



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: Μεταγραφικό προφίλ των κυτταρικών πληθυσμών εγκεφάλου ποντικού με απώλεια έκφρασης της BIN1 στη μικρογλοία

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

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΔΗΜΗΤΡΑ ΘΩΜΑΪΔΟΥ (ΕΙΠ)

Μεταγραφικό προφίλ των κυτταρικών πληθυσμών εγκεφάλου ποντικού με απώλεια έκφρασης της BIN1 στη μικρογλοία

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

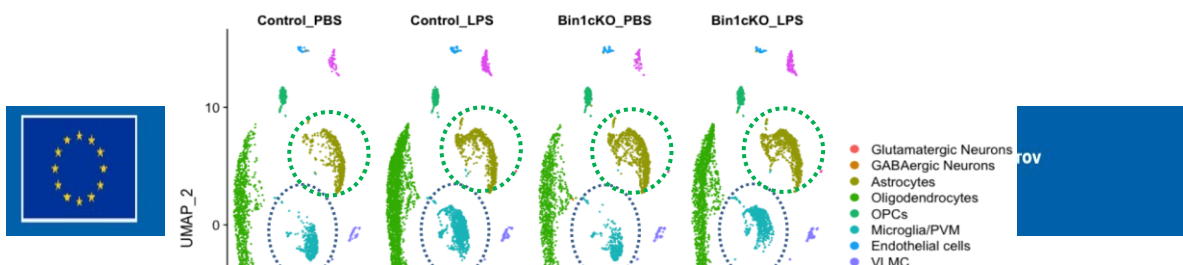
Έχει κατασκευαστεί μοντέλο διπλά διαγονιδιακών μυών που οδηγεί σε επαγόμενη απώλεια έκφρασης της πρωτεΐνης- κινδύνου εμφάνισης της σποραδικής νόσου Alzheimer BIN1 στα μικρογλοιακά κύτταρα, με στόχο τη μελέτη της συνεισφοράς της BIN1 στη μικρογλοιακή ενεργοποίηση κατά την εξέλιξη της νόσου. Στόχος της ΕΕ είναι ο έλεγχος του μεταγραφώματος των εγκεφάλων των διπλά διαγονιδιακών μυών σε επίπεδο ενός κυττάρου χρησιμοποιώντας την τεχνολογία single nucleus RNA-Sequencing (snRNA-Seq), σε φυσιολογικές συνθήκες και μετά από επαγωγή συστημικής νευροφλεγμονής, ώστε να ταυτοποιηθούν οι αλλαγές που επιφέρει η απώλεια της BIN1 πρωτεϊνώντως στη μικρογλοία αλλά και σε όλους τους όλους κυτταρικούς πληθυσμούς του εγκεφάλου και πώς αυτές εντείνονται παρουσία νευροφλεγμονής.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ – ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΟΦΕΛΗ

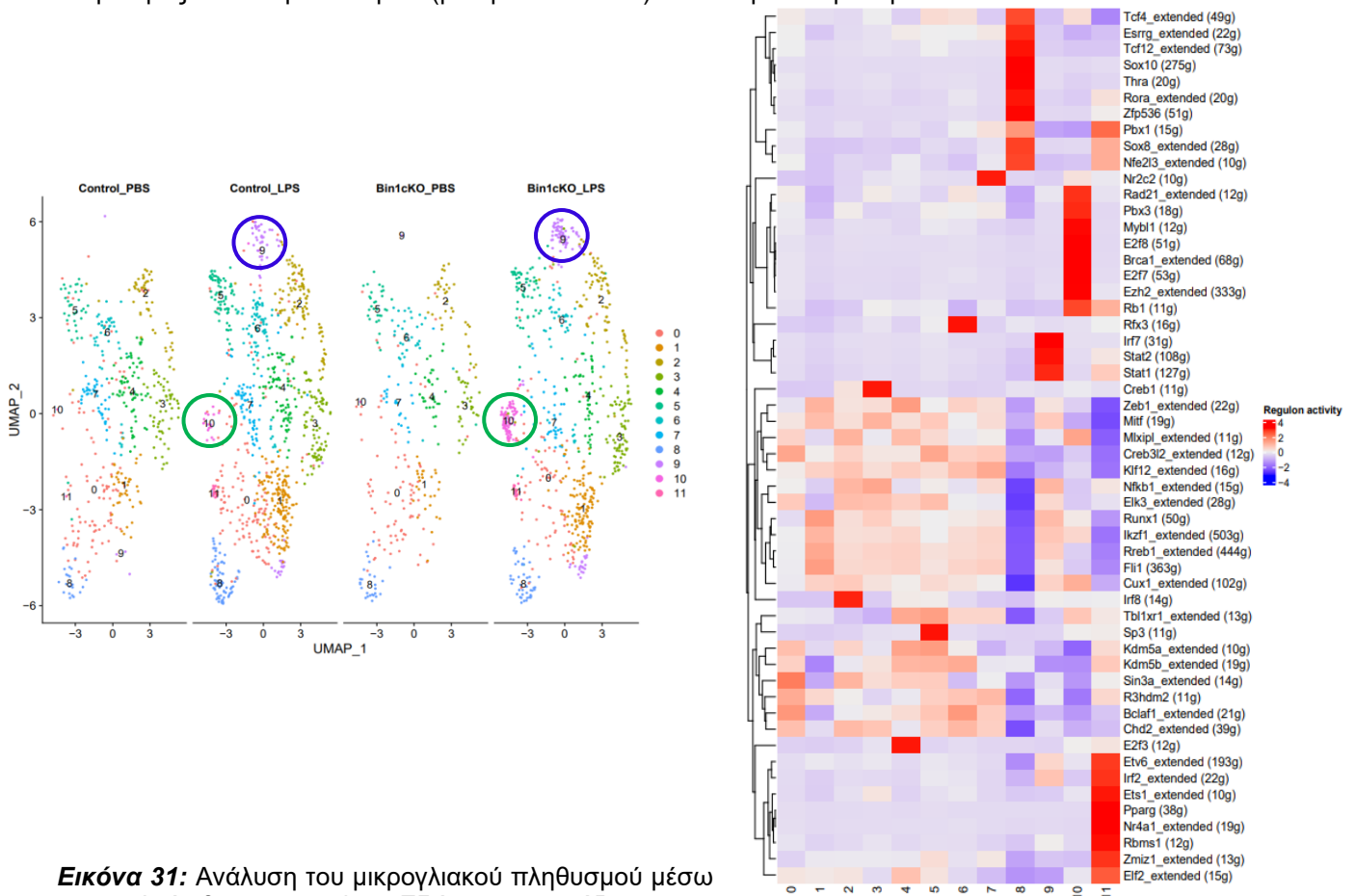
Ύστερα από τη δημιουργία του διπλά διαγονιδιακού ζώου και την εγκαθίδρυση του πρωτοκόλλου αποσιώπησης του bin1 στα μικρογλοιακά κύτταρα του εγκεφάλου αλλά και την εγκαθίδρυση του πρωτοκόλλου πρόκλησης νευροφλεγμονής, μέσω της χορήγησης LPS (Lipopolysaccharides), προχωρήσαμε σε πείραμα single nucleus RNA Sequencing, με σκοπό την εύρεση των αλλαγών, οι οποίες πραγματοποιούνται σε επίπεδο γονιδίων στον εγκεφαλικό φλοιό σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του εγκεφάλου, ύστερα από την αποσιώπηση του bin1 στη μικρογλοία αλλά και ύστερα από την πρόκληση της νευροφλεγμονής. Τα δείγματα τα οποία αναλύθηκαν είναι τα ακόλουθα: **CTR (+/BIN1 f/f)**, **CTR+LPS**, **Bin1Cko** (iCX3CR1-Cre^{ER}/BIN1 f/f), **Bin1Cko+LPS**.

