



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Αξιολόγηση μοριακής δράσης ανασυσταμένης HDL, που περιέχει ανθρώπινες απολιποπρωτεΐνες apoA-I ή apoE3 αγρίου τύπου, στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής και ειδικότερα στην έκφραση miRNAs

**ΚΟΥΦΑΡΓΥΡΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2018

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Αξιολόγηση μοριακής δράσης ανασυσταμένης HDL, που περιέχει ανθρώπινες απολιποπρωτεΐνες apoA-I ή apoE3 αγρίου τύπου, στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής και ειδικότερα στην έκφραση miRNAs.

ΚΟΥΦΑΡΓΥΡΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

A.M.: 71603

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Σανούδου Δέσποινα, Αναπλ. Καθηγήτρια, Δ' Παθολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Σανούδου Δέσποινα**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Δ' Παθολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
2. **Λιανίδου Ευρύκλεια**, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας και Κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
3. **Χρόνη Αγγελική**, Ερευνήτρια Α', Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και εφαρμογών ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 9 Οκτ. 2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αθηροσκλήρωση είναι η κύρια αιτία καρδιαγγειακής νόσου παγκοσμίως. Οι διαθέσιμες όμως θεραπείες παρουσιάζουν σημαντικούς περιορισμούς ως προς την αποτελεσματικότητα ή/και την ασφάλειά τους. Οι διαταραχές της ακεραιότητας και της λειτουργίας του ενδοθηλίου διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε όλα τα στάδια της αθηροσκλήρωσης. Ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (ECs) αποκαθιστούν την ακεραιότητα του ενδοθηλίου, ενώ η διατήρηση της ομοιόστασης της χοληστερόλης είναι απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία του. Αν και έχει δειχθεί *in vivo* πως η χορήγηση ανασυσταμένης HDL (rHDL) λειτουργεί αθηροπροστατευτικά αυξάνοντας την ανάστροφη ροή χοληστερόλης και η επίδρασή των rHDL apoA-I και apoE3 στη γονιδιακή έκφραση των ECs έχει αποτελέσει αντικείμενο προηγούμενης μελέτης της ομάδας μας, η πιθανή επίδραση τους στην έκφραση miRNAs των ECs δεν έχει ακόμα μελετηθεί. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο εντοπισμός πιθανών αθηροπροστατευτικών επιδράσεων των συγκεκριμένων τύπων rHDL στα ECs και ο χαρακτηρισμός των ενδεχόμενων ρόλων των miRNAs στους μηχανισμούς μέσω των οποίων ασκούνται. Χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων (GeneChip™ miRNA 2.0 Array, Affymetrix) που αξιολογούν αλλαγές έκφρασης όλων των γνωστών miRNAs, μελετήθηκαν φυσιολογικά ανθρώπινα ECs αορτής μετά από έκθεση στους δύο τύπους rHDL. Μετά από λεπτομερή βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών με κριτήρια ανάλυσης την αλλαγή έκφρασης με λόγο (fold change, FC) $\geq \pm 1,5$ και πιθανότητα λάθους (false discovery rate, FDR) $\leq 0,05$ παρατηρήθηκαν αλλαγές σε 8 miRNAs. Τα miR-3188, miR-3185, miR-1231, miR-3195, miR-2861, miR-1915 και miR-638 υποεκφράζονταν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μετά τη χορήγηση rHDL-apoA-I και το miR-503 μετά τη χορήγηση rHDL-apoE3. Δεν βρέθηκαν miRNAs με στατιστικά σημαντική υπερέκφραση. Ακολούθησε η αναζήτηση πειραματικά επιβεβαιωμένων και η πρόβλεψη πιθανών στόχων για το καθένα. Ανάλυση με το πρόγραμμα Ingenuity Pathway Analysis έδειξε πως τόσο τα miRNAs όσο και οι στόχοι τους, εμπλέκονται σε εύρος κυτταρικών λειτουργιών, κάποιες από τις οποίες σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία των ECs και ενδεχομένως με την αθηροσκλήρωση. Ο λειτουργικός χαρακτηρισμός των στόχων των miRNAs έδειξε ότι στους στόχους των miR-3185 και miR-2861 περιλαμβάνονται σημαντικά γονίδια του μεταβολισμού χοληστερόλης, ενώ οι στόχοι του miR-503 περιλαμβάνουν σημαντικούς ρυθμιστές της αγγειογένεσης. Βιβλιογραφικά βρέθηκε ότι το miR-503 είναι ρυθμιστής της αγγειογένεσης. Η υπερέκφραση του την εμποδίζει, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ECs, ενώ η αναστολή του έχει τα αντίθετα αποτελέσματα. Ανάμεσα στους στόχους του βρίσκονται γονίδια με σημαντική επίδραση στον πολλαπλασιασμό (EFNB2, FLT1, NR4A1, ADAMTS4) και τη μετανάστευση (EFNB2, FLT1, PTGIR, COL4A1) των ECs. Ο συνδυασμός με τα δεδομένα της προηγούμενης μελέτης γονιδιακής έκφρασης υποδεικνύει ότι η rHDL-apoE3 θα μπορούσε να επάγει τον πολλαπλασιασμό των ECs μέσω ενός άξονα rHDL-apoE3 – miR-503↓ – mRNA στόχων↑. Αν και μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί κάποιος ρόλος για τα miR-3185 και miR-2861 στη ρύθμιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης, ανάμεσα στους πιθανούς στόχους τους βρίσκονται

γονίδια σημαντικά για όλες σχεδόν τις λειτουργίες του. Από αυτά, τα HMGCR, MVK και CYP51A1 κωδικοποιούν για ένζυμα που συμμετέχουν άμεσα στο μονοπάτι βιοσύνθεσης χοληστερόλης. Ο συνδυασμός με τα δεδομένα της προηγούμενης μελέτης υποδεικνύει την πιθανή ύπαρξη ενός άξονα της μορφής rHDL-apoA-I (ή η εκροή χοληστερόλης που προκαλεί) – miR-3185 και miR-2861↓ – mRNA των HMGCR, MVK και CYP51A1↑ – επαγωγή της βιοσύνθεσης χοληστερόλης. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που εξετάζει την επίδραση των rHDL-apoA-I και rHDL-apoE3 στην έκφραση miRNAs από φυσιολογικά HAECs καθώς και το ρόλο των miRNAs στις πιθανές αθηροπροστατευτικές δράσεις της rHDL. Το miR-503 έχει τη δυνατότητα να επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ECs, συμβάλλοντας στην αποκατάσταση της ενδοθηλιακής συνέχειας, ενώ τα miR-3185 και miR-2861, μπορούν να επάγουν την ελεγχόμενη βιοσύνθεση χοληστερόλης, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ομοιότητας της στα ECs. Μέσω αυτών των δράσεων τα miR-3185, miR-2861 και miR-503 έχουν τη δυνατότητα να διαμεσολαβούν αθηροπροστατευτικές επιδράσεις των rHDL-apoA-I και rHDL-apoE3 στα ECs, αποτελώντας πολλά υποσχόμενους θεραπευτικούς στόχους, που αξίζει να μελετηθούν σε μεγαλύτερο βάθος και περισσότερα επίπεδα, ώστε να τεθούν οι βάσεις για την περαιτέρω αξιοποίησή τους στο χώρο της πρόληψης και αντιμετώπισης της αθηροσκλήρωσης.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Αθηροπροστατευτική δράση της HDL με απολιποπρωτεΐνες apoA-I και apoE3, που μεσολαβούνται από αλλαγές στην έκφραση miRNAs.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Αθηροσκλήρωση, rHDL-apoA-I, rHDL-apoE3, miRNAs, ενδοθηλιακά κύτταρα, πολλαπλασιασμός & βιοσύνθεση χοληστερόλης.

ABSTRACT

Despite atherosclerosis being the leading cause of cardiovascular disease worldwide, there is no available treatment without important effectivity and/or safety issues. Damage of the endothelial monolayer integrity is an important initiating event in the pathogenesis of atherosclerosis; however increased endothelial cell (EC) proliferation and migration can restore its integrity following vascular injury. Furthermore, the maintenance of cholesterol homeostasis is essential for EC function and its perturbations can contribute to the emergence of several pathologies. Although it has been shown that reconstituted HDL (rHDL) administration is atheroprotective, partly due to the increased reverse cholesterol transport it mediates and a previous study of our group has studied the effects of rHDL particles containing either apoA-I or apoE3 on EC gene expression, their effect on miRNA expression are still unknown. The aim of this study was to identify potential atheroprotective effects of discoid rHDL particles containing human wild type apoA-I or apoE3 and phospholipids and characterize the potential roles of miRNAs in the mechanisms by which these could be exercised. We studied normal human aortic ECs after exposure to the two types of rHDL, using oligonucleotide miRNA expression microarrays (GeneChip™ miRNA 2.0 Array Affymetrix). Multilevel bioinformatical analysis using 1.5-fold and ≤ 0.05 false discovery rate thresholds identified 8 significantly changed miRNAs: miR-3188, miR-3185, miR-1231, miR-3195, miR-2861, miR-1915 and miR-638 were under-expressed after rHDL-apoA-I treatment and so was miR-503 after the rHDL-apoE3 one. There were no significantly changed miRNAs over-expressed. Next we identified the experimentally validated and predicted targets for each one of the 8 miRNAs. Ingenuity Pathway Analysis indicated that both the miRNAs and their targets affect several cellular functions, some of which could affect EC function and atherosclerosis. The in depth functional characterization of the predicted target genes of miR-3185 and miR-2861, revealed that some of them are key cholesterol biosynthesis genes, while the targets of miR-503 include key genes regulating angiogenesis. PubMed analysis showed that miR-503 is an important regulator of angiogenesis; its over-expression inhibits it by reducing EC proliferation and migration, while its inhibition has the opposite effects. Furthermore, genes with significant effects on EC proliferation (EFNB2, FLT1, NR4A1, and ADAMTS4) and migration (EFNB2, FLT1, PTGIR and COL4A1) can be found among its validated and predicted target genes. Combination of the above with data from the preceding gene expression study, allows us to make the assumption that rHDL-apoE3 can theoretically induce EC proliferation through an rHDL-apoE3 – miR-503 expression reduction – target mRNA increase, axis. Although, there are no reports indicating that miR-3185 and miR-2861 have a part in cholesterol metabolism regulation so far, several genes participating in almost every part of it, could be found among their predicted targets. Of these, HMGCR, MVK and CYP51A1 code for enzymes that directly participate in the cholesterol biosynthesis pathway. Again, combination of the above with data from the preceding gene expression study suggest the existence of an axis where rHDL-apoA-I itself or the cholesterol efflux it causes, down-regulates miR-

3185 and miR -2861, up-regulating HMGCR, MVK and CYP51A1 expression leading to an increase in cholesterol biosynthesis. In conclusion the present study is the first to examine the effects of rHDL-apoA-I and rHDL-apoE3 on EC miRNA expression, as well as the role of the affected miRNAs in mediating the probable atheroprotective effects of rHDL on ECs. Through this study we found that miR-503 has the potential to induce the proliferation and migration of ECs, contributing to the restoration of endothelial integrity, whereas miR-3185 and miR-2861 could potentially induce cholesterol biosynthesis in a controlled manner, contributing to the maintenance of EC cholesterol homeostasis. Through these effects, miR-3185, miR-2861 and miR-503 could mediate potentially atheroprotective rHDL-apoA-I and rHDL-apoE3 functions. This makes rHDL in general and these miRNAs in particular possible therapeutic targets worth exploring more deeply, since the deeper understanding of their effects on the endothelium at the cellular and molecular level promises to facilitate the development of new therapies to prevent from or treat atherosclerosis.

SUBJECT AREA: Atheroprotective effects of HDL containing apolipoproteins apoA-I or apoE3, mediated through altered miRNA expression.

KEYWORDS: Atherosclerosis, rHDL-apoA-I, rHDL-apoE3, miRNAs, endothelial cells, proliferation & cholesterol biosynthesis.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	12
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Εισαγωγή	14
1.1 Το μείζον πρόβλημα της αθηροσκλήρωσης	14
1.2 Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου	15
1.3 Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών	16
1.3.1 Η LDL χοληστερόλη	17
1.3.2 Η HDL χοληστερόλη	18
1.3.3 Αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της HDL	19
1.4 Αθηροσκλήρωση	21
1.4.1 Επίδραση των λιποπρωτεϊνών	21
1.4.2 Φλεγμονή	22
1.4.3 Αθηρωματική πλάκα	22
1.5 Θεραπείες έναντι της αθηροσκλήρωσης	24
1.5.1 Στατίνες	25
1.5.2 Άλλοι υπολιπιδαιμικοί παράγοντες	26
1.5.3 Θεραπείες μείωσης των τριγλυκεριδίων	27
1.5.4 Θεραπείες που αυξάνουν την HDL	28
1.5.5 Πολλά υποσχόμενες μελλοντικές θεραπείες	28
1.5.6 Θεραπείες που βασίζονται στην HDL	29
1.6 In vitro μοντέλα μελέτης του ενδοθηλίου	31
1.6.1 Πρωτογενή ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής	32
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 MicroRNAs και αθηροσκλήρωση	33
2.1 Εισαγωγή	33
2.2 Επίδραση των miRNAs στην αθηροσκλήρωση	34

2.2.1	Παραδείγματα	35
2.3	Βασικές αρχές και προβλήματα της μελέτης των miRNAs.....	35
2.3.1	Μικροσυστοιχίες.....	36
2.3.2	Εξόρυξη βιολογικών δεδομένων από τα αποτελέσματα μικροσυστοιχιών .	37
2.3.3	Μεθοδολογίες εξόρυξης βιολογικών δεδομένων (data mining)	37
2.3.4	Πρόβλεψη στόχων	38
2.4	Ερευνητική δραστηριότητα του εργαστηρίου, στόχος της παρούσας μελέτης ..	38
3.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Υλικά και μέθοδοι	40
3.1	Πειραματικό μέρος.....	40
3.1.1	Κατασκευή ανασυνδυασμένου αδενοϊού που εκφράζει apoA-I	40
3.1.2	Παραγωγή και καθαρισμός των απολιποπρωτεϊνών	40
3.1.3	Παρασκευή δισκοειδών rHDL σωματιδίων που περιέχουν apoA-I.....	41
3.1.4	Καλλιέργεια πρωτογενών ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων και χορήγηση των rHDL-apoA-I σωματιδίων.....	41
3.1.5	Ανάλυση ολικής γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων της Affymetrix.....	41
3.1.6	Απόκτηση και ανάλυση εικόνας	42
3.1.7	Κανονικοποίηση.....	43
3.2	Στατιστική ανάλυση	44
3.3	Εξόρυξη βιολογικών δεδομένων από τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών.	44
3.3.1	IPA ανάλυση	44
3.3.2	Ανάλυση βιβλιογραφίας με τη βάση δεδομένων του PubMed.....	46
3.3.3	Εύρεση πειραματικά επιβεβαιωμένων στόχων	46
3.3.4	Πρόβλεψη πιθανών στόχων.....	47
3.3.5	Συνδυασμός με τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης	49
3.3.6	Κατηγοριοποίηση με βάση όρους Gene Ontology	49

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Αποτελέσματα	51
4.1 Εισαγωγή.....	51
4.2 Αποτελέσματα για τα rHDL-apoA-I vs PBS miRNAs	51
4.2.1 Ανάλυση βιολογικών και μοριακών λειτουργιών με βάση το λογισμικό IPA.....	51
4.2.2 Πειραματικά επιβεβαιωμένοι στόχοι των υπο εξέταση miRNAs	54
4.2.3 Πρόβλεψη πιθανών στόχων των υπό εξέταση miRNAs.....	55
4.2.4 IPA ανάλυση για τους στόχους των miRNAs	58
4.2.4.1 Αποτελέσματα ανάλυσης των στόχων του miR-3188.....	58
4.2.4.2 Αποτελέσματα ανάλυσης των στόχων του miR-3185.....	61
4.2.4.3 Αποτελέσματα ανάλυσης των στόχων του miR-1231	65
4.2.4.4 Αποτελέσματα ανάλυσης των στόχων του miR-2861	69
4.2.4.5 Αποτελέσματα ανάλυσης των στόχων του 1915	73
4.2.4.6 Αποτελέσματα ανάλυσης των στόχων του 638	77
4.2.5 Αποτελέσματα κατηγοριοποίησης βάσει Gene Ontology (GO)	80
4.2.6 Αποτελέσματα εξόρυξης δεδομένων βάσει PubMed.....	81
4.2.6.1 Αποτελέσματα για το miR-3188.....	82
4.2.6.2 Αποτελέσματα για το miR-2861	82
4.2.6.3 Αποτελέσματα για το miR-638.....	82
4.3 Αποτελέσματα για τα rHDL-apoE3 vs PBS miRNAs.....	83
4.3.1 Ανάλυση λειτουργιών με βάση το λογισμικό IPA.....	83
4.3.2 Πειραματικά επιβεβαιωμένοι στόχοι του miR-503	85
4.3.3 Πρόβλεψη πιθανών στόχων του miR-503.....	86
4.3.4 IPA ανάλυση των στόχων του miR-503	87
4.3.5 Αποτελέσματα κατηγοριοποίησης βάσει όρων Gene Ontology	92
4.3.6 Αποτελέσματα εξόρυξης δεδομένων βάσει PubMed για το miR-503	93
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 Συζήτηση – Συμπεράσματα	94

6. ΟΡΟΛΟΓΙΑ	109
7. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	110
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	112
9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	119
10. ΑΝΑΦΟΡΕΣ	138

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Η δομή της HDL του πλάσματος.	18
Σχήμα 1.2: Πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με την HDL.....	19
Σχήμα 1.3: Πορεία ανάπτυξης αθηρωματικής πλάκας.....	23
Σχήμα 1.4: Η δομή της πρόδρομης δισκοειδούς και της ώριμης σφαιρικής HDL.....	29
Σχήμα 3.1: Η μικροσυστοιχία GeneChip™ miRNA 2.0 Array.....	41
Σχήμα 4.1: Ραβδόγραμμα λειτουργικών κατηγοριών του miR-638.....	52
Σχήμα 4.2: Ραβδόγραμμα επιλεγμένων λειτουργικών κατηγοριών των στόχων του miR-3188, που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση.	60
Σχήμα 4.3: Ραβδόγραμμα λειτουργικών κατηγοριών των στόχων του miR-3185, που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση.....	64
Σχήμα 4.4: Ραβδόγραμμα λειτουργικών κατηγοριών των στόχων του miR-1231 που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση.....	67
Σχήμα 4.5: Ραβδόγραμμα λειτουργικών κατηγοριών των στόχων του miR-2861, που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση.....	71
Σχήμα 4.6: Ραβδόγραμμα λειτουργικών κατηγοριών των στόχων του miR-1915, που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση.....	75
Σχήμα 4.7: Ραβδόγραμμα λειτουργικών κατηγοριών των στόχων του miR-638, που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση.....	78
Σχήμα 4.8: Ραβδόγραμμα των λειτουργικών κατηγοριών του miR-503, του μόνου miRNA που επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από τη χορήγηση rHDL-apoE3.....	83
Σχήμα 4.9 Ραβδόγραμμα λειτουργικών κατηγοριών των στόχων του miR-503, που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση.....	90
Σχήμα 5.1 Διαγραμματική αναπαράσταση του πιθανού μονοπατιού μέσω του οποίου η rHDL-apoE3 μπορεί να επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων με τη διαμεσολάβηση του miR-503 και των στόχων του.....	99

Σχήμα 5.2: Διαγραμματική αναπαράσταση των μονοπατιών μετανάστευσης ERK1/2 και PI3K/AKT/eNOS (γαλάζιο πλαίσιο) που επηρεάζονται από τη χορήγηση rHDL-apoE3 μέσω του miR-503 και του στόχου του EFNB2.....	100
Σχήμα 5.3 Διαγραμματική αναπαράσταση μονοπατιών μετανάστευσης των P38 MAPK/PAK/ROCK κινασών κάτωθι των RHO GTPασών (RHOA, RAC1) που επηρεάζονται από τη χορήγηση rHDL-apoE3 μέσω του miR-503 και των στόχων του EFNB2 και FLT1.....	101
Σχήμα 5.4 Διαγραμματική αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού των ιντεγκρινών στις εστίες κυτταρικής προσκόλλησης που επηρεάζεται από τη χορήγηση rHDL-apoE3 μέσω του miR-503 και των στόχων του COL4A1 και PTGIR.....	103
Σχήμα 5.5: Διαγραμματική αναπαράσταση του πιθανού μονοπατιού μέσω του οποίου η rHDL-apoA-I μπορεί να επάγει τη βιοσύνθεση χοληστερόλης στα ενδοθηλιακά κύτταρα με τη διαμεσολάβηση των miR-3185, miR-2861 και των στόχων τους.....	106

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.1: Οι επιλεγμένες ρυθμίσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις με το πρόγραμμα IPA.....	44
Πίνακας 3.2: Οι επιλεγμένες ρυθμίσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις με το πρόγραμμα miRWalk.....	47
Πίνακας 4.1: Όλα τα miRNAs των οποίων η έκφραση αλλάζει στατιστικά σημαντικά....	50
Πίνακας 4.2: Βιολογικές και μοριακές λειτουργικές κατηγορίες των miRNAs που η έκφραση τους αλλάζει στατιστικά σημαντικά με τη χορήγηση rHDL-apoA-I.....	51
Πίνακας 4.3: Λεπτομερής χαρακτηρισμός των λειτουργικών κατηγοριών τις οποίες επηρεάζει η αλλαγή έκφρασης του miR-638.....	52
Πίνακας 4.4: Οι πειραματικά επιβεβαιωμένοι στόχοι των υπό εξέταση miRNAs.	53
Πίνακας 4.5: Πιθανοί στόχοι του miR-3188.....	55
Πίνακας 4.6: Πιθανοί στόχοι του miR-3185.....	55
Πίνακας 4.7: Πιθανοί στόχοι του miR-1231.....	55
Πίνακας 4.8: Πιθανοί στόχοι του miR-3195.....	56
Πίνακας 4.9 Πιθανοί στόχοι του miR-2861.....	56
Πίνακας 4.10: Πιθανοί στόχοι του miR-1915.....	56
Πίνακας 4.11: Πιθανοί στόχοι του miR-638.....	57
Πίνακας 4.12: Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης των στόχων του miR-3188.	58
Πίνακας 4.13: Επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τις λειτουργίες του ενδοθηλίου και πιθανώς με την αθηροσκλήρωση και στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-3188.	59
Πίνακας 4.14: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “μεταβολισμός λιπιδίων”, που έχει το χαμηλότερο p-value και τον μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-3188.....	61

Πίνακας 4.15: Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης των στόχων του miR-3185.	61
Πίνακας 4.16: Επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τις λειτουργίες του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση και στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-3185.	63
Πίνακας 4.17: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “Μεταβολισμός λιπιδίων” που έχει το χαμηλότερο p-value, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-3185.	64
Πίνακας 4.18: Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης των στόχων του miR-1231.	65
Πίνακας 4.19: Επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τις λειτουργίες του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση και στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-1231.	67
Πίνακας 4.20: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος”, που έχει το χαμηλότερο p-value, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-1231.	68
Πίνακας 4.21: Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης των στόχων του miR-2861.	69
Πίνακας 4.22: Επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τις λειτουργίες του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση και στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-2861.	70
Πίνακας 4.23: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της υποκατηγορίας “μεταβολισμός χοληστερόλης” της λειτουργικής κατηγορίας “μεταβολισμός λιπιδίων”, που έχει το χαμηλότερο p-value, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-2861.	72
Πίνακας 4.24: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της υποκατηγορίας “μεταβολισμός λιπιδίων” της λειτουργικής κατηγορίας “μεταβολισμός λιπιδίων”, που έχει το χαμηλότερο p-value, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-2861.	72

Πίνακας 4.25: Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης των στόχων του miR-1915	73
Πίνακας 4.26: Επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τις λειτουργίες του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση και στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-1915.....	74
Πίνακας 4.27: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “μεταβολισμός λιπιδίων”, που έχει το χαμηλότερο p-value, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-1915.	76
Πίνακας 4.28: Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης των στόχων του miR-638.	76
Πίνακας 4.29: Επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τις λειτουργίες του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση και στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-638.....	78
Πίνακας 4.30: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “κυτταρική κίνηση”, που έχει το χαμηλότερο p-value, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-638.	79
Πίνακας 4.31: Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εμπλουτισμού σε όρους GO για τους στόχους του miR-3185.	80
Πίνακας 4.32: Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εμπλουτισμού σε όρους GO για τους στόχους του miR-2861	80
Πίνακας 4.33: Συγκεντρωτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της PubMed ανάλυσης.	81
Πίνακας 4.34: Οι λειτουργικές κατηγορίες του miR-503, του μόνου miRNA που η έκφραση του αλλάζει στατιστικά σημαντικά μετά τη χορήγηση rHDL-apoE3.....	83
Πίνακας 4.35: Λεπτομερής χαρακτηρισμός των λειτουργικών κατηγοριών στις οποίες συμμετέχει το miR-503.	84
Πίνακας 4.36: Οι πειραματικά επιβεβαιωμένοι στόχοι του miR-503.....	85
Πίνακας 4.37: Πιθανοί στόχοι του miR-503.....	86

Πίνακας 4.38: Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης των στόχων του miR-503.	87
Πίνακας 4.39: Επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τις λειτουργίες του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση και στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-503.	89
Πίνακας 4.40: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος”, που έχει το χαμηλότερο p-value, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-503.	91
Πίνακας 4.41: Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εμπλουτισμού σε όρους GO για τους στόχους του miR-503.	92
Πίνακας 6.1: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....	109
Πίνακας 8.1: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-3188.....	113
Πίνακας 8.2: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-3185.....	114
Πίνακας 8.3: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-1231.....	115
Πίνακας 8.4: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-3195.....	116
Πίνακας 8.5: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-2861.....	117
Πίνακας 8.6: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-1915.....	118
Πίνακας 8.7: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-638.....	119
Πίνακας 8.8: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-503.....	120

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κρασιά-Σανούδου, του κέντρου Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης στην Κλινική Χημεία του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά τη διάρκεια των ακαδημαϊκών ετών 2017-2018. Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Δ. Σανούδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Ιατρικής Σχολής Αθηνών και Επιστημονική υπεύθυνη - Επιβλέπουσα της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η κα Δ. Σανούδου, εκτός από τις πλούσιες επιστημονικές γνώσεις που απλόχερα μου χάρισε, μου δίδαξε πόσο σημαντικό είναι να προσπαθείς και να δουλεύεις σκληρά για να πετύχεις το στόχο σου, ανεξάρτητα από τις δυσκολίες που μπορεί να παρουσιαστούν. Η θέληση που τη χαρακτηρίζει να εξοικειώνει τους φοιτητές της με ό,τι πιο επίκαιρο και σύγχρονο στον τομέα της βασικής έρευνας τους εφοδιάζει με κίνητρα και ερεθίσματα για μια μετέπειτα εξελικτική πορεία και για αυτό θεωρώ τον εαυτό μου τυχερό που ήμουν ένας από αυτούς.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης, στην κα Ε. Λιανίδου, Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας – Κλινικής Χημείας του Τμήματος Χημείας Αθηνών και Συντονίστρια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης στην Κλινική Χημεία. Η κα Ε. Λιανίδου με εμπιστεύτηκε επιλέγοντας με για το μεταπτυχιακό πρόγραμμα που συντονίζει δίνοντας μου έτσι τη ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα επίκαιρο θέμα μεγάλου επιστημονικού ενδιαφέροντος και να εμπλουτίσω με αυτό τον τρόπο τις γνώσεις μου ειδικότερα στον τομέα των μικροσυστοιχιών. Θεωρώ τη συμβολή της στην αναβάθμιση του περιεχομένου των μαθημάτων του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης στην Κλινική Χημεία πολύ σημαντική καθώς προσπαθεί συνέχεια να ανανεώνει το γνωστικό τους αντικείμενο με τις πιο σύγχρονες τεχνολογίες. Με αυτόν τον τρόπο ενθαρρύνει τους φοιτητές να διευρύνουν τις ερευνητικές τους δραστηριότητες.

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας μου δόθηκε η δυνατότητα να γνωρίσω τον κο Β. Ζαννή, Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Βοστώνης, καθώς η παρούσα ερευνητική μελέτη έχει πραγματοποιηθεί έπειτα από συνεργασία του με την ομάδα της κα Δ. Σανούδου. Τον ευχαριστώ θερμά για την πολύτιμη καθοδήγησή του. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Αγγελική Χρόνη, ερευνήτρια Α' στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος", καθώς δέχτηκε να αποτελέσει το τρίτο μέλος της εξεταστικής επιτροπής της παρούσας ερευνητικής εργασίας αλλά και για τις στοχευμένες παρατηρήσεις της. Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην κα Ε. Βαλαντή, Διδακτορική ερευνήτρια στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του ΙΙΒΕΑΑ για την κατάρτισή μου στις εργαστηριακές και βιοπληροφορικές τεχνικές, τις επιστημονικές γνώσεις που απλόχερα μου προσέφερε, τη συνεχή βοήθεια που μου παρείχε κατά την

εκπόνηση της μελέτης και τη συγγραφή του παρόντος, καθώς και για το ευχάριστο περιβάλλον εκπαίδευσης και εργασίας. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τους Γ. Καλοζούμη, Ε. Βαφειαδάκη και Δ. Αρβανίτη για τη βοήθεια, την εκπαίδευση σε τεχνικές και τις επιστημονικές γνώσεις και συμβουλές που μου προσέφεραν, οι οποίες ήταν ιδιαίτερα πολύτιμες για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης. Τέλος, ευχαριστώ βαθύτητα την οικογένειά μου και τους φίλους μου για το συνεχές ενδιαφέρον και τη συμπαράστασή τους καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

1.1 Το μείζον πρόβλημα της αθηροσκλήρωσης

Με βάση τα στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), τα καρδιαγγειακά νοσήματα (στεφανιαία νόσος, έμφραγμα του μυοκαρδίου, ισχαιμικά επεισόδια κτλ) είναι η κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως.¹ Η αθηροσκλήρωση, μία συστηματική νόσος κατά την οποία λιπίδια, φλεγμονώδεις παράγοντες, ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού και ουλώδης ιστός, συσσωρεύονται στο εσωτερικό των αρτηριών διαταράσσοντας τη φυσιολογική λειτουργία του αγγείου, είναι η υποκείμενη αιτία εμφάνισης της πλειοψηφίας των καρδιαγγειακών συμβαμάτων.² Το κόστος των παθήσεων του καρδιαγγειακού συστήματος σε ανθρώπινες ζωές έφτασε το 2015 στα 17,5 εκατομμύρια θανάτους παγκοσμίως, ενώ με βάση τα ίδια στοιχεία, το ποσοστό των θανάτων που αποδίδονται σε αυτά αυξήθηκε από 25,8% το 1990 σε 32,1% το 2015.¹ Αντίστοιχα είναι τα δεδομένα και για τη Ελλάδα, καθώς με βάση τα στοιχεία της Eurostat για το 2014, οι καρδιαγγειακές παθήσεις είναι η πρώτη αιτία θανάτου, σε σχεδόν διπλάσιο ποσοστό από αυτό του καρκίνου που ακολουθεί στη δεύτερη θέση της σχετικής λίστας.³

Περίπου τα μισά περιστατικά καρδιακών νοσημάτων αφορούν τα οξεία στεφανιαία σύνδρομα (οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ασταθής στηθάγχη, έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς έπαρμα Q), και το 1/3 εξ αυτών αντιστοιχούν σε καρδιακές προσβολές. Είναι χαρακτηριστικό πως, κάθε χρόνο και μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες, περίπου 900.000 άνθρωποι υποφέρουν από καρδιακή προσβολή, και από αυτούς οι 225.000 τελικά καταλήγουν. Επιπροσθέτως, η ασταθής στηθάγχη και το έμφραγμα μυοκαρδίου χωρίς έπαρμα Q ευθύνονται για 2.500.000 εισαγωγές σε νοσοκομεία ανά έτος.⁴ Τα στεφανιαία σύνδρομα προκαλούνται από την αθηροσκλήρωση των στεφανιαίων αρτηριών,⁵ αυτό σε συνδυασμό με τη συμβολή της αθηροσκλήρωσης στην εξέλιξη της παθολογίας και άλλων νοσημάτων, όπως για παράδειγμα τα ισχαιμικά εγκεφαλικά επεισόδια, την καθιστούν την κύρια αιτία πρόκλησης θανάτου και αναπηρίας στις δυτικές χώρες.⁶

Παράλληλα με το κόστος σε ανθρώπινες ζωές, οι καρδιαγγειακές παθήσεις έχουν σημαντικό οικονομικό τίμημα στα εθνικά συστήματα υγείας. Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες ξοδεύονται περισσότερα από 189,7 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως για τις άμεσες δαπάνες υγειονομικής περίθαλψης των

καρδιαγγειακών παθήσεων (αμοιβές γιατρών και άλλων επαγγελματιών υγείας, νοσοκομειακό και φαρμακευτικό κόστος), εάν συμπεριληφθεί και η μειωμένη παραγωγικότητα των ασθενών το κόστος ανέρχεται σε ποσό μεγαλύτερο των 316,1 δισεκατομμυρίων δολαρίων ετησίως.² Πολλοί θεωρούν ότι η αθηροσκλήρωση είναι πρόβλημα κυρίως του αναπτυσσόμενου κόσμου, όμως ο ΠΟΥ προβλέπει ότι η αυξανόμενη οικονομική ευημερία των αναπτυσσόμενων χωρών θα οδηγήσει πιθανότατα σε επιδημία καρδιαγγειακών παθήσεων, καθώς συνοδεύεται από την υιοθεσία του δυτικού τρόπου ζωής, από τους πληθυσμούς αυτών των χωρών.⁷

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποκαλύψει σημαντικούς περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση.⁷ Ωστόσο, οι κυτταρικές και μοριακές αλληλεπιδράσεις που οδηγούν στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης είναι σύνθετες και εξακολουθούν να μην είναι πλήρως κατανοητές.^{7,8} Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, η διαθεσιμότητα νέων εργαλείων μελέτης, έχει οδηγήσει στην βαθύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που συνδέουν το διαταραγμένο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και άλλους παράγοντες κινδύνου με την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης.⁷

1.2 Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε σειρά σημαντικών λειτουργιών του ενδοθηλίου, δημιουργούν έναν εκλεκτικά διαπερατό φραγμό μεταξύ του αίματος και των ιστών, σχηματίζουν μία αντιθρομβωτική και αντιπηκτική επιφάνεια στο εσωτερικό των αγγείων και συμμετέχουν στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου επιδρώντας στην τοπική αγγειοσυστολή και αγγειοδιαστολή. Ακόμα συμμετέχουν σε όλες τις φυσιολογικές λειτουργίες της αγγειακής ομοιόστασης, αλλά και σε όλες τις παθολογικές διεργασίες που περιλαμβάνουν το ενδοθήλιο.^{9,10}

Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου θεωρείται ένα από τα πρωταρχικά στάδια της αθηρογένεσης.¹¹ Ο όρος δυσλειτουργία του ενδοθηλίου συνήθως αναφέρεται στις διαταραχές στην παραγωγή και βιοδιαθεσιμότητα του ενδοθηλιακής προέλευσης μονοξειδίου του αζώτου, σε συνδυασμό με τον περιορισμό στην προσαρμοστικότητα του αγγείου (**vascular reactivity**) που τις συνοδεύει.¹² Όμως η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου έχει εκφάνσεις που ξεπερνούν κατά πολύ τις αλλαγές στον μεταβολισμό του μονοξειδίου του αζώτου και περιλαμβάνουν μεταβολές που συμμετέχουν άμεσα στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης, όπως η αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου από τις κυκλοφορούσες λιποπρωτεΐνες και η διευκόλυνση της οξειδωτικής ενίσχυσης της προσκόλλησης μονοπύρηνων λευκοκυττάρων στον ενδοθήλιο,

οι αλλαγές στο μεταβολισμό της εξωκυττάριας μήτρας και η απορύθμιση της αιμοστατικής/θρομβωτικής ισορροπίας.¹³

Τα παθοφυσιολογικά βιοχημικά ερεθίσματα που μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση δυσλειτουργίας του αρτηριακού ενδοθηλίου και παρουσιάζουν ιδιαίτερη σημασία για την αθηρογένεση, περιλαμβάνουν προ-φλεγμονώδεις (**pro-inflammatory**) κυτοκίνες, βακτηριακά προϊόντα και ιούς, προϊόντα αυξημένης γλυκίωσης πρωτεϊνών (advanced glycation end products, AGEs, μόρια που παράγονται στα πλαίσια του διαβήτη και της γήρανσης), η υπερχοληστερολαιμία καθ' αυτή και οι οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες και επιμέρους συστατικά τους όπως η λυσοφωσφατίδυλοχολίνη, όταν συσσωρεύονται εντός του αρτηριακού τοιχώματος.^{13,14} Εκτός από τα βιοχημικά ερεθίσματα και οι μηχανικές δυνάμεις που ασκούνται επί των τοιχωμάτων του αγγείου λόγω της κυκλοφορίας του αίματος, επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων και επηρεάζουν τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την φυσιοπαθολογία της αθηρογένεσης (μόρια προσκόλλησης, προ-φλεγμονώδη μόρια κ),¹⁵ αλλάζοντας την έκφραση τους.¹⁶ Η αιμοδυναμική μεταγραφική ρύθμιση εξηγεί γιατί οι αρχικές αθηρωματικές βλάβες δεν αναπτύσσονται τυχαία, αλλά εμφανίζονται ειδικά σε διακλαδώσεις και άλλες περιοχές του αρτηριακού αιμοφόρου δικτύου (καμπές, στενώσεις) όπου η ροή του αίματος αλλάζει.¹³ Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου σε περιοχές που είναι επιρρεπείς στην εμφάνιση αθηρωματικών αλλοιώσεων, έχει ως αποτέλεσμα το ενδοθήλιο να γίνεται διαπερατό από τα κυκλοφορούντα σωματίδια LDL, αυτά αφού περάσουν και παγιδευτούν στον υποενδοθηλιακό χώρο υπόκεινται σε φυσικοχημικές τροποποιήσεις, διαδικασία που αποτελεί το πλέον πρώιμο ανιχνεύσιμο στάδιο στην εξέλιξη μίας αθηρωματικής αλλοίωσης.¹⁷

1.3 Μεταβολισμός των λιποπρωτεϊνών

Η χοληστερόλη αποτελεί απαραίτητο συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών και πρόδρομη ένωση για το σχηματισμό χολικών οξέων, ορμονών του φύλου, στεροειδών ορμονών και της βιταμίνης D3.^{18,19} Μπορεί είτε να παραχθεί ενδογενώς, είτε να προσληφθεί από το περιβάλλον με την τροφή. Όποια και αν είναι η προέλευση της η μεταφορά της στα περιφερειακά κύτταρα γίνεται κυρίως μέσω των κυκλοφορούντων στο πλάσμα λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απολιποπρωτεΐνες Β (apoB), το μεγαλύτερο ποσοστό των οποίων αντιστοιχεί στην LDL. Το σύνολο των μέχρι στιγμής διαθέσιμων δεδομένων επιδεικνύουν αξιοσημείωτη συνέπεια όσον αφορά τη δόσοεξαρτώμενη συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης του καρδιαγγειακού συστήματος στην LDL χοληστερόλη και του κινδύνου εμφάνισης αθηροσκληρωτικής καρδιαγγειακής

νόσου, ενώ κίνδυνος αυξάνει ακόμη περισσότερο όσο πιο μακροχρόνια είναι η έκθεση σε υψηλά επίπεδα LDL χοληστερόλης.¹⁸

Η βιοσύνθεση, όπως και η απορρόφηση της εξωγενούς χοληστερόλης γίνεται κυρίως στο ήπαρ και περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό ενζυμικών αντιδράσεων. Η βιοσύνθεση της χοληστερόλης ξεκινά με τη συμπύκνωση τριών μορίων ακετυλο-CoA για να σχηματιστεί 3-υδρόξυ-3-μέθυλογλουτάρυλο-CoA (HMG-CoA). Η μετατροπή του HMG-CoA σε μεβαλονικό οξύ, από το ένζυμο αναγωγάση του HMG-CoA (HMGCR), είναι το στάδιο που προσδιορίζει την ταχύτητα του μονοπατιού βιοσύνθεσης χοληστερόλης (**rate limiting step**). Από αυτό το σημείο μέχρι την τελική παραγωγή χοληστερόλης απαιτούνται ακόμα πάνω από 20 ενζυμικές αντιδράσεις.^{19,20} Για να καταστεί η χοληστερόλη και τα υπόλοιπα λιπίδια διαλυτά στο αίμα, πακετάρονται μέσα σε έναν πλούσιο σε λιπίδια πυρήνα, γύρω από τον οποίο τυλίγονται πρωτεΐνες. Οι μη πολικές ομάδες των αμινοξέων αυτών των πρωτεϊνών εκτίθενται προς το λιπιδικό πυρήνα, ενώ οι πολικές ή ηλεκτρικά φορτισμένες προσανατολίζονται προς την εξωτερική επιφάνεια του σωματιδίου καθιστώντας το υδατοδιαλυτό. Οι πρωτεΐνες που σχηματίζουν τις λιποπρωτεΐνες ονομάζονται απολιποπρωτεΐνες και έχουν μία σειρά λειτουργιών, πέρα από την απλή μεταφορά λιπιδίων και χοληστερόλης στην κυκλοφορία, δρώντας ως επιφανειακά συστατικά των σωματιδίων, βασικά ένζυμα για το μεταβολισμό των λιπιδίων στο αίμα και προσδέτες (**ligands**) για επιφανειακούς υποδοχείς που συμμετέχουν στη δέσμευση και πρόσληψη των λιποπρωτεϊνών από τα κύτταρα.¹⁹ Οι λιποπρωτεΐνες συντίθενται και καταβολίζονται σε τρία διακριτά μονοπάτια, αυτά των χυλομικρών, των VLDL-IDL-LDL (Very Low Density Lipoprotein - Intermediate Density Lipoprotein - Low Density Lipoprotein) και της HDL (High Density Lipoprotein), που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Αρκετές διαφορετικές πρωτεΐνες, απολιποπρωτεΐνες, ένζυμα του πλάσματος, πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων και χοληστερόλης και υποδοχείς λιποπρωτεϊνών συμμετέχουν σε αυτά τα μονοπάτια και συμβάλουν στην ομοίωση των λιπιδίων και της χοληστερόλης.²¹

1.3.1 Η LDL χοληστερόλη

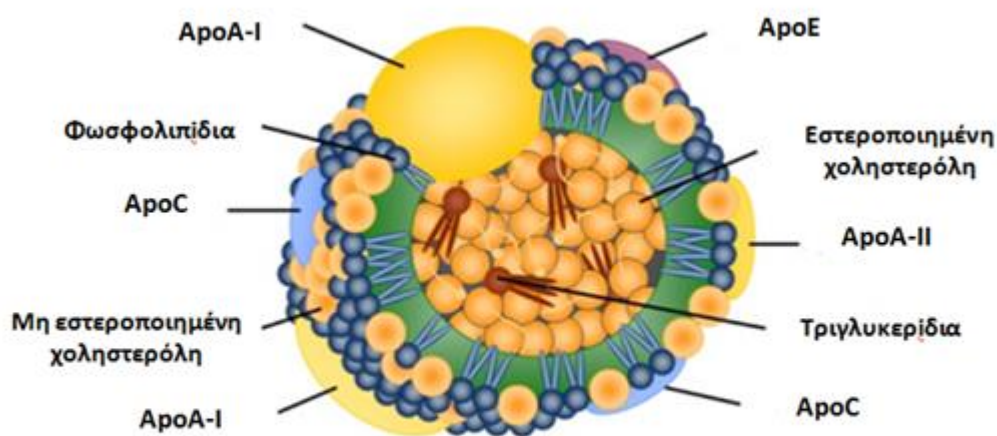
Το πρώτο στάδιο για την παραγωγή LDL είναι το πακετάρισμα χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και άλλων λιπιδίων σε σωματίδια VLDL που περιβάλλονται από απολιποπρωτεΐνη apoB-100 στο ήπαρ. Η ενδογενής παραγωγή τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης από τα ηπατοκύτταρα είναι απαραίτητη για την όλη διαδικασία.²⁴ Μόλις βρεθεί στην κυκλοφορία και σε αντιστοιχία με τα χυλομικρά, η apoC-2 του σωματιδίου VLDL συνδέεται με την LPL στα τριχοειδή αγγεία που περιβάλλουν τους ιστούς. Τα τριγλυκερίδια του πυρήνα

της VLDL υδρολύονται και σχηματίζεται ένα υπόλειμμα VLDL και ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία προσλαμβάνονται από τους ιστούς. Με περαιτέρω υδρόλυση σχηματίζεται το τελικό κατάλοιπο των VLDL, IDL που είναι σχετικά φτωχό σε τριγλυκερίδια αλλά σχετικά εμπλουτισμένο σε χοληστερόλη.²⁵ Το ήπαρ απορροφά απευθείας κάποια σωματίδια IDL μέσω της αλληλεπίδρασης της apoE που περιέχουν με τον LDLR (LDL Receptor). Το σωματίδιο IDL τροποποιείται στη συνέχεια από την ηπατική λιπάση, οπότε παράγονται σωματίδια LDL τα οποία είναι ιδιαίτερα πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης.¹⁹ Το μεγαλύτερο τμήμα της LDL στην κυκλοφορία προέρχεται από τη VLDL. Η κύρια απολιποπρωτεΐνη της LDL είναι η apoB-100, που χρησιμεύει ως προσδέτης για τη σύνδεση της στον υποδοχέα LDLR.²⁶ Μετά τη σύνδεση το σύμπλεγμα LDL-LDLR εισάγεται στο κύτταρο. Εκεί η LDL αποικοδομείται στα λυσοσώματα, ενώ ο LDLR απελευθερώνεται και επιστρέφει πίσω στην κυτταρική επιφάνεια. Το ένζυμο ACAT ελέγχει την αναλογία ελεύθερης, ως προς εστεροποιημένη χοληστερόλη και το προτιμώμενο υπόστρωμα του είναι τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το ελαϊκό και όχι τα κορεσμένα.²⁷ Όταν προσλαμβάνεται περίσσεια κορεσμένων λιπαρών οξέων από την τροφή εστεροποιείται λιγότερη χοληστερόλη, η περίσσεια ελεύθερης χοληστερόλης που προκύπτει μειώνει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα SREBP, με συνέπεια την μείωση της μεταγραφής τόσο του γονιδίου του LDLR όσο και του γονιδίου της HMGCR.^{19,26}

1.3.2 Η HDL χοληστερόλη

Η HDL διαδραματίζει βασικό ρόλο στο μονοπάτι αντίστροφης μεταφοράς χοληστερόλης, τη διαδικασία κατά την οποία χοληστερόλη μεταφέρεται από τους περιφερειακούς ιστούς πίσω στο ήπαρ, που μειώνει την ποσότητα χοληστερόλης στην κυκλοφορία. Το πρώτο στάδιο για την παραγωγή της HDL περιλαμβάνει την εξαγωγή των apoA-1 και apoA-II από τα ηπατοκύτταρα όπου παράγονται και το “φόρτωμα” τους στην κυκλοφορία με φωσφολιπίδια και χοληστερόλη κυτταρικής προέλευσης, μέσω της δράσης του ενζύμου ABCA1. Έτσι παράγονται τα πρώιμα δισκοειδή σωματίδια λιπιδιωμένης apoA-I (**pre-beta HDL**). Στο πλάσμα το ένζυμο LCAT εστεροποιεί ελεύθερη χοληστερόλη που έχει εξαχθεί (efflux) από τα κύτταρα μέσω του μεταφορέα ABCA1, αυτή η εστεροποιημένη χοληστερόλη προσλαμβάνεται από τη δισκοειδή HDL, η οποία μετατρέπεται σταδιακά σε σφαιρικά σωματίδια HDL. Οι εστέρες χοληστερόλης της HDL μεταφέρονται στις λιποπρωτεΐνες VLDL/IDL/LDL μέσω της πρωτεΐνης μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης CETP και τελικά απομακρύνονται από την κυκλοφορία με την αλληλεπίδραση της IDL ή της LDL με τον LDLR που εντοπίζεται στην επιφάνεια των ηπατικών ή περιφερικών κυττάρων. Η HDL υπόκειται και σε περαιτέρω αναδιαμόρφωση που μπορεί να περιλαμβάνει τη μεταφορά φωσφολιπιδίων από την LDL στην

HDL μέσω της δράσης της πρωτεΐνης μεταφοράς φωσφολιπιδίων PLTP, και την πρόσληψη χοληστερόλης που έχει εξαχθεί από περιφερειακά κύτταρα όπως τα μακροφάγα μέσω του υποδοχέα SR-B1, ή διαμέσου του επιφανειακού μεταφορέα χοληστερόλης ABCG1. Όπως θα δειχθεί παρακάτω, η εξαγωγή και αντίστροφη ροή χοληστερόλης ιδιαιτέρως από τα μακροφάγα, είναι κρίσιμης σημασίας για την πρόληψη της αθηρογένεσης.^{19,28,29} Άλλες πρωτεΐνες που απαντώνται σε υποπληθυσμούς της HDL είναι η apoA-II, apoE, apoA-IV και apoC-III.³⁰

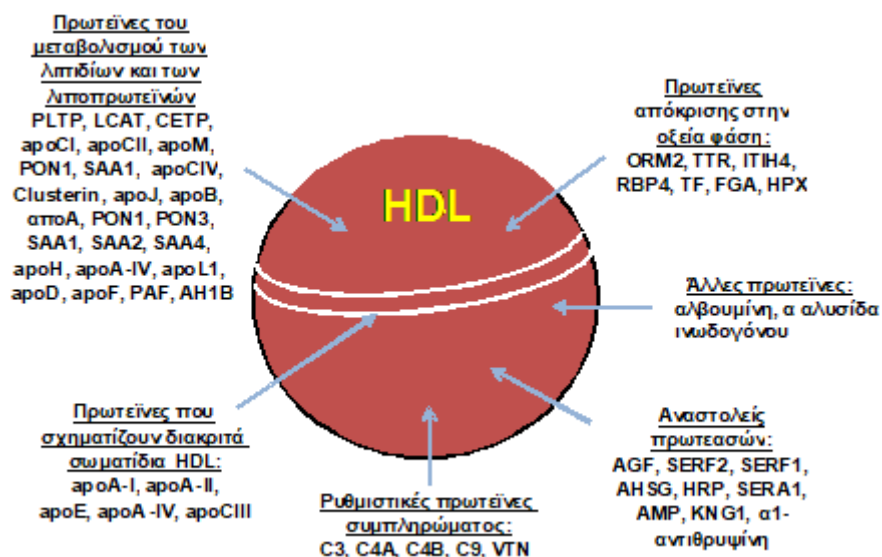


Σχήμα 1.1: Η δομή της HDL του πλάσματος: ένα σύμπλεγμα λιπιδίων και απολιποπρωτεϊνών, με κυριότερο συστατικό την apoA-I. Άλλες πρωτεΐνες που απαντώνται σε υποπληθυσμούς της HDL είναι η apoA-II, apoE, apoA-IV και apoC-III.³⁰

1.3.3 Αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της HDL

Οι αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της HDL έχουν αποδοθεί σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητά της να επάγει την εκροή χοληστερόλης από τα μακροφάγα και άλλα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος και στην προστασία της ακεραιότητας του ενδοθηλίου του αρτηριακού τοιχώματος που παρέχει.^{31,32} Η απομάκρυνση της περίσσειας της χοληστερόλης από τα μακροφάγα των αθηρωματικών πλακών μέσω της HDL αποτρέπει την υπερφόρτωση τους με χοληστερόλη επαναφέροντάς τα σε φυσιολογική κατάσταση, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η δημιουργία αφρωδών κυττάρων και η εξωκυττάρια εναπόθεση χοληστερόλης στα τοιχώματα των αρτηριών.³³ Σειρά πειραμάτων σε ζώα έχει δείξει πως η υπερέκφραση του γονιδίου της

apoA-I προστατεύει από την αθηροσκλήρωση και τη φλεγμονή, ενώ η απαλοιφή του έχει τα αντίστροφα αποτελέσματα.³⁴⁻³⁶



Σχήμα 1.2: Πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με την HDL (αποτελέσματα από μελέτες πρωτεωμικής).³⁷

Η αθηροπροστατευτική δράση της HDL δεν έχει συσχετισθεί μόνο με τα επίπεδά της, αλλά και με την πρωτεϊνική και λιπιδική σύστασή της. Πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια που δεν εξέφραζαν τον υποδοχέα SR-BI, ή που υπερέφραζαν το γονίδιο της apoA-II έχουν δείξει ότι ούτε οι φυσιολογικές, αλλά ούτε και οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις HDL είναι από μόνες τους αθηροπροστατευτικές. Αυτή η παρατήρηση έδειξε πως οι διαφορές στη σύσταση των HDL σωματιδίων, έχουν μεγάλη επίδραση στην άσκηση ή μη των αθηροπροστατευτικών δράσεων της HDL.³⁸ Έχει δειχθεί πειραματικά πως εκτός από την επίδρασή της στην ομοίωση της χοληστερόλης, η HDL και τα πρωτεϊνικά (apoA-I, apoE) και λιπιδικά συστατικά της, έχουν επιπροσθέτως αγγειοδιασταλτικές, αντι-οξειδωτικές, αντι-φλεγμονώδεις και αντι-θρομβωτικές ιδιότητες, συνεισφέροντας συνολικά στην παρατηρούμενη αθηρο-προστατευτική δράση της.³⁹ Επιπλέον, η HDL, αλλά και η apoA-I και τα λιπιδικά συστατικά της HDL εμποδίζουν την απόπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων που επάγεται από την oxLDL.⁴⁰ Η αντι-αποπτωτική αυτή δράση τους σε συνδυασμό με την επαγωγή του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων που επάγεται από την HDL και την apoA-I,⁴¹ διατηρεί την ακεραιότητα του ενδοθηλίου κατά μήκος των αιμοφόρων αγγείων, η οποία, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, προστατεύει από την αθηροσκλήρωση.

