



**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:** Ανάλυση εξωκυτταρικών κυστιδίων στο πλάσμα ασθενών με νόσο Alzheimer ή Parkinson

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

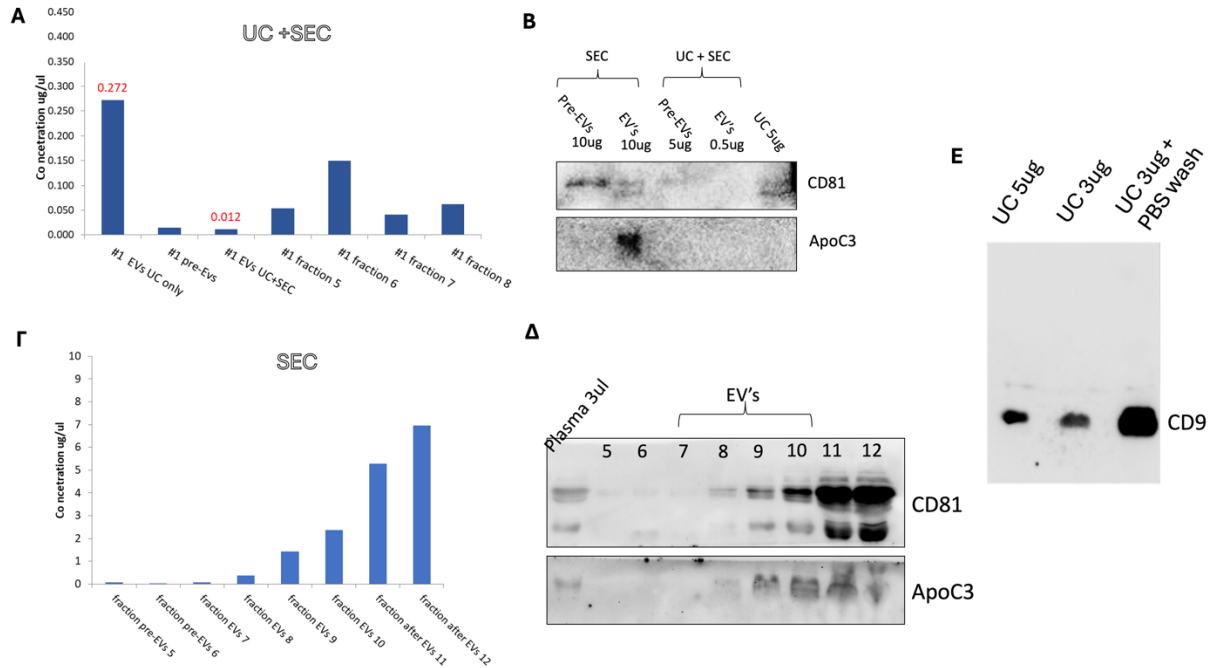
**ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ):** ΙΩΑΝΝΑ ΚΕΚΛΙΚΟΓΛΟΥ (ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ)

