



ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ: Π.3.4

«ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΟΥ ΠΟΥ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΑΛΛΕΡΓΙΑ (ΑΝΑΦΟΡΑ)»

**ΓΙΑ ΤΟ ΥΠΟΕΡΓΟ 1 ΤΗΣ ΠΡΑΞΗΣ:
«ΘΑΛΗΣ- Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας
Αθηνών- Ωρίμανση της μη ειδικής ανοσίας: επιρροή των
λοιμώξεων και ρόλος τους στην ανάπτυξη ατοπίας και
άσθματος» (MIS 377047)**

του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση»
Επιστημονικός Υπεύθυνος Πράξης και Υπεύθυνος Υποέργου 1:
Ανδρέακος Ευάγγελος

Επιμέλεια σύνταξης εγγράφου: ΟΜΑΔΑ ΥΠΟΕΡΓΟΥ 1

ΓΑΛΑΝΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ
ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ
ΘΕΟΔΟΣΙΟΥ ΘΕΟΔΟΣΙΟΣ
ΚΟΚΚΙΝΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ
ΛΟΥΚΙΔΗΣ ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ
ΜΑΓΓΙΝΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ
ΜΑΝΙΟΥΔΑΚΗ ΜΑΡΙΑ
ΜΕΓΡΕΜΗΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

ΜΠΑΚΑΚΟΣ ΠΕΤΡΟΣ
ΞΕΠΑΠΑΔΑΚΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ
ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΠΑΡΑΣΚΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ
ΠΑΥΛΟΠΟΥΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΡΟΥΜΠΕΔΑΚΗ ΕΙΡΗΝΗ
ΣΚΕΥΑΚΗ ΧΡΥΣΑΝΘΗ
ΤΑΚΑ ΣΤΥΛΙΑΝΗ



Η προαναφερθείσα συγχρηματοδοτούμενη πράξη ΕΚΤ-ΕΣΠΑ 2007-2013 έχει ως σκοπό να εξετάσει την υπόθεση ότι η ελαττωματική ωρίμανση της φυσικής ανοσίας νωρίς στη ζωή, επηρεαζόμενη από λοιμώξεις, συμβάλλει στην ανάπτυξη αλλεργικών παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος.

Στόχοι της πράξης είναι να περιγραφεί η ωρίμανση της φυσικής ανοσίας σε υγιείς και ασθματικούς δότες, να διευκρινιστεί η επιρροή των λοιμώξεων στην ωρίμανση της φυσικής ανοσίας και την ανάπτυξη/επιμονή αλλεργικών αντιδράσεων στους αεραγωγούς, να προσδιοριστεί η συσχέτιση ιϊκών λοιμώξεων με τη μικροβιακή αποικιοποίηση του ανώτερου αναπνευστικού και να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του αναπνευστικού επιθηλίου και την αναδόμησης των αεραγωγών στην ανάπτυξη αλλεργίας και άσθματος. Σκοπός του προγράμματος είναι να αποκαλύψει σημαντικές βιολογικές διαδικασίες που ενεργοποιούνται στα πρώτα στάδια της ζωής και συμβάλλουν στην ανάπτυξη αλλεργικών παθήσεων του αναπνευστικού συστήματος με σημαντική διαγνωστική και θεραπευτική σημασία.

Στο πλαίσιο της πράξης, υλοποιείται το Υποέργο 1 με τίτλο «Ωρίμανση της μη-ειδικής ανοσίας: επιρροή των λοιμώξεων και ρόλος τους στην ανάπτυξη ατοπίας και άσθματος» και θα εκτελεστούν επτά (8) Δράσεις.

Το παρόν παραδοτέο 3.4 αποτελεί μέρος της Δράσης 3: «Μελέτη της ωρίμανσης της φυσικής ανοσίας του πνευμονικού επιθηλίου και συσχέτιση με την ανάπτυξη αλλεργίας και άσθματος» και περιλαμβάνει όλες τις ενέργειες για τον χαρακτηρισμό μεταγραφικών μονοπατιών επιθηλίου που συνδέονται με την αλλεργία.

