



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: Εφαρμογή φυσικών προϊόντων και παραγώγων τους σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων

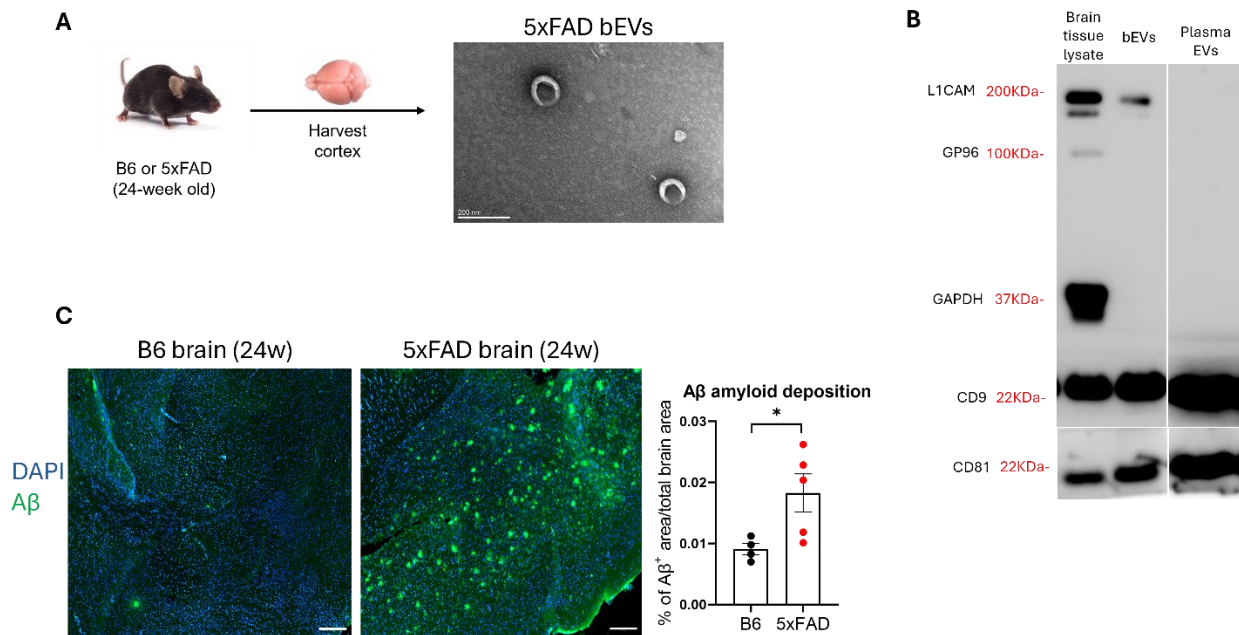
ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 6: Ανάπτυξη καινοτόμων προκλινικών θεραπευτικών παρεμβάσεων κατά της πρόωρης εμφάνισης νευροεκφυλιστικών νοσημάτων Alzheimer και Parkinson.

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

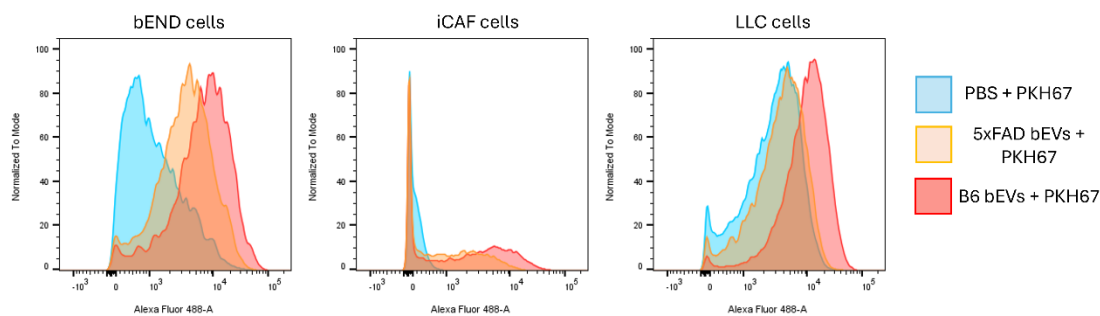
Ανάπτυξη καινοτόμων προκλινικών θεραπευτικών παρεμβάσεων κατά της πρόωρης εμφάνισης νευροεκφυλιστικών νοσημάτων Alzheimer και Parkinson.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

