



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: Γενετική απαλοιφή γονιδίων σχετιζόμενων με άνοια σε νευρωνικά κύτταρα

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

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΕΥΘΥΜΙΟΠΟΥΛΟΣ (ΕΚΠΑ)

Γενετική απαλοιφή γονιδίων σχετιζόμενων με άνοια σε νευρωνικά κύτταρα

ΕΕ4. Ανάπτυξη κυτταρικών και ζωικών μοντέλων, καθώς και νέων βιοδεικτών για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες Alzheimer και Parkinson.

Παραδοτέο 4.3. Γενετική απαλοιφή γονιδίων σχετιζόμενων με άνοια σε νευρωνικά κύτταρα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η νόσος Αλτσχάιμερ είναι μια ασθένεια που προσβάλλει κυρίως άτομα προχωρημένης ηλικίας, αλλά μπορεί να εμφανιστεί και σε νεότερα άτομα στις περιπτώσεις του πρώιμου τύπου της νόσου^{1, 2}. Η νόσος χαρακτηρίζεται από συμπτώματα ύφεσης της μνήμης και της γνωστικής λειτουργίας, συμπεριφορικές αλλαγές, και προοδευτική απώλεια νευρώνων, νευροϊνιδιακά δεμάτια που αποτελούνται από φωσφορυλιωμένη ταυ πρωτεΐνη, και νευριτικές/αμυλοειδικές πλάκες. Τρεις πρωτεΐνες που εμπλέκονται άμεσα στην εξέλιξη της νόσου είναι η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (Amyloid Precursor Protein, APP), η σχετιζόμενη με τους μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη TAU (microtubule associated protein tau, MAPT) και η πρεσενιλίνη 1 (Presenilin1, PSEN1). Η APP είναι το πρόδρομο μόριο του β-αμυλοειδούς που αποτελεί το συστατικό των νευριτικών πλακών, η MAPT συμβάλλει στην σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων του κυτταροσκελετού του κυττάρου, και η PSEN1 αποτελεί το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου της γ-σεκρετάσης που μεσολαβεί στην δημιουργία του β-αμυλοειδούς. Μεταλλάξεις και στις 3 πρωτεΐνες μπορεί να προκαλέσουν τη νόσο Αλτσχάιμερ. Μπορούν επίσης να επηρεάσουν άλλες λειτουργίες αυτών των πρωτεϊνών. Πάρα πολλά φάρμακα έχουν δοκιμαστεί σε κλινικές δοκιμές για την νόσο Αλτσχάιμερ με φτωχά αποτελέσματα. Ένας από τους λόγους μπορεί να είναι ότι οι ασθενείς που συμμετέχουν σε αυτές τις δοκιμές είναι μεγάλης ηλικίας (ηλικιωμένοι) με εκτεταμένο νευροεκφυλισμό που προχωράει με υψηλό ρυθμό. Επιπροσθέτως, μπορεί να οφείλεται στην απουσία βιοδεικτών για να κατηγοριοποιήσουμε ασθενείς και να καθορίσουμε αυτούς που θα μπορούσαν να επωφεληθούν από αυτά τα φάρμακα. Συνεπώς, είναι επιτακτικό να βρεθούν διαγνωστικοί δείκτες και άλλοι βιοδείκτες που θα επιτρέψουν την κατηγοριοποίηση των ασθενών. Η εύρεση διαγνωστικών δεικτών θα επιτρέψει την συμπερίληψη σε κλινικές δοκιμές νεότερων ασθενών που θα αναπτύξουν την ασθένεια στο μέλλον, εφόσον σήμερα θεωρείται ότι η ασθένεια αναπτύσσεται τουλάχιστον 10-15 χρόνια πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Προς υποστήριξη αυτής της προσέγγισης, έχει δειχθεί ότι η θεραπεία ασθενών που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα με μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα⁷ ή μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών με οιστρογόνα⁸, οδηγεί σε μειωμένη συχνότητα εμφάνισης της νόσου Αλτσχάιμερ σε αυτούς τους πληθυσμούς. Σε αυτές τις περιπτώσεις οι θεραπείες εφαρμόστηκαν σε άτομα ηλικίας 45-55 ετών τα οποία δεν είχαν συμπτώματα της νόσου Αλτσχάιμερ. Παρόλαυτα, όταν αυτές οι θεραπείες εφαρμόστηκαν σε κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με επιβεβαιωμένη νόσο Αλτσχάιμερ και ηλικία μεγαλύτερη των 65 ετών, δεν ήταν αποτελεσματικές. Για να επιταχυνθεί η ανακάλυψη φαρμάκων για την

νόσο Αλτσχάιμερ θεωρούμε ότι η έρευνα πρέπει να εστιαστεί στην ανακάλυψη βιοδεικτών που προβλέπουν την μελλοντική εμφάνιση της νόσου Αλτσχάιμερ.

Συνεπώς προτείνουμε να διεξάγουμε πειράματα για την εύρεση βιοδεικτών για την νόσο Αλτσχάιμερ. Για την εξακρίβωση της ειδικότητας αυτών των βιοδεικτών για την νόσο Αλτσχάιμερ, προτείνουμε να εφαρμόσουμε την πειραματική προσέγγιση που περιγράφεται παρακάτω και για την εύρεση δεικτών για της άνοιες τουχρωμοσώματος 13, οικογενείς Άνοιες τύπου Βρετανίας και Δανίας. Αυτές οι άνοιες μοιράζονται νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά με την νόσο Αλτσχάιμερ, όπως εναπόθεση αμυλοειδούς (που διαφέρει από το Αβ), νευροϊνιδιακά συμπλέγματα, νευρωνικό θάνατο και άνοια. Σε αυτή την περίπτωση, μεταλλάξεις στην BRI2 πρωτεΐνη συνδέονται με την ανάπτυξη της νόσου. Συνεπώς είναι πιθανό ότι παρόμοια μονοπάτια που οδηγούν στον νευροεκφυλισμό να επηρεάζονται. Ως επιπλέον δοκιμασία για την ειδικότητα των δεικτών για τη νόσο Αλτσχάιμερ, θα μελετήσουμε επίσης την άλφα-συνουκλεΐνη (alpha-synuclein, SNCA) μεταλλάξεις του γονιδίου της οποίας οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου Πάρκινσον.

Για να πετύχουμε τους στόχους μας, θα προσδιορίσουμε διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια, και θα καθορίσουμε τα βιολογικά μονοπάτια που επηρεάζονται έπειτα από εξάλειψη (Knockout, KO) καθενός από τα 5 γονίδια ενδιαφέροντος. Για να επιτύχουμε KO των προαναφερθέντων γονιδίων, θα χρησιμοποιήσουμε το σύστημα CRISPR/Cas9, που είναι ένα καινοτόμο εργαλείο για τον χειρισμό γονιδίων. Χρησιμοποιώντας single guide RNA συμπληρωματικά σε αλληλουχίες DNA καθενός από αυτά τα γονίδια, η πρωτεΐνη Cas9 του συστήματος CRISPR μπορεί στοχευμένα να αφαιρέσει, να προσθέσει ή να αντικαταστήσει τμήματα DNA σε γονίδια.

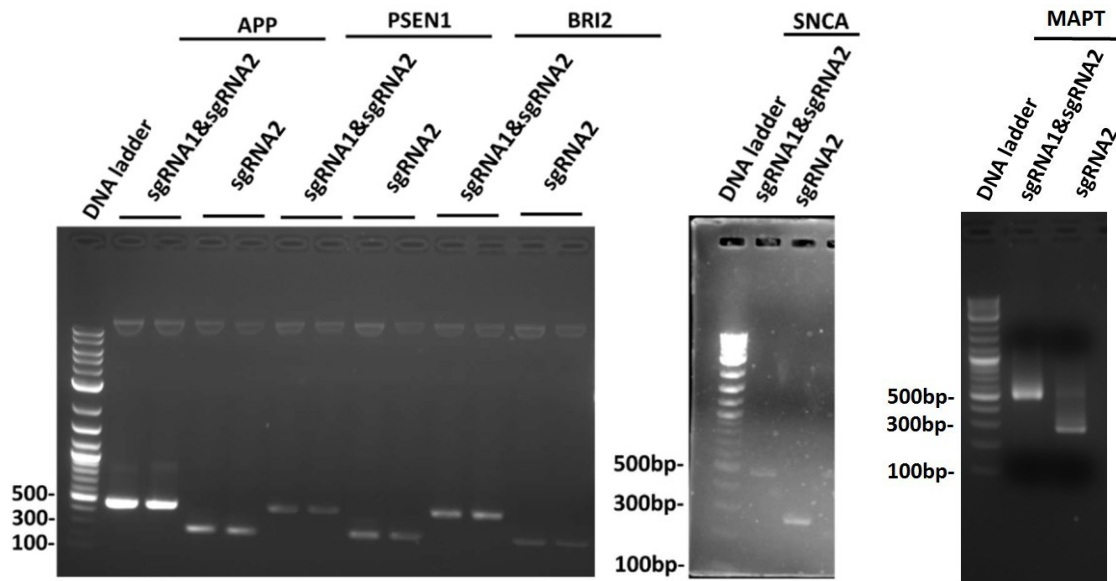
Στην συνέχεια, θα εφαρμοστεί η τεχνολογία RNA-Seq για να προσδιοριστούν διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. Η τεχνολογία RNA-Seq επιτρέπει την χαρτογράφηση και ποσοτικοποίηση συνολικά του μεταγραφώματος του κυττάρου σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή, χρησιμοποιώντας high-throughput μεθόδους όπως την αλληλούχιση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing)³. Το RNA-Seq δίνει πληροφορίες όχι μόνο για τα διαφορικά εκφραζόμενα RNA σε ένα βιολογικό δείγμα⁴, αλλά δίνει επίσης και μια εικόνα για τα βιολογικά μονοπάτια και τις λειτουργίες στις οποίες αυτά τα γονίδια εμπλέκονται.

Χρησιμοποιώντας την Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG)⁵, η διαφορική έκφραση γονιδίων μπορεί να διασαφηνίσει τα μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται σύνολα διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων, ποια από αυτά μπορεί να είναι κοινά ή διακριτά, και με ποιες λειτουργίες/διεργασίες αυτά τα γονίδια σχετίζονται, όπως το μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης (INSR, IRS, PI3K, PIP3, Akt), η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ή ο κυτταρικός θάνατος (CASP3, CASP12, ROS). Συνεπώς, έχουμε όχι μόνο ποσοτική αλλά και λειτουργική ερμηνεία της γονιδιακής έκφρασης.

Η ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology, GO)⁶ παρέχει δεδομένα για μονοπάτια και κυτταρικά συστατικά στα οποία αντιστοιχούν τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια, όπως π.χ. η φυσιολογική δημιουργία αμυλοειδικών συμπλεγμάτων (RIP1, RIP3 kinases), η σύνδεση πρωτεϊνών με β αμυλοειδές (LDLR, ITM2B), τα μιτοχόνδρια (ROS), το ενδοπλασματικό δίκτυο, κ.α.

Σύνολο παραδοτέων

Κλωνοποίηση πλασμιδίων με τα κατάλληλα sgRNAs: Για τον προσδιορισμό γονιδίων που σχετίζονται με την έκφραση και τη λειτουργία της APP, της PSEN1, της MAPT, της BRI2 ή της SNCA, πραγματοποιήσαμε ΚΟ του αντίστοιχου γονιδίου χρησιμοποιώντας το σύστημα CRISPR/Cas9. Παρακάτω, περιγράφουμε, ως παράδειγμα, την εξάλειψη του γονιδίου APP σε κύτταρα SKN-SH (ανθρώπινου νευροβλαστώματος με επιθηλιακή μορφολογία). Κλωνοποιήσαμε στον φορέα pX333 (Addgene #64073, παρέχεται από τον Δρ. Παντελή Χατζή της Μονάδας Γονιδιωματικής Ε.ΚΕ.Β.Ε. Φλέμινγκ), μεταξύ των περιοριστικών θέσεων BbsI και BsaI, δύο sgRNA που στοχεύουν μια περιοχή του γονιδίου APP που μεταγράφεται και μεταφράζεται σε όλες τις ισομορφές της πρωτεΐνης. Η επιτυχής κλωνοποίηση επιβεβαιώθηκε με PCR και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, η οποία έδειξε ότι τα προϊόντα της PCR είχαν το κατάλληλο μέγεθος (Εικόνα 1). Επιπροσθέτως, η κλωνοποίηση των sgRNA στο πλασμίδιο pX333 επιβεβαιώθηκε με Sanger sequencing. Χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές, λάβαμε μια αλληλουχία στην οποία εντοπίζουμε και το APP-sgRNA1: 5' AAACGGGGCTGGTGTGATTGGGC 3' και το APP-sgRNA2: 5' AAACCATTGGTGATCTGCAGTTCAC 3'. Η αλληλουχία που λάβαμε φαίνεται στην Εικόνα 2 με τα 2 sgRNA υπογραμμισμένα. Επαναλάβαμε το πρωτόκολλο χρησιμοποιώντας διαφορετικά τμήματα DNA συμπληρωματικά με ακολουθίες εξωνίων της PSEN1, BRI2, MAPT, SNCA για να δημιουργήσουμε 4 νέα πλασμίδια για ΚΟ της PSEN1, BRI2, MAPT, SNCA, αντίστοιχα. Στην εικόνα 1 φαίνονται επίσης οι επιτυχείς κλωνοποιήσεις για τα sgRNA όλων των γονιδίων. Η PCR και τα αποτελέσματα του Sanger sequencing επιβεβαίωσαν την σωστή κλωνοποίηση και σε αυτές τις περιπτώσεις (εικόνες 2,3,4,5,6).



Εικόνα 1. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτωμα αгарόζης των προϊόντων PCR του πλασμιδίου pX333 για τα γονίδια APP, PSEN1, MAPT, SNCA και BRI2. 2 μικρά τμήματα DNA εισήχθησαν στο πλασμίδιο στις θέσεις περιορισμού των BbsI και BsaI, αντίστοιχα. Αυτά τα τμήματα χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές σε συνδυασμό με έναν καταρροϊκό εκκινητή, για την εκτέλεση PCR που θα ενισχύσει την αλληλουχία DNA όπου εισάγονται τα τμήματα. Αναμενόμενο προϊόν PCR για το δεύτερο sgRNA: 280bp. Αναμενόμενο προϊόν PCR και για το sgRNA1 με το sgRNA2: 450bp. Και στις δύο περιπτώσεις, εντοπίστηκαν προϊόντα με το κατάλληλο μέγεθος. Τα προϊόντα είναι ίδια μεταξύ των διαφορετικών γονιδίων διότι σχεδιάσαμε τα sgRNAs να έχουν το ίδιο μέγεθος μεταξύ τους και να αλλάζει μόνο η αλληλουχία.

>20211101AS1P7_C11_2021-11-03.ab1 APP

```
5'GGGMGRITTKGYSGGGGYSTKGGGSGGTMGCCAGGCGGGCCATTACCGTAAGTTATGTAACGGGTACCCCAT
TTGTCTGCAGAAATGGSGCACGCGCTAAAAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACAAAAA
GCACCGACTCGGTGCCACTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAACTGG
GGCTGGTGTGATTGGGC GGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTAC
GGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTAAAACACTGCAAACTACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTCAC
GTATTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATCCAATTATCTCTAACAGCCTTGATCGTATATGCAA
TATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTAGAGCCATTTGTCTGCAGAATTGGCGCACGCGCTAAAAACGGACT
AGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTCAAGTTGATAACGG
ACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAACCATTGGTGATCTGCAGTTACGGTGTTTCGTCCTTTCCACA
AGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTAA
AACTGCAAACTACCCAAGAAATATTACTTTCTACGTCACGATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTA
TTCCAATTATCTCTAACAGCCTTGATCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCACATGCGCC
ATTCTCGAR 3'
```

Εικόνα 2. Η αλληλουχία που λάβαμε έπειτα από Sanger sequencing με κατάλληλους εκκινητές για APPKO. APP-sgRNA1:5' AAACGGGGCTGGTGTGATTGGGC 3', APP-sgRNA2:5' AAACCATTGGTGATCTGCAGTTAC 3'. Αυτό επιβεβαιώνει την σωστή κλωνοποίηση.

>20211101AS2P7_F11_2021-11-03.ab1 PSEN1

```
5'CGMCATACTGGCSSGGWSKTTGGGGCGGTCAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAAGTTATGTAACGGGTACCCCA
TTTGTCTGCMsaATTGGCGCACGCGCTAAAAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACAAAAA
AGCACCGACTCGGTGCCACTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAACCA
GGGTAACCCCGGCAGGTC GGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTA
CGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTAAAACACTGCAAACTACCCAAGAAATATTACTTTCTACGTC
CGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATCCAATTATCTCTAACAGCCTTGATCGTATATGCAA
ATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTAGAGCCATTTGTCTGCAGAATTGGCGCACGCGCTAAAAACGGAC
TAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTCAAGTTGATAACG
GACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAACAGGTCTAACCGTTACCTTGACGGTGTTTCGTCCTTTCCAC
ARGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAACATAATTTWA
AACTGCAAACTACCCAAGAAATATTACTTTCTACGTCACGATTTTGTACTATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTTT
CAATTATCTCTAACRCCTTGATCGTATATGCAAATATGAAAGGATTATGGGAAAWAGGCCCTCMACATKCGCC
CATTYCYSR 3'
```

Εικόνα 4. Η αλληλουχία που λάβαμε έπειτα από Sanger sequencing με κατάλληλους εκκινητές για PSEN1KO. PSEN1-sgRNA1:5' AAACAGGGTAACTCCCGGCAGGTC 3', PSEN1-sgRNA2:5' AAACAGGTCTAACCGTTACCTTGAC 3'. Αυτό επιβεβαιώνει την σωστή κλωνοποίηση.

>20211101AS3P7_A12_2021-11-03.ab1 BRI2

```
5'GTMAAATGGGGGAGAAAGRGMGTGKGGCGGTMGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAAGTTATGTAACGGGTACC
CCATTTGTCTGCMGAATTGGCGCACGCGCTAAAAACGGACTAGCCTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACAA
AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAA
CCTCCCGATGTGCATTACAAAACGGTGTTCGTCCTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAACTACTTTCAAGT
TACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTAAAACATAATTTAAAACACTGCAAACCTACCCAAGAAATATTACTTTCTACGT
CACGATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTACAGTCAAATTAATTCCAATTATCTCTAACAGCCTTGATCGTATATGC
AAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTCTAGAGCCATTTGTCTGCAGAATTGGCGCACGCGCTAAAAACGG
ACTAGCCTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTCAAGTTGATAAC
GGACTAGCCTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAACAGATGATGTGGTACCAGTTGC GG TGTTCGTCCTTTCCA
CAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTAAAACATAATTT
AAAACCTGCAAACCTACCCAAGAAATATTACTTTCTACGTCACGATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAAT
AATCCAATTATCTCTAACAGCCTTGATCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCACATGC
GCCATTCTCGA 3'
```

Εικόνα 3. Η αλληλουχία που λάβαμε έπειτα από Sanger sequencing με κατάλληλους εκκινητές για BRI2KO. BRI2-sgRNA1:5' AAACAGATGATGTGGTACCAGTTGC 3', BRI2-sgRNA2:5' AACCTCCCGATGTGCATTACAAAAC 3'. Αυτό επιβεβαιώνει την σωστή κλωνοποίηση.

