

HEALTHY NEURAL NETWORKS

DOPAMINERGIC PATHWAY DISRUPTION (PARKINSON'S)

AMYLOID & TAU PATHOLOGY (ALZHEIMER'S)

BRAINPRECISION

UNDERSTAND. TARGET. TRANSFORM.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΠΡΑΞΗΣ: TAEDR-0535850

Δράση «Εμβληματικές δράσεις σε διαθεματικές επιστημονικές περιοχές με ειδικό ενδιαφέρον για την σύνδεση με τον παραγωγικό ιστό» ID 16618

Εθνικό δίκτυο έρευνας για την ανάδειξη της γενετικής βάσης των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson, την ανίχνευση αξιόπιστων βιοδεικτών και την ανάπτυξη καινοτόμων υπολογιστικών τεχνολογιών και θεραπευτικών στρατηγικών στη βάση της ιατρικής ακριβείας (BRAIN PRECISION, TAEDR-0535850)

ΤΙΤΛΟΣ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ: Ανάπτυξη πειραματικών μοντέλων βασισμένων σε γενετικά ευρήματα στη Νόσο Πάρκινσον (ΝΠ)

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

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΚΥΡΟΥΣΗ (ΕΚΠΑ)

Ενότητα Εργασίας 4

Τίτλος Παραδοτέου. 4.4. Ανάπτυξη πειραματικών μοντέλων βασισμένων σε γενετικά ευρήματα στη Νόσο Πάρκινσον (ΝΠ)

A. (Ομάδα Κυρούση).

ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ / ΕΙΣΑΓΩΓΗ

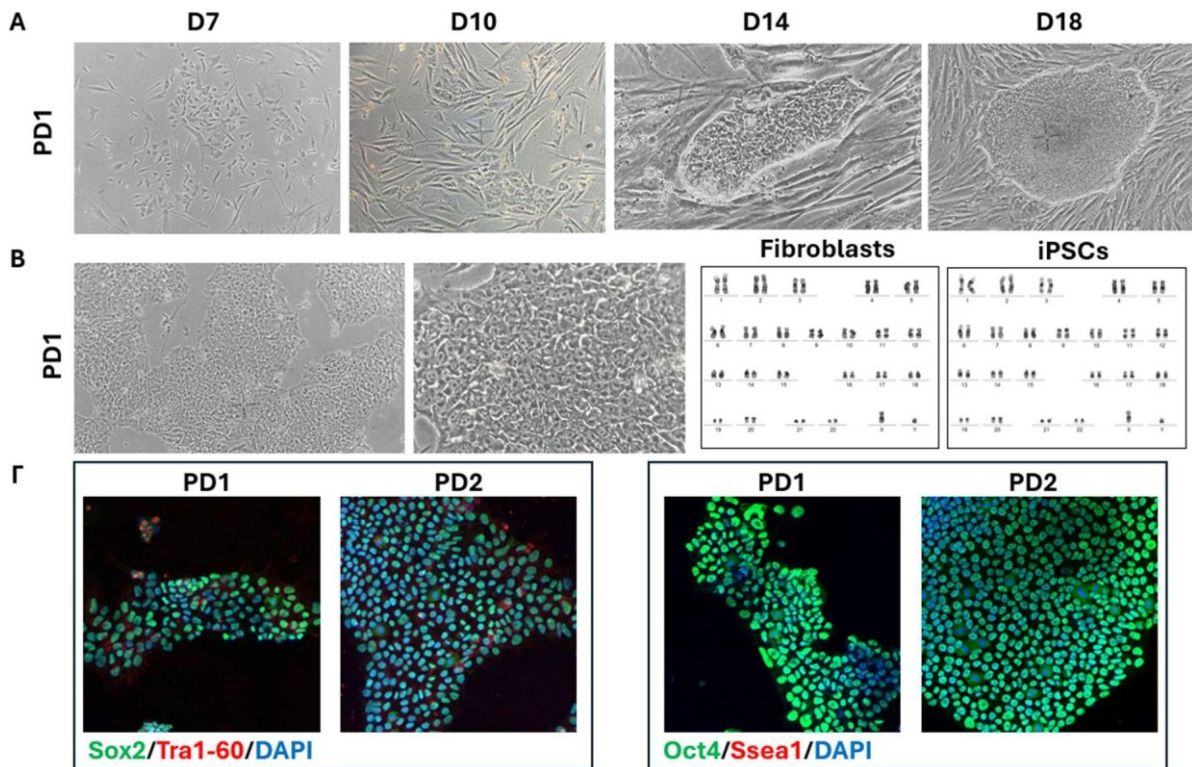
Μοντελοποίηση γενετικής μορφής ΝΠ με δημιουργία ανθρώπινων νευρικών κυττάρων επαγόμενων από ινοβλάστες ασθενών με την μετάλλαξη A30G στο SNCA γονίδιο.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΕ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

