

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: Χαρακτηρισμός Μοντέλου Εγκεφαλικών Οργανοειδών από iPSC Ασθενών με Νευροεκφυλιστικές Ασθένειες

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

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΧΡΗΣΤΟΣ ΓΚΟΓΚΑΣ (ΙΒΕ-ΙΤΕ)

Περιεχόμενα

Παραδοτέο 1: Χαρακτηρισμός Μοντέλου Εγκεφαλικών Οργανοειδών από iPSC Ασθενών με Νευροεκφυλιστικές Ασθένειες	2
Εισαγωγή στη Νόσο Parkinson	2
Σκοπός του Έργου.....	5
Μεθοδολογία	5
Κύρια Αποτελέσματα	11
Συζήτηση και Σημασία του Μοντέλου	11
Δραστηριότητες διάχυσης και επικοινωνίας	14
Βιβλιογραφία.....	14

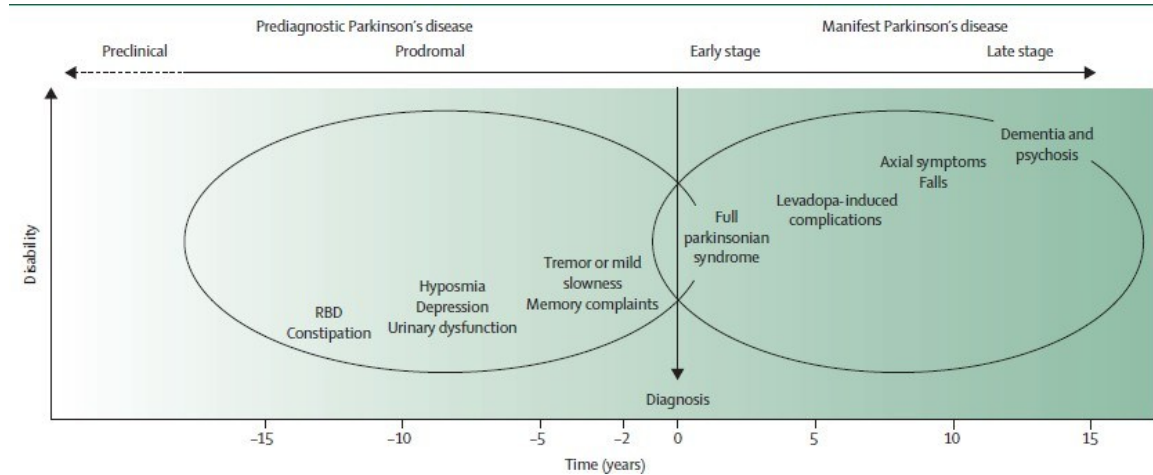
Παραδοτέο: Χαρακτηρισμός Μοντέλου Εγκεφαλικών Οργανοειδών από iPSC Ασθενών με Νευροεκφυλιστικές Ασθένειες

Εισαγωγή στη Νόσο Parkinson

Η νόσος Parkinson (PD) αποτελεί μία από τις πιο γνωστές και μελετημένες νευροεκφυλιστικές διαταραχές, κατατασσόμενη ως η δεύτερη πιο συχνή παγκοσμίως μετά τη νόσο Alzheimer. Εκτιμάται ότι πάνω από 6 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως πάσχουν από τη νόσο, αριθμός που αυξάνεται δραματικά λόγω της γήρανσης του πληθυσμού. Από το 1991, η συχνότητα εμφάνισης της νόσου έχει διπλασιαστεί, ενώ οι προβλέψεις δείχνουν περαιτέρω αύξηση τις επόμενες δεκαετίες. Αυτό καθιστά τη νόσο Parkinson μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις για τη δημόσια υγεία, επηρεάζοντας όχι μόνο τους ασθενείς αλλά και τις οικογένειές τους και τα συστήματα υγείας παγκοσμίως.

Η νόσος χαρακτηρίζεται από την προοδευτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων που εντοπίζονται στη μέλαινα ουσία του εγκεφάλου, μια περιοχή που είναι κρίσιμη για τον έλεγχο των κινήσεων. Η εκφύλιση αυτή οδηγεί σε σημαντική μείωση της παραγωγής του νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση της κίνησης και άλλων λειτουργιών. Ένα από τα κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι η εμφάνιση σωματίων Lewy, κυτταρικών συσσωματωμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη. Η δυσλειτουργική α-συνουκλεΐνη θεωρείται ότι παίζει κεντρικό ρόλο στην

παθογένεια της νόσου, καθώς συσσωρεύεται σε τοξικές μορφές που συμβάλλουν στη νευρωνική εκφύλιση.



Προ-κλινικό στάδιο	Προδρομικό στάδιο	Νόσος Parkinson
<ul style="list-style-type: none"> Δεν υπάρχουν συμπτώματα 	<ul style="list-style-type: none"> Μη-ειδικά συμπτώματα 	<ul style="list-style-type: none"> Δυσκολία διάκρισης παρκινσονισμού - ψευδο-παρκινσονισμού στα πρώιμα στάδια
<ul style="list-style-type: none"> Δεν υπάρχουν βιοδείκτες 	<ul style="list-style-type: none"> Με-ειδικοί βιοδείκτες (μόνο βιοδείκτες νευροεκφύλισης υπάρχουν) 	<ul style="list-style-type: none"> Κλινική επικάλυψη μεταξύ νόσου Parkinson και ατυπικού Παρκινσονισμού.
<ul style="list-style-type: none"> Γενετική ανάλυση και συμβουλευτική είναι διαθέσιμες 	<ul style="list-style-type: none"> Υπάρχει επικάλυψη μεταξύ προδρομικού και πρώιμου σταδίου της νόσου 	<ul style="list-style-type: none"> Δεν υπάρχουν ειδικοί βιοδείκτες με μεγάλη ευαισθησία πρόγνωσης της νόσου. Ωστόσο υπάρχουν κάποια επικουρικά διαγνωστικά τεστ (π.χ. απεικόνιση DaTscan - μέτρηση ντοπαμίνης στον μεσεγκέφαλο με ανεύρεση ανωμαλιών της αιμάτωσης σε συνδυασμό με ραδιοφάρμακα)
<ul style="list-style-type: none"> Πιθανότητα ταυτοποίησης και τροποποίησης περιβαλλοντικών 	<ul style="list-style-type: none"> Πιθανές θεραπείες που βελτιώνουν την εξέλιξη της νόσου (π.χ. έναρξη λεβοντόπας) 	