>20231103AS1P2_H12_2023-11-06.ab1 MAPT

```
GGGGAAC TT KWKKYGGGTGKGGCGGTCAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAAGTTATGTAACGGGTACCCCA
TTTGTCTGCMGAATTGGCGCACGCGCTAAAAACGGACTAGCCTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACA
AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCT
AAACCTGTGTCTCAGGTCCTGTCCGGTGTTCGTCCTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAACTACT
TTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTAAAACATAATTTAAAACACTGCAAACCTACCCAAGAAATATTACT
TTCTACGTCACGATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCCAATTATCTCTAACAGCCTTGTA
TCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTCTAGAGCCATTTGTCTGCAGAATTGGCGCAC
GCGCTAAAAACGGACTAGCCTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCA
CTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAACCGCCTTTTGTCCCACT
CCGGTGTTCGTCCTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGAT
AGTCCATTTAAAACATAATTTAAAACACTGCAAACCTACCCAAGAAATATTACTTTCTACGTCACGATTTTGTACTA
ATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATTCCAATTATCTCTAACAGCCTTGATCGTATATGCAATATGAAGGAAT
CATGGGAAATAGCCCTCACATGCGCCATTCTCGAGCATGCTCGAGATTGGCGCATGCTCGAGAATGGYGCAT
GTGAGCAAAGYCAGCAAAGCCAGGAYCGTAAAGCGCGTGCTGCGTTTTTCAWAGCTCCGCCCTGACKA
GCATCACAAAATCGACGCTYAGTCRRAGGTGCGACCCGACMGACTATAAGATWCAGGCGATCCCATGAGC
TCAYGTGCCTTCTGATTGACTTGCSTTACGATCGTTGCTTACCATCGAACGKACCATTWCYTAGAGYTTCMG
```

Εικόνα 5. Η αλληλουχία που λάβαμε έπειτα από Sanger sequencing με κατάλληλους εκκινητές για MAPTKO. MAPT-sgRNA1:5' AAACCTGTGTCTCAGGTCCTGTGC 3', MAPT-sgRNA2:5' AAACCGCCTTTTGTCCCACTCC 3'. Αυτό επιβεβαιώνει την σωστή κλωνοποίηση.

```
>20230418AS1P1_A04_2023-04-20.ab1 SNCA FORWARD
AAGTWRARYWGAATAGCAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTT
TTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAA
ATGGCTCTAGAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAAT
TGAATTAATTTGACTGTAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGT
TTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAAGTATTTGATTTCCTGGCTTT
ATATATCTTGTGGAAAGGACGAAAACACCGACTTTGAATGAGAACTTTCGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAA
AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA
AGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGGGTACCCGTTACATAACTT
ACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGG
GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAKTACATCAAGTGTATCATAT
GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTGTGCCAGTACATGACCTT
ATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTWAGTCATCGCTATTACCAWGGTCGAGGTGAGCCCCAC
GTTCTGCTTCACTCTCCCCATYTCCCCCCTCCCCACCCSCAATTTTGATTTATTTATTTTTAATTAWTTTGTG
CAACGATGGGGGCSGGGGGGG
>20230418AS1P2_B04_2023-04-20.ab1 SNCA REVERSE
GGGKTTATSGGKGSSTKGGGSGGTMGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAAAGTTATGTAACGGGTACCCCATTTG
TCTGCAGAAATTGGCGCACGCGCTAAAAACGGACTAGCCTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACAAAA
AGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAA
CCGAAAGTTCTCATTCAAAGTCGGTGTTCGTCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCA
AGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTAAAACATAATTTAAAACGCAAACTACCCAAGAAATTAATTTCT
ACGTCACGATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAAATTAATCCAATTATCTCTAACAGCCTTGTATCGT
ATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCTCTAGAGCCATTTGTCTGCAGAAATTGGCGCACGCG
CTAAAACGGACTAGCCTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTT
TTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACAAACCCATCACTCATGAACAAC
GGTGTTCGTCTTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAG
TCCATTTAAAACATAATTTAAAACGCAAACTACCCAAGAAATTAATTTCTACGTACGATTTTGTACTAATA
```

Εικόνα 6. Η αλληλουχία που λάβαμε έπειτα από Sanger sequencing με κατάλληλους εκκινητές για SNCAKO. SNCA-sgRNA1:5' CACCGACTTTGAATGAGAAGCTTTCG 3', SNCA-sgRNA2:5' AAACAACCCATCACTCATGAACAAC 3'. Αυτό επιβεβαιώνει την σωστή κλωνοποίηση.

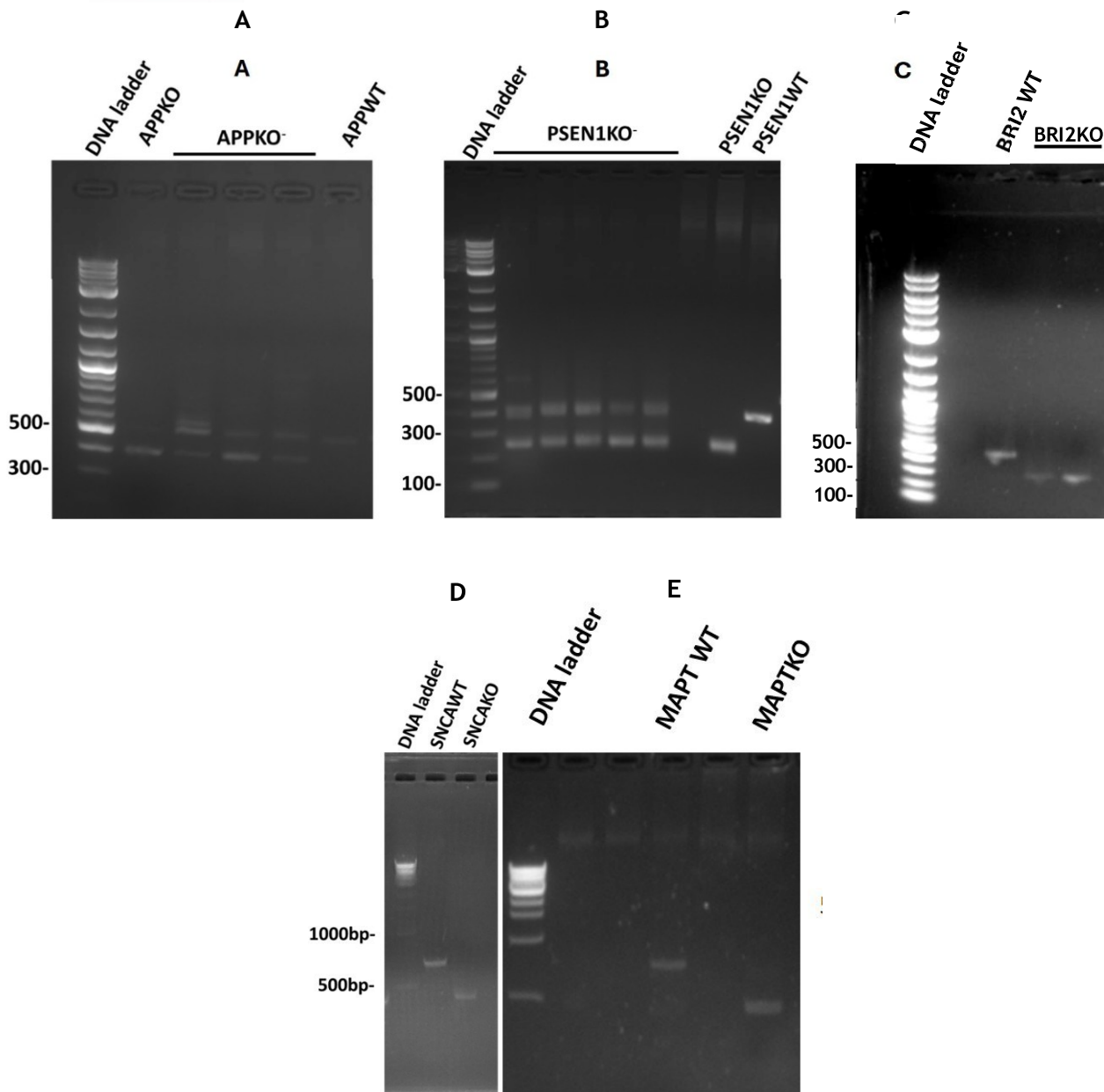
Δημιουργία κλώνων κυττάρων SK-N-SH με KO των γονιδίων APP, PSEN1, MAPT, SNCA ή BRI2 χρησιμοποιώντας CRISPR-μεσολαβούμενη απαλοιφή του γονιδίου. Μεθοδολογία: επιμόλυνση κυττάρων SKN-SH χρησιμοποιώντας τους φορείς που κατασκευάστηκαν παραπάνω για να παραχθεί γονιδιακό knock-out με τη μεσολάβση της CRISPR, επιλογή κλώνων ανθεκτικών σε αντιβιοτικό και επαλήθευση της διαγραφής γονιδίου με PCR. Τα SKN-SH κύτταρα είναι κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος, τα οποία είναι δεκτικά σε επιμόλυνση και θα μας επιτρέψουν να μοντελοποιήσουμε τους νευρώνες που επηρεάζονται στην AD.

Μετά την επιτυχή παραγωγή του πλασμιδίου με τα 2 sgRNA (pX333-APP, pX333-PSEN1, pX333-MAPT, pX333-SNCA και pX333-BRI2), το εισάγαμε, μαζί με το πλασμίδιο pcDNA6TR και το οποίο θα παρέχει αντίσταση στο αντιβιοτικό Blastidicin, σε κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος (SKN-SH) με χημική επιμόλυνση χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο επιμόλυνσης PolyFect (Qiagen). Το πλασμίδιο pcDNA6TR χορηγήθηκε από τον Δρ Παντελή Χατζή (Ε.ΚΕ.Β.Ε. Φλέμινγκ). Το κλωνοποιημένο πλασμίδιο pX333 παρέχεται σε περίσσεια σε σύγκριση με το πλασμίδιο pcDNA6TR για να διασφαλιστεί ότι κύτταρα ανθεκτικά στη Blastidicin θα έχουν επίσης διαμολυνθεί με το πλασμίδιο pX333. Μετά τη διαμόλυνση, ένα θρεπτικό επιλογής που περιέχει Blastidicin επέτρεψε την επιβίωση μόνο εκείνων των κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί επιτυχώς και με τα δύο πλασμίδια. Αυτά τα κύτταρα δημιούργησαν αποικίες που ελέγχθηκαν, όπως περιγράφεται παρακάτω, αν είναι KO για τα γονίδια APP, PSEN1, MAPT, SNCA ή BRI2.

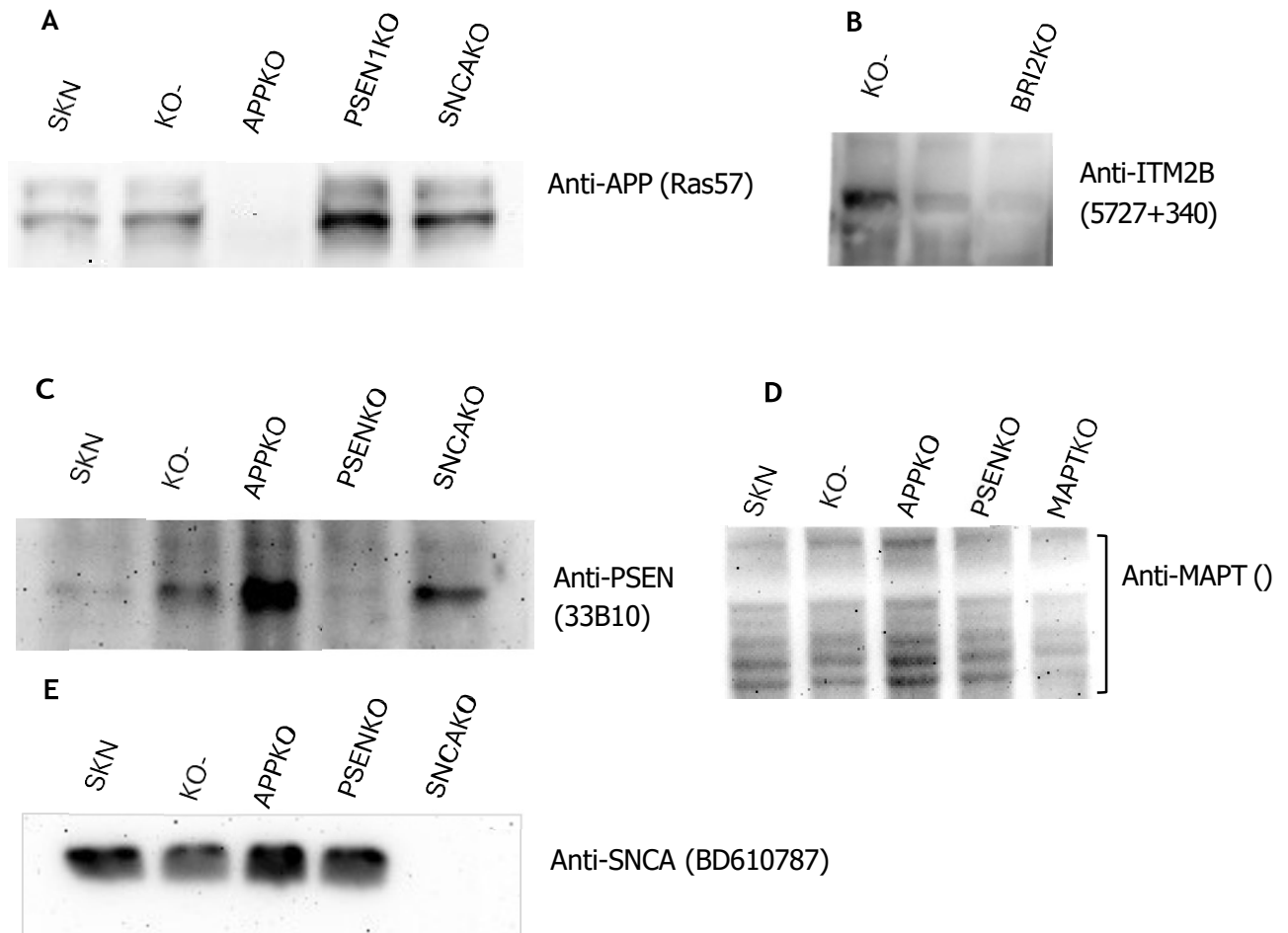
Εξέταση των νεοσύστατων κυτταρικών σειρών για να προσδιορίσουμε επιτυχές KO των γονιδίων.

Οι μεμονωμένες αποικίες συλλέχθηκαν και αναπτύχθηκαν σε χωριστά πηγαδάκια σε 12-well plates. Στην συνέχεια, η εξάλειψη ή μη του κάθε γονιδίου επιβεβαιώθηκε με ανάλυση PCR χρησιμοποιώντας γενωμικό DNA από φυσικού τύπου (wild type, WT) κύτταρα SKN-SH και KO SKN-SH κύτταρα και κατάλληλους εκκινητές. Η παρουσία τμήματος DNA με μικρότερο μέγεθος σε KO κύτταρα σε σχέση με τα WT στο πήκτωμα αγαρόζης υποδεικνύει επιτυχή διαγραφή του γονιδίου.

Αυτό είχε επιτευχθεί για τα γονίδια APP, PSEN1, BRI2 και SNCA και στο **χρονικό διάστημα 11/2024-12/2025 έγινε αυτή η διαδικασία για τα γονίδια MAPT.** Η απαλοιφή φαίνεται από την αποκλειστική ύπαρξη μικρότερης μπάντας στο τζελ αγαρόζης σε σχέση με τα φυσικού τύπου κύτταρα (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτωμα αгарόζης των προϊόντων PCR του ολικού DNA για τα κύτταρα SKNSH. A: APPKO, B: PSEN1KO, C: BRI2KO, D: SNCAKO, E: MAPTKO. Η PCR διεξήχθη σε ολικό DNA με εκκινητές εκατέρωθεν και εξωτερικά των σημείων κοπής της Cas9 έτσι ώστε το WT προϊόν να είναι μεγαλύτερο από το KO. Αναμενόμενα προϊόντα PCR για την APP: WT=523 bp, KO=363bp. Αναμενόμενα προϊόντα PCR για την PSEN1: WT=398bp, KO=232bp. Αναμενόμενα προϊόντα PCR για την BRI2: WT=450 bp, KO=210bp. Αναμενόμενα προϊόντα PCR για την SNCA: WT=720 bp, KO=485bp. Αναμενόμενα προϊόντα PCR για την MAPT: WT=732 bp, KO=487bp. Και στις 5 περιπτώσεις, εντοπίστηκαν προϊόντα με το κατάλληλο μέγεθος.



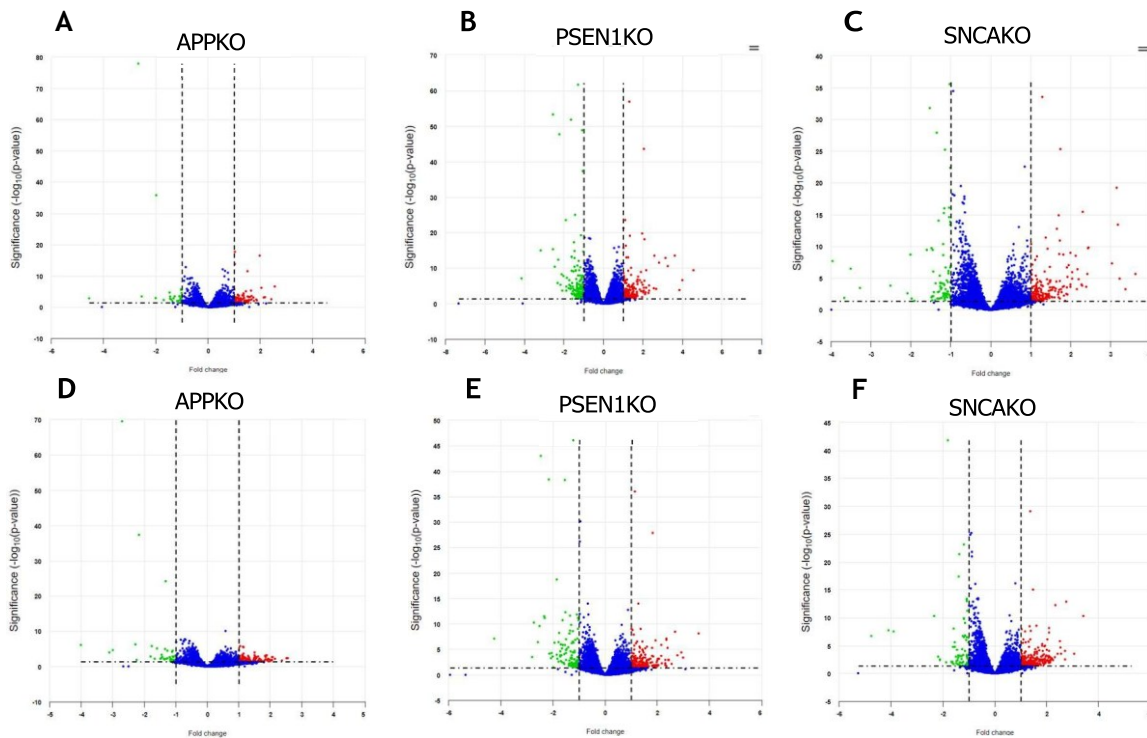
Εικόνα 8. Ανοσοσύπωμα κατά Western σε ολικό δείγμα πρωτεΐνης για τα κύτταρα SKNSH. A: αντίσωμα κατά της APP, B: αντίσωμα κατά της BRI, C: αντίσωμα κατά της PSEN1 D: αντίσωμα κατά της MAPT, E: αντίσωμα κατά της SNCA. Η Western διεξήχθη σε ολική πρωτεΐνη με αντισώματα που αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος και δεύτερα αντισώματα ειδικά για τα πρωτογενή. Σε κάθε περίπτωση, επιβεβαιώθηκε η απαλοιφή του γονιδίου σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

RNAseq

Η αλληλούχιση RNA αποκαλύπτει ποιων γονιδίων η έκφραση έχει αυξηθεί, μειωθεί ή έχει παραμείνει η ίδια. Περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων RNA-Seq παρέχει πληροφορίες για τη λειτουργία και τις σχετικές οδούς στις οποίες εμπλέκονται αυτά τα γονίδια. Η σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών ΚΟ κυτταρικών μοντέλων αναδεικνύει την εμπλοκή τους σε κοινές και διακριτές βιολογικές διαδικασίες και λειτουργίες.