## Ανάλυση εξωκυτταρικών κυστιδίων στο πλάσμα ασθενών με νόσο Alzheimer ή Parkinson

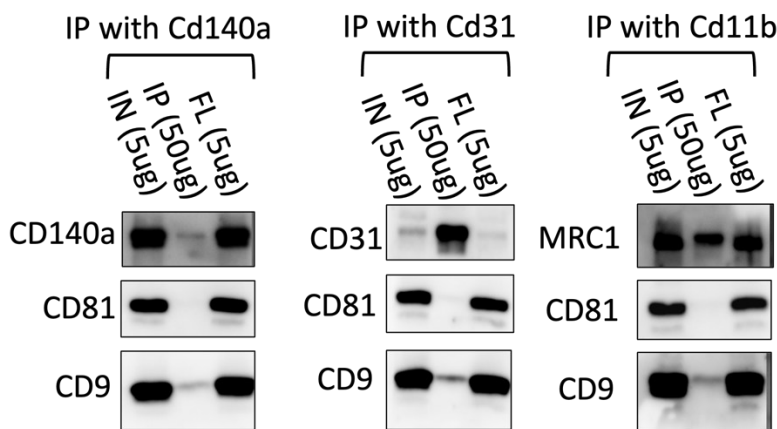
### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Οι υγρές βιοψίες αποτελούν ένα πολύ ισχυρό εργαλείο στην κλινική πράξη για διαγνωστικούς και προγνωστικούς σκοπούς. Η ταυτοποίηση μορίων που σχετίζονται με κυκλοφορούντα εξωκυττάρια κυστίδια αποτελεί ένα πεδίο αιχμής για την ανακάλυψη διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών σε ποικίλες νόσους, συμπεριλαμβανομένων των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Στα πλαίσια της εμβληματικής δράσης και προκειμένου να ταυτοποιήσουμε βιομάρτυρες που σχετίζονται με την έγκαιρη/ πρώιμη ανίχνευση νευροεκφυλιστικών νόσων σε υγρές βιοψίες, έχουμε συγκρίνει διαφορετικές μεθόδους απομόνωσης εξωκυττάρων κυστιδίων από το πλάσμα υγιών δότην έτσι ώστε να βελτιστοποιήσουμε το πρωτόκολλο απομόνωσης που θα εφαρμόσουμε για την ανάλυση εξωκυττάρων κυστιδίων από το πλάσμα των ασθενών που θα συμπεριληφθούν στην παρούσα μελέτη. Συγκεκριμένα, συγκρίναμε την υπερφυγοκέντρωση και την χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (size exclusion chromatography, SEC) και διερευνήσαμε την καθαρότητα και το βιοχημικό προφίλ των κυκλοφορούντων εξωκυττάρων κυστιδίων. Σύμφωνα με την προηγούμενη ερευνητική μας εμπειρία στην ανάλυση κυκλοφορούντων εξωκυττάρων κυστιδίων, η απομόνωση κυστιδίων με υπερφυγοκέντρωση υπερεισχύει της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους, καθώς τα δείγματα είναι αντιπροσωπευτικά των εξωκυττάρων κυστιδίων με χαμηλή παρουσία απολιποπρωτεϊνών (Εικόνα 19). Η πλύση με PBS απαλλάσσει τα δείγματα από ελεύθερες πρωτεΐνες και εμπλουτίζει τα εξωκυττάρια κυστίδια (Εικόνα 19). Επιπλέον, αναπτύξαμε μία μέθοδο απομόνωσης κυτταροειδικών εξωκυττάρων κυστιδίων, των οποίων η απομόνωση βασίζεται στην ύπαρξη επιφανειακών υποδοχέων οι οποίοι στη συνέχεια με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης οδηγούν στην απομόνωση εξωκυττάρων κυστιδίων που προέρχονται από διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του ενδιαφέροντός μας (Εικόνα 20). Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών που συλλέχθηκαν στα πλαίσια της εμβληματικής δράσης, και σε συνεργασία με την Νευρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου ΠΑΓΝΗ, υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθ. Ιωάννη Ζαγανά, συλλέξαμε πλάσμα και ορό από 150 δότες (υγείς και ασθενείς με άνοια/Alzheimer), για τους οποίους έχει καταγραφεί το ιατρικό ιστορικό και η διάγνωση. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε 2ml πλάσματος για την απομόνωση με υπερφυγοκέντρωση εξωκυττάρων κυστιδίων από 72 συνολικά δότες (ασθενείς με Alzheimer και υγείς δότες). Τα εξωκυττάρια κυστίδια στάλθηκαν για ανάλυση του πρωτεϊνικού τους φορτίου, στη συνεργάτιδά μας Δρ Μαρίνα Σαμιωτάκη (Ινστιτούτο Αλέξανδρος Φλέμιγκ, Αθήνα). Τα κυστίδια αναλύθηκαν με τη χρήση μεθόδων πρωτεομικής (LC MS/MS) έτσι ώστε να ανακαλύψουμε μόρια με διαφορετική φόρτωση. Συγκεκριμένα, η πέψη πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας θρυψίνη σύμφωνα με το πρωτόκολλο Single-Pot Solid-Phase-enhanced Sample Preparation (Sp3). Η πρωτεωμική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το εξαιρετικά ευαίσθητο σύστημα timsTOF Ultra2 (Bruker) σε συνδυασμό με το nanoLC ProteoElite2, παρέχοντας πρωτοφανές βάθος ανίχνευσης πρωτεϊνών (εντοπίστηκαν περίπου 3000 πρωτεΐνες ανά δείγμα). Τα ακατέργαστα δεδομένα timsTOF DIA αναλύθηκαν στο Proteoscape του Bruker σε σχέση με την αναθεωρημένη βάση δεδομένων ανθρώπινων πρωτεϊνών UniProt χρησιμοποιώντας τη ροή εργασίας dia-PASEF Spectronaut® 20.0. Διαφορική ανάλυση των δεδομένων αυτών πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας τα δεδομένα ασθενών σε πρώιμο στάδιο έναντι εξελιγμένου σταδίου, και συγκριτικά με τα δεδομένα υγιών δότην (Εικόνα 21). Τα φυσικά χαρακτηριστικά των εξωκυττάρων σωματιδίων αναλύθηκαν με τεχνικές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, και Western blotting (Εικόνα 22), τα οποία επιβεβαιώνουν την καθαρότητα των δειγμάτων που αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας. Οι συμμετέχοντες προέρχονται από τη δεξαμενή ασθενών που παρακολουθούνται στο Ιατρείο Κινητικών Διαταραχών της Νευρολογικής Κλινικής του