παραγόντων κινδύνου		
------------------------	--	--

Εικόνα 1. Η φυσική εξέλιξη της νόσου του Parkinson και οι διαγνωστικές προκλήσεις ανά στάδιο της νόσου. Προσαρμοσμένη από (Tolosa et al., 2021). Διαταραχή συμπεριφοράς ύπνου RBD-REM. Ο χρόνος διάγνωσης αντιπροσωπεύεται στον άξονα ως χρόνος «0». Τα χρονικά σημεία στην αριστερή πλευρά της διάγνωσης αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των ετών πριν από τη διάγνωση και τα χρονικά σημεία στα δεξιά αντιπροσωπεύουν τα έτη μετά τη διάγνωση. Αυτές οι χρονικές περίοδοι δίδονται προσεγγιστικά. Το διακεκομμένο βέλος υποδεικνύει ότι η διάρκεια της προ κλινικής φάσης είναι άγνωστη, σε αντίθεση με την πρόδρομη φάση, η οποία μπορεί να εκτείνεται μεταξύ 10 και 15 ετών.

Τα συμπτώματα της νόσου Parkinson χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: κινητικά και μη κινητικά. Τα κινητικά συμπτώματα περιλαμβάνουν τη βραδυκινησία, τον τρόπο ανάπαυσης, την ακαμψία και τη δυσκολία στον συντονισμό των κινήσεων. Αυτά τα συμπτώματα επιδεινώνονται προοδευτικά, καθιστώντας τις καθημερινές δραστηριότητες ολοένα και πιο δύσκολες για τους ασθενείς. Παράλληλα, τα μη κινητικά συμπτώματα, όπως η δυσκοιλιότητα, η απώλεια όσφρησης, οι διαταραχές ύπνου, η κατάθλιψη και οι γνωστικές δυσλειτουργίες, επιβαρύνουν σημαντικά την ποιότητα ζωής, καθιστώντας τη διαχείριση της νόσου ιδιαίτερα περίπλοκη.

Οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου είναι πολυπαραγοντικοί και περιλαμβάνουν τόσο γενετικούς όσο και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η γήρανση είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου, καθώς η πλειονότητα των περιπτώσεων εμφανίζεται σε άτομα άνω των 60 ετών. Επιπλέον, γενετικές μεταλλάξεις, όπως αυτές στο γονίδιο SNCA που κωδικοποιεί την α-συνουκλεΐνη, έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη της νόσου. Παράλληλα, περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η έκθεση σε φυτοφάρμακα και τοξίνες, έχουν συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε ορισμένους πληθυσμούς.

Παρά τη σημαντική πρόοδο στην κατανόηση των μηχανισμών της νόσου και την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών, καμία από τις υπάρχουσες θεραπείες δεν μπορεί να σταματήσει ή να αναστρέψει την εκφύλιση των νευρώνων. Οι θεραπείες επικεντρώνονται κυρίως στη διαχείριση των συμπτωμάτων μέσω φαρμακευτικής αγωγής, όπως η χορήγηση λεβοντόπας, και μη φαρμακευτικών προσεγγίσεων, όπως η φυσικοθεραπεία. Ωστόσο, η εξέλιξη της νόσου παραμένει αναπόφευκτη, υπογραμμίζοντας την επείγουσα ανάγκη για την ανάπτυξη νέων, πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών παρεμβάσεων.

Συνοψίζοντας, η νόσος Parkinson αποτελεί μια σύνθετη και πολυδιάστατη νευροεκφυλιστική διαταραχή, η οποία απαιτεί διεπιστημονικές προσεγγίσεις για την καλύτερη κατανόηση, διάγνωση και θεραπεία της. Η συνεχής έρευνα είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη καινοτόμων στρατηγικών που θα μπορέσουν να βελτιώσουν την πρόγνωση και την ποιότητα ζωής των ασθενών.

Σκοπός του Έργου

Το παρόν παραδοτέο στοχεύει στη δημιουργία και ανάλυση εγκεφαλικών οργανοειδών που προέρχονται από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSC) ασθενών με νευροεκφυλιστικές ασθένειες, εστιάζοντας στη νόσο Parkinson. Οι κύριοι στόχοι περιλαμβάνουν:

1. Κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου Parkinson μέσω μοριακών και κυτταρικών αναλύσεων.
2. Ανάπτυξη εργαλείων για την αναγνώριση βιοδεικτών και την αξιολόγηση θεραπευτικών παρεμβάσεων.
3. Προώθηση της εξατομικευμένης ιατρικής με τη χρήση κυτταρικών μοντέλων που αντικατοπτρίζουν την ποικιλομορφία των ασθενών.

Μεθοδολογία-Αποτελέσματα

Η μεθοδολογία περιλάμβανε:

1. Διαφοροποίηση iPSC σε εγκεφαλικά οργανοειδή μεσεγκεφάλου

Η διαδικασία διαφοροποίησης των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (iPSCs) σε εγκεφαλικά οργανοειδή μεσεγκεφάλου αποτέλεσε ένα κρίσιμο στάδιο της μελέτης, αξιοποιώντας προηγμένα πρωτόκολλα για την επίτευξη υψηλής ακρίβειας και αναπαραγωγιμότητας. Τα iPSCs απομονώθηκαν από ασθενείς που έφεραν τριπλασιασμό του γονιδίου SNCA, μια σοβαρή γενετική αλλοίωση που σχετίζεται με υπερβολική έκφραση της α-συνουκλεΐνης, η οποία οδηγεί σε παθολογικά φαινόμενα όπως η συσσώρευση τοξικών συσσωματωμάτων και η απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Παράλληλα, για να δημιουργηθούν ελεγχόμενες συνθήκες, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε γονιδιακή διόρθωση μέσω της τεχνολογίας CRISPR/Cas9, εξαλείφοντας τον τριπλασιασμό του γονιδίου SNCA.

