



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: Φαινοτυπική μελέτη αστροκυττάρων από παρκινσονικούς ασθενείς με τη μετάλλαξη A53T- α -συν

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

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΦΛΩΡΕΝΤΙΑ ΠΑΠΑΣΤΕΦΑΝΑΚΗ (ΕΙΠ)

Φαινοτυπική μελέτη αστροκυττάρων από παρκινσονικούς ασθενείς με τη μετάλλαξη A53T-α-συν

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Σε καλλιέργειες iPSCs από δύο ασθενείς με ΝΠ που φέρουν τη μετάλλαξη A53T α-συν και δύο υγιείς δότες καθώς και ενός ζεύγους iPSC σειρών που προέρχονται από ασθενή δότη, αλλά στη μία έχει γίνει γενετική διόρθωση της μετάλλαξης στο γονίδιο της α-συν (gene corrected, isogenic control) θα εφαρμοστούν πρωτόκολλα επαγωγής φαινοτύπου νευροεκτοδέρματος, διαφοροποίησης προς νευρικά βλαστικά κύτταρα (NBK) του κοιλιακού μεσεγκεφάλου (ventral midbrain) και διαφοροποίησης προς αστροκύτταρα σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιεύσεις (10.1038/nature10648; 10.1002/crcb.98; 10.1002/crcb.98; 10.1016/j.stemcr.2017.06.018). Τα επαγόμενα αστροκύτταρα από υγιείς και ασθενείς δότες iPSC θα δοκιμαστούν για βασικές λειτουργίες των αστροκυττάρων όπως είναι η πρόσληψη γλουταμικού οξέος και η κινητικότητα ιόντων ασβεστίου. Επιπλέον, θα γίνει σύγκριση των επιπέδων πολλαπλασιασμού και κυτταρικού θανάτου που εμφανίζονται στις καλλιέργειες. Ο βασικός μορφολογικός χαρακτηρισμός τους θα γίνει με ανοσοφθορισμό, συνεστιακή μικροσκοπία και ανάλυση εικόνας για χαρακτηριστικές πρωτεΐνες μάρτυρες της αστροκυτταρικής γενεαλογίας (S100b, ALDH1L1, GFAP, CD44, Vimentin, CD49f κ.α.) ενώ επίσης θα γίνει ανίχνευση της α-συν και της φωσφορυλιωμένης της μορφής στην Ser129 (pSer129aSyn) συνδυαστικά με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (p62, ubiquitin, LAMP1, LC3 κ.α.). Τα αποτελέσματά μας αναμένεται να οδηγήσουν στον εντοπισμό μορφολογικών διαφορών μεταξύ των επαγόμενων αστροκυττάρων που προέρχονται από υγιείς δότες και ασθενείς ΝΠ που φέρουν τη μετάλλαξη A53T-α-συν που θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην παθολογία της νόσου και να χρησιμοποιηθούν ως read-outs για τη δοκιμασία υποψήφιων θεραπευτικών μορίων στο σύστημα HC/HT imaging.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ – ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΟΦΕΛΗ

Για την κατανόηση της λειτουργίας και της παθολογίας του Νευρικού συστήματος με σκοπό την ανάπτυξη νέων θεραπειών για ανίατες νευρολογικές παθήσεις όπως η Νόσος Πάρκινσον, στο Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Νευροβιολογίας και στη Μονάδα Ανθρώπινων Βλαστικών Κυττάρων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, έχουμε αναπτύξει ένα σύστημα μελέτης *in vitro* που βασίζεται στην τεχνολογία του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού. Πιο συγκεκριμένα, από δερματικά κύτταρα ασθενών με κληρονομική νόσο Πάρκινσον που φέρουν την παθολογική μετάλλαξη p.A53T στην πρωτεΐνη αλφα-συνουκλείνη (αSyn) κατασκευάστηκαν επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSC) τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιήσαμε προς νευρώνες (Kouroupi *et al.*, 2017). Οι νευρώνες αυτοί εμφανίζουν παθολογικά χαρακτηριστικά όμοια με αυτά που εμφανίζουν οι νευρώνες στον εγκέφαλο των ασθενών, όπως συσσωμάτωση πρωτεϊνών και παθολογικών μορφών της αSyn, νευραξονική παθολογία και μειωμένη συνδεσιμότητα. Μάλιστα τα παθολογικά αυτά χαρακτηριστικά, όπως δείξαμε, αντιστρέφονται μετά από χορήγηση *in vitro* υποψήφιων θεραπευτικών μορίων (Antoniou *et al.*, 2022, Kouroupi *et al.*, 2017). Τα πρωτόκολλα διαφοροποίησης iPSC προς αστροκύτταρα είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και ακολουθούν το χρονικό πλαίσιο της εμβρυικής ανάπτυξης κατά την οποία πρώτα εμφανίζονται οι νευρώνες και στη συνέχεια, προς το τέλος της νευρογένεσης, τα αστροκύτταρα. Το πρωτόκολλο που εφαρμόσαμε έχει διάρκεια τουλάχιστον 100 ημέρες μέχρι τη δημιουργία ώριμων αστροκυττάρων από iPSC (de Rus Jacquet, 2019). Αξιοποιώντας το πρωτόκολλο κατασκευής νευρικών βλαστικών κυττάρων με ταυτότητα κοιλιακού μεσεγκεφάλου (Kriks *et al.*, 2011), δημιουργήσαμε αστροκύτταρα με αντίστοιχη τοπολογική ταυτότητα, δεδομένου ότι είναι αποδεκτό πλέον ότι τα αστροκύτταρα από διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου παρουσιάζουν ετερογένεια καθώς και μορφολογική και λειτουργική εξειδίκευση (Kostuk *et al.*, 2019). Στο τέλος της διαφοροποίησης, τόσο τα αστροκύτταρα που προέρχονται από υγιείς όσο και από iPSC κύτταρα ασθενών με Πάρκινσον εμφάνισαν ισχυρή έκφραση δεικτών της αστρογλοϊκής μοίρας, συμπεριλαμβανομένων των CD44, vimentin, Aldehyde Dehydrogenase 1 family member L1 (ALDH1L1)

