



**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:** Μελέτη συνθετικών αναλόγων νευροτροφινών σε ζωικά μοντέλα της Νόσου Αλτςχάιμερ.

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

**ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ):** ΑΧΙΛΛΕΑΣ ΓΡΑΒΑΝΗΣ – ΙΩΑΝΝΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΠΟΥΛΟΣ (ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ)

## Μελέτη συνθετικών αναλόγων νευροτροφινών σε ζωικά μοντέλα της Νόσου Αλτςχάιμερ.

### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Η ερευνητική ομάδα με υπεύθυνους τους **Καθηγητές Αχιλλέα Γραβάνη** και **Ιωάννη Χαραλαμπίδου**, μελέτησαν την χορήγηση καινοτόμων συνθετικών αναλόγων των νευροτροφινών NGF και BDNF σε διαγονιδιακούς μύες 5xFAD, ζωικό μοντέλο της Νόσου Αλτςχάιμερ που προσομοιάζει την παθολογική ανάπτυξη πλακών β-αμυλοειδούς και καταλήγει στην νευρική εκφύλιση. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δημοσιεύθηκαν στο κορυφαίο επιστημονικό περιοδικό Molecular Psychiatry (Kokkali et al, Molecular Psychiatry, 2024), του εκδοτικού οίκου Springer Nature, παρουσιάζοντας τα αποτελέσματα της προαναφερθείσας μελέτης του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας που αφορούν τις πλειοτροπικές θεραπευτικές δράσεις ενός καινοτόμου συνθετικού μορίου, του BNN27, έναντι της νευροεκφυλιστικής Νόσου Αλτςχάιμερ. Η πλειοτροπική δράση του νευροτροφικού μορίου έγκειται στην ταυτόχρονη νευροπροστασία και νευροαναγέννηση, στην μείωση της νευροφλεγμονής και της συσσώρευσης του τοξικού Αμυλοειδούς-β-42, με αποτέλεσμα την βελτίωση της γνωσιακής λειτουργίας και της μνήμης των πειραματόζων που εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά της Νόσου Αλτςχάιμερ.

Επιπροσθέτως, νέα αναπτυσθέντα μόρια που δρουν μέσω του υποδοχέα νευροτροφινών TrkB μελετήθηκαν ως προς τις νευροπροστατευτικές τους δράσεις σε νευρικά κύτταρα υπό την επίδραση τοξικού αμυλοειδούς-β. Η μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ιωάννα Ζώτα, μέλος της ομάδας έργου της παρούσας χρηματοδότησης, δημοσίευσε (Zota et al., GLIA, 2024) μέρος των ερευνητικών της αποτελεσμάτων για την συσχέτιση του νευροτροφικού παράγοντα BDNF και του υποδοχέα του TrkB, στο ζωικό μοντέλο 5xFAD της Νόσου Αλτςχάιμερ, ενώ ολοκληρώνοντας την διδακτορική διατριβή της έχει ολοκληρώσει και την μελέτη νέων συνθετικών αναλόγων που βρίσκονται στο στάδιο ελέγχου για κατοχύρωση διπλώματος ευρεσιτεχνίας.

Σε συνέχεια των ανωτέρω ευρημάτων, το Εργαστήριο Φαρμακολογίας μελέτησε ειδικότερα τον ρόλο του p75 υποδοχέα νευροτροφινών στην Νόσο Αλτςχάιμερ, εστιάζοντας σε μια προσφάτως αναδειχθείσα ενδογενή διαδικασία, την ενήλικη νευρογένεση του ιπποκάμπτου, η οποία φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία από την εκδήλωση και την εξέλιξη της Νόσου Αλτςχάιμερ.

