



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ**

**Διερεύνηση της σχέσης των μιτοχονδρίων και της  $\alpha$ -synuclein στα  
χαρακτηριστικά του νευρικού κυττάρου που σχετίζονται  
με τη νόσο του Parkinson: αποκάλυψη ενός νέου ρόλου για τη  
μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1**

**ΒΑΣΙΛΗ ΕΥΤΥΧΙΑ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ**

**Διερεύνηση της σχέσης των μιτοχονδρίων και της  $\alpha$ -synuclein στα  
χαρακτηριστικά του νευρικού κυττάρου που σχετίζονται  
με τη νόσο του Parkinson: αποκάλυψη ενός νέου ρόλου για τη  
μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1**

**ΒΑΣΙΛΗ ΕΥΤΥΧΙΑ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016**



Ορισμός έναρξης της εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής της Βιολόγου Βασίλη Ευτυχίας από τη Γ.Σ.Ε.Σ. : 127/23-10-2009

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ. : 128/03-04-2009

Επιτροπή αποτελούμενη από τους:

**Θεολόγος Μιχαηλίδης** Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Πρόεδρος της Επιτροπής)

**Αθανασιάδου Αγλαΐα** Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών (Μέλος)

**Αλεξανδράκη Δέσποινα** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης (Μέλος)

Ορισμός θέματος από τη Γ.Σ.Ε.Σ. : 128/03-04-2009

Θέμα: «Μελέτη των συνεπειών της υπερέκφρασης φυσικών μεταλλαγών του γονιδίου της *α-synuclein* στον *Saccharomyces cerevisiae* και σε κύτταρα θηλαστικών»

Τροποποίηση τίτλου από τη Γ.Σ.Ε.Σ. : 234/21-09-2016

Νέος τίτλος: «Διερεύνηση της σχέσης των μιτοχονδρίων και της *α-synuclein* στα χαρακτηριστικά του νευρικού κυττάρου που σχετίζονται με τη νόσο του Parkinson: αποκάλυψη ενός νέου ρόλου για τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1»



Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ. : 237/09-11-2016

<b>Θεολόγος Μιχαηλίδης</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Πρόεδρος της Επιτροπής)
<b>Αθανασιάδου Αγλαΐα</b>	Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών (Μέλος)
<b>Αλεξανδράκη Δέσποινα</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης (Μέλος)
<b>Γρηγορίου Μαριρένα</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης (Μέλος)
<b>Παναγούλα Κόλλια</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Μέλος)
<b>Μαρίκα Σύρρου</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Μέλος)
<b>Λαδουκάκης Εμμανουήλ</b>	Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης (Μέλος)







ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ  
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

Ιωάννινα, 16-11-2016

ΜΙΧΑΗΛΙΔΗΣ ΘΕΟΛΟΓΟΣ  
Αν. Καθηγητής  
Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110  
ΤΗΛ: 26510-07101, FAX: 26510 07061

#### ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Μετά από πρόσκληση του Επιβλέποντα Αν. Καθηγητή Μοριακής Γενετικής κ. Θ. Μιχαηλίδη, σήμερα Τετάρτη 16/11/2016 και ώρα 12:30, έλαβε χώρα σύσκεψη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την αξιολόγηση και κρίση της διδακτορικής διατριβής της κ. Ευτυχίας Βασιλή με θέμα: «Διερεύνηση της σχέσης των μιτοχονδρίων και της α-synuclein στα χαρακτηριστικά του νευρικού κυττάρου που σχετίζονται με τη νόσο του Parkinson: αποκάλυψη ενός νέου ρόλου για τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1». Προσήλθε η κ. Βασιλή, η οποία ανέπτυξε το θέμα της διατριβής της, της έγιναν ερωτήσεις από τη Επιτροπή και αποχώρησε. Στη συνέχεια, η Επιτροπή έκρινε το πρωτότυπο του περιεχομένου της διατριβής, την ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη, καθώς και την επάρκεια της υποψήφιας στο γνωστικό αντικείμενο της διατριβής της. Ακολούθησε ώφθοφορία, όπου εγκρίθηκε παμψηφεί η διδακτορική διατριβή με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ».

#### Ο ΠΡΟΕΔΡΟΣ

Θεολόγος Μιχαηλίδης, Αν. Καθηγητής  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

#### ΤΑ ΜΕΛΗ

Αγλαΐα Αθανασιάδου, Καθηγήτρια  
Πανεπιστήμιο Πάτρας

Μαρίκα Σύρρου, Αν. Καθηγήτρια  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Παναγούλα Κόλλια, Αν. Καθηγήτρια  
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δέσποινα Αλεξανδράκη, Αν. Καθηγήτρια  
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μανόλης Λαδουκάκης, Επί Καθηγητής  
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μαρία Γρηγορίου, Αν. Καθηγήτρια  
Πανεπιστήμιο Θράκης



Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110  
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 07265, 07336, 7294  
FAX: (26510) 07064  
ΠΑΡΟΦΟΡΕΣ: Άννα Υφαντή  
e-mail: grambeti@cc.uoi.gr

Ιωάννινα, 29 Νοεμβρίου 2016  
Αριθμ. Πρωτ.: 275

Προς τους κ.κ. :

1. **Θεολόγο Μιχαηλίδη**, Αναπληρωτή Καθηγητή Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. **Δέσποινα Αλεξανδράκη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
3. **Αγλαΐα Αθηνασιάδου**, Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών
4. **Μαρία Γρηγορίου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής Δημοκριτείου Πανεπιστημίου Θράκης
5. **Παναγιώτα Κάλια**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
6. **Ερμηνιώτη Λαδοκούκη**, Επίκουρο Καθηγητή Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
7. **Μαρίκα Σύρρου**, Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Θέμα: «Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής της κας. Ευτυχίας Βασιίλη»**

Σας γνωρίζουμε ότι η Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύγκλησης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών στη Συνεδρίασή της αριθμ. 237/09-11-2016, σας όρισε μέλη της 7μελούς εξεταστικής επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής που εκτόνησε η κ. Ευτυχία Βασιίλη με τίτλο «Μελέτη των συνεπειών της υπερέκφρασης φυσικών μεταλλάξεων του γονιδίου της  $\alpha$ -synuclein στον *Saccharomyces cerevisiae* και σε κύτταρα θηλαστικών».

Πρόεδρος της Επιτροπής ορίζεται ο Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος κος Θεολόγος Μιχαηλίδης.

Κοινοποιείται:  
κα. Ευτυχία Βασιίλη

Με εντολή Προέδρου  
Η Γραμματέας του Τμήματος

ANNA YFANTH





Ιωάννινα, 12-10-2016

Προς τη Γραμματεία,  
του  
Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών &  
Τεχνολογιών,  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Θεολόγος Μιχαηλίδης  
Αν. Καθηγητής  
Δ/ση: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110  
Τηλ: 26510-07101  
FAX: 26510-07064  
e-mail: [tmichael@uoi.gr](mailto:tmichael@uoi.gr)

**Έγκριση έναρξης συγγραφής διδακτορικής διατριβής**

Με την παρούσα αίτηση θα ήθελα να βεβαιώσω ότι η διδακτορική διατριβή με τίτλο «Διερεύνηση της σχέσης μιτοχονδρίων και α-συνυκλείν στα χαρακτηριστικά των νευρικών κυττάρων που σχετίζονται με τη νόσο Parkinson: νέος ρόλος για τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1» έχει ολοκληρωθεί. Συνεπώς, η τριμελής επιτροπή της υποψήφιας διδάκτορος Ευτυχίας Βασίλη από κοινού ζητά την έναρξη της συγγραφής της διδακτορικής διατριβής, αφού προηγουμένως έχει κρίνει και συναποφασίσει ότι η ΥΔ έχει ολοκληρώσει επιτυχώς όλα τα προηγούμενα στάδια.

Με εκτίμηση,

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Αγλαΐα Αθανασιάδου, Καθηγήτρια  
Πανεπιστήμιο Πατρών



Δέσποινα Αλεξανδράκη, Καθηγήτρια  
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Θεολόγος Μιχαηλίδης, Αν. Καθηγητής  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων







ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Θεολόγος Μιχαηλίδης  
Αν. Καθηγητής  
Δ/ση: Πανεπολιτ. Ιωαννίνων, 45-110  
Τηλ: 26510-07101  
FAX: 26510-07064  
e-mail: [tmichael@uoi.gr](mailto:tmichael@uoi.gr)

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ  
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

Αριθμ. Πρωτ. 34  
Ημερομηνία 16/9/16

Ιωάννινα, 27-07-2016

Προς τη Γραμματεία,  
του  
Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών &  
Τεχνολογιών,  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Αξιότιμοι κυρίες/κύριοι,

Θα θέλαμε να σας ενημερώσουμε ότι ο τελικός τίτλος της διδακτορικής διατριβής της υποψηφίας διδάκτορας Βασιλή Ευτυχία είναι ελαφρά τροποποιημένος. Ο προκαταρκτικός αρχικός τίτλος ήταν: «Μελέτη των συνεπειών της υπερέκθεσης φυσικών μεταλλαγών του γονιδίου της  $\alpha$ -synuclein στον *Saccharomyces cerevisiae* και σε κύτταρα θηλαστικών.» και ο τελικός τίτλος τροποποιήθηκε ως εξής: «Διευκρίνιση της σχέσης μιτοχονδρίων και  $\alpha$ -synuclein στα χαρακτηριστικά των νευρικών κυττάρων που σχετίζονται με τη νόσο Parkinson: νέος ρόλος για τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη LoraP1.»

Βεβαιώνουμε ότι με την τροποποίηση του τίτλου δεν τροποποιείται το ήδη εγκριμένο φυσικό αντικείμενο του έργου.

Με εκτίμηση,

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Αγλαΐα Αθανασιάδου, Καθηγήτρια  
Πανεπιστήμιο Πατρών

Δέσποινα Αλεξανδράκη, Καθηγήτρια  
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Θεολόγος Μιχαηλίδης, Αν. Καθηγητής  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων







ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ  
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

Ιωάννινα, 2-04-2009

ΜΙΧΑΗΛΙΔΗΣ ΘΕΟΛΟΓΟΣ  
Αν. Καθηγητής  
Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 45 110  
ΤΗΛ: 26510-97101  
FAX: 26510 97061

Προς την Επιτροπή Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιολογικών  
Εφαρμογών και Τεχνολογιών

Θέμα: Δήλωση θέματος διδακτορικής διατριβής και ορισμός Τριμελούς Επιτροπής

Επιθυμώ να ενημερώσω την Επιτροπή Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος ΒΕΤ για τον τίτλο της Διδακτορικής Διατριβής της υποψήφιας δίδασκός του τμήματος κας Ευτυχίας Βασιλή. Το προτεινόμενο θέμα έχει τίτλο: "Μελέτη των συνεπειών της υπερέκφρασης φυσικών μεταλλαγών του γονιδίου της *a-synuclein* στον *Saccharomyces cerevisiae* και σε κύτταρα θηλαστικών".

Η προτεινόμενη τριμελής επιτροπή είναι

1. Αλεξανδράκη Δέσποινα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
2. Αθανασιάδου Αглаία, Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πάτρας
3. Μιχαηλίδης Θεολόγος, Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Παρακαλώ για τις δικές σας ενέργειες

Με τιμή

Θεολόγος Μιχαηλίδης

ΝΑΙ 128 / 3-4-09



*Στη μνήμη του πατέρα μου*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοϊατρικών Ερευνών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) κατά τη χρονική περίοδο 2009-2016 υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών κ. Θεολόγου Μιχαηλίδη.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή **κ. Θεολόγο Μιχαηλίδη** για την επιστημονική καθοδήγηση, την ενεργό συμμετοχή, την άριστη συνεργασία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλα τα στάδια της παρούσας μελέτης καθώς και για την ατέρμονη αισιοδοξία του.

Εν συνεχεία, θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κ. Αγλαΐα Αθανασιάδου, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, η συμβολή της οποίας ήταν καταλυτική για την διαικπεραίωση των πειραμάτων που αφορούν δείγματα από ασθενείς με νόσο του Parkinson.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Δέσποινα Αλεξανδράκη, αναπληρώτρια καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Κρήτης, μέλος της τριμελούς επιτροπής καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής κ. Μαριρένα Γρηγορίου, κ. Παναγούλα Κόλλια, κ. Μανώλη Λαδουκάκη και κ. Μαρίκα Σύρρου για την πολύτιμη συμμετοχή και τη συμβολή στη διαδικασία αξιολόγησης της διατριβής. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους Frank Gillardon, Anton Pallua, Ειρήνη Στρατιδάκη, Μιχάλη Αϊβαλιώτη, Μιχαέλα Φίλιου και την Παλαιολόγου Αικατερίνη για την βοήθεια τους στην ολοκλήρωση της διατριβής.

Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ στα πολύτιμα μέλη του εργαστηρίου μου, δεν έχει ιδιαίτερη σημασία να αναφέρω συγκεκριμένα του συμβολή του καθενός, ο κάθε ένας έχει μία πολύ ξεχωριστή θέση για εμένα και τους ευχαριστώ για τον ισχυρό δεσμό που αναπτύχθηκε μεταξύ μας. Αυτοί είναι οι συνάδελφοι Κυριακή Παπαγεωργίου, Αναστασία Ξαγαρά, Μαρούσα Δαρσινού, Ιωάννης Τσίγκας, Μαρία Κόκκαλη, Θεοδώρα Σούρδη και Αλεξία Τσακανέλη καθώς και παλαιότερα και νεότερα μέλη του εργαστηρίου.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του ινστιτούτου για την ομαδικότητα, τη συνεργασία και την έντονη διάθεση αλληλοβοήθειας.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τους αφανής ήρωες, την οικογένεια μου, τους στενούς μου φίλους και το σύντροφό μου που υπήρξαν στήριγμά στις δύσκολες στιγμές και στερήθηκαν αδιαμαρτύρητα το χρόνο μου, με υπομονή και αγάπη.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>17</b>
<b>Κεφάλαιο 1: Νόσος του Parkinson</b> .....	<b>17</b>
A.1.1 Η νόσος του Parkinson ( Parkinson’s Disease-PD).....	17
A.1.2 Τα κλινικά συμπτώματα της νόσου του Parkinson .....	18
A.1.3 Τα Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της νόσου του Parkinson .....	19
A.1.4 Αίτια και παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση της νόσου του Parkinson .....	22
A.1.4.1 Η γενετική της νόσου του Parkinson .....	23
A.1.5 $\alpha$ -Synuclein.....	30
A.1.5.1 Η πρωτοταγής δομή της $\alpha$ -synuclein .....	30
A.1.5.2 Η φυσιολογική λειτουργία της $\alpha$ -synuclein .....	33
A.1.5.3 Ο παθολογικός ρόλος της $\alpha$ -synuclein.....	34
A.1.5.4 Η αποικοδόμηση της $\alpha$ -synuclein .....	38
<b>Κεφάλαιο 2: Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στη νόσο του Parkinson</b> .....	<b>40</b>
A.2.1 Το μιτοχόνδριο .....	40
A.2.1.1 Δομή και οργάνωση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA).....	41
A.2.2 Οξειδωτικό stress .....	45
A.2.3 Η νόσος του Parkinson αποτελεί μιτοχονδριακή διαταραχή.....	47
A.2.4. Η $\alpha$ -synuclein συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια ασθενών με νόσο του Parkinson. ...	49
<b>Κεφάλαιο 3: Μοντελοποίηση της νόσου του Parkinson</b> .....	<b>51</b>
A.3.1 Εισαγωγή.....	51
A.3.2 Τοξικά μοντέλα .....	52
A.3.2.1 MPTP .....	52
A.3.2.2 6-OHDA.....	54
A.3.2.3 Rotenone. ....	55
A.3.2.4 Paraquat.....	56
A.3.3 Γενετικά και συνδυαστικά μοντέλα .....	69
A.3.4 Κυτταροπλασματικά Υβρίδια (Cytoplasmic hyBRIDS–Cybrids) .....	61
<b>B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ</b> .....	<b>65</b>
<b>Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>67</b>

## **Γ.1 ΥΛΙΚΑ 67**

Γ.1.1 Αναλώσιμα.....	67
Γ.1.2 Διαλύματα – Χημικά αντιδραστήρια – Θρεπτικά υλικά.....	67
Γ.1.2.1 Διαλύματα μοριακής βιολογίας που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο .....	68
Γ.1.2.2. Διαλύματα μοριακής βιολογίας του εμπορίου.....	70
Γ.1.2.3 Διαλύματα κυτταρικής βιολογίας που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο ..	71
Γ.1.2.4 Διαλύματα κυτταρικής βιολογίας του εμπορίου.....	71
Γ.1.2.5 Θρεπτικά υλικά και διαλύματα κυτταροκαλλιιεργειών .....	71
Γ.1.3 Χημικοί αναστολείς – επαγωγείς .....	72
Γ.1.4 Αντισώματα.....	72
Γ.1.5 Πλασμίδια .....	74
Γ.1.6 Εκκινητές .....	75
Γ.1.7 Λογισμικό.....	76
Γ.1.8 Εξοπλισμός.....	76
<b>Γ.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>78</b>
Γ.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων.....	78
Γ.2.1.1 Ανακαλλιέργεια των SH-SY5Y κυττάρων με τη χρήση θρυψίνης .....	78
Γ.2.1.2 Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer .....	79
Γ.2.1.3 Αποθήκευση κυτταρικών σειρών .....	80
Γ.2.1.4 Απόψυξη των κυττάρων .....	80
Γ.2.2 Νευρική διαφοροποίηση των κυττάρων SH-SY5Y .....	80
Γ.2.3 Διαμόλυνση των κυττάρων (Transfection) .....	81
Γ.2.4 Προετοιμασία κυττάρων για ανάλυση FACS .....	82
Γ.2.5 Έμμεσος ανοσοφθορισμός .....	83
Γ.2.6 Απομόνωση ολικού RNA από ευκαρυωτικά κύτταρα.....	85
Γ.2.6.1 Καθαρισμός του απομονωμένου RNA από το DNA.....	86
Γ.2.7 Αντίστροφη Μεταγραφή .....	87
Γ.2.8 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) .....	88
Γ.2.8.1 Σχεδιασμός εκκινητών .....	89
Γ.2.8.2 Σύσταση μίγματος αντίδρασης και πρόγραμμα στο θερμοκυκλοποιητή για τα διάφορα ζεύγη εκκινητών .....	90
Γ.2.8.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Q-PCR) .....	90



Γ.2.8.4 Η τιμή Ct (threshold cycle – το κατώφλι του κύκλου).....	91
Γ.2.8.5 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην Q-PCR .....	92
Γ.2.8.6 Σύσταση μίγματος και συνθήκες της αντίδρασης Q-PCR .....	92
Γ.2.9 Ενίσχυση μιτοχονδριακού DNA .....	93
Γ.2.10 Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από νευρικά κύτταρα.....	94
Γ.2.10.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	95
Γ.2.11 Ανοσοαποτύπωση (Western blot).....	95
Γ.2.11.1 Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμιδίου .....	95
Γ.2.11.2 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης .....	98
Γ.2.11.3 Επώαση της μεμβράνης με ειδικά αντισώματα και ανίχνευση των πρωτεϊνών .....	99
Γ.2.12 Διαδικασία διαχωρισμού πρωτεϊνών που προσδέονται στη χρωματίνη - Chromatin Binding Assay (CBA) .....	100
Γ.2.13 Διαχωρισμός μιτοχονδριακών κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων (Subcellular fractionation protocol).....	101
Γ.2.14 Απομόνωση γενωμικού DNA από SH-SY5Y κύτταρα .....	102
Γ.2.14.1 Καθαρισμός του DNA με τους οργανικούς διαλύτες φαινόλη και χλωροφόρμιο .....	103
Γ.2.15 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation IP) .....	104
Γ.2.16 Φασματομετρία μάζας και ταυτοποίηση πρωτεϊνών ολικού κυτταρικού κλάσματος.....	106
Γ.2.16.1 Χρώση πηκτής SDS– πολυακρυλαμιδίου με τη χρωστική Coomassie brilliant blue R-250 .....	106
Γ.2.16.2 Ανάλυση με φασματοφωτομετρία μάζας (Mass spectrometry).....	107
Γ.2.16.3 Λειτουργική ανάλυση και ανάλυση των μονοπατιών των υποθετικών LonP1αλληλεπιδρώντων μορίων. ....	108
Γ.2.17 Προσδιορισμός του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης ΔΨm με τη χρωστική JC-1 .....	109
Γ.2.18 Αναλυτικός προσδιορισμός ATP (5'-Adenosine-triphosphoricacid - ATP).....	109
Γ.2.19 Στατιστική ανάλυση.....	110
<b>Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>111</b>

<b>ΜΕΡΟΣ Α: Εγκαθίδρυση ενός <i>in vitro</i> χρόνιου μοντέλου μελέτης της νόσου του Parkinson.....</b>	<b>111</b>
Δ.Α.1 Τα κύτταρα SHSY5Y ως κατάλληλο νευρικό κυτταρικό μοντέλο.....	111
Δ.Α.2 Ανάπτυξη ενός <i>in vitro</i> κυτταρικού μοντέλου για τη νόσο PD μετά από χρόνια έκθεση στη νευροτοξίνη 6-OHDA .....	112
Δ.Α.2.1 Τα έγκλειστα $\alpha$ -synuclein που σχηματίζονται στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA έχουν συσσωρεύσει στο εσωτερικό τους P- $\alpha$ -synuclein στη σερίνη 129 .....	115
Δ.Α.3 Έλεγχος της μιτοχονδριακής λειτουργίας στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στην τοξίνη 6-OHDA .....	116
Δ.Α.4 Η παρουσία της τοξίνης 6-OHDA για 16 συνεχόμενες γενιές δεν έχει καμία επίδραση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αλλά προκαλεί επιμήκυνση της φάσης G2-M του κυτταρικού κύκλου .....	119
Δ.Α.5 Η παρουσία της τοξίνης 6-OHDA για 16 συνεχόμενες γενιές επηρεάζει αρνητικά το δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων. ....	122
Δ.Α.6. Η χρόνια έκθεση στην τοξίνη 6-OHDA έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3/Akt στη γενιά P:16. ....	124
Δ.Α.7 Η παρουσία της τοξίνης 6-OHDA στα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της $\alpha$ -synuclein στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων.....	127
Δ.Α.8 Η μετακίνηση της $\alpha$ -synuclein στα μιτοχόνδρια συνοδεύεται από τη συσσώρευση του μεταγραφικού παράγοντα FOXO3a στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. ....	129
Δ.Α.9 Η χρόνια έκθεση στην τοξίνη 6-OHDA είχε ως αποτέλεσμα μεταβολές στα δομικά γονίδια της μιτοχονδριακής λειτουργίας καθώς και σε γονίδια που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική άμυνα.....	131
Δ.Α.10 Έλεγχος του mtDNA για μεταλλάξεις ή απαλοιφές με τη μεθοδολογία του «εν τω βάθει» νουκλεοτιδικής αλληλούχησης (Deep Sequencing). ....	133
Δ.Α.11 Χορήγηση Φολικού οξέος (Folic acid – FA) στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA .....	140
Δ.Α.12 Χρήση χημικών αναστολέων στη γενιά P:12 .....	143
Δ.Α.13 Υπερέκφρασης της αγρίου τύπου (WT) και της μεταλλαγμένης $\alpha$ -synuclein (A30P) .....	144

<b>ΜΕΡΟΣ Β: Η ταυτοποίηση της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 στο χρόνιο μοντέλο μελέτης της νόσου του Parkinson.....</b>	<b>149</b>
Δ.Β.1 Έλεγχος για τον εντοπισμό πρωτεϊνών των οποίων το πρότυπο αλλάζει σε συνθήκες PD κάνοντας χρήση του αναστολέα του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας Rotenone και εντοπισμός της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1.....	149
Δ.Β.2 Η φυσιολογική λειτουργία της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1. ....	152
Δ.Β.2.1 Η σημασία τη πρωτεάσης LonP1 στο μηχανισμό ποιοτικού ελέγχου των μιτοχονδρίων.....	154
Δ.Β.3 Η απορρύθμιση της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 επιβεβαιώνεται και σε συνθήκες σχηματισμού εγκλειστών <i>α-synuclein</i> με τη χρήση των αναστολέων rotenone και 6-OHDA. ....	155
Δ.Β.4 Έλεγχος της συμπεριφοράς της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA.....	157
Δ.Β.5 Ο εντοπισμός της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 στη χρωματίνη στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA.....	158
Δ.Β.5.1. Η βιοπληροφορική ανάλυση της πρωτοταγούς αλληλουχίας της LonP1 αποκάλυψε μια πιθανή αλληλουχία NLS υπεύθυνη για τη μεταφορά της στον πυρήνα .....	162
Δ.Β.6 Έλεγχος για πιθανά αλληλεπιδρώντα μόρια με τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1 στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA .....	164
Δ.Β.7 Ταυτοποίηση με Φασματομετρία μάζας (MS) των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη LonP1 .....	165
Δ.Β.8 Ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας για τα πιθανά αλληλεπιδρώντα μόρια με τη LonP1 .....	167
Δ.Β.9 Ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας για τα πιθανά αλληλεπιδρώντα μόρια που εντοπίζονται στον πυρήνα.....	170
Δ.Β.10 Επιβεβαίωση της φυσιολογικής αλληλεπίδρασης της Hsp90 με τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1 .....	173
<b>ΜΕΡΟΣ Γ: Δημιουργία Κυτταροπλασματικών Υβριδίων (CYtoplasmic hyBRIDS - cybrids) αντικαθιστώντας τα μιτοχόνδρια υγιών νευρικών κυττάρων με τα μιτοχόνδρια ασθενών με κληρονομική μορφή της νόσου του Parkinson.....</b>	<b>175</b>
Δ.Γ.1 Τα cybrids (CYtoplasmic hyBRID) ως <i>in vitro</i> μοντέλο μελέτης της	

νόσου του Parkinson.....	175
Δ.Γ.2 Δημιουργία $\rho^0$ κυττάρων (Rho 0)..	176
Δ.Γ.2.1. Πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για τα $\rho^0$ κύτταρα.	179
Δ.Γ.3 Δημιουργία SH-SY5Y Κυτταροπλασματικών Υβριδίων (Cytoplasmic Hybrids - cybrids).	181
Δ.Γ.3.1. Απομόνωση αιμοπεταλίων από φλεβικό αίμα..	182
Δ.Γ.3.2 Διαδικασία σύντηξης των αιμοπεταλίων (κύτταρα δότες μιτοχονδρίων) με τα $\rho^0$ SH-SY5Y κύτταρα (κύτταρα δέκτες μιτοχονδρίων).	183
Δ.Γ.4 Δημιουργία Cybrid κυτταρικών σειρών που περιέχουν μιτοχόνδρια ασθενών με την κληρονομική μορφή νόσο του Parkinson.	187
Δ.Γ.5 Έλεγχος του mtDNA για μεταλλάξεις ή απαλοιφές στις Cybrids κυτταρικές σειρές που προέρχονται από το γενεαλογικό δέντρο με οικογενή νόσο του Parkinson με τη μεθοδολογία του «εν τω βάθει» νουκλεοτιδικής αλληλούχησης (Deep Sequencing)..	191
<b>E. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>197</b>
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....</b>	<b>207</b>
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....</b>	<b>211</b>
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ.....</b>	<b>215</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>217</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος του Parkinson (PD) είναι μια προοδευτική κινητική νευροεκφυλιστική διαταραχή η οποία προσβάλλει περίπου το 1% των ενηλίκων ηλικίας άνω των 60 ετών. Οφείλεται στην εκλεκτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας και χαρακτηρίζεται από συσσώρευση συσσωματωμάτων ινδιακής μορφής της πρωτεΐνης  $\alpha$ -synuclein και εξασθένηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Η  $\alpha$ -synuclein είναι μια μικρή όξινη πρωτεΐνη αποτελούμενη από 140 αμινοξέα, η οποία εντοπίζεται κυρίως στις προσυναπτικές νευρικές απολήξεις. Αυξημένη έκφραση της άγριου τύπου  $\alpha$ -synuclein οδηγεί σε δυσλειτουργία των ντοπαμινεργικών νευρώνων σε διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών. Τα μιτοχόνδρια είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση και λειτουργία των νευρικών κυττάρων, καθώς είναι οι βασικοί ρυθμιστές του μεταβολισμού της ενέργειας, της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης του ασβεστίου, της αναλογίας  $NAD^+/NADH$ , της παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου και της απόπτωσης. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία επάγει τη συσσωμάτωση της  $\alpha$ -synuclein, η οποία και αποτελεί το κύριο συστατικό των σωματίων του Lewy, ενώ από την άλλη πλευρά η  $\alpha$ -synuclein μπορεί να οδηγήσει σε δοσοεξαρτώμενη απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης  $\Delta\psi_m$ . Οι μηχανισμοί που διέπουν την αλληλεπίδραση μεταξύ της  $\alpha$ -synuclein και τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία καθώς και η πιθανή συμμετοχή τους στη νευροεκφύλιση δεν είναι ακόμη σαφείς. Στόχος αυτής της διατριβής ήταν η δημιουργία κατάλληλων κυτταρικών μοντέλων για τη διερεύνηση των μοριακών αλληλεπιδράσεων και των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην προοδευτική εκδήλωση της νόσου του Parkinson, με επίκεντρο την επίδραση της  $\alpha$ -synuclein στη μιτοχονδριακή λειτουργία. Ως τέτοια μοντέλα επιλέξαμε την ανάπτυξη κυττάρων κάτω από συνθήκες που επιβαρύνουν την κατάσταση των μιτοχονδρίων στα νευρικά κύτταρα όπως η έκθεση σε νευροτοξίνες που αυξάνουν το φορτίο των ελεύθερων ριζών, καθώς και τη δημιουργία μιας ιδιαίτερης κατηγορίας υβριδικών κυττάρων (cybrids) αντικαθιστώντας τα μιτοχόνδρια υγιών νευρικών κυττάρων με τα μιτοχόνδρια ασθενών με κληρονομικές μορφές της νόσου. Αναπτύξαμε και χαρακτηρίσαμε και τα δύο μοντέλα. Η λεπτομερής ανάλυση του πρώτου από αυτά, οδήγησε στην ταυτοποίηση της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης LonP1, μιας πρωτεΐνης που ήταν ήδη γνωστή για το ρόλο της στην ομαλή λειτουργία των μιτοχονδρίων. Τα πειράματά μας αποκάλυψαν για πρώτη φορά, μια πιθανή σύνδεση αυτής της πρωτεΐνης με την εμφάνιση παθολογικών χαρακτηριστικών της νόσου στα νευρικά κύτταρα, όπως η συσσωμάτωση της  $\alpha$ -synuclein και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.

Για την ανάπτυξη του πρώτου μοντέλου, καλλιεργήσαμε κύτταρα νευρικής προέλευσης, υπό συνθήκες ήπιας αλλά συνεχούς (χρόνιας) πρόκλησης οξειδωτικού *stress*. Χρησιμοποιήθηκαν τα ανθρώπινα νευροβλαστωματικά κύτταρα SHSY5Y και η κατεχολαμινεργική νευροτοξίνη 6-υδροξυνοτοπαμίνη (6-OHDA), ένα υδροξυλιωμένο ανάλογο της ντοπαμίνης (DA). Η ουσία αυτή συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, επάγει το σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου και αναστέλλει τη δραστηριότητα του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Διαπιστώσαμε ότι η χρόνια έκθεση των SHSY5Y κυττάρων στις συγκεντρώσεις 1  $\mu\text{M}$  και 5  $\mu\text{M}$  6-OHDA για 16 συνεχόμενες γενιές (passages, P) επάγει το σχηματισμό εγκλειστών  $\alpha$ -synuclein (τα οποία αρχίζουν να εμφανίζονται από τη γενιά P:12), όπως επίσης και μια σημαντική αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης, στη γενιά P:16. Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα ήταν η παρατήρηση ότι ορισμένα από τα έγκλειστα, παρουσιάζουν μορφολογία σωματίων του Lewy, αφού περικλείουν στο εσωτερικό τους τη φωσφορυλιωμένη μορφή της  $\alpha$ -synuclein στο κατάλοιπο σερίνης 129 (S129). Αυτοί οι φαινότυποι συνοδεύονται από μείωση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης  $\Delta\psi_m$  και αυξημένη μετακίνηση της  $\alpha$ -synuclein στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, κάτω από τις ίδες συνθήκες παρατηρήθηκε ενεργοποίηση, και είσοδος των ενεργών μορφών της κινάσης Akt, καθώς και του μεταγραφικού παράγοντα FOXO3a στα μιτοχόνδρια.

Ανάλυση με φασματομετρία μάζας μιτοχονδριακών εκχυλισμάτων, για την εύρεση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών οι οποίες απορρυθμίζονται σε κύτταρα SH-SY5Y τα οποία υπερεκφράζουν άγριου τύπου ή μεταλλαγμένες μορφές της  $\alpha$ -syn και έχουν εκτεθεί σε rotenone, αποκάλυψε ένα σύνολο πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων ήταν πρωτεΐνες απόκρισης στο *stress*, καθώς και η μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1. Σε συνθήκες υπερέκφρασης της  $\alpha$ -synuclein σε συνδυασμό με τη χρήση των νευροτοξινών rotenone και 6-OHDA παρατηρήθηκε μια έντονη αυξορύθμιση της LonP1. Περαιτέρω έλεγχος στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης αποκάλυψε μια έντονη μετατόπιση της πρωτεάσης στο κυτταρικό διαμέρισμα του πυρήνα, ενώ η βιοχημική ανάλυση έδειξε ότι η πρωτεΐνη αυτή κατανέμεται στο κλάσμα των πρωτεϊνών που συνδέονται ισχυρά με την χρωματίνη. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης για την LonP1 σε συνδυασμό με ανάλυση φασματομετρίας μάζας οδήγησαν στην ταυτοποίηση μιας σειράς πρωτεϊνών οι οποίες αλληλεπιδρούν με την πρωτεάση μόνο στις συνθήκες εμφάνισης των παθολογικών κυτταρικών χαρακτηριστικών, στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης. Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται κυρίως σε βιολογικές διαδικασίες σχετικές με την αντιγραφή του DNA, τη

μεταγραφή και τη μετάφραση. Η συγκριτική πρωτεωμική ανάλυση επιλεκτικά για τις πυρηνικές πρωτεΐνες, αποκάλυψε ριβοσωμικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες που δεσμεύονται και αλληλεπιδρούν με το DNA, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή και μεταγραφή του DNA, στη λειτουργία του πρωτεασώματος κ.α. Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν το ενδεχόμενο εμπλοκής της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 σε ένα νέο ρόλο εντός του πυρήνα, αφήνοντας ανοιχτό το ενδεχόμενο να αποτελεί κομβικό μόριο στην επικοινωνία μεταξύ μιτοχονδρίου και πυρήνα (για παράδειγμα, επηρεάζοντας την έκφραση επιλεγμένων γονιδίων του πυρήνα ως ως απάντηση στο ήπιο οξειδωτικό *stress*). Τέλος, από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης επιβεβαιώθηκε ότι η Hsp90 αλληλεπιδρά άμεσα με την LonP1, μια παρατήρηση που δεν ήταν προηγούμενα γνωστή.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη οδήγησε στην ανάπτυξη ενός αξιόπιστου *in vitro* συστήματος για τη μελέτη του προοδευτικού χαρακτήρα της νόσου του Parkinson. Με μια σειρά βιοχημικών και κυτταροβιολογικών μεθόδων αποδείξαμε ότι στο σύστημα αυτό αναπαράγονται πολλά από τα παρκινσονιακά χαρακτηριστικά που έχουν κατά καιρούς αναφερθεί σε προηγούμενες *in vitro* και *in vivo* μελέτες, και μάλιστα με μια συγκεκριμένη χρονική ακολουθία, και ταυτοποιήσαμε έναν νέο ρόλο για τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1 στον πυρήνα, πιθανά σημαντικό για την πορεία της νόσου Parkinson. Τέλος, εστιάζοντας στη μιτοχονδριακή λειτουργία, εγκαθιδρύσαμε και αναπτύξαμε υβριδικές κυτταρικές σειρές, οι οποίες περιέχουν μιτοχόνδρια ασθενών με την κληρονομική μορφή της νόσου του Parkinson, καθώς και από υγιή συγγενικά τους άτομα. Ακολούθησε πλήρης χαρακτηρισμός αυτών των σειρών, όσον αφορά βασικές κυτταρικές ιδιότητες όπως είναι η λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων, ο πολλαπλασιασμός και η ικανότητα διαφοροποίησής τους, και έγινε έλεγχος του βαθμού των νουκλεοτιδικών αλλαγών που έχουν συσσωρευτεί στη μιτοχονδριακή αλληλουχία, με μεθοδολογία αλληλούχισης νέας γενιάς (*deep sequencing*). Παρότι δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές μεταξύ «PD» και «υγιών» *cybrids*, τα κύτταρα αυτά παραμένουν στη διάθεσή μας ως ένα πολύτιμο πειραματικό μοντέλο το οποίο σε συνδυασμό με το μοντέλο του χρόνιου *stress* θα μπορούσε μελλοντικά να συμβάλλει στην κατανόηση του ρόλου της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στην νόσο του Parkinson.





## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive, neurodegenerative movement disorder that affects approximately 1% of adults aged 60 and over. It is characterized by the selective degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra, accumulation of  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) fibrils, and impaired mitochondrial function. Alpha-synuclein is a small acidic protein consisting of 140 amino acids, located mainly in the presynaptic terminals. Increased expression of wild type  $\alpha$ -syn leads to dopaminergic neuron degeneration in transgenic mouse models. Mitochondria are vital for neuronal cell survival and function, as they are key regulators of energy metabolism, intracellular calcium homeostasis, NAD<sup>+</sup>/NADH ratio, generation of endogenous reactive oxygen species and apoptosis. Mitochondrial dysfunction induces  $\alpha$ -syn aggregation, which constitutes the main component of Lewy bodies. On the other hand,  $\alpha$ -syn can lead to a dose-dependent loss of mitochondrial transmembrane potential ( $\Delta\psi_m$ ). The mechanisms underlying the interplay between  $\alpha$ -syn and mitochondrial dysfunction, as well as their potential involvement in neurodegeneration are not yet clear. The aim of this thesis was the generation of relevant cellular models for investigating molecular interactions and signaling pathways that are involved in the progressive appearance of PD-related cell phenotypes, focusing on the influence of  $\alpha$ -synuclein in mitochondrial function. As such models, we considered the exposure of neuronal cells in conditions that lead to mitochondrial impairment, namely the presence of neurotoxins that increase the load of free radicals, and the generation of cytoplasmic hybrid cells (cybrids) by replacing the mitochondria of healthy neuronal cells with the mitochondria from patients with inherited forms of the disease. We developed and characterized both models. The detailed analysis of the first model, led to the identification of mitochondrial LonP1 protease, a protein already known for its role in protein quality control in mitochondria. Our experiments uncovered a previously unknown connection of this protein with the occurrence of pathological features of the disease in the neuronal cells, such as  $\alpha$ -synuclein aggregation and mitochondrial dysfunction.

In order to develop the first model, we cultured cells of neural origin in conditions of mild but continuous (chronic) oxidative stress challenge. We used the SHSY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells and the catecholaminergic neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA), a hydroxylated analog of dopamine (DA). This substance is accumulated in the cytoplasm, induces the formation of hydrogen peroxide and inhibits the activity of the mitochondrial respiratory chain complex I. We found that prolonged

exposure of SHSY5Y cells to low concentrations of 6-OHDA (1 $\mu$ M and 5 $\mu$ M) for 16 consecutive cell passages (P:16) induces formation of  $\alpha$ -synuclein inclusions (which are starting to emerge from P:12), and leads to a significant increase in  $\alpha$ -syn protein levels. Importantly, some of these inclusions exhibit Lewy body appearance as revealed by the phosphorylation of  $\alpha$ -syn at the serine residue 129 (S129). These phenotypes are accompanied by a reduction of the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ), and an increased accumulation of  $\alpha$ -syn in mitochondria. Furthermore, under the same conditions we observed activation and translocation of the active forms of Akt kinase and the transcription factor FOXO3a in mitochondria.

A mass spectrometry screen to identify mitochondrial proteins that are differentially expressed in rotenone-stressed SH-SY5Y cells overexpressing wild-type or mutant forms of alpha-synuclein revealed a set of proteins, including the mitochondrial protease LonP1. A marked upregulation of LonP1 was observed in conditions where the cells were overexpressing  $\alpha$ -synuclein in the presence of 6-OHDA, but not in either condition alone. Further scrutiny in the chronic model revealed a considerable translocation of this protease in the nucleus of the treated cells, and biochemical fractionation revealed a tight association of LonP1 with the chromatin. Immunoprecipitation experiments combined with mass spectrometry (MS) led to the identification of proteins that interact with LonP1 selectively in the PD-related conditions. These proteins are mainly involved in biological processes related to DNA replication, transcription and translation as well as in proteasome function. These findings put forward a new role of the mitochondrial protease LonP1 in the nucleus, and leave open the possibility that LonP1 may be a key molecule in the communication between mitochondria and nucleus (for example, by affecting the expression of selected nuclear genes in response to a mild oxidative stress). The immunoprecipitation experiments confirmed that Hsp90 interacts directly with LonP1, an observation that was previously unknown.

In conclusion, this study has led to the development of a reliable *in vitro* system to study the progression of Parkinson's disease. By using a series of biochemical and cell biology approaches we demonstrated that this system can faithfully recapitulate many of the key PD features that have been reported in previous *in vitro* and *in vivo* studies, in a chronological order, and we have identified a new role of the mitochondrial protease LonP1 in the nucleus, probably important for the advancement of Parkinson's disease. Finally, focusing on the mitochondrial function, we developed cybrid cell lines containing

mitochondria from patients with the inherited form of PD as well as from healthy relatives. We characterized basic cellular properties such as mitochondria function, proliferation and differentiation potential, and examined possible nucleotide changes using next generation sequencing approaches (deep sequencing). Although no differences were detected between «PD» and «healthy» cybrids, these cell lines constitute a valuable experimental model, which in conjunction with the chronic stress model could be explored in future studies to contribute to the understanding of the role of mitochondria dysfunction in Parkinson's disease.



# **A. Εισαγωγή**

## **Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>**

### **Νόσος του Parkinson**

#### **A.1.1 Η νόσος του Parkinson ( Parkinson's Disease, PD)**

Η νόσος του Parkinson αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή νευροεκφυλιστική διαταραχή, μετά το Alzheimer (Tanner and Aston 2000). Η νόσος προσβάλλει περίπου το 1% των ενηλίκων ηλικίας άνω των 60 ετών, ενώ υπάρχουν περιπτώσεις εμφάνισης και σε ηλικία μικρότερη των 40 ετών (early onset Parkinsonism). Οφείλεται στην εκλεκτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας και χαρακτηρίζεται από συσσώρευση ινιδιακών συσσωματωμάτων μιας πρωτεΐνης, της  $\alpha$ -synuclein. Η πρώτη περιγραφή της νόσου έγινε το 1817 από τον Άγγλο γιατρό James Parkinson στην μελέτη του με τίτλο «An Essay on the Shaking Palsy». Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά είναι η βραδυκινησία (δυσκολία ή αποτυχία εκτέλεσης εκούσιων κινήσεων), ο τρόμος κατά την ηρεμία, η δυσκαμψία και οι διαταραχές της στάσης και της βάδισης (αστάθεια θέσης) (Jankovic 2008). Το 1912 ο Lewy περιέγραψε την παρουσία κυτταροπλασματικών εγλείστων γνωστά ως σωματίδια του Lewy (LBs) στη διάμεση φαιά ουσία του εγκεφάλου ασθενών. Τα σωματίδια του Lewy αποτελούν τυπικό ιστοπαθολογικό γνώρισμα της νόσου με βασικό συστατικό τα ινίδια της  $\alpha$ -synuclein (1997). Της εκδήλωσης της νόσου προηγείται πολυετής ασυμπτωματική απώλεια νευρικών κυττάρων, ενώ κατά την έναρξη της νόσου περίπου το 60% των νευρικών κυττάρων στις προσβληθείσες περιοχές του εγκεφάλου έχουν καταστραφεί. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση στην παραγωγή της ντοπαμίνης, αλλοιώσεις στα νευρικά γάγγλια και την εμφάνιση των κινητικών συμπτωμάτων. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων της νόσου είναι σποραδική (Feng and Maguire-Zeiss 2010), ενώ η αιτιολογία και η παθογένεση παραμένουν αινιγματικές (Brundin, Li et al. 2008). Η νόσος του Parkinson αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο άμεσα σχετιζόμενη με τη γήρανση. Η προέλευση και η εξέλιξη της φαίνεται να οφείλεται τόσο σε γενετική προδιάθεση όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η τρέχουσα φαρμακολογική θεραπεία περιλαμβάνει τη χρήση ενός πρόδρομου μορίου της ντοπαμίνης, της L-dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine), το οποίο ανακουφίζει τη βραδυκινησία, την αύξηση του μυϊκού τόνου και τον τρόμο, αλλά δεν έχει

καμία επίδραση στη μείωση των μη-κινητικών συμπτωμάτων (Mercuri and Bernardi 2005).

### **A.1.2 Τα κλινικά συμπτώματα της νόσου του Parkinson**

Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου του Parkinson είναι η βραδυκινησία (δυσκολία ή αποτυχία εκτέλεσης εκούσιων κινήσεων), ο τρόμος κατά την ηρεμία, η δυσκαμψία και οι διαταραχές της στάσης και της βάδισης (αστάθεια θέσης) (Jankovic 2008).

Η βραδυκινησία αποτελεί το πιο χαρακτηριστικό και επίμοχθο κλινικό γνώρισμα της νόσου. Η αρχική εκδήλωση της βραδυκινησίας γίνεται αντιληπτή από τον αργό ρυθμό πραγματοποίησης και αντίδρασης στις καθημερινές δραστηριότητες, καθώς και από την επιτέλεση λεπτών κινήσεων. Συνέπειες της βραδυκινησίας είναι η μειωμένη εκφραστικότητα - υπομιμία (καθλωμένο, ανέκφραστο προσωπείο), η ελαττωμένη αιώρηση του άνω άκρου κατά τη βάδιση, η μονότονη και υποτονική δυσαρθρία, η μικρογραφία, η ακούσια σύσπαση των βλεφάρων, η δυσκαμψία των άκρων, η σιελόρροια, η δυσκολία στην έναρξη της βάδισης και το χαρακτηριστικό βάδισμα με μικρά, συρόμενα βήματα (Jankovic 2008).

Ο τρόμος ηρεμίας είναι το πιο εύκολα αναγνωρίσιμο χαρακτηριστικό κλινικό σύμπτωμα της νόσου. Εμφανίζεται με συχνότητα μεταξύ 4 και 6 Hz, και σχεδόν πάντα είναι εμφανές στο περιφερικό τμήμα του ενός άκρου, συνήθως είναι ασύμμετρος δηλαδή στο ένα χέρι ή πόδι. Ο τρόμος ηρεμίας σε ασθενείς με PD μπορεί επίσης να είναι εμφανής στα χείλη, το πηγούνι, το σαγόνι και τα πόδια. Συνήθως δεν εντοπίζεται στην κεφαλή ή στη φωνή, καθώς είναι και ένα σύμπτωμα που μπορεί να εκλείπει τελείως. Ο τρόμος ηρεμίας παύει κατά τη διάρκεια μια ενέργειας όπως και κατά τη διάρκεια του ύπνου.

Η δυσκαμψία χαρακτηρίζεται από αυξημένη αντίσταση και οφείλεται στην αύξηση του μυϊκού τόνου λόγω της εξωπυραμιδικής υπερτονίας. Είναι ουσιαστικά το φαινόμενο που είναι υπεύθυνο για τον πόνο στους ασθενείς, και είναι είτε διάχυτο είτε εντοπισμένο σε ένα άκρο ή στον κορμό. Κλινικά εκδηλώνεται είτε με το φαινόμενο του “οδοντωτού τροχού” (δίνει την αίσθηση «γραναζιού»), όπου ο ασθενής συναντά αντίσταση κατά την αργή, παθητική κίνηση μιας άρθρωσης, πχ. του καρπού, είτε με το φαινόμενο του “μολυβδοσωλήνα”, όπου συναντά μία σταθερής αντίστασης καθ’ όλο το εύρος της παθητικής κίνησης (Jankovic 2008).

Η αστάθεια (έλλειψη στατικής ισορροπίας) αποτελεί κλινικό χαρακτηριστικό στα προχωρημένα στάδια της νόσου. Χαρακτηριστικό της αστάθειας είναι η «καμπτοκορμία», δηλαδή η κάμψη προς τα εμπρός, η οποία αρχικά εντοπίζεται στον αυχένα («πτώση κεφαλής») και έπειτα στον κορμό. Η «καμπτοκορμία» ουσιαστικά αποτελεί προσπάθεια αντιρρόπησης και είναι το κυριότερο αίτιο πτώσεων των παρκινσονιακών ασθενών (Jankovic 2008).

Από τις κινητικές διαταραχές της PD χαρακτηριστικό είναι το φαινόμενο «freezing», όπου ο ασθενής έχει την αίσθηση ότι τα πόδια του είναι κολλημένα στο δάπεδο. Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται στο 1/3 περίπου των ασθενών και αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου (Berardelli, Rothwell et al. 2001). Επιπλέον κλινικό γνώρισμα είναι η «παράδοξη κινητικότητα» όπου ο ασθενής από τη φάση ακινησίας κάνει ξαφνικά απρόσμενα γρήγορες κινήσεις εάν αναστατωθεί.

Τέλος, το φαινόμενο «stops walking when talking» συνίσταται στην παραχώρηση «προτεραιότητας» στη νοητική εντολή σε σχέση με την εκτέλεση της κίνησης, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αυξημένου κινδύνου πτώσεων στους παρκινσονιακούς ασθενείς (Jankovic 2008).

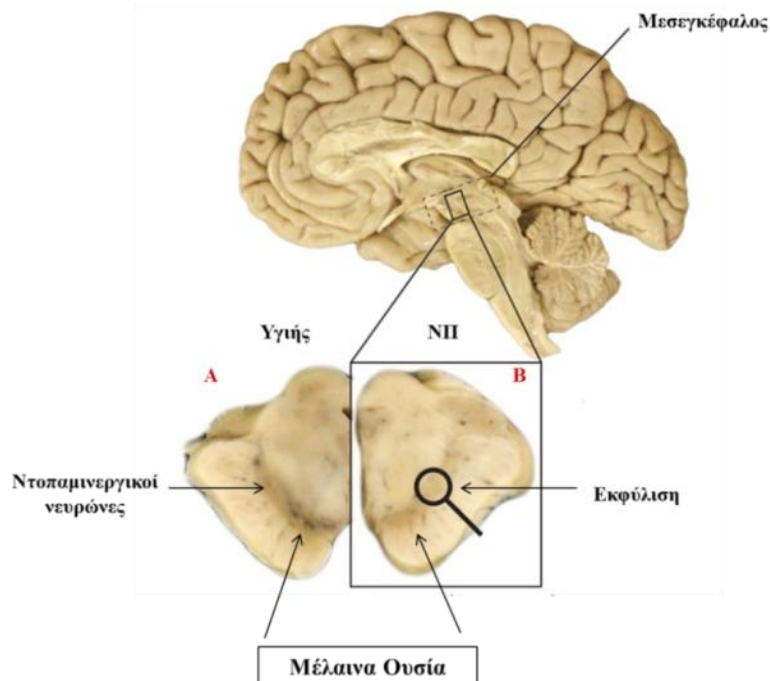
Τα προαναφερθέντα κινητικά συμπτώματα της νόσου γίνονται εμφανή μετά την εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μελαινοραβδωτής οδού σε ποσοστό 50–60%, και την εξάντληση των αποθεμάτων ντοπαμίνης σε ποσοστό 70–80% (Gibb and Lees 1991) Αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη ενός ισχυρού μηχανισμού αντιστάθμισης στα πρώιμα στάδια της νόσου (Bernheimer, Birkmayer et al. 1973).

Παράλληλα η πλειοψηφία των ασθενών εμφανίζουν σταδιακά και μη κινητικά προβλήματα όπως διαταραχές του Αυτόνομου Νευρικού Συστήματος, διαταραχές ύπνου με κύρια αυτών τη διαταραχή συμπεριφοράς του ύπνου REM, υποσμία (ελαττωμένη όσφρηση), πόνοι συνήθως στον ώμο (frozen shoulder), εύκολη κόπωση, γνωστική εξασθένηση και άνοια, ψευδαισθήσεις και κατάθλιψη. Εν κατακλείδι τα μη κινητικά συμπτώματα συνυπάρχουν με τα κινητικά και επηρεάζουν στον ίδιο βαθμό την ποιότητα ζωής του ασθενή.

### **A.1.3 Τα Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της νόσου του Parkinson**

Το κυριότερο παθολογοανατομικό χαρακτηριστικό της νόσου του Parkinson είναι η εκτεταμένη εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Dopaminergic neuron, DA),

κυρίως στην περιοχή της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας (substantia nigra pars compacta, SNpc), Εικόνα 1. Το 1912 ο Frederick H. Lewy περιέγραψε την παρουσία κυτταροπλασματικών εγλείστων στη διάμεση φαιά ουσία του εγκεφάλου ασθενών. Τα κυτταροπλασματικά αυτά έγκλειστα πρωτεϊνών είτε έχουν ατρακτοειδή μορφή και καλούνται νευρίτες του Lewy (Lewy Neurites, LNs), ή εντοπίζονται στο σώμα των ενεχόμενων κυττάρων, έχουν σφαιρική μορφή και αποτελούν τα σωμάτια Lewy (Lewy Bodies, LBs) (Takahashi and Wakabayashi 2001).



**Εικόνα 1. Παθολογοανατομία της νόσου του Parkinson. Σχηματική απεικόνιση της εκφύλισης των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην περιοχή της μέλαινας ουσίας. Α. σε ένα υγιές άτομο, φυσιολογική εκφύλιση λόγω γήρατος και Β. εκτεταμένη εκφύλιση λόγω PD. (Προσαρμογή και τροποποίηση από Dzamko et al., 2014).**

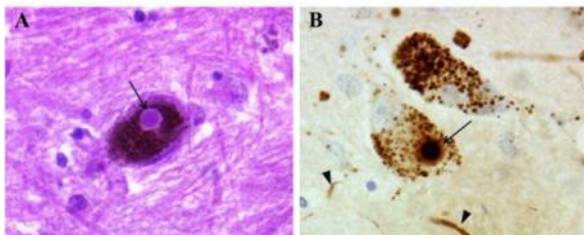
Τα σωμάτια του Lewy αποτελούν το δεύτερο τυπικό ιστοπαθολογικό γνώρισμα της PD στους εναπομείναντες ντοπαμινεργικούς νευρώνες της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας του, με βασικό συστατικό τα ινίδια της  $\alpha$ -synuclein και την ουβικιτίνη (Spillantini, Schmidt et al. 1997). Εκτεταμένη έρευνα χαρακτηρισμού των LBs συνέβαλλε στον εντοπισμό περισσότερων από 70 διαφορετικών πρωτεϊνών, που ανήκουν σε 10 διαφορετικές κλάσεις πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων δομικών στοιχείων, πρωτεϊνών που δεσμεύονται στην  $\alpha$ -synuclein, πρωτεϊνών που δεσμεύονται στην συμφιλίνη-1, στοιχεία του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε



κυτταρικές αποκρίσεις, πρωτεΐνες που σχετίζονται με την φωσφορυλίωση και την μεταγωγή σήματος, πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος και άλλες (Wakabayashi, Tanji et al. 2007), με τον πυρήνα των ινιδίων να αποτελείται αποκλειστικά από  $\alpha$ -synuclein (Crowther, Daniel et al. 2000). Συγκεκριμένα στο εσωτερικό των LBs, εναποτίθεται και συσσωρεύεται κατά κύριο λόγο η φωσφορυλιωμένη μορφή της  $\alpha$ -synuclein στο κατάλοιπο σερίνης 129 (p-S129  $\alpha$ -synuclein), σχηματίζοντας δομές ινιδίων με  $\beta$ -πτυχωτά φύλλα (Fujiwara, Hasegawa et al. 2002). Μορφολογικά, τα σωματία Lewy διακρίνονται σε δύο τύπους:

1) Τα κλασσικά σωματία του Lewy, είναι εύκολα αναγνωρίσιμα μετά από ιστολογική χρώση σαν μεγάλα σφαιρικά ηωσινόφιλα συσσωματώματα. Αποτελούνται από έναν πυρήνα στο κέντρο και έναν περιφερειακό δακτύλιο. Ο πυρήνας αποτελείται κυρίως από κυστιδικές δομές αλλά και από ινίδια, ενώ ο δακτύλιος μόνο από ινίδια, Εικόνα 2.

2) Τα σωματία Lewy του φλοιού είναι ελάχιστα καθορισμένες δομές, με ακανόνιστο σχήμα και χωρίς συχνά να εμφανίζουν διακριτό πυρήνα ή δακτύλιο (Takahashi and Wakabayashi 2001).



**Εικόνα 2. Σωματία του Lewy στη μέλαινα ουσία ασθενούς με νόσο του Parkinson. Α.** Σωματίο του Lewy σε νευρώνα στην περιοχή της μέλαινας ουσίας μετά από ιστοχημική χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη. **Β.** Σωματίο του Lewy σε νευρώνα στην περιοχή της μέλαινας ουσίας μετά από

ανοσοϊστοχημική χρώση με το αντίσωμα της  $\alpha$ -synuclein. Διακρίνεται ένα ενδονευρωνικό σωματίο με καφέ χρώμα. Με την κεφαλή του βέλους διακρίνονται οι νευρίτες Lewy. (Προσαρμογή και τροποποίηση από Taipa et al., 2012).

Υπάρχει πληθώρα ενδείξεων ότι οι νευροπαθολογικές βλάβες στην PD μπορεί να προκύπτουν από το γεγονός ότι η  $\alpha$ -synuclein έχει την ικανότητα να εξαπλώνεται σταδιακά στις γειτονικές περιοχές του εγκεφάλου μέσω ενός διακυτταρικού μηχανισμού μετάδοσης. Στηριζόμενοι σε αυτήν την υπόθεση, οι ασθενείς με PD εμφανίζουν συσσωματώματα της παθολογικής μορφής της  $\alpha$ -synuclein σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου (Ulusoy, Rusconi et al. 2013). Η ύπαρξη των σωματίων Lewy δεν περιορίζεται μόνο στην περιοχή της μέλαινας ουσίας, καθώς έχουν και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου όπως στον υπομέλαινα τόπο (locus coeruleus), το ραχιαίο κινητικό πυρήνα (dorsal motor nucleus), τους πυρήνες της ραφής (raphe nucleus), τον οσφρητικό βολβό (olfactory bulb), τους συμπαθητικούς και παρασυμπαθητικούς μεταγαγγλιονικούς

νευρώνες (parasympathetic and sympathetic post-ganglionic neurons), τον πυρήνα του Meynert (Meynert nucleus), την αμυγδαλή (amygdaloid nucleus) και τον εγκεφαλικό φλοιό (cerebral cortex) (Jellinger 2012). Στην παθολογία των παραπάνω, μη ντοπαμινεργικών περιοχών του εγκεφάλου, οφείλονται πολλά από τα βασικά μη κινητικά συμπτώματα που συνδέονται με την εκδήλωση της νόσου, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την απώλεια της όσφρησης που συνδέεται με την παρουσία των σωματίων και νευριτών Lewy στον οσφρητικό βολβό και στα κέντρα του εγκεφάλου αμυγδαλή και περιρινικός πυρήνας (perirhinal nucleus) (Witt 2010). Τέλος, τα LBs δεν αποτελούν αποκλειστικότητα της PD. Εναποθέσεις  $\alpha$ -synuclein έχουν ανιχνευθεί σε διάφορες νευροεκφυλιστικές διαταραχές όπως στην άνοια με Lewy bodies (Dementia with Lewy Bodies, DLB), στο Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) και στην ατροφία πολλαπλών συστημάτων (multiple system atrophy, MSA). Η βασική διαφορά μεταξύ των διαταραχών είναι οι περιοχές του εγκεφάλου στις οποίες εντοπίζονται τα LBs, με την DLB να εντοπίζονται κυρίως στον εγκεφαλικό φλοιό (cortex), στην AD στην αμυγδαλή (amygdala) και στην MSA στα γλοιακά κύτταρα (glial cells) (Kim, Kagedal et al. 2014). Παρότι τα σωματίνα του Lewy ανακαλύφθηκαν περίπου έναν αιώνα πριν, η σημασία και η συμβολή τους στην παθογένεια της νόσου παραμένει άγνωστη (Goedert, Spillantini et al. 2013).

#### **A.1.4 Αίτια και παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση της νόσου του Parkinson**

Η νόσος του Parkinson αποτελεί ένα εξαιρετικό παράδειγμα νευρολογικής διαταραχής στο οποίο η γήρανση, η γενετική προδιάθεση και η περιβαλλοντική έκθεση συγκλίνουν σε διαφορετικό βαθμό και προκαλούν νευροεκφύλιση. Παρά τις δεκαετίες ερευνών, η αιτία πρόκλησης της ασθένειας παραμένει άγνωστη. Η νόσος του Parkinson κληρονομικής μορφής προκύπτει από μεταλλάξεις σε έναν από τους 18 διαφορετικούς γενετικούς τόπους και αφορά μόνον το 10% των περιπτώσεων (Gasser 2009), ενώ η σποραδική μορφή που αφορά το 90% των περιπτώσεων είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης μεταξύ περιβάλλοντος και γενετικού υπόβαθρου, υπό το πρήσμα της ηλικίας που αποτελεί και τον κυριότερο παράγοντα κινδύνου (Sulzer 2007). Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα περιβαλλοντικού παράγοντα για τη νόσο του Parkinson, αποτελεί η έκθεση στη μιτοχονδριακή τοξίνη MPTP (1-μεθυλο-4-φαινυλο-1,2,3,6,-τετραϋδροπυριδίνη).

#### **A.1.4.1 Η γενετική της νόσου του Parkinson**

Για πολλά χρόνια επικρατούμε η ιδέα ότι η νόσος του Parkinson είναι μια μη γενετική ασθένεια. Πληθυσμιακές μελέτες έδειξαν ότι μπορεί να αποτελέσει και γενετική ασθένεια. Παρότι η κληρονομική μορφή της νόσου αφορά περίπου το 10% του συνόλου των ασθενών, το γενετικό τους υπόβαθρο αποτελεί ένα ευρύ πεδίο μελέτης λόγω της μεγάλης ομοιότητας στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με την σποραδική μορφή της νόσου, που μπορεί να αναδείξουν τους βιοχημικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην εξέλιξη της PD. Όσον αφορά τη γενετική της νόσου μέχρι σήμερα, έχουν ενοχοποιηθεί 18 διαφορετικοί γενετικοί τόποι, οι οποίοι χαρακτηριστικά ονομάζονται με το όνομα PARK (που υποδηλώνει τη συσχέτισή τους με το Parkinson), και έναν αριθμό π.χ. PARK1, PARK2, PARK3, κλπ που αντιστοιχεί στη χρονολογική σειρά συσχέτισης του γενετικού τόπου με τη νόσο.

