Zuwendungsempfänger:	Michela Deleidi
Förderkennzeichen:	01ED2005A
Vorhabenthema:	GBA – personalisierte Medizin für Parkinson: klinisch und therapeutische Stratifizierung
Laufzeit des Vorhabens:	01.07.2020 – 30.04.2024
Berichtszeitraum:	Schlussbericht

Die Parkinson-Krankheit (PD) ist eine häufige neurodegenerative Erkrankung, von der mehr als 1 % der Bevölkerung über 65 Jahre und mehr als 4 % der Bevölkerung im Alter von 85 Jahren betroffen sind. Mehrere Hinweise, die für das Verständnis der Krankheitspathogenese wichtig sind, stammen von Mutationen in Genen, die mit vererbten Formen der Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht werden. Unter diesen wurden kürzlich heterozygote Mutationen im GBA1-Gen als stärkster genetischer Risikofaktor für die Erkrankung identifiziert. Homozygote GBA1-Mutationen sind für die rezessive lysosomale Speicherkrankheit Morbus Gaucher (GD) verantwortlich. Je nach dem Fehlen (nicht neuronopathische Formen, GD Typ 1) oder Vorhandensein (neuronopathische Formen, GD Typ 2 und 3) neurologischer Symptome werden verschiedene klinische Formen der GD beschrieben. In den letzten Jahren wurden GD und PD aufgrund der klinischen Beobachtung von Parkinsonismus bei Patienten mit GD Typ 1 in Verbindung gebracht [Lwin et al., 2004; Neudorfer et al., 1996]. Im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung haben Patienten mit GD Typ 1 ein 20fach erhöhtes Lebenszeitrisiko für die Entwicklung von Parkinsonismus [Bultron et al., 2010], während Personen mit heterozygoten GBA1-Mutationen ein fünfmal höheres Risiko haben, an Parkinsonismus zu erkranken als Nichtträger [Sidransky et al., 2009].
Die Mechanismen, die der Neurodegeneration bei GBA1-Mutationsträgern zugrunde liegen, sind noch immer schwer zu verstehen. Sowohl Gain- als auch Loss-of-Function-Mechanismen sind wahrscheinlich an der Pathogenese der Krankheit beteiligt. GBA1 kodiert die Glucocerebrosidase (GCase), ein lysosomales Enzym, das die Hydrolyse von Glucosylceramid, einem Membranglycosphingolipid, zu Ceramid und Glucose katalysiert. Nach der Funktionsverlust-Hypothese verursacht der GCase-Mangel die Anhäufung von Glucosylceramid und anderen mehrfach ungesättigten Lipiden, die die Sphingolipid-Zusammensetzung der Zellmembranen verändern und die Aggregation von α-Synuclein (α-syn) fördern [Jo et al., 2000; Velayati et al., 2010]. Toxische α-syn Oligomere beeinflussen die Aktivität von GCase negativ und blockieren den Export von GCase aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). GCase wird normalerweise im ER glykosyliert und gefaltet und anschließend durch den Golgi-Apparat zum Lysosom transportiert. Die Faltung und Reifung von GCase erfordert die Beteiligung von molekularen Chaperonen/Co-Chaperonen. Nach der Gain-of-Function-Hypothese greifen mutierte GCase in diesen Faltungsprozess ein und werden im ER zurückgehalten. Das fehlgefaltete Enzym wird also ins Zytoplasma retrotransloziert, ubiquitiniert und über ER-assoziierte Degradation (ERAD) durch das Proteasom abgebaut [Cuervo et al., 2004; Ron and Horowitz, 2005; Sawkar et al., 2005; Vogiatzi et al., 2008]. Interessanterweise sind die meisten GCase-Mutationen Missense-Mutationen, und die mutierten Enzyme hätten eine ausreichende enzymatische Aktivität, wenn sie richtig gefaltet und zum Lysosom transportiert würden. In den letzten Jahren wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, um die GCase-Proteostase zu modulieren.
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass GBA1-Mutationen die intraneuronalen Spiegel von A-SYN beeinflussen und die Anfälligkeit gegenüber der A-SYN-Pathologie erhöhen können [Mazzulli et al., 2011; Gegg und Schapira. 2018]. Eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber der A-SYN-

