



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: Πρώιμα βιολογικά φαινόμενα ως ρυθμιστές νευροεκφυλιστικών ασθενειών

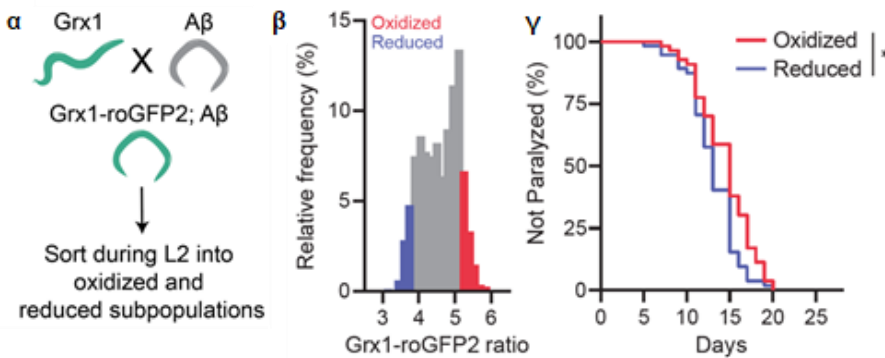
ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 4: Ανάπτυξη κυτταρικών και ζωικών μοντέλων, καθώς και νέων βιοδεικτών για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες Alzheimer και Parkinson

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΔΑΦΝΗ ΜΑΡΙΑ ΜΠΑΖΟΠΟΥΛΟΥ (ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ)

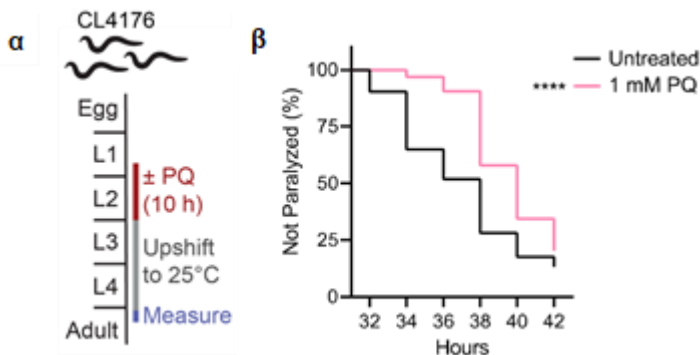
Πρώιμα βιολογικά φαινόμενα ως ρυθμιστές νευροεκφυλιστικών ασθενειών

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Οι μοριακοί μηχανισμοί της παθογένειας που χαρακτηρίζει νευροεκφυλιστικές νόσους έχουν τεθεί σε λειτουργία πολύ πριν εκδηλωθούν κλινικά συμπτώματα. Επομένως, η ταυτοποίηση βιολογικών διεργασιών κατά τα προ-συμπτωματικά στάδια, οι οποίες να επηρεάζουν την εξέλιξη της νόσου αποτελεί μια ουσιαστική προσέγγιση για το σχεδιασμό θεραπειών. Η ερευνητική ομάδα της Καθ. Δάφνης Μπαζοπούλου ανακάλυψε πρόσφατα ότι η αντοχή στο στρες και το προσδόκιμο ζωής επηρεάζεται από παροδικές διακυμάνσεις στα επίπεδα ενεργών ελευθέρων ριζών σε πρώιμα στάδια ζωής. Συγκεκριμένα, μια σύντομη έκθεση του οργανισμού *C. elegans* σε ήπιο οξειδωτικό στρες κατά την ανάπτυξη, αυξάνει σημαντικά την αντοχή στο στρες και το προσδόκιμο ζωής. Οι θετικές αυτές επιπτώσεις οφείλονται στην οξειδωτική απενεργοποίηση του συμπλόκου COMPASS, υπεύθυνο για την τριμεθυλίωση της Ιστονής 3 στην Λυσίνη 4 (H3K4me3) και κατά συνέπεια στην αρνητική ρύθμιση των επιπέδων του επιγενετικού αυτού παράγοντα. Στα πλαίσια της Εμβληματικής δράσης εξετάσαμε αν η ήπια οξείδωση κατά την ανάπτυξη, καθυστερεί και την εμφάνιση συμπτωμάτων (π.χ. συσσωματώματα αμυλοειδών, παράλυση) σε στέλεχος *C. elegans*, μοντέλο της ασθένειας Alzheimer. Για τα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήσαμε διαγονιδιακά στελέχη *C. elegans* (CL4176) τα οποία εκφράζουν το ανθρώπινο αμυλοειδές πεπτιδίδιο Αβ1-42 (A-beta) το οποίο έχει συνδεθεί μη την παθολογία της νόσου του Alzheimer, κάτω από έναν υποκινητή που επάγεται από τη θερμοκρασία. Το στέλεχος αυτό εμφανίζει προοδευτικά παράλυση, όταν εκτεθεί σε θερμοκρασία 25 βαθμών Celsius. Αρχικά διασταυρώσαμε τα διαγονιδιακά CL4176 με σκουλήκια που εκφράζουν την GRX-1::roGFP2, η οποία ανταποκρίνεται πιστά στην κυτταρική αναλογία οξειδωμένης προς ανηγμένη γλουταθειόνη (GSSG:GSH) για την παρακολούθηση και την ταξινόμηση των σκουληκιών με βάση το ενδογενές περιβάλλον οξειδωσής τους (Εικ. 9α). Η ανάλυση των ζώων που ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τις οξειδοαναγωγικές τους καταστάσεις στο στάδιο της προνύμφης L2 (Εικ. 9β), έδειξε ότι τα πιο οξειδωμένα άτομα (“oxidized”) κατά την ανάπτυξη έχουν μικρή αλλά στατιστικά σημαντική καθυστέρηση στην εμφάνιση της παράλυσης (Εικ. 9γ) σε σύγκριση με τα λιγότερο οξειδωμένα ή ανηγμένα σκουλήκια (“reduced”). Αυτό υποδηλώνει ότι η ευαισθησία στην τοξικότητα του αμυλοειδούς αργότερα στη ζωή μπορεί να επηρεαστεί από φυσικά συμβάντα της πρώιμης ζωής και ότι η κυτταρική οξείδωση σε αυτά τα στάδια είναι ωφέλιμη. Σε συμφωνία με αυτό, πληθυσμοί σε στάδιο L2 έλαβαν θεραπεία με χαμηλές συγκεντρώσεις οξειδωτικών (paraquat, PQ) για 10 ώρες κατά το αναπτυξιακό στάδιο L2 (Εικ. 10α), επέδειξαν επίσης καθυστέρηση στην παράλυση τους (Εικ. 10β).



