



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
*“Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή
Κατεύθυνση”*

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ miRNA ΣΤΗΝ
ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ»

Θωμαδάκης Παναγιώτης
Α.Μ.: 20180136

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ιωάννα-Ραχήλ Συνοδινού-Traeger (Επιβλέπων)

Καθηγήτρια Γενετικής, Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Χριστίνα Βρεπού

Μέλος Ε.Δι.Π., Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Κυριακή Κέκου

Μέλος Ε.Δι.Π., Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ
Φεβρουάριος 2020



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

School of Health Sciences
Department of Medicine

MASTER PROGRAM IN
“Medical Genetics: Clinic & Laboratory Direction”

MASTER THESIS

**“The Participation of miRNAs in Erythropoiesis and
Haemoglobin Gene Expression”**

Thomadakis Panagiotis
Register Number: 20180136

Examining Board Members

Joanne-Rachel Synodinos-Traeger (Supervisor)
Professor of Genetics, Medical School NKUA

Christina Vrettou
Laboratory Teaching Personnel, Medical School NKUA

Kyriaki Kekou
Laboratory Teaching Personnel, Medical School NKUA

Athens
February 2020

ΠΜΣ: «ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ & ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ»

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΘΩΜΑΔΑΚΗΣ

**«Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ miRNA ΣΤΗΝ
ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ»**

ΑΘΗΝΑ, 2020

© 2020

Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ)
Παναγιώτης Θωμαδάκης, BSc Βιολογίας

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, η οποία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του ΕΚΠΑ στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. "ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ" αποτελεί συνιδιοκτησία του ΕΚΠΑ και του φοιτητή, ο καθένας από τους οποίους έχει το δικαίωμα ανεξάρτητης χρήσης και αναπαραγωγής τους (στο σύνολο ή τμηματικά) για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, σε κάθε περίπτωση αναφέροντας τον τίτλο και τον/την συγγραφέα και το ΕΚΠΑ όπου εκπονήθηκε η Διπλωματική Εργασία καθώς και τον Επιβλέποντα και την άλλα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής.



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΒΕΒΑΙΩΣΗ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

«Δηλώνω υπεύθυνα ότι η συγκεκριμένη Διπλωματική Εργασία με τίτλο:

Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΩΝ miRNA ΣΤΗΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

για τη λήψη του μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών του **Π.Μ.Σ. “ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ”**, του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, έχει συγγραφεί από εμένα προσωπικά και δεν έχει υποβληθεί ούτε έχει εγκριθεί στο πλαίσιο κάποιου άλλου μεταπτυχιακού ή προπτυχιακού τίτλου σπουδών, στην Ελλάδα ή στο εξωτερικό.

Η εργασία αυτή αντιπροσωπεύει τις προσωπικές μου απόψεις επί του θέματος.

Κατά τη συγγραφή, ακολούθησα την πρέπουσα ακαδημαϊκή δεοντολογία. Οι πηγές στις οποίες ανέτρεξα για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής αναφέρονται στο σύνολό τους, δίνοντας πλήρεις αναφορές στους συγγραφείς, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Έχω επίσης αποφύγει οποιαδήποτε ενέργεια που συνιστά παράπτωμα λογοκλοπής. Γνωρίζω ότι η λογοκλοπή μπορεί να επισύρει ποινή ανάκλησης του πτυχίου μου.

Σε κάθε περίπτωση, αναληθούς ή ανακριβούς δηλώσεως, υπόκειμαι στις συνέπειες που προβλέπονται στον Κανονισμό Σπουδών του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση», και στις διατάξεις που προβλέπει η Ελληνική και Κοινοτική Νομοθεσία περί πνευματικής ιδιοκτησίας».

Ο ΔΗΛΩΝ:

Υπογραφή:

Όνοματεπώνυμο:

Αριθμός Μητρώου:

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, Dr Joanne Rachel Traeger-Synodinou, Καθηγήτρια Γενετικής, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής στο Τμήμα Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου και να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και την πολύτιμη καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της συγκεκριμένης εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Χριστίνα Βρεττού και την Δρ. Κυριακή Κέκου για τις γνώσεις που αποκόμισα από την διδασκαλία τους, τόσο μέσω των εργαστηριακών μαθημάτων, όσο και των θεωρητικών ενοτήτων. Ευχαριστώ θερμά όλους τους διδάσκοντες του μεταπτυχιακού προγράμματος ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ, καθώς και όλους τους εργαζόμενους στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής Αθηνών του ΕΚΠΑ.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια και τους φίλους μου, που στάθηκαν δίπλα μου όλο αυτό το διάστημα και χωρίς τους οποίους δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία. Τους ευχαριστώ για τη βοήθεια, την αγάπη, την υποστήριξη και την υπομονή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	10
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	16
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	17
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	19
A.1 miRNA	21
A.1.1 miRNA: ΜΙΑ ΣΥΝΟΨΗ	21
A.1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	22
A.1.3 ΤΑ ΜΙΚΡΑ RNA ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ	23
A.1.4 Η ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ miRNA	25
A.1.4.1. ΜΕΣΑ ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ	25
A.1.4.2 miRNA ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΕΤΑΙ ΑΠΟ «JUNK DNA» ΠΕΡΙΟΧΕΣ	26
A.1.4.3 miRNA ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΕΤΑΙ ΑΠΟ ΙΝΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΚΑΙ MIRTRON	26
A.1.4.4 ΕΞΑΓΩΓΗ ΤΩΝ miRNA ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ	28
A.1.4.5. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ	28
A.1.4.6 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ miRNA ΜΕ ΜΟΝΗΡΗ ΕΚΤΟΜΗ	29
A.1.4.7 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ miRNA ΜΕ ΔΙΠΛΗ ΕΚΤΟΜΗ	30
A.1.4.8 ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ RISC	31
A.1.5 ΦΟΡΤΩΣΗ ΤΟΥ RISC ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	31
A.1.6 ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΣΤΟΧΟΥ	33
A.1.7 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ	33
A.1.7.1 ΕΚΤΟΜΗ ΤΟΥ mRNA – ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΟΥ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΠΟΚΟΠΗ	34
A.1.7.2 ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ – ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΟΣ ΑΠΟΚΟΠΗΣ	35
A.1.8 ΣΩΜΑΤΙΑ P (P BODIES)	37
A.1.9 ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ miRNA	39
A.2 ΑΙΜΑ	42
A.2.1 ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ – ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ	44
A.2.2 ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	45

A.2.2.1 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	45
A.2.2.2 ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	47
A.3 ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΦΑΙΡΙΝΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	48
A.3.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΣΦΑΙΡΙΝΩΝ	48
A.3.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΣΦΑΙΡΙΝΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗ	50
A.3.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΤΗΣ β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	51
A.3.4 ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΠΑΘΕΙΕΣ	55
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	57
B.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ miRNA	58
B.1.1. miRNA qPCR ARRAYS	58
B.1.2 miRNA ARRAYS	62
B.1.3 RNA-seq	63
B.1.4 MULTIPLEX miRNA PROFILING	64
B.2 <i>IN SILICO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ miRNA	67
B.2.1 ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ miRNA	67
B.2.1.1 miRBase	67
B.2.1.2 miRWalk 2.0	67
B.2.1.3 FirePlex Discovery Engine	67
B.2.1.4 DIANA-TarBase v7.0	67
B.2.1.5 miRCancer: microRNA CANCER ASSOCIATION DATABASE	68
B.2.1.6 miRGator 3.0	68
B.2.1.7 doRiNA 2.0	68
B.2.1.8 STarMirDB	68
B.2.1.9 miRSel	68
B.2.1.10 PolymiRTS DATABASE	69
B.2.1.11 SonamiR DATABASE	69
B.2.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ	69
B.2.2.1 miRSystem	69
B.2.2.2 mirPath	69
B.2.2.3 StarMir	70
B.2.2.4 miRDB	70
B.2.2.5 TargetScan	70
B.2.2.6 miRSearch	70
B.2.2.7 RegRNA	70
B.2.2.8 DeepBase 2.0	71
B.2.2.9 mirTools 2.0	71

B.2.3 ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ miRNA ΣΕ ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	71
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	73
Γ.1. miRNA ΚΑΙ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ	74
Γ.1.2 miR-24	76
Γ.1.3 miR-223	77
Γ.1.4 miR-150	77
Γ.1.5 miR-15a	78
Γ.1.6 miR-144/451	78
Γ.1.7 ΕΚΦΡΑΣΗ miRNA ΣΤΑ ΕΡΥΘΡΑ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΑ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ	82
Γ.1.8 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	82
Γ.2 <i>IN SILICO</i> ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΣΕ ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ miRNA ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ	84
Γ.3 miRNA ΚΑΙ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	87
Γ.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ miRNA ΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ	88
Γ.5 ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ microRNA ΣΤΗ β-ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ	91
Γ.6 ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΕΠΙΛΟΓΟΣ	93
Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	96

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «**Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση**» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2019-2020 στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής Σχολής Αθηνών του ΕΚΠΑ. Πρόκειται για μία μελέτη ανάλυσης και συνδυασμού δεδομένων από βιβλιογραφικές πηγές πάνω στο θέμα «Η συμμετοχή των miRNA στην ερυθροποίηση και την έκφραση των γονιδίων αιμοσφαιρίνης». Αρχικά παρουσιάζονται συνοπτικά οι επιμέρους εισαγωγικές γνώσεις που αφορούν την περιγραφή των miRNA, την ερυθροποίηση και την διάταξη των γονιδίων της αιμοσφαιρίνης με λεπτομερή αναφορά και των ποικίλων μορίων και παραγόντων που συμμετέχουν στην βιογένεση και δράση των miRNA. Στην συνέχεια, γίνεται αναφορά τόσο των *in vitro*, όσο και των *in silico* μεθόδων εξαγωγής πληροφοριών και επεξεργασίας των miRNA με εκτενή περιγραφή της qPCR μεθόδου και των βάσεων δεδομένων σε κάθε κατηγορία αντίστοιχα. Στο τρίτο κομμάτι της διπλωματικής περιγράφονται οι σχέσεις των ποικίλων δράσεων των miRNA με την διαδικασία της αιμοποίησης, με ειδική μνεία στην ερυθροποίηση, και με τα γονίδια των αιμοσφαιρινών, καθώς και των παθολογικών τους γονοτύπων και φαινοτύπων. Περιγράφονται οι πιο σημαντικοί εκπρόσωποι των miRNA, όπως τα miR-150, miR-223, miR-15a, miR-144, miR-451, που σχετίζονται τόσο με την ερυθροποίηση, όσο και με τα γονίδια των σφαιρινών, ανάλογα με τη σχέση που έχουν με τα πιο σημαντικά γονίδια της ερυθροποίησης και των σφαιρινικών αλυσίδων. Τέλος, γίνεται συνοπτική αναφορά σε παθολογικές περιπτώσεις όπως η β-θαλασσαιμία και εξάγονται γενικότερα συμπεράσματα για την δράση των miRNA στην έρευνα, στην διάγνωση, στην θεραπεία, και γίνονται υποθέσεις για την μελλοντική δράση τους.

Επιστημονική Περιοχή: Ιατρική Γενετική

Λέξεις-Κλειδιά: miRNA, ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ, ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ, ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

ABSTRACT

This dissertation was conducted under the aegis of the National and Kapodistrian University of Athens, as part of the Master's Program "**Medical Genetics: Clinical and Laboratory Direction**" for the academic year 2019-2020. It is a bibliographic dissertation which focuses on the analysis and comparison of existing literature with regards to the contribution of miRNAs in erythropoiesis and expression of hemoglobin genes. Firstly, the necessary introductory information is presented, concerning erythropoiesis and hemoglobin's gene sequence, discussing the various molecules and other factors which contribute to the biogenesis and function of miRNAs. Secondly, all *in silico* and *in vitro* methods of miRNA processing are presented, thoroughly explicating both the qPCR method and the various miRNA databases. In the third segment of the present work, the miRNAs that contribute to the procedure of the hematopoiesis, and more specifically that of erythropoiesis, are presented along with the most representative miRNAs connected to the hemoglobin genes and their pathological variants. Thus, miRNAs such as miR-150, miR-223, miR-15a and miR-451, which are related both with erythropoiesis and hemoglobin genes are of great importance. Lastly, there is brief mention of pathological cases, such as β -thalassemia, and conclusions regarding the function of miRNAs in research, diagnosis and therapy are drawn, along with hypotheses about their future contribution.

Subject Area: Medical Genetics

Key Words: miRNAs, Erythropoiesis, Hemoglobin, Gene expression

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

3' – UTR	Αμετάφραστη Περιοχή 3' –
5' – UTR	Αμετάφραστη Περιοχή 5' –
AGO2 – Argonaute 2	Πρωτεΐνη Αργοναύτης 2
ALK4	Υποδοχέας τύπου 1 με δράση Κινάσης Σερίνης/Θρεονίνης
Array	Εργαστηριακή μέθοδος ταυτοποίησης με βάση τον υβριδισμό
ATP – Adenotriphosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
BCL11A – B-cell lymphoma 11A	Γονίδιο πρωτεϊνικών δακτύλων ψευδαργύρου
Bcl-2	Αντιαποπτωτική πρωτεΐνη της οικογένειας Bcl-2
CBC – complete blood cell count	Ολικός αριθμός κυττάρων αίματος
CD34+ cells	Προγονικά κύτταρα αιμοποίησης που φέρουν γλυκοπρωτεΐνη CD34
CDF1	Υποδοχέας τρανσφερίνης 71
CLP – lymphoid progenitor cells	Λεμφικά προγονικά κύτταρα
CMEP – myeloid-erythroid progenitor cells	Προγονικά κύτταρα μυελού
Dcp1	Ένζυμο απομάκρυνσης καλύμματος 1
Dcp2	Ένζυμο απομάκρυνσης καλύμματος 2
DeepBase	Υπολογιστικό πρόγραμμα πρόβλεψης
DGCR8 - DiGeorge syndrome chromosomal region 8	Πυρηνική πρωτεΐνη επεξεργασίας του miRNA
DIANA-Tar Base	Βάση δεδομένων miRNA
DICER	Ελικάση με μοτίβο RNάσης
DNA	Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
doRiNA	Βάση δεδομένων miRNA

DROSHA	Ριβονουκλεάση τάξης 2
dsRNA	Δίκλωνο RNA
eIF2	Ευκαρυωτικός παράγων 2
Exosome	Εξώσωμα
Exportin5	Επικουρική πρωτεΐνη εξόδου του pri-mRNA από τον πυρήνα κατά τη βιογένεσή του
FirePlex Engine	Βάση δεδομένων miRNA
FRET – Fluorescence resonance energy transfer	Πειραματική μέθοδος μέτρησης μέσω φθορισμού
GATA1	Μεταγραφικός παράγοντας ευκαρυωτών
GPA	Γλυκοφορίνη A
Hb	Αιμοσφαιρίνη
HSC – Hematopoietic stem cells	Αιματοποιητικά βασικά κύτταρα
hypoxamirs	Υποξικά εξαρτώμενα miRNA
<i>In silico</i>	Σε ηλεκτρονικό υπολογιστικό σύστημα
<i>In vitro</i>	Σε δοκιμαστικό σωλήνα
Junk DNA	Περιοχές DNA που δεν οδηγούν σε πρωτεΐνες
K562 cells	Τεχνητές αθάνατες κυτταρικές σειρές από νεοπλάσματα Μυελογενούς Λευχαιμίας
KIT	Υποδοχέας κυτοκινών της επιφάνειας των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων αιμοποίησης
KLF – Kruppel-like factor	Μεταγραφικός παράγοντας με δράση δακτύλου ψευδαργύρου
LCR – Locus Control Region	Περιοχή Ελέγχου Γονιδίων β-σφαιρίνης
LMO2 – Lim Domain 2	Περιοχή δακτύλων ψευδαργύρου

MAPK – Mitogen-Activated Protein kinase	Κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα
miR 150	Μicro Ριβονουκλεϊκό οξύ 150
miR Base	Βάση δεδομένων miRNA
miR Cancer	Βάση δεδομένων miRNA
miR Gator	Βάση δεδομένων miRNA
miR Walk	Βάση δεδομένων miRNA
miR-144	Μicro Ριβονουκλεϊκό οξύ 144
miR-15a	Μicro Ριβονουκλεϊκό οξύ 15a
miR-223	Μicro Ριβονουκλεϊκό οξύ 223
miR-24	Μicro Ριβονουκλεϊκό οξύ 24
miR-451	Μicro Ριβονουκλεϊκό οξύ 451
miRDB	Υπολογιστικό πρόγραμμα πρόβλεψης
miRNA:miRNA* (miRNA duplex)	Διμερές miRNA
mirPath	Υπολογιστικό πρόγραμμα πρόβλεψης
miRSearch	Υπολογιστικό πρόγραμμα πρόβλεψης
mirSel	Βάση δεδομένων miRNA
miRSystem	Υπολογιστικό πρόγραμμα πρόβλεψης
mirTools	Υπολογιστικό πρόγραμμα πρόβλεψης
Mirtron	Μετάγραφα miRNA από ιντρονικές περιοχές
Morpholino	Ολιγομερές μόριο επεξεργασίας της γονιδιακής έκφρασης
mRNA – messenger RNA	Μεταφορικό RNA
MYB – myeloblastosis gene	Μεταγραφικός παράγων MYB
NK cells	Κύτταρα φονιάδες
P bodies	Σωμάτια Πι
PACT	Πρωτεΐνη ενεργοποίησης του eIF2

Pol I – Polymerase I	Πολυμεράση I
Pol II – Polymerase II	Πολυμεράση II
Pol III – Polymerase III	Πολυμεράση III
polymiRTs	Βάση δεδομένων miRNA
Pre miRNA – precursor miRNA	Πρόδρομο RNA
Pri miRNA– primary Mrna	Πρωτογενές RNA
Primer	Εκκινητής της qPCR
PRMT – protein arginine methyltransferase	Πρωτεΐνη με δράση μεθυλοτρανσφεράσης
qPCR – quantitative Polymerase Chain Reaction	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης
Ran (Ras-related Nuclear Protein)	Πυρηνική πρωτεΐνη υδρόλυσης του GTP
Read	Ανάγνωση βάσης στην αλληλούχιση επόμενης γενιάς
RegRNA	Υπολογιστικό πρόγραμμα πρόβλεψης
RHA	RNA ελικάση A
RISC – RNA-induced silencing complex	Σύμπλοκο αποσιώπησης μέσω RNA
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ
RNA-seq	Αλληλούχιση RNA επόμενης γενιάς
SCD – Sickle cell disease	Δρεπανοκυτταρική αναιμία
SonamiR	Βάση δεδομένων miRNA
SOX6	Μεταγραφικός παράγοντας ευκαρυωτών
ssRNA	Μονόκλωνο RNA
StarMir	Υπολογιστικό πρόγραμμα πρόβλεψης
STarMirDB	Βάση δεδομένων miRNA
SYBR green	Χρωστική της qPCR
TaqMan	Ιχνηθέτης της qPCR

TargetScan	Υπολογιστικό πρόγραμμα πρόβλεψης
TGF-β – Transforming Growth factor β	Μεταμορφωτικός παράγων β αυξητικός
TRBP	Επικουρική πρωτεΐνη του συμπλόκου RISC
Xrn1p	Εξωριβονουκλεάση
Zebrafish	Ψάρι ζέβρα

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας	Τίτλος	Σελίδα
Πίνακας 1	Σύγκριση Μεθόδων μελέτης miRNA	65
Πίνακας 2	miRNA με θετική και αρνητική έκφραση κατά την ερυθροποίηση και οι λειτουργίες τους	81

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Εικόνα	Τίτλος	Σελίδα
Εικόνα 1	Μορφή ενός miRNA που συναντούμε πριν την ωρίμανσή του	21
Εικόνα 2	Βιογένεση και δράση των miRNA	23
Εικόνα 3	Μονοπάτι ωρίμανσης των miRNA μέσα στον πυρήνα	27
Εικόνα 4	Μονοπάτι ωρίμανσης miRNA μέσα στο κυτταρόπλασμα	29
Εικόνα 5	Δράση των miRNA μέσω εκτομής στόχου	35
Εικόνα 6	Μηχανισμός δράσης μέσω μεταφραστικής καταστολής του γονιδίου	36
Εικόνα 7	Μονοπάτι των miRNA μέσα στα σωματίδια P	38
Εικόνα 8	Ολιστικό μοντέλο μονοπατιών του προτεινόμενου	41
Εικόνα 9	Η δομή της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης	43
Εικόνα 10	Ιεραρχικό μοντέλο αιμοποίησης	45
Εικόνα 11	Σχηματική απεικόνιση οστού	46
Εικόνα 12	Τα β- και α-γονιδιακά συμπλέγματα	49
Εικόνα 13	Οι αιμοσφαιρίνες του ανθρώπου και η έκφρασή τους στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια στον άνθρωπο και η θέση τέλεσης της ερυθροποίησης	51

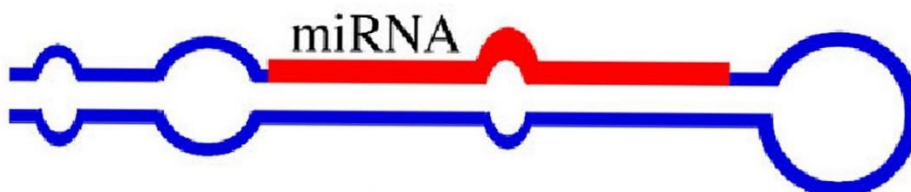
Εικόνα 14	Πειραματική μεθοδολογία της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης	58
Εικόνα 15	Αρχή λειτουργίας του ιχνηθέτη TaqMan	60
Εικόνα 16	Αρχή μεθόδου της χρωστικής SYBR Green	61
Εικόνα 17	Δείγμα μικροσυστοιχιών διαφορικής έκφρασης miRNA	62
Εικόνα 18	Βασική αρχή μεθόδου της αλληλούχισης RNA	63
Εικόνα 19	Πορεία μεθόδου πολλαπλών αναλύσεων	64
Εικόνα 20	Μελέτες ποσοτικοποίησης της Ago2	75
Εικόνα 21	Στόχευση του KIT από τα miR-221 και miR-222	76
Εικόνα 22	Διάταξη γονιδίων β-σφαιρίνης στο χρωμόσωμα 11 και τα διαφορετικά miRNA που επιδρούν στην έκφρασή τους	90
Εικόνα 23	Απορρύθμιση της έκφρασης των miRNA ανάμεσα σε φυσιολογικά ερυθροκύτταρα και σε κύτταρα με β-θαλασσαιμία	92

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 miRNA

A.1.1 miRNA: ΜΙΑ ΣΥΝΟΨΗ

Τα microRNA είναι μικρά, εξαιρετικά διατηρημένα μη κωδικοποιητικά μόρια RNA που εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Τα microRNA μεταγράφονται από τις RNA πολυμεράσες II και III, δημιουργώντας πρόδρομες μορφές (**Εικόνα 1**) που υφίστανται μια σειρά γεγονότων διάσπασης για να σχηματίσουν το ώριμο microRNA. Η συμβατική οδός βιογένεσης αποτελείται από δύο γεγονότα διάσπασης, ένα που επιτελείται στον πυρήνα και ένα κυτταροπλασματικό. Ωστόσο, υπάρχουν εναλλακτικές οδοί βιογένεσης που διαφέρουν στον αριθμό των γεγονότων διάσπασης και στο είδος των υπεύθυνων ενζύμων. Ο τρόπος με τον οποίο ταξινομούνται οι πρόδρομες μορφές του microRNA στις διαφορετικές οδούς είναι ασαφής, αλλά φαίνεται να καθορίζεται από τη θέση προέλευσης του microRNA, την αλληλουχία και τη θερμοδυναμική σταθερότητά του. Οι ρυθμιστικές ιδιότητες των microRNA επιτελούνται μέσω του συμπλόκου αποσιώπησης που αποτελείται από το σύμπλοκο RISC. Το microRNA συναρμολογείται στο RISC, ενεργοποιώντας το σύμπλοκο προς το messenger RNA (mRNA)- στόχο, που καθορίζεται από το microRNA. Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα συναρμολόγησης του RISC και η έρευνα συνεχίζει να διερευνά τους μηχανισμούς της φόρτωσης και της ενεργοποίησής του. Ο βαθμός και η φύση της συμπληρωματικότητας μεταξύ του microRNA και του στόχου προσδιορίζουν τον τρόπο δράσης του μηχανισμού αποσιώπησης γονιδίων, δηλαδή την αποσύνθεση του mRNA ή την αναστολή της μετάφρασής του. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι τα σωματίδια P (P bodies) είναι απαραίτητα για την αποσιώπηση γονιδίων μέσω των microRNA και ότι η συναρμολόγηση και η επεξεργασία μέσω του RISC συμβαίνουν κυρίως εντός των σωματίων P. Το μοντέλο των P-bodies περιγράφει την διαλογή και την μετακίνηση μεταξύ των εξειδικευμένων διαμερισμάτων του σωματίου P που φιλοξενούν τα ένζυμα που απαιτούνται για την αποσιώπηση. Η λεπτομερής γνώση των οδών των microRNA είναι απαραίτητη για την κατανόηση του φυσιολογικού ρόλου τους και των επιπτώσεων που σχετίζονται με την δυσλειτουργία και την απορρύθμισή τους.

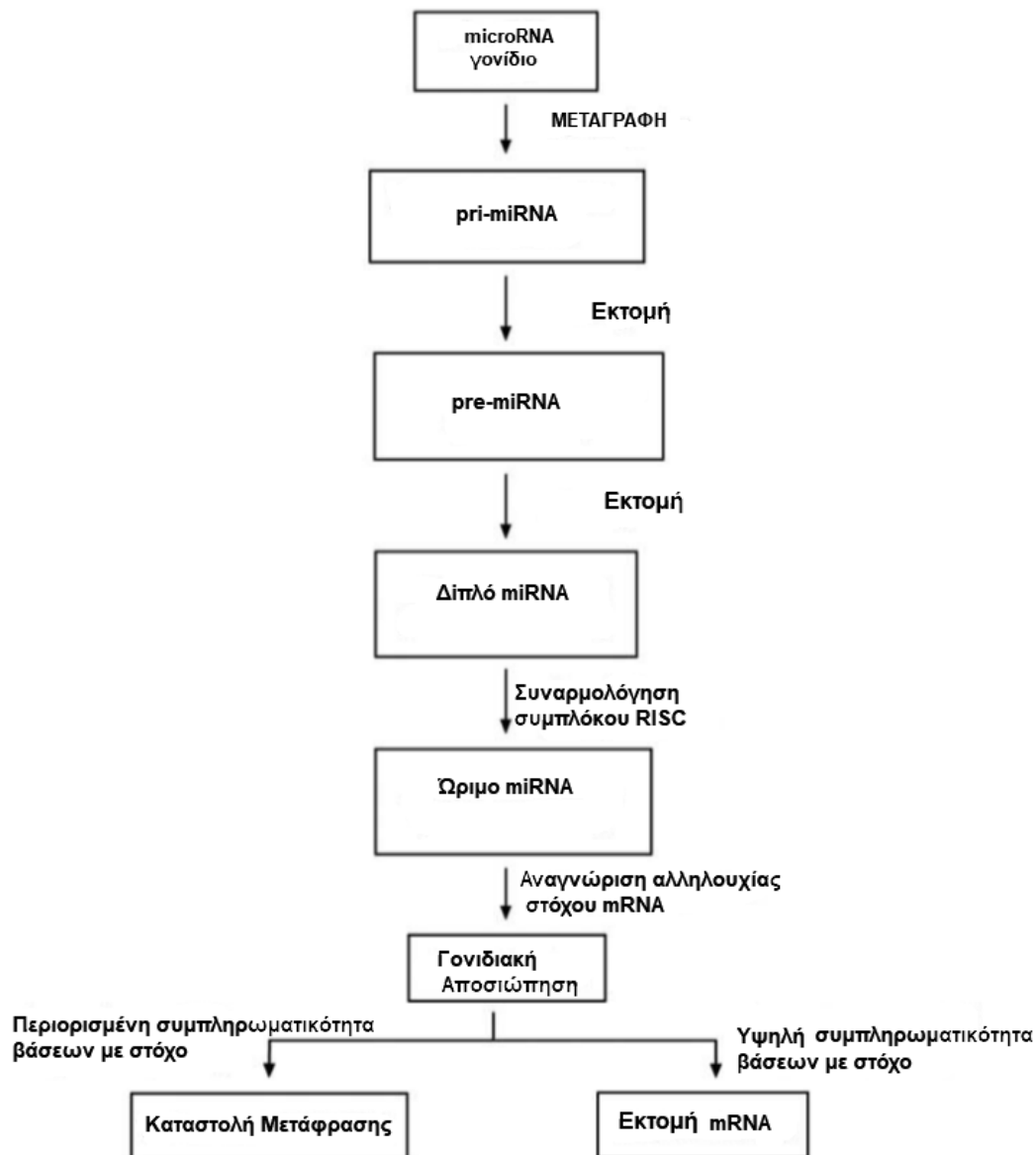


Εικόνα 2. Μορφή ενός miRNA που συναντούμε πριν την ωρίμανσή του (Τροποποιημένο από MacFarlane & Murphy, 2010)

A.1.2 ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Το miRNA ανακαλύφθηκε αρχικά στον νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans* και βρίσκεται στους περισσότερους ευκαρυώτες, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων (Lee & Ambros, 1993; Wightman & Ruvkun, 1993; Perron & Provost, 2008). Προβλέπεται ότι το miRNA αντιπροσωπεύει το 15% του ανθρώπινου γονιδιώματος και ρυθμίζει τουλάχιστον το 30% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Liu, Mao & Zhu, 2007; Stanczyk *et al.*, 2008). Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί περισσότερα από 940 διαφορετικά μόρια miRNA στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Cullen, 2004; Griffiths-Jones, 2004; *ibid*, 2006; *ibid*, 2008) (<http://microrna.sanger.ac.uk>). Παρόλο που λίγα είναι γνωστά, επί του παρόντος, για τους συγκεκριμένους στόχους των μορίων miRNA και τις βιολογικές λειτουργίες τους μέχρι τώρα, είναι προφανές ότι το miRNA διαδραματίζει έναν κομβικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές και μεταβολικές οδούς (Ambros, 2004; Monticelli *et al.*, 2005; Zhao, Samal & Srivastava, 2005; Garzon *et al.*, 2006). Το miRNA είναι μικρά, εξελικτικά διατηρημένα μονοκλωνικά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA που δεσμεύουν ένα mRNA στόχο με σκοπό την καταστολή της παραγωγής πρωτεϊνών. Το ώριμο miRNA δημιουργείται μέσω της διάσπασης ενός πρωτογενούς miRNA (**pri-miRNA**) σε δύο στάδια, το οποίο ενσωματώνεται στο σύμπλεγμα ενεργοποίησης που προέρχεται από το σύμπλοκο RNA (**RISC**). Το miRNA λειτουργεί ως οδηγός συμπληρωματικότητας των αζωτούχων βάσεων με το mRNA στόχο για να ρυθμίσει αρνητικά την έκφρασή του. Το επίπεδο συμπληρωματικότητας μεταξύ του καθοδηγητικού miRNA και του στόχου mRNA καθορίζει ποιος μηχανισμός αποσιώπησης θα χρησιμοποιηθεί: διάσπαση-κόψιμο του RNA αγγελιαφόρου-στόχου με επακόλουθη αποδόμηση ή καταστολή της μετάφρασης. (**Εικόνα 2**)

Υπάρχει μια γενική κατανόηση της λειτουργίας του miRNA, αλλά οι μηχανιστικές λεπτομέρειες της βιογένεσής του, καθώς και του ίδιου του μηχανισμού της γονιδιακής αποσιώπησης είναι ακόμα ασαφείς. Αυτό το νέο και συναρπαστικό πεδίο της μοριακής βιολογίας συνεχίζει να προχωρά, έχοντας βαθιές συσχετίσεις με την ιατρική. Αν και η ακριβής βιολογική λειτουργία των αναγνωρισμένων miRNA μπορεί να είναι άγνωστη, η εξέταση των προφίλ έκφρασης αυτών των μορίων παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη ρύθμιση και τη λειτουργία τους. Τέτοιες παρατηρήσεις έδειξαν ότι τα προφίλ έκφρασης των miRNA μεταβάλλονται σε συγκεκριμένους νεοπλασματικούς όγκους, υποδηλώνοντας ότι το miRNA μπορεί να εμπλέκεται στην ανάπτυξη καρκίνου και άλλων ασθενειών (Garzon *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Nelson, Wang & Rajeev, 2008; Wang *et al.*, 2008). Παρά την περιορισμένη γνώση αυτών των μορίων, η βασική περιγραφή της έκφρασής τους αποδεικνύεται κλινικά σχετική με τη διάγνωση, την εξέλιξη και την τελική έκβαση σε περιπτώσεις καρκινικών όγκων (Garzon *et al.*, 2006; Hernando, 2007; MacFarlane & Murphy, 2010).



Εικόνα 3. Βιογένεση και δράση των miRNA

Το γονίδιο του miRNA μεταγράφεται και έτσι δημιουργείται το πρωτογενές miRNA ή pri-miRNA το οποίο υφίσταται μια διαδικασία κοπής-εκτομής στον πυρήνα και δημιουργείται το pre-miRNA, το οποίο υφίσταται μια παρόμοια διαδικασία εκτομής στο κυτταρόπλασμα, ώστε να δημιουργηθεί το διπλό-διμερές miRNA, που περιέχει το ώριμο miRNA. Το διμερές μόριο ξετυλίγεται και το ώριμο miRNA συναρμολογείται στο σύμπλοκο RISC. Έπειτα το ώριμο miRNA μέσα στο σύμπλοκο εκτελεί την διαδικασία της γονιδιακής αποσιώπησης με δύο διαφορετικούς τρόπους (Τροποποιημένο από MacFarlane & Murphy, 2010).

Α.1.3 ΤΑ ΜΙΚΡΑ RNA ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Υπάρχουν πολλές κατηγορίες μικρών ενδογενών μορίων RNA, όπως το μεταφορικό RNA (tRNA), το ριβοσωμικό RNA (rRNA), το μικρό πυρηνικό RNA (snRNA), το μικρό παρεμβαλλόμενο RNA (siRNA) και το microRNA (miRNA). Το miRNA και το siRNA είναι βιοχημικά και λειτουργικά πανομοιότυπα. Και τα δύο είναι μήκους 19-20 νουκλεοτιδίων (nt) με άκρα 5'-φωσφορικού και 3'-υδροξυλίου και συναρμολογούνται προς το σύμπλοκο RISC για να επηρεάσουν

την γονιδιακή έκφραση (Ambros *et al.*, 2003; MacFarlane & Murphy, 2010). Επομένως, τα μόρια αυτά διακρίνονται με βάση την προέλευσή τους. Το microRNA προέρχεται από την περιοχή διπλής έλικας ενός προδρόμου μορίου φουρκέτας 6070nt RNA, ενώ το siRNA παράγεται από μακρύ δίκλωνο RNA (dsRNA) (Bartel, 2004; Ambros *et al.* 2003). Αρχικά, όλα τα μικρά RNA που συμμετείχαν στην μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση μέσω RISC αναφέρονταν ως siRNA ανεξάρτητα από την προέλευσή τους. Ωστόσο, τώρα πια είναι σύνηθες να γίνεται διάκριση μεταξύ miRNA και siRNA.

Οι πρόδρομες μορφές των miRNA βρίσκονται συνήθως σε συστάδες-αθροίσματα σε πολλές διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος, συχνότερα ανάμεσα σε γονίδια πρωτεϊνών ή ιντρονικές περιοχές. Ιστορικά αυτές οι περιοχές αναφέρονται ως "junk DNA", επειδή η λειτουργία τους ήταν άγνωστη. Η ανακάλυψη των γονιδίων miRNA σε αυτό το τεράστιο κομμάτι του γονιδιώματος, συνεπάγεται με το ότι το «junk DNA» δεν είναι άχρηστο, όπως αρχικά πολλοί πίστευαν. Έτσι, οι πρόδρομες μορφές των miRNA βρίσκονται λιγότερο συχνά στα εξόνια των μεταγράφων (Lagos-Quintana, Rauhut, Meyer, Borkhardt & Tuschl, 2003; Rodriguez, Griffiths-Jones, Ashurst & Bradley, 2004).

Οι μεταγραφικές μονάδες των miRNA και η ρύθμισή τους ποικίλουν ανάμεσα στους γονιδιακούς τόπους. Τα ιντρονικά miRNA που βρίσκονται εντός ενός γονιδίου ξενιστή, με τον ίδιο προσανατολισμό, μεταγράφονται μαζί με το πρωταρχικό μετάγραφο και από τον ίδιο κοινό υποκινητή (*ibid*, 2004; Ying, Chang & Lin, 2010). Αντίθετα, το miRNA που εκφράζεται από "junk DNA περιοχές", κατά πάσα πιθανότητα βασίζεται στους δικούς του υποκινητές (Lagos-Quintana *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2004; Saini, Griffiths-Jones & Enright, 2007). Η πρόσφατη γονιδιωματική ανάλυση υποδεικνύει ότι οι πρωτογενείς πρόδρομες μορφές miRNA είναι μακρά πολυσιτρονικά αντίγραφα που είναι παρόμοια με το mRNA στο ότι έχουν ξεχωριστά άκρα UTR 5' και 3', καλύπτρα 7-μεθυλογουανοσίνης (m7G) και (PolyA) ουρές πολυαδενυλίωσης (Cullen, 2004; Saini *et al.*, 2007). Η ανακάλυψη του miRNA των μη πρωτεϊνικών γονιδίων και του ιντρονικού miRNA που συσχετίζεται με την εργασία των Lee, Y., Kim, Han, Yeom, Lee, S., Baek & Kim (2004), δείχνει ότι η πλειονότητα των miRNA μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση II (pol II) (Saini *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2004; MacFarlane & Murphy, 2010). Το ένζυμο RNA Pol II είναι το καταλυτικό συστατικό του συμπλέγματος της πρωτεΐνης που είναι υπεύθυνο για τη μεταγραφή του DNA σε mRNA (Woychik & Young, 1990; Cramer, 2004). Ωστόσο, το miRNA μπορεί επίσης να μεταγραφεί από την RNA πολυμεράση III (pol III), η οποία συνθέτει ειδικά μικρά μη-πρωτεϊνικά κωδικοποιητικά RNA που συνδέονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την κυτταρική ανάπτυξη (Kassavetis, Riggs, Negri, Nguyen & Geiduschek, 1989; White, Gottlieb, Downes & Jackson, 1995; Borchert, Lanier & Davidson, 2006). Η διερεύνηση του αθροίσματος C19MC των miRNA στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 19, που μεταγράφηκε από την pol III, έδειξε ότι υπήρχαν διάσπαρτες επαναλήψεις Alu, ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της μεταγραφής μέσω της pol III (Hess, Perez-Stable, Wu, Weir, Tinoso & Shen,

1985; Borchert *et al.*, 2006). Ακολουθώντας αυτήν την παρατήρηση, οι Borchert *et al.* (2006), υποδηλώνουν ότι η μεταγραφή των miRNA μέσω pol III μπορεί να είναι πιο διαδεδομένη από ό,τι αρχικά πιστευόταν, σημειώνοντας ότι τουλάχιστον 50 επιπλέον τύποι miRNA βρίσκονται μεταξύ των επαναλαμβανόμενων στοιχείων που σχετίζονται με τη μεταγραφή μέσω της pol III. Πρόσφατη μελέτη από τους Gu, Yi, Zhao, X., Zhao, Y. & Yin (2009) ταυτοποίησε 68 νέα miRNA που φαίνεται να μεταγράφονται από έναν Alu-εξαρτώμενο μηχανισμό, δηλαδή μέσω της pol III. Η σύνθεση του miRNA από τις pol II και pol III υποδηλώνει ότι το miRNA είναι ένα θεμελιώδες ρυθμιστικό στοιχείο που παράγεται από διάφορους γενετικούς τύπους εντός του ανθρώπινου γονιδιώματος, οι οποίοι εμπλέκονται στον έλεγχο μιας γονιδιακής έκφρασης απαραίτητης για την κανονική κυτταρική λειτουργία.

