν σχετίζονταν με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της ανάπτυξης αλλά με άλλες σημαντικές κυτταρικές διεργασίες. (Lee & Ambros, 2001)

Αυτή η κατηγορία γονιδίων με παρόμοια χαρακτηριστικά αλλά αδιευκρίνιστο μηχανισμό δράσης, έφερε τον όρο microRNA στο προσκήνιο. Πρόκειται για μόρια μεγέθους περίπου 18-25 νουκλεοτιδίων, τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες και αποτελούν σημαντικούς αρνητικούς μετα-μεταγραφικούς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. (Kloosterman & Plasterk, 2006 , Bushati & Cohen, 2007 , Rana, 2007)

Επειδή ο ακριβής τους αριθμός είναι ακόμα άγνωστος υπολογίζεται ότι αποτελούν το 1-3 % των γονιδίων κάθε οργανισμού. (Grad et. al, 2003) Εκτιμάται ότι υπάρχει περίπου 1000 με 1500 microRNA στον άνθρωπο ρυθμίζοντας περίπου το 60% των γονιδίων και εμπλεκόμενα σχεδόν σε κάθε γονιδιακή σηματοδότηση. (Lim et. al, 2005 , Friedman et. al, 2009) Η σημαντική δράση τους επεκτείνεται σε πολλές βιολογικές διεργασίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η διαφοροποίηση, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου και η ανάπτυξη. (Lau et. al, 2001 , Hwang et. al, 2006 , Appasini et. al, 2008)

Όσον αφορά την εξελικτική προέλευση αυτών των μορίων RNA, φαίνεται να υπάρχουν στην μορφή ομάδων (clusters) τα οποία οδηγούν σε

πολυκιστρονικά μετάγραφα, δηλαδή πολλά microRNA από ένα αρχικό μετάγραφο. Κατηγοριοποιημένα στις ομάδες συναντάμε microRNA της ίδιας ή και διαφορετικής οικογένειας και αυτό ίσως εξηγείται από την επέμβασή τους στη ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια. (Marco et. al, 2013)

Βιογένεση των microRNA

Με τον όρο βιογένεση των microRNA γονιδίων αναφερόμαστε στο σύνολο των διαδικασιών που απαιτούνται για την ωρίμανση του microRNA. Τα microRNAs προέρχονται από μακρά, μονόκλωνα μόρια RNA (stem) που ονομάζονται πρόδρομα microRNA (pre-miRNA) και αναδιπλώνονται σε δομή φουρκέτας (hairpin) , μέγεθος περίπου 75 νουκλεοτίδιων και συνήθως βρίσκονται σε ένα μόνο αντίγραφο στο γονιδίωμα. Τυπικά τα microRNA εντοπίζονται σε περιοχές ανάμεσα σε άλλα γονίδια (intergenic areas). Αρκετά microRNA βρίσκονται ανάμεσα στα ιντρόνια γνωστών γονιδίων. Σε ότι αφορά στη μεταγραφή τους μπορεί να πραγματοποιείται πολυκιστρονικά (polycistronically) με δικό τους εκκινήτη ή σαν μέρος άλλων γνωστών γονιδίων. (Nelson et. al, 2003)

Το πρώτο βήμα της διαδικασίας ξεκινά με τη μεταγραφή του microRNA γονιδίου από το ένζυμο RNA πολυμεράση II (RNA Pol II) ενώ σε πιο σπάνιες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί microRNA γονίδια να μεταγράφονται από RNA πολυμεράση III (Borchert et. al, 2006). Αποτέλεσμα αυτής της επεξεργασίας είναι η δημιουργία του πρώιμου microRNA μετάγραφου που έχει την ονομασία pri-miRNA και μέγεθος πάνω από εκατό νουκλεοτίδια (Chunsheng et. al, 2009). Τα πρώιμα microRNA αναδιπλώνονται λαμβάνοντας μια ή πολλαπλές δομές στελέχους-βρόχου σε σχήμα φουρκέτες με 5' καλύπτρα (5' cap), ενώ επίσης είναι πολυαδενυλιωμένα και αρκετές φορές φέρουν ιντρόνια όπως δηλαδή και τα κανονικά μετάγραφα. Σε αρκετές περιπτώσεις συντελείται μάτισμα καθώς το microRNA γονίδιο μπορεί να προέρχεται από περιοχή ιντρονίου κάποιου άλλου γονιδίου που κωδικοποιεί πρωτεΐνη. (Carthew & Sontheimer, 2009) Για να παραχθεί το τελικό ώριμο microRNA από το πρώιμο μετάγραφο πρέπει να πραγματοποιηθούν 2 βήματα ριβονουκλεϊκών

αντιδράσεων. Η διαδικασία της ωρίμανσης ξεκινά στον πυρήνα και αποτέλεσμα της είναι να παραχθεί από το pri-miRNA ύστερα από ενδονουκλεολυτικό κόψιμο, ένα πρόδρομο μόριο μεγέθους περίπου 70 νουκλεοτιδίων το pre-miRNA. Η διαδικασία καταλύεται από το ένζυμο Drosha που ανήκει στην κατηγορία των ριβονουκλεασών τύπου III (RNase III) (Lee et. al, 2003).

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της ριβονουκλεάσης Drosha είναι αδιευκρίνιστος αλλά πολλές μελέτες καταλήγουν ότι η ρύθμιση της επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή του πρόδρομου microRNA. Επιπλέον η επεξεργασία του pri-miRNA εκτός από τη Drosha απαιτεί και την ύπαρξη του συμπράγοντα DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8). Η σημασία της δράσης της πρωτεΐνης DGCR8 είναι μεγάλη και αυτό αποδεικνύεται από πειράματα που έγιναν σε βλαστοκύτταρα εμβρύων ποντικού όπου η έλλειψη αυτής είχε ως αποτέλεσμα να αναστέλλεται η παραγωγή miRNA και η διαφοροποίηση των κυττάρων.

Μόλις η Drosha ολοκληρώσει τη δράση της και παραχθεί το πρόδρομο microRNA πραγματοποιείται μεταφορά του στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια της μεταφορικής πρωτεΐνης Exportin 5 μέσω υδρόλυσης GTP. Μετά τη μεταφορά στο κυτταρόπλασμα σειρά έχει η διαδικασία ωρίμανσης του πρόδρομου microRNA ώστε τελικά να παραχθεί το ενεργό μόριο. Η διαδικασία της ωρίμανσης πραγματοποιείται με δράση της ενδοριβονουκλεάσης Dicer. Η Dicer είναι μια πολύ καλά συντηρημένη RNase III ανάμεσα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η Dicer με την ιδιότητα ελικάσης που έχει, επεξεργάζεται το πρόδρομο microRNA και μέσω ενδονουκλεολυτικού κόψιμου, παράγει ένα μόριο περίπου 22 νουκλεοτιδίων που είναι το τελικό ώριμο microRNA. (Du & Zamore, 2005 , Peters & Meister, 2007 , Rana, 2007)

Τα ώριμα microRNA μόρια είναι αρκετά ευπαθή και χαρακτηρίζονται από μικρό χρόνο ημιζωής. Ο μικρός χρόνος ημιζωής είναι σε συμφωνία με τη θεωρία που προβλέπει ότι τα microRNA προκαλούν εξειδικευμένη ρύθμιση όταν και όπου χρειάζεται. (Bushati & Cohen, 2007) Αποτελούνται από 2 σκέλη (strands) όπου το ένα ονομάζεται κλώνος-οδηγός (guide strand) ή απλά

miRNA και είναι αυτό που προσδένεται στις αργοναυτικές πρωτεΐνες (Ago) οι οποίες και ουσιαστικά καταλύουν την αποσιώπηση. Το άλλο σκέλος ονομάζεται κλώνος-επιβάτης (passenger strand) ή πιο απλά miRNA* και αποικοδομείται. Γενικά, ο κλώνος που θα επιλεγεί ως οδηγός, είναι εκείνος με το 5' άκρο να βρίσκεται στο θερμοδυναμικά λιγότερο σταθερό άκρο του δίκλωνου miRNA. (Sontheimer, 2005 , Filipowicz et. al, 2005 , Peters & Meister, 2007)

Σε ένα επόμενο στάδιο, δημιουργούνται ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα που θα καταλύσουν τις μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις που επιφέρουν τα miRNA, εκτός κι αν η δράση τους αφορά τη συμμετοχή τους στη μεθυλίωση γονιδίων (Bao et. al, 2004)

Διαφορική έκφραση των *microRNA*

Για τη μελέτη της έκφρασης των *microRNA* γονιδίων έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες μελέτες. Είναι αποδεκτό ότι τα *microRNA* γονίδια έχουν πολύ διαφορετικά και εξαιρετικά ενδιαφέροντα προφίλ έκφρασης. (Nelson et. al, 2003 , Heneghan et. al, 2009) Αυτή η ποικιλία στην έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων είναι και μια πρώτη ένδειξη για τον πολύ σημαντικό ρόλο τους στη ρύθμιση που προκαλούν στα υπόλοιπα γονίδια. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό αφορά στην ποσοτικοποίηση της έκφρασής τους. Μελέτες έχουν δείξει ότι συγκεκριμένα *microRNA* εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους ενώ σε άλλους παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα, ενώ ακόμα δεν έχει αποσαφηνιστεί το που οφείλονται αυτά τα διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης. (Lim et. al, 2003)

Επιπρόσθετα, άγνωστος παραμένει και ο ακριβής μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης των *microRNA* γονιδίων. Συνήθως ενέχονται φαινόμενα αυτορρύθμισης των *microRNA* ή ρύθμισης μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι με τη σειρά τους επηρεάζουν τη ρύθμιση των ίδιων των γονιδίων δημιουργώντας μοτίβα ανάδρασης. (Hobert, 2004 , Yijun et al, 2011)

Μηχανισμός Δράσης - Σύμπλοκο αποσιώπησης επαγόμενο από RNA

Τα ώριμα miRNA προσδένονται στις αργοναυτικές πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν τα βασικά συστατικά του συμπλέγματος RISC και πιο συγκεκριμένα του miRISC. Το σύμπλεγμα RISC παίρνει την ονομασία του από τον αγγλικό τίτλο RNA induced silencing complex και σχετίζεται με την αναγνώριση και καταστολή στόχων mRNA. (Schwaraz et. al, 2003)

Είναι υπεύθυνο επομένως για την ρύθμιση της έκφρασης και άρα τα microRNAs μέσω του συμπλέγματος αυτού μπορούν μετά-μεταγραφικά να καταστείλουν την έκφραση άλλων γονιδίων. Αν και οι πρωτεΐνες AGO1-AGO4 μπορούν να δημιουργήσουν miRISC, όμως μόνο η AGO2 έχει την ικανότητα να επάγει αποσιώπηση μέσω του RNAi μηχανισμού μέσω της περιοχής PIWI που διαθέτει. (Peters & Meister, 2007 , Tolia & Joshua-Tor, 2007) Παρόλα αυτά, όλες οι αργοναυτικές πρωτεΐνες μοιράζονται ομόλογες περιοχές. Η περιοχή PAZ χρησιμοποιείται για πρόσδεση με το 3' άκρο του miRNA, η περιοχή MID για σύνδεση με το 5' άκρο και η περιοχή PIWI όπως στην περίπτωση της AGO-2 έχει ενεργότητα RNase H και καταλύει τη διχοτόμηση του mRNA. Για τον άνθρωπο, δυο πολύ γνωστές αργοναυτικές πρωτεΐνες είναι οι παράγοντες eIF2C1 και eIF2C2. (Martinez et. al, 2002)

Τα microRNA αποτελούν ακριβείς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. Η ειδικότητα στην επιλογή των γονιδίων-στόχων βασίζεται στη συμπληρωματικότητα των βάσεων μεταξύ του mRNA και της περιοχής 2-8 του 5' άκρου του microRNA (η περιοχή αυτή φέρει την ονομασία «seed»). Στις περισσότερες περιπτώσεις η πρόσδεση συμβαίνει στην 3' UTR του mRNA ενώ πιο πρόσφατες έρευνες εντόπισαν και πρόσδεση στην 5' UTR όπως και μέσα στην κωδική περιοχή (Lytle et al, 2007 , Carthew & Sontheimer, 2009)

Η σύνδεση του microRNA στο mRNA στόχο τυπικά οδηγεί σε μεταφραστική καταστολή ή καταστροφή του mRNA. Ο βαθμός και η φύση της συμπληρωματικότητας ανάμεσα στην οδηγό αλυσίδα και την αλυσίδα στόχο, καθορίζει και τον μηχανισμό αποσιώπησης που θα επιλεγεί. Έχει παρατηρηθεί ότι η πλήρης συμπληρωματικότητα ,που συμβαίνει συχνότερα στα φυτά και όχι στα ζώα, έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του mRNA. Αντίθετα όταν η συμπληρωματικότητα είναι ατελής και παρατηρούνται

αναντιστοιχίες (mismatches) ανάμεσα στις βάσεις, τότε παρατηρείται η καταστολή της μετάφρασης του γονιδίου-στόχου. (Doench & Sharp, 2004 , Jones-Rhoades et. al, 2006)

Η αλληλεπίδραση miRNA-mRNA στόχος στα θηλαστικά διέπεται από τις κάτωθι αρχές:

- Ο ρόλος της αλληλουχίας «seed»
- Προεξοχές λόγω αναντιστοιχιών στο κέντρο του διμερούς miRNA-mRNA παρακωλύουν την ενδονουκλεϊκή αποδόμηση του mRNA
- Μεγάλου βαθμού συμπληρωματικότητα στο 3' UTR ή σε κάποια άλλη περιοχή που πρόσδεσης του miRNA
- Περιοχές πλούσιες σε αδενίνες και ουρακίλες πλησίον των περιοχών πρόσδεσης του miRNA
- Η περιοχή πρόσδεσης να μην είναι πολύ μακριά από την πολυαδενυλιωμένη ουρά ή το κωδικόνιο τερματισμού. (Brennecke et. al, 2005 , Lewis et. al, 2005 , Grimson et. al, 2007 , Nielsen et. al, 2007)

Οι λειτουργίες των *microRNAs*

Κάθε *microRNA* μπορεί να ρυθμίζει πολλούς στόχους αλλά και διαφορετικοί στόχοι μπορούν να συνδέονται και να ρυθμίζονται από διαφορετικά *microRNA*. Γονίδια στόχοι των *microRNAs* μπορεί να κωδικοποιούν για μεταβολικά ένζυμα, σηματοδοτικές πρωτεΐνες ή και μεταγραφικοί παράγοντες.

Μελετες σε διάφορους τύπους οργανισμών υποδεικνύουν τη συμμετοχή των *microRNAs* σε μονοπάτια ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση, στην ανάπτυξη του νευρικού και μυϊκού συστήματος , την εμβρυογένεση και τη μορφογένεση. (Wienholds & Plasterk, 2005 , Subramanian & Steer, 2010) Επιπλέον πειράματα σε ποντίκια έδειξαν εμπλοκή των *microRNA* στη ρύθμιση των βλαστοκυττάρων (stem cells). (Vasudevan et. al, 2008 , Yangming & Blelloch, 2009) Ένα ακόμα σημαντικό μονοπάτι ρύθμισης εμπλέκει τα *microRNA* με τις βασικές αρχές λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. (Petrocca & Lieberman, 2009)

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις ρύθμισης παρατηρείται ένα συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης. Η διατήρηση αυτού του προτύπου ή εναλλακτικά της miRNA ομοιόστασης, είναι ζωτικής σημασίας για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού. Πάρα πολλές περιπτώσεις ασθενειών συνοδεύονται από μεταβολές στο πρότυπο έκφρασης των microRNAs γονιδίων γεγονός που αναδεικνύει το σημαντικό τους ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και σχετίζεται με την συμβολή τους στην πρόγνωση, διάγνωση και θεραπεία διαφόρων ασθενειών. (Wurdinger & Costa, 2007)

Πέρα όμως από τη ρύθμιση βασικών λειτουργιών του οργανισμού ο μηχανισμός δράσης αυτών των μορίων χρησιμοποιείται και από αρκετούς ιούς. (Pfeffer et. al, 2004) Οι ιοί σαν παρασιτικοί οργανισμοί κωδικοποιούν microRNAs τα οποία συμβάλλουν στην προσαρμογή του ιού στο περιβάλλον του ξενιστή τους. Είναι γνωστά περισσότερα από 120 ιικά miRNA συμπεριλαμβανομένων και κάποιων που έχουν συνδεθεί με ογκογόνους ιούς. (Gottwein et. al, 2007)

Η συμμετοχή των microRNA στις ασθένειες

Παρά το γεγονός, ότι λίγα είναι γνωστά μέχρι σήμερα για τα γονίδια-στόχους και την ακριβή λειτουργία των microRNAs, αυτά έχουν αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς συμμετέχουν σε πληθώρα φυσιολογικών κυτταρικών και μεταβολικών διαδικασιών. Η διαφορική ιστοειδική και κυτταροειδική έκφρασή τους καθώς και οι μετα-μεταγραφικές ρυθμίσεις που προάγουν καθιστούν επιτακτική την ανάγκη διατήρησης της ενεργότητάς τους καθώς η απορύθμιση τους έχει συσχετιστεί με σημαντικές παθολογικές καταστάσεις μεταξύ των οποίων και του καρκίνου.