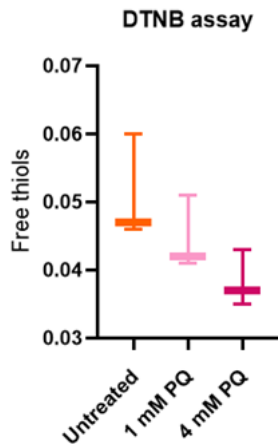
Εικόνα 9. Διασταύρωση στελέχους *N2jrls2[Prpl-17::Grx1-roGFP2]* με *CL4176 (N2dvl527 [myo-3p::A-Beta(1-42)::let-851 3'UTR])* (α). Ανάλυση των επιπέδων οξειδωσης (*Grx1-roGFP* ratio) του πληθυσμού του διασταυρωμένου στελέχους κατά το αναπτυξιακό στάδιο L2 με κυτταρομετρία ροής και επισήμανση των υποπληθυσμών που χαρακτηρίστηκαν ως “oxidized” & “reduced” και συλλέχθηκαν για περαιτέρω πειράματα (β). Ανάλυση παράλυσης των “oxidized” & “reduced” υποπληθυσμών μετά από επαγωγή της έκφρασης του A-beta αμυλοειδούς (γ). Οι καμπύλες αναπαριστούν δεδομένα από $n = 65-84$ νηματώδεις. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία Log-rank (Mantel-Cox). ***, $p = 0,001$.



Εικόνα 10. Σχήμα για τη θεραπεία με PQ του στελέχους *CL4176* που εκφράζει το αμυλοειδές A-beta (α) και ανάλυση της παράλυσής του (β). Οι καμπύλες αναπαριστούν δεδομένα από $n = 58-83$ νηματώδεις. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία Log-rank (Mantel-Cox). ***, $p = 0,001$.