Η ρύθμιση της έκφρασης του miRNA παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Έχει προταθεί ότι τα πρωτογενή μετάγραφα miRNA που παράγονται από την pol II ρυθμίζονται με παρόμοιο τρόπο με τα πρωτεϊνικά μετάγραφα. Η έκφραση των miRNA μπορεί να ελεγχθεί με μεταγραφικούς παράγοντες και ενδεχομένως και με άλλα miRNA προς απόκριση μιας ποικιλίας ενδογενών και εξωγενών ερεθισμάτων (Woods, Thomson & Hammond, 2007; Fiedler, Carletti, Hong & Christenson, 2008). Η ρύθμιση των πολλαπλών σταδίων επεξεργασίας στη βιογένεση των miRNA μπορεί, επίσης, να επηρεάσει την έκφραση. Πρωτεΐνες όπως οι HnRNPA1, SMAD1 και SMAD5 έχει μελετηθεί ότι αλληλεπιδρούν με πρόδρομα μόρια miRNA και ρυθμίζουν την επακόλουθη επεξεργασία τους σε ώριμο miRNA (Davis, Hilyard, Nguyen, Lagna, Hata & Smad, 2010). Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες μπορούν επίσης να δεσμεύσουν ώριμο miRNA για να κατευθύνουν την αποικοδόμησή τους, εμποδίζοντας την έκφρασή τους. Επιπρόσθετα, υπολογίζεται ότι το 10% της έκφρασης του miRNA ελέγχεται μέσω της μεθυλίωσης του DNA (MacFarlane & Murphy, 2010).

A.1.4 Η ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ miRNA

A.1.4.1. ΜΕΣΑ ΣΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ

(εικόνα 2)

Η βιογένεση του ανθρώπινου miRNA είναι μια διαδικασία δύο σταδίων, με αμφότερα το στάδιο εντός του πυρήνα και τα επακόλουθα βήματα της κυτταροπλασματικής πορείας να διεξάγονται από δύο ενδονουκλεάσες III, τις Drosha και Dicer (Lee *et al.*, 2003). Το miRNA γονίδιο μεταγράφεται για να παράγει ένα **πρωτογενές miRNA** (pri-miRNA) το οποίο επεξεργάζεται σε ένα **πρόδρομο miRNA** (pre-miRNA) και στη συνέχεια σε **διπλό miRNA** (miRNA: miRNA*) που τελικά απελευθερώνει το **ώριμο miRNA** (Bartel, 2004). Η προέλευση και το μέγεθος miRNA φαίνεται να καθορίζουν ποια θα είναι η πυρηνική οδός που θα ακολουθήσει τελικά το miRNA. Ο πρώτος καθοριστικός

παράγοντας είναι η προέλευση του miRNA, που είναι είτε από “junk DNA” περιοχές, είτε από ιντρονικές (Rodriguez *et al.*, 2004) .

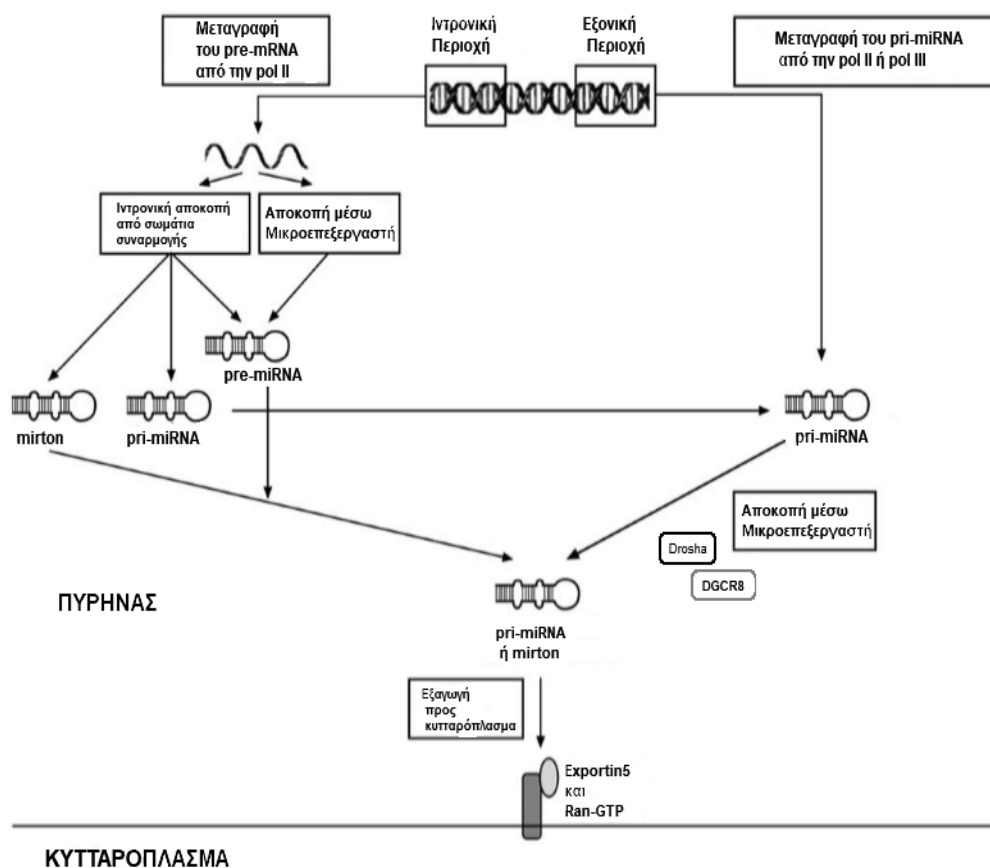
A. 1.4.2 miRNA ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΕΤΑΙ ΑΠΟ «JUNK DNA» ΠΕΡΙΟΧΕΣ

Τα miRNA των μη κωδικών περιοχών μεταγράφονται από την pol II ή την pol III, παράγοντας ένα pri-miRNA το οποίο αποτελείται από μια μεγάλη δομή βρόγχου με μονόκλωνες επεκτάσεις RNA και στα δύο άκρα (Lee *et al.*, 2004; Borchert *et al.*, 2006). Μόνο τα pri-miRNA που έχουν το κατάλληλο μήκος μεγάλου εύκαμπτου τερματικού βρόγχου (10bp) και την ικανότητα παραγωγής μονόκλωνων RNA προεξοχών 5' και 3' θα υποστούν αποτελεσματική επεξεργασία και θα ωριμάσουν σε λειτουργικό miRNA (Lee *et al.*, 2003; Zeng & Cullen, 2003; *ibid.*, 2005; Zhang & Zeng, 2010). Η διαδικασία ωρίμανσης ξεκινά με την πυρηνική διάσπαση του pri-miRNA από ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα γνωστό ως "μικροεπεξεργαστής", το οποίο αποτελείται από την ενδονουκλεάση RNase III Drosha (Drosha) και της περιοχής του γονιδίου 8, που σχετίζεται με το σύνδρομο DiGeorge (DGCR8) (Lee *et al.*, 2003). Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η μοναδική διασταυρούμενη ρύθμιση μεταξύ Drosha και DGCR8 είναι σημαντική για τον έλεγχο της βιογένεσης του miRNA. Σε αυτή τη διασταυρούμενη ρύθμιση, η DGCR8 σταθεροποιεί την Drosha μέσω αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και βοηθά στον έλεγχο των επιπέδων της πρωτεΐνης Drosha (Han *et al.*, 2009). Αντίθετα, η Drosha ως μικροεπεξεργαστής ρυθμίζει αρνητικά το DGCR8 mRNA μετάγραφο, διαχωρίζοντας μια φουρκέτα 88 nt που βρίσκεται στην 5' αμετάφραστη περιοχή (UTR), η οποία αποσταθεροποιεί το μετάγραφο (*ibid.*, 2009; Triboulet, Chang, Lapierre & Gregory, 2009). Επιπλέον, πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον μικροεπεξεργαστή απαιτούνται για την επεξεργασία συγκεκριμένων pre-miRNA. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το miR-18a, το οποίο απαιτεί τον πρωτεϊνικό παράγοντα hnRNPA1 (MacFarlane & Murphy, 2010). Το πιο πρόσφατο μοντέλο επεξεργασίας υποδεικνύει ότι η DGCR8 αναγνωρίζει το pri-miRNA στη σύνδεση ssRNA-dsRNA και κατευθύνει την Drosha σε ένα συγκεκριμένο σημείο διάσπασης ~ 11 ζευγών βάσεων (bp) από τη διασταύρωση, όπου η Drosha κόβει για να απελευθερώσει ένα ~ 60-70bp miRNA σε μορφή φουρκέτας (pre-miRNA) (Lee *et al.*, 2003; Gregory & Shiekhattar, 2005). Το pre-miRNA έχει το ένα άκρο του ώριμου miRNA που ορίζεται από την περικοπή της Drosha και περιέχει το ώριμο miRNA στον βραχίονα 5' ή στον βραχίονα 3' (MacFarlane & Murphy, 2010).

A. 1.4.3 miRNA ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΕΤΑΙ ΑΠΟ ΙΝΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΚΑΙ MIRTRON

Αντίθετα, το miRNA που βρίσκεται μέσα σε ιντρόνιο ενός γονιδίου που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μεταγράφεται από την pol II ως μέρος του pre-mRNA (Rodriguez *et al.*, 2004). Τα αποδεικτικά στοιχεία υποστηρίζουν δύο πιθανές διεργασίες αποκοπής του miRNA, οι οποίες μπορεί να συμβαίνουν ταυτόχρονα ή ανεξάρτητα (Kim, Y & Kim, V, 2007). Η αρχική έρευνα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα ιντρόνια αποκόπτονται από το pre-miRNA και διαχωρίζονται από σωματίδια συναρμογής (spliceosomes) (Ying & Lin, 2004).

Δεν είναι ξεκάθαρο κατά πόσον η διαδικασία συναρμογής είναι αυτή που απελευθερώνει το pre-miRNA που εξέρχεται του πυρήνα προς ωρίμανση εντός του κυτταροπλάσματος ή εάν ένα pri-miRNA απελευθερώνεται, αποκτώντας μια δευτερεύουσα δομή βρόγχου και προχωρά σαν το pri-miRNA από “junk DNA” περιοχές προς επεξεργασία από το σύμπλοκο του μικροεπεξεργαστή (MacFarlane & Murphy, 2010). Μια πρόσθετη υποθετική οδός εντός του πυρήνα μπορεί να συμβεί για εκείνα τα **μικρά (~ 50-200nt) ιντρονικά αποκόμματα που περιέχουν miRNA**, τα οποία έχουν τη δομή για να υποστηρίξουν τον σχηματισμό φουρκέτας. Πρόσφατα τέτοιου είδους ιντρόνια, αναφερόμενα ως **mirtron**, έχουν ανακαλυφθεί σε ασπόνδυλα και θηλαστικά (Berezikon, Chung, Willis, Cuppen & Lai, 2007; Ruby, Jan & Bartel, 2007). Στα ασπόνδυλα, τα mirtron παρακάμπτουν τη διάσπαση από τον μικροεπεξεργαστή, εισέρχονται στο μονοπάτι ωρίμανσης του miRNA κατά τη διάρκεια της εξαγωγής του από τον πυρήνα προχωρώντας προς την επεξεργασία στο κυτταρόπλασμα. Παρόλο που εντοπίστηκαν mirtron θηλαστικών, δεν είναι σαφές εάν προχωρούν μέσω της ίδιας οδού ωρίμανσης miRNA που προτείνεται για τα ασπόνδυλα.



Εικόνα 4. Μονοπάτι ωρίμανσης των miRNA μέσα στον πυρήνα (Τροποποιημένο από MacFarlane & Murphy, 2010).

Η εναλλακτική υπόθεση της εκτομής miRNA είναι ότι η επεξεργασία του pre-miRNA δεν είναι απαραίτητη για την επεξεργασία του pri-miRNA. Σε αυτή την

υπόθεση, το miRNA αποκόπτεται μετά την πραγματοποίηση του ματίσματος, αλλά πριν την εκτομή ιντρονίου.

Οι θέσεις ματίσματος στο pre-miRNA υποδηλώνονται και δεσμεύονται κατά προτίμηση με ένα σύμπλεγμα δέσμησης ματίσματος επιτρέποντας στον μικροεπεξεργαστή να επεξεργάζεται επιλεκτικά και να απελευθερώνει pre-miRNA, ενώ το μάτισμα/συναρμογή συνεχίζεται κανονικά για να παραχθεί ώριμο mRNA. Αυτό προτείνει ότι ο μικροεπεξεργαστής έχει και μια εναλλακτική μέθοδο αναγνώρισης, η οποία δεν έχει ακόμη διερευνηθεί (Kim *et al.*, 2007; Ruby *et al.*, 2007).

A.1.4.4 ΕΞΑΓΩΓΗ ΤΩΝ miRNA ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΥΡΗΝΑ

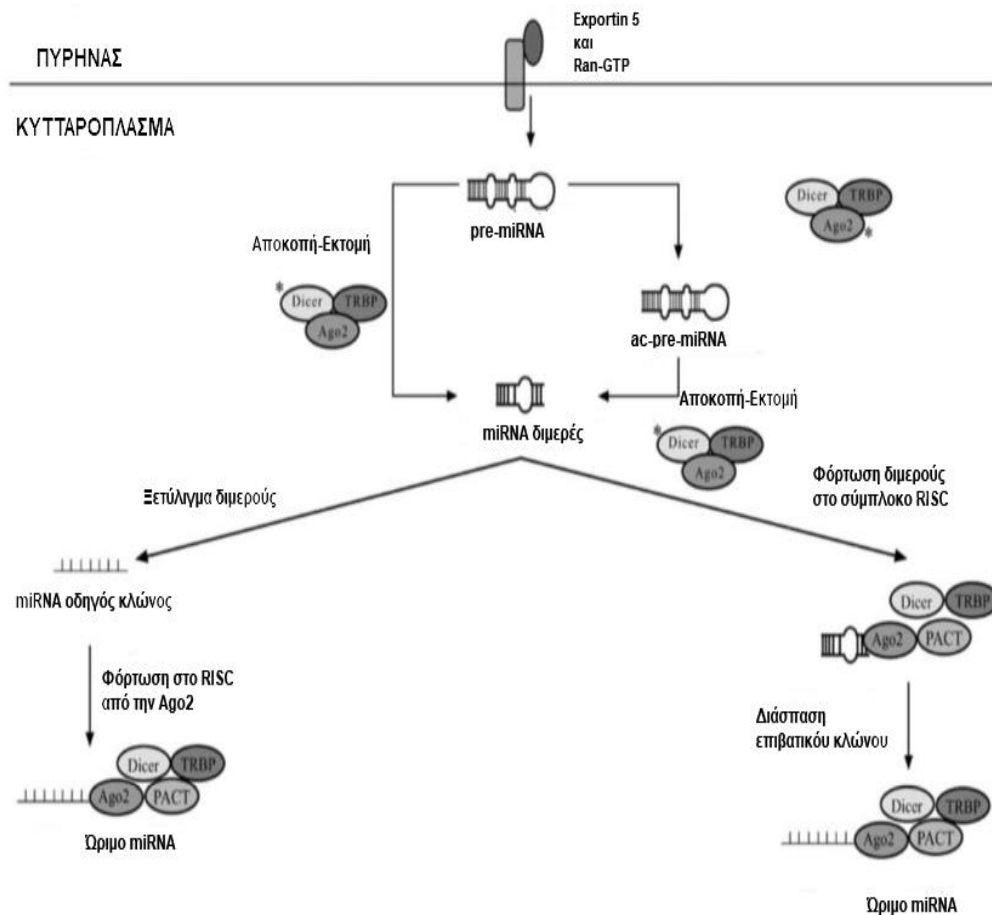
Η μεταγενέστερη επεξεργασία του pre-miRNA (και πιθανώς των mirtron) λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα. Το pre-miRNA συναρμολογείται σε ένα σύμπλεγμα με τον παράγοντα μεταφοράς που λέγεται Exportin-5 και με την πρωτεΐνη RanGTP, η οποία αποτρέπει την πυρηνική αποικοδόμηση και διευκολύνει τη μετατόπιση στο κυτταρόπλασμα (Zen & Cullen, 2004; Lund & Dahlberg, 2006). Η οδός εξαγωγής μέσω Exportin-5 / RanGTP μπορεί να υποστηρίξει τη μεταφορά ενός mirtron στο κυτταρόπλασμα σε ορισμένα είδη, συμπεριλαμβανομένων των ωοκυττάρων των *Xenopus laevis* και *Drosophila*, αλλά παραμένει ασαφές αν αυτό συμβαίνει και στα θηλαστικά (Lund & Dahlberg, 2006; Berezikov *et al.*, 2007). Είναι πιθανό να υπάρχουν άγνωστοι παράγοντες που συμμετέχουν στην εξαγωγή των mirtron από τον πυρήνα του κυττάρου.

A.1.4.5. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ

(εικόνα 4)

Η ωρίμανση του miRNA στο κυτταρόπλασμα περιστρέφεται γύρω από την Dicer, της ενδονουκλεάσης με δράση RN-άσης III, η οποία έχει βρεθεί σε όλους τους ευκαρυωτές που εξετάστηκαν μέχρι σήμερα, εκτός από τους ζυμομύκητες (Zhang, Kolb, Brondani, Billy & Filipowicz, 2002). Οι άνθρωποι έχουν μια μόνη ισομορφή της Dicer, που λειτουργεί τόσο στις οδούς των siRNA όσο και στα miRNA (Filipowicz, Jaskiewicz, Kolb & Pillai, 2005; Haase, Jaskiewicz, Xhang, Laine, Sack, Gratignol & Filipowicz, 2005). Αντίθετα, στην *Drosophila* υπάρχουν ξεχωριστές ισομορφές της Dicer για την οδό siRNA και τις οδούς των miRNA (Lee *et al.*, 2004). Δεν είναι γνωστό ακόμα στον άνθρωπο πώς η Dicer διακρίνει μεταξύ μονοπατιών siRNA και miRNA. Η Dicer είναι μια πρωτεΐνη πολλαπλών τομέων (Domains) που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και / ή στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και αποτελείται από μία N-τελική περιοχή με δράση ATPάσης / Ελικάσης, την DUF283 (περιοχή άγνωστης λειτουργίας), τον PAZ (Piwi / Argonaute / Zwilli) τομέα και δύο αλληλουχίες νουκλεάσης RNaseIII που βρίσκονται στο C-τελικό άκρο (Provost, Dishart, Doucet, Frenthewey, Samuelsson & Radmark, 2002). Η περιοχή PAZ, οι περιοχές νουκλεάσης

RNάσης III και μία dsRBD περιοχή εμπλέκονται στη δέσμευση και την εκτομή (cleavage) των dsRNA (Zhang *et al.*, 2002; Zhang Kolb, Jaskiewicz, Westhof & Filipowicz, 2004; Song *et al.*, 2003). Εντούτοις, η ακριβής λειτουργία της περιοχής ΑΤΡάσης / Ελικάσης και της περιοχής DUF283 είναι άγνωστη. Η Dicer τυπικά διασπά το dsRNA με έναν ανεξάρτητο του ΑΤΡ τρόπο, αλλά έχει προταθεί ότι μπορεί να απαιτείται ΑΤΡ που βοηθά στη διαμόρφωση του προϊόντος ή/και αλλαγών πρωτεϊνικής διαμόρφωσης (Zhang *et al.*, 2002; MacFarlane & Murphy, 2010).



Εικόνα 5. Μονοπάτι ωρίμανσης miRNA μέσα στο κυτταρόπλασμα (Τροποποιημένο από MacFarlane & Murphy, 2010).

A.1.4.6 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ miRNA ΜΕ ΜΟΝΗΡΗ ΕΚΤΟΜΗ

Σε ένα προτεινόμενο μοντέλο, το pre-miRNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα και ενσωματώνεται στο εκτελεστικό σύμπλεγμα επεξεργασίας πρώτης σειράς που αποτελείται από την **Dicer**, την RNA-συνδεόμενη πρωτεΐνη που ενεργοποιείται από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (**TRBP**) και την R-ενεργοποιούμενη πρωτεΐνη της πρωτεϊνικής κινάσης (**PACT**) (Perron *et al.*, 2008). Αυτό το σύμπλεγμα είναι ο πυρήνας του συμπλόκου RISC (Diederichs & Haber, 2007). Η περιοχή PAZ της Dicer αναγνωρίζει την δινουκλεοτιδική 3'-προεξοχή του pre-miRNA και αρχίζει τη δέσμευση (Zhang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2003). Η απόσταση μεταξύ των περιοχών PAZ και Rnάσης III της Dicer χρησιμοποιείται ως δείκτης για τον προσδιορισμό της

ακριβούς θέσης διάσπασης στο pre-miRNA (Zhang *et al.*, 2004; Perron *et al.*, 2008). Ο διμερισμός των δύο τομέων με δραστικότητα Rn-άσης III της Dicer σχηματίζει ένα μοναδικό κέντρο επεξεργασίας με δύο καταλυτικές θέσεις που διασπούν τον απλό κλώνο απέναντι από αυτόν που προηγουμένως διασπάστηκε από την Drosha στο pre-miRNA. Το προκύπτον προϊόν είναι ένα διπλό δίκλωνο miRNA με 3' προεξέχοντα άκρα. Ένα πρόσφατο μοντέλο που προτάθηκε από τους Cifuentes *et al.* (2010) επικεντρώνεται γύρω από την πρωτεΐνη «Αργοναύτη» Argonaute 2 (**Ago2**), επίσης γνωστή και ως 2C2 παράγοντας έναρξης μετάφρασης σε ευκαρυωτικά κύτταρα (**eIF2C2**). Η Ago2 περιέχει μία περιοχή Piwi και μία περιοχή PAZ που έχει δραστηριότητα ενδονουκλεάσης (Song, Smoth, Hannon & Joshua-Tor, 2004; Meister, Landthaler, Patkaniowska & Dorsett, 2004; O'Carroll *et al.*, 2007). Αυτό το νέο μοντέλο περιγράφει ένα μονοπάτι επεξεργασίας miRNA που είναι εξαρτώμενο από Ago2 και ανεξάρτητο της Dicer. Μετά την δέσμευση της Ago2 στο πρώιμο RNA η ενδονουκλεάση διασπά την επιβατική αλληλουχία της πρόδρομης φουρκέτας 10 νουκλεοτιδίων upstream του οδηγού κλώνου 5' που διευκολύνει το ξετύλιγμα. Τέλος, τα εναπομείναντα νουκλεοτίδια γύρω από τη θέση διάσπασης που δεν προστατεύονται από την Ago2 υφίστανται πολυουριδυλίωση και υπόκεινται στη δράση της νουκλεάσης, ώστε να δημιουργηθεί το ώριμο miRNA.

A.1.4.7 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ miRNA ΜΕ ΔΙΠΛΗ ΕΚΤΟΜΗ

Ένα πρόσθετο μοντέλο επεξεργασίας του pre-miRNA εξαρτώμενο από την Ago2 που προτάθηκε από τους Diedrichs & Haber (2007) υποδηλώνει ότι οι Dicer, TRBP και Ago2 σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που αναγνωρίζει και δεσμεύει το pre-miRNA μέσω της περιοχής PAZ της Dicer και της Ago2. Η Ago2, στη συνέχεια, διασπά μια μονή έλικα των νουκλεοτιδίων 11-12 του pre-miRNA από το άκρο του στην 3' UTR για να δημιουργήσει μια δομή φουρκέτας που έχει αναφερθεί ως «πρόδρομο miRNA που υφίσταται εκτομή από την Ago2» ή αλλιώς «ac-pre-miRNA». Το ac-pre-miRNA είναι το υπόστρωμα που δρα η Dicer, το οποίο διασπάται για να δημιουργήσει το δίκλωνο διπλό miRNA.

Υπάρχουν στοιχεία ότι η Dicer, η TRBP, η PACT και η Ago2 μπορούν να αλληλεπιδράσουν, αλλά καμία ομάδα δεν έχει ακόμη περιγράψει ένα σύμπλεγμα επεξεργασίας που να αποτελείται από όλες αυτές τις πρωτεΐνες. Φαίνεται ότι οι ακριβείς αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών παραμένουν ασαφείς. Σε όλα τα στάδια της βιογένεσης του miRNA, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται και επανασυνδέονται με τα ενεργά σύμπλοκα, καθιστώντας δύσκολο τον προσδιορισμό της θέσης τους στο μονοπάτι του miRNA. Υπάρχει συναίνεση στο πλαίσιο της βιβλιογραφίας, ότι η TRBP συνεργάζεται με τις Ago2 και Dicer για να διαδραματίσει έναν αναπόσπαστο ρόλο στο μονοπάτι του miRNA (Haase *et al.*, 2005; Gregory, Chendrimada, Cooch & Shiekhattar, 2005; Maniatakis & Mourelatos, 2005). Ωστόσο, η ακριβής λειτουργία παραμένει υπό συζήτηση. Δύο μελέτες από τους Haase *et al.* 2005 και Chendrimada *et al.* 2005

βρίσκονται σε σύγκρουση. Οι Hasse *et al.*(2005) προτείνουν ότι η TRBP είναι απαραίτητη για τη διάσπαση του pre-miRNA από την Dicer και την επακόλουθη μεταφορά του στην Ago2 για συναρμολόγηση του συμπλόκου RISC. Αντίθετα, οι Chendrimada *et al.* (2005), πιστεύουν ότι η TRBP είναι μόνο χρήσιμη για την συναρμολόγηση του miRNA στο RISC. Επιπρόσθετα, μια ανεξάρτητη μελέτη έδειξε ότι το TRBP μπορεί να ρυθμίζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης Dicer μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Melo *et al.*, 2009). Απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για να καθοριστεί σαφώς η λειτουργία του TRBP.

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός, ότι το TRBP αναστέλλει το μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης R (PKR) που ενεργοποιείται από ιντερφερόνη, καθώς και τη συγγενή της πρωτεΐνη PACT, η οποία ενεργοποιεί την οδό PKR (Patel & Sen, 1998; Daher *et al.*, 2001; Perron *et al.*, 2008). Η ενεργοποίηση της οδού PKR αναστέλλει τη γενική πρωτεϊνική σύνθεση σε όλο το κύτταρο και επάγει την παραγωγή ιντερφερονών, οι οποίες μεσολαβούν στην αντι-πολλαπλασιαστική και προ-αποπτωτική διαδικασία (Vattem, Staschke & Wek, 2001; Garcia, Meurs & Esteban, 2007). Φαίνεται ότι το TRBP και το PACT λειτουργούν για την πρόληψη της κυτταροπλασματικής pre-miRNA ενεργοποίησης της οδού PKR ή/και για την ρύθμιση της φωσφορυλίωσης της PKR, που ελέγχει συστατικά του λειτουργικού μονοπατιού των miRNA (Perron *et al.*, 2008).

A.1.4.8 ΣΥΓΚΡΟΤΗΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ RISC

Το δίκλωνο microRNA είναι γενικά ένα ασταθές, ατελές μόριο που αποτελείται από έναν επιβατικό κλώνο και έναν ώριμο κλώνο microRNA (επίσης αναφερόμενο και ως οδηγό κλώνο) που συνήθως συμβολίζεται ως **miRNA: miRNA***, όπου ο επιβατικός κλώνος είναι ο συμβολισμός miRNA* (Bartel, 2004; Kim, 2005). Τελικά, το διμερές RNA ξετυλίγεται και το μονόκλωνο ώριμο miRNA ενσωματώνεται στο σύμπλεγμα πρωτεϊνών **RISC** για να λειτουργήσει ως οδηγός, κατευθύνοντας την αποσιώπηση ενός mRNA στόχου (Bartel, 2004). Η συναρμολόγηση και η ενεργοποίηση του RISC έχει μελετηθεί κυρίως στην *Drosophila* με σχεδόν τέλειες αντιστοιχίσεις ζευγών βάσεων μεταξύ των οδηγών και των επιβατικών κλώνων των διμερών miRNA. Το μοντέλο συναρμολόγησης RISC από την *Drosophila* πρότεινε το ATP-εξαρτώμενο ξετύλιγμα των διμερών, το οποίο επιτρέπει στον ώριμο κλώνο οδηγό να φορτωθεί στην Ago2 του συμπλέγματος RISC με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του (Rand, Petersen, Du & Wang, 2005).

A.1.5 ΦΟΡΤΩΣΗ ΤΟΥ RISC ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Στους ανθρώπους υπάρχουν οκτώ κατηγορίες συμπλεγμάτων RISC, οι οποίες βασίζονται σε πρωτεϊνική σύνθεση επικεντρωμένη γύρω από τις τέσσερις πρωτεΐνες Ago 1-4 (Macrae, Ma, Zhou, Robinson & Doudna, 2008). Η γονιδιωματική ανάλυση υποδεικνύει ότι οι πρωτεΐνες αργοναύτες έχουν

εξελιχθεί από την πρωτεΐνη του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης (Anantharaman, Koonin & Aravind, 2002). Η Ago2 είναι η μόνη πρωτεΐνη αργοναύτης με δραστικότητα ικανή να καταλύει την εκτομή, δηλαδή την διάσπαση του mRNA. Ωστόσο, και οι τέσσερις πρωτεΐνες Ago συσχετίζονται με το miRNA και φαίνεται να λειτουργούν κατά την γονιδιακή αποσιώπηση. Δεν είναι σαφές εάν συγκεκριμένες πρωτεΐνες Ago συνδέονται με ένα συγκεκριμένο μηχανισμό αποσιώπησης. Τα βασικά συστατικά του συμπλέγματος φόρτωσης RISC είναι οι Dicer, Ago2, PACT και TRBP (Maniataki & Mourelatos, 2005; Lee *et al.*, 2006; Macrae *et al.*, 2008). Τα σύμπλοκα RISC που φορτώνουν το miRNA ονομάζονται σύμπλοκα ριβονουκλεοπρωτεϊνών που περιέχουν microRNA (**miRISC** ή miRNP).

Ο μηχανισμός της συναρμολόγησης των RISC του ανθρώπινου miRNA είναι ασαφής. Οι υποθέσεις βασίζονται κυρίως στο μοντέλο της *Drosophila*. Ο μηχανισμός του ξετυλίγματος του διμερούς είναι άγνωστος, ωστόσο τα στοιχεία δείχνουν ότι η διαδικασία είναι ανεξάρτητη από το ATP σε ανθρώπους (Maniataki & Mourelatos, 2005; Gregory *et al.*, 2005). Υπάρχουν πολλές υποθέσεις για το ξετύλιγμα του διμερούς: η Dicer θα μπορούσε να διασπάσει τον επιβατικό κλώνο, αρχίζοντας να ξετυλίγει και να απελευθερώσει το ώριμο μονόκλωνο miRNA που θα μπορούσε να συλληφθεί από την Ago2. Εναλλακτικά, η Ago2 θα μπορούσε να διασπάσει τον επιβατικό κλώνο ενός φορτωμένου διμερούς, διατηρώντας ανέπαφο τον οδηγό κλώνο του miRNA. Το ξετύλιγμα του διμερούς μπορεί, επίσης, να συμβεί ταυτόχρονα με μεταβολές διαμόρφωσης του RISC κατά τη συναρμολόγηση ή από μια μη αναγνωρισμένη ελικάση (Maniataki & Mourelatos, 2005). Μια πρόσφατη μελέτη υποδηλώνει ότι η RNA Ελικάση A (**RHA**), που επίσης αναφέρεται ως DHX9 ή NDH11, είναι υπεύθυνη για το ξετύλιγμα του διμερούς RNA που σχετίζεται με την ενεργοποίηση του RISC στο μονοπάτι των miRNA του ανθρώπου (Robb & Rana, 2007). Η RHA είναι μια πρωτεΐνη DEAH-box ελικάση (Johnson *et al.*, 1999) ικανή να δεσμεύεται με ssRNA, dsRNA και dsDNA (Lee & Hurwitz, 1992; Abdelhaleem, Maltais & Wain, 2003; Robb & Rana, 2007). Η RHA είναι ικανή να ξετυλίγει RNA:RNA διμερή, αλλά η αποτελεσματικότητά της είναι ασαφής και πιστεύεται ότι εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις της RHA με επιπρόσθετες σχετικές πρωτεΐνες (Lee & Hurwitz, 1992; Friedemann, Grosse & Zhang, 2005; Robb & Rana, 2007). Η RHA αλληλεπιδρά με τις Dicer, Ago2 και TRBP σε μια χωρική διάταξη που είναι ειδική για το ξετύλιγμα RNA:RNA διμερών (Robb & Rana, 2007). Επιπρόσθετα, η ελικάση MOV10 (ομόλογο ιού λευχαιμίας Moloney 10) έχει συσχετισθεί με μερικά Ago2 και RISC σύμπλοκα, αλλά παραμένει ασαφές εάν η MOV10 είναι ικανή να ξετυλίξει δομές διμερών RNA (*ibid*, 2007). Είναι ενδιαφέρον ότι μια πολύ πρόσφατη μελέτη από τους Yoda, Kawamata, Paroo, Ye, Iwasaki, Liu & Tomari (2010), υποδηλώνει ότι η διάσπαση της Dicer και η συναρμολόγηση του RISC είναι ATP-εξαρτώμενη. Απαιτούνται μελλοντικές μελέτες για να επιβεβαιωθεί αυτό το εύρημα.

A.1.6 ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΣΤΟΧΟΥ

Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο RISC δεσμεύει το mRNA στόχο μέσω συμπληρωματικότητας βάσεων μεταξύ του κλώνου οδηγού και της περιοχής 3'UTR του στόχου (Wightman & Runkun, 1993; Lee & Ambros, 1993). Ο βαθμός και η φύση των συμπληρωματικών θέσεων μεταξύ του οδηγού και του στόχου φαίνεται να καθορίζουν τον μηχανισμό αποσιώπησης γονιδίων (Bartel, 2004; Yekta, Shih & Bartel, 2004). Η δράση της Ago2 γενικά ευνοείται από την σχεδόν τέλεια (εκτεταμένη) σύζευξη βάσεων, ενώ η πιο κοινή καταστολή της μετάφρασης φαίνεται να απαιτεί πολλαπλές συμπληρωματικές θέσεις με περιορισμένη συμπληρωματικότητα βάσεων σε κάθε θέση (Bartel, 2004; Yekta et al., 2004). Στα ζώα, το miRNA είναι γενικά 100% συμπληρωματικό στην 5' περιοχή του miRNA, αλλά όχι σε ολόκληρο το miRNA, γεγονός που οδηγεί σε ατελή υβρίδια RNA με χαρακτηριστικά εξογκώματα (Doench, Petersen & Sharp, 2003; Bartel, 2004). Η δέσμευση στην 5'UTR είναι σημαντική για την θερμική σταθερότητα της αλληλεπίδρασης, η οποία συμβάλλει στην εξειδίκευση και τη δραστηριότητα του miRNA (Stark, Brennecke, Russell & Cohen, 2003; Doench & Sharp, 2004). Το φαινόμενο του ζευγαρώματος βάσεων G: U (μη ταίριασμα) βάσης στην 5' περιοχή θεωρήθηκε αρχικά ότι ήταν επιβλαβές για τη λειτουργία των miRNA. Η miRNA:mRNA αλληλεπίδραση μπορεί ακόμη να συμβεί παρουσία ενός φαινομένου ταλάντωσης (wobble) G: U αλλά επιδρά στην ειδικότητα και την δραστηριότητα του miRNA (Enright, John, Gaul, Tuschl, Sander & Marks, 2003; Doench & Sharp, 2004). Μια μεταγενέστερη έρευνα αποκάλυψε ότι αυτό δεν ισχύει για όλα τα miRNA. Στα θηλαστικά το miR-196 εμφανίζει τέλεια συμπληρωματικότητα βάσεων με το στόχο HOXB8, με εξαίρεση μια ταλάντωση G: U και εξακολουθεί να ρυθμίζει αποτελεσματικά την HOXB8 μέσω διάσπασης-εκτομής mRNA (Yekta et al., 2004).

A.1.7 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι το miRNA συνδέεται με το mRNA στόχο και ρυθμίζει αρνητικά την έκφρασή του. Ένα μοναδικό miRNA οδηγός μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση σε διάφορους στόχους mRNA και αντιστρόφως πολλαπλά miRNA μπορούν να ρυθμίζουν σε συνεργασία την έκφραση σε έναν ενιαίο στόχο mRNA (Bartel, 2004). Ωστόσο, τα μέσα αποσιώπησης παραμένουν ασαφή. Τα αποδεικτικά στοιχεία υποστηρίζουν δύο διαφορετικούς μηχανισμούς αποσιώπησης: διάσπαση-εκτομή mRNA και καταστολή της μετάφρασής του, οι οποίοι μπορούν να οριστούν ως εξαρτώμενος από αποκοπή μηχανισμός και ανεξάρτητος αποκοπής μηχανισμός (Sheth & Parker, 2003; Eystathiou, Jakymiw, Chan, Seraphin, Cougot & Fritzler, 2003; Coller & Parker, 2005). Η δραστηριότητα της αποκοπής αναφέρεται στην δράση ενδονουκλεάσης στο mRNA στόχου μέσω της Ago2, η οποία απαιτεί εκτεταμένη συμπληρωματικότητα βάσεων μεταξύ του miRNA και του mRNA στόχου (Meister et al., 2004; Liu et al., 2004; Valencia-Sanchez, Liu, Hannon & Parker, 2006). Οι δύο μηχανισμοί αποσιώπησης που, είτε εξαρτώνται από την

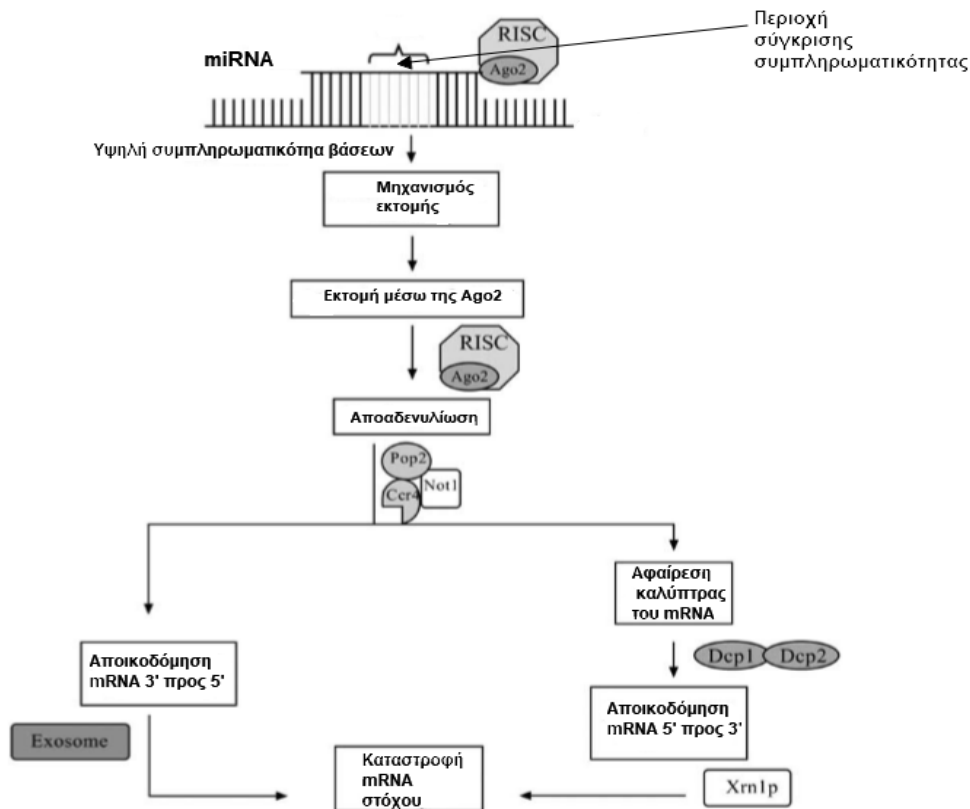
αποκοπή, είτε όχι, συντελούν προς την αποικοδόμηση του mRNA ή την αναστολή της μετάφρασης, αλλά και οι δύο τελικά οδηγούν σε αρνητική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Μια σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων είναι η αναστρεψιμότητα, διότι η αποσύνθεση-αποκοπή του mRNA είναι μια μη αναστρέψιμη διαδικασία. Αντίθετα, η αναστολή της μετάφρασης είναι αναστρέψιμη (Brenques *et al.*, 2005; Valencia-Sanchez *et al.*, 2006; MacFarlane & Murphy, 2010).

Οι ακόλουθες ενότητες αναλύουν τους δύο μηχανισμούς αποσιώπησης.