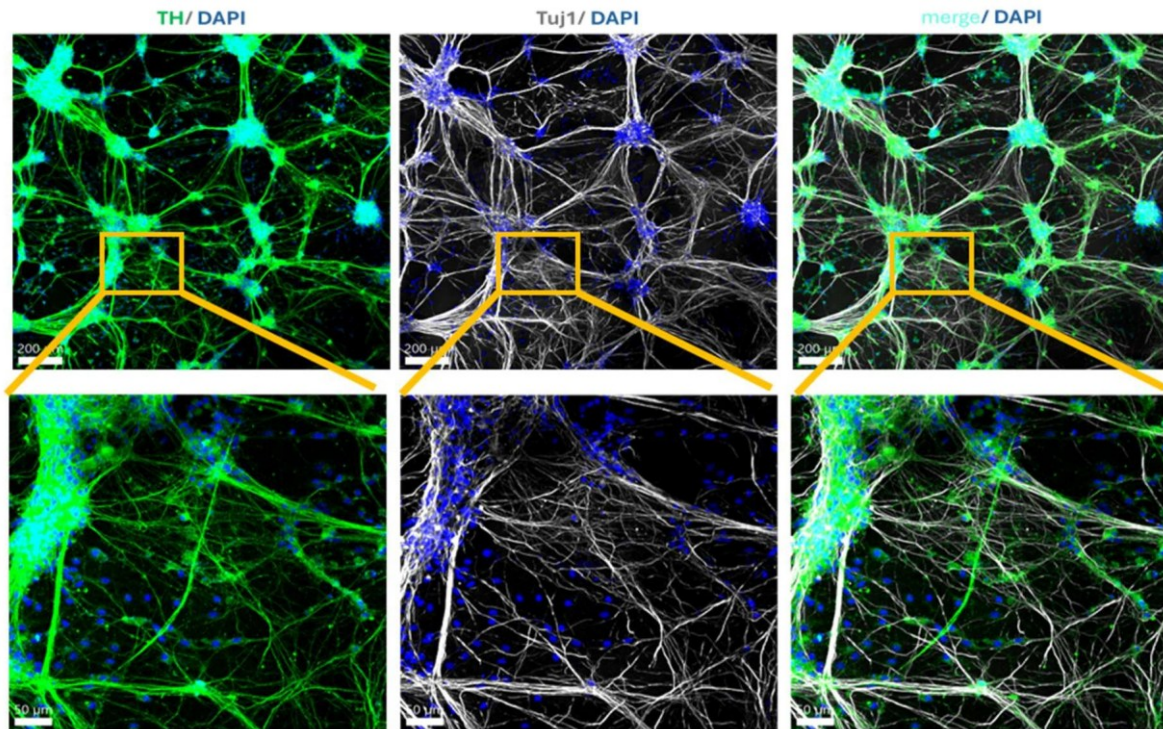
Δημιουργήθηκαν κλώνοι iPSCs από 2 διαφορετικούς ασθενείς με την μετάλλαξη A30G στο SNCA γονίδιο. Αυτοί, όπως και κλώνοι από άτομα ελέγχου, διαφοροποιήθηκαν σε νευρωνικούς ντοπαμινεργικούς νευρώνες και έγινε ένας αρχικός χαρακτηρισμός τους.