Toxizität könnte daher ein Schlüsselmechanismus sein, durch den GBA1-Mutationen das Parkinson-Risiko erhöhen. In einer früheren Studie, die in Zusammenarbeit von zwei Partnern dieses JPND-Konsortiums (UCL und DZNE) durchgeführt wurde, konnten wir zeigen, dass die durch A-SYN-Überexpression verursachte Degeneration nigraler Neurone bei Mäusen, die eine heterozygote Knock-in-Mutation (*L444P*) im *Gba1*-Gen der Maus exprimieren, sich signifikant verstärkt ausprägte [Migdalska-Richards et al., 2017]. Wir planen nun, die Auswirkungen von GBA1-Mutationen auf andere wichtige Aspekte der A-SYN-Pathologie hin zu untersuchen. Experimentelle Studien über die Zusammenhänge zwischen GBA1-Mutationen und der A-SYN-Pathologie, sowie über die Mechanismen, die diesen zugrunde liegen, werden in hochmodernen Modellen, nämlich Hirnorganoiden (Arbeitspaket 3 - Michela Deleidi - Tübingen) und Tiermodellen (Arbeitspaket 4 und 5 - Donato Di Monte - Bonn), durchgeführt. Außerdem soll die Fähigkeit niedermolekularer Chaperone, als neuroprotektive Wirkstoffe zu wirken, untersucht werden.

Die spezifischen Ziele des Vorschlags waren

1. Verstärkte und harmonisierte Rekrutierung und Untersuchung von PD- und GBA1-PD-Patienten und GBA1-Trägern zur Untersuchung des Prodroms und der klinischen Entwicklung von GBA1-PD im gesamten Konsortium (Vereinigtes Königreich, Italien, Deutschland, Spanien).
2. Nutzung der Kohorte zur Sammlung und Analyse von Proben (Speichel-DNA, Blut, Fibroblasten, Makrophagen), um biochemische und entzündliche Biomarker zu identifizieren, die die klinischen Ziel-1-Marker ergänzen.
3. Verwendung von Zellmodellen (humane induzierbare pluripotente Stammzellen - iPSCs, 3-D-Organoide, primäre neuronale Kulturen) und Tiermodellen, um die biochemischen Auswirkungen von GBA1-Mutationen auf A-SYN-Spiegel, Aggregation und Ausbreitung, angeborene Immunfunktion, exosomale, lysosomale und mitochondriale Funktion und den Metabolismus freier Radikale zu untersuchen.
4. Untersuchung der Wirkung von Ambroxol als archetypisches GBA1-Chaperon zur Umkehrung nachgeschalteter biochemischer Ereignisse, die an der Pathogenese der Parkinson-Krankheit beteiligt sind und diese beschleunigen.

Konkret wollten wir folgendes erreichen:

AP1: Klinische Kohorten

Harmonisierung der Bewertung von >700 GBA1-PD Patienten in Großbritannien, Italien, Deutschland und Spanien unter Verwendung klinischer und webbasierter Instrumente. Sammlung von Blut, Urin und Liquor zur Analyse von Biomarkern (z.B. Alpha-Synuclein, GCase-Aktivität) und Entwicklung standardisierter Auswertungsprotokolle für longitudinale Studien.

AP2: Entzündliche und biochemische Marker

Untersuchung, wie GBA1-Mutationen Entzündung, mitochondriale Dysfunktion und lysosomale Dysfunktion in Makrophagen verursachen. Screening von Patientenzellen auf ihre Reaktion auf GCase-aktivierende Verbindungen wie Ambroxol, um Entzündungssignaturen und therapeutische Ziele zu identifizieren.

WP3: Gehirn-Organoide für GBA1 und Alpha-Synuclein Pathologie (

Verwendung von 3D-Gehirnorganoiden, die aus iPSCs von Patienten gewonnen wurden, zur Modellierung der Alpha-Synuclein-Pathologie. Untersuchung der Auswirkungen von GBA1-Mutationen auf die lysosomale, mitochondriale und synaptische Funktion und Bewertung der Auswirkungen von Medikamenten auf die Alpha-Synuclein-Aggregation und -Ausbreitung für Anwendungen in der Präzisionsmedizin.

AP4: iPSC- und Mausmodelle

Analyse der alpha-Synuclein-Aggregation und -Ausbreitung in iPSC-abgeleiteten Neuronen und GBA1-mutierten Mäusen. Verwendung von in vivo und in vitro Ansätzen zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der GBA1-bezogenen Pathologie und zur Validierung therapeutischer Targets.