Συγκεκριμένα, πολλά microRNA γονίδια έχουν πάρει την ονομασία oncomiRs καθώς βρέθηκε ότι η δράση τους ενισχύει την δημιουργία και τη μετάσταση του καρκίνου αλλά πέραν των ογκογόνων έχουν σημειωθεί και ογκοκατασταλτικές δράσεις σε περιπτώσεις που η έκφραση τους είναι μειωμένη στις κακοήθειες και καταστέλλουν ογκογονίδια. Ο αριθμός τέτοιων μορίων σε καρκινικούς φαινοτύπους είναι αρκετά μεγάλος (Heneghan et. al,

2009) ενώ επίσης φαίνεται ότι εμπλέκονται και σε μια πληθώρα άλλων παθολογικών διαταραχών καθώς αρκετοί από τους στόχους τους έχουν ρόλο στην ασθένεια, προτείνοντας ότι η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs συμβάλλει στην παθολογία της ασθένειας. Ενδεικτικά αναφέρονται τα miR-208 και miR-1 σε καρδιαγγειακές παθήσεις, (Yang et. al, 2007) το miR-224 σε ασθένειες νευρολογικής φύσεως μεταξύ των οποίων και η νόσος του Parkinson, (Maes et. al, 2009) και τα miR-146, miR -155 και miR-181 που έχουν συσχετισθεί με απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος σε μολύνσεις από παθογόνους μικρο-οργανισμούς, την προσαρμοστική ανοσία και τον έλεγχο των T λεμφο-κυττάρων. (Taganov et. al, 2006)

Εύκολα γίνεται κατανοητό ότι τα microRNAs εμπλέκονται στην έναρξη και την εξέλιξη αρκετών ασθενειών καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο και ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Για το λόγο αυτό και προκειμένου να βελτιωθούν υπάρχουσες μέθοδοι διάγνωσης και θεραπευτικής προσέγγισης, είναι αναγκαία η συνεχής μελέτη και έρευνα αυτών των μορίων.

ΜΕΡΟΣ Γ΄

microRNA-επαγόμενη γονιδιακή ρύθμιση στο Ανεύρυσμα Κοιλιακής Αορτής

Η μέχρι σήμερα θεραπευτική προσέγγιση του ανευρύσματος περιορίζεται στην χειρουργική αποκατάσταση αυτού και στη χορήγηση φαρμάκων τα οποία σταθεροποιούν την πορεία εξέλιξή του. Το ενδιαφέρον των μελετών πλέον στρέφεται στην τεχνολογία των microRNA, τα οποία μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων, ρυθμίζουν την έκφραση μορίων που ενέχονται στην παθογένεση του ΑΚΑ με σκοπό την καταστολή της δημιουργίας του.

Οι μελέτες που αφορούν στη συμβολή των microRNAs στην παθολογία του ΑΚΑ υποδεικνύουν συμμετοχή των miR-21, miR-26a και miR-29b στην εξέλιξη της νόσου αλλά και άλλων microRNA για τα οποία δεν έχει γίνει σαφής συσχέτιση με τη νόσο, όμως οι βιολογικές τους επιδράσεις σχετίζονται με διαφοροποίηση του κυτταρικού φαινοτύπου καθώς και επιπλέον παθολογικών ευρημάτων τα οποία εμφανίζονται και στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής. Οι έρευνες έχουν διεξαχθεί σε μοντέλα ποντικών αλλά και ανθρώπινους ιστούς από ασθενείς που υπεβλήθησαν σε χειρουργική αποκατάσταση του ΑΚΑ.

miR-21

Το microRNA-21 (miR-21), το οποίο προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ έχει ανασταλτική δράση στην απόπτωση αποτελεί ένα από τα πιο συχνά υπερεκφραζόμενα microRNA σε αρκετές καρδιαγγειακές παθήσεις όπως και σε πολλούς τύπους καρκίνου ενώ μόρια στόχοι του αποτελούν τα γονίδια *PTEN*, *SPRY1*, *PDCD4* και *BCL-2*. Ο Maegdefessel και οι συνεργάτες του, μελέτησαν την πιθανή εμπλοκή αυτού του microRNA στην παθολογία του ανευρύσματος χρησιμοποιώντας ποντίκια στα οποία πραγματοποιήθηκε επαγωγή του ανευρύσματος μέσω διάχυσης ελασάσης και έγχυσης αγγειοτενσίνης II. Επίσης προκειμένου να ελέγξουν την συμμετοχή του miR-21 στη παθογένεση της νόσου, έλεγξαν τα επίπεδά του έπειτα από χορήγηση νικοτίνης η οποία και αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου του ΑΚΑ

Σύμφωνα με την έρευνα παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-21 στο ΑΚΑ ενώ η έκφρασή του ήταν ακόμη μεγαλύτερη σε πειραματόζωα που έλαβαν νικοτίνη με τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο (7, 14 και 28 ημέρες μετά την επαγωγή του ΑΚΑ). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του miR-21 αυξανόταν καθώς αυξανόταν η διάμετρος της αορτής και κατ' επέκταση και το μέγεθος του ανευρύσματος.

Από τους στόχους αυτού του μορίου, βρέθηκε μειωμένη έκφραση του γονιδίου *Pten* και στις τρεις χρονικές περιόδους που προαναφέρθηκαν, σε μοντέλα που ανέπτυξαν ΑΚΑ συγκριτικά με τα φυσιολογικά ποντίκια. Επίσης μειωμένα ήταν και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *Pdcd4*, *Spry1* μετά από 14 μέρες χορήγησης ελασάσης ενώ μετά τις 28 ημέρες, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Bcl2*.

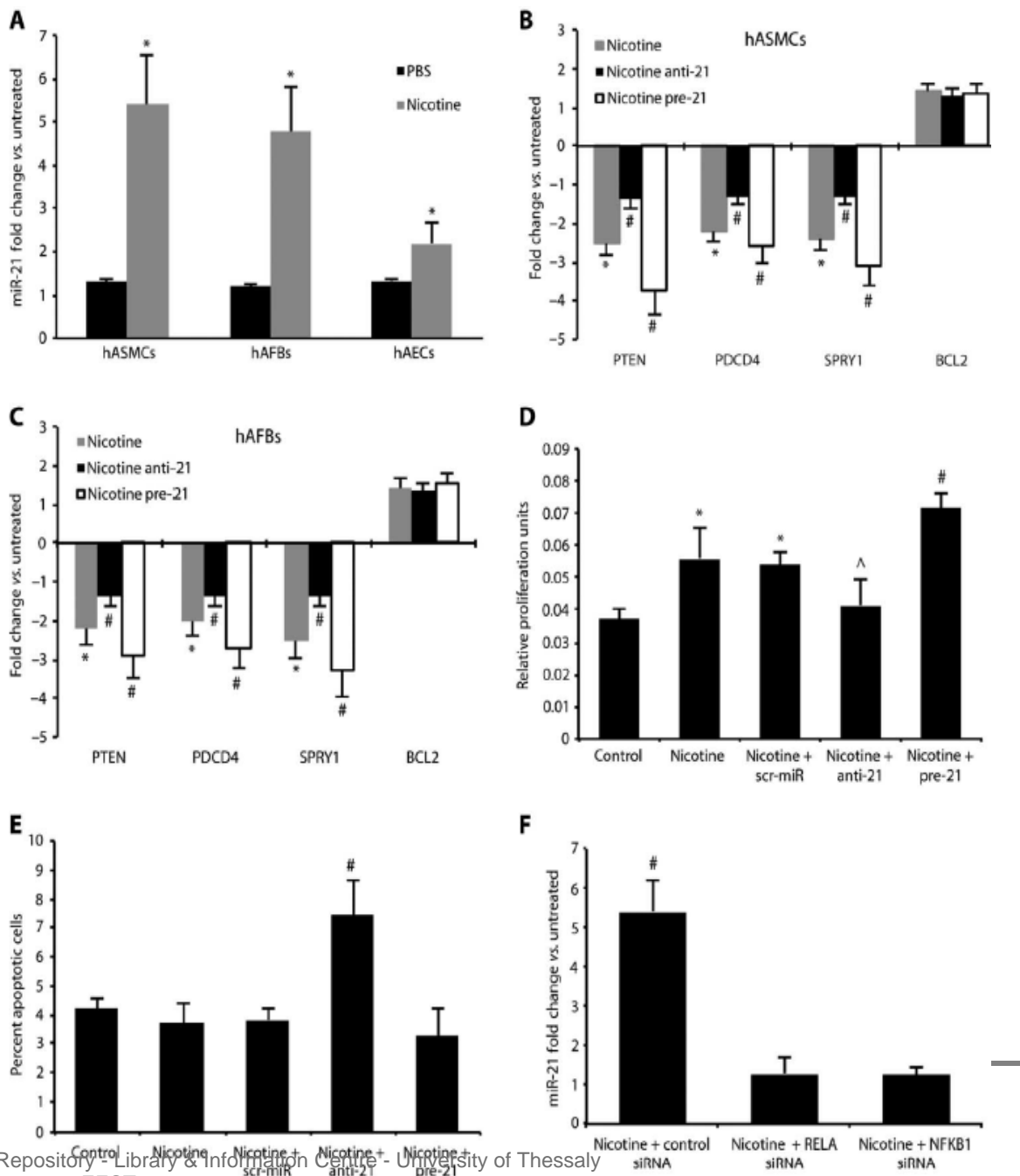
Επιπλέον σημαντικός είναι ο ρόλος του miR-21 στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των κυτταρικών τύπων της αορτής. Πειράματα σε ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα καθώς και ινοβλάστες από ανευρυσματική αορτή, έδειξαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-21 στα λεία μυϊκά κύτταρα και στους ινοβλάστες ενώ μη ανιχνεύσιμα ήταν τα επίπεδα του στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Η χορήγηση νικοτίνης σε καλλιέργειες των παραπάνω κυττάρων, αύξησε τα επίπεδα του miR-21 σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, ενώ από τα γονίδια στόχους του υποεκφραζόμενα βρέθηκαν τα γονίδια *PTEN*, *PDCD4* και *SPRY1* τόσο στα λεία μυϊκά κύτταρα όσο και στους ινοβλάστες, όχι όμως στα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία ήταν τα μόνα κύτταρα που παρουσίασαν σημαντική υπερέκφραση του *BCL2* γονιδίου.

Η ρύθμιση του miR-21 είτε αρνητικά μέσω ενός antagomiR (anti-21) είτε θετικά μέσω ενός pre-miR (pre-21) στους τρεις κυτταρικούς τύπους όπου είχε χορηγηθεί νικοτίνη, επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PTEN*, *PDCD4* και *SPRY1* στα λεία μυϊκά κύτταρα και τους ινοβλάστες όχι όμως του *BCL2*. Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζουν επιστημονικά δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν ότι κύτταρα που επιμολύνθηκαν με το anti-21 παρουσίασαν μειωμένο πολλαπλασιασμό και μεγαλύτερο βαθμό απόπτωσης, ενώ στην

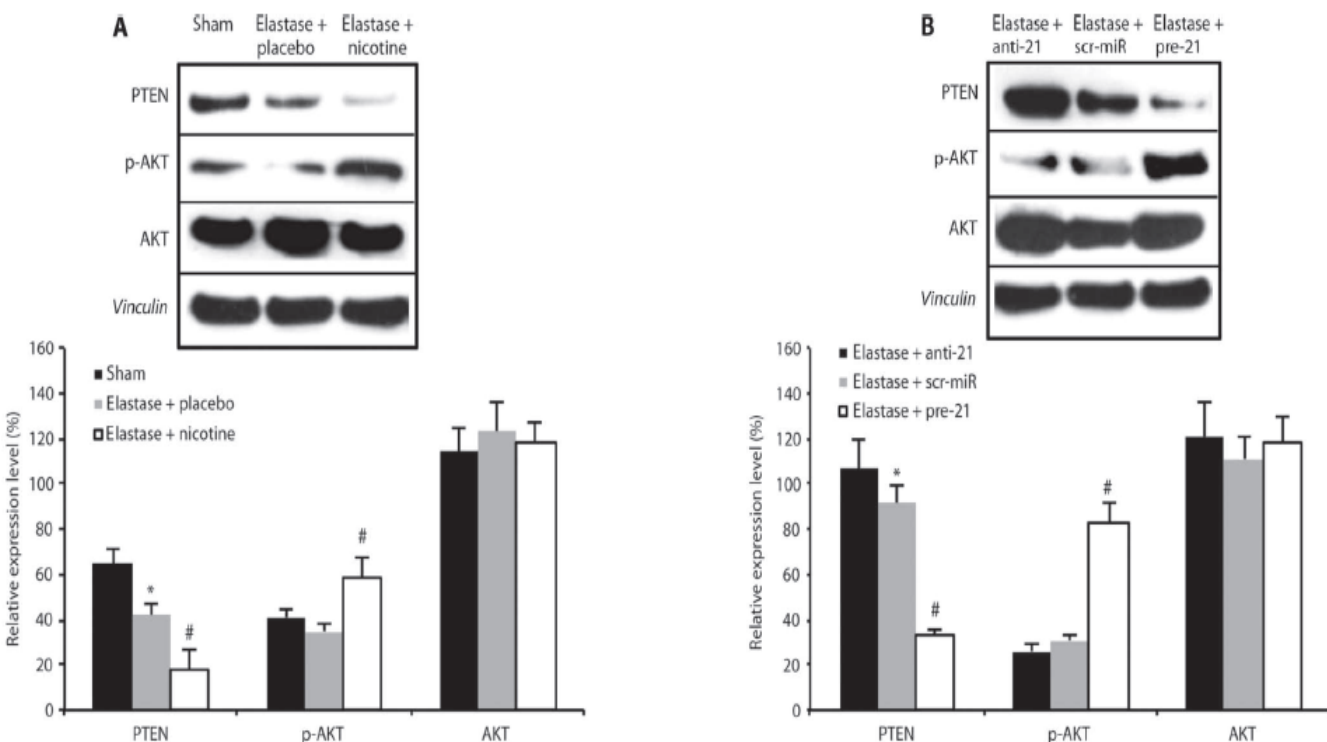
περίπτωση του pre-21, σημειώθηκε αύξηση του πολλαπλασιασμού και καταστολή της απόπτωσης των κυττάρων.

Τα διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης του miR-21 σε κάθε περίπτωση όπως και του γονιδίου *Pten*, επαληθεύθηκαν με τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών όπως η φλουορεσκίνη (Fluorescein isothiocyanate - FITC) για σήμανση του LNA-anti-21 (τεχνηκή Locked Nucleic Acid) που θα ανέστειλε την έκφραση του miR-21 και η GFP (Green Fluorescent Protein), για σήμανση ενός λεντιϊού με το pre-21. Η χορήγηση του anti-21 σε ποντίκια με ΑΚΑ είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης και μείωση των επιπέδων έκφρασης του miR-21 ενώ χορήγηση του pre-21 αντιθέτως οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του miR-21.



Επιδράσεις της νικοτίνης και των ρυθμιστικών μορίων του miR-21 στο ΑΚΑ ποντικών. (Maegdefessel et. al. 2012)

Αύξηση επίσης παρατηρήθηκε στα επίπεδα mRNA του *Pten*, μετά τη χορήγηση του anti-21 ενώ παρόμοιο μοτίβο έκφρασης του γονιδίου *PTEN* παρατηρήθηκε και σε ποντίκια όπου χορηγήθηκε anti-21 και νικοτίνη. Αντίθετα η χορήγηση του pre-21 σε ποντίκια επέφερε μείωση των επιπέδων έκφρασης του *PTEN* ενώ παρόμοια ήταν η έκφραση του στα ποντίκια όπου χορηγήθηκε pre-21 και νικοτίνη. Αντίθετα σε δείγματα μη ανευρυσματικής αορτής η χορήγηση anti-21, pre-21 και νικοτίνης δεν επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης του *Pten* γεγονός που συμβαδίζει με τα υπόλοιπα αποτελέσματα που υποδεικνύουν την στοχευμένη δράση των ρυθμιστών του miR-21 στην περιοχή της βλάβης, δηλαδή της διεσταλμένης αορτής.



Επίπεδα έκφρασης PTEN, φωσφορυλιωμένης AKT και μη φωσφορυλιωμένης AKT. (Maegdefessel et. al, 2012)

Η επίπτωση που έχει η ρύθμιση της ενεργότητας του miR-21 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση ελέγχθηκε επίσης με ιστολογική ανάλυση γονιδίων η δράση των οποίων επηρεάζεται από το συγκεκριμένο miR, όπως των *PTEN*, *Ki-67* που αποτελεί ουδέτερο δείκτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κασπάσης-3, η οποία επάγει την απόπτωση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων συσχετίστηκε αρνητικά με την έκφραση της *PTEN*, ενώ υπήρξε θετική συσχέτιση με την απόπτωση.

Επιπρόσθετα, ιστολογική ανάλυση για τον Mac-1, υποδοχέα των μακροφάγων και ουδετερόφιλων κυττάρων, ανέδειξε αυξημένα επίπεδα του στα ποντίκια στα οποία είχε χορηγηθεί νικοτίνη.