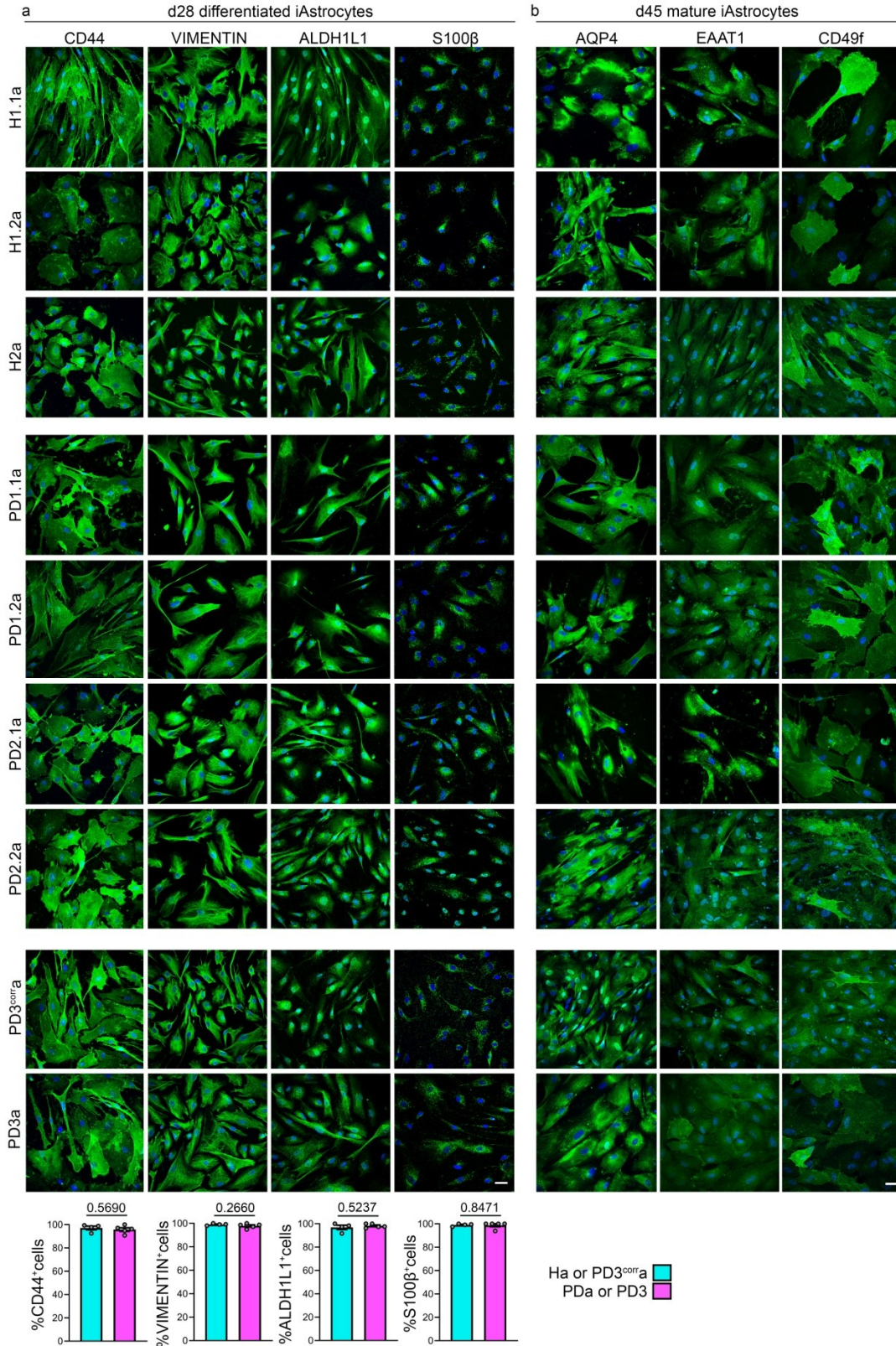
και S100β. Δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές στο δυναμικό διαφοροποίησης και στη μορφολογία μεταξύ υγιών και PD αστροκυττάρων. Αστροκυτταρικοί δείκτες πιο ώριμων αστροκυττάρων συμπεριλαμβανομένης των ακουαπορίνης 4 (AQP4), CD49f και του μεταφορέα γλουταμικού οξέος 1 (EAAT1/GLAST1) εμπλουτίστηκαν με την εφαρμογή πρωτοκόλλου περαιτέρω ωρίμανσης 2 εβδομάδων, παρουσία BMP-4 και CNTF (**Εικ. 1**). Στον **Πίνακα 1** συγκεντρώνονται οι διαφορετικοί κλώνοι iPSC κυττάρων που διαφοροποιήθηκαν προς αστροκύτταρα.

Πίνακας 1 | Λίστα κλώνων iPSC κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη

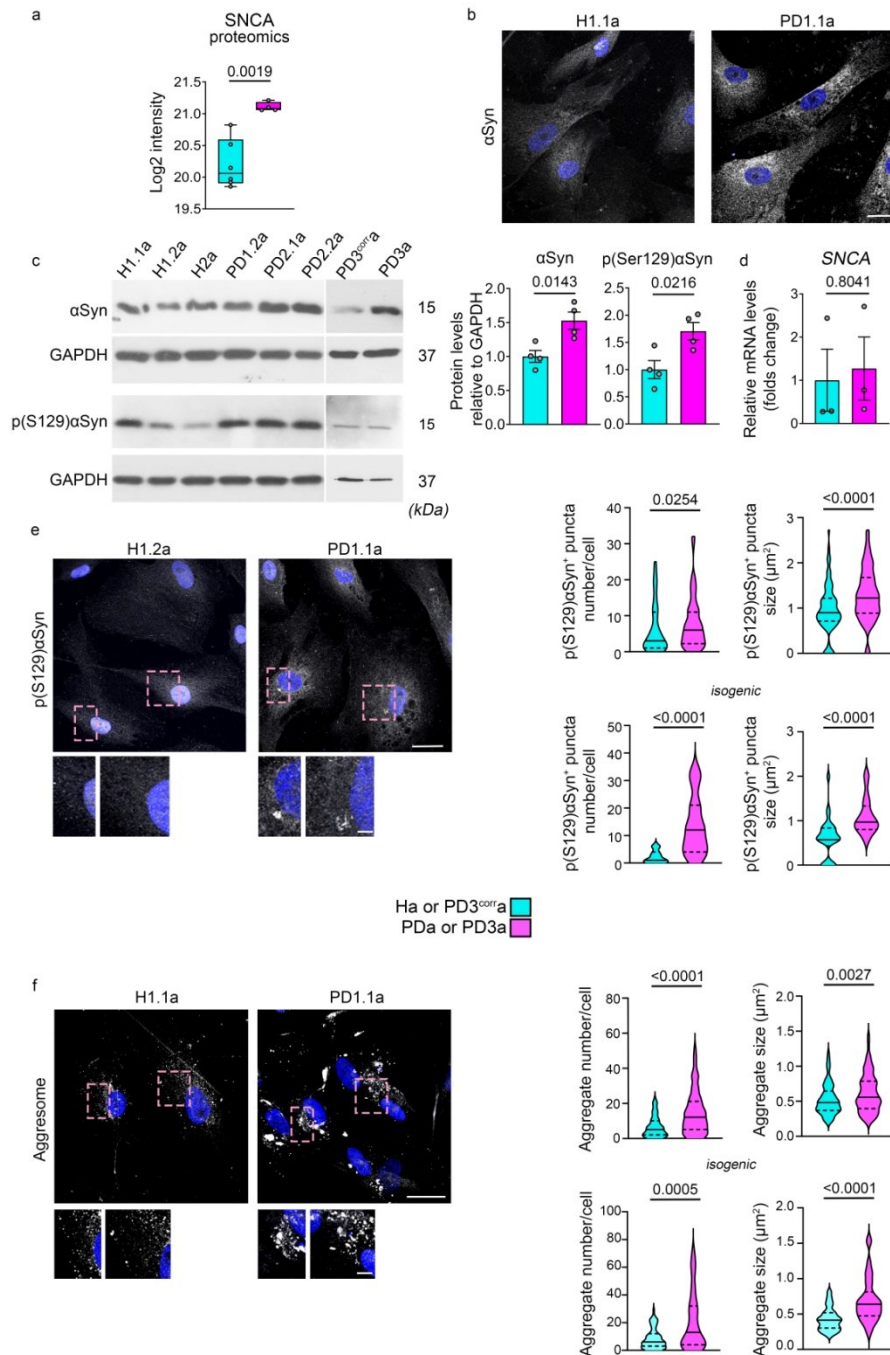
	Donor status	iPSC line coding	Age at biopsy	aSyn mutation	Sex	Source/reference
Non-isogenic	Healthy (non-PD control)	H1.1	41	Wild Type SNCA	M	Kouroupi et al., 2017
		H1.2				
	Healthy (non-PD control)	H2	45	Wild Type SNCA	M	New York Stem Cell Foundation
	Parkinson's Disease Patient	PD1.1	49	G209A SNCA	M	Kouroupi et al., 2017
		PD1.2				
Parkinson's Disease Patient	PD2.1	40	G209A SNCA	M	Kouroupi et al., 2017	
	PD2.2					
Isogenic	Parkinson's Disease Patient	PD3	49	G209A SNCA	F	Soldner et al., 2011
	Parkinson's Disease Patient (gene-corrected control)	PD3 ^{corr}	49	G209A SNCA corrected	F	Soldner et al., 2011

Με ανοσοϊστοχημεία έναντι της αSyn παρατηρήσαμε αυξημένα επίπεδα στα PD αστροκύτταρα, όπως επιβεβαιώθηκε επίσης με western blot και με πρωτεομική ανάλυση (**Εικ. 2a-c**). Τα επίπεδα mRNA της αSyn, δεν έδειξαν διαφορές (**Εικ. 2d**). Ανοσοϊστοχημεία έναντι της φωσφορυλιωμένης παθολογικής μορφής της αSyn (pS129αSyn), στα PD αστροκύτταρα ανέδειξε παθολογικά χαρακτηριστικά, όπως σημαντική αύξηση σε σύγκριση με τα υγιή αστροκύτταρα στον αριθμό και το μέγεθος ενδοκυτταρικών σχηματισμών που μοιάζουν με συσσωματώματα pS129αSyn τα οποία ανιχνεύθηκαν στο κυτταρόπλασμα με ανάλυση εικόνας (**Εικ. 2e**). Δεδομένου ότι απουσιάζουν οι νευρώνες από τις καλλιέργειες των αστροκυττάρων συμπεραίνουμε ότι η αSyn στα αστροκύτταρα προέρχεται από ενδογενή έκφραση του γονιδίου και ότι η μετάλλαξη p.A53T πυροδοτεί τη συσσώρευση αSyn συσσωματωμάτων. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε με συμπληρωματική δοκιμασία για των εντοπισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (PROTEOSTAT) όπου παρατηρήσαμε αύξηση της συχνότητας εμφάνισης συσσωματωμάτων μεγαλύτερου μεγέθους στα PD αστροκύτταρα (**Εικ. 2f**), γεγονός που υποστηρίζει πιθανή απορρύθμιση στους μηχανισμούς ομοίωσης των πρωτεϊνών, όπως ο ποιοτικός έλεγχος και η αποικοδόμηση.

