



Δράση «Εμβληματικές δράσεις σε διαθεματικές επιστημονικές περιοχές με ειδικό ενδιαφέρον για την σύνδεση με τον παραγωγικό ιστό» ID 16618

Εθνικό δίκτυο έρευνας για την ανάδειξη της γενετικής βάσης των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson, την ανίχνευση αξιόπιστων βιοδεικτών και την ανάπτυξη καινοτόμων υπολογιστικών τεχνολογιών και θεραπευτικών στρατηγικών στη βάση της ιατρικής ακριβείας (BRAIN PRECISION, TAEDR-0535850)

ΤΙΤΛΟΣ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ: Άνοιξες: Γενετική Ανάλυση.

Β. Γενετική ανάλυση Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας, Αττικό Νοσοκομείο, ΕΚΠΑ

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 3: Βιοχημικός και μοριακός χαρακτηρισμός του βιολογικού υλικού με στόχο την ανάδειξη της γενετικής βάσης των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΕΛΙΣΣΑΒΕΤ ΚΑΠΑΚΗ (ΕΚΠΑ)

Άνοιες: Γενετική Ανάλυση.

Β. Γενετική ανάλυση Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας, Αττικό Νοσοκομείο, ΕΚΠΑ

ΕΕ3. Βιοχημικός και μοριακός χαρακτηρισμός του βιολογικού υλικού με στόχο την ανάδειξη της γενετικής βάσης των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ : Άνοιες: Γενετική Ανάλυση.

Β. Γενετική ανάλυση στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας, Αττικό Νοσοκομείο, ΕΚΠΑ

Γενετική ανάλυση (*PGRN*, *MAPT*, *TARDBP* γονίδια και τροποποιητικοί πολυμορφισμοί σε *APOE4* AD ασθενείς)

Στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του Αττικού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου αναπτύχθηκαν μεθοδολογίες DNA Sequencing/MLPA για την ανίχνευση DNA σημειακών πολυμορφισμών/μεταλλάξεων και μεγάλων εξονικών αναδιατάξεων στα γονίδια *PGRN* (προγρανουλίνη), *TARDBP* και *MAPT* ώστε στη περίπτωση εύρεσης παθολογικών ευρημάτων να υποβοηθείται η διαφοροδιάγνωση μεταξύ AD και FTD ανοϊκών ασθενών.

Στο σύνολο τριών κοορτών στις οποίες συμμετείχε ενεργά το εργαστήριο με Έλληνες FTD επιβεβαιωμένους ασθενείς (n=211 συνολικά), ανιχνεύθηκαν 10 ασθενείς με παθολογικές *PGRN* μεταλλάξεις, 3 ασθενείς με την ίδια *TARDBP* μετάλλαξη (p.I383V) και μία *MAPT* μετάλλαξη (επίσης αλλαχού 14 *CSORF* επεκτάσεις, με NGS μεθοδολογία 1 *PRNP*, 1 *pC2/SQSTM1* και 4 *VCP* μετάλλαξη). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα οι μεταλλάξεις προγρανουλίνης ανευρίσκονται στο 4,7% των Ελλήνων FTD ασθενών και αποτελούν περίπου το ένα τρίτο των παθολογικών μεταλλάξεων σε διεισδυτικά FTD γονίδια (29,4%).

Οι 10 ασθενείς φορείς παθολογικών *PGRN* μεταλλάξεων ασθενείς κατανέμονταν οι μισοί ως bvFTD και οι άλλοι μισοί είτε ως nfvPPA είτε ως svPPA και οι μεταλλάξεις τους εντοπίζονται κυρίως σε περιοχές ματίσματος ως εξής: c.349+1G>C, c.350-2A>G (σε 2 ασθενείς), c.463-2A>G, c.934-1G>A, c.264delG, c.264+1G>A, c.264 del (p.ala89profs*167) (σε 2 ασθενείς), p.Gln401LeufsTer69.