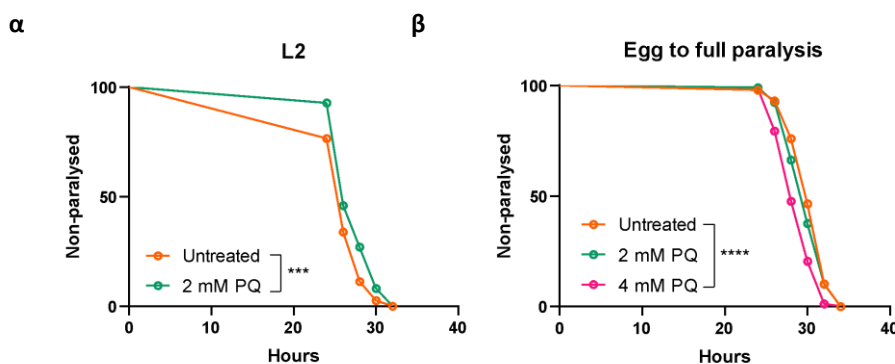
Ωστόσο, παράλληλα πειράματα έδειξαν ότι η θετική επίδραση των οξειδωτικών παραγόντων απαιτεί την παρουσία μεταβολικά ενεργών βακτηρίων, την κύρια πηγή τροφής του *C. elegans*, τα οποία καθιστούν στη συνέχεια και το εντερικό του μικροβίωμα (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται εδώ). Η παρατήρηση αυτή είναι ενδεικτική της αλληλεπίδρασης του μικροβιώματος με την χορήγηση π.χ. φαρμάκων και της συνεργατική τους δράσης στην υγεία και ομοίωση του οργανισμού. Ως συνέπεια, εξετάστηκε η υπόθεση κατά πόσο η οξείδωση βακτηρίων που θα δοθούν ως τροφή, μπορούν να έχουν την ίδια ή μεγαλύτερη θετική επίδραση στον οργανισμό – ξενιστή, έτσι ώστε να αποφευχθεί η απευθείας χορήγηση οξειδωτικών ουσιών στο *C. elegans*.

Προς αυτήν την κατεύθυνση, το στέλεχος *E. coli* OP50, το οποίο χρησιμοποιείται για καθημερινή συντήρηση και ανάπτυξη των νηματωδών, υποβλήθηκε σε επεξεργασία με paraquat (PQ) σε συνθήκες που δεν επηρεάζουν τη βακτηριακή βιωσιμότητα με στόχο την επαρκή και σταθερή οξειδωσή του (Εικόνα 11).



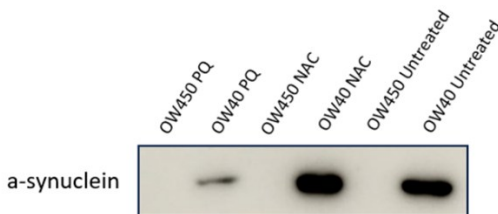
Εικόνα 11. Ποσοτικοποίηση ελεύθερων (ανηγμένων) θειολών με χρήση της δοκιμασίας DTNB για την παρατήρηση των διαφορετικών επιπέδων οξειδωσης των βακτηρίων *E. coli* OP50 μετά από επεξεργασία με διαφορετικές συγκεντρώσεις paraquat (PQ), σε σχέση με μη επεξεργασμένα βακτήρια (untreated). Τα δεδομένα δείχνουν τη μέση τιμή ± τυπική απόκλιση από τρεις επαναλήψεις.

Ακολουθώντας παρόμοια προσέγγιση με την Εικόνα 9, πληθυσμοί του *C. elegans* CL4176 εκτέθηκαν κατά το αναπτυξιακό στάδιο L2, σε PQ-οξειδωμένα βακτήρια για περίπου 10 ώρες και ακολούθως μεταφέρθηκαν και παρέμειναν σε μη επεξεργασμένη *E. coli*. Παρατηρήθηκε ότι οι πληθυσμοί αυτοί είχαν στατιστικά σημαντική καθυστέρηση στην παράλυσή τους σε σχέση με πληθυσμούς ελέγχου που παρέμειναν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος σε μη επεξεργασμένα βακτήρια (Εικ. 12α). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι πληθυσμοί CL4176 οι οποίοι εκτέθηκαν εξολοκλήρου και παρατεταμένα (egg to full paralysis) σε εντόνως PQ-οξειδωμένα βακτήρια εμφάνισαν επιταχυνόμενη παράλυση, ενδεικτικό της ανάγκης ελεγχόμενης οξειδωσης τόσο ποσοτικά όσο και χρονικά (Εικ. 12β).



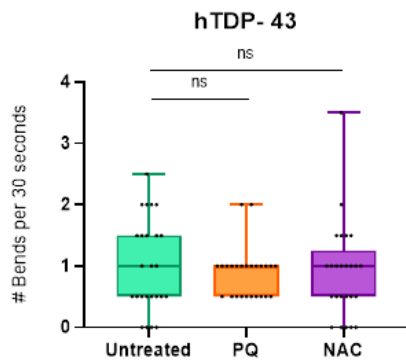
Εικόνα 12. Καμπύλες παράλυσης πληθυσμών CL4176 που εκτέθηκαν σε *E. coli* OP50, επεξεργασμένη με 2 mM paraquat κατά το αναπτυξιακό στάδιο L2. Οι καμπύλες αναπαριστούν δεδομένα από n = 85–94 νηματώδεις. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία Log-rank (Mantel-Cox). ***, p = 0,001. β) Καμπύλες παράλυσης πληθυσμών CL4176 που εκτέθηκαν σε *E. coli* OP50, επεξεργασμένη με 2 mM ή 4 mM paraquat καθ' όλη τη διάρκεια ζωής τους. Οι καμπύλες αναπαριστούν δεδομένα από n = 109–115 νηματώδεις. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία Log-rank (Mantel-Cox). 4 mM paraquat: ****, p < 0,0001.