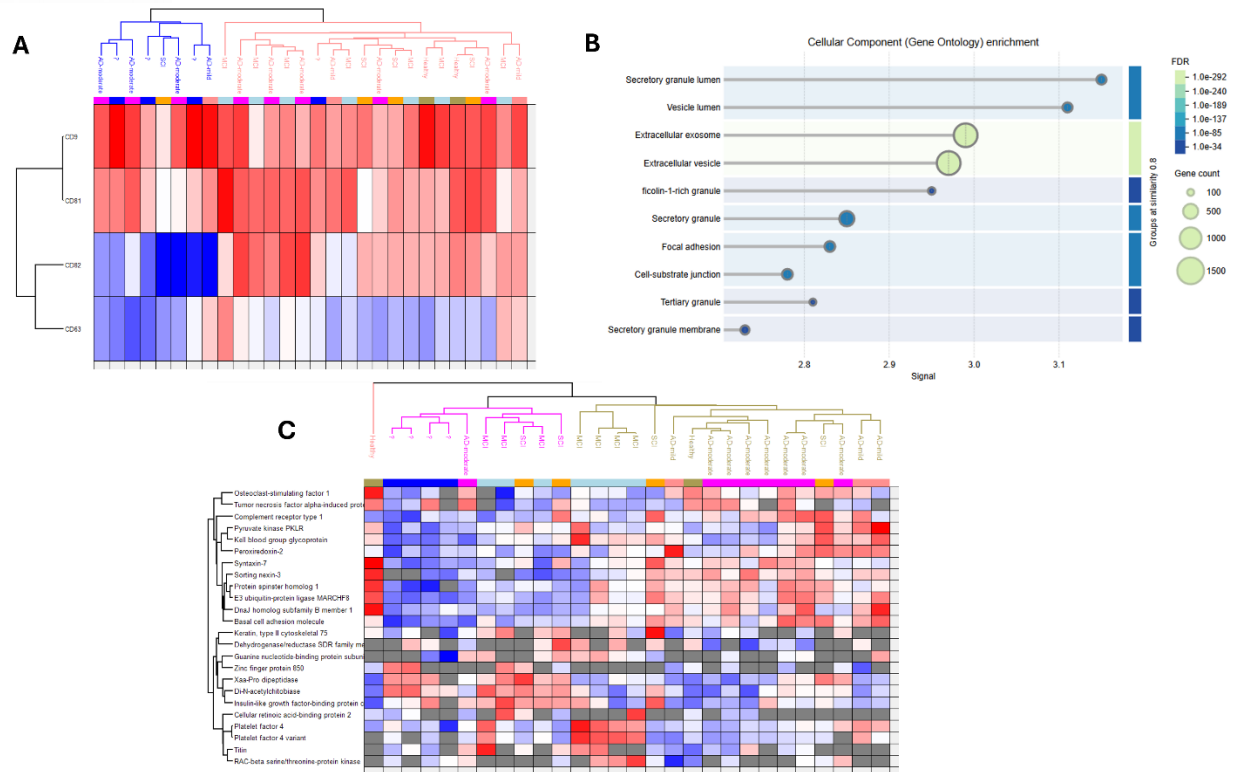
Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης (ΠΑΓΝΗ), σε συνεργασία με τον κλινικό νευρολόγο κ. Ιωάννη Ζαγανά, στα πλαίσια του παρόντος προγράμματος.



