

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: Μελέτη μηχανισμών πρωτεόστασης σε πειραματικά μοντέλα νόσου Alzheimer

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

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΣΤΑΘΗΣ ΓΚΟΝΟΣ (ΕΙΠ)

Μελέτη μηχανισμών πρωτεόστασης σε πειραματικά μοντέλα νόσου Alzheimer

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

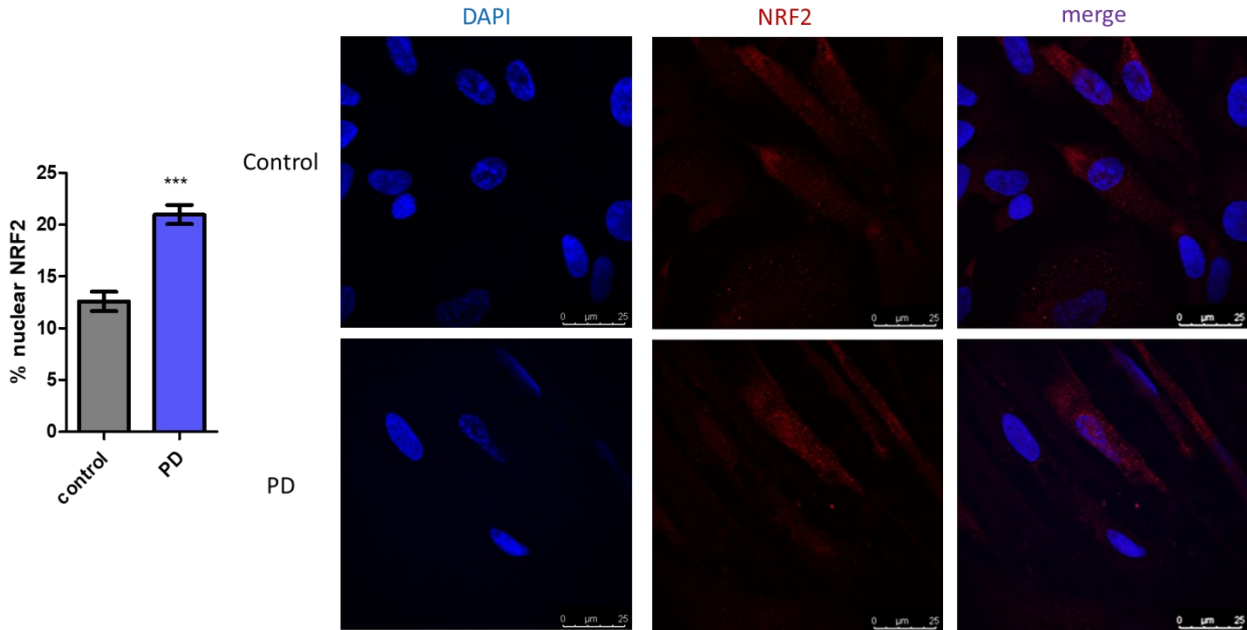
Στο πλαίσιο του φυσικού αντικείμενου με τίτλο «Μελέτη μηχανισμών πρωτεόστασης σε πειραματικά μοντέλα της νόσου Αλτσχάιμερ», διερευνήθηκαν διάφορες παράμετροι που συνδέονται με τη διατήρηση της πρωτεόστασης και στη νευροεκφυλιστική παθολογία. Ειδικότερα, η μελέτη επεκτείνεται και στη νόσο του Πάρκινσον (PD), μια νευροεκφυλιστική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση της α-συνουκλείνης. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μελέτη του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, ο οποίος αποτελεί βασικό ρυθμιστή της κυτταρικής απόκρισης στο οξειδωτικό στρες και σχετίζεται άμεσα με την έκφραση του πρωτεασώματος, του κύριου ενδοκυττάριου πρωτεολυτικού συστήματος. Στα αστροκύτταρα που προήλθαν από ασθενείς με νόσο του Πάρκινσον (PD), ή σε νευρώνες ζώνων μοντέλων της νόσου, παρατηρήθηκε μία τάση ενεργοποίησης του Nrf2 συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες (control), γεγονός που πιθανόν αντανάκλα μια αντισταθμιστική απόκριση σε αυξημένο οξειδωτικό στρες.

Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του οξειδωτικού στρες μέσω της φωσφορυλιωμένης ιστόνης γH2AX, η οποία αποτελεί δείκτη διπλών θραύσεων του DNA. Οι θραύσεις αυτές συνδέονται άμεσα με το οξειδωτικό στρες, καθιστώντας τη γH2AX ένα πολύτιμο εργαλείο για την εκτίμηση των επιπέδων του. Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένα επίπεδα γH2AX στα PD αστροκύτταρα, γεγονός που επιβεβαιώνει τη συσσώρευση οξειδωτικού στρες. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την κατανόηση της συμβολής του οξειδωτικού στρες στη νευροεκφυλιστική παθολογία της AD. Ωστόσο, στα δείγματα από PD νευρώνες (DIV10) παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα της γH2AX, συγκριτικά με τα κύτταρα WT. Στα δείγματα αυτά θα μελετηθεί η ενεργότητα του πρωτεασώματος, αναδεικνύοντας πιθανές δυσλειτουργίες στους μηχανισμούς πρωτεόλυσης και απόκρισης στο πρωτεοτοξικό και οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, απαιτείται η διερεύνηση της πρωτεόλυσης καθοριστικών πρωτεϊνών της νόσου, καθώς και η ανάλυση των παραγόντων αυτοφαγίας (LC3, Beclin-1, Atg5, Atg7) για την κατανόηση της συμβολής τους στη δυσλειτουργία της πρωτεόστασης και την εξέλιξη της νόσου.

Επιπλέον, μελετήθηκε η έκφραση της ανοσοουπομονάδας β5i του πρωτεασώματος, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των φλεγμονωδών αποκρίσεων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε μικρογλοιακά κύτταρα από διπλά διαγονιδιακά ποντίκια με επαγόμενη απώλεια της έκφρασης της BIN1. Τα αποτελέσματα έδειξαν διαφοροποιημένη έκφραση της β5i, γεγονός που αναδεικνύει τη σύνδεση του ανοσοπρωτεασώματος με τη φλεγμονώδη απόκριση.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ – ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΟΦΕΛΗ

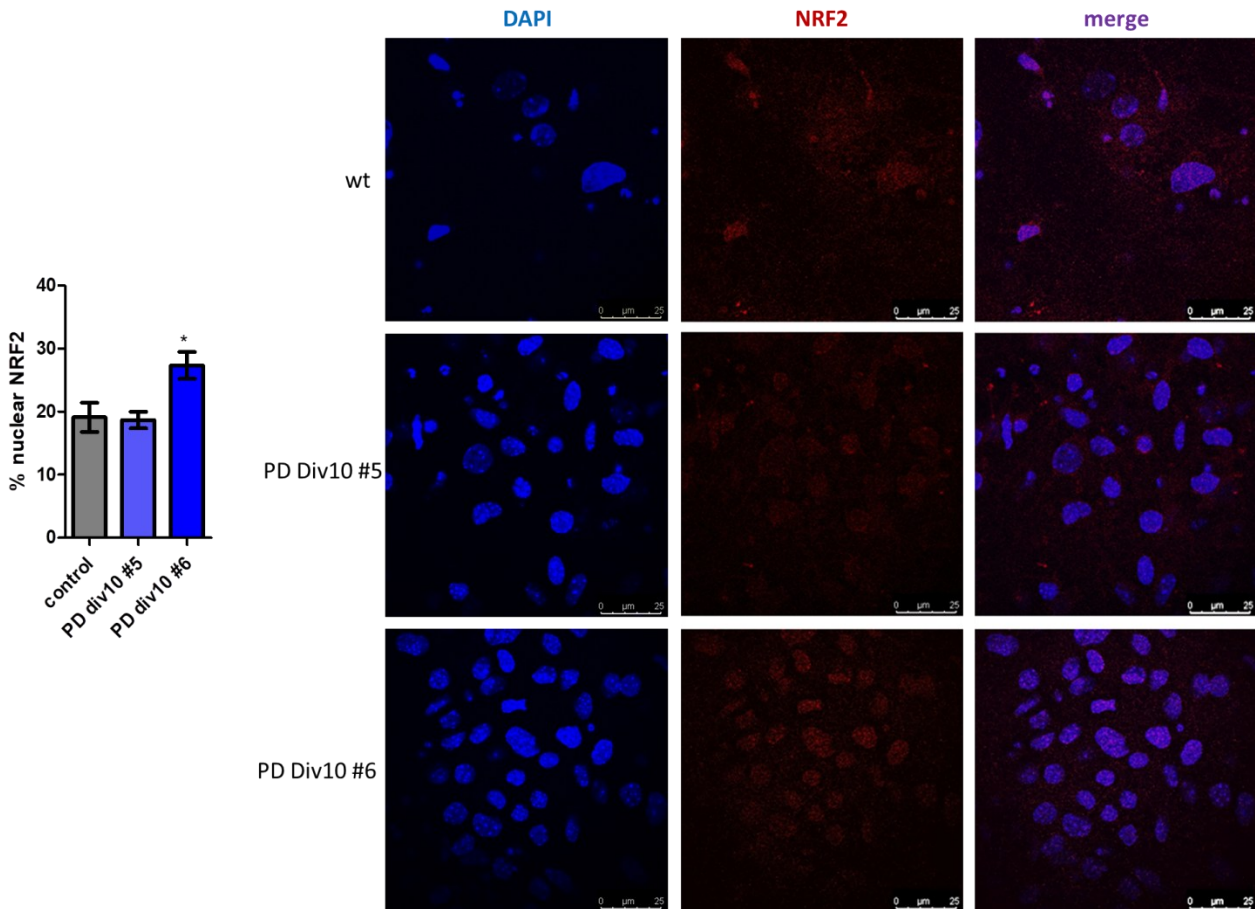
Αρχικά, διερευνήθηκε ο εντοπισμός του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, ο οποίος αποτελεί βασικό ρυθμιστή της κυτταρικής απόκρισης στο οξειδωτικό στρες και της έκφρασης του πρωτεασώματος, του κύριου ενδοκυττάριου πρωτεολυτικού συστήματος. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε σειρά δειγμάτων καλλιέργειών αστροκυττάρων, που προήλθαν από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs). Τα αστροκύτταρα αυτά προέρχονταν από κλώνους από υγιή δότη (control) είτε από κλώνους ασθενή με νόσο του Πάρκινσον (PD), επιτρέποντας την εξαγωγή συγκριτικών συμπερασμάτων για τη μεταγραφική ενεργότητα του Nrf2 τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές συνθήκες. Για την ανίχνευση του Nrf2 χρησιμοποιήθηκε το αντι-Nrf2 αντίσωμα Alexa Fluor® 594 [EP1808Y], το οποίο επιτρέπει τον άμεσο εντοπισμό του μεταγραφικού παράγοντα μέσω φθορισμού. Τα δείγματα χρωματίστηκαν με το αντίσωμα σύμφωνα με πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού και εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο, επιτρέποντας την ανάλυση της κυτταρικής εντόπισης του Nrf2 (πυρηνική ή κυτταροπλασματική).



Εικόνα 52: Ποσοτικοποίηση του πυρηνικού εντοπισμού του Nrf2 και αντιπροσωπευτικές εικόνες από αστροκύτταρα που προήλθαν από iPSCs ιγίους δότη (control) και ασθενή με νόσο του Πάρκινσον (PD). Ο Nrf2 ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας αντίσωμα anti-Nrf2 (κόκκινο). Το DNA απεικονίζεται μέσω DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole) (μπλε). Στις εικόνες παρουσιάζονται οι πυρήνες και ο εντοπισμός του Nrf2. ***: $p < 0.001$.

Από την ποσοτική ανάλυση προέκυψε ότι ο εντοπισμός του Nrf2 στον πυρήνα ήταν σημαντικά αυξημένος στα κύτταρα PD σε σχέση με τα control. Συγκεκριμένα, το ποσοστό του πυρηνικού Nrf2 ήταν 12,6% στα control κύτταρα, ενώ στα κύτταρα με νόσο του Πάρκινσον το ποσοστό ανήλθε στο 20,975%. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει μία τάση για ενεργοποίηση του Nrf2 στις παθολογικές συνθήκες, πιθανώς ως προσαρμοστική απόκριση στο αυξημένο οξειδωτικό στρες που χαρακτηρίζει τη νόσο του Πάρκινσον (Εικόνα 52).

