

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
Departamentul IV - Biochimie-Farmacologie

CHIȘ AIMÉE-RODICA



FOLOSIREA REȚELELOR COMPLEXE ÎN
INVESTIGAREA BOLII PARKINSON PRIN
ANALIZA MIR-19B ȘI REPOZIȚIONAREA
MEDICAMENTELOR

REZUMAT

Conducător științific

Conf. Univ. Dr. SÎRBU IOAN-OVIDIU

Timișoara
2021

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ.....	1
PARTEA SPECIALĂ.....	3
SCOPUL STUDIULUI.....	3
OBIECTIVELE STUDIULUI.....	3
MATERIAL ȘI METODE	3
REZULTATE	4
DISCUȚII	6
CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE.....	8

PARTEA GENERALĂ

Boala Parkinson (BP) este a doua cea mai frecventă boală neurodegenerativă după Alzheimer, cu o incidență anuală la nivel mondial de până la 35 de cazuri noi / 100.000 de persoane. Se estimează că povara sa globală se va dubla până în 2030. BP este o boală a persoanelor vârstnice (peste 65 de ani), prevalența sa crescând de la 1% la 65 de ani la 3% la persoanele cu vârsta peste 80 de ani. Incidența BP variază în funcție de sex (mai frecvent la bărbați), rasă (mai puțin frecventă la afro-americieni), etnie (mai frecventă la evreii așkenazi, nativii din Alaska) și mediu (de exemplu, expunerea la pesticide, tricloretilenă).

Diagnosticul BP este în esență clinic, bazat pe simptome non-motorii (hiposmie, constipație, tulburări de somn, declin cognitiv, tulburări psihiatrice) și motorii (rigiditate, tremor de odihnă, instabilitate posturală, bradikinezie). Diagnosticarea BP se bazează pe evaluarea răspunsului clinic la levodopa (ameliorarea rapidă a simptomelor motorii), la care se adaugă o serie de teste precum evaluarea denervării simpatice cardiace (prin scintigrafie miocardică cu iod-123-meta-iodobenzilguanidină) și tomografia computerizată cu emisie de fotoni (DaTSPECT). Cu toate acestea, ele nu pot diferenția BP de sindroamele parkinsoniene care prezintă similitudini atât din punct de vedere clinic cât și molecular, de exemplu la nivelul disfuncționalității transportului dopaminei.

Criteriile de diagnostic pentru boala Parkinson permit identificarea bolii manifeste clinic, simptomele apărând la ani de la începerea procesului neurodegenerativ, când jumătate din neuronii dopaminergici din substanția nigra sunt deja pierduți. Majoritatea pacienților cu BP răspund bine la terapia de substituție cu dopamină, perioadele de ON-OFF și diskinezia apărând în termen de 2 până la 6 ani de la începerea terapiei cu levodopa.

Nu există biomarkeri biochimici sau moleculari pentru diagnosticul BP, monitorizarea terapiei sau pentru evaluarea prognostică. α -sinucleina din sânge, salivă și lichidul cefalorahidian (LCR) a fost cercetată intens în ultimul deceniu, dar s-a dovedit a fi lipsită de specificitate și sensibilitate.

MicroARN sunt o specie de ARN endogeni mici, non-codanți, implicați în reglajul post-transcripțional al expresiei genice. Un singur microARN modulează stabilitatea a sute de ARNm, în timp ce un ARNm poate fi ținta a zeci de microARN, o relație biunivocă ce explică capacitatea microARN de a regla expresia a aproape jumătate din transcriptomul uman. Datorită stabilității lor remarcabile în diferite fluide biologice, microARN sunt biomarkeri candidați ideali într-o largă varietate de patologii, inclusiv boli neurodegenerative.

Formarea microARN matur este un proces complex, foarte bine controlat la fiecare etapă/nivel. Biogeneza microARN începe în nucleu prin transcripția genei de către o ARN polimeraza II (în unele cazuri particulare, cum ar fi secvențele de microRNA situate după elementele transpozabile Alu, de către o ARN polimeraza III). Se formează astfel un microARN primar (pri-miR) care va fi procesat tot în nucleu de către o enzimă din clasa RNAza III, numită Drosha, rezultând un microARN precursor (pre-miR). Acesta va fi exportat de către o proteină numită Exportina-5 prin porii nucleului, în citoplasmă, unde o altă RNAza III, Dicer, îl va prelucra, rezultând un microARN dublu-catenar. Una dintre cele două catene, denumită secvența ghid (guide strand), va fi incorporată alături de proteinele AGO în complexul RISC (RNA Induced Silencing Complex), iar cealaltă, secvența pasager (passenger strand) va fi, cel mai probabil, degradată. Dacă biosinteza microARN respectă aceste etape, ea se va numi biogeneza canonică. În cazul anumitor microARN (de exemplu miR-451, miR-320, miR-484 etc.), sinteza este independentă de Dicer,

Drosha sau chiar de AGO; in aceste cazuri este vorba despre o biogeneza non-canonica. Biosinteza microARN este supusa unui proces strict de reglaj care poate avea loc atât la nivelul transcripției, cât și la nivelul procesării. Acest reglaj este specific și dependent de vârsta organismului, de tipul de celulă sau țesut și reprezintă un aspect foarte important, deoarece alterarea expresiei microARN poate determina și acompania o paletă foarte largă de patologii la om.

