



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:** Ανάλυση Γονιδιωματικών Δεδομένων νόσου Alzheimer 's μέσω του Δικτύου Πρωτεϊνικών Αλληλεπιδράσεων

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

**ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ):** ΜΑΡΙΑ ΚΛΑΠΑ – ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΜΟΣΧΟΝΑΣ (ΙΤΕ)

## Ανάλυση Γονιδιωματικών Δεδομένων νόσου Alzheimer 's μέσω του Δικτύου Πρωτεϊνικών Αλληλεπιδράσεων

### Περιεχόμενα

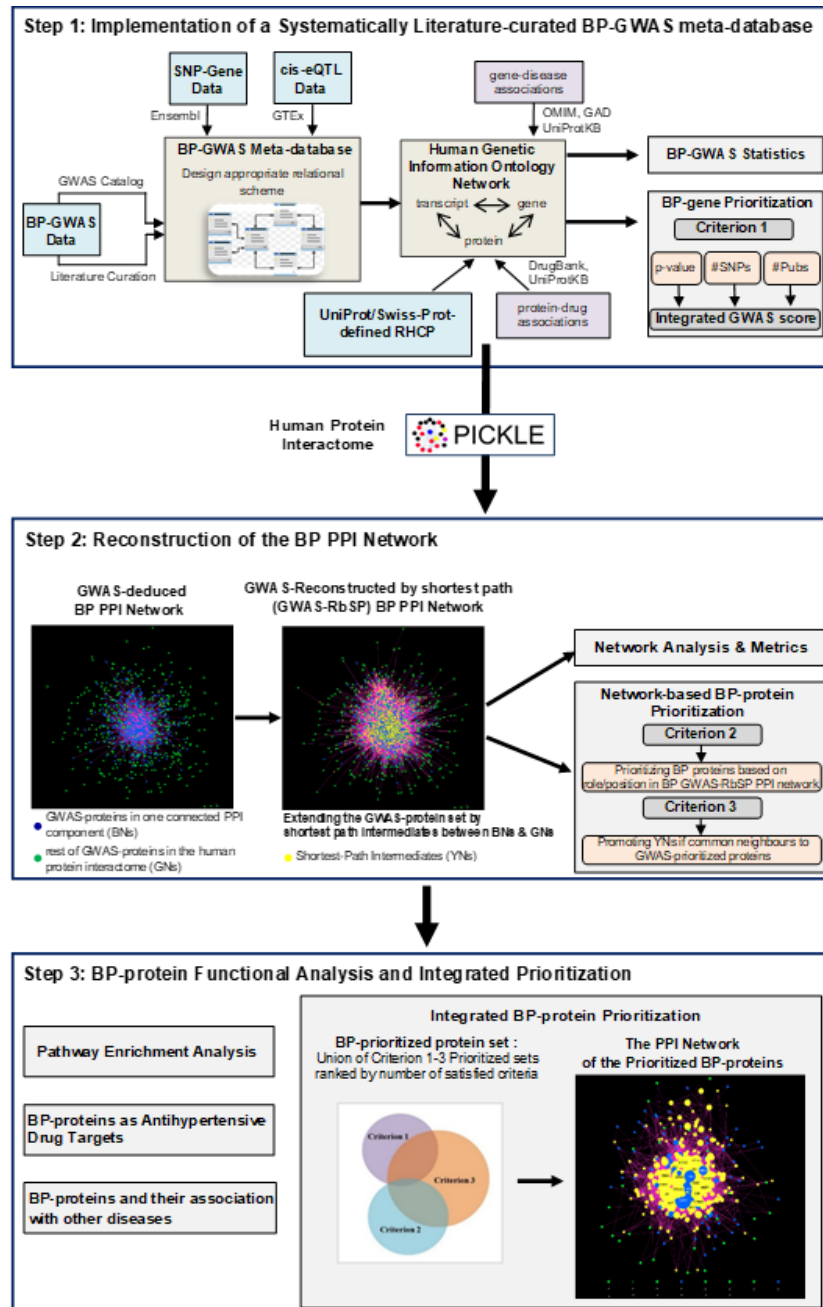
|           |  |                              |
|-----------|--|------------------------------|
| <b>1.</b> | <b><u>Εισαγωγή</u></b> .....   | Error! Bookmark not defined. |
| <b>2.</b> | <b><u>Στόχος</u></b> .....   | Error! Bookmark not defined. |
| <b>3.</b> | <b><u>Μεθοδολογία</u></b> .....  | Error! Bookmark not defined. |
| <b>4.</b> | <b><u>Αποτελέσματα</u></b> .....   | <b>6</b>                     |
| 4.1       | <u>Σύνολο δεδομένων GWAS που σχετίζεται με την AD</u> .....                          | 6                            |
| 4.2       | <u>Προτεραιοποίηση AD -γονιδίων βάσει κριτηρίων GWAS</u> .....                       | 8                            |
| 4.3       | <u>Ανάλυση cis-eQTL</u> .....  | 9                            |
| 4.4       | <u>Ανακατασκευή του σχετικού με την AD δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων</u> ..... | 10                           |
| 4.5       | <u>Προτεραιοποίηση πρωτεϊνών βάσει κριτηρίων του δικτύου</u> .....                   | 12                           |
| 4.6       | <u>Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού</u> .....                                       | 13                           |
| 4.7       | <u>AD-πρωτεΐνες και φάρμακα</u> .....  | 16                           |
| 4.8       | <u>AD και συννοσηρότητα</u> .....  | 16                           |
| <b>5.</b> | <b><u>Συζήτηση</u></b> .....   | <b>17</b>                    |
| <b>6.</b> | <b><u>Βιβλιογραφία</u></b> .....   | <b>19</b>                    |

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η νόσος Αλτσχάιμερ (Alzheimer's Disease- AD) αποτελεί την πιο συχνή νευροεκφυλιστική νόσο και συνιστά ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα δημόσιας υγείας, καθώς ευθύνεται για τη συντριπτική πλειονότητα των περιστατικών άνοιας παγκοσμίως (Zheng and Wang, 2024). Παρόλο που τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί σημαντική ερευνητική προσπάθεια, οι βιολογικές διεργασίες που οδηγούν στη νευροεκφύλιση παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ασαφείς, γεγονός που αντικατοπτρίζεται και στον περιορισμένο αριθμό αποτελεσματικών θεραπευτικών παρεμβάσεων (Singh *et al.*, 2024). Η συμβολή των γενετικών παραγόντων στην παθοφυσιολογία της AD είναι καθοριστική και στο πλαίσιο αυτό, οι μελέτες γενετικής ανάλυσης γονιδιωματικής κλίμακας (Genome Wide Association Studies-GWAS) έχουν προσφέρει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη γενετική της βάση της AD (Andrews *et al.*, 2023). Ωστόσο, η εστίαση των GWAS σε μεμονωμένες γενετικές παραλλαγές, όπως οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide polymorphisms, SNPs), περιορίζει την ικανότητά τους να αποδώσουν τη σύνθετη γενετική δομή της AD. Η παρατήρηση αυτή υπογραμμίζει την πολυπαραγοντική φύση της νόσου και καταδεικνύει την ανάγκη για προσεγγίσεις που ενσωματώνουν συμπληρωματικές πηγές και επίπεδα γενετικής πληροφορίας (Zhang *et al.*, 2024).

Η ερμηνεία των ευρημάτων των μελετών GWAS έχει ενισχυθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια χάρη στη συμβολή της συστημικής προσέγγισης στη βιολογία, η οποία αντιμετωπίζει τα νοσήματα ως αποτέλεσμα πολύπλοκων δικτύων βιομοριακών αλληλεπιδράσεων και όχι ως συνέπεια μεμονωμένων γενετικών μεταβολών (Visonà *et al.*, 2024). Στο πλαίσιο αυτό, η ανάλυση γενετικών δεδομένων μέσω δικτυακών μοντέλων επιτρέπει την αποκάλυψη λειτουργικών σχέσεων μεταξύ γονιδίων και βιολογικών οδών που συνδιαμορφώνουν τη μοριακή βάση πολυπαραγοντικών ασθενειών, καθώς η μοριακή παθοφυσιολογία τους προκύπτει από τη συνδυαστική διαρρύθμιση πολλαπλών αλληλεπιδρώντων γενετικών παραγόντων (Tsare *et al.*, 2024). Κεντρικό ρόλο σε αυτές τις αναλύσεις κατέχουν τα δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (protein-protein interaction, PPI), τα οποία παρέχουν μια ολοκληρωμένη απεικόνιση της κυτταρικής λειτουργίας σε επίπεδο πρωτεϊνών, δηλ. των βασικών ρυθμιστών της πλειονότητας των βιολογικών διεργασιών, και επιτρέπουν τη σύνδεση των γενετικών παραλλαγών που εντοπίζονται από τις GWAS με συγκεκριμένες βιολογικές διεργασίες. Η εφαρμογή τέτοιων δικτυακών προσεγγίσεων έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη στη διερεύνηση της μοριακής αρχιτεκτονικής σύνθετων νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένης της AD (π.χ. Rosenthal *et al.*, 2022), καθώς διευκολύνει τον εντοπισμό κρίσιμων μοριακών κόμβων και λειτουργικών μονοπατιών με πιθανή παθογενετική σημασία. Κατά συνέπεια, η αξιοποίηση δικτύων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων συνιστά ένα ισχυρό εργαλείο για τη βαθύτερη κατανόηση της AD και μπορεί να συμβάλει ουσιαστικά στην ανάδειξη νέων στόχων για θεραπευτική παρέμβαση.

Σε πρόσφατη δημοσίευση της ερευνητικής μας ομάδας (Tsare *et al.*, 2024) αναπτύχθηκε ένα ολοκληρωμένο υπολογιστικό πρωτόκολλο με στόχο τη λειτουργική αξιοποίηση των δεδομένων GWAS που αφορούν τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, μέσω της ενσωμάτωσής τους σε ένα πλαίσιο ανάλυσης βασισμένο σε δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, όπως συνοψίζεται σχηματικά στην Εικόνα 1. Η προσέγγιση αυτή περιλαμβάνει τη συστηματική συλλογή ενός αξιόπιστου συνόλου γενετικών συσχετίσεων, μέσω της ανάπτυξη μιας συστηματικά επιμελημένης από τη βιβλιογραφία βάσης δεδομένων GWAS για τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης (βλ. Step 1, Εικόνα 1). Στη συνέχεια, το σύνολο των δεδομένων GWAS αξιοποιείται για την ανακατασκευή του πρωτεϊνικού δικτύου που σχετίζεται με το φαινότυπο, το οποίο εμπλουτίζεται με επιπλέον πρωτεΐνες που εμφανίζουν αυξημένη πιθανότητα συμμετοχής στη νόσο (βλ. Step 2, Εικόνα 1). Τέλος, στο ανακατασκευασμένο δίκτυο πραγματοποιείται λειτουργική ανάλυση, με σκοπό τον προσδιορισμό σχετικών βιολογικών μονοπατιών και την ιεράρχηση υποψήφια γονιδίων και πρωτεϊνών σύμφωνα με συνδυαστικά κριτήρια που αντλούνται από τα δεδομένα GWAS και την ανάλυση του ανακατασκευασμένου δικτύου, καθώς και την ταυτοποίηση πρωτεϊνών-στόχων φαρμάκων και συννοσηροτήτων (βλ. Step 3, Εικόνα 1). Η εν λόγω υπολογιστική μεθοδολογία παρουσιάζει δυνατότητα γενίκευσης και μπορεί να εφαρμοστεί στη μελέτη της μοριακής βάσης και άλλων, πολυπαραγοντικών νοσημάτων μεταξύ των οποίων και της AD.