Παράλληλα, στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του εντοπισμού του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 σε καλλιέργειες νευρώνων ιπποκάμπου, οι οποίες προήλθαν από ποντίκια M83. Οι καλλιέργειες διαχωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες δειγμάτων: από wild-type (WT) ποντίκια στο αναπτυξιακό στάδιο 11 ημερών (DIV11) και από δύο διαφορετικά +/- ποντίκια στο στάδιο 10 ημερών (DIV10). Για την ανίχνευση του Nrf2 χρησιμοποιήθηκε το αντι-Nrf2 αντίσωμα Alexa Fluor® 594 [EP1808Y], το οποίο επιτρέπει τον άμεσο εντοπισμό του μεταγραφικού παράγοντα μέσω φθορισμού. Τα δείγματα χρωματίστηκαν με το αντίσωμα σύμφωνα με πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού και εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Η ανάλυση επικεντρώθηκε στον εντοπισμό του Nrf2 (πυρηνική ή κυτταροπλασματική κατανομή), με στόχο να αξιολογηθεί η διαφορά στην ενεργοποίηση του παράγοντα μεταξύ των WT και +/- κατηγοριών (Εικόνα 53).

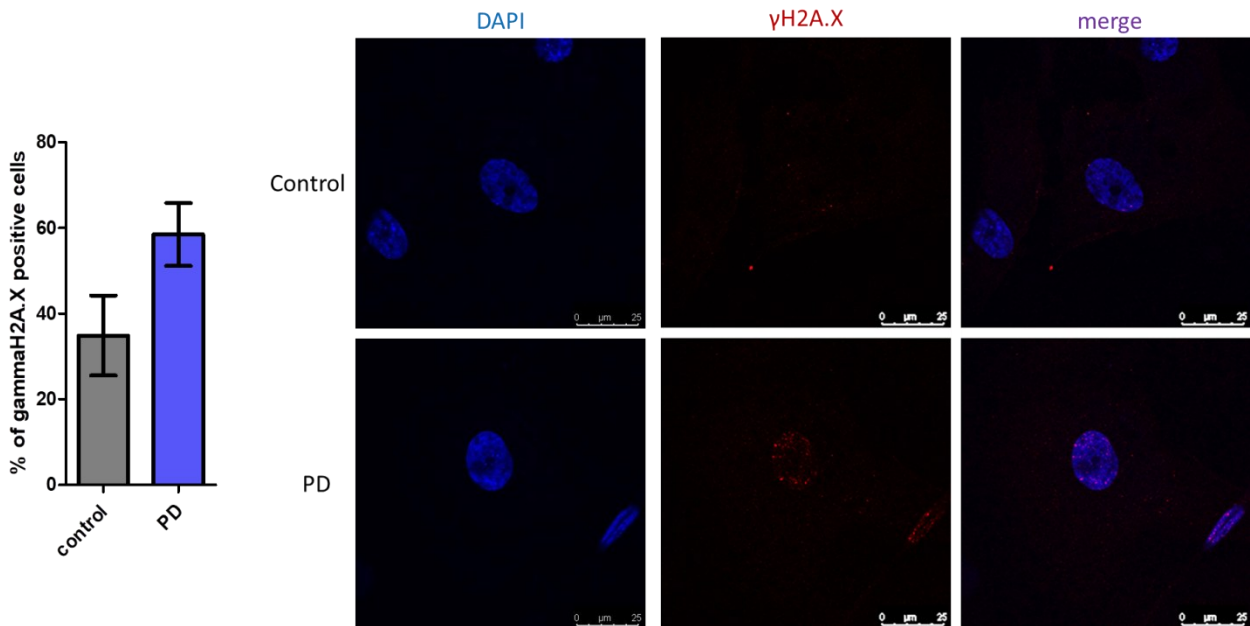


Εικόνα 53: Ποσοστό των κυττάρων με πυρηνικό εντοπισμό του Nrf2 και αντιπροσωπευτικές εικόνες από νευρώνες ιπποκάμπου που προήλθαν από WT (Div11) και PD (Div10) ποντίκια. Ο Nrf2 ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας αντίσωμα anti-Nrf2 (κόκκινο). Το DNA απεικονίζεται μέσω DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole) (μπλε). Στις εικόνες παρουσιάζονται οι πυρήνες και ο εντοπισμός του Nrf2. *: $p < 0.05$. Από την ποσοτική ανάλυση προέκυψε ότι, στις καλλιέργειες WT, το ποσοστό του πυρηνικού Nrf2 ανήλθε στο 19,1%. Στις δύο καλλιέργειες +/- παρατηρήθηκε ότι το ένα δείγμα παρουσίασε σημαντική αύξηση του πυρηνικού Nrf2 (27,35%), ενώ το άλλο παρέμεινε στα επίπεδα του μάρτυρα (18,7%). Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η πυρηνική ενεργοποίηση του Nrf2 μπορεί να είναι διαφοροποιημένη μεταξύ των +/- δειγμάτων, πιθανώς αντικατοπτρίζοντας μεταβλητότητα στις συνθήκες καλλιέργειας ή ατομικές διαφορές στη μεταγραφική δραστηριότητα.

