



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: Αλληλούχηση RNA σε επίπεδο ενός κυττάρου της μικρογλοίας ποντικών που εκφράζουν την μετάλλαξη A53T-α-συν

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

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΕΡΑ ΤΑΟΥΦΙΚ (ΕΙΠ)

Αλληλούχιση RNA σε επίπεδο ενός κυττάρου της μικρογλοίας ποντικών που εκφράζουν την μετάλλαξη A53T-α-συν

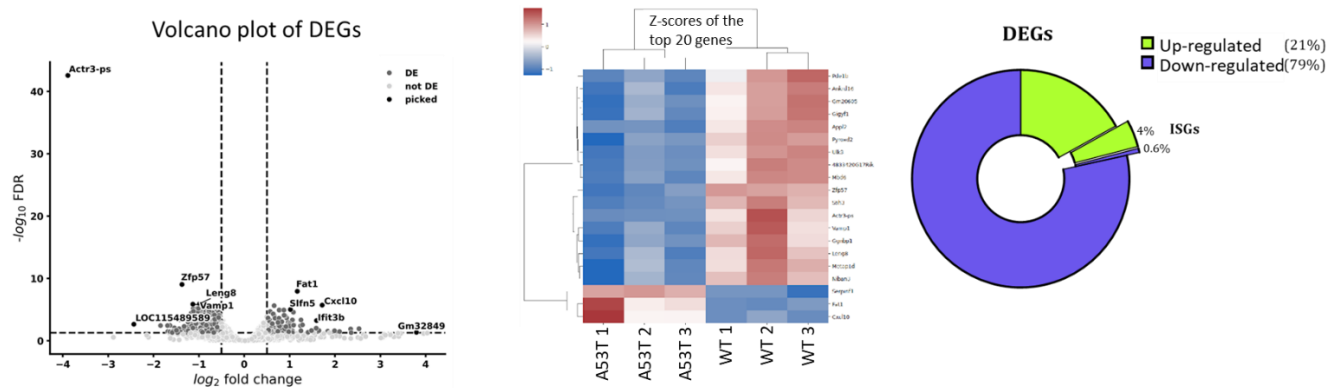
ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Χρησιμοποιήθηκαν M83 διαγονιδιακά ζώα που εκφράζουν την A53T μετάλλαξη στην α-συνουκλείνη και αναλύθηκε η μικρογλοία με αλληλούχιση RNA στο αναπτυξιακό στάδιο P7. Η αναγνώριση αλλαγών στα μικρογλοιακά κύτταρα από τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια αποκάλυψε σημαντικά γεγονότα στην αλληλεπίδραση μικρογλοίας και νευρώνων και κατ' επέκταση στη δημιουργία και λειτουργία των νευρωνικών δικτύων παρουσία της παθολογικής α-συνουκλείνης. Απομονώσαμε μικρογλοιακά κύτταρα με FACS sorting από συνολικά 12 (6 A53T, 6 αγρίου τύπου) εγκεφάλους αρσενικών P7 μυών. Το sorting πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τους δείκτες CD45, CD11b, CX3CR1 που χαρακτηρίζουν τα μικρογλοιακά κύτταρα. Τα μικρογλοιακά συγκεντρώθηκαν μαζί σε δυάδες, έτσι που καταλήξαμε με 3 δείγματα από ομόζυγα της A53T ζώα και 3 δείγματα από τα αντίστοιχα αγρίου τύπου. Η απομόνωση του RNA έγινε με το Qiagen micro RNeasy kit και τα RNA δείγματα εστάλησαν στο Ινστιτούτο Παστέρ του Παρισιού για αλληλούχιση με το NextSeq 1000/2000 Sequencing System. Η μετέπειτα υπολογιστική ανάλυση αποκάλυψε μονοπάτια που απορρυθμίζονται στη μικρογλοία από την A53T α-συνουκλείνη που εκφράζουν οι νευρώνες του ζωικού μας μοντέλου ήδη από το αναπτυξιακό στάδιο P7. Επιπλέον, οι αναλύσεις Gene Ontology (GO) και Ingenuity Pathway (IPA) σε συνδυασμό με τη βιβλιογραφία θα μας επιτρέψουν να επιλέξουμε συγκεκριμένα γονίδια και πρωτεΐνες με κομβικό ρόλο στα παραπάνω μονοπάτια και να εστιάσουμε σε αυτά ως στόχους στα επόμενα βήματα της μελέτης μας. Ήδη, έχουν αναδειχθεί τα μονοπάτια με τις πιο έντονες και σημαντικές διαφορές και είμαστε στο στάδιο επιλογής των πιο ειδικών και συγκεκριμένων γονιδίων – στόχων. Με αυτό το παραδοτέο, έχουμε την πρώτη στο πεδίο περιγραφή των μεταγραφικών προφίλ της μικρογλοίας σε πολύ πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο σε ένα ζωικό μοντέλο Πάρκινσον και την ταυτοποίηση ειδικών χαρακτηριστικών της μικρογλοίας που σχετίζονται με την A53T α-συνουκλείνη στην ανάπτυξη των μυών και την πιθανή σχέση τους με νευρολογικές νόσους στον άνθρωπο.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ – ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΟΦΕΛΗ

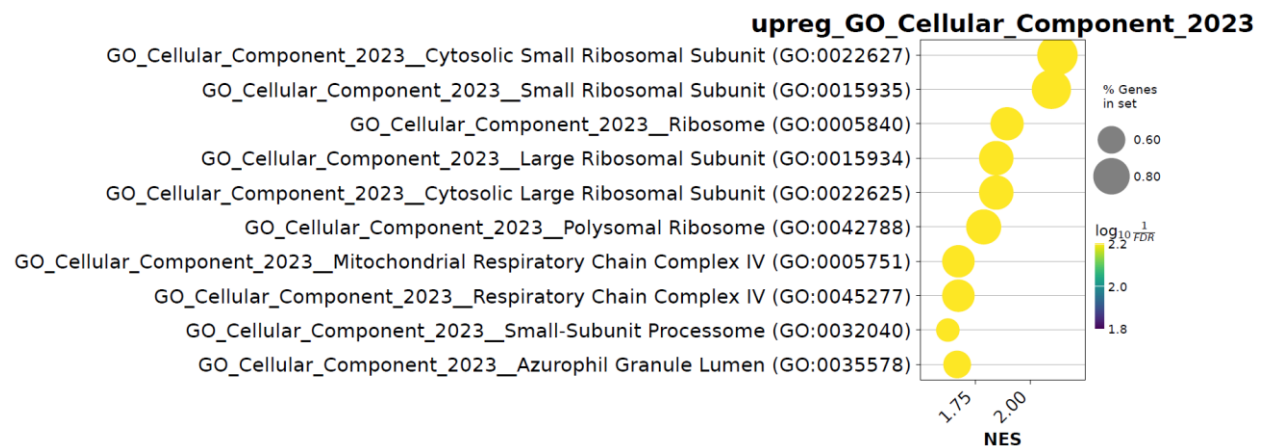
Η υλοποίηση του παραδοτέου ξεκίνησε με την αποστολή M83 μυών στο Παρίσι στα αναπτυξιακά στάδια των P30, 4 μηνών και 8-10 μηνών και της μετάβασης της μεταδιδακτορικής ερευνήτριας EN στο εργαστήριο Deczkowska, προκειμένου να απομονωθούν τα μικρογλοιακά κύτταρα από τα ζώα εκεί και να ακολουθήσει αλληλούχιση RNA σε μονήρη κύτταρα με το πρωτόκολλο MARS-seq 2.0 (single cell RNA sequencing). Μετά από επανειλημμένες προσπάθειες, η απομόνωση των κυττάρων και η αποθήκευσή τους στα ειδικά πιάτα 384 θέσεων στέφθηκε με επιτυχία. Η EN επέστρεψε στην Αθήνα και οι συνεργάτες μας στο Ινστιτούτο Παστέρ του Παρισιού συνέχισαν με τη διαδικασία της αλληλούχισης. Όμως, λόγω σοβαρών τεχνικών προβλημάτων και λανθασμένων επιλογών του υπεύθυνου τεχνικού στη βασική εγκατάσταση και στην αντίστοιχα πλατφόρμα, όλα τα δείγματα καταστράφηκαν και δεν μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για καμία εφαρμογή. Δεδομένου ότι η αποστολή ζώων για δεύτερη φορά ήταν ένα σημαντικό έξοδο και μάλιστα, χωρίς να υπάρχει κάποια εγγύηση ότι η πλατφόρμα θα λειτουργούσε απρόσκοπτα αυτή τη φορά, αποφασίσαμε να προχωρήσουμε σε απομόνωση των μικρογλοιακών κυττάρων στο δικό μας εργαστήριο, αφού πλέον είχαμε την τεχνογνωσία, και να αποστείλουμε RNA δείγματα για αλληλούχιση του συνολικού μεταγραφώματος εις βάθος (bulk RNA sequencing). Όντως, απομονώσαμε τα κύτταρα με FACS sorting στη βασική εγκατάσταση κυτταρομετρίας ροής του ΕΙΠ με χρήση του Melody και χρησιμοποιώντας τους δείκτες CCD45, CD11b και CX3CR1 και κατόπιν, απομονώσαμε το RNA τους με το Qiagen micro RNeasy kit από συνολικά 58 ζώα διάφορων αναπτυξιακών σταδίων, ήτοι P7, P30, 4-5 μηνών και ενός έτους. Κάθε δείγμα RNA προήλθε από κύτταρα δύο ζώων συνολικά. Μετά από αρχικό έλεγχο ποιότητας, τελικά καταλήξαμε με συνολικά 24 δείγματα RNA που εστάλησαν στους συνεργάτες μας στο Ινστιτούτο Παστέρ του Παρισιού για να αλληλουχηθούν με το NextSeq 1000/2000 Sequencing System, κατόπιν ενδεδειγμένα.