1.4 Αθηροσκλήρωση

Η αθηροσκλήρωση είναι μία νόσος πολλών σταδίων. Ξεκινά με την αναδιαμόρφωση των έσω και μέσου χιτώνα του αγγείου λόγω εναπόθεσης οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών που προσελκύει στο σημείο κύτταρα του ανοσοποιητικού και κυρίως μακροφάγα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αλλοίωσης στο αγγείο (atherosclerotic lesion). Συν τω χρόνω, στο σημείο της αλλοίωσης σχηματίζεται αθηρωματική πλάκα, η οποία προκαλεί τη στένωση του αγγείου και η πιθανή διάρρηξή της ευθύνεται για τα θρομβοεμβολικά επεισόδια που συνοδεύουν τη νόσο.⁴² Αν και η αθηρογένεση είναι μία διαδικασία πολλών σταδίων, που περιλαμβάνει περίπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών, το βασικό ρόλο σε αυτήν έχουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού και τα αγγειακά λεία μυοκύτταρα.⁴³

1.4.1 Επίδραση των λιποπρωτεϊνών

Οι λιποπρωτεΐνες, εκ των οποίων το μεγαλύτερο ποσοστό αντιστοιχεί στην LDL χοληστερόλη, διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην αθηρογένεση. Η αυξημένη συγκέντρωσή τους στην κυκλοφορία και η επακόλουθη συσσώρευσή τους κάτω από το αρτηριακό ενδοθήλιο είναι ικανή συνθήκη για την εμφάνιση αθηροσκλήρωσης.^{32,44} Ωστόσο, στην περίπτωση που συνυπάρχουν και άλλοι παράγοντες κινδύνου όπως το κάπνισμα, η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης και σειρά γενετικών παραγόντων που έχει δείχθει ότι αυξάνουν την προδιάθεση γι αυτήν, η νόσος μπορεί να εμφανιστεί ακόμη και όταν το επίπεδο της LDL είναι χαμηλό.¹⁴

Αφού διαπεράσουν το ενδοθήλιο, συνήθως σε σημείο όπου η συνέχειά του έχει διαταραχθεί, οι λιποπρωτεΐνες προσκολλώνται στο αρτηριακό τοίχωμα. Τα δεσμευμένα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια, εκτίθενται εντός του αγγειακού τοιχώματος σε οξειδωτικούς παράγοντες και ένζυμα που προκαλούν την οξειδωσή τους και το σχηματισμό συσσωματωμάτων. Οι τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες προσομοιάζουν με μόρια που προέρχονται από παθογόνα ή με μοριακά σήματα βλάβης και για αυτό πυροδοτούν μία αρχικά ήπια φλεγμονώδη απόκριση. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκαλείται από την παρουσία της οξειδωμένης LDL (oxLDL), προκαλεί την αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης, συμπεριλαμβανομένου του VCAM-1, που προσελκύουν στο σημείο κυκλοφορούντα κύτταρα του ανοσοποιητικού και παράλληλα αυξάνουν τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου. Η δέσμευση των λιποπρωτεϊνών στον έσω-μέσο χιτώνα του αγγείου λειτουργεί ως μηχανισμός θετικής ανάδρασης, δίνοντας το έναυσμα σε έναν φαύλο κύκλο που αυξάνει

συνεχώς την κατακράτηση λιποπρωτεϊνών και τη φλεγμονή με αποτέλεσμα το σχηματισμό της πρώιμης αθηρωματικής αλλοίωσης.¹⁵

1.4.2 Φλεγμονή

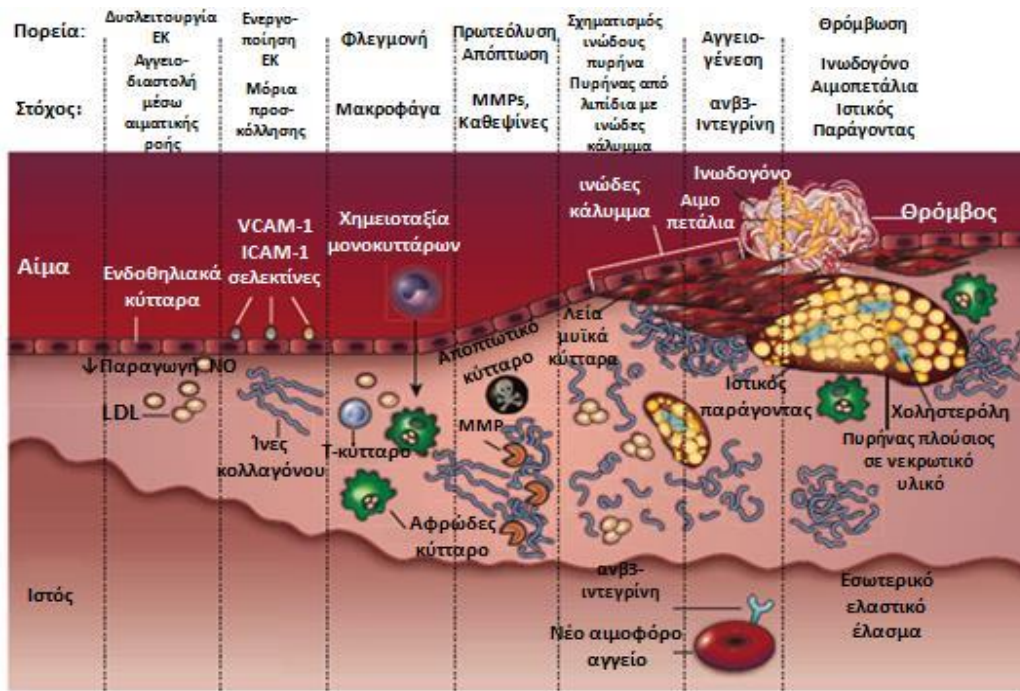
Η παρουσία της oxLDL στον έσω-μέσο χιτώνα θέτει σε κίνηση μία περίπλοκη φλεγμονώδη διαδικασία. Αυτή αρχικά περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων για την παραγωγή χημειοκινών και χημειοτακτικών παραγόντων που αναγνωρίζονται από υποδοχείς στην επιφάνεια των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων, καθώς και μορίων προσκόλλησης που προκαλούν την επιλεκτική προσέλκυση και διείσδυση τους στον έσω-μέσο χιτώνα της αρτηρίας. Εκεί τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα.¹¹ Τα συσσωματώματα oxLDL αναγνωρίζονται ως παθογόνοι παράγοντες και φαγοκυττώνονται από τα μακροφάγα. Όταν η πρόσληψη και συσσώρευση τροποποιημένων λιποπρωτεϊνών και χοληστερόλης εντός των μακροφάγων ξεπεράσει την εξαγωγή μέσω της δράσης της HDL ή στις περιπτώσεις που ο μηχανισμός εξαγωγής δεν λειτουργεί σωστά, τότε η χοληστερόλη και η oxLDL συσσωρεύονται εντός τους. Η υπερβολική συσσώρευση χοληστερόλης εντός των μακροφάγων έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα. Τα μακροφάγα και ιδίως τα αφρώδη κύτταρα, παράγουν κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που επιδρούν πάνω στα γειτονικά αγγειακά λεία μυοκύτταρα, επάγοντας τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την παραγωγή συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας από αυτά. Ενώ, και τα ίδια τα μακροφάγα εκκρίνουν πρωτεογλυκάνες που αυξάνουν τη συσσώρευση τροποποιημένης LDL, αλλά και κυτοκίνες και πρωτεάσες που συντηρούν τη φλεγμονή.^{14,44}

1.4.3 Αθηρωματική πλάκα

Η φλεγμονή προκαλεί τη μετανάστευση αγγειακών λείων μυοκυττάρων από την περιφέρεια του αγγείου προς τον έσω χιτώνα και την παραγωγή από αυτά αυξημένων ποσοτήτων κολλαγόνου και άλλων συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας. Αυτό οδηγεί στη δημιουργία μίας ινομυώδους πλάκας από ινοβλάστες, αγγειακά λεία μυοκύτταρα, κολλαγόνο και εξωκυττάρια μήτρα, με αρχικά μεγάλη διατομή. Ο σχηματισμός της ινομυώδους πλάκας γίνεται πιθανότατα λόγω της ενεργοποίησης του μηχανισμού σχηματισμού ουλής, για την απομόνωση της πρώιμης αθηρωματικής αλλοίωσης, αποτρέποντας την επαφή μεταξύ των κυκλοφορούντων αιμοπεταλίων και του υλικού που επάγει τη θρόμβωση (**pro-thrombotic material**) εντός της.⁴⁵ Η προκαλούμενη αναδιαμόρφωση του αρτηριακού τοιχώματος έχει ως αποτέλεσμα να αποφεύγεται ο σχηματισμός θρόμβου και έτσι να διατηρείται η ροή του

αίματος, ενώ η επαγωγή της αγγειογένεσης από την φλεγμονή συμβάλλει στην αποφυγή της ισχαιμίας. Λόγω αυτής της διαδικασίας οι περισσότερες αθηρωματικές αλλοιώσεις είναι ασυμπτωματικές και δεν προκαλούν οξεία αγγειακή νόσο.⁴⁶

Με την πάροδο του χρόνου οι δομικές αλλαγές που παρατηρούνται στις αναπτυσσόμενες αθηρωματικές αλλοιώσεις έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός νεκρωτικού πυρήνα κάτω από το ινομύδες κάλυμμα. Ο νεκρωτικός πυρήνας αποτελείται κυρίως από κρυστάλλους χοληστερόλης, οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες και κυτταρικά θραύσματα που δημιουργούνται καθώς τα αφρώδη κύτταρα αποπίπτουν και παρουσιάζουν έντονα προ-φλεγμονώδη δράση. Οι αθηρωματικές πλάκες που σχηματίζονται, συνοδεύονται από αναδιαμόρφωση της δομής του τοιχώματος της αρτηρίας και της εξοκυττάριας μήτρας και χαρακτηρίζονται από διαφόρων βαθμών ασβεστοποίηση του ινώδους καλύμματος. Τα πλευρικά όρια της πλάκας συγκεντρώνουν μεγάλο αριθμό φλεγμονωδών κυττάρων, που επάγουν έτι περαιτέρω την πρόσκτηση από τα ενδοθηλιακά κύτταρα προ-φλεγμονώδους φαινότυπου και αυξάνουν την αστάθεια της αθηρωματικής πλάκας μέσω της έκκρισης πρωτεολυτικών ενζύμων που διασπούν την εξοκυττάρια μήτρα.^{14,46,47} Οι πλάκες αυτού του τύπου ονομάζονται ώριμες και χαρακτηρίζονται από την εξέλιξη στην επιφάνεια του αυλού και από την αιμορραγία των μικρών αγγείων που αναπτύσσονται στην περιοχή της αλλοίωσης.^{7,48} Η αυξανόμενη ένταση της φλεγμονής καθώς η αλλοίωση εξελίσσεται, προκαλεί τη λέπτυνση του ινομύδους καλύμματος, τη διάβρωση του και σε πολλές περιπτώσεις τη θραύση της αθηρωματικής πλάκας. Έτσι έρχονται σε επαφή τα κυκλοφορούντα αιμοπετάλια και ο νεκρωτικός πυρήνας, με αποτέλεσμα το σχηματισμό θρόμβου, την πλήρη απόφραξη της αρτηρίας και τελικά την εμφάνιση ενός οξέως επεισοδίου, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου ή το εγκεφαλικό επεισόδιο.¹⁴ Εκτός από τις πλάκες με τα παραπάνω χαρακτηριστικά (μεγάλης έκτασης νεκρωτικό πυρήνα, λεπτό ινομύδες κάλυμμα, έντονη φλεγμονή), υπάρχουν και σταθερές πλάκες που τυπικά δε δίνουν θρομβοεμβολικά επεισόδια. Αυτές έχουν παχύ ινώδες κάλυμμα, περιέχουν μικρότερες ποσότητες λιπιδίων και μικρότερο αριθμό φλεγμονωδών κυττάρων. Όμως, όσο η νόσος εξελίσσεται το μέγεθος τους αυξάνει και η διατομή της αρτηρίας μειώνεται με αποτέλεσμα την εμφάνιση ισχαιμικών επεισοδίων στο επηρεαζόμενο όργανο. Για παράδειγμα, αν μία τέτοια αθηρωματική πλάκα σχηματιστεί στα στεφανιαία αγγεία, υπάρχει μεν μικρότερος κίνδυνος οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου, αλλά προκαλείται στηθάγχη λόγω του περιορισμού της ροής αίματος στον καρδιακό ιστό.^{49,50}



Σχήμα 1.3: Πορεία ανάπτυξης αθηρωματικής πλάκας. Σχηματική αναπαράσταση της μετατροπής ενός φυσιολογικού αιμοφόρου αγγείου (δεξιά) σε ένα αγγείο με αθηρωματική πλάκα και επάλληλη θρόμβωση (αριστερά).⁵¹

1.5 Θεραπείες έναντι της αθηροσκλήρωσης

Η θεραπεία της στεφανιαίας νόσου αποσκοπεί στη μείωση των συμπτωμάτων της στηθάγχης, των οξέων συμβαμάτων και το κυρίως, στην παράταση της επιβίωσης. Η πρόοδος που έχει σημειωθεί στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας της αθηρωματικής στεφανιαίας νόσου (**coronary artery disease**) και η εφαρμογή καλύτερων θεραπειών, έχει οδηγήσει τις τελευταίες δεκαετίες σε σημαντική μείωση των θανάτων λόγω στεφανιαίας καρδιοπάθειας, σε ορισμένες χώρες.⁵² Όμως παρά τη μείωση αυτή και όπως αναφέρθηκε αρχικά, η στεφανιαία νόσος παραμένει η κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως.⁵³ Οι θεραπείες που εφαρμόζονται αφορούν αφενός τη συντηρητική αγωγή (αλλαγή τρόπου ζωής, διατροφή, άσκηση, φάρμακα) και αφετέρου τις παρεμβάσεις επαναιμάτωσης και επαναγγείωσης (**revascularization**), όπως η αγγειοπλαστική ή το by pass, μετά από ένα σύμβαμα.⁵⁴ Όσον αφορά τη μείωση στη θνησιμότητα που αναφέρθηκε προηγουμένως, το 47% αποδίδεται σε θεραπείες που περιλαμβάνουν την πρόληψη νέων συμβαμάτων μετά από έμφραγμα, τη βελτίωση στην αντιμετώπιση του οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου και της ασταθούς στηθάγχης, την καλύτερη αντιμετώπιση της καρδιακής ανεπάρκειας, την επαναγγείωση για την αντιμετώπιση της χρόνιας στηθάγχης και σε άλλες

θεραπευτικές παρεμβάσεις. Περίπου το 44% της μείωσης αποδίδεται σε θεραπείες και αλλαγές στον τρόπο ζωής που αντιμετωπίζουν τους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης τη ολικής χοληστερόλης και της συστολικής πίεσης, της διακοπής του καπνίσματος και της αύξησης της φυσικής άσκησης.⁵²

Αν και ο ρόλος της κάθε παραμέτρου είναι ακόμα υπό διερεύνηση οι LDL, HDL και τα τριγλυκερίδια παραμένουν η βάση για την εκτίμηση του κινδύνου μελλοντικής εμφάνισης κλινικών συμβαμάτων σχετιζόμενων με αθηροσκλήρωση. Το επίπεδο των LDL, HDL και τριγλυκεριδίων στην κυκλοφορία αναδείχθηκε ως ισχυρός προγνωστικός δείκτης εμφάνισης αθηροσκλήρωσης για πρώτη φορά από τη μελέτη Framingham.⁵⁵ Η υπερχοληστερολαιμία (υψηλά επίπεδα LDL χοληστερόλης στην κυκλοφορία) αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες που πυροδοτούν την αθηρογένεση. Αντίστοιχα, η χαμηλή ποσότητα HDL χοληστερόλης, αποτελεί ισχυρό ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη εμφάνισης πρώιμης αθηροσκλήρωσης και περιλαμβάνεται στον υπολογισμό των περισσότερων σκορ εκτίμησης κινδύνου.⁵⁶ Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε τα πολύ υψηλά επίπεδα HDL δεν παρέχουν κάποια επιπλέον προστασία έναντι της αθηροσκλήρωσης και υποδεικνύουν πως σημασία δεν έχει η ποσότητα της ολικής HDL χοληστερόλης, αλλά η αναλογία μεταξύ λειτουργικών και μη μορφών της.⁵⁷

1.5.1 Στατίνες

Στην κλινική πρακτική η φαρμακευτική αντιμετώπιση της υπερλιπιδαιμίας κρίνεται απαραίτητη στις περιπτώσεις που η αλλαγή του τρόπου ζωής (διατροφή, άσκηση, διακοπή καπνίσματος) δεν έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα, καθώς για τη δευτερογενή πρόληψη μετά από κάποιο επεισόδιο.^{54,55} Ο κύριος φαρμακευτικός υπολιπιδαιμικός παράγοντας, που αποτελεί τη θεραπεία πρώτης γραμμής, είναι οι αναστολείς του HMGCR, που αναφέρονται ως στατίνες και αποτελούν τα φάρμακα που άλλαξαν τη θεραπευτική προσέγγιση των καρδιαγγειακών παθήσεων.⁵⁶ Οι στατίνες εκτός από το να μειώνουν τη βιοσύνθεση χοληστερόλης, επάγουν την έκφραση του LDLR από τα ηπατοκύτταρα μέσω ενός μηχανισμού που ρυθμίζεται από το μονοπάτι των SREBP.⁵⁷ Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης της LDL χοληστερόλης από την κυκλοφορία και τη μείωση της συγκέντρωσης λιποπρωτεϊνών που περιέχουν apoB στο πλάσμα.⁵⁵

Οι στατίνες έχουν την ικανότητα να μειώσουν την εξέλιξη των αθηρωματικών βλαβών περισσότερο από άλλα φάρμακα, γεγονός που συνάδει με την

βελτίωση της κλινικής εικόνας των ασθενών που συνοδεύει τη χρήση τους. Υπάρχει πλήθος αποδεικτικών στοιχείων από μια μεγάλη σειρά μελετών, των τελευταίων 15 ετών, που στοιχειοθετούν την ευνοϊκή επίδραση των στατινών στη μείωση των καρδιαγγειακών επεισοδίων και της καρδιαγγειακής και ολικής θνητότητας από αθηροσκλήρωση. Οι στατίνες μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα των αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών, προκαλώντας παράλληλα μικρή αλλά σημαντική αύξηση της HDL.^{56,58} Όμως, παρά το σε γενικές γραμμές καλό προφίλ ασφαλείας, είναι δυνατόν να εμφανιστούν σοβαρές παρενέργειες (μυοπάθειες και μυικοί πόνοι, σπανιότερα ραβδομυόλυση, αύξηση του κινδύνου εμφάνισης διαβήτη τύπου 2) κατά τη χορήγησή τους σε κάποιους ασθενείς, που μπορεί να οδηγήσουν σε διακοπή της θεραπείας (statin intolerance).^{59,60} Αυτό, σε συνδυασμό με την ύπαρξη ασθενών στους οποίους λόγω πολυμορφισμών οι στατίνες δεν έχουν θεραπευτικό αποτέλεσμα ακόμα και στο μέγιστο της δοσολογίας (statin resistance),⁵⁸ τις καθιστά ακατάλληλες για τη θεραπεία σημαντικού αριθμού ασθενών, χαρακτηριστικό που μοιράζονται με όλες τις κατηγορίες φαρμάκων.⁵⁶

1.5.2 Άλλοι υπολιπιδαιμικοί παράγοντες

Η εξετιμίμπη (ezetimib) εμποδίζει την απορρόφηση της χοληστερόλης της διατροφής από το λεπτό έντερο.⁵⁹ Κλινικές δοκιμές έχουν δείξει πως η μονοθεραπεία με εξετιμίμπη μειώνει την LDL χοληστερόλη κατά 15-22% και πως η συγχορήγηση της με στατίνες επάγει 15-20% επιπλέον μείωση επί αυτής των στατινών, χωρίς να έχουν αναφερθεί σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες.⁵⁶ Η χρήση της ενδείκνυται ως θεραπεία δεύτερης γραμμής σε συνδυασμό με στατίνες, όταν ο θεραπευτικός στόχος δεν επιτυγχάνεται ακόμη και με τη μέγιστη ανεκτή δόση στατινών, ή σε ασθενείς που δεν μπορούν ή πρέπει να λαμβάνουν χαμηλές δόσεις στατινών.⁵⁶

Το PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) είναι μία πρωτεΐνη με βασικό ρυθμιστικό ρόλο στην ομοιοστάση της χοληστερόλης, καθώς μειώνει την πυκνότητα του υποδοχέα της LDL που εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των ηπατοκυττάρων. Ο LDLR με κάθε σωματίδιο LDL που εισάγει στο κυτταρόπλασμα απομακρύνει από την κυκλοφορία τρεις με έξι χιλιάδες μόρια λιπιδίων και χοληστερόλης.⁶⁰ Η σύνδεση ενός σωματιδίου LDL στον υποδοχέα, επάγει την εισαγωγή στο κύτταρο του συμπλέγματος LDLR-LDL εντός ενός ενδοσώματος. Το όξινο περιβάλλον εντός του ενδοσώματος αλλάζει τη διαμόρφωση του LDLR με αποτέλεσμα την αποσύνδεση του από την LDL. Στη συνέχεια ο ελεύθερος υποδοχέας ανακυκλώνεται επιστρέφοντας στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όπου είναι διαθέσιμος για να συνδεθεί με κάποιο νέο σωματίδιο LDL. Το PCSK9 συνδέεται πάνω στον LDLR και εμποδίζει την αλλαγή

διαμόρφωσης, με τελικό αποτέλεσμα αντί ο LDLR να απελευθερωθεί από το σύμπλεγμα για να επιστρέψει στο κυτταρόπλασμα, να καταλήγει στο λυσόσωμα όπου αποικοδομείται.⁶¹ Μειώνοντας την ποσότητα του διαθέσιμου LDLR στην επιφάνεια των κυττάρων, το PCSK9 τελικά προκαλεί αύξηση της ποσότητας της LDL χοληστερόλης στην κυκλοφορία.⁶²

Η χρήση αναστολέων του PCSK9 προσφέρει τη δυνατότητα μείωσης του επιπέδου της LDL χοληστερόλης ακόμη χαμηλότερα και από το συνδυασμό στατινών-εξετιμίμπης.⁵⁷ Αυτή τη στιγμή κυκλοφορούν δύο μονοκλωνικά αντισώματα για την αναστολή του PCSK-9 (evolocumab και alirocumab) που έχουν λάβει άδεια κυκλοφορίας από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency) και τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (U.S Food and Drug Administration) για την αντιμετώπιση της υψηλής LDL χοληστερόλης στις περιπτώσεις που οι στατίνες δεν είναι αποτελεσματικές ή ανεκτές από τους ασθενείς.⁵⁷ Κλινικές δοκιμές φάσης III, στις οποίες εξετάστηκε η ασφάλεια και αποτελεσματικότητα των evolocumab και alirocumab, έδειξαν μείωση της LDL χοληστερόλης περίπου κατά 50%, καθώς και μείωση των καρδιαγγειακών συμβαμάτων στους συμμετέχοντες.^{63,64} Το σχετικά υψηλό κόστος της θεραπείας με αναστολείς του PCSK9 (στις ΗΠΑ το κόστος ενός έτους θεραπείας με evolocumab ανέρχεται στα \$14.000)⁶⁵ και η αμφισβήτηση του αν η αποτελεσματικότητα τους μπορεί να δικαιολογήσει το πολύ υψηλό κόστος, απουσία μεγάλης έκτασης τυχαίοποιημένων ελεγχόμενων κλινικών δοκιμών,⁶⁶ περιορίζουν την χρήση τους στην κλινική πρακτική,^{56,57} ενώ ακόμα και όταν συνταγογραφούνται συχνά οι ασφαλιστικές εταιρείες αρνούνται την κάλυψη του κόστους.⁶⁷

1.5.3 Θεραπείες μείωσης των τριγλυκεριδίων

Αν και το υψηλό επίπεδο τριγλυκεριδίων στην κυκλοφορία είναι παράγοντας αυξημένου καρδιαγγειακού κινδύνου, τα οφέλη από τη μείωση του είναι σχετικά μέτρια.⁵⁷ Οι στατίνες αποτελούν την πρώτη επιλογή για τη θεραπεία ασθενών που παρουσιάζουν υπερτριγλυκεριδαιμία. Αυτό γιατί αφενός μειώνουν των καρδιαγγειακό κίνδυνο, και αφετέρου σε μεγάλες δόσεις, ελαττώνουν σημαντικά την ποσότητα των σωματιδίων που μεταφέρουν τριγλυκερίδια στην κυκλοφορία, μειώνοντας τη συγκέντρωσή τους στο πλάσμα έως και κατά 27%.⁵⁶

Οι φιβράτες (**fibrates**) είναι μία κατηγορία συνθετικών προσδετών του PPAR-α, του κύριου μεταγραφικού παράγοντα που ρυθμίζει τον μεταβολισμό των λιπιδίων στο ήπαρ.⁶⁸ Οι φιβράτες είναι αποτελεσματικές στη μείωση τόσο των

τριγλυκεριδίων νηστείας, όσο και μεταγευματικά, ενώ μειώνουν και τα πλούσια σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνικά κατάλοιπα, ελαττώνοντας τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στην κυκλοφορία έως και κατά 50%.⁶⁹ Ωστόσο τα αποτελέσματα τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων κλινικών δοκιμών, όπως και οι μετα-ανάλυσεις μεγάλου αριθμού κλινικών δοκιμών, δεν έδειξαν κάποιο επιπλέον όφελος στη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου από τη χρήση φιβρατών.⁵⁶

1.5.4 Θεραπείες που αυξάνουν την HDL

Οι αλλαγές στον τρόπο ζωής μπορούν να αυξήσουν την HDL χοληστερόλη, όχι όμως σε σημαντικό βαθμό. Εάν ο επιδιωκόμενος σκοπός είναι η σημαντική αύξηση της, τότε είναι απαραίτητο να χορηγηθεί κάποια αγωγή. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί πως δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής πειστικές αποδείξεις πως η τεχνητή αύξηση της HDL μπορεί προσφέρει κάποιο όφελος στην υγεία του καρδιαγγειακού συστήματος.⁵⁷

Η χορήγηση αναστολέων έναντι της CETP είναι η πιο αποτελεσματική φαρμακολογική προσέγγιση για την αντιμετώπιση της χαμηλής HDL μέχρι στιγμής, καθώς μπορεί να προκαλέσει αύξηση ακόμη και πάνω από 100%, ενώ συχνά προκαλεί και παράλληλη μείωση της LDL. Η πρωτεΐνη CETP, εντοπίζεται στο πλάσμα, όπου μεταφέρει εστέρες της χοληστερόλης και τριγλυκερίδια μεταξύ των λιποπρωτεϊνών. Συλλέγει τριγλυκερίδια από τις VLDL και LDL και τα ανταλλάσσει με εστέρες χοληστερόλης από την HDL, και το αντίστροφο.⁷⁰ Όμως παρά την εντυπωσιακή αύξηση της HDL που προκαλούν, οι αναστολείς της CETP δεν κατάφεραν σε καμία κλινική μελέτη να επιτύχουν τους στόχους βελτίωσης της καρδιαγγειακής υγείας που είχαν τεθεί και να επιδείξουν κάποιο κλινικό όφελος.⁵⁷

1.5.5 Πολλά υποσχόμενες μελλοντικές θεραπείες

Μία πρόσφατη προσέγγιση για την αναστολή του PCSK-9 είναι η χορήγηση μορίων siRNA που στοχεύουν το mRNA του. Η κλινική δοκιμή φάσης II ORION, έδειξε πως η άπαξ χορήγηση 300 mg inclisiran (siRNA έναντι του PCSK-9) υποδορίως, προκάλεσε τη μέση μείωση της LDL χοληστερόλης κατά 51%, έως και μετά από έξι μήνες. Επιπλέον ήταν καλά ανεκτό και δεν προκάλεσε σημαντικές παρενέργειες.⁷¹ Το inclisiran έχει λάβει άδεια να προχωρήσει σε κλινικές δοκιμές φάσης III (μελέτη ORION-II).⁷² Βασικό προσόν του έναντι των αντισωμάτων evolocumab και alirocumab, είναι η δυνατότητα χορήγησης σε μόλις δύο δόσεις καθ έτος, αντί της συχνότερης χορήγησης που είναι απαραίτητη για τα παραπάνω αντισώματα.⁶⁹ Στην ίδια

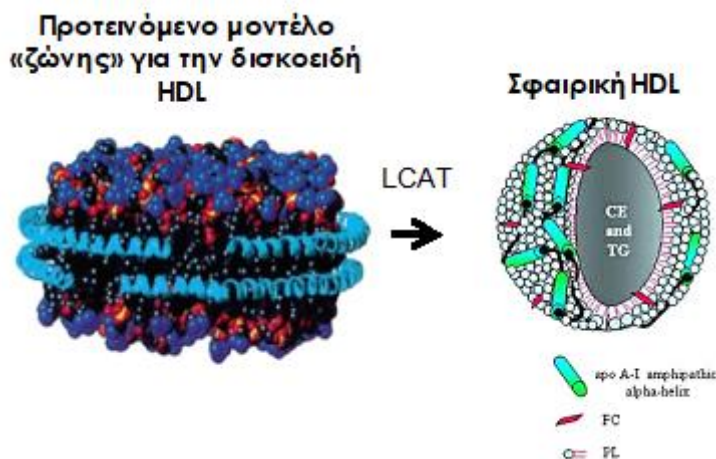
κατεύθυνση κινείται και η προσπάθεια ανάπτυξης ενός εμβολίου έναντι του PCSK-9. Δοκιμές σε ποντικούς και πιθήκους έχουν δείξει πως ένα εμβόλιο έναντι του πεπτιδίου του PCSK-9 μπορεί να μειώσει αποτελεσματικά τα επίπεδα των λιπιδίων στην κυκλοφορία, έχοντας παράλληλα τη δυνατότητα να δρα συνεργιστικά με τις στατίνες.⁷³

Η ANGPTL3 (angiopoietin-like 3) είναι σημαντικός ρυθμιστής του μεταβολισμού των λιπιδίων. Οι ομοζυγώτες για μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας της έχουν χαμηλότερα επίπεδα LDL χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στο πλάσμα και εμφανίζουν χαμηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης σε σύγκριση με τους μη φορείς. Αυτό έχει καταστήσει την αναστολή της πιθανό στόχο νέων θεραπειών για την αντιμετώπιση της δυσλιπιδαιμίας και της καρδιαγγειακής νόσου.⁷⁴ Σε μελέτη φάσης I για το ANGPTL3-LRx, ένα αντινοσηματικό ολιγονουκλεοτίδιο που καταστέλλει τη μεταγραφή της ANGPTL3 δε σημειώθηκαν βραχυπρόθεσμες παρενέργειες. Παράλληλα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στις μέσες τιμές των τριγλυκεριδίων (66%), της LDL (35%) και της ολικής χοληστερόλης (36%) στους εθελοντές.⁷⁵ Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε μελέτη χορήγησης του evinacumab, ενός αντισώματος έναντι της ANGPTL3, σε ασθενείς με οικογενή υπερχοληστερολαιμία.⁷⁶ Αυτά τα δεδομένα δείχνουν πως τόσο το ολιγονουκλεοτίδιο, όσο και το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ANGPTL3 πιθανότατα μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου και πως οι μοριακές θεραπείες που στοχεύουν την ANGPTL3 είναι ασφαλείς και αποτελεσματικές.⁷⁷

1.5.6 Θεραπείες που βασίζονται στην HDL

Η ανάγκη ανάπτυξης νέων θεραπειών για την αντιμετώπιση των περιπτώσεων όπου οι υπάρχουσες θεραπείες που στοχεύουν τα υψηλά επίπεδα LDL δεν επαρκούν και η αποτυχία των θεραπειών που απλά αυξάνουν την ποσότητα της HDL, σε συνδυασμό με την περιπλοκότητα του σωματιδίου της HDL, έχει στρέψει το ερευνητικό ενδιαφέρον στη μελέτη των διαφορετικών υποτύπων της HDL και στη λειτουργικότητα τους. Ιδίως όσον αφορά την αντίστροφη ροή χοληστερόλης και την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους.^{31,78,79} Η απολιποπρωτεΐνη A-I (apoA-I) είναι το κύριο λειτουργικό τμήμα των σωματιδίων της HDL, προσλαμβάνει χοληστερόλη από τα περιφερειακά κύτταρα για να σχηματιστεί η πρόδρομη δισκοειδής μορφή της HDL που θεωρείται ο κύριος λήπτης χοληστερόλης. Το επίπεδο της σχετίζεται αντίστροφα με την πιθανότητα εκδήλωσης καρδιαγγειακών συμβαμάτων⁸⁰ και έρευνες σε ζώα και ανθρώπους έχουν δείξει πως μόρια που μιμούνται την ενδογενή λειτουργική apoA-I, έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν αντίστροφη ροή χοληστερόλης,⁸¹ εμφανίζοντας

αθηροπροστατευτική δράση.^{31,82} Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, η προσέγγιση που έχει αναπτυχθεί για την αύξηση όχι μόνο της ποσότητας της HDL, αλλά και της λειτουργικότητάς της, είναι η απευθείας έγχυση στην κυκλοφορία ανασυσταμένης HDL (**reconstituted HDL, rHDL**) αποτελούμενης από διάφορους τύπους apoA-I και συνδυασμούς λιπιδίων.⁸³



Σχήμα 1.4: Η δομή της πρόδρομης δισκοειδούς (αριστερά) και της ώριμης σφαιρικής (δεξιά) HDL. Το ένζυμο LCAT εστεροποιεί την ελεύθερη χοληστερόλη των δισκοειδών σωματιδίων HDL συμμετέχοντας έτσι στην αναδιαμόρφωση των σωματιδίων της HDL στο πλάσμα.²⁵⁸

Τα άτομα με τη μετάλλαξη apoA-I_{Milano} εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης στην κυκλοφορία, χωρίς αυτό να συνοδεύεται από κάποια αύξηση στον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου.⁸⁵ Επιπλέον κάποιες πρώιμες μελέτες έδειξαν πως η ενδοφλέβια χορήγηση ανασυνδυασμένης apoA-I_{Milano} μειώνει το μέγεθος της αθηρωματικής βλάβης σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι η χορήγηση wild-type apoA-I.⁸⁶ Στην proof-of-concept μελέτη MILANO-PILOT, εξετάστηκε η επίδραση του MDCO-216, ενός σωματιδίου αποτελούμενου από απολιποπρωτεΐνη apo A-I_{Milano} και φωσφολιπίδια (POPC) που μιμείται τη δομή της πρόδρομης δισκοειδούς HDL, στη στεφανιαία αθηροσκλήρωση ασθενών με πρόσφατο οξύ στεφανιαίο σύνδρομο. Στη μελέτη αυτή, το MDCO-216 δε φάνηκε να έχει κάποια σημαντική επίδραση στη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου, για αυτό και η περαιτέρω ανάπτυξη του διακόπηκε.⁸⁷ Σχετικά πρόσφατα αναφέρθηκε πως η ανασυνδυασμένη apoA-I_{Milano}, εμφανίζει πιο έντονη επίδραση στη σταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας και τη μείωση της φλεγμονής, απ' ότι στην αντιμετώπιση της αθηροσκλήρωσης καθ' αυτής.⁸⁸

Το σωματίδιο rHDL CER-001 που επίσης μιμείται την ενδογενή πρόδρομη δισκοειδή HDL, αποτελείται από ανασυνδυασμένη ανθρώπινη apoA-I και

λιπίδια (σφιγγομυελίνη και διπαλμιτοϋλο-φωσφατίδυλογλυκερόλη). Σε κλινικές μελέτες φάσης I, το CER-001 δεν προκάλεσε παρενέργειες, ήταν καλά ανεκτό σε όλες τις δοσολογίες και δεν οδήγησε στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων έναντι της apoA-I. Ακόμα, αύξησε την ποσότητα της HDL στην κυκλοφορία, την ολική και μη εστεροποιημένη χοληστερόλη που εντοπίζεται στα σωματίδια HDL και την αντίστροφη ροή χοληστερόλης. Η αύξηση στην αντίστροφη ροή χοληστερόλης παρατηρήθηκε ακόμα και με πολύ χαμηλές δοσολογίες, στις οποίες όμως η HDL επέστρεψε στα φυσιολογικά επίπεδα μετά από λιγότερο από 24 ώρες.⁸⁹ Αυτή τη στιγμή αναμένονται τα αποτελέσματα της μελέτης φάσης II CARAT που ερευνά την επίδραση της εβδομαδιαίας ενδοφλέβιας χορήγησης CER-001 στο μέγεθος των στεφανιαίων αθηρωματικών αλλοιώσεων, ασθενών με πρόσφατο οξύ στεφανιαίο σύνδρομο.⁹⁰

Το σωματίδιο rHDL CSL112 αποτελείται από ανθρώπινη, απομονωμένη από πλάσμα apoA-I, ανασυσταμένη σε δισκοειδή HDL με φωσφατίδυλοχολίνη. Οι αρχικές μελέτες έχουν δείξει σημαντική δοσοεξαρτώμενη αύξηση της HDL πλάσματος και της αντίστροφης ροής χοληστερόλης μετά από χορήγηση του.^{81,91} Τα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών φάσης II για την ασφάλεια και ανοχή του, έδειξαν πως είναι ασφαλές και δεν επηρεάζει τη λειτουργία των νεφρών ή του ήπατος, όπως άλλα μόρια που έχουν δοκιμαστεί. Πιθανά οφέλη του CSL 112 στην μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου, θα εξεταστούν σε ήδη σχεδιαζόμενη κλινική δοκιμή φάσης III.^{57,91}

Τα παραπάνω δεδομένα σε συνδυασμό με άλλες μελέτες και κλινικές δοκιμές δείχνουν πως τα μόρια που μιμούνται την HDL έχουν τη δυνατότητα να βελτιώνουν την ποσότητα και κυρίως τη λειτουργικότητα της ενδογενούς HDL και να αποτελέσουν τη βάση νέων θεραπειών για την αντιμετώπιση της αθηροσκλήρωσης. Ειδικά για εκείνους τους ασθενείς με αθηροσκλήρωση (πάνω από το 50% του συνόλου), που δεν μπορούν να λάβουν ή δεν ανταποκρίνονται στις στατίνες.⁷⁹

1.6 In vitro μοντέλα μελέτης του ενδοθηλίου

Η διατήρηση της φυσικής συνέχειας και λειτουργίας του ενδοθηλίου είναι ζωτικής σημασίας για την πρόληψη της αθηροσκλήρωσης, καθώς οι διαταραχές της ακεραιότητας και της λειτουργίας του διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη, εξέλιξη και εμφάνιση των επιπλοκών της νόσου.^{9,12,92} Είναι χαρακτηριστικό πως η απώλεια των ενδοθηλιακών κυττάρων στο σημείο της αλλοίωσης οδηγεί στην αποδυνάμωση της αθηρωματικής πλάκας και είναι μία από τις κύριες αιτίες εμφάνισης επιπλοκών (ρήξη της πλάκας, θρόμβωση).^{93,94} Υπό την επίδραση των παραγόντων αυξημένου

καρδιαγγειακού κινδύνου (υψηλή LDL, υπέρταση, φλεγμονή), το ενδοθήλιο τραυματίζεται συνεχώς. Ο συνεχής τραυματισμός και η ακόλουθη ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι από τους κύριους παράγοντες που συμβάλουν στην εμφάνιση αγγειακής νόσου.^{41,95,96} Οι δύο κύριες διαδικασίες που συμβάλουν στην αποκατάσταση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου μετά από τον τραυματισμό του, είναι ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων στο σημείο της βλάβης, διαδικασίες που διαμεσολαβούνται είτε από ενδοθηλιακά κύτταρα που ήδη βρίσκονται στο σημείο του τραυματισμού, είτε από τα κυκλοφορούντα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών ή τους περιφερειακούς ιστούς.⁹⁷⁻¹⁰⁰ Επιπροσθέτως, οι αλλαγές στη φυσιολογική λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης,¹² καθώς ρυθμίζουν μία ευρεία σειρά λειτουργιών στο αρτηριακό τοίχωμα. Αυτές περιλαμβάνουν τη θρόμβωση, τη ρύθμιση του αγγειακού τόνου, τη διακίνηση των λευκοκυττάρων και μονοκυττάρων μέσα στο αρτηριακό τοίχωμα, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των αγγειακών λείων, και την αγγειογένεση.^{10,92,101,102} Οι δύο προσεγγίσεις που εφαρμόζονται για τη μελέτη των ανωτέρω λειτουργιών *in vitro* είναι η καλλιέργεια είτε πρωτογενών ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων, είτε ενδοθηλιακών κυτταρικών σειρών.

1.6.1 Πρωτογενή ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής

Τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής (HAECs, **Human Aortic Endothelial Cells**), που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα της παρούσας μελέτης, αποτελούν ένα καλό *in vitro* σύστημα μελέτης των λειτουργιών των ενδοθηλιακών κυττάρων στα πλαίσια της αθηροσκλήρωσης.¹⁰³ Μπορούν να πολλαπλασιάζονται *in vitro* για αρκετές γενιές διατηρώντας τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που αποτελούν δείκτες των ενδοθηλιακών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής αντι-θρομβωτικών και προ-θρομβωτικών παραγόντων όπως τα t-PA και PAI-1 αντίστοιχα, και της ανταπόκρισης στον TNF-α, το σημαντικότερο παράγοντα που σχετίζεται με φλεγμονή. Οι μηχανισμοί απόκρισης στον TNF-α περιλαμβάνουν αφενός την παραγωγή κυτοκινών όπως το GM-CSF και μορίων προσκόλλησης όπως το ICAM-1 στην επιφάνειά τους, δύο μορίων που ρυθμίζουν την προσέλκυση των λευκοκυττάρων, και αφετέρου την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων του αγγειοδιασταλτικού παράγοντα NO (nitric oxide, μονοξείδιο του αζώτου) και του αγγειοσυσταλτικού παράγοντα ενδοθηλίνη.¹⁰³ Τα HAECs εκφράζουν επίσης επιφανειακούς υποδοχείς τόσο για τη φυσιολογική όσο και για την οξειδωμένη LDL,¹⁰³ καθώς και τον SR-BI, αποτελώντας έτσι ένα καλό *in vitro* σύστημα για τη μελέτη του ρόλου των λιποπρωτεϊνών στην αθηροσκλήρωση.^{103,104}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

MicroRNAs και αθηροσκλήρωση

2.1 Εισαγωγή

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί έχουν αναδειχθεί ως ένα από τους σημαντικότερους μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.¹⁰⁵ Αν και οι επιγενετικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στις καρδιαγγειακές νόσους δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί,¹⁰⁶ οι έρευνες των τελευταίων ετών έχουν καταδείξει το σημαντικότερο ρόλο τους στην παθοφυσιολογία και τις πιθανές θεραπείες της αθηροσκλήρωσης. Είναι χαρακτηριστικό πως η αθηροσκλήρωση έχει χαρακτηριστεί από κάποιες ομάδες ως “επιγενετική νόσος”.¹⁰⁷ Ρυθμίζοντας την έκφραση βασικών γονιδίων, οι επιγενετικοί μηχανισμοί μεσολαβούν στην αλληλεπίδραση μεταξύ του κληρονομούμενου γονιδιώματος και του περιβάλλοντος. Φαίνεται επίσης ότι επηρεάζουν τον κίνδυνο εμφάνισης, τη συμπτωματολογία και την εξέλιξη που θα έχει η αθηροσκλήρωση σε κάθε ασθενή, ακόμα και το ποια θα είναι η απόκριση στις υπάρχουσες θεραπείες.^{108–110}

Όλοι οι μηχανισμοί επιγενετικών τροποποιήσεων (μεθυλίωση του DNA, τροποποιήσεις επί των ιστονών, non-coding RNAs) συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης. Όμως τα δεδομένα των ερευνών έχουν ξεχωρίσει τα miRNAs αποδίδοντάς τους κεντρική θέση στην έρευνα των επιγενετικών μηχανισμών που εμπλέκονται στα καρδιαγγειακά νοσήματα. Ενδεικτικό του επιστημονικού ενδιαφέροντος που έχουν προσελκύσει και των προοπτικών που εμφανίζουν, είναι πως οι δημοσιεύσεις που αναφέρονται σε miRNAs στις καρδιαγγειακές νόσους έχουν αυξηθεί κατά 400% την τελευταία πενταετία.¹¹¹ Τα miRNAs είναι μικρά εξελικτικά συντηρημένα μόρια μη κωδικοποιού RNA μήκους 18 έως 25 νουκλεοτιδίων. Συμμετέχουν στη μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, επεμβαίνοντας στη μετάφραση των μορίων mRNA σε πρωτεΐνες.¹¹² Εκφράζονται με ιστοειδικό τρόπο και έχουν βασικό ρόλο στη διαφοροποίηση κυττάρων και ιστών.¹¹³ Καθώς ρυθμίζουν την μετάφραση των πρωτεϊνών συμμετέχουν στη ρύθμιση σχεδόν κάθε κυτταρικής λειτουργίας και οι διαταραχές στην έκφρασή τους έχει δειχθεί ότι εμπλέκονται στην εμφάνιση ή/και εξέλιξη πλειάδας παθήσεων, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών νοσημάτων (αθηροσκλήρωση, καρδιακή ανεπάρκεια, αρρυθμίες κα).^{114–116} Ενώ έχει δειχθεί πως η ρύθμιση

της λειτουργίας τους με τα κατάλληλα μόρια μπορεί να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό μέσο.^{117,118}

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω miRNAs είναι στοχευμένη και βασίζεται στη συμπληρωματικότητα μεταξύ της ακολουθίας του miRNA και του mRNA του γονιδίου στόχου του.¹¹⁴ Αν η συμπληρωματικότητα είναι πλήρης σχηματίζεται διπλή έλικα miRNA-mRNA, η οποία καταστρέφεται από ειδικά κυτταρικά ένζυμα. Συχνότερα όμως εμφανίζεται μερική μόνο συμπληρωματικότητα. Σε αυτήν την περίπτωση το mRNA δεν καταστρέφεται αλλά ο ρυθμός μεταγραφής του μειώνεται.¹²⁸ Καθώς, η εμφάνιση μερικής συμπληρωματικότητας αρκεί για να ασκήσουν τη δράση τους, ένα μόνο miRNA μπορεί να καταστέλλει περισσότερα του ενός γονίδια, ενώ διαφορετικά miRNAs μπορεί να καταστέλλουν το ίδιο γονίδιο, αλλά σε διαφορετικό βαθμό. Ακόμα το mRNA ενός γονιδίου μπορεί να έχει θέσεις πρόσδεσης και κατά συνέπεια να ρυθμίζεται από περισσότερα miRNAs.¹²⁹ Αυτή η μεγάλη πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν τα miRNAs αποτελεί σημαντικό εμπόδιο τόσο στην κατανόηση της λειτουργίας τους, όσο και στην πρόβλεψη και θεραπευτική τροποποίηση της δράσης τους.¹³⁰

2.2 Επίδραση των miRNAs στην αθηροσκλήρωση

Έρευνες έχουν δείξει πως τα miRNAs έχουν βασικό ρυθμιστικό ρόλο σε όλα τα στάδια της αθηροσκλήρωσης, από το μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και τη φλεγμονή, μέχρι το σχηματισμό των πλακών και το αν και πότε αυτές θα διαρραγούν.^{115,119-123} Η έκφραση τους μεταβάλλεται αποκρινόμενη σε διαφορετικά ερεθίσματα σε όλους τους τύπους κυττάρων που συμμετέχουν στη νόσο.¹²⁰ Ενώ τα αποτελέσματα ολοένα και περισσότερων μελετών δείχνουν ότι είναι κρίσιμοι ρυθμιστές των λειτουργιών των ενδοθηλιακών κυττάρων στα πλαίσια της αθηροσκλήρωσης.^{108,124-127} Ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των αγγειακών λείων μυοκυττάρων, τη φλεγμονή του ενδοθηλίου, όπως και τη φυσιολογική λειτουργία και δυσλειτουργία του. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ειδικότερα και εκτός των άλλων ρόλων τους, ελέγχουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης, τη γήρανση (**senescence**), τη σύνθεση μονοξειδίου του αζώτου και τη μετάπτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (**endothelial-to-mesenchymal transition/EndMT**), μετατροπή που πυροδοτεί το σχηματισμό, την εξέλιξη και την αποσταθεροποίηση της αθηρωματικής πλάκας.¹³¹

Η ικανότητα των miRNAs να ελέγχουν την έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων, υπολογισμοί ανεβάζουν τον αριθμό έως και το 60% του συνόλου,¹³² με ειδικό τρόπο, η ευρεία παρουσία τους σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων

του καρδιαγγειακού συστήματος και η δυνατότητά τους να ρυθμίζουν πολλές και σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες,¹³³ τα έχουν καταστήσει αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος, τόσο για την κατανόηση του ρόλου τους στην παθολογία των καρδιαγγειακών νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης, όσο και για τη δυνατότητα χρήσης τους στα πλαίσια πιθανών θεραπειών.¹²⁸

2.2.1 Παραδείγματα

Το miR-122 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο ήπαρ και εμπλέκεται στο μεταβολισμό της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων και η αναστολή του έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ολικής χοληστερόλης στο πλάσμα.¹³⁴ Το miR-33a στοχεύει το μεταφορέα χοληστερόλης ABCA1, όπως και τους μεταφορείς NPC1 και ABCG1, ενώ το mRNA του ABCA1 φέρει πολλαπλές θέσεις σύνδεσης του miR-33a γι αυτό και η μετάφραση του υπόκειται σε ισχυρή καταστολή από αυτό.¹¹⁹ Η χορήγηση αναστολέα έναντι του miR-33 σε ζωικό μοντέλο αθηροσκλήρωσης προκάλεσε την αύξηση της HDL χοληστερόλης στην κυκλοφορία, αύξησε την αντίστροφη ροή χοληστερόλης, ελάττωσε την έκταση των αθηρωματικών αλλοιώσεων και μείωσε το λιπιδαιμικό φορτίο στο πλάσμα. Επιπροσθέτως ο αναστολέας προσλήφθηκε και από τα μακροφάγα της αθηρωματικής πλάκας όπου προκάλεσε πτώση της έκφρασης προ-φλεγμονωδών γονιδίων και την επωφελή μετάπτωση των μακροφάγων από τον M1 στον αντι-φλεγμονώδη φαινότυπο M2.¹³⁵ Το miRNA Let-7g εμφανίζει σημαντική αντιφλεγμονώδη και αντιγηραντική δράση και έχει δειχθεί πως η μείωση της έκφρασης του οδηγεί σε ενεργοποίηση του ενδοθηλίου και τραυματισμό του αγγείου.¹³⁶ Το miR-10a στοχεύει προ-φλεγμονώδεις πρωτεΐνες και μόρια προσκόλλησης όπως η MCP-1, η IL-6, η IL-8, το VCAM-1 και η σελεκτίνη-E και έχει δειχθεί πως η μείωση της έκφρασης του οδηγεί στην αύξηση της σύνθεσης αυτών των μορίων.¹³⁷ Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί και άλλα miRNAs που εμπλέκονται στη ρύθμιση της φλεγμονής του ενδοθηλίου, όπως τα miR-17, miR-31, miR-126 και miR-181.¹¹⁴ Ακόμα η μέτα-ανάλυση μεγάλου αριθμού μελετών, έδειξε πως τα miR-100, miR-127, miR-133a, miR-133b, miR-145, και miR-494 υπερεκφράζονται στις ασταθείς αθηρωματικές πλάκες, ενώ οι σταθερές αθηρωματικές πλάκες χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκφραση των miR-21, miR-143, και miR-221, επιτρέποντας τη χρήση τους ως βιοδεικτών για τη διάγνωση και κατηγοριοποίηση των ασθενών σε χαμηλού και υψηλού κινδύνου, καθώς και να αποτελέσουν στόχους νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων για τη σταθεροποίηση των αθηρωματικών πλακών.¹³⁸

2.3 Βασικές αρχές και προβλήματα της μελέτης των miRNAs

Πολλές ιδιότητες που απαντώνται ταυτόχρονα στα miRNAs θέτουν προκλήσεις στην ακριβή ανίχνευση και ποσοτικοποίηση τους.¹³⁹ Για παράδειγμα, το μήκος των ώριμων miRNAs είναι ανεπαρκές για την υβριδοποίηση των συνήθων εκκινητών και αντίθετα από τα mRNA δεν περιλαμβάνουν κάποια κοινή αλληλουχία όπως η poly(A) ουρά, που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εμπλουτισμό τους σε κάποιο δείγμα, ή ως μια γενική θέση δέσμησης εκκινητών. Αυτό γίνεται ακόμα πιο σημαντικό επειδή τα miRNAs αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό κλάσμα (~0,01%) του ολικού RNA του κυττάρου και γι αυτό πρέπει να είναι δυνατή η επιλεκτική ανίχνευση τους μέσα στο σύνολο των κυτταρικών RNA,¹¹² το οποίο περιλαμβάνει και τα πρόδρομα pri- και pre-miRNA που και αυτά περιέχουν την αλληλουχία του ώριμου miRNA. Τα miRNAs μίας οικογένειας μπορεί να διαφέρουν μεταξύ τους μόνο ως προς ένα νουκλεοτίδιο, καθιστώντας την ικανότητα διάκρισης μεταξύ μορφών με διαφορές ενός ή δύο νουκλεοτιδίων ιδιαίτερα σημαντική, ενώ πολλά miRNAs έχουν παραλλαγές (isomiRs) που προκύπτουν από τη μετα-μεταγραφική προσθήκη νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο του ώριμου miRNA και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι σημαντικό να γίνει διάκριση μεταξύ των ισομορφών.^{140,141} Τεσσερις είναι οι κύριες προσεγγίσεις που έχουν καθιερωθεί για τη μελέτη των miRNAs: οι μέθοδοι που βασίζονται στον υβριδισμό (μικροσυστοιχίες και liquid bead arrays), η ποσοτική PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR) και η αλληλούχιση RNA υψηλής απόδοσης (RNAseq).^{142,259}

2.3.1 Μικροσυστοιχίες

Οι μικροσυστοιχίες ήταν μεταξύ των πρώτων μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για παράλληλη ανάλυση μεγάλου αριθμού miRNAs. Για την εκτέλεση ενός προσδιορισμού μετά την εξαγωγή και τον καθαρισμό του ολικού RNA, τα miRNAs επισημαίνονται με την προσθήκη νουκλεοτιδίων επισημασμένων με κάποιο φθορισμοφόρο στο 3' άκρο τους. Η ανίχνευση των διαφορετικών miRNAs γίνεται μέσω του υβριδισμού τους σε συγκεκριμένους ανιχνευτές σύλληψης (capture probes, συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια DNA συμπληρωματικά ως προς το κάθε miRNA), τα οποία έχουν τοποθετηθεί κατά ομάδες σε κουκίδες στην επιφάνεια πλακιδίων ή σε σφαιρίδια. Η ένταση του φθορισμού για κάθε κουκίδα της συστοιχίας εξαρτάται από την ποσότητα του ιχνηθετημένου μορίου-στόχου που υβριδοποιείται ειδικά σε αυτήν, και σχετίζεται με την αλληλουχία ή την ποσότητα του υπό εξέταση DNA, cDNA ή cRNA, αντίστοιχα. Μετά από κατάλληλη επεξεργασία, η κάθε μικροσυστοιχία σαρώνεται από λέιζερ, και ξεκινάει μια μακροσκελής διαδικασία βιοπληροφορικών επεξεργασιών και αναλύσεων.^{143,144}

Οι διαθέσιμες στο εμπόριο μικροσυστοιχίες διαφέρουν ως προς την έκδοση του miRBase που υποστηρίζουν, τα είδη που καλύπτουν και την ενσωμάτωση ή μη ανιχνευτών σύλληψης με LNA (Locked Nucleic Acids). Το miRBase είναι η on-line βάση δεδομένων στην οποία δημοσιεύονται όλα τα γνωστά miRNAs, οι εκδόσεις του miRBase διαφέρουν κυρίως ως προς τον αριθμό των miRNAs που περιέχουν, καθώς οι νεώτερες εκδόσεις περιέχουν επιπλέον όσα ανακαλύφθηκαν μετά την έκδοση της προηγούμενης και σε ζητήματα που αφορούν τα ονόματα ή τις αλληλουχίες ορισμένων εγγραφών. Οι διαφορές στα είδη αναφέρονται στους οργανισμούς των οποίων τα miRNA καλύπτονται από τη μικροσυστοιχία, πχ μόνο τα γνωστά miRNAs του ανθρώπου (*homo sapiens*) ή κάποιου μικρού αριθμού ειδών ή όλα τα γνωστά ανεξαρτήτως είδους. Η τρίτη διαφορά αναφέρεται στην ενσωμάτωση ή μη ανιχνευτών σύλληψης με LNA, τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την αντιστάθμιση του μεγάλου εύρους Tm που εμφανίζουν τα διαφορετικά miRNAs, καθώς λόγω του περιορισμένου μήκους τους μικρές διάφορες στο περιεχόμενο σε γουανίνες και κυτοσίνες μπορεί να αντιστοιχούν σε μεγάλο εύρος Tm κατά τον υβριδισμό.^{142,145}

2.3.2 Εξόρυξη βιολογικών δεδομένων από τα αποτελέσματα μικροσυστοιχιών

Η εξόρυξη βιολογικών πληροφοριών από τις λίστες που προκύπτουν από μικροσυστοιχίες και συχνά περιλαμβάνουν εκατοντάδες miRNAs, των οποίων η έκφραση αλλάζει στατιστικά σημαντικά, είναι μία πολύπλοκη και επίπονη διαδικασία. Προκειμένου να διατυπωθούν και να ελεγχθούν οι υποθέσεις θα πρέπει να εφαρμοσθούν μέθοδοι, που παρέχονται από κατάλληλο λογισμικό, που να συνδέουν τα miRNAs και τα σχετικά επίπεδα έκφρασής τους, με βιολογικές λειτουργίες, εδραιωμένα μοριακά μονοπάτια, παθολογίες, τη βιβλιογραφία και αποτελέσματα από προηγούμενα πειράματα.

