



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: Συσχέτιση εγκεφαλικής παθολογίας Tau και εγκεφαλικών εξωσωμάτων μέσω από πολυεπίπεδη ανάλυση / Έλεγχος του ρόλου των εξωσωμάτων στον επιβαρυντικό ρόλο του χρόνιου στρες στην Tau παθολογία

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

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΩΤΗΡΟΠΟΥΛΟΣ (ΕΚΕΒΕ “Αλέξανδρος Φλέμιγκ”)

Συσχέτιση εγκεφαλικής παθολογίας Ταυ και εγκεφαλικών εξωσωμάτων μέσω από πολυεπίπεδη ανάλυση / Έλεγχος του ρόλου των εξωσωμάτων στον επιβαρυντικό ρόλο του χρόνιου στρες στην Ταυ παθολογία

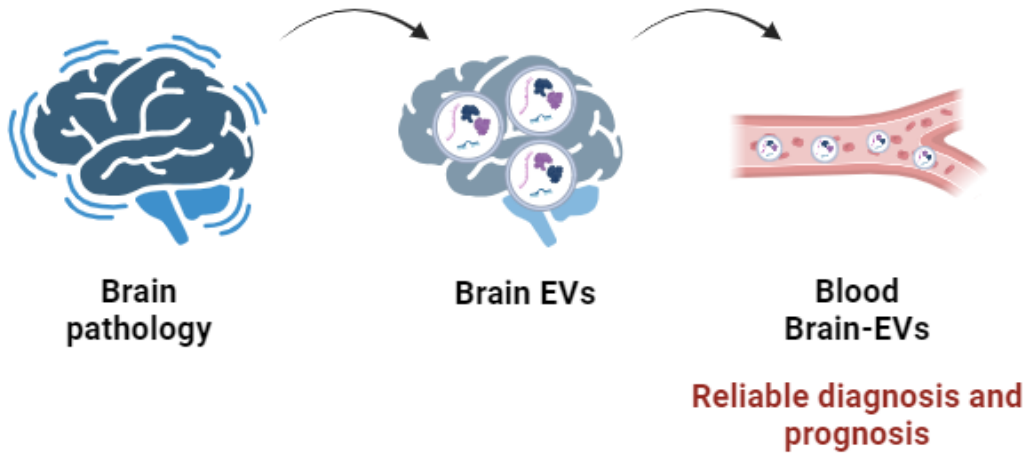
ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Τίτλος παραδοτέου: α) Συσχέτιση εγκεφαλικής παθολογίας Ταυ και εγκεφαλικών εξωσωμάτων β) έλεγχος του ρόλου των εξωσωμάτων στον επιβαρυντικό ρόλο του χρόνιου στρες στην Ταυ παθολογία