Necesitatea identificării unui biomarker (microARN) în BP a condus la o cantitate impresionantă de date, caracterizată printr-o lipsă surprinzătoare de consistență, fapt datorat diferitelor metode și platforme analitice folosite, diversității de țesuturi evaluate (LCR, sânge integral, plasmă, ser) sau etniei și stadializării pacienților incluși în studiu.

Analizând literatura de specialitate am identificat 56 de microARN diferențiat exprimați în lichidul cefalorahidian al pacienților cu BP, 9 fiind comuni pentru cel puțin 2 articole. Dintre aceștia, doar let-7g-3p (supra-exprimat), miR-184 (supra-exprimat) și miR-99a-5p (sub-exprimat) au avut expresii concordante, toți ceilalți prezentând expresii divergente. În plasmă au fost identificați 44 de microARN, dintre care 14 au fost comuni pentru cel puțin 2 studii. Trei dintre ei au fost identificați ca fiind concordant supra-exprimați (miR-124-3p, miR-132-3p, miR-433-3p), 8 au fost concordant sub-exprimați (miR-128-3p, miR-136-3p, miR-154-5p, miR-323a-3p, miR-382-5p, miR-409-3p, miR-410-3p, miR-485-5p). În probele de ser de la pacienți cu BP au fost identificați 36 microARN diferențial exprimați dintre care, 10 comuni pentru cel puțin 2 studii, toți având expresii concordante: miR-24, miR-195 (supra-exprimați), miR-141, miR-146b-5p, miR-193a-3p, miR-19b, miR-214, miR-29a, miR-29b, miR-29c (sub-exprimați).

Foarte puține studii îndeplinesc stringențele unui studiu de descoperire a unui biomarker în ceea ce privește proiectarea, rigurozitatea analizei și amplexarea înscrierii pacienților, ceea ce ar putea explica de ce niciun microARN nu a intrat în uz clinic până acum. În acest sens, o metodă analitică de bază include obligatoriu o etapă de screening (de obicei secvențierea de nouă generație (Next Generation Sequencing - NGS, microarray sau RT-PCR array) urmată de o etapă de validare printr-o altă tehnologie (de exemplu, qRT-PCR) și într-un lot independent de pacienți; în ambele etape, sunt esențiale folosirea de criterii stricte de incluziune și excludere atât a pacienților, cât și a controlilor, precum și metode bioinformaticе și statistice adecvate.

Una dintre metodele bioinformaticе folosite este analiza rețelelor complexe. Aplicarea teoriei rețelelor complexe în biologie s-a dovedit a fi o unealtă importantă în înțelegerea mecanismelor de reglaj la nivel celular și molecular, fiind utilă în descifrarea proceselor care stau la baza producerii unor boli. Deoarece microARN participă la reglajul genic, prin interacțiune directă cu ARNm, ei reprezintă un element important în funcționarea și stabilitatea rețelelor complexe. Analiza rețelelor complexe de microARN-ARNm este îngreunată de faptul că biogeneza, transportul, interacțiunea cu ARNm și degradarea microARN pot fi reglate de activitatea altor microARN, de acțiunea factorilor de transcripție, a transportorilor. Stabilitatea rețelelor microARN-ARNm este influențată de mecanisme feedback și feed-forward. Analiza dinamicii stabilității rețelei poate duce, de exemplu, la înțelegerea manifestărilor clinice asociate cu modificarea expresiei microARN. Dereglarea expresiei microARN poate duce la o mulțime de modificări ale expresiei genice: scăderea expresiei unui microARN duce la derepresia genelor țintă, iar creșterea expresiei microARN poate duce la represia genelor țintă. În cazul mai multor miR, care fac parte din aceeași familie, modificarea expresiei unuia dintre microARN antrenează mecanisme compensatorii din partea celorlalți membri ai familiei, fenomen care lipsește în cazul microARN izolați. Toți acești factori pot duce la modificarea dinamicii rețelei și este importantă integrarea tuturor factorilor pentru a înțelege funcționarea corectă a rețelei și deci a mecanismelor care stau la baza patologiilor asociate.

