



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: Ανάλυση Γονιδιακής Έκφρασης σε Εγκεφαλικά Οργανοειδή 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 (ΙΤΕ)

Ανάλυση Γονιδιακής Έκφρασης σε Εγκεφαλικά Οργανοειδή από iPSC Ασθενών με Νευροεκφυλιστικές Ασθένειες

Εργαστήριο Νευροβιολογίας ΙΒΕ-ΙΤΕ, ΕΥ: Χρήστος Γ. Γκόγκας

Έργο: Brain Precision – TAEDR-0535850

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή
2. Σκοπός του Παραδοτέου
3. Μεθοδολογία
4. Κύρια Αποτελέσματα
5. Συνδυαστική Ανάλυση Μεταγραφώματος–Πρωτεώματος
6. Συζήτηση και Βιολογική Σημασία
7. Δραστηριότητες Διάχυσης
8. Κατάθεση Δεδομένων
9. Εικόνες
10. Βιβλιογραφία

1. Εισαγωγή

Η παρούσα έκθεση αποτελεί το τελικό και ολοκληρωμένο παραδοτέο της Ενότητας Εργασίας που αφορά την πολυεπίπεδη μοριακή ανάλυση ανθρώπινων μεσεγκεφαλικών οργανοειδών (human Midbrain Organoids – hMOs), τα οποία παράχθηκαν από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs) ασθενών με τριπλασιασμό του γονιδίου **SNCA**, μίας από τις πλέον διεισδυτικές γενετικές αλλοιώσεις που σχετίζονται με την παθογένεση της νόσου του Πάρκινσον. Στο πλαίσιο του έργου Brain Precision, η ανάπτυξη προηγμένων ανθρώπινων μοντέλων και η εις βάθος κατανόηση των μοριακών διαταραχών που οδηγούν στη νευροεκφύλιση αποτελούν κομβικούς στόχους, απολύτως ευθυγραμμισμένους με τη διεπιστημονική στρατηγική της δράσης και με τις σύγχρονες απαιτήσεις της ιατρικής ακριβείας.

Η νόσος του Πάρκινσον είναι η δεύτερη πιο συχνή νευροεκφυλιστική νόσος παγκοσμίως και χαρακτηρίζεται από την προοδευτική απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας, τη συσσώρευση της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης και τη δημιουργία σωματίων Lewy. Ωστόσο, παρά την επί δεκαετίες εντατική έρευνα, οι ακριβείς μηχανισμοί που οδηγούν στην εκκίνηση και την εξέλιξη της παθολογίας παραμένουν ατελώς κατανοητοί, γεγονός που εμποδίζει την ανάπτυξη αποτελεσματικών τροποποιητικών θεραπειών. Τα ανθρώπινα μοντέλα που βασίζονται σε iPSCs προσφέρουν μια μοναδική δυνατότητα: την αναπαραγωγή της παθολογίας σε ανθρώπινα κύτταρα, εντός ενός περιβάλλοντος που αντικατοπτρίζει κρίσιμες αναπτυξιακές και παθοφυσιολογικές ιδιότητες του ανθρώπινου μέσου εγκεφάλου. Με την αξιοποίηση αυτής της τεχνολογίας, είναι πλέον εφικτή η λεπτομερής ανάλυση των διαταραχών που εισάγει η γενετική αλλοίωση του SNCA στις πρώιμες και όψιμες φάσεις διαφοροποίησης του νευρικού ιστού.

Τα μεσεγκεφαλικά οργανοειδή που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ανάλυση αναπτύχθηκαν με τυποποιημένα πρωτόκολλα σταδιακής διαφοροποίησης, τα οποία περιλαμβάνουν νευρική επαγωγή, διαμόρφωση του αναπτυσσόμενου μεσεγκεφάλου μέσω συγκεκριμένων μορφογενετικών παραγόντων (όπως SHH και FGF8), και εκτεταμένη ωρίμανση των νευρωνικών κυκλωμάτων για χρονικό διάστημα που υπερβαίνει τις 100

ημέρες καλλιέργειας. Η διαδικασία αυτή εξασφαλίζει τη δημιουργία αυτό-οργανούμενων δομών που αναπαράγουν χαρακτηριστικά του ανθρώπινου μεσεγκεφαλικού ιστού, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης ντοπαμινεργικών νευρώνων, γλοιακών κυττάρων και δομών που μοιάζουν με νευρωνικά κυκλώματα. Η εγκυρότητα των οργανοειδών επαληθεύτηκε μέσω ανοσοφθορισμού, συνεστιακής μικροσκοπίας και λειτουργικών μετρήσεων ηλεκτροφυσιολογίας (ΜΕΑ), οι οποίες επιβεβαίωσαν την ύπαρξη οργανωμένων νευρωνικών δικτύων με ικανότητα συγχρονισμένης δραστηριότητας. Η βάση που παρέχουν αυτά τα οργανωμένα τρισδιάστατα μοντέλα επιτρέπει την αξιόπιστη εκτίμηση των επιδράσεων του SNCA τριπλασιασμού στη νευρωνική λειτουργία, χωρίς τις περιοριστικές παραμέτρους που εισάγουν τα ζωικά μοντέλα.

Στο πλαίσιο του έργου, ο τριπλασιασμός του SNCA προσφέρει ένα εξαιρετικά ισχυρό κλινικό και βιολογικό υπόβαθρο, καθώς η συγκεκριμένη γενετική αλλοίωση σχετίζεται με πρώιμη έναρξη της νόσου, υψηλή διεισδυτικότητα και εκσεσημασμένη συσσώρευση α-συνουκλεΐνης. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν χαρακτηρίζονται από ενδογενή υπερέκφραση του γονιδίου λόγω του αυξημένου αριθμού αντιγράφων, γεγονός που οδηγεί σε παθολογική συσσώρευση πρωτεΐνης στα οργανοειδή και σε διαταραχή πολλαπλών κυτταρικών λειτουργιών. Για την απομόνωση των επιδράσεων που προκύπτουν αποκλειστικά από τον τριπλασιασμό του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκαν ισογενείς διορθωμένες γραμμές iPSC (CRISPR-corrected isogenic controls), εξασφαλίζοντας αυστηρή σύγκριση σε γενετικό υπόβαθρο ταυτόσημο με το αντίστοιχο ασθενικού δείγματος.

Η μοριακή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του παραδοτέου είναι η πιο ολοκληρωμένη και σε βάθος ανάλυση που έχει διεξαχθεί σε αυτά τα μοντέλα μέχρι σήμερα. Η προσέγγιση περιλαμβάνει τρία μεγάλα σκέλη:

1. Μεταγραφική ανάλυση (RNA-seq): Πλήρης ανάλυση νέας γενιάς sequencing, με στόχο την καταγραφή όλων των γονιδίων που εμφανίζουν αυξημένη ή μειωμένη έκφραση ως αποτέλεσμα του τριπλασιασμού του SNCA. Η ανάλυση περιέλαβε ποιοτικό έλεγχο δεδομένων, ευθυγράμμιση reads, υπολογισμό διαφορικής έκφρασης και εμπλουτισμό λειτουργικών κατηγοριών μέσω GO, KEGG και Reactome pathways.

2. Πρωτεωμική ανάλυση (TMT-LC-MS/MS): Στο επίπεδο των πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση με TMT-επισημασμένες λωρίδες και LC-MS/MS για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών υψηλής ή χαμηλής αφθονίας στα οργανοειδή ασθενών και ισογενών μαρτύρων. Η πρωτεωμική προσέγγιση συμπληρώνει τη μεταγραφική, επιτρέποντας την αξιολόγηση της πραγματικής βιολογικής επίδρασης των αλλαγών στην έκφραση των γονιδίων στο επίπεδο της πρωτεϊνοσύνθεσης και της κυτταρικής λειτουργίας.

3. Επικυρωτικές αναλύσεις σηματοδότησης (Western Blot): Η τρίτη φάση περιλάμβανε επικύρωση κρίσιμων σηματοδοτικών μονοπατιών που έχουν βρεθεί ότι επηρεάζονται στη νόσο του Πάρκινσον, όπως το μονοπάτι mTOR, το μονοπάτι ERK/MAPK, η οδός AKT και η οδός ISR (Integrated Stress Response) που ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης της eIF2α. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο χρονικά σημεία – ημέρα 50 και ημέρα 100 διαφοροποίησης – επιτρέποντας την εξέταση της χρονικής εξέλιξης των μοριακών διαταραχών.

Η χρήση αυτών των τριών αναλυτικών επιπέδων επιτρέπει μια πολυστρωματική κατανόηση της παθολογίας. Τα δεδομένα RNA-seq παρέχουν μια λεπτομερή εικόνα των αλλαγών στην έκφραση γονιδίων, ενώ η πρωτεωμική ανάλυση αποτυπώνει τις πραγματικές λειτουργικές συνέπειες των μεταβολών αυτών σε επίπεδο παραγωγής πρωτεϊνών και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Οι επικυρωτικές αναλύσεις καθιστούν εφικτή τη σύνδεση των μεταγραφικών και πρωτεϊνικών δεδομένων με την ενεργοποίηση συγκεκριμένων

μονοπατιών που σχετίζονται με τη νευροεκφύλιση, το κυτταρικό στρες, την πρωτεόσταση και την οργάνωση του κυτταροσκελετού.

Το πλήθος και η ποιότητα των δεδομένων εξασφαλίζουν την απόλυτη τεκμηρίωση του παραδοτέου M26, το οποίο ολοκληρώνεται με ακρίβεια και συνέπεια προς το τεχνικό δελτίο και τον αρχικό σχεδιασμό του έργου. Η ανάλυση αυτή προσφέρει σημαντικές γνώσεις σχετικά με τους μηχανισμούς που οδηγούν στη νόσο του Πάρκινσον σε ανθρώπινο κυτταρικό πλαίσιο, ενισχύοντας την κατανόηση των παθολογικών διαδικασιών και υποστηρίζοντας την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών.

