



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: Νόσος Πάρκινσον: Βιοχημική Ανάλυση καινούργιων βιοδεικτών/ Ανάλυση συσσωματωμένων μορφών α-συνουκλείνης σε ερυθροκύτταρα

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 4: Ανάπτυξη κυτταρικών και ζωικών μοντέλων, καθώς και νέων βιοδεικτών για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες Alzheimer και Parkinson.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛΙΔΟΥ (ΕΚΠΑ)

Νόσος Πάρκινσον: Βιοχημική Ανάλυση καινούργιων βιοδεικτών / Ανάλυση συσσωματωμένων μορφών α-συνουκλεΐνης σε ερυθροκύτταρα

Ομάδα Εμμανουηλίδου, Τελική έκθεση Φυσικού Αντικειμένου Brain Precision

Ενότητα Εργασίας 4: Ανάπτυξη κυτταρικών και ζωικών μοντέλων, καθώς και νέων βιοδεικτών για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες Alzheimer και Parkinson.

Τίτλος Παραδοτέου: Νόσος Πάρκινσον: Βιοχημική Ανάλυση καινούργιων βιοδεικτών

A. Ανάλυση συσσωματωμένων μορφών α-συνουκλεΐνης σε ερυθροκύτταρα

ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ / ΕΙΣΑΓΩΓΗ (γενικά για το 4.2.)

