

Μελέτη της έκφρασης miRNAs και γενετικών παραλλαγών σε γυναίκες με καθ' ἑξιν αποβολές και επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης μετά από IVF.

Υποψήφια διδάκτωρ : Κουβουτσάκη Κωνσταντίνα

Μέλη τριμελούς επιτροπής : Ντόμαλη Αικατερίνη

Ροδολάκης Αλέξανδρος

Δρακάκης Πέτρος

Ως καθ' ἑξιν αποβολές ορίζονται η απώλεια τριών ή περισσότερων διαδοχικών κυήσεων. Οι καθ' ἑξιν αποβολές επηρεάζουν περίπου το 1% των ζευγαριών, ενώ έχει υπολογιστεί ότι 1-2% των κυήσεων 2ου τριμήνου καταλήγουν σε αποβολή πριν τις 24 εβδομάδες. Ως επαναλαμβανόμενη αποτυχία εμφύτευσης ορίζεται η αποτυχία επίτευξης εγκυμοσύνης (8 εβδομάδων έμβρυο με θετικούς καρδιακούς παλμούς) μετά από τη μεταφορά τουλάχιστον τεσσάρων καλής ποιότητας εμβρύων (είτε φρέσκων, είτε κατεψυγμένων) σε ένα σύνολο όχι μικρότερο των τριών κύκλων υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η διαδικασία της εμφύτευσης και η δημιουργία του πλακούντα είναι απαραίτητα στάδια για την επιτυχή έκβαση της κύησης. Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη διερεύνηση των καθ' ἑξιν αποβολών και των επαναλαμβανόμενων αποτυχιών στην εμφύτευση του εμβρύου παρουσιάζει το γενετικό προφίλ των γυναικών. Η έρευνα έχει στραφεί και στα microRNAs. Τα microRNAs (miRNAs) είναι μονόκλιωνα μόρια RNA, μήκους 19-22 νουκλεοτιδίων, που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση, αλληλεπιδρώντας με ειδικές θέσεις της 3' αμετάφραστης περιοχής (3' UTR) του mRNA συγκεκριμένων γονιδίων, προκαλώντας αναστολή της μετάφρασης, ενώ δρουν και ως ρυθμιστικά σηματοδοτικά μόρια καθορίζοντας τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των βλαστικών κυττάρων ενήλικης ή εμβρυϊκής προέλευσης. Διαταραχές των miRNAs κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη επηρεάζουν την κυτταρική διαφοροποίηση καθώς και την διαδικασία της εμφύτευσης, ενώ διαφορετική έκφραση των miRNAs έχει παρατηρηθεί σε τροφοβλαστικά κύτταρα πρώτου και τελευταίου τριμήνου υποδεικνύοντας την εμπλοκή των miRNAs σε διαφορετικές δράσεις των τροφοβλαστικών κυττάρων. Μελετώντας την έκφραση των miRNAs σε κατεψυγμένα έμβρυα μετά την εμβρυομεταφορά παρατηρήθηκε αυξορρύθμιση σε 29 miRNAs σε επιτυχή εμφύτευση, ενώ μειορρύθμιση στα miR-891a, miR-522 και miR-198 σημειώθηκε σε περιπτώσεις αποτυχίας εμφύτευσης. Βασικό κομμάτι για την κατανόηση του ρόλου τους στη διαδικασία της εμφύτευσης και τη συμμετοχή τους στην επικοινωνία βλαστοκύστης – ενδομητρίου αποτελεί η μελέτη της συμμετοχής μιας πληθώρας miRNAs (panels) στην υποδεκτικότητα και τη φθαρτοποίηση του ενδομητρίου. Διαφορές στην έκφραση των miRNAs έχουν παρατηρηθεί σε διαφορετικά στάδια ζωής του ενδομητρίου (εκκριτική φάση, παράθυρο εμφύτευσης) σε γόνιμες γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Παράδειγμα αποτελεί η οικογένεια miR-30 της οποίας τα μέλη εμφανίζονται στο ενδομήτριο γόνιμων γυναικών με φυσιολογικό κύκλο με τα miR-30b και miR-30d να υπερεκφράζονται στα επιθύλια του υποδεκτικού ενδομητρίου. Συγκρίνοντας το ενδομήτριο γόνιμων γυναικών με γυναίκες που αντιμετώπισαν επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης παρατηρήθηκε αυξορρύθμιση των miR-141, miR-23b και miR-99a στις δεύτερες σε σχέση με τις πρώτες. Βιβλιογραφικά η έκφραση ή μη γενετικών παραλλαγών σε γονίδια που κωδικοποιούν mRNAs ενέχει ένα πολύ ενεργό ρόλο στον τρόπο δράσης του ενδομητρίου τόσο σε προϋποδεκτικό στάδιο όσο και κατά το παράθυρο εμφύτευσης αλλά και την διεύθυνση της τροφοβλάστης και επομένως την επιτυχή εμφύτευση του εμβρύου.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της έκφρασης miRNAs και γενετικών παραλλαγών σε γυναίκες με καθ' ἑξιν αποβολές και επαναλαμβανόμενες αποτυχίες εμφύτευσης μετά από συμμετοχή σε πρωτόκολλα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όπως η εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF). Απώτερος στόχος είναι ο προσδιορισμός της συμμετοχής τους στο παράθυρο εμφύτευσης, την ενεργοποίηση ή αναστολή διαδικασιών απαραίτητων για διαδικασίες όπως η υποδεκτικότητα και η φθαρτοποίηση του ενδομητρίου αλλά και στην ευρύτερη προεμφυτευτική επικοινωνία βλαστοκύστης – ενδομητρίου. Τα ανωτέρω θα συμβάλουν στην ορθότερη κατανόηση των μηχανισμών αποδοχής και απόρριψης του εμβρύου από το ενδομήτριο.