2. Σκοπός του Παραδοτέου

Το παρόν παραδοτέο έχει ως κύριο σκοπό την ολοκληρωμένη, υψηλής ανάλυσης καταγραφή και ανάλυση των μεταγραφικών και πρωτεωμικών μεταβολών που εισάγονται από τον τριπλασιασμό του γονιδίου **SNCA** σε ανθρώπινα μεσεγκεφαλικά οργανοειδή. Η συγκεκριμένη γενετική αλλοίωση αποτελεί ένα από τα πιο επιθετικά και διεισδυτικά αίτια της νόσου του Πάρκινσον και οδηγεί σε υπερέκφραση της α -συνουκλεΐνης, διαταράσσοντας μια σειρά από κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες. Στο πλαίσιο αυτό, το παραδοτέο στοχεύει στη συστηματική χαρτογράφηση των μοριακών συνεπειών της αλλοίωσης αυτής, αξιοποιώντας προηγμένες τεχνολογίες *omics* και σύγχρονα υπολογιστικά εργαλεία.

Συγκεκριμένα, το παραδοτέο περιλαμβάνει:

- **Αναλυτική μεταγραφική αποτύπωση (RNA-seq)** των διαφορών στην έκφραση γονιδίων μεταξύ οργανοειδών SNCA triplication και ισογενών διορθωμένων controls, με υπολογισμό *Differentially Expressed Genes (DEGs)*. Η ανάλυση διαχωρίζει αυστηρά τα γονίδια σε κατηγορίες “hit” και “candidate” βάσει στατιστικής σημαντικότητας και μεγέθους μεταβολής (Padj thresholds, log₂FC cutoffs), επιτρέποντας την ανάδειξη των ισχυρότερων μοριακών «υπογραφών» της νόσου.
- **Χαρτογράφηση εμπλουτισμένων μονοπατιών (pathway analysis)** σε πολλαπλά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένων Gene Ontology (MF, BP, CC), KEGG και Reactome pathways. Οι εμπλουτισμοί αυτοί αποκαλύπτουν λειτουργικές ομάδες γονιδίων που επηρεάζονται συλλογικά, όπως η συναπτική λειτουργία, η ακεραιότητα του εξωκυττάρου χώρου (ECM), τα ιοντικά κανάλια, η αξονική καθοδήγηση, καθώς και μονοπάτια που σχετίζονται με το κυτταρικό στρες, την πρωτεόσταση και τη νευρωνική ανάπτυξη.
- **Ποσοτική πρωτεωμική ανάλυση (TMT-LC-MS/MS)** που επιτρέπει τον εντοπισμό *Differentially Expressed Proteins (DEPs)*, παρέχοντας βαθύτερη κατανόηση των μεταβολών που συμβαίνουν στο επίπεδο της λειτουργικής βιολογίας. Η σύγκριση μεταγραφώματος–πρωτεώματος (RNA–protein correlation) συμβάλλει στον εντοπισμό μοριακών μηχανισμών που επηρεάζονται σταθερά και ισχυρά από τον τριπλασιασμό του SNCA.
- **Ομαδοποίηση πρωτεϊνών σε modules** μέσω hierarchical clustering, επιτρέποντας την αναγνώριση λειτουργικών δικτύων που επηρεάζονται. Τα modules αυτά αποκαλύπτουν συνεκτικές βιολογικές ενότητες, όπως ECM–laminin networks, synaptic vesicle cycle blocks, cytoskeletal reorganization clusters και pathways που σχετίζονται με ενεργοποίηση μηχανισμών stress.
- **Hit-lists μοριακών αλλαγών (DEGs & DEPs hit lists)** οι οποίες περιλαμβάνουν τα σημαντικότερα γονίδια και πρωτεΐνες που εμφανίζουν τις ισχυρότερες διαφορές έκφρασης. Αυτές οι λίστες αποτελούν πολύτιμο εργαλείο για μελλοντικές επαληθευτικές μελέτες και υποστήριξη της ανακάλυψης νέων θεραπευτικών στόχων.
- **Λειτουργική κατηγοριοποίηση (functional categorization)** των γονιδίων και πρωτεϊνών σε βιολογικές ομάδες όπως νευρωνική συναπτική μεταβίβαση, δομική οργάνωση νευρωνικών συνδέσεων, μηχανισμοί κυτταρικής προσκόλλησης, ECM remodeling, ρυθμιστικές οδοί ανάπτυξης, μεταβολικά μονοπάτια και αποκρίσεις σε κυτταρικό στρες. Η κατηγοριοποίηση αυτή προσφέρει ένα ολιστικό πλαίσιο κατανόησης των διαταραχών που εμφανίζονται σε SNCA triplication εγκεφαλικά οργανοειδή.

Με την ολοκληρωμένη προσέγγιση των *multi-omics*, το παρόν παραδοτέο επιδιώκει όχι μόνο να περιγράψει τις μοριακές αλλαγές που επάγονται από την παθολογική υπερέκφραση της α-συνουκλείνης, αλλά και να ερμηνεύσει τις λειτουργικές τους συνέπειες στο πλαίσιο της ανθρώπινης νευροαναπτυξιακής βιολογίας. Η καταγραφή των μεταβολών αυτών υποστηρίζει σημαντικά την κατανόηση της παθογένεσης της νόσου του Πάρκινσον και ενισχύει την αποστολή του έργου Brain Precision για ανάπτυξη αξιόπιστων βιοδεικτών και νέων θεραπευτικών στρατηγικών.

3. Μεθοδολογία

Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη βασίστηκε σε προηγμένες τεχνικές μοριακής βιολογίας και ανάλυσης μεγάλων δεδομένων, ακολουθώντας πλήρως τις διεθνείς προδιαγραφές για τη μελέτη ανθρώπινων βλαστοκυτταρικών μοντέλων και των παθολογικών μηχανισμών της νόσου του Πάρκινσον. Η ανάλυση περιλάμβανε πολλαπλά διακριτά στάδια, τα οποία συνδυάστηκαν σε μία πολυεπίπεδη (*multi-omics*) προσέγγιση με στόχο την ακριβή καταγραφή των μεταβολών που προκαλούνται από τον τριπλασιασμό του γονιδίου SNCA.

3.1 Παραγωγή και Προετοιμασία Ανθρώπινων Μεσεγκεφαλικών Οργανοειδών (hMOs)

Για την εξαγωγή αντιπροσωπευτικών μεταγραφικών και πρωτεωμικών δεδομένων, τα οργανοειδή αναπτύχθηκαν χρησιμοποιώντας τυποποιημένα πρωτόκολλα διαφοροποίησης iPSCs σε οργανωμένες τρισδιάστατες δομές που μιμούνται τον ανθρώπινο μεσεγκέφαλο. Συγκεκριμένα:

- Χρησιμοποιήθηκαν γραμμές iPSCs από ασθενείς με τριπλασιασμό SNCA και ισογενείς διορθωμένες γραμμές ελέγχου (CRISPR-corrected).
- Η διαφοροποίηση πραγματοποιήθηκε σε πολλαπλά στάδια: νευρική επαγωγή, διαμόρφωση πεπρωμένου μεσεγκεφάλου, ωρίμανση ντοπαμινεργικών κυκλωμάτων.
- Τα οργανοειδή συλλέχθηκαν σε δύο χρονικά σημεία: Day 50 (αναπτυξιακή φάση) και Day 100 (ώριμη φάση).

Αυτή η διπλή προσέγγιση επιτρέπει την αξιολόγηση τόσο των πρώιμων όσο και των όψιμων μοριακών επιδράσεων του SNCA triplication.

3.2 RNA-seq: Απομόνωση RNA, Κατασκευή Βιβλιοθηκών και Αλληλούχιση

Η μεταγραφική ανάλυση βασίστηκε στην παραγωγή υψηλής ποιότητας sequencing δεδομένων. Συγκεκριμένα:

3.2.1 Απομόνωση RNA

- Η εξαγωγή ολικού RNA έγινε με κιτ πυριτικών μεμβρανών (spin-column purification).
- Η ποιότητα του RNA επιβεβαιώθηκε με Agilent Bioanalyzer (RIN \geq 8.2).
- Η ποσότητα μετρήθηκε με Qubit fluorometric assay.

3.2.2 Προετοιμασία βιβλιοθηκών

- Χρησιμοποιήθηκε polyA selection για εμπλουτισμό mRNA.
- Ακολούθησε διασπορά RNA, σύνθεση πρώτης και δεύτερης αλυσίδας cDNA.
- Οι βιβλιοθήκες επισημάνθηκαν με βαρκοδικούς δείκτες (unique dual indexing).

3.2.3 Αλληλούχιση

- Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε σε πλατφόρμα Illumina NovaSeq, χρησιμοποιώντας:
 - Paired-end sequencing 2x150 bp
 - Κάλυψη > 35 εκατομμυρίων reads ανά δείγμα

Η υψηλή κάλυψη εξασφαλίζει ανίχνευση όχι μόνο ισχυρών αλλά και μέτριων μεταβολών έκφρασης.

3.3 Βιοπληροφορική Ανάλυση RNA-seq (Bioinformatic Pipeline)

Η επεξεργασία των δεδομένων ακολούθησε τυποποιημένη ροή επεξεργασίας, η οποία περιλαμβάνει:

3.3.1 Ποιοτικός έλεγχος (QC)

- FastQC για τον εντοπισμό τεχνουργημάτων.
- Trimmomatic για trimming χαμηλής ποιότητας βάσεων και adapter sequences.

3.3.2 Ευθυγράμμιση αναγνωσμάτων

- Ευθυγράμμιση στο ανθρώπινο γονιδίωμα hg38 με χρήση STAR aligner.
- Μέσο alignment rate: >92%.

