

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: Ταυτοποίηση των χωροχρονικών μοτίβων των μικρογλοιακών ομάδων των μυών 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)

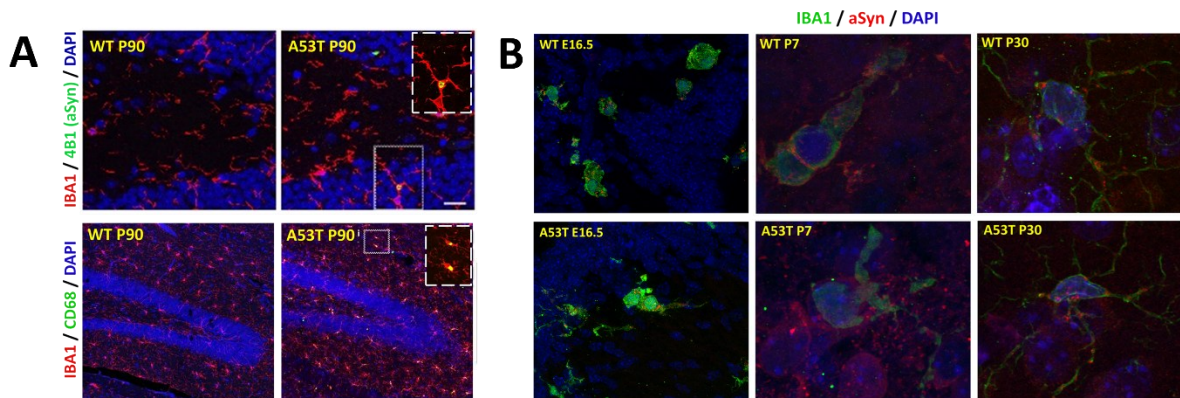
Ταυτοποίηση των χωροχρονικών μοτίβων των μικρογλοιακών ομάδων των μυών που εκφράζουν την μετάλλαξη A53T-α-συν

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

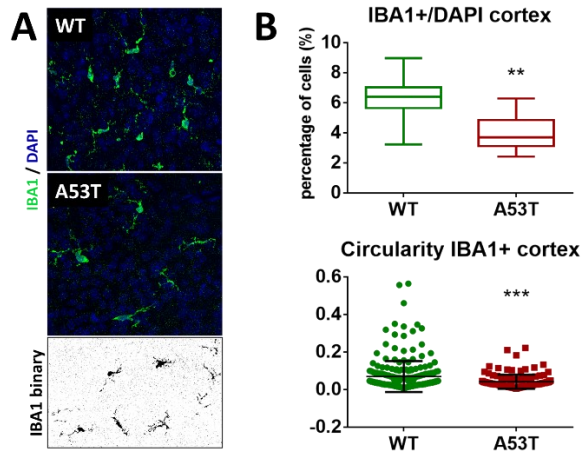
Τα αποτελέσματα από την αλληλούχηση RNA του προηγούμενου παραδοτέου μπορούν να τοποθετηθούν σε ένα χωροχρονικό πλαίσιο σε επίπεδο ιστού. Αν και η μικρογλοία του ανθρώπου έχει μεγαλύτερη ετερογένεια και περισσότερες ενεργοποιημένες φάσεις από του μύος, αναλύσεις κανονικής συσχέτισης μεταξύ της μικρογλοίας του ανθρώπου και του μύος αποκάλυψαν εντυπωσιακές ομοιότητες στο μεταγραφικό τους προφίλ στις νόσους Αλτσχάιμερ και Πολλαπλή Σκλήρυνση, όπως και νέους, συγκεκριμένους μικρογλοιακούς πληθυσμούς που εμπλέκονται στη νευροεκφύλιση. Ακολουθώντας μια παρόμοια προσέγγιση όπως η υπολογιστική ανάλυση του προηγούμενου παραδοτέου, θα εφαρμόσουμε μικροσκοπία υψηλής ανάλυσης, χρησιμοποιώντας επιλεγμένους μάρτυρες για τη μικρογλοία σε τομές εγκεφάλου του ζωικού μας μοντέλου και μικτές καλλιέργειες μικρογλοίας και νευρώνων ώστε να αναλύσουμε πώς η A53T-α-συνουκλείνη που εκφράζεται από τους νευρώνες επηρεάζει την τοπική διανομή και το μοτίβο των μεταγραφών που μας ενδιαφέρουν, ταυτόχρονα με την αρχιτεκτονική οργάνωση των μικρογλοιακών κυττάρων. Με την ολοκλήρωση του παραδοτέου, φιλοδοξούμε να έχουμε ένα λεπτομερή χάρτη σε επίπεδο ιστού για τα επιλεγμένα μόρια που θα προκύψουν από την αλληλούχηση RNA μονήρων κυττάρων στα M83 ζώα και μια λεπτομερή περιγραφή της υποκυτταρικής οργάνωσης επιλεγμένων RNAs και της νανο-αρχιτεκτονικής των συνάψεων και των σημείων επαφής μεταξύ μικρογλοίας και νευρώνων παρουσία της A53T-α-συνουκλείνης