3 από τις κυτταρικές σειρές μας: APPKO, PSEN1KO και SNCAKO υποβλήθηκαν σε ανάλυση RNAseq, σε σύγκριση με την μητρική σειρά SK-N-SH και την σειρά KO- ως controls (Εικόνα 9).

Εν τέλει αποφασίστηκε ότι ο κατάλληλος μάρτυρας (control) είναι η κυτταρική σειρά KO-, συνεπώς αυτή χρησιμοποιείται σε όλες τις περαιτέρω αναλύσεις. Από το σύνολο των μεταγράφων που ανιχνεύθηκαν με την αλληλούχιση RNA, επιλέχθηκαν για ανάλυση αυτά των οποίων η έκφραση έχει τουλάχιστον υποδιπλασιαστεί και αυτά των οποίων η έκφραση έχει αυξηθεί κατά μισό ή παραπάνω.



Εικόνα 9. Volcano plots των αποτελεσμάτων του RNA sequencing. Κάθε κουκκίδα αντιπροσωπεύει ένα γονίδιο που αναγνωρίστηκε (ως mRNA). Με κόκκινο φαίνονται τα μεταγράφα των οποίων η έκφραση έχει αυξηθεί και με πράσινο αυτά που έχουν μειωμένη έκφραση, σε σχέση με την κυτταρική σειρά SK-N-SH (A-C), και την KO- (D-F) η οποία χρησιμοποιείται ως control.

Εκτός από το βασικό RNA-seq που έδωσε πληροφορίες για τα διαφορικά επίπεδα των εκφραζόμενων γονιδίων, η περαιτέρω ανάλυση (KEGG, GO) αυτών των αποτελεσμάτων παρέχει πληροφορίες σχετικά με το ποιες βιολογικές διεργασίες επηρεάζονται από τα αλλαγμένα επίπεδα έκφρασης. Αυτό με τη σειρά του μας επιτρέπει να

εξερενήσουμε τις κατάλληλες βιολογικές οδούς προκειμένου να ορίσουμε τις λειτουργίες των APP, PSEN1, MAPT, SNCA ή BRI2 αντίστοιχα. Επιπλέον, μπορεί να εντοπίσουμε κοινά διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια (Differentially expressed genes, DEGs), βιολογικές οδούς και διεργασίες που μπορεί να είναι σημαντικές ή συστατικά των νευροεκφυλιστικών οδών που παρατηρούνται σε αυτές τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Πίνακας 1, Εικόνα 10).

Πίνακας 1. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων RNAseq με το πρόγραμμα Genecodis 4. Ανάλυση ως προς το βιολογικό μονοπάτι. A: APPKO, B: PSEN1KO, C: SNCAKO. Στην APPKO δεν βρέθηκαν διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια που να συμβάλλουν στατιστικά σημαντικά σε κάποιο μονοπάτι, όπως φαίνεται από το προσαρμοσμένο επίπεδο σημαντικότητας (p -value adjusted, ≤ 0.05). Στην PSEN1KO, έχει τροποποιηθεί η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με μονοπάτια ανάπτυξης του νευρικού συστήματος, ανάπτυξης του νευρικού σωλήνα και αρνητικής ρύθμισης της νευρωνικής απόπτωσης. Στην SNCAKO, έχει τροποποιηθεί η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με αποπτωτικές διαδικασίες και κυτταρική προσκόλληση.

A

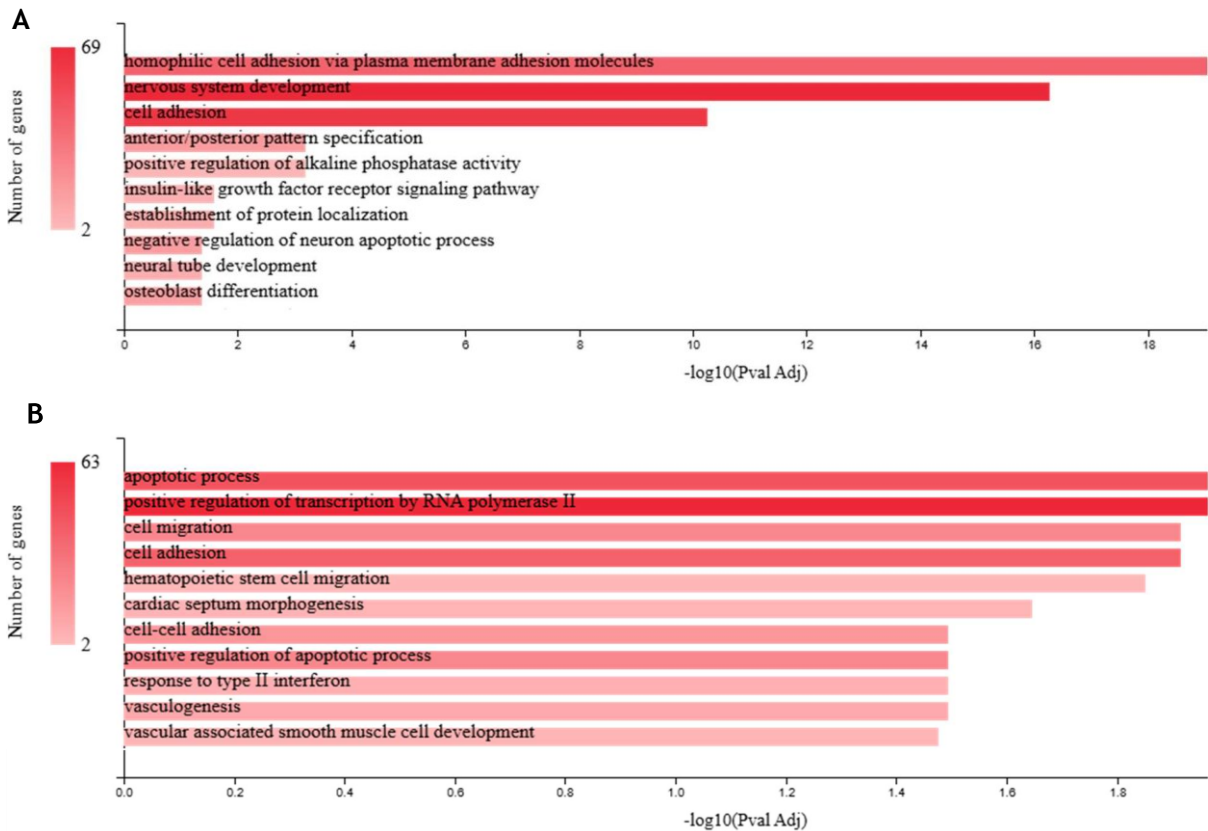
description	genes_found	input_size	term_genes	pval	pval_adj	genes
angiogenesis	14	27C	28	0.000882	0.150765	AMOTL2, EPHA2, CASP8, NR2E1, SH2D2A, TNFRSF12A, SOX18, RORA, NOS3, HOXA7, C1GALT1, PXDN, HAND1, APOLD1
embryonic heart tube morphogenesis	3	27C	5	0.000253	0.159007	YAP1, MESP1, ACVR1
positive regulation of transcription by RNA polymerase II	34	27C	121	0.000279	0.159007	MESP1, APP, CREBRF, MYB, TOX3, HOXA7, TWIST1, HOXA9, SLC40A1, USF3, SIX2, ACVR1, RNASEL, ETS1, LDB1, HAND1, PPARC
positive regulation of odontogenesis of dentin-containing tooth	2	27C	3	0.000649	0.221831	PRKCB, CSF1
plasma membrane lactate transport	2	27C	3	0.000649	0.221831	EMB, SLC16A7

B

description	genes_found	input_size	term_genes	pval	pval_adj	genes
homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecule	42	597	167	1.34E-05	3.89E-07	CDH3, PCDHGB5, PCDHA12, PCDHA11, MPZL2, PCDHGB3, PCDHA1, PCDHGC3, PCDHGA2, PCDHA3, EMB, PCDHGA11, PCDHA8, PCDHA2, PCDHGA1, PCDHGA9, PCDHGA8, NECTIN4, PCDHA7, PCDHGB1, PCDHA10, PCDHGA7, PCDHA13, PCDHGA4, PCDHGB2, PCDHAC1, PCDHGA10, CDHR1, PCDH9, PCDHGA5, PCDHGB7, PCDHA5, PCDHAC2, PCDHGC5, PCDHGA3, PCDHGA12, PCDHA6, PCDHGC4, PCDHA4, PCDHGB4, PCDHGA6, PCDHA9
nervous system development	66	597	596	3.72E-04	5.40E-01	ZNF365, PCDHGB5, PCDHA12, GAP43, PCDHA11, SPOCK1, TUBB2B, NR2E1, CRIM1, FOS, MEF2C, PCDHGB3, PCDHA1, PCDHGC3, PCDHGA2, PCDHA3, DEAF1, BEX1, PCDHGA11, PCDHA8, UNCX, PCDHA2, PCDHGA1, CAMK2B, PLXNA4, PAFAH1B3, BTBD3, LRPS, PCDHGA9, TRAPPC6B, PCDHGA8, PCDHA7, PCDHGB1, PCDHA10, JAG1, PCDHGA7, PCDHA13, PCDHGA4, PCDHGB2, PCDHAC1, PCDHGA10, ARX, EPHA7, HDAC4, SLIT2, CHRDL1, MBD5, FGF13, ARHGAP26, PCDHGA5, PCDHGB7, PCDHA5, PCDHAC2, LDB1, PCDHGC5, PCDHGA3, PCDHGA12, PCDHA6, PCDHGC4, PCDHA4, PCDHGB4, GPM6B, PCDHGA6, NGFR, FGF12, WDPCP, SCN2A, NEURL1, PCDHA9
cell adhesion	62	597	657	5.76E+01	5.57E+05	CDH3, LMLN, CCN1, PCDHGB5, ITGA2, EPHA2, PCDHA12, CCN2, PCDHA11, CNTNAP3, SPOCK1, SVEP1, ADAM23, MPZL2, COL5A1, PCDHGB3, PCDHA1, PCDHGC3, PCDHGA2, PCDHA3, EMB, PCDHGA11, PCDHA8, PCDHA2, PCDHGA1, TLN2, ITGA4, PCDHGA9, PCDHGA8, NECTIN4, PCDHA7, CLDN19, PCDHGB1, PCDHA10, PCDHGA7, SUSD5, COL6A1, PCDHA13, PCDHGA4, PCDHGB2, PCDHAC1, PCDHGA10, PTK2B, CDHR1, PCDH9, PCDHGA5, PCDHGB7, PCDHA5, PCDHAC2, LDB1, PCDHGC5, PCDHGA3, PCDHGA12, SLC23A2, PCDHA6, PCDHGC4, PCDHA4, PCDHGB4, PCDHGA6, COL14A1, NPNT, PCDHA9
positive regulation of alkaline phosphatase activity	4	597	4	1.14E+05	0.000662	MEF2C, PPARGC1B, GPLD1, NPNT
anterior/posterior pattern specification	16	597	114	9.46E+08	0.000662	HOXB5, TBX1, HOXC13, TCF15, LRPS, GLI2, RING1, WNT3A, SFRP1, HOXA7, ZBTB16, HOXA5, WNT5A, HOXA3, ARC, HOXD10
establishment of protein localization	8	597	42	5.57E+10	0.026684	ADAM11, RCC2, RAP2A, DZIP1, ELFN1, WDPCP, SMYD3, NPNT
insulin-like growth factor receptor signaling pathway	7	597	32	6.43E+10	0.026684	CRIM1, COL6A1, GHR, PLCB1, IGFBP5, IRS1, IGF2
negative regulation of neuron apoptotic process	15	597	151	0.000133	0.043516	CCND1, GBE1, MFSDB, CITED1, ARMCK5-GPRASP2, MEF2C, PCDHGC3, TOX3, SNCA, PTK2B, ISL1, BHLHB9, CRLF1, PCDHGC5, PCDHGC4
neural tube development	8	597	48	0.000150	0.043516	PLXNA2, EPHA2, GLI2, GDF7, TBC1D32, SFRP1, WNT5A, WDPCP
last differentiation	14	597	135	0.000140	0.043516	CCN1, EPHA2, MEF2C, CREB3L1, GLI2, COL6A1, WNT3A, SFRP1, TWIST1, HDAC4, IGFBP5, TP53INP2, IGF2, MAP2K6

C

description	genes_found	input_size	term_genes	pval	pval_adj	genes
positive regulation of transcription by RNA polymerase	65	524	1219	4.17E+09	0.006207	ELF3, CCN1, KLF4, PAX1, BACH1, CITED1, NR1D1, NR2E1, HEY2, RUNX1, CSRN1, NR4A1, AHR, SETD4, ZNF43, ETV5, MAF, MAML2, CDK9, NLRCS, LHX4, IRF9, EAF2, SP100, KLF10, BCL11B, SCX, GLI2, C1orf61, CSRN3, VDR, SERTAD1, JAG1, CEBPB, MYB, TOX3, MAFF, CITED2, ZNF786, ATF6B, GABPB2, SPX, MTF1, USF3, CASK, PRKD1, E2F2, RPS6KA3, ETS1, LDB1, CGA, ZNF485, HOXA13, HAND1, FOSL1, RARA, BCLAF3, NFKB1, SOX12, EGFR, AKNA, ABLIM3, PTMS
apoptotic process	45	524	745	2.27E+09	0.006207	SGK1, CCN1, EPHA2, APAF1, PRKCB, BIK, CASP8, CITED1, EMP3, PPP2R2B, GADD45B, CTSV, NR2E1, CSRN1, NR4A1, AHR, TNFRSF12A, YARS1, LHX4, TRIM35, ITPR1, EAF2, PPP1R15A, IER3, BCL11B, IFI6, TNFAIP3, GADD45A, CSRN3, NCKAP1, PRICKLE1, DDX47, TOX3, TGFBR2, BCL10, PTK2B, ERF1, EPHA7, PRKD1, GOS2, EMP1, NKX3-1, MAP2K6, EVA1A, CHAC1
cell adhesion	35	524	657	1.63E+11	0.012110	CDH3, CCN1, EPHA2, NEDD9, CCN2, CNTNAP3, AIUBA, SPOCK1, SVEP1, PLPP3, MPZL2, LAMB3, FN1, MXRA8, TNFRSF12A, COL5A1, TLN2, GPNMB, PCDH19, LAMA4, PKP3, SPON1, NECTIN4, PCDH10, LGALS3BP, PTK2B, AOC3, LAMA5, CASK, CD44, RND3, PXDN, RIPOR2, SDK1, LDB1, FAT3, AMBN, CD99, COL14A1
cell migration	25	524	291	1.26E+11	0.012110	CDH3, USP45, EPHA2, NEDD9, SORL1, CCN2, COL5A1, SYDE2, TNFAIP3, NCKAP1, PRICKLE1, PRAG1, ERF1, LAMA5, PHLDB2, RHOF, CD44, RND3, SCYL3, PIK3CD, TGFBR2, ARC, FLT1
hematopoietic stem cell migration	3	524	3	2.36E+09	0.014066	GPLD1, BCL11B, KIT
cardiac septum morphogenesis	5	524	15	4.55E+11	0.022598	HEY2, DHRS3, JAG1, CITED2, HAND1
positive regulation of apoptotic process	25	524	328	8.21E+10	0.032093	CCN1, APAF1, CASP8, GADD45B, NR4A1, TNFRSF12A, BIN1, TRIM35, ITPR1, GPLD1, GADD45A, CSRN3, DUSP6, PNMA2, SFRP1, BCL10, DCUN1D3, TXNIP, HPGD, FOSL1, MAP2K6, ADM, NEURL1
response to type II interferon	6	524	27	9.70E+10	0.032093	CXCL16, CITED1, CYP27B1, SP100, BST2, TRIM21
cell-cell adhesion	17	524	205	9.39E+09	0.032093	CDH3, CCN1, PLPP3, MPZL2, TJP2, TLN2, LRRC7, PKP3, ANXA1, PRICKLE1, LIMS2, TRIM29, CD44, FAT3, KRT18, COL14A1, EGFR
vasculogenesis	5	524	66	0.000108	0.032112	TNNS3, EPHA2, CITED1, HEY2, CITED2, TGFBR2, HOXA13, ADM, CAV1
vascular associated smooth muscle cell development	4	524	10	0.000124	0.033428	HEY2, EDNRA, EFEMP2, ADM

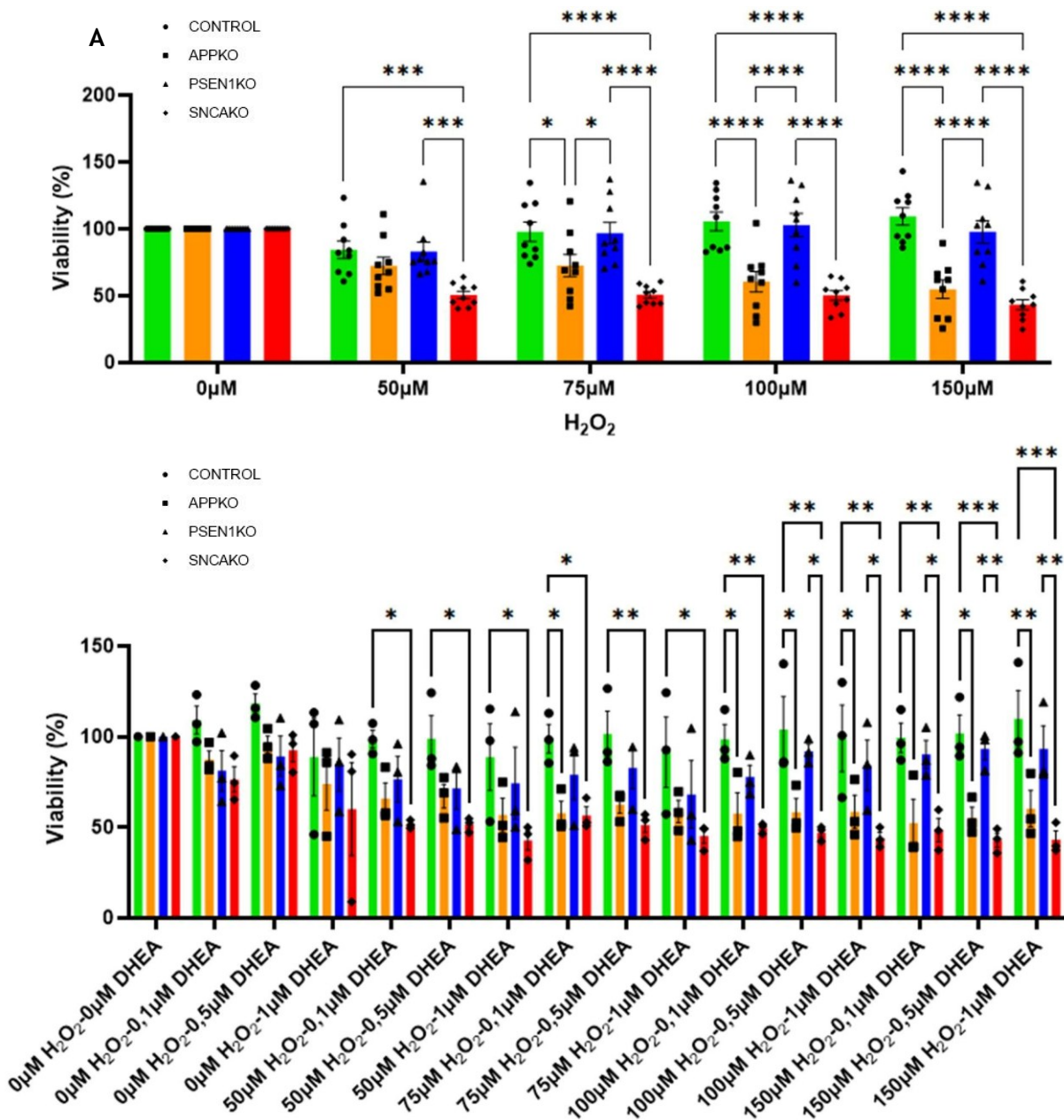


Εικόνα 10. Bar chart των ανωτέρω αποτελεσμάτων (Πίνακας 1), όπως προκύπτει από το Genecodis. A: τα μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται γονίδια διαφορετικά εκφραζόμενα στην PSEN1KO. B: τα μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται γονίδια διαφορετικά εκφραζόμενα στην SNCAKO.

