



**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: Κατασκευή κυτταροειδικών ζωικών μοντέλων πρώιμης εμφάνισης της νόσου του Parkinson.**

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

**ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΓΑΡΙΝΗΣ (ΙΤΕ)**

## Κατασκευή κυτταροειδικών ζωικών μοντέλων πρόωμης εμφάνισης της νόσου του Parkinson.

### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Η συσσώρευση βλαβών στο DNA αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των νευροεκφυλιστικών νόσων που σχετίζονται με τη γήρανση, όπως η νόσος Alzheimer (1, 2), η νόσος Parkinson (3), η νόσος Huntington (4) και η αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση (5). Μη επιδιορθώσιμες βλάβες στο DNA παρεμβαίνουν ακούσια στη συνεχιζόμενη μεταγραφή σε μεταμιτωτικούς νευρώνες ή παρεμποδίζουν τη διαδικασία σύνθεσης mRNA και την αντιγραφή του DNA σε διαιρούμενα γλοιακά κύτταρα, οδηγώντας σε κυτταρική δυσλειτουργία, κυτταρική γήρανση ή κυτταρικό θάνατο (6, 7). Για την αντιμετώπιση της βλάβης του DNA, τα θηλαστικά κύτταρα βασίζονται σε μερικώς επικαλυπτόμενα μονοπάτια διατήρησης του γονιδιώματος, ώστε να επιδιορθώνουν τις βλάβες και να διατηρούν τη γονιδιωματική ακεραιότητα (8). Σε συμφωνία, συγγενείς διαταραχές στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA συσχετίζονται συχνά ή αποκλειστικά με νευρολογικά συμπτώματα στον άνθρωπο και στα αντίστοιχα ζωικά μοντέλα (9, 10). Η νευροφλεγμονή είναι η ενεργοποίηση μιας έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης στον εγκέφαλο ή τον νωτιαίο μυελό, η οποία συχνά προηγείται της βλάβης και εκφύλισης του νευρωνικού ιστού (11, 12). Τα μικρογλοιακά κύτταρα, οι μόνιμοι φαγοκυτταρικοί πληθυσμοί του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), είναι φαινοτυπικά και αναπτυξιακά διακριτά από τους περιφερικούς ή άλλους ιστικούς μακροφάγους και κατανέμονται ευρέως στον εγκέφαλο για να υποστηρίξουν τη διατήρηση των ιστών και να προστατεύουν το νευρωνικό παρέγχυμα από ξένους παθογόνους παράγοντες και κυτταρικά υπολείμματα (13). Η παροδική διέγερση της μικρογλοίας είναι προστατευτική για τον εγκέφαλο. Ωστόσο, η χρόνια ενεργοποίηση της εγκεφαλικής μικρογλοίας προκαλεί επίμονη έκκριση φλεγμονωδών κυτταροκινών, οι οποίες υπερδιεγείρουν υποδοχείς των νευρώνων, με επακόλουθη βλάβη των νευρωνικών κυττάρων και πρόωρη έναρξη νευροεκφυλιστικών διαταραχών (14, 15). Εμείς και άλλοι δείξαμε πρόσφατα ότι η φλεγμονή που οδηγείται από βλάβες στο DNA συμβάλλει αιτιολογικά σε κυτταρική δυσλειτουργία και εκφυλιστικές μεταβολές ιστών με τη γήρανση (7, 16–20). Ωστόσο, η σχετική συμβολή των επίμονων βλαβών DNA σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, π.χ. νευρώνες ή γλοιακά κύτταρα, στη σχετιζόμενη με την ηλικία νευροεκφύλιση παραμένει ασαφής. Για να το διερευνήσουμε, εστίασαμε σε ζώα Er1Cx/- που φέρουν ένα μηχανικά σχεδιασμένο έλλειμμα στο XPF–ERCC1 (Xeroderma Pigmentosum F–Excision Repair Cross Complementation group 1) μόνο στους μόνιμους ιστικούς μακροφάγους. Το XPF–ERCC1 είναι ένα ετεροδιμερές, δομικά εξειδικευμένο σύμπλοκο ενδονουκλεάσης, απαραίτητο για την εκτομή βλαβών στη νουκλεοτιδική επιδιόρθωση εκτομής (NER). Το ERCC1–XPF συμμετέχει επίσης στην επιδιόρθωση διπλών θραύσεων DNA (DSB), στην επιδιόρθωση διασταυρούμενων δεσμών μεταξύ κλώνων (ICL), στην επιδιόρθωση εκτομής βάσεων (BER) και στη διατήρηση των τελομερών (21–25). Επιπλέον, το ERCC1–XPF συμβάλλει στην επεξεργασία εναλλακτικών δομών DNA (D-loops, R-loops, hairpin loops, ZDNA, G4DNA) που δυναμικά παρεμποδίζουν την αντιγραφή, τη μεταγραφή ή συμβάντα επιδιόρθωσης του DNA (26). Στον άνθρωπο, μεταλλάξεις που επηρεάζουν

το σύμπλοκο XPF–ERCC1 οδηγούν σε XFE προγηρία, η οποία χαρακτηρίζεται από παθολογίες πρόωρης γήρανσης, συμπεριλαμβανομένης προοδευτικής νευροεκφύλισης (27). Τα ευρήματά μας παρέχουν τεκμήρια για έναν θεμελιώδη μηχανισμό μέσω του οποίου μη επιδιορθώσιμη βλάβη DNA οδηγεί σε παρατεταμένη ανοσολογική ενεργοποίηση της μικρογλοίας, με αποτέλεσμα νευρωνικό θάνατο. Μετά από βλάβη DNA, δείχνουμε ότι δίκλωνα μόρια DNA (dsDNA) συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα της μικρογλοίας και διεγείρουν απόκριση ιντερφερόνης τύπου I. Τα μικρογλοιακά κύτταρα συσκευάζουν τα κυτταροπλασματικά dsDNA σε εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) που στοχεύουν νευρώνες ανταποκρινόμενους στην ιντερφερόνη, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο και πρόωρη εμφάνιση νευροεκφυλιστικών χαρακτηριστικών στα ποντίκια *Er1Cx/-*. Για να απομακρύνουμε τα dsDNA από το κυτταρόπλασμα ενεργοποιημένης μικρογλοίας και να προλάβουμε τη νευροφλεγμονή, κατασκευάσαμε EVs φορτωμένα με ανασυνδυασμένη DNase I ώστε να στοχεύουν μικρογλοιακά κύτταρα *in vitro* και *in vivo*. Δείχνουμε ότι η θεραπεία με στοχευμένα DNase I-EVs εξαλείφει ταχέως τα dsDNA από το κυτταρόπλασμα της μικρογλοίας και από τα EVs που εκκρίνονται από αυτήν. Σημαντικά, η απομάκρυνση των κυτταροπλασματικών dsDNA μέσω EVs μειώνει την απόκριση ιντερφερόνης τύπου I και βελτιώνει τον νευρωνικό θάνατο στα ζώα *Er1Cx/-*. Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν τον κεντρικό ρόλο της μικρογλοίας στη σχετιζόμενη με την ηλικία νευροεκφύλιση και παρέχουν μια νέα, στοχευμένη στρατηγική παρέμβασης έναντι της νευροφλεγμονής και των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων.