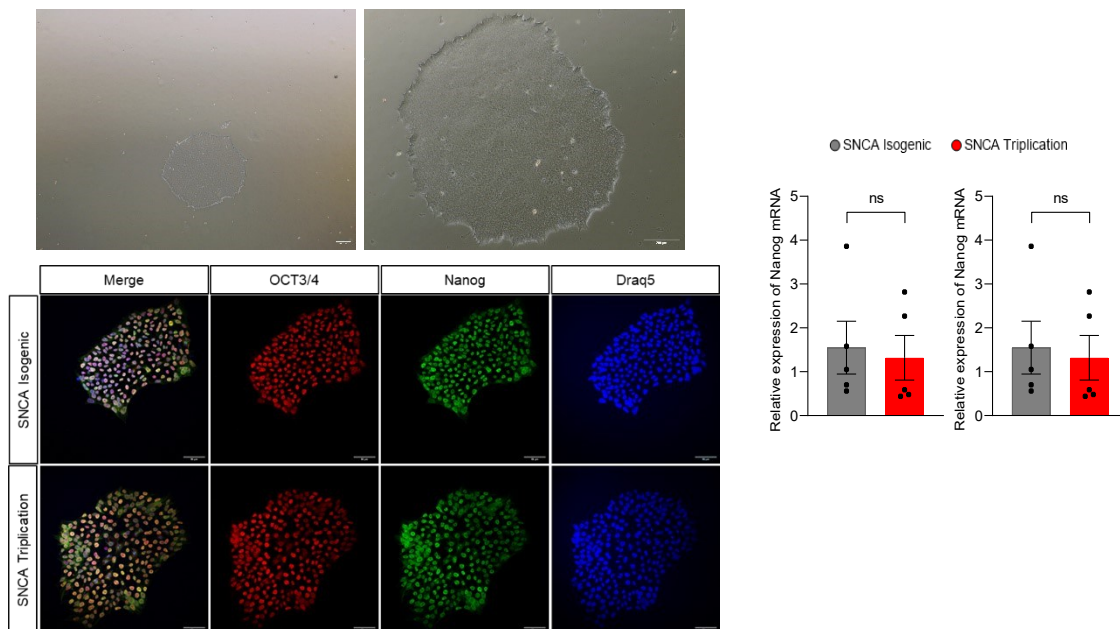
Η διαδικασία διαφοροποίησης ξεκίνησε με την καλλιέργεια των iPSCs σε επιφάνειες υποστηρικτικές της προσκόλλησής τους και με τη χρήση κατάλληλων μέσων καλλιέργειας εμπλουτισμένων με αυξητικούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί, όπως ο FGF8 (Fibroblast Growth Factor 8) και ο SHH (Sonic Hedgehog), έχουν αποδειχθεί κρίσιμοι για την προώθηση της διαφοροποίησης των κυττάρων σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες, ειδικά στη μέλαινα ουσία. Το πρωτόκολλο προσαρμόστηκε για την επίτευξη ισορροπίας μεταξύ της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης, διασφαλίζοντας την παραγωγή κυτταρικών πληθυσμών που αντικατοπτρίζουν τη δομή του ανθρώπινου μεσεγκεφάλου.

Κατά τη διάρκεια περίπου 30 ημερών, οι κυτταρικές αποικίες διαφοροποιήθηκαν σε τρισδιάστατα εγκεφαλικά οργανοειδή. Αυτά τα οργανοειδή μιμούνται τη φυσιολογία του ανθρώπινου μεσεγκεφάλου, παρουσιάζοντας τη χαρακτηριστική μορφολογία ντοπαμινεργικών νευρώνων, γλοιακών κυττάρων και άλλων κυτταρικών τύπων. Η διαδικασία επιτηρήθηκε στενά για την αποφυγή εμφάνισης μη επιθυμητών

διαφοροποιήσεων, ενώ παράλληλα αξιοποιήθηκαν ελεγχόμενες συνθήκες οξυγόνωσης και θερμοκρασίας για τη διατήρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας.

Η επιτυχία της διαφοροποίησης επιβεβαιώθηκε με πολλαπλές μεθόδους, συμπεριλαμβανομένων κυτταρικών και μοριακών αναλύσεων. Χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενή αντισώματα για την ταυτοποίηση δεικτών που σχετίζονται με τη ντοπαμινεργική ταυτότητα, όπως η Tyrosine Hydroxylase (TH), και άλλων πρωτεϊνών που χαρακτηρίζουν την κυτταρική σύνθεση του μεσεγκεφάλου. Αυτά τα δεδομένα επιβεβαίωσαν τη δημιουργία οργανοειδών με πιστότητα ως προς τη δομή και λειτουργία του ανθρώπινου εγκεφάλου.

Τα παραγόμενα οργανοειδή αποτελούν πολύτιμο εργαλείο για την επόμενη φάση της μελέτης, παρέχοντας μια εξαιρετικά αντιπροσωπευτική πλατφόρμα για την ανάλυση των παθογενετικών μηχανισμών που συνδέονται με τη νόσο του Πάρκινσον.



Εικόνα 2. Χαρακτηρισμός iPSCs. Απεικόνιση αποικιών iPSCs σε καλλιέργεια δύο διαφορετικών μεγενθύνσεων (scale bar 200μm). Χαρακτηρισμός πολυδυναμίας των κυττάρων με εικόνες από ανοσοφθορισμό και διαγράμματα έπειτα από ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής με τη χρήση δεικτών πολυναμίας (OCT3/4 και Nanog).