Το πρώτο γονίδιο που συνδέθηκε με τη νόσο του Parkinson είναι η  $\alpha$ -synuclein - PARK1/4. Αρχικά χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 4q21 μια μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου (A53T) (Polymeropoulos, Higgins et al. 1996), ενώ στη συνέχεια η ίδια μετάλλαξη ανακαλύφθηκε σε οικογένειες ελληνικής και ιταλικής καταγωγής με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονομικότητας (Polymeropoulos, Lavedan et al. 1997). Ακολούθησε η ανακάλυψη δύο ακόμα σημειακών μεταλλάξεων (A30P, E46K) σε δύο ξεχωριστές οικογένειες (Belin and Westerlund 2008). Οι ασθενείς που εκφράζουν τις μεταλλάξεις του γονιδίου συνήθως εμφανίζουν την ασθένεια σε πρώιμο στάδιο. Η άμεση σύνδεση του φυσικού τύπου (wild type-WT) του γονιδίου με τη νόσο έγινε από νεότερες μελέτες, οι οποίες αποκάλυψαν ότι ο διπλασιασμός ή ο τριπλασιασμός του γενετικού τόπου ευθύνεται για την εμφάνιση αυτοσωμικού οικογενούς Parkinson (Singleton, Farrer et al. 2003) (Chartier-Harlin, Kachergus et al. 2004). Συγκεκριμένα οι ασθενείς που φέρουν τριπλασιασμό του γενετικού τόπου εμφανίζουν πιο έντονα συμπτώματα και σε πιο πρώιμα στάδια συγκριτικά με ασθενείς με διπλασιασμό του γενετικού τόπου. Το παραπάνω εύρημα αποτέλεσε ένδειξη ότι η φυσικού τύπου  $\alpha$ -synuclein μπορεί να αποκτήσει παθογόνο δράση και να συμβάλλει στην εμφάνιση και στην πρόοδο της νόσου, με τρόπο δοσο-εξαρτώμενο από την παρουσία της στο κυτταρόπλασμα (Eriksen, Przedborski et al. 2005).

Ο γενετικός τόπος PARK2 ανήκει σε μια E3 λιγάση της ουβικιτίνης, την πρωτεΐνη Parkin (RING domain-containing E3 ubiquitin ligase). Η Parkin καταλύει την προσθήκη αλυσίδων ουβικιτίνης στις πρωτεΐνες που πρέπει να σηματοδοτηθούν προς αποικοδόμηση

στο σύστημα ουβικιτίνης – πρωτεασώματος (ubiquitin–proteasome system, UPS) και η ανακάλυψή της αποτέλεσε την πρώτη απόδειξη εμπλοκής του UPS στη ντοπαμινεργική εκφύλιση (Mata, Lockhart et al. 2004). Η parkin ευθύνεται για το 49% της κληρονομικής και το 19% της σποραδικής μορφής της PD με πρώιμη εμφάνιση (Lucking, Durr et al. 2000). Μεταξύ των υποστρωμάτων της έχει αναγνωριστεί και η  $\alpha$ -synuclein (Cookson 2005). Επίσης η Parkin εμπλέκεται στην αποικοδόμηση και απομάκρυνση των μιτοχονδρίων που έχουν υποστεί σοβαρές βλάβες μέσα από τη διαδικασία της αυτοφαγίας, γνωστή στην προκειμένη ως μιτοφαγία, που αποτελεί έναν από τους κυριότερους μιτοχονδριακούς μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου (Yoshii, Kishi et al. 2011).

Ο γενετικός τύπος PARK5 ανήκει στην πρωτεΐνη UCH-L1 (Ubiquitin C-terminal Hydrolase-L1) που κωδικοποιεί δύο αντίθετες ενζυματικές δραστηριότητες. Είναι μέλος μιας οικογένειας γονιδίων που δρουν σαν υδρολάσες. Το UCH-L1 εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο, καταλύει την υδρόλυση του καρβοξυτελικού άκρου των εστέρων της ουβικιτίνης με αποτέλεσμα την ανακύκλωση των αλυσίδων ουβικιτίνης στα μονομερή της. Η δεύτερη ενζυμική της δραστηριότητα είναι ότι μπορεί να διμερίζεται και να δρα και ως λιγάση της ουβικιτίνης (Liu, Fallon et al. 2002). Έχει εντοπιστεί μία επικρατής μετάλλαξη του γονιδίου η οποία μειώνει τη δράση της UCH-L1 ως λιγάση, και ένας πολυμορφισμός που ενισχύει τη δράση της λιγάσης και προστατεύει έναντι της PD μειώνοντας την πιθανότητα εμφάνισης της σποραδικής μορφής της νόσου (Leroy, Boyer et al. 1998) (Maraganore, Lesnick et al. 2004). Η ανακάλυψη της αποτελεί μια επιπλέον επιβεβαίωση της εμπλοκής του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος στη νευροεκφύλιση.

Το PINK1 (PTEN-induced kinase protein 1- PARK6) εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και ιδιαίτερα στον εγκέφαλο σε υψηλά επίπεδα (Nakajima, Kataoka et al. 2003) και κωδικοποιεί μια μιτοχονδριακή κινάση σερίνης/θρεονίνης. Ενεργοποιείται σε συνθήκες οξειδωτικού stress από το σηματοδοτικό μονοπάτι PTEN. Εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια όπου συμμετέχει στη φωσφορυλίωση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών ως απόκριση στο stress, προστατεύοντας από μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Poole, Thomas et al. 2008). Μεταλλάξεις στο γονίδιο PINK1, επηρεάζουν την ικανότητα της πρωτεΐνης να αναγνωρίσει τα υποστρώματά της, με αποτέλεσμα την πρώιμη εκδήλωση της PD. Η αγρίου τύπου PINK1 μεσολαβεί στη μείωση του κυτοχρώματος C (cytochrome C) που απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, επάγοντας τη νευρωνική απόπτωση, ενώ η υπερэкφραση αυτής έχει σαν αποτέλεσμα τη δραματική μείωση της δραστηριότητας κασπάσης-3 (Petit, Kawarai et al. 2005). Η φυσιολογική PINK1 πρωτεΐνη βρέθηκε ότι έχει

νευροπροστατευτική δράση σε κύτταρα νευροβλαστώματος έναντι του θανάτου που προκαλείται από αναστολή του πρωτεασώματος, ενώ η μεταλλαγμένη PINK1 όχι (Valente, Salvi et al. 2004). Επίσης το PINK1 μαζί με την Parkin αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές του μονοπατιού της μιτοφαγίας, με το PINK1 να βρίσκεται ανοδικά της Parkin επάγοντας την αποικοδόμηση των μιτοχονδρίων που έχουν υποστεί βλάβες (Lin and Kang 2008) (Matsuda, Sato et al. 2010) (Narendra, Jin et al. 2010)

Η DJ1 (PARK7) είναι μία ομοδιμερής πρωτεΐνη, έχει πλειοτροπική δράση, δρα σαν πρωτεΐνη συνοδός, σαν μεταγραφικός ρυθμιστής, αντιοξειδωτικός περισυλλέκτης και σαν οξειδοαναγωγικός αισθητήρας. Επιπλέον αλληλεπιδρά με την parkin και το PINK1 και συμμετέχει στο σχηματισμό ενός λειτουργικού συμπλόκου με δράση E3 λιγάση της ουβικιτίνης. Το σύμπλοκο αυτό προάγει την αποικοδόμηση των μη-σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης και της Parkin. Η παρεμπόδιση της λειτουργίας του συμπλόκου έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση αυτών των πρωτεϊνών και κατά συνέπεια την αυξημένη ευαισθησία στο οξειδωτικό stress, που αποτελεί τοξικό παράγοντα ικανό για την εμφάνιση της PD (Xiong, Wang et al. 2009).

Η LRRK2 (leucine rich repeat kinase 2, PARK8) είναι μία πρωτεΐνη με πέντε λειτουργικά πεδία, διαθέτει ένα πεδίο με ενεργότητα GTPασης, παρόμοιας με τις Rho/Ras, ένα πεδίο πρωτεϊνικής κινάσης της οικογένειας MAPKKK, καθώς επίσης ένα πεδίο που φέρει επαναλήψεις WD40 και ένα πεδίο με επαναλήψεις πλούσιες στο αμινοξύ λευκίνη. Επίσης υπάρχει ένα πεδίο με άγνωστη λειτουργία η οποία βρίσκεται καρβοξυτελικά ως προς την επικράτεια με ενεργότητα GTPασης και ονομάζεται COR (Carboxy-terminal Of Ras). Μεταλλάξεις στην LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) (ή, όπως ονομάζεται αλλιώς, dardarin) προκαλούν την αυτοσωμική μορφή της νόσου του Πάρκινσον (Zimprich, Biskup et al. 2004) (Paisan-Ruiz, Jain et al. 2004). Είναι κατά κύριο λόγο μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη και αλληλεπιδρά με την parkin (Smith, Pei et al. 2005). Ο ακριβής ρόλος της LRRK2 δεν είναι ακόμα γνωστός, αλλά η ύπαρξη πολλών επικρατειών στο μόριο, υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών του κυττάρου, όπως στην ανάπτυξη των νευριτών, την ανακύκλωση των συναπτικών κυστιδίων, καθώς και τη ρύθμιση λειτουργιών των λυσοσωμάτων, του συμπλέγματος Golgi και των μιτοχονδρίων (Zhu, Babar et al. 2006) (MacLeod, Dowman et al. 2006) (Sakaguchi-Nakashima, Meir et al. 2007) (Hatano, Kubo et al. 2007). Όπως είναι φυσικό, δυσλειτουργίες στις παραπάνω διεργασίες, μπορεί να επηρεάζουν την επιβίωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Li and Beal 2005). Μεταλλάξεις στο γονίδιο LRRK2

αποτελούν την πιο συχνή αιτία κληρονομικής νόσου του Parkinson με ποσοστό 5-15% των κληρονομικών μορφών με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονομικότητας.

Το ATP13A2 (PARK9) ανήκει στην υπεροικογένεια των ATP-ασών και κωδικοποιεί μια νευρωνική ATP-άση τύπου-P. Μεταφέρει ανόργανα κατιόντα και άλλα υποστρώματα διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών (Schultheis, Hagen et al. 2004), ενώ μπλέκεται και στη λειτουργία των λυσοσωμάτων (Podhajska, Musso et al. 2012).

Το HTRA2 (PARK13) είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεάση σερίνης η οποία εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στον διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Αποκρίνεται σε αποπτωτικά ερεθίσματα, εκθέτοντας στην επιφάνεια ένα μοτίβο πρόσδεσης των πρωτεϊνών αναστολής της απόπτωσης (inhibitor of apoptosis proteins-IAP), μεσολαβεί έτσι στον κυτταρικό θάνατο, ή μέσω της δραστηριότητάς της ως πρωτεάση σερίνης. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της έχουν βρεθεί σε ασθενείς με Parkinson (Suzuki, Imai et al. 2001).

Ο γενετικός τόπος PARK14 κωδικοποιεί τη φωσφολιπάση A2 η οποία είναι υπεύθυνη για είναι ένζυμο που υδρολύουν τα φωσφολιπίδια στη 2-θέση του γλυκερινικού σκελετού προς λυσο-φωσφολιπίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα (Larsson Forsell, Kennedy et al. 1999). Μεταλλάξεις στο γονίδιο PLA2G6 έχουν περιγραφεί σε δύο παθήσεις της παιδικής ηλικίας, στην νευροαξονική δυστροφία και στην νευροεκφύλιση με συσσώρευση σιδήρου. Στα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά αυτών των διαταραχών συμπεριλαμβάνονται και σωμάτια του Lewy με βασικό συστατικό την  $\alpha$ -synuclein (Gasser 2009).

Η FBXO7 (F-BOX only protein 7 - PARK15) πρωτεΐνη αποτελεί συστατικό του συμπλόκου των E3 λιγασών ουβικιτίνης SCFs και συμμετέχει στην αναγνώριση των προς αποικοδόμηση πρωτεϊνών στόχων. Εμπλέκεται και στη μιτοφαγία, παίζει ρόλο καθοδικά του PINK1, καθοδηγώντας την Parkin στα κατεστραμμένα εκπολωμένα μιτοχόνδρια (Burchell, Nelson et al. 2013). Μεταλλάξεις στο γονίδιο FBXO7 PARK15 βρέθηκαν σε δύο οικογένειες με βραδείας εξέλιξης Parkinson, σπαστικότητα και άνοια (Di Fonzo, Dekker et al. 2009).

Το VPS35 (Vacuolar protein sorting-associated protein 35 - PARK17) γονίδιο αποτελεί συστατικό ενός πολυμερούς συμπλόκου που ονομάζεται retromer σύμπλοκο, και εμπλέκεται στην ανάδρομη μεταφορά πρωτεϊνών από τα ενδοσώματα στο δίκτυο trans-Golgi. Έχει βρεθεί μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό σε μέλη μιας Ελβετικής και μιας Αυστριακής οικογένειας με τυπική PD (Zimprich, Benet-Pages et al. 2011).

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο EIF4G1 (Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1- PARK18) είναι ο ευκαρυωτικός παράγοντας έναρξης της μετάφρασης και αποτελεί συστατικό του πρωτεϊνικού συμπλόκου EIF4F. Σε μέλη μιας Γαλλικής οικογένειας με PD έχει εντοπιστεί μια αυτοσωμική επικρατής μετάλλαξη. Αυτά τα ευρήματα εμπλέκουν τις βλάβες στην έναρξη της μετάφρασης με τη νόσο, με κύρια υπόθεση ότι η μετάλλαξη αυτή εμποδίζει τη γρήγορη και δυναμική απόκριση στο stress που είναι απαραίτητο για την κυτταρική επιβίωση (Chartier-Harlin, Dachsel et al. 2011).

Υπάρχουν γονιδιακοί τόποι που έχουν χαρτογραφηθεί σε οικογένειες με PD που φαίνεται να ακολουθούν πρότυπα μεντελικής κληρονομικότητας, αλλά τα υπεύθυνα γονίδια δεν έχουν ακόμα αναγνωρισθεί ή δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως η σχέση τους με την παθογένεση, όπως ο γονιδιακός τόπος PARK3, PARK10, PARK11, PARK12 και PARK16.

**Πίνακας 1.** Οι γενετικοί τόποι που έχουν συσχετισθεί μέχρι σήμερα με την κληρονομικότητα της Νόσου του Parkinson.

Γενετικός τόπος	Χρωμοσωμική θέση	Πρωτεΐνη	Φαινότυπος	Μεντελική κληρονομικότητα	Μεταλλάξεις	Βιβλιογραφική αναφορά
<b>PARK1</b>	4q21-22	SNCA ( $\alpha$ -synuclein)	Πρώιμη εκδήλωση PD	Αυτοσωμική Επικρατής	Έξι σημειακές μεταλλάξεις: A30P, E46K, A53T, H50Q, G51D, A53E διπλασιασμοί/τριπλασιασμοί του γενετικού τόπου.	( <u>Polymeropoulos, Lavedan et al. 1997</u> )
<b>PARK2</b>	6q25.2-q27	Parkin	Πρώιμη εκδήλωση-εμφάνιση PD σε νεαρή ηλικία	Αυτοσωμική Υπολειπόμενη	Περίπου 170 Μεταλλάξεις (σημειακές μεταλλάξεις, εξονικές αναδιατάξεις).	( <u>Kitada, Asakawa et al. 1998</u> )
<b>PARK3</b>	2p13	Άγνωστη	Τυπική PD	Αυτοσωμική Επικρατής	Δεν έχουν εντοπιστεί.	( <u>Gasser, Muller-Myhsok et al. 1998</u> )
<b>PARK4</b>	4q21-q23	SNCA	Πρώιμη εκδήλωση PD	Αυτοσωμική Επικρατής	Τρεις σημειακές μεταλλάξεις: A30P, E46K, A53T, διπλασιασμοί/τριπλασιασμοί του γενετικού τόπου.	( <u>Farrer, Gwinn-Hardy et al. 1999</u> ) ( <u>Singleton, Farrer et al. 2003</u> )
<b>PARK5</b>	4p13	UCHL1	Τυπική PD	Αυτοσωμική Επικρατής	Μία μετάλλαξη	( <u>Leroy, Boyer et al. 1998</u> )
<b>PARK6</b>	1p35-p36	PINK1	Πρώιμη εκδήλωση PD	Αυτοσωμική Υπολειπόμενη	Περίπου 50 σημειακές μεταλλάξεις.	( <u>Valente, Bentivoglio et al. 2001</u> )
<b>PARK7</b>	1p36	DJ-1	Πρώιμη εκδήλωση PD	Αυτοσωμική Υπολειπόμενη	Περίπου 15 σημειακές μεταλλάξεις και μεγάλες απαλοιφές.	( <u>Bonifati, Rizzu et al. 2003</u> )
<b>PARK8</b>	12q12	LRRK2	Τυπική PD	Αυτοσωμική Επικρατής	>80 Παρανοηματικές παραλλαγές, >7 από αυτές παθογόνες, πιο συχνή η G2019S.	( <u>Zimprich, Biskup et al. 2004</u> )
<b>PARK9</b>	1p36	ATP13A2	Σύνδρομο Kufor-Rakeb, άτυπος παρκινσονισμός με άνοια, σπαστική παράλυση, και Προϊούσα Υπερπυρηνική Παράλυση	Αυτοσωμική Υπολειπόμενη	>5 Σημειακές μεταλλάξεις.	( <u>Hampshire, Roberts et al. 2001</u> )



<b>PARK10</b>	1p32	Άγνωστη	Τυπική PD	Άγνωστη	Δεν έχουν εντοπιστεί.	( <a href="#">Li, Scott et al. 2002</a> )
<b>PARK11</b>	2q36-27	Άγνωστη, όχι η GIGYF2	Όψιμη εκδήλωση PD	Αυτοσωμική Επικρατής	7 Παρανοηματικές παραλλαγές.	( <a href="#">Pankratz, Nichols et al. 2003</a> )
<b>PARK12</b>	Xq21-q25	Άγνωστη	Τυπική PD	Φυλοσύνδετη	Δεν έχουν εντοπιστεί.	( <a href="#">Nichols, Pankratz et al. 2002</a> )
<b>PARK13</b>	2p12	HTRA2	Τυπική PD	Αυτοσωμική Επικρατής	2 Παρανοηματικές παραλλαγές.	( <a href="#">Strauss, Martins et al. 2005</a> )
<b>PARK14</b>	22q13.1	PLA2G6	Πρώιμη εκδήλωση PD-Δυστονία	Αυτοσωμική Υπολειπόμενη	2 Παρανοηματικές μεταλλάξεις.	( <a href="#">Paisan-Ruiz, Bhatia et al. 2009</a> )
<b>PARK15</b>	22q12-q13	FBX07	Πρώιμη εκδήλωση PD, Παρκινσονικό-πυραμιδικό σύνδρομο	Αυτοσωμική Υπολειπόμενη	3 Σημειακές μεταλλάξεις.	( <a href="#">Di Fonzo, Dekker et al. 2009</a> )
<b>PARK16</b>	1q32	Άγνωστη	Τυπική PD	Άγνωστη	Δεν έχουν εντοπιστεί.	( <a href="#">Simon-Sanchez, Schulte et al. 2009</a> )
<b>PARK17</b>	16q11.2	VPS35	Τυπική PD	Αυτοσωμική Επικρατής	1 Σημειακή μετάλλαξη (D620N).	( <a href="#">Vilarino-Guell, Wider et al. 2011</a> ; <a href="#">Zimprich, Benet-Pages et al. 2011</a> )
<b>PARK18</b>	3q27.1	EIF4G1	Τυπική PD	Αυτοσωμική Επικρατής	1 Σημειακή μετάλλαξη (R1205H), 2 Παρανοηματικές παραλλαγές.	( <a href="#">Chartier-Harlin, Dachsel et al. 2011</a> )

(Προσαρμογή και τροποποίηση από ([Klein and Westenberger 2012](#)) ([Corti, Lesage et al. 2011](#)))

### A.1.5 $\alpha$ -Synuclein

Το γονίδιο της  $\alpha$ -synuclein βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωματοσώματος 4 (4q21). Η  $\alpha$ -synuclein (Alpha-synuclein,  $\alpha$ -syn) είναι μια μικρή όξινη πρωτεΐνη αποτελούμενη από 140 αμινοξέα μοριακού βάρους 14.5 kDa (Bisaglia, Mammi et al. 2009), παρουσιάζει ισχυρό πρότυπο συντήρησης στα σπονδυλωτά και εκφράζεται σε αρκετές περιοχές του εγκεφάλου στις προσυναπτικές νευρικές απολήξεις (Jain, Bhasne et al. 2013). Χαρακτηρίζεται από την παρουσία όξινων αμινοξέων στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης και χαρακτηριστικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο αμινοτελικό άκρο. Η πρωτεΐνη ανήκει στην οικογένεια των synucleins που περιλαμβάνει τρία μέλη την  $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ - synuclein που αντιστοιχούν στα γονίδια SNCA, SNCB και SNCG (Lavedan 1998), και τους γενετικούς τόπους 4q21, 5q35, 10q23.2-q23.3. Για πρώτη φορά απομονώθηκε από τον οργανισμό *Torpedo californica* το 1988, επειδή εντοπίστηκε στην προ-συναπτική περιοχή και στην πυρηνική μεμβράνη του νευρικού κυττάρου της δόθηκε το όνομα synuclein (Maroteaux, Campanelli et al. 1988)

#### A.1.5.1 Η πρωτοταγής δομή της $\alpha$ -synuclein

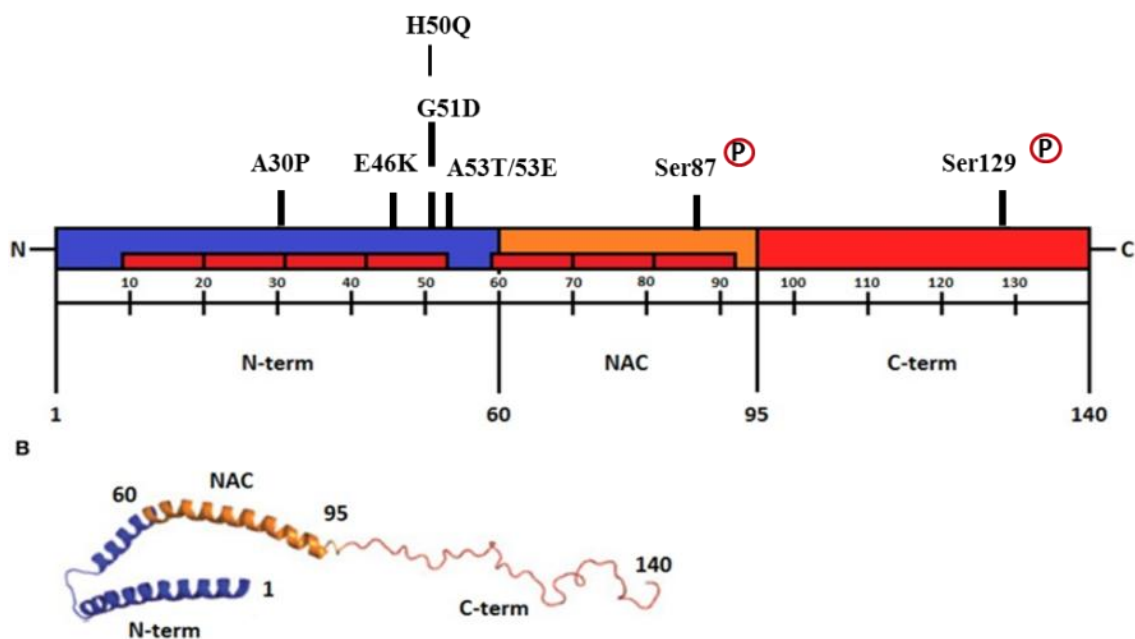
Η  $\alpha$ -synuclein ανήκει στην οικογένεια των μη δομημένων πρωτεϊνών αφού στερείτε δευτεροταγούς δομής, ωστόσο χαρακτηρίζεται από έντονη διαμορφωτική πλαστικότητα που της επιτρέπει να υιοθετεί ένα ευρύ φάσμα από δυναμικές δομές ανάλογα με το περιβάλλον και τα αλληλεπιδρώντα μόρια (Jain, Bhasne et al. 2013). Δομικά αποτελείται από τρεις διαφορετικές περιοχές (Εικόνα 3).

**1.** Το αμινοτελικό άκρο, αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 1-60. Η αμινοτελική αλληλουχία περιλαμβάνει επαναλήψεις μια αλληλουχίας 11 αμινοξέων, με ένα ισχυρά συντηρημένο εξαμερές μοτίβο όμοιο με αυτό που βρέθηκε στις αμφιπαθείς έλικες των απολιποπρωτεϊνών (Bellucci et al., 2012; Deleersnijder et al., 2013). Στο τμήμα αυτό της πρωτεΐνης εντοπίζονται τρεις σημειακές μεταλλάξεις που έχουν συσχετιστεί με τη PD και έχουν μελετηθεί εκτενώς, οι A30P, A53T, και E46K (Bisaglia et al., 2009). Επιπλέον, εντοπίζονται τρεις ακόμα σημειακές μεταλλάξεις, η H50Q (Appel-Cresswell et al., 2013), η G51D (Kiely et al., 2013) και η A53E (Pasanen et al., 2014) οι οποίες ανιχνεύθηκαν πολύ πρόσφατα και σχετίζονται επίσης με κληρονομικής μορφής νόσο του Parkinson.

**2.** Το κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης ονομάζεται NAC (non-amyloid- $\beta$  component) και αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 61–95. Αποτελεί το πιο υδρόφοβο τμήμα της

πρωτεΐνης και περιέχει τρία επαναλαμβανόμενα μοτίβα. Το τμήμα αυτό της πρωτεΐνης είναι υπεύθυνο για τη συσσωμάτωση της. Χαρακτηριστικά η κεντρική αυτή περιοχή πρώτη φορά απομονώθηκε σε πλάκες αμυλοειδούς από ασθενής με Alzheimer το 1993 (Ueda, Fukushima et al. 1993). Η κεντρική περιοχή μπορεί να υφίσταται διαμορφωτική μεταβολή από μια τυχαία σπείρα σε β-πτυχωτό φύλλο και είναι σε θέση να σχηματίζει κυλινδρικά β-πτυχωτά φύλλα και ινίδια β-αμυλοειδούς (Bellucci, Zaltieri et al. 2012; Deleersnijder, Gerard et al. 2013). Στο τμήμα αυτό της πρωτεΐνης απαντάται μια θέση φωσφορυλίωσης στο κατάλοιπο σερίνης 87 η οποία έχει εντοπιστεί σε ασθενής με PD.

3. Το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 96–140, και είναι πλούσιο σε όξινα αμινοξέα (Bisaglia, Mammi et al. 2009) είναι η περιοχή που προσδίδει τη μη διαμορφωμένη δομή στην πρωτεΐνη και παίζει ρυθμιστικό ρόλο στο σχηματισμό ινιδίων της πρωτεΐνης (Deleersnijder, Gerard et al. 2013). Η ντοπαμίνη αλληλεπιδρά μη ειδικά με τα κατάλοιπα στο καρβοξυτελικό άκρο υποδηλώνοντας ότι ακατάλληλη διάσπαση του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης, κάτι το οποίο συμβαίνει σε εγκεφάλους με PD, μπορεί να επηρεάζει την ομοιόσταση της ντοπαμίνης (Bisaglia, Mammi et al. 2009; Bellucci, Zaltieri et al. 2012).



**Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών της πρωτεΐνης  $\alpha$ -synuclein.** A. Το αμινοτελικό άκρο αποτελείται από τα κατάλοιπα 1-60, είναι η υπεύθυνη περιοχή αλληλεπίδρασης με τις μεμβράνες. Περιέχει τα επαναλαμβανόμενα εξαμερή μοτίβα. Σε αυτή εντοπίζονται οι έξι σημειακές μεταλλαγές που σχετίζονται με τη PD (A30P, E46K, A53T, H50Q, G51D και η A53E), οι οποίες σχετίζονται με την κληρονομικής μορφής νόσο του Parkinson. Η κεντρική περιοχή περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 1-95,

ονομάζεται NAC περιοχή (non-β amyloid component), αποτελεί το πιο υδρόφοβο τμήμα της πρωτεΐνης και είναι απαραίτητο για τη διαδικασία της συσσωμάτωσης. Παίρνει δευτεροταγή διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλου και σχηματίζει αμυλοειδή ινίδια. Σε αυτήν εντοπίζεται η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο σερίνης 87. Το καρβοξυτελικό άκρο αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 96–140 και χαρακτηρίζεται από ύπαρξη όξινων αμινοξέων και αρνητικού φορτίου. Σε αυτό το τμήμα εντοπίζεται η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο σερίνης 129, το οποίο απαντάται στα σωμάτια του Lewy. **B.** Σχηματική αναπαράσταση της δομικής διαμόρφωσης της  $\alpha$ -synuclein. Η αντιπαράλληλη  $\alpha$ -έλικα στο αμινοτελικό άκρο (μπλε χρώμα), στη NAC περιοχή υπάρχει επίσης μια  $\alpha$ -έλικα (πορτοκαλί χρώμα) και το καρβοξυτελικό άκρο (κόκκινο χρώμα) και δεν έχει συγκεκριμένη διαμόρφωση. (Προσαρμογή και τροποποίηση από (Gallegos, Pacheco et al. 2015).

Η φωσφορυλίωση της  $\alpha$ -synuclein στο κατάλοιπο σερίνης 129 είναι μια από τις πιο συχνές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης στη PD, και παίζει ρόλο σε πολλούς στόχους της πρωτεΐνης (Sato, Kato et al. 2013). Το 90% της  $\alpha$ -synuclein που απαντάται στα σωμάτια του Lewy είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser129, κάτι το οποίο είναι βιοχημικά ανιχνεύσιμο στον εγκεφαλικό φλοιό, στη μέλαινα ουσία και στο βασικό πυρήνα του Meynert (Walker, Lue et al. 2013), ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες το ποσοστό αυτό δεν ξεπερνά το 4%, κάτι το οποίο υποδηλώνει τον αυστηρό έλεγχο της φωσφορυλίωσης στη Ser129. Η φωσφορυλίωση αυτή ελέγχεται από διάφορες κινάσες και φωσφατάσες. Τέτοιες κινάσες, μετά από πρόσφατες μελέτες έγινε γνωστό ότι μπορεί να είναι οι κινάσες του κυτταρικού κύκλου τύπου –Polo, PLK2 και PLK3 (Polo-like kinase), οι κινάσες καζεΐνης CK1 και CK2, καθώς και μέλη της οικογένειας κινασών GRK2, GRK3, GRK5 και GRK6 (G-protein coupled receptor kinase) (Hara, Arawaka et al. 2013) (Sato, Kato et al. 2013) (Kosten, Binolfi et al. 2014), ενώ η φωσφατάση PPA2 μάλλον ευθύνεται για την από-φωσφορυλίωση της  $\alpha$ -synuclein, καθώς ενίσχυση της έκφρασης της PP2A οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα φωσφορυλιωμένης S129  $\alpha$ -synuclein και κατ' επέκταση μειωμένα επίπεδα συσσωματωμένης πρωτεΐνης (Sato, Kato et al. 2013) (Walker, Lue et al. 2013).

*In vitro* μελέτες αποκάλυψαν ότι η  $\alpha$ -synuclein έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με λιπιδικές μεμβράνες, μέσω των επαναλαμβανόμενων μοτίβων, και με αρνητικά φορτισμένα κυστίδια και μικκύλια που αποτελούνται από μονή λιπιδική στοιβάδα (Ulmer, Bax et al. 2005). Σε αυτή της αλληλεπίδραση το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης αποκτά διαμόρφωση  $\alpha$ -έλικας η οποία μπορεί να είναι εκτεταμένη ή αντιπαράλληλη που βοηθά στην πρόσδεση, ανάλογα με τις ιδιότητες της μεμβράνης, ενώ το καρβοξυτελικό παραμένει χωρίς συγκεκριμένη διαμόρφωση (Ulmer, Bax et al. 2005) (Plotegher, Greggio

et al. 2014). Η ικανότητα πρόσδεσης στα μικκυλιακά φωσφολιπίδια ισχύει και στις δύο μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης A53T και E46K, ενώ η A30P εμφανίζει μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης με τις μεμβράνες (Auluck, Caraveo et al. 2010).

#### **A.1.5.2 Η φυσιολογική λειτουργία της $\alpha$ -synuclein**

Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η  $\alpha$ -synuclein εμπλέκεται στον έλεγχο των διαδικασιών που ρυθμίζονται από τις συναπτικές μεμβράνες (Bellucci, Zaltieri et al. 2012) και συμμετέχει στον έλεγχο της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών μέσω της αλληλεπίδρασης της με μέλη των πρωτεϊνών SNARE (SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor) (Tsigelny, Sharikov et al. 2012). Το σύμπλοκο SNARE αποτελείται από την κυστιδιακή πρωτεΐνη συναπτομπρεβίνη (VAMP) και τις πρωτεΐνες της ενεργούς ζώνης συνταξίνη και SNAP-25. Ειδικότερα η  $\alpha$ -synuclein προάγει τη συναρμολόγηση του συμπλόκου SNARE μέσω ενός μη ενζυματικού μηχανισμού, το αμινοτελικό άκρο προσδένεται στα φωσφολιπίδια και με το καρβοξυτελικό άκρο προσδένεται στη συναπτομπρεβίνη II (Burre, Sharma et al. 2010), ωστόσο η ακριβής λειτουργία της  $\alpha$ -synuclein παραμένει άγνωστη. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η  $\alpha$ -synuclein παίζει το ρόλο πρωτεΐνης συνοδού για το προσυναπτικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο SNARE και ευθύνεται τόσο για τη συναρμολόγηση και τον έλεγχο της αποικοδόμησης, καθώς και για τη διατήρηση και την κατανομή του, εμπλέκεται δηλαδή άμεσα στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών συμπεριλαμβανομένης και της ντοπαμίνης (Burre, Sharma et al. 2010).

Μελέτες σε ποντίκια στα οποία η έκφραση των  $\alpha$ -,  $\beta$ - ή  $\gamma$ -synuclein αποσιωπάτε έδειξαν ότι δεν επηρεάζεται η βιωσιμότητά τους (Lashuel, Overk et al. 2013), ενώ επίσης η απουσία έκφρασης της  $\alpha$ -synuclein δεν επηρεάζει το σχηματισμό των συνάψεων αλλά ούτε και τη βιωσιμότητα (Bisaglia, Mammi et al. 2009), αλλά παρατηρείται καθυστερημένη μετατόπιση στις προσυναπτικές απολήξεις κατά τη διάρκεια της συναπτογένεσης (Chandra, Fornai et al. 2004). Αυτό υποδηλώνει ότι ναι μεν δεν είναι απαραίτητο συστατικό του μηχανισμού απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών, αλλά μπορεί να συνεισφέρει στη μακροπρόθεσμη ρύθμιση και διατήρηση των νευρικών απολήξεων. Ποντίκια στα οποία γίνεται ταυτόχρονη αποσιώπηση και στα τρία γονίδια των synucleins ( $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ -) είναι βιώσιμα και γόνιμα, ανέπτυξαν όμως σοβαρές νευρολογικές διαταραχές που επιδεινώνονταν όσο μεγάλωναν και οδήγησαν σε πρόωρο θάνατο (Burre, Sharma et al. 2010) (Greten-Harrison, Polydoro et al. 2010). Επιπλέον με το πέρασ του

χρόνου στα ποντίκια το SNARE σύμπλοκο έχανε την ικανότητα συναρμολόγησης, κάνοντας σαφές ότι η λειτουργία των synucleins είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του φυσιολογικού συμπλόκου SNARE κατά τη γήρανση των ποντικών (Burre, Sharma et al. 2010), και παίζει καθοριστικό ρόλο στη μακροπρόθεσμη επιβίωση (Greten-Harrison, Polydoro et al. 2010).

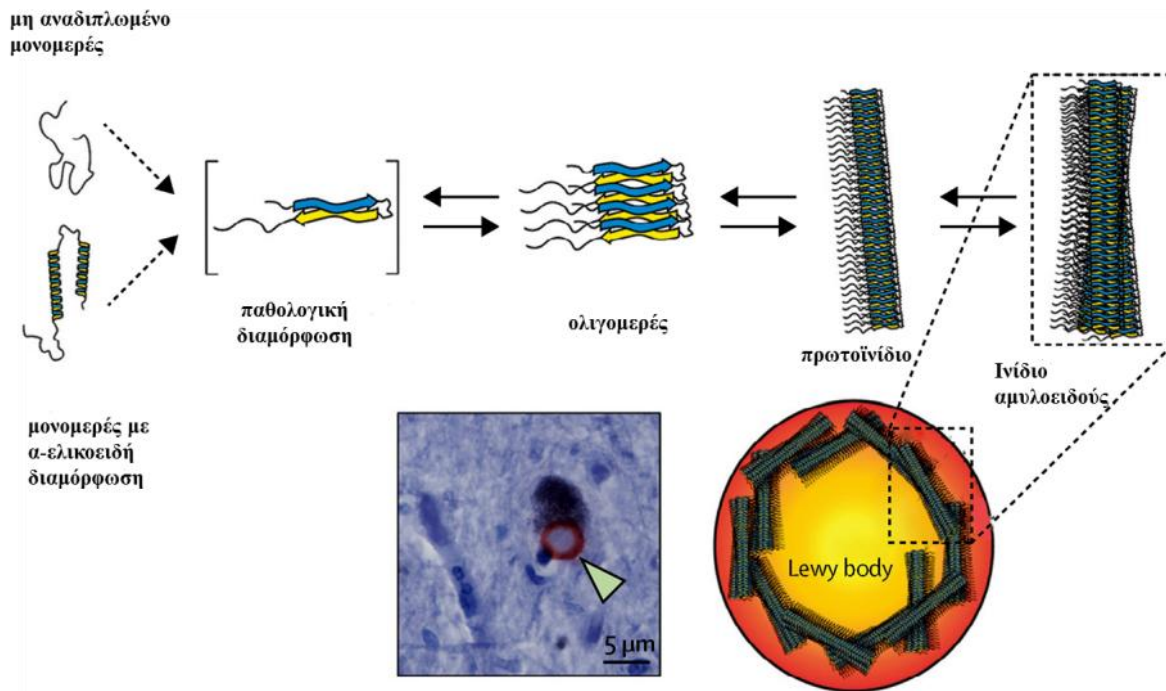
Το γεγονός ότι η  $\alpha$ -synuclein είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη μπορεί να οφείλεται στη διαμορφωτική ευκαμψία που τις επιτρέπει να αλλάζει τη διαμόρφωσή της ανάλογα με την πρόσδεση και τη αλληλεπίδραση με τις βιολογικές μεμβράνες, και να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικά σύμπλοκα (Lashuel, Overk et al. 2013; Plotegher, Greggio et al. 2014).

#### **A.1.5.3 Ο παθολογικός ρόλος της $\alpha$ -synuclein**

Ο παθολογικός ρόλος της  $\alpha$ -synuclein απορρέει από την ενδοκυτταρική συσσωμάτωση της πρωτεΐνης σε αμυλοειδή ινίδια χαρακτηριστικό γνώρισμα των νευρολογικών διαταραχών που ονομάζονται *Synucleinopathies*, συμπεριλαμβανομένης και της νόσου του Parkinson (Luk, Song et al. 2009; Danzer, Kranich et al. 2012). Η  $\alpha$ -synuclein σε φυσιολογικές συνθήκες είναι μονομερής ενώ σε μεγάλες συγκεντρώσεις δημιουργεί πρωτοϊνίδια, τα οποία πολυμερίζονται προς ινίδια και αποτελούν το βασικό δομικό συστατικό των LBs, Εικόνα 4. Διάφοροι παράγοντες όπως η υπερέκφραση της πρωτεΐνης, αλλαγές στο pH, το οξειδωτικό stress, οι μέτα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (φωσφορυλίωση στη σερίνη 87 και 129), η ουβικιτίνωση, η νίτρωση (στα κατάλοιπα τυροσίνης 39, 125 και 133), η αποκοπή της καρβοξυτελικής περιοχής η οποία συμβαίνει συνήθως κοντά στο κατάλοιπο 121 (Ross and Poirier 2004; Deleersnijder, Gerard et al. 2013), η αλληλεπίδραση με φωσφολιπίδια και μεταλλικά ιόντα, η συγκέντρωση λιπαρών οξέων, ή λόγω αλληλεπίδρασης με τη ντοπαμίνη μπορεί να επάγουν ή να διαμορφώσουν τη δομή και το βαθμό ολιγομερισμού *in vitro* και μπορεί να επηρεάσουν την ισορροπία μεταξύ της μονομερούς και της ολιγομερούς κατάστασης *in vivo*. Μεταξύ αυτών η ουβικιτίνωση και η φωσφορυλίωση στη σερίνη 129 αποτελούν τις πιο συχνά απαντώμενες μέτα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

*In vitro* μελέτες έδειξαν ότι τα πρωτοϊνίδια έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν τη διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την αύξηση στην εισροή ασβεστίου από τον εξωκυττάριο στον ενδοκυττάριο χώρο που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (Danzer, Haasen et al. 2007). Τα ολιγομερή μπορεί να προκαλέσουν επίσης τοξικότητα

παρεμβαίνοντας σε διάφορους μηχανισμούς όπως πρόκλησης βλάβης στα μιτοχόνδρια (Hsu, Sagara et al. 2000), εκκίνηση λυσοσωμικής διαρροής (Hashimoto, Kawahara et al. 2004) ή διάσπαση των μικροσωληνίσκων (Alim, Ma et al. 2004). Επιπλέον τα ολιγομερή παρεμβαίνουν στην αξονική μεταφορά των συναπτικών πρωτεϊνών όπως η συναψίνη 1 προκαλώντας βλάβη στις συνάψεις και πιθανή νευροεκφύλιση (Scott, Tabarean et al. 2010).



**Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού συσσωμάτωσης της  $\alpha$ -synuclein.** Η  $\alpha$ -synuclein υφίσταται σε διάφορες διαμορφώσεις και απαντάται σε δύο δομικές ισομορφές: ένα φυσικά μη αναδιπλωμένο μονομερές και μια μορφή πλούσια σε  $\alpha$ -έλικες που προσδένεται στις μεμβράνες. Και οι δύο ισομορφές μπορούν να υποστούν σημαντικές δομικές αλλαγές που έχουν σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό και τη συσσώρευση  $\beta$ -πτυχωτών φύλλων. Από διάφορες *in vitro* μελέτες έγινε γνωστό ότι η  $\alpha$ -synuclein βρίσκεται σε μια δυναμική ισορροπία, η μονομερής μορφή μπορεί να συσσωματωθεί σε διάφορους τύπους μικρών ολιγομερών τα οποία σταθεροποιούνται με αλληλεπιδράσεις  $\beta$ -πτυχωτού φύλλου, στη συνέχεια σε αδιάλυτα πρωτοϊνίδια υψηλότερου μοριακού βάρους, τα οποία πολυμερίζονται σε αμυλοειδή φύλλα σαν εκείνα που εντοπίζονται στα σωματίδια του Lewy. Ωστόσο, ο μηχανισμός που διέπει τη βασική αλλαγή στη διαμόρφωση και τη μεταβολή της κανονικής μονομερούς μορφής σε παθολογική, παραμένει άγνωστος. Στη μικροφωτογραφία απεικονίζεται ένα σωματίο του Lewy στο μεσεγκέφαλο ασθενή με σποραδική PD (κόκκινο χρώμα), όπως φαίνεται με το βέλος (πράσινο χρώμα). (Προσαρμογή και τροποποίηση από (Dehay, Bourdenx et al. 2015).

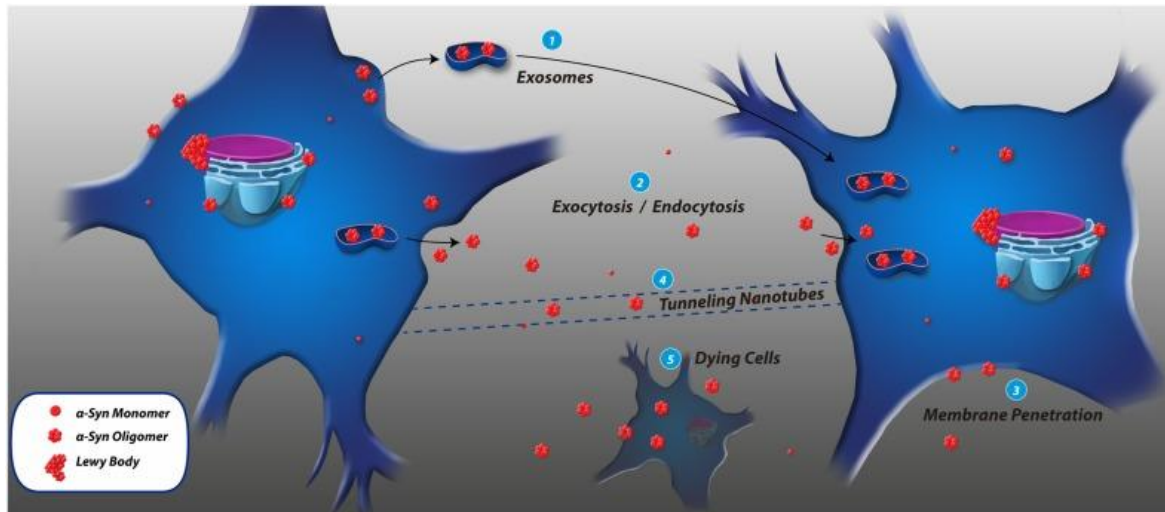
Πολλές μελέτες έδειξαν ότι τα διαλυτά ολιγομερή της  $\alpha$ -synuclein έχουν μεγαλύτερη τοξικότητα συγκριτικά με τα ινίδια της πρωτεΐνης (Stockl, Zijlstra et al. 2013).

Παράγοντες που αναστέλλουν τη μετατροπή των πρωτοϊνιδίων σε ινίδια οδηγούν σε συσσώρευση πρωτοϊνιδίων και επιταχύνουν την εξέλιξη της νόσου του Parkinson.

Το 2008, τρεις ανεξάρτητες μελέτες ανέφεραν ότι σε δείγμα ασθενών με νόσο του Parkinson, μετά από μεταμόσχευση εμβρυϊκών νευρώνων μεσεγκεφάλου εντός του ραβδωτού σώματος ανέπτυξαν δομές όμοιες με τα σωματίδια του Lewy στους μεταμοσχευμένους νευρώνες 11, 14, και 16 χρόνια μετά την επέμβαση (Kordower, Chu et al. 2008; Li, Englund et al. 2008; Mendez, Vinuela et al. 2008). Αυτό το εύρημα πρότεινε τη μετάδοση των σωματίων του Lewy στα κύτταρα ξενιστές και οδήγησε στην εικασία ότι οι παθολογικές διαμορφώσεις της  $\alpha$ -synuclein μεταδίδονται από κύτταρο σε κύτταρο συμβάλλοντας επιβαρυντικά στην προοδευτική εξέλιξη της νόσου. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από το γεγονός ότι οι ασθενείς με PD εμφανίζουν σωματίδια του Lewy σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Desplats, Lee et al. 2009). Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε και με *in vivo* μελέτες όπου χαρακτηριστικά σε ποντίκια τα οποία υπερέκφραζαν ανθρώπινη  $\alpha$ -synuclein παρατηρήθηκε μετάδοση τη  $\alpha$ -synuclein σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες που μεταμοσχεύθηκαν στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου. Η παρουσία σωματίων του Lewy σε αυτούς τους νευρώνες αποτελούμε μια χρόνο-εξαρτώμενη διαδικασία με μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης στα παλαιότερα μοσχεύματα (Angot, Steiner et al. 2012). Ωστόσο από ποιο σημείο του σώματος ξεκινά η παθογένεια της  $\alpha$ -synuclein καθώς και ο μηχανισμός που ενεργοποιείται από την πρόσληψη της παθολογικής  $\alpha$ -synuclein από τα κύτταρα δέκτες που οδηγεί στη συσσωμάτωση της παραμένει άγνωστο. Τα κύτταρα δέκτες προσλαμβάνουν τη μη σωστά αναδιπλωμένη  $\alpha$ -synuclein η οποία λειτουργεί σαν εκμαγείο για την ανάπτυξη συσσωματωμάτων που τελικά οδηγούν στο σχηματισμό σωματίων του Lewy στα κύτταρα δέκτες (Angot and Brundin 2009; Steiner, Angot et al. 2011). Αρκετοί μηχανισμοί ευθύνονται για την απελευθέρωση της  $\alpha$ -synuclein στον εξωκυττάριο χώρο και τη μετάδοση μεταξύ των κυττάρων (Εικόνα 5). Για παράδειγμα *in vitro* μελέτη στην ανθρώπινη νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά SH-SY5Y απέδειξε ότι η υπερέκφραση της αγρίου τύπου  $\alpha$ -synuclein, καθώς και των μεταλλαγών A53T και A30P έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση στον εξωκυττάριο χώρο μέσω της διαδικασίας της εξωκυττάρωσης αφού η απελευθέρωση αναστέλλεται σημαντικά σε θερμοκρασία 18°C (Lee and Yu 2005). Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, και συγκεκριμένα το επαναλαμβανόμενο μοτίβο των 11 αμινοξέων, είναι αυτό που αρχικά έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης, αυτό οδηγεί σε αλλαγές στην δευτεροταγή



δομή οι οποίες επιτρέπουν στην  $\alpha$ -synuclein να διεισδύει στη μεμβράνη (Tsigelny, Sharikov et al. 2012).



**Εικόνα 5. Μηχανισμοί μετάδοσης της  $\alpha$ -synuclein μεταξύ των κυττάρων.** (1) Τα εξωσώματα είναι μικρά μεμβρανικά κυστίδια που προέρχονται από το μονοπάτι ενδοκύττωσης, τα οποία εγκλωβίζουν στο εσωτερικό τους ολιγομερή  $\alpha$ -synuclein και τα απελευθερώνουν στον εξωκυττάριο χώρο. (2) Η  $\alpha$ -synuclein συσσωρεύεται στον εξωκυττάριο χώρο και προσλαμβάνεται από γειτονικά κύτταρα δέκτες με το μονοπάτι της ενδοκύττωσης. (3) Η  $\alpha$ -synuclein προσδέεται στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου δέκτη διαμέσου της αμινοτελικής περιοχής, διεισδύει στη μεμβράνη και αποκτά πρόσβαση στο κυτταρόπλασμα. (4) μεταξύ των κυττάρων σχηματίζονται νανοσήραγγες, δηλαδή μεμβρανικές γέφυρες επικοινωνίας που αποτελούνται κατά βάση από ακτίνη, μέσω των οποίων μπορεί να μεταδίδεται η  $\alpha$ -synuclein, αποτελεί έναν υποθετικό μηχανισμό. (5) Τα νεκρά κύτταρα αποτελούν μια σημαντική δεξαμενή παθολογικής  $\alpha$ -synuclein η οποία απελευθερώνεται μετά τη λύση αυτών. [Προσαρμογή και τροποποίηση από (Gallegos, Pacheco et al. 2015)].

Τα εξωσώματα είναι μικρά κυστίδια μεμβράνης που προέρχεται από την ενδοκυτταρική οδό και απελευθερώνονται από τα κύτταρα μέσα στον περιβάλλοντα χώρο. *In vitro* ένα ευρύ φάσμα κυττάρων εκκρίνουν εξωσώματα συμπεριλαμβανομένων των νευρώνων και των αστροκυττάρων (Angot and Brundin 2009). Τα εξωσώματα που βρίσκονται στον περιβάλλοντα χώρο των κυττάρων και περιέχουν ολιγομερή  $\alpha$ -synuclein είναι πιο επιρρεπή στην πρόσληψη από τα κύτταρα δέκτες συγκριτικά με εξωσώματα που δεν περιέχουν ολιγομερή (Danzer, Kranich et al. 2012), ενώ η δυσλειτουργία των λυσοσωμάτων μπορεί να επιταχύνει την απελευθέρωση των εξωσωμάτων (Alvarez-Erviti, Seow et al. 2011). Επίσης η ανταλλαγή ολιγομερών  $\alpha$ -synuclein μπορεί να λαμβάνει χώρα διαμέσου των TNTs (tunneling nanotubes), είναι μεμβρανικές γέφυρες ακτίνης μεταξύ των κυττάρων που λειτουργούν σαν αγωγοί για την ανταλλαγή κυτταροπλασματικών και μεμβρανικών μορίων, οργανιδίων καθώς και μετάδοσης παθογόνων (Angot and Brundin

2009). Ωστόσο ένα σημαντικό τμήμα των ολιγομερών  $\alpha$ -synuclein που απαντώνται στον διακυτταρικό χώρο προέρχεται από την απελευθέρωση των συσσωματωμάτων από τα νεκρά κύτταρα στις προσβληθείσες περιοχές του εγκεφάλου (Angot and Brundin 2009). Τέλος, αρκετές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η πρόσληψη της εξωκυττάριας  $\alpha$ -synuclein από τα κύτταρα δέκτες γίνεται με το μηχανισμό της ενδοκύττωσης (Desplats, Lee et al. 2009; Hansen, Angot et al. 2011).

#### A.1.5.4 Η αποικοδόμηση της $\alpha$ -synuclein

Η αυξημένη συγκέντρωση  $\alpha$ -synuclein στο εσωτερικό των ντοπαμινεργικών κυττάρων σε ασθενής με PD υποδηλώνει τον ελαττωματικό χειρισμό και την εκκαθάριση της πρωτεΐνης, γεγονότα που συμβάλλουν στην παθογένεση. Η ομοιότητα του κυττάρου και κατ' επέκταση η επιβίωσή του εξαρτάται άμεσα από την ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της αποδόμησης των κυτταρικών πρωτεϊνών. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (ubiquitin-proteasome system, UPS) και το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosomal pathway, ALP) είναι τα δύο πλέον σημαντικά συστήματα πρωτεϊνικής αποδόμησης. Το UPS αποικοδομεί τις βραχύβιες κυτταροπλασματικές και πυρηνικές πρωτεΐνες, καθώς και τις ανώμαλα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Rubinsztein 2006). Στο σύστημα ALP αποικοδομούνται μακρόβιες σταθερές πρωτεΐνες, οργανίδια και πυρηνικά συγκροτήματα (Levine and Klionsky 2004). Η  $\alpha$ -synuclein αποικοδομείται και από τα δύο συστήματα. *In vivo* μελέτες δείχνουν ότι η φυσιολογική διαλυτή  $\alpha$ -synuclein αποικοδομείται επιλεκτικά από το UPS, ενώ οι πιο πολύπλοκες διαμορφώσεις όπως τα ολιγομέρη και τα ινίδια διατίθενται προς αποικοδόμηση στο μονοπάτι ALP (Ebrahimi-Fakhari, Cantuti-Castelvetri et al. 2011). Η ανακάλυψη ότι στη νόσο του Parkinson τα σωματίδια του Lewy αποτελούνται κυρίως από μόρια  $\alpha$ -synuclein συζευγμένης με ουβικιτίνη, πιθανότατα δείχνει μια αποτυχημένη προσπάθεια αποικοδόμησης της  $\alpha$ -synuclein, μέσω ουβικιτίνωσης, στο πρωτεάσωμα. Το μόριο της φυσιολογικής  $\alpha$ -synuclein μπορεί να αποικοδομηθεί στο 20S πρωτεάσωμα με τρόπο ανεξάρτητο της ουβικιτίνης (Tofaris, Layfield et al. 2001), αλλά η υπερέκφραση της  $\alpha$ -synuclein, οι τροποποιήσεις όπως νιτροζυλίωση, η φωσφορυλίωση και οι μεταλλάξεις, προκαλούν ισχυρή μείωση της δραστηριότητας του 20S πρωτεασώματος (Tanaka, Engelender et al. 2001; Singleton, Farrer et al. 2003; Hodara, Norris et al. 2004). Επιπλέον η δέσμευση των ολιγομερών διαλυτών μορφών  $\alpha$ -synuclein στο πρωτεάσωμα, οδηγεί σε

μείωση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας του καταλυτικού πυρήνα (Lindersson, Beedholm et al. 2004).

Όταν η πρωτεασωματική δραστηριότητα αδυνατεί να εξασφαλίσει την ομοιοστάση του κυττάρου μέσω της αποικοδόμησης τοξικών ή επιρρεπών στη συσσώματωση ενδοκυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, το ALP αναλαμβάνει, ως ένας πλήρως ευδιάκριτος από το UPS μηχανισμός, να διατηρήσει την πρωτεϊνική ομοιοστάση του κυττάρου. Αυτός είναι και ο λόγος που παρατηρείται αυξημένος αριθμός αυτοφαγικών κενοδομίων σε εγκεφάλους ασθενών με PD (Anglade, Vyas et al. 1997), παρατήρηση που επιβεβαιώνεται και σε ζωικά Παρκινσονιακά μοντέλα (Öztaç E 2003).

Η αυτοφαγία αποτελεί μια διαδικασία πολλών βημάτων που περιλαμβάνει τη δημιουργία των αυτο-φαγοσωμάτων με διπλομεμβρανική δομή, τα οποία στη συνέχεια μετά τη σύντηξή τους με τα λυσοσώματα, σχηματίζουν τα αυτοφαγο-λυσοσώματα και το περιεχόμενό τους αποικοδομείται από τα υδρολυτικά ένζυμα. Η  $\alpha$ -synuclein περιέχει ένα μοτίβο αναγνώρισης μορίων συνοδών που εμπλέκονται στην αυτοφαγία, το VKKDQ56 (KFERQ-like), που της επιτρέπει την αλληλεπίδραση με την κυτταροπλασματική Hsc70 πρωτεΐνη, και τη μετατόπισή της στο λυσοσώμα μέσω του μεμβρανικού λυσοσωμικού υποδοχέα LAMP2a (Auluck, Chan et al. 2002; Bieschke, Russ et al. 2010). *In vitro* μελέτες απέδειξαν ότι οι μεταλλαγμένες μορφές της  $\alpha$ -synuclein (A30P και A53T), καθώς και η τροποποιημένη  $\alpha$ -synuclein λόγω αλληλεπίδρασης με τη ντοπαμίνη, σε αντίθεση με την αγρίου τύπου, αποτυγχάνουν να απελευθερωθούν στον αυλό του λυσοσώματος μετά την πρόσδεση με τον υποδοχέα LAMP2a (Cuervo, Stefanis et al. 2004; Martinez-Vicente, Talloczy et al. 2008). Το μονοπάτι ALP αναστέλλεται στην PD, όταν μεταλλαγμένες μορφές  $\alpha$ -synuclein ή διαλυτά ολιγομερή δεσμεύονται με υψηλή χημική συγγένεια στους υποδοχείς της λυσοσωμικής μεμβράνης, προκαλώντας αναστολή της πρόσληψης και κατ' επέκταση της αποικοδόμησης τόσο της ίδιας όσο και άλλων πρωτεϊνών (Cuervo, Stefanis et al. 2004).

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>

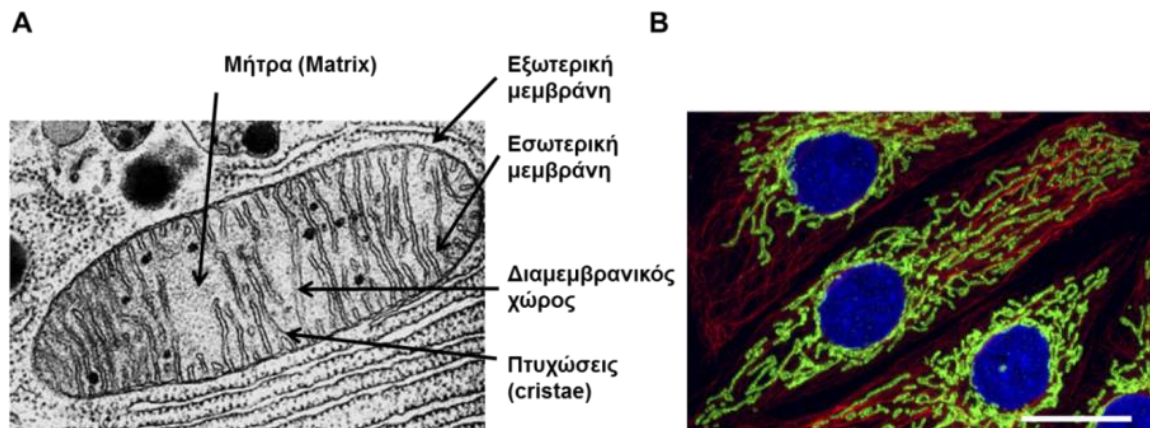
### Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στη νόσο του Parkinson

#### A.2.1 Το μιτοχόνδριο

Τα μιτοχόνδρια απαντώνται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα και αποτελούν τα κέντρα παραγωγής ενέργειας με τη μορφή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine triphosphate, ATP) διαμέσου της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (oxidative phosphorylation, OXPHOS). Καταλαμβάνουν σημαντικό ποσοστό του κυτταροπλάσματος (18-20%), έχουν μέγεθος από 1 έως 10  $\mu\text{m}$  και απεικονίζονται σαν ένα περίπλοκο κυλινδρικό δίκτυο που εξαπλώνεται σχεδόν σε όλο το κυτταρόπλασμα, Εικόνα 6. Β. Στην πραγματικότητα απαρτίζουν ένα δυναμικό δίκτυο με μεγάλη δομική πλαστικότητα, που ονομάζεται μιτοχονδριακό δίκτυο (mitochondrial network). Το μιτοχονδριακό δίκτυο βρίσκεται σε μια συνεχόμενη κίνηση και αλλαγή σχήματος μέσω των διαδικασιών της σχάσης και της σύντηξης, που έχει σαν αποτέλεσμα την εξάπλωση ή τη συρρίκνωση στον κυτταροπλασματικό χώρο, σαν απόκριση σε ποικίλα κυτταρικά σήματα. Το μιτοχονδριακό δίκτυο βρίσκεται σε μια δυναμική ισορροπία, ένα σύνολο αλληλεπιδράσεων καθορίζει και διαμορφώνει τη μορφολογία και το σχήμα του μιτοχονδριακού δικτύου (Nunnari and Suomalainen 2012). Διαταραχή στην οργάνωση και τη διακίνηση των μιτοχονδρίων αποτελούν κοινό χαρακτηριστικό νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως το Parkinson και η νόσος του Huntington (Schon and Przedborski 2011).

Είναι οργανίδια με χαρακτηριστική δομή. Οριοθετούνται από δύο μεμβράνες την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και την εσωτερική, η οποία σχηματίζει πολυάριθμες εσωτερικές πτυχώσεις (cristae). Οι μεμβράνες αυτές έχουν διαφορετική λιπιδιακή και πρωτεϊνική σύσταση. Η εξωτερική μεμβράνη αποτελείται κυρίως από σύμπλοκα πρωτεϊνών, στην πλειοψηφία πορίνες, που σχηματίζουν υδρόφιλους διάυλους, και είναι διαπερατή σε μόρια μεγέθους έως 5 KDa. Αντίθετα η διαπερατότητα της εσωτερικής μεμβράνης χαρακτηρίζεται από μεγάλη επιλεκτικότητα. Είναι η μόνη κυτταρική μεμβράνη που περιέχει στη σύσταση της το φωσφολιπίδιο καρδιολιπίνη (cardiolipin), και μάλιστα σε μεγάλο ποσοστό, γεγονός που την κάνει ιδιαίτερα στεγανή σε ιόντα. Στην εσωτερική μεμβράνη εδράζονται τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας καθώς και σύμπλοκα που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs και στη σύνθεση ATP. Στον εσωτερικό χώρο των μιτοχονδρίων εντοπίζονται δύο διαφορετικά διαμερίσματα η μιτοχονδριακή μήτρα

(mitochondrial matrix), και ο διαμεμβρανικός χώρος, Εικόνα 6.A. Στη μιτοχονδριακή μήτρα απαντάται το μιτοχονδριακό DNA, κοντά στην εσωτερική μεμβράνη.



