



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: Λειτουργικός χαρακτηρισμός 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)

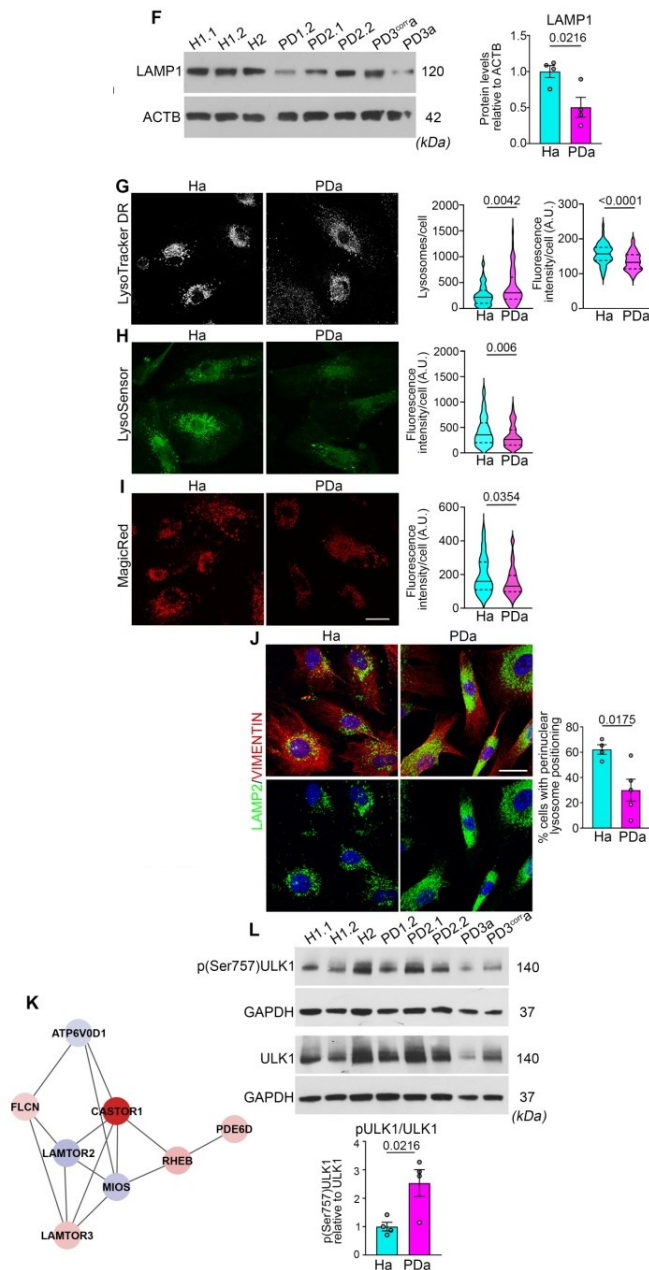
Λειτουργικός χαρακτηρισμός αστροκυττάρων από παρκινσονικούς ασθενείς με τη μετάλλαξη A53T-α-συν

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Η διαφορική απόκριση των επαγόμενων αστροκυττάρων από υγιείς δότες και ασθενείς ΝΠ που φέρουν τη μετάλλαξη A53T-α-συν σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες θα συγκριθεί με Real Time qPCR έπειτα από επώασή τους με το προφλεγμονώδες μίγμα κυτταροκινών TNFα, IL-1b, C1q που έχει δειχθεί ότι απελευθερώνεται από τη μικρογλοία και οδηγεί τα αστροκύτταρα σε νευροτοξικό φαινότυπο, σε παθολογικές καταστάσεις νευροεκφυλισμού (10.1038/s41586-021-03960-y). Επίσης με Real Time qPCR θα γίνει σύγκριση των επιπέδων του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress) και της απόκρισης στις μη-αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (unfolded protein response, UPR) σε βασικές συνθήκες, έπειτα από επαγωγή με thapsigargin (μη-ανταγωνιστικός παρεμποδιστής της SERCA) και έπειτα από επώαση με salubrinal (ειδικός αναστολέας φωσφατασών του eIF2a) που έχει προταθεί ως υποψήφιος θεραπευτικός παράγοντας στη ΝΠ (10.1016/j.brainres.2014.01.003). Παράλληλα, θα γίνει πρωτεομική ανάλυση των επαγόμενων αστροκυττάρων από υγιείς και ασθενείς για τον εντοπισμό πρωτεϊνών με διαφορική έκφραση και των μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται, που στη συνέχεια θα επιβεβαιωθούν με Western blot. Η συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση θα μας δώσει νέα δεδομένα σε ό,τι αφορά τις επιπτώσεις της ενδογενούς έκφρασης της A53T-α-συν στη φυσιολογία και την παθολογία των αστροκυττάρων ασθενών με ΝΠ καθώς και το αν μπορούμε να αντιστρέψουμε φαρμακολογικά τον παθολογικό φαινότυπο.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ – ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΟΦΕΛΗ

Η διαφορική απόκριση των επαγόμενων αστροκυττάρων από υγιείς δότες και ασθενείς ΝΠ που φέρουν τη μετάλλαξη A53T-α-συν σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες θα συγκριθεί με Real Time qPCR έπειτα από επώασή τους με το προφλεγμονώδες μίγμα κυτταροκινών TNFα, IL-1b, C1q που έχει δειχθεί ότι απελευθερώνεται από τη μικρογλοία και οδηγεί τα αστροκύτταρα σε νευροτοξικό φαινότυπο, σε παθολογικές καταστάσεις νευροεκφυλισμού (10.1038/s41586-021-03960-y). Επίσης με Real Time qPCR θα γίνει σύγκριση των επιπέδων του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER stress) και της απόκρισης στις μη-αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (unfolded protein response, UPR) σε βασικές συνθήκες, έπειτα από επαγωγή με thapsigargin (μη-ανταγωνιστικός παρεμποδιστής της SERCA) και έπειτα από επώαση με salubrinal (ειδικός αναστολέας φωσφατασών του eIF2a) που έχει προταθεί ως υποψήφιος θεραπευτικός παράγοντας στη ΝΠ (10.1016/j.brainres.2014.01.003). Παράλληλα, θα γίνει πρωτεομική ανάλυση των επαγόμενων αστροκυττάρων από υγιείς και ασθενείς για τον εντοπισμό πρωτεϊνών με διαφορική έκφραση και των μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται, που στη συνέχεια θα επιβεβαιωθούν με Western blot. Η συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση θα μας δώσει νέα δεδομένα σε ό,τι αφορά τις επιπτώσεις της ενδογενούς έκφρασης της A53T-α-συν στη φυσιολογία και την παθολογία των αστροκυττάρων ασθενών με ΝΠ καθώς και το αν μπορούμε να αντιστρέψουμε φαρμακολογικά τον παθολογικό φαινότυπο.



Εικόνα 7: Τα αστροκύτταρα p.A53T-aSyn παρουσιάζουν δυσλειτουργικά λυσοσώματα. (F) Western blot για την LAMP1 και την ACTB (πρότυπο φόρτωσης) και ποσοτικοποίηση. (G) Ζωντανή απεικόνιση (live imaging) των Ha και PDa με LysoTracker DR και ποσοτικοποίηση. Κατανομές του αριθμού των λυσοσωμάτων ανά κύτταρο (αριστερά) και των εντάσεων φθορισμού ανά κύτταρο (δεξιά). (H, I) Ζωντανά Ha και PDa μετά από σήμανση με τη χρωστική LysoSensor (H) ή με Magic Red (I) και ποσοτικοποιήσεις. Κατανομή των εντάσεων φθορισμού ανά κύτταρο. (J) Ha και PDa μετά από ανοσοχρώση για LAMP2 και Βιμεντίνη (Vimentin) με DAPI. Ποσοτικοποίηση του ποσοστού των κυττάρων με περιφερηγικά λυσοσώματα. Κλίμακες (scale bars) (G-I στο I) και (J): 30 μ m. (K) Δίκτυο αλληλεπιδράσεων STRING μεταξύ των διαφορετικά εκφραζόμενων (DE) πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν στα PDa σε σύγκριση με τα Ha. Οι πρωτεΐνες με αυξημένη έκφραση (up-regulated) στα PDa εμφανίζονται με κόκκινο, ενώ εκείνες με μειωμένη έκφραση (down-regulated) με μπλε. Οι γραμμές σύνδεσης αντιπροσωπεύουν συσχετίσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. (L) Western blot και ποσοτικοποίηση των ULK1, p(Ser757)ULK1 και GAPDH σε 3 Ha, 3 μη-ισογενείς σειρές PDa, καθώς και στις PD3a και PD3corra. Το διάγραμμα αναπαριστά την p(Ser757)ULK1 σε σχέση με τη συνολική ULK1. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm SEM στα (F, J, L), ή ως διάμεσος και ενδοτεταρτημοριακό εύρος στα (G-I) (Paschou C, Apokotou O, et al, 2025, 10.1073/pnas.2505240122).