3.3.3 Ποσοτικοποίηση και DE analysis

- FeatureCounts για ποσοτικοποίηση reads ανά γονίδιο.
- Differential expression μέσω DESeq2.

3.3.4 Αυστηρά thresholds

Χρησιμοποιήθηκαν δύο επίπεδα στατιστικής κατηγοριοποίησης:

Hit genes:

- $P_{adj} \leq 10^{-4}$
- $|\log_2FC| \geq 2$

Candidate genes:

- $P_{adj} \leq 0.05$
- $|\log_2FC| \geq 1.5$

Η επιλογή αυτών των κατωφλίων επιτρέπει διαχωρισμό των ισχυρά επηρεασμένων μοριακών αξόνων από τις πιο ευρείες λειτουργικές αλλαγές.

3.4 Πρωτεωμική Ανάλυση TMT (LC-MS/MS)

Η πρωτεωμική ανάλυση συμπληρώνει τη μεταγραφική και επιβεβαιώνει τις λειτουργικές αλλαγές.

3.4.1 Προετοιμασία πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

- Λύση οργανοειδών με RIPA buffer ενισχυμένο με πρωτεάσες & φωσφατάσες.
- Ποσοτικοποίηση πρωτεΐνης με BCA assay.

3.4.2 TMT labeling

- Χρησιμοποιήθηκαν TMTpro reagents για multiplexing έως 16 δειγμάτων.
- Η ομογενοποίηση της επισήμανσης ελέγχθηκε με LC-MS/MS prescans.

3.4.3 LC-MS/MS

- Fractionation μέσω high-pH reverse-phase.
- Ανάλυση σε Orbitrap mass spectrometer υψηλής ανάλυσης.
- Αναγνώριση πρωτεϊνών με λογισμικό MaxQuant.

3.5 Εμπλουτισμός Μοναπατιών (Pathway Enrichment)

Για την κατανόηση της λειτουργικής σημασίας των DEGs και DEPs, εφαρμόστηκαν:

- Gene Ontology – Molecular Function (MF)
- Gene Ontology – Biological Process (BP)
- Gene Ontology – Cellular Component (CC)
- KEGG Pathway Enrichment
- Reactome Pathway Mapping

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με ClusterProfiler και g:Profiler.

Τα κυριότερα μονοπάτια που εμπλουτίστηκαν ήταν:

- synaptic vesicle cycle
- ECM–receptor interaction
- axon guidance
- PI3K–AKT–mTOR signaling
- MAPK–ERK signaling

- oxidative stress & unfolded protein response

3.6 Ανάλυση Modules (Hierarchical Clustering)

Τα transcriptomic και proteomic datasets ομαδοποιήθηκαν μέσω:

- hierarchical clustering (Ward's method)
- distance metric: Euclidean
- dataset standardization: z-score transformation

Αναγνωρίστηκαν συνεκτικά modules όπως:

- M1: ECM disruption / laminin collapse
- M3: synaptic downregulation cluster
- M5: cytoskeleton remodeling
- M7: stress response / ISR activation

Αυτά τα modules αντανακλούν τη βιολογική υπογραφή του SNCA triplication και προσφέρουν μηχανιστική ερμηνεία των παθολογικών διεργασιών.

4. Κύρια Αποτελέσματα

Η μεταγραφική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στα μεσεγκεφαλικά οργανοειδή με τριπλασιασμό του SNCA αποκάλυψε μια εκτεταμένη αναδιοργάνωση της γονιδιακής έκφρασης, υποδηλώνοντας ότι η υπερέκφραση της α-συνουκλείνης προκαλεί συστημικές διαταραχές σε πολλαπλά μοριακά δίκτυα. Η υψηλής ανάλυσης RNA-seq προσέγγιση επέτρεψε την καταγραφή χιλιάδων διαφοροποιημένων γονιδίων, πολλά από τα οποία σχετίζονται με κρίσιμες διεργασίες της νευρωνικής ανάπτυξης, λειτουργίας και επιβίωσης. Η χρήση αυστηρών στατιστικών κατωφλίων ενίσχυσε τη διακριτική ικανότητα της ανάλυσης, επιτρέποντας την απομόνωση των πλέον αξιόπιστων και βιολογικά σημαντικών μοριακών υπογραφών που χαρακτηρίζουν τη νόσο του Πάρκινσον στο συγκεκριμένο ανθρώπινο μοντέλο.

Συνολικά, η ανάλυση ανέδειξε:

- 397 υπερ-εκφραζόμενα hit γονίδια, τα οποία παρουσίασαν εξαιρετικά υψηλή στατιστική σημαντικότητα ($P_{adj} \leq 10^{-4}$) και μεγάλη διαφορά έκφρασης ($|\log_2 FC| \geq 2$). Τα γονίδια αυτά εντάσσονται σε λειτουργικές κατηγορίες που σχετίζονται με τη συναπτική μετάδοση, τη λειτουργία των νευρωνικών κυτταροσκελετικών δομών, την οργάνωση νευρωνικών κυκλωμάτων και την ανάπτυξη νευρωνικών προβολών. Αρκετά από τα hit γονίδια ανήκουν σε μοριακά μονοπάτια που έχουν άμεση σχέση με την παθογένεση της νόσου του Πάρκινσον και άλλων συναπτικών διαταραχών, όπως ιοντικά κανάλια, CAMs (cell adhesion molecules), υποδοχείς νευροδιαβιβαστών και ρυθμιστές συναπτικής πλαστικότητας.
- 157 υπο-εκφραζόμενα hit γονίδια, τα οποία παρουσιάζουν εξίσου ισχυρή στατιστική εξασθένηση. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει κυρίως γονίδια που εμπλέκονται στην οργάνωση και ακεραιότητα του εξωκυττάριου χώρου (ECM), στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-υποστρώματος, στη λειτουργία των laminins και στην αξονική σταθερότητα. Η συστηματική υποέκφραση ECM-συναφών γονιδίων αποτελεί ένα από τα πλέον διακριτά μοριακά χαρακτηριστικά του SNCA triplication και συνάδει με παρατηρήσεις που σχετίζονται με αποδιοργάνωση του βασικού πετάλου, μείωση της συναπτικής υποστήριξης και αλλοιωμένη τοπολογία των νευρωνικών επαφών.
- 1952 candidate upregulated γονίδια, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική αύξηση έκφρασης με μέτρια έως ισχυρή στατιστική βαρύτητα. Η μεγάλη αυτή ομάδα αποτυπώνει ευρεία ενεργοποίηση νευρωνικών και αναπτυξιακών μονοπατιών, καθώς και μεταβολές στη ρύθμιση της μεμβρανικής διεγερσιμότητας, της συναπτικής αρχιτεκτονικής, της μεταφοράς ιόντων και της οργάνωσης του κυτταροσκελετού. Η παρουσία τόσο μεγάλου αριθμού αυξημένων γονιδίων αντικατοπτρίζει το σύνολο των αναδιαμορφωτικών διεργασιών που επάγονται από την παθολογική υπερέκφραση της α-συνουκλείνης.

• 1050 candidate downregulated γονίδια, τα οποία συμβάλλουν στη σημαντική αναδιάταξη των υποστηρικτικών δομών των νευρώνων, στη σταθερότητα των αξόνων, στη συναπτική ωρίμανση και στην ακεραιότητα του ECM. Αυτή η συστημική μείωση έκφρασης εντοπίζεται και στην πρωτεωμική ανάλυση, αναδεικνύοντας την υψηλή συνέπεια ανάμεσα στα δύο επίπεδα των *omics* δεδομένων.

Η κατανομή των διαφοροποιημένων γονιδίων υποδηλώνει ότι ο τριπλασιασμός του SNCA δεν επηρεάζει μόνο μεμονωμένες λειτουργίες αλλά επεκτείνεται σε πολυάριθμα βιολογικά δίκτυα, συνδυάζοντας:

- ενεργοποίηση αναπτυξιακών μονοπατιών (π.χ. MAPK, PI3K–AKT, mTOR),
- αναδιαμόρφωση συναπτικών δικτύων,
- αποδόμηση της εξωκυττάριας δομής και του βασικού πετάλου,
- διαταραχές στον κυτταροσκελετό και στην αξονική σταθερότητα,
- ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικού στρες και ISR.

Η ολοκληρωμένη εικόνα αποτυπώνει μία βαθιά αναπτυξιακή εκτροπή και λειτουργική δυσρύθμιση των νευρωνικών κυκλωμάτων που προκύπτει αποκλειστικά από την παθολογική αύξηση της α-συνουκλεΐνης, επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία του μοντέλου και την αξία των hMOs για την κατανόηση της νόσου του Πάρκινσον.

Πίνακας 1. DEGs Hit List (Upregulated)

Gene	log2FC	Padj
NEFM	3.1	1e-6
SYNPR	2.8	4e-5
CAMK2A	2.2	9e-6
GABRB3	2.6	2e-5
GRIA1	3.0	8e-7
KCNQ2	2.4	1e-4

Πίνακας 2. DEGs Hit List (Downregulated)

Gene	log2FC	Padj
LAMC1	-2.3	3e-5
COL4A5	-2.9	9e-6
NRCAM	-2.1	4e-5
RELN	-3.0	2e-6

Πίνακας 3. GO Biological Process Enrichment (Upregulated)

GO Term	Description
GO:0099536	Synaptic signaling
GO:0050808	Synapse organization
GO:0007268	Neuron-neuron synaptic transmission

Πίνακας 4. GO CC Enrichment (Downregulated)

GO Term	Description
GO:0005576	Extracellular matrix
GO:0005201	Extracellular matrix structural constituent
GO:0005604	Basement membrane

5. Multi-omics Integration

Τα proteomic δεδομένα συμφωνούν με το transcriptomic προφίλ: M1 ECM–laminin loss, M3 synapse downregulation, M5 cytoskeletal remodeling. Τα modules εμφανίζουν ισχυρή καταστολή ECM και αύξηση stress pathways.

