



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ:
«ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Προκαταρτικές μελέτες ερυθροειδικών γονιδίων και microRNAs (miRNAs) σε φυσιολογικά ανθρώπινα πρόδρομα ερυθροκύτταρα διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης με σκοπό τη θέσπιση ενός ισχυρού ex-novo μοντέλου ποσοτικοποίησης, ικανού για την μελέτη των γονιδίων και microRNAs που εμπλέκονται στα μονοπάτια των αιματολογικών παθήσεων»

Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια: Μαρία Χατζηαγαπίου

Επιβλέπουσα: κα. Jan Traeger-Συνοδινού

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής, Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής

ΑΘΗΝΑ, Νοέμβριος 2012

Ευχαριστίες

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Μοριακής και Εφαρμοσμένης Φυσιολογίας» του Εργαστηρίου Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Γενετικής κας. Jan Traeger-Συνοδινού.

Με την ευκαιρία αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής, Καθηγητή Καναβάκη Εμμανουήλ, υπό τη εποπτεία του οποίου εκπονήθηκε η παρούσα εργασία, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα την κυρία Jan Συνοδινού για την καθοδήγηση, την υποστήριξη και τις σημαντικές συμβουλές της, χάριν στις οποίες έγινε δυνατή η διεκπαιρέωση της εργασίας αυτής, όπως επίσης και την κα Μαρία Τζέτη.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Ασπασία Δεστούνη, η οποία με καθοδήγησε στα πρώτα εργαστηριακά μου βήματα, αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου δραστηριότητας μεταδίδοντας τόσο τις γνώσεις όσο και την εμπειρία της στη διερεύνηση επιστημονικών θεμάτων και στην επεξεργασία στατιστικών αποτελεσμάτων.

Ευχαριστίες οφείλω και στο Τμήμα Μεταμόσχευσης Μυελού του Νοσοκομείου Παίδων Αγίας Σοφίας, στο οποίο πραγματοποιήθηκε μέρος των πειραμάτων, για την άριστη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσφέρθηκε όλο αυτό το διάστημα. Ιδιαίτερα, ευχαριστώ τις ερευνήτριες Μαρία Θεοδοσάκη και Ευτυχία Πετράκου και τις υποψήφιες διδακτορικού τίτλου Αγγελική Καραγιαννίδου και Ιωάννα Βαρελά για το χρόνο που διέθεσαν στην εκμάθηση ορισμένων τεχνικών, απαραίτητων για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας εργασίας, καθώς και για τις χρήσιμες παρατηρήσεις που βοήθησαν στην καλύτερη εξέλιξη της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και την αμέριστη βοήθεια που μου παρείχαν όλο αυτό το διάστημα παραμονής μου στο εργαστήριο, τη μεταλαμπάδευση των γνώσεών τους και την ανταλλαγή χρήσιμων απόψεων και ιδεών σε διάφορα ερευνητικά θέματα.

ΠΕΡΙΟΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
1. ΕΡΥΘΡΟΠΟΙΗΣΗ	9
1.1 Εισαγωγή	9
1.2 Στάδια ερυθροποίησης	10
1.3 Ρυθμιστικοί παράγοντες στην ερυθροποίηση	12
I. Stem Cell Factor (SCF)	13
II. Ερυθροποιητίνη (EPO)	13
III. GATA-1	15
IV. EKLF	16
2. MicroRNA	18
2.1 Εισαγωγή	18
2.2 Βιοσύνθεση των microRNAs	18
2.3 Λειτουργίες των microRNAs	20
2.4 Τα microRNAs στην ερυθροποίηση	21
3. Σκοπός της Μεταπτυχιακής Εργασίας	27
4. Υλικά και Μέθοδοι	28
4.1 Δείγματα	28
4.2 Υλικά	29
4.3 Μέθοδοι	30
4.3.1 Ημιστερεή καλλιέργεια (Βραχείας διάρκειας).....	30
4.3.2 Συλλογή κυτταρικών αποικιών	31
4.3.3 Μέτρηση ερυθροειδών κυττάρων	31
4.3.4 Μελέτη της μορφολογίας των ερυθροειδών κυττάρων	32
4.3.5 Εξαγωγή ολικού RNA και microRNA	33
4.3.6 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA	36
4.3.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο	39
4.3.8 Σχετική ποσοτικοποίηση	41
4.3.9 Στατιστική επεξεργασία	42

5. Αποτελέσματα	43
5.1 Αξιολόγηση των ερυθροειδών κυττάρων μίας αποικίας	43
5.2 Μελέτη της μορφολογίας των ερυθροειδών κυττάρων με Giemsa stain	44
5.3 Αξιολόγηση της απομόνωση ολικού RNA και microRNA από τις ερυθροειδείς αποικίες	46
5.4 Σχετική ποσοτικοποίηση	49
5.4.1 Σχετική ποσοτικοποίηση των γονιδίων GATA-1, HBB, HBG1/2 και KLF1 από ex vivo καλλιεργούμενα ερυθροειδή κύτταρα φυσιολογικών ατόμων	50
5.4.2 Σχετική ποσοτικοποίηση των microRNAs: miRNA-451 και miRNA-144 σε ex vivo καλλιεργούμενα ερυθροειδή κύτταρα φυσιολογικών ατόμων	57
5.4.3 Σχετική ποσοτικοποίηση των γονιδίων GATA-1, HBB, HBG1/2 και KLF1 σε ex vivo καλλιεργούμενα ερυθροειδή κύτταρα ατόμων με ομόζυγη β ⁰ -Μεσογειακή Αναιμία	60
5.4.4 Σχετική ποσοτικοποίηση των miRNA-451 και miRNA-144 σε ex vivo καλλιεργούμενα ερυθροειδή κύτταρα ατόμων με ομόζυγη β ⁰ -Μεσογειακή Αναιμία.....	70
6. Συζήτηση	75
7. Παράρτημα	79
7.1 Αντιδραστήρια	80
7.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός	80
7.3.1 Εκκινητές για σύνθεση cDNA από microRNAs	81
7.3.2 Μείγμα εκκινητών/ανιχνευτών για την αντίδραση της Real-Time PCR	81
7.4 Υλικά.....	82
8. Βιβλιογραφία	83

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ:

Αγγλική Σύντμηση	Αγγλικός Όρος
Ago protein	Argonaute protein
Bcl-XL	B-cell lymphoma extra large
BFU-E	Burst-forming unit-erythroid
BTG-1	B-cell translocation gene-1
cDNA	complementary DNA
CFU-E	Colony-forming unit-erythroid
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EKLF	Erythroid Krüppel-like factor
EPO	Erythropoietin
EPO-R	Erythropoietin receptor
Fog-1	Friend of GATA-1
Foxo3A	Forkhead Fox class 0
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HBB	Hemoglobin beta
HBG1/2	Hemoglobin gamma
HSC	Hematopoietic Stem Cell
IFN-I	Interferon type I
IL-6, IL-3	Interleukin-6, Interleukin-3
JAK-2	Janus kinase 2
LMO2	Lim domain only 2
MRE	microRNA- Responding Elements

mRNA	messenger RNA
PBGD	Porphobilinogen deaminase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pre-miRNA	precursor microRNA
pri-miRNA	primary-microRNA
RISC	RNA-induced silencing complex
SCF	Stem Cell Factor
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TNF-b/a	Tumor necrosis factor –b/a

Περίληψη

Η διαδικασία παραγωγής των ώριμων απύρηνων ερυθροκυττάρων στο μυελό των οστών και η απελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία του αίματος, αποτελούν βασικές και συνάμα απαραίτητες διεργασίες του ανθρώπινου οργανισμού μέσω των οποίων γίνεται δυνατή η μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες σε όλους τους ιστούς και διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς στους πνεύμονες. Η κύρια πηγή παραγωγής ερυθροκυττάρων είναι ο μυελός των οστών, όπου εκεί πλήθος αυξητικών και μεταγραφικών παραγόντων «συνομιλούν» με τα συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του μυελού με στόχο την ορθή ρύθμιση της εξέλιξης και ολοκλήρωσης της ερυθροποίησης.

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για την έρευνα της ερυθροποίησης έχει στραφεί στη μελέτη των microRNAs· μίας ομάδας μικρών, μη κωδικών μορίων RNAs, τα οποία λειτουργούν ως μετα-μεταγραφικοί ρυθμιστικοί παράγοντες. Τα μόρια αυτά έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν είτε θετικά την ερυθροποίηση επάγοντας την ανάπτυξη, διαφοροποίηση και ωρίμανση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων είτε αρνητικά αναστέλλοντας την εξέλιξη της ερυθροειδούς διαδικασίας με στόχο να παραμένει ο πληθυσμός των ερυθροκυττάρων σε σταθερά επίπεδα στον ανθρώπινο οργανισμό.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η μεταβολή της έκφρασης δύο χαρακτηριστικών microRNAs της ερυθροποίησης, του miRNA-451 και miRNA-144, καθώς και τεσσάρων γονιδίων: του GATA-1, HBB, HBG1/2 και KLF-1 σε καθορισμένες χρονικές περιόδους ανάπτυξης των ex vivo ερυθροειδών κυτταρικών καλλιιεργειών φυσιολογικών δοτών αίματος και ατόμων με ομόζυγη β⁰-Μεσογειακή Αναιμία. Ο σχεδιασμός και η προτυποποίηση, επίσης, ενός εύχρηστου, αξιόπιστου και σταθερού συστήματος ποσοτικοποίησης για τη μελέτη των προαναφερθέντων microRNAs και γονιδίων αποτέλεσαν βασικό στοιχείο της πειραματικής διαδικασίας το οποίο και καθόρισε την αποτελεσματικότητα της πειραματικής προσέγγισης που σχεδιάστηκε στο εργαστήριο.

Στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα των φυσιολογικών ατόμων καταγράφηκαν σταθερές τιμές των λόγων έκφρασης μεταξύ των υπό μελέτη γονιδίων και microRNAs, παρόλο που παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης στις καθορισμένες χρονικές περιόδους αξιολόγησης των κυτταρικών καλλιιεργειών.

Ακολούθως -και έχοντας αναπτύξει ένα σταθερό ex vivo μοντέλο ποσοτικοποίησης των microRNAs στην ερυθροποίηση- εφαρμόστηκαν παρόμοιες μελέτες σε πρόδρομα ερυθροκύτταρα ατόμων με ομόζυγη β^0 - Μεσογειακή Αναιμία. Από τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε υποέκφραση των γονιδίων και των microRNAs σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα· αναδεικνύοντας μ' αυτό τον τρόπο τη διαφορετική εικόνα έκφρασης των ρυθμιστικών μορίων και γονιδίων στις αιμοσφαιρινοπαθειες.

1. Ερυθροποίηση

1.1 Εισαγωγή

Ένα από τα βασικά συστατικά του αίματος είναι τα ερυθροκύτταρα (ερυθρά αιμοσφαίρια) τα οποία είναι μικρά απύρηνα κύτταρα υπεύθυνα για τη μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς και διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς στους πνεύμονες. Τα κύτταρα αυτά παράγονται μέσα από μία ακολουθία σταδίων ανάπτυξης και διαφοροποίησης που ονομάζεται ερυθροποίηση και κατά την οποία τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (Hematopoietic Stem Cells, HSC) -που δεσμεύονται στην ερυθρά σειρά- διαφοροποιούνται σε ερυθροκύτταρα **(1,2,3)**.

Η ερυθροποίηση είναι μία σημαντική διαδικασία για τον ανθρώπινο οργανισμό και αποτελεί μία από τις πρώτες διεργασίες που ξεκινάει νωρίς κατά την εμβρυική ηλικία. Η έναρξή της παρατηρείται από την 16^η-19^η ημέρα της ενδομητρίου ζωής στο έξω εμβρυικό μεσέγγυμα του λεκιθικού σάκκου και ακολούθως μεταφέρεται προσωρινά στο ήπαρ του εμβρύου **(4,5,6,7,8)**. Η κύρια πηγή παραγωγής ερυθροκυττάρων είναι ο μυελός των οστών και ειδικότερα οι ερυθροβλαστικές νησίδες του μυελού, οι οποίες αποτελούνται από πρόδρομα ερυθροκύτταρα που περιβάλλουν ένα μακροφάγο, απαραίτητο για την απομάκρυνση του πυρήνα από τα κύτταρα αυτά **(2,9)**.

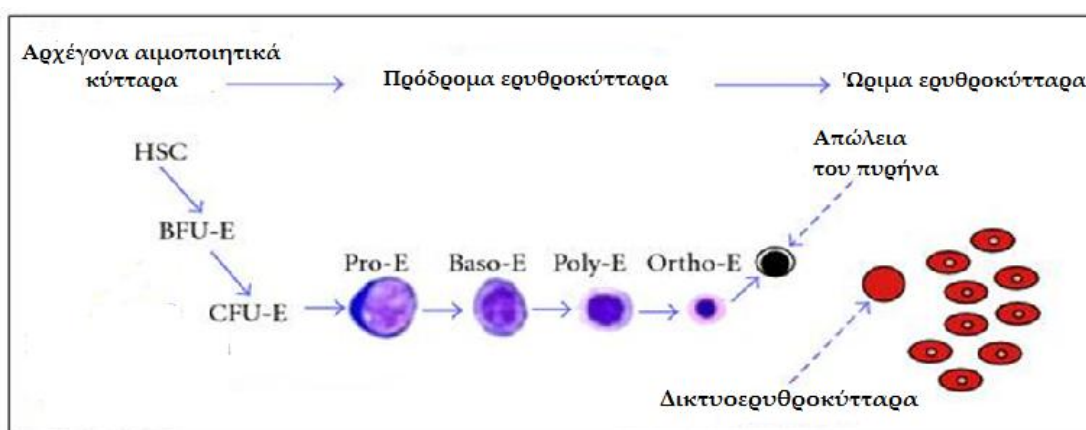
Τα στάδια της ερυθροποίησης είναι αυστηρά ελεγχόμενα και ρυθμιζόμενα από διάφορους παράγοντες, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες, οι μεταγραφικοί παράγοντες και το μικροπεριβάλλον του μυελού, οι οποίοι “συνομιλούν” με σκοπό να διατηρηθεί σταθερός ο αριθμός των ερυθροκυττάρων στον οργανισμό **(2,6,10)**.

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί στη μελέτη των microRNAs (miRNAs) –μίας ομάδας μετα-μεταγραφικών ρυθμιστικών μορίων- τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ερυθροποίησης και στην παραγωγή των ώριμων, απύρηνων ερυθροκυττάρων. Η ισορροπία μεταξύ των microRNAs που ρυθμίζουν θετικά π.χ. miRNA-451/144 και των microRNAs που ρυθμίζουν αρνητικά την ερυθροποίηση π.χ. miRNA-221/222 έχει ως στόχο να επάγεται ή να αναστέλλεται η έκφραση γονιδίων που ελέγχουν την παραγωγή των ερυθροκυττάρων στο μυελό και ακολούθως την είσοδό τους στην κυκλοφορία του αίματος, προστατεύοντας τον οργανισμό από την αυξημένη ή μειωμένη συγκέντρωση των κυττάρων αυτών. Σ' ένα φυσιολογικό άτομο υπάρχουν 4.5-6*10⁶/ μl ερυθροκύτταρα με ημερήσια απώλεια 1%. Η συνολική διάρκεια ζωής τους είναι περίπου 120 ημέρες **(10,11,12)**.

1.2 Στάδια της ερυθροποίησης

Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα που δεσμεύονται στην ερυθρά σειρά χάνουν αρχικά την ικανότητά τους να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα άλλων σειρών και αποκτούν δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των πρόδρομων ερυθροκυττάρων (13,14).

Τα πρώτα δεσμευμένα ερυθρά κύτταρα είναι τα BFU-Es (burst-forming unit-erythroid) και CFU-Es (colony-forming unit-erythroid), τα οποία έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται *in vitro* σε ερυθροκύτταρα όταν καλλιεργηθούν σε μεθυλοκυτταρίνη (2,15,16). Από τα CFU-Es θα προκύψουν οι προερυθροβλάστες, τα πρώτα μορφολογικά αναγνωρισμένα πρόδρομα ερυθροκύτταρα, που έχουν διακριτά χαρακτηριστικά της ερυθράς σειράς, όπως είναι η παρουσία υποδοχέων ερυθροποιητίνης και η έναρξη της σύνθεσης αιμοσφαιρίνης. Στη συνέχεια, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των προερυθροβλαστών -με τη βοήθεια διαφόρων πρωτεϊνών π.χ. ερυθροποιητίνης (EPO)- θα οδηγήσει, αρχικά, στην παραγωγή των βασεόφιλων ερυθροβλαστών, οι οποίοι θα μετατραπούν στους πολυχρωματόφιλους ερυθροβλάστες και ακολούθως στους οξεόφιλους ερυθροβλάστες. Η απώλεια του πυρήνα από τον τελευταίο τύπο κυττάρων είναι απαραίτητη για την παραγωγή των δικτυοερυθροκυττάρων των κυττάρων που θα διαφοροποιηθούν τελικά στα ώριμα, απύρρινα ερυθροκύτταρα (10,13,16) (Εικ. 1).



Εικ.1: Δέσμευση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSC) στην ερυθρά σειρά με στόχο τη διαφοροποίησή τους σε ερυθροκύτταρα και την απελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία του αίματος

Γενικά, η όλη πορεία εξέλιξης της ερυθροποίησης περιλαμβάνει ποικίλες μεταβολές τόσο δομικές όσο και λειτουργικές που αρχίζουν από το στάδιο παραγωγής των προερυθροβλαστών και συνεχίζουν μέχρι το στάδιο παραγωγής των

δικτυοερυθροκυττάρων. Σκοπός αυτής της εξελικτικής πορείας είναι η παραγωγή και απελευθέρωση των τελικών ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος. Οι κυριότερες μεταβολές που παρατηρούνται είναι α) η προοδευτικά αυξανόμενη παραγωγή της αιμοσφαιρίνης, β) η μείωση του κυτταρικού μεγέθους και γ) η συνεχής συμπίκνωση του πυρήνα και τελικά η απώλειά του **(2,9,16)**. Εκφράζονται επίσης, σημαντικές πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των ερυθροκυττάρων, όπως είναι ο μεμβρανικός υποδοχέας ερυθροποιητίνης (EPO-R), ο μεταγραφικός παράγοντας GATA-1, καθώς και τα αντιγόνα των ομάδων αίματος **(4,12)**.

Εκτενής μελέτη των διαφόρων σταδίων ανάπτυξης των κυττάρων της ερυθράς σειράς καταδεικνύει ότι: **(8,12,11,14)**

οι προερυθροβλάστες είναι μεγάλα κύτταρα σε μέγεθος, με μεγάλο πυρήνα και δύο-τρεις πυρηνίσκους. Το κυτόπλάσμα τους είναι έντονα βασεόφιλο λόγω της παρουσίας πολλών ριβοσωμάτων, ενώ παρατηρείται η έναρξη σύνθεσης αιμοσφαιρίνης.

οι βασεόφιλοι ερυθροβλάστες είναι μικρότερα κύτταρα με λιγότερο βασεόφιλο κυτόπλασμα. Ο πυρήνας τους γίνεται ολοένα και πιο πυκνός, ενώ έχει απωλέσει τους πυρηνίσκους.

οι πολυχρωματόφιλοι ερυθροβλάστες είναι τα πρόδρομα ερυθροκύτταρα στα οποία σταματά η κυτταρική διαίρεση. Δεν φέρουν πυρηνίσκους και ο πυρήνας παρουσιάζεται συμπαγής. Παρατηρείται επίσης, περισσότερη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης στο κυτόπλάσμα τους η οποία δίνει μία πολυχρωματόφιλη εικόνα.

οι οξεόφιλοι ερυθροβλάστες είναι πολύ μικρά κύτταρα με αυξημένο λόγο του κυτοπλάσματος ως προς τον πυρήνα. Ο μικρός πυρήνας είναι έκκεντρος και συμπαγής, ενώ το άφθονο κυτόπλασμα φέρει αυξημένα επίπεδα αιμοσφαιρίνης και γίνεται περισσότερο οξεόφιλο.

τα δικτυοερυθροκύτταρα είναι το τελευταίο στάδιο ερυθροβλαστών πριν από τη διαφοροποίησή τους σε ώριμα ερυθροκύτταρα. Κύριο γνώρισμά τους είναι το δίκτυο ριβοσωμικού RNA που φέρουν στο κυτόπλασμα, ενώ έχουν χάσει τον πυρήνα τους. Συνεχίζουν να παράγουν πρωτεΐνες λόγω των λειτουργικών πολυριβοσωμάτων που έχουν και συνθέτουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση

αιμοσφαιρίνης σε σύγκριση με τους προηγούμενους κυτταρικούς τύπους.

τα ώριμα ερυθροκύτταρα είναι μικρά, απύρρηνα κύτταρα με αμφίκυκλο σχήμα, το οποίο τους δίνει τη δυνατότητα να διακινούνται δια μέσου των αιμοφόρων τριχοειδών αγγείων και να μεταφέρουν οξυγόνο στους ιστούς και διοξείδιο του άνθρακα στους πνεύμονες. Είναι η πολυπληθέστερη ομάδα αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών. Ο πληθυσμός τους φτάνει το 20% του συνόλου των αιμοποιητικών κυττάρων, ενώ έχουν τη μικρότερη διάρκεια ζωής από τους υπόλοιπους κυτταρικούς τύπους λόγω της απουσίας πυρήνα.

1.3 Ρυθμιστικοί παράγοντες στην ερυθροποίηση

Η επιτυχία της ερυθροποίησης επηρεάζεται από ένα σύνολο παραγόντων και μοριακών μηχανισμών οι οποίοι έχουν ως βασικό ρόλο τη ρύθμιση της ερυθροειδούς διαδικασίας και τη διατήρηση του αριθμού των ερυθροκυττάρων σε σταθερά επίπεδα στον οργανισμό **(9,17,18)**.

Σ' αυτούς τους παράγοντες συγκαταλέγονται μεταγραφικοί παράγοντες και πρωτεΐνες, που δρουν ως θετικοί ρυθμιστές επάγοντας την έναρξη της ερυθροποίησης και κυρίως την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε κύτταρα της ερυθράς σειράς. Οι κυριότεροι είναι η κυτοκίνη Stem Cell Factor (SCF) και η ερυθροποιητίνη (EPO). Η δεύτερη έχει βασικό ρόλο και στην επιβίωση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων επάγοντας την υπερέκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-XL, η οποία αναστέλλει την απόπτωση των ερυθροβλαστών **(7,9,17,19)**. Σημαντικό ρόλο, επίσης, διαδραματίζουν και οι κασπάσες συμμετέχοντας στην συμπύκνωση του πυρήνα των ερυθροβλαστών. Οι πρωτεάσες αυτές οδηγούν στη μείωση της έκφρασης και της δράσης μίας δομικής πρωτεΐνης, της λαμινίνης, ενώ ταυτόχρονα επάγουν την έναρξη της λειτουργίας του παράγοντα Acinus, ενός παράγοντα υπεύθυνου για τη συμπύκνωση του πυρήνα.

Αντίθετα, όταν δεν απαιτείται επιπρόσθετη παραγωγή και ελευθέρωση ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος, τότε πρωτεΐνες όπως η IL-6, ο TNF- α και ο TNF- β , δρουν αρνητικά αναστέλλοντας την έναρξη της ερυθροποίησης και

εμποδίζοντας την αύξηση του πληθυσμού των ερυθροκυττάρων, διαφορετικά θα καταγράφονταν δυσμενείς συνέπειες για τον ανθρώπινο οργανισμό **(3,17)**.

Πιο κάτω γίνεται αναφορά στη δράση ορισμένων ρυθμιστικών παραγόντων, ειδικών για την ερυθροποίηση.

I. Stem Cell Factor (SCF)

Μία σημαντική κυτοκίνη της ερυθροποίησης είναι ο παράγοντας Stem Cell Factor (SCF), ο οποίος κωδικοποιείται από τη χρωμοσωμική περιοχή 12q22-12q24 και παράγεται από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών **(17,20)**.

Είναι ο προσδέτης του c-kit υποδοχέα -που βρίσκεται σε αφθονία στην κυτταρική επιφάνεια των πρόδρομων ερυθροκυττάρων BFU-E και CFU-E- και η δέσμευσή του με το συγκεκριμένο υποδοχέα σηματοδοτεί τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των BFU-E και CFU-E κυττάρων **(10,20,21)**. Πρόσφατες έρευνες καταδεικνύουν ότι η παρουσία του SCF ενισχύει τη δράση της ερυθροποιητίνης στα επόμενα στάδια της ερυθροποίησης συμμετέχοντας σε μικρό βαθμό στη διαφοροποίηση και στην ωρίμανση των ερυθροβλαστών. **(10,21)** Ακόμη, ο παράγοντας αυτός, έχει την ικανότητα να μειώνει τον ρυθμό απόπτωσης των πρόδρομων ερυθροκυττάρων επιτρέποντας την επιβίωση και τη σωστή ανάπτυξή τους μέχρι το τελικό στάδιο της ερυθροποίησης.