Η πιθανή συμβολή του miR-21 στο ΑΚΑ ενισχύθηκε και με πειράματα, τα οποία έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης μορίων που ενέχονται στο φλεγμονώδες μονοπάτι *Pten/mTOR*, όπως η MCP-1, η IL-6, η CXCL1 και η CXCL12, οι δράσεις των οποίων υπόκεινται στη δράση του miR-21, είναι αυξημένα στα ανευρυσματικά ποντίκια. Η υπόθεση ενισχύθηκε όταν χορήγηση του pre-21 στα ποντίκια με ΑΚΑ αύξησε τα επίπεδα έκφρασης των φλεγμονωδών μορίων της IL-6 και Msp-1

Τα ανωτέρω ευρήματα επαληθεύτηκαν και σε ζωικά μοντέλα στα οποία πραγματοποιήθηκε knock out του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης E (*ApoE*) και η επαγωγή του ανευρύσματος έγινε με χορήγησης αγγειοτενσίνης II. Η επαλήθευση των αποτελεσμάτων ήταν αναγκαία ώστε να εξαλειφθεί τυχόν πιθανότητα, η χορήγηση της ελασάσης για τη δημιουργία του ανευρύσματος να έχει επίπτωση στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων του ενδιαφέροντος.

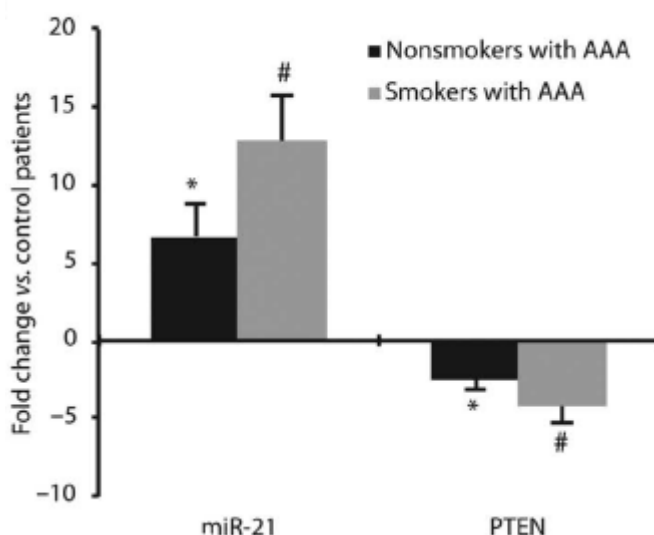
Παρομοίως παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-21 σε ποντίκια με ΑΚΑ τα οποία και αυξήθηκαν με τη συνδυασμένη χορήγηση νικοτίνης. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Pten*, ήταν μειωμένα και στις δύο ομάδες ανευρυσματικών *ApoE^{-/-}* ποντικών.

Χρήση του pre-21 οδήγησε και εδώ, σε μείωση της έκφρασης του *PTEN*, περιορίζοντας το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής, ενώ σε ποντίκια όπου χορηγήθηκε anti-21, ο κίνδυνος για ρήξη του ανευρύσματος άγγιζε το 80% σε

σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η διαφορά στα δύο ζωικά μοντέλα, έγκειται στο βαθμό ρύθμισης της έκφρασης του miR-21, ο οποίος στο μοντέλο της αγγειοτενσίνης II, ήταν μικρότερος σε σχέση με το μοντέλο της ελαστάσης.

Ο ρόλος του miR-21 στο ΑΚΑ σε συνδυασμό με τη δράση της νικοτίνης διερευνήθηκε και σε καπνίζοντες και μη καπνίζοντες ασθενείς οι οποίοι λάμβαναν την ίδια φαρμακευτική αγωγή (στατίνες, β-αδρενεργικοί αγωνιστές, ARBs, ή αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης).

Η μελέτη έδειξε ότι τα επίπεδα έκφρασης του miR-21 σε αορτή με ΑΚΑ είναι έως $6,7 \pm 1,1$ φορές υψηλότερα στους μη καπνίζοντες ανευρυσματικούς ασθενείς και $12,8 \pm 2,1$ φορές υψηλότερα στους καπνίζοντες ασθενείς με ΑΚΑ συγκριτικά με τα επίπεδα σε άτομα με φυσιολογική κοιλιακή αορτή. Στις ίδιες ομάδες, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *PTEN*, $2,4 \pm 0,5$ φορές στους ανευρυσματικούς μη καπνιστές και $4,3 \pm 1,2$ φορές στους ανευρυσματικούς καπνιστές ασθενείς, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.



Υπερέκφραση του miR-21 και υποέκφραση του *PTEN* σε ανθρώπινο ιστό ανευρύσματος κοιλιακής αορτής προερχόμενο από ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική αποκατάσταση σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου από δωρητές οργάνων. (Maegdefessel et. al, 2012)

Η ικανότητα του miR-21 να δρα προστατευτικά ενάντια στην διαστολή της αορτής στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής φαίνεται να αποτελεί μια φυσιολογική απόκριση η οποία πιθανόν να εντείνεται έπειτα από διέγερση της νικοτίνης. Η ανάπτυξη επομένως του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής έχει συσχετιστεί με αύξηση της έκφρασης του miR-21 και μείωση της έκφρασης του *PTEN* επάγοντας τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλοντας την απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων. Το παραπάνω επιβεβαιώθηκε και με την ενίσχυση της έκφρασης του miR-21 χορηγώντας ένα pre-21 μόριο, όπου η επαγόμενη αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού PTEN/PI3K/AKT συνδέθηκε με καταστολή της αύξησης της αορτικής διαμέτρου. Παράλληλα, οι επιπτώσεις των μειωμένων επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *PTEN* που προάγει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, εξαλείφονταν με την αναστολή του miR-21 μέσω ενός anti-21 μορίου, οδηγώντας σε αύξηση ή ακόμα και ρήξη σε ανευρυσματικά ποντίκια στα οποία χορηγούνταν νικοτίνη.

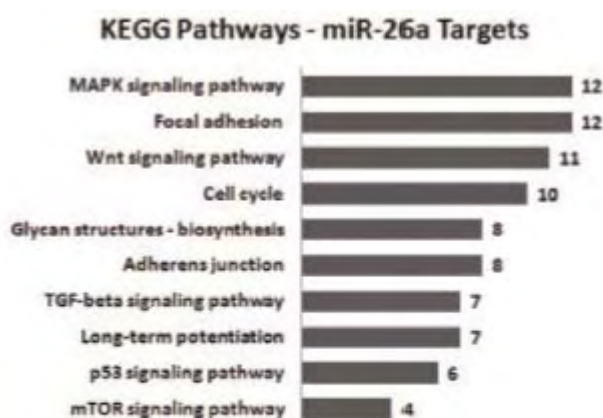
Επίσης παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση του miR-21 συσχετίστηκε με αύξηση της έκφραση κάποιων προφλεγμονωδών μορίων (*Mcp1*, *Il6*, *Cxcl1*, *Cxcl12*).

(Maegdefessel et. al, 2012)

miR-26a

Το 2011, ο Leeper και οι συνεργάτες του μελετώντας τη βιολογία των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων, πραγματοποίησαν την πρώτη ανάλυση της έκφρασης miRNA με μικροσυστοιχίες σε διαφοροποιούμενα ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα. Παρατήρησαν ότι το miR-26a αναστέλλει την διαφοροποίηση και απόπτωση των λείων μυϊκών κυττάρων, προάγοντας παράλληλα τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση τους, πιθανά μέσω ενός μηχανισμού που στοχεύει το σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β/BMP. Αναφορικά με το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής, το miR-26a παρουσίαζε μειωμένα επίπεδα έκφρασης σε ποντίκια, υποδεικνύοντας έναν καινούργιο πιθανό θεραπευτικό στόχο στην διεύρυνση της αορτής.

Η ανάλυση των miRNA μικροσυστοιχιών ανέδειξε 135 σημαντικά ρυθμιζόμενα microRNA, 31 από τα οποία παρουσίαζαν διακυμάνσεις μεταξύ της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου (>2.0 φορές), όπου αυξημένα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν για 28 miR και μειωμένα επίπεδα έκφρασης για 3. Επιπλέον ταυτοποιήθηκαν πιθανά γονίδια στόχοι των διαφορετικά ρυθμιζόμενων miRNAs μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται γονίδια που σχετίζονται με τη φύση και λειτουργία των λείων μυϊκών κυττάρων την αθηροσκλήρωση και το αορτικό ανεύρυσμα. Το miR-26a, οι στόχοι του οποίου φαίνονται στην παρακάτω εικόνα φαίνεται να ρυθμίζει το *SMAD-1* ενώ πιθανός στόχος του είναι και το *SMAD-4*.



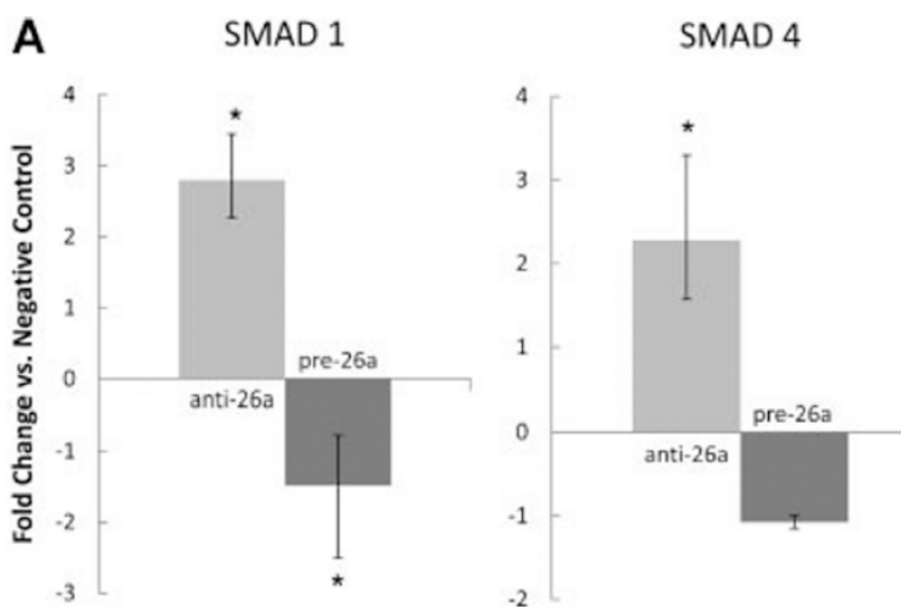
Πιθανοί στόχοι του miR-26a. (Leeper et. al, 2011)

Επίσης απώλεια του miR-26a συσχετίστηκε με έκφραση δεικτών που αφορούν στην κυτταρική διαφοροποίηση καθώς και με σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των κυττάρων και αυξημένη απόπτωση. Επιμόλυνση (transfection) των κυττάρων με anti-26a επέφερε μεγαλύτερη αύξηση χαρακτηριστικών δεικτών των λείων μυϊκών κυττάρων *MYH11* και *ACTA2*, ενώ στην περίπτωση χορήγησης pre-26a μορίων παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των δεικτών διαφοροποίησης σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν ένα σημαντικό ρόλο του miR-26a στις κυτταρικές διεργασίες των λείων μυϊκών κυττάρων, ενώ ο ακριβής του ρόλος

διερευνήθηκε μέσω μελέτης των επιδράσεων του miR-26a στον σηματοδοτικό καταρράκτη προ-διαφοροποίησης του TGF-β. Η αναστολή του miR-26a από το anti-26 σε συνδυασμό με τον TGF-β, οδήγησε σε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας των SMAD (1,36 φορές) πέραν αυτής που παρατηρήθηκε από τη δράση του TGF-β μόνο, ενώ η υπερέκφραση του miR-26a στην περίπτωση του pre-26a μείωσε σημαντικά τα επίπεδα δραστηριότητας των SMAD (-1,74 φορές).

Απουσία του TGF-β, η αναστολή και υπερέκφραση του miR-26a από τα ανάλογα μόρια, δεν είχε καμία επίπτωση στην βασική δράση των SMAD, γεγονός που σημαίνει πως ο μηχανισμός δράσης του miR-26a απαιτεί την ενεργοποίηση του μονοπατιού από τον TGF-β. Επίσης, λεία μυϊκά κύτταρα στα οποία ενσωματώθηκε το antagomiR παρουσίασαν αυξήσεις στην έκφραση των δύο μορίων SMAD (2,3-3,5 φορές και 1,6-3,3 φορές αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και σε πρωτεϊνικό επίπεδο όπου χορήγηση TGF-β σε αορτικά λεία μυϊκά κύτταρα με απώλεια ενεργότητας miR-26a παρουσίασαν αύξηση της έκφρασης της SMAD-1 (1,59 φορές) και της SMAD-4 (1,16 φορές).

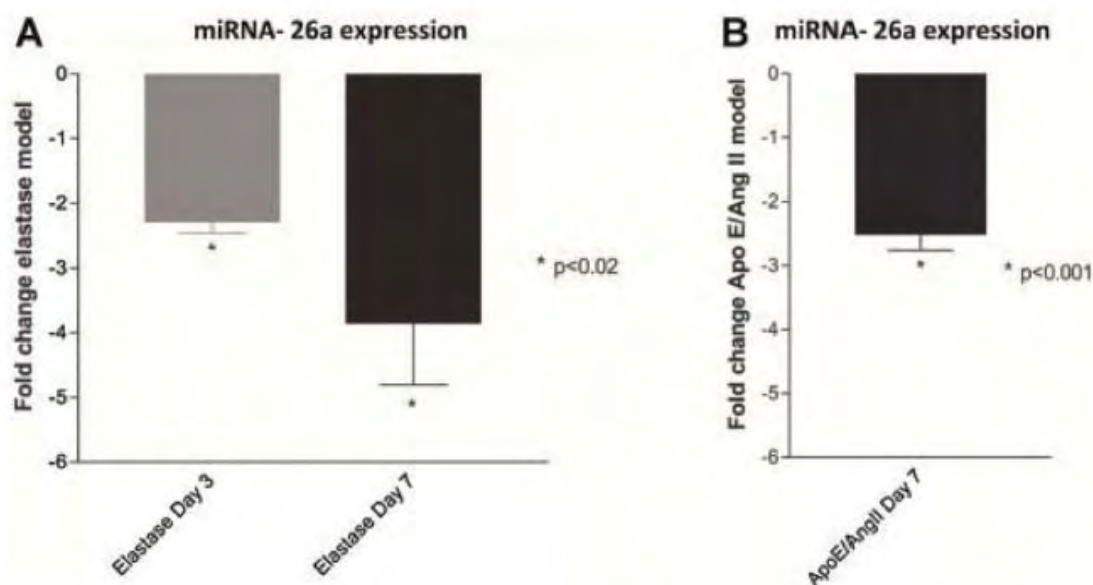


Ανθρώπινα αορτικά λεία μυϊκά κύτταρα που δεν εκφράζουν miR-26a, παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση των SMAD-1 και SMAD-4, ενώ η υπερέκφραση του miR-26a οδηγεί σε μείωση των επιπέδων έκφρασης της SMAD-1. (Leeper et. al, 2011)

Επιπλέον μελέτες σε μοντέλα ζώων ανέδειξαν ότι η μειωμένη έκφραση του miR-26a συμβαδίζει παροδικά με την μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση της α-ακτίνης των λείων μυϊκών κυττάρων και αγγειακή διαστολή, ενώ σε συμφωνία με προηγούμενη έρευνα του Maegdefessel, το miR-21 εμφανίστηκε αυξημένο στη διεσταλμένη αορτή.

Από τα γονίδια-στόχους του miR-26a (535 γονίδια) τα 124 παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης κατά την δημιουργία του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής (συμπεριλαμβανομένων των *Smad1*, *Smad4*, *Loxl2*, *Inhbb*). Πρόκειται για γονίδια τα οποία συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, την παραγωγή κυτταροκινών και στη σηματοδότηση του TGF-β.

Παρόλο που έχουν διεκρινιστεί ορισμένοι μηχανισμοί που ενέχονται στη ρύθμιση του κυτταρικού φαινοτύπου, οι τρόποι με τους οποίους τα miRNA μπορούν να επάγουν ή να μεταβάλουν αυτές τις διαδικασίες, παραμένουν σε μεγάλο βαθμό, μη κατανοητοί. Έρευνες έχουν δείξει ότι ένας αριθμός microRNA ενέχεται στις διαδικασίες της διαφοροποίησης των κυττάρων και συγκεκριμένα εμπλέκονται σε μονοπάτια που σχετίζονται με την φαινοτυπική αλλαγή και πάθηση στα λεία μυϊκά κύτταρα, όπως κυτταροσκελετική ρύθμιση, τα σηματοδοτικά μονοπάτια των Wnt και TGF-β, η σηματοδότηση του p53 και αλληλεπιδράσεις κυττάρων με εξωκυττάρια ουσία.



Το miR-26a είναι υποεκφρασμένο στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής. (Leeper et. al, 2011)

Ένα από αυτά τα μόρια είναι και το miR-26a η δράση του οποίου έγκειται στην διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων και πιθανά ενέχεται σε ένα είδος αρνητικής τροφοδότησης, λειτουργώντας ως αναστολέας της διαφοροποίησης τους. Στα πλαίσια αυτής της υπόθεσης, βρέθηκε ότι κύτταρα που δεν εξέφραζαν το miR-26a, παρουσίαζαν μειωμένους κυτταρικούς κύκλους και μειωμένη ικανότητα μετανάστευσης. Επίσης, παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερους ρυθμούς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

Η ανασταλτική λειτουργία του miR-26a πιθανότατα αφορά σε μόρια του σηματοδοτικού καταράκτη των TGF-β/BMP παραγόντων όπως στην μεταφραστική καταστολή των SMAD-1 και SMAD-4 Όπου σε περίπτωση υπερέκφρασης του miR-26a παρατηρήθηκε καταστολή της έκφρασης του SMAD-1 όχι όμως του SMAD-4.