**Η απώλεια του ERCC1 στους μόνιμους ιστικούς μακροφάγους προκαλεί προοδευτική αταξία στα ποντίκια.** Η νευροεκφύλιση είναι μια προοδευτική επιδείνωση, σχετιζόμενη με την ηλικία, των νευρωνικών δομών και λειτουργιών, που τελικά οδηγεί σε προοδευτική γνωστική έκπτωση και/ή κινητική δυσλειτουργία (28). Η νευροφλεγμονή, δηλαδή η έμφυτη ανοσολογική απόκριση του ΚΝΣ (εγκέφαλος και νωτιαίος μυελός) σε φλεγμονώδη πρόκληση, έχει αναδειχθεί πρόσφατα ως κεντρικό χαρακτηριστικό των νευροεκφυλιστικών νόσων (13). Οι μόνιμοι ιστικοί μακροφάγοι, όπως η εγκεφαλική μικρογλοία, κατοικούν σε διακριτά ιστικά περιβάλλοντα και είναι ζωτικοί για την ομοιόσταση και την άμυνα έναντι παθογόνων ή περιβαλλοντικών προκλήσεων (29).

Για να διερευνήσουμε τον ρόλο των εγκεφαλικών μόνιμων μακροφάγων στην απόκριση σε μη επιδιορθώσιμες βλάβες DNA *in vivo*, διασταυρώσαμε ομόζυγα floxed *Ercc1* (*Ercc1F/F*) ζώα με ποντίκια που φέρουν το διαγονίδιο *Cx3cr1-Cre* σε ετερόζυγο υπόβαθρο *Ercc1* (εφεξής *Er1Cx/-*). Έχει αναφερθεί πρόσφατα ότι ο υποκινητής *Cx3cr1* είναι παροδικά ενεργός σε νευρώνες κατά την ανάπτυξη (30, 31), γεγονός που υποδεικνύει ως εναλλακτική στρατηγική τη χρήση *Cx3cr1CreER* ζώων με *Cre* επαγωγή από *tamoxifen*. Ωστόσο, το *tamoxifen* είναι ισχυρός γονοτοξικός παράγοντας που προκαλεί αδιακρίτως βλάβες DNA στα κύτταρα, καθιστώντας το ακατάλληλο για τις μελέτες μας (32, 33). Έτσι, επιδιώξαμε να επαναξιολογήσουμε την ειδικότητα του συνταγματικού *Cx3cr1-Cre* στο έργο μας.

Μελέτες συνεστιακής μικροσκοπίας σε εγκεφαλικές κρυστομές και σε απομονωμένη μικρογλοία από ποντίκια *Cx3cr1-Cre* διασταυρωμένα με *Rosa-YFP* έδειξαν έκφραση *YFP* υπό τον *Cx3cr1* σε *MAC1+* μόνιμους ιστικούς μακροφάγους, επιβεβαιώνοντας την ειδικότητα του υποκινητή *Cx3cr1* στα μικρογλοιακά κύτταρα (34). Το *MAC1* (ετεροδιμερές *CD11b/CD18*) θεωρείται αποδεκτός δείκτης για μικρογλοία και περιφερικούς μακροφάγους, ενώ το *TMEM119* μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως

επιλεκτικός δείκτης μικρογλοίας. Ο TMEM119-θετικός κυτταρικός πληθυσμός δεν διαφέρει από τον MAC1-θετικό πληθυσμό σε μελέτες ανοσοφθορισμού σε κρυτομέγες εγκεφάλου wt. Η ειδικότητα του Cx3cr1-Cre τεκμηριώθηκε επίσης από την απουσία έκφρασης ERCC1 σε απομονωμένα MAC1+ μικρογλοιακά κύτταρα από Er1Cx/- ζώα που εκφράζουν Cx3cr1-Cre, σε σύγκριση με Ercc1F/+ ζώα που εκφράζουν Cx3cr1-Cre (εφεξής άγριος τύπος, wt). Σε συμφωνία, διαπιστώσαμε ότι το ERCC1 εκφράζεται σε διαφορετικές περιοχές του ΚΝΣ, δηλ. παρεγκεφαλίδα, εγκεφαλικός φλοιός και νωτιαίος μυελός, υποδεικνύοντας φυσιολογικά επίπεδα ERCC1 στα Er1Cx/- κύτταρα πέραν του στοχευμένου πληθυσμού. Τέλος, western blot ολικών εκχυλισμάτων από εγέφαλο και νωτιαίο μυελό επιβεβαίωσε συγκρίσιμα επίπεδα ERCC1 σε Er1Cx/- και wt ζώα. Συνολικά, τα ευρήματά μας υποστηρίζουν πρόσφατες παρατηρήσεις ότι ο υποκινητής Cx3cr1 κατευθύνει την έκφραση της Cre κυρίως και περιοριστικά στη μικρογλοία, ακόμη και μετά από διεγερτικό τραυματισμό (35).