AP5: Ambroxol für PD-Pathologie
Untersuchung der Fähigkeit von Ambroxol, die GCase-Aktivität wiederherzustellen und die Alpha-Synuclein-Pathologie in GBA1-mutierten Mausmodellen zu lindern. Bewertung der Auswirkungen auf die mitochondriale und lysosomale Funktion, Entzündung und Umkehrung der Pathologie.

Spezifische Ergebnisse
Originale Aufgaben mit aktiver Beteiligung des deutschen Partners (**Deleidi-Team**) werden gezeigt.
WP3
Erweiterte Beschreibung der Ergebnisse zu aus GBA1-Patienten abgeleiteten Mittelhirn-Organoiden und α-Synuclein-Pathologie
Wir haben humane Mittelhirn-Organoide aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) von GBA1-PD-Patienten mit den Mutationen E326K und L444P sowie den entsprechenden isogenen Kontrollen generiert. Zur Verbesserung der Differenzierung kombinierten wir ein etabliertes Protokoll zur Induktion von Mittelhirnbodenplatten mit einer biphasischen Aktivierung der WNT-Signalgebung. Organoide von GBA1-Mutanten und isogenen Kontrollen zeigten eine vergleichbare Größe und Organisation, was die Robustheit unseres Modells unterstreicht. Immunhistochemische Charakterisierungen belegten die Bildung von dopaminergen (DA) Subtypen, die für die Parkinson-Pathologie relevant sind.
Strukturelle und zelluläre Charakterisierung
Frühzeitige Immunfluoreszenz-Analysen bestätigten die Expression von neuronalen Vorläufermarkern (SOX2) sowie spezifischen Markern der Mittelhirnplatte (FOXA2, OTX2), was auf eine korrekte Mittelhirn-Strukturierung hinweist. Ab Tag 65 in vitro (DIV 65) wurden Astrozytenmarker (GFAP, S100B) und reife dopaminerge Marker (TH, DDC, VMAT2, Dopamintransporter) nachgewiesen. Langzeitkulturen zeigten die Bildung von Neuromelanin und phosphoryliertem α-Synuclein (p-Ser129 α-syn) in DA-Neuronen, was die Relevanz des Modells für die PD-Pathologie bestätigt.
Pathologische Merkmale der GBA1-Mutationen
Organoide mit GBA1-Mutationen wiesen eine reduzierte GBA1-Enzymaktivität, geringere Proteinlevel sowie eine reduzierte Anzahl an TH+ Neuronen auf. Zudem wurden im Vergleich zu isogenen Kontrollen erhöhte α-Synuclein-Konzentrationen festgestellt. Western-Blot-Analysen zeigten die Akkumulation unlöslichen α-Synucleins in spät entwickelten GBA1-Organoiden. Nach DIV 130 wurden proteinase-K-resistente p-Ser129 α-syn-Aggregate in DA-Neuronen nachgewiesen. Ab DIV 165 entwickelten die GBA1-Mutanten intraneuronale, lipidassoziierte p-Ser129 α-syn-Aggregate, die Einschlussstrukturen ähnelten.
Mitochondriale Dysfunktion
Im Einklang mit unseren früheren Ergebnissen, die auf eine direkte Rolle von GCase in der Funktion des mitochondrialen Komplexes I (CI) hinweisen, war die CI-Aktivität in GBA1-Mutanten-Organoiden im Vergleich zu Kontrollen signifikant reduziert. Eine Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNA-Seq) zeigte eine gestörte mitochondriale ATP-Produktion und Dysregulation des Atmungsketten-Komplexes I, insbesondere in L444P-mutierten Organoiden.
Entwicklung eines Synucleinopathie-Modells
Um die α-Synuclein-Pathologie zu modellieren, haben wir Mittelhirn-Organoide aus iPSCs einer gesunden Kontrolle (KOLF 2.1J), von GBA1-PD-Patienten (E326K und L444P) und ihren isogenen Kontrollen erzeugt. Exogene α-Synuclein-präformierte Fibrillen (PFFs) wurden eingesetzt, um die Aggregation von endogenem α-Syn zu induzieren. Außerdem wurde ein Protokoll zur Integration von iPSC-abgeleiteten Mikroglia in die Organoide entwickelt, um die Rolle von Gliazellen bei der α-Synuclein-Pathologie zu untersuchen. Mikroglia integrierten sich erfolgreich und überlebten bis zu zwei Monate in Ko-Kultur.
PFF-Behandlung und pathologische Progression