Σκοπός του Π.Ε.3.4 είναι να γίνει ο χαρακτηρισμός των βασικών μεταγραφικών μονοπατιών του επιθηλίου που συνδέονται με την αλλεργία και διεγείρονται ύστερα από ιογενείς λοιμώξεις.

Δράση 3: Μελέτη της ωρίμανσης της φυσικής ανοσίας του πνευμονικού επιθηλίου και συσχέτιση με την ανάπτυξη αλλεργίας και άσθματος.

3.4 Χαρακτηρισμός μεταγραφικών μονοπατιών επιθηλίου που συνδέονται με την αλλεργία.

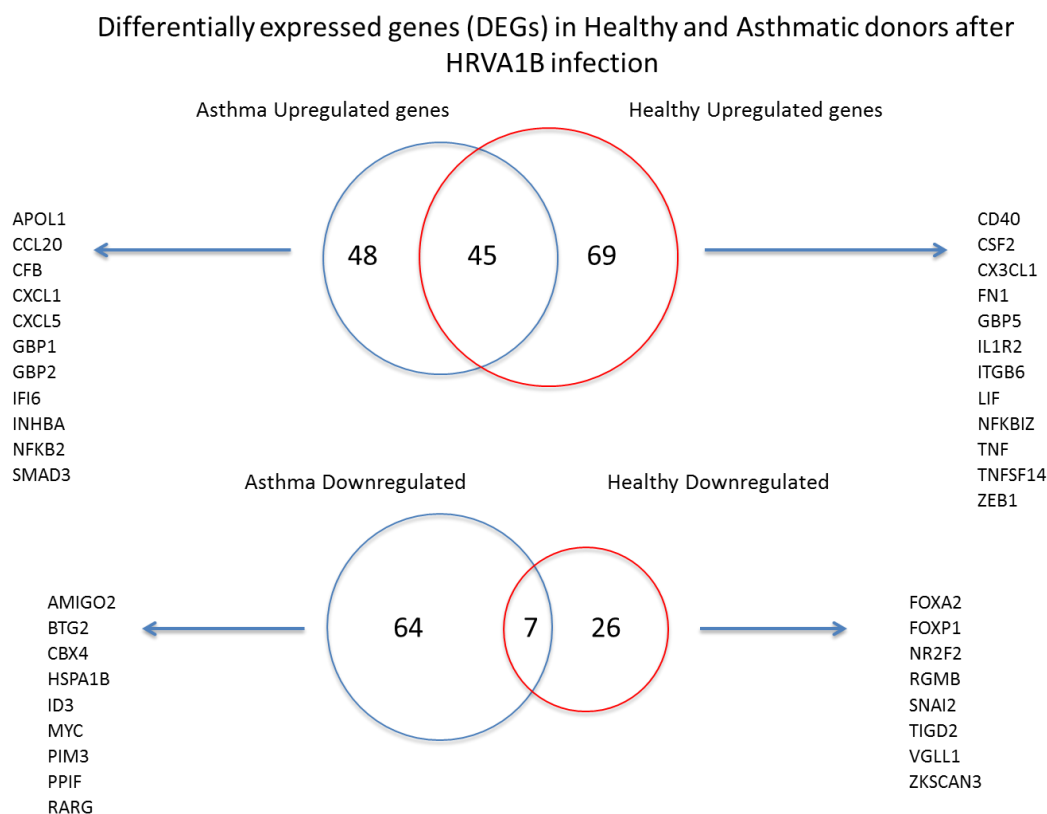
Για να χαρακτηρίσουμε με λεπτομέρεια τα μεταγραφικά μονοπάτια και να τα γίνει στοχευμένη μελέτη των σημαντικότερων από αυτά έγινε ανάλυση βιοπληροφορικής σε έναν περιορισμένο αριθμό δειγμάτων κυττάρων του αναπνευστικού επιθηλίου (8 δείγματα: 4 υγιείς και 4 με αλλεργικό άσθμα), που είχε προηγηθεί αλληλούχιση όλου του μεταγραφόμενου γονιδιώματος (Next generation sequencing). Τα ρινικά επιθηλιακά κύτταρα αυτών των δοτών είχαν καλλιεργηθεί μέχρι τη τρίτη γενεά και μολύνθηκαν με τον ρινοϊό HRVA1B (1MOI). Η αλληλούχιση των μεταγράφων έγινε στις έξι ώρες μετά τη μόλυνση με σκοπό να γίνει ο χαρακτηρισμός των μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στα κυτταρικά μονοπάτια της μόλυνσης με τον ρινοϊό και να χαρακτηριστούν με αυτό τον τρόπο οι συνδέσεις των δικτύων των μεταγραφικών μονοπατιών καθώς και να προσδιοριστούν οι διαφορές στην απόκριση από πολύ νωρίς χρονικά των ατοπικών και μη ατοπικών επιθηλιακών κυττάρων.