A.1.7.1 ΕΚΤΟΜΗ ΤΟΥ mRNA – ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΟΥ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΠΟΚΟΠΗ

(Εικόνα 5)

Η διάσπαση-εκτομή του mRNA που κατευθύνεται από microRNA καταλύεται από την Ago2, όταν ο στόχος και το miRNA εμφανίζουν εκτεταμένη συμπληρωματικότητα βάσεων σε περιοχές που περιλαμβάνουν την 5'UTR περιοχή και τις βάσεις 10-11 του οδηγού κλώνου (Yekta *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Valencia-Sanchez *et al.*, 2006; MacFarlane & Murphy, 2010). Μία απλή εκτεταμένη συμπληρωματική περιοχή είναι συνήθως επαρκής για διάσπαση. Εντούτοις, παρατηρήθηκαν εξαιρέσεις που υποδηλώνουν ότι μπορεί να απαιτούνται μη αναγνωρισμένες πρόσθετες απαιτήσεις για τη διάσπαση του mRNA (Zeng & Cullen, 2003; Doench *et al.*, 2003; Doench & Sharp, 2004; Valencia-Sanchez *et al.*, 2006). Τα προϊόντα διάσπασης αποικοδομούνται με μία από τις δύο διεργασίες που είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση του mRNA. Και οι δύο αρχίζουν με τη αποαδενυλίωση του mRNA για να απομακρυνθεί η πολυA ουρά (Valencia-Sanchez *et al.*, 2006; Parker & Song, 2004). Μεταγενέστερη διάσπαση μπορεί να λάβει χώρα μέσω του εξωσώματος (exosome), το οποίο είναι ένα σύμπλοκο πολλαπλών πρωτεϊνών με δραστικότητα 3'-5' εξωνουκλεάσης. Εναλλακτικά, το mRNA μπορεί να υποβληθεί σε απομάκρυνση καλύμματος από τα ένζυμα Dcp1 και Dcp2 που διευκολύνουν την αποικοδόμηση 5'-προς-3' από την εξωριβονουκλεάση Xrn1p (Valencia-Sanchez *et al.*, 2006; Collier & Parker, 2004).



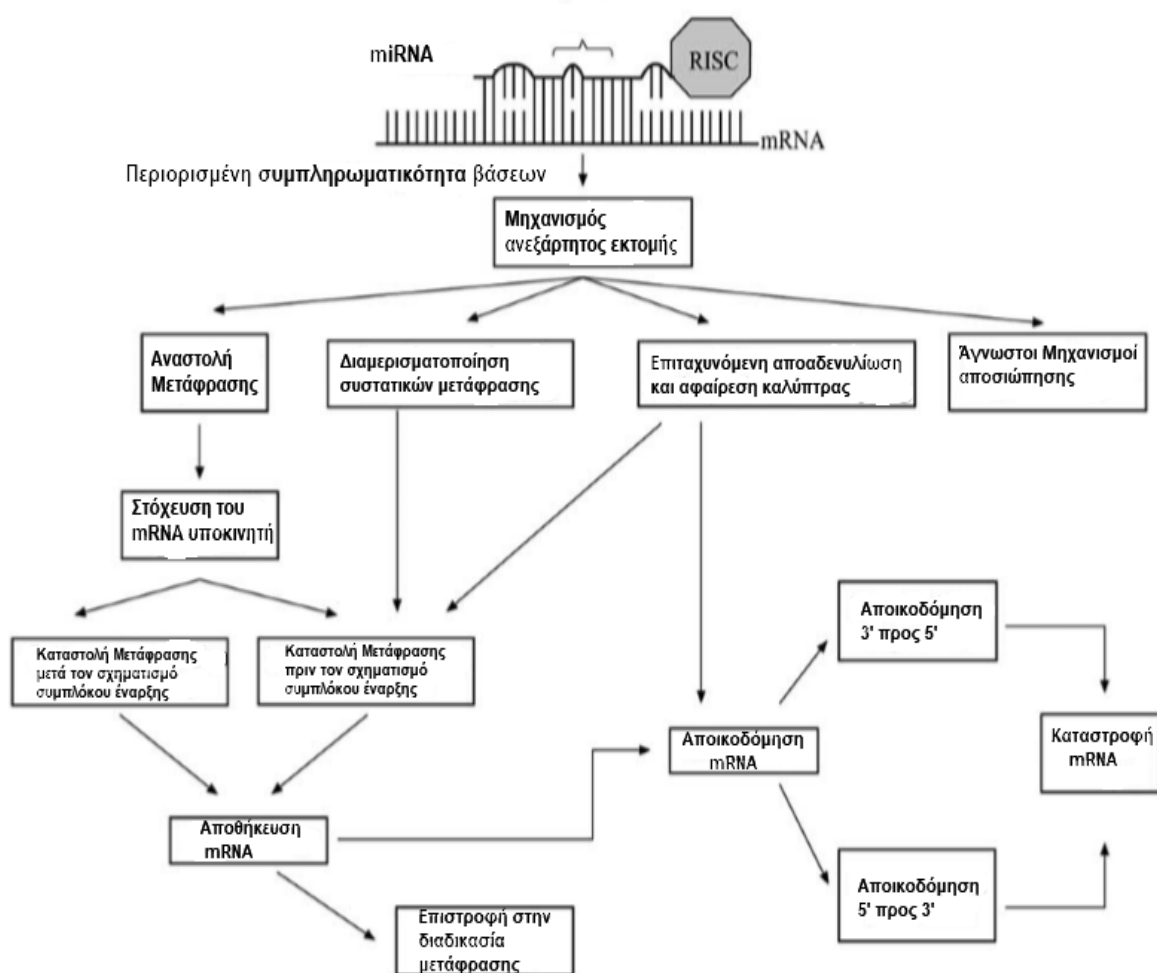
Εικόνα 6. Δράση των miRNA μέσω εκτομής στόχου (Τροποποιημένο από MacFarlane & Murphy, 2010)

A.1.7.2 ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ – ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΟΣ ΑΠΟΚΟΠΗΣ

(Εικόνα 6)

Πολλαπλές θέσεις με ατελή συμπληρωματικότητα στα ζεύγη βάσεων δημιουργούν διογκώσεις στο διμερές RNA και αναστέλλουν την δράση της Ago2 (Wightman & Ruvkun, 1993; Lee & Ambros, 1993; Bartel, 2004; Pillai, 2005; Valencia-Sanchez et al., 2006). Αυτό δεν επηρεάζει την ικανότητα των πρωτεϊνών Ago να καταστέλλουν τη μετάφραση του mRNA στόχου (Meister et al., 2004; Liu et al., 2004; MacFarlane & Murphy, 2010). Δεν υπάρχει ξεχωριστό μοντέλο για το πώς τα miRNA καταστέλλουν τη μετάφραση, αλλά είναι σαφές ότι αυτό μπορεί να συμβεί με διάφορους τρόπους. Η μετάφραση πραγματοποιείται σε τρία στάδια: έναρξης, επιμήκυνσης και τερματισμού, τα οποία απαιτούν συντονισμό πολλών πρωτεϊνικών παραγόντων (Richter & Isono, 1977). Πειράματα που έγιναν σε κύτταρα θηλαστικών παρέιχαν στοιχεία που υποστηρίζουν την αναστολή της μετάφρασης από το miRNA τόσο στα στάδια έναρξης όσο και στην επιμήκυνση (Pillai, 2005; Richter & Isono, 1977). Ωστόσο, ο μηχανισμός επιλογής είναι ασαφής. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο υποκινητής που χρησιμοποιήθηκε για να μεταγράψει το

mRNA στόχου καθορίζει ποιοι μηχανισμοί καταστολής της μετάφρασης θα χρησιμοποιηθούν (Kong *et al.*, 2008). Η μετάφραση μπορεί επίσης να ρυθμίζεται έμμεσα με χωρικό διαχωρισμό των συστατικών, έτσι ώστε το mRNA που στοχεύεται στο miRNA να απομακρύνεται από το μεταφραστικό μηχανισμό σε κυτταροπλασματικές εστίες γνωστές ως **σωμάτια P** (P bodies-επίσης γνωστά ως σώματα επεξεργασίας, σωμάτια GW και σωμάτια Dcp) (Liu *et al.*, 2005; Anderson & Kedersha, 2006). Επιπρόσθετα, το miRNA μπορεί να επιταχύνει την απελευθέρωση του mRNA στόχου και την απόσπαση ανεξάρτητα από τη δραστηριότητα της αποκοπής, επηρεάζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της έναρξης της μετάφρασης ή/και τη σταθερότητα του μεταγράφου (Fischer & Weis, 2002). Αυτή η τελευταία διαδικασία θα οδηγήσει σε αποσύνθεση του mRNA στόχου μέσω του ίδιου εξωσώματος και της Xrn1p ως, τελικά, εξαρτώμενη από αποκοπή αποσιώπηση (Coller *et al.*, 2002).

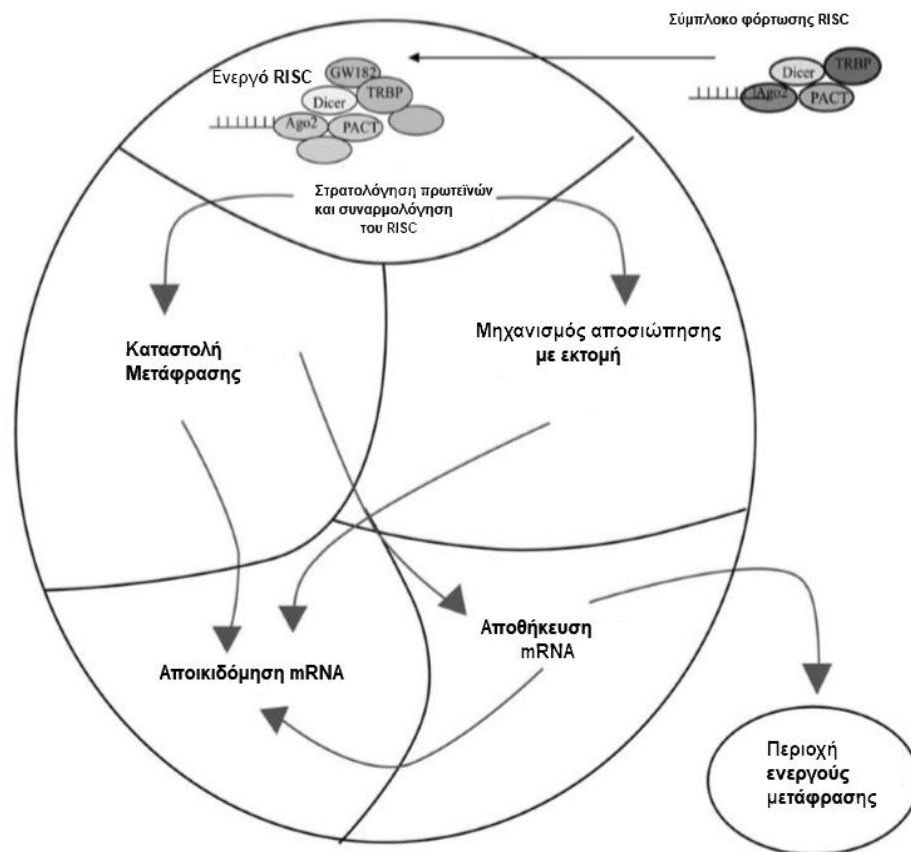


Εικόνα 7. Μηχανισμός δράσης μέσω μεταφραστικής καταστολής του γονιδίου στόχου (Τροποποιημένο από MacFarlane & Murphy, 2010)

A.1.8 ΣΩΜΑΤΙΑ P (P BODIES)

Τα σωματίδια P είναι δυναμικές μικρές κυτταροπλασματικές περιοχές σφαιρικής πρωτεΐνης που βρίσκονται σε κύτταρα που συναντούμε από ζυμομύκητες έως και σε ανθρώπους (Sheth & Parker, 2003). Ένας μεγάλος αριθμός μελετών που διερευνούν τον σχηματισμό και τη λειτουργία των σωματίων P έχουν διεξαχθεί σε ζυμομύκητες. Αν και αυτές οι δομές είναι παρόμοιες στους ανθρώπους, υπάρχουν ειδικές πρωτεΐνες θηλαστικών που μπορεί να σχετίζονται. Υπάρχουν πολλά παρόμοια κυτταροπλασματικά πεδία που βρίσκονται σε κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων κοκκίων στρες, εξωσώματα και πολυκυστικών σωματίων που περιέχουν μερικά από τα ίδια πρωτεϊνικά συστατικά (Kedersha & Anderson, 2007; MacFarlane & Murphy, 2010). Ωστόσο, υπάρχουν μερικοί δείκτες πρωτεϊνών που φαίνεται να είναι ειδικοί για τα σωματίδια P όπως οι Dcp1, 4E-T, GE-1 / hedls, p54 / RCK και Xrn1 (Kedersha & Anderson, 2007). Υπάρχει κάποια διαμάχη στον τομέα όσον αφορά την ταξινόμηση αυτών των μικρών κυτταροπλασματικών περιοχών που σχετίζεται με την μεταβλητή λειτουργία, τον εντοπισμό, το μέγεθος και τις πρωτεΐνες που περιέχουν. Αυτό οφείλεται εν μέρει στη δυναμική φύση αυτών των δομών. Τα σωματίδια P επηρεάζονται από μια ποικιλία κυτταρικών παραγόντων που περιλαμβάνουν τα επίπεδα γλυκόζης, την ωσμωτική πίεση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Teixeira *et al.*, 2005). Ομοίως, τα κοκκία στρες ποικίλουν σε αριθμό και μέγεθος σε διαφορετικές περιβαλλοντικές καταπονήσεις όπως η θερμοκρασία, η μόλυνση, η υποξία και το υπεριώδες φως (Kedersha, Gupta, Li, Miller & Anderson, 1999).

Η συλλογική έρευνα δείχνει ότι τα σωματίδια P είναι η λειτουργική θέση της αναστρέψιμης καταστολής του mRNA και της αποσύνθεσής του, η οποία περιλαμβάνει και την γονιδιακή αποσιώπηση μέσω miRNA (Liu *et al.*, 2005; Parker & Sheth, 2007). Τα σωματίδια P περιέχουν mRNA μαζί με μια ποικιλία ενζύμων και παραγόντων που απαιτούνται για διεργασίες όπως απομάκρυνση καλύμματος, ουράς πολυA, αποικοδόμηση RNA και μεταφραστική καταστολή (Coller & Parker, 2004). Περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της miRNA αποσιώπησης και των σωματίων P αποκάλυψε ότι οι πρωτεΐνες Ago 1-4 εντοπίζονται σε σωματίδια P με κλώνους επιβατικούς και οδηγούς από miRNA διμερή (Pillai, 2005; Filipowicz *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Jakymiw *et al.*, 2005; Sen & Blau, 2005 in MacFarlane & Murphy, 2010). Αυτό υποδηλώνει ότι εκτός από το ότι είναι η λειτουργική θέση για καταστολή των mRNA, τα σωματίδια P είναι επίσης η λειτουργική θέση της προκαλούμενης από miRNA γονιδιακής σίγασης. Ο ρόλος των P bodies στην γονιδιακή αποσιώπηση μέσω miRNA διερευνάται διαρκώς.



Εικόνα 8. Μονοπάτι των miRNA μέσα στα σωμάτια P (Τροποποιημένο από MacFarlane & Murphy, 2010).

Η σχέση των σωματίων P και των miRNA είναι πολύ σημαντική. Τα στοιχεία δείχνουν σαφώς ότι τα σωμάτια P είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του miRNA, καθώς η αναστολή του σχηματισμού τους με την εξάντληση του GW182 (το κύριο πρωτεϊνικό συστατικό των σωματίων P) παρεμποδίζει σημαντικά τη λειτουργία των miRNA (Jakymiw *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005 in MacFarlane & Murphy, 2010). Αντίστροφα, η απομάκρυνση του συμπλέγματος μικροεπεξεργαστών αναστέλλει τον σχηματισμό των σωματίων P (Teixeira *et al.*, 2005; Jakymiw *et al.*, 2007). Η συναρμολόγηση και η ενεργοποίηση του συμπλόκου RISC πραγματοποιείται μέσα στα σωμάτια P, η οποία υποστηρίζει τον συνεντοπισμό των διπλών miRNA και των Ago 1-4 πρωτεϊνών στο GW182. Η πρωτεΐνη GW182 είναι ένα σημαντικό συστατικό του συμπλόκου RISC, που έχει λειτουργική εμπλοκή τόσο σε μηχανισμούς αποσιώπησης που εξαρτώνται από αποκοπή, όσο και σε ανεξάρτητους μηχανισμούς αποκοπής (Liu *et al.*, 2005; Jakymiw *et al.*, 2005; Jakymiw *et al.*, 2007). Αυτό το μοντέλο υποθέτει ότι υπάρχουν εξειδικευμένα διαμερίσματα μέσα στα σωμάτια P για την ανάκτηση του RISC από πρωτεΐνες τελεστές αποσιώπησης. Η διάσπαση του στόχου mRNA μέσω αποκοπής εμφανίζεται πιθανώς σε ένα εξειδικευμένο διαμέρισμα του σωματίου P που είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση του mRNA (Pillai, 2005). Τα ένζυμα που εμπλέκονται στη διαδικασία

αποικοδόμησης του mRNA, όπως τα ένζυμα Ccy4, Not1, Pop2, τα ένζυμα αποκοπής Dcp1, Dcp2 και οι νουκλεάσες Xrn1p, καθώς και το εξώσωμα, βρίσκονται εντός των σωματίων P (Coller & Parker, 2004; Chu & Rana, 2006; Parker & Sheth, 2007). Εναλλακτικά, μηχανισμοί ανεξάρτητοι από την αποκοπή αναστέλλουν τη μετάφραση με διάφορα μέσα. Τα σωματίδια P περιέχουν ένζυμα και παράγοντες ελέγχου της μετάφρασης, ιδιαίτερα τα p54, FMRP, Gemin5 και RAP55, που απαιτούνται για την μεταφραστική καταστολή που προκαλείται από miRNA ή/και την κατευθυνόμενη αποθήκευση mRNA (Chu & Rana, 2006; Jakymiw *et al.*, 2007). Τα διαμερίσματα αποθήκευσης πρέπει να απομονώνονται από τα ένζυμα αποικοδόμησης και να διαθέτουν έναν μηχανισμό για τη διαχείριση της κατάστασης του mRNA, ο οποίος θα καθορίζει εάν τα μετάγραφα αποικοδομούνται ή επιστρέφουν στο κυτταρόπλασμα προς μετάφραση (Coller & Parker, 2005; Bhattacharyya, Habermacher & Martine, 2006a; Bhattacharyya, Habermacher & Martine, 2006b). Από την άλλη πλευρά, τα mRNA που μεταφράζονται ενεργά από πολυριβοσώματα στοχεύονται από το σύμπλοκο miRISC στο κυτταρόπλασμα προς αναστολή της έναρξης της μετάφρασης ή/και της επιμήκυνσης (MacFarlane & Murphy, 2010). Αυτά τα mRNA στη συνέχεια κατευθύνονται σε σωματίδια P προς αποθήκευση ή αποικοδόμηση. Η καταστολή των ενεργά μεταφραζόμενων mRNA από τα miRNA μπορεί να εξηγήσει γιατί τα miRNA και οι πρωτεΐνες Ago συναντώνται και στο κυτταρόπλασμα.

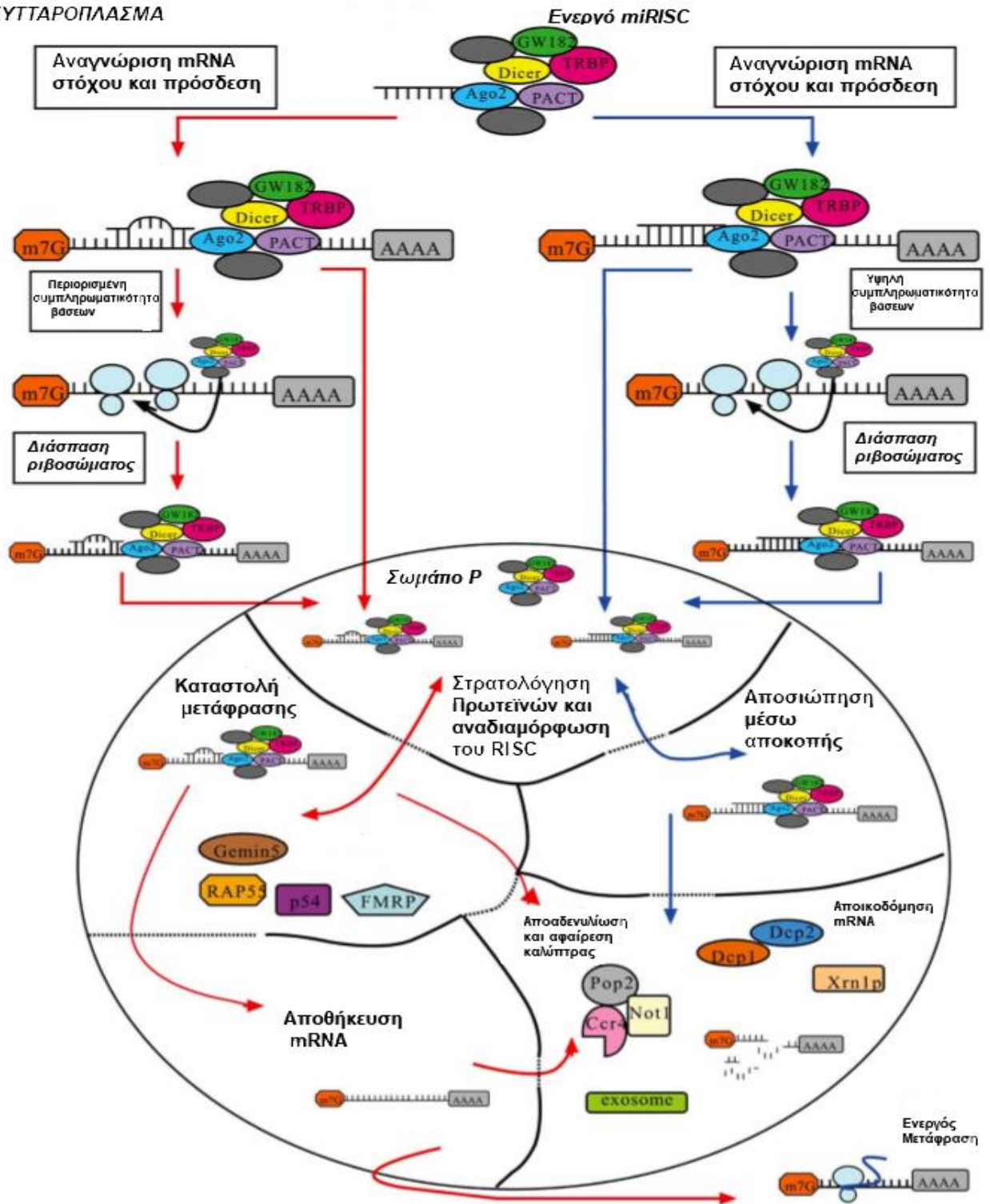
A.1.9 ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ miRNA

(εικόνα 8)

Μετά από κάποιο ερέθισμα το miRNA μεταγράφεται από το γονιδίωμα, είτε ως συστατικό του pre-miRNA, είτε ως ένα πολυσιστρονικό πρωτογενές μετάγραφο miRNA. Η διάσπαση του pre-miRNA από το σύμπλοκο αποκοπής ή τον μικροεπεξεργαστή απελευθερώνει ένα από τα τρία πιθανά πρόδρομα μόρια miRNA: ένα mirtron, ένα pri-miRNA ή ένα pre-miRNA. Το pri-miRNA μετατρέπεται σε pre-miRNA από το σύμπλοκο μικροεπεξεργαστή που διασπά τον ένα βραχίονα σε μία απόσταση 11 bp από τη σύνδεση ssRNA-dsRNA. Τα pre-miRNA (και πιθανώς τα mirtron) εξάγονται στο κυτταρόπλασμα μέσω της οδού Exportin5 / RanGTP. Στο κυτταρόπλασμα, το pre-miRNA μπορεί να ωριμάσει στο διπλό miRNA μέσω δύο εναλλακτικών οδών. Η άμεση οδός είναι ένα μοναδικό γεγονός διάσπασης που εκτελείται από τη Dicer, η οποία συνδέεται με την TRBP και την PACT. Αντίθετα, η έμμεση οδός είναι μια διεργασία διάσπασης δύο σταδίων που διεξάγεται από ένα σύμπλεγμα αποτελούμενο από Dicer, Ago2 και TRBP. Μία αρχική διάσπαση Ago2 δημιουργεί ένα ενδιάμεσο, ac-pre-miRNA, το οποίο λειτουργεί ως υπόστρωμα για την Dicer. Το διμερές miRNA φορτώνεται στην Ago2 του συμπλέγματος φόρτωσης RISC που περιέχει τις Dicer, TRBP και PACT. Εάν το διμερές miRNA εμφανίζει υψηλή συμπληρωματικότητα βάσεων, η Ago2 θα διασπάσει

τον βραχίονα με το πιο σταθερό άκρο 5', που ονομάζεται επιβατικός κλώνος, ενεργοποιώντας την αποικοδόμησή του και αφήνοντας τον οδηγό κλώνο δεσμευμένο με την Ago2. Το ενεργό σύμπλοκο miRISC θα κατευθύνει το mRNA που περιμένει να μεταφραστεί ή μεταφράζεται στο διαμέρισμα προσλήψεως ενός σωματίου P, όπου το επίπεδο συμπληρωματικότητας οδηγού-στόχου ρυθμίζει την πρόσληψη πρωτεϊνών που απαιτούνται για τους δύο μηχανισμούς γονιδιακής αποσιώπησης, τον εξαρτώμενο από αποκοπή και τον ανεξάρτητο. Η εκτεταμένη συμπληρωματικότητα βάσεων οδηγού-στόχου θα μεταφέρει το miRISC, με τον δεσμευμένο mRNA στόχο και τις προσληθείσες πρωτεΐνες, στο διαμέρισμα του σωματίου P, που έχει οριστεί για την αποσιώπηση που εξαρτάται από αποκοπή, όπου η Ago2 θα διασπάσει το mRNA στόχο. Η επακόλουθη αποσύνθεση του mRNA θα λάβει χώρα στο εξειδικευμένο διαμέρισμα αποικοδόμησης mRNA, οπότε το miRISC θα επιστρέψει στη μονάδα στρατολόγησης για την επιπρόσθετη ATP-εξαρτώμενη αποσιώπηση. Εναλλακτικά, η περιορισμένη συμπληρωματικότητα βάσεων οδηγού-στόχου θα κατευθύνει τη μετεγκατάσταση σε ένα διαμέρισμα συγκεκριμένο προς αποσιώπηση ανεξάρτητη από αποκοπή, δηλαδή μεταφραστική καταστολή. Στο σημείο αυτό το mRNA, είτε θα συσχετιστεί με παράγοντες καταστολής της μετάφρασης, είτε θα μεταφερθεί προς μακροχρόνια αποθήκευση ή, τελικά, θα συμβεί επιτάχυνση της αποσύνθεσής του.

ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ



Εικόνα 9. Ολιστικό μοντέλο μονοπατιών του προτεινόμενου μηχανισμού δράσης των miRNA (Τροποποιημένο από MacFarlane & Murphy, 2010)

A.2 ΑΙΜΑ

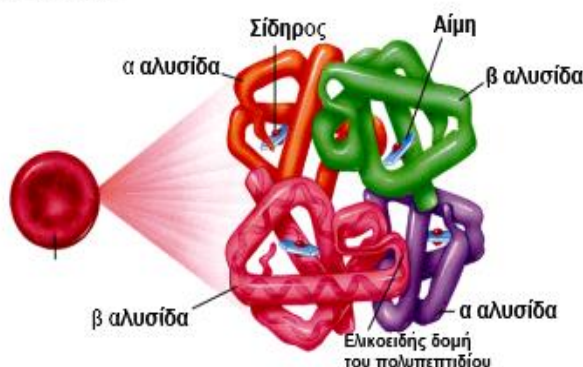
Το αίμα είναι υγρός παχύρρευστος ιστός, που συναντάται μόνο στους πολυκύτταρους οργανισμούς, και έχει χρώμα που κυμαίνεται από λαμπρό ερυθρό μέχρι κυανέρυθρο, κολλώδη σύσταση και ιδιάζουσα οσμή. Με τη βοήθεια του κυκλοφορικού συστήματος, το οποίο αποτελείται από ένα περίπλοκο δίκτυο αγγείων και από την καρδιά, κυκλοφορεί σε όλο το σώμα. Ο μέσος όγκος αίματος στον ενήλικο άνθρωπο είναι 5 L και αντιστοιχεί περίπου στο 8% του ολικού βάρους του σώματος.

Το αίμα αποτελεί το μέσο μεταφοράς του οξυγόνου και του CO₂ μεταξύ των πνευμόνων και των υπόλοιπων ιστών του σώματος και των θρεπτικών από το γαστρεντερικό σωλήνα στους άλλους ιστούς. Επιπλέον, μεταφέρει τα ένζυμα, τις ορμόνες και τις βιταμίνες από τα σημεία παραγωγής προς τα κύτταρα-προορισμούς και τα άχρηστα προϊόντα του σώματος στα όργανα απέκκρισης. Παίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της θερμοκρασίας του σώματος στους 36,7 °C, αφού κατανέμει τη θερμότητα ισότιμα σε όλα τα επιμέρους τμήματά του. Παράλληλα, μέσω των λευκοκυττάρων και των ανοσοσφαιρινών που περιέχει, συμμετέχει στην άμυνα έναντι παθογόνων, ενώ μέσω των αιμοπεταλίων, ρυθμίζει την αιμόσταση. Τέλος, μεταφέροντας νερό και τα όξινα προϊόντα του μεταβολισμού προς απέκκριση, συμβάλει στη διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας στο σώμα.

Το αίμα αποτελείται από μία ρευστή μεσοκυττάρια ουσία, το **πλάσμα**, μέσα στην οποία αιωρούνται τα κυτταρικά συστατικά, τα αιμοσφαίρια. Το πλάσμα είναι ένα ωχροκίτρινο υγρό το οποίο αποτελείται από πολλά συστατικά, το βασικότερο εκ των οποίων είναι το νερό που αντιπροσωπεύει το 90 % του όγκου του. Άλλα στοιχεία είναι τα άλατα, όπως το χλωριούχο νάτριο (NaCl) και το διττανθρακικό ιόν (HCO₃⁻), που εξασφαλίζουν σταθερό pH, και ιόντα, όπως τα Ca²⁺, Fe²⁺ και Cu²⁺, που είναι απαραίτητα σε πολλές βιολογικές διαδικασίες. Επιπλέον, περιέχονται πολλά μόρια χαμηλού μοριακού βάρους, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη, αμινοξέα, νουκλεοτίδια (ATP, cAMP), βιταμίνες και ορμόνες, λιπαρά οξέα, οξέα χολής, ουρία και αμμωνία. Επιπρόσθετα, υπάρχουν και στοιχεία με υψηλό μοριακό βάρος, όπως πεπτίδια και γλυκοπρωτεΐνες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες, DNA και RNA. Τέλος, στα 2 συστατικά του πλάσματος συγκαταλέγονται και αέρια σε διαλυτή μορφή, όπως O₂, CO₂ και N₂O (πρωτοξειδίο αζώτου), και διάφοροι μεταβολίτες (Schaller *et al.*, 2008). Τα έμμορφα συστατικά του αίματος, διακρίνονται σε τρεις ομάδες: 1) τα **ερυθρά αιμοσφαίρια**, 2) τα **λευκά αιμοσφαίρια** και 3) τα **αιμοπετάλια**. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι τα κύτταρα που υπερτερούν στο αίμα. Είναι απύρρηνα, έχουν διάμετρο 7.5 μm και δισκοειδές αμφίκωλο σχήμα. Χαρακτηρίζονται από μεγάλη ευκαμψία, η οποία τους επιτρέπει την παροδική παραμόρφωσή τους κατά τη διέλευση από τα στενά τριχοειδή αγγεία. Στο κυτταρόπλασμά τους περιέχουν την αιμοσφαιρίνη (εικόνα 9), η οποία

συμμετέχει στην κύρια λειτουργία των ερυθροκυττάρων, που είναι η μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς.

Μόριο Αιμοσφαιρίνης



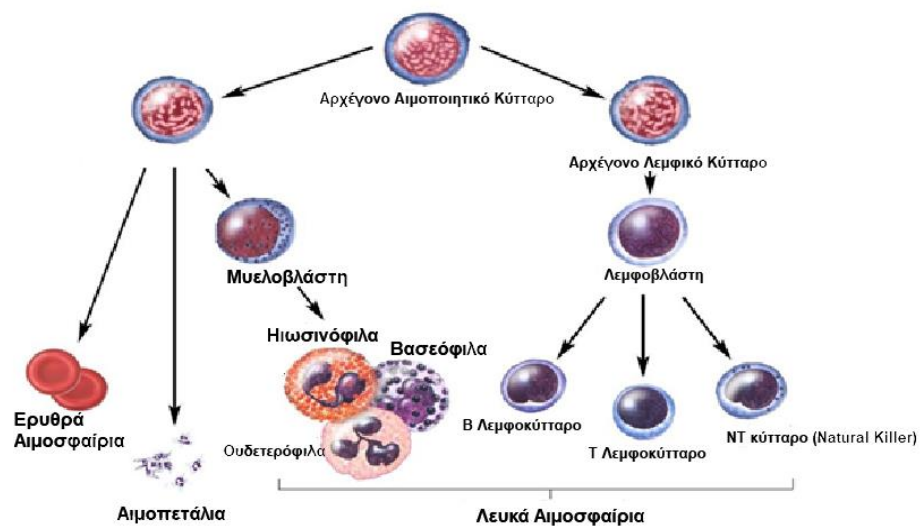
Εικόνα 9. Η δομή της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης (Τροποποιημένο από: <http://easypediatrics.com/physiology-of-hemoglobin>)

Τα λευκά αιμοσφαίρια βρίσκονται συνήθως σε συγκέντρωση που κυμαίνεται από 4,000 έως 10,000 ανά μL αίματος και διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα κοκκιώδη (ή πολυμορφοπύρρηνα) και τα άκοκκα λευκά αιμοσφαίρια. Τα κοκκιώδη έχουν πυρήνα με δύο ή περισσότερους λοβούς και φέρουν χαρακτηριστικά κοκκία στο κυτταρόπλασμα τους. Ανάλογα με τη συγγένεια που παρουσιάζουν τα κοκκία τους προς τις ιστολογικές χρωστικές, διακρίνονται σε τρεις τύπους: τα ουδετερόφιλα (50-65% των λευκοκυττάρων), τα ηωσινόφιλα (1-5%) και τα βασεόφιλα (0-1%). Τα **ουδετερόφιλα** είναι σφαιρικά κύτταρα με μέγεθος που κυμαίνεται από 9 έως 12 μm , έχουν φαγοκυτταρική λειτουργία και συμμετέχουν στην αντιμετώπιση λοιμώξεων. Τα κοκκία τους χρωματίζονται από ουδέτερες χρωστικές, ενώ ο πυρήνας τους αποτελείται από 3-5 λοβούς που συνδέονται μεταξύ τους με γέφυρες χρωματίνης. Τα **ηωσινόφιλα** είναι επίσης σφαιρικά και έχουν μέγεθος που φτάνει μέχρι και τα 14 μm . Τα κοκκία τους χρωματίζονται κιτρινοπορτοκαλόχρα από όξινες χρωστικές. Ο πυρήνας τους αποτελείται συνήθως από 2 ωοειδείς λοβούς που συνδέονται με μία γέφυρα χρωματίνης. Τα **βασεόφιλα** είναι σφαιρικά κύτταρα με μέγεθος περίπου ίδιο με των ουδετερόφιλων και με πυρήνα που έχει συνήθως σιγμοειδές σχήμα. Τα κοκκία τους είναι αδρά βασεόφιλα. Τα άκοκκα λευκά αιμοσφαίρια (30-40% των λευκοκυττάρων) διακρίνονται στα λεμφοκύτταρα και στα μεγάλα μονοπύρρηνα. Τα λεμφοκύτταρα (25-40% των λευκοκυττάρων) είναι σφαιρικά κύτταρα με μέγεθος που κυμαίνεται από 7.5-18 μm . Ανάλογα με το σημείο όπου ωριμάζουν και τον λειτουργικό τους ρόλο, διακρίνονται σε **T-** και **B- λεμφοκύτταρα**. Τα μεγάλα μονοπύρρηνα (3-8% των λευκοκυττάρων) αποτελούν τα μακροφάγα κύτταρα του σώματος. Έχουν μέγεθος 12-20 μm και σχήμα σφαιρικό. Κατέχουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού, λόγω της έντονης φαγοκυτταρικής τους λειτουργίας. Η τελευταία ομάδα των έμμορφων συστατικών του αίματος, τα **αιμοπετάλια** ή αλλιώς θρομβοκύτταρα, είναι μικρά απύρρηνα σωμάτια διαφόρου σχήματος που προέρχονται από τα μεγακαρυοκύτταρα. Έχουν το μικρότερο μέγεθος από τα έμμορφα στοιχεία του

αίματος, με διάμετρο από 2 έως 3 μm . Η φυσιολογική συγκέντρωσή τους στο αίμα κυμαίνεται από 150,000 έως 400,000 ανά μL . Ο βασικός τους ρόλος είναι η πήξη του αίματος και η εξασφάλιση της αιμόστασης.

A.2.1 ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ – ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Η αιμοποίηση (εικόνα 10) είναι η διαδικασία παραγωγής των κυττάρων του αίματος και συμβαίνει κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και καθ' όλη την ενήλικη ζωή για τη σύνθεση και τον ανεφοδιασμό του κυκλοφορικού συστήματος. Η διαδικασία της αιμοποίησης ξεκινάει από τα **αρχέγονα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα, HSC** (hematopoietic stem cells), τα οποία δίνουν γένεση σε όλα τα κύτταρα του αίματος. Τα HSC έχουν δυνατότητα αυτοανανέωσης αλλά και διαφοροποίησης σε οποιοδήποτε τύπο κυττάρου αίματος. Δεδομένου ότι τα ώριμα κύτταρα του αίματος έχουν κατά κύριο λόγο σύντομο χρόνο ζωής και ο αριθμός των HSC παραμένει σταθερός καθ' όλη την ενήλικη ζωή, οι δύο διαδικασίες, διαφοροποίηση και αυτοανανέωση, βρίσκονται σε ισορροπία. Αυτό συμβαίνει αφού τα HSC μπορούν είτε να διαιρεθούν συμμετρικά παράγοντας δύο νέα HSC κύτταρα, είτε να διαιρεθούν ασύμμετρα δίνοντας ένα HSC και ένα κύτταρο που είναι δεσμευμένο για διαφοροποίηση. Στον άνθρωπο, η ερυθροποίηση κατά τις πρώτες εβδομάδες της εμβρυϊκής ανάπτυξης συμβαίνει στον λεκιθικό σάκο, όπου τα αρχέγονα κύτταρα διαφοροποιούνται σε προγονικά ερυθροειδή κύτταρα. Τα HSC μεταναστεύουν μέχρι τον τρίτο μήνα της εγκυμοσύνης από τον εμβρυϊκό σάκο στο ήπαρ και έπειτα στον σπλήνα. Έως τον έβδομο μήνα της κύησης αυτά τα δύο όργανα παίζουν κεντρικό ρόλο στην ερυθροποίηση, αλλά έπειτα αυτό τον ρόλο αναλαμβάνει κυρίως ο μυελός των οστών. Μετά τη γέννηση η αιμοποιητική δραστηριότητα των δύο οργάνων μηδενίζεται. Το αιμοποιητικό σύστημα είναι οργανωμένο σε μία ιεραρχία κατά την οποία προοδευτικά, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε προγονικά από τα οποία τελικά προκύπτουν τα ώριμα κύτταρα του αίματος. Αυτά χαρακτηρίζονται από μερική ή παντελή απώλεια ικανότητας αυτοανανέωσης. Αυτή η ιεραρχία του αιμοποιητικού συστήματος πιθανώς προστατεύει τον οργανισμό από καρκινογένεση, αφού τα διαφοροποιημένα κύτταρα που έχουν προκύψει μετά από κυτταρική διαίρεση, η οποία είναι επιρρεπής σε σφάλματα και στην πρόκληση μεταλλάξεων, χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και έτσι δεν μπορούν να οδηγήσουν σε καρκίνο. Σύμφωνα με το κλασσικό μοντέλο της αιμοποίησης, ένα HSC μπορεί να διαφοροποιηθεί σε δύο είδη προγονικών κυττάρων, στα λεμφοειδή προγονικά κύτταρα (lymphoid progenitor cells, **CLP**), που δίνουν γένεση στα **B**, **T** και στα **NK κύτταρα**, και στα μυελοειδή προγονικά κύτταρα (myeloid-erythroid progenitor cells, **CMEP**), που δίνουν γένεση στα προγονικά κύτταρα των ερυθρών αιμοσφαιρίων, σε πολλά λευκά αιμοσφαίρια και στα megakaryocytes (Seita & Weissman, 2010).