Fünf Tage nach der Behandlung mit PFFs zeigten Immunfluoreszenz-Analysen eine periphere Lokalisierung der PFFs und ihre Kolokalisation mit dem lysosomalen Marker LAMP1 in neuronalen und mikroglialen Zellen, was auf eine effiziente Aufnahme und lysosomale Ausrichtung hindeutet. Bis DIV 70 waren erhöhte p-Ser129 α-syn-Werte in PFF-behandelten Organoiden im Vergleich zu α-Syn-Monomer-behandelten und unbehandelten Kontrollen sichtbar. Bei DIV 100 (35 Tage nach der Behandlung) korrelierte die Akkumulation pathologischen α-Synucleins mit einer Reduktion der TH+-Neuronen, was die neurodegenerativen Prozesse der Parkinson-Krankheit widerspiegelt.
Frühe zelluläre Mechanismen
Zur Untersuchung der frühen zellulären Reaktionen auf die α-Synuclein-Pathologie wurde eine scRNA-Seq fünf Tage nach der PFF-Behandlung durchgeführt. Das Einzelzell-Transkriptom zeigte eine Vielzahl von Zelltypen, darunter neuronale und gliale Vorläufer, differenzierende Neuronen, reaktive Glia und reife DA-Neuronen. Besonders in DA-Neuronen wurden signifikante transkriptionelle Dysregulationen nachgewiesen, verbunden mit metabolischen Störungen und mitochondrialer Fehlfunktion.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass GBA1-Mutationen eine Dysfunktion des mitochondrialen Komplexes I verursachen und die Aggregation von α-Synuclein fördern, was zu einem progressiven Verlust dopaminerger Neuronen führt. Zudem induzieren α-Synuclein-PFFs pathologische Veränderungen in einer Subpopulation dopaminerger Neuronen, die metabolische Störungen und Neuronenverlust hervorrufen – zentrale Merkmale der Parkinson-Krankheit. Diese Ergebnisse bieten neue Einblicke in die Krankheitsmechanismen und potenzielle therapeutische Ansätze.

Erzielte repräsentative Ergebnisse

1. Entwicklung eines humanen Mittelhirn-Organoid-Modells
Wir haben ein Modell von Mittelhirn-Organoiden aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) von GBA1-Patienten (E326K und L444P) und entsprechenden isogenen Kontrollen entwickelt. Diese Organoide ermöglichten eine detaillierte Untersuchung der Auswirkungen von GBA1-Mutationen auf die Entwicklung und Funktion dopaminerger Neuronen, die für Parkinson-Krankheit (PD) relevant sind.
2. Optimierung der Differenzierung der Organoide
Zur Verbesserung der Differenzierung der Mittelhirn-Organoide haben wir ein neues Protokoll entwickelt, das eine frühere Methode zur Förderung der Bildung der Mittelhirnbodenplatte mit einer modernen biphasischen Aktivierung von WNT-Signalen kombiniert. Dies führte zu einer verbesserten und stabileren Differenzierung der Organoide.
3. Charakterisierung der Organoide
Wir charakterisierten die Organoide während ihrer Reifung (bis zu 200 Tage) und konnten die Bildung von relevanten dopaminergen Subtypen nachweisen. Frühzeitige Immunfluoreszenz-Analysen bestätigten eine korrekte Strukturierung der Mittelhirnregion, während Langzeitkulturen die Entwicklung von Neuromelanin und phosphoryliertem α-Synuclein in dopaminergen Neuronen zeigten.
4. Pathologische Merkmale in GBA1-mutierten Organoiden
Organoide aus GBA1-mutierten iPSCs wiesen eine signifikante Reduktion der GBA1-Aktivität, eine reduzierte Anzahl von TH+ Neuronen und erhöhte α-Synuclein-Konzentrationen auf. Besonders bemerkenswert war die Akkumulation von unlöslichem α-Synuclein, das in späteren Stadien proteinase-K-resistente Aggregaten bildete. Dies spiegelte die typischen pathologischen Merkmale der Parkinson-Krankheit wider.
5. Mitochondriale Dysfunktion

