



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:** Ανάπτυξη mRNA-θεραπευτικών προσεγγίσεων ενάντια στη νευροφλεγμονή και τον νευροεκφυλισμό

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

**ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ):** ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΓΑΡΙΝΗΣ (ΙΤΕ)

## Ανάπτυξη mRNA-θεραπευτικών προσεγγίσεων ενάντια στη νευροφλεγμονή και τον νευροεκφυλισμό

### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

**Η ενδορρινική χορήγηση EVs φορτωμένων με DNase I μειώνει την DNA damage-driven αντι-ικη-όμοια απόκριση και τον νευρωνικό θάνατο στα Er1Cx/- ποντίκια.** Για να απομακρύνουμε τα κυτταροπλασματικά dsDNA από τα μικρογλοιακά κύτταρα και να μειώσουμε το φλεγμονώδες φορτίο στους Er1Cx/- εγκεφάλους, επιδιώξαμε να αναπτύξουμε μια στρατηγική βασισμένη σε EVs για τη μεταφορά ανασυνδυασμένης νουκλεάσης DNase I και την ανακούφιση της dsDNA-μεσολαβούμενης αντι-ικη-όμοιας απόκρισης στον εγκέφαλο Er1Cx/-. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε αρχικά τη σειρά NIH/3T3 για την παραγωγή EVs φορτωμένων με ανασυνδυασμένη (pH-ανεξάρτητη) DNase I. Για εκλεκτική στόχευση των DNase I-EVs προς μικρογλοιακά κύτταρα, τα EVs προερχόμενα από NIH3T3 επικαλύφθηκαν με ένα προσαρμοσμένο anti-CD11b πεπτιδίο, που προέκυψε από συνδυασμό μιας αλληλουχίας πρόσδεσης CD63 (CRHSQMTVTSRL) (1) και του πεπτιδίου πρόσδεσης στην αMI-domain CP05 (RKLRSLWRR) (2). Στη συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε ενδορρινική μέθοδο χορήγησης ως μη επεμβατικό τρόπο παράκαμψης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και παράδοσης CD11b-ligand EVs στον εγκέφαλο και στον νωτιαίο μυελό. Πριν από τη θεραπεία, τα CD11b-ligand EVs επισημάνθηκαν με την εξοσωμική χρωστική ExoFlow. Μελέτες ανοσοφθορισμού σε ποντίκια που έλαβαν ενδορρινικά CD11b-ligand EVs έδειξαν ότι τα στοχευμένα (επικαλυμμένα με CD11b ligand) EVs παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερη συνεντόπιση με μικρογλοιακά (MAC1+) κύτταρα σε σύγκριση με EVs ελέγχου (μη επικαλυμμένα). Σε συμφωνία, το σήμα ExoFlow ανιχνεύθηκε σε παρόμοια επίπεδα σε μη-μικρογλοιακά (MAC1-) κύτταρα σε όλες τις ομάδες που εξετάστηκαν. Αξιοσημείωτα, η χορήγηση στοχευμένων DNase I-EVs σε μικρογλοία που είχε υποστεί θεραπεία με ετοποσίδη ex vivo εξάλειψε σημαντικά τα κυτταροπλασματικά dsDNA και την cGAS σε σύγκριση με κενά (naïve) EVs. Αφού διαπιστώσαμε ότι τα CD11b-ligand EVs φορτωμένα με DNase I μπορούν να στοχεύσουν αποτελεσματικά τη μικρογλοία και να απομακρύνουν κυτταροπλασματικά dsDNA ex vivo, αξιολογήσαμε στη συνέχεια την in vivo αποτελεσματικότητα αυτών των μηχανικά σχεδιασμένων EVs στη μείωση της νευροφλεγμονής και του νευρωνικού θανάτου στα Er1Cx/- ποντίκια. Για τον σκοπό αυτό, χορηγήσαμε στοχευμένα DNase I-EVs ενδορρινικά σε 12-εβδομάδων Er1Cx/- ζώα, δύο φορές την εβδομάδα, για 6 έως 15 εβδομάδες, μετά από θεραπεία με αγγειοσυσπαστικό ώστε να αποτραπεί η παροχέτευση των EVs από τα αιμοφόρα αγγεία προς τους ιστούς που επενδύουν τις ρινικές διόδους. Πραγματοποιώντας μελέτες ανοσοφθορισμού σε κρυοτομές εγκεφάλου Er1Cx/- ποντικών που έλαβαν ενδορρινικά στοχευμένα DNase I-EVs, παρατηρήσαμε σημαντική μείωση των επιπέδων dsDNA στο κυτταρόπλασμα της μικρογλοίας in vivo. Σε συμφωνία, ανιχνεύθηκε σημαντική εξασθένηση της απόκρισης τύπου I ιντερφερόνης 6 εβδομάδες μετά την έναρξη της θεραπείας, όπως μετρήθηκε από τα επίπεδα πρωτεΐνης τύπου I IFN σε brain lavages Er1Cx/-. Επιπλέον, η στοχοποίηση του κυτταροπλασματικού DNA in vivo οδήγησε σε σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό ενεργοποιημένων