### **Ο ρόλος του υποδοχέα p75NTR στην ενήλικη νευρογένεση σε συνθήκες Νόσου Αλτςχάιμερ**

Η Νόσος Αλτςχάιμερ (Alzheimer's disease, AD) αποτελεί τη συχνότερη μορφή άνοιας και χαρακτηρίζεται από προοδευτική απώλεια μνήμης, έκπτωση των ανώτερων γνωστικών λειτουργιών και τελικά σοβαρή λειτουργική ανικανότητα. Σε παθολογο-ανατομικό επίπεδο, η νόσος ορίζεται από την παρουσία εξωκυττάριων πλακών αμυλοειδούς-β (Aβ), ενδοκυττάριων νευροϊνιδίων που αποτελούνται από υπερφωσφορυλιωμένη tau, καθώς και εκτεταμένη συναπτική και νευρωνική απώλεια. Παρά τη μακρόχρονη εστίαση της έρευνας στα δύο αυτά

κλασικά χαρακτηριστικά, οι μέχρι σήμερα θεραπευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν αποκλειστικά στη μείωση του αμυλοειδούς ή της tau δεν έχουν επιτύχει ουσιαστική αναστροφή της κλινικής πορείας.

Η διαπίστωση αυτή έχει οδηγήσει σε αυξανόμενο ενδιαφέρον για μηχανισμούς που σχετίζονται με τη νευρωνική πλαστικότητα και την ικανότητα του εγκεφάλου για ενδογενή αναγέννηση. Ένας τέτοιος μηχανισμός είναι η ενήλικη νευρογένεση της περιοχής του ιπποκάμπου, η διαδικασία παραγωγής νέων λειτουργικών νευρώνων από πληθυσμούς νευρικών βλαστοκυττάρων (NSCs) που προκύπτουν στην οδοντωτή έλικα. Οι νεοπαραγόμενοι νευρώνες ενσωματώνονται στα υπάρχοντα κυκλώματα και συμβάλλουν σε λειτουργίες όπως η μάθηση, η χωρική μνήμη και η ρύθμιση του συναισθήματος.

Πλήθος δεδομένων δείχνουν ότι στη Νόσο Αλτςχάιμερ η διαδικασία αυτή διαταράσσεται. Ωστόσο, παραμένει ασαφές ποιοι μοριακοί παράγοντες καθορίζουν αν τα NSCs θα διατηρήσουν την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται και να παράγουν βιώσιμους νευρώνες ή αν θα οδηγηθούν σε πρόωρη εξάντληση.

Ο p75NTR (p75 neurotrophin receptor) είναι ένας παν-νευροτροφινικός υποδοχέας με κεντρικό ρόλο στην απόφαση επιβίωσης ή θανάτου των κυττάρων. Η σηματοδότησή του εξαρτάται από το σύμπλεγμα συν-υποδοχέων και από το είδος του προσδέτη του. Στον ενήλικο εγκέφαλο, η έκφρασή του είναι σχετικά περιορισμένη αλλά αυξάνεται σε συνθήκες βλάβης και νευροεκφύλισης. Στη Νόσο Αλτςχάιμερ έχει δείχθει ότι μπορεί να δεσμεύει Αβ, επηρεάζοντας ποικίλες ενδοκυττάρειες οδούς.

Παρά τη σημασία του, ο ρόλος του p75NTR στη ρύθμιση της ενήλικης νευρογένεσης, ειδικά κατά την εξέλιξη της παθολογίας της Νόσου Αλτςχάιμερ δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.

## Στόχοι της μελέτης

Η μελέτη είχε ως κεντρικό σκοπό τη διερεύνηση της συμβολής του p75NTR στη δημιουργία και επιβίωση νεο-πολλαπλασιαζόμενων νευρικών βλαστικών κυττάρων (NSCs), καθώς και στον τρόπο με τον οποίο οι λειτουργίες αυτές μεταβάλλονται στο πλαίσιο της αμυλοειδούς παθολογίας.

Επιπλέον, επιδιώχθηκε η αξιολόγηση της μεταφραστικής σημασίας των ευρημάτων μέσω πειραμάτων σε ανθρώπινα νευρικά βλαστοκύτταρα προερχόμενα από iPSCs.

## Μεθοδολογία και πειραματικά μοντέλα

Για την επίτευξη των στόχων χρησιμοποιήθηκαν συμπληρωματικές προσεγγίσεις.

Το διαγονιδιακό μοντέλο 5xFAD\_p75NTR επέτρεψε τη μελέτη του όλων των παραπάνω υπό συνθήκες Alzheimer's σε καθορισμένα χρονικά σημεία. Γενικότερα όμως, χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια με:

- ολική απαλοιφή του p75NTR,
- υπό όρους διαγραφή σε θετικούς για την έκφραση της πρωτεΐνης Nestin κυτταρικούς πληθυσμούς.