Τα αστροκύτταρα, σε αντίθεση με τους νευρώνες, δεν έχουν την ικανότητα να παρουσιάζουν ηλεκτρικά δυναμικά αλλά εμφανίζουν τόσο επαγόμενα όσο και αυθόρμητα ενδοκυττάρια σήματα ασβεστίου. Η ενδοκυττάρια σηματοδότηση του Ca²⁺ στα αστροκύτταρα παίζει καθοριστικό ρόλο στη φυσιολογία του ΚΝΣ. Χρησιμοποιώντας τον φθορίζοντα δείκτη ασβεστίου Fluo-4 αξιολογήσαμε τη αυθόρμητη και την επαγόμενη από ATP δραστηριότητα των ενδοκυτταρικών ιόντων Ca²⁺ (**Εικ. 3a, b**). Τα υγιή και PD αστροκύτταρα είχαν την ικανότητα να παρουσιάζουν σηματοδότηση Ca²⁺ αυθόρμητη (**Εικ. 3b, c**) και μετά από προσθήκη ATP (**Εικ. 3a, b**). Τα PD αστροκύτταρα εμφάνισαν μικρότερη περιοχή κάτω από την καμπύλη ενεργοποίησης (Area Under the Curve: AUC) κατά την αυθόρμητη δραστηριότητα του Ca²⁺ σε σύγκριση με τα υγιή (**Εικ. 3c**). Η καμπύλη ενεργοποίησης αποτυπώνει την ένταση και τη διάρκεια της ενεργοποίησης. Παράλληλα τα PD αστροκύτταρα εμφάνισαν σημαντική αύξηση στη συχνότητα (**Εικ. 3c**). Οι παρατηρούμενες αλλαγές στη δραστηριότητα του Ca²⁺ είναι ενδεικτικές διαταραχών στην ομοίωση και δυσλειτουργιών στα υποκυτταρικά διαμερίσματα, συμπεριλαμβανομένου του ενδοπλασματικού δικτύου, των μιτοχονδρίων και του μηχανισμού ενδοκυττάρωσης.

