**Extra academic skills 20/12/2021**

Κατσίκα Ευθυμία Βασιλίνα (370)

**Ανάλυση έκφρασης μακρών μη κωδικοποιών RNA προερχόμενων από εξωσώματα ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση**

**Περίληψη**

Η πολλαπλή σκλήρυνση είναι μια προοδευτική, αυτοάνοση, απομυελινωτική ασθένεια, με ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις. Η ακαθόριστη αιτιολογία της περιπλέκει τη διάγνωση και τις θεραπευτικές προσεγγίσεις που έχουν αναπτυχθεί. Πρόσφατα, η βιβλιογραφία έδειξε ότι τα μη κωδικοποιά RNA εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία πολλών αυτοάνοσων ασθενειών. Ειδικότερα, μακρά μη κωδικοποιά RNA φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της πολλαπλής σκλήρυνσης. Επιπλέον, τα εξωσώματα είναι κυστίδια προερχόμενα από κύτταρα που αντιπροσωπεύουν έναν καλά οργανωμένο τρόπο επικοινωνίας μεταξύ κυττάρων και σήμερα μελετώνται εκτενώς. Το εξωσωμικό φορτίο αποτελείται από νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια και πρόσφατα προτάθηκε η συσχέτισή του με την πολλαπλή σκλήρυνση. Η παρούσα διατριβή έχει ως στόχο τον εντοπισμό συγκεκριμένων μακρών μη κωδικοποιών RNA, που μεταφέρονται από εξωσώματα τα οποία βρίσκονται στο πλάσμα ασθενών με πολλαπλή σκλήρυνση.

Σε συνεργασία με το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης, συλλέχθηκαν δείγματα ολικού αίματος από ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση και από υγιή άτομα. Η βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων για την απομόνωση των εξωσωμάτων από το πλάσμα και στη συνέχεια του RNA, κρίθηκε απαραίτητη. Γνωρίζοντας πως τα εξωσώματα περιέχουν πολύ μικρές συγκεντρώσεις νουλεϊκών οξέων χρησιμοποιήθηκε γλυκογόνο για να αυξηθεί η απόδοση της απομόνωσης του RNA. Τα αποτελέσματα μετρήθηκαν με Nanodrop και βρέθηκαν ικανοποιητικά για να συνεχιστεί η πειραματική διαδικασία. Παρόλα αυτά, επειδή δεν υπήρχαν άμεσα διαθέσιμα αντιδραστήρια, η πιο ευαίσθητη μέθοδος μέτρησης με Qubit δεν χρησιμοποιήθηκε. Τέλος, με βάση προηγούμενη γνώση, τις μετρήσεις από το Nanodrop και προσπάθειες βελτιστοποίησης, διεξήχθησαν PCRs πραγματικού χρόνου (qPCRs) για την ανάλυση έκφρασης των μακρών μη κωδικοποιών RNA *GAS5* και *NORAD*.

Από την ανάλυση των δεδομένων από τις qPCRs προέκυψαν ενδιαφέρουσες διαφορές στα προφίλ έκφρασης των δύο RNA, όμως ταυτόχρονα φάνηκε πως υπήρχε μια αναντιστοιχία μεταξύ των τιμών Ct που παρατηρήθηκαν και των αναμενόμενων με βάση τις ποσότητες RNA που είχαν φορτωθεί. Για την εξακρίβωση της εγκυρότητας της μέτρησης των συγκεντρώσεων του RNA, πραγματοποιήθηκαν, στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, επιπλέον μετρήσεις συγκέντρωσης κάποιων αρχικών δειγμάτων με τα αντιδραστήρια του Qubit. Οι μετρήσεις αυτές έκαναν φανερή την αναξιοπιστία των μετρήσεων με Nanodrop σε μικρές αρχικές συγκεντρώσεις RNA, καθώς δεν ανίχνευαν ποσότητα RNA μέσα στα δείγματα. Επομένως, τα αποτελέσματα από τις qPCRs δεν μπορούν να ερμηνευτούν, καθώς δεν βασίζονται στις πραγματικές μετρήσεις.

Τα αποτελέσματα αυτά επισημαίνουν ότι το γλυκογόνο δεν μπορεί να αυξήσει σημαντικά την συγκέντρωση του RNA, όταν η αρχική του συγκέντρωση είναι πολύ μικρή. Επιπρόσθετα, επηρεάζει τη μέτρηση με το Nanodrop και την αλλοιώνει, ενώ δεν φαίνεται να αλληλοεπιδρά με τα αντιδραστήρια του Qubit. Συνεπώς είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν ξανά οι πειραματικές διαδικασίες με μεγαλύτερες αρχικές ποσότητες δειγμάτων, ώστε η τελική συγκέντρωση RNA να είναι επαρκής.