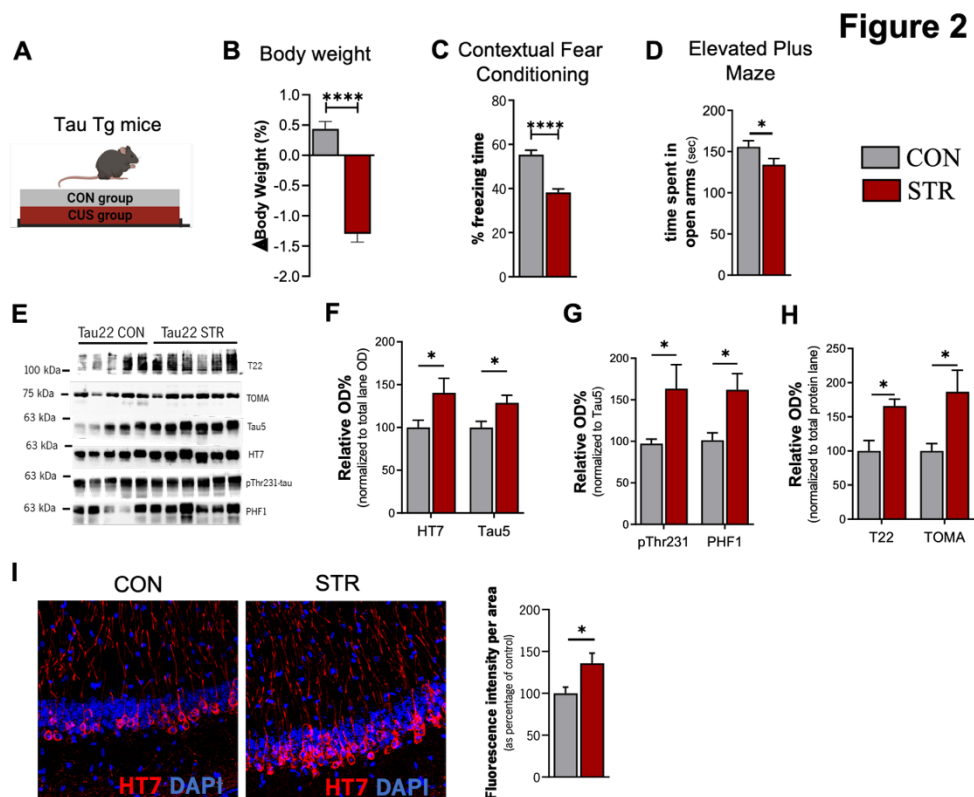
Δρ. Σωτηρόπουλος - Φλέμινγκ

Στη νέα εποχή της Ιατρικής Ακριβείας, τα εξωκυτταρικά κυστίδια (extracellular vesicles – EV), ιδίως τα εξωσώματα (exosomes), διαφαίνονται ως επαναστατικό “εργαλείο” για τη διάγνωση και θεραπεία ασθενειών του εγκεφάλου όπως η νόσος Αλτσχάιμερ (ΝΑ). Τα εξωσώματα εμφανίζονται σαν διαμεσολαβητές διασποράς της παθολογίας στον εγκέφαλο από το ένα κύτταρο/περιοχή του εγκεφάλου στο άλλο/άλλη, αλλά και περιφερικοί (αίμα) βιοδείκτες της εγκεφαλικής παθολογίας στην ΝΑ (Gomes P et al., *Exper Neurology* 2022) – βλέπε **Figure 1** πιο κάτω. Παρόλα αυτά, οι γνώσεις μας σχετικά με την ικανότητα των εξωσωμάτων του εγκεφάλου και του φορτίου τους να διαφοροποιούνται κατά την εξέλιξη της παθολογίας της ΝΑ αλλά και να συσχετίζονται με το εύρος των παθολογικών αλλοιώσεων του εγκεφάλου είναι περιορισμένη. Επίσης, δεν γνωρίζουμε εάν τα εξωσώματα και το φορτίο τους μπορούν να αποτυπώσουν την επιβλαβή δράση παραγόντων κινδύνου της ΝΑ όπως το χρόνο, ψυχολογικό στρες τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους. Δεδομένης την προτεινόμενης αιτιοπαθολογικής σχέσης του χρόνιου στρες και της ΝΑ και καθώς ο σύγχρονος τρόπος ζωής εκθέτει όλους μας σε πολλαπλές και αυξανόμενες πηγές στρες καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής μας, είναι σαφές ότι η κατανόηση των μηχανιστικών μέσω των οποίων το χρόνο στρες οδηγεί στην Ταυ παθολογία και προάγει τη διακυτταρική εξάπλωσή της θα διευκολύνει τη θεραπεία της νόσου και θα ωφελήσει ένα μεγάλο μέρος του παγκόσμιου πληθυσμού.