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ – ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΟΦΕΛΗ

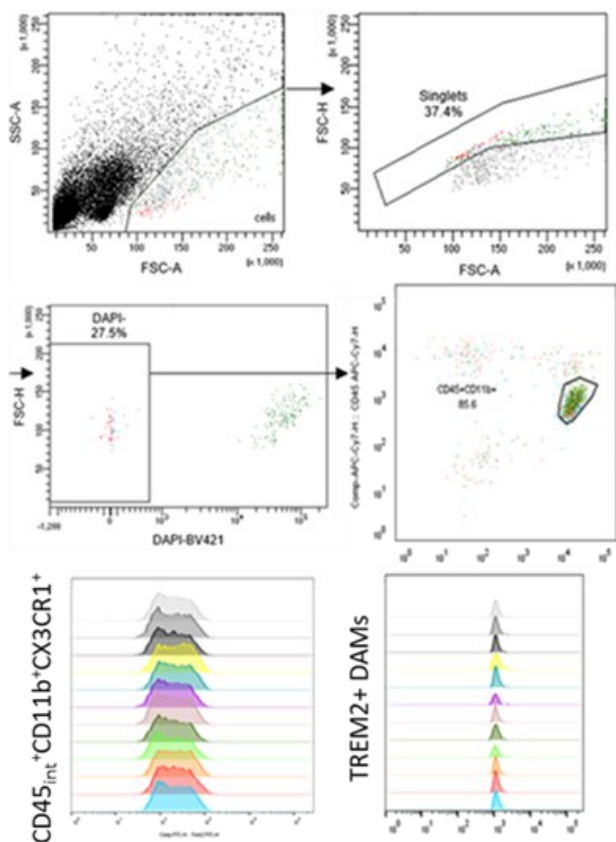
Έχουν υλοποιηθεί ήδη αρκετές ανοσοϊστοχημείες σε ιστό από εγκέφαλο διάφορων αναπτυξιακών σταδίων, όπου έχει χαρακτηριστεί η ύπαρξη έγκλειστων α-συνουκλείνης, έχουν βρεθεί διαφορές στη μορφολογία ή και άλλους ειδικούς μάρτυρες (Εικόνες 16-10). Μεγαλύτερη έμφαση δίνεται στο αναπτυξιακό στάδιο P7, λόγω των αποτελεσμάτων του προηγούμενου παραδοτέου.



