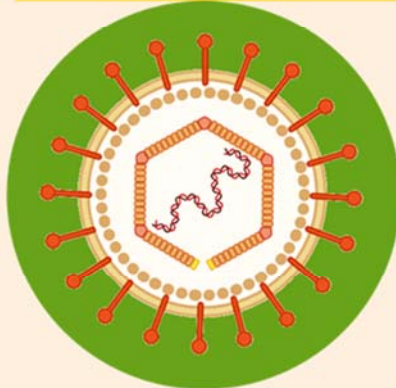
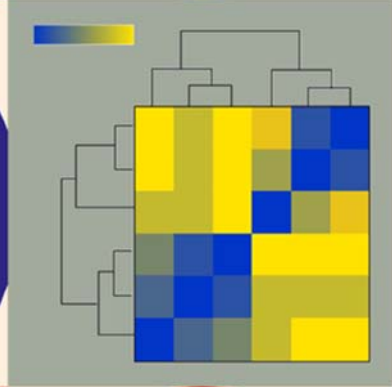
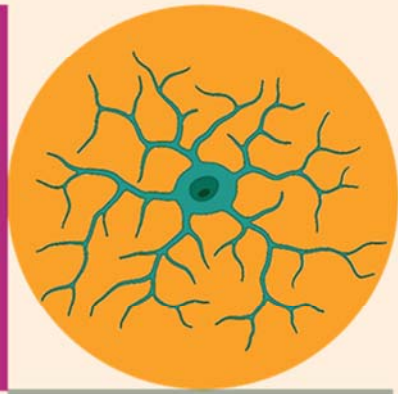




**6^η ΗΜΕΡΙΔΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ &
ΜΕΤΑΔΙΔΑΚΤΩΡΩΝ**



**ABSTRACT
BOOK**



#imeridaHPI2023

4.10.2023

Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Αντί προλόγου

Το **Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (ΕΙΠ)** επαναφέρει, μετά τους περιορισμούς της πανδημίας Covid-19, και διοργανώνει ξανά την **6^η Ημερίδα Μεταπτυχιακών και Μεταδιδακτόρων, αποσκοπώντας για ακόμη μία φορά στη διασύνδεση της Επιστήμης με την Κοινωνία**. Οι πόρτες του ΕΙΠ ανοίγουν και πάλι για το επιστημονικό αλλά και για το ευρύ κοινό, με στόχο την επικοινωνία των ερευνητικών ευρημάτων των νέων επιστημόνων του ΕΙΠ στο ευρύ κοινό, την προβολή της συνεισφοράς τους στο έργο του Ινστιτούτου, καθώς και την ανάπτυξη νέων συνεργασιών.

Η Ημερίδα περιλαμβάνει προφορικές και αναρτημένες ανακοινώσεις από μεταπτυχιακούς φοιτητές, μεταδιδάκτορες και συνεργαζόμενους ερευνητές του Ινστιτούτου, σχετικές με τα πεδία της Βιοπληροφορικής, της Ανοσολογίας, της Ογκολογίας, της Νευροβιολογίας, της Μικροβιολογίας και της Ιολογίας. Επιπλέον, την Ημερίδα πλαισιώνουν ομιλίες από προσκεκλημένους εξωτερικούς ομιλητές/ερευνητές (Δρ Βίβιαν Τσεβελέκη, Δρ Αλέξανδρος Μήτσιος, Δρ Ευάγγελος Καραδήμας, Νίκη Μιχαλοπούλου, Έλλη Παπαδοπούλου), αλλά και προσκεκλημένους ομιλητές του Ινστιτούτου (Δρ Μαρίτσα Μαργαρώνη, Δρ Βασιλική Πόγκα, Δρ Ελίνα Χορευτή, Δρ Μαρία Ευαγγελίδου), καθώς και ένα κεντρικό αφιέρωμα - ομιλία από τον Δρ. Κώστα Μπουγιούκο, με βασικό άξονα τις «Προοπτικές και όρια πόλυ-ομικής, δομικής ανάλυσης και μηχανικής μάθησης».

Καρδιά της φετινής Ημερίδας που αποτελεί πλέον θεσμό είναι οι νέοι ερευνητές του Ινστιτούτου, οι οποίοι με τη θέληση και τον αστείρευτο ενθουσιασμό τους, καθώς και με τη στήριξη του υπόλοιπου ανθρώπινου δυναμικού του Ινστιτούτου, καταφέρνουν να υλοποιήσουν τη δράση αυτή και ως εκ τούτου τους ανήκουν οι θερμές μας ευχαριστίες. Θερμές ευχαριστίες ανήκουν και σε όλους τους προσκεκλημένους συνέδρους – εισηγητές που μοιράστηκαν τη γνώση, την εμπειρία και την έρευνά τους. Επιπλέον ευχαριστούμε θερμά τον Δρ Ευστάθιο Γκόνο, Γενικό Διευθυντή του Ινστιτούτου, την Δρ Ευδοκία Καραγκούνη, Αντιπρόεδρο και εκτελούσα χρέη Προέδρου Δ.Σ. του Ινστιτούτου, καθώς και τις Διοικητικές Υπηρεσίες του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ για την οικονομική και ηθική υποστήριξη στη διοργάνωση της Ημερίδας. Επιπλέον, ευχαριστούμε από καρδιάς την Δρ Χριστίνα Οικονομοπούλου, Προϊσταμένη Διοίκησης του Ινστιτούτου, η οποία υπήρξε εμπνευστής της Ημερίδας και ένθερμος αρωγός της Οργανωτικής Επιτροπής. Επίσης, ευχαριστούμε ιδιαίτερα την κα Αγγελική Λυμπεροπούλου για τη βοήθεια και τις συμβουλές που μας πρόσφερε καθ' όλη τη διάρκεια της διοργάνωσης, τη συνάδελφο Ολυμπία Αποκότου για τη συμβολή της στη δημιουργία της αφίσας και του συνόλου των γραφικών, τον συνάδελφο Γιώργο Σκούφο, καθώς και το σύνολο του βοηθητικού προσωπικού. Επιπρόσθετα, ευχαριστούμε θερμά την κυρία Τζωρτζίνα Τζανάκη, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας της Δημόσιας Υγείας και Επιστημονική Υπεύθυνη Εθνικού Κέντρου Αναφοράς Μηνιγγίτιδας στη σχολή Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, τον κύριο Σπύρο Γεωργόπουλο, Ερευνητή Β' του Εργαστηρίου Κυτταρικής Νευροβιολογίας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών και

τον κύριο Ιωάννη Καρακασιλιώτη, Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Βιολογίας – Μοριακής Ιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης (Δ.Π.Θ.), οι οποίοι απαρτίζουν την επιτροπή αξιολόγησης των επιστημονικών εργασιών, για την καίρια συμβολή τους στην επιλογή των εργασιών προς βράβευση. Τέλος, δε θα μπορούσαμε να παραβλέψουμε την καταλυτική συμβολή των χορηγών και υποστηρικτών της πραγματοποίησης της Ημερίδας. Ειδικότερα, οφείλουμε ένα μεγάλο ευχαριστώ στις εταιρείες: Π.Ζαφειρόπουλος Α.Ε, "Αντισέλ" Αφοί Σελίδη Α.Ε., Lab Supplies Scientific Π. Γαλάνης & ΣΙΑ Ο.Ε., Αφοί Ντούρου - Ε. Δεμάγκος ΟΕ Bioline scientific και SB Bioanalytica Α.Ε. για τις ευγενικές τους χορηγίες, την L-taste για την υποστήριξή της και το ραδιοφωνικό σταθμό "Αθήνα 9,84" και τη lifo.gr για την υποστήριξη επικοινωνίας.

Η Οργανωτική Επιτροπή της Ημερίδας

Αθανασοπούλου Ρουμπίνη, MSc
Εμμανουήλ Μαρία, Δρ
Κουπρέενκο Ολέξι, MSc
Κουτσώνη Όλγα, Δρ
Μαργαρίτη Μαρία, MSc
Νίνου Ελπινίκη, Δρ

Περιεχόμενα

Αντί προλόγου	1
ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ.....	4
1 ^η Συνεδρία: Μικροβιολογία.....	5
2 ^η Συνεδρία: Νευροβιολογία.....	11
4 ^η Συνεδρία: Ανοσολογία – Δομική Βιολογία	16
ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ.....	21

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

1^η Συνεδρία: Μικροβιολογία

ΠΑ.01

Το σύστημα high-through put CRISP/Cas9 στο στέλεχος *Leishmania donovani* LG13 και η απαλοιφή των γονιδίων *tyrrip*₂₂ και *snx* από παράσιτα *L.mexicana*. Από τη Γλασκώβη στο ΕΠΠ

Ολυμπία Τζιουβάρα¹, Χαραλαμπία Μπολέτη^{1,2}

¹Εργαστήριο Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα

²Μονάδα Οπτικής Μικροσκοπίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα

Εισαγωγή: Μέχρι το 2015, οι μελέτες απώλειας λειτουργικότητας (loss-of-function) για το χαρακτηρισμό πρωτεϊνών στα παράσιτα *Leishmania* μπορούσε να γίνει μόνο μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Η τεχνολογία CRISPR/Cas9 παρέχει έναν γρήγορο τρόπο για την αφαίρεση ή την αντικατάσταση γονιδίων σε έναν οργανισμό γεγονός που την καθιστά πολύτιμο εργαλείο για λειτουργικές μελέτες πρωτεϊνών [1]. Ωστόσο, η τεχνική αυτή δεν είχε ακόμη εισαχθεί στο ΕΠΠ για τα Τρυπανοσωματίδια ως το 2022. Στο εργαστήριό μας χρησιμοποιήσαμε την τεχνολογία CRISPR/Cas9 για δημιουργία παρασίτων *Leishmania (L.) donovani* LG13-Cas9/T7, τα οποία δεν έχουν κατασκευαστεί σε άλλο εργαστήριο, προκειμένου να μελετήσουμε σε αυτά τη λειτουργία δύο πρωτεϊνών (*LdTryPIP*₂₂ [2] και *LdSNXi* [3]) που εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση μέσω φωσφοϊνοσιτιδίων (PIs). Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε καθώς και η διαδικασία κατασκευής Knock Out (KO) στελεχών *L. mexicana* με απαλοιφή των δύο γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που αναφέρονται παραπάνω. Η κατασκευή των KO στελεχών *L. mexicana* έγινε υπό την καθοδήγηση της ομάδας της Δρ. Gluenz στη Γλασκώβη.

Υλικά – Μέθοδοι / Αποτελέσματα: Κατασκευή LG13-Cas9/T7RNAP: Σε καλλιέργειες λογαριθμικής φάσης αγρίου τύπου *L. donovani* LG13, εισήχθη με ηλεκτροδιάτρηση το πλασμίδιο pTB007 [1]. Στη συνέχεια, τα παράσιτα καλλιεργήθηκαν παρουσία του αντιβιοτικού Hygromycin για επιλογή των διαγονιδιακών στελεχών. Επιβεβαίωση της παραγωγής από το πλασμίδιο pT007 ανασυνδυασμένης Cas9 σημασμένης με Flag, έγινε με Western Blot και ανίχνευση με ειδικό αντίσωμα έναντι των επιτόπων Flag.

Κατασκευή Δ tyrrip₂₂ και Δ snx: Για την παραγωγή KO στελεχών για τα ορθόλογα των *tyrrip*₂₂ και *snx* γονίδια σε *L. mexicana*, εισήχθησαν με ηλεκτροδιάτρηση σε καλλιέργειες διαγονιδιακών σειρών *L. mexicana*-Cas9/ T7 RNAP (εκφράζουν Cas9 και T7 RNA πολυμεράση), προϊόντα PCR που παρήχθησαν με ειδικά ολιγονουκλεοτίδια εκκινητών. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με χρήση της πλατφόρμας LeishGEdit [4]. Η επιλογή των Δ tyrrip₂₂ και Δ snx έγινε με τα αντιβιοτικά Puromycin και Blastidicin, ενώ η απαλοιφή των γονιδίων επιβεβαιώθηκε με PCR. Ο ρυθμός ανάπτυξης των παρασίτων στην καλλιέργεια και η ανάλυση της μορφολογίας τους έγινε με κυτταρόμετρο CASY Counter (OMNI Life Science).

Συμπεράσματα: Με την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης, το Εργαστήριο Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού μπορεί να διεξάγει έρευνα πάνω στο λειτουργικό χαρακτηρισμό πρωτεϊνών που μελετά ή που ενδιαφέρεται να μελετήσει, τόσο με απαλοιφή όσο και με σήμανση με φθορίζουσες πρωτεΐνες. Το δεύτερο θα επιτρέψει τον ακριβή εντοπισμό των υπό μελέτη πρωτεϊνών με μικροσκοπία φθορισμού με χρήση

κατάλληλου εξοπλισμού στην μονάδα Μικροσκοπίας του ΕΙΠ. Είναι σημαντικό ότι διατίθεται πλέον στο ΕΙΠ η τεχνογνωσία (πρωτόκολλα και μέθοδοι διερεύνησης σφάλματος) για τη δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών σε οποιοδήποτε στέλεχος *Leishmania*, καθώς επίσης και βιβλιοθήκες πλασμιδίων και αντιβιοτικών. Τα αντιδραστήρια αυτά είναι στη διάθεση κάθε ερευνητικής ομάδας μετά από συνεννόηση με το Εργαστήριο Ενδοκυττάριου Παρασιτισμού.

Η παραπάνω εργασία ολοκληρώθηκε με χρηματοδότηση του EMBO-Scientific Exchange Grant #9372 και του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.

Αναφορές

- [1] Beneke T, Madden R, Makin L, Valli J, Sunter J, Gluenz E. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. R Soc Open Sci. 2017 May 3;4(5):170095. doi: 10.1098/rsos.170095. PMID: 28573017; PMCID: PMC5451818.
- [2] Papadaki A, Tziouvara O, Kotropouli A, Koumariou P, Doukas A, Rios P, Tardieux I, Köhn M, Boleti H. The *Leishmania donovani* LDBPK_220120.1 Gene Encodes for an Atypical Dual Specificity Lipid-Like Phosphatase Expressed in Promastigotes and Amastigotes; Substrate Specificity, Intracellular Localizations, and Putative Role(s). Front Cell Infect Microbiol. 2021 Mar 25;11:591868. doi: 10.3389/fcimb.2021.591868. PMID: 33842381; PMCID: PMC8027504.
- [3] Tziouvara O, Petsana M, Kourounis D, Papadaki A, Braliou G, Boleti H Characterization of the First Secreted Sorting Nexin identified in the *Leishmania* genus of Kinetoplastea protists. 2023 (under submission)
- [4] <http://www.leishgedit.net/Home.html>

ΠΑ.02

Προσδιορισμός της ανοσοπροστατευτικής δράσης του αιθέριου ελαίου θυμαριού (*thymus vulgaris*) ως διατροφικό συμπλήρωμα εκτρεφόμενης τσιπούρας (*sparus aurata*) έναντι φυσικής μόλυνσης με το παράσιτο *sparicotyle chrysophrii*

Οδυσσέας Π. Τζωρτζάτος¹, Δήμητρα Κ. Τουμπανάκη¹, Παρασκευή Ζησιμοπούλου², Ιωάννης Κοτζαμάνης³, Μάρκος Κολύγας⁴, Βασίλειος Μπακόπουλος⁵, Αχιλλέας Χατζόπουλος⁶, Φωτεινή Αθανασοπούλου⁴, Ευδοκία Καραγκούνη^{1*}

¹Τμήμα Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα

² Τμήμα Νευροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα

³Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιέργειας, Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ), Αθήνα, Ελλάδα

⁴Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Κτηνιατρικής, Ιχθυολογίας & Υδατοκαλλιέργειας, Καρδίτσα, Ελλάδα

⁵Τμήμα Θαλάσσιων Επιστημών, Σχολή Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη, Ελλάδα

⁶Σκάλωμα Α.Ε., Νέα Σελεύχεια, Ηγουμενίτσα, Ελλάδα.

*Συγγραφέας επικοινωνίας: ekaragouni@pasteur.gr

Εισαγωγή: Η χρήση φαρμακευτικών φυτών ως διατροφικά συμπληρώματα παρέχει έναν βιώσιμο τρόπο προστασίας των ιχθύων από παθογόνα, καθώς έχουν σημαντικές αντιμικροβιακές, ανοσοδιεγερτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης συμπληρωμάτων διατροφής θυμαριού (*Thymus vulgaris*) στην ανοσολογική απόκριση της τσιπούρας (*Sparus aurata*) και η προστατευτική τους δράση έναντι φυσικής μόλυνσης από το παράσιτο *Sparicotyle chrysophrii*.

Υλικά και Μέθοδοι: Μελετήθηκαν δύο πειραματικές εκτροφές που περιείχαν διαφορετικές ποσότητες εκχυλίσματος αιθέριου ελαίου *Thymus vulgaris* (T) (0,25T και 0,50T) για περίοδο σίτισης δύο μηνών. Δείγματα ιχθύων απομονώθηκαν και τα βράγχια εξετάστηκαν με μικροσκοπία για την παρουσία παρασίτων. Δείγματα βλέννας και ορού χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση δεικτών έμφυτης ανοσίας, οξειδωτικού στρες

και μεταβολισμού. Επιπλέον, σε δείγματα ιστών προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων SOD1, GPx1, IL-10, TGFb1, IL-1b, TNFa, hepcidin και GRP75, με χρήση μοριακών τεχνικών.

Αποτελέσματα: Οι σωματομετρικοί δείκτες, δεν διαφοροποιήθηκαν στις ομάδες εκτροφής και ελέγχου, καθώς και στην ομάδα που επιμολύνθηκε. Στην ομάδα 0,25T, τα επίπεδα λυσοζύμης και νιτρικών ιόντων στη βλέννα ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Στην ομάδα 0,50T τα νιτρικά ιόντα της βλέννας ήταν σημαντικά χαμηλότερα ενώ η ανοσοσφαιρίνη IgM αυξήθηκε σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η έκφραση των γονιδίων που μελετήθηκαν, δεν μεταβλήθηκε από τις πειραματικές διατροφές. Στην ομάδα 0,50T που επιμολύνθηκε από το παράσιτο, οι ολικές πρωτεΐνες της βλέννας ήταν σημαντικά χαμηλότερες στους μολυσμένους ιχθύες. Στον ορό, τα συνολικά επίπεδα αντισωμάτων παρέμειναν σταθερά χαμηλά, ωστόσο τα επίπεδα της IgM ήταν χαμηλότερα σε σύγκριση με τη μη μολυσμένη ομάδα. Το κυτόχρωμα-1A1 και η μεταλλοθειονίνη είχαν πτωτική τάση χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις. Όλα τα γονίδια που αναλύθηκαν εκφράστηκαν περισσότερο στο πρόσθιο νεφρό, ενώ η μόλυνση φαίνεται να καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων στα υπόλοιπα όργανα, εκτός της IL-10.

Συμπεράσματα: Συνολικά, παρόλο που οι πειραματικές εκτροφές θεωρήθηκαν ευεργετικές για το ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων, η φυσική μόλυνση με *S. chrysophrii* αποκάλυψε ήπια ανοσο-προστατευτική δράση της διατροφής με *T. vulgaris* στις εκτρεφόμενες τσιπούρες.

Η εργασία αυτή χρηματοδοτήθηκε από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία 2014-2020», MIS 5055881.

ΠΑ.03

Ρύθμιση από MAPKs της πρωτεϊνολυτικής δράσης στο χόριο μέσω επαγωγής της έκφρασης MMP-3 και MMP-9 στη λοίμωξη από *Helicobacter pylori*

I. Καραγιάννης^{1,2}, B. Martinez-Gonzalez¹, E. Κοντιζάς¹, A. Βούλγαρη Κόκκοτα¹, K. Πετράκη³, A. Μεντής¹, Π. Κόλλια², Δ. Ν. Σγούρας¹

¹ Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα

² Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

³ Παθολογοανατομικό Τμήμα, «Metropolitan Hospital», Αθήνα

Εισαγωγή: Η λοίμωξη από *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) αποτελεί τον πρωτεύοντα παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη έλκους, γαστρικού αδενοκαρκινώματος και MALT λεμφώματος, λόγω αυξημένης πρωτεολυτικής δραστηριότητας στο χόριο μέσω της επαγωγής μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (MMPs). Προηγούμενα δεδομένα του εργαστηρίου καταδεικνύουν ότι η πειραματική *in vitro* *H. pylori* λοίμωξη επάγει στρωμελυσίνη-1 (MMP-3) και ζελατινάση Β (MMP-9), σαν αποτέλεσμα της έκφρασης, της ενδοκυτταρικής διαμετάθεσης και της φωσφορυλίωσης της βακτηριακής ογκοπρωτεΐνης CagA. Στη συγκεκριμένη ανακοίνωση αναφέρουμε αποτελέσματα με χρήση *in vivo* πειραματικού προτύπου *H. pylori* λοίμωξης και μελετάμε τη συμβολή των MAPKs στην ρύθμιση της έκφρασης των MMPs.

