

**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: RNAseq και πρωτεομική ανάλυση hiPSC διαφοροποιηθέντων κυττάρων.**

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

**ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): CAROL MURPHY (ΙΤΕ)**

## RNAseq και πρωτεομική ανάλυση hiPSC διαφοροποιηθέντων κυττάρων.

### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Οι στόχοι είναι:

Δράση 1: Χαρακτηρισμός των hiPSCs LRRK2 G2019S και των κυττάρων-μαρτύρων (isogenic control) hiPSCs

Δράση 2: Τροποποίηση του πρωτοκόλλου διαφοροποίησης σε ενδοθηλιακά κύτταρα και έλεγχος της αποτελεσματικότητας της διαφοροποίησης των hiPSCs LRRK2 G2019S και των κυττάρων-μαρτύρων (isogenic control) hiPSCs

Δράση 3: Δημιουργία συσταλτών και συνθετικών τοιχωματικών κυττάρων

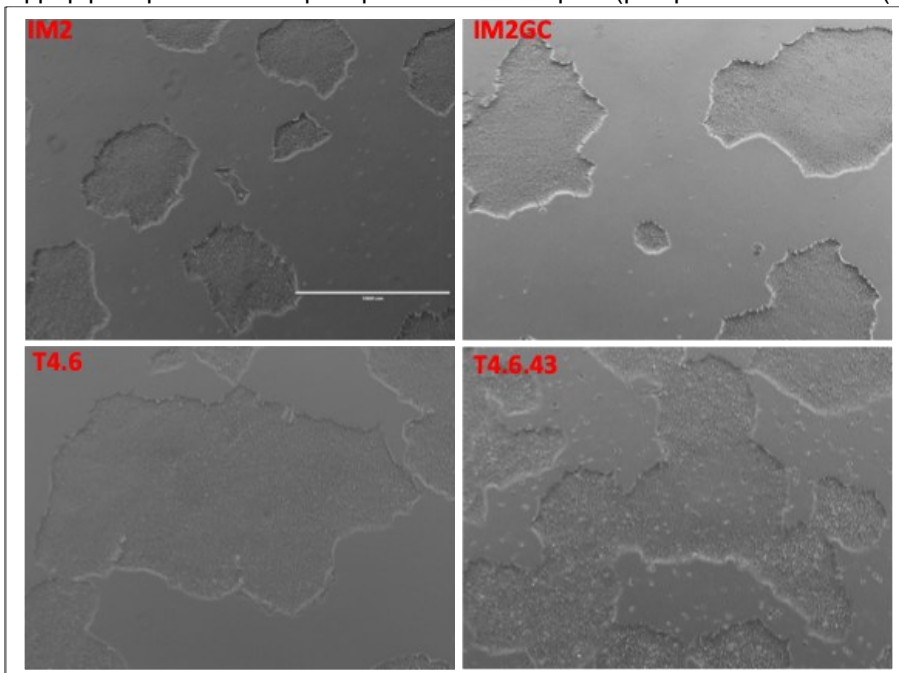
Δράση 4: Ανάλυση υψηλής απόδοσης σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης

### **Δράση 1: Χαρακτηρισμός των hiPSCs LRRK2 G2019S και των κυττάρων-μαρτύρων (isogenic control) hiPSCs**

Λάβαμε hiPSC και κυττάρων-μαρτύρων (isogenic control) από 2 ασθενείς με Πάρκινσον. Τα κύτταρα αυτά, όπως φαίνονται παρακάτω, έχουν χαρακτηριστεί εκτενώς, έχουν επεκταθεί και έχουν αποθηκευτεί σε υγρό άζωτο.