2.3.3 Μεθοδολογίες εξόρυξης βιολογικών δεδομένων (data mining)

Η ανάλυση των στατιστικά σημαντικά αλλαγμένων miRNAs που προκύπτουν από μικροσυστοιχίες μπορεί να γίνει με τη χρήση προγραμμάτων εξόρυξης βιολογικών δεδομένων καθώς και με τη χρήση βάσεων βιβλιογραφικών δεδομένων. Επιπλέον υπάρχει ένα εύρος διαθέσιμων προγραμμάτων εξόρυξης βιολογικών δεδομένων και ανάλυσης γονιδίων όπως το Ingenuity Pathway Analysis (IPA) [<http://www.ingenuity.com>].¹⁴⁶ Τα προγράμματα αυτά παρέχουν σε επεξεργασμένη μορφή ένα μεγάλο εύρος ερευνητικών ευρημάτων δημοσιευμένων σε έγκυρα επιστημονικά περιοδικά.¹⁴⁷ Τα ευρήματα αυτά αφορούν τις βιολογικές ή μοριακές λειτουργίες

γονιδίων/πρωτεϊνών που ρυθμίζονται από τα υπό εξέταση miRNAs, άμεσες/έμμεσες αλληλεπιδράσεις γονιδίων και miRNAs και εδραιωμένα μοριακά μονοπάτια που αλλάζουν στο υπό μελέτη σύστημα. Επιπλέον ο ερευνητής μπορεί να αποκομίσει πληροφορίες και διαγράμματα όχι μόνο για τη θέση των υπό μελέτη miRNAs μέσα σε εδραιωμένα γνωστά μονοπάτια αλλά και για τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μοριακών δικτύων που τα περιέχουν, σε κάθε ανάλυση.^{147,148} Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη βάση δεδομένων για αναζήτηση διεθνούς επιστημονικής βιβλιογραφίας είναι η PubMed της NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>]. Η στοχευμένη εξόρυξη βιβλιογραφικών δεδομένων σχετικών με τα υπό μελέτη miRNAs και η εντατική μελέτη τους σε συνδυασμό με τις πληροφορίες και τα διαγράμματα για τη θέση των ίδιων και των γονιδίων που ρυθμίζουν σε εδραιωμένα μοριακά μονοπάτια που παρέχονται από τις βάσεις δεδομένων, βοηθούν τον ερευνητή να περάσει από την υπό μελέτη λίστα των μεμονωμένων miRNAs σε επίπεδο μοριακών μονοπατιών και κυτταρικών διεργασιών που ρυθμίζονται από τα υπό μελέτη μόρια. Η ανακάλυψη των μοριακών μονοπατιών που αλλάζουν στο υπό μελέτη σύστημα θέτει τις βάσεις για τη βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας μίας νόσου, την ανάδειξη βιοδεικτών διάγνωσης και πρόγνωσης, καθώς και την ανακάλυψη νέων πιο στοχευμένων θεραπευτικών στόχων και θεραπειών ή τη μοριακή αξιολόγηση των ήδη διαθέσιμων φαρμάκων.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

2.3.4 Πρόβλεψη στόχων

Για να γίνει κατανοητός ο βιολογικός ρόλος κάποιου miRNA, είναι απαραίτητο να ταυτοποιηθούν όλα τα mRNA και κατ'επέκταση τα γονίδια, τα οποία στοχεύει. Το πρώτο βήμα για να πραγματοποιηθεί αυτό είναι να προβλεφθούν οι πιθανοί στόχοι του miRNA, για το σκοπό αυτό έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός υπολογιστικών προγραμμάτων. Το πρώτο βήμα των περισσότερων προγραμμάτων είναι ο εντοπισμός πιθανών θέσεων πρόσδεσης του υπό εξέταση miRNA, κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA (3'UTR). Πρέπει όμως να σημειωθεί πως θέσεις πρόσδεσης μπορεί να υπάρχουν και σε άλλα τμήματα του mRNA (προμότορας, 5' UTR, κωδικεύουσα περιοχή).¹⁴⁹ Αυτές οι θέσεις πρόσδεσης αναγνωρίζονται με βάση τη συμπληρωματικότητα τους με την seed region του miRNA. Η seed region είναι ακολουθία 7 συνεχόμενων νουκλεοτιδίων, που ξεκινά από το πρώτο ή το δεύτερο νουκλεοτίδιο στο 5' άκρο του miRNA και είναι απαραίτητη για την επιτυχή στόχευση του miRNA στο mRNA στόχο.¹⁵⁰ Στη συνέχεια και ανάλογα με το πρόγραμμα, γίνεται αξιολόγηση των προβλεφθέντων θέσεων πρόσδεσης με βάση κάποιο δεύτερο κριτήριο για να μειωθεί ο αριθμός των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.¹⁵¹

2.4 Ερευνητική δραστηριότητα του εργαστηρίου, στόχος της παρούσας μελέτης

Αν και τα έως τώρα δεδομένα δείχνουν πως η rHDL θα μπορούσε να έχει σημαντική κλινική εφαρμογή, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ασκούνται οι αθηροπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις λειτουργίες της, δεν είναι ακόμα διασαφηνισμένοι. Το εργαστήριο μας και συνεργαζόμενοι ερευνητές έχουν ήδη διεξάγει μελέτες για την ταυτοποίηση γονιδίων που θα μπορούσαν να μεσολαβούν αθηροπροστατευτικές λειτουργίες της rHDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και μηχανισμών και σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των ενδοθηλιακών κυττάρων από αυτήν. Τα δεδομένα αυτών των πειραμάτων δείχνουν πως η χορήγηση σωματιδίων rHDL-apoA-I ή rHDL-apoE3 σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων προκαλεί σημαντικές αλλαγές στο μεταγράφημα τους. Η βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων που προέκυψαν από μικροσυστοιχίες γονιδιακής έκφρασης και τα πειράματα που έχουν γίνει, έχουν καταδείξει σημαντικές πρωτεΐνες (ANGPTL4) και σηματοδοτικά μονοπάτια (PI3K/AKT/FOXO1) που επηρεάζονται από την rHDL-apoA-I και θα μπορούσαν να μεσολαβούν αθηροπροστατευτικές δράσεις.¹⁵² Σε αυτά τα πλαίσια, εξετάσαμε την επίδραση των δύο διαφορετικών τύπων rHDL (apoA-I, apoE3) στην έκφραση miRNA των ενδοθηλιακών κυττάρων, με στόχο τον εντοπισμό miRNAs που θα μπορούσαν να ρυθμίζουν τις πιθανές αθηροπροστατευτικές δράσεις της και έτσι να αποτελέσουν τη βάση για το σχεδιασμό νέων θεραπευτικών εργαλείων για την αντιμετώπιση της αθηρωματικής καρδιαγγειακής νόσου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Υλικά και μέθοδοι

3.1 Πειραματικό μέρος

Το ερευνητικό αυτό σκέλος (**υποκεφάλαιο 3.1**) είχε προηγηθεί της έναρξης της παρούσας διπλωματικής εργασίας, και είχε πραγματοποιηθεί από την ομάδα της κ. Σανούδου (Εργαστήριο Φαρμακολογίας, ΕΚΠΑ) σε συνεργασία με τον Καθηγητή κ. Ζαννή (Ιατρική Σχολή του Παν/μίου της Βοστώνης). Τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν αποτέλεσαν τη βάση για όλες τις βιοπληροφορικές αναλύσεις που διεξήχθησαν στα πλαίσια της διπλωματικής. Η πειραματική διαδικασία θα περιγραφεί για την rHDL-apoA-I, αλλά όσα αναφερθούν έγιναν παράλληλα και για την rHDL-apoE3.

3.1.1 Κατασκευή ανασυνδυσμένου αδενοϊού που εκφράζει apoA-I

Το cDNA ανθρώπινης apoA-I άγριου τύπου εισήχθη στον pAdTrack φορέα. Ακολούθησε ανασυνδυασμός με το πλασμίδιο pAdEasy-1 που είναι φορέας του ανασυνδυσμένου αδενοϊού σε BJ5183 Escherichia Coli κύτταρα. Έγινε επιλογή των ανασυνδυσμένων βακτηριακών κλώνων που ήταν ανθεκτικοί σε καναμυκίνη. Το ανασυνδυσμένο πλασμίδιο κόπηκε με PacI και εισήχθη σε κύτταρα. Στα κύτταρα αυτά ο ανασυνδυσμένος αδενοϊός πακετάρεται σε ιοσωμάτια και τα κύτταρα λύνονται. Με τον τρόπο αυτό σχηματίστηκε ο ανασυνδυσμένος αδενοϊός που φέρει και εκφράζει την ανθρώπινη apoA-I. Ακολούθησε επιμόλυνση καλλιέργειας HEK293 κυττάρων με τον αδενοϊό αυτό. Στα HEK293 κύτταρα που εκφράζουν τον ανασυνδυσμένο αδενοϊό, αυτός παράγεται σε μεγαλύτερη ποσότητα. Τέλος, ακολουθεί απομόνωση και καθαρισμός του ανασυνδυσμένου αδενοϊού με φυγοκέντρηση σε CsCl₂.¹⁵³

3.1.2 Παραγωγή και καθαρισμός των απολιποπρωτεϊνών

Ακολούθησε μόλυνση ανθρώπινων HTB-13 κυττάρων με τους αδενοϊούς που εκφράζουν την ανθρώπινη apoA-I με αποτέλεσμα αυτά να την παράγουν σε μεγάλη ποσότητα και να την εκκρίνουν στο θρεπτικό μέσο (στα HTB-13 ο ιός δεν πακετάρεται όποτε αυτά δε λύνονται, απλά παράγεται η πρωτεΐνη). Από εκεί συλλέγεται η ελεύθερη από λιπίδια apoA-I και ακολουθεί καθαρισμός της.¹⁵⁴

3.1.3 Παρασκευή δισκοειδών rHDL σωματιδίων που περιέχουν apoA-I

Τα ανασυσταμένα δισκοειδή σωματίδια HDL (rHDL-apoA-I) παρασκευάστηκαν *in vitro* και περιέχουν καθαρή ανθρώπινη απόE3 άγριου τύπου (WT) και φωσφολιπίδια (POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-l-phosphatidylcholine) σε αναλογία 1:100, όπως έχει ήδη περιγραφεί.¹⁵⁴

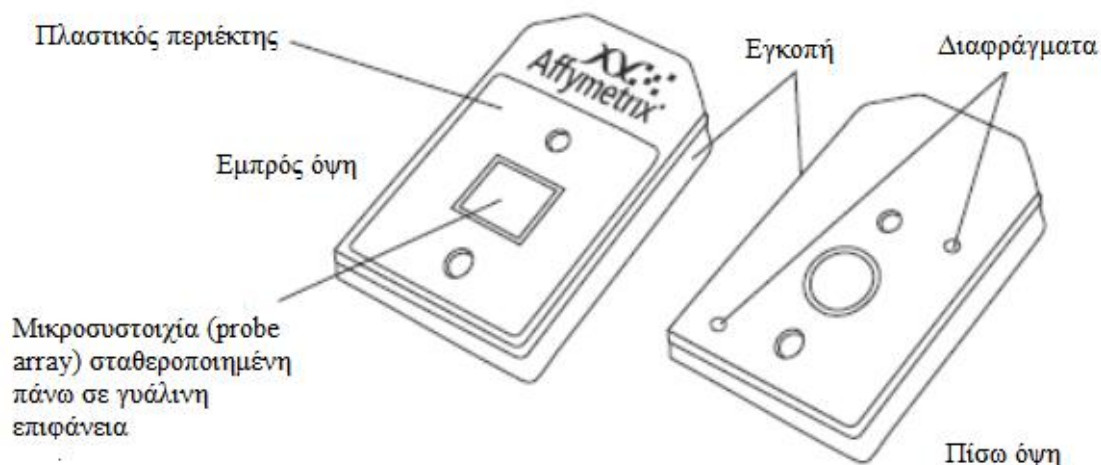
3.1.4 Καλλιέργεια πρωτογενών ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων και χορήγηση των rHDL-apoA-I σωματιδίων

Φυσιολογικά πρωτογενή ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής (HAECs) (Lonza, Walkersville Inc MD) τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο Petri διαμέτρου 100mm με παρουσία EBM-2 (endothelial cell basal medium-2) σαν θρεπτικό μέσο καλλιέργειας παρουσία ορμονών (EGM-2 single quotes) και αυξητικών παραγόντων [Lonza, Walkersville Endothelial Growth Medium, EGM-2 Bulletkit]. Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας EBM-2 περιείχε 2% εμβρυϊκό ορό βοδιού (fetal bovine serum, FBS), 0,4% hFGF-B (human Fibroblast Growth Factor-B), 0,04% υδροκορτιζόνη και 0,1% ινσουλίνη (Lonza, Walkersville Endothelial Growth Medium, EGM-2). Μετά από ένα επιπλέον πέρασμα, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 35 mm και ακολούθησε επώαση για 48h. Στη συνέχεια το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας αντικαταστάθηκε επιτυχώς με EBM-2 που περιέχει 0.5% εμβρυϊκό ορό βοδιού και 5% ορό ανεπαρκή σε λιποπρωτεΐνες (LDS) και ακολούθησε επώαση 4h. Κατόπιν, το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας αντικαταστάθηκε με EBM-2 που περιέχει 5% LDS και τα κύτταρα επώαστηκαν για 12 ώρες παρουσία ή απουσία 250 µg rHDL-apoA-I σωματιδίων ανά mL ή φυσιολογικού ρυθμιστικού αλατούχου διαλύματος φωσφορικών (PBS). Συνολικά προστέθηκαν 500 mg rHDL-apoA-I.

3.1.5 Ανάλυση ολικής γονιδιακής έκφρασης με μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων της Affymetrix

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι μικροσυστοιχίες της εταιρίας Affymetrix. Η επιλογή αυτή οφείλεται στη μακρά ιστορία της συγκεκριμένης εταιρείας στο χώρο, και στην αποδεδειγμένη αξιοπιστία και επαναληψιμότητα των μετρήσεων που δίνουν οι μικροσυστοιχίες της. Η Affymetrix διαθέτει μία μεγάλη ποικιλία από διαφορετικά είδη μικροσυστοιχιών. Στην παρούσα μελέτη έγινε χρήση του GeneChip™ miRNA 2.0 Array (**Σχήμα 3.1**). Παρά το μικρό τους μέγεθος (11µm), οι συγκεκριμένες μικροσυστοιχίες αναλύουν αλλαγές έκφρασης όλων των miRNAs που περιλαμβάνονται στην βάση δεδομένων miRBase Release 20, ήτοι 15.644 διαφορετικά miRNAs από 145 οργανισμούς

και επιπλέον 2.202 pre-miRNAs και 2.334 είδη μικρών RNA (snoRNAs, scaRNAs).



Σχήμα 3.1: Η μικροσυστοιχία GeneChip™ miRNA 2.0 Array. Η μικροσυστοιχία αποτελείται από ένα τετράγωνο γυάλινο υπόστρωμα, πάνω στο οποίο είναι διατεταγμένα τα ολιγονουκλεοτίδια ανιχνευτές. Αυτό με τη σειρά του είναι σταθεροποιημένο εντός πλαστικού καλύμματος. Τα ολιγονουκλεοτίδια βρίσκονται πάνω στην εσωτερική πλευρά της γυάλινης επιφάνειας. Κάτω ακριβώς από τη γυάλινη επιφάνεια βρίσκεται κενός χώρος, εντός του οποίου λαμβάνει χώρα η υβριδοποίηση και τα απαραίτητα ξεπλύματα.¹⁵⁶

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εκτέλεση του πειράματος ήταν η εξής: αρχικά καλλιεργήθηκαν HAECs τα οποία στη συνέχεια εκτέθηκαν είτε σε θεραπεία με σωματίδια rHDL-apoA-I ή μόνο σε PBS (ομάδα ελέγχου). Στη συνέχεια ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA με το αντιδραστήριο Trizol. Λήφθηκε ποσότητα 1μg από κάθε δείγμα RNA και μέσα από σειρά χημικών αντιδράσεων¹⁵⁵ σημάνθηκε και υβριδοποιήθηκε στις μικροσυστοιχίες GeneChip™ miRNA 2.0 Array της Affymetrix. Χρησιμοποιήθηκαν 5 μικροσυστοιχίες/θεραπεία, έγινε δηλαδή χρήση 5 πλακιδίων μικροσυστοιχιών, στα οποία υβριδοποιήθηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες 1μg RNA από 5 διαφορετικές καλλιέργειες HAECs υπό θεραπεία με σωματίδια rHDL-apoA-I ή PBS. Η πολλαπλή εκτέλεση των προσδιορισμών είναι απαραίτητη προκειμένου να αυξηθεί η βιολογική εγκυρότητα των ευρημάτων.

3.1.6 Απόκτηση και ανάλυση εικόνας

Μετά τη λήψη της εικόνας που προκύπτει από την υβριδοποίηση ακολουθεί ποιοτική ανάλυση της εικόνας, των ιχνηθετών ελέγχου, και των χαρακτηριστικών του cRNA, της μικροσυστοιχίας και της υβριδοποίησης. Μετά την ανάλυση της εικόνας ακολουθεί η διαδικασία προ-

φιλτραρίσματος/μασκαρίσματος, ενώ συστήνεται ο έλεγχος του λόγου Σήμα Δείγματος/Σήμα Υποβάθρου πριν την κλιμακοποίηση. Το μασκάρισμα αναφέρεται στις εφαρμογές διόρθωσης του σήματος της μικροσυστοιχίας που αντισταθμίζουν τον διασταυρούμενο υβριδισμό (cross hybridization), τυχόν φθορές στη μικροσυστοιχία, τη λανθασμένη ρύθμιση του σαρωτή, τον κορεσμό του φωτός του προβολέα και τυχόν θέματα που μπορεί να έχουν προκύψει κατά την έκπλυση. Επιπλέον το μασκάρισμα εμποδίζει τον αλγόριθμο κανονικοποίησης από το να αναλύει σήματα από αποκλεισμένες περιοχές.¹⁵⁷

3.1.7 Κανονικοποίηση

Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων είναι απαραίτητο βήμα στη διαδικασία προεπεξεργασίας της σαρωμένης εικόνας των μικροσυστοιχιών. Αναφέρεται στη μαθηματική τροποποίηση των σημάτων υβριδισμού κάθε γονιδίου εντός μίας μικροσυστοιχίας, καθώς και του συνολικού υβριδισμού διαφορετικών μικροσυστοιχιών, έτσι ώστε να είναι άμεσα συγκρίσιμα μεταξύ τους.^{158,159}

Υπάρχουν διάφοροι λόγοι για τους οποίους τα δεδομένα θα πρέπει να κανονικοποιηθούν. Για να εξαλειφθούν οι συστηματικές ροπές (**bias**) που περιλαμβάνονται στην προετοιμασία του δείγματος, οι διακυμάνσεις κατά τον υβριδισμό, οι χωρικές επιδράσεις, οι ρυθμίσεις του σαρωτή, και οι ροπές του υπεύθυνου του πειράματος. Η απόφαση σχετικά με το ποια μέθοδος κανονικοποίησης είναι η κατάλληλη εξαρτάται από το είδος της μικροσυστοιχίας καθώς για κάθε τεχνολογία μικροσυστοιχίας υπάρχει και μία προτεινόμενη μέθοδος κανονικοποίησης και από τη βιολογική φύση της ομάδας δειγμάτων που εξετάστηκαν. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος Robust Multiarray Analysis (RMA). Ο RMA είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος αλγόριθμος για την προ-επεξεργασία των δεδομένων που προκύπτουν από τις μικροσυστοιχίες της Affymetrix. Αφαιρεί το σήμα υποβάθρου, κανονικοποιεί τα αποτελέσματα ώστε τα δεδομένα που προκύπτουν από διαφορετικές μικροσυστοιχίες να είναι συγκρίσιμα και συνδυάζει τα αποτελέσματα (ένταση φθορισμού) των διαφορετικών μικροσυστοιχιών, ώστε οι τελικές μετρήσεις να αντιστοιχούν στα επίπεδα έκφρασης των miRNAs.¹⁶⁰

3.2 Στατιστική ανάλυση

Καθώς δεν υπάρχει μονάδα μέτρησης έκφρασης, τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών έχουν νόημα μόνο σε σύγκριση με αυτά του ίδιου πειράματος. Το αποτέλεσμα αυτής της σύγκρισης επιτρέπει τον

προσδιορισμό αλλαγής ή μη της έκφρασης ενός miRNA σε μια ομάδα δειγμάτων σε σχέση με αυτήν κάποιας άλλης και ανάλογα με τον αριθμό των διαφορετικών ομάδων βιολογικών δειγμάτων πραγματοποιείται και ο αντίστοιχος αριθμός συγκρίσεων. Για τη διαδικασία της σύγκρισης τέτοιου όγκου δεδομένων έχει αναπτυχθεί μια σειρά από ειδικά στατιστικά εργαλεία. Στο τελικό στάδιο της στατιστικής ανάλυσης προσδιορίζεται η στατιστική σημαντικότητα της αλλαγής έκφρασης κάθε miRNA. Στο παρόν πείραμα, η ανάλυση αυτή έγινε μέσω της σύγκρισης των δεδομένων των δειγμάτων ελέγχου (PBS χωρίς rHDL) με αυτά των δειγμάτων στα οποία είχε προστεθεί rHDL, χρησιμοποιώντας t-test. Στη συνέχεια επιλέξαμε τα κριτήρια με βάση τα οποία θα προσδιοριστεί αν η αλλαγή έκφρασης είναι βιολογικά (με βάση το λόγο της αλλαγής έκφρασης ανάμεσα σε δύο ομάδες δειγμάτων – fold change) και στατιστικά (με βάση την p-value) σημαντική. Τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: αλλαγή έκφρασης με λόγο (fold change) $\geq 1,5$ και πιθανότητα λάθους (false discovery rate, FDR) $\leq 0,05$. Το FDR είναι τρόπος υπολογισμού της πιθανότητας οι συγκεκριμένες μετρήσεις έκφρασης να είναι τυχαίο προϊόν και όχι συστηματικό βιολογικό εύρημα. Ως θετικό ή αρνητικό λόγο έκφρασης ορίσαμε το λόγο της μέσης έκφρασης ενός miRNA μετά από χορήγηση σωματιδίων rHDL-apoA-I, προς την έκφρασή του μετά από χορήγηση PBS. Το τελικό αποτέλεσμα της παραπάνω ανάλυσης ήταν μια λίστα miRNA που αντιστοιχούν στις κυριότερες αλλαγές ανάμεσα στις δύο υπό μελέτη ομάδες.^{158,161,162}

3.3 Εξόρυξη βιολογικών δεδομένων από τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών

3.3.1 IPA ανάλυση

Η αρχική ανάλυση των στατιστικά σημαντικά αλλαγμένων miRNAs έγινε με το πρόγραμμα ανάλυσης Ingenuity Pathway Analysis Software (<http://www.ingenuity.com>). Η IPA ανάλυση παρέχει τη δυνατότητα εκτέλεσης πολλών αναλύσεων συμπεριλαμβανομένης της λειτουργικής ανάλυσης και της ανάλυσης των βιολογικών και μοριακών λειτουργιών των υπό εξέταση μορίων.¹⁴⁷ Το λογισμικό IPA παρέχει σε επεξεργασμένη μορφή ένα μεγάλο εύρος ερευνητικών ευρημάτων που έχουν δημοσιευτεί σε έγκυρα επιστημονικά περιοδικά και έχουν οργανωθεί στη βάση δεδομένων του Ingenuity (**Ingenuity knowledge base**). Τα ευρήματα της IPA ανάλυσης που παρουσιάζονται υποστηρίζονται από τα πειραματικά αποτελέσματα των πιο πρόσφατων επιστημονικών δημοσιεύσεων και αφορούν μεταξύ άλλων βιολογικές ή μοριακές λειτουργίες γονιδίων, άμεσες ή/και έμμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, εδραιωμένα μοριακά μονοπάτια, καθώς και πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδιακών/πρωτεϊνικών δικτύων

που σχηματίζονται από τα γονίδια και miRNA επιλογής του χρήστη, σε κάθε ανάλυση.¹⁴⁷

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η λίστα των ονομάτων των στατιστικά σημαντικά αλλαγμένων miRNAs και ο λόγος αλλαγής έκφρασης που αντιστοιχεί στο καθένα φορτώθηκε, σε μορφή αρχείου Microsoft Office Excel (.xls), στο λογισμικό IPA και εκτελέστηκε η “κεντρική ανάλυση” (**core analysis**), υπό ειδικά επιλεγμένες ρυθμίσεις (**Πίνακας 3.1**). Η “κεντρική ανάλυση” κατηγοριοποιεί τα μόρια με βάση τις βιολογικές και μοριακές λειτουργίες στον οποίων τη ρύθμιση εμπλέκονται, και παρέχει πληροφορίες και διαγράμματα για τη μεταξύ τους βιολογική σχέση, καθώς και τη θέση τους μέσα σε εδραιωμένα γνωστά μονοπάτια όπως και σε δίκτυα στα οποία συμμετέχουν. Τα δεδομένα κάθε κατηγορίας μπορούν να εξαχθούν και να αποθηκευτούν σε έγγραφο τύπου Microsoft Office Excel και σε σχήματα που αποθηκεύονται σαν αρχεία τύπου jpg.

Πίνακας 3.1: Οι επιλεγμένες ρυθμίσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις με το πρόγραμμα IPA.

Συνθήκες Βασικής Ανάλυσης IPA	
Γενικές Συνθήκες:	Περιοχή Αναφοράς: Βάση γνώσεων του Ingenuity, να συμπεριλαμβάνονται άμεσες και έμμεσες αλληλεπιδράσεις
Τύποι δικτύων	Αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων/miRNAs και να περιλαμβάνονται Ενδογενείς Μεταβολίτες
Μόρια ανά δίκτυο	Μέχρι 35
Δίκτυα ανά ανάλυση	Μεχρι 25
Πηγές Δεδομένων:	Όλες (περιλαμβάνει miInteractions και miRBase)
Επίπεδο εμπιστοσύνης	Όλα (πειραματικά αποτελέσματα, προβλέψεις υψηλής και μέτριας εμπιστοσύνης)
Να συμπεριλαμβάνονται τα ευρήματα που αφορούν τα είδη:	Όλα (άνθρωπος, ποντικός, επίμυς)
Να συμπεριλαμβάνονται τα ευρήματα από:	Όλους τους ιστούς και τις κυτταρικές σειρές
Να συμπεριλαμβάνονται ευρήματα που αφορούν:	Τον άγριο τύπο του γονιδίου ή του προϊόντος του και τις μεταλλάξεις

3.3.2 Ανάλυση βιβλιογραφίας με τη βάση δεδομένων του PubMed

Για τα στατιστικά σημαντικά αλλαγμένα miRNAs και τους στόχους τους ακολούθησε εκτενής αναζήτηση σχετικής επιστημονικής βιβλιογραφίας στη διεθνή βάση δεδομένων PubMed [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>] της NCBI. Η ανάλυση εστιάστηκε στην επίδραση των υπό εξέταση μορίων, πάνω στις λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων, με έμφαση στον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την επιβίωση και στο ρόλο τους στην αθηροσκλήρωση. Η αναζήτηση της διεθνούς βιβλιογραφίας στη βάση δεδομένων PubMed έγινε με βάση επιλεγμένες λέξεις “κλειδιά”. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το επίσημο πλήρες όνομα κάθε miRNA ή γονιδίου σε συνδυασμό με τις λέξεις: endothelium (ενδοθήλιο), endothelial cells (ενδοθηλιακά κύτταρα), re-endothelialization (αποκατάσταση της στοιβάδας του ενδοθηλίου), atherosclerosis (αθηροσκλήρωση) και atheroprotection (αθηροπροστασία). Επειδή τα περισσότερα miRNAs δεν ήταν ιδιαίτερα μελετημένα το σύνηθες αποτέλεσμα της αναζήτησης ήταν λίγες έως καθόλου δημοσιεύσεις για αυτό το συνδυασμό όρων, γι αυτό ακολούθησε αναζήτηση μόνο με το επίσημο όνομα του κάθε miRNA, ώστε να ανακτηθεί η πλήρης βιβλιογραφία για το καθένα (τα ποσοτικά αποτελέσματα στα υποκεφάλαια 4.2.6 και 4.3.6). Οι δημοσιεύσεις οι οποίες τελικώς επιλέχθηκαν προς μελέτη κρίθηκαν με βάση του κατά πόσο το περιεχόμενο τους προσέγγιζε περισσότερο τις υπό εξέταση βιολογικές λειτουργίες και παθολογίες. Δεν εφαρμόστηκε περιορισμός ως προς το έτος της δημοσίευσης ώστε να μη παραληφθούν σημαντικές πληροφορίες.

Οι βιβλιογραφικές αναζητήσεις στη βάση PubMed πραγματοποιήθηκαν τη χρονική περίοδο 8-12-17 με 30-06-18.

3.3.3 Εύρεση πειραματικά επιβεβαιωμένων στόχων

Για την εύρεση γονιδίων για τα οποία η αλληλεπίδραση miRNA-mRNA έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά, έγινε χρήση της βάσης δεδομένων miRTarBase [<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>]. Στο miRTarBase έχουν συγκεντρωθεί και παρουσιάζονται περισσότερες από 360.000 πειραματικά επιβεβαιωμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ miRNA και mRNA γονιδίων ρυθμιστικών στόχων τους, που έχουν συλλεχθεί μέσω της συστηματικής μελέτης της σχετικής βιβλιογραφίας. Η επιβεβαίωση των αλληλεπιδράσεων που περιέχονται στη βάση, έχει γίνει με πειράματα reporter assay, western blot, μικροσυστοιχιών και αλληλούχησης υψηλής απόδοσης.¹⁶³ Για την παρούσα μελέτη η αναζήτηση έγινε στην πλέον πρόσφατη έκδοση v7.0 που δημοσιεύτηκε στις 15 Σεπτεμβρίου του 2017. Η πορεία που ακολουθήθηκε

ήταν η εξής: αρχικά έγινε λήψη του συνόλου της βάσης δεδομένων σε μορφή excel (.xls) και στη συνέχεια με τη χρήση των εργαλείων που παρέχει το αντίστοιχο πρόγραμμα, έγινε αναζήτηση των καταγραφών για το κάθε miRNA ξεχωριστά. Οι καταγραφές για κάθε miRNA περιλαμβάνουν: 1) μία ταυτότητα (miRTarBase ID) που αντιστοιχεί στην αλληλεπίδραση ενός miRNA με το mRNA ενός συγκεκριμένου γονιδίου πχ στην αλληλεπίδραση miR-503-mRNA του VEGF, έχει αποδοθεί η ταυτότητα MIRT007224, 2) το όνομα με τη μορφή hsa-miR- και η ταυτότητα MIMAT id του υπό εξέταση miRNA 3) το είδος στο οποίο εκφράζεται το miRNA, στην προκειμένη περίπτωση homo sapiens, 4) το όνομα και ο κωδικός Entrez Gene, καθώς και το είδος (homo sapiens) στο οποίο εκφράζεται το γονίδιο, το mRNA του οποίου αποτελεί το στόχο, 5) ο τύπος του πειράματος και 6) ο κωδικός PMID της δημοσίευσης από την οποία προήλθαν τα δεδομένα. Η αναζήτηση έγινε με βάση την ταυτότητα MIMAT id που αποδίδεται από το miRBase σε κάθε μοναδικό ώριμο miRNA. Τα MIMAT id προσδιορίστηκαν μετά από σχετική αναζήτηση στο miRBase που έγινε με βάση την αλληλουχία των miRNAs, όπως αυτή αναφέρεται στα αρχεία με τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών. Το αποτέλεσμα της παραπάνω επεξεργασίας ήταν η λήψη μίας λίστας με τους πειραματικά επιβεβαιωμένους στόχους για κάθε miRNA.

3.3.4 Πρόβλεψη πιθανών στόχων

Τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ανάλυση για τον εντοπισμό πιθανών στόχων ήταν τα miRWalk v2.0 (mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/search_mirnas/) και TargetScan 6.2 (targetscan.org/vert_62/). Το TargetScan 6.2 πέραν της συμπληρωματικότητας μεταξύ των ακολουθιών miRNA-mRNA, εξετάζει και εάν η προβλεπόμενη θέση πρόσδεσης είναι εξελικτικά συντηρημένη μεταξύ 28 συγγενικών ειδών. Καθώς στην πλειοψηφία των λειτουργικών ανθρώπινων γονιδίων η 3'UTR εμφανίζει υψηλό βαθμό συντήρησης, αυτή η προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιτυχή πρόβλεψη μεγάλου ποσοστού από τους στόχους των ανθρώπινων miRNAs. Ο αλγόριθμος στη συνέχεια ταξινομεί τους πιθανούς στόχους με βάση βαθμολογία που υπολογίζεται από το βαθμό εξελικτικής συντήρησης, το σημείο της 3'UTR στο οποίο εντοπίζονται και τη δομή της ακολουθίας που περιβάλλει τις πιθανές θέσεις πρόσδεσης.¹⁶⁴ Η αναζήτηση έγινε ξεχωριστά για κάθε ένα από τα miRNAs, συμπληρώνοντας το επίσημο όνομα του στην αντίστοιχη φόρμα της ιστοσελίδας και τα αποτελέσματα ελήφθησαν με την μορφή απλού αρχείου κειμένου (txt). Το miRWalk v2.0, πέρα από την πρόβλεψη θέσεων πρόσδεσης την οποία εκτελεί, για την οποία εξετάζει την ακολουθία ολόκληρου του mRNA και όχι μόνο αυτή της 3'UTR, παρουσιάζει τα αποτελέσματα και δεκατριών ακόμα προγραμμάτων πρόβλεψης και συγκεκριμένα των DIANA-microTn4.0, DIANA-microT-CDS, miRanda-rel2010,

mirBridge, miRDB4.0, miRmap, miRNAMap, PicTar2, PITA, RNA22v2, RNAhybrid2.1, και Targetscan 6.2. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων για θέσεις πρόσδεσης που εντοπίζονται στον προμότορα (προβλέψεις από 4 προγράμματα), στην κωδικεύουσα περιοχή (5 προγράμματα), στην 5' UTR- (5 προγράμματα) και στην 3'-UTR (πρόβλεψη και από τα 13 προγράμματα) του mRNA. Επίσης συγκεντρώνει και παρέχει πληροφορίες για τις πειραματικά επιβεβαιωμένες αλληλεπιδράσεις miRNA-mRNA που εντοπίζει αναλύοντας δημοσιεύσεις μέσω αλγόριθμων αυτόματης ανάλυσης κειμένου και τις οποίες συνδυάζει με τα δεδομένα από τις βάσεις δεδομένων miRTarBase, PhenomiR2.0, miR2Disease και HMDD.¹⁴⁹ Η ανάλυση έγινε για κάθε ένα miRNA ξεχωριστά, συμπληρώνοντας το επίσημο όνομα του στην αντίστοιχη φόρμα της ιστοσελίδας. Τα αποτελέσματα ελήφθησαν με την μορφή απλού αρχείου κειμένου (txt). Οι συνθήκες ανάλυσης που επιλέχθηκαν αναλύονται στον **πίνακα 3.2**.

Και στις δύο αναλύσεις οι λίστες με τους πιθανούς στόχους, μετατράπηκαν σε μορφή Microsoft Office Excel (.xls) και η περαιτέρω επεξεργασία τους έγινε με το αντίστοιχο πρόγραμμα.

Πίνακας 3.2: Οι επιλεγμένες ρυθμίσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις με το πρόγραμμα miRWalk.

Συνθήκες ανάλυσης miRWalk	
Είδος	Άνθρωπος (homo sapiens)
Επιλογή βάσης δεδομένων	miRBase
Επιλογή μορφής ονόματος των miRNAs	miRNA (hsa-miR-)
Πληροφορίες για τα υπό αναζήτηση miRNAs που θα προβάλλονται στα αποτελέσματα	Όνομα, miRNAs με παρόμοιες seed regions, οικογένεια, αντιστοίχιση με την ακολουθία του γονιδίου στόχου, γονίδιο εντός του οποίου κωδικοποιείται το miRNA
Αρχική θέση αναζήτησης στην ακολουθία του πιθανού γονιδίου στόχου	1
Αναζήτηση	Στην 3'UTR
Ελάχιστο μήκος της seed region	7 νουκλεοτίδια
p-value	0,05
Αναζήτηση σε άλλα προγράμματα πρόβλεψης	Σε όλα

3.3.5 Συνδυασμός με τα δεδομένα γονιδιακής έκφρασης

Καθώς τα miRNAs καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση αποσταθεροποιώντας το μόριο του mRNA,¹⁶⁵ μία μεγάλη, ενδογενής ή τεχνητή, αλλαγή στην έκφραση κάποιου miRNA, μπορεί να προκαλεί παρατηρήσιμη αλλαγή και στην έκφραση του γονιδίου-στόχου. Γι αυτό μία επιτυχημένη τακτική για την αύξηση της ακρίβειας κατά τη πρόβλεψη πιθανών στόχων είναι ο συνδυασμός δεδομένων γονιδιακής έκφρασης με τα αποτελέσματα της πρόβλεψης στόχων μέσω υπολογιστικών προγραμμάτων.¹⁵¹ Στην παρούσα μελέτη συγκρίναμε τις λίστες των πιθανών στόχων των στατιστικώς σημαντικά αλλαγμένων miRNAs με τα δεδομένα από προηγούμενο πείραμα γονιδιακής έκφρασης ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από θεραπεία με σωματίδια rHDL-apoA-I, της ομάδας μας. Με αυτόν τον τρόπο εντοπίστηκαν εκείνα τα mRNA που είναι κοινά και για τις δύο λίστες και γι αυτό παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα να είναι όντως στόχοι των miRNAs.¹⁶⁶ Δεδομένου πως αυτή η μέθοδος δεν βασίζεται στη σύγκριση των ακολουθιών miRNA-mRNA, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να φιλτραριστούν οι προβλέψεις που προκύπτουν από τα υπολογιστικά προγράμματα, που συνήθως αντιστοιχούν σε λίστες εκατοντάδων γονιδίων για κάθε miRNA.¹⁵¹

3.3.6 Κατηγοριοποίηση με βάση όρους Gene Ontology

Η ανάλυση εμπλουτισμού σε όρους Gene Ontology (GO) είναι μία τεχνική για τη διερεύνηση μεγάλων ομάδων γονιδίων. Σε αυτήν γίνεται χρήση του συστήματος ταξινόμησης GO στο οποίο τα γονίδια κατατάσσονται σε προκαθορισμένες κατηγορίες με βάση τα λειτουργικά χαρακτηριστικά τους. Μέσω αυτής προσδιορίζεται εάν σε μία λίστα γονιδίων υπάρχουν όροι GO που υπερ- ή υπο-εκπροσωπούνται χρησιμοποιώντας τον λεπτομερή χαρακτηρισμό (**annotation**) του κάθε γονιδίου.^{167,168} Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης για την εκτέλεση της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο “Enrichment analysis” που παρέχεται στην ιστοσελίδα <http://geneontology.org/> του Gene Ontology Consortium, του οργανισμού που ρυθμίζει το σύστημα ταξινόμησης GO. Για να γίνει η ανάλυση η λίστα με τα γονίδια που προέκυψε από το συνδυασμό των δεδομένων έκφρασης με τα δεδομένα πρόβλεψης πιθανών στόχων, φορτώθηκε στο εργαλείο Enrichment analysis. Στα πλαίσια της ανάλυσης έγινε επιλογή του είδους (homo sapiens) και επιλέχθηκε η κατηγορία ανάλυσης: μοριακή λειτουργία (molecular function) που αναφέρεται στις μοριακές δράσεις των προϊόντων των γονιδίων, κυτταρικό τμήμα (cellular component) που αναφέρεται στο τμήμα του κυττάρου στο οποίο είναι ενεργά τα προϊόντα των γονιδίων και βιολογική διεργασία (biological process) που αναφέρεται στα μονοπάτια και της ευρύτερες διεργασίες που σχηματίζονται από τις δράσεις των προϊόντων

περισσότερων γονιδίων. Η ανάλυση έγινε τρεις φορές για κάθε λίστα, ώστε να καλυφθούν και οι τρεις κατηγορίες. Τα αποτελέσματα είναι λίστες με τους στατιστικά σημαντικούς (p -value και $FDR \leq 0,05$) όρους GO για την κάθε ομάδα γονιδίων σε μορφή απλού κειμένου (txt).¹⁶⁹

Συνδυάζοντας τα δεδομένα από την στατιστική επεξεργασία, την βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών, την πρόβλεψη των πιθανότερων στόχων των miRNAs και την ανάλυση εμπλουτισμού σε όρους GO, είναι δυνατόν να σχεδιαστούν πιθανοί άξονες ρύθμισης (HDL-apoA-I – miRNA – mRNA), που θα μπορούσαν να μεσολαβούν τις ενδεχόμενες αθηροπροστατευτικές δράσεις της rHDL-apoA-I στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Αποτελέσματα

4.1 Εισαγωγή

Μετά από λεπτομερή βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών με κριτήρια ανάλυσης την αλλαγή έκφρασης με λόγο (fold change, FC) $\geq \pm 1,5$ και πιθανότητα λάθους (false discovery rate, FDR) $\leq 0,05$ παρατηρήθηκαν αλλαγές σε 8 miRNAs. Τα miR-3188, miR-3185, miR-1231, miR-3195, miR-2861, miR-1915 και miR-638 υποεκφράζονταν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μετά τη χορήγηση rHDL-αpoA-I και το miR-503 μετά τη χορήγηση rHDL-αpoE3. Δεν βρέθηκαν miRNA με στατιστικά σημαντική υπερέκφραση. Το FC των miRNAs κυμαίνεται από -4,19 για το miR-3188 μέχρι -1,67 για το miR-503. Αναλυτική παράθεση γίνεται στον **πίνακα 4.1** που ακολουθεί.

Πίνακας 4.1: Όλα τα miRNAs των οποίων η έκφραση αλλάζει στατιστικά σημαντικά

rHDL-αpoA-I vs PBS			
miRNA	Ταυτότητα miRBase	Ακολουθία	FC
hsa-miR-3188	MIMAT0015070	AGAGGCUUUGUGCGGAU ACGGGG	-4,19
hsa-miR-3185	MIMAT0015065	AGAAGAAGGCGGUCGGU CUGCGG	-2,48
hsa-miR-1231	MIMAT0005586	GUGUCUGGGCGGACAGC UGC	-2,35
hsa-miR-3195	MIMAT0015079	CGCGCCGGGCCCGGGUU	-2,22
hsa-miR-2861	MIMAT0013802	GGGGCCUGGCGGUGGGC GG	-2,02
hsa-miR-1915	MIMAT0007891	CCCCAGGGCGACGCGGC GGG	-1,89
hsa-miR-638	MIMAT0003308	AGGGAUCGCGGGCGGGU GGCGCCU	-1,67
rHDL-αpoE3 vs PBS			
has-miR-503	MIMAT0002874	UAGCAGCGGGAACAGUU CUGCAG	-1,88

4.2 Αποτελέσματα για τα rHDL-apoA-I vs PBS miRNAs

4.2.1 Ανάλυση βιολογικών και μοριακών λειτουργιών με βάση το λογισμικό IPA

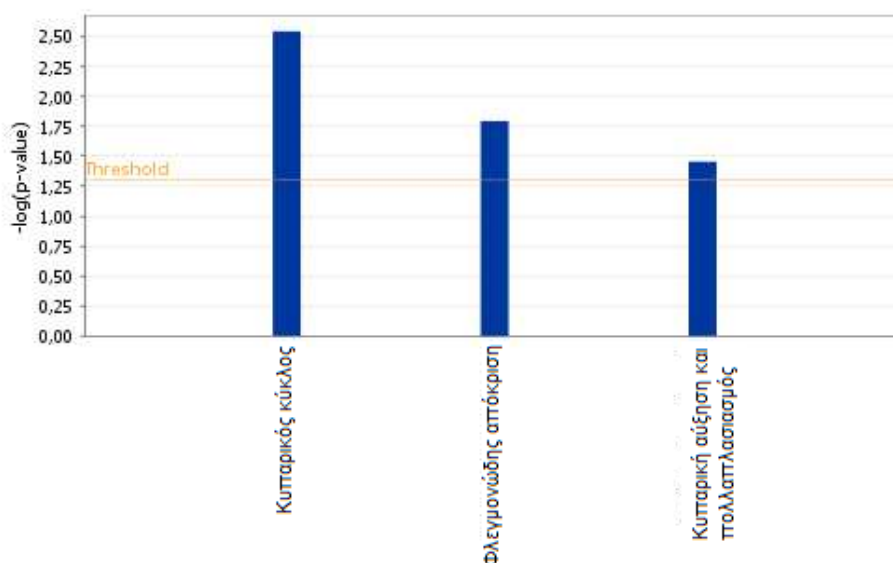
Η πρώτη αξιολόγηση των υπό εξέταση miRNAs έγινε με το Ingenuity Pathway Analysis, σκοπός της ανάλυσης ήταν η ταυτοποίηση των μοριακών και βιολογικών λειτουργιών στις οποίες συμμετέχουν, ώστε να εντοπιστούν εκείνες που επηρεάζονται από την αλλαγή έκφρασης των miRNAs που προκαλεί η rHDL-apoA-I. Πρώτο στάδιο της ανάλυσης είναι η επιτυχής αναγνώριση των ταυτοτήτων των υπό εξέταση μορίων και η αντιστοίχηση τους με μόρια καταχωρημένα στη βάση δεδομένων του προγράμματος IPA, στην οποία οργανώνονται τα αποδελτιωμένα δεδομένα χιλιάδων δημοσιεύσεων. Αφού φορτώθηκαν οι ταυτότητες των 6 miRNAs, η κεντρική ανάλυση του λογισμικού αντιστοίχησε επιτυχώς όλα τα IDs των στατιστικά σημαντικά αλλαγμένων miRNAs που προέκυψαν από τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών, σε miRNAs που περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων του.

Το λογισμικό του IPA έδειξε πως μόνο το miR-638 επηρεάζει λειτουργικές κατηγορίες σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, πιθανότατα λόγω του πολύ μικρού αριθμού δημοσιευμένων μελετών για τα υπόλοιπα έξι miRNAs (ενδεικτικά υποκεφάλαιο 4.2.6 με τα αποτελέσματα της αναζήτησης στο PubMed). Οι πιο στατιστικά σημαντικές βιολογικές και μοριακές λειτουργικές κατηγορίες που επηρεάζονται από την αλλαγή στην έκφραση του miR-638 με βάση την IPA ανάλυση, που για την αξιολόγηση χρησιμοποιεί το Fisher's Exact Test, οι οποίες παρουσιάζουν $p\text{-value} \leq 0,05$ είναι: ο “κυτταρικός κύκλος” (1 miRNA, $p\text{-value}: 2,88 \times 10^{-3}$), η “φλεγμονώδης απόκριση” (1 miRNA, $p\text{-value}: 1,61 \times 10^{-2}$) και η “κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός” (1 miRNA, $p\text{-value}: 3,51 \times 10^{-2}$). Πίνακας 4.2 και Σχήμα 4.1

Πίνακας 4.2: Βιολογικές και μοριακές λειτουργικές κατηγορίες των miRNAs που η έκφραση τους αλλάζει στατιστικά σημαντικά με τη χορήγηση rHDL-apoA-I.

Λειτουργική κατηγορία	p-value	Μόρια	#Μορίων
Κυτταρικός κύκλος	$2,88 \times 10^{-3}$	miR-638	1
Φλεγμονώδης απόκριση	$1,61 \times 10^{-2}$	miR-638	1
Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός	$3,51 \times 10^{-2}$	miR-638	1

Η σειρά αναφοράς των λειτουργικών κατηγοριών προκύπτει με βάση τις τιμές p-value που προκύπτουν από την κεντρική ανάλυση του Ingenuity (IPA core analysis).



Σχήμα 4.1: Ραβδόγραμμα λειτουργικών κατηγοριών του miR-638

Οι κατηγορίες αυτές κατατάσσονται με βάση την τιμή $-\log(p\text{-value})$ της IPA ανάλυσης. Η μπλε μπάρα αντιστοιχεί στην τιμή $p\text{-value}$ της συγκεκριμένης λειτουργικής κατηγορίας και η λεπτή κίτρινη γραμμή αντιπροσωπεύει το όριο πάνω από το οποίο είναι στατιστικά σημαντική η κατηγορία αυτή με βάση το λογισμικό του Ingenuity χρησιμοποιώντας το Fisher's Exact Test και $p\text{-value} \leq 0,05$.

Ακολούθησε ο λεπτομερής χαρακτηρισμός των λειτουργικών κατηγοριών που επηρεάζονται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από την αλλαγή έκφρασης του miR-638, ώστε να διασαφηνιστεί ποιες ακριβώς λειτουργίες αντιστοιχούν σε αυτήν. Αυτός έδειξε πως η λειτουργική κατηγορία “κυτταρικός κύκλος” αντιστοιχεί στην “καταστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου κυτταρικών σειρών λευχαιμίας” (1 miRNA, $p\text{-value}: 2,88 \times 10^{-3}$). Η λειτουργική κατηγορία “φλεγμονώδης απόκριση” αναφέρεται στην “νεφρίτιδα τάξης II, λόγω συστηματικού ερυθρηματώδους λύκου” (1 miRNA, $p\text{-value}: 1,61 \times 10^{-2}$). Η κατηγορία “κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός” αντιστοιχεί στον “πολλαπλασιασμό κυτταρικών σειρών λευχαιμίας” (1 miRNA, $p\text{-value}: 3,51 \times 10^{-2}$). Αναλυτική παρουσίαση των παραπάνω στον **πίνακα 4.3**.

Πίνακας 4.3: Λεπτομερής χαρακτηρισμός των λειτουργικών κατηγοριών τις οποίες επηρεάζει η αλλαγή έκφρασης του miR-638.

Λειτουργική κατηγορία	Λειτουργία	P-value	miRNAs	#miRNAs
Κυτταρικός κύκλος	Καταστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου κυτταρικών	$2,88 \times 10^{-3}$	miR-638	1

	σειρών λευχαιμίας			
Φλεγμονώδης απόκριση	Νεφρίτιδα τάξης II, λόγω συστηματικού ερυθρηματώδους λύκου	$1,61 \times 10^{-2}$	miR-638	1
Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός	Πολλαπλασιασμός κυτταρικών σειρών λευχαιμίας	$3,51 \times 10^{-2}$	miR-638	1

4.2.2 Πειραματικά επιβεβαιωμένοι στόχοι των υπό εξέταση miRNAs

Με δεδομένο πως ο συνήθης τρόπος με τον οποίο ασκούν τη δράση τους τα miRNAs είναι η σύνδεση με το mRNA των γονιδίων που ρυθμίζουν, θελήσαμε να βρούμε τα γονίδια για τα οποία η αλληλεπίδραση μεταξύ του mRNA τους και των υπό εξέταση miRNAs είναι πειραματικά επιβεβαιωμένη. Το αποτέλεσμα αυτής της αναζήτησης στη βάση δεδομένων miRTarBase ήταν μία σειρά από λίστες (μία για κάθε miRNA), που περιλάμβαναν από 34 εγγραφές (24 μοναδικά γονίδια) για το miR-3195, έως και 259 εγγραφές (233 μοναδικά γονίδια) για το miR-1915 (οι πλήρεις λίστες παρατίθενται στο **παράρτημα I**). Στη συνέχεια και για να εντοπιστούν εκείνα από τα γονίδια που πιθανότατα επηρεάζονται από τις αλλαγές στην έκφραση των miRNAs υπό τις συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος, έγινε αντιπαράβολή των παραπάνω λιστών με αυτήν που προέκυψε από προηγούμενο πείραμα γονιδιακής έκφρασης της ομάδας μας, το οποίο πραγματοποιήθηκε υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες (ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής, θεραπεία με σωματίδια rHDL-apoA-I, PBS ως control).¹⁷⁴ Αποτέλεσμα της παραπάνω σύγκρισης είναι ο προσδιορισμός ενός μικρού αριθμού γονιδίων, η αναλυτική παρουσίαση των οποίων ακολουθεί στον **πίνακα 4.4**.

Πίνακας 4.4: Οι πειραματικά επιβεβαιωμένοι στόχοι των υπό εξέταση miRNAs.

miRNA	Σύνολο πειραματικά επιβεβαιωμένων στόχων	Κοινά γονίδια*	FC κοινών γονιδίων
hsa-miR-3188	87	-	
hsa-miR-3185	166	-	
hsa-miR-1231	47	CYP1A1	2,53
hsa-miR-3195	24	-	
hsa-miR-2861	70	-	
hsa-miR-1915	233	-	
hsa-miR-638	55	-	

* Κοινά μεταξύ της λίστας με όλους τους επιβεβαιωμένους στόχους του κάθε miRNA όπως προέκυψαν μετά από τη σχετική αναζήτηση στη βάση δεδομένων miRTarBase και της λίστας με τα γονίδια που η έκφραση τους έχει βρεθεί από προηγούμενο πείραμα της ομάδας μας πως αλλάζει στα ενδοθηλιακά κύτταρα όταν υπόκεινται σε θεραπεία με rHDL-apoA-I.

4.2.3 Πρόβλεψη πιθανών στόχων των υπό εξέταση miRNAs

Για την εύρεση γονιδίων που το mRNA τους θα μπορούσε να αποτελεί στόχο των υπό εξέταση miRNAs έγινε αναζήτηση με τα προγράμματα πρόβλεψης miRWalk και TargetScan. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3 (Υλικά και Μέθοδοι), το miRWalk εκτός από το να προβλέπει πιθανούς στόχους, συγκεντρώνει και παρουσιάζει τα αποτελέσματα δεκατριών ακόμα προγραμμάτων πρόβλεψης πιθανών στόχων. Οι λίστες των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τη χρήση του περιλαμβάνουν όλα τα γονίδια τα οποία έχουν προβλεφθεί από τουλάχιστον ένα από αυτά τα προγράμματα. Αυτό έχει ως συνέπεια τα αποτελέσματα της αναζήτησης σε αυτό να αντιστοιχούν σε λίστες χιλιάδων γονιδίων για το κάθε miRNA. Μετά από μελέτη της βιβλιογραφίας και για να περιοριστεί ο αριθμός ώστε αφενός να αυξηθεί η σχετική βεβαιότητα και αφετέρου τα αποτελέσματα να είναι πιο εύχρηστα, επιλέχθηκε να εξεταστούν περαιτέρω εκείνα τα miRNAs για τα οποία υπάρχει συμφωνία τουλάχιστον πέντε¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ εκ των προγραμμάτων πρόβλεψης, μειώνοντας τον αριθμό σε μερικές εκατοντάδες για κάθε miRNA. Επιπλέον, καθώς το TargetScan είναι το συχνότερα χρησιμοποιούμενο πρόγραμμα πρόβλεψης στη σχετική βιβλιογραφία (χρήση σε 770 δημοσιεύσεις, έναντι 374 για το δεύτερο miRanda), στις περιπτώσεις που κάποια από τα αποτελέσματα του δεν περιλαμβάνονταν σε αυτά του miRWalk, αυτά προστέθηκαν στις τελικές λίστες.