Η αναστολή της λειτουργίας είτε του SCF είτε του c-kit υποδοχέα ή η μετάλλαξη των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτές τις δύο πρωτεΐνες έχει ως συνέπεια τη δημιουργία αναιμίας στον οργανισμό λόγω του μειωμένου ρυθμού ερυθροποίησης και του πολύ μικρού αριθμού ερυθροκυττάρων που παράγονται. **(20,22)**

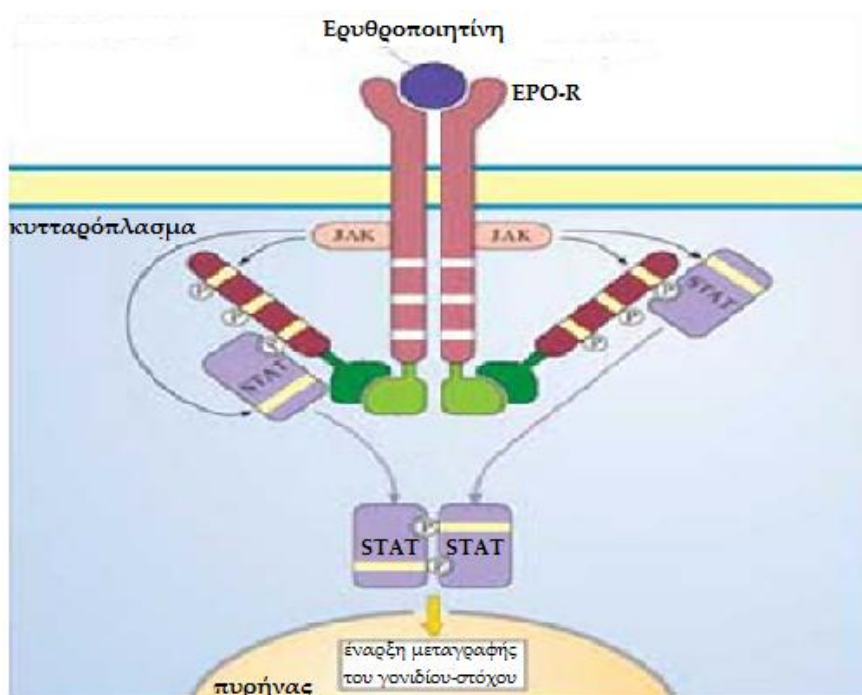
Επίσης, για να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή απόδοση της δράσης του, ο SCF συνεργάζεται με διάφορες κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη-3 (IL-3), η ινσουλίνη και η ιντερφερόνη τύπου I (IFN-I). Η απουσία των κυτοκινών αυτών οδηγεί σε σημαντική μείωση της λειτουργικότητας του SCF και επιφέρει παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που παρατηρούνται κατά την αναστολή της δράσης του SCF στον οργανισμό **(20)**.

II. Ερυθροποιητίνη (EPO)

Ένας από τους βασικότερους ρυθμιστές της ερυθροποίησης είναι η ερυθροποιητίνη (EPO), μία γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 34 kDa, που κωδικοποιείται από το χρωμόσωμα 7 και αποτελείται από 165 αμινοξέα. Παράγεται

κυρίως από τα περιωληθναριακά κύτταρα του νεφρού και δια μέσου της κυκλοφορίας του αίματος εισέρχεται στο μυελό των οστών όπου και δεσμεύεται στο σύστοιχο υποδοχέα της (υποδοχέας ερυθροποιητίνης, EPO-R), που βρίσκεται στη μεμβράνη των πρόδρομων ερυθροκυττάρων (10,13,23,24).

Η δημιουργία του συμπλόκου ερυθροποιητίνης - υποδοχέα οδηγεί αρχικά στο διμερισμό του υποδοχέα και ακολούθως σηματοδοτεί την ενεργοποίηση μίας τυροσινικής κινάσης, της JAK-2, η οποία θα φωσφορυλιώσει και θα ενεργοποιήσει την οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων STATs (signal transducers and activators of transcription). Οι τελευταίοι μεταφέρονται στον πυρήνα και επάγουν την έναρξη της μεταγραφής ειδικών γονιδίων, υπεύθυνων για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων (13,23) (Εικ.2). Επίσης, η ερυθροποιητίνη μαζί με τον EPO-R υποδοχέα συμμετέχουν και στην επιβίωση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων σηματοδοτώντας την υπερέκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως την Bcl-XL και την Bcl-2, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την αναστολή της ερυθροποίησης και την πρόωρη απόπτωση των κυττάρων (13,21).



Εικ.2: JAK/STAT σηματοδοτικό μονοπάτι. Η έναρξη της δράσης του σηματοδοτείται από την παρουσία της πρωτεΐνης EPO και έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγραφή ερυθροειδικών γονιδίων

Γενικά, το σύμπλοκο ερυθροποιητίνης - EPO-R υποδοχέα είναι ένα πολύ καλό ρυθμιστικό σύστημα στον ανθρώπινο οργανισμό. Η απώλεια της δράσης της EPO-

πρωτεΐνης ή/ και του σύστοιχου υποδοχέα της ή η μετάλλαξη των γονιδίων που κωδικοποιούν αυτές τις δύο πρωτεΐνες έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αναιμίας στον οργανισμό λόγω της μειωμένης παραγωγής ερυθροκυττάρων. Αντίθετα, η υπερέκφραση της ερυθροποιητίνης οδηγεί στην αύξηση του πληθυσμού των ερυθροκυττάρων προκαλώντας αύξηση της αρτηριακής πίεσης, θρόμβωση, αρτηριακά εγκεφαλικά επεισόδια και ερυθρή κνάνωση· συμπτώματα της νόσου Polycythemia **(23)**.

III. GATA-1

Η πρωτεΐνη GATA-1 είναι ένας μεταγραφικός ρυθμιστής, ειδικός για την ερυθροποίηση και ιδιαίτερα για την επαγωγή της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των ερυθροβλαστών. **(25,26,27)**

Κωδικοποιείται από τη χρωμοσωμική περιοχή Xp21.11 και ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων GATA, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την παρουσία δύο δακτύλων ψευδαργύρου στο μόριό τους και από την κοινή αμινοξική ακολουθία Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys. Οι πρωτεΐνες αυτές δεσμεύονται στην ειδική αλληλουχία 5' T/ A GATA A/G 3' που βρίσκεται στον υποκινητή ή/και ενισχυτή των γονιδίων-στόχων και ονομάζεται GATA-μοτίβο. Ειδικότερα, το καρβοξυτελικό άκρο των GATA-πρωτεϊνών είναι το υπεύθυνο τμήμα δέσμευσης με τη DNA ακολουθία και το αμινοτελικό άκρο ενισχύει και σταθεροποιεί αυτή τη σύνδεση **(25,26,28,29)**.

Από τα έξι πρωτεϊνικά μέλη που αποτελούν τη μεταγραφική οικογένεια GATA, οι GATA-1 και GATA-2 είναι οι παράγοντες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ερυθροποίησης και στην ωρίμανση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων **(6,25,27)**.

Ο GATA-2 εκφράζεται τόσο στα αρχέγονα μη-δεσμευμένα όσο και στα πρώτα δεσμευμένα κύτταρα της ερυθράς σειράς συμμετέχοντας στον πολλαπλασιασμό αυτών των κυττάρων, ενώ η παρουσία του εμποδίζει την έκφραση του GATA-1. Αργότερα, η έναρξη της μεταγραφής του GATA-1 στις ίδιες ρυθμιστικές περιοχές με τον GATA-2 έχει ως αποτέλεσμα να ανασταλεί η έκφραση και η δράση του δεύτερου και ο μεταγραφικός παράγοντας GATA-1 να αποτελεί πλέον ένα από τους κύριους ρυθμιστές της ερυθροποίησης **(6,10)**.

Η πρωτεΐνη GATA-1 έχει κύριο ρόλο στην εξέλιξη της ερυθροποίησης και η πιθανή απώλεια της δράσης της εμποδίζει την περαιτέρω ωρίμανση τόσο των προερυθροβλαστών όσο και των ερυθροβλαστών προκαλώντας αναιμία στον οργανισμό **(6,26)**. Η παρουσία της ουσιαστικά, ενισχύει τη μεταγραφή του υποδοχέα

ερυθροποιητίνης (EPO-R) και αυξάνει την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-XL. Επίσης, με τη συνεργατική δράση των αναστολέων της κυκλίνης Δ2 και των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p18 και p27 η GATA-1 αναστέλλει τη μεταγραφή μιτογόνων γονιδίων, όπως του myc και του myb, στο στάδιο των πολυχρωματόφιλων ερυθροβλαστών παγώνοντας τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1 με σκοπό να σταματήσει η κυτταρική διαίρεση και να υποβοηθηθεί η ωρίμανση των κυττάρων αυτών **(18,27,29)**. Επιπλέον, ως μεταγραφικός καταστολέας έχει την ικανότητα να αναστείλει τη μεταγραφή του γονιδίου της ε-σφαιρίνης μειώνοντας τα επίπεδα της ε-σφαιρίνης στον οργανισμό **(25,27)**. Όμως, στα τελευταία στάδια της ερυθροποίησης παρατηρείται σημαντική μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης GATA-1 εξαιτίας της δράσης των κασπασών· σε αντίθετη περίπτωση η συνεχής έκφραση ή υπερέκφρασή της μπορεί να αναστείλει την παραγωγή των ώριμων ερυθροκυττάρων και να οδηγήσει τα πρόδρομα ερυθροκύτταρα σε πρόωρη απόπτωση.

Σημαντικό ρόλο, επίσης, στην ενίσχυση της δράσης της ερυθροειδικής πρωτεΐνης GATA-1 έχει μία δομικά παρόμοια πρωτεΐνη, η Fog-1 (friend of GATA-1), η οποία περιέχει στο μόριό της εννέα δακτύλους ψευδαργύρου εκ των οποίων οι τέσσερις δεσμεύονται στο αμινοτελικό τμήμα της GATA-1 **(6)**. Η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει στη διαφοροποίηση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων αυξάνοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα της GATA-1 δεσμεύοντας είτε ενεργοποιητές είτε καταστολείς στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων-στόχων **(10)**. Οι επιστήμονες Evans και Felsenfeld παρατήρησαν ότι η ομόζυγη έλλειψη του γονιδίου Fog-1 σε κύτταρα της ερυθράς σειράς μείωσε τη λειτουργικότητα της GATA-1 **(25)** και οδήγησε σε δυσερυθροποιητική αναιμία τον ανθρώπινο οργανισμό **(10)**.

IV. EKLF (Erythroid Krüppel-like Factor)

Ένας βασικός ρυθμιστής της έκφρασης των γονιδίων της α- και β-σφαιρίνης είναι ο μεταγραφικός παράγοντας EKLF (Erythroid Krüppel-like Factor), ο οποίος δρα κυρίως στα τελευταία στάδια της ερυθροποίησης **(22,27)**.

Δομικά χαρακτηρίζεται από την παρουσία τριών δακτύλων ψευδαργύρου στο μόριό του, οι οποίοι έχουν μία περιοχή δέσμευσης με το DNA **(22,27,28)**. Η περιοχή αυτή αναγνωρίζει και δεσμεύει το συντηρημένο μοτίβο CACCC που υπάρχει στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων σηματοδοτώντας την έναρξη της μεταγραφής τους **(6,10)**. Η μετάλλαξη αυτού του μοτίβου ή της DNA-δεσμευόμενης περιοχής του

παράγοντα EKLF οδηγεί στην αναστολή της πιο πάνω σύνδεσης και στην εμφάνιση του φαινοτύπου της β-μεσογειακής αναιμίας **(25,27,29)**.

Η κύρια λειτουργία του EKLF είναι η μεταστροφή της έκφρασης από την εμβρυική σφαιρίνη στην ενήλικη β-σφαιρίνη **(25)**, ενώ σε μικρότερο βαθμό ελέγχει και την έκφραση της α-σφαιρίνης **(27)**. Έχει την ικανότητα επίσης, να οργανώνει και να ελέγχει μικρές χρωματινικές περιοχές του γονιδίου της β-σφαιρίνης **(29)**, καθώς και να ρυθμίζει τα γονίδια που συμμετέχουν στο μεταβολισμό της αιμοσφαιρίνης **(25)**. Επιπλέον, δεσμεύεται στις ρυθμιστικές περιοχές που βρίσκονται πολύ κοντά με τις αντίστοιχες ρυθμιστικές περιοχές του GATA-1 ενισχύοντας μ' αυτό τον τρόπο τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα GATA-1 κατά την πορεία εξέλιξης της ερυθροποίησης **(25)**.

2. MicroRNAs

2.1 Εισαγωγή

Τα microRNAs (miRNAs) είναι μία πρόσφατα αναγνωρισμένη ομάδα ενδογενών ρυθμιστικών μορίων που εμπλέκονται στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης και ειδικότερα στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση διαφόρων mRNAs (**12,30,31**). Είναι μικρά, μη-κωδικά RNAs τα οποία αποτελούνται από 19-25 νουκλεοτίδια και είναι φυλογενετικά συντηρημένα (**32,33**).

Η πρώτη αναφορά για την ύπαρξή τους έγινε το 1993 όταν το εργαστήριο των Ambros και Runkun κλωνοποίησε ένα μεταγραφικό καταστολέα, το lin-4, από το *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (**34**). Με έκπληξη οι επιστήμονες διαπίστωσαν ότι το lin-4 μετάγραφο ήταν πολύ μικρό σε μέγεθος και μη-κωδικό (**34,35**). Από τότε ταυτοποιήθηκαν και άλλα τέτοια μόρια σ' ένα ευρύ φάσμα οργανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου, φτάνοντας τα 21264 αναγνωρισμένα microRNAs (miRBase, version 19.0) (**36**). Στον άνθρωπο έχουν καταγραφεί 1921 microRNAs -με βάση και τα τελευταία στοιχεία της βάσης δεδομένων miRBase (version 18.0)- τα οποία αποτελούν μέρος διαφόρων ρυθμιστικών μονοπατιών με στόχο τη σωστή λειτουργία των βιολογικών διεργασιών στον οργανισμό (**36**).

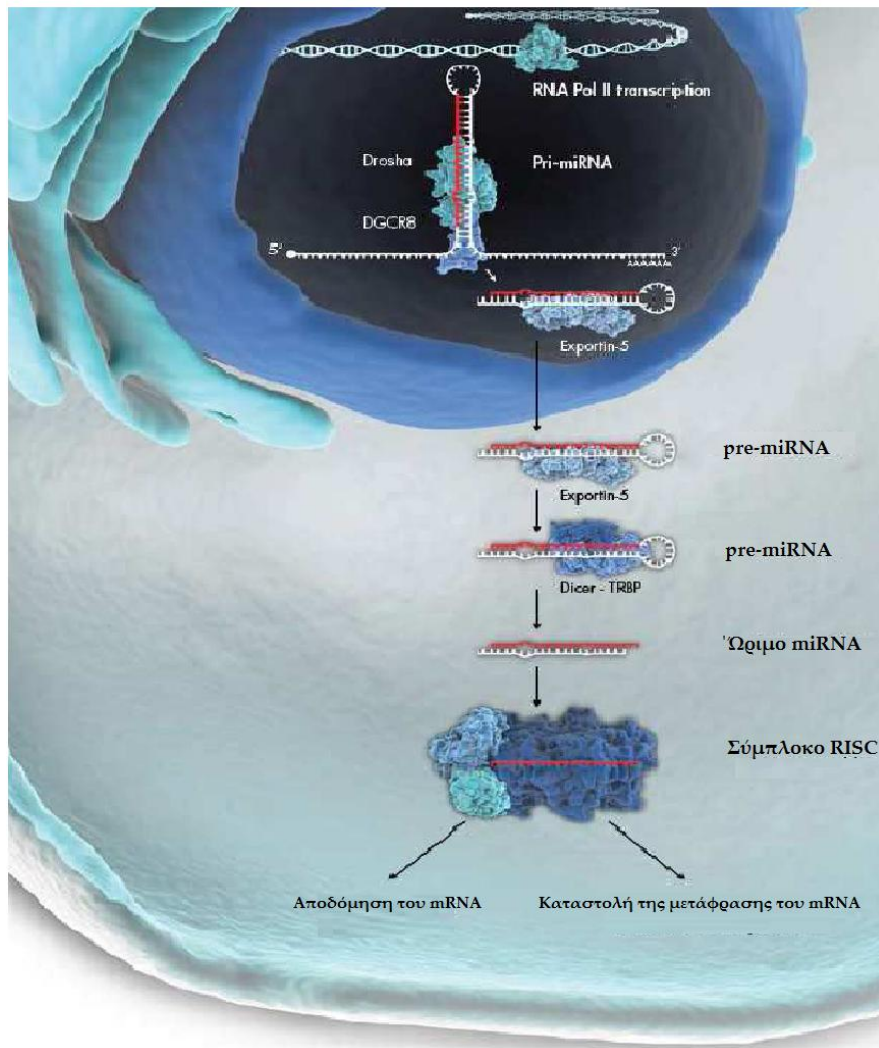
2.2 Βιοσύνθεση των microRNAs

Η βιοσύνθεση των microRNAs είναι μία πολυσταδιακή, αυστηρά ρυθμιζόμενη διαδικασία, παρόμοια με τη μεταγραφή των κωδικών γονιδίων, η οποία ξεκινά από τον πυρήνα και καταλήγει στο κυτταρόπλασμα.

Τα περισσότερα microRNAs κωδικοποιούνται στις περιοχές ιντρονίων των κωδικών γονιδίων και στις αμετάφραστες περιοχές των mRNAs, ενώ μία μικρή ομάδα αναγνωρίζεται σε περιοχές εξονίων μη-κωδικών mRNAs (**37,38,39**).

Αρχικά, τα microRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II δημιουργώντας ένα μεγάλο, πολυαδενυλιωμένο μετάγραφο (**36,40**), το primary-miRNA (pri-miRNA), το οποίο παρουσιάζει στο μόριό του την χαρακτηριστική δομή φουρκέτας και περιλαμβάνει πολλαπλές αλληλουχίες microRNAs (**37,41**). Στη συνέχεια, το ενζυμικό σύμπλοκο μικροεπεξεργαστών DROSHA-DGCR8 διασπά το αρχικό μετάγραφο στον πυρήνα (**39,40,42**) απελευθερώνοντας ένα μικρότερο μόριο, το πρόδρομο miRNA (precursor miRNA, pre-miRNA) που έχει μέγεθος 60-70

νουκλεοτίδια (43). Συγκεκριμένα, το ένζυμο DGCR8 αναγνωρίζει το σημείο όπου η μονόκλωνη έλικα της φουρκέτας συνδέεται με το δίκλωνο RNA του υπόλοιπου μορίου και υποβοηθεί την RNA πολυμεράση III- DROSHA να διασπάσει το primary-miRNA (pri-miRNA) στο συγκεκριμένο σημείο (41). Ακολούθως, το πρόδρομο miRNA μετακινείται -με τη βοήθεια της εξπορτίνης 5- από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα διαμέσου των πυρηνικών πόρων και εκεί μία δεύτερη RNA πολυμεράση III, η Dicer, το επεξεργάζεται (36,41,43). Το ένζυμο αυτό διασπά τη φουρκέτα του πρόδρομου miRNA απελευθερώνοντας ένα ώριμο, δίκλωνο μόριο το οποίο θα συνδεθεί, στην συνέχεια, στην πρωτεΐνη Ago (Argonaute) του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου απενεργοποίησης RISC (RNA-induced silencing complex) (37,44) ενός συμπλόκου υπεύθυνου για τη μετακίνηση του miRNA και την αλληλεπίδρασή του με τα mRNA-στόχους του (Εικ.3).



Εικ.3: Βιογένεση των microRNAs. Η διαδικασία ξεκινά από τον πυρήνα και καταλήγει στο κυτταρόπλασμα

Γενικά, όλη η διαδικασία της βιογένεσης των microRNAs είναι ρυθμιζόμενη από διάφορες πρωτεΐνες και μεταγραφικούς παράγοντες που συμμετέχουν τόσο στην έναρξη όσο και στην εξέλιξη της διαδικασίας αυτής. Στα αρχικά στάδια, ο μεταγραφικός παράγοντας TGF- β έχει την ικανότητα να επάγει την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης DROSHA (42) και να διεγείρει τη δράση της πρωτεΐνης SMAD, η οποία ενισχύει ακόμη περισσότερο τη λειτουργία της RNase-III DROSHA (39,42). Επιπλέον, αρκετές RNA-δεσμευόμενες πρωτεΐνες ανταγωνίζονται τη θέση δέσμευσης του ενζυμικού συμπλόκου DROSHA-DGCR8 στο pri-miRNA, αναστέλλοντας την περαιτέρω επεξεργασία αυτού του μεταγράφου. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη Lin-28, η οποία εμποδίζει το ενζυμικό σύμπλοκο να δεσμευτεί στην περιοχή της φουρκέτας του let7 pri-miRNA αναστέλλοντας την εξέλιξη της βιοσύνθεσής του (41). Επίσης, σε παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με τη διαδικασία της κυτταρικής ανάπτυξης, π.χ. καρκίνος, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 επάγει την έναρξη της μεταγραφής συγκεκριμένων microRNAs που εμπλέκονται στην καταστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και στη συνέχεια, η p53 συμμετέχει στην επεξεργασία του αρχικού μεταγράφου pri-miRNA (42). Ακόμη, η μετακίνηση των πρόδρομων miRNAs στο κυτταρόπλασμα απαιτεί την παρουσία της ενεργούς GTP-δεσμευόμενης εξπορτίνης 5. Η παρουσία της ως GDP-δεσμευόμενη πρωτεΐνη έχει ως αποτέλεσμα να παραμένει σε ανενεργό μορφή, αναστέλλοντας τόσο τη μεταφορά των pre-miRNAs στο κυτταρόπλασμα όσο και την τελική ωρίμανσή τους (41).

Με βάση τα πιο πάνω, γίνεται αντιληπτό ότι η διαδικασία της μεταγραφής και επεξεργασίας των microRNAs απαιτεί την παρουσία είτε συνενεργοποιητών είτε συγκατασταλτών, οι οποίοι θα καθορίσουν την εξέλιξη της μεταγραφής και τελικά την απελευθέρωση ή όχι των ώριμων microRNAs στο κυτταρόπλασμα.

2.3 Λειτουργίες των microRNAs

Τα microRNAs αποτελούν μία σημαντική ομάδα μετα-μεταγραφικών μορίων και ρυθμιστικών παραγόντων της γονιδιακής έκφρασης και εμπλέκονται σε ποικίλες βιολογικές διαδικασίες, όπως είναι η κυτταρική ανάπτυξη, η κυτταρική επιβίωση, η διαφοροποίηση και η κυτταρική απόπτωση (31,45,46). Η έκφρασή τους είναι ειδική για κάθε ιστό και κυτταρικό τύπο και χαρακτηριστική για την αναγνώριση των φυσιολογικών κυτταρικών σειρών (45). Η μεταβολή των επιπέδων έκφρασης ενός microRNA σ' ένα κυτταρικό τύπο αποτελεί σημαντικό βιοδείκτη διάγνωσης

παθολογικών καταστάσεων π.χ. αιματολογικών παθήσεων, ογκογένεσης και καταστολής της δράσης ογκοκατασταλτικών γονιδίων και ταυτόχρονα είναι ένας από τους κύριους στόχους για την αντιμετώπιση και τη θεραπεία των ασθενειών (30,32). Τα microRNAs καθορίζουν επίσης, την εξέλιξη και διαφοροποίηση των κυτταρικών σειρών που προέρχονται από τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα επάγοντας ή καταστέλλοντας τη δράση μεταγραφικών παραγόντων που είναι καθοριστικοί για την κυτταρική διαφοροποίηση (30,32,35,45).

Η λειτουργία αυτών των μικρών μορίων RNAs επιτυγχάνεται έπειτα από τη δέσμευση της περιοχής "seed"- μίας μικρής φυλογενετικά συντηρημένης περιοχής 2-8 νουκλεοτιδίων που αναγνωρίζεται στη δομή των microRNAs- (43) με τα απαντητικά στοιχεία microRNA (microRNA-Responding Elements, MRE) που υπάρχουν στο 3'-UTR αμετάφραστο τμήμα των mRNAs-στόχων (33,46). Η σύνδεση αυτή ενισχύεται ακόμη περισσότερο και από παράγοντες που δεν δεσμεύονται άμεσα με τα microRNAs, όπως είναι οι κωδικές περιοχές των mRNAs, η δευτεροταγής δομή τους καθώς και η 5'-UTR αμετάφραστη περιοχή των mRNAs (39,42). Ο βαθμός συμπληρωματικότητας μεταξύ των δύο αντιδρόντων περιοχών (περιοχή seed- MRE) είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει τον τρόπο δράσης των microRNAs (42). Η αυξημένη συμπληρωματικότητα επάγει την αποδόμηση του mRNA-στόχου, ενώ ο μικρός βαθμός συμπληρωματικότητας μεταξύ της περιοχής seed και των MRE – απαντητικών στοιχείων οδηγεί στην καταστολή της μετάφρασης του mRNA (39,42).

Παρά τον μικρό αριθμό τους στο ανθρώπινο γονιδίωμα (1921 microRNAs, miRBase version 18.0), τα microRNAs έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκφραση ενός σημαντικού ποσοστού των ανθρώπινων γονιδίων (~30%) (37,43). Αυτό οφείλεται στη δυνατότητα ενός microRNA να δεσμεύεται με πολλαπλά mRNAs και αντίστοιχα, στην παρουσία αρκετών θέσεων δέσμευσης για microRNAs στην 3' UTR περιοχή ενός mRNA. Έτσι, η πλειοτροπική δράση αυτών των μορίων είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο μίας πληθώρας γονιδίων και βιολογικών διεργασιών στον άνθρωπο (47,48).

2.4 Τα microRNAs στην ερυθροποίηση

Η ερυθροποίηση έχει μελετηθεί και παρουσιασθεί τις τελευταίες δεκαετίες ως μία πολύ καλά ρυθμιζόμενη και συντονισμένη διαδικασία στον ανθρώπινο οργανισμό που στόχο έχει την παραγωγή και απελευθέρωση των ώριμων, απύρηνων ερυθροκυττάρων στο κυκλοφορικό σύστημα. Η επιτυχία της διεκπεραίωσής της

βασίζεται σ' ένα δίκτυο ρυθμιστικών παραγόντων και σηματοδοτικών μοριακών μονοπατιών που δρουν είτε συνεργατικά είτε ανταγωνιστικά ελέγχοντας τα διάφορα στάδια της ερυθροειδούς ανάπτυξης και διαφοροποίησης (31).