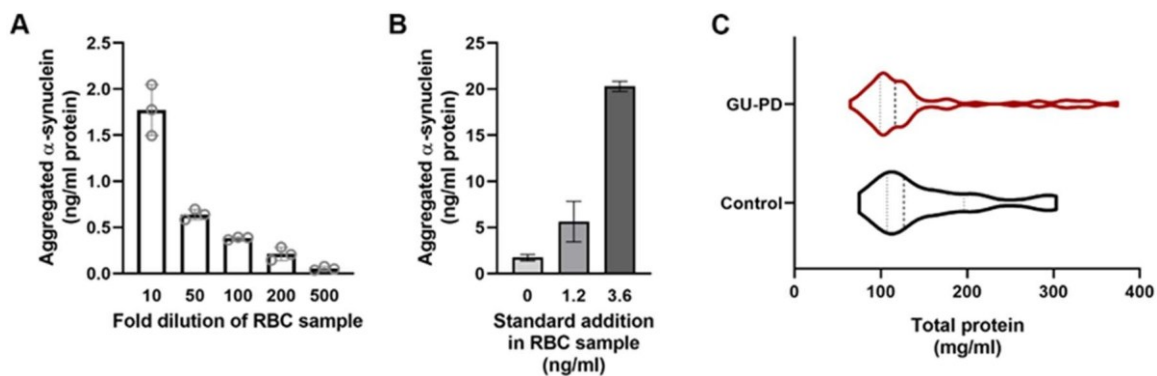
Βιοχημικός χαρακτηρισμός των δειγμάτων βιολογικού υλικού που έχουν συλλεγεί από ασθενείς με ΝΠ-DLB και πρόδρομες μορφές αυτών από τους κλινικούς φορείς του Έργου, ενώ παράλληλα θα ελεγχθούν και δείγματα από άτομα ελέγχου. Θα δοθεί έμφαση στην ανάλυση των επιπέδων mRNA της PRKN σε PBMCs καθώς και σε ολικό αίμα, κάτι που πρόσφατα η ερευνητική μας ομάδα έχει αναδείξει ως έναν πιθανό εύρηστο βιοδείκτη σε ασθενείς με ΝΠ που φέρουν μεταλλάξεις στο αντίστοιχο γονίδιο. Επίσης θα αναλυθούν στο ENY, καθώς και σε διάφορα άλλα βιολογικά υλικά, τα επίπεδα διαφόρων μορφών της α-συνουκλεΐνης, συμπεριλαμβανομένων συσσωματωμένων μορφών της, μέσω Seeding Aggregation Assays (SAAs) σε shaking microplate reader (Εργαστήριο Νευροβιολογίας, ΑΝευρολογική Κλινική), καθώς και με δοκιμασίες ELISA που έχουν αναπτυχθεί στο εργαστήριο της Ε. Εμμανουηλίδου. Τα ευρήματα θα συσχετιστούν με τις γενετικές αναλύσεις που θα γίνουν στα πλαίσια του Άξονα 2, ενώ στις περιπτώσεις λήψης ENY θα συσχετιστούν και με τους κλασσικούς δείκτες νευροεκφύλισης (Εργαστήριο Νευροχημείας και Βιολογικών Δεικτών, Α Νευρολογική Κλινική). Το παραδοτέο στοχεύει στην ανάδειξη νέων βιοδεικτών που θα μπορέσουν να διακρίνουν τα πάσχοντα άτομα με ΝΠ από τα μη πάσχοντα, με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση, αλλά και να κατηγοριοποιήσουν τους ασθενείς ανάλογα με το μοριακό/βιοχημικό τους προφίλ με σκοπό την εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΕ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στα πλαίσια του συγκεκριμένου παραδοτέου εξετάστηκε κατά πόσο τα επίπεδα των συσσωματωμένων μορφών (ινιδιακές ή ολιγομερείς) της α- συνουκλεΐνης στα ερυθροκύτταρα (red blood cells, RBCs) μπορούν να αποτελέσουν νέο βιοδείκτη για τη ΝΠ. Για το σκοπό αυτό, σε συνεργασία με την ομάδα του Λ. Στεφανή, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα RBCs που είχαν συλλεχθεί από ασθενείς με ιδιοπαθή ΝΠ (genetically undetermined group, GU-PD, n=56), ασθενείς με κληρονομούμενη ΝΠ που φέρουν την μετάλλαξη A53T στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης (A53T-PD, n=28) και ασθενείς με ΝΠ που φέρουν μία από τις μεταλλάξεις D409H, H255Q, L444P και N370S στο γονίδιο GBA (GBA- PD, n=24). Τα επίπεδα της συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης μετρήθηκαν σε ομογενοποιημένα ερυθροκύτταρα μέσω ειδικής ELISA που έχει αναπτυχθεί από την ομάδα της κ. Εμμανουηλίδου [1] και συγκρίθηκαν με άτομα ελέγχου με παρόμοια ηλικία και φύλο (n=35). Παράλληλα, μετρήθηκε με ELISA η συσσωματωμένη μορφή σε δείγματα πλάσματος από ασθενείς με ατροφία πολλαπλών συστημάτων (MSA, n=9), Προοδευτική Υπερπυρηνική Παράλυση (PSP, n=8) και φλοιοβασική εκφύλιση (CBS, n=7).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δείγματα μετρήθηκαν μετά από έλεγχο της μεθόδου ως προς την ειδικότητα του σήματος και την παρεμπόδιση υποβάθρου στο υλικό των RBCs. Η ειδικότητα της ELISA σε δείγματα ερυθρών αιμοσφαιρίων επιβεβαιώθηκε με μέτρηση πέντε σειριακών αραιώσεων (10, 50, 100, 200 και 500 φορές) ενός δείγματος από ένα άτομο από την ομάδα ελέγχου. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι το σήμα για τη συσσωματωμένη α-συνουκλεΐνη ήταν αντιστρόφως ανάλογο με την αραιώση. Η αραιώση 50 φορές επιλέχθηκε τελικά λόγω υψηλότερης αναλογίας σήματος προς θόρυβο σε σύγκριση με τις άλλες αραιώσεις. Δεδομένου ότι τα RBCs αποτελούν ένα περίπλοκο βιολογικό δείγμα, εξετάστηκε η παρεμβολή του υποβάθρου σε ένα 50 φορές αραιωμένο δείγμα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της γνωστής προσθήκης. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης αξιολογήθηκε πριν και μετά την προσθήκη 1,2 και 3,6 ng/ml προσχηματισμένων ινιδίων α-συνουκλεΐνης (Preformed fibrils, PFFs). Η συγκέντρωση της συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης που μετρήθηκε από το 50 φορές αραιωμένο δείγμα δε διέφερε από εκείνη που εκτιμήθηκε μέσω της μεθόδου γνωστής προσθήκης, υποδεικνύοντας ότι το εγγενές υπόβαθρο των 50 φορές αραιωμένων ερυθροκυττάρων δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα της ELISA.