Όπως και στην περίπτωση των επιβεβαιωμένων στόχων, έγινε αντιπαραβολή με τη λίστα που προέκυψε από το προηγούμενο πείραμα γονιδιακής έκφρασης, για να εντοπιστούν εκείνοι από τους πιθανούς στόχους των miRNAs που δυνητικά έχουν κάποιο βιολογικό ρόλο στο παρόν πείραμα. Στη συνέχεια παρατίθενται οι πίνακες με τα αποτελέσματα της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων για κάθε miRNA.

Με **έντονα γράμματα** σημειώνονται τα γονίδια για τα οποία υπάρχει συμφωνία μεταξύ miRWalk και TargetScan. Το βέλος δίπλα στο όνομα του κάθε γονιδίου υποδεικνύει αν η έκφραση του αυξάνει (↑) ή μειώνεται (↓) μετά τη θεραπεία με σωματίδια rHDL-apoA-I. Στο κάτω μέρος κάθε πίνακα συμπληρώνονται οι στόχοι που προβλέφθηκαν μόνο από το TargetScan.

Πίνακας 4.5: Πιθανοί στόχοι του miR-3188

miRWalk	
Αριθμός προγραμμάτων σε συμφωνία	Γονίδια
8	SV2A ↑
7	PDK4 ↑
6	VIPR1 ↑, XAF1 ↑
5	DHRS3 ↓, EPST1 ↑, HMGCR ↑, ITGA11 ↑, LIPG ↑, OAS2 ↑, RRM2 ↓
TargetScan	ACSS2 ↑, CKAP2L ↓, CTH ↑, EXO1 ↓, GINS2 ↓, IFIT1 ↑, MCM4 ↓

Πίνακας 4.6: Πιθανοί στόχοι του miR-3185

miRWalk	
Αριθμός προγραμμάτων σε συμφωνία	Γονίδια
7	IFI44L ↑
6	PLAT ↓, SLC25A20 ↑
5	APOBEC3B ↓, BMP2 ↓, HELLS ↓, HMGCR ↑, PARP9 ↑, PSAT1 ↑, RRM2 ↓, XRCC2 ↓
TargetScan	AGPAT9 ↑, CDK1 ↓, CKAP2L ↓, CLSPN ↓, CTH ↑, CYP51A1 ↑, FST ↓, GINS2 ↓, HIST1H2AI ↓, HIST1H3H ↓, HTR1D ↑, IFIT1 ↑, INSIG1 ↑, MCM10 ↓, MMP10 ↓, MT1E ↓, SHCBP1 ↓, STARD4 ↑, XAF1 ↑

Πίνακας 4.7: Πιθανοί στόχοι του miR-1231

miRWalk	
Αριθμός προγραμμάτων σε συμφωνία	Γονίδια
9	BMP2 ↓
8	LDLR ↑
7	CHAC1 ↑, MKI67 ↓, SLC7A5 ↑
6	OAS2 ↑
5	ITGB8 ↓, KIF11 ↓, LIPG ↑, PARP9 ↑, TGFB2 ↓, XRCC2 ↓

TargetScan	IFI44L↑, PNPLA3↑, CTH↑, MCM5↓, GINS1↓, HIST1H2AB↓, HIST1H2AH↓, HELLS↓, GINS2↓, HIST1H2BF↓
-------------------	---

Πίνακας 4.8: Πιθανοί στόχοι του miR-3195

miRWalk	
Αριθμός προγραμμάτων σε συμφωνία	Γονίδια
>5	-
TargetScan	-

Πίνακας 4.9 Πιθανοί στόχοι του miR-2861

miRWalk	
Αριθμός προγραμμάτων σε συμφωνία	Γονίδια
8	PDK4 ↑
7	CHAC1 ↑, LDLR ↑, MVK ↑
6	BRCA1 ↓, HTR1D ↑, ITGA11 ↑, PARP9 ↑, SLC7A5 ↑, XRCC2 ↓
5	ANGPTL4 ↑
TargetScan	EXO1↓, FST↓, HELLS↓, HMGCR↑, LIPG↑, MCM5↓, MELK↓, MT1F↓, PNPLA3↑, SLC25A20↑, STARD4↑, SV2A↑, TRIP13↓

Πίνακας 4.10: Πιθανοί στόχοι του miR-1915

miRWalk	
Αριθμός προγραμμάτων σε συμφωνία	Γονίδια
7	ADAMTS4 ↑, OAS2 ↑, SLC7A5 ↑, VIPR1 ↑
6	ANGPTL4 ↑, BRCA1 ↓, ITGA11 ↑, PLAT ↓, SV2A ↑
5	CHAC1 ↑, DHRS3 ↓, MVK ↑
TargetScan	HIST1H2AH↓, HIST1H3F↓, HMGCS1↑, LIPG↑, MCM5↓

Πίνακας 4.11: Πιθανοί στόχοι του miR-638

miRWalk	
Αριθμός προγραμμάτων σε συμφωνία	Γονίδια
6	BMP2↓
5	ASF1B↓, BRCA1↓, CHAC1↑, LDLR↑, PARP9↑, PNPLA3↑, SLC7A5↑, VIPR1↑
TargetScan	AQP5↑, BRIP1↓, CTH↑, HIST1H2AH↓, ITGA11↑, XAF1

4.2.4 IPA ανάλυση για τους στόχους των miRNAs

Στη συνέχεια έγινε IPA ανάλυση των παραπάνω γονιδίων, ώστε να καταταχθούν σε λειτουργικές κατηγορίες και επιμέρους λειτουργίες, με σκοπό να ερευνηθεί αν συμμετέχουν σε διεργασίες που να σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία του ενδοθηλίου και ενδεχομένως με την αθηροσκλήρωση. Τέτοιες για παράδειγμα η “κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός”, ο “κυτταρικός θάνατος και η επιβίωση”, η “φλεγμονώδης απόκριση”, ή η “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος”. Με απώτερο στόχο να εντοπιστούν πιθανά ρυθμιστικά ζεύγη miRNA-γονιδίων, που να τις ελέγχουν ή να τις επηρεάζουν.

4.2.4.1 Αποτελέσματα ανάλυσης των στόχων του miR-3188

Η πρώτη αξιολόγηση των υπό εξέταση γονιδίων έγινε με το Ingenuity Pathway Analysis, σκοπός της ανάλυσης ήταν η ταυτοποίηση των μοριακών και βιολογικών λειτουργιών στις οποίες συμμετέχουν, ώστε να εντοπιστούν εκείνες που επηρεάζονται από την αλλαγή έκφρασης των miRNAs που προκαλεί η rHDL-apoA-I. Πρώτο στάδιο της ανάλυσης είναι η επιτυχής αναγνώριση των ταυτοτήτων των υπό εξέταση μορίων και η αντιστοίχησή τους με μόρια καταχωρημένα στη βάση δεδομένων του προγράμματος (Ingenuity's knowledge base), στην οποία οργανώνονται τα αποδελτιωμένα δεδομένα χιλιάδων δημοσιεύσεων. Αφού φορτώθηκαν οι ταυτότητες των γονιδίων στόχων του miR-3188 η κεντρική ανάλυση του λογισμικού αντιστοίχησε επιτυχώς και τα 20 IDs των στόχων, σε γονίδια της βάσης δεδομένων του. Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης αυτών των γονιδίων που περιλαμβάνει την κυτταρική τοπολογία και την κύρια μοριακή ή βιολογική λειτουργία του κάθε γονιδίου ή του προϊόντος του με όρους Gene Ontology, παρουσιάζονται στον **πίνακα 4.12** που ακολουθεί.

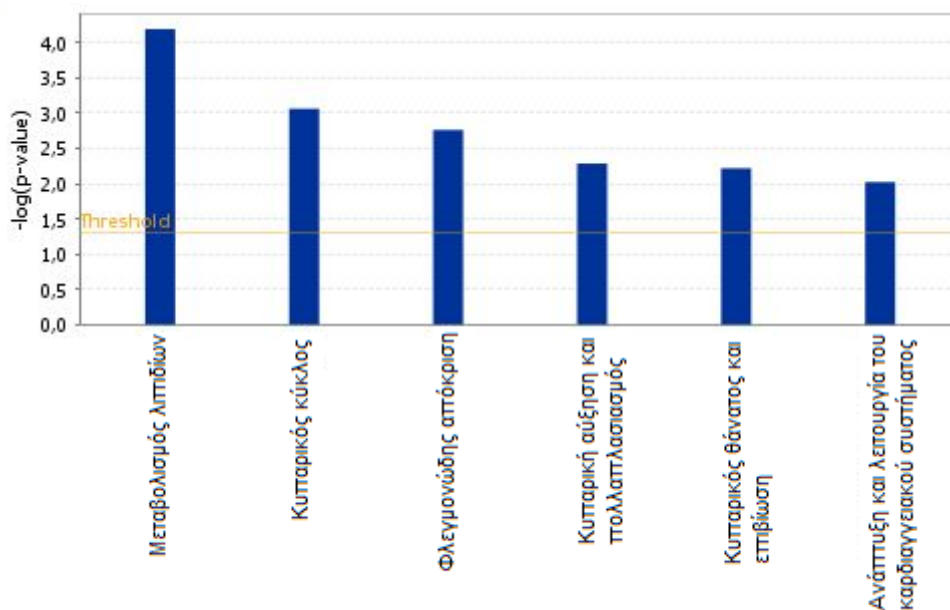
Πίνακας 4.12: Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης των στόχων του miR-3188.

Γονίδιο	FC	Όνομα Entrez Gene	Κυτταρική τοπολογία	Τύπος
ACSS2	2,331	acyl-CoA synthetase short chain family member 2	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
CKAP2L	-2,345	cytoskeleton associated protein 2 like	Κυτταρόπλασμα	Άλλο
CTH	3,199	cystathionine gamma-lyase	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
DHRS3	-2,538	dehydrogenase/reductase 3	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
EPSTI1	4,021	epithelial stromal interaction 1	Άλλο	Άλλο
EXO1	-3,402	exonuclease 1	Πυρήνας	Ένζυμο
FAM111B	-6,126	family with sequence similarity 111 member B	Άλλο	Άλλο
GINS2	-3,278	GINS complex subunit 2	Πυρήνας	Άλλο
HIST1H2AH	-3,146	histone cluster 1 H2A family member h	Πυρήνας	Άλλο
HMGR	2,438	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
IFIT1	3,135	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1	Κυτταρόπλασμα	Άλλο
ITGA11	2,505	integrin subunit alpha 11	Κυτταρική μεμβράνη	Άλλο
LIPG	3,420	lipase G, endothelial type	Εξωκυττάριος χώρος	Ένζυμο
MCM4	-4,264	minichromosome maintenance complex component 4	Πυρήνας	Ένζυμο
OAS2	2,645	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
PDK4	3,135	pyruvate dehydrogenase kinase 4	Κυτταρόπλασμα	Κινάση
RRM2	-2,394	ribonucleotide reductase regulatory subunit M2	Πυρήνας	Ένζυμο
SV2A	2,579	synaptic vesicle glycoprotein 2A	Κυτταρόπλασμα	Μεταφορέας
VIPR1	2,731	vasoactive intestinal peptide receptor 1	Κυτταρική μεμβράνη	G-protein συνδεδεμένος υποδοχέας
XAF1	2,672	XIAP associated factor 1	Πυρήνας	Ένζυμο

Ακολούθησε η αναζήτηση των πιο στατιστικά σημαντικών λειτουργικών κατηγοριών στις οποίες κατηγοριοποιούνται τα παραπάνω γονίδια, με βάση την IPA ανάλυση και χρησιμοποιώντας το Fisher's Exact Test αυτές που παρουσιάζουν $p\text{-value} \leq 0,05$, είναι συνολικά 40. Αυτές ποικίλουν από το “μεταβολισμό νουκλεϊκών οξέων” (8 γονίδια $p\text{-value}: 6,45 \times 10^{-5} - 2,23 \times 10^{-2}$) έως την “εμβρυακή ανάπτυξη” (1 γονίδιο, $p\text{-value}: 2,23 \times 10^{-2} - 2,23 \times 10^{-2}$). Από τις παραπάνω κατηγορίες κάποιες σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου και ενδεχομένως με την αθηροσκλήρωση. Σε αυτές περιλαμβάνονται ο “μεταβολισμός λιπιδίων” (6 γονίδια, $p\text{-value}: 6,45 \times 10^{-5} - 2,23 \times 10^{-2}$), ο “κυτταρικός κύκλος” (3 γονίδια, $p\text{-value}: 8,66 \times 10^{-4} - 6,91 \times 10^{-3}$), η “φλεγμονώδης απόκριση” (4 γονίδια, $p\text{-value}: 1,73 \times 10^{-3} - 1,92 \times 10^{-2}$), η “κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός” (2 γονίδια, $p\text{-value}: 5,19 \times 10^{-3} - 1,89 \times 10^{-2}$), ο “κυτταρικός θάνατος και επιβίωση” (3 γονίδια, $p\text{-value}: 6,05 \times 10^{-3} - 1,97 \times 10^{-2}$) και η “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος” (2 γονίδια, $p\text{-value}: 9,49 \times 10^{-3} - 2,06 \times 10^{-2}$). Οι λειτουργικές κατηγορίες αυτές παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 4.13** και το **Σχήμα 4.2**.

Πίνακας 4.13: Επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τις λειτουργίες του ενδοθηλίου και πιθανώς με την αθηροσκλήρωση και στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-3188.

Λειτουργική κατηγορία	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Μεταβολισμός λιπιδίων	$6,45 \times 10^{-5} - 2,23 \times 10^{-2}$	DHRS3, VIPR1, ACSS2, LIPG, HMGCR, PDK4	6
Κυτταρικός κύκλος	$8,66 \times 10^{-4} - 6,91 \times 10^{-3}$	CTH, EXO1, MCM4	3
Φλεγμονώδης απόκριση	$1,73 \times 10^{-3} - 1,92 \times 10^{-2}$	IFIT1, OAS2, RRM2, HMGCR	4
Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός	$5,19 \times 10^{-3} - 1,89 \times 10^{-2}$	CTH, HMGCR	2
Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση	$6,05 \times 10^{-3} - 1,97 \times 10^{-2}$	XAF1, CTH, EXO1	3
Ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος	$9,49 \times 10^{-3} - 2,06 \times 10^{-2}$	LIPG, CTH	2



Σχήμα 4.2: Ραβδόγραμμα επιλεγμένων λειτουργικών κατηγοριών των στόχων του miR-3188, που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση.

Ακολούθησε ο λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “μεταβολισμός λιπιδίων” που έχει το χαμηλότερο p-value και τον μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-3188. Ο σκοπός αυτής της διαδικασίας ήταν να εντοπιστούν οι ακριβείς λειτουργίες που αντιστοιχούν σε αυτήν ώστε να εντοπιστούν οι ακριβείς λειτουργίες που επηρεάζονται. Έτσι φάνηκε πως η κατηγορία αντιστοιχεί στις λειτουργίες: “σύνθεση ακετυλο-CoA” (2 γονίδια, p-value: $6,45 \times 10^{-5}$), “μετατροπή ακετυλο-CoA” (2 γονίδια, p-value: $6,45 \times 10^{-5}$), κατανάλωση ακετυλο-CoA (1 γονίδιο, p-value: $2,60 \times 10^{-3}$), “συσσώρευση λιπιδίων” (3 γονίδια, p-value: $8,32 \times 10^{-3}$) και “απελευθέρωση λιπαρών οξέων” (1 γονίδιο, p-value: $9,49 \times 10^{-3}$). **Πίνακας 4.14**

Ο λεπτομερής χαρακτηρισμός των επιλεγμένων λειτουργικών κατηγοριών οι οποίες σχετίζονται με τη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων ή την αθηροσκλήρωση και στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι των υπό εξέταση miRNAs, οι οποίες δεν αναλύονται στο παρόν υποκεφάλαιο είναι διαθέσιμος, στο **παράρτημα II** για όλα τα miRNAs.

Πίνακας 4.14: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “μεταβολισμός λιπιδίων”, που έχει το χαμηλότερο p-value και τον μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-3188.

Λειτουργική κατηγορία	Λειτουργία	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Μεταβολισμός λιπιδίων	Σύνθεση ακέτυλο-CoA	$6,45 \times 10^{-5}$	ACSS2, PDK4	2
	Μετατροπή ακέτυλο-CoA	$6,45 \times 10^{-5}$	ACSS2, HMGCR	2
	Κατανάλωση ακέτυλο-CoA	$2,60 \times 10^{-3}$	PDK4	1
	Συσσώρευση λιπιδίων	$8,32 \times 10^{-3}$	DHRS3, HMGCR, PDK4	3
	Απελευθέρωση λιπαρών οξέων	$9,49 \times 10^{-3}$	LIPG	1

4.2.4.2 Αποτελέσματα ανάλυσης των στόχων του miR-3185

Η «κεντρική ανάλυση» του λογισμικού του Ingenuity αντιστόχησε επιτυχώς και τα 30 IDs των γονιδίων, σε γονίδια της βάσης δεδομένων του. Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης αυτών των γονιδίων που περιλαμβάνει την κυτταρική τοπολογία και την κύρια μοριακή ή βιολογική λειτουργία του κάθε γονιδίου ή του προϊόντος του με όρους Gene Ontology, παρουσιάζονται στον **πίνακα 4.14** που ακολουθεί.

Πίνακας 4.15: Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης των στόχων του miR-3185.

Γονίδιο	FC	Όνομα Entrez Gene	Κυτταρική τοπολογία	Τύπος
APOBEC3B	-2,179	apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3B	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
BMP2	-2,086	bone morphogenetic protein 2	Εξωκυττάριος χώρος	Αυξητικός παράγοντας
CDK1	-2,084	cyclin dependent kinase 1	Πυρήνας	κινάση
CKAP2L	-2,179	cytoskeleton associated protein 2 like	Κυτταρόπλασμα	Άλλο
CLSPN	-2,152	claspin	Πυρήνας	Άλλο
CTH	2,125	cystathionine gamma-lyase	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
CYP51A1	2,469	cytochrome P450 family 51 subfamily A member 1	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
FST	-2,281	follistatin	Εξωκυττάριος	Άλλο

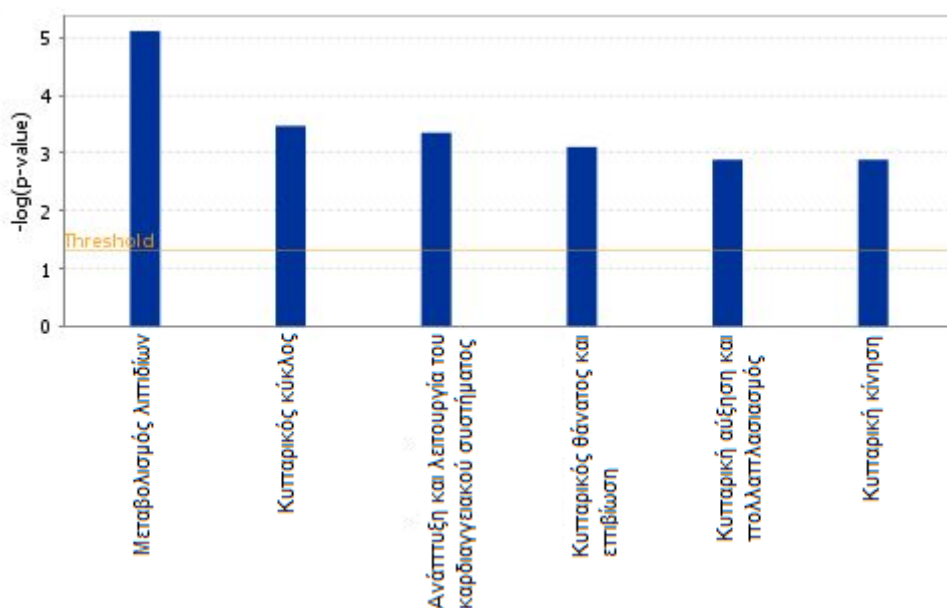
			χώρος	
GINS2	-2,852	GINS complex subunit 2	Πυρήνας	Άλλο
AGPAT9	2,049	glycerol-3-phosphate acyltransferase 3	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
HELLS	-2,701	helicase, lymphoid specific	Πυρήνας	Ένζυμο
HIST1H2AI	-2,739	histone cluster 1 H2A family member i	Πυρήνας	Άλλο
HIST1H3H	-2,454	histone cluster 1 H3 family member h	Πυρήνας	Άλλο
HMGCR	2,438	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
HTR1D	1,998	5-hydroxytryptamine receptor 1D	Κυτταρική μεμβράνη	G-protein συνδεδεμένος υποδοχέας
IFI44L	11,572	interferon induced protein 44 like	Πυρήνας	Άλλο
IFIT1	4,024	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1	Κυτταρόπλασμα	Άλλο
INSIG1	2,957	insulin induced gene 1	Κυτταρόπλασμα	Άλλο
MCM10	-2,741	minichromosome maintenance 10 replication initiation factor	Πυρήνας	Άλλο
MMP10	-2,131	matrix metalloproteinase 10	Εξωκυττάριος χώρος	Πεπτιδάση
MT1E	-3,535	metallothionein 1E	Άλλο	Άλλο
PARP9	3,025	poly(ADP-ribose) polymerase family member 9	Πυρήνας	Ένζυμο
PLAT	-2,903	plasminogen activator, tissue type	Εξωκυττάριος χώρος	Πεπτιδάση
PSAT1	2,988	phosphoserine aminotransferase 1	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
RRM2	-2,394	ribonucleotide reductase regulatory subunit M2	Πυρήνας	Ένζυμο
SHCBP1	-2,372	SHC binding and spindle associated 1	Άλλο	Άλλο
SLC25A20	2,167	solute carrier family 25 member 20	Κυτταρόπλασμα	Μεταφορέας
STARD4	2,091	StAR related lipid transfer domain containing 4	Κυτταρόπλασμα	Μεταφορέας

XAF1	2,672	XIAP associated factor 1	Πυρήνας	Άλλο
XRCC2	-2,266	X-ray repair cross complementing 2	Πυρήνας	Ένζυμο

Με βάση την IPA ανάλυση οι πιο στατιστικά σημαντικές λειτουργικές κατηγορίες, με βάση το Fisher's Exact Test και $p\text{-value} \leq 0,05$, στις οποίες κατηγοριοποιούνται τα γονίδια είναι συνολικά 26, και ποικίλουν από το “μεταβολισμό λιπιδίων” (7 γονίδια $p\text{-value}$: $7,68 \times 10^{-6}$ - $1,03 \times 10^{-2}$) έως το “μεταβολισμό φαρμάκων” (2 γονίδια, $p\text{-value}$: $9,93 \times 10^{-3}$ - $9,93 \times 10^{-3}$). Από τις παραπάνω κατηγορίες πολλές σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου και ενδεχομένως με την αθηροσκλήρωση. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται: “ο μεταβολισμός λιπιδίων”, ο “κυτταρικός κύκλος” (6 γονίδια, $p\text{-value}$: $3,38 \times 10^{-4}$ - $1,06 \times 10^{-2}$), η “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος” (6 γονίδια, $p\text{-value}$: $4,43 \times 10^{-4}$ - $1,16 \times 10^{-2}$), ο “κυτταρικός θάνατος και επιβίωση” (15 γονίδια, $p\text{-value}$: $7,82 \times 10^{-4}$ - $1,03 \times 10^{-2}$), η “κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός” (7 γονίδια, $p\text{-value}$: $1,3 \times 10^{-3}$ - $1,16 \times 10^{-2}$) και η “κυτταρική κίνηση” (6 γονίδια, $p\text{-value}$: $1,3 \times 10^{-3}$ - $5,19 \times 10^{-3}$). Οι λειτουργικές κατηγορίες αυτές παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.16** και το **Σχήμα 4.3**.

Πίνακας 4.16: Επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τις λειτουργίες του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση και στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-3185.

Λειτουργική κατηγορία	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Μεταβολισμός λιπιδίων	$7,68 \times 10^{-6}$ - $1,03 \times 10^{-2}$	INSIG1, BMP2, GPAT3, HMGCR, STARD4, CYP51A1, PLAT	7
Κυτταρικός κύκλος	$3,38 \times 10^{-4}$ - $1,06 \times 10^{-2}$	XRCC2, BMP2, MCM10, CLSPN, CTH, CDK1	6
Ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος	$4,43 \times 10^{-4}$ - $1,16 \times 10^{-2}$	BMP2, RRM2, MMP10, CTH, CYP51A1, PLAT	6
Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση	$7,82 \times 10^{-4}$ - $1,03 \times 10^{-2}$	XRCC2, APOBEC3B, FST, INSIG1, BMP2, XAF1, RRM2, MMP10, MCM10, CLSPN, HELLS, CTH, HMGCR, CDK1, PLAT	15
Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός	$1,3 \times 10^{-3}$ - $1,16 \times 10^{-2}$	FST, BMP2, RRM2, CTH, HMGCR, CDK1, PLAT	7
Κυτταρική κίνηση	$1,3 \times 10^{-3}$ - $5,19 \times 10^{-3}$	FST, BMP2, RRM2, PARP9, CDK1, PLAT	6



Σχήμα 4.3: Ραβδόγραμμα λειτουργικών κατηγοριών των στόχων του miR-3185, που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση.

Ο λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “μεταβολισμός λιπιδίων” η οποία παρουσιάζει το χαμηλότερο p-value ανάμεσα στις επιλεγμένες, έδειξε πως τα γονίδια της συμμετέχουν σε 9 λειτουργίες: τη "σύνθεση στερολών" (4 γονίδια, p-value: $7,68 \times 10^{-6}$), τη "σύνθεση στεροειδών" (5 γονίδια, p-value: $1,15 \times 10^{-4}$), τη "σύνθεση χοληστερόλης" (3 γονίδια, p-value: $1,36 \times 10^{-4}$), το "μεταβολισμό στεροειδών" (4 γονίδια, p-value: $9,46 \times 10^{-4}$), την "ποσότητα στεροειδών" (5 γονίδια, p-value: $2,32 \times 10^{-3}$), τη "συγκέντρωση χοληστερόλης" (4 γονίδια, p-value: $2,55 \times 10^{-3}$), τη "σύνθεση λιπιδίων" (6 γονίδια, p-value: $3,18 \times 10^{-3}$), τη "συσσώρευση λιπιδίων" (4 γονίδια, p-value: $3,57 \times 10^{-3}$) και την "ομοιοστάση της χοληστερόλης" (2 γονίδια, p-value: $1,03 \times 10^{-2}$). **Πίνακας 4.17.**

Πίνακας 4.17: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “Μεταβολισμός λιπιδίων” που έχει το χαμηλότερο p-value, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-3185.

Λειτουργική κατηγορία	Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Μεταβολισμός λιπιδίων	Σύνθεση στερολών	$7,68 \times 10^{-6}$	CYP51A1, HMGCR, INSIG1, STARD4	4
	Σύνθεση στεροειδών	$1,15 \times 10^{-4}$	BMP2, CYP51A1, HMGCR, INSIG1, STARD4	5
	Σύνθεση	$1,36 \times 10^{-4}$	CYP51A1, HMGCR,	3

χοληστερόλης		INSIG1	
Μεταβολισμός στεροειδών	$9,46 \times 10^{-4}$	BMP2, CYP51A1, HMGCR, INSIG1	4
Ποσότητα στεροειδών	$2,32 \times 10^{-3}$	GPAT3, HMGCR, INSIG1, PLAT, STARD4	5
Συγκέντρωση χοληστερόλης	$2,55 \times 10^{-3}$	GPAT3, HMGCR, INSIG1, STARD4	4
Σύνθεση λιπιδίων	$3,18 \times 10^{-3}$	BMP2, CYP51A1, GPAT3, HMGCR, INSIG1, STARD4	6
Συσσώρευση λιπιδίων	$3,57 \times 10^{-3}$	BMP2, GPAT3, HMGCR, INSIG1	4
Ομοιόσταση της χοληστερόλης	$1,03 \times 10^{-2}$	HMGCR, INSIG1	2

4.2.4.3 Αποτελέσματα ανάλυσης των στόχων του miR-1231

Η «κεντρική ανάλυση» του λογισμικού του Ingenuity αντιστοίχησε επιτυχώς και τα 23 IDs των στόχων, σε γονίδια της βάσης δεδομένων του. Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης αυτών των γονιδίων που περιλαμβάνει την κυτταρική τοπολογία και την κύρια μοριακή ή βιολογική λειτουργία του κάθε γονιδίου ή του προϊόντος του με όρους Gene Ontology, παρουσιάζονται στον **πίνακα 4.18** που ακολουθεί.

Πίνακας 4.18: Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης των στόχων του miR-1231.

Γονίδιο	FC	Όνομα Entrez Gene	Κυτταρική τοπολογία	Τύπος
BMP2	-2,086	bone morphogenetic protein 2	Εξωκυττάριος χώρος	Αυξητικός παράγοντας
CHAC1	4,041	ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
CTH	2,125	cystathionine gamma-lyase	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
CYP1A1	2,530	cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
GINS1	-2,066	GINS complex subunit 1	Πυρήνας	Άλλο
GINS2	-2,852	GINS complex subunit 2	Πυρήνας	Άλλο
HELLS	-2,701	helicase, lymphoid specific	Πυρήνας	Ένζυμο
HIST1H2AB	-2,457	histone cluster 1 H2A family member b	Πυρήνας	Άλλο
HIST1H2AH	-2,618	histone cluster 1 H2A	Πυρήνας	Άλλο

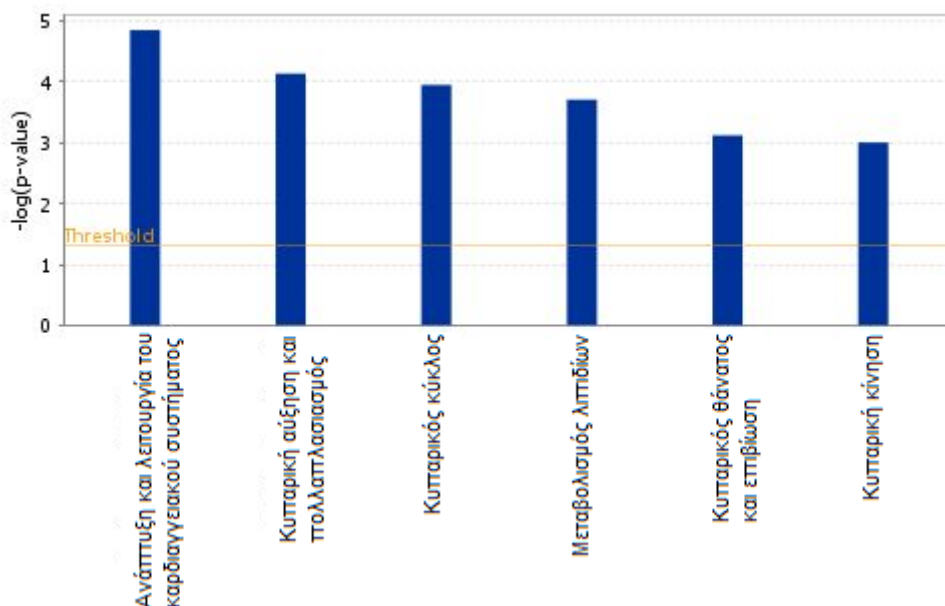
		family member h		
HIST1H2BF	-2,864	histone cluster 1 H2B family member f	Πυρήνας	Άλλο
IFI44L	11,572	interferon induced protein 44 like	Πυρήνας	Άλλο
ITGB8	-2,601	integrin subunit beta 8	Κυτταρική μεμβράνη	Άλλο
KIF11	-2,158	kinesin family member 11	Πυρήνας	Άλλο
LDLR	2,159	low density lipoprotein receptor	Κυτταρική μεμβράνη	Μεταφορέας
LIPG	3,420	lipase G, endothelial type	Εξωκυττάριος χώρος	Ένζυμο
MCM5	-2,048	minichromosome maintenance complex component 5	Πυρήνας	Ένζυμο
MKI67	-2,084	marker of proliferation Ki-67	Πυρήνας	Άλλο
OAS2	2,645	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
PARP9	3,025	poly(ADP-ribose) polymerase family member 9	Πυρήνας	Ένζυμο
PNPLA3	3,307	patatin like phospholipase domain containing 3	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
SLC7A5	2,244	solute carrier family 7 member 5	Κυτταρική μεμβράνη	Μεταφορέας
TGFB2	-2,211	transforming growth factor beta 2	Εξωκυττάριος χώρος	Αυξητικός παράγοντας
XRCC2	-2,266	X-ray repair cross complementing 2	Πυρήνας	Ένζυμο

Οι πιο στατιστικά σημαντικές λειτουργικές κατηγορίες γονιδίων, με βάση την IPA ανάλυση, χρησιμοποιώντας το Fisher's Exact Test και $p\text{-value} \leq 0,05$ στις οποίες κατηγοριοποιούνται οι στόχοι του miR-1231 είναι συνολικά 29, και ποικίλουν από την “κυτταρική ανάπτυξη” (9 γονίδια, $p\text{-value}: 7,35 \times 10^{-5} - 1,29 \times 10^{-2}$), έως τη “μετα-μεταγραφική τροποποίηση του RNA” (1 γονίδιο, $p\text{-value}: 1,09 \times 10^{-2} - 1,09 \times 10^{-2}$). Από τις παραπάνω κατηγορίες, αυτές που σχετίζονται περισσότερο με τη λειτουργία του ενδοθηλίου και ενδεχομένως με την αθηροσκλήρωση είναι οι: “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος” (5 γονίδια, $p\text{-value}: 1,42 \times 10^{-5} - 1,19 \times 10^{-2}$), “κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός” (9 γονίδια, $p\text{-value}: 7,35 \times 10^{-4} - 1,14 \times 10^{-2}$), “κυτταρικός κύκλος” (7 γονίδια, $p\text{-value}: 1,13 \times 10^{-4} - 1,22 \times 10^{-2}$), “μεταβολισμός λιπιδίων” (6 γονίδια, $p\text{-value}: 1,97 \times 10^{-4} - 1,29 \times 10^{-2}$), “κυτταρικός θάνατος και επιβίωση” (7

γονίδια, p-value: $7,6 \times 10^{-4}$ - $9,92 \times 10^{-3}$) και “κυτταρική κίνηση” (4 γονίδια, p-value: $9,96 \times 10^{-4}$ - $1,19 \times 10^{-2}$). Αναλυτικά στον **Πίνακα 4.19** και το **Σχήμα 4.4**.

Πίνακας 4.19: Επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τις λειτουργίες του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση και στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-1231.

Λειτουργική κατηγορία	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος	$1,42 \times 10^{-5}$ - $1,19 \times 10^{-2}$	LDLR, BMP2, TGFB2, CTH, ITGB8	5
Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός	$7,35 \times 10^{-4}$ - $1,14 \times 10^{-2}$	XRCC2, CYP1A1, LDLR, BMP2, TGFB2, SLC7A5, MKI67, CTH, ITGB8	9
Κυτταρικός κύκλος	$1,13 \times 10^{-4}$ - $1,22 \times 10^{-2}$	XRCC2, BMP2, TGFB2, HELLS, MKI67, CTH, KIF11	7
Μεταβολισμός λιπιδίων	$1,97 \times 10^{-4}$ - $1,29 \times 10^{-2}$	CYP1A1, LDLR, BMP2, LIPG, PNPLA3, ITGB8	6
Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση	$7,6 \times 10^{-4}$ - $9,92 \times 10^{-3}$	XRCC2, BMP2, TGFB2, MKI67, CTH, ITGB8, KIF11	7
Κυτταρική κίνηση	$9,96 \times 10^{-4}$ - $1,19 \times 10^{-2}$	LDLR, BMP2, TGFB2, PARP9	4



Σχήμα 4.4: Ραβδόγραμμα λειτουργικών κατηγοριών των στόχων του miR-1231 που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση.

Ο λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος”, που παρουσιάζει το χαμηλότερο p-value ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες, έδειξε πως τα γονίδια της συμμετέχουν σε 28 λειτουργίες, η πλειοψηφία των οποίων αναφέρονται στην ανάπτυξη και διαμόρφωση του καρδιαγγειακού συστήματος κατά την εμβρυακή φάση (πχ μορφογένεση των κολποκοιλιακών βαλβίδων – morphogenesis of atrioventricular valve, αγγείωση του λεκιθικού σάκου – vascularization of yolk sac κα). Περιλαμβάνονται όμως και λειτουργίες που παραμένουν ενεργές και στην ενήλικη ζωή και πιο συγκεκριμένα οι: “αγγειογένεση των οστών” (2 γονίδια, p-value: $1,42 \times 10^{-5}$), “διαφοροποίηση των αγγειακών λείων μυοκυττάρων” (2 γονίδια, p-value: $2,81 \times 10^{-4}$), “διατήρηση του ελαστικού χιτώνα των αγγείων” (preservation of elastic lamina, 1 γονίδιο, p-value: $1,99 \times 10^{-3}$), “διατομή του έσω χιτώνα των αγγείων” (thickness of tunica intima, 1 γονίδιο, p-value: $3,98 \times 10^{-3}$) και “αγγειοδιαστολή των αρτηριών” (2 γονίδια, p-value: $4,26 \times 10^{-3}$). **Πίνακας 4.19**

Πίνακας 4.20: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος”, που έχει το χαμηλότερο p-value, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-1231

Λειτουργική κατηγορία	Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος	Αγγειογένεση των οστών	$1,42 \times 10^{-5}$	BMP2, TGFB2	2
	Διαφοροποίηση των αγγειακών λείων μυοκυττάρων	$2,81 \times 10^{-4}$	BMP2, LDLR	2
	Διατήρηση του ελαστικού χιτώνα των αγγείων	$1,99 \times 10^{-3}$	LDLR	1
	Διατομή του έσω χιτώνα των αγγείων	$3,98 \times 10^{-3}$	LDLR	1
	Αγγειοδιαστολή των αρτηριών	$4,26 \times 10^{-3}$	CTH, LDLR	2

4.2.4.4 Αποτελέσματα ανάλυσης των στόχων του miR-2861

Η «κεντρική ανάλυση» του λογισμικού του Ingenuity αντιστοίχησε επιτυχώς και τα 26 IDs των στόχων, σε γονίδια της βάσης δεδομένων του. Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης αυτών των γονιδίων που περιλαμβάνει την κυτταρική τοπολογία και την κύρια μοριακή ή βιολογική λειτουργία του κάθε γονιδίου ή του προϊόντος του με όρους Gene Ontology, παρουσιάζονται στον **πίνακα 4.21** που ακολουθεί.

Πίνακας 4.21: Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης των στόχων του miR-2861.

Γονίδιο	FC	Όνομα Entrez Gene	Κυτταρική τοπολογία	Τύπος
ANGPTL4	6,502	angiopoietin like 4	Εξωκυττάριος χώρος	Άλλο
BRCA1	-2,049	BRCA1,DNA repair associated	Πυρήνας	Μεταγραφικός παράγοντας
CHAC1	4,041	ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
EXO1	-2,673	exonuclease 1	Πυρήνας	Ένζυμο
FST	-2,281	follistatin	Εξωκυττάριος χώρος	Άλλο
HELLS	-2,701	helicase, lymphoid specific	Πυρήνας	Ένζυμο
HMGCR	2,438	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
HTR1D	1,998	5-hydroxytryptamine receptor 1D	Κυτταρική μεμβράνη	G-protein συνδεδεμένος υποδοχέας
IFI44L	11,572	interferon induced protein 44 like	Πυρήνας	Άλλο
ITGA11	2,505	integrin subunit alpha 11	Κυτταρική μεμβράνη	Άλλο
LDLR	2,159	low density lipoprotein receptor	Κυτταρική μεμβράνη	Μεταφορέας
LIPG	3,420	lipase G, endothelial type	Εξωκυττάριος χώρος	Ένζυμο
MCM5	-2,048	minichromosome maintenance complex component 5	Πυρήνας	Ένζυμο
MELK	-2,235	maternal embryonic leucine zipper kinase	Κυτταρόπλασμα	Κινάση
MT1F	-2,296	metallothionein 1F	Άλλο	Άλλο
MVK	2,661	mevalonate kinase	Κυτταρόπλασμα	Κινάση
PARP9	3,025	poly(ADP-ribose) polymerase family member 9	Πυρήνας	Ένζυμο
PDK4	3,135	pyruvate dehydrogenase kinase 4	Κυτταρόπλασμα	Κινάση
PNPLA3	3,307	patatin like phospholipase domain containing 3	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
SLC25A20	2,167	solute carrier family 25 member 20	Κυτταρόπλασμα	Μεταφορέας
SLC7A5	2,244	solute carrier family 7	Κυτταρική	Μεταφορέας

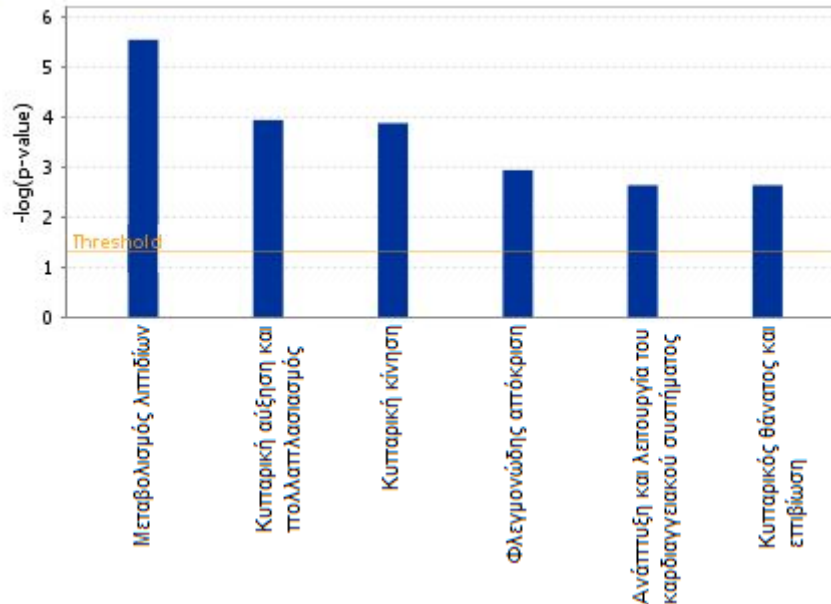
		member 5	μεμβράνη	
STARD4	2,091	StAR related lipid transfer domain containing 4	Κυτταρόπλασμα	Μεταφορέας
SV2A	2,579	synaptic vesicle glycoprotein 2A	Κυτταρόπλασμα	Μεταφορέας
TRIP13	-2,006	thyroid hormone receptor interactor 13	Κυτταρόπλασμα	Μεταγραφικός παράγοντας
XRCC2	-2,266	X-ray repair cross complementing 2	Πυρήνας	Ένζυμο

Οι πιο στατιστικά σημαντικές λειτουργικές κατηγορίες γονιδίων, με βάση την IPA ανάλυση, χρησιμοποιώντας το Fisher's Exact Test και $p\text{-value} \leq 0,05$, στις οποίες κατηγοριοποιούνται τα γονίδια είναι 49 και ποικίλουν από το “μεταβολισμό λιπιδίων” (10 γονίδια, $p\text{-value}: 2,88 \times 10^{-6} - 1,16 \times 10^{-2}$) έως τη “μέτα-μεταφραστική τροποποίηση” (1 γονίδιο, $p\text{-value}: 1,15 \times 10^{-2} - 1,15 \times 10^{-2}$). Από τις παραπάνω κατηγορίες, αυτές που σχετίζονται περισσότερο με τη λειτουργία του ενδοθηλίου και ενδεχομένως με την αθηροσκλήρωση είναι οι: “μεταβολισμός λιπιδίων”, “κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός” (10 γονίδια, $p\text{-value}: 1,15 \times 10^{-4} - 9,2 \times 10^{-3}$), “κυτταρική κίνηση” (9 γονίδια, $p\text{-value}: 1,33 \times 10^{-4} - 1,04 \times 10^{-2}$), “φλεγμονώδης απόκριση” (3 γονίδια, $p\text{-value}: 1,15 \times 10^{-3} - 1,15 \times 10^{-2}$), “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος” (2 γονίδια, $p\text{-value}: 2,31 \times 10^{-3} - 9,38 \times 10^{-3}$) και “κυτταρικός θάνατος και επιβίωση” (12 γονίδια, $p\text{-value}: 2,31 \times 10^{-3} - 1,15 \times 10^{-2}$). Αναλυτικότερα στον **Πίνακα 4.22** και το **Σχήμα 4.5**.

Πίνακας 4.22: Επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τις λειτουργίες του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση και στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-2861.

Λειτουργική κατηγορία	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Μεταβολισμός λιπιδίων	$2,88 \times 10^{-6} - 1,16 \times 10^{-2}$	FST, ANGPTL4, LDLR, MVK, PNPLA3, LIPG, BRCA1, HMGCR, STARD4, PDK4	10
Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός	$1,15 \times 10^{-4} - 9,2 \times 10^{-3}$	XRCC2, LDLR, ANGPTL4, FST, SLC7A5, MELK, HELLS, BRCA1, HMGCR, PDK4	10
Κυτταρική κίνηση	$1,33 \times 10^{-4} - 1,04 \times 10^{-2}$	LDLR, ANGPTL4, FST, ITGA11, MT1F, BRCA1, HMGCR, PARP9, PDK4	9
Φλεγμονώδης απόκριση	$1,15 \times 10^{-3} - 1,15 \times 10^{-2}$	LDLR, MVK, HMGCR	3
Ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού	$2,31 \times 10^{-3} - 9,38 \times 10^{-3}$	LDLR, ITGA11	2

συστήματος			
Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση	$2,31 \times 10^{-3}$ - $1,15 \times 10^{-2}$	XRCC2, LDLR, FST, ANGPTL4, MVK, MT1F, MELK, HELLS, HMGCR, BRCA1, EXO1, PDK4	12



Σχήμα 4.5: Ραβδόγραμμα λειτουργικών κατηγοριών των στόχων του miR-2861, που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση.

Ο λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “μεταβολισμός λιπιδίων”, αυτής που παρουσιάζει το χαμηλότερο p-value από τις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες, έδειξε πως τα γονίδια της συμμετέχουν σε 17 λειτουργίες. Λόγω του πλήθους τους και για την καλύτερη παρουσίαση των αποτελεσμάτων, επιλέξαμε να παρουσιάσουμε τις επιμέρους λειτουργίες μοιρασμένες με βάση το αν συμμετέχουν στο μεταβολισμό χοληστερόλης ή το μεταβολισμό λιπιδίων. Στην υποκατηγορία του μεταβολισμού χοληστερόλης περιλαμβάνονται οι επιμέρους λειτουργίες: η “σύνθεση στερολών” (4 γονίδια, p-value: $2,88 \times 10^{-6}$), η “πρόσληψη χοληστερόλης” (2 γονίδια, p-value: $5,73 \times 10^{-5}$), η “σύνθεση χοληστερόλης” (3 γονίδια, p-value: $6,49 \times 10^{-5}$), η “συγκέντρωση χοληστερόλης” (5 γονίδια, p-value: $7,94 \times 10^{-5}$), η “ανάστροφη μεταφορά χοληστερόλης” (2 γονίδια, p-value: $2,65 \times 10^{-4}$), η “ομοιοστάση της χοληστερόλης” (3 γονίδια, p-value: $3,08 \times 10^{-4}$), η “μεταφορά χοληστερόλης” (3 γονίδια, p-value: $7,10 \times 10^{-4}$), η “εστεροποίηση χοληστερόλης” (2 γονίδια, p-value: $8,77 \times 10^{-4}$) και η “συγκέντρωση εστέρων χοληστερόλης” (2 γονίδια, p-value: $9,24 \times 10^{-4}$). **Πίνακας 4.23.** Στην υποκατηγορία του μεταβολισμού λιπιδίων περιλαμβάνονται: η “συγκέντρωση λιπιδίων” (8 γονίδια, p-value: $3,96 \times 10^{-5}$), η “σύνθεση λιπιδίων” (7 γονίδια, p-value: $9,89 \times 10^{-5}$), η “συγκέντρωση τριγλυκεριδίων” (5 γονίδια, p-value: $1,16 \times 10^{-4}$), η “ομοιοστάση

λιπιδίων” (4 γονίδια, p-value: $1,58 \times 10^{-4}$), η “εκκαθάριση τριγλυκεριδίων” (2 γονίδια, p-value: $1,94 \times 10^{-4}$), ο “μεταβολισμός λιπαρών οξέων” (6 γονίδια, p-value: $2,29 \times 10^{-4}$), η “εκκαθάριση λιπιδίων” (2 γονίδια, p-value: $4,75 \times 10^{-4}$) και η “υδρόλυση τριγλυκεριδίων” (2 γονίδια, p-value: $7,02 \times 10^{-4}$). **Πίνακας 4.24.**

Πίνακας 4.23: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της υποκατηγορίας “μεταβολισμός χοληστερόλης” της λειτουργικής κατηγορίας “μεταβολισμός λιπιδίων”, που έχει το χαμηλότερο p-value, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-2861.

Λειτουργική κατηγορία	Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Μεταβολισμός χοληστερόλης	Σύνθεση στερολών	$2,88 \times 10^{-6}$	HMGCR, LDLR, MVK, STARD4	4
	Πρόσληψη χοληστερόλης	$5,73 \times 10^{-5}$	LDLR, STARD4	2
	Σύνθεση χοληστερόλης	$6,49 \times 10^{-5}$	HMGCR, LDLR, MVK	3
	Συγκέντρωση χοληστερόλης	$7,94 \times 10^{-5}$	ANGPTL4, HMGCR, LDLR, LIPG, STARD4	5
	Ανάστροφη μεταφορά χοληστερόλης	$2,65 \times 10^{-4}$	LDLR, LIPG	2
	Ομοιοστάση χοληστερόλης	$3,08 \times 10^{-4}$	HMGCR, LDLR, LIPG	3
	Μεταφορά χοληστερόλης	$7,10 \times 10^{-4}$	LDLR, LIPG, STARD4	3
	Εστεροποίηση χοληστερόλης	$8,77 \times 10^{-4}$	LDLR, STARD4	2
	Συγκέντρωση εστέρων χοληστερόλης	$9,24 \times 10^{-4}$	LDLR, STARD4	2

Πίνακας 4.24: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της υποκατηγορίας “μεταβολισμός λιπιδίων” της λειτουργικής κατηγορίας “μεταβολισμός λιπιδίων”, που έχει το χαμηλότερο p-value, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-2861

Λειτουργική κατηγορία	Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Μεταβολισμός λιπιδίων	Συγκέντρωση λιπιδίων	$3,96 \times 10^{-5}$	ANGPTL4, BRCA1, HMGCR, LDLR, LIPG, PDK4, PNPLA3, STARD4	8
	Σύνθεση λιπιδίων	$9,89 \times 10^{-5}$	BRCA1, HMGCR, LDLR, MVK, PDK4, PNPLA3, STARD4	7
	Συγκέντρωση	$1,16 \times 10^{-4}$	ANGPTL4, LDLR,	5

τριγλυκεριδίων		LIPG, PDK4, PNPLA3	
Ομοίωση λιπιδίων	1,58x10 ⁻⁴	ANGPTL4, HMGCR, LDLR, LIPG	4
Εκκαθάριση τριγλυκεριδίων	1,94x10 ⁻⁴	ANGPTL4, LDLR	2
Μεταβολισμός λιπαρών οξέων	2,29x10 ⁻⁴	BRCA1, LDLR, LIPG, PDK4, PNPLA3, STARD4	6
Εκκαθάριση λιπιδίων	4,75x10 ⁻⁴	LDLR, PDK4	2
Υδρόλυση τριγλυκεριδίων	7,02x10 ⁻⁴	ANGPTL4, LIPG	2

4.2.4.5 Αποτελέσματα ανάλυσης των στόχων του 1915

Η «κεντρική ανάλυση» του λογισμικού του Ingenuity αντιστοίχησε επιτυχώς και τα 17 IDs των στόχων, σε γονίδια της βάσης δεδομένων του. Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης αυτών των γονιδίων που περιλαμβάνει την κυτταρική τοπολογία και την κύρια μοριακή ή βιολογική λειτουργία του κάθε γονιδίου ή του προϊόντος του με όρους Gene Ontology, παρουσιάζονται στον **πίνακα 4.25** που ακολουθεί.

Πίνακας 4.25: Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης των στόχων του miR-1915

Γονίδιο	FC	Όνομα Entrez Gene	Κυτταρική τοπολογία	Τύπος
ADAMTS4	2,103	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 4	Εξωκυττάριος χώρος	Πεπτιδάση
ANGPTL4	6,502	angiopoietin like 4	Εξωκυττάριος χώρος	Άλλο
BRCA1	-2,049	BRCA1, DNA repair associated	Πυρήνας	Ρυθμιστής της μεταγραφής
CHAC1	4,041	ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
DHRS3	-2,538	dehydrogenase/reductase 3	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
HIST1H2AH	-2,618	histone cluster 1 H2A family member h	Πυρήνας	Άλλο
HIST1H3F	-2,028	histone cluster 1 H3 family member f	Πυρήνας	Άλλο
HMGCS1	2,820	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο

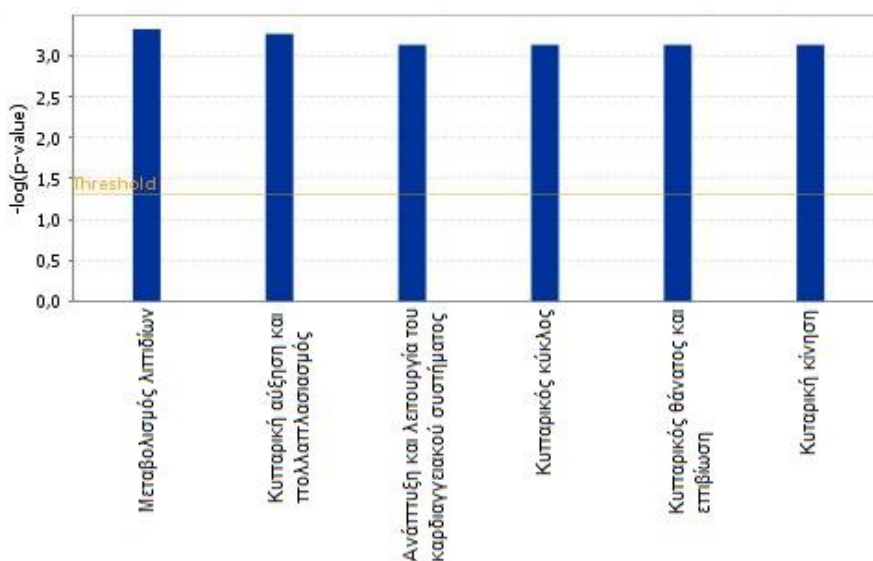
ITGA11	2,505	integrin subunit alpha 11	Κυτταρική μεμβράνη	Άλλο
LIPG	3,420	lipase G, endothelial type	Εξωκυττάριος χώρος	Ένζυμο
MCM5	-2,048	minichromosome maintenance complex component 5	Πυρήνας	Ένζυμο
MVK	2,661	mevalonate kinase	Κυτταρόπλασμα	Κινάση
OAS2	2,645	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
PLAT	-2,903	plasminogen activator, tissue type	Εξωκυττάριος χώρος	Πεπτιδάση
SLC7A5	2,244	solute carrier family 7 member 5	Κυτταρική μεμβράνη	Μεταφορέας
SV2A	2,579	synaptic vesicle glycoprotein 2A	Κυτταρόπλασμα	Μεταφορέας
VIPR1	2,731	vasoactive intestinal peptide receptor 1	Κυτταρική μεμβράνη	G-protein συνδεδεμένος υποδοχέας

Με βάση την IPA ανάλυση, Fisher's Exact Test και $p\text{-value} \leq 0,05$, τα παραπάνω γονίδια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 26 πιο στατιστικά σημαντικές λειτουργικές κατηγορίες. Αυτές ποικίλουν από το “μεταβολισμό λιπιδίων” (7 γονίδια, $p\text{-value}: 4,74 \times 10^{-5} - 4,88 \times 10^{-2}$) έως τη “διακίνηση πρωτεϊνών” (1 γονίδιο, $p\text{-value}: 4,05 \times 10^{-2} - 4,05 \times 10^{-2}$). Από τις παραπάνω κατηγορίες αυτές που σχετίζονται περισσότερο με τη λειτουργία του ενδοθηλίου και ενδεχομένως με την αθηροσκλήρωση είναι οι: “μεταβολισμός λιπιδίων”, “κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός” (7 γονίδια, $p\text{-value}: 5,41 \times 10^{-4} - 4,72 \times 10^{-2}$), “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος” (5 γονίδια, $p\text{-value}: 7,36 \times 10^{-4} - 4,82 \times 10^{-2}$), “κυτταρικός κύκλος” (1 γονίδιο, $p\text{-value}: 7,36 \times 10^{-4} - 4,82 \times 10^{-2}$), “κυτταρικός θάνατος και επιβίωση” (4 γονίδια, $p\text{-value}: 7,36 \times 10^{-4} - 4,33 \times 10^{-2}$), και “κυτταρική κίνηση” (4 γονίδια, $p\text{-value}: 7,36 \times 10^{-4} - 4,61 \times 10^{-2}$). Αναλυτική παρουσίαση των ανωτέρων αποτελεσμάτων στον **Πίνακα 4.26** και το **Σχήμα 4.6**.