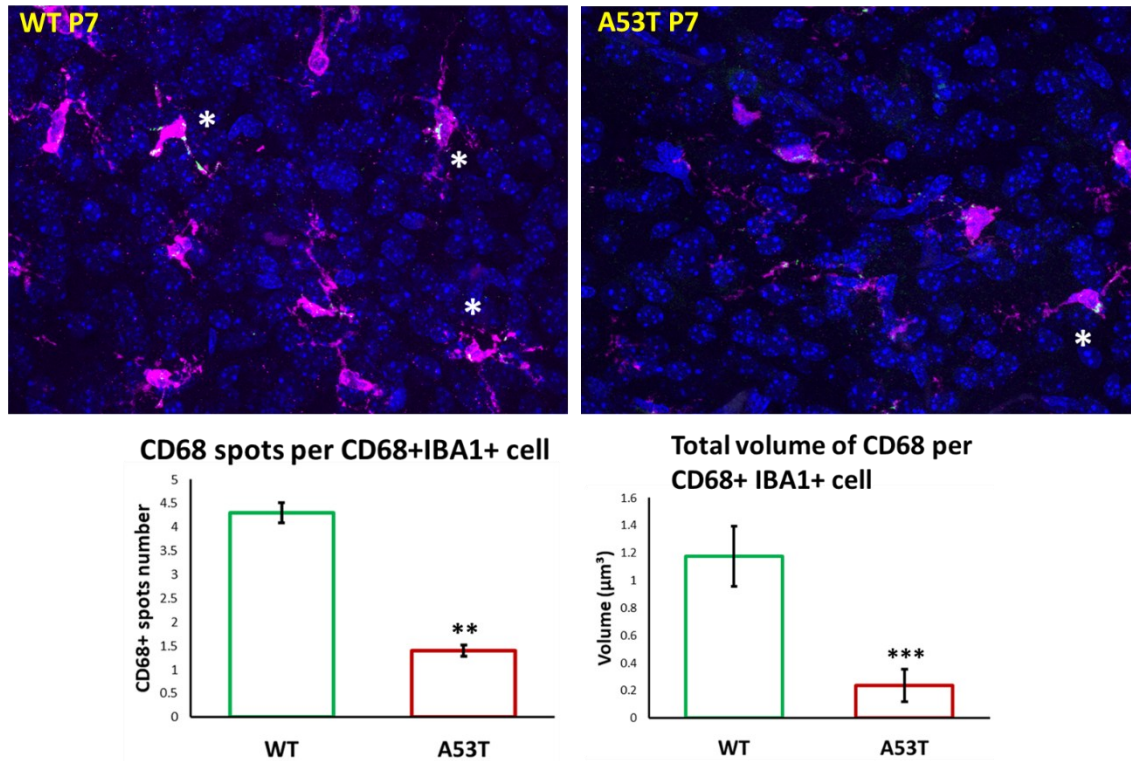
Εικόνα 16: Ανοσοϊστοχημεία σε ιστούς εγκεφάλου μύος ομόζυγων για την A53T α-συνουκλείνη και αγρίου τύπου σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. A) Εντοπισμός έγκλειστων α-συνουκλείνης σε μικρογλοιακά κύτταρα και μικρογλοίωση σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου A53T ομόζυγων μυών. B) Εντοπισμός α-συνουκλείνης εντός των IBA1+ μικρογλοιακών κυττάρων παρατηρείται σε πρώιμες χρονικές στιγμές: κατά την εμβρυϊκή ημέρα E16,5, στο P7, στο P30.



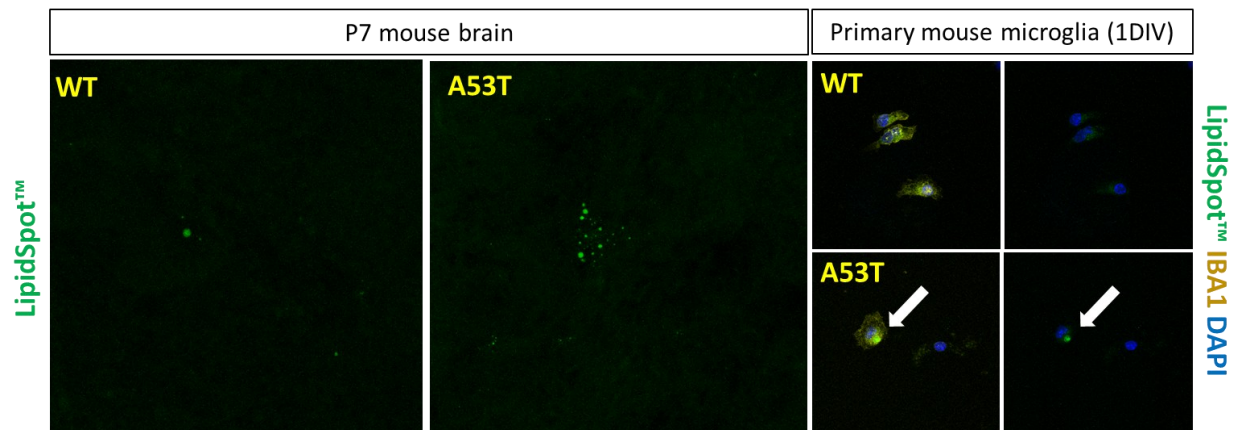
Εικόνα 17: Α) Οι ανοσοϊστοχημείες των εγκεφαλικών ιστών A53T ομόζυγων και αγρίου τύπου μυν μετατρέπονται σε δυαδικό σήμα. Β) Μετράται το ποσοστό των μικρογλοιακών κυττάρων IBA1+ και διάφορες μορφολογικές παράμετροι στο φλοιό και την οδοντωτή έλικα (επιφάνεια, περίμετρος, κυκλικότητα, λόγος διαστάσεων, στρογγυλότητα, στερεότητα). Αντιπροσωπευτικές μετρήσεις από το φλοιό απεικονίζουν μορφολογικές διαφορές μεταξύ των εγκεφάλων A53T ομόζυγων και αγρίου τύπου μυν ήδη στο P7.



