



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: Δημιουργία ζωικού μοντέλου με διπλή έλλειψη βιοδεικτών υπεύθυνων για τη δημιουργία εκτεταμένης φλεγμονής και μελέτη του φαινοτύπου.

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

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΣΠΗΛΙΑΝΑΚΗΣ (ΙΤΕ)

Δημιουργία ζωικού μοντέλου με διπλή έλλειψη βιοδεικτών υπεύθυνων για τη δημιουργία εκτεταμένης φλεγμονής και μελέτη του φαινοτύπου.

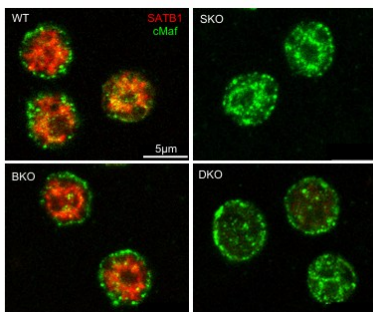
Σύντομη Περιγραφή

Στις ερευνητικές μας προσπάθειες που στοχεύουν στον εντοπισμό παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για τη διαμόρφωση της τρισδιάστατης δομής του γονιδιώματος, εντοπίσαμε δύο πολλά υποσχόμενους υποψηφίους, τις πρωτεΐνες SATB1 και BACH1. Για να αποσαφηνίσουμε τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς τους, δημιουργήσαμε ποντικούς που φέρουν τη διαγραφή είτε του γονιδίου *Bach1* (BKO), του γονιδίου *Satb1* (SKO) ή και των δύο γονιδίων *Bach1* και *Satb1* (DKO). Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός αυτών των ποντικών έχει δείξει ότι το ποντίκι με έλλειψη του *Bach1* είναι απόλυτα υγιές, το ποντίκι με έλλειψη του *Satb1* πάσχει από σοβαρή αυτοανοσία και γενικευμένη φλεγμονή, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου και το ποντίκι με διπλή έλλειψη (*Bach1* & *Satb1* ή αλλιώς DKO) είναι υγιές.

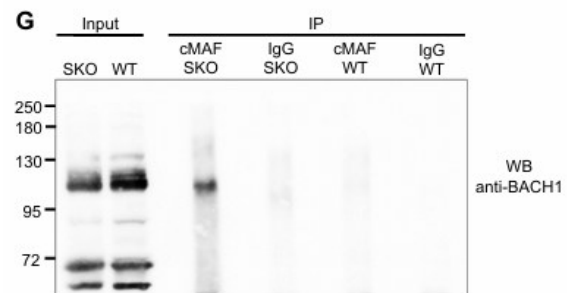
Πραγματοποιήθηκαν πειράματα RNAseq και single-cell RNAseq σε θυμοκύτταρα και σπληνοκύτταρα ποντικού με διπλή έλλειψη *Bach1* & *Satb1* σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα αγρίου τύπου καθώς και αυτά με έλλειψη μόνο του *Satb1*.

Τα πειράματα RNAseq στα κύτταρα των προαναφερθέντων γονοτύπων κατέδειξαν ότι το πλέον διαφορετικά εκφραζόμενο γονίδιο μεταξύ των κυττάρων από αγρίου τύπου και κυττάρων με έλλειψη του *Satb1* είναι το πρωτοογκογονίδιο *c-Maf*.

Το scRNAseq στα θυμοκύτταρα των διαφόρων γονοτύπων επιβεβαίωσε την εκτοπική έκφραση του παράγοντα cMAF σε υποπληθυσμό των θυμοκυττάρων και πειράματα ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι η πρωτεΐνη cMAF εντοπίζεται στον πυρήνα τους (Εικόνα 1). Στη συνέχεια, πειράματα ανοσοκατακρίμησης έδειξαν ότι οι παράγοντες BACH1 και cMAF αλληλεπιδρούν στα θυμοκύτταρα του SKO (Εικόνα 2).