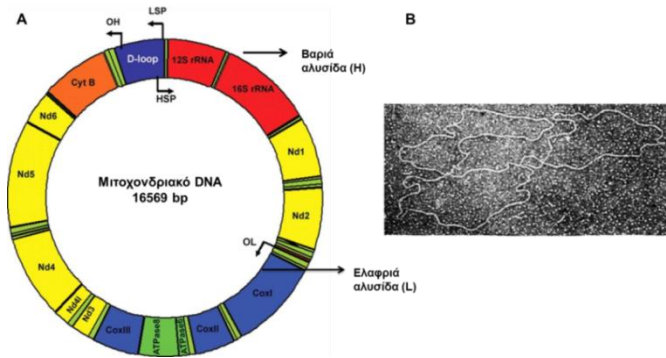
**Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της δομής του μιτοχονδρίου.** **A.** Φωτογραφία μιτοχονδρίου από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η χαρακτηριστική δομή του μιτοχονδρίου περιλαμβάνει την εξωτερική μεμβράνη, την εσωτερική μεμβράνη, τον διαμεμβρανικό χώρο, τις εσωτερικές πτυχώσεις (cristae) και τη μήτρα του μιτοχονδρίου (matrix). **B.** Ενδεικτική εικόνα ανοσοφθορισμού στην οποία αποτυπώνεται το μιτοχονδριακό δίκτυο στα ευκαρυωτικά κύτταρα PK2. Η σήμανση του μιτοχονδριακού δικτύου έγινε με το αντίσωμα Tom20 (πράσινο), οι μικροσωληνίσκοι του κυτταροσκελετού με το αντίσωμα για την  $\alpha$ -tubulin (κόκκινο) και η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI (μπλε). (Scale bar: 20  $\mu$ m.) [Προσαρμογή και τροποποίηση από (Kukat, Wurm et al. 2011)]

Το εκκεντρικό χαρακτηριστικό των μιτοχονδρίων είναι ότι, διαθέτοντας δικό τους γενετικό υλικό και ριβοσώματα, απολαμβάνουν ένα είδος γενετικής αυτονομίας, μιας και είναι ικανά να παράγουν πρωτεΐνες, κατ'εντολήν του μιτοχονδριακού DNA, και όχι του DNA του πυρήνα. Ιστορικά η πρώτη παρατήρηση ότι τα μιτοχόνδρια κάνουν ανεξάρτητη σύνθεση πρωτεϊνών και RNA (Mc, Cohn et al. 1958; Wintersberger 1964) δικαιολογήθηκε από την ανακάλυψη DNA, του μιτοχονδριακού DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) εντός του οργανιδίου (Nass, Nass et al. 1965; Nass 1969). Η αποκάλυψη αυτή προκάλεσε το ενδιαφέρον για την εξελικτική προέλευση των μιτοχονδρίων. Η προέλευση των μιτοχονδρίων σύμφωνα με την, αμφιλεγόμενη αρχικά, ενδοσυμβιωτική θεωρία (Margulis 1970) προτείνει ότι τα μιτοχόνδρια προήλθαν από τη συμβίωση ενός αρχέγονου προκαρυωτικού αερόβιου οργανισμού με ένα αναερόβιο πρωτοευκαρυωτικό ξενιστή. Η συμβιωτική αυτή σχέση διατηρήθηκε και η βαθμιαία προσαρμογή συνετέλεσε στη «μεταμόρφωση» των αερόβιων προκαρυωτικών οργανισμών σε μιτοχόνδρια. Η πυκνότητα των μιτοχονδρίων ανά κύτταρο είναι άμεσα εξαρτώμενη από τις ενεργειακές απαιτήσεις

του κυττάρου, με τους νευρώνες και τα μυϊκά κύτταρα να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη πυκνότητα.

#### **A.2.1.1 Δομή και οργάνωση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA)**

Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA είναι δίκλωνο, κυκλικό, υπερελικωμένο μόριο DNA το οποίο εντοπίζεται μέσα στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Αποτελείται από 16,569 ζεύγη βάσεων (base pairs - bp) και δεν περιέχει ιντρόνια σαν ενδιάμεσα των γονιδίων. Η αντιγραφή γίνεται καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Το mtDNA κωδικοποιεί 13 μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη συναρμολόγηση των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι επτά υπομονάδες της αφυδρογονάσης NADH (σύμπλοκο I), μία υπομονάδα της αναγωγάσης του κυτοχρώματος C (σύμπλοκο III), τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος C (σύμπλοκο IV) και δύο υπομονάδες της ATP συνθάσης (σύμπλοκο V; Εικόνα 7. Α.). Οι εναπομείναντες υπομονάδες των συμπλόκων, το σύμπλοκο II καθώς και αυτές που συμμετέχουν στη λειτουργική συγκρότηση του οργανιδίου προέρχονται από το χρωμοσωμικό DNA. Επιπλέον το mtDNA κωδικοποιεί και κάποιες πρωτεΐνες της μεταγραφικής και μεταφραστικής μηχανής, και συγκεκριμένα 22 μεταφορικά RNAs (tRNAs) και 2 ριβοσωμικά RNAs (rRNAs), χαρακτηριστικό της ημι-αυτόνομης φύσης του οργανιδίου (Anderson, Bankier et al. 1981). Οι αλυσίδες του mtDNA διαχωρίζονται σε ελαφριά (Light-L) και βαριά (Heavy-H), ανάλογα με το ποσοστό γουανίνης και θυμίνης (G+T) που περιέχουν. Το mtDNA περιέχει και μια μη-κωδική περιοχή που ονομάζεται βρόγχος εκτόπισης (D-loop), και έχει μέγεθος 1124 ζεύγη βάσεων. Εντοπίζεται μεταξύ των 16024-576 bp, και αποτελεί το σημείο ελέγχου της έκφρασης του mtDNA μιας και περιέχει τις θέσεις υποκινητών για την έναρξη της αντιγραφής για τη βαριά και ελαφριά αλυσίδα, καθώς και την περιοχή έναρξης της αντιγραφής της βαριάς αλυσίδας (H-strand replication, OH) (Clayton 2000). Σε αυτήν αγκυροβολούν τα μεταγραφικά σύμπλοκα συμπεριλαμβανομένης και της μιτοχονδριακής RNA πολυμεράσης για τον έλεγχο της μεταγραφής του mtDNA (Brown and Clayton 2002). Στο εσωτερικό της εντοπίζονται δύο υπερμεταβλητές περιοχές η HV1 και η HV2 (Hypervariable region 1 και 2) στις θέσεις 16.024 - 16.383 και 57-372 αντίστοιχα. Οι περιοχές αυτές αποτελούν σημείο εντοπισμού πολλών mtDNA τροποποιήσεων (Sharma, Singh et al. 2005).



**Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA).** Α. Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα mtDNA κωδικοποιεί 13 πρωτεΐνες, συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας ETC. Αυτές είναι επτά υπομονάδες του συμπλόκου I (ND 1–6 και ND4L), μία υπομονάδα του συμπλόκου III (CytB), τρεις υπομονάδες του συμπλόκου

IV (COX I-III) και δύο υπομονάδες του συμπλόκου V (ATPase6 και ATPase8). Επίσης κωδικοποιεί δύο rRNAs (12S και 16S) και 22 tRNAs. Η περιοχή D-loop περιέχει τον υποκινητή της βαριάς (H-strand promoter region, HSP) και της ελαφριάς αλυσίδας (L-strand promoter region, LSP), καθώς και την περιοχή έναρξης της αντιγραφής της βαριάς αλυσίδας (H-strand replication, OH). Η δεύτερη περιοχή έναρξης της αντιγραφής για την ελαφριά αλυσίδα (L-strand replication, OL) αποτελείται μόνο από 30 ζεύγη βάσεων, και εντοπίζεται μεταξύ των γονιδίων ND2 και COX1. Β. Ηλεκτρονική μικρογραφία σάρωσης του κυκλικού μιτοχονδριακού DNA. [Προσαρμογή και τροποποίηση από (Hudson and Vinograd 1967; St John, Facucho-Oliveira et al. 2010)]

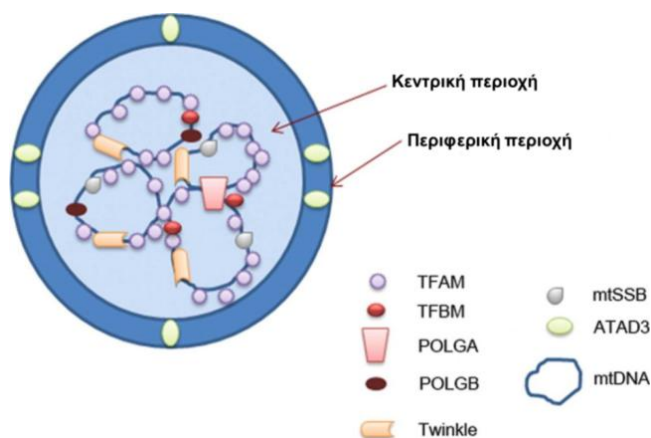
Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά του mtDNA είναι ο ιδιόμορφος γενετικός του κώδικας. Στα μιτοχόνδρια παρατηρούνται αποκλίσεις από τον γενικευμένο γενετικό κώδικα. Συνολικά στο mtDNA απαντώνται δύο κωδικόνια έναρξης (AUA και AUG) και τέσσερα κωδικόνια τερματισμού (UAA, UAG, AGA και AGG) της πρωτεϊνοσύνθεσης, Εικόνα 7. Η ύπαρξη μερικών διαφορών στο γενετικό κώδικα του mtDNA, σχετίζεται με την παρουσία 22 μόνο tRNAs, σε αντίθεση με τα 32 που απαιτούνται για την κυτταροπλασματική πρωτεϊνοσύνθεση. Φαίνεται ότι τα 22 tRNAs που κωδικοποιούνται στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα επαρκούν για τη σύνθεση των 13 πολυπεπτιδίων που επίσης κωδικοποιούνται από αυτό.

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Trp UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } Ile AUC } AUA } Met AUG }	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA Stop AGG Stop	U C A G
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

**Εικόνα 8. Ο γενετικός κώδικας στα μιτοχόνδρια.** Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι αλλαγές στα κωδικόνια στο mtDNA. Το κωδικόνιο UGA χρησιμοποιείται ως κωδικόνιο τερματισμού στον παγκόσμιο γενετικό κώδικα, αλλά κωδικοποιεί για το αμινοξύ τρυπτοφάνη στο mtDNA των θηλαστικών, το κωδικόνιο AUA κωδικοποιεί για ισολευκίνη στον παγκόσμιο γενετικό κώδικα, αλλά κωδικοποιεί για μεθειονίνη στο mtDNA των θηλαστικών, τα κωδικόνια AGA και AGG κωδικοποιούν για αργινίνη στον παγκόσμιο γενετικό κώδικα αλλά χρησιμοποιείται ως κωδικόνιο τερματισμού στο mtDNA των θηλαστικών.

[Προσαρμογή πίνακα από (Griffiths, Barrowclough et al. 2004)]

Δεδομένης της εξελικτικής βακτηριακής προέλευσης των μιτοχονδρίων δεν αποτέλεσε έκπληξη η ομοιότητα της οργάνωσης του mtDNA με το βακτηριακό DNA. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα υποβάλλεται σε συμπίεση του όγκου του για να σχηματίσει τα μιτοχονδριακά πυρηνοειδή (mitochondrial nucleoid). Τα μιτοχονδριακά πυρηνοειδή τυπικά έχουν διάμετρο ~100 nm (Kukat, Wurm et al. 2011), ενώ ένα τελείως χαλαρό κυκλικό mtDNA μόριο μεγέθους 16.6 kb έχει μήκος της τάξης των ~2 μm. Τα πυρηνοειδή είναι εμφανή στο μικροσκόπιο σαν μικρές στικτές δομές που κατανέμονται σε όλο το μιτοχονδριακό δίκτυο (Alam, Kanki et al. 2003; Legros, Malka et al. 2004). Τα μιτοχονδριακά πυρηνοειδή αποτελούνται από ένα σύνολο πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε ένα εύρος λειτουργιών όπως η συσκευασία του mtDNA, η αντιγραφή και η μεταγραφή. Δομικά αποτελούνται από μια κεντρική και μία περιφερική περιοχή (Εικόνα 9), όπου η κεντρική περιοχή περιέχει πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων, ενώ στην περιφερική περιοχή εντοπίζονται πρωτεΐνες της μεταφραστικής μηχανής καθώς και αυτές που έχουν σχέση με τη συγκρότηση των πρωτεϊνών (Bogenhagen, Rousseau et al. 2008). Ο αριθμός των πυρηνοειδών ανά μιτοχόνδριο κυμαίνεται από 1 έως 10 , ενώ κάθε πυρηνοειδές μπορεί να περιέχει από 1 έως 15 αντίγραφα mtDNA σύμφωνα με (Sato 2004), ή 2 έως 8 σύμφωνα με (Legros, Malka et al. 2004).



**Εικόνα 9. Δομικό μοντέλο του μιτοχονδριακού πυρηνοειδούς.** Στην

κεντρική περιοχή το mtDNA προσδέεται με πρωτεΐνες που ανήκουν στην μηχανή αντιγραφής και μεταγραφής και έχουν ικανότητα απευθείας πρόσδεσης στο mtDNA.

Στην περιφερική περιοχή εντοπίζονται οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μετάφραση, δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με το mtDNA, αλλά μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των

πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, στην κεντρική περιοχή των πυρηνοειδών εντοπίζονται οι μεταγραφικοί παράγοντες TFAM (mitochondrial transcription factor A) και TFBM (mitochondrial transcription factor B), με τον μεταγραφικό παράγοντα TFAM να αποτελεί την πιο άφθονη πρωτεΐνη συσκευασίας-πακεταρίσματος του mtDNA. Η mtSSB (mitochondrial single-strand binding protein), η μιτοχονδριακή πολυμεράση POLG, αποτελείται από δύο υπομονάδες στα θηλαστικά την POLGA, είναι η καταλυτική υπομονάδα που έχει δραστηριότητα 3'-5' εξωνουκλεάσης και ευθύνεται για την υψηλή πιστότητα του ενζύμου (Graziewicz, Longley et al. 2006). Η δεύτερη υπομονάδα είναι η POLGB, είναι βοηθητική υπομονάδα, σχηματίζει ετεροδιμερές σε αναλογία 2:1 με την POLGA, σταθεροποιώντας το ένζυμο αυξάνοντας την αποτελεσματικότητά του (Carrodeguas, Kobayashi et al. 1999; Carrodeguas, Theis et al. 2001). Επιπλέον



πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι η POLGB αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τον αριθμό αντιγράφων του mtDNA (Di Re, Sembongi et al. 2009). Η POLRMT (mtRNA polymerase), η ελικάση Twinkle, η πρωτεΐνη mtSSB, αποτελεί μια εκτυλικτική πρωτεΐνη, μέσω της φυσικής αλληλεπίδρασης με την Twinkle μεσολαβεί στην εκτύλιξη του ξετύλιγμα mtDNA. Η πρωτεΐνη ATAD3 δεν αλληλεπιδρά άμεσα με το mtDNA, αλλά με το μιτοχονδριακό ριβόσωμα και την εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. [Προσαρμογή και τροποποίηση από (St John, Facucho-Oliveira et al. 2010)]

Δεν υπάρχουν ιστόνες στο mtDNA, το ρόλο αυτό αναλαμβάνει ο μεταγραφικός παράγοντας TFAM, μιας και αποτελεί την πιο άφθονη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη, αφού αντιστοιχούν ~900–1000 μόρια TFAM :1 μόριο mtDNA (Ekstrand, Falkenberg et al. 2004). Συμμετέχει ενεργά στον έλεγχο και τη συσκευασία του mtDNA όπως αντίστοιχα οι ιστόνες στο χρωμοσωμικό DNA (Bianchi and Agresti 2005). Επιπλέον η γ-πολυμεράση, το ένζυμο δηλαδή που είναι υπεύθυνο για την αντιγραφή του mtDNA, στερείται της ικανότητας επιδιόρθωσης λαθών, κάτι που έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταλλάξεων σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με το πυρηνικό DNA. Η απουσία ιντρονίων, ψευδογονιδίων, επαναλαμβανόμενου DNA και μεγάλων ακολουθιών που να παρεμβάλλονται μεταξύ των γονιδίων, καθιστά το mtDNA παράδειγμα γενετικής οικονομίας στη φύση. Οι περισσότερες από τις γενετικές αλλαγές που παρατηρούνται είναι απλές αντικαταστάσεις βάσεων, όπως και μικρές προσθήκες ή ελλείμματα (ενός ή λίγων νουκλεοτιδίων), ενώ λιγότερες περιλαμβάνουν μεγάλες αλλαγές (μέχρι αρκετές 100άδες νουκλεοτίδια) στο μήκος του μορίου. Οι περισσότερες διαφορές μήκους περιορίζονται στην περιοχή ελέγχου του μορίου D-Loop. Η κληρονομική μεταβίβαση του mtDNA γίνεται μητρικά.

### **A.2.2 Οξειδωτικό stress**

Τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια πηγή παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS). Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου αποτελούν παραπροϊόντα της κυτταρικής αναπνοής και συμβάλλουν σημαντικά στο ενδοκυτταρικό οξειδωτικό stress, δηλαδή στη διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των ελευθέρων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού (Starkov 2008; Murphy 2009). Ο σχηματισμός ROS είναι ανάλογος με τη δραστηριότητα της αναπνευστικής αλυσίδας (Di Meo and Venditti 2001). Το σύμπλοκο I και σε μικρότερο βαθμό το σύμπλοκο III της αναπνευστικής αλυσίδας αποτελούν τις κύριες εστίες παραγωγής ROS στα μιτοχόνδρια. Κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, το σύμπλοκο I της αναπνευστικής

αλυσίδα λειτουργεί σαν σημείο εισόδου των ηλεκτρονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα στην αναπνευστική αλυσίδα. Καθώς το μοριακό οξυγόνο ανάγεται σταδιακά σε νερό από τα σύμπλοκα την αλυσίδα, παράγεται ένα μικρό ποσό ιόντων σουπεροξειδίου ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) από τα σύμπλοκα I και III. Τα ιόντα αυτά μπορούν να μετατραπούν σε υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) από τη δισμουτάση του σουπεροξειδίου, και το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται από την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης σε νερό ( $\text{H}_2\text{O}$ ) και μοριακό οξυγόνο ( $\text{O}_2$ ). Στην αναπνευστική αλυσίδα το 95-99% του οξυγόνου που καταναλώνεται ανάγεται σε νερό, ωστόσο ένα μικρό ποσοστό 1-5%, θα οδηγήσει στο σχηματισμό  $\cdot\text{O}_2^-$ .

Το  $\text{H}_2\text{O}_2$  είναι ένα δραστικό μόριο, που μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως η ρίζα του υδροξυλίου ( $\cdot\text{OH}$ ). Είναι σταθερό, διαπερατό στις μεμβράνες και έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής μέσα στο κύτταρο. Είναι κυτταροτοξικό, αλλά θεωρείται ένας σχετικά ασθενής οξειδωτικός παράγοντας. Ωστόσο, παρουσία μεταλλικών ιόντων όπως ο σίδηρος  $\text{Fe}^{2+}$ , το υπεροξειδίο του υδρογόνου μπορεί να μετατραπεί σε πολύ δραστικές ρίζες υδροξυλίου σαν συνέπεια της αντίδρασης Fenton, η οποία προκαλεί σοβαρή οξειδωτική βλάβη στα κυτταρικά συστατικά. Η δραστικότητα της ρίζας υδροξυλίου είναι εξαιρετικά υψηλή (Bielski 1985; Akhlaq, Schuchmann et al. 1987; Halliwell 1999), αποτελεί έναν ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο συμπεριλαμβανομένων και των βιολογικών μακρομορίων.

Τα λιπίδια μεμβρανών που απαντώνται στα ενδοκυτταρικά οργανίδια, είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε βλάβες προκαλούμενες από ελεύθερες ρίζες. Συγκεκριμένα ένας μεγάλος αριθμός τοξικών παραπροϊόντων σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με τις ελεύθερες ρίζες, που οδηγεί σε μια εξαιρετικά επιζήμια αλυσίδα αντιδράσεων λιπιδικής υπεροξειδωσης. Η βλάβη που προκαλείται από τη λιπιδική υπεροξειδωση είναι ιδιαίτερα επιζήμια για τη λειτουργία του κυττάρου (Devasagayam, Boloor et al. 2003), αφού αλλάζει τη ρευστότητα των κυτταρικών μεμβρανών και μειώνει την ικανότητα διατήρησης μιας εξισοροποιημένης βαθμίδας συγκέντρωσης. Αυξάνει δηλαδή τη διαπερατότητα της μεμβράνης (Radak, Kaneko et al. 1999), συνεπώς προκύπτει απώλεια ενδοκυτταρικών υγρών, μείωση της μεταφοράς ηλεκτρονίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο και αλλαγές στη μιτοχονδριακή λειτουργία (Jackson and O'Farrell 1993).

Η συσσώρευση των ROS έχει επίσης σαν αποτέλεσμα την οξείδωση των πρωτεϊνών. Σαν συνέπεια της οξείδωσης, οι πρωτεΐνες μπορεί να χάσουν αμινοξέα ή να

κατακερματιστούν, και ως εκ τούτου απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας και αλλαγή στην κυτταρική λειτουργία (Grune, Michel et al. 1997; Halliwell 1999). Η οξείδωση των πρωτεϊνών και των αμινοξέων συνοδεύεται από αύξηση στα επίπεδα των ομάδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Reinke, Smith et al. 2000; Levine 2002) και των οξειδωμένων αμινοξέων (Leeuwenburgh, Hansen et al. 1999; Stadtman and Levine 2000). Τα ROS έχουν επίσης την ικανότητα να εξασθενούν τη λειτουργία των συστημάτων πρωτεϊνικής αποδόμησης (UPS) και το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος (ALP) με αποτέλεσμα τη συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κυττάρου (Szweda, Friguier et al. 2002).

Παρότι το DNA αποτελεί ένα σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο, τα ROS αλληλεπιδρούν με αυτό και προκαλούν μια σειρά από βλάβες όπως τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών, αλλαγή στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Συγκεκριμένα η ρίζα υδροξυλίου αντιδρά με τη γουανίνη στην θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν την 8-υδροξυ-2-γουανοσίνη (8-OHdG), ενώ αυτό μπορεί να προκύψει και μετά από αλληλεπίδραση και με άλλες βάσεις όπως η αδενίνη. Άλλα τοξικά προϊόντα αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου είναι ο σχηματισμός υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, και γλυκολών της θυμίνης (Halliwell 2001; Dizdaroglu, Jaruga et al. 2002).

Στις βλαβερές συνέπειες του οξειδωτικού stress το κύτταρο έχει αναπτύξει μια πληθώρα μηχανισμών που ενεργοποιούνται κατά την οξειδωτική βλάβη των μιτοχονδρίων για να διατηρήσουν την κυτταρική ομοιόσταση και τη βιωσιμότητά του. Η απομάκρυνση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβη μέσω των πρωτεολυτικών μηχανισμών, η αποκατάσταση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων από τα υγιή μέσω των μηχανισμών σχάσης και σύντηξης και η απομάκρυνση των μιτοχονδρίων που έχουν υποστεί ανεπανόρθωτες βλάβες μέσω της διαδικασίας της μιτοφαγίας αποτελούν τους κύριους μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου των μιτοχονδρίων.

### **A.2.3 Η νόσος του Parkinson αποτελεί μιτοχονδριακή διαταραχή**

Τα πρώτα στοιχεία ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου του Parkinson, έρχονται μετά την παρατήρηση ότι η χρήση από τοξικομανής νοθευμένων παρασκευασμάτων που περιείχαν 1-μεθυλ-4-φαινυλ-1,2,4,5-τετραυδροπυριδίνη (MPTP), έναν αναστολέα του συμπλόκου I της αναπνευστικής

αλυσίδας, προκαλεί παρκινσονισμό (Langston, Ballard et al. 1983). Αποδείξεις για τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία προέκυψαν σε ασθενείς με PD, όπου επιβεβαιώθηκε η ανεπαρκής δραστηριότητα του συμπλόκου I στην περιοχή της μέλαινας ουσίας (Schapira, Cooper et al. 1990; Hattori, Tanaka et al. 1991). Επιπλέον έχει αναφερθεί ατελής συναρμολόγηση του συμπλόκου I σε ασθενείς με νόσο του Parkinson, στην εγκεφαλική περιοχή του φλοιού (Parker, Parks et al. 2008). Ωστόσο η δυσλειτουργία του συμπλόκου I έχει παρατηρηθεί και σε άλλους ιστούς όπως σε μιτοχόνδρια που απομονώθηκαν από αιμοπετάλια ασθενών με νόσο του Parkinson (Krige, Carroll et al. 1992; Haas, Nasirian et al. 1995), στους ινοβλάστες (Mytilineou, Werner et al. 1994), στους μυς (Blin, Desnuelle et al. 1994), και στους λεμφοβλάστες (Yoshino, Nakagawa-Hattori et al. 1992; Haas, Nasirian et al. 1995), ενώ πρόσφατα αυτή η δυσλειτουργία επιβεβαιώθηκε και σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από μετωπιαίο φλοιό ασθενών (Parker, Parks et al. 2008). Μείωση στη δραστηριότητα του συμπλόκου I παρατηρήθηκε και σε κυτταροπλασματικά υβρίδια, σε κυτταρικές σειρές που περιείχαν μιτοχονδριακό DNA από ασθενείς με τη σποραδική μορφή της νόσου του Parkinson (Swerdlow, Parks et al. 2001). Πρόσφατη μελέτη έδειξε επίσης ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα οξειδωμένου συνενζύμου Q-10 και του οξειδωτικού προϊόντος 8-υδροξυ-2-γουανοσίνη (8-OHdG) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με PD ενισχύοντας την υπόθεση για μιτοχονδριακή οξειδωτική βλάβη και οξειδωτική βλάβη του DNA στην παθολογία του Parkinson (Isobe, Abe et al. 2010).

Η αύξηση του stress που προκύπτει από την παραγωγή ROS είναι ένας από τους προτεινόμενους υπεύθυνους μηχανισμούς για την εκλεκτική απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη νόσο του Parkinson. Η καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου I βρέθηκε να περιέχει οξειδωμένες πρωτεΐνες και η πιθανή συσχέτιση μεταξύ των οξειδωμένων πρωτεϊνών και της μείωσης της μεταφοράς ηλεκτρονίων που παρατηρείται σε ασθενής με PD δείχνει ότι η οξειδωτική βλάβη σε αυτές τις υπομονάδες μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την ανεπάρκεια του συμπλόκου I (Keeney, Xie et al. 2006).

Η εγγύτητα του mtDNA στα κέντρα παραγωγής ROS, καθώς και η απουσία μηχανισμών επιδιόρθωσης και προστατευτικών ιστονών, καθιστούν το mtDNA ευάλωτο σε μεταλλάξεις (Richter, Park et al. 1988; Ozawa 1997). Μελέτες σε ζωικά μοντέλα ποντικών αποδεικνύουν ότι βλάβες στα γονίδια που είναι απαραίτητα για τη διατήρηση και τη συγκρότηση του mtDNA συνεπάγονται ανεπαρκή λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, ενώ φαινοτυπικά παρουσιάζουν χαρακτηριστικά πρόωρης γήρανσης (Reeve,

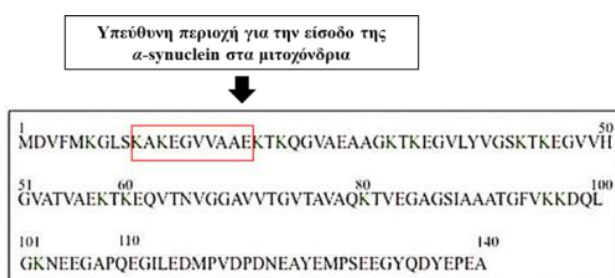
Krishnan et al. 2008; Larsson 2010; Park and Larsson 2011). Επιπλέον ο ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων στο mtDNA των ντοπαμινεργικών νευρώνων ασθενών με νόσο του Parkinson είναι πολύ υψηλός συγκριτικά με υγιή γερασμένα άτομα (Bender, Krishnan et al. 2006). Οι νευρώνες της μέλαινας ουσίας φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι σε μεταλλάξεις του mtDNA, δεδομένου ότι οι νευρώνες του ιππόκαμπου ή οι πυραμιδικοί νευρώνες γερασμένων ατόμων δεν περιείχαν υψηλό ρυθμό μεταλλάξεων. Παρόλα αυτά δεν υπάρχει ακόμα ισχυρή απόδειξη ότι οι μεταλλάξεις στο mtDNA μπορεί να αποτελέσουν την πρωταρχική αιτία πρόκλησης της νόσου του Parkinson, αλλά φαίνεται πολύ πιθανό οι μεταλλάξεις να συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της νόσου σαν συνέπεια της αύξησης του κυτταρικού stress και των λαθών κατά τη διάρκεια αντιγραφής του mtDNA. Όταν η συσσώρευση των μεταλλάξεων ξεπεράσει ένα κρίσιμο κατώφλι, προκαλούν αναπνευστική ανεπάρκεια που συμβάλλει στη νευροεκφύλιση. Αξίζει να σημειωθεί ότι το σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας είναι ιδιαίτερα ευάλωτο στις μεταλλάξεις μιας και 7 από τις 45 υπομονάδες που είναι απαραίτητες για τη λειτουργική συναρμολόγηση του συμπλόκου κωδικοποιούνται από το mtDNA. Δεδομένων των παραπάνω στοιχείων είναι εμφανές ότι τα μιτοχόνδρια αποτελούν ταυτόχρονα πηγή και στόχο των ROS (Starkov 2008; Murphy 2009).

#### **A.2.4 Η $\alpha$ -synuclein συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια ασθενών με νόσο του Parkinson.**

Η  $\alpha$ -synuclein φυσιολογικά αλληλεπιδρά με τα μιτοχόνδρια. Μελέτες *in vivo* έχουν αποκαλύψει ότι ένα τμήμα της πρωτεΐνης απαντάται φυσιολογικά στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων των ντοπαμινεργικών νευρώνων, ενώ έχει εντοπιστεί και σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου μεταξύ των οποίων ο οσφρητικός βολβός, το ραβδωτό σώμα, ο ιππόκαμπος και ο εγκεφαλικός φλοιός (Liu, Zhang et al. 2009). Επιπλέον αυτός ο εντοπισμός έχει επιβεβαιωθεί και σε *in vitro* μελέτες σε διάφορες κυτταρικές σειρές όπως HELA, PC12 και SH-SY5Y (Zhu, Li et al. 2012).

Η περιοχή της  $\alpha$ -synuclein που είναι υπεύθυνη για αυτήν την αλληλεπίδραση είναι το αμινοτελικό της άκρο. Όπως έχουμε αναφέρει προηγουμένως (Παράγραφος 1.5.1.) το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης αποτελείται από 60 αμινοξέα και περιλαμβάνει επαναλήψεις μια αλληλουχίας 11 αμινοξέων, με ένα ισχυρά συντηρημένο εξαμερές μοτίβο. Η μετάβαση της  $\alpha$ -synuclein στα μιτοχόνδρια, γίνεται μέσω μιας μικρής αλληλουχίας μεταξύ των καταλοίπων 4-32 (KAKEGVVAAE), η οποία χρησιμεύει ως

αλληλουχία στόχος για την αναγνώριση και την είσοδο στα μιτοχόνδρια, (Zigoneanu, Yang et al. 2012) Εικόνα 10. Φυσιολογικά απαντάται στην εσωτερική μεμβράνη του οργανιδίου όπου αλληλεπιδρά με το φωσφολιπίδιο, συστατικό της εσωτερικής μεμβράνης, καρδιολιπίνη (cardiolipin, CL). Η αγκυροβόληση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη πιθανόν επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων ηλεκτροστατικής φύσης μεταξύ των θετικά φορτισμένων καταλοίπων Λυσίνης (Lysine – K) με το ανιονικό φωσφολιπίδιο CL (Zigoneanu, Yang et al. 2012).



**Εικόνα 10. Η αμινοξική αλληλουχία της  $\alpha$ -synuclein.** Στο κόκκινο πλαίσιο εικονίζεται η υπεύθυνη περιοχή που χρησιμεύει σαν αλληλουχία στόχος για τη μεταφορά της εντός των μιτοχονδρίων. [Προσαρμογή και τροποποίηση από (Gonzalez-Horta 2013)]

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν έναν από τους άμεσους στόχους της  $\alpha$ -synuclein κατά την παθογένεση του Parkinson. Σημαντική συσσώρευση της πρωτεΐνης έχει παρατηρηθεί στα μιτοχόνδρια που αφορούν τις περιοχές του εγκεφάλου της μέλαινας ουσίας και το ραβδωτό σώμα σε ασθενής με νόσο Parkinson. Η αγκυροβόληση της  $\alpha$ -synuclein στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και η συσσώρευση της έχει ευρέως συσχετιστεί με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία αφού αποσταθεροποιεί την εσωτερική μεμβράνη (Cole, Dieuliis et al. 2008; Vila, Ramonet et al. 2008; Devi and Anandatheerthavarada 2010), προκαλεί δυσλειτουργία του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας (Ellis, Murphy et al. 2005; Devi, Raghavendran et al. 2008; Chinta, Mallajosyula et al. 2010), οξειδωτικό stress (Parihar, Parihar et al. 2008), απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης (mitochondrial membrane potential -  $\Delta\Psi_m$ ), αύξηση στην παραγωγή ROS, απελευθέρωση του cytochrome C και ενίσχυση των φαινομένων της μιτοχονδριακής σχάσης (Nakamura, Nemani et al. 2011). Επιπλέον η  $\alpha$ -synuclein αλληλεπιδρά συγκεκριμένα με το σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας παρεμποδίζοντας έτσι τη λειτουργία του, ενώ είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι η  $\alpha$ -synuclein στην οποία έχει αφαιρεθεί η περιοχή που φέρει την αλληλουχία - μιτοχονδριακό στόχο αποτυγχάνει να εισέλθει στα μιτοχόνδρια και δεν προκαλεί καμία ανιχνεύσιμη μεταβολή στη λειτουργία του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας (Devi, Raghavendran et al. 2008).

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>

### Μοντελοποίηση της νόσου του Parkinson

#### A.3.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η νόσος του Parkinson είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή, η οποία επηρεάζει κατά βάση τις εγκεφαλικές λειτουργίες του ανθρώπου. Τα πρώτα παθολογικά ευρήματα βασίστηκαν σε δείγματα νεκροψίας όταν η νόσος βρισκόταν ήδη στο τελικό στάδιο. Η επιτακτική ανάγκη μελέτης της νόσου σε πρώιμα στάδια, για την κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται, οδήγησε στην ανάπτυξη ζωικών παρκινσονικών μοντέλων τα οποία κατηγοριοποιούνται ως εξής:

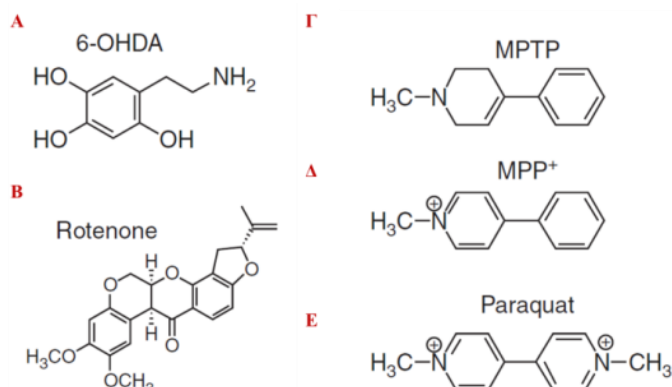
(1) Τοξικά μοντέλα που προκύπτουν από τη χρήση τοξινών όπως η 1-μεθυλ-4-φαινυλ-1,2,4,5-τετραυδροπυριδίνη (1-methyl-4-phenyl-1,2,4,5-tetrahydropyridine, MPTP), η 6-υδροξυντοπαμίνη (6-hydroxydopamine, 6-OHDA), η ροτενόνη (rotenone) και το παρακουάτ (paraquat), Εικόνα 11.

(2) Γενετικά μοντέλα που προκύπτουν μετά από μια γενετική τροποποίηση στα γονίδια *α-synuclein*, *LRRK2*, *parkin*, *PINK1* and *DJ-1*.

(3) Συνδυαστικά μοντέλα, μοντέλα δηλαδή που βασίζονται στη χρήση ενός εκ των παραπάνω περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου και μίας γενετικής τροποποίησης.

Ιδανικό μοντέλο μελέτης της νόσου του Parkinson, είναι ένα μοντέλο που είτε επάγεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες είτε από γενετικούς χειρισμούς, έχει σαν αποτέλεσμα την επιτυχή αναπαραγωγή των χαρακτηριστικών της νόσου του Parkinson, όσον αφορά τις διαταραχές της συμπεριφοράς (κινητικές διαταραχές), τα παθολογικά χαρακτηριστικά (προοδευτική, επιλεκτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων με ταυτόχρονη παρουσία LBs), καθώς και διαταραχές σε μοριακούς μηχανισμούς. Δυστυχώς όλα τα τρέχοντα ζωικά μοντέλα αδυνατούν να αναπαραστήσουν πλήρως το σύνολο των χαρακτηριστικών που έχουν περιγραφεί στη νόσο του Parkinson. Πολλά γενετικά Παρκινσονιακά μοντέλα, βασιζόμενα τόσο στον αυτοσωμικό επικρατή όσο και στον αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας, αποτυγχάνουν να οδηγήσουν σε νευροεκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων και σχεδόν όλα δεν οδηγούν στο σχηματισμό των κυτταροπλασματικών εγκλείστων που θυμίζουν τα σωματίδια του Lewy (Terzioglu and Galter 2008). Όσον αφορά τα παρκινσονιακά μοντέλα μελέτης που βασίζονται στη χρήση τοξινών, έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί και έχουν συμβάλει στην κατανόηση μηχανισμών που εμπλέκονται στη νόσο. Επίσης αποτελούν κατάλληλα μοντέλα μελέτης φαρμακολογικών στόχων στη δοκιμή πιθανόν θεραπειών. Ωστόσο προς

το παρόν δεν υπάρχει υποδειγματικό μοντέλο που να αναπαριστά πλήρως τα φαινοτυπικά και παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου του Parkinson.



**Εικόνα 11. Οι χημικές δομές των νευροτοξινών που χρησιμοποιούνται στα πιο συχνά μοντέλα μελέτης της νόσου του Parkinson. Α.** 6-υδροξυτοπαμίνη (6-OHDA) **Β.** Ροτενονη (rotenone) **Γ.** N-μεθυλ-4-φαινυλ-1, 2, 3, 6-τετραυδροπυριδίνη (MPTP) **Δ.** το τοξικό παράγωγο MPP+ **Ε.** Παρακουάτ (Paraquat). [Προσαρμογή και τροποποίηση από (Tieu 2011)].

### A.3.2 Τοξικά μοντέλα

#### A.3.2.1 MPTP

Το 1982 παρατηρήθηκε ότι η κατανάλωση της χημικής ουσίας MPTP (N-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) που βρίσκεται σε νοθευμένα παρασκευάσματα ηρωίνης προκαλεί στους χρήστες μη αναστρέψιμο παρκινσονικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από όλα τα συμπτώματα της νόσου του Parkinson, καλή απόκριση στη levodopa και ανάπτυξη κινητικών διαταραχών μετά από χρόνια χορήγησή της (Langston, Ballard et al. 1983). Αμέσως μετά την επιβεβαίωση ότι το MPTP λειτουργεί σαν ντοπαμινεργική νευροτοξίνη, δημιουργήθηκε το πρώτο αποτελεσματικό ζωικό μοντέλο μελέτης της νόσου του Parkinson (σε πιθήκους) με τη χορήγηση MPTP σε επαναλαμβανόμενες ενέσεις (Burns, Chiueh et al. 1983).

Όπως και στη νόσο του Parkinson, η ευαισθησία στο MPTP, το οποίο έκτοτε χρησιμοποιήθηκε σε διάφορα ζωικά μοντέλα, αυξάνει με την ηλικία (Ovadia, Zhang et al. 1995). Μάλιστα, χρόνια χορήγηση χαμηλών ή μετρίων δόσεων MPTP οδηγεί σε απόπτωση των ντοπαμινεργικών κυττάρων της SN (Tatton and Kish 1997). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η εμπλοκή της  $\alpha$ -synuclein στην παθογένεια του μοντέλου MPTP, καθώς η εκτομή του γονιδίου της από το γονιδίωμα του μυός επιφέρει νευροπροστασία έναντι του



MPTP (Dauer, Kholodilov et al. 2002). Αν και έχουν περιγραφεί ενδοκυτταρικά συσσωματώματα, η κλασική ιστοπαθολογία των σωματίων Lewy δεν παρατηρείται στο MPTP μοντέλο (Forno, DeLanney et al. 1993), με εξαίρεση μία και μόνη αναφορά όπου χρόνια χορήγηση MPTP οδήγησε στο σχηματισμό συσσωματωμάτων  $\alpha$ -synuclein (Fornai, Schluter et al. 2005).

Το MPTP είναι μια λιπόφιλη ουσία, με αποτέλεσμα η συστηματική χορήγηση να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (blood-brain barrier, BBB). Οξειδώνεται από τα σεροτονινεργικά και γλοιακά κύτταρα μέσω της μονοαμινικής οξειδάσης Β (MAO-B) σε MPDP<sup>+</sup>, το οποίο στη συνέχεια με αυθόρμητη οξείδωση μετατρέπεται σε MPP<sup>+</sup>, που αποτελεί το τοξικό προϊόν το οποίο απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο. Από εκεί λόγω υψηλής συγγένειας με το μεταφορέα της ντοπαμίνης (Dopamine transporter-DAT), και χαμηλότερο βαθμό της νορεπινεφρίνης και της σεροτονίνης, μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου (Javitch, D'Amato et al. 1985). Εκεί εμπλέκεται σε δύο μονοπάτια, είτε θα δεσμευτεί στον κυστιδικό μεταφορέα της μονοαμίνης 2 (Vesicular Monoamine Transporter 2- VMAT2) το οποίο με τη σειρά του το μεταφέρει στα συναπτικά κυστίδια (Liu, Roghani et al. 1992), μηχανισμός που πιστεύεται ότι προστατεύει τα κύτταρα από την εκφύλιση (Takahashi, Maruyama et al. 1997; Miller, Gainetdinov et al. 1999), είτε μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια όπου και συσσωρεύεται μέσω ενός μηχανισμού εξαρτώμενου από το διαμεμβρανικό δυναμικό, αναστέλλει τη δράση του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας, διαταράσσοντας την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Nicklas, Vyas et al. 1985). Η αναστολή αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη ραγδαία μείωση των επιπέδων του ATP, προκαλώντας ενεργειακό έλλειμμα (Fabre, Monserrat et al. 1999). Επιπλέον, η ελάττωση του ATP μπορεί να οδηγεί σε αδυναμία του VMAT2 να διατηρήσει τη διαβάθμιση συγκέντρωσής του στο κύτταρο, γεγονός που μπορεί να οδηγεί σε απελευθέρωση της ντοπαμίνης από τα συναπτικά κυστίδια στο κυτταρόπλασμα και επακόλουθο οξειδωτικό stress (Johnson 1988). Τέλος, διαταράσσοντας τη ροή ηλεκτρονίων μέσω του συμπλόκου I των μιτοχονδρίων, το MPTP μπορεί να οδηγεί άμεσα στη δημιουργία ελευθέρων ριζών (Hasegawa, Kang et al. 1997). Το ενεργειακό έλλειμμα και το οξειδωτικό stress παρατηρούνται πολύ πριν την εκφύλιση των κυττάρων και φαίνεται ότι ενεργοποιούν διαδικασίες στο κύτταρο που τελικά το σκοτώνουν (Vila, Jackson-Lewis et al. 2001). Επιπλέον σε *in vitro* μελέτες το MPTP αναστέλλει τη δράση των συμπλόκων III και IV της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας (Desai, Feuers et al. 1996). Οι νευρώνες της περιοχής του μεσεγκεφάλου

περιέχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση DAT ανά κύτταρο (Cerruti, Walther et al. 1993), πράγμα που εν μέρει εξηγεί την επιλεκτική ευαισθησία των νευρώνων αυτών στη δράση του MPTP. Οι DAT είναι απαραίτητοι για τη δράση της τοξίνης, αφού στελέχη ποντικών με μη λειτουργική μετάλλαξη για τον DAT ήταν προστατευμένα από τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από το MPTP (Gainetdinov, Fumagalli et al. 1997).

### **A.3.2.2 6-OHDA**

Η 6-υδροξυνοτοπαμίνη (6-Hydroxydopamine, 6-OHDA), αποτελεί ένα υδροξυλιωμένο ανάλογο της ντοπαμίνης που περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1959 (Senoh 1959; Senoh 1959). Εκτός από τη ντοπαμίνη αποτελεί δομικό ανάλογο των κατεχολαμίνη και νοραδρεναλίνη, και ασκεί τοξικές επιδράσεις στους κατεχολαμινεργικούς νευρώνες. Το 1968 ο Ungerstedt απέδειξε ότι η ενέσιμη χορήγηση της 6-OHDA στην SNpc είχε σαν αποτέλεσμα την εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Αυτό αποτέλεσε το πρώτο ζωικό μοντέλο μελέτης της νόσου του Parkinson (Ungerstedt 1968). Έκτοτε έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως και έχει καθιερωθεί σαν PD μοντέλο μελέτης της εκφύλισης των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην SNpc. Η 6-OHDA δεν έχει τη δυνατότητα διέλευσης του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ενύεται στερεοταξικά στη μέλαινα ουσία (SN), στο ραβδωτό σώμα ή στην έσω τηλεγκεφαλική δεσμίδα (medial forebrain bundle-MFB) που περιλαμβάνει ντοπαμινεργικές και σεροτονινεργικές ίνες. Μετά την χορήγησή της, τα ντοπαμινεργικά κύτταρα αρχίζουν να εκφυλίζονται μέσα σε 24 ώρες χωρίς να εμφανίζουν αποπτωτική μορφολογία (Jeon, Jackson-Lewis et al. 1995).

Ο νευροτοξικός μηχανισμός δράσης της αποτελείται από δύο βήματα. Μετά τη χορήγηση, προσλαμβάνεται από τους μεταφορείς ντοπαμίνης και νοραδρεναλίνης (DAT και NAT αντίστοιχα) λόγω της δομικής ομοιότητας με την ενδογενή κατεχολαμίνη (Luthman, Fredriksson et al. 1989) και συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, όπου οδηγεί στη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου –ROS- (Reactive Oxygen Species) και σε επακόλουθο οξειδωτικό stress (Cohen and Werner 1994). Φαρμακολογική αναστολή η γενετική απενεργοποίηση των DAT ή NAT, εμποδίζει την τοξική δράση της 6-OHDA, υποδεικνύοντας ότι η συσσώρευση στους κατεχολαμινεργικούς νευρώνες αποτελεί μια εκδήλωση-κλειδί σε αυτή τη διαδικασία (Van Kampen, McGeer et al. 2000). Η 6-OHDA συμμετέχει σε ενζυματικές και μη αντιδράσεις και παράγει κυτταροτοξικά προϊόντα αξιοποιώντας ενδοκυτταρικά στοιχεία όπως ο σίδηρος και το μαγγάνιο (Cadet and Brannock 1998; Choi, Yoon et al. 1999; Lotharius, Dugan et al. 1999). Έτσι, η οξείδωση

της 6-OHDA από την μονοαμινική οξειδάση A (MAO-A) οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) το οποίο εκτός του ότι είναι εξαιρετικά κυτταροτοξικό, πυροδοτεί και το σχηματισμό ελευθερών ριζών οξυγόνου  $O_2^-$  και ROS (Cohen 1984). Συνέπεια της συσσώρευσης αυτής είναι η σταδιακή εξάντληση των ενδοκυττάρων αντιοξειδωτικών ενζύμων, διαταραχές στους μηχανισμούς διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης και τελικά νευρωνική βλάβη (Blum, Torch et al. 2001).

Είναι σημαντικό ότι η τοξικότητα της 6-OHDA μειώνεται δραστικά σε διαγονιδιακά ποντίκια ή σε καλλιέργειες κυττάρων όπου υπερεκφράζονται τα ένζυμα υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide dismutase-SOD) και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Glutathione peroxidase-GPx) (Callio, Oury et al. 2005; Ridet, Bensadoun et al. 2006). Εκτός από το οξειδωτικό stress η 6-OHDA επηρεάζει και τη μιτοχονδριακή λειτουργία, αφού φαίνεται να μειώνει τη δραστηριότητα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας (Glinka and Youdim 1995).

### **A.3.2.3 Rotenone**

Η rotenone έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιβλιογραφία σε πειραματικά μοντέλα μελέτης του Parkinson και είναι ικανή από μόνη της να προκαλέσει εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων καθώς και το σχηματισμό συσσωματωμάτων  $\alpha$ -synuclein (Sherer, Kim et al. 2003). Χρησιμοποιείται ευρέως σαν εντομοκτόνο, εντομοαπωθητικό καθώς και σαν φυτοφαρμακο. Απομονώνεται από τις ρίζες και τους μίσχους τροπικών και υποτροπικών φυτών, συγκεκριμένα από φυτά που ανήκουν στα γένη *Lonchocarpus* και *Derris* (Soloway 1976). Η συχνή έκθεση σε rotenone αποτελεί παράγοντα κινδύνου εμφάνισης της νόσου του Parkinson (Tanner, Kamel et al. 2011; Martinez and Greenamyre 2012). Είναι μια λιπόφιλη χημική ένωση, πράγμα που της δίνει τη δυνατότητα να διαπερνά εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και τις βιολογικές μεμβράνες χωρίς την απαίτηση κάποιου υποδοχέα πρόσδεσης ή κάποιου μεμβρανικού μεταφορέα (Martinez and Greenamyre 2012). Αυτό αποτελεί βασικό πλεονέκτημα για τη συστηματική χρήση της σε πειραματικά μοντέλα. Ιστορικά, χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά στην έρευνα για το Parkinson τη δεκαετία του 1980 μετά την ανακάλυψη ότι το MPTP, είναι αναστολέας του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας (Heikkila, Nicklas et al. 1985).

Ιδιαίτερη σημασία για τη μελέτη του Parkinson απέκτησε μετά τη δημοσίευση της μελέτης των Greenamyre και των συναδέλφων, η οποίοι μετά από χρόνια έκθεση σε χαμηλές δόσεις rotenone διαπίστωσαν την επιλεκτική εκφύλιση των νευρώνων της

μέλαινας ουσίας, καθώς και ο σχηματισμός κυτταροπλασματικών εγκλείστων με κύρια συστατικά  $\alpha$ -synuclein και ουβικιτίνη (Betarbet, Sherer et al. 2000). Το ζωικό αυτό μοντέλο παρουσίαζε και ένα σύνολο συμπεριφορικών παρκινσονιακών χαρακτηριστικών. Η συγκεκριμένη μελέτη απέκτησε ιδιαίτερο ενδιαφέρον για δύο λόγους. Πρώτον, γιατί παρά την αναστολή του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας στο σύνολο του εγκεφάλου η εκφύλιση ήταν επιλεκτική, με πιο ευάλωτο τον πληθυσμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Αυτό αποτέλεσε τη βάση για την συσχέτιση της αναστολής του συμπλόκου I και των μηχανισμών που εμπλέκονται στην νόσο του Parkinson. Και δεύτερον, υποδηλώνει ότι η χρόνια έκθεση στους παράγοντες κινδύνου της νόσου είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των εγκλείστων της  $\alpha$ -synuclein. Η rotenone είναι ένας κλασικός αναστολέας του συμπλόκου I, ο οποίος προσδένεται στον τελικό δέκτη του συμπλόκου και αναστέλλει τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο συνένζυμο Q10, με συνέπεια τη συσσώρευση αυτών στη μήτρα του μιτοχονδρίου όπου αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο παράγοντας υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και ενεργές ρίζες οξυγόνου προκαλώντας οξειδωτικό stress. Η δράση της επί του συμπλόκου I έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων παραγωγής ATP καθώς και μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης (Duty and Jenner 2011; Martinez and Greenamyre 2012).

#### **A.3.2.4 Paraquat**

Το paraquat ή 1,1'-διμεθυλο-4,4'-διπυριδίνιο (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium, paraquat) είναι ένα ευρέως χρησιμοποιημένο ζιζανιοκτόνο, και έγινε γνωστό ότι αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τη νόσο του Parkinson το 1985 (Snyder and D'Amato 1985). Έκτοτε, έχει χρησιμοποιηθεί για τη μοντελοποίηση της νόσου σε ποντικούς. Παρότι έχει παρόμοια χημική δομή με τη νευροτοξίνη MPP+ (εικόνα 11), το paraquat έχει την ικανότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μέσω των μεμβρανικών μεταφορέων αμινοξέων ουδέτερου φορτίου (Shimizu, Ohtaki et al. 2001; McCormack, Thiruchelvam et al. 2002).

Ο μηχανισμός δράσης είναι οξειδοαναγωγικής φύσης, αλλά δεν είναι γνωστός στο σύνολο του. Η γενική προσέγγιση υπαγορεύεται από το γεγονός ότι ενοχοποιείται για το σχηματισμό υπεροξειδίων και άλλων ισχυρών σε ενέργεια ριζών που έχουν σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση  $H_2O_2$  και τη μεταβολή της συγκέντρωσης του NADPH. Η αλλαγή της ισορροπίας του NADPH οδηγεί στη μείωση της παραγωγής λιπαρών οξέων και λιπιδίων (Day, Patel et al. 1999). Εντοπίζεται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, δεν

είναι άμεσος αναστολέας του συμπλόκου I (Richardson, Quan et al. 2005), αλλά χωροταξικά εκεί ανάγεται για να σχηματίσει το υπεροξειδίο του υδρογόνου (Cocheme and Murphy 2008). Παρατεταμένη έκθεση ποντικών σε paraquat οδηγεί στο σχηματισμό κυτταροπλασματικών εγκλείστων  $\alpha$ -synuclein στους νευρώνες της μέλαινας ουσίας (Manning-Bog, McCormack et al. 2002). Επιπλέον η συστηματική ενέσιμη χορήγηση σε ποντικούς προκαλεί κινητικές διαταραχές και απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων με τρόπο δοσο-εξαρτώμενο (Brooks, Chadwick et al. 1999; McCormack, Thiruchelvam et al. 2002), ενώ σε αυτό συνεισφέρει αρνητικά η ηλικία των πειραματόζων (McCormack, Thiruchelvam et al. 2002; Thiruchelvam, McCormack et al. 2003).

Στον πίνακα 2 αναφέρεται συγκεντρωτικά η δράση των παραπάνω τοξινών καθώς και τα παθολογικά και συμπεριφορικά χαρακτηριστικά που έχουν παρατηρηθεί σε Παρκινσονιακά μοντέλα θηλαστικών.

**Πίνακας 2.** Αντιπροσωπευτικά Πρκινσονιακά μοντέλα θηλαστικών επαγόμενα από τη δράση νευροτοξινών.

Νευροτοξίνη	Παθολογικά και συμπεριφορικά χαρακτηριστικά	Μοριακοί Μηχανισμοί
<b>MPTP</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Παρκινσονισμός με οξεία έναρξη (βραδυκίνησια, τρόμος ηρεμίας, δυσκαμψία)</li> <li>2. Σχετικά μικρότερη ισχύς σε τρωκτικά</li> <li>3. Καλή απόκριση στη θεραπεία με L-DOPA και αγωνιστές ντοπαμίνης (DA-agonists)</li> <li>4. Απώλεια των TH-νευρώνων (ντοπαμινεργικών ινών) και μείωση στην ντοπαμίνη που περιέχεται στα κύτταρα της μελαινοραβδωτής οδού.</li> <li>5. Απώλεια των TH-νευρώνων (ντοπαμινεργικών ινών) στο εντερικό νευρικό σύστημα.</li> <li>6. Έγκλειστα <math>\alpha</math>-synuclein</li> <li>7. Ακανόνιστα LBs</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Διαπερνά εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.</li> <li>2. Μετατρέπεται από τα νευρογλοιακά κύτταρα στο τοξικό παράγωγο MPP+.</li> <li>3. Μεταφέρεται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων με ειδικούς μεμβρανικούς μεταφορείς.</li> <li>4. Αναστέλλει τη λειτουργία του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας.</li> <li>5. Αυξορρύθμιση στην επαγωγίμη συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (iNOS), στην οξειδάση NADPH, και στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)</li> <li>6. Ενεργοποίηση της μικρογλοίας.</li> </ol>
<b>6-OHDA</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Κινητικές διαταραχές (περιστροφή, ακινησία)</li> <li>2. Καλή απόκριση στη θεραπεία με L-DOPA και αγωνιστές ντοπαμίνης.</li> <li>3. Απώλεια των TH-νευρώνων (ντοπαμινεργικών ινών) και μείωση στην ντοπαμίνη που περιέχεται στα κύτταρα της μελαινοραβδωτής οδού.</li> <li>4. Ακανόνιστα LBs</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Δεν διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.</li> <li>2. Μεταφέρεται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων</li> <li>3. Αναστέλλει τη λειτουργία του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας.</li> <li>4. Ενεργοποίηση της μικρογλοίας.</li> </ol>
<b>Rotenone</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Παρκινσονισμός (βραδυκίνησια, δυσκαμψία και , σταθερή στάση σώματος)</li> <li>2. Καλή απόκριση στη θεραπεία με L-DOPA και αγωνιστές ντοπαμίνης.</li> <li>3. Απώλεια των TH-νευρώνων (ντοπαμινεργικών ινών) και μείωση στην ντοπαμίνη που περιέχεται στα κύτταρα της μελαινοραβδωτής οδού.</li> <li>4. Ενδοκυτταρικά έγκλειστα <math>\alpha</math>-synuclein, παρόμοια με τα σωματίδια Lewy.</li> <li>5. Απώλεια των μυντερικών νευρώνων.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Διαπερνά εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.</li> <li>2. Αναστέλλει τη λειτουργία του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας.</li> <li>3. Αυξορρύθμιση of NADPH-oxidase</li> <li>4. Ενεργοποίηση της μικρογλοίας.</li> </ol>
<b>Paraquat</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Παρκινσονισμός όμοιος με αυτόν που προκύπτει από τη χρήση MPTP</li> <li>2. Μείωση στην ντοπαμίνη που περιέχεται στα κύτταρα της μελαινοραβδωτής οδού.</li> <li>3. Ενδοκυτταρικά έγκλειστα <math>\alpha</math>-synuclein μετά από μεγάλη έκθεση.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μέσα από τους μεμβρανικούς μεταφορείς αμινοξέων ουδέτερου φορτίου.</li> <li>2. Αναστέλλει τη λειτουργία του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας.</li> <li>3. Μείωση στους νικοτινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης, που μεσολαβείτε από την απελευθέρωση ντοπαμίνης.</li> <li>4. Αναστέλλει τη λειτουργία του συμπλόκου III της αναπνευστικής αλυσίδας.</li> </ol>

[Προσαρμογή από (Hisahara and Shimohama 2010)]

### **A.3.3 Γενετικά και συνδυαστικά μοντέλα**

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές μελέτες σε ζωικά παρκινσονιακά μοντέλα είτε σε σπονδυλωτά (τρωκτικά, πρωτεύοντα), είτε σε ασπόνδυλα (μύγες (*Drosophila*) και νηματοειδής σκόληκας (*C. elegans*)) συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που συμπεριφέρονται με αυτοσωμικό επικρατή και με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονομής. Τα γονίδια που κυρίως έχουν μελετηθεί σε αυτά τα μοντέλα είναι η *α-synuclein*, η *LRRK2*, η *UCHL1*, η *parkin*, η *DJ-1*, και η *PINK1*, Πίνακας 3.

Η λογική της μελέτης των σχετικά σπάνιων κληρονομικών περιπτώσεων μίας γενικά σποραδικής νόσου στηρίζεται στην προσδοκία ότι ο κοινός παθολογικός φαινότυπος που χαρακτηρίζει όλες τις μορφές της νόσου του Parkinson, ανεξάρτητα από την αιτία πρόκλησης, υποδεικνύει την εμπλοκή κοινών μηχανισμών παθογένειας. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η μελέτη της λειτουργίας των γονιδίων που προκαλούν την κληρονομική μορφή της νόσου, καθώς και των μηχανισμών μέσω των οποίων οι μεταλλάξεις τους οδηγούν στην επιλεκτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, ίσως προσδιορίσει κομβικά μοριακά μονοπάτια ιδιαίτερης σημασίας στην εξέλιξη της παθογένειας της νόσου.

Πέρα από την έρευνα της φυσιολογικής λειτουργίας των γονιδίων της κληρονομικής μορφής του Parkinson και της επίδρασης των μεταλλάξεων τους (Πίνακας 1), έγιναν εκτεταμένες μελέτες σε διαγονιδιακά ζώα καθώς και σε ζώα στα οποία έχουν απενεργοποιηθεί (knockout) τα συγκεκριμένα γονίδια.

Έτσι λοιπόν διαγονιδιακή υπερέκφραση της φυσιολογικής ή μεταλλαγμένης *α-synuclein* οδηγεί στο σχηματισμό ενδοκυτταρικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες χωρίς ωστόσο αυτό να συνοδεύεται από νευρωνικό θάνατο (Dauer and Przedborski 2003), ενώ η εκτομή του γονιδίου της *α-synuclein* δεν προκαλεί νευροεκφύλιση (Abeliovich, Schmitz et al. 2000; Dauer, Kholodilov et al. 2002), γεγονός που δείχνει ότι ο μηχανισμός παθογένειας της *α-synuclein* δε σχετίζεται με την απώλεια λειτουργίας του γονιδίου. Αντίθετα, υπερέκφραση της *α-synuclein* μέσω ιών σε αρουραίους επάγει την εκφύλιση της μελαινοραβδωτής οδού. Επειδή δεν υπήρχε νευρωνική απώλεια στα περισσότερα διαγονιδιακά ποντίκια χρησιμοποιήθηκε σαν επιπλέον επιβαρυντικός παράγοντας το MPTP (Song 2004; Nieto, Gil-Bea et al. 2006). Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία φαίνεται να είναι επαρκής για να επάγει τη δημιουργία συσσωματωμάτων *α-synuclein* καθώς και τοξικότητα που οδηγεί σε εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Όπως ήταν αναμενόμενο οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες είναι πιο ευαίσθητοι στη μιτοχονδριακή τοξίνη (Nieto, Gil-Bea et al. 2006). Ενδιαφέρον είναι

ότι σε ποντίκια στα οποία έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο της  $\alpha$ -synuclein οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη δράση του MPTP (Dauer, Kholodilov et al. 2002), δείχνοντας ότι για την απώλεια των νευρώνων απαιτείται συσσωμάτωση της  $\alpha$ -synuclein καθοδικά της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας (Thomas, Mandir et al. 2011).

Σε ότι αφορά την parkin, μύες ή μύγες που το γονίδιο έχει αφαιρεθεί δεν εκδηλώνουν παθολογία ντοπαμινεργικού θανάτου (Goldberg, Fleming et al. 2003; Greene, Whitworth et al. 2003). Παρόλα αυτά, τα συγκεκριμένα ζώα εκδηλώνουν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Pesah, Pham et al. 2004). Παραδόξως ποντίκια με μη λειτουργική μετάλλαξη για το γονίδιο της Parkin, έχουν την ίδια τοξική απόκριση στην τοξίνη MPTP συγκριτικά με τα αγρίου τύπου ποντίκια, ενώ η υπερέκφραση της parkin φαίνεται να έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της τοξίνης (Perez, Curtis et al. 2005; Paterna, Leng et al. 2007; Thomas, von Coelln et al. 2007). Ομοίως με την parkin συμπεριφέρονται και τα ποντίκια στα οποία δεν εκφράζεται η PINK1, ενώ εκείνα στα οποία δεν εκφράζεται το γονίδιο DJ-1 παρουσιάζουν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και αυξημένη ευαισθησία στη δράση της MPTP (Kim, Murphy et al. 2005). Αντίστοιχα, μύες που στερούνται του γονιδίου UCH-L1 υφίστανται νευροεκφυλιστικές αλλαγές, αλλά όχι στη μελαινοραβδωτή οδό (Saigoh, Wang et al. 1999).

Συνοπτικά, στον πίνακα 3 παρουσιάζονται το σύνολο των γενετικών μοντέλων που έχουν χρησιμοποιηθεί ανά γονίδιο μελέτης καθώς και τα φαινοτυπικά και παθολογικά τους χαρακτηριστικά.