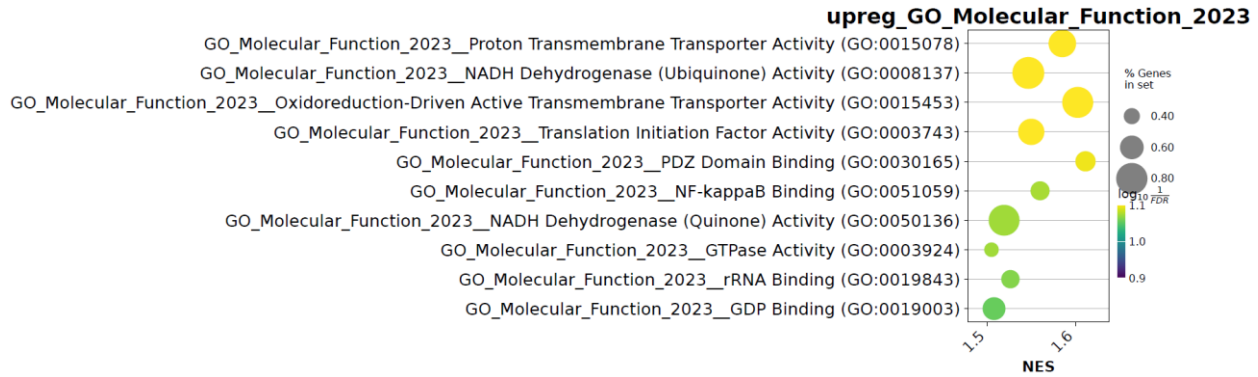
ποιοτικού ελέγχου. Συγκεκριμένα, εστάλησαν 3 δείγματα P7 αγρίου τύπου και 3 P7 A53T ομόζυγα, 3 δείγματα P30 αγρίου τύπου και 3 P30 A53T ομόζυγα, 3 δείγματα 4-5 μηνών αγρίου τύπου και 3 4-5 μηνών A53T ομόζυγα, 3 δείγματα ενός έτους αγρίου τύπου και 3 ενός έτους A53T ομόζυγα. Από αυτά, ο ποιοτικός έλεγχος έδειξε ότι εκτός από τα δείγματα που προήλθαν από P7 ζώα, πολλά από τα δείγματα δεν είχαν καλή ενίσχυση με PCR, γεγονός που μπορεί να σημαίνει μικρή ποσότητα αρχικού RNA ή αποδόμηση πριν την έναρξη της διαδικασίας. Μετά από τροποποίηση του πρωτοκόλλου και υιοθετώντας μια προσέγγιση αυξημένης ευαισθησίας, τελικά προχώρησε η αλληλούχιση των δειγμάτων, όμως και πάλι μόνο για τα P7 δείγματα τα αποτελέσματα είναι ασφαλή. Μάλιστα, για τα δείγματα αυτά η αλληλούχιση έφτασε σε μεγάλο βάθος και έτσι, προχωρήσαμε σε βιοπληροφορική ανάλυση μόνο για αυτά.



