



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: Γονιδιακή στόχευση των πιθανών ρυθμιστών της μικρογλοιακής δυσλειτουργίας λόγω A53T-συνουκλειΐνης

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

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΕΡΑ ΤΑΟΥΦΙΚ (ΕΙΠ)

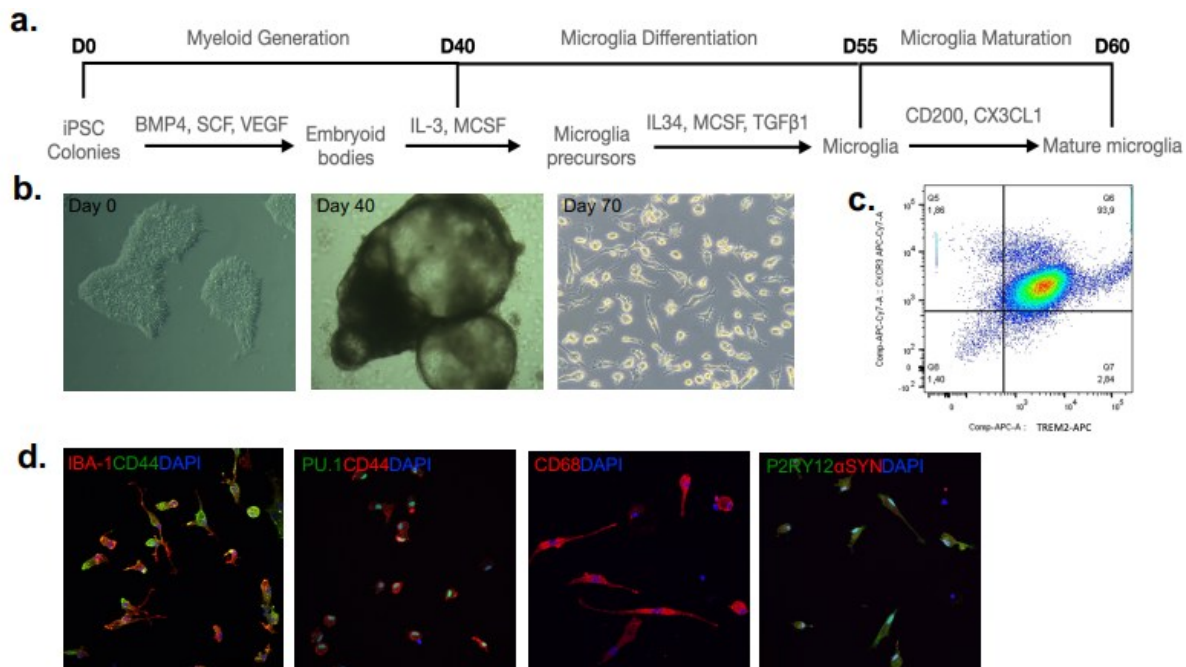
Γονιδιακή στόχευση των πιθανών ρυθμιστών της μικρογλοιακής δυσλειτουργίας λόγω A53T-συνουκλείνης

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Με βάση τα ευρήματα των προηγούμενων παραδοτέων, τα οποία ανέδειξαν πρώιμες και πολυεπίπεδες διαταραχές στη λειτουργία της μικρογλοίας και τη συμβολή της στη νευρωνική δυσλειτουργία στη νόσο Πάρκινσον, το παρόν παραδοτέο στοχεύει στη μηχανιστική διερεύνηση των μοριακών ρυθμιστών που ελέγχουν τη μικρογλοιακή παθοφυσιολογία. Εστιάζουμε στην ταυτοποίηση και τη λειτουργική αξιολόγηση κρίσιμων γονιδίων της μικρογλοίας, τα οποία θα τροποποιηθούν μέσω αποσιώπησης ή υπερέκφρασης σε ανθρώπινα μικρογλοιακά κύτταρα προερχόμενα από επαγόμενα βλαστοκύτταρα (hiPSCs). Μέσω συν-καλλιέργειας με ανθρώπινους νευρώνες που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη A53T-α-συνουκλείνη και αξιοποιώντας προηγμένες πλατφόρμες απεικόνισης υψηλού περιεχομένου, ηλεκτροφυσιολογίας και μεταγραφωμικής ανάλυσης, φιλοδοξούμε να αποσαφηνίσουμε πώς συγκεκριμένοι μικρογλοιακοί ρυθμιστές συμβάλλουν σε συναπτοπάθεια, νευροεκφύλιση και φλεγμονώδη απόκριση. Η προσέγγιση αυτή στοχεύει στη γεφύρωση των προηγούμενων περιγραφικών δεδομένων με αιτιολογικούς μηχανισμούς και στη δημιουργία μιας ισχυρής βάσης για τον εντοπισμό νέων θεραπευτικών στόχων στη νόσο Πάρκινσον.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΥΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ – ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΟΦΕΛΗ

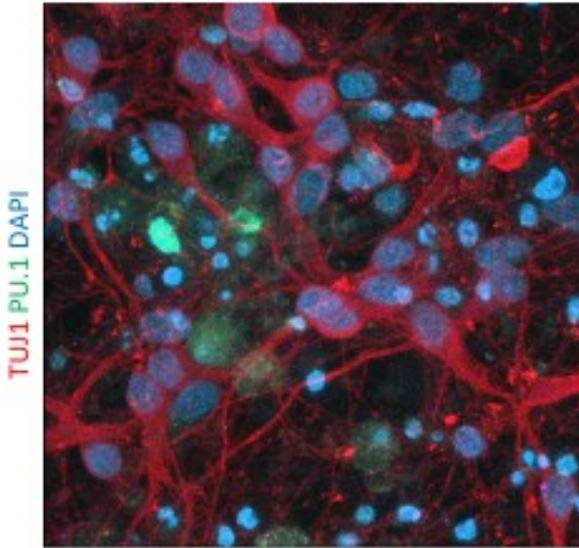
Αρχικά, έχουμε εγκαθιδρύσει τα πρωτόκολλα διαφοροποίησης μικρογλοιακών κυττάρων από ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, τα οποία έχουν ελεγχθεί για όλους τους βασικούς δείκτες (Εικόνα 24). Προχωρήσαμε και σε συν-καλλιέργεια με νευρώνες που προέρχονται από ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα και οι οποίοι καλλιεργούνται και μελετώνται στο εργαστήριό μας εδώ και χρόνια (Εικόνα 25).



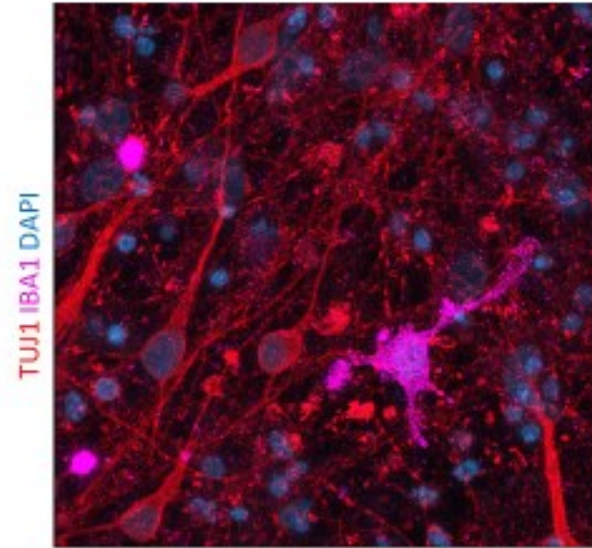
Εικόνα 24: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων διαφοροποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων από ανθρώπινα επαγόμενα βλαστοκύτταρα και ενδεικτικές εικόνες των κυττάρων από τα κρίσιμα στάδια της

διαδικασίας (a, b). Τα μικρογλοιακά κύτταρα από ανθρώπινα επαγόμενα βλαστοκύτταρα εκφράζουν CX3CR1 και TREM2, όπως φαίνεται με κυτταρομετρία ροής (c). Ανοσοκυτταρικός χαρακτηρισμός με τους αντίστοιχους ειδικούς δείκτες (IBA-1, PU.1, P2RY12, CD68, CD44). (d). Προκαταρκτικά αποτελέσματα ανοσοκυτταροχημείας μικρογλοιακών κυττάρων από ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα για τον μικρογλοιακό μάρτυρα IBA1.