Υλικό και Μέθοδοι: C57BL/6 ποντικοί μολύνθηκαν με *H. pylori* (HPARE, HPARE/ΔCagA και SS1) για 6 και 9 μήνες. Η μεταγραφική έκφραση των *Mmp-3* και *Mmp-9* μελετήθηκε μέσω qPCR ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα πρωτεΐνης στο γαστρικό ιστό προσδιορίστηκαν ανοσοϊστοχημικά. Για την μελέτη της συμβολής των MAPKs,

επιθηλιακές κυτταρικές σειρές AGS και GES-1 μολύνθηκαν με *H. pylori* στέλεχος P12 παρουσία χημικών αναστολέων των κινασών JNK, ERK1/2 και p38 για 24 ώρες. Τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης των MMPs προσδιορίστηκαν με qPCR και Western blot, αντίστοιχα.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε μεταγραφική ενεργοποίηση των *Mmp-3* και *Mmp-9*, καθώς και αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση των MMP-3 και MMP-9 στο γαστρικό ιστό ποντικών συνακόλουθα της *H. pylori* λοίμωξης. Η έκφραση της CagA συσχετίστηκε με την αυξορρύθμιση των MMPs, ειδικότερα κατά τ' αρχικά στάδια της λοίμωξης. Αναστολή των ERK1/2 οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης των MMP-3 και MMP-9 κατά την *H. pylori* λοίμωξη και στις δύο κυτταρικές σειρές. Τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των δύο MMPs βρέθηκαν επίσης σημαντικά μειωμένα παρουσία του αναστολέα των JNK, τόσο στα AGS όσο και στα GES-1 κύτταρα. Αντίθετα, αναστολή του p38 οδήγησε σε πιο σύνθετα αποτελέσματα.

Συμπέρασμα: ERK1/2 και JNK κινάσες ενέχονται πρωτευόντως στην αυξορρύθμιση των MMP-3 και MMP-9 στο γαστρικό χόριο στην *H. pylori* λοίμωξη.

ΠΑ.04

Σημασία του βιοσυνθετικού και μεταβολικού μονοπατιού των κατεχολαμινών στη μόλυνση με τον SARS-CoV-2 και τη σοβαρότητα της νόσου

Γ. Μπεκούλης¹, Κ. Ι. Καλλιαμπάκου¹, Ρ. Σ. Μυλωνά¹, Δ. Λαγού¹, Ι. Γεμεντζή¹, Α. Ιωαννίδης², Ε. Jahaj³, Ι. Καρακασιλιώτης⁴, Α. Κοτανίδου³, Σ. Χατζηπαναγιώτου⁵, Δ. Βασιλακοπούλου⁶, Ε. Αγγελάκης^{7,8,#}, Α. Γ. Βασιλείου^{3,#} και Ν. Βασιλάκη^{1,*}

¹ Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα 11521, Ελλάδα

² Τμήμα Νοσηλευτικής, Πανεπιστήμιο Πελοποννήσου, Σπάρτη 23100, Ελλάδα

³ Α' Τμήμα Εντατικής Θεραπείας & Πνευμονολογίας, Εργαστήρια Γ.Π. Λιβανού και Μ. Σίμου, Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Ευαγγελισμός, Αθήνα 10676, Ελλάδα

⁴ Εργαστήριο Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη 68100, Ελλάδα

⁵ Τμήμα Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Αθήνα 11528, Ελλάδα

⁶ Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 15772, Ελλάδα

⁷ Τμήμα Διάγνωσης, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα 11521, Ελλάδα Greece

⁸ Aix Marseille Univ, IRD, IHU Méditerranée Infection, VITROME, Μασσαλία 13005, Γαλλία

Ισότιμη συνεισφορά

* Corresponding author: nikiv@pasteur.gr, τηλ επικοινωνίας: +306974174747

Εισαγωγή: Πρόσφατα η ερευνητική μας ομάδα συσχέτισε την έκφραση της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης (DDC), βιοσυνθετικού ενζύμου της ντοπαμίνης, με την μόλυνση από τον ιό SARS-CoV-2 (Mpekoulis et al, 2021). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα mRNA της DDC βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα σε δείγματα ρινοφαρυγγικών επιχρισμάτων ασθενών COVID-19 (Wuhan στέλεχος) με ήπια/καθόλου συμπτώματα, συγκριτικά με τα αντίστοιχα ομάδας αρνητικού ελέγχου. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου αυτού με τα επίπεδα του ιικού RNA, τόσο στα δείγματα των ασθενών όσο και σε μολυσμένα επιθηλιακά κύτταρα (VeroE6).

Υλικά – Μέθοδοι / Αποτελέσματα: Στην παρούσα μελέτη, αναδείξαμε για πρώτη φορά την αξία της DDC ως ένα αξιόπιστο δείκτη σοβαρότητας της νόσου COVID-19, συγκρίνοντας τα επίπεδα mRNA του γονιδίου σε δείγματα ρινοφαρυγγικών επιχρισμάτων μεταξύ ασθενών μολυσμένων με τον ιό (Wuhan) που παρουσιάζουν

διαφορετικά συμπτώματα (σοβαρά, ήπια/καθόλου). Το παραπάνω επιβεβαιώθηκε και από τον καθορισμό της έκφρασης του γονιδίου σε δείγματα ασθενών μολυσμένων με την παραλλαγή Omicron του ιού σε σύγκριση με το αρχικό στέλεχος. Παράλληλα, ως αναμενόταν λόγω της αυξημένης μεταδοτικότητας της παραλλαγής Omicron, εντοπίστηκαν αυξημένα επίπεδα του υποδοχέα του ιού, ACE2, στα αντίστοιχα δείγματα ασθενών. Επιπλέον, σε δείγματα αίματος νοσηλευόμενων ασθενών και στην κυτταροκαλλιέργεια, το βιοσυνθετικό μέρος του μονοπατιού της ντοπαμίνης παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένο και παράλληλα το καταβολικό του μέρος παρουσιάστηκε ενισχυμένο σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης αλλά και συγκέντρωσης ντοπαμίνης ορού. Τέλος, με τη σειρά της η εξωγενής χορήγηση L-Dopa ή ντοπαμίνης σε μολυσμένα VeroE6 κύτταρα εξασθένησε σημαντικά την κυτταροπαθητική επίδραση του ιού.

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την προληπτική και θεραπευτική αξία της χορήγησης L-Dopa/ντοπαμίνης έναντι της λοίμωξης COVID-19.

ΠΑ.05

Εξέλιξη των σχέσεων δομής-λειτουργίας στις μέταλλο-β-λακταμάσες

Αναστασία Λαμπροπούλου, Βιβή Μυριαγκού, Στάθης Δ. Κωτσάκης

Εργαστήριο Βακτηριολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Εισαγωγή: Στην παρούσα εργασία το γονίδιο μέταλλο-β-λακταμάσης (ΜβΛ) του *Mycococcus xanthus* (MYX-1). Περιβαλλοντικό ένζυμο που σχετίζεται φυλογενετικά με τις κλινικές ΜβΛ NDM και VIM) επιλέχθηκε για πειράματα κατευθυνόμενης εξέλιξης ώστε να αναπαραχθούν οι ιδιότητες της NDM-1 και να αποκαλυφθούν οι επικράτειες που είναι σημαντικές για την λειτουργία των ΜβΛ.

Υλικά και Μέθοδοι: Τα γονίδια *bla_{MYX-1}* και *bla_{NDM-1}* εκφράστηκαν ισογονικά σε *E. coli*. Ο έλεγχος ευαισθησίας στα β-λακταμικά έγινε με τη μέθοδο Kirby-Bower και με προσδιορισμό των ελάχιστων συγκεντρώσεων αναστολής (MIC). Το φάσμα υποστρωμάτων προσδιορίστηκε με εκτίμηση των αρχικών ταχυτήτων υδρόλυσης β-λακταμικών μέσω φασματοφωτομετρίας υπεριώδους χρησιμοποιώντας ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Οι κινητικές σταθερές *Michaelis-Menten* της MYX-1 προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας ομοιογενή παρασκευάσματα του ενζύμου (καθαρότητα >90%. 4 στάδια υγρής χρωματογραφίας στήλης). Η κατευθυνόμενη εξέλιξη του *bla_{MYX-1}* έλαβε χώρα μέσω εισαγωγής τυχαίων μεταλλάξεων με αντιδράσεις PCR χαμηλής πιστότητας (error-prone PCR). Οι παραλλαγμένες βιβλιοθήκες εξελιγμένων ενζύμων επιλέχθηκαν σε συγκεντρώσεις β-λακταμικών \geq MIC του αντίστοιχου πατρικού κλώνου.

Αποτελέσματα: Εκφραζόμενη σε *E. coli* η MYX-1 προσέδιδε χαμηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας συγκρινόμενη με την NDM-1. Οι διαφορές στην MIC κυμαίνονταν από 4 έως >6 διαδοχικές αραιώσεις. Η MYX-1 εμφάνιζε παρόμοιο φάσμα υποστρωμάτων με αυτό της NDM-1. Οι κινητικές σταθερές έδειξαν ότι η MYX-1 είναι το ίδιο αποδοτική με την NDM-1 (δημοσιευμένα δεδομένα) όσον αφορά την υδρόλυση βενζυλπενικιλίνης και μεροπενέμης ενώ παρουσίαζε κατά 6 φορές πιο αποδοτική υδρόλυση κεφοταξίμης. Οι μεταλλάξεις που αύξαναν την ανθεκτικότητα συσσωρεύονταν κυρίως στο πεπτίδιο οδηγητή, στο αμινοτελικό άκρο της ώριμης MYX-1 και στις α1/α2 α-έλικες. Η Glu127Lys βρέθηκε ότι αυξάνει την απόδοση υδρόλυσης κεφαζιδίμης ενώ η Asp98Asn αυξάνει την υδρόλυση όλων των β-

λακταμικών πιθανώς τροποποιώντας την αλληλεπίδραση ενός από τα ιόντα Zn(II) με τα καταλυτικά αμινοξέα.

Συμπεράσματα: Η αντικατάσταση αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων στις θέσεις 98 και 127 που εντοπίζονται κοντά στη θέση πρόσδεσης ενός από τα ιόντα ψευδαργύρου αυξάνει την καταλυτική απόδοση. Η συσσώρευση μεταλλάξεων στο πεπτίδιο οδηγητή των εξελεγμένων ενζύμων έδειξε ότι πιθανώς η MYX-1 να μην μπορεί να εκκριθεί αποτελεσματικά στον περιπλασματικό χώρο του *E. coli*.

Η υποψήφια διδάκτωρ Α.Α. έλαβε υποτροφία αριστείας από το καταπίστευμα «ΝΟΣΤΟΣ».

2^η Συνεδρία: Νευροβιολογία

ΠΑ.06

Η επίδραση της μετάλλαξης p.A53T στην α-συνουκλεΐνη σε επαγόμενα αστροκύτταρα ασθενών με Πάρκινσον

Χριστίνα Πάσγου¹, Αναστάσιος Κόλλιας¹, Κωνσταντίνα Χαρμπί¹, Ολυμπία Αποκοτού², Σοφία Δέδε¹, Μαρτίνα Σαμιωτάκη³, Γιώργος Παναγιώτου³, Έρα Ταουφίκ¹, Ρεβέκκα Μάτσα¹, Φλωρεντία Παπαστεφανάκη^{1,2}

¹ Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας-Βλαστοκύτταρα, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

² Μονάδα Βλαστικών Κυττάρων και Τεχνολογίας Κυτταρικού Επαναπρογραμματισμού, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

³ Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Ερευνών «Αλ. Φλέμινγκ»

Εισαγωγή: Η νόσος Πάρκινσον (ΝΠ) επηρεάζει περίπου το 1-2% του παγκόσμιου πληθυσμού άνω των 60 ετών⁽¹⁾. Κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά της ΝΠ είναι ο προοδευτικός θάνατος των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας στον εγκέφαλο και η παρουσία πρωτεϊνικών εγκλειστών στους νευρώνες, των σωματίων Lewy (LB), που έχουν ως βασικό συστατικό την πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη (αSyn)⁽²⁾. Η καλύτερα χαρακτηρισμένη μετάλλαξη της αSyn, είναι η αυτοσωμική επικρατής G209A που οδηγεί στην έκφραση της παθολογικής πρωτεΐνης pA53T-αSyn⁽³⁾ και έχει συσχετιστεί με τη ΝΠ. Σε αντίθεση με τον καλά μελετημένο ρόλο των νευρώνων, η βιβλιογραφία για τη συμβολή των αστροκυττάρων στην παθολογία της ΝΠ είναι περιορισμένη⁽⁴⁾. Στόχος μας είναι ο προσδιορισμός της επίδρασης της έκφρασης της pA53T-αSyn στη λειτουργία των αστροκυττάρων.

Υλικά και μέθοδοι: Διαφοροποιήσαμε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSC) από Παρκινσονικούς ασθενείς, που φέρουν τη μετάλλαξη p.A53T-αSyn και υγιείς δότες, προς αστροκύτταρα. Με ανοσοφθορισμό/συνεστιακή μικροσκοπία/ανάλυση εικόνας και real time RT-PCR έγινε ο βασικός χαρακτηρισμός τους. Επιπρόσθετα, εφαρμόσαμε δοκιμασίες αυτοφαγίας και φαγοκυττάρωσης, ενώ πραγματοποιήθηκε σύγκριση υγιών και p.A53T αστροκυττάρων με πρωτεομική ανάλυση.

Αποτελέσματα: Αρχικά επιβεβαιώσαμε την επιτυχημένη διαφοροποίηση των iPSC προς ώριμα λειτουργικά αστροκύτταρα καθώς εκφράζουν μόρια χαρακτηριστικά της γενεαλογίας και είναι ικανά για απόκριση σε κυτταροκίνες και για φαγοκυττάρωση. Επιπλέον, τα p.A53T αστροκύτταρα εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα της αSyn, αυξημένου μεγέθους συσσωματώματα της παθολογικής φωσφορυλιωμένης αSyn και πρωτεϊνικά συσσωματώματα. Τα ευρήματα αυτά είναι σε κοινό πλαίσιο με τις δυσλειτουργίες που παρατηρήθηκαν στην αυτοφαγία και τη φαγοκυττάρωση στα p.A53T αστροκύτταρα και συνοδεύονται από αυξημένη απόπτωση. Σε άμεση συνάφεια, η πρωτεομική ανάλυση ανέδειξε ως άμεσα επηρεαζόμενα τα μονοπάτια της αυτοφαγίας, της ενδοκυττάρωσης και του καταβολισμού των πρωτεϊνών στη σύγκριση p.A53T και υγιών αστροκυττάρων.

Συμπεράσματα: Η παρουσία της μετάλλαξης p.A53T-αSyn στα αστροκύτταρα έχει ως συνέπεια την εμφάνιση παθολογικών φαινοτύπων που σχετίζονται με την πρωτεόσταση και τους κυτταρικούς μηχανισμούς εκκαθάρισης. Οι δυσλειτουργίες αυτές των αστροκυττάρων ενδεχομένως εμπλέκονται στην παθολογία της ΝΠ.

Το ερευνητικό έργο υποστηρίχθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «1η Προκήρυξη ερευνητικών έργων ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. για την ενίσχυση των μελών ΔΕΠ και Ερευνητών/τριών και την προμήθεια ερευνητικού εξοπλισμού μεγάλης αξίας» (Αριθμός Έργου: 1019).

Αναφορές

- [1] Pang SY, et al., “The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease.” *Transl Neurodegener.* (2019) doi: 10.1186/s40035-019-0165-9.
- [2] Goedert M, Jakes R, Spillantini MG. “The Synucleinopathies: Twenty Years On.” *J Parkinsons Dis.* (2017) doi: 10.3233/JPD-179005
- [3] Polymeropoulos MH, et al., “Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease.” *Science* (1997) doi:10.1126/science.276.5321.2045.
- [4] Brandebura AN, et al., “Astrocyte contribution to dysfunction, risk and progression in neurodegenerative disorders.” *Nat Rev Neurosci* (2023) doi: 10.1038/s41583-022-00641-1

ΠΑ.07

Διαταραγμένη ιπποκαμπική νευρογένεση ύστερα από το χημικό τραυματισμό του εγκεφάλου με χορήγηση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα Ara-C

Μ. Φουρμούζη¹, Ι. Θάνου¹, Ε. Μακαρούνη¹, Μ. Μαργαρίτη¹, Δ. Θωμαΐδου¹

¹ Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Τμήμα Νευροβιολογίας, Αθήνα, Ελλάδα

Εισαγωγή: Παρά το θεραπευτικό ρόλο των χημειοθεραπευτικών παραγόντων ενα σύνολο δευτερογενών ανεπιθύμητων επιδράσεων εμφανίζονται ύστερα από την συστηματική λήψη τους. Οι επιδρασεις αυτές ανιχνεύονται στην φυσιολογία αλλά και στην γνωσιακή λειτουργία του εγκεφάλου συμβάλλοντας στον συνδρομο που αναφέρεται ως **"Χημειο-Εγκέφαλος" (ChemoBrain)**. Υπάρχουσες μελέτες έχουν αναδείξει την σημαντική μείωση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των νευρικών βλαστικών κυττάρων (NBK) με πιθανή συμμετοχή στην απώλεια μνήμης ύστερα από την χορήγηση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Έτσι, σκοπός της μελέτης μας είναι να διερευνήσουμε εις βάθος την απόκριση της νευρογενετικής φωλέας του ενήλικου ιπποκάμπου παρουσία αντιμιτωτικών παραγόντων.

Υλικά – Μέθοδοι: Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήσαμε ένα πρωτόκολλο επαναλαμβανόμενων στερεοταξικών εγχύσεων του μιτοτοξικού παράγοντα κυτοσίνη αραβινοσίδη (Ara-C), που σκοτώνει τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα NBK, στις κοιλίες του εγκεφάλου. Αφού τα ζώα θυσιάστηκαν 4, 15 μέρες και 6 εβδομάδες αργότερα, ακολούθησαν ανοσοϊστοχημεία και real-time PCR για ποικίλους δείκτες προκειμένου να μελετηθούν οι διαφορετικοί πληθυσμοί της φωλέας.

Αποτελέσματα: Μέχρι στιγμής τα ευρήματα από πειράματα ανοσοϊστοχημείας μας δείχνουν ότι η χορήγηση του Ara-C οδήγησε σε σημαντική μείωση των πληθυσμών των NBK (SOX2+), των ενδιάμεσων προγονικών (TBR2+) καθώς και των νευροβλαστικών/ανώριμων νευρικών κυττάρων (DCX+) σε διάστημα 15 ημερών. Προς έκπληξη μας, ύστερα από 6 εβδομάδες ο πληθυσμός των DCX+ κυττάρων ήταν σημαντικά αυξημένος ξεπερνώντας τον αντίστοιχο πληθυσμό στα control ζώα, μάλιστα παρατηρήθηκαν DCX+ κύτταρα ασυνήθιστα βαθύτερα τοποθετημένα στην κοκκιώδη στιβάδα του ιπποκάμπου προς την πλευρά της μοριακής στιβάδας. Τέλος, οι ανάλυσεις του αριθμού των αποφυάδων και του μήκους τους αποκάλυψε σημαντική μείωση της πολυπλοκότητας της δενδριτικής μορφολογίας τους υποδηλώνοντας διατάραξη της διαδικασίας ωρίμανσης. Το φαινόμενο αυτό ήταν ορατό ήδη από τις 4 μέρες και παρέμεινε έως και την 6 εβδομάδα.