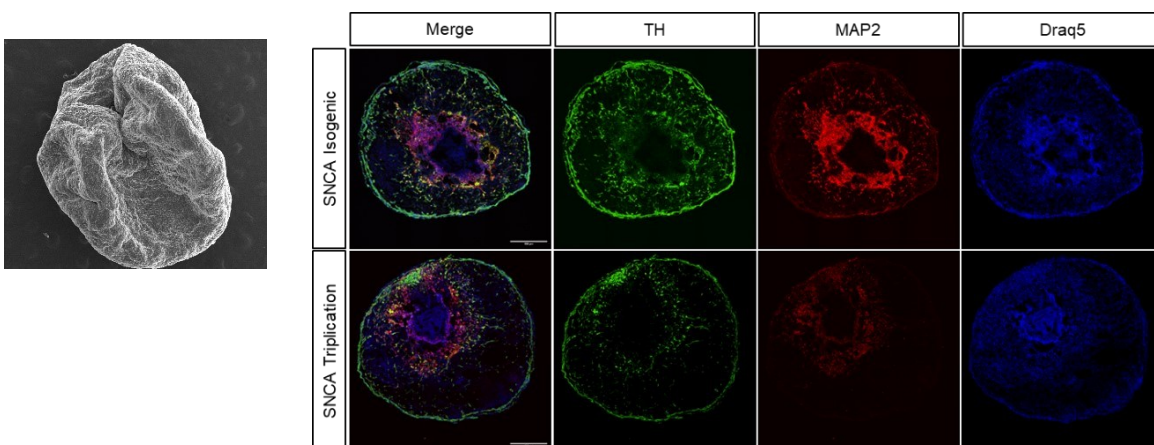
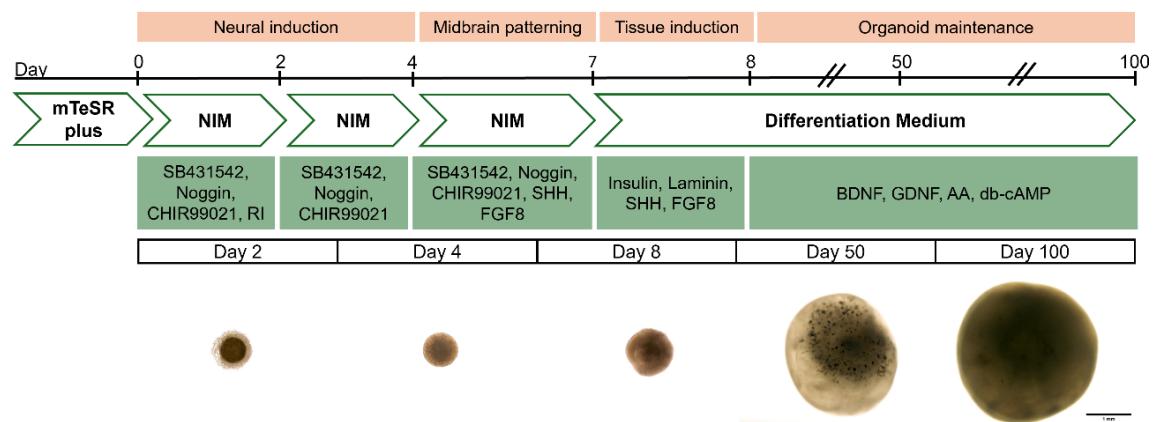
2. Μοριακός και κυτταρικός χαρακτηρισμός με ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία

Ο μοριακός και κυτταρικός χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση προηγμένων τεχνικών, όπως ο ανοσοφθορισμός και η συνεστιακή μικροσκοπία. Οι τεχνικές αυτές

παρείχαν λεπτομερή εικόνα της κυτταρικής σύνθεσης, της δομικής αρχιτεκτονικής και των παθολογικών χαρακτηριστικών των οργανοειδών.

Για τον ανοσοφθορισμό, επιλέχθηκαν πρωτογενή αντισώματα που στοχεύουν σε δείκτες ντοπαμινεργικών νευρώνων (όπως η Tyrosine Hydroxylase), καθώς και σε πρωτεΐνες σχετικές με την α -συνουκλεΐνη. Τα σήματα ανιχνεύθηκαν μέσω φθοριούχων ουσιών, ενώ η συνεστιακή μικροσκοπία επέτρεψε τη δημιουργία τρισδιάστατων απεικονίσεων των οργανοειδών. Αυτές οι αναλύσεις αποκάλυψαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στη συσσώρευση της α -συνουκλεΐνης, ειδικά στα οργανοειδή που προέρχονταν από ασθενείς.

Παρατηρήθηκαν επίσης αλλαγές στη δομική συνοχή των κυττάρων, υποδεικνύοντας την παρουσία παθολογικών μηχανισμών. Επιπλέον, καταγράφηκαν ανωμαλίες στη διασύνδεση των κυττάρων, ενισχύοντας την κατανόηση των παθοφυσιολογικών επιδράσεων της τριπλασιασμού του SNCA. Οι πληροφορίες που αποκτήθηκαν αποτέλεσαν τη βάση για τη σύγκριση των οργανοειδών και τη διερεύνηση θεραπευτικών παρεμβάσεων.



Εικόνα 3. Χαρακτηρισμός μοντέλου οργανοειδών μεσεγκεφάλου. Σχηματικό χρονοδιάγραμμα του πρωτοκόλλου σταδιακής διαφοροποίησης για τη δημιουργία hMO από iPSCs, συμπεριλαμβανόμενων των σταδίων νευρικής επαγωγής, διαμόρφωσης μεσεγκεφάλου καθώς και ωρίμανσης του ιστού. Απεικόνιση μορφολογικών και δομικών χαρακτηριστικών των hMOs μέσω εικόνων καθώς και εικόνων

ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοφθορισμού από τομές ΗΜΟς ημέρας 50 με χρήση αντισωμάτων Tyrosine Hydroxylase (δείκτης ντοπαμινεργικών νευρώνων), Mar2 (νευρωνικός δείκτης) και Draq5 (πυρηνικός δείκτης). Scale bar 500um.

3. Νευροφυσιολογική ανάλυση με χρήση ηλεκτροφυσιολογίας

Η λειτουργική αξιολόγηση των εγκεφαλικών οργανοειδών πραγματοποιήθηκε μέσω πολυηλεκτροδιακής ανάλυσης (MEA - Multi-Electrode Arrays), μια πρωτοποριακή μέθοδος που επιτρέπει τη μέτρηση της ηλεκτρικής δραστηριότητας των νευρώνων σε πραγματικό χρόνο. Η συγκεκριμένη τεχνική ήταν καίριας σημασίας για την κατανόηση της συνδεσιμότητας και της λειτουργικής κατάστασης των ντοπαμινεργικών νευρώνων, που αποτελούν το κύριο κυτταρικό στόχο της νόσου του Πάρκινσον.

Τα οργανοειδή τοποθετήθηκαν σε ειδικά τσιπ με ενσωματωμένα ηλεκτρόδια, τα οποία κατέγραψαν ηλεκτρικά σήματα από πολλαπλές περιοχές ταυτόχρονα. Αυτή η μη επεμβατική τεχνική παρείχε πολύτιμες πληροφορίες για τη συναπτική δραστηριότητα, τη συχνότητα εκπομπής δυναμικών ενεργείας και τη συνολική νευρωνική λειτουργία.

Η ανάλυση αποκάλυψε ότι τα οργανοειδή από ασθενείς με τριπλασιασμό του SNCA παρουσίαζαν μειωμένη ηλεκτρική δραστηριότητα, γεγονός που υποδηλώνει διαταραχή στη συναπτική μετάδοση και στη συνδεσιμότητα των νευρώνων. Αντίθετα, τα οργανοειδή από τα διορθωμένα κύτταρα έδειξαν σημαντική βελτίωση στη λειτουργικότητα, επιβεβαιώνοντας την αποτελεσματικότητα της διόρθωσης του γονιδίου.