Οι προαναφερθείσες λειτουργίες του miR-26a αποτέλεσαν και τη βάση της υπόθεσης ότι το συγκεκριμένο microRNA ενέχεται στην ανάπτυξη του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής. Σημαντική παρατήρηση αποτέλεσε το γεγονός ότι καταστολή της έκφρασης του miR-26a σε ζωικά μοντέλα ανευρύσματος επέφερε μείωση της έκφρασης της α-ακτίνης των λείων μυϊκών κυττάρων του μέσου χιτώνα και την αορτική διαστολή.

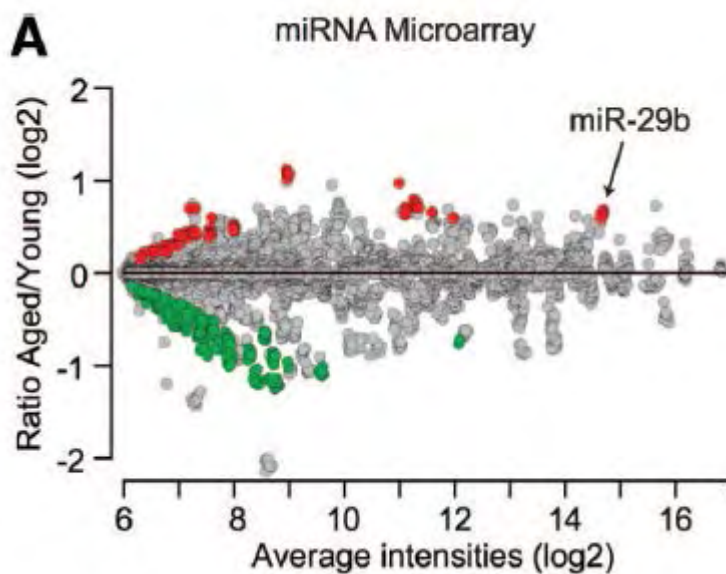
Η ρύθμιση της δράσης του miR-26a ως προς τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα οποία συνιστούν τον κύριο κυτταρικό τύπο της αορτής και έχουν τον σημαντικότερο ρόλο στην παθογένεια του ΑΚΑ, αποτελεί σημαντικό μελλοντικό θεραπευτικό στόχο, ο οποίος θα μπορούσε να αποκαταστήσει το φαινότυπο και λειτουργία των κυττάρων. (Leeper et. al, 2011)

miR-29b

Περαιτέρω έρευνες στη συσχέτιση των microRNA με το ΑΚΑ ανέδειξαν συσχέτιση της έκφρασης αυτών με την ηλικία ανάπτυξης του ανευρύσματος. Συγκεκριμένα έρευνα του Boon και των συνεργατών του και σε σχετική δημοσίευση το 2011, παρουσίασαν αποτελέσματα του προφίλ έκφρασης συσχετιζόμενων microRNA σε ιστό αορτής ποντικών νεαρής και μεγαλύτερης ηλικίας.

Η ανάλυση μικροσυστοιχιών που πραγματοποίησε η ερευνητική ομάδα αποκάλυψε 18 microRNA που υπάγονται σε ρύθμιση θετική ή αρνητική (>1,5 φορές αύξηση ή μείωση) συγκρίνοντας τις δύο ομάδες ποντικών.

Ταυτοποιήθηκε η οικογένεια των miR-29 (miR-29a, miR-29b, miR-29c) ως η μόνη από τα 18 προαναφερθέντα microRNA που επηρεάζει λειτουργικά τα επίπεδα του mRNA



Προφίλ έκφρασης microRNA σε αορτικό ιστό. (Boon et. al, 2011)

Η οικογένεια των miR-29 μεταγράφεται σε δύο αμφικιστρονικά microRNA και βρέθηκε πως μόνο η ομάδα miR-29b1/a επάγεται σε επίπεδο μεταγραφής από την αυξανόμενη ηλικία, προτείνοντας πως η αύξηση των miR-29 οφείλεται τόσο σε μεταγραφικούς όσο και σε μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς. Αυτά τα ευρήματα αποτελούν ένδειξη ότι τα miR-29 είναι τα μόνο microRNA που ρυθμίζονται από την ηλικία και επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση στην αορτή.

Ο ρόλος αυτών των miR-29 στην καρδιά αφορά τον έλεγχο της ίνωσης του ιστού μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, στοχεύοντας γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας όπως κολλαγόνο, φιμπριλλίνη και ελαστίνη. Επειδή η μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας αποτελεί χαρακτηριστικό του ανευρύσματος και η ηλικία

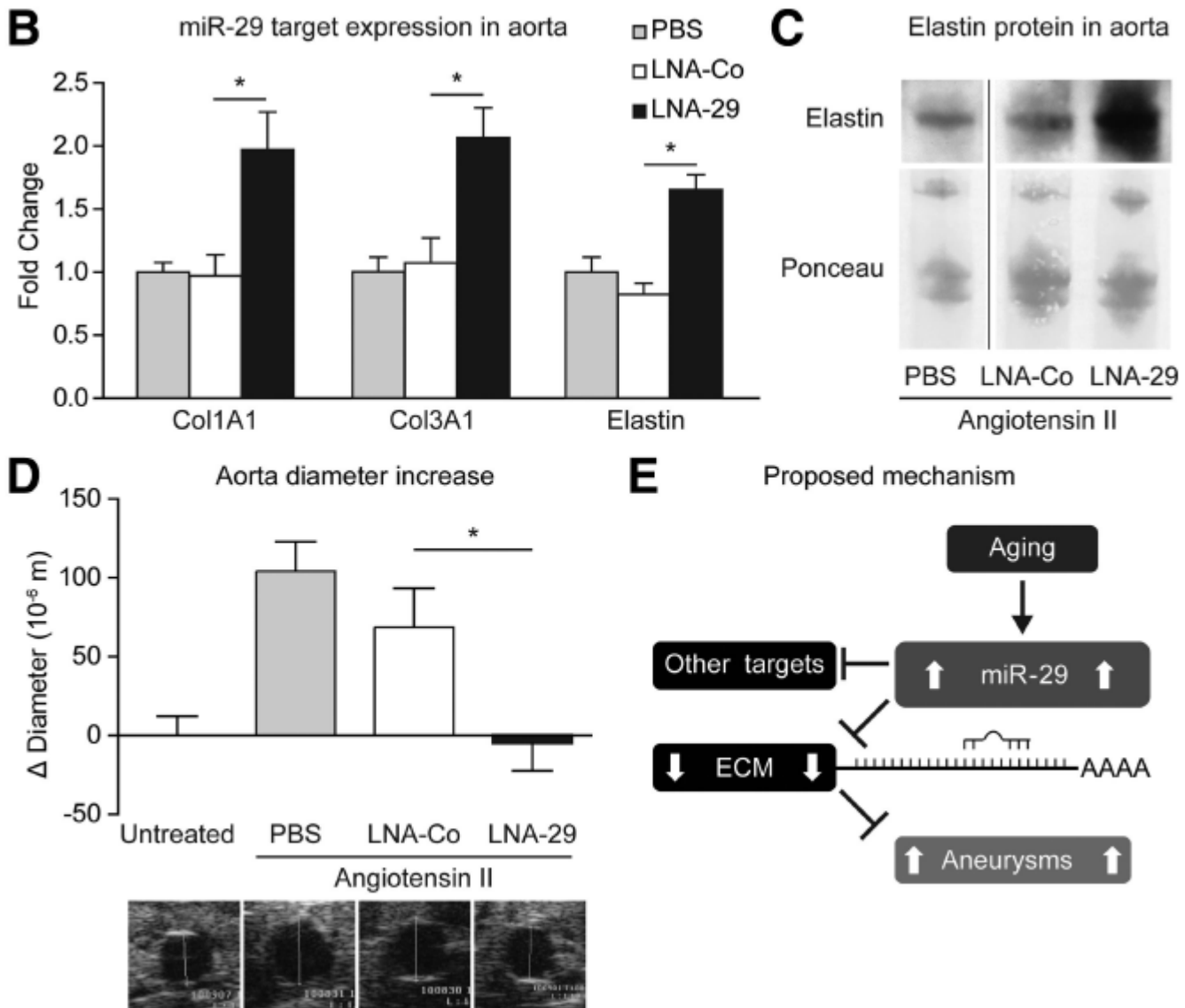
παίζει πρωτεύοντα ρόλο στην προδιάθεση για την ανάπτυξη ΑΚΑ. Οι έρευνες στράφηκαν προς τη μελέτη της σχέσης miR-29 και ηλικίας στο ανεύρυσμα της κοιλιακής αορτής.

Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι μόνο το miR-29b παρουσίασε υψηλή έκφραση στην αορτή ενώ η έκφραση των άλλων δύο, δεν επηρεάστηκε. Το επίπεδο έκφρασης αυτού του microRNA ταυτοποιήθηκε και σε ανευρυσματικές αορτές στον θώρακα, τόσο σε ποντίκια (ζωικό μοντέλο Fibulin-4^{R/R} ποντικών), όσο και σε ασθενείς με θωρακικό ανεύρυσμα που υποβάλλονταν σε χειρουργική επέμβαση.

Η επιβεβαίωση ότι η έκφραση των miR-29 συνδέεται με την αορτική διαστολή, ήρθε με τη χρήση LNA-τροποποιημένων antisense ολικονουκλεοτιδίων (LNA-29) για την αποσιώπηση των miR-29 *in vivo*. Η χρήση του LNA-29 ανέστειλε επιτυχώς και τα τρία μέλη των miR-29 και οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης των γονιδίων στόχων τους όπως τα *Col1a1*, *Col1a2* και η ελαστίνη στον ιστό της αορτής.

Για να αποδείξουν ότι η αναστολή των miR-29, αποτρέπει την διάταση του αορτικού τοιχώματος, οι ερευνητές χορήγησαν αγγειοτενσίνη II σε ποντίκια 18 μηνών και μέτρησαν την διάμετρο της αορτής μέσω υπερήχων, πριν την χορήγηση και 7 ημέρες μετά. Παράλληλα διαπίστωσαν ότι η αναστολή των miR-29 από το LNA-29 συνεχιζόταν ακόμα και με διαρκή έγχυση αγγειοτενσίνης II, επάγοντας την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της ελαστίνης, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν και σε 6 μηνών ApoE^{-/-} ποντίκια μέσω έγχυσης αγγειοτενσίνης II. Η πίεση του αίματος δεν επηρεάστηκε από την αποσιώπηση των miR-29, υποδεικνύοντας ότι η απώλεια αύξησης της διαμέτρου της αορτής δεν οφείλεται σε έμμεσες επιδράσεις της πίεσης του αίματος.

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία εστίασε στην υπερέκφραση των miR-29 μορίων σε αορτές ανθρώπων και ποντικών, σε συσχέτιση με την αγγειακή γήρανση. Από τα τρία μέλη της οικογένειας αυτής, το miR-29b εμφάνισε αυξημένα επίπεδα έκφρασης σχετιζόμενα με ηλικιακά γερασμένες αορτές.



Η αναστολή των miR-29 επάγει την έκφραση των γονιδίων της εξωκυττάριας ουσίας και εμποδίζει την επαγόμενη από την αγγειοτενσίνη II διαστολή της αορτής. (Boon et. al, 2011)

Τα miR-29 ρυθμίζουν αρκετές πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, γνωστές για την διατήρηση της ακεραιότητας του αγγειακού τοιχώματος και εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα λεία μυϊκά κύτταρα, επομένως η απόπτωση αυτών των κυττάρων που σχετίζεται με την ανάπτυξη ανευρυσμάτων, θα μπορούσε να συνεισφέρει στην αποσταθεροποίηση του αγγειακού τοιχώματος στο οποίο συμμετέχουν τα miR-29. Η αναστολή των miR-29 βρέθηκε να οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της MMP9 στην αορτή,

κάτι που θα μπορούσε να εμποδίζει περαιτέρω αποικοδόμηση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας. (Boon et. al, 2011).

Μια πιο εμπειριστατωμένη έρευνα δημοσιεύθηκε ένα χρόνο μετά από τον Maegdefessel και τους συνεργάτες του,. Το ενδιαφέρον της ερευνητικής ομάδας περιστράφηκε γύρω από την οικογένεια miR-29 και πιο συγκεκριμένα στο miR-29b και την επίδρασή του στη δράση των MMP2 και MMP9.

Η χρήση μοντέλου ποντικού όπου πραγματοποιήθηκε επαγωγή του ανευρύσματος με χορήγηση ελαστάσης σε 10 εβδομάδων ποντίκια, επέτρεψε την διερεύνηση της έκφρασης των miR-29 και των πιθανών τους στόχων σε χρονικά διαστήματα των 3,7, 14, 21 και 28 ημερών μετά την διάχυση ελαστάσης. Τα αποτελέσματα ως αναμενόμενο, παρουσίαζαν σταδιακή αύξηση της διαμέτρου της κοιλιακής αορτής σε σύγκριση με τα ποντίκια που ανήκαν στην ομάδα ελέγχου

Η απομόνωση αορτικού ιστού από στις 7, 14 και 28 ημέρες, ανέδειξε πως το miR-29b ήταν το μόνο από τα miR-29 που υφίστατο σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης και στις τρεις χρονικές στιγμές. Τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης επιβεβαιώθηκαν και με *in situ* υβριδισμό, όπου τα επίπεδα έκφρασης του miR-29b ήταν σχεδόν μηδενικά κυρίως στον έξω χιτώνα του αορτικού τοιχώματος σε σύγκριση τόσο με την ομάδα ελέγχου για την ελαστάση, όσο και με τα ποντίκια στα οποία δεν είχε χορηγηθεί τίποτα. Αναφορικά με τα γονίδια στόχους, η έκφραση στα *Col1a1*, *Col3a*, *Col5a1*, συσχετίστηκε αρνητικά με την έκφραση του miR-29b ενώ τα επίπεδα έκφρασης της ελαστίνης ήταν αυξημένα 14 ημέρες μετά την χορήγηση της ελαστάσης, όχι όμως στα άλλα δύο χρονικά σημεία.

Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν και ένα δεύτερο ζωικό μοντέλο επαγόμενου ανευρύσματος, 10 εβδομάδων ApoE^{-/-} ποντίκια στα οποία εγχύσανε αγγειοτενσίνη II, για να επιβεβαιώσουν ότι τα προηγούμενα αποτελέσματά τους δεν περιορίζονταν στο μοντέλο της ελαστάσης μόνο.

Και πάλι ως αναμενόμενο, η διαστολή της αορτής αυξανόταν σταδιακά από την 7^η έως και την 28^η ημέρα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (χορήγηση φυσιολογικού ορού) και το ποσοστό θνησιμότητας από την ρήξη του ΑΚΑ

άγγιζε το 26% στα $\text{ApoE}^{-/-}$ ποντίκια με αγγειοτενσίνη II. Στις 14 και 28 ημέρες, το miR-29b ήταν και πάλι το μόνο μέλος με σημαντικά μειωμένα επίπεδα στα δύο χρονικά διαστήματα. Αρνητική συσχέτιση με την έκφραση του miR-29b εμφάνισαν τα επίπεδα έκφρασης των *Col1a1*, *Col3a*, *Col5a1*, *Eln*, και *Fbn1*, ενώ αυξημένα επίπεδα παρουσίασαν τα 3 γονίδια του κολλαγόνου και στις 14 και στις 28 ημέρες. Η ελαστίνη όπως και στο προηγούμενο μοντέλο παρουσίασε σημαντική υπερέκφραση στις 14 ημέρες ενώ το γονίδιο *Fbn1* παρέμεινε ανεπηρέαστο.

Επιπλέον χορήγηση TGF- β 1, γνωστού ρυθμιστή του miR-29b, σε καλλιέργειες κυττάρων της αορτής οδήγησε σε μείωση των επιπέδων έκφρασης του miR-29b στους ινοβλάστες αλλά όχι στα λεία μυϊκά κύτταρα. Ακολούθησε επιμόλυνση με anti-29b και pre-29b η οποία επιβεβαιώθηκε με μικροσκόπιο φθορισμού και FACS (επιτυχής, >50% όλων των κυττάρων).

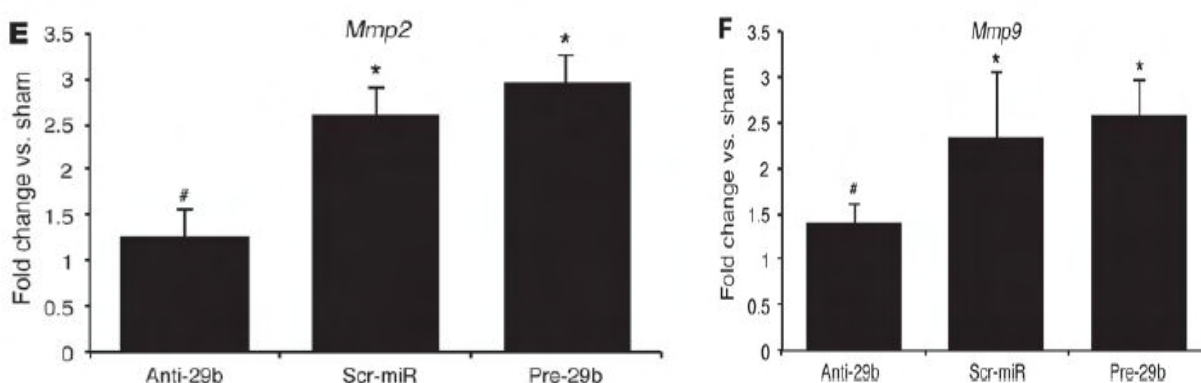
Η ρύθμιση του miR-29b είχε μεγάλες επιπτώσεις στην έκφραση των *COL1A1* και *COL3A1* και στους δύο κυτταρικούς τύπους, και συγκεκριμένα η υπερέκφραση του miR-29b, ανέστειλε την έκφραση του *ELN* στα λεία μυϊκά κύτταρα, ενώ η αποσιώπηση του miR-29b με το antagomiR του, ενίσχυσε την δράση του TGF- β 1 στην σύνθεση του κολλαγόνου (σημαντική αύξηση) στους ινοβλάστες. Αντίθετο αποτέλεσμα καταγράφηκε στην περίπτωση της επιμόλυνσης με το pre-29b.