Τα τελευταία χρόνια αντικείμενο εκτενούς μελέτης στην ερυθροποίηση αποτελούν τα μετα-μεταγραφικά ρυθμιστικά μόρια microRNAs, τα οποία παρουσιάζουν δυναμικές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασή τους από το στάδιο των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSC) μέχρι το στάδιο των ώριμων ερυθροκυττάρων (31,39,45). Παραδείγματος χάρη, microRNAs που εκφράζονται στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, όπως είναι τα miRNA-221/222 και miRNA-24, αναστέλλουν τη μεταγραφή ερυθροειδικών γονιδίων π.χ. του c-kit και του ALK4, εμποδίζοντας τη διαφοροποίηση των HSC-κυττάρων σε κύτταρα της ερυθράς σειράς. Όταν τα HSC δεσμευτούν στην ερυθρά σειρά τα επίπεδα έκφρασης αυτών των microRNAs μειώνονται σημαντικά και σηματοδοτείται η έναρξη της μεταγραφής ερυθροειδικών γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση και ωρίμανση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων. Ταυτόχρονα, microRNAs τα οποία είναι χαρακτηριστικά για την ανάπτυξη και επιβίωση της ερυθράς σειράς π.χ. miRNA-144 και miRNA-451 υπερεκφράζονται ρυθμίζοντας θετικά την εξέλιξη της ερυθροποίησης.

Η πρώτη έρευνα για την παρουσία των microRNAs στην ερυθροποίηση έγινε από το εργαστήριο του Lu και των συνεργατών του (2005), οι οποίοι εφαρμόζοντας τη μοριακή μέθοδο των μικροσυστοιχιών (microarrays) παρατήρησαν τη μεταβολή της έκφρασης ορισμένων microRNAs κατά τη διαφοροποίηση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων (34). Λίγα χρόνια αργότερα οι Zhan et al. (2007) μελετώντας την έκφραση 300 microRNAs σε διάφορες αιμοποιητικές σειρές αναγνώρισαν ότι περισσότερα από 100 microRNAs εντοπίζονταν στην ερυθρά σειρά και παρουσίαζαν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης κατά την εξέλιξη της ερυθροποίησης· ορισμένα υποεκφράζονται ενώ άλλα υπερεκφράζονται (31).

Η πρώτη αναφορά για τον τρόπο δράσης και την έκφραση συγκεκριμένων microRNAs κατά την πορεία εξέλιξης της ερυθροειδούς διαδικασίας παρουσιάστηκε το 2005 από το εργαστήριο των N Felli et al. Οι ερευνητές, μελετώντας τα miRNA-221 και miRNA-222, παρατήρησαν ότι τα μόρια αυτά υποεκφράζονταν σε όλα τα στάδια της ερυθροποίησης και η πιθανή έκφρασή τους λειτουργούσε ανασταλτικά στην ανάπτυξη των πρόδρομων ερυθροκυττάρων.

Τα miRNA-221 και miRNA-222 είναι μικρά μόρια RNA που προέρχονται από το ίδιο αρχικό miRNA-μετάγραφο (pri-miRNA) (37,38), μοιράζονται την ίδια seed-

περιοχή και κωδικοποιούνται από το χρωμόσωμα X **(43)**. Κύριος στόχος τους είναι το πρωτογονιδίο c-kit, του οποίου καταστέλλουν τη μετάφραση, εμποδίζοντας τη δημιουργία του αυξητικού συμπλόκου μεταξύ της πρωτεΐνης c-kit και του παράγοντα SCF (Stem Cell Factor) και κατά συνέπεια καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των BFU-Es και CFU-Es κυττάρων. Επίσης, η έκφραση των miRNA-221 και miRNA-222 στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα οδηγεί σε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων αυτών και ταυτόχρονα αυξάνει το ρυθμό απόπτωσής τους. Μαζί με το miRNA-223, τα δύο προαναφερθέντα miRNAs αποτελούν τους κύριους αρνητικούς ρυθμιστές της ερυθροποίησης που στόχο έχουν τη δέσμευση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε άλλες αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές πέραν της ερυθράς.

Το miRNA-223 αποτελεί ένα καθοριστικό παράγοντα για τη ρύθμιση της λειτουργίας της κοκκιοκυτταρικής σειράς αλλά και τη διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε κοκκιοκύτταρα. Τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί ο ρόλος του στην εξέλιξη της ερυθροποίησης και στην παραγωγή των ώριμων ερυθροκυττάρων. Κύριος στόχος της δράσης του είναι η πρωτεΐνη LMO2 (Lim domain only 2) **(49)**, μία πρωτεΐνη που ανήκει στο σύμπλοκο των ρυθμιστικών πρωτεϊνών οι οποίες ελέγχουν την έκφραση ειδικών γονιδίων υπεύθυνων για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των BFU-Es και CFU-Es κυττάρων **(37)**. Η υπερέκφραση του miRNA-223 στα πρώτα δεσμευμένα κύτταρα της ερυθράς σειράς έχει ως αποτέλεσμα να σχηματίζονται λιγότερες BFU-E και CFU-E αποικίες και να μειώνεται σημαντικά ο ρυθμός ωρίμανσης των προερυθροβλαστών **(43)**. Εκτός όμως από την LMO2, το miRNA-223 στοχεύει και τη λειτουργία της πρωτεΐνης Foxo3A (Forkhead Fox class 0)· ενός μεταγραφικού παράγοντα που ανήκει στην υπεροικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων Forkhead. Η έκφραση της Foxo3A παρατηρείται στα τελευταία στάδια της ερυθροποίησης στα οποία είναι απαραίτητη για τη βαθμιαία συμπύκνωση του πυρήνα και τη μετατροπή των ερυθροβλαστών σε δικτυοερυθροκύτταρα **(50)**. Η απώλεια της δράσης της ή η μετάλλαξη του σύστοιχου γονιδίου της έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αναιμίας στον οργανισμό ή/και δικτυοερυθροκυττάρωσης **(51)**. Η Foxo3A είναι μία σημαντική πρωτεΐνη για την ωρίμανση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων, γιατί επάγει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στους πολυχρωματόφιλους και οξεόφιλους ερυθροβλάστες και καταστέλλει την κωδικοποίηση του γονιδίου BTG-1 (B-cell translocation gene-1) το οποίο εμποδίζει την επιβίωση και ωρίμανση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων **(50,52)**. Η παρουσία της επίσης, έχει συνδεθεί με την ικανότητα των ώριμων ερυθροκυττάρων να επιβιώνουν σε συνθήκες οξειδωτικού στρες

και να διατηρούν τον σχετικά μεγάλο χρόνο ζωής τους, παρά την απουσία πυρήνα και την απώλεια της δυνατότητας κυτταρικής διαίρεσης η οποία τα χαρακτηρίζει (52).

Άλλο ένα εξίσου σημαντικό miRNA που εμπλέκεται στη διαδικασία της ερυθροποίησης είναι το miRNA-24, το οποίο αποτελεί ακόμη ένα αρνητικό ρυθμιστή της διαδικασίας αυτής. Κύριος στόχος του είναι η καταστολή της μετάφρασης του υποδοχέα ακτιβίνης τύπου I (ALK4) και έμμεσα η καταστολή της λειτουργίας της ακτιβίνης A, μέλους της υπερικογένειας των αυξητικών παραγόντων TGF-β. Η ακτιβίνη A είναι μία κυτοκίνη απαραίτητη για τη σωστή εξέλιξη της ερυθροποίησης και συμμετέχει ενεργά τόσο στη διαφοροποίηση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων όσο και στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης. Η ικανότητά της να διεγείρει τη σύνθεση του DNA και την κυτταρική διαίρεση στις BFU-Es αποικίες οδηγεί στην ωρίμανση και αύξηση των αποικιών αυτών, ενώ η “συνομιλία” της με την ερυθροποιητίνη ενισχύει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των CFU-Es κυττάρων (43,53). Η δέσμευσή της με τους επιφανειακούς σύστοιχους υποδοχείς της –τους υποδοχείς ακτιβίνης τύπου I (ALK4) και τύπου II- επάγει την μετάφραση του mRNA σφαιρίνης και την έναρξη της σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης (53). Ειδικότερα, η δημιουργία του συμπλόκου ακτιβίνης A και υποδοχέα ακτιβίνης τύπου II σηματοδοτεί τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του υποδοχέα τύπου I (ALK4). Ο υποδοχέας ALK4 φωσφορυλιώνει στη συνέχεια τις πρωτεΐνες Smad2 και Smad3, οι οποίες σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο Smad πρωτεϊνών στο οποίο συνδέεται και η πρωτεΐνη Smad4. Το σύμπλοκο αυτό μεταφέρεται στον πυρήνα, δεσμεύεται στην περιοχή του υποκινητή των ερυθροειδικών γονιδίων π.χ. των γονιδίων σφαιρίνης και ρυθμίζει την έκφρασή τους (37,54). Η παρουσία των υψηλών επιπέδων έκφρασης του miRNA-24 στα κύτταρα της ερυθράς σειράς έχει ως αποτέλεσμα να ανασταλεί η μετάφραση του ALK4-mRNA -λόγω της δέσμευσης του miRNA-24 στην 3-UTR αμετάφραστη περιοχή του μεταγράφου- να μειωθεί η σύνθεση της αιμοσφαιρίνης και να παρατηρηθεί σημαντική μείωση του ρυθμού δημιουργίας των BFU-E και CFU-E αποικιών (40,43,54).

Δύο άλλες κύριες μεταβολές που υφίστανται κατά την εξέλιξη της ερυθροποίησης, η συμπύκνωση της χρωματίνης και η απώλεια του πυρήνα στο στάδιο των δικτυοερυθροκυττάρων, βρίσκονται υπό τον έλεγχο ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει τα γονίδια *Riok3* και *Mxi1*, την ιστονική ακετυλοτρανσφεράση *Gcn5* και το miRNA-191. Στα φυσιολογικά πρόδρομα ερυθροκύτταρα η αυξημένη έκφραση των γονιδίων *Riok3* και *Mxi1* και η αντίστοιχη υποέκφραση του miRNA-191 σηματοδοτούν τη μείωση των επιπέδων έκφρασης της

ιστονικής ακετυλοτρανσφεράσης Gen5 επάγοντας τη συμπύκνωση της χρωματίνης και την αποακετυλίωση των ιστονών (12,40). Αντίθετα, η υπερέκφραση του miRNA-191 στα κύτταρα της ερυθράς σειράς αναστέλλει την έκφραση των δύο γονιδίων με αποτέλεσμα να παραμένει ο πυρήνας στα δικτυερυθροκύτταρα και να είναι ελλιπής η ολοκλήρωση της ερυθροποίησης (12,55).

Γενικά, η ορθή εξέλιξη της ερυθροειδούς διαδικασίας είναι βασισμένη στην ισορροπία μεταξύ των αρνητικών και θετικών ρυθμιστικών μορίων -συμπεριλαμβανομένων των miRNAs, των γονιδίων και των μεταγραφικών παραγόντων- που ελέγχουν την ερυθροποίηση με στόχο την παραγωγή και ελευθέρωση των φυσιολογικών απύρηνων ερυθροκυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος.

Ένα από τα σημαντικά ζεύγη miRNAs που έχουν χαρακτηριστεί ως θετικοί ρυθμιστές της ερυθροποίησης και των οποίων η έκφραση είναι αυξημένη τόσο στα πρόδρομα όσο και στα ώριμα ερυθροκύτταρα είναι το ζεύγος των miRNA-451 και miRNA-144. Τα δύο αυτά μόρια μεταγράφονται από το ίδιο αρχικό miRNA-μετάγραφο (pri-miRNA) και μοιράζονται την ίδια αλληλουχία στη seed-περιοχή (33,37,38). Κωδικοποιούνται επίσης, από τη χρωμοσωμική περιοχή 17q11.2 του ανθρώπινου γονιδιώματος (44) και αποτελούν τους κύριους στόχους του μεταγραφικού παράγοντα GATA-1 -ο οποίος διεγείρει την βιοσύνθεσή τους.

Τα miRNA-451 και miRNA-144 είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και επιβίωση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων, γι αυτό και η έναρξη της έκφρασής τους καταγράφεται από τα πρώτα στάδια δημιουργίας των ερυθροβλαστών και συγκεκριμένα από το στάδιο των προερυθροβλαστών. Συμμετέχουν, επίσης, ενεργά στις δομικές και λειτουργικές μεταβολές που συμβαίνουν κατά την εξέλιξη της ερυθροποίησης, ενώ μελέτες σε πειραματόζωα έχουν καταδείξει το ρυθμιστικό τους ρόλο στην καταστολή γονιδίων που δρουν ανασταλτικά στην πορεία της ερυθροειδούς ανάπτυξης π.χ. του γονιδίου GATA-2 (31,33). Η παρουσία και η δράση του γονιδιακού τύπου miRNA-451/144 στα δεσμευμένα κύτταρα της ερυθράς σειράς ρυθμίζει μετα-μεταγραφικά την έκφραση γονιδίων που συνδέονται με την ερυθροποίηση π.χ. των γονιδίων σφαιρίνης και επάγει την ωρίμανση των προερυθροβλαστών και τη διαφοροποίησή τους σε βασεόφιλους ερυθροβλάστες. Επιπλέον, σηματοδοτεί τη βαθμιαία μείωση του ρυθμού κυτταρικής διαίρεσης με σκοπό την ενίσχυση της ανάπτυξης και επιβίωσης των ερυθροβλαστών (45).

Ακόμη, το miRNA-144 συμμετέχει σ' ένα μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης που στόχο έχει τη ρύθμιση της έκφρασης της α-εμβρυικής σφαιρίνης. Το 2009 το

εργαστήριο των Fu et al, μέσα από μία σειρά πειραμάτων σε έμβρυα ποντικών, παρατήρησε ότι η έκφραση του miRNA-144 ήταν αντιστρόφως ανάλογη της έκφρασης της εμβρυικής α-σφαιρίνης. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του miRNA-144 οδηγούσαν σε μείωση της σύνθεσης της σφαιρίνης και αντίστροφα. Κύριος στόχος και των δύο γονιδίων είναι ο μεταγραφικός παράγοντας KLFD, ο οποίος έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στον υποκινητή τόσο του ενός όσο και του άλλου γονιδίου. Η υπερέκφραση του miRNA-144 έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη δέσμευση του KLFD στον υποκινητή του γονιδίου της εμβρυικής α-σφαιρίνης με αποτέλεσμα να αναστέλλεται και η έναρξη της σύνθεσης της σφαιρίνης. Αντίθετα, τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης του miRNA-144 ενισχύουν τη δέσμευση του KLFD στον υποκινητή του γονιδίου της εμβρυικής α-σφαιρίνης σηματοδοτώντας την έναρξη της σύνθεσης της πρωτεΐνης (Εικ.4). Η παρουσία του μηχανισμού αυτού ουσιαστικά ρυθμίζει τα επίπεδα συγκέντρωσης της εμβρυικής α-σφαιρίνης στον οργανισμό και τον προστατεύει από την υπο- ή υπερέκφρασή της (34,46).



Εικ.4: Αυξημένη παραγωγή της εμβρυικής α-σφαιρίνης κατά τη απουσία του miRNA-144.

Η έκφραση του miRNA-144 αναστέλλει τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα KLFD και έμμεσα εμποδίζει την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου της εμβρυικής α-σφαιρίνης.

Πιθανή απώλεια της δράσης του γονιδιακού τύπου miRNA-454/144 έχει δυσμενείς συνέπειες στον οργανισμό αλλά ταυτόχρονα μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο κλινικό εργαλείο/βιοδείκτη για την ταυτοποίηση παθολογικών καταστάσεων (48). Η μειωμένη έως καθόλου έκφραση του miRNA-451 ή/και του miRNA-144 έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται σημαντικά η δυνατότητα ωρίμανσης και διαφοροποίησης των προερυθροβλαστών καθώς επίσης και η έναρξη της σύνθεσης της αιμοσφαιρίνης (43,49). Αντίθετα, αυξάνεται δραματικά ο αριθμός απόπτωσης των πρόδρομων ερυθροκυττάρων και δημιουργείται αναιμία στον οργανισμό λόγω του μειωμένου αριθμού ερυθροκυττάρων που ελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος, του χαμηλού αιματοκρίτη και της μειωμένης συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης (33,44).

3. Στόχος της Μεταπτυχιακής εργασίας

Ο κύριος στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η προκαταρκτική διερεύνηση πιθανών διαφορών των προτύπων έκφρασης ορισμένων ερυθροειδικών γονιδίων και miRNAs που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων σφαιρίνης στα τελικά στάδια διαφοροποίησης φυσιολογικών και παθολογικών ερυθροκυττάρων. Στόχος, επίσης, είναι η ανάπτυξη και προτυποποίηση μίας ευαίσθητης και αξιόπιστης μεθόδου ποσοτικοποίησης των mRNAs και των microRNAs των ex-vivo πρόδρομων ερυθροκυττάρων.

4. Υλικά και Μέθοδοι

Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής για μελέτη των microRNAs στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα. Η πειραματική διαδικασία αποτελείται από στάδια ανάπτυξης, προτυποποίησης και αξιολόγησης της αξιοπιστίας της μεθοδολογίας. Σ' αυτή τη εργασία, η μεθοδολογία αφορά μία πολυσταδιακή και ευαίσθητη διαδικασία η οποία πραγματοποιείται σε αποστειρωμένες συνθήκες εργαστηρίου. Για το λόγο αυτό δεσμεύτηκαν χώροι και αναλώσιμα ειδικά για την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Η παρούσα μελέτη των microRNAs περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- Αρχικά, γίνεται καλλιέργεια των μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος σε υλικό μεθυλοκυτταρίνης, εμπλουτισμένο με τους αυξητικούς παράγοντες Stem Cell Factor και ερυθροποιητίνη (EPO).
- Σε καθορισμένες χρονικές περιόδους συλλέγονται τα ερυθροειδή κύτταρα και απομονώνεται το ολικό RNA και miRNA από τα κύτταρα αυτά.
- Με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής μετατρέπεται το mRNA σε cDNA και στη συνέχεια γίνεται σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων: GATA-1, HBB, HBG1/2 και KLF-1 με τη χρήση της μοριακής μεθόδου PCR πραγματικού χρόνου (Real –Time PCR).
- Παρόμοια πειραματική προσέγγιση ακολουθείται και για τα εξεταζόμενα miRNA-451 και miRNA-144, των οποίων η έκφραση ρυθμίζει θετικά την ερυθροποίηση.

4.1 Δείγματα

- Τέσσερα (4) δείγματα ολικής αίματος φυσιολογικών ατόμων
- Τέσσερα (4) δείγματα ολικής αίματος με ομόζυγη β⁰ Μεσογειακή Αναιμία
- Δείγματα ρυθμιστές (calibrators)
 - Μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών
 - Επιθηλιακά κύτταρα βρόγχου
 - Μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος

4.2 Υλικά

(Αντιδραστήρια και Προμηθευτές: Παρ. 7.1)

- Ημιστερεή καλλιέργεια μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (βραχείας διάρκειας)
 - MethoCult[®] H4230
 - Ficoll-Histopaque[®] 1077
 - rhSCF (c: 10μg/μl)
 - rhEPO (c: 1U/5μl)
 - Ρυθμιστικό διάλυμα PBS
- Απομόνωση ολικού RNA και microRNA
 - A' Μέθοδος: Trizol[®] Reagent**
 - Ίζημα ερυθροειδών κυττάρων
 - Trizol[®] Reagent
 - Χλωροφόρμιο
 - RNase-free γλυκογόνο (c: 20μg/μl)
 - Ισοπροπυλική αλκοόλη
 - 75% αιθανόλη
 - RNase-free water
 - B' Μέθοδος: miRNeasy mini kit**
 - Ίζημα ερυθροειδών κυττάρων
 - miRNeasy mini kit
 - 70%, 80% και 100% αιθανόλη
- Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA synthesis)
 - **mRNA:** Super Script First-Strand Synthesis System kit
 - **miRNA:** TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription kit
- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)
 - LightCycler TaqMan Master

4.3 Μέθοδοι

4.3.1 Ημιστερεή καλλιέργεια μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (βραχείας διάρκειας)

Η εφαρμογή του πρωτοκόλλου της ημιστερεής καλλιέργειας βραχείας διάρκειας βασίζεται στην ικανότητα των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων να αναπτύσσονται σε ημιστερεό καλλιεργητικό μέσο και να δίνουν αποικίες μίας μόνο κυτταρικής σειράς.

Αναλυτικά, το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στο εργαστήριο έχει ως εξής:

- Λήψη 5 mL περιφερικού αίματος σε σωληνάριο που περιέχει αντιπηκτικό υλικό (EDTA)
- Αραίωση του αίματος σε διπλάσιο ή τριπλάσιο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος PBS
- Επιστοίβαξη του αραιωμένου δείγματος σε ίσους όγκους διαχωριστικού μέσου: Ficoll-Histopaque
- Φυγοκέντρηση στις 1500rpm για 30 min
- Αναρρόφηση της στοιβάδας των μονοπύρηνων κυττάρων με σύριγγα 10 mL και μεταφορά της σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο
- Προσθήκη ίσου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος και φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 10 min
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου, προσθήκη 2 mL PBS και φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 10 min
- Αφαίρεση του υπερκειμένου και διαλυτοποίηση του ιζήματος σε 1 mL PBS
- Μέτρηση της συγκέντρωσης των κυττάρων/ mL σε κυτταρομετρητή ροής
- Σε κάθε 1 mL καλλιεργητικού υλικού θα εμπεριέχονται:
 - 200.000 μονοπύρηννα κύτταρα
 - 50 ng SCF (c: 10ng/ μ L)
 - 5 U EPO (c: 1U/ μ L)
- Προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας κυττάρων και παραγόντων σε 6 mL καλλιεργητικού υλικού για καλλιέργειες εις τετραπλούν
- Πολύ καλή ανάδευση με σύριγγα 2.5 mL και διαχωρισμός του υλικού σε τέσσερα μικρά τρυβλία Petri (35 mm)
- Σ' ένα μεγάλο τρυβλίο Petri (90 mm) τοποθετούνται δύο μικρά τρυβλία και προστίθεται ακόμη ένα 3^ο με αποστειρωμένο νερό, απαραίτητο για την παροχή υγρασίας

- Γίνεται επώαση των κυττάρων σε συνθήκες 5% CO₂ και 37° C
- Παρακολούθηση και συλλογή των αποικιών σε συγκεκριμένες χρονικές περιόδους της καλλιέργειας

4.3.2 Συλλογή κυτταρικών αποικιών

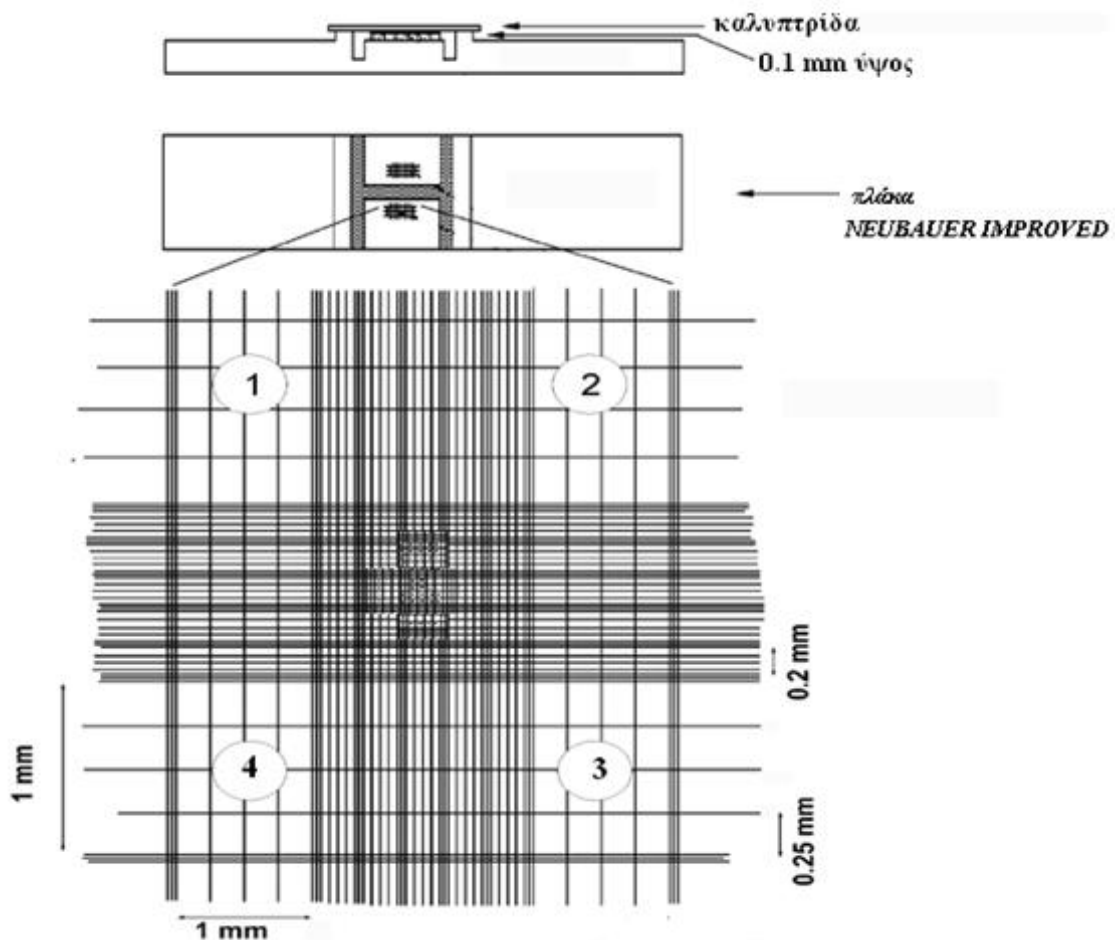
- Οι αποικίες συλλέγονται κατά τη 10^η, 12^η και 14^η μέρα της κυτταρικής καλλιέργειας
- Πλένονται δύο φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS και φυγοκεντρώνονται στις 3000 rpm για 10 min στους 4° C
- Μετά το δεύτερο πλύσιμο, αφαιρείται το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα διαλυτοποιείται σε PBS
- Το εναιώρημα διαχωρίζεται στη συνέχεια σε τρία tubes:
 - το εναιώρημα μίας αποικίας το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα Neubauer
 - το εναιώρημα μίας δεύτερης αποικίας το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων και
 - ο μεγαλύτερος όγκος εναιωρήματος ο οποίος θα χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή ολικού RNA και microRNA

4.3.3 Μέτρηση των ερυθροειδών κυττάρων

Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται με τη χρήση της πλάκας Neubauer Improved (0.1 mm depth) η οποία είναι γνωστή και ως αιμοκυτταρόμετρο (Εικ.5). Είναι μία αντικειμενοφόρος πλάκα διαφορετική από τις υπόλοιπες, η οποία έχει δύο λείες επιφάνειες με χαραγμένο πλέγμα κάθετων και οριζόντιων γραμμών στην κάθε μία. Κάθε πλέγμα αποτελείται από εννέα μεγάλα τετράγωνα διαχωρισμένα μεταξύ τους από τρεις παράλληλες γραμμές και το κάθε τετράγωνο διαιρείται σε επιμέρους μικρότερα τετράγωνα. Δεξιά και αριστερά από τα πλέγματα υπάρχουν υπερειπωμένες άκρες στις οποίες επικάθεται η καλυπτρίδα, δημιουργώντας μία απόσταση ύψους 0.1 mm μεταξύ του πλέγματος και της καλυπτρίδας. Κατά συνέπεια ο όγκος ενός μεγάλου τετραγώνου είναι 0.1 mm³, γιατί το μήκος του είναι 1 mm, το πλάτος: 1mm και το ύψος: 0.1 mm

Από το εναιώρημα της κάθε κυτταρικής αποικίας τοποθετείται μία μικρή ποσότητα (10μL) στην περιοχή των δύο πλεγμάτων και μετρείται ο αριθμός των κυττάρων που εντοπίζονται στα τέσσερα μεγάλα, ακραία τετράγωνα (τετράγωνα 1-4

Εικ.5). Στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται ο Μέσος Όρος των κυττάρων X 1000, δίνοντας έτσι τον αριθμό των κυττάρων που υπάρχουν σε μία αποικία, η οποία έχει εναιωρηθεί σε 100 μ L ρυθμιστικού διαλύματος.