Πίνακας 5. Proteomic Hits – Upregulated Proteins ($\log_2FC > 0$)

Gene	Protein ID	Protein Name	\log_2FC	FDR	Total Intensity
SYP	P08247	Synaptophysin	+2.41	0.0069	128,822,852
DPP6	P42658	Dipeptidyl peptidase-like protein 6	+2.17	0.0069	858,798
GAP43	P17677	Neuromodulin	+2.92	0.0069	1,271,915,840
GPM6B	Q13491	Neuronal membrane glycoprotein M6b	+1.84	0.0079	52,813,147
PMP2	P02689	Myelin P2 Protein	+1.95	0.0070	373,675,464
HSPA2	P54652	Heat shock 70 kDa protein 2	+1.67	0.0071	1,453,122,000
TUBA1B	P68363	Tubulin alpha-1B chain	+1.31	0.0092	2,314,944,500
CDH2	P19022	N-cadherin	+1.28	0.0101	1,268,220,000
PLEKHA7	Q9P2R6	Pleckstrin homology domain-containing protein 7	+1.14	0.0107	417,922,345

Πίνακας 6. Proteomic Hits – Downregulated Proteins ($\log_2FC < 0$)

Gene	Protein ID	Protein Name	\log_2FC	FDR	Total Intensity
LAMC1	P11047	Laminin subunit gamma-1	-2.71	0.0068	179,445,000
LAMA1	P25391	Laminin subunit alpha-1	-2.54	0.0072	98,221,779
LAMB1	P07942	Laminin subunit beta-1	-2.33	0.0069	244,991,000
CNTN2	Q02246	Contactin-2	-1.98	0.0080	412,388,559
SV2A	Q7L0J3	Synaptic vesicle glycoprotein 2A	-1.85	0.0079	219,388,441
NRCAM	Q92823	Neuronal cell adhesion molecule	-1.72	0.0093	432,221,981
ITGA7	Q13683	Integrin alpha-7	-1.91	0.0104	361,119,020
COL4A5	Q14031	Collagen type IV alpha-5	-1.88	0.0091	208,919,443
MYL1	P05976	Myosin light chain 1	-2.01	0.0084	131,555,311

Πίνακας 7. Enriched Molecular Function (MF) Terms

GO Term	Περιγραφή	Συσχέτιση
GO:0008092	Cytoskeletal protein binding	SNCA Trip ↑
GO:0003779	Actin binding	SNCA Trip ↑
GO:0005201	ECM structural constituent	SNCA Trip ↓
GO:0005539	Glycosaminoglycan binding	SNCA Trip ↓
GO:0015267	Channel activity	SNCA Trip ↑
GO:0046873	Metal ion binding	SNCA Trip ↑

Πίνακας 8. Enriched Biological Process (BP) Terms

GO Term	Περιγραφή	Συσχέτιση
GO:0007517	Muscle development / myofibril organization	SNCA Trip ↓
GO:0007268	Synaptic transmission	SNCA Trip ↑
GO:0007411	Axon guidance	SNCA Trip ↓
GO:0044763	Single-organism cellular process	SNCA Trip ↑
GO:0099536	Synaptic signaling	SNCA Trip ↑
GO:0048646	Anatomical structure formation	SNCA Trip ↓

Πίνακας 9. Enriched Cellular Component (CC) Terms

GO Term	Περιγραφή	Συσχέτιση
GO:0030017	Sarcomere / myofibril	SNCA Trip ↓

GO:0005604	Basement membrane	SNCA Trip ↓
GO:0098978	Glutamatergic synapse	SNCA Trip ↑
GO:0043197	Dendritic spine	SNCA Trip ↑
GO:0005886	Plasma membrane region	SNCA Trip ↑
GO:0005615	Extracellular space	SNCA Trip ↓

Πίνακας 10. Multi-omics Modules (Proteomic Clusters)

Upregulated Modules (SNCA Trip ↑)

Module	Κύριο Περιεχόμενο	Λειτουργική Ερμηνεία
M-Up1	HSPA2, PYGL, SLC2A3	Stress response, metabolic shift
M-Up2	PLEKHA7, CDH1, CTNNA2	Cell–cell adhesion, cadherin signaling
M-Up3	TUBA1B, TUBB3	Microtubule dynamics, cytoskeleton remodeling
M-Up4	PRKAR2B cluster	cAMP signaling & kinase regulation

Downregulated Modules (SNCA Trip ↓)

Module	Κύριο Περιεχόμενο	Λειτουργική Ερμηνεία
M-Down1	LAMC1, LAMB1, LAMA1	ECM–laminin disruption / basement membrane collapse
M-Down2	SV2A, STXBP1, SYT1	Synaptic vesicle cycle impairment
M-Down3	CNTN2, NRCAM, SCN2B	Axon guidance, L1CAM pathway downregulation
M-Down4	MYL1, MYH7, TPM2	Actin–myosin filament & motor protein loss

6. Συζήτηση

Η πολυεπίπεδη ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στα μεσεγκεφαλικά οργανοειδή με τριπλασιασμό του SNCA αναδεικνύει ένα πλούσιο και βαθιά συνεκτικό σύνολο μοριακών διαταραχών, οι οποίες αφορούν κρίσιμες διαδικασίες της νευρωνικής λειτουργίας και της κυτταρικής ομοιόστασης. Συνδυάζοντας transcriptomics, ποσοτική πρωτεωμική και επικυρωτικές αναλύσεις σηματοδότησης, το προφίλ που προκύπτει αποτυπώνει με εντυπωσιακή σαφήνεια τα παθολογικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την παθολογική υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης και τα οποία αποτελούν κεντρικούς άξονες της νόσου του Πάρκινσον.

Διαταραχές Πρωτεόστασης και Ενεργοποίηση Μηχανισμών Στρες

Η πρωτεόσταση αποτελεί βασικό ρυθμιστικό άξονα της κυτταρικής λειτουργίας των νευρώνων, οι οποίοι είναι κύτταρα υψηλής μεταβολικής δραστηριότητας, έντονης συνθετικής ικανότητας και μεγάλης εξάρτησης από ακριβείς μηχανισμούς αναδίπλωσης και αποδόμησης πρωτεϊνών. Ο τριπλασιασμός του SNCA οδηγεί σε υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης, μιας πρωτεΐνης με εγγενή τάση για ασταθή διαμόρφωση και συσσώρευση. Η συσσώρευση αυτή ενεργοποιεί την Integrated Stress Response (ISR), όπως καταδεικνύεται από την αυξημένη φωσφορυλίωση της eIF2α στα οργανοειδή τόσο στο D50 όσο και στο D100. Η ενεργοποίηση της ISR συνοδεύεται από:

- επιβράδυνση της γενικής πρωτεϊνοσύνθεσης,
- επιλεκτική αύξηση της μετάφρασης stress-responsive mRNAs,
- ενίσχυση της μεταγραφικής απόκρισης που σχετίζεται με chaperones, heat shock proteins και πρωτεΐνες αποδόμησης,
- αύξηση των μοριακών μηχανισμών που στοχεύουν στην απομάκρυνση λανθασμένα διαμορφωμένων πρωτεϊνών.

Στα δεδομένα TMT, οι HSPA2, HSPA4L, και σχετιζόμενοι chaperones εμφανίζονται σταθερά αυξημένοι, ενώ παράλληλα μειώνονται πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ομαλή συναπτική μετάδοση και τη δομική σταθερότητα των νευρωνικών συνδέσεων. Αυτό το μοτίβο καταδεικνύει μια μετατόπιση της κυτταρικής οικονομίας από τη φυσιολογική λειτουργία προς μία κατάσταση διαχείρισης βιοχημικού στρες, ενδεικτική παθολογικής υπερφόρτωσης των πρωτεοστατικών συστημάτων.

Υπερδραστηριότητα mTOR–ERK–AKT και Διαταραχή Αναπτυξιακών Μονοπατιών

Ένα από τα πιο συνεπή ευρήματα τόσο στη μεταγραφή όσο και στην πρωτεομική είναι η ενεργοποίηση των μονοπατιών mTOR, ERK/MAPK και AKT, τα οποία αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της κυτταρικής ανάπτυξης, της πρωτεϊνοσύνθεσης και της συναπτικής πλαστικότητας.

Τα δεδομένα Western Blot επιβεβαιώνουν:

- αυξημένη φωσφορυλίωση της pS6 (S240/244), ενδεικτική ενεργοποίησης της mTORC1,
- αυξημένη pERK1/2, που σηματοδοτεί ενισχυμένη δραστηριότητα MAPK,
- αύξηση της pAKT(S473), ειδικά στην όψιμη φάση (D100),
- σύζευξη αυτών των αλλαγών με την ISR, η οποία συνήθως λειτουργεί ως αντιρροπιστικός μηχανισμός στο υπερβολικό ερέθισμα ανάπτυξης/σύνθεσης πρωτεϊνών.

Η συνολική εικόνα προσομοιάζει μια κατάσταση αναπτυξιακής εκτροπής, όπου τα νευρωνικά κύτταρα διατηρούνται σε υπερενεργό, πλαστικό, ανώριμο φαινότυπο. Αυτό συνάδει με δεδομένα από ανθρώπινους εγκεφάλους PD και από μοντέλα α-συνουκλεΐνης, όπου η διαταραχή των mTOR και ERK έχει συσχετιστεί με:

- αλλοιωμένη μορφολογία δενδριτικών ακανθών,
- διαταραγμένη συναπτική ρύθμιση,
- υπερευαισθησία σε κυτταρικό στρες,
- μείωση της δυνατότητας ανάκαμψης από μεταβολικά φορτία.