Για αυτό το σκοπό αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του εγκεφαλικού φλοιού και στη συνέχεια μηχανική ομογενοποίηση και απομόνωση των κυττάρων. Στα κύτταρα, αρχικά, πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής (FACs) για το αντίσωμα NEUN (πυρηνικό αντίσωμα το οποίο σημαίνει νευρώνες) με απώτερο σκοπό τον εμπλουτισμό του δείγματός μας σε πυρήνες προερχόμενους από κύτταρα γλοίας (απόρριψη μέρους των NEUN+ κυττάρων). Αυτό συνέβη γιατί οι νευρώνες είναι σε ποσοστό πολύ περισσότεροι στον εγκέφαλο σε σχέση με τα κύτταρα γλοίας και υπήρχε ο κίνδυνος να μην αναλυθεί ο απαιτούμενος αριθμός γλοιακών κυττάρων, εάν παρέμενε το σύνολο των νευρώνων. Η αναλογία στην ανάλυσή μας ήταν 1 NeuN+ νευρώνες : 4 NeuN- γλοιακά κύτταρα. Τα επόμενα στάδια ήταν η σήμανση των πυρήνων (tagging), η προετοιμασία της βιβλιοθήκης (library preparation), η αλληλούχηση (next generation sequencing) και η συλλογή και ανάλυση των δεδομένων (demultiplexing and data analysis).

Τα αποτελέσματα μας έδωσαν δεδομένα για διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς (μικρογλοία, αστροκύτταρα, νευρώνες, ολιγοδενδροκύτταρα) (εικόνα 3). Αρχικά προχωρήσαμε σε ανάλυση του μικρογλοιακού πληθυσμού. Τα μικρογλοιακά κύτταρα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Seurat (**Εικόνα 30**) όπου, βάσει των επιπέδων των γονιδιακών αλλαγών κατηγοριοποιήθηκαν σε 12 υποπληθυσμούς. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια του αλγορίθμου Scenic πραγματοποιήθηκε κατηγοριοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων βάσει μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι φαίνεται να ρυθμίζουν τα γονίδια με διαφορετική έκφραση στις διαφορετικές συνθήκες (**Εικόνα 31**).



Εικόνα 30: Ανάλυση των κυτταρικών πληθυσμών του sn-RNA seq. Το UMAP δείχνει όλους τους διαφορετικούς πληθυσμούς που προέκυψαν. Ο μικρογλοιακός πληθυσμός (με μπλε κύκλο) και ο πληθυσμός των αστροκυττάρων (με πράσινο κύκλο) αναλύθηκαν περαιτέρω.