**Πίνακας 3.** Γενετικά ζωικά Παρκινσονιακά μοντέλα.

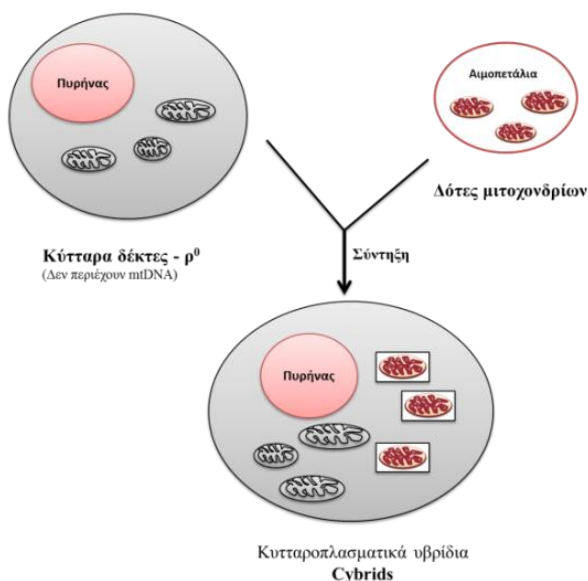
Υπό μελέτη Γονίδιο	Ζωικός οργανισμός	Χειρισμός	Απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων	Σωματίδια του Lewy	Κινητικά συμπτώματα
<b>Αυτοσωμικά επικρατή γονίδια</b>					
<i>a-synuclein</i> (PARK1)	Νηματώδης σκόληκας Μύγα Ποντικός Αρουραίος Πίθηκος	Διαγονιδιακά	Ναι/Όχι Ναι Όχι Ναι Ναι	Όχι Ναι Ναι/Όχι Όχι Όχι	Ναι Ναι Ναι/Όχι Ναι Ήπια συμπτώματα
<i>UCHL1</i> (PARK5)	Ποντικός	Διαγονιδιακά	Ναι	Όχι	Ναι
<i>LRK2</i> (PARK8)	Νηματώδης σκόληκας Μύγα Ποντικός	Διαγονιδιακά	Ναι Ναι Όχι	Παρόμοιες δομές Όχι Όχι	Ήπια συμπτώματα Ναι Ναι
<b>Αυτοσωμικά υπολειπόμενα γονίδια</b>					
Parkin (PARK2)	Νηματώδης σκόληκας Μύγα Ποντικός	Knockout Knockout Transgenic Knockout Transgenic	Όχι Ναι Ναι Όχι Ναι	Όχι Όχι Όχι Όχι Ναι	Όχι Ναι Ναι Ήπια συμπτώματα Ήπια συμπτώματα
PINK1 (PARK6)	Μύγα Ποντικός	Knockout Knockout	Ναι Όχι	Όχι Όχι	Ναι Ήπια συμπτώματα
DJ-1 (PARK7)	Μύγα Ποντικός	Knockout Knockout	Ναι Όχι	Όχι Όχι	Ναι Ήπια συμπτώματα
HtrA2/Omi (PARK13)	Μύγα Ποντικός	Knockout Knockout	Όχι Όχι	Όχι Όχι	Όχι Ήπια συμπτώματα

[Προσαρμογή και τροποποίηση από (Hisahara and Shimohama 2010)]

### A.3.4 Κυτταροπλασματικά Υβρίδια (CYtoplasmic hyBRIDS – Cybrids)

Τα κυτταροπλασματικά υβρίδια, γνωστά ως *cybrids* (CYtoplasmic hyBRID), είναι κυτταρικές σειρές που προκύπτουν από τη σύντηξη απύρηνων κυττάρων που περιέχουν μόνο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), με κύτταρα δέκτες στα οποία δεν υπάρχει mtDNA-<sup>0</sup> κύτταρα. Στις περισσότερες των περιπτώσεων τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται σαν κύτταρα δότες είναι τα αιμοπετάλια, ενώ σαν δέκτες η ανθρώπινη νευραβλαστωματική κυτταρική σειρά SH-SY5Y ή η κυτταρική σειρά τερατωκαρκινώματος NT2. Μετά τη σύντηξη τα κύτταρα δέκτες επαναπατρίζονται με το mtDNA των κυττάρων δότες και

γίνεται η διαλογή από τα κύτταρα που δεν επαναπατρίστηκαν επιτυχώς υπό τον έλεγχο της μεταβολικής διαλογής (Swerdlow, Parks et al. 1996; Ghosh, Swerdlow et al. 1999). Το αποτέλεσμα είναι μετά από αρκετούς κύκλους επαναλήψεων να προκύπτουν κυτταρικές σειρές που περιέχουν το περιεχόμενο mtDNA της επιλογής μας, υπό τον έλεγχο του πυρηνικού γενετικού και περιβαλλοντικού υπόβαθρου που εμείς επιλέγουμε (Swerdlow, Parks et al. 1996; Ghosh, Swerdlow et al. 1999).



**Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση των Cybrids.** Οι υβριδικές κυτταρικές σειρές που παράγονται από τη σύντηξη απύρηνων κυττάρων (αιμοπεταλίων-κύτταρα δότες) με  $\rho^0$  κύτταρα, δηλαδή κύτταρα που δεν περιέχουν μιτοχονδριακό DNA.

Το cybrid κυτταρικό μοντέλο επιτρέπει στους ερευνητές να διερευνήσουν πως η μιτοχονδριακή λειτουργία επηρεάζει τη φυσιολογία των κυττάρων. Το μοντέλο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για τη μελέτη νευροεκφυλιστικών διαταραχών που σχετίζονται με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία κυρίως στο Parkinson, αλλά και στο Alzheimer, την Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS), και την Προοδευτική Υπερπυρηνική Παράλυση (Progressive supranuclear palsy, PSP). Μελετες σε Cybrid από ασθενείς με νόσο του Parkinson, έδειξαν ότι τα μιτοχονδριακά γονίδια είναι επιζήμια για την κυτταρική επιβίωση, προκαλώντας παθολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά που εμφανίζονται στη νόσο του Parkinson. Συγκεκριμένα τα παρκινσονιακά cybrid αποκάλυψαν μειωμένη καταλυτική δραστηριότητα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας (Swerdlow, Parks et al. 1996; Gu, Cooper et al. 1998; Esteves, Domingues et al. 2008), αυξημένη παραγωγή ROS (Swerdlow, Parks et al. 1996; Esteves, Domingues et al. 2008) και οξειδωμένων πρωτεϊνών (Esteves, Domingues et al. 2008), αλλαγές στην ενδοκυτταρική ομοιοστάση του ασβεστίου (Sheehan, Swerdlow et al. 1997), αύξηση στα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Cassarino, Fall et al. 1997), αυξημένη

πυρηνική μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα NFκβ (Cassarino, Halvorsen et al. 2000) καθώς και αύξηση στα επίπεδα πρωτεϊνών που προάγουν την επιβίωση Bcl-2 and Bcl-XL (Veech, Dennis et al. 2000), διάσπαση της PARP, μειωμένα επίπεδα στο μιτοχονδριακό cytochrome C, αυξημένη δραστηριότητα Κασπάσης 3, απελευθέρωση LDH (Lactate dehydrogenase, LDH) και ενεργοποίηση των κινασών απόκρισης στο stress p38 και JNK (Onyango, Tuttle et al. 2005; Esteves, Domingues et al. 2008), λιγότερη παραγωγή ATP και περισσότερα εκπολωμένα μιτοχόνδρια (Esteves, Domingues et al. 2008). Επιπλέον τα PD cybrids αποκάλυψαν αυξημένα επίπεδα ολιγομερισμού της  $\alpha$ -synuclein (Esteves, Domingues et al. 2008), ενώ παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στη δράση της τοξίνης MPTP (Swerdlow, Parks et al. 1996).

Όσον αφορά τη μορφολογία, ανιχνεύονται περισσότερα στρογγυλά και διογκωμένα μιτοχόνδρια, με τη μήτρα να παρουσιάζει πολύ λιγότερες πτυχώσεις στην εσωτερική μεμβράνη, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση στον αριθμό των γιγάντιων μιτοχονδρίων (Trimmer, Swerdlow et al. 2000). Επίσης η παρατήρηση τους αποκάλυψε το σχηματισμό κυστιδιακών εγκλείστων θετικών στα αντιγονικά και δομικά χαρακτηριστικά των σωματίων του Lewy. Αν και τα σωματία του Lewy απαντώνται σε πολύ μικρό ποσοστό στα PD Cybrids, αυτό υποδηλώνει ότι η πληροφορία στα μιτοχονδριακά γονίδια είναι ικανή να οδηγήσει στο σχηματισμό των σωματίων Lewy, δεδομένου ότι σε control cybrids SH-SY5Y κύτταρα αυτό είναι ένα πολύ σπάνιο φαινόμενο. Τα cybrid κύτταρα διαφοροποιούνται κανονικά υπό την παρουσία staurosporine (Borland, Mohanakumar et al. 2009). Τα νευρωνικά κύτταρα που προκύπτουν εκφράζουν νευρωνικούς δείκτες όπως συναπτοφυσίνη, υδροξυλάση της τυροσίνης, μεταφορέα της ντοπαμίνης, και υποδοχείς ντοπαμίνης D2. Η διαφοροποίηση οδηγεί στο σχηματισμό σωματίων του Lewy καθώς και νευριτικών συσσωματωμάτων  $\alpha$ -synuclein που μοιάζουν με τους νευρίτες του Lewy στους εγκεφάλους ασθενών (Borland, Mohanakumar et al. 2009), ενώ η τάση σχηματισμού των σωματίων του Lewy όπως και οι νευρίτες, δεν επάγονται από τη δράση κάποιου εξωγενούς παράγοντα όπως κάποιος αναστολέας του πρωτεασώματος, αναστολέας του λυσοσωματος ή υπερέκφραση της  $\alpha$ -synuclein.



## B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Με βάση τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, ιδανικό μοντέλο μελέτης της νόσου Parkinson, θα ήταν ένα μοντέλο που, είτε επάγεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες είτε από γενετικούς χειρισμούς, είτε από συνδυασμό των δύο, και έχει ως αποτέλεσμα την επιτυχή αναπαραγωγή των χαρακτηριστικών της νόσου, όσον αφορά τις διαταραχές της συμπεριφοράς (κινητικές διαταραχές), τα παθολογικά χαρακτηριστικά (προοδευτική, επιλεκτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων με ταυτόχρονη παρουσία LBs), καθώς και διαταραχές σε μοριακούς μηχανισμούς. Ωστόσο προς το παρόν δεν υπάρχει υποδειγματικό μοντέλο που να αναπαριστά πλήρως το σύνολο των φαινοτυπικών και παθολογικών χαρακτηριστικών που έχουν περιγραφεί στη νόσο.

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η δημιουργία ενός κατάλληλου συστήματος μελέτης της προοδευτικής φύσης της νόσου του Parkinson. Η υπόθεσή μας ήταν ότι η χρόνια έκθεση νευρικών κυττάρων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της νευροτοξίνης 6-OHDA, θα μπορούσε να επιβαρύνει τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, και κατά συνέπεια την προσαρμογή των κυττάρων στο συνεχές οξειδωτικό *stress*, αλλά και τις ιδιότητες πρωτεϊνών όπως η *α-synuclein*. Ένα τέτοιο μοντέλο θα μπορούσε να διευκολύνει τη μελέτη των μοριακών αλληλεπιδράσεων και των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην εμφάνιση των κυτταρικών χαρακτηριστικών που συνοδεύουν τη νόσο, καθώς και τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του πυρήνα και του μιτοχονδρίου σε συνθήκες που προσομοιάζουν ή επάγουν τέτοια χαρακτηριστικά.

Προκειμένου να ελεγχθεί η παραπάνω υπόθεση και να αναπτυχθεί το κυτταρικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά SH-SY5Y. Η σειρά αυτή έχει αξιοποιηθεί ευρύτατα για τη μελέτη της νόσου του Parkinson, καθώς κατέχει πολλά από τα χαρακτηριστικά των ντοπαμινεργικών νευρώνων, και φυσιολογικά παράγει χαμηλά, αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα *α-synuclein*. Παράλληλα, στο γενικότερο πλαίσιο της κατανόησης της αλληλεπίδρασης των μιτοχονδρίων και του πυρήνα σε PD συνθήκες, δημιουργήθηκαν Cybrid (Cytoplasmic hybrid) κυτταρικές σειρές από άτομα που ανήκουν σε γενεαλογικό δέντρο με κληρονομικής μορφής νόσο του Parkinson.

Ένα από τα καινοτομικά στοιχεία της παρούσας μελέτης έγκειται στην χρόνια έκθεση των SH-SY5Y κυττάρων σε χαμηλά επίπεδα της νευροτοξίνης 6-OHDA η οποία οδηγεί σε προοδευτικές μεταβολές στη συσσώρευση και την κατανομή της *α-synuclein* στο κύτταρο, και παράλληλη εμφάνιση αλλαγών στη μιτοχονδριακή λειτουργία. Το σύστημα αυτό προσομοιάζει τον προοδευτικό χαρακτήρα της νόσου του Parkinson και

επιτρέπει τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών σε διαφορετικά στάδια. Η γνώση αυτή θα μπορούσε να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση της αλληλουχίας των μηχανισμών παθογένειας της νόσου Parkinson, και πιθανά να ανοίξει νέους δρόμους για την ανάπτυξη διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων στο μέλλον.

## **Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **Γ.1 ΥΛΙΚΑ**

#### **Γ.1.1 Αναλώσιμα**

- Σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου erpendorf 1,5ml (Sarstedt)
- Σωλήνες φυγοκέντρησης τύπου falcon 50ml και 15ml (Sarstedt)
- Σωληνάρια κατάψυξης κυττάρων 2ml (Cryo tube vials, Kisker)
- Τρυβλία 100mm επίπεδου πυθμένα, επεξεργασμένα για κυτταροκαλλιέργειες (Greiner Bio one)
- Τρυβλία 60mm επίπεδου πυθμένα, επεξεργασμένα για κυτταροκαλλιέργειες (Greiner Bio one)
- Τρυβλία 6 φρεατίων επίπεδου πυθμένα, επεξεργασμένα για κυτταροκαλλιέργειες (Greiner Bio one)
- Τρυβλία 24 φρεατίων επίπεδου πυθμένα, επεξεργασμένα για κυτταροκαλλιέργειες (Greiner Bio one)
- Κρυοφιαλίδια για πάγωμα κυττάρων στους -196°C (Kisker)
- Πιπέτες 25 ml, 10ml, 5ml και 2ml αποστειρωμένες, για χρήση σε κυτταροκαλλιέργειες (Sarstedt)
- Πιπέτες Pasteur 3ml, πλαστικές, μη αποστειρωμένες (Sarstedt)
- Μικροπιπέτες 0,2 – 1μl, 2 – 20μl, 20 – 200μl, 200 – 1000μl (Gilson)
- Πλαστικά tips για μικροπιπέτες 0,2 – 1μl (Greiner Bio one)
- Πλαστικά tips για μικροπιπέτες 2 – 20μl, 20 – 200μl, 200 – 1000μl (Sarstedt)
- Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (HBG)
- Cell Scraper για τη συγκομιδή των κυττάρων από τα πιάτα κυτταροκαλλιέργειας
- Γυάλινες καλυπτρίδες στρόγγυλες Ø 11mm (Thermo Scientific, Cat. No.: 12688116)
- Αντικειμενοφόροι πλάκες 26 x 76mm (Deltalab)
- Φίλτρα 0,45μm (Sarstedt)

#### **Γ.1.2 Διαλύματα – Χημικά αντιδραστήρια – Θρεπτικά υλικά**

Όλα τα διαλύματα, τα χημικά αντιδραστήρια και τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη προέρχονται από τις εταιρίες: Sigma-Aldrich, Applichem, Panreac, Merck, Riedel-de Haen, Carl Roth, Regilait, HT-Biotechnology, Fluka, Biorad, MRC, Cell signaling, Nippon Genetics, Polysciences, Calbiochem, Roche,

GE Healthcare, KAPA Biosystems, ThermoFisher Scientific, Kisker, Promega, Biosera, Axon Medchem, Cayman, Santa cruz, Selleckchem.com.

#### **Γ.1.2.1 Διαλύματα μοριακής βιολογίας που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο**

- Διάλυμα γάλακτος (5%) για την επαναιώρηση των δευτερογενών αντισωμάτων  
Για την παρασκευή 500ml διαλύματος, 25gr σκόνης γάλακτος (Regilait) διαλύονται σε 480ml TBS – Tween-20 0,1%, (1x).
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών SDS - PAGE (10x)  
Για την παρασκευή 1lt διαλύματος 10x, 30gr Tris (Sigma – Aldrich, T1503), 144gr γλυκίνης (Applichem, A1067) και 10gr SDS (Applichem, A1502) διαλύονται σε 800ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1lt με H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8,3 με HCl (Sigma -Aldrich, 258148). Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα συλλέγεται μετά τη χρήση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλη μια φορά.
- Διάλυμα υγρής μεταφοράς πρωτεϊνών 10x  
Για την παρασκευή 1lt διαλύματος 10x, 24,32gr Tris (Sigma – Aldrich, T1503) και 111,66gr γλυκίνης (Applichem, A1067) διαλύονται σε 800ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1lt με H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου. Στο 1lt διαλύματος 1x προστίθενται 200ml MeOH (Merck, M/4056/17) λίγο πριν τη χρήση. Το διάλυμα συλλέγεται μετά τη χρήση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλες δυο φορές.
- Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (Ammonium Persulfate - APS) 10%  
Για την παρασκευή 10ml διαλύματος, 1gr APS (Sigma-Aldrich, A3678) διαλύεται σε 10ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών 4x (Laemmli)  
Για την παρασκευή 12ml διαλύματος, 2,2ml Tris 1M, pH: 6,8 αναμειγνύονται με 4,4ml γλυκερόλης 100%, 4,4ml SDS 10%, 0,5ml της χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης και 0,5ml β-μερκαπτοαιθανόλης. Ακολουθεί έντονη ανάδευση με vortex και το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα BSA (5%) για την επαναιώρηση των πρωτογενών αντισωμάτων  
Για την παρασκευή 10ml διαλύματος, 1gr BSA (Sigma – Aldrich, A9647) διαλύεται σε 10ml TBS – Tween-20 0,1%, (1x).



➤ Διάλυμα Phosphate Buffered Saline (PBS) 20x

Για την παρασκευή 1lt διαλύματος συμπύκνωσης 20x, 160gr NaCl (Applichem, A2942), 4gr KCl (Sigma-Aldrich, P9541), 28,8gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Panreac, 141679.124) και 4,8gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, 1.04873) διαλύονται σε 800ml H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με NaOH (Riedel-de Haen, 30620) και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1lt με δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121°C για 15min και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Διάλυμα SDS 10%

Για την παρασκευή 100ml διαλύματος, 10gr SDS (Applichem, A1502) διαλύονται σε 80ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και ο όγκος συμπληρώνεται στα 100ml με H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Διάλυμα Tris Buffered Saline (TBS) 20x

Για την παρασκευή 1lt διαλύματος συμπύκνωσης 20x, 160gr NaCl (Applichem, A2942), 4gr KCl (Sigma-Aldrich, P9541) και 60gr Tris base (Sigma – Adrich, T1503) διαλύονται σε 800ml H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 7,4 με HCl (Sigma - Aldrich, 258148) και ο όγκος συμπληρώνεται στο 1lt με δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121°C για 15min και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Διάλυμα Tris – HCl 1,5M, pH: 8,8

Για την παρασκευή 500ml διαλύματος, 20,85gr Tris (Sigma – Adrich, T1503) διαλύονται σε 450ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500ml με H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8,8 με HCl (Sigma -Aldrich, 258148). Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121°C για 15min και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Διάλυμα Tris – HCl 1M, pH: 6,8

Για την παρασκευή 500ml διαλύματος, 60,56gr Tris (Sigma – Adrich, T1503) διαλύονται σε 450ml δις απεσταγμένο H<sub>2</sub>O και ο όγκος συμπληρώνεται στα 500ml με H<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 6,8 με HCl (Sigma -Aldrich, 258148). Ακολουθεί αποστείρωση μέσω βρασμού στους 121°C για 15min και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Διάλυμα TBS – Tween-20 0,1%

Για την παρασκευή 500ml διαλύματος TBS – Tween-20 0,1%, 5ml Tween-20 10% (αραιωμένο 10 φορές από stock 100% (Sigma-Aldrich, P2287) σε υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O)

προστίθενται σε 495ml TBS 1x. Ακολουθεί ανάδευση και το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

➤ Μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)

Για την παρασκευή 100μl μείγματος, 25μl από το καθένα dNTP (dATP, dTTP, dGTP και dCTP - HT Biotechnology, SB23) αναμειγνύονται και το μείγμα φυλάσσεται στους -20°C.

### **Γ.1.2.2 Διαλύματα μοριακής βιολογίας του εμπορίου**

- Αιθανόλη (EtOH) υπερέκαθαρη (Fluka E/0650DF/17 )
- Αντιδραστήριο Bradford 5x (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, 5000006)
- Αντιδραστήριο TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine - Carl Roth, 2367)
- Αντιδραστήριο Trizol (MRC, RT-111)
- Διάλυμα Acrylamide/Bis-Acrylamide 30 % (29:1) (Carl Roth, 3029.1)
- Διάλυμα RIPA 10x (Cell signaling, 9806)
- Μάρτυρας μοριακών βαρών για ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων (HT Biotechnology, MK05b)
- Μάρτυρας μοριακών βαρών για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Nippon Genetics, MWP04)
- Μείγμα αναστολέων των πρωτεασών (protease inhibitor cocktail, Sigma - Aldrich, P8340)
- Νερό για PCR (Calbiochem, 9601)
- Προπανόλη-2 (Merck, 109634)
- Υπόστρωμα ECL για την εμφάνιση κατά την ανοσοαποτύπωση (Lumilight western blotting Substrate, Roche, 1201520001)
- Χλωροφόρμιο - CHCl<sub>3</sub> (Fluka, C/4960/17)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για μεταφορά πρωτεϊνών (GE Healthcare, 10600002)
- Dimethyl Sulfoxide – DMSO (Sigma – Aldrich, D8418)
- DNA πολυμεράση (kit) (KAPA Biosystems, KK1510)
- KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (KAPA Biosystems, KK4601)
- Oligo(dT)18 primer – εκκινητής ολιγο-dT (Thermo Scientific, SO131)
- PCR-Plate 96-well (Kisker, GK96LOW)

- RevertAid™ Premium Reverse Transcriptase - Αντίστροφη μεταγραφάση (Thermo Scientific, EP0733)
- RiboLock RNase Inhibitor – αναστολέας των ριβονουκλεασών (Thermo Scientific, EO0381)
- RQ1 RNase-Free DNase kit (Promega, M6101)
- PEG Poly (ethylene glycol) (Sigma – Aldrich, 86101)

### **Γ.1.2.3 Διαλύματα κυτταρικής βιολογίας που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο**

- Διάλυμα ανοσοφθορισμού  
Για την παρασκευή 50ml διαλύματος ανοσοφθορισμού, 500μl Donkey serum και 500μl Triton X-100 10% (αραιωμένο 10 φορές από stock 100% (Carl Roth, 3051) σε υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O) προστίθενται σε 49ml TBS 1x. Ακολουθεί ανάδευση και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Κιτρικού Νατρίου (NaCitrate)  
Για την παρασκευή 20ml διαλύματος 1M, 5,88gr NaCitrate (M.B. 294,1g/mol) διαλύονται σε 18ml υπερκάθαρου H<sub>2</sub>O. Ρυθμίζεται το pH στο 7,4 με κιτρικό οξύ και ο όγκος συμπληρώνεται στο 20ml με υπερκάθαρο H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί αποστείρωση με φίλτρο 0,45μm και φύλαξη του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα ιωδιούχου προπιδίου (Propidium Iodide - PI)  
Για την παρασκευή 300μl διαλύματος, 13,8μl (ή 69μM) Ιωδιούχου προπιδίου (Sigma-Aldrich, P4864) προστίθενται σε 283,2μl Κιτρικού Νατρίου (38mM). Ακολουθεί ανάμειξη και στο μείγμα προστίθενται 3μl RNase (10mg/ml, Sigma-Aldrich, R4875). Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C σε σκοτεινό μέρος.

### **Γ.1.2.4 Διαλύματα κυτταρικής βιολογίας του εμπορίου**

- Μέσο στερέωσης των καλυπτρίδων στην αντικειμενοφόρο πλάκα: Aqua-Poly/Mount Coverslipping Medium (Polysciences, 18606 - 20)

### **Γ.1.2.5 Θρεπτικά υλικά και διαλύματα κυτταροκαλλιιεργειών**

- Donkey Serum (Biosera, AS-228/500)
- Fetal Bovine Serum - FBS (Biosera, FB-1001/500(B11636))
- Antibiotic-Antimycotic 100x (ThermoFisher Scientific, 15240062)

- Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (ThermoFisher Scientific, 41966029)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (- Sodium Pyruvate) (ThermoFisher Scientific, 11966)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (- Calcium Chloride) (ThermoFisher Scientific, 21068-028 )
- Διάλυμα θρυψίνης 0,05% με 0,53mM EDTA σε PBS (Biosera, LM-T1706/500)
- Phosphate Buffered Saline – PBS για κυτταροκαλλιέργεια (Biosera, LM-S2041/500).

### Γ.1.3 Χημικοί αναστολείς – επαγωγείς

- 6-OHDA (Sigma, H116-5MG)
- Rotenone (Sigma, R8875-1G)
- Uridine (Sigma, u3003-5G)
- Ρετινοϊκό οξύ (Retinoic Acid – RA) (Sigma – Aldrich, R2625)
- Βρωμιούχο Αιθίδιο (Ethidium Bromide – EtBr) (Sigma – Aldrich, E1510)

### Γ.1.4 Αντισώματα

#### ➤ Αντισώματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western

##### Πρωτογενή αντισώματα

- Anti- $\alpha$ -Synuclein (BD Biosciences #610787), αραίωση 1:500.
- Anti-p- $\alpha$ -Synuclein S129 (BD Biosciences #610787), αραίωση 1:500.
- Anti-VDAC (Thermo Scientific #PA5-17460), αραίωση 1:500.
- Anti-LonP1 (Sigma-Aldrich #HPA002192), αραίωση 1:500.
- Anti-b-actin (Millipore #MAB1501), αραίωση 1:10000.
- Anti-Parkin (Cell Signaling Technology #2132), αραίωση 1:500.
- Anti-MnSOD (ADI-SOD-110), αραίωση 1:1000.
- Anti-HSP70/HSP72 (ADI-SPA-810), αραίωση 1:1000.
- Anti-Cytochrome C (Abcam #ab13575), αραίωση 1:1500.
- Anti-Tim23 (BD Biosciences #611222), αραίωση 1:1200.
- Anti-SFXN3 (proteintech #15156-1-AP), αραίωση 1:1200.
- Anti- foxo3a FKHRL1 (Santa Cruz # sc-11351), αραίωση 1:500.
- Anti- $\beta$ -tubulin (Abcam # ab6046), αραίωση 1:10000.

- Anti-DCX C18 (Santa Cruz # sc-8066), αραιώση 1:200.
- Anti-NF160KD (*Invitrogen* # 34-1000), αραιώση 1:500.
- Anti-Akt (Cell signaling # 4691), αραιώση 1:2000.
- Anti-Hsp40 (Abcam, # ab69402), αραιώση 1:5000.
- Anti-Hsp90 (Millipore, # 386041), αραιώση 1:1000.
- Anti-Hsc70 (Stressgen, # SPA-815B), αραιώση 1:5000.
- Anti-p-Akt(Ser473) (Cell signaling, # 4060), αραιώση 1:1000.
- Anti-p-Akt(Thr308) (Cell signaling, # 2965), αραιώση 1:1000.
- Anti-HP1 gamma (Millipore, # MAB3450), αραιώση 1:2000.
- Anti-Histone H3 (FL-136) (Santa Cruz # sc-10809), αραιώση 1:200.
- Anti- ACO2 (A-22) (Santa Cruz # sc-130677), αραιώση 1:200.
- Anti- Mitofilin antibody (2E4AD5) (Abcam # ab110329), αραιώση 1:500.
- Anti- OXPHOS Rodent Total WB Antibody Cocktail (Abcam # ab110413), αραιώση 1:250.

#### **Δευτερογενή αντισώματα**

- Αντίσωμα κατσίκας έναντι IgG (H+L) κουνελιού συζευγμένο με HRP (goat anti-rabbit, Thermo Scientific, 31460), αραιώση 1:2500 – 1:5000.
- Αντίσωμα κατσίκας έναντι IgG (H+L) ποντικού συζευγμένο με HRP (goat anti-mouse, Jackson immunoresearch, 115-035-146), αραιώση 1:5000.
- Αντίσωμα κατσίκας έναντι IgG (H+L) αρουραίου συζευγμένο με HRP (goat anti-rat, Jackson immunoresearch, 112-035-003), αραιώση 1:5000.

#### ➤ **Ανοσοφθορισμός**

##### **Πρωτογενή αντισώματα**

- Anti-alpha-Synuclein (BD Biosciences #610787), αραιώση 1:500.
- Anti-alpha-Synuclein (phospho S129) ( Abcam, ab51253), αραιώση 1:1000.
- Anti-LonP1 (Sigma-Aldrich #HPA002192), αραιώση 1:500.
- Anti- NF160KD (*Invitrogen* # 34-1000), αραιώση 1:200.
- Anti-Ki67 (Abcam, ab15580), αραιώση 1:500.

### Δευτερογενή αντισώματα

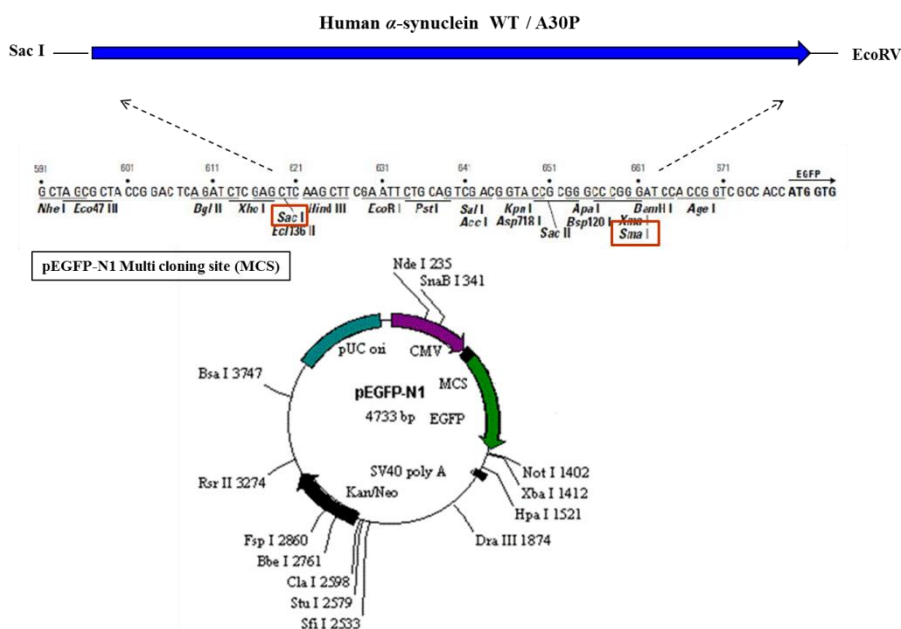
- Αντίσωμα κασίκας έναντι IgG (H+L) κουνελιού συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική CF που εκπέμπει στα 555nm, δίνοντας κόκκινο χρώμα (CF555 goat anti-rabbit, Biotium, 20033), αραιώση 1:1000.
- Αντίσωμα κασίκας έναντι IgG (H+L) ποντικού συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική Alexa fluor που εκπέμπει στα 488nm, δίνοντας πράσινο χρώμα (Alexa fluor 488 goat anti-mouse, Invitrogen, A-11001), αραιώση 1:1000.

### Χρώση του πυρήνα

Για τη χρώση του πυρήνα χρησιμοποιήθηκε η χρωστική DAPI (Sigma-Aldrich, D9542), η οποία εκπέμπει στα 460nm δίνοντας μπλέ χρώμα, αραιώση 1:2000.

### G.1.5 Πλασμίδια

Τα πλασμίδια για την υπερέκφραση της  $\alpha$ -synuclein, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παραχωρήθηκαν από τον Anton Pallua σε φορέα pTRE2hyg-a-synWT και -a-synA30P, για την αγρίου τύπου και τη σημειακή μεταλλαγή αντίστοιχα. Ακολούθησε κλωνοποίηση του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N1, Εικόνα 13, ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα που ακολουθούν.



Εικόνα 13: Κυκλικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-N1 στον οποίο έχει ενσωματωθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την ανθρώπινη αγρίου τύπου πρωτεΐνη  $\alpha$ -synuclein (wt) και τη μεταλλαγμένη μορφή  $\alpha$ -synuclein A30P.

### Γ.1.6 Εκκινητές

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη καθώς και οι θέσεις των νουκλεοτιδίων που αναγνωρίζουν πάνω στο γονιδίωμα περιγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί. Η αλληλουχία του γονιδιώματος καταγράφεται στη βάση δεδομένων NCBI.

**Πίνακας 4.** Το σύνολο των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Εκκινητές	Αλληλουχία (5' έως 3')	Θέσεις αναγνώρισης πάνω στο γονίδιο	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
LonP1s	5'-TCACACATCCACCTGCATGTGC-3'	2317 - 2338	191
LonP1a	5'-GCAATGGTCTTCTCCTTGATGC-3'	2507 - 2486	
SRP14s	5'-CAGCGTGTTCATCACCCCTCAA-3'	154 - 174	109
SRP14a	5'-GGCTCTCAACAGACACTTGTTTT-3'	262 - 240	
$\alpha$ -syn-s	5'-TTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTG-3'	144 - 166	273
$\alpha$ -syn-a	5'-TGGTCCTTTTTTGACAAAGCCAGTG-3'	416 - 393	
Hsf1-a	5'-CACTCTTCAGGGTGGACA-3'	552 - 535	214
Hsf1-s	5'-CTGCCCAAGTACTTCAAG-3'	339 - 356	
b/g actin-a	5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'	1154 - 1135	141
b/g actin-s	5'-TTGCTGACAGGATGCAGAAG-3'	1014 - 1033	
Ngn2-s	5'- CACTTCACAGGGCAGGTGTA-3'	1257 - 1276	191
Ngn2-a	5'- ATGCCACCATCATCTCTTCC-3'	1447 - 1428	
Pink1-s	5'-CAGCACATTTGCAGCTAAGCG-3'	1415 - 1432	177
Pink1-a	5'-CCAATCCCTTCTATGGCCAAG-3'	1591 - 1574	
APEX1-F	5'-CCAGAGGCCAAGAAGAGTAA-3'	386 - 405	135
APEX1-R	5'-GCAGATCTTGAGTGTGGCAG-3'	520 - 501	
MYH1-F	5'-GGCTTGTCTGTGTCACTGT-3'	452 - 471	214
MYH1-R	5'-GCTTGGTGTTCACAGTCTTC-3'	665 - 646	
PARKIN-a	5'-GGTACGCTTCTTTACATTCCCG-3'	1248 - 1227	204
PARKIN-s	5'-GGATTCTGGGAGAAGAGCAGTA-3'	1045 - 1066	
POLG-s	5'-GCTCACTGACAATAGTGCCA-3'	2310 - 2329	182
POLG-a	5'-CGTTGTAAGGTCCATTGC-3'	2491 - 2474	
TFAM-s	5'-CGTTTCTCCGAAGCATGT-3'	148 - 165	145
TFAM-a	5'-GGACAACCTTGCCAAGACAGA-3'	292 - 273	
TFB1M-s	5'-CCAAGATAGAGCAGCCATTC-3'	518 - 537	156
TFB1M-a	5'-GGTCTATGTCTGCCAACTCT-3'	673 - 654	
TFB2M-s	5'-GGAATGTTCCCAAGTAGAGG-3'	702 - 721	223
TFB2M-a	5'-GCTCCATGTGCAGAACCTTA-3'	924 - 905	

UNG-s	5'-CCAACTCTCATAAGGAGCGA 3	850 - 869	158
UNG-a	5'-CGTCTGTAGTACATGGTG-3'	1007 - 990	
OGG1-s	5'-CGCAAGTACTTCCAGCTAGA-3'	627 - 646	170
OGG1-a	5'-GCGATGTTGTTGTTGGAGGAACAG-3'	796 - 773	
DJ-1-s	5'-GGTTCTACCAGGAGGTAATC-3'	393 - 412	139
DJ-1-a	5'-TTCATGAGCCAACAGAGCAG-3'	531 - 512	
LRRK2-s	5'-CCTGGGATTCAGAAATGTGG-3'	1785 - 1804	148
LRRK2-a	5'-CCAGACACTGAATTTCTTGGTC-3'	1932 - 1911	
mtDNA-s	5'-CCTATGTCGCAGTATCTGTC-3	113-132	167
mtDNA-a	5'-GATGTCTGTGTGGAAAGT-3'	280-163	
mtDNA-fragment A-s	5'- AACCAAACCCCAAAGACACC -3'	550-569	9289
mtDNA-fragment A-a	5'- GCCAATAATGACGTGAAGTCC -3'	9839-9819	
mtDNA-fragment B-s	5'- TCCCCTCCTAAACACATCC -3	9592-9610	7752
mtDNA-fragment B-a	5'- AGAAAGGCTAGGACCAAACC -3'	671-652	

Η σύνθεση των συγκεκριμένων εκκινητών πραγματοποιήθηκε από την εταιρία: VbC BIOTECH.

### Γ.1.7 Λογισμικό

Για την ανάλυση των πειραμάτων της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω λογισμικά:

- Excel, όπου η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Paired t-TEST.
- Bio-Rad CFX Manager, για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της QPCR.
- FlowJo, για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής.
- LAS AF Lite, για την ανάλυση των αποτελεσμάτων του ανοσοφθορισμού.
- Quantity One 4.6 για την πυκνομετρική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων από πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά western.

### Γ.1.8 Εξοπλισμός

- Αναδευτήρας για ανάδευση των μεμβρανών (Kisker, mini Rocker, MR-1)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος για eppendorfs (KUBOTA 3300)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος για σωληνάρια τύπου falcon (Heraeus, Megafuge 1R)
- Θάλαμος νηματικής ροής (Telstar, Bio II Advance)
- Θερμοκυκλοποιητής για συμβατική PCR (Applied Biosystems, PCR system 8700)



- Θερμοκυκλοποιητής για QPCR (Biorad, CFX96 system)
- Κλίβανος κυττάρων (FORMA SCIENTIFIC)
- Κυτταρομετρητής ροής (BD Biosciences FACSCalibur Flow Cytometer)
- Μαγνητικός αναδευτήρας (LABINCO L34)
- Μηχάνημα εμφάνισης φιλμ (Amersham Hyperprocessor)
- Μικροσκόπιο TIRF (Leica)
- Οπτικό μικροσκόπιο (ZEISS, Axiovert25)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών μικρής κλίμακας (Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell, BIORAD)
- Συσκευή μέτρησης του pH (ORION 410A)
- Συσκευή υπερήχων (BRANSON 250-D)
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους/ορατού (Hitachi, U-2001).

## **Γ.2 ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **Γ.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων**

Όλες οι διαδικασίες που σχετίζονται με την καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιούνται στο δωμάτιο κυτταροκαλλιεργειών σε θάλαμο νηματικής ροής, υπό ασηπτικές συνθήκες.

Τα νευροβλαστωματικά κύτταρα SH-SY5Y αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιλαμβάνει:

- DMEM (4500 mg/L glucose)
- 10% FBS
- 1% αντιβιοτικό (Antibiotic – Antimycotic).

Τα ρ<sup>0</sup> SH-SY5Y κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιλαμβάνει:

- DMEM (4500 mg/L glucose)
- 5% FBS
- 1% αντιβιοτικό (Antibiotic – Antimycotic)
- 50 μg/ml Uridine
- 100μg/ml sodium pyruvate.

Απαραίτητη προϋπόθεση πριν τη χρήση του ορού (FBS) είναι η θέρμανσή του στους 56°C για 30min με σκοπό την αδρανοποίηση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος του ορού. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες ενεργοποιούν την ανοσολογική απόκριση και η αδρανοποίησή τους θεωρείται απαραίτητη για την αποφυγή τυχόν λανθασμένων ανοσολογικών αποκρίσεων από το κύτταρο. Ακόμη, η θέρμανση του ορού έχει συνδεθεί με την αδρανοποίηση μικροοργανισμών όπως το μυκόπλασμα (BIOCHROM AG, 2005).

Η καλλιέργεια γίνεται σε ειδικούς επωαστήρες στις ακόλουθες συνθήκες:

- Θερμοκρασία: 37°C
- Περιεκτικότητα σε CO<sub>2</sub>: 5%

(www.abcam.com)

#### **Γ.2.1.1 Ανακαλλιέργεια των SH-SY5Y κυττάρων με τη χρήση θρυψίνης**

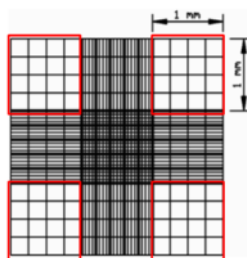
Για να διατηρηθεί η κυτταροκαλλιέργεια των νευροβλαστωματικών SH-SY5Y κυττάρων, όταν τα κύτταρα καταλάβουν το 80% - 90% της επιφάνειας του τρυβλίου, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια (ή passage) σε καινούριο τρυβλίο με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης. Η θρυψίνη είναι μια πρωτεάση η οποία προκαλεί διάσπαση των

αμινοξικών δεσμών μεταξύ των κυττάρων και την αποκόλληση τους από την επιφάνεια του τρυβλίου. Συνήθως, πραγματοποιούνται έως 25 ανακαλλιέργειες περίπου, καθώς από το σημείο αυτό κι έπειτα αρχίζει να φθίνει ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και να αυξάνεται ο κυτταρικός θάνατος. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από το τρυβλίο.
2. Απομάκρυνση του εναπομείναντος θρεπτικού υλικού μέσω πλύσης με διάλυμα PBS.
3. Αφαίρεση του PBS και προσθήκη 800ml θρυψίνης (για πιάτο διαμέτρου 100mm), επώαση στους 37°C για 3 min, ικανό διάστημα για την αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα του πιάτου με ελαφρά χτυπήματα.
4. Προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού και ανάδευση των κυττάρων, με πιπέτα μιας χρήσεως, ώστε να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα μεταξύ τους.
5. Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.
6. Μεταφορά του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε νέο τρυβλίο, στο οποίο έχει ήδη προστεθεί θρεπτικό υλικό.
7. Επώαση των κυττάρων στους 37°C. Στο διάστημα των επόμενων 4-5 ωρών τα κύτταρα προσκολλώνται ξανά στο υπόστρωμα του τρυβλίου.

### Γ.2.1.2 Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

Ο αριθμός των κυττάρων που απαιτείται σε κάθε περίπτωση υπολογίζεται με το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer ή πλάκα Neubauer. Προστίθενται 10μl κυτταρικού εναιωρήματος στην πλάκα και μετράται ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται εντός των τεσσάρων μεγάλων τετραγώνων της πλάκας. Τα τετράγωνα αυτά βρίσκονται στις τέσσερις γωνίες της πλάκας και αποτελούνται από 16 μικρότερα τετράγωνα, Εικόνα 14. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων προκύπτει από το άθροισμα του αριθμού των κυττάρων που περιλαμβάνονται σε καθένα από τα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα και διαιρείται δια του 4. Ο αριθμός που προκύπτει πολλαπλασιάζεται  $\times 10^4$  και αποτελεί τον αριθμό των κυττάρων της καλλιέργειας ανά ml ([www.celeromics.com](http://www.celeromics.com)).



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση των σημείων μέτρησης κυττάρων στην πλάκα Neubauer

### **Γ.2.1.3 Αποθήκευση κυτταρικών σειρών**

Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε ειδικά κρυοφιαλίδια για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε βαθιά κατάψυξη (-196°C) με την παρακάτω διαδικασία:

1. Θρυψινοποίηση των κυττάρων του τρυβλίου.
2. Φυγοκέντρηση του κυτταρικού εναιωρήματος σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 min/ 900rpm.
3. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 900μl θρεπτικού μέσου (900μl κυτταρικού εναιωρήματος αντιστοιχούν σε ένα κρυοφιαλίδιο)
4. Προσθήκη 900μl διαλύματος κατάψυξης (freezing mix) το οποίο περιλαμβάνει: 50% FBS, 20% DMSO και 30% θρεπτικού υλικού (χωρίς FBS).
5. Μεταφορά του συνολικού όγκου, 1.8 ml αυτού του διαλύματος που περιλαμβάνει τα κύτταρα, σε ένα κρυοφιαλίδιο κατάψυξης.
6. Τοποθέτηση σε ειδικό δοχείο με ισοπροπανόλη (για αργό και σταδιακό πάγωμα) στους -80°C. Το διάλυμα αποθήκευσης είναι τοξικό για τα κύτταρα, γι αυτό τα κρυοφιαλίδια πρέπει να ψύχονται κατευθείαν μετά την προσθήκη του στο κυτταρικό εναιώρημα.
7. Μετά από 12-24 ώρες, το κρυοφιαλίδιο φυλάσσεται στο υγρό άζωτο (-196°C).

### **Γ.2.1.4 Απόψυξη των κυττάρων**

Η απόψυξη των κυττάρων περιλαμβάνει:

1. Άμεση μεταφορά του κρυοφιαλιδίου από το υγρό άζωτο στους 37°C, αφού πρώτα καθαριστεί με 70% αιθανόλη.
2. Μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος σε ένα σωλήνα φυγοκέντρωσης τύπου falcon που περιέχει 8.2ml πλήρους θρεπτικού μέσου και φυγοκέντρωση στα 900rpm/ 5min.
3. Απομάκρυνση του υπερκειμένου, επαναιώρηση των κυττάρων σε νέο θρεπτικό μέσο και ανάδευση με πιπέτα μιας χρήσεως.
4. Μεταφορά των κυττάρων σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας και τοποθέτηση στους 37 °C μέχρι την επόμενη ανακαλλιέργεια.

### **Γ.2.2 Νευρική διαφοροποίηση των κυττάρων SH-SY5Y**

Η διαφοροποίηση των κυττάρων νευροβλαστώματος SH-SY5Y, πραγματοποιείται με τη χρήση ρετινοϊκού οξέος (Retinoic Acid, RA). Το ρετινοϊκό οξύ επάγει τη

διαφοροποίηση των κυττάρων καθώς εμπλέκεται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που καταστέλλουν την έκφραση της ογκοπρωτεΐνης N-Myc, η οποία είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό των νευροβλαστωματικών κυττάρων και παρεμποδίζουν τη δημιουργία του συμπλόκου N-Myc/Max (Cetinkaya et al., 2007). Επιπλέον το RA επάγει τη διαδικασία της διαφοροποίησης, ενεργοποιώντας μόρια, όπως είναι οι p21<sup>Cip1</sup> και p27<sup>Kip1</sup> τα οποία αναστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο στις φάσεις G0/G1 (Dimberg et al., 2002).

Το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης περιλαμβάνει:

- 15μM RA
- DMEM
- 0,5% FBS
- 1% Antibiotic – Antimycotic

Η διαδικασία διαφοροποίησης των κυττάρων έχει ως εξής:

1. Αφού έχει προηγηθεί θρυψινοποίηση, μεταφέρεται ο κατάλληλος αριθμός των κυττάρων σε νέο τρυβλίο (π.χ. 35000 κύτταρα σε πιάτο 6-well). Είναι πολύ σημαντικό να πραγματοποιηθεί καλή ανάδευση των κυττάρων, πριν τη μεταφορά στο νέο τρυβλίο, γιατί να κύτταρα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μονήρη.
2. Την επόμενη ημέρα, η πυκνότητα των κυττάρων πρέπει να είναι περίπου 60%-70%, προστίθεται το RA στην καλλιέργεια.
3. Το RA ανανεώνεται ανά δυο ημέρες αφαιρώντας τη μισή ποσότητα του θρεπτικού μέσου και προσθέτοντας άλλη τόση που περιέχει όμως τη διπλάσια ποσότητα RA.
4. Τα κύτταρα συλλέγονται μετά από 7 ημέρες παρουσία του RA και είτε χρησιμοποιούνται κατευθείαν, είτε τα πιάτα καταψύχονται στους -80°C.

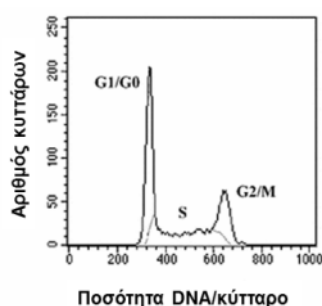
### Γ.2.3 Διαμόλυνση των κυττάρων (Transfection)

Η είσοδος εξωγενούς DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα (διαμόλυνση) μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με χημικούς τρόπους (όπως CaCl<sub>2</sub>, λιποσώματα, κατιονικά πολυμερή), είτε με μη χημικές μεθόδους (όπως ηλεκτροδιάτρηση, υψηλή πίεση, νανοσωματίδια) καθώς και παρουσία ιών. Από τις χημικές μεθόδους, ακολουθήθηκε η διαμόλυνση με τη μέθοδο των λιποσωμάτων (lipofectamine 2000 # 11668030) και των κατιονικών πολυμερών (PEI JetPRIME Polyplus #114-007), όπου το ποσοστό επιτυχίας αγγίζει το 40% - 50% στα κύτταρα SH-SY5Y.

## Γ.2.4 Προετοιμασία κυττάρων για ανάλυση FACS

Η ανάλυση FACS (Fluorescence-activated cell sorting) αποτελεί μια εξειδικευμένη μορφή κυτταρομετρίας ροής. Η μεθοδολογία αυτή επιτρέπει τη μελέτη ετερογενών κυτταρικών πληθυσμών όπου η ανάλυση γίνεται κύτταρο προς κύτταρο, με βάση κάποια χαρακτηριστικά του κάθε κυττάρου, όπως είναι η σκέδαση και ο φθορισμός. Παρέχει μια γρήγορη, αντικειμενική και ποσοτική καταγραφή των σημάτων φθορισμού από μεμονωμένα κύτταρα, καθώς και τη δυνατότητα φυσικού διαχωρισμού και απομόνωσης των κυττάρων (Julius et al., 1972).

Στην παρούσα μελέτη, η μεθοδολογία FACS χρησιμοποιήθηκε για τη ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων στις διάφορες συνθήκες του πειράματος. Ο κυτταρικός κύκλος των ενεργά πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων μιας καλλιέργειας παρουσιάζει 2 κορυφές, Εικόνα 15. Η κορυφή στα αριστερά (πλησιέστερα στον άξονα των y), αντιστοιχεί στις φάσεις G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> και δεξιά αντιστοιχεί στις φάσεις G<sub>2</sub>/M. Η περιοχή που βρίσκεται ενδιάμεσα απ' τις δυο κορυφές και επικαλύπτεται με την ώριμη G<sub>1</sub> και την πρόιμη G<sub>2</sub>, αντιπροσωπεύει τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, όπου αντιγράφεται το γενετικό υλικό (Hang et al., 2004). Τα κύτταρα των φάσεων G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> ενός διπλοειδούς οργανισμού έχουν δυο αντίγραφα DNA, ενώ όταν βρίσκονται στις φάσεις G<sub>2</sub>/M έχουν τέσσερα αντίγραφα. Η ανίχνευση της ποσότητας του DNA των κυττάρων και ο διαχωρισμός στις επιμέρους φάσεις γίνεται με τη χρήση της χρωστικής ιωδιούχο προπίδιο η οποία είναι ένα φθορίζον μόριο που συνδέεται στις βάσεις του DNA (ή RNA).



Εικόνα 15. Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής. (Προσαρμογή και τροποποίηση από Hang et al., 2004)

Η προετοιμασία των κυττάρων για ανάλυση FACS περιγράφεται παρακάτω ([www.flemingtonlab.com](http://www.flemingtonlab.com)):

1. Για την ανάλυση απαιτούνται  $10^6$  κύτταρα, τα οποία φυγοκεντρώνονται στα 900rpm/ 5 min.
2. Ακολουθεί μια πλύση των κυττάρων με 3ml - 5ml PBS.

3. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 500μl διαλύματος PBS με 0,1% γλυκόζη (αυτό το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C).
4. Αμέσως προστίθενται 5ml παγωμένης 70% EtOH (φυλάσσεται στους -20°C) στάγδην καθώς πραγματοποιείται ήπια ανάδευση των κυττάρων μέσω vortex.
5. Το μείγμα αναδεύεται και φυλάσσεται στους 4°C για το χρονικό διάστημα 1hr έως 1 εβδομάδα, με σκοπό τη μονιμοποίηση των κυττάρων παρουσία της EtOH.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 900rpm/ 5min.
7. Πλύση των κυττάρων μια φορά με 1ml PBS.
8. Φυγοκέντρηση και αφαίρεση του PBS. Δεύτερη φυγοκέντρηση και αφαίρεση του εναπομείναντος PBS.
9. Επαναιώρηση των κυττάρων σε 300μl διαλύματος ιωδιούχου προπιδίου το οποίο περιέχει RNase για τον κατακερματισμό του RNA και την πρόσδεση του ιωδιούχου προπιδίου μόνο στο DNA (φυλάσσεται στους 4°C).
10. Ανάδευση και επώαση στους 37°C / 30 – 45min.
11. Ανάλυση των δεδομένων στο κυτταρόμετρο.

Η συγκεκριμένη ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Κλινικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο μηχάνημα που περιγράφεται στην παράγραφο Γ.1.8.

### **Γ.2.5 Έμμεσος ανοσοφθορισμός**

Ο ανοσοφθορισμός είναι μια μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθοριοχρώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα. Τα φθοριοχρώματα, ή φθορίζουσες χρωστικές, εκπέμπουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος όταν διεγερθούν από φως υψηλότερης ενέργειας. Οι φθορίζουσες χρωστικές είναι συνδεδεμένες με την περιοχή Fc των αντισωμάτων, ώστε να μην επηρεάζουν την ειδικότητά τους. Μερικές από τις πιο γνωστές φθορίζουσες χρωστικές είναι η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) που εκπέμπει πράσινο χρώμα, η ισοθειοκυανική τετραμεθυλοραδαμίνη (TMRITC) που εκπέμπει κόκκινο χρώμα και η φυκοερυθρίνη (RE) που εκπέμπει πορτοκαλί χρώμα. Στον έμμεσο ανοσοφθορισμό το πρώτο αντίσωμα είναι μη σημασμένο και ανιχνεύεται με ένα δεύτερο αντι-ισοτυπικό αντίσωμα συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική.

Για τη χρώση του πυρήνα χρησιμοποιούνται χρωστικές που δεσμεύονται στο DNA, όπως είναι οι DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), PI (ιωδιούχο προπιδίο) και TO-PRO-

3, οι οποίες εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος. Το φως που εκπέμπεται από τις φθορίζουσες χρωστικές μπορεί να γίνει ορατό με απλό μικροσκόπιο το οποίο είναι εξοπλισμένο με λάμπα φθορισμού ή με συνεστιακό μικροσκόπιο.

Το πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού που ακολουθείται στο εργαστήριο μας είναι το ακόλουθο:

1. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πιάτο 24-well στο οποίο έχει προηγηθεί η επίστρωση με γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 11mm.
2. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα και πραγματοποιείται μια πλύση των κυττάρων με 500μl PBS.
3. Τα κύτταρα επί των καλυπτρίδων μονιμοποιούνται σε 200μl διαλύματος PFA 4% (παραφορμαδεΰδης) για 10min, σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Ακολουθούν τρεις πλύσεις με 500μl PBS, από 5min η καθεμία. Στο στάδιο αυτό, τα κύτταρα μπορούν να φυλαχτούν στους 4°C.
5. Οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα μεταφέρονται σε μια κατασκευή που τους παρέχει υγρασία και περιέχει τα εξής: ένα πιάτο κυτταροκαλλιεργειών μεγάλης διαμέτρου με 3 χαρτιά whatman στο μέγεθος του πιάτου, τα οποία διαβρέχονται με νερό και πάνω τους τοποθετείται πλαστική μεμβράνη τύπου parafilm. Οι καλυπτρίδες μεταφέρονται πάνω στην μεμβράνη με την πλευρά των κυττάρων προς τα πάνω.
6. Τα κύτταρα επωάζονται με 100μl διαλύματος ανοσοφθορισμού για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό την αύξηση της διαπερατότητας των κυττάρων και τη διευκόλυνση της εισόδου των αντισωμάτων.
7. Στη συνέχεια αφαιρείται το διάλυμα ανοσοφθορισμού και προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση. Τα κύτταρα επωάζονται με το πρωτογενές αντίσωμα ολονύκτια στους 4°C.
8. Ακολουθούν δυο πλύσεις με 100μl διαλύματος ανοσοφθορισμού, από 5min η καθεμία και μια ακόμη που διαρκεί 30min.
9. Αφαιρείται το διάλυμα ανοσοφθορισμού και προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα, στην κατάλληλη αραιώση, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η αραιώση καθώς και η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα γίνονται σε σκοτεινό μέρος.
10. Ακολουθούν τέσσερις πλύσεις με 100μl PBS, από 5min η καθεμία.
11. Στη συνέχεια προστίθεται στα κύτταρα η χρωστική DAPI, αραιωμένη σε PBS (50μl) για 2min.
12. Πραγματοποιούνται τέσσερις πλύσεις με 100μl PBS, από 5min η καθεμία.



13. Τέλος, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται με την επιφάνεια των κυττάρων προς τα κάτω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στο σημείο ακριβώς όπου πριν έχει τοποθετηθεί μικρή ποσότητα (6-7μl) του μέσου στερέωσης των καλυπτρίδων (mounting medium).
14. Οι καλυπτρίδες αφήνονται να στεγνώσουν ολονύκτια σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος και στη συνέχεια φυλάσσονται στους 4°C (σε σκοτεινό μέρος) μέχρι την παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο.

Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού ανιχνεύτηκαν μέσω μικροσκοπίας TIRF.

Σημείωση: Οι αραιώσεις του πρωτογενούς και του δευτερογενούς αντισώματος γίνονται σε 100μl διαλύματος ανοσοφθορισμού.

### **Γ.2.6 Απομόνωση ολικού RNA από ευκαρυωτικά κύτταρα**

Η απομόνωση του ολικού RNA από τα ευκαρυωτικά κύτταρα μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους. Κοινό χαρακτηριστικό για όλες τις μεθόδους είναι η ιδιαίτερη προσοχή που θα πρέπει να διατηρηθεί προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση του RNA με αποδιατακτικά ένζυμα, όπως είναι οι ριβονουκλεάσες (RNases) τόσο κατά τη διάρκεια της απομόνωσης αλλά και μετά το πέρας αυτής. Γι' αυτό το λόγο όλη η διαδικασία θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σε περιβάλλον όπου ακολουθούνται όλες οι μικροβιολογικές ασηπτικές τεχνικές και χρησιμοποιείται ειδικός πλαστικός εξοπλισμός που είναι απαλλαγμένος από RNases. Η απομόνωση του RNA στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο εκχύλισης μέσω του συνδυασμού: θειοκυανικό γουανιδίνιο – φαινόλη – χλωροφόρμιο. Το θειοκυανικό γουανιδίνιο και η φαινόλη περιέχονται στο διάλυμα Trizol. Το πρωτόκολλο απομόνωσης RNA με τη μέθοδο Trizol, από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε πιάτο 10cm, είναι το ακόλουθο (<https://tools.thermofisher.com>):

1. 1ml διαλύματος Trizol προστίθεται στα κύτταρα του πιάτου κυτταροκαλλιέργειας (αφού έχει απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό) ή στο ίζημα των κυττάρων (αφού έχει προηγηθεί φυγοκέντρωση).
2. Τα κύτταρα με το Trizol συλλέγονται σε φιαλίδιο τύπου eppendorf και σε αυτό το στάδιο μπορούν να φυλαχθούν στους -80°C. Ειδικά, ακολουθεί θραύση των κυτταρικών μεμβρανών μέσω έντονης ανάδευσης (15 φορές) με τη χρήση σύριγγας ινσουλίνης (1ml).
3. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Προστίθενται 200μl χλωροφορμίου και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση με το χέρι για 15sec.
  5. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
  6. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στα 12000g/ 15min/ 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση προκύπτει ένα μείγμα τριών φάσεων: η πάνω φάση (υδατική) περιλαμβάνει τα νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA), η μεσόφαση περικλείει κυρίως πρωτεΐνες και η κάτω φάση (οργανική) περιέχει μεμβρανικά θραύσματα, λιπίδια, πολυσακχαρίτες και θραύσματα οργανιδίων.
  7. Η πάνω φάση, που περιέχει το RNA, μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο, προστίθενται 200μl ισοπροπανόλης και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση με το χέρι για 15sec.
  8. Ακολουθεί επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτό το στάδιο το RNA κατακρημνίζεται λόγω βαρύτητας και αδιαλυτότητας στην ισοπροπανόλη.
  9. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στα 12000g/ 10min/ 4°C.
  10. Ακολουθεί πλύση του ιζήματος με 1ml διαλύματος 75% υπερκάθαρης αιθανόλης. Το ίζημα σε αυτό το στάδιο παραμένει ορατό καθώς δεν διαλυτοποιείται παρουσία αιθανόλης.
  11. Το RNA φυγοκεντρείται στα 7500g/ 5min/ 4°C.
  12. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ακολουθεί ακόμα μια φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων αιθανόλης.
  13. Τα φιαλίδια με το RNA αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου με ανοικτά τα καπάκια για 5 - 10min. Σε αυτό το στάδιο απαιτείται προσοχή καθώς πρώτον, το RNA θα πρέπει να παραμείνει σε περιβάλλον καθαρό από RNases και δεύτερον, δεν θα πρέπει να ξεπεραστεί το διάστημα των 10min καθώς υπάρχει κίνδυνος να ξεραθεί το RNA και να μην επαναδιαλύεται στη συνέχεια.
  14. Τέλος, το RNA επαναδιαλύεται σε 30μl H<sub>2</sub>O και φυλάσσεται στους -20°C για σύντομο χρονικό διάστημα ή στους -80°C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.
- Αξίζει να σημειωθεί ότι για τα πιάτα διαφορετικής διαμέτρου οι ποσότητες των αντιδραστηρίων προσαρμόζονται ανάλογα.

#### **Γ.2.6.1 Καθαρισμός του απομονωμένου RNA από το DNA**

Μια διαδικασία η οποία είναι απαραίτητη για την εξασφάλιση της καθαρότητας του απομονωμένου RNA είναι η απομάκρυνση τυχόν επιμολύνσεων με γενωμικό DNA. Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει την κατεργασία του RNA με

δεοξυριβονουκλεάση (DNase), ένα ένζυμο το οποίο αποικοδομεί το DNA καθώς καταλύει τη διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το RQ1 RNase-Free DNase kit της εταιρίας Promega και η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

1. Αναμειγνύονται τα συστατικά της αντίδρασης:

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Όγκος</b>
RNA	1-8μl (1,5μg)
Ρυθμιστικό διάλυμα της DNase, 10x(απαλλαγμένο από RNases)	1μl
DNase (απαλλαγμένη από RNases)	1μl
H <sub>2</sub> O (απαλλαγμένο από RNases)	0-7μl
<b>Τελικός όγκος</b>	<b>10μl</b>

2. Ακολουθεί επώαση του μείγματος στους 37°C για 30min, όπου δρα η DNase.
3. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 1μl διαλύματος STOP, το οποίο απενεργοποιεί τη δράση της DNase.
4. Επώαση του μείγματος στους 65°C για 10min, όπου δρα το διάλυμα STOP και αποθήκευση του RNA προσωρινά στους -20°C ή απευθείας μετατροπή σε cDNA

### **Γ.2.7 Αντίστροφη Μεταγραφή**

Κατά την αντίδραση της Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription), ένα μονόκλωνο RNA μετατρέπεται στο συμπληρωματικό του μονόκλωνο DNA (complementary DNA - cDNA), με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase). Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μια RNA κατευθυνόμενη DNA πολυμεράση η οποία χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο μια αλυσίδα RNA συνθέτει τη συμπληρωματική της αλυσίδα cDNA. Παρουσία ενός εκκινητή που περιέχει την αλληλουχία ολιγο-dT, η αντίστροφη μεταγραφάση μπορεί να συνθέσει ειδικό cDNA, από mRNA, καθώς ο εκκινητής αυτός σχηματίζει ζεύγη βάσεων με την αλληλουχία πολύ-A που βρίσκεται στο 3' άκρο των ευκαρυωτικών μορίων mRNA. Το 3' άκρο που σχηματίστηκε δημιουργεί μια δομή φουρκέτας και εκκινεί τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (Sambrook et al., 2006). Στη συγκεκριμένη μελέτη η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια της εταιρίας Thermo Scientific. Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είναι η ακόλουθη:

1. Προσθήκη των τριών πρώτων συστατικών για κάθε δείγμα (Τελικός όγκος 13μl).

dH <sub>2</sub> O (απαλλαγμένο από νουκλεάσες)	0-8μl
Εκκινητής (primer) OligodT (5μM)	1μl
RNA (0.75 μg/αντίδραση)	1-12μl

2. Ανάδευση (8-10 φορές) και μεταφορά σε πάγο.