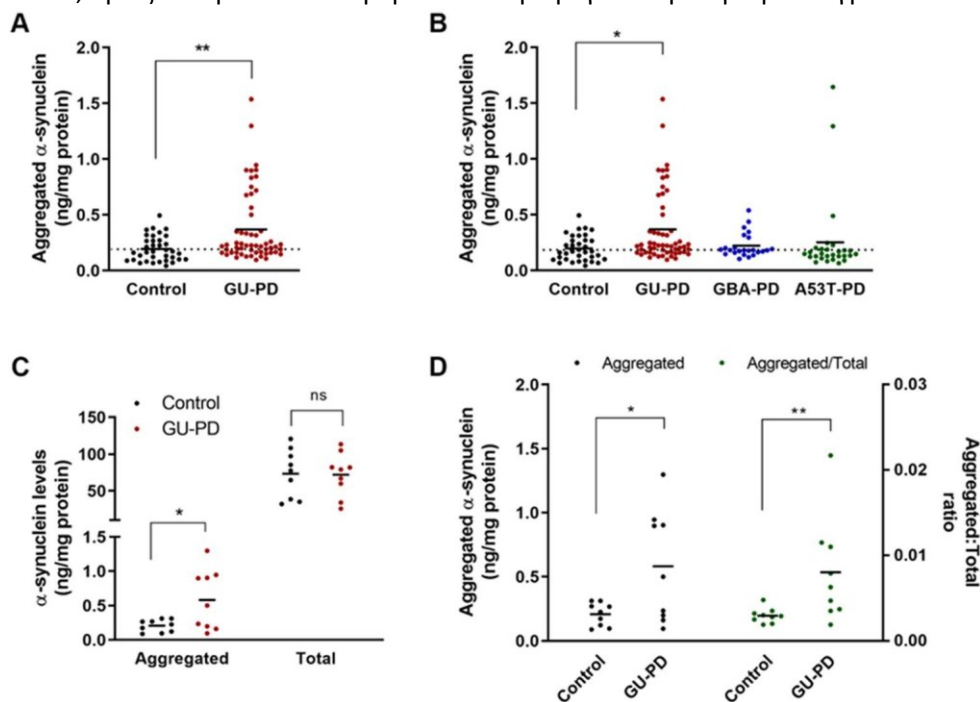


Εικόνα 1. Ειδικότητα των μετρήσεων που χρησιμοποιούν την ειδική για τη διαμόρφωση ELISA σε λυμένα ερυθρά αιμοσφαίρια. Α. Εκτίμηση σειριακών αραιώσεων δείγματος ερυθρών αιμοσφαιρίων από την ομάδα ελέγχου. Οι αραιώσεις έγιναν σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T/BSA και μετρήθηκαν εις τριπλούν. **Β.** Εκτίμηση δείγματος ερυθρών αιμοσφαιρίων από την ομάδα PD πριν και μετά την προσθήκη 1,2 ή 3,6 ng/ml PFF. Η συσσωματωμένη α-συνουκλεΐνη μετά την προσθήκη PFF εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της γνωστής προσθήκης. Τα δεδομένα στα Α και Β παρουσιάζονται ως μέσος όρος \pm SEM. **Γ.** Μέτρηση της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης σε λυμένα RBCs από τις ομάδες ελέγχου (n=34) και GU-PD (n=56) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Student's t-test ($p=0,4024$).