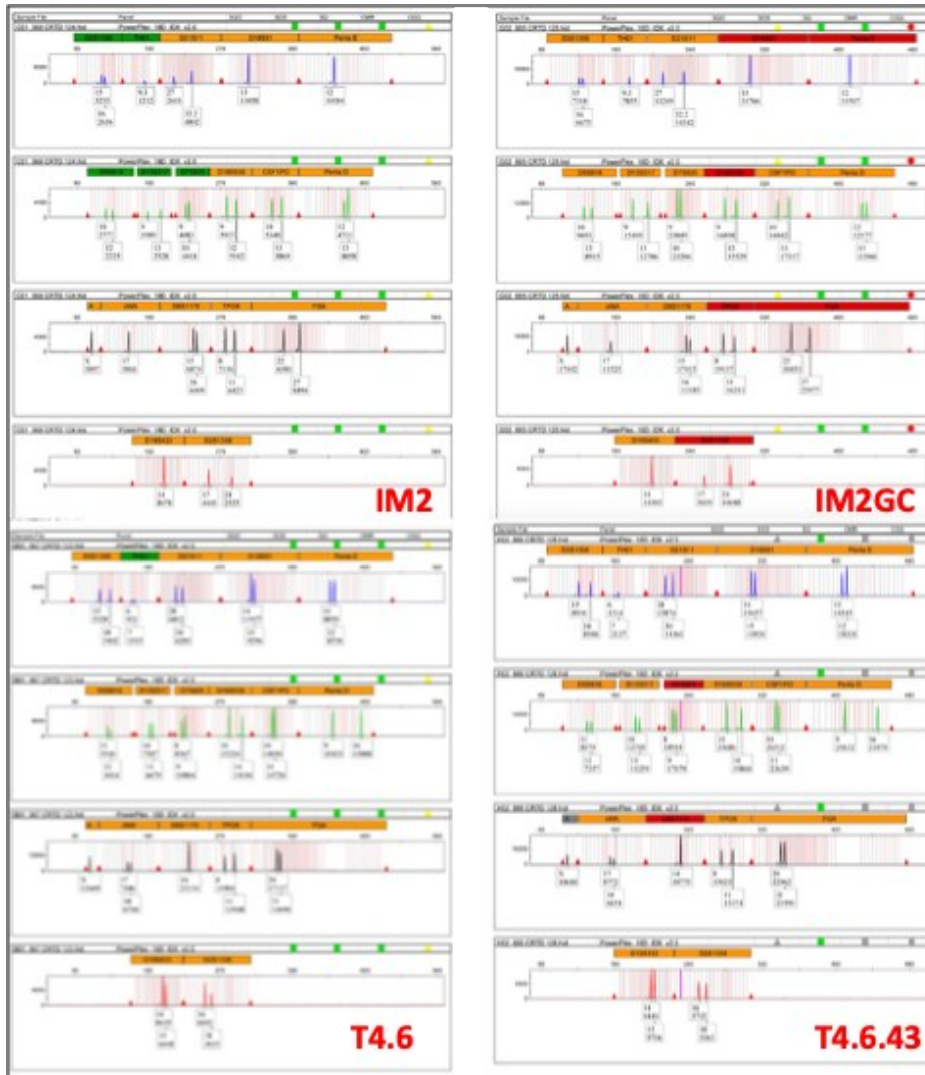
- T4.6 (L1-1Mut): hiPSCs ασθενούς με την ετερόζυγη μετάλλαξη G2019S στο LRRK2.
- T4.6.43 (L1-1GC1): υποκλώνος του T4.6 (L1-1Mut) με διορθωμένη τη μετάλλαξη σε άγριο τύπο.
- IM2 (L2-1Mut): hiPSCs ασθενούς με την ετερόζυγη μετάλλαξη G2019S στο LRRK2.
- IM2GC (L2-1GC): υποκλώνος του IM2 (L2-1Mut) με διορθωμένη τη μετάλλαξη σε άγριο τύπο.

Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία και η μορφολογία τους ήταν ικανοποιητική και συμβατή με τη μορφολογία πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (pluripotent stem cells (PSCs) (Εικ. 1).



Εικόνα 1: Εικόνες αντίθεσης φάσης των αποικιών από κάθε καλλιέργεια hiPSC.

Για να χαρακτηριστούν περαιτέρω οι κυτταρικές σειρές και να διασφαλιστεί η προέλευσή τους, πραγματοποιήθηκε ανάλυση βραχέων tandem επαναλήψεων (short tandem repeat, STR). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι η σειρά IM2GC προέρχεται από την IM2 και η T4.6.43 από την T4.6 (Εικ.2).



Εικόνα 2: Ανάλυση STR των 4 κυτταρικών σειρών hiPSC

Επιπλέον, ο καρυότυπος των κυτάρων διερευνήθηκε και βρέθηκε φυσιολογικός (Εικ. 3).