Πίνακας 1. Λίστα iPSC κλώνων που δημιουργήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια του έργου

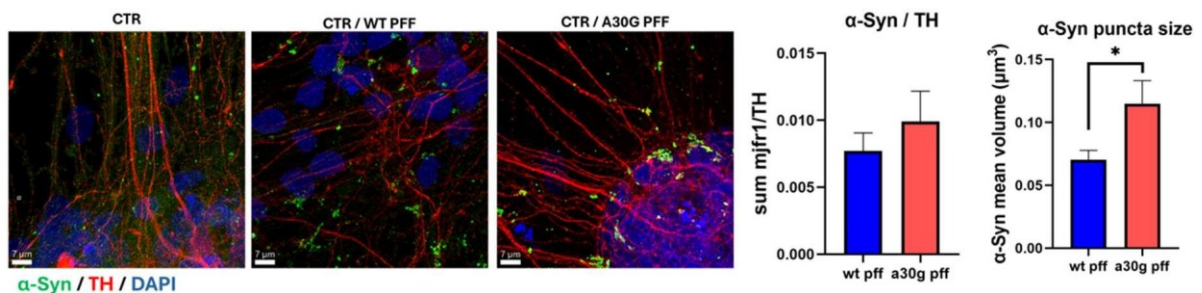
	N of Karyotyped cells	N of analyzed cells	Karyotype	Pluripotency test	Κλώνοι που χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση
Fibroblasts patient 570	8	19	46,XY/47,XY,+18 PNA MOSAIC		
iPSCs					
570.4	10	21	46,XY	+	+
570.4 pool	7	24	46,XY		
570.5	6	20	46,XY, t(1;7)(q12;pter)	+	
570.6	9	25	46,XY	+	
570.7	5	19	47,XY,+18	+	
570.10	8	20	47,XY,+18	+	
570.12	4	23	47,XY,+18	+	
570.13	3	25	47,XY,+18	+	
570.14	5	19	46,XY	+	+
Fibroblasts patient Math 55	8	21	46,XX		
iPSCs					
mAth55_1	5	20	46,XX	+	+
mAth55_4	5	20	46,XX	+	
mAth55_5	7	18	46,XX	+	
mAth55_6	5	20	46,XX	+	
mAth55_12	7	7	47,XX,+i(16q)	+	
PBMCs patient C158	7	12	46,XX		
iPSCs					
C158_2	13	20	46,XX	+	
C158_4	7	20	46,XX	+	
C158_10	7	20	46,XX	+	
Commercially available iPSC line (#1)	-	-	46,XY	-	+



