



**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:** Μελέτη των αλληλεπιδράσεων αστροκυττάρων-νευρώνων υγιών δοτών και ασθενών με ΝΠ

**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)

## Μελέτη των αλληλεπιδράσεων αστροκυττάρων-νευρώνων υγιών δοτών και ασθενών με ΝΠ

### ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Επαγόμενα αστροκύτταρα και νευρώνες θα συγκαλλιερηθούν σύμφωνα με τους παρακάτω συνδυασμούς: A53T-νευρώνες/A53T-αστροκύτταρα, A53T-νευρώνες/υγιή αστροκύτταρα, υγιείς νευρώνες/A53T-αστροκύτταρα και υγιείς νευρώνες/υγιή αστροκύτταρα. Οι συγκαλλιέργειες θα μελετηθούν στις 2 και στις 4 εβδομάδες με συνεστιακή μικροσκοπία και ανάλυση εικόνας προκειμένου να διαφανούν διαφορές σε ό,τι αφορά την επιβίωση των νευρώνων και την ανάπτυξη δικτύων, την εναπόθεση συσσωματωμάτων α-συν και pSer129aSyn και την εμφάνιση χαρακτηριστικών νευροεκφυλισμού (ακεραιότητα κυτταροσκελετού αξόνων/νευριτών), ως αποτέλεσμα της επίδρασης των A53T-αστροκυττάρων στους νευρώνες. Από την άλλη μεριά, θα μελετηθεί η φλεγμονώδης ενεργοποίηση των αστροκυττάρων ως αποτέλεσμα της επίδρασης των A53T-νευρώνων. Τέλος, θα ελεγχθεί η ικανότητα των αστροκυττάρων να ενδοκυτταρώνουν και να αποικοδομούν συσσωματώματα α-συν από τους A53T-νευρώνες και τον εξωκυττάριο χώρο, ώστε να επιτελέσουν τον νευροπροστατευτικό τους ρόλο. Επιπλέον, η λειτουργικότητα των νευρώνων θα ελεγχθεί με τον εντοπισμό συνάψεων διπλά θετικών για προσυναπτικές (synapsin-1 κ.α.) και μετασυναπτικές (psd-95 κ.α.) πρωτεΐνες, αλλά και με τη χρήση συστήματος Rabies virus-based monosynaptic retrograde tracing (10.1016/j.celrep.2016.03.067). Τα αποτελέσματα αυτής της ενότητας θα μας δώσουν νέα δεδομένα ως προς το αν τα A53T-αστροκύτταρα είναι λιγότερο νευροπροστατευτικά ή περισσότερο νευροτοξικά για τους A53T-νευρώνες, σε σύγκριση με τα υγιή αστροκύτταρα και ως προς το αν θα μπορούσαν να αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους για τη ΝΠ. Οι κυριότερες μορφολογικές διαφορές μεταξύ των συγκαλλιέργειών θα χρησιμοποιηθούν ως readouts για τη δοκιμασία υποψήφιων θεραπευτικών μορίων στο σύστημα HC/HT imaging.

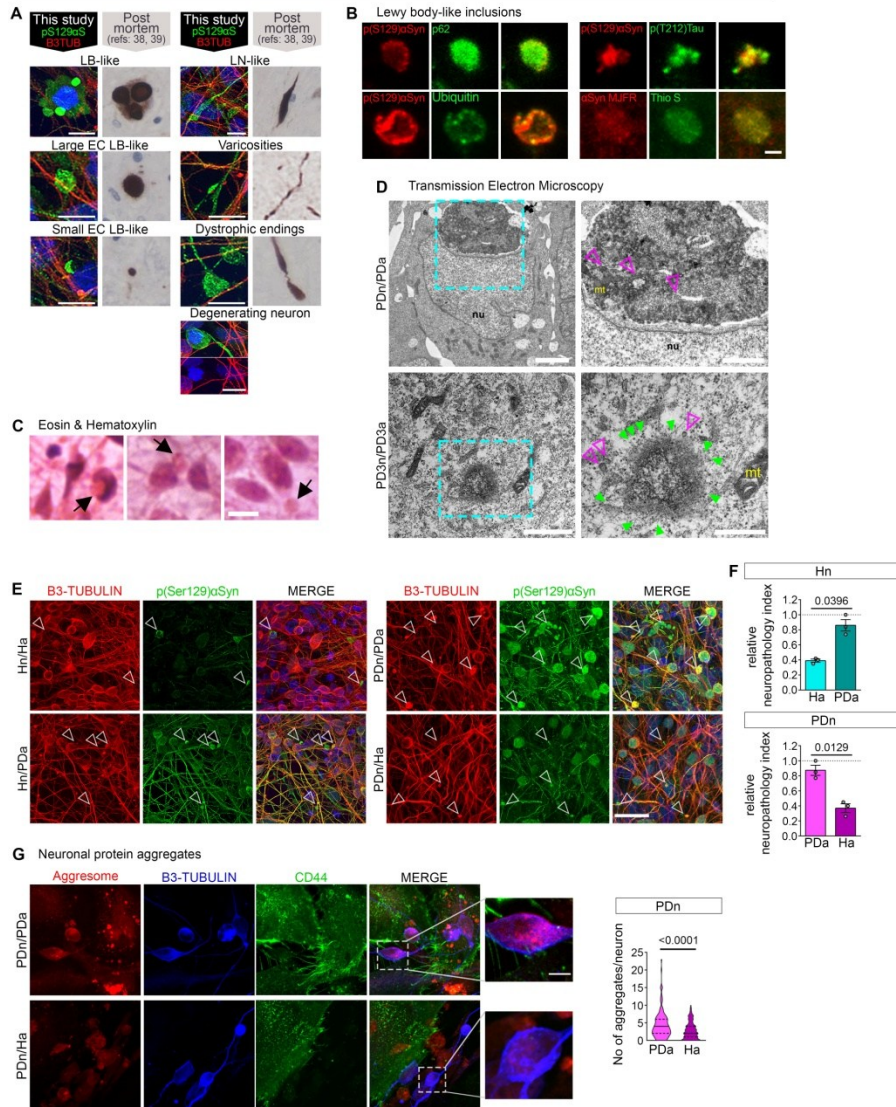
### ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ – ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΟΦΕΛΗ

Συνδυάζοντας μονήρεις καλλιέργειες επαγόμενων μεσεγκεφαλικών νευρώνων και αστροκυττάρων, προχωρήσαμε στην ανάπτυξη ενός μοντέλου συγκαλλιέργειας νευρώνων-αστροκυττάρων, που προσομοιάζει με ακριβέστερο τρόπο τις αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον εγκέφαλο των ασθενών με Πάρκινσον. Πιο συγκεκριμένα, νευρώνες, έπειτα από περίπου 1 μήνα διαφοροποίησης σε μονήρη καλλιέργεια, επιστρώθηκαν πάνω σε αστροκύτταρα τα οποία επίσης βρίσκονταν σε καλλιέργεια διαφοροποίησης για τουλάχιστον ένα μήνα. Συγκαλλιέργειες όλων των δυνατών συνδυασμών νευρώνων-αστροκυττάρων (υγιείς νευρώνες-υγιή αστροκύτταρα, υγιείς νευρώνες-PD αστροκύτταρα, PD νευρώνες-υγιή αστροκύτταρα, PD νευρώνες-PD αστροκύτταρα) μελετήθηκαν φαινοτυπικά για έως 2 εβδομάδες. Παρατηρήσαμε ότι ο συνδυασμός PD νευρώνες-PD αστροκύτταρα παρουσιάζει εντονότερη παθολογία τόσο σε σύγκριση με τους υπόλοιπους συνδυασμούς όσο και με τις μονοκαλλιέργειες PD νευρώνων. Η παθολογία που εντοπίσαμε είχε να κάνει με την εντονότερη εμφάνιση συσσωματωμάτων πρωτεϊνών στα σώματα των νευρώνων καθώς και με την εμφάνιση τυπικών ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών της νόσου, όπως είναι τα σωματίδια και οι νευρίτες Lewy. Τα έγκλειστα aSyn των σωματίων Lewy (LB) αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα της παθολογίας του PD. Μέσω ανοσοχρωστικής p(Ser129)aSyn σε συνκαλλιέργειες PDn-PDa (νευρώνων-αστροκυττάρων) στις 14 ημέρες, ταυτοποιήσαμε ενδονευρωνικά έγκλειστα παρόμοια με LB, καθώς και εξω-κυτταροπλασματικά έγκλειστα μικρής (< 4 μm) και μεγάλης (> 4 μm) διαμέτρου, και νευρίτες τύπου Lewy (Εικ. 8A, B), που προσομοιάζουν με τα ιστοπαθολογικά ευρήματα που ανιχνεύονται τυπικά σε νεκροτομικό υλικό από εγκεφάλους ασθενών με PD. Επιπλέον νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία παρατηρούνται επίσης σε ιστοπαθολογικές αναλύσεις ανθρώπινου εγκεφάλου, περιελάμβαναν αξονικές διογκώσεις (axonal varicosities) (θετικές και αρνητικές για βήτα-3 τουμπουλίνη), βολβοειδείς/δυστροφικές αξονικές απολήξεις —που πιθανώς αντιπροσωπεύουν αναστελλόμενους άξονες— και νευρωνικά κυτταρικά σώματα που ήταν έντονα θετικά για p(Ser129)aSyn και παρουσίαζαν νεκρωτικό (πυκνωτικό) πυρήνα, αντιστοιχώντας σε εκφυλιζόμενους νευρώνες (Εικ. 8A,

**Ε).** Τα έγκλειστα ήταν θετικά για p62, ουβικουΐνη, p(Thr212)Ταυ, συσσωματώματα αSyn (όπως ταυτοποιήθηκαν από το αντίσωμα MJFR-14-6-4-2) και Θειοφλαβίνη S (**Εικ. 8B**), τυπικοί δείκτες των LB.