Εικόνα 1: Ολοκληρωμένο υπολογιστικό πρωτόκολλο για την συνδυαστική ανάλυση των δεδομένων GWAS μέσω του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Tsare et.al 2024).

## 2. ΣΤΟΧΟΣ

Ο ευρύτερος στόχος αυτής της μελέτης, αφορά στη συστηματική συλλογή και επιμέλεια γονιδιωματικών και λειτουργικών δεδομένων για τη νόσο Alzheimer's, μια συχνή νευροεκφυλιστική ανίατη ασθένεια που οδηγεί σε προοδευτική απώλεια μνήμης και λόγου, από σχετικές δημόσιες βάσεις δεδομένων, τη βιβλιογραφία και τη παρούσα μελέτη και την ανάλυσή τους στο πλαίσιο του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του ανθρώπου, όπως ανακατασκευάζεται με βάση την πρότυπη μετα-βάση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων PICKLE του

Εργαστηρίου ([http:// www.pickle.gr](http://www.pickle.gr)). Σκοπός είναι ο προσδιορισμός σχετικών μονοπατιών και η προτεραιοποίηση γονιδίων/πρωτεϊνών που θα μπορούν να αξιοποιηθούν ως πλέον αξιόπιστοι βιοδείκτες πρώιμης και έγκαιρης διάγνωσης ή/και στόχοι φαρμάκων/θεραπευτικών αγωγών. Στο πλαίσιο αυτό και με βάση το υπολογιστικό πρωτόκολλο των Tsare *et al.*, 2024 που παρουσιάστηκε προηγουμένως οι επιμέρους στόχοι της αυτής της μελέτης και του παραδοτέου αφορούν:

- Στην συλλογή γενετικών δεδομένων που σχετίζονται με την AD από GWAS και γονιδιωματικών πληροφοριών για τις γενετικές παραλλαγές που προσδιορίζονται από αυτές τις μελέτες.
- Στην ανάλυση της συνδεσιμότητας των δεδομένων GWAS μέσω του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, την ανακατασκευή του σχετικού με την AD πρωτεϊνικού δικτύου και την ανάδειξη νέων πρωτεϊνών που ενδέχεται να συμμετέχουν στη μοριακή βάση της νόσου.
- Στην λειτουργική ανάλυση του ανακατασκευασμένου δικτύου για των προσδιορισμό βιολογικών μονοπατιών και την ιεράρχηση γονιδίων/πρωτεϊνών που εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα συσχέτισης με τη νόσο βάσει συνδυαστικών κριτηρίων που αντλούνται από τα δεδομένα GWAS και τα τοπολογικά χαρακτηριστικά του δικτύου.
- Στη διερεύνηση πρωτεϊνών που αποτελούν γνωστούς στόχους φαρμάκων για την AD, καθώς και της συμμετοχής τους σε άλλα νοσήματα πέραν της AD για την ανάδειξη συννοσηροτήτων.

### 3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Τα δεδομένα GWAS που αφορούν τις συσχετίσεις των SNPs με την AD συλλέχθηκαν από την GWAS Catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>). Οι γονιδιωματικές πληροφορίες για τους SNPs που αφορούν, μεταξύ άλλων, όλες τις πιθανές συνέπιες που έχουν στην λειτουργία των μεταγράφων και κατ'επέκταση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από αυτά εξορύχθηκαν από την Ensembl (<https://www.ensembl.org/>), μέσω του εργαλείου Variant Effect Predictor (VEP). Παράλληλα, ενσωματώθηκαν ιστοειδικές συσχετίσεις SNP-γονιδίου που προκύπτουν από αναλύσεις *cis*-eQTL (expression Quantitative Trait Loci), αξιοποιώντας τη Genotype-Tissue Expression (GTEx) Portal, (<https://gtexportal.org>).

Τα γονίδια και οι πρωτεΐνες που προέκυψαν από την ανάλυση των δεδομένων GWAS χαρτογραφήθηκαν στο δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων του ανθρώπου της μετα-βάσης γνώσης PICKLE ([www.pickle.gr](http://www.pickle.gr)) (Dimitrakopoulos *et al.*, 2021). Η PICKLE ενσωματώνει δεδομένα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων από πρωτογενείς πηγές, χαρτογραφώντας τα στο πλήρως αξιολογημένο ανθρώπινο πρωτεϊνωμα (Reviewed Human Complete Proteome-RHCP) της UniProt/SwissProt (<https://www.uniprot.org/>) και στο αρχικό γενετικό επίπεδο χωρίς προγενέστερο μετασχηματισμό. Από το πλήρες δίκτυο της PICKLE εξήχθη το υποσύνολο των GWAS-πρωτεϊνών που σχετίζονται με την AD. Πραγματοποιήθηκε επέκταση αυτού του δικτύου με επιπλέον πρωτεΐνες, προσδιορίζοντας όλα τα συντομότερα μονοπάτια που ενώνουν όλες τις AD GWAS-πρωτεΐνες σε ένα ενιαίο δίκτυο (ανακατασκευασμένο πρωτεϊνικό δίκτυο της AD), με βάση τον αλγόριθμο που περιγράφεται στην εργασία των Tsare *et al.*, 2024. Η οπτικοποίηση των πρωτεϊνικών δικτύων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Cytoscape (<https://cytoscape.org/>), ενώ η ανάλυση των ιδιοτήτων τους έγινε μέσω των αντίστοιχων προσθέτων (plugins) του εργαλείου αυτού. Επιπλέον, η σημασία κάθε κόμβου εντός των δικτύων, εκτός των βασικών ιδιοτήτων του, αξιολογήθηκε και με τη χρήση του δείκτη «Integrated Value of Influence (IVI)» (Salavaty *et al.*, 2020), όπως περιγράφεται στην εργασία των Tsare *et al.*, 2024.

Στο ανακατασκευασμένο δίκτυο πραγματοποιήθηκε ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού, με στόχο τον προσδιορισμό βιολογικών μονοπατιών και τη διερεύνηση της σημασίας των επιμέρους

πρωτεϊνών εντός του δικτύου. Η ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού μονοπατιών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<https://www.kegg.jp>) και DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (<https://david.ncifcrf.gov/>). Επιπλέον, ενσωματώθηκαν φαρμακολογικά δεδομένα κάνοντας χρήση των βάσεων UniProtKB και DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>) για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών του συνόλου δεδομένων μας που αποτελούν γνωστούς στόχους φαρμάκων για την AD. Για την ανάλυση συννοσηροτήτων χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων Genetic Association Database (GAD) (Campbell, 2004) μέσω της DAVID.

Τέλος, εφαρμόστηκε ένα ολοκληρωμένο σχήμα ιεράρχησης γονιδίων και πρωτεϊνών που περιγράφεται αναλυτικά στην εργασία των Tsare *et al.*, 2024. Το σχήμα ιεράρχησης στηρίχτηκε στον συνδυασμό τριών κριτηρίων: το πρώτο αφορά στην κατάταξη των γονιδίων βάσει συνδυαστικών δεδομένων GWAS, ενώ τα άλλα δύο βασίζονται στη θέση των πρωτεϊνών στο διευρυμένο πρωτεϊνικό δίκτυο γενικά, και ως προς τις προτεραιοποιημένες GWAS-πρωτεΐνες, ειδικότερα. Τελικά, οι πρωτεΐνες ιεραρχούνται βάσει του αριθμού των κριτηρίων που ικανοποιούν.

## 4. Αποτελέσματα

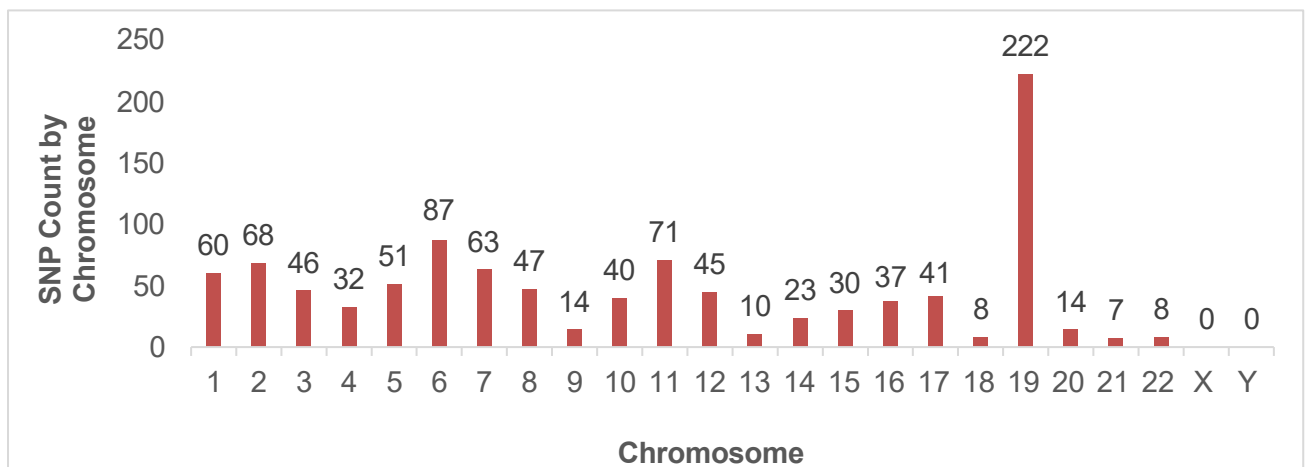
### 4.1 Σύνολο δεδομένων GWAS που σχετίζεται με την AD

Συνολικά, από την GWAS Catalog εξορύχθηκαν όλες οι συσχετίσεις με τιμή στατιστικής σημαντικότητας  $p\text{-value} < 10^{-5}$ , ενώ για την περαιτέρω ανάλυση επιλέχθηκαν οι στατιστικά αξιόπιστες συσχετίσεις με  $p < 5 \times 10^{-8}$ , με αποτέλεσμα ένα σύνολο 1.548 συσχετίσεων για 1.024 SNPs από 73 δημοσιεύσεις (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1: Το μέγεθος του στατιστικά αξιόπιστου συνόλου δεδομένων GWAS που σχετίζεται με την AD.**

|                    | p-value < 10 <sup>-8</sup> |
|--------------------|----------------------------|
| SNPs               | 1024                       |
| Συσχετίσεις SNP-AD | 1548                       |
| Δημοσιεύσεις       | 73                         |

Οι 1024 SNPs κατανέμονται και στα 22 αυτοσωματικά χρωμοσώματα και κανέναν στα φυλετικά χρωμοσώματα X και Y (Εικόνα 2).