Εικόνα 10. Ιεραρχικό μοντέλο αιμοποίησης, κλιμάκωση της δέσμευσης για διαφοροποίηση και της ικανότητας αυτοανανέωσης. (Τροποποιημένο από Peng, Y. and C.M. Croce, *The role of MicroRNA in human cancer*. 2016. 1: p. 15004)

Εκτός από το κλασσικό μοντέλο ερυθροποίησης υπάρχει και το εναλλακτικό μυελο-βασιζόμενο μοντέλο που προτάθηκε από τους Kawamoto & Katsura (2009). Σύμφωνα με αυτό, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSC) διαφοροποιούνται αρχικά σε ένα αρχέγονο μυελοειδές αιμοποιητικό κύτταρο (CMEP) και σε ένα κοινό προγονικό μυελο-λεμφοειδές κύτταρο (myelo-lymphoid progenitor cell, CMLP). Τα τελευταία μέσω δύο πιθανών μονοπατιών-στάδιο προγονικού T μυελοειδούς κυττάρου και στάδιο προγονικού B μυελοειδούς κυττάρου- δίνουν γένεση στα T και B προγονικά κύτταρα, αντίστοιχα. Η διαφορά μεταξύ του κλασσικού και εναλλακτικού μοντέλου έγκειται στο ότι στο πρώτο τα προγονικά T και B κύτταρα του σημείου διακλάδωσης δε διατηρούν την ικανότητα παραγωγής μυελοειδών κυττάρων, ενώ στο μυελο-βασιζόμενο μοντέλο αυτή η ικανότητα διατηρείται σε όλα τα διακλαδιζόμενα σημεία των T, B και ερυθροειδών σειρών (Kawamoto, Wada & Katsura, 2010).

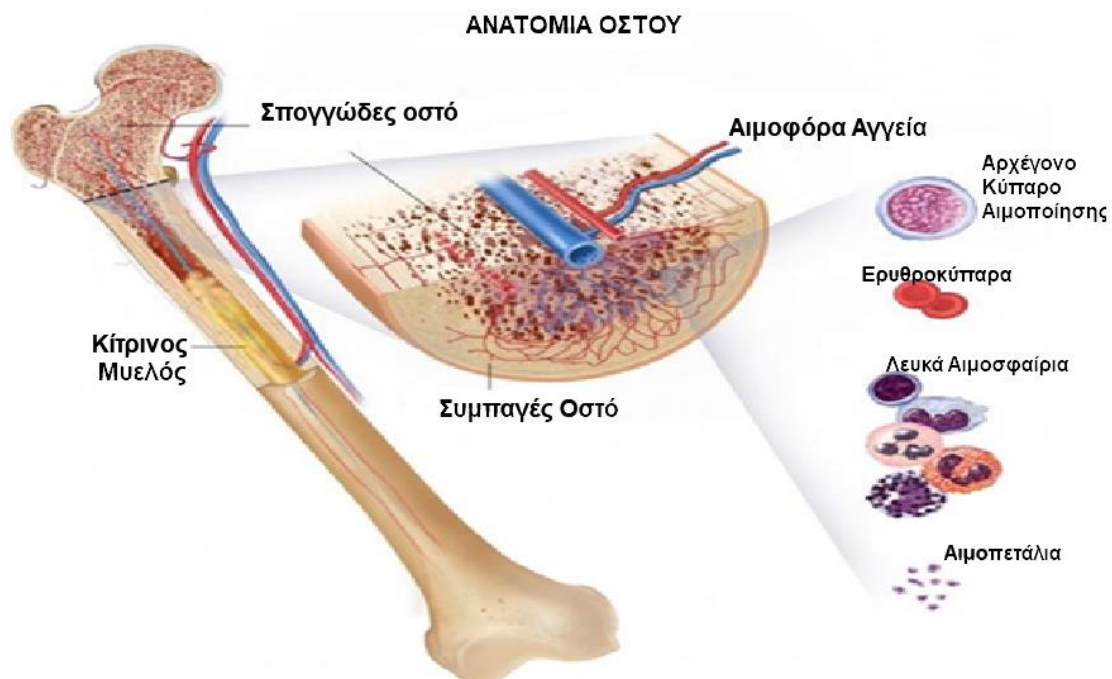
A.2.2 ΜΥΕΛΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

A.2.2.1 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Τα οστά αποτελούνται από έναν εξωτερικό σκελετό **συμπαγούς οστού**, τον φλοιό, που αποτελεί το 80% του συνολικού τους όγκου, και από ένα εσωτερικό δίκτυο οσταρίων, το **σπογγώδες οστό**, που αποτελεί το 20% του οστικού όγκου. Το συμπαγές οστό αποτελείται κυρίως από ίνες κολλαγόνου τύπου I, που περιβάλλονται από άμορφη ουσία πρωτεϊνών και πρωτεογλυκανών. Οι λειτουργικές μονάδες του είναι οι οστεώνες, που είναι κυλινδρικές δομές οστού

τοποθετημένες σε ομόκεντρους κύκλους στο κέντρο των οποίων εντοπίζονται τριχοειδή αγγεία και φλεβίδια. Το σπογγώδες οστό είναι κυψελοειδές και περιβάλλεται από το συμπαγές οστό, οι δοκίδες του έχουν πάχος συνήθως λιγότερο από 0,2 mm και αποτελείται από παράλληλες στρώσεις-ελάσματα. Περίπου 10% της σπογγώδους επιφάνειάς του αποτελείται από οστεοειδή.

Ο μυελός των οστών (εικόνα 11) είναι ο ιστός που καταλαμβάνει τις κοιλότητες του εσωτερικού σπογγώδους οστού. Ζυγίζει περίπου 1600-3700 g και διακρίνεται σε **κίτρινο**, αποτελούμενος κυρίως από λιπώδη ιστό, και σε **ερυθρό**, που περιλαμβάνει τα αιμοποιητικά κύτταρα. Τα λιπώδη μαζί με τα δικτυωτά κύτταρα, τους ινοβλάστες με τα ινίδια τους και το εκτενές δίκτυο αιμοφόρων αγγείων με τα συνοδά νευρικά κύτταρα αποτελούν τα στρωματικά κύτταρα, που είναι το υποστηρικτικό πλαίσιο της ερυθροποίησης. Τα αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα του ερυθρού μυελού παρέχουν συνεχώς νέα προγονικά κύτταρα δεσμευμένα για ερυθρο-, κοκκιο-, μονο- και μεγακαρυοκυτταροποίηση. Στον ερυθρό μυελό λαμβάνει επίσης χώρα η λεμφοποίηση και η ωρίμανση των πλασματοκυττάρων. Η ακριβής τοποθεσία του αιμοποιητικού ιστού (ερυθρός μυελός) είναι το εξωαγγειακό τμήμα του μυελού. Οι ερυθροειδείς νησίδες, όπου γίνεται η ερυθροποίηση, τα μεγακαρυοκύτταρα και οι πιο ώριμες μορφές των κοκκιοκυτταρικών σειρών βρίσκονται στην κεντρική περιοχή των μυελικών κοιλοτήτων, ενώ τα πρώιμα μυελοειδή προγονικά κύτταρα εντοπίζονται στις ενδοστεϊκές επιφάνειες και στα αρτηρίδια. Διαφοροποιήσεις αυτής της τοπολογίας παρατηρούνται σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις (Baug-Melnyk, 2012).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση οστού: σε μεγέθυνση φαίνονται οι κοιλότητες του σπογγώδους οστού στις οποίες εντοπίζεται ο ερυθρός μυελός, όπου γίνεται η ερυθροποίηση. Δεξιά: ανατομία του μυελού των οστών: κεντρικά φαίνεται ο λιπώδης κίτρινος ιστός, γύρω από αυτόν φαίνεται ο ερυθρός μυελός και περιφερειακά η εξωτερική επιφάνεια του οστού. (Τροποποιημένο από Bone Marrow Anatomy Human Anatomy Diagram. 2016)

Στους ενήλικες ο αιμοποιητικός ιστός εντοπίζεται στις κοιλότητες των ανώτερων άκρων των μακρίων οστών, του κρανίου, του στέρνου, της ωμοπλάτης, των πλευρών, των σπονδύλων και των οστών της λεκάνης. Η αναλογία ερυθροκίτρινου μυελού είναι ηλικιο-εξαρτώμενη, με τον αιμοποιητικό ιστό να μειώνεται και τα λιπώδη κύτταρα να αυξάνονται όσο αυξάνεται η ηλικία. Επίσης, παρατηρείται μείωση του όγκου του σπογγώδους οστού, του αριθμού των οστεοκυττάρων, των ενδοστεϊκών κυττάρων και αιμοφόρων αγγείων (Baur-Melnyk, 2012).

A.2.2.2 ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Η εξέταση του μυελού των οστών επιτρέπει την εκτίμηση της κατάστασης των κυττάρων του και της αρχιτεκτονικής του. Οι δύο διαδικασίες που ακολουθούνται είναι η αναρρόφηση ή/και η βιοψία του μυελού και είναι συμπληρωματικές. Με την αναρρόφηση παρέχονται λεπτομερείς πληροφορίες για τον αριθμό και τη μορφή των κυττάρων, ενώ με τη βιοψία αποκαλύπτεται η αρχιτεκτονική του ιστού. Η εξέταση του μυελού των οστών γίνεται με σκοπό τη διάγνωση ή/και την παρακολούθηση της εξέλιξης πολλών ασθενειών όπως η ανεξήγητη μικροκυττάρωση, μεγακυττάρωση, αναιμία και θρομβοκυτταροπενία, πυρετός αγνώστου αιτιολογίας, χρόνια μυελοπλασματοειδής διαταραχή, αποθηκευτικές διαταραχές, πολλαπλό μυέλωμα ή άλλες πλασματοκυτταρικές δυσκρασίες. Στη λευχαιμία, όπως και στις προαναφερθείσες ασθένειες, η αναρρόφηση μυελού των οστών επιτρέπει τη μελέτη της μορφολογίας των αιμοποιητικών κυττάρων του και τον προσδιορισμό της αναλογίας τους (Orazi, O'Malley & Arber, 2006). Η περιοχή που προτιμάται για αναρρόφηση μυελού είναι η οπίσθια λαγόνιος ακρολοφία για λόγους ασφαλείας, μειωμένου κινδύνου πόνου και εύκολης προσβασιμότητας. Εναλλακτικά μπορεί να αναρροφηθεί μυελός από την πρόσθια λαγόνιο ακρολοφία, σε περιπτώσεις τραυματισμού ή μόλυνσης της οπίσθιας και σε περιπτώσεις παθολογικής παχυσαρκίας. Παρόλα αυτά το δείγμα δεν είναι τόσο καλής ποιότητας λόγω της ύπαρξης πυκνής φλοιώδους στρώσης και της μεγάλης πιθανότητας πρόκλησης πόνου στον ασθενή. Σε βρέφη νεότερα του ενός έτος χρησιμοποιείται η κνήμη και η αναρρόφηση γίνεται μετά από γενική αναισθησία. Τέλος, ως λύση ανάγκης, για παιδιά μεγαλύτερα των 12 ετών και στα παθολογικώς παχύσαρκα άτομα, χρησιμοποιείται η περιοχή του στέρνου με μεγάλη προσοχή για να μη τραυματιστούν τα μαλακά όργανα της περιοχής. Κατά τη διαδικασία της αναρρόφησης ο ασθενής κατακλίνεται πλαγίως με το επάνω πόδι κεκλιμένο και το κάτω τεντωμένο. Οι συνθήκες είναι ασηπτικές και στο σημείο αναρρόφησης γίνεται τοπική αναισθησία. Σε συνδυασμό με την ανάλυση του δείγματος του μυελού, πρέπει να αναλύεται και περιφερικό αίμα του ασθενούς που συλλέγεται την ίδια μέρα. Στο περιφερικό αίμα γίνεται πλήρης μέτρηση αιμοποιητικών κυττάρων (complete blood cell count, **CBC**) και παρατήρηση χρωσμένου επιχρίσματος. Το δείγμα μυελού που έχει αναρροφηθεί μπορεί να υποστεί διάφορες ειδικές εξετάσεις όπως καλλιέργεια για βακτήρια, μύκητες, ή ιούς, χρωμοσωμική ανάλυση, κυτταρομετρία ροής για εντοπισμό επιφανειακών πρωτεϊνών,

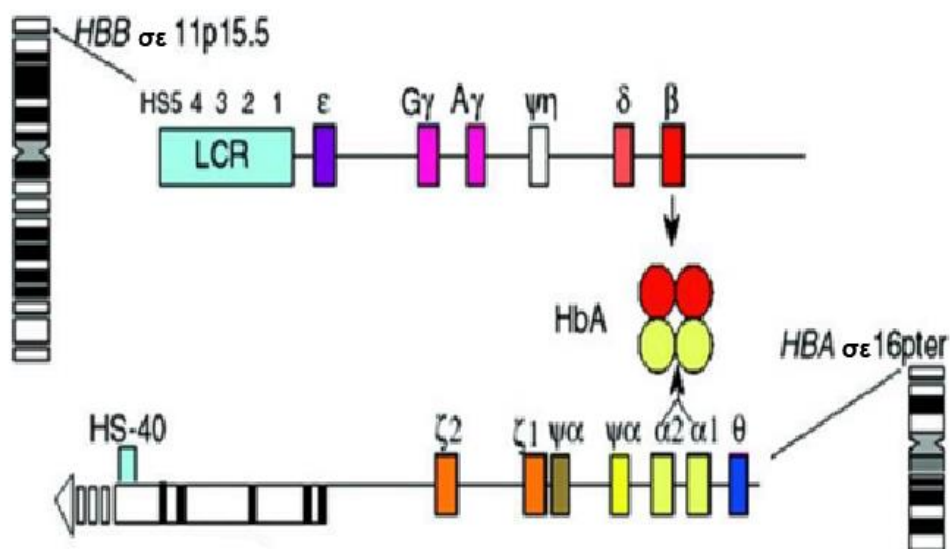
επίστρωση σε φιλμ και παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Τα χαρακτηριστικά που παρατηρούνται είναι η κυτταροβρίθεια, η κατανομή των διαφόρων τύπων κυττάρων, η ωρίμανσή τους και η ύπαρξη σπάνιων ή ανώμαλων κυττάρων. Η κυτταροβρίθεια του μυελού εκφράζεται ως ο λόγος του όγκου των αιμοποιητικών κυττάρων προς τον ολικό όγκο του μυελού. Η κυτταρική της λαγονίου ακρολοφίας εξαρτάται από την ηλικία και εμφανίζει αλλαγές σε παθολογικές καταστάσεις. Εάν είναι μεγαλύτερη από το φυσιολογικό, ο μυελός χαρακτηρίζεται ως υπερπλαστικός, ενώ αν είναι μικρότερη, ως υποπλαστικός. Η κυτταροβρίθεια μπορεί να μετρηθεί στα χρωσμένα επιχρίσματα συγκρίνοντας τις 10 περιοχές που καταλαμβάνονται από λιπώδη κύτταρα με τις περιοχές που καταλαμβάνονται από εμπύρηννα κύτταρα, στα σωματίδια που υπάρχουν στο φιλμ. Παρόλα αυτά, μετρείται πιο αξιόπιστα σε δείγματα μυελού που προέρχονται από βιοψία. Στο επίχρισμα η κατανομή των κυττάρων παρατηρείται στο μικροσκόπιο αρχικά σε μικρή μεγέθυνση (100x ή 200x) αναζητώντας την ύπαρξη ανωμαλιών στα κύτταρα, στην κατανομή τους και στον αριθμό των μεγακαρυοκυττάρων. Έπειτα σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (400x ή 1000x), παρατηρούνται περιοχές του επιχρίσματος όπου έχει γίνει αποτελεσματικός διαχωρισμός των κυττάρων. Σε αυτές τις περιοχές γίνεται η βέλτιστη ταυτοποίηση και η διαφορική μέτρηση 300-1000 κυττάρων για τον υπολογισμό του ποσοστού του κάθε τύπου. Επίσης, υπολογίζεται ο λόγος του αριθμού των κυττάρων της μυελικής σειράς (M) προς τον αριθμό κυττάρων της ερυθράς σειράς (E), (M/E). Στους ενήλικες η τιμή του λόγου ποικίλει από 1,2:1 έως 4:1. Αυξημένος λόγος μετρείται σε παθολογικές καταστάσεις, όπως μολύνσεις ή Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία. Μειωμένος λόγος παρατηρείται επίσης σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στην Ερυθροβλαστική Υπερπλασία. Σε φυσιολογική εικόνα μυελού με 100x μεγέθυνση υπάρχουν κατά μέσο όρο τρία μεγακαρυοκύτταρα. Η ωρίμανση των κυττάρων ελέγχεται από την ύπαρξη ισορροπίας μεταξύ της πυρηνικής και κυτταροπλασματικής ανάπτυξης. Δυσπλαστική ωρίμανση παρατηρείται σε περιπτώσεις λευχαιμίας ή λήψης ορισμένων φαρμάκων. Η ύπαρξη σπάνιων ή ανώμαλων κυττάρων, τέλος, συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις. Τέτοια κύτταρα είναι τα μαστοκύτταρα, που φυσιολογικά είναι πολύ σπάνια στο μυελό, και οι οστεοβλάστες και οστεοκλάστες που είναι επίσης ασυνήθιστα (McPherson *et al.*, 2011).

A.3 ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΦΑΙΡΙΝΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

A.3.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΣΦΑΙΡΙΝΩΝ

Στον άνθρωπο τα γονίδια των σφαιρινών βρίσκονται τοποθετημένα σε πολυγονιδιακά συμπλέγματα (multigene clusters), τα α-like και β-like συμπλέγματα σφαιρινών. Αυτός ο τύπος γονιδιακής οργάνωσης είναι συνήθης στα θηλαστικά. Το α-γονιδιακό σύμπλεγμα βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του 16ου χρωμοσώματος. Το σύμπλεγμα αυτό περιλαμβάνει με κατεύθυνση 5'-3'

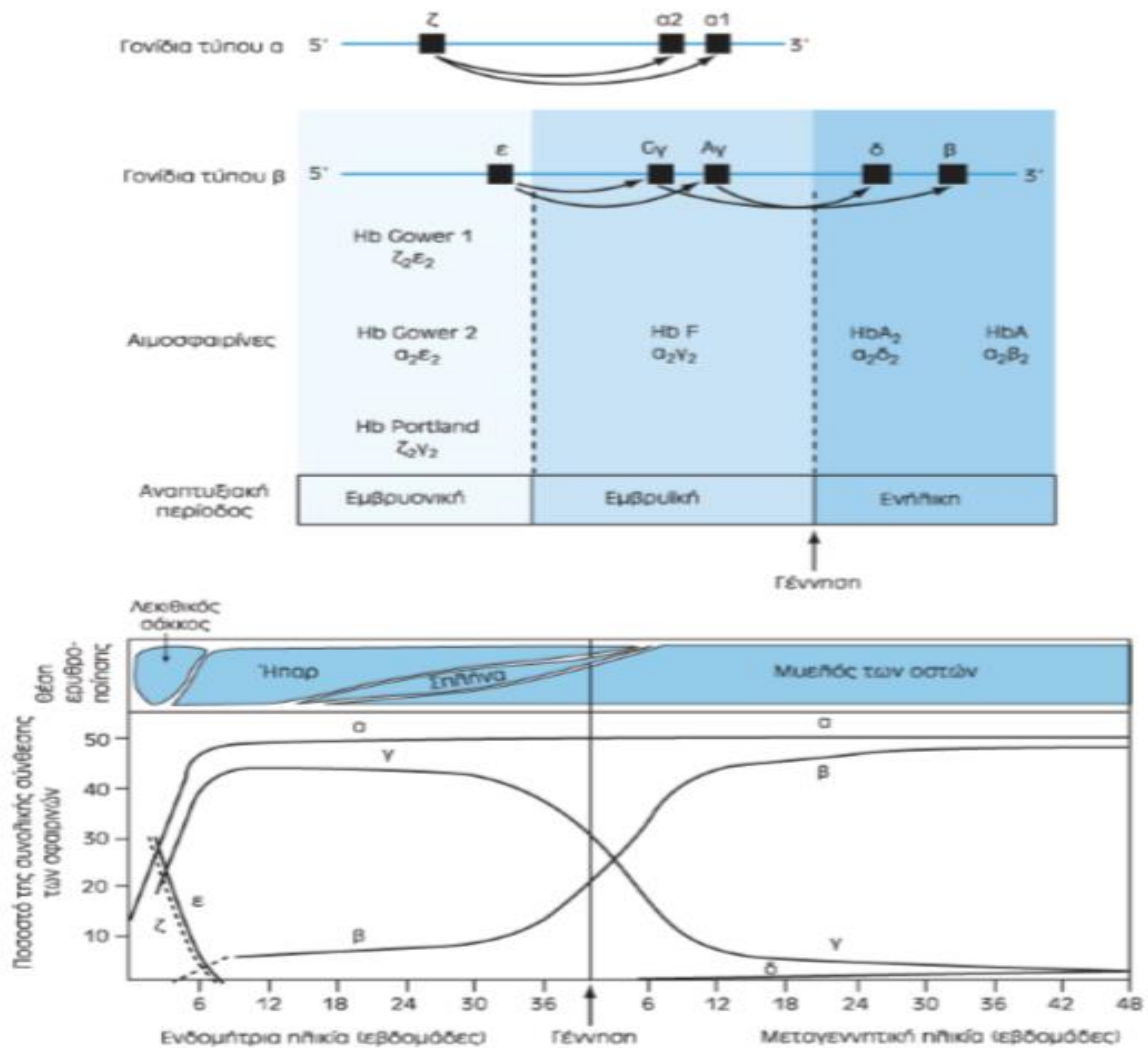
το εμβρυονικό γονίδιο HBZ, που κωδικοποιεί τη ζ αλυσίδα, το ψευδογονίδιο HBZP, τα δύο ψευδογονίδια HBAP2 και HBAP1, τα λειτουργικά γονίδια HBA2 και HBA1 ($\alpha 2$ και $\alpha 1$) και το HBQ1 ή γονίδιο θ , του οποίου η λειτουργία δεν είναι ακόμη γνωστή. Τα δύο γονίδια- α είναι παρόμοια μεταξύ τους και κωδικοποιούν τις αλυσίδες- α που είναι απαραίτητες για τη σύσταση των αιμοσφαιρινών των ενήλικων ατόμων HbA και HbA2, της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης HbF, καθώς και της εμβρυονικής αιμοσφαιρίνης Hb Gower 2. Αυτός ο γονιδιακός τόπος βρίσκεται κάτω από το ρυθμιστικό έλεγχο του ενισχυτή της α -σφαιρίνης, HS-40. Το β -γονιδιακό σύμπλεγμα εδράζεται στο βραχύ σκέλος του 11ου χρωμοσώματος. Στο σύμπλεγμα αυτό περιλαμβάνονται τα εξής γονίδια: το BHE που κωδικοποιεί την εμβρυονική σφαιρίνη ϵ , τα HBG2 (G γ) και HBG1 (A γ), που κωδικοποιούν την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη HbF, το β ψευδογονίδιο HBBP, το HBD (γονίδιο δ), που κωδικοποιεί τη δ -σφαιρίνη και το HBB (γονίδιο β), που κωδικοποιεί τη β -σφαιρίνη. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, η σωστή έκφραση αυτών των γονιδίων ελέγχεται από την περιοχή ελέγχου του γενετικού τόπου της β σφαιρίνης, LCR (locus control region). Τα α και β γονιδιακά συμπλέγματα φαίνονται στην εικόνα 3 (Patrinos *et al*, 2005). Τα γονίδια των αιμοσφαιρινών έχουν πολλές λειτουργικές ομοιότητες στην οργάνωσή τους. Συγκεκριμένα, καθένα από τα γονίδια αυτά διαθέτει τρία εξόνια. Μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου εξονίου, όπως και μεταξύ του δεύτερου και του τρίτου εξονίου υπάρχουν παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες (ιντρόνια), IVS-I και IVS-II (Patrinos & Antonarakis, 2010).



Εικόνα 12. Τα β - και α -γονιδιακά συμπλέγματα (Τροποποιημένο από: http://www.nature.com/gim/journal/v12/n2/fig_tab/gim201012f2.html)

A.3.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ ΣΦΑΙΡΙΝΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης στον άνθρωπο παράγονται διαφορετικοί τύποι αιμοσφαιρινών (εικόνα 13). Η σειρά με την οποία βρίσκονται τοποθετημένα τα γονίδια των αιμοσφαιρινών σε καθένα από τα δύο γονιδιακά συμπλέγματα συμπίπτει με τη σειρά της οντογενετικής έκφρασης των γονιδίων αυτών και της παραγωγής του αντίστοιχου τύπου αιμοσφαιρίνης. Καθώς εναλλάσσονται τα αναπτυξιακά στάδια, ο αιμοποιητικός ιστός από τον οποίο παράγονται οι διαφορετικοί τύποι αιμοσφαιρίνης που κυριαρχούν σε κάθε στάδιο μεταβάλλεται. Στον άνθρωπο, λοιπόν, η ερυθροποίηση ξεκινά από τον λεκιθικό σάκο, όπου παράγονται οι α, ζ και ε-σφαιρίνες. Στη συνέχεια και μετά το πέρας πέντε εβδομάδων κύησης, η ερυθροποίηση πραγματοποιείται στο ήπαρ του εμβρύου, όπου συντίθενται μεγάλες ποσότητες α- και γ-αλυσίδων σφαιρίνης. Το ήπαρ παραμένει ο κύριος ερυθροποιητικός ιστός μέχρι την εικοστή εβδομάδα της κύησης. Κατά την παιδική ηλικία, αλλά και αργότερα κατά την ενήλικη ζωή, οι α-, β- και δ-αλυσίδες σφαιρίνης παράγονται στο μυελό των οστών και τον σπλήνα, που σταδιακά μετατρέπονται σε κύριους ιστούς αιμοποίησης (Patrinos & Antonarakis, 2010). Αναλυτικότερα, οι εμβρυονικές αιμοσφαιρίνες **Gower 1** (ε2ζ2), **Gower 2** (α2ε2) και **Portland 1** (γ2ζ2) αποτελούν τις αιμοσφαιρίνες του εμβρύου κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια. Οι αιμοσφαιρίνες αυτές αντικαθίστανται σταδιακά από την εμβρυική αιμοσφαιρίνη **HbF** (α2γ2). Ενδεικτικά, σε έμβρυο 10 εβδομάδων η αιμοσφαιρίνη Portland 1 ανιχνεύεται σε ποσοστό μέχρι και 20% της συνολικής αιμοσφαιρίνης του εμβρύου, ενώ από τη δέκατη εβδομάδα και μετά, η HbF αποτελεί το 90% της συνολικής αιμοσφαιρίνης του εμβρύου (διατηρείται στα επίπεδα αυτά μέχρι το τέλος της κύησης). Μετά τη γέννηση, τα επίπεδα της HbF μειώνονται απότομα στο 2-3%. Σε διάστημα δέκα μηνών από τη γέννηση, η παραγωγή της HbF πραγματοποιείται αποκλειστικά από έναν συγκεκριμένο πληθυσμό ερυθροκυττάρων, τα κύτταρα F. Τα επίπεδα της HbF, καθώς και των κυττάρων F, καθορίζονται γενετικά και ο αριθμός τους ποικίλει στους ενήλικες διαφορετικών πληθυσμών. Η κύρια αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων, **HbA** (α2β2), ανιχνεύεται στα έμβρυα από την 6η εβδομάδα της κύησης σε ποσοστό 5-10% της συνολικής αιμοσφαιρίνης. Μετά τη γέννηση, αυξάνεται η παραγωγή, τόσο της HbA, όσο και της **HbA2** (α2δ2). Η παραγωγή των δ-αλυσίδων ξεκινά την 6η εβδομάδα της κύησης, μαζί με την παραγωγή των β-αλυσίδων. Η αιμοσφαιρίνη HbA2 ανιχνεύεται σε ποσοστό 2,5-3% στα ενήλικα άτομα (Stamatoyannopoulos *et al.*, 2001; Gravia *et al.*, 2014).



Εικόνα 13. Οι αιμοσφαιρίνες του ανθρώπου και η έκφρασή τους στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια στον άνθρωπο και η θέση τέλεσης της ερυθροποίησης (Τροποποιημένο από Thompson & Thompson. 2007)

A.3.3 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΤΗΣ β-ΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Κατά τη διάρκεια της εμβρυονικής και εμβρυϊκής ανάπτυξης πραγματοποιούνται δύο εναλλαγές στην έκφραση των γονιδίων του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης: α) η έκφραση του γονιδίου ε και η παραγωγή των εμβρυονικών αιμοσφαιρινών ακολουθείται από την έκφραση των γονιδίων γ και την παραγωγή HbF κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου ζωής και β) η έκφραση των γονιδίων γ και η παραγωγή της HbF ακολουθείται από την έκφραση του γονιδίου β και την παραγωγή της HbA κοντά στη γέννηση. Η ρύθμιση των αλλαγών αυτών στο κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο ελέγχεται από ένα διπλό ρυθμιστικό μηχανισμό, που περιλαμβάνει τον ανταγωνισμό των

γονιδίων για ενεργοποίηση από την περιοχή ελέγχου του γονιδιακού τόπου, LCR (locus control region) και την αποσιώπηση των γονιδίων που ήταν ενεργά κατά το προηγούμενο αναπτυξιακό στάδιο (Chen *et al*, 2008). Επιπρόσθετα, για τη ρύθμιση και την εναλλαγή της έκφρασης των γονιδίων του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης στο κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο είναι απαραίτητα συγκεκριμένα ρυθμιστικά στοιχεία. Τα στοιχεία αυτά μπορεί να είναι cis-ρυθμιστικά στοιχεία (ρυθμιστικά στοιχεία που βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα με το σύμπλεγμα) ή trans-ρυθμιστικά στοιχεία (στοιχεία που βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, αλλά κωδικοποιούν παράγοντες που μπορούν να προσδεθούν σε συγκεκριμένες ρυθμιστικές αλληλουχίες του συμπλέγματος και να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων). Τα cis-ρυθμιστικά στοιχεία μπορεί να είναι υποκινητές, ενισχυτές ή ανασταλτικά στοιχεία. Περιλαμβάνουν θέσεις πρόσδεσης για ερυθροειδικούς, αλλά και απλούς, μη εξειδικευμένους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με άλλους συμπαράγοντες, ώστε να επιτευχθεί η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Κάθε γονίδιο του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης διαθέτει συγκεκριμένο μοτίβο θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων: ένα 'TATA box' και δύο χαρακτηριστικά μοτίβα το 'CCAAT box' και το 'CACCC box' (Patrinos & Antonarakis, 2010). Το σημαντικότερο στοιχείο που ρυθμίζει την έκφραση όλων των γονιδίων του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης είναι η περιοχή ελέγχου του γονιδιακού τόπου, LCR. Η περιοχή αυτή, εδράζεται στο 5' άκρο του γονιδιακού τόπου των γονιδίων της β-σφαιρίνης, σε απόσταση περίπου 20kb από το εμβρυονικό γονίδιο ε. Αποτελείται από πέντε θέσεις (HS), υπερευαίσθητες στην έκθεση σε DNAση I. Κάθε μία από αυτές έχει μήκος 250-500bp και περιέχει μια περιοχή, τον πυρήνα, που είναι υπεύθυνη για τις δραστηριότητές της. Ο πυρήνας περιέχει θέσεις πρόσδεσης για ποικίλους ερυθροειδικούς, αλλά και ευρείας δράσης μεταγραφικούς παράγοντες. Η LCR δρα, είτε ως ενισχυτής της γονιδιακής έκφρασης (θέσεις HS2-4 με ισχυρότερο ενισχυτή τον HS-2), είτε ως μονωτής της γονιδιακής έκφρασης (θέση HS-5). Η θέση HS-1 δεν έχει γνωστή λειτουργία (Stamatoyannopoulos *et al.*, 1993; Patrinos & Antonarakis, 2010). Η LCR ενεργοποιεί μεταγραφικά κάθε γονίδιο του συμπλέγματος ξεχωριστά, με πιο αποδεκτό τρόπο, το μοντέλο σχηματισμού χρωματινικής θηλειάς. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, σχηματίζεται χρωματινική θηλειά, μέσω της οποίας έρχονται σε άμεση επαφή οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες που προσδένονται στην LCR με εκείνες που προσδένονται στον υποκινητή του γονιδίου που ενεργοποιείται μεταγραφικά κάθε φορά. Η απόσταση από την LCR επηρεάζει σημαντικά τη σειρά έκφρασης των γονιδίων του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης κατά την ανάπτυξη. Πιο κοντά στην LCR βρίσκεται το εμβρυονικό γονίδιο ε, ακολουθούν τα εμβρυικά γονίδια γ και τέλος, τα γονίδια δ και β που εκφράζονται στους ενήλικες. Τα γονίδια είναι τοποθετημένα σε σειρά που αντιστοιχεί στη σειρά με την οποία εκφράζονται κατά την ανάπτυξη. Τα γονίδια ε και γ τελικά αποσιωπούνται, καθώς προχωρά η διαδικασία της ανάπτυξης, χάρη σε τοπικές ρυθμιστικές αλληλουχίες που δρουν στο κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο, όπως θα αναλυθεί παρακάτω (Suzuki *et al*, 2014). Τέλος, η LCR μπορεί να κατευθύνει το χρόνο της αντιγραφής με έναν αναπτυξιακά ειδικό τρόπο *in vivo*, με αποτέλεσμα η περιοχή της β-σφαιρίνης στον άνθρωπο να αντιγράφεται αργά

στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, αλλά νωρίς στα ερυθροκύτταρα (Patrinos & Antonarakis, 2010). Άλλοι σημαντικοί παράγοντες για τη ρύθμιση των γονιδίων του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης είναι οι εξής.

- Το σύμπλοκο DRED(direct repeat erythroid-definitive): αποτελείται από τους πυρηνικούς υποδοχείς TR2 και TR4. Καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων γ και ϵ σε ενήλικα άτομα. Σημειακή μετάλλαξη στα σημεία πρόσδεσής τους στον υποκινητή του γονιδίου της γ -σφαιρίνης οδηγεί σε αυτόνομη, αυξημένη σύνθεση της γ -σφαιρίνης σε ενήλικα άτομα. Η διαταραχή αυτή ονομάζεται «κληρονομική διατήρηση της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης», HPFH (hereditary persistence of fetal hemoglobin) (Suzuki *et al*, 2014).
- Ο ερυθροειδικός μεταγραφικός παράγοντας GATA: αποτελεί βασικό παράγοντα για την ανάπτυξη και την τελική διαδικασία ωρίμανσης των ερυθροκυττάρων. Καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων γ στα ενήλικα άτομα, μέσω σύνδεσης στη μεταγραφική συσκευή άμεσα ή με τη βοήθεια άλλων πρωτεϊνικών παραγόντων, επηρεάζοντας την αλλαγή στη χρωματινική δομή της περιοχής, ρυθμίζοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα του BCL11A (Horak *et al*, 2002). Επίσης, σχετίζεται με την αποσιώπηση του εμβρυονικού γονιδίου ϵ (Chen *et al*, 2008).
- Το γονίδιο MYB: κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που είναι κρίσιμος για τα βλαστικά και πρόγονα ερυθροποιητικά κύτταρα. Ρυθμίζει έμμεσα τη μεταγραφή των γονιδίων της γ -σφαιρίνης, μειώνοντας την παραγωγή των καταστολέων TR2/TR4 και BCL11A. Η αύξηση της δραστηριότητάς του οδηγεί στο σύνδρομο HPFH. Η αποδιοργάνωση της μεσογονιδιακής περιοχής των MYB και HBS1L οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων γ και ϵ (Suzuki *et al*, 2014).
- Ο παράγοντας BCL11A (B-cell lymphoma leukemia A): μεταγραφικός παράγοντας ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των B λεμφοκυττάρων. Καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων της γ -σφαιρίνης μέσω πρόσδεσης στη μεσογονιδιακή περιοχή μεταξύ τους, αλλά και στη θέση HS3 της LCR (Tallacka & Perkinsa, 2013). Επίσης, εμποδίζει την έκφραση των γ και ϵ γονιδίων, μέσω αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα SOX6 ή κατά τον σχηματισμό συμπλόκου με την GATA-1 και άλλες πρωτεΐνες (Suzuki *et al*, 2014) ή δρώντας συνεργατικά με την LSD1, μέσω ενός συμπλόκου που περιλαμβάνει τον CoREST (repressor element-1 silencing factor co-repressor1) (Ginder, 2015).
- Ο παράγοντας KLF1 (erythroid Kruppel like factor): μεταγραφικός παράγοντας που συμβάλει στην αντικατάσταση των εμβρυικών γονιδίων γ από το γονίδιο β της HbA εντός του ενεργού χρωματινικού κόμβου (ACH) που σχηματίζεται μεταξύ της LCR και των γονιδίων που εκφράζονται κάθε φορά, σύμφωνα με το μοντέλο σχηματισμού θηλειάς. Επίσης, ο KLF1 διαδραματίζει καίριο ρόλο στη διαδικασία της ερυθροποίησης, που επάγεται λόγω στρες σε περιπτώσεις οξείας

αναιμίας, οδηγεί στην αύξηση της παραγωγής ερυθροκυττάρων και σχετίζεται με την επαγωγή της HbF. Τέλος, ο εν λόγω παράγοντας ρυθμίζει το εύρος της ερυθροποίησης και επομένως, τα επίπεδα της HbF, ελέγχοντας τον κυτταρικό κύκλο (Tallacka & Perkinsa, 2013).

- Τα **microRNA**: μικρά μόρια RNA, μήκους περίπου 20 νουκλεοτιδίων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση. Στοχεύουν mRNA με σκοπό να τα οδηγήσουν στην καταστροφή ή να επάγουν την μεταφραστική καταστολή τους. Για παράδειγμα το microRNA 23a και 27 οδηγούν στην καταστολή των μεταγραφικών παραγόντων KLF3 και SP1 αντίστοιχα, οι οποίοι είναι καταστολείς της έκφρασης του γονιδίου της β-σφαιρίνης. Επιπλέον, τα 23a και 27 επάγουν την έκφραση των γ και ε γονιδίων (Ma *et al*, 2013). Το miR-96 καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων της γ-σφαιρίνης, ενώ τα miR-15a και miR-16-1 ενισχύουν την έκφρασή τους, μέσω του MYB σε άτομα με τρισωμία 21. Το miR-210 εμπλέκεται στην αύξηση της έκφρασης των γ γονιδίων (Ma *et al*, 2013). Τέλος, το miR-486-3p καταστέλλει την έκφραση του BCL11A, επάγοντας την έκφραση των εμβρυικών γονιδίων (Ginder, 2015). Περαιτέρω ανάλυση τους γίνεται σε επόμενες ενότητες.