Μέθοδος : Θα γίνει λήψη περιφερικού αίματος ή/και κοκκωδών κυττάρων από γυναίκες με ιστορικό καθ' ἑξιν αποβολών και επαναλαμβανόμενων αποτυχιών εμφύτευσης. Ποσοτικός προσδιορισμός των miRNAs με την πραγματοποίηση PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR) με την τεχνική της SYBR GREEN ή με τη χρήση probes, με τη χρήση του γονιδίου G6PD ή/και του γονιδίου GAPDH ως γονίδιο αναφοράς. Τέλος, θα ακολουθήσει η μέθοδος αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS, Next Generation Sequencing) όπου μέσω ειδικά διαμορφωμένων panels θα ελεγχθεί ένα εύρος miRNAs και γενετικών παραλλαγών ώστε να μελετηθεί η συμμετοχή τους στη διαδικασία της εμφύτευσης.

Study of miRNAs expression and genetic variants in women with recurrent miscarriages and repeated implantation failures after IVF.

PhD candidate : Kouvoutsaki Konstantina

Members of the PhD Committee : Domali Ekaterini (Supervisor)

Rodolakis Alexandros

Drakakis Petros

Three or more miscarriages in a row is called a recurrent miscarriage. This affects the 1% of couples and it is known that the 1-2% of pregnancies involuntarily end before 24 weeks. Repeated implantation failure (RIF) refers to failure to achieve a clinical pregnancy (8 weeks embryo with heart beat) after transfer of at least four good-quality embryos in a minimum of three fresh or frozen cycles. Implantation procedure and the development of the placenta are essential stages for a successful pregnancy. The genetic profile of women suffering from recurrent miscarriages and repeated implantation failure is of great research interest. Attention has turned to miRNA. A microRNA (abbreviated miRNA) is a small single-stranded non-coding RNA molecule, containing about 19 - 22 nucleotides, that functions in post-transcriptional regulation of gene expression. Interacting with regulatory regions in the three prime untranslated region (3' - UTR) they can block translation and regulate properties of human blastocysts (adult and embryos). MiRNAs disorders during the early metal development affects cell differentiation process and the implantation procedure. Also differences in the expression of miRNAs have been observed in first and last term trophoblasts, which initiate miRNAs involvement in their development. Absence of miR-891a, miR-522 and miR-198 was observed in frozen embryos whose transfer led to implantation failure. The understanding of miRNAs role in the communication between blastocyst and endometrium and the implantation procedure can be achieved through the study of their participation in the receptivity and decidualization of the endometrium. Differences in the expression of miRNAs have been observed in different development stages of the endometrium (luteal phase, implantation window) in reproductive age women. Members of miR-30 family appear in reproductive women's endometrium with regular menstrual cycles, specifically miR-30b and miR-30d are overexpressed in receptive endometrial epithelial cells. Overexpression of miR-141, miR-23b and miR-99a has been observed in the endometrium of women suffering from multiple implantation failure. As we can study from the bibliography the expression or its absence of genetic variants in genes encoding miRNAs, plays an important role in the way endometrium functions in both preimplantation stage and implantation window and the trophoblast penetration, leading to a success implantation of the embryo.

The **purpose** of this thesis is the study of miRNAs expression and genetic variants in women with recurrent miscarriages and repeated implantation failures after IVF. The objective is to identify their participation in the implantation window, the activation or suspension they cause in procedures like the receptivity and the decidualization of the endometrium but also in the preimplantation communication between blastocyst and endometrium in general. Results may contribute in a better understanding of the mechanism of the acceptance or rejection of the embryo.

Methods : Peripheral blood or/and granulose cells will be collected from women suffering from recurrent miscarriages and repeated implantation failure. Quantitive real - time PCR (SYBER GREEN and/or probes) will be used for quantifying miRNAs. G6PD and/or GAPDH will be used as reference genes (control). Next generation sequencing (NGS) will be used for the study of a panel of miRNAs and genetic variants whose may or may not participate in implantation procedure.