Συμπεράσματα: Η παρουσία του Ara-C οδηγεί σε δυναμικές αλλαγές των πληθυσμών της νευρωνικής γενεαλογίας της οδοντωτής έλικας του ιπποκάμπου. Οι μελλοντικές μελέτες μας στοχεύουν στην αποσαφήνιση των αιτιών της ατελούς ωρίμανσης τους καθώς και την δυνατότητα ενσωμάτωσής τους στο σύστημα.

ΠΑ.08

Στατιστική ανάλυση δύο συνόλων πρωτεομικών δεδομένων που σχετίζονται με τη νόσο του Πάρκινσον – κοινά σημεία και διαφορές

Κ. Χαρμπί¹, Χ. Πάσχου¹, Ε. Ακριώτη¹, Α. Κόλλιας¹, Ο. Αποκότου², Π. Χανδρής¹, Μ. Σαμιωτάκη³, Γ. Παναγιώτου³, Φ. Παπαστεφανάκη^{1,2}, Ε. Ταουφίκ¹, και Ρ. Μάτσα¹

¹ Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

² Μονάδα Βλαστικών Κυττάρων και Τεχνολογίας Κυτταρικού Επαναπρογραμματισμού, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

³ Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Ερευνών «Αλ. Φλέμινγκ»

Εισαγωγή: Σε αυτή τη μελέτη εξετάζουμε δύο σύνολα πρωτεομικών δεδομένων σχετιζόμενων με τη νόσο του Πάρκινσον: ένα από συναπτοσώματα τριών περιοχών του εγκεφάλου ποντικών με και χωρίς Πάρκινσον, και ένα από επαγόμενα ανθρώπινα αστροκύτταρα υγιών και με Πάρκινσον δοτών, με θεραπεία φλεγμονής και χωρίς. Παρουσιάζουμε τη στατιστική τους ανάλυση- με στόχο τον εντοπισμό πρωτεϊνών και υποδικτύων απορυθμιζόμενων στο Πάρκινσον- και συζητάμε ομοιότητες και διαφορές.

Υλικά – Μέθοδοι: Στην προεπεξεργασία των αστροκυττάρων, εφαρμόστηκε λογαριθμικός μετασχηματισμός ακολουθούμενος από κανονικοποίηση ποσοστημορίων. Στη συνέχεια, χρειάστηκε batch correction και διόρθωση κυτταρικού κύκλου. Για να αναγνωρίσουμε πρωτεΐνες σχετιζόμενες με το Πάρκινσον, εφαρμόσαμε ένα μικτό μοντέλο ANOVA ακολουθούμενο από ανάλυση εμπλουτισμού γονδιακής οντολογίας (GO) για τις επηρεαζόμενες διεργασίες, ενώ το STRING δίκτυο χρησιμοποιήθηκε για τις απορυθμισμένες περιοχές δικτύου. Στα ποντίκια, εφαρμόστηκε λογαριθμικός μετασχηματισμός και κανονικοποίηση ποσοστημορίων. Τα δεδομένα ακολούθως περιορίστηκαν στις συναπτικές πρωτεΐνες που λήφθηκαν από τη βάση δεδομένων SynGO. Χρησιμοποιήσαμε ένα t-test ανά περιοχή εγκεφάλου για τις πρωτεΐνες σχετιζόμενες με το Πάρκινσον, εμπλουτισμό GO για τις επηρεαζόμενες διεργασίες και το STRING δίκτυο για τις απορυθμισμένες περιοχές δικτύου.

Αποτελέσματα: Μερικά από τα βήματα προεπεξεργασίας ήταν κοινά στα σύνολα δεδομένων. Ωστόσο, τα batch effects και η τεράστια επίδραση του κυτταρικού κύκλου παρούσα στα αστροκύτταρα κατέστησαν απαραίτητη την πρόσθετη προεπεξεργασία εκεί. Από την άλλη πλευρά, τα δεδομένα στο ποντίκι μειώθηκαν για λόγους πιθανής μόλυνσης. Όσον αφορά τις κύριες αναλύσεις, ο εμπλουτισμός GO και οι αναλύσεις δικτύου STRING ήταν κοινές, ενώ διαφορετικά μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν στη διαφορική ανάλυση έκφρασης: μια απλούστερη προσέγγιση στα ποντίκια και μια πιο περίπλοκη- αλλά πιο δύσκολη στην ερμηνεία- προσέγγιση στα αστροκύτταρα όπου λιγότερη βιολογική πληροφορία ήταν διαθέσιμη και επομένως χρειαζόταν περισσότερη στατιστική ισχύς.

Συμπέρασμα: Έχουμε δείξει ξεκάθαρα τις διαφορετικές προσαρμογές στη βασική πρωτεομική ανάλυση που χρειάζονται με βάση το σχεδιασμό της μελέτης και τις πειραματικές συνθήκες του υπό εξέταση συνόλου δεδομένων.

Το ερευνητικό έργο υποστηρίχθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «1η Προκήρυξη ερευνητικών έργων ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. για την ενίσχυση των μελών ΔΕΠ και Ερευνητών/τριών και την προμήθεια ερευνητικού εξοπλισμού μεγάλης αξίας» (Αριθμός Έργου: 1019).

ΠΑ.09

Η κινάση Mirk/Dyrk1B ελέγχει την ανάπτυξη του κοιλιακού νωτιαίου μυελού μέσω της σηματοδοτικής οδού Sonic Hedgehog

Κοκκοράκης Ν.¹, Δούκα Κ¹., Πολίτης ΠΚ.², Ζαγοραίου Λ.², Μάτσα Ρ.¹, Γαϊτάνου Μ.¹

1. Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας-Βλαστοκύτταρα,
Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

2. Κέντρο Βασικών Ερευνών, Ίδρυμα Βιοϊατρικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

Εισαγωγή

Η αλληλεπίδραση μεταξύ της κινάσης Mirk/Dyrk1B και της οδού Sonic hedgehog (Shh)/Gli επηρεάζει τη φυσιολογία και την παθολογία. Εδώ, αποκαλύπτουμε έναν νέο ρόλο για τη Dyrk1B στη ρύθμιση των κοιλιακών προγονικών υποτύπων και νευρώνων στον εμβρυϊκό νωτιαίο μυελό του κοτόπουλου μέσω της οδού Shh.

Μέθοδοι

Προσεγγίσεις κέρδους-και-απώλειας-λειτουργίας στον νευρικό σωλήνα E2 κοτόπουλου και πειράματα φαινοτύπου μηχανιστικής διάσωσης με χρήση μονόπλευρης ηλεκτροδιάτρησης σε ωάριο και επακόλουθη ανάλυση με WB, IHC, ανάλυση qPCR σε πραγματικό χρόνο στο νωτιαίο μυελό κοτόπουλου E4 και E6.

Αποτελέσματα

Χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις κέρδους και απώλειας λειτουργίας ωαρίων στον νευρικό σωλήνα E2 του κοτόπουλου, βρήκαμε ότι η Dyrk1B επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των νευρωνικών προγόνων στο E4 και επηρεάζει την απόπτωση ειδικά στον τομέα των κινητικών νευρώνων (KN). Ειδικά, η υπερέκφραση της Dyrk1B μειώνει τον αριθμό των κοιλιακών προγόνων, των KN και των ενδιάμεσων νευρώνων V2a, ενώ η φαρμακολογική αναστολή της δραστηριότητας της ενδογενούς κινάσης Dyrk1B με τη χορήγηση AZ191 αυξάνει τον αριθμό των κοιλιακών προγόνων και των KN. Μηχανιστικά, η υπερέκφραση της Dyrk1B καταστέλλει τα επίπεδα των Shh και Gli3 mRNA, ενώ αντίθετα, η μεταγραφή Shh και Gli3 αυξάνεται παρουσία του αναστολέα της Dyrk1B, AZ191 ή του Smoothened αγωνιστή SAG. Σημειωτέον στα πειράματα διάσωσης φαινοτύπου, το SAG αποκαθιστά τη διαμεσολαβούμενη από την Dyrk1B απορρύθμιση των κοιλιακών προγόνων. Επιπλέον στο E6, η Dyrk1B επηρεάζει επιλεκτικά τη στήλη του έσω πλευρικού κινητικού νευρώνα (LMCm), σύμφωνα με την έκφραση του Shh σε αυτήν την περιοχή.

Συμπεράσματα

Συλλογικά, αυτές οι παρατηρήσεις αποκαλύπτουν μια νέα ρυθμιστική λειτουργία της κινάσης Dyrk1B στην καταστολή της οδού Shh/Gli και επομένως επηρεάζοντας τους κοιλιακούς υποτύπους στον αναπτυσσόμενο νωτιαίο μυελό. Αυτά τα δεδομένα καθιστούν το Dyrk1B έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο για ασθένειες των κινητικών νευρώνων.

ΠΑ.10

Η τροποποίηση των παραγόντων του συμπλόκου σελτερίνης TRF1 και TRF2 αμβλύνει την σχετιζόμενη με την κυτταρική γήρανση φθορά των τελομερών και ενισχύει τη γονιδιωματική σταθερότητα

Μαριάννα Καπετάνου¹, Ευστάθιος Γκόνος¹

1: Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Εισαγωγή: Η κυτταρική γήρανση χαρακτηρίζεται από μη αναστρέψιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και λειτουργική έκπτωση. Η προστασία των τελομερών από την απόκριση στις βλάβες του DNA είναι απαραίτητη για τη διατήρησή τους και την αποφυγή της εισόδου στην κυτταρική γήρανση. Η προοδευτική βράχυνση του DNA των τελομερών στα διαιρούμενα σωματικά κύτταρα, οδηγεί σε εξαιρετικά κοντά τελομερή που πυροδοτούν την αναδιπλασιαστική γήρανση και κατά συνέπεια συμβάλλουν στη γήρανση του οργανισμού. Σε αρκετούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών, τα τελομερή προστατεύονται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που ονομάζεται Σελτερίνη, το οποίο προστατεύει τα άκρα των χρωμοσωμάτων μέσω των ειδικευμένων λειτουργιών κάθε υπομονάδας του.

Υλικά και μέθοδοι: Για τους σκοπούς της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινοι εμβρυικοί ινοβλάστες HFL-1.

Αποτελέσματα: Η μελέτη μας αποκαλύπτει ότι τα πυρηνικά επίπεδα πρωτεΐνης των συστατικών της Σελτερίνης TRF1 και TRF2 μειώνονται στους γηρασμένους ινοβλάστες. Παράλληλα, ταυτοποιούμε ένα φυσικό μονοτερπένιο που ενισχύει αποτελεσματικά τα επίπεδα των TRF1 και TRF2, διασώζοντας τη σχετιζόμενη με τη γήρανση ελάττωση αυτών των κρίσιμων πρωτεϊνών. Αυτό ενισχύει την προστασία του DNA από οξειδωτικές βλάβες, ιδιαίτερα στις τελομερικές περιοχές, διατηρώντας έτσι το μήκος των τελομερών και καθυστερώντας την κυτταρική γήρανση.

Συμπεράσματα: Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την κατανόησή μας για τα μοριακά μονοπάτια που εμπλέκονται στη σχετιζόμενη με τη γήρανση δυσλειτουργία των τελομερών και υπογραμμίζουν τη δυνατότητα των φυσικών ενώσεων να δράσουν ως θεραπευτικές παρεμβάσεις για την προαγωγή της υγιούς γήρανσης και την καταπολέμηση των ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία.

4^η Συνεδρία: Ανοσολογία – Δομική Βιολογία

ΠΑ.11

Εύρεση θέσεων πρόσδεσης αλλοστερικών τροποποιήτων στον hACE2, με στόχο την ανάπτυξη ενεργοποιητών - υποψήφιων φαρμακευτικών ενώσεων

Κουμπρένκο Ολέξι¹, Πέτρος Γκιάστας^{1,2}, Μάριος Ζουριδάκης²

¹Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Γενετικής

Ιερά Οδός 75, TK 11855, Αθήνα

²ΕΠΠ, Εργαστήριο Μοριακής Νευροβιολογίας και Ανοσολογίας, Ομάδα Δομικής Νευροβιολογίας

Εισαγωγή: Το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2) είναι ενζυμικός υποδοχέας με δράση καρβοξυπεπτιδάσης που λειτουργεί ως μέλος του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης (RAAS), συμμετέχοντας στη ρύθμιση της ροής του αίματος στους ιστούς. Σε ένα απλοποιημένο γραμμικό μονοπάτι της λειτουργίας του RAAS, η πρόδρομη πρωτεΐνη αγγειοτενσινογόνο, η οποία μέσω του ενζύμου ρενίνη (ασπαρτική πρωτεάση) υδρολύεται στο δεκαπεπτίδιο αγγειοτενσίνη I (Ang I) και εν συνεχεία μέσω του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE) στο αγγειοσυσταλτικό οκταπεπτίδιο αγγειοτενσίνη II (Ang II), το οποίο τελικά μέσω του ACE2 υδρολύεται στο αγγειοδιασταλτικό επταπεπτίδιο αγγειοτενσίνη 1-7 (Ang 1-7). Ο ACE2 στον οργανισμό υπάρχει σε δυο μορφές - ανοιχτή (ελεύθερο) και κλειστή (ενεργή, συνδεδεμένο με το υπόστρωμα).

Το αντικείμενο της μελέτης είναι η εύρεση εκλεκτικών αλλοστερικών ενεργοποιητών του ACE2 – υποψήφιων φαρμακευτικών ενώσεων για την ρύθμιση της πίεσης σε υπερτασικούς ασθενείς.

Αμέσως γίνεται σαφές ότι ο ενεργοποιητής δεν πρέπει να βρίσκεται στο ενεργό κέντρο ή κοντά σε αυτό, ώστε να μην παρεμποδίζει την πρόσβαση του φυσικού υποστρώματος.

Υλικά και μέθοδοι: Η εξωκυττάρια (καταλυτική) περιοχή του ACE2 εκφράστηκε σε κύτταρα ζυμομύκητα *P. pastoris*, καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας (6xHis tag), πραγματοποιήθηκε απογλυκοζυλίωση και εν συνέχεια χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Προκειμένου να εξεταστούν οι κοιλότητες που σχηματίζονται αναμεσα στις δυο υποπεριοχές του ενεργού ενζύμου πραγματοποιήθηκε συγκρυστάλλωση με μη υδρολύσιμα φωσφινικά ψευδοτριπεπτίδια - ανάλογα μεταβατικής κατάστασης, ώστε το ένζυμο να μείνει στην κλειστή διαμόρφωση (proof of concept). Έπειτα από ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, έγινε επιτυχής συγκρυστάλλωση του ACE2 με φωσφινικό ανάλογο του φυσικού υποστρώματος (pAng II), ώστε να βρεθούν προσδέτες στο κλειστό ένζυμο από σάρωση βιβλιοθηκών ενώσεων (fragment screening).

Αποτελέσματα: Από επίλυση του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας, λήφθηκε δομή του ACE2 με εγκλωβισμένο φωσφινικό ψευδοτριπεπτίδιο σε ανάλυση 2.4 Å. Σημειωτέο πως είναι η δεύτερη δομή του ACE2 σε κλειστή διαμόρφωση, στην PDB. Η δομή με την pAngII είναι υπό επεξεργασία.

Συμπεράσματα: Η προσέγγιση που εφαρμόστηκε στα πλαίσια της μελέτης έδωσε την δυνατότητα προσδιορισμού κοιλότητων πρόσδεσης αλλοστερικών τροποποιητών, χρήσιμη για την αποσαφήνιση της λειτουργίας του ενζύμου και εφαρμογές στην εύρεση ενεργοποιητών.

ΠΑ.12

Φυσικά Αντισώματα έναντι του LPS σε Υπεζωκοτικές συλλογές ποικίλης αιτιολογίας

Ιωάννης Σαρρηγεωργίου¹, Ερασμία Ρούκα², Ουρανία Κόττσιου², Γαρυφαλλιά Περλεπέ³, Ευφροσύνη Γεροβασιλείου⁴, Κωνσταντίνος Γουργουλιάνης³, Σωτήριος Ζαρογιάννης⁴, Πηγή Λυμπέρη¹

¹Εργαστήριο Ανοσολογίας, Τμήμα Ανοσολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα

²Τμήμα Νοσηλευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

³Τομέας Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

⁴Τομέας Βασικών και Εφαρμοσμένων Βιοϊατρικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Εισαγωγή: Η συσσώρευση πλευρικού υγρού στην πλευρική κοιλότητα με τη δημιουργία υπεζωκοτικής συλλογής (ΥΣ) εκδηλώνεται σε διάφορες κλινικές καταστάσεις, όπως στην καρδιακή ανεπάρκεια, στον καρκίνο και στη λοίμωξη. Η κατανόηση της παθοφυσιολογίας της πλευρικής φλεγμονής θα μπορούσε να βοηθήσει περαιτέρω στην ανάπτυξη νέων θεραπειών για τις πλευρικές παθήσεις. Τα φυσικά αντισώματα (ΦΑ) ανευρίσκονται στην κυκλοφορία και σε εκκρίσεις σε κοιλότητες, όπως η πλευρική, με καθοριστικό ανοσορρυθμιστικό ρόλο. Τα ΦΑ εμφανίζουν πολυδραστικότητα και είναι ικανά να αναγνωρίζουν εξελικτικά συντηρημένους επίτοπους στις επιφάνειες των παθογόνων, λειτουργώντας ως πρώτη γραμμή άμυνας. Μέχρι σήμερα, η παρουσία και ο ρόλος των ΦΑ στην παθοφυσιολογία των ΥΣ είναι άγνωστος.

Στόχος: Γνωρίζοντας πως ο λιποσακχαρίτης (LPS), βασικό συστατικό της επιφάνειας των gram αρνητικών βακτηρίων, αποτελεί μια εξελικτικά συντηρημένη δομή και στόχο των ΦΑ, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ορολογική διερεύνηση ΦΑ τάξης M, A και G, έναντι του LPS τόσο στο πλευρικό υγρό όσο και στον ορό ασθενών με καλοήθειες και κακοήθειες ΥΣ, με απώτερο σκοπό την πιθανή χρήση τους ως δεικτών.

Υλικά και μέθοδοι: Πλευρικό υγρό και ορός από 78 ασθενείς με ΥΣ (49 καλοήθειες και 29 κακοήθειες) με πλήρη δημογραφικά στοιχεία (φύλο, ηλικία, κάπνισμα) και βιοχημικά δεδομένα (μέγεθος ΥΣ, pH, γλυκόζη, συνολική πρωτεΐνη, αλβουμίνη, LDH και απαμινάση της αδενοσίνης) μελετήθηκαν σε ζεύγη για να αξιολογηθούν τα επίπεδα των ΦΑ έναντι του LPS (*E. Coli* 055:B5) των τάξεων M, A και G, και σε σύγκριση με τις ολικές ανοσοσφαιρίνες για κάθε τάξη. Οι μετρήσεις για τα αντι-LPS αντισώματα πραγματοποιήθηκαν παράλληλα στην ίδια αραιώση (για την κάθε τάξη) με έμμεση ELISA και ο λόγος της οπτικής πυκνότητας «πλευρικό υγρό/ορός» υπολογίστηκε για κάθε περίπτωση. Παράλληλα, με sandwich ELISA μετρήθηκαν τα επίπεδα των ολικών M, A και G στα αντίστοιχα βιολογικά υγρά με βάση κατάλληλες πρότυπες καμπύλες. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν σε πολυπαραγοντικά στατιστικά μοντέλα μαζί με άλλες κρίσιμες βιοχημικές παραμέτρους από τις βιοψίες.

Αποτελέσματα: ΦΑ έναντι του LPS ανιχνεύθηκαν σε όλα τα πλευρικά υγρά και τους ορούς των ασθενών. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στον λόγο «πλευρικό υγρό/ορός» όσον αφορά τις IgM και IgA αντι-LPS στις καλοήθειες σε σύγκριση με τις κακοήθειες ΥΣ, ενώ αυτό δεν παρατηρήθηκε για την ολική συγκέντρωση των IgM και IgA στις αντίστοιχες περιπτώσεις. Η πολυπαραμετρική γραμμική παλινδρόμηση επιβεβαίωσε την αρνητική συσχέτιση μεταξύ των κακοήθων ΥΣ και των επιπέδων IgM και IgA ΦΑ αντι-LPS, ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες παραμέτρους που αναλύθηκαν.