Εικόνα 1 Ανοσοφθορισμός των πρωτεϊνών SATB1 και cMAF στα θυμοκύτταρα των διαφόρων γονοτύπων

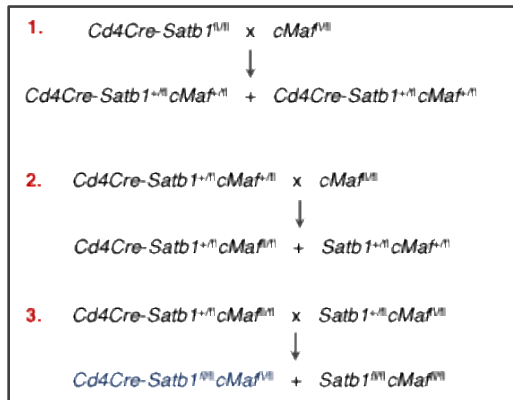


Εικόνα 2 Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης BACH1 κατά Western μετά από ανοσοκατακρίμηση με αντίσωμα ειδικό για cMAF

Προκειμένου να εκτιμήσουμε την σημασία της εκτοπικής έκφρασης του cMAF στην εμφάνιση της αυτοανοσίας προτείναμε την κατασκευή ζωικού μοντέλου που θα φέρει ιστοειδική έλλειψη του γονιδίου

cMaf σε υπόστρωμα με έλλειψη επίσης του γονιδίου *Satb1*. Το ζωικό μοντέλο με τη διπλή έλλειψη (που στο εξής θα αναφέρεται ως DcKO) θα χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της αναστολής του φλεγμονώδους φαινοτύπου.

Το σχήμα γενετικών διασταυρώσεων που ακολουθήθηκε προκειμένου να λάβουμε το γενετικά τροποποιημένο ποντίκι με τη διπλή έλλειψη των γονιδίων *Satb1* και *c-Maf* είναι το παρακάτω:

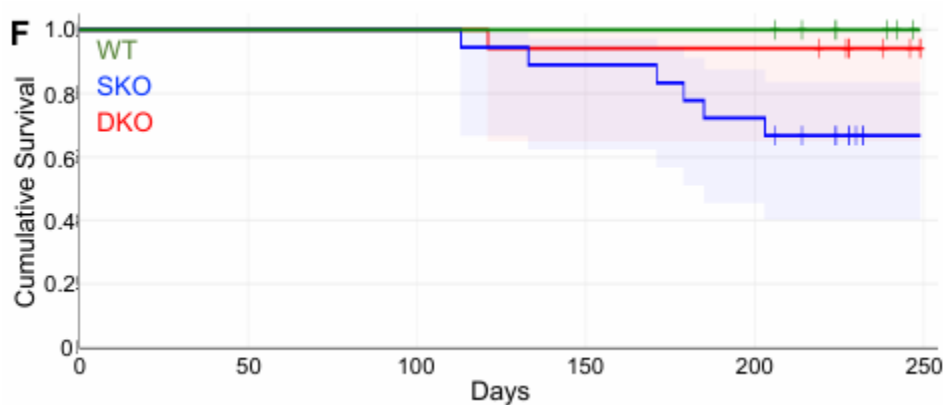


Προκειμένου να διερευνήσουμε αν ο παράγοντας cMAF είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του αυτοάνοσου φαινοτύπου που προκαλεί η έλλειψη του SATB1 στα θυμοκύτταρα, πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις μεταξύ $Cd4CreSatb1^{fl/fl}$ και $cMaf^{fl/fl}$ ζώων για να παραχθεί το στέλεχος $Cd4CreSatb1^{fl/fl}Maf^{fl/fl}$ (DcKO) με θυμοκύτταρα που φέρουν διπλή έλλειψη, των παραγόντων SATB1 και cMAF.