Καθώς το ποσοστό παθολογικών *MAPT* μεταλλάξεων ήταν απροσδόκητα χαμηλό, σε 20 από τα ανωτέρω FTD DNA δείγματα διερευνήθηκε πιλοτικά ο συνδυασμός αθών (benign) ιντρονικών παραλλαγών στο γονίδιο αυτό αναφορικά με εκφάνσεις της FTD νόσου. Ανιχνεύθηκε ο H1 *MAPT* απλότυπος στο 50% των FTD Ελλήνων ασθενών ο οποίος συσχετίζεται με αυξημένη έκφραση της 4R *MAPT* ισομορφής, η οποία δεσμεύεται πιο ισχυρά στους μικροσωληνίσκους (σε φυσιολογικό πληθυσμό εντοπίζεται στο 15%). Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει εμφανισθεί αμφιλεγόμενη συσχέτιση με PSP νόσο ωστόσο το εύρημα αυτό δεν επιβεβαιώθηκε στον υπό εξέταση μικρό πληθυσμό. Επίσης στο γονίδιο *TARDBP*, στους ανωτέρω 20 ασθενείς εντοπίστηκε σε έναν, η παραλλαγή p.Val195Glu, η οποία διερευνήθηκε με εργαλεία βιοπληροφορικής και θεωρήθηκε καλοήθης.

Επίσης, στο Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας του Αττικού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου διερευνήθηκαν δύο σημειακοί πολυμορφισμοί οι οποίοι πιθανόν τροποποιούν τον κίνδυνο ή την πρόοδο της νόσου σε 80 *APOE4* ανοϊκούς ασθενείς: στο γονίδιο της φιμπρονεκτίνης *FN1* NG_012196.1:g.16777G>A, p.Gly357Glu και στο γονίδιο *KLOTHO* NG_011485.2:g.42760T>G, p.Phe352Val. Η πλειοψηφία των ασθενών κατατάσσονταν ως AD/AD μικτή άνοια (n=58), οι υπόλοιποι ως FTD. Το ποσοστό γυναικών ήταν 58% και η μέση ηλικία του συνόλου των ασθενών ήταν 70 έτη (διάμεση τιμή 71, SD ±8 έτη). 63 ασθενείς (79%) ήταν *APOE3/4* ετεροζυγώτες και 17 (21%) ήταν *APOE4/4* ομοζυγώτες.

Οι μέθοδοι αναπτύχθηκαν με real-time PCR μέθοδο και simple probe (Roche) στην πλατφόρμα LightCycler480 και εφαρμόστηκαν σε 80 ασθενείς που έφεραν είτε ένα είτε δύο *APOE4* αλληλία ενώ ταυτόχρονα το εργαστήριο είχε αναλύσει τους βιοδείκτες τους στο ENY (ab42, tau, p-tau181) με ELISA μέθοδο (Innotest, Fujirebio).

Δεν ανιχνεύθηκε ο *FN1* πολυμορφισμός ενώ η παραλλαγή *KLOTHO* G ανιχνεύθηκε σε 14 (22%) από τους 63 *APOE3/4* ετεροζυγώτες και σε 5 (29%) από τους 17 *APOE4/4* ομοζυγώτες (Hardy-Weinberg $p > 0,05$).

Η ηλικία εμφάνισης της νόσου και οι τιμές p-tau δεν διέφεραν ενώ οι τιμές των βιοδεικτών αμυλοειδούς ab42 και tau ήταν λίγο χειρότεροι στους φορείς *KLOTHO* (Hetero στον Πίνακα 1) σε σχέση με τους wild-type υπολοίπους (Other): μέσος όρος \pm SE ήταν 440 ± 36 vs 542 ± 28 pg/ml για αμυλοειδές ab42 και 575 ± 154 vs. 449 ± 39

pg/ml για tau (μικρή στατιστική σημαντικότητα (t-test $p = 0,023$ για tau, πιθανώς λόγω του μικρού πληθυσμού που εξετάστηκε).