PARTEA SPECIALĂ

SCOPUL STUDIULUI

În studiul de față ne-am propus identificarea unui/unor microARN din plasma care pot fi folosiți ca și biomarkeri în boala Parkinson, precum și găsirea prin repoziționare a unor noi medicamente antiparkinsoniene.

OBIECTIVELE STUDIULUI

1. Formarea lotului de studiu
2. Identificarea microARN exprimați în plasmăle pacienților cu Parkinson
3. Validarea microARN identificați
4. Identificarea unui/unor microARN ca răspuns la terapia cu Levodopa
5. Predicția căilor de semnalizare impactate de microARN identificați
6. Validarea la nivel transcripțional a nivelului modificării unor gene din căile de semnalizare prezise
7. Formarea unei rețele complexe de medicamente pe baza interacțiunii dintre medicament-receptor
8. Validarea unor medicamente repoziționate
9. Identificarea unor posibile noi medicamente antiparkinsoniene

MATERIAL ȘI METODE

Toți pacienții din loturile de screening și validare au fost recrutați prin Clinica de Neurologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Timișoara și au semnat un consimțământ informat. Diagnosticul de BP a fost pus în conformitate cu criteriile de diagnostic clinic ale Parkinson and Movement Disorder Society for Parkinsons Disease.

Lotul de screening cuprinde 10 pacienți și 10 controli, dintre care 6 de sex masculin și 4 de sex feminin în ambele cazuri. Lotul de validare este format din 66 pacienți (35 bărbați și 31 femei) și 29 de controli (14 bărbați și 15 femei). Probele de plasmă naive (și terapia post Levodopa corespunzătoare) au fost furnizate de Harvard NeuroDiscovery Center (Centrul pentru Boli Neurologice, Spitalul Brigham & Women). Este vorba de un lot de 10 pacienți diagnosticați cu BP, de la care s-au recoltat probe de plasmă înainte și după tratamentul cu Levodopa; 7 bărbați și 3 femei cu vârstă medie 67,2 de ani.

Criteriile de excludere includ la afectarea cognitivă, incapacitatea de a semna consimțământul informat, un diagnostic asociat de cancer și / sau boli autoimune și un istoric recent de traumatisme craniene sau ale măduvei spinării.

Pentru izolarea și purificarea ARN din plasmă am folosit kitul miRNeasy Serum / Plasma de la Qiagen.

În vederea identificării de microARN exprimați diferențiat în lotul de screening am folosit kitul miScript® miRNA PCR Array de la Qiagen.

Pentru lotul de validare și naiv am folosit o tehnică qPCR în doi timpi, revers-transcripția și Real-Time PCR sunt efectuate în două etape separate, folosind reactivi specifici TaqMan.

Pentru diferențierea celulelor neuronale dopaminergice au fost folosiți precursori de celule neuronale dopaminergice umane LUHMES, care au fost expuși timp de 24 de ore la trei concentrații diferite de LevoDopa (10 uM, 20 uM și 50 uM).

Izolarea și purificarea microARN și ARNm am realizat-o cu ajutorul kitului mirVana miRNA Isolation. Ulterior, am folosit tot o tehnică qPCR în doi timpi folosind reactivi specifici TaqMan (Thermo Fisher Scientific).

Toate calculele statistice au fost efectuate folosind Prism 8 pentru MacOS, versiunea 8.3.0.

REZULTATE

În etapa de screening am evaluat un lot de 10 pacienți diagnosticați cu boala Parkinson vs. 10 pacienți control. Am folosit o tehnică de PCR Array și am evaluat 1008 posibile ținte microARN, dintre care doar 15 au fost exprimați diferit în plasmăle pacienților vs. control și au prezentat valori p corectate sub pragul de 0,05 cu modificări ale nivelului de expresie (FC) variind între 1,5 și 5,1.

Etapa de validare a cuprins un lot format din 66 pacienți diagnosticați cu BP și 29 control. Dintre microARN studiați, 5 au avut o expresie modificată semnificativ statistic, și anume: miR-16, miR-19a, miR-19b, miR-195, miR-92a. Expresiile au fost crescute, confirmând rezultatul obținut în lotul de screening. Am analizat o posibilă legătură între valorile Ct ale acestor microARN și vârsta pacienților, respectiv stadiul Y-H al bolii, dar nu s-a identificat nicio corelație. Analiza ROC efectuată pentru cei 5 microARN, arată că miR-19a, miR-19b, miR-195 au cele mai mari arii de sub curbă (AUC), având capacitatea de a distinge pacienții cu Parkinson de control, în schimb miR-16 și miR-92a prezintă rezultate mai modeste.