Figure 1



Στα πλαίσια του παρόντος ερευνητικού προγράμματος, έχουμε χρησιμοποιήσει ποντίκια άγριου τύπου και διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την ανθρώπινη εγκεφαλική παθολογία της Tau πρωτεΐνης και τα έχουμε εκθέσει σε χρόνια στρες για 6 εβδομάδες. Πραγματοποιήσαμε σε συμπεριφορική ανάλυση με διαφορετικές δοκιμασίες για την μνήμη και την διάθεση όπου παρατηρήσαμε την ότι το χρόνια στρες οδηγεί σε μνημονικά ελλείματα (μετρημένα με την δοκιμασία contextual fear conditioning- CFC) και αυξημένα επίπεδα άγχους (μετρημένα με την δοκιμασία elevated plus maze-EPM) χωρίς αλλαγές στην γενική κινητικότητα των πειραματόζων (μετρημένα με την δοκιμασία Open Field-OF) – βλέπε **Figure 2**. Επιπρόσθετα, προχωρήσαμε στην μελέτη της εγκεφαλικής παθολογίας αλλά και την εγκεφαλικών εξωσωμάτων



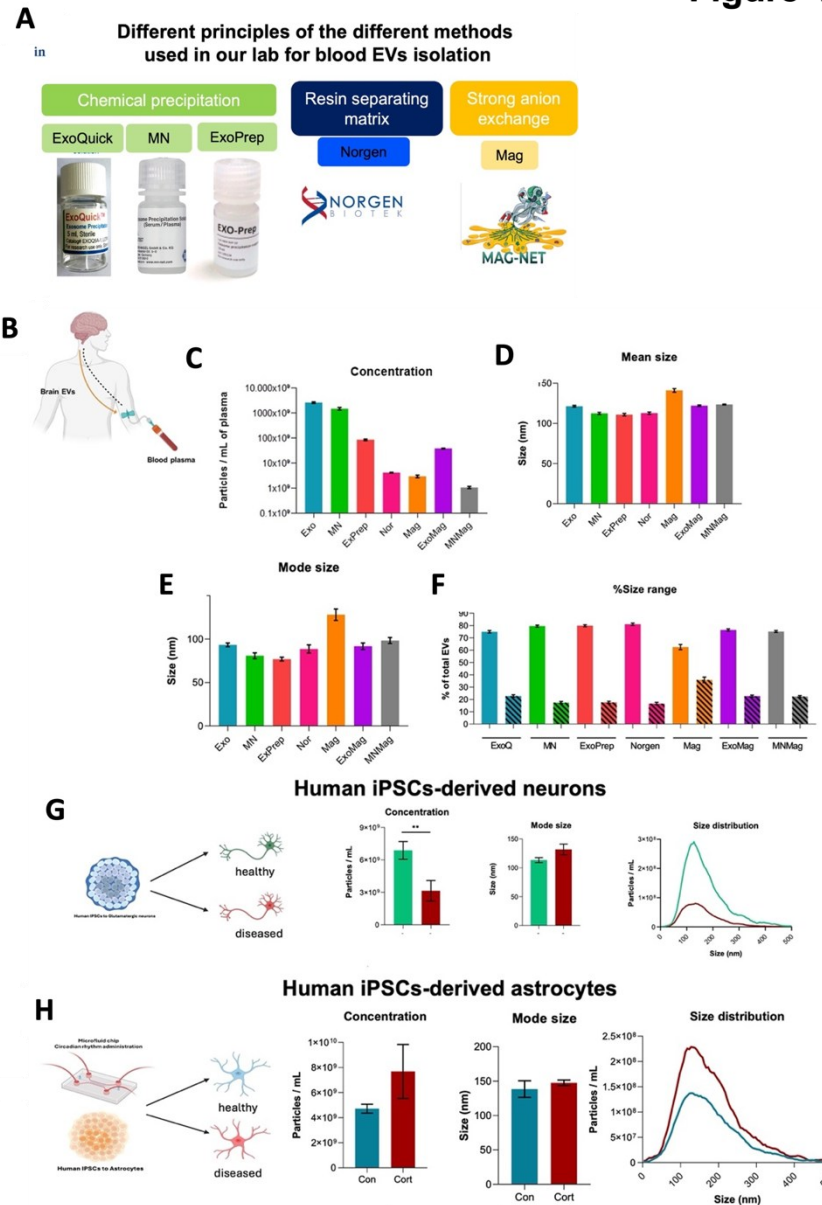
προκειμένου να απαντήσουμε τα δυο πρώτα, κυριά ερωτήματα μας στο ερευνητικό αυτό πρόγραμμα που επικεντρώνονται στο εάν τα εξωσώματα και το φορτίο τους μπορούν να αντικατοπτρίσουν την εγκεφαλική παθολογία. Συγκεκριμένα, η **ανάλυση της εγκεφαλικής παθολογίας Tau** με την τεχνική Western Blot (WB) εμπεριέχει διαφορετικές παραμέτρους της Tau παθολογίας όπως διαφορετικούς φωσφωεπιτόπους της πρωτεΐνης Tau (αντισώματα p231-Tau και PHF1) καθώς και τα ολικά της επίπεδα της (αντισώματα Tau5 και HT7 για την μέτρηση ολικών και ανθρώπινων μορφών της πρωτεΐνης Tau, αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, μετρήσαμε και τα ολιγομερή συσσωματώματα της Tau (αντισώματα T22 και TOMA). Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήσαμε ανοσοφθορισμό (immunofluorescence-IF) με το αντίσωμα HT7 (μετρά ανθρώπινη Tau). Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η έκθεση σε χρόνιο στρες αύξησε διάφορες παραμέτρους της παθολογίας της Tau στον εγκέφαλο (Figure 2).

