



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 / Ανίχνευση συσσωματωμένων μορφών της ασνουκλεΐνης

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 6: Ανάπτυξη καινοτόμων προκλινικών θεραπευτικών παρεμβάσεων κατά της πρόωρης εμφάνισης νευροεκφυλιστικών νοσημάτων Alzheimer και Parkinson.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΑΙΓΙΝΗΤΕΙΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ (ΕΚΠΑ)

Νόσος Πάρκινσον: Βιοχημική Ανάλυση καινούργιων βιοδεικτών/ Ανίχνευση συσσωματωμένων μορφών της α-συνουκλεΐνης

Ενότητα Εργασίας 4

Τίτλος Παραδοτέου. 4. 2. Νόσος Πάρκινσον: Βιοχημική Ανάλυση καινούργιων βιοδεικτών. Β. Ανίχνευση συσσωματωμένων μορφών της α-συνουκλεΐνης

ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ / ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο Εργαστήριο Νευροβιολογίας του Αιγινήτειου Νοσοκομείου έγινε προσπάθεια εγκαθίδρυσης της καινοτόμου μεθόδου Seeding Amplification Assay (SAA), μέτρησης συσσωματωμάτων της α- συνουκλεΐνης. Η μέθοδος ανιχνεύει συσσωματώματα που αναπτύσσονται μετά από έκθεση σε βιολογικό υλικό, ιδιαίτερα ENY, ασθενών με συνουκλείνοπάθειες όπως η ΝΠ και η DLB. Χρησιμοποιήθηκε το καινούργια εγκατεστημένο κινούμενο φθορισμόμετρο στο Εργαστήριο Νευροβιολογίας του Αιγινήτειου Νοσοκομείου.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΕ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

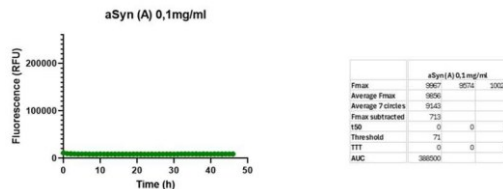
Έγιναν προσπάθειες να στανταρισθεί το πρωτόκολλο για την δοκιμασία ανίχνευσης συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης μέσω της μεθόδου RT-Quic, που είναι πλέον γνωστή ως alpha-synuclein seed Amplification Assay (AS SAA), στο κινούμενο φθορισμόμετρο που είναι εγκατεστημένο στο Εργαστήριο Νευροβιολογίας στο Αιγινήτειο Νοσοκομείο. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά διαλύματα, ιδιαίτερα όσον αφορά διαφορετικές συγκεντρώσεις SDS, διαφορετικές πηγές και συγκεντρώσεις ήδη προετοιμασμένων ινιδίων της α-συνουκλεΐνης (Pre-formed Fibrils, PFFs), καθώς και, το πιο σημαντικό, διαφορετικές πηγές υποστρώματος φυσικού τύπου α-συνουκλεΐνης, ακόμη και μια μεταλλαγμένη μορφή K23Q SNCA, η οποία παρεμποδίζει την αυτόματη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης. Να σημειωθεί ότι η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα δαπανηρή και χρειάστηκαν πόροι πολύ παραπέρα από αυτούς που διατίθενται από το Πρόγραμμα για την διενέργεια των πειραμάτων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

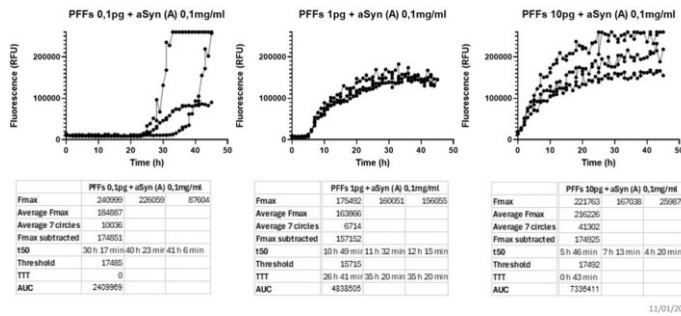
Παρατίθενται ενδεικτικά αποτελέσματα από πολλαπλά πειράματα. Έγιναν

