



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: Αξιολόγηση δυνητικά νευροπροστατευτικών χημικών ουσιών.

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 6: Ανάπτυξη καινοτόμων προκλινικών θεραπευτικών παρεμβάσεων κατά της πρόωρης εμφάνισης νευροεκφυλιστικών νοσημάτων Alzheimer και Parkinson.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ ΤΑΒΕΡΝΑΡΑΚΗΣ (ΙΤΕ)

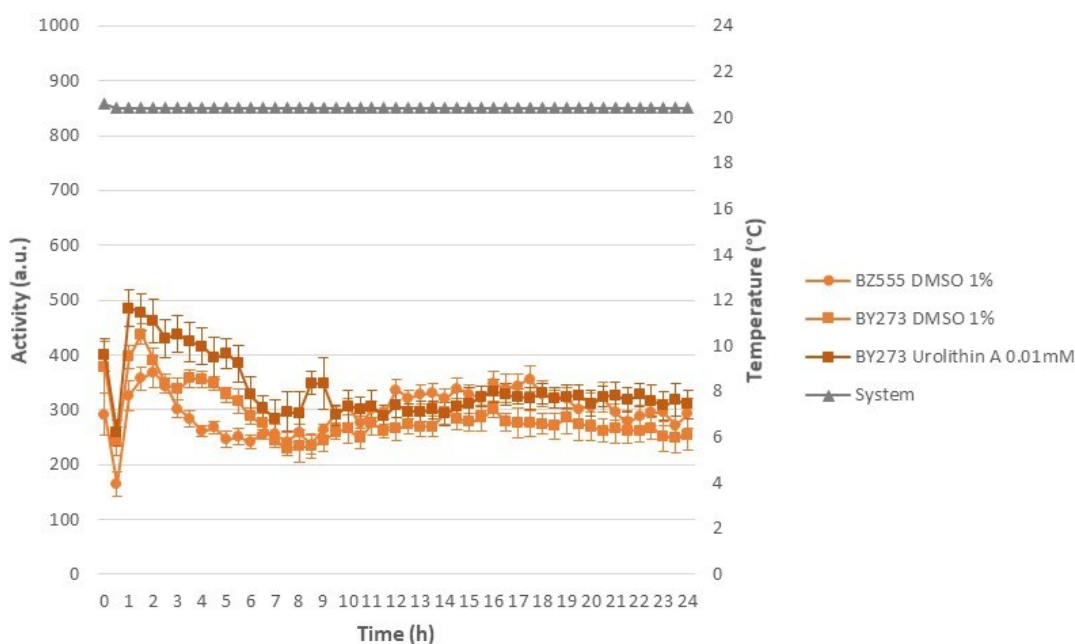
Αξιολόγηση δυνητικά νευροπροστατευτικών χημικών ουσιών.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

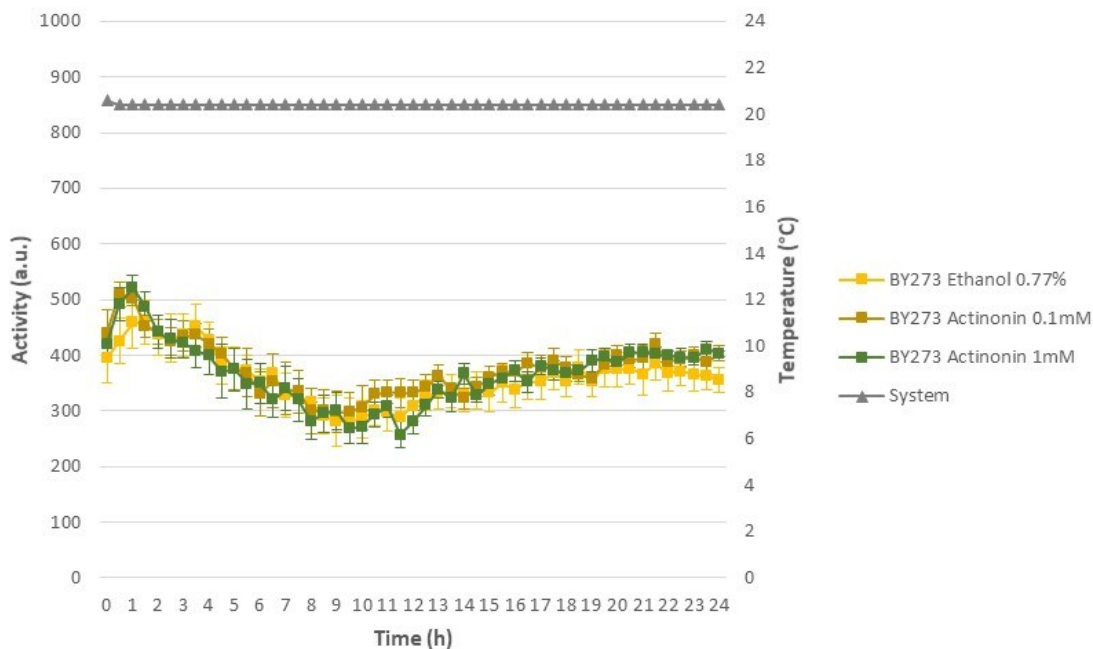
Η μιτοφαγία, μια επιλεκτική μορφή αυτοφαγίας μέσω της οποίας αποικοδομούνται δυσλειτουργικά ή/και περιττά μιτοχόνδρια, είναι ελαττωματική ή απορρυθμισμένη στη νόσο Parkinson (Χiao et al., 2022). Δεδομένου του καθοριστικού της ρόλου στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, σχεδιάστηκαν δοκιμασίες σάρωσης για ενώσεις που, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ρυθμίζουν τα επίπεδά της (Andreux et al., 2019; Lou et al., 2020).