Για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες στις ίδιες κατηγορίες δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ανοσοφθοριστική χρώση για τη φωσφορυλιωμένη ιστόνη H2AX (γ H2AX), η οποία αποτελεί δείκτη διπλών θραύσεων του DNA. Η ποσοτικοποίηση της γ H2AX έγινε μέσω λογισμικού ανάλυσης εικόνας, παρέχοντας δεδομένα σχετικά με τον αριθμό και την ένταση των φθορίζοντων σημάτων ανά κύτταρο.

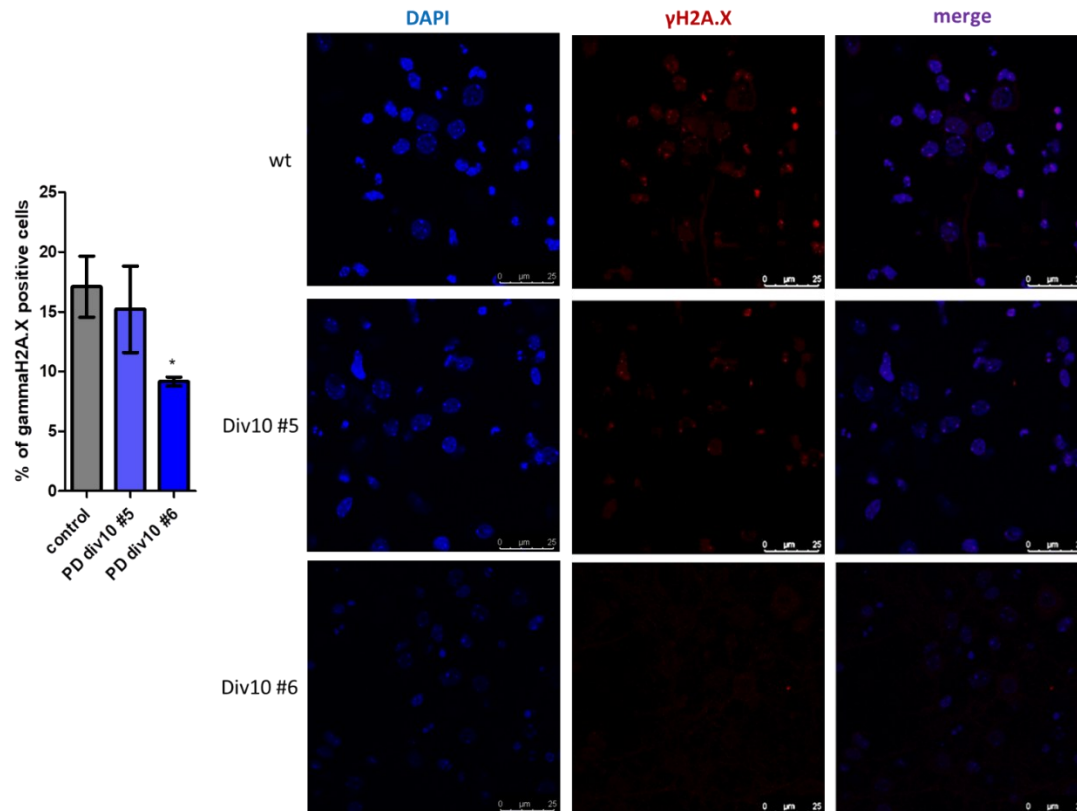
Η συνδυαστική ανάλυση των δεδομένων εντόπισης του Nrf2 και των βλαβών στο DNA στις διαφορετικές κατηγορίες δειγμάτων αναμένεται να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τον ρόλο του Nrf2 στη ρύθμιση των αντιοξειδωτικών αποκρίσεων και την προστασία από βλάβες στο DNA, ιδιαίτερα σε συνθήκες που αντικατοπτρίζουν τη νευροεκφυλιστική νόσο. Για την ποσοτικοποίηση της γ H2AX χρησιμοποιήθηκε το πρωτογενές αντίσωμα ab11174, και το δευτερογενές αντίσωμα ήταν συντηγμένο με Alexa Fluor 647. Η επιλογή του φθοριοχρώματος έγινε στρατηγικά ώστε να αποφεύγεται η χρήση φθορισμού στο πράσινο φάσμα, λόγω του αυτοφθορισμού των αστροκυττάρων, που θα μπορούσε να προκαλέσει αυξημένο υπόβαθρο και να μειώσει την αξιοπιστία των μετρήσεων. Τα δείγματα απεικονίστηκαν με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου, και τα δεδομένα που προέκυψαν αναλύθηκαν ποσοτικά με εξειδικευμένο λογισμικό, ώστε να προσδιοριστούν τυχόν διαφορές μεταξύ των δύο κατηγοριών δειγμάτων. Η μελέτη συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση της γονιδιακής ακεραιότητας και των μηχανισμών κυτταρικής