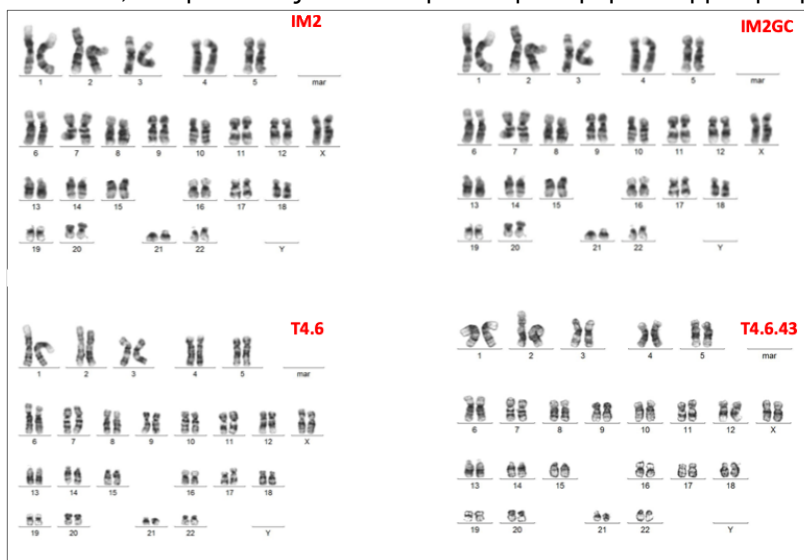
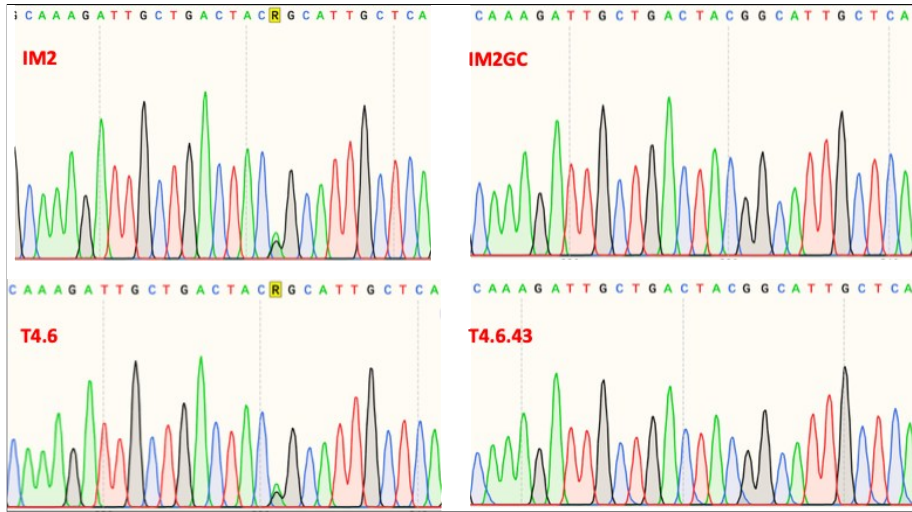


Figure 3, karyotype analysis of LRRK2 hiPSCs (IM2, T4.6) and isogenic controls (IM2GC and T4.6.43)

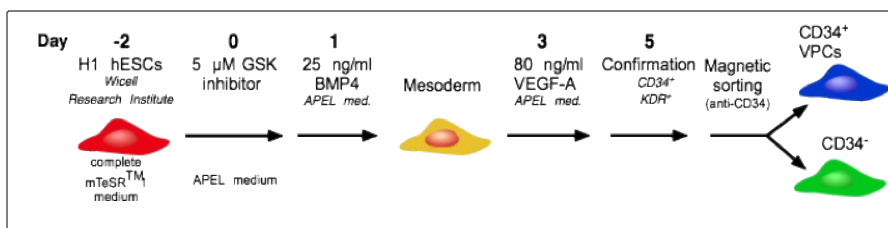
Τέλος, το DNA αλληλουχίστηκε στη μετάλλαξη για να διασφαλιστεί η παρουσία του LRRK2 G2019S και η σωστή επιδιόρθωση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 4 και αποδεικνύουν ότι οι σειρές hiPSC IM2 και T4.6 έχουν τη μετάλλαξη LRRK2 G2019S, ενώ οι ισογονικές σειρές-μάρτυρες IM2GC και T4.6.43 είναι πράγματι ισογονικές σειρές.