Τα Er1Cx/- ποντίκια γεννήθηκαν με την αναμενόμενη Μεντελιανή συχνότητα και δεν παρουσίασαν αναπτυξιακές ανωμαλίες ή άλλα παθολογικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, στην ηλικία των 6 μηνών (24 εβδομάδων) παρατηρήσαμε προοδευτικά σημεία αταξίας. Όταν 6-μηνών wt ποντίκια αναρτήθηκαν από την ουρά, εξέτειναν και ταλαντούσαν τα οπίσθια άκρα τους για να διατηρήσουν ισορροπία. Αντίθετα, τα Er1Cx/- ποντίκια κρατούσαν τα οπίσθια άκρα σε θέση “σύσπασης/πιασίματος” (clasp) και βιάζον με ευρεία βάση σε σύγκριση με συνομήλικους μάρτυρες. Αξιολόγηση rotarod έδειξε ότι η μειωμένη συντονιστική ικανότητα των οπίσθιων άκρων προκαλεί σημαντικά ελλείμματα στην ικανότητα των 6-μηνών Er1Cx/- ζώων να εκτελέσουν το τεστ, σε σύγκριση με wt μάρτυρες. Από τους 8 μήνες (32 εβδομάδες), τα Er1Cx/- ζώα αναπτύσσουν κύφωση και λεπτό τρόπο στα πρόσθια άκρα. Η πρόωμη εμφάνιση νευροπαθολογικών χαρακτηριστικών μας ώθησε να αξιολογήσουμε τα μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των μακροφάγων του ΚΝΣ. Τα μικρογλοιακά κύτταρα στον φλοιό, στην παρεγκεφαλίδα και στον νωτιαίο μυελό 6-μηνών Er1Cx/- ζώων σχημάτιζαν δακτυλοειδείς προεκβολές, χαρακτηριστικό ενεργοποίησης της μικρογλοίας που σχετίζεται με κυτταρική κινητικότητα και αυξημένη παρουσίαση αντιγόνου (36). Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας συνδέεται άμεσα με τον πολλαπλασιαστικό της ρυθμό και με την έκφραση πρωτεϊνών παρουσίασης αντιγόνου (37). Αντίστοιχα, κυτταρομετρία ροής αποκάλυψε σημαντική αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών MHC-II (εκφράζεται μόνο σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα) και CD86 (εκφράζεται συνταγματικά σε ενεργοποιημένους μακροφάγους) στη μικρογλοία των εγκεφάλων Er1Cx/- σε σύγκριση με wt. Ωστόσο, σε σύγκριση με μικρογλοία πλήρως ενεργοποιημένη προς προ-φλεγμονώδη κατάσταση μετά από λιποπολυσακχαρίτη, τα Er1Cx/- μικρογλοιακά κύτταρα φαίνεται να βρίσκονται σε “primed”, αλλά όχι πλήρως ενεργοποιημένη κατάσταση. Για να διερευνήσουμε τον πολλαπλασιασμό, αναφέρουμε τους αριθμούς του πληθυσμού CD11b+CD45lo σε wt και Er1Cx/- ποντίκια (37). Το CD45 είναι διαμεμβρανικό μόριο τύπου I που εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε λεμφοκύτταρα και περιφερικά μονοκύτταρα και σε χαμηλότερα επίπεδα στη μόνιμη μικρογλοία. Διαπιστώσαμε ότι οι αριθμοί CD11b+CD45lo είναι συγκρίσιμοι μεταξύ wt και Er1Cx/- 6-μηνών ποντικών. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά σε πληθυσμούς Annexin V+PI+ εντός των CD11b-gated κυττάρων, υποδεικνύοντας ότι η Er1Cx/- μικρογλοία δεν υφίσταται απόπτωση και είναι ανεκτική σε ενδογενή βλάβη DNA. Στη συνέχεια εξετάσαμε αν το παρατηρούμενο “priming” προέρχεται από διήθηση περιφερικών ανοσοκυττάρων στους εγκεφάλους Er1Cx/-. Ιστολογική H&E αξιολόγηση σε 6-μηνών Er1Cx/- εγκεφάλους δεν έδειξε φλεγμονώδεις εστίες. Επιπλέον, ο αριθμός Ly6C+ μακροφάγων προερχόμενων από μυελό ήταν παρόμοιος

μεταξύ Er1Cx/- και wt εγκεφάλων. Σε συμφωνία με την απουσία διήθησης, τα επίπεδα πρωτεΐνης CD45 ήταν συγκρίσιμα μεταξύ 6-μηνών Er1Cx/- και wt εγκεφάλων.

**Η συσσώρευση κυτταροπλασματικών θραυσμάτων χρωματίνης ενεργοποιεί απόκριση ιντερφερόνης τύπου I στη μικρογλοία Er1Cx/-.** Αφού τεκμηριώσαμε ότι το έλλειμμα επιδιόρθωσης DNA στους μόνιμους ιστικούς μακροφάγους οδηγεί σε “priming” μικρογλοίας και προοδευτική αταξία, διερευνήσαμε αν η απάλειψη του ERCC1 στη μικρογλοία επαρκεί για να προκαλέσει συνταγματική σηματοδότηση βλάβης DNA. Η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη ATM (pATM) είναι κεντρικός μεσολαβητής της απόκρισης σε βλάβες DNA. Επιπλέον, εστίες που περιέχουν φωσφορυλιωμένη ιστόνη H2A.X ( $\gamma$ -H2A.X) συσσωρεύονται σε θέσεις θραύσεων DNA (38). Συνεστιακή μικροσκοπία έδειξε σημαντική αύξηση του αριθμού pATM+/MAC1+ και  $\gamma$ -H2A.X+/MAC1+ σε καλλιεργημένη μικρογλοία από Er1Cx/- εγκεφάλους σε σύγκριση με wt. Αντίστοιχα, ο αριθμός εστιών  $\gamma$ -H2A.X ήταν σημαντικά υψηλότερος σε Er1Cx/- πυρήνες από απομονωμένη μικρογλοία ή σε μικρογλοιακά κύτταρα εντός εγκεφαλικών κρυοτομών σε σύγκριση με τους wt μάρτυρες, υποδηλώνοντας συσσώρευση μη επιδιορθώσιμων βλαβών DNA στο γονιδίωμα της μικρογλοίας Er1Cx/-.

Η πυρηνική βλάβη DNA οδηγεί σε συσσώρευση κυτταροπλασματικού DNA, ιδίως ως μικροπυρήνες και Κυτταροπλασματικά Θραύσματα Χρωματίνης (CCFs) ή ως DNA speckles (39). Η ανάλυσή μας έδειξε ότι κυτταροπλασματικά dsDNA συσσωρεύονται στη μικρογλοία Er1Cx/- σε κρυοτομές εγκεφάλου και σε καλλιεργημένα μικρογλοιακά κύτταρα Er1Cx/- σε σύγκριση με wt. Επιπλέον, εστίες χρώσης DAPI (χρησιμοποιείται ευρέως για χρώση χρωμοσωμάτων) συνεντοπίζονταν με  $\gamma$ -H2A.X στο κυτταρόπλασμα απομονωμένων μικρογλοιακών κυττάρων Er1Cx/-. Περαιτέρω, pATM και  $\gamma$ -H2A.X εστίες συσσωρεύονταν στο κυτταρόπλασμα Er1Cx/- κυττάρων.