Εικ.5: Απεικόνιση της πλάκας NEUBAUER IMPROVED στην οποία καταμετρήθηκαν τα κύτταρα της κυτταρικής καλλιέργειας.

4.3.4 Μελέτη της μορφολογίας των ερυθροειδών κυττάρων με Giemsa stain

Η χρώση Giemsa (Παρ. 7.4) είναι μία εύχρηστη τεχνική που χρησιμοποιείται για τη διάκριση των κυτταρικών τύπων του αίματος και του μυελού των οστών με βάση την πυρηνική και κυτταροπλασματική τους μορφολογία.

Αποτελείται από ένα μείγμα χρωστικών ουσιών ικανών να χρωματίζουν τα συστατικά του κυττάρου με βάση το pH τους. Οι χρωστικές είναι:

α) το μπλε του μεθυλενίου, το οποίο χρωματίζει μπλε τα όξινα συστατικά του αίματος π.χ. το RNA, το κυτταρόπλασμα και τους πυρηνίσκους

β) το κυανού (azure B), το οποίο χρωματίζει μωβ και κόκκινα τα βασικά συστατικά, όπως είναι το DNA και τα πρωτογενή κοκκία και

γ) η ηωσίνη, η οποία δίνει ένα κοκκινο-πορτοκαλί χρώμα στα πιο αλκαλικά συστατικά, όπως είναι η αιμοσφαιρίνη

Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό ότι το pH των χρωστικών ουσιών έχει σημαντικό και καθοριστικό ρόλο στη διάκριση των συστατικών των αιμοποιητικών κυττάρων και κατά συνέπεια στη διάκριση των κυτταρικών αιμοποιητικών σειρών. Η οποιαδήποτε μεταβολή του θα σήμαινε λανθασμένη αντίδραση μεταξύ της χρωστικής και των κυτταρικών συστατικών και αποτυχία στην ορθή αναγνώρισή τους.

Στο εργαστήριο χρησιμοποιείται επίχρισμα ερυθροειδούς αποικίας σε αντικειμενοφόρο πλάκα για τη μελέτη της μορφολογίας των ερυθροειδών κυττάρων με την τεχνική Giemsa:

- Το επίχρισμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης Giemsa για 5 λεπτά και στη συνέχεια ξεπλένεται με απεσταγμένο νερό.
- Αφήνεται να στεγνώσει πολύ καλά σε θερμοκρασία δωματίου
- Με τη χρήση μικροσκοπίου παρατηρούνται τα κύτταρα του επιχρίσματος στα οποία μπορεί να προστεθεί και μία σταγόνα ελαίου για καλύτερη αναγνώριση

4.3.5 Εξαγωγή ολικού RNA και microRNA από τις ερυθροειδείς αποικίες

Για την εξαγωγή ολικού RNA και microRNA από τα ερυθροειδή κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι:

- Απομόνωση ολικού RNA με Trizol® Reagent (Invitrogen) και
- Χρήση του miRNeasy Mini kit (Qiagen)

➤ Απομόνωση ολικού RNA με Trizol® Reagent

- Λόγω της μικρής συγκέντρωσης κυττάρων που υπάρχουν στο ίζημα των ερυθροειδών αποικιών, προσθέτονται 800μL Trizol στο ίζημα και ομογενοποιείται.
- Το ομογενοποιημένο δείγμα στη συνέχεια, μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα για την απομόνωση του ολικού RNA ή να διατηρηθεί στην υπερκατάψυξη (-80°C) για ένα μήνα τουλάχιστον.
- Κατά την απομόνωση του RNA γίνεται αρχικά επώαση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.

- Προσθέτονται 160μL χλωροφορμίου και το δείγμα ανακινείται πολύ καλά για 15 sec.
- Στη συνέχεια, επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 min και φυγοκεντρείται για 15 min στις 12.000 X g στους 4° C.
- Στο στάδιο αυτό δημιουργούνται τρεις διακριτές στοιβάδες από το ομογενοποιημένο δείγμα: α) η οργανική-φαινολική στοιβάδα που βρίσκεται στον πυθμένα, β) η μεσαία-χλωροφορμική και γ) η ανώτερη υδάτινη στοιβάδα στην οποία υπάρχει το RNA.
- Μεταφέρονται 300μL υδάτινης στοιβάδας σε αποστειρωμένο σωλήνα 1.5 ml και προσθέτονται 400μl ισοπροπυλικής αλκοόλης και 1μl RNase-free γλυκογόνο
- Το διάλυμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min και ακολούθως το RNA κατακρυσνίζεται με φυγοκέντρωση στις 12.000 X g για 10 min σε θερμοκρασία 4° C.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και το RNA-ίζημα πλένεται με 800μl 75% αιθανόλης. Γίνεται φυγοκέντρωση στις 7500 X g για 5 min σε θερμοκρασία 4°C.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει πολύ καλά για 10 min.
- Στη συνέχεια, διαλυτοποιείται σε 40μl RNase-free water. Για καλύτερη διαλυτοποίηση, το διάλυμα επωάζεται στους 55°C για 10-15 min και ακολούθως γίνεται πολύ καλή ανάδευση.
- Με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου NanoDrop ND-1000 προσδιορίζεται η συγκέντρωση και η καθαρότητα του RNA και ακολούθως αποθηκεύεται στην υπερκατάψυξη (-80°C) για μεγάλο χρονικό διάστημα ή χρησιμοποιείται άμεσα για την σύνθεση του συμπληρωματικού DNA.

➤ **Απομόνωση ολικού RNA με χρήση του miRNeasy Mini kit**

- Αρχικά, γίνεται ομογενοποίηση του ιζήματος των ερυθροειδών κυττάρων με 700μL QIAzol Lysis Reagent.
- Το ομογενοποιημένο δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- Προσθέτονται 140μl χλωροφορμίου και το δείγμα ανακινείται πολύ καλά για 15 sec. Ακολούθως επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 min.
- Φυγοκεντρείται στις 12.000 X g για 15 min στους 4°C.

- Σε αποστειρωμένο σωλήνα μεταφέρονται 350μl υδάτινης στοιβάδας και προστίθεται ίσος όγκος 70% αιθανόλης. Το δείγμα αναμειγνύεται πολύ καλά και μεταφέρεται σε μία στήλη RNeasy Mini spin.
- Φυγοκεντρείται στις 12.000 X g για 15 sec σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το διάλυμα που απορρίφθηκε από τη στήλη κατά τη φυγοκέντρωση (flow-through) και το οποίο περιέχει τα microRNAs, μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο σωλήνα για να ξεκινήσει η διαδικασία καθαρισμού των microRNAs.
- Η RNeasy Mini spin στήλη –που περιέχει το ολικό RNA- διατηρείται προσωρινά σε συνθήκες συντήρησης για τον επακόλουθο καθαρισμό του RNA.

Καθαρισμός των microRNAs από το flow-through διάλυμα:

- Στο διάλυμα flow-through προστίθεται 100% αιθανόλη σε όγκο 0,65 X (π.χ. 700μl διάλυμα και 450 μl αιθανόλη).
- Γίνεται πολύ καλή ανάδευση και μεταφέρεται ο όγκος σε νέα στήλη RNeasy Mini spin. Φυγοκεντρείται στις 12.000 X g για 15 sec σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το διάλυμα που απομακρύνεται από τη στήλη απορρίπτεται και προσθέτονται 700μl από το Buffer RWT, το οποίο είναι υπεύθυνο για το ξέπλυμα της RNeasy Mini spin στήλης. Γίνεται φυγοκέντρωση στις 12.000 X g για 15 sec στους 25°C.
- Στη συνέχεια, μεταφέρονται στη στήλη 500μl Buffer RPE και φυγοκεντρούνται στις 12.000 X g για 15 sec (25°C).
- Το διάλυμα που απομακρύνεται από τη στήλη αφαιρείται και προσθέτονται 500μl 80% αιθανόλη. Γίνεται φυγοκέντρωση στις 12.000 X g για 2 min με στόχο να στεγνώσει πολύ καλά η μεμβράνη της στήλης.
- Η RNeasy Mini spin στήλη μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα 2ml και φυγοκεντρείται με ανοικτό καπάκι για 5 min στις 12.000 X g.
- Τοποθετείται τέλος, σ' ένα νέο σωλήνα 1.5 ml και στο κέντρο της μεμβράνης της προσθέτονται 30μl RNeasy-free water.
- Η στήλη φυγοκεντρείται για 1 min στις 12.000 X g και εκλούεται το πλουσιο σε microRNAs κλάσμα.
- Με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου NanoDrop ND-1000 φωτομετρείται το RNA και προσδιορίζονται η συγκέντρωση και η καθαρότητά του.

Καθαρισμός του RNA:

- Στην RNeasy Mini spin στήλη που περιέχει το ολικό RNA προσθέτονται 700μl Buffer RWT και φυγοκεντρείται για 15 sec στις 12.000 X g (25°C)
- Αφαιρείται το διάλυμα flow-through και προσθέτονται 500μl Buffer RPE. Γίνεται φυγοκέντρηση στις 12.000 X g για 15 sec (25°C)
- Μεταφέρονται ακόμη 500μl Buffer RPE στην RNeasy Mini spin στήλη και γίνεται φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες.
- Στη συνέχεια, η στήλη τοποθετείται σε σωλήνα 2ml και φυγοκεντρείται στην μέγιστη ταχύτητα με ανοικτό καπάκι για 1 min.
- Ακολούθως, μεταφέρεται σ' ένα νέο αποστειρωμένο σωλήνα 1.5 ml και στο κέντρο της μεμβράνης της προσθέτονται 40μl RNeasy-free water.
- Γίνεται φυγοκέντρηση για 1 min στις 12.000 X g και έκλυση του ολικού RNA.

4.3.6 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) από ένα αγγελιαφόρο RNA (mRNA), που λειτουργεί ως εκμαγείο, αποτελεί ένα εύχρηστο εργαλείο στη Γενετική τόσο για την κλωνοποίηση ευκαρυωτικών γονιδίων σε προκαρυωτικούς οργανισμούς όσο και για τη μελέτη της έκφρασης πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από διάφορα υπό μελέτη γονίδια.

Με τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης (της RNA-εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης) και την παρουσία εκκινητών, το mRNA μεταγράφεται σε μία συμπληρωματική αλυσίδα DNA από την οποία θα δημιουργηθεί ένα αντίγραφο δίκλωνου DNA. Ειδικότερα, η αλληλουχία της πολυ-A ουράς, που υπάρχει στο 3-άκρο των ευκαρυωτικών mRNAs, έχει την ικανότητα να δεσμεύεται συμπληρωματικά με ολιγονουκλεοτίδια (oligo-dT) δημιουργώντας μία δίκλωνη περιοχή που αναγνωρίζεται από την αντίστροφη μεταγραφάση. Το ένζυμο στη συνέχεια και κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες π.χ. παρουσία ιόντων μαγνησίου, ουδέτερο pH και κατάλληλη θερμοκρασία, συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα DNA.

Στο εργαστήριο, η αντίστροφη μεταγραφή του mRNA γίνεται με τη χρήση του Super Script First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen) και την παρουσία ολιγονουκλεοτιδίων (primer oligo-dT) για το mRNA και ειδικών εκκινητών (specific primers) για τα microRNAs.

➤ Σύνθεση cDNA από mRNA

- Σε κάθε σωληνάριο 0.2 ml προσθέτονται τα ακόλουθα:

Συστατικά	Όγκος (μl)
RNA	n (η ποσότητα RNA που θα προστεθεί, θα αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 100ng/μl)
10 mM dNTP mix	1
Primer (oligo-dT)	1
DEPC-treated water	x [x= 10 μl- (n _{RNA} + 1 _{dNTP} + 1 _{oligo-dT})]
Τελικός όγκος αντίδρασης	10

- Γίνεται επώαση των δειγμάτων για 5 min στους 65° C και στη συνέχεια τοποθετούνται σε πάγο για 1 min τουλάχιστον.
- Ετοιμάζεται το διάλυμα της αντίδρασης (reaction mix) ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που θα μελετηθούν

Συστατικά	Όγκος (1 δείγμα)	Όγκος (10 δείγματα)
10X RT Buffer	2 μl	20 μl
25mM MgCl₂	4 μl	40 μl
0.1 M DTT	2 μl	20 μl
RNase OUT™ (40 U/μl)	1 μl	10 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	9 μl	90 μl

- Σε κάθε δείγμα προσθέτονται 9 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα και γίνεται μία μικρή ανάδευση.
- Τα δείγματα επωάζονται για 2 min στους 42°C
- Ακολούθως, σε κάθε δείγμα προστίθεται 1 μl Super Script II RT
- Γίνεται επώαση στους 42°C για 50 min και στη συνέχεια στους 70°C για 15 min
- Τα δείγματα συλλέγονται και αναδεύονται ελαφρώς.
- Προστίθεται 1 μl RNase H σε κάθε δείγμα και επωάζονται στους 37° C για 20 min
- Τα δείγματα τέλος, μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία -20°C ή να χρησιμοποιηθούν άμεσα σε αντίδραση PCR.

➤ **Σύνθεση cDNA από microRNA**

- Σ' ένα σωλήνα 1.5 ml ετοιμάζεται το διάλυμα της αντίδρασης (master mix). Ο όγκος των αντιδρόντων συστατικών που χρησιμοποιείται είναι ανάλογος των δειγμάτων που θα μελετηθούν

Συστατικά	Όγκος (1 δείγμα)	Όγκος (10 δείγματα)
100 mM dNTP mix	0.15 µl	1.5 µl
Multiscribe™ RT enzyme (c: 50U/µl)	1.00 µl	10.0 µl
10 X RT Buffer	1.50 µl	15.0 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0.19 µl	1.9 µl
Nuclease-free water	4.16 µl	41.6 µl
Τελικός όγκος αντίδρασης	7.00 µl	70.00 µl

- Για κάθε δείγμα, μεταφέρονται σ' ένα μικρό σωλήνα 0.2 ml τα ακόλουθα:
 - 7µl master mix,
 - 5µl microRNAs και
 - 3µl ειδικών εκκινήτων (specific primers) (Παρ. 7.3.1)
- Γίνεται πολύ καλή ανάμειξη των συστατικών σε κάθε δείγμα και ακολουθεί επώαση σε θερμικό κυκλοποιητή. Το πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιείται για την επώαση είναι το ακόλουθο:

Step Type	Time (min)	Temperature (° C)
HOLD	30	16
HOLD	30	42
HOLD	5	85
HOLD	∞	4

4.3.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερέσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία από τις πιο ισχυρές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μοριακές τεχνικές, η οποία έχει την ικανότητα της ενζυμικής ενίσχυσης και του πολλαπλασιασμού μικρών τμημάτων DNA ώστε να καταστούν ανιχνεύσιμα.

Τα τελευταία χρόνια εφαρμόζεται εργαστηριακά μία εξειδικευμένη μέθοδος της PCR, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR), η οποία πέραν από την ενίσχυση της DNA αλληλουχίας, δίνει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης και μέτρησης του παραγόμενου προϊόντος σε κάθε κύκλο αντίδρασης (56). Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση φθορίζοντων δεικτών, δηλαδή φθορίζουσων χρωστικών ή τροποποιημένων φθορίζοντων εκκινητών, που δεσμεύονται στην DNA αλληλουχία. Η ένταση του σήματος που δημιουργείται είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό των προϊόντων που παράγονται κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης

Η μέθοδος της Real-time PCR έχει καθιερωθεί στη Μοριακή Βιολογία ως μία σημαντική τεχνική, η οποία χαρακτηρίζεται από πλήθος πλεονεκτημάτων και δυνατοτήτων κατά την ανίχνευση των DNA προϊόντων. Τα κυριότερα από αυτά είναι:

1. η δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης PCR όπως αυτή συμβαίνει σε πραγματικό χρόνο
2. η ταυτόχρονη ανίχνευση και μέτρηση του προϊόντος στον ίδιο σωλήνα που πραγματοποιείται η αντίδραση, αποφεύγοντας επιπρόσθετες τεχνικές π.χ. ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων
3. η ικανότητα μέτρησης της ακριβούς συγκέντρωσης των προϊόντων σε κάθε κύκλο
4. η μείωση του χρόνου και των ανθρώπινων χειρισμών στην πειραματική μελέτη

Είναι λοιπόν, γενικά αποδεκτό ότι η Real-Time PCR αποτελεί μία αξιόπιστη, ευαίσθητη και εξειδικευμένη μοριακή τεχνική η οποία βελτιστοποιεί την απόδοση των πειραμάτων, ενώ μειώνει τους παράγοντες που συντίουν στη χαμηλή απόδοση, όπως είναι ανθρώπινοι χειρισμοί και εφαρμογή επιπλέον σταδίων για λήψη αποτελεσμάτων.

Στο εργαστήριο, η εφαρμογή της Real-time PCR για τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων γονιδιακών τμημάτων έγινε με τη χρήση του LightCycler TaqMan Master (Roche) και ειδικών εκκινητών και ανιχνευτών (primers, probes) τα οποία παρασκευάστηκαν από την εταιρεία Applied Biosystems (Παρ. 7.1). Το κάθε ζεύγος

primer/probe που καθορίζει το σύστοιχο γονίδιο, βρίσκεται σε ένα διάλυμα συγκέντρωσης 2X.

Διαδικασία:

- Σ' ένα σωλήνα 1.5 ml προσθέτονται τα ακόλουθα συστατικά της PCR-αντίδρασης. Ο όγκος των συστατικών αυξάνεται ανάλογα του αριθμού των δειγμάτων σε κάθε πείραμα και κάθε δείγμα τοποθετείται εις τριπλούν.

Συστατικά	Όγκος (1 δείγμα)
PCR-grade water	9 μl
10 X conc. Primer/Probe	2 μl
5 X conc. Master Mix	4 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	15 μl

- Μεταφέρονται σε κάθε LightCycler® τριχοειδές 15μl από το PCR-mix και προσθέτονται ακολούθως 5 μl DNA
- Γίνεται φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 15 sec
- Μεταφέρονται τα δείγματα στο μηχάνημα του LightCycler και εφαρμόζεται το πιο κάτω πρόγραμμα

Analysis Mode	Cycles	Segment	Target Temperature	Hold Time	Acquisition Mode
Pre-Incubation					
None	1		95°C	10 min	none
Amplification					
Quantification	45	Denaturation	95°C	10 s	none
		Annealing	primer dependent	20 - 40 s	none
		Extension	72°C	1 s	single
Cooling					
None	1		40°C	30 s	none

4.3.8 Σχετική ποσοτικοποίηση (Relative Quantification)

Η χρήση της σχετικής ποσοτικοποίησης στη μελέτη των γονιδίων-στόχων αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διερεύνηση των μεταβαλλόμενων επιπέδων έκφρασης των γονιδίων σε υπό μελέτη δείγματα. Για την εξαγωγή ορθών και συγκρίσιμων αποτελεσμάτων, απαιτείται η κανονικοποίηση (normalization) του εξεταζόμενου γονιδίου με βάση την έκφραση ενός ενδογενούς “γονιδίου ελέγχου” (housekeeping), π.χ. το GAPDH ή το PBGD για τα ερυθροκύτταρα (56). Ειδικότερα, με τη μέθοδο αυτή, προσδιορίζεται η αλλαγή των επιπέδων έκφρασης ενός γονιδίου-στόχου (target-gene) σε σχέση με την έκφραση ενός γονιδίου-ελέγχου (reference-gene). Η διαφορά εκφράζεται ως λόγος έκφρασης και δείχνει το βαθμό υπερ- ή υποέκφρασης του γονιδίου-στόχου σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου-ελέγχου. Γονίδιο ελέγχου μπορεί να θεωρηθεί οποιοδήποτε γονίδιο το οποίο έχει την ικανότητα να παραμένει σταθερό στις μεταβαλλόμενες συνθήκες των πειραμάτων και η αλληλουχία του είναι γνωστή. Με τον τρόπο αυτό, διορθώνονται πιθανές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων οι οποίες δημιουργούνται από τη διαφορετική συγκέντρωση του αρχικού υλικού σε κάθε δείγμα ή από τη διαφορετική απόδοση της PCR-αντίδρασης (58,59).

Η σχετική ποσοτικοποίησης προϋποθέτει και τη σύγκριση του λόγου έκφρασης (target gene/reference gene) που προσδιορίζεται στα δείγματα μελέτης με το λόγο έκφρασης που προσδιορίζεται σ' ένα δείγμα που αποτελεί το δείγμα κανονικοποίησης (calibrator).

Για τον υπολογισμό της σχετικής έκφρασης έχουν δημιουργηθεί αρκετά μαθηματικά μοντέλα, τα οποία βασίζονται στη σύγκριση των κύκλων της PCR αντίδρασης, δηλαδή του ct (cycle threshold) ή cp (crossing points), στους οποίους το φθορίζον σήμα ξεκινά να αυξάνεται και να απομακρύνεται από το κατώτατο όριο της σιγμοειδούς καμπύλης της αντίδρασης. Η σύγκριση μεταξύ των εξεταζομένων δειγμάτων και των δειγμάτων αναφοράς γίνεται σε σταθερές συνθήκες φθορισμού (60).

Απο αυτά τα μοντέλα, τα κυριότερα είναι:

- 1) Το μοντέλο “delta cp (Δcp)” (εξ.1) ή “delta-delta cp ($\Delta\Delta cp$)” (εξ.2)

$$R = 2^{[Cp \text{ sample} - Cp \text{ control}]} \Rightarrow R = 2^{\Delta Cp} \quad (\text{εξ.1})$$

$$R = 2^{-[\Delta Cp \text{ sample} - \Delta Cp \text{ control}]} \Rightarrow R = 2^{-\Delta\Delta Cp} \quad (\text{εξ.2})$$

- 2) Το μαθηματικό μοντέλο που βασίζεται σ’ ένα δείγμα (εξ.3) και το αντίστοιχο μοντέλο με αρκετά δείγματα (εξ.4)

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Cp \text{ target (control - sample)}}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta Cp \text{ Ref (control - sample)}}} \quad (\text{εξ.3})$$

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Cp \text{ target (MEAN control - MEAN sample)}}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta Cp \text{ Ref (MEAN control - MEAN sample)}}} \quad (\text{εξ.4})$$

- 3) Το μαθηματικό μοντέλο που βασίζεται σε πολλαπλά δείγματα και πολλαπλά γονίδια αναφοράς (εξ.5)

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Cp \text{ target (MEAN control - MEAN sample)}}}{(E_{\text{Ref index}})^{\Delta Cp \text{ Ref index (MEAN control - MEAN sample)}}} \quad (\text{εξ.5})$$

Σ’ όλες τις πιο πάνω εξισώσεις, τα υπό μελέτη γονίδια του δείγματος-ρυθμιστή και του εξεταζόμενου δείγματος έχουν κανονικοποιηθεί με το γονίδιο αναφοράς ώστε όλες οι παράμετροι, εκτός από τα επίπεδα έκφρασης, να είναι ίδιες και το αποτέλεσμα των εξισώσεων να εστιάζεται στη διερεύνηση της υπό- ή υπερέκφρασης των γονιδίων στόχων.

4.3.9 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την εφαρμογή δύο στατιστικών μοντέλων από το πρόγραμμα STATA8 (Stata Corporation, College Station, TX,USA): α) του Shapiro –Wilk και β) του Mann-Whitney.