Η κυτταρική δυναμική παρακολούθηθηκε μέσω χρήσης BrdU. Ο χαρακτηρισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με ειδικούς πρωτεϊνικούς δείκτες:

- Sox2 για τα βλαστοκύτταρα,
- Dcx για τους ανώριμους νευρώνες,
- NeuN για τους ώριμους,
- ενεργοποιημένη κασπάση-3 για την απόπτωση.

Επιπλέον, RNA-seq ανάλυση χρησιμοποιήθηκε για την αποκάλυψη μοριακών δεικτών που επηρεάζονται από την απώλεια του υποδοχέα.

Τέλος, σε ανθρώπινα NSCs εξετάστηκε η επίδραση του Αβ και της φαρμακολογικής αναστολής του p75NTR.

## Ο p75NTR ως ρυθμιστής της νευρογένεσης σε φυσιολογικό εγκέφαλο

Η απουσία του p75NTR είχε ως άμεσο αποτέλεσμα τη μείωση του πολλαπλασιασμού των NSCs. Το εύρημα αυτό καταδεικνύει ότι ο υποδοχέας υποστηρίζει τη διατήρηση της δεξαμενής των προγονικών κυττάρων.

Παράλληλα, παρατηρήθηκε αύξηση των Dcx+ κυττάρων, γεγονός που υποδηλώνει επιτάχυνση της διαφοροποίησης. Η επιταχυνόμενη αυτή έξοδος από τον κυτταρικό κύκλο όμως δεν συνοδεύτηκε από επιτυχή μακροχρόνια επιβίωση. Αντίθετα, μειώθηκε σημαντικά ο αριθμός των ώριμων νευρώνων, ενώ αυξήθηκαν οι δείκτες απόπτωσης.

Το σύνολο των δεδομένων δείχνει ότι ο p75NTR δεν λειτουργεί απλώς ως «διακόπτης» διαφοροποίησης αλλά ως παράγοντας που επιτρέπει τη σωστή χρονική αλληλουχία ωρίμανσης.

## Μηχανισμοί δράσης: το μικροπεριβάλλον

Η απουσία σημαντικών αλλαγών στα conditional Nestin knockouts υποδεικνύει ότι ο p75NTR δεν δρα αποκλειστικά μέσα στα ίδια τα NSCs. Αντίθετα, φαίνεται να ρυθμίζει το νευρογενετικό niche γενικότερα.

Τα γλοιακά κύτταρα, μέσω νευροτροφινών, κυτταροκινών και ρύθμισης της φλεγμονής, μπορούν να επηρεάσουν δραστικά την πορεία των προγονικών κυττάρων. Ο p75NTR πιθανώς επηρεάζει αυτή την επικοινωνία, διαμορφώνοντας ένα περιβάλλον που ευνοεί ή αναστέλλει την επιβίωση, πάρα το ότι δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στον αριθμό των κυττάρων αυτών.

## Η νευρογένεση στα πρώιμα στάδια του Alzheimer's

Στα νεαρά 5xFAD ζώα παρατηρήθηκε παροδική αύξηση του πολλαπλασιασμού. Η αντίδραση αυτή ερμηνεύεται ως προσπάθεια του εγκεφάλου να αντισταθμίσει την αυξανόμενη νευρωνική δυσλειτουργία.

Ωστόσο, όσο η παθολογία επιδεινώνεται, η ικανότητα αυτή μειώνεται, οδηγώντας τελικά σε σημαντική πτώση της νευρογένεσης.

## Ο ρόλος του p75NTR στην αντισταθμιστική απάντηση

Η κατάργηση του p75NTR στο υπόβαθρο του 5xFAD εξάλειψε την πρώιμη αυτή αύξηση. Το αποτέλεσμα αναδεικνύει ότι ο υποδοχέας είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας απέναντι στο Αβ. Χωρίς αυτόν, το σύστημα οδηγείται ταχύτερα σε απορρύθμιση και εξάντληση.

## RNA-seq ανάλυση

Η ανάλυση RNA-seq αποκάλυψε ευρείες αλλαγές σε γονίδια που ελέγχουν:

- τον κυτταρικό κύκλο,
- την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού,
- τη συναπτική λειτουργία,
- την απόκριση στο στρες.