Am realizat stratificarea pe sexe pentru cei 5 microARN și dintre aceștia, doar miR-19a, miR-19b, miR-195 au o expresie crescută semnificativ statistic atât în cazul bărbaților, cât și al femeilor. Nu au existat diferențe semnificative între nivelurile plasmatică miR-19a, miR-19b și miR-195 ale bărbaților control față de femeile control. miR-19a și miR-19b au valori semnificativ mai mici în plasma pacienților bărbați cu BP comparativ cu femeile cu BP.

Deoarece pacienții din lotul de validare erau sub tratament cu LevoDopa, ne-am întrebat dacă există o corelație între tratamentul administrat și nivelul de expresie al microARN. În acest sens, am folosit un al treilea lot la care am evaluat expresia miR-19a, miR-19b, miR-195 în plasmăle provenite de la pacienți înainte și după tratamentul cu LevoDopa, iar rezultatele indică faptul că un singur microARN, și anume miR-19b a prezentat o expresie crescută semnificativ statistic.

Pentru a demonstra în continuare efectul direct al LevoDopa în modularea expresiei miR-195/miR-19a/miR-19b, am monitorizat răspunsul neuronilor dopaminergici derivați din celule progenitoare LUHMES la concentrații diferite de LevoDopa. Neuronii dopaminergici au fost expuși la trei concentrații diferite de LevoDopa (10uM, 20uM și 50uM) timp de 24 de ore, apoi spălate cu 1x PBS, colectate și arhivate la -80°C. În urma analizei, rezultatele arată o creștere semnificativă a expresiei miR-19b corelată cu creșterea dozei administrate. În schimb, expresia miR-19a și miR-195 a rămas nemodificată sau a scăzut.

Pentru obținerea unei perspective asupra rolului biologic al miR-19b am încercat identificarea posibilelor sale ținte combinând mai multe tehnici analitice: predicția țințelor folosind algoritmi mirWalk, studiul rețelelor complexe, și interogarea transcriptomelor publicate în GEO (Gene Expression Omnibus).

Folosind studiul rețelelor complexe am încercat să realizăm identificarea cailor de semnalizare targetate de către miR-19b. Genele țintă (în considerare interacțiunea cu regiunile 3'UTR, 5'UTR și secvența codantă CDS) pentru miR-19b au fost prezise utilizând algoritmul miRWalk 3.0, cu un $p \leq 0.05$ (ajustat Bonferroni) ca limită. Apoi, cu ajutorul algoritmului Force Atlas 2 a rezultat o rețea de gene țintă ale miR-19b. Genele au fost grupate topologic în 35 de comunități. Primele 11 comunități care s-au clusterizat central sunt cele mai numeroase. În urma analizei DAVID a genelor din fiecare comunitate au rezultat diferite cai de semnalizare, unele cunoscute a fi asociate cu boala Parkinson, altele nu.

O alta abordare a fost analiza datelor transcriptomice publicate din două experimente pe un model de șoarece cu pierdere progresivă a neuronilor dopaminergici striatali indusă de 6-hidroxidopamină (6-HODA). Acestor șoareci li s-au administrat două concentrații de LevoDopa: una mai redusă și a doua mai crescută. Am realizat această analiză pe acest set de date întrucât 1) nu exista date de transcriptomică umană care să urmărească nivelul de expresie al genelor dereglate funcție de nivelul de LevoDopa și 2) miR-19b matur este extrem de bine conservat în evoluție la vertebrate. Analiza Geo2R (FDR < 0,05, cu ajustare Benjamini-Hochberg) a modelului murin de afectare hemiparkinsoniană sub terapia cu LevoDopa a identificat 5722 (regim LevoDopa ridicat) și 2999 (regim LevoDopa scăzut) gene unice exprimate diferențial (GED), dintre care 651 (11,38%), respectiv 378 (12,61%) sunt posibile ținte 5'-UTR/CDS/3'-UTR ale miR-19b (conform algoritmului miRwalk3.0). Analiza ontologică KEGG (FDR < 0,05) a țințelor miR-19b utilizând platforma DAVID 6.8 a identificat proteoliza mediată de Ubiquitina (UDP) ca țintă a dereglării expresiei miR-19b consecutiv suplimentării cu LevoDopa.

În continuare, ne-am întrebat dacă modificările genelor UDP identificate în modelul murin se regăsesc în datele transcriptomice umane depozitate în GEO. În acest sens, am analizat 22 de seturi de date transcriptomice (analiza Geo2R, FDR < 0,05) urmărind nivelurile de expresie pentru cele 16 gene țintă UDP ale miR-19b.