Healthy neurons - healthy microglia



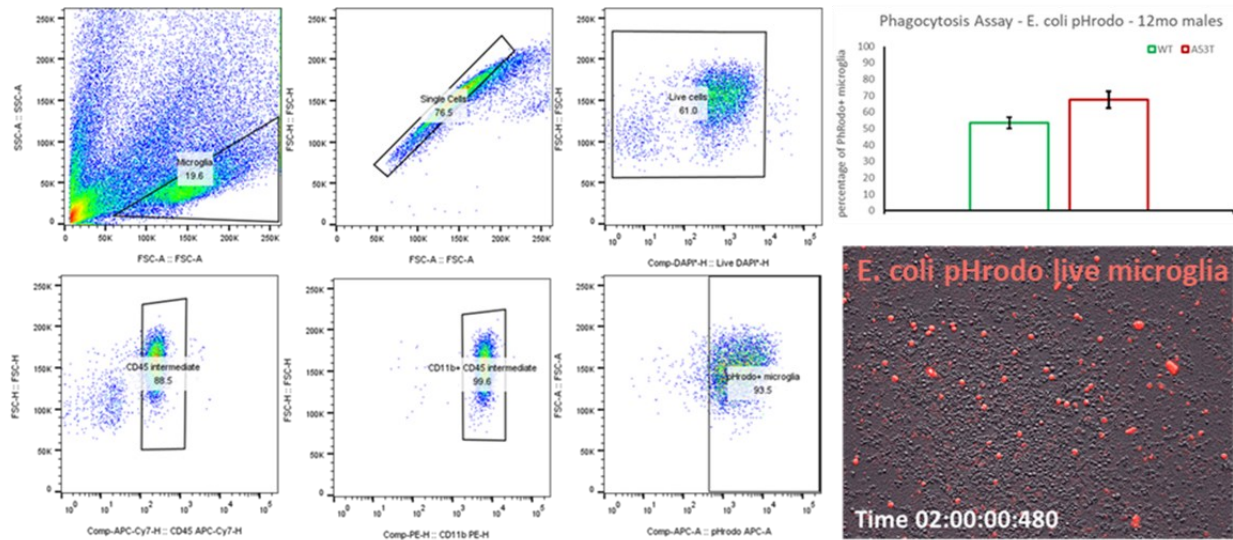
Control neurons - PD microglia



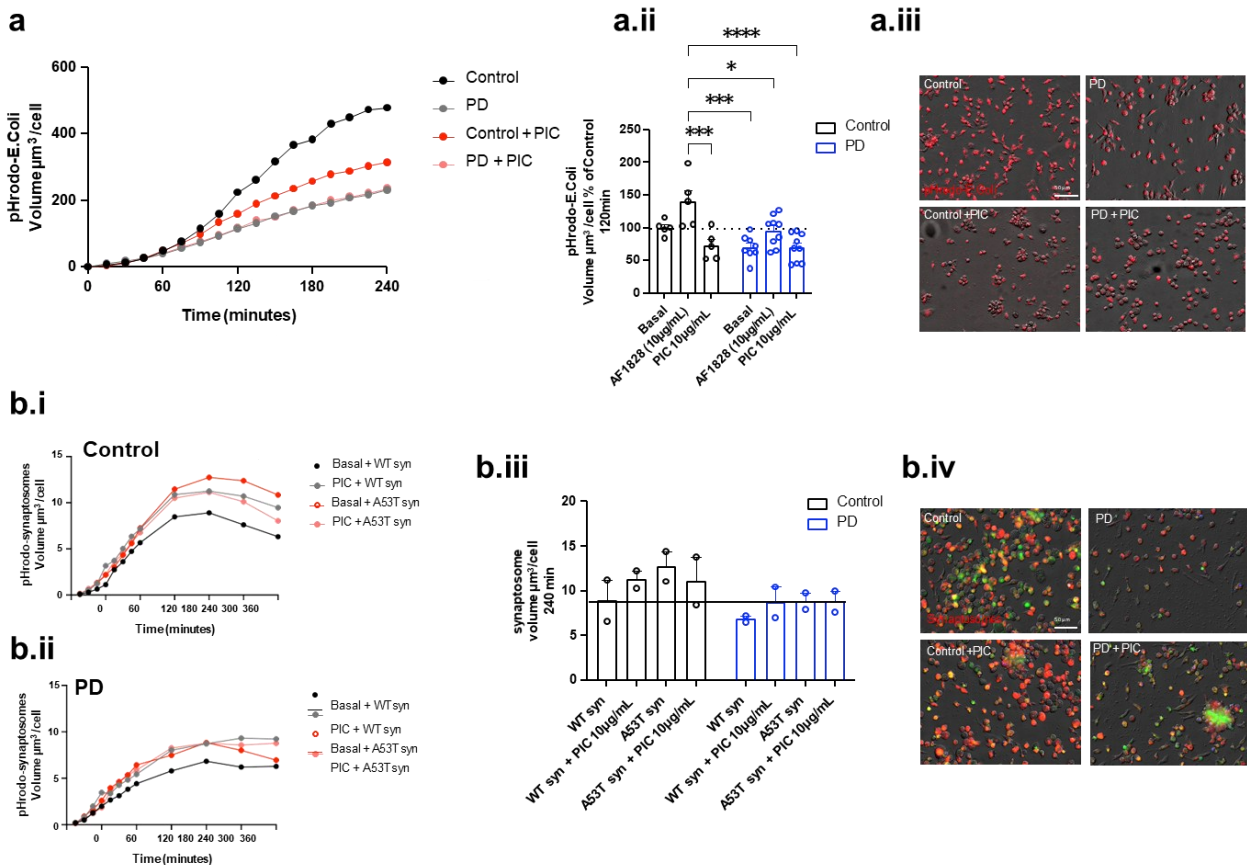
Εικόνα 25: Ενδεικτικές εικόνες μικροσκοπίου από συν-καλλιέργειες νευρώνων και μικρογλοίας που έχουν προέλθει από υγιή ή παρκινσονικά ανθρώπινα επαγόμενα βλαστοκύτταρα.