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με ενώσεις που επάγουν γενικά την αυτοφαγία, όπως η ρεσβερατρόλη και η ραπαμυκίνη (Madedo et al., 2015), μια διαδικασία που διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην απομάκρυνση των συσσωματωμάτων α-συνουκλεΐνης. Επιπλέον, εξετάστηκαν ενώσεις με ειδική δράση στη μιτοφαγία, όπως η ουρολιθίνη Α, το νικοτιναμίδιο και η ακτινονίνη.

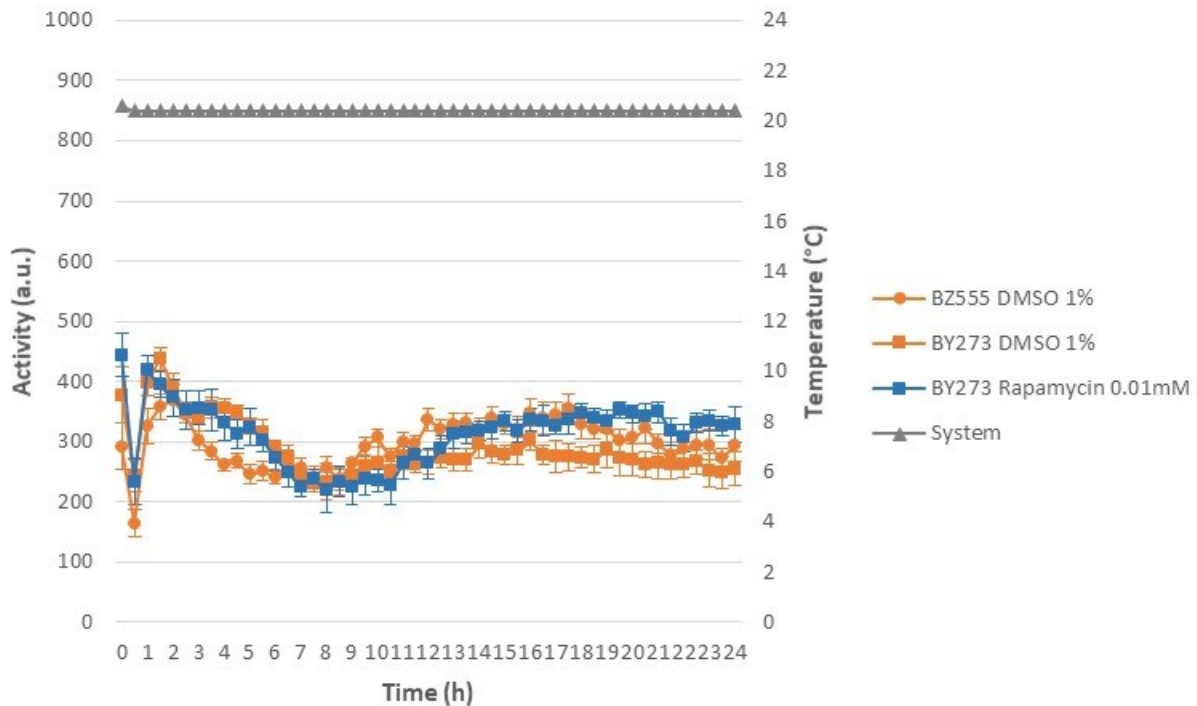
Όλες οι δοκιμασίες διεξήχθησαν τόσο σε νηματώδεις αγρίου τύπου όσο και στα διαγονιδιακά μοντέλα της νόσου Parkinson UA49, BY273, τα οποία εκφράζουν την α-συνουκλεΐνη στους μυς και στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι οι ουσίες ουρολιθίνη Α, ακτινονίνη, ραπαμυκίνη και ρεσβερατρόλη, σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, βελτιώνουν την κινητικότητα των διαγονιδιακών μοντέλων (**Εικόνες 1-4**).