Εικόνα 4: Ανάλυση αλληλούχισης DNA που δείχνει τη μετάλλαξη LRRK2 G2019S στα κύτταρα IM2 και T4.6 και τη διορθωμένη αλληλουχία που προσδιορίστηκε στους ισογονικούς ελέγχους IM2GC και T4.6.43. Το R δείχνει τη μετάλλαξη G-A

## Δράση 2: Πρωτόκολλο διαφοροποίησης σε ενδοθηλιακά κύτταρα, δημιουργία συνθηκών για πειράματα σηματοδότησης

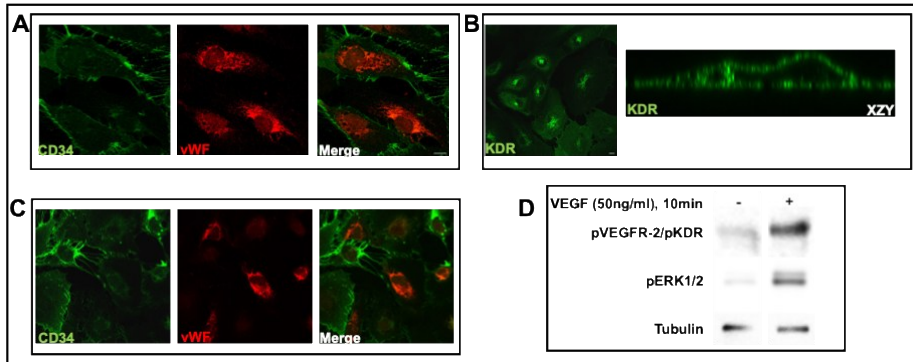
Έχουμε αναπτύξει μια μέθοδο για τη διαφοροποίηση των hESCs και των hiPSCs σε CD34+ αγγειακά προγονικά κύτταρα και περαιτέρω σε ECs χρησιμοποιώντας χημικά καθορισμένα μέσα και συνθήκες ανάπτυξης {Tsolis, 2016 #8005}, Εικόνα 5. Τα EK που παράγονται με τη χρήση αυτού του πρωτοκόλλου έχουν περιορισμένο πολλαπλασιασμό. Βελτιστοποιήσαμε περαιτέρω αυτό το πρωτόκολλο στο πλαίσιο του προγράμματος Brain Precision για να αυξήσουμε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων EK μετά τη διαλογή, καθώς και την ωρίμανσή τους που κρίνεται από την έκφραση του παράγοντα Von Willebrand (vWF)



Εικόνα 5. Πρωτόκολλο διαφοροποίησης πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων σε ενδοθηλιακά κύτταρα.

Συγκρίναμε την καλλιέργεια των απομονωμένων EK σε τρυβλία επιστρωμένα με ινωδονεκτίνη (Εικ. 6A&B) ή κολλαγόνο (Εικ. 7Γ) και εξετάσαμε την έκφραση των CD34, KDR και vWF (A,B, Γ). Όπως φαίνεται η ινωδονεκτίνη υπερέχει καθώς ένας αυξημένος αριθμός κυττάρων εκφράζει vWF. Επιπλέον, αυξήσαμε τη συγκέντρωση του VEGF στα απομονωμένα EK και καταφέραμε να επεκτείνουμε το δυναμικό πολλαπλασιασμού τους (δεδομένα δεν παρουσιάζονται).

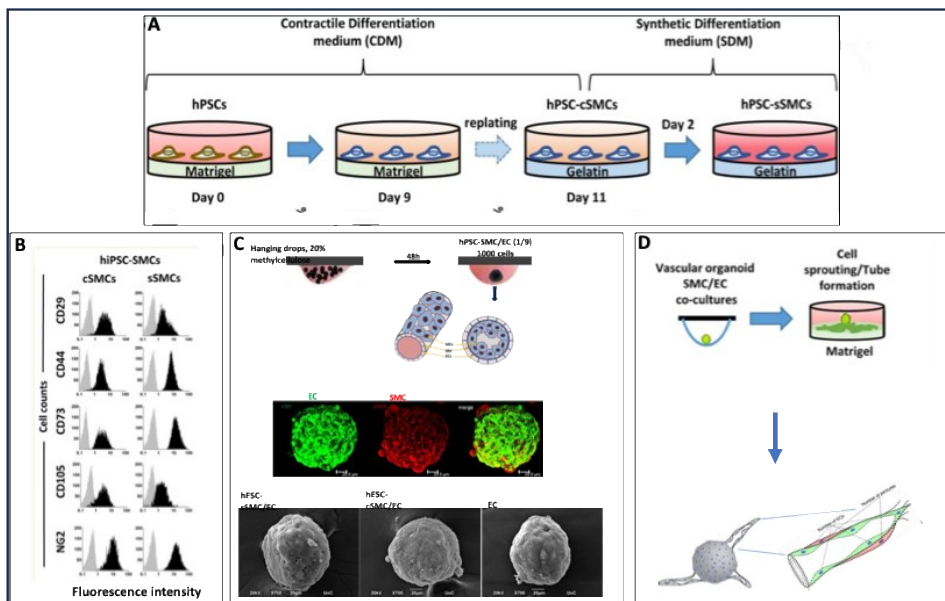
Για να δημιουργήσουμε τις συνθήκες για το πείραμα σηματοδότησης και διακίνησης των υποδοχέων δημιουργήσαμε αρχικά συνθήκες όπου η σηματοδότηση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGFA ενεργοποιούνται ελάχιστα απουσία του συνδέτη και διεγείρονται έντονα παρουσία του. Μετά από αρκετές δοκιμές καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η στέρηση ορού για 2 ώρες ακολουθούμενη από προσθήκη VEGF για 10 λεπτά ήταν η βέλτιστη. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 7.Δ, το βασικό επίπεδο (απουσία VEGF) της φωσφορυλίωσης της ERK1/2 (pERK1/2) και του υποδοχέα του VEGF, KDR (pKDR) είναι πολύ χαμηλό μετά από στέρηση ορού και επάγεται έντονα από την προσθήκη VEGF. Αυτή η σαφής διαφορά θα μας επιτρέψει να πραγματοποιήσουμε πειράματα σηματοδότησης.