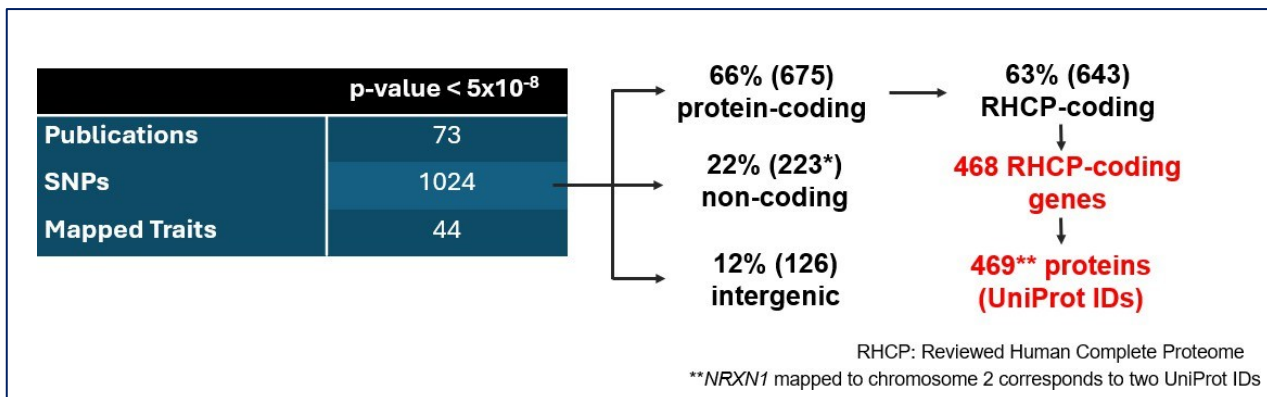


**Εικόνα 2: Χρωμοσωματική κατανομή των σχετιζόμενων με την AD SNPs.**

Το χρωμόσωμα 19 συγκεντρώνει τον μεγαλύτερο αριθμό SNPs. Με βάση τη βιβλιογραφία το μακρύ σκέλος αυτού αποτελεί βασικό γονιδιακό τόπο για την AD καθυστερημένης έναρξης (late

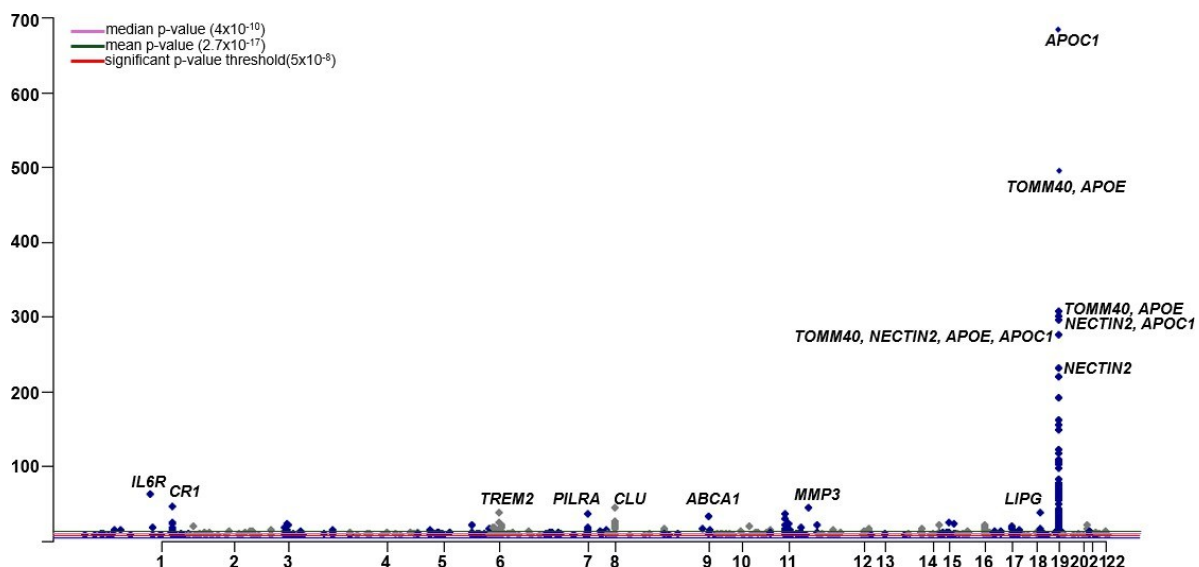
onset AD), καθώς περιλαμβάνει το *APOE*, το οποίο ήταν ο πρώτος και σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για την AD (Corder *et al.*, 1993), και άλλα σχετιζόμενα με την AD γονίδια: *TOMM40*, *EXOC3L2*, *CD33*, *PLD3*, και *ABCA7* (Moreno-Grau *et al.*, 2018).

Το 66% (675) των SNPs επηρεάζουν τη λειτουργία τουλάχιστον ενός μεταγράφου που κωδικοποιεί πρωτεΐνη, το 22% επηρεάζει τη λειτουργία μη κωδικών μεταγράφων, ενώ το 12% εντοπίζεται σε διαγονιδιακές περιοχές (intergenic). Συνολικά, 643 SNPs σχετίζονται με 468 γονίδια που κωδικοποιούν 469 πρωτεΐνες που ανήκουν RHCP (Εικόνα 3).



**Εικόνα 3: Τα γονίδια και οι πρωτεΐνες που σχετίζονται με τους AD-SNPs.**

Η διάμεση τιμή των ελάχιστων τιμών  $p$  είναι  $4.4 \times 10^{-10}$  (Εικόνα 4), με περίπου τα μισά γονίδια να σχετίζονται με SNPs με ελάχιστη τιμή  $p <$  από τη διάμεση (Εικόνα 5A). Περίπου 9% των γονιδίων έχουν ελάχιστη τιμή  $p < 10^{-20}$  και για 11 γονίδια  $< 10^{-50}$ . Οι μικρότερες τιμές καταγράφονται για SNPs στα γονίδια *APOC1*, *TOMM40* και *APOE* (Εικόνα 5A).

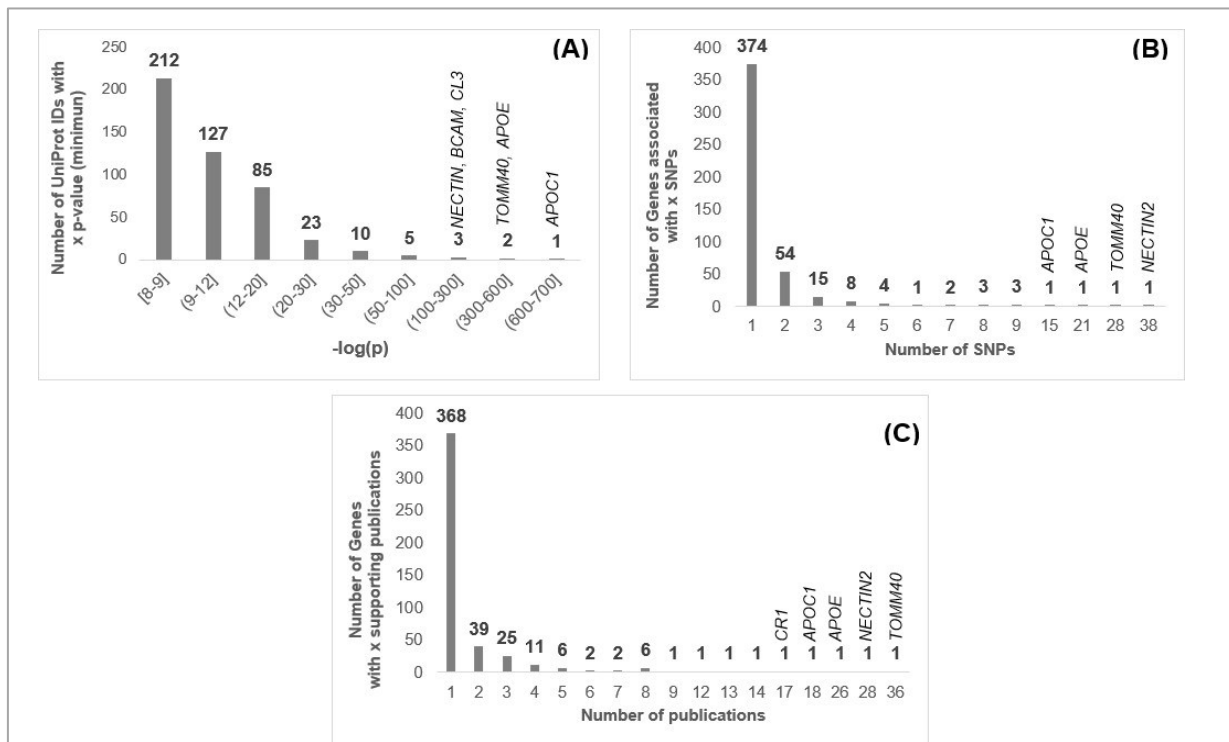


**Εικόνα 4: Η γραφική παράσταση Manhattan των AD-SNPs που σχετίζονται πρωτεΐνες του RHCP, βάσει της ελάχιστης τιμής  $p$  συσχέτισεων.**

Το 80% των 468 γονιδίων σχετίζονται με τουλάχιστον έναν SNP, και τέσσερα με τουλάχιστον πέντε: *APOC1*, *APOE*, *TOMM40*, *NECTIN2* (Εικόνα 5B). Η συσχέτιση για 21% (100) των γονιδίων υποστηρίζεται από δύο τουλάχιστον δημοσιεύσεις, για 13% (61) από τουλάχιστον τρεις και για οκτώ γονίδια από περισσότερες από 10 ανεξάρτητες δημοσιεύσεις: *TOMM40*, *NECTIN2*, *APOE*, *APOC1*, *CR1*, *CLU*, *ABCA7*, και *EPHA1* (Εικόνα 5C).

## 4.2 Προτεραιοποίηση AD -γονιδίων βάσει κριτηρίων GWAS

Χρησιμοποιήθηκε το ολοκληρωμένο σχήμα βαθμολόγησης γονιδίων που βασίζεται στα δεδομένα GWAS (Κριτήριο Προτεραιοποίησης 1), όπως προτάθηκε στην εργασία των Tsare et al. (2024). Το σχήμα βαθμολόγησης λαμβάνει υπόψη όχι μόνο την τιμή  $r$  της συσχέτισης του γονιδίου, όπως χρησιμοποιείται κλασσικά, αλλά και τον αριθμό των SNPs, καθώς και τον αριθμό των υποστηρικτικών δημοσιεύσεων GWAS ανά γονίδιο. Το σκορ αυτό συνοψίζεται στην παρακάτω εξίσωση  $s_i = w_{p-value} \times |\log(\hat{p-value}_i)| + w_{SNP} \times \#SNPs_i + w_{Pub} \times \#Pub_s_i$ , όπου  $w_{p-value}$ ,  $w_{SNP}$  και  $w_{Pub}$  είναι τα αντίστοιχα % βάρη των τριών κριτηρίων GWAs. Προτεραιοποιήθηκαν 14 γονίδια (Πίνακας 2) με τα *TOMM40*, *NECTIN2*, *APOC1* και *APOE* να εμφανίζουν τις υψηλότερες βαθμολογίες, και πλειονότητα των προτεραιοποιημένων γονιδίων (9) χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα 1919.



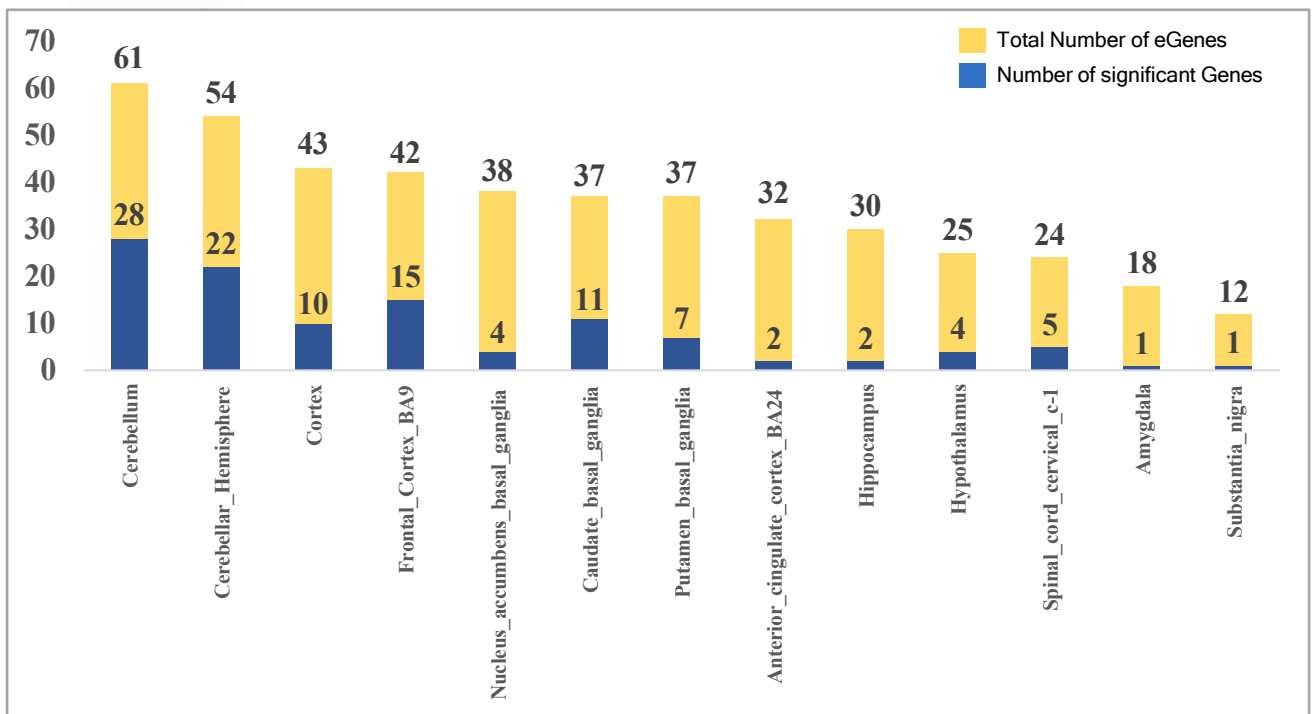
Εικόνα 5: Η κατανομή των AD κωδικών γονιδίων σύμφωνα με την A) ελάχιστη τιμή  $p$  της συσχέτισης, B) του αριθμού των SNPs και C) του αριθμού των δημοσιεύσεων.