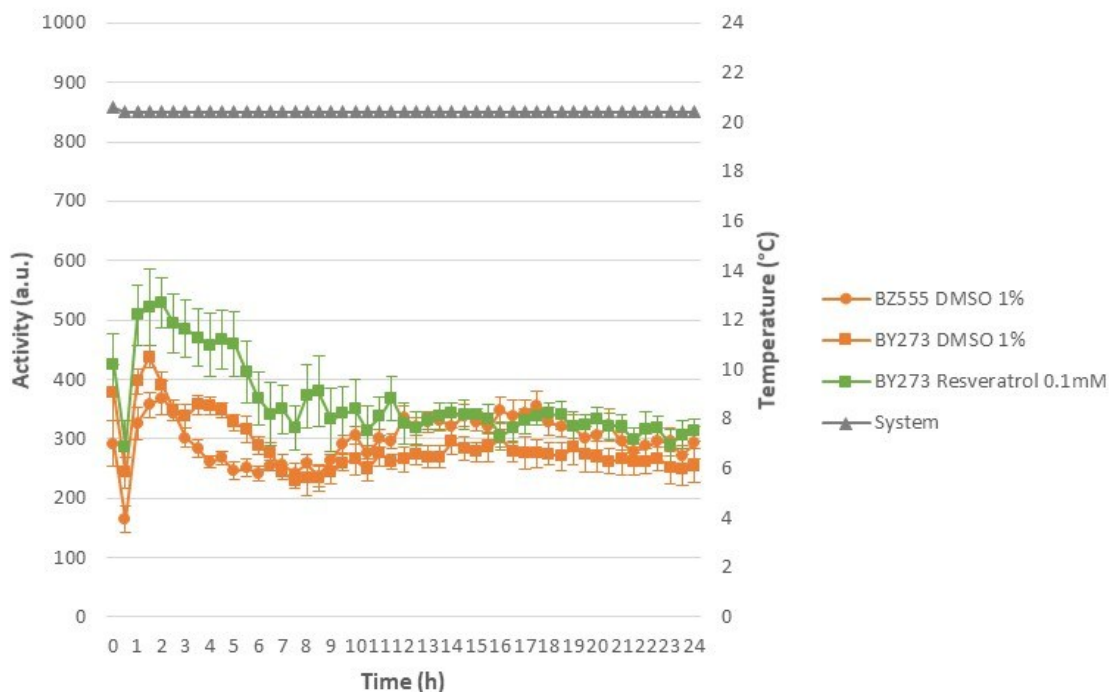
Εικόνα 1. Η ουρολιθίνη Α (0,01 mM) επιδρά διεγερτικά κατά τις πρώτες 6 ώρες στο μοντέλο της νόσου Parkinson (BY273), αποκαθιστώντας κατά τη διάρκεια του πειράματος την κινητικότητα των σκουληκιών σε επίπεδα αντίστοιχα των ζώων αγρίου τύπου (BZ555). Τα δεδομένα προέρχονται από τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις (n = 100 σκουλήκια ανά συνθήκη και στέλεχος).



Εικόνα 2. Η ακτινονίνη σε συγκεντρώσεις 0,1 mM και 1 mM έχει θετικά αποτελέσματα στο μοντέλο της νόσου Parkinson (στέλεχος BY273) μία ώρα μετά την επίδραση, καθώς και 20-24 ώρες μετά την αρχική προσθήκη. Τα δεδομένα προέρχονται από 3 επαναλήψεις (n = 100 σκουλήκια ανά συνθήκη και στέλεχος).

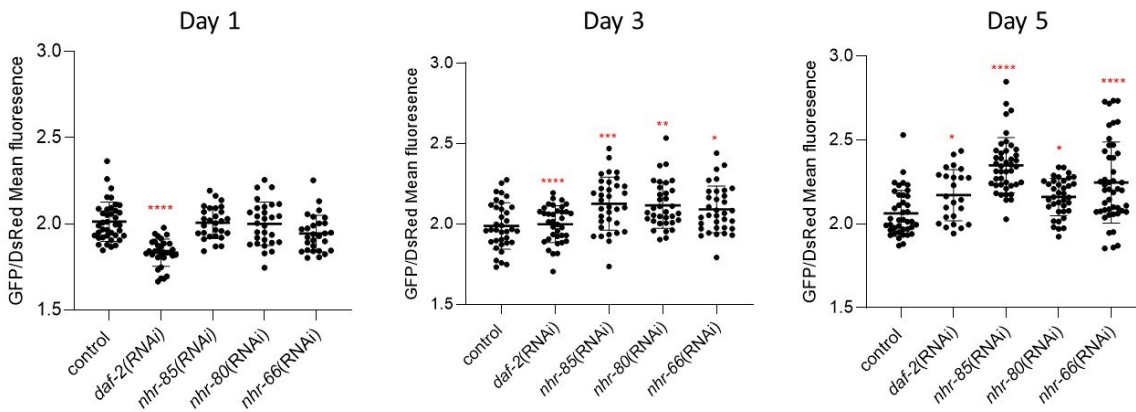


Εικόνα 3. Η ραπαμυκίνη (0,01 mM) βελτιώνει σημαντικά την κινητικότητα του νηματώδους μοντέλου της νόσου Parkinson (BY273), επαναφέροντάς την σε επίπεδα αγρίου τύπου (BZ555). Τα δεδομένα προέρχονται από τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις (n = 100 σκουλήκια ανά συνθήκη και στέλεχος).