Συμπέρασμα: Η σημαντική αύξηση των επιπέδων των IgM και IgA αντι-LPS στις καλοήθειες σε σύγκριση με τις κακοήθειες ΥΣ, επιβεβαιώθηκε από πολυπαραμετρικά στατιστικά μοντέλα. Αυτή η αύξηση αποδίδεται στην αντισωματική δράση των ΦΑ

έναντι του LPS, αφού δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα των ολικών IgM και IgA. Ο ρόλος των φυσικών αντι-LPS αντισωμάτων στην πλευρική κοιλότητα θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω προκειμένου να αξιοποιηθούν ως δυνητικοί δείκτες στην διαχείριση των ασθενών με ΥΣ.

ΠΑ.13

Ανοσοπροφίλ του ΚΝΣ: Συγκριτική μελέτη του περιφερικού αίματος και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση

Βασίλειος Γουζούασης^{1,2}, Σπύρος Τατσσόγλου^{3,4}, Λίλα Δημητρακοπούλου⁵, Αναστασία Δαγκωνάκη¹, Μαρία Ελευθερία Ευαγγελοπούλου⁶, Μαρία Αναγνωστούλη⁶, Νίκος Μάρκογλου⁶, Δημήτρης Καραθανάσης⁶, Ελένη Τσουκαλά¹, Κωνσταντίνος Καμπάς¹, Αντώνης Γιαννακάκης², Λέσλυ Πρόμπερτ¹

1 Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα.

2 Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη, Ελλάδα.

3 DIANA-Lab, Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 35131 Λαμία, Ελλάδα.

4 DIANA-Lab, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, 11521 Αθήνα, Ελλάδα

5 Τμήμα Ανοσολογίας, Λαϊκό Νοσοκομείο, Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα.

6 Τμήμα Νευρολογίας, Αιγινήτειο Νοσοκομείο, Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα.

Σκοπός: Η παρούσα συγκριτική μελέτη διερευνά το ανοσοπροφίλ περιφερικού αίματος (ΠΑ) και εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ) με σκοπό την πρόωμη πρόγνωση της πολλαπλής σκλήρυνσης (ΠΣ).

Υλικά και μέθοδοι: Δείγματα ΠΑ και ΕΝΥ συλλέχθηκαν από 38 ασθενείς που παρουσίασαν ένα νευρολογικό κλινικό επεισόδιο. Συγκεκριμένα, συλλέχθηκαν δείγματα από ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα ΠΣ (ΥΔΠΣ, n=27), κλινικά μεμονωμένο σύνδρομο (ΚΜΣ, n=5), πρωτοπαθώς προϊούσα ΠΣ (ΠΠΠΣ, n=5) και από μη φλεγμονώδη κοντρόλ (ΜΦΚ, n=7). Τα δείγματα ΠΑ και ΕΝΥ συλλέχθηκαν σε σωληνάρια Transfix και βιάφτηκαν με τα εξής αντισώματα: CD45, CD66b, CD14, CD19, CD56, CD3, CD4 και CD8. Η κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε σε κυτταρόμετρο ροής FACS Canto II εντός τριών ημερών.

Αποτελέσματα: Ο πληθυσμός των CD3+/CD4+ T λεμφοκυττάρων βρέθηκε σημαντικά αυξημένος στο ΕΝΥ σε σύγκριση με το ΠΑ (1,39-φορές αύξηση) στους ασθενείς με ΠΣ, ΚΜΣ και ΜΦΚ. Οι ασθενείς με ΥΔΠΣ/ΚΜΣ παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό μονοκυττάρων στο ΠΑ σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΠΠΠΣ (1,19-φορές αύξηση). Ο λόγος ουδετερόφιλων προς λεμφοκύτταρα βρέθηκε υψηλότερος στο ΠΑ των ασθενών με υποτροπή σε σύγκριση με τους ασυμπτωματικούς ασθενείς (1,71-φορές αύξηση). Επιπλέον, οι ασθενείς στο πρώτο κλινικό επεισόδιο εμφάνισαν υψηλότερο λόγο ανώριμων-ρυθμιστικών CD56^{bright}/CD56^{dim} κυτταροτοξικών NK κυττάρων σε σύγκριση με τους ασυμπτωματικούς και τους ασθενείς με υποτροπή. Τέλος, ο λόγος CD56^{bright}/CD56^{dim} ήταν υψηλότερος στο ΕΝΥ σε σύγκριση με το ΠΑ σε όλους τους ασθενείς με ΠΣ (5,95-φορές αύξηση).

Συμπεράσματα: Η συγκριτική ανάλυση του ανοσοπροφίλ μεταξύ ΠΑ και ΕΝΥ ανέδειξε διαφορές στο ποσοστό των μονοκυττάρων μεταξύ ΥΔΠΣ/ΚΜΣ και ΠΠΠΣ. Ο λόγος ουδετερόφιλων προς λεμφοκύτταρα και CD56^{bright}/CD56^{dim} NK κυττάρων αποδείχθηκαν σημαντικοί για τη διάκριση ανάμεσα στα διάφορα στάδια της νόσου (ασυμπτωματικοί, πρώτο κλινικό επεισόδιο, υποτροπή και προοδευτική ΠΣ). Αξίζει να

σημειωθεί ότι τα ανώριμα-ρυθμιστικά NK κύτταρα (CD56^{bright}) βρέθηκαν εμπλουτισμένα στο ENY σε σχέση με τα κυτταροτοξικά (CD56^{dim}). Τα παραπάνω αποτελέσματα υπογραμμίζουν τη συμβολή του ανοσοπροφίλ στην έγκαιρη πρόγνωση και την προσαρμογή της θεραπείας σε ασθενείς με ΠΣ.

ΠΑ.14

Ετερόλογη έκφραση της τυροσινάσης του *Agaricus bisporus* σε *E. coli*, διερεύνηση της καταλληλότητας του συστήματος έκφρασης

Πολίτη Μαρία Ευγενία^{1,2}, Κουμπρένκο Ολέξι^{1,2}, Ζουριδάκης Μάριος¹, Γκιάστας Πέτρος^{1,2}

¹ Εργαστήριο Μοριακής Νευροβιολογίας και Ανοσολογίας, Ομάδα Δομικής Νευροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

² Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Γενετικής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

* Ανταπόκριση στα e-mails epoliti@aua.gr και e.politi@pasteur.gr

Εισαγωγή: Η μελανίνη είναι μία χρωστική η οποία συναντάται σε οργανισμούς από όλα τα βασίλεια. Ο ρόλος της είναι η προστασία του γενετικού υλικού από ζημιογόνους παράγοντες, με κύριο αυτών την υπεριώδη ακτινοβολία. Επίσης, είναι το κύριο υπαίτιο μόριο για τη χρώση της επιδερμίδας, των τριχών και των οφθαλμών των θηλαστικών, συνεπώς και του ανθρώπου [1]. Η μελανίνη βιοσυντίθεται από το μονοπάτι που ονομάζεται μελανινوسύνθεση. Το τελευταίο βασίζεται στη λειτουργία του ενζύμου τυροσινάση, το οποίο καταλύει το πρώτο βήμα στο μεταβολικό μονοπάτι [2]. Η βιβλιογραφία που υπάρχει μέχρι σήμερα βασίζεται κατά κύριο λόγο στη μελέτη της τυροσινάσης από το μύκητα *Agaricus bisporus* (AbTYR), που, λόγω της εμπορικής διαθεσιμότητάς της, έχει καθιερωθεί ως «μοντέλο» για τη μελέτη των τυροσινάσεων, ακόμη και για μελέτες που αφορούν την ανθρώπινη, με την οποία εμφανίζει ομολογία 23.85%. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι να γίνει ετερόλογη έκφραση της AbTYR, με σκοπό την απόκτηση υψηλής καθαρότητας ενζύμου, κατάλληλου για αναλύσεις ενζυμικής κινητικής και για δομικές μελέτες.

Υλικά και μέθοδοι: Για την επίτευξη των παραπάνω, ήταν απαραίτητο να σχεδιαστεί μία μοριακή κατασκευή η οποία περιείχε το γονίδιο που κωδικοποιεί την AbTYR, η οποία κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδιο pGEX-6P. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό BL21DE3 *E. coli* κυττάρων, στα οποία έγινε η επαγωγή της ετερόλογης έκφρασης της πρωτεΐνης. Από την βακτηριακή καλλιέργεια, έγινε ανάλυση, τόσο του διαλυτού, κυτταροπλασματικού, πρωτεϊνικού περιεχομένου, όσο και των σωματίων εγκλεισμού για τον εντοπισμό, την απομόνωση και τον καθαρισμό της ετερόλογης AbTYR. Επιπλέον, έγινε μελέτη της επίδρασης της συνέκφρασης διάφορων μοριακών συνοδών στα επίπεδα έκφρασης της τυροσινάσης στο κυτταροπλασματικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο.

Αποτελέσματα-Συζήτηση: Παρόλες τις προσπάθειες για την απόκτηση διαλυτής πρωτεΐνης, η AbTYR φάνηκε ότι εντοπίζεται κυρίως στα σωματίνα εγκλεισμού, ακόμη και παρουσία διάφορων συνδυασμών μοριακών συνοδών. Δεδομένης αυτής της παρατήρησης, έγινε δοκιμή πρωτοκόλλου *in vitro* αναδίπλωσης της πρωτεΐνης από τα σωματίνα εγκλεισμού. Το πρωτόκολλο αυτό είχε ως αποτέλεσμα την αποκόμιση υψηλής απόδοσης παραγωγής και σχετικά υψηλής καθαρότητας AbTYR. Η απομονωμένη, πλέον, πρωτεΐνη παρόλο που φάνηκε να έχει αναδιπλωθεί επιτυχώς, δεν έφερε ενζυμική δραστηριότητα. Συνεπώς, θα πρέπει να γίνει περαιτέρω μελέτη της μεθόδου,

ώστε να διαπιστωθεί εάν το πρωτόκολλο χρήζει τροποποιήσεων ή εάν το συγκεκριμένο σύστημα έκφρασης δυσχεραίνει την ορθή αναδίπλωση της AbTYR.

Αναφορές

- [1] Sánchez-Ferrer, Á.; Neptuno Rodríguez-López, J.; García-Cánovas, F.; García-Carmona, F. Tyrosinase: A Comprehensive Review of Its Mechanism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1995**, *1247*, 1–11, doi:10.1016/0167-4838(94)00204-T.
- [2] Ito, S.; Wakamatsu, K. Chemistry of Mixed Melanogenesis—Pivotal Roles of Dopaquinone. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84*, 582–592, doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00238.x.

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

ΑΑ.01

Μελέτη της χρήσης εκχυλίσματος του φυτού *artemisia arborescens* ως ανοσοενισχυτικό στη φυσιολογία και την ανοσολογική απόκριση εκτρεφόμενης τσιπούρας (*sparus aurata*)

Οδυσσέας Π. Τζωρτζάτος¹, Δήμητρα Κ. Τουμπανάκη¹, Παρασκευή Ζησιμοπούλου², Ιωάννης Κοτζαμάνης³, Μάρκος Κολύγας⁴, Φωτεινή Αθανασοπούλου⁴, Βασίλειος Μπακόπουλος⁵, Αχιλλέας Χατζόπουλος⁶, Ευδοκία Καραγκούνη^{1*}

¹ Τμήμα Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα; ² Τμήμα Νευροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα; ³ Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιέργειας, Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ), Αθήνα, Ελλάδα; ⁴ Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Κτηνιατρικής, Ιχθυολογίας & Υδατοκαλλιέργειας, Καρδίτσα, Ελλάδα; ⁵ Τμήμα Θαλάσσιων Επιστημών, Σχολή Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη, Ελλάδα; ⁶ Σκάλωμα Α.Ε., Νέα Σελεύκεια, Ηγουμενίτσα, Ελλάδα.

*Συγγραφέας επικοινωνίας: ekaragouni@pasteur.gr

Εισαγωγή: Οι μολυσματικές ασθένειες των ιχθύων αποτελούν έναν από τους κύριους περιοριστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας. Η χρήση φυσικών βοτάνων έχει μεγάλο ενδιαφέρον για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος των ιχθύων, την προστασία από παθογόνα, την αύξηση της όρεξης και την μείωση του στρες. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης συμπληρωμάτων διατροφής *Artemisia arborescens* στις φυσιολογικές και ανοσολογικές αποκρίσεις της τσιπούρας (*Sparus aurata*) τόσο σε πειραματικές δοκιμές όσο και σε δοκιμές σίτισης στο πεδίο.

Υλικά και Μέθοδοι: Μελετήθηκαν δύο πειραματικές εκτροφές που περιείχαν διαφορετικές ποσότητες εκχυλίσματος αιθέριου ελαίου *Artemisia arborescens* (ΑΑ) (0,25ΑΑ και 0,50ΑΑ). Δείγματα βλέννας και ορού απομονώθηκαν για την αξιολόγηση δεικτών έμφυτης ανοσίας, οξειδωτικού στρες και μεταβολισμού. Επιπλέον, σε δείγματα ιστών σπλήνα προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων SOD1, GPx1, IL-10, TGFb1, IL-1b, TNFα, hepcidin και GRP75, με χρήση μοριακών τεχνικών.

Αποτελέσματα : Οι σωματομετρικοί δείκτες των ιχθύων παρέμειναν σταθεροί στις πειραματικές ομάδες συγκρινόμενοι με την ομάδα ελέγχου, με εξαίρεση τον σπληνοσωματομετρικό δείκτη που παρουσίασε σημαντική μείωση. Οι ολικές πρωτεΐνες στον ορό και τη βλέννα ήταν σημαντικά χαμηλότερες στις πειραματικές εκτροφές. Οι δείκτες έμφυτης ανοσίας που εξετάστηκαν δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά μεταξύ των πειραματικών εκτροφών. Διαφορές εντοπίστηκαν στα επίπεδα των νιτρικών ιόντων τα οποία ήταν σημαντικά χαμηλότερα στις πειραματικές εκτροφές. Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στη λυσοζύμη της ομάδας 0,25ΑΑ, και αύξηση της λυσοζύμης και των πρωτεασών της ομάδας 0,50ΑΑ στην βλέννα. Η υψηλότερη συγκέντρωση *Artemisia* φαίνεται να αυξάνει ελαφρά την έκφραση των εξεταζόμενων γονιδίων. Η διατροφή με 0,25ΑΑ, ελέγχθηκε σε εκτροφές πεδίου, όπου δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις παραμέτρους που μελετήθηκαν.

Συμπεράσματα: Η προσθήκη της *A. Arborescens* στην διατροφή των ιχθύων προκαλεί ήπια ανοσολογική απόκριση στην τσιπούρα. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η *A. arborescens* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαιτητικό πρόσθετο αφού φαίνεται να έχει δυνατότητες δράσης ως φυσικό ανοσοδιεγερτικό.

Η εργασία αυτή χρηματοδοτήθηκε από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία 2014-2020», MIS 5055881.

ΑΑ.02

Επιπτώσεις της αντικατάστασης ιχθυαλεύρων από εντομοάλευρα του *Hermetia Illucens* σε κυτταρικές, γονιδιακές και ανοσομεταβολικές διεργασίες του Ευρωπαϊκού λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*)

Ολυμπία Τζιουβάρα¹, Μαρία Αγάλλου¹, Οδυσσέας Π. Τζωρτζάτος¹, Σ. Ρούσσος², Δήμητρα Κ. Τουμπανάκη¹, Γιάννης Κοτζαμάνης², Ευδοκία Καραγκούνη¹

¹ Ομάδα Ανοσολογίας Λοιμώξεων, Τμήμα μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα

² Εργαστήριο Διατροφής και Ωμικών Τεχνολογιών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογία και Ιχθυοκαλλιέργεια, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ), Αθήνα, Ελλάδα

Εισαγωγή: Οι προνύμφες εντόμων αποτελούν πλούσια πηγή πρωτεϊνών, λίπους, βιταμινών, και μετάλλων, ενώ έχει δειχθεί ότι διαμορφώνουν το μικροβίωμα των ψαριών και βελτιώνουν το ανοσοποιητικό τους σύστημα (Antonopoulou et al., 2019). Έχει προταθεί η χρήση πρωτεϊνών προνυμφών εντόμων ως εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης στις ιχθυοτροφές, καθώς οι προνύμφες εντόμων είναι εύκολο να παραχθούν με χαμηλό κόστος (Hawkey et al., 2021). Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ως προς τις ανοσολογικές αποκρίσεις στο ευρωπαϊκό λαβράκι, η μερική αντικατάσταση του ιχθυάλευρου από εντομοάλευρο προνυμφών του *Hermetia illucens*.

Υλικά και Μέθοδοι: Χρησιμοποιήθηκαν πέντε πειραματικές εκτροφές με διαφορετικό ποσοστό υποκατάστασης από *H. illucens* (20,30,40,50,60%) και μια διατροφή ελέγχου. Δείγματα ορού χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση δεικτών ευζωίας και ανοσολογικής απόκρισης. Σε δείγματα ιστών πρόσθιου νεφρού και σπλήνα, αναλύθηκε το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων IRF7, ISG12, MxA, IL-1b, IL-10, STAT3, IgHM, CD4, CD8a και herpudin μέσω RT-qPCR. Σε εναιωρήματα λευκοκυττάρων μελετήθηκε η πολλαπλασιαστική ικανότητα και η ενεργοποίηση των μακροφάγων.

Αποτελέσματα: Η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης και τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης δεν διαφοροποιήθηκαν. Τα επίπεδα γλυκόζης μεταβλήθηκαν σημαντικά από τη διαίτα 30%, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων NO⁻ των ψαριών που έλαβαν διαίτα 40-60% και σε όλες τις πειραματικές δίαιτες υπήρχε λιγότερη λυσοζύμη στον ορό. Τα επίπεδα MPO του 60% ήταν σημαντικά χαμηλότερα, Στον ορό, τα επίπεδα IgM αυξήθηκαν ελαφρώς, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου IgHM μειώθηκαν. Όλα τα γονίδια που αναλύθηκαν εκφράστηκαν διαφορετικά σε κάποιο βαθμό, αλλά οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Η δυνατότητα φαγοκυττάρωσης των μακροφάγων εμφάνισε δόσοεξαρτώμενη αύξηση. Η οξειδωτική δραστηριότητα αυξήθηκε σημαντικά στη διαίτα 60%, αλλά η παραγωγή νιτρωδών αποκάλυψε ότι η υποκατάσταση της διαίτας δεν ενίσχυσε περαιτέρω την ικανότητα αντίδρασης των κυττάρων.

Συμπεράσματα: Οι πειραματικές εκτροφές που περιείχαν διαφορετικά ποσοστά υποκατάστασης ιχθυαλεύρων από απολιπασμένο εντομοάλευρο *H. illucens* δεν προκάλεσαν ανοσολογική απόκριση, γεγονός που θα ήταν ενδεικτικό επιβλαβών επιδράσεων των εντομοαλεύρων στη φυσιολογία των ψαριών. Βάσει των παραπάνω, τα εντομοάλευρα θα μπορούσαν να αποτελέσουν εναλλακτική πηγή πρωτεΐνης στην ιχθυοκαλλιέργεια.

Η εργασία αυτή χρηματοδοτήθηκε από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Αλιείας και Θάλασσας 2014-2020», MIS 5029335.