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν μια στατιστικά σημαντική αύξηση της συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης στην ομάδα GU-PD έναντι της ομάδας ελέγχου ($0,197 \pm 0,019$ και $0,369 \pm 0,043$ ng συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης / mg ολικής πρωτεΐνης, για την ομάδα ελέγχου και για την ομάδα GU-PD, αντίστοιχα). Τα επίπεδα της συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης στις ομάδες A53T-PD και GBA-PD ήταν παρόμοια με την ομάδα ελέγχου ($0,222 \pm 0,022$ και $0,252 \pm 0,067$ ng/mg, για την ομάδα GBA-PD και A53T-PD, αντίστοιχα). Αξιολογήθηκε, επίσης, η δυνατότητα διάκρισης ασθενών με PD από την ομάδα ελέγχου μέσω

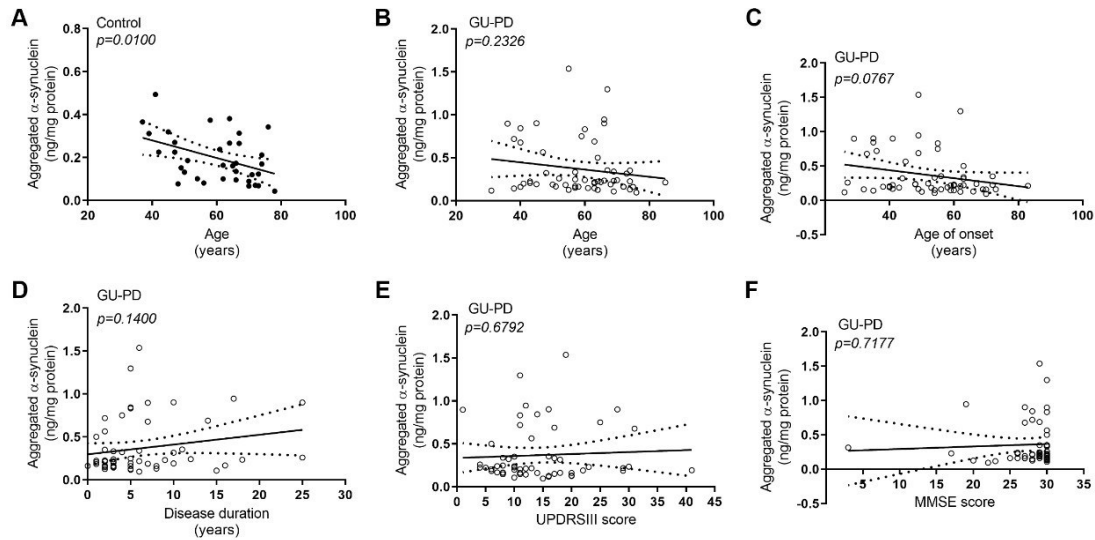
της μέτρησης της ολικής α-συνουκλεΐνης. Μετρήθηκε η συσσωματωμένη και η ολική α-συνουκλεΐνη σε 18 δείγματα από συμμετέχοντες που ανήκαν είτε στην ομάδα ελέγχου, είτε στην ομάδα GU-PD χρησιμοποιώντας μία διαφορετική δοκιμασία ELISA για την ανίχνευση της ολικής α-συνουκλεΐνης που έχει αναπτυχθεί επίσης από την ομάδα της κ. Εμμανουηλίδου [2]. Τα δεδομένα αποκάλυψαν ότι η συσσωματωμένη, αλλά όχι η συνολική, α-συνουκλεΐνη δίνει τη δυνατότητα διάκρισης των ασθενών με PD από τα άτομα ελέγχου. Η χρήση της αναλογίας συσσωματωμένης/ολικής ενίσχυσε την ικανότητα διάκρισης στα ίδια δείγματα. Στα υγιή άτομα η συγκέντρωση της συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης ήταν μειούμενη και κατά συνέπεια η αυξητική τάση που παρατηρήθηκε στους GU-PD ασθενείς θεωρήθηκε ότι δεν είναι αποτέλεσμα της φυσιολογικής γήρανσης. Τα επίπεδα της συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης στα RBCs δε συσχετίστηκαν με την ηλικία έναρξης της νόσου ή τη διάρκεια της νόσου στην ομάδα GU-PD. Εξετάστηκαν, επίσης, πιθανές συσχετίσεις της συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης σε RBCs με κλινικά χαρακτηριστικά που αντικατοπτρίζουν την κινητική και γνωστική κατάσταση των ασθενών με GU-PD. Τα επίπεδα συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης δεν βρέθηκε να έχουν θετική ή αρνητική συσχέτιση με τις βαθμολογίες UPDRSIII ή MMSE. Η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τις ομάδες A53T-PD και GBA-PD χωρίς στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης μας δείχνουν ότι η μέτρηση της συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης στα ερυθροκύτταρα μπορεί να είναι ενδεικτική της προοδευτικής συσσώρευσης της συγκεκριμένης παθολογίας στη ΝΠ, και κατ'επέκταση θα μπορούσε να αποτελέσει νέο βιοδείκτη για τη νόσο.