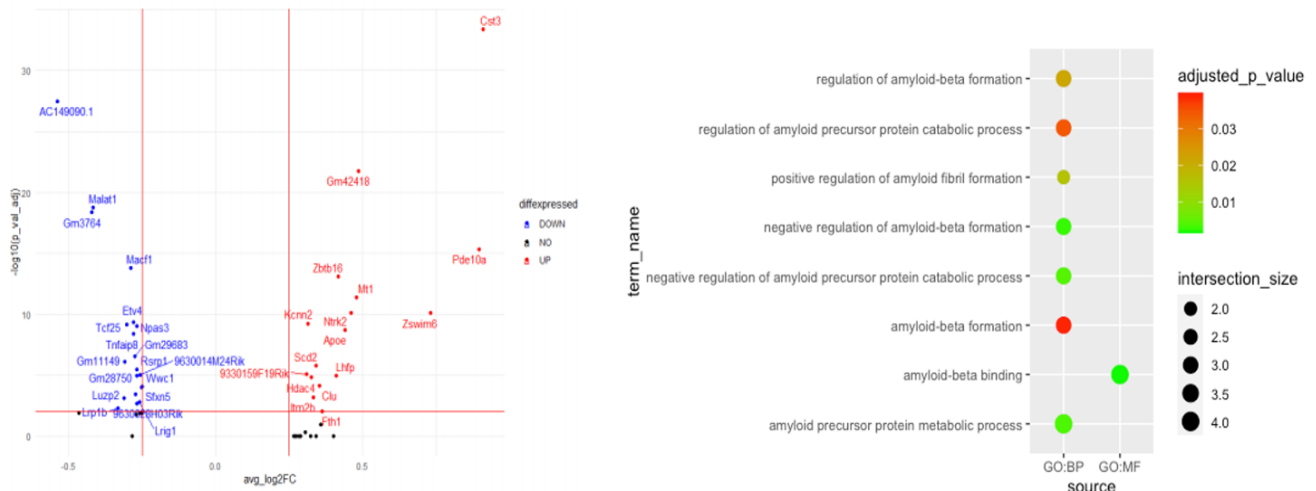


Εικόνα 31: Ανάλυση του μικρογλοιακού πληθυσμού μέσω του αλγόριθμου scenic. Εδώ παρουσιάζονται οι υποπληθυσμοί μικρογλοιακών κυττάρων (UMAP), τα οποία έχουν κατηγοριοποιηθεί βάσει των μεταγραφικών παραγόντων (heatmap) που ρυθμίζουν τα γονίδια των οποίων παρατηρήθηκε διαφορετική έκφραση στις διαφορετικές συνθήκες.

Σε αυτή την ανάλυση παρατηρήθηκε η ύπαρξη δύο υποπληθυσμών μικρογλοίας (9 και 10) των οποίων οι αριθμοί κυττάρων είναι μη ανιχνεύσιμοι έως ελάχιστοι στις συνθήκες στις οποίες δεν υπάρχει η νευροφλεγμονή και των οποίων οι αριθμοί αυξάνονται στο δείγμα στο οποίο υπάρχει και η αποσιώπηση του bin1 (Bin1cKO_LPS VS Control_LPS). Επιπλέον, ύστερα από τη συσχέτιση των γονιδίων διαφορετικής

έκφρασης με τους μεταγραφικούς παράγοντες παρατηρήθηκε πως ο υποπληθυσμός 9 ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται άμεσα με την απόκριση στη φλεγμονή (Irf7, Stat2, Stat1) ενώ ο υποπληθυσμός 10 ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται άμεσα με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Bcra1, E2f7, E2f8, Rb1). Επιπρόσθετα, ύστερα από περαιτέρω μελέτη των γονιδίων με διαφορετική έκφραση στον υποπληθυσμό 9 φαίνεται πως ο υποπληθυσμός αυτός σχετίζεται με το μονοπάτι τύπου ένα των ιντερφερονών (IFN-type I - mediated inflammatory response) καθώς παρατηρούμε αυξημένη έκφραση γονιδίων όπως ενός εκ των τελεστών του συγκεκριμένου μονοπατιού, το ifi204. Έτσι φαίνεται πως η αποσιώπηση του bin1 στη νευροφλεγμονή ενισχύει την ύπαρξη ενός μικρογλιακού υποπληθυσμού με πολλαπλασιαστικό δυναμικό και ενός υποπληθυσμού με άμεση απόκριση στη νευροφλεγμονή.