**Πίνακας 2: Τα προτεραιοποιημένα γονίδια που σχετίζονται με την AD με βάση το ολοκληρωμένο σκορ GWAS (Κριτήριο Προτεραιοποίησης 1)**

| Rank | Gene Symbol    | p-value | #SNPs | #Pubs | Score |
|------|----------------|---------|-------|-------|-------|
| 1    | <i>TOMM40</i>  | 497     | 28    | 36    | 100   |
| 2    | <i>NECTIN2</i> | 300     | 38    | 28    | 89.4  |
| 3    | <i>APOC1</i>   | 673     | 15    | 18    | 86.6  |
| 4    | <i>APOE</i>    | 497     | 21    | 26    | 84.5  |
| 5    | <i>BCAM</i>    | 192     | 8     | 8     | 30.0  |
| 6    | <i>CRI</i>     | 46      | 9     | 17    | 25.3  |
| 7    | <i>BCL3</i>    | 117     | 8     | 8     | 23.7  |
| 8    | <i>CLU</i>     | 44      | 9     | 14    | 22.9  |
| 9    | <i>ABCA7</i>   | 37      | 9     | 13    | 21.6  |
| 10   | <i>PPP1R37</i> | 71      | 8     | 6     | 18.3  |
| 11   | <i>EPHA1</i>   | 14      | 7     | 12    | 16.6  |
| 12   | <i>CLPTM1</i>  | 64      | 7     | 4     | 15.1  |
| 13   | <i>CD2AP</i>   | 22      | 5     | 8     | 12.0  |
| 14   | <i>SLC24A4</i> | 21      | 5     | 8     | 11.9  |

### 4.3 Ανάλυση cis-eQTL

Προσδιορίστηκαν οι σημαντικές ιστοειδικές συσχετίσεις SNP-γονιδίου ( $q\text{-value} \leq 0.05$ ), που προκύπτουν από αναλύσεις μελετών προσδιορισμού γονιδιωματικών περιοχών ποσοτικής γονιδιακής έκφρασης (expression quantitative trait loci-eQTLs), δηλαδή γονιδιακών περιοχών που ελέγχουν την γονιδιακή ενεργότητα. Οι συσχετίσεις αυτές αφορούν σε 13 περιοχές του εγκεφάλου όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 6. Γονίδια που παρουσιάζουν σημαντικές συσχετίσεις σε έναν συγκεκριμένο ιστό αναφέρονται ως eGenes. Από τα 468 γονίδια, 112 είναι eGenes σε τουλάχιστον μία από τις 13 εγκεφαλικές περιοχές. Είκοσι ένα εμφανίζουν ευρεία ρυθμιστική δράση (>7 περιοχές) και τρία (*CHRNE*, *KAT8*, *SIGLEC11*) σε όλες τις περιοχές. Οι πιο αντιπροσωπευτικές περιοχές σε AD-eGenes (>40) είναι ο μετωπιαίος φλοιός BA9 (frontal cortex BA9), ο φλοιός (cortex), το παρεγκεφαλιδικό ημισφαίριο (cerebellar hemisphere) και η παρεγκεφαλίδα (cerebellum). Αυτά τα αποτελέσματα συνάδουν με βιβλιογραφικές παρατηρήσεις για δομικές και λειτουργικές αλλαγές αυτών των περιοχών σε AD (Leuba *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2024).

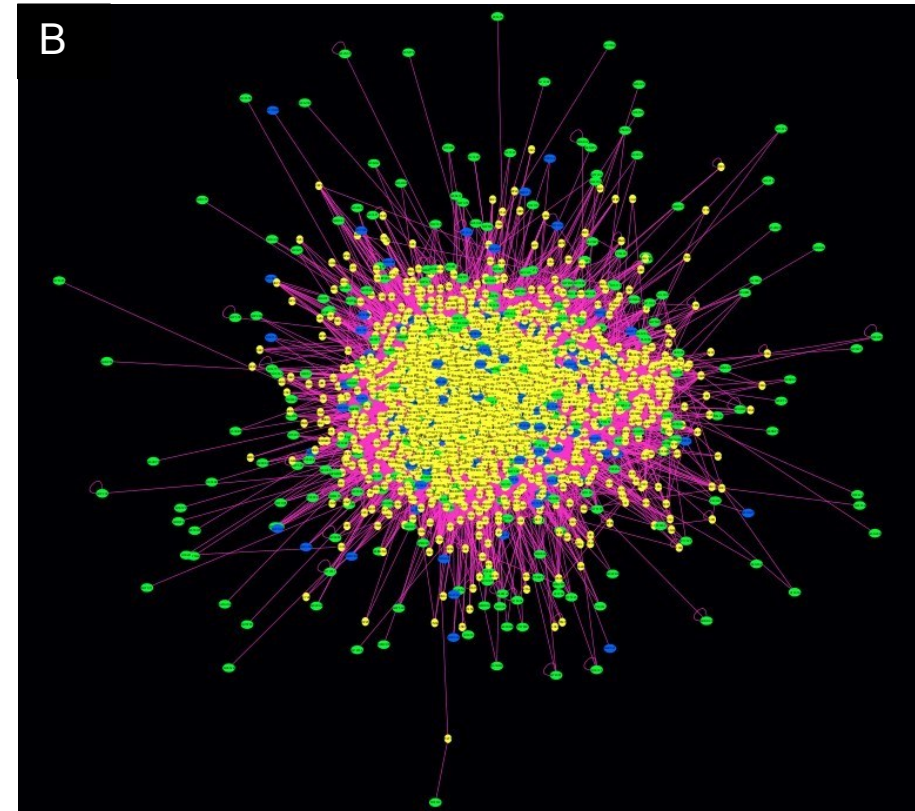
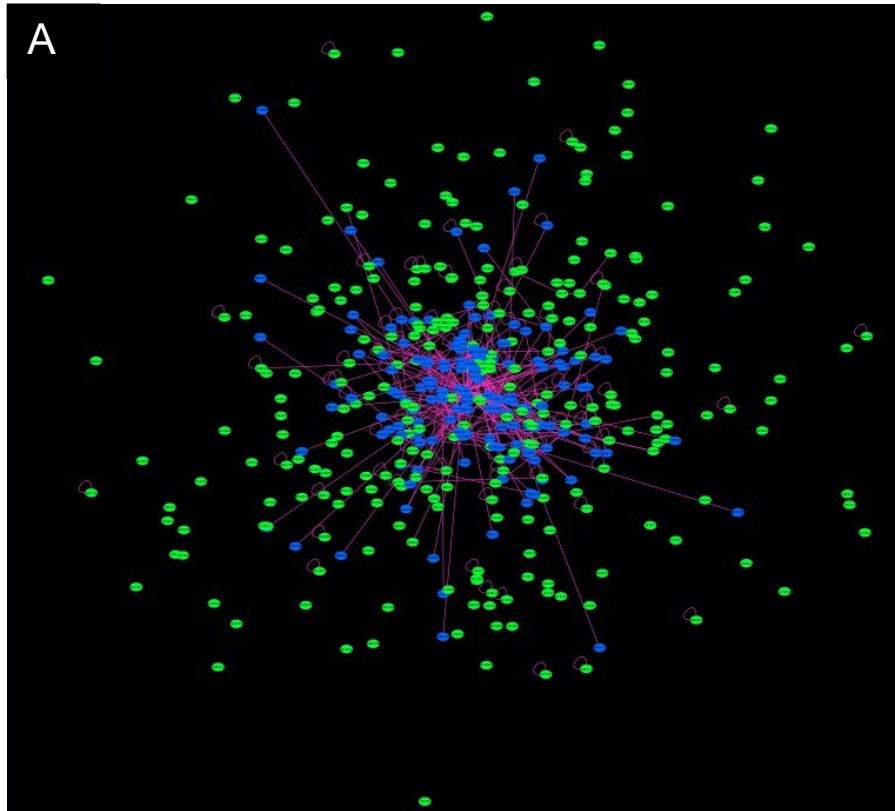


Εικόνα 6: Κατανομή των AD-eGenes σχετικών με την AD. Η κατανομή εμφανίζεται για 13 εγκεφαλικούς ιστούς σε αύξοντα αριθμό eGenes ανά ιστό. Σημαντικά eGenes για έναν ιστό είναι αυτά που εμφανίζονται σε αυτόν τον ιστό την ελάχιστη τιμή  $q$  τους μεταξύ και των 13 ιστών.

#### 4.4 Ανακατασκευή του σχετικού με την AD δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων

Προσδιορίστηκε το δίκτυο των GWAS-πρωτεϊνών σχετιζόμενων με την AD όπως προκύπτει από το ολοκληρωμένο δίκτυο του ανθρώπου. Από τις συνολικά 469 AD-πρωτεΐνες, οι 427 αλληλεπιδρούν τουλάχιστον με μια άλλη και 155 συνδέονται σε ένα μεγάλο υποδίκτυο ("μπλε κόμβοι" -MK, Tsare et al. 2024) μέσω 246 αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 7A). Οι υπόλοιποι που δεν συνδέονται στο υποδίκτυο ("πράσινοι κόμβοι" (ΠΚ), Tsare et al. 2024) είναι κυρίως μονομερή ή ομοδιμερή. Στο υποδίκτυο των μπλε κόμβων η amyloid beta A4 (*APP*) έχει τις περισσότερες αλληλεπιδράσεις (62), ακολουθούμενη από τις *SRC* (20), *APOE* (12) και *RAC1* (12).

Το δίκτυο των GWAS-πρωτεϊνών επεκτάθηκε, ενσωματώνοντας τους ενδιαμέσους κόμβους (2462 "κίτρινοι" κόμβοι – KK) των συντομότερων μονοπατιών που συνδέουν όλες τις GWAS-πρωτεΐνες σε ένα ενιαίο δίκτυο (Tsare et al. 2024). Το τελικό ανακατασκευασμένο δίκτυο περιλαμβάνει 2889 κόμβους και 55.315 αλληλεπιδράσεις, καλύπτοντας ~18% των πρωτεϊνών



Εικόνα 7: Το πρωτεϊνικό δίκτυο των GWAS-πρωτεϊνών που σχετίζονται με την AD όπως προκύπτει από το ολοκληρωμένο δίκτυο του ανθρώπου (A) και το ανακατασκευασμένο δίκτυο της AD (B). Οι κόμβοι είναι χρωματισμένοι ανάλογα με την κατηγορία τους: Μπλε για τις πρωτεΐνες GWAS που συνδέονται σε ένα ενιαίο δίκτυο ("μπλε" κόμβοι, ΜΚ), Πράσινο για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες GWAS ("πράσινοι" κόμβοι, ΠΚ), Κίτρινο για τους ενδιάμεσους κόμβους της συντομότερης διαδρομής που συνδέουν τους ΠΚ με τους ΜΚ ("κίτρινοι" κόμβοι, ΚΚ).