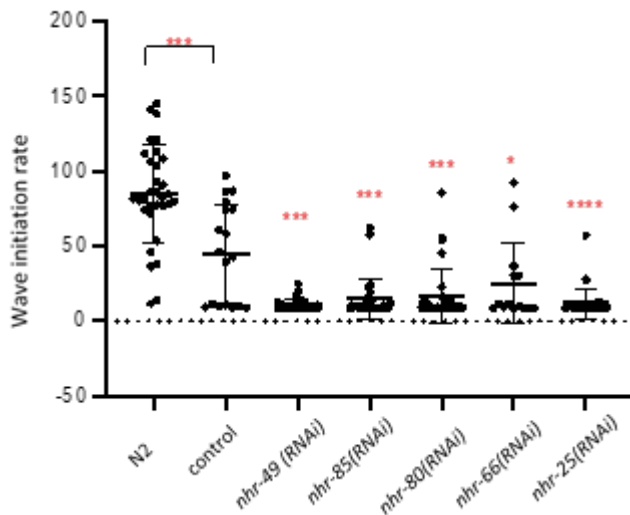


Εικόνα 4. Η ρεσβερατρόλη (0,1 mM) παρουσιάζει αρχικά διεγερτική δράση και στη συνέχεια αποκαθιστά την κινητική ανεπάρκεια στο μοντέλο της νόσου Parkinson (BY273) σε επίπεδα αγρίου τύπου (BZ555). Τα δεδομένα προέρχονται από 3 επαναλήψεις (n = 100 σκουλήκια ανά συνθήκη και στέλεχος).

Με βάση αυτά τα ευρήματα και δεδομένης της σημασίας της μιτοφαγίας και σε άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, η παρούσα μελέτη εστίασε στη νόσο Alzheimer. Τα αποτελέσματα της μελέτης, σε συνδυασμό με προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας και άλλων ερευνητικών ομάδων, καταδεικνύουν ότι η ελλειμματική μιτοφαγία επιδεινώνει παθολογικούς φαινοτύπους της νόσου. Ενδεικτικά, έχουμε δείξει ότι η καταστολή της έκφρασης γονιδίων των πυρηνικών υποδοχέων μειώνει τα επίπεδα της μιτοφαγίας (Εικόνα 5), και επιδεινώνει, μεταξύ άλλων, τη διαταραχή του ρυθμού έναρξης της κυματοειδούς κίνησης (wave initiation rate, Εικόνα 6) στο νευρωνικό μοντέλο Alzheimer CL2355 του *C. elegans*.



Εικόνα 5. Η καταστολή γονιδίων των πυρηνικών υποδοχέων (NRs) μειώνει τη μιτοφαγία κατά τη γήρανση. Πειράματα RNA παρεμβολής (RNAi) έναντι των *nhr-85*, *nhr-80* ή *nhr-66* οδήγησαν σε μείωση της μιτοφαγίας σε ζώα ηλικίας 3 και 5 ημερών, όπως υποδηλώνεται από τον αυξημένο λόγο GFP/DsRed. Το *daf-2(RNAi)* χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας (n = 30–40 ζώα ανά συνθήκη, *P < 0,05; **P < 0,005; ***P < 0,0002; ****P < 0,0001, one-way ANOVA).



Εικόνα 6. Η καταστολή της έκφρασης γονιδίων των πυρηνικών υποδοχέων (NRs) επιδεινώνει την παθολογία του β-αμυλοειδούς στο νευρωνικό μοντέλο Alzheimer CL2355 του *C. elegans* (n = 30–40 ζώα ανά συνθήκη; *P < 0.05, **P < 0.005, ***P < 0.0002, ****P < 0.0001, one-way ANOVA).

Με βάση τα δεδομένα αυτά, αναμένεται ότι ενώσεις που ενεργοποιούν τους πυρηνικούς υποδοχείς θα ενισχύουν τον νευροπροστατευτικό τους ρόλο, τόσο μέσω της ενίσχυσης της μιτοφάνιας αλλά και μέσω άλλων μονοπατιών στα οποία οι υποδοχείς εμπλέκονται.

Στο πλαίσιο αυτό, σε συνάφεια με τον κύριο στόχο της μελέτης, σχεδιάστηκαν πειράματα για την αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των πλέον αποτελεσματικών χημικών ενώσεων για τη νόσο Parkinson σε μοντέλα Alzheimer στον *C. elegans*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά στελέχη που εκφράζουν είτε το β-αμυλοειδές (Αβ) είτε την ανθρώπινη πρωτεΐνη Ταυ στους νευρώνες.

Οι δοκιμασίες σάρωσης των βιοδραστικών ουσιών πραγματοποιήθηκαν σε εύρος συγκεντρώσεων, με στόχο τον προσδιορισμό της σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης, για τις ουσίες που παρουσίασαν βιολογική δράση. Η αποτελεσματικότητα των ενώσεων αξιολογήθηκε με βάση την ικανότητά τους να βελτιώνουν τα κινητικά ελλείμματα, ως αποτέλεσμα της καταστολής της συσσωμάτωσης τοξικών πρωτεϊνών.

