



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 ανάλυση Whole Exome Sequencing για την ανίχνευση γενετικών αλλαγών σχετιζόμενων με νόσο Alzheimer και νόσο Parkinson.

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): Μονάδα ΔΙΓΕΝΙΑ (ΙΤΕ)

Γενετική ανάλυση Whole Exome Sequencing για την ανίχνευση γενετικών αλλαγών σχετιζόμενων με νόσο Alzheimer και νόσο Parkinson.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Η νόσος Alzheimer (AD) και η νόσος Parkinson (PD) είναι οι πιο κοινές νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Η γενετική των νόσων αυτών είναι εξαιρετικά πολύπλοκη λόγω της ετερογενούς φύσης των διαταραχών. Η πολυπαραγοντική και πολυγονιδιακή φύση των νόσων αυτών έχει αποτελέσει εμπόδιο στην έγκαιρη διάγνωση και πρόβλεψη κινδύνου εμφάνισης.

Το APOE*4 αποτελεί τον ισχυρότερο γενετικό παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση AD, ενώ μελέτες Genome Wide Association Studies (GWAS) έχουν αποκαλύψει περισσότερους από 30 επιπλέον γενετικούς τόπους ευαισθησίας, ο καθένας από τους οποίους έχει σχετικά μικρό μέγεθος επίδρασης και οι οποίοι στο σύνολό τους εξηγούν μόνο το 30% περίπου της γενετικής διακύμανσης της νόσου AD. Ως εκ τούτου ένα μεγάλο μέρος της γενετικής διακύμανσης παραμένει ανεξήγητο.

Η PD αποτελεί και αυτή μια πολυπαραγοντική νόσο, με μεγάλη γενετική ετερογένεια, με το 10% των περιπτώσεων PD να έχουν μεντελική κληρονομικότητα. Τα γονίδια που έχουν ενοχοποιηθεί πιο ισχυρά στις μεντελικές μορφές PD περιλαμβάνουν SNCA, LRRK2, PARK2, ATP13A2, PINK1, DJ-1, VPS35, DNAJC13 και GBA. Σε αυτά και σε άλλα γονίδια, έχουν εντοπιστεί σπάνιες μεταλλάξεις με κυρίαρχη ή υπολειπόμενη κληρονομικότητα, συχνά μέσω Genome Wide Association Studies (GWAS). Επιπλέον, κοινές παραλλαγές ευαισθησίας όπως Πολυμορφισμοί μεμονωμένων νουκλεοτιδίων (SNPs) έχουν ανιχνευθεί σε αυτά τα γονίδια, π.χ. στο LRRK2 και στο SNCA. Ωστόσο, οι γενετικές παραλλαγές που έχουν εντοπιστεί μέχρι τώρα, είτε κοινές είτε σπάνιες, εξηγούν μόλις ένα μικρό μέρος της κληρονομικότητας της PD ενώ για τη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων PD η γενετική διάγνωση παραμένει ανεπίλυτη.

Οι κωδικεύουσες πρωτεϊνικές περιοχές του γονιδιώματος (exome), είναι τα καλύτερα χαρακτηρισμένα και πιο διατηρημένα τμήματα του γονιδιώματος και η πηγή των περισσότερων παραλλαγών που έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα και είναι υπεύθυνες για τις Μεντελικές ασθένειες. Έτσι, η ανάλυση του εξώματος αποτελεί ένα πιο ελκυστικό και λιγότερο δαπανηρό στόχο για την αναγνώριση σπάνιων παραλλαγών με μεγάλη επίδραση στη νόσο.

Σκοπός της παρούσας Ενότητας εργασίας είναι η ανάλυση κλινικών δειγμάτων ασθενών με AD και PD με τη χρήση της μεθοδολογίας Whole Exome Sequencing σε πλατφόρμα αλληλούχισης Ion Torrent S5 (ThermoFisher). Η διευρυμένη γενετική ανάλυση ολόκληρου του εξώματος θα επιτρέψει την ανάδειξη της γενετικής βάσης των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson και το προσδιορισμό μέρους της ελλείπουσας κληρονομικότητας των νόσων αυτών. Απώτερος στόχος είναι η ανάδειξη νέων βιοδεικτών σημαντικών στην πρόωμη διάγνωση και την ανάπτυξη νέων εξατομικευμένων θεραπειών.

Πορεία εργασιών και προόδου:

A) Έχει ολοκληρωθεί ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη πρωτοκόλλων επεξεργασίας κλινικών δειγμάτων ασθενών με νόσο Alzheimer (AD) και η νόσο Parkinson (PD) και πρωτοκόλλων αλληλούχισης κλινικών δειγμάτων με τη μεθοδολογία NGS-WES στην πλατφόρμα αλληλούχισης Ion S5 XL (ThermoFisher).

B) Έχουν ολοκληρωθεί οι διαδικασίες προμήθειας των αντιδραστηρίων και αναλωσίμων Whole Exome Sequencing - WES (ηλεκτρονικός διαγωνισμός).