Πέραν όλων των παραπάνω στοιχείων, στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης εμπλέκονται και επιγενετικές τροποποιήσεις (αλλαγές που πραγματοποιούνται στο DNA και τις ιστόνες μετά τη σύνθεσή τους και μπορούν να επηρεάσουν την γονιδιακή έκφραση). Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι επιγενετικές τροποποιήσεις αποτελούν σήμα αναγνώρισης για πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Βασική επιγενετική τροποποίηση αποτελεί η μεθυλίωση του γενετικού υλικού σε κατάλοιπα κυτοσίνης σε αλληλουχίες CpG. Η μεθυλίωση σε συγκεκριμένες θέσεις στις ρυθμιστικές περιοχές ενός γονιδίου οδηγεί στη μεταγραφική αποσιώπησή του. Η απομεθυλίωση τέτοιων θέσεων στα γ γονίδια οδηγεί στη μεταγραφική τους ενεργοποίηση. Εξίσου σημαντική είναι η μεθυλίωση των ιστονών, η οποία μπορεί να αποτελεί σήμα, τόσο γονιδιακής ενεργοποίησης, όσο και αποσιώπησης. Υπεύθυνες για τη μεθυλίωση των ιστονών είναι οι μεθυλοτρανσφεράσες, όπως οι PRMTs (protein arginine methyltransferases). Ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που εξαρτάται από την PRMT5 συμβάλλει στην αποσιώπηση των γ γονιδίων. Επιπλέον, η μεθυλίωση της αργινίνης 3 στην H4 δρα ως σήμα για την DNMT3A που μεθυλιώνει με τη σειρά της τους υποκινητές των γονιδίων γ. Μια άλλη πρωτεΐνη της οικογένειας PRMT, η PRMT1 σχετίζεται με την αποσιώπηση της έκφρασης των γ γονιδίων μέσω της πρωτεΐνης FoP (friend of PRMT1). Η PRMT1 διευκολύνει, επίσης, μια σειρά ακετυλίωσεων των ιστονών, οδηγώντας σε μεταγραφική ενεργοποίηση του β γονιδίου. Συνεπώς, η PRMT1 μπορεί να συμβάλει στην αποσιώπηση των γ γονιδίων, αυξάνοντας την ικανότητα του γονιδίου β να ανταγωνιστεί τα γονίδια αυτά ως προς την ενισχυτική επίδραση της LCR (Ginder, 2015). Έτερη επιγενετική τροποποίηση, η ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης ιστονών, έχει ως αποτέλεσμα χρωματίνη με πιο «ανοιχτή» δομή, γεγονός που διευκολύνει τη μεταγραφή. Η

ακετυλίωση των ιστονών στις περιοχές κοντά στα γονίδια γ οδηγεί σε μεταγραφή τους και αύξηση της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης HbF.

A.3.4 ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΠΑΘΕΙΕΣ

Ως αιμοσφαιρινοπάθειες χαρακτηρίζονται όλες οι γενετικές ασθένειες που σχετίζονται με την αιμοσφαιρίνη. Μπορεί να επηρεάζουν, τόσο την ποσότητα, όσο και την ποιότητα των μορίων αιμοσφαιρίνης που παράγονται. Διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: α) τις θαλασσαιμίες, όταν οι γενετικές αλλαγές οδηγούν σε προβλήματα κατά τη σύνθεση των αιμοσφαιρινών, με αποτέλεσμα να παράγεται αιμοσφαιρίνη σε μικρότερη ποσότητα και β) τις ασθένειες που σχετίζονται με δομικές αλλαγές του μορίου της αιμοσφαιρίνης, με αποτέλεσμα την παραγωγή της αιμοσφαιρίνης με αλλοιωμένη μορφή. Οι θαλασσαιμίες είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων στους γονιδιακούς τόπους των γονιδίων της α - και β -σφαιρίνης. Ως εκ τούτου, διακρίνονται σε α - και β -, ανάλογα με το αν επηρεάζουν τη σύνθεση των α - ή β - αλυσίδων της σφαιρίνης και κληρονομούνται, κυρίως, με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Οι αιμοσφαιρινοπάθειες που σχετίζονται με την παραγωγή αιμοσφαιρινών με αλλοιωμένη δομή, οφείλονται σε αλλαγές στην αμινοξική ακολουθία της α - ή της β -σφαιρίνης. Οι αιμοσφαιρινοπάθειες αυτού του τύπου διακρίνονται στις εξής υποκατηγορίες: α) αυτές που οδηγούν σε σχηματισμό δρεπανοκυττάρων, όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία, SCD (sickle cell disease), β) αυτές που οδηγούν στη σύνθεση μη φυσιολογικών αιμοσφαιρινών, όπως της HbE, γ) αυτές που οδηγούν σε σύνθεση αιμοσφαιρινών με τάση κατακρήμνισης και οδηγούν σε αιμόλυση, όπως η Hb Köln και τέλος, δ) αυτές που έχουν ως αποτέλεσμα τη σύνθεση αιμοσφαιρινών που αδυνατούν να διεκπεραιώσουν σωστά τη διαδικασία μεταφοράς του οξυγόνου και οδηγούν σε εκ γενετής πολυκυτταραιμία ή κυάνωση. Η τρίτη και η τέταρτη κατηγορία οδηγούν σε σοβαρά κλινικά συμπτώματα σε ετεροζυγώτες, ενώ είναι θανατηφόρες για τα ομόζυγα άτομα (Kohne, 2011).

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ miRNA

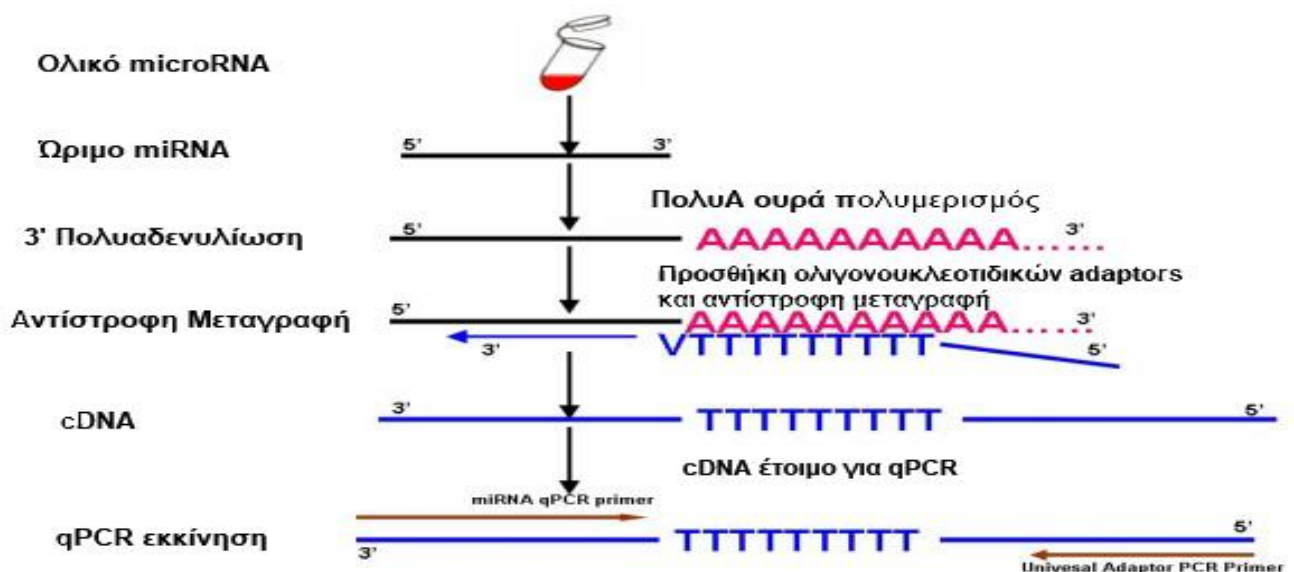
Παρόλο που η βιοπληροφορική παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση των υπό μελέτη miRNA, πρέπει επίσης να επαληθευτούν πειραματικά τα δεδομένα στο εργαστήριο. Μια σειρά τεχνικών έχει αναπτυχθεί για να ξεπεράσει τις προκλήσεις της δημιουργίας προφίλ των miRNA. Εδώ εξετάζουμε τις πιο δημοφιλείς μεθόδους που χρησιμοποιούνται σήμερα.

B.1.1. miRNA qPCR ARRAYS

Μία από τις πιο δημοφιλείς τεχνικές για την επικύρωση και ακριβή ποσοτικοποίηση των miRNA είναι η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Εκτός από το ότι είναι μία ευαίσθητη τεχνική, η qPCR (εικόνα 14) είναι επίσης σχετικά φθηνή και ευέλικτη, καθιστώντας την προτιμώμενη επιλογή για την επικύρωση νέων miRNA και για χρήση σε σχετικά μικρά πειράματα.

Αυτή η τεχνική αρχίζει με τη μετατροπή του miRNA σε cDNA, με το μήκος ενός miRNA να είναι συγκρίσιμο με αυτό ενός τυπικού εκκινητή DNA. Η σύνθεση του cDNA από miRNA παρουσιάζει τις δικές της προκλήσεις. Μια τέτοια πρόκληση είναι να επιμηκύνουμε το μόριο, είτε ενσωματώνοντας μια δομή πολυ (A) ουράς ή μία δομή βρόγχου.

Μόλις το miRNA μετατραπεί σε cDNA, μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας την ίδια προσέγγιση με ένα συμβατικό πείραμα qPCR. Η ενίσχυση αρχίζει με ένα εκκινητή ειδικό για το miRNA και έναν εκκινητή στέλεχος βρόγχου /πολυ (A). Για την ανίχνευση του ενισχυμένου προϊόντος χρησιμοποιείται είτε χρωστική SYBR® Green είτε ένας ιχνηθέτης TaqMan®.

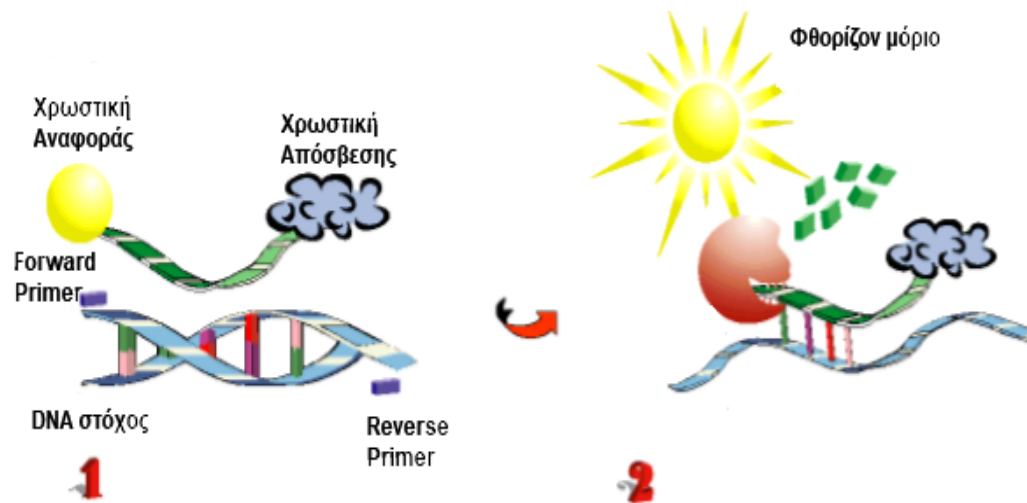


Εικόνα 14. Πειραματική μεθοδολογία της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Τροποποιημένο από <https://www.genecoroeia.com/product/mirna-qpcr-arrays/>)

Όσον αφορά τους ιχνηθέτες, μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές είναι η τεχνική TaqMan. Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται την 5'-3' εξωνουκλεολυτική ενεργότητα της πολυμεράσης Taq και την εκπομπή σήματος φθορισμού από διπλά σημασμένους ολιγονουκλεοτιδικούς ιχνηθέτες όταν αυτοί κοπούν. Οι ιχνηθέτες TaqMan είναι διπλά σημασμένοι και περιλαμβάνουν μία φθορίζουσα χρωστική αναφοράς-μόριο ανταποκριτή (reporter fluorescence dye) συνδεδεμένη στο 5' άκρο του ιχνηθέτη και μία χρωστική αποσβέστη (quencher dye) στο 3' άκρο του. Όσο ο ιχνηθέτης είναι ακέραιος, λόγω της κοντινής τους απόστασης, η χρωστική αποσβέστης μειώνει τον φθορισμό που παράγεται από τη φθορίζουσα χρωστική. Αν η αλληλουχία στόχος είναι παρούσα στο δείγμα, τότε ο ιχνηθέτης προσδένεται στη μήτρα DNA σε κάποια θέση ανάμεσα στις θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών και τέμνεται από την 5' νουκλεολυτική ενεργότητα της DNA πολυμεράσης κατά την επιμήκυνση. Η τομή αυτή του ιχνηθέτη, επιτρέπει τον διαχωρισμό των δύο χρωστικών και κατά συνέπεια την αύξηση του σήματος φθορισμού από το μόριο ανταποκριτή και τη συνέχεια της επιμήκυνσης από την DNA πολυμεράση. Επιπλέον μόρια ιχνηθέτες προσδένονται και τέμνονται σε κάθε κύκλο με αποτέλεσμα την αντίστοιχη αύξηση της έντασης του φθορισμού ανάλογα με την ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος που προκύπτει. Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου στο δείγμα, τόσο πιο σύντομα θα παρατηρηθεί σημαντική αύξηση στον φθορισμό. Η τεχνική TaqMan εμφανίζει πολύ υψηλή ειδικότητα λόγω της συμπληρωματικότητας των εκκινητών και του ιχνηθέτη με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία-στόχο και τη δημιουργία του σήματος φθορισμού μόνο με την πρόσδεση του ιχνηθέτη στην αλληλουχία-στόχο που ενισχύεται (Σκορίλας, 2009; Life Technologies, 2018).

Η λειτουργία των ιχνηθετών TaqMan (εικόνα 15) βασίζεται στην αρχή μεταφοράς ενέργειας συντονισμού με φθορισμό (fluorescence resonance energy transfer, FRET), ένας μηχανισμός που περιγράφει τη μεταφορά ενέργειας ανάμεσα σε δύο φωτοευαίσθητα μόρια (χρωμοφόρα). Η FRET είναι μία φυσική διαδικασία, εξαρτώμενη από την απόσταση, κατά την οποία ενέργεια μεταφέρεται από ένα διεγερμένο φθορίζον μόριο (δότης) σε ένα άλλο μόριο (δέκτης) μέσω διαμοριακών αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου όταν τα δύο μόρια βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη της ακτίνας Förster, δηλαδή απόσταση στην οποία η μισή από την ενέργεια διέγερσης του δότη μεταφέρεται στον δέκτη.

Μία άλλη εναλλακτική ανίχνευσης, εκτός των σημασμένων ιχνηθετών, είναι η χρήση χρωστικών όπως οι ασύμμετρες κυανίνες, στις οποίες ανήκει και η SYBR Green (εικόνα 16), που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Οι ασύμμετρες κυανίνες έχουν δύο αρωματικά συστήματα που περιέχουν άζωτο, ένα από τα οποία είναι θετικά φορτισμένο, συνδεδεμένο με μία γέφυρα μεθινίου. Όταν είναι ελεύθερες στο διάλυμα, αυτές οι χρωστικές δεν παράγουν φθορισμό λόγω των δονήσεων των αρωματικών συστημάτων που μετατρέπουν την ηλεκτρονιακή διέγερση σε θερμότητα, που διαχέεται στο διάλυμα. Όταν συνδέονται με DNA, και συγκεκριμένα, στη μικρή αύλακα, δεν είναι εφικτή η περιστροφή γύρω από τον δεσμό μεθινίου (Nygren, Svanvik & Kubista, 1998;

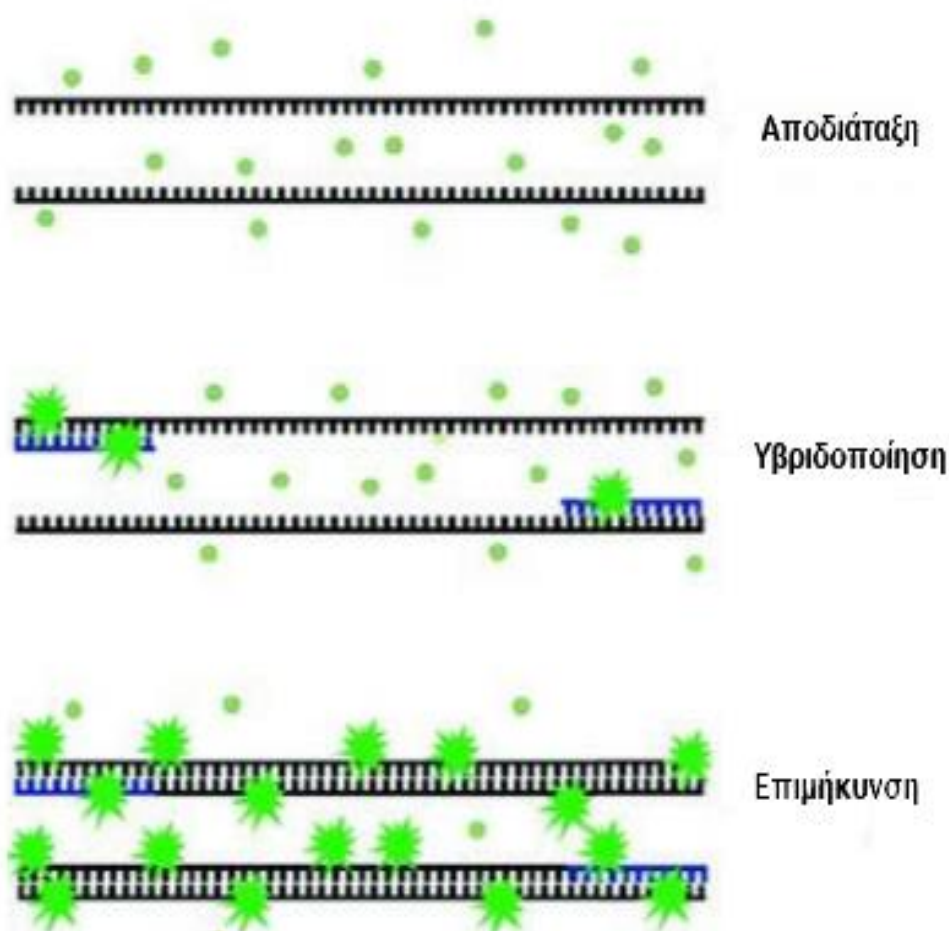


Εικόνα 15. Αρχή λειτουργίας του ιχνηθέτη TaqMan. Όσο η χρωστική αποσβέστης είναι συνδεδεμένη με την χρωστική αναφοράς δεν φθορίζει (1). Με την πρόοδο της αντίδρασης, η Taq πολυμεράση διασπά τον ιχνηθέτη και φθορίζει η χρωστική αναφοράς (2) (Τροποποιημένο από Hydrolysis Probes Biogene).

Kubista *et al.*, 2006). Στην αντίδραση της PCR, ο φθορισμός των χρωστικών αυξάνεται όσο σχηματίζεται δίκλωνο DNA αλλά το σήμα φθορισμού εξαρτάται και από άλλους παράγοντες εκτός της ποσότητας, όπως ο λόγος χρωστικής: συνδεδεμένων βάσεων και η αλληλουχία του DNA (Kubista *et al.*, 2006). Η χρήση τέτοιων χρωστικών που προσδένονται σε διπλή έλικα DNA (dsDNA binding dyes) αποδείχτηκε πολύ χρήσιμη στην ανίχνευση σχηματισμού προϊόντων PCR καθώς παρουσιάζουν πλήθος πλεονεκτημάτων. Με την τεχνική αυτή αποφεύγεται η χρήση εξειδικευμένου ιχνηθέτη, γεγονός που ελαττώνει το κόστος της μεθόδου, είναι εύκολες στη χρήση και χρησιμοποιείται η ίδια μέθοδος για κάθε αντίδραση ενώ απαιτείται μόνο ένα ζεύγος εκκινητών. Ωστόσο, οι χρωστικές αυτές δεν παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών στην PCR και φθορίζουν παρουσία οποιουδήποτε δίκλωνου τμήματος DNA, ακόμα και μη ειδικών προϊόντων όπως τα διμερή εκκινητών. Το μειονέκτημα αυτό, ξεπερνιέται με τον σωστό σχεδιασμό εκκινητών και τον ποιοτικό έλεγχο των προϊόντων, μέσω των καμπυλών τήξης, στις οποίες καθορίζεται η ειδικότητα της αντίδρασης (Life Technologies, 2014; Gupta, 2014).

Η ανάλυση των καμπυλών τήξης (melting curve analysis) γίνεται μετά το τέλος της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου για να διαπιστωθεί η ενίσχυση και μη-ειδικών στόχων. Η κατασκευή τους, ξεκινάει με τη θέρμανση των προϊόντων της PCR, μετά το τέλος της αντίδρασης. Τα επίπεδα φθορισμού της χρωστικής SYBR Green αυξάνονται σημαντικά όσο βρίσκεται συνδεδεμένη με το δίκλωνο DNA (dsDNA). Όσο τα προϊόντα της PCR αποδιατάσσονται, δηλαδή αποχωρίζονται οι δύο αλυσίδες και χάνεται η δίκλωνη δομή με την άνοδο της θερμοκρασίας, η ένταση του φθορισμού της χρωστικής μειώνεται, καθώς αυτή απελευθερώνεται στο διάλυμα, και προκύπτει έτσι μία καμπύλη τήξης των μορίων.

Η ανάλυση της καμπύλης τήξης, μπορεί να ανιχνεύσει την ύπαρξη διμερών εκκινητών, καθώς παρουσιάζουν μικρότερη θερμοκρασία τήξης από το προϊόν ενίσχυσης της αλληλουχίας-στόχου. Η ύπαρξη των διμερών εκκινητών μειώνει την απόδοση της αντίδρασης και εμποδίζει την ανάλυση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης. Στα δείγματα, μπορεί να υπάρχουν και μη ειδικά προϊόντα, τα οποία ανιχνεύονται, όπως και τα διμερή των εκκινητών, με την ανίχνευση στην καμπύλη τήξης, πολλαπλών κορυφών.



Εικόνα 16. Αρχή μεθόδου της χρωστικής SYBR Green. Το σήμα φθορισμού που παράγεται από τη χρωστική, αυξάνεται όταν συνδέεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA. Έτσι, μετριέται η ποσότητα του DNA στο τέλος της επιμήκυνσης της αντίδρασης PCR (Τροποποιημένο από Fraga, D., Meulia, Tea, Fenster, Steven, *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 2014).

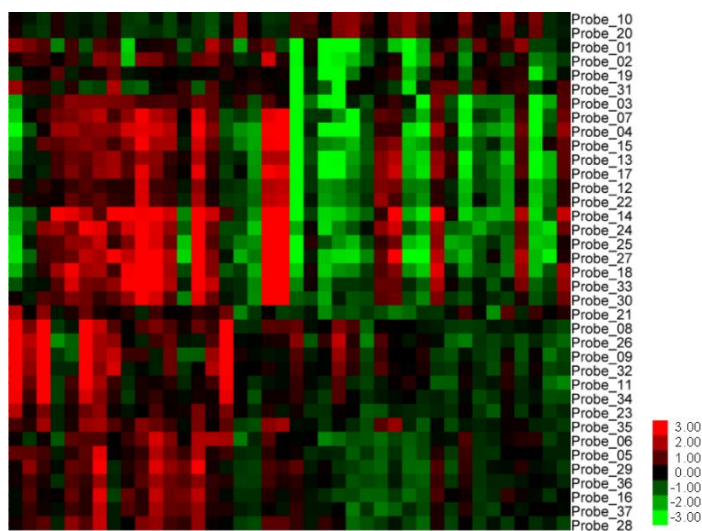
Ωστόσο, το qPCR έχει τους περιορισμούς του: τα μεγάλα πειράματα χρειάζονται εντατική και δύσκολη μελέτη για να πραγματοποιηθούν. Επιπλέον, σε αντίθεση με την συμβατική qPCR, μόνο ένας πλευρικός (αριστερά ή δεξιά) εκκινητής μπορεί να είναι ειδικός για το miRNA, οπότε πρέπει να ληφθεί μέριμνα ώστε να διασφαλιστεί ότι μόνο ένα προϊόν ενισχύεται, ειδικά όταν χρησιμοποιείται το SYBR® Green.

Το μικρό μήκος του εκμαγείου μπορεί να αποδειχθεί ένα ιδιαίτερα προβληματικό ζήτημα όταν προσπαθούμε να διακρίνουμε miRNA που μπορεί να διαφέρουν μόνο σε ελάχιστο αριθμό βάσεων. Οι θερμοκρασίες τήξης μπορεί να είναι πολύ χαμηλές και πολύ παρόμοιες. Η χρήση νέων ανιχνευτών όπως κλειδωμένα νουκλεϊκά οξέα έχει αναπτυχθεί ώστε να αμβλύνει τα θέματα ειδικότητας, αλλά η δειγματοληψία παραμένει ένας περιορισμός για μεγάλες μελέτες (Vester *et al.*, 2004).

B.1.2 miRNA ARRAYS

Οι συστοιχίες επιλέγονται συνήθως για μεγαλύτερες μελέτες που καλύπτουν πολλαπλούς στόχους miRNA. Αν και είναι οι λιγότερο ποσοτικές από τις τρεις μεθόδους ανίχνευσης miRNA, οι συνηθισμένες συστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων DNA είναι ένας σχετικά φτηνός τρόπος μέτρησης εκατοντάδων στόχων ταυτόχρονα.

Χιλιάδες ανιχνευτές μπορούν εύκολα να εντοπιστούν σε διαφανή πλακάκια (εικόνα 17) ή να κατασκευαστούν με φωτολιθογραφία, επιτρέποντας έτσι την παράλληλη παρακολούθηση όλων των γνωστών miRNA. Οι συστοιχίες ανιχνεύονται με υβριδισμό δειγμάτων DNA ή RNA που έχουν επισημανθεί με φθορισμό. Η φωτεινότητα των μεμονωμένων σημείων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συναχθούν σχετικές αλλαγές στην έκφραση μεταξύ των δειγμάτων.



Εικόνα 17. Δείγμα μικροσυστοιχιών διαφορικής έκφρασης miRNA (Τροποποιημένο από https://www.oceanridgebio.com/microrna_microarray)

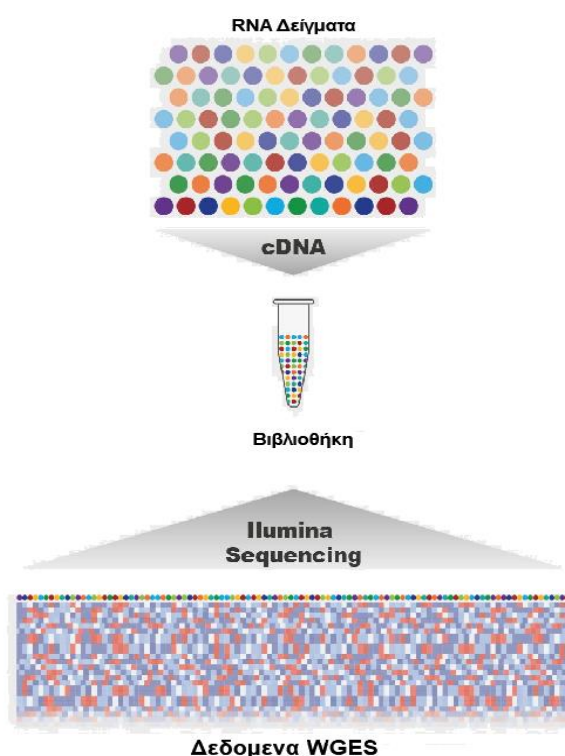
Όπως και με το qPCR, η διάκριση παρόμοιων αλληλουχιών μπορεί να είναι προβληματική, αλλά η προσεκτική επιλογή των ανιχνευτών ελέγχου, η αυστηρή πλύση και η ανάλυση μπορούν να μετριάσουν το πρόβλημα. Το γεγονός ότι είναι πλέον διαδεδομένη η χρήση της πλατφόρμας συστοιχιών είναι ένα

σημαντικό πλεονέκτημα εδώ, καθώς υπάρχουν καλά αναπτυγμένα πρωτόκολλα και διαθέσιμα εργαλεία ανάλυσης για το σκοπό.

B.1.3 RNA-seq

Αυτή η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού miRNA χρησιμοποιεί την ικανότητα υψηλής απόδοσης των πλατφορμών επόμενης γενιάς (NGS). Αν και δεν μπορεί να ποσοτικοποιήσει τα επίπεδα miRNA (εικόνα 18) με τη γραμμομοριακή ανάλυση του qPCR, η βαθιά αλληλούχηση του miRNA έχει το πλεονέκτημα ότι είναι σε θέση να δείξει όλα τα miRNA που υπάρχουν σε ένα δείγμα, είτε ο ερευνητής γνωρίζει την ακολουθία είτε όχι, καθιστώντας το ιδανικό εργαλείο ανεύρεσης. Επιπλέον, καθώς οι αλληλουχίες διαβάζονται απευθείας, το RNA-seq μπορεί να διακρίνει στενά σχετιζόμενα miRNA και ισομορφές.

Αυτή η μέθοδος έχει πολλά πλεονεκτήματα: μπορεί να διακρίνει τα miRNA στο επίπεδο μίας βάσης, δεν απαιτεί εκ των προτέρων γνώση της ύπαρξης ενός miRNA, μπορεί να προσδιορίσει τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του miRNA και, ακόμα καλύτερα, οι βιβλιοθήκες με ετικέτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πολλαπλές αναλύσεις.



Εικόνα 18. Βασική αρχή μεθόδου της αλληλούχησης RNA (Τροποποιημένο από <https://www.abcam.com/kits/review-of-mirna-assay-methods-qpcr-arrays-and-sequencing#miRNA%20profiling>)

Ωστόσο, από όλες τις μεθόδους που συζητήθηκαν, το NGS απαιτεί το μεγαλύτερο εισερχόμενο υλικό και ακόμη και τότε το miRNA-seq δεν μπορεί να συναγωνιστεί την ευαισθησία ανίχνευσης της qPCR.

Η κατασκευή της βιβλιοθήκης, ιδιαίτερα η κλωνική ενίσχυση, είναι δυνητικά σημαντική πηγή λαθών και απαιτεί καλό τεχνικό επίπεδο δεξιοτήτων (Baker *et*

al., 2010). Η ανάλυση δεδομένων μπορεί επίσης να εμφανίζει προκλήσεις, ειδικά για εργαστήρια που μπορεί να μην έχουν υπηρεσίες βιοπληροφορικής.

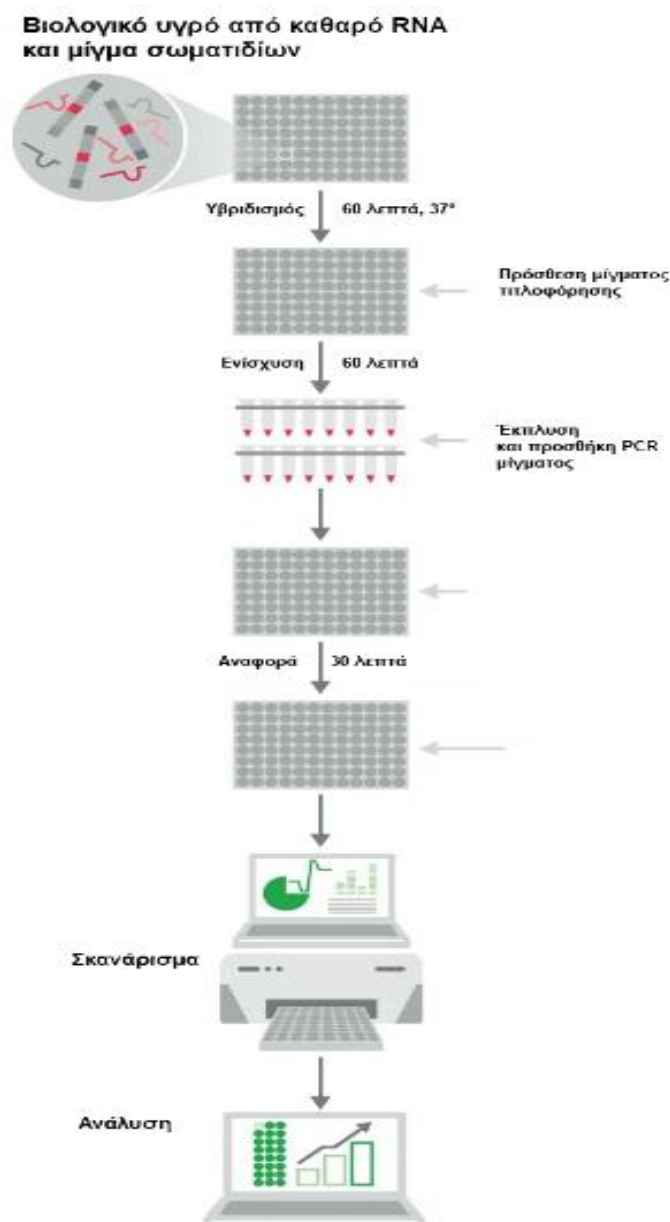
B.1.4 MULTIPLEX miRNA PROFILING

Οι μελέτες πολλαπλών αναλύσεων miRNA με τη χρήση τεχνολογίας σωματιδίων Firefly είναι μια πιο πρόσφατη προσθήκη στο εύρος των διαθέσιμων εργαλείων για την ανίχνευση των miRNA. Ένα βασικό πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η ικανότητά της να επιτρέπει την επικύρωση πολλαπλών miRNA σε μια σειρά δειγμάτων, χωρίς τη ροή εργασίας υψηλής έντασης εργασίας ή με μεγάλη απαίτηση δειγμάτων άλλων τεχνικών.

Αυτή η τεχνική (εικόνα 19) εξαρτάται από τα σωματίδια υγρού τζελ που περιέχουν προσαρμοσμένους επιλεγμένους ανιχνευτές για τους miRNA στόχους. Τα miRNA συνδέονται με αυτούς τους ανιχνευτές και στη συνέχεια συνδέονται με τις αλληλουχίες προσαρμογέα για ανίχνευση ή ενίσχυση προ-ανίχνευσης.

Τα σωματίδια βελτιστοποιούνται για χρήση με κοινούς κυτταρομετρητές ροής, επιτρέποντας την ανίχνευση χωρίς εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό. Επιπλέον, η ανάλυση δεδομένων είναι σχετικά απλή και δεν απαιτεί προηγμένες δεξιότητες βιοπληροφορικής.

Αυτή η τεχνολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα με ακατέργαστα βιολογικά ρευστά και η παρασκευή μιας βιβλιοθήκης RNA δεν είναι απαραίτητη. Η υψηλή ευαισθησία της ανάλυσης σημαίνει ότι ο προσδιορισμός του miRNA μπορεί να επιτευχθεί από την εισαγωγή τουλάχιστον 10 μl πλάσματος ή ορού ή 100 pg καθαρισμένου RNA.



Εικόνα 19. Πορεία μεθόδου πολλαπλών αναλύσεων (Τροποποιημένο από <https://www.abcam.com/kits/review-of-mirna-assay-methods-qpcr-arrays-and-sequencing#miRNA%20profiling>)

Πίνακας 1 Σύγκριση Μεθόδων μελέτης miRNA

Τεχνική	Πότε χρησιμοποιείται	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
qPCR	Μικρού μεγέθους μελέτες 1-2 δειγμάτων	Εφαρμοσμένα πρωτόκολλα Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα	Απαιτεί εντατική εργαστηριακή εργασία Χρειάζεται miRNA Annotation
miRNA arrays	Μεγαλύτερες μελέτες πολλών εκατοντάδων δειγμάτων	Εφαρμοσμένα Πρωτόκολλα Υψηλή ειδικότητα	Η λιγότερο ποσοτική μέθοδος Χρειάζεται miRNA Annotation
RNA-seq	Υπό διερεύνηση	Ανάλυση ολόκληρου γονιδιώματος Διακριτική Ικανότητα μέχρι και μία βάση	Μικρότερη ευαισθησία από την qPCR Απαιτεί υψηλή συγκέντρωση αρχικού δείγματος Απαιτεί ικανότητες Βιοπληροφορικής
Multiplex miRNA profiling	Μελέτες πολλαπλών χρήσεων πολλών εκατοντάδων δειγμάτων	Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα Απλή ανάλυση δεδομένων Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ακατέργαστα βιολογικά υγρά	Όχι ιδανικό για μικρής κλίμακας πειράματα ενός ή δύο δειγμάτων Χρειάζεται miRNA Annotation

Οι μελέτες που επικεντρώνονται σε ένα ή δύο δείγματα miRNA με σχετικά λίγες ομάδες δοκιμών είναι πιθανό να επιλέξουν την qPCR ως την πρωταρχική μέθοδο, ενώ τα πειράματα που προσπαθούν να ανακαλύψουν νέες παραλλαγές miRNA θα εξετάσουν μια λύση μέσω NGS. Για μεγαλύτερες μελέτες που εξετάζουν ταυτόχρονα πολλαπλά miRNA, είναι προτιμότερες οι μικροσυστοιχίες ή οι πολλαπλές (multiplex) δοκιμασίες miRNA χρησιμοποιώντας την τεχνολογία σωματιδίων Firefly.

B.2 *IN SILICO* ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ miRNA

B.2.1 ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ miRNA

Η ανάλυση των λειτουργιών, των αλληλεπιδράσεων και των κυτταρικών επιδράσεων των miRNA είναι ένα πολύ περίπλοκο και δύσκολο έργο. Έχουν αναπτυχθεί πολλές βάσεις δεδομένων miRNA με ποικίλα περιεχόμενα δεδομένων με αρκετά διαδεδομένες τις miRWalk και miRBase.

B.2.1.1 miRBase



Η βάση δεδομένων από αλληλούχιση miRBase είναι μια βάση για τις δημοσιευμένες ακολουθίες miRNA και τον σχολιασμό τους (annotation). Ως εργαλείο που βασίζεται στο web, μπορείτε να αναζητήσετε γνωστές πληροφορίες miRNA σχετικά με το miRBase χρησιμοποιώντας ακολουθίες και λέξεις-κλειδιά χωρίς να χρειάζεται να κατεβάσετε δεδομένα (Moore *et al.*, 2015).

B.2.1.2 miRWalk 2.0



Η miRWalk παρέχει ένα μεγάλο και ελεύθερα προσβάσιμο αρχείο των προβλεπόμενων και επικυρωμένων αλληλεπιδράσεων μεταξύ miRNA-στόχου. Οι θέσεις δέσμευσης των miRNA εντός της πλήρους αλληλουχίας ενός γονιδίου τεκμηριώνονται, μαζί με πειραματικά επαληθευμένα δεδομένα αλληλεπίδρασης miRNA-στόχου που συγκεντρώνονται από τέσσερις άλλους υπάρχοντες πόρους (Moore *et al.*, 2015).

B.2.1.3 FirePlex Discovery Engine

Μια μεγάλη βάση δεδομένων με δημοσιευμένες miRNA μελέτες. Με απλή πληκτρολόγηση λέξεων-κλειδιά και επιλογή ενός οργανισμού από το αναπτυσσόμενο μενού, το FirePlex Discovery Engine θα φιλτράρει χιλιάδες έγγραφα, ώστε να βρεθούν τα πιο σημαντικά miRNA για την εκάστοτε έρευνά.

B.2.1.4 DIANA-TarBase v7.0

Το TarBase κυκλοφόρησε για πρώτη φορά πριν από εννέα χρόνια και ήταν η πρώτη βάση δεδομένων που φιλοδοξεί να καταρτίσει δημοσιευμένες πειραματικά επικυρωμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ miRNA και γονιδίων. Σήμερα, περιέχει εκατοντάδες χιλιάδες, υψηλής ποιότητας, επιλεγμένες, πειραματικά επαληθευμένες αλληλεπιδράσεις miRNA: γονιδίου, ενισχυμένες με λεπτομερή μεταδεδομένα.

B.2.1.5 miRCancer: microRNA CANCER ASSOCIATION DATABASE

Μια συλλογή από ποικίλα προφίλ έκφρασης miRNA σε ανθρώπινους καρκίνους. Εξάγονται αυτόματα από τη βιβλιογραφία που δημοσιεύεται στο PubMed πριν από τη επιμέλεια και μετά την εξαγωγή, για να διασφαλιστεί ότι τα δεδομένα είναι ακριβή. Η αναζήτηση με ονομασίες καρκινικών νόσων ή με χρήση των εργαλείων ανάλυσης αλληλουχίας.

B.2.1.6 miRGator 3.0

Το εργαλείο miRGator περιέχει πληροφορίες σχετικά με την ποικιλία των miRNA, τις σχέσεις τους με τους στόχους και τα προφίλ έκφρασής τους. Υπάρχουν 73 σειρές δεδομένων βαθιάς αλληλούχισης σε ανθρώπινα δείγματα από αρχεία GEO, SRA και TCGA, τα οποία ανέρχονται σε 4,1 δισεκατομμύρια σύντομες αναγνώσεις (reads) και 2,5 δισεκατομμύρια ευθυγραμμισμένες αναγνώσεις (aligned reads).

B.2.1.7 doRiNA 2.0

Οι αλληλεπιδράσεις των RNA στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση αποτελούν το επίκεντρο αυτής της βάσης δεδομένων, η οποία επιτρέπει επίσης τη μεταφόρτωση αρχείων BED που περιέχουν θέσεις ρυθμιστικών στοιχείων προς αναζήτηση μαζί με τις επιλεγμένες καταχωρήσεις άλλων βάσεων δεδομένων

B.2.1.8 STarMirDB

Μια συλλογή θέσεων δέσμευσης miRNA. Αυτή η βάση δεδομένων παρέχει τη δυνατότητα να μελετήσουμε την επιλογή των στόχων των miRNA για ανθρώπους, ποντίκια και σκώληκες και τα αποτελέσματα μπορούν επίσης να φιλτραριστούν με βάση νόμους στατιστικών πιθανοτήτων.