Toate seturile de date sunt coerente în scăderea expresiei ANAPC1 (în 72,7% din seturile de date), UBE2D3 (68,2%), CUL2, CUL3 și KEAP1 (63,6 %), în timp ce FBXW8 și UBE2J2 sunt sub-exprimate doar în 22,7% din seturile de date analizate.

Dintre aceste gene posibil targetate de miR-19b, am ales 5 dintre ele (CUL2, CUL3, UBE2D3, WWP1, ANAPC1) care au avut expresiile cele mai scăzute și le-am analizat la nivel transcriptomic în celulele neuronale dopaminergice expuse la diferite concentrații de levodopa. Am obținut expresii scăzute pentru CUL2, CUL3 și UBE.

Folosind tehnici de analiza rețelelor complexe, ne-am propus să încercăm realizarea repoziționării unor medicamente în Parkinson. Rețeaua formată conține 1008 noduri/medicamente care au fost analizate și grupate în 26 de comunități topologice indexate în funcție de proprietatea farmacologică dominantă. Din totalul de noduri ale rețelei, 59,52% reprezintă medicamente ale căror proprietate corespunde cu cea din comunitatea corespunzătoare confirmate de versiunea nouă de DrugBank, 26,98% sunt medicamente confirmate de literatura de specialitate, iar 13,49% sunt medicamente neconfirmate, posibile repoziționări.

Comunitatea 20 corespunde medicamentelor Antidepresive și Antiparkinsoniene și cuprinde 21 de medicamente majoritatea fiind confirmate (57,14% de DrugBank și 14,29% de literatură), iar 28,57% sunt posibile repoziționări, dintre care menționez Quinidina, Propafenona,

Cichocaina, MMDA si Aprindina. De menționat ca Propfenona si Quinidina sunt propuse spre repoziționare deoarece au valorile b/d cele mai mari.

DISCUȚII

În literatura de specialitate există o lipsă de consens vis-a-vis de modificările de expresie a microARN circulanți, în funcție de originea lor: plasmă, ser sau celule periferice mononucleare provenite de la pacienții cu Parkinson. Aceste diferențe reflectă nu numai sursa tisulară, dimensiunile loturilor analizate, designul experimental (de la izolarea ARN până la metoda de validare), ci și (așa cum arată datele noastre) la nivelul răspunsurilor individuale la diferite doze de levodopa.

Majoritatea studiilor care au investigat nivelurile de microARN în ser (inclusiv în exosomi), celule periferice mononucleare și LCR au evidențiat o diminuare a nivelului miR-19b la pacienții cu BP comparativ cu loturile control. În schimb, analiza microARN plasmatici a demonstrat niveluri crescute de miR-19b la pacienții cu Parkinson față de controlii sănătoși, dar și față de atrofia multisistemică. Interesant este că analiza globală a exosomilor plasmatici nu a identificat diferențe în expresia miR-19b, ceea ce poate duce la excluderea exosomilor ca factori care contribuie la modificările asociate miR-19b în BP.

Referitor la expresiile miR-19a și miR-195, studiile arată expresii crescute pentru miR-19a în lichidul cefalorahidian, iar pentru miR-195 tot o supra-expresie în ser. Aceste rezultate sunt în concordanță cu datele noastre.

De asemenea, este demn de remarcat faptul că, cu foarte puține excepții, microARN natural îmbogățiti în creier, au niveluri plasmatice crescute la pacienții cu BP, sugerând că sursa tisulară a microARN este un factor major de influență a nivelurilor plasmatice în condiții patologice. Scenariile care pot explica nivelul crescut al microARN sunt: augmentarea transcripției prin diferiți factori care pot acționa la nivelul promoterilor genelor, ceea ce se va traduce printr-un nivel crescut al pri-miR; creșterea stabilității microARN, ceea ce nu este neapărat însoțită de creșterea pri-miR, dar ar putea să fie asociată cu creșterea nivelului unor proteine care să ajute la menținerea stabilității, un exemplu putând fi chiar AGO; diminuarea degradării microARN, poate fi legată de scăderea nivelului unor long noncoding ARN care au capacitatea de a interacționa cu microARN. Identificarea mecanismelor care conduc la creșterea nivelului de microARN necesită experimente suplimentare complexe.

Studiile care au investigat răspunsul microARN la terapia LevoDopa în boala Parkinson, au folosit o abordare ținută pe expresia microARN în celulele sanguine periferice. Cu toate acestea, rezultatele arată aceeași lipsă de deconcertantă consens: Alieva și colab. a descris o creștere semnificativă a miR-7, miR-9-3p, miR-9-5p, miR-129 și miR-132, Serafin și colab. au arătat supraexprimarea miR-103a, miR-30b și miR-29a, în timp ce Caggiu și colab. a constatat o creștere a miR-155 și o scădere a miR-146 în celule periferice mononucleate la pacienții cu Parkinson tratați cu LevoDopa. De remarcat, cu excepția miR-146, toți microARN analizați au o expresie crescută, inclusiv microARN regăsiți în creier, și anume miR-7 și miR-132.