Εικόνα 6. Τα ΕΚ που διαφοροποιήθηκαν από hiPSC απομονώθηκαν και τοποθετήθηκαν σε ινωδονεκτίνη (Α, Β) ή κολλαγόνο (Γ). Πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός με τη χρήση anti-CD34, anti-vWF (Α,Β) ή anti-KDR (Β). (Δ) Τα ΕΚ που διαφοροποιήθηκαν από hiPSCs απομονώθηκαν, τοποθετήθηκαν σε ινωδονεκτίνη και υπέστησαν στέρηση ορού για 2 ώρες πριν από την προσθήκη VEGFA για 10 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση Western Blot με χρήση αντι-φωσφοΚDR (pKDR), αντι-φωσφοERK1/2 (pERK1/2) και αντι-tublin ως έλεγχος ισοφόρτωσης.

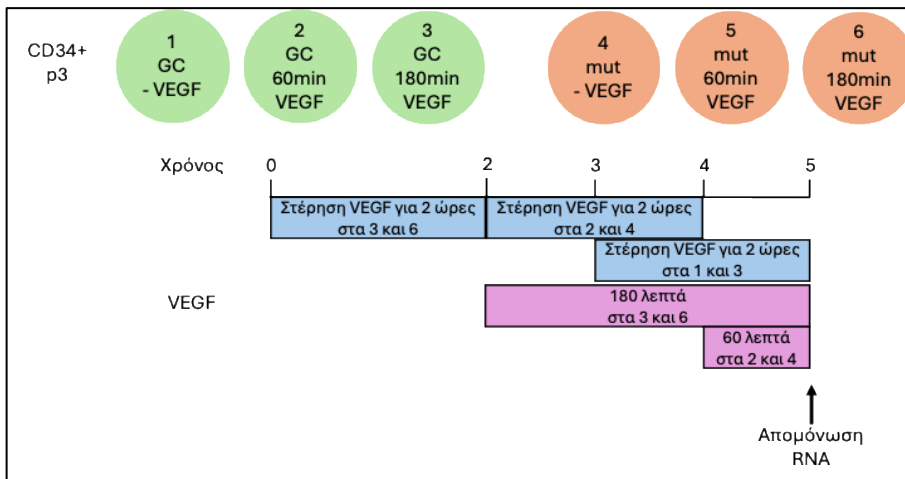
### Δράση 3: Πρωτόκολλο διαφοροποίησης σε τοιχωματικά κύτταρα

Αναπτύξαμε ένα πρωτόκολλο για τη διαφοροποίηση των PSCs τόσο σε συσταλτικά όσο και σε συνθετικά τοιχωματικά κύτταρα {Markou, 2020 #9569} όπως φαίνεται στην Εικ.8.