Στην συνέχεια, προχωρήσαμε στην **ανάλυση των εξωσωμάτων του εγκεφάλου (Figure 3)** συνδυάζοντας διάφορες τεχνικές όπως Nanoparticle tracking analysis (NTA) με το οποίο μετρούμε τόσο το μέγεθος όσο και την κατανομή των εξωσωμάτων (εξωκυττάρων κυστιδίων)]. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι το χρόνιο στρες αύξησε την έκκριση των εγκεφαλικών εξωσωμάτων και άρα δείχνουμε ξεκάθαρα ότι η έκθεση στο χρόνιο στρες, έναν επιβαρυντικό παράγοντα της ΝΑ, αυξάνει την έκκριση των εγκεφαλικών εξωσωμάτων. Επιπρόσθετα, πέτυχαμε πολυεπίπεδη μελέτη μας με νέες τεχνικές εξωσωμικής ανάλυσης όπως η μέθοδος ExoView με την οποία μετράμε σε υποπληθυσμούς εξωσωμάτων (με βάση τους διαφορετικούς πρωτεϊνικούς

εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά πρωτεΐνης Ταυ ενώ μέσω της τεχνικής capillary electrophoresis (αντίστοιχη της τεχνικής Western blot analysis αλλά ειδική για πολλή μικρή ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης), βρήκαμε ότι τα εξωσώματα από στρεσοσαρισμένα ζώα περιέχουν αυξημένη ποσότητα ολιγομερικών μορφών της Ταυ. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3**, τα εγκεφαλικά εξωσώματα συλλεγμένα από τα ζώα που είχαν υποστεί χρόνια στρες εμφάνισαν αύξηση διαφόρων παραμέτρων της παθολογίας Ταυ στο φορτίο τους η οποία παρομοιάζει τις αλλαγές του εγκεφαλικού ιστού. Επιπλέον Mass-spect proteomics analysis του φορτίου των εξωσωμάτων αλλά και σύγκριση του με την πρωτεομική ανάλυση του εγκεφαλικού ιστού δείχνουν κοινές πρωτεΐνες που φαίνεται να αλλάζουν τόσο το φορτίο των εγκεφαλικών εξωσωμάτων όσο και τον εγκεφαλικό ιστό από τον οποίο προέρχονται, προτείνοντας την χρήση του φορτίου των εγκεφαλικών εξωσωμάτων ως μια πλατφόρμα βιοδεικτών που μπορούν να αντικατοπτρίζουν την παθολογία του εγκεφαλικού ιστού. Μέρος αυτών των αποτελεσμάτων έχουν συμπεριληφθεί στην δημοσίευση **Ruixue Ai et al., Science Advances 2025 Nov 7;11(45):eady9811. doi: 10.1126/sciadv.ady9811. Epub 2025 Nov 7** ενώ ετοιμάζεται νέα δημοσίευση που θα περιλάβει τα υπόλοιπα δεδομένα.