Καμπύλες επιβίωσης – κλινική εικόνα – γονιμότητα

Οι καμπύλες επιβίωσης των στελεχών αγρίου τύπου (WT), SKO και DKO που παρουσιάζονται στην εικόνα 3 (Εικόνα 3) απεικονίζουν τη βελτίωση του προσδόκιμου επιβίωσης στο DKO σε σχέση με το SKO.

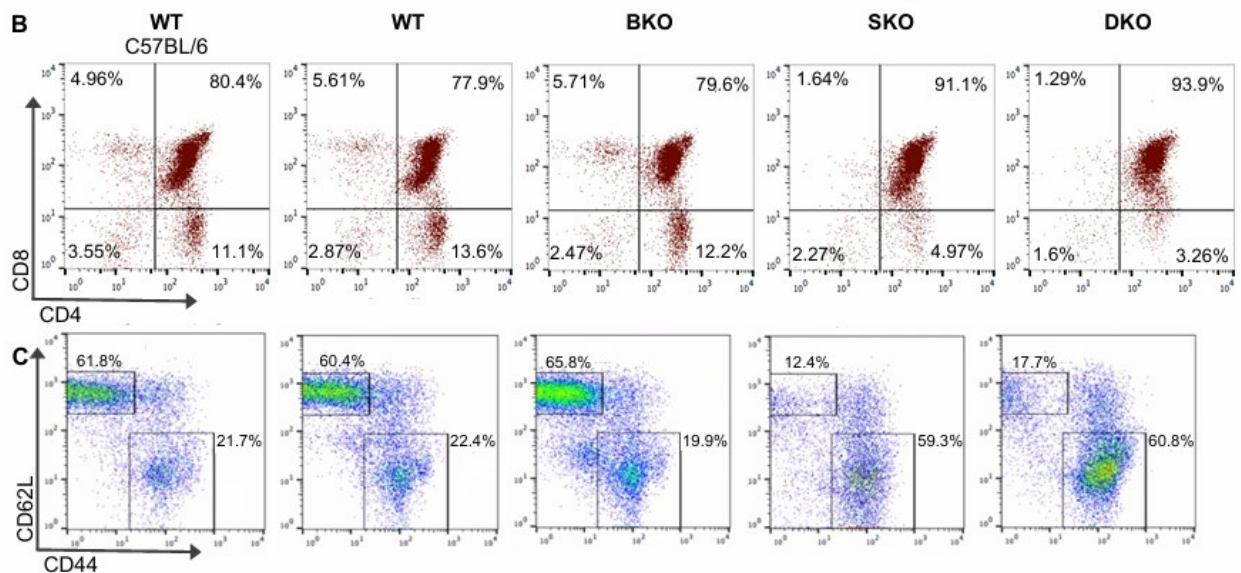
Τα ζώα με γενετικό υπόβαθρο DcKO παρουσίασαν ανάπτυξη, γονιμότητα και κλινική εικόνα στη διάρκεια που τα έχουμε παρακολουθήσει παρόμοιες με τα ζώα αγρίου τύπου. Η διάρκεια που τα παρακολουθούμε δεν είναι αρκετή για την δημιουργία καμπύλης επιβίωσης



Εικόνα 3 Καμπύλες επιβίωσης στελεχών ποντικών με γενετικές τροποποιήσεις SKO, DKO και στελέχους αγρίου τύπου (WT)