Η *in vitro* ρύθμιση του miR-29b που παρατηρήθηκε στα ανθρώπινα κύτταρα της αορτής, επιβεβαιώθηκε και *in vivo* στο ζωικό μοντέλο επαγόμενου ανευρύσματος μέσω διάχυσης ελαστάσης. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν ένα FITC-σημασμένο LNA-anti-29b μόριο και έναν λεντιϊό σημασμένο με GFP για την επιμόλυνση με pre-29b και διπλές μελέτες ανοσοφθορισμού αποκάλυψαν την επιτυχή επιμόλυνση (transfection) με τα ρυθμιστικά μόρια του miR-29b, στο αορτικό τοίχωμα. Και τα δύο αυτά ρυθμιστικά μόρια εκφράστηκαν στα λεία μυϊκά κύτταρα κάτι που παρατηρήθηκε με ταυτόχρονη έκφραση της ακτίνης των λείων μυϊκών κυττάρων καθώς και στον έξω χιτώνα της αορτής, και στις δύο περιπτώσεις όμως ο εντοπισμός τους περιοριζόταν στο παθολογικό σημείο του ανευρύσματος της κοιλιακής αορτής.

Ενδιαφέρουσα παρατήρηση αφορούσε την μεγάλη αύξηση της διαμέτρου της αορτής στα ποντίκια όπου χορηγήθηκε pre-29b, η οποία οδήγησε στο θάνατο τέσσερα από αυτά, λόγω της ρήξης των ανευρυσμάτων τους.

Όσο αφορά στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στόχων του miR-29b, η χορήγηση του anti-29b οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA των *Col1a1*, *Col3a1* και της ελαστίνης στις 7, 14 και 28 ημέρες μετά την έγχυση ελαστάσης, ενώ η αλλαγή των επιπέδων έκφρασης αυτών των γονιδίων στην περίπτωση του pre-29b όμως, δεν χαρακτηρίστηκε από διαβάθμιση ανάμεσα στα τρία αυτά χρονικά σημεία αν και ήταν σαφώς μειωμένη σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου.

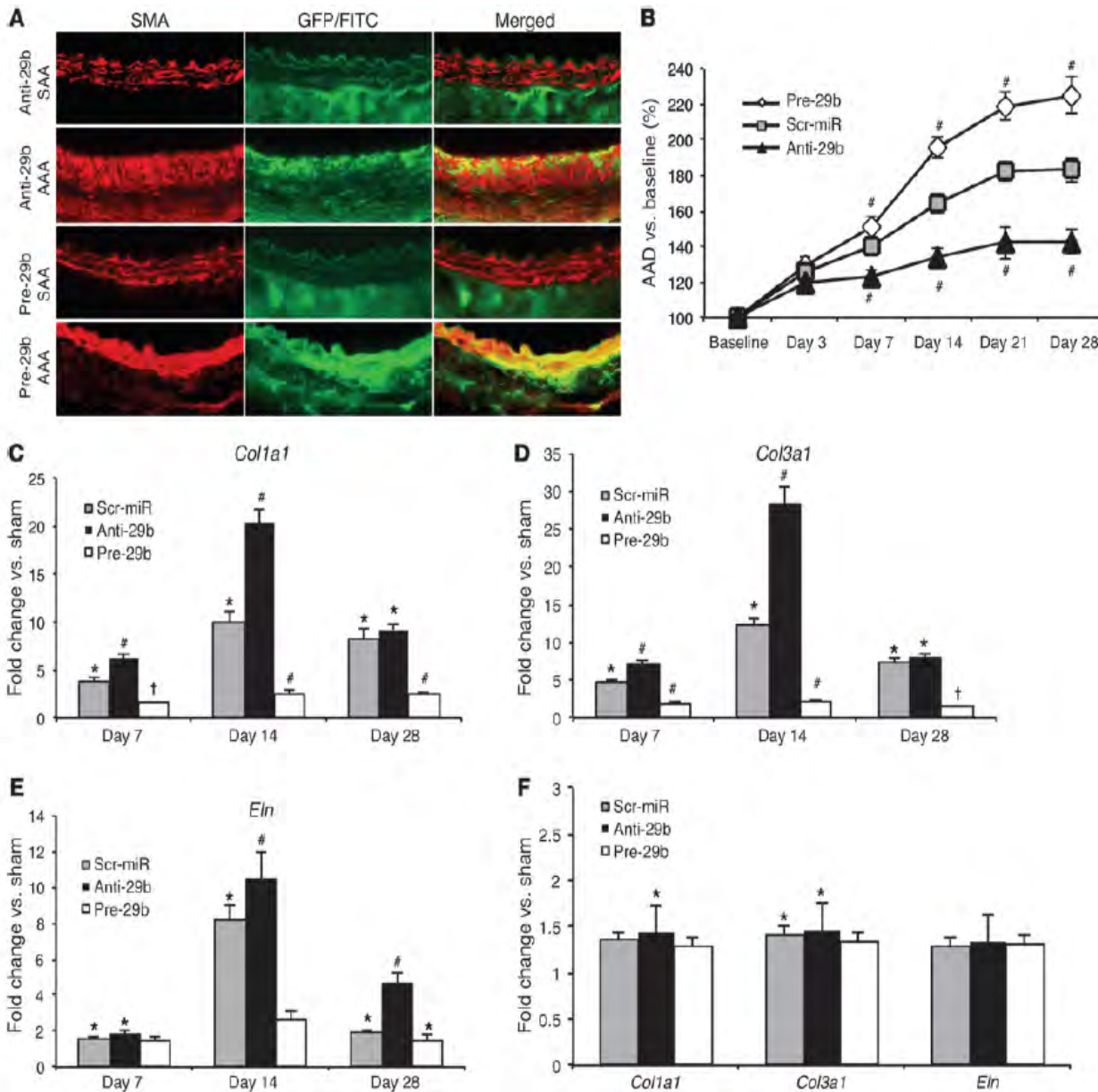
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, σημαντική είναι η συμβολή του miR-29b στη ρύθμιση των MMPs. *In situ* ζυμογραφία, αποκάλυψε χαμηλότερη δραστηριότητα των MMPs σε ποντίκια όπου χορηγήθηκε anti-29b σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, στις 14 ημέρες μετά την επαγωγή του ανευρύσματος στο μοντέλο της ελαστάσης. Αναμενόμενα, η δραστηριότητα των πρωτεασών αυτών, αυξήθηκε στα pre-29b ποντίκια με μεγάλες διαμέτρους της κοιλιακής τους αορτής. Η έκφραση των γονιδίων *Mmp2* και *Mmp9* βρέθηκε υψηλή στα pre-29b ποντίκια και αρκετά μειωμένη στα anti-29b. (Fig 5). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στις περιπτώσεις των *Mmp2*, *Mmp9* γονιδίων στους ανθρώπινους αορτικούς ινοβλάστες στους οποίους χορηγήθηκε TGF-β1 και ρυθμιστές του miR-29b



Επίπεδα έκφρασης των *Mmp2*, *Mmp9* σε ποντίκια επαγόμενου ανευρύσματος μέσω διάχυσης ελαστάσης με ρύθμιση του miR-29b από τα anti-29 και pre-29. (Maegdefessel et. al, 2012 *)

Η *in vivo* προσέγγιση στο μοντέλο επαγόμενου ανευρύσματος μέσω διάχυσης ελαστάσης, πραγματοποιήθηκε και στο μοντέλο της αγγειοτενσίνης II.

Αναστολή του miR-29b με το anti-29b κατέληξε σε σημαντική μείωση της αύξησης του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής μετά από 28 ημέρες, ενώ η υπερέκφραση του μέσω του pre-29b οδήγησε σε αύξηση της διαμέτρου της αορτής στις 14 και 28 ημέρες μετά την έγχυση της αγγειοτενσίνης II.



Οι επιδράσεις του anti-29b και του pre-29b σε ποντίκια επαγόμενου ανευρύσματος μέσω διάχυσης ελαστάσης. (Maegdefessel et. al, 2012 *)

Η έκφραση των γονιδίων στόχων του miR-29b, μειώθηκε σημαντικά μετά από 28 ημέρες τα ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε το pre-29b και ο κίνδυνος ρήξης αυξήθηκε στο 63% σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου καθώς και την ομάδα του anti-29b. Το ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι η ρύθμιση της έκφρασης του miR-29b μέσω των anti-29b και pre-29b δεν σημείωσε μεγάλες διαφορές, όπως στο μοντέλο της ελαστάσης. Η πιθανή εξήγηση που έδωσαν οι ερευνητές αφορούσε στην οξεία και εστιασμένη βλάβη που προκαλείται στην κοιλιακή αορτή στο μοντέλο της ελαστάσης η οποία οδηγεί σε υψηλή «πρόσληψη» των ρυθμιστών του miR-29b, σε σχέση με την περίπτωση του άλλου ζωικού μοντέλου.

Επίσης μελέτη σχετικά με την επίδραση του miR-29b σε αορτικό ιστό ασθενών με κοιλιακό ανεύρυσμα ανέδειξε μειωμένα επίπεδα του miR-29b ($-2,3 \pm 0,6$ φορές) στους πάσχοντες. Σε συμφωνία με τα δεδομένα από μελέτες σε ζωικά μοντέλα, τα γονίδια *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1* και *ELN* εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα στα ανευρύσματα κοιλιακής αορτής.

Προηγούμενες μελέτες έχουν παρουσιάσει ενδείξεις για την θεραπευτική δυναμική των miR-29 σε ασθένειες που σχετίζονται με ινώσεις. Σε καταστάσεις όπως η καρδιακή ίνωση μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου και στην ισχαιμία καθώς και στην ίνωση σε ήπαρ και νεφρούς η αυξημένη έκφραση των γονιδίων του κολλαγόνου, ελέγχεται άμεσα από την μείωση των επιπέδων του miR-29b.

Η προσέγγιση της μελέτης αυτής, παρουσιάζει την υποέκφραση του miR-29b σαν έναυσμα για την προ-ινώδη απόκριση στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής. Στη ρύθμιση του miR-29b ενδογενώς, φαίνεται να συμμετέχει ο TGF- β ο οποίος έχει την ικανότητα να καταστέλλει την έκφραση του miR-29b.

Από τη ρύθμιση του miR-29b, επηρεάζονται κυρίως τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων του κολλαγόνου και λιγότερο της ελαστίνης. Το γεγονός ότι η αναστολή ενός μόνο microRNA μπορεί να επάγει σημαντική περιαγγειακή ίνωση στο αορτικό τοίχωμα και έτσι να προστατέψει την αορτή από την αυξανόμενη διάτασή της, δείχνει την δύναμη μεμονωμένων microRNA στην ρύθμιση πολλών γονιδίων-στόχων σε μια συντονισμένη προσπάθεια. Σε χρόνιες παθήσεις όπως το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής, μακροχρόνια

χορήγηση και επαναλαμβανόμενη χορήγηση φαρμακευτικών παραγόντων, μοιάζουν απαραίτητες για να παρέχουν σε ασθενείς με αυξημένο κίνδυνο, αποτελεσματική θεραπεία.

Η τοπική χορήγηση με μπαλόνια που εκκρίνουν φάρμακα, στην συγκεκριμένη περίπτωση anti-29b, έχει ήδη σημειώσει επιτυχία σε πειραματικό στάδιο με χορήγηση siRNA. Στρατηγικές που θα εστιάζουν στην περεταίρω μείωση της έκφρασης του miR-29b, πιθανώς να επιφέρουν θεραπευτικά αποτελέσματα όσο αφορά την προστασία της αορτής από διάταση και μελλοντική ρήξη.

(Maegdefessel et. al, 2012 *)

miR-133a/b και miR-204

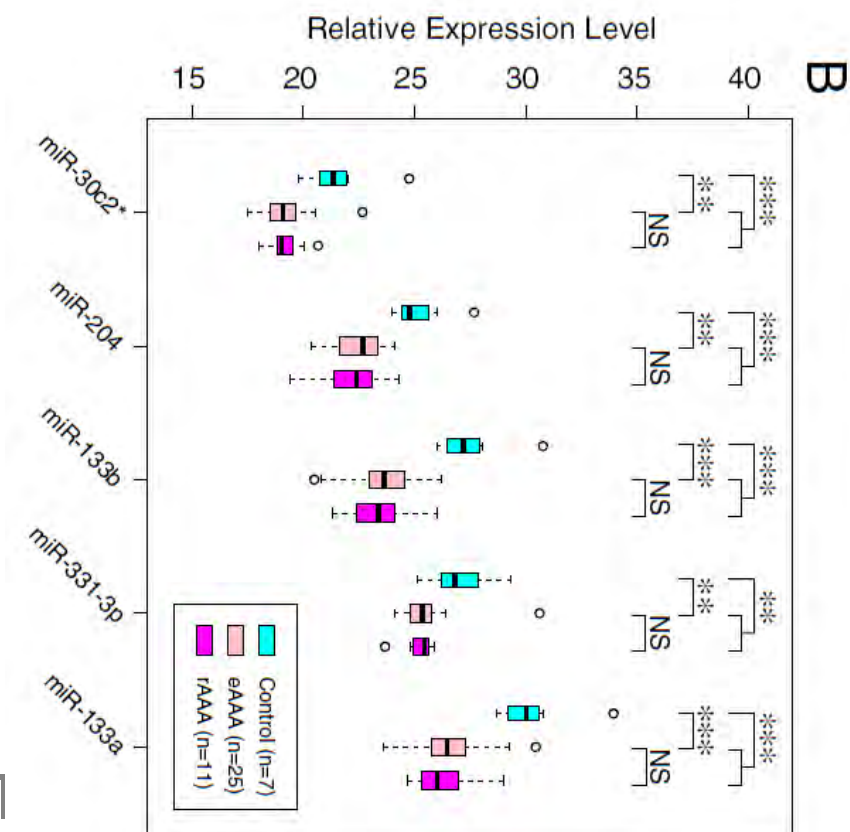
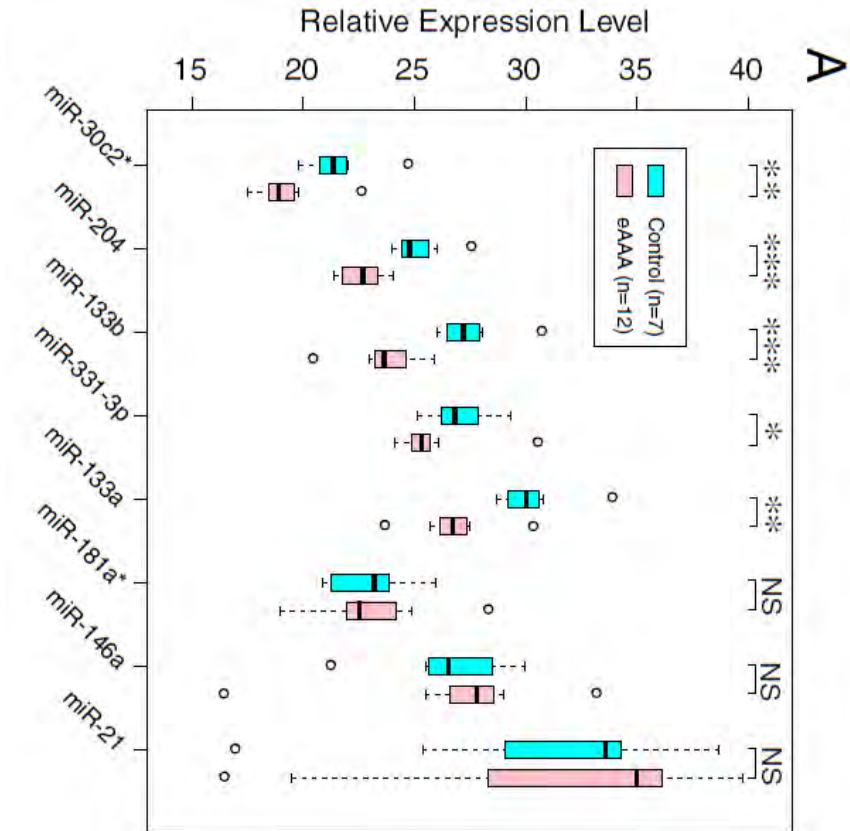
Ο αριθμός των microRNA που συσχετίζονται με το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής τα οποία μελετήθηκαν μεμονωμένα κυρίως σε ζωικά μοντέλα επαγόμενου ανευρύσματος, είναι πολύ μικρός ενώ περιορισμένες είναι οι έρευνες πάνω στη συμβολή των microRNA στο ανθρώπινο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής. Ο Pahl και οι συνεργάτες του το 2012 διερεύνησαν τα microRNA που εκφράζονται στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής. Η μελέτη μέσω μικροσυστοιχιών συνέκρινε την έκφραση των miRNA μεταξύ 5 δειγμάτων από ασθενείς με ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής και 5 δειγμάτων ελέγχου, από άτομα αντίστοιχης ηλικίας και φύλου και κατέληξε σε 139 microRNA που εκφράζονταν διαφορετικά, από τα οποία τα 8 εμφάνιζαν σημαντικές και υπολογίσιμες διαφορές.