Η ανάλυση έγινε ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα και αλγόριθμους:

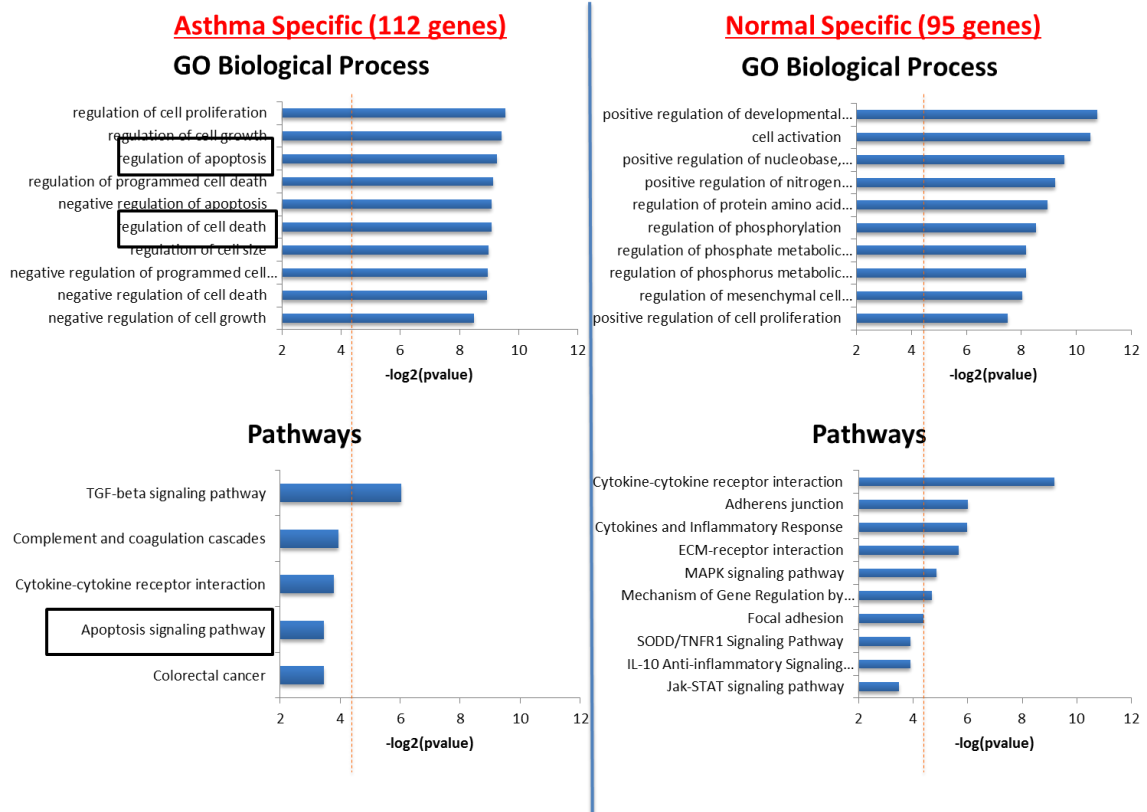
1. Έγινε ποιοτικός έλεγχος των δεδομένων με τη χρήση του λογισμικού FastQC.
2. Ευθυγράμμιση των δεδομένων έγινε με τον αλγόριθμο tophat2 χρησιμοποιώντας την επιλογή ευαίσθητο ευθυγράμμιση.
3. Έγινε Cluster ανάλυση των δεδομένων με το λογισμικό cluster3.0 και η οπτικοποίηση των δεδομένων ολοκληρώθηκε με το λογισμικό treeview.
4. Χρησιμοποιήθηκε το πακέτο Samtools για τη μετατροπή των δεδομένων.
5. Έγινε τροποποίηση σε DESeq αλγόριθμος που χρησιμοποιείται για την κλήση διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων με τη βοήθεια του πακέτου R / Bioconductor.
6. Πραγματοποιήθηκε ταξινόμηση των γονιδίων σε μονοπάτια, βιολογική επεξεργασία και δίκτυα με τη χρήση του λογισμικού DAVID knowledgebase and INGENUITY pathway analysis (IPA) software.
7. Χρησιμοποιήθηκαν τόσο το Fisher τεστ όσο και η υπεργεωμετρική δοκιμή (hypergeometric test) στο λογισμικό IPA για τον εντοπισμό των μεταγραφικών ρυθμιστικών μορίων και των μονοπατιών σηματοδότησης.
8. Προκειμένου να χαρακτηριστούν περαιτέρω νέοι μεταγραφικοί παράγοντες που συνδέονται με την αλλεργία, έγινε ηλεκτρονική υποβολή των Refseq ID των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων σε ένα διαδικτυακό εργαλείο εύρεσης θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, p-scan. Χρησιμοποιώντας 2 διαφορετικές βάσεις δεδομένων θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, JASPAR και TRANSFAC, βρέθηκαν οι μεταγραφικοί παράγοντες καθώς και οι ακριβείς θέσεις πρόσδεσής τους (στην περιοχή -950, +50 του εκάστοτε γονιδίου). Αποτελέσματα με $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά. Τέλος, έγινε ομαδοποίηση των γονιδίων σε αυτά που υπόκεινται σε έλεγχο κοινών μεταγραφικών παραγόντων και σε αυτά που ρυθμίζονται από 1-2 ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες.