Στο διάστημα 11.2024-12.2025 έγινε και επιπλέον ανάλυση των ανωτέρω αποτελεσμάτων που έδειξε ότι τα γονίδια **BEX1**, **GALNT13** και **MCTS2P** έχουν αυξημένη έκφραση στις κυτταρικές σειρές APPKO και PSEN1KO αλλά δεν αλλάζει η έκφραση τους στην σειρά SNCAKO. Το γονίδιο **HOXA7** επίσης δεν αλλάζει επίπεδα έκφρασης στην σειρά SNCAKO και έχει αυξημένη έκφραση στην σειρά PSEN1KO και μειωμένη στην APPKO. Μεταξύ των κυτταρικών σειρών APPKO και PSEN1KO ξεχωρίζουμε το γονίδιο **APP** που είναι σημαντικά μειωμένη η έκφραση στην APPKO και δεν αλλάζει στην PSEN1KO, και τα γονίδια **NUDT7** και **DMC1** των οποίων η έκφραση αυξάνεται στην APPKO και δεν αλλάζει στην PSEN1KO. Αντιθέτως, τα γονίδια **ARX**, **HOXA5** και **JAG1** είναι διαφορετικά εκφραζόμενα στην PSEN1KO αλλά όχι στην APPKO. Τέλος, τα γονίδια **SOX12**, **KLF4** και **MDK** είναι διαφορετικά εκφρασμένα μόνο στην κυτταρική σειρά SNCAKO ενώ τα γονίδια **AQP3** και **TOX3** έχουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε όλες τις κυτταρικές σειρές.

Δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας

Οι κυτταρικές σειρές KO-, APPKO, PSEN1KO και SNCAKO επίσης υποβλήθηκαν σε δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας MTT με διαφορετικές συγκεντρώσεις για 24 ώρες υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) για προσομοίωση οξειδωτικού στρες. Η δοκιμασία MTT επιτρέπει την μέτρηση του ποσοστού των ζωντανων κυττάρων που έχουν απομείνει έπειτα από επεξεργασία με χημικούς ή φυσικούς παράγοντες. Για την εξέταση της διάσωσης της βιωσιμότητας διεξάχθηκε και πείραμα προεπάσης με το νευροστεροειδές διυδροεπιανδροστερόνη (DHEA) με 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις DHEA για κάθε συγκέντρωση H₂O₂ (Εικόνα 11).

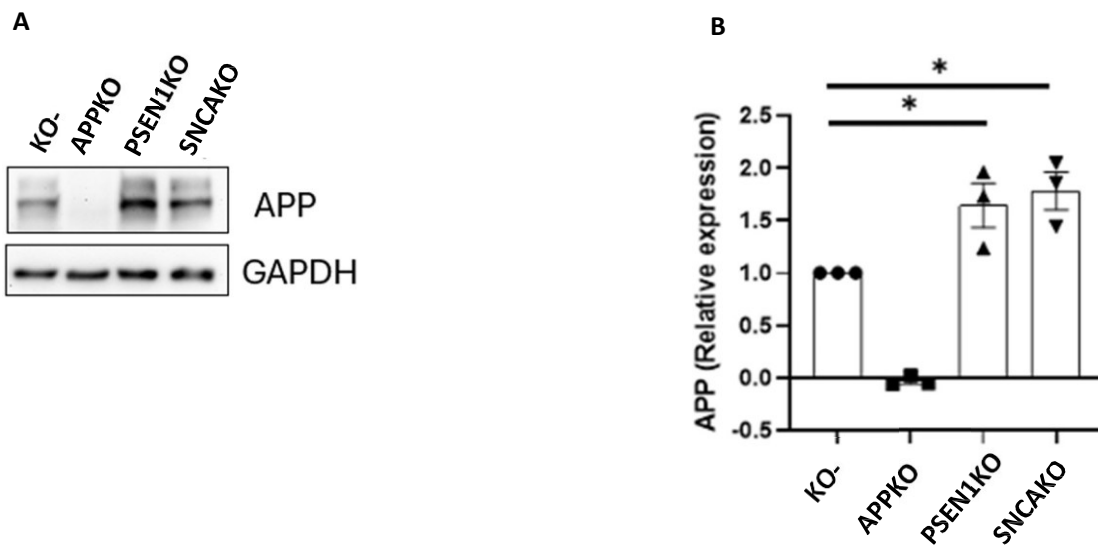


Εικόνα 11. Γραφήματα βιωσιμότητας των κυτταρικών σειρών KO-, APPKO, PSEN1KO και SNCAKO έπειτα από επώαση με **A:** 0μM, 50μM, 75μM, 100μM, 150μM H₂O₂ και **B:** προ-επώαση με 0,1μM, 0,5μM, 1μM DHEA για κάθε μια από τις προηγούμενες συγκεντρώσεις H₂O₂. Βλέπουμε ότι οι κυτταρικές σειρές APPKO και SNCAKO έχουν μειωμένη βιωσιμότητα σε όλες τις συγκεντρώσεις υπεροξειδίου, ενώ η PSEN1KO δεν φαίνεται να επηρεάζεται. Με την προ-επώαση DHEA βλέπουμε ότι δεν αλλάζει σε καμία περίπτωση η απόκριση των κυττάρων. Συνεπώς μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η απώλεια της APP και SNCA επηρεάζει μηχανισμούς υπεύθυνους για την απόκριση σε οξειδωτικό στρες και το νευροστεροειδές DHEA δεν μπορεί να διασώσει αυτή την τοξικότητα. 2-way ANOVA with multiple comparisons (Tukey's test), p-value ≤0,05

Σηματοδοτικά μονοπάτια και δείκτες απόπτωσης και οξειδωτικού στρες

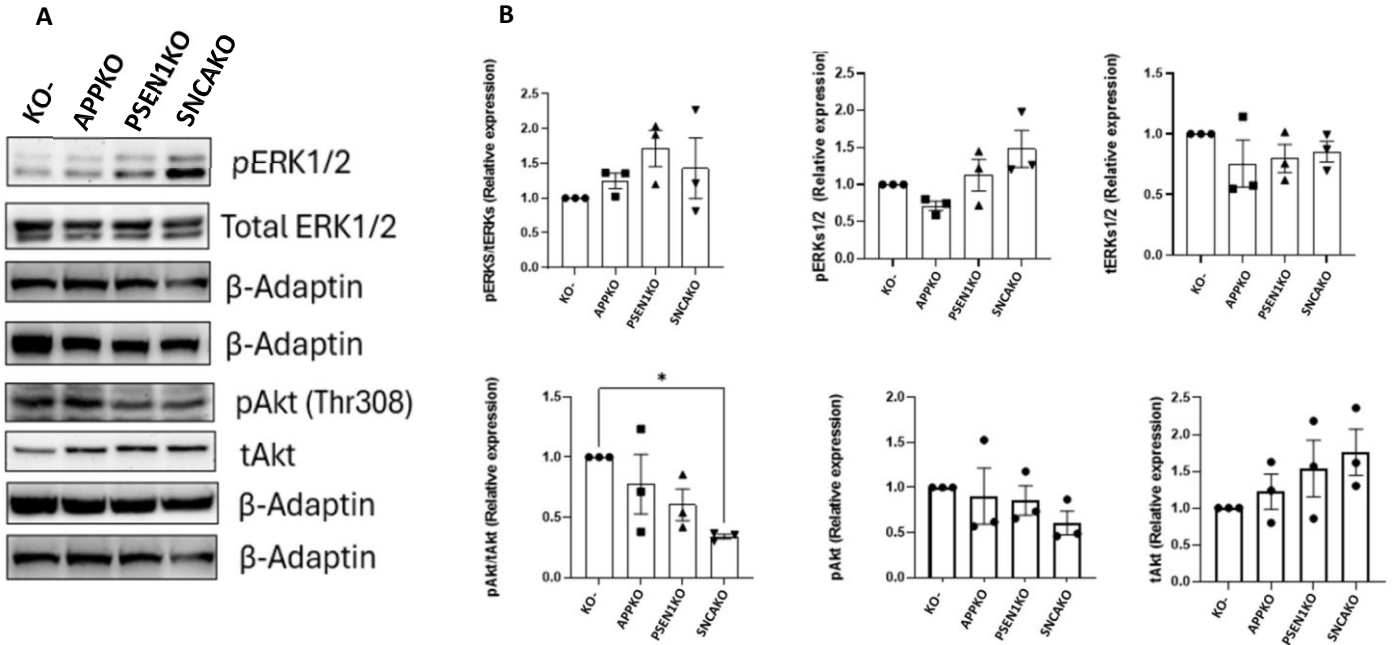
Η δοκιμασία MTT μας επέτρεψε να επιλέξουμε την συγκέντρωση H₂O₂ (40μM) που είναι κατάλληλη για πειράματα μέτρησης επιπέδου πρωτεϊνών και με αυτή έγιναν οι δοκιμασίες ανοσοστυπώματος κατά Western. Ελέχθησαν τα επίπεδα των πρωτεϊνών CREB, pCREB, pERK, Bax, LC3β και pJNK. Δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των πρωτεϊνών αυτών μεταξύ των κυτταρικών σειρών.

Επίπεδα των βασικών πρωτεϊνών που απαλοίφθηκαν



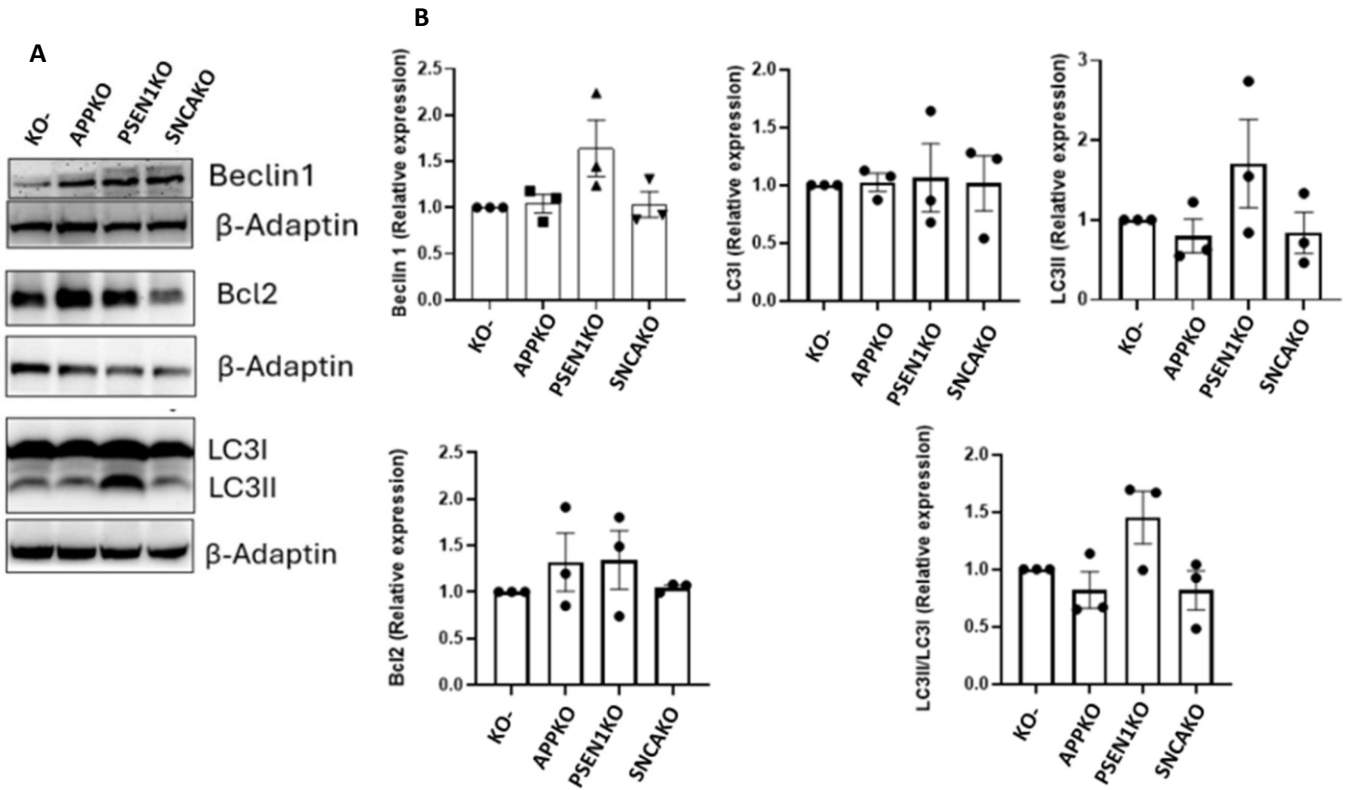
Εικόνα 12. Επίπεδα πρωτεΐνης APP στις 4 κυτταρικές σειρές. **A:** Ανοσοστύπωμα κατά Western με αντίσωμα κατά της APP, σε συνδυασμό με το βασικό γονίδιο GAPDH για κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. **B:** Διάγραμμα επιπέδων της πρωτεΐνης APP (όπως προκύπτει από πυκνομέτρηση των bands στο A). Φαίνεται ότι η ποσότητα της πρωτεΐνης APP είναι σημαντικά αυξημένη στις κυτταρικές σειρές PSEN1KO και SNCAKO. Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας p-value ≤0,05.

Επίπεδα πρωτεϊνών σηματοδοτικών μονοπατιών



Εικόνα 13. Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνών σηματοδοτικών μονοπατιών στις 4 κυτταρικές σειρές. Α: Ανοσοσύτρωμα κατά Western με αντισώματα κατά των ERK1/2 και Akt και των φωσφορυλιωμένων μορφών τους, σε συνδυασμό με το βασικό γονίδιο β-ανταπίνη για κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Β: Διάγραμμα επιπέδων των πρωτεϊνών (όπως προκύπτει από πυκνομέτρηση των bands στο Α. Φαίνεται ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι των ERKs δεν έχει επηρεαστεί ενώ μόνο στην κυτταρική σειρά SNCAKO έχει μειωθεί η αναλογία της φωσφορυλιωμένης Akt σε σχέση με την ολική. Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας p -value $\leq 0,05$.

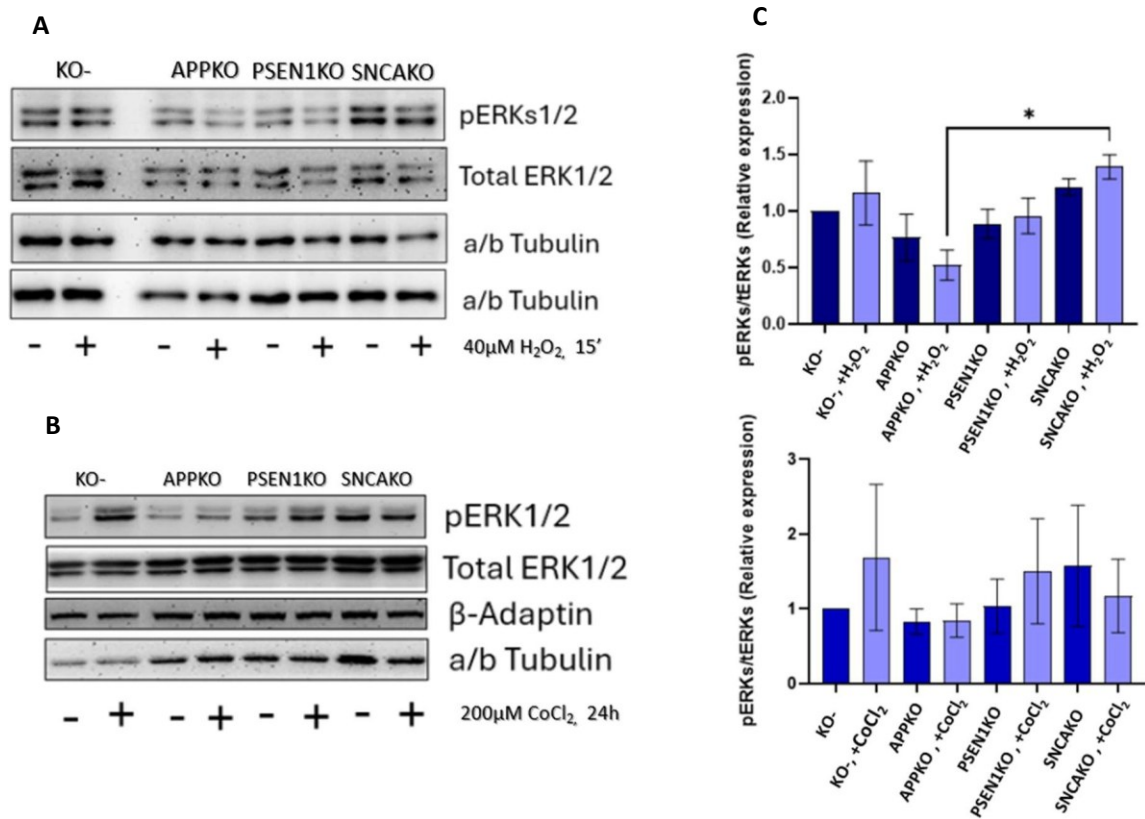
Επίπεδα πρωτεϊνών αυτοφαγίας και απόπτωσης



Εικόνα 14. Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνών αυτοφαγίας και απόπτωσης στις 4 κυτταρικές σειρές. Α: Ανοσοσύτρωμα κατά Western με αντισώματα κατά των Beclin1, Bcl2, LC3I/II, σε συνδυασμό με το βασικό γονίδιο β-ανταπτίνη για κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Β: Διάγραμμα επιπέδων των πρωτεϊνών (όπως προκύπτει από πυκνομέτρηση των bands στο Α. Τα μονοπάτια της αυτοφαγίας και απόπτωσης δεν έχουν επηρεαστεί. Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας p -value $\leq 0,05$.

Επίπεδα πρωτεϊνών σηματοδοτικών μονοπατιών σε οξειδωτικό στρες και υποξία

Τα κύτταρα υποβάλλονται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες με την χορήγηση τους υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2 , 40Μμ, όπως προσδιορίστηκε από τις δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας) και σε συνθήκες χημικής υποξίας, που κατορθώνεται με τη χορήγηση $CoCl_2$.



Εικόνα 15. Προσδιορισμός επιπέδων πρωτεϊνών του σηματοδοτικού μονοπατιού ERK σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και υποξίας στις 4 κυτταρικές σειρές. A, B: Ανοσοσύτρωμα κατά Western με αντισώματα κατά των ERK1/2 και των φωσφορυλιωμένων μορφών τους, σε συνδυασμό με τα βασικά γονίδια β-ανταπτίνη και α/β τουμπουλίνη για κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. C: Διάγραμμα επιπέδων του λόγου των πρωτεϊνών (φωσφορυλιωμένη προς ολική) (όπως προκύπτει από πυκνομέτρηση των bands στο A και B). Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά αλλά βλέπουμε μια τάση της APPKO να ανταποκρίνεται με μειωμένη φωσφορυλίωση και στις δυο συνθήκες στρες, η PSEN1KO με αυξημένη φωσφορυλίωση και η SNCAKO έχει διαφορετική απόκριση στις 2 συνθήκες. Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας p -value $\leq 0,05$.

Μεταβολομική ανάλυση κυτταρικών σειρών knockout για γονίδια σχετιζόμενων με την νόσο του Alzheimer

Ευγενία Καζολιά, Δήμητρα Μπενάκη, Εμμανουήλ Μικρός

Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Εισαγωγή

Η μεταβολομική παρέχει μια αντιπροσωπευτική εικόνα της λειτουργίας ενός βιολογικού συστήματος (κύτταρο, ιστός, οργανισμός) προσφέροντας πολύτιμες πληροφορίες για μοριακούς μηχανισμούς που σχετίζονται με διαταραχές που προκαλούνται από το περιβάλλον ή ως απάντηση σε παθολογικές καταστάσεις όπως η Alzheimer's Disease.