Επιπλέον, η ηλεκτροφυσιολογική ανάλυση ανέδειξε διαφορές στη δυναμική της συναπτικής πλαστικότητας μεταξύ των δύο ομάδων. Παρατηρήθηκαν ανωμαλίες στην ταχύτητα και στην ισχύ των δυναμικών ενεργείας στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες των οργανοειδών από ασθενείς, χαρακτηριστικά που αντανάκλουν την υποκείμενη παθολογία της νόσου του Πάρκινσον. Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνουν τη σημασία της ΜΕΑ για την κατανόηση των λειτουργικών αλλαγών που σχετίζονται με τη νόσο.

Μεταβλητή	Περιγραφή	Μονάδα	Φαινότυπος (Ισογενείς)	Φαινότυπος (Τριπλασιασμός)
LFP (Τοπικό Πεδίο Δυναμικού)	Μετρά τη συνολική ηλεκτρική δραστηριότητα των νευρώνων σε μια περιοχή.	μV (μικροβολτ)	382.3±60.2	180.9±31.1
MUA (Δραστηριότητα Πολλαπλών Μονάδων)	Συνολική δραστηριότητα αιχμών από πολλούς	Αιχμές/δευτερόλεπτο	18.1±1.2	9.5±2.1

	νευρώνες κοντά στα ηλεκτρόδια.			
Δυναμικό Ενέργειας (Action Potential)	Μέτρηση αιχμών από μεμονωμένους νευρώνες σε απόκριση σε ερεθίσματα.	mV (μιλιβολτ)	80-100	40-70
Ταχύτητα Διάδοσης	Ταχύτητα μετάδοσης σήματος μεταξύ συνδεδεμένων νευρώνων.	mm/ms	0.81±0.05	0.64±0.12

Πίνακας 1 Αποτελέσματα ηλεκτροφυσιολογικών αναλύσεων. LFP (Τοπικό Πεδίο Δυναμικού): Καταγράφει τη συνολική δραστηριότητα των συνάψεων και των δενδριτών. MUA (Δραστηριότητα Πολλαπλών Μονάδων): Αντιπροσωπεύει τη συνολική δραστηριότητα αιχμών των νευρώνων κοντά στα ηλεκτρόδια. Δυναμικό Ενέργειας (Action Potential): Εκτιμά το πλάτος και τη σταθερότητα των αιχμών από μεμονωμένους νευρώνες. Ταχύτητα Διάδοσης: Αντικατοπτρίζει την αποτελεσματικότητα μετάδοσης σημάτων στα νευρωνικά δίκτυα.

4. Συγκριτική ανάλυση μεταξύ ασθενών και υγιών δειγμάτων

Η συγκριτική ανάλυση των εγκεφαλικών οργανοειδών από ασθενείς (SNCA Triplication) και υγιείς δότες αποτέλεσε το τελικό στάδιο της μελέτης, με στόχο την ταυτοποίηση κρίσιμων διαφορών που συνδέονται με την παθολογία της νόσου. Οι αναλύσεις επικεντρώθηκαν σε τέσσερις κύριες παραμέτρους:

- **Συσσώρευση α-συνουκλεΐνης:**

Η συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης, η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου Parkinson, αξιολογήθηκε μέσω ανοσοφθορισμού. Τα οργανοειδή από ασθενείς έδειξαν έντονα σήματα συσσωρευμένης α-συνουκλεΐνης σε σύγκριση με τα οργανοειδή από υγιείς δότες. Αυτό το εύρημα υπογραμμίζει τη συμβολή του SNCA στην παθοφυσιολογία της νόσου.

- **Μέγεθος οργανοειδών:**

Μετρήθηκε το μέγεθος των οργανοειδών, αποκαλύπτοντας ότι τα οργανοειδή από ασθενείς ήταν σημαντικά μικρότερα. Η μειωμένη ανάπτυξη πιθανόν αντικατοπτρίζει την κυτταρική δυσλειτουργία και τη διαταραχή της νευροαναπτυξιακής πορείας.

- **Κυτταρικός θάνατος:**

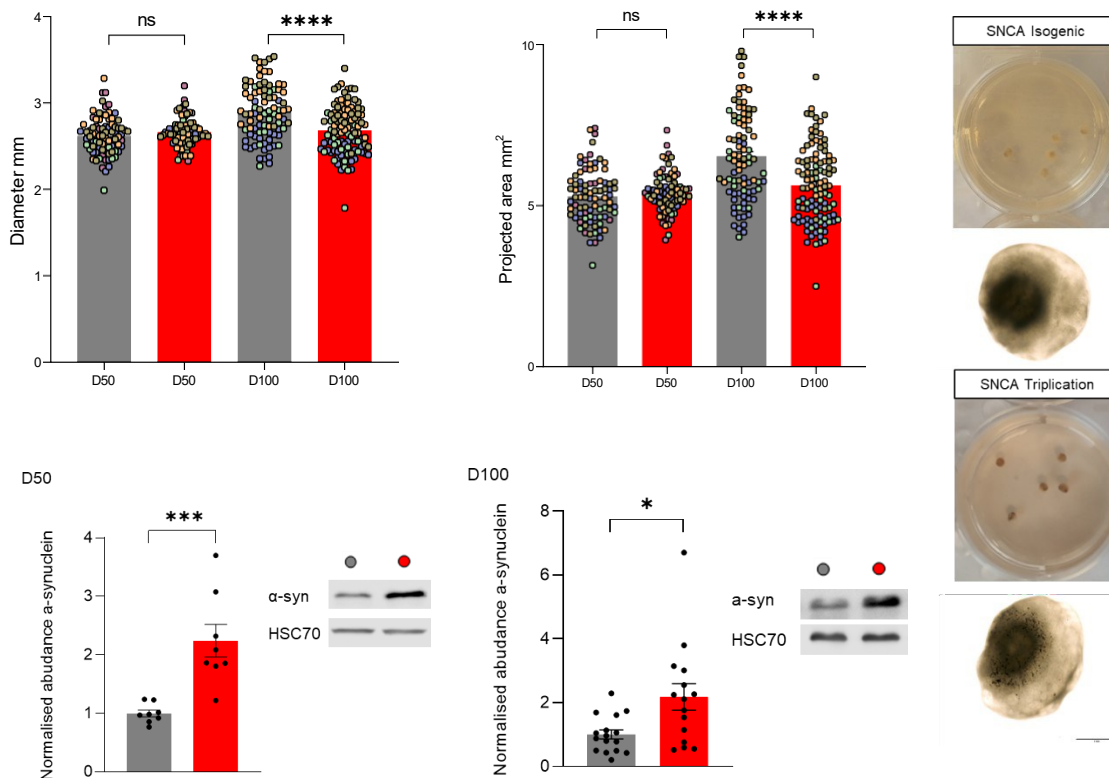
Η ανάλυση των οργανοειδών έδειξε αυξημένα επίπεδα απόπτωσης στους νευρώνες των ασθενών. Η χρήση δεικτών όπως η Caspase-3 κατέδειξε την υψηλότερη ευπάθεια των νευρώνων αυτών σε σχέση με τους υγιείς δότες.