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die GBA1-Mutationen die Aktivität des mitochondrialen Komplexes I signifikant reduzierten, was auf eine mitochondriale Dysfunktion hinweist, die mit neurodegenerativen Prozessen in der Parkinson-Krankheit assoziiert ist.
6. Entwicklung eines Modells der α-Synuclein-Pathologie
Wir entwickelten ein Modell der α-Synuclein-Pathologie, indem wir exogene α-Synuclein-präformierte Fibrillen (PFFs) in die Mittelhirn-Organoide integrierten. Dies führte zu einer Aggregation von α-Synuclein und pathologischen Veränderungen, die mit dem Verlust dopaminerger Neuronen in Verbindung standen.
7. Integration von Mikroglia in das Modell
Durch die Integration von iPSC-abgeleiteten Mikroglia in die Organoide konnten wir die Rolle von Gliazellen in der α-Synuclein-Pathologie untersuchen. Mikroglia überlebten in den Organoiden und trugen zur Pathogenese bei, indem sie die Aggregation von α-Synuclein unterstützten.
8. Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNA-Seq)
Eine Einzelzell-RNA-Sequenzierung der Organoide ermöglichte es uns, zelluläre Dysregulationen und transkriptionelle Veränderungen zu identifizieren, insbesondere in dopaminergen Neuronen. Wir entdeckten eine gestörte mitochondriale ATP-Produktion und eine Dysregulation der Atmungskettenkomplexe, was die metabolischen Störungen in der Parkinson-Krankheit verdeutlicht.

Diese Errungenschaften bieten einen tiefen Einblick in die molekularen Mechanismen der Parkinson-Krankheit, die durch GBA1-Mutationen und α-Synuclein-Aggregation ausgelöst werden. Unser Modell ermöglicht es, die Rolle von Gliazellen und mitochondriellen Dysfunktionen in der Neurodegeneration zu untersuchen und trägt zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze bei.

Wichtige Ergebnisse des Gesamtprojekts

1. Erhebung und Integration umfangreicher klinischer, genetischer und biochemischer Daten.
Wir haben eine umfassende Sammlung klinischer, genetischer und biochemischer Daten sowie Proben peripherer Biomarker, einschließlich Stuhl- und Speichelmikrobiome, von GBA1- und Nicht-GBA1-Kohorten durchgeführt. Ziel war es, prodromale Merkmale zu definieren, die die Penetranz der PD bestimmen. Die bisherigen Analysen haben einen Zusammenhang zwischen Platelet A-SYN, extrazellulärem vesikulärem A-SYN im Plasma und Cathepsin D mit dem klinischen Status und insbesondere den nicht-motorischen Symptomen gezeigt.
2. Direkte Rolle von GCase in der mitochondrialen Funktion und im Energiestoffwechsel.
Wir haben gezeigt, dass GCase eine direkte Rolle in der mitochondrialen Funktion und im Energiestoffwechsel spielt. Darüber hinaus haben wir einen Zusammenhang zwischen mitochondrialen Schäden und der A-SYN-Pathologie im Gehirn und im peripheren Nervensystem gefunden. Diese Entdeckung erweitert unser Verständnis darüber, wie GBA1-Mutationen neurodegenerative Prozesse fördern.
3. Erhöhte A-SYN-Aggregation und -Verteilung unter oxidativem/nitrativem Stress.
Mit Hilfe verschiedener in vivo Modelle, einschließlich Mäusen mit der GBA1 L444P Variante, konnten wir zeigen, dass die intra-neuronale A-SYN-Aggregation und die inter-neuronale A-SYN-Verteilung durch oxidativen und nitrativen Stress signifikant erhöht werden. Mitochondrien erwiesen sich als wichtige Quellen für oxidativen Stress durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, und die Akkumulation von nitratiertem A-SYN war ein konsistentes Merkmal, das mit der Aggregation und Ausbreitung von A-SYN assoziiert war.

Diese Ergebnisse bieten einen tiefen Einblick in die Mechanismen der Parkinson-Krankheit und die Rolle von GCase, oxidativem Stress und der A-SYN-Pathologie.

Spezifische Beiträge und Interaktionen

P1 - P3-Zusammenarbeit:

Diese Partnerschaft ermöglichte die Charakterisierung von geschlechtsspezifischen Unterschieden im Phänotyp der Mikroglia.