B.2.1.9 miRSEL

Αυτή η βάση δεδομένων συνδέει τα miRNA με διάφορους στόχους, χρησιμοποιώντας βιβλιογραφικές αναφορές. Η διαδικτυακή διεπαφή επιτρέπει στο χρήστη να αναζητά τα miRNA προς αναγνώριση, τα ονόματα γονιδίων και πρωτεϊνών καθώς και να διασταυρώνει αποτελέσματα με το PubMed.

B.2.1.10 PolymiRTS DATABASE

Μία βάση δεδομένων με φυσικές παραλλαγές DNA σε 5' περιοχές miRNA, οι οποίες συντελούν στην σύγκριση συμπληρωματικότητας με κάποιον στόχο, καθώς και τις θέσεις στόχων τους.

B.2.1.11 SonamiR DATABASE

Αυτή η βάση δεδομένων επικεντρώνεται σε αυτοσωμικές μεταλλάξεις καρκίνου στα miRNA και στις θέσεις στόχους τους, καθώς επίσης παρέχει και μια πλατφόρμα για τη λειτουργική ανάλυση αυτών των μεταλλάξεων.

B.2.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ

Επί του παρόντος, οι ερευνητές χρειάζονται μια μέθοδο για τον ακριβή προσδιορισμό των στόχων miRNA, πριν την εφαρμογή των πειραματικών προσεγγίσεων που επιτρέπουν έναν καλύτερο λειτουργικό χαρακτηρισμό των miRNA σε βιολογικές διαδικασίες και μπορούν έτσι να προβλέψουν τα αποτελέσματά τους. Τα υπολογιστικά εργαλεία πρόβλεψης παρέχουν μια γρήγορη μέθοδο για τον εντοπισμό υποτιθέμενων στόχων miRNA.

Τα μοντέλα πρόβλεψης χρησιμοποιούν δεδομένα που στηρίζονται στα ακόλουθα στοιχεία: την αλληλουχία των miRNA, την 3' και την 5' περιοχή τους, τα αμετάφραστα άκρα των mRNA στόχων, την ελεύθερη θερμοδυναμική ενέργεια που απαιτείται για την αλληλεπίδραση miRNA:mRNA, καθώς και το αν είναι εξελικτικά συντηρημένα μια αλληλουχία και σε ποιο βαθμό.

B.2.2.1 miRSystem

Αυτή η βάση δεδομένων συνδυάζει επτά άλλα γνωστά προγράμματα πρόβλεψης του miRNA σε ένα: τα miRanda, PicTar, DIANA, miRBridge, rna22, PITA και TargetScan. Χρησιμοποιούμε αυτήν την βάση για να αναζητήσουμε πολλά miRNA σε ένα βήμα και για να βρούμε συνδέσεις μεταξύ των γονιδίων στόχων και των miRNA.

B.2.2.2 mirPath

Ένας διακομιστής εξόρυξης δεδομένων (data mining) που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση μονοπατιών που ελέγχονται από ένα υποσύνολο miRNA. Η ρύθμιση του miRNA και τα βιοχημικά δεδομένα αναλύονται μαζί για τέσσερα είδη: άνθρωπος, ποντίκι, *D. melanogaster* και *C. elegans*.

B.2.2.3 StarMir

Λογισμικό που αφορά την στατιστική αναδίπλωση νουκλεϊκών οξέων και μελέτες ρυθμιστικών RNA με βάση τα δεδομένα CLIP (αλληλουχία, θερμοδυναμική και χαρακτηριστικά δομής στόχου). Από τον Μάρτιο του 2007, έχουν βρεθεί περισσότερες από 20.000 ακολουθίες χρησιμοποιώντας αυτό το εργαλείο πρόβλεψης στόχων.

B.2.2.4 miRDB

Ένα διαδικτυακό εργαλείο πρόβλεψης στόχων. Τα δεδομένα δημιουργούν ένα εργαλείο βιοπληροφορικής που αναπτύχθηκε με σκοπό την ανάλυση χιλιάδων αλληλεπιδράσεων miRNA-στόχου. Οι μέθοδοι εκμάθησης μηχανών (machine learning) χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό κοινών χαρακτηριστικών που σχετίζονται με τον στόχο του miRNA και για την πρόβλεψη στόχων σε πέντε είδη οργανισμών.

B.2.2.5 TargetScan

Το TargetScan είναι ένα εργαλείο πρόβλεψης στόχων που προβλέπει τους βιολογικούς στόχους των miRNA, αναζητώντας την παρουσία διατηρημένων θέσεων, που ταιριάζουν με την περιοχή σύγκρισης συμπληρωματικότητας βάσεων του κάθε miRNA. Το λογισμικό πρόβλεψης στόχου ενημερώνεται συχνά και η τελευταία έκδοση αυτού του πόρου κυκλοφόρησε τον Αύγουστο του 2015.

B.2.2.6 miRSearch

Ένα εργαλείο που επιτρέπει τον γρήγορο εντοπισμό miRNA που στοχεύουν σε συγκεκριμένα μετάγραφα γονιδίων. Τα επικυρωμένα και τα προβλεπόμενα miRNA μπορούν να ταυτοποιηθούν χρησιμοποιώντας ένα προηγμένο σύστημα αναφοράς. Οι νέες δυνατότητες στην τελευταία έκδοση εμπεριέχουν: πληροφορίες σχετικά με ασθένειες και ιστούς και λεπτομερείς πληροφορίες για κάθε miRNA.

B.2.2.7 RegRNA

Web server που επιτρέπει στο χρήστη να αναγνωρίζει τις ομόλογες μορφές των ρυθμιστικών RNA σε μια επιλεγμένη ακολουθία. Καθορίζει την πρόβλεψη στόχου, χρησιμοποιώντας το όνομα του γονιδίου, την ταυτότητα του γονιδίου ή την ακολουθία miRNA.

B.2.2.8 DeepBase 2.0

Εμπεριέχει το σχολιασμό και την αναζήτηση των μικρών (miRNA, siRNA, piRNA), ncRNA και κυκλικών RNA χρησιμοποιώντας δεδομένα βαθιάς αλληλουχίας επόμενης γενιάς (deep learning sequencing data). Η DeepBase παρέχει εργαλεία για την αποκωδικοποίηση μοτίβων σε 19 είδη

B.2.2.9 mirTools 2.0

Αυτός ο ιστότοπος παρέχει εργαλεία για την ταξινόμηση μιας μικρής κλίμακας σύντομων αναγνώσεων (reads) σε γνωστές κατηγορίες, για την ανακάλυψη νέων miRNA από την τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχίας υψηλής απόδοσης, για την αποσαφήνιση πληροφοριών γνωστών miRNA και για τον εντοπισμό διαφορικά εκφραζόμενων miRNA σύμφωνα με τον αριθμό των reads (Τροποποιημένο από <https://www.abcam.com/kits/microrna-database-and-target-predictor-resources>).

B.2.3 ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ miRNA ΣΕ ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Σύμφωνα με ένα σύστημα τυποποιημένης ονοματολογίας, τα ονόματα αποδίδονται σε πειραματικά επιβεβαιωμένα miRNAs πριν από τη δημοσίευση. Το πρόθεμα "miR" ακολουθείται από μια παύλα και έναν αριθμό, ο οποίος δείχνει συχνά τη σειρά ονοματοδοσίας. Για παράδειγμα, το miR-124 ονομάστηκε και πιθανόν ανακαλύφθηκε πριν από το miR-456. Ένα κεφαλαιοποιημένο "miR-" αναφέρεται στην ώριμη μορφή του miRNA, ενώ το "mir-" με πεζούς χαρακτήρες αναφέρεται στο pre-miRNA και στο pri-miRNA. Τα γονίδια κωδικοποίησης miRNA ονομάζονται επίσης χρησιμοποιώντας το ίδιο πρόθεμα τριών γραμμάτων σύμφωνα με τις συμβάσεις της ονοματολογίας του γονιδίου του οργανισμού. Για παράδειγμα, τα επίσημα ονόματα γονιδίων miRNA σε ορισμένους οργανισμούς είναι "mir-1 σε *C. elegans* και *Drosophila*, Mir-1 σε *Rattus norvegicus* και MIR-25 στον άνθρωπο.

Τα miRNAs με σχεδόν ταυτόσημες αλληλουχίες εκτός από ένα ή δύο νουκλεοτίδια σημειώνονται με ένα επιπλέον μικρό γράμμα. Για παράδειγμα, το miR-124a σχετίζεται στενά με το miR-124b :

hsa-miR-181a: aacauucaACgucugucggugAgu

hsa-miR-181b: aacauucaUUgucugucggugGgu

Τα pre-miRNAs, pri-miRNAs και τα γονίδια που οδηγούν σε 100% πανομοιότυπα ώριμα miRNAs αλλά που βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία του γονιδιώματος υποδεικνύονται με επιπρόσθετο επίθεμα αριθμού παύλας. Για παράδειγμα, τα pre-miRNAs hsa-mir-194-1 και hsa-mir-194-2 οδηγούν σε ένα

πανομοιότυπο ώριμο miRNA (hsa-miR-194), αλλά προέρχονται από γονίδια που βρίσκονται σε διαφορετικές περιοχές γονιδιώματος.

Τα είδη προέλευσης χαρακτηρίζονται με ένα πρόθεμα τριών γραμμάτων, π.χ. το hsa-miR-124 είναι ένα ανθρώπινο (*Homo sapiens*) miRNA και το oar-miR-124 είναι ένα miRNA προβάτου (*Ovis aries*). Άλλα κοινά προθέματα περιλαμβάνουν «ν» για ιό (miRNA που κωδικοποιείται από ένα γονιδίωμα ιού) και «d» για το miRNA της *Drosophila*.

Όταν δύο ώριμα microRNAs προέρχονται από αντίθετους βραχίονες του ίδιου pre-miRNA και βρίσκονται σε περίπου παρόμοιες ποσότητες, υποδηλώνονται με μία υπόδειξη -3p ή -5p. (Στο παρελθόν, αυτή η διάκριση έγινε επίσης με «s» (sense) και «as» (antisense)). Ωστόσο, το ώριμο microRNA που βρέθηκε από το ένα σκέλος της φουρκέτας είναι συνήθως πολύ πιο άφθονο από αυτό που βρέθηκε από το άλλο, οπότε ένας αστερίσκος μετά το όνομα δείχνει το ώριμο είδος που βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα από τον αντίθετο βραχίονα μιας φουρκέτας. Για παράδειγμα, τα miR-124 και miR-124 * μοιράζονται μια φουρκέτα pre-miRNA, αλλά πολύ περισσότερα miR-124 βρίσκονται στο κύτταρο.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

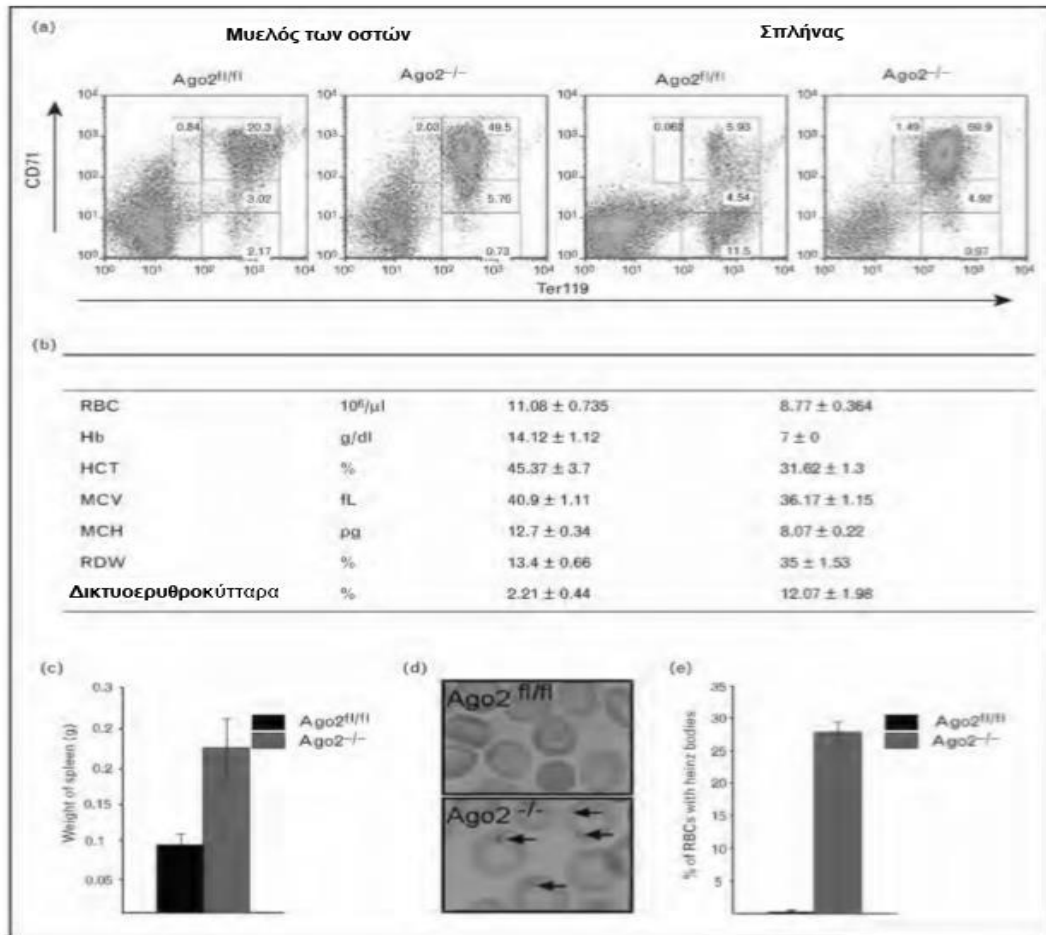
Γ.1. miRNA ΚΑΙ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ

Η ερυθροποίηση, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αποτελεί κομμάτι της αιμοποίησης και περιγράφει την διαδικασία σχηματισμού ώριμων ερυθρών αιμοσφαιρίων από προγονικές μορφές κυττάρων.

Η τρέχουσα έρευνα επικεντρώνεται στην αναγνώριση συγκεκριμένων miRNA και των σχετικών γενετικών οδών που ρυθμίζουν, καθώς και στην φυσιολογική και παθολογική ανάπτυξη των ερυθροκυττάρων. Παράλληλα, αναπτύσσονται γρήγορα νέες τεχνολογίες για την εξέταση και τον χειρισμό των miRNA, τόσο ως ερευνητικών μέσων, όσο και ως θεραπευτικών (Zhao *et al.*, 2010).

Οι ισχυρές ενδείξεις ότι τα miRNA είναι σημαντικά στην ερυθροποίηση εμφανίστηκαν από μελέτες της Argonaute 2 (Ago2), ενός βασικού συστατικού του συμπλόκου RISC (O'Carroll *et al.*, 2007). Η ειδική πειραματική εξάλειψη του γονιδίου Ago2 έδειξε ότι παρεμποδίζει την φυσιολογική βιογένεση των miRNA και προκαλεί σοβαρή αναιμία, σπληνομεγαλία και διακοπή ωρίμανσης των προγονικών ερυθροκυττάρων. Τα κυκλοφορούντα κατάλοιπα Ago2 σε ερυθροκύτταρα χωρίς κανέναν πολυμορφισμό ομάδων αίματος (null) είναι ανοιχτόχρωμα και περιέχουν ιζήματα αιμοσφαιρίνης (σώματα Heinz). Οι αιματοποιητικές επιδράσεις της πειραματικής εξάλειψης του Ago2 είναι επιλεκτικές, βλάπτοντας την ανάπτυξη B-κυττάρων και ερυθροκυττάρων, αλλά δεν επιδρούν στον σχηματισμό T κυττάρων, κοκκιοκυττάρων και μακροφάγων. Είναι ενδιαφέρον ότι η δράση της πρωτεΐνης Ago2 να πραγματοποιεί αποκοπή και διάσπαση των RNA, είναι τουλάχιστον εν μέρει περιττή για την ερυθροποίηση. Η επιλεκτική εργαστηριακή εξάλειψη της Dicer κατά την αιμοποίηση, επίσης παρεμποδίζει την ερυθροποίηση. Αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι τα miRNA είναι απαραίτητα για ανάπτυξη ερυθροκυττάρων και για τον προσδιορισμό των σχετικών μορίων που συμμετέχουν στις φυσιολογικές οδούς (Zhao *et al.*, 2010).

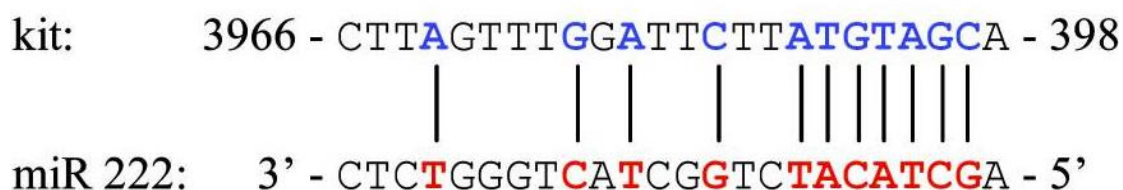
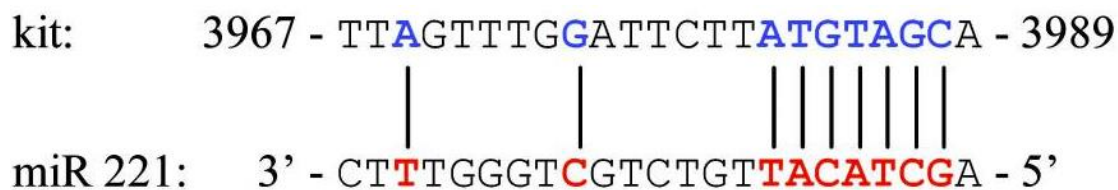
Οι μελέτες της Ago2 (εικόνα 20), προκάλεσαν μια εκτεταμένη αναζήτηση για τα συγκεκριμένα miRNA που εμπλέκονται στην ερυθροποίηση. Πολλές πλατφόρμες για τη δημιουργία των προφίλ της έκφρασης των miRNA έχουν εφαρμοστεί στη μελέτη της αιματοποίησης θηλαστικών χρησιμοποιώντας κυτταρικές σειρές και μεριστωματικούς ιστούς (Zhan, Miller, Papayanopoulou, Stamatoyanopoulos & Song, 2007; Georgantas *et al.*, 2007; Choong, Yang & McNiece, 2007; Dore *et al.*, 2008; Merkeronva, Belickova & Bruchova, 2008). Αυτές οι μελέτες αποκάλυψαν ότι τα πρόδρομα ερυθροκύτταρα περιέχουν πολλαπλά miRNA των οποίων η έκφραση αλλάζει δυναμικά κατά τη διαφοροποίηση και την ωρίμανσή τους. Συγκεκριμένα miRNA που ρυθμίζουν θετικά και αρνητικά την ανάπτυξη ερυθροειδών εξετάζονται στις επόμενες σελίδες (Zhao *et al.*, 2010).



Εικόνα 20. Μελέτες ποσοτικοποίησης της Ago2: Η Ago2 αποτελεί βασικό στοιχείο του RISC. Η διαγραφή της Ago2 σε πρόδρομα ερυθροκύτταρα μειώνει την έκφραση των miRNAs και αναστέλλει την ερυθροποίηση. (a) Η κυτταρομετρία ροής δείχνει την παύση ωρίμανσης και τη συσσώρευση των ανώριμων CD71⁺Ter119⁺ προγονικών κυττάρων στο σπλήνα και τον μυελό των οστών σε δείγματα ζώων με Ago2^{-/-} μεταλλάξεις. (b) Ερυθροειδείς δείκτες των Ago2^{-/-} μεταλλαγών που παρουσιάζουν αναιμία, μικροκυττάρωση και δικτυοκυττάρωση. (c) Σπληνομεγαλία σε Ago2^{-/-} μεταλλάγματα, (d) και (e) Heinz σωματίδια που προκύπτουν από την έλλειψη Ago2.

Γ.1.1 miR-221 ΚΑΙ miR-222

Αυτά τα miRNA, τα οποία κωδικοποιούνται από ένα κοινό πρόδρομο pri-miRNA, ρυθμίζονται αρνητικά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των ερυθροκυττάρων και καταστέλλουν άμεσα την έκφραση του **KIT** mRNA (εικόνα 21), το οποίο κωδικοποιεί έναν υποδοχέα κυτοκίνης απαραίτητο για την επέκταση των προγονικών ερυθροκυττάρων (Wang, Huang, Xue, Jin, Ju, Han & Chen, 2008). Η υπερέκφραση του miR-221 ή του miR-222 επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των ερυθροβλαστών και επιταχύνει την ωρίμανση, που συμπίπτει με την καταστολή του KIT. Αυτό υποδηλώνει ότι η μείωση αυτών των miRNA προάγει την επέκταση του ερυθροβλάστη με την μείωση έκφρασης του KIT υποδοχέα.



Εικόνα 21. Στόχευση του KIT από τα miR-221 και miR-222 (Τροποποιημένο από Felli et al. 2005)

Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι ο KIT καταστέλλεται από πολλαπλούς μεταγραφικούς μηχανισμούς κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης (Spinello *et al.*, 2009; Munugalavadla, Dore, Tan, Hing, Vishnu, Weiss & Kapur, 2005). Επιπλέον, απαιτείται αρνητική ρύθμιση της έκφρασης του KIT υποδοχέα κατά τη διάρκεια των τελικών σταδίων ερυθροειδούς ωρίμανσης (Muta, Krantz, Bondurant & Dai, 1995). Επομένως, η συνολική σημασία των miR-221/222-KIT στην αιμοποίηση δεν έχει, ακόμα, καθορισθεί. Τα miR-221/222 ρυθμίζουν επίσης την μυογένεση, αναστέλλοντας την παραγωγή του αναστολέα κυτταρικού κύκλου p27 (Cardinali, Cstellani, Fasarano, Basso, Alema, Martelli & Falcone, 2009) και ενισχύοντας τον σχηματισμό όγκων με αναστολή παραγωγής της ογκοκατασταλτικής φωσφατάσης και της ομόλογου τενσίνης (PTEN). Αυτά τα ευρήματα απεικονίζουν δύο σημαντικές γενικές αρχές των miRNA. Πρώτον, συχνά ρυθμίζουν πολλαπλά mRNA-στόχους. Δεύτερον, ένα απλό miRNA μπορεί να έχει διαφορετικές λειτουργίες ανάλογα με το περιβάλλον του ιστού (Zhao *et al.*, 2010).

Γ.1.2 miR-24

Το πρωτεϊνικό διμερές Activin (ακτιβίνη-μορφογενετικός παράγων), μέλος της οικογένειας κυτοκινών του Transforming Growth Factor β (TGF- β), προάγει την ερυθροποίηση. Το miR-24 αναστέλλει την σηματοδότηση της ακτιβίνης με στόχευση του mRNA που κωδικοποιεί τον τύπου 1 B υποδοχέα της ακτιβίνης A (ACVR1B, **ALK4**). Το miR-24 εκφράζεται κανονικά σε υψηλά επίπεδα σε ανθρώπινα πρωτογενή αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα CD34 +(αναγνώριση μέσω της διαμεμβρανικής φωσφογλυκοπρωτεΐνης CD34) και ρυθμίζεται αρνητικά κατά την ωρίμανση τους *in vitro* σε ερυθροκύτταρα. Σε αυτό το πειραματικό σύστημα, η υπερέκφραση του miR-24 παρεμποδίζει την έκφραση του υποδοχέα της ακτιβίνης ALK4 και την ερυθροποίηση, ενώ, η μειωμένη έκφραση του miR-24 έχει τα αντίθετα αποτελέσματα. Μία μελέτη δείχνει ότι η αρνητική ρύθμιση του miR-24 διεγείρει την ερυθροποίηση με την προώθηση

της σηματοδότησης της ακτιβίνης. Ωστόσο, μια άλλη μελέτη (Lal *et al.*, 2009) έδειξε ότι κατά τη χημική επαγωγή της ωρίμανσης των κυττάρων οξείας μυελογενούς λευχαιμίας K562 (τεχνητές θάνατες κυτταρικές σειρές που εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με αδιαφοροποίητα ερυθροκύτταρα), το miR-24 εμφανίζει θετική έκφραση και προωθεί την τελική διαφοροποίηση, καταπιέζοντας γονίδια που διεγείρουν την κυτταρική διαίρεση. Έτσι, η ρύθμιση του miR-24 διαφέρει σε δύο πειραματικά μοντέλα για την ερυθροποίηση. Στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, το miR-24 αποδείχθηκε ότι οδηγεί στον μυελοειδή πολλαπλασιασμό και ότι αναστέλλει τη διαφοροποίηση, καταπιέζοντας την πρωτεϊνική κινάση (MAPK) φωσφατάση-7, υποδεικνύοντας και πάλι τη σημασία του κυτταρικού πλαισίου όσον αφορά τις δράσεις των miRNA (Zhao *et al.*, 2010).

Γ.1.3 miR-223

Το miR-223 υπόκειται σε θετική έκφραση κατά τη διάρκεια της γένεσης των κοκκιοκυττάρων και ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση αυτής της κυτταρικής σειράς (Johnnidis *et al.*, 2008; Fazi *et al.*, 2007). Σε αντίθεση, όμως, το miR-223 καταστέλλεται κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης. Επιπλέον, η ενισχυμένη έκφραση αυτού του miRNA αναστέλλει την ερυθροειδή ωρίμανση των προγονικών κυττάρων CD34+ και των χημικώς επεξεργασμένων κυττάρων οξείας μυελογενούς λευχαιμίας K562 (Yuan, Wang, Yang, Liu & Zhang, 2009). Ένας βιολογικά σχετικός στόχος του miR-223 φαίνεται να είναι το πρωτεϊνικό σύμπλοκο LIM domain (δηλαδή ένα μοτίβο με δύο συνεχόμενες περιοχές δακτύλων Ψευδαργύρου) only 2 (**LMO2** ή RBTN2), ένα κρίσιμο συστατικό ενός συμπλόκου σύνδεσης στο DNA που απαιτείται για την ερυθροποίηση, το οποίο επίσης περιλαμβάνει την πρωτεΐνη GATA-1 (GATA-1), το γονίδιο T-κυτταρικής οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας 1 (SCL / TAL1) και την πρωτεΐνη δεσμεύσεως της περιοχής LIM 1 (LDB1) (Wadman, Osada, Grtz, Agulnick, Westphal, Forster & Rabitts, 1997; Mikkola, Klintamn, Yang, Hock, Schkaeger, Fujiwara & Orkin, 2003). Παραδόξως, το miR-223 επάγεται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης μεγακαρυοκυττάρων K562 που προκαλείται εργαστηριακά από χημικά και φαίνεται να προάγει αυτή τη διαδικασία (Yuan *et al.*, 2009), αν και τα SCL-GATA συμπλέγματα, τα οποία πιθανώς περιλαμβάνουν και την LMO2, είναι προαπαιτούμενα για την διαφοροποίηση αυτή. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν αναφέρθηκαν σημαντικές ανωμαλίες στην ανάπτυξη ερυθροκυττάρων ή μεγακαρυοκυττάρων κατά ανάλυση των miR-223 σε περιπτώσεις null ερυθροκυττάρων ποντικών (Johnnidis *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010).

Γ.1.4 miR-150

Το miR-150 εκφράζεται κατά προτίμηση σε μεγακαρυοκύτταρα σε σύγκριση με τα ερυθροκύτταρα και η ενισχυμένη έκφραση του miR-150 σε προγονικά

κύτταρα μεγακαρυοκυττάρων οδηγεί στον σχηματισμό τους, ενώ αναστέλλει την ερυθροποίηση (Lu *et al.*, 2008). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με μελέτες απώλειας λειτουργίας με χρήση antisense antagomirs miR-150, τα οποία ανέστειλαν την ωρίμανση μεγακαρυοκυττάρων. Το miR-150 φαίνεται να ασκεί αυτές τις επιδράσεις εν μέρει με την άμεση αναστολή της παραγωγής του ογκογονιδίου **MYB**, ενός παράγοντα μεταγραφής του οποίου η αρνητική έκφραση προάγει την ανάπτυξη μεγακαρυοκυττάρων εις βάρος της ερυθροποίησης (Lu *et al.*, 2008; Barroga, Pham & Kaushansky, 2008). Το miR-150 επάγεται ταχέως από τη θρομβοποιητίνη, απεικονίζοντας μια πιθανή διαδρομή μέσω της οποίας αυτή η κυτοκίνη οδηγεί στην ανάπτυξη μεγακαρυοκυττάρων (Barroga *et al.*, 2008). Αυτές οι μελέτες αποκαλύπτουν πώς ένα miRNA μπορεί να ρυθμίσει μία αιματοποιητική κυτταρική σειρά, μεταβάλλοντας την έκφραση ενός βασικού μεταγραφικού παράγοντα. Το miR-150 ρυθμίζει επίσης την ανάπτυξη των B-κυττάρων, καταστέλλοντας την παραγωγή του MYB, δείχνοντας τον τρόπο με τον οποίο τα miRNAs μπορούν να ρυθμίσουν πολλαπλούς τύπους κυττάρων μέσω κοινών γονιδίων-στόχων (Zhao *et al.*, 2010).

Γ.1.5 miR-15a

Το miR-15a αναγνωρίστηκε αρχικά ως καταστολέας όγκων που χάθηκε με διαγραφή στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Calin *et al.*, 2002). Σε αυτό το πλαίσιο, το miR-15a / 16-1 καταστέλλει την ογκογένεση, εν μέρει, εμποδίζοντας το σχηματισμό της της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (Cimmino *et al.*, 2005). Πιο πρόσφατα, οι Zhao *et al.* (2010), ταυτοποίησαν ότι το mRNA του MYB καταστέλλεται άμεσα από το miR-15a. Επιπλέον, το **MYB** ενεργοποιεί τη μεταγραφή του miR-15a / 16-1. Η ενισχυμένη έκφραση του miR-15a παρεμπόδισε τον σχηματισμό αποικιών ερυθροκυττάρων από προγονικά κύτταρα σχηματισμού αποικιών (Colony Forming Unit erythroids/CFU-e), σε σχέση με τις αποικίες BFU-e, υποδεικνύοντας ότι το miRNA ρυθμίζει αρνητικά την μετάβαση από CFU-e σε BFU-e κυτταρική σειρά (Zhao *et al.*, 2010).

Γ.1.6 miR-144/451

Το miR-451 εκφράζεται έντονα σε πειραματικά μοντέλα ωρίμανσης ερυθροκυττάρων (Georgantas *et al.*, 2007; Choong *et al.*, 2007; Merkerova *et al.*, 2008) και εκφράζεται επίσης σε ώριμα ερυθροκύτταρα της κυκλοφορίας. Το miR-451 συγχωνεύεται με το miR-144 σε ένα δισιστρονικό μεταγραφικό pri-mRNA, του οποίου η σύνθεση ενεργοποιείται άμεσα από τον παράγοντα μεταγραφής ερυθροκυττάρων **GATA-1** (Choong *et al.*, 2007). Η ενισχυμένη έκφραση του miR-451 ή του miR-144 ενισχύει την ωρίμανση των ερυθρολευχαιμικών κυττάρων του ποντικού, ενώ η εξάντληση του miR-451 έχει τα αντίθετα αποτελέσματα. Επιπλέον, η in-vivo εξάλειψη είτε του miR-144, είτε του miR-451 με τη χρήση RNAs που δρουν με φορέα έναν λεντοϊό αναστέλλει

την ωρίμανση των αιματοποιητικών βλαστοκυττάρων και γενικά προγονικών κυττάρων σε ώριμους ερυθροβλάστες. Οι αλληλουχίες αυτών των δύο miRNAs είναι εντελώς διαφορετικές και η καταστολή τους αναστέλλει την ερυθροποίηση με αθροιστικό τρόπο, υποδηλώνοντας ότι τα βιολογικά τους αποτελέσματα διαμεσολαβούνται από την καταστολή διακεκριμένων συμπληρωματικών συνόλων mRNA στόχων.

Σε μη δημοσιευμένες μελέτες διαπιστώθηκε ότι η αποκοπή της γονιδιακής θέσης των miR-144/451 σε ποντίκια προκαλεί ήπια αιμολυτική αναιμία και αυξημένη ευαισθησία ερυθροκυττάρων στο οξειδωτικό στρες. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η καταστολή των miR-144/451 μέσω κατασταλτικών RNA σε ενήλικους ποντικούς αναστέλλει την ερυθροποίηση πιο σοβαρά από τη στοχευμένη αποκοπή του γονιδιακού τόπου αυτών των miRNA. Αυτή η ασυμφωνία πιθανόν οφείλεται σε διαφορετικές τεχνικές ή / και βιολογικές διαφορές μεταξύ των δύο πειραματικών προσεγγίσεων και δείχνει τη σημασία της χρήσης πολλαπλών τρόπων για την αξιολόγηση της λειτουργίας των miRNA (Zhao *et al.*, 2010).

Δύο ομάδες εξέτασαν ανεξάρτητα τις επιδράσεις της (επαγόμενης από morpholino-ένα oligομερές μόριο για gene knockdown μελέτες) εξάντλησης του miR-451 σε zebrafish. Διαπιστώθηκε ότι η θεραπεία με αντι-miR-451 morpholino προκάλεσε σοβαρή αναιμία σε έμβρυα zebrafish (Choong *et al.*, 2007). Οι Pase, Layton, Kloosterman, Carradice, Waterhouse & Lieschke (2009) διαπίστωσαν ότι η ίδια διαδικασία προκάλεσε ελάττωση της ερυθροποίησης, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό. Αυτή η ασυμφωνία μπορεί να εξηγηθεί από τη συμμετοχή της 1-φαινυλο-2-θειουρίας (PTU) στις μορφολογικές μελέτες miR-451. Η PTU είναι ένας αναστολέας σύνθεσης μελανίνης, ο οποίος συνήθως περιλαμβάνεται σε πειράματα zebrafish για τη βελτίωση της απεικόνισης των εσωτερικών δομών εμβρύου. Το PTU έχει προ-οξειδωτικά αποτελέσματα και φαίνεται να ενισχύει τις επιβλαβείς επιδράσεις της απώλειας miR-451 σε zebrafish. Έτσι, το miR-451 προστατεύει από το οξειδωτικό στρες τόσο σε ποντίκια όσο και σε zebrafish. Το miR-451 διευκολύνει, επίσης, την ωρίμανση των ερυθροκυττάρων στην περίπτωση των zebrafish με στόχευση του mRNA που κωδικοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα *gata2* (Pase *et al.*, 2009), αν και αυτό δεν φαίνεται να συμβαίνει σε ποντίκια (Zhao *et al.*, 2010).

Το miR-144, το οποίο συσχετίζεται με το miR-451, ρυθμίζει την αναπτυξιακή έκφραση των γονιδίων σφαιρίνης στο zebrafish. Συγκεκριμένα, η μείωση του miR-144 υποβαθμίζει την σύνθεση της α -E1, μιας εμβρυϊκής μορφής σφαιρίνης. Το miR-144 αναστέλλει άμεσα τη σύνθεση του *klf4*, ενός μεταγραφικού παράγοντα τύπου Kruppel που ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίου α -E1. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο *klf4*, επίσης, ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδιακού τόπου miR-144/451, καθορίζοντας ένα κύκλωμα αρνητικής ανάδρασης που φαίνεται να τελειοποιεί την έκφραση σφαιρίνης, συμβάλλοντας ίσως στη διατήρηση της ισορροπίας της αλυσίδας της σφαιρίνης κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης. Εάν αυτός ο ρυθμιστικός άξονας υπάρχει επίσης στην ερυθροποίηση των θηλαστικών είναι ακόμα αβέβαιο (Zhao *et al.*, 2010).

Αν και ο γονιδιακός τύπος miR-144/451 εκφράζεται περισσότερο σε ερυθροκύτταρα, αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι επιδρά και σε άλλους ιστούς. Συγκεκριμένα, το miR-451 ρυθμίζει την ανάπτυξη αρκετών καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του γλοιοβλαστώματος, του καρκίνου του γαστρεντερικού και άλλων συστημάτων (Bandres *et al.*, 2009). Το miR-451 ρυθμίζει, επίσης, την πολικότητα των επιθηλιακών κυττάρων (Tsuchiya *et al.*, 2009) και προστατεύει τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα από ισχαιμικό και οξειδωτικό στρες (Zhang, Chen, Ren, Wang, Kranias, Medvedovic & Fan, 2009). Η τελευταία λειτουργία είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα υπό το πρίσμα παρόμοιων λειτουργιών στα ερυθροειδή κύτταρα, οι οποίες μπορεί να προκύψουν μέσω κοινών μηχανισμών (Zhao *et al.*, 2010).

Πίνακας 2: miRNA με θετική και αρνητική έκφραση κατά την ερυθροποίηση και οι λειτουργίες τους (Τροποποιημένο από Zhao et al., 2010).

miRNA	ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ	ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΟΧΟΙ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
miR-221/222	↓		KIT		<i>Feli et al. 2005</i>
miR-24	↓		ALK4	ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ	<i>Wang et al. 2008</i>
miR-223	↓	ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ CD34+ ΑΠΟΙΚΙΕΣ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΚΑΙ K562 ΚΥΤΤΑΡΑ	LMO2	ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗΣ	<i>Yuan et al 2008 ; Feli et al 2009</i>
miR-150	↓		MYB	Ενίσχυση διαφοροποίησης των MEP κυττάρων σε Μεγακαρυοκύτταρα	<i>Lu et al 2008</i>
miR-15a	↓		MYB	Καταστολή μετατροπής των BFU-e σε CFU-E	<i>Zhao et al 2009</i>
miR-144 ^a	↑↑	Κύτταρα zebrafish με morpholino knockdown	klf1	Καταστολή της εμβρυικής α σφαιρίνης	<i>Du et al. 2009</i>
miR-144 ^a	↑↑	Προγονικά κύτταρα τρωκτικών	Unknown	Καταστολή ωρίμανσης των προγονικών CD71+Ter119+	<i>Papapetrou et al. 2009</i>
miR-451 ^a	↑↑	Κύτταρα zebrafish με morpholino knockdown	gata2	ΠΡΟΩΘΗΣΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ	<i>Dore et al. 2008</i>
miR-451 ^a	↑↑	Υπερέκφραση σε ερυθρολευχαιμικά κύτταρα ποντικών	Ywhaz/14-3-3ζ	ΣΕ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	<i>Zhan et al. 2007</i>

Γ.1.7 ΕΚΦΡΑΣΗ miRNA ΣΤΑ ΕΡΥΘΡΑ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΑ ΤΗΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ

Τα miRNA που περιγράφηκαν στις προηγούμενες ενότητες αναλύθηκαν σε μεγάλο βαθμό σε πρόδρομα ερυθροκύτταρα. Ωστόσο, αρκετές μελέτες (Rathjen, Nicol, McConkey & Dalmay, 2006; Chen, Wang, Tele & Chi, 2008; Noh *et al.*, 2009) δείχνουν ότι πολλά miRNAs υπάρχουν επίσης στα κυκλοφορούντα δικτυοερυθροκύτταρα και τα ώριμα ερυθροκύτταρα. Κατά την τελική ωρίμανση του ερυθροκυττάρου, όταν η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης καθίσταται εξ ολοκλήρου μετα-μεταγραφικά, τα miRNA μπορούν να βοηθήσουν στην απομάκρυνση των μη απαραίτητων mRNA και στην εξομάλυνση της διαδικασίας της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Ωστόσο, οι ρόλοι των miRNA σε ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια, είναι ακόμα άγνωστοι. Αυτό συμβαίνει διότι τα ώριμα ερυθροκύτταρα δεν είναι μεταγραφικά ή μεταφραστικά ενεργά, λόγω απώλειας πυρήνα. Τέτοια miRNA, τα οποία είναι ένα ιδιαίτερα σταθερά, μπορεί απλώς να αντιπροσωπεύουν αδρανή υπολείμματα από προηγούμενα στάδια ανάπτυξης. Εναλλακτικά, πολλές λειτουργίες είναι δυνατές.