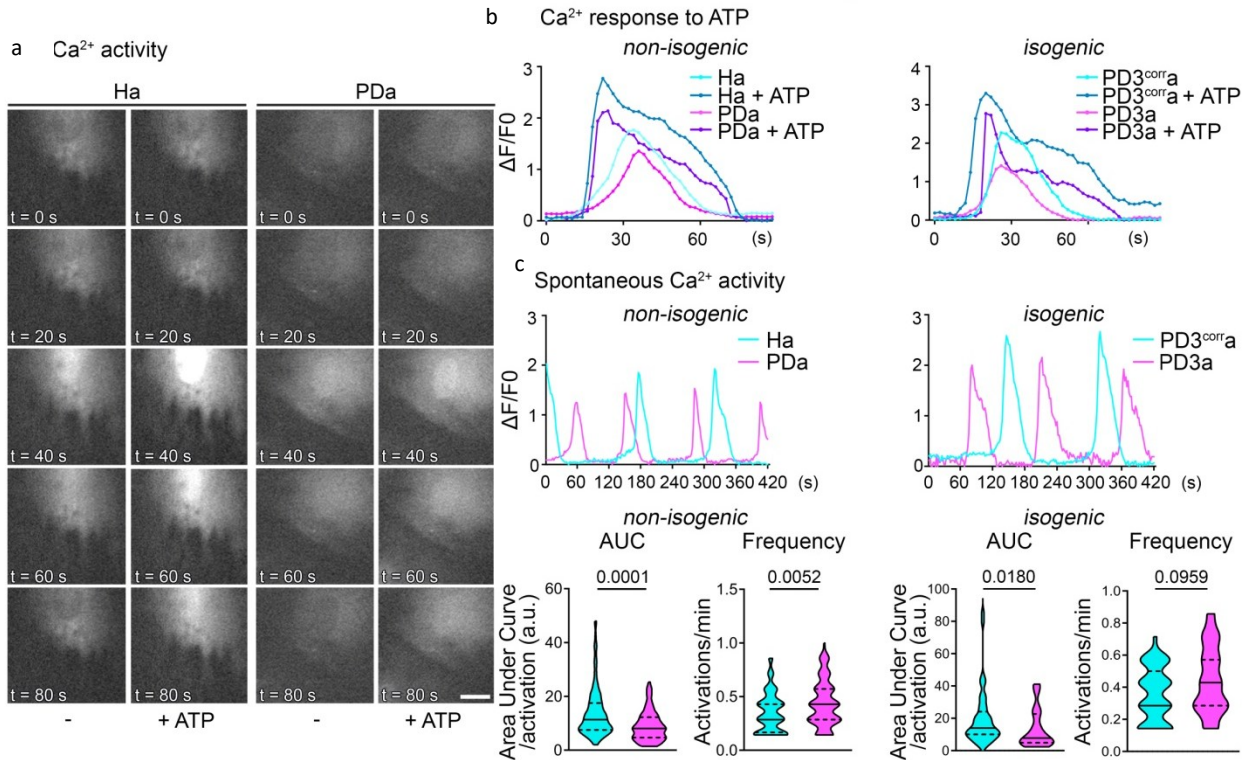


Εικόνα 1. Παγόμενα μεσεγκεφαλικά αστροκύτταρα | Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας υγιών (H) και PD αστροκυττάρων έπειτα από ανοσοφθορισμό για τυπικούς αστροκυτταρικούς δείκτες (a, πρώιμα στάδια και όψιμα στάδια, b, όψιμα στάδια): Κλίμακα, 40 μ m. (Paschou C, Αροκότου O, et al, 2025, 10.1073/pnas.2505240122)



Εικόνα 2. Επίπεδα αSyn, p(S129)αSyn και πρωτεϊνικά συσσωματώματα στα επαγόμενα μεσεγκεφαλικά αστροκύτταρα *a* Διάγραμμα της έντασης Log₂ του SNCA σε υγιή και PD αστροκύτταρα, όπως ανιχνεύθηκε μέσω της πρωτεομικής ανάλυσης. *b* Ανοσοϊστοχημεία για αSyn (κλίμακα 30 μm). Ανάλυση Western blot για αSyn, p(Ser129)αSyn και GAPDH. Τα διαγράμματα παρουσιάζουν την ποσοτικοποίηση των επιπέδων αSyn και p(Ser129)αSyn ομαλοποιημένων ως προς GAPDH. *d* Διάγραμμα των επιπέδων mRNA του SNCA σε σχέση με αυτά της GAPDH. *b* Ανοσοϊστοχημεία για p(Ser129)αSyn (κλίμακα 30 μm). Τα διαγράμματα παρουσιάζουν τις κατανομές του αριθμού των p(S129)αSyn⁺ αSyn⁺ δομών ανά κύτταρο (αριστερά) και του μεγέθους (δεξιά) σε υγιή και PD αστροκύτταρα (πάνω) και στο ισογενές ζεύγος (κάτω). *f* Ιχνηθέτηση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων με το Aggresome detection kit (Proteostat, ENZO) (κλίμακα 30 μm) και διαγράμματα των κατανομών του αριθμού των Aggresome⁺ δομών ανά κύτταρο