ΑΑ.03

Έλεγχος αντικής δραστηριότητας φωτοενεργών επιφανειών για καθαρό και ασφαλές περιβάλλον

Νίκος Μουστάκας¹, Όλγα Παπαγγελή², Σοφία Μάκκα³, Nadia Todorova⁴, Πελαγία Φωκά², Χρήστος Τράπαλης⁴, Εμμανουήλ Αγγελάκης³, Ουρανία Γεωργοπούλου², Διονύσιος Σγούρας

¹ Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

² Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

³ Διαγνωστικό Τμήμα και Εργαστήρια Δημόσιας Υγείας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

⁴ Εργαστήριο Νανολειτουργικών και Νανοσύνθετων Υλικών, Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας, ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»

Η πανδημία Covid-2019 έχει αλλάξει σημαντικά την παγκόσμια καθημερινότητα και τα νέα δεδομένα, απαιτούν ολοένα και περισσότερο την εξασφάλιση καθαρού και ασφαλούς περιβάλλοντος, την καλή ποιότητα του εισπνεόμενου αέρα, καθώς και την υψηλή υγιεινή σε εργασιακούς και ιδιαίτερα νοσοκομειακούς χώρους. Η φωτοκατάλυση ή ενεργοποίηση της οξειδοαναγωγικής δράσης επιφανειών μετά από έκθεση στο ορατό φως, είναι μία από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται εδώ και αρκετά χρόνια στην αποδόμηση αέριων ρύπων και στην καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών. Νέοι καινοτόμοι φωτοκαταλύτες με διαβαθμισμένη περιεκτικότητα ημιαγωγών g-C₃N₄ και Ag₃PO₄ αναδεικνύονται ως ιδανικοί για ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών οξειδοαναγωγικής αντιμικροβιακής δράσης με εξαιρετικά ενισχυμένη απόδοση και αποτελεσματικότητα. Για την αξιολόγηση της αντικής δράσης τέτοιων φωτοκαταλυτικών επιστρώσεων θα εφαρμοστούν διαδικασίες βασισμένες στα διεθνή πρότυπα ISO 21702:2019 και ISO 18071:2016. Πιο συγκεκριμένα, με βάση το ISO 21702:2019 θα χρησιμοποιηθούν DNA ιοί με έλυτρο όπως οι πρότυποι ιοί Vaccinia και HSV-1 και θα διερευνηθεί επιπλέον, αν η αντική δράση των επιφανειών έπεται από ενεργοποίηση με έκθεση στο ορατό φως, οφείλεται σε καταστροφή του ιικού καψιδίου ή στην κατάλυση του νουκλεϊνικού οξέος του ιού μετά από ποσοτικό προσδιορισμό της κυτταρο- παθογόνου δράσης του ιού σε καλλιέργειες κυτταρικών σειρών. Επιπλέον, βάσει του ISO 18071:2016, η εκτίμηση της αντικής δραστηριότητας των επιστρώσεων θα προσδιοριστεί και μέσω της προτυποποιημένης μεθόδου προσδιορισμού βακτηριοκτόνου δράσης του βακτηριοφάγου Q- beta σε καλλιέργειες *E. coli*. Τα αποτελέσματα των δύο τεχνικών θα συγκριθούν όσον αφορά την ικανότητα τους να προσδιορίζουν με ακρίβεια την αντική δράση των νέων επιστρώσεων.

Χρηματοδότηση: Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Αττική 2014-2020» ΑΠΟΓΕΙΟΝ ΑΤΤΡ4-0349671

AA.04

Διερεύνηση της δράσης ολικού φαινολικού κλάσματος προερχομένου από το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο: νέες *in vitro* προοπτικές κατά της δερματικής λεϊσμανίασης

Γεωργία Γώγου¹, Όλγα Σ. Κουτσώνη¹, Λέανδρος Α. Σκαλτσούνης², Μαρία Χαλαμπαλάκη² και Ελένη Ντότσικα¹

1. Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Λεωφ. Βασιλίσσης Σοφίας 127, 11521 Αθήνα, Ελλάδα.

2. Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη, Ζωγράφου, 15771 Αθήνα, Ελλάδα.

Εισαγωγή: Το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο (EVOO) αποτελεί βασικό συστατικό της Μεσογειακής διατροφής. Τα σεκοϊριδοειδή αποτελούν την πλειοψηφία των βιοδραστικών βιοφαινολών του ελαιολάδου και έχουν προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω των υποσχόμενων βιολογικών τους δράσεων. Στην παρούσα μελέτη, συνοψίζονται πρόσφατα ευρήματα σχετικά με την αντι-λεϊσμανιακή δράση ενός ολικού φαινολικού κλάσματος (TPF) προερχόμενου από το EVOO, πλούσιου στα σεκοϊριδοειδή ολεασεΐνη (OLEA) και ολεοκανθάλη (OLEO). Ειδικότερα, αξιολογείται η δραστηριότητά του έναντι του στελέχους *Leishmania major* που αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα της δερματικής λεϊσμανίασης, της πιο κοινής μορφής της νόσου με παγκόσμια κατανομή. Η αντιμετώπιση της λεϊσμανίασης βασίζεται σε χημειοθεραπευτικά πρωτόκολλα με σοβαρά μειονεκτήματα, όπως τοξικότητα, ανάπτυξη αντοχής, υψηλό κόστος και μακροχρόνια αγωγή. Συνεπώς, η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων είναι αναγκαία και τα τελευταία χρόνια εστιάζεται στη μελέτη βιοδραστικών ενώσεων φυσικής προέλευσης.

Υλικά –Μέθοδοι / Αποτελέσματα: Η χημική σύσταση του TPF προσδιορίστηκε με υγρή χρωματογραφία (HPLC-DAD) και αποκάλυψε την ύπαρξη OLEA και OLEO σε περιεκτικότητα 144,12 και 301,24 mg/g εκχυλίσματος, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε *in vitro* η αντιλεϊσμανιακή του δράση, χρησιμοποιώντας την οξειδοαναγωγική αντίδραση της ρεσαζουρίνης και μικροσκοπία αντίθεσης φάσεων. Αναλυτικότερα, διερευνήθηκε η μονήρης δραστηριότητά του έναντι των εξωκυττάρων προμαστιγωτών και των ενδοκυττάρων αμαστιγωτών μορφών του παρασίτου *L. major*. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το TPF επάγει δόσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση στη βιωσιμότητα τόσο των προμαστιγωτών, όσο και των αμαστιγωτών μορφών *L. major* και οι μέσες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (τιμές IC₅₀) προσδιορίστηκαν στα 252,6 και 76,1 μg/ml, αντίστοιχα. Ο δείκτης εκλεκτικότητας (SI) υπολογίστηκε στο 2,1. Επιπλέον, διερευνήθηκε η επίδραση του TPF στα επίπεδα των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) στους *L. major* προμαστιγώτες με κυτταρομετρία ροής. Τέλος, αξιολογήθηκε η αλληλεπίδραση του TPF και της μιλτεφοσίνης σε προμαστιγώτες και αμαστιγώτες *L. major* μέσω κατασκευής ισοβολογραμμάτων.

Συμπεράσματα: Όλα τα ευρήματα σηματοδοτούν τη θετική επίδραση ενός TPF, πλούσιου σε OLEA και OLEO, έναντι των δερμοτροπικών στελεχών *Leishmania*, αναδεικνύοντάς το ως ένα πολλά υποσχόμενο εν δυνάμει αντιπαρασιτικό φάρμακο.

AA.05

Μελέτη του ρόλου της ηπατιδίνης στην αντιμετώπιση λοιμώξεων από GRAM(-) βακτήρια

Α. Ντούτσουλη¹, Ε. Σιατραβάνη¹, Α. Δημητριάδης², Δ. Μακατσώρη², Ε. Πετεινάκη³, Α. Μαμαλάκη², Σ. Δ. Κωτσάκης¹, Β. Μυριαγκού¹

¹Εργαστήριο Βακτηριολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα

²Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας & Ανοσοβιοτεχνολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα

³Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

Εισαγωγή: Η ηπατιδίνη, μια πεπτιδική ορμόνη του ήπατος, αποτελεί το βασικό σημείο ελέγχου και διατήρησης της ομοιόστασης του σιδήρου στον ανθρώπινο οργανισμό. Κατά την διάρκεια των βακτηριακών λοιμώξεων, η αύξηση της παραγόμενης ηπατιδίνης έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του σιδήρου στην κυκλοφορία και συσχετίζεται με καταστάσεις αναιμίας προκαλούμενης από φλεγμονή. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της τεχνητής μείωσης της ηπατιδίνης, μέσω χορήγησης anti-Hepcidin μονοκλωνικών αντισωμάτων (anti-Heps), στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων και των καταστάσεων αναιμίας σχετιζόμενων με τις λοιμώξεις.

Υλικά και μέθοδοι: Χρησιμοποιήθηκε πειραματικό ζωικό μοντέλο σήψης, με *E. coli* ή *K. pneumoniae*, σε ουδετεροπενικά και ανοσοεπαρκή ποντίκια. Η ανάλυση επιβίωσης έγινε με καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier. Εγινε ποσοτικοποίηση του σιδήρου, της ηπατιδίνης και της CRP στον ορό, του βακτηριακού φορτίου στο ολικό αίμα και των σχετικών επιπέδων έκφρασης της ηπατιδίνης στους ιστούς του ήπατος και σπλήνα, με ή χωρίς την χορήγηση anti-Heps.

Αποτελέσματα: Στις ομάδες ουδετεροπενικών ποντικών επιμολυσμένων με *E. coli*, τα επίπεδα σιδήρου ήταν χαμηλά, ωστόσο η συγχορήγηση των anti-Heps, οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων της ηπατιδίνης αλλά μικρή αύξηση των επιπέδων του σιδήρου και μείωση του βακτηριακού φορτίου. Κατά την διάρκεια της λοίμωξης ουδετεροπενικών ποντικών με *K. pneumoniae*, παρουσία ή όχι anti-Heps, τα επίπεδα σιδήρου ήταν χαμηλά και αντίστοιχα τα επίπεδα ηπατιδίνης ήταν υψηλά. Ωστόσο, σε ανοσοεπαρκή ποντίκια που έλαβαν anti-Heps, τα επίπεδα ηπατιδίνης μειώθηκαν και ο σίδηρος του ορού παρουσίασε αύξηση. Η χορήγηση των αντισωμάτων σε ουδετεροπενικά και ανοσοεπαρκή ποντίκια επιμολυσμένα με *K. pneumoniae* οδήγησε σε μικρότερο βακτηριακό φορτίο.

Συμπεράσματα: Η χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά την *in vivo* λοίμωξη με *E. coli* ή *K. pneumoniae* οδήγησε σε μείωση της ηπατιδίνης ενώ τα επίπεδα σιδήρου παρουσίασαν μικρή αύξηση αλλά σε καμία περίπτωση δεν επανήλθαν στις φυσιολογικές τιμές, υποδεικνύοντας ότι η χορήγηση των αντισωμάτων μπορεί να συμβάλλει μερικώς μόνο στην αντιμετώπιση καταστάσεων αναιμίας σχετιζόμενων με λοίμωξη.

Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα ΕΠΑνΕΚ 2014-2020 (MIS5032783). Η ΥΔ Α.Ν. έλαβε υποτροφία μικρής διάρκειας από το καταπίστευμα «ΝΟΣΤΟΣ».

AA.06

Αλληλεπίδραση των ανθρώπινων ουδετερόφιλων με την *Legionella pneumophila* σε μία πιθανή μόλυνση

Μυρτώ Κουτάντου^{1,3}, Σοφία Μάκκα¹, Δημοσθένης Χοχλάκης², Γεώργιος Τσιώτης³, Κωνσταντίνος Καμπάς⁴, Εμμανουήλ Αγγελάκης^{1,5}

¹ Διαγνωστικό Τμήμα, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα

² Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα

³ Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Σπουδών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Αθήνα

⁴ Εργαστήριο Μοριακής Γενετικής, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα

⁵ Aix Marseille Université, IRD, APHM, SSA, VITROME, IHU-Méditerranée Infection, 19-21 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France

Εισαγωγή: Η *Legionella pneumophila* είναι ένα προαιρετικά ενδοκυττάριο βακτήριο που εμφανίζεται παγκοσμίως και κατοικεί σε λίμνες, ποτάμια, θερμές πηγές και ελλιπώς συντηρημένα τεχνητά συστήματα νερού. Η *L. pneumophila* μολύνει τα κυψελιδικά μακροφάγα και προκαλεί τη Νόσο των Λεγεωνάριων, μια άτυπη πνευμονία που μπορεί να αποβεί θανατηφόρα. Τα ουδετερόφιλα διεισδύουν στους πνεύμονες των μολυσμένων ασθενών και επιτίθενται στα βακτήρια. Παρά τη συμβολή τους, πολύ λίγα είναι γνωστά για τις ανοσολογικές αποκρίσεις που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια μιας λοίμωξης από *L. pneumophila* καθώς και για τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται. Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι να διαφωτίσει και να κατανοήσει την αλληλεπίδραση των ουδετερόφιλων με την *L. pneumophila*.

Υλικά και Μέθοδοι: Τα ουδετερόφιλα απομονώθηκαν από ηπαρινισμένο αίμα υγιών ατόμων και μολύνθηκαν με οψωνοποιημένη, καλλιεργημένη σε άγαρ, *L. pneumophila* σε συγκέντρωση ~10 βακτηρίων ανά ουδετερόφιλο. Μετά από 3,5 ώρες επώασης, τα κύτταρα σταθεροποιήθηκαν με 4% παραφορμαλδεΰδη (PFA). Διεξήχθη ανοσοσήμανση για να προσδιοριστεί η ικανότητα των ουδετερόφιλων να δημιουργήσουν Neutrophil Extracellular Traps (NETs). Επιπλέον, τα βακτήρια ανοσοσημάνθηκαν για να διερευνηθεί εάν πραγματοποιείται φαγοκυττάρωση. Τέλος, μετρήθηκαν και οι Δραστικές Ρίζες Οξυγόνου (ROS) χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής.

Αποτελέσματα: Τα ουδετερόφιλα είναι ικανά να φαγοκυτταρώσουν την *L. pneumophila* μετά την οψωνοποίηση, ενώ αντίθετα, τα μη οψωνοποιημένα βακτήρια φαγοκυτταρώνονται μόνο σε πολύ μικρό βαθμό. Επιπλέον, τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν ROS μόλις έρθουν σε επαφή με τα οψωνοποιημένα *L. pneumophila* λόγω φαγοκυττάρωσης, καθώς τα μη οψωνισμένα βακτήρια χάνουν την ικανότητα να παράγουν ROS. Τέλος, η *L. pneumophila* είναι ικανή να προκαλέσει απελευθέρωση των NETs από τα ουδετερόφιλα.

Συμπεράσματα: Παρέχουμε στοιχεία ότι σε περίπτωση μόλυνσης από *L. pneumophila*, τα ουδετερόφιλα καταπολεμούν τους εισβολείς με φαγοκυττάρωση, δημιουργία ROS και απελευθέρωση NETs. Αυτά τα ευρήματα συμβάλουν σημαντικά στην κατανόηση της επίδρασης των ουδετερόφιλων στην εξουδετέρωση της μόλυνσης από *L. pneumophila*. Επιπλέον, ο προσδιορισμός συγκεκριμένων πρωτεϊνών που υπάρχουν στα NETs θα μπορούσε να είναι κρίσιμος προκειμένου να κατανοηθούν οι μηχανισμοί/στόχοι για την αποτελεσματική καταπολέμηση της συγκεκριμένης λοίμωξης.

AA.07

Μοριακή επιδημιολογία της *Neisseria Gonorrhoeae* στην Ελλάδα για τη διετία 2020-2021

Ε. Σιατραβάνη^{1,3}, Α-Δ. Πανοπούλου², Σ. Χρυσού², Α. Μπελούκας³, Σ. Κωτσάκης¹, Β. Μυριαγκού¹

¹Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Γονόκοκκου, Εργαστήριο Βακτηριολογίας, Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, Αθήνα

²Μικροβιολογικό Εργαστήριο Νοσοκομείου «Ανδρέας Συγγρός», Αθήνα

³Εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αθήνα

Εισαγωγή: Η *Neisseria gonorrhoeae* είναι το παθογόνο αίτιο της γονόρροιας, ενός από τα κυριότερα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι ο επιδημιολογικός έλεγχος του γονοκοκκικού πληθυσμού στην Ελλάδα για την διετία 2020-2021 και η διερεύνηση της κλωνικής διασποράς στελεχών με συγκεκριμένους φαινοτύπους αντοχής στον ελληνικό πληθυσμό.

Υλικά και Μέθοδοι: Ελέγχθηκαν όλα τα στελέχη *N. gonorrhoeae* που παραλήφθηκαν από το Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Γονόκοκκου (ΕΚΑΓ) τη διετία 2020-2021. Συγκεκριμένα το έτος 2020 παρελήφθησαν n=114 στελέχη και το 2021 n=107 στελέχη. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος αντοχής/ευαισθησίας σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά για το σύνολο των στελεχών. Η τυποποίηση των στελεχών γονοκόκκου έγινε με τη μοριακή μεθοδολογία NG-MAST (*Neisseria Gonorrhoeae* –Multi Antigen Sequencing Type). Η φυλογενετική συγγένεια των στελεχών υπολογίστηκε βάσει του αλγορίθμου Maximum Likelihood. Για επιλεγμένα στελέχη πραγματοποιήθηκε ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS).

Αποτελέσματα: Στο δείγμα των γονοκόκκων του 2020 και 2021 ταυτοποιήθηκαν 53 και 34 STs, αντίστοιχα. Τα στελέχη με αντοχή στην πενικιλίνη, τετρακυκλίνη, αζιθρομυκίνη και κινολόνες το 2020 ανήκαν στους STs 388, 2318, 14994, 17972, 19535, 15589, 17614 και το 2021 στους 17972, 20926. Στελέχη με αντοχή στην αζιθρομυκίνη ανήκαν στους STs 9372 και 3935. Ο ST17972, με αντοχή στην αζιθρομυκίνη και στις κινολόνες εμφανίστηκε το 2020 και επικράτησε το 2021. Τα στελέχη με αντοχή στις κινολόνες έφεραν μεταλλάξεις στα γονίδια γυράσης (*gyrA*) και τοποϊσομεράσης (*parC*) ενώ αυτά με υψηλού επιπέδου αντοχή στην αζιθρομυκίνη έφεραν τη σημειακή μετάλλαξη C2611T στα γονίδια 23S rRNA.

Συμπεράσματα: Η φυλογενετική ανάλυση του γονοκοκκικού πληθυσμού που μελετήθηκε επιβεβαίωσε την ύπαρξη κλωνικής διασποράς ανθεκτικών στελεχών γονόκοκκου. Η παρακολούθηση των επιδημιολογικών και μοριακών δεδομένων καθώς και της μικροβιακής αντοχής του γονοκοκκικού πληθυσμού είναι σημαντική για την μελέτη της εξάπλωσης της γονοκοκκικής λοίμωξης και αποτελεί ζήτημα υψηλής προτεραιότητας για τη δημόσια υγεία και την καθοδήγηση της εμπειρικής θεραπείας.

AA.08

Ανάπτυξη μιας αντιγονοειδικής θεραπείας για τη μυασθένεια με πρόκληση ανοσολογικής ανοχής

Ντουκάκη Ελένη, Μπαλαταζίδου Βασιλική, Λαζαρίδης Κωνσταντίνος

Εργαστήριο Ανοσολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Εισαγωγή: Ο μυϊκός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης (AChR) αποτελεί τον κύριο αντιγονικό στόχο στην πλειοψηφία των ασθενών με μυασθένεια (MG). Η χορήγηση μη-ειδικών ανοσοκατασταλτικών αποτελεί την πιο συνηθισμένη θεραπευτική προσέγγιση για την MG, αλλά μπορεί να επιφέρει σοβαρές παρενέργειες. Συνεπώς, υπάρχει επιτακτική ανάγκη για την ανάπτυξη καινοτόμων αντιγονο-ειδικών θεραπειών. Ο επαναπρογραμματισμός των αυτοδραστικών κυττάρων προς επανίδρυση της ανοσολογικής ανοχής συνιστά μια υποσχόμενη εναλλακτική για τη θεραπεία της MG.

Υλικά – Μέθοδοι / Αποτελέσματα: Η ομάδα μας, στοχεύει στην ανάπτυξη μιας αντιγονοειδικής θεραπείας που βασίζεται στην χορήγηση υπομονάδων του AChR. Σε προηγούμενη μελέτη έχουμε περιγράψει την έκφραση μιας μεταλλαγμένης μορφής της α1 υπομονάδας του ανθρώπινου AChR σε σύστημα ετερόλογης έκφρασης ζυμομύκητα, παρουσιάζοντας υψηλή διαλυτότητα. Στην συνέχεια, προχωρήσαμε σε *in vivo* μελέτες σε αρουραίους με πειραματική MG (EAMG) και εξετάσαμε τη θεραπευτική ικανότητα της α1-ECD, με χορήγηση της μέσω διαφορετικών οδών μετά την έναρξη της νόσου, και την αντιγονοειδικότητα της απόκρισης. Η ενδοφλέβια χορήγηση της α1-ECD επέδειξε το πιο έντονο θεραπευτικό αποτέλεσμα, οδηγώντας σε σημαντική μείωση των συμπτωμάτων. Σε αντίθεση με συνήθεις φαρμακευτικές αγωγές για την MG, η παραπάνω προσέγγιση οδήγησε σε μακροπρόθεσμη ύφεση της νόσου στους αρουραίους. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός του τίτλου αντισωμάτων και επιπέδου κυτταροκινών σε δείγματα ορών που ελήφθησαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Καθώς στην παραπάνω προσέγγιση η πρωτεΐνη παρουσιάζει μικρό χρόνο ημιζωής, η αξιοποίηση τεχνικών που θα αυξήσουν τον χρόνο ημιζωής της α1-ECD κρίνεται σκόπιμη για την περαιτέρω ενίσχυση της θεραπευτικής της ικανότητας. Επιπλέον, η αποσαφήνιση των ανοσολογικών μηχανισμών δράσης της θεραπείας βρίσκεται υπό εξέταση.