Τα miR-181a*, miR-146a και miR-21 παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης, ενώ τα miR-133b, miR-133a, miR-331-3p, miR-30c-2* και miR-204, είχαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης

Οι έρευνες επικεντρώθηκαν στη μελέτη των microRNA που παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης. Δεδομένου ότι η έναρξη, ανάπτυξη και ρήξη του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής, χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς, συγκρίνανε τα επίπεδα έκφρασης των ανωτέρω microRNA, μεταξύ δειγμάτων προερχόμενων από ασθενείς με ανεύρυσμα

κοιλιακής αορτής, από τους οποίους οι 11 είχαν υποστεί ρήξη και οι 25 είχαν υποβληθεί σε χειρουργική αποκατάσταση του ΑΚΑ.

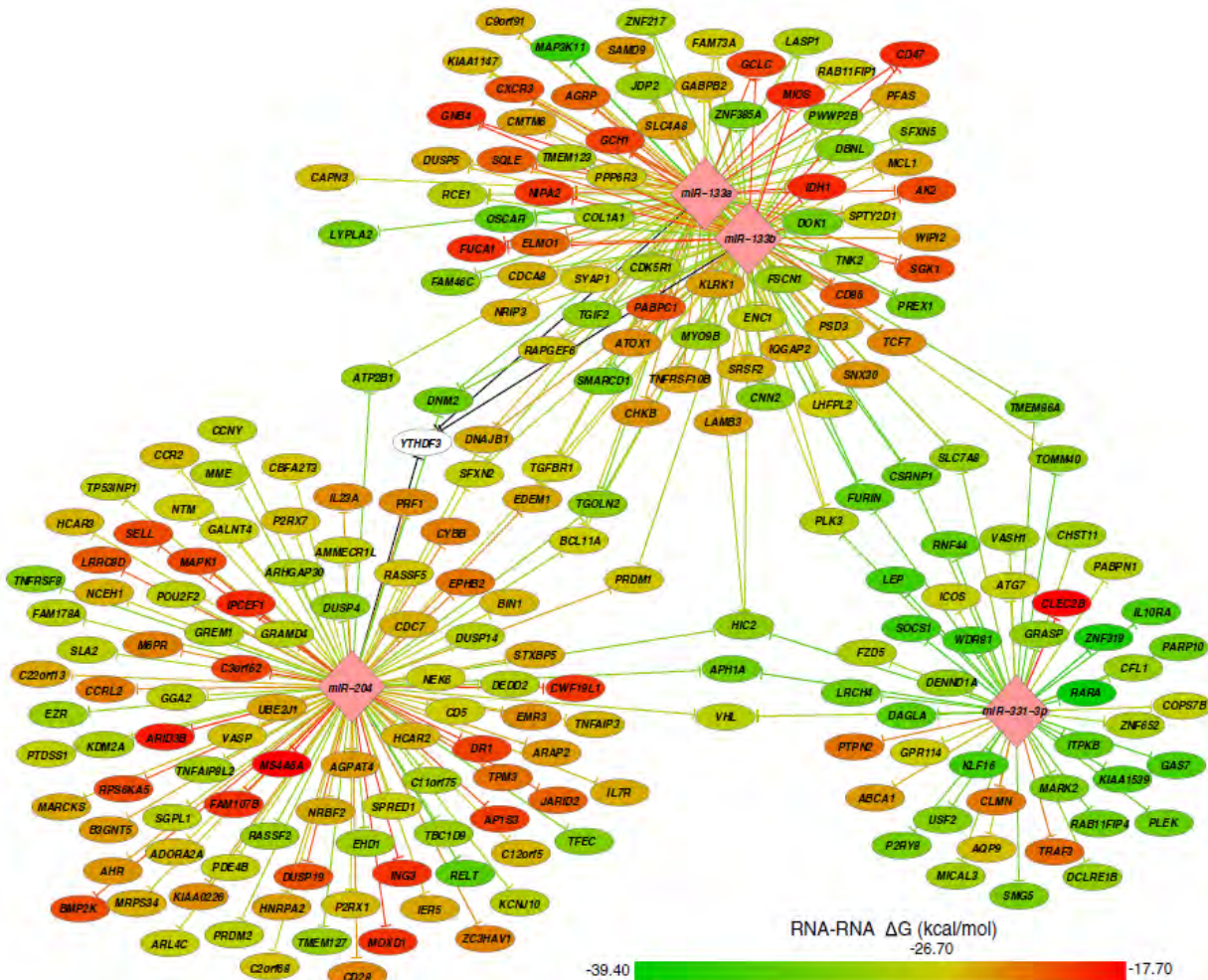
Τα δεδομένα της ανάλυσης υπέδειξαν διαφοροποιημένη έκφραση των miR-133b, miR-133a, miR-331-3p, miR-30c-2* και miR-204.



Επικύρωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης μικροσυστοιχιών μέσω qRT-PCR πραγματικού χρόνου. (Pahl et. al, 2012).

Προχώρησαν λοιπόν στην εύρεση των πιθανών στόχων των miR-133b, miR-133a, miR-331-3p, miR-30c-2* και miR-204 μέσω βιοπληροφορικών αναλύσεων από τις οποίες σε πρώτο στάδιο πληροφορήθηκαν για την μη ύπαρξη πιθανών γονιδίων στόχων για το miR-30c-2*. Τα 222 από αυτά τα γονίδια-στόχοι ήταν σημαντικά υπερεκφρασμένα σε προηγούμενη δημοσίευση πάνω στα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης mRNA στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν οιαλληλεπιδράσεις μεταξύ miRNA-mRNA μέσω λογισμικού προγράμματος, για να ταυτοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις με τη μικρότερη ενέργεια σύνδεσης, ώστε να θεωρηθούν πιο πιθανές να υφίστανται στην πραγματικότητα. Σαν αποτέλεσμα, απεικόνισαν ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπίδρασης των miR-133b, miR-133a, miR-331-3p, και miR-204 με γονίδια στόχους, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Το γονιδιακό δίκτυο των miR-133a, miR-133b, miR-331-3p και miR-204 με τα προβλεπόμενα γονίδια-στόχους τους. (Pahl et. al, 2012)]

Όπως φαίνεται και στην απεικόνιση του δικτύου αλληλεπίδρασης, τα γονίδια *CSRNP1*, *SLC7AB*, *PLK3* και *FURIN* αποτελούν πιθανούς στόχους των miR-133a, miR-133b και miR-331-3p, τα *APH1A* και *VHL*, στόχους των miR-204 και miR-331-3p και τα γονίδια *DNM2*, *DNAJB1*, *TGFBR1*, *TGOLN2*, *BCL11A*, *EDEM1*, *SFXN2*, *YTHDF3*, πιθανοί στόχοι των miR-204, miR-133a και miR-133b. Το μόνο γονίδιο που αποτελεί πιθανό στόχο και των τεσσάρων, είναι το *HIC2*, στενός συγγενής του ισχυρά ογκοκατασταλτικού γονιδίου *HIC1*.

Επίσης, αρκετά γονίδια-στόχοι με ρόλο στην απόπτωση, υπόκεινται σε ρύθμιση της γονιδιακής τους έκφρασης από τα microRNA. Δύο υποδοχείς του παράγοντα TNF, τα γονίδια *TNFRSF10B* και *TNFRSF8*, φαίνεται να αποτελούν γονίδια-στόχους των miR-133a/miR-133b το πρώτο και του miR-204 το δεύτερο. Το πρώτο γονίδιο, κωδικοποιεί τον υποδοχέα θανάτου 5 και εμπλέκεται στο μονοπάτι της απόπτωσης που χαρακτηρίζεται από τα *DR5*, *FADD* και την κασπάση-8. Το δεύτερο γονίδιο, γνωστό και ως *CD30*, εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και εκφράζεται από τα ενεργοποιημένα T και B λεμφοκύτταρα. Ακόμα, το γονίδιο *TP53INP1*, ένα γονίδιο στόχος του p53 που αποκρίνεται σε πολλά είδη κυτταρικού στρες, και προάγει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση, αποτελεί στόχο και του miR-204.

Όσον αφορά στη φλεγμονή, χαρακτηριστικό ιστολογικό εύρημα ανευρυσματικής αορτής, τα *CD28*, *CD86* και *ICOS* γονίδια, φαίνεται να ρυθμίζονται από τα miR-204, miR133a/133b και miR-331-3p, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί πως τα επίπεδα mRNA των *CD86* και *ICOS*, έχουν βρεθεί αυξημένα στο αορτικό τοίχωμα ασθενών με ΑΚΑ.

Ένα επιπλέον ενδιαφέρον εύρημα, αποτελεί η πιθανή στόχευση του *MMP9* γονιδίου από το miR-204 γεγονός που ενισχύει τη συμβολή του miR-204 στην παθογένεια του ανευρύσματος.

Η εμπλοκή αυτών των τεσσάρων microRNA στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής επιβεβαιώθηκε και σε κυταροκαλλιέργειες, όπου η μειωμένη έκφραση των miR-133a και miR-133b έχει συσχετιστεί με προώθηση του πολλαπλασιασμού των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων.

Το miR-133a, ρυθμίζει την έκφραση ενός γονιδίου που ονομάζεται πυρηνικός παράγοντας ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων εξαρτώμενος από καλσινευρίνη 4 (*NFATC4/NFAT3*) ο οποίος εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ μειωμένα επίπεδα της έκφρασής του έχουν αναφερθεί στο ΑΚΑ.

Άλλος ένας στόχος των miR-133a και miR-133b είναι το γονίδιο *KLF15*, η έκφρασή του οποίου είναι μειωμένη τόσο σε ζωικά μοντέλα ανευρύσματος όσο και σε ασθενείς με ΑΚΑ.

Από τα ανωτέρω ευρήματα συμπεραίνεται ότι τέσσερα μόνο microRNA τα οποία παρουσίασαν διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ ανευρυσματικού και φυσιολογικού ιστού φέρονται να εμπλέκονται μέσω πολύπλοκων ρυθμιστικών δικτύων στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής καθώς ρυθμίζουν γονίδια που συμμετέχουν στην απόπτωση και στη φλεγμονή. Τα αποτελέσματα ερευνών, παρέχουν ισχυρές ενδείξεις για την σημαντική ρυθμιστική λειτουργία των microRNA στην αορτή. (Pahl et. Al. 2012)

miR-516a-5p και miR-1260

Σε μια παρόμοια προσέγγιση των microRNA που εκφράζονται στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής κινήθηκαν και οι Cheuk και Cheng, μελέτησαν την έκφραση των microRNA σε καλλιέργειες λείων μυϊκών κυττάρων τα οποία απομονώθηκαν από τον μεσαίο χιτώνα ασθενών με ΑΚΑ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα σημαντική διαφορά στην έκφρασή τους, παρουσίασαν το miR-516a-5p με εμφανή αύξηση και το miR-1260 με εμφανή μείωση και η ποσοτικοποίηση με την PCR πραγματικού χρόνου επιβεβαίωσε τις αλλαγές και συγκεκριμένα για περισσότερο από τρεις φορές αύξηση στην περίπτωση του miR-516a και σχεδόν τέσσερις φορές μείωση για το miR-1260 και καμία

σημαντική διαφορά στην έκφραση αυτών των δύο microRNA δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των φυσιολογικών δειγμάτων.

| Probe ID | Sample ID Group Annotation | P value | Average | | SD | | ΔLMR A-C | SD A-C | Fold change A vs control |
|----------|----------------------------------|---------|---------|-------|------|------|---------------------|-----------|-----------------------------|
| | | | A | C | A | C | | | |
| 42550 | hsa-miR-516a-5p | .01 | 0.15 | -0.81 | 0.32 | 0.34 | 0.96 | 0.47 | 1.947 |
| 145975 | hsa-miR-1260 | .04 | -0.93 | 0.13 | 0.63 | 1.11 | -1.06 | 1.28 | 0.48 |
| 46755 | hsa-miRPlus-E1026 | .04 | -0.45 | 0.08 | 0.46 | 0.35 | -0.54 | 0.58 | 0.689 |
| 46498 | hsa-miRPlus-F1099 | .05 | -0.37 | 0.01 | 0.08 | 0.36 | -0.38 | 0.37 | 0.77 |
| 46624 | hsa-miR-1236 | .06 | 0.02 | 0.42 | 0.21 | 0.47 | -0.4 | 0.51 | 0.759 |
| 145838 | hsa-miR-125b-1 | .06 | -0.48 | -1 | 0.49 | 0.24 | 0.53 | 0.55 | 1.441 |
| 46786 | hsa-miRPlus-F1193 | .06 | 0.16 | -0.22 | 0.19 | 0.28 | 0.38 | 0.33 | 1.298 |
| 146196 | hsa-miR-711 | .07 | -0.46 | -0.95 | 0.32 | 0.26 | 0.49 | 0.41 | 1.403 |
| 11175 | hsa-miR-525-5p | .07 | 0.36 | -0.22 | 0.39 | 0.29 | 0.58 | 0.49 | 1.493 |
| 42661 | hsa-miR-492 | .07 | -0.28 | -0.68 | 0.28 | 0.17 | 0.39 | 0.33 | 1.311 |
| 46473 | hsa-miRPlus-E1112 | .1 | 0.21 | -0.12 | 0.24 | 0.22 | 0.33 | 0.33 | 1.257 |
| 46256 | hsa-miRPlus-E1238 | .11 | -0.33 | -1.09 | 0.54 | 0.58 | 0.76 | 0.79 | 1.691 |
| 17354 | hsa-miR-637 | .11 | -0.8 | 0.19 | 0.79 | 0.59 | -1 | 0.99 | 0.501 |
| 45891 | hsa-miRPlus-E1285 | .12 | -0.14 | -0.75 | 0.48 | 0.41 | 0.61 | 0.63 | 1.529 |
| 146072 | hsa-miR-1469 | .14 | -0.41 | 0.12 | 0.42 | 0.46 | -0.53 | 0.62 | 0.691 |
| 46885 | hsa-miRPlus-E1225 | .15 | 0.33 | -0.54 | 0.81 | 0.52 | 0.87 | 0.97 | 1.825 |

ΔΔΔ, Abdominal aortic aneurysm; *ΔLMR*, absolute Δ LogMedianRatios; *miR*, microRNAs; *SD*, standard deviation. Hsa-miR-516a-5p and mi-1260 showed the highest fold change ($P < .05$).

Προφίλ έκφρασης microRNA στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής μέσω ανάλυσης miRNA μικροσυστοιχιών.
(Cheuk & Cheng, 2014)

Επιπλέον δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της έκφρασης των δύο αυτών microRNA με τους παράγοντες κινδύνου της εμφάνισης ΑΚΑ όπως η ηλικία και το κάπνισμα.

Επιπρόσθετες μελέτες υπέδειξαν συσχέτιση αυτών των microRNA με την δυσκαμψία της αορτής, της αλλαγές στο αορτικό τοίχωμα, την αθηρομάτωση, τη φλεγμονή, την υπέρταση, τις κυτταροκίνες και την κυτταρική σηματοδότηση που εξαρτάται από τις χυμοκίνες. Όλα αφορούν μηχανισμούς που πιθανολογείται να ενέχονται στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής.

| <i>Broad phenotypes</i> | <i>Target gene</i> |
|--------------------------------|--------------------|
| (ANCA)-associated vasculitis | TNF |
| Abdominal aortic aneurysm | MTHFR |
| Hypertension | MTHFR |
| Arterial and venous thrombosis | MTHFR |
| Arthritis | TNF |
| Arthritis | <u>IL-3</u> |
| Arthritis, juvenile | TNF |
| Arthritis, psoriatic | NFKB1 |
| Arthritis, psoriatic | TNF |
| Atherosclerosis, coronary | <u>VEGFA</u> |
| Atherosclerosis, coronary | PPP1R3A |
| Atherosclerosis, coronary | GPXI |
| Atherosclerosis, coronary | PTGSI |
| Atherosclerosis, coronary | TNF |
| Atherosclerosis, coronary | MTHFR |
| Atherosclerosis, coronary | CXCL12 |
| Atherosclerosis, generalized | GPXI |
| Blood pressure | FURIN |
| Blood pressure, arterial | GNAS |

CXCL 12, Chemokine (C-X-C motif) ligand 12; *FURIN*, furin; *GNAS*, stimulatory G-protein alpha subunit; *GPXI*, glutathione peroxidase 1; *IL-3*, interleukin-3; *MTHFR*, methylenetetrahydrofolate reductase; *NFKB1*, nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit 1; *PPP1R3A*, protein phosphatase 1 regulatory subunit 3A; *PTGSI*, prostaglandin-endoperoxide synthase 1; *TNF*, tumor necrosis factor; *VEGFA*, vascular endothelial growth factor A. Source: miRANDA bioinformatics analysis, total 756 entries. The secretory protein levels encoded by the underlined genes – IL-3 and VEGFA – were analyzed.