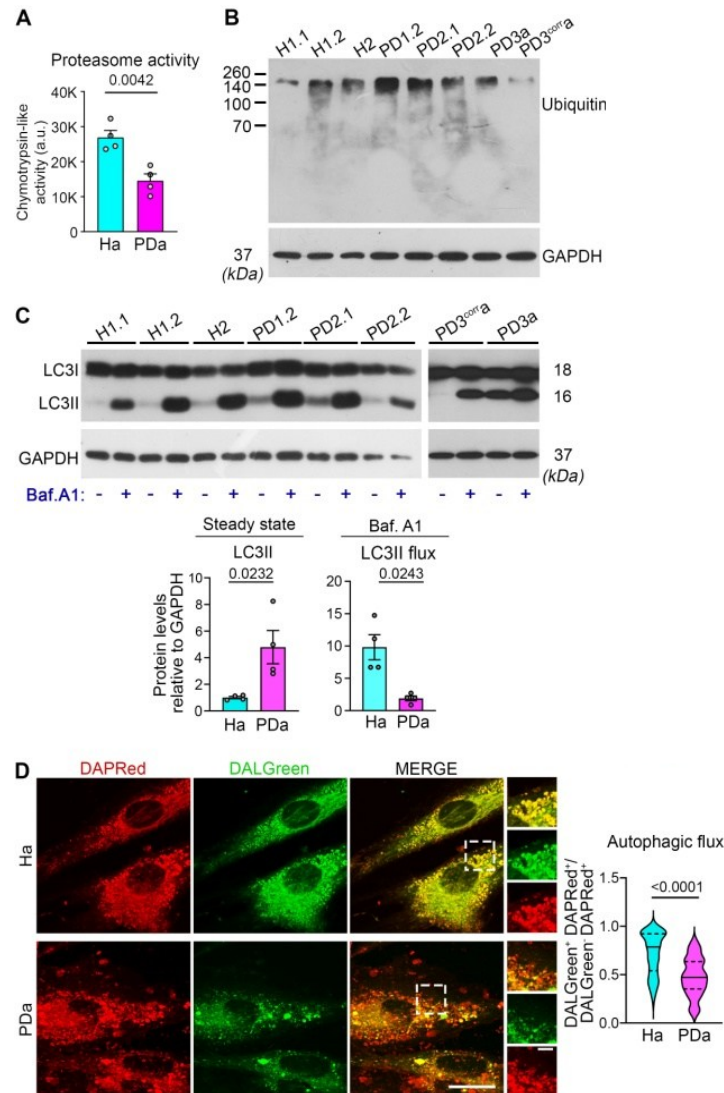
(αριστερά) και του μεγέθους (δεξιά) σε υγιή και PD αστροκύτταρα (πάνω) και στο ισογενές ζεύγος (κάτω). (Paschou C, Arokotou O, et al, 2025, 10.1073/pnas.2505240122)



Εικόνα 3. Δραστηριότητα ιόντων ασβεστίου στα επαγόμενα υγιή και PD αστροκύτταρα | **a.** Αντιπροσωπευτικές εικόνες που απεικονίζουν την αυθόρμητη και επαγόμενη, ύστερα από προσθήκη 50 μ M ATP, δραστηριότητα ιόντων Ca²⁺ σε υγιή και PD αστροκύτταρα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά την καταγραφή τους. **b.** Αντιπροσωπευτικά ίχνη δραστηριότητας Ca²⁺ (με Fluo-4AM) επαγόμενης από ATP σε υγιή και PD αστροκύτταρα. **c.** Αντιπροσωπευτικά ίχνη Fluo-4AM αυθόρμητης δραστηριότητας Ca²⁺ σε υγιή και PD αστροκύτταρα. Διαγράμματα ποσοτικοποίησης της περιοχής κάτω από την καμπύλη και της συχνότητας εμφάνισης σήματος σε non-isogenic (αριστερά) και isogenic (δεξιά) κυτταρικών σειρών. (Paschou C, Arokotou O, et al, 2025, 10.1073/pnas.2505240122)