Επεκτείνοντας τις παρατηρήσεις και σε άλλα νευροεκφυλιστικά μοντέλα, εξετάστηκε αν τα PQ-οξειδωμένα βακτήρια είχαν θετική επίδραση στο στέλεχος *C. elegans* OW40, το οποίο εκφράζει σταθερά την ανθρώπινη πρωτεΐνη α-συνουκλείνη σε μυϊκά κύτταρα του σωματικού τοιχώματος του νηματώδη, συγχωνευμένη με κίτρινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (YFP) και υπό τον ενδογενή υποκινητή του γονιδίου *unc-54*. Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιείται για τη μελέτη των τοξικών συσσωματωμάτων της α-συνουκλείνης τα οποία στον άνθρωπο συσσωρεύονται στους νευρώνες, σχηματίζοντας σωμάτια Lewy, και αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα των συνουκλεινοπαθειών όπως η νόσος του Parkinson. Παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση PQ-οξειδωμένων βακτηρίων κατά τη διάρκεια του σταδίου L2 μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της α-συνουκλείνης, ενώ έκθεση πληθυσμών OW40 σε ανηγμένα βακτήρια (βακτήρια επεξεργασμένα με το αντιοξειδωτικό N-acetylcystein, NAC), αυξάνει την παραγωγή της (Εικ. 13), συμφωνώντας με τα προηγούμενα αποτελέσματα σχετικά με την προστατευτική δράση των οξειδωμένων βακτηρίων σε μοντέλα νευροεκφυλισμού του *C. elegans*.



Εικόνα 13. Ζώνες Western blot που αναπαριστούν την έκφραση της πρωτεΐνης α-συνουκλείνης σε πληθυσμούς *C. elegans* που εκτέθηκαν σε οξειδωμένα ή ανηγμένα βακτήρια κατά το στάδιο L2. 20 ηλικιακά συγχρονισμένοι, ενήλικοι νηματώδεις (ηλικία: 1 μέρα ενηλικίωσης) εξετάστηκαν σε κάθε συνθήκη. Το στέλεχος *C. elegans* OW450 εκφράζει την κίτρινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (YFP) υπό τον ενδογενή υποκινητή του γονιδίου *unc-54*, απουσία α-συνουκλείνης, και χρησιμοποιείται ως στέλεχος ελέγχου. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν: Alpha-synuclein Monoclonal Antibody (LB509) (Invitrogen, #18-0215) 1:1000 & Goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP conjugate (Biorad, #1706516) 1:10.000.

Τέλος, το ίδιο πρωτόκολλο δοκιμάστηκε στο στέλεχος OW1601, το οποίο εκφράζει την ανθρώπινη πρωτεΐνη hTDP-43 στους νευρώνες του *C. elegans*. Τα κυτταροπλασματικά έγκλειστα που αποτελούνται από TDP-43 αποτελούν βασικό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνοπαθειών TDP-43 όπως η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS). Οι πρωτεοτοξικές επιδράσεις της hTDP-43 μεταφράζονται σε πολυάριθμους φαινοτύπους στο *C. elegans*, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης κινητικότητας, η οποία και εξετάστηκε (Εικ. 14). Σε αντίθεση με τις προηγούμενες παρατηρήσεις, η έκθεση πληθυσμών OW1601 σε οξειδωμένα ή ανηγμένα βακτήρια κατά τη διάρκεια του σταδίου L2, δεν οδήγησε σε αλλαγές του νευροεκφυλιστικού φαινοτύπου.



Εικόνα 14. Ανάλυση κινητικότητας που υπολογίζεται με τον μέσο αριθμό καμπών του σώματος του νηματώδη σε υγρό περιβάλλον ανά 30 δευτερόλεπτα. Τα κουτιά αναπαριστούν δεδομένα από 25 νηματώδεις του στελέχους OW1601 τα οποία έχουν εκτεθεί σε οξειδωμένα (PQ), ανηγμένα (NAC) ή μη επεξεργασμένα (untreated) βακτήρια κατά το αναπτυξιακό στάδιο L2. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μη παραμετρική δοκιμασία Kruskal-Wallis (one-way ANOVA). Δεν διαπιστώνεται διαφορά μεταξύ των εξεταζόμενων συνθηκών.