Αποτελέσματα

Διαφορετικός αριθμός γονιδίων που υπέρ και υπό εκφράζονται σε υγιείς και ασθματικούς δότες . Οι υγιείς έχουν περισσότερα γονίδια που αυξάνεται η έκφρασή τους μετά τη λοίμωξη με τον ρινοϊό (69) ενώ οι ασθματικοί έχουν περισσότερα γονίδια που καταστέλλεται η έκφρασή τους (64) σε σχέση με τα υποεκφραζόμενα των υγιών (26). Φαίνεται λοιπόν να αλλάζει η ισορροπία της γονιδιακής έκφρασης με τη παρουσία αλλεργικού άσθματος ύστερα από την μόλυνση με τον HRVA1B.



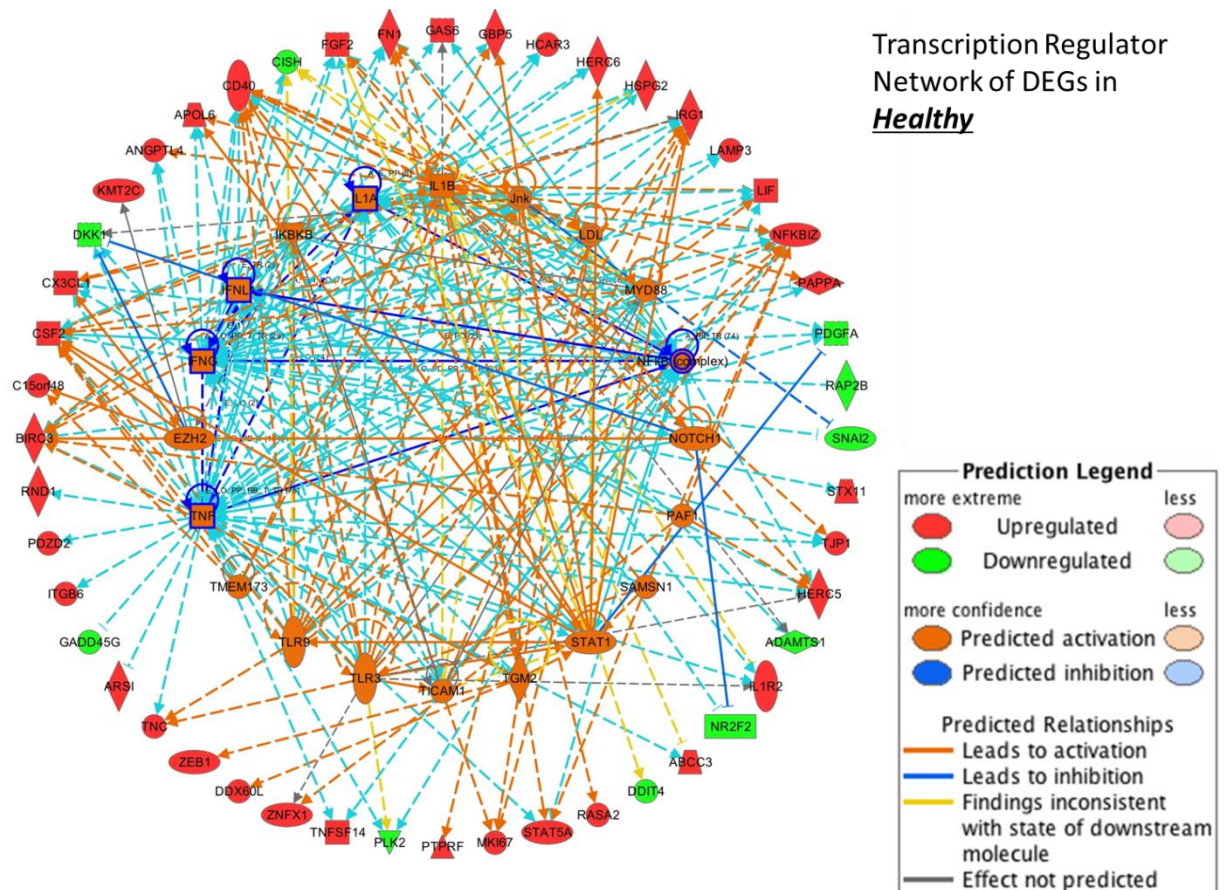
Εικόνα 1: Αριθμός υπέρ- και υπό – εκφραζόμενων γονιδίων σε σχέση με τη βασική έκφραση των ρινικών επιθηλιακών κυττάρων ύστερα από τη μόλυνση με τον HRVA1B (1MOI) (τουλάχιστον σε δύο δότες να είναι στατιστικώς σημαντική η έκφρασή τους).



Εικόνα 2: Ανάλυση βασικών βιολογικών διαδικασιών (GO analysis) και κυτταρικών μονοπατιών (Pathway analysis) που συμμετέχουν τα στατιστικώς σημαντικά - διαφορικώς εκφραζόμενων γονιδίων τόσο στους φυσιολογικούς όσο και στους ασθενής με αλλεργικό άσθμα.