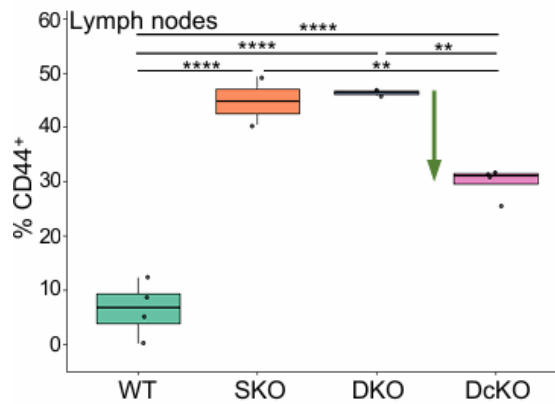
Ανοσολογικά χαρακτηριστικά

Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS ανάλυση) των θυμοκυττάρων που απομονώθηκαν από τα διαφορετικά στελέχη με δείκτες τα αντιγόνα CD4 και CD8 που παρουσιάζονται στην κυτταρική του μεμβράνη δείχνουν την φραγή στην ανάπτυξη των DP θυμοκυττάρων (θυμοκύτταρα που εκφράζουν και τα δύο αντιγόνα) στα στελέχη SKO και DKO σε σχέση με τα στελέχη αγρίου τύπου και ΒΚΟ. Τα περιφερικά λεμφοκύτταρα που αναλύθηκαν με τους διαμεμβρανικούς δείκτες CD44 και CD62L δείχνουν ότι στα στελέχη SKO και DKO τα CD62L θετικά που αντιπροσωπεύουν ένα πληθυσμό λεμφοκυττάρων «αθώο» και ανενεργό είναι πολύ περιορισμένα σε αριθμό, σε αντίθεση με τα κύτταρα που φέρουν το δείκτη CD44, ο οποίος μαρτυρά ενεργοποίηση των κυττάρων. Η αύξηση των ενεργοποιημένων κυττάρων στην περιφέρεια αποτελεί την πρώτη απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη του αυτοάνοσου φαινοτύπου στο SKO. Η παρουσία τους όμως και στο DKO, μαρτυρά ότι η παρουσία των ενεργοποιημένων κυττάρων είναι αναγκαία αλλά όχι ικανή για την ανάπτυξη του αυτοάνοσου φαινοτύπου. Συμπεραίνουμε ότι η απαλοιφή του παράγοντα BACH1 στο στέλεχος DKO μεταβάλλει τις ιδιότητες των ενεργοποιημένων κυττάρων με αποτέλεσμα να τα καθιστά λιγότερο φλεγμονώδη.



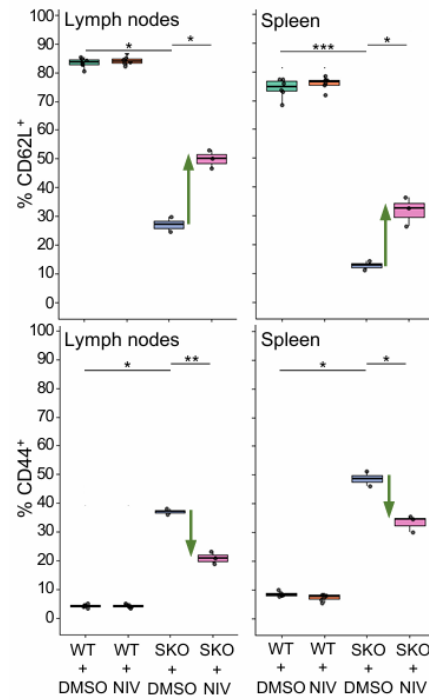
Εικόνα 4 Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής θυμοκυττάρων (πάνω) και περιφερικών λεμφοκυττάρων (κάτω) όπου ανιχνεύονται κύτταρα με δείκτες αναπτυξιακούς (CD4, CD8) και χαρακτηριστικούς της ενεργοποίησής τους (CD62L, CD44)

Στην περίπτωση του στελέχους με διπλή απαλοιφή των SATB1 και cMAF (DcKO) παρατηρήθηκε ότι τα περιφερικά T λεμφοκύτταρα που απομονώθηκαν από λεμφαδένες εμφάνισαν μειωμένα ποσοστά ενεργοποιημένων κυττάρων T δραστικής μνήμης CD44⁺ (effector memory cells) συγκριτικά με αυτά του SKO (Εικόνα 5).