μικρογλοιακών κυττάρων Er1Cx/- που είναι MHC-II+CD86+, 6 εβδομάδες μετά τη θεραπεία, υποδεικνύοντας καθυστέρηση στην πρώιμη έναρξη της νευροφλεγμονής. Πέρα από τη μικρογλοία Er1Cx/-, η θεραπεία με στοχευμένα DNase I–EVs μείωσε επίσης το σήμα dsDNA (χρώση PicoGreen) στα EVs που εκκρίνονται από μικρογλοία Er1Cx/- (CD11b+). Περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε ότι, σε αντίθεση με τα naïve EVs, η ενδορρινική χορήγηση στοχευμένων DNase I–EVs μείωσε σημαντικά το ποσοστό Annexin+ PI– και Annexin+ PI+ κυττάρων στα Er1Cx/- ποντίκια. Εντυπωσιακά, αξιολόγηση rotarod της κινητικής συντονιστικής ικανότητας σε wt και Er1Cx/- ποντίκια που θεραπεύτηκαν με EVs φορτωμένα με DNase I έδειξε εξασθένηση των νευροεκφυλιστικών συμπτωμάτων στα Er1Cx/- ζώα. Η θεραπεία με naïve ή DNase I–φορτωμένα EVs ξεκίνησε στις 12 εβδομάδες και συνεχίστηκε για 15 εβδομάδες έως ότου τα ζώα φθάσουν στις 27 εβδομάδες. Τα ζώα που έλαβαν DNase I–EVs παρουσίασαν τις πιο εμφανείς διαφορές στον χρόνο παραμονής (latency) σε σύγκριση με τα ζώα που έλαβαν naïve EVs μεταξύ 21 και 27 εβδομάδων ηλικίας (δηλαδή μετά από 9 έως 15 εβδομάδες θεραπείας). Αξίζει να σημειωθεί ότι wt ποντίκια που έλαβαν DNase I ή naïve EVs δεν εμφάνισαν ιδιαίτερες μεταβολές στο latency κατά το διάστημα των 15 εβδομάδων θεραπείας). Συνεπώς, η χρήση στοχευμένων DNase I–EVs μπορεί να απομακρύνει αποτελεσματικά τα κυτταροπλασματικά dsDNA και να μειώσει την αντι-ιική-όμοια απόκριση και τον νευρωνικό θάνατο στα Er1Cx/- ποντίκια, παρέχοντας έτσι μια ορθολογικά τεκμηριωμένη θεραπευτική στρατηγική έναντι νευροφλεγμονωδών διαταραχών που σχετίζονται με την ηλικία (3-4).

1. X. Gao *et al.*, Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy. *Sci Transl Med* **10** (2018).
2. N. P. Podolnikova, A. V. Podolnikov, T. A. Haas, V. K. Lishko, T. P. Ugarova, Ligand recognition specificity of leukocyte integrin alphaMbeta2 (Mac-1, CD11b/CD18) and its functional consequences. *Biochemistry* **54**, 1408-1420 (2015).
3. Stavgiannoudaki, I., Goulielmaki, E. & Garinis, G. A. Broken strands, broken minds: Exploring the nexus of DNA damage and neurodegeneration. *DNA Repair (Amst)* **140**, 103699, doi:10.1016/j.dnarep.2024.103699 (2024).
4. Arvanitaki, E. S. et al. Microglia-derived extracellular vesicles trigger age-related neurodegeneration upon DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **121**, e2317402121, doi:10.1073/pnas.2317402121 (2024)