Το μοντέλο Shapiro-Wilk αποτελεί ένα σημαντικό τύπο ελέγχου της κατανομής των μεταβλητών ως προς την κανονικότητα. Με το σύστημα αυτό γίνεται αποδοχή της

υπόθεσης ότι δεν υπάρχει σημαντική απόκλιση της κανονικής κατανομής των αποτελεσμάτων, εφόσον η τιμή P (Probability) είναι μεγαλύτερη από 0.05 ($P > 0.05$)

Αντίθετα, οι μη-κανονικά κατανεμημένες μεταβολές αξιολογούνται με το στατιστικό μοντέλο Mann-Whitney. Το μοντέλο αυτό είναι μία μη-παραμετρική δοκιμή, η χρήση της οποίας προϋποθέτει α) τυχαία δείγματα από τον πληθυσμό και β) τα δείγματα να μην είναι κανονικά κατανεμημένα. Το επίπεδο στατιστικής σημασίας είναι αποδεκτό όταν η τιμή P είναι μικρότερη από 0.05 ($P < 0.05$)

5. Αποτελέσματα

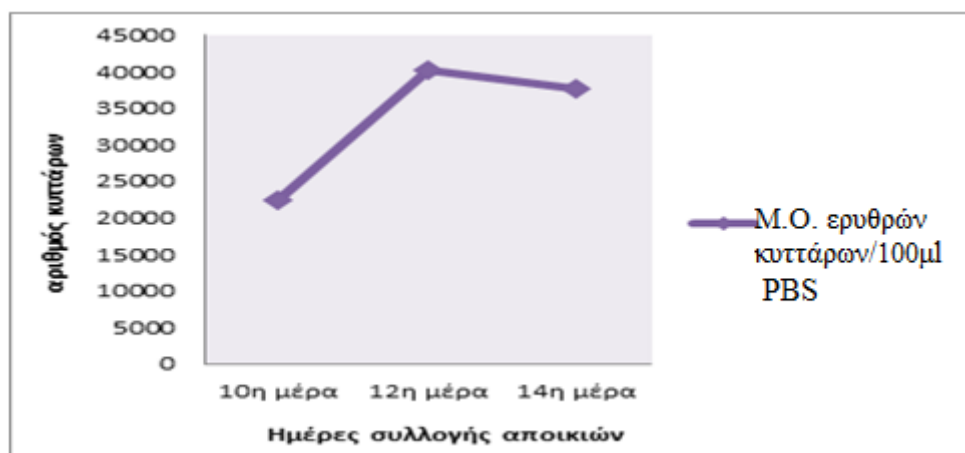
5.1 Αξιολόγηση των ερυθροειδών κυττάρων μίας αποικίας φυσιολογικών ατόμων

Η μέτρηση των κυττάρων μίας ερυθροειδούς αποικίας, εναιωρούμενης σε 100μl ρυθμιστικού διαλύματος PBS, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της πλάκας Neubauer Improved (Πίν.1). Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν αποικίες από BFU-E καλλιέργειες πέντε φυσιολογικών δοτών αίματος, οι οποίες απομονώθηκαν κατά τη 10^η, 12^η και 14^η μέρα ανάπτυξης των καλλιεργειών.

Πίνακας 1: Μετρήσεις κυττάρων αποικίας / 100μL ρυθμιστικού διαλύματος PBS:

Δείγματα	10η μέρα		12η μέρα		14η μέρα	
	αριθμός κυττάρων / αποικία	M. O.	αριθμός κυττάρων / αποικία	M.O.	αριθμός κυττάρων / αποικία	M.O.
1	38000		45500		52000	
2	24000		38000		33000	
3	23000	22400	52500	40100	44000	37614
4	16000		34500		32000	
5	11000		30000		27070	

Από τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν, παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων σε κάθε αποικία μέχρι τη 12^η μέρα συλλογής. Σ' αυτή την ημέρα υπάρχει η μέγιστη συγκέντρωση των κυττάρων σε όλα σχεδόν τα δείγματα, ενώ ακολούθως παρουσιάζεται μία μικρή μείωση η οποία πιθανόν να οφείλεται στην απώλεια του πυρήνα και της ικανότητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων στα τελευταία στάδια της ερυθροειδούς ωρίμανσης (Γραφ.Παρ.1).

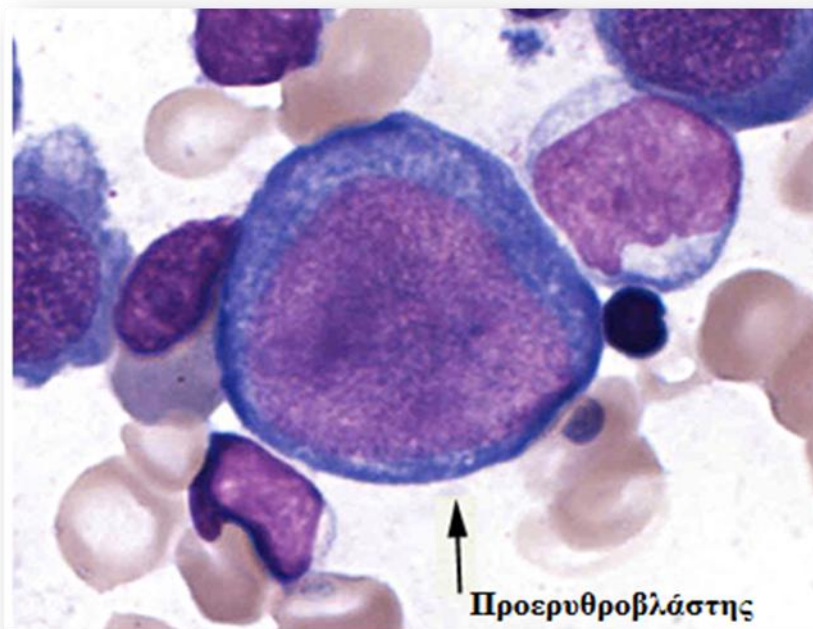


Γρ. II: Γραφική απεικόνιση του M.O. του αριθμού των κυττάρων ανά αποικία από δείγματα BFU-E καλλιέργειας κατά την 10^η, 12^η και 14^η μέρα συλλογής τους.

5.2 Μελέτη της μορφολογίας των ερυθροειδών κυττάρων με Giemsa stain

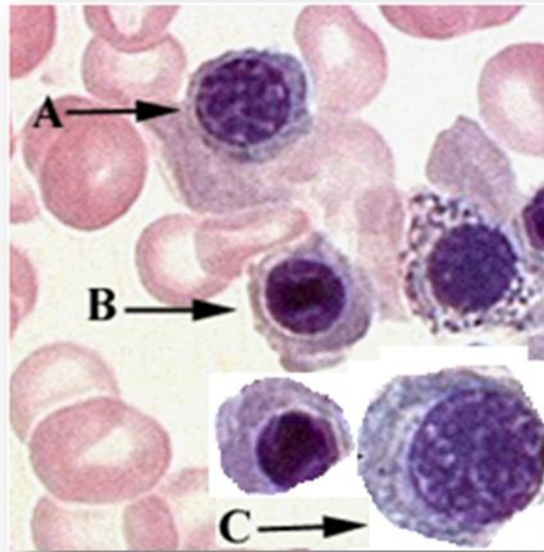
Η ανάλυση των ex vivo διαφοροποιημένων κυττάρων της ερυθράς σειράς με τη χρήση της τεχνικής Giemsa stain, αναδεικνύει τα δομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά που φέρουν τα κύτταρα της BFU-E καλλιέργειας σε καθορισμένες χρονικές περιόδους παρατήρησής τους.

- Κατά τη 10^η μέρα ανάπτυξης της καλλιέργειας εμφανίζονται μικρές ευδιάκριτες αποικίες κυττάρων, οι οποίες αποτελούνται από μικρά κύτταρα με μεγάλο πυρήνα και έντονα βασεόφιλο κυτόπλασμα. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται προερυθροβλάστες και χαρακτηρίζονται ως τα πρώτα μορφολογικά αναγνωρισμένα ερυθροειδή κύτταρα (Εικ.6).



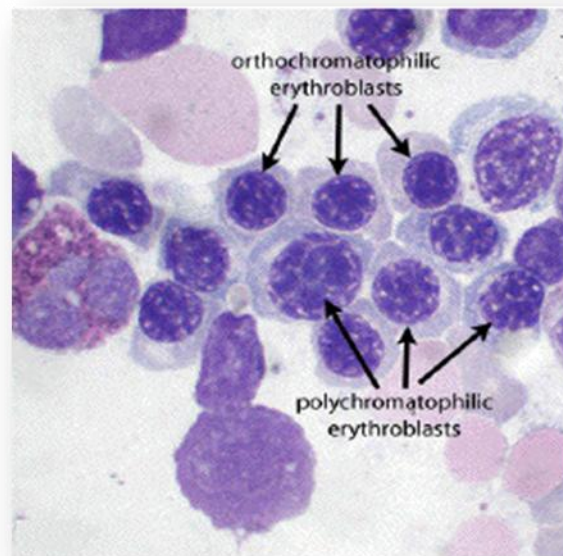
Εικ.6: Προερυθροβλάστης, το πρώτο μορφολογικά αναγνωρισμένο ερυθροειδές κύτταρο

- Στη 12^η μέρα της κυτταρικής καλλιέργειας οι αποικίες είναι μεγαλύτερες και ερυθρές λόγω της σύνθεσης αιμοσφαιρίνης. Το μέγεθος του πυρήνα μειώνεται και αυξάνεται αντίστοιχα το μέγεθος του κυτοπλάσματος. Ο κύριος κυτταρικός πληθυσμός σ' αυτό το στάδιο είναι οι πολυχρωματόφιλοι ερυθροβλάστες, ενώ παρουσιάζεται και ένας μικρός αριθμός βασεόφιλων ερυθροβλαστών (Εικ.7).



Εικ.7: A: Πρώιμοι πολυχρωματόφιλοι ερυθροβλάστες, B: Ωριμοί πολυχρωματόφιλοι ερυθροβλάστες, C: βασεόφιλοι ερυθροβλάστες

- Κατά τη 14^η μέρα παρατήρησης της κυτταρικής καλλιέργειας οι αποικίες είναι έντονα ερυθρές, λόγω της αυξημένης σύνθεσης αιμοσφαιρίνης. Τα κύτταρα φέρουν ένα αυξημένο σε μέγεθος οξεόφιλο κυτόπλασμα και ένα πολύ μικρό, έκκεντρο πυρήνα. Σ' αυτό το στάδιο αναγνωρίζονται κυρίως οι οξεόφιλοι ερυθροβλάστες, ενώ υπάρχουν και ελάχιστοι πολυχρωματόφιλοι ερυθροβλάστες (Εικ.8).



Εικ.8: Παρουσία των πολυχρωματόφιλων και οξεόφιλων ερυθροβλαστών κατά τη 14^η μέρα ανάπτυξης της ερυθροειδούς καλλιέργειας.

5.3 Αξιολόγηση της απομόνωσης ολικού RNA και microRNA από τις ερυθροειδείς αποικίες

Η απομόνωση του ολικού RNA και των microRNAs είναι μία διαδικασία η οποία απαιτεί ορθούς χειρισμούς, κατάλληλες συνθήκες εργαστηρίου και την εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου που θα δώσει τη μέγιστη δυνατή απόδοση σε συγκέντρωση (ng/μl) και ταυτόχρονα την καλύτερη καθαρότητα δείγματος ($A_{260/280}$) · παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση cDNA και επομένως την ποσοτική PCR.

Σύγκριση μεθόδων απομόνωσης:

Στην παρούσα εργασία έγινε, αρχικά, σύγκριση των πρωτοκόλλων: 1) Trizol® Reagent (Παρ.7.1) και 2) miRNeasy mini kit (Παρ.7.1) σε τέσσερα δείγματα ίδιου αρχικού υλικού και ίσου όγκου (Πιν.2). Από την απομόνωση του ολικού RNA από κάθε δείγμα και την μέτρηση της συγκέντρωσής του στον φωτομετρητή NanoDrop -1000 (Πιν.2) υπολογίστηκε ο όγκος του γενετικού υλικού που θα χρησιμοποιηθεί στα επόμενα στάδια των πειραμάτων και θα δίνει την ίδια συγκέντρωση RNA σε όλα τα δείγματα με σκοπό την καταγραφή αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Χρησιμοποιήθηκε όγκος RNA-εναιωρήματος, ο οποίος αντιστοιχεί σε συγκέντρωση: 110ng/μl. Ακολούθως, με τη μοριακή μέθοδο της Real-Time PCR, έγινε ενζυμική ενίσχυση του γονιδιακού τύπου που καθορίζει το γονίδιο ελέγχου GAPDH (Πιν.3) (Γραφ.Παρ.2). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν εις τριπλούν στην PCR-αντίδραση με σκοπό να ελεγχθεί α) η εγκυρότητα της μεθόδου, β) η διακύμανση των αποτελεσμάτων και γ) οι ανθρώπινοι χειρισμοί κατά την προσθήκη μικρών ποσοτήτων cDNA υλικού στην αντίδραση PCR.

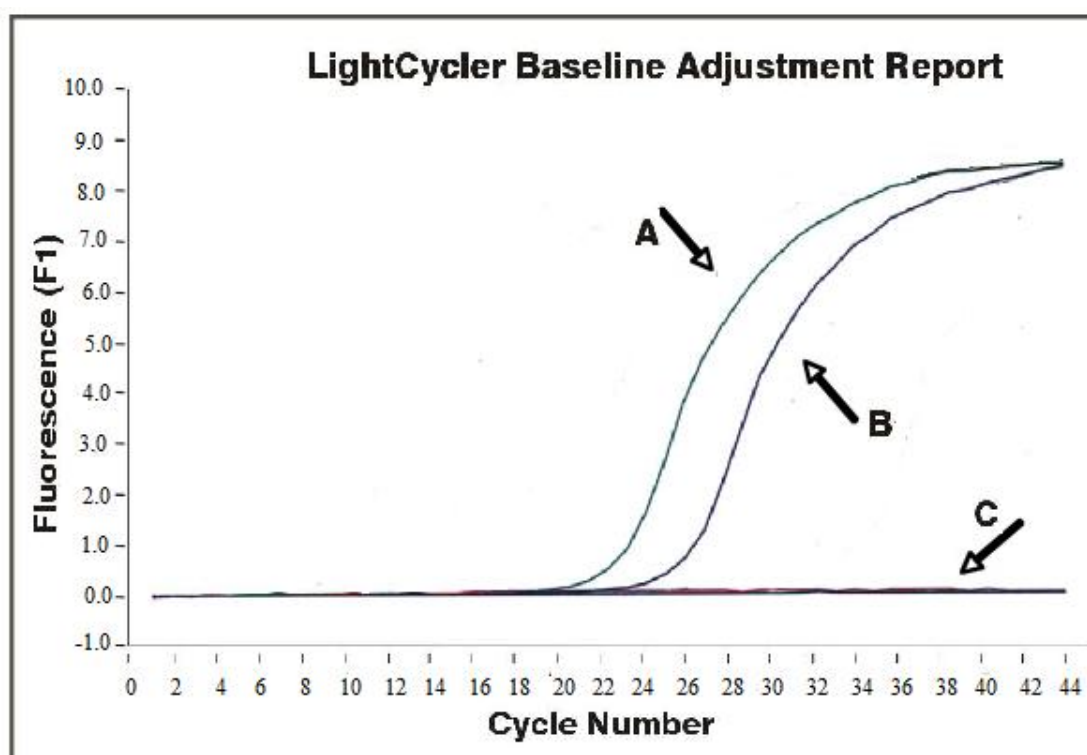
Αποτελέσματα (αρχικό υλικό: μονοπύρηνα κύτταρα αίματος)

Πιν.2: Σύγκριση της απόδοσης και της καθαρότητας από την εφαρμογή των μεθόδων απομόνωσης RNA: miRNeasy mini kit και Trizol® Reagent.

Δείγμα	Συγκέντρωση RNA (ng/μl)	Καθαρότητα ($A_{260/280}$)
1 miRNeasy	24.00	1.96
2 miRNeasy	25.50	1.90
3 Trizol	110.00	1.62
4 Trizol	110.50	1.65

Πιν.3: Ενζυμική ενίσχυση του γονιδιακού τύπου GAPDH από το cDNA των δύο αρχικών δειγμάτων RNA, με τη μοριακή μέθοδο της Real-Time PCR

Δείγμα	GAPDH Cycle threshold (ct)
1 miRNeasy	22.62
2 miRNeasy	22.50
3 Trizol	24.50
4 Trizol	24.75



Γρ.Π. 2: Γραφική απεικόνιση της ενζυμικής ενίσχυσης του GAPDH με Real-Time PCR, από δείγματα που προέρχονται: A→RNA απομονωμένο με miRNeasy mini kit και B→ RNA απομονωμένο με Trizol® Reagent. Το C είναι αρνητικός μάρτυρας.

Με βάση τα πιο πάνω στοιχεία, γίνεται αντιληπτό ότι η μέθοδος απομόνωσης του ολικού RNA με το πρωτόκολλο του miRNeasy mini kit δίνει καθαρότερο δείγμα RNA σε σχέση με το Trizol® Reagent. Το προϊόν επίσης, έχει καλύτερη απόδοση στην ενζυμική ενίσχυση του GAPDH -γονιδιακού τύπου με αποτέλεσμα να εξάγονται και ορθότερα συμπεράσματα στην πειραματική έρευνα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η σύγκριση των δύο μεθόδων καθιέρωσε το miRNeasy mini kit ως το καταλληλότερο για την απομόνωση του ολικού RNA και

microRNA από κύτταρα της ερυθροειδούς καλλιέργειας κατά τη 12^η και 14^η μέρα ανάπτυξής τους.

Απομόνωση ολικού RNA και microRNA από τις ερυθροειδείς αποικίες:

Για τη δημιουργία των ex vivo ερυθροειδών καλλιέργειών, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα (4) δείγματα ολικής αίματος από φυσιολογικούς δότες αίματος και τέσσερα (4) δείγματα ασθενών με ομόζυγη β⁰-Μεσογειακή Αναιμία (Πιν.4). Το κάθε δείγμα καλλιιεργήθηκε εις τετραπλούν. Στους ασθενείς οι κυτταρικές αποικίες που δημιουργήθηκαν ήταν πολύ μικρές, περιορισμένες και έφεραν μικρό αριθμό κυττάρων η κάθε μία. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην καταστολή του μηχανισμού ερυθροποίησης στο μυελό των οστών, λόγω της συνεχούς μετάγγισης αυτών των ατόμων. Εξαιτίας λοιπόν, αυτής της ιδιαιτερότητας η ποσότητα των κυττάρων που συλλέγεται από τις καλλιέργειες των ασθενών είναι πολύ μικρή και κατ' επέκταση η συγκέντρωση του ολικού RNA είναι χαμηλή.

Πιν.4: Απομόνωση ολικού RNA από δείγμα φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με ομόζυγη β⁰-Thal. με βάση το πρωτόκολλο miRNeasy mini kit (Qiagen). Ο λόγος A_{260/280} προσδίδει την καθαρότητα των δειγμάτων

Δείγμα	Συγκέντρωση RNA (ng/μl)		Καθαρότητα A _{260/280}	
	12 ^η μέρα	14 ^η μέρα	12 ^η μέρα	14 ^η μέρα
N.1	135.00	58.60	1.87	1.85
N.2	50.00	45.57	1.80	1.75
N.3	122.77	132.57	1.95	1.90
N.4	366.80	165.41	2.00	1.95
β ⁰ -Thal.1	35.63	27.50	1.68	1.65
β ⁰ -Thal.2	41.10	41.14	1.71	1.75
β ⁰ -Thal.3	45.50	56.12	1.73	1.70
β ⁰ -Thal.4	40.40	70.00	1.75	1.80

5.4 Σχετική ποσοτικοποίηση (Relative Quantification) επιλεγμένων ερυθροειδικών mRNAs και microRNAs

Η αρχική προσέγγιση για τη μελέτη της σχετικής ποσοτικοποίησης των mRNAs: GATA-1, HBB, HBG1/2 και KLF-1 όπως και των miRNA-451 και miRNA-144 βασίστηκε στο μαθηματικό μοντέλο «delta-delta Cp ($\Delta\Delta C_p$)»: $R = 2^{-\Delta\Delta C_p} \Rightarrow R = 2^{-(\Delta C_p \text{ sample} - \Delta C_p \text{ reference})}$ (τύπος I). Στο μοντέλο αυτό υπάρχει η παρουσία ενός δείγματος-ρυθμιστή (calibrator) το οποίο λειτουργεί ως βάση για τον υπολογισμό της υπο- ή υπερέκφρασης των γονιδίων και miRNAs των εξεταζόμενων δειγμάτων. Ως ρυθμιστές (calibrators) δοκιμάστηκαν δείγματα κυττάρων όπως μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών, επιθηλιακά κύτταρα βρόγχου και μονοκύτταρα κύτταρα λίγο πριν καλλιεργηθούν για τη δημιουργία των BFU-E καλλιεργειών. Η παρουσία όμως, μίας μικρής αλλά σημαντικής έκφρασης mRNAs-στόχων και microRNAs-στόχων σ' αυτά τα κύτταρα οδηγούσε σε μη-αξιόπιστα αποτελέσματα.

Με βάση τα πιο πάνω δεδομένα και τις παραμέτρους που λήφθηκαν υπόψιν, επιλέχθηκε μία παραλλαγή του τύπου I, στην οποία δεν περιλαμβάνεται ο ρυθμιστής (calibrator) και αποτελεί το κατάλληλο μαθηματικό μοντέλο για τη μελέτη της σχετικής έκφρασης των γονιδίων και microRNAs στα ερυθροειδή κύτταρα. Η παραλλαγή αυτή είναι το μοντέλο «delta Cp (ΔC_p)»: $R = 2^{\Delta C_p} \Rightarrow R = 2^{(C_p \text{ sample} - C_p \text{ control})}$, το οποίο συγκρίνει την μεταβολή της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων και microRNAs. Επίσης, η κανονικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων και microRNAs-στόχων κατά τη σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με επιλεγμένα γονίδια και microRNAs αναφοράς (housekeeping) με σκοπό τη μείωση των συστηματικών σφαλμάτων που οφείλονται στην αρχική συγκέντρωση του υλικού ή/και σε ανθρώπινους χειρισμούς κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Τα γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1) το GAPDH, ένα γονίδιο που εκφράζεται σε πολλούς ιστούς και χρησιμοποιείται σε αρκετές πειραματικές μελέτες ως γονίδιο αναφοράς, λόγω της σταθερής έκφρασής του και 2) το PBGD, που είναι χαρακτηριστικό γονίδιο της ερυθράς σειράς και παρουσιάζει σταθερά επίπεδα έκφρασης κατά την πορεία εξέλιξης της ερυθροποίησης (56). Για τα microRNAs χρησιμοποιήθηκαν τα small RNA: RNU6 και RNU48 ως μόρια αναφοράς.

Αποτελέσματα:

5.4.1 Σχετική ποσοτικοποίηση των mRNAs: GATA-1, HBB, HBG1/2 και KLF-1 σε ex vivo καλλιεργούμενα ερυθροειδή κύτταρα φυσιολογικών ατόμων.

Στους παρακάτω πίνακες συνοψίζονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη της διακύμανσης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων: GATA-1, HBB, HBG1/2 και KLF-1 μεταξύ της 12^{ης} και 14^{ης} μέρας παρατήρησης των φυσιολογικών ex vivo πρόδρομων ερυθροκυττάρων.

12^η μέρα:

Πιν.5: Σχετική έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων σε ερυθροειδή κύτταρα φυσιολογικών ατόμων

Δείγμα	GATA-1 (GAPDH)	GATA-1 (PBGD)	HBB (GAPDH)	HBB (PBGD)	HBG1/2 (GAPDH)	HBG1/2 (PBGD)	KLF1 (GAPDH)	KLF1 (PBGD)
N.1	0,33	8,79	214,28	5686,53	62,68	1663,49	0,06	1,69
N.2	0,11	5,83	68,44	3549,34	83,48	4329,55	0,02	0,97
N.3	0,82	9,74	509,64	6080,61	125,66	1499,22	0,11	1,29
N.4	0,8	14,49	346,49	6295,04	159,42	2896,31	0,1	1,84

14^η μέρα:

Πιν.6: Σχετική έκφραση των γονιδίων-στόχων τη 14^η μέρα ανάπτυξης των ερυθροειδών κυττάρων

Δείγμα	GATA-1 (GAPDH)	GATA-1 (PBGD)	HBB (GAPDH)	HBB (PBGD)	HBG1/2 (GAPDH)	HBG1/2 (PBGD)	KLF1 (GAPDH)	KLF1 (PBGD)
N.1	1,07	23,81	1040,70	23170,48	232,32	5172,57	0,15	3,34
N.2	0,38	13,49	210,35	7451,59	198,09	7017,17	0,04	1,54
N.3	1,07	18,17	1495,76	25296,79	141,04	2385,37	0,17	2,86
N.4	0,77	15,38	749,19	15825,90	167,34	3334,68	0,10	1,99

Αξιολογώντας τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης των γονιδίων που συνδέονται με την ερυθρά σειρά, παρατηρείται μία αυξανόμενη έκφραση μεταξύ των δύο χρονικών περιόδων παρατήρησης, δηλαδή μεταξύ της 12^{ης} και 14^{ης} μέρας ανάπτυξης της ερυθροειδούς καλλιέργειας. Η αύξηση αυτή σημειώνεται τόσο με την εφαρμογή του

γονιδίου GAPDH ως «γονίδιο ελέγχου» (housekeeping) στον τύπο της σχετικής ποσοτικοποίησης όσο και με το γονίδιο PBGD.

Η σύγκριση όμως, των λόγων της σχετικής έκφρασης μεταξύ των τεσσάρων γονιδίων-στόχων (Πιν. 7,8,9,10) καθορίζει το γονίδιο ελέγχου -ανάμεσα στο GAPDH και το PBGD- το οποίο δίνει τη μικρότερη απόκλιση τιμών. Με βάση τα αποτελέσματα από τους λόγους: GATA-1/KLF-1, GATA-1/HBB, GATA-1/HBG_{1/2} και KLF-1/HBG_{1/2} παρατηρείται μεγαλύτερη σύγκλιση τιμών με το γονίδιο PBGD τόσο τη 12^η όσο και τη 14^η μέρα. Έτσι, το γονίδιο αυτό μπορεί να θεωρηθεί ως πιο ειδικό για τη μελέτη των γονιδίων της ερυθράς σειράς σε σύγκριση με το γονίδιο GAPDH. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, το γονίδιο που χρησιμοποιήθηκε εν τέλει στην μελέτη της σχετικής ποσοτικοποίησης ήταν το PBGD.