Συμπέρασμα: Η επαναφορά της ανοσολογικής ανοχής έναντι αντιγονοειδικών στόχων δια της ενδοφλέβιας οδού, συνιστά μια υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση για την MG.

AA.09

Μελέτη της μικρογλοιακής αποσιώπησης του bin1 σε συνθήκες ομοιόστασης και νευροφλεγμονής

M. Μαργαρίτη¹, Ε. Θάνου¹, Ε. Παπαδημητρίου¹, A. Pelletier², Ε. Ξύγγη³, Μ. Α. Ρουσσάκη¹, Μ. Αυλωνίτη⁵, Β. Κυραργύρη⁵, Μ. Costa^{2,4}, Δ. Θωμαΐδου¹

¹ Hellenic Pasteur Institute, Neural Stem Cells and Neuro-imaging Group, Department of Neurobiology, Athens, Greece

² Institut Pasteur de Lille, Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Lille, France

³ Hellenic Pasteur Institute, Light Microscopy Unit, Athens, Greece

⁴ Federal University of Rio Grande do Norte, Brain Institute, Natal, Brazil

⁵ Hellenic Pasteur Institute, Laboratory of Molecular Genetics, Microbiology Department, Athens, Greece

Εισαγωγή: Μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies, GWAS) έχουν εντοπίσει αρκετούς πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) που σχετίζονται ισχυρά με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της όψιμης μορφής της νόσου Αλτσχάιμερ (Late – onset Alzheimer’s Disease, LOAD). SNPs κοντά στο γονίδιο Bridging Integrator 1 (BIN1) παρουσιάζουν την ισχυρότερη συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης της LOAD, μετά την απολιποπρωτεΐνη Ε. Το BIN1 είναι μέλος της οικογένειας Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) πρωτεΐνη – προσαρμογέας, η οποία εμπλέκεται στο δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης. Αν και ο ρόλος της στους νευρώνες έχει μελετηθεί τόσο in vitro όσο και in vivo, ο ρόλος της BIN1 στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας και η συμβολή της στην παθολογία της LOAD μένει να αποσαφηνιστεί. Στόχος μας είναι να διερευνήσουμε την επίδραση της αποσιώπησης του bin1 στη μικρογλοία στον εγκέφαλο ποντικού, υπό ομοιοστατικές και φλεγμονώδεις συνθήκες.

Υλικά – Μέθοδοι: Δημιουργήσαμε ένα Cx3CR1Cre-ERT2//Bin1^{fl/fl} διπλά διαγονιδιακό ζώο, στο οποίο το bin1 έχει αποσιωπηθεί στα μικρογλοιακά κύτταρα. Στη συνέχεια, χορηγήσαμε στα ποντίκια μία εφάπαξ δόση LPS, με σκοπό την πρόκληση φλεγμονώδους απόκρισης. Στο μοντέλο μας, πραγματοποιήσαμε ανοσοϊστοχημική ανάλυση για να χαρακτηρίσουμε τον μοριακό φαινότυπο της μικρογλοίας του φλοιού και πραγματοποιήσαμε single nucleus RNA-Seq ώστε να αποκαλύψουμε νέους στόχους που σχετίζονται με το μικρογλοιακό BIN1. Τέλος, επιβεβαιώσαμε τα ευρήματά μας με τεχνικές μοριακής βιολογίας.

Αποτελέσματα: Η ανάλυση των μικρογλοιακών υποπληθυσμών έδειξε εμπλουτισμό ενός υποπληθυσμού ικανού προς πολλαπλασιασμό και ενός προ-φλεγμονώδους υποπληθυσμού, ύστερα από την πρόκληση της νευροφλεγμονής και την αποσιώπηση του bin1. Επιπλέον, η ανάλυση αποκάλυψε πως, ύστερα από αποσιώπηση του μικρογλοιακού bin1, προκαλούνται στα αστροκύτταρα αλλαγές σε γονίδια, τα οποία σχετίζονται με το σχηματισμό της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP).

Συμπεράσματα: Η αποσιώπηση του μικρογλοιακού bin1 οδηγεί σε μικρογλοιακούς υποπληθυσμούς συγκεκριμένων μοριακών και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών και υφίσταται ένας έμμεσος ρόλος του bin1 στην επικοινωνία μικρογλοίας – αστροκυττάρου.

Supported by Institut Pasteur Network PTR-MIAD Program and Nostos Foundation fellowship to M. Margariti

AA.10

Η μικρογλοιακή αποσιώπηση του bin1 επηρεάζει την απόκριση στη νευροφλεγμονή και την ενήλικη νευρογένεση στον ιππόκαμπο

M. A. Ρουσσάκη¹, Μ. Μαργαρίτη¹, Ε. Θάνου¹, Ε. Ξύγγη², Μ. Αυλωνήτη³, Β. Κυραργύρη³, Δ. Θωμαΐδου¹

¹ Hellenic Pasteur Institute, Neural Stem Cells and Neuro-imaging Group, Department of Neurobiology, Athens, Greece

² Hellenic Pasteur Institute, Light Microscopy Unit, Athens, Greece

³ Hellenic Pasteur Institute, Laboratory of Molecular Genetics, Microbiology Department, Athens, Greece

Εισαγωγή: Μελέτες συσχέτισης γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies, GWAS) έχουν εντοπίσει αρκετούς πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) που σχετίζονται ισχυρά με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης της όψιμης μορφής της νόσου Αλτσχάιμερ (Late – onset Alzheimer’s Disease, LOAD). SNPs κοντά στο γονίδιο Bridging Integrator 1 (BIN1) παρουσιάζουν την ισχυρότερη συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης της LOAD, μετά την απολιποπρωτεΐνη Ε. Το BIN1 είναι μέλος της οικογένειας Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) πρωτεΐνη – προσαρμογέας, η οποία εμπλέκεται στο δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης. Ενώ η BIN1 έχει μελετηθεί εκτενώς στους νευρώνες, η συμβολή της στη μικρογλοιακή ενεργοποίηση και στην παθολογία της LOAD παραμένει ασαφής.

Υλικά – Μέθοδοι: Προκειμένου να διερευνήσουμε το ρόλο της BIN1 στη μικρογλοία, αναπτύξαμε ένα διπλά διαγονιδιακό ζώο (Cx3cr1^{Cre-ERT2}//Bin1^{fl/fl}), το οποίο επιτρέπει την εκλεκτική αποσιώπηση της μικρογλοιακής BIN1. Κατόπιν, χορηγήσαμε στα ποντίκια μία εφάπαξ δόση LPS, με σκοπό την πρόκληση φλεγμονώδους απόκρισης, ώστε να μελετήσουμε την αποσιώπηση της μικρογλοιακής BIN1 τόσο υπό ομοιοστατικές, όσο υπό φλεγμονώδεις συνθήκες. Στο μοντέλο μας, προχωρήσαμε με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας και μοριακής βιολογίας σε μελέτη της περιοχής του ιπποκάμπου, περιοχής που σχετίζεται άμεσα με τη LOAD.

Αποτελέσματα: Πειράματα ανοσοϊστοχημείας στον ιππόκαμπο έδειξαν ότι παρουσία LPS και απουσία BIN1, αυξήθηκε ο αριθμός των πολλαπλασιαζόμενων μικρογλοιακών κυττάρων (IBA1+KI67+), ενώ τόσο ο πληθυσμός τους (IBA1+) όσο η ένταση φθορισμού του IBA1 δε μεταβλήθηκαν σημαντικά. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκαν μεταβολές στην ένταση φθορισμού του αστροκυτταρικού δείκτη GFAP, και αλλαγές στην έκφραση γονιδίων φλεγμονής (STAT1, IRF7) παρουσία LPS και απουσία μικρογλοιακής BIN1, στον ιππόκαμπο. Τέλος, η αποσιώπηση της BIN1 στη μικρογλοία οδήγησε σε αύξηση του αριθμού ανώριμων νευρωνικών κυττάρων (DCX+) και σε μεταβολή του αριθμού των βλαστικών νευρωνικών (SOX2+) και των ενδιάμεσων προγονικών (TBR2+) κυττάρων.

Συμπεράσματα: Η BIN1 φαίνεται να σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό της μικρογλοίας στον ιππόκαμπο. Ταυτόχρονα, η απουσία της οδήγησε σε αύξηση των ανώριμων νευρωνικών κυττάρων στην οδοντωτή έλικα του ιπποκάμπου και σε πληθυσμιακές μεταβολές άλλων κυττάρων της νευρωνικής γενεαλογίας, στην ίδια περιοχή.

Supported by Institut Pasteur Network PTR-MIAD Program

ΑΑ.11

Η κινάση Dyrk1B εμπλέκεται στη νευροφλεγμονή στα SOD1^{G93A} ποντίκια

Ναλμπάντη Β.¹, Κοκκοράκης Ν.¹, Ζαγοραίου Α.,² Μάτσα Ρ.¹, Γαϊτάνου Μ.¹

1. Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας-Βλαστοκύτταρα, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ
2. Κέντρο Βασικών Ερευνών, Ίδρυμα Βιοϊατρικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

Εισαγωγή: Η Dyrk1B ρυθμίζει μέσω της οδού Sonic Hedgehog (Shh) τη δημιουργία και την επιβίωση των κινητικών νευρώνων (KN) και των V2A διάμεσων νευρώνων, καθώς και των LMCm KN που νευρώνουν κοιλιακά τους μύες των άκρων. Η Dyrk1B καταστέλλει την οδό Shh/Gli, ενώ ο ειδικός αναστολέας της, το AZ191 αυξάνει αντίστροφα τη σηματοδότηση Shh/Gli, με αποτέλεσμα αυξημένους πληθυσμούς κοιλιακών προγόνων και KN. Η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ΑΠΣ) χαρακτηρίζεται από εκλεκτική απώλεια των LMC KN. Οι KN και V2A επηρεάζονται πρώτοι στο νωτιαίο μυελό των ποντικών SOD1^{G93A}. Αξίζει να σημειωθεί ότι το Shh έχει αναφερθεί μειωμένο στην ΑΠΣ, ενώ ο κυτταροπροστατευτικός του ρόλος στην ΑΠΣ έχει αποδειχθεί στο παρελθόν. Εδώ, στοχεύουμε να διερευνήσουμε τον ρόλο της κινάσης Dyrk1B στην υγεία και τη νόσο των κινητικών νευρώνων.

Υλικά – Μέθοδοι: Εμβρυϊκές πρωτογενείς καλλιέργειες κινητικών νευρώνων και μελέτες έκφρασης.

Αποτελέσματα: Αναπτύξαμε ένα βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο πρωτογενούς κυτταροκαλλιέργειας E12.5 KN που αποδίδει 95% Tuj1⁺ νευρώνες και 90% Islet1/2⁺ KN που περιλαμβάνουν όλους τους υποτύπους. Προσθήκη 1μM AZ191 σε αυτήν την καλλιέργεια οδήγησε σε νευρώνες Tuj1⁺ με αυξημένο μήκος νευραξόνων κατά 2 φορές και αυξημένες διακλαδώσεις κατά 1,5 φορά, υποδηλώνοντας τη νευροτροφική επίδραση του AZ191. Στον νωτιαίο μυελό ποντικών P30 SOD1^{G93A}, βρήκαμε ότι η έκφραση της Dyrk1B είναι μειωμένη κατά 46% και 70% σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης αντίστοιχα. Στον νωτιαίο μυελό ποντικών P140 SOD1^{G93A} παρατηρείται έντονη νευροφλεγμονή, καθώς τα κύτταρα GFAP⁺ και Iba1⁺ αυξάνονται κατά 2,6 και 8,4 φορές αντίστοιχα. Παραδόξως, ενώ η Dyrk1B εκφράζεται αποκλειστικά από νευρώνες στον υγιή νωτιαίο μυελό, στα P140 SOD1^{G93A} η Dyrk1B εκφράζεται επίσης από αστροκύτταρα και μικρογλοία. Ειδικά, τα κύτταρα Dyrk1B⁺/GFAP⁺ και Dyrk1B⁺/Iba1⁺ αυξάνονται κατά 8 φορές και 25 φορές αντίστοιχα.

Συμπεράσματα: Τα προκαταρκτικά μας δεδομένα υποδηλώνουν έναν νευροπροστατευτικό ρόλο του AZ191 σε εμβρυϊκές πρωτογενείς καλλιέργειες KN και αποκάλυψαν μια πιθανή επίπτωση της Dyrk1B στη νευροφλεγμονή στην ΑΠΣ.

AA.12

Ο ρόλος της μικρογλοίας σε *in vivo* μοντέλο οικογενούς νόσου Πάρκινσον

E. Νίνου¹, G. Zejneli², K. Σέγκλια¹, K. Χαρμπή¹, Π. Χανδρής¹, O. Mirabeau², A. Deczkowska², E. Ταουφίκ¹

¹ Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, 11521 Αθήνα, Ελλάδα

² Brain-Immune Communication Lab, Institut Pasteur, Université Paris Cité, Inserm U1224, F-75015, Παρίσι, Γαλλία

Η νόσος του Πάρκινσον (ΝΠ) είναι η δεύτερη πιο συχνή νευροεκφυλιστική διαταραχή (ΝΔ) με πολλαπλές κλινικές εκδηλώσεις. Ένας κοινός παρονομαστής των περισσότερων ΝΔ είναι η συναπτική δυσλειτουργία που προκαλείται από αλλαγές στη συναπτική δομή και λειτουργία, οι οποίες μπορεί να είναι είτε η αιτία είτε το αποτέλεσμα της νόσου. Πρόσφατα δεδομένα σε νευροψυχιατρικές διαταραχές υποδηλώνουν μια νευροαναπτυξιακή προέλευση για τη συναπτική δυσλειτουργία και αντιτίθενται στο αξίωμα δεκαετιών που ορίζει ότι η συναπτική δυσλειτουργία είναι μεταξύ των τελικών παρεπόμενων των ΝΔ. Αυτή η αντιφατική θεωρία υποστηρίχθηκε πρόσφατα από την ανακάλυψη απροσδόκητων κοινών σημείων στους λειτουργικούς μηχανισμούς μεταξύ αναπτυξιακών και νευροεκφυλιστικών συνθηκών. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η συναπτική απορρύθμιση είναι αποτέλεσμα ακατάλληλων νευρογλοιακών αλληλεπιδράσεων, όχι μόνο στην ενήλικη ζωή, αλλά ήδη από τα κρίσιμα εμβρυϊκά και μεταγεννητικά αναπτυξιακά στάδια για τα νευρωνικά κυκλώματα, όπου η σημασία της μικρογλοίας είναι καλά τεκμηριωμένη. Η κατανόηση του ρόλου της μικρογλοίας νωρίς στη ΝΔ μπορεί να βελτιώσει την κατανόησή μας και να ανοίξει δρόμο για νέους θεραπευτικούς στόχους.

Σε αυτή τη μελέτη του ρόλου της μικρογλοίας στον προοδευτικό νευροεκφυλισμό, χρησιμοποιούμε ένα μοντέλο μυ (M83) που φέρει μία οικογενή μετάλλαξη ΝΠ στο γονίδιο της α- συνουκλείνης (pA53T-αSyn). Πραγματοποιούμε εκτεταμένο ανοσοϊστοχημικό χαρακτηρισμό της μικρογλοίας (IBA1, CD68, αSYN, TMEM119, TREM2, NFκB-p65, P2RY12, κ.ά.) σε πολλαπλές εγκεφαλικές περιοχές μυών M83 σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (E14-17 & P7-10), σε νεαρά ενήλικα (P30), σε όψιμα ενήλικα (4-5 μηνών) και σε υπερήλικα ζώα που έχουν εμφανίσει τα συμπτώματα της ασθένειας (1 έτους) με συνεστιακή μικροσκοπία (Leica TCS SP8) και ανάλυση εικόνων με τα προγράμματα ImageJ και Imaris για μορφομετρική ανάλυση. Παράλληλα, με κυτταρομετρία ροής με το BD FACSMelody™ Cell Sorter σε μικρογλοιακά κύτταρα M83 ζώων στα αντίστοιχα αναπτυξιακά στάδια και με τους κατάλληλους δείκτες (πχ. CD45, CD11b, CX3CR1, TREM2) και ανάλυση στο πρόγραμμα FlowJo μελετάμε πώς η νευρωνική έκφραση pA53T-αSyn αλλάζει τους υποπληθυσμούς της μικρογλοίας και τις οδούς σηματοδότησης που σχετίζονται με την ΝΠ, πριν ακόμα από την έναρξη των συμπτωμάτων.

Η παρούσα μελέτη χρησιμοποιεί το οικογενές μοντέλο ΝΠ A53T-αSyn για να αναγνωρίσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικρογλοίας και νευρώνων κατά τα προσυμπτωματικά στάδια ανάπτυξης και εξέλιξης της νόσου Πάρκινσον. Χρησιμοποιώντας αυτή τη μη νευροκεντρική προσέγγιση, αποσκοπούμε στη διαλεύκανση του ρόλου της μικρογλοίας στην πρόοδο της νόσου, στους κυτταρικούς υποπληθυσμούς που σχετίζονται με τη νόσο και στους πιθανούς θεραπευτικούς στόχους.

AA.13

Μελέτη της επικοινωνίας νευρικών και μικρογλοιακών κυττάρων σε κυτταρικά μοντέλα της Νόσου του Πάρκινσον

Γκαρή Α.Β., Νίνου Ε., Ταουφίκ Ε.

Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, 11521, Αθήνα, Ελλάδα

Εισαγωγή: Η νόσος του Πάρκινσον (Parkinson's, disease PD) είναι η δεύτερη συνηθέστερη νευροεκφυλιστική νόσος. Η σπάνια μετάλλαξη p.A53T στην πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη είναι υπεύθυνη για μια οικογενή μορφή της νόσου η οποία, όπως η σποραδική νόσος, χαρακτηρίζεται από κυτταροπλασματικά έγκλειστα (σωμάτια του Lewy) τα οποία εμποδίζουν την φυσιολογική λειτουργία των νευρώνων, είναι νευροτοξικά και περιέχουν α-συνουκλεΐνη. Χρησιμοποιώντας κυτταρικές σειρές μπορούμε να μελετήσουμε τις επιπτώσεις της μετάλλαξης σε κυτταρικό επίπεδο και στο πώς επηρεάζει την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, ειδικά μεταξύ νευρώνων και μικρογλοίας. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιούμε τις κυτταρικές σειρές ανθρώπινων νευρικών βλαστοκυττάρων SH-SY5Y και μικρογλοίας μυός BV2 τα οποία έχουν διαμολυνθεί με ικούς φορείς που εκφράζουν την ανθρώπινη p.A53T α-συνουκλεΐνη συνδεδεμένη με τη πρωτεΐνη dsRed ή με την dsRED (κυτταρική σειρά ελέγχου). Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετήσουμε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ SH-SY5Y νευροβλαστοκυττάρων και BV2 μικρογλοιακών κυττάρων, με έμφαση στις επιδράσεις της p.A53T που παράγεται από τα SH-SY5Y.

Υλικά - Μέθοδοι: Συν-καλλιεργούμε τις δύο κυτταρικές σειρές και τις μελετάμε σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, 24 ώρες, 3 ημέρες, 7 ημέρες έπειτα από μονιμοποίηση ή σε ζωντανό χρόνο. Πραγματοποιούμε ανοσοκυτταροχημεία για συγκεκριμένους δείκτες και λαμβάνουμε εικόνες με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου. Ύστερα αναλύουμε τις εικόνες μέσω του προγράμματος ImageJ. Εξετάζουμε την μορφολογία (IBA1, ionised calcium binding adaptor molecule 1), την ενεργοποίηση (CD68, cluster of differentiation 68), το ρυθμό πολλαπλασιασμού (BrdU, Bromodeoxyuridine) και φαγοκυττάρωσης (pHrodo, phagocytosis particle labelling) των BV2 κυττάρων παρουσία της φυσιολογικής και της μεταλλαγμένης α-συνουκλεΐνης.