Εικόνα 18: Κυτταρομετρία ροής σε μικρογλοιακά κύτταρα A53T και αγρίου τύπου ποντικούς ηλικίας ενός έτους. Χρησιμοποιούνται οι δείκτες CD45, CD11b, CX3CR1 για την ταυτοποίηση των μικρογλοιακών και ο TREM2 ως βασικός δείκτης-μάρτυρας για τα DAMs (disease-associated microglia, μικρογλοιακά που συνδέονται με φαινότυπο ασθένειας).



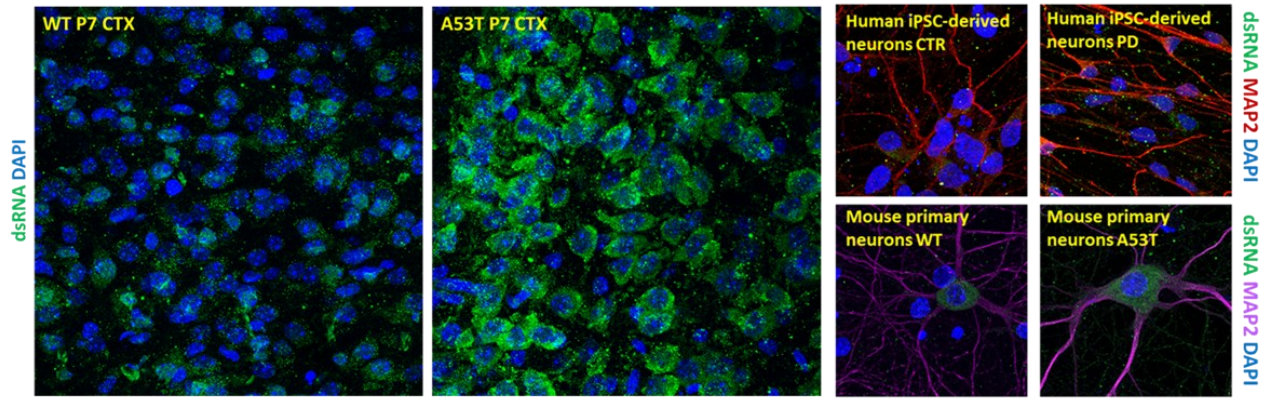
Εικόνα 19: Ανοσοϊστοχημεία εγκεφαλικών ιστών A53T ομόζυγων και αγρίου τύπου μυών P7, όπου μετράται ο δείκτης CD68 εντός των IBA1+ μικρογλοιακών κυττάρων. Το πλήθος και ο συνολικός όγκος των CD68+ λυσοσωμάτων είναι σημαντικά μικρότερος στους A53T ομόζυγους.



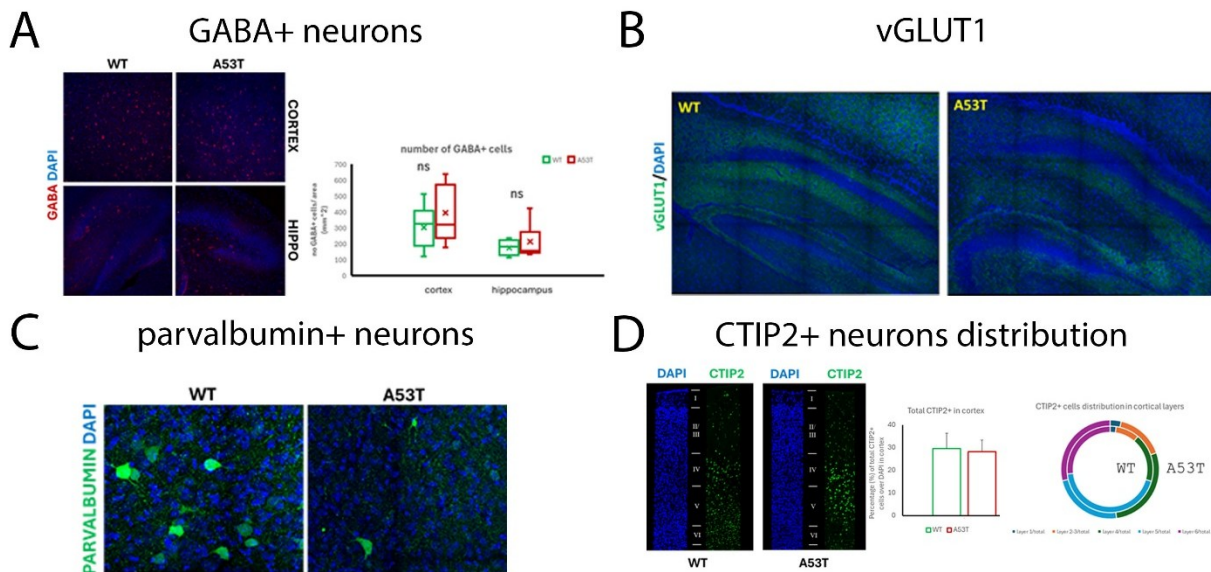
Εικόνα 20: Ουδέτερα λιπίδια παρατηρούνται να συσσωρεύονται στον εγκέφαλο των A53T ζώων ήδη από το στάδιο P7. Με πρωτογενείς καλλιέργειες μικρογλοίας από το στάδιο P5, σταγονίδια λιπιδίων είναι εμφανή σε μικρογλοιακά κύτταρα από A53T ζώα, ενώ στα αγρίου τύπου είναι πολύ σπάνια.