12^η μέρα:

Πιν.7: Ο λόγος της σχετικής έκφρασης μεταξύ των γονιδίων. Η κανονικοποίηση των γονιδίων έγινε με το γονίδιο GAPDH

Gene Ratio (GAPDH)				
	GATA-1/KLF1	GATA-1/HBB	GATA-1/HBG1/2	KLF-1/HBG_{1/2}
N.1	5,50	0,0015	0,0053	0,00057
N.2	5,50	0,0016	0,0013	0,00024
N.3	7,45	0,0016	0,0065	0,00087
N.4	8,00	0,0023	0,0050	0,00063

Πιν.8: Ο λόγος της σχετικής έκφρασης μεταξύ των γονιδίων. Η κανονικοποίηση των γονιδίων έγινε με το γονίδιο PBGD

Gene Ratio (PBGD)				
	GATA-1/KLF1	GATA-1/HBB	GATA-1/HBG1/2	KLF-1/HBG_{1/2}
N.1	5,20	0,0015	0,0053	0,00101
N.2	6,01	0,0016	0,0013	0,00022
N.3	7,55	0,0016	0,0065	0,00086
N.4	7,87	0,0023	0,0050	0,00063

14^η μέρα:

Πιν.9: Ο λόγος της σχετικής έκφρασης μεταξύ των γονιδίων.

Gene Ratio (GAPDH)				
	GATA-1/KLF-1	GATA-1/HBB	GATA-1/HBG _{1/2}	KLF-1/HBG _{1/2}
N.1	7,13	0,0010	0,0046	0,0006
N.2	9,50	0,0018	0,0019	0,0002
N.3	6,30	0,0007	0,0076	0,0012
N.4	7,70	0,0010	0,0046	0,0006

Πιν.10: Ο λόγος της σχετικής έκφρασης μεταξύ των γονιδίων.

Gene Ratio (PBGD)				
	GATA-1/KLF-1	GATA-1/HBB	GATA-1/HBG _{1/2}	KLF-1/HBG _{1/2}
N.1	7,13	0,0010	0,0046	0,0006
N.2	8,76	0,0018	0,0020	0,0002
N.3	6,35	0,0007	0,0076	0,0012
N.4	7,73	0,0010	0,0046	0,0006

Με την εφαρμογή, επίσης, έγκυρων μαθηματικών μοντέλων παρατηρήθηκε και στατιστικά η διακύμανση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων. Με το μοντέλο Shapiro wilk test ελέγχθηκε η κανονικότητα του λόγου της σχετικής έκφρασης δύο σημαντικών και καθοριστικών γονιδίων για τη φυσιολογική εξέλιξη της ερυθροποίησης, του GATA1 και του KLF-1 (Πιν.13,14) σε όλα τα δείγματα για πιθανές στατιστικές διαφορές ($P < 0.05$).

Πιν.13: Οι τιμές του λόγου GATA-1/KLF-1 κατά την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης στα δείγματα φυσιολογικών πρόδρομων ερυθροκυττάρων

GATA-1/KLF-1	
12 ^η μέρα	5,20
	6,01
	7,55
	7,87
14 ^η μέρα	7,13
	8,76
	6,35
	7,73

Πιν.14: Στατιστική ανάλυση GATA-1/KLF-1 με το πρόγραμμα Shapiro wilk test

Variable	Shapiro-Wilk W test for normal data				
	Obs	W	U	z	Prob>z
12η μέρα	4	0.90807	1.060	0.070	0.47222

Variable	Shapiro-Wilk W test for normal data				
	Obs	W	U	z	Prob>z
14η μέρα	4	0.99492	0.059	-2.077	0.98109

Οι λόγοι δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και γι' αυτό μελετήθηκαν με τη μη-παραμετρική μέθοδο Mann-Whitney σε συνδυασμό με το διάγραμμα box-plot.

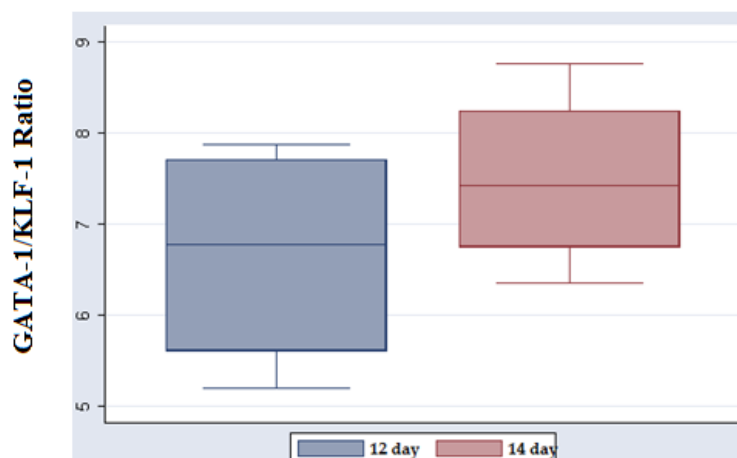
Πιν.16: Στατιστική ανάλυση του λόγου GATA-1/KLF-1 με το πρόγραμμα Mann Whitney U test

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
```

var2	obs	rank sum	expected
12η μέρα	4	15	18
14η μέρα	4	21	18
combined	8	36	36

```
unadjusted variance      12.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance       12.00

Ho: var3(var2==12) = var3(var2==14)
z = -0.866
Prob > |z| = 0.3865
```



Box-Plot.1: Γραφική απεικόνιση του λόγου GATA-1/KLF-1 τη 12^η και 14^η μέρα ανάπτυξης των BFU-E καλλιεργειών

Παρόμοια, εξετάστηκαν και οι λόγοι: GATA-1/HBG_{1/2} και KLF-1/HBG_{1/2} με το μη-παραμετρικό στατιστικό μοντέλο Mann-Whitney για τον προσδιορισμό τυχόν διακυμάνσεων της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων της 12^{ης} ως προς τα δείγματα της 14^{ης} μέρας.

Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν πιο κάτω, φαίνεται πως δεν υπάρχουν σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ($P > 0.05$) (Πιν.16,18,20). ουσιαστική στατιστική απόκλιση θα υπήρχε εάν η τιμή P (Probability) ήταν μικρότερη από 0,05 ($P < 0,05$). Επίσης, τα box-plot διαγράμματα παρουσιάζουν παρόμοια μεταβολή του λόγου μεταξύ της 12^{ης} και 14^{ης} μέρας ανάπτυξης των ερυθροειδών κυττάρων και, όπως καταδεικνύεται από τις γραφικές παραστάσεις, ένα σημαντικό εύρος των τιμών αλληλεπικαλύπτεται δίνοντας συγκρίσιμα αποτελέσματα (Box-Plot.1,2,3).

GATA-1/HBG_{1/2}

Πιν.17: Ο λόγος της σχετικής έκφρασης GATA-1/HBG_{1/2}

Δείγμα	Gene Ratio GATA-1/HBG _{1/2}	
	12 ^η μέρα	14 ^η μέρα
N.1	0,0050	0,0046
N.2	0,0013	0,0020
N.3	0,0065	0,0076
N.4	0,0050	0,0046

Πιν.18: Στατιστική ανάλυση του λόγου GATA-1/HBG_{1/2} με το πρόγραμμα Mann Whitney U test

```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

```

var1?	obs	rank sum	expected
12η μέρα	4	19	18
14η μέρα	4	17	18
combined	8	36	36

```

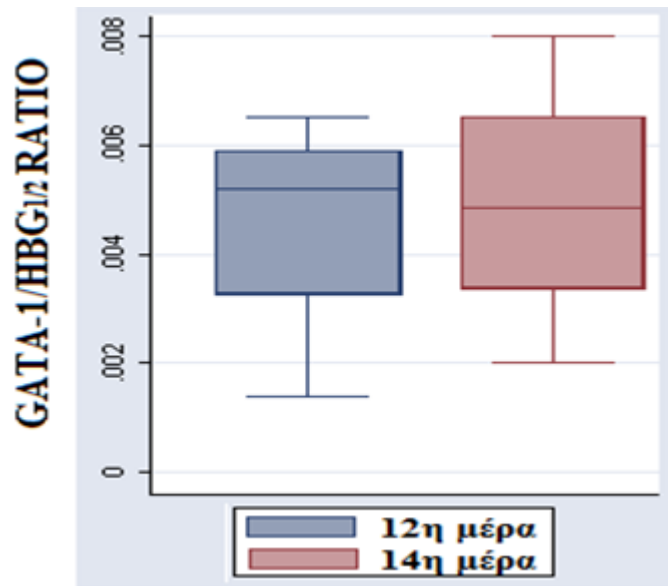
unadjusted variance      12.00
adjustment for ties      0.00
adjusted variance        12.00

```

```

Ho: var16(var1?==1) = var16(var1?==2)
      z = 0.289
      Prob > |z| = 0.7728

```



Box-Plot.2: Γραφική απεικόνιση του λόγου GATA-1/HBG_{1/2} τη 12^η και 14^η μέρα ανάπτυξης των BFU-E καλλιεργειών

KLF-1/HBG_{1/2}

Πιν.19: Ο λόγος της σχετικής έκφρασης KLF-1/HBG_{1/2}

Δείγμα	Gene Ratio KLF-1/HBG _{1/2}	
	12 ^η μέρα	14 ^η μέρα
N.1	0,0010	0,0006
N.2	0,0002	0,0002
N.3	0,0008	0,0012
N.4	0,0006	0,0006

Πιν.20: Στατιστική ανάλυση του λόγου KLF-1/HBG_{1/2} με το πρόγραμμα Mann Whitney U test

```

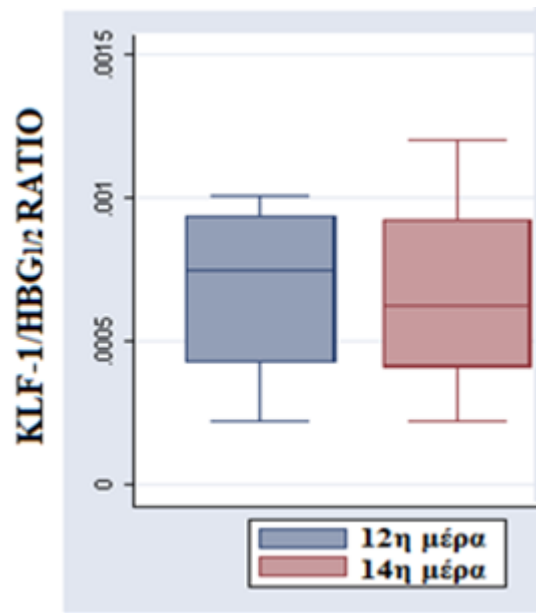
two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

  var17 |      obs   rank sum   expected
-----|-----
  12η μέρα |      4      19      18
  14η μέρα |      4      17      18
-----|-----
 combined |      8      36      36

unadjusted variance      12.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance      12.00

Ho: var16(var17==1) = var16(var17==2)
      z = 0.289
Prob > |z| = 0.7728

```

Box-Plot.3: Γραφική απεικόνιση του λόγου KLF-1/HBG1/2 τη 12η και 14η μέρα ανάπτυξης των BFU-E καλλιεργειών

5.4.2 Σχετική ποσοτικοποίηση των microRNAs: miRNA-451 και miRNA-144 σε ex vivo καλλιεργούμενα ερυθροειδή κύτταρα φυσιολογικών ατόμων

Στους πιο κάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη της μεταβολής των επιπέδων έκφρασης των miRNA-451 και miRNA-144 μεταξύ της 12^{ης} και 14^{ης} μέρας παρατήρησης των φυσιολογικών ex vivo πρόδρομων ερυθροκυττάρων.

Πιν.21: Σχετική έκφραση των υπό μελέτη miRNA-451 και miRNA-144 σε ερυθροειδή κύτταρα φυσιολογικών ατόμων, τη 12^η μέρα

Δείγματα	miR-451 (RNU6)	miR-451 (RNU48)	miR-144 (RNU6)	miR-144 (RNU48)
N.1	24,03	1,51	3,36	0,21
N.2	26,72	0,97	6,41	0,23
N.3	32,82	2,76	14,62	1,23
N.4	13,77	2,10	6,29	0,96
N.5	21,21	0,34	16,37	0,26

Πιν.22: Σχετική έκφραση των miRNA-451 και miRNA-144, τη 14^η μέρα

Δείγματα	miR-451 (RNU6)	miR-451 (RNU48)	miR-144 (RNU6)	miR-144 (RNU48)
N.1	30,00	1,93	9,71	0,62
N.2	4,08	0,30	1,04	0,10
N.3	266,26	5,95	42,91	1,00
N.4	360,37	10,22	57,28	1,62
N.5	147,37	1,45	36,09	0,35

Η ανάλυση των ερυθροειδικών miRNA-451 και miRNA-144 με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης, παρουσίασε μία αυξανόμενη σχετική έκφραση των υπό μελέτη microRNAs κατά τις καθορισμένες χρονικές περιόδους παρατήρησης των

κυτταρικών καλλιιεργειών. Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε να συμβαίνει τόσο με τη χρήση του RNU6 ως «microRNA αναφοράς» (housekeeping) όσο και τη χρήση του RNU48. Οι τιμές μεταβολής, όμως, της σχετικής έκφρασης των microRNAs είχαν σημαντική διαφορά μεταξύ τους όταν στον τύπο της σχετικής ποσοτικοποίησης εφαρμόζοταν το RNU6. Αντίθετα, οι τιμές που λαμβάνονταν με το RNU48 ως microRNA αναφοράς είχαν μικρή απόκλιση μεταξύ των δειγμάτων. Το αποτέλεσμα αυτό αναδεικνύει το RNU48 ως το καταλληλότερο microRNA αναφοράς για την μελέτη των miRNAs γι' αυτό και τα αποτελέσματα που έχουν καταγραφεί στην παρούσα εργασία, βασίζονται στην κανονικοποίηση του miRNA-451 και miRNA-144 με το RNU48.

Η εφαρμογή, επίσης, του στατιστικού μοντέλου Mann Whitney U test και του διαγράμματος box-plot δίνει τη δυνατότητα στατιστικής ανάλυσης της σχετικής έκφρασης των δύο microRNAs μεταξύ της 12^{ης} και 14^{ης} μέρας μελέτης των ex vivo καλλιεργούμενων πρόδρομων ερυθροκυττάρων.

Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν πιο κάτω, φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική απόκλιση μεταξύ των λόγων των δειγμάτων κατά τις δύο ημέρες ελέγχου των ερυθροειδών κυτταρικών καλλιιεργειών (Πιν.24). Οι τιμές P (Probability) που εξάγονται, είναι μεγαλύτερες από το καθορισμένο όριο: $P < 0,05$ με αποτέλεσμα η διακύμανση των λόγων της 12^{ης} ως προς τη 14^η μέρα να είναι στατιστικώς ασήμαντη. Αυτό κατ' επέκταση καταδεικνύει ότι η τιμή των λόγων microRNA-451/144 είναι σταθερή και τις δύο χρονικές περιόδους μελέτης των πρόδρομων ερυθροκυττάρων.

Πιν.23: Ο λόγος της σχετικής έκφρασης miRNA-451/miRNA-144

Δείγμα	microRNA Ratio miRNA-451/miRNA-144	
	12 ^η μέρα	14 ^η μέρα
N.1	7,0	3,1
N.2	4,2	4,0
N.3	2,2	6,0
N.4	2,2	6,3
N.5	1,5	4,1

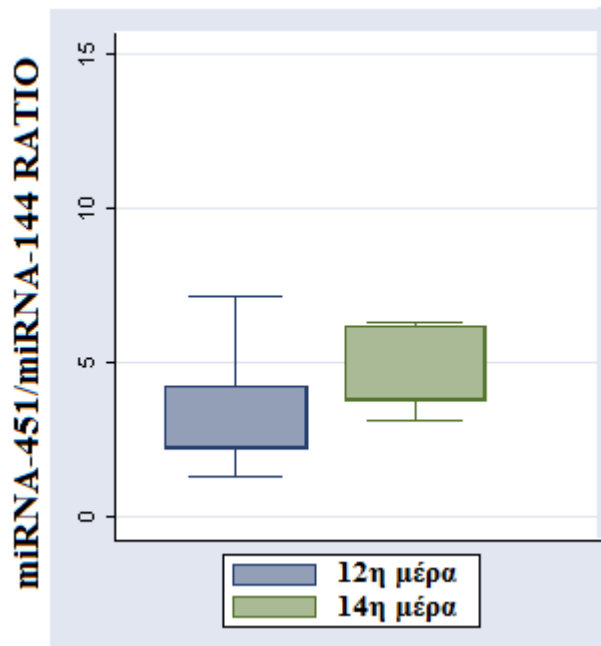
Πιν.24: Στατιστική ανάλυση του λόγου miRNA-451/miRNA-144 με το πρόγραμμα Mann Whitney U test

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
```

var6	obs	rank sum	expected
12η μέρα	5	23	27.5
14η μέρα	5	32	27.5
combined	10	55	55

unadjusted variance 22.92
adjustment for ties -0.14
adjusted variance 22.78

Ho: var5(var6==1) = var5(var6==2)
z = -0.943
Prob > |z| = 0.3457



Box-Plot.4: Γραφική απεικόνιση του λόγου miRNA-451/miRNA-144 τη 12^η και 14^η μέρα καλλιέργειας ερυθροειδών κυττάρων

5.4.3 Σχετική ποσοτικοποίηση των mRNAs: GATA-1, HBB, HBG1/2, KLF-1 σε ex vivo καλλιεργούμενα ερυθροειδή κύτταρα ατόμων με ομόζυγη β⁰-Μεσογειακή Αναιμία.

Στους παρακάτω πίνακες παραθέτονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη της διακύμανσης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων: GATA-1, HBB, HBG1/2 και KLF1 κατά τη 12^η και 14^η μέρα ελέγχου των ex vivo ερυθροειδών κυτταρικών καλλιεργειών ατόμων με ομόζυγη β⁰-Μεσογειακή Αναιμία (β⁰-Thal).

Όπως παρατηρείται (Πίν.25 και 26), υπάρχει μία γενική αύξηση των επιπέδων έκφρασης, η οποία καταγράφεται και με τα δύο γονίδια αναφοράς. Η εφαρμογή, όμως, της ίδιας μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε στα φυσιολογικά δείγματα απαιτεί την χρήση του PBGD για την περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων.

12^η μέρα:

Πιν.25: Σχετική έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων σε ερυθροειδή κύτταρα ατόμων με β⁰-Thal.

Δείγματα	GATA-1 (GAPDH)	GATA-1 (PBGD)	HBB (GAPDH)	HBB (PBGD)	HBG1/2 (GAPDH)	HBG1/2 (PBGD)	KLF1 (GAPDH)	KLF1 (PBGD)
β ⁰ -Thal.1	0,64	17,79	14,39	397,09	462,51	12765,83	0,08	2,28
β ⁰ -Thal.2	0,52	6,77	1,57	20,39	259,57	3365,64	0,05	0,65
β ⁰ -Thal.3	0,60	33,98	8,21	465,72	200,85	11399,37	0,05	3,00
β ⁰ -Thal.4	0,16	3,80	1,23	29,93	62,54	1527,19	0,02	0,53

14^η μέρα:

Πιν.26: Σχετική έκφραση των γονιδίων GATA-1, HBB, HBG_{1/2} και KLF-1 σε ερυθροειδή κύτταρα ατόμων με β-Thal.

Δείγματα	GATA-1 (GAPDH)	GATA-1 (PBGD)	HBB (GAPDH)	HBB (PBGD)	HBG1/2 (GAPDH)	HBG1/2 (PBGD)	KLF1 (GAPDH)	KLF1 (PBGD)
β ⁰ -Thal.1	0,42	13,99	20,53	685,02	449,86	15006,85	0,04	1,35
β ⁰ -Thal.2	0,75	7,73	12,10	124,50	458,25	4715,95	0,08	0,82
β ⁰ -Thal.3	1,05	17,88	18,17	310,12	539,94	9216,48	0,18	3,02
β ⁰ -Thal.4	0,73	10,17	25,22	351,33	270,60	3769,09	0,09	1,19

Επίσης, η σύγκριση των λόγων: GATA-1/KLF-1, GATA-1/HBG_{1/2} και KLF1/HBG_{1/2}, στις δύο καθορισμένες χρονικές στιγμές ελέγχου των κυτταρικών καλλιιεργειών (12^η και 14^η μέρα), αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο μελέτης της γονιδιακής έκφρασης στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα των παθολογικών δειγμάτων. Με τη σύγκριση αυτή παρουσιάζεται και αποδεικνύεται ουσιαστικά η σταθερότητα των λόγων της σχετικής έκφρασης μεταξύ της 12^{ης} και της 14^{ης} μέρας (Box-Plot.5, 6 και 7).

Για την ανάλυση των λόγων εφαρμόστηκε το στατιστικό μοντέλο Mann Whitney U test και τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν από το διάγραμμα box-plot.

GATA-1/KLF-1

Πιν.27: Ο λόγος της σχετικής έκφρασης GATA-1 /KLF-1 σε ασθενείς με ομόζυγη β⁰-Thal.

Δείγμα	Pathol. Gene Ratio GATA-1/KLF-1	
	12 ^η μέρα	14 ^η μέρα
β ⁰ -Thal.1	7,80	10,37
β ⁰ -Thal.2	10,41	9,41
β ⁰ -Thal.3	11,33	5,90
β ⁰ -Thal.4	7,20	8,55

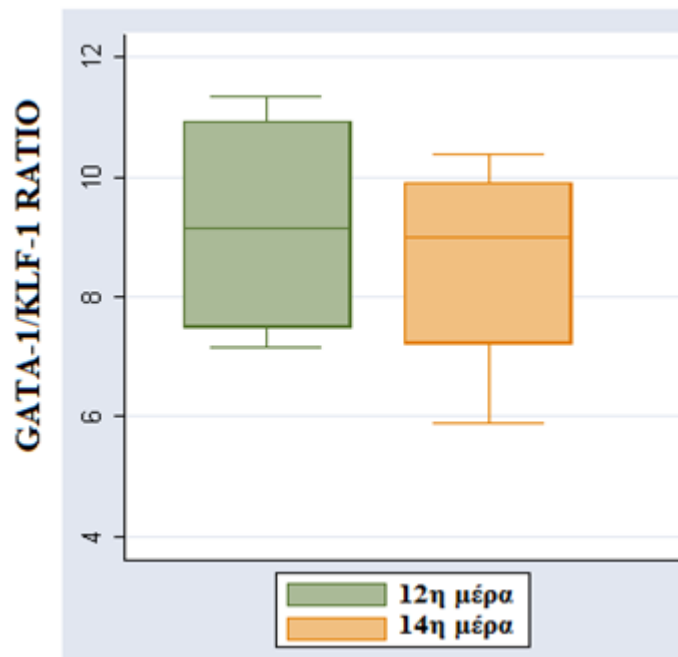
Πιν.28: Στατιστική ανάλυση του λόγου GATA-1/KLF-1 με το πρόγραμμα Mann Whitney U test

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
```

var1?	obs	rank sum	expected
12η μέρα	4	19.5	18
14η μέρα	4	16.5	18
combined	8	36	36

```
unadjusted variance      12.00
adjustment for ties      -3.00
-----
adjusted variance        9.00

Ho: var18(var1?==1) = var18(var1?==2)
      z = 0.500
Prob > |z| = 0.6171
```



Box-Plot.5: Γραφική απεικόνιση του λόγου GATA-1/KLF-1 τη 12^η και 14^η μέρα ελέγχου των ex vivo καλλιεργούμενων παθολογικών πρόδρομων ερυθροκυττάρων.

GATA-1/ HBG_{1/2}

Πιν.29: Ο λόγος της σχετικής έκφρασης GATA-1 /HBG_{1/2} σε ασθενείς με ομόζυγη β⁰-Thal.

Δείγμα	Pathol. Gene Ratio GATA-1/HBG _{1/2}	
	12 ^η μέρα	14 ^η μέρα
β ⁰ -Thal.1	0,0014	0,0009
β ⁰ -Thal.2	0,0020	0,0016
β ⁰ -Thal.3	0,0030	0,0020
β ⁰ -Thal.4	0,0025	0,0026

Πιν.30: Στατιστική ανάλυση του λόγου GATA-1/HBG_{1/2} με το πρόγραμμα Mann Whitney U test

```

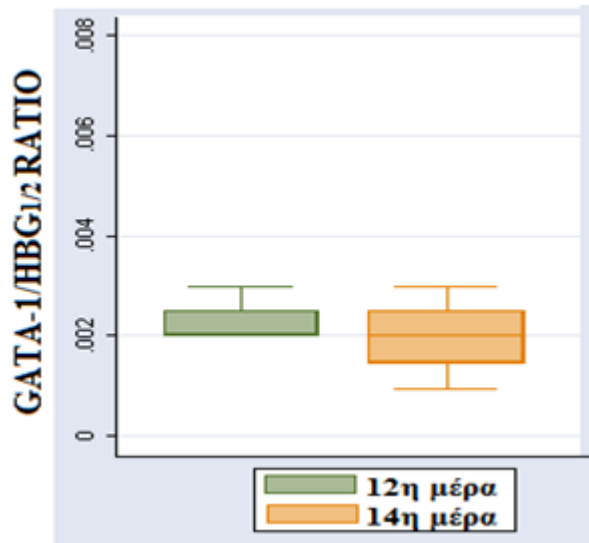
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

  var15 |      obs   rank sum  expected
-----|-----
  12η μέρα |      4      20      18
  14η μέρα |      4      16      18
-----|-----
 combined |      8      36      36

unadjusted variance      12.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance      12.00