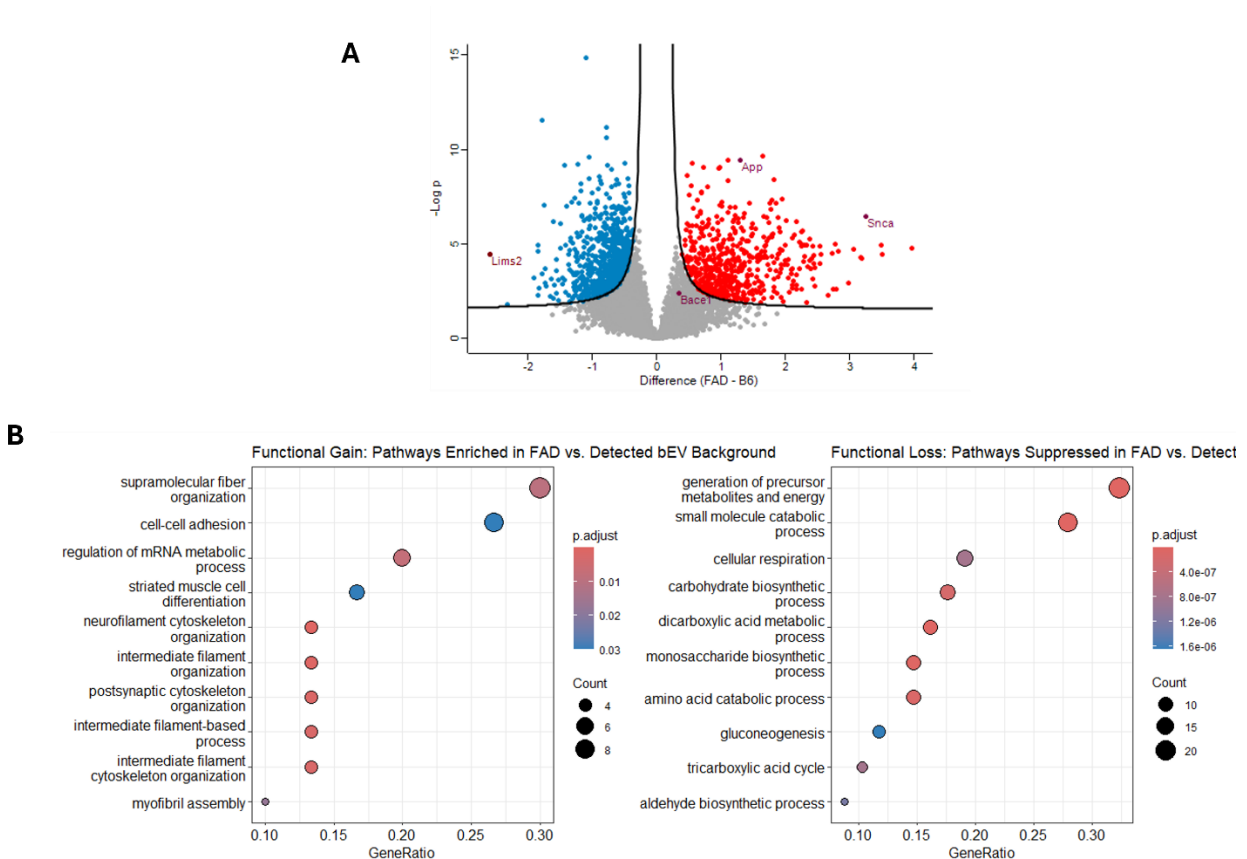
Στόχος του παραδοτέου αποτελεί η διερεύνηση των κυτταρικών στόχων και του λειτουργικού ρόλου εξωκυττάρων κυστιδίων που προέρχονται από νευρώνες ασθενών με νευροεκφυλιστικές νόσους. Για να ταυτοποιήσουμε τα κύτταρα στόχους των κυκλοφορούντων εξωκυττάρων κυστιδίων σε ασθενείς με νευροεκφυλιστική νόσο, εξωκυττάρια κυστιδία απομονώθηκαν από τον εγκέφαλο πειραματικών διαγονιδιακών μοντέλων μυών 5xFAD τα οποία παρουσιάζουν εναπόθεση πλακών αμυλοειδών στον εγκεφαλικό φλοιό (Εικόνα 23C). Τα απομονωμένα εξωκυττάρια κυστιδία από τον εγκέφαλο (brain EVs – bEVs), ταυτοποιήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία ανάλυση κατά Western για τα ποιοτικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τους (Εικόνα 23A και 23B). Στη συνέχεια τα bEVs φυσιολογικών και διαγονιδιακών μυών τιτλοφορηθούν με χρήση φθορίζουσας χρωστικής PKH67. Στη συνέχεια θα πραγματοποιήσουμε πειράματα προκειμένου να ταυτοποιήσουμε κύτταρα στόχους των κυστιδίων αυτών, όπως ενδοθηλιακά κύτταρα (bEND), ινοβλάστες (iCAF) και καρκινικά κύτταρα (LLC) με κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 24). Τα bEVs ενδοκυτταρώνονται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και σε ένα σημαντικό ποσοστό από ινοβλάστες. Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν περιορισμένη ικανότητα ενδοκυττάρωσης (Εικόνα 24). Τέλος, για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των εξωκυττάρων κυστιδίων που εκκρίνονται από τον εγκέφαλο υγιών και 5xFAD μυών, πραγματοποιήσαμε πρωτεϊνική ανάλυση με χρήση φασματομετρίας μάζας, ώστε να ανακαλύψουμε μονοπάτια και κυτταρικές διεργασίες που μεταβάλλονται σε υγιείς και ασθενείς καταστάσεις (Εικόνα 25). Όπως προκύπτει από την Εικόνα 25, τα 5xFAD bEVs είναι εμπλουτισμένα από πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην παθολογία της νόσου του Alzheimer (πχ APP), ενώ πλήθος μεταβολικών μονοπατιών είναι απορρυθμισμένα. Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνήσουμε πώς η νόσος του Alzheimer επηρεάζει την ογκογένεση μέσω συστημικής επικοινωνίας, εγχύθηκαν καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα LLC σε μύες αγρίου τύπου και 5xFAD. Παρατηρήθηκε μία μικρή καθυστέρηση της ανάπτυξης των όγκων (Εικόνα 26A) ενώ παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της διήθησης των όγκων από ουδετερόφιλα (Εικόνα 26B), ενώ τα υπόλοιπα ανοσοποιητικά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος δεν επηρεάστηκαν