Τα δεδομένα προσφέρουν πιθανές μοριακές γέφυρες μεταξύ σηματοδότησης p75NTR και νευρογενετικής ικανότητας.

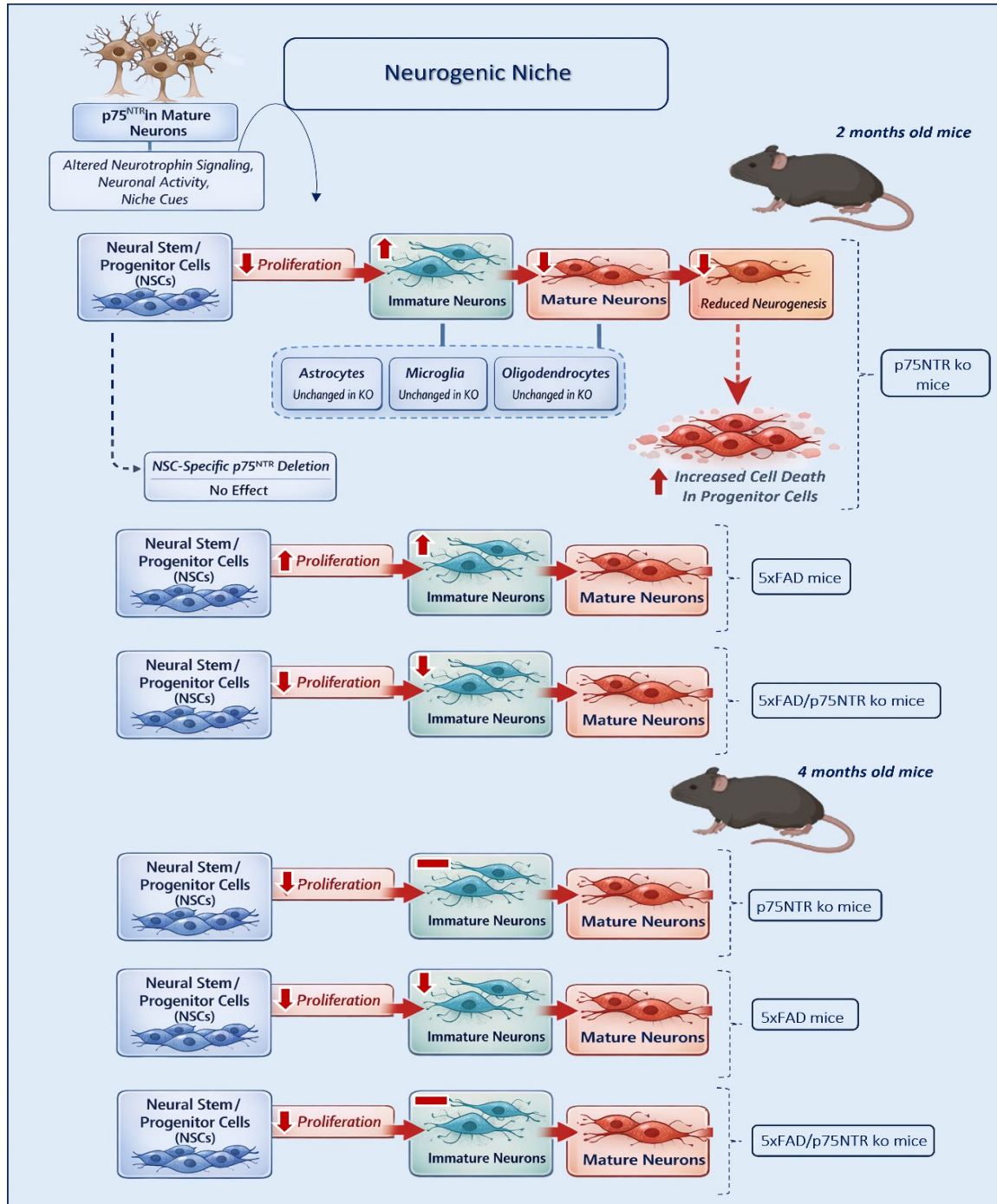
## Ανθρώπινα βλαστοκύτταρα

Η επιβεβαίωση της έκφρασης του p75NTR σε ανθρώπινα NSCs και η μείωση της τοξικότητας μετά από αναστολή του ενισχύουν τη μεταφραστική σημασία. Παράλληλα, η απουσία επίδρασης στον πολλαπλασιασμό υποστηρίζει την ιδέα ότι οι κρίσιμες επιδράσεις προέρχονται από το περιβάλλον και όχι από τα ίδια τα νευρικά βλαστοκύτταρα.