Τέλος, προκειμένου να ελέγξουμε εάν παρόμοια αποτελέσματα έχουμε και σε ανθρώπους που πάσχουν από την ΝΑ, στα πλαίσια αυτού του ερευνητικού προγράμματος και σε συνεργασία με διάφορες πανεπιστημιακές κλινικές και κέντρα Αλτσχάιμερ στην Ελλάδα, έχουμε συλλέξει δείγματα περιφερικού αίματος από κλινικά χαρακτηρισμένους ασθενείς με ΝΑ το οποίο περιλαμβάνει πάνω από 200 ασθενείς με ΝΑ και υγιείς συμμετέχοντες. Πριν να προχωρήσουμε στην ανάλυση εγκεφαλικών εξωσωμάτων του πλάσματος των ασθενών, ελέγξαμε 7 διαφορετικά kits απομόνωσης εξωσωμάτων αλλά και συνδυασμών αυτών, προκειμένου να επιτύχουμε την βέλτιστη αναλογία ποσότητας και ποιότητας εγκεφαλικών εξωσωμάτων – **Figure 4**. Σημειώστε ότι το πλάσμα περιέχει μεγάλη ποσότητα λιπιδίων, λιποσωμάτων και πρωτεϊνών του πλάσματος (πχ αλβουμίνες) οι οποίες δημιουργούν προβλήματα στην ποσότητα μέτρηση των εξωσωμάτων αλλά και στην ποιοτική/πρωτεομική ανάλυση του φορτίου τους. Σε αυτά τα περάματα μας, χρησιμοποιήσαμε ως σημείο αναφοράς και σύγκλισης, εξωσώματα από ανθρώπινα iPSCs-induced νευρικά και αστρογλοιακά κύτταρα.