Group Statistics

	HETERO	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Age	OTHER	64	69,34	7,935	,992
	HETERO	16	70,50	7,616	1,904
Ab42	OTHER	64	542,47	224,892	28,112
	HETERO	16	439,50	145,951	36,488
tau	OTHER	64	448,53	312,058	39,007
	HETERO	16	575,19	617,715	154,429
p-tau	OTHER	64	74,16	45,037	5,630
	HETERO	16	74,06	54,589	13,647

Πίνακας 1. Επίδραση *KLOTHO* πολυμορφισμού σε βιοδείκτες στο σύνολο των *APOE4* ανοϊκών ασθενών ($n=80$).

Η τάση για αυξημένα επίπεδα tau ισχύει και στις υποομάδες των *APOE3/4* ετεροζυγωτών και *APOE4/4* ομοζυγωτών.

Επικεντρώνοντας μόνο στους ασθενείς με AD νόσο είτε με μικτή AD νόσο, παρατηρούνται εκ νέου οι ίδιες τάσεις είτε στο σύνολο τους (t-test tau, $p = 0,015$, πίνακας 2) είτε στις υποομάδες *APOE3/4* ετεροζυγωτών και *APOE4/4* ομοζυγωτών.

Group Statistics

	HETERO	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Age	OTHER	46	69,76	7,863	1,159
	HETERO	12	71,17	8,089	2,335
Ab42	OTHER	46	524,78	200,314	29,535
	HETERO	12	437,58	140,338	40,512
tau	OTHER	46	501,35	295,801	43,613
	HETERO	12	665,92	681,490	196,729
p-tau	OTHER	46	85,76	47,155	6,953
	HETERO	12	89,58	53,430	15,424

Πίνακας 2. Επίδραση *KLOTHO* πολυμορφισμού σε βιοδείκτες στο υποσύνολο των *APOE4* AD ασθενών ($n=58$).

Στη διεθνή βιβλιογραφία παρατηρούνται αμφιλεγόμενα αποτελέσματα κυρίως για το βιοδείκτη του αμυλοειδούς ab42 του οποίου όμως η μέτρηση παρουσιάζει τη μεγαλύτερη μεταβλητότητα πιθανώς λόγω προαναλυτικών προβλημάτων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (στα yellow-highlighted abstracts γίνεται αναφορά στο πρόγραμμα BRAIN Precision TAEDR- 0535850 funding, επίσης στις yellow-highlighted διατριβές επιπρόσθετα γίνεται προσθήκη του logo Ελλάδα 2.0)

Abstracts σε διεθνή συνέδρια και σε Proceedings (2023-2025):

Milona A., A. Pouloupoulou, C. Koros, C. Florou-Hatziyiannidou, V. Papastefanopoulou, R. Antonellou, E. Angelopoulou, J.D. Papatriantafyllou, L. Stefanis, S.G. Papageorgiou and **C. Kroupis** (2024) "Detection of *MAPT* polymorphisms and H1 haplotype in frontotemporal dementia (FTD) Greek patients" (26th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine-WorldLab IFCC, May 26-30, Dubai) *Clin. Chim. Acta* 558, S118676

Tsingka C., Milona A., A. Pouloupoulou, C. Koros, R. Antonellou, E. Angelopoulou, K. Makris, J.D. Papatriantafyllou, L. Stefanis, S.G. Papageorgiou and **C. Kroupis** (2025) "Molecular studies of *TARDBP* gene mutations in Frontotemporal Dementia (FTD) Greek patients" (26th European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine-EuroMedlab, May 18-22, Brussels) *Clin. Chem. Lab Med* 63, S1339

Anagnostou A., A. Athanasaki, V. Tsamadias, C. Koros, I. Tsantzali, I. Papatriantafyllou, L. Stefanis, S. Papageorgiou, G. Paraskevas and **C. Kroupis** "Investigation of the effect of modifying polymorphisms to clinical and biochemical characteristics of *APOE4* dementia patients" (IFCC Satellite Meeting -23rd National Congress of Clinical Chemistry, "Emerging technologies in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine" Thessaloniki, 30 Oct-2 Nov., 2025)