## Συμπεράσματα

Ο p75NTR αποτελεί βασικό ρυθμιστή της ισορροπίας μεταξύ αναγέννησης και εκφύλισης. Η απώλειά του οδηγεί σε πρόωρη διαφοροποίηση, μειωμένη επιβίωση και εξάντληση του αποθέματος των NSCs, ενώ στο πλαίσιο του Alzheimer's στερεί από τον εγκέφαλο την ικανότητα πρώιμης αντιστάθμισης (**Εικόνα 5**).

Η κατανόηση της πολυεπίπεδης δράσης του ανοίγει νέους δρόμους για παρεμβάσεις που στοχεύουν όχι μόνο την παθολογία αλλά και την ενίσχυση της ενδογενούς αναγεννητικής δυναμικής.



**Εικόνα 5. Ο p75NTR ρυθμίζει την ενήλικη νευρογένεση στον ιππόκαμπο *in vivo* υπό φυσιολογικές συνθήκες και στη νόσο Alzheimer.** Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του υποδοχέα νευροτροφινών p75 (p75NTR) στην ενήλικη νευρογένεση της οδοντωτής έλικας του ιππόκαμπου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο p75NTR υποστηρίζει τον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστοκυττάρων (NSC), τη σωστή νευρωνική διαφοροποίηση και ωρίμανση μέσω μηχανισμών του μικροπεριβάλλοντος (niche), πιθανόν με τη μεσολάβηση της έκφρασης του p75NTR σε ώριμους νευρώνες. Η διαγραφή του p75NTR μειώνει τον πολλαπλασιασμό των NSC, οδηγεί σε συσσώρευση ανώριμων νευρώνων, διαταράσσει την τελική νευρωνική ωρίμανση και αυξάνει τη συνολική κυτταρική θνησιμότητα, ενώ η ειδική διαγραφή του p75NTR στα NSC δεν έχει καμία επίδραση, γεγονός που υποδηλώνει εξωγενή ρύθμιση και όχι ενδογενή ελαττώματα των βλαστοκυττάρων ή των γλοιακών κυττάρων.

Στο μοντέλο ποντικού 5xFAD της νόσου Alzheimer (AD), τα πρώιμα στάδια της νόσου εμφανίζουν μια αντισταθμιστική αύξηση στον πολλαπλασιασμό των NSC και στην παραγωγή ανώριμων νευρώνων, η οποία χάνεται στα ποντίκια 5xFAD/p75NTR ko. Μέχρι τους 4 μήνες, ο πολλαπλασιασμός και η παραγωγή ανώριμων νευρώνων μειώνονται στα ποντίκια 5xFAD, και η διαγραφή του p75NTR επιδεινώνει περαιτέρω αυτά τα ελλείμματα, υποδεικνύοντας τον κρίσιμο ρόλο του p75NTR στα πρώιμα στάδια της AD, καθώς και αναδεικνύοντας τον p75NTR ως βασικό ρυθμιστή της ενήλικης νευρογένεσης του ιπποκάμπου.

Η μελέτη της δράσης του υποδοχέα p75NTR στην ενήλικη νευρογένεση σε φυσιολογικές και σε συνθήκες νευροεκφύλισης λόγω Νόσου Αλτςχάιμερ έγινε δεκτή προς δημοσίευση πριν λίγες μέρες στο επιστημονικό περιοδικό *Alzheimer's Research and Therapy* (IF: 7.5) (Papadopoulou MA, Chanoumidou K., Peteinareli M., Tsaglioti E., Michalaki K., Lavigne MD, Charalampopoulos I. p75 Neurotrophin Receptor Shapes the Dynamics of Adult Hippocampal Neurogenesis in Alzheimer's Disease. 2025, *in press*), με αναφορά στο παρόν έργο.