Μεταβλητή	Περιγραφή	Μονάδα	Φαινότυπος (Ισογενείς)	Φαινότυπος (Τριπλασιασμός)
Έκφραση Caspase-3 σε TH ⁺ κύτταρα	Μέτρηση με ανοσοφθορισμό και συνεστιακή μικροσκοπία	Αυθαίρετες μονάδες - ομάδα ελέγχου (1) ισογενείς.	1±0.85	2.4±0.66

Πίνακας 2 Κυτταρικός Θάνατος

- Συσσώρευση νευρομελανίνης:

Η συσσώρευση νευρομελανίνης, η οποία αποτελεί έναν ακόμη δείκτη εκφύλισης των ντοπαμινεργικών νευρώνων, ήταν σημαντικά αυξημένη στα οργανοειδή από ασθενείς. Η παρουσία αυτής της ουσίας υποδεικνύει χρόνια καταπόνηση των κυττάρων και συσχετίζεται με τη λειτουργική επιδείνωση στη νόσο Parkinson.



Εικόνα 4. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός μεσεγκεφαλικών οργανοειδών με τριπλασιασμό του γονιδίου SNCA. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα Western blot που δείχνουν αυξημένα επίπεδα α-σ συνουκλεΐνης στα οργανοειδή που φέρουν τρία αντίγραφα του γονιδίου SNCA σε σύγκριση με τα οργανοειδή με φυσιολογικό αριθμό αντιγράφων τις ημέρες 50 και 100. Μορφομετρική ανάλυση αποκαλύπτει σημαντική μείωση στη διάμετρο των οργανοειδών και στην προβαλλόμενη επιφάνεια (εμβαδόν) στα hMO τριπλασιασμού SNCA στο D100. Οι εικόνες φωτεινού πεδίου υπογραμμίζουν τις

μορφολογικές διαφορές, υποστηρίζοντας περαιτέρω τις παρατηρούμενες φαινοτυπικές αλλοιώσεις που σχετίζονται με τον τριπλασιασμό του SNCA, τα μελανά χρώματα αποδίδονται στα αυξημένα επίπεδα νευρομελανίνης στα οργανοειδή.

Η συγκριτική ανάλυση προσέφερε μια ολοκληρωμένη εικόνα των διαφορών μεταξύ ασθενών και υγιών δειγμάτων, αναδεικνύοντας τους βασικούς μηχανισμούς που συμβάλλουν στην εξέλιξη της νόσου. Τα αποτελέσματα αυτά όχι μόνο επιβεβαιώνουν τη χρησιμότητα των εγκεφαλικών οργανοειδών ως μοντέλα, αλλά ανοίγουν και νέους δρόμους για τη μελέτη και την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών.

Κύρια Αποτελέσματα (σύνοψη)

Τα κύρια αποτελέσματα του παρόντος έργου περιλαμβάνουν:

- Την επιτυχή δημιουργία εγκεφαλικών οργανοειδών που προέρχονται από iPSC ασθενών με τριπλασιασμό του γονιδίου SNCA.
- Τη λεπτομερή ανάλυση της κυτταρικής και μοριακής αρχιτεκτονικής των οργανοειδών.
- Την κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στη συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης και στον σχηματισμό σωματίων Lewy.
- Τη σύγκριση με εγκεφαλικά οργανοειδή που προέρχονται από υγιείς δότες για την ταυτοποίηση διαφορών που σχετίζονται με την παθολογία της νόσου.
- Την προώθηση της εξατομικευμένης ιατρικής μέσω της χρήσης αυτών των μοντέλων για την αξιολόγηση νέων φαρμακευτικών προσεγγίσεων.

Συζήτηση και Σημασία του Μοντέλου

Η δημιουργία εγκεφαλικών οργανοειδών από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs) ασθενών με τριπλασιασμό του γονιδίου SNCA αποτελεί μια καινοτόμο προσέγγιση που έχει αλλάξει ριζικά το τοπίο της έρευνας για τη νόσο Parkinson. Αυτά τα τρισδιάστατα κυτταρικά μοντέλα αναπαριστούν με μοναδική ακρίβεια τις ανθρώπινες νευροαναπτυξιακές διαδικασίες και τη μοριακή παθολογία της νόσου σε ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες. Η δυνατότητα προσομοίωσης της ανθρώπινης νευροαναπτυξιακής πορείας καθιστά τα οργανοειδή πολύτιμα για τη διερεύνηση των μηχανισμών που οδηγούν στην εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, ενώ παράλληλα παρέχει νέες προοπτικές για τη στόχευση της θεραπείας.

Μοναδικό Εργαλείο για τη Μελέτη της Παθογένειας

Τα εγκεφαλικά οργανοειδή με τριπλασιασμό του SNCA προσφέρουν μοναδικές ευκαιρίες για τη μελέτη της παθογένειας της νόσου του Πάρκινσον. Η υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης, που προκύπτει από τον τριπλασιασμό του γονιδίου SNCA, οδηγεί σε τοξική συσσώρευση πρωτεΐνης και τελικά στην εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Μέσα από αυτά τα μοντέλα, οι ερευνητές έχουν τη δυνατότητα να παρακολουθούν τη διαδικασία της

πρωτεϊνικής συσσώρευσης και να αναλύουν τη μοριακή και κυτταρική αλληλεπίδραση που οδηγεί σε νευρωνικό θάνατο.

Επιπλέον, τα οργανοειδή αυτά αναδεικνύουν τις διαφορές στη λειτουργικότητα των νευρώνων μεταξύ ασθενών και υγιών δειγμάτων. Με τις τεχνικές που περιλαμβάνουν τη χρήση πολυηλεκτροδίων (ΜΕΑ), έχει καταγραφεί μείωση της ηλεκτρικής δραστηριότητας στα οργανοειδή ασθενών, ενώ οι δομικές ανωμαλίες που παρατηρούνται μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας αποκαλύπτουν την αλλοίωση της κυτταρικής ακεραιότητας. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν τα οργανοειδή αναντικατάστατα εργαλεία για την κατανόηση των παθολογικών μηχανισμών.