Η ερευνητική ομάδα του καθηγητή Σπύρου Ευθυμιόπουλου, στο Τμήμα Βιολογίας, της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δημιουργήθηκαν κυτταρικά στελέχη knockout (KO) στα οποία αποσιωπήθηκαν γονίδια που διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην παθογένεια της νόσου AD. Συγκεκριμένα αποσιωπήθηκαν τα ακόλουθα: α) της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (Amyloid Precursor Protein Knock Out, APPKO), το οποίο εμπλέκεται άμεσα στον σχηματισμό των αμυλοειδικών πλακών, β) το γονίδιο της πρωτεΐνης πρεσενιλίνης 1 (Presenilin-1 Knock Out, PSEN1KO), που συμμετέχει στη λειτουργία της γ-σεκρετάσης και επηρεάζει την παραγωγή αμυλοειδών πεπτιδίων· καθώς και γ) το γονίδιο της α-συνουκλείνης (Synuclein Alpha Knock Out, SNCAKO), το οποίο στοχεύτηκε για να διακριθούν τα φαινόμενα γενικευμένου νευροεκφυλισμού από εκείνα που σχετίζονται ειδικά με τη νόσο του Alzheimer.

Στόχος της μελέτης είναι να χαρακτηρισθεί και να μελετηθεί το μεταβολικό αποτύπωμα των ανωτέρω σειρών για την ανάδειξη πιθανών ενδοκυτταρικών δεικτών, σχετικών με την παθολογία της νόσου. Η καταγραφή του μεταβολικού αποτυπώματος των πολικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με μονοδιάστατα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού υψηλής ανάλυσης (¹H-Nuclear Magnetic Resonance, ¹H-NMR) η οποία αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τις μεταβολομικές μελέτες προσφέροντας υψηλή επαναληψιμότητα και λεπτομερή αποτύπωση του κυτταρικού μεταβολισμού. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα αναλύθηκαν με μονοπαραμετρικές και πολυπαραμετρικές στατιστικές μεθόδους συγκρίνοντας τα δείγματα των κυτταρικών σειρών APPKO, PSEN1KO και SNCAKO συγκρίνοντας με ομάδα ελέγχου με ανέπαφο γονιδίωμα (KO-).

Παράλληλα διερευνήθηκε η επίδραση των αυξανόμενων κύκλων χειρισμών, ή «περασμάτων», στο μεταβολικό προφίλ των κυττάρων, ώστε να εντοπιστούν αλλοιώσεις που ενδέχεται να οφείλονται στην πειραματική διαδικασία και όχι στην απουσία των επιλεγμένων γονιδίων.

Μεθοδολογία

1. Συλλογή δειγμάτων

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινης προέλευσης κύτταρα νευροβλαστώματος, της σειράς SK-N-SH, που χρησιμοποιείται ως μοντέλο για διάφορες νευροπαθολογίες. Στη γονεϊκή σειρά SK-N-SH έγινε γενετική τροποποίηση, μέσω της διαδικασίας διαμόλυνσης κυττάρων (transfection) και δημιουργήθηκαν τρεις σειρές knockout (KO), εκ των οποίων δύο με στόχευση γονιδίων ειδικά σχετιζόμενων με τη νόσο Alzheimer, και συγκεκριμένα της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APPKO), της πρωτεΐνης πρεσενιλίνης 1 (PSEN1KO), και μία

με στόχευση του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης (SNCAKO), το οποίο σχετίζεται γενικά με νευροεκφυλισμό. Τα ευρήματα συγκρίθηκαν με μια ομάδα ελέγχου που υπεβλήθη στην ίδια επεξεργασία αλλά διατήρησε όλα τα γονίδια ανέπαφα (KO-). Συλλέχθηκαν έξι επαναλήψεις κυτταροκαλλιέργειών από κάθε μία από τις τέσσερις σειρές KO για την εξαγωγή στατιστικών αποτελεσμάτων.

Η εργασία πραγματοποιήθηκε με τη συνδρομή της υποψήφιας διδάκτορος του Τμήματος Βιολογίας, Κλυταιμνήστρας Γιαννάκη.

2. Εκχύλιση δειγμάτων κυτταρικών σειρών

Για τη συλλογή των κυττάρων τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε πάγο, αφαιρέθηκε με αναρρόφηση το θρεπτικό υλικό και έγινε δύο φορές έκπλυση με διάλυμα φωσφορικών, θερμοκρασίας 4 °C PBS. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν μηχανικά και μεταφέρθηκαν σε περιέκτη τύπου Falcon. Ακολούθησε φυγοκέντρηση 4 min, απόχυση του υπερκειμένου και φύλαξη του κυτταρικού ιζήματος στους -80 °C μέχρι την διαδικασία της εκχύλισης. Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο εκχύλισης με τρεις διαλύτες (μεθανόλη-νερό-χλωροφόρμιο), που εφαρμόζεται ευρέως, τόσο σε μελέτες κυτταρικού, όσο και ιστοικού μεταβολομικού προφίλ.

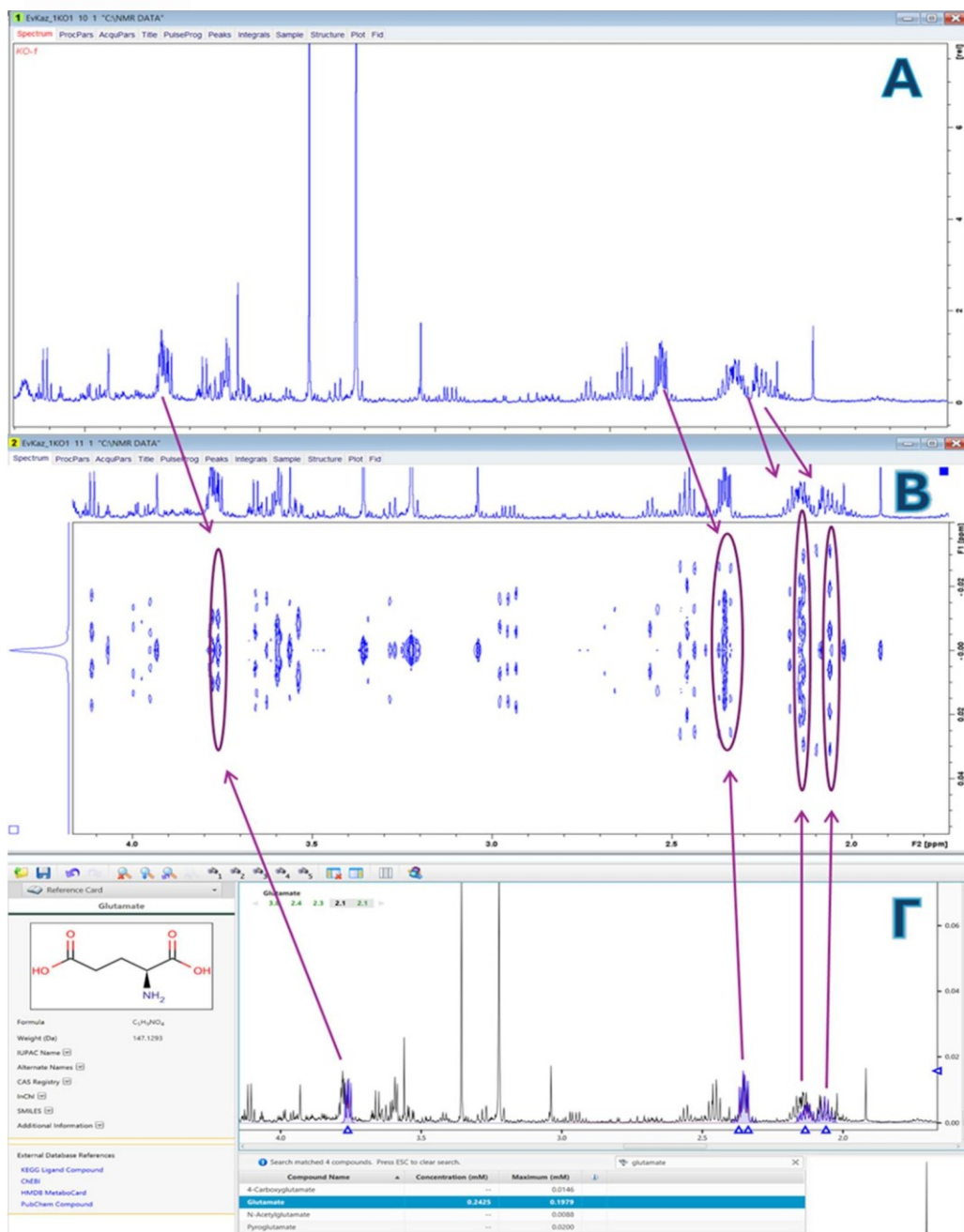
1. Στο κάθε δείγμα κυτταρικού ιζήματος προστέθηκαν 2 mL παγωμένη μεθανόλη και 2 mL παγωμένου χλωροφορμίου (αναλογία μεθανόλης/χλωροφορμίου 1:1, -20 °C)
2. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 5 λεπτά σε χαμηλή θερμοκρασία.
3. Προστέθηκαν 1.8 mL παγωμένου (4 °C) υπερκάθαρου νερού.
4. Ακολούθησε στροβιλομετρική ανακίνηση (vortex) για 1 λεπτό ώστε να δημιουργηθεί ομοιογενές γαλάκτωμα.
5. Τα δείγματα παρέμειναν σε πάγο για 15 λεπτά (διευκολύνει το διαχωρισμό των δύο φάσεων).
6. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 18.900 × g, για 20 min, στους 4 °C.
7. Η πολική φάση συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε καθαρό περιέκτη τύπου Eppendorf (epf) και φυλάχθηκε στους 4 °C μέχρι να ολοκληρωθεί ο δεύτερος κύκλος εκχύλισης (βήμα 8).
8. Επαναλήφθηκε η διαδικασία εκχύλισης (πρόσθεση μεθανόλης/ χλωροφορμίου/ νερού, σε αναλογία 2:2:1.8, αντίστοιχα και συνεχίστηκε από το βήμα 4).
9. Η πολική φάση από την δεύτερη εκχύλιση ενώθηκε με το κλάσμα της πρώτης εκχύλισης.
10. Οι διαλύτες των εκχυλισμάτων εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε φυγοκεντρική κενού και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C, μέχρι την παρασκευή των δειγμάτων NMR.

3. Παρασκευή δειγμάτων NMR

Τα ξηρά εκχυλίσματα ανασυντίθενται σε 10% ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.4 και 90% D2O (συνολικός όγκος κάθε δείγματος 650 μL). Με τη χρήση πιπέτας ακριβείας, μεταφέρονται 550 μL του υπερκειμένου σε επισημασμένο σωλήνα NMR από χαλαζία, διαμέτρου 5 mm.

4. Λήψη φασμάτων NMR

Τα φάσματα ελήφθησαν 1H 1D NMR σε φασματομέτρο AVANCE III 600 MHz (Bruker, Germany), με τη βοήθεια του προγράμματος αυτοματισμού Icon NMR (Bruker BioSpin, Germany). Για κάθε δείγμα ελήφθησαν φάσματα υψηλής ανάλυσης 1H NMR 1D NOESY (160 σαρώσεις και ανάλυση 64k, **Εικ. 1A**), καθώς και για δείγματα ελέγχου (τυφλά) για το ρυθμιστικό διάλυμα για την παρασκευή δειγμάτων NMR και για τους διαλύτες των εκχυλίσεων.



Εικόνα 1: Χαρακτηριστικό φάσμα υψηλής ανάλυσης ^1H NMR 1D NOESY στο περιβάλλον του προγράμματος Torrsrin (A) και το αντίστοιχο ψευδο-δισδιάστατο φάσμα J-resolved της ίδιας φασματικής περιοχής (1.5-4.5 ppm) (B). Στο φάσμα J-resolved η πολλαπλότητα των κορυφών προβάλλεται στον κάθετο άξονα, επιτυγχάνοντας την απλοποίηση της πληροφορίας στον άξονα των χημικών μετατοπίσεων, αναγκαία για την ταυτοποίηση των κορυφών συντονισμού των μεταβολιτών ιδιαίτερα σε φασματικές περιοχές αλληλεπικάλυψης. (Γ) Στο περιβάλλον του προγράμματος Chenomx, με μαύρο προβάλλεται η περιοχή 1.5-4.5 ppm του ίδιου φάσματος και με μπλε το φάσμα του γλουταμικού οξέος που περιέχεται στη βιβλιοθήκη του προγράμματος. Η παρουσία ή όχι ενός μεταβολίτη στο φάσμα του υπό εξέταση δείγματος βασίζεται στη σύγκριση των χαρακτηριστικών του συνόλου των κορυφών (χημική μετατόπιση, πολλαπλότητα, εύρος και ένταση κορυφών).

Επίσης, για κάθε δείγμα λήφθηκε ψευδο-δισδιάστατο φάσμα J-resolved, στο οποίο επιτυγχάνεται διαχωρισμός της πληροφορίας της χημικής μετατόπισης και της ομοπυρηνικής σύζευξης J, ώστε να διευκολύνεται η αναγνώριση των κορυφών συντονισμού σε φασματικές περιοχές υψηλής αλληλεπικάλυψης. Στον οριζόντιο άξονα (F2) απεικονίζεται η χημική μετατόπιση, ενώ στον κατακόρυφο άξονα (F1) αναπαρίσταται η σύζευξη J (Εικ. 1B). Για επιλεγμένο δείγμα και συγκεκριμένα για το δείγμα KO-1, ελήφθη φάσμα τύπου TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) που αποτελεί μια δισδιάστατη απεικόνιση φάσματος NMR (2D NMR) η οποία βασίζεται στις συζεύξεις J για τον προσδιορισμό διαφορετικών συστημάτων spin. Στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται η διαδικασία ταυτοποίησης του γλουταμικού οξέος και τα προγράμματα που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία.

5. Επεξεργασία φασμάτων NMR και ταυτοποίηση μεταβολιτών

Η επεξεργασία περιλαμβάνει την ευθυγράμμιση με βάση το εσωτερικό πρότυπο το (Trimethylsilylpropanoic acid (TSP)). Η φασματική πληροφορία μετασχηματίζεται σε αριθμητική με την διαδικασία bucketing. Συγκεκριμένα τα φάσματα χωρίζονται σε διαστήματα (buckets) πλάτους 0.001 ppm και υπολογίζεται το εμβαδόν κάθε διαστήματος. Η φασματική πληροφορία από το πείραμα μετασχηματίστηκε σε αριθμητικό πίνακα Excel με 8121 μεταβλητές για το φάσμα κάθε δείγματος. Αφαιρέθηκε η περιοχή ~4.7–5.0 ppm (υπόλειμμα της κορυφής του νερού). Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Chemomx και οι βάσεις δεδομένων HMDB και BMRB.

Η κανονικοποίηση των δεδομένων έγινε ως προς τη συνολική ένταση του φάσματος. Στα δεδομένα εφαρμόστηκαν δύο τύποι κλιμάκωσης κατά την στατιστική ανάλυση η κλιμάκωση UV (Unit Variance ή Autoscaling) και η κλιμάκωση Pareto.

6. Στατιστική Ανάλυση

6.1 Μονοπαραμετρική ανάλυση

Η μονοπαραμετρική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα GraphPad Prism (Univariate analysis). Τα επίπεδα των εξεταζόμενων μεταβολιτών συγκρίθηκαν μεταξύ των τεσσάρων κυτταρικών ομάδων με τη χρήση one-way ANOVA ή του μη παραμετρικού ελέγχου Kruskal-Wallis, ανάλογα με την κατανομή των τιμών του κάθε μεταβολίτη (σε κανονικές και μη-κανονικές κατανομές αντίστοιχα, τιμή $p < 0.05$). Η μέση τιμή, τα διαστήματα εμπιστοσύνης και οι στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις παρουσιάζονται με την μορφή διαγραμμάτων σμήνους (jitter plots). Σε περιπτώσεις στατιστικά σημαντικού συνολικού αποτελέσματος, πραγματοποιήθηκαν post hoc πολλαπλές συγκρίσεις, οι οποίες κατέδειξαν ότι ορισμένοι μεταβολίτες διαφοροποιούνταν ειδικά σε συγκεκριμένα knock-out μοντέλα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, καθώς και μεταξύ διαφορετικών knock-out ομάδων, υποδηλώνοντας γονιδιο-ειδικές μεταβολικές επιδράσεις.

Για τους μεταβολίτες που παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση καμπυλών ROC (Receiver Operating Characteristic) για να αξιολογηθεί η δυνατότητα διάκρισης των 2 συγκρινόμενων κυτταρικών ομάδων. Η ανάλυση ROC πραγματοποιήθηκε σε ζεύγη συγκρίσεων, επιτρέποντας την εκτίμηση της διακριτικής απόδοσης κάθε μεταβολίτη σε σχέση με τη γενετική τροποποίηση.

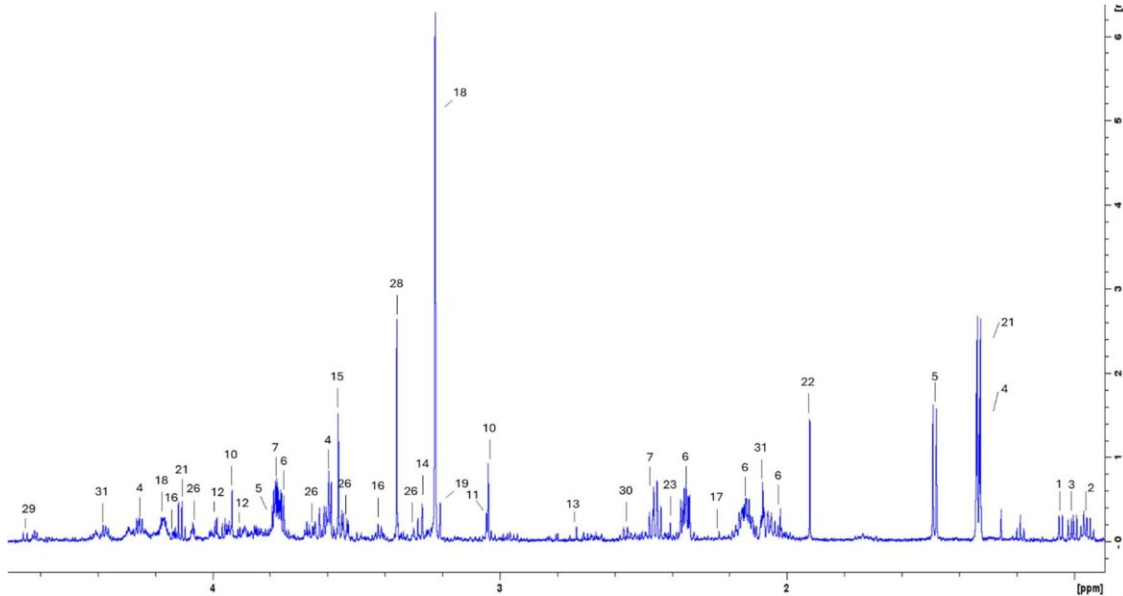
6.2 Πολυπαραμετρική ανάλυση

Η πολυπαραμετρική ανάλυση πραγματοποιείται μέσω του λογισμικού SIMCA - Multivariate Data Analysis Software. Πραγματοποιήθηκαν μη-επιβλεπόμενες αναλύσεις Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) και επιβλεπόμενες: όπως η Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) και η Ορθογώνια PLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA). Επιπλέον, εφαρμόστηκε ο Έλεγχος Τυχαίων Μεταθέσεων (Permutations test) για την επικύρωση των μοντέλων.

Αποτελέσματα

1. Φάσματα NMR-Ταυτοποίηση μεταβολιτών

Τα φάσματα ^1H 1D NMR των έξι αντιγράφων για τις κυτταρικές σειρές **APPKO**, **PSEN1KO**, **SNCAKO** και τη σειρά ελέγχου **KO**- ελήφθησαν σε φασματόμετρο AVANCE III 600 MHz (Bruker, Germany). Αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H 1D NMR με τους μεταβολίτες που έχουν αναγνωριστεί παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2**. Οι μεταβολίτες που αναγνωρίστηκαν στο σύνολο των δειγμάτων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**.