Πίνακας 4.26: Επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τις λειτουργίες του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση και στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-1915.

Λειτουργική κατηγορία	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Μεταβολισμός λιπιδίων	$4,74 \times 10^{-5} - 4,88 \times 10^{-2}$	DHRS3, ANGPTL4, VIPR1, MVK, LIPG, BRCA1, PLAT	7
Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός	$5,41 \times 10^{-4} - 4,72 \times 10^{-2}$	SV2A, ANGPTL4, VIPR1, SLC7A5, BRCA1, ADAMTS4, PLAT	7

Ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος	$7,36 \times 10^{-4}$ - $4,82 \times 10^{-2}$	DHRS3, ANGPTL4, ITGA11, LIPG, PLAT	5
Κυτταρικός κύκλος	$7,36 \times 10^{-4}$ - $4,82 \times 10^{-2}$	BRCA1	1
Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση	$7,36 \times 10^{-4}$ - $4,33 \times 10^{-2}$	MVK, BRCA1, HMGCS1, PLAT	4
Κυτταρική κίνηση	$7,36 \times 10^{-4}$ - $4,61 \times 10^{-2}$	ANGPTL4, ITGA11, BRCA1, PLAT	4



Σχήμα 4.6: Ραβδόγραμμα λειτουργικών κατηγοριών των στόχων του miR-1915, που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση.

Ο λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “μεταβολισμός λιπιδίων” που εμφανίζει το χαμηλότερο p-value ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες, έδειξε πως τα γονίδια της συμμετέχουν σε 9 λειτουργίες: την “υδρόλυση τριγλυκεριδίων” (2 γονίδια, p-value: $4,74 \times 10^{-5}$), τη “χρησιμοποίηση τριγλυκεριδίων” (1 γονίδιο, p-value: $7,36 \times 10^{-4}$), την “υδρόλυση λιπιδίων” (3 γονίδια, p-value: $9,32 \times 10^{-4}$), την “ποσότητα στεροειδών” (4 γονίδια, p-value: $1,71 \times 10^{-3}$), την “ομοιόσταση φωσφολιπιδίων” (1 γονίδιο, p-value: $7,34 \times 10^{-3}$), την “ομοιόσταση λιπιδίων” (2 γονίδια, p-value: $1,39 \times 10^{-2}$), την “αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης” (1 γονίδιο, p-value: $1,54 \times 10^{-2}$), τη “συγκέντρωση χοληστερόλης” (2 γονίδια, p-value: $4,20 \times 10^{-2}$) και τη “συγκέντρωση τριγλυκεριδίων” (2 γονίδια, p-value: $4,88 \times 10^{-2}$). **Πίνακας 4.27**

Πίνακας 4.27: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “μεταβολισμός λιπιδίων”, που έχει το χαμηλότερο p-value, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-1915.

Λειτουργική κατηγορία	Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Μεταβολισμός λιπιδίων	Υδρόλυση τριγλυκεριδίων	$4,74 \times 10^{-5}$	ANGPTL4, LIPG	2
	Χρησιμοποίηση τριγλυκεριδίων	$7,36 \times 10^{-4}$	ANGPTL4	1
	Υδρόλυση λιπιδίων	$9,32 \times 10^{-4}$	ANGPTL4, LIPG, VIPR1	3
	Ποσότητα στεροειδών	$1,71 \times 10^{-3}$	ANGPTL4, BRCA1, LIPG, PLAT	4
	Ομοίωση φωσφολιπιδίων	$7,34 \times 10^{-3}$	LIPG	1
	Ομοίωση λιπιδίων	$1,39 \times 10^{-2}$	ANGPTL4, LIPG	2
	Αντίστροφη μεταφορά χοληστερόλης	$1,54 \times 10^{-2}$	LIPG	1
	Συγκέντρωση χοληστερόλης	$4,20 \times 10^{-2}$	ANGPTL4, LIPG	2
	Συγκέντρωση τριγλυκεριδίων	$4,88 \times 10^{-2}$	ANGPTL4, LIPG	2

4.2.4.6 Αποτελέσματα ανάλυσης των στόχων του 638

Η «κεντρική ανάλυση» του λογισμικού του Ingenuity αντιστοίχησε επιτυχώς και τα 15 IDs των στόχων, σε γονίδια της βάσης δεδομένων του. Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης αυτών των γονιδίων που περιλαμβάνει την κυτταρική τοπολογία και την κύρια μοριακή ή βιολογική λειτουργία του κάθε γονιδίου ή του προϊόντος του με όρους Gene Ontology, παρουσιάζονται στον **πίνακα 4.28** που ακολουθεί.

Πίνακας 4.28: Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης των στόχων του miR-638.

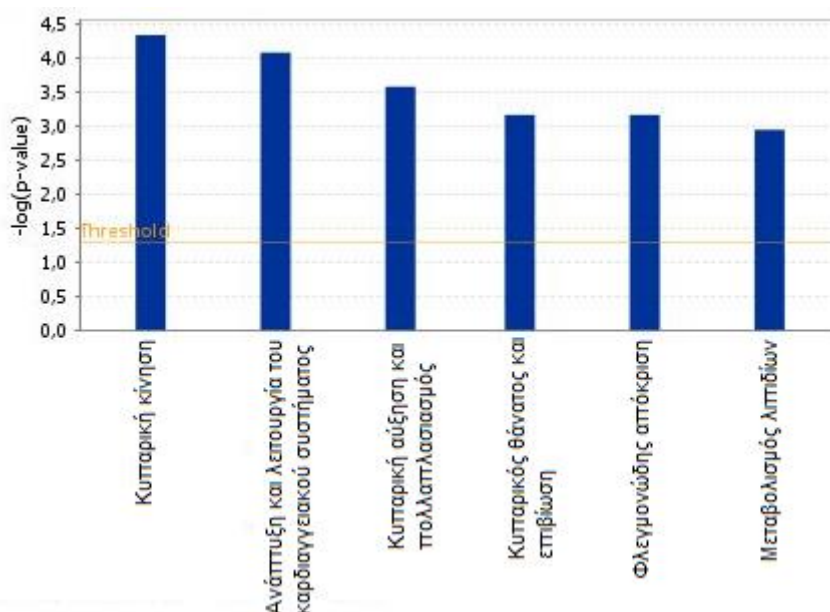
Γονίδιο	FC	Όνομα Entrez Gene	Κυτταρική τοπολογία	Τύπος
AQP5	2,014	aquaporin 5	Κυτταρική μεμβράνη	Μεταφορέας
ASF1B	- 2,634	anti-silencing function 1B histone chaperone	Πυρήνας	Άλλο
BMP2	-	bone morphogenetic protein	Εξωκυττάριος	Αυξητικός

	2,086	2	χώρος	παράγοντας
BRCA1	- 2,049	BRCA1,DNA repair associated	Πυρήνας	Μεταγραφικός παράγοντας
BRIP1	- 3,203	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	Πυρήνας	Ένζυμο
CHAC1	4,041	ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
CTH	2,125	cystathionine gamma-lyase	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
HIST1H2A H	- 2,618	histone cluster 1 H2A family member h	Πυρήνας	Άλλο
ITGA11	2,505	integrin subunit alpha 11	Πυρήνας	Άλλο
LDLR	2,159	low density lipoprotein receptor	Κυτταρική μεμβράνη	Μεταφορέας
PARP9	3,025	poly(ADP-ribose) polymerase family member 9	Πυρήνας	Ένζυμο
PNPLA3	3,307	patatin like phospholipase domain containing 3	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
SLC7A5	2,244	solute carrier family 7 member 5	Κυτταρική μεμβράνη	Μεταφορέας
VIPR1	2,731	vasoactive intestinal peptide receptor 1	Κυτταρική μεμβράνη	G-protein συνδεδεμένος υποδοχέας
XAF1	2,672	XIAP associated factor 1	Πυρήνας	Άλλο

Οι πιο στατιστικά σημαντικές λειτουργικές κατηγορίες γονιδίων, με βάση την IPA ανάλυση, χρησιμοποιώντας το Fisher's Exact Test και $p\text{-value} \leq 0,05$, στις οποίες κατηγοριοποιούνται οι στόχοι του miR-638 είναι 51 και ποικίλουν από την “αντιγραφή, ανασυνδυασμό και επιδιόρθωση του DNA” (6 γονίδια, $p\text{-value}: 2,27 \times 10^{-5} - 1,85 \times 10^{-2}$) έως τη “μέτα-μεταφραστική τροποποίηση” (1 γονίδιο, $p\text{-value}: 1,45 \times 10^{-2} - 1,45 \times 10^{-22}$). Από τις παραπάνω κατηγορίες αυτές που σχετίζονται περισσότερο με τη λειτουργία του ενδοθηλίου και ενδεχομένως με την αθηροσκλήρωση είναι οι: “κυτταρική κίνηση” (7 γονίδια, $p\text{-value}: 4,68 \times 10^{-5} - 1,53 \times 10^{-2}$), “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος” (4 γονίδια, $p\text{-value}: 8,45 \times 10^{-4} - 1,65 \times 10^{-2}$), “κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός” (6 γονίδια, $p\text{-value}: 2,67 \times 10^{-4} - 1,86 \times 10^{-2}$), “κυτταρικός θάνατος και επιβίωση” (6 γονίδια, $p\text{-value}: 6,93 \times 10^{-4} - 1,79 \times 10^{-2}$), “φλεγμονώδης απόκριση” (4 γονίδια, $p\text{-value}: 6,93 \times 10^{-4} - 1,51 \times 10^{-2}$) και “μεταβολισμός λιπιδίων” (5 γονίδια, $p\text{-value}: 1,14 \times 10^{-3} - 1,85 \times 10^{-2}$). Αναλυτικότερα στον **Πίνακα 4.29** και το **Σχήμα 4.7**.

Πίνακας 4.29: Επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τις λειτουργίες του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση και στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-638.

Λειτουργική κατηγορία	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Κυτταρική κίνηση	$4,68 \times 10^{-5}$ - $1,53 \times 10^{-2}$	AQP5, LDLR, VIPR1, ITGA11, BMP2, BRCA1, PARP9	7
Ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος	$8,45 \times 10^{-4}$ - $1,65 \times 10^{-2}$	LDLR, ITGA11, BMP2, CTH	4
Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός	$2,67 \times 10^{-4}$ - $1,86 \times 10^{-2}$	LDLR, ITGA11, BMP2, SLC7A5, CTH, BRCA1	6
Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση	$6,93 \times 10^{-4}$ - $1,79 \times 10^{-2}$	LDLR, BMP2, XAF1, CTH, BRCA1, BRIP1	6
Φλεγμονώδης απόκριση	$6,93 \times 10^{-4}$ - $1,51 \times 10^{-2}$	AQP5, LDLR, VIPR1, BMP2	4
Μεταβολισμός λιπιδίων	$1,14 \times 10^{-3}$ - $1,85 \times 10^{-2}$	LDLR, VIPR1, BMP2, PNPLA3, BRCA1	5



Σχήμα 4.7: Ραβδόγραμμα λειτουργικών κατηγοριών των στόχων του miR-638, που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση.

Ο λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “κυτταρική κίνηση” που έχει το χαμηλότερο p-value, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-638, έδειξε πως τα

γονίδια της συμμετέχουν σε 9 λειτουργίες: την “επιβράδυνση της κυτταρικής κίνησης” (2 γονίδια, $p\text{-value}: 4,68 \times 10^{-5}$), τη “χημειοταξία των αρχέγονων κυττάρων του μυελού των οστών” (1 γονίδιο, $p\text{-value}: 6,93 \times 10^{-4}$), την “επιβράδυνση της μετανάστευσης των λείων μυικών κυττάρων” (1 γονίδιο, $p\text{-value}: 2,08 \times 10^{-3}$), την “κυτταρική κίνηση” (7 γονίδια, $p\text{-value}: 4,56 \times 10^{-3}$), τη “μετανάστευση των λείων μυικών κυττάρων” (2 γονίδια, $p\text{-value}: 6,58 \times 10^{-3}$), την “κυτταρική κίνηση των μονοκυττάρων” (2 γονίδια, $p\text{-value}: 8,56 \times 10^{-3}$), την “κυτταρική μετανάστευση” (6 γονίδια, $p\text{-value}: 1,15 \times 10^{-2}$) και τη “χημειοταξία” (3 γονίδια, $p\text{-value}: 1,53 \times 10^{-2}$). **Πίνακας 4.30**

Πίνακας 4.30: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “κυτταρική κίνηση”, που έχει το χαμηλότερο $p\text{-value}$, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-638.

Λειτουργική κατηγορία	Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Κυτταρική κίνηση	Επιβράδυνση της κυτταρικής κίνησης	$4,68 \times 10^{-5}$	BRCA1, LDLR	2
	Χημειοταξία αρχέγονων κυττάρων του μυελού των οστών	$6,93 \times 10^{-4}$	BMP2	1
	Επιβράδυνση της μετανάστευσης των λείων μυικών κυττάρων	$2,08 \times 10^{-3}$	LDLR	1
	Κυτταρική κίνηση	$4,56 \times 10^{-3}$	AQP5, BMP2, BRCA1, ITGA11, LDLR, PARP9, VIPR1	7
	Μετανάστευση των λείων μυικών κυττάρων	$6,58 \times 10^{-3}$	BMP2, LDLR	2
	Κυτταρική κίνηση των μονοκυττάρων	$8,56 \times 10^{-3}$	LDLR, VIPR1	2
	Κυτταρική μετανάστευση	$1,15 \times 10^{-2}$	AQP5, BMP2, BRCA1, LDLR, PARP9, VIPR1	6
	Χημειοταξία	$1,53 \times 10^{-2}$	BMP2, LDLR, VIPR1	3

4.2.5 Αποτελέσματα κατηγοριοποίησης βάσει Gene Ontology (GO)

Για να προσδιορίσουμε σε μεγαλύτερο βάθος το λειτουργικό προφίλ των στόχων των miRNAs και να κατανοήσουμε καλύτερα της βιολογικές διεργασίες που μπορεί να επηρεάζονται από αυτά ακολούθησε ανάλυση εμπλουτισμού σε όρους GO. Από τα σετ των στόχων των έξι miRNAs (miR-

3188, miR-3185, miR-1231, miR-2861, miR-1915, miR-638) μόνο αυτά των miR-3185 και miR-2861 παρουσίαζαν στατιστικά σημαντικό εμπλουτισμό (p-value και FDR $\leq 0,05$) στην ανάλυση βιολογικών λειτουργιών. Για κανένα σετ στόχων δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα στις αναλύσεις για εμπλουτισμό ως προς τις μοριακές λειτουργίες ή την κυτταρική τοπολογία. Οι στόχοι των miR-3185 και miR-2861 έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό παρουσία όρων GO που αναφέρονται στο μεταβολισμό λιπιδίων ενώ ταυτίζονται ως προς τη λειτουργία “regulation of sterol biosynthetic process” (GO:0106118) που περιλαμβάνει το μονοπάτι βιοσύνθεσης χοληστερόλης. Τα αναλυτικά αποτελέσματα για το miR-3185 παρουσιάζονται στον **πίνακα 4.31** και αυτά για το miR-2861 στον **πίνακα 4.32**

Πίνακας 4.31: Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εμπλουτισμού σε όρους GO για τους στόχους του miR-3185.

Βιολογική λειτουργία (όρος GO)*	Εμπλουτισμός (Fold enrichment)	P-value	FDR
regulation of sterol biosynthetic process (GO:0106118)	40.40	1.87×10^{-7}	2.94×10^{-3}
regulation of steroid metabolic process (GO:0019218)	30.30	7.33×10^{-7}	5.77×10^{-3}
regulation of lipid biosynthetic process (GO:0046890)	19.17	6.44×10^{-6}	2.53×10^{-2}
DNA replication (GO:0006260)	16.32	1.38×10^{-5}	3.62×10^{-2}
regulation of small molecule metabolic process (GO:0062012)	11.77	1.08×10^{-5}	3.39×10^{-2}
DNA metabolic process (GO:0006259)	7.78	1.40×10^{-6}	7.33×10^{-3}

Πίνακας 4.32: Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εμπλουτισμού σε όρους GO για τους στόχους του miR-2861

Βιολογική λειτουργία (όρος GO)*	Εμπλουτισμός (Fold enrichment)	P-value	FDR
intracellular lipid transport (GO:0032365)	86.71	7.33×10^{-6}	2.31×10^{-2}
regulation of steroid metabolic process (GO:0019218)	28.90	1.19×10^{-5}	3.12×10^{-2}
regulation of lipid biosynthetic process (GO:0046890)	27.43	7.88×10^{-8}	1.24×10^{-3}
lipid homeostasis (GO:0055088)	26.53	1.65×10^{-5}	3.70×10^{-2}
double-strand break repair (GO:0006302)	23.80	2.13×10^{-6}	1.12×10^{-2}
regulation of lipid metabolic process	14.95	3.20×10^{-7}	2.52×10^{-3}

(GO:0019216)			
regulation of small molecule metabolic process (GO:0062012)	14.03	3.62×10^{-6}	1.42×10^{-2}

* Δεδομένου πως η όροι Gene Ontology είναι συγκεκριμένοι και προκαθορισμένοι από το Gene Ontology Consortium και καθώς η ανάλυση εμπλουτισμού βασίζεται στη χρήση των όρων GO, αυτοί επιλέχθηκε να παρουσιαστούν στην επίσημη μορφή τους και να μη μεταφραστούν.

4.2.6 Αποτελέσματα εξόρυξης δεδομένων βάσει PubMed

Στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής μελέτης, ακολούθησε εκτενής αναζήτηση της σχετικής επιστημονικής βιβλιογραφίας στη βάση δεδομένων του PubMed της NCBI, για τα miRNAs η έκφραση των οποίων αλλάζει στατιστικά σημαντικά υπό την επίδραση της rHDL-apoA1. Τα συγκεκριμένα miRNAs, με την εξαίρεση του miR-638, δεν είναι ιδιαίτερα μελετημένα και για αυτό εντοπίστηκε σχετικά μικρός αριθμός δημοσιεύσεων. Παρόλα αυτά από τη μελέτη της διαθέσιμης βιβλιογραφίας προέκυψε ότι τα miR-3188, miR-2861 και miR-638, εμπλέκονται είτε στην αθηροσκλήρωση, είτε στη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων ή και στις δύο ταυτόχρονα. Στον **πίνακα 4.34** που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της ανάλυσης, τα οποία θα παρουσιαστούν αναλυτικά για το κάθε ένα από τα 3 miRNAs στη συνέχεια.

Πίνακας 4.33: Συγκεντρωτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της PubMed ανάλυσης.

miRNA	Συνολικός αριθμός εργασιών	Εργασίες αναφέρονται στην αθηροσκλήρωση	Εργασίες που αναφέρονται στη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων
hsa-mir-3188	7	1	-
hsa-mir-3185	1	-	-
hsa-mir-1231	8	-	-
hsa-mir-3195	0	-	-
hsa-mir-2861	22	4	1
hsa-mir-1915	16	-	-
hsa-mir-638	86	2	2

4.2.6.1 Αποτελέσματα για το miR-3188

Η έκφραση του miR-3188 έχει βρεθεί ότι μειώνεται στην κυκλοφορία ασθενών με αθηροσκλήρωση, όπως και από καλλιέργειες μακροφάγων όταν αυτά

εκτείνονται σε ox-LDL. Επιπλέον, η έκθεση των μακροφάγων στην ox-LDL προκαλεί τον τραυματισμό τους καθώς επάγει την απόπτωση και αυξάνει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Η υπερέκφραση του miR-3188 μείωσε τη βλάβη που προκαλείται σε αυτά από την ox-LDL, ενώ η υποέκφραση του είχε τα αντίθετα αποτελέσματα.¹⁷⁸

4.2.6.2 Αποτελέσματα για το miR-2861

Η αυξημένη έκφραση του miR-2861 αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση αθηροσκλήρωσης,¹⁷⁹ καθώς προκαλεί και ρυθμίζει τη μετατροπή των αγγειακών λείων μυοκυττάρων σε οστεοβλάστες. Η διαδικασία αυτή προκαλεί την ασβεστοποίηση των αγγείων, που είναι ένας από τους παράγοντες αυξημένου κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου.^{180,181} Επιπροσθέτως, η αυξημένη παραγωγή miR-2861 από τα μονοκύτταρα και τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα, που οδηγεί σε αυξημένη παρουσία του στην κυκλοφορία, αποτελεί δείκτη για οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου ή ασταθή στηθάγχη), ιδίως στα αρχικά στάδια του.^{182,183}

4.2.6.3 Αποτελέσματα για το miR-638

Το miR-638 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την ευπάθεια (vulnerability) της αθηρωματικής πλάκας, καθώς τα χαμηλά επίπεδα του στην κυκλοφορία συνδέονται με υψηλό κίνδυνο ρήξης της πλάκας και εμφάνισης εγκεφαλικού επεισοδίου.¹⁸⁴ Η υποέκφραση του, επάγει την αγγειογένεση και τον σχηματικό σωληνίσκων, στο σάρκωμα Ewing και τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η δράση αυτή επιτυγχάνεται μέσω της καταστολής της δράσης του αυξητικού παράγοντα VEGFA.^{185,186} Τέλος, έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται από τα αγγειακά λεία μυοκύτταρα και η μείωση της έκφραση του επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση τους.¹⁸⁷

4.3 Αποτελέσματα για τα rHDL-apoE3 vs PBS miRNAs

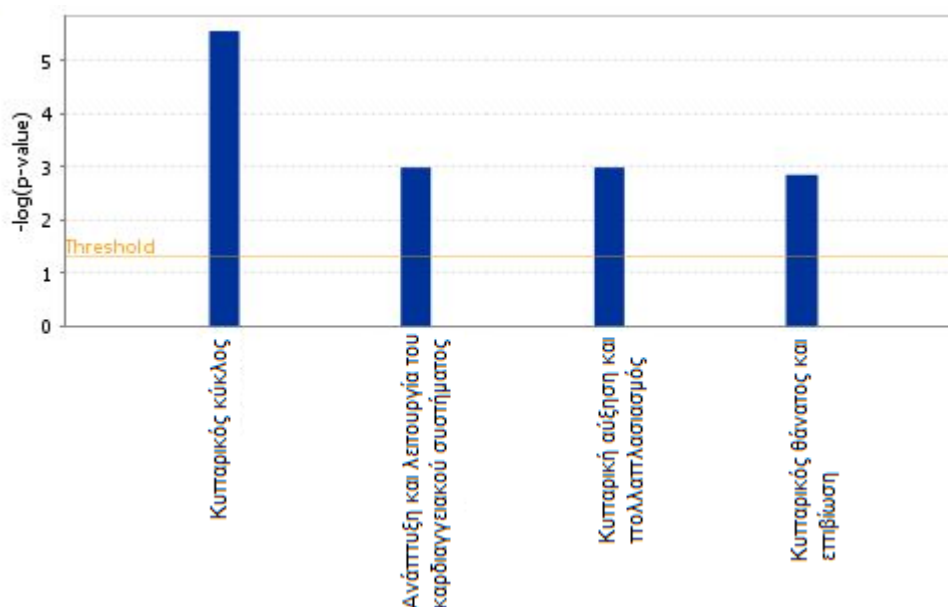
4.3.1 Ανάλυση λειτουργιών με βάση το λογισμικό IPA

Η πρώτη αξιολόγηση του miR-503 έγινε με το Ingenuity Pathway Analysis, σκοπός της ανάλυσης ήταν η ταυτοποίηση των μοριακών και βιολογικών λειτουργιών στις οποίες συμμετέχει, ώστε να εντοπιστούν εκείνες που επηρεάζονται από την αλλαγή έκφρασης που του προκαλεί η rHDL-apoA-I. Πρώτο στάδιο της ανάλυσης ήταν η επιτυχής αναγνώριση της ταυτότητας του miR-503 και η αντιστοίχηση της σε μόριο καταχωρημένο στη βάση δεδομένων του προγράμματος. Η “κεντρική ανάλυση” για το miR-503, το μόνο miRNA που η έκφραση του αλλάζει στατιστικά σημαντικά υπό την επίδραση της rHDL-apoE3, έδειξε πως οι μοριακές λειτουργικές κατηγορίες τις οποίες

επηρεάζει είναι: ο “κυτταρικός κύκλος” (1 miRNA, p-value: $2,76 \times 10^{-6}$ - $1,36 \times 10^{-5}$) η “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος” (1 miRNA, p-value: $1,02 \times 10^{-3}$ - $1,02 \times 10^{-3}$), η “κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός” (1 miRNA, p-value: $1,02 \times 10^{-3}$ - $1,02 \times 10^{-3}$) και ο “κυτταρικός θάνατος και επιβίωση” (1 miRNA, p-value: $1,4 \times 10^{-3}$ - $1,4 \times 10^{-3}$). **Πίνακας 4.35** και Σχήμα 4.8.

Πίνακας 4.34: Οι λειτουργικές κατηγορίες του miR-503, του μόνου miRNA που η έκφραση του αλλάζει στατιστικά σημαντικά μετά τη χορήγηση rHDL-apoE3.

Λειτουργική κατηγορία	p-value	miRNAs	#Μορίων
Κυτταρικός κύκλος	$2,76 \times 10^{-6}$ - $1,36 \times 10^{-5}$	miR-503	1
Ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος	$1,02 \times 10^{-3}$	miR-503	1
Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός	$1,02 \times 10^{-3}$	miR-503	1
Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση	$1,4 \times 10^{-3}$	miR-503-	1



Σχήμα 4.8: Ραβδόγραμμα των λειτουργικών κατηγοριών του miR-503, του μόνου miRNA που επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από τη χορήγηση rHDL-apoE3

Οι κατηγορίες αυτές κατατάσσονται με βάση την τιμή $-\log(p\text{-value})$ της IPA ανάλυσης. Η μπλε μπάρα αντιστοιχεί στην τιμή p-value της συγκεκριμένης λειτουργικής κατηγορίας και η λεπτή κίτρινη γραμμή αντιπροσωπεύει το όριο (threshold) πάνω από το οποίο είναι στατιστικά σημαντική η κατηγορία αυτή με βάση το λογισμικό του Ingenuity χρησιμοποιώντας το Fisher's Exact Test και $p\text{-value} \leq 0,05$.

Ακολούθησε ο λεπτομερής χαρακτηρισμός των λειτουργικών κατηγοριών που επηρεάζονται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από την αλλαγή έκφρασης του miR-503, ώστε να διασαφηνιστεί ποιες ακριβώς λειτουργίες αντιστοιχούν σε αυτήν. Η λειτουργική κατηγορία “κυτταρικός κύκλος” έδειξε πως αναφέρεται στις εξής λειτουργίες: “καταστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου κυτταρικών σειρών λευχαιμίας” (1 miRNA, p-value: $2,88 \times 10^{-3}$), “καταστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου κυτταρικών σειρών καρκίνου των οστών στη φάση G1” (1 miRNA, p-value: $1,13 \times 10^{-5}$), “καταστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου κυτταρικών σειρών σαρκώματος στη φάση G1” (1 miRNA, p-value: $1,13 \times 10^{-5}$) και “καταστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου κυτταρικών σειρών καρκίνου του παχέος εντέρου στη φάση G1” (1 miRNA, p-value: $1,36 \times 10^{-5}$). Η λειτουργική κατηγορία “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος”, όπως και η “κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός” αναφέρεται στον “πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων” (1 miRNA, p-value: $1,02 \times 10^{-3}$). Τέλος η λειτουργική κατηγορία “κυτταρικός θάνατος και επιβίωση” αντιστοιχεί στην λειτουργία “επιβίωση των δενδριτικών κυττάρων που προέρχονται από το μυελό των οστών” (1 miRNA, p-value: $1,40 \times 10^{-3}$). Αναλυτική παρουσίαση των παραπάνω στον **πίνακα 4.35**.

Πίνακας 4.35: Λεπτομερής χαρακτηρισμός των λειτουργικών κατηγοριών στις οποίες συμμετέχει το miR-503.

Λειτουργική κατηγορία	Λειτουργία	p-Value	miRNAs	#Μορίων
Κυτταρικός κύκλος	Καταστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου κυτταρικών σειρών λευχαιμίας	$2,76 \times 10^{-6}$	mir-503	1
	Καταστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου κυτταρικών σειρών καρκίνου των οστών στη φάση G1	$1,13 \times 10^{-5}$	mir-503	1
	Καταστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου κυτταρικών σειρών σαρκώματος στη φάση G1	$1,13 \times 10^{-5}$	mir-503	1
	Καταστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου κυτταρικών σειρών καρκίνου του παχέος εντέρου στη φάση G1	$1,36 \times 10^{-5}$	mir-503	1
Ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού	Πολλαπλασιασμός ενδοθηλιακών κυττάρων	$1,02 \times 10^{-3}$	mir-503	1

συστήματος				
Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός				
Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση	Επιβίωση δενδριτικών κυττάρων προερχόμενων από το μυελό των οστών	$1,40 \times 10^{-3}$	mir-503	1

4.3.2 Πειραματικά επιβεβαιωμένοι στόχοι του miR-503

Με δεδομένο πως ο συνήθης τρόπος με τον οποίο ασκούν τη δράση τους τα miRNAs είναι η σύνδεση με το mRNA των γονιδίων που ρυθμίζουν, θελήσαμε να βρούμε τα γονίδια για τα οποία η αλληλεπίδραση μεταξύ του mRNA τους και των υπό εξέταση miRNAs είναι πειραματικά επιβεβαιωμένη. Το αποτέλεσμα της αναζήτησης των πειραματικά επιβεβαιωμένων στόχων του miR-503 στη βάση δεδομένων miRTarBase, ήταν μία λίστα με 432 εγγραφές (252 μοναδικά γονίδια, η πλήρης λίστα στο **παράρτημα I**), τα οποία έχει δείξει ότι ρυθμίζονται από αυτό, σε διάφορες πειραματικές συνθήκες. Στη συνέχεια και για να εντοπιστούν εκείνα από τα γονίδια που πιθανότατα επηρεάζονται από τις αλλαγές στην έκφραση του miR-503 υπό τις συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος, έγινε αντιπαραβολή των παραπάνω λιστών με αυτήν που προέκυψε από προηγούμενο πείραμα γονιδιακής της ομάδας μας, το οποίο πραγματοποιήθηκε υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες (ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής, θεραπεία με σωματίδια rHDL-apoE3, PBS ως control). Αποτέλεσμα την παραπάνω διαλογής είναι ο προσδιορισμός ενός μικρού αριθμού γονιδίων που αναφέρονται αναλυτικά στον **πίνακα 4.36**.

Πίνακας 4.36: Οι πειραματικά επιβεβαιωμένοι στόχοι του miR-503

miRNA	Σύνολο πειραματικά επιβεβαιωμένων στόχων	Κοινά γονίδια*	Αλλαγή έκφρασης κοινών γονιδίων
hsa-mir-503	252	EFNB2	3,03
		KIF23	-2,11
		LYVE1	-2,99
		MT1E	-4,51

* Κοινά μεταξύ της λίστας με όλους τους επιβεβαιωμένους στόχους του miR-503 και της λίστας με τα γονίδια που η έκφραση τους έχει βρεθεί πως αλλάζει στα ενδοθηλιακά κύτταρα όταν υπόκεινται σε θεραπεία (treatment) με rHDL-apoE3.

4.3.3 Πρόβλεψη πιθανών στόχων του miR-503

Τα αποτελέσματα της αναζήτησης πιθανών στόχων του miR-503 στο miRWalk ήταν μία λίστα 6149 γονιδίων. Τέθηκε και εδώ ο περιορισμός να εξεταστούν μόνο εκείνα τα γονίδια για τα οποία υπάρχει συμφωνία τουλάχιστον πέντε εκ των προγραμμάτων πρόβλεψης και προστέθηκαν στις τελικές λίστες τα αποτελέσματα του TargetScan, εάν αυτά δεν περιλαμβάνονταν στη λίστα του miRWalk. Όπως και στην περίπτωση των επιβεβαιωμένων γονιδίων-στόχων, έγινε σύγκριση με τα γονίδια η έκφραση των οποίων αλλάζει στα ενδοθηλιακά κύτταρα, υπό την επίδραση της rHDL-αροΕ3, για να εντοπιστούν εκείνα τα γονίδια που πιθανόν έχουν κάποιο βιολογικό ρόλο στο παρόν πείραμα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **πίνακα 4.37**.

Με **έντονα γράμματα** σημειώνονται τα γονίδια για τα οποία υπάρχει συμφωνία μεταξύ miRWalk και TargetScan. Το βέλος δίπλα στο όνομα του κάθε γονιδίου υποδεικνύει αν η έκφραση του αυξάνει (↑) ή μειώνεται (↓) μετά τη χορήγηση rHDL-αροΕ3. Στο κάτω μέρος κάθε πίνακα συμπληρώνονται τα γονίδια που προβλέφθηκαν μόνο από το TargetScan.

Πίνακας 4.37: Πιθανοί στόχοι του miR-503

miRWalk	
Αριθμός προγραμμάτων σε συμφωνία	Γονίδια
8	COL4A1↑, CYB561↑
7	KLHDC8B↓, LIPG↑, PTGIR↓, SIPA1L2↑, TFPI2↑
6	ADAMTS1↑, FAM189A2↓, PMEPA1↑, RSPO3 ↓, SLC39A10↑, TGM2↓, UNC5B↑
5	AQP1↓, CD274↓, DNMT3↑, FLT1↑, IFFO2↑, IQGAP3↓, ITGB8↓, KLHL13↓, MAMDC2↓, NDRG4↓, NR4A1↑, PNP↑, RGS5↑, SNAI1↑, TGFB2↓, TNS3↑
TargetScan	NEK10↑

4.3.4 IPA ανάλυση των στόχων του miR-503

Στη συνέχεια έγινε IPA ανάλυση των παραπάνω γονιδίων, ώστε να καταταχθούν σε λειτουργικές κατηγορίες, με σκοπό να ερευνηθεί αν συμμετέχουν σε λειτουργίες που να σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με το ενδοθήλιο και ενδεχομένως με την αθηροσκλήρωση και να εντοπιστούν

πιθανά ρυθμιστικά ζεύγη miR-503-γονιδίων, που να τις ελέγχουν ή επηρεάζουν. Η «κεντρική ανάλυση» του λογισμικού του Ingenuity αντιστοίχησε επιτυχώς και τα 39 IDs των στόχων, σε γονίδια που οργανώνονται στη βάση δεδομένων του. Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης αυτών των γονιδίων που περιλαμβάνει την κυτταρική τοπολογία και την κύρια μοριακή ή βιολογική λειτουργία του κάθε γονιδίου ή του προϊόντος του με όρους Gene Ontology, παρουσιάζονται στον **πίνακα 4.38** που ακολουθεί.

Πίνακας 4.38: Τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής ανάλυσης των στόχων του miR-503.

Γονίδιο	FC	Όνομα Entrez Gene	Κυτταρική τοπολογία	Τύπος
ADAMTS1	3,757	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 1	Εξωκυττάριος χώρος	Πεπτιδάση
AQP1	-2,352	aquaporin 1 (Colton blood group)	Κυτταρική μεμβράνη	Μεταφορέας
CD274	-2,156	CD274 molecule	Κυτταρική μεμβράνη	Ένζυμο
COL4A1	2,139	collagen type IV alpha 1 chain	Εξωκυττάριος χώρος	Άλλο
CYB561	2,339	cytochrome b561	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
DNM3	2,152	dynamin 3	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
EFNB2	3,032	ephrin B2	Κυτταρική μεμβράνη	Κινάση
FAM189A2	-3,605	family with sequence similarity 189 member A2	Άλλο	Άλλο
FLT1	2,768	fms related tyrosine kinase 1	Κυτταρική μεμβράνη	Κινάση
IFFO2	2,078	intermediate filament family orphan 2	Άλλο	Άλλο
IQGAP3	-2,047	IQ motif containing GTPase activating protein 3	Κυτταρική μεμβράνη	Άλλο
ITGB8	-3,174	integrin subunit beta 8	Κυτταρική μεμβράνη	Άλλο
KIAA1147	2,173	KIAA1147	Άλλο	Άλλο
KIF23	-2,113	kinesin family member 23	Κυτταρόπλασμα	Άλλο
KLHDC8B	-2,091	kelch domain containing 8B	Κυτταρόπλασμα	Άλλο
KLHL13	-2,611	kelch like family member 13	Κυτταρόπλασμα	Άλλο
LAPTM5	2,010	lysosomal protein transmembrane 5	Κυτταρική μεμβράνη	Άλλο
LIPG	4,590	lipase G, endothelial type	Εξωκυττάριος	Ένζυμο

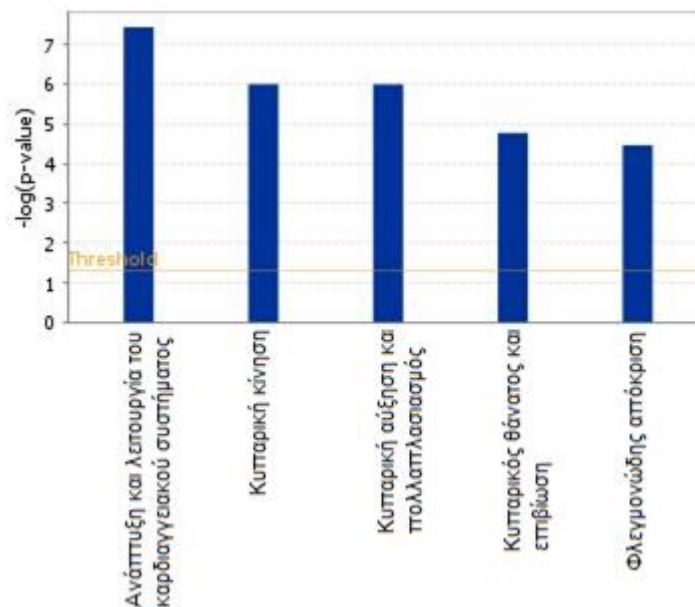
			χώρος	
MAMDC2	-3,879	MAM domain containing 2	Εξωκυττάριος χώρος	Άλλο
MKI67	-2,128	marker of proliferation Ki-67	Πυρήνας	Άλλο
MME	-2,139	membrane metalloendopeptidase	Κυτταρική μεμβράνη	Πεπτιδάση
NDRG4	-2,540	NDRG family member 4	Κυτταρική μεμβράνη	Άλλο
NEK10	2,093	NIMA related kinase 10	Άλλο	Κινάση
NR4A1	2,047	nuclear receptor subfamily 4 group A member 1	Πυρήνας	Πυρηνικός υποδοχέας
PMEPA1	2,373	prostate transmembrane protein, androgen induced 1	Κυτταρική μεμβράνη	Άλλο
PNP	2,007	purine nucleoside phosphorylase	Πυρήνας	Ένζυμο
PTGIR	-2,212	prostaglandin I2 receptor	Κυτταρική μεμβράνη	G-protein συνδεδεμένος υποδοχέας
RGS5	2,702	regulator of G protein signaling 5	Κυτταρική μεμβράνη	Άλλο
RSPO3	-2,969	R-spondin 3	Εξωκυττάριος χώρος	Κινάση
SIPA1L2	2,312	signal induced proliferation associated 1 like 2	Άλλο	Άλλο
SLC39A10	2,328	solute carrier family 39 member 10	Εξωκυττάριος χώρος	Μεταφορέας
SNAI1	3,163	snail family transcriptional repressor 1	Πυρήνας	Ρυθμιστής μεταγραφής
TFPI2	2,166	tissue factor pathway inhibitor 2	Εξωκυττάριος χώρος	Άλλο
TGFB2	-2,741	transforming growth factor beta 2	Εξωκυττάριος χώρος	Αυξητικός παράγοντας
TGM2	-2,000	transglutaminase 2	Κυτταρόπλασμα	Ένζυμο
TNS3	2,348	tensin 3	Κυτταρική μεμβράνη	Φωσφατάση
TRAF3IP2	2,015	TRAF3 interacting protein 2	Κυτταρόπλασμα	Άλλο
UNC5B	3,570	unc-5 netrin receptor B	Κυτταρική μεμβράνη	Διαμεμβρاني κός υποδοχέας
ZNF641	-2,266	zinc finger protein 641	Άλλο	Άλλο

Οι πιο στατιστικά σημαντικές λειτουργικές κατηγορίες γονιδίων, με βάση την IPA ανάλυση, χρησιμοποιώντας το Fisher's Exact Test και $p\text{-value} \leq 0,05$ στις

οποίες κατηγοριοποιούνται οι στόχοι του miR-503 είναι 44, που ποικίλουν από την “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος” (17 γονίδια, p-value: $3,71 \times 10^{-8}$ - $3,38 \times 10^{-3}$) έως την “αντιγραφή, ανασυνδυασμό και επισκευή του DNA” (5 γονίδια, p-value: $3,52 \times 10^{-3}$ - $3,52 \times 10^{-3}$). Από τις παραπάνω κατηγορίες αυτές που σχετίζονται περισσότερο με τη λειτουργία του ενδοθηλίου και ενδεχομένως με την αθηροσκλήρωση είναι οι: “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος”, “κυτταρική κίνηση” (18 γονίδια, p-value: 1×10^{-6} - $3,84 \times 10^{-3}$), “κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός” (20 γονίδια, p-value: $1,01 \times 10^{-6}$ - $3,83 \times 10^{-3}$), “κυτταρικός θάνατος και επιβίωση” (20 γονίδια, p-value: $1,7 \times 10^{-5}$ - $3,95 \times 10^{-3}$) και “φλεγμονώδης απόκριση” (18 γονίδια, p-value: $3,47 \times 10^{-5}$ - $3,94 \times 10^{-3}$). Αναλυτικότερα στον **Πίνακα 4.39** και το **Σχήμα 4.9**

Πίνακας 4.39: Επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τις λειτουργίες του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση και στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-503.

Λειτουργική κατηγορία	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος	$3,71 \times 10^{-8}$ - $3,38 \times 10^{-3}$	MME, PTGIR, COL4A1, ADAMTS1, FLT1, SNAI1, UNC5B, AQP1, ITGB8, TGM2, EFNB2, RSPO3, TRAF3IP2, RGS5, TGFB2, NR4A1, CD274	17
Κυτταρική κίνηση	1×10^{-6} - $3,84 \times 10^{-3}$	MME, COL4A1, PTGIR, ADAMTS1, FLT1, SNAI1, UNC5B, AQP1, ITGB8, TFPI2, TGM2, RSPO3, EFNB2, TNS3, TRAF3IP2, TGFB2, NR4A1, CD274	18
Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός	$1,01 \times 10^{-6}$ - $3,83 \times 10^{-3}$	COL4A1, PTGIR, FLT1, ADAMTS1, SNAI1, AQP1, ITGB8, MKI67, TFPI2, KLHL13, TGM2, EFNB2, TRAF3IP2, RGS5, NDRG4, TGFB2, PNP, NR4A1, CD274, PMEPA1	20
Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση	$1,7 \times 10^{-5}$ - $3,95 \times 10^{-3}$	MME, COL4A1, PTGIR, FLT1, ADAMTS1, SNAI1, UNC5B, SLC39A10, AQP1, MKI67, TFPI2, TGM2, EFNB2, TRAF3IP2, RGS5, TGFB2, NR4A1, PNP, CD274, PMEPA1	20
Φλεγμονώδης απόκριση	$3,47 \times 10^{-5}$ - $3,94 \times 10^{-3}$	MME, COL4A1, PTGIR, ADAMTS1, FLT1, SNAI1, UNC5B, AQP1, MKI67, ITGB8, TFPI2, TGM2, RSPO3, TRAF3IP2, PNP, NR4A1,	18



Σχήμα 4.9 Ραβδόγραμμα λειτουργικών κατηγοριών των στόχων του miR-503, που σχετίζονται με τη λειτουργία του ενδοθηλίου ή την αθηροσκλήρωση.

Ο λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος” που έχει το χαμηλότερο p-value, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-503, έδειξε πως τα γονίδια της συμμετέχουν σε 42 λειτουργίες, η πλειοψηφία των οποίων αναφέρονται στην ανάπτυξη και διαμόρφωση του καρδιαγγειακού συστήματος κατά την εμβρυακή φάση (πχ ανάπτυξη των αγγειακού συστήματος - development of vasculature, διαμόρφωση της καρδιάς - morphology of heart κα). Περιλαμβάνονται όμως και λειτουργίες που παραμένουν ενεργές και στην ενήλικη ζωή και πιο συγκεκριμένα: η “αγγειογένεση” (14 γονίδια, p-value: $6,45 \times 10^{-8}$), ο “πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων” (8 γονίδια, p-value: $1,01 \times 10^{-6}$), ο “πολλαπλασιασμός των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων” (5 γονίδια, p-value: $5,43 \times 10^{-5}$), η “δημιουργία σωληνίσκων (tubulation) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα” (4 γονίδια, p-value: $1,31 \times 10^{-4}$), η “μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων” (6 γονίδια, p-value: $1,98 \times 10^{-4}$), η “μετανάστευση των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων” (4 γονίδια, p-value: $6,61 \times 10^{-4}$) και η “δημιουργία σωληνίσκων από τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα” (3 γονίδια, p-value: $9,90 \times 10^{-4}$). **Πίνακας 4.40.**

Ο λεπτομερής χαρακτηρισμός των επιλεγμένων λειτουργικών κατηγοριών στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-503 και οι οποίες δεν αναλύονται στο παρόν κεφάλαιο είναι διαθέσιμοι, στο **παράρτημα II.**

Πίνακας 4.40: Λεπτομερής χαρακτηρισμός της λειτουργικής κατηγορίας “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος”, που έχει το χαμηλότερο p-value, ανάμεσα στις επιλεγμένες λειτουργικές κατηγορίες στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι του miR-503.

Λειτουργική κατηγορία	Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος	Αγγειογένεση	$6,45 \times 10^{-8}$	ADAMTS1, AQP1, COL4A1, EFNB2, FLT1, ITGB8, NR4A1, PTGIR, RGS5, RSPO3, SNAI1, TGFB2, TGM2, UNC5B	14
	Πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων	$1,01 \times 10^{-6}$	ADAMTS1, COL4A1, EFNB2, FLT1, NR4A1, PTGIR, RGS5, TGFB2	8
	Πολλαπλασιασμός των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων	$5,43 \times 10^{-5}$	EFNB2, FLT1, NR4A1, PTGIR, RGS5	5
	Δημιουργία σωληνίσκων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα	$1,31 \times 10^{-4}$	EFNB2, FLT1, NR4A1, TGFB2	4
	Μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων	$1,98 \times 10^{-4}$	ADAMTS1, COL4A1, EFNB2, FLT1, NR4A1, TGFB2	6
	Μετανάστευση των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων	$6,61 \times 10^{-4}$	ADAMTS1, EFNB2, FLT1, NR4A1	4
	Δημιουργία σωληνίσκων από τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα	$9,90 \times 10^{-4}$	EFNB2, FLT1, NR4A1	3

4.3.5 Αποτελέσματα κατηγοριοποίησης βάσει όρων Gene Ontology

Για να προσδιορίσουμε σε μεγαλύτερο βάθος το λειτουργικό προφίλ των στόχων του miR-503 και να κατανοήσουμε καλύτερα της βιολογικές διεργασίες που μπορεί να επηρεάζονται από αυτό ακολούθησε ανάλυση εμπλουτισμού σε όρους GO. Οι στόχοι του miR-503 παρουσιάζουν τον υψηλότερο εμπλουτισμό για τη λειτουργία “angiogenesis” (GO:0001525), ενώ δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα στις αναλύσεις για

εμπλουτισμό ως προς τις μοριακές λειτουργίες ή την κυτταρική τοπολογία. Τα αναλυτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα **4.41**.

Πίνακας 4.41: Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εμπλουτισμού σε όρους GO για τους στόχους του miR-503.

Βιολογική λειτουργία (όρος GO)*	Εμπλουτισμός (Fold enrichment)	P-value	FDR
angiogenesis (GO:0001525)	10.83	3.78×10^{-6}	1.49×10^{-2}
blood vessel morphogenesis (GO:0048514)	8.45	1.84×10^{-5}	2.63×10^{-2}
blood vessel development (GO:0001568)	8.00	6.43×10^{-6}	1.44×10^{-2}
morphogenesis of an epithelium (GO:0002009)	7.93	2.75×10^{-5}	3.60×10^{-2}
vasculature development (GO:0001944)	7.64	9.00×10^{-6}	1.77×10^{-2}
cardiovascular system development (GO:0072358)	7.47	1.05×10^{-5}	1.66×10^{-2}
tube morphogenesis (GO:0035239)	6.79	5.88×10^{-6}	1.54×10^{-2}
positive regulation of cell proliferation (GO:0008284)	6.74	3.41×10^{-8}	5.36×10^{-4}
circulatory system development (GO:0072359)	6.27	9.70×10^{-7}	5.09×10^{-3}
tube development (GO:0035295)	5.88	5.77×10^{-6}	1.82×10^{-2}
anatomical structure formation involved in morphogenesis (GO:0048646)	5.52	9.98×10^{-6}	1.74×10^{-2}
regulation of cell proliferation (GO:0042127)	4.51	4.34×10^{-7}	3.41×10^{-3}

* Δεδομένου πως η όροι Gene Ontology είναι συγκεκριμένοι και προκαθορισμένοι από το Gene Ontology Consortium και καθώς η ανάλυση εμπλουτισμού βασίζεται στη χρήση των όρων GO, αυτοί επιλέχθηκε να παρουσιαστούν στην επίσημη μορφή τους και να μη μεταφραστούν.

4.3.6 Αποτελέσματα εξόρυξης δεδομένων βάσει PubMed για το miR-503

Το miR-503 είναι το καλύτερο μελετημένο miRNA από όσα εξετάστηκαν. Έως και τις 5/9/2018, υπήρχαν αναρτημένες 178 εργασίες που το αναφέρουν, εκ των οποίων 3 στα πλαίσια της αθηροσκλήρωσης και 18 σε σχέση με τη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων και του ενδοθηλίου. Βιβλιογραφικά βρέθηκε ότι το miR-503 είναι ρυθμιστής της λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η αυξημένη έκφραση του εμποδίζει την αγγειογένεση, μειώνοντας

τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και το σχηματισμό σωληνίσκων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα όπως έχει δείχθει για πλειάδα συνθηκών (διαβήτης, υποξία, φλεγμονή, καρκίνος), αντιθέτως στα ίδια πλαίσια η αναστολή της δράσης του έχει τα αντίθετα αποτελέσματα.¹⁸⁸⁻¹⁹¹ Ακόμα, το miR-503 παράγεται και εκκρίνεται από μακροφάγα που έχουν εκτεθεί σε προ-αθηρογόνους παράγοντες, προσλαμβάνεται από κύτταρα που δεν έχουν εκτεθεί στους ίδιους παράγοντες και εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση τους. Αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των λείων αγγειακών μυοκυττάρων της αορτής. Ενώ μέρος της αντι-αθηροσκληρωτικής δράσης της εξετιμίμπης έχει αποδοθεί στην μείωση της έκφραση του miR-503, που προκαλεί το συγκεκριμένο φάρμακο.¹⁹²⁻¹⁹⁴

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Συζήτηση – Συμπεράσματα

Εισαγωγή

Αντικείμενο της παρούσας φαρμακογονιδιωματικής μελέτης ήταν η αξιολόγηση της μοριακής δράσης της ανασυσταμένης HDL, που περιέχει ανθρώπινες απολιποπρωτεΐνες apoA-I ή apoE3 αγρίου τύπου (rHDL-apoA1, rHDL-apoE3), στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής (HAECs) και ειδικότερα στην έκφραση miRNAs. Στόχος της παραπάνω αξιολόγησης ήταν ο εντοπισμός πιθανών αθηροπροστατευτικών επιδράσεων των συγκεκριμένων τύπων rHDL στα HAECs και ο χαρακτηρισμός των ενδεχόμενων ρόλων των miRNAs στους μηχανισμούς μέσω των οποίων αυτές μπορεί να ασκούνται. Για το σκοπό αυτό έγινε χρήση μικροσυστοιχιών, ώστε να εντοπιστούν εκείνα τα miRNAs των οποίων η έκφραση αλλάζει στατιστικά σημαντικά στα HAECs υπό την επίδραση θεραπειών με σωματίδια rHDL-apoA-I ή rHDL-apoE3 και θα μπορούσαν να μεσολαβούν αθηροπροστατευτικές δράσεις.