Γονίδια που σχετίζονται με την αορτή και βρέθηκαν ως πιθανοί στόχοι του miR-516a-5p. (Cheuk Cheng, 2014)

Όσο αφορά τα γονίδια στόχους φαίνεται ότι τα γονίδια *IL-3* και *VEGFA* τα οποία ρυθμίζονται από το miR-516a-5p παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε ανευρυσματικά κύτταρα. Επίσης, η πρωτεϊνική έκφραση του *COL1A1*, μορίου στόχου του miR-1260, εμφανίστηκε αυξημένη στα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα των καλλιεργημένων ανευρυσματικών κοιλιακών αορτών σε σύγκριση με τις φυσιολογικές.

Ένας περιορισμός αυτής της έρευνας ήταν ότι μόνο δείγματα τελικού σταδίου του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής μπορούν να ληφθούν από επεμβάσεις αποκατάστασης και όπως είναι προφανές θα πρέπει να ακολουθήσουν και εκτενέστερες μελέτες πάνω σε αυτά τα δύο microRNA, εμπιριέχοντας έρευνες και σε ζωικά μοντέλα. (Cheuk and Cheng, 2014)

| <i>Broad phenotypes</i> | <i>Target gene</i> |
|--|--------------------|
| Angina | GPIBA |
| Aortic stiffness | CYP11B2 |
| Aortic stiffness | <u>COL1A1</u> |
| Arterial stiffness blood pressure, arterial | ECE2 |
| Arterial wall changes | CYP11B2 |
| Arthritis | TAP2 |
| Atherosclerosis, carotid | AHSG |
| Atherosclerosis, coronary | LMNA |
| Atherosclerosis, coronary | PECAM1 |
| Atherosclerosis, coronary | CYP11B2 |
| Atherosclerosis, coronary lipoprotein | HAPI |
| Atherosclerosis, coronary myocardial infarct | GPIBA |
| Atherosclerosis, diabetes | PTPNI |
| Atherosclerosis, generalized | GPIBA |

AHSG, Alpha-2-HS-glycoprotein; *COL1A1*, collagen, type I, alpha 1; *CYP11B2*, cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2; *ECE2*, endothelin converting enzyme 2; *GPIBA*, glycoprotein Ib (platelet), alpha polypeptide; *HAPI*, Huntingtin-associated protein 1; *LMNA*, lamin A/C; *PECAM1*, platelet endothelial cell adhesion molecule 1; *PTPNI*, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1; *TAP2*, protein antigen peptide transporter 2.

Source: miRANDA bioinformatics analysis, total 774 entries. The expression of specific protein *COL1A1* encoded by the underlined gene was analyzed.

Γονίδια που σχετίζονται με την αορτή και βρέθηκαν ως πιθανοί στόχοι του miR-1260. (Cheuk Cheng, 2014)

miR-205

Ακόμα μια πρόσφατη επιστημονική μελέτη, καταδεικνύει το ρόλο του miR-205 στην παθογένεια του ΑΚΑ. Ο Kim και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν μοντέλο ποντικού όπου πραγματοποιήθηκε επαγωγή του ανευρύσματος με χορήγηση αγγειοτενσίνης II με στόχο την ταυτοποίηση της έκφρασης εξειδικευμένων microRNA αυτού του μοντέλου, στο κοιλιακό αορτικό επιθήλιο. Η μελέτη μικροσυστοιχιών μαζί με τις απαραίτητες μεθοδολογικές επικυρώσεις των αποτελεσμάτων, αποκάλυψε τέτοια έκφραση για το miR-712 και το ομόλογό του στον ανθρώπινο οργανισμό, miR-205.

Ενδιαφέρον αποτελούν οι στόχοι αυτού του microRNA το οποίο διεγείρει τη δράση των MMPs στο αορτικό τείχος στοχεύοντας άμεσα τους MMP αναστολείς, TIMP3 και RECK (reversion-inducing Cys-rich protein with kazal motifs). Η αποσιώπηση αυτού του microRNA μέσω των antagomiR (anti-712 στον ποντικό, anti-205 στον άνθρωπο) οδήγησε σε σημαντική μείωση της δραστηριότητας των MMP στην αορτή καθώς και της φλεγμονής, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη ΑΚΑ στο συγκεκριμένο ζωικό μοντέλο. Παράλληλα, η υπερέκφραση τριών ακόμα microRNA, των miR-21, miR-133b, και miR-378, η έκφραση των οποίων επάγεται από την διέγερση της αγγειοτενσίνης II, ταυτοποιήθηκε μαζί με το miR-205 και σε ανθρώπινα δείγματα ΑΚΑ σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Οι ερευνητές κατέληξαν στο ότι η στόχευση του miR-205 θα μπορούσε ενδεχομένως να αποτελεί μια καινούργια θεραπευτική προσέγγιση για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης ΑΚΑ. (Kim et. al, 2014)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας, ήταν να παρουσιάσει τις μελέτες που έχουν διεξαχθεί σχετικά με microRNA και το ρόλο τους στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής. Τα κύρια microRNA που φαίνεται να ενέχονται στο ΑΚΑ είναι τα miR-21, miR-26a, miR-29b, miR-133a/b, miR-204, miR-516a-5p και miR-1260 και το miR-205.

Σύμφωνα με μελέτες παρατηρήθηκε σε δύο ζωικά μοντέλα ανευρύσματος, αυξημένα επίπεδα του miR-21 τα οποία και συσχετίστηκαν με την αυξημένη διάμετρο της αορτής, ενώ επίσης το γονίδιο της που υφίσταται ρύθμιση από το ανωτέρω microRNA παρουσίασε μειωμένα επίπεδα έκφρασης. Μελέτες έδειξαν ότι η ανεσταλμένη *PTEN* και η ρύθμιση του miR-21 είχαν ευεργετικές επιπτώσεις στον οργανισμό, μέσω του μαζικού πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων στο αορτικό τείχος. Αξιοσημείωτη είναι και η αλληλεπίδραση του καπνίσματος ως περιβαλλοντικού παράγοντα κινδύνου με το miR-21. Η νικοτίνη προκάλεσε ενίσχυση των επιπέδων του miR-21, μια δράση που συσχετίστηκε με καταστολή της περαιτέρω διάτασης της αορτής. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε μελέτες σε ανθρώπινο ιστό όπου αυξημένα επίπεδα του miR-21 και μειωμένα επίπεδα του *PTEN* παρατηρήθηκαν σε καπνίζοντες συγκριτικά με τους μη καπνίζοντες ασθενείς..

Άλλο ένα μόριο που πιθανώς ενέχεται στο ΑΚΑ είναι το miR-26a το οποίο συμμετέχει σε τροποποιήσεις που αφορούν στο φαινότυπο των λείων μυϊκών κύτταρων και ρυθμίζει τις SMAD1 και SMAD4 πρωτεΐνες. Η υπερέκφραση αυτών των δύο πρωτεϊνών επιτεύχθηκε έπειτα από χρήση ενός antagomiR αναστολέα του miR-26a σε *in vitro* πειράματα με ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα ανευρύσματος κοιλιακής αορτής. Σε ζωικά μοντέλα ανευρύσματος, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα του miR-26a, τα οποία υποδεικνύουν την συμμετοχή του στην δημιουργία ανευρύσματος κοιλιακής αορτής λόγω της επαγόμενης απόπτωσης των λείων μυϊκών κυττάρων.

Τα miR-29, αποτελούν μια σημαντική ομάδα ρύθμισης στην περίπτωση του ανευρύσματος καθώς ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση τόσο κατά την ανάπτυξη του ανευρύσματος όσο και κατά τη γήρανση της αορτής. Από τα τρία μέλη της οικογένειας το miR-29b είναι εκείνο που φαίνεται σημαντικά

μειωμένο σε ανευρύσματα κοιλιακής αορτής σε ποντικούς. Τα επιστημονικά δεδομένα προτείνουν πως η καταστολή των επιπέδων έκφρασης του miR-29b σχετίζεται με την αποδυνάμωση του αορτικού τοιχώματος που καθώς επίσης δρα ενάντια της επαγωγής της έκφρασης κολλαγόνου,. Η ηλικία που αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για το ΑΚΑ φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα των miR-29, τα οποία παρουσιάζονταν αρκετά αυξημένα σε αορτές ηλικιωμένων ποντικών, υποδεικνύοντας την απώλεια της προστατευτικής επίδρασης ενός υποεκφραζόμενου miR-29b, με την πάροδο των χρόνων.

Περαιτέρω μελέτες έδειξαν διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης των miR-516a-5p και miR-1260 σε ιστό ανευρύσματος συγκριτικά με δείγματα φυσιολογικής αορτής. Συγκεκριμένα περιγράφηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-516a-5p και μειωμένα επίπεδα έκφρασης του miR-1260 στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής σε σχέση με φυσιολογικά δείγματα. Η σημασία αυτών των microRNA θεωρήθηκε σημαντική, καθώς το miR-516a-5p ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων της IL-3 και του VEGF-α ενώ το miR-1260 του *COL1A1*. Σε μια άλλη έρευνα μειωμένη έκφραση στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής περιγράφηκε για τα miR-133a, miR-133b, miR-331-3p και miR-204. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι στόχοι αυτών των γονιδίων μεταξύ των οποίων και η MMP-9, στόχος του miR-204 και ο KLF15 παράγοντας του οποίου η έκφραση είναι μειωμένη στο ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής και αποτελεί στόχο των miR-133a και miR-133b.

Ακόμα μια μελέτη, κατέδειξε τον ρόλο του miR-205 στην ανάπτυξη ΑΚΑ μέσω στοχευμένης καταστολής των TIMP3 και RECK, αναστολέων των MMPs. Η υπερέκφραση αυτού του microRNA στο ΑΚΑ, φαίνεται να συμβάλλει στην προαγωγή της πρωτεόλυσης του αορτικού τοιχώματος παρεμποδίζοντας την καταστολή των MMPs. Θεραπευτικές προσεγγίσεις που θα συμπεριλάμβαναν την αποσιώπηση αυτού του microRNA, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παρεμπόδιση ανάπτυξης ανευρύσματος κοιλιακής αορτής.

Επιπλέον ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι microRNA που παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε ιστό ανευρύσματος, βρέθηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα ασθενών με ΑΚΑ. Ανάμεσα σε αυτά

ήταν τα miR-15a, miR-15b, miR-29b, miR-124a, miR-126, miR-146a, miR-155, και miR-223. (Kin et. al, 2012)

Στα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρονται και άλλα microRNA όπως τα miR-126, miR-146a, miR-155 και miR-143/145, η δράση των οποίων δεν έχει ταυτιστεί άμεσα με το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής αλλά με παθολογικές διαταραχές που σχετίζονται με τη νόσο. (Harris et. al, 2008 , , Quintavalle et. al, 2010 Vasa-Nicotera et. al, 2011 , Zhu et. al, 2011, Hergenreider et. al, 2012)

Είναι σαφές, πλέον πως η βιολογική σημασία των microRNA είναι πολύ μεγάλη. Υπάρχει ισχυρή πεποίθηση στην επιστημονική κοινότητα ότι αυτά τα μόρια αποτελούν μελλοντικά εργαλεία που συνεισφέρουν στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στο ΑΚΑ ενώ επίσης αποτελούν μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους. Η συμβολή τους στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας του ΑΚΑ και της θεραπείας αυτού βρίσκεται ακόμα σε πρώιμα στάδια και προϋποθέτει περαιτέρω έρευνες για το κατά πόσο οι επιγενετικές τροποποιήσεις μπορούν να ρυθμίσουν μόρια-κλειδί της παθογένειας του ανευρύσματος. Επιπλέον, η μελέτη τους θα μπορούσε να αναδείξει και προγνωστικούς δείκτες όσο αφορά το ανεύρυσμα της κοιλιακής αορτής και να αναδείξει περισσότερους θεραπευτικούς στόχους για την αντιμετώπισή του.. (Zampetaki et. al, 2012)

Τα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνολογίας τα καθιστούν ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης καθώς τα miRs μπορούν να ενισχυθούν και να ανιχνευτούν με υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία σε υποτύπους βιολογικών δειγμάτων (αίμα, ούρα, σάλιο) ενώ επίσης η χρήση miR-μικροσυστοιχιών επιτρέπει την ποσοτικοποίηση της έκφρασής τους καθώς επίσης σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το γεγονός ότι υπάρχει η ικανότητα της ρύθμισης αυτών μέσω συστημικής χορήγησης αναστολέων των microRNA (antagomiRs) ή μιμητικών τους μορίων (pre-miRs), χωρίς την εμφάνιση τοξικότητας.

Συμπερασματικά, τα microRNAs πιθανόν να αποτελούν σημαντικούς διαγνωστικούς και θεραπευτικούς στόχους προσδίδοντας καινούργιες προοπτικές στη θεραπεία του ανευρύσματος κοιλιακής αορτής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alcorn HG, Wolfson SK Jr, Sutton-Tyrrell K, et al. Risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults enrolled in the Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16(8):963–70. 1996
- Appasani K. *MicroRNAs: from basic science to disease biology.* Cambridge: Cambridge University Press. 2008
- Baas AF, Medic J, van 't Slot R, et al. Association of the TGF-beta receptor genes with abdominal aortic aneurysm. *Eur J Hum Genet.* 2009
- Bao, N., Lye, K. W. & Barton, M. K. MicroRNA binding sites in Arabidopsis class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Dev. Cell* 7, 653–662. 2004
- Bartel D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* vol. 116, Jan. pp. 281-297. 2004
- Baxter B. T., W. H. Pearce, E. A. Waltke et al. Prolonged administration of doxycycline in patients with small asymptomatic abdominal aortic aneurysms: report of a prospective (Phase II) multicenter study. *Journal of Vascular Surgery.* vol. 36, no. 1, pp. 1–12. 2002
- Bobik A. Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:1712–1720. 2006
- Boon, R.A.; Seeger, T.; Heydt, S.; Fischer, A.; Hergenreider, E.; Horrevoets, A.J.G.; Vinciguerra, M.; Rosenthal, N.; Sciacca, S.; Pilato, M.; et al. MicroRNA-29 in aortic dilation: Implications for aneurysm formation. *Circ. Res.* 109, 1115–1119. 2011
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* Dec;13(12):1097–101. 2006
- Brady AR, Thompson SG, Fowkes FG, Greenhalgh RM, Powell JT. Abdominal aortic aneurysm expansion: risk factors and time intervals for surveillance. *Circulation.* July 6;110(1):16-21. 2004
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B. & Cohen, S. M. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 3, 404–418. 2005
- Bushati, N. & Cohen, S. M. MicroRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 175–205. 2007
- Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* Feb 20;136(4):642–55. 2009

Chakraborti S, Mandal M, Das S, et al. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Mol Cell Biochem.* 253:269–285. 2003

Cheuk Bernice Lai Yee and Stephen Wing Keung Cheng. Identification and characterization of microRNAs in vascular smooth muscle cells from patients with abdominal aortic aneurysms. *Journal of Vascular Surgery.* 59:1. 2014

Chunsheng Li, Yi Feng, George Coukos, and Lin Zhang¹. Therapeutic MicroRNA Strategies in Human Cancer. *The AAPS Journal.* Vol. 11, No. 4. 2009

Curci JA. Digging in the "soil" of the aorta to understand the growth of abdominal aortic aneurysms. *Vascular.* 17:S21–29. 2009

Curci, J. A., Liao, S., Huffman, M. D., Shapiro, S. D. & Thompson, R. W. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J. Clin. Invest.* 102, 1900–1910. 1998

Dobrin PB, Baumgartner N, Anijar S, Chejfec G, Mrkvicka R. Inflammatory aspects of experimental aneurysms. Effect of methylprednisolone and cyclosporine. *Ann NY Acad Sci.* 800:74–88. 1996

Doench, J. G. & Sharp, P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18, 504–511. 2004

Du, T. & Zamore, P. D. MicroPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development.* 132, 4645–4652. 2005

Eriksson P, Jones KG, Brown LC, et al. Genetic approach to the role of cysteine proteases in the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg.* 91(1):86–9. 2004

Ernst CB. Abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med.* 328:1167–1172. 1993

Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F. A. & Pillai, R. S. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 331–341. 2005

Friedman R. C., K. K. H. Farh, C. B. Burge, and D. P. Bartel. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research.* vol. 19, no. 1, pp. 92–105. 2009

Ghilardi G, Biondi ML, Battaglioli L, et al. Genetic risk factor characterizes abdominal aortic aneurysm from arterial occlusive disease in human beings: CCR5 Delta 32 deletion. *J Vasc Surg.* 40(5):995–1000. 2004

Ghosh Abhijit, Paul D Dimusto, Lauren K Ehrlichman, Omar Sadiq, Brendan McEvoy, John S Futchko, Peter K Henkle, Jonathan L Eliason, Gilbert R Upchurch Jr. The Role of Extracellular Signal-Related Kinase During Abdominal Aortic Aneurysm Formation. *J Am Coll Surg.* 215(5): 668-680. 2012

Gillum RF. Epidemiology of aortic aneurysm in the United States. *J Clin Epidemiol.* 48(11):1289-1298. 1995

Giusti B, Saracini C, Bolli P, et al. Genetic analysis of 56 polymorphisms in 17 genes involved in methionine metabolism in patients with abdominal aortic aneurysm. *J Med Genet.* 45(11): 721–30. 2008

Golledge ALV, Walker P, Norman PE, Golledge J. A systematic review of studies examining inflammation associated cytokines in human abdominal aortic aneurysm samples. *Disease Markers.* 26:181–188. 2009

Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, Frenzel C, Majoros WH, Chi JT, et al. A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature.* Dec 13;450(7172):1096–9. 2007