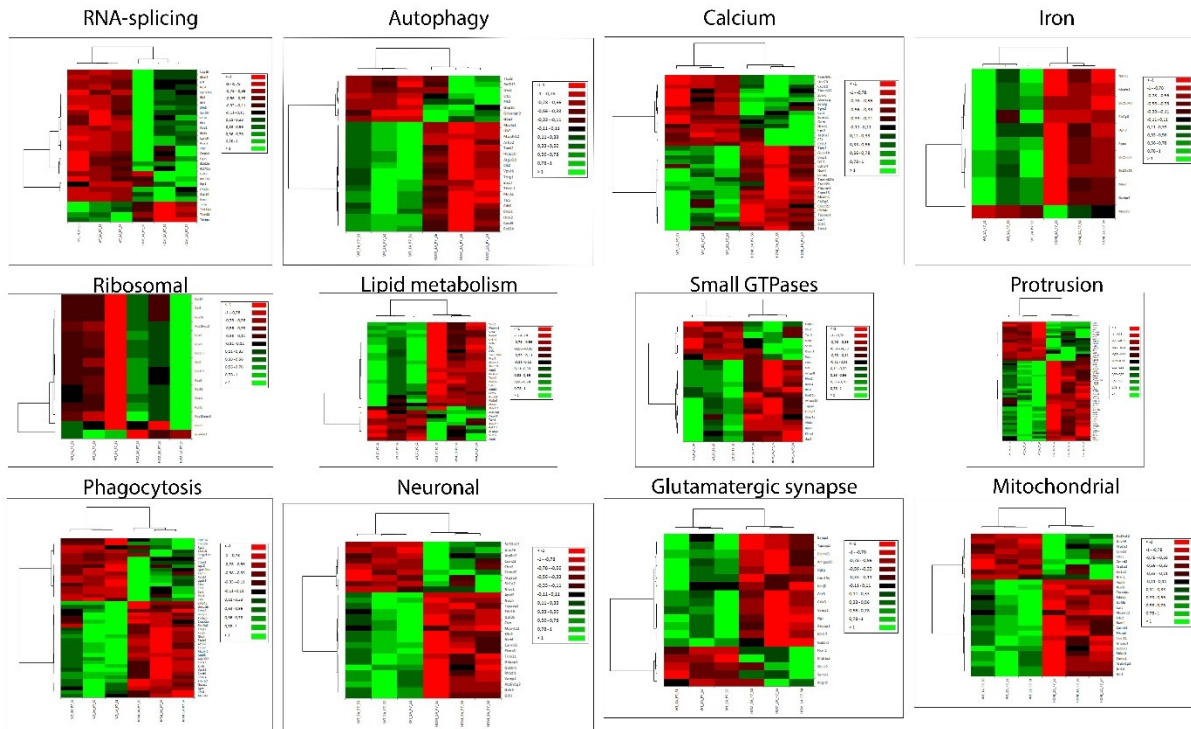
Εικόνα 12: Τα σημαντικότερα γονίδια που διαφοροποιούνται μεταξύ A53T και αγρίου τύπου μικρογλία στο στάδιο P7: Volcano plot, z-scores των 20 πλέον διαφοροποιημένων γονιδίων, ποσοστά αυξορυθμισμένων και μειορυθμισμένων γονιδίων.

Βρέθηκαν 652 διαφοροποιημένα γονίδια στα δείγματα αυτά, με τα πιο σημαντικά από αυτά σημασμένα στο παρακάτω volcano plot (Εικόνα 12). Οι αρνητικές τιμές σημαίνουν μειορύθμιση και οι θετικές αυξορύθμιση στα A53T μικρογλοιακά κύτταρα. Επιπλέον, οι αναλύσεις Gene Ontology δείχνουν μία ξεκάθαρη επίδραση στα ριβοσώματα και στα μιτοχόνδρια, όπως φαίνεται στα παρακάτω παραδείγματα GO ανάλυσης (Εικόνα 13).