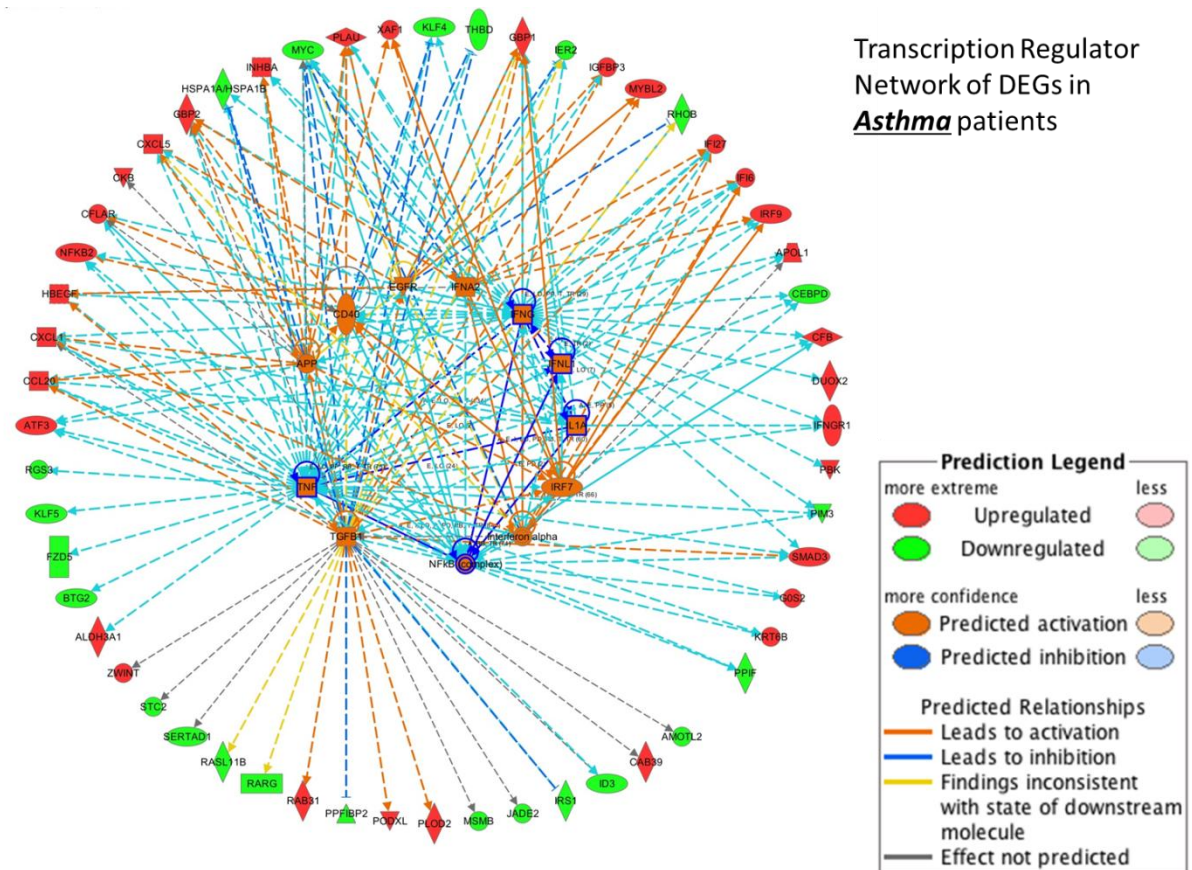
Οι βασικές βιολογικές διαδικασίες που συμμετέχουν τα διαφορικώς εκφραζόμενα γονίδια των υγιών ύστερα από τη λοίμωξη είναι η θετική ρύθμιση της ανάπτυξης, ενεργοποίηση του κυττάρου και την ενεργοποίηση της φωσφορλίωσης ενώ στους ασθματικούς φαίνεται να ενεργοποιούνται οι διαδικασίες που εμπλέκονται στα μονοπάτια του κυτταρικού θανάτου.

Έπειτα, χρησιμοποιώντας τα γονίδια των οποίων η έκφραση ήταν στατιστικώς σημαντική ύστερα από τη μόλυνση με τον ρινοϊό τόσο για τους φυσιολογικούς (Εικόνα 3) όσο και για τους αλλεργικούς ασθματικούς δότες (Εικόνα 4), δημιουργήσαμε τη μεταγραφική υπογραφή η οποία περιγράφει τα πρότυπα έκφρασης (εξωτερικός κύκλος) καθώς και τη μεταγραφική μηχανή (μεταγραφικούς ρυθμιστές – εσωτερικός κύκλος) με τελικό στόχο την ανίχνευση των διαφορών μεταξύ αλλεργικών και μη ατόμων.



Εικόνα 3. Μεταγραφικά πρότυπα υγιών ρινικών κυττάρων ύστερα από λοίμωξη με τον ρινοϊό HRAV1B. Ο εξωτερικός κύκλος περιλαμβάνει τα γονίδια που είναι αυξημένη η έκφρασή τους μετά τη μόλυνση (κόκκινο) και μειωμένη (πράσινο). Στον εσωτερικό κύκλο παρουσιάζονται οι μεταγραφικοί ρυθμιστές που ελέγχουν και εμπλέκονται στα μεταγραφικά μονοπάτια του εξωτερικού κύκλου.