3. Επώαση των αντιδράσεων για 5min στους 65°C και 2min στον πάγο.

4. Προετοιμασία του Master Mix της αντίδρασης στον πάγο (Τελικός όγκος 7μl/αντίδραση).

dH <sub>2</sub> O (απαλλαγμένο από νουκλεάσες)	1μl
Μείγμα dNTPs (10mM το καθένα)	1μl
Ρυθμιστικό διάλυμα 5x (Reaction Buffer buffer)	4μl
Αναστολέας των RNases (RiboLock RNase Inhibitor - 20U)	0.5μl
Αντίστροφη μεταγραφάση (RevertAid RT - 100U)	0.5μl

5. Ανάδευση 12-15 φορές.

6. Από το Master Mix μεταφέρονται 7μl σε κάθε αντίδραση.

7. Επώαση των αντιδράσεων στους 50°C για 30min.

8. Απενεργοποίηση των ενζύμων με επώαση στους 85°C για 5min και άμεση μεταφορά σε πάγο.

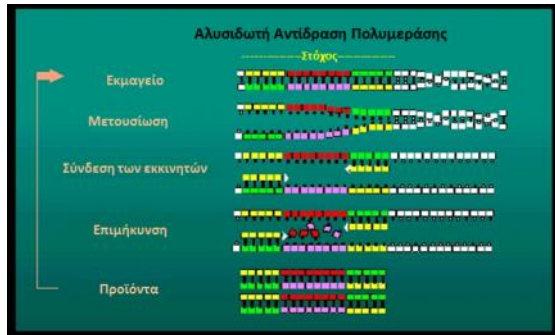
9. Φύλαξη στους -20°C.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αντιδράσεις μετατροπής του RNA σε cDNA έγιναν εις διπλούν για το κάθε δείγμα. Η μια ήταν η κανονική και η άλλη που ονομάζεται no RT ή -RT περιελάμβανε όλα τα συστατικά της αντίδρασης (μαζί με το RNA), χωρίς όμως την αντίστροφη μεταγραφάση. Αυτό το δείγμα αποτελεί το αρνητικό δείγμα ελέγχου (negative control) της αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής καθώς εάν υπάρχει χρωμοσωμικό DNA στο RNA θα φανεί και εκεί προϊόν μετά την αντίδραση PCR.

## Γ.2.8 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αναπτύχθηκε από τον Kary Mullis και τους συνεργάτες του στα μέσα του 1980, για την οποία ο Kary Mullis βραβεύτηκε το 1993 με το βραβείο Nobel στη Χημεία (Kubista, Andrade et al. 2006). Με την απλή PCR, μια συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενισχύεται με συγκεκριμένα πριμοδοτικά μόρια και με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης. Η PCR αποτελείται από διάφορα θερμοκικά στάδια. Στο πρώτο στάδιο το προς ενίσχυση DNA μετουσιώνεται, στο δεύτερο στάδιο τα

πριμοδοτικά μόρια (εκκινητές) ενώνονται με τις μονόκλωνες συμπληρωματικές τους αλυσίδες DNA (την νοηματική και την αντινοηματική αλυσίδα) και στο τρίτο στάδιο η DNA πολυμεράση συνθέτει μια καινούργια μονόκλωνη αλυσίδα από κάθε εκκινητή χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την προς ενίσχυση αλυσίδα, Εικόνα 16.



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση ενός κύκλου PCR [Τροποποίηση από (Lee 2009)].

Η σύνθεση γίνεται προς την κατεύθυνση 5'→3' και οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες χρησιμεύουν ως εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο. Θεωρητικά, το DNA ενισχύεται μέσω PCR 2n φορές μετά από n κύκλους (Saiki, Gelfand D.H. et al. 1988). Το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει το DNA εκμαγείο, τους εκκινητές, dNTPs, DNA πολυμεράση, MgCl<sub>2</sub> και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου.

### Γ.2.8.1 Σχεδιασμός εκκινητών

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε το γονίδιο LonP1 και ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το SRP14, καθώς η έκφρασή του δεν μεταβάλλεται στις συνθήκες του πειράματός μας. Σχεδιάστηκαν τα ζεύγη εκκινητών α) LonP1s (sense), β) LonP1a (antisense), γ) SRP14s και δ) SRP14a. Επιπλέον σχεδιάστηκαν ένα πλήθος εκκινητών που αφορούν το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία του κάθε γονιδίου και οι περιοχές που ενισχύθηκαν βρίσκονται εντός της κωδικής περιοχής των γονιδίων και περιλαμβάνουν τουλάχιστον ένα ιντρόνιο. Οι εκκινητές sense έχουν ακριβώς την ίδια αλληλουχία με την νοηματική αλυσίδα και είναι συμπληρωματικοί της αντινοηματικής αλυσίδας, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τους εκκινητές antisense. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι θέσεις που προσδέονται πάνω στο γονίδιο περιγράφονται στον πίνακα 4, στην παράγραφο Γ.1.6.

### Γ.2.8.2 Σύσταση μίγματος αντίδρασης και πρόγραμμα στο θερμοκυκλοποιητή για τα διάφορα ζεύγη εκκινητών

Το χρησιμοποιούμενο πρόγραμμα στον θερμοκυκλοποιητή αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

1. Αρχική μετουσίωση του DNA στους 94°C για 3min.
2. 30 κύκλους αποτελούμενους από τρία βήματα ο καθένας:
  - i. μετουσίωση στους 94°C/ 20sec
  - ii. πρόσδεση των εκκινητών στους 60°C/ 20sec
  - iii. επιμήκυνση στους 72°C/ 45sec
3. Τελική επιμήκυνση στους 72°C/ 2min.

Η σύσταση του μίγματος της αντίδρασης PCR περιγράφεται παρακάτω.

#### Σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR

Αντιδραστήριο	Όγκος
Υπερκάθαρο H <sub>2</sub> O	33,4μl
5x buffer με MgCl <sub>2</sub> (1x)	13μl
dNTPs (0,2 mM)	0,4μl
Εκκινητής Sense (s) (0,4μM)	1μl
Εκκινητής Antisense (a) (0,4μM)	1μl
Υπόστρωμα DNA	1μl *
Taq DNA Polymerase (1U)	0,2μl
Τελικός όγκος	50μl

\* Οι χρησιμοποιούμενοι όγκοι αντιστοιχούν σε ποσότητα 37,5ng.

### Γ.2.8.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Q-PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου, μπορεί να ονομαστεί και ποσοτική PCR (Q-PCR/qPCR/qrt-PCR). Οι περιορισμοί που έθετε η απλή PCR κάμφθηκαν το 1992 με την ανάπτυξη της Q-PCR από τον Higuchi και τους συνεργάτες του. Από την ανακάλυψή της μέχρι και σήμερα, η PCR έχει γνωρίσει μεγάλη άνθιση αλλά και βελτίωση με την Q-PCR.

Στην απλή PCR μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ακολουθεί η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στην Q-PCR όμως, η ποσότητα του προϊόντος που σχηματίζεται ανιχνεύεται κατά τη διάρκεια της πορείας της αντίδρασης. Πρόκειται δηλαδή για μια τεχνική στην οποία γίνεται συλλογή

πληροφοριών κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της PCR, και έτσι συνδυάζει τον πολλαπλασιασμό και την ανίχνευση σε ένα στάδιο. Οι πραγματικού χρόνου αντιδράσεις εκτελούνται σε θερμοκυκλοποιητή ο οποίος επιτρέπει τη μέτρηση των επιπέδων φθορισμού ενός μορίου-ανιχνευτή. Αυτό επιτυγχάνεται με την αξιοποίηση ειδικών χημικών αντιδραστηρίων τα οποία φθορίζουν ανάλογα με τη συγκέντρωση του PCR προϊόντος. Επειδή οι επιθυμητές αλληλουχίες ανιχνεύονται καθώς πολλαπλασιάζονται δεν χρειάζεται να αφαιρεθούν ποσότητες του προϊόντος κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Αντί για αυτό, το μηχάνημα απεικονίζει το ρυθμό της συσσώρευσης του πολλαπλασιαζόμενου DNA καθώς η αντίδραση εξελίσσεται. Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική συγκέντρωση των προς πολλαπλασιασμό αλληλουχιών στο μίγμα της αντίδρασης τόσο λιγότεροι είναι οι κύκλοι που απαιτούνται για να επιτευχθεί μια συγκεκριμένη παραγωγή του πολλαπλασιαζόμενου προϊόντος (Sambrook and Russell 2001). Για την κατανόηση της τεχνικής Q-PCR πρέπει να γίνει αναφορά στην τιμή Ct και στις φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται.

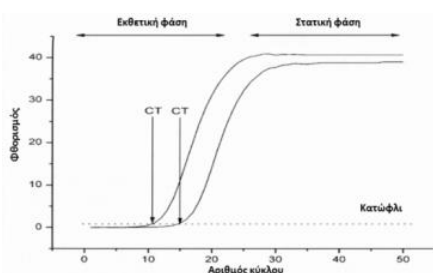
#### **Γ.2.8.4 Η τιμή Ct (threshold cycle – το κατώφλι του κύκλου)**

Η βασική πορεία σε μια PCR μπορεί να διακριθεί σε τρεις φάσεις:

- Εκθετική φάση: Συμβαίνει ο διπλασιασμός του προϊόντος σε κάθε κύκλο (υποθέτουμε 100% απόδοση σε κάθε προϊόν). Η αντίδραση είναι πολύ ειδική και ακριβής.
- Γραμμική φάση (Υψηλή Μεταβλητότητα): Τα αντιδρώντα συστατικά αρχίζουν να καταναλώνονται, η αντίδραση επιβραδύνεται, πλησιάζοντας στη φάση κορεσμού και δεν λαμβάνονται πλέον τα επιθυμητά προϊόντα.
- Στατική φάση (Τελικό-Σημείο): Χρήση της πηκτικής αгарόζης για παραδοσιακές μεθόδους: Η αντίδραση έχει παύσει και δεν παράγονται άλλα προϊόντα.

Στα αρχικά στάδια των κύκλων το σήμα είναι ασθενές και δεν μπορεί να καταγραφεί (είναι μικρότερο του υποβάθρου, δηλαδή του ορίου ανίχνευσης). Καθώς η ποσότητα του προϊόντος αυξάνεται, η ανίχνευση του σήματος εξελίσσεται εκθετικά. Σταδιακά όμως, παύει να αυξάνεται άλλο και έτσι έχουμε κορεσμό, Εικόνα 17. Σε ένα τυπικό πείραμα Q-PCR όλες οι καμπύλες φτάνουν σε κορεσμό στο ίδιο επίπεδο. Έτσι, οι μετρήσεις στο τελικό σημείο (στατική φάση) δεν μας πληροφορούν για τις αρχικές ποσότητες των μορίων cDNA που θέλουμε να ενισχύσουμε και τα οποία αντιστοιχούν στα επίπεδα RNA που περιέχονται στα δείγματα. Το μόνο που διαχωρίζουν είναι το αρνητικό από το θετικό δείγμα. Ωστόσο, οι καμπύλες των αντιστοιχών δειγμάτων διαχωρίζονται στη φάση ανάπτυξης της

αντίδρασης, γεγονός που αντανακλά τις διαφορετικές αρχικές ποσότητες (Kubista, Andrade et al. 2006). Το σημείο του χρόνου ή ο κύκλος όπου ανιχνεύεται για πρώτη φορά το τμήμα που ενισχύεται, ονομάζεται τιμή Ct (threshold cycle). Είναι ο χρόνος στον οποίο η ένταση του φθορισμού είναι μεγαλύτερη από το φθορισμό του υποβάθρου. Συνεπώς, όσο περισσότερη είναι η ποσότητα του DNA-στόχου στο αρχικό υλικό, τόσο γρηγορότερα θα εμφανιστεί μια σημαντική αύξηση του σήματος φθορισμού, που σημαίνει ένα χαμηλό Ct (Wong and Medrano 2005).



Εικόνα 17. Γραφικές παραστάσεις στις οποίες εικονίζεται το κατώφλι του κύκλου στην αρχή της εκθετικής φάσης.

#### Γ.2.8.5 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην Q-PCR

Οι μεταβολές στην συγκέντρωση του DNA ανιχνεύονται με τη χρήση ειδικών μορίων που αλληλεπιδρούν με αυτό και έχουν ιδιότητες φθορισμού. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν φθορίζουσες χρωστικές που εισχωρούν στη διπλή έλικα του DNA. Αυτές οι χρωστικές φθορίζουν λίγο όταν βρίσκονται ελεύθερες στο διάλυμα του δείγματος (μη δεσμευμένες), ενώ αρχίζουν να φθορίζουν έντονα όταν συνδέονται σε διπλή έλικα DNA και εκτίθενται σε ένα κατάλληλο μήκος κύματος φωτός. Έτσι, όσο ο αριθμός των αντιγράφων του DNA αυξάνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, τόσο αυξάνεται και ο φθορισμός (Wong and Medrano 2005; Kubista, Andrade et al. 2006).

Υπάρχουν διάφορες φθορίζουσες ουσίες όπως BEBO, BOXTO, Eva Green® με πιο γνωστή τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I, η οποία χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια των πειραμάτων μας.

#### Γ.2.8.6 Σύσταση μίγματος και συνθήκες της αντίδρασης Q-PCR

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται στην Q-PCR έχουν τελικό όγκο 10 μl και περιέχουν: το προς πολλαπλασιασμό DNA, τους εκκινητές και ποσότητα έτοιμου μίγματος του εμπορίου (KAPA SYBR® FAST qPCR Kit) που περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την τέλεση της αντίδρασης (KAPA SYBR® DNA Polymerase, χρωστική SYBR® Green I, MgCl<sub>2</sub> και dNTPs). Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με υπερκάθαρο



H<sub>2</sub>O. Η σύσταση του μίγματος και οι συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή αναφέρονται παρακάτω.

Σύσταση μίγματος Q-PCR και πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή:

<b>Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή</b>	<b>Σύσταση μίγματος αντίδρασης</b>
95°C για 3min	1 – 4,8μl DNA (<10 ng)
95°C για 10sec (αποδιάταξη του DNA)	0,1 μl απ' τον εκκινητή Sense (200 nM)
60°C για 1min (υβριδισμός των εκκινητών στο DNA)	0,1 μl απ' τον εκκινητή Antisense (200 nM)
Ανάγνωση της πλακέτας	5 μl του έτοιμου μίγματος αντιδραστηρίων που περιέχουν και τη χρωστική SYBR Green I
Επανάληψη των σταδίων 2 έως 4 για 40 κύκλους	0 – 3,8μl ddH <sub>2</sub> O
Δημιουργία καμπύλης τήξης από 50°C έως 90°C με ανάγνωση 0,5°C κάθε 5sec	Τελικός όγκος: 10 μl

Για την παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ειδικός θερμοκυκλοποιητής για QPCR.

## **Γ.2.9 Ενίσχυση μιτοχονδριακού DNA**

Η ενίσχυση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος έγινε με τη χρήση της πολυμεράσης LA Taq DNA Polymerase (RR042A, TaKaRa LA Taq® DNA Polymerase Hot-Start Version). Για κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 50ng γενωμικού DNA.

Οι αντιδράσεις περιλαμβάνουν:

PCR αντίδραση:	1x
Takara LA Taq	0.5 μl
10x LA PCR Buffer	5 μl
dNTPs Mixture (2.5mM)	8 μl
Γενωμικό DNA	50ng μl
εκκινητής sense	0.5 μl (10pmol/αντίδραση)
εκκινητής antisense	0.5 μl (10pmol/αντίδραση)
H <sub>2</sub> O	... μl
Τελικός όγκος αντίδρασης:	50 μl

Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για το κάθε τμήμα μιτοχονδριακού DNA είναι:

Τμήμα A: Πρόγραμμα    Τμήμα B: Πρόγραμμα

94°/3 min	94°/3min
94°/15 sec	94°/15 sec
58°/30 sec	54°/30 sec
72°/10 min	68°/10 min
	72°/10 min

Οι εκκινητές για τα τμήματα A και B αναγράφονται στον Πίνακα 4, Παράγραφο Γ.1.6. Τα προϊόντα της PCR ελέγχονται σε πηκτή αгарόζης 1% , στα 50V/1 ½ hrs. Ενδεικτική εικόνα των προϊόντων A και B παρουσιάζονται στην παράγραφο Δ.Β.10, Εικόνα 33. Η ποσότητα που ελέγχεται στην ηλεκτροφόρηση είναι 2μl, από τον συνολικό όγκο αντίδρασης (50μl). Ακολουθεί καθαρισμός για το υπόλοιπο προϊόν (PCR clean-up, Gel extraction, Macherey-Nagel). Τέλος, εκτιμάται η καθαρότητα του προϊόντος στο NanoDrop.

#### **Γ.2.10 Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από νευρικά κύτταρα**

Η απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τα κύτταρα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το διάλυμα λύσης RIPA Buffer (Cell Signaling). Η συγκεκριμένη διαδικασία συνίσταται απ' τα ακόλουθα στάδια:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων στο πιάτο κυτταροκαλλιέργειας μια φορά με PBS.
2. Προσθήκη 400μl διαλύματος RIPA 1x (για πιάτο 10cm) στο οποίο έχει προστεθεί μείγμα αναστολέων των πρωτεασών (1:100).
3. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5min.
4. Τα κύτταρα συλλέγονται με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας (cell scraper) σε φιαλίδιο τύπου erpendorf.
5. Πραγματοποιείται λύση των κυτταρικών μεμβρανών και θραύση των νουκλεϊκών οξέων με την εφαρμογή υπερήχων για 4sec, με εναλλάξ 0,5sec θραύση και 0,5sec παγόλουτρο και ένταση 30%.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14000g/ 10min/ 4°C.
7. Συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο περιλαμβάνει το πρωτεϊνικό εκχύλισμα και αποθηκεύεται στους -20°C.

### **Γ.2.10.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595nm. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (διάλυμα Bradford) που περιέχει την παραπάνω χρωστική και με το οποίο ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. Πραγματοποιείται μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης στα 595nm συναρτήσει της συγκέντρωσης του προτύπου διαλύματος BSA (1mg/ml) σε 2.5ml διαλύματος Bradford αραιωμένο 1:5 (0-25μg πρωτεΐνης). Το μίγμα παραμένει για 60sec και ακολουθεί φωτομέτρηση.
2. Ποσότητα έως 40μl δείγματος επαναιωρείται σε 2.5ml αραιωμένου διαλύματος Bradford, παραμένει για 60sec και φωτομετρείται στα 595nm.

### **Γ.2.11 Ανοσοαποτύπωση (Western blot)**

Η ανοσοαποτύπωση (ή αλλιώς Western blot) είναι μια μέθοδος ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών ενός σύνθετου μίγματος, που συνδυάζει την υψηλή αναλυτική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης, την ειδικότητα των αντισωμάτων και την ευαισθησία των ενζυμικών μεθόδων. Η μέθοδος αυτή αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

- Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμίδιου.
- Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης.
- Επώαση της μεμβράνης με αντισώματα.
- Ανίχνευση των πρωτεϊνών.

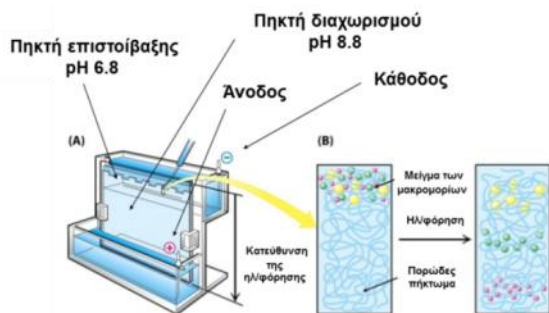
#### **Γ.2.11.1 Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμίδιου**

Σχεδόν όλες οι αναλυτικές ηλεκτροφορήσεις των πρωτεϊνών πραγματοποιούνται σε πηκτές πολυακρυλαμίδιου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες οι οποίες διασφαλίζουν αφενός μεν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις αντίστοιχες πολυπεπτιδικές τους υπομονάδες, αφετέρου δε τον μη σχηματισμό συσσωματωμάτων. Συνήθως, χρησιμοποιείται το ισχυρά ιονικό απορρυπαντικό SDS σε συνδυασμό με έναν αναγωγικό παράγοντα και την υψηλή θερμοκρασία για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών πριν τη φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή. Επιπλέον, η προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης στα δείγματα διασφαλίζει τον μη-σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών.

Τα μετουσιωμένα πολυπεπίδια προσδένονται με το SDS και έτσι φορτίζονται αρνητικά. Επειδή η πρόσδεση με το SDS είναι σχεδόν πάντα ανάλογη με το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και είναι ανεξάρτητη με την αλληλουχία του, τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου σύμφωνα με το μέγεθος του πολυπεπτιδίου. Έτσι, χρησιμοποιώντας ειδικούς μάρτυρες γνωστών μοριακών βαρών μπορούμε να εκτιμήσουμε το μοριακό βάρος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Μετατροπές όμως του πολυπεπτιδικού σκελετού, όπως Π.χ. N- ή O- γλυκοζυλιώσεις έχουν μια σημαντική επίδραση στο μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και πιθανόν το μοριακό βάρος που υπολογίζεται να μην ανταποκρίνεται στην πραγματική μάζα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Sambrook and Russell 2001).

Στις περισσότερες των περιπτώσεων, η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) πραγματοποιείται σε ένα διακοπτόμενο σύστημα ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο, το ρυθμιστικό διάλυμα στη δεξαμενή έχει διαφορετικό pH και ιονική ισχύ από αυτό που χρησιμοποιείται για να παρασκευαστεί η πηκτή. Τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται προς τον θετικό πόλο της κατακόρυφης συσκευής όταν περάσει συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα από τα ηλεκτρόδια. Όταν περάσουν πια μέσω της πηκτής επιστοίβαξης (stacking) η οποία είναι αρκετά πορώδης, τα συμπλέγματα κατακάθονται σε μια πολύ λεπτή ζώνη στην επιφάνεια της πηκτής διαχωρισμού (separating).

Τα ιόντα χλωρίου στο ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος και στην πηκτή επιστοίβαξης σχηματίζουν ένα προπορευμένο άκρο του κινούμενου οροθετικού δείκτη ενώ το ρυμουλκούμενο άκρο αποτελείται από μόρια γλυκίνης. Μεταξύ του προπορευόμενου και του ρυμουλκούμενου άκρου του κινούμενου οροθετικού δείκτη υπάρχει μια ζώνη χαμηλότερης αγωγιμότητας η οποία εναποθέτει τελικά τα πολυπεπίδια στην επιφάνεια της πηκτής διαχωρισμού. Εκεί το υψηλότερο pH της πηκτής ευνοεί τον ιονισμό της γλυκίνης και τα ιόντα γλυκίνης που προκύπτουν μεταναστεύουν στην πηκτή διαχωρισμού ακριβώς πίσω από τα ιόντα χλωρίου. Ελεύθερα από τον κινούμενο οροθετικό δείκτη, τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίων μετακινούνται στην πηκτή διαχωρισμού και διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθος τους.



Εικόνα 18. Βασικά χαρακτηριστικά της ηλεκτροφόρησης SDS – PAGE. (Τροποποίηση από [www.slideshare.net](http://www.slideshare.net)).

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου συνθέτονται από αλυσίδες πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου οι οποίες είναι συνδεδεμένες με bis-ακρυλαμίδιο. Με την προσθήκη TEMED (N,N,N''N' -tetramethylethylenediamine) κατά την παρασκευή των πηκτών επιταχύνεται ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου και του bis-ακρυλαμιδίου καταλύοντας τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών οι οποίες παρέχονται από το APS (Υπερθειϊκό αμμώνιο), Η διαχωριστική ικανότητα αυτών των πηκτών εξαρτάται από την συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου στην πηκτή.

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο SDS-PAGE είναι η ακόλουθη:

1. Συναρμολογείται κατάλληλα η συσκευή γυάλινων πλακών που θα χρησιμοποιηθεί έτσι ώστε να μην υπάρχει διαρροή.
2. Κατασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού στην κατάλληλη πυκνότητα (Πίνακας 3.4).
3. Το μείγμα τοποθετείται πολύ γρήγορα στο σύστημα των γυάλινων πλακών, στην επιφάνεια του προστίθεται ισοπροπανόλη για να ευθυγραμμιστεί η στάθμη και να αποφευχθεί τυχόν εξάτμιση του υγρού.
4. Το πήκτωμα αφήνεται σε ηρεμία ~20min προκειμένου να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός.
5. Κατασκευάζεται το πήκτωμα επιστοιβάξης με συγκέντρωση ακρυλαμίδης 4%.
6. Απομακρύνεται η ισοπροπανόλη από το πήκτωμα διαχωρισμού, ξεπλένεται το πήκτωμα με H<sub>2</sub>O και προστίθεται το διάλυμα του πηκτώματος επιστοιβάξης.
7. Τοποθετείται το ειδικό χτενάκι για τη δημιουργία των πηγαδιών, αφήνεται σε ηρεμία για ~15min να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός. Στο στάδιο αυτό, το πήκτωμα μπορεί να αποθηκευθεί στους 4°C ή να χρησιμοποιηθεί την ίδια ημέρα μετά το πέρας τουλάχιστον 45min.
8. Η συσκευή με το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδική δεξαμενή.

9. Η δεξαμενή γεμίζεται με 1lt περίπου 1x SDS-PAGE ρυθμιστικό διάλυμα, προσέχοντας η στάθμη του να βρίσκεται 1-2cm πάνω από την επιφάνεια των πηκτών.
10. Προετοιμασία των δειγμάτων με επαναιώρησή τους σε διάλυμα 1x ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (Laemmli).
11. Αφαιρείται το χτενάκι από το πήκτωμα επιστοιβάξης και φορτώνονται τα δείγματα στην πηκτή, με τελικό όγκο 24μl.
12. Φορτώνεται επίσης και μίγμα με πρότυπες πρωτεΐνες για SDS-PAGE (μάρτυρας μοριακών βαρών), έτσι ώστε να μπορεί να υπολογιστεί το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θα διαχωριστούν.
13. Η δεξαμενή καλύπτεται και η όλη διάταξη λειτουργεί περίπου στα 120 - 150Volt μέχρι η ζώνη της χρωστικής διατρέξει κατά μήκος την πηκτή.

Οι όγκοι των αντιδραστηρίων για τις πηκτές διαχωρισμού και επιστοιβάξης περιγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί.

**Πίνακας 5.** Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

<b>Πηκτή διαχωρισμού (separating)</b>	<b>8%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>	<b>Πηκτή επιστοιβάξης (stacking) 5%</b>
Acryl:bis (29:1)	2.7ml	3.3ml	4ml	5ml	0.67ml
1.5M Tris pH 8.8	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	
1M Tris pH 6.8					0,5ml
H <sub>2</sub> O (υπερκάθαρο)	4.6ml	4ml	3.3ml	2.3ml	2.7ml
10 % SDS	100μl	100μl	100μl	100μl	40 μl
10 % APS	100μl	100μl	100μl	100μl	40 μl
TEMED	6μl	4μl	4μl	4μl	4 μl
<b>Τελικός όγκος</b>	10ml	10ml	10ml	10ml	4ml

### **Γ.2.11.2 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

Μόλις η χρωστική φτάσει στο κάτω μέρος της πηκτής σταματά η ηλεκτροφόρηση και αρχίζει η διαδικασία της υγρής μεταφοράς των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη οφείλεται σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις καθώς και σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μεμβράνης και των πρωτεϊνών. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κόβεται στο μέγεθος της πηκτής διαχωρισμού και διαβρέχεται με υπερκάθαρο (nanopure) H<sub>2</sub>O.

2. 2 ειδικά «σφουγγαράκια» και 4 διηθητικά χαρτιά Whatman διαβρέχονται με το διάλυμα υγρής μεταφοράς.
3. Τοποθετούνται στη συσκευή υγρής μεταφοράς από κάτω προς τα πάνω τα εξής: 1 «σφουγγαράκι», 2 χαρτιά Whatman, η πηκτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, αλλά 2 χαρτιά Whatman και τέλος ακόμη 1 «σφουγγαράκι».
4. Η συσκευή συναρμολογείται, μεταφέρεται στη δεξαμενή όπου πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών και η δεξαμενή γεμίζεται με 1lt περίπου διαλύματος υγρής μεταφοράς.
5. Ξεκινά η μεταφορά των πρωτεϊνών, σε χαμηλή θερμοκρασία, στα 200mA για  $1^{1/2} - 4^{1/2}$  hrs, ανάλογα με το μοριακό βάρος των προς μεταφορά πρωτεϊνών.

### **Γ.2.11.3 Επώαση της μεμβράνης με ειδικά αντισώματα και ανίχνευση των πρωτεϊνών**

Μετά το πέρας της μεταφοράς η μεμβράνη επωάζεται με εκείνα τα αντισώματα που αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες του ενδιαφέροντος. Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Επώαση της μεμβράνης με διάλυμα γάλακτος για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου (Blocking). Η καζεΐνη του γάλακτος μπλοκάρει στη μεμβράνη όλες τις μη ειδικές θέσεις δέσμησης των αντισωμάτων αφήνοντας εκτεθειμένες μόνο αυτές στις οποίες βρίσκονται οι πρωτεΐνες.
2. Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης, των 5min με διάλυμα TBS-T (Washing).
3. Επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο έχει επαναδιαλυθεί σε διάλυμα TBS-T + BSA, για 1 h υπό συνεχή ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου ή O/N στους  $4^{\circ}\text{C}$  (Binding).
4. Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης των 5min με διάλυμα TBS-T (Washing).
5. Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο έχει επαναδιαλυθεί σε διάλυμα γάλακτος, για 1 h υπό συνεχή ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (Binding).
6. Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης των 5min με διάλυμα TBS-T (Washing).

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας, χρησιμοποιώντας το kit: Lumilight western blotting Substrate, της εταιρίας Roche. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

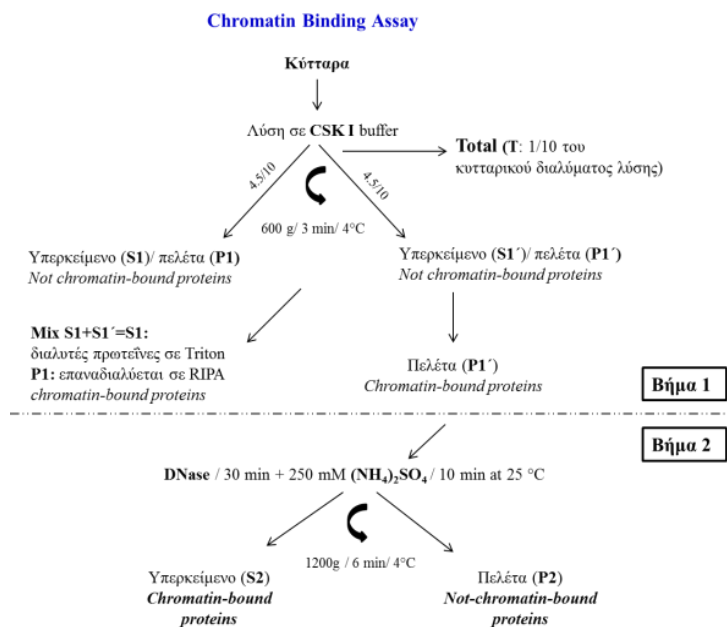
1. Επώαση της μεμβράνης με 700μl από το κάθε διάλυμα εμφάνισης του kit για 5min, μακριά απ' το πολύ φως.
2. Τοποθέτηση της μεμβράνης μέσα στην κασέτα εμφάνισης.

3. Μετάβαση στο σκοτεινό θάλαμο και τοποθέτηση ενός φωτογραφικού φιλμ πάνω στην μεμβράνη για 1-15 min.
4. Εμφάνιση του φιλμ σε ειδικό μηχάνημα.
5. Μετά το πέρας της διαδικασίας η μεμβράνη στεγνώνεται και διατηρείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Τέλος τα φιλμ σκανάρονται και οι εικόνες αναλύονται με τη χρήση του λογισμικού Quantity One για την ποσοτικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών. Τα δεδομένα από τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος κακοικοποιήθηκαν με βάση τις τιμές πυκνότητας για τις εκάστοτε πρωτεΐνες αναφοράς ( $\beta$ -actin,  $\beta$ -tubulin και Tim23).

### Γ.2.12 Διαδικασία διαχωρισμού πρωτεϊνών που προσδένονται στη χρωματίνη (Chromatin Binding Assay, CBA)

Το πρωτόκολλο διαχωρισμού των πρωτεϊνών που προσδένονται στη χρωματίνη περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Πλύση των κυττάρων με 5ml PBS. Διάρρηξη και λύση των κυττάρων για 15min/ $4^{\circ}\text{C}$  στο buffer CSK I (cytoskeleton buffer I): 10 mM Pipes (pH 6.8), 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, συμπληρώνεται με 1 mM DTT, 1 mM PMSF, protease inhibitor και 0.5% (vol/vol) Triton X-100. Επώαση για 3/ $4^{\circ}\text{C}$ .



Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας απομόνωσης των πρωτεϊνών που προσδένονται στη

2. Αποθηκεύεται το 1/10 του εκχυλίσματος, αποτελεί το συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων (total fraction, T).

3. Το υπόλοιπο εκχύλισμα διαχωρίζεται ισόποσα σε δύο eppendorfs. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 600g/ 3min/ $4^{\circ}\text{C}$ . Με τη φυγοκέντρηση κατακρημνίζονται οι πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και το πυρηνικό εκχύλισμα, και παραμένουν στο ελαιώρημα οι διαλυτές πρωτεΐνες. Το



εναιώρημα ονομάζεται (S1 – supernatant 1), δηλαδή πρωτεΐνες διαλυτές από Triton ή πρωτεΐνες που δεν προσδένονται στη χρωματίνη.

4. Ακολούθως η μία από τις δύο πελέτες, η οποία περιέχει τις πρωτεΐνες που προσδένονται στη χρωματίνη, πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας και αδιάλυτες πρωτεΐνες, επαναιωρείται σε RIPA buffer (εκχύλισμα P1).

5. Η δεύτερη πελέτα επαναδιαλύεται σε CSK II buffer (10 mM Pipes (pH 6.8), 50 mM NaCl, 300 mM sucrose, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT), επώαση με DNase/ 30 min και προσθήκη 250 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ 10min/ 25 °C.

6. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 1200g/ 6min/ 4°C. απομόνωση υπερκείμενου εκχύλισμα S2, το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες που απελευθερώθηκαν από τη χρωματίνη μετά την επώαση με DNase και η πελέτα P2 η οποία περιέχει τις αδιάλυτες, κυτταροσκελετικές και πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας. Η πελέτα P2 επαναδιαλύεται σε RIPA buffer ( Llano et al., 2006), σχηματική απεικόνιση Εικόνα 19.

### **Γ.2.13 Διαχωρισμός μιτοχονδριακών κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων (Subcellular fractionation protocol)**

Το πρωτόκολλο διαχωρισμού μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο καλλιέργειας και πλύση με διάλυμα PBS.

2. Αφαίρεση του PBS και προσθήκη 800μl θρυψίνης (για πιάτο διαμέτρου 100mm), επώαση στους 37°C για 3 min για την αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα του τρυβλίου.

3. Πλύση της πελέτας κυττάρων με 5ml PBS και επανάληψη της φυγοκέντρησης.

4. Η πελέτα επαναδιαλύεται σε 0.5ml Διάλυμα Λύσης: 20mM HEPES, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 1mM EDTA pH 8, 1mM EGTA, 2.5mM Sucrose, 5mM DTT, 1mM PMSF, 1:100 Protease Inhibitor. Ακολουθούν 300 χτυπήματα σε γυάλινο Dounce Homogenizer των 2ml για τη διάρρηξη των κυττάρων.

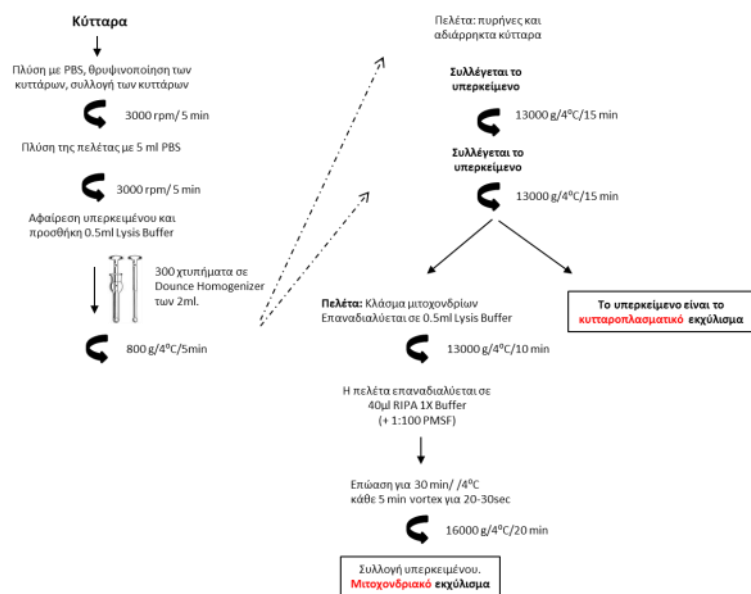
5. Φυγοκέντρηση στις 800 g/4°C/5min. Στο στάδιο αυτό καθιζάνουν οι πυρήνες και τα αδιαρρηκτα κύτταρα

6. Συλλέγεται το υπερκείμενο και φυγοκεντρείται στις 13.000 g/4°C/15min. Συλλέγεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο αποτελεί το

κυτταροπλασματικό εκχύλισμα και η πελέτα αποτελεί το εκχύλισμα στο οποίο εντοπίζονται τα μιτοχόνδρια.

7. Η πελέτα επαναδιαλύεται άμεσα σε 0.4ml Lysis Buffer και φυγοκεντρείται στις 13.000 g/4<sup>0</sup>C/10min. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση.

#### Διαχωρισμός κυτταροπλασματικών – Μιτοχονδριακών εκχυλισμάτων



Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση του διαχωρισμού κυτταροπλασματικών (Cytoplasmic, C) – μιτοχονδριακών (Mitochondrial, M) εκχυλισμάτων που ακολουθήθηκε.

8. Η πελέτα επαναδιαλύεται σε 40μl RIPA Buffer (που περιλαμβάνει 1:100 PMSF) και ακολουθεί επώαση για 30min στον πάγο (vortexing για 20-30 sec κάθε 5min).

9. Φυγοκέντρηση στις 16.000xg/4<sup>0</sup>C/20min.

10. Συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο αποτελεί το κλάσμα των μιτοχονδρίων (σχηματική απεικόνιση, Εικόνα 20).

#### Γ.2.14 Απομόνωση γενωμικού DNA από SH-SY5Y κύτταρα

Το πρωτόκολλο απομόνωσης γενωμικού DNA από SH-SY5Y κύτταρα περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο καλλιέργειας και πλύση με διάλυμα PBS.
2. Αφαίρεση του PBS και προσθήκη 800μl θρυψίνης (για πιάτο διαμέτρου 100mm), επώαση στους 37<sup>0</sup>C/ 3 min για την αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα του τρυβλίου.
3. Πλύση της πελέτας κυττάρων με 5ml PBS και επανάληψη της φυγοκέντρησης.
4. Η πελέτα επαναδιαλύεται σε 300-500μL Διάλυμα Λύσης: 10mM Tris pH 7.5, 100mM EDTA pH 8, SDS 0,5%, RNaseA 200μg/ml.
5. Επώαση για 30 min/ 37 <sup>0</sup>C.

6. στο υπερκείμενο γίνεται πέψη με την προσθήκη 15μl Proteinase K (stock 15mg/ml) και επώαση στους 1hr/ 55 °C.

7. Ακολουθεί καθαρισμός με τους οργανικούς διαλύτες φαινόλη και χλωροφόρμιο για την απομάκρυνση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών.

#### **Γ.2.14.1 Καθαρισμός του DNA με τους οργανικούς διαλύτες φαινόλη και χλωροφόρμιο**

Το πρωτόκολλο καθαρισμού του γενωμικού DNA με τους οργανικούς διαλύτες φαινόλη - χλωροφόρμιο περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Αρχικά προστίθεται ίσος όγκος με το ομογενοποίημα φαινόλης και αναμιγνύονται με αργό ρυθμό έως ότου δημιουργηθούν τρεις φάσεις. Η πάνω φάση είναι υδάτινη (πολική) και περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα, η ενδιάμεση περιέχει τις πρωτεΐνες και η κάτω φάση η οργανική περιέχει τα λιπίδια. Οι πρωτεΐνες βρίσκονται στην ενδιάμεση φάση καθώς αποτελούνται και από υδρόφοβες και από υδρόφιλες περιοχές.

2. Φυγοκέντρηση στο μέγιστο των στροφών για 3min.

3. Αφαιρείται η υδατική φάση. Προστίθεται σε αυτή ίση ποσότητα χλωροφορμίου και αναμιγνύονται με αργό ρυθμό. Το χλωροφόρμιο (χλωροφόρμιο / ισοαμυλική αλκοόλη 24:1) απομακρύνει επιπλέον τα λιπίδια και τη φαινόλη από την υδάτινη φάση και μετουσιώνει τις πρωτεΐνες.

4. Φυγοκέντρηση στο μέγιστο των στροφών για 2min.

5. Απομακρύνεται η πάνω φάση και προστίθενται 1/10 του όγκου CH<sub>3</sub>COONa και δύο όγκοι του συνολικού απόλυτη αιθανόλη. Ακολουθεί ήπια ανάδευση.

6. Το δείγμα μεταφέρεται στους -80°C/ 1hr ή εναλλακτικά -20°C/ overnight.

7. Φυγοκέντρηση στο μέγιστο των στροφών για 10min.

8. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται ίσος όγκος αιθανόλης 70%.

9. Φυγοκέντρηση στο μέγιστο των στροφών για 3min.

10. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση για μερικά sec. Με τη βοήθεια ενός tip απομακρύνεται εναπομείνασα αιθανόλη.

11. Στέγνωμα ιζήματος στον πάγκο για 7min.

12. Διαλυτοποίηση σε κατάλληλο όγκο TE (10mM Tris -Cl pH 8.0, 1mM EDTA)

## Γ.2.15 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation, IP)

Η ανοσοκατακρήμνιση αποτελεί μία μορφή χρωματογραφίας συγγένειας. Σε αυτήν, ως στερεή φάση χρησιμοποιούνται σφαιρίδια από αгарόζη ή κάποιο ανάλογο υλικό. Πάνω στα σφαιρίδια βρίσκεται ομοιοπολικά δεσμευμένη πρωτεΐνη A και πρωτεΐνη G. Είναι πρωτεΐνες βακτηριακής προέλευσης που δεσμεύουν με μεγάλη συγγένεια την Fc περιοχή ορισμένων τύπων IgG ανοσοσφαιρινών. Με τη χρήση της δημιουργείται ένα σύμπλοκο σφαιριδίων-πρωτεϊνών A και G-αντισωμάτων στο οποίο δεσμεύεται επιλεκτικά το αντιγόνο που θέλουμε να κατακρημνίσουμε. Το σύμπλοκο αυτό είναι δυνατό να συλλεχθεί μετά από φυγοκέντρηση και οι πρωτεΐνες που υπάρχουν σε αυτό να αποδεσμευτούν με τη χρήση αποδιατακτικών παραγόντων.

### Σύζευξη αντισώματος - Antibody conjugation

1. Για την παρακάτω διαδικασία χρησιμοποιούνται σφαιρίδια αгарόζης καλυμμένα με πρωτεΐνη G - beads. Το σύνολο των beads που θα χρειαστούν μεταφέρονται σε ένα erpendorf, ακολουθούν 3 πλύσεις, με τη βοήθεια του μαγνήτη, με 200μl PBS (η αφαίρεση του PBS γίνεται επίσης με τη χρήση του μαγνήτη).
2. Τα beads επαναδυναμώνονται στον όγκο PBS που χρειάζεται για το σύνολο των αντιδράσεων και μοιράζονται από 25μl σε κάθε erpendorf όπου προορίζεται να γίνει το Antibody conjugation, (π.χ σε 75 μl PBS αν πρόκειται για 3 αντιδράσεις και μεταφέρω από 25μl σε κάθε νέο erpendorf).
3. Τα beads μεταφέρονται στον πάγο (25μl ανά αντίσωμα) και προστίθενται:
  - 2.5μg αντίσωμα
  - 5% Glycerol (for molecular biology, 99% clean)
  - Ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι 200μl με PBS.
4. Επώαση στο cold room / overnight.

### Σημειώσεις:

1. Για δύο IP αντιδράσεις το conjugation γίνεται σε 200μl, για παραπάνω αντιδράσεις οι όγκοι διαμορφώνονται αναλογικά.
2. Το PBS buffer βρίσκεται ήδη στον πάγο.
3. Στην περίπτωση αντισωμάτων που ήδη περιέχουν glycerol αν ο όγκος του αντισώματος που απαιτείται για την IP αντίδραση είναι μεγάλος και κοντά σε αυτόν της glycerol που συμπληρώνουμε τότε δεν είναι απαραίτητο να προσθέσουμε επιπλέον γλυκερόλη ή ίσως χρειάζεται να συμπληρώσουμε λιγότερο όγκο (φυσικά ελέγχουμε τη ροή του δείγματος)

#### Επώαση beads με το εκχύλισμα πρωτεΐνης.

- Απομακρύνεται το υπερκείμενο που περιέχει το αντίσωμα (φυλάσσεται για ανοσοαποτύπωση κατά western λαμβάνεται υπόψη η συνολική αραίωση) (Supernatant - S).
- Τα beads μεταφέρονται στον πάγο, ακολουθούν 2 πλύσεις με 200μl PBS Buffer και μια με τελευταία πλύση με 200μl RIPA buffer (1x).
- Μετά τις πλύσεις επαναδιαλύονται σε 110μl RIPA Buffer στον πάγο (προορίζεται για δύο αντιδράσεις), αντίστοιχα αν προορίζονται για μία αντίδραση σε 55μl RIPA Buffer.
- Προετοιμάζεται ένα νέο eppendorf tube το οποίο θα περιλαμβάνει:
  - ✓ 50μl beads
  - ✓ 200μg εκχύλισμα πρωτεϊνών
  - ✓ 20μl protease inhibitor
  - ✓ 150mM τελική συγκέντρωση NaCl (ελέγχεται πρώτα πόσο περιέχεται στο buffer και συμπληρώνεται ανάλογα)
  - ✓ 5% Glycerol (από working stock 50%) σε 200μl συνολικού όγκου RIPA. Ο όγκος της αντίδρασης δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 250μl.
- Επώαση στο cold room/ overnight (η αντίδραση είναι έτοιμη μετά από 3-4 ώρες παραμονής στο coldroom)

#### Έλεγχος της ανοσοκατακρήμνισης.

- Τοποθετείται η αντίδραση στο μαγνήτη και συλλέγεται το υπερκείμενο (Supernatant - S).
- 3 πλύσεις με 200μl RIPA Buffer και συλλέγονται οι αντίστοιχες πλύσεις δηλαδή: Wash1, Wash2, Wash3 (W1, W2 και W3 αντίστοιχα) (ενδιάμεσα από κάθε πλύση αναδεύω για περίπου 3min).
- Τα beads επαναδιαλύονται σε 40μl Laemmli Buffer.
- Τα προϊόντα της ανοσοκατακρήμνισης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση με τη μέθοδο SDS-PAGE.
- Τα δείγματα που ελέγχονται από κάθε αντίδραση είναι:  
**L:** Load, 20μg από το αρχικό εκχύλισμα πρωτεϊνών (αναλογικά αντιστοιχεί σε όγκο 20μl), **B:** Beads, 20μl από τα 40μl Laemmli στα οποία έχουν επαναδιαλυθεί τα beads, **S:** Supernatant, 20μl, **W1:** Wash 1, 20μl.

## **Γ.2.16 Φασματομετρία μάζας και ταυτοποίηση πρωτεϊνών ολικού κυτταρικού κλάσματος**

### **Γ.2.16.1 Χρώση πηκτής SDS– πολυακρυλαμιδίου με τη χρωστική Coomassie brilliant blue R-250**

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή όπως περιγράφηκε στην σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμιδίου 10%.

Μονιμοποίηση πρωτεϊνών: Το πήκτωμα μονιμοποιείται προκειμένου να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες και να αποφευχθεί η διάχυσή τους.

Του χρωματισμού της πηκτής προηγείται η μονιμοποίηση σε διάλυμα μονιμοποίησης για χρονικό διάστημα 30min-1hr.

Διάλυμα μονιμοποίησης (συνολικός όγκος 50ml/ minigel):

- 30% Methanol
- 10% Acetic Acid

Μετά τη μονιμοποίηση ακολουθούν 4 πλύσεις των 15min με απεσταγμένο H<sub>2</sub>O.

Απεικόνιση αποτελεσμάτων – Χρωματισμός της πηκτής ακρυλαμίδης (ελάχιστος χρόνος χρωματισμού 3hrs): Οι πρωτεΐνες που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση μπορούν να εμφανιστούν με χρώση Coomassie brilliant blue (ανιχνεύει 10ng και πάνω). Ο χρωματισμός γίνεται με τη χρωστική coomassie, η οποία έχει την ιδιότητα να προσδένεται στα αρωματικά αμινοξέα των πρωτεϊνών, αλλάζοντας χρώμα από κοκκινωπό-καφέ έως έντονο μπλε.

Το διάλυμα χρωματισμού περιλαμβάνει (συνολικός όγκος 50ml/ minigel):

- 0,12% χρωστική
- 10% ammonium sulfate
- 10% phosphoric acid
- 20% methanol

Για την προετοιμασία του διαλύματος χρωστικής απαιτείται η παρακάτω διαδικασία: Στο 20% H<sub>2</sub>O του όγκου που απαιτείται προστίθεται αρχικά το phosphoric acid, ακολουθεί η προσθήκη του ammonium sulfate. Όταν το ammonium sulfate διαλυτοποιηθεί, προστίθεται η χρωστική Coomassie brilliant blue R-250. Όταν διαλυτοποιηθεί προστίθεται το υπόλοιπο H<sub>2</sub>O που απαιτείται για το 80% του συνολικού όγκου διαλύματος, και ακολουθεί το 20% της methanol. Το διάλυμα αυτό αποθηκεύεται σε σκοτεινό μπουκάλι, σε θερμοκρασία δωματίου, και μπορεί να διατηρηθεί για χρονικό διάστημα > 6 μηνών.

Αποχρωματισμός: πλύση της περίσσειας χρωστικής: Το πήκτωμα παραμένει στο διάλυμα της χρωστικής για 12-24 ώρες. Επειδή η χρωστική βρίσκεται σε περίσσεια, στο τέλος αυτής της διαδικασίας το πήκτωμα έχει χρωματιστεί σε όλο το μήκος του. Στη συνέχεια το πήκτωμα τοποθετείται για αρκετές ώρες σε διάλυμα αποχρωματισμού (7% οξικό οξύ) προκειμένου να αποχρωματιστεί η μη-ειδική χρώση, δηλαδή οι περιοχές του πηκτώματος που δεν περιέχουν πρωτεΐνες και να παραμείνουν έγχρωμες αποκλειστικά οι ζώνες της κατανομής των πρωτεϊνικών συστατικών. Η χρώση αυτή παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης πρωτεϊνών σε συγκέντρωση τουλάχιστον 0,1 μg (Candiano, Bruschi et al. 2004).

### **Γ.2.16.2 Ανάλυση με φασματοφωτομετρία μάζας (Mass spectrometry, MS)**

Η κάθε λωρίδα-διαδρομή δείγματος που απομονώθηκε από την πηκτή κόπηκε σε 10 επιμέρους ζωνώσεις, οι οποίες στη συνέχεια υπέστησαν πρωτεόλυση με θρυψίνη (Shevchenko, Wilm et al. 1996). Τα μίγμα των πρωτεολυμένων πρωτεϊνών ξηράνθηκε με τη βοήθεια φυγοκέντρου αντλίας κενού (speed-vacuum) και επαναδιαλύθηκε σε διάλυμα 5% μεθανικό οξύ (formic acid) σε υπερκάθαρο νερό. Όλα τα δείγματα αφαλατώθηκαν με τη χρήση στηλών κλασμάτωσης που φέρουν δίσκους εκχύλισης C18 (Empore) και σταδιακή έκλουση με 80% MeOH και 5% μεθανικό οξύ. Όλα τα κλάσματα έκλουσης συλλέχθηκαν, αποξηράνθηκαν με φυγόκεντρο αντλίας κενού και επαναδιαλύθηκαν σε 5% διαλύματος μεθανικού οξέος για περαιτέρω MS ανάλυση. Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών και η σχετική ποσοτικοποίηση με nLC-ESI-MS/MS έγινε σε LTQ-Orbitrap XL σε συνδυασμό με το σύστημα Easy nLC (Thermo Scientific). Η προετοιμασία των δειγμάτων και ο διαχωρισμός LC πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε από τους Aivaliotis et al. (Aivaliotis, Gevaert et al. 2007), με μικρές τροποποιήσεις. Εν συντομία, τα αποξηραμένα πεπτίδια επαναδιαλύθηκαν σε 20μl 0.5% μεθανικό οξύ, υδατικό διάλυμα και το μίγμα των θρυψινοποιημένων πεπτιδίων διαχωρίστηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης (Reprosil Pur C18 AQ, μέγεθος σωματιδίων = 3 μm, μέγεθος πόρων = 120 Å, ο Δρ Maisch), συγχωνευμένοι πομποί πυριτίου μήκους 100 mm με εσωτερική διάμετρο 75 μm (Thermo Scientific), (35 to 40 bars of helium, Loader kit SP035, Proxeon). Ο ρυθμός ροής nLC ήταν 200 nl min<sup>-1</sup>. Τα θρυψινοποιημένα πεπτίδια διαχωρίστηκαν και εκλούστηκαν σε γραμμική βαθμίδωση νερού-ακετονιτριλίου. Ακολούθησε εγχυση στο φασματόμετρο μάζας (Aivaliotis, Gevaert et al. 2007; Aivaliotis, Macek et al. 2009). Η ανάλυση MS σαρώσεων αποκτήθηκε στο Orbitrap από 200 έως 2,000m/z, σε ανάλυση των 60,000, και

για το MS/MS διεξήχθει πρόδρομη απομόνωση στα 1.6 m/z με τεχνική τετραπόλου (quadrupole-Q). Ο κατακερματισμός των είκοσι πιο έντονων ιόντων με επαγόμενη σύγκρουση διάστασης (CID) με κανονικοποιημένη ενέργεια σύγκρουσης 35% και ανάλυση ταχείας σάρωσης MS διεξήχθησαν στην παγίδα ιόντων. Η δυναμική διάρκεια αποκλεισμού ορίστηκε σε 15s με 10 rpm ανοχή γύρω από το επιλεγμένο πρόδρομο ιόν και των ισοτόπων του. Οι τιμές-στόχοι AGC τέθηκαν σε  $4.0 \times 10^5$  και  $1.0 \times 10^4$  και ο μέγιστος χρόνος έγχυσης ήταν 50 ms και 35 ms για τις MS και τις MSn σαρώσεις, αντίστοιχα. Στα αρχικά δεδομένα MS raw έγινε ανάλυση με Proteome Discoverer 1.4.0 (Thermo Scientific) χρησιμοποιώντας αλγόριθμο αναζήτησης Mascot 2.3.01 (Matrix Science). Τα διαφορετικά φάσματα έτρεξαν βάση του Human theoretical proteome (Last τροποποίηση 9 Ιουλίου, 2014. Έκδοση 153) που περιλαμβάνει 140,330 εγγραφές, και μια λίστα από κοινές προσμίξεις (Rappsilber, Ryder et al. 2002). Οι παράμετροι αναζήτησης που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται λεπτομερώς στο Papanastasiou et al., 2013, τα τελικά πεπτιδία και η λίστα πρωτεϊνών συγκεντρώθηκαν βάση ενός Scaffold (version 4.4.1.1, Proteome Software; Portland, OR) χρησιμοποιώντας τα κριτήρια που περιγράφονται παραπάνω (Papanastasiou, Orfanoudaki et al. 2013).

### **Γ.2.16.3 Λειτουργική ανάλυση και ανάλυση των μονοπατιών των υποθετικών LonP1 αλληλεπιδρόντων μορίων**

Η λειτουργική ανάλυση των δεδομένων και η ανάλυση των εμπλεκόμενων μονοπατιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Perseus (1.5.2.6) ως μέρος του λογισμικού MaxQuant Software Package (Cox and Mann 2012). Ο σχολιασμός των κατηγοριών πραγματοποιήθηκε από τις βάσεις δεδομένων Gene Ontology (GO), όσον αφορά τη βιολογική λειτουργία (biological process-BP), τη μοριακή λειτουργία (molecular function-MF) και το κυτταρικό διαμέρισμα (cellular component-CC), και τη βάση δεδομένων KEGG pathway database για την ανάλυση των εμπλεκόμενων μονοπατιών (Ashburner, Ball et al. 2000; Huang da, Sherman et al. 2009; Consortium 2014; Kanehisa, Sato et al. 2016). Οι όροι GO επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση και ερμηνεία, χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα κριτήρια για τη σημασία: καταμέτρηση γονιδίων από δύο και Benjamini-Hochberg προσαρμοσμένη τιμή  $p \leq 0,05$ , Ύψος μεταβολής (fold change)  $\geq 2$ . Τα πιο βιολογικά σημαντικά γονίδια ήταν αυτά με το μεγαλύτερο «εμπλουτισμό» (enrichment) και τις μεγαλύτερες τιμές καταμέτρησης (count of genes values). Για την καλύτερη κατανόηση των άμμεσων και έμμεσων των υποθετικών αλληλεπιδρόντων



μορίων με τη LonP1, δημιουργήθηκε ένα δίκτυο αλληλεπιδράσης γονιδίων (gene-interaction-network) από τη STRING κάνοντας χρήση των μονοπατιών και των πληροφοριών από τις βάσεις δεδομένων KEGG και UniProt ([Franceschini, Szklarczyk et al. 2013](#)).

### **Γ.2.17 Προσδιορισμός του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης $\Delta\Psi_m$ με τη χρωστική JC-1**

Το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης  $\Delta\Psi_m$  εκτιμήθηκε με τη χρήση της χρωστικής JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazole- carbocyanide iodine) (Cayman # 10009172). Το JC-1 είναι μία λιπόφιλη κατιονική χρωστική η οποία εισέρχεται επιλεκτικά στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων με τρόπο εξαρτώμενο από το δυναμικό της μεμβράνης. Σε υγιή κύτταρα όπου το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης είναι υψηλό η μονομερής μορφή της χρωστικής εισέρχεται στη μήτρα των μιτοχονδρίων και σχηματίζει συσσωματώματα (J-aggregates) τα οποία εκπέμπουν σε μήκος κύματος 590 nm (κόκκινο). Όταν τα μιτοχόνδρια δυσλειτουργούν, το δυναμικό της μεμβράνης είναι χαμηλό, και η μονομερής μορφή δεν σχηματίζει συσσωματώματα στα μιτοχόνδρια, αντίθετα, διαχέεται στο κυτταρόπλασμα και εκπέμπει σε μήκος κύματος 527 nm (πράσινο).

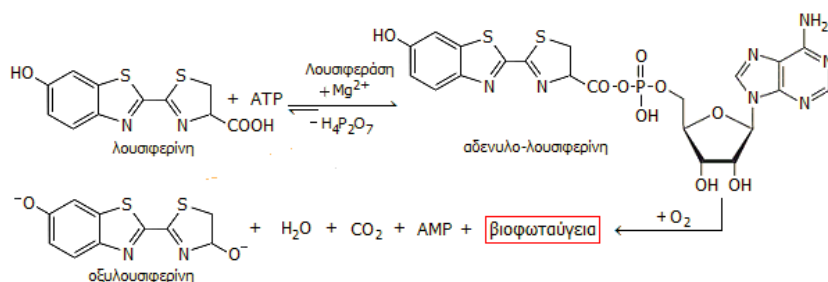
- Αραίωση της χρωστικής 1:100 σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, και επώαση για 30min/ 37°C. Μία πλύση με το JC-1 Buffer, και δύο πλύσεις με PBS.
- Μονιμοποίηση των κυττάρων με 4% PFA/ 10min.
- Μια πλύση με PBS και επώαση με DAPI 1:2000/ 2min.
- Μετά τη χρώση του πυρήνα ακολουθούν τρεις πλύσεις με PBS και στερέωση των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρο.

Τα κύτταρα είναι έτοιμα προς παρατήρηση την επόμενη μέρα σε μικροσκόπιο φθορισμού.

### **Γ.2.18 Αναλυτικός προσδιορισμός ATP (5'-Adenosine-triphosphoric acid - ATP)**

Η καθιερωμένη μέθοδος προσδιορισμού ATP σε βιολογικά υγρά είναι εξαιρετικά απλή και βασίζεται στη βιοφωταύγεια (bioluminescence). Το ATP αντιδρά με λουσιφερίνη (luciferin) παρέχοντας μια ενδιάμεση ένωση, την αδενυλολουσιφερίνη, παρουσία του ενζύμου λουσιφεράση (luciferase), το ένζυμο που καταλύει την εκπομπή βιοφωταύγειας από τις πυρολαμπίδες, και παρουσία μικρής συγκέντρωσης ιόντων μαγνησίου, σε pH 7,8. Η ενδιάμεση ένωση αντιδρά με το διαλυμένο οξυγόνο παρέχοντας βιοφωταύγεια (με  $\lambda_{max}$

= 560 nm), της οποίας η ένταση συσχετίζεται γραμμικά με την ποσότητα ATP του εξεταζόμενου δείγματος. Ο βιοφωταυγειομετρικός προσδιορισμός του ATP είναι εξαιρετικά απλός, με μεγάλη εκλεκτικότητα και ιδιαίτερα ευαίσθητος με κατώτερο όριο ανίχνευσης ποσότητες ATP της τάξης του 0,1 pmol ATP (50 pg). Η μέτρηση έγινε με φορητό φωταυγείομετρο (Luminometer Junior EG&G Berthold LB 9509). Για τη μέτρηση ATP χρησιμοποιήθηκε το ATP determination kit, Molecular Probes A22066. Γίνεται λύση των κυττάρων σε RIPA buffer 1x και μέτρηση των επιπέδων αμέσως μετά τη λύση. Τα επίπεδα ATP αποδόθηκαν ως nM/μg εκχυλίσματος πρωτεΐνης.



**Εικόνα 21. Αλληλουχία αντιδράσεων κατά το βιοφωταυγειομετρικό προσδιορισμό ATP.**

[http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem\\_ATP.htm](http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_ATP.htm)

### Γ.2.19 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. Για τον υπολογισμό της στατιστική διαφοράς ανάμεσα σε δύο ομάδες δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε αμφίπλευρο (two tailed) Student's *t* test. Η τιμή *p* (*p value*) θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική σε τιμές μικρότερη από 0,05.