Ταυτοποιήθηκαν επίσης ηωσινόφιλα έγκλειστα τύπου LB, χαρακτηριστικά του PD (**Εικ. 8C**). Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (**TEM**), σε συνεργασία με την Παρασκευή Κουτσοδάκη και τη Σοφία Χαβάκη στο εργαστήριο του Καθ. Γοργούλη στην Ιατρική Σχολή Αθηνών, επαλήθευσε περαιτέρω την παρουσία ενδονευρωνικών εγκλείστων ποικίλου μεγέθους, που πιθανώς αντιστοιχούν σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης, με χαρακτηριστικά γνωρίσματα LB, όπως έναν ηλεκτρονιόπυκνο πυρήνα, κοκκώδεις και νηματώδεις δομές, περιφερειακά ακτινωτά ινίδια, κοντινά κατεστραμμένα οργανίδια (μιτοχόνδρια, ενδοσωματικά κυστίδια) και μεμβρανώδεις δομές (**Εικ. 8D**). Κάθε ένα από τα παθολογικά χαρακτηριστικά που ανιχνεύθηκαν με ανοσοφθορισμό ποσοτικοποιήθηκε σε όλους τους συνδυασμούς συγκαλλιέργειών, παρουσιάζοντας σημαντικά διαφορετικές τιμές μεταξύ των γονότυπων. Οι **Hn** (υγιείς νευρώνες) είχαν χειρότερη απόδοση σε κάθε πτυχή όταν καλλιιεργήθηκαν πάνω σε PDa, ενώ τα παθολογικά χαρακτηριστικά των **PDn** (νευρώνων PD) διασώθηκαν (rescued) πάνω σε Ha. Οι μεμονωμένες τιμές ενσωματώθηκαν σε μια σχετική ένδειξη, τον **σχετικό δείκτη νευροπαθολογίας**, ο οποίος υπολογίστηκε ως το άθροισμα όλων των παθολογικών χαρακτηριστικών ανά 100 νευρώνες και κλιμακώθηκε σε σχέση με τις συγκαλλιέργειες PDa (ορίστηκαν ως 1). Αυτό κατέδειξε ότι η νευροπαθολογία επάγεται στους Hn όταν συγκαλλιιεργούνται με PDa, σε σύγκριση με τη συγκαλλιέργεια με Ha. Αντίθετα, η παθολογία των PDn μετριάστηκε όταν συγκαλλιιεργήθηκαν με Ha (**Εικ. 8E, F**). Χρησιμοποιώντας το kit ανίχνευσης **Proteostat**, ανιχνεύσαμε σημαντική μείωση στον αριθμό των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων στα περικάρυα των PDn όταν συγκαλλιιεργήθηκαν για 14 ημέρες με Ha, σε σύγκριση με τα PDa (**Εικ. 8G**). Αυτή είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείται μια ολοκληρωμένη περιγραφή των παθολογιών που σχετίζονται με το PD σε ένα δισδιάστατο ανθρώπινο μοντέλο PD βασισμένο σε iPSC, το οποίο περιλαμβάνει νευρώνες και αστροκύτταρα, εμφανίζοντας αυθεντικά ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Συνολικά, αυτά τα πειράματα τεκμηριώνουν τον ρόλο των PD αστροκυττάρων στην επιδείνωση του νευροεκφυλισμού και αναδεικνύουν την ικανότητα των υγιών αστροκυττάρων να διασώζουν τους PD νευρώνες, πιθανώς υποστηρίζοντας την εκκαθάριση ή εμποδίζοντας τη συσσώρευση των νευρωνικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Paschou C, Apokotou O, et al, 2025, 10.1073/pnas.2505240122).