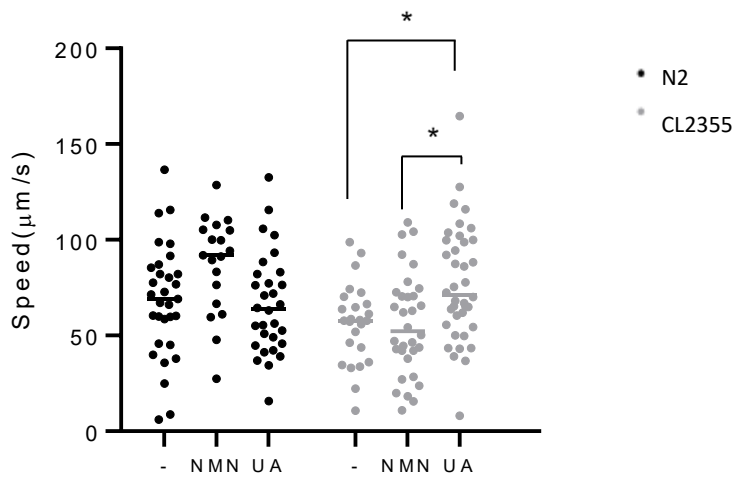
Στη συνέχεια, σχεδιάστηκαν συμπεριφορικές μελέτες με σκοπό την αξιολόγηση της ικανότητας των πλέον αποτελεσματικών μορίων, στις βέλτιστες συγκεντρώσεις τους, να βελτιώνουν τη συνειρμική μνήμη των νηματωδών-μοντέλων της νόσου, όχι μόνο στην γονική γενεά αλλά ενδεχομένως και σε διαγενεαλογικό επίπεδο.

Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκαν πειράματα με το διαγονιδιακό στέλεχος CL2355: *dvIs50 [P_{snb-1}Abeta 1–42; P_{mtl-2}GFP] I*, το οποίο εκφράζει το Αβ1-42 υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *snb-1*, οδηγώντας την έκφραση του β-αμυλοειδούς σε όλους τους νευρώνες. Συμπληρωματικά χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος BR5270: *byIs161 [p_{rab-3}F3ΔK280; p_{myo-2}mCherry]*, που εκφράζει στους νευρώνες την ανθρώπινη πρωτεΐνη Ταυ, συγκεκριμένα, ένα προ-συσσωματικό τμήμα αυτής (Ταυ F3Δ K280). Το αγρίου τύπου στέλεχος N2 χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.

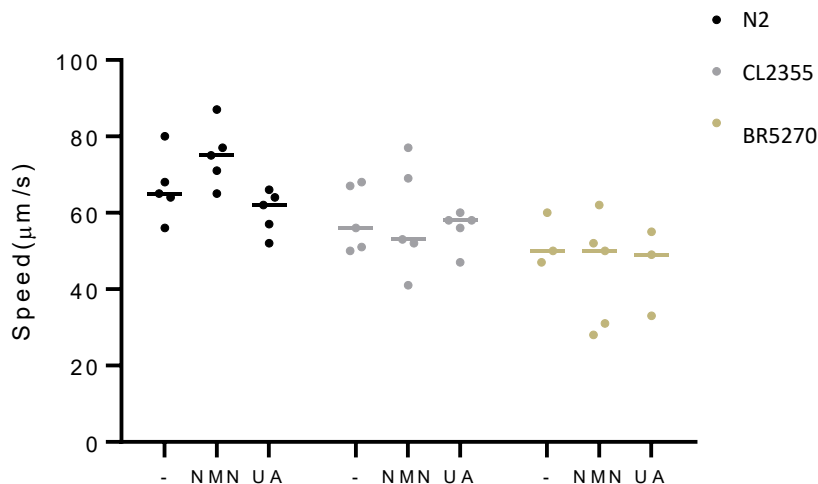
Τα αποτελέσματα της χορήγησης ουρολιθίνης Α (UA) και νικοτιναμίδιου (NMN) μελετήθηκαν ως προς την κινητική συμπεριφορά των νηματωδών. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε καταγραφή βίντεο της συμπεριφοράς τους και η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού WormLab. Η κινητικότητα ποσοτικοποιήθηκε μέσω της ταχύτητας κίνησης, η οποία εκφράστηκε ως μήκος διαδρομής ανά μονάδα χρόνου (track length/time).

Η Εικόνα 7 παρουσιάζει τα αποτελέσματα ενός αντιπροσωπευτικού πειράματος, τα οποία καταδεικνύουν διαφοροποιήσεις στην κινητικότητα μεταξύ των πειραματικών ομάδων και των ζώων-μαρτύρων. Βάσει προγενέστερων αποτελεσμάτων, η ουρολιθίνη Α χρησιμοποιήθηκε τελικά σε συγκέντρωση 0,05 mM και το νικοτιναμίδιο σε συγκέντρωση 1 mM. **Η Εικόνα 8** απεικονίζει τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από 3-5 ανεξάρτητα πειράματα, ανάλογα με το στέλεχος του *C. elegans* που εξετάστηκε. Στην ανάλυση αυτή δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πειραματικών ομάδων και των ζώων-μαρτύρων που εκτέθηκαν μόνο στον διαλύτη.