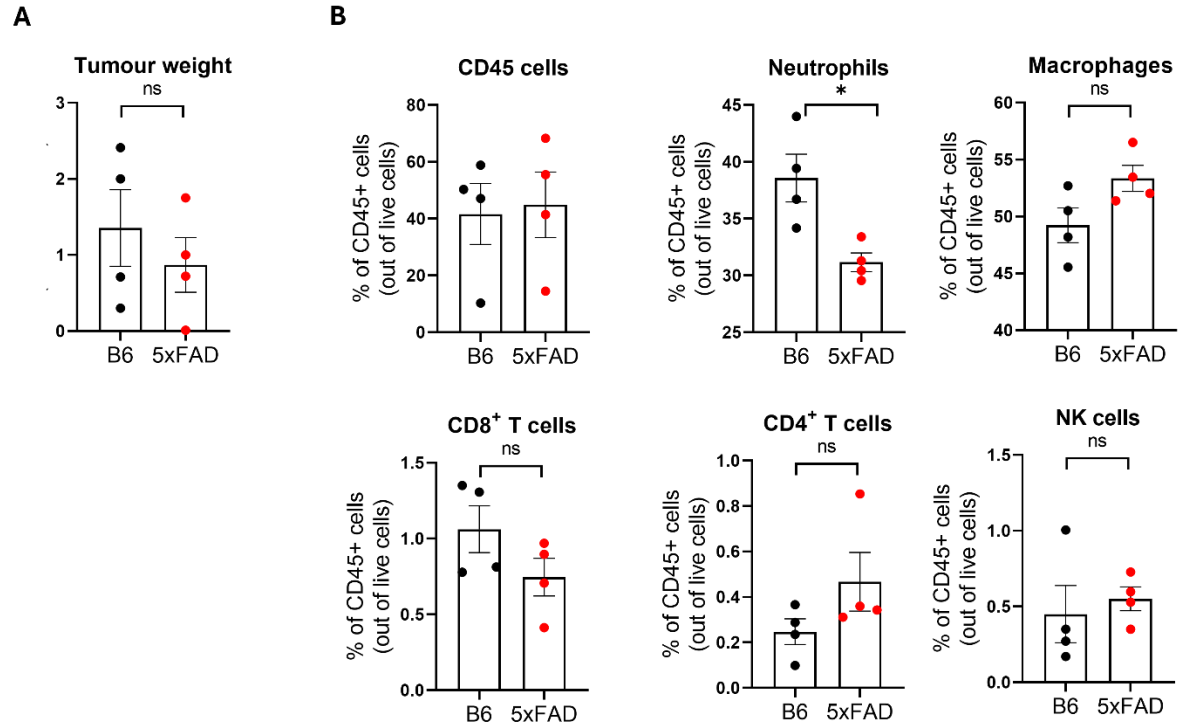
Εικόνα 23. Α) Απομόνωση εξωκυττάρων κυστιδίων από τον εγκεφαλικό φλοιό μύων αγρίου τύπου (B6) ή διαγονιδιακών 5xFAD, με πέψη ιστού και υπερφυγοκέντρηση. Τα προερχόμενα από εγκεφαλικό φλοιό εξωκυτάρια κυστιδία (bEVs) αναλύθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία (TEM). 200kV, 15.000x Magnification, 200nm Scalebar. Β) Ανάλυση κατά Western blotting για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό των bEVs και των κυκλοφορούντων EVs (απομόνωση από το πλάσμα), καθώς και του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος εγκεφαλικού φλοιού από B6 μύες, μετά από υπερφυγοκέντρηση. Γ) Ποσοτικοποίηση εναπόθεσης αμυλοειδών στον εγκεφαλικό φλοιό μύων αγρίου τύπου και 5xFAD (24 εβδομάδων), με χρήση ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας. Στατιστική ανάλυση με student's t-test.