PD-related neuropathology

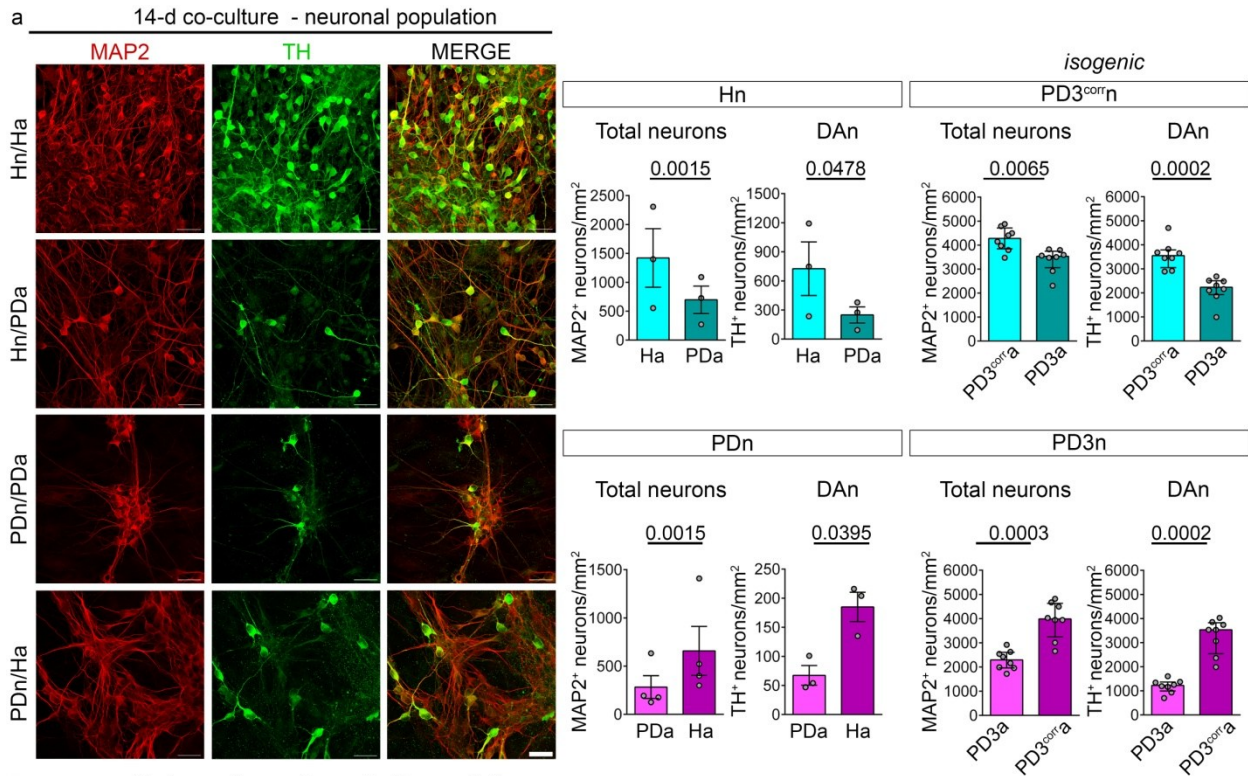


**Εικόνα 8: Νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά σχετιζόμενα με τη νόσο Πάρκινσον (PD), συμπεριλαμβανομένης παθολογίας τύπου Lewy, σε συγκαλλιέργειες iNeuron-iAstrocyte p.A53T-aSyn. (A)** Ιστοπαθολογικά γνωρίσματα της PD σε PDn συγκαλλιεργημένους με PDa, μετά από ανοσοχρώση για pSer(129)αSyn και β3-τουμπουλίνη. Κλίμακα (Scale bar): 10 μm. Εδώ συγκρίνονται με αντίστοιχες ιστοπαθολογικές παρατηρήσεις από μεταθανάτιους εγκεφάλους PD, όπως έχουν αναφερθεί προηγουμένως (κατόπιν άδειας χρήσης). **(B)** Έγκλειστα τύπου LB που ανιχνεύθηκαν σε συγκαλλιέργειες PDn/PDa, με διπλή χρώση για τυπικούς δείκτες LB, σε ζεύγη συνεντοπισμού (colocalization pairs). Κλίμακα: 1 μm. **(C)** Ηωσινόφιλα έγκλειστα τύπου LB (βέλη) που ανιχνεύθηκαν στον συνδυασμό PD3n/PD3a. Κλίμακα: 10 μm. **(D)** Μικρογραφίες TEM ενδονευρωνικών εγκλείστων τύπου LB (σημειώνονται με κυανά ορθογώνια και σε μεγέθυνση) σε μη-ισογονικές PD2.1n/PD2.1a και ισογονικές PD3n/PD3a συγκαλλιέργειες 14 ημερών. Οι ροζ κεφαλές βελών υποδεικνύουν συσσωρευμένα ενδοσωματικά κυστίδια και μεμβρανώδες υλικό· οι πράσινες κεφαλές βελών υποδεικνύουν ακτινωτά ινίδια· mt, μιτοχόνδρια· nu, πυρήνας. Κλίμακα: PD2.1n/PD2.1a, 2 μm (αριστερά), 1 μm (δεξιά)· PD3n/PD3a, 1 μm (αριστερά), 500 nm (δεξιά). **(E)** Συγκαλλιέργειες 14 ημερών με ανοσοχρώση για pSer(129)αSyn και β3-τουμπουλίνη. Οι κεφαλές βελών υποδεικνύουν τα ταυτοποιημένα νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά. Κλίμακα: 30 μm. **(F)** Σχετικός δείκτης νευροπαθολογίας σε συγκαλλιέργειες Hn ή PDn, σε όλους τους συνδυασμούς (μη-ισογονικούς). **(G)** Συγκαλλιέργειες 14 ημερών PDn σε PDa ή Ha, με χρώση Aggresome και ανοσοχρώση για β3-τουμπουλίνη και CD44. Κλίμακες: 30 μm, 5 μm (ένθετο). Κατανομές του αριθμού των συσσωματωμάτων ανά PDn σε PDa ή Ha (μη-ισογονικά). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± SEM (F) ή ως διάμεσος με ενδοτεταρτημοριακό εύρος (G) (Paschou C, Arokotou O, et al, 2025, 10.1073/pnas.2505240122).

Επιπλέον, μετά από 14 ημέρες συγκαλλιέργειας, η βιωσιμότητα/διαφοροποίηση των συνολικών (MAP2+) και, σε μεγαλύτερο βαθμό, των ντοπαμινεργικών (TH+) PD νευρώνων βελτιώθηκε σημαντικά από τα υγιή αστροκύτταρα σε σχέση με την επίδραση των PD αστροκυττάρων. Από την άλλη μεριά, οι αρνητικές επιδράσεις των PD αστροκυττάρων ήταν εμφανείς και στους υγιείς νευρώνες, καθώς τόσο συνολικά (MAP2+) όσο και σε επίπεδο των ντοπαμινεργικών νευρώνων (TH+) νmDNA, οι αριθμοί τους μειώθηκαν σε συγκαλλιέργειες με PD αστροκύτταρα σε σύγκριση με τα υγιή αστροκύτταρα (**Εικ. 9**). Αυτό υποδεικνύει ότι τα PD αστροκύτταρα πιθανά ασκούν νευροτοξική επίδραση ακόμη και στους υγιείς νευρώνες.