και 26% των συνολικών αλληλεπιδράσεων του ανθρώπινου δικτύου (Εικόνα 7B). Όλες οι GWAS-πρωτεΐνες της AD είναι το πολύ δεύτεροι γείτονες επιβεβαιώνοντας τη στενή σχέση μεταξύ των MK και ΠΚ αλλά και των ΚΚ ως πιθανές για την σχέση τους με την AD. Η A4 έχει τις περισσότερες αλληλεπιδράσεις (1077) στο ανακατασκευασμένο δίκτυο, ενώ πέντε ακόμη ξεπερνούν τις 300: P53 (ΚΚ), EGFR (ΚΚ), HTT (ΚΚ), SRC (MK; κεντρικός κόμβος του δικτύου των MK), UBC (ΚΚ).

#### 4.5 Προτεραιοποίηση πρωτεϊνών βάσει κριτηρίων του δικτύου

Για να αξιολογηθεί ο ρόλος των πρωτεϊνών στο ανακατασκευασμένο δίκτυο εφαρμόστηκαν τα Κριτήρια Προτεραιοποίησης 2 και 3 που βασίζονται στην ανάλυση του δικτύου από τους Tsare et al. 2024. Το Κριτήριο 2 βασίζεται στη μετρική Integrated Value of Influence (IVI) (Salavaty et al., 2020) που συνδυάζει για κάθε κόμβο τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων του την συμβολή του στη διατήρηση της διασυνδεσιμότητας του δικτύου. Προτεραιοποιήθηκαν 140 πρωτεΐνες (4 MK, 1ΠΚ, 135 ΚΚ) με τις 10 κορυφαίες να παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Στο τρίτο κριτήριο αναδεικνύονται οι προτεραιοποιημένες GWAS-πρωτεΐνες (Κριτήριο 1) και οι κοινοί τους γείτονες που είναι ΚΚ. Προσδιορίστηκαν 36 ΚΚ, από τους οποίους 15 έχουν ήδη προτεραιοποιηθεί με το Κριτήριο 2, που είναι κοινοί γείτονες μεταξύ εννέα (4 MK, 9 ΠΚ) προτεραιοποιημένων GWAS-πρωτεϊνών (Κριτήριο 1) στο ανακατασκευασμένο δίκτυο. Οι πρωτεΐνες του Κριτηρίου 3 σχηματίζουν ένα δίκτυο που συνδέεται μέσω 136 αλληλεπιδράσεων. Οι 10 κορυφαίες πρωτεΐνες με βάση το IVI τους στο δίκτυο των 45 πρωτεϊνών του Κριτηρίου 3 εμφανίζονται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 3: Οι 10 AD-πρωτεΐνες με το μεγαλύτερο IVI στο ανακατασκευασμένο δίκτυο (Κριτήριο Προτεραιοποίησης 2)**

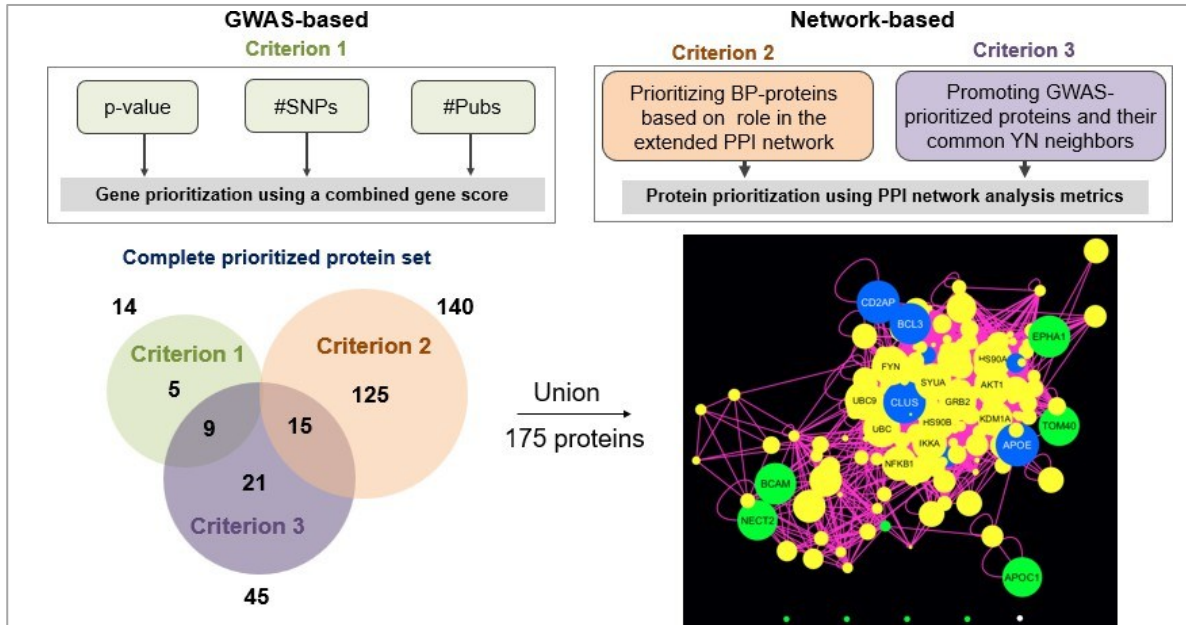
| Rank | Entry Name | Node Type | IVI   |
|------|------------|-----------|-------|
| 1    | A4         | BN        | 100   |
| 2    | P53        | YN        | 43.38 |
| 3    | EP300      | YN        | 29.22 |
| 4    | ESR1       | YN        | 28.4  |
| 5    | EGFR       | YN        | 24.75 |
| 6    | ANDR       | YN        | 24.06 |
| 7    | SRC        | BN        | 23.78 |
| 8    | TF65       | YN        | 23.61 |
| 9    | HDAC1      | YN        | 23.06 |
| 10   | UBC        | YN        | 22.78 |

**Πίνακας 4: Οι 10 AD-πρωτεΐνες με το μεγαλύτερο IVI στο δίκτυο των προτεραιοποιημένων GWAS-πρωτεϊνών και των κοινών τους γειτόνων-ΚΚ (Κριτήριο Προτεραιοποίησης 3)**

| Rank | Entry Name | Node Type | IVI    |
|------|------------|-----------|--------|
| 1    | UBC9       | YN        | 100.00 |
| 2    | HS90A      | YN        | 41.98  |
| 3    | RU17       | YN        | 37.84  |
| 4    | FYN        | YN        | 32.09  |
| 5    | APOE       | BN        | 31.50  |
| 6    | CD2AP      | BN        | 30.91  |
| 7    | CLUS       | BN        | 29.81  |
| 8    | UBC        | YN        | 18.68  |
| 8    | GRB2       | YN        | 18.68  |
| 8    | NR4A1      | YN        | 18.68  |

Το τελικό σύνολο προτεραιοποιημένων πρωτεϊνών που προκύπτει από την ένωση των τριών συνόλων πρωτεϊνών των 3 κριτηρίων προτεραιοποίησης (Εικόνα 8) περιλαμβάνει 175 πρωτεΐνες,

από τις οποίες το 97% σχηματίζουν έναν συνδεδεμένο δίκτυο μέσω 2568 αλληλεπιδράσεων. Έγινε κατάταξη των 175 πρωτεϊνών με βάση τον αριθμό των κριτηρίων προτεραιοποίησης που ικανοποιούν. Καμία πρωτεΐνη δεν πληροί και τα 3 κριτήρια. Στην κορυφή της λίστας βρίσκονται είκοσι τέσσερις (24) πρωτεΐνες που πληρούν 2 κριτήρια (9 GWAS-πρωτεΐνες (4 ΜΚ, 5 ΠΚ, Κριτήριο 1) έχουν κοινούς γείτονες-ΚΚ (Κριτήριο 3), και δεκαπέντε (15) ΚΚ προτεραιοποιούνται βάσει των Κριτηρίων 2 και 3). Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι 10 κορυφαίες πρωτεΐνες της κατάταξης.



Εικόνα 8: Σύνολο προτεραιοποιημένων γονιδίων της AD με βάση το ολοκληρωμένο σχήμα προτεραιοποίησης γονιδίων των Tsare et al. 2024.

Πίνακας 5: Οι 10 κορυφαίες πρωτεΐνες βάσει του σχήματος ιεράρχησης προτεραιοποιημένων γονιδίων.

| Protein Entry Name  | Gene Symbol | Criterion 1 | Criterion 2 | Criterion 3 | Overall Ranking |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|
| APOE <sup>BN</sup>  | APOE        | ✓           |             | ✓           | 1               |
| CD2AP <sup>BN</sup> | CD2AP       | ✓           |             | ✓           | 2               |
| CLUS <sup>BN</sup>  | CLU         | ✓           |             | ✓           | 3               |
| EPHA1 <sup>GN</sup> | EPHA1       | ✓           |             | ✓           | 4               |
| BCAM <sup>GN</sup>  | BCAM        | ✓           |             | ✓           | 5               |
| BCL3 <sup>BN</sup>  | BCL3        | ✓           |             | ✓           | 6               |
| TOM40 <sup>GN</sup> | TOMM40      | ✓           |             | ✓           | 7               |
| NECT2 <sup>GN</sup> | NECTIN2     | ✓           |             | ✓           | 8               |
| APOC1 <sup>GN</sup> | APOC1       | ✓           |             | ✓           | 9               |
| UBC9 <sup>YN</sup>  | UBE2I       |             | ✓           | ✓           | 10              |

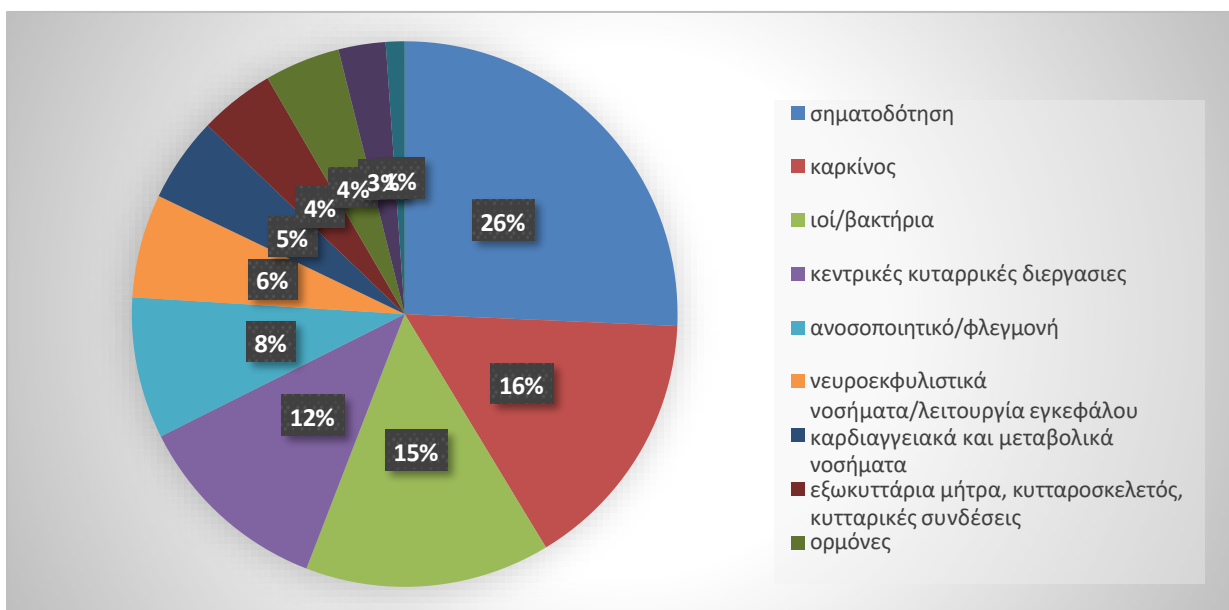
#### 4.6 Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού μονοπατιών της KEGG για το σύνολο των 2931 AD-πρωτεϊνών μέσω της DAVID. Το 58% (1701) συμμετέχει σε τουλάχιστον ένα από τα 342 μονοπάτια της KEGG, εκ των οποίων 179 είναι στατιστικώς σημαντικά εμπλουτισμένα ( $p < 0.05$ ) με τις σχετικές με την AD πρωτεΐνες (1259 ΚΚ, 76 ΜΚ, 88 ΠΚ, 2-χωρίς αλληλεπιδράσεις).