Επίδραση της rHDL στην ολική έκφραση miRNAs των HAECs και λειτουργική κατηγοριοποίηση των επηρεαζόμενων μορίων

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας διεξήχθη βιοπληροφορική ανάλυση των δεδομένων που λήφθηκαν από μικροσυστοιχίες έκφρασης miRNA, με τη χρήση προγραμμάτων ανάλυσης τελευταίας τεχνολογίας, η οποία ανέδειξε περιορισμένες αλλά στατιστικά και βιολογικά σημαντικές αλλαγές. Συγκεκριμένα, προέκυψε ότι οι δύο τύποι rHDL που εξετάστηκαν (rHDL-apoA-I και rHDL-apo-E3) μεταβάλουν την έκφραση δύο διαφορετικών ομάδων miRNA, μεταξύ των οποίων δεν υπάρχει αλληλεπικάλυψη. Η rHDL-apoA-I προκάλεσε μείωση της έκφρασης των miR-3188, miR-3185, miR-1231, miR-3195, miR-2861, miR-1915 και miR-638. Η rHDL-apo-E3 επηρέασε την έκφραση μόνο του miR-503 μειώνοντας την. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανές αθηροπροστατευτικές δράσεις των δύο τύπων rHDL στα ενδοθηλιακά κύτταρα, πιθανότατα επιτυγχάνονται μέσω διαφορετικών miRNA ρυθμιστικών μονοπατιών. Ακολούθησε η εύρεση πειραματικά επιβεβαιωμένων και η πρόβλεψη πιθανών στόχων για καθένα από τα παραπάνω miRNAs, και η αντιπαραβολή των στόχων που εντοπίστηκαν με τα αποτελέσματα προηγούμενου πειράματος γονιδιακής έκφρασης, που έγινε από την ομάδα μας υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες με το παρόν.¹⁷⁴ Με τον τρόπο αυτό εντοπίστηκαν οι στόχοι του κάθε miRNA που είναι βιολογικά σχετικοί στα πλαίσια της παρούσας μελέτης και οι επόμενες αναλύσεις έγιναν μόνο σε αυτούς.

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι μοριακοί μηχανισμοί στους οποίους εμπλέκονται τα miRNAs που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αλλαγή στην έκφραση τους, πραγματοποιήθηκαν εκτενείς βιοπληροφορικές

αναλύσεις. Το πρόγραμμα Ingenuity Pathway Analysis έδειξε πως τόσο τα miRNAs καθαυτά όσο και οι στόχοι τους, εμπλέκονται σε μία σειρά διαφορετικών κυτταρικών λειτουργιών, κάποιες από τις οποίες σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων και ενδεχομένως με την αθηροσκλήρωση. Συγκεκριμένα αφού φορτώθηκαν οι λίστες με τα miRNAs και του στόχους τους, η “κεντρική ανάλυση” του IPA προσδιόρισε τις λειτουργικές κατηγορίες και τις επί μέρους λειτουργίες, οι οποίες επηρεάζονται στατιστικά σημαντικά από τις διαφορετικές ομάδες των υπό εξέταση μορίων. Το σύνθημα αποτέλεσε για κάθε ομάδα μορίων που εξετάστηκαν ήταν μία λίστα με μεγάλο αριθμό διαφορετικών μοριακών και βιολογικών λειτουργικών κατηγοριών. Ανάμεσα σε αυτές εντοπίστηκε μία σειρά λειτουργικών κατηγοριών που εμπλέκονται άμεσα με τη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων και ενδεχομένως με την αθηροσκλήρωση. Αυτές ήταν η κυτταρική μετανάστευση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ο κυτταρικός θάνατος και επιβίωση, η φλεγμονώδης απόκριση, ο μεταβολισμός λιπιδίων, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η μεταγωγή σήματος και η ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος.

Για να προσδιορίσουμε σε μεγαλύτερο βάθος το λειτουργικό προφίλ των στόχων των miRNAs ακολούθησε ανάλυση εμπλουτισμού σε όρους GO με το πρόγραμμα GO Enrichment Analysis [<http://geneontology.org/page/go-enrichment-analysis>]. Η ανάλυση αυτή έδειξε πως στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα (p -value και $FDR \leq 0,05$) υπήρχαν μόνο για τους στόχους των miR-3185, miR-2861 και miR-503. Οι στόχοι των miR-3185 και miR-2861 έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό τον υψηλό εμπλουτισμό σε όρους GO που αναφέρονται στο μεταβολισμό λιπιδίων ενώ ταυτίζονται ως προς τη λειτουργία “regulation of sterol biosynthetic process” (GO:0106118) που περιλαμβάνει το μονοπάτι βιοσύνθεσης χοληστερόλης. Οι στόχοι του miR-503 παρουσιάζουν τον υψηλότερο εμπλουτισμό για τη λειτουργία “angiogenesis” (GO:0001525). Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τον λεπτομερή χαρακτηρισμό των λειτουργικών κατηγοριών που προέκυψαν από την IPA ανάλυση για τα miR-3185, miR-2861 και miR-503. Ο συνδυασμός των ανωτέρω παρατηρήσεων με τα αποτελέσματα της βιβλιογραφικής έρευνας για τους πιθανούς ρόλους των miRNAs και ιδίως των στόχων τους στις λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αθηροσκλήρωση, οδήγησαν στην επιλογή, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, από τα miRNAs της θεραπείας rHDL-apoA-I να επικεντρωθούμε στα miR-3185 και miR-2861 και στη λειτουργική κατηγορία “μεταβολισμός λιπιδίων” με έμφαση στη βιοσύνθεση χοληστερόλης και από τη θεραπεία rHDL-apoE3 στο ρόλο του miR-503 στην “ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος” και ειδικότερα στην αγγειογένεση.

Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι διερευνήθηκαν όλες οι λειτουργίες που αναδείχθηκαν από την ανάλυση με το πρόγραμμα IPA για τα miRNAs και τους στόχους τους, ακόμα και αν δεν σχετίζονταν άμεσα με το αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Αυτό γιατί, καθώς τα δεδομένα της βάσης δεδομένων του IPA προέρχονται από την αποδελτίωση πλήθους ερευνητικών δημοσιεύσεων και όπως είναι αναμενόμενο παρουσιάζουν ποικιλία ως προς το αντικείμενο τους. Επιπλέον, η δράση των υπό εξέταση μορίων στα επιμέρους μοριακά μονοπάτια είναι μεν πιθανό να παρουσιάζει ιστοειδικότητα,¹⁷⁰⁻¹⁷² αλλά τα ίδια μονοπάτια (π.χ πολλαπλασιασμός, φλεγμονώδης απόκριση κτλ) που έχει αναφερθεί ότι επηρεάζονται από αυτά σε έναν τύπο κυττάρου (πχ κυτταρικές σειρές καρκίνου των οστών, νεφρικά κύτταρα) είναι πολύ πιθανό να επηρεάζονται από τα ίδια μόρια και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, που είναι το αντικείμενο της παρούσας μελέτης.^{101,171} Μελετώντας και αυτές τις δράσεις των υπό εξέταση μορίων μπορούμε να αποκτήσουμε πολύτιμες πληροφορίες για τις μοριακές και βιολογικές λειτουργίες τους, που λόγω του μικρού αριθμού μελετών στα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν θα μας ήταν γνωστές.

Η επίδραση του miR-503 στην αγγειογένεση

Η επιλογή να επικεντρωθούμε στην αγγειογένεση, από όλες τις λειτουργίες που επηρεάζονται από το miR-503 και τους στόχους του, ενισχύεται από τη ζωτική σημασία της διατήρησης της φυσικής συνέχειας και λειτουργίας του ενδοθηλίου για την πρόληψη της αθηροσκλήρωσης, όπως προέκυψαν από τη μελέτη της βιβλιογραφίας. Οι διαταραχές της ακεραιότητας και της λειτουργίας του ενδοθηλίου διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη, εξέλιξη και εμφάνιση των επιπλοκών της νόσου. Η δυσλειτουργία του έχει αναγνωρισθεί ως η πλέον πρόωμη αλλοίωση του αγγειακού τοιχώματος και εμφανίζεται πριν από την έναρξη του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας.^{9,12,92} Ενώ είναι χαρακτηριστικό πως η απώλεια των ενδοθηλιακών κυττάρων στο σημείο της αλλοίωσης οδηγεί στην αποδυνάμωση της αθηρωματικής πλάκας και είναι μία από τις κύριες αιτίες εμφάνισης επιπλοκών (ρήξη της πλάκας, θρόμβωση).^{93,94} Υπό την επίδραση των παραγόντων αυξημένου καρδιαγγειακού κινδύνου (υψηλή LDL, υπέρταση, φλεγμονή), το ενδοθήλιο τραυματίζεται συνεχώς. Ο συνεχής τραυματισμός και η ακόλουθη ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι από τους κύριους παράγοντες που συμβάλουν στην εμφάνιση αγγειακής νόσου.^{41,95,96} Οι δύο κύριες διαδικασίες που έχει δειχθεί ότι συμβάλουν στην αποκατάσταση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου μετά από τον τραυματισμό του *in vivo*, είναι ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων στο σημείο της βλάβης.⁹⁷⁻¹⁰⁰

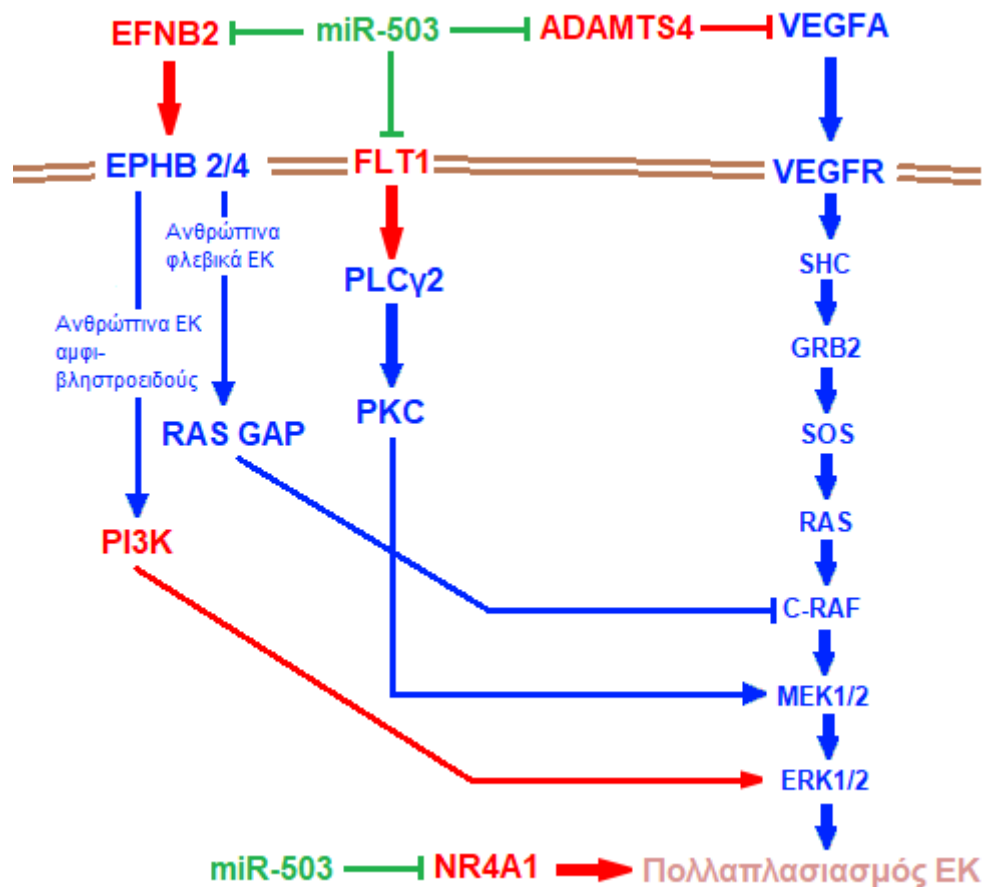
Σημαντικός αριθμός δημοσιεύσεων δείχνουν πως το miR-503 είναι σημαντικός ρυθμιστής της αγγειογένεσης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν πολύ χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού και ο

ρυθμός ανανέωσης τους (turnover rate) είναι της τάξης των μηνών, ιδιότητα που έχει εν μέρει αποδοθεί στη σταθερή έκφραση του miR-503 από αυτά.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ Χαρακτηριστικό του ρόλου του miR-503 στην αναστολή της αγγειογένεσης είναι πως τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν το miR-503 εντός μικροκυστιδίων, τα οποία προσλαμβάνονται από τα γειτονικά λεία αγγειακά μυοκύτταρα και τα περικύτταρα των αρτηριών, δύο τύπους κυττάρων που επίσης συμμετέχουν στην αγγειογένεση. Έχει αποδειχθεί πως το miR-503 που προσλαμβάνεται με αυτόν τον τρόπο εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση και αυτών των τύπων κυττάρων.^{193,198,199} Οι διαταραχές της έκφρασης του, τόσο προς τα επάνω όσο και προς τα κάτω, έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων.¹⁹⁶ Για παράδειγμα, η υπεργλυκαιμία και ισχαιμία που συνοδεύει συχνά το διαβήτη επάγει την αύξηση της έκφρασης του και αυτή με τη σειρά τη έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαταραχών στην αγγειογένεση λόγω καταστολής του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων.^{188,193,197,198} Η μείωση της έκφρασης έχει δείχθει πως έχει τα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα. Ενδεικτικά έχει βρεθεί πως κατά τη φλεγμονή ή την υποξία η έκφραση του miR-503 μειώνεται. Αυτή η μείωση προκαλεί την αύξηση της έκφρασης ειδικών για κάθε πάθηση στόχων του (CD40, apelin αντίστοιχα) με αποτέλεσμα την επαγωγή της αγγειογένεσης μέσω του αυξημένου πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων.^{189,200} Ο συγκεκριμένος μηχανισμός πρέπει να βρίσκεται υπό στενό έλεγχο, καθώς ο αυξημένος πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων που προκαλείται από τη μειωμένη έκφραση του miR-503, μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις.²⁰¹ Όπως είναι για παράδειγμα η καταστροφή των πνευμονικών αρτηριδίων, χαρακτηριστικό σύμπτωμα της πνευμονικής υπέρτασης, που προκαλείται λόγω της αντικατάστασης τους από ουλώδη ιστό, αποτελούμενο από ενδοθηλιακά και αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα που παρουσιάζουν υπερβολικό πολλαπλασιασμό.²⁰² Όσα αναφέρθηκαν δείχνουν πως η παρατηρούμενη μείωση της έκφρασης του miR-503 που προκαλεί η rHDL-apoE3, είναι ικανή συνθήκη για την επαγωγή της αγγειογένεσης καθώς έχει συνδεθεί με αύξηση του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Για να εντοπιστούν οι πιθανοί στόχοι μέσω των οποίων το miR-503 θα μπορούσε να επηρεάζει την αγγειογένεση στα πλαίσια της παρούσας μελέτης ακολούθησε αναζήτηση στη σχετική βιβλιογραφία. Από αυτήν εντοπίστηκαν αρκετές δημοσιεύσεις που δείχνουν ότι κάποια από τα γονίδια τα mRNA των οποίων βρίσκονται ανάμεσα στους στόχους του miR-503 έχουν σημαντική επίδραση στην αγγειογένεση. Ανάμεσα στους πειραματικά επιβεβαιωμένους στόχους βρίσκεται το mRNA το γονίδιο EFNB2, η έκφραση του οποίου όπως έδειξε το προηγούμενο πείραμα γονιδιακής έκφρασης αυξάνεται υπό την επίδραση της rHDL-apoE3. Το EFNB2 κωδικοποιεί για τη διαμεμβρανική

τυροσινική κινάση εφρίνη B2, που μαζί με τον υποδοχέα της EPHB4 διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση της αγγειογένεσης.²⁰³⁻²⁰⁵ Σε ενδοθηλιακά κύτταρα υπό υποξικές συνθήκες η επαγωγή της σηματοδότησης μέσω της εφρίνης B2 και του υποδοχέα της έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της αγγειογένεσης.²⁰⁶ Ενώ έχει βρεθεί ότι εκφράζεται από διαφορετικούς τύπους καρκινικών κυττάρων στα οποία έχει δείχθει ότι η αναστολή της δράσης της, καταστέλλει την αγγειογένεση *in vivo*.^{199,207} Έχει επίσης δείχθει ότι η εφρίνη B2 έχει κεντρικό ρόλο στη μετάδοση του σήματος του VEGF στην μικρή GTPάση Rac1 και τις κινάσες Akt και Erk, αποτελώντας με αυτόν τον τρόπο κεντρικής σημασίας ρυθμιστή της αγγειογένεσης.²⁰⁸ Από τους πιθανούς στόχους του miR-503 τα FLT1 και NR4A1 επίσης επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ το ADAMTS1 είναι αναστολέας αγγειογένεσης. Η έκφραση και των τριών γονιδίων αυξάνεται υπό την επίδραση της rHDL-apoE3. Το γονίδιο FLT1 κωδικοποιεί μία πρωτεϊνική κινάση που λειτουργεί ως υποδοχέας για τους αυξητικούς παράγοντες VEGFA, VEGFB και PDGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα, είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανάπτυξη των αγγείων στο έμβρυο, ενώ ρυθμίζει την αγγειογένεση και στην ενήλικη ζωή επάγοντας τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK1/2.²⁰⁹⁻²¹² Το γονίδιο NR4A1 κωδικοποιεί τον πυρηνικό ορμονικό υποδοχέα Nur77, η δράση του οποίου ως μεταγραφικού παράγοντα είναι ανεξάρτητη από την παρουσία του προσδέτη του, ενώ είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος σε αυξητικούς παράγοντες όπως ο VEGF και ο PDGF. Έχει βρεθεί πως η έκφραση του αυξάνει σε μεγάλο βαθμό σε περιπτώσεις παθολογικής αγγειογένεσης και η υπερέκφραση του από τα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*, προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού τους ακόμα και απουσία του VEGFA.²¹³⁻²¹⁵ Η αυξημένη έκφραση των EFNB2, FLT1 και NR4A1, σε συνδυασμό με την μείωση της έκφρασης του miR-503 που στοχεύει τα mRNA τους, δείχνει πως η rHDL-apoE3 θα μπορούσε να επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω ενός άξονα rHDL-apoE3 – μείωση της έκφρασης του miR-503 – αύξηση της έκφρασης των EFNB2, FLT1 και NR4A1 – επαγωγή της αγγειογένεσης. Η παρατήρηση πως εκτός των άλλων γονιδίων επάγεται και η μεταγραφή του ADAMTS1, προσθέτει βάρος στην παραπάνω υπόθεση. Αν και το ADAMTS1 είναι ισχυρός αναστολέας της αγγειογένεσης, η έκφραση του επάγεται σε σημαντικό βαθμό υπό την επίδραση του VEGF σε ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*, και επιπλέον η έκφραση του (όπως και αυτή του VEGF) έχει βρεθεί ότι αυξάνει κατά την αγγειογένεση που επάγεται από την ισχαιμία *in vivo*. Για αυτό έχει προταθεί πως το ADAMTS1 αποτελεί τμήμα ενός μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης που εμποδίζει την υπέρμετρη επαγωγή της αγγειογένεσης.²¹⁶⁻²¹⁸ Δηλαδή, εάν υποθέσουμε πως η rHDL-apoE3 όντως επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω του miR-503 και των στόχων του, η ενεργοποίηση του μηχανισμού αρνητικής ανάδρασης

είναι αναμενόμενη και προσφέρει μία ακόμα ένδειξη για την πιθανή ορθότητα της υπόθεσης. Τα ανωτέρω παρουσιάζονται διαγραμματικά στο **σχήμα 5.1**.

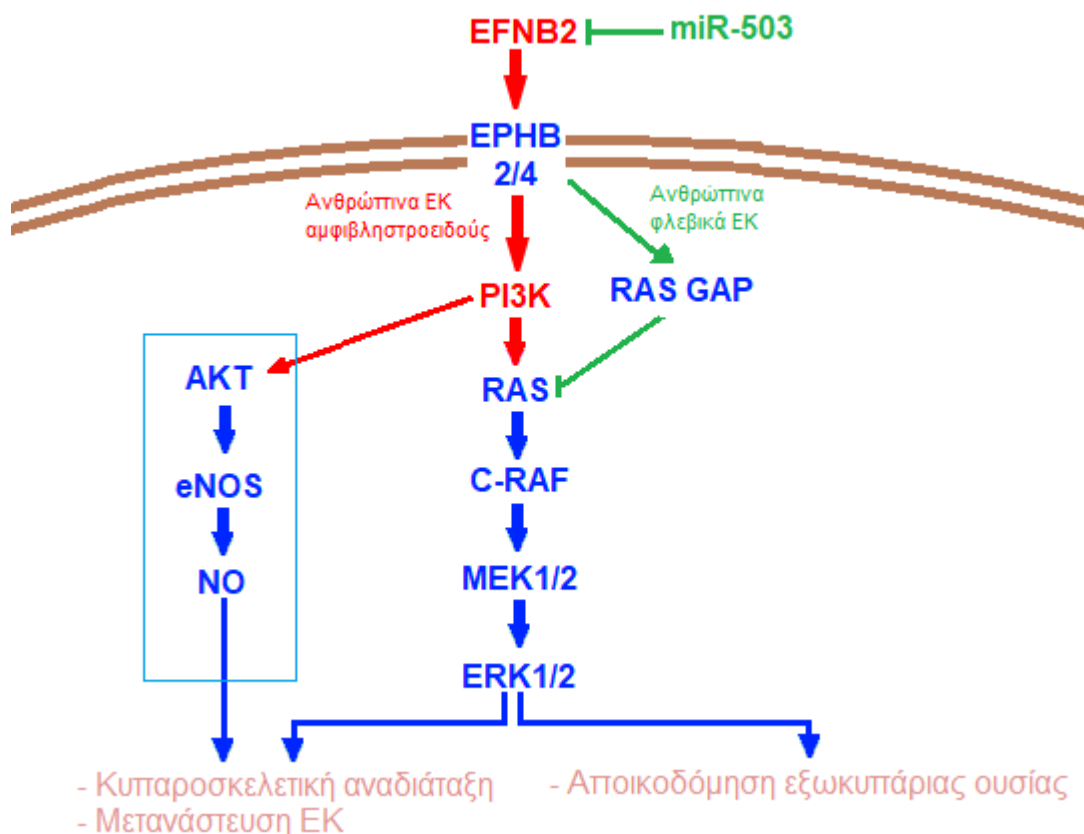


Σχήμα 5.1 Διαγραμματική αναπαράσταση του πιθανού μονοπατιού μέσω του οποίου η rHDL-αροΕ3 μπορεί να επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων με τη διαμεσολάβηση του miR-503 και των στόχων του. Πράσινο: μείωση της έκφρασης ή/και απενεργοποίηση του μονοπατιού. Κόκκινο: αύξηση της έκφρασης ή/και ενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: χωρίς αλλαγή στα διαθέσιμα δεδομένα.

Εκτός από τον πολλαπλασιασμό, κάποιοι από τους στόχους του miR-503 συμμετέχουν και σε διάφορα μονοπάτια που ρυθμίζουν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν γονίδια που συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στα εξής μονοπάτια: 1) το ERK1/2 μονοπάτι, 2) το μονοπάτι PI3K/AKT/eNOS, 3) το μονοπάτι των P38 MAPK/PAK/ROCK κινασών κάτωθι των RHOA GTPασών, και 4) το σηματοδοτικό μονοπάτι ιντεγκρινών στις εστίες κυτταρικής προσκόλλησης.

1) και 2) τα μονοπάτια μετανάστευσης ERK1/2 και PI3K/AKT/eNOS. Από τους στόχους του miR-503 μόνο η EFN2 συμμετέχει στο μονοπάτι ERK1/2, του οποίου την ενεργοποίηση μπορεί είτε να επάγει,²¹⁹ είτε να καταστέλλει, ανάλογα με το είδος των ενδοθηλιακών κυττάρων.²²⁰ Σε ανθρώπινα

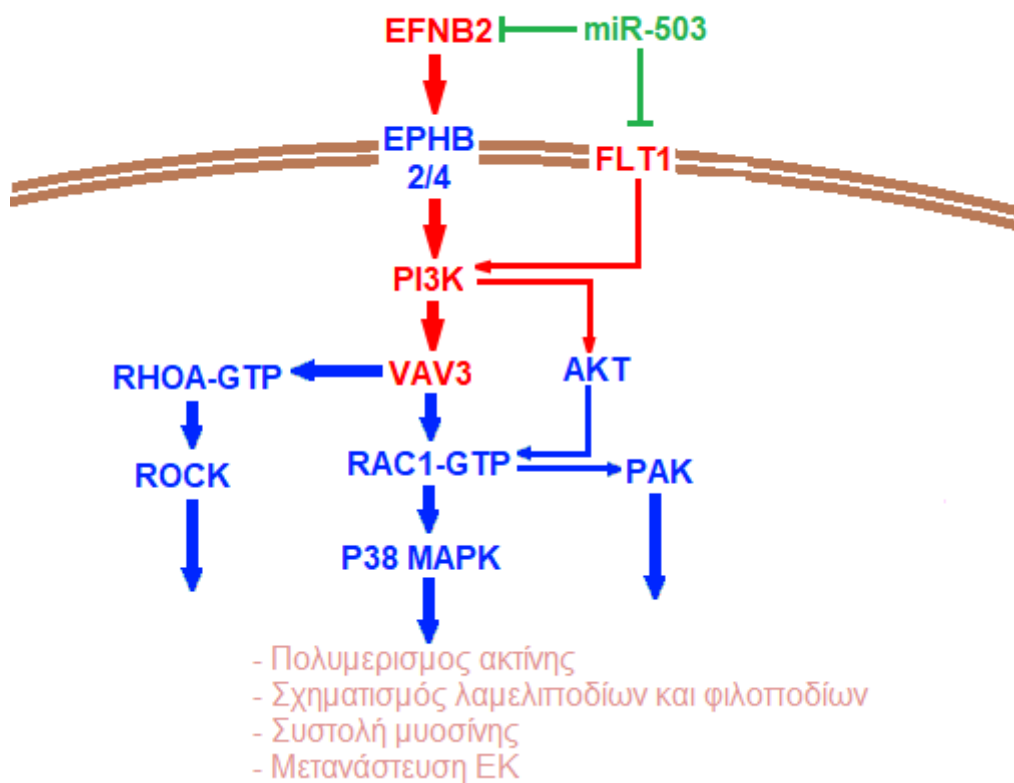
ενδοθηλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς, η πρόσδεση της εφρίνης B2 στον υποδοχέα της ενεργοποιεί την PI3Kγ κινάση,²¹⁹ που φέρει τη γ ισομορφή της καταλυτικής υπομονάδας που κωδικοποιείται από το γονίδιο PIK3CG, η έκφραση του οποίου επίσης αυξάνει υπό την επίδραση της rHDL-αροE3.^{174,221,222} Η PIK3 με τη σειρά της φωσφορυλιώνει καθοδικά το RAS με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ERK1/2 κινασών και την επαγωγή της κυτταρικής μετανάστευσης.²¹⁹ Ωστόσο, η εφρίνη B2 έχει την αντίθετη δράση στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας (HUVECs).²²⁰ Σε αυτήν την περίπτωση, αφού προσδεθεί και φωσφορυλιώσει τους υποδοχείς της EPHB2/4, αυτοί προσελκύουν το p120RASGAP που καταστέλλει τη λειτουργία του RAS, μετατρέποντας το στην ανενεργή μορφή RAS-GDP.²²⁰ Με το μοριακό αυτό μηχανισμό δράσης της εφρίνης B2 καταστέλλεται η ενεργοποίηση των ERK1/2 κινασών κάτωθι των VEGF και αγγειοποιητίνης 1.²²⁰ **Σχήμα 5.2**



Σχήμα 5.2: Διαγραμματική αναπαράσταση των μονοπατιών μετανάστευσης ERK1/2 και PI3K/AKT/eNOS (γαλάζιο πλαίσιο) που επηρεάζονται από τη χορήγηση rHDL-αροE3 μέσω του miR-503 και του στόχου του EFNΒ2. Κόκκινο: αύξηση της έκφρασης ή/και ενεργοποίηση του μονοπατιού. Πράσινο: μείωση τη έκφρασης ή/και απενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: χωρίς αλλαγές στα διαθέσιμα δεδομένα.

Επιπροσθέτως η εφρίνη B2 επάγει τη μετανάστευση των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων των τριχοειδών αγγείων και του αμφιβληστροειδούς, μέσω της ενεργοποίησης και του μονοπατιού PI3K/AKT/eNOS που ακολουθεί τη σύνδεση της με τον υποδοχέα EPHB4.^{219,225} **Σχήμα 5.2**

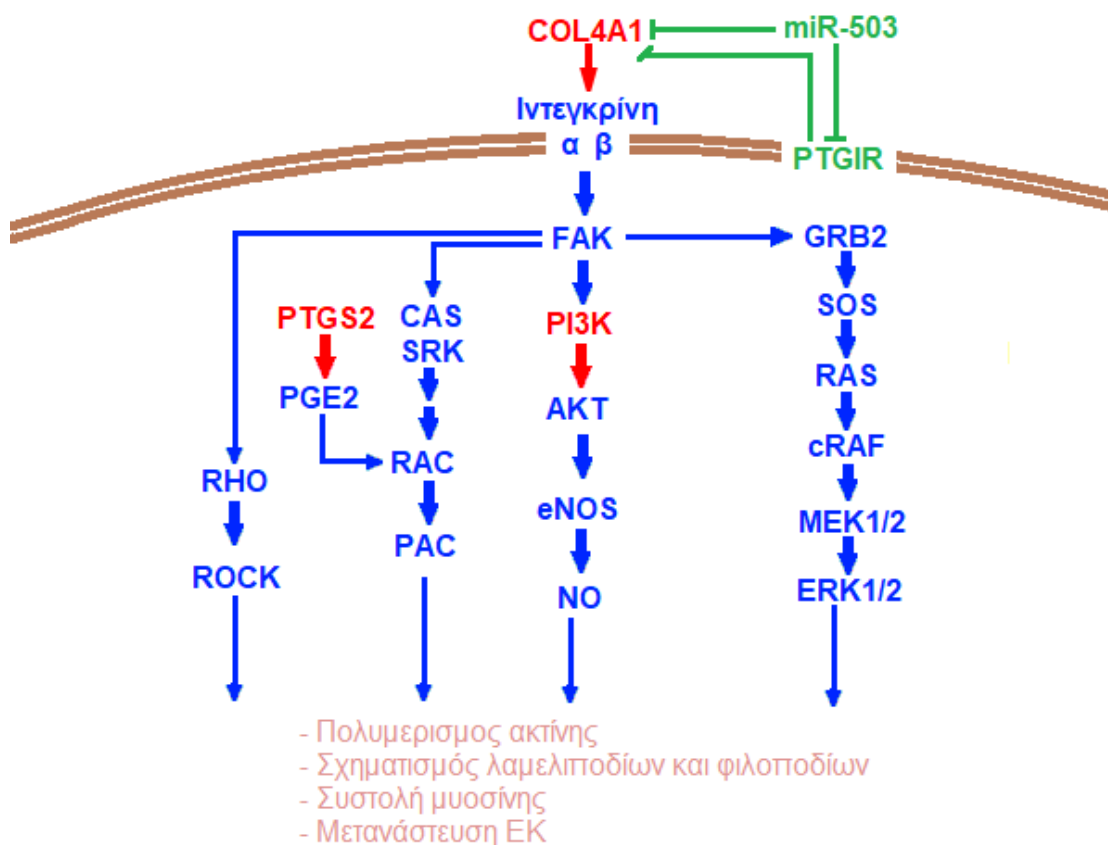
3) το μονοπάτι μετανάστευσης P38 MAPK/PAK/ROCK κινασών. Τα FLT1 και EFNB2 είναι τα δύο γονίδια που επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα το μονοπάτι μετανάστευσης των P38 MAPK/PAK/ROCK κινασών, κάτωθι των RHOA GTPασών και τα mRNA τους στοχεύονται από το miR-503. Μελέτες έχουν δείξει πως και τα δύο επάγουν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των RHO GTPασών RHOA και RAC1.^{223,224} Η φωσφορυλίωση του FLT1 μετά από την πρόσδεση του VEGF επάγει τη μετανάστευση των ανθρώπινων αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/AKT/RAC1,²²³ ενώ και η εφρίνη B2 επηρεάζει την ενεργοποίηση της RAC1 κινάσης, επάγοντας μέσω αυτής τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.²²⁴ **Σχήμα 5.3**



Σχήμα 5.3 Διαγραμματική αναπαράσταση μονοπατιών μετανάστευσης των P38 MAPK/PAK/ROCK κινασών κάτωθι των RHO GTPασών (RHOA, RAC1) που επηρεάζονται από τη χορήγηση rHDL-apoE3 μέσω του miR-503 και των στόχων του EFNB2 και FLT1. Κόκκινο: αύξηση της έκφρασης που οδηγεί σε ενεργοποίηση των RHO GTPασών. Πράσινο: μείωση της έκφρασης που οδηγεί σε ενεργοποίηση των RHO GTPασών. Μπλε: χωρίς αλλαγές στα διαθέσιμα δεδομένα.

4) το σηματοδοτικό μονοπάτι ιντεγκρινών στις εστίες κυτταρικής προσκόλλησης. Τα mRNA των γονιδίων της A αλυσίδας του κολλαγόνου τύπου IV (COL4A1) και του υποδοχέα της προσταγλανδίνης I2 (PTGIR), είναι οι πιθανοί στόχοι του miR-503 που επάγουν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων επηρεάζοντας άμεσα το μονοπάτι των ιντεγκρινών στις εστίες κυτταρικής προσκόλλησης. Το COL4A1, του οποίου η έκφραση αυξάνεται υπό την επίδραση της rHDL-apoE3, επάγει τη μετανάστευση μέσω της ενεργοποίησης της ιντεγκρίνης $\alpha 1\beta 1$ μετά την απευθείας πρόσδεση του σε αυτήν.²²⁶ Αντιθέτως, το καρβόξυ-τελικό τμήμα του, που απελευθερώνεται μετά την πρωτεολυτική διάσπαση του και ονομάζεται *arresten*, ανταγωνίζεται το COL4A1 για την πρόσδεση στην ιντεγκρίνη $\alpha 1\beta 1$. Όταν το *arresten* συνδεθεί με την ιντεγκρίνη $\alpha 1\beta 1$ αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της FAK κινάσης και την ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS/RAF/MEK/ERK1 καθοδικά αυτής.²²⁷ Η προσταγλανδίνη I2 μπορεί να επάγει τη μετανάστευση των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro*, κάτωθι της ενεργοποίησης των ιντεγκρινών $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ και $\alpha V\beta 3$ από τη φимπρονεκτίνη. Η δράση της προσταγλανδίνης I2 εκδηλώνεται μετά την πρόσδεση της στον υποδοχέα της, ο οποίος αυξάνει την έκφραση των παραπάνω προσταγλανδινών.²²⁸ Η μειωμένη έκφραση του PTGIR έχει δείχθει πως οδηγεί σε μείωση της μετανάστευσης προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων και της αποκατάστασης της ακεραιότητας του ενδοθηλίου μετά από τραυματισμό.²²⁸ Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί ότι αν η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων όντως επάγεται από την rHDL-apoE3 αυτό πιθανότατα επιυγχάνεται μέσω της προσταγλανδίνης H2 που παράγεται από το PTGS2, του οποίου η έκφραση επίσης αυξάνει υπό την επίδραση της rHDL-apoE3,¹⁷⁴ και όχι από την I2. Οι παρατηρούμενες αλλαγές στην έκφραση των τριών γονιδίων: PTGS2 (αυξάνει), PTGIS (μειώνεται, κωδικοποιεί τη συνθετάση της PGI2 που καταλύει τη μετατροπή της προσταγλανδίνης H2 σε I2), και PTGIR (μειώνεται), δείχνουν πως τόσο η παραγωγή προσταγλανδίνης I2, όσο και η σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα της μειώνεται. Από τα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε πως αυτό το τμήμα του μονοπατιού των ιντεγκρινών πιθανότατα ρυθμίζεται από άλλους μοριακούς μηχανισμούς που επηρεάζονται από την rHDL-apoE3 και όχι μέσω της μείωσης του miR-503.

Σχήμα 5.4



Σχήμα 5.4 Διαγραμματική αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού των ιντεγκρινών στις εστίες κυτταρικής προσκόλλησης που επηρεάζεται από τη χορήγηση rHDL-apoE3 μέσω του miR-503 και των στόχων του COL4A1 και PTGIR. Κόκκινο: αύξηση της έκφρασης η/και ενεργοποίηση του μονοπατιού. Πράσινο: μείωση της έκφρασης ή/και απενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: χωρίς αλλαγές στα διαθέσιμα δεδομένα.

Τα ευρήματα της παραπάνω ανάλυσης υποδηλώνουν ότι η rHDL-apoE3, μέσω της μείωσης της έκφρασης του miR-503 που προκαλεί, έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει μοριακά μονοπάτια που σχετίζονται με τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, την οποία πιθανότατα επάγει μέσω της κυτταροσκελετικής αναδιάρταξης και της αυξημένης παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου (NO) που προκαλείται από την αυξημένη έκφραση των mRNA των στόχων του miR-503 EFNB2, FLT1 και COL4A1.

Η επίδραση των miR-3185 και miR-2861 στη βιοσύνθεση χοληστερόλης

Όπως και στην περίπτωση της αγγειογένεσης, τα δεδομένα των βιοπληροφορικών αναλύσεων που οδήγησαν στην επιλογή του μεταβολισμού της χοληστερόλης για περαιτέρω ανάλυση, ενισχύονται και από τα βιβλιογραφικά δεδομένα, μιας και έχει δεχθεί πως η διατήρηση της ομοιόστασης της χοληστερόλης είναι απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία

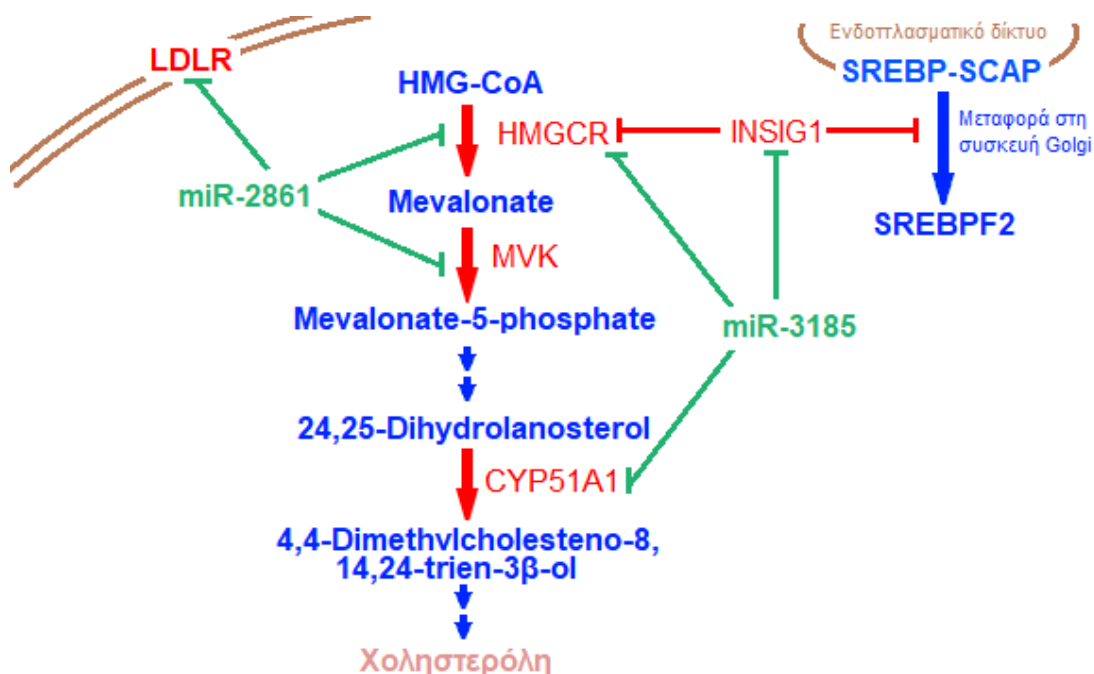
των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η χοληστερόλη επιτελεί μία σειρά από σημαντικές λειτουργίες ειδικές για τη φυσιολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων.²²⁹ Ρυθμίζει τη μεταφορά μορίων εντός του κυτάρου (intracellular transport) και τη μεταγωγή σημάτων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.^{230,231} Η παρουσία της στην κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του σηματοδοτικού μονοπάτι του αυξητικού παράγοντα VEGF και η έλλειψη της μπορεί να προκαλέσει αναστολή της αγγειογένεσης.^{232,233} Το ίδιο αποτέλεσμα επέρχεται και αν υπάρξει διαταραχή στη ενδοκυτταρική διακίνηση της και μεγάλη συσσώρευση ελεύθερης χοληστερόλης εντός των κυττάρων.²³⁴⁻²³⁷ Λόγω της έλλειψης καταβολικών μονοπατιών στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η συγκέντρωση της πρέπει να ρυθμίζεται στενά, ώστε να διατηρείται η ομοιοστατική ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης, της εστεροποίησης και της πρόσληψης ή απόδοσης της στις λιποπρωτεΐνες της κυκλοφορίας.^{229,238,239} Τα miRNAs ρυθμίζουν τις βασικές πρωτεΐνες της ομοιόστασης της χοληστερόλης και η αλλαγές στην έκφραση όσων εμπλέκονται σε αυτήν έχουν σχετιστεί με μεταβολικές διαταραχές όπως η αθηροσκλήρωση.²⁴⁰⁻²⁴²

Κατά τη βιβλιογραφική αναζήτηση που έγινε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης δεν εντοπίστηκε κάποια δημοσίευση που να συνδέει τα υπό εξέταση miRNAs με τη ρύθμιση του μεταβολισμού της χοληστερόλης, η ανάλυση των στόχων τους όμως, έδειξε πως ανάμεσα στους πιθανούς στόχους των miR-3185 και miR-2861 βρίσκονται γονίδια σημαντικά για όλες σχεδόν τις λειτουργίες της ομοιόστασης της χοληστερόλης. Επιπλέον, η IPA ανάλυση έδειξε πως τα miR-3188, miR-3185, miR-1231, miR-2861, miR-1915 και iR-628 (6 από τα 7 miRNAs που η έκφραση τους επηρεάζεται από τα σωματίδια rHDL-apoA-I), έχουν πιθανούς στόχους που επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα το γενικότερο μεταβολισμό λιπιδίων. Στη λίστα με τους πιθανούς στόχους του miR-3185 εντοπίστηκαν 5 γονίδια (CYP51A1, HMGCR, INSIG1, STARD4, GPAT3), που με βάση την IPA ανάλυση συμμετέχουν στις λειτουργίες: σύνθεση στερολών, σύνθεση χοληστερόλης, συγκέντρωση χοληστερόλης και ομοιόσταση της χοληστερόλης. Στην αντίστοιχη λίστα για το miR-2861 εντοπίστηκαν 6 γονίδια (HMGCR, LDLR, MVK, STARD4, ANGPTL4, LIPG), που η IPA ανάλυση έδειξε ότι συμμετέχουν σε όλες σχεδόν τις λειτουργίες της ομοιόστασης της χοληστερόλης: σύνθεση στερολών, σύνθεση χοληστερόλης, πρόσληψη χοληστερόλης, κυτταρική συγκέντρωση χοληστερόλης, αναστροφή μεταφορά χοληστερόλης, μεταφορά χοληστερόλης, εστεροποίηση χοληστερόλης, κυτταρική συγκέντρωση εστέρων χοληστερόλης και ομοιόσταση της χοληστερόλης. Από τα ανωτέρω γονίδια τα HMGCR, MVK και CYP51A1 κωδικοποιούν για ένζυμα που συμμετέχουν άμεσα στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της χοληστερόλης. Καθώς υπό την επίδραση της rHDL-apoA-1 η έκφραση των miR-3185 και miR-2861 μειώνεται και λαμβάνοντας υπόψιν μας το συνήθη τρόπο λειτουργίας των miRNAs, αναμένουμε η έκφραση των

γονιδίων των οποίων τα mRNA στοχεύουν να αυξάνεται. Τα δεδομένα έκφρασης που έχουν προκύψει από το αντίστοιχο πείραμα γονιδιακής έκφρασης έχουν δείξει πως η έκφραση των HMGCR, MVK και CYP51A1 όντως αυξάνει.¹⁷⁴ Έχοντας υπόψιν μας τα παραπάνω θα μπορούσαμε να προτείνουμε την ύπαρξη ενός υποθετικού άξονα κατά τον οποίο είτε η rHDL-αποΑ-I καθαυτή, είτε η εκροή χοληστερόλης που προκαλεί, επάγει τη μείωση της έκφρασης των miR-3185 και miR-2861, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης των HMGCR, MVK και CYP51A1, με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή της βιοσύνθεσης χοληστερόλης. Τα γονίδια LDLR και STARD4 επίσης συνεισφέρουν στην αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης χοληστερόλης. Το γονίδιο LDLR κωδικοποιεί των υποδοχέα της LDL και αποτελεί την κύρια οδό πρόσληψης χοληστερόλης από την κυκλοφορία. Είναι ένα από τα γονίδια που η έκφραση του επάγεται όταν μειώνεται η συγκέντρωση χοληστερόλης εντός του κυττάρου μέσω των ρυθμιστικών στοιχείων SREBP.^{243,244} Η STARD4 είναι μία μικρή, διαλυτή πρωτεΐνη ενδοκυτταρικής διακίνησης που μεταφέρει ελεύθερη χοληστερόλη στο ενδοπλασματικό δίκτυο ή τα μιτοχόνδρια. Έχει δείχθει πως η υπερέκφραση της οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής και εστεροποίησης χοληστερόλης, όταν η ποσότητα χοληστερόλης στην κυτταρική μεμβράνη μειώνεται. Σε αυτήν την περίπτωση η STARD4 επάγει την παραγωγή SREBP και αυξάνει την ποσότητα ελεύθερη χοληστερόλης που μεταφέρει σε τμήματα του ενδοπλασματικού δικτύου πλούσια στο ένζυμο ACAT (Acyl-CoA cholesterol acyltransferase).²⁴⁵⁻²⁴⁹ Όμως, ανάμεσα στους πιθανούς στόχους του miR-3185 που η έκφραση τους αυξάνεται περιλαμβάνεται και το γονίδιο INSIG1, που κωδικοποιεί για τον κύριο αρνητικό ρυθμιστή του μονοπατιού βιοσύνθεσης χοληστερόλης.^{250,251} Η πρωτεΐνη INSIG1 ενισχύει την ανασταλτική επίδραση των στερολών στην έξοδο του συμπλόκου SCAP/SREBP από το ενδοπλασματικό δίκτυο και τη μεταφορά του στο σωμάτιο Golgi όπου παράγεται η ενεργή μορφή SREBPF2.²⁵¹⁻²⁵³ Ο SREBPF2 είναι ο μεταγραφικός παράγοντας που επάγει το μεταγραφικό πρόγραμμα βιοσύνθεσης και πρόσληψης εξωκυττάριας χοληστερόλης. Επιπλέον η INSIG1 ρυθμίζει αρνητικά τόσο τη μεταγραφή της αναγωγής του HMG-CoA, η οποία επάγεται από τον SREBPF2, όσο και την δράση του ενζύμου καθαυτή, αφού προσδένεται πάνω του παρεμποδίζοντας το.²⁵⁴⁻²⁵⁶

Μία από τις υποθέσεις που μπορούν να γίνουν συνδυάζοντας τα παραπάνω είναι πως η rHDL-αποΑ-I προκαλεί την εξαγωγή χοληστερόλης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, η μειωμένη ενδοκυτταρική ποσότητα στερολών οδηγεί στην ενεργοποίηση των μονοπατιών βιοσύνθεσης και πρόσληψης για να καλυφθούν οι ανάγκες του ενδοθηλιακού κυττάρου σε χοληστερόλη και παράλληλα επάγεται η έκφραση της INSIG1 ώστε να προληφθεί η ενδεχόμενη υπέρμετρη αύξηση της συγκέντρωσης της. Αν και παραπάνω προτεινόμενος μηχανισμός δεν προϋποθέτει τη μεσολάβηση miRNAs, κάποιες παρατηρήσεις

δείχνουν πως επιδεικνύεται ειδικότητα ως προς τον αριθμό και το είδος των επηρεαζόμενων μορίων. Συγκεκριμένα, η αύξηση της έκφρασης τριών μόνο από τα δεκαέξι γονίδια του μονοπατιού βιοσύνθεσης χοληστερόλης δεν μπορεί να εξηγηθεί μόνο από την επαγωγή του SREBF2, αφού όπως έχει δειχθεί²⁵⁷ αυτός επάγει αδιάκριτα τη μεταγραφή όλων των γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι. Επιπλέον, ενώ η μείωση του επιπέδου των στερολών που προκαλεί η rHDL-apoA-I θα έπρεπε να επάγει τη μείωση της έκφρασης της INSIG1, συμβαίνει το ακριβώς αντίθετο. Αν η rHDL-apoA-I όντως επάγει το μονοπάτι βιοσύνθεσης χοληστερόλης και αυτό επιτυγχάνεται μέσω των miR-3185 και miR-2861, η εξειδίκευση που χαρακτηρίζει γενικότερα τη ρυθμιστική δράση των miRNAs θα μπορούσε να εξηγήσει την παρατηρούμενη ειδικότητα ως προς τα επηρεαζόμενα γονίδια. Διαγραμματικά τα παραπάνω στο **σχήμα 5.5** που ακολουθεί.



Σχήμα 5.5: Διαγραμματική αναπαράσταση του πιθανού μονοπατιού μέσω του οποίου η rHDL-apoA-I μπορεί να επάγει τη βιοσύνθεση χοληστερόλης στα ενδοθηλιακά κύτταρα με τη διαμεσολάβηση των miR-3185, miR-2861 και των στόχων τους. Πράσινο: μείωση της έκφρασης ή/και απενεργοποίηση του μονοπατιού. Κόκκινο: αύξηση της έκφρασης ή/και ενεργοποίηση του μονοπατιού. Μπλε: χωρίς αλλαγή στα διαθέσιμα δεδομένα.

Περιορισμοί της παρούσας μελέτης

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε μικροσυστοιχίες ανάλυσης της έκφρασης του συνόλου των γνωστών miRNAs για τον εντοπισμό εκείνων των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται υπό την επίδραση των rHDL-apoA-I και

rHDL-apoE3, σε φυσιολογικά HAECs. Ο βασικότερος περιορισμός της μελέτης είναι πως οι αλλαγές στην έκφραση των miRNAs που προσδιορίστηκαν δεν έχουν ακόμη επιβεβαιωθεί με τη μέθοδο αναφοράς RT-qPCR. Επιπλέον η παρούσα μελέτη αξιολογεί την επίδραση των rHDL-apoA-I και rHDL-apoE3 σε φυσιολογικά HAECs. Ο ολοκληρωμένος χαρακτηρισμός της δράσης της rHDL όσον αφορά τα επηρεαζόμενα miRNAs και η επιβεβαίωση των πιθανών στόχων τους ώστε να επιτευχθεί ο ολοκληρωμένος χαρακτηρισμός της δράσης της rHDL σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, αποτελεί ένα καθοριστικό πρώτο βήμα προκειμένου η έρευνα να προχωρήσει περαιτέρω σε ζωικά μοντέλα in vivo και κλινικές δοκιμές. Ωστόσο, η συγκεκριμένη εργασία είναι μία in vitro μελέτη με αποτέλεσμα να μη γνωρίζουμε τη δράση της rHDL και των miRNAs που επηρεάζει σε επίπεδο ιστού, δηλαδή in vivo και ιδιαίτερα στο αθηροσκληρωτικό ενδοθήλιο.

Μελλοντικές μελέτες

Ο περαιτέρω λειτουργικός και μοριακός χαρακτηρισμός των μοριακών μονοπατιών, και των βάσιμων υποθέσεων που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, είναι αναγκαίος προκειμένου να αξιολογήσουμε τον ακριβή ρόλο που διαδραματίζουν οι rHDL-apoA-I και rHDL-apoE3 και τα miR-503, miR-3185 και miR-2861 στον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και το μεταβολισμό της χοληστερόλης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και στην αθηροπροστασία γενικότερα. Σε πρώτη φάση θα πρέπει να γίνει έλεγχος της έκφρασης των miRNAs και των επιλεγμένων στόχων που συμμετέχουν στη ρύθμιση των υπό εξέταση μονοπατιών (RT-qPCR) και η επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης miRNA-mRNA των επιλεγμένων στόχων (Luciferase Dual Reporter Assay). Εν συνεχεία πρέπει να ακολουθήσουν in vitro πειράματα ελέγχου των ενδοθηλιακών κυττάρων για πολλαπλασιασμό (BrdU Cell Proliferation Assay, δοκιμασία πολλαπλασιασμού), μετανάστευση (δοκιμασία μετανάστευσης) και επούλωσης πληγής της μονοστοιβάδας των ενδοθηλιακών κυττάρων (endothelial cell monolayer wound healing assay) και παραγωγή χοληστερόλης (χημικός/ενζυμικός προσδιορισμός), ώστε να αξιολογηθεί η δράση των rHDL και των επιλεγμένων miRNAs στις αντίστοιχες λειτουργίες των HAECs.

Μελέτες επαγωγής/αναστολής της δράσης των επιλεγμένων miRNAs με miR-mimics/antagomiRs θα μπορούσαν να συμβάλλουν στον ακριβέστερο προσδιορισμό της επίδρασης τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και του ρόλου τους στη δράση της rHDL. In vivo πειράματα χορήγησης miR-mimics/antagomiRs σε ζώα μοντέλα αθηροσκλήρωσης θα μπορούσαν να αξιολογήσουν τη δράση τους στην αποκατάσταση του ενδοθηλίου μετά από αγγειακό τραυματισμό και στην ομοίωση της χοληστερόλης.

Τελικά Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που εξετάζει την επίδραση των rHDL-apoA-I και rHDL-apoE3 στην έκφραση miRNAs από φυσιολογικά HAECs, καθώς και το ρόλο των επηρεαζόμενων miRNAs στα μονοπάτια πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης και μεταβολισμού χοληστερόλης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα ευρήματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης που έγινε υποστηρίζουν ότι οι δύο τύποι rHDL που εξετάστηκαν (-apoE3 -apoA-I), επάγουν αλλαγές στην έκφραση διαφορετικών ομάδων miRNAs. Το miR-503, το μόνο που η έκφραση του αλλάζει στατιστικά σημαντικά υπό την επίδραση της rHDL-apoE3, έχει τη δυνατότητα να επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, συμβάλλοντας στην αποκατάσταση της ενδοθηλιακής συνέχειας. Ενώ τα miR-3185 και miR-2861, δύο από τα miRNAs που επηρεάζει η rHDL-apoA-I, δυνητικά επάγουν την ελεγχόμενη βιοσύνθεση και πρόσληψη χοληστερόλης από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, βοηθώντας στη διατήρηση της ομοιόστασης της χοληστερόλης σε αυτά. Μέσω αυτών των δράσεων τους τα συγκεκριμένα miRNAs μπορεί να διαμεσολαβούν πιθανές αθηροπροστατευτικές λειτουργίες των rHDL-apoA-I και rHDL-apoE3. Κατά συνέπεια, τα υπό εξέταση miRNAs (miR-3185, miR-2861 και miR-503) θα μπορούσαν να αποτελέσουν υποψήφιους θεραπευτικούς στόχους, που αξίζει να μελετηθούν σε μεγαλύτερο βάθος και περισσότερα επίπεδα, ώστε να τεθούν οι βάσεις για την περαιτέρω αξιοποίησή τους στο χώρο της πρόληψης και αντιμετώπισης της αθηροσκλήρωσης.