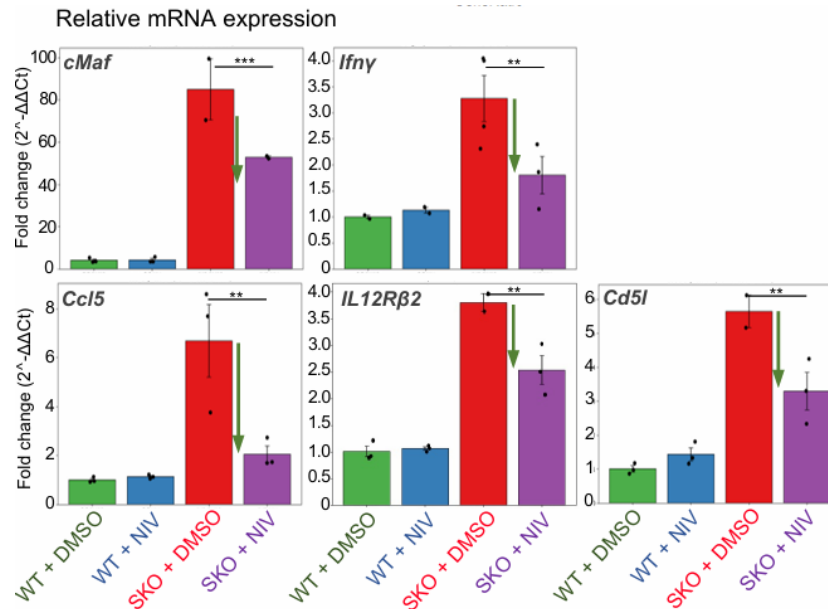


Εικόνα 5 Κατανομή του ποσοστού των ενεργοποιημένων περιφεριακών CD44⁺ κυττάρων στους λεμφαδένες ποντικών των τεσσάρων γονοτύπων

Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε και η φαρμακευτική παρεμπόδιση του παράγοντα cMAF με χρήση του ειδικού αναστολέα Nivalenol. Η χορήγηση του φαρμάκου δια στόματος σε SKO ζώα ηλικίας 20-30 ημερών μείωσε τα δραστικά T κύτταρα μνήμης CD44⁺ σε σπλήνα και λεμφαδένες ενώ παράλληλα αύξησε τα ανενεργά CD62L⁺ κύτταρα (Εικόνα 6). Επίσης, με πειράματα qRT-PCR φάνηκε ότι η εφαρμογή του φαρμάκου περιορίσε την έκφραση των προφλεγμονωδών γονιδίων στόχων του παράγοντα cMAF (*Ifng*, *Ccl5*, *Il12rb2*, *Cd5l*) στα SKO θυμοκύτταρα (Εικόνα 7).



Εικόνα 6 Κατανομή του ποσοστού των περιφεριακών CD44⁺ (ενεργοποιημένων) κυττάρων και των CD62L⁺ (μη ενεργοποιημένων) κυττάρων στους λεμφαδένες και στον σπλήνα ποντικών αγρίου τύπου και SKO στους οποίους έχει χορηγηθεί ο αναστολέας του cMAF, Nivalenol ή ο διαλύτης DMSO για control.