P1 - P2 - P6-Zusammenarbeit:

Die Entwicklung einer integrierten klinischen Kohorte mit tiefgreifender Phänotypisierung und Sammlung und Bewertung von Biomarkern. P1 stellte P5 mutierte L444P-Mäuse zur Verfügung.

P1 - P4 Zusammenarbeit:

Die gemeinsame Arbeit identifizierte den Beitrag der GCase zur mitochondrialen Komplex I Funktion. P4 lieferte iPSC-Zellen an P1

P4-P5

Zusammenarbeit bei der Identifizierung der Pathologie von a-Synuclein

P3 - P5 Zusammenarbeit:

P3 und P5 arbeiteten aktiv zusammen, um ihr wissenschaftliches Fachwissen und ihre GBA-Modellsysteme zu kombinieren. Die Zusammenarbeit umfasste auch einen Austausch von Studenten, der eine tiefere Integration von Wissen und Fähigkeiten förderte.

P3 - P2 Zusammenarbeit:

Ziel dieser Partnerschaft war es, die neuroprotektive Kapazität von Makrophagen, die aus Patientenproben von P2 stammen, gründlich zu charakterisieren. Die Experimente zu diesem Thema sind noch nicht abgeschlossen.

P3-P2- P6-Zusammenarbeit:

Der Austausch von Urinproben von P6 und P2 mit P3 wurde mit dem Ziel durchgeführt, frühe Biomarker für Neurodegeneration zu identifizieren. Die Experimente zu diesem Thema sind noch nicht abgeschlossen.

Diskussion

Unter Verwendung komplementärer Ansätze, die klinische Kohorten sowie Maus- und menschliche Stammzellmodelle umfassen, ist dieses Forschungsprojekt das erste, das die Rolle von Stoffwechselwegen und deren Modulation als potenzielle therapeutische Ansätze für die Parkinson-Krankheit (PD) untersucht. Der Antrag wurde sorgfältig entworfen, um Risiken zu minimieren, indem klar definierte Mechanismen angesprochen und Werkzeuge ausgewählt wurden, die für präklinische Settings entwickelt wurden, was eine hohe Machbarkeit und translationales Potenzial sicherstellt. Die Umsetzung dieser Strategie vom Labor zum Patienten ist ein ehrgeiziger Prozess, aber wir sind zuversichtlich, dass diese innovative Strategie in naher Zukunft neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen wird. Unser Programm hat dieses Problem angegangen, indem es menschliche Zellplattformen geschaffen hat, die menschliche Erkrankungen nachahmen können. Unser bahnbrechender Ansatz, Mausmodelle mit 2D- und 3D-Kulturen zu kombinieren, ist eine vielversprechende und machbare Methode, um die facettenreiche Natur der PD-Pathogenese zu erforschen. In diesem Zusammenhang stellen patientenspezifische iPSCs eine erneuerbare Quelle dar, die die Möglichkeit bietet, Pathomechanismen im Detail vor dem Hintergrund eines spezifischen genetischen Profils zu studieren. Besonders vielversprechend sind in diesem Zusammenhang das zentrale Nervensystem (CNS)-Organoide, die als vielversprechendes Werkzeug zur genauen Nachbildung der strukturellen Komplexität des CNS und der Interaktion unterschiedlicher Zelltypen dienen. Sie schaffen ein physiologisch relevanteres, zuverlässigeres und vorhersagbares Modell der menschlichen Krankheit und bieten damit beispiellose Möglichkeiten für die Forschung zu neurologischen Erkrankungen. Gehirnorganoide unterstützen die Bildung von menschlichem Nervengewebe auf räumlich und zeitlich kontrollierte Weise, die den Prozess in nativen Organen nachahmt und vielversprechender für die Untersuchung der Pathogenese, die Wirkstoffentwicklung und regenerative Medizinstudien ist als die Differenzierung isolierter Neuronen. Da die Gehirnorganoide patientenspezifisch sind, bieten sie auch eine Plattform für

die Entwicklung personalisierter Therapien. Insgesamt bietet dieses Projekt eine innovative Möglichkeit, die Pathogenese der PD im Detail zu untersuchen, indem es intrinsische pathogene Mechanismen mittels spezifischer 2D-Kulturen, wie Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen, sowie Zell-Zell-Verbindungen und -Interaktionen durch die Generierung von iPSC-abgeleiteten Gehirnorganoiden erforscht. Zusammengefasst können all diese Ergebnisse dazu beitragen, neue Einblicke in die Pathogenese der PD zu gewinnen, die zur Entwicklung effektiver therapeutischer Strategien führen könnten.