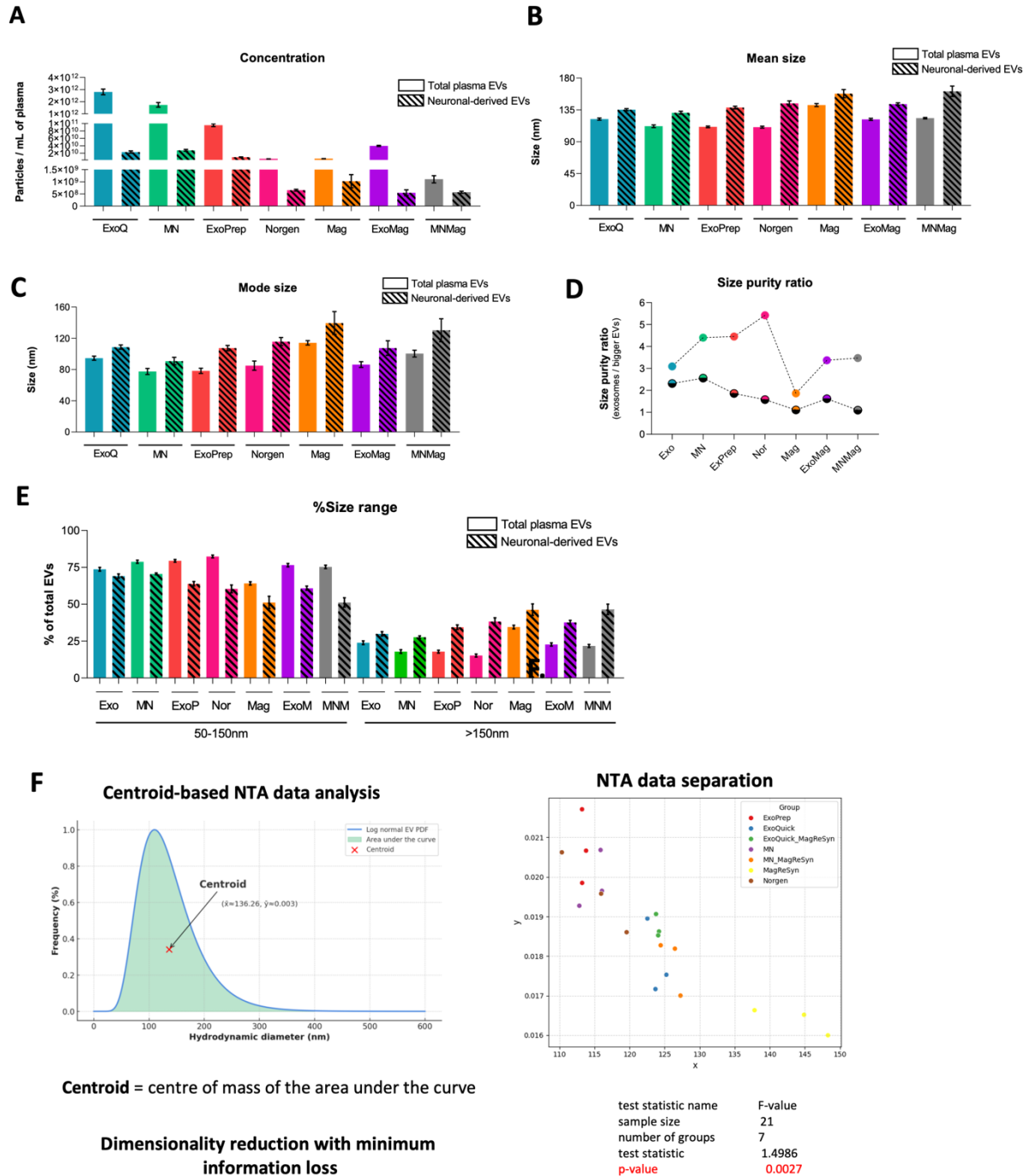
Figure 4



Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε μια πολυεπίπεδη ανάλυση των αποτελεσμάτων του χαρακτηρισμού των εξωσωμάτων ανάμεσα στις διάφορες τεχνικές απομόνωσης και καθαρισμού η οποία περιελάμβανε και νέα εργαλεία πολυδιάστατης ανάλυσης δεδομένων NTA, όπως φαίνεται στην **Figure 5**. Μέσα από αυτά τα πειράματα, επιλέξαμε την βέλτιστη τεχνική απομόνωσης εξωσωμάτων αλλά και εγκεφαλικών εξωσωμάτων προερχόμενα από νευρικά κύτταρα (neuronal-derived EVs/exosomes).