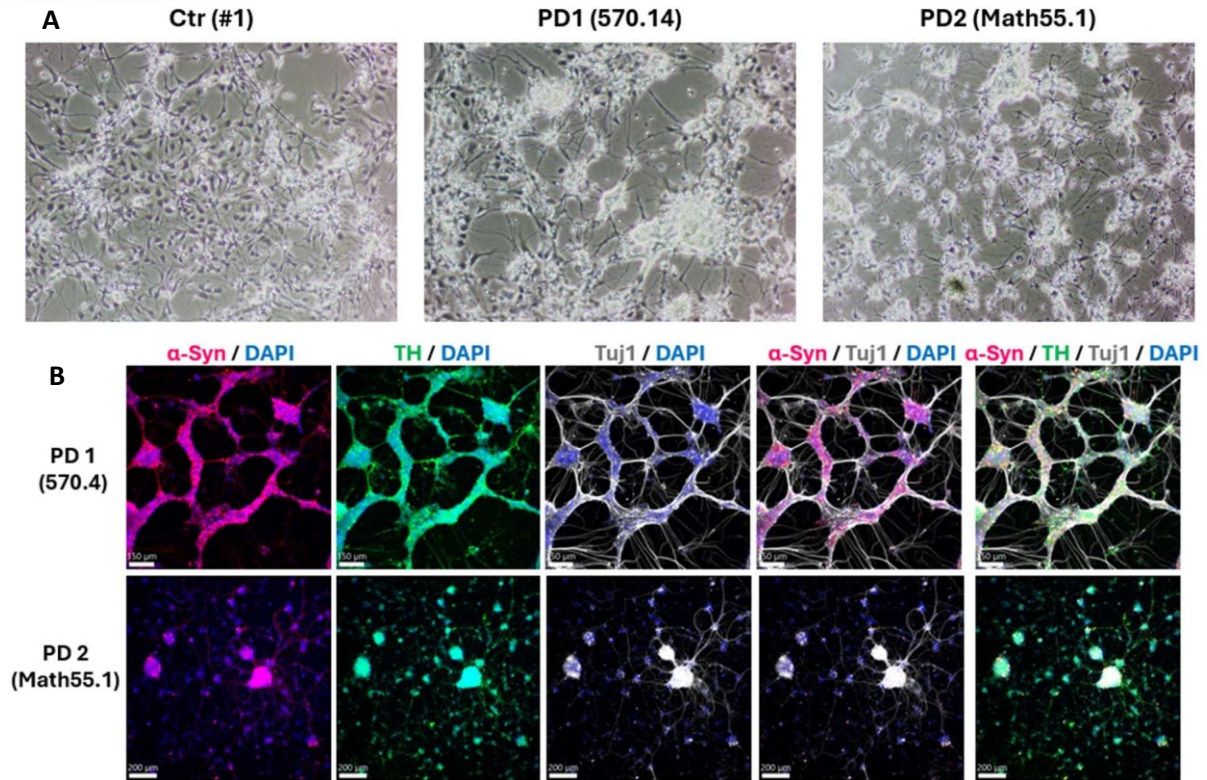
Εικόνα 1. Δημιουργία και χαρακτηρισμός ανθρώπινων επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κύτταρων (iPSC) δύο ασθενών (PD1 και PD2) με την μετάλλαξη A30G της α-συνουκλεΐνης. Α. Επαναπρογραμματισμός ανθρώπινων ινοβλαστών ασθενών με την μετάλλαξη A30G της α-συνουκλεΐνης, σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSC). Β. Καρυοτυπικός έλεγχος iPSC κλώνων. Γ. Έλεγχος των iPSC κλώνων ως προς την πολυδυναμία τους με ανοσοκυτταροχημεία και χρήση αντισωμάτων έναντι των δεικτών Sox2, Tra1-60, Oct4. Το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Ssea1 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.



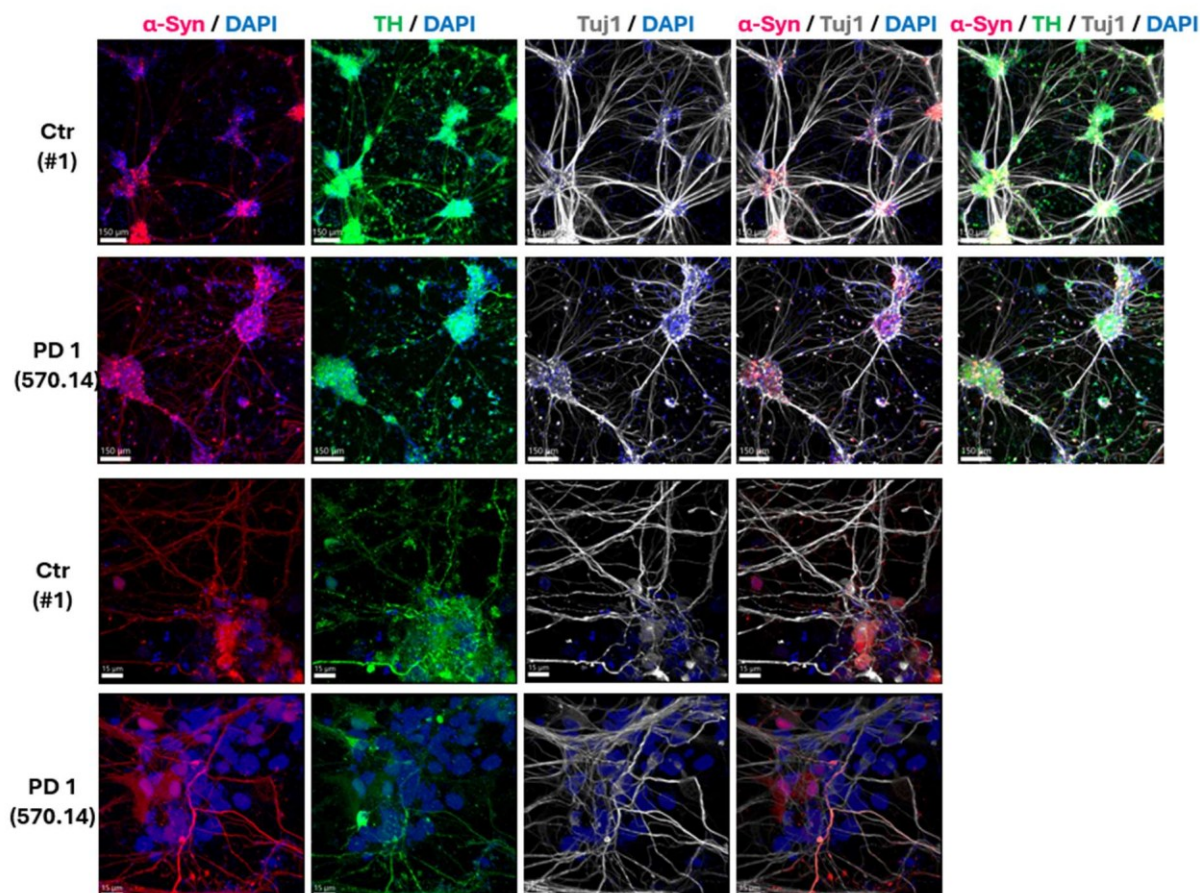
Εικόνα 2. Διαφοροποίηση επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κύτταρων (iPSC) σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Nishimura et al., 2023. iPSC- κύτταρα υγιούς ατόμου διαφοροποιήθηκαν σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες και την ημέρα 53 (d53) πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός με χρήση αντισωμάτων έναντι των TH (Tyrosine Hydroxylase) και Tuj1 (β3-Tubulin). Η χρωστική DAPI χρησιμοποιήθηκε για την σήμανση των πυρήνων. Παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των κυττάρων έχει επιτυχώς διαφοροποιηθεί σε ενυρώνες (Tuj1+) και εμφανίζει ντοπαμινεργικό χαρακτήρα (TH+).