Αποτελέσματα - Συμπέρασμα: Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα δείχνουν ότι παρουσία p.A53T α-συνουκλεΐνης από τα SH-SY5Y κύτταρα, τα BV2 κύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχύτερα. Επιπλέον, ο δείκτης CD68 δείχνει μια συσσωμάτωση των λυσοσωμάτων στα BV2 κύτταρα υπό τις ίδιες συνθήκες. Με βάση τις παρατηρήσεις μας, η συν-καλλιέργεια SH-SY5Y και BV2 κυττάρων είναι αξιόπιστο σύστημα για να μελετήσουμε τη μορφολογία, τον πολλαπλασιασμό, και τη φαγοκυτταρική ικανότητα των μικρογλοιακών κυττάρων σε φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες που προκύπτουν από τη συσσώρευση φυσιολογικής ή/και p.A53T α-συνουκλεΐνης. Επομένως, σε μελλοντικές κατευθύνσεις σχεδιάζουμε να προσδιορίσουμε την έκταση της λυσοσωμικής συσσωμάτωσης και να ποσοτικοποιήσουμε τις διαφορές των BV2 κυττάρων υπό παθολογικές ή/και p.A53T συνθήκες.

ΑΑ.14

Μηχανισμοί πρόωμης συναπτικής δυσλειτουργίας στην p.A53T-αSyn παθολογία

Ε.Κ. Ακριώτη¹, Κ.Σέγκλια¹, Π. Κουτσουδάκη², Σ. Χαβάκη², S. Lipton³, Ρ. Μάτσα¹,
Ε. Ταουφίκ¹

¹ Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας-Βλαστικών Κυττάρων, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

² Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, Ελληνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

³ Scripps Research & UC San Diego, Neurodegeneration New Medicines Center, La Jolla, United States of America

Εισαγωγή: Η άλφα-συνουκλεΐνη (αSyn) αποτελεί μια πρωτεΐνη που απαντάται σε αφθονία στο προσυναπτικό άκρο των νευρώνων και θεωρείται κρίσιμος παράγοντας για την εκδήλωση της νόσου Πάρκινσον. Ένα από τα πρώιμα χαρακτηριστικά της νόσου αποτελεί η δυσλειτουργία της συναπτογένεσης, με τους μηχανισμούς που την πυροδοτούν να παραμένουν απροσδιόριστοι. Η παρούσα εργασία εστιάζεται στην μετάλλαξη p.A53T-αSyn και αποσκοπεί να διερευνήσει τα πρώιμα γεγονότα που οδηγούν στην κατάρρευση των συνάψεων.

Υλικά – Μέθοδοι: Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακοί μύες που εκφράζουν την ανθρώπινη p.A53T-αSyn (Prlp-SNCA*A53T) (Giasson et al., 2001) καθώς και ανθρώπινοι επαγόμενοι νευρώνες που φέρουν την μεταλλαγή p.A53T (Kouroupi et al., 2017). Διερευνήθηκε η δομή των συνάψεων μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και χαρακτηρίστηκαν οι συναπτικές επαφές και τα συστήματα νευροδιαβίβασης με ανάλυση ανοσοφθορισμού. Ακόμη εξετάστηκαν πιθανά προβλήματα κατά τη συναπτογένεση μέσω μιας δοκιμασίας δημιουργίας τεχνητών συνάψεων. Τέλος εφαρμόστηκε μονοσυναπτική ιχνηλάτηση με τον ιο της λύσσας για την εξέταση της νευρωνικής συνδεσιμότητας.

Αποτελέσματα: Από την ανάλυση προκύπτει ότι οι διαγονιδιακοί μύες εμφανίζουν προβλήματα στην οργάνωση των συνάψεων και τον αριθμό των συναπτικών κυστιδίων. Επιπλέον, τόσο οι ανθρώπινοι όσο και οι νευρώνες των μυών παρουσιάζουν ελαττωματική συνδεσιμότητα, αλλαγές στον αριθμό των διεγερτικών και ανασταλτικών συνάψεων, ενώ τα δίκτυα τους είναι κατεστραμμένα σε μεγάλο βαθμό. Η πρόωμη εμφάνιση αυτών των ελαττωμάτων υποστηρίζεται επιπρόσθετα από τη μερική ανικανότητα των p.A53T νευρώνων να σχηματίζουν τεχνητές συνάψεις. Αξιοσημείωτο επίσης είναι ότι στους Prlp-SNCA*A53T μύες η έκφραση των νευροδιαβιβαστών vGLUT1 και GABA πλήττεται πριν τον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην μέλαινα ουσία. Τέλος, είναι δυνατή η αναστροφή της παρατηρούμενης συναπτικής δυσλειτουργίας όταν χορηγούνται οι διπλοϊ-αλλοστερικοί ανταγωνιστές του NMDAR, Μεμαντίνη και Νιτροσυναψίνη, *in vitro*.

Συμπέρασμα: Συνολικά, ένα σύνολο χωροχρονικών γεγονότων αποδεικνύουν ότι η πρόωμη συναπτική δυσλειτουργία αποτελεί ένα βασικό γνώρισμα της p.A53T-αSyn παθολογίας, το οποίο δύναται να αναστραφεί με τη χρήση κατάλληλων νευρο-ρυθμιστικών σκευασμάτων.

AA.15

Οι ρόλοι των πρωτεϊνών της οικογένειας SLITRK στη συναπτική δυσλειτουργία παρουσία της p.A53T-αSyn

Π. Φουρτίνη, Ε. Κ. Ακριώτη, Κ.Σέγκλια, Ρ. Μάτσα, Ε.Ταουφίκ

Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας-Βλαστικών Κυττάρων, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Εισαγωγή: Η νόσος Parkinson (PD) είναι μια νευροεκφυλιστική ασθένεια που σχετίζεται με την α-συνουκλείνη (αSyn). Η παθολογική της μορφή δημιουργεί συσσωματώματα, τα Lewy Bodies. Η μετάλλαξη G209A στο γονίδιο της αSyn SNCA οδηγεί στην παθολογική πρωτεΐνη p.A53T-αSyn. Προηγούμενες μελέτες σε μοντέλα της p.A53T παρουσίασαν απορρύθμιση του επιπέδου έκφρασης πολλών πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων και τρία μέλη της οικογένειας των μετασυναπτικών μορίων SLITRK (1,2,4) (Kouroupi et al., 2017). Τα SLITRKs αλληλεπιδρούν με τα προσυναπτικά LAR-RPTPs και ευθύνονται για τη νευρωνική ανάπτυξη και το σχηματισμό συνάψεων (Proenca et al., 2011). Έχουν συσχετιστεί με νευροψυχιατρικά σύνδρομα και νευροαναπτυξιακές διαταραχές, όμως η σχέση των SLITRKs με τις συνουκλείνοπάθειες δεν είναι ακόμα γνωστή. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού των Slitrk 1, 2, 4 στη σύναψη, η ποσοτικοποίηση σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης και η ανάλυση των μοριακών αλληλεπιδράσεων (interactome) των συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε μοντέλα p.A53T.

Υλικά – Μέθοδοι: Η μελέτη των μορίων SLITRK (1,2,4) διεξήχθη σε διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού που εκφράζει το ανθρώπινο p.A53T-αSyn (Pnp-SNCA*A53T) (Giasson et al., 2001) και σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (hiPSC) από ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη. Στη συγκεκριμένη εργασία δίνεται έμφαση στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος SH-SY5Y που εκφράζει την ανθρώπινη p.A53T α-συνουκλείνη. Εξετάστηκαν η ενδογενής έκφραση των SLITRK1,2,4 και δοκιμάζονται transfections με πλασμιδιακούς φορείς των SLITRK1, 2, 4 γονιδίων. Επιπλέον, γίνεται ανοσοφθορισμός με δείκτες για τις πρωτεΐνες υπό εξέταση και οι εικόνες λαμβάνονται με συνεστιακό μικροσκόπιο και αναλύονται στο ImageJ.

Αποτελέσματα: Προκαταρκτικά αποτελέσματα δείχνουν ενδογενή έκφραση των SLITRKs στα SH-SY5Y. Ο υποκυτταρικός εντοπισμός των SLITRKs μεταβλήθηκε σημαντικά παρουσία της p.A53T-αSyn στα SH-SY5Y κύτταρα, υποδεικνύοντας δυσλειτουργία στον κυτταρικό μηχανισμό διακίνησης μορίων. Επιπλέον, στα άλλα δύο μοντέλα (ποντίκι και hiPSCs) παρατηρήθηκε μείωση των SLITRK 1, 2, 4 σε επίπεδο RNA και πρωτεϊνικής έκφρασης καθώς και αδυναμίες στο σχηματισμό και τη λειτουργία των συνάψεων.

Συμπέρασμα: Μέσα από αυτή τη μελέτη επιδιώκεται η απόκτηση μεγαλύτερης γνώσης των μηχανισμών της συναπτικής δυσλειτουργίας στην νόσο του Parkinson εξαιτίας της μετάλλαξης G209A στο γονίδιο SNCA και η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η παθολογία αυτή επηρεάζει την έκφραση και τη λειτουργία των πρωτεϊνών SLITRK 1, 2, 4.

AA.16

Πρώιμα και όψιμα γεγονότα της p.A53T-αSyn παθολογίας σε ένα γενετικό μοντέλο ποντικού για τη νόσο Πάρκινσον

Κατερίνα Σέγκλια¹, Ρεβέκκα Μάτσα¹, Έρα Ταουφίκ¹

¹Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας – Βλαστικών Κυττάρων, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα

Εισαγωγή: Η νόσος του Πάρκινσον (Parkinson's disease, PD) και οι συγγενείς συνουκλείνοπάθειες αποτελούν μια ομάδα ανιάτων και προοδευτικά εξελισσόμενων νευροεκφυλιστικών ασθενειών, με χαρακτηριστικό την απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων και την εκδήλωση πληθώρας κινητικών ή/ και μη κινητικών συμπτωμάτων.

Υλικά – Μέθοδοι: Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ενδεδειγμένη φαινοτυπική ανάλυση ενός γενετικού μοντέλου PD, στο οποίο οι νευρώνες του εγκεφάλου έχουν τροποποιηθεί ώστε να εκφράζουν την ανθρώπινη α-συνουκλείνη που φέρει την παθολογική μετάλλαξη p.A53T υπό τον έλεγχο του υποκινητή P_{hnp}. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη είναι η πιο καλά χαρακτηρισμένη, προκαλεί οικογενή μορφή της νόσου με πρώιμη έναρξη και δριμύ φαινότυπο και μέσω των συσσωματωμάτων α-συνουκλείνης που δημιουργούνται, προκαλεί αξονικές ανωμαλίες και δυσλειτουργία στη συναπτική συνδεσιμότητα. Φυσικού τύπου και p.A53T διαγονιδιακοί ποντικοί (P_{hnp}-SNCA*A53T) αναλύθηκαν σε διάφορες μεταγεννητικές ηλικίες, από 4 έως 16 μηνών, με τη μέθοδο της ανοσοιστοχημείας και τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας.

Αποτελέσματα: Αρχικά εξετάστηκε η παρουσία συσσωματωμάτων α-συνουκλείνης, τα οποία είναι ήδη εμφανή σε νεαρούς A53T ποντικούς (4 μηνών), στην περιοχή της μέλαινας ουσίας (substantia nigra) και του φλοιού και ο αριθμός τους αυξάνει στους μεγαλύτερης ηλικίας ποντικούς. Είναι επίσης εμφανής η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος, με την ουβικουτίνη να είναι σημαντικά αυξημένη στους A53T ποντικούς από νεαρή ηλικία. Στην ηλικία των 16 μηνών, παρατηρείται μείωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων (TH⁺) στη substantia nigra και στις ανώτερες περιοχές του μεσεγκεφάλου των A53T ποντικών, καθώς και των αξόνων που προβάλλουν στον ιπόκαμπο και πρόσθιο φλοιό. Δεν παρατηρείται αυξημένη αστρογλοΐωση, σε αντίθεση με την αυξημένη μικρογλοΐωση που ταυτοποιείται με το συνεντοπισμό Iba1⁺/CD68⁺ κυττάρων. Επιπλέον, στους εγκεφάλους των A53T ποντικών, παρατηρείται συνεντοπισμός των συσσωματωμάτων α-συνουκλείνης με μικρογλοιακά κύτταρα. Σημαντική είναι επίσης η μείωση της έκφρασης του vGLUT1 σε ιπόκαμπο και φλοιό, ήδη από την ηλικία των 4 μηνών, φαινόμενο που προηγείται χρονικά της δυσλειτουργίας του ντοπαμινεργικού συστήματος. Παρατηρείται επίσης στατιστικά σημαντική μείωση στους Parvalbumin⁺ ώριμους νευρώνες, στον ιπόκαμπο των A53T ποντικών, αποτέλεσμα που σχετίζεται άμεσα με τη γνωστική δυσλειτουργία της νόσου Πάρκινσον. Τέλος, σημαντική είναι και η μείωση που καταγράφεται σε υποκυτταρικούς δείκτες που σχετίζονται με το σωματίο Golgi, την ενδοκυττάρωση, τη διακίνηση των πρωτεϊνών και τη σωστή λειτουργία των λυσοσωμάτων.

Συμπέρασμα: Η παρούσα *in vivo* μελέτη μας δίνει τη δυνατότητα να διερευνήσουμε πώς η μετάλλαξη p.A53T αSyn επηρεάζει τη συναπτική πλαστικότητα και να αποσαφηνίσει το χρονικό σημείο απ' όπου ξεκινούν οι δυσλειτουργίες, με απώτερο στόχο την καλύτερη κατανόηση των γεγονότων που οδηγούν στον εκφυλισμό που προκαλεί.

AA.17

Αλληλεπιδράσεις νευρώνων-αστροκυττάρων από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα Παρκινσονικών ασθενών με τη μετάλλαξη pA53T στην α-συνουκλεΐνη

Ολυμπία Αποκότου¹, Χριστίνα Πάσχου², Σοφία Δέδε², Αναστάσιος Κόλλιας², Έρα Ταουφίκ², Ρεβέκκα Μάτσα², Φλωρεντία Παπαστεφανάκη^{1,2}

¹Μονάδα Βλαστικών Κυττάρων και Τεχνολογίας Κυτταρικού Επαναπρογραμματισμού, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

² Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας-Βλαστικά κύτταρα, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Εισαγωγή: Η νόσος του Πάρκινσον (ΝΠ) χαρακτηρίζεται από την προοδευτική απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων του μεσεγκεφάλου με αποτέλεσμα κινητικά και μη κινητικά συμπτώματα. Το κύριο ιστοπαθολογικό χαρακτηριστικό της νόσου είναι η παρουσία πρωτεϊνικών εγκλείστων, πλούσιων στην πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη, που ονομάζονται σωμάτια και νευρίτες Lewy¹. Περίπου το 10% των περιπτώσεων ΝΠ σχετίζονται με γνωστές μεταλλάξεις, όπως η pA53T στην α-συνουκλεΐνη, που προκαλεί μια οικογενή μορφή ΝΠ με πρόωμη έναρξη και σοβαρό φαινότυπο. Η τεχνολογία του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού παρέχει ένα μοναδικό ανθρώπινο σύστημα για τη μελέτη των μηχανισμών της ΝΠ², οι οποίοι παραμένουν εν πολλοίς άγνωστοι. Ο στόχος μας στην παρούσα μελέτη είναι να διερευνήσουμε τη συμβολή των αστροκυττάρων και των αλληλεπιδράσεών τους με τους νευρώνες στην παθολογία της ΝΠ για την ανάδειξη νέων θεραπευτικών στόχων.

Υλικά και Μέθοδοι: Αναπτύξαμε *in vitro* νευρώνες και αστροκύτταρα μεσεγκεφαλικής ταυτότητας από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSC) Παρκινσονικών ασθενών που φέρουν τη μετάλλαξη p.A53T και από υγιείς δότες. Νευρώνες και αστροκύτταρα αναμίχθηκαν σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς σε συστήματα συγκαλλιέργειας, προκειμένου να εξετάσουμε τις αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις τους.

Αποτελέσματα: Παρατηρήσαμε μειωμένη βιωσιμότητα, μειωμένη ανάπτυξη του νευριτικού δικτύου και εμφάνιση νευροεκφυλιστικού φαινοτύπου στους υγιείς νευρώνες όταν συγκαλλιεργήθηκαν με p.A53T αστροκύτταρα. Από την άλλη μεριά, η βιωσιμότητα, η ανάπτυξη νευριτών και ο νευροεκφυλιστικός φαινότυπος (συμπεριλαμβανομένων τυπικών χαρακτηριστικών της ΝΠ όπως οι νευρίτες και τα σωμάτια Lewy) των p.A53T νευρώνων παρουσίασαν βελτίωση κατά τη συγκαλλιέργεια με υγιή αστροκύτταρα. Επιπλέον, τα υγιή αστροκύτταρα βοήθησαν στην εκκαθάριση των p.A53T νευρώνων από πρωτεϊνικά συσσωματώματα και συσσωματώματα της παθολογικής φωσφορυλιωμένης α-συνουκλεΐνης, ενώ τα p.A53T αστροκύτταρα δεν παρουσίασαν αυτή την ικανότητα.

Συμπεράσματα: Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν έναν σημαντικό ρόλο των p.A53T αστροκυττάρων στη διαδικασία του νευροεκφυλισμού που παρατηρείται στη ΝΠ και μια αξιοσημείωτη ικανότητα των υγιών αστροκυττάρων να προσφέρουν προστασία στους p.A53T νευρώνες, πιθανά μέσω πρόσληψης και αποικοδόμησης των τοξικών συσσωματωμάτων της α-συνουκλεΐνης και άλλων πρωτεϊνών.

Χρηματοδότηση: Το ερευνητικό έργο υποστηρίχθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «1η Προκήρυξη ερευνητικών έργων ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. για την ενίσχυση των μελών ΔΕΠ και Ερευνητών/τριών και την προμήθεια ερευνητικού εξοπλισμού μεγάλης αξίας» (Αριθμός Έργου: 1019).

Αναφορές

- [1] Desplats, Paula et al. "Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein." *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2009) doi:10.1073/pnas.0903691106
- [2] Kouroupi G, Taoufik E, Vlachos IS, et al. "Defective synaptic connectivity and axonal neuropathology in a human iPSC-based model of familial Parkinson's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2017) doi:10.1073/pnas.1617259114

ΑΑ.18

Μελέτη της σηματοδότησης μέσω ιόντων ασβεστίου σε επαγόμενα αστροκύτταρα από ασθενείς με οικογενή νόσο Πάρκινσον

Α. Κόλλιας¹, Χ. Πάσχου¹, Κ. Χαρμπή¹, Ο. Αποκότου², Π. Χανδρή¹, Μ. Σαμιωτάκη³, Γ. Παναγιώτου³, Ε. Ταουφίκ¹, Ρ. Μάτσα¹, Φ. Παπαστεφανιάκη^{1,2}

¹Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

²Μονάδα Βλαστικών Κυττάρων και Τεχνολογίας Κυτταρικού Επαναπρογραμματισμού, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

³Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Ερευνών «Αλ. Φλέμινγκ»

Εισαγωγή: Τα αστροκύτταρα αποτελούν την πολυπληθέστερη ομάδα κυττάρων του εγκεφάλου και είναι υπεύθυνα για πληθώρα διεργασιών συμπεριλαμβανομένης της σηματοδότησης μέσω ιόντων Ca^{2+} που ρυθμίζει το συγχρονισμό και την ορθή νευρωνική δραστηριότητα⁽¹⁾. Σε γενετικά μοντέλα της νόσου Πάρκινσον (ΝΠ) παρατηρείται απορρύθμιση της ομοιόστασης των ιόντων Ca^{2+} στα αστροκύτταρα, η οποία ενδεχομένως συμβάλει στην παθολογία των νευρώνων^(2,3,4). Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη των μονοπατιών ιόντων Ca^{2+} σε αστροκύτταρα και σε συγκαλλιεργούμενους νευρώνες που φέρουν τη μετάλλαξη p.A53T στο γονίδιο της α-συνουκλείνης.