Οι μικροπυρήνες και τα CCFs περιέχουν μικρά χρωμοσωμικά θραύσματα, συχνά περιβάλλονται από πυρηνικό φάκελο και συσχετίζονται με αποδιοργάνωση και ρήξη της λαμίνης (39). Στη δουλειά μας, τα κυτταροπλασματικά θραύσματα χρωματίνης ήταν θετικά για το  $\gamma$ -H2A.X, αλλά, σε αντίθεση με μικροπυρήνες, ήταν αρνητικά για lamin A/C ή lamin B1 (40). Σε συμφωνία, χρώση με αντισώματα έναντι lamin A/C ή lamin B1 δεν αποκάλυψε σημαντικές διαταραχές στη πυρηνική λαμίνη μικρογλοίας είτε σε καλλιέργεια είτε σε κρυοτομές. Η απουσία ERCC1 μπορεί να οδηγήσει σε ανασυνδυασμούς μεταξύ τελομερών και ενδιάμεσων τελομερικών ακολουθιών, τελικά σε βραχύτερα τελομερή και κυκλικά προϊόντα με τελομερικό DNA (25). Ωστόσο, TelC in situ FISH δεν έδειξε αξιοσημείωτη διαφορά στο πυρηνικό σήμα TelC μεταξύ Er1Cx/- και wt απομονωμένης μικρογλοίας.

Τέλος, κυτταροπλασματικό DNA θα μπορούσε να είναι άμεσο ή έμμεσο αποτέλεσμα (π.χ. λόγω κατάρρευσης πιρουνιού αντιγραφής) από R-loops και βλάβες DNA (41, 42). Η καθήλωση πιρουνιού αντιγραφής αυξάνει την έκθεση ssDNA, επιτρέποντας στο ssDNA επικαλυμμένο με RPA να ενεργοποιήσει την ATR. Η ενεργοποίηση της ATR οδηγεί ενεργοποίηση καθοδικών στόχων, όπως Chk1, MLL και το ίδιο το RPA (41, 43). Για να διερευνήσουμε αν τα Er1Cx/- κύτταρα υφίστανται στρες αντιγραφής, πραγματοποιήσαμε IF ανάλυση με φωσφορυλιωμένο RPA (RPA32-S33). Διαπιστώσαμε εμπλουτισμό πυρηνικού RPA32-S33 στη μικρογλοία Er1Cx/- σε σύγκριση με wt.

Στις περισσότερες μελέτες, η γονιδιωματική αστάθεια συνδέεται με συσσώρευση κυτταροπλασματικού ssDNA και όχι dsDNA (42, 44). Για να συμφιλώσουμε την παρατήρηση ότι η μικρογλοία Er1Cx/- συσσωρεύει κυτταροπλασματικό dsDNA, μπορεί να προταθεί ότι δευτεροταγείς δομές επαναληπτικών ssDNA ακολουθιών

δημιουργούν dsDNA. Για να το εξετάσουμε, καλλιεργημένη μικρογλοία Er1Cx/- ελέγχθηκε για κυτταροπλασματικό ssDNA και, απροσδόκητα, εμφάνισε χαμηλότερα επίπεδα κυτταροπλασματικού ssDNA σε σύγκριση με wt. Επιπλέον, η ένταση φθορισμού κυτταροπλασματικού dsDNA στη μικρογλοία Er1Cx/- μειώθηκε σημαντικά μετά από μεταφορά της ανασυνδυασμένης νουκλεάσης mung bean S1. Προηγούμενες αναφορές έδειξαν ότι ανεπαρκής επιδιόρθωση βλάβης DNA σε Atm/- μικρογλοία οδηγεί σε ενεργή εξαγωγή AT-πλούσιων επαναληπτικών στοιχείων στο κυτταρόπλασμα (45). Το GSAT\_MM, η κύρια δορυφορική επανάληψη, ήταν μεταξύ των κορυφαία εμπλουτισμένων AT-πλούσιων ακολουθιών στο κυτταροπλασματικό DNA μικρογλοίας με αναστολή ATM. Τα επίπεδα GSAT\_MM ήταν επίσης υψηλότερα στο κυτταροπλασματικό DNA της μικρογλοίας Er1Cx/- σε σύγκριση με wt. Η μείωση του σήματος dsDNA μετά από S1 νουκλεάση και η συσσώρευση AT-πλούσιων ακολουθιών υποδηλώνουν ότι επανασυνδεδεμένο ssDNA μπορεί να αποτελεί την προέλευση του κυτταροπλασματικού dsDNA στα Er1Cx/- κύτταρα. Η συνθετάση cGMP-AMP (cGAS) είναι κυτταροπλασματικός αισθητήρας μικροβιακού ή αυτο-dsDNA και έχει πρόσφατα δειχθεί ότι ανιχνεύει κυτταροπλασματικό DNA ως συνέπεια πυρηνικής βλάβης DNA (39, 46). Διαπιστώσαμε ότι η cGAS συσσωρεύεται σημαντικά στο κυτταρόπλασμα καλλιεργημένης μικρογλοίας Er1Cx/- ή σε μικρογλοία κρυοτομών εγκεφάλου Er1Cx/-. Επιπλέον, η cGAS συνεντοπιζόταν με dsDNA και με DAPI+/γ-H2AX+ εστίες στο κυτταρόπλασμα. Για να εξετάσουμε αν η πυρηνική βλάβη DNA στη μικρογλοία Er1Cx/- συμβάλλει αιτιολογικά στη συσσώρευση κυτταροπλασματικού dsDNA, θεραπεύσαμε wt μικρογλοία με ετοποσίδη, ισχυρό γονοτοξικό παράγοντα που εμποδίζει την επανασύνδεση των διπλών θραύσεων DNA που μεσολαβούνται από τοποϊσομεράση II. Όπως και στη μικρογλοία Er1Cx/-, παρατηρήσαμε ότι κυτταροπλασματικά dsDNA και DAPI+ θραύσματα χρωματίνης συσσωρεύονται και συνεντοπίζονται με συσσωματώματα cGAS σε κύτταρα wt μετά από ετοποσίδη. Η ειδικότητα της χρώσης dsDNA επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με θεραπεία DNase I σε wt και wt+ETO μικρογλοία μετά τη σταθεροποίηση. Η απελευθέρωση DNA στο κυτταρόπλασμα διεγείρει το STING (stimulator of interferon genes) (47). Αφού φωσφορυλιωθεί από αισθητήρες DNA όπως η cGAS, το STING δρα ως αισθητήρας κυκλικού d-GMP και ως προσαρμοστική πρωτεΐνη που μεσολαβεί την απόκριση ιντερφερόνης. Οι ιντερφερόνες τύπου I εκτελούν αντι-ικές λειτουργίες (48) και υπό συνθήκες νευροφλεγμονής ασκούν ισχυρά νευροτοξικά αποτελέσματα στον εγκεφαλο (49). Κυτταρομετρία ροής έδειξε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα pSTING σε μικρογλοία εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού 6-μηνών Er1Cx/- ποντικών. Αντίστοιχα, τα επίπεδα mRNA του Ifnβ και αρκετών “interferon signature genes”, συμπεριλαμβανομένων των Ifi207, Irf1 και Mx1, ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ολικά εκχυλίσματα εγκεφάλου Er1Cx/- σε σύγκριση με wt. Χρησιμοποιώντας τη B16-Blue™ IFN-α/β κυτταρική σειρά, διαπιστώσαμε επίσης ότι τα βιοενεργά επίπεδα τύπου I IFN ήταν σημαντικά υψηλότερα στο εξωκυττάριο περιβάλλον (brain lavage) 6-μηνών Er1Cx/- εγκεφάλων. ELISA έδειξε συγκρίσιμα επίπεδα IFN-α, όμως western blot για IFN-β αποκάλυψε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα IFN-β στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF) των Er1Cx/-. Σε συμφωνία, τα επίπεδα IFN-β ήταν πολύ υψηλότερα μετά από θεραπεία Er1Cx/- κυττάρων με brefeldin A (αναστολέας μεταφοράς πρωτεϊνών που αυξάνει το ενδοκυττάριο σήμα κυτταροκινών) (50). Ομοίως, IFN-β αυξήθηκε σημαντικά σε wt μικρογλοία μετά από ετοποσίδη παρουσία brefeldin A. Τα Ercc1/- προγηροειδή ζώα εμφανίζουν παθολογικά χαρακτηριστικά που μιμούνται στενά τη φυσιολογική γήρανση (10, 27). Χρώση κρυοτομών εγκεφάλου από νεαρά (2 μηνών) και ηλικιωμένα (24 μηνών) ποντίκια με MAC1 και γ-H2A.X έδειξε ότι η ηλικιωμένη μικρογλοία έχει περισσότερες πυρηνικές