*Εγκαθίδρυση ενός in vitro χρόνιου μοντέλου μελέτης της νόσου του Parkinson.*

#### **Δ.Α.1 Τα κύτταρα SHSY5Y ως κατάλληλο νευρικό κυτταρικό μοντέλο**

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήσαμε είναι η ανθρώπινη νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά SH-SY5Y. Το νευροβλάστωμα είναι καρκίνος της παιδικής ηλικίας του συμπαθητικού νευρικού συστήματος που προέρχεται από κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y αποτελεί υποκλώνο της κυτταρικής σειράς SK-N-SH, που προήλθε από βιοψία του μυελού των οστών ασθενούς με νευροβλάστωμα προέλευσης από τα συμπαθητικά αδρενεργικά γάγγλια στις αρχές της δεκαετίας του 1970 . Η κυτταρική σειρά SK-N-SH περιέχει πληθυσμούς κυττάρων με τρεις διαφορετικούς φαινοτύπους: τα νευροβλαστικά κύτταρα με νευρωνικό φαινότυπο (N - type), τα νεοπλασματικά κύτταρα, είναι πολυδύναμα πρόδρομα Schwann κύτταρα και είναι έντονα προσκολλημένα στο υπόστρωμα (S - type), και τον ενδιάμεσο τύπο που μπορεί να είναι κύτταρα που αντιπροσωπεύουν είτε ένα βλαστοκύτταρο είτε ένα ενδιάμεσο στάδιο μεταξύ N- και S-τύπου κυττάρων (I type) (Ciccarone, Spengler et al. 1989; Ross, Spengler et al. 1995; Ross, Biedler et al. 2003; Joshi, Guleria et al. 2006). Τα κύτταρα N-τύπου αποτελούν τα κακοήθη κύτταρα του νευροβλαστώματος, ενώ τα S-τύπου φαίνεται να είναι μη-κακοήθη (Piacentini, Piredda et al. 1996; Spengler, Lazarova et al. 1997). Η SH-SY5Y κυτταρική σειρά αποτελεί μια συγκριτικά ομοιογενή νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά νευρωνικού τύπου (N - type) μιας και περιέχει N-τύπου κύτταρα σε ποσοστό 80% έναντι των S-τύπου που εντοπίζονται σε ποσοστό 20% στον κυτταρικό πληθυσμό (Bell, Hann et al. 2013).

Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y αποτελεί ένα δημοφιλές πειραματικό μοντέλο για τη νόσο του Parkinson μιας και κατέχει πολλά χαρακτηριστικά των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Παθολογικά η νόσος του Parkinson χαρακτηρίζεται από την απώλεια των ντοπαμινεργικών κυττάρων του μεσεγκεφάλου. Τα χαρακτηριστικά που το καθιστούν κατάλληλο για τη μελέτη της νόσου είναι πρώτον ότι έχουν την ικανότητα να εκφράζουν ντοπαμίνη και νοραδρεναλίνη επειδή εκφράζουν τυροσίνη και β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης (Oyarce and Fleming 1991). Δεύτερον τα SH-SY5Y κύτταρα εκφράζουν το

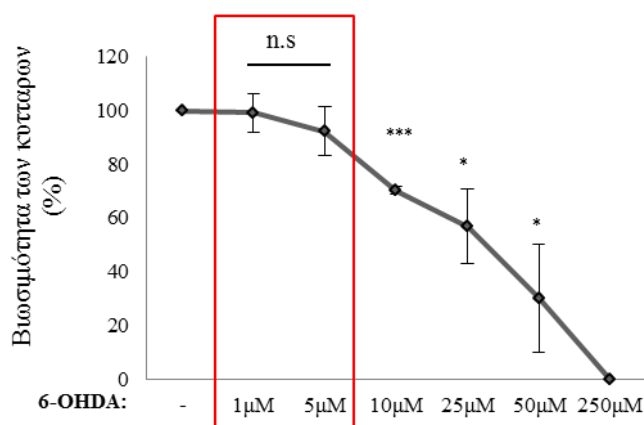
μεταφορέα της ντοπαμίνης (dopamine transporter, DAT), μία πρωτεΐνη που απαντάται μόνο στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η πρωτεΐνη DAT ρυθμίζει την ομοιόσταση της ντοπαμίνης μέσω ειδικής πρόσληψης και παγίδευσης της (Takahashi, Deng et al. 1994). Και τρίτον τα SH-SY5Y κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμους λειτουργικούς νευρώνες υπό την παρουσία κάποιων παραγόντων όπως για παράδειγμα το ρετινοϊκό οξύ (RA), το οποίο έχει την ικανότητα να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και να προάγει τη διαφοροποίηση (Sidell 1982; Cheung, Lau et al. 2009). Το ρετινοϊκό οξύ διαφοροποιεί τα SH-SY5Y κύτταρα προς ντοπαμινεργικούς νευρώνες, οδηγώντας στην απόκτηση όλων των επιθυμητών μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών ενός *in vitro* κυτταρικού μοντέλου για τη μελέτη της νόσου του Parkinson. Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι η διαφοροποίηση παρουσία ρετινοϊκού οξέος για 7 ημέρες αποτελεί το καταλληλότερο πειραματικό μοντέλο για τη μελέτη μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών που βασίζονται στην παθοφυσιολογία της PD (Lopes, Schroder et al. 2010). Συγκεκριμένα, η έκθεση διαφοροποιημένων και μη SH-SY5Y κυττάρων σε διάφορες συγκεντρώσεις της νευροτοξίνης 6-OHDA επάγει την απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, προκαλεί το σχηματισμό ROS, απελευθέρωση του cytochrome c και ενεργοποίηση της απόπτωσης (Ikeda, Tsuji et al. 2008), ενώ στο ίδιο πλαίσιο έρευνας έχει μελετηθεί και η επίδραση των νευροτοξινών MPTP και rotenone.

Λόγω της δυσκολίας να βρεθεί ένα κατάλληλο προσιτό κυτταρικό μοντέλο για την *in vitro* μελέτη της νόσου του Parkinson, λαμβάνοντας υπόψη μοριακές και βιοχημικές παραμέτρους, έχουν καθιερωθεί οι κυτταρικές σειρές SH-SY5Y and PC12 (κυτταρική σειρά Φαιοχρωμοκυτώματος αρουραίου) (Lee, Shin et al. 2002; Gomez-Lazaro, Bonekamp et al. 2008). Ωστόσο δεν πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός ότι εξαιτίας της καρκινικής φύσης οι κυτταρικές αυτές σειρές έχουν ογκογόνες και μιτογόνες ιδιότητες (Biedler, Roffler-Tarlov et al. 1978)

#### **Δ.Α.2. Ανάπτυξη ενός *in vitro* κυτταρικού μοντέλου για τη νόσο PD μετά από χρόνια έκθεση στη νευροτοξίνη 6-OHDA**

Έχοντας ως γνώμονα ότι η νόσος του Parkinson αποτελεί μια προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή, αποφασίσαμε να προχωρήσουμε στην ανάπτυξη ενός *in vitro* μοντέλου χρόνιας έκθεσης νευρικών κυττάρων στη νευροτοξίνη 6-OHDA για τη μελέτη μονοπατιών που εμπλέκονται στην προοδευτική εμφάνιση της νόσου PD. Η 6-

OHDA αποτελεί ένα υδροξυλιωμένο ανάλογο της ντοπαμίνης, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως και έχει καθιερωθεί σαν Παρκινσονιακό μοντέλο μελέτης της εκφύλισης των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην SNpc περιοχή (Εισαγωγή, Παράγραφος Α.3.3.2). Οι περισσότερες μελέτες που αναλύουν τις συνέπειες τέτοιων ουσιών στα νευρικά κύτταρα χρησιμοποιούν υψηλές συγκεντρώσεις οι οποίες συνοδεύονται από τοξικές δράσεις και παράπλευρη ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών. Αρχικά, ελέγχθηκε η τοξική δράση διάφορων συγκεντρώσεων τοξίνης 6-OHDA στην κυττάρικη σειρά SH-SY5Y, για χρονικό διάστημα τριών ημερών. Το εύρος των συγκεντρώσεων που ελέγχθηκαν ήταν 1μM, 5μM, 10μM, 25μM, 50μM και 250μM. Οι συγκεντρώσεις 10μM, 25μM, 50μM και 250μM, απεδείχθησαν τοξικές για την επιβίωση των κυττάρων, αφού παρατηρήθηκε έντονος κυτταρικός θάνατος, Εικόνα 22.



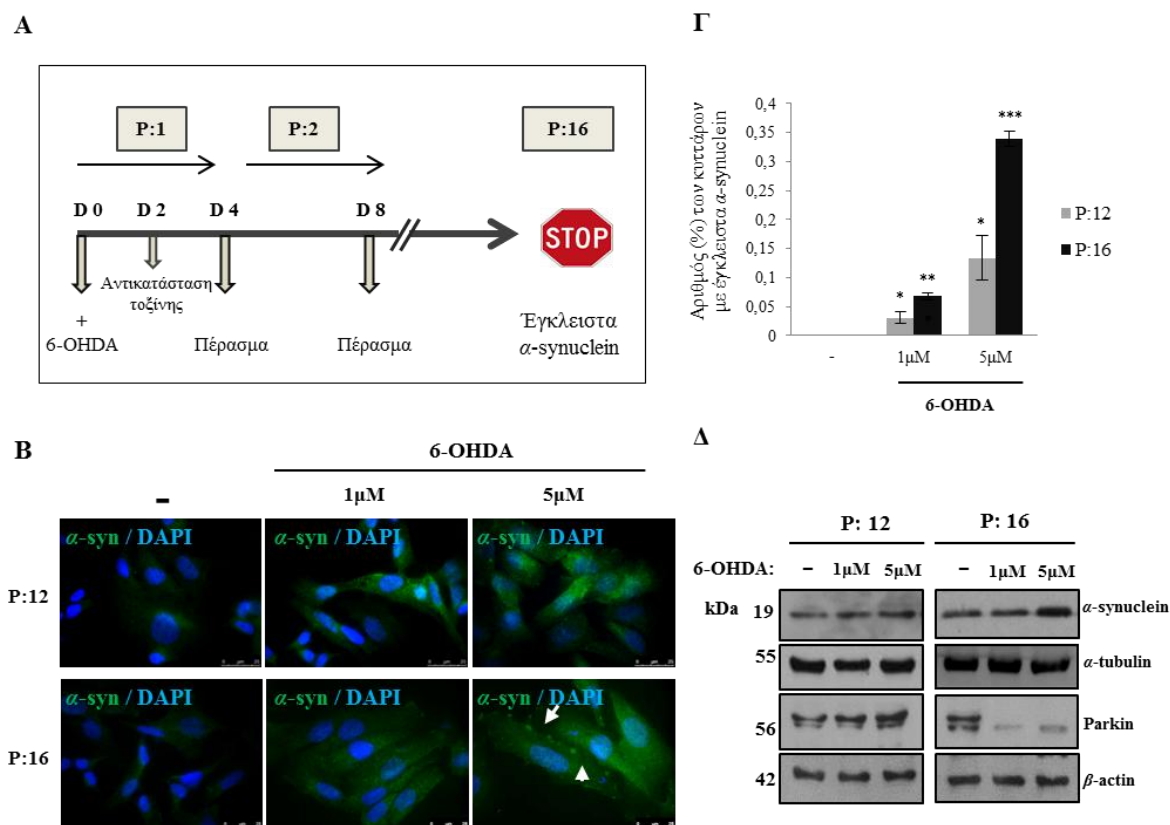
**Εικόνα 22.** Απεικόνιση του αριθμού των κυττάρων SH-SY5Y παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων της νευροτοξίνης 6-OHDA για 3 ημέρες. Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν για τη χρόνια έκθεση είναι 1μM και 5μM. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. (n=4, n.s. p > 0,05, \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001).

Σκοπός της μελέτης αυτής είναι η χρήση ήπιας συγκέντρωσης αναστολέα, προκειμένου να επιτευχθεί περιορισμένη αναστολή του συμπλόκου I, ένα χαρακτηριστικό που έχει περιγραφεί στο νευρικό σύστημα ασθενών με τη νόσο PD ([Greenamyre, MacKenzie et al. 1999](#)). Μάλιστα η χρόνια χορήγηση χαμηλής συγκέντρωσης rotenone είναι γνωστό ότι προκαλεί νευροεκφύλιση στην περιοχή της μέλαινας ουσίας, με χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται στους ασθενείς, όπως είναι ο σχηματισμός συσσωματωμάτων της  $\alpha$ -synuclein ([Betarbet, Sherer et al. 2000](#)).

Συγκεκριμένα για την ανάπτυξη του μοντέλου χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA, επιλέχθηκαν δύο ήπιες συγκεντρώσεις 6-OHDA, οι 1 μM και 5 μM, οι οποίες δεν χωρίς επάγουν κυτταρικό θάνατο, Εικόνα 22. Τα κύτταρα SHSY5Y καλλιεργήθηκαν παρουσία της τοξίνης για 16 συνεχόμενες γενιές (*passages*, P), με αλλαγή θρεπτικού μέσου κάθε 2 μέρες (Day 2, D2) για την ανανέωση της τοξίνης και πέρασμα στην επόμενη

γενιά κάθε τέσσερις μέρες (Day 4, D4), Εικόνα 23Α. Η κάθε γενιά αποτελεί χρονικό διάστημα τεσσάρων ημερών.

Στη γενιά 16 (P:16) παρατηρήθηκε στο εσωτερικό των κυττάρων ο σχηματισμός εγκλείστων  $\alpha$ -synuclein, Εικόνα 23B. Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στη γενιά P:12 και P:16, αποκάλυψε ότι στη γενιά 12 περίπου το 15% των κυττάρων έχουν σχηματίσει στο εσωτερικό του έγκλειστα  $\alpha$ -synuclein στη συγκέντρωση των 5  $\mu$ M, ενώ στη γενιά 16 το ποσοστό των κυττάρων αυξάνεται περίπου στο 35%. Στα δύο αυτά σημεία αναφοράς στη συγκέντρωση 1 $\mu$ M τα κύτταρα που σχημάτισαν έγκλειστα ήταν πολύ λιγότερα, γεγονός που αποδεικνύει το δοσοεξαρτώμενο χαρακτήρα του φαινομένου, Εικόνα 23Γ.



**Εικόνα 23.** Χρόνια έκθεση των κυττάρων SH-SY5Y στη νευροτοξίνη 6-OHDA για 16 γενιές οδηγεί στο σχηματισμό ενδοκυτταρικών εγκλείστων  $\alpha$ -synuclein, ταυτόχρονη αύξηση των ενδογενών επιπέδων της και μείωση στα επίπεδα έκφρασης της Parkin. **A.** Ενδεικτική εικόνα της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε. Καλλιέργεια των κυττάρων για 16 γενιές (P:16) παρουσία 6-OHDA, με αλλαγή θρεπτικού μέσου κάθε 2 μέρες (D2) για την ανανέωση της τοξίνης και πέρασμα στην επόμενη γενιά κάθε τέσσερις μέρες (D4). **B.** Ενδεικτική εικόνα ανοσοφθορισμού στο P:12 και P:16 με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn). Με τα βέλη εικονίζονται τα έγκλειστα  $\alpha$ -synuclein στο P:16. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. (Φακός 100x, κλίμακα 25 $\mu$ m, n=4) **Γ.** Ποσοτικοποίηση των κυττάρων που εμφάνισαν ενδοκυττάρια έγκλειστα  $\alpha$ -synuclein στο P:12 και P:16, στις συγκεντρώσεις 1 $\mu$ M και 5 $\mu$ M.

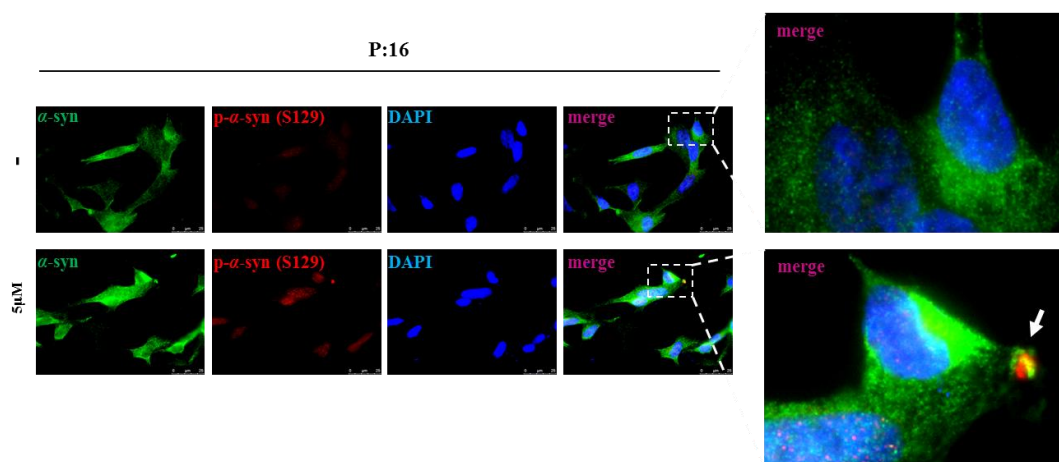
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση. (n=120, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001). Δ. Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η αύξηση των ενδογενών επιπέδων της  $\alpha$ -synuclein στο P:16 στη συγκέντρωση 5 $\mu$ M 6-OHDA, η οποία συνοδεύεται από μείωση των επιπέδων έκφρασης της Parkin. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκαν η  $\alpha$ -tubulin και η  $\beta$ -actin.

Τα έγκλειστα αυτά, προέκυψαν από τη συσσώρευση της ενδογενούς πρωτεΐνης, τα επίπεδα της οποίας αυξάνονται στο P:16, όπως επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western, Εικόνα 23Δ. Επιπλέον η ανοσοαποτύπωση κατά Western για το αντίσωμα της Parkin αποκάλυψε ότι τα επίπεδά της στο P:16 έχουν πέσει δραματικά, κάτι το οποίο ακόμα δεν είναι εμφανές στο P:12, Εικόνα 23Δ. Η Parkin (Εισαγωγή, Παράγραφος A.1.4.), είναι μια E3 λιγάση της ουβικιτίνης. Καταλύει την προσθήκη αλυσίδων ουβικιτίνης στις πρωτεΐνες που πρέπει να σηματοδοτηθούν προς αποικοδόμηση στο σύστημα ουβικιτίνης – πρωτεασώματος (UPS), ενώ μεταξύ των υποστρωμάτων της έχει αναγνωριστεί και η  $\alpha$ -synuclein (Cookson 2005).

#### **Δ.Α.2.1 Τα έγκλειστα $\alpha$ -synuclein που σχηματίζονται στο *in vitro* μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA έχουν συσσωρεύσει στο εσωτερικό τους P- $\alpha$ -synuclein στη Σερίνη 129**

Επόμενος στόχος ήταν να ελέγξουμε αν τα έγκλειστα  $\alpha$ -synuclein που σχηματίζονται παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά των σωματίων του Lewy. Για το λόγο αυτό ακολούθησαν πειράματα ανοσοφθορισμού για τη φωσφορυλιωμένη  $\alpha$ -synuclein στο κατάλοιπο σερίνης 129 (P- $\alpha$ -syn (S129)). Στο σημείο αυτό να υπενθυμίσουμε ότι η φωσφορυλίωση της  $\alpha$ -synuclein στο κατάλοιπο σερίνης 129 αποτελεί μια από τις πιο συχνές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης στην PD (Sato, Kato et al. 2013). Το 90% της  $\alpha$ -synuclein που απαντάται στα σωματίνα του Lewy είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser129, κάτι το οποίο είναι βιοχημικά ανιχνεύσιμο στον εγκεφαλικό φλοιό, στη μέλαινα ουσία και στο βασικό πυρήνα του Meynert (Walker, Lue et al. 2013), ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες το ποσοστό αυτό δεν ξεπερνά το 4% υποδηλώνοντας τον αυστηρό έλεγχο της φωσφορυλίωσης στη Ser129. Τα πειράματα ανοσοφθορισμού αποκάλυψαν ότι μετά από 16 γενιές καλλιέργειας των κυττάρων παρουσία της τοξίνης στον πληθυσμό των κυττάρων εντοπίζονται και έγκλειστα  $\alpha$ -synuclein που περιέχουν στο εσωτερικό του μεγάλα ποσοστά συσσώρευσης αυτής της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης, Εικόνα 24. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει την

υπόθεσή ότι το *in vitro* μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη γενιά P:16 παρουσιάζει έγκλειστα  $\alpha$ -synuclein που έχουν τα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των σωματίων του Lewy.



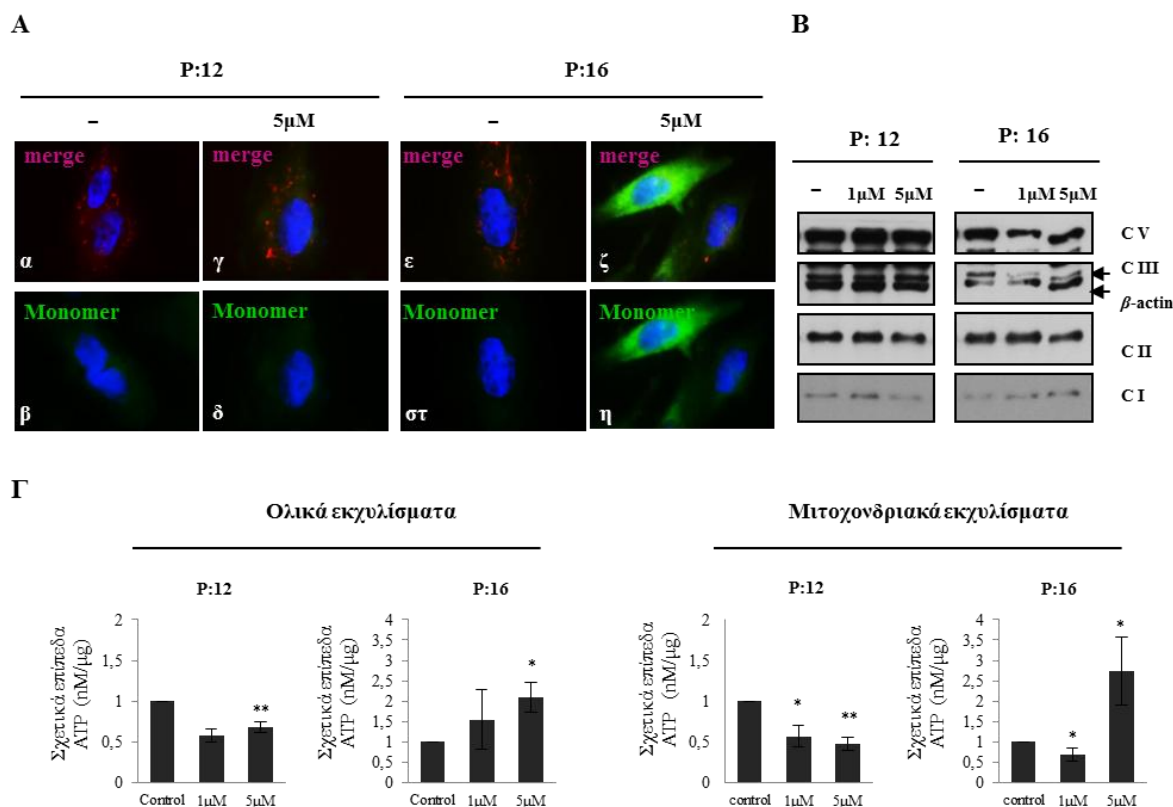
**Εικόνα 24.** Τα έγκλειστα  $\alpha$ -synuclein που σχηματίζονται μετά από χρόνια έκθεση των κυττάρων SH-SY5Y στη νευροτοξίνη 6-OHDA για 16 γενιές περιέχουν P- $\alpha$ -syn (S129). Ενδεικτική εικόνα ανοσοφθορισμού στο P:16 με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι της  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) και της φωσφορυλιωμένης  $\alpha$ -syn στα κατάλοιπα σερίνης 129 (P- $\alpha$ -syn S129). Κάποια από τα έγκλειστα  $\alpha$ -synuclein που σχηματίζονται μετά από έκθεση στην τοξίνη 6-OHDA για 16 γενιές (P:16) στο εσωτερικό τους παρουσιάζουν συσσωρευμένη P- $\alpha$ -syn (S129), ενδεικτικό στοιχείο των Lewy bodies (LBs). Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. (Φακός 100x, κλίμακα 25µm, Τεχνητό ζουµ 2x)

### Δ.Α.3. Έλεγχος της μιτοχονδριακής λειτουργίας στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στην τοξίνη 6-OHDA.

Ένα δεύτερο πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό της νόσου του Parkinson είναι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης (mitochondrial membrane potential -  $\Delta\Psi_m$ ) αποτελεί συνέπεια της συσσώρευσης ROS και είναι ένα γεγονός που έχει περιγραφεί σε πολλά παρκινσονιακά μοντέλα ([Piccoli, Sardanelli et al. 2008](#); [Gandhi, Wood-Kaczmar et al. 2009](#); [Zanellati, Monti et al. 2015](#)). Επόμενος στόχος λοιπόν ήταν να ελέγξουμε αν κατά τη διάρκεια του χρόνιου stress έχει επηρεαστεί το δυναμικό της μεμβράνης. Για το λόγο αυτό αρχικά ελέγξαμε εάν στα χρονικά σημεία των P:12 και P:16 έχει προκύψει τέτοιου είδους διαταραχή χρησιμοποιώντας την χρωστική JC-1. Το JC-1 είναι μία λιπόφιλη κατιονική χρωστική η οποία εισέρχεται επιλεκτικά στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων με τρόπο εξαρτώμενο από το δυναμικό της μεμβράνης. Σε υγιή κύτταρα όπου το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης είναι υψηλό η μονομερής μορφή της χρωστικής εισέρχεται στη μήτρα των μιτοχονδρίων και σχηματίζει συσσωματώματα (J-aggregates) τα οποία εκπέμπουν σε



μήκος κύματος 590 nm (κόκκινο), (Υλικά και Μέθοδοι, Παράγραφος Γ.2.17). Όταν τα μιτοχόνδρια δυσλειτουργούν, το δυναμικό της μεμβράνης είναι χαμηλό, και η μονομερής μορφή δεν σχηματίζει συσσωματώματα στα μιτοχόνδρια, αντίθετα, διαχέεται στο κυτταρόπλασμα και εκπέμπει σε μήκος κύματος 527 nm (πράσινο). Η χρήση της χρωστικής αποκάλυψε ότι στη γενιά P:16 το δυναμικό της μεμβράνης έχει μειωθεί αρκετά με αποτέλεσμα στη συνθήκη αυτή να ανιχνεύεται μόνο το πράσινο χρώμα. Αντίθετα, στη γενιά P:12 το δυναμικό της μεμβράνης δεν έχει ακόμη επηρεαστεί, Εικόνα 25Α. Ακολούθησαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, στα σημεία αναφοράς P:12 και P:16, όπου ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης υπομονάδων των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, συγκεκριμένα μία υπομονάδα για το κάθε σύμπλοκο (C I, C II, CIII, και CV). Τα πειράματα αυτά δεν αποκάλυψαν καμία αλλαγή στα πρωτεϊνικά επίπεδα των υπομονάδων που ελέγχθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, η οποία να μπορεί να συσχετιστεί με υπολειτουργία της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, Εικόνα 25B. Στα πλαίσια της μιτοχονδριακής λειτουργίας, στις ίδιες συνθήκες ελέγχθηκαν τα παραγόμενα επίπεδα ATP. Η καθιερωμένη μέθοδος προσδιορισμού ATP σε βιολογικά υγρά βασίζεται στη βιοφωταύγεια (bioluminescence). Το ATP αντιδρά με τη λουσιφερίνη (luciferin) παρέχοντας μια ενδιάμεση ένωση, την αδενυλολουσιφερίνη, η οποία παρουσία του ενζύμου λουσιφεράση (luciferase), αντιδρά με το διαλυμένο οξυγόνο παρέχοντας βιοφωταύγεια. Η ένταση της βιοφωταύγειας συσχετίζεται γραμμικά με την ποσότητα ATP του εξεταζόμενου δείγματος, όπως περιγράφηκε στα Υλικά και Μέθοδοι, παράγραφος Γ.2.18. Στη γενιά P:12 παρατηρήθηκε μια αναμενόμενη πτώση στα επίπεδα ATP μετά τη χρήση της τοξίνης, αναμενόμενο της γενικότερης έκθεσης των κυττάρων στον παράγοντα stress. Παραδόξως διαπιστώθηκε αύξηση στα ενεργειακά επίπεδα του κυττάρου στη γενιά P:16, συγκεκριμένα διπλασιασμός των επιπέδων παραγωγής ATP, Εικόνα 25Γ. Για να επιβεβαιωθεί εάν η αύξηση αυτή οφείλεται σε αυξημένη λειτουργία της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας έγινε απομόνωση μιτοχονδριακών εκχυλισμάτων και έλεγχος των επιπέδων ATP σε αυτά. Στα εκχυλίσματα αυτά διαπιστώθηκε παρόμοια αύξηση των επιπέδων ATP, Εικόνα 25Γ.



**Εικόνα 25.** Έλεγχος του δυναμικού της μεμβράνης των μιτοχονδρίων ( $\Delta\Psi_m$ ) με τη χρήση της χρωστικής JC-1 και των παραγόμενων επιπέδων ATP, μετά από χρόνια έκθεση των κυττάρων SH-SY5Y στη νευροτοξίνη 6-OHDA. **A.** Ενδεικτική εικόνα ανοσοφθορισμού. Χρώση των κυττάρων στη γενιά P:12 και P:16 με JC-1. Το κόκκινο χρώμα διατηρείται στις συνθήκες απουσία της τοξίνης (α, β, ε και στ) καθώς και στη γενιά P:12 (5μM) παρουσία της τοξίνης (γ, δ), ενδεικτικό της φυσιολογικής λειτουργίας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, ενώ παρουσία της τοξίνης στη γενιά P:16 (5μM) εμφανίζεται το πράσινο φθορίζον μονομερές της χρωστικής (η, ζ) ενδεικτικό της μείωσης του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης στο στάδιο αυτό. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. (Φακός 100x, κλίμακα 25μm, Τεχνητό ζουμι 2x). **B.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η έκφραση των υπομονάδων των συμπλόκων C I, C II, CIII, και CV της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, στις γενιές P:12 και P:16. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε και η  $\beta$ -actin. **Γ.** Έλεγχος των παραγόμενων επιπέδων ATP στη γενιά P:12 και P:16 σε ολικά και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα αντίστοιχα. Η μέτρηση της παραγόμενης φωταύγειας έγινε με το Φωταυγιόμετρο (luminiometer) εργαστηριακού πάγκου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση. (n=4, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01).

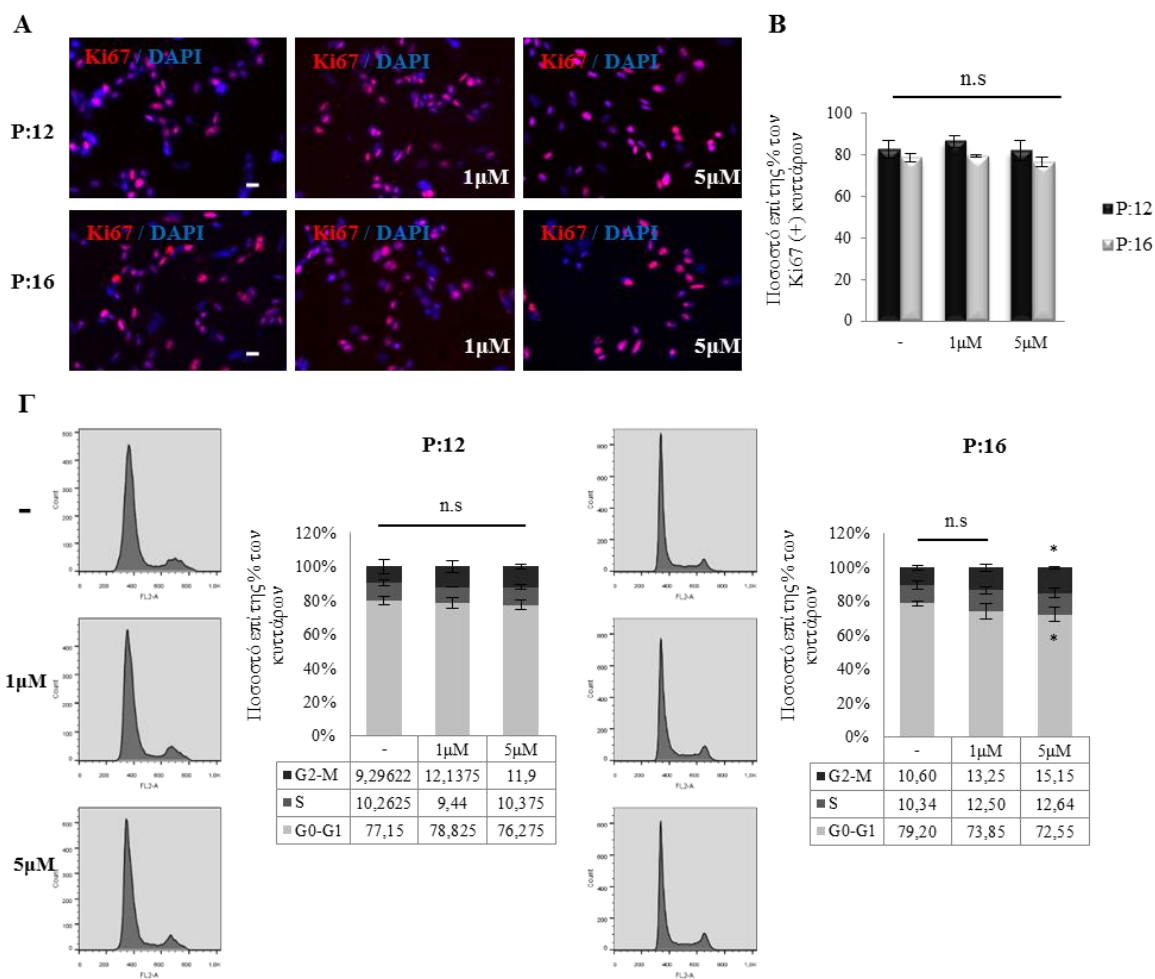
Συνοψίζοντας, η μιτοχονδριακή διαταραχή αποτελεί συνέπεια της χρόνιας έκθεσης στην τοξίνη 6-OHDA. Παρουσιάζει ένα προοδευτικό χαρακτήρα δεδομένου ότι στη γενιά P:12, παρότι τα έγκλειστα  $\alpha$ -synuclein έχουν σχηματιστεί, δεν προκλήθηκε κάποια μεταβολή στο δυναμικό της μεμβράνης, εν αντιθέσει με τη γενιά P:16 όπου το δυναμικό

της μεμβράνης έχει μειωθεί αισθητά. Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι στη συνθήκη συγκέντρωσης 1μM 6-OHDA, και στις δύο γενιές, δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στο δυναμικό της μεμβράνης, γεγονός που υποδηλώνει τη δόσοεξαρτώμενη φύση του φαινομένου. Επιπλέον η αύξηση στα επίπεδα ATP στη γενιά P:16 αποτελεί παράδοξο. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με την μέχρι τώρα βιβλιογραφία όπου η συσσώρευση ROS έχει ως συνέπεια τη διατάραξη στη ροή ηλεκτρονίων διαμέσου του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας και κατά συνέπεια στη μείωση της μιτοχονδριακής παραγωγής ATP (Chan, DeLanney et al. 1991; Fabre, Monserrat et al. 1999; Drechsel and Patel 2008; Winklhofer and Haass 2010). Τέλος, το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην έκφραση των υπομονάδων της αναπνευστικής αλυσίδας, αποκαλύπτει ότι το δυναμικό της μεμβράνης αποτελεί ένα γεγονός το οποίο προηγείται χρονικά και πιθανός η δυσλειτουργία της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας να έπεται. Η παράταση της καλλιέργειας των κυττάρων παρουσία 6-OHDA για περισσότερες γενιές μπορεί να αποκαλύπτει αυτή τη δυσλειτουργία.

#### **Δ.Α.4. Η παρουσία της τοξίνης 6-OHDA για 16 συνεχόμενες γενιές δεν έχει καμία επίδραση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, αλλά προκαλεί επιμήκυνση της φάσης G2-M του κυτταρικού κύκλου**

Στα ίδια σημεία αναφοράς του μοντέλου χρόνιας έκθεσης, ελέγξαμε αν η παρουσία της τοξίνης 6-OHDA έχει επηρεάσει βασικές ιδιότητες των νευρικών κυττάρων όπως ο ρυθμός πολλαπλασιασμού και το δυναμικό διαφοροποίησης. Για να διαπιστώσουμε εάν η παρουσία της 6-OHDA έχει κάποια συνέπεια στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων ελέγξαμε την έκφραση της πρωτεΐνης Ki67. Η πρωτεΐνη Ki67 έχει συσχετιστεί αυστηρά με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό καθώς εκφράζεται σε όλες τις ενεργές φάσεις του κυτταρικού κύκλου (G (1), S, G (2), και μίτωση), αλλά απουσιάζει από τη φάση G (0) (Gerdes, Li et al. 1991). Το γεγονός αυτό καθιστά την πρωτεΐνη Ki67 έναν εξαιρετικό δείκτη για τον προσδιορισμό του λεγόμενου κλάσματος ανάπτυξης ενός δεδομένου κυτταρικού πληθυσμού. Είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη που η κατανομή της αλλάζει ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου (Scholzen and Gerdes 2000). Η χρήση ειδικού αντισώματος για την παραπάνω πρωτεΐνη αποκάλυψε ότι η παρουσία της τοξίνης 6-OHDA, στις συγκεντρώσεις 1 και 5μM, στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων για 16 συνεχόμενες γενιές, δεν είχε καμία επίδραση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων συγκριτικά με την καλλιέργεια ελέγχου, ενώ ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε και στη γενιά P:12 χωρίς επίσης καμία μεταβολή, Εικόνα 26A και B.

Ωστόσο, στις ίδιες συνθήκες αποφασίσαμε να ελέγξουμε εάν η τοξίνη επηρεάζει κάποια από τις επιμέρους φάσεις του κυτταρικού κύκλου με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής (ή ανάλυση FACS) (Υλικά και Μέθοδοι, Παράγραφος Γ.2.4). Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής αποκάλυψε ότι η 6-OHDA στη γενιά P:16 στη συγκέντρωση των 5μM προκαλεί επιμήκυνση της φάσης G2-M από ποσοστό 10% στην καλλιέργεια ελέγχου σε ποσοστό 15%, ενώ η επιμήκυνση αυτή δεν είναι εμφανής στη γενιά P:12, Εικόνα 26Γ.



**Εικόνα 26.** Έλεγχος του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων SH-SY5Y μετά από χρόνια έκθεση στη νευροτοξίνη 6-OHDA. **A.** Μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης – δείκτη του πολλαπλασιασμού Ki67. Ενδεικτική εικόνα ανοσοφθορισμού στη γενιά P:12 και P:16 με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Ki67. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. (Φακός 20x, κλίμακα 25μm, Τεχνητό ζουμ 4x). **B.** Ποσοτικοποίηση του αριθμού των Ki67(+) κυττάρων διαιρούμενων δια του συνολικού αριθμού των κυττάρων στις γενιές P:12 και P:16 παρουσία ή απουσία της τοξίνης 6-OHDA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. (n=800, n.s.) **Γ.** Διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής στις γενιές P:12 και P:16 και ποσοτικοποίηση των διαγραμμάτων αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. (n=4, n.s. p > 0,05, \* p < 0,05)

Το γεγονός αυτό συνοδεύεται από μείωση των κυττάρων στη φάση G0-G1. Στη διάρκεια της φάσης G(2) του κυτταρικού κύκλου (*gap2*, δεύτερο χάσμα) το κύτταρο προετοιμάζεται για την είσοδο του στην επόμενη φάση, εκείνη της μίτωσης, φάση M (mitosis, μίτωση) όπου το διπλασιασμένο DNA διαχωριζόμενο με ακρίβεια σε δύο ίσα μέρη συμπυκνώνεται σχηματίζοντας χρωμοσώματα ώστε καθένα από τα δύο θυγατρικά κύτταρα να διαθέτει πλήρες αντίγραφο του γενετικού υλικού του μητρικού κυττάρου. Η όλη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου, προκειμένου να διατηρήσει την ακρίβεια της, υπόκειται σε πολλαπλά σημεία ελέγχου (check points) που βρίσκονται σε διάφορα χρονικά σημεία του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα ερεθίσματα επιτρέπουν την συνέχιση και ολοκλήρωση του κύκλου ή τον αναστέλλουν (Hartwell and Weinert 1989). Το σημείο ελέγχου μεταξύ των φάσεων G2-M παίζει σημαντικό ρόλο στην αναχαίτιση του κυτταρικού κύκλου κατά την μετάβαση από την φάση G2 στην φάση M μετά από βλάβη του DNA, ενώ η καθυστέρηση στην έναρξη της μίτωσης είναι απαραίτητη για την επιδιόρθωση βλαβών στο DNA που έχουν συσσωρευτεί κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου (Taylor and Stark 2001).

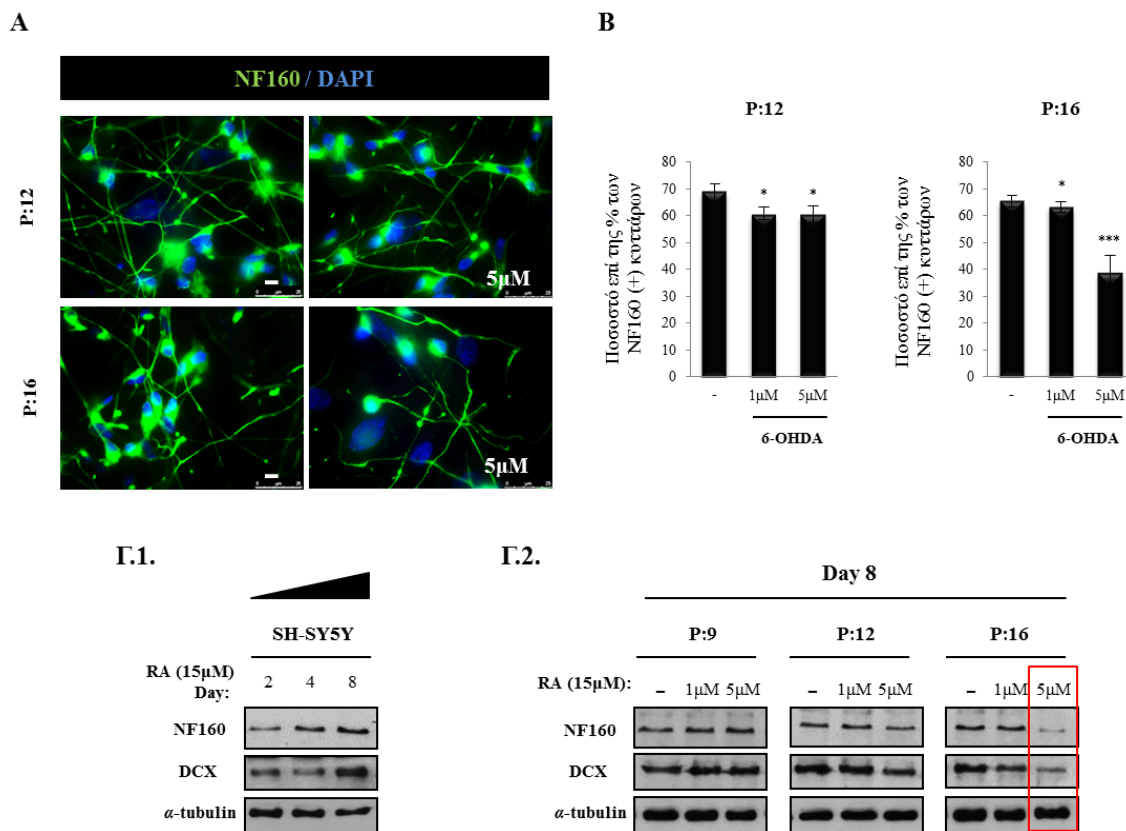
Η χρήση της 6-OHDA οδηγεί στο σχηματισμό ROS. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι τα ROS αλληλεπιδρούν με το DNA, συγκεκριμένα η ρίζα υδροξυλίου αντιδρά με τη γουανίνη στην θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν την 8-υδροξυ-2-γουανοσίνη (8-oxodG) (Εισαγωγή, Παράγραφος A.2.2), που χρησιμοποιείται πλέον ως βιολογικός δείκτης της οξειδωτικής βλάβης του DNA (Kasai 1997; Pilger and Rudiger 2006). Η 6-OHDA οδηγεί σε αυξημένη οξειδωτική βλάβη του DNA στο ραβδωτό σώμα μοντέλων ποντικού (Ferger, Rose et al. 2001), καθώς και στη μέλαινα ουσία ποντικών με PD φαινότυπο (Yasuhara, Hara et al. 2007), ενώ αυτό έχει επιβεβαιωθεί και σε *in vitro* μελέτες στις ανθρώπινες νευροβλαστωματικές κυτταρικές σειρές SK-N-SH και SH-SY5Y (Bruchelt, Schraufstatter et al. 1991; Kobayashi, Oikawa et al. 2008). Βιβλιογραφικά είναι γνωστό ότι η χορήγηση 6-OHDA επάγει την επιμήκυνση της φάσης G2-M στην κυτταρική σειρά PC12 και ενεργοποίηση της απόπτωσης μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού ERK1/2 (Zhang, Wang et al. 2009), ενώ η ίδια συμπεριφορά έχει επιβεβαιωθεί και με τη χορήγηση της τοξίνης rotenone στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y, η οποία επίσης προκαλεί επιμήκυνση της φάσης G2-M και ενεργοποίηση της απόπτωσης μέσω της caspase-3 (Wang, Zhang et al. 2014). Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι ο κυτταρικός κύκλος αναστέλλεται στη φάση G2 λίγο πριν οι εκφυλιζόμενοι νευρώνες οδηγηθούν σε αποπτωτικό θάνατο (Hoglinger, Breunig et al. 2007; Currais,

Hortobagyi et al. 2009), ενώ μελέτες σε *in vivo* and *in vitro* PD μοντέλα επιβεβαιώνουν ότι οι διαταραχές στον κυτταρικό κύκλο σχετίζονται με την απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων μέσω της ενεργοποίησης της απόπτωσης (Cabeza-Arvelaiz and Schiestl 2012). Έχοντας ως γνώμονα όλα τα παραπάνω η επιμήκυνση στη φάση G2-M στη γενιά P:16, που παρατηρείται από τη χρόνια χορήγηση της 6-OHDA, μπορεί να οφείλεται στη συσσώρευση βλαβών στο DNA, γεγονός που απαιτεί περισσότερο χρόνο για την επιδιόρθωση αυτών. Επιπλέον η μικρή αύξηση του κυτταρικού αριθμού στη φάση G2-M μπορεί να αποτελεί ένδειξη της αρχής μιας προοδευτικής κατάστασης, όπου ενδεχόμενη παραμονή των κυττάρων στην τοξίνη 6-OHDA για περισσότερες γενιές θα οδηγήσει σε μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων με επιμήκυνσης της φάσης G2-M και ενδεχόμενα ενεργοποίηση της απόπτωσης.

#### **Δ.Α.5. Η παρουσία της τοξίνης 6-OHDA για 16 συνεχόμενες γενιές επηρεάζει αρνητικά το δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων.**

Ένα βασικό χαρακτηριστικό των SHSY5Y κυττάρων είναι η δυνατότητά τους να διαφοροποιούνται προς ώριμα νευρικά κύτταρα σχηματίζοντας εκτεταμένες νευριτικές δομές. Ένα ενδιαφέρον ερώτημα αποτέλεσε το κατά πόσον μετά την εφαρμογή του χρόνιου stress στη νευροτοξίνη 6-OHDA το δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων SH-SY5Y έχει επηρεαστεί. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν παρουσία ρετινοϊκού οξέος συγκέντρωσης 15  $\mu\text{M}$  για 7 ημέρες σε θρεπτικό μέσο με 0,5% FBS, με ανανέωση του κάθε δύο ημέρες (Υλικά και Μέθοδοι, Παράγραφος Γ.2.2). Ο έλεγχος της διαφοροποίησης πραγματοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά western και πειράματα ανοσοφθορισμού για τις πρωτεΐνες δείκτες της νευρικής διαφοροποίησης Neurofilament 160 (NF160) και Doublecortin (DCX). Η πρωτεΐνη DCX εκφράζεται στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα και στους ανώριμους νευρώνες. Βρίσκεται συνδεδεμένη με τους μικροσωληνίσκους και επάγει τη δημιουργία και την μετανάστευση των νευριτών (Brown, Couillard-Despres et al. 2003). Η NF160 ανήκει στην οικογένεια των Neurofilaments που αποτελείται από τρία μέλη (NF-Light 68-70 kDa, NF-Medium 145-160 kDa και NF-Heavy 200-220 kDa). Ανήκει στις πρωτεΐνες με τα πιο υψηλά ποσοστά φωσφορύλιωσης στο νευρικό σύστημα. Αποτελούν σημαντικό συστατικό του κυτταροσκελετού, παρέχουν τη δομική στήριξη του νευράξονα και ρυθμίζουν τη διάμετρο αυτού (Kushkuley, Chan et al. 2009).

Όπως προέκυψε μετά από πειράματα ανοσοφθορισμού έναντι της πρωτεΐνης NF160, στις γενιές P:12 και P:16, το χρόνιο stress στην τοξίνη 6-OHDA έχει σαν αποτέλεσμα να επηρεάζεται το δυναμικό διαφοροποίησης. Το φαινόμενο αυτό γίνεται ήδη εμφανές από τη γενιά P:12 όπου στην καλλιέργεια ελέγχου καταφέρνουν να διαφοροποιηθούν περίπου το 68% των κυττάρων, ενώ παρουσία τοξίνης το ποσοστό μειώνεται στο 60%. Η μείωση αυτή παρουσιάζει προοδευτικό χαρακτήρα αφού στη γενιά P:16 το ποσοστό των διαφοροποιημένων κυττάρων μειώνεται σε ποσοστό 38% στη συγκέντρωση των 5μM, Εικόνα 27A και B. Ακολούθως αυτό επιβεβαιώθηκε και με πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά western στα ίδια σημεία αναφοράς. Αρχικά επιβεβαιώθηκε η αύξηση στην έκφραση των δεικτών διαφοροποίησης NF160 και DCX στην καλλιέργεια ελέγχου, στις ημέρες διαφοροποίησης 2, 4 και 8 (day 2, 4, 8), Εικόνα 27Γ.1. Στη συνέχεια ακολούθησαν πειράματα διαφοροποίησης στις γενιές P:12 και P:16 μετά από 8 ημέρες παρουσία 15μM RA. Τα πειράματα αυτά επιβεβαίωσαν τη μείωση στην έκφραση των πρωτεϊνών NF160 και DCX, η οποία είναι σαφώς πιο έντονη στη γενιά P:16 παρουσία τοξίνης συγκέντρωσης 5μM, Εικόνα 27Γ.2.



**Εικόνα 27.** Έλεγχος του δυναμικού διαφοροποίησης των κυττάρων SH-SY5Y μετά από χρόνια έκθεση στη νευροτοξίνη 6-OHDA παρουσία Retinoic Acid (RA) 15μM. Α. Ενδεικτική εικόνα ανοσοφθορισμού με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης- δείκτη της διαφοροποίησης NF160, στη γενιά P:12

και P:16. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. (Φακός 100x, κλίμακα 25μm) **B.** Ποσοτικοποίηση του αριθμού των NF160 (+) κυττάρων διαιρούμενων δια του συνολικού αριθμού των κυττάρων στις γενιές P:12 και P:16 παρουσία ή απουσία της τοξίνης 6-OHDA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση. (n=600, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ) **Γ.1.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η αύξηση στην έκφραση των πρωτεϊνών DCX και NF160 κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, δηλαδή στις 2, 4 και 8 ημέρες (Day 2, 4, 8) παρουσία RA 15μM, στην καλλιέργεια ελέγχου SH-SY5Y. **Γ.2.** Στις ίδιες συνθήκες διαφοροποίησης στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA παρατηρείται μείωση στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών DCX και NF160, που γίνεται εμφανής από τη γενιά P:12 (5μM), ενώ είναι πιο έντονη στη γενιά P:16 (5μM). Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\alpha$ -tubulin.

#### **Δ.Α.6. Η χρόνια έκθεση στην τοξίνη 6-OHDA έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3/Akt στη γενιά P:16.**

Η πρωτεΐνη Akt ή PKB (Protein kinase B) κινάση αποτελεί ένα από τα βασικά μόρια επιβίωσης και ανήκει στην κατηγορία των AGC κινασών (όπως και οι PKA, PKG και PKC). Αποτελεί μέρος του μονοπατιού σηματοδότησης PI3k/Akt. Φωσφορυλιώνει τους στόχους της σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης, γι αυτό και ανήκει στην οικογένεια κινασών σερίνης/θρεονίνης. Εμπλέκεται στη ρύθμιση σχεδόν όλων των βασικών κυτταρικών λειτουργιών όπως η μεταγραφή, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η μετανάστευση, η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός. Η ενεργοποίησή της γίνεται από την κινάση PI3k η οποία φωσφορυλιώνει το μεμβρανικό φωσφολιπίδιο PIP2 (phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PtdIns(3,4)P2) με αποτέλεσμα την παραγωγή του PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P3). Το PIP3 προσελκύει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη τις κινάσες Akt και PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1). Αυτή η συνεντόπιση έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της Akt στο ενεργοποιητικό της κατάλοιπο, Thr308, από την PDK1. Αυτό οδηγεί σε μια διαμορφωτική μεταβολή που επιτρέπει τη φωσφορυλίωση και στο κατάλοιπο Ser473 η οποία πραγματοποιείται από την κινάση PDK2 (ή phosphatidylinositol-dependent kinase-2) (Jacinto, Facchinetti et al. 2006; Lessmann, Ngo et al. 2007). Η φωσφορυλίωση σε αυτές τις δύο θέσεις έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη ενεργοποίηση της Akt. Η κινάση Akt, αφού ενεργοποιηθεί, απομακρύνεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και είναι έτοιμη να φωσφορυλιώσει πλήθος υποστρωμάτων σε διάφορα διαμερίσματα στο κυτταρόπλασμα, συμπεριλαμβανομένων και των μιτοχονδρίων (Andjelkovic, Alessi et al. 1997; Bijur and Jope 2003). Επιπλέον εισέρχεται στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί

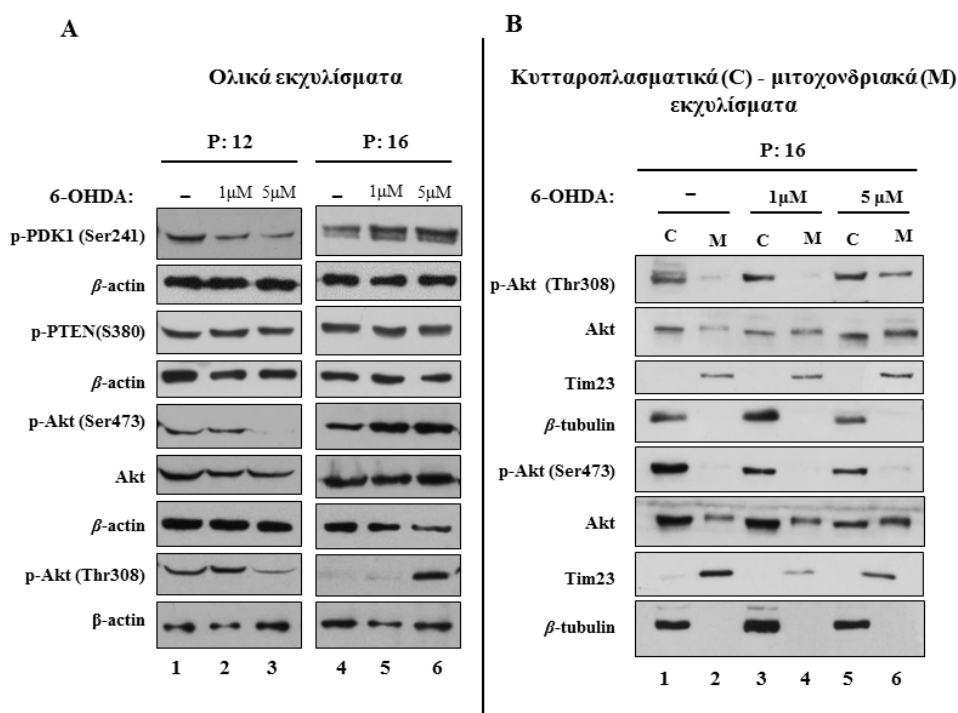


διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες όπως CREB (cAMP response element binding), NF-κB (nuclear factor kappa from B cells), E2F (eukaryotic transcription factor 2) και MDM2 (murine double minute 2). Ακόμη, φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες (Forkhead box O1 & O3) FOXO1 και FOXO3. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι η Akt ενεργοποιείται από διάφορα ερεθίσματα όπως αυξητικοί παράγοντες π.χ. ο αυξητικός παράγοντας της ινσουλίνης (Insulin-like growth factor 1, IGF1), διάφορες ορμόνες π.χ. η ινσουλίνη και διάφοροι στρεσογόνοι παράγοντες όπως το θερμικό σοκ (Datta, Brunet et al. 1999).

Στα πλαίσια μελέτης του μονοπατιού PI3/Akt αρχικά ελέγχθηκε η έκφραση της κινάσης PDK1, υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της Akt στη θέση Thr308. Τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά western, αποκάλυψαν μείωση της έκφρασης της p- PDK1 στη γενιά P:12 παρουσία της τοξίνης, Εικόνα 28A (διαδρομές 2 και 3) και αύξηση των επιπέδων στη γενιά P:16 (διαδρομές 5 και 6). Ακολούθως ελέγχθηκε η έκφραση της φωσφατάσης PTEN. Στο σημείο αυτό να τονίσουμε ότι η δημιουργία του PIP3 αναστέλλεται από τη φωσφατάση PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) η οποία αφαιρεί φωσφορικές ομάδες από το PIP3 και το μετατρέπει σε PIP2. Το PIP3 προσελκύει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη τις κινάσες Akt και PDK1 αναγνωρίζοντας την κοινή περιοχή των δυο μορίων, PH (pleckstrin homology). Αυτή η συνεντόπιση έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της Akt στο ενεργοποιητικό της κατάλοιπο, Thr308, από την PDK1. Όπως παρατηρήθηκε η έκφραση της p-PTEN στις γενιές P:12 και P:16 δεν μεταβάλλεται, Εικόνα 28A. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η έκφραση της Akt. Όπως ήταν αναμενόμενο η αύξηση στην έκφραση της φωσφορυλιωμένης PDK1 κινάσης έχει σαν αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της Akt πρωτεΐνης στο κατάλοιπο Thr308, ενώ αυξημένη παρατηρείται και η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο Ser473, Εικόνα 28A (διαδρομές 5 και 6). Επαναλαμβάνεται ωστόσο, το ίδιο πρότυπο έκφρασης με την κινάση PDK1 δηλαδή μείωση των επιπέδων στη γενιά P:12 (διαδρομές 2 και 3) και αύξηση στην ενεργή μορφή της Akt παρουσία της τοξίνης 6-OHDA στη γενιά P:16. Τέλος δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στα συνολικά επίπεδα της Akt.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως ένα πεδίο δράσης της Akt είναι και τα μιτοχόνδρια. Επομένως στη συνέχεια έγινε απομόνωση κυτταροπλασματικών (Cytoplasm. C) – μιτοχονδριακών (Mitochondrial, M) εκχυλισμάτων (Υλικά και Μεθοδοι, παράγραφος Γ.2.13). Ακολούθησαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά western, όπου ελέγχθηκε εάν υπάρχει μετατόπιση της Akt στα μιτοχόνδρια. Πράγματι στη γενιά P:16, στα

μιτοχονδριακά (M) εκχυλίσματα και συγκεκριμένα στη συγκέντρωση τοξίνης 5μM, παρατηρήθηκε αυξημένος εντοπισμός στα ολικά επίπεδα της Akt. Η αύξηση αυτή συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα και στις φωσφορυλιωμένες μορφές στα κατάλοιπα Thr308 και Ser473, Εικόνα 28B (διαδρομή 6). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι σαν συνέπεια της ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3/Akt, η Akt μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια όπου κατά κύριο λόγο απαντάται στην ενεργή της μορφή και κατά συνέπεια φωσφορυλιώνει διάφορα υποστρώματα. Συνοψίζοντας στη γενιά P:16 η κινάση Akt είναι πλήρως ενεργή, ενώ στη γενιά P:12 παρατηρείται μείωση στην ενεργή της μορφή, ενώ τα συνολικά επίπεδα παραμένουν σταθερά, Εικόνα 28A. Επιπλέον παρατηρήθηκε μετατόπιση της Akt και των φωσφορυλιώσεων στα κατάλοιπα Thr308 και Ser473 στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων.



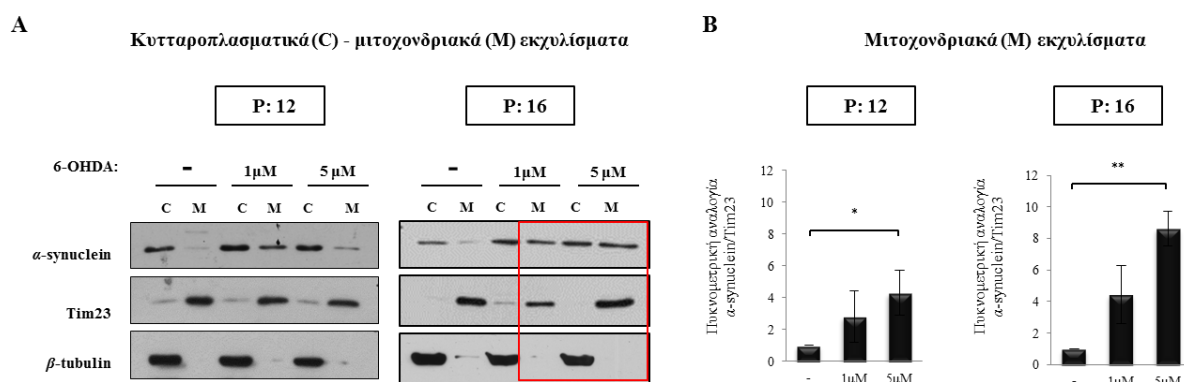
**Εικόνα 28.** Η χρόνια έκθεση των SH-SY5Y κυττάρων στην τοξίνη 6-OHDA έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3/Akt στη γενιά P:16. **A.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η αύξηση στην έκφραση της φωσφορυλιωμένης κινάσης PDK1 η οποία έχει σαν αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Akt στο κατάλοιπο Thr308, ενώ αυξημένη παρατηρείται και η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο Ser473. Τα συνολικά επίπεδα της Akt δεν μεταβάλλονται. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-actin. **B.** Έλεγχος της μετατόπισης της Akt στα μιτοχόνδρια. Ανοσοαποτύπωση κατά Western στη γενιά P:16, όπου παρατηρείται αυξημένη μετατόπιση της Akt, καθώς και της φωσφορυλιωμένης p-Akt (Thr308) και p-Akt (Ser473) στο μιτοχονδριακό (M) εκχύλισμα. Η πρωτεΐνη Tim23 χρησιμοποιήθηκε ως μιτοχονδριακός δείκτης ισοφόρτωσης, ενώ ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-tubulin.