Υλικά και Μέθοδοι: Με κατευθυνόμενη διαφοροποίηση επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων ασθενών με ΝΠ που φέρουν τη μετάλλαξη p.A53T και υγιών ατόμων, δημιουργήσαμε αστροκύτταρα και νευρώνες μεσεγκεφαλικής ταυτότητας. Σε αστροκύτταρα και συγκαλλιέργειες νευρώνων-αστροκυττάρων έπειτα από σήμανση με Fluo4-AM πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική παρατήρηση και λήψη ροής εικόνων, στις οποίες εξετάστηκαν οι κυματομορφές της δραστηριότητας ιόντων Ca^{2+} . Παράλληλα, έγινε πρωτεομική ανάλυση υγιών και p.A53T αστροκυττάρων για τον εντοπισμό στόχων σε μονοπάτια ασβεστίου.

Αποτελέσματα: Σε μονοκαλλιέργειες αστροκυττάρων καταγράψαμε αυθόρμητη και προκλητή, μέσω ATP, δραστηριότητα ιόντων Ca^{2+} , το οποίο επιβεβαιώνει την επιτυχία του πρωτοκόλλου διαφοροποίησης και λειτουργικής ωρίμανσης. Η κυματομορφή της αυθόρμητης δραστηριότητας ιόντων Ca^{2+} των p.A53T αστροκυττάρων παρουσίασε χαμηλότερη ένταση και διάρκεια, σε συνδυασμό με αυξημένη συχνότητα, σε σύγκριση με τα υγιή αστροκύτταρα. Η πρωτεομική ανάλυση των p.A53T και των υγιών αστροκυττάρων ανέδειξε μεταβολές στα επίπεδα πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε μονοπάτια ενδοκυτταρικής αποθήκευσης, ρύθμισης και σηματοδότησης ιόντων Ca^{2+} . Επιπρόσθετα, παρατηρήσαμε αυξημένη συχνότητα στην κινητικότητα των ιόντων Ca^{2+} στους p.A53T και στους υγιείς νευρώνες σε συγκαλλιέργειες με p.A53T αστροκύτταρα έναντι υγιών αστροκυττάρων. Τέλος, ανεξαρτήτως αστροκυττάρων, και σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία καταγράψαμε αυξημένη συχνότητα στην κυματομορφή των ιόντων Ca^{2+} στους p.A53T σε σύγκριση με τους υγιείς νευρώνες.

Συμπεράσματα: Η μετάλλαξη p.A53T στα αστροκύτταρα ασθενών με ΝΠ διαταράσσει την ομοιόσταση των ιόντων Ca^{2+} και επηρεάζει τη σηματοδοτική δραστηριότητα των νευρώνων, με πιθανή εμπλοκή στην παθολογία της ΝΠ.

Χρηματοδότηση: Το ερευνητικό έργο υποστηρίχθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «1η Προκήρυξη ερευνητικών έργων ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. για την ενίσχυση των μελών ΔΕΠ και Ερευνητών/τριών και την προμήθεια ερευνητικού εξοπλισμού μεγάλης αξίας» (Αριθμός Έργου: 1019).

Αναφορές

- [1] Sasaki, et al. “Astrocyte calcium signalling orchestrates neuronal synchronization in organotypic hippocampal slices.” *J. Physiol* (2014) doi: 10.1113/jphysiol.2014.272864
- [2] di Domenico A, et al. “Patient-Specific iPSC-Derived Astrocytes Contribute to Non-Cell-Autonomous Neurodegeneration in Parkinson's Disease.” *Stem Cell Reports* (2019) doi: 10.1016/j.stemcr.2018.12.011
- [3] Aflaki E, et al. “A characterization of Gaucher iPSC-derived astrocytes: Potential implications for Parkinson's disease.” *Neurobiol Dis.* (2020). doi: 10.1016/j.nbd.2019.104647
- [4] Ramos-Gonzalez P, et al. “Astrocytic atrophy as a pathological feature of Parkinson's disease with LRRK2 mutation.” *NPJ Parkinsons Dis.* (2021) doi: 10.1038/s41531-021-00175-w

AA.19

Ο ρόλος του miR-124 στον άμεσο επαναπρογραμματισμό αστροκυττάρων σε επαγόμενους νευρώνες: μελέτη του μοριακού μηχανισμού και της *in vivo* δράσης του

Έλσα Παπαδημητρίου¹, Ειρήνη Θάνου¹, Δήμητρα Καραγκούνη^{2,*}, Τιμοκράτης Καραμήτρος³, Άρτεμις Χατζηγεωργίου², Δήμητρα Θωμαΐδου¹

¹Ομάδα Νευρικών Βλαστικών Κυττάρων και Νευροαπεικόνισης, Τμήμα Νευροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

²DIANA-Lab, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ & Τμήμα Πληροφορικής με εφαρμογές στη Βιοιατρική, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Harvard Medical School, Department of Pathology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Broad Institute of MIT and Harvard, Boston, MA, USA

³Μονάδα Βιοπληροφορικής και Εφαρμοσμένης Γενωμικής, Τμήμα Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Εισαγωγή: Ο άμεσος επαναπρογραμματισμός αστροκυττάρων αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη νευρωνική υποκατάσταση, αξιοποιώντας τοπικά εγκεφαλικά κύτταρα με σκοπό την αντιμετώπιση της απώλειας νευρώνων λόγω νευροεκφυλισμού ή τραύματος. Αρκετές *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει μέχρι σήμερα, ότι τα αστροκύτταρα μπορούν να επαναπρογραμματιστούν σε νευρώνες μετά από υπερέκφραση διαφόρων νευρογενετικών παραγόντων, όπως μεταγραφικοί παράγοντες, και σε μικρότερο βαθμό miRNAs και χημικά μόρια. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο μηχανισμός δράσης του νευροειδικού miRNA, miR-124, στον επαναπρογραμματισμό πρωτογενών αστροκυττάρων από φλοιό ποντικού προς επαγόμενους νευρώνες, καθώς και η *in vivo* επαναπρογραμματιστική του ικανότητα σε ένα μοντέλο τραύματος ποντικού.

Υλικά- Μέθοδοι / Αποτελέσματα: Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι το miR-124 έχει τη δυνατότητα να οδηγήσει τα αστροκύτταρα προς μία ανώριμη νευρωνική ταυτότητα, καταστέλλοντας πολλά ρυθμιστικά αστροειδικά γονίδια και αυξάνοντας έμμεσα τα επίπεδα νευροειδικών γονιδίων που εκφράζονται στους νευρώνες του φλοιού. Η ανάλυση των άμεσων στόχων του miR-124 χρησιμοποιώντας δημόσια διαθέσιμα δεδομένα από ένα Ago HITS-CLIP πείραμα σε φλοιό ποντικού σε συνδυασμό με δικά μας RNA-seq δεδομένα, ανέδειξε την πρωτεΐνη Zfp3611, η οποία προσδένεται σε RNA μόρια-στόχους και τα οδηγεί προς αποικοδόμηση, ως έναν σημαντικό στόχο του miR-124. Περαιτέρω πειράματα έδειξαν ότι η στόχευση του mRNA της Zfp3611 από το miR-124 παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διαδικασία του νευρωνικού επαναπρογραμματισμού, οδηγώντας στην αποκαταστολή πολλών νευροειδικών mRNA μορίων-στόχων της Zfp3611 σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο.

Συμπεράσματα: Τα παραπάνω *in vitro* αποτελέσματα αναδεικνύουν τη συμβολή του miR-124 στη δημιουργία επαγόμενων ανώριμων νευρώνων, οι οποίοι προσεγγίζουν τη λειτουργική ωρίμανση, όταν συμπληρωματικά χρησιμοποιείται το νευρογενετικό χημικό μόριο ISX9. *In vivo*, η υπερέκφραση του miR-124 μέσω ενός AAV φορέα στον τραυματισμένο φλοιό ποντικού, σε συνδυασμό με τη χορήγηση BrdU, υπέδειξε την ικανότητα του miR-124 να επαναπρογραμματίσει ενεργοποιημένα αστροκύτταρα σε ανώριμους επαγόμενους νευρώνες, τονίζοντας έτσι την πιθανή θεραπευτική του αξία, που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

AA.20

Οι ενσωματώσεις του ιού της Ηπατίτιδας Β (HBV) σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές του ανθρώπινου γονιδιώματος & ο πιθανός τους ρόλος στην ανάπτυξη HBV-συσχετιζόμενου Ηπατοκυτταρικού Καρκίνου

Μπούσαλη Μαρία¹, Παπαθεοδωρίδης Γεώργιος², Παρασκευής Δημήτριος³, Καραμήτρος Τιμοκράτης^{1,4}

¹Μονάδα Βιοπληροφορικής και Εφαρμοσμένης Γενομικής, Τμήμα Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

²Γαστρεντερολογική Κλινική, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό», Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

³Εργαστήριο Υγιεινής, Επιδημιολογίας και Ιατρικής Στατιστικής, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

⁴Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Εισαγωγή: Οι ενσωματώσεις του ιού HBV στο γονιδίωμα ασθενών με Ηπατίτιδα Β αποτελούν κρίσιμο παράγοντα για την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου (HCC), καθώς έχουν ανιχνευθεί σε περισσότερο από το 85% των ασθενών με HBV-συσχετιζόμενο HCC. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση ύπαρξης μεταγραφικά ενεργών γονιδιωματικών περιοχών-στόχων στο ανθρώπινο γονιδίωμα στις οποίες το γονιδίωμα του ιού HBV ενσωματώνεται συστηματικά και η αξιολόγηση της συμβολής κάθε σημείου ενσωμάτωσης στην ανάπτυξη HCC.

Υλικά - Μέθοδοι: Εξειδικευμένοι βιοπληροφορικοί αλγόριθμοι αναπτύχθηκαν, με τη χρήση των γλωσσών προγραμματισμού R και BASH, για την ανάλυση 16,332 γονιδιωματικών συντεταγμένων του ανθρώπινου γονιδιώματος στις οποίες έχει βρεθεί ενσωματωμένος ο ιός της Ηπατίτιδας Β. Οι συντεταγμένες αυτές εξήχθησαν από δεδομένα Whole Genome Sequencing και Target Enrichment Sequencing σε ένα σύνολο 4,564 βιοψιών ήπατος [2,248 HBV-HCC (Cases) : 2,116 HBV+/HCC-(Controls)] διαθέσιμων σε βάσεις δεδομένων.

Αποτελέσματα: Ενσωματώσεις του ιού HBV εντοπίζονται σε 5,053/53,539 (9.44%) μεταγραφικά ενεργές περιοχές του ανθρώπινου γονιδιώματος, ενώ 18 γονίδια βρέθηκαν να αποτελούν συστηματικούς στόχους ενσωμάτωσης HBV ($p < 0.01$). Ο λειτουργικός σχολιασμός των γονιδίων αυτών ανέδειξε ότι εμπλέκονται σε κρίσιμα στάδια του κύκλου ζωής των κυττάρων, ενώ ορισμένα από τα γονίδια αυτά έχουν προηγούμενα προταθεί ως ογκογονίδια. Οι ενσωματώσεις HBV σε 15 από τα 18 αυτά γονίδια βρέθηκαν να συσχετίζονται με τον HBV-HCC. Συγκεκριμένα, οι HBV ενσωματώσεις εντός 8 εκ των γονιδίων-στόχων έχουν πιθανή επιβαρυντική επίδραση (θετική συσχέτιση) στην ανάπτυξη HBV-HCC ($OR > 1$, $p < 0.01$) ενώ οι HBV ενσωματώσεις εντός 7 γονιδίων-στόχων πιθανώς σχετίζονται αρνητικά με την ανάπτυξη HBV-HCC ($OR < 1$, $p < 0.01$).

Συμπεράσματα: Τα 15 γονίδια στα οποία οι HBV ενσωματώσεις ανευρίσκονται συστηματικά και σχετίζονται στατιστικά σημαντικά με το HBV-HCC πιθανώς αντιπροσωπεύουν γονίδια-οδηγούς (HBV-HCC driver genes) και περαιτέρω μελέτη τους ενδεχομένως να συμβάλει στην ανεύρεση νέων θεραπευτικών στόχων.

AA.21

Παρουσία μικροοργανισμών εντός των εσωτερικών υγιών οργάνων του ανθρώπου, αναθεωρώντας την άποψη περί στειρότητας των εσωτερικών ανθρώπινων ιστών.

Ανάργυρος Σκουλάκης¹, Γιώργος Σκούφος,^{1,2} Αρμέν Οβσεπιάν¹, Άρτεμις Χατζηγεωργίου^{1,2}

¹DIANA-Lab, Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στην Βιοϊατρική, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

²Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Εισαγωγή: Η ύπαρξη μικροοργανισμών στο έντερο, στο ουρογεννητικό σύστημα, στο δέρμα, ακόμη και στους πνεύμονες του ανθρώπου είναι πλέον εδραιωμένη.

Ορισμένες έρευνες υποστηρίζουν την ύπαρξη μικροοργανισμών ακόμη και εντός εσωτερικών οργάνων του ανθρώπου, άποψη σε άμεση συμφωνία και με έρευνες σε άλλα είδη, όπως ποντίκια, η οποία όμως δεν έχει επιβεβαιωθεί ακόμη.

Υλικά και Μέθοδοι: Μελετήθηκαν 13,871 RNA-seq δείγματα από 28 διαφορετικούς ιστούς από την ερευνητική κοινοπραξία GTEx. Για κάθε δείγμα, τα διαβάσματα αλληλούχησης (reads) που δεν στοιχίζονταν στο ανθρώπινο γονιδίωμα, αναλύθηκαν με τον αλγόριθμο AGAMEMNON, όπου πραγματοποιεί στοίχιση και ποσοτικοποίηση της αφθονίας μικροοργανισμών σε επίπεδο στελέχους, είδους κλπ. Χρησιμοποιώντας τις μικροβιακές αφθονίες σε επίπεδο είδους ως χαρακτηριστικά, εκπαιδεύτηκαν μοντέλα μηχανικής μάθησης gradient boosting (GB), με στόχο την κατηγοριοποίηση των ιστών με βάση το μικροβιακό τους προφίλ. Καθώς τα δείγματα του GTEx προέρχονται από νεκροτομές, μελετήθηκαν επιπρόσθετα 212 δείγματα υγιών ζωντανών ιστών, με στόχο την περαιτέρω επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

Αποτελέσματα: Σε 16 από τους 28 ιστούς (εγκέφαλο, πάγκρεας, λεπτό έντερο, ήπαρ, ουροδόχο κύστη, μύες, αιμοφόρα αγγεία, καρδιά, σιελογόνους αδένες, σπλήνα, οισοφάγο, στομάχι, παχύ έντερο, όρχι, ολικό αίμα, υπόφυση), τα GB μοντέλα είχαν υψηλή προβλεπτική ικανότητα (AUROC > 0.75), διαχωρίζοντας τον κάθε ιστό από όλους τους άλλους σε ικανοποιητικό βαθμό. Η ικανότητα διάκρισης των ιστών με βάση μόνο το μικροβιακό προφίλ των δειγμάτων υποδηλώνει την ύπαρξη συγκεκριμένης για τον κάθε ιστό μικροβιακής υπογραφής. Στους ζωντανούς υγιείς ιστούς, τα GB μοντέλα είχαν επίσης υψηλή προβλεπτική ικανότητα (AUROC > 0.90) και στους 7 ιστούς που μελετήθηκαν (νεφρό, πνεύμονα, μαστό, καρδιά, ήπαρ, πάγκρεας, οισοφάγο), υποστηρίζοντας περαιτέρω την ύπαρξη μικροβιακής υπογραφής εντός των συγκεκριμένων ιστών.

Συμπεράσματα: Η ύπαρξη μικροβιακής υπογραφής στα εσωτερικά όργανα του ανθρώπου, η οποία καθιστά δυνατή τη διάκριση των διαφόρων οργάνων με τη χρήση μοντέλων μηχανικής μάθησης, συνηγορεί στην άποψη ότι τα εσωτερικά όργανα του ανθρώπου δεν είναι στείρα και περιέχουν μικροοργανισμούς, πιθανώς σε πολύ περιορισμένη ποσότητα.

AA.22

DIANA-microT 2023: Η διαδικτυακή εφαρμογή αιχμής με υπολογιστικές προβλέψεις στόχων των μικρών RNAs ξενιστών και ιών

Σπύρος Τατσσόγλου¹, Αθανάσιος Αλεξίου¹, Δήμητρα Καραγκούνη², Γιώργος Σκούφος¹, Ελισσάβητ Ζαχαροπούλου¹, Άρτεμις Χατζηγεωργίου¹

¹DIANA-Lab, Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας | Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, Ελλάδα

²Department of Pathology, Beth Israel Deaconess Medical Center | Harvard Medical School | Broad Institute of MIT and Harvard, MA, USA

Εισαγωγή: Τα μικρά RNAs (microRNAs, miRNAs) είναι σημαντικοί μετα-μεταγραφικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης που προσδένουν σε μετάγραφα κυρίως στην 3' Αμετάφραστη Περιοχή (3'-UTR) επάγοντας την αποικοδόμησή τους και/ή την καταστολή της μετάφρασης. Η στόχευση των miRNAs είναι κρίσιμη για πληθώρα διεργασιών, διαδραματίζοντας ρόλο στην κυτταρική ταυτότητα, την απόκριση σε ερεθίσματα, την ανάπτυξη και διαφοροποίηση, ενώ η απορρύθμισή της παρατηρείται σε πληθώρα ασθενειών και αποτελεί αντικείμενο εντατικής μελέτης. Το DIANA-microT-CDS είναι ένας αλγόριθμος πρόβλεψης στόχων των miRNAs και αποτελεί την πρώτη εφαρμογή που επιτρέπει την ανάδειξη σημείων πρόσδεσής τους (miRNA Recognition Elements) τόσο στην 3'UTR, όσο και στην κωδική ακολουθία των μεταγράφων. Η νέα έκδοση του web-server DIANA-microT, προσφέρει μια σειρά από καινοτομίες και προβλέψεις αλληλεπιδράσεων που μέχρι στιγμής δεν ήταν διαθέσιμες.

Υλικά και μέθοδοι: Ο αλγόριθμος DIANA-microT-CDS εκτελέστηκε αξιοποιώντας πρόσφατες επισημειώσεις μεταγράφων από την Ensembl v102 και μικρών RNAs από τη miRBase v22.1 και την MirGeneDB 2.1. Πραγματοποιήθηκαν προβλέψεις στα είδη *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Ratus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Caenorhabditis elegans* και *Drosophila melanogaster*. Για τα *H. sapiens*, *M. musculus* και *G. gallus*, πραγματοποιήθηκαν επίσης προβλέψεις στόχων για γνωστά miRNAs 20 ιών για τους οποίους αποτελούν ξενιστές. Οι παρεχόμενες αλληλεπιδράσεις συμπληρώνονται από μεταδεδομένα που αφορούν άλλες πηγές στόχων των miRNAs (DIANA-TarBase, TargetScan), συσχετίσεων με ασθένειες (plasmir, HMDD), γνωστών πολυμορφισμών (dbSNP, ClinVar) και αφθονίας miRNAs/μεταγράφων.

Αποτελέσματα: Η νέα βάση περιλαμβάνει >83 εκ. και >185000 αλληλεπιδράσεις εαυτών και ικών miRNAs αντίστοιχα. Συγκριτικές αναλύσεις των αλληλεπιδράσεων αξιοποιώντας miRNA ακολουθίες από τις δύο βάσεις αναφοράς αναδεικνύουν μεταβολές στο ρεπερτόριο στόχευσης πληθώρας miRNAs που χαρακτηρίζονται από κοινού στη miRBase και τη MirGeneDB.

Συμπεράσματα: Το DIANA-microT 2023 επεκτείνει τις διαθέσιμες αλληλεπιδράσεις των miRNAs, επιτρέποντας για πρώτη φορά την αξιοποίηση και λειτουργική μελέτη αλληλεπιδράσεων ικών miRNAs, καθώς και miRNAs από τη νέα βάση αναφοράς MirGeneDB. Τα δεδομένα είναι διαθέσιμα δημόσια online (www.microna.gr/microt_webserver) και για τοπική ανάκτηση.