συνολικά 29 πειραματικές διαδικασίες, όπου η κάθε μία ενείχε πολλές διαφορετικές παραμέτρους με διαφοροποιήσεις όσον αφορά το υπόστρωμα της μονομερούς α-συνουκλείνης, τις συνθήκες του διαλύματος (pH, SDS, τύπο PB) και την ποσότητα των PFFs ή της Thioflavin T με την οποία συνδέονται τα ινίδια.

aSyn (A) 0,1mg/ml (w/o seeds)

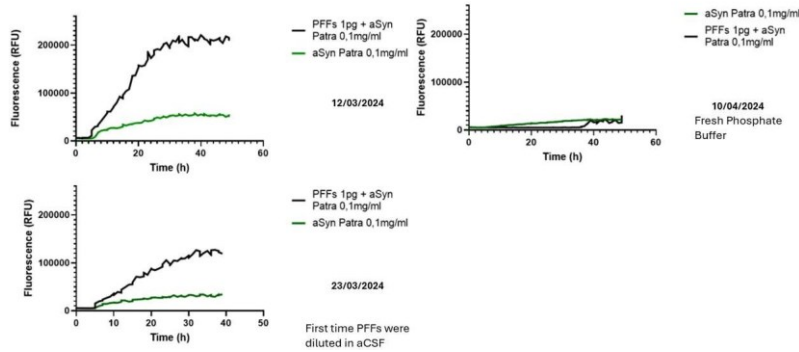


PFFs + aSyn (A) 0,1mg/ml



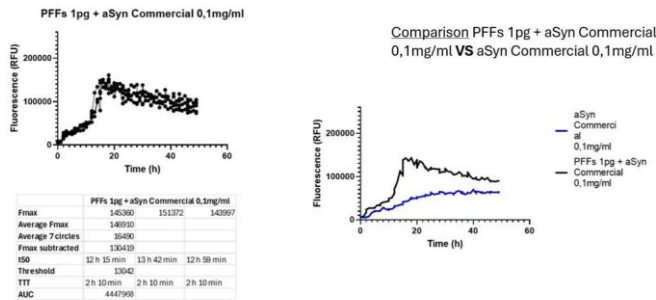
Πρόκειται για ένα από τα πρώτα και πιο ελπιδοφόρα πειράματα, όπου υπήρχε μηδενική δραστηριότητα συσσωμάτωσης με το υπόστρωμα μονομερούς α-συνουκλείνης, και δοσοεξαρτώμενη επαγωγή της συσσωμάτωσης με την συν-επάση με μικρές ποσότητες PFFs. Δυστυχώς η πρόσβαση στο συγκεκριμένο υπόστρωμα, που κατασκευαζόταν από συνεργάτες μας, ήταν πολύ περιορισμένη, και αναγκαστήκαμε να την εγκαταλείψουμε, ενώ ακόμη και αυτό το «ιδανικό» πείραμα με το ίδιο υπόστρωμα ποτέ δεν δούλεψε τόσο καλά έκτοτε. Πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα συνήθους αποτελέσματος με αυτό το υπόστρωμα, με πιο ασταθείς και λιγότερο σαφείς απαντήσεις, παρατίθεται παρακάτω.

• 2nd amount

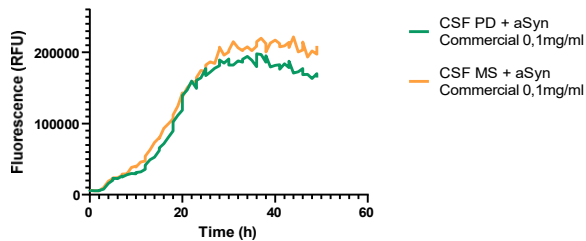


Παρακάτω παρατίθεται πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε εμπορική πηγή για το μονομερές υπόστρωμα, με μέτρια αποτελέσματα.