Ho: var14<var15==1> = var14<var15==2>
z = 0.577
Prob > |z| = 0.5637

```



Box-Plot.6: Γραφική απεικόνιση του λόγου GATA-1/HBG_{1/2} τη 12^η και 14^η μέρα ελέγχου των ex vivo καλλιεργούμενων παθολογικών πρόδρομων ερυθροκυττάρων.

KLF-1/ HBG_{1/2}

Πιν.31: Ο λόγος της σχετικής έκφρασης KLF-1 /HBG_{1/2} σε ασθενείς με ομόζυγη β⁰-Thal.

Δείγμα	Pathol. Gene Ratio KLF-1/HBG _{1/2}	
	12 ^η μέρα	14 ^η μέρα
β ⁰ -Thal.1	0,0019	0,00010
β ⁰ -Thal.2	0,0020	0,00017
β ⁰ -Thal.3	0,0026	0,00033
β ⁰ -Thal.4	0,0035	0,00032

Πιν.32: Στατιστική ανάλυση του λόγου KLF-1/HBG_{1/2} με το πρόγραμμα Mann Whitney U

```

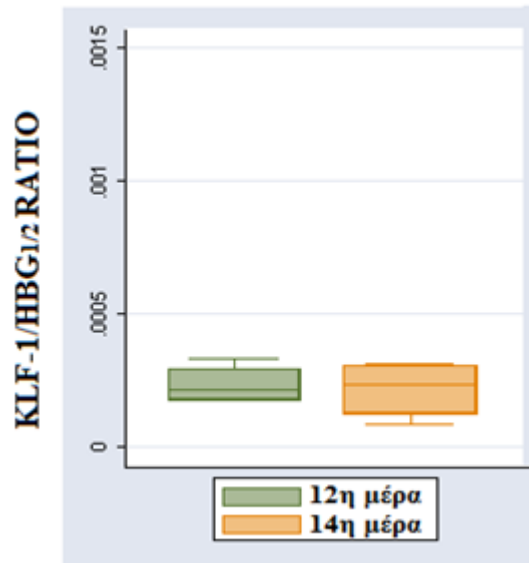
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

  var6 |      obs   rank sum  expected
-----|-----
  12η μέρα |      4      20      18
  14η μέρα |      4      16      18
-----|-----
 combined |      8      36      36

unadjusted variance      12.00
adjustment for ties      0.00
-----
adjusted variance      12.00

Ho: var?(var6==1) = var?(var6==2)
      z = 0.527
      Prob > |z| = 0.5637

```

Box-Plot.7: Γραφική απεικόνιση του λόγου KLF-1/HBG_{1/2} τη 12^η και 14^η μέρα ανάπτυξης των ex vivo καλλιεργούμενων παθολογικών πρόδρομων ερυθροκυττάρων.

5.4.3.2 Σύγκριση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων-στόχων μεταξύ φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με ομόζυγη β^0 -Μεσογειακή Αναιμία.

Η σύγκριση των λόγων της σχετικής γονιδιακής έκφρασης, μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών δειγμάτων, αποτελεί ένα πολύ καλό εργαλείο/βιολογικό δείκτη για την αναγνώριση της μεταβαλλόμενης έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων.

Στο στάδιο αυτό, προσδιορίστηκε αρχικά ο Μέσος Όρος της σχετικής ποσοτικοποίησης των mRNAs των φυσιολογικών δειγμάτων τη 12^η και 14^η μέρα και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο λόγος των επιπέδων έκφρασης στα παθολογικά δείγματα έναντι του Μέσου Όρου των φυσιολογικών. Όταν η τιμή που προκύπτει είναι μεγαλύτερη του ενός (> 1) τότε τα γονίδια των ομόζυγων β^0 - Thal. ασθενών υπερεκφράζονται σε σχέση με των φυσιολογικών. Αντίθετα, εάν η τιμή είναι μικρότερη του ενός (< 1) τότε τα γονίδια των παθολογικών δειγμάτων υποεκφράζονται (Πιν.33 και 34).

Από τα αποτελέσματα (Πίν.33 και 34) γίνεται αντιληπτή η υποέκφραση των γονιδίων GATA-1, HBB και KLF-1 στους ασθενείς, λόγω της σημαντικής μείωσης που παρατηρείται στην έκφραση αυτών των γονιδίων από τη 12^η έως τη 14^η μέρα ανάπτυξης των ex vivo καλλιεργούμενων παθολογικών κυττάρων. Αντίθετα, το γονίδιο HBG1/2 φαίνεται να υπερεκφράζεται στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με τα δείγματα των φυσιολογικών ατόμων, αν και η σύγκριση των τιμών έκφρασης μεταξύ της 12^{ης} και 14^{ης} μέρας ανάλυσης (Πιν.33 και 34) παρουσιάζει μία σημαντική πτώση, η οποία όμως παραμένει μεγαλύτερη της μονάδας.

12^η μέρα

Πιν.33: Καθορισμός της έκφρασης των γονιδίων των παθολογικών ατόμων με βάση το Μέσο Όρο της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων φυσιολογικών ατόμων

FOLD CHANGE RATIO TO NORMAL MEAN RATIO				
	GATA-1	KLF-1	HBB	HBG1/2
β^0 -Thal.1	1,83	1,58	0,07	4,92
β^0 -Thal.2	0,70	0,45	0,00	1,30
β^0 -Thal.3	3,50	2,07	0,09	4,39
β^0 -Thal.4	0,40	0,40	0,01	0,59

14^η μέρα

Πιν.34: Καθορισμός της έκφρασης των γονιδίων των παθολογικών ατόμων με βάση το Μέσο Όρο της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων φυσιολογικών ατόμων

Δείγμα	FOLD CHANGE RATIO TO NORMAL MEAN RATIO			
	GATA-1	KLF-1	HBB	HBG1/2
β ⁰ -Thal.1	0,79	0,55	0,04	3,35
β ⁰ -Thal.2	0,44	0,34	0,01	1,05
β ⁰ -Thal.3	1,00	1,24	0,02	2,06
β ⁰ -Thal.4	0,55	0,50	0,02	0,84

Πιο κάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την στατιστική επεξεργασία των λόγων GATA-1/KLF-1, GATA-1/HBG_{1/2} και KLF-1/HBG_{1/2} στα υπό εξέταση φυσιολογικά και ομόζυγα β⁰-Thal. δείγματα.

Από την εφαρμογή του μοντέλου Mann Whitney U test (Πιν.Ι,ΙΙ,ΙΙΙ,ΙV,V,VI) προκύπτει στατιστικά ότι οι τιμές των λόγων έκφρασης –μεταξύ των δύο ομάδων- δεν παρουσιάζουν σημαντική απόκλιση μεταξύ τους (P>0,05). Οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται στα θηκογράμματα (Box-Plot.8,9,10) πιθανόν οφείλονται στα λίγα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν και στο μικρό αρχικό υλικό των παθολογικών δειγμάτων.

GATA-1 /KLF-1

Πιν.35: Ο λόγος της σχετικής έκφρασης GATA-1 /KLF-1 φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με β⁰-Thal.

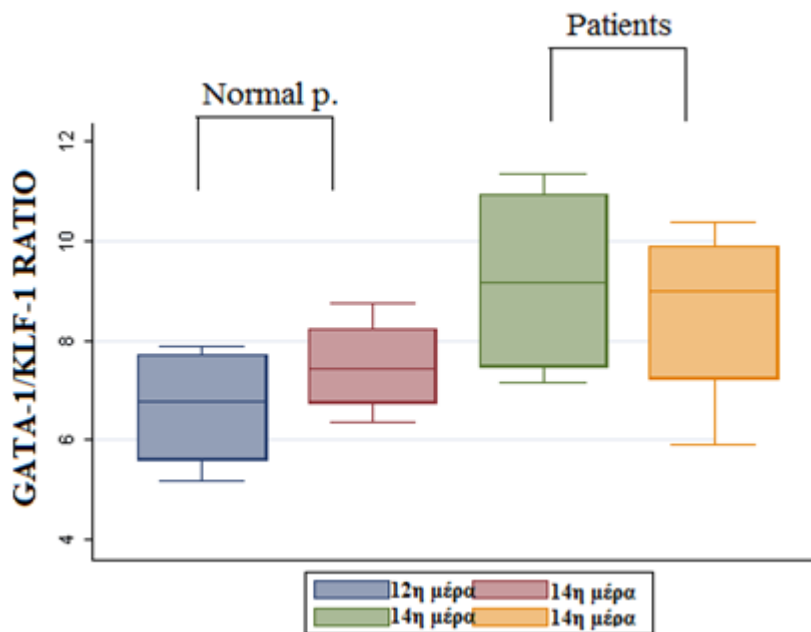
Δείγμα	Gene Ratio GATA-1/KLF-1	
	12 ^η μέρα	14 ^η μέρα
N.1	5,20	7,13
N.2	6,01	8,76
N.3	7,55	6,35
N.4	7,87	7,73
β ⁰ -Thal.1	7,80	10,37
β ⁰ -Thal.2	10,41	9,41
β ⁰ -Thal.3	11,33	5,90
β ⁰ -Thal.4	7,20	8,55

Πιν.Ι: Στατιστική ανάλυση του λόγου GATA-1/KLF-1 σε φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα, τη 12η μέρα (P>0,05)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

var10	obs	rank sum	expected
Normal	4	13	18
β0-Thal.	4	23	18
combined	8	36	36
unadjusted variance	12.00		
adjustment for ties	0.00		
adjusted variance	12.00		
Ho: var11(var10==1) = var11(var10==2)			
	z = -1.443		
	Prob > z = 0.1489		

Πιν.ΙΙ: Στατιστική ανάλυση του λόγου GATA-1/KLF-1 σε φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα, τη 14η μέρα (P> 0,05)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

var13	obs	rank sum	expected
Normal	4	15	18
β0-Thal.	4	21	18
combined	8	36	36
unadjusted variance	12.00		
adjustment for ties	0.00		
adjusted variance	12.00		
Ho: var12(var13==1) = var12(var13==2)			
	z = -0.866		
	Prob > z = 0.3865		



Box-Plot.8: Γραφική απεικόνιση του λόγου GATA-1/KLF-1 τη 12^η και 14^η μέρα ανάπτυξης των ex vivo καλλιεργούμενων φυσιολογικών και παθολογικών πρόδρομων ερυθροκυττάρων

GATA-1/ HBG_{1/2}

Πιν.36: Ο λόγος της σχετικής έκφρασης GATA-1 /HBG_{1/2} φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με β⁰-Thal.

Δείγμα	Gene Ratio GATA-1/HBG _{1/2}	
	12 ^η μέρα	14 ^η μέρα
N.1	0,0050	0,0046
N.2	0,0013	0,0020
N.3	0,0065	0,0076
N.4	0,0050	0,0046
β ⁰ -Thal.1	0,0014	0,0009
β ⁰ -Thal.2	0,0020	0,0016
β ⁰ -Thal.3	0,0030	0,0020
β ⁰ -Thal.4	0,0025	0,0026

Πιν.ΙΙΙ: Στατιστική ανάλυση του λόγου GATA-1/HBG_{1/2} σε φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα, τη 12η μέρα (P>0,05)

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

var1?	obs	rank sum	expected
Normal	4	22	18
β ⁰ -Thal.	4	14	18
combined	8	36	36

unadjusted variance 12.00

adjustment for ties -0.57

adjusted variance 11.43

Ho: var19(var1?==1) = var19(var1?==2)

z = 1.183

Prob > |z| = 0.2367

Πιν.ΙV: Στατιστική ανάλυση του λόγου GATA-1/HBG_{1/2} σε φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα, τη 14η μέρα (P>0,05)

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

var1?	obs	rank sum	expected
Normal	4	24	18
β ⁰ -Thal.	4	12	18
combined	8	36	36

unadjusted variance 12.00

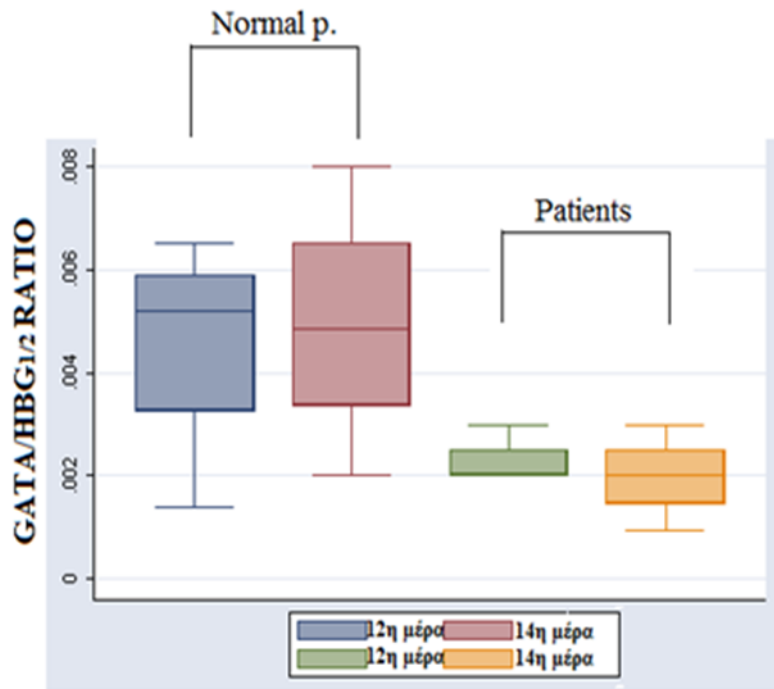
adjustment for ties -0.57

adjusted variance 11.43

Ho: var20(var1?==1) = var20(var1?==2)

z = 1.775

Prob > |z| = 0.0759



Box-Plot.9: Γραφική απεικόνιση του λόγου GATA-1/HBG_{1/2} τη 12^η και 14^η μέρα ανάπτυξης των ex vivo καλλιεργούμενων φυσιολογικών και παθολογικών πρόδρομων ερυθροκυττάρων

KLF-1/ HBG_{1/2}

Πιν.37: Ο λόγος της σχετικής έκφρασης KLF-1/HBG_{1/2} φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με ομόζυγη β⁰-Thal.

Δείγμα	Gene Ratio KLF-1/HBG _{1/2}	
	12 ^η μέρα	14 ^η μέρα
N.1	0,0010	0,0006
N.2	0,0002	0,0002
N.3	0,0008	0,0012
N.4	0,0006	0,0006
β ⁰ -Thal.1	0,0019	0,00010
β ⁰ -Thal.2	0,0020	0,00017
β ⁰ -Thal.3	0,0026	0,00033
β ⁰ -Thal.4	0,0035	0,00032

Πιν.V: Στατιστική ανάλυση του λόγου KLF-1/HBG_{1/2} σε φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα, τη 12η μέρα (P>0,05)

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
```

var6	obs	rank sum	expected
Normal	4	24	18
β0-Thal.	4	12	18
combined	8	36	36

unadjusted variance 12.00
 adjustment for ties 0.00
 adjusted variance 12.00

Ho: var8(var6==1) = var8(var6==2)
 z = 1.732
 Prob > |z| = 0.0833

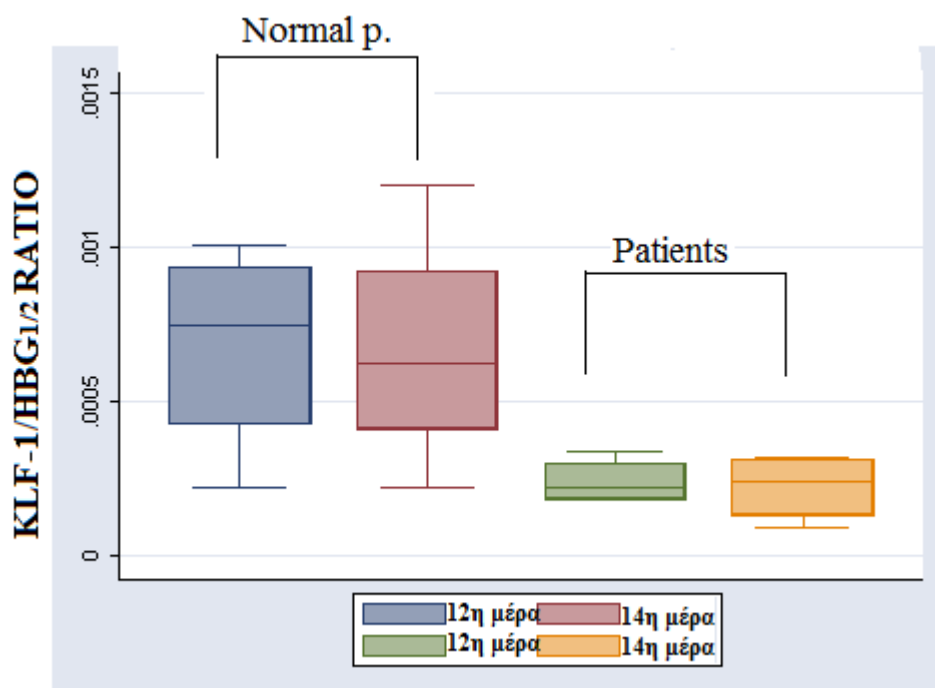
Πιν. VI: Στατιστική ανάλυση του λόγου KLF-1/HBG_{1/2} σε φυσιολογικά και παθολογικά δείγματα, τη 14η μέρα (P>0,05)

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
```

var6	obs	rank sum	expected
Normal	4	24	18
β0-Thal.	4	12	18
combined	8	36	36

unadjusted variance 12.00
 adjustment for ties 0.00
 adjusted variance 12.00

Ho: var9(var6==1) = var9(var6==2)
 z = 1.732
 Prob > |z| = 0.0833



Box-Plot.10: Γραφική απεικόνιση του λόγου KLF-1/HBG_{1/2} τη 12^η και 14^η μέρα ανάπτυξης των ex vivo καλλιεργούμενων φυσιολογικών και παθολογικών πρόδρομων ερυθροκυττάρων

5.4.4 Σχετική ποσοτικοποίηση των microRNAs: miRNA-451 και miRNA-144 σε ex vivo καλλιεργούμενα ερυθροειδή κύτταρα απόμων με ομόζυγη β⁰-Μεσογειακή Αναιμία

Από δείγματα των ex vivo καλλιεργούμενων πρόδρομων ερυθροκυττάρων –που προέρχονται από ασθενείς με ομόζυγη β⁰-Μεσογειακή Αναιμία- μελετήθηκε η σχετική ποσοτικοποίηση των ερυθροειδικών microRNAs: miRNA-451 και miRNA-144.

Η καταγραφή και παρατήρηση των αποτελεσμάτων έδωσε μία εικόνα αυξανόμενης έκφρασης των δύο microRNAs, από τη 12^η έως τη 14^η μέρα μελέτης, σε όλα σχεδόν τα δείγματα (Πιν.38 και 39). Η αύξηση αυτή παρουσιάζεται τόσο με τη χρήση του RNU6 ως «microRNA ελέγχου» όσο και με το RNU48. Η επιλογή, όμως, του δεύτερου ως καταλληλότερου στη μελέτη της σχετικής έκφρασης των microRNAs φυσιολογικών δειγμάτων «επιβάλλει» την εφαρμογή του και στη μελέτη των β⁰-Thal. ασθενών με σκοπό την εξαγωγή συγκρίσιμων αποτελεσμάτων με τα φυσιολογικά δείγματα.

12^η μέρα

Πιν.38: Σχετική έκφραση των υπό μελέτη miRNA-451 και miRNA-144 σε ερυθροειδή κύτταρα απόμων με ομόζυγη β⁰-Μεσογειακή Αναιμία

Δείγμα	miR-451 (RNU6)	miR-451 (RNU48)	miR-144 (RNU6)	miR-144 (RNU48)
β ⁰ -Thal.1	5,15	1,01	0,38	0,07
β ⁰ -Thal.2	2,84	0,47	0,60	0,10
β ⁰ -Thal.3	2,26	0,44	0,13	0,03
β ⁰ -Thal.4	12,07	0,16	22,37	0,29

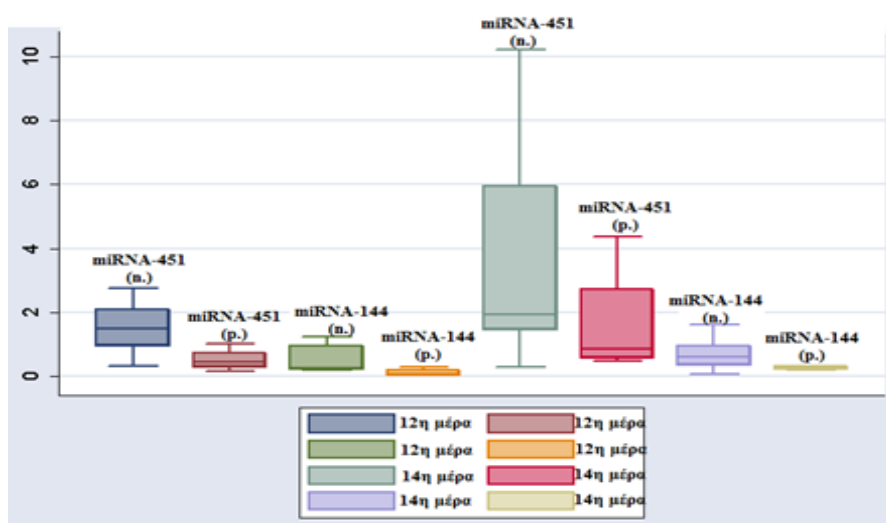
14^η μέρα

Πιν.39: Σχετική έκφραση των υπό μελέτη miRNA-451 και miRNA-144 σε ερυθροειδή κύτταρα ατόμων με ομόζυγη β⁰-Μεσογειακή Αναιμία

Δείγμα	miR-451 (RNU6)	miR-451 (RNU48)	miR-144 (RNU6)	miR-144 (RNU48)
β ⁰ -Thal.1	164,66	4,38	12,32	0,33
β ⁰ -Thal.2	15,45	0,65	4,94	0,21
β ⁰ -Thal.3	33,82	1,10	9,15	0,30
β ⁰ -Thal.4	27,16	0,50	14,45	0,27

5.4.4.2 Σύγκριση της σχετικής έκφρασης των microRNAs-στόχων μεταξύ φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με β⁰-Μεσογειακή Αναιμία.

Όπως παρατηρήθηκε και πιο πάνω, η σχετική έκφραση των miRNA-451 και miRNA-144 αυξάνεται τόσο στα φυσιολογικά ερυθροειδή κύτταρα όσο και στα ερυθροειδή κύτταρα ασθενών με ομόζυγη β⁰-Μεσογειακή Αναιμία. Όπως παρουσιάζεται και στο διάγραμμα box-plot (box-plot 11), αποκαλύπτεται ένα παρόμοιο μοτίβο μεταβολής της σχετικής έκφρασης των δύο υπό μελέτη microRNAs, με τη μεγαλύτερη αύξηση να καταγράφεται στο miRNA-451 και στις δύο ομάδες δειγμάτων.



Box-Plot 11: Γραφική απεικόνιση της σχετικής έκφρασης των miRNA-451 και miRNA-144 από ex vivo πρόδρομα ερυθροκύτταρα φυσιολογικών (n.) και β⁰-Thal ατόμων (p.)

Η σύγκριση όμως, των παθολογικών δειγμάτων με τα φυσιολογικά, τα οποία αποτελούν και το δείγμα-ρυθμιστή (calibrator), παρουσιάζει ένα διαφορετικό μοτίβο μεταβολής της έκφρασης των microRNAs. Όπως παρατηρείται στους πίνακες 40 και 41, οι τιμές της σχετικής έκφρασης των miRNA-451 και miRNA-144 στα ομόζυγα β^0 -Thal. δείγματα είναι μικρότερες του ενός (<1) τόσο τη 12^η όσο και τη 14^η μέρα, υποδηλώνοντας ότι τα δύο ρυθμιστικά μόρια υποεκφράζονται στα παθολογικά ex vivo πρόδρομα ερυθροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά.

12^η μέρα

Πιν.40: Καθορισμός της σχετικής έκφρασης των microRNAs β^0 -Thal. ασθενών με βάση το Μέσο Όρο της σχετικής έκφρασης των αντίστοιχων microRNAs φυσιολογικών ατόμων

FOLD CHANGE RATIO TO MEAN NORMAL microRNAs		
	miRNA-451 (RNU48)	miRNA-144 (RNU48)
β^0 -Thal.1	0,65	0,12
β^0 -Thal.2	0,31	0,17
β^0 -Thal.3	0,29	0,05
β^0 -Thal.4	0,10	0,50

14^η μέρα

Πιν.41: Καθορισμός της σχετικής έκφρασης των microRNAs β^0 -Thal. ασθενών με βάση το Μέσο Όρο της σχετικής έκφρασης των αντίστοιχων microRNAs φυσιολογικών ατόμων

FOLD CHANGE RATIO TO MEAN NORMAL microRNAs		
	miRNA-451 (RNU48)	miRNA-144 (RNU48)
β^0 -Thal.1	1,10	0,45
β^0 -Thal.2	0,16	0,29
β^0 -Thal.3	0,28	0,41
β^0 -Thal.4	0,13	0,37

Παρ' όλα αυτά, η σύγκριση του λόγου miRNA-451/miRNA-144, στα υπό μελέτη δείγματα τόσο των φυσιολογικών (Πιν.Α) όσο και των ομόζυγων β⁰-Thal. (Πιν.Β) πρόδρομων ερυθροκυττάρων, δίνει τιμές οι οποίες στατιστικά δεν παρουσιάζουν σημαντική απόκλιση μεταξύ τους (P > 0,05). Η διακύμανση του λόγου που παρατηρείται στο διάγραμμα (Box-Plot.12) μεταξύ των ομόζυγων β⁰-Thal. δειγμάτων και των φυσιολογικών, ίσως οφείλεται στο μικρό αριθμό δειγμάτων που εξετάστηκαν σ' αυτή την εργασία καθώς και στη μικρή συγκέντρωση αρχικού υλικού που απομονώθηκε από τα παθολογικά δείγματα.

Πιν.42: Ο λόγος της σχετικής έκφρασης miRNA-451/144 φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με β⁰-Thal.

Δείγμα	miRNA-451/144 Ratio	
	12 ^η μέρα	14 ^η μέρα
N.1	7,00	3,1
N.2	4,20	4,00
N.3	2,20	6,00
N.4	2,20	6,30
N.5	1,50	4,10
β ⁰ -Thal.1	14,43	13,27
β ⁰ -Thal.2	4,70	3,10
β ⁰ -Thal.3	14,67	3,67
β ⁰ -Thal.4	0,50	1,85

Πιν.Α : Στατιστική ανάλυση του λόγου miRNA-451/144 τη 12η μέρα ανάπτυξης των ex vivo πρόδρομων ερυθροκυττάρων

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
```

var10	obs	rank sum	expected
Normal	5	21	25
β ⁰ -Thal.	4	24	20
combined	9	45	45

```
unadjusted variance      16.67
adjustment for ties      0.00
adjusted variance        16.67

Ho: var9(var10==1) = var9(var10==2)
z = -0.980
Prob > |z| = 0.3272
```