Επιπλέον, έχουμε διαμορφώσει τα απαραίτητα πρωτόκολλα για τη μελέτη της φαγοκυττάρωσης, αρχικά χρησιμοποιώντας ex vivo μικρογλοιακά κύτταρα μυός (Εικόνα 26), ώστε η ίδια μεθοδολογία να χρησιμοποιηθεί και σε ανθρώπινα κύτταρα (Εικόνα 27). Οι δοκιμασίες για τη φαγοκυττάρωση γίνονται με χρήση των pHrodo Deep Red E. coli βιοσφαιριδίων και βιντεοσκόπηση με το μικροσκόπιο υψηλού περιεχομένου Zeiss Cell Discoverer CD7 ή με κυτταρομετρία ροής στο BD FACSMelody.

No significant differences in phagocytosis of E. coli by microglia of old mice

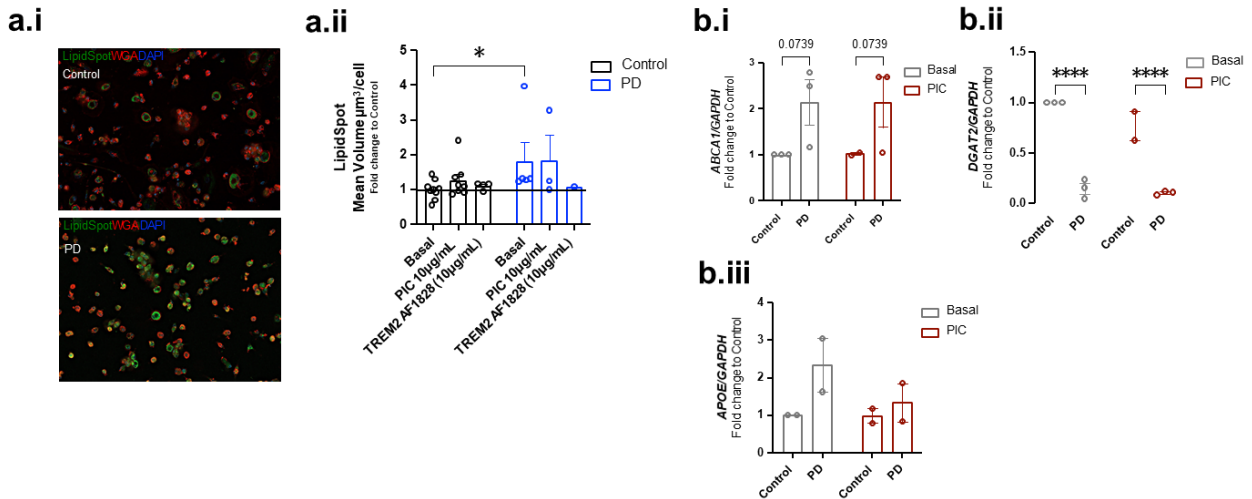


Εικόνα 26: Αφού προσδιορίσαμε το καταλληλότερο χρονικό παράθυρο για τη λειτουργική δοκιμασία φαγοκυττάρωσης, προχωρήσαμε σε κυταρομετρία ροής με άμεση ποσοτικοποίηση των E.coli pHrodo που βρίσκονται εντός των μικρογλοιακών κυττάρων. Συγκεκριμένα για μικρογλοιακά κύτταρα από μύες ενός έτους, δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ αγρίου τύπου και A53T.

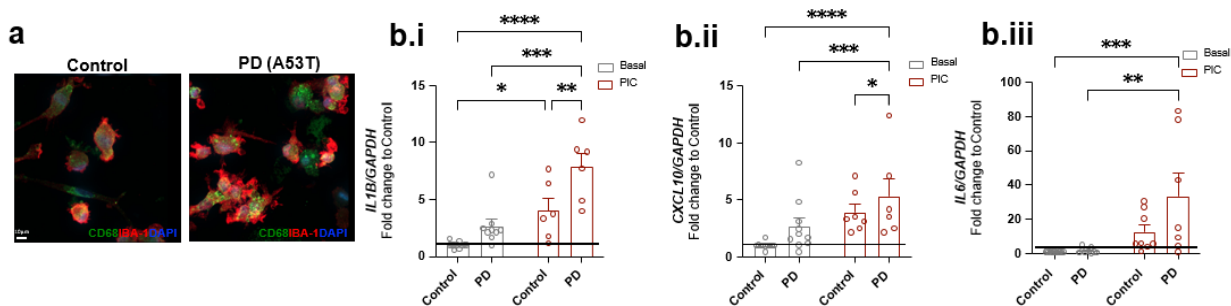


Εικόνα 27: Πρόσληψη σωματιδίων *E. coli* με την πάροδο του χρόνου (a.i) και στο χρονικό σημείο των 120 λεπτών (a.ii, a.iii) σε μικρογλοία από ανθρώπινα iPSCs υγιών (Control) και παρκινσονικών (PD) ατόμων, υπό βασικές συνθήκες, μετά από ενεργοποίηση με Poly(I:C) (PIC, 10 µg/mL, 24 ώρες) και μετά από αγωνιστική ενεργοποίηση του TREM2 με το αντίσωμα AF1828 (10 µg/mL, 60 λεπτά). Πρόσληψη συναπτοσωμάτων αγρίου τύπου (WT) ή A53T με την πάροδο του χρόνου σε μικρογλοία από iPSC υγιών (b.i) και PD (A53T) (b.ii), καθώς και στο χρονικό σημείο των 240 λεπτών (b.iii, b.iv), υπό βασικές συνθήκες και μετά από ενεργοποίηση με Poly(I:C) (PIC, 10 µg/mL, 24 ώρες).

Επιπλέον, προχωρήσαμε σε μελέτη των διαφορών στο μεταβολισμό των λιπιδίων (Εικόνα 28) και στην φλεγμονώδη αντίδραση (Εικόνα 29).



Εικόνα 28: Αντιπροσωπευτικές εικόνες χρώσης LipidSpot™ 488 των λιπιδιακών σταγονιδίων (LDs) (a.i) και ποσοτικοποίηση (a.ii) σε μικρογλοία από ανθρώπινα iPSC υγιών (Control) και παρκινσονικών (PD) ατόμων, υπό βασικές συνθήκες και μετά από 24 ώρες ενεργοποίησης με Poly(I:C) (PIC, 10 µg/mL). Επίπεδα γονιδιακής έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στον λιπιδιακό μεταβολισμό (ABCA1, DGAT2, APOE) (b.i–b.iii), όπως μετρήθηκαν με RT-PCR, σε μικρογλοία από ανθρώπινα iPSC Control και PD (A53T), υπό βασικές συνθήκες και μετά από ενεργοποίηση με Poly(I:C) (PIC, 10 µg/mL, 24 ώρες).