Συνολικά, τα έως τώρα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η παθολογία της α-συνουκλείνης στα A53T ζώα συνοδεύεται από πρώιμες και πολυεπίπεδες αλλοιώσεις της μικρογλοίας ήδη από τα αρχικά αναπτυξιακά στάδια, με ιδιαίτερη έμφαση στο P7. Παρατηρούνται ενδοκυττάρια έγκλειστα α-συνουκλείνης, μορφολογικές μεταβολές της μικρογλοίας, μείωση της λυσοσωμικής δραστηριότητας (CD68) και πρώιμη συσσώρευση ουδέτερων λιπιδίων, στοιχεία που συνάδουν με διαταραχή της φαγοκυτταρικής και μεταβολικής λειτουργίας των κυττάρων. Αντίθετα, σε μεγαλύτερες ηλικίες (1 έτος) δεν ανιχνεύονται σαφείς διαφορές σε βασικούς δείκτες των DAM, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι κρίσιμες παθοφυσιολογικές διεργασίες λαμβάνουν

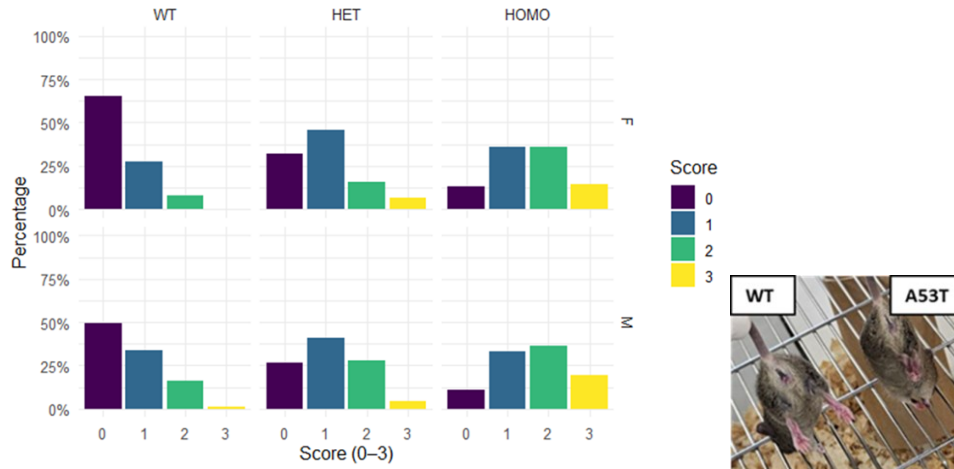
χώρα πολύ νωρίς, πριν από την εγκατάσταση προχωρημένων νευροεκφυλιστικών φαινοτύπων. Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν τη σημασία της πρώιμης μικρογλοιακής δυσλειτουργίας στην παθογένεια της νόσου και τεκμηριώνουν την επιστημονική αξία του παραδοτέου, τόσο για την κατανόηση των μηχανισμών όσο και για τον εντοπισμό πρώιμων θεραπευτικών στόχων.