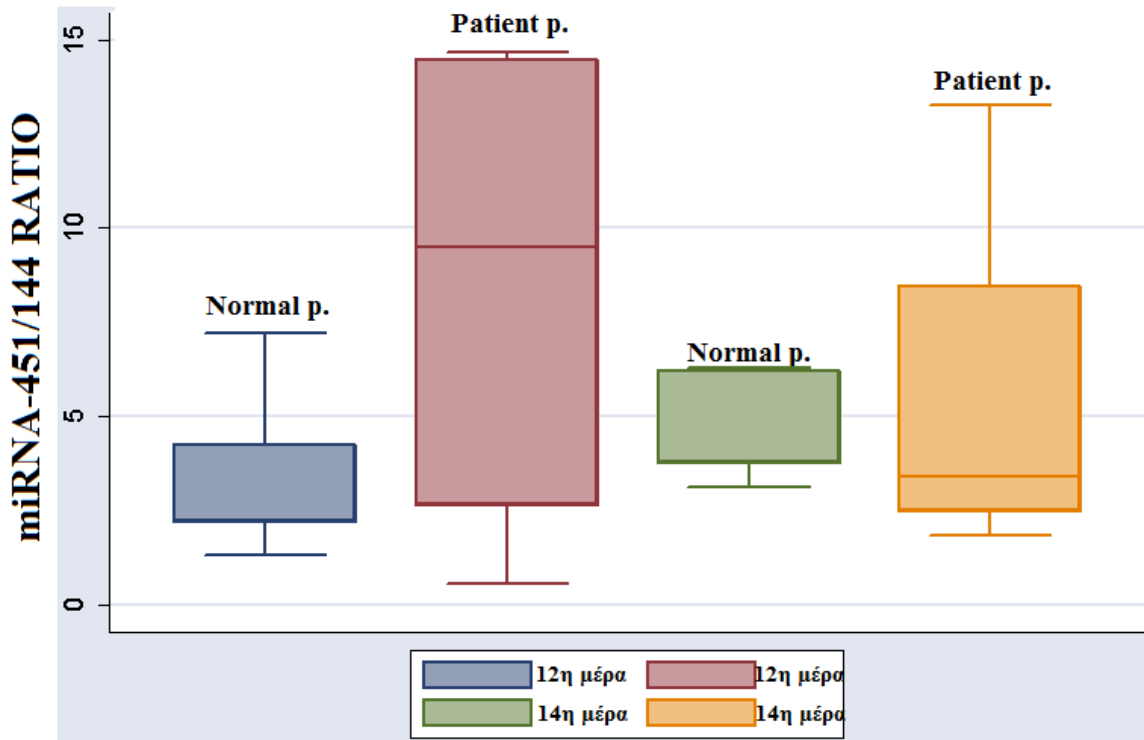
Πιν. Β: Στατιστική ανάλυση του λόγου miRNA-451/144 τη 14η μέρα ανάπτυξης των ex vivo πρόδρομων ερυθροκυττάρων

```
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test
```

var10	obs	rank sum	expected
Normal	5	29	25
β ⁰ -Thal.	4	16	20
combined	9	45	45

```
unadjusted variance      16.67
adjustment for ties      -0.14
adjusted variance        16.53

Ho: var11(var10==1) = var11(var10==2)
z = 0.984
Prob > |z| = 0.3252
```



Box-Plot 12: Γραφική απεικόνιση του λόγου miRNA-451/144 σε φυσιολογικά (n.) και παθολογικά δείγματα (p.).

6. Συζήτηση

Η ερυθροποίηση είναι μία πολυσταδιακή και αυστηρώς ρυθμιζόμενη διαδικασία παραγωγής ώριμων απύρηνων ερυθροκυττάρων και εισόδου τους στην κυκλοφορία του αίματος. Στον ενήλικο πραγματοποιείται κυρίως στο μυελό των οστών, όπου εκεί πλήθως μεταγραφικών παραγόντων και ρυθμιστικών μορίων «συνομιλούν» με τα συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του μυελού με σκοπό την ορθή εξέλιξη και ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής στον οργανισμό (6,10). Η πιθανή διαταραχή της ερυθροποίησης στον ανθρώπινο οργανισμό, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφόρων αιματολογικών παθήσεων, όπως είναι οι αιμοσφαιρινοπάθειες.

Κύριος στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η δημιουργία ενός συστήματος ex vivo ερυθροειδών κυτταρικών καλλιέργειών φυσιολογικών ατόμων, το οποίο θα επιτρέπει την αξιόπιστη ποσοτικοποίησης της έκφρασης ερυθροειδικών microRNAs και στη συνέχεια την εφαρμογή του σε ασθενείς με ομόζυγη β^0 -Μεσογειακή Αναιμία (β^0 -M.A.).

Το σύστημα αυτό θα πρέπει να πληρεί ορισμένες σημαντικές προϋποθέσεις όπως:

(α) καθαρός κυτταρικός πληθυσμός των πρόδρομων ερυθροκυττάρων σε κάθε στάδιο ανάπτυξης της καλλιέργειας

(β) μέθοδο που θα υποστηρίζει πολύ καλή ποιότητα και απόδοση εξαγόμενου γενετικού υλικού από τα πρόδρομα ερυθροκύτταρα

Η επιλογή του κατάλληλου τύπου κυτταρικής καλλιέργειας για την ανάπτυξη, διαφοροποίηση και ωρίμανση ενός καθαρού πληθυσμού πρόδρομων ερυθροκυττάρων, αποτέλεσε ένα βασικό κριτήριο για την επιτυχή διεξαγωγή της ερυθροποίησης ex vivo. Σ' αυτή την εργασία επιλέχθηκε η ημιστερεή καλλιέργεια μεθυλοκυτταρίνης, η οποία δίνει τη δυνατότητα στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα να παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο καλλιεργητικό υλικό και να αναπτύσσονται μόνο όσα διεγείρονται από τους αυξητικούς παράγοντες Stem Cell Factor και ερυθροποιητίνη, που υπάρχουν στο καλλιεργητικό μέσο. Μ' αυτό τον τρόπο δημιουργούνται καθαρές κυτταρικές αποικίες πρόδρομων ερυθροκυττάρων- όπως διαφάνηκε και από την αξιολόγηση της μορφολογίας των κυττάρων- οι οποίες, όταν μελετηθούν, δίνουν αποτελέσματα που καθορίζουν μόνο τα κύτταρα της ερυθράς σειράς.

Ένα ακόμη βασικό στάδιο του παρόντος συστήματος ποσοτικοποίησης αποτελεί η απομόνωση του ολικού RNA και των microRNAs από τα ex vivo πρόδρομα

ερυθροκύτταρα. Κατά τη διαδικασία απομόνωσης απαιτείται η εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου που θα δώσει τη μέγιστη δυνατή απόδοση και ταυτόχρονα την καλύτερη ποιότητα RNA. Στην παρούσα διπλωματική εργασία δοκιμάστηκαν δύο πρωτόκολλα: 1) το Trizol® Reagent και 2) το miRNeasy mini kit, για την εξαγωγή του γενετικού υλικού.

Το Trizol® Reagent είναι ένα απλό και εύχρηστο εργαλείο απομόνωσης RNA, το οποίο εφαρμόζεται σε πλήθος κυτταρικών τύπων και ιστών. Παρόλα αυτά, η διαπίστωση ορισμένων μειονεκτημάτων, όπως: 1) η χρήση ενός δεύτερου πρωτοκόλλου για τον καθαρισμό του εξαγόμενου γενετικού υλικού από το DNA, 2) το μεγάλο χρονικό διάστημα που χρειάζεται για τη διεκπαιρέωση της διαδικασίας απομόνωσης και 3) οι ψευδώς υψηλές συγκεντρώσεις ολικού RNA που καταγράφονται κατά τη φωτομέτρηση του RNA, λόγω της παρουσίας οργανικών διαλυτών στο RNA-εναιώρημα· όλα αυτά καθιστούν το πρωτόκολλο του Trizol® Reagent μη-συμβατό για την απομόνωση ολικού RNA και microRNAs από τα πρόδρομα ερυθροκύτταρα. Αντίθετα, το miRNeasy mini kit προσφέρει σε μικρότερο χρόνο υψηλής ποιότητας γενετικό υλικό, το οποίο δίνει καλύτερη απόδοση στα επόμενα στάδια της πειραματικής διαδικασίας (σύνθεση cDNA και PCR πραγματικού χρόνου).

Η επιλογή επίσης, του κατάλληλου γονιδίου αναφοράς (housekeeping), το οποίο θα αποτελέσει τη βάση για τη μελέτη της σχετικής ποσοτικοποίησης των ερυθροειδικών mRNAs, έχει μέγιστη σημασία για την ακριβή σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης σε πολλαπλά δείγματα. Η χρήση του GAPDH ως γονιδίου αναφοράς αποτελεί μία πολύ καλή λύση σε αρκετές πειραματικές προσπάθειες, λόγω της αυξημένης παρουσίας του και της σταθερής έκφρασής του σε διάφορους ιστούς και κυτταρικούς τύπους. Η εφαρμογή όμως, του γονιδίου PBGD δίνει καλύτερα αποτελέσματα στην κανονικοποίηση και στη σχετική ποσοτικοποίηση των ερυθροειδικών mRNAs, σύμφωνα και με προηγούμενη μελέτη (56). Το γονίδιο αυτό είναι ειδικό για την ερυθρά σειρά, έχει σταθερά επίπεδα έκφρασης και δεν έχουν καταγραφεί -μέχρι τώρα- γνωστά PBGD-ψευδογονίδια. Επίσης, κατά τη μελέτη της σχετικής ποσοτικοποίησης, οι τιμές που εξάγονται με το γονίδιο PBGD ως γονίδιο αναφοράς, παρουσιάζουν μικρότερη απόκλιση μεταξύ των δειγμάτων, σε σχέση με το γονίδιο GAPDH. Η καταγραφή των πιο πάνω συμπερασμάτων, καθιστά το PBGD ως ένα ισχυρό και αξιόπιστο γονίδιο αναφοράς στη μελέτη των ερυθροειδικών mRNAs και στη σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ πολλαπλών δειγμάτων.

Όπως προαναφέρθηκε, κύριος στόχος της εργασίας ήταν η δημιουργία ενός συστήματος ποσοτικοποίησης, το οποίο θα είναι σταθερό και αξιόπιστο για τη μελέτη των microRNAs που εμπλέκονται στην ερυθροποίηση. Για να διερευνηθεί και να αξιολογηθεί η σταθερότητα του συστήματος, ελέγχθηκε αρχικά η σχετική ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων ερυθροειδικών mRNAs: των GATA-1, KLF-1, HBB και HBG1/2 σε φυσιολογικούς δότες αίματος και ακολούθως τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με τη χρήση στατιστικών μοντέλων. Η επιλογή των mRNAs για την αρχική μελέτη του συστήματος, οφείλεται στη γνώση ότι τα mRNAs είναι πιο ασταθή μόρια σε σύγκριση με τα microRNAs και συνεπώς τα αποτελέσματα που θα εξαχθούν από την ανάλυσή τους, θα καθορίσουν τη λειτουργικότητα και τη σταθερότητα του παρόντος συστήματος.

Με την εφαρμογή στατιστικών μοντέλων στη μελέτη της σχετικής ποσοτικοποίησης (Shapiro wilk και Mann-Whitney) καθώς και του διαγράμματος box-plot, διαφάνηκε ότι οι λόγοι της έκφρασης των εξεταζομένων mRNAs: GATA-1/KLF-1, GATA-1/HBG_{1/2} και KLF-1/HBG_{1/2} είναι σταθεροί χωρίς σημαντική στατιστική απόκλιση μεταξύ των δειγμάτων. Αυτό αποδεικνύει, παράλληλα, ότι το σύστημα ποσοτικοποίησης -που δημιουργήθηκε και εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία- είναι σταθερό, εύχρηστο και ικανό να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση των ρυθμιστικών μορίων miRNAs κατά την πορεία εξέλιξης της ex vivo ερυθροποίησης.

Με βάση τα πιο πάνω δεδομένα, γίνεται εφικτός ο έλεγχος της σχετικής ποσοτικοποίησης των microRNAs τόσο σε φυσιολογικά δείγματα ex vivo πρόδρομων ερυθροκυττάρων όσο και σε παθολογικά δείγματα που φέρουν ομόζυγη β⁰-M.A. Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η έκφραση δύο ερυθροειδικών microRNAs που λειτουργούν ως θετικοί ρυθμιστές της ερυθροποίησης, των miRNA-451 και miRNA-144. Επιλέχθηκαν αυτά τα δύο μόρια, γιατί: (α) διεγείρουν τη μετάφραση ερυθροειδικών γονιδίων απαραίτητων για τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των πρόδρομων ερυθροκυττάρων καθώς και την σύνθεση σφαιρινών και (β) η έκφρασή τους αυξάνεται καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης της ex vivo ερυθροειδούς κυτταρικής καλλιέργειας. (Paparretrou E. et al, Svasti S. et al.) (33,45).

Τα επίπεδα έκφρασης των δύο ρυθμιστικών μορίων miRNA-451 και miRNA-144 αυξάνονται καθ' όλη τη διάρκεια εξέλιξης της ex vivo ερυθροειδούς διαδικασίας στα φυσιολογικά δείγματα. Αντίθετα, η σύγκριση των παθολογικών ομόζυγων β⁰-M.A. δειγμάτων έναντι των φυσιολογικών, δίνει μία εικόνα υποέκφρασης που καταγράφεται και στις δύο χρονικές περιόδους ανάλυσης των ex vivo κυτταρικών καλλιεργειών (12^η

και 14^η μέρα). Παράλληλα, όμως, ο λόγος miRNA-451/144 παραμένει σταθερός μεταξύ των φυσιολογικών και παθολογικών δειγμάτων, δίνοντας τιμές οι οποίες δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική απόκλιση μεταξύ των δύο ομάδων (45).

Γενικά, το παρόν σύστημα ποσοτικοποίησης αποτελεί μία καλή βάση για την περαιτέρω διερεύνηση της έκφρασης ερυθροειδικών ρυθμιστικών μορίων. Η σταθερότητα και η αξιοπιστία που το χαρακτηρίζουν, το καθιστούν ένα χρήσιμο εργαλείο για μελλοντικές μελέτες ερυθροειδικών γονιδίων ή/και microRNAs που συνδέονται με την εμφάνιση αιμοσφαιρινοπαθειών στον ανθρώπινο οργανισμό. Το επόμενο βήμα -στην προσπάθεια μελέτης των ερυθροειδικών microRNAs, θα είναι η σύγκριση της έκφρασης των miRNAs-μεταγράφων σε ex vivo πρόδρομα ερυθροκύτταρα φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με ομόζυγη β⁰-Μεσογειακή Αναιμία και α⁰-Μεσογειακή Αναιμία με τη χρήση περισσότερων εξειδικευμένων μεθόδων όπως είναι η μοριακή μέθοδο των συστοιχιών (arrays).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ:

1. Αντιδραστήρια:

Χημικά	Προμηθευτές
MethoCult[®] H4230	Stemcell Technologies, Thessaloniki, Greece
Ficoll- Histopaque[®] 1077	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
rhSCF (c: 10μg/μl)	R&D Systems, Minneapolis, MN
rhEPO (c: 1U/5μl)	R&D Systems, Minneapolis, MN
TRizol[®] Reagent	Applied Biosystems by Life Technologies, Thessaloniki, Greece
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Isopropyl alcohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
Absolute alcohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
miRNeasy Mini kit	Qiagen GmbH, Hilden, Germany
Super Script[®] First-Strand Synthesis System kit	Applied Biosystems by Life Technologies, Thessaloniki, Greece
TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription kit	Applied Biosystems by Life Technologies, Thessaloniki, Greece
LightCycler[®] TaqMan Master	Roche-Applied Science, Indianapolis, USA

2. Εργαστηριακός εξοπλισμός:

- Φυγόκεντρος: Hettich Micro 200 Benchtop Centrifuge
- Θερμικός κυκλοποιητής: Eppendorf[®] Mastercycler[®] pro
- Μηχάνημα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου: Roche LightCycler
- Φωτομετρητής: NanoDrop 1000

3.1. Εκκινητές για σύνθεση cDNA από microRNAs (Applied Biosystems by Life Technologies, Thessaloniki, Greece)

LT Assay ID	LT Assay Name	Target Sequence
001006	RNU48	GAUGACCCCAGGUAACUCUGAGUGUGUCG CUGAUGCCAUCACCGCAGCGCUCUGACC
001093	RNU6B	CGCAAGGAUGACACGCAAAUUCGUGAAGC GUUCCAUAUUUUU
001141	hsa-miR-451	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU
002148	hsa-miR-144	GGUAUCAUCAUAUACUGUAAG

3.2. Μείγμα εκκινητών/ανιχνευτών (primers/probes) για την αντίδραση της Real-Time PCR (Applied Biosystems by Life Technologies, Thessaloniki, Greece)

TaqMan microRNA Assays	TaqMan Gene Assays
miRNA-451 (# 001141)	GATA-1 (Hs01085823_m1*)
miRNA-144 (# 002148)	HBB (Hs00747223_g1)
RNU6B (# 001093)	HBG1/2 (Hs00361131_g1)
RNU48 (# 001006)	KLF-1 (Hs00610592_m1*)
	GAPDH (Hs99999905_m1)
	PBGD(Hs00609297_m1)

4. Υλικά:

1. Καλλιεργητικό μέσο:

- 1 ml MethoCult[®] H4230
- 200.000 μονοπύρηννα κύτταρα
- 50ng SCF (c: 10ng/ μl)
- 5U EPO (c: 1U/ μL)

2. Χρώση Giemsa:

- Σε 250ml μεθανόλης διαλύονται 3,8 γρ. σκόνης Giemsa
- Το διάλυμα θερμαίνεται στους 60° C για 90 λεπτά
- Ακολούθως, προσθέτονται 250ml γλυκερίνης και γίνεται πολύ καλή ανάδευση των υλικών
- Το διάλυμα φυλάσσεται στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πριν από τη χρήση του προσθέτονται 80 ml απεσταγμένο νερό και 10ml αιθανόλης σε 10ml διαλύματος Giemsa

Βιβλιογραφία

- 1) Ronzoni L et al. Erythroid differentiation and maturation from peripheral CD34+ cells in liquid culture: cellular and molecular characterization. *Blood Cells Mol. Dis.* 2008, 40:148-155
- 2) Philipsen S et al. Erythropoiesis. *Medicine* 2009, 2:24-46
- 3) Hristoskova S et al. The chromatin of differentiating erythroblasts is cleaved into large size fragments independent of caspase activated DNase and apoptosis inducing factor. *J Cell Physiol.* 2007, 213:490-494
- 4) Palis J et al. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 1999, 126:5073-5084
- 5) Kruse A et al. Red blood cell lifespan, erythropoiesis and hemoglobin control. *Contrib. Nephrol.* 2008, 161:247-254
- 6) Bonnet D. Haematopoietic stem cells. *J. Pathol.* 2002, 197:430-440
- 7) Dolznig H et al. Erythroid progenitor renewal versus differentiation: genetic evidence for cell autonomous, essential functions of EpoR, Stat5 and the GR. *Oncogene.* 2006, 25:2890-2900
- 8) Sherwood L et al. *Animal Physiology.* Brooks/Cole Cengage Learning 2005
- 9) Ingle, E et al. New insights into the regulation of erythroid cells. *IUBMB Life* 2004, 56: 177–184.
- 10) Orkin S et al. Diversification of hematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* 2000, 1: 57-64
- 11) Arcasoy M et al. Co-operative signalling mechanisms required for erythroid precursor expansion in response to erythropoietin and stem cell factor. *Br. J. Haematol.* 2005, 130:121-9
- 12) Hattangadi S et al. From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood* 2011, 118:6258-68

- 13) Kennedy, M et al. A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive hematopoiesis. *Nature* 1997, 386: 488–493.
- 14) Eshghi S et al. Alpha4beta1 integrin and erythropoietin mediate temporally distinct steps in erythropoiesis: integrins in red cell development. *J Cell Biol.* 2007, 177:871-80
- 15) Koury M. Self-renewal in late-stage erythropoiesis. *Blood* 2011, 117: 2562-2564
- 16) Chen K et al. Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *PNAS* 2009, 106:17413-17418
- 17) Zeuner A et al. Stem cell factor protects erythroid precursor cells from chemotherapeutic agents via up-regulation of BCL-2 family proteins. *Blood* 2003, 102:87-93
- 18) Welch J et al. Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1. *Blood* 2004, 104:3136-3147
- 19) Brandt S et al. Regulation of LMO2 mRNA and protein expression in erythroid differentiation. *Haematologica* 2009, 94: 447–448
- 20) Dai C et al. Human burst-forming units-erythroid need direct interaction with stem cell factor for further development. *Blood* 1991, 78:2493-2497
- 21) Muta K et al. Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* 1995, 86:572-580
- 22) Sui X et al. Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood* 1998, 92:1142-1149
- 23) Lappin T. The cellular biology of erythropoietin receptors. *Oncologist* 2003, Suppl. 1:15-8
- 24) Wilson I et al. The structure, organization, activation and plasticity of the erythropoietin receptor. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999, 9:696-704
- 25) Cantor A et al. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 2002, 21:3368-3376

- 26)** Ferreira R et al. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol. Cell Biol.* 2005, 25:1215-1227
- 27)** Blobel G et al. Nuclear factors that regulate erythropoiesis. In: Steinberg MH, et al., editors. *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management.* Cambridge University Press; Cambridge, UK: 2001. pp. 72–94.
- 28)** Kerenyi M et al. Networking erythropoiesis. *J. Exp. Med.* 2010, 207:2537-2541
- 29)** Tsiftoglou A et al. Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life* 2009, 61:800-830
- 30)** Pase L et al. miR-451 regulates zebrafish erythroid maturation in vivo via its target *gata2*. *Blood* 2009, 113:1794-1804.
- 31)** Zhan M et al. MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation. *Exp. Hematol.* 2007, 35: 1015–1025
- 32)** Choong M et al. MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. *Exp. Hematol.* 2007, 35:551-64
- 33)** Papapetrou E et al. A genetic strategy for single and combinatorial analysis of miRNA function in mammalian hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2010, 28:287-96
- 34)** Lawrie C. microRNA expression in erythropoiesis and erythroid disorders. *Br. J. Haematol.* 2010, 150:144-51
- 35)** Lawrie C. MicroRNAs and haematology: small molecules, big function. *Br. J. Haematol.* 2007, 137:503-12
- 36)** Bissels U et al. MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. *Haematologica* 2012, 97:160-167
- 37)** Zhao G et al. MicroRNAs in erythropoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 2010, 17:155-162
- 38)** Lu J et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005, 435:834-838
- 39)** Brandi D et al. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 2008, 454: 56–61

- 40)** Azzouzi I et al. MicroRNAs as components of regulatory networks controlling erythropoiesis. *Eur. J. Haematol.* 2012, 89:1-9
- 41)** Lau P et al. The molecular machines that mediate microRNA maturation. *J. Cell Mol. Med.* 2009, 13:54-60
- 42)** Navarro F et al. Small RNAs guide hematopoietic cell differentiation and function. *J. Immunol.* 2010, 184:5939-5947
- 43)** Byon J et al. MicroRNAs: Allies or foes in erythropoiesis? *J. Cell Physiol.* 2012, 227:7-13
- 44)** Rasmussen K et al. The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. *J. Exp. Med.* 2010, 207:1351-1358
- 45)** Svasti S et al. Expression of microRNA-451 in normal and thalassemic erythropoiesis. *Ann. Hematol.* 2010, 89:953-958
- 46)** Fu Y et al. Mir-144 selectively regulates embryonic alpha-hemoglobin synthesis during primitive erythropoiesis. *Blood* 2009, 113:1340-1349
- 47)** Masaki S et al. Expression analysis of microRNAs in erythropoiesis. *Rinsho Byori.* 2008, 56:1086-1092
- 48)** Masaki S et al. Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 364:509-514
- 49)** Felli N et al. MicroRNA 223-dependent expression of LMO2 regulates normal erythropoiesis. *Haematologica* 2009, 94: 479–486
- 50)** Bakker W et al. FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *J. Cell Biol.* 2004, 164:175–184
- 51)** Bakker W et al. Differential Regulation of Foxo3a Target Genes in Erythropoiesis. *Mol. Cell Biol.* 2007, 27: 3839–3854
- 52)** Marinkovic D et al. Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. *J. Clin. Invest.* 2007, 117:2133-2144

- 53)** Shao L et al. Effect of activin A on globin gene expression in purified human erythroid progenitors. *Blood* 1992, 79:773-781
- 54)** Wang Q et al. MicroRNA miR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4. *Blood* 2008, 111:588-595
- 55)** Ji P et al. Formation of mammalian erythrocytes: chromatin condensation and enucleation. *Trends Cell Biol.* 2011, 21:409-415
- 56)** Silver N et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 2006, 7:33.
- 57)** Giulietti A et al. Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Drug Discovery Today* 2001, 25:386-401
- 58)** Huggett J et al. Real-time RT-PCR normalization strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005, 6: 279–284
- 59)** Vandesompele J et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002, 3:0034.1–0034.11
- 60)** Pfaffl M. Quantification strategies in real-time PCR. *A-Z of quantitative PCR* 2004, Chapter 3 p: 87 - 112