Εικόνα 3. Πυρήνωση και συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες προερχόμενους από iPSC κύτταρα υγιούς ατόμου έπειτα από τη χρήση ανασυνδυασμένων ινιδίων αγρίου τύπου και A30G α-συνουκλεΐνης. iPSC κύτταρα υγιούς ατόμου διαφοροποιήθηκαν σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες και την ημέρα 48 προστέθηκαν ανασυνδυασμένα ινίδια (PFF) wt και A30G α-συνουκλεΐνης. Μετά από 5 ημέρες επώασης, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε χρώση με αντισώματα έναντι της α-συνουκλεΐνης, του TH και του Tuj1. Η χρωστική DAPI χρησιμοποιήθηκε για την σήμανση των πυρήνων. Τα ραβδογράμματα δείχνουν τον όγκο της α-συνουκλεΐνης ως προς τον όγκο των κυττάρων (αριστερά) καθώς και το μέγεθος των συσσωματωμάτων της α-συνουκλεΐνης (δεξιά). Παρατηρείται αύξηση της πυρήνωσης και συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης στη περίπτωση χρήσης A30G ινιδίων γεγονός που υποδηλώνει τον παθολογικό τους χαρακτήρα.



Εικόνα 4. Διαφοροποίηση και χαρακτηρισμός των iPSC κυτταρικών σειρών από ινοβλάστες υγιούς ατόμου και δύο ασθενών που φέρουν την A30G μετάλλαξη. Α. Αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης ντοπαμινεργικών νευρώνων, 34 ημέρες μετά την έναρξη της διαφοροποίησης. Β. iPSC κύτταρα ασθενών που φέρουν την A30G μετάλλαξη (PD1, κλώνος 570.4, PD2, κλώνος Math55.1) διαφοροποιήθηκαν σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Την ημέρα 40, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός και χρώση έναντι της α-συνουκλεΐνης, του TH και του Tuj1. Η χρωστική DAPI χρησιμοποιήθηκε για την σήμανση των πυρήνων. Αντιπροσωπευτικές 3D εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας με τη χρήση 10x φακού. Η επεξεργασία των εικόνων έγινε με το λογισμικό Imaris. Παρατηρείται η ικανότητα διαφοροποίησης των A30G iPSCs να διαφοροποιούνται επιτυχώς προς ντοπαμινεργικούς νευρώνες στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας (d34) με τη δημιουργία νευρωνικού δικτύου το οποίο όμως δεν διατηρείται σε μετέπειτα στάδια σε αντίθεση με τα iPSC κύτταρα υγιούς ατόμου.