Εργαλείο για την Ανακάλυψη Νέων Θεραπευτικών Στόχων

Τα οργανοειδή αυτά παρέχουν μια αξιόπιστη πλατφόρμα για την ανακάλυψη και την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στόχων. Η δυνατότητα παρατήρησης των αλλαγών στη συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης, στον κυτταρικό θάνατο και στη συσσώρευση νευρομελανίνης επιτρέπει την ταυτοποίηση κρίσιμων σημείων παρέμβασης. Μέσα από τις συγκριτικές αναλύσεις, οι ερευνητές μπορούν να εντοπίσουν γενετικούς και μοριακούς παράγοντες που εμπλέκονται στην πρόοδο της νόσου, ανοίγοντας το δρόμο για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών.

Η χρήση των οργανοειδών ως πλατφόρμα για τη δοκιμή φαρμάκων είναι εξίσου σημαντική. Σε σύγκριση με τα συμβατικά δισδιάστατα κυτταρικά μοντέλα, τα οργανοειδή παρέχουν ένα πιο ρεαλιστικό περιβάλλον που αντικατοπτρίζει καλύτερα τη φυσιολογία του ανθρώπινου εγκεφάλου. Οι δοκιμές φαρμάκων σε αυτά τα μοντέλα επιτρέπουν την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας νέων ουσιών, πριν από την κλινική τους εφαρμογή.

Μελέτη της Αλληλεπίδρασης Γενετικών και Περιβαλλοντικών Παραγόντων

Η νόσος Parkinson είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια, όπου γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο. Τα οργανοειδή από iPSCs με τριπλασιασμό του SNCA επιτρέπουν τη μελέτη αυτών των αλληλεπιδράσεων σε ελεγχόμενο περιβάλλον. Μέσω πειραμάτων που ενσωματώνουν περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τοξικές ουσίες ή φλεγμονώδεις καταστάσεις, μπορούν να διερευνηθούν οι μηχανισμοί που οδηγούν σε επιδείνωση της παθολογίας.

Η προσομοίωση της παθολογίας στο πλαίσιο διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών επιτρέπει τη δημιουργία εξατομικευμένων προσεγγίσεων, με στόχο τη βελτιστοποίηση των θεραπευτικών στρατηγικών. Επιπλέον, η ανάλυση της αλληλεπίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων με το γενετικό υπόβαθρο του ασθενούς βοηθά στην κατανόηση της ετερογένειας της νόσου και στην ανάπτυξη προσαρμοσμένων θεραπειών.

Συμβολή στην Κατανόηση και τη Θεραπεία της Νόσου

Η σημασία αυτών των μοντέλων δεν περιορίζεται μόνο στη βασική έρευνα. Παρέχουν ένα ισχυρό εργαλείο για τη γεφύρωση του χάσματος μεταξύ της προκλινικής έρευνας και της

κλινικής εφαρμογής. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αναλύσεις αυτών των οργανοειδών έχουν τη δυνατότητα να καθοδηγήσουν την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμάκων και θεραπειών που θα μπορούσαν να επιβραδύνουν ή ακόμα και να αναστρέψουν την πρόοδο της νόσου Parkinson.

Συνολικά, η συμβολή των εγκεφαλικών οργανοειδών στην έρευνα για τη νόσο του Πάρκινσον είναι ανεκτίμητη. Τα μοντέλα αυτά προσφέρουν μια ολοκληρωμένη πλατφόρμα για τη μελέτη της παθολογίας, την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων και τη δοκιμή φαρμάκων. Παράλληλα, ενισχύουν τη δυνατότητα εξατομικευμένης ιατρικής, βελτιώνοντας σημαντικά τις προοπτικές για τους ασθενείς. Με την προώθηση της κατανόησης της νόσου και την ανάπτυξη νέων προσεγγίσεων, τα οργανοειδή αυτά αποτελούν θεμέλιο λίθο για τη μελλοντική έρευνα και θεραπεία.

Τεκμηρίωση ολοκλήρωσης παραδοτέου


Η επιτυχής ολοκλήρωση του παραδοτέου του μήνα 12 βασίστηκε στα σαφή και αναλυτικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τη δημιουργία και τη χαρακτηριστική ανάλυση των εγκεφαλικών οργανοειδών. Η διαφοροποίηση των iPSC σε εγκεφαλικά οργανοειδή μεσεγκεφάλου αποδείχθηκε αποτελεσματική, καθώς τα παραγόμενα οργανοειδή αναπαρήγαγαν τις βασικές μοριακές και κυτταρικές ιδιότητες των ανθρώπινων νευρώνων. Τα οργανοειδή που δημιουργήθηκαν από κύτταρα ασθενών με τριπλασιασμό του γονιδίου SNCA παρουσίασαν χαρακτηριστικές παθολογικές μεταβολές, όπως η αυξημένη συσσώρευση α-συνουκλεΐνης και η μειωμένη ηλεκτροφυσιολογική δραστηριότητα, επιβεβαιώνοντας την επιτυχία του πρωτοκόλλου.

Ο μοριακός και κυτταρικός χαρακτηρισμός μέσω ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας επέτρεψε την επιβεβαίωση της παρουσίας ντοπαμινεργικών νευρώνων και την παρατήρηση χαρακτηριστικών παθολογικών φαινομένων, όπως η συσσώρευση α-συνουκλεΐνης και οι διαταραχές στη δομή των κυττάρων. Επιπλέον, η ανάλυση ηλεκτροφυσιολογικής δραστηριότητας με τη χρήση MEA ανέδειξε διαφορές στη νευρωνική συνδεσιμότητα και τον συγχρονισμό μεταξύ οργανοειδών που προέρχονται από ασθενείς και υγιείς δότες, παρέχοντας νέες πληροφορίες για τις λειτουργικές επιπτώσεις της παθολογίας. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι τα οργανοειδή που δημιουργήθηκαν είναι κατάλληλα για τη μελέτη της παθογένειας της νόσου του Parkinson.

Συνολικά, η ολοκλήρωση αυτού του παραδοτέου αποτελεί σημαντικό ορόσημο για την κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στη νόσο του Parkinson. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν παρέχουν μια ισχυρή βάση για τη συνέχιση της έρευνας, καθώς και για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών. Με την παράδοση αυτών των αποτελεσμάτων, επιβεβαιώνεται η επιτυχής ολοκλήρωση του έργου για τον μήνα 12, σύμφωνα με τους στόχους που είχαν τεθεί.