εστίες  $\gamma$ -H2A.X από τη νεαρή. Στη συνέχεια εξετάσαμε αν dsDNA συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα μικρογλοίας κατά τη γήρανση. Διαπιστώσαμε ότι κυτταροπλασματικό dsDNA και cGAS συσσωρεύονται σε μικρογλοιακά κύτταρα 24-μηνών φυσιολογικά γηρασμένων ποντικών σε σύγκριση με 2-μηνών νεαρά. Αντίστοιχα, τα ποσοστά pSTING+/CD11b+ κυττάρων ήταν υψηλότερα σε φυσιολογικά γηρασμένους εγκεφάλους. Έτσι, η πυρηνική βλάβη DNA πυροδοτεί συσσώρευση κυτταροπλασματικών dsDNA και θραυσμάτων χρωματίνης στη μικρογλοία Er1Cx<sup>-</sup>, οδηγώντας σε ενεργοποίηση απόκρισης τύπου I IFN σε ποντίκια με έλλειμμα επιδιόρθωσης DNA και πιθανότατα και κατά τη γήρανση.

Η μικρογλοία Er1Cx<sup>-</sup> εκκρίνει εξωκυτταρικά κυστίδια φορτωμένα με νουκλεϊκά οξέα. Έχουμε δείξει προηγουμένως ότι η επίμονη συσσώρευση βλάβης DNA σε Ercc1<sup>-</sup>/μακροφάγα που διηθούν ιστούς προκαλεί έκκριση εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs) in vivo και ex vivo (51). Αντίστοιχα, είναι γνωστό ότι η ενεργοποιημένη μικρογλοία παράγει και εκκρίνει αποτελεσματικά EVs (52). Στη μελέτη μας, η έκφραση του δείκτη EV CD9 ήταν σημαντικά υψηλότερη στη μικρογλοία Er1Cx<sup>-</sup> σε σύγκριση με wt, υποδηλώνοντας EV-σχετιζόμενο εκκριτικό φαινότυπο. Για να καθαρίσουμε EVs από brain lavages Er1Cx<sup>-</sup>, πραγματοποιήσαμε υπερφυγοκέντρηση σε κλίση σακχαρόζης και στη συνέχεια κυτταρομετρία ροής για τον μικρογλοιακό δείκτη CD11b. Βρήκαμε αύξηση EVs προερχόμενων από μικρογλοία (CD11b<sup>+</sup>) σε 6-μηνών Er1Cx<sup>-</sup> εγκεφάλους. Σημαντικά, western blot επιβεβαίωσε τον εμπλουτισμό CD11b, της τετρασπανίνης CD81 (συνήθης δείκτης μικρών EVs) (53) και, πιο έντονα, του δείκτη βλάβης DNA  $\gamma$ -H2A.X σε EVs από Er1Cx<sup>-</sup> brain lavages έναντι wt. Αντίθετα, τα επίπεδα της μη-εξοσωμικής πρωτεΐνης πρόσδεσης EEA1 (λειτουργεί στη σύντηξη πρώιμων ενδοσωμάτων) (54) ήταν συγκρίσιμα μεταξύ Er1Cx<sup>-</sup> και wt EVs. Συνολικά, τα δεδομένα δείχνουν ότι η μικρογλοία Er1Cx<sup>-</sup> εκκρίνει EVs φορτωμένα με κυτταροπλασματικά,  $\gamma$ H2AX<sup>+</sup>-σχετιζόμενα θραύσματα χρωματίνης (55).