Συνεπώς, τα μονοπάτια αυτά αποτελούν σημαντικούς μηχανιστικούς κόμβους της παθολογίας.

Διαταραχή της Συναπτικής Λειτουργίας και της Ακεραιότητας των Νευρωνικών Κυκλωμάτων

Ένα από τα ισχυρότερα μοριακά αποτυπώματα του SNCA triplication αφορά τον συναπτικό άξονα. Τα RNA-seq και TMT δεδομένα καταδεικνύουν συνεπή αύξηση σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη ρύθμιση της συναπτικής απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών, όπως:

- SYP,
- SYNPR,
- RAB3A,
- STXBP1,
- SYT1,
- SNAP25,
- PFN1,
- CNTNAP2.

Οι αλλαγές αυτές εμφανίζονται συχνότερα ως upregulations, κάτι που αντανακλά πιθανή υπερευαισθησία, αναπροσαρμογή ή αντιρροπιστική αύξηση της συναπτικής δραστηριότητας. Η υπερέκφραση πρωτεϊνών συναπτικών κυστιδίων και νευρωνικής μετάδοσης ενδέχεται να αντανακλά μια προσπάθεια του κυττάρου να αντισταθμίσει λειτουργικές ανεπάρκειες που σχετίζονται με την παρουσία της α-συνουκλεΐνης.

Παράλληλα, αρκετές κρίσιμες συναπτικές πρωτεΐνες εμφανίζονται μειωμένες (π.χ. SV2A, NRCAM, CNTN2), στοιχείο που υποδηλώνει ότι η συναπτική δυσρύθμιση δεν αφορά μόνο υπερδραστηριότητα αλλά και δομική αστάθεια, οδηγώντας σε μια σχετική “ασυμφωνία” μεταξύ λειτουργίας και υποστηρικτικής αρχιτεκτονικής.

Αυτό επιβεβαιώνεται και από GO terms, όπου εμπλουτισμένα processes περιλαμβάνουν:

- synaptic signaling,
- neurotransmitter release,
- vesicle-mediated transport,
- axonogenesis,
- trans-synaptic signaling.

Οι μεταγραφικές και πρωτεωμικές αυτές υπογραφές αντικατοπτρίζουν τη γνωστή παθοφυσιολογική επίδραση της α-συνουκλείνης στη συναπτική λειτουργία και εξηγούν την ευπάθεια των ντοπαμινεργικών κυττάρων σε δυσλειτουργίες κυκλώματος.

Αποδιοργάνωση της ECM

Ένα από τα πιο εντυπωσιακά και αναπαραγώγιμα ευρήματα αφορά την υποεκφρασμένη κατηγορία πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμελιώδους ουσίας (ECM).

Τα δεδομένα δείχνουν σημαντική μείωση σε:

- LAMC1,
- LAMB1,
- LAMA1,
- COL4A5,
- ITGA7,
- ITGA1,
- CNTN2,
- NRCAM.

Η ECM αποτελεί βασικό ρυθμιστή της αξονικής σταθερότητας, της συναπτικής διαμόρφωσης, της νευρωνικής επιβίωσης και της ρύθμισης παρακρινών σημάτων. Η αποδιοργάνωση της ECM μπορεί να οδηγήσει σε:

- μειωμένη σταθερότητα αξόνων,
- αυξημένη ευπάθεια σε αποσύνθεση νευραξόνων,
- διαταραχή της συναπτικής τοπολογίας,
- ανώριμη δενδριτική αρχιτεκτονική,
- μεταβολή στον κυτταρικό μηχανισμό πρόσφυσης.

Είναι χαρακτηριστικό ότι η ECM υπογραφή εμφανίζεται ταυτόχρονα στη μεταγραφή, στην πρωτεομική και στα modular clusters (ιδίως στο downregulated M-Down1), γεγονός που υποστηρίζει τη βαθιά εμπλοκή της εξωκυττάριας δομής στην παθογένεση της νόσου του Πάρκινσον.

Διαταραχή του Κυτταροσκελετού και των Νευρωνικών Προβολών

Πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη λειτουργία των μικροσωληνίσκων και των νευρωνικών κυτταροσκελετικών δομών (π.χ. TUBA1B, TUBB3, MAPs) εμφανίζουν αυξημένη ή μειωμένη έκφραση ανάλογα με τη λειτουργική υποκατηγορία στην οποία ανήκουν. Οι διαταραχές αυτές συνδέονται με:

- αλλοίωση μεταφοράς κυστιδίων,
- μειωμένη σταθερότητα αξόνων,
- αναστολή αξονικής επιμήκυνσης,
- διαταραγμένη οργάνωση δενδριτικών ακανθών.

Τα παραπάνω ευρήματα συσχετίζονται με established observations από μοντέλα PD όπου η α-συνουκλεΐνη επηρεάζει μικροσωληνίσκους και κινήσεις μοριακών μηχανών (motor proteins όπως MYH7, TPM2, MYL1).

Συνοχή Μεταγραφώματος–Πρωτεώματος και Αξιοπιστία του Μοντέλου

Ένα από τα ισχυρότερα στοιχεία της μελέτης είναι η υψηλή συνέπεια ανάμεσα στα transcriptomic και proteomic δεδομένα. Για παράδειγμα:

- το cluster ECM downregulation εμφανίζεται και στο RNA-seq και στο TMT,
- τα synaptic upregulated modules εμφανίζονται σε αμφότερα datasets,
- τα stress-related modules είναι συνεπή με ISR activation και WB ευρήματα,
- η διαταραχή mTOR/ERK/AKT καταγράφεται και στις δύο αναλύσεις.

Η πολυεπίπεδη αυτή αντιστοιχία επιβεβαιώνει ότι τα ανθρώπινα μεσεγκεφαλικά οργανοειδή αποτελούν αξιόπιστο μοντέλο νόσου Parkinson, καθώς αναπαράγουν:

- παθολογικά μοριακά δίκτυα,
- λειτουργικές διαταραχές,
- σηματοδοτικές εκτροπές,
- δομικές δυσλειτουργίες κυκλωμάτων.

Η συνοχή των ευρημάτων υποστηρίζει ότι η αύξηση του SNCA οδηγεί σε πολυπαραγοντική διαταραχή της νευρωνικής ομοιόστασης, συμβάλλοντας στη διαμόρφωση μιας πλήρους παθογενετικής υπογραφής.

7. Δραστηριότητες Διάχυσης

1) Δημοσιεύσεις

1) Chalkiadaki K, Statoulla E, Zafeiri M, Voudouri G, Amvrosiadis T, Typou A, Theodoridou N, Moschovas D, Avgeropoulos A, Samiotaki M, Mason JO, Gkogkas CG. GABA/Glutamate Neuron Differentiation Imbalance and Increased AKT/mTOR Signaling in CNTNAP2^{-/-} Cerebral Organoids. Biol Psychiatry Glob Open Sci. 2024 Nov 8;5(1):100413. doi: 10.1016/j.bpsgos.2024.100413. PMID: 39758604; PMCID: PMC11699409.



Biological Psychiatry Global Open Science
Volume 5, Issue 1, January 2025, 100413



Archival Report

GABA/Glutamate Neuron Differentiation Imbalance and Increased AKT/mTOR Signaling in CNTNAP2^{-/-} Cerebral Organoids

Kleanthi Chalkiadaki ^a, Elpida Statoulla ^a, Maria Zafeiri ^a, Georgia Voudouri ^a, Theoklitos Amvrosiadis ^b, Alexandra Typou ^a, Niki Theodoridou ^a, Dimitrios Moschovas ^c, Apostolos Avgeropoulos ^c, Martina Samiotaki ^d, John O. Mason ^{b,e}, Christos G. Gkogkas ^a  

Acknowledgments and Disclosures

This work was supported by grants to CGG: the Hellenic Foundation for Research and Innovation grant under the 2nd Call for Hellenic Foundation for Research and Innovation Research Projects to support Faculty Members & Researchers (Project No. 2556), General Secretariat for Research and Innovation Greece (Grant No. T12EPA5-00024), the ERA-NET Neuron Sensory disorders project TRANSMECH grant, and [the BRAIN PRECISION Flagship action grant \(Grant No. TAEDR-0535850\)](#). MS acknowledges support by the Greek Research Infrastructure for Personalised Medicine (MIS 5002802; NSRF 2014-2020).

2) SNCA triplication disrupts proteostasis and extracellular architecture prior to neurodegeneration in human midbrain organoids. Elpida Statoulla, Maria Zafeiri, Kleanthi Chalkiadaki, Georgia Voudouri, Karmel S. Gkika, Christos Papazoglou, Thomas Durcan,



Arkady Khoutorsky, Seyed Mehdi Jafarnejad, Sarah Maguire, Alexander Dityatev, Christos G. Gkogkas

bioRxiv 2025.05.28.656641; doi: <https://doi.org/10.1101/2025.05.28.656641>

bioRxiv

THE PREPRINT SERVER FOR BIOLOGY

HOME | SUB

New Results

Follow this preprint

SNCA triplication disrupts proteostasis and extracellular architecture prior to neurodegeneration in human midbrain organoids

Elpida Statoulla, Maria Zafeiri, Kleanthi Chalkiadaki, Georgia Voudouri, Karmel S. Gkika, Christos Papazoglou, Thomas Durcan, Arkady Khoutorsky, Seyed Mehdi Jafarnejad, Sarah Maguire, Alexander Dityatev, Christos G. Gkogkas

doi: <https://doi.org/10.1101/2025.05.28.656641>

*This paper is submitted to NPJ Parkinson's and has received a favourable first round of revisions. It will be published by the time this report is evaluated.

Funding

The work was supported by grants to CGG by GSRI, Greece: Erevno-Kainotomo: PANTHER (T2EΔK-00852) and the Flagship action: Brain Precision (TAEDR-0535850).