Transcription Regulator
Network of DEGs in
Asthma patients



Εικόνα 4. Μεταγραφικά πρότυπα αλλεργικών ασθματικών ρινικών κυττάρων ύστερα από λοίμωξη με τον ρινοϊό HRAV1B. Ο εξωτερικός κύκλος περιλαμβάνει τα γονίδια που είναι αυξημένη η έκφρασή τους μετά τη μόλυνση (κόκκινο) και μειωμένη (πράσινο). Στον εσωτερικό κύκλο παρουσιάζονται οι μεταγραφικοί ρυθμιστές που ελέγχουν και εμπλέκονται στα μεταγραφικά μονοπάτια του εξωτερικού κύκλου.

Φαίνεται ότι ο κοινός κύριος μεταγραφικός παράγοντας και στις δύο περιπτώσεις είναι το σύμπλεγμα του NF-Kb. Οι ασθματικοί φαίνεται να παρουσιάζουν μικρότερη μεταγραφική δραστηριότητα στις έξι ώρες μετά η λοίμωξη που μπορεί να σημαίνει την ανεπάρκεια ενεργοποίησης κάποιων μεταγραφικών ρυθμιστών.

Τέλος, προκειμένου να χαρακτηριστούν περαιτέρω νέοι μεταγραφικοί παράγοντες που συνδέονται με την αλλεργία, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές βάσεις δεδομένων θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, JASPAR και TRANSFAC, βρέθηκαν οι μεταγραφικοί παράγοντες καθώς και οι ακριβείς θέσεις πρόσδεσής τους (στην περιοχή -950, +50 του εκάστοτε γονιδίου). Τέλος, έγινε ομαδοποίηση των γονιδίων σε αυτά που υπόκεινται σε έλεγχο κοινών μεταγραφικών παραγόντων και σε αυτά που ρυθμίζονται από 1-2 ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες (Πίνακας 1).

Upregulated Genes	TF
APOL1	IRF-1
BPGM	NF-kappaB
CFB	NF-kappaB
IFI27	STAT1
IRF9	STAT1
CFB	STAT1
BPGM	Gata1
IFNGR1	EGR2
IRF9	Stat5a::Stat5b
C1orf168	Stat5a::Stat5b
IFI27	Stat5a::Stat5b
C1orf168	FOXD3
CAB39	HSF1
CAB39	SRF
IRF9	SRF
RAB31	SRF
CAB39	RORA_2
IGFBP3	RORA_2
ZWINT	RORA_1
DUOXA1	CREB1
CFB	MZF1
DUOXA1	MZF1
IRF9	USF
RAB31	USF
IRF9	MYC::MAX
RAB31	MYC::MAX

DUOXA1	Nkx2-5
KRT6B	Nkx2-5
IRF9	Arnt
RAB31	Arnt
RAB31	Arnt
IRF9	Max
RAB31	Max
IGFBP3	TP53
ZWINT	TP53

Πίνακας 1. Μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τα γονίδια που εκφράζονται σημαντικά αποκλειστικά στους αλλεργικούς ασθματικούς δότες ύστερα από τη μόλυνση με τον HRVA1B και τα οποία εντοπίστηκαν και με τα δύο προγράμματα βιοπληροφορικής (JASPAR και TRANSFAC).

Συνοπτικά μπορούμε να πούμε ότι τα μεταγραφικά μονοπάτια που ακολουθούνται μετά την ιική μόλυνση μεταξύ φυσιολογικών και ατοπικών ατόμων όσον αφορά στην ανοσολογική απόκριση του επιθηλίου, είναι διαφορετικά. Είναι αναγκαία τόσο η περαιτέρω διερεύνηση και ταυτοποίηση αυτών σε μεγάλο αριθμό ασθενών και υγιών ατόμων όσο και η διερεύνηση των μεταγραφικών μηχανισμών που εμπλέκονται στη διαφοροποίησή τους με τη μελέτη της μεταγραφικής μηχανής του κάθε μονοπατιού.