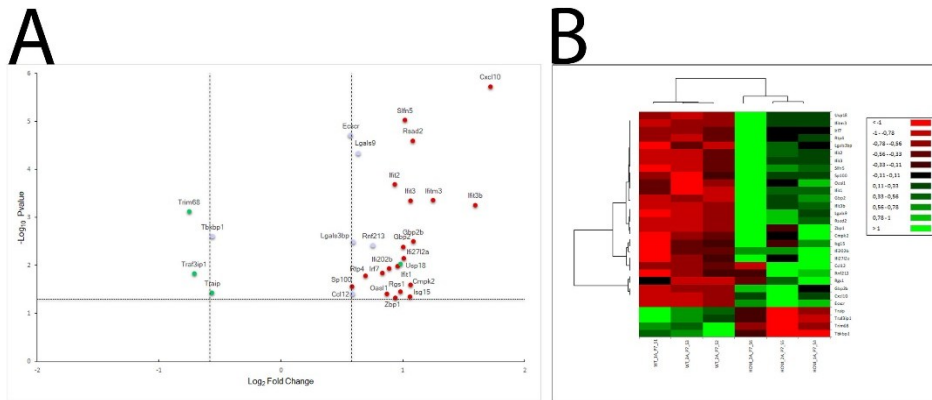


Εικόνα 13: GO ανάλυση για κυτταρικό εντοπισμό και μοριακή λειτουργία σε αυξορυθμισμένα γονίδια στα μικρογλοιακά κύτταρα A53T ομόζυγων P7 μυών συγκριτικά με αντίστοιχα αγρίου τύπου.



Εικόνα 14: Χάρτες θερμότητας (heatmaps) με τα σημαντικότερες ομάδες γονιδίων που παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές μεταξύ A53T και αγρίου τύπου μικρογλία στο στάδιο P7.

Η ανάλυση των δεδομένων από το RNAseq συνεχίστηκε σε μεγαλύτερο βάθος με χρήση του λογισμικού Ingenuity και κατασκευή περαιτέρω χαρτών θερμότητας για συγκεκριμένες ομάδες γονιδίων και συγκεκριμένα, για γονίδια που έχουν να κάνουν με το εναλλακτικό μάτισμα, την αυτοφαγία, τη ρύθμιση μέσω ασβεστίου, το μεταβολισμό του σιδήρου, τα ριβοσώματα, το μεταβολισμό λιπιδίων, τις μικρές GTPάσες, τις κυτταρικές προεκβολές, την φαγοκυττάρωση, τα μιτοχόνδρια και νευρωνικά ή πιο συγκεκριμένα γονίδια που έχουν να κάνουν με τις γλουταματεργικές συνάψεις (Εικόνα 14). Μέσα από αυτή την ανάλυση, αναδύθηκε και μια ξεχωριστή ομάδα, τα γονίδια που ανταποκρίνονται στην ιντερφερόνη (interferon response genes – ISGs) και τα οποία φαίνεται να αυξορυθμίζονται στην A53T P7 μικρογλία, αποκαλύπτοντας μια ομάδα (cluster) μικρογλοίας με αυτή τη μοριακή υπογραφή σε αυτό το μοντέλο (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Volcano plot (A) και heatmap (B) των γονιδίων που ανταποκρίνονται στην ιντερφερόνη. Φαίνεται η διαφορική έκφρασή τους μεταξύ μεταξύ A53T και αγρίου τύπου μικρογλία στο στάδιο P7.

Τα οφέλη προς το ΕΙΠ και το εργαστήριο Ταουφίκ περιλαμβάνουν τη συνεργασία με το εργαστήριο Deczkowska, η οποία συνεχίζεται, η τεχνογνωσία και η εγκαθίδρυση στο εργαστήριο του πρωτοκόλλου απομόνωσης μικρογλοιακών κυττάρων που πλέον αποτελεί εργαστηριακή ρουτίνα και η εξαγωγή σημαντικών αποτελεσμάτων από το RNA seq που θα οδηγήσουν στο επόμενο στάδιο τη μελέτη, πιθανώς να λειτουργήσουν και ως εφαλτήριο για καινούργιες μελέτες.