Διατριβές ειδίκευσης:

- 1) **Τσίγκα Χρυσάνθη:** «Μοριακή μελέτη *TARDBP* γονιδίου σε ασθενείς με άνοια» Διατμηματικό Μεταπτυχιακό στη Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική, Πανεπιστήμιο Αθηνών Μάιος 2025
- 2) **Αναγνώστου Αντώνιος:** «Μελέτη τροποποιητικών πολυμορφισμών σε ομοζυγώτες *APOE4/E4* στη νόσο Alzheimer» Διατμηματικό Μεταπτυχιακό στη Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική, Πανεπιστήμιο Αθηνών Φεβρουάριος 2026 (υπολείπεται η παρουσίαση)
- 3) **Μυλωνά Αριστέα:** «Ανίχνευση απλοτύπου H1 στο *MAPT* γονίδιο και επαλήθευση μεθόδου μέτρησης βιοδεικτών σε βιολογικά υγρά ασθενών με άνοιες» Διατμηματικό Μεταπτυχιακό στη Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Απρίλιος 2024
- 4) **Πουλοπούλου Αντιγόνη:** «Ανίχνευση μεταλλάξεων γονιδίου προγρανουλίνης (*PGRN*) στη μετωποκρατική άνοια (frontotemporal dementia)» Διατμηματικό Μεταπτυχιακό στη Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Απρίλιος 2023

Related Publications:

- 1) Ramos E.M., C. Koros, D.R. Dokuru, V. van Berlo, **C. Kroupis**, K. Wojta, Q. Wang, N. Andronas, S. Matsi, I.N. Beratis, A.Y. Huang, S.E. Lee, A. Bonakis, C. Florou-Hatziyiannidou, S. Fragkiadaki, D. Kontaxopoulou, D. Agiomyrgiannakis, V. Kamtsadeli, N. Tsinia, V. Papastefanopoulou, M. Stamelou, B. L. Miller, L. Stefanis, J.D. Papatriantafyllou, S.G. Papageorgiou and G. Coppola (2019) "Frontotemporal dementia spectrum: first genetic screen in a Greek cohort" *Neurobiology of Aging* 75, 224.e1-224.e8
- 2) Bourbouli M., G.P. Paraskevas, M. Rentzos, L. Mathioudakis, V. Zouvelou, A. Bougea, A. Tychalas, V.K. Kimiskidis, V. Constantinides, S. Zafeiris, M. Tzagournissakis, G. Papadimas, G. Karadima, G. Koutsis, **C. Kroupis**, C. Kartanou, E. Kapaki and I. Zaganas (2021) "Genotyping and Plasma/Cerebrospinal Fluid Profiling of a Cohort of Frontotemporal Dementia-Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients" *Brain Sci.* 11 (9), 1239
- 3) Koumasopoulos E., E. Stanitsa, E. Angeopoulou, C. Koros, V. Barbarousi, G. Velonakis, C. Michaletou, S.K Alevetsovitis, V.C. Constantinides, A. Kyrozis, L. Stefanis, **C. Kroupis** and S.G. Papageorgiou (2025) "Heterozygous *pC2/SQSTM1* mutation and right temporal variant of frontotemporal dementia:



- 4) A case report” *Neurocase* 31(2):70-73
Koumasopoulos E., E. Stanitsa, E. Angeopoulou, C. Koros, V. Barbarousi, G. Velonakis, A. Koulouris, C. Michaletou, S.K Alevetsovitis, V.C. Constantinides, A. Kyrozis, L. Stefanis, C. Kroupis and S.G. Papageorgiou (2025) “Predominant right temporal and frontal brain atrophy and progressive behavioral dementia. A case of prion gene mutation (*PRNP*)” *Neurocase* 31(4):149-154.