Εικόνα 21: Ανοσοϊστοχημεία σε τομές εγκεφάλου A53T και αγρίου τύπου με το αντίσωμα J2 που αναγνωρίζει RNA μόρια με διπλή έλικα (dsRNAs). Αντίστοιχες ανοσοκυταροχημικές δοκιμασίες σε νευρώνες από υγιά και παρκινσονικά ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, όπως και από πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων αγρίων τύπου και A53T. Τα dsRNA μόρια είναι πολύ περισσότερα όταν εκφράζεται η μεταλλαγμένη A53T α-συνουκλείνη σε όλες τις ανωτέρω πειραματικές διατάξεις.



Εικόνα 22: Ανοσοϊστοχημεία σε τομές εγκεφάλου A53T και αγρίου τύπου με ειδικούς δείκτες για συγκεκριμένους νευρωνικούς πληθυσμούς. Κάποιοι πληθυσμοί φαίνονται διαφοροποιημένοι στο στάδιο P7, όπως οι νευρώνες που εκφράζουν παρβαλμπουμίνη (είναι μειωμένος ο πληθυσμός) και οι νευρώνες που εκφράζουν το CTIP2 (μετατόπιση από το layer 5 στο 4).



Εικόνα 23: Συμπεριφορική δοκιμασία σε πολύ νεαρά ποντίκια αγρίου τύπου και A53T (P21), όπου φαίνεται η διαφορά στη σύσφιξη των οπίσθιων άκρων με το ομώνυμο τεστ (*hind limb clasping test*).

Συνολικά, τα ευρήματα των Εικόνων 21–23 ενισχύουν περαιτέρω την υπόθεση ότι η έκφραση της μεταλλαγμένης A53T α-συνουκλείνης πυροδοτεί πρώιμες και διακριτές μοριακές, κυτταρικές και λειτουργικές διαταραχές ήδη από τα αρχικά αναπτυξιακά στάδια. Η αυξημένη παρουσία dsRNA σε εγκεφαλικό ιστό, πρωτογενείς νευρώνες και ανθρώπινα iPSC-παράγωγα νευρικά κύτταρα υποδηλώνει ενεργοποίηση έμφυτων αντιικών/ιντερφερονικών μονοπατιών και πιθανή εμπλοκή μηχανισμών στρες RNA στην παθογένεση. Παράλληλα, οι αλλοιώσεις σε συγκεκριμένους νευρωνικούς πληθυσμούς (μείωση παρβαλμπουμινικών νευρώνων και μετατόπιση CTIP2+ κυττάρων) καταδεικνύουν ότι η νευρωνική ωρίμανση και η στρωμάτωση του φλοιού επηρεάζονται νωρίς, πριν από την εμφάνιση εκτεταμένης νευροεκφύλισης. Οι πρώιμες συμπεριφορικές διαφορές στο P21, με χειρότερη κινητική επίδοση και εμφανή φυλετικό διμορφισμό, επιβεβαιώνουν ότι οι μοριακές και κυτταρικές διαταραχές μεταφράζονται σε λειτουργικό φαινότυπο. Συνολικά, τα δεδομένα συγκλίνουν σε ένα μοντέλο πρώιμης, πολυεπίπεδης δυσλειτουργίας που συνδέει τη μεταλλαγμένη α-συνουκλείνη με RNA-σχετιζόμενες αποκρίσεις, αλλοιωμένη νευρωνική ανάπτυξη και πρώιμα συμπεριφορικά ελλείμματα, αναδεικνύοντας κρίσιμα παράθυρα παρέμβασης και νέους δυνητικούς θεραπευτικούς στόχους.

Τα οφέλη για τον φορέα αφορούν προς το παρόν κυρίως στον εξαιρετικά λεπτομερή ανοσοϊστολογικό χαρακτηρισμό ενός ζωικού μοντέλου για τη νόσο Πάρκινσον και ειδικότερα για έναν κυτταρικό πληθυσμό που δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, αυτόν της μικρογλοίας. Επιπλέον, αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε η μεθοδολογία απομόνωσης και πρωτογενούς καλλιέργειας μικρογλοίας από το ζωικό μοντέλο M83. Παράλληλα, η ανάπτυξη και εφαρμογή προηγμένων ποσοτικών αναλύσεων μορφολογίας, λυσοσωμικής δραστηριότητας, λιπιδιακού φορτίου και μοριακών δεικτών επέτρεψε τη δημιουργία ενός ολοκληρωμένου και πολυεπίπεδου πλαισίου αξιολόγησης της μικρογλοιακής λειτουργίας σε πρώιμα και όψιμα στάδια της παθολογίας.