Εικόνα 5. Χαρακτηρισμός ντοπαμινεργικών νευρώνων προερχόμενων από iPSC κυτταρικές σειρές υγιούς ατόμου και ασθενούς που φέρει την A30G μετάλλαξη. iPSC κύτταρα υγιούς ατόμου (Ctr, κλώνος #1) και ασθενούς που φέρει την A30G μετάλλαξη (PD1, κλώνος 570.14) διαφοροποιήθηκαν σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Την ημέρα 50, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός και χρώση με αντισώματα έναντι της α-συνουκλεΐνης, του TH και του Tuj1. Η χρωστική DAPI χρησιμοποιήθηκε για την σήμανση των πυρήνων. Αντιπροσωπευτικές 3D εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας με τη χρήση 10x και 63x φακού. Η επεξεργασία των εικόνων έγινε με το λογισμικό Imaris. Παρατηρείται ότι στις καλλιέργειες των ντοπαμινεργικών νευρώνων προερχόμενων από iPSC κύτταρα ασθενών που φέρουν την A30G μετάλλαξη εμφανίζεται μεγαλύτερη συσσώρευση της παθολογικής α-συνουκλεΐνης.

Αναρτημένη ανακοίνωση 1. Δημοσίευση αποτελεσμάτων στο διεθνές συνέδριο: 31η Διετής συνάντηση της Ελληνικής Εταιρεία Νευροεπιστημών, ESN-HSN Join Meeting, 18-21 Μαΐου 2025, Νάξος

Characterization of the novel A30G α -Synuclein mutant in Parkinson's Disease

Marina Pantazopoulou^{1,2}, Vasilina-Zafeira Gavra^{1,2}, Michalis Stamoulos¹, Audrey

Coens³, Ronald Melki³, Martina Samiotaki⁴, Christina Kyrousi^{1,2}, Leonidas Stefanis^{1,2}