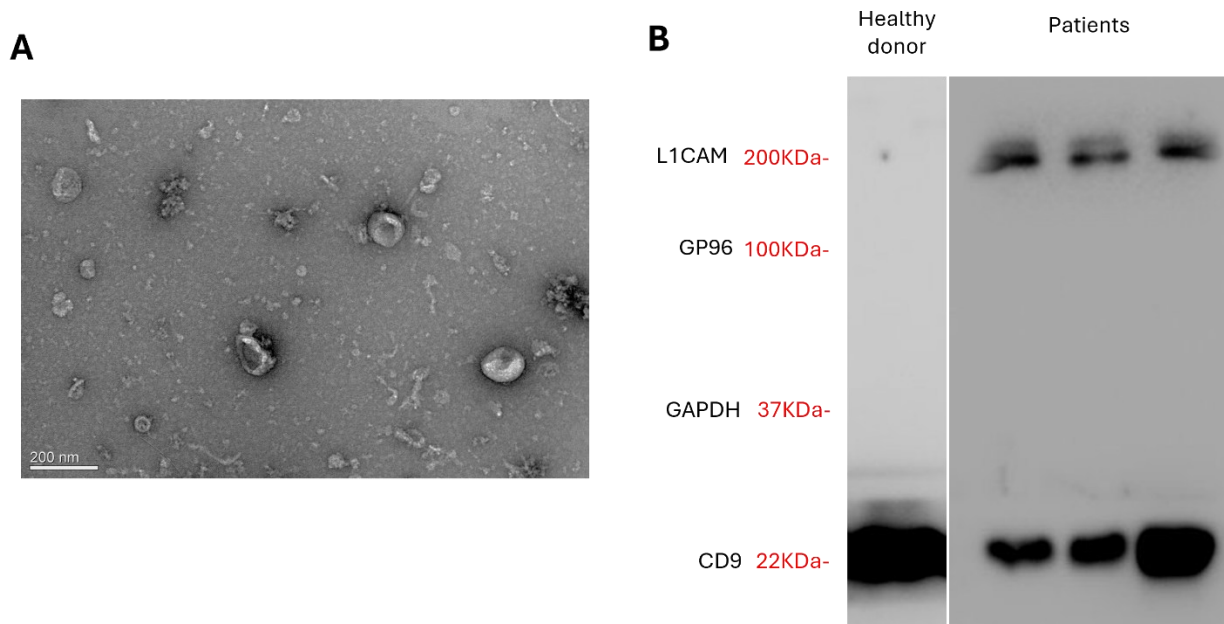
**Εικόνα 19.** Βιοχημικός χαρακτηρισμός των εξωκυττάρων κυστιδίων που προκύπτουν μετά την απομόνωσή τους από το πλάσμα αίματος υγιών δοτών με τη μέθοδο της υπερφυγοκέντρωσης (UC) και της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους (SEC). Α) Ποσοτικοποίηση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο microBCA και Β) χαρακτηρισμός με Western blotting ανάλυση στα κλάσματα μετά από συνδυαστική υπερφυγοκέντρωση και χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους. Γ) Ποσοτικοποίηση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο microBCA και Δ) χαρακτηρισμός με Western blotting ανάλυση στα κλάσματα μετά από χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους. Ε) Χαρακτηρισμός με Western blotting ανάλυση στα κυκλοφορούντα εξωκυττάρια κυστίδια του πλάσματος μετά από υπερφυγοκέντρωση (UC).



**Εικόνα 20.** Ανάλυση κατά Western blotting για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό των εξωκυττάρων κυστιδίων προερχόμενων από συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους όπως ινοβλάστες (CD140a+ EVs), ενδοθηλιακά κύτταρα (CD31+ EVs) και μακροφάγα (CD11b+ EVs) μετά από ανοσοκατακρήμνιση για τους αντίστοιχους υποδοχείς



**Εικόνα 21.** Πρωτεομική διαφορική ανάλυση κυκλοφορούντων εξωκυττάρων κυστιδίων που απομονώθηκαν από το πλάσμα υγιών δοτών και ασθενών με Alzheimer ή άνοια. Α) Εμπλουτισμός τετρασπανινών που εντοπίζονται σε εξωκυττάρια κυστιδία. Β) Ανάλυση STRING επιβεβαιώνει τη ποιότητα του δείγματος που αναλύθηκε (εξωκυττάρια κυστιδία). Γ) Heatmap διαφορικής ανάλυσης ασθενών που αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας.



**Εικόνα 22.** Α) Ανάλυση εξωκυττάρων κυστιδίων απομονωμένων από το πλάσμα υγιών δοτών με ηλεκτρονική μικροσκοπία (TEM). 200kV, 15.000x Magnification, 200nm Scalebar. Β) Ανάλυση κατά Western blotting για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό των εξωκυττάρων κυστιδίων προερχόμενων από υγιούς δότες και ασθενείς με Alzheimer, μετά από υπερφυγοκέντρηση.