Πρώτον, ορισμένα miRNA προστατεύουν τους ιστούς από την εισβολή των παθογόνων μικροβίων (Jopling, Yi, Lancaster, Lemon & Sarnow, 2005; Lecellier *et al.*, 2005), και αυτό μπορεί να συμβεί και στα ερυθροκύτταρα, όπως σε περιπτώσεις ελονοσίας. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το miR-451 μετατοπίζεται στο παράσιτο της ελονοσίας κατά τη διάρκεια της εισβολής των ερυθροκυττάρων, αν και οι λειτουργικές επιπτώσεις αυτού του ευρήματος δεν είναι αποδεδειγμένες (Xue, Zhang, Huang, Feng & Pan, 2008). Δεύτερον, τα miRNA των ερυθροκυττάρων από ελαττωματικά ερυθρά αιμοσφαίρια μπορούν να απελευθερωθούν στην κυκλοφορία και στη συνέχεια να ληφθούν από άλλους ιστούς. Τρίτον, τα γερασμένα ερυθροκύτταρα ή αυτά με συσσωρευμένες βλάβες, συνήθως απορροφούνται από μακροφάγα και η διαδικασία αυτή μπορεί να περιλαμβάνει τη μεταφορά λειτουργικών miRNA. Σε σχέση με τα δύο τελευταία σημεία, μικροκυτίδια που απελευθερώνονται από πολυάριθμους κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων και των αιματοποιητικών, περιέχουν miRNAs ικανά να μεταφερθούν σε γειτονικά κύτταρα κατά την ενδοκύτωση (Valadi, Ekström, Bossios, Sjöstrand, Lee & Lötval, 2007). Τέλος, τα miRNA μπορούν να ρυθμίζουν την φυσιολογία των ερυθροκυττάρων ανεξάρτητα από τον έλεγχο της μετάφρασης μέσω νέων μηχανισμών που δεν έχουν ακόμα ανακαλυφθεί (Zhao *et al.*, 2010).

Γ.1.8 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με την μελέτη των Zhao *et al.* (2010), λαμβάνοντας υπόψη τις ποικίλες λειτουργίες των miRNA σχεδόν σε όλους τους ιστούς των πολυκύτταρων οργανισμών, είναι αξιοσημείωτο ότι τα miRNA διαφεύγουν την προσοχή των βιολόγων μέχρι πολύ πρόσφατα. Τώρα, η κατανόησή μας για αυτά τα μη κωδικοποιημένα RNA αυξάνει γρήγορα και αρχίζουμε να ορίζουμε

τα συγκεκριμένα miRNA που συμμετέχουν στον σχηματισμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων και στη φυσιολογία τους. Πιθανότατα, η φυσιολογική ερυθροποίηση απαιτεί δυναμική ρύθμιση πολλαπλών miRNA σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Περαιτέρω καθορισμός αυτών των miRNA, των mRNA στόχων τους και των συναφών κυτταρικών οδών θα προωθήσει την κατανόησή μας για την ερυθροποίηση και θα μπορούσε επίσης να απεικονίσει νέες γενικές αρχές της βιολογίας των miRNA. Από αυτή την άποψη, πολλές τεχνολογίες αιχμής για την εξέταση της έκφρασης και της λειτουργίας του miRNA μπορούν τώρα να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση της ερυθροποίησης. Για παράδειγμα, είναι δυνατό να οριστούν νέα miRNA με απευθείας προσδιορισμό της αλληλουχίας των μικρών κυτταρικών RNA, αντί να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευση προηγουμένως ανακαλυφθέντων miRNA γνωστής αλληλουχίας. Είναι επίσης δυνατόν να προσδιοριστούν αλληλεπιδράσεις miRNA-στόχου με ανοσοκαταβύθιση των συστατικών του RISC και την ανάλυση των λειτουργιών των miRNA χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις πρωτεομικής μεθοδολογίας (ibid, 2010).

Γ.2 *IN SILICO* ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΣΕ ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ miRNA ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΗΝ ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ

Θα διερευνηθεί σε βάσεις δεδομένων η συσχέτιση ανάμεσα σε miRNA και γονίδια στόχους από το σύνολο των πληροφοριών που αναλύθηκαν μέσω βιβλιογραφικών δεδομένων στην προηγούμενη ενότητα.

Θα επιχειρηθεί η επικύρωση, δηλαδή, των παραπάνω πειραματικών δεδομένων σε δύο από τις πιο διαδεδομένες βάσεις δεδομένων.

Θα συσχετίσουμε τα παρακάτω microRNA και γονίδια στον άνθρωπο.

ΓΟΝΙΔΙΟ	miRNA
KIT	miR-221/222
ALK4	miR-24
LMO2	miR-223
MYB	miR-150
MYB	miR-15a

(http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_72/targetscan.cgi?species=Human&mir_sc=miR-221-3p/222-3p)

Συσχέτιση του γονιδίου KIT με το hsa-miR-221 χρησιμοποιώντας την βάση δεδομένων TargetScan:



Search for predicted microRNA targets in mammals

[\[Go to TargetScanMouse\]](#)

[\[Go to TargetScanWorm\]](#)

[\[Go to TargetScanFly\]](#)

[\[Go to TargetScanFish\]](#)

1. Select a species

AND

2. Enter a human gene symbol (e.g. "Hmga2")
or an Ensembl gene (ENSG00000149948) or transcript (ENST00000403681) ID

AND/OR

3. Do one of the following:

• Select a broadly conserved* microRNA family

• Select a conserved* microRNA family

• Select a poorly conserved but confidently annotated microRNA family

• Select another miRBase annotation

Note that most of these families are star miRNAs or RNA fragments misannotated as miRNAs.

• Enter a microRNA name (e.g. "miR-9-5p")

Αρχικά παρατηρούμε ότι το KIT συσχετίζεται με 2 εκδοχές του miR-221, τις miR221-3p/222-3p και miR-221-5p/8073.

Παρόλα αυτά το γονίδιο KIT υπάρχει ως Target Gene στο database μόνο του miR-221-3p/222-3p



Release 7.2: March 2018

Agarwal et al., 2015

hsa-mir-221 matches multiple families in our miRNA database:

miR-221-3p/222-3p broadly conserved
miR-221-5p/8073 other miRBase annotation

You may wish to consult our [list of miRNAs and miRNA families](#).



Release 7.2: March 2018

Agarwal et al., 2015

KIT

Human | miR-221-3p/222-3p

504 transcripts with conserved sites, containing a total of 537 conserved sites and 186 poorly conserved sites.

Please note that these predicted targets include some false positives. [\[Read more\]](#)

Genes with only poorly conserved sites are not shown. [\[View top predicted targets, irrespective of site conservation\]](#)

Table sorted by cumulative weighted context++ score [\[Sort table by aggregate P_{CT}\]](#)

The table shows at most one transcript per gene, selected for being the most prevalent, based on 3P-seq tags (or the one with the longest 3' UTR, in case of a tie). [\[Download table\]](#)

Target gene	Representative transcript	Gene name	Number of 3P-seq tags supporting UTR + 5	Link to sites in UTRs	Conserved sites				Poorly conserved sites				6mer sites	Representative miRNA	Cumulative weighted context++ score	Total context++ score	Aggregate P _{CT}	Previous TargetScan publication(s)
					total	8mer	7mer-m8	7mer-A1	total	8mer	7mer-m8	7mer-A1						
PVRL1	ENST00000264025.3	poliovirus receptor-related 1 (herpesvirus entry mediator C)	50	Sites in UTR	1*	0	0	0	2	2	0	0	0	hsa-miR-222-3p	-1.58	-1.58	< 0.1	2011
CDKN1B	ENST00000228872.4	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	587	Sites in UTR	2	2	0	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-222-3p	-1.05	-1.05	0.90	2005, 2007, 2009, 2011
GABRA1	ENST00000428797.2	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1	5	Sites in UTR	3	1	1	1	0	0	0	0	0	hsa-miR-222-3p	-0.88	-0.88	0.76	2005, 2007, 2009, 2011
VAPB	ENST00000395802.3	VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein B and C	391	Sites in UTR	1	1	0	0	2	0	1	1	2	hsa-miR-221-3p	-0.86	-0.93	0.68	2005, 2007, 2009, 2011
TMSB15B	ENST00000540220.1	thymosin beta 15B	211	Sites in UTR	1	1	0	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-221-3p	-0.83	-0.83	0.12	2011
TFG	ENST00000240851.4	TRK-fused gene	2164	Sites in UTR	1	1	0	0	2	0	2	0	0	hsa-miR-221-3p	-0.80	-0.98	< 0.1	
SNX4	ENST00000251775.4	sorting nexin 4	454	Sites in UTR	1	1	0	0	1	1	0	0	0	hsa-miR-222-3p	-0.75	-0.83	< 0.1	2009, 2011
WSB2	ENST00000315436.3	WD repeat and SOCS box containing 2	938	Sites in UTR	1	1	0	0	1	0	0	1	1	hsa-miR-222-3p	-0.74	-0.76	0.65	2009, 2011
EIF5A2	ENST00000474096.1	eukaryotic translation initiation factor 5A2	443	Sites in UTR	1	1	0	0	1	0	0	1	1	hsa-miR-222-3p	-0.72	-0.88	0.63	2005, 2007, 2009, 2011
IRX5	ENST00000394636.4	iroquois homeobox 5	82	Sites in UTR	1	1	0	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-222-3p	-0.70	-0.70	0.33	2005, 2007, 2009, 2011
NTF3	ENST00000423158.3	neurotrophin 3	154	Sites in UTR	1	1	0	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-222-3p	-0.69	-0.69	0.67	2005, 2007, 2009, 2011
HECTD2	ENST00000371667.1	HECT domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	1514	Sites in UTR	1	1	0	0	1	0	1	0	0	hsa-miR-221-3p	-0.64	-0.64	0.67	2005, 2007, 2009, 2011
TUBA1A	ENST00000301071.7	tubulin, alpha 1a	22536	Sites in UTR	1	1	0	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-222-3p	-0.61	-0.61	< 0.1	
CLVS2	ENST00000275162.5	clavesin 2	19	Sites in UTR	2	1	1	0	0	0	0	0	1	hsa-miR-221-3p	-0.61	-0.61	0.71	2005, 2007, 2009, 2011
KIT	ENST00000288135.5	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	329	Sites in UTR	1	1	0	0	1	1	0	0	1	hsa-miR-222-3p	-0.61	-0.61	0.68	2011
RFX7	ENST00000423270.1	regulatory factor X, 7	1049	Sites in UTR	2	2	0	0	0	0	0	0	0	hsa-miR-222-3p	-0.59	-0.59	0.87	2007, 2009, 2011
PAIP1	ENST00000514514.1	poly(A) binding protein interacting protein 1	165	Sites in UTR	1	1	0	0	1	0	0	1	0	hsa-miR-221-3p	-0.57	-0.59	0.14	2005, 2007, 2009, 2011

Για να έχουμε υψηλό ποσοστό βεβαιότητας ότι τα αποτελέσματα είναι έγκυρα θα επιχειρήσουμε να τα διασταυρώσουμε με μία δεύτερη εξίσου έγκυρη βάση δεδομένων, τη miRanda.

Συσχέτιση του γονιδίου KIT με το miR-221, χρησιμοποιώντας την βάση δεδομένων miRanda:

microRNA.org - Targets and Expression
 Predicted microRNA targets & target downregulation scores. Experimentally observed expression patterns.
 August 2010 Release Last Update: 2010-11-01 [[release notes](#)]

miRNA Target mRNA miRNA Expression Downloads FAQ

You are currently searching:
 - Homo sapiens

miRNA Stats:
 - Homo sapiens: 1100
 - Mus musculus: 717
 - Rattus norvegicus: 387
 - Drosophila melanogaster: 186
 - Caenorhabditis elegans: 233

miRNA Search

miRNA(s): fuzzy search ("let-7" will match "let-7a", "let-7b", etc.)

Species:

microRNA.org - Targets and Expression
 Predicted microRNA targets & target downregulation scores. Experimentally observed expression patterns.
 August 2010 Release Last Update: 2010-11-01 [[release notes](#)]

target sites by: scores by: Computational Biology Center:
 miRanda - miSVR
 ::cBio@MSKCC

miRNA Target mRNA miRNA Expression Downloads FAQ

You are currently searching:
 - Homo sapiens
 - hsa-miR-221
 [[view targets](#)]
 [[view expression profile](#)]

miRNA Stats:
 - Homo sapiens: 1100
 - Mus musculus: 717
 - Rattus norvegicus: 387
 - Drosophila melanogaster: 186
 - Caenorhabditis elegans: 233

Selected miRNAs: hsa-miR-221

Click [\[i\]](#) to view alternative isoforms.

Displaying results 1 - 50 of 5,670
[first](#) | [next](#) | [last](#)

mRNAs Targeted by hsa-miR-221

	miRSVR score
LRRCC1 [hsa] NM_033402,NM_001077501,AB051551 [alignment details]	-3.02
GABRA1 [hsa] NM_000806,NM_001127643,NM_001127644,NM_001127645... [alignment details]	-2.77
<input checked="" type="checkbox"/> PRDM2 [hsa] NM_012231 [alignment details]	-0.13
NM_001135610 [alignment details]	-0.13
AK307377 [alignment details]	-0.10
NM_015866,BX647310 [alignment details]	-2.76
CR612351 [alignment details]	-2.46
SNX4 [hsa] NM_003794,AK298972 [alignment details]	-2.37
TCF12 [hsa] NM_003205,NM_207036,NM_207037,NM_207038,NM_207040,AK302749... [alignment details]	-2.36
TFG [hsa] NM_006070,NM_001007565,BC001483,BC041600,CR591931 [alignment details]	-2.27
RFX7 [hsa] NM_022841 [alignment details]	-2.26
GBE1 [hsa] NM_000158 [alignment details]	-2.25
<input checked="" type="checkbox"/> KIAA1841 [hsa] NM_001129993,BC039298 [alignment details]	
For this gene, only alternative isoforms met search criteria	
NM_032506 [alignment details]	-2.22
<input checked="" type="checkbox"/> RECK [hsa] NM_021111,BC050306 [alignment details]	-2.22
<input checked="" type="checkbox"/> KIT [hsa] NM_000222,NM_001093772 [alignment details]	-2.20
CDKN1B [hsa] NM_004064 [alignment details]	-2.11
MARK1 [hsa] NM_018650,AB385474,AK295506,AK314614 [alignment details]	-2.11
FBXO47 [hsa] NM_001008777 [alignment details]	-2.08
<input checked="" type="checkbox"/> BRWD1 [hsa] NM_018963,AK125906 [alignment details]	-2.07

Παρατηρούμε ότι και οι δύο βάσεις δεδομένων συσχετίζουν το γονίδιο του υποδοχέα KIT με το συγκεκριμένο miRNA.

Με αντίστοιχο τρόπο πραγματοποιούμε διερεύνηση σε αυτές τις δύο βάσεις δεδομένων και για υπόλοιπα γονίδια και miRNA.

- Το γονίδιο KIT συσχετίζεται με το miR-222 εξίσου στις βάσεις δεδομένων TargetScan και miRanda.
- Το γονίδιο ALK4 βρέθηκε να συσχετίζεται με το miR-24 στη βάση δεδομένων TargetScan, ενώ τα ίδια αποτελέσματα δεν έγινε δυνατό να διασταυρωθούν στη βάση δεδομένων miRanda.
- Το γονίδιο LMO2 βρέθηκε να συσχετίζεται με το miR-223 στη βάση δεδομένων TargetScan, ενώ τα ίδια αποτελέσματα δεν έγινε δυνατό να διασταυρωθούν στη βάση δεδομένων miRanda.
- Το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα MYB συσχετίζεται με το miR-150 εξίσου στις βάσεις δεδομένων TargetScan και miRanda.
- Τέλος, το ίδιο γονίδιο, MYB, βρέθηκε να συσχετίζεται με το miR-15a εξίσου στις βάσεις δεδομένων TargetScan και miRanda.

Για καλύτερη συσχέτιση απαιτείται σύγκριση συμπληρωματικότητας βάσεων ανάμεσα στις seed περιοχές των miRNA και τον γονιδίων στόχων, ώστε να προβλεφθεί ο μηχανισμός γονιδιακής αποσιώπησης

Γ.3 miRNA ΚΑΙ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Αρκετές ομάδες μελετούν τους πιθανούς ρόλους των miRNA σε ερυθροκυτταρικές διαταραχές. Οι Bruchova, Yoon, Agarwal, Mendell & Prchal (2007), και Bruchova, Merkerova & Prchal (2008), διαπίστωσαν ότι τα προφίλ των miRNA μεταβάλλονται σε πολλαπλές σειρές κυττάρων αιμοποίησης από ασθενείς με Ερυθραιμία (PCV), μια μυελοπολλαπλασιαστική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από υπερβολική έκφραση ερυθροκυττάρων. Σήμερα, αρχίζουν να χαρτογραφούνται οι mRNA στόχοι, μέσω των οποίων μπορεί να συνεισφέρει η έκφραση των miRNA στη διαταραχή (Bruchova, Yoon, Agarwal Swierczek & Prchal, 2009). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, το miR-150, το οποίο στοχεύει τον μεταγραφικό παράγοντα MYB, εκφράζεται λιγότερο κατά τη διάρκεια της PCV σε σύγκριση με την κανονική ωρίμανση των ερυθροκυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (Bruchova *et al.*, 2007). Έτσι, η αύξηση της έκφρασης του MYB μέσω απώλειας του miR-150 θα μπορούσε να συμβάλει στον υπερπολλαπλασιασμό των ερυθροβλαστών κατά την PCV (Bruchova *et al.*, 2009). Οι Chen *et al.* (2008), έδειξαν ότι πολλαπλά miRNA απορυθμίζονται στα ερυθροκύτταρα με δρεπανοκυτταρική αναιμία. Για παράδειγμα, το miR-320 είναι σχετικά χαμηλά εκφρασμένο σε προσβεβλημένα ερυθροκύτταρα. Η αφαίρεση αυτού του miRNA αναστέλλει την επιβίωση και την ωρίμανση των κανονικών δικτυοκυττάρων. Ένας σχετικός στόχος του miR-320 μπορεί να είναι το mRNA που κωδικοποιεί τον υποδοχέα τρανσφερίνης (CD71), ο οποίος κανονικά ρυθμίζεται αρνητικά στα τελικά στάδια ερυθροειδούς ωρίμανσης (Chen *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010).

Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτουν ποικίλες συσχετίσεις με επιπτώσεις στην ιατρική. Περαιτέρω μελέτες σχετικά με τους μηχανισμούς με τους οποίους τα miRNA θα απορρυθμιστούν πειραματικά σε καλλιέργειες που σχετίζονται με ασθένειες ερυθροκυττάρων θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε νέες θεραπείες. Οι τεχνολογίες για τον χειρισμό των επιπέδων συγκεκριμένων miRNA στους στοχευόμενους ιστούς (Brown & Naldini, 2009) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη ρύθμιση των διαταραχών των ερυθροκυττάρων με την εξάντληση επιβλαβών miRNA ή την υπερέκφραση των ωφέλιμων. Επιπλέον, η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο αυτά τα miRNA επηρεάζουν τις ασθένειες των ερυθρών αιμοσφαιρίων θα βοηθήσει να εντοπιστούν νέες κυτταρικοί οδοί που μπορούν να υποβληθούν σε χειρισμούς με τυποποιημένες φαρμακολογικές προσεγγίσεις. Για παράδειγμα, αρκετά miRNA σχετίζονται με την αναπτυξιακή αλλαγή από τη εμβρυϊκή (γ-αλυσίδα) στην ενήλικη (β-αλυσίδα) σύνθεση σφαιρίνης (Bianchi, Zuccato, Lampronti, Borgatti & Gambari, 2009; Zhao *et al.*, 2010). Ο καθορισμός της σημασίας αυτών των παρατηρήσεων θα μπορούσε να απεικονίσει νέες στρατηγικές για την αποκατάσταση της σύνθεσης γ-σφαιρίνης για τη θεραπεία των αιμοσφαιρινοπαθειών. Επιπρόσθετα, τα miRNA δείχνουν πολλές υποσχέσεις ως διαγνωστικοί βιοδείκτες για πολλές ασθένειες. Αυτή η ιδιότητα μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την παρακολούθηση της εμφάνισης, της πρόγνωσης και της εξέλιξης των διαταραχών της ερυθροποίησης, ιδιαίτερα καθώς ο σχετικός τύπος κυττάρου (κύτταρα αίματος) είναι εύκολα προσβάσιμος μέσω της φλεβοτομής ή αναρρόφησης και βιοψίας του μυελού των οστών.

Γ.4 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ miRNA ΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Η σύνθεση της αιμοσφαιρίνης είναι μια απίστευτα πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί τη ρύθμιση μέσω cis και trans παραγόντων. Η προσθήκη σε αυτή την πολυπλοκότητα είναι ο μετασχηματισμός του τύπου της αιμοσφαιρίνης έναντι εμβρυϊκής και ενήλικης ζωής. Η πρώτη ένδειξη ότι τα miRNA εμπλέκονται στη ρύθμιση της σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης προέρχεται από μελέτες του miR-144 σε zebrafish (Fu, Du *et al.*, 2009). Καθώς η έκφραση του miR-144 σταδιακά αυξάνεται κατά την ανάπτυξη του zebrafish, μειώνεται η εμβρυϊκή της έκφραση α-σφαιρίνης. Η αναστολή του miR-144 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της εμβρυϊκής α-σφαιρίνης χωρίς να επηρεάζεται η σύνθεση της β-σφαιρίνης. Ο μηχανισμός της δράσης του miR-144 επί της εμβρυϊκής α-σφαιρίνης φαίνεται να εμφανίζεται μέσω στόχευσης του μεταγραφικού παράγοντα KLF1. Ο KLF1 δεσμεύεται επίσης στην περιοχή του υποκινητή του miR-144 και επάγει την έκφρασή του. Έτσι, το miR-144 και το KLF1 (εικόνα 22) σχηματίζουν μία λούπα αρνητικής ανατροφοδότησης για να ρυθμίσουν τα επίπεδα του δεύτερου (δηλαδή του KLF1). Η ορθόλογη πρωτεΐνη του KLF1 στα θηλαστικά είναι άγνωστη, αλλά σχετίζεται περισσότερο με την πρωτεΐνη KLF1. Τα έμβρυα με γονότυπο KLF1 - / - έχουν μειωμένα επίπεδα ζ-σφαιρίνης, της μορφής

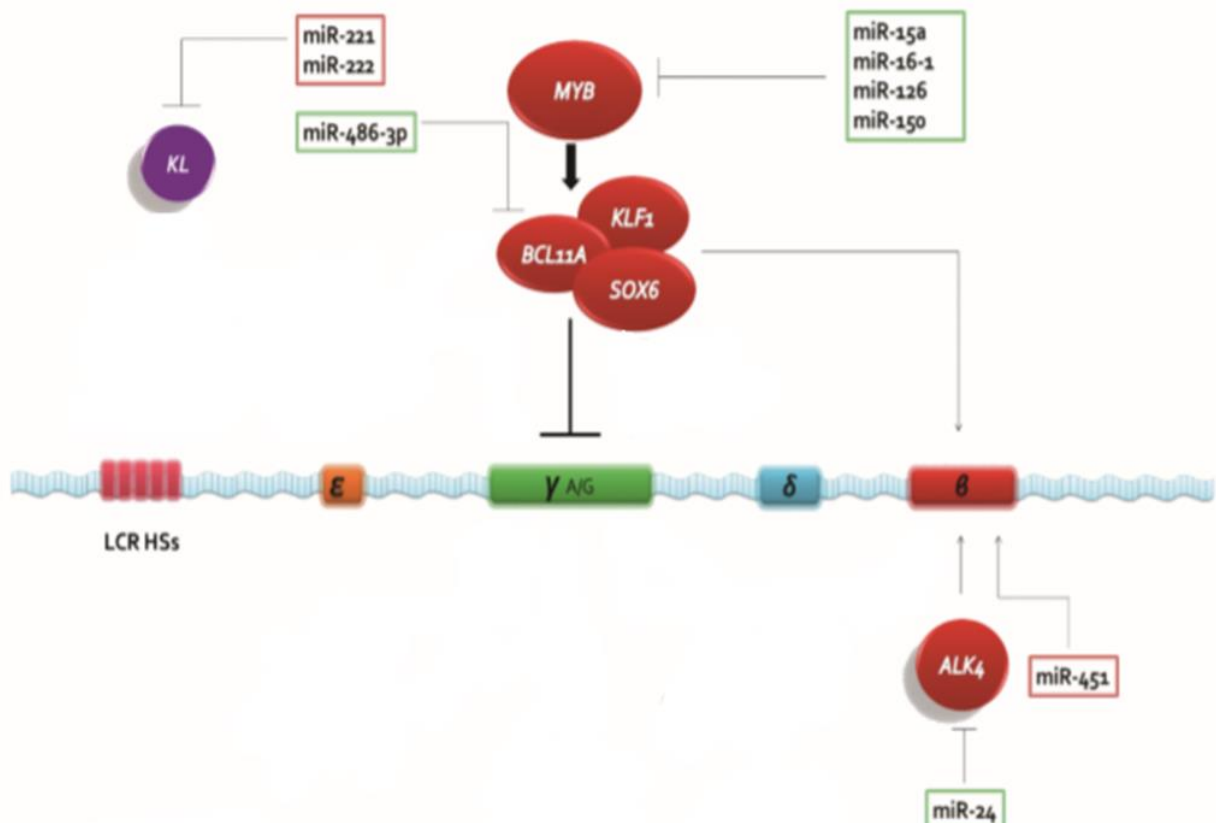
εμβρυϊκής α-σφαιρίνης σφαιρίνης στα θηλαστικά (Basu, Lung *et al.*, 2007). Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η απλοανεπάρκεια του KLF1 βρέθηκε να προκαλεί κληρονομική επιμονή (hereditary persistence) της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HPFH) μέσω μειωμένης έκφρασης της BCL11A (Borg, Papadopoulos *et al.*, 2010). Δεν είναι σαφές εάν το miR-144 διαδραματίζει παρόμοιο ρόλο στη ρύθμιση της σύνθεσης της σφαιρίνης των θηλαστικών, καθώς οι βλάβες στους τύπους σφαιρίνης δεν σχολιάστηκαν στις μελέτες έκφρασης των miR-144/451 - / - σε ποντίκια (Byon & Papayannopoulou, 2012; Saki *et al.*, 2016).

Αν και η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF) αντιπροσωπεύει μια μειοψηφία της ολικής αιμοσφαιρίνης που βρίσκεται σε ενήλικα κύτταρα, η έκφραση της HbF μπορεί να προκληθεί από μια ποικιλία χημικών ενώσεων (Stamatoyannopoulos, 2005). Στην πραγματικότητα, η υδροξουρία χρησιμοποιείται συχνά σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία για την αύξηση των επιπέδων της HbF, προκειμένου να βελτιωθούν τα επιβλαβή αποτελέσματα της ασταθούς μεταλλαγμένης αιμοσφαιρίνης των ενηλίκων (HbS). Εκτός από τις συνθετικές ενώσεις, ένας ενδογενής κιτ-προσδέτης (kit-ligand), ο οποίος ως κυτοκίνη προάγει την διαφοροποίηση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει την σύνθεση HbF (Gabbianelli, Testa *et al.*, 2003). Ο kit-ligand μπορεί να επάγει έκφραση HbF σε κύτταρα CD34 + αίματος του ομφάλιου λώρου (CB) που αναπτύσσονται υπό συνθήκες διαφοροποίησης ερυθροκυττάρων (Gabbianelli, Testa *et al.*, 2010). Η παρεμπόδιση της σηματοδότησης του κιτ-προσδέτη από τον αναστολέα κινάσης τυροσίνης Imatinib καταργεί τις επιδράσεις του κιτ-προσδέτη στην επανενεργοποίηση της έκφρασης της HbF. Προηγουμένως, η ίδια ομάδα είχε δείξει ότι το miR-221/222 ρυθμίζει την διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων μέσω της επίδρασης του στον υποδοχέα kit (Felli, Fontana *et al.*, 2005). Επομένως, ήταν πολύ ενδιαφέρον να δούμε αν η τροποποίηση (μέσω του miR-221/222) της έκφρασης του κιτ-υποδοχέα επηρεάζει επίσης την έκφραση της HbF. Η υπερέκφραση του miR-221/222 στα CB CD34 + κύτταρα εξασθενεί την διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων, τον πολλαπλασιασμό, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και τη σύνθεση της HbF (Gabbianelli, Testa *et al.*, 2010). Η προσθήκη περίσσειας ενός εξωγενούς κιτ-προσδέτη δεν μπόρεσε να ξεπεράσει τα αποτελέσματα της έκφρασης του miR-221/222.

Η τρισωμία 13 είναι ένα από τα σπάνια, βιώσιμα σύνδρομα ανευπλοειδίας του ανθρώπου και συνδέεται με καθυστερημένη μεταγωγή αιμοσφαιρίνης από εμβρυϊκή σε ενήλικη και επίμονα-ετεροχρονισμένα αυξημένα επίπεδα εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF) σε ορισμένες περιπτώσεις. Ανάλυση 4 περιπτώσεων μερικής τρισωμίας 13 με αυξημένη έκφραση HbF και λεπτομερή δεδομένα κυτταρογενετικής χαρτογράφησης, αποκάλυψε μια συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων HbF και της χρωμοσωματικής ζώνης 13q14 (Sankaran, Menne *et al.*, 2011). Σε μια αναζήτηση για υποψήφια γονίδια σε αυτή τη θέση, το πρόδρομο RNA για το miR-15a και το miR-16-1 ήταν ο κορυφαίος υποψήφιος. Η έκτοπη έκφραση των miR-15a και miR-16-1 σε προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα ενηλίκων ανθρώπων σε επίπεδα που παρατηρούνται στην τρισωμία 13 οδηγεί σε αύξηση κατά 50% της έκφρασης

της γ-σφαιρίνης. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα κύτταρα που υπερεκφράζουν τα miR-15a και miR-16-1 παρουσίασαν επιβράδυνση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου μόνο στο στάδιο των κυττάρων CFU-E / προ-ερυθροβλάστης. Για άλλη μια φορά, το γονίδιο MYB βρέθηκε να είναι ο λειτουργικός παράγων που επηρεάζει τα miR-15a και miR-16-1 στη ρύθμιση της έκφρασης της αιμοσφαιρίνης. Περαιτέρω μελέτες σχετικά με τη ρύθμιση των miR-15a και miR-16-1 μπορεί να οδηγήσουν σε νέες θεραπείες για την αύξηση των επιπέδων HbF σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία ή β-θαλασσαιμία, όπου ακόμη και μέτριες αυξήσεις στα επίπεδα HbF μπορεί να έχουν σημαντικό κλινικό αντίκτυπο (Byon & Parayannopoulou, 2012).

Αυτές οι μελέτες αποκαλύπτουν ένα άλλο ρυθμιστικό επίπεδο στο ήδη πολύπλοκο πεδίο έκφρασης γονιδίων της αιμοσφαιρίνης. Αν και η ρύθμιση μέσω cis-ενεργοποιητικών παραγόντων είναι ο πιο άμεσος τρόπος με τον οποίο τα miRNAs μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση της σφαιρίνης, οι trans παράγοντες που τροποποιούν την αρχιτεκτονική χρωματίνης όπως οι BCL11A, SWI / SNF και CTCF, είναι απαραίτητοι για την κατάλληλη έκφραση της σφαιρίνης. Ειδικότερα, η BCL11A έχει λάβει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς φαίνεται ότι είναι ένας καταστολέας έκφρασης της HbF (Sankaran, Menne *et al.*, 2008). Παραμένει να δούμε εάν τα miRNAs ρυθμίζουν επίσης την έκφραση ή τη δραστηριότητα των trans παραγόντων ενεργοποίησης (Byon & Parayannopoulou, 2012).



Εικόνα 22. Διάταξη γονιδίων β-σφαιρίνης στο χρωμόσωμα 11 και τα διαφορετικά miRNA που επιδρούν στην έκφρασή τους (Τροποποιημένο από Saki *et al.*, 2015)

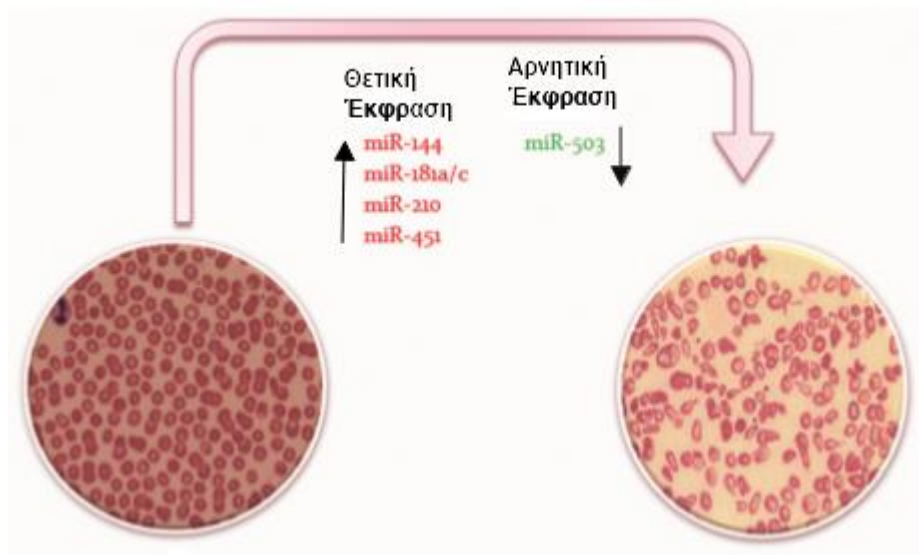
Γ.5 ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ microRNA ΣΤΗ Β-ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ

Η θαλασσαιμία είναι μια κληρονομική διαταραχή του αίματος που προκαλείται από περισσότερες από 200 αυτοσωμικές μεταλλάξεις σε γονίδια σφαιρίνης με αποτέλεσμα την αποτυχία παραγωγής φυσιολογικών αλυσίδων σφαιρίνης. Παρουσιάζει διαφορετικούς φαινότυπους ανάλογα της σοβαρότητας της αναιμίας και των κλινικών επιπλοκών (Khanahmad *et al.*, 2006; Saki *et al.*, 2016). Οι α και β-θαλασσαιμίες που προκύπτουν από διαφορετικές μεταλλάξεις στα γονίδια α και β σφαιρίνης αντίστοιχα, οδηγούν σε χρόνια αναιμία και αναποτελεσματική ερυθροποίηση στους ασθενείς (Dehgani-Fard, Kaviani, Saki & Mortaz, 2012). Στη β-θαλασσαιμία, η περίσσεια α αλυσίδων συσσωρεύεται στα ερυθροκύτταρα εξαιτίας της ανεπαρκούς έκφρασης των β αλυσίδων σφαιρίνης, προκαλώντας αιμόλυση και αναποτελεσματική αιμοποίηση. Οι επαναλαμβανόμενες μεταγγίσεις αίματος και η σύνθεση HbF είναι δύο μέθοδοι για την επίτευξη των θεραπευτικών στόχων σε αυτούς τους ασθενείς (Atweh & Schechter, 2001). Δεδομένου ότι τα miRNA εμπλέκονται στην έκφραση των γονιδίων σφαιρίνης (εικόνα 23) και επίσης ρυθμίζουν μεταγραφικά πολλά γονίδια της ερυθροποίησης, για παράδειγμα αναφέραμε τον μεταγραφικό παράγοντα Kruppel-like transcription factor D (KLFD), μπορεί να θεωρηθεί ότι οι αλλαγές στην έκφραση αυτών των μικρών RNAs είναι αποτελεσματικές στη μείωση των κλινικών επιπλοκών σε ασθενείς με θαλασσαιμία (Saki *et al.*, 2016). Η συσσώρευση των αλυσίδων σφαιρίνης καταστρέφει την μεμβράνη των ερυθροκυττάρων στα θαλασσαιμικά κύτταρα. Τα περισσότερα miRNA που αναστέλλουν την έκφραση των α γονιδίων, βελτιώνουν την αιμολυτική αναιμία.

Το miR-144 ως ερυθροειδικό-miRNA, εμποδίζει τη λύση των κυττάρων με άμεση στόχευση του ειδικού για την ερυθροποίηση παράγοντα KLFD (Fu, Du *et al.*, 2009). Ο KLFD, αλληλεπιδρώντας με τις περιοχές με αλληλουχία CACCC στο miR-144 και τον υποκινητή των γονιδίων α σφαιρίνης, δρα ως συν-ρυθμιστής και των δύο γονιδίων (*ibid.*, 2009). Έχει αποδειχθεί ότι το επίπεδο έκφρασης του miR-144 ελέγχει αρνητικά την έκφραση των γονιδίων α / β σφαιρίνης σε παιδιά με μείζονα β-θαλασσαιμία. Αυτή η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης παρέχει την πρωταρχική βάση της κύριας θεραπείας της β-θαλασσαιμίας, στην οποία η πρόληψη της συσσώρευσης της υπερβολικής α-σφαιρίνης μπορεί να μειώσει τις κλινικές επιπλοκές στους ασθενείς (Wu, Xue & Dang, 2010).

Το miR-150 είναι ένας άλλος υποψήφιος παράγοντας για την καταστολή της έκφρασης των γονιδίων της α σφαιρίνης. Αυτό το miR έχει διάφορους ρόλους σε τύπους ερυθροκυττάρων, λεμφοκυττάρων και μεγακαρυοκυττάρων. Αν και έχει μειωμένη έκφραση κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης, παρουσιάζει πολύ χαμηλότερες ποσότητες στην Ερυθραιμία (Αληθή Πολυκυτταραιμία). Ο έλεγχος της τύχης των προγονικών σειρών των ερυθροκυττάρων, καθώς και η

καταστολή της έκφρασης των γονιδίων της α σφαιρίνης είναι άλλες λειτουργίες αυτού του miR μαζί με το να στοχεύει τον μεταγραφικό παράγοντα MYB όπως περιγράφηκε και πριν στο υποκεφάλαιο Γ.1.4.



Εικόνα 23. Απορρύθμιση της έκφρασης των miRNA ανάμεσα σε φυσιολογικά ερυθροκύτταρα (αριστερά) και σε κύτταρα με β -θαλασσαιμία (δεξιά) (Τροποποιημένο από Saki *et al.*, 2015)

Η χρόνια αναιμία, ο πιο σημαντικός παράγοντας στην επαγωγή της υποξίας, προκαλεί υπερέκφραση των υποξικά εξαρτώμενων miRs γνωστών ως **hypoxamirs** σε ασθενείς με θαλασσαιμία (Saki *et al.*, 2016; Sarakul, Vattaniboon, Tanaka, Fucharoen, Abe, Svasti & Umemura, 2013).

Το miR-210, ως hypoxamiR, αυξάνεται στα φυσιολογικά προγονικά ερυθροκύτταρα και σε κύτταρα με β -θαλασσαιμία / HbE και ενισχύει επίσης τον παράγοντα GATA1, τον Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) και την ερυθροειδική ισομορφή των ρυθμιστικών παραγόντων της ALAS2 κατά την ερυθροποίηση που συμβαίνει σε συνθήκες υποξίας (Sarakul *et al.*, 2013). Αυτό το miR επηρεάζει επίσης την έκφραση του υποδοχέα τρανσφερίνης (CD71) και της γλυκοφορίνης A (GPA, CD235a) κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των ερυθροκυττάρων, αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα α και γ σφαιρίνης τα οποία ακολουθούνται από αυξημένα επίπεδα HbF (ibid, 2013). Η παραγωγή υψηλών επιπέδων HbF, ως αποτέλεσμα αλλαγής της γονιδιακής έκφρασης της σφαιρίνης, αποτελεί θεραπευτική προσέγγιση σε ασθενείς με αιμοσφαιρινοπάθεια.

Μειωμένη έκφραση του miR-503 που ρυθμίζει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση, βρέθηκε σε κύτταρα με μεταλλάξεις β -θαλασσαιμίας (Roy, Bhattacharya, Lahiri, Dasgupta, Banerjee, Chandra & Das, 2012). Το γονίδιο CDC25A αποτελεί στόχο για αυτό το miR και εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο και στις αποκρίσεις σε περίπτωση βλάβης του DNA. Τα θαλασσαιμικά

κύτταρα παρουσιάζουν υπέρ-έκφραση κατά 1000 φορές του CDC25A λόγω χαμηλών επιπέδων αυτού του miR, γεγονός που αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την αναποτελεσματική αιμοποίηση που εμφανίζεται σε τέτοιους ασθενείς (ibid, 2012). Η επαγωγή των miR-503, miR-322 / 424 ή άλλων παραγόντων που εξαρτώνται από την υποξία όπως το miR-21 και ο εξαρτώμενος από την κυκλίνη αναστολέας κινάσης p21, καταστέλλουν την CDC25A και εμποδίζουν την ανάπτυξη σε προγονικά θαλασσαιμικά κύτταρα και καρκινικά κύτταρα αντίστοιχα (ibid, 2012; De Oliveira, Zhang, Wang & Lazo, 2009).