Εικόνα 2: Αλειφατική περιοχή (4.90-1.40 ppm) αντιπροσωπευτικού φάσματος ^1H 1D NMR (δείγμα KO-1) πολικών εκχυλισμάτων της κυτταρικής σειράς SK-N-SH. Η αρίθμηση που χρησιμοποιείται στην απόδοση των μεταβολιτών παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Ταυτοποιημένοι μεταβολίτες σε πολικά εκχυλίσματα τροποποιημένων κυτταρικών σειρών νευροβλαστώματος, SK-N-SH.

α/α	Μεταβολίτης	Χημική μετατόπιση δ (ppm) - Πολλαπλότητα
Αμινοξέα και παράγωγα		
1	Valine	1.04(d), 0.99(d)
2	Isoleucine	1.01(d), 0.94(t)
3	Leucine	0.97(d), 0.95(d)
4	Threonine	1.33(d), 4.25(m)
5	Alanine	1.48(d), 3.78(q)

6	Glutamate	2.35(m), 2.14(m), 2.06(m)
7	Glutamine	2.43(m), 2.13(m)
8	N-acetyl-ornithine	2.02(s)
9	Aspartate	2.81(dd), 2.68(q)
10	Creatine	3.93(s), 3.04(s)
11	Creatine phosphate	3.06(s)
12	Serine	3.99(dd), 3.97(dd), 3.84(m)
13	Sarcosine (N-methylglycine)	2.73(s), 3.60(s)
14	Betaine (N,N,N-trimethylglycine)	3.27(s)
15	Glycine	3.56(s)
16	Proline	4.13(dd), 3.40(m), 2.05(m), 2.00(m)
17	Glutathione	2.93(q), 2.95(q), 2.49(m), 2.17(q), 2.16(m)
Κετονοσώματα		
18	acetone	2.23(s)
Χολίνες		
19	O-phosphocholine	4.17(m), 3.59(m), 3.22(s)
20	Choline	4.10(m), 3.52 (m), 3.20(s)
Οργανικά οξέα		
21	3-Hydroxy-isovalerate	1.25(s)
22	Lactate	1.32(d), 4.11(q)
23	Acetate	1.91(s)
24	Succinate	2.40(s)
25	Formate	8.46(s)

26	Pyruvate	2.37(s)
Πολυόλες		
27	Myo-inositol	4.06(t), 3.61(t), 3.53(dd), 3.28(t)
28	Ethanol	1.18(t)
29	Methanol	3.35(s)
Υδρογονάνθρακες		
30	Glucose	5.23(d), 4.65(d), 3.89(dd), 3.53(dd), 3.49(t), 3.25(dd)
Νουκλεοτίδια και παράγωγα		
31	UDP-N-Acetylglucosamine (UDP-GlcNAc)	7.94(d), 5.98(d), 5.94(d), 2.08(s)
32	UDPs	7.95(d), 5.97(d), 4.38(dd), 4.37(dd), 4.36(dd), 4.36(dd), 3.90(m)
33	IMP(hypoxanthine)	8.46(s), 8.27(s), 6.15(d)

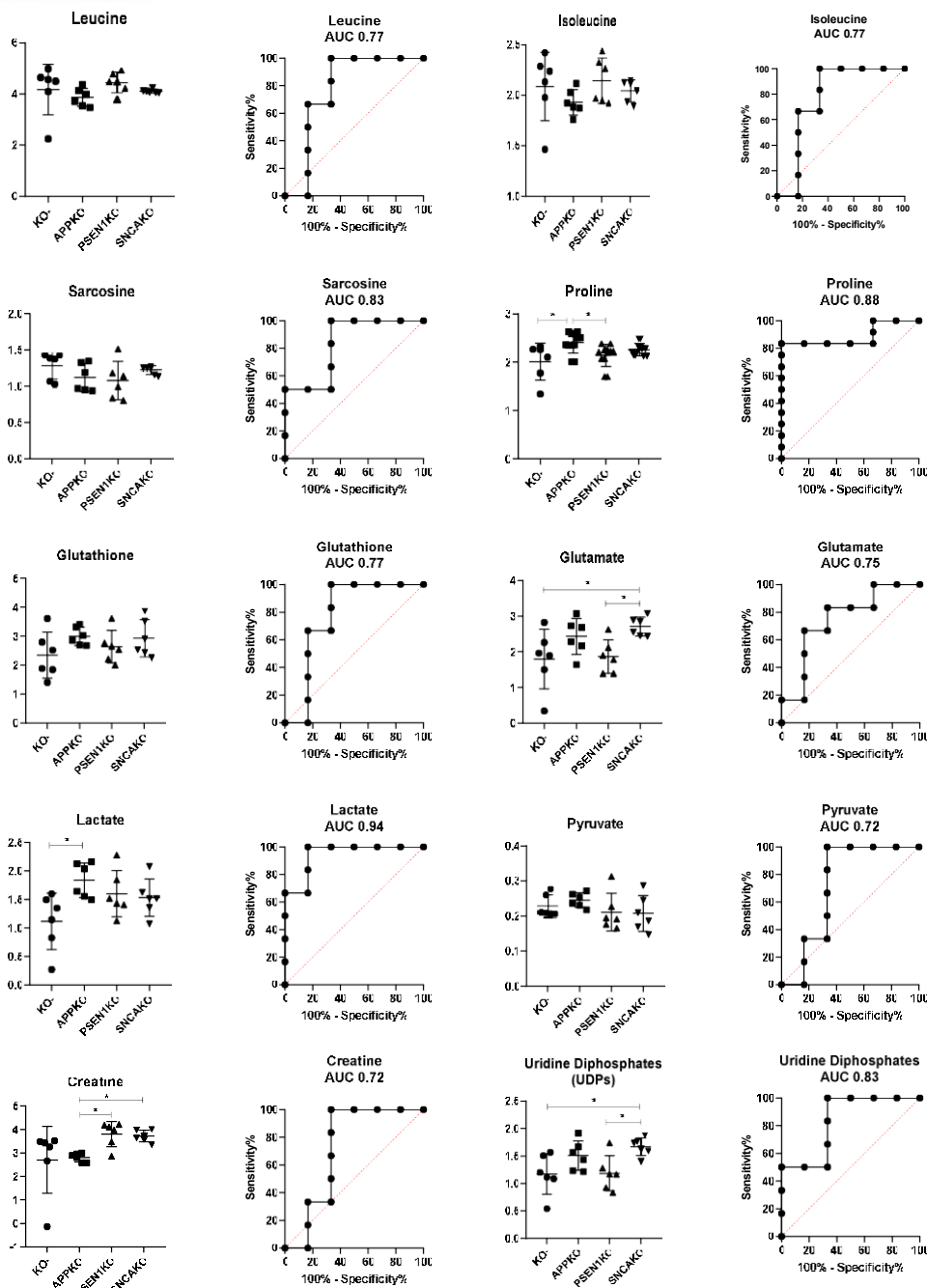
s: singlet, μονή κορυφή, d: doublet, διπλή κορυφή, dd: double of doublet, διπλή διπλών, m: multiplet, πολλαπλή κορυφή

2 Στατιστική επεξεργασία

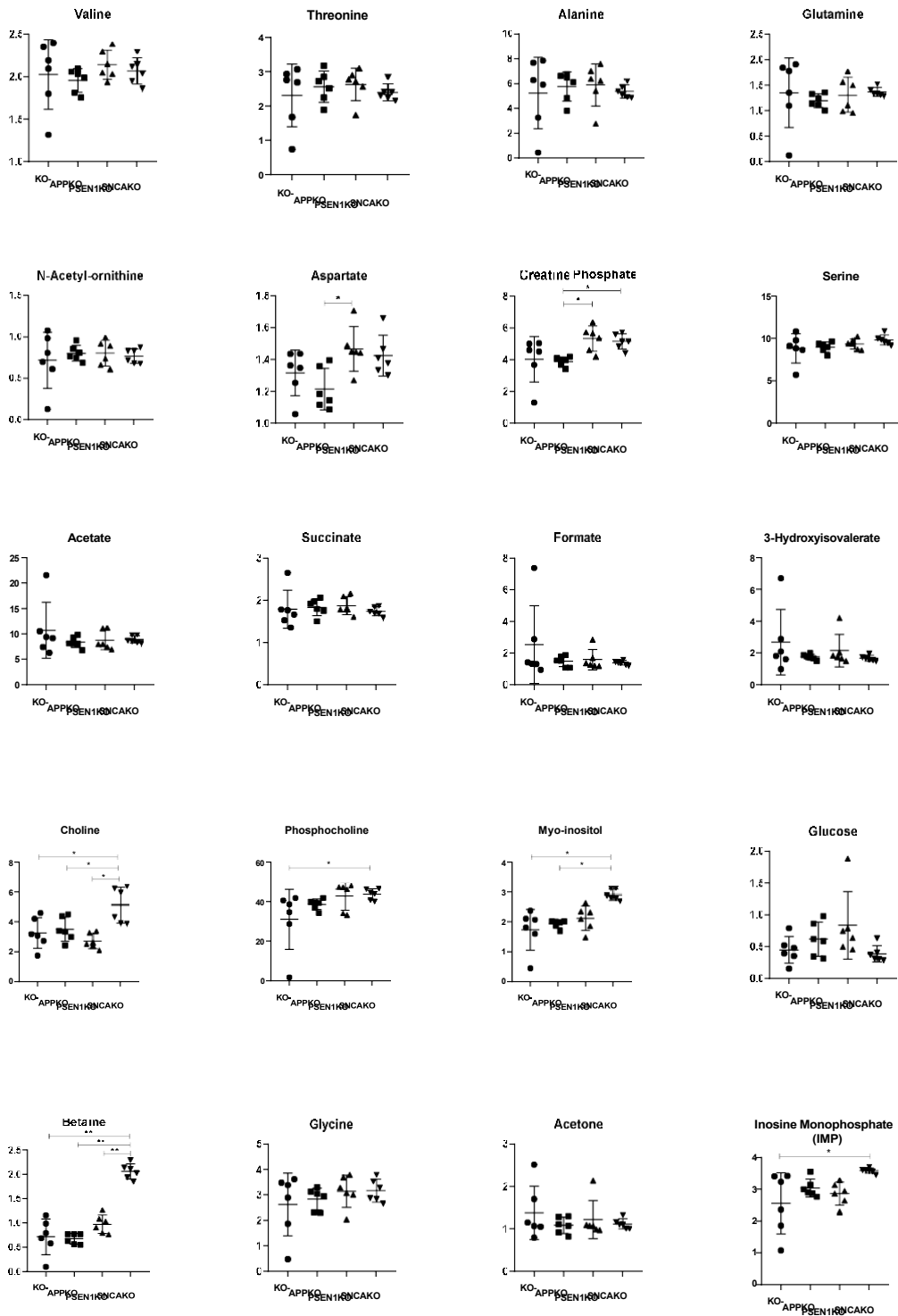
2.1 Μονοπαραμετρική ανάλυση

2.1.1 Μονοπαραμετρική ανάλυση για σύγκριση επιπέδων πολικών μεταβολιτών μεταξύ των τεσσάρων τροποποιημένων κυτταρικών σειρών, KO-, APPKO, PSEN1KO, SNCAKO

Για την στατιστική ανάλυση των μεταβολιτών που αναγνωρίστηκαν στις τέσσερις ομάδες δειγμάτων (KO-, APPKO, PSEN1KO, SNCAKO) χρησιμοποιήθηκε η μονοπαραμετρική στατιστική ανάλυση στην οποία κάθε μεταβολίτης εξετάζεται μεμονωμένα. Στην **Εικόνα 3** παρουσιάζονται οι τιμές της σχετικής συγκέντρωσης στις ομάδες KO-, APPKO, PSEN1KO, SNCAKO των μεταβολιτών με τιμή AUC>0.7 για το ζεύγος APPKO - KO-, ενώ στην **Εικόνα 4** παρουσιάζονται οι τιμές της σχετικής συγκέντρωσης των μεταβολιτών με τιμές 0.5<AUC< 0.7 για το ζεύγος APPKO - KO-. Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζονται οι τιμές AUC >0.7 των τριών τροποποιημένων κυτταρικών σειρών σε σύγκριση με την σειρά ελέγχου.



Εικόνα 3: Διαγράμματα με τις σχετικές συγκεντρώσεις των ταυτοποιημένων μεταβολιτών στις τροποποιημένες κυτταρικές σειρές APPKO, PSEN1KO, SNCAKO και στην σειρά ελέγχου KO-, στις οποίες έχει σημειωθεί η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση. Επίσης, παρουσιάζονται οι καμπύλες ROC και η αντίστοιχη τιμή AUC, για το ζεύγος APPKO-KO- με τιμή AUC>0.7. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές φαίνονται με γραμμές που τις συνδέουν (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$).



Εικόνα 4: Διαγράμματα με τις σχετικές συγκεντρώσεις () των ταυτοποιημένων μεταβολιτών στις τροποποιημένες κυτταρικές σειρές APPKO, PSEN1KO, SNCACO και στην σειρά ελέγχου KO-, με $0.5 < AUC < 0.7$ για το ζεύγος APPKO - KO-. Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση σημειώνονται σχηματικά σε κάθε ομάδα. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές φαίνονται με γραμμές που τις συνδέουν (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$)

Πίνακας 2: Τιμές AUC>0.7 των πολικών μεταβολιτών στις κυτταρικές σειρές APPKO, PSEN1KO, SNC AKO σε σχέση με την σειρά ελέγχου (KO-).

<i>Metabolites</i>	<i>AUC /APPKO</i>	<i>KO-</i>	<i>AUC KO-/PSEN1KO</i>	<i>AUC KO-/SNCAKO</i>
<i>Leucine</i>	0.78	-	-	-
<i>Isoleucine</i>	0.78	-	-	-
<i>Sarcosine</i>	0.83	-	0.72	-
<i>Proline</i>	0.89	-	-	-
<i>Glutathione</i>	0.78	-	-	-
<i>Glutamate</i>	0.75	-	-	0.92
<i>Lactate</i>	0.94	-	-	0.78
<i>Pyruvate</i>	0.72	-	0.72	-
<i>Creatine</i>	0.72	-	0.83	-
<i>Creatine phosphate</i>	-	-	0.81	0.83
<i>UDPs</i>	0.83	-	-	0.94
<i>Aspartate</i>	0.89	-	-	-
<i>Choline</i>	-	-	-	0.86
<i>Phosphocholine</i>	-	-	0.78	0.91
<i>Myo-inositol</i>	-	-	-	1
<i>Glucose</i>	-	-	0.78	-
<i>Betaine</i>	-	-	0.75	1
<i>IMP</i>	-	-	-	1

Στην μονοπαραμετρική ανάλυση των δεδομένων ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ακόλουθες παρατηρήσεις:

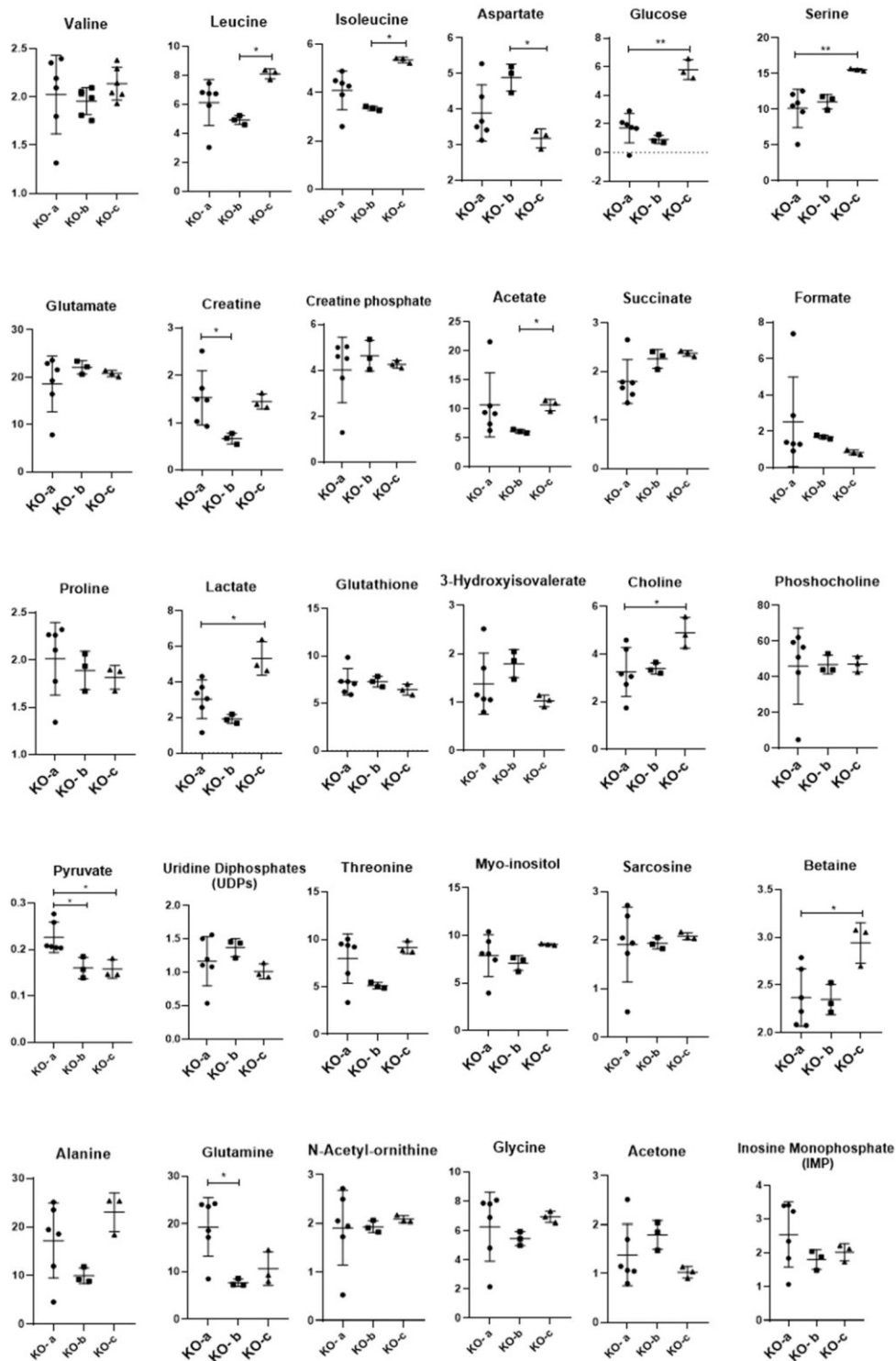
Η αποσιώπηση του γονιδίου της συνουκλειΐνης A οδηγεί στην στατιστικά σημαντική αύξηση της χολίνης, της μυο-ινοσιτόλης, και της βηταιίνης σε σχέση με όλες τις άλλες κυτταρικές σειρές. Το γλουταμικό οξύ, καθώς και τα διφωσφορικά παράγωγα της ουριδίνης αυξάνονται σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την PSEN1KO.