Δραστηριότητες διάχυσης και επικοινωνίας

- 74 συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (2024 Δεκέμβριος, Θεσσαλονίκη) - αναρτημένη ανακοίνωση.



ABSTRACT BOOK

74. EEBMB
ΔΙΕΘΝΕΣ ΣΥΝΕΔΡΙΟ
ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

P50-87

Studying Translational Control in human midbrain organoids harboring Parkinson's Disease-related SNCA triplication

Elpida Statoula¹, Maria Zafeiri¹, Kleanthi Chalkiadaki, Georgia Voudouri & Christos G. Gkogkas
**co-first authors*

Biomedical Research Institute, Foundation for Research and Technology-Hellas, University Campus, 45110 Ioannina, Greece

Dysregulation of translational control is increasingly recognized as a key contributor to neurodegenerative diseases, including Parkinson's Disease (PD). In this study, we investigate the impact of the α -synuclein (SNCA) gene triplication, a mutation found in PD patients, on protein synthesis regulation in human midbrain organoids derived from patient iPSCs and isogenic controls. The accumulation of SNCA protein, a hallmark of PD, has been linked to activation of the mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway, a critical regulator of protein synthesis and a potential therapeutic target. Our results show that SNCA accumulates in midbrain organoids over time, paralleling disease progression. We have developed and applied novel methodologies to measure protein synthesis within these organoids as a candidate biomarker for disease progression and for elucidating PD pathophysiology. Additionally, omics analyses have identified new pathways modulated downstream of SNCA accumulation. These findings provide a robust human midbrain organoid model for studying translational control in PD and open avenues for personalized diagnostic and therapeutic strategies.

Βιβλιογραφία

1. Mohamed NV et al. Midbrain organoids with an SNCA gene triplication model key features of synucleinopathy. *Brain Communications*. 2021;3(4):fcab223. doi:10.1093/braincomms/fcab223. PMID: 34632384; PMCID: PMC8495137.
2. Patikas N et al. Single-cell transcriptomics identifies perturbed molecular pathways in midbrain organoids using α -synuclein triplication Parkinson's disease patient-derived iPSCs. *Neurosci Res*. 2023;195:13-28. doi:10.1016/j.neures.2023.06.001. PMID: 37271312.
3. Oliveira L et al. Elevated α -synuclein caused by SNCA gene triplication impairs neuronal differentiation and maturation in Parkinson's patient-derived induced pluripotent stem cells. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1994. doi:10.1038/cddis.2015.318. PMID: 26610207; PMCID: PMC4670926.
4. Devine M et al. Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the α -synuclein locus. *Nat Commun*. 2011;2:440. doi:10.1038/ncomms1453. PMID: 21863007; PMCID: PMC3265381.
5. Jo J, Xiao Y, Sun AX, Cukuroglu E, Tran HD, Goke J, Tan Z, Saw TY, Lokman H, Lee Y, Kim D, Ko HS, Kim W, Chai C, Pan Y, Kim J, Hon CC, Tan EK, Je HS, Ng HH. "Lewy body-like inclusions in human midbrain organoids carrying glucocerebrosidase and α -synuclein mutations." *Ann Neurol*. 2021;90(3):490-505. doi:10.1002/ana.26160. PMID: 34228847.
6. Kim MS, Cho CH, Park S, Kim D, Lee S, Kim J, Lee J, Kim C, Cho SW. "Advanced human iPSC-based preclinical model for Parkinson's disease with optogenetic

- alpha-synuclein aggregation." *Cell Stem Cell*. 2023;30(7):973-986.e11. doi:10.1016/j.stem.2023.05.015. PMID: 37290512.
7. Zheng X, Liang Y, Su J, Liao Y, Wang W, Ye J, Tan C, Chen D, Xie W, Deng H. "Human iPSC-derived midbrain organoids functionally integrate into striatum circuits and restore motor function in a mouse model of Parkinson's disease." *Theranostics*. 2023;13(6):2673-2692. doi:10.7150/thno.78912. PMID: 37025012.
8. Spathopoulou A, Kouroupi G, Karakostas A, Matsas R. "Targeting α -Synuclein in Parkinson's Disease by Induced Pluripotent Stem Cell Models." *Front Neurol*. 2021;12:786835. doi:10.3389/fneur.2021.786835. PMID: 34956025.
9. Kim TW, Koo SY, Studer L. "Pluripotent Stem Cell Therapies for Parkinson Disease: Present Challenges and Future Opportunities." *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:729. doi:10.3389/fcell.2020.00729. PMID: 32974212.
10. Chung SY, Kishinevsky S, Mazzulli JR, Graziotto JJ, Mrejeru A, Mosharov EV, Pchelintsev NV, Siggia ED, Krainc D, Wichterle H. "Modeling α -synucleinopathy with cerebral organoids." *Cell Stem Cell*. 2020;27(6):953-969.e9. doi:10.1016/j.stem.2020.09.013. PMID: 33065028.
11. Smits LM, Schwamborn JC. "Midbrain Organoids: A New Tool to Investigate Parkinson's Disease." *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:359. doi:10.3389/fcell.2020.00359. PMID: 32529000.
12. Nickels SL, Modamio J, Mendes-Pinheiro B, Falk A. "Reproducible Generation of Human Midbrain Organoids for In Vitro Modeling of Parkinson's Disease." *Stem Cell Reports*. 2020;15(2):1-13. doi:10.1016/j.stemcr.2020.06.012. PMID: 32697988.
13. Kim H, Park HJ, Choi H, Chang Y, Park H, Shin J, Yang E, Kong J, Kim J, Lee B, Sun W. "Modeling G2019S-LRRK2 Sporadic Parkinson's Disease in 3D Midbrain Organoids." *Stem Cell Reports*. 2019;12(3):518-531. doi:10.1016/j.stemcr.2019.01.020. PMID: 30799241.
14. Monzel AS, Smits LM, Hemmer K, Hachi S, Sieber S, Lugo D, Garcia-Gonzalez D, Bayerl SH, Barcia C, De Sousa Lopes SM, Wilkinson D, Schwamborn JC. "Derivation of Human Midbrain-Specific Organoids from Neuroepithelial Stem Cells." *Stem Cell Reports*. 2017;8(5):1144-1154. doi:10.1016/j.stemcr.2017.03.010. PMID: 28416295.