απόκρισης σε καταστάσεις στρες, αναδεικνύοντας διαφορές μεταξύ αστροκυττάρων που προέρχονται από υγιείς δότες και από ασθενείς με νόσο του Πάρκινσον (Εικόνα 54).



Εικόνα 54: Ποσοτικοποίηση των κυττάρων θετικών για γH2AX και αντιπροσωπευτικές εικόνες από αστροκύτταρα που προήλθαν από iPSCs ελέγχου (control) και ασθενών με νόσο του Πάρκινσον (PD). Η γH2AX ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας αντίσωμα anti-γH2AX (κόκκινο). Το DNA απεικονίζεται μέσω DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole) (μπλε). Στις εικόνες παρουσιάζονται οι πυρήνες και η γH2AX.

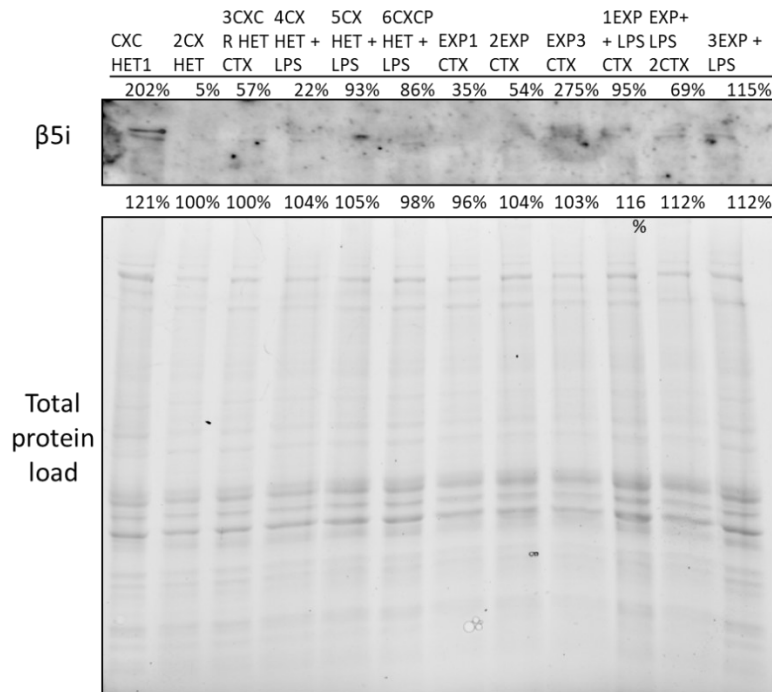
Από την ανάλυση των δεδομένων διαπιστώθηκε ότι στα κύτταρα PD παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του ποσοστού των θετικών σε γH2AX κυττάρων, το οποίο ανήλθε σε 58,49%, σε σύγκριση με τα 34,89% του μάρτυρα. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν αυξημένο οξειδωτικό στρες και συσσωρευμένες βλάβες στο DNA στα κύτταρα PD.