Η λίστα των εμπλουτισμένων μονοπατιών περιλαμβάνει μονοπάτια σχετικά με (Εικόνα 9):

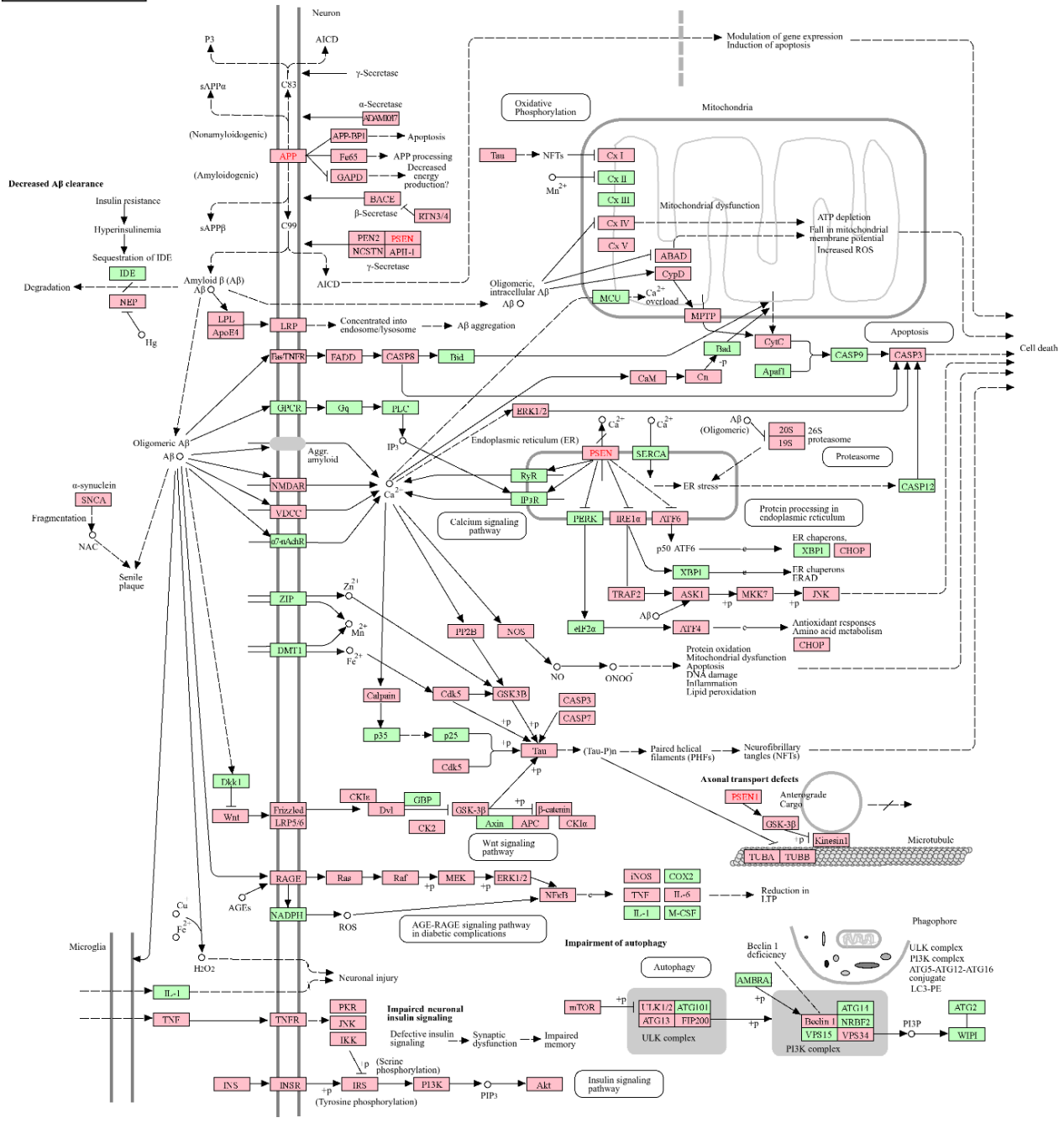
- νευροεκφυλιστικά νοσήματα μεταξύ των οποίων: AD, Πάρκινσον, Huntington και Prion
- ρύθμιση νευρωνικής και εγκεφαλικής λειτουργίας μεταξύ των οποίων: “Long-term potentiation”, “Glutamatergic Synapse”, “Cholinergic Synapse”, “GABAergic Synapse”, “Dopaminergic Synapse”
- σηματοδότηση (46 μονοπάτια) μεταξύ των οποίων: “NF-kappa B”, “PI3K-Akt”, “FOXO”, “MAPK και “AGE-RAGE”
- ανοσολογικές ή φλεγμονώδεις διεργασίες (15 μονοπάτια)
- καρδιο- ή μεταβολικούς μηχανισμούς (9 μονοπάτια)
- εξωκυττάρια μήτρα, κυτταροσκελετό και κυτταρικές συνδέσεις (8 μονοπάτια)
- σύνθεση, αντίσταση, έκκριση ορμονών(8 μονοπάτια)
- εθισμούς (5 μονοπάτια)
- καρκίνος (28 μονοπάτια)
- ιογενείς/βακτηριακές λοιμώξεις (26 μονοπάτια)

Οι ΚΚ αντιπροσωπεύουν πάνω από το 60% των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών ενισχύοντας τη σημασία της συσχέτισης τους με τα μονοπάτια που σχετίζονται με την AD. Η παρουσία των ΚΚ υπερβαίνει το 80% στα νευροεκφυλιστικά νοσήματα και στα μονοπάτια που σχετίζονται με τη λειτουργία του εγκεφάλου. Χαρακτηριστικά, στο μονοπάτι της AD το ποσοστό αυτό φτάνει το 89% (Εικόνα 10) και πολλές από τις ΚΚ διαδραματίζουν καθοριστικό και ρόλο. Για παράδειγμα, τέτοιες πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τις: BACE1 (Ohno, 2025), PSEN1 (Kelleher and Shen, 2017), PSEN2 (An *et al.*, 2015) και LRP1 (Petralla *et al.*, 2024) οι οποίες γενικότερα ρυθμίζουν την επεξεργασία της πρωτεΐνης A4 (APP) και την παραγωγή και απομάκρυνση του β-αμυλοειδούς, ενώ οι GSK3B (Lauretti *et al.*, 2020) και CDK5 (Garemilla *et al.*, 2024) συμβάλλουν, μεταξύ άλλων, στην υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau. Εξετάστηκαν, επίσης, πιθανές συνδέσεις μεταξύ των AD-πρωτεϊνών και των μεταβολικών μηχανισμών (“Metabolic Pathways”). Το 74% των πρωτεϊνών αυτών είναι ΚΚ, συμμετέχοντας σε σηματοδοτικά μονοπάτια σύνθεσης στεροειδών ορμονών, μεταβολισμού λιπαρών οξέων, καθώς και βιοσύνθεσης πυροσταφυλικού οξέος, πεντόζης, αμινοξέων κ.α.



Εικόνα 9:Κατηγορίες των σημαντικά εμπλουτισμένων με πρωτεΐνες σχετικές με την AD μονοπατιών.

**ALZHEIMER DISEASE**



05010 8/11/21  
(c) Kanchisa Laboratories

Εικόνα 10: Το μονοπάτι της AD όπως ορίζεται από την KEGG. Στα πλαίσια ροζ χρώματος συμμετέχουν οι σχετικές με την AD πρωτεΐνες του συνόλου δεδομένων μας.



Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού μονοπατιών για τις 175 προτεραιοποιημένες πρωτεΐνες, η οποία υπέδειξε εμπλουτισμό σε 152 μονοπάτια KEGG, με 82% από αυτά να είναι κοινά με τα μονοπάτια του πλήρους συνόλου των AD-πρωτεϊνών. Οι προτεραιοποιημένες έδειξαν μεγαλύτερο εμπλουτισμό σε επιλεγμένα καρκινικά και σηματοδοτικά μονοπάτια (π.χ. “B cell receptor”, “Thyroid hormone”, “Hepatitis C”, “Kaposi sarcoma”), ενώ το πλήρες σύνολο σε μονοπάτια κυτταροσκελετού (π.χ. “Focal adhesion”, “Adherens junction) και λοιμώξεων (π.χ., “HIV-1”, “Shigellosis”, “HPV”, “Salmonella”).

#### 4.7 AD-πρωτεΐνες και φάρμακα

Προσδιορίστηκαν 13 πρωτεΐνες (2 ΠΚ και 11 ΚΚ) ως στόχοι έξι εγκεκριμένων φαρμάκων που χορηγούνται σε στην AD. Τα φάρμακα αυτά που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6 περιλαμβάνουν δύο μονοκλωνικά αντισώματα κατά των πλακών β-αμιλοειδούς, έναν αναστολέα της ακετυλοχολινεστεράσης, τον ανταγωνιστή NMDA υποδοχέων μεμαντίνη και δύο άτυπα αντιψυχωσικά. Έξι από τις πρωτεΐνες-στόχους συμμετέχουν σε 33 εμπλουτισμένα μονοπάτια KEGG και στα “Μεταβολικά Μονοπάτια”, με τις RXRA και NOS3 να εμπλέκονται σε πάνω από 14. Ο ανταγωνιστής των υποδοχέων NMDA μεμαντίνη παρουσιάζει τον μεγαλύτερο αριθμό AD πρωτεϊνών-στόχων (8), ακολουθούμενος από τον αναστολέα της ακετυλοχολινεστεράσης donepezil, ο οποίος στοχεύει επτά AD-πρωτεΐνες.