Τα δεδομένα παρουσίασαν αυξημένη παραλλακτικότητα μεταξύ των επαναλήψεων, γεγονός που αντανάκλα τη φυσική βιολογική διακύμανση των νηματωδών. Παρά την παραλλακτικότητα, παρατηρήθηκε τάση βελτίωσης της κινητικότητας στα ζώα του στελέχους CL2355 μετά από μεταχείριση με ουρολιθίνη Α, όπως υποδηλώνεται από την αυξημένη ταχύτητα κίνησης σε σύγκριση με τα ζώα-μάρτυρες. Αντίθετα, στο στέλεχος BR5270 δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη επίδραση, καθώς οι μετρήσεις παρέμειναν συγκρίσιμες με εκείνες των ζώων-μαρτύρων.



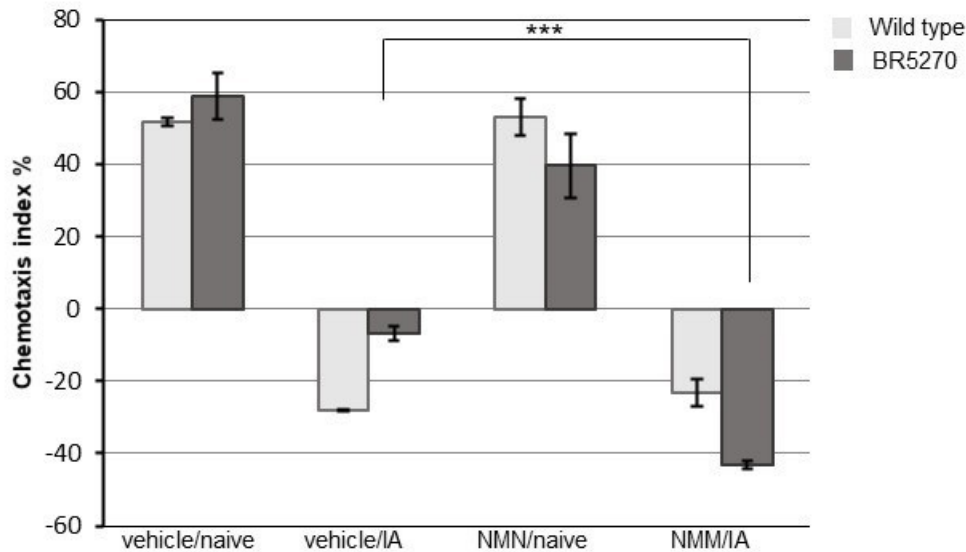
Εικόνα 7. Επίδραση του νικοτιναμιδίου (NMN, 1 mM) και της ουρολιθίνης A (UA, 0.05 mM) στο μοντέλο *C. elegans* της νόσου Alzheimer που εκφράζει Αβ (CL2355). Το αγρίου τύπου στέλεχος N2 χρησιμοποιήθηκε για λόγους σύγκρισης. Η ουρολιθίνη A βελτιώνει την κινητικότητα στο μοντέλο Αβ, όπως ποσοτικοποιήθηκε με βάση την ταχύτητα κίνησης (n=30-40 ζώα ανά συνθήκη, ανά στέλεχος, ανά πείραμα. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν μέσους όρους ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM (*P<0.05, one-way ANOVA).



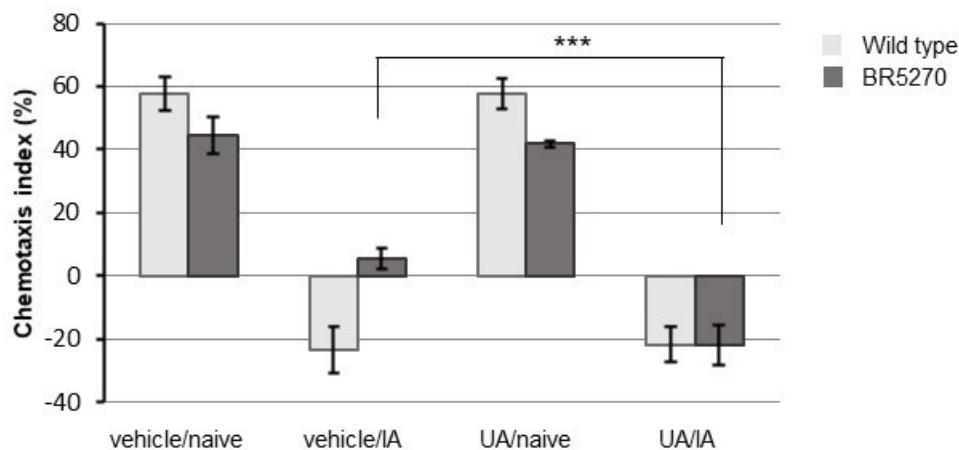
Εικόνα 8. Επίδραση του νικοτιναμιδίου (NMN, 1 mM) και της ουρολιθίνης A (UA, 0.05 mM) σε μοντέλα *C. elegans* της νόσου Alzheimer που εκφράζουν Αβ (CL2355) ή Tau (BR5270). Το αγρίου τύπου στέλεχος N2 χρησιμοποιήθηκε για λόγους σύγκρισης. Μελετήθηκε η κινητική συμπεριφορά των νηματωδών, όπως ποσοτικοποιήθηκε με βάση την ταχύτητα κίνησης (n=30-40 ζώα ανά συνθήκη, ανά στέλεχος, ανά πείραμα. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν μέσους όρους από 3-5 ανεξάρτητα πειράματα ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM).