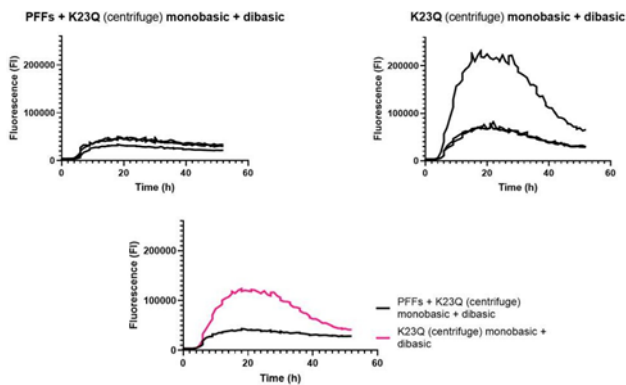
PFFs 1pg + aSyn Commercial 0,1mg/ml



Έγιναν και κάποια πειράματα με υλικό ασθενών (ENY), που είναι και το τελικό ζητούμενο να εφαρμοστεί η μέθοδος. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ENY από ασθενή με Σκλήρυνση κατά Πλάκας (MS), και αναμενόμενο θετικό δείγμα ENY από ασθενή με νόσο Πάρκινσον (PD) με επιβεβαιωμένη μετάλλαξη στο GBA. Οι ασθενείς αυτοί έχουν σχεδόν πάντα θετικό αποτέλεσμα στην συγκεκριμένη μέθοδο, ενδεικτικό της βαριάς συνουκλείνωσης. Δεν ανιχνεύθηκε κάποια διαφορά στην συσσωμάτωση της α-συνουκλείνης μεταξύ των δύο δειγμάτων, το σήμα που αναπτύσσεται είναι αυτό που προκύπτει από την αυτόματη συσσωμάτωση του υποστρώματος κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες.



Στην προσπάθεια να μειωθεί η αυτόματη συσσωμάτωση, προμηθευτήκαμε από εμπορική πηγή μεταλλαγμένη μορφή μονομερούς α-συνουκλεΐνης K23Q με μειωμένη τάση τέτοιας συσσωμάτωσης. Κάτω από συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, έχει δείξει συμπεριφορά κάπως καλύτερη από το φυσικού τύπου υπόστρωμα, όπως φαίνεται παρακάτω, αλλά τα αποτελέσματα είναι ασταθή.



Εν κατακλείδι, ακόμη προσπαθούμε να βελτιστοποιήσουμε την μέθοδο. Αλλάζουμε τις πειραματικές συνθήκες που φαίνεται ότι είναι ιδιαίτερες για κάθε υπόστρωμα της μονομερούς α-συνουκλεΐνης. Στην φάση αυτή πειραματιζόμαστε με υπόστρωμα που μας έχει παραχωρήσει ο συνεργάτης μας Ronald Melki καθώς και με το εμπορικό K23Q. Σκεφτόμαστε μήπως, επί ελλείψεως αναπαραγωγίμων, σταθερών αποτελεσμάτων εγκαταλείψουμε το πρωτόκολλο Byron Coughy που έχουμε χρησιμοποιήσει μέχρι τώρα και δοκιμάσουμε το πρωτόκολλο του Claudio Soto.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Τα αποτελέσματα από τις προσπάθειες εγκαθίδρυσης της μεθόδου αυτής παρουσιάστηκαν ως αναρτημένη ανακοίνωση στο 31^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Νευροεπιστημών στην Σύρο (Μάιος 2025, TU01-10. Kotoula et al., OPTIMIZATION OF ALPHA-SYNUCLEIN SEEDING AMPLIFICATION ASSAY EXPLOITING RECOMBINANT MONOMERIC PROTEIN FROM DIFFERENT SOURCES). Η αναρτημένη ανακοίνωση επισυνάπτεται.