**Πίνακας 6: Φάρμακα της AD και αριθμός των πρωτεϊνικών τους στόχων**

| DrugBank ID | Φάρμακο/Περιγραφή  | # AD-πρωτεϊνών |
|-------------|--|----------------|
| DB12274     | Aducanumab, monoclonal IgG1 antibody that targets extracellular amyloid-β plaques in the brain   | 1              |
| DB14580     | Lecanemab, monoclonal IgG1 antibody directed against aggregated soluble and insoluble forms of amyloid beta (Aβ)   | 1              |
| DB00843     | Donepezil, a piperidine derivative acetylcholinesterase inhibitor used in the management of the dementia of AD   | 7              |
| DB01043     | Memantine is an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist used in the management of AD   | 8              |
| DB00734     | Risperidone, a second-generation antipsychotic (SGA) medication used in the treatment of a number of mood and mental health conditions, in some cases indicated short-term symptomatic management of aggression or psychotic symptoms in patients with severe dementia of the Alzheimer type | 2              |
| DB09128     | Brexpiprazole, an atypical antipsychotic and a novel D2 dopamine and serotonin 1A partial agonist called serotonin-dopamine activity modulator (SDAM). Currently approved for the treatment of depression, schizophrenia, and agitation associated with dementia due to AD                   | 2              |

#### 4.8 AD και συννοσηρότητα

Προσδιορίστηκε ότι 75% των AD-πρωτεϊνών έχουν συνδεθεί με διάφορα νοσήματα. Από αυτές το 78% παρουσιάζουν σημαντικές συσχετίσεις ( $\alpha < 0.05$ ) με 143 όρους φαινοτύπων της GAD, συμπεριλαμβανομένου και του ίδιου του όρου «Alzheimer’s Disease». Ο όρος αυτός συνδέεται με 309 πρωτεΐνες του συνόλου μας (28 ΜΚ, 29 ΠΚ, 252 ΚΚ). Επτά από τα εμπλουτισμένα μονοπάτια της λίστας μας περιλαμβάνουν περισσότερες από 30 πρωτεΐνες από τις 309 που σχετίζονται με τον όρο “Alzheimer’s disease” της GAD. Αυτά περιλαμβάνουν τα: “Pathways in cancer” (71 πρωτεΐνες), “PI3K-Akt signaling pathway” (47 πρωτεΐνες), “Alzheimer disease” (43 πρωτεΐνες), “Pathways of neurodegeneration - multiple diseases” (39 πρωτεΐνες), “MAPK signaling pathway” (39 πρωτεΐνες), “Lipid and atherosclerosis” (39 πρωτεΐνες) και “Human papillomavirus infection” (32 πρωτεΐνες).

Για τη διερεύνηση πιθανών συννοσηροτήτων, οι υπόλοιποι 142 όροι της GAD ομαδοποιήθηκαν σε 12 ευρείες κατηγορίες, με 89% (276) από τις 309 πρωτεΐνες να σχετίζονται και με τουλάχιστον έναν επιπλέον φαινότυπο πέρα από την AD (Εικόνα 11).



**Εικόνα 11: Κατανομή των ομαδοποιημένων όρων της GAD όσον αφορά τον αριθμό των συμπεριλαμβανόμενων πρωτεϊνών του συνόλου δεδομένων μας που σχετίζονται με τον όρο «Alzheimer's Disease» της GAD**

Από τις 276 πρωτεΐνες, 135 (49%) συνδέονται με τέσσερις ή περισσότερες κατηγορίες φαινοτύπων, ενώ οι TGFB1 (KK), TNFA (KK), APOE(MK), IL6 (KK), VDR (KK), MMP9 (KK), NFKB1 (KK), NOS3 (KK) σχετίζονται με 12 διαφορετικές κατηγορίες φαινοτύπων.

Οι κατηγορίες φαινοτύπων που περιλαμβάνουν πάνω από 100 AD-πρωτεΐνες είναι οι:

- «Διαβήτης και μεταβολικό σύνδρομο» (178 πρωτεΐνες)
- «Καρκίνος» (155 πρωτεΐνες)
- «Νευρολογικές και διαταραχές διάθεσης» (126 πρωτεΐνες)
- «Χρήση καπνού και αλκοόλ» (121 πρωτεΐνες)
- «Καρδιακή ανεπάρκεια, καρδιαγγειακά και εγκεφαλικά» (117 πρωτεΐνες).

## 5. Συζήτηση

Συνολικά, σε αυτή τη μελέτη επιτεύχθηκαν όλοι οι στόχοι που είχαν τεθεί. Συγκεκριμένα, παρουσιάστηκε μια υπολογιστική μελέτη για την διερεύνηση των βιομοριακών μηχανισμών της AD συνδυάζοντας δεδομένα γενετικής ανάλυσης GWAS και του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Η ανάλυση των δεδομένων GWAS ανέδειξε 468 γονίδια που κωδικοποιούν 469 πρωτεΐνες, εκ των οποίων 24% υποστηρίζονται από μετρήσεις cis-eQTLs και πολλά από αυτά εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 19 κυρίως στην περιοχή γύρω από το γονίδιο *APOE*, που επηρεάζει τη μεταφορά λιπιδίων, τη φλεγμονή στον εγκέφαλο και τις γνωστικές λειτουργίες (Murphy *et al.*, 2025). Άλλα σημαντικά γονίδια γύρω από το *APOE*, όπως τα *TOMM40*, *NECTIN2*, *APOC1* που σχετίζονται στενά με την AD περιλαμβάνονται στην λίστα των 14 γονιδίων που προτεραιοποιήθηκαν στο Κριτήριο 1 και στις κορυφαίες 10 του τελικού προτεραιοποιημένου συνόλου. Τα μισά από τα 14 γονίδια υποστηρίζονται από μετρήσεις cis-eQTL και στην πλειονότητα τους η σχέση τους με την AD υποστηρίζεται από λειτουργικά πειράματα.

Η ανάλυση δικτύων έδειξε ότι περίπου 2/3 των GWAS πρωτεϊνών σχηματίζουν ένα υποδίκτυο, ενώ η ανακατασκευή του συνολικού δικτύου αποκάλυψε 2462 νέες πρωτεΐνες και κεντρικές πρωτεΐνες-«κόμβους» όπως οι APP, SRC, RAC1, p53, EGFR, HTT και UBC, οι οποίες συμμετέχουν σε κρίσιμες διαδικασίες σχετικές με την AD. Χρησιμοποιώντας 2 κριτήρια με βάση το δίκτυο στα οποία το ένα διερευνά τον ρόλο των πρωτεϊνών στο ανακατασκευασμένο δίκτυο και στο δεύτερο αναδεικνύονται οι προτεραιοποιημένες GWAS-πρωτεΐνες και οι κοινοί τους που είναι KK, προτεραιοποιήθηκαν 140 και 45 πρωτεΐνες, αντίστοιχα. Η ένωση των τριών συνόλων των

πρωτεΐνών των τριών κριτηρίων περιλαμβάνει 175 πρωτεΐνες από τις οποίες το 97% αυτών των πρωτεϊνών σχηματίζουν ένα συνδεδεμένο δίκτυο. Στις κορυφαίες 10 βρίσκονται πρωτεΐνες για τις οποίες η σχέση τους με την AD υποστηρίζεται από λειτουργικά πειράματα.

Η ενσωμάτωση των ΚΚ εμπλούτισε σημαντικά το βιολογικό περιεχόμενο του δικτύου των GWAS-πρωτεϊνών της AD, αποκαλύπτοντας 179 σημαντικά μονοπάτια αντί για μόλις 2 όταν εξετάζονταν μόνο τα γονίδια GWAS, με πάνω από το 60% των πρωτεϊνών αυτών των μονοπατιών να προέρχονται από τις ΚΚ, δείχνοντας ότι παίζουν βασικό ρόλο στη νόσο. Πολλά από τα μονοπάτια της λίστας μας έχουν συνδεθεί στενά με την παθοφυσιολογία της AD από λειτουργικά πειράματα. Για παράδειγμα, μονοπάτια άμεσα εμπλεκόμενα στην παθογένεση της AD, όπως τα “Alzheimer disease”, “Parkinson disease”, “Huntington disease”, συγκλίνουν σε κοινές διεργασίες όπως συσσωμάτωση παθολογικών πρωτεϊνών, μεταβολικό στρες και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, χαρακτηριστικά που μοιράζονται πολλές νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Gan *et al.*, 2018; Wareham *et al.*, 2022; De Marchi *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2024). Παράλληλα, τα μονοπάτια που σχετίζονται με ντοπαμινεργικούς, χολινεργικούς, γλουταμινεργικούς και GABAεργικούς υποδοχείς συνάψεων, αντικατοπτρίζουν θεμελιώδεις μηχανισμούς νευρωνικής επικοινωνίας που διαταράσσονται από νωρίς στη νόσο, συμβάλλοντας στη γνωσιακή και συναπτική δυσλειτουργία (Hampel *et al.*, 2018; Ambrad Giovannetti and Fuhrmann, 2019; Puranik and Song, 2024; Moreira *et al.*, 2025). Τα εμπλουτισμένα μονοπάτια που αφορούν φλεγμονώδεις και μεταβολικές διεργασίες, καίριες στην παθοφυσιολογία της AD, όπως τα μονοπάτια NF-κΒ, και των MAPK αναδεικνύουν τον ρόλο της χρόνιας νευροφλεγμονής στην AD, η οποία προάγει την τοξικότητα του β-αμυλοειδούς (Αβ) και της άμεσα σχετιζόμενης με την AD πρωτεΐνης tau (Kaltschmidt *et al.*, 2024; Almasoudi *et al.*, 2025). Διαταραχές σε σηματοδοτικά μονοπάτια όπως για παράδειγμα τα PI3K-Akt και FoxO συμβάλουν σημαντικά στη νευρωνική δυσλειτουργία καθώς αναστολή του PI3K-Akt από τις Αβ και tau οδηγεί σε μειωμένη συναπτική πλαστικότητα και ενεργοποίηση του FoxO, προάγοντας απόπτωση και μιτοχονδριακό στρες (Pan *et al.*, 2024). Τέλος, η παρουσία εμπλουτισμένων μονοπατιών ιογενών και βακτηριακών λοιμώξεων υποδεικνύει τη διαρκώς ενισχυόμενη υπόθεση ότι παθογόνοι παράγοντες ενδέχεται να συμβάλλουν στη νευροεκφύλιση. Ιοί όπως ο EBV (Schreiner *et al.*, 2024) και ο HIV (Gu and Naghavi, 2025) έχουν συνδεθεί με ενίσχυση της παθολογίας των Αβ και tau μέσω νευροφλεγμονής και ανοσολογικής απορρύθμισης, ενώ βακτηριακοί παράγοντες, όπως ο λιποσακχαρίτης (LPS) του *E. coli*, έχουν ανιχνευθεί στον εγκέφαλο και μάλιστα σε στενή γειτνίαση με αμυλοειδικές πλάκες (Schütze *et al.*, 2022).

Η ανάλυση σχετικά με φάρμακα της AD επιβεβαίωσε τα υπάρχοντα δεδομένα για περιορισμούς των διαθέσιμων θεραπειών, οι οποίες δρουν κυρίως με την ανακούφιση των γνωστικών συμπτωμάτων, χωρίς ουσιαστική επίδραση στην επιβράδυνση ή αναστροφή της εξέλιξης της νόσου. Παρ’ όλα αυτά, η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε στη μελέτη μπορεί να υποδείξει πιθανούς θεραπευτικούς στόχους για την επανατοποθέτηση φαρμάκων, όπως οι GSK3B (Zhao *et al.*, 2024), BACE1 (Bazzari and Bazzari, 2022) και LRP1 (Pan *et al.*, 2025) οι οποίες παρουσιάζουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε προκλινικά μοντέλα της νόσου. Τα ευρήματα της ανάλυσης συνοσηροτήτων ευθυγραμμίζονται με τη βιβλιογραφία, η οποία υποδεικνύει ότι η AD συχνά συνυπάρχει με μεταβολικές, καρδιαγγειακές, ψυχιατρικές διαταραχές και καρκίνο. Συγκεκριμένα, η υψηλή παρουσία AD-πρωτεϊνών σε μεταβολικούς και αρδιαγγειακούς φαινοτύπους συμφωνεί με δεδομένα που δείχνουν ότι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, η παχυσαρκία, οι καρδιοπάθειες, η κατανάλωση καπνού και αλκοόλ αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης και επιταχύνουν την εξέλιξη της AD (Kciuk *et al.*, 2024). Αντίστοιχα, η επικάλυψη των AD-πρωτεϊνών με τον καρκίνο και νευρολογικές ή διαταραχές διάθεσης ενισχύει τη πρόσφατη βιβλιογραφία για ύπαρξη κοινών μοριακών μηχανισμών που συμβάλλουν τόσο στη νευροεκφύλιση όσο και στην καρκινογένεση (Duranti and Villa, 2024).