Δεδομένου ότι βασικά παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer είναι οι γνωστικές διαταραχές και τα προβλήματα μνήμης, διερευνήθηκε επίσης η επίδραση του νικοτιναμιδίου, της ουρολιθίνης A και της ακτινονίνης στη μνήμη στο μοντέλο Tau (BR5270) της νόσου Alzheimer. Για το σκοπό αυτό αξιολογήθηκε η μνήμη των διαγονιδιακών ζώων, καθώς και του αγρίου τύπου (WT), με τη χρήση δοκιμασίας αποστροφικής οσφρητικής μάθησης χημειοταξίας, όπου οι αρνητικές τιμές του δείκτη

συσχετίζονται με τη διατηρημένη μνήμη. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι και οι τρεις ενώσεις βελτίωσαν τη μνήμη του μοντέλου Alzheimer στον *C. elegans* (Εικόνες 9-11).

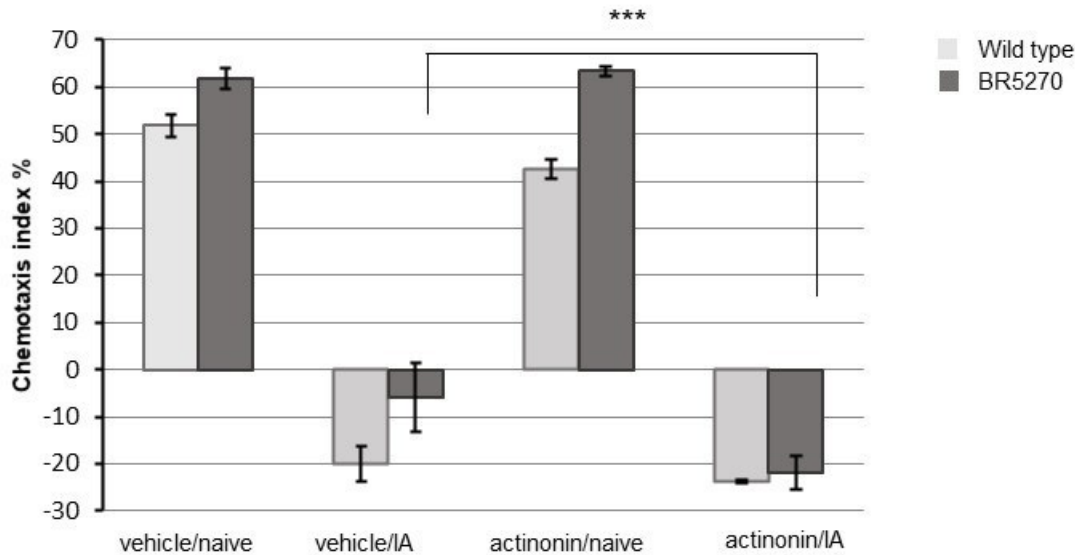


Εικόνα 9. Χορήγηση νικοτιναμιδίου (NMN) και επίδραση στη μνήμη νηματωδών που εκφράζουν Tau. Η χορήγηση νικοτιναμιδίου (NMN, 5 mM) βελτίωσε σημαντικά τη μνήμη σε διαγονιδιακούς νηματώδεις που εκφράζουν Tau. Οι στήλες απεικονίζουν τους δείκτες χημειοταξίας προς την ισοαμυλική αλκοόλη, όπως μετρήθηκαν σε ανεκπαιδευτα (naive) και εκπαιδευμένα (conditioned) ζώα αγρίου τύπου (WT) και σε νηματώδεις που εκφράζουν Tau, με ή χωρίς χορήγηση NMN. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα μέσου όρου. (n = 300-400 νηματώδεις ανά ομάδα. ***P < 0.001, two-way ANOVA).



Εικόνα 10. Χορήγηση ουρολιθίνης Α (UA) και επίδραση στη μνήμη νηματωδών που εκφράζουν Tau. Οι δείκτες χημειοταξίας προς την ισοαμυλική αλκοόλη μετρήθηκαν σε ανεκπαιδευτα (naive) και εκπαιδευμένα (conditioned) ζώα αγρίου τύπου (WT) και σε διαγονιδιακούς νηματώδεις που εκφράζουν Tau, με ή χωρίς χορήγηση UA (0,1 mM). Οι

τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα μέσου όρου. (n = 300-400 νηματώδεις ανά ομάδα. ***P < 0.001, two-way ANOVA).