Nu am găsit nicio corelație între niciunul dintre cei cinci microARN plasmatici și vârsta sau stadiul H&Y al pacienților cu BP. Sexul masculin a fost evidențiat ca unul dintre factorii de risc pentru dezvoltarea BP. Interesant este că expresia diferențială dependentă de sex a miR-16 în plasma este pierdută la pacienții cu BP, în timp ce miR-19a și miR-19b își păstrează dependența de sex. De remarcat, de asemenea, ca miR-19a și miR-19b sunt considerate microARN „specifice bărbaților”, în timp ce miR-195 este mai degrabă de specifică femeilor.

Un număr mare de dovezi a arătat că Dopamina este un toxic neuronal și poate determina moartea celulelor neuronale, efect dependent de doză, timp și asociat cu alterarea activității proteazomice mediată de stresul oxidativ

Proteazomul este esențial pentru supraviețuirea neuronală, iar reducerea activității sale proteice a fost corelată cu îmbătrânirea și instalarea bolilor neurodegenerative. Acumularea de agregate proteice în neuronii stresati este în mod normal contracarată de proteoliza dependentă de ubiquitina (UDP), a cărei supraîncărcare duce la o amplificare a stresului oxidativ, la o reducere a bioenergeticii mitocondriale și la moartea neuronală. Stresul oxidativ afectează proteoliza dependentă de ubiquitinare prin oxidarea componentelor UDP și, în mod specific, prin inhibarea activității subunității 26 a proteazomului, S-glutathionilarea și S-nitrozilarea ubiquitin ligaselor. De remarcat, α -sinucleina poate fi eliminată independent de ubiquitinare, prin activitatea endoproteolitică directă a proteazomului 20S. Pentru a complica problema, agregate de α -sinucleina rezultate din alterarea UDP afectează în continuare activitatea proteazomului, într-o relație biunivocă care duce la moartea neuronală.

Analiza datelor transcriptomice din BP arată o lipsă de consens în ceea ce privește nivelul genelor exprimate diferențial în toate țesuturile; cu toate acestea, în ciuda eterogenității intra și inter-experimentale a populațiilor de celule analizate, concordanța se îmbunătățește atunci când analiza transcriptomica se concentrează pe căile de semnalizare modificate. Activitatea proteazomului a fost raportată ca fiind modificată în studiile transcriptomice din diferite regiuni ale creierului (inclusiv la nivel extra-nigral), sângelui sau LCR, indicând o modificare sistemică a acestei căi în BP. Datele noastre sugerează că această modificare ar putea reflecta de fapt răspunsul diferitelor țesuturi la terapia LevoDopa prin modularea nivelului de expresie a microARN.

Relația dintre microARN și UDP a fost explorată în multiple contexte experimentale și clinice *in vivo* și *ex vivo*, inclusiv inima, celulele osteosarcomului și bolile neurodegenerative. Diferite componente ale sistemului UDP au fost descrise ca ținte microARN, printre care: izoformele E2 ale UE2A, UBE2B, UBE2D3 și UBCH10 targetate de miR-7, miR-455-5p, miR-21-5p și respectiv miR-631. E3-ubiquitin ligaza Parkin asociată cu BP este targetată de miR-181a în mușchii senescenti. Nivelurile miR-103a-3p sunt crescute într-un model MPTP *in vitro* și *in vivo* al bolii Parkinson, miR-146a este supraexprimat într-un model de neurodegenerare indus de rotenonă, iar nivelurile miR-218 sunt crescute în celulele HEK293. Datele noastre sugerează că LevoDopa alterează activitatea UDP în neuronii dopaminergici prin modificarea activității enzimei E2 Ubiquitin/ E2 Ubiquitin-conjugating enzyme, a sistemului E3 Ubiquitin ligază și a complexelor Cullin-2, -3 și -7, modificări mediate de creșterea miR-19b.

Deși arătăm că neuronii dopaminergici răspund la LevoDopa prin creșterea nivelului miR-19b matur, sursa exactă a miR-19b plasmatic la pacienții tratați cu LevoDopa nu este nici pe departe clară. Cu toate acestea, sub rezerva validării în loturi mai mari și mai eterogene, noi considerăm ca miR-19b ar putea fi utilizat ca biomarker de răspuns în terapia LevoDopa, deschizând o nouă cale în cercetarea clinică. O altă întrebare deschisă se referă la rolul acestui miR circulant în progresia BP sub terapia de substituție. În acest sens, tamponarea creșterii expresiei miR-19b s-ar putea dovedi a fi o modalitate eficientă de a preveni sau cel puțin a diminua neurotoxicitatea asociată cu LevoDopa.