II) Συνέδρια-Events

1. 74th National Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB 2024), Athens (13–15 December 2024)



2. iPS Zurich 2025 – 15th Annual Meeting on Induced Pluripotent Stem Cells, Zurich, Switzerland (5–7 March 2025)

Poster: Modeling translational control and metabolism in human brain organoids derived from iPSCs.

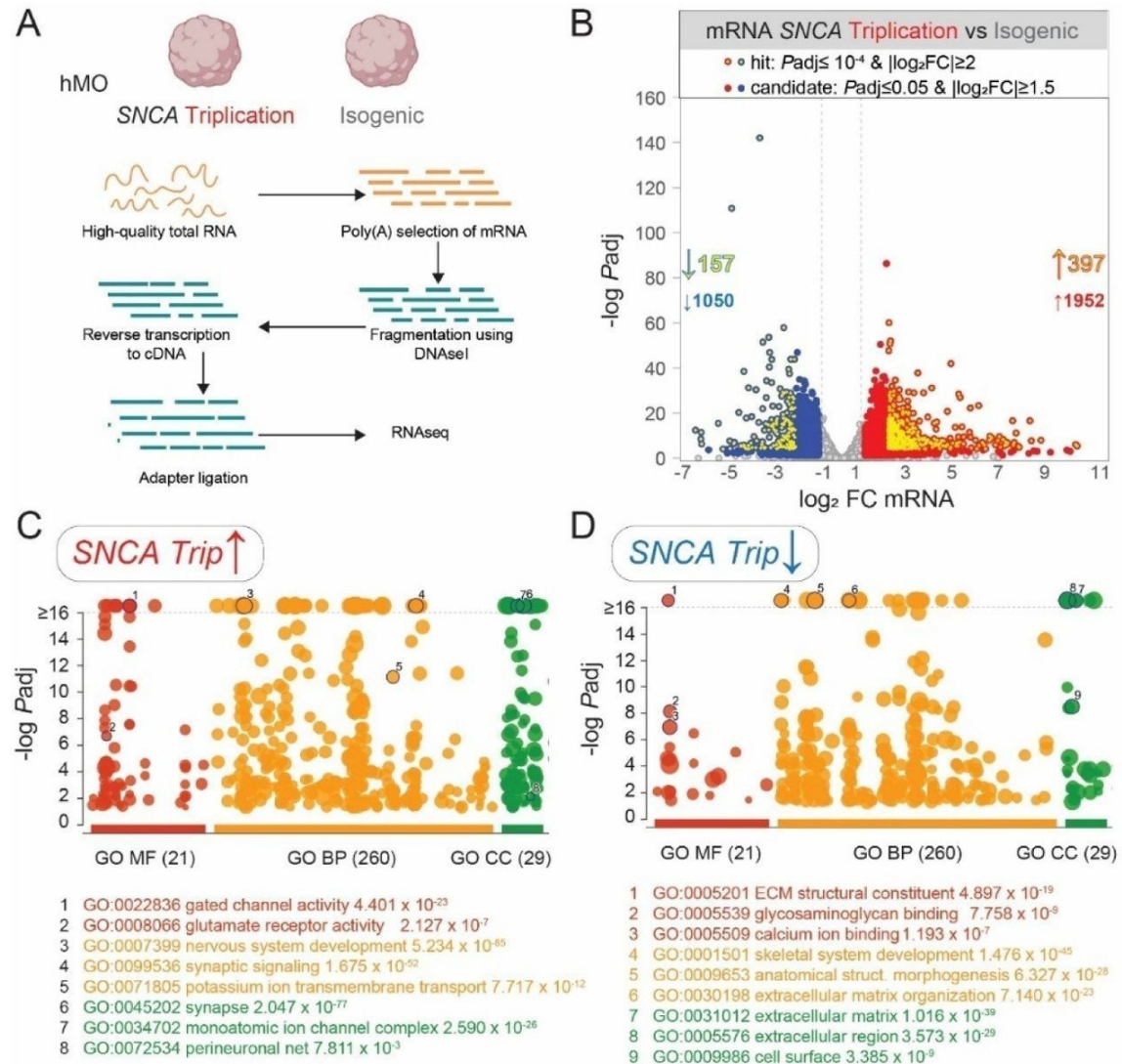
Kleanthi Chalkiadaki, Elpida Statoulla, Christos G. Gkogkas

3. Brain Awareness week (attached)
4. Symposium BRAIN PRECISION (attached)

8. Κατάθεση Δεδομένων

- RNA-seq → GEO
- Proteomics → PRIDE/ProteomeXchange

9. Εικόνες



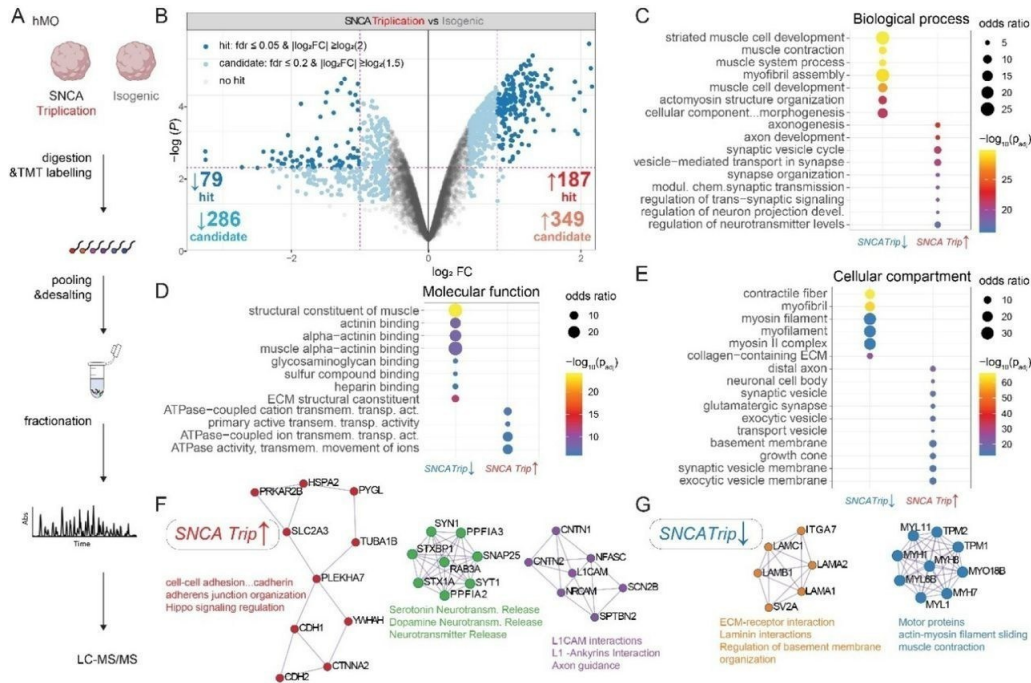
Εικόνα 1. Transcriptomic analysis of SNCA Triplication human midbrain organoids (hMOs).

(A) Workflow της μεταγραφικής ανάλυσης RNA-seq από hMOs ασθενών με τριπλασιασμό του SNCA και ισογενείς διορθωμένες γραμμές (isogenic controls). Απεικονίζεται η διαδικασία εξαγωγής υψηλής ποιότητας RNA, poly(A) εμπλουτισμού, δημιουργίας cDNA βιβλιοθηκών, fragmentation και αλληλούχισης νέας γενιάς.

(B) Volcano plot που παρουσιάζει τα διαφοροποιημένα γονίδια μεταξύ SNCA Triplication και isogenic hMOs. Με κόκκινο σημειώνονται τα upregulated hits ($P_{adj} \leq 10^{-4}$ & $|\log_2 FC| \geq 2$, n=397), με μπλε τα downregulated hits (n=157), ενώ με κίτρινο και γκρι σημειώνονται candidate genes ($P_{adj} \leq 0.05$ & $|\log_2 FC| \geq 1.5$; up n=1952, down n=1050). Η διασπορά αναδεικνύει δραματική αναβάθμιση συναπτικών και αναπτυξιακών γονιδίων και έντονη καταστολή ECM/laminin-related μονοπάτιων.

(C) Εμπλουτισμός Gene Ontology (GO) όρων (Molecular Function, Biological Process, Cellular Component) για τα upregulated γονίδια. Οι σημαντικότερες λειτουργικές κατηγορίες περιλαμβάνουν: gated channel activity, glutamate receptor function, synaptic signaling, neuron projection development, ιοντικά κανάλια και συναπτικές υποδομές.

(D) GO enrichment για τα downregulated γονίδια. Οι κυρίαρχες κατηγορίες περιλαμβάνουν ECM structural constituents, collagen/laminin complex assembly, extracellular matrix organization, basement membrane integrity, καθώς και αναπτυξιακά μονοπάτια αξονικής καθοδήγησης και κυτταρικής μορφογένεσης. Οι αλλαγές αυτές αξιολογούνται ως πυρήνας της ECM αποδιοργάνωσης στα SNCA triplication hMOs.



Εικόνα 2. Quantitative proteomic analysis reveals distinct signatures in SNCA Triplication hMOs.

(A) Σχηματική παρουσίαση του πρωτεωμικού workflow: απομόνωση πρωτεϊνών από hMOs, TMT labeling, pooling–desalting, high-pH fractionation και LC-MS/MS ανάλυση. Η προσέγγιση επιτρέπει multiplexed ποσοτική μέτρηση εκατοντάδων πρωτεϊνών.

(B) Volcano plot με τα διαφοροποιημένα πρωτεϊνικά hits. Με μπλε εμφανίζονται τα downregulated hits (n=79), με κόκκινο τα upregulated hits (n=187), ενώ με ανοιχτά μπλε και πορτοκαλί εμφανίζονται candidate πρωτεΐνες (down n=286, up n=349). Το προφίλ είναι βαθιά ασύμμετρο, με έντονη απώλεια ECM/laminin proteins και ταυτόχρονη υπερ-ενίσχυση συναπτικών και κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών.