Εικόνα 11. Χορήγηση ακτινονίνης (AC) και επίδραση στη μνήμη νηματωδών που εκφράζουν Tau. Η χορήγηση ακτινονίνης (AC, 1 mM) βελτίωσε σημαντικά τη μνήμη σε διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν Tau. Οι στήλες απεικονίζουν τους δείκτες χημειοταξίας προς την ισοαμυλική αλκοόλη, όπως μετρήθηκαν σε ανεκπαιδευτα (naive) και εκπαιδευμένα-εξαρτημένα (conditioned) ζώα αγρίου τύπου (WT) και σε νηματώδεις που εκφράζουν Tau, με ή χωρίς χορήγηση AC. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα μέσου όρου. (n = 300-400 νηματώδεις ανά ομάδα. ***P < 0.001, two-way ANOVA).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η ουρολιθίνη, το νικοτιναμίδιο και η ακτινονίνη βελτιώνουν επίσης τη μνήμη σε διαγονιδιακούς νηματώδεις που εκφράζουν το β-αμυλοειδές σε όλους τους νευρώνες (στέλεχος CL2355) (Fang et al., 2019).

Για λόγους σύγκρισης παρουσιάζεται και το στέλεχος CL2006 (*dvl2* [*Punc-54::human A-beta3-42*; pRF4 (*rol-6*(*su1006*)]), το οποίο εκφράζει το Αβ3-42 υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *unc-54*, επιτρέποντας την εξειδικευμένη έκφραση της τοξικής πρωτεΐνης στους μυς. Σε μελέτες αξιολόγησης χημικών ενώσεων, το στέλεχος αυτό χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ικανότητας ουσιών να καθυστερούν ή να καταστέλλουν την παράλυση που προκαλεί η συσσώρευση του Αβ.

Η χρήση του συγκεκριμένου μοντέλου επιτρέπει την επιτάχυνση γενετικών πειραμάτων που συνήθως ακολουθούν την αρχική αξιολόγηση της δραστηριότητας χημικών ενώσεων, με στόχο την αποσαφήνιση των μηχανισμών παθογένεσης της νόσου Alzheimer. Τέτοιου τύπου πειράματα συχνά περιλαμβάνουν τη σίγηση της έκφρασης γονιδίων ενδιαφέροντος (π.χ. γονίδια που εμπλέκονται στην αυτοφαγία ή τη μιτοφαγία) μέσω παρεμβολής RNA (RNA interference, RNAi).

Η διεξαγωγή πειραμάτων RNAi είναι ταχύτερη και τεχνικά ευκολότερη στο στέλεχος CL2006 σε σύγκριση με τα στελέχη που εκφράζουν την τοξική πρωτεΐνη στους νευρώνες, καθώς οι νευρώνες είναι ανθεκτικοί στο RNAi. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση στελεχών *C. elegans* που εμφανίζουν αυξημένη νευρωνική ευαισθησία στο RNAi, λόγω της έκφρασης της πρωτεΐνης SID-1 στους νευρώνες (Calixto et al., 2010).

Η ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης, η οποία επικεντρώθηκε στην αξιολόγηση χημικών ενώσεων σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών ασθενειών στον *C. elegans* με έμφαση στη νόσο Alzheimer, οδήγησε στην ταυτοποίηση ουσιών που βελτιώνουν συγκεκριμένους παθολογικούς φαινοτύπους, όπως κινητικά ελλείμματα και γνωστικές διαταραχές, στα αντίστοιχα μοντέλα. Η προσέγγιση αυτή αποτελεί ισχυρό εργαλείο για τη διαλεύκανση της παθογένεσης, τη σύνδεση των υποκείμενων μοριακών μηχανισμών με τους παρατηρούμενους φαινοτύπους και την ανάδειξη δυνητικών θεραπευτικών στόχων, προσφέροντας σημαντική βάση για μελλοντικές ερευνητικές και μεταφραστικές μελέτες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Andreux, P.A., Blanco-Bose, W., Ryu, D. et al. (2019) The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans. *Nat Metab* 1, 595–603.
2. Calixto A., Chelur D., Topalidou I. et al. (2010) Enhanced neuronal RNAi in *C. elegans* using SID-1. *Nat Methods* 7, 554–559.
3. Fang E. F., Hou Y., Palikaras K., Adriaanse B. A., Kerr J. S., Yang B., Lautrup S., Hasan-Olive M., Caponio D., Dan X., Rocktaschel P., Croteau D. L., Akbari M., Greig N. H., Fladby T., Nilsen H., Cader M. Z., Mattson M. P., Tavernarakis N. and Bohr V. A. (2019) Mitophagy inhibits amyloid-beta and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 22: 401-412.
4. Lou G., Palikaras K., Lautrup S., Scheibye-Knudsen M., Tavernarakis N. and Fang E. (2020) Mitophagy and Neuroprotection. *Trends in Molecular Medicine*, Volume 26, Issue 1, 8-20.
5. Madeo F., Zimmermann A., Maiuri MC. and Kroemer G. (2015) Essential role for autophagy in life span extension *J Clin Invest.*, 125(1):85-93.
6. Markaki M. and Tavernarakis N. (2020) *Caenorhabditis elegans* as a model system for human diseases. *Current Opinion in Biotechnology*, 63: 118-125.
7. Palikaras K., Lionaki E. and Tavernarakis N. (2015) Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 521: 525-528.
8. Xiao B., Kuruvilla J. and Tan EK. (2022) Mitophagy and reactive oxygen species interplay in Parkinson's disease. *npj Parkinsons Dis.* 8, 135.