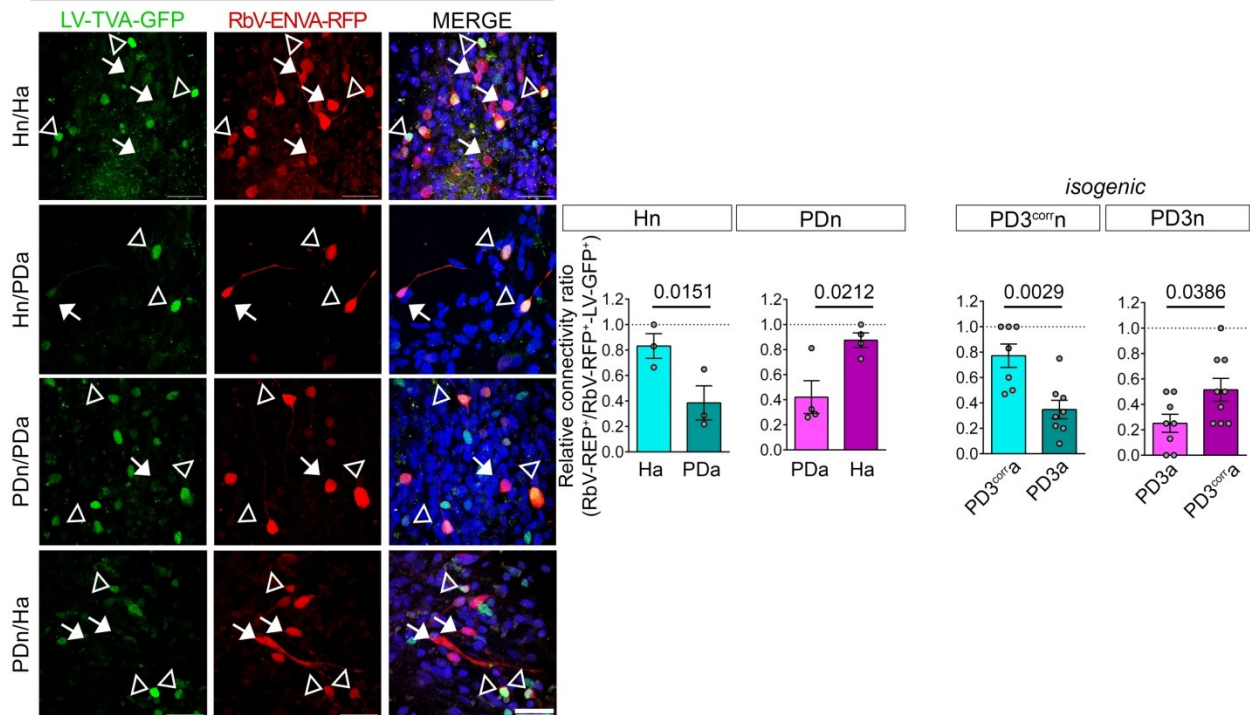
Για τη λειτουργική αποτύπωση της συναπτικής συνδεσιμότητας των νευρωνικών δικτύων, αξιοποιήσαμε ένα εργαλείο βασισμένο στον ιό της λύσσας. Πρόκειται για ένα σύστημα ανάδρομης μονοσυναπτικής ανίχνευσης που επιτρέπει τον εντοπισμό μονοσυναπτικών συνδέσεων μεταξύ νευρώνων. Ειδικότερα, κατασκευάσαμε έναν λεντιϊκό φορέα (Miyamichi et al., 2011) που εκφράζει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) με σήμανση H2B, τον υποδοχέα TVA (για εκλεκτική επιμόλυνση από τον ΕnvA-ψευδοτυπημένο ιό της λύσσας) υπό τον υποκινητή της ανθρώπινης συναψίνης (hSYN) και τη γλυκοπρωτεΐνη ακίδας του φακέλου του ιού της λύσσας (GP) (για να επιτρέπεται η διασυναπτική μεταφορά του ιού της λύσσας) (LV-GP-TVA-GFP). Ο φορέας αυτός χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με έναν ανασυνδυασμένο ιικό φορέα λύσσας όπου έχει γίνει διαγραφή της πρωτεΐνης G (ΔG), ψευδοτύπηση με την πρωτεΐνη του φακέλου ΕnvΑ (ώστε να επιμολύνει επιλεκτικά τα κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα TVA) και ο οποίος ιχνηθετείται με τη βοήθεια της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (RFP) (RBV-ΔG-ΕnvΑ-RFP). Η επιμόλυνση των νευρώνων με τον LV-GP-TVA-GFP έχει ως αποτέλεσμα οι μετασχηματισμένοι νευρώνες να αναγνωρίζονται από την πυρηνική έκφραση της GFP. Τρεις ημέρες μετά τον πρώτο μετασχηματισμό, ακολουθεί μόλυνση με τον ιό RBV-ΔG-ΕnvΑ-RFP. Οι νευρώνες με διπλή επιμόλυνση (εναρκτήριοι -starting- νευρώνες) εντοπίζονται βάσει του συνεντοπισμού της πυρηνικής GFP και της κυτταροπλασματικής RFP, και λόγω της έκφρασης της GP, επιτρέπουν στον ιό της λύσσας ΔG να σχηματίσει μολυσματικά σωματίδια στο κυτταρόπλασμά τους που μεταφέρονται άπαξ ανάδρομα σε συνδεδεμένο προσυναπτικό νευρώνα. Ο ανάδρομος μετασχηματισμός των προσυναπτικών νευρώνων (νευρώνες στόχοι-target) αναγνωρίζεται από την έκφραση σε αυτούς, μόνο του RBV-ΔG-ΕnvΑ-RFP στο κυτταρόπλασμα. Μόνο οι συνάψεις πρώτης τάξης ανιχνεύονται επειδή η έκφραση του GP περιορίζεται στους αρχικούς νευρώνες, χωρίς να επιτρέπεται περαιτέρω διάδοση του ιού της λύσσας ΔG. Το σύνθετο αυτό σύστημα αποτελεί μέτρο της λειτουργικότητας του νευρωνικού δικτύου και το χρησιμοποιήσαμε για τη σύγκριση της συναπτικής συνδεσιμότητας των επαγόμενων υγιών και PD νευρώνων σε συγκαλλιέργειες με υγιή και PD αστροκύτταρα. Με τον υπολογισμό του σχετικού δείκτη συνδεσιμότητας, ο οποίος αντιστοιχεί στο κλάσμα των νευρώνων-στόχων (RFP+/GFP-) που επισημαίνονται ανάδρομα μέσω μονοσυναπτικών συνδέσεων ως προς τους αρχικούς νευρώνες (RFP+/GFP+), διαπιστώσαμε ότι τα PD αστροκύτταρα είχαν αρνητική επίδραση στη συναπτική συνδεσιμότητα των υγιών νευρώνων σε σύγκριση με τα υγιή αστροκύτταρα. Επιπλέον, η συναπτική συνδεσιμότητα των PD νευρώνων βελτιώθηκε όταν συγκαλλιιεργήθηκαν με υγιή αστροκύτταρα (**Εικ. 10**).

Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνουν την αρχική μας υπόθεση ότι τα αστροκύτταρα παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της νευροπαθολογίας στη νόσο Πάρκινσον και ότι πρέπει να συμπεριλαμβάνονται στις μελέτες που αφορούν τους εμπλεκόμενους κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς (Paschou C, Apokotou O, et al, 2025, 10.1073/pnas.2505240122).



**Εικόνα 9: Επίδραση αστροκυττάρων στον νευρωνικό πληθυσμό** Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας από συγκαλλιέργειες 14 ημερών έπειτα από ανοσοφθορισμό για MAP2 και TH. (Κλίμακα: 30  $\mu$ m). Τα συνοδευτικά ραβδογράμματα δείχνουν την ποσοτικοποίηση των συνολικών νευρώνων (MAP2+) και των TH+ ντοπαμινεργικών νευρώνων σε συγκαλλιέργειες με υγιή και PD αστροκύτταρα σε όλους τους συνδυασμούς (αριστερός, non-isogenic, δεξιά, isogenic). (Paschou C, Αροκοτού O, et al, 2025, 10.1073/pnas.2505240122).

b 18-d co-culture - Synaptic Connectivity



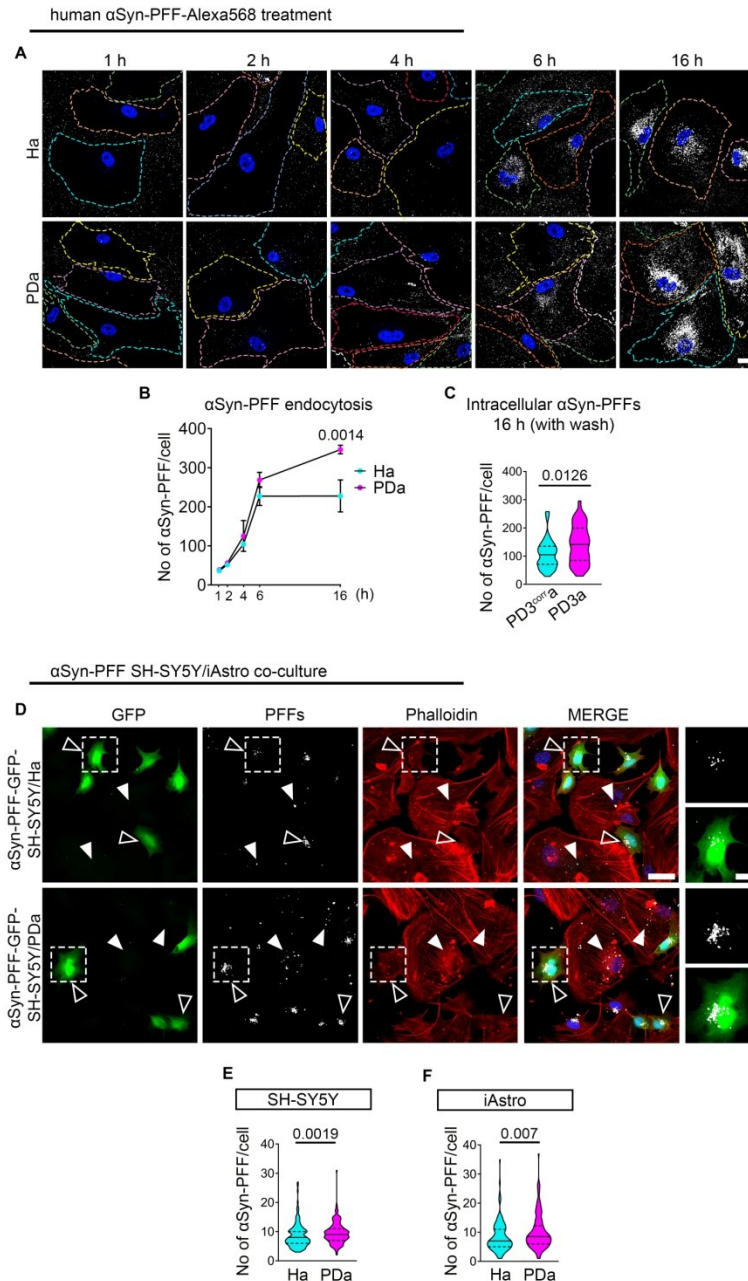
**Εικόνα 9: Επίδραση αστροκυττάρων στον νευρωνικό πληθυσμό** Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας έπειτα από μονοσυναπτική ιχνηλάτηση με βάση τον ίδιο της λύσσας σε συγκαλλιέργειες 18 ημερών των υγιών και PD νευρώνων με υγιή και PD αστροκύτταρα σε όλους τους συνδυασμούς. Οι στοχευμένοι προσυναπτικοί νευρώνες είναι RbV-ENVA-RFP+/LV-TVA-GFP- (λευκά βέλη), ενώ οι αρχικοί μετασυναπτικοί νευρώνες είναι RbV-ENVA-RFP+/LV-TVA-GFP+ (κενά βέλη). (Κλίμακα: 30 μm). Τα συνοδευτικά ραβδογράμματα δείχνουν την ποσοτικοποίηση του σχετικού λόγου συνδεσιμότητας στους υγιείς και PD νευρώνες, για όλους τους συνδυασμούς με υγιή και PD αστροκύτταρα (αριστερά, non-isogenic, δεξιά, isogenic) (Paschou C, Apokotou O, et al, 2025, 10.1073/pnas.2505240122).