Το DNA που συνδέεται με την εξωτερική μεμβράνη των EVs είναι συνήθως μεγαλύτερο και κυρίως δίκλωνο, ενώ τόσο ssDNA όσο και dsDNA είναι άφθονα στο εσωτερικό των EVs (56). Εξαγωγή DNA από EVs προερχόμενα από CSF με φαινόλη-χλωροφόρμιο, ακολουθούμενη από ηλεκτροφόρηση σε ακρυλαμίδα και χρώση με EtBr, έδειξε υψηλότερη αφθονία ειδών DNA <400 bp στα Er1Cx<sup>-</sup> EVs έναντι wt. Σάρωση και ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης των κυστιδίων από κλάσματα κλίσης σακχαρόζης έδειξαν ότι τα EVs προερχόμενα από μικρογλοία έχουν μέγεθος ~100 nm. Αξιοσημείωτα, τα Er1Cx<sup>-</sup> κυστίδια συσχετιζόνταν με “πυκνότερο” φορτίο, όπως υποδηλώνεται από πιο σκούρο κέντρο και εμπλουτισμένο φωσφόρο, δείκτη παρουσίας θετικά φορτισμένων μορίων DNA, που περιβάλλονται από μεμβράνη σε σχήμα “ντόνατ”. Για περαιτέρω επιβεβαίωση, EVs από 6-μηνών Er1Cx<sup>-</sup> και wt brain lavages χρωματίστηκαν για CD11b και με την φθορίζουσα βενζοθειαζολική ανιχνευτική ουσία PicoGreen που δεσμεύει ειδικά dsDNA. Κυτταρομετρία ροής έδειξε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό EVs προερχόμενων από μικρογλοία (CD11b<sup>+</sup>) φορτωμένων με dsDNA στα Er1Cx<sup>-</sup> brain lavages. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα EVs διευκολύνουν την οριζόντια και λειτουργική μεταφορά πρωτεϊνών, RNA και DNA μεταξύ κυττάρων (57–59). Αυτό μας οδήγησε να διερευνήσουμε αν EVs προερχόμενα από μικρογλοία Er1Cx<sup>-</sup> μεταφέρουν κυτταροπλασματικά dsDNA σε νευρώνες. Για να το ελέγξουμε, επώασαμε τη νευρωνική κυτταρική σειρά SH-SY5Y (σημασμένη με NESTIN-1, δείκτη νευρωνικών προγονικών κυττάρων) (60) με EVs από Er1Cx<sup>-</sup> και wt brain lavages, χρωματισμένα με ExoFlow και PicoGreen. Σημαντικά, ανιχνεύσαμε σημαντικά υψηλότερο σήμα PicoGreen σε νευρωνικά κύτταρα μετά από επώαση 16 ωρών με Er1Cx<sup>-</sup> EVs σε σύγκριση με wt EVs. Έτσι, τα EVs

προερχόμενα από μικρογλοία Er1Cx/- μπορούν να στοχεύσουν και να αποδώσουν αποτελεσματικά το φορτίο dsDNA σε δέκτες-νευρώνες. Συνολικά, τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι ένα κλάσμα νευρώνων στο ΚΝΣ των Er1Cx/- ποντικών είναι ευαίσθητο σε ερεθίσματα τύπου I IFN. Σε συμφωνία, μελέτες ανοσοφθορισμού σε διαφορετικές περιοχές του ΚΝΣ σε Er1Cx/- και wt ποντίκια που έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά brefeldin A έδειξαν συσσώρευση IFN-β σε νευρωνικά κύτταρα εντοπισμένα στον φλοιό, σε κύτταρα Purkinje, σε κύτταρα των κοκκιοκυτταρικών στιβάδων της παρεγκεφαλίδας και σε μικρογλοιακά (MAC1+) κύτταρα σε όλες τις περιοχές του ΚΝΣ που εξετάστηκαν στα Er1Cx/- ποντίκια. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν πρόσφατες παρατηρήσεις ότι, πέρα από τη μικρογλοία, και οι νευρώνες μπορούν να παράγουν IFN-β ως αποτέλεσμα εξωκυττάρων ερεθισμάτων IFN-β και/ή ενδοκυττάριας σηματοδότησης (61). Σε συμφωνία με την IFN απόκριση σε μη-μικρογλοιακούς κυτταρικούς πληθυσμούς, περαιτέρω ανάλυση σε κρυοτομές παρεγκεφαλίδας, φλοιού και νωτιαίου μυελού αποκάλυψε έντονη συσσώρευση κυτταροπλασματικών dsDNA σε κύτταρα Purkinje και κοκκιοκυτταρικούς νευρώνες, σε κύτταρα της μοριακής στιβάδας της παρεγκεφαλίδας, καθώς και στη ραχιαία και πλάγια μοίρα του νωτιαίου μυελού σε Er1Cx/- ποντίκια, σε σύγκριση με wt μάρτυρες. Θεραπεία κρυοτομών Er1Cx/- με DNase I μετά τη σταθεροποίηση μείωσε σημαντικά τα επίπεδα dsDNA σε MAC1+ κύτταρα καθώς και σε PAX6+/CALB+ κύτταρα, ενισχύοντας την ειδικότητα του σήματος dsDNA. Σε συμφωνία, βρήκαμε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό CD11b- pSTING+ κυττάρων στην παρεγκεφαλίδα και στον νωτιαίο μυελό 6-μηνών Er1Cx/- ποντικών.

**Τα μικρογλοιακά Er1Cx/- EVs στοχεύουν Purkinje κύτταρα ανταποκρινόμενα σε IFN-α και πυροδοτούν απόπτωση.** Το εύρημά μας ότι τα EVs προερχόμενα από μικρογλοία Er1Cx/- μπορούν να στοχεύσουν και να αποδώσουν το φορτίο dsDNA σε νευρωνικά κύτταρα in vitro μας οδήγησε στην υπόθεση ότι ένα παρόμοιο σενάριο ισχύει και in vivo στα Er1Cx/- ζώα. Υποθέσαμε ότι η μικρογλοία Er1Cx/- συσκευάζει κυτταροπλασματικά dsDNA σε EVs, τα οποία εκκρίνονται και στοχεύουν νευρώνες που αποκρίνονται σε IFN, αλλά είναι επαρκείς ως προς την επιδιόρθωση DNA, οδηγώντας σε νευρωνικό θάνατο και προοδευτική νευροεκφύλιση στα Er1Cx/- ζώα. Αυτό θα εξηγούσε επίσης: (i) το υψηλότερο ποσοστό pSTING+ κυττάρων σε 6-μηνών εγκεφαλο και νωτιαίο μυελό Er1Cx/-, (ii) τα υψηλότερα επίπεδα IFNAR και IFN-β και (iii) την ανίχνευση κυτταροπλασματικών dsDNA σε διακριτούς νευρωνικούς πληθυσμούς της παρεγκεφαλίδας (Purkinje) και του νωτιαίου μυελού. Για να εξετάσουμε αν οι νευρώνες στοχεύονται από EVs προερχόμενα από μικρογλοία Er1Cx/-, εστίασαμε σε κύτταρα Purkinje, μια κατηγορία GABAεργικών ανασταλτικών νευρώνων που διαδραματίζουν καίριο ρόλο στον συντονισμό, στον έλεγχο και στη μάθηση της κίνησης. Αρχικά, θεραπεύσαμε καλλιέργειες οξέων εγκεφαλικών τομών από wt ζώα με Er1Cx/- και wt EVs προερχόμενα από εγκεφάλους 6-μηνών, τα οποία είχαν προηγουμένως επισημανθεί με την λιποφιλική πράσινη φθορίζουσα χρωστική PKH67. Έπειτα, υποβάλαμε τις τομές σε ταυτόχρονη πολυφωτονική σάρωση 2–3 καναλιών, ώστε να παρακολουθήσουμε την εκλεκτική πρόσληψη των Er1Cx/- EVs από calbindin+ κύτταρα σε βάθη ανίχνευσης τουλάχιστον 200 μm· η calbindin είναι πρωτεΐνη δέσμευσης ασβεστίου που εκφράζεται στα κύτταρα Purkinje. Η ανάλυσή μας έδειξε ότι τα Er1Cx/- EVs στοχεύουν αποτελεσματικά τα κύτταρα Purkinje σε σύγκριση με wt EVs· ενδιαφέρον είναι ότι η εκλεκτική πρόσληψη των Er1Cx/- EVs από Purkinje ήταν υψηλότερη όταν οι τομές υποβλήθηκαν επιπλέον σε θεραπεία με