Τα αποτελέσματα μέτρησης της συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης σε πλάσμα ασθενών με MSA, PSP και CBS είναι ενθαρρυντικά, όμως θα πρέπει να επιβεβαιωθούν με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων.



Εικόνα 2. Η συσσωματωμένη α-συνουκλεΐνη στα ερυθρά αιμοσφαίρια μπορεί να διακρίνει την ομάδα GU-PD από την ομάδα ελέγχου. Α. Η συσσωματωμένη α-συνουκλεΐνη μετρήθηκε σε ερυθρά αιμοσφαίρια από άτομα ελέγχου (n=35) και ασθενείς με GU-PD (n=56). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμή Mann Whitney (**p=0,0067). **Β.** Τα επίπεδα της συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης που βρέθηκαν σε ασθενείς με GU-PD συγκρίθηκαν με ασθενείς με PD που φέρουν μεταλλάξεις GBA και A53T. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη δοκιμή Kruskal-Wallis ακολουθούμενη από τη δοκιμή πολλαπλών συγκρίσεων του Dunn (p=0,0102, 0,9616 και >0,9999 για GU-PD, GBA-PD και A53T-PD έναντι της ομάδας ελέγχου, αντίστοιχα). **Γ.** Η

συγκέντρωση της συσσωματωμένης α-συνουκλείνης σε σύγκριση με την ολική α-συνουκλείνη σε δείγματα ερυθρών αιμοσφαιρίων από 9 άτομα ελέγχου και 9 ασθενείς με GU-PD. Οι ομάδες ελέγχου έναντι των GU-PD συγκρίθηκαν με το Student's t-test (* $p=0,02319$ για συσσωματωμένη α-συνουκλείνη, $p=0,9327$ για ολική α-συνουκλείνη). **D.** Η συγκέντρωση της συσσωματωμένης α-συνουκλείνης σε σύγκριση με την αναλογία συσσωματωμένης:ολικής σε δείγματα ερυθρών αιμοσφαιρίων από 9 άτομα ελέγχου και 9 ασθενείς με GU-PD. Οι ομάδες ελέγχου έναντι GU-PD συγκρίθηκαν με τη δοκιμή Mann-Whitney (* $p=0,0326$ για συσσωματωμένη α-συνουκλείνη, ** $p=0,0078$ για αναλογία συγκεντρωτική:ολική).



Εικόνα 3. Η συσσώρευση συσσωματωμάτων α-συνουκλείνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια ασθενών με GU-PD δεν οφείλεται στη γήρανση. **A, B.** Ανάλυση συσχέτισης των επιπέδων της συσσωματωμένης α-συνουκλείνης με την ηλικία της ομάδας ελέγχου (A, $R^2=0.1845$) ή των ομάδων GU-PD (B, $R^2=0.0263$). **C-F.** Συσχετίσεις μεταξύ της συσσωματωμένης α-συνουκλείνης και των κλινικών μετρήσεων της σοβαρότητας της νόσου: ηλικία έναρξης (C, $R^2=0,0569$), διάρκεια της νόσου (D, $R^2=0,0399$), βαθμολογία UPDRS Part-III (E, $R^2=0,0032$) και βαθμολογία MMSE (F, $R^2=0,0027$).

ΠΙΘΑΝΕΣ ΛΟΙΠΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έχουν δημοσιευθεί στο έγκριτο περιοδικό "Parkinsonism & Related Disorders". Η δημοσίευση επισυνάπτεται (DOI: 10.1016/j.parkreldis.2025.107321).