Εικόνα 29: Αντιπροσωπευτικές εικόνες χρώσης για CD68 και IBA-1, όπως απεικονίστηκαν με το σύστημα Cell Discoverer 7, σε μικρογλοία Control και PD (A53T) (a). Επίπεδα γονιδιακής έκφρασης προφλεγμονωδών γονιδίων (IL6, IL1B, CXCL10) (b.i–b.iii), όπως μετρήθηκαν με RT-PCR, σε μικρογλοία από ανθρώπινα iPSC Control και PD (A53T), υπό βασικές συνθήκες και μετά από ενεργοποίηση με Poly(I:C) (PIC, 10 µg/mL, 24 ώρες).

Συνολικά, τα αποτελέσματα του παραδοτέου τεκμηριώνουν με σαφήνεια ότι το ανθρώπινο μοντέλο μικρογλοίας από iPSC αποτελεί ένα ισχυρό και λειτουργικά αξιόπιστο εργαλείο για τη μελέτη πρώιμων παθοφυσιολογικών μηχανισμών στη νόσο Πάρκινσον. Η επιτυχής εγκαθίδρυση και ο πολυεπίπεδος

φαινοτυπικός και μοριακός χαρακτηρισμός των ανθρώπινων μικρογλοιακών κυττάρων, καθώς και η ανάπτυξη συν-καλλιιεργειών με ανθρώπινους νευρώνες, επιτρέπουν τη διερεύνηση διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων σε ένα ανθρώπινο, μεταφραστικά σχετικό σύστημα. Οι λειτουργικές δοκιμασίες ανέδειξαν μειωμένη φαγοκυτταρική ικανότητα στη μικρογλοία PD, ιδιαίτερα ως προς την πρόσληψη συναπτοσωμάτων, ενώ η αυξημένη συσσώρευση λιπιδιακών σταγονιδίων και η μεταβολή γονιδίων του λιπιδιακού μεταβολισμού υποδηλώνουν μεταβολικό επαναπρογραμματισμό. Παράλληλα, η ενισχυμένη προφλεγμονώδης απόκριση και οι αλλαγές σε δείκτες ενεργοποίησης μικρογλοίας ενισχύουν το μοντέλο μιας πρώιμης, πολυδιάστατης δυσλειτουργίας της μικρογλοίας στη νόσο Πάρκινσον.

Το παρόν παραδοτέο ενισχύει ουσιαστικά την επιστημονική και τεχνολογική δυναμική του φορέα, εδραιώνοντάς τον ως κέντρο αριστείας στη μελέτη της μικρογλοίας και των νευροφλεγμονωδών μηχανισμών στη νόσο Πάρκινσον. Η ανάπτυξη συν-καλλιιεργειών ανθρώπινων μικρογλοιακών και νευρωνικών κυττάρων, αλληλούχισης RNA και πλατφορμών υψηλού περιεχομένου απεικόνισης και ηλεκτροφυσιολογίας ενισχύει σημαντικά τη μεθοδολογική υπεροχή και τη μεταφραστική εμβέλεια του φορέα. Παράλληλα, η δημιουργία λειτουργικά επικυρωμένων ανθρώπινων κυτταρικών μοντέλων και η ταυτοποίηση κρίσιμων μικρογλοιακών ρυθμιστών που επηρεάζουν τη νευρωνική επιβίωση και τη συναπτική ακεραιότητα δημιουργούν ισχυρή βάση για δημοσιεύσεις υψηλού αντίκτυπου, διεθνείς συνεργασίες, ανταγωνιστικές χρηματοδοτήσεις και δυναμική αξιοποίηση σε προκλινικές ή φαρμακολογικές εφαρμογές. Επιπλέον, η μεταφορά τεχνογνωσίας, η εκπαίδευση εξειδικευμένου ανθρώπινου δυναμικού και η αξιοποίηση των υποδομών αιχμής του Ινστιτούτου ενισχύουν τη βιωσιμότητα, την εξωστρέφεια και τη στρατηγική θέση του φορέα στον τομέα της νευροεκφυλιστικής έρευνας.