ΟΡΟΛΟΓΙΑ

Πίνακας 6.1: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Annotation	Λεπτομερής χαρακτηρισμός
Atherosclerotic lesion	Αθηρωματική αλλοίωση
IPA core analysis	Κεντρική ανάλυση του IPA
Coronary artery disease	Αθηρωματική στεφανιαία νόσος
Endothelial to mesenchymal transition	Μετάπτωση από τον ενδοθηλιακό στο μεσεγχυματικό φαινότυπο
False discovery rate	Ποσοστό ψευδώς θετικών
Fibrates	Φιβράτες
Fold change	Λόγος αλλαγής έκφρασης
Human aortic endothelial cells	Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής
Ingenuity Knowledge Base	Βάση δεδομένων του IPA
Ligand	Προσδέτης υποδοχέα
Microarray	Μικροσυστοιχία
Pre-beta-HDL	Πρόδρομη δισκοειδής HDL
Pro-inflammatory	Που επάγει τη φλεγμονή
Pro-thrombotic	Που επάγει τη θρόμβωση
Rate limiting step	Στάδιο που καθορίζει την ταχύτητα του μονοπατιού
Re-vascularization	Αποκατάσταση της φυσικής συνέχειας του ενδοθηλίου
Senescence	Κυτταρική γήρανση
Statin intolerance	Δυσανεξία στις στατίνες
Statin resistance	Αποτυχία των στατινών να επιδείξουν θεραπευτικό αποτέλεσμα
Vascular reactivity	Προσαρμοστικότητα του αγγείου

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους

ABCA1	ATP-binding cassette transporter 1
ABCG1	ATP-binding cassette sub-family G member 1
ACAT	Acyl-CoA cholesterol acyltransferase
ADAMTS4	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
AGEs	Advanced glycation end products
AKT	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
ANGPTL4	Angiopoietin-like 4
apo-	Apolipoprotein
ApoB	Apolipoprotein B
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
COL4A1	Collagen, type IV, alpha 1
CVD	Cardiovascular disease
CYP41A1	Lanosterol 14 alpha-demethylase
DHA	Docosahexaenoic acid
EBM-2	Endothelial cell basal medium-2
EFNB2	Ephrin B2
EGM-2	Endothelial cell growth medium-2
EndMT	Endothelial-to-mesenchymal transition
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
EPA	Eicosapentaenoic Acid
EPHB 2/4	Ephrin B receptor 2/4
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal bovine serum
FDR	False discovery rate
FLT1	Fms related tyrosine kinase 1
FOXO1	Forkhead box protein O1
GAP	GTPase-activating protein
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosine-5'-triphosphate

HAECs	Human aortic endothelial cells
HDL	High density lipoprotein
hFGF-B	Human fibroblast growth factor-B
HL	Hepatic lipase
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HMGCR	HMG-CoA reductase
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule
IDL	Intermediate-density lipoprotein
IL	Interleukin
INSIG1	Insulin-induced gene 1
IPA	Ingenuity pathway analysis
LCAT	Lecithin-cholesterol acyltransferase
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LDS	Lipoprotein depleted serum
LNA	Locked nucleic acids
LPL	Lipoprotein lipase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MEK 1/2	MAPK/ERK kinase 1/2
miRNA	microRNA
MVK	Mevalonate kinase
NCBI	National center for biotechnology information
NO	Nitric oxide
NPC1	Niemann-Pick disease, type C1
NR4A1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
OxLDL	Oxidized LDL
PAC	Puromycin N-acetyltransferase
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-I
PAK	p21-activated kinase
PBS	Phosphate-buffered saline
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase

PKC	Protein kinase C
PLC γ 2	1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase γ -2
PLTP	Phospholipid transfer protein
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-1-phosphatidylcholine
PPAR- α	Peroxisome proliferator-activated receptor- α
PTGIR	Prostaglandin I2 receptor
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma serine/threonine protein kinase
RAS	Rat sarcoma
RISC	RNA-induced silencing complex
rHDL	Reconstituted HDL
RHOA	Ras homolog gene family, member A
RHO	Rho kinase
RMA	Robust multiarray analysis
RNAseq	RNA sequencing
ROCK	Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1
SCAP	SREBP cleavage activating protein
SHC	SHC-transforming protein
siRNA	Small interfering RNA
SOS	Son of Sevenless guanine nucleotide exchange factor
SR-B1	Scavenger receptor class B type 1
SREBP	Sterol-regulatory element-binding protein
SRK	S-locus receptor kinase
t-PA	Tissue plasminogen activator
TNF α	Tumor necrosis alpha
UTR	Untranslated region
VAV3	Vav guanine nucleotide exchange factor 3
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VLDL	Very low density lipoprotein
WT	Wild type

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Πλήρεις λίστες των γονιδίων των οποίων τα mRNA αποτελούν πειραματικά επιβεβαιωμένους στόχους των στατιστικά σημαντικά αλλαγμένων miRNAs, όπως προέκυψαν από το miRTarBase.

Πίνακας 8.1: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-3188.

ABAT	HEXIM1	SETD7
ACTC1	HIF1AN	SIGLEC9
ACTG1	ICAM1	SLC24A4
ADM	IMMP2L	SMARCD1
ALX1	INIP	SNX9
ARHGDI3	KIAA0408	SRCAP
ARL5A	KIAA1191	SSH3
BAZ2A	LIN9	TFCP2L1
CAPN1	LMNB2	TMBIM6
CCNT1	LY6H	TMEM19
CD209	MTMR3	TOLLIP
CEP126	MTOR	TSR1
CKS1B	NCEH1	URM1
CLDN12	NFIC	WDR13
CRY2	NSMCE2	WDTC1
CSNK2A1	PLCE1	WNK1
CTC1	PLEKHG4B	XPO6
DDN	POFUT1	YIPF4
DFFA	PTGES2	ZBTB8A
DGAT2	PYCARD	ZKSCAN4
DNAH10OS	QSOX1	ZNF33A
DVL3	RFC2	ZNF439
E2F2	RFT1	ZNF451
EGF	RIMS4	ZNF774
ESF1	RPH3AL	ZNF81
ESPL1	RPLP1	ZSCAN25
EXOSC2	RRAS	
FIBIN	SCD	
GAGE1	SDHAF2	
GID8	SETD5	

Πίνακας 8.2: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-3185.

ADGRF2	CYP4A22	KIAA1456	PSMA5	UBE2W
AHCYL2	DAD1	KPNA6	PTGFRN	UCHL5
AIFM2	DCAF15	LIN7C	RAB1A	VCAN
AKAP11	DCAF7	LRIG3	RAB1B	VCP
AKR7A2	DDT	LRR58	REG4	VEGFC
ALG9	DDX21	LURAP1L	RIMS3	WDR41
ANKIB1	DNAJC10	LZIC	RNF121	WIZ
ANKRD52	DR1	MAP2K4	RNF185	WRN
APLP2	DYRK3	MFSD14B	S1PR2	YARS
ARF6	EEF2	MINDY2	SALL2	ZDHHC20
ARHGAP42	EMP1	MINK1	SAP18	ZFP36L1
ARHGEF7	ERH	MOG	SATB2	ZIC5
ARL10	ETV3	MPRIIP	SEC22C	ZNF12
ATP2A2	EXT2	MSANTD2	SEMA5A	ZNF256
BBS9	FAM160B1	MSN	SERPINB5	
BUB3	FAM19A3	NAT8L	SF1	
C20orf96	FBLN5	NCOA1	SLC44A1	
C4orf36	FEM1C	NCOA4	SMARCD1	
CALM3	FOXC1	NDNF	SRF	
CANX	FXR1	NEGR1	SSFA2	
CCDC117	GATA6	NEK7	STK4	
CDH6	GLO1	NELL2	STX11	
CHRD1	GLUL	NFIB	SUZ12	
CHST11	GOLGA6L10	NR1D2	TAGLN2	
CLCN3	GOLGA6L4	NUDT4	TBRG1	
CNGA3	GPHA2	OPHN1	TFRC	
CNOT6L	GPR35	OTUB1	THUMPD3	
COL4A1	HEMK1	PACSIN1	TIMM22	
COQ10B	HGFAC	PANK1	TLR5	
COX11P1	HIF3A	PFKFB3	TLR6	
CPE	HNRNPA2B1	PGK1	TM9SF1	
CPSF2	HOMEZ	PHLDA3	TMED7	
CREBL2	HOXA3	PMAIP1	TMEM216	
CTC1	HS6ST1	POLE3	TNFAIP3	
CTHRC1	HSPA4	PPM1N	TPD52L2	
CTNND1	JUND	PPP1R15B	TRPM7	
CYB5R4	KDM5B	PPP3R1	TSPYL1	
CYP4A11	KHSRP	PRDM10	TUBB8	

Πίνακας 8.3: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-1231.

AMBRA1	STARD13
ARGFX	STC2
ATP5C1	STIM1
CACNA1A	TEP1
CCT5	THYN1
CD164	TMEM184A
CORO2A	WNT10A
CXCL10	
CYBRD1	
CYP1A1	
DERL2	
ELK4	
FAIM2	
FOLR1	
FOXF2	
GABPB1	
GINM1	
GMDS	
HDGF	
HSPB6	
IMPG1	
KIF18B	
LSM3	
LZIC	
MAPKAPK2	
MSH6	
PET117	
PHF13	
PHLPP2	
POLD3	
POLL	
PTP4A1	
PTPA	
RPS6KA4	
RUFY2	
SHOX2	
SLC39A1	
SOX5	

Πίνακας 8.4: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-3195.

AIP
ARC
C10orf55
C2orf82
CASZ1
CTDNEP1
HMX1
INO80E
ISL2
LHFPL3
MIB2
MSX2
NPBWR1
PER1
PHLDA2
REPIN1
RHBDD1
RNASEK
SIX5
UCK1
VDR
VGF
VWA7

Πίνακας 8.5: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-2861.

ABL2	MRPS18A
AKT2	MTRNR2L1
ANKRD24	MTSS1L
ANKS4B	MYRF
APAF1	NDEL1
BAP1	NEU3
BBC3	NFATC2IP
BCAS3	NKX2-2
BICDL1	NRG2
C17orf102	NT5C
CASKIN2	PACS1
CCND1	PARD3
CLU	PHLDA3
COLCA1	PPIB
CREB3L2	PPP6R1
CTDSP1	REEP2
CYCS	RNF40
DARS2	SCD
DCAF7	SHMT2
EFHD2	SNRPD3
EGFR	STX4
EMB	SUPT16H
FAM109A	TMEM174
FOXK2	TMEM2
G6PC3	TMPRSS6
GIPC1	TSTD2
GRAMD1B	TXNIP
GRK6	VDR
HIC2	ZNF175
INF2	ZNF488
LAMA5	
LASP1	
LIMK1	
LY6E	
MAP2K3	
MAPK8IP3	
MED16	
MEI1	

Πίνακας 8.6: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-1915.

ABCF2	CELF1	FUT11	LGSN	PLA2G12A	SPATA18	ZNF134
ABCG4	CENPBD1	GALM	LIAS	PLEKHM3	SPIB	ZNF329
ABHD14A-ACY1	CEP76	GATA6	LIPC	PNPT1	SPPL2A	ZNF485
ACSL6	CEP89	GIGYF1	LONP2	POFUT1	SSTR3	ZNF486
ACVR1B	CERS4	GJB1	LRRC59	POU5F1B	SYAP1	ZNF487
ACY1	CES2	GMEB1	MARCH4	PPM1K	SYNJ2BP	ZNF500
ADM2	CIAO1	GNE	MCTS1	PRKAR2A	TAB1	ZNF557
AIPL1	CNNM1	GOLGA2	MEF2D	PRPF4	TAF1D	ZNF620
ALDOA	CPM	GPBP1	METTL22	PRR11	TIGD5	ZNF844
ALKBH5	CRCP	GPHA2	METTL2B	PTCHD1	TIRAP	ZNF860
APCDD1	CRK	GPN1	MFAP5	PTCHD3	TJP3	
APEX1	CYCS	GPN2	MICA	PTDSS2	TMEM154	
APOL1	CYP7B1	GRM6	MLLT10	PTGES2	TMEM184A	
AQR	DCAF10	HDGF	MNT	PTPN14	TMEM184B	
ARFGEF3	DCAF7	HEYL	MSANTD4	PXMP4	TMEM19	
ARHGEF39	DMWD	HIST1H2BJ	MSN	PYCARD	TMEM241	
ATP6V0B	DNAJB13	HIST2H3A	MTA3	RAB27A	TMEM251	
ATXN7L3	DPM2	HSD17B12	MYL9	RAB3IP	TMEM69	
BACH2	DTWD2	IDH2	MYO1F	RABL3	TMEM78	
BBC3	EFCAB11	IFNLR1	MYPN	RACGAP1	TMIGD2	
BCAS4	EFEMP2	IFT22	NAA30	RAD51	TNFRSF13C	
BCL2	EHD2	IGFBP4	NAB2	RGS12	TNFSF14	
BCL2L2	EIF4G1	IL20RB	NACC1	RND2	TPT1	
BHLHE40	ELMSAN1	IL6R	NDRG3	RNF14	TSPAN11	
BHMT2	ERCC6L2	ILDR1	NKD1	RPL34	TTF2	
BRMS1L	FAM118A	INF2	NOA1	RRP36	TTLL12	
BTN2A2	FAM163A	INIP	NOP53	RSL1D1	TTR	
BTN3A2	FAM216A	IP6K1	NSG1	RTTN	TTYH3	
BZW1	FBXO44	ITPA	NYAP2	RUBCNL	UBXN7	
C18orf32	FCAR	KCNJ12	OLFML2A	SAMD4A	UQCC3	
C1D	FGFR1OP2	KDELRL1	PABPN1	SCAMP1	VPS18	
C8orf58	FIBCD1	KIAA1958	PACS2	SETD1A	VPS37C	
CAV2	FKBP15	KIF3A	PALM2	SETD1B	WDR81	
CBX6	FN3KRP	KLF8	PCSK9	SLC25A22	XRCC5	
CCBE1	FOXK1	KMT2D	PHF21B	SLC25A45	ZBTB25	
CD226	FRAT2	KPNA6	PHLDA3	SLC25A51	ZBTB7A	
CDCA4	FSCN1	LCE1A	PISD	SLC39A2	ZDHHC5	

Πίνακας 8.7: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-638.

ABHD12	RAB21
BLOC1S4	RPS6KA1
BMPR1A	SOD2
BUB1	SOX2
CALHM5	SP110
CD4	SP2
CDK2	STARD10
CNGA2	STC2
CNNM4	SULT1B1
DACT3	THAP1
DCTN5	TMED2
ELOC	TP53
FAM46B	TP53INP2
FUT10	ZNF275
GALNT10	ZNF439
GPAT4	
GPR137C	
HIST2H4A	
HIST2H4B	
HMGN5	
HOXB6	
INAFM1	
ISCA2	
LDHA	
LMBR1L	
MFGE8	
MIER3	
NCAPG2	
NR4A3	
NUP155	
OSCP1	
OTUD7B	
PDE4C	
PEAK1	
PLD1	
PPM1F	
PPP1R15B	
PTEN	

Πίνακας 8.8: Γονίδια των οποίων το mRNA αποτελεί πειραματικά επιβεβαιωμένο στόχο του miR-503.

ACTR2	CD40	DNAJC10	KIF23	PIK3R1	SEC61A1	USP48
ACTR3B	CDC14A	DYNLL2	KIF5B	PIK3R4	SESTD1	USP53
AGO1	CDC25A	E2F3	KPNA3	PISD	SETD1B	VEGFA
AHSA1	CDC37L1	EFNB2	L2HGDH	PLAG1	SF3B3	VOPP1
AKT3	CDC42SE2	EIF4H	LANCL1	PLEKHA1	SIAH2	WEE1
ANK3	CDCA4	ELMSAN1	LARP1	PNPLA6	SKI	WIPI2
ANLN	CDK12	EPOR	LIX1L	PNRC2	SLC25A12	WNK3
AP2B1	CDK17	EXT1	LRWD1	PPM1A	SLC2A3	XKR7
ARHGEF19	CDKN1A	FAM229B	LURAP1L	PPP1R11	SLC33A1	YRDC
ASCC1	CERK	FANCA	MAP3K7	PPP2R5C	SMAD2	YTHDC1
ASH1L	CHAC1	FARSA	MAP4K2	PRDM4	SMAD7	ZBTB34
ATAD5	CHEK1	FBXL18	MCM7	PRKAR2A	SNRPB2	ZBTB44
ATF6	CLTC	FBXW7	MOB4	PRSS21	SNTB2	ZFHX4
ATP5G3	CMTM4	FGF2	MRGBP	PSAT1	SOCS5	ZMAT3
ATP6V1B2	CNKSR3	FGF8	MRPL10	PTPRD	SPNS1	ZNF282
B4GALT5	CNNM2	FGFR1	MRPS23	RAB3IP	SPRED1	ZNF367
BCL2	COL1A1	FO XK1	MT1E	RALGAPB	SREK1	ZNF449
BCL2L12	CREBL2	GLP2R	MTMR3	RAPH1	SRPRA	ZNF620
BTN3A3	CREBRF	GNAT1	MTPN	RCC1L	SZRD1	ZNF622
BZW1	CRK	GPR27	MYB	RECK	TAOK1	ZNF691
C1orf21	CTDSPL	GREM2	MYO5A	REL	TFAP2A	ZNF704
CA8	CTSA	GSG1	N4BP1	RFK	TLK1	ZNRF2
CACUL1	CTSD	HCFC2	NAPG	RIF1	TLL1	ZNRF3
CANX	CUL3	HDGF	NDUFA4P1	RNF149	TMEM100	
CAPZA2	CUZD1	HEXIM1	NNT	RNF41	TMEM245	
CASK	CYP26B1	HNRNPA1	NPLOC4	RPL15	TNFRSF11A	
CBX2	DCAF10	HNRNPA1L2	NR6A1	RPL18A	TOMM20	
CBX4	DCAF17	HNRNPK	NT5DC3	RPL23	TRAK1	
CCDC83	DCLRE1A	HSPA8	NUCKS1	RPS5	TRAPPC10	
CCND1	DCTN5	HSPE1	NUFIP2	RPS6KA3	TRIM35	
CCND2	DDHD2	IGF1R	NUP50	RS1	TSC22D2	
CCND3	DDX3X	IKBKB	OCRL	RTN4	TUT1	
CCNE1	DECR1	IVD	ODF2L	SALL1	TXNDC5	
CCNE2	DHFR	JARID2	ORC4	SBF1	UBFD1	
CCNF	DLGAP3	KANK1	OSCAR	SBNO1	UBN2	
CCNG2	DLST	KIAA0895L	PAPOLG	SCAMP4	UBR3	
CCNT1	DMTF1	KIAA1456	PHKA1	SEC16A	UGT2B4	
CD2AP	DNAH17	KIAA1671	PI4K2B	SEC24A	UHMK1	

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Λεπτομερής χαρακτηρισμός των επιλεγμένων λειτουργικών κατηγοριών στις οποίες κατατάσσονται οι στόχοι των στατιστικά σημαντικά αλλαγμένων miRNAs, οι οποίες δεν αναλύθηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια.

miR-3188

Λειτουργική κατηγορία	Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Κυτταρικός κύκλος	Lack of chiasmata	$8,66 \times 10^{-4}$	EXO1	1
	Anaphase of fibroblasts	$2,60 \times 10^{-3}$	MCM4	1
	Contact growth inhibition of prostate cancer cell lines	$5,19 \times 10^{-3}$	CTH	1
	Checkpoint control of fibroblast cell lines	$6,91 \times 10^{-3}$	EXO1	1
Φλεγμονώδης απόκριση	Endotoxin tolerance of peritoneal macrophages	$1,73 \times 10^{-3}$	HMGCR	1
Κυταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός	Colony formation of breast cell lines	$1,21 \times 10^{-3}$	HMGCR	1
Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση	Survival of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$6,05 \times 10^{-3}$	EXO1	1
	Cell viability of hepatocytes	$1,38 \times 10^{-2}$	CTH	1
	Antiapoptosis	$1,89 \times 10^{-2}$	CTH	1
	Survival of oligodendrocytes	$1,97 \times 10^{-2}$	XAF1	1
Ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος	Angiogenesis of aortic ring tissue	$9,49 \times 10^{-3}$	CTH	1
	Vasodilation of aortic ring tissue	$1,29 \times 10^{-2}$	CTH	1
	Function of vascular endothelial cells	$2,06 \times 10^{-2}$	LIPG	1

miR-3185

Κυτταρικός κύκλος			
Λειτουργίες	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Mitosis of breast cancer cell lines	$3,38 \times 10^{-4}$	BMP2, CDK1	2
Arrest in S phase of ovarian cancer cell lines	$1,30 \times 10^{-3}$	CDK1	1
Assembly of chromosomes	$1,30 \times 10^{-3}$	CDK1	1
Binding of negative regulatory domain promoter element	$1,30 \times 10^{-3}$	CDK1	1
Binding of positive regulatory domain promoter element	$2,60 \times 10^{-3}$	CDK1	1
Delay in initiation of mitosis of sarcoma cell	$2,60 \times 10^{-3}$	CDK1	1

lines			
Delay in mitosis of bone cancer cell lines	2,60x10 ⁻³	CDK1	1
Sister chromatid exchange of chromosomes	2,60x10 ⁻³	XRCC2	1
Aneuploidy of fibroblasts	3,89x10 ⁻³	XRCC2	1
Binding of TGF beta response element	3,89x10 ⁻³	BMP2	1
Arrest in G2/M phase transition of breast cancer cell lines	5,19x10 ⁻³	CDK1	1
Arrest in G2/M phase transition of melanoma cell lines	5,19x10 ⁻³	CDK1	1
Arrest in S/G2 phase transition	5,19x10 ⁻³	CDK1	1
Arrest in mitosis of breast cancer cell lines	5,19x10 ⁻³	CDK1	1
Delay in cell cycle progression of cervical cancer cell lines	5,19x10 ⁻³	CDK1	1
G2/M phase	5,85x10 ⁻³	CDK1, CLSPN, MCM10	3
Arrest in G1 phase of myeloma cell lines	6,48x10 ⁻³	BMP2	1
Binding of osteoblast specific element 2	6,48x10 ⁻³	BMP2	1
Initiation of mitosis	6,48x10 ⁻³	CDK1	1
Contact growth inhibition of tumor cell lines	7,76x10 ⁻³	BMP2, CTH	2
Binding of CCAAT element	7,77x10 ⁻³	BMP2	1
Contact growth inhibition of prostate cancer cell lines	7,77x10 ⁻³	CTH	1
Delay in initiation of mitotic exit of cervical cancer cell lines	7,77x10 ⁻³	CDK1	1
Mitosis of PASM cells	7,77x10 ⁻³	BMP2	1
Origin firing	7,77x10 ⁻³	CLSPN	1
Arrest in G2/M phase of epithelial cell lines	9,06x10 ⁻³	MCM10	1
Arrest in G2/M phase of kidney cell lines	9,06x10 ⁻³	MCM10	1
Length of mitotic spindle	9,06x10 ⁻³	CDK1	1
Entry into S phase of cervical cancer cell lines	1,03x10 ⁻²	MCM10	1
Cycling of centrosome	1,06x10 ⁻²	CDK1, XRCC2	2

Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός			
Λειτουργίες	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Induction of muscle cell lines	1,30x10 ⁻³	BMP2	1
Onset of lymphopoiesis of long-term bone marrow culture cells	1,30x10 ⁻³	FST	1
Proliferation of interstitial fibroblasts	1,30x10 ⁻³	PLAT	1
Proliferation of mesenchymal stem cells	2,08x10 ⁻³	BMP2, PLAT	2
Cell proliferation of colorectal cancer cell lines	2,14x10 ⁻³	BMP2, CDK1, FST, RRM2	4
Proliferation of stromal fibroblast cells	2,60x10 ⁻³	BMP2	1
Formation of osteoblasts	2,85x10 ⁻³	BMP2, FST	2
Induction of chondrocytes	3,89x10 ⁻³	BMP2	1

Induction of red blood cells	3,89x10 ⁻³	BMP2	1
Arrest in growth of B cell hybridoma cells	5,19x10 ⁻³	BMP2	1
Neurogenesis of olfactory epithelial cells	5,19x10 ⁻³	BMP2	1
Osteoblastogenesis of bone marrow cell lines	5,19x10 ⁻³	BMP2	1
Osteoblastogenesis of stromal cell lines	5,19x10 ⁻³	BMP2	1
Osteogenesis of osteoblasts	5,19x10 ⁻³	BMP2	1
Proliferation of muscle cells	5,72x10 ⁻³	BMP2, FST, HMGCR, PLAT	4
Outgrowth of neurites	6,24x10 ⁻³	BMP2, CDK1, HMGCR, PLAT	4
Chondrogenesis of fibroblast cell lines	6,48x10 ⁻³	BMP2	1
Chondrogenesis of embryonic cell lines	7,77x10 ⁻³	BMP2	1
Formation of colony forming unit osteoblasts	7,77x10 ⁻³	FST	1
Sprouting of mossy fibers	7,77x10 ⁻³	PLAT	1
Expansion of mesenchymal stem cells	1,16x10 ⁻²	PLAT	1

Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση			
Λειτουργίες	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Cell death of melanoma cell lines	7,82x10 ⁻⁴	CDK1, CLSPN, RRM2, XAF1	4
Apoptosis of M1 macrophages	1,30x10 ⁻³	PLAT	1
Delay in apoptosis of Purkinje cells	1,30x10 ⁻³	PLAT	1
Delay in apoptosis of granule cells	1,30x10 ⁻³	PLAT	1
Delay in degeneration of axons	1,30x10 ⁻³	PLAT	1
Delay in initiation of regeneration of myotube	1,30x10 ⁻³	MMP10	1
Necrosis of soleus muscle	1,30x10 ⁻³	MMP10	1
Apoptosis	1,47x10 ⁻³	APOBEC3B, BMP2, CDK1, CTH, FST, HELLS, HMGCR, MCM10, MMP10, PLAT, RRM2, XAF1, XRCC2	13
Necrosis	1,82x10 ⁻³	APOBEC3B, BMP2, CDK1, CLSPN, CTH, FST, HELLS, MCM10, MMP10, PLAT, RRM2, XAF1, XRCC2	13
Fragmentation of nucleus	1,85x10 ⁻³	CDK1, FST	2
Cell death of brain cells	1,91x10 ⁻³	BMP2, CDK1, PLAT, XRCC2	4
Apoptosis of brain cells	2,22x10 ⁻³	CDK1, PLAT, XRCC2	3
Apoptosis of granule cells	2,94x10 ⁻³	CDK1, PLAT	2
Apoptosis of tumor cell lines	3,14x10 ⁻³	BMP2, CDK1, CTH, FST, MCM10, PLAT, RRM2, XAF1	8
Apoptosis of stromal cell lines	3,89x10 ⁻³	BMP2	1
Apoptosis of stromal fibroblast cells	3,89x10 ⁻³	BMP2	1
Necrosis of muscle	3,92x10 ⁻³	BMP2, MMP10, PLAT, XAF1	4
Cell death of tumor cell lines	3,97x10 ⁻³	BMP2, CDK1, CLSPN, CTH, FST, MCM10, PLAT, RRM2, XAF1	9

Necrosis of kidney	4,72x10 ⁻³	APOBEC3B, CDK1, HELLS, PLAT	4
Condensation of chromatin	4,73x10 ⁻³	CDK1, FST	2
Mitochondrial cell death of colorectal cancer cell lines	5,19x10 ⁻³	CDK1	1
Cell death	5,50x10 ⁻³	APOBEC3B, BMP2, CDK1, CLSPN, CTH, FST, HELLS, HMGCR, MCM10, MMP10, PLAT, RRM2, XAF1, XRCC2	14
Apoptosis of B cell hybridoma cells	7,77x10 ⁻³	BMP2	1
Survival of superior cervical ganglion neurons	9,06x10 ⁻³	BMP2	1
Cell death of myeloma cell lines	9,28x10 ⁻³	BMP2, CDK1	2
Cell survival	9,49x10 ⁻³	BMP2, CDK1, CTH, INSIG1, PLAT, RRM2, XAF1, XRCC2	8
Cell death of cerebral cortex cells	9,73x10 ⁻³	BMP2, CDK1, PLAT	3
Apoptosis of cortical neurons	1,03x10 ⁻²	CDK1, PLAT	2

Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός			
Λειτουργία	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Onset of lymphopoiesis of long-term bone marrow culture cells	1,30x10 ⁻³	FST	1
Proliferation of interstitial fibroblasts	1,30x10 ⁻³	PLAT	1
Proliferation of mesenchymal stem cells	2,08x10 ⁻³	BMP2, PLAT	2
Cell proliferation of colorectal cancer cell lines	2,14x10 ⁻³	BMP2, CDK1, FST, RRM2	4
Proliferation of stromal fibroblast cells	2,60x10 ⁻³	BMP2	1
Formation of osteoblasts	2,85x10 ⁻³	BMP2, FST	2
Neurogenesis of olfactory epithelial cells	5,19x10 ⁻³	BMP2	1
Osteoblastogenesis of bone marrow cell lines	5,19x10 ⁻³	BMP2	1
Osteoblastogenesis of stromal cell lines	5,19x10 ⁻³	BMP2	1
Osteogenesis of osteoblasts	5,19x10 ⁻³	BMP2	1
Proliferation of muscle cells	5,72x10 ⁻³	BMP2, FST, HMGCR, PLAT	4
Outgrowth of neurites	6,24x10 ⁻³	BMP2, CDK1, HMGCR, PLAT	4
Chondrogenesis of fibroblast cell lines	6,48x10 ⁻³	BMP2	1
Chondrogenesis of embryonic cell lines	7,77x10 ⁻³	BMP2	1
Formation of colony forming unit osteoblasts	7,77x10 ⁻³	FST	1
Expansion of mesenchymal stem cells	1,16x10 ⁻²	PLAT	1

Κυτταρική κίνηση			
Λειτουργία	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Chemotaxis of bone marrow precursor cells	1,30x10 ⁻³	BMP2	1

Chemorepulsion of sensory neurons	$3,89 \times 10^{-3}$	PLAT	1
Ejection of first polar body	$5,19 \times 10^{-3}$	CDK1	1

miR-1231

Κυτταρικός κύκλος			
Λειτουργία	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Mitosis	$5,83 \times 10^{-4}$	BMP2, HELLS, KIF11, MKI67, XRCC2	5
Cell cycle progression	$6,71 \times 10^{-4}$	BMP2, CTH, HELLS, KIF11, MKI67, TGFB2, XRCC2	7
Maintenance of mitotic spindle	$9,96 \times 10^{-4}$	KIF11	1
Arrest in G1 phase of myeloma cell lines	$4,97 \times 10^{-3}$	BMP2	1
Arrest in G2 phase of squamous cell carcinoma cell lines	$5,96 \times 10^{-3}$	KIF11	1
Cycling of centrosome	$6,31 \times 10^{-3}$	KIF11, XRCC2	2
Re-entry into cell cycle progression of tumor cell lines	$8,93 \times 10^{-3}$	HELLS	1
Cell division of somatic cells	$1,19 \times 10^{-2}$	TGFB2	1
Mitosis of tumor cell lines	$1,22 \times 10^{-2}$	BMP2, KIF11	2
Formation of mitotic spindle	$3,08 \times 10^{-3}$	HELLS, KIF11	2
Length of mitotic spindle	$6,95 \times 10^{-3}$	KIF11	1
Contact growth inhibition of tumor cell lines	$4,60 \times 10^{-3}$	BMP2, CTH	2
Contact growth inhibition of prostate cancer cell lines	$5,96 \times 10^{-3}$	CTH	1
Separation of mitotic centrosome	$4,97 \times 10^{-3}$	KIF11	1
Sister chromatid exchange of chromosomes	$1,99 \times 10^{-3}$	XRCC2	1
Abnormal segregation of chromosomes	$4,97 \times 10^{-3}$	KIF11	1
Segregation of chromosomes	$9,70 \times 10^{-3}$	KIF11, MKI67	2
Aneuploidy of fibroblasts	$2,99 \times 10^{-3}$	XRCC2	1
Binding of Smad binding sequence	$1,13 \times 10^{-4}$	BMP2, TGFB2	2
Binding of TGF beta response element	$2,99 \times 10^{-3}$	BMP2	1
Binding of osteoblast specific element 2	$4,97 \times 10^{-3}$	BMP2	1
Binding of CCAAT element	$5,96 \times 10^{-3}$	BMP2	1
Binding of TPA response element	$1,19 \times 10^{-2}$	BMP2	1
Mitosis of PASMC cells	$5,96 \times 10^{-3}$	BMP2	1

Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση			
Λειτουργία	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Apoptosis of osteoblasts	$7,60 \times 10^{-4}$	BMP2, TGFB2	2
Cell survival of squamous cell carcinoma cell	$9,96 \times 10^{-4}$	KIF11	1

lines			
Cell viability of epithelial cells	2,59x10 ⁻³	CTH, KIF11	2
Apoptosis of stromal cell lines	2,99x10 ⁻³	BMP2	1
Apoptosis of stromal fibroblast cells	2,99x10 ⁻³	BMP2	1
Cell death of interdigital region	3,98x10 ⁻³	TGFB2	1
Apoptosis of B cell hybridoma cells	5,96x10 ⁻³	BMP2	1
Apoptosis of B-lymphocyte derived cell lines	9,45x10 ⁻³	BMP2, TGFB2	2
Survival of superior cervical ganglion neurons	6,95x10 ⁻³	BMP2	1
Apoptosis of neural precursor cells	9,92x10 ⁻³	XRCC2	1
Apoptosis of PASC cells	6,95x10 ⁻³	MKI67	1

Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός			
Λειτουργία	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Proliferation of bone marrow stromal cells	7,35x10 ⁻⁵	BMP2, TGFB2	2
Arrest in proliferation of cells	1,44x10 ⁻⁴	BMP2, SLC7A5, TGFB2, XRCC2	4
Proliferation of cholangiocytes	2,59x10 ⁻⁴	MKI67, TGFB2	2
Development of connective tissue cells	3,43x10 ⁻⁴	BMP2, CYP1A1, LDLR, TGFB2	4
Formation of osteoclasts	5,42x10 ⁻⁴	BMP2, CYP1A1, LDLR	3
Differentiation of induced regulatory T-lymphocyte	7,24x10 ⁻⁴	BMP2, ITGB8	2
Induction of muscle cell lines	9,96x10 ⁻⁴	BMP2	1
Stimulation of connective tissue cells	1,37x10 ⁻³	BMP2, TGFB2	2
Formation of osteoblasts	1,68x10 ⁻³	BMP2, TGFB2	2
Proliferation of stromal fibroblast cells	1,99x10 ⁻³	BMP2	1
Conversion of Th17 cells	2,99x10 ⁻³	ITGB8	1
Induction of chondrocytes	2,99x10 ⁻³	BMP2	1
Induction of red blood cells	2,99x10 ⁻³	BMP2	1
Proliferation of activated T lymphocytes	3,22x10 ⁻³	CTH, TGFB2	2
Arrest in growth of B cell hybridoma cells	3,98x10 ⁻³	BMP2	1
Neurogenesis of olfactory epithelial cells	3,98x10 ⁻³	BMP2	1
Osteoblastogenesis of bone marrow cell lines	3,98x10 ⁻³	BMP2	1
Osteoblastogenesis of stromal cell lines	3,98x10 ⁻³	BMP2	1
Osteogenesis of osteoblasts	3,98x10 ⁻³	BMP2	1
Chondrogenesis of fibroblast cell lines	4,97x10 ⁻³	BMP2	1
Proliferation of epithelial cells	5,92x10 ⁻³	ITGB8, MKI67, SLC7A5, TGFB2	4
Chondrogenesis of embryonic cell lines	5,96x10 ⁻³	BMP2	1
Conversion of naive T lymphocytes	5,96x10 ⁻³	ITGB8	1
Cell proliferation of colorectal cancer cell lines	8,40x10 ⁻³	BMP2, ITGB8, SLC7A5	3
Arrest in growth of colorectal cancer cell lines	9,92x10 ⁻³	SLC7A5	1

Proliferation of connective tissue cells	$1,14 \times 10^{-2}$	BMP2, MKI67, TGFB2, XRCC2	4
--	-----------------------	---------------------------	---

Κυτταρική κίνηση			
Λειτουργία	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Migration of B cell lymphoma cells	$2,99 \times 10^{-3}$	PARP9	1
Extravasation	$7,26 \times 10^{-3}$	LDLR, TGFB2	2
Chemotaxis of bone marrow precursor cells	$9,96 \times 10^{-4}$	BMP2	1
Delay in transmigration of smooth muscle cells	$2,99 \times 10^{-3}$	LDLR	1

Μεταβολισμός λιπιδίων			
Λειτουργία	p-value	Γονίδια	#Γονιδίων
Reverse cholesterol transport	$1,97 \times 10^{-4}$	LDLR, LIPG	2
Release of docosaheptaenoic acid	$1,99 \times 10^{-3}$	LIPG	1
Release of linoleic acid	$1,99 \times 10^{-3}$	LIPG	1
Release of stearic acid	$2,99 \times 10^{-3}$	LIPG	1
Release of palmitic acid	$3,98 \times 10^{-3}$	LIPG	1
Depletion of cholesterol	$4,97 \times 10^{-3}$	LDLR	1
Influx of cholesterol	$8,93 \times 10^{-3}$	LDLR	1
Import of cholesterol	$9,92 \times 10^{-3}$	LDLR	1
Efflux of cholesterol	$1,02 \times 10^{-2}$	LDLR, LIPG	2
Release of oleic acid	$1,09 \times 10^{-2}$	LIPG	1
Abnormal quantity of triacylglycerol	$1,19 \times 10^{-2}$	LDLR	1
Concentration of triacylglycerol	$1,20 \times 10^{-2}$	LDLR, LIPG, PNPLA3	3
Concentration of eicosanoid	$1,25 \times 10^{-2}$	CYP1A1, LDLR	2
Quantity of alpha-tocopherol phosphate	$1,99 \times 10^{-3}$	LDLR	1
Fatty acid metabolism	$1,88 \times 10^{-3}$	BMP2, CYP1A1, LDLR, LIPG, PNPLA3	5
Demethylation of 2-hydroxyestradiol	$1,99 \times 10^{-3}$	CYP1A1	1
Conversion of bile acid	$2,99 \times 10^{-3}$	LDLR	1
Synthesis of triacylglycerol	$3,68 \times 10^{-3}$	LDLR, PNPLA3	2
Lipolysis of tributyrin	$3,98 \times 10^{-3}$	LIPG	1
Metabolism of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid	$3,98 \times 10^{-3}$	CYP1A1	1
Lipolysis of triolein	$4,97 \times 10^{-3}$	LIPG	1
Production of 1-oleoylglycerol	$4,97 \times 10^{-3}$	PNPLA3	1
Metabolism of eicosanoid	$5,91 \times 10^{-3}$	BMP2, CYP1A1, LDLR	3
Synthesis of triolein	$5,96 \times 10^{-3}$	PNPLA3	1
Regulation of cholesterol	$6,95 \times 10^{-3}$	LDLR	1
Trafficking of cholesterol	$6,95 \times 10^{-3}$	LDLR	1
Homeostasis of phospholipid	$9,92 \times 10^{-3}$	LIPG	1
Hydrolysis of cholesterol ester	$9,92 \times 10^{-3}$	LDLR	1
Catabolism of lipid	$9,95 \times 10^{-3}$	LDLR, PNPLA3	2

Metabolism of ganglioside	1,19x10 ⁻²	ITGB8	1
Conversion of cholesterol	1,29x10 ⁻²	LDLR	1
Production of 2-hydroxyestradiol	9,96x10 ⁻⁴	CYP1A1	1
Steroid metabolism	4,54x10 ⁻³	BMP2, CYP1A1, LDLR	3
Synthesis of steroid	6,00x10 ⁻³	BMP2, CYP1A1, LDLR	3
Homeostasis of cholesterol	6,11x10 ⁻³	LDLR, LIPG	2
Conversion of vitamin A	7,94x10 ⁻³	CYP1A1	1
Conversion of retinaldehyde	9,92x10 ⁻³	CYP1A1	1
Catabolism of cholesterol	1,29x10 ⁻²	LDLR	1

miR-2861

Λειτουργική κατηγορία	Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός	Colony formation of breast cell lines	1,15x10 ⁻⁴	BRCA1, HMGCR	2
	Proliferation of prostate cancer cell lines	1,30x10 ⁻⁴	BRCA1, FST, HELLS, PDK4, SLC7A5	5
	Cell proliferation of colorectal cancer cell lines	1,08x10 ⁻⁴	ANGPTL4, BRCA1, FST, SLC7A5	4
	Expansion of basal stem cells	1,15x10 ⁻³	BRCA1	1
	Onset of lymphopoiesis of long-term bone marrow culture cells	1,15x10 ⁻³	FST	1
	Proliferation of epiblast cells	1,15x10 ⁻³	BRCA1	1
	Proliferation of alpha islet cells	2,31x10 ⁻³	ANGPTL4	1
	Arrest in proliferation of cells	3,27x10 ⁻³	BRCA1, SLC7A5, XRCC2	3
	Cell proliferation of tumor cell lines	6,24x10 ⁻³	ANGPTL4, BRCA1, FST, HELLS, HMGCR, MELK, PDK4, SLC7A5	8
	Formation of colony forming unit osteoblasts	6,91x10 ⁻³	FST	1
	Arrest in growth of colorectal cancer cell lines	9,20x10 ⁻³	SLC7A5	1
Κυτταρική κίνηση	Delay in cell movement	1,33x10 ⁻⁴	BRCA1, LDLR	2
	Delay in movement of cells	2,65x10 ⁻⁴	BRCA1, LDLR	2
	Delay in initiation of cell spreading of gonadal cell lines	1,15x10 ⁻⁴	BRCA1	1
	Delay in transmigration of	3,46x10 ⁻³	LDLR	1

	smooth muscle cells			
	Migration of B cell lymphoma cells	3,46x10 ⁻³	PARP9	1
	Cell movement	1,04x10 ⁻²	ANGPTL4, BRCA1, FST, HMGCR, ITGA11, LDLR, MT1F, PARP9, PDK4	9
Φλεγμονώδης απόκριση	Endotoxin tolerance of peritoneal macrophages	2,31x10 ⁻³	HMGCR	1
	Inflammation of vascular tissue	5,76x10 ⁻³	LDLR	1
	Quantity of monocyte-derived macrophages	8,06x10 ⁻³	LDLR	1
Ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος	Area of aortic valve	2,31x10 ⁻³	LDLR	1
	Preservation of elastic lamina	2,31x10 ⁻³	LDLR	1
	Function of aortic valve	3,46x10 ⁻³	LDLR	1
	Thickness of tunica intima	3,46x10 ⁻³	LDLR	1
	Vasodilation of aortic root	4,61x10 ⁻³	LDLR	1
	Size of heart	9,38x10 ⁻³	ITGA11, LDLR	2
Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση	Cytotoxicity of topotecan	2,31x10 ⁻³	BRCA1	1
	Apoptosis	2,81x10 ⁻³	ANGPTL4, BRCA1, EXO1, FST, HELLS, HMGCR, LDLR, MELK, MT1F, MVK, XRCC2	11
	Cytotoxicity of cisplatin	6,91x10 ⁻³	BRCA1	1
	Survival of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8,06x10 ⁻³	EXO1	1
	Apoptosis of male germ cells	9,81x10 ⁻³	BRCA1, EXO1	2
	Survival of mammary epithelial cells	1,03x10 ⁻²	BRCA1	1
	Cell viability of fibroblast cell lines	1,11x10 ⁻²	BRCA1, PDK4	2
	Apoptosis of neural precursor cells	1,15x10 ⁻²	XRCC2	1

miR-1915

Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός			
Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Expansion of stem cells	5,41x10 ⁻⁴	BRCA1, PLAT	2
Expansion of basal stem cells	7,36x10 ⁻⁴	BRCA1	1
Proliferation of epiblast cells	7,36x10 ⁻⁴	BRCA1	1
Proliferation of interstitial fibroblasts	7,36x10 ⁻⁴	PLAT	1

Proliferation of alpha islet cells	1,47x10 ⁻³	ANGPTL4	1
Branching of neurites	3,50x10 ⁻³	ADAMTS4, PLAT, SV2A	3
Cell proliferation of colorectal cancer cell lines	3,50x10 ⁻³	ANGPTL4, BRCA1, SLC7A5	3
Sprouting of mossy fibers	4,41x10 ⁻³	PLAT	1
Expansion of mesenchymal stem cells	6,61x10 ⁻³	PLAT	1
Arrest in growth of colorectal cancer cell lines	7,34x10 ⁻³	SLC7A5	1
Colony formation of breast cell lines	1,03x10 ⁻²	BRCA1	1
Colony formation of ovarian cancer cell lines	1,68x10 ⁻²	BRCA1	1
Arrest in proliferation of cells	1,70x10 ⁻²	BRCA1, SLC7A5	2
Formation of foam cells	2,19x10 ⁻²	ANGPTL4	1
Proliferation of embryonic cells	2,30x10 ⁻²	BRCA1, PLAT	2
Neuritogenesis of neurons	2,40x10 ⁻²	PLAT	1
Dendritic growth/branching	2,50x10 ⁻²	ADAMTS4, SV2A	2
Proliferation of enterocytes	2,91x10 ⁻²	VIPR1	1
Proliferation of mammary epithelial cells	3,33x10 ⁻²	BRCA1	1
Arrest in proliferation of fibroblast cell lines	3,41x10 ⁻²	BRCA1	1
Cytostasis of breast cancer cell lines	3,97x10 ⁻²	BRCA1	1
Proliferation of bladder cancer cell lines	3,97x10 ⁻²	PLAT	1
Cell proliferation of tumor cell lines	4,01x10 ⁻²	ADAMTS4, ANGPTL4, BRCA1, PLAT, SLC7A5	5
Proliferation of prostate cancer cell lines	4,72x10 ⁻²	BRCA1, SLC7A5	2

Ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος			
Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Perfusion of myocardium	7,36x10 ⁻⁴	PLAT	1
Vascular resistance of cerebellum	7,36x10 ⁻⁴	PLAT	1
Shape change of microvascular endothelial cells	7,34x10 ⁻³	PLAT	1
Abnormal morphology of lymph vessel	1,24x10 ⁻²	ANGPTL4	1
Function of vascular endothelial cells	1,75x10 ⁻²	LIPG	1
Angiogenesis of endothelial tissue	2,26x10 ⁻²	PLAT	1
Permeability of blood-brain barrier	2,69x10 ⁻²	PLAT	1
Morphology of heart	2,90x10 ⁻²	DHRS3, ITGA11, PLAT	3
Angiogenesis of cornea	2,91x10 ⁻²	ANGPTL4	1
Tubulation of endothelial cell lines	3,55x10 ⁻²	ANGPTL4	1
Morphology of heart ventricle	3,68x10 ⁻²	DHRS3, PLAT	2
Morphogenesis of outflow tract	3,90x10 ⁻²	DHRS3	1
Contractility of ventricular myocardium	4,05x10 ⁻²	PLAT	1
Neovascularization of choroid	4,19x10 ⁻²	PLAT	1

Κυτταρικός κύκλος			
Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Arrest in cell cycle progression of embryonic stem cell lines	7,36x10 ⁻⁴	BRCA1	1
Delay in mitosis of breast cancer cell lines	7,36x10 ⁻⁴	BRCA1	1
Progression of chromosomes	1,47x10 ⁻³	BRCA1	1
S phase of mammary epithelial cells	1,47x10 ⁻³	BRCA1	1
Reorganization of chromatin	3,68x10 ⁻³	BRCA1	1
Formation of chromosomes	4,41x10 ⁻³	BRCA1	1
Senescence of embryonic cells	5,88x10 ⁻³	BRCA1	1
Formation of senescence-associated heterochromatic foci	6,61x10 ⁻³	BRCA1	1
Arrest in S phase of embryonic cell lines	8,80x10 ⁻³	BRCA1	1
Meiosis of spermatocytes	8,80x10 ⁻³	BRCA1	1
Arrest in S phase of fibroblast cell lines	9,53x10 ⁻³	BRCA1	1
Arrest in G2 phase of fibroblast cell lines	1,46x10 ⁻²	BRCA1	1
Arrest in G2 phase of lung cancer cell lines	1,46x10 ⁻²	BRCA1	1
Binding of p53 consensus binding site	1,46x10 ⁻²	BRCA1	1
Arrest in G2 phase of colorectal cancer cell lines	1,54x10 ⁻²	BRCA1	1
Arrest in G2/M phase of breast cancer cell lines	1,54x10 ⁻²	BRCA1	1
Arrest in G2 phase of carcinoma cell lines	1,90x10 ⁻²	BRCA1	1
Homologous recombination of DNA	1,90x10 ⁻²	BRCA1	1
Arrest in cell cycle progression of breast cancer cell lines	2,40x10 ⁻²	BRCA1	1
Arrest in G1 phase of carcinoma cell lines	2,47x10 ⁻²	BRCA1	1
Joining of DNA	2,62x10 ⁻²	BRCA1	1
Arrest in G1 phase of lung cancer cell lines	2,69x10 ⁻²	BRCA1	1
Arrest in G1 phase of breast cancer cell lines	2,98x10 ⁻²	BRCA1	1
Length of telomeres	3,55x10 ⁻²	BRCA1	1
Arrest in G1 phase of colorectal cancer cell lines	3,62x10 ⁻²	BRCA1	1
G1 phase of embryonic cell lines	3,69x10 ⁻²	BRCA1	1
Duplication of centrosome	3,76x10 ⁻²	BRCA1	1
Senescence of fibroblasts	4,05x10 ⁻²	BRCA1	1
Arrest in G2/M phase transition	4,40x10 ⁻²	BRCA1	1
Aneuploidy of cells	4,82x10 ⁻²	BRCA1	1

Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση			
Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Apoptosis of M1 macrophages	7,36x10 ⁻⁴	PLAT	1
Delay in apoptosis of Purkinje cells	7,36x10 ⁻⁴	PLAT	1
Delay in apoptosis of granule cells	7,36x10 ⁻⁴	PLAT	1

Delay in degeneration of axons	7,36x10 ⁻⁴	PLAT	1
Cytotoxicity of topotecan	1,47x10 ⁻³	BRCA1	1
Apoptosis of keratinocytes	2,14x10 ⁻³	MVK, PLAT	2
Cytotoxicity of cisplatin	4,41x10 ⁻³	BRCA1	1
Survival of mammary epithelial cells	6,61x10 ⁻³	BRCA1	1
Survival of bone marrow-derived macrophages	7,34x10 ⁻³	PLAT	1
Cell viability of macrophage cancer cell lines	1,17x10 ⁻²	PLAT	1
Killing of breast cancer cell lines	1,17x10 ⁻²	BRCA1	1
Loss of stem cells	1,24x10 ⁻²	BRCA1	1
Neurodegeneration of hippocampal neurons	1,46x10 ⁻²	PLAT	1
Apoptosis of progenitor cells	1,54x10 ⁻²	BRCA1	1
Apoptosis of bone marrow-derived macrophages	1,68x10 ⁻²	PLAT	1
Cell death of Schwann cells	1,83x10 ⁻²	PLAT	1
Apoptosis of spermatocytes	2,04x10 ⁻²	BRCA1	1
Cell viability of bone marrow cells	2,26x10 ⁻²	BRCA1	1
Apoptosis of hippocampal neurons	2,62x10 ⁻²	PLAT	1
Cell viability of breast cell lines	2,69x10 ⁻²	BRCA1	1
Apoptosis of macrophage cancer cell lines	2,76x10 ⁻²	PLAT	1
Cell viability of sarcoma cell lines	3,69x10 ⁻²	BRCA1	1
Cell death of bladder cancer cell lines	3,90x10 ⁻²	HMGCS1	1
Necrosis of renal glomerulus	4,33x10 ⁻²	PLAT	1

Κυτταρική κίνηση			
Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Delay in initiation of cell spreading of gonadal cell lines	7,36x10 ⁻⁴	BRCA1	1
Chemorepulsion of sensory neurons	2,21x10 ⁻³	PLAT	1
Cell spreading of embryonic cell lines	2,19x10 ⁻²	ITGA11	1
Migration of granule cells	2,98x10 ⁻²	PLAT	1
Cell spreading	3,14x10 ⁻²	BRCA1, ITGA11	2
Invasion of pancreatic cancer cell lines	3,48x10 ⁻²	PLAT	1
Invasion of breast cancer cell lines	3,67x10 ⁻²	ANGPTL4, BRCA1	2
Cell spreading of fibroblast cell lines	4,33x10 ⁻²	ITGA11	1
Influx of neutrophils	4,61x10 ⁻²	PLAT	1

miR-638

Ανάπτυξη και λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος			
Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Differentiation of vascular smooth muscle cells	8,45x10 ⁻⁵	BMP2, LDLR	2

Vasodilation of artery	1,02x10 ⁻³	CTH, LDLR	2
Area of aortic valve	1,39x10 ⁻³	LDLR	1
Preservation of elastic lamina	1,39x10 ⁻³	LDLR	1
Function of aortic valve	2,08x10 ⁻³	LDLR	1
Thickness of tunica intima	2,08x10 ⁻³	LDLR	1
Delay in differentiation of cardiomyocytes	2,77x10 ⁻³	BMP2	1
Vasodilation of aortic root	2,77x10 ⁻³	LDLR	1
Size of heart	3,41x10 ⁻³	ITGA11, LDLR	2
Angiogenesis of bone	4,15x10 ⁻³	BMP2	1
Angiogenesis of aortic ring tissue	4,84x10 ⁻³	CTH	1
Vascularization of bone	6,22x10 ⁻³	BMP2	1
Vasodilation of aortic ring tissue	7,60x10 ⁻³	CTH	1
Morphogenesis of atrioventricular valve	9,66x10 ⁻³	BMP2	1
Relaxation of aortic ring tissue	1,17x10 ⁻²	CTH	1
Proliferation of PASM cells	1,31x10 ⁻²	BMP2	1
Development of pericardium	1,65x10 ⁻²	BMP2	1

Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός			
Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Cytostasis of tumor cell lines	2,67x10 ⁻⁴	BMP2, BRCA1, CTH	3
Expansion of basal stem cells	6,93x10 ⁻⁴	BRCA1	1
Induction of muscle cell lines	6,93x10 ⁻⁴	BMP2	1
Proliferation of epiblast cells	6,93x10 ⁻⁴	BRCA1	1
Arrest in proliferation of cells	7,08x10 ⁻⁴	BMP2, BRCA1, SLC7A5	3
Proliferation of stromal fibroblast cells	1,39x10 ⁻³	BMP2	1
Induction of chondrocytes	2,08x10 ⁻³	BMP2	1
Induction of red blood cells	2,08x10 ⁻³	BMP2	1
Cell proliferation of colorectal cancer cell lines	2,43x10 ⁻³	BMP2, BRCA1, SLC7A5	3
Arrest in growth of B cell hybridoma cells	2,77x10 ⁻³	BMP2	1
Neurogenesis of olfactory epithelial cells	2,77x10 ⁻³	BMP2	1
Osteoblastogenesis of bone marrow cell lines	2,77x10 ⁻³	BMP2	1
Osteoblastogenesis of stromal cell lines	2,77x10 ⁻³	BMP2	1
Osteogenesis of osteoblasts	2,77x10 ⁻³	BMP2	1
Chondrogenesis of fibroblast cell lines	3,46x10 ⁻³	BMP2	1
Chondrogenesis of embryonic cell lines	4,15x10 ⁻³	BMP2	1
Formation of osteoclasts	4,60x10 ⁻³	BMP2, LDLR	2
Arrest in growth of colorectal cancer cell lines	5,53x10 ⁻³	SLC7A5	1
Proliferation of fibroblast cell lines	7,01x10 ⁻³	BMP2, BRCA1, ITGA11	3
Proliferation of osteoprogenitor cells	7,60x10 ⁻³	BMP2	1
Proliferation of bone marrow stromal cells	8,28x10 ⁻³	BMP2	1

Colony formation of breast cell lines	9,66x10 ⁻³	BRCA1	1
Expansion of myeloid progenitor cells	1,17x10 ⁻²	BMP2	1
Proliferation of stem cells	1,38x10 ⁻²	BMP2, BRCA1	2
Proliferation of cerebral cortex cells	1,45x10 ⁻²	BMP2	1
Colony formation of ovarian cancer cell lines	1,58x10 ⁻²	BRCA1	1
Formation of osteoclast precursor cells	1,58x10 ⁻²	LDLR	1
Formation of foam cells	1,65x10 ⁻²	LDLR	1
Proliferation of embryonic cells	1,86x10 ⁻²	BMP2, BRCA1	2

Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση			
Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Cell viability of epithelial cells	8,81x10 ⁻⁴	BRCA1, CTH	2
Apoptosis of stromal fibroblast cells	1,39x10 ⁻³	BMP2	1
Cytotoxicity of topotecan	1,39x10 ⁻³	BRCA1	1
Apoptosis of stromal cell lines	2,08x10 ⁻³	BMP2	1
Colony survival of lymphoma cell lines	2,08x10 ⁻³	BRIP1	1
Cell viability of fibroblasts	2,13x10 ⁻³	BMP2, BRCA1	2
Apoptosis of B cell hybridoma cells	4,15x10 ⁻³	BMP2	1
Cytotoxicity of cisplatin	4,15x10 ⁻³	BRCA1	1
Survival of superior cervical ganglion neurons	4,15x10 ⁻³	BMP2	1
Survival of mammary epithelial cells	6,22x10 ⁻³	BRCA1	1
Apoptosis of bone cancer cell lines	6,94x10 ⁻³	BMP2, BRCA1	2
Cell viability of hepatocytes	7,60x10 ⁻³	CTH	1
Cell death of hepatocytes	7,69x10 ⁻³	CTH, LDLR	2
Killing of breast cancer cell lines	8,28x10 ⁻³	BRCA1	1
Apoptosis of prostate cancer cell lines	1,01x10 ⁻²	BMP2, BRCA1	2
Loss of stem cells	1,10x10 ⁻²	BRCA1	1
Cell viability	1,14x10 ⁻²	BMP2, BRCA1, BRIP1, CTH, XAF1	5
Apoptosis of sarcoma cell lines	1,14x10 ⁻²	BMP2, BRCA1	2
Apoptosis of progenitor cells	1,45x10 ⁻²	BRCA1	1
Antiapoptosis	1,51x10 ⁻²	CTH	1
Cell viability of muscle cell lines	1,51x10 ⁻²	BMP2	1
Survival of oligodendrocytes	1,51x10 ⁻²	XAF1	1
Cytotoxicity	1,67x10 ⁻²	BRCA1, LDLR	2
Survival of osteoclasts	1,72x10 ⁻²	BMP2	1
Apoptosis of spermatocytes	1,79x10 ⁻²	BRCA1	1

Φλεγμονώδης απόκριση			
Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Inflammation of vascular tissue	3,46x10 ⁻³	LDLR	1
Quantity of monocyte-derived macrophages	4,84x10 ⁻³	LDLR	1

Μεταβολισμός λιπιδίων			
Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Synthesis of triacylglycerol	1,14x10 ⁻³	LDLR, PNPLA3	2
Conversion of bile acid	1,39x10 ⁻³	LDLR	1
Quantity of alpha-tocopherol phosphate	1,39x10 ⁻³	LDLR	1
Fatty acid metabolism	1,76x10 ⁻³	BMP2, BRCA1, LDLR, PNPLA3	4
Synthesis of fatty acid	2,55x10 ⁻³	BMP2, BRCA1, LDLR	3
Depletion of cholesterol	2,77x10 ⁻³	LDLR	1
Synthesis of triolein	2,77x10 ⁻³	PNPLA3	1
Production of 1-oleoylglycerol	3,46x10 ⁻³	PNPLA3	1
Synthesis of lipid	4,04x10 ⁻³	BMP2, BRCA1, LDLR, PNPLA3	4
Trafficking of cholesterol	4,15x10 ⁻³	LDLR	1
Catabolism of lipid	4,24x10 ⁻³	LDLR, PNPLA3	2
Regulation of cholesterol	4,84x10 ⁻³	LDLR	1
Conversion of cholesterol	5,53x10 ⁻³	LDLR	1
Hydrolysis of cholesterol ester	6,22x10 ⁻³	LDLR	1
Influx of cholesterol	6,22x10 ⁻³	LDLR	1
Import of cholesterol	6,91x10 ⁻³	LDLR	1
Abnormal quantity of triacylglycerol	8,28x10 ⁻³	LDLR	1
Catabolism of cholesterol	8,97x10 ⁻³	LDLR	1
Catabolism of triacylglycerol	8,97x10 ⁻³	PNPLA3	1
Excretion of bile acid	8,97x10 ⁻³	LDLR	1
Synthesis of thromboxane A2	8,97x10 ⁻³	LDLR	1
Synthesis of prostaglandin	9,05x10 ⁻³	BMP2, LDLR	2
Hydrolysis of lipid	9,72x10 ⁻³	LDLR, VIPR1	2
Secretion of lipid	1,10x10 ⁻²	BMP2, LDLR	2
Secretion of phospholipid	1,10x10 ⁻²	LDLR	1
Clearance of triacylglycerol	1,24x10 ⁻²	LDLR	1
Excretion of sterol	1,31x10 ⁻²	LDLR	1
Reverse cholesterol transport	1,45x10 ⁻²	LDLR	1
Accumulation of cholesterol ester	1,58x10 ⁻²	LDLR	1
Secretion of cholesterol	1,58x10 ⁻²	LDLR	1
Abnormal quantity of cholesterol	1,79x10 ⁻²	LDLR	1
Metabolism of long chain fatty acid	1,85x10 ⁻²	PNPLA3	1

miR-503

Κυτταρική κίνηση			
Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Migration of cells	$1,00 \times 10^{-6}$	ADAMTS1, AQP1, CD274, COL4A1, EFNB2, FLT1, ITGB8, MME, NR4A1, PTGIR, RSPO3, SNAI1, TFPI2, TGFB2, TGM2, TNS3, TRAF3IP2, UNC5B	18
Leukocyte migration	$2,56 \times 10^{-6}$	CD274, COL4A1, EFNB2, FLT1, NR4A1, PTGIR, RSPO3, SNAI1, TGFB2, TGM2, TRAF3IP2, UNC5B	12
Cell movement of leukocytes	$5,25 \times 10^{-6}$	CD274, COL4A1, EFNB2, FLT1, NR4A1, PTGIR, RSPO3, TGFB2, TGM2, TRAF3IP2, UNC5B	11
Cellular infiltration by leukocytes	$7,62 \times 10^{-6}$	CD274, FLT1, NR4A1, PTGIR, RSPO3, TGM2, TRAF3IP2, UNC5B	8
Cellular infiltration by myeloid cells	$1,20 \times 10^{-5}$	FLT1, NR4A1, PTGIR, RSPO3, TGM2, TRAF3IP2, UNC5B	7
Cell movement of myeloid cells	$1,25 \times 10^{-5}$	COL4A1, FLT1, NR4A1, PTGIR, RSPO3, TGFB2, TGM2, TRAF3IP2, UNC5B	9
Cellular infiltration by granulocytes	$1,40 \times 10^{-5}$	NR4A1, PTGIR, RSPO3, TGM2, TRAF3IP2, UNC5B	6
Transmigration of mononuclear leukocytes	$1,74 \times 10^{-5}$	CD274, COL4A1, EFNB2, TGM2	4
Cell movement of mononuclear leukocytes	$2,12 \times 10^{-5}$	CD274, COL4A1, EFNB2, FLT1, NR4A1, TGM2, TRAF3IP2, UNC5B	8
Migration of mononuclear leukocytes	$3,64 \times 10^{-5}$	CD274, COL4A1, EFNB2, FLT1, NR4A1, TGM2, TRAF3IP2	7
Cell movement of granulocytes	$4,08 \times 10^{-5}$	NR4A1, PTGIR, RSPO3, TGFB2, TGM2, TRAF3IP2, UNC5B	7
Cellular infiltration by mononuclear leukocytes	$5,43 \times 10^{-5}$	CD274, FLT1, NR4A1, TRAF3IP2, UNC5B	5
Transmigration of T lymphocytes	$5,62 \times 10^{-5}$	CD274, COL4A1, TGM2	3
Migration of embryonic cells	$7,62 \times 10^{-5}$	AQP1, EFNB2, FLT1, SNAI1	4
Cell movement of T lymphocytes	$2,11 \times 10^{-4}$	CD274, COL4A1, NR4A1, TGM2, TRAF3IP2	5
Cellular infiltration by eosinophils	$2,55 \times 10^{-4}$	NR4A1, PTGIR, TRAF3IP2	3
Migration of eye cell lines	$4,67 \times 10^{-4}$	FLT1, TGFB2	2
Invasion of cells	$6,14 \times 10^{-4}$	ADAMTS1, CD274, FLT1,	9

		ITGB8, NR4A1, SNAI1, TFPI2, TGFB2, UNC5B	
Cellular infiltration by B lymphocytes	1,10x10 ⁻³	NR4A1, TRAF3IP2	2
Recruitment of macrophages	1,34x10 ⁻³	CD274, FLT1, SNAI1	3
Cellular infiltration by monocytes	1,51x10 ⁻³	FLT1, UNC5B	2
Recruitment of cells	1,65x10 ⁻³	CD274, EFNB2, FLT1, SNAI1, TRAF3IP2	5
Migration of hemangioblasts	1,69x10 ⁻³	FLT1	1
Recruitment of chondroclasts	1,69x10 ⁻³	FLT1	1
Infiltration by T lymphocytes	1,70x10 ⁻³	CD274, NR4A1, TRAF3IP2	3
Migration of mesenchymal cells	2,29x10 ⁻³	AQP1, SNAI1	2
Recruitment of phagocytes	2,70x10 ⁻³	CD274, FLT1, SNAI1, TRAF3IP2	4
Cell movement of phagocytes	3,37x10 ⁻³	COL4A1, FLT1, RSPO3, TGFB2, TRAF3IP2, UNC5B	6
Scattering of pancreatic cancer cells	3,38x10 ⁻³	SNAI1	1
Cell movement of cancer cells	3,52x10 ⁻³	FLT1, SNAI1, TGFB2	3
Recruitment of myeloid cells	3,84x10 ⁻³	CD274, FLT1, SNAI1, TRAF3IP2	4

Κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμός			
Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Proliferation of epithelial cells	2,95x10 ⁻⁵	EFNB2, FLT1, ITGB8, MKI67, NR4A1, TGFB2, TGM2, TRAF3IP2	8
Proliferation of smooth muscle cells	5,02x10 ⁻⁵	EFNB2, NDRG4, NR4A1, PTGIR, TFPI2, TGM2	6
Cell proliferation of tumor cell lines	7,39x10 ⁻⁵	ADAMTS1, AQP1, CD274, FLT1, ITGB8, KLHL13, MKI67, NDRG4, NR4A1, PMEPA1, SNAI1, TFPI2, TGFB2, TGM2	14
Differentiation of regulatory T lymphocytes	3,86x10 ⁻⁴	CD274, ITGB8, NR4A1	3
Proliferation of keratinocytes	3,89x10 ⁻⁴	EFNB2, MKI67, TGFB2, TRAF3IP2	4
Proliferation of cholangiocytes	7,49x10 ⁻⁴	MKI67, TGFB2	2
Differentiation of effector T lymphocytes	8,14x10 ⁻⁴	CD274, EFNB2	2
Lymphopoiesis	1,21x10 ⁻³	CD274, EFNB2, FLT1, ITGB8, NR4A1, PNP, SNAI1	7
Co-stimulation of T lymphocytes	1,42x10 ⁻³	CD274, EFNB2	2
Neuritic differentiation of neuroblastoma cell lines	1,69x10 ⁻³	TGM2	1
Production of neural crest cells	1,69x10 ⁻³	SNAI1	1
Proliferation of connective tissue	3,83x10 ⁻³	AQP1, EFNB2, FLT1, MKI67,	6

cells		TGFB2, TRAF3IP2	
-------	--	-----------------	--

Κυτταρικός θάνατος και επιβίωση			
Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Apoptosis	1,70x10 ⁻⁵	ADAMTS1, AQP1, CD274, COL4A1, EFNB2, FLT1, MKI67, MME, NR4A1, PMEPA1, PNP, RGS5, SLC39A10, SNAI1, TFPI2, TGFB2, TGM2, TRAF3IP2, UNC5B	19
Cell death of lymphocytes	3,52x10 ⁻⁵	CD274, NR4A1, PNP, SLC39A10, TGFB2, TGM2, TRAF3IP2	7
Necrosis	9,53x10 ⁻⁵	ADAMTS1, CD274, COL4A1, EFNB2, FLT1, MKI67, MME, NR4A1, PMEPA1, PNP, RGS5, SLC39A10, SNAI1, TFPI2, TGFB2, TGM2, TRAF3IP2, UNC5B	18
Apoptosis of lymphocytes	1,58x10 ⁻⁴	CD274, NR4A1, PNP, SLC39A10, TGFB2, TRAF3IP2	6
Formation of apoptotic bodies	1,82x10 ⁻⁴	CD274, TGM2	2
Cell death	2,03x10 ⁻⁴	ADAMTS1, AQP1, CD274, COL4A1, EFNB2, FLT1, MKI67, MME, NR4A1, PMEPA1, PNP, PTGIR, RGS5, SLC39A10, SNAI1, TFPI2, TGFB2, TGM2, TRAF3IP2, UNC5B	20
Necrosis of epithelial tissue	8,21x10 ⁻⁴	ADAMTS1, EFNB2, FLT1, NR4A1, RGS5, TGM2, UNC5B	7
Cell death of T lymphocytes	8,64x10 ⁻⁴	CD274, NR4A1, PNP, TGFB2, TGM2	5
Apoptosis of tumor cell lines	1,38x10 ⁻³	CD274, COL4A1, FLT1, MME, NR4A1, PMEPA1, SNAI1, TGFB2, TGM2, UNC5B	10
Anoikis of dermal fibroblasts	1,69x10 ⁻³	TGM2	1
Apoptosis of antigen-specific T cells	1,69x10 ⁻³	CD274	1
Killing of endothelial cell lines	1,69x10 ⁻³	CD274	1
Anoikis	1,73x10 ⁻³	COL4A1, FLT1, TGM2	3
Apoptosis of osteoblasts	2,19x10 ⁻³	EFNB2, TGFB2	2
Apoptosis of B lymphocytes	2,31x10 ⁻³	NR4A1, SLC39A10, TRAF3IP2	3
Apoptosis of kidney cancer cell lines	2,40x10 ⁻³	CD274, TGM2	2
Degeneration of neurons	2,42x10 ⁻³	FLT1, MME, TGFB2, TGM2	4
Cytolysis	3,33x10 ⁻³	MME, PNP, PTGIR, SNAI1	4
Anoikis of vascular endothelial	3,38x10 ⁻³	FLT1	1

cells			
Survival of radial glial progenitor cell	$3,38 \times 10^{-3}$	SNAI1	1
Cell death of connective tissue cells	$3,66 \times 10^{-3}$	EFNB2, FLT1, NR4A1, TGFB2, TGM2, UNC5B	6
Cell death of thymocytes	$3,80 \times 10^{-3}$	NR4A1, PNP, TGM2	3
Apoptosis of T lymphocytes	$3,95 \times 10^{-3}$	CD274, NR4A1, PNP, TGFB2	4

Φλεγμονώδης απόκριση			
Λειτουργία	p-Value	Γονίδια	#Γονιδίων
Inflammation of organ	$1,57 \times 10^{-4}$	AQP1, CD274, COL4A1, FLT1, ITGB8, MKI67, MME, NR4A1, PTGIR, SNAI1, TGM2, TRAF3IP2	12
Recruitment of macrophages	$1,34 \times 10^{-3}$	CD274, FLT1, SNAI1	3
Hereditary angiopathy with nephropathy, aneurysms, and muscle cramps	$1,69 \times 10^{-3}$	COL4A1	1
Immune response of T lymphocytes	$2,44 \times 10^{-3}$	CD274, PNP, TRAF3IP2	3
Recruitment of phagocytes	$2,70 \times 10^{-3}$	CD274, FLT1, SNAI1, TRAF3IP2	4

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. WHO | Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. WHO Available at: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/. (Accessed: 6th March 2018)
2. Benjamin, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* CIR.0000000000000485 (2017). doi:10.1161/CIR.0000000000000485
3. Στατιστικές αιτιών θανάτου - Statistics Explained. Available at: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Causes_of_death_statistics/el. (Accessed: 6th March 2018)
4. Αρχική Site Map Επικοινωνία. Available at: http://www.incardiology.gr/pathiseis_stefaniaia/index.html. (Accessed: 14th May 2018)
5. Greenow, K., Pearce, N. J. & Ramji, D. P. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 83, 329–342 (2005).
6. Topol, E. J. & Califf, R. M. *Textbook of Cardiovascular Medicine*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2007).
7. Lusis, A. J. Atherosclerosis. *Nature* (2000). doi:10.1038/35025203
8. Vander, A., Sherman, J., Luclano, D., and Τσακόπουλος Μ., *Φυσιολογία του ανθρώπου*, 8η έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2001, τόμος 2, κεφ. 14, σελ. 604-606.
9. Vanhoutte, P. M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur. Heart J.* 18 Suppl E, E19-29 (1997).
10. Michiels, C. Endothelial cell functions. *J. Cell. Physiol.* 196, 430–443 (2003).
11. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115–126 (1999).
12. Gimbrone, M. A. & García-Cardena, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 118, 620–636 (2016).
13. Gimbrone, M. A. & García-Cardena, G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* 22, 9–15 (2013).

14. Usman, A., Ribatti, D., Sadat, U. & Gillard, J. H. From Lipid Retention to Immune-Mediate Inflammation and Associated Angiogenesis in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* 22, 739–749 (2015).
15. Hansson, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 352, 1685–1695 (2005).
16. Chiu, J.-J. & Chien, S. Effects of Disturbed Flow on Vascular Endothelium: Pathophysiological Basis and Clinical Perspectives. *Physiol. Rev.* 91, (2011).
17. Simionescu, N., Vasile, E., Lupu, F., Popescu, G. & Simionescu, M. Prelesional events in atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. *Am. J. Pathol.* 123, 109–125 (1986).
18. Ference, B. A. et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur. Heart J.* 38, 2459–2472 (2017).
19. Arnold, D. R. & Kwiterovich Jr, P. O. CHOLESTEROL | Absorption, Function, and Metabolism. in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (ed. Caballero, B.) 1226–1237 (Academic Press, 2003). doi:10.1016/B0-12-227055-X/00225-X
20. Ness, G. C. Physiological feedback regulation of cholesterol biosynthesis: Role of translational control of hepatic HMG-CoA reductase and possible involvement of oxysterols. *Biochim. Biophys. Acta* 1851, 667–673 (2015).
21. Zannis, V. I. et al. Probing the pathways of chylomicron and HDL metabolism using adenovirus-mediated gene transfer. *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 151–166 (2004).
22. Ramasamy, I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin. Chem. Lab. Med.* 52, 1695–1727 (2014).
23. Bejta, F. et al. Oxidation of chylomicron remnant-like particles inhibits their uptake by THP-1 macrophages by apolipoprotein E-dependent processes. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 901–910 (2007).
24. Tiwari, S. & Siddiqi, S. A. Intracellular trafficking and secretion of VLDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1079–1086 (2012).
25. den Hartigh, L. J., Altman, R., Norman, J. E. & Rutledge, J. C. Postprandial VLDL lipolysis products increase monocyte adhesion and lipid droplet formation via activation of ERK2 and NFκB. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 306, H109-120 (2014).

26. Venugopal, S. K. & Jialal, I. Biochemistry, Low Density Lipoprotein. in StatPearls (StatPearls Publishing, 2018).
27. Zhu-qin, Z. et al. Regulation of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 2 expression by saturated fatty acids. *Chin. Med. Sci. J. Chung-Kuo Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih* 25, 222–227 (2010).
28. Feingold, K. R. & Grunfeld, C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. in *Endotext* (eds. De Groot, L. J. et al.) (MDText.com, Inc., 2000).
29. Pleiotropic Functions of HDL Lead to Protection from Atherosclerosis and Other Diseases | IntechOpen. Available at: /books/dyslipidemia-from-prevention-to-treatment/pleiotropic-functions-of-hdl-lead-to-protection-from-atherosclerosis-and-other-diseases. (Accessed: 13th June 2018)
30. Ansell, B. J. et al. Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation* 108, 2751–2756 (2003).
31. Bhatt, A. & Rohatgi, A. HDL Cholesterol Efflux Capacity: Cardiovascular Risk Factor and Potential Therapeutic Target. *Curr. Atheroscler. Rep.* 18, 2 (2016).
32. Zannis V.I., Kypreos K.E., Chroni A., Kardassis D. and Zanni E.E. Lipoproteins and atherogenesis. in *Molecular Mechanisms of atherosclerosis* 111–174 (Loscalzo, J., Taylor & Fransis, 2004).
33. Saleheen, D. et al. Association of HDL cholesterol efflux capacity with incident coronary heart disease events: a prospective case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 3, 507–513 (2015).
34. Rong, J. X. et al. Elevating high-density lipoprotein cholesterol in apolipoprotein E-deficient mice remodels advanced atherosclerotic lesions by decreasing macrophage and increasing smooth muscle cell content. *Circulation* 104, 2447–2452 (2001).
35. Wilhelm, A. J. et al. Apolipoprotein A-I modulates regulatory T cells in autoimmune LDLr^{-/-}, ApoA-I^{-/-} mice. *J. Biol. Chem.* 285, 36158–36169 (2010).
36. Belalcazar, L. M. et al. Long-term stable expression of human apolipoprotein A-I mediated by helper-dependent adenovirus gene transfer inhibits atherosclerosis progression and remodels atherosclerotic plaques in a mouse model of familial hypercholesterolemia. *Circulation* 107, 2726–2732 (2003).

37. Vaisar, T. et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J. Clin. Invest.* 117, 746–756 (2007).
38. Παπαγεωργάκης Ν. Απολιποπρωτεΐνες: Βιοχημεία, Μεταβολισμός, Διαγνωστική Σημασία, Λιπίδια-Λιποπρωτεΐνες. in 5ο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ελληνικής Εταιρίας Κλινικής Χημείας-Κλινικής Βιοχημείας σελ.35-53 (Κείμενα Διαλέξεων, 2004).
39. Kontush, A. HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 103, 341–349 (2014).
40. Nofer, J. R. et al. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J. Biol. Chem.* 276, 34480–34485 (2001).
41. Seetharam, D. et al. High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ. Res.* 98, 63–72 (2006).
42. de Lucia, C. et al. microRNA in Cardiovascular Aging and Age-Related Cardiovascular Diseases. *Front. Med.* 4, (2017).
43. Hosin, A. A., Prasad, A., Viiri, L. E., Davies, A. H. & Shalhoub, J. MicroRNAs in atherosclerosis. *J. Vasc. Res.* 51, 338–349 (2014).
44. Nakashima, Y., Wight, T. N. & Sueishi, K. Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans. *Cardiovasc. Res.* 79, 14–23 (2008).
45. Tabas, I., García-Cardeña, G. & Owens, G. K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J. Cell Biol.* 209, 13–22 (2015).
46. Virmani, R., Burke, A. P., Kolodgie, F. D. & Farb, A. Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J. Intervent. Cardiol.* 15, 439–446 (2002).
47. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868–874 (2002).
48. Curtiss, L. K. & Boisvert, W. A. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 243–251 (2000).
49. Schwartz, S. M., Galis, Z. S., Rosenfeld, M. E. & Falk, E. Plaque rupture in humans and mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 705–713 (2007).
50. Libby, P. Mechanisms of acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 369, 883–884 (2013).
51. Sanz, J. & Fayad, Z. A. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature* 451, 953–957 (2008).

52. Ford, E. S. et al. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000. *N. Engl. J. Med.* 356, 2388–2398 (2007).
53. Lozano, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* 380, 2095–2128 (2012).
54. Η αθηροσκλήρωση της καρδιάς. *Καρδιολογικό Βήμα*
55. Pencina, M. J. et al. Apolipoprotein B improves risk assessment of future coronary heart disease in the Framingham Heart Study beyond LDL-C and non-HDL-C. *Eur. J. Prev. Cardiol.* 22, 1321–1327 (2015).
56. Authors/Task Force Members: et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias: The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Atherosclerosis* 253, 281–344 (2016).
57. Bergheanu, S. C., Bodde, M. C. & Jukema, J. W. Pathophysiology and treatment of atherosclerosis. *Neth. Heart J.* 25, 231–242 (2017).
58. Reiner, Z. Resistance and intolerance to statins. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* 24, 1057–1066 (2014).
59. Γαληνός - Δραστική ουσία - Εξετιμίμπη. Available at: <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/ezetimibe>. (Accessed: 4th June 2018)
60. Joseph, L. & Robinson, J. G. Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Inhibition and the Future of Lipid Lowering Therapy. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 58, 19–31 (2015).
61. Zhang, D.-W. et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J. Biol. Chem.* 282, 18602–18612 (2007).
62. Shapiro, M. D., Tavori, H. & Fazio, S. PCSK9: From Basic Science Discoveries to Clinical Trials. *Circ. Res.* 122, 1420–1438 (2018).
63. Robinson, J. G. et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* 372, 1489–1499 (2015).
64. Sabatine, M. S. et al. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* 372, 1500–1509 (2015).
65. Hawkes, N. Evolocumab “must become cheaper” to be cost effective in enhancing benefits of statins. *BMJ* 358, j4042 (2017).

66. Hlatky, M. A. & Kazi, D. S. PCSK9 Inhibitors: Economics and Policy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70, 2677–2687 (2017).
67. Baum, S. J. et al. PCSK9 inhibitor access barriers—issues and recommendations: Improving the access process for patients, clinicians and payers. *Clin. Cardiol.* 40, 243–254 (2017).
68. Kersten, S. Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Mol. Metab.* 3, 354–371 (2014).
69. Nishikido, T. & Ray, K. K. Inclisiran for the treatment of dyslipidemia. *Expert Opin. Investig. Drugs* 27, 287–294 (2018).
70. Mabuchi, H., Nohara, A. & Inazu, A. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency and CETP inhibitors. *Mol. Cells* 37, 777–784 (2014).
71. Trial to Evaluate the Effect of ALN-PCSSC Treatment on Low Density Lipoprotein Cholesterol (LDL-C) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02597127>. (Accessed: 8th June 2018)
72. Clinical Trials Register. Available at: <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2017-001846-90/HU>. (Accessed: 8th June 2018)
73. Crossey, E. et al. A cholesterol-lowering VLP vaccine that targets PCSK9. *Vaccine* 33, 5747–5755 (2015).
74. Su, X. & Peng, D. New insights into ANGPTL3 in controlling lipoprotein metabolism and risk of cardiovascular diseases. *Lipids Health Dis.* 17, (2018).
75. Graham, M. J. et al. Cardiovascular and Metabolic Effects of ANGPTL3 Antisense Oligonucleotides. *N. Engl. J. Med.* 377, 222–232 (2017).
76. Hovingh, G. K. et al. Efficacy of evinacumab in homozygous familial hypercholesterolemia patients with null or non-null LDL-receptor mutations and on various background therapies. *Eur. Heart J.* 38, (2017).
77. Kersten, S. Angiopoietin-like 3 in lipoprotein metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 731–739 (2017).
78. Woudberg, N. J. et al. Pharmacological Intervention to Modulate HDL: What Do We Target? *Front. Pharmacol.* 8, (2018).
79. Ikenaga, M., Higaki, Y., Saku, K. & Uehara, Y. High-Density Lipoprotein Mimetics: a Therapeutic Tool for Atherosclerotic Diseases. *J. Atheroscler. Thromb.* 23, 385–394 (2016).
80. van der Steeg, W. A. et al. High-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein particle size, and apolipoprotein A-I: significance for

cardiovascular risk: the IDEAL and EPIC-Norfolk studies. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51, 634–642 (2008).

81. Gille, A., Easton, R., D'Andrea, D., Wright, S. D. & Shear, C. L. CSL112 enhances biomarkers of reverse cholesterol transport after single and multiple infusions in healthy subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 2106–2114 (2014).

82. Nicholls, S. J. et al. Efficacy and safety of a novel oral inducer of apolipoprotein a-I synthesis in statin-treated patients with stable coronary artery disease a randomized controlled trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 57, 1111–1119 (2011).

83. Hafiane, A. & Genest, J. HDL, Atherosclerosis, and Emerging Therapies. *Cholesterol* (2013). doi:10.1155/2013/891403

84. Segrest, J. P. et al. Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. *Curr. Opin. Lipidol.* 11, 105–115 (2000).

85. Sirtori, C. R. et al. Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I(Milano) mutant: the Limone sul Garda study. *Circulation* 103, 1949–1954 (2001).

86. Nissen, S. E. et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 290, 2292–2300 (2003).

87. MDCO-216 Infusions Leading to Changes in Atherosclerosis: A Novel Therapy in Development to Improve Cardiovascular Outcomes - Proof of Concept Intravascular Ultrasound (IVUS), Lipids, and Other Surrogate Biomarkers Trial - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02678923>. (Accessed: 20th June 2018)

88. Ibanez, B. et al. Recombinant HDL(Milano) exerts greater anti-inflammatory and plaque stabilizing properties than HDL(wild-type). *Atherosclerosis* 220, 72–77 (2012).

89. Keyserling, C. H., Barbaras, R., Benghozi, R. & Dasseux, J.-L. Development of CER-001: Preclinical Dose Selection Through to Phase I Clinical Findings. *Clin. Drug Investig.* 37, 483–491 (2017).

90. Andrews, J. et al. Effect of serial infusions of reconstituted high-density lipoprotein (CER-001) on coronary atherosclerosis: rationale and design of the CARAT study. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* 7, 45–51 (2017).

91. Michael Gibson, C. et al. Safety and Tolerability of CSL112, a Reconstituted, Infusible, Plasma-Derived Apolipoprotein A-I, After Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 134, 1918–1930 (2016).

92. Keane, J. F. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol. Aspects Med.* 21, 99–166 (2000).
93. Versari, D., Lerman, L. O. & Lerman, A. The importance of reendothelialization after arterial injury. *Curr. Pharm. Des.* 13, 1811–1824 (2007).
94. Bonetti, P. O., Lerman, L. O. & Lerman, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 168–175 (2003).
95. Mineo, C. & Shaul, P. W. Role of high-density lipoprotein and scavenger receptor B type I in the promotion of endothelial repair. *Trends Cardiovasc. Med.* 17, 156–161 (2007).
96. Werner, N. et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ. Res.* 93, e17-24 (2003).
97. Murugesan, G., Sa, G. & Fox, P. L. High-density lipoprotein stimulates endothelial cell movement by a mechanism distinct from basic fibroblast growth factor. *Circ. Res.* 74, 1149–1156 (1994).
98. Kawasaki, K. et al. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5726–5737 (2003).
99. Asahara, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964–967 (1997).
100. Zhang, Y. et al. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation* 108, 661–663 (2003).
101. Hergenreider, E. et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat. Cell Biol.* 14, 249–256 (2012).
102. Félétou, M. *Multiple Functions of the Endothelial Cells.* (Morgan & Claypool Life Sciences, 2011).
103. Donnini, D., Perrella, G., Stel, G., Ambesi-Impiombato, F. S. & Curcio, F. A new model of human aortic endothelial cells in vitro. *Biochimie* 82, 1107–1114 (2000).
104. Yeh, Y. C., Hwang, G. Y., Liu, I. P. & Yang, V. C. Identification and expression of scavenger receptor SR-BI in endothelial cells and smooth muscle cells of rat aorta in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* 161, 95–103 (2002).

105. Goldberg, A. D., Allis, C. D. & Bernstein, E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128, 635–638 (2007).
106. Perrino, C. et al. Epigenomic and transcriptomic approaches in the post-genomic era: path to novel targets for diagnosis and therapy of the ischaemic heart? Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart. *Cardiovasc. Res.* 113, 725–736 (2017).
107. Xu, S., Pelisek, J. & Jin, Z. G. Atherosclerosis Is an Epigenetic Disease. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM (2018). doi:10.1016/j.tem.2018.04.007
108. Sun, X., Belkin, N. & Feinberg, M. W. Endothelial MicroRNAs and Atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 15, (2013).
109. Zampetaki, A. et al. Histone deacetylase 3 is critical in endothelial survival and atherosclerosis development in response to disturbed flow. *Circulation* 121, 132–142 (2010).
110. Zaina, S. et al. DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 7, 692–700 (2014).
111. Home - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. (Accessed: 6th March 2018)
112. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297 (2004).
113. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350–355 (2004).
114. Condorelli, G., Latronico, M. V. G. & Cavarretta, E. microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 2177–2187 (2014).
115. Andreou, I., Sun, X., Stone, P. H., Edelman, E. R. & Feinberg, M. W. miRNAs in atherosclerotic plaque initiation, progression, and rupture. *Trends Mol. Med.* 21, 307–318 (2015).
116. Zhang, J., Wu, L., Li, Z. & Fu, G. miR-1231 exacerbates arrhythmia by targeting calcium channel gene CACNA2D2 in myocardial infarction. *Am. J. Transl. Res.* 9, 1822–1833 (2017).
117. Vannini, I., Fanini, F. & Fabbri, M. Emerging roles of microRNAs in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* (2018). doi:10.1016/j.gde.2018.01.001
118. Neudecker, V., Brodsky, K. S., Kreth, S., Ginde, A. A. & Eltzschig, H. K. Emerging Roles for MicroRNAs in Perioperative Medicine. *Anesthesiology* 124, 489–506 (2016).

119. Rayner, K. J. & Moore, K. J. microRNA control of HDL Metabolism and Function. *Circ. Res.* 114, 183–192 (2014).
120. Madrigal-Matute, J., Rotllan, N., Aranda, J. F. & Fernández-Hernando, C. MicroRNAs and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 15, 322 (2013).
121. Wei, Y., Nazari-Jahantigh, M., Neth, P., Weber, C. & Schober, A. MicroRNA-126, -145, and -155: a therapeutic triad in atherosclerosis? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 449–454 (2013).
122. Shan, Z. et al. Differentially expressed microRNAs at different stages of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Chin. Med. J. (Engl.)* 126, 515–520 (2013).
123. Wei, Y. et al. The microRNA-342-5p fosters inflammatory macrophage activation through an Akt1- and microRNA-155-dependent pathway during atherosclerosis. *Circulation* 127, 1609–1619 (2013).
124. Qin, B. et al. MicroRNA-142-3p Induces Atherosclerosis-Associated Endothelial Cell Apoptosis by Directly Targeting Rictor. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 47, 1589–1603 (2018).
125. Zhong, L., Simard, M. J. & Huot, J. Endothelial microRNAs regulating the NF- κ B pathway and cell adhesion molecules during inflammation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 32, 4070–4084 (2018).
126. Kumar, S., Kim, C. W., Simmons, R. D. & Jo, H. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis: mechanosensitive athero-miRs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 2206–2216 (2014).
127. Araldi, E. & Suárez, Y. MicroRNAs as regulators of endothelial cell functions in cardiometabolic diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 2094–2103 (2016).
128. Barwari, T., Joshi, A. & Mayr, M. MicroRNAs in Cardiovascular Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 68, 2577–2584 (2016).
129. Lim, L. P. et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769–773 (2005).
130. Zampetaki, A. & Mayr, M. MicroRNAs in vascular and metabolic disease. *Circ. Res.* 110, 508–522 (2012).
131. Schiattarella, G. G. et al. Epigenetic modulation of vascular diseases: Assessing the evidence and exploring the opportunities. *Vascul. Pharmacol.* (2018). doi:10.1016/j.vph.2018.02.009

132. Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105 (2009).
133. Catalanotto, C., Cogoni, C. & Zardo, G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int. J. Mol. Sci.* 17, (2016).
134. Esau, C. et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 3, 87–98 (2006).
135. Rayner, K. J. et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 121, 2921–2931 (2011).
136. Liao, Y.-C. et al. Let-7g improves multiple endothelial functions through targeting transforming growth factor-beta and SIRT-1 signaling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63, 1685–1694 (2014).
137. Wojciechowska, A., Braniewska, A. & Kozar-Kamińska, K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease. *Adv. Clin. Exp. Med. Off. Organ Wroclaw Med. Univ.* 26, 865–874 (2017).
138. Koroleva, I. A., Nazarenko, M. S. & Kucher, A. N. Role of microRNA in Development of Instability of Atherosclerotic Plaques. *Biochem. Biokhimiia* 82, 1380–1390 (2017).
139. Wark, A. W., Lee, H. J. & Corn, R. M. Multiplexed detection methods for profiling microRNA expression in biological samples. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 47, 644–652 (2008).
140. Wyman, S. K. et al. Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity. *Genome Res.* 21, 1450–1461 (2011).
141. Newman, M. A., Mani, V. & Hammond, S. M. Deep sequencing of microRNA precursors reveals extensive 3' end modification. *RNA N. Y. N* 17, 1795–1803 (2011).
142. Pritchard, C. C., Cheng, H. H. & Tewari, M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat. Rev. Genet.* 13, 358–369 (2012).
143. Stears, R. L., Martinsky, T. & Schena, M. Trends in microarray analysis. *Nat. Med.* 9, 140–145 (2003).
144. Schulze, A. & Downward, J. Navigating gene expression using microarrays--a technology review. *Nat. Cell Biol.* 3, E190-195 (2001).
145. Castoldi, M. et al. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* 12, 913–920 (2006).

146. The KEGG resource for deciphering the genome. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681412>. (Accessed: 17th July 2018)
147. Sample to Insight Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®) Guide.
148. Gusev, Y. Computational methods for analysis of cellular functions and pathways collectively targeted by differentially expressed microRNA. *Methods San Diego Calif* 44, 61–72 (2008).
149. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of predicted and validated miRNA-target interactions. Available at: <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/documentation.html#mirwalk>. (Accessed: 17th July 2018)
150. Fujiwara, T. & Yada, T. miRNA-target prediction based on transcriptional regulation. *BMC Genomics* 14, S3 (2013).
151. Ritchie, W. & Rasko, J. E. J. Refining microRNA target predictions: sorting the wheat from the chaff. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 445, 780–784 (2014).
152. Theofilatos, D. et al. HDL-apoA-I induces the expression of angiopoietin like 4 (ANGPTL4) in endothelial cells via a PI3K/AKT/FOXO1 signaling pathway. *Metabolism* doi:10.1016/j.metabol.2018.06.002
153. Gray, J. T. & Zolotukhin, S. Design and construction of functional AAV vectors. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 807, 25–46 (2011).
154. Li, X., Kan, H.-Y., Lavrentiadou, S., Krieger, M. & Zannis, V. Reconstituted discoidal ApoE-phospholipid particles are ligands for the scavenger receptor BI. The amino-terminal 1-165 domain of ApoE suffices for receptor binding. *J. Biol. Chem.* 277, 21149–21157 (2002).
155. Sanoudou, D. et al. Expression profiling reveals altered satellite cell numbers and glycolytic enzyme transcription in nemaline myopathy muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4666–4671 (2003).
156. Package Insert GeneChip™ miRNA 2.0 Array.
157. Timlin, J. A. Scanning microarrays: current methods and future directions. *Methods Enzymol.* 411, 79–98 (2006).
158. Hatfield, G. W., Hung, S.-P. & Baldi, P. Differential analysis of DNA microarray gene expression data. *Mol. Microbiol.* 47, 871–877 (2003).
159. Argyropoulos, C. et al. Operational criteria for selecting a cDNA microarray data normalization algorithm. *Oncol. Rep.* 15 Spec no., 983–96 (2006).

160. McCall, M. N., Bolstad, B. M. & Irizarry, R. A. Frozen robust multiarray analysis (fRMA). *Biostat. Oxf. Engl.* 11, 242–253 (2010).
161. Wang, B. & Xi, Y. Challenges for MicroRNA Microarray Data Analysis. *Microarrays* 2, 34–50 (2013).
162. Mastriani, E., Zhai, R. & Zhu, S. Microarray-Based MicroRNA Expression Data Analysis with Bioconductor. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1751, 127–138 (2018).
163. Chou, C.-H. et al. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 46, D296–D302 (2018).
164. Liu, G., Zhang, R., Xu, J., Wu, C.-I. & Lu, X. Functional conservation of both CDS- and 3'-UTR-located microRNA binding sites between species. *Mol. Biol. Evol.* 32, 623–628 (2015).
165. Lim, L. P. et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769–773 (2005).
166. Ritchie, W., Rajasekhar, M., Flamant, S. & Rasko, J. E. J. Conserved expression patterns predict microRNA targets. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000513 (2009).
167. Ashburner, M. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* 25, 25–29 (2000).
168. Gene Ontology Consortium, T. Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. - PubMed - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27899567>. (Accessed: 12th September 2018)
169. Mi, H. et al. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res.* 45, D183–D189 (2017).
170. Rupaimoole, R. & Slack, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 203–222 (2017).
171. van Rooij, E. & Kauppinen, S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol. Med.* 6, 851–864 (2014).
172. Bernardo, B. C. et al. Therapeutic inhibition of the miR-34 family attenuates pathological cardiac remodeling and improves heart function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 17615–17620 (2012).
173. Boon, R. A. & Dimmeler, S. MicroRNAs in myocardial infarction. *Nat. Rev. Cardiol.* 12, 135–142 (2015).

174. Βαλαντή Έφη. Μοριακή αξιολόγηση της αθηροπροστατευτικής δράσης της HDL που περιέχει απολιποπρωτεΐνη E3 με τη χρήση νέων γονιδιωματικών μεθοδολογιών. (2013).
175. Wang, Z., Zhang, Z., Zhang, C. & Xu, Y. Identification of potential pathogenic biomarkers in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol. Lett.* 15, 8491–8499 (2018).
176. Gao, H.-Y. et al. Screening of prognostic risk microRNAs for acute myeloid leukemia. *Hematol. Amst. Neth.* 1–9 (2018). doi:10.1080/10245332.2018.1475860
177. Plotnikova, O. M. & Skoblov, M. Y. [Efficiency of the miRNA- mRNA Interaction Prediction Programs]. *Mol. Biol. (Mosk.)* 52, 543–554 (2018).
178. Li, N., Chen, J., Zhao, J. & Wang, T. MicroRNA-3188 targets ETS-domain protein 4 and participates in RhoA/ROCK pathway to regulate the development of atherosclerosis. *Pharm.* 72, 687–693 (2017).
179. Liu, X. et al. The SNP Rs915014 in MTHFR Regulated by MiRNA Associates with Atherosclerosis. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 45, 1149–1155 (2018).
180. Liu, W. et al. Circulating microRNAs correlated with the level of coronary artery calcification in symptomatic patients. *Sci. Rep.* 5, 16099 (2015).
181. Xia, Z.-Y. et al. Runx2/miR-3960/miR-2861 Positive Feedback Loop Is Responsible for Osteogenic Transdifferentiation of Vascular Smooth Muscle Cells. *BioMed Res. Int.* 2015, 624037 (2015).
182. Li, X.-D. et al. Elevated plasma miRNA-122, -140-3p, -720, -2861, and -3149 during early period of acute coronary syndrome are derived from peripheral blood mononuclear cells. *PloS One* 12, e0184256 (2017).
183. Li, X. et al. Plasma miR-122 and miR-3149 Potentially Novel Biomarkers for Acute Coronary Syndrome. *PloS One* 10, e0125430 (2015).
184. Luque, A., Farwati, A., Krupinski, J. & Aran, J. M. Association between low levels of serum miR-638 and atherosclerotic plaque vulnerability in patients with high-grade carotid stenosis. *J. Neurosurg.* 1–8 (2018). doi:10.3171/2018.2.JNS171899
185. Zhou, X. et al. MicroRNA-638 inhibits cell growth and tubule formation by suppressing VEGFA expression in human Ewing sarcoma cells. *Biosci. Rep.* 38, (2018).
186. Cheng, J. et al. Downregulation of miRNA-638 promotes angiogenesis and growth of hepatocellular carcinoma by targeting VEGF. *Oncotarget* 7, 30702–30711 (2016).

187. Li, P. et al. MicroRNA-638 is highly expressed in human vascular smooth muscle cells and inhibits PDGF-BB-induced cell proliferation and migration through targeting orphan nuclear receptor NOR1. *Cardiovasc. Res.* 99, 185–193 (2013).
188. Hou, L.-J., Han, J.-J. & Liu, Y. Up-regulation of microRNA-503 by high glucose reduces the migration and proliferation but promotes the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells by inhibiting the expression of insulin-like growth factor-1 receptor. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22, 3515–3523 (2018).
189. Lee, A. et al. A PPAR γ -dependent miR-424/503-CD40 axis regulates inflammation mediated angiogenesis. *Sci. Rep.* 7, (2017).
190. Hirakawa, T. et al. miR-503, a microRNA epigenetically repressed in endometriosis, induces apoptosis and cell-cycle arrest and inhibits cell proliferation, angiogenesis, and contractility of human ovarian endometriotic stromal cells. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 31, 2587–2597 (2016).
191. Caporali, A. et al. p75(NTR)-dependent activation of NF- κ B regulates microRNA-503 transcription and pericyte-endothelial crosstalk in diabetes after limb ischaemia. *Nat. Commun.* 6, 8024 (2015).
192. Nguyen, M.-A. et al. Extracellular Vesicles Secreted by Atherogenic Macrophages Transfer MicroRNA to Inhibit Cell Migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2017). doi:10.1161/ATVBAHA.117.309795
193. Bi, R. et al. miR-503 inhibits platelet-derived growth factor-induced human aortic vascular smooth muscle cell proliferation and migration through targeting the insulin receptor. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 84, 1711–1716 (2016).
194. Muñoz-Pacheco, P. et al. Ezetimibe inhibits PMA-induced monocyte/macrophage differentiation by altering microRNA expression: a novel anti-atherosclerotic mechanism. *Pharmacol. Res.* 66, 536–543 (2012).
195. Woywodt, A., Bahlmann, F. H., de Groot, K., Haller, H. & Haubitz, M. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol. Dial. Transplant.* 17, 1728–1730 (2002).
196. Caporali, A. & Emanuelli, C. MicroRNA-503 and the Extended MicroRNA-16 Family in Angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 21, 162–166 (2011).
197. Caporali, A. et al. Deregulation of microRNA-503 contributes to diabetes mellitus-induced impairment of endothelial function and reparative angiogenesis after limb ischemia. *Circulation* 123, 282–291 (2011).

198. Caporali, A. et al. p75NTR-dependent activation of NF- κ B regulates microRNA-503 transcription and pericyte–endothelial crosstalk in diabetes after limb ischaemia. *Nat. Commun.* 6, (2015).
199. Pierscianek, D. et al. Activation of multiple angiogenic signaling pathways in hemangiopericytoma. *Brain Tumor Pathol.* 33, 200–208 (2016).
200. Wen, Y. et al. MiR-503 suppresses hypoxia-induced proliferation, migration and angiogenesis of endothelial progenitor cells by targeting Apelin. *Peptides* 105, 58–65 (2018).
201. Zhou, B. et al. MicroRNA-503 targets FGF2 and VEGFA and inhibits tumor angiogenesis and growth. *Cancer Lett.* 333, 159–169 (2013).
202. Kim, J. et al. Endothelial Apelin-FGF Link Mediated by MicroRNAs 424 and 503 is Disrupted in Pulmonary Arterial Hypertension. *Nat. Med.* 19, 74–82 (2013).
203. Erber, R. et al. EphB4 controls blood vascular morphogenesis during postnatal angiogenesis. *EMBO J.* 25, 628–641 (2006).
204. Davidson, B. A. et al. Differential Angiogenic Gene Expression in TP53 Wild-Type and Mutant Ovarian Cancer Cell Lines. *Front. Oncol.* 4, (2014).
205. Brantley-Sieders, D. M. & Chen, J. Eph receptor tyrosine kinases in angiogenesis: from development to disease. *Angiogenesis* 7, 17–28 (2004).
206. Ehlken, C. et al. Therapeutic interference with EphrinB2 signalling inhibits oxygen-induced angioproliferative retinopathy. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* 89, 82–90 (2011).
207. Oweida, A. et al. Ephrin-B2 overexpression predicts for poor prognosis and response to therapy in solid tumors. *Mol. Carcinog.* 56, 1189–1196 (2017).
208. Wang, Y. et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* 465, 483–486 (2010).
209. Stefater, J. A. et al. Regulation of angiogenesis by a non-canonical Wnt-Flt1 pathway in myeloid cells. *Nature* 474, 511–515 (2011).
210. Li, S. et al. Basal Flt1 tyrosine kinase activity is a positive regulator of endothelial survival and vascularization during zebrafish embryogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 373–384 (2015).
211. Wu, L. W. et al. Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 5096–5103 (2000).

212. Kong, X. et al. [VEGF promotes the proliferation of bone marrow derived mesenchymal stem cells through ERK1/2 signal pathway]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 18, 1292–1296 (2010).
213. Zhao, Y. & Bruemmer, D. NR4A Orphan Nuclear Receptors: Transcriptional Regulators of Gene Expression in Metabolism and Vascular Biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1535–1541 (2010).
214. Zeng, H. et al. Orphan nuclear receptor TR3/Nur77 regulates VEGF-A-induced angiogenesis through its transcriptional activity. *J. Exp. Med.* 203, 719–729 (2006).
215. Liu, D., Jia, H., Holmes, D. I. R., Stannard, A. & Zachary, I. Vascular endothelial growth factor-regulated gene expression in endothelial cells: KDR-mediated induction of Egr3 and the related nuclear receptors Nur77, Nurr1, and Nor1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 2002–2007 (2003).
216. Krampert, M. et al. ADAMTS1 proteinase is up-regulated in wounded skin and regulates migration of fibroblasts and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 280, 23844–23852 (2005).
217. Ren, P. et al. Critical Role of ADAMTS-4 in the Development of Sporadic Aortic Aneurysm and Dissection in Mice. *Sci. Rep.* 7, 12351 (2017).
218. Xu, Z., Yu, Y. & Duh, E. J. Vascular endothelial growth factor upregulates expression of ADAMTS1 in endothelial cells through protein kinase C signaling. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 4059–4066 (2006).
219. Steinle, J. J., Meininger, C. J., Chowdhury, U., Wu, G. & Granger, H. J. Role of ephrin B2 in human retinal endothelial cell proliferation and migration. *Cell. Signal.* 15, 1011–1017 (2003).
220. Kim, I. et al. EphB ligand, ephrinB2, suppresses the VEGF- and angiopoietin 1-induced Ras/mitogen-activated protein kinase pathway in venous endothelial cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 1126–1128 (2002).
221. Heller, R. et al. Overlapping and distinct roles for PI3K β and γ isoforms in S1P-induced migration of human and mouse endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 80, 96–105 (2008).
222. Chavakis, E. et al. Phosphatidylinositol-3-kinase-gamma is integral to homing functions of progenitor cells. *Circ. Res.* 102, 942–949 (2008).
223. Wang, F. et al. RACK1 regulates VEGF/Flt1-mediated cell migration via activation of a PI3K/Akt pathway. *J. Biol. Chem.* 286, 9097–9106 (2011).
224. Bochenek, M. L., Dickinson, S., Astin, J. W., Adams, R. H. & Nobes, C. D. Ephrin-B2 regulates endothelial cell morphology and motility independently of Eph-receptor binding. *J. Cell Sci.* 123, 1235–1246 (2010).

225. Steinle, J. J. et al. Eph B4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 43830–43835 (2002).
226. Colorado, P. C. et al. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res.* 60, 2520–2526 (2000).
227. Sudhakar, A. et al. Human alpha1 type IV collagen NC1 domain exhibits distinct antiangiogenic activity mediated by alpha1beta1 integrin. *J. Clin. Invest.* 115, 2801–2810 (2005).
228. Kawabe, J.-I. et al. Prostaglandin I2 promotes recruitment of endothelial progenitor cells and limits vascular remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 464–470 (2010).
229. Giral, H., Kratzer, A. & Landmesser, U. MicroRNAs in lipid metabolism and atherosclerosis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 30, 665–676 (2016).
230. Maxfield, F. R. & Tabas, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438, 612–621 (2005).
231. Incardona, J. P. & Eaton, S. Cholesterol in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 193–203 (2000).
232. Noghero, A. et al. Liver X receptor activation reduces angiogenesis by impairing lipid raft localization and signaling of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 2280–2288 (2012).
233. Fang, L. et al. Control of angiogenesis by AIBP-mediated cholesterol efflux. *Nature* 498, 118–122 (2013).
234. Lyu, J. et al. Astemizole Inhibits mTOR Signaling and Angiogenesis by Blocking Cholesterol Trafficking. *Int. J. Biol. Sci.* 14, 1175–1185 (2018).
235. Xu, J., Dang, Y., Ren, Y. R. & Liu, J. O. Cholesterol trafficking is required for mTOR activation in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4764–4769 (2010).
236. Shim, J. S. et al. Divergence of Antiangiogenic Activity and Hepatotoxicity of Different Stereoisomers of Itraconazole. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 2709–2720 (2016).
237. Shim, J. S. et al. Inhibition of angiogenesis by selective estrogen receptor modulators through blockade of cholesterol trafficking rather than estrogen receptor antagonism. *Cancer Lett.* 362, 106–115 (2015).
238. Tall, A. R. & Yvan-Charvet, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 104–116 (2015).

239. Moore, K. J. & Tabas, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 145, 341–355 (2011).
240. Rottiers, V. & Näär, A. M. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 239–250 (2012).
241. Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* 12, 99–110 (2011).
242. Jeon, T.-I. & Osborne, T. F. miRNA and cholesterol homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 2041–2046 (2016).
243. Lagor, W. & S Millar, J. Overview of the LDL receptor: Relevance to cholesterol metabolism and future approaches for the treatment of coronary heart disease. *J. Recept. Ligand Channel Res.* 3, 1–14 (2010).
244. LDLR low density lipoprotein receptor [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3949>. (Accessed: 9th September 2018)
245. Maxfield, F. R., Iaea, D. B. & Pipalia, N. H. Role of STARD4 and NPC1 in intracellular sterol transport. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 94, 499–506 (2016).
246. Calderon-Dominguez, M., Gil, G., Medina, M. A., Pandak, W. M. & Rodríguez-Agudo, D. The StarD4 subfamily of steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer (START) domain proteins: new players in cholesterol metabolism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 49, 64–68 (2014).
247. Korytowski, W., Rodriguez-Agudo, D., Pilat, A. & Girotti, A. W. StarD4-mediated translocation of 7-hydroperoxycholesterol to isolated mitochondria: deleterious effects and implications for steroidogenesis under oxidative stress conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392, 58–62 (2010).
248. Rodriguez-Agudo, D. et al. Intracellular cholesterol transporter StarD4 binds free cholesterol and increases cholesteryl ester formation. *J. Lipid Res.* 49, 1409–1419 (2008).
249. Rodriguez-Agudo, D. et al. Subcellular localization and regulation of StarD4 protein in macrophages and fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1811, 597–606 (2011).
250. Yabe, D., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12753–12758 (2002).

251. Yang, T. et al. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110, 489–500 (2002).
252. Yabe, D., Komuro, R., Liang, G., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3155–3160 (2003).
253. Sun, L.-P., Li, L., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* 280, 26483–26490 (2005).
254. Sever, N. et al. Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J. Biol. Chem.* 278, 52479–52490 (2003).
255. Espenshade, P. J. & Hughes, A. L. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 41, 401–427 (2007).
256. Dong, X.-Y., Tang, S.-Q. & Chen, J.-D. Dual functions of Insig proteins in cholesterol homeostasis. *Lipids Health Dis.* 11, 173 (2012).
257. Sakakura, Y. et al. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 176–183 (2001).
258. Segrest, J. P. Amphipathic helices and plasma lipoproteins: thermodynamic and geometric considerations. *Chem. Phys. Lipids* 18, 7–22 (1977).
259. Gaarz, A. et al. Bead Array–Based microRNA Expression Profiling of Peripheral Blood and the Impact of Different RNA Isolation Approaches. *J Mol Diagn* 12, 335–344 (2010).