Εικόνα 55: Ποσοτικοποίηση του ποσοστού των κυττάρων θετικών για γH2A.X και αντιπροσωπευτικές εικόνες από νευρώνες ιπποκάμπου που προήλθαν από ποντίκια WT (Div11) ή PD (Div10). Η γH2A.X ανιχνεύθηκε χρησιμοποιώντας πρωτογενές αντίσωμα anti-γH2A.X (κόκκινο). Το DNA απεικονίζεται μέσω DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole) (μπλε). *: $p < 0.05$.

Ωστόσο, στα δείγματα από νευρώνες (DIV10) παρατηρήθηκε αντίθετη τάση. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα PD εμφάνισαν μείωση στα επίπεδα της γH2A.X, συγκριτικά με τα κύτταρα WT. Η παρατηρούμενη αυτή διαφορά μπορεί να υποδηλώνει διαφοροποιημένες στρατηγικές απόκρισης στο οξειδωτικό στρες μεταξύ αστροκυττάρων και νευρώνων, καθώς και την πιθανή ύπαρξη προστατευτικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται στους νευρώνες PD, οι οποίοι περιορίζουν την εμφάνιση διπλών θραύσεων του DNA (Εικόνα 55).

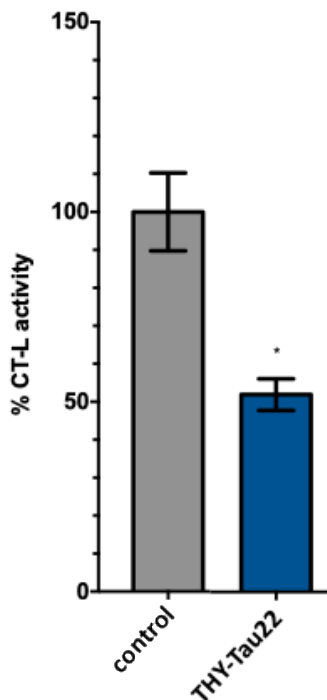
Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε προετοιμασία και ποιοτικός έλεγχος πρωτεϊνικών δειγμάτων από μοντέλο διπλά διαγονιδιακών ποντικών, στο οποίο προκαλείται επαγόμενη απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης BIN1 στα μικρογλοιακά κύτταρα. Η BIN1 είναι μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της σποραδικής νόσου Alzheimer. Τα δείγματα προήλθαν από πειραματικές ομάδες στις οποίες είχαν εφαρμοστεί διαφορετικές συνθήκες διέγερσης με LPS (λιποπολυσακχαρίτης), προκειμένου να διερευνηθούν οι επιπτώσεις στη φλεγμονώδη απόκριση. Ο ποιοτικός έλεγχος της ποιότητας και της συγκέντρωσης των δειγμάτων έγινε με χρήση της τεχνολογίας StainFree™. Στη συνέχεια, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση έκφρασης της ανοσουπομονάδας βδ1 του πρωτεασώματος, χρησιμοποιώντας τεχνικές Western blot. Ο η ανάλυση έκφρασης της βδ1 πραγματοποιήθηκε με στόχο την κατανόηση του ρόλου της BIN1 στη ρύθμιση της ανοσοπροσαρμοστικής λειτουργίας του πρωτεασώματος στα μικρογλοιακά κύτταρα, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για τους μοριακούς μηχανισμούς που συνδέονται με τη φλεγμονώδη απόκριση και την παθογένεια της νόσου Alzheimer (Εικόνα 56).