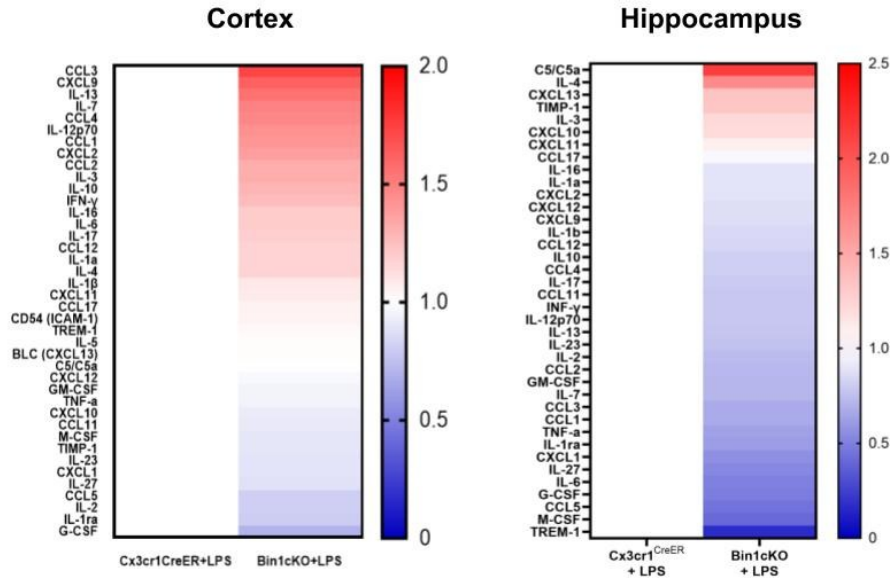
Τέλος, μέσω της ανάλυσης των δεδομένων του sequencing παρατηρήσαμε πως η αποσιώπηση του bin1 στη μικρογλία οδηγεί σε αλλαγές στο γονιδιακό προφίλ των αστροκυττάρων (**Εικόνα 32**). Πιο συγκεκριμένα, σε συνθήκη ομοίωσης (συνθήκες χωρίς LPS) η αποσιώπηση του bin1 στη μικρογλία οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων, τα οποία σχετίζονται άμεσα σε τον κίνδυνο εμφάνισης της όψιμης μορφής της νόσου Αλτσχάιμερ (LOAD) και του σχηματισμού του β αμυλοειδούς, όπως τα ApoE, C1u και Cst3. Έτσι, παρατηρήθηκε και μία κυτταρικά ανεξάρτητη επίδραση (non cell autonomous effect) της αποσιώπησης του bin1 στη μικρογλία.



Εικόνα 32: Κυτταρικά ανεξάρτητη επίδραση (non cell autonomous effect) της αποσιώπησης του bin1 στη μικρογλία. Αριστερά: Volcano plot, το οποίο δείχνει την αύξηση των επιπέδων γονιδίων όπως τα ApoE, C1u και Cst3 στα αστροκύτταρα ύστερα από την αποσιώπηση του bin1 στη μικρογλία. Δεξιά: Ανάλυση γονιδιακής οντολογίας (go term analysis) όπου φαίνεται πως η αποσιώπηση του bin1 στη μικρογλία οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται στον σχηματισμό, τη ρύθμιση και τη δέσμευση του αμυλοειδούς, στα αστροκύτταρα.

Συμπερασματικά η ανάλυση μεταγραφώματος σε επίπεδο ενός κυττάρου που πραγματοποιήσαμε ανέδειξε ένα ρυθμιστικό κυτταρο-εξαρτώμενο, αλλά και μη κυτταροεξαρτώμενο ρόλο της μικρογλοιακής BIN1 στην στη φλεγμονώδη απόκριση των γλοιοκυττάρων του εγκεφάλου, φαινόμενο το οποίο είναι άμεσα συνδεδεμένο και πιθανότητα πυροδοτεί την εξέλιξη της νόσου Alzheimer.

Προκειμένου να αξιολογηθεί εάν οι μεταβολές στο επίπεδο του μεταγραφώματος που εντοπίστηκαν συνοδεύονται από αντίστοιχες μεταβολές στο επίπεδο του πρωτεώματος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με χρήση πάνελ κυτταροκινών και χημειοκινών. Η προσέγγιση αυτή ανέδειξε σημαντικές διαφοροποιήσεις τόσο στον φλοιό όσο και στον ιππόκαμπο. Αξιοσημείωτο είναι ότι τα πρότυπα πρωτεωμικής διαφοροποίησης παρουσίαζαν έντονη χωροειδική ετερογένεια μεταξύ των δύο περιοχών. Το πρωτεωμικό προφίλ του φλοιού συνάδει με την ενεργοποίηση προφλεγμονωδών μονοπατιών, αντιθέτως ο ιππόκαμπος εμφανίζει ένα προφίλ χαρακτηριζόμενο από επικράτηση αντιφλεγμονωδών μορίων και μείωση των προφλεγμονωδών παραγόντων(**Εικόνα34**).



Εικόνα 34: Heatmap των επιπέδων των κυτοκινών και των χημειοκινών σε φλοιό (αριστερά) και ιππόκαμπο (δεξιά) μετά από χορήγηση LPS.