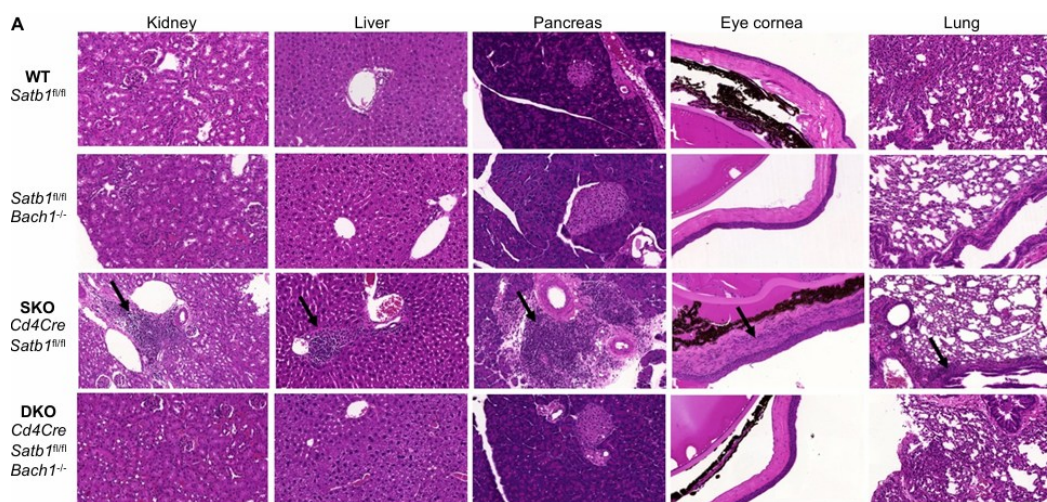
Εικόνα 7 Σχετική ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης του *cMaf* καθώς και των χαρακτηριστικών προφλεγμονωδών γονιδίων *Ifny*, *Ccl5*, *Il12rβ2* και *Cd5l* σε θυμοκύτταρα ποντικών WT και SKO στα οποία έχει χορηγηθεί είτε DMSO (control) είτε Nivalenol (διαλυμένο σε DMSO).

Διήθηση Τ λεμφοκυττάρων σε ιστούς

Τα ενεργοποιημένα κύτταρα της περιφέρειας αναπτύσσουν επιθετικό, φλεγμονώδη χαρακτήρα και διηθούν όργανα όπως το νεφρό, το ήπαρ, το πάγκρεας, τον πνεύμονα, το νευρικό σύστημα, το δέρμα και άλλους. Εκεί η συσσώρευσή τους και η ανοσολογική τους δραστηριότητα προκαλούν φθορά και τελικά καταστροφή του ιστού. Στην Εικόνα 8 παρουσιάζονται τομές από διάφορα όργανα των στελεχών WT, BKO (*Satb1^{fl/fl} Bach1^{-/-}*), SKO και DKO.

Η διήθηση είναι έκδηλη στα όργανα του SKO. Οι περιοχές που έχουν διηθηθεί από Τ λεμφοκύτταρα επισημαίνονται με μαύρο τόξο. Αντίθετα στο DKO δεν παρατηρήθηκαν τέτοιες αλλοιώσεις.

Η ιστολογική ανάλυση των DcKO ζώων δεν έχει ακόμη ολοκληρωθεί.



Εικόνα 8 Τομές ποικιλίας ιστών από ποντίκια των διαφόρων στελεχών που έχουν υποστεί χρώση H&E (αιματοξυλίνη&εοσίνη)

Συνολικά τα παραπάνω ευρήματα μαρτυρούν ότι οι παράγοντες *BACH1* και *cMAF* συνεργάζονται στη διαμόρφωση ενός ρυθμιστικού δικτύου έκφρασης που ενεργοποιεί γονίδια που συμμετέχουν στην επαγωγή φλεγμονής στα περιφερικά $CD4^+$ T λεμφοκύτταρα στα ποντίκια SKO. Τα αποτελέσματα αυτά αντικατοπτρίζουν μοριακή υπογραφή της ανθρώπινης αυτοάνοσης νόσου Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος.

Καθώς η απουσία ή η καταστολή του παράγοντα *cMAF* αρκεί για την αναστροφή του αυτοάνοσου φαινοτύπου στα SKO, πιστεύουμε ότι η δυνατότητα φαρμακευτικής στόχευσης του άξονα SATB1–*BACH1*–*cMAF* στην αυτοανοσία είναι πολλά υποσχόμενη.

Είδος Παραδοτέου:

- Πιλοτική κατασκευή
- Οι διασταυρώσεις έχουν ολοκληρωθεί και βρισκόμαστε στη φάση δημιουργίας ικανού αριθμού γενετικά τροποποιημένων ζώων που θα χρησιμοποιηθούν για τη στατιστική επεξεργασία αναστροφής του φλεγμονώδους φαινοτύπου και την ιστολογική μελέτη του νευροεκφυλισμού.

Παράδοση (μήνας):

24