Κάποιοι από τους κυτταροπλασματικούς στόχους της Akt είναι η κινάση GSK-3β (glycogen-synthase kinase-3β), που αποτέλεσε και το πρώτο γνωστό υπόστρωμα της (Cross, Flannery et al. 1995). Η ανακάλυψη της GSK3b στα μιτοχόνδρια (Hoshi, Takashima et al. 1996) προκάλεσε το ενδιαφέρον μελέτης για τον εντοπισμό και της Akt στα μιτοχόνδρια η οποία επιβεβαιώθηκε το 2003 (Bijur and Jope 2003). Γνωστά υποστρώματα της Akt στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων είναι εκτός από την GSK3b, και η β-υπομονάδα της ATP συνθάσης ή εναλλακτικά το σύμπλοκο V της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας (Bijur and Jope 2003). Η φωσφορυλίωση της ATP συνθάσης μέσω της κινάσης Akt ρυθμίζει τα επίπεδα παραγωγής του ATP σε σκελετικούς μύες (Hojlund, Wrzesinski et al. 2003), ενώ έχει προταθεί ότι η ενδομιτοχονδριακή Akt ρυθμίζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και το πεπρωμένο των κυττάρων (Antico Arciuch, Galli et al. 2009). Τα παραπάνω ευρήματα δικαιολογούν την παράδοξη συμπεριφορά των επιπέδων ATP, δηλαδή τη μείωση των επιπέδων στη γενιά P:12 και την αύξηση των επιπέδων ATP στη γενιά P:16, Παράγραφος Δ.Β.3, Εικόνα 25Γ. Φαίνεται λοιπόν, ότι η μετατόπιση της Akt στα μιτοχόνδρια έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της β-υπομονάδας της ATP συνθάσης και κατά συνέπεια την αύξηση στην παραγωγή ATP, σαν απόκριση στο οξειδωτικό stress που προκαλεί η χρόνια παρουσία της τοξίνης 6-OHDA.

#### **Δ.Α.7. Η παρουσία της τοξίνης 6-OHDA στα κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της $\alpha$ -synuclein στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων.**

Ακολούθως ελέγχθηκε, στις γενιές P:12 και P:16, εάν η χρόνια έκθεση στην τοξίνη οδηγεί στην συσσώρευση της  $\alpha$ -synuclein στα μιτοχόνδρια. Η αγκυροβόληση της  $\alpha$ -synuclein στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και η συσσώρευση της έχει ευρέως συσχετιστεί με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στη νόσο του Parkinson. Η συσσώρευση της προκαλεί αποσταθεροποίηση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Cole, Dieuliis et al. 2008; Vila, Ramonet et al. 2008; Devi and Anandatheerthavarada 2010), δυσλειτουργία του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας (Ellis, Murphy et al. 2005; Devi, Raghavendran et al. 2008; Chinta, Mallajosyula et al. 2010), οξειδωτικό stress (Parihar, Parihar et al. 2008), απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης ( $\Delta\Psi_m$ ), αύξηση στην παραγωγή ROS, απελευθέρωση του cytochrome C και ενίσχυση των φαινομένων της μιτοχονδριακής σχάσης (Nakamura, Nemani et al. 2011) (Εισαγωγή, Α. 2.4.)

Στα δύο σημεία αναφοράς, δηλαδή στη γενιά P:12 και P:16, έγινε απομόνωση κυτταροπλασματικών (C) – μιτοχονδριακών (M) εκχυλίσμάτων, ακολούθησαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά western με αντίσωμα έναντι της  $\alpha$ -synuclein. Τα πειράματα αυτά αποκάλυψαν ότι πράγματι η χρόνια έκθεση στη νευροτοξίνη 6-OHDA έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση της  $\alpha$ -synuclein στα μιτοχόνδρια, Εικόνα 29A και B.



**Εικόνα 29.** Η χρόνια έκθεση στη νευροτοξίνη 6-OHDA οδηγεί στην προοδευτική συσσώρευση της  $\alpha$ -synuclein στα μιτοχόνδρια. **A.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η έκφραση της πρωτεΐνης  $\alpha$ -synuclein στη γενιά P:12 και P:16. Η πρωτεΐνη Tim23 χρησιμοποιήθηκε ως μιτοχονδριακός δείκτης ισοφόρτωσης, ενώ ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -tubulin. **B.** Ποσοτικοποίηση των επιπέδων συσσώρευσης της  $\alpha$ -synuclein στα μιτοχονδριακά (M) εκχυλίσματα στη γενιά P:12 και P:16. Η ποσοτικοποίηση έγινε με το πρόγραμμα Quantity One. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση. (n=4, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01)

Το φαινόμενο αυτό παρουσιάζει προοδευτικό χαρακτήρα και η συσσώρευση της  $\alpha$ -synuclein στα μιτοχόνδρια είναι πιο έντονη στη συγκέντρωση των 5μM 6-OHDA. Στο σημείο αυτό να υπενθυμίσουμε ότι στη γενιά P:12, στη συνθήκη των 5 μM, περίπου το 15% των κυττάρων έχουν σχηματίσει στο εσωτερικό του έγκλειστα  $\alpha$ -synuclein, ενώ στη γενιά P:16 το ποσοστό των κυττάρων αυξάνεται περίπου στο 35%, και συνοδεύεται από αύξηση στα ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης, Παράγραφος Δ.Α.2., Εικόνα 23Δ. Ένα μέρος της πρωτεΐνης έχει ήδη αρχίσει να συσσωρεύεται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων από τη γενιά P:12 όπου συγκριτικά με την καλλιέργεια ελέγχου στη συγκέντρωση των 5μM έχουμε αύξηση των επιπέδων περίπου 5,4 φορές πάνω, ενώ στη γενιά P:16 η αύξηση γίνεται πιο έντονη και φτάνει το 8,6, Εικόνα 29B.

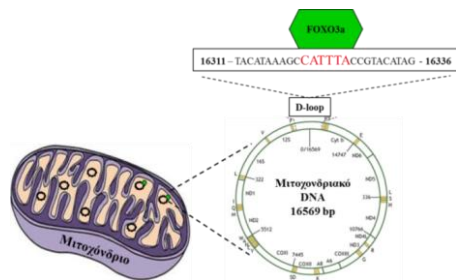
#### **Δ.Α.8. Η μετακίνηση της $\alpha$ -synuclein στα μιτοχόνδρια συνοδεύεται από τη συσσώρευση του μεταγραφικού παράγοντα FOXO3a στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων.**

Στις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω ελέγξαμε την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FOXO3a. Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXO3a ανήκει στην οικογένεια των FOXO μεταγραφικών παραγόντων (Forkhead transcription factors of the O class - FOXOs) (Kaestner, Knochel et al. 2000). Αποτελούν σημαντικούς στόχους του PI3/Akt μονοπατιού και είναι βασικοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης, ενώ αποτελούν και παράγοντες απόκρισης στο οξειδωτικό stress. Στους νευρώνες η ενεργοποίηση του παράγοντα FOXO3a έχει διττό ρόλο, είτε λειτουργεί προστατευτικά έναντι τοξικών παραγόντων παρέχοντας ανθεκτικότητα λόγω ενεργοποίησης της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στη αποτοξίνωση από τα ROS (Mojsilovic-Petrovic, Nedelsky et al. 2009; Hamanaka and Chandel 2010), είτε προάγοντας το νευρωνικό θάνατο ενεργοποιώντας την απόπτωση (Gilley, Coffey et al. 2003; Davila and Torres-Aleman 2008; Dick and Bading 2010).

Αρχικά ελέγχθηκε, με ανοσοαποτύπωση κατά Western, εάν τα ολικά επίπεδα του FOXO3a παράγοντα στις γενιές P:12 και P:16 επηρεάζονται. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29A, διαπιστώθηκε αύξηση των συνολικών επιπέδων η οποία όμως ανιχνεύεται μόνον στη γενιά P:16, σε συμφωνία με τα συνολικά επίπεδα έκφρασης της ενεργούς μορφής Akt, Εικόνα 28A. Επίσης η αύξηση στα συνολικά επίπεδα FOXO3a συμφωνεί με την αύξηση στα ενδογενή επίπεδα  $\alpha$ -synuclein η οποία παρατηρείται μόνο στη γενιά P:16. Σε ασθενείς με νόσο του Parkinson έχει παρατηρηθεί αυξημένη δραστηριότητα των FOXO μεταγραφικών παραγόντων στον εγκέφαλο (Dumitriu, Latourelle et al. 2012), ενώ επιπλέον έχει επιβεβαιωθεί ο συνεντοπισμός της πρωτεΐνης FOXO3a με την  $\alpha$ -synuclein στα σωματίδια του Lewy καθώς και στους Lewy νευρίτες (Su, Liu et al. 2009). Επιπλέον πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε ότι η υπερέκφραση του FOXO3a έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση στο πλεόνασμα της μονομερούς μορφής της  $\alpha$ -synuclein, ενώ δεν επηρεάζει τα επίπεδα της συσσωρευμένης μορφής. Η μείωση αυτή επιτυγχάνεται μέσω αποικοδόμησης λόγω ενεργοποίησης της αυτοφαγίας (Pino, Amamoto et al. 2014).

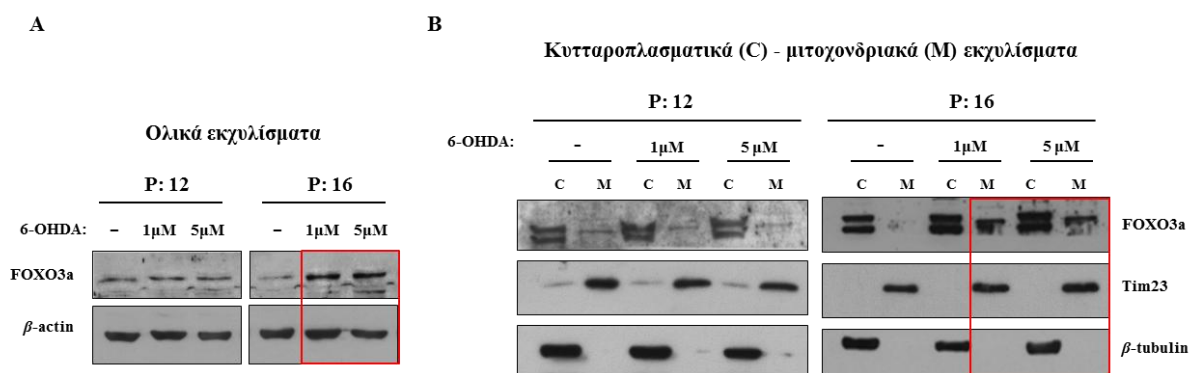
Στη συνέχεια ελέγχθηκε στις ίδιες συνθήκες εάν ο μεταγραφικός παράγοντας FOXO3a μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXO3a απαντάται φυσιολογικά στα μιτοχόνδρια των νευρωνικών κυττάρων όπου αλληλεπιδρά με

το mtDNA στην περιοχή ελέγχου D-loop (Caballero-Caballero, Engel et al. 2013), μέσω του μοτίβου αναγνώρισης GTAAA(C/T)A (Greer and Brunet 2005), Εικόνα 30.



**Εικόνα 30.** Θέση δέσμευσης του μεταγραφικού παράγοντα FOXO3a, στην περιοχή D-loop του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA).

Εμπλέκεται στον έλεγχο της μιτοχονδριακής λειτουργίας, στη μορφολογία και στη βιογένεση των μιτοχονδρίων (Ferber, Peck et al. 2012), ενώ το γεγονός ότι η PINK1 πρωτεΐνη (Εισαγωγή A.1.4.) αποτελεί καθοδικό στόχο του FOXO3a αφήνει ανοιχτό το ενδεχόμενο συσχέτισης με τη μιτοφαγία (Mei, Zhang et al. 2009). Για το λόγο αυτό έγινε απομόνωση κυτταροπλασματικών (C) – μιτοχονδριακών (M) εκχυλισμάτων και όπως διαπιστώθηκε, μετά από πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, η αύξηση των συνολικών επιπέδων FOXO3a στη γενιά P:16 έχει σαν αποτέλεσμα την έντονη μετατόπιση αυτού στα μιτοχόνδρια, Εικόνα 31B. Η αύξηση των επιπέδων συμβαδίζει με τα συνολικά επίπεδα, Εικόνα 31A. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με την μετατόπιση της Akt στα μιτοχόνδρια, όπως παρατηρήθηκε στην Παράγραφος Δ.Β.6., Εικόνα 28B.



**Εικόνα 31.** Η χρόνια έκθεση στη νευροτοξίνη 6-OHDA έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα FOXO3a στη γενιά P:16 στα μιτοχόνδρια. **A.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα FOXO3a σε ολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών στη γενιά P:12 και P:16. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -actin. **B.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western σε κυτταροπλασματικά (C) και μιτοχονδριακά (M) εκχυλίσματα στη γενιά P:12 και P:16 όπου επιβεβαιώνεται η έντονη μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα FOXO3a στα μιτοχόνδρια στη γενιά P:16. Ως μιτοχονδριακός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη Tim23, ενώ ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης η  $\beta$ -tubulin.

**Δ.Α.9. Στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στην τοξίνη 6-OHDA εντοπίστηκαν μεταβολές στα δομικά γονίδια της μιτοχονδριακής λειτουργίας καθώς και σε γονίδια που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική άμυνα.**

Στη συνέχεια αποφασίσαμε να μελετήσουμε την έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του σιδήρου καθώς και στην αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι η Sideroflexin 3 (SfxN3), το υπεροξείδιο της δισμουτάσης του μαγγανίου (superoxide dismutase (Mn)SOD,) καθώς και την έκφραση του Cytochrome C (Cyt C).

Η πρωτεΐνη Sideroflexin 3 (SfxN3) ανήκει στην οικογένεια των sideroflexin, είναι μια πρωτεΐνη μεταφορέας που επιτρέπει τη μεταφορά ιόντων διαμέσου της μεμβράνης. Εδράζεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και αποτελεί τον πιθανότερο μεταφορέα σιδήρου εντός του μιτοχονδρίου. Το μιτοχόνδριο αποτελεί το κέντρο ομοιόστασης του σιδήρου, αφού εκεί αρχικά καταναλώνεται για τη σύνθεση της Αίμης, το σχηματισμό συστάδων Fe-S και την αποθήκευση από τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη αποθήκευσης σιδήρου τη Φερριτίνη (Ajioka, Phillips et al. 2006; Lill 2009; Asano, Komatsu et al. 2011). Ο σίδηρος μέσω της αναστρέψιμης μετατροπής από  $Fe^{++}$  σε  $Fe^{+++}$  έχει την ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα Κυτοχρώματα και στην αναπνευστική αλυσίδα. Διαταραχές στην ομοιόσταση του σιδήρου συνεισφέρουν στην ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών διαταραχών, ενώ συγκεκριμένα στην περιοχή SNpc ασθενών με Parkinson έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα σιδήρου που πιθανόν σχετίζονται με τη μείωση των επιπέδων Φερριτίνης (Blum, Torch et al. 2001; Chen and Paw 2012). Υψηλά επίπεδα σιδήρου έχουν επιβεβαιωθεί και *in vivo* στην περιοχή της μέλαινας ουσίας και στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου, σε παρκινσονιακά μοντέλα ποντικού μετά από συστηματική ενέσιμη χορήγηση 6-OHDA. Τα υψηλά επίπεδα σιδήρου με τη σειρά τους συνεισφέρουν στην παραγωγή ROS (Blum, Torch et al. 2001). Η μειωρόθυμση της πρωτεΐνης SfxN3 έχει επιβεβαιωθεί στη νόσο του Parkinson σαν απόρροια της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας (Simunovic, Yi et al. 2009).

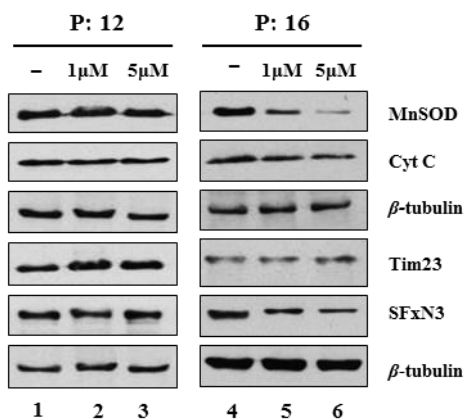
Όσον αφορά την πρωτεΐνη MnSOD ανήκει στην οικογένεια των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD, η οποία περιλαμβάνει τρία μέλη, το υπεροξείδιο της δισμουτάσης του χαλκού/ψευδαργύρου (superoxide dismutase (Cu/Zn)SOD, SOD1), το οποίο λειτουργεί στο κυτταρόπλασμα, το υπεροξείδιο της δισμουτάσης του μαγγανίου (superoxide dismutase (Mn)SOD, SOD2) το οποίο συμμετέχει στην αντιοξειδωτική άμυνα εντός της μιτοχονδριακής μήτρας και το υπεροξείδιο της δισμουτάσης 3 που εδράζεται και

λειτουργεί στον εξωκυττάριο χώρο (extracellular superoxide dismutase ECSOD ή SOD3) (Candas and Li 2014). Η πρωτεΐνη MnSOD κωδικοποιείται από το πυρηνικό DNA και η έκφρασή του είναι άμεσα εξαρτώμενη από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του μιτοχονδρίου. Αρχικά εισέρχεται στη μιτοχονδριακή μήτρα όπου σχηματίζει πλήρως λειτουργικά τετραμερή που συμμετέχουν στην αποτοξίνωση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου  $\cdot O_2^-$  (Fridovich 1995; Kim, Murphy et al. 2005). Η παρουσία του MnSOD στα μιτοχόνδρια αποσκοπεί στην άμεση μετατροπή των παραπροϊόντων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στον τόπο παραγωγής τους ούτως ώστε τα υπεροξειδία να μην διαπερνούν τις μεμβράνες και να προκαλούν επιπτώσεις στα βιομόρια. Ο προστατευτικός ρόλος του MnSOD έναντι του οξειδωτικού stress έχει μελετηθεί εκτενώς, δίνοντας έμφαση στον κρίσιμο ρόλο του στη διατήρηση της κυτταρικής φυσιολογίας σε απόκριση στο οξειδωτικό stress. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η συσσώρευση ROS εντός του μιτοχονδρίου οδηγούν στη μείωση των επιπέδων εισαγωγής του ενζύμου MnSOD στο μιτοχόνδριο, αφού η μιτοχονδριακή μηχανή μεταφοράς πρωτεϊνών και ιόντων αποτελεί ευαίσθητο στόχο των ριζών υπεροξειδίου, κατά συνέπεια λιγότερο λειτουργικό MnSOD ένζυμο υπό οξειδωτικές συνθήκες (Wright, Terada et al. 2001). Επιπλέον μειωμένα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου έχουν επιβεβαιωθεί σε διάφορες νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Evans, Dizdaroglu et al. 2004).

Το cytochrome C, είναι μια μικρή πρωτεΐνη που εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη προσδεσμένη στο φωσφολιπίδιο CL. Αποτελεί συστατικό της αναπνευστικής αλυσίδας και είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο IV. Η διάσπασή του από την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και η απελευθέρωση μέσω των πόρων της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα αποτελεί το εναρκτήριο βήμα της απόπτωσης (Orrenius and Zhivotovsky 2005).

Με πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά western στα σημεία αναφοράς P:12 και P:16 παρατηρήθηκε η μείωση στην έκφραση των πρωτεϊνών MnSOD, SfxN3 και Cyt C, συγκεκριμένα στη γενιά P:16, Εικόνα 32. Αυτό επιβεβαιώνεται και στις δύο συγκεντρώσεις 6-OHDA (διαδρομές 5 και 6), με πιο έντονη μείωση σε εκείνη των 5μM (διαδρομή 6). Στη γενιά P:12 δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή (διαδρομές 1-3). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε πλήρη συμφωνία με προηγούμενη μελέτη χρόνιας έκθεσης ποντικών στη νευροτοξίνη MPTP για 6 εβδομάδες (Patki, Che et al. 2009).





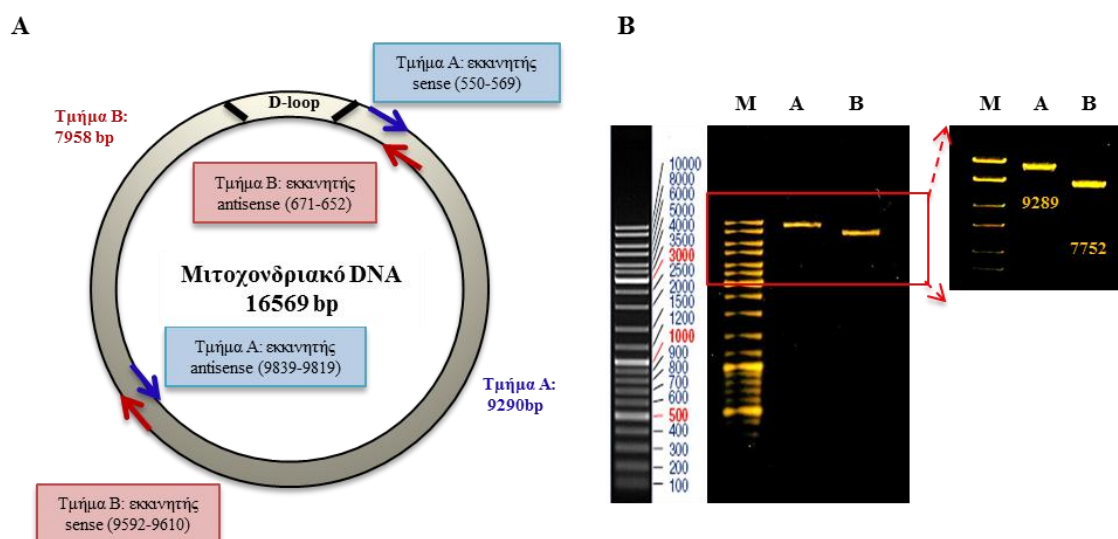
**Εικόνα 32.** Έλεγχος των πρωτεϊνών MnSOD, Cyt C και SfxN3 στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA. Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η έκφραση των πρωτεϊνών MnSOD, SfxN3, και Cyt C, στη γενιά P:12 και P:16. Η πρωτεΐνη Tim23 χρησιμοποιήθηκε ως μιτοχondριακός δείκτης ισοφόρτωσης, ενώ ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-tubulin.

#### **Δ.Α.10. Έλεγχος του mtDNA για μεταλλάξεις ή απαιολιφές με τη μεθοδολογία του «εν τω βάθει» νουκλεοτιδικής αλληλούχησης (Deep Sequencing).**

Σε κυτταρικό επίπεδο, η νόσος του Parkinson έχει επίσης συνδεθεί με τη μιτοχondριακή δυσλειτουργία, η οποία εμφανίζεται πριν από την έναρξή των συμπτωμάτων, και φαίνεται ότι αποτελεί έναν μάλλον κοινό, παθολογικό μηχανισμό των νευροεκφυλιστικών διαταραχών. Ο πιθανός ρόλος της μιτοχondριακής δυσλειτουργίας στην παθογένεση της PD ενισχύθηκε σημαντικά ως ιδέα, μόλις λίγα χρόνια πριν, όταν δύο ανεξάρτητες μελέτες αποκάλυψαν ότι τα νευρικά κύτταρα της μέλαινας ουσίας χαρακτηρίζονται από σημαντικό αριθμό ελλειμμάτων στο mtDNA και διαταραχή της λειτουργίας των μιτοχondρίων τους. Σήμερα γνωρίζουμε ότι οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες του μεσεγκεφάλου είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι σε βλάβες του mtDNA, καθώς και στη συσσώρευση μεταλλάξεων εκεί, συγκριτικά με νευρώνες από άλλες περιοχές του εγκεφάλου.

Για τους παραπάνω λόγους, αποφασίσαμε να ελέγξουμε εάν η χρόνια χορήγηση της τοξίνης 6-OHDA, στο *in vitro* μοντέλο, έχει προκαλέσει νουκλεοτιδικές αλλαγές - μεταλλάξεις στο mtDNA, οι οποίες να συσχετίζονται με την εμφάνιση των φαινοτυπικών μεταβολών που περιγράφηκαν παραπάνω. Αρχικά, έγινε ενίσχυση του mtDNA με PCR, σε δύο μεγάλα τμήματα. Η ενίσχυση έγινε με δύο ζεύγη αλληλεπικαλυπτόμενων εκκινητών, ένα ζεύγος για το τμήμα A και ένα για το τμήμα B, ούτως ώστε να ενισχύεται το σύνολο του mtDNA, Εικόνα 33A. Τα προϊόντα που προκύπτουν από την αντίδραση PCR είναι τα τμήματα A και B μήκους 9289 και 7752 ζευγών βάσεων (base pairs - bp), Εικόνα 33B. Τα τμήματα A και B που ενισχύονται προορίζονται για ανάλυση ολικής σάρωσης του μιτοχondριακού γονιδιώματος χρησιμοποιώντας την τελευταία τεχνολογία της «εν τω βάθει» νουκλεοτιδικής αλληλούχησης (Deep Sequencing). Η σύγκριση που ακολούθησε

αναφέρεται στο χωρίς έκθεση στην τοξίνη 6-OHDA δείγμα και στη συγκέντρωση των 5μM 6-OHDA στη γενιά P:16 με την καλλιέργεια ελέγχου. Η σύγκριση των αλληλουχιών αποκάλυψε μια σειρά από πολυμορφισμούς (a single nucleotide polymorphism – SNP). Τα SNPs είναι ο πιο κοινός τύπος της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των ανθρώπων και αντιστοιχεί σε μια αλλαγή σε ένα νουκλεοτίδιο σε μια συγκεκριμένη θέση στο DNA. Για παράδειγμα, σε μία συγκεκριμένη θέση βάσεως στο ανθρώπινο γονιδίωμα, η βάση C μπορεί να εμφανιστεί στα περισσότερα άτομα, αλλά σε μια μειοψηφία των ατόμων, η θέση έχει αντικατασταθεί από βάση A. Αυτό αντιστοιχεί σε ένα SNP σε αυτή τη συγκεκριμένη θέση βάσεως, οι δύο πιθανές παραλλαγές νουκλεοτιδίων - C ή A – ονομάζονται αλληλόμορφα (alleles) για τη βάση στη συγκεκριμένη θέση.

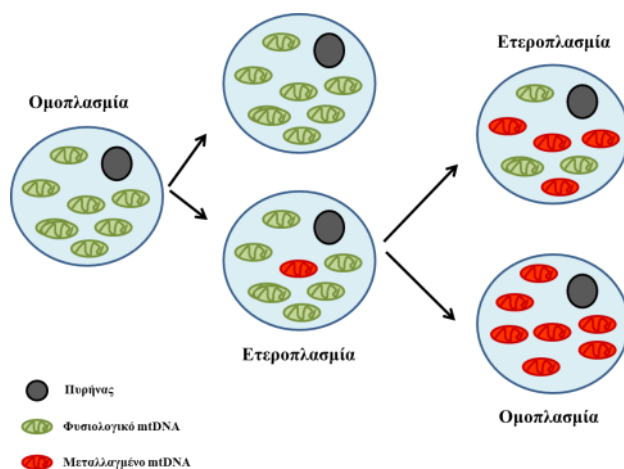


**Εικόνα 33. Ενίσχυση του συνολικού μιτοχondριακού DNA.** **A.** Η θέση εντοπισμού των εκκινητών για τμήματα A και B πάνω στο mtDNA. **B.** Αντιπροσωπευτική εικόνα, των τμημάτων A και B, που ενισχύονται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - PCR.

Στην πλειοψηφία οι περισσότεροι SNPs αντιστοιχούν μόνο σε δύο διαφορετικά αλληλόμορφα, έχουν εντοπιστεί ωστόσο και SNPs στα οποία τρεις διαφορετικές παραλλαγές βάσης μπορεί να συνυπάρχουν μέσα σε ένα πληθυσμό (triallelic) ([Hodgkinson and Eyre-Walker 2010](#)). Απαντώνται φυσιολογικά στο ανθρώπινο γονιδίωμα με συχνότητα 1 ανά 300 νουκλεοτίδια, ενώ μεγαλύτερη συχνότητα εμφανίζουν στην αλληλουχία μεταξύ των γονιδίων. Τα περισσότερα SNPs δεν έχουν καμία επίπτωση στην υγεία και την ανάπτυξη, ωστόσο όταν συμβαίνουν στο εσωτερικό ενός γονιδίου ή στη ρυθμιστική περιοχή του, μπορεί να διαδραματίσουν πιο άμεσο ρόλο στην εμφάνιση μιας διαταραχής επηρεάζοντας τη λειτουργία του γονιδίου. Η μελέτη τους παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την παρακολούθηση της κληρονομικότητας γονιδίων που ευθύνονται για την εμφάνιση

ασθενειών μεταξύ οικογενειών. Οι αντικαταστάσεις που προκύπτουν από τα SNPs στις κωδικές περιοχές των γονιδίων κατηγοριοποιούνται σε συνώνυμες και μη συνώνυμες αντικαταστάσεις. Οι συνώνυμες αντικαταστάσεις δεν οδηγούν στην αλλαγή του αμινοξέως στην πρωτεΐνη, χωρίς ωστόσο αυτό να αποκλείει το ενδεχόμενο η αντικατάσταση αυτή να επηρεάσει τη λειτουργία της πρωτεΐνης με άλλους τρόπους. Στις μη συνώνυμες αντικαταστάσεις, όπως οι παρανοηματικές, η αλλαγή μιας βάσης έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή στο αμινοξύ που κωδικοποιείται και κατά συνέπεια δυσλειτουργία που οδηγεί σε ασθένεια. Όπως έχουμε προαναφέρει το μιτοχondριακό γονιδίωμα απαντάται σε πολλαπλά αντίγραφα και κωδικοποιεί 13 σημαντικές πρωτεΐνες της μιτοχondριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Οι μεταλλάξεις που κληρονομούνται από το mtDNA είναι μια σημαντική αιτία των ανθρώπινων ασθενειών (Taylor and Turnbull 2005). Οι μεταλλάξεις αυτές διαχωρίζονται βάση ενός ιδιαίτερου χαρακτηριστικού της γενετικής των μιτοχondρίων την ομοπλασμία (επηρεάζονται όλα τα αντίγραφα του μιτοχondριακού γονιδιώματος) και την ετεροπλασμία (επηρεάζονται μερικά από τα αντίγραφα του μιτοχondριακού γονιδιώματος),

Εικόνα 34.



Εικόνα 34. Σχηματική απεικόνιση της ομοπλασμίας, κατάσταση στην οποία επηρεάζονται όλα τα αντίγραφα mtDNA του κυττάρου και της ετεροπλασμίας, κατάσταση στην οποία επηρεάζονται μερικά από τα αντίγραφα mtDNA.

Η ετεροπλασμία οδηγεί στο σχηματισμό ενός μοτίβου μωσαϊκού εντός των κυττάρων ενός ιστού με κύτταρα στα οποία η αναπνευστική αλυσίδα λειτουργεί κανονικά και με κύτταρα στο οποία παρουσιάζεται ανεπάρκεια, χαρακτηριστικό της παρουσίας ετεροπλασμικών βλαβών στο mtDNA. Η συσσώρευση μεταλλάξεων στο mtDNA έχει συσχετιστεί με τη γήρανση και τη νευροεκφύλιση, ενώ υψηλά επίπεδα μιτοχondριακών απαλοιφών έχουν συσχετιστεί με τη γήρανση και τη νόσο του Parkinson (Bender, Krishnan et al. 2006). Επιπλέον προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι υψηλά επίπεδα

μεταλλαγών στο mtDNA προκαλούν ανεπάρκεια σχετιζόμενη με την ηλικία, στην οξειδάση του κυτοχρώματος c (cytochrome c oxidase - COX), δηλαδή στη δραστηριότητα του συμπλόκου IV, λόγω του ότι 3 από τις 13 υπομονάδες του συμπλόκου κωδικοποιούνται από το mtDNA (Cottrell, Blakely et al. 2001).

Η ανάλυση ολικής σάρωσης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος έγινε για τρία διαφορετικά δείγματα: **1.** Καλλιέργεια ελέγχου SH-SY5Y, **2.** καλλιέργεια SH-SY5Y απουσία τοξίνης 6-OHDA στη γενιά P:16 και **3.** καλλιέργεια SH-SY5Y παρουσία τοξίνης 6-OHDA συγκέντρωσης 5μM στη γενιά P:16. Η συγκριτική ανάλυση έγινε βάση της αλληλουχίας αναφοράς για το μιτοχονδριακό γονιδίωμα NC\_012920.1 από τη βάση δεδομένων NCBI. Όπως ήταν αναμενόμενο, προέκυψαν συνολικά 10 κοινές θέσεις SNPs για τα τρία δείγματα, Πίνακας 4. Από αυτούς, 7 θέσεις αντιστοιχούν στα αποκαλούμενα κοινά πληθυσμιακά SNPs, δηλαδή πολυμορφισμοί που απαντώνται στον ανθρώπινο πληθυσμό σε ποσοστό τουλάχιστον 1% (m.263A>G, m.750A>G, m.1438A>G, m.4769A>G, m.11016G>A, m.15326A>G και m.16519 T > C), εξ αυτών οι δύο εντοπίστηκαν στη μιτοχονδριακή μη κωδική περιοχή D-loop (m.263A>G, m.16519T>C), ενώ οι άλλοι τρεις κοινοί πολυμορφισμοί (m.1217G>A, m.6267G>A, m.6457T>C) πιθανόν να αποτελούν χαρακτηριστικό της κυτταρικής σειράς. Επιπλέον, εντοπίστηκε ένας πολυμορφισμός στην κωδική περιοχή του γονιδίου ATP6, που αποτελεί μια από τις 17 υπομονάδες της ATP συνθάσης ή του συμπλόκου V της αναπνευστικής αλυσίδας, στη θέση m.8860A>G. Αποτελεί μία παρανοηματική αντικατάσταση που οδηγεί σε επίπεδο πρωτεΐνης στη μεταλλαγή Thr112Ala. Το γονίδιο της ATP6 είναι πολύ επιρρεπές σε παρανοηματικές αντικαταστάσεις αμινοξέων σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (Ghaffarpour, Mahdian et al. 2014), ενώ ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει ευρέως συσχετιστεί με τη νόσο Alzheimer (Ridge, Maxwell et al. 2012).

Τέλος στο δείγμα SH-SY5Y παρουσία τοξίνης 6-OHDA συγκέντρωσης 5μM στη γενιά P:16, εντοπίστηκε μια θέση απαλοιφής στη θέση m.9906delG στο γονίδιο COX3 (Cytochrome c oxidase subunit 3 - COX3), που αποτελεί μία από τις κεντρικές υπομονάδες του συμπλόκου IV της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, Πίνακας 4. Ωστόσο, επειδή η ανάλυση ανεξάρτητου δείγματος δεν επιβεβαίωσε την απαλοιφή, στο δείγμα παρουσία της τοξίνης, που υποδηλώνει ότι μπορεί να αποτελεί ένα τυχαίο γεγονός ή μια απαλοιφή που να υπάρχει σε πολύ χαμηλά ποσοστά. Οι προσθήκες ή οι απαλοιφές (Insertions and deletions -Indels), αποτελούν το δεύτερο πιο κοινό τύπο πολυμορφισμών. Το μέσο ποσοστό του ρυθμού πρόκλησης των indels είναι ένα σε 5.1 έως 13.2 kb του

DNA (Mills, Luttig et al. 2006), ενώ εκτιμάται ότι συγκριτικά με τα SNPs έχουν οχτώ φορές μικρότερη πιθανότητα πρόκλησης (Abecasis, Altshuler et al. 2010). Πολύ υψηλά επίπεδα απαλοιφών στο μιτοχondριακό γονιδίωμα (~50%) έχουν περιγραφεί στους νευρώνες της μέλαινας ουσίας σε δείγματα ελέγχου ηλικιωμένων ατόμων καθώς και σε ασθενείς με νόσο του Parkinson (Bender, Krishnan et al. 2006; Kraytsberg, Kudryavtseva et al. 2006). Αυτές οι μεταλλάξεις επεκτείνονται και εάν επιτευχθούν υψηλά επίπεδα μιας μεμονωμένης μετάλλαξης, τότε αυτό οδηγεί σε μια βιοχημική διαταραχή (Reeve, Krishnan et al. 2008). Στο σημείο αυτό να τονίσουμε ότι στα δείγματα μας μπορεί να υπάρχουν μεταλλαγές ή απαλοιφές οι οποίες να βρίσκονται σε πολύ μικρά μη ανιχνεύσιμα ποσοστά.

**Πίνακας 6.** Αποτύπωση των αποτελεσμάτων από την ανάλυση της «εν τω βάθει» νουκλεοτιδικής αλληλούχησης (Deep Sequencing) για το μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA.

Κοινά SNPs										
Γονιδίωμα	Νουκλεοτιδική Θέση	Νουκλεοτίδιο Αναφοράς	Νουκλεοτιδική Παραλλαγή	Κλήση Αλληλομόρφου	Συχνότητα Εμφάνισης	Ποιότητα	Τύπος Παραλλαγής	Γενετική Περιοχή	Κωδικός Ταυτοποίησης Μεταγράφου	Νουκλ. Παραλλαγή Μεταγράφου
mtDNA	263	A	G	Ομόζυγο	100	2209.92	SNP	D-Loop	NC_012920.1:576_1	
mtDNA	750	A	G	Ομόζυγο	98.3	3275.66	SNP	RNR1	MT-RNR1 NC_012920.1:648_1601	
mtDNA	1217	G	A	Ετερόζυγο	54.1	579.82	SNP	RNR1	14T-RNR1 NC_012920.1:648_1601	
mtDNA	1438	A	G	Ομόζυγο	100	4030.2	SNP	RNR1	LIT-RNR1 NC_012920.1:648_1601	
mtDNA	4769	A	G	Ομόζυγο	100	820.57	SNP	ND2	MT-ND2 NC_012920.1:4470_5511	m.4769A>G
mtDNA	6267	G	A	Ετερόζυγο	24.9	123.15	SNP	COX1	LIT-001 NC_012920.1:5904_7445	m.6267G>A
mtDNA	6457	T	C	Ετερόζυγο	30.1	145.79	SNP	COX1	luIT-001 NC_012920.1:5904_7445	m.6457T>C
mtDNA	11016	G	A	Ομόζυγο	100	809.33	SNP	ND4	LIT-ND4 NC_012920.1:10760_12137	m.11016G>A
mtDNA	15326	A	G	Ομόζυγο	100	2331.63	SNP	CYTB	MT-CYB NC_012920.1:14747_15887	m.15326A>G
mtDNA	16519	T	C	Ομόζυγο	100	2872.01	SNP	D-Loop	NC_012920.1:16569_16024	
mtDNA	8860	A	G	Ομόζυγο	100	158.92	SNP	ATP6	MT-ATP6 NC_012920.1:8527_9207	m.8860A>G
<b>Μόνο στο δείγμα 5μM 6-OHDA (P:16)</b>										
<b>mtDNA</b>	<b>9906</b>	<b>G</b>	<b>-</b>	<b>Ομόζυγο</b>	<b>100</b>	<b>1542.56</b>	<b>DEL</b>	<b>COX3</b>	<b>MT-003 NC_012920.1:9207_9990</b>	<b>m.9906deIG</b>

Κοινά SNPs								
Παραλλαγή Πρωτεΐνης	Συνέπειες στη Μετάφραση	Τιμή p	Βάση Δεδομένων SNP	Συχνότητα Σπάνιου Αλληλομόρφου	Συνήθη SNPs κατά την UCSC	Κάλυψη	Ref+/Ref- , Var+/Var-	Μέγεθος Ομοπολυμερούς
		1,75E-140	rs2853515	0,019	YES	146	A=0/0, G=102/44	1
		1,52E-139	rs2853518	0,011	YES	167	A=1/7, G=81/78	2
		7,21E-15	rs28673326			51	G=13/10, A=17/11	1
		2,70E-139	rs2001030	0,044	YES	145	A=0/0, G=76/69	2
p.M100M	Συνόνομη	2,47E-20	rs3021086	0,006	YES	20	A=0/0, G=14/6	1
p.A122T	Παρανοηματική	7,18E-17	rs202216551	0,002		116	G=33/36, A=22/25	1
p.V185A	Παρανοηματική	2,77E-11				93	T=27/32, C=12/22	1
p.S86N	Παρανοηματική	7,03E-171	rs3937033	0,421	YES	178	T=0/0, C=128/50	1
p.T194A	Παρανοηματική	1,02E-221	rs2853515	0,019	YES	231	A=0/0, G=146/85	1
		0	rs2853518	0,011	YES	362	A=3/3, G=223/133	2
	Παρανοηματική	1,11E-46				48	G=0/0, A=18/30	1
<b>Μόνο στο δείγμα 5μM 6-OHDA (P:16)</b>								
	<b>Παρανοηματική</b>	<b>3,78E-163</b>	<b>rs2853508</b>	<b>0,007</b>		<b>181</b>	<b>A=1/3, G=80/97</b>	<b>2</b>

#### **Δ.Α.11. Χορήγηση Φολικού οξέος (Folic acid, FA) στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA**

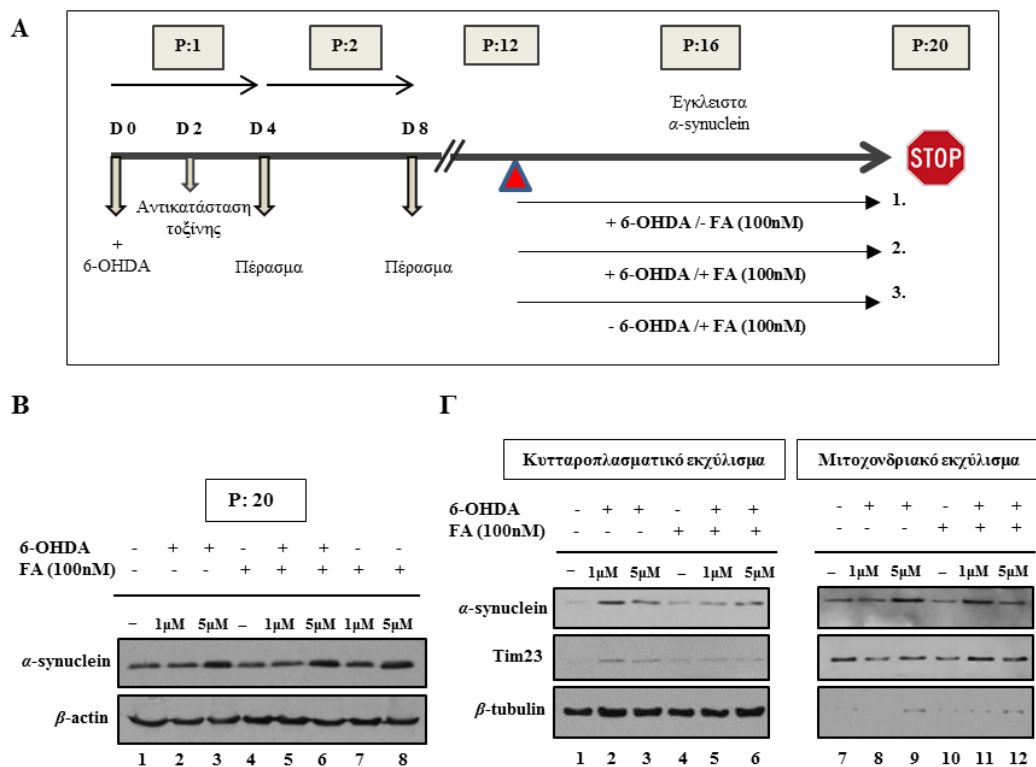
Στη συνέχεια ελέγχθηκε η επίδραση της αντιοξειδωτικής ουσίας φολικό οξύ (folic acid, FA) στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA. Το FA είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο συμπλήρωμα διατροφής σε ανθρώπους, και η ασφάλειά του είναι καλά εδραιωμένη. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ποντίκια που υποβάλλονται σε δίαιτα χαμηλού FA, έχουν περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν τη νόσο PD συγκριτικά με ποντίκια που έχουν μια κανονική διατροφή (Duan, Ladenheim et al. 2002; Chen, Zhang et al. 2004). Επιπλέον, μελέτη στη *Drosophila melanogaster* που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο PINK1, προκαλούν πρόωμη έναρξη της νόσου του Parkinson, έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της δεξαμενής νουκλεοτιδίων, προωθώντας τη βιογένεση των μιτοχονδρίων και συγχρόνως βελτιώνοντας τη λειτουργία των νευρώνων με νευροεκφύλιση, επιβεβαιώνοντας τον μηχανισμό με τον οποίο λειτουργεί. Τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης υποστηρίζουν ότι δίαιτα υψηλή σε FA μπορεί να είναι ευεργετική για την προοδευτική διαμόρφωση της PD, αποτρέποντας την καταστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας (Tufi, Gandhi et al. 2014).

Το FA είναι σημαντικό για την παραγωγή S-adenosylmethionine, τον κύριο δότη μεθυλίου για τη μεθυλίωση του DNA. Η μετατροπή της μονοφωσφορικής δεοξουριδίνης (deoxyuridine monophosphate, dUMP) σε μονοφωσφορική θυμιδίνη (thymidine monophosphate, TMP) απαιτεί φολικό οξύ με τη μορφή 5,10, μεθυλενοτετραϋδροφολικού (5,10, methylenetetrahydrofolate) ως δότη μεθυλίου. Φυσιολογικά, η ποσότητα της τριφωσφορικής δεοξουριδίνης (dUTP, πηγή της ουρακίλης) στο κύτταρο διατηρείται πολύ χαμηλή συγκρινόμενη με τα επίπεδα της τριφωσφορικής δεοξυθυμιδίνης (dTTP, πηγή της θυμίνης), εμποδίζοντας την ενσωμάτωση της ουρακίλης κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA. Αν αυτή η αυστηρή ρύθμιση διαταραχθεί και η αναλογία της dUTP προς τη dTTP αυξηθεί, η ποσότητα της ουρακίλης που ενσωματώνεται λανθασμένα στο DNA επίσης αυξάνεται. Σε συνθήκες εξάντλησης του FA, η παρεμπόδιση της μεθυλίωσης της dUMP σε TMP οδηγεί σε αύξηση στα κυτταρικά επίπεδα της dUTP και λανθασμένη ενσωμάτωση εντός του μορίου του DNA της ουρακίλης στη θέση της θυμίνης. Το σύστημα επιδιόρθωσης, το οποίο μπορεί να διαχωρίσει την ουρακίλη από τη θυμίνη, στη συνέχεια απομακρύνει την ουρακίλη με τη βοήθεια μιας ουρακιλο-DNA γλυκοζυλάσης και να επανασυνθέσει το DNA, πράγμα που περιλαμβάνει προσωρινά τη σχάση (κόψιμο) του σκελετού του DNA. Ωστόσο, αν η αναλογία της dUTP προς τη dTTP συνεχίσει να



αυξάνεται, αυτή η επανασύνθεση μπορεί να ενσωματώσει πάλι ουρακίλη αντί θυμίνης. Αυτός ο κύκλος τελικά οδηγεί σε θραύσεις της αλυσίδας του DNA και σε κατάτμηση του χρωμοσώματος, όταν αυτές οι προσωρινές σχάσεις στο DNA συμβαίνουν η μία μετά την άλλη και πολύ κοντά μεταξύ τους (Goulian, Bleile et al. 1980; Reidy 1987; MacGregor, Schlegel et al. 1990; Blount and Ames 1995). Για τους παραπάνω λόγους το FA είναι πολύ σημαντικό για τη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA.

Ο σκοπός της συγκεκριμένης προσπάθειας ήταν να διερευνήσουμε εάν στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA η χορήγηση FA θα μπορούσε να επιβραδύνει τα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της PD, που περιγράφηκαν στις παραπάνω παραγράφους. Η χορήγηση του FA ξεκίνησε στη γενιά P:12. Χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 100nM FA και χορηγήθηκε στην καλλιέργεια έως τη γενιά P:20, με ανανέωση του κάθε δύο ημέρες, Εικόνα 35A.

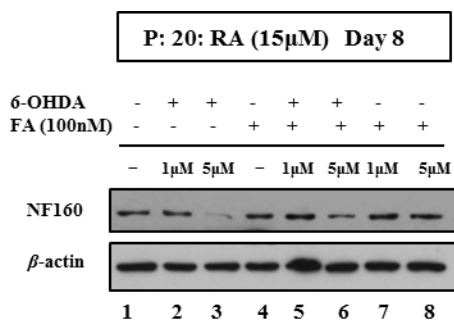


**Εικόνα 35. Χορήγηση φολικού οξέος (Folic Acid - FA) στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA. A.** Ενδεικτική εικόνα της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε. Καλλιέργεια των κυττάρων στις συνθήκες: + 6-OHDA/ - FA, + 6-OHDA/ + FA και - 6-OHDA/ + FA από τη γενιά P:12 – P:20. Ανανέωση του FA κάθε 2 μέρες. **B.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η αύξηση των ενδογενών επιπέδων της  $\alpha$ -synuclein στο P:20, στη συγκέντρωση 5μM και στις τρεις διαφορετικές καλλιέργειες (+6-OHDA/ -FA, +6-OHDA/ +FA και -6-OHDA/ +FA). Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -actin. **Γ.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η μετατόπιση της πρωτεΐνης  $\alpha$ -synuclein στη γενιά P:20 απουσία και παρουσία FA (+6-OHDA/ -FA και +6-OHDA/ +FA

αντίστοιχα). Η πρωτεΐνη Tim23 χρησιμοποιήθηκε ως μιτοχονδριακός δείκτης ισοφόρτωσης, ενώ ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -tubulin.

Επί της ουσίας, διατηρήθηκαν οι καλλιέργειες +6-OHDA/ -FA, +6-OHDA/ +FA και η καλλιέργεια -6-OHDA/ +FA από τη γενιά P:12- P:20. Αρχικά, ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της  $\alpha$ -synuclein στη γενιά P:20. Συγκριτικά με την κατάσταση χρόνιας έκθεσης, Εικόνα 35B (διαδρομές 1, 2 και 3), η παρουσία του FA δεν φαίνεται να επηρέασε τα επίπεδα συσσώρευσης της  $\alpha$ -synuclein, ούτε παρουσία των δύο παραγόντων, δηλαδή FA και 6-OHDA μαζί (διαδρομές 4, 5 και 6), αλλά ούτε και παρουσία μόνο του FA (διαδρομές 7 και 8). Ωστόσο, όταν ελέγχθηκαν τα επίπεδα συσσώρευσης της  $\alpha$ -synuclein στα μιτοχόνδρια, διαπιστώθηκε ότι η παρουσία του FA έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση στην μετατόπιση της εντός των μιτοχονδρίων, Εικόνα 35Γ (διαδρομή 12) συγκριτικά με την παρατηρούμενη αυξημένη μετατόπιση παρουσία της 6-OHDA (διαδρομή 9).

Στη συνέχεια ελέγχθηκε μια άλλη βασική ιδιότητα των νευρικών κυττάρων, η διαφοροποίηση προς ώριμα νευρικά παρουσία Retinoic Acid. Όπως περιγράφηκε στην παράγραφο Δ.Α.5., Εικόνα 27, η παρουσία της 6-OHDA για 16 συνεχόμενες γενιές μειώνει το δυναμικό διαφοροποίησης των κυττάρων. Ο έλεγχος της διαφοροποίησης πραγματοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά western για το δείκτη νευρικής διαφοροποίησης Neurofilament 160 (NF160), Εικόνα 36. Αρχικά επιβεβαιώθηκε η μείωση στην έκφραση της NF160 στη γενιά P:20 στην καλλιέργεια +6-OHDA/ -FA (διαδρομές 1, 2 και 3). Η μείωση αυτή παρατηρείται σε μικρότερη ένταση στην καλλιέργεια +6-OHDA/ +FA (διαδρομές 4, 5 και 6), ενώ στην καλλιέργεια -6-OHDA/ +FA η έκφραση του δείκτη διαφοροποίησης επανέρχεται (διαδρομές 7 και 8) σε συγκρίσιμα επίπεδα με την καλλιέργεια ελέγχου (διαδρομές 1 και 4).



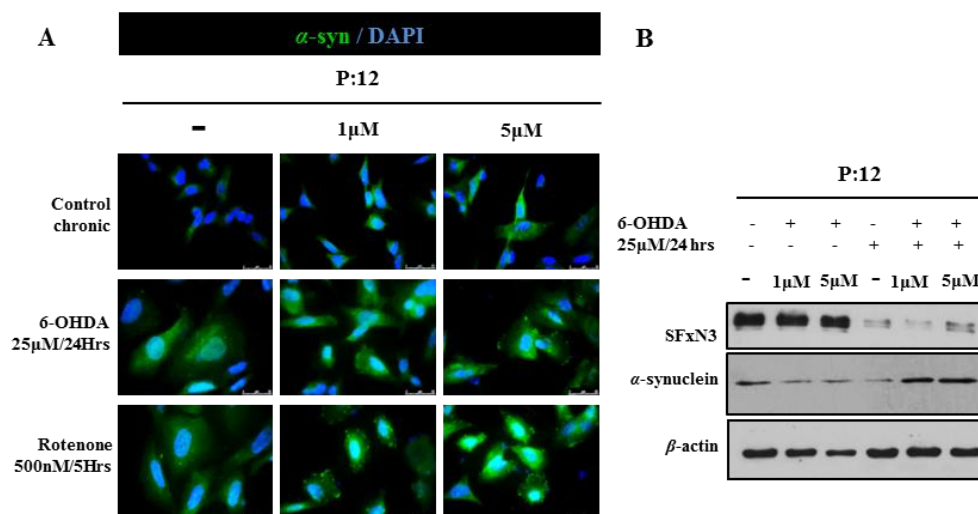
Εικόνα 36. Έλεγχος του δυναμικού διαφοροποίησης των κυττάρων μετά από χορήγηση FA στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA για το χρονικό διάστημα P:12 – P:20. Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η μείωση στην έκφραση της πρωτεΐνης NF160 κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης στην καλλιέργεια +6-OHDA/ -FA (διαδρομές 1, 2 και 3), η μικρή αύξηση της NF160 στην καλλιέργεια +6-OHDA/ +FA

(διαδρομές 4, 5 και 6), και η αναστροφή του φαινομένου στην καλλιέργεια -6-OHDA/ +FA (διαδρομές 7 και 8). Η διαφοροποίηση έγινε για 8 ημέρες (Day 8) παρουσία RA 15 $\mu$ M, με ανανέωση κάθε δύο ημέρες. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -actin.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η διακοπή της τοξίνης στη γενιά P:12 και η χορήγηση του FA για το χρονικό διάστημα P:12-P:20 στη συγκέντρωση των 100nM, αποτελεί μια συνθήκη στην οποία αναστρέφεται η δυσκολία των κυττάρων προς διαφοροποίηση. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η παρουσία του FA με την τοξίνη 6-OHDA δεν προκαλεί αναστροφή του φαινομένου της αύξησης των ενδογενών επιπέδων της  $\alpha$ -synuclein. Ενδεχομένως καλλιέργεια των κυττάρων σε μεγαλύτερη συγκέντρωση FA να είχε καλύτερα αποτελέσματα.

#### Δ.Α.12. Χρήση χημικών αναστολέων στη γενιά P:12

Ακολούθησαν πειράματα ελέγχου της απόκρισης των κυττάρων σε οξύ stress στη γενιά P:12. Ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκε η γενιά P:12, είναι γιατί αποτελεί στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης ένα πρώιμο στάδιο εκδήλωσης της νόσου, δεδομένου ότι ο μόνος παθολογικός φαινότυπος που έχει εκδηλωθεί είναι ο σχηματισμός εγκλείστων. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκαν υψηλές συγκεντρώσεις των αναστολέων rotenone και 6-OHDA, 500nM/5hrs και 25 $\mu$ M/24hrs αντίστοιχα.



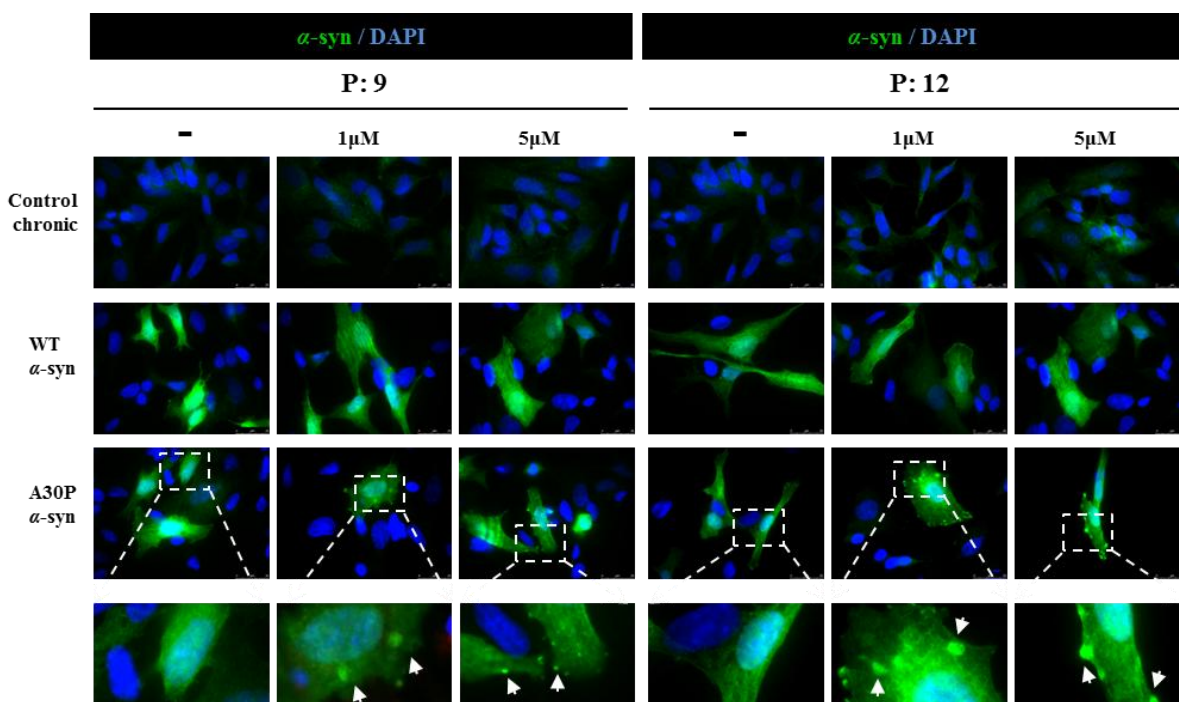
**Εικόνα 37.** Έλεγχος της απόκρισης των κυττάρων στη γενιά P:12 σε οξύ stress. **A.** Ενδεικτική εικόνα ανοσοφθορισμού στη γενιά P:12 και P:16 με αντίσωμα έναντι της  $\alpha$ -synuclein. Χρήση των αναστολέων rotenone και 6-OHDA, 500nM/5hrs και 25 $\mu$ M/24hrs αντίστοιχα. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. (Φακός 100x, κλίμακα 25 $\mu$ m). **B.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η αύξηση στην έκφραση της  $\alpha$ -synuclein και συγχρόνως η μείωση στην έκφραση της SFxN3 μετά από 25 $\mu$ M/24hrs 6-OHDA. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -actin.

Όπως προέκυψε από πειράματα ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι της  $\alpha$ -synuclein, η εφαρμογή του stress ωθεί τα κύτταρα στο σχηματισμό μεγάλου αριθμού

εγκλείστων  $\alpha$ -synuclein, Εικόνα 37A. Η συμπεριφορά αυτή παρατηρείται και στους δύο χημικούς αναστολείς. Επιπλέον η χορήγηση 25 $\mu$ M 6-OHDA για 24hrs έχει ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της SFxN3 πρωτεΐνης, Εικόνα 37B, ενώ συγχρόνως αυτό συνοδεύεται από αύξηση των ενδογενών επιπέδων της  $\alpha$ -synuclein. Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι ελέγχθηκε εάν σε αυτές τις συνθήκες επηρεάζονται τα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, χωρίς ωστόσο καμία μεταβολή.

#### **Δ.Α.13. Υπερέκφρασης της αγρίου τύπου (WT) και της μεταλλαγμένης $\alpha$ -synuclein (A30P)**

Στη συνέχεια ακολούθησαν πειράματα υπερέκφρασης της  $\alpha$ -synuclein, και συγκεκριμένα της αγρίου τύπου (wild type, WT) και της πρωτεΐνης που φέρει τη σημειακή μετάλλαξη A30P. Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφηκαν στα Υλικά και Μέθοδοι, Παράγραφος Γ.1.5. Η υπερέκφραση των μορφών της  $\alpha$ -synuclein έγινε στη γενιά P:9 και P:12. Ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκε το P:9 ήταν γιατί αποτελεί ένα πολύ αρχικό στάδιο της νόσου, όπου δεν έχει εκδηλωθεί κανένας παθολογικός φαινότυπος της PD ούτε έχουν σχηματιστεί τα εγκλείστα της  $\alpha$ -synuclein, ενώ το P:12 χρησιμοποιήθηκε ως ένα πρώιμο στάδιο εκδήλωσης της νόσου. Μετά από υπερέκφραση για 48hrs, ακολούθησαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western και ανοσοφθορισμού.

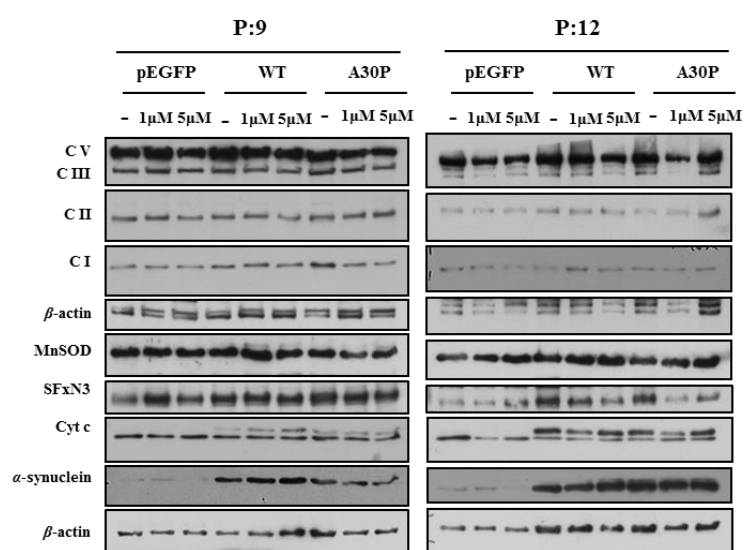


**Εικόνα 38. Υπερέκφρασης της αγρίου τύπου (WT) και της μεταλλαγμένης  $\alpha$ -synuclein (A30P) στη γενιά P:9.** Ενδεικτική εικόνα ανοσοφθορισμού στο P:9 με τη χρήση αντισώματος έναντι της  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn). Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. (Φακός 100x, κλίμακα 25 $\mu$ m, Τεχνητό ζουμ 3x)

Η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης  $\alpha$ -synuclein A30P στη γενιά P:9 και P:12, είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό εγκλείστων. Τα εγκλείστα ανιχνεύονται ήδη στη γενιά P:9, αλλά η τάση σχηματισμού είναι πιο έντονη στη γενιά P:12, αφού αριθμητικά εντοπίστηκαν περισσότερα κύτταρα. Τα εγκλείστα σχηματίζονται μόνο μετά από υπερέκφραση της A30P στις συνθήκες 1 και 5 $\mu$ M 6-OHDA, Εικόνα 38. Αντιθέτως, η υπερέκφραση της WT  $\alpha$ -synuclein δεν επάγει το σχηματισμό των εγκλείστων. Είναι σαφές ότι η μεταλλαγμένη  $\alpha$ -synuclein A30P έχει πιο ισχυρή τάση σχηματισμού των εγκλείστων συγκριτικά με την WT  $\alpha$ -synuclein. Η σημειακή μετάλλαξη A30P εντοπίστηκε σε οικογένειες με κληρονομικής μορφής νόσο του Parkinson και συσχετίστηκε με ασθενείς που εκφράζουν τις μεταλλάξεις του γονιδίου συνήθως εμφανίζουν την ασθένεια σε πρώιμο στάδιο. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η A30P εμφανίζει μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης με τις μεμβράνες, συγκριτικά με την WT και A53T  $\alpha$ -synuclein (Auluck, Caraveo et al. 2010). Η A30P  $\alpha$ -synuclein όπως και η WT, δεν έχει συγκεκριμένη δομή, αλλά έχει μεγαλύτερη ικανότητα να σχηματίζει  $\beta$ -πτυχωτά φύλλα, η οποία προσδίδει στην πρωτεΐνη μια αυξητική τάση συσσωμάτωσης (Li, Uversky et al. 2001). Ωστόσο, αποτελεί παράδοξο το γεγονός ότι παρότι η μεταλλαγή A30P έχει μειωμένη ικανότητα αλληλεπίδρασης με τις κυτταρικές μεμβράνες, στην πράξη δύναται να παράγει είδη ολιγομερών που παρουσιάζουν παθογόνες επιδράσεις. Συνοψίζοντας, η χρόνια συσσώρευση ROS μέσω της χορήγησης της 6-OHDA οδηγεί στην εκδήλωση διαφορετικής συμπεριφοράς μεταξύ της αγρίου τύπου (WT) και της μεταλλαγμένης  $\alpha$ -synuclein (A30P), με τη δεύτερη να παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία ως προς το σχηματισμό εγκλείστων.