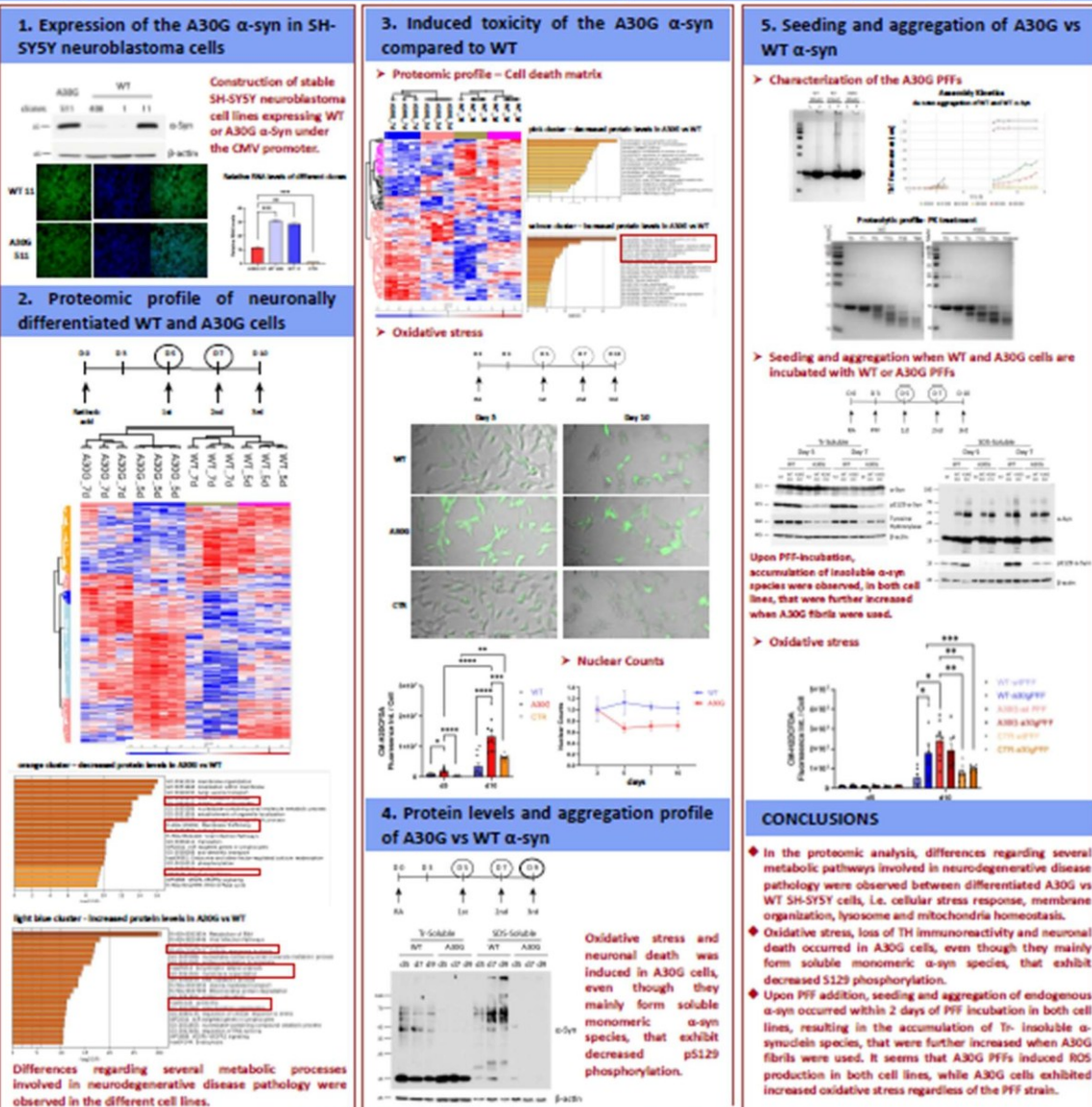
HEALTHY RESEARCH
National and Kapodistrian
University of Athens

¹Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, ²Clinical-Experimental Surgery & Translational Research, Athens, Greece, ³National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, Athens, Greece, ⁴Institut François Jacob (MIRCA), CNRS, CEA and Laboratory of Neurodegenerative Diseases, Sorbonne-université, France, ⁵Alexander Fleming Biomedical Sciences Research Center, BSRC, Athens, Greece.

ACADEMY OF ATHENS
BRFAA
BIOMEDICAL RESEARCH FOUNDATION
ACADEMY OF ATHENS

Abstract

Our main aim is to unravel the biochemical properties of the A30G α -synuclein (α -syn) mutant in a cellular context, deciphering the mechanisms governing aggregation and induced toxicity, leading to a better understanding of PD pathogenesis. Hence, we constructed stable neuroblastoma cell lines overexpressing WT or A30G α -syn and assessed the proteomic profile, the α -syn-induced toxicity, as well as the seeding and aggregation propensity of the A30G α -syn compared to WT. In the proteomic analysis, we observed differences regarding several metabolic pathways involved in neurodegenerative disease pathology, i.e. cellular cell response, membrane organization, lysosome and mitochondria homeostasis. Interestingly, proteins involved in positive regulation of apoptotic processes were increased in A30G cells. To verify this, we assessed A30G α -Syn-induced toxicity by measuring ROS and cell viability (nuclear counts). A30G cells displayed an early pattern of oxidative stress, followed by increased cell death. Additionally, we assessed protein levels and the formation of α -syn aggregated species. It seems that A30G cells form mainly soluble α -syn species with limited phosphorylation, compared to WT cells. Using WT and A30G α -syn recombinant fibrils (PFFs) in neuronally differentiated WT and A30G cells, we examined seeding and aggregation of endogenous α -syn, as well as the induced cell stress. Upon PFF addition, seeding and aggregation of endogenous α -syn occurred within 2 days of PFF incubation in both cell lines, resulting in the accumulation of insoluble α -syn species, that were further increased when A30G PFFs were used. Phosphorylation of A30G α -syn was limited in A30G cells, even in the presence of PFFs. It seems that A30G PFFs induced ROS production in both cell lines, while A30G cells exhibited increased oxidative stress regardless of the PFF strain. Interestingly, proteomic analysis revealed that A30G cells demonstrated decreased TH levels, that were further verified by immunoblotting. Our results highlight that A30G α -syn seems to be less potent to form aggregates that are less phosphorylated than WT α -syn, nonetheless is efficiently inducing cellular stress and cell death, propagating α -syn-induced pathology.