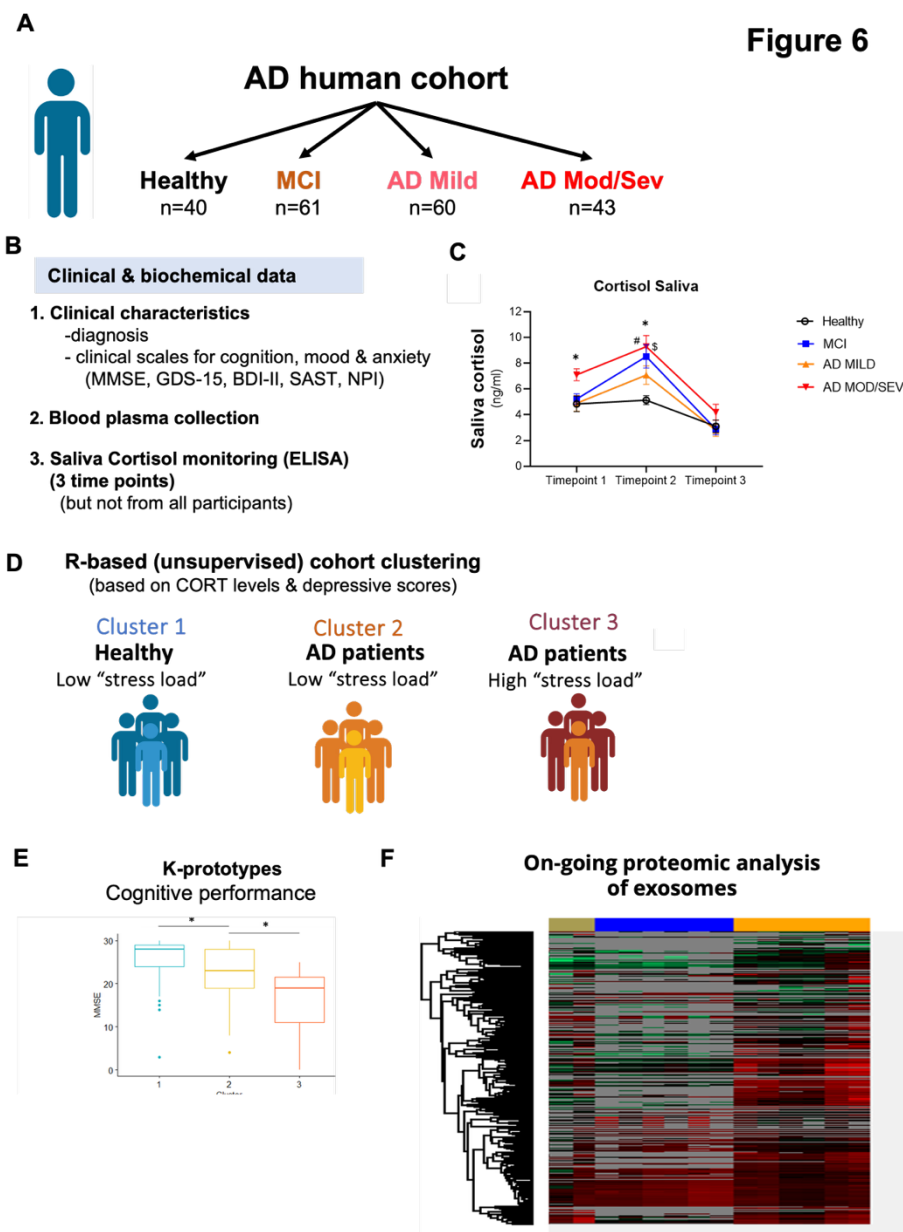
NTA analysis

Figure 5



Στην συνέχεια, προχωρήσαμε στην επιλογή των κλινικών δειγμάτων από τα 230 δείγματα που είχαμε συλλέξει- βλέπε **Figure 6**. Μετά από ανάλυση των κλινικών χαρακτηριστικών και των επιπέδων της βασικής ορμόνης του στρες, κορτιζόλης σε 3 διαφορετικά σημεία της μέρας, χρησιμοποιήσαμε την unsupervised clustering analysis, η οποία δημιούργησε τις 3 υποομάδες