Η μελέτη της φλεγμονώδους ενεργοποίησης των αστροκυττάρων ως αποτέλεσμα της επίδρασης των PD νευρώνων δεν ανέδειξε σημαντικά ευρήματα. Επιπλέον, έγινε αξιολόγηση της ικανότητας των υγιών και PD αστροκυττάρων να ενδοκυτταρώνουν και να αποικοδομούν συσσωματώματα aSyn. Προκειμένου να τεκμηριωθεί εάν η περιορισμένη ικανότητα των μεταλλαγμένων p.A53T-aSyn αστροκυττάρων να μειώνουν τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα των συγκαλλιεργημένων PD νευρώνων πηγάζει από την εξασθενημένη ικανότητά τους να ενδοκυτταρώνουν και να αποικοδομούν τα νευρωνικά είδη aSyn, προχωρήσαμε στα εξής πειράματα: Επώασαμε Ha και PDa με φθορίζοντα ανασυνδυασμένα προσχηματισμένα ινίδια aSyn (aSyn-PFFs) και παρατηρήσαμε την κινητική της ενδοκυττάρωσης των aSyn-PFFs έως και τις 16 ώρες (**Εικ. 10A, B**). Στις 4 και 6 ώρες, τα aSyn-PFFs συσσωρεύτηκαν περισσότερο στο κυτταρόπλασμα των PDa σε σύγκριση με τα Ha, παρουσιάζοντας στατιστικά σημαντική διαφορά στις 16 ώρες. Για να αποσυνδέσουμε την αθροιστική πρόσληψη από την αποικοδόμηση κατά τη διάρκεια της περιόδου των 16 ωρών, επαναλάβαμε το ίδιο πείραμα, αλλά αυτή τη φορά απομακρύναμε την περίσσεια aSyn-PFFs μετά από 2 ώρες. Και πάλι στις 16 ώρες, στατιστικά περισσότερα aSyn-PFFs είχαν συσσωρευτεί στα PDa σε σύγκριση με τα Ha, επαληθεύοντας την υστέρηση στην αποικοδόμηση (clearance lag) (**Εικ. 10C**). Για την περαιτέρω διερεύνηση της ικανότητας αποικοδόμησης των επαγόμενων αστροκυττάρων, ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y (με σήμανση GFP) εκτέθηκαν αρχικά σε aSyn-PFFs για 16 ώρες και, μετά από έκπλυση, ενζυμικό διαχωρισμό και ανάμειξη είτε με Ha είτε με PDa, τα κύτταρα παρακολούθηθηκαν (chase) για επιπλέον 24 ώρες (**Εικ. 10D**). Τα κύτταρα SH-SY5Y που συγκαλλιεργήθηκαν με PDa διατήρησαν σημαντικά περισσότερα ενδοκυτταρικά aSyn-PFFs σε σύγκριση με εκείνα που συγκαλλιεργήθηκαν με Ha, επιβεβαιώνοντας ότι τα Ha, αλλά όχι τα PDa, μπορούν να ανακουφίσουν τη νευρωνική συσσώρευση aSyn (**Εικ. 10D,E**). Ταυτόχρονα, τα PDa που συγκαλλιεργήθηκαν με κύτταρα SH-SY5Y φορτωμένα με aSyn-PFFs περιείχαν σημαντικά περισσότερα

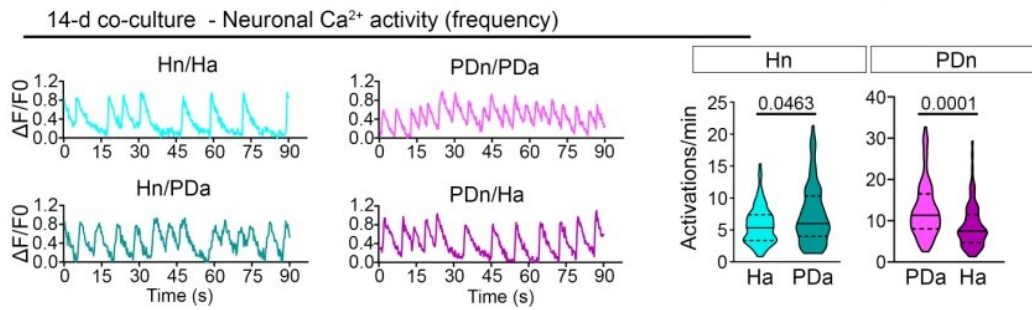
aSyn-PFFs σε σύγκριση με τα Ha, σε συμφωνία με την εξασθενημένη ικανότητα αποικοδόμησης (**Εικ. 10D, F**) (Paschou C, Apokotou O, et al, 2025, 10.1073/pnas.2505240122).