- Η αποσιώπηση του γονιδίου της πρόδρομης πρωτεΐνης του β-αμυλοειδούς οδηγεί στην στατιστικά σημαντική αύξηση του γαλακτικού οξέος και της προλίνης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η κρεατίνη και η φωσφοκρεατίνη αυξάνονται σημαντικά σε σχέση με τις τροποποιημένες κυτταρικές

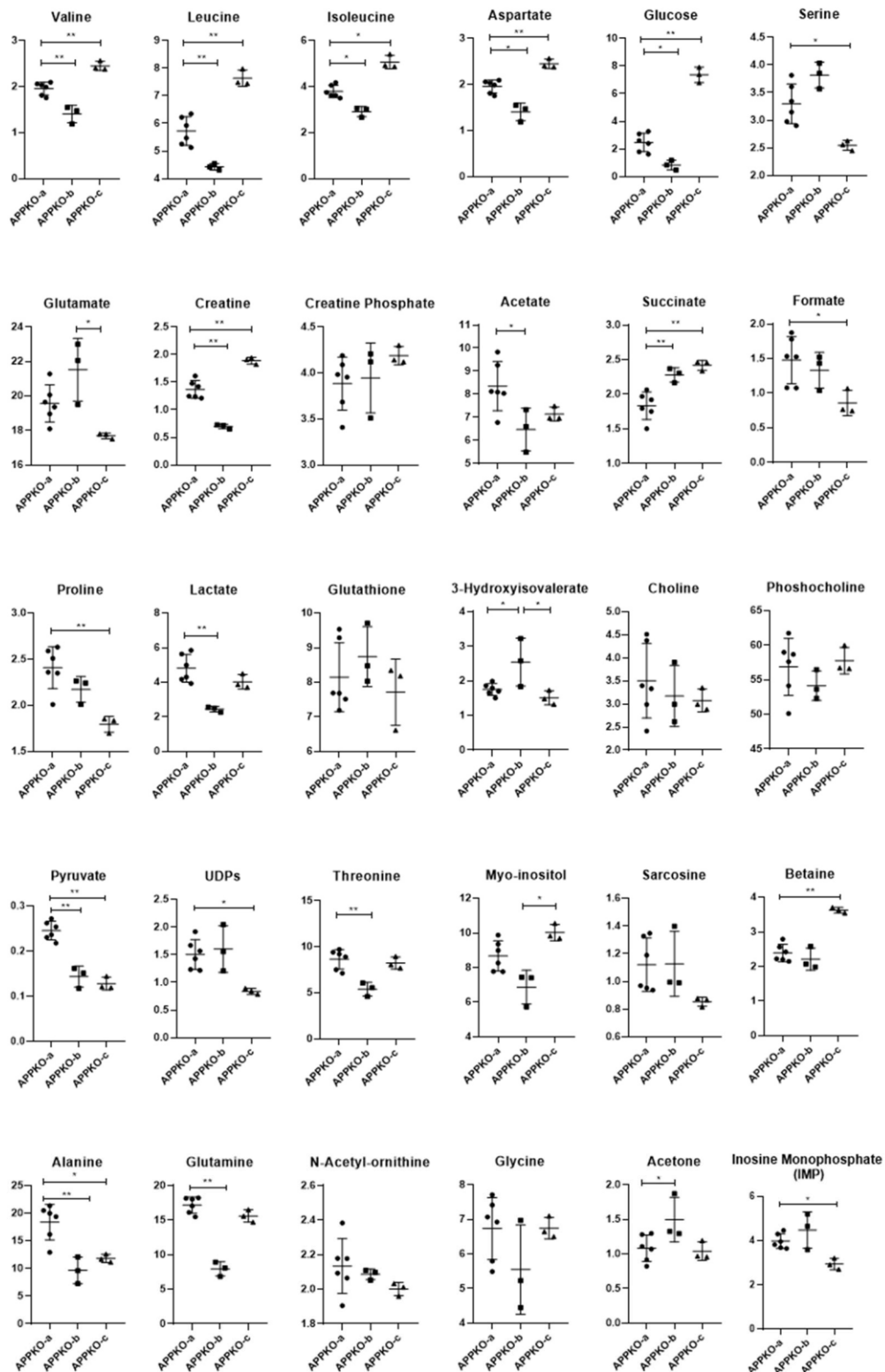
σειρές PSEN1KO και SNCAKO. Στατιστικά σημαντική μείωση παρουσιάζει η κρετίνη και η φωσφοκρεατίνη σε σχέση με τις τροποποιημένες σειρές, ενώ τα Β-διακλαδισμένα αμινοξέα (λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη) παρουσιάζουν μία τάση για μείωση σε σχέση με όλες τις άλλες κυτταρικές σειρές.

2.1.2 Μονοπαραμετρική ανάλυση για την αξιολόγηση της επίδρασης του αριθμού των «περασμάτων» στο μεταβολικό αποτύπωμα των τροποποιημένων κυτταρικών σειρών και της σειράς ελέγχου

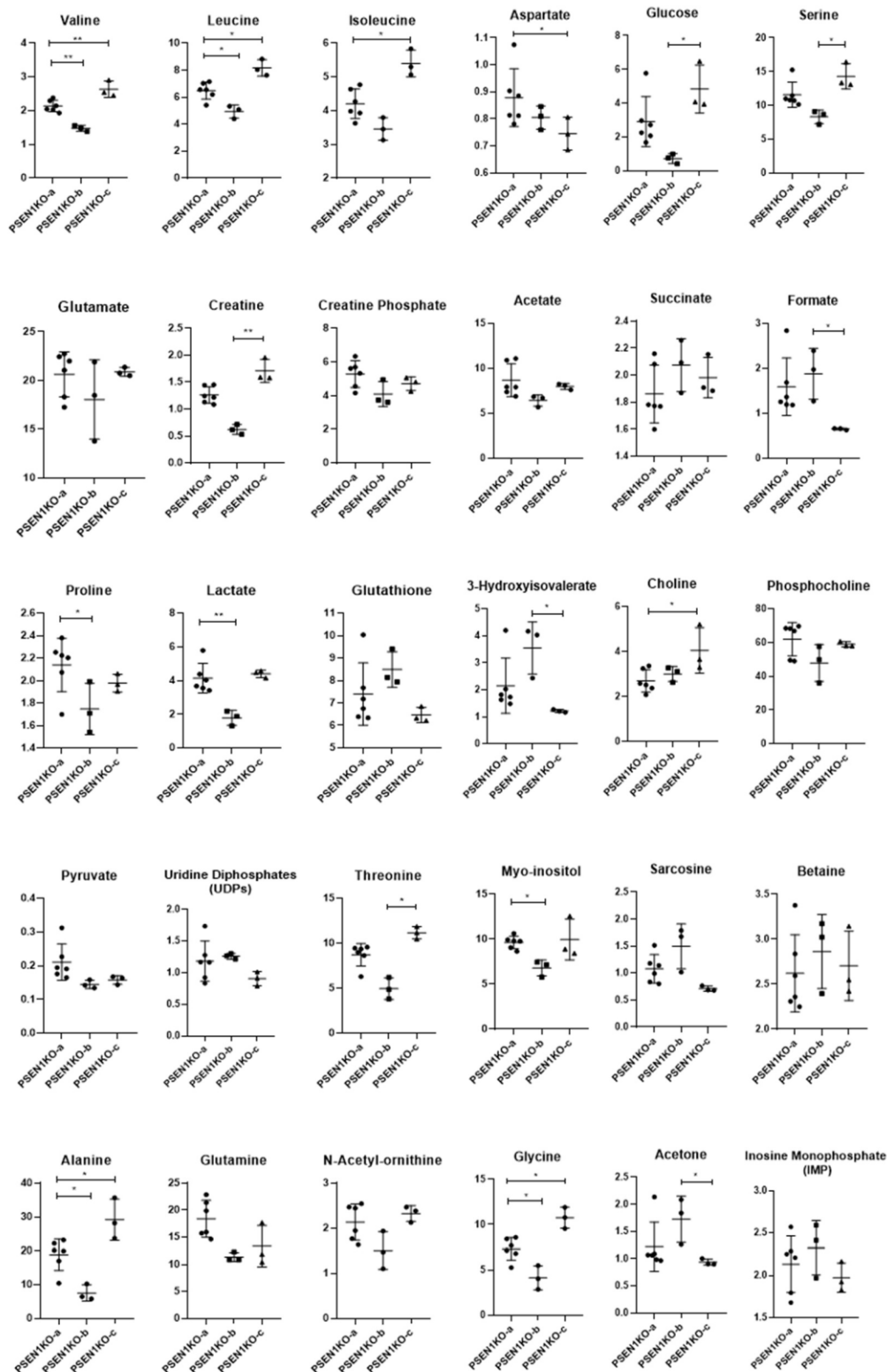
Στις μελέτες που πραγματοποιούνται σε κυτταρικές σειρές πολύ συχνά χρησιμοποιούνται και συγκρίνονται μεταξύ τους δείγματα, τα οποία έχουν υποβληθεί σε διαφορετικό αριθμό κύκλων παγώματος – ξεπαγώματος («περάσματα»). Οι κυτταρικές σειρές μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετική ανθεκτικότητα και ομοιότητα στους χειρισμούς, γεγονός που πιθανότατα αποτυπώνεται στο μεταβολισμό. Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί ένα ευαίσθητο εργαλείο για την ολιστική αποτύπωση του μεταβολώματος και είναι σκόπιμο να πραγματοποιηθεί αυτός ο έλεγχος στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές, τόσο τις τροποποιημένες, όσο και την σειρά ελέγχου. Στην **Εικόνα 5** παρουσιάζονται σε διάγραμμα η σχετική συγκέντρωση, η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των μεταβολιτών στην σειρά ελέγχου ΚΟ- σε τρία διαφορετικά περάσματα (a, b και c). Στο πέραςμα a χρησιμοποιήθηκαν έξι αντίγραφα, στα οποία πραγματοποιήθηκε η μεταβολομική ανάλυση, ενώ στο πέραςμα b και c χρησιμοποιήθηκαν τρία αντίγραφα. Στις **Εικόνες 6, 7 και 8** παρουσιάζεται η μεταβολή της σχετικής συγκέντρωσης των μεταβολιτών των τροποποιημένων κυτταρικών σειρών APPKO, PSEN1KO και SNCAKO, αντίστοιχα.



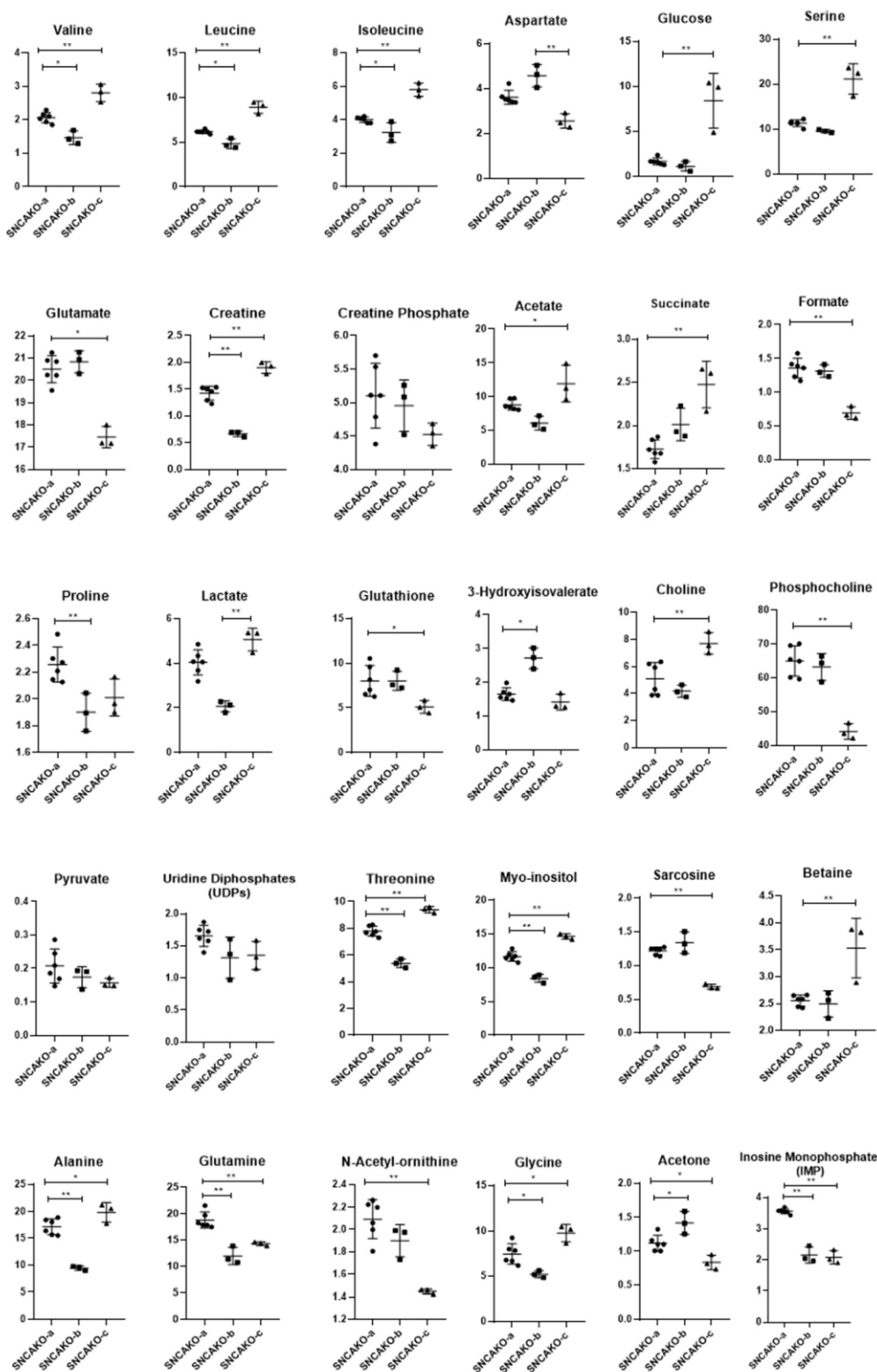
Εικόνα 5: Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της σχετικής συγκέντρωσης των μεταβολιτών στην σειρά ελέγχου KO- σε τρία διαφορετικά περάσματα (a: έξι αντιγραφα, b: τρία αντιγραφα και c: τρία αντιγραφα). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα διαφορετικά περάσματα φαίνονται με γραμμές που τις συνδέουν (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$).



Εικόνα C: Ή μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της σχετικής συγκέντρωσης των μεταβολιτών στην τροποποιημένη σειρά APPKO σε τρία διαφορετικά περάσματα (a: έξι αντίγραφα, b: τρία αντίγραφα και c: τρία αντίγραφα). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα διαφορετικά περάσματα φαίνονται με γραμμές που τις συνδέουν (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$).



Εικόνα 7: Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της σχετικής συγκέντρωσης των μεταβολιτών στην τροποποιημένη σειρά **PSEN1KO** σε τρία διαφορετικά περάσματα (a: έξι αντίγραφα, b: τρία αντίγραφα και c: τρία αντίγραφα). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα διαφορετικά περάσματα φαίνονται με γραμμές που τις συνδέουν (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$).



Εικόνα 8: Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της σχετικής συγκέντρωσης των μεταβολιτών στην τροποποιημένη σειρά SNC-AKO σε τρία διαφορετικά περάσματα (a: έξι αντίγραφα, b: τρία αντίγραφα και c: τρία αντίγραφα). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές στα διαφορετικά περάσματα φαίνονται με γραμμές που τις συνδέουν (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$).

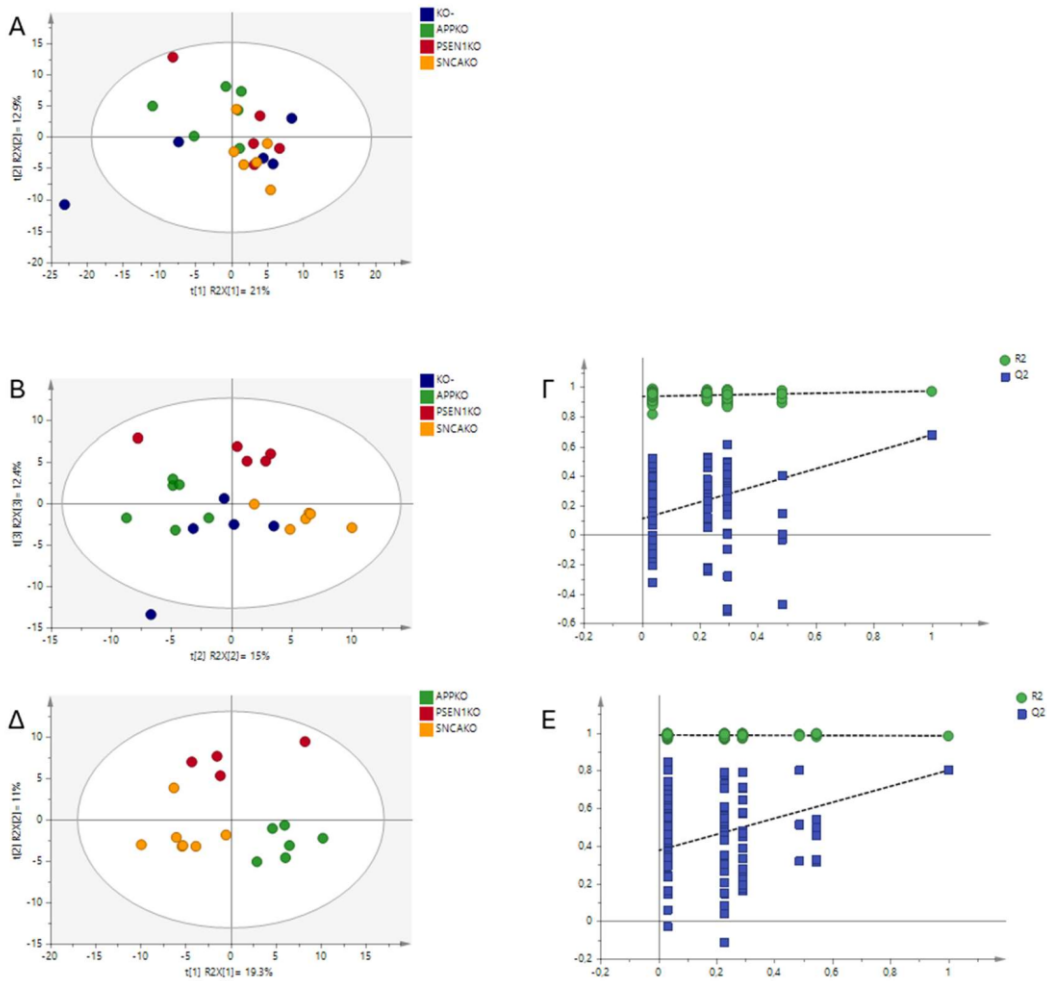
Η διερεύνηση της επίδρασης των διαφορετικών περασμάτων στο μεταβολικό αποτύπωμα των τροποποιημένων κυτταρικών σειρών και τη σειράς ελέγχου οδηγεί σε αποτελέσματα που παρουσιάζουν ενδιαφέρον και συνοψίζονται στα ακόλουθα:

- Η σειρά ελέγχου ΚΟ- παρουσιάζει τις λιγότερες στατιστικά σημαντικές μεταβολές, παρατήρηση που πιθανότατα σχετίζεται με υψηλότερη μεταβολική σταθερότητα και ανθεκτικότητα σε σχέση με τις τροποποιημένες. Μία γενική παρατήρηση αφορά την διασπορά των μετρήσεων η οποία για τους περισσότερους μεταβολίτες είναι υψηλότερη στο πέρασμα a, γεγονός όμως που μπορεί αν συνδέεται και με τον μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων (a: 6, ενώ b: 3 και c: 3).
- Στην τροποποιημένη σειρά APPKO, οι περισσότεροι μεταβολίτες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές και μόνο οι χολίνες, η γλουταθειόνη, η φωσφορική κρεατίνη και η σαρκοζίνη δεν επηρεάζονται από τα διαφορετικά περάσματα. Ειδικότερα, στο πέρασμα b, σε σύνολο 30 μεταβολιτών παρατηρείται μειωμένη συγκέντρωση στους 15, στους 12 εκ των οποίων η μεταβολή είναι στατιστικά σημαντική. Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει κάποιο πρόβλημα στην ανάπτυξη των κυττάρων στο πέρασμα b, το οποίο δεν είναι χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης σειράς, αλλά πιθανότατα να συνδέεται με κάποιο λάθος χειρισμό.
- Στην τροποποιημένη σειρά PSEN1KO μικρός αριθμός μεταβολιτών παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές μεταβολές και αφορά κυρίως αμινοξέα. Συγκεκριμένα, τα β διακλαδισμένα αμινοξέα (λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη), η αλανίνη και η γλυκίνη παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μείωση στο πέρασμα b και στατιστικά σημαντική αύξηση στο πέρασμα c σε σχέση με το πέρασμα a.
- Η τροποποιημένη σειρά SNCAKO παρουσιάζει σχετικά ασταθές μεταβολικό αποτύπωμα μεταξύ των διαφορετικών περασμάτων. Στατιστικά σημαντικές μεταβολές παρατηρούνται για τους περισσότερους μεταβολίτες με εξαίρεση στη φωσφορική κρεατίνη, τα διφωσφορικά παράγωγα της ουριδίνης και το πυροσταφυλικό οξύ.