Γ) Έχει πραγματοποιηθεί NGS-WES σε συνολικά 21 κλινικά δείγματα ασθενών. Έχει ολοκληρωθεί η βιοπληροφορική ανάλυση συνολικά 16 δείγματα ασθενών με Άνοια/Alzheimer και 1 δείγμα ασθενούς με νόσο Parkinson.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΕ

Σχεδιασμός και ανάπτυξη πρωτοκόλλων αλληλούχισης NGS-WES στην πλατφόρμα αλληλούχισης Ion S5 XL (ThermoFisher): Έχει ολοκληρωθεί η ανάπτυξη πρωτοκόλλου απομόνωσης γενωμικού DNA με χρήση του QIAmp DNA Blood mini kit (QIAGEN) σε κλινικά δείγματα περιφερικού αίματος.

Έχει ολοκληρωθεί ο σχεδιασμός, η ανάπτυξη και προτυποποίηση αναλυτικού πρωτοκόλλου αλληλούχισης NGS-WES σε πλατφόρμα αλληλούχισης Ion S5 XL (ThermoFisher). Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει i) τη κατασκευή βιβλιοθηκών με χρήση του kit Ion AmpliSeq™ Exome RDY (ThermoFisher), που καλύπτει περίπου 33Mb αλληλουχίας. Η τεχνολογία στοχεύει στην αλληλούχιση >97% της κωδικοποιούσας αλληλουχίας (εξονικές περιοχές) (Whole Exome Sequencing) με την χρήση της πλατφόρμας αλληλούχισης Ion S5 XL (ThermoFisher). Η εξέταση αυτή είναι σχεδιασμένη ώστε να ανιχνεύει σημειακές μεταλλάξεις και μικρές ελλείψεις/εισδοχές. ii) στοίχιση των αναγνώσεων που παράγονται κατά την αλληλούχιση και χαρτογράφηση στο γονιδίωμα αναφοράς GRCh37/hg19 με το λογισμικό Torrent Suite 5.18.2. iii) επισημείωση των παραλλαγών στο σύνολο των γονιδίων στόχων του WES με χρήση του λογισμικού Ion Reporter 5.20.8.0. iv) αξιολόγηση και χαρακτηρισμό των παραλλαγών που ανιχνεύονται με την χρήση ειδικού αλγοριθμικού συστήματος στην πλατφόρμα VarSome Clinical (Saphetor), σύμφωνα με βάσεις δεδομένων και υπολογιστικά μοντέλα για την πρόβλεψη της παθογονικότητας, την σύνδεση της παραλλαγής με τον φαινότυπο, την συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό κ.α. (ClinVar, GnomAD, ClinGen, NCBI Conserved domains, Mutation Taster, OMIM, dbSNP κ.α). v) τελική αξιολόγηση των ευρημάτων η οποία ακολουθεί τις συστάσεις του Αμερικάνικου Κολεγίου Ιατρικής Γενετικής – ACMG (Richards et al., 2015). Η εξέταση αυτή είναι σχεδιασμένη ώστε να ανιχνεύει σημειακές μεταλλάξεις και μικρές ελλείψεις/εισδοχές.

Προμήθεια αντιδραστηρίων και αναλωσίμων: Διενεργήθηκε ηλεκτρονικός διαγωνισμός με σκοπό τη προμήθεια αντιδραστηρίων και αναλωσίμων Whole Exome Sequencing – WES. Η προμήθεια των αναλωσίμων ολοκληρώθηκε στις 21/5/25.

Εφαρμογή πρωτοκόλλων αλληλούχισης NGS-WES στην πλατφόρμα αλληλούχισης Ion S5 XL (ThermoFisher): Κατά την περίοδο αναφοράς παρελήφθησαν συνολικά 21 κλινικά δείγματα (περιφερικό αίμα) ασθενών με νευροεκφυλιστικά νοσήματα. Συγκεκριμένα παρελήφθησαν 20 δείγματα ασθενών με Άνοια ή πρόδρομή μορφή αυτής, και 1 δείγμα ασθενή με νόσο Parkinson. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωμικού DNA από το σύνολο των δειγμάτων. Πραγματοποιήθηκε η κατασκευή βιβλιοθηκών WES για το σύνολο των δειγμάτων. Έχει ολοκληρωθεί η αλληλούχιση NGS του συνόλου των δειγμάτων που έχουν παραληφθεί, ενώ έχει πραγματοποιηθεί βιοπληροφορική ανάλυση και αξιολόγηση σε συνολικά 17 δείγματα. Αναμένεται η παραλαβή επιπλέον 50 κλινικών δειγμάτων προκειμένου να συγκεντρωθεί ένας ικανός αριθμός κλινικών δειγμάτων ο οποίος θα επιτρέψει να πραγματοποιηθούν μελέτες διερεύνησης νέων πιθανών αιτιοπαθογόνων γονιδίων και γενετικών παραλλαγών στις υπό μελέτη νόσους με σκοπό το προσδιορισμό μέρους της ελλείπουσας κληρονομικότητας των νόσων αυτών.