Τα PDa (παρκινσονικά αστροκύτταρα) παρουσιάζουν διαταραχές στα κύρια μονοπάτια πρωτεϊνικής αποικοδόμησης. Με βάση τα ανωτέρω, εξετάσαμε αρχικά τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος (τύπου χυμοθρυψίνης) στα επαγόμενα αστροκύτταρα. Σε συμφωνία με την παρατηρηθείσα υπορρύθμιση (down-regulation) κρίσιμων σχετικών πρωτεϊνών (STUB1, TMTC3, KEAP1, MKRN2, PSMC1, PSMC2, PSMC6, RAD23B) στην πρωτεομική ανάλυση, διαπιστώσαμε ότι η δραστηριότητα του πρωτεασώματος είναι σημαντικά μειωμένη στα PDa (**Εικ. 4A**), συνοδευόμενη από συσσώρευση ουβικουιτινωμένων πρωτεϊνών υψηλού μοριακού βάρους (high-MW) (**Εικ. 4B**). Στη συνέχεια, διερευνήσαμε την αυτοφαγική ικανότητα των PDa, αναγνωρίζοντας το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσώματος (ALP) ως τον πρωταρχικό μηχανισμό αποικοδόμησης για τη συσσωματωμένη α Syn. Σε κατάσταση ηρεμίας (steady state), τα επίπεδα της LC3-II —της λιπιδιωμένης μορφής του μεσολαβητή αυτοφαγίας LC3 που συνδέεται με την αυτοφαγοσωμική μεμβράνη— ήταν σημαντικά αυξημένα στα PDa (**Εικ. 4C**). Ακολούθως, εξετάσαμε εάν τα αυξημένα επίπεδα LC3-II στα PDa αντικατοπτρίζουν συσσώρευση αυτοφαγοσωμάτων λόγω μειωμένης αυτοφαγικής ροής (autophagic flux). Η μπαφιλομυκίνη A1 αναστέλλει την αυτοφαγική ροή εμποδίζοντας τη σύντηξη αυτοφαγοσώματος-λυσώματος, οδηγώντας σε συσσώρευση LC3II+ αυτοφαγοσωμάτων. Μετά από 4 ώρες επώασης με μπαφιλομυκίνη A1, η ροή LC3II ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα PDa σε σύγκριση με τα υγιή Ha (**Εικ. 4C**), υποδεικνύοντας μειωμένη αυτοφαγική ροή. Επιπλέον, χρησιμοποιήσαμε τα μόρια-ανιχνευτές DALGreen και DAPRed για την παρακολούθηση της αυτοφαγικής ροής μέσω της επιλεκτικής

σήμανσης αυτοφαγοσωμάτων και αυτολυσοσωμάτων. Ο φθορισμός του DALGreen, ο οποίος ενισχύεται σε χαμηλό pH, ανιχνεύει τα αυτολυσοσώματα, ενώ το DAPRed σημαίνει τόσο τα αυτοφαγοσώματα όσο και τα αυτολυσοσώματα (**Εικ. 4D**). Μετά από 6 ώρες επεξεργασίας με DALGreen/DAPRed, η αναλογία αυτολυσοσωμάτων (DALGreen+/DAPRed+) προς αυτοφαγοσώματα (DALGreen-/DAPRed+) ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα PDa σε σύγκριση με τα Ha, επιβεβαιώνοντας την μειωμένη αυτοφαγική ροή και τη διαταραχή της διαδικασίας σύντηξης αυτοφαγοσώματος-λυσοσώματος (**Εικ. 4D**).



Εικόνα 4: Τα αστροκύτταρα p.A53T-aSyn παρουσιάζουν ελλείμματα στους μηχανισμούς πρωτεασώματος και αυτοφαγίας. (A) Ποσοτικοποίηση της δραστηριότητας του πρωτεασώματος (τύπου χυμοθρυψίνης) σε Ha και PDa. **(B)** Western blot για ουβικουιτινωμένες πρωτεΐνες και GAPDH (πρότυπο φόρτωσης / loading control). **(C)** Western blot για την LC3B (LC3I και LC3II) και την GAPDH, πριν και μετά την επεξεργασία με μπαφιλομυκίνη A1. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων LC3II σε κατάσταση ηρεμίας (steady-state) με κανονικοποίηση ως προς την GAPDH, και της αυτοφαγικής ροής LC3II. **(D)** Ha και PDa μετά από επώαση με DAPRed και DALGreen. Ποσοτικοποίηση της αναλογίας (ανά κύτταρο) των DALGreen+/DAPRed+ αυτολυσοσωμάτων προς τα DALGreen-/DAPRed+ αυτοφαγοσώματα. Κλίμακα (D) 30 μm; (D, inset, 5 μm) (Paschou C, Apokotou O, et al, 2025, 10.1073/pnas.2505240122)