Ținte miR-19b detectate prin analiza de rețele complexe

Căile de semnalizare rezultate în urma analizei rețelei de gene posibile ținte ale miR-19b au fost căutate în literatura de specialitate pentru a face corelația cu boala Parkinson. Din comunitatea 1 căile Focal adhesion, Phosphatidylinositol signaling system. Chemokine signaling pathway, au

fost raportate si de alte grupuri ca fiind asociate cu boala Parkinson, iar din comunitatea 2 doar calea de semnalizare Cell cycle. Shehadeh si colab. arata ca Serine/Arginine Repetitive Matrix 2 (SRRM2), care este un component al spliceosomului, este crescut in sângele pacienților cu BP, deci din comunitatea 3 singura cale de semnalizare care este asociata cu BP e calea Spliceosome. In comunitatea 4, din patru cai de semnalizare identificate, doar 2 sunt au fost asociate cu boala Parkinson si anume Metabolic pathways (întâlnită si in comunitatea 9) si Valine, leucine and isoleucine degradation regăsită in literatura sub forma Amino acid metabolism. Comunitatea 6 este reprezentata doar de Ubiquitin mediated proteolysis, aceasta fiind una din căile cel mai des citate in literatura ca fiind asociata cu BP.

Repozitionari de medicamente prin analiza de rețele complexe

Rețeaua conține un număr mare de medicamente confirmate cu proprietățile specifice din comunitățile din care fac parte (57,14%); in plus, încă 14,29% medicamente au fost validate de studii noi de literatura, deci exista o probabilitate crescuta ca cele propuse spre repoziționare sa aibă proprietăți noi.

Daca analizam comunitățile separat, cea cu numărul 16 care conține medicamente antidepresive si stimulante ale SNC (o comunitate apropiata de cea care conține antiparkinsonienele) conține toate medicamentele confirmate 92,31% de către DrugBank si 7,69% de către literatura ceea ce este încurajator pentru validarea medicamentelor din comunitatea 20 medicamente antidepresive si antiparkinsoniene. Alte exemple de comunități la care toate medicamentele sunt validate sunt: 2 antihipertensive, 14 anticolinergice, 26 hipnotice si sedative. In plus, din cele 14 medicamente propuse spre repoziționare, acidul azelaic si meprobumatol, au fost studiate prin metode de docking molecular care arata posibilitatea repoziționării in anticanceroase si antifungice.

In literatura au mai fost propuse repoziționări in Parkinson, iar un exemplu interesant este cel a lui Ayoub si colab., care propun un agent antidiabetic ca posibila reutilizare. Omarigliptin este primul din clasa gliptinelor care are capacitatea de a trece de bariera hematoencefalica cu posibila acțiune neuroprotectoare.

Exista si un studiu in literatura care face legătura intre Parkinson si quinidina, dar in acest caz medicamentul este folosit împreună cu dextrometorfanul in tratarea diskineziei induse de tratamentul cu levodopa la pacienții parkinsoniei.

Deci, propunerile noastre de repoziționare ca agenți antidepresivi / antiparkinsonieni sunt quinidina si propafenona, doua medicamente antiaritmice.

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Am încercat sa identificam microARN asociați cu boala Parkinson pentru ca prezinta o serie de avantaje (stabilitate in lichidele biologice si pot fi cuantificați cu ajutorul unor metode destul de rapide) fata de biomarkerii proteici. In plus, determinarea alfa-sinucleinei propusa pentru diagnosticul Parkinson se face din lichidul cefalorahidian, iar pentru recoltarea acestuia este nevoie de personal specializat si de un mediu spitalicesc dedicat.

Din păcate, in ceea ce privește expresia microARN in boala Parkinson, literatura de specialitate prezinta date divergente, datorita influentei țesutului de origine, a mediului circulant (ser, plasmă sau celule periferice mononucleate). Unele dintre aceste date sunt in concordanta cu rezultatele noastre, dar altele nu.

Analiza în două etape (screening și validare) a microARN plasmatici ca posibili biomarkeri în boala Parkinsony a condus la identificarea a doar 5 microARN (miR-16, miR-19a, miR-19b, miR-195, miR-92a) a căror expresie este crescută semnificativ statistic. Niciunul din aceștia nu se corelează cu vârsta sau stadiul Y-H al pacienților.

Din cei cinci microARN, doar miR-19a, miR-19b, miR-195 rămân modificați semnificativ atât în cazul bărbaților, cât și al femeilor. Analiza ROC arată ca toți cei trei microARN, miR-19a, miR-19b, miR-195 au capacitatea de a diferenția pacienții cu Parkinson de controli, având cele mai mari arii de sub curbă, comparativ cu miR-16 și miR-92a ale căror rezultate sunt mai modeste.