προς ανάλυση η οποία θα μας απαντήσει στο αρχικό ερώτημα της αποτύπωσης του αυξημένου στρες στην κλινική εικόνα και το πρωτεομικό προφίλ των εγκεφαλικών εξωσωμάτων των ασθενών με ΝΑ (την οποία βρήκαμε στα παραπάνω πειράματα μας σε ζώα (βλέπε **Figure 2 και 3**). Η ανάλυση μας έδωσε 3 clusters: υγείς συμμετέχοντες με χαμηλά επίπεδα στρες, ασθενείς με ΝΑ και «χαμηλά επίπεδα στρες» και ασθενείς με ΝΑ και «υψηλά επίπεδα στρες». Η περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι οι ασθενείς με ΝΑ και «υψηλά επίπεδα στρες είχαν χειρότερη απόδοση MMSE σε σχέση με τους ασθενείς με ΝΑ και «χαμηλά επίπεδα στρες» επιβεβαιώνοντας την αρνητική δράση του στρες στο κλινικό προφίλ των ασθενών με ΝΑ (Figure 6 E). Στην συνέχεια, προχωρήσουμε σε πρωτεομική ανάλυση των εγκεφαλικών εξωσωμάτων αίματος των ασθενών αυτών. Ενώ η βιοπληροφορική ανάλυση βρίσκεται σε εξέλιξη, τα πρώτα αποτελέσματα καταδεικνύουν διαφορετικό πρωτεομικό προφίλ ανάμεσα στις δυο clusters ασθενών με ΝΑ (ασθενείς με ΝΑ με υψηλά vs. χαμηλά επίπεδα στρες) – Fig 6F.



ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΝΟΤΗΤΑΣ Α

Συσχέτιση εγκεφαλικής παθολογίας Ταυ και εγκεφαλικών εξωσωμάτων μέσω από πολυεπίπεδη ανάλυση

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ

Αναλύσαμε πολυεπίπεδα την σχέση εγκεφαλικής παθολογίας Ταυ και εγκεφαλικών εξωσωμάτων σε πειραματόζωα και βρήκαμε ότι το φορτίο των εγκεφαλικών εξωσωμάτων αντικατοπτρίζει την παθολογία του εγκεφάλου κάτω από κανονικές και συνθήκες κινδύνου

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΕ – ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΟΦΕΛΗ

Παραγωγή νέων δεδομένων, εκπαίδευση νέων ερευνητών, παραγωγή μιας δημοσίευσης (Science Advances 2025) και προετοιμασία νέας δημοσίευσης, ενίσχυση τεχνογνωσίας σε in vivo πειραματικών αναλύσεων, βελτίωση στρατηγικών επιλογής διαγνωστικών εργαλείων της ΝΑ

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΝΟΤΗΤΑΣ Β

Έλεγχος του ρόλου των εξωσωμάτων στον επιβαρυντικό ρόλο του χρόνιου στρες στην Ταυ παθολογία σε πειραματικά μοντέλα ζώων αλλά και ασθενείς της ΝΑ

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ

Βρήκαμε ότι η έκθεση σε χρόνιο στρες σε πειραματικά μοντέλα της ΝΑ αλλά και τα αυξημένα επίπεδα στρες σε ασθενείς της ΝΑ επιφέρουν αλλαγές τόσο την εγκεφαλική παθολογία επηρεάζοντας την γνωστική λειτουργία (πχ μνήμη) ενώ επίσης αλλάζουν το πρωτεομικό προφίλ του φορτίου των εγκεφαλικών εξωσωμάτων προτείνοντας την χρήση των εγκεφαλικών εξωσωμάτων στην αποτίμηση της επιβλαβούς δράσης του ψυχολογικού στρες στην ΝΑ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΕ – ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΟΦΕΛΗ

Παραγωγή νέων δεδομένων τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ασθενείς με ΝΑ, εκπαίδευση νέων ερευνητών, προετοιμασία δημοσίευσης, ενίσχυση τεχνογνωσίας τόσο σε πειραματικές αναλύσεις όσο και στην ανάλυση κλινικών δειγμάτων, βελτίωση στρατηγικών επιλογής διαγνωστικών εργαλείων της ΝΑ και πιθανή χρήση τους στην κλινική πράξη.