Τέλος, ελέγξαμε τη λειτουργικότητα των νευρώνων στις συγκαλλιέργειες με ζωντανή μικροσκοπία της ενεργότητας των ιόντων ασβεστίου. Σε πειράματα ζωντανής απεικόνισης ιόντων  $Ca^{2+}$  (live  $Ca^{2+}$  imaging), οι Hn εμφάνισαν υψηλότερη συχνότητα πάνω σε PDa, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους νευρώνες πάνω σε Ha, ενώ οι PDn παρουσίασαν σημαντική αναστροφή (reversal) του φαινομένου παρουσία των Ha (**Εικ. 11**). Καθώς η δυναμική του  $Ca^{2+}$  ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση ή/και τη διαφοροποίηση — συμπεριλαμβανομένης της νευριτικής ανάπτυξης και της συναπτικής συνδεσιμότητας με τη συμβολή των αστροκυττάρων— τα δεδομένα μας υποδηλώνουν ότι οι παρατηρούμενες αλλοιώσεις στη σηματοδότηση  $Ca^{2+}$  θα μπορούσαν να εξηγήσουν, τουλάχιστον εν μέρει, τους παρατηρούμενους φαινοτύπους (Paschou C, Apokotou O, et al, 2025, 10.1073/pnas.2505240122).

Τα αποτελέσματα της προσέγγισής μας αποδεικνύουν ότι τα PD αστροκύτταρα είναι λιγότερο νευροπροστατευτικά ή/και περισσότερο νευροτοξικά για τους PD νευρώνες, σε σύγκριση με τα υγιή αστροκύτταρα και θα μπορούσαν να αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους για τη ΝΠ.



**Εικόνα 10: Διαταραγμένη ενδοκυττάρωση της  $\alpha$ Syn από αστροκύτταρα p.A53T- $\alpha$ Syn.** (A) Ha και PDa στις 1, 2, 4, 6 και 16 ώρες μετά από επώαση με  $\alpha$ Syn-PFF-AlexaFluor568 (λευκό). Τυχαία χρωματισμένες διακεκομμένες γραμμές οριοθετούν τα κυτταρικά όρια. Κλίμακα (Scale bar): 30  $\mu$ m. (B) Γραμμικό διάγραμμα που απεικονίζει την εξέλιξη της ενδοκυτταρικής επεξεργασίας των προσληφθέντων  $\alpha$ Syn-PFF-Alexa568 σε Ha και PDa. (C) Ποσοτικοποίηση των  $\alpha$ Syn-PFF-Alexa568 που ανιχνεύθηκαν ενδοκυτταρικά σε PD3<sup>corr a</sup> και PD3a στις 16 ώρες, μετά από επεξεργασία 2 ωρών με PFF και επακόλουθη έκπλυση (washout). (D) Αντιπροσωπευτικές εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal) από Ha και PDa που συγκαλλιέργησαν για 24 ώρες με κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος GFP-SH-SY5Y, τα οποία είχαν προηγουμένως επωαστεί με  $\alpha$ Syn-PFF-AlexaFluor568 και σημανθεί με AlexaFluor647 Phalloidin (Φαλλοιδίνη). Μεγεθύνσεις των πλαισιωμένων περιοχών εμφανίζονται στα ένθετα. Οι κενές κεφαλές βελών υποδεικνύουν τα  $\alpha$ Syn-PFFs στα κύτταρα GFP-SH-SY5Y· οι συμπαγείς κεφαλές βελών υποδεικνύουν τα  $\alpha$ Syn-PFFs στα αστροκύτταρα. Κλίμακα: 30  $\mu$ m. (E) Κατανομή του αριθμού των  $\alpha$ Syn-PFFs ανά κύτταρο στα κύτταρα GFP-SH-SY5Y, μετά από 24 ώρες σε συγκαλλιέργεια είτε με Ha είτε με PDa. (F) Κατανομή του αριθμού των  $\alpha$ Syn-PFFs ανά κύτταρο στα Ha και PDa μετά από 24 ώρες σε συγκαλλιέργεια με κύτταρα GFP-SH-SY5Y φορτωμένα με  $\alpha$ Syn-PFFs. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  SEM (B) ή ως διάμεσος με ενδοτεταρτημοριακό εύρος (C, E, F) (Paschou C, Arokotou O, et al, 2025, 10.1073/pnas.2505240122)



**Εικόνα 11: Επίδραση των p.A53T-aSyn αστροκυττάρων στη νευρωνική δραστηριότητα ασβεστίου σε συγκαλλιέργεια.** Αυθόρμητη δραστηριότητα  $Ca^{2+}$  (Fluo4AM) σε Hn συγκαλλιιεργημένους με Ha ή PDa, και σε PDn συγκαλλιιεργημένους με PDa ή Ha, μετά από 14 ημέρες. Κατανομή των συχνότητων  $Ca^{2+}$  σε Hn και PDn, σε όλους τους συνδυασμούς, με κανονικοποίηση ως προς τη μέση βασική τους απόκριση μετά την αφαίρεση του υποβάθρου (background subtraction) (μη-ισογονικά δείγματα). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος με ενδοτεταρτημοριακό εύρος (Paschou C, Apokotou O, et al, 2025, 10.1073/pnas.2505240122).