Der während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Alpha-Synuclein als Biomarker: Alpha-Synuclein-Oligomere in Hautbiopsien werden als potenzieller Biomarker zur Unterscheidung von idiopathischer Parkinson-Erkrankung und gesunden Kontrollpersonen untersucht.

GBA1-bezogene Biomarker: Forscher untersuchen Biomarker, die mit GBA1-Mutationen assoziiert sind, um Personen mit erhöhtem Parkinson-Risiko zu identifizieren und den Krankheitsverlauf zu überwachen.

AAV-GBA1-Transfer: Studien zeigen, dass der Transfer von GBA1 durch Adeno-assoziierte Viren die Ansammlung von Alpha-Synuclein reduzieren und die motorische Funktion in Parkinson-Modellen verbessern kann.

GBA1-assoziierte Parkinson-Krankheit: Die Forschung hebt die charakteristischen Merkmale der GBA1-assoziierten Parkinson-Krankheit hervor, einschließlich eines früheren Krankheitsbeginns, einer schnelleren Progression und einer höheren Inzidenz nicht-motorischer Symptome im Vergleich zur idiopathischen Parkinson-Krankheit.

Gain-of-function-Mechanismus: Der Gain-of-function-Mechanismus, bei dem mutiertes GBA1 schädliche Eigenschaften erwirbt, hat sich als möglicher Haupttreiber der GBA1-assoziierten Parkinson-Krankheit erwiesen.

Insgesamt hat die Forschung seit 2019 unser Verständnis der komplexen Beziehung zwischen GBA1 und Alpha-Synuclein bei der Parkinson-Krankheit vertieft. Diese Ergebnisse haben Auswirkungen auf die Entwicklung neuer diagnostischer Instrumente und therapeutischer Strategien, insbesondere für Patienten mit GBA1-Mutationen. Die im Rahmen dieser JPND-Studie durchgeführten Untersuchungen haben zum ersten Mal eine direkte Rolle von GBA1 in den Mitochondrien gezeigt.

Kurzfristige Verwertung der Ergebnisse/Perspektiven

Die Parkinson-Krankheit ist nach wie vor ein großes Gesundheitsproblem. Bis heute gibt es keine wirksame Behandlung. Klinische Studien mit verschiedenen Therapeutika haben keinen signifikanten Nutzen für die Patienten gezeigt. Die Schwierigkeit bei der Entwicklung wichtiger Therapeutika liegt vor allem im Fehlen zuverlässiger präklinischer Modelle, um pathogenetische Mechanismen zu entschlüsseln und neue Strategien zu testen. Unsere Forschung zielt darauf ab, dieses Problem durch die Etablierung neuer humaner 3D in vitro Modelle zu lösen, die neue Einblicke in die Krankheit liefern können. Insbesondere sind 3D-Kulturen repräsentativer für die Physiologie in vivo, was ihren translationalen Wert erhöht. Da Hirnorganoide patientenspezifisch sind, können sie auch eine Plattform für die Präzisionsmedizin für Patienten bieten, die in Zukunft für therapeutische Studien in einem akademischen Umfeld durch kommerzielle Unternehmen zur Verfügung stehen könnte. Unser Projekt trägt dazu bei, das Wissen über pathogenetische Mechanismen im Zusammenhang mit Immun- und Stoffwechselwegen zu erweitern, um neue therapeutische Ziele für die Entwicklung effizienter genetischer und molekularer Ansätze zu identifizieren. Die genetische/molekulare Therapie der PD hat sich in den letzten Jahren zu einem spannenden Forschungsfeld entwickelt, mit vielversprechenden Ergebnissen aus