Η μελέτη αναδεικνύει τη σημασία της συνδυαστικής ανάλυσης δεδομένων GWAS και δικτύων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της AD. Η δικτυακή προσέγγιση επέτρεψε την προτεραιοποίηση νέων μοριακών στόχων, την ανάδειξη κρίσιμων βιολογικών μονοπατιών και πιθανών θεραπευτικών στόχων με προοπτική επανατοποθέτησης

φαρμάκων. Παράλληλα, υποστηρίζει την ύπαρξη κοινών μοριακών μηχανισμών μεταξύ της AD και άλλων νοσημάτων, ανοίγοντας τον δρόμο για νέες θεραπευτικές στρατηγικές.

## 6. Βιβλιογραφία

- Almasoudi, S.H., Al-kuraishy, H.M., Al-Gareeb, A.I., Eliwa, D., Alexiou, A., Papadakis, M., *et al.* (2025) 'Role of mitogen-activated protein kinase inhibitors in Alzheimer's disease: Rouge of brain kinases', *Brain Research Bulletin*, 224, p. 111296. doi:10.1016/j.brainresbull.2025.111296.
- Ambrad Giovannetti, E. and Fuhrmann, M. (2019) 'Unsupervised excitation: GABAergic dysfunctions in Alzheimer's disease', *Brain Research*, 1707, pp. 216-226. doi:10.1016/j.brainres.2018.11.042.
- An, S.S., Cai, Y. and Kim, S. (2015) 'Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders', *Clinical Interventions in Aging*, p. 1163. doi:10.2147/CIA.S85808.
- Andrews, S.J., Renton, A.E., Fulton-Howard, B., Podlesny-Drabiniok, A., Marcora, E. and Goate, A.M. (2023) 'The complex genetic architecture of Alzheimer's disease: novel insights and future directions', *eBioMedicine*, 90, p. 104511. doi:10.1016/j.ebiom.2023.104511.
- Bazzari, F.H. and Bazzari, A.H. (2022) 'BACE1 Inhibitors for Alzheimer's Disease: The Past, Present and Any Future?', *Molecules*, 27(24), p. 8823. doi:10.3390/molecules27248823.
- Campbell, N. (2004) 'Genetic association database', *Nature Reviews Genetics*, 5(2), pp. 87-87. doi:10.1038/nrg1288.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., *et al.* (1993) 'Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families', *Science*, 261(5123), pp. 921-923. doi:10.1126/science.8346443.
- Dimitrakopoulos, G.N., Klapa, M.I. and Moschonas, N.K. (2021) 'PICKLE 3.0: enriching the human meta-database with the mouse protein interactome extended via mouse-human orthology', *Bioinformatics*. Edited by P.L. Martelli, 37(1), pp. 145-146. doi:10.1093/bioinformatics/btaa1070.
- Duranti, E. and Villa, C. (2024) 'Insights into Dysregulated Neurological Biomarkers in Cancer', *Cancers*, 16(15), p. 2680. doi:10.3390/cancers16152680.
- Gan, L., Cookson, M.R., Petrucelli, L. and La Spada, A.R. (2018) 'Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms', *Nature Neuroscience*, 21(10), pp. 1300-1309. doi:10.1038/s41593-018-0237-7.
- Garemilla, S., Kumari, R. and Kumar, R. (2024) 'CDK5 as a therapeutic tool for the treatment of Alzheimer's disease: A review', *European Journal of Pharmacology*, 978, p. 176760. doi:10.1016/j.ejphar.2024.176760.
- Gu, F. and Naghavi, M.H. (2025) 'Negative interplay between HIV-1 Gag and amyloid precursor protein centers around competition for VPS4A and TSG101', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 122(34). doi:10.1073/pnas.2503988122.
- Hampel, H., Mesulam, M.-M., Cuello, A.C., Farlow, M.R., Giacobini, E., Grossberg, G.T., *et al.* (2018) 'The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease', *Brain*, 141(7), pp. 1917-1933. doi:10.1093/brain/awy132.
- Kaltschmidt, B., Czaniera, N.J., Schulten, W. and Kaltschmidt, C. (2024) 'NF-κB in

- Alzheimer's Disease: Friend or Foe? Opposite Functions in Neurons and Glial Cells', *International Journal of Molecular Sciences*, 25(21), p. 11353. doi:10.3390/ijms252111353.
- Kciuk, M., Kruczkowska, W., Gałęziewska, J., Wanke, K., Kałuzińska-Kołat, Ż., Aleksandrowicz, M., *et al.* (2024) 'Alzheimer's Disease as Type 3 Diabetes: Understanding the Link and Implications', *International Journal of Molecular Sciences*, 25(22), p. 11955. doi:10.3390/ijms252211955.
- Kelleher, R.J. and Shen, J. (2017) 'Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(4), pp. 629-631. doi:10.1073/pnas.1619574114.
- Lauretti, E., Dincer, O. and Praticò, D. (2020) 'Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(5), p. 118664. doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118664.
- Leuba, G., Vernay, A., Zimmermann, V., Saini, K., Kraftsik, R. and Savioz, A. (2009) 'Differential damage in the frontal cortex with aging, sporadic and familial Alzheimer's disease', *Brain Research Bulletin*, 80(4-5), pp. 196-202. doi:10.1016/j.brainresbull.2009.06.009.
- De Marchi, F., Munitic, I., Vidatic, L., Papić, E., Rački, V., Nimac, J., *et al.* (2023) 'Overlapping Neuroimmune Mechanisms and Therapeutic Targets in Neurodegenerative Disorders', *Biomedicines*, 11(10), p. 2793. doi:10.3390/biomedicines11102793.
- Moreira, I.P., Vieira-Coelho, M.A. and Guimarães, J. (2025) 'Dopamine System Dysfunction in Alzheimer's Disease', *Psychogeriatrics*, 25(5). doi:10.1111/psyg.70097.
- Moreno-Grau, S., Hernández, I., Heilmann-Heimbach, S., Ruiz, S., Rosende-Roca, M., Mauleón, A., *et al.* (2018) 'Genome-wide significant risk factors on chromosome 19 and the APOE locus', *Oncotarget*, 9(37), pp. 24590-24600. doi:10.18632/oncotarget.25083.
- Murphy, K.B., Hu, D., Wolfs, L., Rohde, S.K., Fauró, G.L., Geric, I., *et al.* (2025) 'The APOE isoforms differentially shape the transcriptomic and epigenomic landscapes of human microglia xenografted into a mouse model of Alzheimer's disease', *Nature Communications*, 16(1), p. 4883. doi:10.1038/s41467-025-60099-4.
- Ohno, M. (2025) 'BACE1 as an early biomarker and its relevance to risk factors for Alzheimer's disease', *Brain Research Bulletin*, 230, p. 111475. doi:10.1016/j.brainresbull.2025.111475.
- Pan, J., Yao, Q., Wang, Y., Chang, S., Li, C., Wu, Y., *et al.* (2024) 'The role of PI3K signaling pathway in Alzheimer's disease', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 16. doi:10.3389/fnagi.2024.1459025.
- Pan, T.-T., Sun, Y.-Y., Shi, Y.-F., Zhao, M., Khan, N.U., Chen, H.-Y., *et al.* (2025) 'Endothelial delivery of simvastatin by LRP1-targeted nanoparticles ameliorates pathogenesis of Alzheimer's disease in a mouse model', *Alzheimer's Research & Therapy*, 17(1), p. 193. doi:10.1186/s13195-025-01840-5.
- Petralla, S., Panayotova, M., Franchina, E., Fricker, G. and Puris, E. (2024) 'Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 as a Potential Therapeutic Target in Alzheimer's Disease', *Pharmaceutics*, 16(7), p. 948. doi:10.3390/pharmaceutics16070948.
- Puranik, N. and Song, M. (2024) 'Glutamate: Molecular Mechanisms and Signaling Pathway in Alzheimer's Disease, a Potential Therapeutic Target', *Molecules*, 29(23),

- p. 5744. doi:10.3390/molecules29235744.
- Salavaty, A., Ramialison, M. and Currie, P.D. (2020) 'Integrated Value of Influence: An Integrative Method for the Identification of the Most Influential Nodes within Networks', *Patterns*, 1(5), p. 100052. doi:10.1016/j.patter.2020.100052.
- Schreiner, T., Romanescu, C., Schreiner, O. and Nhambasora, F. (2024) 'New insights on the link between Epstein-Barr virus infection and cognitive decline in neurodegenerative diseases (Review)', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 28(5), p. 413. doi:10.3892/etm.2024.12702.
- Schütze, S., Döpke, A., Kellert, B., Seele, J., Ballüer, M., Bunkowski, S., et al. (2022) 'Intracerebral Infection with E. coli Impairs Spatial Learning and Induces Necrosis of Hippocampal Neurons in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease', *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, 6(1), pp. 101-114. doi:10.3233/ADR-210049.
- Shi, C., Deng, H., Deng, X., Rao, D. and Yue, W. (2023) 'The Structural Changes of Frontal Subregions and Their Correlations with Cognitive Impairment in Patients with Alzheimer's Disease', *Journal of Integrative Neuroscience*, 22(4). doi:10.31083/j.jin2204099.
- Singh, B., Day, C.M., Abdella, S. and Garg, S. (2024) 'Alzheimer's disease current therapies, novel drug delivery systems and future directions for better disease management', *Journal of Controlled Release*, 367, pp. 402-424. doi:10.1016/j.jconrel.2024.01.047.
- Tsare, E.-P.G., Klapa, M.I. and Moschonas, N.K. (2024) 'Protein-protein interaction network-based integration of GWAS and functional data for blood pressure regulation analysis', *Human Genomics*, 18(1), p. 15. doi:10.1186/s40246-023-00565-6.
- Visonà, G., Bouzigon, E., Demenais, F. and Schweikert, G. (2024) 'Network propagation for GWAS analysis: a practical guide to leveraging molecular networks for disease gene discovery', *Briefings in Bioinformatics*, 25(2). doi:10.1093/bib/bbae014.
- Wareham, L.K., Liddelow, S.A., Temple, S., Benowitz, L.I., Di Polo, A., Wellington, C., et al. (2022) 'Solving neurodegeneration: common mechanisms and strategies for new treatments', *Molecular Neurodegeneration*, 17(1), p. 23. doi:10.1186/s13024-022-00524-0.
- Wu, Y., Ma, B., Liu, C., Li, D. and Sui, G. (2024) 'Pathological Involvement of Protein Phase Separation and Aggregation in Neurodegenerative Diseases', *International Journal of Molecular Sciences*, 25(18), p. 10187. doi:10.3390/ijms251810187.
- Yang, C., Liu, G., Chen, X. and Le, W. (2024) 'Cerebellum in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases: an emerging research frontier', *MedComm*, 5(7). doi:10.1002/mco2.638.
- Zhang, Q., Liu, J., Liu, H., Ao, L., Xi, Y. and Chen, D. (2024) 'Genome-wide epistasis analysis reveals gene-gene interaction network on an intermediate endophenotype P-tau/Aβ42 ratio in ADNI cohort', *Scientific Reports*, 14(1), p. 3984. doi:10.1038/s41598-024-54541-8.
- Zhao, J., Wei, M., Guo, M., Wang, M., Niu, H., Xu, T., et al. (2024) 'GSK3: A potential target and pending issues for treatment of Alzheimer's disease', *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 30(7). doi:10.1111/cns.14818.
- Zheng, Q. and Wang, X. (2024) 'Alzheimer's disease: insights into pathology, molecular mechanisms, and therapy', *Protein & Cell* [Preprint]. doi:10.1093/procel/pwae026.