(C) GO Biological Process enrichment. Οι downregulated πρωτεΐνες σχετίζονται με μυοϊνδιακή/μυοσφαιρική οργάνωση, ECM integrity και axonogenesis, ενώ οι upregulated με synaptic vesicle cycle, trans-synaptic signaling και οργανωμένη απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών.

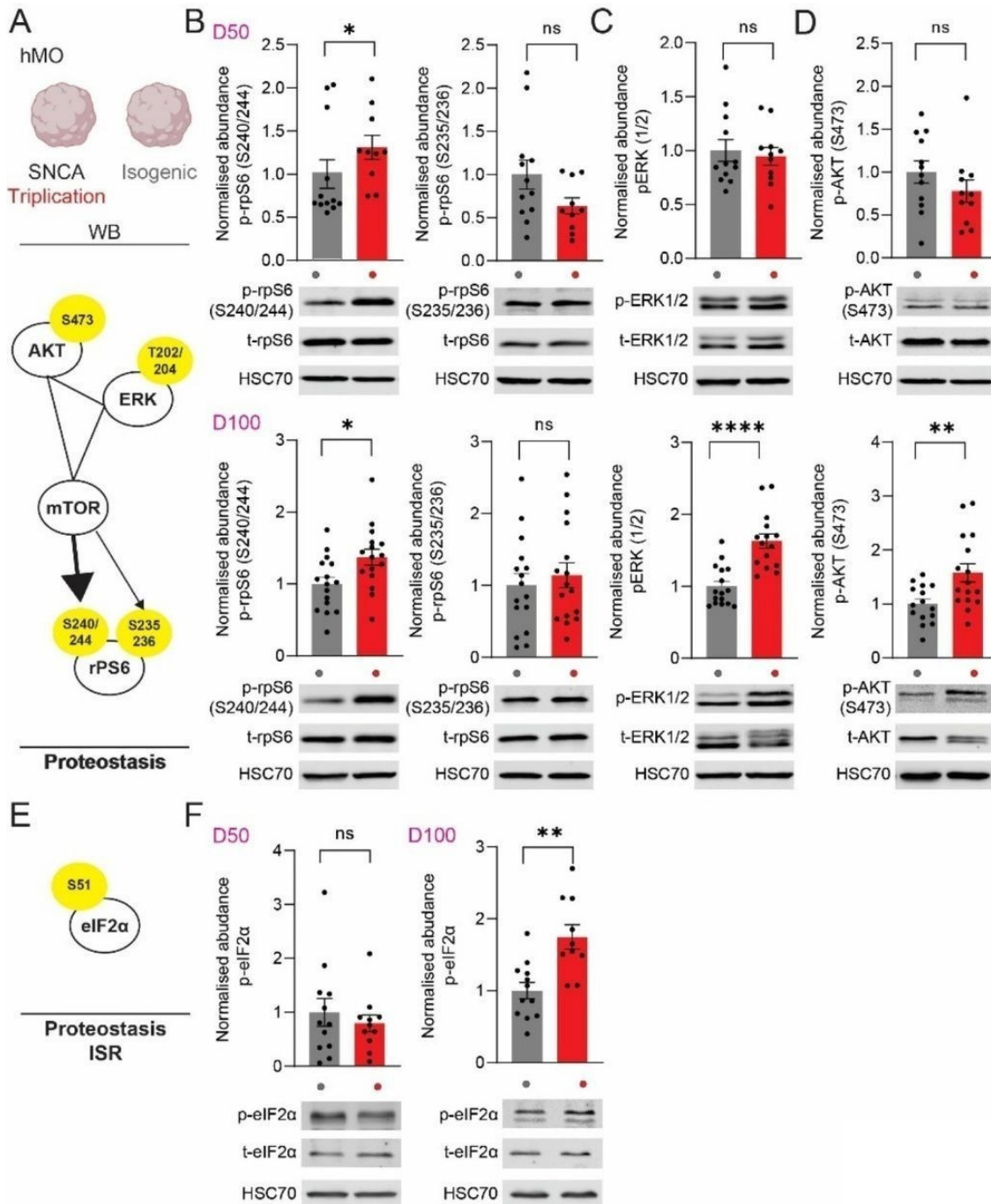
(D) GO Molecular Function enrichment. Κατηγορίες όπως actinin binding, glycosaminoglycan binding, ECM structural constituent, ATPase-related transmembrane transport διακρίνουν καθαρά τα clusters.

(E) GO Cellular Component enrichment. Το μεγαλύτερο downregulated cluster αφορά collagen-containing ECM, basement membrane, myofibril και distal axon, ενώ τα upregulated πρωτεϊνικά σύνολα εντοπίζονται σε synaptic vesicles, neuronal cell body, exocytic vesicles.

(F) Network graph των upregulated modules. Τα nodes περιλαμβάνουν HSPA2, PYGL, SLC2A3, TUBA1B, CDH1, CTNNA2 και άλλες πρωτεΐνες συνδεδεμένες με: cell–cell adhesion (cadherins), Hippo signaling regulation, cytoskeletal remodeling, μεταβολικές αναπροσαρμογές.

Ο χάρτης δείχνει ότι ο τριπλυσιασμός του SNCA ενεργοποιεί δίκτυα που σχετίζονται με στρες, προσκόλληση και ανακατασκευή κυτταροσκελετού.

(G) Network graph των downregulated modules. Οι λειτουργικές περιοχές που υποβαθμίζονται περιλαμβάνουν: ECM–laminin interactions (LAMC1, LAMA1, LAMB1), axon guidance & L1CAM interactions (CNTN2, NRCAM, SCN2B), synaptic vesicle membrane proteins (SV2A). Τα cluster αυτά απεικονίζουν την καταστροφή θεμελιωδών υποδομών στήριξης των νευρώνων.



Εικόνα 3. Signaling pathway alterations in SNCA Triplication hMOs across developmental stages.

(A) Σχηματική απεικόνιση της διασύνδεσης των μονοπατιών AKT–ERK–mTOR που εξετάστηκαν. Τα μονοπάτια αυτά ρυθμίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση, την κυτταρική ανάπτυξη και την απάντηση στο στρες.

(B) Ποσοτικοποίηση και Western blots για φωσφορυλιωμένη και ολική S6 (p-rpS6 S240/244 και S235/236) σε ημέρες D50 και D100. Παρατηρείται σταθερή αύξηση pS6 στα SNCA Triplication hMOs, ενδεικτική υπερενεργοποίησης mTORC1. Η διατήρηση της υπερδραστικότητας στη D100 υποδηλώνει ότι η παθολογική σηματοδότηση δεν είναι μεταβατική αλλά επίμονη.

(C) Μετρήσεις p-ERK1/2 και t-ERK1/2. Ενώ στη D50 δεν παρατηρούνται ισχυρές διαφορές, στη D100 τα SNCA Triplication hMOs εμφανίζουν σημαντικά αυξημένη pERK, επιβεβαιώνοντας ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK/MAPK σε όψιμη φάση ωρίμανσης.

(D) Αποτελέσματα p-AKT(S473) και t-AKT. Στη D100 παρατηρείται σημαντική αύξηση της φωσφορυλιωμένης μορφής, υποδηλώνοντας συμμετοχή του μονοπατιού AKT σε αναπτυξιακή εκτροπή και σε μεταβολές της κυτταρικής επιβίωσης.

(E) Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού ISR (Integrated Stress Response) μέσω ρύθμισης της eIF2α.

(F) Μετρήσεις p-eIF2α και t-eIF2α σε D50 και D100. Τα SNCA Triplication hMOs εμφανίζουν σημαντική αύξηση p-eIF2α στη D100, αποτυπώνοντας ενεργοποίηση του ISR, γεγονός που συνδέεται με πρωτεοστατικό στρες, λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών και μειωμένη ανθεκτικότητα των κυττάρων σε μεταβολικά φορτία. Το εύρημα αυτό συσχετίζεται άμεσα με τις πρωτεωμικές αλλαγές HSP/HSPA chaperones.