Co-funded by
the European Union

ΕΣΠΑ
2021-2027
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ
ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Funded by Brain Precision (TAMR-0535850), funded by the General Secretariat of Research and Innovation (GSRI), through funds provided by the European Union (Next Generation EU) to the National Recovery and Resilience Plan.

HFRI
HEALTHY RESEARCH
FOUNDATION FOR RESEARCH AND INNOVATION

The research project was supported by the Healthy Foundation for Research and Innovation (HFRI) under the "HFRI Research Projects to Support Post-Doctoral Researchers" (Project Number: 7647).

Αναρτημένη ανακοίνωση 2. Δημοσίευση αποτελεσμάτων στο εθνικό συνέδριο 75ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 5-7 Δεκεμβρίου 2025, Αθήνα

The novel A30G α -Synuclein mutant in Parkinson's Disease: Dissociation of oligomerization and phosphorylation from neuronal toxicity



Marina Pantazopoulou¹, Spyros Merkouris², Niki Georgiadou¹, Michalis Stamoulos¹, Vasilina-Zafeira Gavra¹, Tristan Herskovits-Serre³, Ronald Melki³, Martina Samiotaki⁴, Christina Kyrou¹, Leonidas Stefanis¹

¹ Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Clinical-Experimental Surgery & Translational Research, Athens, Greece, ² University Mental Health Research Institute, UMHR, Cellular and Molecular Neuroscience Department, Athens, Greece, ³ Institut Francis Jacob (MIRAC), CNRS, CEA and Laboratory of Neurodegenerative Diseases, Fontenay-aux-Roses, France, ⁴ Alexander Fleming Biomedical Sciences Research Center, BGRC, Athens, Greece.

Abstract

Our main aim is to unravel the biochemical properties of the novel A30G α -synuclein (α -syn) mutant in a cellular context, deciphering the mechanisms governing aggregation and neurotoxicity, leading to a better understanding of Parkinson's Disease pathogenesis. Hence, we constructed stable SH-SY5Y neuroblastoma cell lines overexpressing at comparable levels WT or A30G α -syn and assessed the proteomic profile, α -syn conformations, the α -syn-induced neurotoxicity and various related cell indices, as well as the seeding propensity of A30G α -syn compared to WT. In the proteomic analysis, we observed differences regarding several metabolic pathways involved in neurodegenerative disease pathology, i.e. cellular stress response, membrane organization, lysosome and mitochondria homeostasis. We assessed A30G α -Syn-induced neurotoxicity by measuring ROS levels, mitochondrial transmembrane potential, caspase activity and cell viability. A30G cells displayed an early pattern of oxidative and mitochondrial stress and decreased TH levels, accompanied by caspase 3 activation and increased cell death. Surprisingly, A30G cells displayed much lower levels of Triton-soluble and insoluble oligomeric and S129-phosphorylated α -syn species relative to WT. This was accompanied by reduced membrane binding. Using WT and A30G α -syn recombinant fibrils (PFFs) in WT and A30G differentiated neuroblastoma cells, as well as in WT iPSC-derived dopaminergic neurons, we examined seeding and aggregation of endogenous α -syn, as well as the induced cell stress. Upon WT PFF addition, seeding and aggregation of endogenous α -syn occurred within 4 days of PFF incubation, resulting in the accumulation of insoluble α -syn species, that were further increased when A30G PFFs were used in both cell models. Our results highlight that the enhanced neurotoxicity of A30G α -syn is accompanied by its reduced oligomerization and phosphorylation in a cellular context, while in its fibrillar form it is more potent than WT in seeding endogenous α -syn, propagating pathology.