gentherapeutischen und editierenden Ansätzen. Aufgrund der komplexen Pathophysiologie der PD und fehlender therapeutischer Targets konnte die PD bisher nicht von diesen Fortschritten profitieren. Unser Projekt hat dazu beigetragen, diese Lücke zu schließen, indem es neue Targets identifiziert und validiert hat, die in zukünftigen klinischen Studien getestet werden können. Das Projekt war erfolgreich, weil es auf einer rationalen Hypothese, durchführbaren Methoden und der synergetischen Expertise der Partner und ihrer früheren Arbeiten basierte. Ein Ergebnis unseres Projekts ist der Nachweis einer direkten Verbindung zwischen GBA1 und den Mitochondrien, die zu einer Beeinträchtigung der Energieversorgung führen könnte. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die Manipulation der Proteostase-Maschinerie eine wirksame Strategie zur Linderung der Proteinopathie sein könnte. Die Möglichkeit, patientenspezifische iPSC-abgeleitete Organoide zu erzeugen und diese durch Transkriptom- und Proteomstudien eingehend zu charakterisieren, bietet ein innovatives Werkzeug zur Modellierung der PD, indem eine Vielzahl biologischer Parameter, einschließlich komplexer regionaler Zell-Zell-Interaktionen, neuronaler Netzwerke, Erregbarkeit und Krankheitsausbreitung, rekapituliert und das Vorhandensein potenzieller Biomarker im Kulturmedium der Organoide untersucht wird. Die vorgeschlagenen Methoden zur Herstellung von Organoiden, die identifizierten molekularen Targets und die Strategien zu ihrer Modifikation können als geistiges Eigentum geschützt werden. Insgesamt werden die im Forschungsprojekt erzielten Ergebnisse aktiv genutzt und zur Verfügung gestellt, unabhängig davon, ob sie kommerziell genutzt werden oder nicht, so dass die Öffentlichkeit von den gewonnenen Erkenntnissen profitieren kann. Entscheidungen über die Nutzung der Ergebnisse werden in Abstimmung mit allen Partnern bei den Partnertreffen getroffen, und jede Veröffentlichung, die auf der Arbeit im Rahmen dieses Projekts basiert, wird die Autorenschaft entsprechend dem Beitrag jedes Partners anerkennen. Im Rahmen der Forschungsarbeiten wurden keine spezifischen Erfindungen oder Schutzrechtsanmeldungen durch den Zuwendungsempfänger oder die Projektteilnehmer gemacht oder geltend gemacht. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die Forschungsergebnisse und die gewonnenen Daten Potenzial für eine weitere Verwertung und zukünftige Anwendungen von gewerblichen Schutzrechten bieten. Im Hinblick auf erkennbare Verwertungsmöglichkeiten bieten die Projektergebnisse vorbehaltlich entsprechender Vereinbarungen und Verhandlungen Potenzial für zukünftige Lizenzierungsmöglichkeiten, Kooperationen oder Partnerschaften mit industriellen Akteuren. Die Verwertungsmöglichkeiten umfassen die Entwicklung diagnostischer Instrumente (metabolische Biomarker), therapeutischer Interventionen oder weiterer wissenschaftlicher Forschung auf dem Gebiet der GBA1-Mutation und ihrer Auswirkungen auf den Energiestoffwechsel.

Publikationen

- Emerging strategies, applications, and challenges for clinical NAD+ augmentation. Commissioned review (expert opinion) for Nature Aging, submitted
- Baden P, Perez MJ, Raji H, Bertoli F, Kalb S, Illescas M, Spanos F, Giuliano C, Calogero AM, Oldrati M, Hebestreit H, Cappelletti G, Brockmann K, Gasser T, **Schapira AHV**, Ugalde C, **Deleidi M**. Glucocerebrosidase is imported into mitochondria and preserves complex I integrity and energy metabolism. Nat Commun. 2023 Apr 6;14(1):1930.
- Panagiotakopoulou V, De Cicco S, Ivanyuk D, Haq W, Arsic A, Yu C, Messelodi D, Oldrati M, Schöndorf DC, Perez MJ, Cassatella RP, Jacobi M, Schneiderhan-Marra N, Nikic I, Gasser T, **Deleidi M***. " Interferon-γ signaling synergizes with LRRK2 in human neurons and microglia". Nat Commun. 2020 Oct 14;11(1):5163. doi: 10.1038/s41467-020-18755-4.
- Strocchi S, Messelodi D, Bertuccio SN, Baden P, Indio V, Giorgi FM, Taddia A, Serravalle S, Pession A, Grifoni D, **Deleidi M**, Astolfi A, Pession A. “Neuronopathic Gaucher disease models reveal defects in cell growth promoted by Hippo pathway activation”. **Communications Biology**, 2023 Apr 19;6(1):431. doi: 10.1038/s42003-023-04813-2.