Εικόνα 24. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής της ενδοκυττάρωσης bEVs απομονωμένων από εγκεφαλικό φλοιό B6 ή 5xFAD μύων μετά από χρώση με PKH67, από ενδοθηλιακά κύτταρα (bEND), ινοβλάστες (iCAF) και καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα (LLC).



Εικόνα 25. Α) Διαφορική ανάλυση πρωτεϊνών φορτωμένων σε bEVs απομονωμένων από εγκεφαλικό φλοιό B6 ή 5xFAD μυών με χρήση φασματομετρίας μάζας. Β) Λειτουργική ανάλυση μονοπατιών που ενισχύονται (αριστερά) ή καταστέλλονται (δεξιά) σε bEVs απομονωμένων από εγκεφαλικό φλοιό 5xFAD μυών συγκριτικά με τα B6.



Εικόνα 26. Ανάλυση συστημικής ρύθμισης ογκογένεσης σε μοντέλα μυών με Alzheimer. A) Βάρος όγκου LLC, που εγχύθηκε υποδόρια σε μύες αγρίου τύπου και 5xFAD, ηλικίας 24 εβδομάδων. B) Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής ανοσοποιητικών πληθυσμών που διηθούν καρκινικούς όγκους απομονωμένους από μύες αγρίου τύπου και 5xFAD. Στατιστική ανάλυση με student's t-test