τύπου I IFN. Όταν τα dsDNA εντός των EVs προ-χρωματίστηκαν με PicoGreen, η συνεντόπιση του σήματος PicoGreen με calbindin ήταν πιο έντονη στις τομές που θεραπεύτηκαν με Er1Cx/- EVs σε σύγκριση με wt EVs. Ενδιαφέρον είναι ότι η αυξημένη πρόσληψη Er1Cx/- EVs από Purkinje παρουσία τύπου I IFN συνοδεύτηκε και από αυξημένη πρόσληψη PicoGreen στα κύτταρα αυτά, υποδεικνύοντας ότι η προτιμησιακή στόχευση ακολουθείται από απελευθέρωση του φορτίου dsDNA των Er1Cx/- EVs στα κύτταρα δέκτες. Τέλος, χρώση οξέων εγκεφαλικών τομών για κασπάση-3 αποκάλυψε ότι η έκθεση τομών (που είχαν προθεραπευθεί με τύπου I IFN) σε Er1Cx/- EVs για 6 ώρες είναι επαρκής για να επάγει θάνατο κυττάρων Purkinje. Έτσι, EVs προερχόμενα από μικρογλοία Er1Cx/- στοχεύουν προτιμησιακά και αποδίδουν το φορτίο dsDNA σε νευρώνες που αποκρίνονται σε τύπου I IFN, οδηγώντας σε απόπτωση. Σημαντικά, όταν χορηγήσαμε ExoFlow-επισημασμένα EVs καθαρισμένα από Er1Cx/- ποντίκια σε wt ποντίκια και χρωμάτισαμε την παρεγκεφαλίδα wt με δείκτη μη-νευρωνικού κυτταρικού τύπου—αστροκύτταρα επισημασμένα με GFAP—παρατηρήσαμε εντόπιση των ExoFlow puncta κυρίως σε κύτταρα Purkinje και στην περιοχή κοκκιοκυττάρων, καθώς και στην εγγύτητα αστροκυττάρων. Τα ευρήματα αυτά ευθυγραμμίζονται με τα δεδομένα πολυφωτονικής μικροσκοπίας, χωρίς να αποκλείουν πρόσληψη Er1Cx/- EVs και από άλλους κυτταρικούς τύπους που βρίσκονται κοντά στους νευρωνικούς δέκτες.

Τα ανωτέρω δεδομένα έχουν δημοσιευθεί και αποτελέσει αντικείμενο σχολιασμού σε έγκριτα διεθνή επιστημονικά περιοδικά (62-63).

1. E. Adamec, J. P. Vonsattel, R. A. Nixon, DNA strand breaks in Alzheimer's disease. *Brain Res* 849, 67-77 (1999).
2. A. Nunomura et al., Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 759-767 (2001).
3. Z. I. Alam et al., Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* 69, 1196-1203 (1997).
4. T. Maiuri et al., DNA Damage Repair in Huntington's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. *Neurotherapeutics* 16, 948-956 (2019).
5. M. Bogdanov et al., Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free Radic Biol Med* 29, 652-658 (2000).
6. B. Schumacher, J. Pothof, J. Vijg, J. H. J. Hoeijmakers, The central role of DNA damage in the ageing process. *Nature* 592, 695-703 (2021).
7. O. Chatzidoukaki, E. Goulielmaki, B. Schumacher, G. A. Garinis, DNA Damage Response and Metabolic Reprogramming in Health and Disease. *Trends Genet* 36, 777-791 (2020).
8. J. H. Hoeijmakers, Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374 (2001).
9. P. J. McKinnon, DNA repair deficiency and neurological disease. *Nat Rev Neurosci* 10, 100-112 (2009).
10. M. Rieckher, G. A. Garinis, B. Schumacher, Molecular pathology of rare progeroid diseases. *Trends Mol Med* 10.1016/j.molmed.2021.06.011 (2021).
11. G. Welch, L. H. Tsai, Mechanisms of DNA damage-mediated neurotoxicity in neurodegenerative disease. *EMBO Rep* 23, e54217 (2022).
12. M. G. Tansey et al., Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Immunol* 22, 657-673 (2022).
13. C. K. Glass, K. Saijo, B. Winner, M. C. Marchetto, F. H. Gage, Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140, 918-934 (2010).