Εικόνα 7: Διαφοροποίηση των hPSCs σε συσταλτικά (cSMCs) και συνθετικά (sSMCs) τοιχωματικά κύτταρα. (Α) Επισκόπηση της διαδικασίας διαφοροποίησης και (Β) ιστογράμματα που παρουσιάζουν το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν τους επιφανειακούς δείκτες CD29, CD44, CD73, CD105 και NG2, τα οποία αξιολογήθηκαν με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής την 11η ημέρα της διαδικασίας διαφοροποίησης. (Γ) Παραγωγή αγγειακών οργανοειδών. Τα αγγειακά οργανοειδή δημιουργήθηκαν σε 2 ημέρες με τη μέθοδο της κρεμαστής σταγόνας. Τα ΕΚ που επισημάνθηκαν με πράσινη κυτταρική χρώση και τα τοιχωματικά κύτταρα με κόκκινη κυτταρική χρώση χρησιμοποιήθηκαν για τον σχηματισμό αγγειακών οργανοειδών (μεσαίο πλαίσιο). Παρουσιάζεται η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης αγγειακών οργανοειδών με χρήση συνθετικών και συσταλτικών τοιχωματικών κυττάρων. (Δ) Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει τη δοκιμασία εκβλάστησης που χρησιμοποιήθηκε σε αγγειακά οργανοειδή τοποθετημένα σε Matrigel.

Με σκοπό την μελέτη του μεταγραφώματος των διαφοροποιημένων κυττάρων προερχόμενα από hiPSCs LRRK2 G2019S και τα κύτταρα-μάρτυρες (isogenic control) hiPSCs LRRK2 G2019S GC, τόσο σε βασικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες επαγωγής από τον VEGF, ΕΚ επιστρώθηκαν σε τρυβλία επικαλυμμένα με ινωδονεκτίνη και την ημέρα όπου η κάλυψη της επιφάνειας ήταν σε ποσοστό 80%, πραγματοποιήθηκε στέρωση VEGF από το βασικό θρεπτικό καλλιέργειας για 2 ώρες και έπειτα πραγματοποιήθηκε επαγωγή με VEGF για 60 και 180 λεπτά αντίστοιχα (πειραματική διάταξη στην παρακάτω εικόνα). Η παραπάνω πειραματική προσέγγιση επαναλήφθηκε δύο φορές, έτσι ώστε να έχουμε συνολικά τρεις βιολογικές επαναλήψεις για την απαραίτητη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων βρίσκεται υπό εξέλιξη και στόχος μας είναι η σύγκριση του μεταγραφώματος των ΕΚ προερχόμενα από hiPSCs LRRK2 G2019S με τα κύτταρα-μάρτυρες (isogenic control) hiPSCs LRRK2 G2019S GC, τόσο σε βασικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες επαγωγής από τον VEGF, ώστε να διερευνήσουμε την μεταβολή της σηματοδότησης του μονοπατιού του VEGF υπό το πρίσμα της μετάλλαξης LRRK2 G2019S.



Εικόνα 8: ΕΚ προερχόμενα από hiPSCs LRRK2 G2019S και κύτταρα-μάρτυρες (isogenic control) hiPSCs LRRK2 G2019S GC υποβλήθηκαν σε στέρωση VEGF για 2 ώρες πριν από την επαγωγή τους με τον αυξητικό παράγοντα για 60 και 180 λεπτά. Ακολούθησε απομόνωση RNA, ποσοτικοποίηση και έλεγχος ποιότητας αυτού, πριν την αποστολή του για πειράματα RNASeq.

Αντίστοιχη ανάλυση πραγματοποιείται για τα συστατικά (cSMCs) και συνθετικά (sSMCs) τοιχωματικά κύτταρα που προήλθαν από διαφοροποίηση των hiPSCs LRRK2 G2019S και των κυττάρων-μάρτυρες (isogenic control) hiPSCs LRRK2 G2019S GC.

Εκτός από την ανάλυση της επίδρασης της μετάλλαξης LRRK2 G2019S στη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων, μας ενδιέφεραν και άλλες μεταλλάξεις που σχετίζονται με τη νόσο του Πάρκινσον και οι οποίες δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Για το λόγο αυτό, εξετάσαμε ασθενείς στην Ήπειρο, οι οποίοι είναι γνωστό ότι φέρουν αυτή τη μετάλλαξη (αδημοσίευτα δεδομένα μας), και πραγματοποιήσαμε WGS για να βεβαιωθούμε ότι αυτή η μετάλλαξη μόνη της ήταν υπεύθυνη για τον φαινότυπο της νόσου του Πάρκινσον. Αφού το επιβεβαιώσαμε, απομονώσαμε ινοβλάστες από έναν ασθενή και με τη βοήθεια συνεργατών μας, δημιουργήσαμε hiPSCs που φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Αυτά τα κύτταρα βρίσκονται επί του παρόντος υπό έρευνα.