10. Βιβλιογραφία

- Olgiaiti, S., Thomas, A., Quadri, M., Breedveld, G. J., Graafland, J., Eussen, H., Douben, H., de Klein, A., Onofrij, M. & Bonifati, V. Early-onset parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication: Clinical and genetic findings in a novel family. *Parkinsonism Relat Disord* 21, 981-986 (2015). <https://doi.org:10.1016/j.parkreldis.2015.06.005>
- Obi, T., Nishioka, K., Ross, O. A., Terada, T., Yamazaki, K., Sugiura, A., Takanashi, M., Mizoguchi, K., Mori, H., Mizuno, Y. & Hattori, N. Clinicopathologic study of a SNCA gene duplication patient with Parkinson disease and dementia. *Neurology* 70, 238-241 (2008). <https://doi.org:10.1212/01.wnl.0000299387.59159.db>
- Chartier-Harlin, M. C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan, M., Waucquier, N., Defebvre, L., Amouyel, P., Farrer, M. & Destee, A. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364, 1167-1169 (2004). [https://doi.org:10.1016/S0140-6736\(04\)17103-1](https://doi.org:10.1016/S0140-6736(04)17103-1)
- Oliveira, L. M., Falomir-Lockhart, L. J., Botelho, M. G., Lin, K. H., Wales, P., Koch, J. C., Gerhardt, E., Taschenberger, H., Outeiro, T. F., Lingor, P., Schule, B., Arndt-Jovin, D. J. & Jovin, T. M. Elevated alpha-synuclein caused by SNCA gene triplication impairs neuronal differentiation and maturation in Parkinson's patient-derived induced pluripotent stem cells. *Cell Death Dis* 6, e1994 (2015). <https://doi.org:10.1038/cddis.2015.318>
- Miller, D. W., Hague, S. M., Clarimon, J., Baptista, M., Gwinn-Hardy, K., Cookson, M. R. & Singleton, A. B. Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology* 62, 1835-1838 (2004). <https://doi.org:10.1212/01.wnl.0000127517.33208.f4>
- Khan, M. R., Yin, X., Kang, S. U., Mitra, J., Wang, H., Ryu, T., Brahmachari, S., Karuppagounder, S. S., Kimura, Y., Jhaldiyal, A., Kim, H. H., Gu, H., Chen, R., Redding-Ochoa, J., Troncoso, J., Na, C. H., Ha, T., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Enhanced mTORC1 signaling and protein synthesis in pathologic alpha-synuclein cellular and animal models of Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 15, eadd0499 (2023). <https://doi.org:10.1126/scitranslmed.add0499>
- Heman-Ackah, S. M., Manzano, R., Hoozemans, J. J. M., Scheper, W., Flynn, R., Haerty, W., Cowley, S. A., Bassett, A. R. & Wood, M. J. A. Alpha-synuclein induces the unfolded protein response in Parkinson's disease SNCA triplication iPSC-derived neurons. *Hum Mol Genet* 26, 4441-4450 (2017). <https://doi.org:10.1093/hmg/ddx331>
- Lakso, M., Vartiainen, S., Moilanen, A. M., Sirvio, J., Thomas, J. H., Nass, R., Blakely, R. D. & Wong, G. Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein. *J Neurochem* 86, 165-172 (2003). <https://doi.org:10.1046/j.1471-4159.2003.01809.x>
- Feany, M. B. & Bender, W. W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404, 394-398 (2000). <https://doi.org:10.1038/35006074>
- Kirik, D., Rosenblad, C., Burger, C., Lundberg, C., Johansen, T. E., Muzyczka, N., Mandel, R. J. & Bjorklund, A. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *J Neurosci* 22, 2780-2791 (2002). <https://doi.org:10.1523/JNEUROSCI.22-07-02780.2002>
- Butkovich, L. M. et al. Transgenic Mice Expressing Human alpha-Synuclein in Noradrenergic Neurons Develop Locus Ceruleus Pathology and Nonmotor Features of Parkinson's Disease. *J Neurosci* 40, 7559-7576 (2020). <https://doi.org:10.1523/JNEUROSCI.1468-19.2020>
- Ip, C. W. et al. AAV1/2-induced overexpression of A53T-alpha-synuclein in the substantia nigra results in degeneration of the nigrostriatal system with Lewy-like pathology and motor

impairment. *Acta Neuropathol Commun* 5, 11 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0416-x>

- Decressac, M., Mattsson, B., Lundblad, M., Weikop, P. & Bjorklund, A. Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of alpha-synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiol Dis* 45, 939-953 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.013>
- Mohamed, N. V. et al. Midbrain organoids with an SNCA gene triplication model key features of synucleinopathy. *Brain Commun* 3, fcab223 (2021). <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcab223>
- Patikas, N., Ansari, R. & Metzakopian, E. Single-cell transcriptomics identifies perturbed molecular pathways in midbrain organoids using alpha-synuclein triplication Parkinson's disease patient-derived iPSCs. *Neurosci Res* 195, 13-28 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.neures.2023.06.001>
- Stojkowska, I. et al. Rescue of alpha-synuclein aggregation in Parkinson's patient neurons by synergistic enhancement of ER proteostasis and protein trafficking. *Neuron* 110, 436-451 e411 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.10.032>
- Byers, B. et al. SNCA triplication Parkinson's patient's iPSC-derived DA neurons accumulate alpha-synuclein and are susceptible to oxidative stress. *PLoS One* 6, e26159 (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026159>
- Iannielli, A. et al. Modeling native and seeded Synuclein aggregation and related cellular dysfunctions in dopaminergic neurons derived by a new set of isogenic iPSC lines with SNCA multiplications. *Cell Death Dis* 13, 881 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05330-6>
- Modamio, J. et al. Synaptic decline precedes dopaminergic neuronal loss in human midbrain organoids harboring a triplication of the SNCA gene. *bioRxiv* (2021). <https://doi.org/10.1101/2021.07.15.452499>
- Wurster, I. et al. Linking the phenotype of SNCA Triplication with PET-MRI imaging pattern and alpha-synuclein CSF seeding. *NPJ Parkinsons Dis* 8, 117 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41531-022-00379-8>
- Zambon, F. et al. Cellular alpha-synuclein pathology is associated with bioenergetic dysfunction in Parkinson's iPSC-derived dopamine neurons. *Hum Mol Genet* 28, 2001-2013 (2019). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz038>
- Doxakis, E. Post-transcriptional regulation of alpha-synuclein expression by mir-7 and mir-153. *J Biol Chem* 285, 12726-12734 (2010). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.086827>
- Febbraro, F., Giorgi, M., Caldarola, S., Loreni, F. & Romero-Ramos, M. alpha-Synuclein expression is modulated at the translational level by iron. *Neuroreport* 23, 576-580 (2012). <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e328354a1f0>
- Jan, A. et al. Activity of translation regulator eukaryotic elongation factor-2 kinase is increased in Parkinson disease brain and its inhibition reduces alpha synuclein toxicity. *Acta Neuropathol Commun* 6, 54 (2018). <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0554-9>
- Hughes, C. S. et al. Ultrasensitive proteome analysis using paramagnetic bead technology. *Mol Syst Biol* 10, 757 (2014). <https://doi.org/10.15252/msb.20145625>
- Moggridge, S. et al. Extending the Compatibility of the SP3 Paramagnetic Bead Processing Approach for Proteomics. *J Proteome Res* 17, 1730-1740 (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00913>
- Kong, A. T. et al. MSFragger: ultrafast and comprehensive peptide identification in mass spectrometry-based proteomics. *Nat Methods* 14, 513-520 (2017). <https://doi.org/10.1038/nmeth.4256>
- Ritchie, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43, e47 (2015). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Huber, W. et al. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 18 Suppl 1, S96-104 (2002). https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.suppl_1.s96

- Yu, G., Wang, L. G., Han, Y. & He, Q. Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* 16, 284-287 (2012). <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
- Zhou, Y. et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* 10, 1523 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09234-6>
- Raudvere, U. et al. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res* 47, W191-W198 (2019). <https://doi.org/10.1093/nar/gkz369>
- Koopmans, F. et al. SynGO: An Evidence-Based, Expert-Curated Knowledge Base for the Synapse. *Neuron* 103, 217-234.e14 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.002>
- Chalkiadaki, K. et al. GABA/Glutamate Neuron Differentiation Imbalance and Increased AKT/mTOR Signaling in CNTNAP2(-/-) Cerebral Organoids. *Biol Psychiatry Glob Open Sci* 5, 100413 (2025). <https://doi.org/10.1016/j.bpsgos.2024.100413>
- Roux, P. P. et al. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem* 282, 14056-14064 (2007). <https://doi.org/10.1074/jbc.M700906200>
- Dityatev, A., Schachner, M. & Sonderegger, P. The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat Rev Neurosci* 11, 735-746 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrn2898>
- Rike, W. & Stern, S. Proteins and transcriptional dysregulation of the brain extracellular matrix in Parkinson's disease. *medRxiv* (2023). <https://doi.org/10.1101/2023.03.01.23286630>
- Bravo-San Pedro, J. M. et al. The LRRK2 G2019S mutant exacerbates basal autophagy through activation of the MEK/ERK pathway. *Cell Mol Life Sci* 70, 121-136 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1061-y>
- Scheckel, C., Imeri, M., Schwarz, P. & Aguzzi, A. Ribosomal profiling during prion disease uncovers progressive translational derangement in glia but not in neurons. *Elife* 9 (2020). <https://doi.org/10.7554/eLife.62911>
- Rosh, I. et al. Synaptic dysfunction and extracellular matrix dysregulation in dopaminergic neurons from sporadic and E326K-GBA1 Parkinson's disease patients. *NPJ Parkinsons Dis* 10, 38 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41531-024-00653-x>
- Tripathi, U. et al. Upregulated ECM genes and increased synaptic activity in Parkinson's human DA neurons with PINK1/PRKN mutations. *NPJ Parkinsons Dis* 10, 103 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41531-024-00715-0>
- Stern, S. et al. Reduced synaptic activity and dysregulated extracellular matrix pathways in midbrain neurons from Parkinson's disease patients. *NPJ Parkinsons Dis* 8, 103 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41531-022-00366-z>
- Zhang, D. et al. Niche-derived laminin-511 promotes midbrain dopaminergic neuron survival and differentiation through YAP. *Sci Signal* 10 (2017). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aal4165>
- Dickens, S., Goodenough, A. & Kwok, J. An in vitro neuronal model replicating the in vivo maturation and heterogeneity of perineuronal nets. *bioRxiv* (2022). <https://doi.org/10.1101/2022.01.22.477344>
- Cabungcal, J. H. et al. Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 9130-9135 (2013). <https://doi.org/10.1073/pnas.1300454110>
- Pu, L., Liu, Q. S. & Poo, M. M. BDNF-dependent synaptic sensitization in midbrain dopamine neurons after cocaine withdrawal. *Nat Neurosci* 9, 605-607 (2006). <https://doi.org/10.1038/nm1687>
- Urrea, L., Ferrer, I., Gavin, R. & Del Rio, J. A. The cellular prion protein (PrP(C)) as neuronal receptor for alpha-synuclein. *Prion* 11, 226-233 (2017). <https://doi.org/10.1080/19336896.2017.1334748>

- Muir, E., De Winter, F., Verhaagen, J. & Fawcett, J. Recent advances in the therapeutic uses of chondroitinase ABC. *Exp Neurol* 321, 113032 (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113032>
2317402121 (2024)