Comparând rezultatele noastre cu cele din literatura, se poate observa o concordanță pentru miR-19a și miR-195, dar aceasta nu se menține în cazul miR-19b. În literatura, atât miR-19a (lichid cefalorahidian) cât și miR-195 (ser) au expresii crescute în BP, în schimb pentru miR-19b datele sunt contradictorii. Majoritatea prezintă expresii scăzute în lichid cefalorahidian, ser, celule periferice mononucleate, în schimb Burgos și colab. au identificat expresii crescute pentru miR-19b în lichidul cefalorahidian, iar Uwatoko și colaboratorii arată o expresie crescută în plasma pacienților cu BP.

Evaluarea expresiei plasmatice a miR-19a, miR-19b, miR-195 în probele provenite de la pacienți înainte de tratament și după tratamentul cu levodopa arată ca doar miR-19b a prezentat o expresie crescută semnificativ statistic.

Astfel, propunem miR-19a și miR-195 ca având un posibil rol în biologia PD, iar miR-19b ar putea fi considerat ca un răspuns la terapia cu levodopa.

Din cunoștințele noastre, exceptând studiul lui Margis pe probe cumulate de sânge integral provenite de la un doar 4 pacienți înainte și după tratament, noi am efectuat primul studiu care investighează individual plasme de la aceiași pacienți înainte și după tratamentul cu levodopa. Toate celelalte date care vizează răspunsul microRNA la terapia cu levodopa sunt efectuate pe loturi diferite de pacienți: Serafin și colab. (miR-103a, miR-30b și miR-29a), Alieva și colab. (miR-7, miR-9-3p, miR-9-5p, miR-129 și miR-132), Caggiu și colab. (miR-155 și miR-146). În aceste studii, cu excepția miR-146, toți microARN analizați au o expresie crescută.

Pentru a demonstra rolul posibil al levodopa în modularea expresiei miR-19b, miR-195, miR-19a, am studiat răspunsul neuronilor dopaminergici în cultură la concentrații diferite de levodopa. Am constatat o scădere treptată a expresiei miR-19a și miR-195 odată cu creșterea concentrației levodopa, în timp ce miR-19b a avut o creștere semnificativă a expresiei funcție de creșterea dozei administrate, acest aspect fiind în concordanță și confirmând rezultatele din lotul naiv.

Pentru a obține o perspectivă asupra rolului biologic al miR-19b am realizat predicția posibilelor ținte ale sale (analiza miRWalk); acestea au fost studiate cu ajutorul rețelelor complexe și s-au clusterizat în mai multe comunități, fiecareia corespunzându-i una sau mai multe cai de semnalizare asociate sau nu cu BP. Dar, din păcate în acest caz rezultatele nu fost încurajatoare, cu excepția cailor UDP, o cale care conține gene validate în BP de alți autori.

O altă abordare pentru relevarea rolului biologic al miR-19b în Parkinson a fost realizat prin identificarea genelor țintă ale miR-19b (analiza miRWalk) din ansamblul genelor exprimate într-un model experimental de șoareci parkinsonieni, tratați cu levodopa. Predicția cailor de semnalizare a indicat ca principala cale UDP, cu 16 gene țintă, dintre care 2 au fost validate ca ținte miR-19, și anume UBE2D3 și TRIM37.

Această analiză transcriptomică a fost validată în celulele tratate cu Levodopa, unde am găsit expresii scăzute semnificativ pentru UBE2D3, CUL2, CUL3. Este plauzibil ca miR-19b indusă de Levodopa este un nou modulator al cailor UDP prin modificarea activității enzimei E2

Ubiquitin/ E2 Ubiquitin-conjugating enzyme, a sistemului E3 Ubiquitin ligază și a complexelor Cullin-2, -3 și -7.

Un alt obiectiv a fost de a repoziționa unele medicamente în BP folosind un algoritm bazat pe rețele complexe. Am obținut Quinidina și Propofolul (două antiaritmice) ca posibile medicamente utile în terapia Parkinson. Acesta este un studiu pur *in silico* care, deși cu argumente solide în favoarea repoziționării, are nevoie de validare experimentală. Din cunoștințele noastre, este pentru prima dată când aceste medicamente sunt propuse ca antiparkinsonie.

În concluzie, propunem miR-19a, miR-195 ca fiind implicate în biologia bolii Parkinson, în timp ce miR-19b ar putea servi ca un biomarker de răspuns în terapia Levodopa, deschizând o nouă cale în cercetarea clinică.