Grad, Y., Aach, J., Hayes, G.D., Reinhart, B.J., Church, G.M., Ruvkun, G., and Kim, J. Computational and experimental identification of *C. elegans* microRNAs. *Mol. Cell.* 11, 1253–1263. 2003

Gretarsdottir S, Baas AF, Thorleifsson G, et al. Genome-wide association study identifies a sequence variant within the DAB2IP gene conferring susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Nat Genet.* 2010

Grimson, A. et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell.* 27, 91–105. 2007

Harris, T.A.; Yamakuchi, M.; Ferlito, M.; Mendell, J.T.; Lowenstein, C.J. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 1516–1521. 2008

Helgadottir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, et al. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet.* 40(2):217–24. 2008

Hellenthal, F. A., Geenen, i. L., Teijink, J. A., Heeneman, s. & schurink, G. w. Histological features of human abdominal aortic aneurysm are not related to clinical characteristics. *Cardiovasc. Pathol.* doi:10.1016/j.carpath.2008.06.014. 2008

Henebiens M, Vahl A, Koelemay MJ. Elective surgery of abdominal aortic aneurysms in octogenarians:a systematic review. *J Vasc Surg.* March ; 47 (3):676-681. 2008

- Heneghan H. M., N.Miller, A. J. Lowery, K. J. Sweeney, and M. J. Kerin. MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer. *Journal of Oncology*. Volume 10. 2009
- Hergenreider, E.; Heydt, S.; Tréguer, K.; Boettger, T.; Horrevoets, A.J.; Zeiher, A.M.; Scheffer, M.P.; Frangakis, A.S.; Yin, X.; Mayr, M.; et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat. Cell Biol.* 14, 249–256. 2012
- Hinterseher I., G. Tromp, and H. Kuivaniemi. Genes and abdominal aortic aneurysm. *Annals of Vascular Surgery*. vol. 25, no. 3, pp. 388–412. 2011
- Hobert Oliver. Common logic of transcription factor and microRNA action. *Trends in Biochemical Sciences*. Vol.29 No.9. 2004
- Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer*. 94(6):776–80. 2006
- Iida Yasunori, Baohui Xu, Geoffrey M. Schultz, Vinca Chow, Julie J. White, Shola Sulaimon, Ayala Hezi-Yamit, Susan Rea Peterson, Ronald L. Dalman. Efficacy and Mechanism of Angiotensin II Receptor Blocker Treatment in Experimental Abdominal Aortic Aneurysms. *PLoS ONE*. 7(12): e49642. 2012
- Irizarry, e. et al. Demonstration of interstitial collagenase in abdominal aortic aneurysm disease. *J. Surg. Res.* 54, 571–574. 1993
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. & Bartel, B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 19–53. 2006
- Kim CW, Kumar S, Son DJ, Jang IH, Griendling KK, Jo H. Prevention of Abdominal Aortic Aneurysm by Anti-MicroRNA-712 or Anti-MicroRNA-205 in Angiotensin II-Infused Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014
- Kin, K.; Miyagawa, S.; Fukushima, S.; Shirakawa, Y.; Torikai, K.; Shimamura, K.; Daimon, T.; Kawahara, Y.; Kuratani, T.; Sawa, Y. Tissue- and plasma-specific microRNA signatures for atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *J. Am. Heart Assoc.* 1, e000745. 2012
- King VL, Trivedi D, Gitlin JM, Loftin CD. Selective cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib decreases angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:1137–1143. 2006
- Kloosterman, W. P. & Plasterk, R. H. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev. Cell* 11, 441–450. 2006
- Kuivaniemi H., E. J. Ryer, H. R. Yoon, and J. R. Elmore. Genetic risk factors for abdominal aortic aneurysms In: *Aortic Aneurysms: Risk*

Factors, Diagnosis, Surgery & Repair, D. Fischhof and F. Hatig, Eds., pp. 1–29, Nova Science, New York, NY, USA. 2013

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., and Tuschl, T. New microRNAs from mouse and human. *RNA* 9. 175–179. 2003

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 294(5543):858–62. 2001

Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Hye RJ, Makaroun MS, Barone GW, Bandyk D, Moneta GL, Makhoul RG. The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *Arch Intern Med*. 160:1425-1430. 2000

Lederle FA. In the clinic. Abdominal aortic aneurysm. *Ann Intern Med*. May 5;150(9):ITC5-ITC15. 2009

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. Sep 25;425(6956):415–9. 2003

Lee, R.C., and Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 294, 862–864. 2001

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854. 1993

Leeper, N.J.; Raiesdana, A.; Kojima, Y.; Chun, H.J.; Azuma, J.; Maegdefessel, L.; Kundu, R.K.; Quertermous, T.; Tsao, P.S.; Spin, J.M. MicroRNA-26a is a novel regulator of vascular smooth muscle cell function. *J. Cell Physiol*. 226, 1035–1043. 2011

Lenk G. M., G. Tromp, S.Weinsheimer, Z. Gatalica, R. Berguer, and H. Kuivaniemi. Whole genome expression profiling reveals a significant role for immune function in human abdominal aortic aneurysms. *BMC genomics*. vol. 8, p. 237. 2007

Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 120, 15–20. 2005

Lillvis H. John, Yoshiki Kyo, Gerard Tromp, Guy M Lenk, Ming Li, Qing Lu, Robert P Igo Jr, Natzi Sakalihan, Robert E Ferrell, Charles M Schworer, Zoran Gatalica, Susan Land, Helena Kuivaniemi. Analysis of positional

candidate genes in the AAA1 susceptibility locus for abdominal aortic aneurysms on chromosome 19. *BMC Medical Genetics*. 12:14: 1471-2350. 2011

Lillvis J. H., R. Erdman, C. M. Schworer et al. Regional expression of HOXA4 along the aorta and its potential role in human abdominal aortic aneurysms. *BMC Physiology*. vol. 11, no. 1, article 9. 2011 *

Lim L. P., N. C. Lau, P. Garrett-Engele et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. vol. 433, no. 7027, pp. 769–773. 2005

Lim, L.P., Lau, N.C., Weinstein, E.G., Abdelhakim, A., Yekta, S Rhoades, M.W., Burge, C.B., and Bartel, D.P. The micro- RNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*. 17, 991–1008. 2003

Liu G, Espinosa E, Oemar BS, et al. Bimodal effects of angiotensin II on migration of human and rat smooth muscle cells. Direct stimulation and indirect inhibition via transforming growth factor beta 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17:1251–1257. 1997

Liu J, Sukhova GK, Sun JS, Xu WH, Libby P, Shi GP. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004

Loeys BL, Schwarze U, Holm T, et al. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF- β receptor. *N Engl J Med*. 355(8):788-798. 2006

Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 110(5):625–632. 2002

Lu H, Rateri DL, Bruemmer D, et al. Involvement of the renin-angiotensin system in abdominal and thoracic aortic aneurysms. *Clin Sci*. 123:531–543. 2012

Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(23):9667–72. 2007

Maegdefessel, L.; Azuma, J.; Toh, R.; Deng, A.; Merk, D.R.; Raiesdana, A.; Leeper, N.J.; Raaz, U.; Schoelmerich, A.M.; McConnell, M.V.; et al. MicroRNA-21 blocks abdominal aortic aneurysm development and nicotine-augmented expansion. *Sci. Transl. Med*. 4, 122ra22. 2012

Maegdefessel, L.; Azuma, J.; Toh, R.; Merk, D.R.; Deng, A.; Chin, J.T.; Raaz, U.; Schoelmerich, A.M.; Raiesdana, A.; Leeper, N.J.; et al. Inhibition

of microRNA-29b reduces murine abdominal aortic aneurysm development. *J. Clin. Invest.* 122, 497–506. 2012 *

Marco Antonio, Maria Ninova, Matthew Ronshaugen, Sam Griffiths-Jones. Clusters of microRNAs emerge by new hairpins in existing transcripts. *Nucleic Acids Research.* Vol.21, No. 16 : 7745-7752. 2013

Martinez, J. et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell.* 110, 563–574. 2002

Massart F, Marini F, Menegato A, et al. Allelic genes involved in artery compliance and susceptibility to sporadic abdominal aortic aneurysm. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 92(5): 413–8. 2004

Miller, F. J., Jr. Aortic aneurysms: it's all about the stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* 22, 1948–1949. 2002

Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, et al. Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* vol 41. 2011

Murphy, G., Atkinson, s., ward, r., Gavrilovic, J. & Reynolds, J. J. The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases. *Ann. NY Acad. Sci.* 667,1–12. 1992

Nelson P., M. Kiriakidou, A. Sharma, E. Maniataki, and Z. Mourelatos. The microRNA world: small is mighty. *Trends in Biochemical Sciences.* vol. 28, Oct. pp. 534-540. 2003

Nelson, K. K. & Melendez, J. A. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 768–784. 2004

Nielsen, C. B. et al. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA.* 13, 1894–1910. 2007

Nienaber CA, Eagle KA. Aortic dissection: new frontiers in diagnosis and management, part I: from etiology to diagnostic strategies. *Circulation.* ;108(5):628-635. 2003

O.C. Maes, H.M. Chertkow, E. Wang, and H.M. Schipper. MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders. *Current Genomics.* vol. 10, May., pp. 154-168. 2009

Ogata T, Gregoire L, Goddard KA, et al. Evidence for association between the HLA-DQA locus and abdominal aortic aneurysms in the Belgian population: a case control study. *BMC Med Genet.* 7:67. 2006

Ogata T, Shibamura H, Tromp G, et al. Genetic analysis of polymorphisms in biologically relevant candidate genes in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 41(6):1036–42. 2005

Pahl, M.C.; Derr, K.; Gäbel, G.; Hinterseher, I.; Elmore, J.R.; Schworer, C.M.; Peeler, T.C.; Franklin, D.P.; Gray, J.L.; Carey, D.J. et al. MicroRNA expression signature in human abdominal aortic aneurysms. *BMC Med. Genomics.* 5, 25. 2012

Papadaki, M. et al. Differential regulation of protease activated receptor-1 and tissue plasminogen activator expression by shear stress in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 83, 1027–1034. 1998

Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg.* November;5(6):491-499. 1991

Peters, L. & Meister, G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol. Cell.* 26, 611–623. 2007

Petersen E, Gineitis A, Wagberg F, Angquist KA. Activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in abdominal aortic aneurysms Relation to size and rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 20(5): 457–461. 2000

Petrinec D., S. Liao, D. R. Holmes, J. M. Reilly, W. C. Parks, and R. W. Thompson. Doxycycline inhibition of aneurismal degeneration in an elastase-induced rat model of abdominal aortic aneurysm: preservation of aortic elastin associated with suppressed production of 92 kD gelatinase. *Journal of Vascular Surgery.* vol. 23, no. 2, pp. 336–346. 1996

Petrocca F, Lieberman J. Micromanagers of immune cell fate and function. *Adv Immunol.* 102:227–44. 2009

Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, et al. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science.* Apr 30 ; 304 (5671) :734–6. 2004

Pleumeekers HJ, Hoes AW, van der DE. Aneurysms of the abdominal aorta in older adults. The Rotterdam Study. *Am J Epidemiol.* December 15;142(12):1291-1299. 1995

Quintavalle, M.; Elia, L.; Condorelli, G.; Courtneidge, S.A. MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *J. Cell Biol.* 189, 13–22. 2010

Rana, T. M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 23–36. 2007

- Rush C., M. Nyara, J. V Moxon, A. Trollope, B. Cullen, J. Golledge. Whole Genome expression analysis within the angiotensin II-apolipoprotein E deficient mouse model of abdominal aortic aneurysm. *BMC Genomics*. 10:29:147102164/10/298. 2009
- Sadamasa N., K. Nozaki, and N. Hashimoto. Disruption of Gene for Inducible Nitric Oxide Synthase Reduces Progression of Cerebral Aneurysms. *Stroke*. vol. 34, no. 12, pp. 2980–2984. 2003
- Sakalihan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*. April 30;365(9470):1577-1589. 2005
- Schechter AD, Calderon TM, Berman AB, et al. Human vascular smooth muscle cells possess functional CCR5. *J Biol Chem*. 275(8):5466–71. 2000
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G. Du et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 115, 199–208. 2003
- Shibamura H., J. M. Olson, C. van Vlijmen-van Keulen et al. Genome scan for familial abdominal aortic aneurysm using sex and family history as covariates suggests genetic heterogeneity and identifies linkage to chromosome 19q13. *Circulation*, vol. 109, no. 17, pp. 2103–2108. 2004
- Shimizu, K., Shichiri, M., Libby, P., Lee, r. T. & Mitchell, r. N. Th2-predominant inflammation and blockade of iFN-gamma signaling induce aneurysms in allografted aortas. *J. Clin. Invest*. 114, 300–308. 2004
- Sontheimer, E. J. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 6, 127–138. 2005
- Spin JM, Hsu M, Azuma J, et al. Transcriptional Profiling and Network Analysis of the Murine Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm. *Physiol Genomics*. 43:993–1003. 2011
- Steinmann B, Royce P, Superti-Furga A. The Ehlers-Danlos syndrome. In: IRoyce PM, Steinmann B, eds. *Connective Tissue and its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects*. 2nd ed. New York, NY: Wiley-Liss;351-407. 1993
- Subramanian S. and C.J. Steer. MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. *Journal of Cellular Physiology*. vol. 223, pp. 289-298. 2010
- Subramanian V, Golledge J, Heywood EB, et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by angiotensin II via transforming

growth factor-beta1-activated p38 mitogenactivated protein kinase in aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32:397–405. 2012

Sukhova GK, Shi GP. Do cathepsins play a role in abdominal aortic aneurysm pathogenesis? *Ann NY Acad Sci.*1085:161–169. 2006

Svensson LG, Crawford ES. *Cardiovascular and Vascular Disease of the Aorta.* Philadelphia, PA: WB Saunders Co:1-6. 1997

Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 15;103(33):12481-6. 2006

Thompson AR, Cooper JA, Jones GT, et al. Assessment of the association between genetic polymorphisms in transforming growth factor beta, and its binding protein (LTBP), and the presence, and expansion, of Abdominal Aortic Aneurysm. *Atherosclerosis.* 209(2):367–73. 2010

Tolia, N. H. & Joshua-Tor, L. Slicer and the argonauts. *Nature Chem. Biol.* 3, 36–43. 2007

United Kingdom Small Aneurysm Trial Participants. Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. *Lancet* . November 21;352(9141):1649–1655. 1998

United Kingdom Small Aneurysm Trial Participants. Smoking, lung function and the prognosis of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* June;19(6):636–642. 2000

Vammen S, Lindholt JS, Ostergaard L, Fasting H, Henneberg EW. Randomized double-blind controlled trial of roxithromycin for prevention of abdominal aortic aneurysm expansion. *Br J Surg.* 88:1066–1072. 2001

Van der Vliet, J. A. & Boll, A. P. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet* . 349, 863–866. 1997

Vasa-Nicotera, M.; Chen, H.; Tucci, P.; Yang, A.L.; Saintigny, G.; Menghini, R.; Mahè, C.; Agostini, M.; Knight, R.A.; Melino, G.; et al. miR-146a is modulated in human endothelial cell with aging. *Atherosclerosis.* 217, 326–330. 2011

Vasudevan S., Y. Tong, and J.A. Steitz. Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle.* vol. 7, Jun., pp. 1545-1549. 2008

Wahlgren C. M., E. Larsson, P. K. E. Magnusson, R. Hultgren, and J. Swedenborg. Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in a twin population. *Journal of Vascular Surgery*, vol. 51, no. 1, pp. 3–7. 2010

Walton LJ, Franklin IJ, Bayston T, Brown LC, Greenhalgh RM, Taylor GW et al. Inhibition of prostaglandin E2 synthesis in abdominal aortic aneurysms: implications for smooth muscle cell viability, inflammatory processes, and the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Circulation*. 100:48–54. 1999

Westerhof N, Stergiopoulos N, Noble MIM. Snapshots of hemodynamics: an aid for clinical research and graduate education. New York, NY: Springer Science + Business Media, Inc. 2005

Wienholds E, Plasterk RH. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett*. Oct 31;579(26):5911–22. 2005

Wills A, Thompson MM, Crowther M, Sayers RD, Bell PR. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms—cellular and biochemical mechanisms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 12:391-400. 1996

Wurdinger T., and FF Costa. Molecular therapy in the microRNA era. *The Pharmacogenomics Journal*. 7, 297–304. 2007

Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G, Wang Z. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med*. Apr;13(4):486-91. 2007

Yangming Wang and Robert Blelloch. Cell Cycle Regulation by MicroRNAs in Embryonic Stem Cells. *Cancer Res*. 69: (10). 2009

Yijun Meng, Chaogang Shao and Ming Chen. Toward microRNA-mediated gene regulatory networks in plants. *Briefings in Bioinformatics*. 2011

Yu X, Lin SG, Huang XR, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression in macrophages via the MEK-ERK MAP kinase pathway. *J Interferon Cytokine Res*. 27:103–109. 2007

Zampetaki, A.; Willeit, P.; Tilling, L.; Drozdov, I.; Prokopi, M.; Renard, J.M.; Mayr, A.; Weger, S.; Schett, G.; Shah, A.; et al. Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction. *J. Am. Coll Cardiol*. 0, 290–299. 2012

Zhu, N.; Zhang, D.; Chen, S.; Liu, X.; Lin, L.; Huang, X.; Guo, Z.; Liu, J.; Wang, Y.; Yuan, W.; Qin, Y. Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis*. 215, 286–293. 2011