Εικόνα 56: Ανάλυση ανοσοσύτωσης της ης ανοσοϋπομονάδας β5i του πρωτεασώματος σε πρωτεϊνικά δείγματα που προήλθαν από μοντέλο διπλά διαγονιδιακών ποντικών με επαγόμενη απώλεια της έκφρασης της BIN1 στα μικρογλοιακά κύτταρα. Για την επιβεβαίωση της ίσης φόρτωσης πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία StainFree™. Η μέση τιμή των δειγμάτων τέθηκε αυθαίρετα ως 100%.

Τα αποτελέσματα δείχνουν διαφοροποίηση στην έκφραση της β5i ανάμεσα στις διάφορες πειραματικές συνθήκες, οι οποίες χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Στο πλαίσιο της μελέτης των μηχανισμών πρωτεόστασης σε πειραματικά μοντέλα νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, πραγματοποιήθηκε επιπλέον λειτουργική ανάλυση της πρωτεασωματικής δραστηριότητας σε δείγματα εγκεφάλου από διαγονιδιακά ποντίκια THY-Tau22, τα οποία αποτελούν καθιερωμένο μοντέλο Tau παθολογίας, καθώς και από αντίστοιχα ποντίκια ελέγχου. Η ανάλυση επικεντρώθηκε στην ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος, η οποία αντιπροσωπεύει τη βασική καταλυτική λειτουργία του 26S πρωτεασώματος και αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της συνολικής πρωτεολυτικής ικανότητας του κυττάρου. Για τη μέτρηση της πρωτεασωματικής ενεργότητας, ιστοί εγκεφάλου ομογενοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης Tris/HCl (25 mM, pH 7.6), το οποίο περιείχε ATP, γλυκερόλη, KCl, EDTA, DTT, Nonidet P-40 και αναστολείς πρωτεασών, ώστε να διατηρηθεί η ακεραιότητα και η λειτουργικότητα του πρωτεασώματος. Μετά τη λύση, τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford, χρησιμοποιώντας λευκωματίνη ορού βοοειδών (BSA) ως πρότυπο. Η ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) του πρωτεασώματος μετρήθηκε με τη χρήση του φθορίζοντος πεπτιδικού υποστρώματος LLVY-AMC. Η ειδική πρωτεασωματική ενεργότητα προσδιορίστηκε ως η διαφορά του φθορισμού παρουσία και απουσία του ειδικού αναστολέα του πρωτεασώματος MG132 και εκφράστηκε, μετά από κανονικοποίηση ως προς την ολική πρωτεΐνη, ως ποσοστό (%) της αντίστοιχης ενεργότητας των ποντικών μαρτύρων (Εικόνα 57).



Εικόνα 57. Η ενεργότητα χυμοθρυψίνης του πρωτεασώματος μειώνεται στον εγκέφαλο από διαγονιδιακά ποντίκια THY-Tau22: Μέση (%) ενεργότητα χυμοθρυψίνης του πρωτεασώματος σε δείγματα εγκεφάλου από ποντίκια THY-Tau22 σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ζώα μάρτυρες. Η μέση τιμή των ποντικών-μαρτύρων τέθηκε αυθαίρετα στο 100%. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm SEM. *: $p < 0.05$.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, τα ποντίκια THY-Tau22 εμφανίζουν σημαντικά μειωμένη πρωτεασωματική ενεργότητα σε σύγκριση με τα ποντίκια μάρτυρες. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μείωση της CT-L δραστηριότητας κατά περίπου 49%, γεγονός που υποδηλώνει σοβαρή διαταραχή της πρωτεόστασης στον εγκέφαλο των διαγονιδιακών ζώων. Η παρατηρούμενη μείωση της πρωτεασωματικής ενεργότητας είναι συμβατή με την προοδευτική συσσώρευση της παθολογικής πρωτεΐνης Tau που χαρακτηρίζει το μοντέλο THY-Tau22, καθώς και με τα δεδομένα μειωμένης έκφρασης της κινάσης Mirk/Dyrk1B και του miR-9-5p που προέκυψαν από προηγούμενες αναλύσεις. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι η απορρύθμιση των μηχανισμών πρωτεόστασης συμβάλλει καθοριστικά στην εξέλιξη της Tau παθολογίας και του νευροεκφυλισμού.