2.2 Πολυπαραμετρική ανάλυση

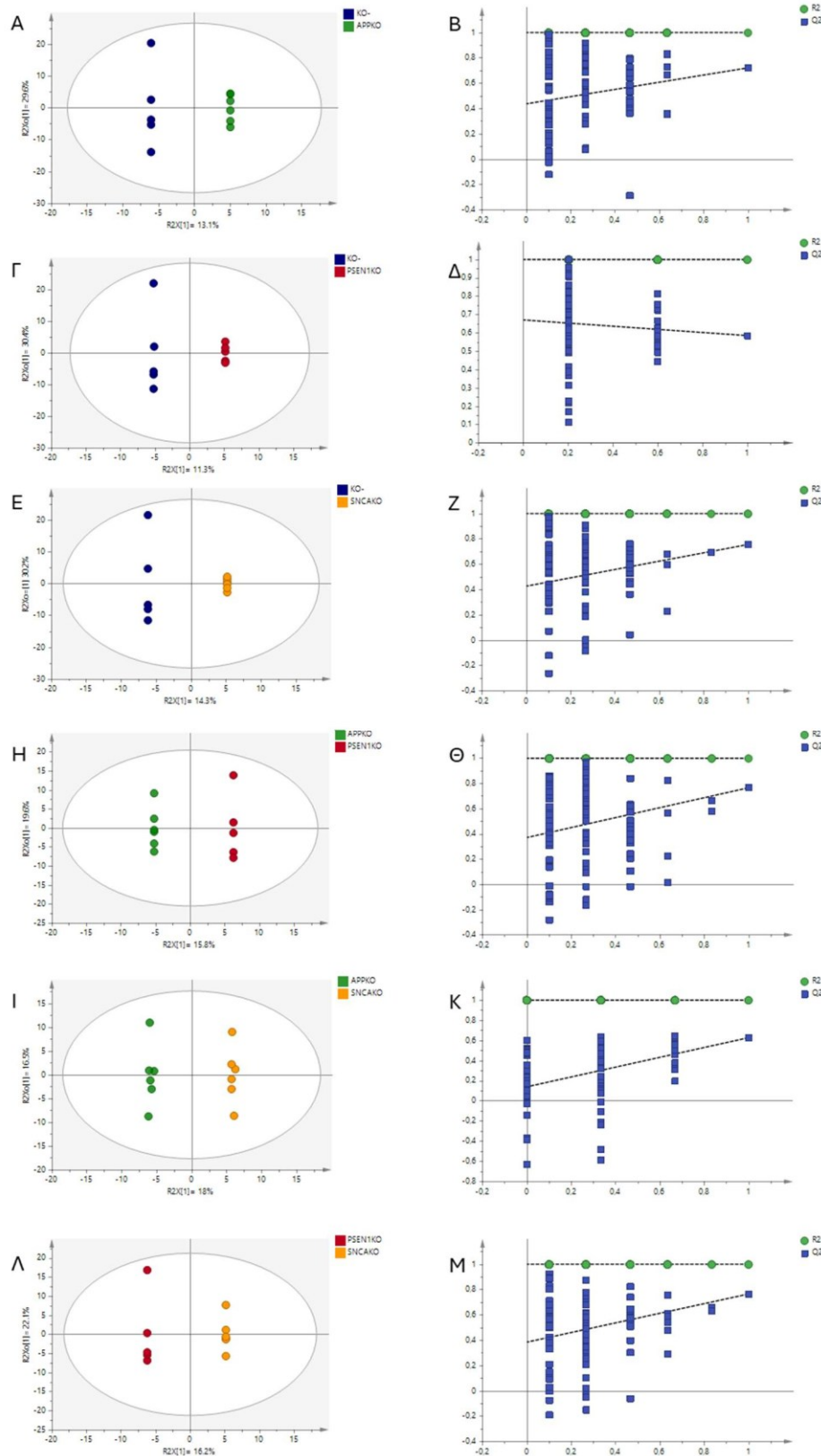
Η πολυπαραμετρική ανάλυση των δεδομένων NMR πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SIMCA - Multivariate Data Analysis Software. Στην πολυπαραμετρική ανάλυση, κάθε δείγμα «περιγράφεται» από 8121 μεταβλητές (8121 φασματικές περιοχές ολοκλήρωσης).

Το διάγραμμα αντικειμένων του μοντέλου που προκύπτει από την μη επιβλεπόμενη ανάλυση PCA του συνόλου των δειγμάτων παρουσιάζεται στην **Εικόνα GA**. Τα δείγματα της σειράς SNCAKO παρουσιάζουν την υψηλότερη ομαδοποίηση, σε αντίθεση με τα δείγματα της σειράς ελέγχου χαρακτηρίζονται από υψηλή διασπορά. Μεγαλύτερη διαφοροποίηση εμφανίζουν τα δείγματα APPKO, τα οποία διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα ως προς την πρώτη κύρια συνιστώσα. Το μοντέλο παρουσιάζει σχετικά καλή περιγραφική δυνατότητα, αλλά περιορισμένη προβλεπτική ($R^2_{cum}=0.43$, $Q^2_{cum}=0.12$). Στην **Εικόνα GB** παρουσιάζεται το διάγραμμα των αντικειμένων της επιβλεπόμενης ανάλυσης PLS-DA και των τεσσάρων ομάδων και στην **Γ** ο έλεγχος αξιοπιστίας του μοντέλου μέσω 100 τυχαίων μεταθέσεων. Το μοντέλο που προκύπτει από την επιβλεπόμενη ανάλυση παρουσιάζει υψηλή διαχωριστική και προβλεπτική ικανότητα ($R^2_{cum}=0.98$ και $Q^2_{cum}=0.73$, αντίστοιχα). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ελέγχου 100 τυχαίων μεταθέσεων, το μοντέλο εμφανίζει χαρακτηριστικά υπερπροσαρμογής. Το πρόβλημα της υπερπροσαρμογής είναι αναμενόμενο στις περιπτώσεις μεγάλου αριθμού δεδομένων (φασματικά δεδομένα υψηλής ανάλυσης) και μικρού αριθμού δειγμάτων, όπως είναι και στην παρούσα περίπτωση. Σύμφωνα με το διάγραμμα αντικειμένων τη σημαντικότερη διαφορά στο μεταβολικό προφίλ παρουσιάζουν τα δείγματα των ομάδων APPKO και SNCAKO, τα οποία διατάσσονται αντιδιαμετρικά στο διάγραμμα αντικειμένων, με τα δείγματα της σειράς ελέγχου να τοποθετούνται μεταξύ τους. Τα δείγματα PSEN1KO παρουσιάζουν διαφοροποίηση και ως προς τις τρεις άλλες ομάδες, όπως φαίνεται με την σχετική τους θέση ως προς τον κάθετο άξονα στο διάγραμμα αντικειμένων (**Εικ. GB**). Αυτή η σχέση επιβεβαιώνεται και από την επιβλεπόμενη ανάλυση των τριών τροποποιημένων ομάδων (**Εικ. G[^]**).

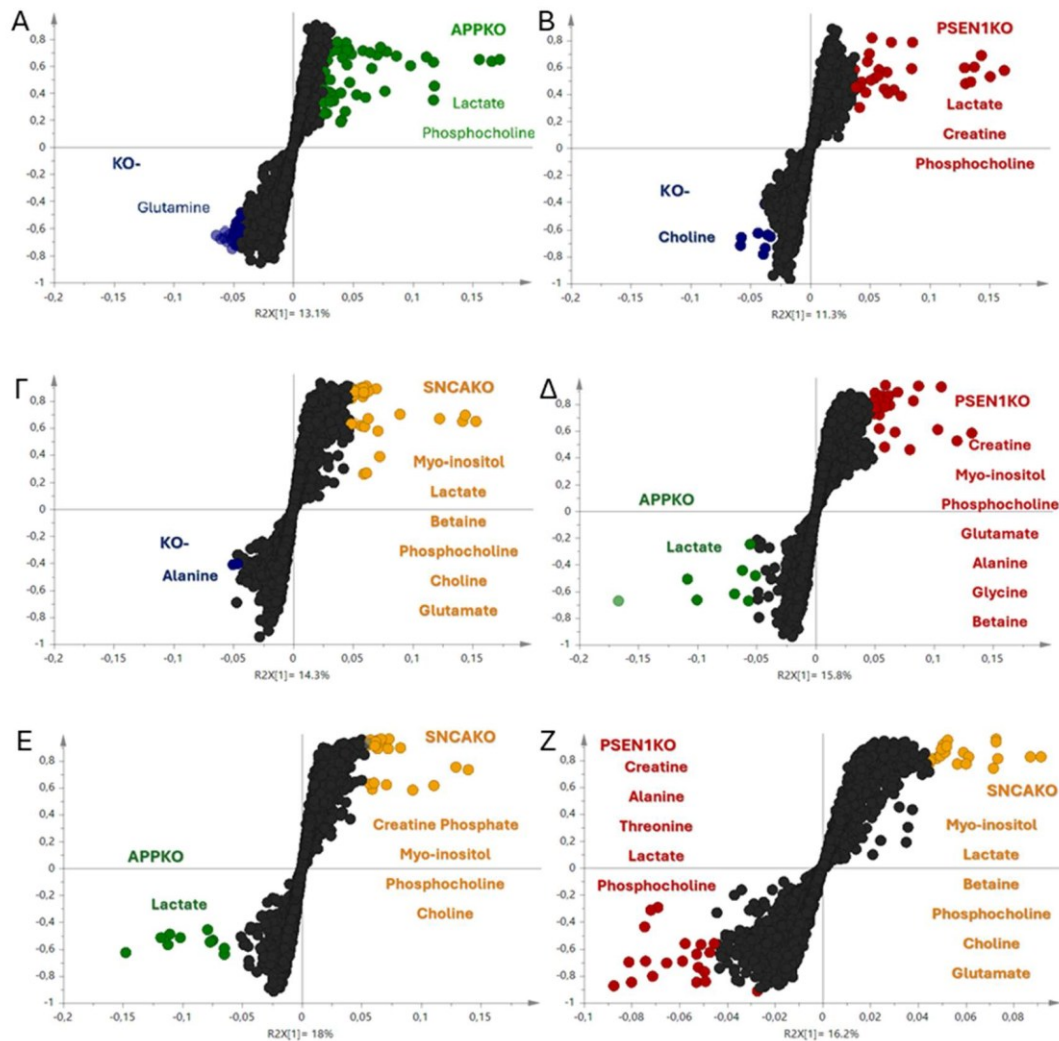


Εικόνα G: (Α) Διάγραμμα αντικειμένων του μοντέλου της PCA για τις 4 ομάδες δειγμάτων KO-, APPKO, PSEN1KO, SNCAKO. (Β) Διάγραμμα αντικειμένων και (Γ) έλεγχος τυχαίων μεταθέσεων του μοντέλου της επιβλεπόμενης ανάλυσης PLS-DA για τις 4 ομάδες δειγμάτων KO-, APPKO, PSEN1KO, SNCAKO. (Δ) Διάγραμμα αντικειμένων και (Ε) έλεγχος τυχαίων μεταθέσεων του μοντέλου της επιβλεπόμενης ανάλυσης PLS-DA για τις 3 ομάδες APPKO, PSEN1KO, SNCAKO.

Στη συνέχεια, οι ομάδες δειγμάτων μελετήθηκαν ανά ζεύγη με την βοήθεια της μεθόδου OPLS-DA, προκειμένου να προσδιοριστούν οι μεταβολίτες που τις διαφοροποιούν. Στην **Εικόνα 10** παρουσιάζονται τα διαγράμματα αντικειμένων και οι αντίστοιχοι έλεγχοι τυχαίων μεταθέσεων για όλα τα ζεύγη συγκρίσεων. Όπως αναφέρθηκε και στην ανάλυση PLS-DA όλα τα μοντέλα που δημιουργήθηκαν χαρακτηρίζονται από υπερπροσαρμογή, λόγω των χαρακτηριστικών του πίνακα των δεδομένων. Το μοντέλο με την υψηλότερη αξιοπιστία βάσει των αποτελεσμάτων του ελέγχου τυχαίων μεταθέσεων, αφορά την σύγκριση των δειγμάτων APPKO με τα δείγματα SNCAKO (Εικ. 10 I και K). Στα υπόλοιπα ζεύγη, οι λάθος μεταθέσεις οδηγούν σε μοντέλα με υψηλότερη προβλεπτική ικανότητα, σε άλλα περισσότερο (ζεύγος KO- και PSEN1KO, **Εικ. 10^Α**) και σε άλλα λιγότερο (π.χ. ζεύγος APPKO και PSEN1KO στην **Εικ. 10Θ**, ζεύγος PSEN1KO – SNCAKO στην **Εικ. 10Μ**).



Εικόνα 10: Διαγράμματα αντικειμένων και έλεγχος 100 τυχαίων μεταθέσεων των μοντέλων OPLS-DA για τα ζεύγη KO- και APPKO (Α, Β), KO- και PSEN1KO (Γ, Δ), KO- και SNCAKO (Ε, Ζ), APPKO και PSEN1KO (Η, Θ), APPKO και SNCAKO (Ι, Κ) και τέλος PSEN1KO και SNCAKO (Λ, Μ).



Εικόνα 11: Διαγράμματα S των μοντέλων OPLS-DA για τα ζεύγη KO- και APPKO (Α), KO- και PSEN1KO (Β), KO- και SNCAKO (Γ), APPKO και PSEN1KO (Δ), APPKO και SNCAKO (Ε) και τέλος PSEN1KO και SNCAKO (Ζ).

Στην **Εικόνα 11** παρουσιάζονται τα διαγράμματα S για όλα τα ζεύγη που ελέγχθηκαν και τα οποία επιτρέπουν τον προσδιορισμό των μεταβλητών /μεταβολιτών στους οποίους οφείλεται ο διαχωρισμός των δύο ομάδων. Ξεκινώντας από το ζεύγος APPKO – SNCAKO, το οποίο παρουσιάζει το μοντέλο με την υψηλότερη αξιοπιστία, στο διάγραμμα S φαίνεται ότι η ομάδα APPKO έχει χαρακτηριστικά υψηλό γαλακτικό οξύ, ενώ η ομάδα SNCAKO παρουσιάζει υψηλά επίπεδα φωσφοκρεατίνης, φωσφοχολίνης, χολίνης και μυο-ινοσιτόλης (**Εικ. 11Ε**). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μεταβολίτες φωσφοχολίνη, χολίνη και μυο-ινοσιτόλη παρουσιάζονται αυξημένοι στα δείγματα SNCAKO σε όλα τα ζεύγη που συγκρίνονται και αποτελούν ένα χαρακτηριστικό μεταβολικό αποτύπωμα της συγκεκριμένης ομάδας. Αντίστοιχα, χαρακτηριστικό μεταβολικό αποτύπωμα τα δείγματα APPKO αποτελεί το αυξημένο γαλακτικό οξύ (**Εικ. 11Α, Β, Ε**). Η ομάδα SNCAKO σε σχέση με την ομάδα ελέγχου παρουσιάζει επιπλέον υψηλότερο γλουταμικό οξύ, γαλακτικό οξύ και βηταΐνη και μειωμένη αλανίνη (**Εικ. 11Γ**). Αυξημένη φωσφοχολίνη και μειωμένη γλουταμίνη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου εμφανίζει η ομάδα APPKO (**Εικ. 11Α**). Η ομάδα PSEN1KO παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα κρεατίνης, αλανίνης και φωσφοχολίνης σε σχέση με τις δύο άλλες τροποποιημένες

ομάδες. Σε σχέση με την ομάδα APPKO, η ομάδα PSEN1KO εμφανίζει υψηλότερα ποσοστά μυο-ινοσιτόλης, γλουταμικού οξέος, γλυκίνης και βηταΐνης, ενώ σε σχέση με την ομάδα SNCAKO παρουσιάζει αυξημένη θρεονίνη και γαλακτικό οξύ.

Συμπεράσματα

Από την ανάλυση προέκυψε σημαντική διαταραχή βιοχημικών μονοπατιών που σχετίζονται με τον **μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων**. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα **χολίνης, ο-φωσφοχολίνης και μυο-ινοσιτόλης** κυρίως στην κυτταρική σειρά **SNCAKO**. Επίσης, παρατηρήθηκε διαταραχή επιπέδων νουκλεοτιδίων (στατιστικά σημαντική **αύξηση IMP και UDP** στην κυτταρική σειρά) που πιθανόν να συνδέεται με αλλοίωση κυτταρικών σηματοδοτικών μηχανισμών. Τα αμινοξέα **ασπαρτικό και γλουταμικό οξύ**, δύο από τα σημαντικότερα μόρια στη νευροδιαβίβαση, εμφάνισαν σημαντική αύξηση στις δύο σειρές- ειδικές για την AD παθολογία- **PSEN1KO και SNCAKO**, αντίστοιχα. Στην κυτταρική σειρά **APPKO** παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή σε μεταβολίτες που εμπλέκονται σε οδούς παραγωγής ενέργειας και ρύθμισης του οξειδοαναγωγικού δυναμικού στα νευρικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, το **γαλακτικό οξύ** και η **προλίνη** παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση σε αντίθεση με την **κρεατίνη** που μειώθηκε.

Παράλληλα διερευνήθηκε η επίδραση της κρυσταλλοποίησης και των κύκλων ψύξης – απόψυξης στο μεταβολικό προφίλ των ευαίσθητων νευρικών κυτταρικών σειρών που αποτελούν το αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Μελετήθηκε το μεταβολικό αποτύπωμα και των τεσσάρων κυτταρικών σειρών σε **τρεις χρονικές στιγμές**, μετά από **διαφορετικό αριθμό «περασμάτων»**. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης τα «περάσματα» επηρεάζουν σημαντικά το μεταβολικό αποτύπωμα των νευρικών κυτταρικών σειρών. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μία ευαίσθητη μέθοδο για την καταγραφή αλλαγών και πιθανών αλλοιώσεων του μεταβολομικού αποτυπώματος νευρικών κυτταρικών σειρών.

Βιβλιογραφία:

1. A. F. Jorm, D. Jolley, The incidence of dementia, A meta-analysis, *Neurology* Sep 1998, 51 (3) 728-733; DOI: 10.1212/WNL.51.3.728
2. Mendez MF. Early-Onset Alzheimer Disease. *Neurol Clin.* 2017 May;35(2):263-281. doi: 10.1016/j.ncl.2017.01.005. PMID: 28410659; PMCID: PMC5407192.
3. Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, 10(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
4. Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor protocols*, 2015(11), 951–969. <https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>
5. Hiroyuki Ogata, Susumu Goto, Kazushige Sato, Wataru Fujibuchi, Hidemasa Bono, Minoru Kanehisa, KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, *Nucleic Acids Research*, Volume 27, Issue 1, 1 January 1999, Pages 29–34, <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.29>
6. Ashburner, M., Ball, C., Blake, J. *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* **25**, 25–29 (2000). <https://doi.org/10.1038/75556>
7. Patrick L. McGeer, Michael Schulzer, Edith G. McGeer, Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease, A review of 17 epidemiologic studies, *Neurology* Aug 1996, 47 (2) 425-432; DOI: 10.1212/WNL.47.2.425
8. Ming-Xin Tang, Diane Jacobs, Yaakov Stern, Karen Marder, Peter Schofield, Barry Gurland, Howard Andrews, Richard Mayeux, Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease, *The Lancet*, Volume 348, Issue 9025, 1996, Pages 429-432, ISSN 0140-6736, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)03356-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)03356-9).