Ένα άλλο ερυθροειδικό miRNA, το miR-451, προκαλεί διαφοροποίηση ερυθροκυττάρων σε κύτταρα CD133+ και επίσης κατά τη διάρκεια της ερυθροποίησης, εμφανίζει πλεονάζουσα έκφραση (Zhan, Miller, Papayannopoulou, Stamatoyannopoulos & Song, 2007). Ωστόσο, στα κύτταρα β-θαλασσαιμίας / HbE, το miR-451 είναι σημαντικά υπερεκφρασμένο και σχετίζεται με την αναποτελεσματική αιματοποίηση, τη χρόνια αιμολυτική αναιμία και τη γενικότερη σοβαρότητα της θαλασσαιμίας. Η υπερέκφραση του miR-451 σχετίζεται με τη μείωση των επιπέδων των μεταγραφών της αλυσίδας σφαιρίνης, της γλυκοφορίνης-A και του GATA-1 και παρατηρείται επίσης σε θαλασσαιμικά κύτταρα που έχουν χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης και περισσότερα δικτυοερυθροκύτταρα. Η υπέρ-έκφραση του miR-451 είναι πιο αποτελεσματική στην αύξηση της έκφρασης των γονιδίων α και β σφαιρίνης από την γ-σφαιρίνη (Zhan et al., 2007; Saki et al, 2016). Η αυξημένη έκφραση αυτού του miR είναι επίσης παρούσα σε άλλες αιμοσφαιρινοπάθειες και στην πολυκυτταραιμία, όπου η ερυθροποίηση λαμβάνει χώρα σε υψηλότερο επίπεδο (Chen, Wang, Telen & Chi, 2008; Schaeffer, West, Conine & Lowrey, 2014).

Συνολικά, σύμφωνα με τη σημασία που έχουν τα miRNA στην έκφραση των γονιδίων σφαιρίνης, η επανενεργοποίηση αυτών των γονιδίων, η οποία μπορεί να αλλάξει την κατάσταση των θαλασσαιμικών κυττάρων και να βελτιώσει την παθοφυσιολογία και τα κλινικά συμπτώματα αιμοσφαιρινοπάθειας, θα καθιστούσε δυνατή τη χρήση αυτών των μικρών μη κωδικοποιούντων RNA ως νέους θεραπευτικούς στόχους.

Γ.6 ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΕΠΙΛΟΓΟΣ

- Τα microRNA είναι μικρά μη κωδικοποιητικά RNA που ρυθμίζουν αρνητικά την γονιδιακή έκφραση μέσω αποικοδόμησης mRNA ή μεταφραστικής καταστολής. Αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ότι τα miRNA διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε όλες σχεδόν τις κυτταρικές διεργασίες, ιδιαίτερα κατά την ανάπτυξη. Η λειτουργία των miRNA στην αιμοποίηση, συμπεριλαμβανομένης της ερυθροποίησης, αρχίζει να διασαφηνίζεται.
- Παρά τα σημερινά οφέλη της γνώσης σχετικά με τη βιολογία του miRNA στην ερυθροποίηση και τη φυσιολογία των ερυθροκυττάρων, η κατανόησή μας παραμένει περιορισμένη. Ένα σημαντικό κενό είναι μια εκτεταμένη

ανάλυση της έκφρασης του miRNA κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων σταδίων της ερυθροποίησης, τόσο στον άνθρωπο όσο και σε άλλους ζωικούς οργανισμούς. Ιδανικά, αυτό θα πραγματοποιείται σε πληθυσμούς υψηλής καθαρότητας σε πρόσφατα απομονωμένα πρωτογενή δείγματα, αντί να βασίζονται σε καλλιεργημένα κύτταρα. Η έλευση της τεχνολογίας του προσδιορισμού της αλληλουχίας των RNA (sequencing) θα πρέπει να βελτιώσει σημαντικά την ικανότητά μας να μετρήσουμε την έκφραση των miRNA, καθώς αυτή η τεχνική μπορεί να συλλάβει τις επιδράσεις της επεξεργασίας RNA, η οποία είναι πέρα από τις τρέχουσες προσεγγίσεις με μικροσυστοιχίες και PCR.

- Ένα σημαντικό εμπόδιο που πλήττει το πεδίο μελέτης των miRNA γενικά, είναι ο εντοπισμός του mRNA στόχου. Επί του παρόντος, υπάρχει μεγάλη εξάρτηση από τη χρήση αλγόριθμων πρόβλεψης και από τις βάσεις δεδομένων για την επιλογή δυνητικών στόχων που ακολουθούνται από την εκτέλεση πολλαπλών διαφορετικών προσδιορισμών για την επικύρωση ενός μόνο στόχου. Αυτή η διαδικασία μπορεί να είναι αρκετά επίπονη και χρονοβόρα καθώς οι αρκετοί πιθανοί στόχοι πρέπει να εξεταστούν πειραματικά πριν να βρεθεί ένα επικυρωμένο θετικό αποτέλεσμα.
- Ένας άλλος τομέας που αξίζει πρόσθετη μελέτη είναι η ρύθμιση της έκφρασης του miRNA. Αυτό δεν περιλαμβάνει μόνο την ταυτοποίηση των cis- και trans- ρυθμιστικών παραγόντων που επάγουν ή καταστέλλουν την έκφραση του miRNA, αλλά επίσης και τον τρόπο με τον οποίο ρυθμίζεται η αποικοδόμηση του miRNA.

Αυτό έχει άμεση σχέση με την ερυθροποίηση, καθώς η μελέτη των Zhang *et al.* (2011), αναφέρει ότι τα επίπεδα έκφρασης του miRNA σε παγκόσμια κλίμακα μειώνονται με την ωρίμανση των ερυθροκυττάρων. Αυτό οφείλεται σε μειωμένη έκφραση ή λειτουργία της καταλυτικής δραστηριότητας του μηχανισμού βιογένεσης του miRNA, ή θα μπορούσε να υπάρξει και θετική ρύθμιση των γονιδίων που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση του miRNA; Εναλλακτικά, είναι αυτό ένα φαινόμενο που αντανακλά την θετική ρύθμιση των γονιδίων που συμμετέχουν στην ερυθροποίηση;

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΚΥΡΙΕΣ ΠΗΓΕΣ

Byon, J. C., & Papayannopoulou, T. (2012). MicroRNAs: Allies or foes in erythropoiesis?. *Journal of cellular physiology*, 227(1), 7–13. doi:10.1002/jcp.22729

Zhao, G., Yu, D., Weiss, M. (2010). MicroRNAs in erythropoiesis. *Current opinion in hematology*. 17. 155-62. DOI: 10.1097/MOH.0b013e328337ba6c.

Riffo-Campos, Á. L., Riquelme, I., & Brebi-Mieville, P. (2016). Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose?. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 1987. doi:10.3390/ijms17121987

Saki, N., Abroun, S., Soleimani, M., Kavianpour, M., Shahjahani, M., Mohammadi-Asl, J., & Hajizamani, S. (2016). MicroRNA Expression in β -Thalassemia and Sickle Cell Disease: A Role in The Induction of Fetal Hemoglobin. *Cell journal*, 17(4), 583–592. doi:10.22074/cellj.2016.3808

Byon, J. C., & Papayannopoulou, T. (2012). MicroRNAs: Allies or foes in erythropoiesis?. *Journal of cellular physiology*, 227(1), 7–13. doi:10.1002/jcp.22729

Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116, 281-297. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5

A

Abdelhaleem, M.; Maltais, L.; Wain, H. The human DDX and DHX gene families of putative RNA helicases. *Genomics*, 2003, 81, 618-622.

Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, 431, 350-355.

Ambros, V., & Bartel, B., & Bartel, D., & Burge, C., & Carrington, J., & Chen, X., & Dreyfuss, G., & Eddy, S., & Griffiths-Jones, S., & Marshall, M., & Matzke, M., & Ruvkun, G., & Tuschl, T. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA (New York, N.Y.)*. 9. 277-9. 10.1261/rna.2183803.

Anantharaman, V.; Koonin, E. V.; Aravind, L. Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30, 1427-1464.

Atweh GF, Schechter AN. Pharmacologic induction of fetal hemoglobin: raising the therapeutic bar in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol*. 2001; 8(2): 123-130. DOI: 10.1097/00062752-200103000-00010

B

Anderson, P.; Kedersha, N. RNA granules. *J. Cell Biol.*, 2006, 172, 803-808.

Bandres, E., Bitarte, N., Arias, F., Agorreta, J., Fortes, P., Agirre, X., Zarate, R., Diaz-Gonzalez, J.A., Ramirez, N., Sola, J.J., Jimenez, P., Rodriguez, J., Garcia-Foncillas, J. microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2009; 15:2281 –2290. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1818

Barroga, C.F., Pham, H., Kaushansky, K. Thrombopoietin regulates c-Myb expression by modulating micro RNA 150 expression. *Exp Hematol* 2008; 36:1585–1592. doi: 10.1016/j.exphem.2008.07.001

Baur-Melnyk, A., *Magnetic Resonance Imaging of the Bone Marrow*. 2012: Springer Berlin Heidelberg

Baur-Melnyk, A., *Magnetic Resonance Imaging of the Bone Marrow*. 2012: Springer Berlin Heidelberg

Berezikov, E.; Chung, W. J.; Willis, J.; Cuppen, E.; Lai, E. C. Mammalian mirtron genes. *Mol. Cell*, 2007, 28, 328-336.

Bhattacharyya, S. N.; Habermacher, R.; Martine, U.; Closs, E. I.; Filipowicz, W. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*, 2006, 125, 1111-1124.

Bianchi, N., Zuccato, C., Lampronti, I., Borgatti, M., Gambari, R. Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of gamma-globin gene expression. *BMB Rep*. 2009 Aug 31;42(8):493-9. DOI: 10.5483/bmbrep.2009.42.8.493

Borchert, G. M.; Lanier, W.; Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2006, 13, 1097-1101.

Bruchova, H., Merkerova, M., Prchal, J.T. Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. *Haematologica*. 2008 Jul;93(7):1009-16. doi: 10.3324/haematol.12706. Epub 2008 May 27. DOI: 10.3324/haematol.12706

Bruchova, H., Yoon, D., Agarwal, A. M., Mendell, J., & Prchal, J. T. (2007). Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. *Experimental hematology*, 35(11), 1657–1667. doi:10.1016/j.exphem.2007.08.021

C

Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., Croce, C.M. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:15524–15529. DOI: 10.1073/pnas.242606799

Cardinali, B., Castellani, L., Fasanaro, P., Basso, A., Alemà, S., Martelli, F., & Falcone, G. (2009). MicroRNA-221 and microRNA-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells. *PloS one*, 4(10), e7607. doi:10.1371/journal.pone.0007607

Chen SY, Wang Y, Telen MJ, Chi JT (2008) The Genomic Analysis of Erythrocyte microRNA Expression in Sickle Cell Diseases. *PLOS ONE* 3(6): e2360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002360>

Choong ML, Yang HH, McNiece I. MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. *Exp Hematol* 2007; 35:551–564. DOI: 10.1016/j.exphem.2006.12.002

Chu, C. Y.; Rana, T. M. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol.*, 2006, 4, e210.

Cifuentes, D.; Xue, H.; Taylor, D. W.; Patnode, H.; Mishima, Y.; Cheloufi, S.; Ma, E.; Mane, S.; Hannon, G. J.; Lawson, N. D.; Wolfe, S. A.; Giraldez, A. J. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science*, 2010, 328, 1694-1698.

Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., Croce, C.M.. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:13944–13949. DOI: 10.1073/pnas.0506654102

Coller, J.; Parker, R. General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell*, 2005, 122, 875-886.

Cramer, P. Structure and function of RNA polymerase II. *Adv. Protein Chem.*, 2004, 67, 1-42.

Cullen, B. R. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol. Cell*, 2004, 16, 861-865.

D

Daher, A.; Longuet, M.; Dorin, D.; Bois, F.; Segéral, E.; Bannwarth, S.; Battisti, P. L.; Purcell, D. F.; Benarous, R.; Vaquero, C.; Meurs, E. F.; Gatignol, A. Two dimerization domains in the trans-activation response RNA-binding protein (TRBP) individually reverse the protein kinase R inhibition of HIV-1 long terminal repeat expression. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 33899-33905.

Davis, B. N.; Hilyard, A. C.; Nguyen, P. H.; Lagna, G.; Hata, A. Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol. Cell*, 2010, 39, 373-384.

Dehghani Fard A, Kaviani S, Saki N, Mortaz E. The emerging role of immunomodulatory agents in fetal hemoglobin induction. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2012; 6(4): 35-36. Retrieved from <http://ijhoscr.tums.ac.ir/index.php/ijhoscr/article/view/361>

de Oliveira PE, Zhang L, Wang Z, Lazo JS. Hypoxia-mediated regulation of Cdc25A phosphatase by p21 and miR21. *Cell Cycle.* 2009; 8(19): 3157-3164. DOI: 10.4161/cc.8.19.9704

Diederichs, S.; Haber, D. A. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*, 2007, 131, 1097-1108.

Doench, J. G.; Petersen, C. P.; Sharp, P. A. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*, 2003, 17, 438-442.

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

Dore, L.C., Amigo, J.D., Dos Santos, C.O., Zhang, Z., Gai, X., Tobias, J.W., Klein, A.M., Dorman, C., Wu, W., Hardison, R.C., Paw, B.H., Weiss, M.J. A GATA-1-

regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:3333–3338. DOI: 10.1073/pnas.0712312105

E

Enright, A. J.; John, B.; Gaul, U.; Tuschl, T.; Sander, C.; Marks, D. S. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.*, 2003, 5, R1.

Eystathioy, T., & Jakymiw, A., & Chan, E., & Séraphin, B., & Cougot, N., & Fritzler, M. (2003). The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA* 9: 1171-1173. *RNA* (New York, N.Y.). 9. 1171-3. Doi: 10.1261/rna.5810203.

F

Fazi, F., Racanicchi, S., Zardo, G., Starnes, L.M., Travaglini, L., Diverio, D., Ammatuna, E., Cimino, G., Lo-Coco, F., Grignani, F., Nervi, C. Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell* 2007; 12:457–466. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.09.020

Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., ... Peschle, C. (2005). MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18081–18086. doi:10.1073/pnas.0506216102

Fiedler, S. D.; Carletti, M. Z.; Hong, X.; Christenson, L. K. Hormonal regulation of microRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 2008, 79(6), 1030-7.

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

Fischer, N.; Weis, K. The DEAD box protein Dhh1 stimulates the decapping enzyme Dcp1. *EMBO J.*, 2002, 21, 2788-2797.

Friedemann, J.; Grosse, F.; Zhang, S. Nuclear DNA helicase II (RNA helicase A) interacts with Werner syndrome helicase and stimulates its exonuclease activity. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 31303-31313.

Fu, Du et al., 2009 ; Mir-144 selectively regulates embryonic α -hemoglobin synthesis during primitive erythropoiesis. *Blood* 2009; 113 (6): 1340–1349. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-174854>

G

Gabianelli, M., Testa, U., Massa., Morsilli, O., Saulle, E., Sposi, N.M., Petrucci, E., Mariani, G., Peschle, C. HbF reactivation in sibling BFU-E colonies: synergistic interaction of kit ligand with low-dose dexamethasone. *Blood* 2003; 101 (7): 2826–2832. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1477>

Gabbianelli, M., Testa, U., Morsilli, O., Pelosi, E., Saulle, E., Petrucci, E., Peschle, C. (2010). Mechanism of human Hb switching: a possible role of the kit receptor/miR 221-222 complex. *Haematologica*, 95(8), 1253–1260. doi:10.3324/haematol.2009.018259

Garzon, R.; Pichiorri, F.; Palumbo, T.; Iuliano, R.; Cimmino, A.; Aqeilan, R.; Volinia, S.; Bhatt, D.; Alder, H.; Marcucci, G.; Calin, G. A.; Liu, C. G.; Bloomfield, C. D.; Andreeff, M.; Croce, C. M. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103, 5078-5083.

Georgantas, R. W., 3rd, Hildreth, R., Morisot, S., Alder, J., Liu, C. G., Heimfeld, S., Calin, G., Croce, C., Civin, C. I. (2007). CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8), 2750–2755. doi:10.1073/pnas.0610983104

GOLDSBY, A.R., J.T. KINDT, and A.B. OSBORNE, IMMUNOLOGY KUBY. 2003: BROKEN HILL PUBLISHERS LTD

Gregory, R. I.; Chendrimada, T. P.; Cooch, N.; Shiekhattar, R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 2005, 123, 631-640.

Gregory, R. I.; Shiekhattar, R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res.*, 2005, 65, 3509-3512.

Griffiths-Jones, S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol. Biol.*, 2006, 342, 129-138.

Griffiths-Jones, S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32, D109-111.

Griffiths-Jones, S.; Saini, H. K.; van Dongen, S.; Enright, A. J. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.*, 2008, 36, D154-158.

Gu, T. J.; Yi, X.; Zhao, X. W.; Zhao, Y.; Yin, J. Q. Alu-directed transcriptional regulation of some novel miRNAs. *BMC Genomics*, 2009, 10, 563.

H

Haase, A. D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Lainé, S., Sack, R., Gagnon, A., & Filipowicz, W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO reports*, 6(10), 961–967. doi:10.1038/sj.embor.7400509

Hernando, E. microRNAs and cancer: role in tumorigenesis, patient classification and therapy. *Clin. Transl. Oncol.*, 2007, 9, 155-160.

Hess, J.; Perez-Stable, C.; Wu, G. J.; Weir, B.; Tinoco, I., Jr. Shen, C. K. End-to-end transcription of an Alu family repeat. A new type of polymerase-III-dependent terminator and its evolutionary implication. *J. Mol. Biol.*, 1985, 184, 7-21.

J

Jakymiw, A.; Lian, S.; Eystathioy, T.; Li, S.; Satoh, M.; Hamel, J. C.; Fritzler, M. J.; Chan, E. K. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat. Cell Biol.*, 2005, 7, 1267-1274.

Johnnidis, J.B., Harris, M.H., Wheeler, R.T., Stehling-Sun, S., Lam, M.H., Kirak, O., Brummerkamp, T.R., Fleming, M.D., Camargo, F.D. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* 2008; 451:1125– 1129. doi: 10.1038/nature06607

Jopling, C., Yi, M., Lancaster, A., Lemon, S., Sarnow, P.. (2005). Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science*, Vol. 309, Issue 5740, pp. 1577-1581. DOI: 10.1126/science.1113329

K

Kassavetis, G. A.; Riggs, D. L.; Negri, R.; Nguyen, L. H.; Geiduschek, E. P. Transcription factor IIIB generates extended DNA interactions in RNA polymerase III transcription complexes on tRNA genes. *Mol. Cell Biol.*, 1989, 9, 2551-2566.

Kawamoto, H., Wada, H., and Y. Katsura, A revised scheme for developmental pathways of hematopoietic cells: the myeloid-based model. *International Immunology*, 2010. 22(2): p. 65-70

Kedersha, N. L.; Gupta, M.; Li, W.; Miller, I.; Anderson, P. RNA- binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.*, 1999, 147, 1431-1442.

Kedersha, N.; Anderson, P. Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol.*, 2007, 431, 61-81.

Khanahmad H, Noori Dalooi MR, Shokrgozar MA, Azadmanesh K, Niavarani AR, Karimi M, Rabbani B, Khalili M, Bagheri R, Maryami F, Zeinali S. A novel single step double positive double negative selection strategy for beta-globin gene replacement. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jun 23;345(1):14-20. Epub 2006 Apr 25. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.04.060

Kim, Y. K.; Kim, V. N. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.*, 2007, 26, 775-783.

Kohne E. (2011). Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Deutsches Arzteblatt international*, 108(31-32), 532–540. doi:10.3238/arztebl.2011.0532

Kong, Y. W.; Cannell, I. G.; de Moor, C. H.; Hill, K.; Garside, P. G.; Hamilton, T. L.; Meijer, H. A.; Dobbyn, H. C.; Stoneley, M.; Spriggs, K. A.; Willis, A. E.; Bushell, M. The mechanism of micro- RNA-mediated translation repression is determined by the promoter of the target gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105, 8866-8871.

L

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., & Tuschl, T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA (New York, N.Y.)*, 9(2), 175–179. doi:10.1261/rna.2146903

Lal, A., Navarro, F., Maher, C.A., Maliszewski, L.E., Yan, N., O'Day, E., Chowdhury, D., Dykxhoorn, D.M., Tsai, P., Hofmann, O., Becker, K.G., Gorospe, M., Hide, W., Lieberman, J. miR-24 inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to 'seedless' 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol Cell* 2009; 35:610–625. doi: 10.1016/j.molcel.2009.08.020

Larsson, J., Do HSCs divide asymmetrically? *Blood*, 2012. 119(11): p. 2431- 2432

Lecellier, C.H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, C., Saïb, A., Voinnet, O. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*. 2005 Apr 22;308(5721):557-60. DOI: 10.1126/science.1108784

Lee, C. G.; Hurwitz, J. A new RNA helicase isolated from HeLa cells that catalytically translocates in the 3' to 5' direction. *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 4398-4407.

Lee, R.C. F. R.; Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75, 843-854.

Lee, Y.; Ahn, C.; Han, J.; Choi, H.; Kim, J.; Yim, J.; Lee, J.; Pro- vost, P.; Radmark, O.; Kim, S.; Kim, V. N. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003, 425, 415- 419.

Lee, Y.; Kim, M.; Han, J.; Yeom, K. H.; Lee, S.; Baek, S. H.; Kim, V. N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.*, 2004, 23, 4051-4060.

Liu, J.; Carmell, M. A.; Rivas, F. V.; Marsden, C. G.; Thomson, J. M.; Song, J. J.; Hammond, S. M.; Joshua-Tor, L.; Hannon, G. J. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 2004, 305, 1437-1441.

Liu, J.; Rivas, F. V.; Wohlschlegel, J.; Yates, J. R., 3rd; Parker, R.; Hannon, G. J. A role for the P-body component GW182 in mi- croRNA function. *Nat. Cell Biol.*, 2005, 7, 1261-1266.

Liu, W.; Mao, S. Y.; Zhu, W. Y. Impact of tiny miRNAs on can- cers. *World J. Gastroenterol.*, 2007, 13, 497-502.

Lu, J., Guo, S., Ebert, B.L., Zhang, H., Peng, X., Bosco, J., Pretz, J., Schlanger, R., Wang, J.Y., Mak, R.H., Dombkowski, D.M., Preffer, F.I., Scadden, D.T., Golub, T.R. MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Dev Cell* 2008; 14:843–853. doi: 10.1016/j.devcel.2008.03.012

Lund, E.; Dahlberg, J. E. Substrate Selectivity of Exportin 5 and Dicer in the Biogenesis of MicroRNAs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 2006, 71, 59-66.

M

Macrae, I. J.; Ma, E.; Zhou, M.; Robinson, C. V.; Doudna, J. A. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105(2), 512-7.

Maniataki, E.; Mourelatos, Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev.*, 2005, 19, 2979-2990.

McPherson, R.A. and M.R. Pincus, *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods E-Book*. 2011: Elsevier Health Sciences

Melo, S. A.; Roper, S.; Moutinho, C.; Aaltonen, L. A.; Yamamoto, H.; Calin, G. A.; Rossi, S.; Fernandez, A. F.; Carneiro, F.; Oliveira, C.; Ferreira, B.; Liu, C. G.; Esteller, M. (2016). Retraction: A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nature genetics*, 48(2), 221. doi:10.1038/ng0216-221

Merkerova M, Belickova M, Bruchova H. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur J Haematol* 2008; 81:304–310. doi:10.1111/j.1600-0609.2008.01111.x

Mikkola, H.K., Klintman, J., Yang, H., Hock, H., Schlaeger, T.M., Fujiwara, Y., Orkin, S.H.. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* 2003; 421:547–551. DOI: 10.1038/nature01345

Monticelli, S.; Ansel, K. M.; Xiao, C.; Socci, N. D.; Krichevsky, A. M.; Thai, T. H.; Rajewsky, N.; Marks, D. S.; Sander, C.; Rajewsky, K.; Rao, A.; Kosik, K. S. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol.*, 2005, 6, R71.

Munugalavadla, V., Dore, L. C., Tan, B. L., Hong, L., Vishnu, M., Weiss, M. J., & Kapur, R. (2005). Repression of c-kit and its downstream substrates by GATA-1 inhibits cell proliferation during erythroid maturation. *Molecular and cellular biology*, 25(15), 6747–6759. doi:10.1128/MCB.25.15.6747-6759.2005

Muta, K., Krantz, S.B., Bondurant, M.C., Dai, C.H. (1995). Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood*. 1995 Jul 15;86(2):572-80. Accessed on 9/10/2019 through

[## N](https://watermark.silverchair.com/572.pdf?token=AECAH2088E490oant9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAA4UwggOBgkqkhiG9w0BwagggNyMIIDbgIBADCCA2cGCSqGSilc3DOEHATAeBgkqkkgBZQMEAS4wEQMYdTBsNjJwJPmF-skAgEQIDOLTR4XE152FL6Zlx-7IE4y7SbvZls49L5U4ek34sGKvPAJ7AgQv5G7TY8GBP_7mwWulhD6XJmUuw5kncdSIWm5BVj_CyWccZVdenvXH3HLWAL9RPPWA6f8P1-8669noI99B_McZP3Q12Y70sSOiXWY5Ug_GZT6l8e_eX18Z_7nMl2lXaDmCTh25d37mHhVf9y-CCBooc-oND2Kex_KT4NT8Sv-I9lIPmacNQShQK4EryxiADR5qul9lGqtlzlfHF_UB0XoWFPpzbwWHOp8P2NH56zOehHD5p3Lh-vso03dl85w9WFAnZelFm4gd93h-3Bml4f3OX6FMKPGSgKwk3tQKjYysU5Yj_mswyH-ZNZkzUY3Yqf0066JDCXVusuk3NDKR1ShJnSLrIZAnGr5KEYEgkDWOzZlZVTIm_on1nrx2oL8n4dFD9r7UjYnXso0LLNeV9sS2XHuw1tB-2gjaKcSTqQd8h-7f5gKWz-QNWLHxqB_S4DNR4KGyE6DMqEvggy9Jr8sHUKFukRGwclBjg6FX-BLzAPvcVIECmifof8Bw0xwWDTCRyZihHw4f1E3m2YfPBRHLU0bxqMJu6XPlz9MgAnxVghHkJulKHV05XHGm7V0BchnTdaRwSb-5zK709p7gE08NcaghD0TevXHCkTpGvYgQxMlcM6Id9OkvPvIB48dV-TZ2kuD0nXpJes3lAMlnhNnRfRG57kU23uXVzF9Q6653FzPF_SRYm16FCS3Ml_2YnNT4Cosdn-dF8SODuzm8JqY86k02RLhCajWaa2360ZzGf9WjBslTdVkc003UjH-20HkDbigpzcSC_jp7oQWmkdASK-3AIBX5YncEil-p-C7TML-HnOOklyDpuQn9l4a8_-EylidA_Rm4dTt5Yrsu-Jola-A1ZsW7QWd0nW5BQ6HY1r5Dp-fgdWiesDSbMFTz5z8yCNSh4MnGFuHyJzoAv5yprJH_3UK50-2xCTSTW0NqYg0rb6l9vpGcajTSYNa4Vo_lExBcYVkJspqspLcN4YzJp5Sg9beBy_uDra52oG9FKqsiESHj4D</p></div><div data-bbox=)

Nelson, P. T.; Wang, W. X.; Rajeev, B. W. MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol.*, 2008, 18, 130-138.

Noh, S. J., Miller, S. H., Lee, Y. T., Goh, S. H., Marincola, F. M., Stroncek, D. F., Reed, C., Wang, W., Miller, J. L. (2009). Let-7 microRNAs are developmentally regulated in circulating human erythroid cells. *Journal of translational medicine*, 7, 98. doi:10.1186/1479-5876-7-98

O

Orazi, A., D.P. O'Malley, and D.A. Arber, *Illustrated Pathology of the Bone Marrow*. 2006: Cambridge University Press

P

Parker, R.; Sheth, U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell*, 2007, 25, 635-646.

Parker, R.; Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2004, 11, 121-127.

Pase L, Layton JE, Kloosterman WP, et al. miR-451 regulates zebrafish erythroid maturation in vivo via its target gata2. *Blood* 2009; 113:1794–1804. DOI: 10.1182/blood-2008-05-155812

Patel, R. C.; Sen, G. C. PACT, a protein activator of the interferon- induced protein kinase, PKR. *EMBO J.*, 1998, 17, 4379-4390. Garcia, M. A.; Meurs, E. F.; Esteban, M. The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie*, 2007, 89, 799-811.

Patrinos, G.P., Antonarakis, S. E. (2010) *Human Genetics: Problems and Approaches*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Patrinos, G.P., Kollia, P., Papadakis, M.N. (2005). Molecular Diagnosis of Inherited Disorders: Lessons From Hemoglobinopathies. *Human Mutation*,26:399-412

Peng, Y. and C.M. Croce, The role of MicroRNAs in human cancer. 2016. 1: p. 15004

Perron, M. P.; Provost, P. Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Front. Biosci.*, 2008, 13, 2537-2547.

Pillai, R. S. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA*, 2005, 11, 1753-1761.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Dec 13;102(50):18081-6. Epub 2005 Dec 5. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. Felli N1, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, Liuzzi F, Lulli V, Morsilli O, Santoro S, Valtieri M, Calin GA, Liu CG, Sorrentino A, Croce CM, Peschle C. Author information 1 Department of Hematology, Oncology, and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy.

Provost, P.; Dishart, D.; Doucet, J.; Frendewey, D.; Samuelsson, B.; Radmark, O. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J.*, 2002, 21, 5864-5874.

R

Rand, T. A.; Petersen, S.; Du, F.; Wang, X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 2005, 123, 621-629.

Rathjen, Tina, Nicol, Clare, McConkey, Glenn and Dalmay, Tamas(2006), Analysis of short RNAs in the malaria parasite and its red blood cell host, *FEBS Letters*, 580, doi: 10.1016/j.febslet.2006.08.063

Richter, D.; Isono, K. The mechanism of protein synthesis- initiation, elongation and termination in translation of genetic messages. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1977, 76, 83-125.

Robb, G. B.; Rana, T. M. RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol. Cell*, 2007, 26, 523-537.

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research*, 14(10A),

1902–1910. doi:10.1101/gr.2722704Ruby, J. G.; Jan, C. H.; Bartel, D. P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 2007, 448, 83-86.

Roy P, Bhattacharya G, Lahiri A, Dasgupta UB, Banerjee D, Chandra S, et al. hsa-miR-503 is downregulated in β -thalassemia major. *Acta Haematol.* 2012; 128(3): 187189. <https://doi.org/10.1159/000339492>

S

Saini, H. K., Griffiths-Jones, S., & Enright, A. J. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(45), 17719–17724. doi:10.1073/pnas.0703890104

Saki, N., Abroun, S., Soleimani, M., Kavianpour, M., Shahjahani, M., Mohammadi-Asl, J., & Hajizamani, S. (2016). MicroRNA Expression in β -Thalassemia and Sickle Cell Disease: A Role in The Induction of Fetal Hemoglobin. *Cell journal*, 17(4), 583–592. doi:10.22074/cellj.2016.3808

Sankaran, V. G., Menne, T. F., Šćepanović, D., Vergilio, J. A., Ji, P., Kim, J., ... Lodish, H. F. (2011). MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), 1519–1524. doi:10.1073/pnas.1018384108

Sankaran, V. G., Menne, T. F., Xu, J., Akie, T.E., Lettre, G., Van Handei, B., Mikkola, H.K., Hirschhorn, J.N., Cantor, A.B., Orkin, S.H. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science*. 2008 Dec 19;322(5909):1839-42. doi: 10.1126/science.1165409. Epub 2008 Dec 4.

Sarakul O, Vattanaviboon P, Tanaka Y, Fucharoen S, Abe Y, Svasti S, et al. Enhanced erythroid cell differentiation in hypoxic condition is in part contributed by miR-210. *Blood Cells Mol Dis.* 2013; 51(2): 98-103. doi: 10.1016/j.bcmd.2013.03.005.

Schaller, J., et al., *Human Blood Plasma Proteins: Structure and Function*. 2008: Wiley

Seita, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation*. Wiley interdisciplinary reviews. *Systems biology and medicine*, 2010. 2(6): p. 640-653

Sen, G. L.; Blau, H. M. Argonaute 2/RISC resides in sites of mam-alian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.*, 2005, 7, 633-636.

Sheth, U.; Parker, R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, 2003, 300, 805- 808.

Song, J. J.; Liu, J.; Tolia, N. H.; Schneiderman, J.; Smith, S. K.; Martienssen, R. A.; Hannon, G. J.; Joshua-Tor, L. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol.*, 2003, 10, 1026-1032.

Song, J. J.; Smith, S. K.; Hannon, G. J.; Joshua-Tor, L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 2004, 305, 1434-1437.

Spinello I, Quaranta MT, Pasquini L, Pelosi E, Petrucci E, Pagliuca A, Castelli, G., Mariani, G., Diverio, D., Foà, R., Testa, U., Labbaye, C.. PLZF-mediated control on c-

kit expression in CD34+ cells and early erythropoiesis. *Oncogene* 28, 2276–2288 (2009) doi:10.1038/onc.2009.87

Stamatoyannopoulos G. (2005). Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Experimental hematology*, 33(3), 259–271. doi:10.1016/j.exphem.2004.11.007

Stanczyk, J.; Pedrioli, D. M.; Brentano, F.; Sanchez-Pernaute, O.; Kolling, C.; Gay, R. E.; Detmar, M.; Gay, S. Kyburz, D. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2008, 58, 1001-1009.

Stark, A.; Brennecke, J.; Russell, R. B.; Cohen, S. M. Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS Biol.*, 2003, 1, E60.

Suzuki, M., Yamamoto, M., & Engel, J. D. (2014). Fetal globin gene repressors as drug targets for molecular therapies to treat the β -globinopathies. *Molecular and cellular biology*, 34(19), 3560–3569. doi:10.1128/MCB.00714-14

T

Teixeira, D.; Sheth, U.; Valencia-Sanchez, M. A.; Brengues, M.; Parker, R. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA*, 2005, 11, 371-382.

Thompson & Thompson, (2007). Ιατρική Γενετική. Π.Χ. Πασχαλίδης

Triboulet, R.; Chang, H. M.; Lapierre, R. J.; Gregory, R. I. Post-transcriptional control of DGCR8 expression by the Microprocessor. *RNA*, 2009, 15, 1005-1011.

Tsuchiya, S., Oku, M., Imanaka, Y., Kunimoto, R., Okuno, Y., Terasawa, K., Sato, F., Tsujimoto, G., Shimizu, K. (2009). MicroRNA-338-3p and microRNA-451 contribute to the formation of basolateral polarity in epithelial cells. *Nucleic acids research*, 37(11), 3821–3827. doi:10.1093/nar/gkp255

V

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O.. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9, 654–659 (2007) doi:10.1038/ncb1596

Valencia-Sanchez, M. A.; Liu, J.; Hannon, G. J.; Parker, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.*, 2006, 20, 515-524.

Vattem, K. M.; Staschke, K. A.; Wek, R. C. Mechanism of activation of the double-stranded-RNA-dependent protein kinase, PKR: role of dimerization and cellular localization in the stimulation of PKR phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 (eIF2). *Eur. J. Biochem.*, 2001, 268, 3674-3684.

W

Wadman, I. A., Osada, H., Grütz, G. G., Agulnick, A. D., Westphal, H., Forster, A., & Rabbitts, T. H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *The EMBO journal*, 16(11), 3145–3157. doi:10.1093/emboj/16.11.3145

Wang, Q., Huang, Z., Xue, H., Jin, C., Ju, X. L., Han, J. D., Chen, Y. G. MicroRNA miR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4. *Blood* 2008; 111:588–595. DOI: 10.1182/blood-2007-05-092718

Wang, T.; Zhang, X.; Obijuru, L.; Laser, J.; Aris, V.; Lee, P.; Mit-tal, K.; Soteropoulos, P.; Wei, J. J. A micro-RNA signature associ- ated with race, tumor size, and target gene activity in human uter- ine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 2007, 46, 336-347.

Wang, W. X.; Rajeev, B. W.; Stromberg, A. J.; Ren, N.; Tang, G.; Huang, Q.; Rigoutsos, I.; Nelson, P. T. The expression of mi- croRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amy- loid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J. Neurosci.*, 2008, 28, 1213-1223.

White, R. J.; Gottlieb, T. M.; Downes, C. S.; Jackson, S. P. Cell cycle regulation of RNA polymerase III transcription. *Mol. Cell Biol.*, 1995, 15, 6653-6662.

Wightman, B. H. I.; Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediated temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993, 75, 855-862.

Woods, K.; Thomson, J. M.; Hammond, S. M. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 2130-2134.

Woychik, N. A.; Young, R. A. RNA polymerase II: subunit struc- ture and function. *Trends Biochem. Sci.*, 1990, 15, 347-351.

X

Xue, X., Zhang, Q., Huang, Y., Feng, L., & Pan, W. (2008). No miRNA were found in Plasmodium and the ones identified in erythrocytes could not be correlated with infection. *Malaria journal*, 7, 47. doi:10.1186/1475-2875-7-47

Y

Yekta, S.; Shih, I. H.; Bartel, D. P. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, 2004, 304, 594-596.

Ying, S. Y.; Chang, C. P.; Lin, S. L. (2010). Intron-mediated RNA interfer ence, Intronic MicroRNAs, and Applications. *RNA Therapeutics*, 629, 203-235]

Yoda, M.; Kawamata, T.; Paroo, Z.; Ye, X.; Iwasaki, S.; Liu, Q.; Tomari, Y. ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2010, 17, 17-23.

Yuan, J.Y., Wang, F., Yu, J., Yang, G.H., Liu, X.L., Zhang, J.W. MicroRNA-223 reversibly regulates erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J Cell Mol Med* 2008. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00585.x

Z

Zeng, Y.; Cullen, B. R. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA*, 2003, 9, 112-123.

Zhan, M., Miller, C. P., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G., & Song, C. Z. (2007). MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation. *Experimental hematology*, 35(7), 1015–1025. doi:10.1016/j.exphem.2007.03.014

Zhang, H.; Kolb, F. A.; Brondani, V.; Billy, E.; Filipowicz, W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini with- out a requirement for ATP. *EMBO J.*, 2002, 21, 5875-5885.

Zhang, H.; Kolb, F. A.; Jaskiewicz, L.; Westhof, E.; Filipowicz, W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, 2004, 118, 57-68.

Zhang, P., Chen, J., Ren, X., Wang, X., Kranias, E., Medvedovic, M., Fan, G. MicroRNA expression profiling in the ischemic preconditioned heart: functional role of a miR-1/GATA-4/MiR-144,-451, and -762 circuit. *Circulation* 2009; 120:S736. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.08.007

Zhang, X., & Zeng, Y. (2010). The terminal loop region controls microRNA processing by Drosha and Dicer. *Nucleic acids research*, 38(21), 7689–7697. doi:10.1093/nar/gkq645

Zhao, J., Lin, W., Ma, X., Lu, Q., Ma, X., Bian, G., Jiang, L. The protein kinase Hal5p is the high-copy suppressor of lithium-sensitive mutations of genes involved in the sporulation and meiosis as well as the ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genomics*, Volume 95, Issue 5, 2010, 290-298. Doi: 10.1016/j.ygeno.2010.02.010.

Π

Παπαδήμου, Α. (2017). Μελέτη της έκφρασης miRNAs που συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης ισομορφών του αποπτωτικού γονιδίου BCL2L12 στην παιδική λευχαιμία. Αθήνα. (Διπλωματική εργασία).

Τ

Ταβιανάτου, Α. Μελέτη του ρόλου των γονιδιακών αλλαγών των γονιδίων ASS1 και NOS2A στην ανάπτυξη της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης Ελλήνων ασθενών με Β-μεσογειακή αναιμία και την ανταπόκρισή τους στην υδροξυουρία. (2015). Πάτρα. (Διπλωματική εργασία).