14. M. L. Block, L. Zecca, J. S. Hong, Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering



- the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8, 57-69 (2007).
15. N. E. Gilhus, G. Deuschl, Neuroinflammation - a common thread in neurological disorders. *Nat Rev Neurol* 15, 429-430 (2019).
  16. G. Chatzinikolaou, I. Karakasilioti, G. A. Garinis, DNA damage and innate immunity: links and trade-offs. *Trends Immunol* 35, 429-435 (2014).
  17. K. Stratigi, O. Chatzidoukaki, G. A. Garinis, DNA damage-induced inflammation and nuclear architecture. *Mech Ageing Dev* 165, 17-26 (2017).
  18. I. Karakasilioti et al., DNA damage triggers a chronic autoinflammatory response, leading to fat depletion in NER progeria. *Cell Metab* 18, 403-415 (2013).
  19. J. S. Tilstra et al., NF-kappaB inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J Clin Invest* 122, 2601-2612 (2012).
  20. Y. Zhao, M. Simon, A. Seluanov, V. Gorbunova, DNA damage and repair in age-related inflammation. *Nat Rev Immunol* 10.1038/s41577-022-00751-y (2022).
  21. Z. Apostolou, G. Chatzinikolaou, K. Stratigi, G. A. Garinis, Nucleotide Excision Repair and Transcription-Associated Genome Instability. *Bioessays* 41, e1800201 (2019).
  22. I. Kamileri, I. Karakasilioti, G. A. Garinis, Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends Genet* 28, 566-573 (2012).
  23. L. J. Niedernhofer et al., The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 24, 5776-5787 (2004).
  24. N. Kumar, S. Raja, B. Van Houten, The involvement of nucleotide excision repair proteins in the removal of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 48, 11227-11243 (2020).
  25. X. D. Zhu et al., ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Mol Cell* 12, 1489-1498 (2003).
  26. T. T. Li, K. M. Vasquez, Multi-Faceted Roles of ERCC1-XPF Nuclease in Processing Non-B DNA Structures. *DNA* 2, 231-247 (2022).
  27. L. J. Niedernhofer et al., A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis. *Nature* 444, 1038-1043 (2006).
  28. L. Gan, M. R. Cookson, L. Petrucelli, A. R. La Spada, Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms. *Nat Neurosci* 21, 1300-1309 (2018).
  29. L. C. Davies, S. J. Jenkins, J. E. Allen, P. R. Taylor, Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14, 986-995 (2013).
  30. Z. Haimon et al., Re-evaluating microglia expression profiles using RiboTag and cell isolation strategies. *Nat Immunol* 19, 636-644 (2018).
  31. B. Zhang et al., The specificity and role of microglia in epileptogenesis in mouse models of tuberous sclerosis complex. *Epilepsia* 59, 1796-1806 (2018).
  32. D. H. Phillips, Understanding the genotoxicity of tamoxifen? *Carcinogenesis* 22, 839-849 (2001).
  33. V. Sahasrabudde, H. S. Ghosh, Cx3Cr1-Cre induction leads to microglial activation and IFN-1 signaling caused by DNA damage in early postnatal brain. *Cell Rep* 38, 110252 (2022).
  34. S. Yona et al., Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79-91 (2013).
  35. X. F. Zhao et al., Targeting Microglia Using Cx3cr1-Cre Lines: Revisiting the Specificity. *eNeuro* 6 (2019).
  36. N. Stence, M. Waite, M. E. Dailey, Dynamics of microglial activation: a

- confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33, 256-266 (2001).
37. A. M. Jurga, M. Paleczna, K. Z. Kuter, Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci* 14, 198 (2020).



38. O. Fernandez-Capetillo, A. Lee, M. Nussenzweig, A. Nussenzweig, H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA repair* 3, 959-967 (2004).
39. T. Li, Z. J. Chen, The cGAS-cGAMP-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer. *J Exp Med* 215, 1287-1299 (2018).
40. K. N. Miller, N. Dasgupta, T. Liu, P. D. Adams, M. G. Vizioli, Cytoplasmic chromatin fragments—from mechanisms to therapeutic potential. *Elife* 10 (2021).
41. S. Saxena, L. Zou, Hallmarks of DNA replication stress. *Mol Cell* 82, 2298-2314 (2022).
42. K. N. Miller et al., Cytoplasmic DNA: sources, sensing, and role in aging and disease. *Cell* 184, 5506-5526 (2021).
43. V. M. Vassin, R. W. Anantha, E. Sokolova, S. Kanner, J. A. Borowiec, Human RPA phosphorylation by ATR stimulates DNA synthesis and prevents ssDNA accumulation during DNA-replication stress. *J Cell Sci* 122, 4070-4080 (2009).
44. F. Coquel, C. Neumayer, Y. L. Lin, P. Pasero, SAMHD1 and the innate immune response to cytosolic DNA during DNA replication. *Curr Opin Immunol* 56, 24-30 (2019).
45. X. Song et al., DNA Repair Inhibition Leads to Active Export of Repetitive Sequences to the Cytoplasm Triggering an Inflammatory Response. *J Neurosci* 41, 9286-9307 (2021).
46. Z. Dou et al., Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature* 550, 402-406 (2017).
47. J. Wu et al., Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 339, 826-830 (2013).
48. L. C. Platanias, Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5, 375-386 (2005).
49. S. Alboni et al., N-acetyl-cysteine prevents toxic oxidative effects induced by IFN-alpha in human neurons. *Int J Neuropsychopharmacol* 16, 1849-1865 (2013).
50. S. B. Kovacs, C. Oh, Y. Aachoui, E. A. Miao, Evaluating cytokine production by flow cytometry using brefeldin A in mice. *STAR Protoc* 2, 100244 (2021).
51. E. Goulielmaki et al., Tissue-infiltrating macrophages mediate an exosome-based metabolic reprogramming upon DNA damage. *Nat Commun* 11, 42 (2020).
52. M. Guo et al., Microglial Exosomes in Neurodegenerative Disease. *Front Mol Neurosci* 14, 630808 (2021).
53. J. M. Escola et al., Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 273, 20121-20127 (1998).
54. R. Kamentseva et al., Functional cycle of EEA1-positive early endosome: Direct evidence for pre-existing compartment of degradative pathway. *PLoS One* 15, e0232532 (2020).
55. J. Ghanam et al., DNA in extracellular vesicles: from evolution to its current application in health and disease. *Cell Biosci* 12, 37 (2022).
56. B. K. Thakur et al., Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res* 24, 766-769 (2014).
57. J. Cai, G. Wu, P. A. Jose, C. Zeng, Functional transferred DNA within extracellular vesicles. *Exp Cell Res* 349, 179-183 (2016).
58. A. Lanna et al., An intercellular transfer of telomeres rescues T cells from senescence and promotes long-term immunological memory. *Nat Cell Biol* 10.1038/s41556-022-00991-z (2022).
59. J. Cai et al., Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells. *J Mol*

- Cell Biol 5, 227-238 (2013).
60. A. Bernal, L. Arranz, Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci* 75, 2177-2195 (2018).
  61. E. V. Mesev, R. A. LeDesma, A. Ploss, Decoding type I and III interferon



- signalling during viral infection. *Nat Microbiol* 4, 914-924 (2019).
62. Stavgiannoudaki, I., Goulielmaki, E. & Garinis, G. A. Broken strands, broken minds: Exploring the nexus of DNA damage and neurodegeneration. *DNA Repair (Amst)* 140, 103699, doi:10.1016/j.dnarep.2024.103699 (2024).
63. Arvanitaki, E. S. et al. Microglia-derived extracellular vesicles trigger age-related neurodegeneration upon DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 121, e2317402121, doi:10.1073/pnas.2317402121 (2024).