Στη συνέχεια στα χρονικά σημεία P:9 και P:12 ελέγχθηκε εάν η υπερέκφραση της αγρίου τύπου (WT) και της μεταλλαγμένης  $\alpha$ -synuclein (A30P) επηρεάζει τη μιτοχονδριακή λειτουργία. Συγκεκριμένα με ανοσοαποτύπωση κατά Western, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων των συμπλόκων της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, χωρίς ωστόσο να παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή, Εικόνα 39. Επιπλέον, ελέγχθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών MnSOD, Cyt c και SFXN3, με τις δύο πρώτες να μην επηρεάζονται, ενώ η SFXN3 μειώνεται στη γενιά P:12, κυρίως μετά από υπερέκφραση μεταλλαγμένης  $\alpha$ -synuclein (A30P). Τέλος, στη γενιά P:9 ο σχηματισμός

των εγκλείστων ως αποτέλεσμα της υπερέκφρασης της μεταλλαγμένης  $\alpha$ -synuclein (A30P) δεν οδήγησε σε κάποια ανιχνεύσιμη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.



**Εικόνα 39.** Έλεγχος γονιδίων της μιτοχονδριακής λειτουργίας έπειτα από υπερέκφρασης της WT και της A30P  $\alpha$ -synuclein στη γενιά P:9 και P:12. Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνονται τα επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων των συμπλόκων της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας και των πρωτεϊνών SFXN3, MnSOD και Cyt c στη γενιά P:9 και P:12 μετά από υπερέκφρασης της αγρίου τύπου (WT) και της μεταλλαγμένης  $\alpha$ -synuclein

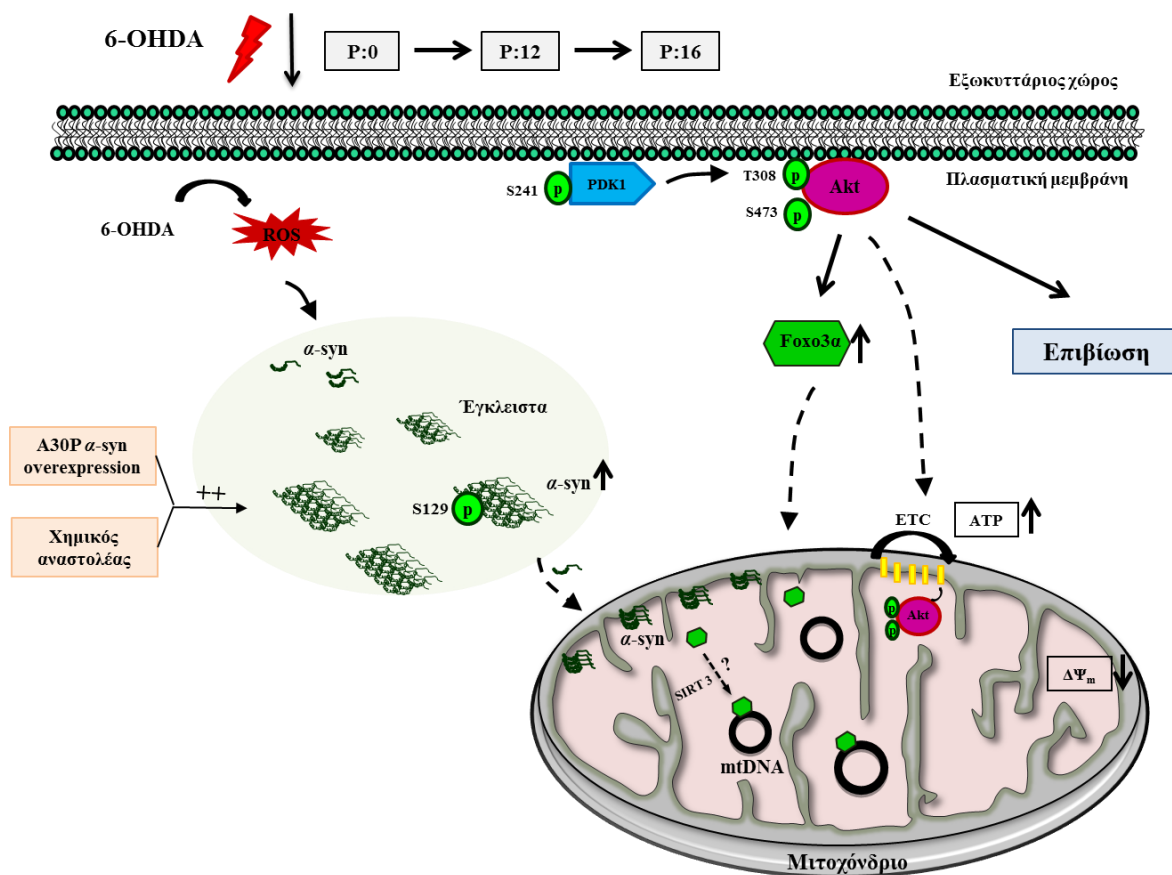
(A30P). Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -actin.

Εν κατακλείδι, στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στην τοξίνη 6-OHDA, μετά από 16 συνεχόμενες γενιές στα κύτταρα SH-SY5Y, επιβεβαιώθηκαν δύο βασικά χαρακτηριστικά της νόσου του Parkinson, ο σχηματισμός εγκλείστων  $\alpha$ -synuclein και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Ο σχηματισμός εγκλείστων της  $\alpha$ -synuclein επιβεβαιώθηκαν στις γενιές P:12 και P:16. Τα έγκλειστα αυτά έχουν χαρακτηριστικά σωματίων του Lewy, αφού μερικά από αυτά περικλείουν στο εσωτερικό τους τη φωσφορυλιωμένη μορφή της  $\alpha$ -synuclein στο κατάλοιπο Ser129. Το φαινόμενο του σχηματισμού των εγκλείστων της  $\alpha$ -synuclein πρώτον παρουσιάζει προοδευτικό χαρακτήρα, καθώς ο αριθμός των κυττάρων που έχουν σχηματίσει τα έγκλειστα αυξάνεται όσο αυξάνεται η γενιά των κυττάρων παρουσία τοξίνης, και δεύτερον έχει δόσοεξαρτώμενο χαρακτήρα καθώς τα έγκλειστα αυξάνονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τοξίνης. Ο σχηματισμός των εγκλείστων προηγείται της αύξησης των επιπέδων της ενδογενούς  $\alpha$ -synuclein, η οποία γίνεται εμφανής στη γενιά P:16. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην ικανότητα ολιγομερισμού της πρωτεΐνης. Παράγοντες όπως το οξειδωτικό stress επηρεάζουν την ισορροπία μεταξύ της μονομερούς και της ολιγομερούς κατάστασης, ενώ γεγονός είναι ότι τα ολιγομερή μπορεί επίσης να προκαλέσουν τοξικότητα παρεμβαίνοντας σε διάφορους μηχανισμούς όπως πρόκληση βλάβης στα μιτοχόνδρια (Hsu, Sagara et al. 2000).

Όσον αφορά τον έλεγχο της μιτοχονδριακής λειτουργίας παρατηρήθηκε απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης  $\Delta\Psi_m$  στη γενιά P:16, ως συνέπεια της συσσώρευσης ROS που προκύπτει από τη χορήγηση της τοξίνης. Επιπλέον ο έλεγχος πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη φυσιολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων όπως το MnSOD, Cyt c και SFXN3 αποκάλυψε μειωμένα επίπεδα αυτών, που επίσης σχετίζονται με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Ο έλεγχος πρωτεϊνών που αποτελούν υπομονάδες των συμπλόκων της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας δεν έδειξε κάποια μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης αυτών. Συνέπεια της χρόνιας χορήγησης 6-OHDA στα κύτταρα SH-SY5Y ήταν η προοδευτική μετατόπιση και συσσώρευση της  $\alpha$ -synuclein στα μιτοχόνδρια, γεγονός που είναι εμφανές από τη γενιά P:12 και γίνεται πιο έντονο στη γενιά P:16. Στη μετατόπιση αυτή μπορεί εν μέρει να οφείλεται η απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Επιπλέον παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα ATP στη γενιά P:16, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στη μετατόπιση της κινάσης Akt στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Η  $\beta$ -υπομονάδα της ATP-συνθάσης αποτελεί υπόστρωμα της κινάσης Akt, κατά συνέπεια η φωσφορυλίωση της έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ATP. Η μετατόπιση της Akt στα μιτοχόνδρια συνοδεύεται από τη μετατόπιση ενός γνωστού υποστρώματος της κινάσης, του μεταγραφικού παράγοντα FOXO3a. Ο FOXO3a παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση στο οξειδωτικό stress και στη ρύθμιση του μεταβολισμού της ενέργειας σε ένα εύρος ιστών επάγοντας την στοχευμένη ενεργοποίηση συντονισμένης μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στο μεταβολισμό, στην αυτοφαγία και στην ανθεκτικότητα στο stress (van der Horst and Burgering 2007; Calnan and Brunet 2008; Chiacchiera F 2010). Η πρόσδεση του FOXO3a στην περιοχή D-loop του mtDNA, μεσολαβεί από τη μιτοχονδριακή αποακετυλάση Sirt3, οδηγεί στη μεταγραφή μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που συμμετέχουν είτε ως κύριες υπομονάδες είτε ως καταλυτικά κέντρα στη μηχανή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και έχει ως αποτέλεσμα τη αύξηση της λειτουργίας της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, αυξημένη παραγωγή ATP και κατά συνέπεια τη διατήρηση του ενεργειακού μεταβολισμού (Peserico, Chiacchiera et al. 2013). Τέλος το παραπάνω *in vitro* σύστημα παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στην υπερέκφραση της μεταλλαγμένης  $\alpha$ -synuclein A30P, συγκριτικά με την αγρίου τύπου (WT) μορφή, αφού η υπερέκφραση της μετάλλαξης σε ένα πολύ πρώιμο στάδιο, όπως η γενιά P:9, επάγει το σχηματισμό εγκλείστων. Αυτή η συμπεριφορά της μεταλλαγμένης  $\alpha$ -synuclein, παρατηρείται και στη γενιά P:12, με την τάση σχηματισμού εγκλείστων να είναι πιο έντονη. Αντιθέτως στην

αγρίου τύπου δεν εντοπίζονται τέτοιοι σχηματισμοί. Συνοπτικά τα παραπάνω γεγονότα παρουσιάζονται στο απεικονιστικό μοντέλο που ακολουθεί, Εικόνα 40.

### Μοντέλο χρόνιας έκθεσης για τη νόσο του Parkinson



**Εικόνα 40.** Απεικόνιση των μοριακών γεγονότων που παρατηρήθηκαν στη γενιά P:16 στο *in vitro* μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA. Η χρόνια χορήγηση της 6-υδροξυτοπαμίνης για 16 συνεχόμενες γενιές διαταράσσει το ισοζύγιο της συγκέντρωσης των ελεύθερων ριζών στο εσωτερικό των νευρικών κυττάρων και έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση ROS τα οποία με τη σειρά τους οδηγούν προοδευτικά στο σχηματισμό συσσωματωμάτων α-synuclein και μετακίνηση αυτής στα μιτοχόνδρια. Κάποια από τα έγκλειστα παρουσιάζουν χαρακτηριστικά των σωματίων του Lewy, ενώ η εφαρμογή επιπλέον *stress* με τη χρήση χημικών αναστολέων ή την υπερέκφραση της μεταλλαγμένης A30P α-synuclein, επάγει το σχηματισμό των εγκλείστων. Ως απόρροια της χρόνιας έκθεσης ενεργοποιείται το σηματοδοτικό μονοπάτι επιβίωσης της PI3K/Akt κινάσης, η οποία μεζί με το μεταγραφικό παράγοντα FOXO3a μετακινούνται στο μιτοχόνδριο, εισάγοντας ένα νέο πεδίο δράσης των μορίων αυτών στη νόσο του Parkinson. Ο μεταγραφικός παράγοντας FOXO3a αλληλεπιδρά φυσιολογικά με το mtDNA στην περιοχή ελέγχου D-loop, ένα βήμα που μεσολαβεί από τη μιτοχονδριακή αποακετυλάση Sirt3, και εμπλέκεται στον έλεγχο της μιτοχονδριακής μεταγραφής.



## *Αποτελέσματα*

### *Μέρος Β*

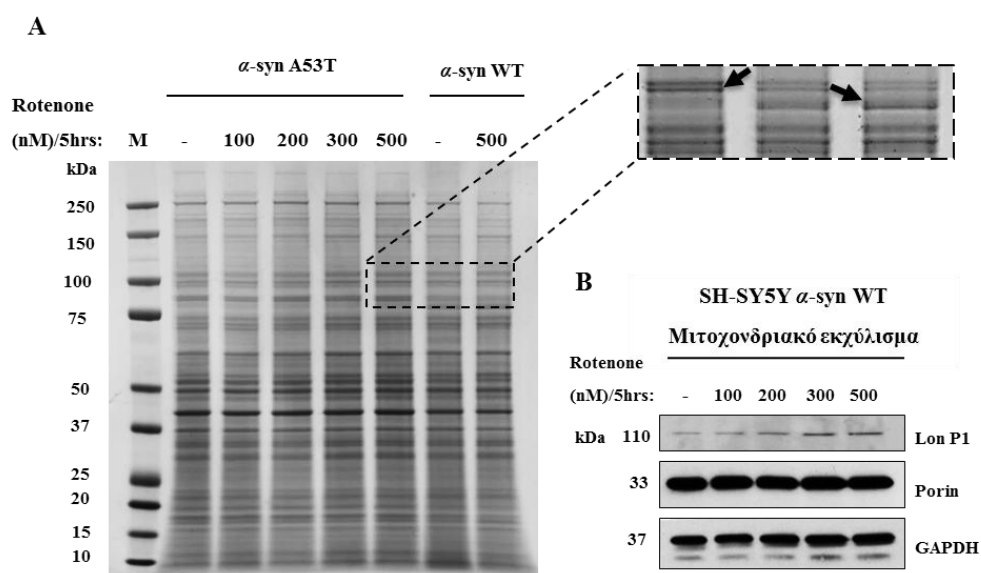
*Η ταυτοποίηση της μιτοχονδριακής πρωτεΐσης LonP1 στο χρόνιο μοντέλο μελέτης της νόσου του Parkinson.*

#### **Δ.Β.1 Έλεγχος για τον εντοπισμό πρωτεϊνών των οποίων το πρότυπο αλλάζει σε συνθήκες PD κάνοντας χρήση του αναστολέα του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας Rotenone: ταυτοποίηση της μιτοχονδριακής πρωτεΐσης LonP1**

Για την έναρξη των πειραμάτων μας χρησιμοποιήσαμε δύο παράγοντες κινδύνου που έχουν ενοχοποιηθεί για τη νόσο του Parkinson, ένα γενετικό παράγοντα και συγκεκριμένα την υπερέκφραση της  $\alpha$ -synuclein, και ένα περιβαλλοντικό παράγοντα την τοξίνη rotenone. Αρχικός μας σκοπός είναι η συνεργατική μελέτη αυτών των παραγόντων στην βιολογία και τη λειτουργία του μιτοχονδρίου δεδομένου ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία έχει συνδεθεί με τη νόσο του Parkinson.

Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν μόνιμα διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές SH-SY5Y για την αγρίου τύπου (WT  $\alpha$ -syn) και τη μεταλλαγμένη  $\alpha$ -synuclein στη θέση 53 της αμινοξικής αλληλουχίας (A53T  $\alpha$ -syn). Έγινε επώαση των κυττάρων σε ένα εύρος συγκεντρώσεων rotenone μεταξύ των 100nM έως 500nM. Η rotenone (Εισαγωγή, Παράγραφος A.3.2.3) είναι αναστολέας του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας (Heikkila, Nicklas et al. 1985). Επιλέχθηκε μια ήπια συγκέντρωση αναστολέα των 100 nM που δεν έχει αντίκτυπο στη λειτουργία του μιτοχονδρίου και μια ακραία των 500 nM όπου έχει διαπιστωθεί προηγουμένως ότι οδηγεί στην παραγωγή ROS, μείωση των παραγόμενων επιπέδων ATP, κατακερματισμό του DNA, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και ενεργοποίηση της δραστηριότητας της caspase 3 (Li, Ragheb et al. 2003). Ακολούθησε επώαση των κυττάρων σε αυτές τις συγκεντρώσεις για 5 ώρες και ελέγχθηκε η επίδραση αυτών των παραγόντων στη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα έγινε απομόνωση μιτοχονδριακών εκχυλισμάτων, ηλεκτροφόρηση αυτών σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμιδίου και χρώση του πηκτώματος με διάλυμα χρωστικής κυανό του Coomassie (Coomassie brilliant blue). Εντοπίστηκαν οι ζώνες το πρότυπο των οποίων μεταβάλλονταν αυξανόμενης της συγκέντρωσης της rotenone, έγινε αποκοπή αυτών και ανάλυση με φασματομετρία μάζας

(mass spectrometry - MS), Εικόνα 41A. Η φασματομετρία μάζας πραγματοποιήθηκε με την χρήση ιονισμού μέσω Ηλεκτροψεκασμού (ElectoSpray Ionization – ESI) και επεξεργασία των δειγμάτων με τον αναλυτή LTQ Orbitrap.



**Εικόνα 41.** Ανίχνευση μιτοχondριακών πρωτεϊνών το πρότυπο των οποίων μεταβάλλεται μετά την υπερέκφραση WT και A53T  $\alpha$ -synuclein και έκθεση στον αναστολέα του συμπλόκου I της μιτοχondριακής αναπνευστικής αλυσίδας, rotenone. **A.** Μιτοχondριακά εκχυλίσματα σταθερών κυτταρικών σειρών SH-SY5Y για την αγρίου τύπου και τη μεταλλαγμένη  $\alpha$ -synuclein (WT  $\alpha$ -syn και A53T  $\alpha$ -syn) παρουσία 100nM-500 nM rotenone. Απεικόνιση του πηκτώματος (10%) μετά τη χρώση με Coomassie brilliant blue. Με τα βέλη εικονίζονται οι ζώνες των οποίων ακολούθησε ανάλυση με φασματομετρία μάζας. **B.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου επιβεβαιώνεται η σταδιακή αύξηση στα επίπεδα της μιτοχondριακής πρωτεάσης LonP1 στη σταθερή κυτταρική σειρά για την WT  $\alpha$ -syn, αυξανόμενων των συγκεντρώσεων της rotenone. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η GAPDH, ενώ ως μιτοχondριακός δείκτης ισοφόρτωσης η porin.

Η MS ανάλυση αποκάλυψε ένα σύνολο πρωτεϊνών. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες που προέκυψαν μετά από διαλογή αυτών βάσει της συχνότητας εμφάνισης και του μοριακού βάρους (εύρους 103 έως 74 kDa) που αντιστοιχεί στις ζώνες που απομονώθηκαν και εικονίζονται με βέλη στην Εικόνα 42A. Όπως ήταν αναμενόμενο μεταξύ των πρωτεϊνών εντοπίστηκαν αρκετά μέλη της οικογένειας των heat shock πρωτεϊνών (HSPs), όπως η Hsp105/110, η Hsp90 και η Hsp75. Είναι γνωστό από *in vitro* και *in vivo* μελέτες ότι τα μέλη της οικογένειας των HSPs πρωτεϊνών, επηρεάζονται κάτω από διάφορες συνθήκες κυτταρικού stress. Τα μόρια συνοδοί (chaperones), είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων συμμετέχοντας στην ορθή αναδίπλωση

των πρωτεϊνών, δρουν ανασταλτικά στη συσσώρευση των πρωτεϊνών και συμμετέχουν στη ρύθμιση των μονοπατιών αποικοδόμησης (Hartl and Hayer-Hartl 2009). Από μια σειρά μελετών έχουν προκύψει σοβαρές ενδείξεις για την πιθανή εμπλοκή συνοδών μορίων όπως η Hsp70 στην παθογένεση της νόσου PD (Broadley and Hartl 2009; Bandopadhyay and de Bellerocche 2010; Witt 2010), ενώ επιπλέον έχει παρατηρηθεί μια εκτεταμένη απορρύθμιση στην έκφραση των διαφορετικών μελών της οικογένειας των HSPs στην περιοχή SNpc του εγκεφάλου, στην οποία συμβαίνει επιλεκτικά η νευροεκφύλιση (Grunblatt, Mandel et al. 2001; Hauser, Li et al. 2005).

**Πίνακας 7.** Στον πίνακα συμπεριλαμβάνονται οι πρωτεΐνες που προέκυψαν μετά την ανάλυση με φασματομετρία μάζας (mass spectrometry-MS) και αντιστοιχούν στη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης με μοριακό βάρος εύρους 103 έως 74 kDa.

Δείγμα	Κωδικός πρωτεΐνης	Όνομα πρωτεΐνης	kDa
1	P12814 (+1)	Alpha-actinin-1	103
2	B4DYH1(+3)	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	97
3	Q4W4Y1(+1)	Dopamine receptor interacting protein 4	96
4	<b>B3KU28</b>	<b>Lon protease homolog</b>	<b>95</b>
5	P13591 (+3)	Neural cell adhesion molecule 1	95
6	B4DH02 (+1)	cDNA FLJ50510, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 4	94
7	B7Z4B2 (+2)	cDNA FLJ56108, highly similar to Puromycin-sensitive aminopeptidase (EC 3.4.11.-)	93
8	P14625 (+1)	Endoplasmin	92
9	Q53FR4	Vacuolar protein sorting 35 variant (Fragment)	92
10	Q58F09	Glucosidase I	92
11	A2A274 (+1)	Aconitase 2 mitochondrial	88
12	P47897 (+1)	Glutaminyl-tRNA synthetase	88
13	P05556	Integrin beta-1	88

14	B3KQF0 (+1)	cDNA FLJ90354 fis, clone NT2RP2003390, highly similar to Translocation protein SEC63 homolog	88
15	P07900	Heat shock protein HSP 90-alpha	85
16	P08238	Heat shock protein HSP 90-beta	83
17	Q16891-2	Isoform 2 of Mitochondrial inner membrane protein	83
18	Q96RP9	Elongation factor G, mitochondrial	83
19	B4DR68 (+3)	cDNA FLJ58608, highly similar to Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	74

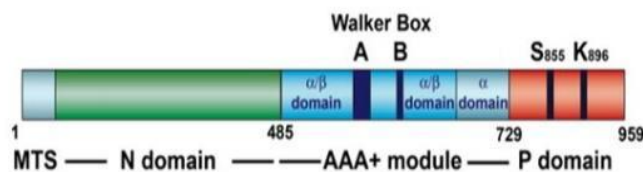
Μεταξύ των πρωτεϊνών ανιχνεύθηκε και η μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1. Η LonP1 ανήκει στην οικογένεια πρωτεασών σερίνης και είναι μέρος του μηχανισμού ποιοτικού ελέγχου εντός της μιτοχονδριακής μήτρας, συμμετέχει δηλαδή στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβη, με παρόμοια λειτουργία με αυτή του πρωτεασώματος στο κυτταρόπλασμα (Ngo and Davies 2007). Είναι η μόνη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη που συμμετέχει στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών εντός του μιτοχονδρίου, ενώ η μείωση της έκφρασής και της δραστηριότητάς της έχει επιβεβαιωθεί σε γερασμένους ποντικούς (Bota, Van Remmen et al. 2002). Επιπλέον η μειωρύθμιση της LonP1 συνεισφέρει στην πρόοδο της γήρανσης. Έχοντας ως γνώμονα όλα τα παραπάνω και λαμβάνοντας υπόψη μια πρόσφατη μελέτη η οποία συνέδεε την απορρύθμιση της LonP1 με ασθένειες που παρουσιάζουν μιτοχονδριακή διαταραχή (Felk, Ohrt et al. 2010), αποφασίσαμε την περαιτέρω μελέτη. Με ανοσοαποτύπωση κατά Western, στα ίδια μιτοχονδριακά εκχυλίσματα που περιγράφηκαν παραπάνω επιβεβαιώθηκε η αύξηση των επιπέδων της LonP1 παρουσία της rotenone, η οποία γίνεται πιο εμφανής στη συγκέντρωση αναστολέα 500nM, Εικόνα 42B.

#### **Δ.Β.2 Η φυσιολογική λειτουργία της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1**

Η μιτοχονδριακή Lon πρωτεΐνη κωδικοποιείται από ένα πυρηνικό χρωμοσωμικό γονίδιο, μεταφράζεται στο κυτταρόπλασμα και σαν πρόδρομο πολυπεπίδιο το οποίο φέρει στο αμινοτελικό άκρο την μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχο (mitochondrial targeting sequence - MTS) εισέρχεται στα μιτοχόνδρια. Αυτή η αλληλουχία κατευθύνει το πρόδρομο πολυπεπίδιο διαμέσου της μιτοχονδριακής εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης στη μιτοχονδριακή μήτρα όπου εν συνεχεία η αλληλουχία στόχος διασπάται με αποτέλεσμα την ώριμη επεξεργασμένη πρωτεΐνη η οποία σχηματίζει ένα λειτουργικό

εξαμερές σύμπλοκο. Η κάθε υπομονάδα του συμπλόκου περιέχει τρεις λειτουργικές περιοχές:

1. Το αμινοτελικό άκρο (N-terminal domain - N-domain) το οποίο εμπλέκεται στην αναγνώριση και πρόσδεση του υποστρώματος, και εμφανίζει τον υψηλότερο βαθμό απόκλισης τόσο στη σύνθεση των αμινοξέων όσο και στο μήκος (Ebel, Skinner et al. 1999).
2. Την ενδιάμεση περιοχή ATP-άσης (ATPase domain ή AAA+ module) στο εσωτερικό της οποίας εντοπίζονται δύο μοτίβα Walker Box A και B τα οποία είναι υπεύθυνα για τη δέσμευση και υδρόλυση του ATP, ενώ είναι και υπεύθυνη περιοχή για την πρόσδεση στο mtDNA (Nomura, Kato et al. 2004).
3. Και το πεδίο πρωτεάσης (protease domain - P-domain) στο καρβοξυτελικό άκρο, περιέχει την πρωτεολυτική ενεργή θέση που σχηματίζεται από μια καταλυτική δυάδα σερίνης (S) – λυσίνης (K) και είναι αυτό που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη εξελικτική συντήρηση, και (Amerik, Antonov et al. 1991), Εικόνα 42.



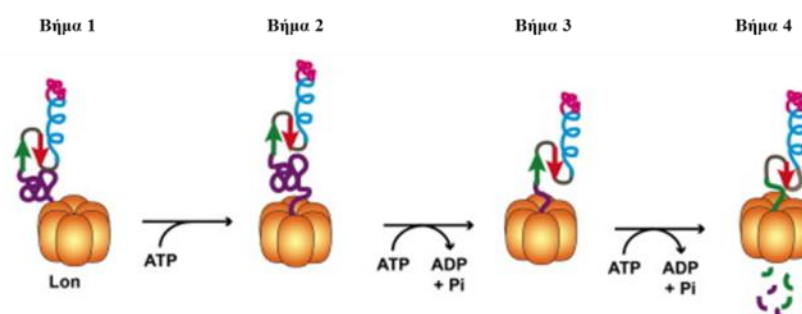
**Εικόνα 42. Σχηματική απεικόνιση των δομικών και λειτουργικών μοτίβων στην πρωτοταγή δομή της ανθρώπινης μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1.** Η μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχος MTS της πρόδρομης πρωτεΐνης προσδένεται στη μιτοχονδριακή μηχανή μετατόπισης της εξωτερικής μεμβράνης και μεσολαβεί στην εισαγωγή στη μιτοχονδριακή μήτρα. Η N περιοχή (N domain) στο αμινοτελικό άκρο, είναι εξαιρετικά μεταβλητή, μεσολαβεί στην αναγνώριση και πρόσδεση του υποστρώματος. Η περιοχή AAA<sup>+</sup>, η οποία αποτελείται από τις υποπεριοχές α/β (α/β domain) στις οποίες εντοπίζονται τα μοτίβα Walker Box A και B, υπεύθυνα για την πρόσδεση και την υδρόλυση του ATP. Επιπλέον περιέχει μια μικρή α υποπεριοχή (α domain). Η περιοχή P (P domain) στο καρβοξυτελικό άκρο, είναι η περιοχή με ενεργότητα πρωτεάσης. Περιέχει το πρωτεολυτικό ενεργό κέντρο που σχηματίζεται από μια καταλυτική δυάδα σερίνης (S) - λυσίνης (K). [Προσαρμογή και τροποποίηση από (Venkatesh, Lee et al. 2012)].

Επιπλέον περιέχει μια περιοχή μεταξύ των μοτίβων Walker Box A και B, την περιοχή SSD (sensor and substrate discrimination domain), που επίσης εμπλέκεται στην αναγνώριση των υποστρωμάτων (Smith, Baker et al. 1999) της πρωτεάσης. Επί της ουσίας η πρωτεάση LonP1 φέρει εντός της ίδιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας τόσο την ενεργότητα ATP-άσης όσο και την πρωτεολυτική δραστηριότητα.

### Δ.Β.2.1 Η σημασία τη πρωτεάσης LonP1 στο μηχανισμό ποιοτικού ελέγχου των μιτοχονδρίων

Η LonP1 συμμετέχει στην αποικοδόμηση των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στη μήτρα των μιτοχονδρίων εμποδίζοντας έτσι τη συσσώρευσή τους, μια ιδιότητα που είναι πολύ σημαντική τόσο για τη μιτοχονδριακή λειτουργία όσο και για την ομοιόσταση του κυττάρου. Εντούτοις, παρότι η Lon μπορεί να αποικοδομήσει πρωτεΐνες που έχουν υποστεί οξειδωτική βλάβη, η ίδια είναι ευάλωτη σε οξειδωτική απενεργοποίηση. Πέραν του ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών, η εξαρτώμενη από τη LonP1 αποικοδόμηση επίσης συνεισφέρει στη ρύθμιση μονοπατιών στα μιτοχόνδρια μέσω του τερματισμού της δραστηριότητας ειδικών πρωτεϊνών ή ρυθμίζοντας την δραστηριότητα πρωτεϊνικών συμπλόκων μέσω της επιλεκτικής αποικοδόμησης υπομονάδων τους.

Ο μηχανισμός αναγνώρισης των προς αποικοδόμηση υποστρωμάτων της δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος, αλλά κατά προσέγγιση η διαδικασία αποικοδόμησης αυτών περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα, Εικόνα 43.



Εικόνα 43. Σχηματική απεικόνιση της αναγνώρισης και αποικοδόμησης των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων από την πρωτεάση Lon. **Βήμα 1**, αναγνώριση και πρόσδεση του υποστρώματος. **Βήμα 2**, ξεδίπλωμα των δομημένων υποστρωμάτων από τις περιοχές AAA+ του εξαμερούς ολοενζύμου, η διαδικασία αυτή απαιτεί την πρόσδεση και υδρόλυση του ATP. Για υποστρώματα που δεν έχουν δευτεροταγή δομή το βήμα αυτό παρακάμπτεται. **Βήμα 3**, μετατόπιση της ξετυλιγμένης μορφής του υποστρώματος στο εσωτερικό του εξαμερούς όπου βρίσκεται το κέντρο αποικοδόμησης. Το βήμα αυτό επίσης απαιτεί πρόσδεση και υδρόλυση ATP. **Βήμα 4**, πρωτεόλυση διάσπαση δηλαδή των πεπτιδικών δεσμών και απελευθέρωση μικρών πεπτιδίων. [Προσαρμογή και τροποποίηση από (Venkatesh, Lee et al. 2012)].

Ένα από τα πιο γνωστά υποστρώματα της LonP1 είναι η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη Aconitase, η οποία είναι ευπαθής σε οξειδωτική αδρανοποίηση και συσσώρευση σε πολλές διαταραχές σχετιζόμενες με τη γήρανση. Η LonP1 επιλεκτικά αναγνωρίζει και αποικοδομεί την οξειδωμένη μορφή μετά από αναγνώριση της υδρόφοβης μορφής που προκύπτει από την οξειδωτική τροποποίηση. Με αυτόν τον τρόπο εμποδίζει την

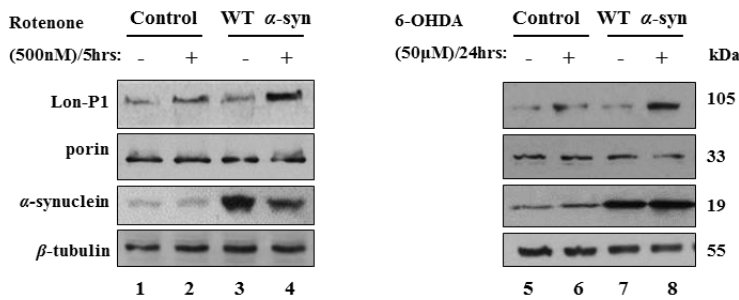
εκτεταμένη οξειδωση και συσώρευση, που θα έθετε σε κίνδυνο τη μιτοχονδριακή λειτουργία και την κυτταρική βιωσιμότητα. Η Aconitase αποτελεί ένα από τα πολλά πιθανά υποστρώματα της LonP1 στη μιτοχονδριακή μήτρα που αποικοδομούνται επιλεκτικά από την πρωτεάση μετά από οξειδωτική τροποποίηση (Bota, Van Remmen et al. 2002). Ένα άλλο υποστρώματα, πολύ σημαντικό για τη φυσιολογική μιτοχονδριακή λειτουργία, είναι ο μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A (TFAM). Η αποσιώπηση της LonP1 πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της TFAM πρωτεΐνης καθώς και αύξηση στον αριθμό αντιγράφων του mtDNA, ενώ αντίθετα η υπερέκφραση της μειώνει τα επίπεδα TFAM καθώς και τον αριθμό αντιγράφων του mtDNA (Matsushima, Goto et al. 2010). Επιπλέον η αποσιώπηση της LonP1 οδηγεί σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα B2 (transcription factor B2 of mitochondria - TFB2M), υποδηλώνοντας ότι μπορεί επίσης να αποτελεί υπόστρωμα της Lon. Σε συνθήκες υποξίας, η LonP1 συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση του ολοενζύμου COX μέσω της αποικοδόμησης της υπομονάδας Cox4-1 (Fukuda, Zhang et al. 2007). Συγκεκριμένα όταν η διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι χαμηλή, ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α (hypoxia-inducible transcription factor HIF-1α) προσδένεται στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (hypoxia response elements - HRE) στον υποκινητή του γονιδίου της LonP1 οδηγώντας σε αυξορρύθμιση της LonP1 και αποικοδόμηση της υπομονάδας Cox4-1. Την ίδια στιγμή ο HIF-1α οδηγεί στην αυξορρύθμιση μιας εναλλακτικής ισομορφής της Cox4-2, η οποία συναρμολογείται στο σύμπλοκο COX προς αντικατάσταση της υπομονάδας Cox4-1. Τα σύμπλοκα που περιέχουν την υπομονάδα Cox4-2 αποδείχτηκε ότι έχουν βέλτιστη μεταφορά ηλεκτρονίων και κατά συνέπεια αύξηση της αποτελεσματικότητας της αναπνοής σε συνθήκες υποξίας (Bota and Davies 2001; Hori, Ichinoda et al. 2002; Fukuda, Zhang et al. 2007). Η ιδιότητα αυτή υποδηλώνει ότι η LonP1 πρωτεάση μπορεί να έχει και ρόλο μορίου συνοδού (chaperone-like function) που καθορίζει τη συναρμολόγηση και αποσυναρμολόγηση πρωτεϊνών.

### **Δ.Β.3 Η απορρύθμιση της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 επιβεβαιώνεται και σε συνθήκες σχηματισμού εγκλείστων $\alpha$ -synuclein με τη χρήση των αναστολέων rotenone και 6-OHDA**

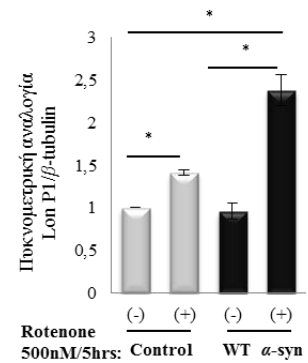
Στη συνέχεια σχεδιάστηκαν επιπλέον πειράματα επιβεβαίωσης. Έγινε διαμόλυνση των SH-SY5Y κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς που εξέφραζαν την αγρίου τύπου  $\alpha$ -

synuclein (WT  $\alpha$ -syn) και ακολούθως εφαρμογή stress με δύο διαφορετικούς αναστολείς της μιτοχondριακής λειτουργίας, τις νευροτοξίνες rotenone και 6-OHDA στις συγκεντρώσεις 500nM/5hrs και 50μM/24hrs αντίστοιχα. Στα πειράματα αυτά επιβεβαιώθηκε η αυξητική τάση έκφρασης της LonP1 παρουσία των αναστολέων, Εικόνα 29B (διαδρομές 2 και 6) συγκριτικά με την καλλιέργεια ελέγχου, Εικόνα 44A (διαδρομές 1 και 5), ενώ γεγονός είναι ότι η αύξηση των επιπέδων γίνεται πιο έντονη όταν συνοδεύεται από υπερέκφραση της WT  $\alpha$ -syn, Εικόνα 44A (διαδρομές 4 και 8). Στο σημείο αυτό να τονίσουμε ότι η υπερέκφραση της WT  $\alpha$ -syn απουσία του αναστολέα δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεάσης LonP1 σε πρωτεϊνικό επίπεδο, Εικόνα 44A (διαδρομές 3 και 7). Η ποσοτικοποίηση αυτών των πειραμάτων επιβεβαίωσε ότι η χρήση των αναστολέων προκαλεί αύξηση από το επίπεδο 1 στο 1.5, ενώ η συνεργατική δράση των αναστολέων και της υπερέκφρασης της  $\alpha$ -synuclein οδηγεί σε αύξηση στο 2.5, Εικόνα 44B.

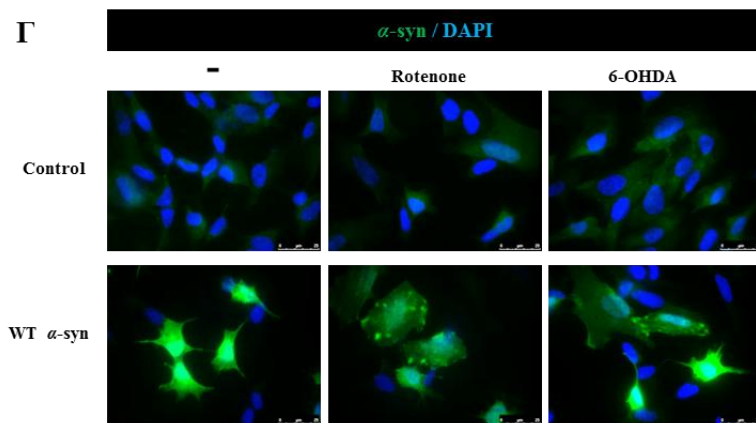
**A**



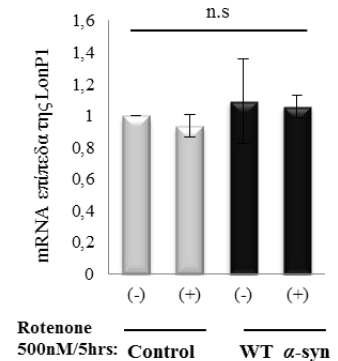
**B**



**Γ**



**Δ**



Εικόνα 44. Η υπερέκφραση της  $\alpha$ -synuclein σε συνδυασμό με την αναστολή της λειτουργίας του συμπλόκου I της μιτοχondριακής αναπνευστικής αλυσίδας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της μιτοχondριακής πρωτεάσης LonP1 και το σχηματισμό κυτταροπλασματικών εγκλείστων  $\alpha$ -synuclein.



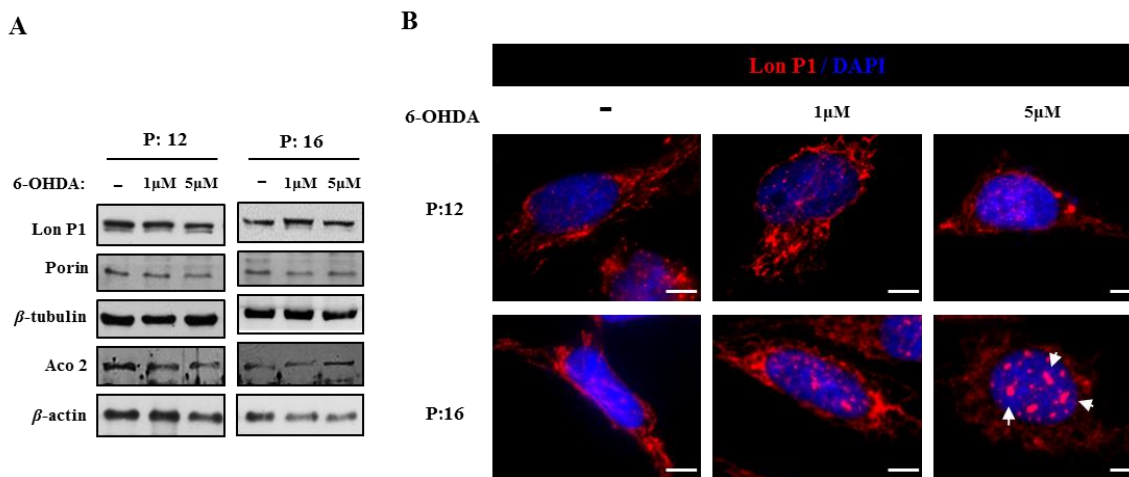
**A.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνονται οι μεταβολές στην έκφραση της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης LonP1, κατά την υπερέκφραση της WT  $\alpha$ -syn, παρουσία η απουσία rotenone (500nM/5hrs) και 6-OHDA (50μM/24hrs). Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -tubulin, ενώ ως μιτοχονδριακός δείκτης ισοφόρτωσης η πρωτεΐνη porin. **B.** Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της LonP1 με το πρόγραμμα Quantity One, έναντι της έκφρασης της  $\beta$ -tubulin. Στατιστική επεξεργασία με one way ANOVA (\*P < 0,05, n=4). **Γ.** Ενδεικτική εικόνα ανοσοφθορισμού με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της  $\alpha$ -synuclein. Η υπερέκφραση της WT  $\alpha$ -syn παρουσία rotenone (500nM/5hrs) και 6-OHDA (50μM/24hrs) συνοδεύεται από την εμφάνιση εγκλείστων  $\alpha$ -synuclein. Η καλλιέργεια ελέγχου αναφέρεται ως control (-). Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. (Φακός 100x, κλίμακα 25μm, n=4) **Δ.** Διαγραμματική απεικόνιση των σχετικών επιπέδων mRNA του γονιδίου LonP1 στις παραπάνω συνθήκες. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ποσοτικής PCR (Q-PCR). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το SRP14 και ως δείγμα αναφοράς το Control (-) (n.s. P > 0,05, n=3).

Επιπλέον, η υπερέκφραση της  $\alpha$ -synuclein σε συνδυασμό με την αναστολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό εγκλείστων  $\alpha$ -synuclein στο εσωτερικό των κυττάρων, ένα χαρακτηριστικό που οφείλεται επίσης στη συνεργατική δράση των δύο παραγόντων, μιας και μόνο η υπερέκφραση της  $\alpha$ -synuclein δεν αποτελεί ικανό παράγοντα για το σχηματισμό των εγκλείστων, Εικόνα 44Γ. Ο σχηματισμός των εγκλείστων της  $\alpha$ -synuclein αποτελεί το πιο σημαντικό παθολογικό χαρακτηριστικό της νόσου του Parkinson. Τέλος στις παραπάνω συνθήκες ελέγχθηκαν τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης LonP1 και δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή σε μεταγραφικό επίπεδο, Εικόνα 44Δ.

#### **Δ.Β.4 Έλεγχος της συμπεριφοράς της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης LonP1 στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA**

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης για την έκφραση της πρωτεΐνης LonP1. Αρχικά με πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά western ελέγχθηκε εάν επηρεάζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης. Σε αντίθεση με την αύξηση που παρατηρήθηκε στην οξεία κατάσταση stress (Εικόνα 42 και 44), διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης παραμένουν σταθερά και στα δύο σημεία αναφοράς, δηλαδή στις γενιές P:12 και P:16 παρουσία της τοξίνης 6-OHDA (1μM και 5μM), Εικόνα 46Α. επιπλέον ο έλεγχος της πρωτεΐνης Aconitase 2, ως γνωστό υπόστρωμα της LonP1, δεν αποκάλυψε κάποια μεταβολή, γεγονός που σημαίνει ότι η κατάσταση χρόνιου stress δεν έχει επηρεάσει την ικανότητα πρωτεΐνης της LonP1. Ως δείκτης της μιτοχονδριακής μάζας χρησιμοποιήθηκε η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη porin. Ωστόσο, πειράματα ανοσοφθορισμού έναντι της LonP1 αποκάλυψαν μια έντονη μετατόπιση της πρωτεΐνης

στον πυρήνα, Εικόνα 45B. Η μετατόπιση αυτή είναι εμφανής στη γενιά P:16 τόσο στη συγκέντρωση 1μM, αλλά σαφώς πιο έντονη στα 5μM. Επομένως αφού τα συνολικά επίπεδα της πρωτεΐνης δεν μεταβάλλονται η μετατόπιση αυτή οδηγεί τελικά στο να απομείνουν μικρότερα επίπεδα στο κυτταρικό διαμέρισμα των μιτοχονδρίων και ένα μέρος αυτού να μετατοπιστεί στον πυρήνα.



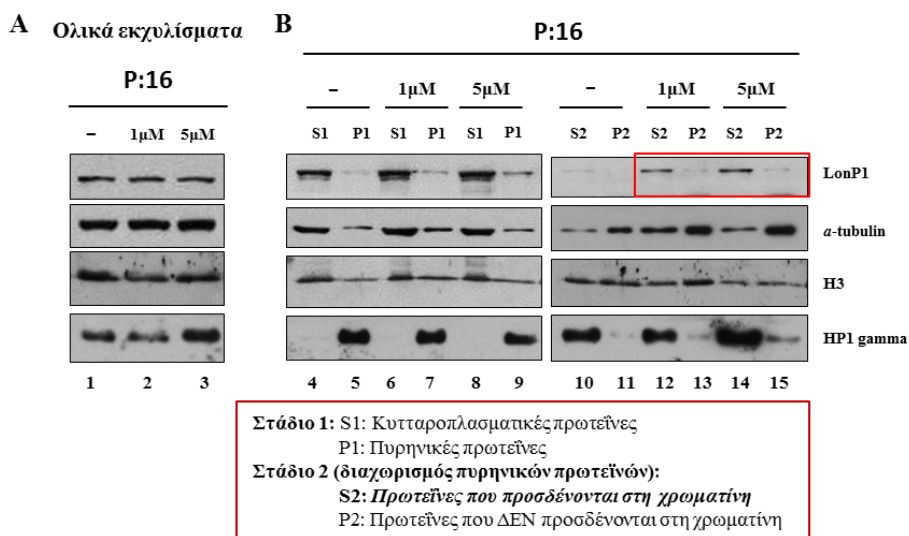
**Εικόνα 45.** Στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA παρατηρήθηκε έντονη μετατόπιση της LonP1 στον πυρήνα, παρότι τα συνολικά πρωτεϊνικά επίπεδα παραμένουν σταθερά. **A.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου δεν παρατηρούνται μεταβολές στην έκφραση της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA στα σημεία αναφοράς P:12 και P:16. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -tubulin, ενώ ως μιτοχονδριακός δείκτης ισοφόρτωσης η πρωτεΐνη porin. **B.** Ενδεικτική εικόνα ανοσοφθορισμού με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της LonP1 στα σημεία αναφοράς P:12 και P:16. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. (Φακός 100x, κλίμακα 50μm, Τεχνητό ζουμ 3x).

Συνοψίζοντας, στην οξεία και χρόνια κατάσταση stress παρατηρείται διαφορετικός τρόπος ρύθμισης στην έκφραση της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1. Στην οξεία κατάσταση, η απόκριση στο stress έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της LonP1. Αντιθέτως, στην χρόνια κατάσταση τα πρωτεϊνικά επίπεδα παραμένουν σταθερά, αλλά παρατηρείται ένα διαφορετικό πρότυπο κατανομής της πρωτεΐνης με έντονη μετατόπιση αυτής στον πυρήνα.

#### **Δ.Β.5 Ο εντοπισμός της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 στη χρωματίνη στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA.**

Η συμπεριφορά αυτή της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 προκάλεσε ιδιαίτερη αίσθηση. Ακολούθως ελέγξαμε εάν η μετατόπιση στον πυρήνα εστιάζεται στο πυρηνικό DNA, δηλαδή εάν η LonP1 αλληλεπιδρά με τη χρωματίνη ή εάν βρίσκεται απλά στο

πυρηνικό διαμέρισμα. Για το λόγο αυτό ακολουθήθηκε η απομόνωση πρωτεϊνικών κλασμάτων με την τεχνική απομόνωσης πρωτεϊνών που δεσμεύονται στη χρωματίνη - Chromatin Binding Assay (CBA) που περιγράφηκε στα Υλικά και Μέθοδοι Παράγραφος Γ.2.12, η οποία επιτρέπει την απομόνωση πρωτεϊνικών κλασμάτων που διαχωρίζουν τη χρωματίνη από τα υπόλοιπα συστατικά του πυρήνα. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται σε δύο στάδια. Στο 1<sup>ο</sup> στάδιο διαχωρίζονται οι κυτταροπλασματικές (S1) από τις πυρηνικές πρωτεΐνες (P1), Εικόνα 46 (διαδρομές 4 - 9). Ήδη από τον διαχωρισμό αυτό εντοπίζεται ένα τμήμα της πρωτεΐνης LonP1 στο εκχύλισμα που περιέχει τις πυρηνικές πρωτεΐνες (διαδρομές 5, 7 και 9). Στο 2<sup>ο</sup> στάδιο ακολουθεί ο διαχωρισμός των πυρηνικών πρωτεϊνών σε αυτές που είναι προσδεδεμένες στη χρωματίνη (S2) και σε αυτές που είναι ελεύθερες στον πυρήνα (P2). Ο έλεγχος αυτός πραγματοποιήθηκε στη γενιά P:16. Όπως διαπιστώθηκε η μετατόπιση της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 στον πυρήνα εντοπίζεται στο εκχύλισμα που αφορά τις πρωτεΐνες που προσδένονται στη χρωματίνη, Εικόνα 46 (διαδρομές 10, 12 και 14). Γεγονός είναι ότι η αλληλεπίδραση της LonP1 με τη χρωματίνη παρατηρείται σε πολύ μικρό βαθμό και στην καλλιέργεια ελέγχου (διαδρομή 10), που υποδηλώνει ότι αυτό μπορεί να είναι μια φυσιολογική αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης. Ωστόσο, η μετατόπιση στη χρωματίνη γίνεται πολύ πιο έντονη παρουσία της τοξίνης 6-OHDA, με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωσή της, αφού παρατηρείται αύξηση στη συγκέντρωση των 5μM συγκριτικά με τη συγκέντρωση 1μM, Εικόνα 46 (διαδρομές 12 και 14). Για την επιβεβαίωση της αξιοπιστίας της μεθόδου διαχωρισμού των πρωτεϊνών, και στα δύο στάδια, χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης μια πυρηνική πρωτεΐνη η οποία είναι γνωστό ότι προσδένεται στη χρωματίνη, η Heterochromatin protein 1 gamma (HP1 gamma). Πράγματι, η HP1 εντοπίζεται στο 1<sup>ο</sup> Στάδιο διαχωρισμού μόνο στο κλάσμα πρωτεϊνών που περιέχει τις πυρηνικές πρωτεΐνες (P1) και στο 2<sup>ο</sup> Στάδιο διαχωρισμού μόνον στο κλάσμα των πρωτεϊνών που προσδένονται στη χρωματίνη (S2).

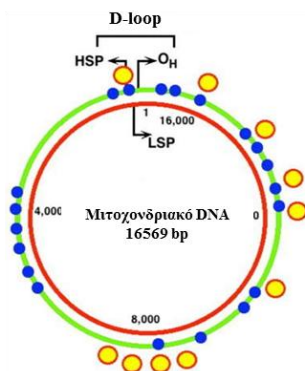


**Εικόνα 46. Η χρόνια έκθεση στη νευροτοξίνη 6-OHDA έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της μιτοχondριακής πρωτεάσης LonP1 στη χρωματίνη. A.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου δεν παρατηρούνται μεταβολές στην έκφραση της μιτοχondριακής πρωτεάσης LonP1 στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA στο σημείο αναφοράς P:16. **B.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου απεικονίζεται η έκφραση της LonP1 μετά από τη μέθοδο κλασμάτωσης πρωτεϊνών που προσδένονται στη χρωματίνη. Η LonP1 εντοπίζεται στο κλάσμα των πρωτεϊνών που προσδένονται στη χρωματίνη (διαδρομές 10, 12 και 14), με πιο έντονο εντοπισμό παρουσία της τοξίνης νευροτοξίνη 6-OHDA στις συγκεντρώσεις 1 μM και 5 μM (διαδρομές 12 και 14 αντίστοιχα). Ως δείκτης πρωτεΐνης που προσδέεται στη χρωματίνη χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη Heterochromatin protein 1 gamma (HP1 gamma). Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\alpha$ -tubulin, ενώ ως δείκτης ισοφόρτωσης χρωματίνης η πρωτεΐνη Ιστόνη 3 (Histone 3 – H3).

Η πρόσδεση της ATP-εξαρτώμενης Lon πρωτεάσης στο DNA, είναι μια εξελικτικά συντηρημένη ιδιότητα από τα βακτήρια (La, ομόλογο στα βακτήρια) στον άνθρωπο, γεγονός που υποδηλώνει ότι αποτελεί μια σημαντική ιδιότητα της πρωτεΐνης. Στα θηλαστικά, μέρος της πρωτεάσης που απαντάται στη μιτοχondριακή μήτρα εντοπίζεται στα μιτοχondριακά πυρηνοειδή (Cheng, Kanki et al. 2005; Kucej and Butow 2007; Bogenhagen, Rousseau et al. 2008) και αλληλεπιδρά με το mtDNA μέσω μιας ειδικής αλληλουχίας πρόσδεσης (Fu and Markovitz 1998; Liu, Lu et al. 2004; Lu, Yadav et al. 2007). Σε αντίθεση με τη βακτηριακή πρωτεάση, η οποία έχει την ικανότητα να προσδέεται σε δίκλωνο DNA (double-stranded DNA - dsDNA), στα θηλαστικά η Lon πρωτεάση αλληλεπιδρά με μονόκλωνο DNA (single-stranded DNA - ssDNA), μέσω της ειδικής αλληλουχία πρόσδεσης, σε περιοχές πλούσιες σε νουκλεοτιδικές βάσεις γουανίνης (G-rich) τόσο στο DNA όσο και στο RNA (Suzuki, Suda et al. 1994; Van Dyck, Pearce et al. 1994; Haynes, Yang et al. 2010). Η πρόσδεση της Lon στο mtDNA μπορεί άμεσα να

αναστέλλει ή να επάγει τις διαδικασίες αντιγραφής ή μεταγραφής. Συγκεκριμένα η Lon αποικοδομεί το μιτοχondριακό μεταγραφικό παράγοντα TFAM και ρυθμίζει με αυτόν τον τρόπο τον αριθμό αντιγράφων του mtDNA (Matsushima, Goto et al. 2010). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η Lon προσδένεται στο mtDNA σε αλληλουχίες που φέρουν τουλάχιστον 4 συνεχόμενα κατάλοιπα Γουανίνης που έχουν την τάση να σχηματίζουν τετραμερή που αποτελούνται από Γουανίνη - G-quadruplexes. Στο μιτοχondριακό γονιδίωμα κάθε ~150 νουκλεοτίδια στη βαριά αλυσίδα του mtDNA εντοπίζονται 4–6 γειτονικά κατάλοιπα γουανίνης που μπορεί δυναμικά να αλληλεπιδράσουν και να σχηματίσουν αυτές τις δομές (Chen, Suzuki et al. 2008).

Η σημασία των G-quadruplexes στο μιτοχondριακό γονιδίωμα δεν έχει μελετηθεί, ωστόσο G-quadruplexes έχουν εντοπιστεί στις περιοχές των υποκινητών πυρηνικών γονιδίων και λειτουργούν είτε προάγοντας είτε εμποδίζοντας τη μεταγραφή αυτών (Simonsson, Pecinka et al. 1998; Siddiqui-Jain, Grand et al. 2002). Στην εικόνα 48 εικονίζονται οι θέσεις στο μιτοχondριακό γονιδίωμα όπου εντοπίζονται συνολικά τα τετραμερή γουανίνης που σχηματίζουν τις δομές G-quadruplexes στο mtDNA, καθώς και οι θέσεις δέσμευσης της πρωτεΐνης LonP1, όπως αποδείχθηκε από *in vitro* πειράματα ανοσοκατακρήμνισης στο μιτοχondριακό DNA (Lu, Yadav et al. 2007). Επίπλέον, δομές G-quadruplexes έχουν ταυτοποιηθεί και στο γονιδίωμα της *Escherichia coli* στους υποκινητές γονιδίων που σχετίζονται με τη μεταγραφή, με τη βιοσύνθεση μεταβολιτών και τη μεταγωγή σήματος (Rawal, Kummarasetti et al. 2006).



**HSP:** (heavy-strand promoter): υποκινητής στην βαριά αλυσίδα  
**LSP:** (light strand promoter): υποκινητής στην ελαφριά αλυσίδα  
**OH:** (origin of heavy strand): θέση έναρξης της αντιγραφής στην βαριά αλυσίδα

- Θέσεις πρόσδεσης της Lon
- Προβλεπόμενες θέσεις σχηματισμού G-quadruplexes

**Εικόνα 47.** Οι σχετικές θέσεις στο mtDNA όπου εντοπίζονται τα G-quadruplexes και οι προβλεπόμενες θέσεις δέσμευσης της LonP1. Οι θέσεις των G-quadruplexes πάνω στη βαριά μιτοχondριακή αλυσίδα προσδιορίστηκαν με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής ανάλυσης Quadfinder Version 1 (<http://miracle.igib.res.in/quadfinder/>) (Chen, Suzuki et al. 2008) The mtDNA regions bound by Lon in cultured HeLa cells were determined by mtDNA immunoprecipitation (mIP) (Lu, Yadav et al. 2007). [Προσαρμογή και τροποποίηση από (Venkatesh, Lee et al. 2012)].

### Δ.Β.5.1 Η βιοπληροφορική ανάλυση της πρωτοταγούς αλληλουχίας της LonP1 αποκάλυψε μια πιθανή αλληλουχία NLS υπεύθυνη για τη μεταφορά της στον πυρήνα

Έχοντας ως δεδομένα, πρώτον την ικανότητα της πρωτεΐνης LonP1 να αλληλεπιδρά με το DNA και δεύτερον τον εντοπισμό στη συνθήκη χρόνιου stress στον πυρήνα και συγκεκριμένα στη χρωματίνη, και τρίτον η πληθώρα των G-quadruplex δομών στους υποκινητές πυρηνικών γονιδίων ελέγχθηκε εάν εντοπίζεται στην πρωτοταγή αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης αλληλουχία στόχος που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά της στον πυρήνα (Nuclear Localization Signal – NLS). Η ανάλυση της πρωτοταγούς αμινοξικής αλληλουχίας έγινε με το πρόγραμμα [http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi).

10	20	30	40	50	60	70
MAASTGYVRL	WGAARCWVLR	RPMLAAAGGR	VPTAAGAWLL	RGQRTCDASP	PWALWGRGPA	IGGQWRGE
80	90	100	110	120	130	140
ASSRGGGAFS	GGEDASEGGA	EEGAGGAGGS	AGAGEGPVIT	ALTPMTIPDV	FPHLPLIAIT	RNPVFRFIK
150	160	170	180	190	200	210
IIEVKNKKLV	ELLRRKVRLA	QPYVGVFLKR	DDSNESDVVE	SLDEIYHTGT	FAQIHEMQDL	GDKLRMIVMG
220	230	240	250	260	270	280
HRRVHISRQL	EVEPEEPEAE	NKHKFRRKSK	RGKKEAE	DEL	SARHPAELAM	EPTPELPAEV
290	300	310	320	330	340	350
EDFQVTEVVK	ALTAEIVKTI	RDIIALNPLY	RESVLQMMQA	GQRVVDNPIY	LSDMGAALTG	AESHELQDVL
360	370	380	390	400	410	420
EETNIPKRLY	KALSLLKKEF	ELSKLQQLG	REVEEKIKQT	HRKYLLQEQL	KIIKKELGLE	KDDKDAIEEK
430	440	450	460	470	480	490
FRERLKELVV	PKHVMDVVDE	ELSKLGLLDN	HSSEFNVTRN	YLDWLTSIPW	GKYSNENLDL	ARAQAVLEED
500	510	520	530	540	550	560
HYGMEDVKKR	ILEFIAVSQI	RGSTQGKILC	FYGPPGVGKT	SIARSARAL	NREYFRFSVG	GMTDVAEIKG
570	580	590	600	610	620	630
HRRTYVGAMP	GKIIQCLKKT	KTENPLILID	EVDKIGRGYQ	GDPSSALLEL	LDPEQANFL	DHYLDVVPDL
640	650	660	670	680	690	700
SKVLFICTAN	VTDTIPEPLR	DRMEMINVSG	YVAQEKLAI	ERYLVPQARA	LCGLDESKAK	LSSDVLTLII
710	720	730	740	750	760	770
KQYCRESGVR	NLQKQVEKVL	RKSAYKIVSG	EAESVEVTPE	NLQDFVGKPV	FTVERMYDVT	PPGVVMGLAW
780	790	800	810	820	830	840
TAMGGSTLFV	ETSL*RRPQDK	DAKGDKDGS	EVTGQLGEVM	KESARIAYTF	ARAFMQHAP	ANDYLVTSHI
850	860	870	880	890	900	910
HLHVPEGATP	KDGSAGCTI	VTALLSLAMG	RPVRQNLAMT	GEVSLTGKIL	PVGGIKE*TI	AAKRAGVTCI
920	930	940	950			
VLPANKKDF	YDLAAFITEG	LEVHFVEHYR	EIFDIAFPDE	QAEALAVER		

MTS: 1-67  
 N-domain: 124-484  
 AAA+ module: 485-729  
 P-domain: 730-949  
 Walker box A and B: 522-531 and 590-593  
 □: nucleotide binding region  
 \*: Active site forming the catalytic dyad  
 □: Predicted monopartite NLS

Εικόνα 48. Η πρωτοταγής αμινοξική αλληλουχία της ανθρώπινης μιτοχονδριακής πρωτεΐνης LonP1. Στις θέσεις αμινοξέων 1-67 εντοπίζεται η μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχος (Mitochondrial Target Sequence - MTS) η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά της εντός των μιτοχονδρίων. Η δομική περιοχή N-domain εντοπίζεται στις θέσεις 124-484 και είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και πρόσδεση του

υποστρώματος, η δομική περιοχή AAA+ module στις θέσεις Η περιοχή AAA+ module, στην οποία εντοπίζονται τα μοτίβα Walker Box A και B (στις θέσεις 522-531 και 590-593 αντίστοιχα), υπεύθυνη για την πρόσδεση και την υδρόλυση του ATP. Επιπλέον περιέχει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA μεταξύ των αμινοξέων 522-530. Η περιοχή P domain, εντοπίζεται στις θέσεις 730-949, περιέχει το πρωτεολυτικό ενεργό κέντρο που σχηματίζεται την καταλυτική διάδα σερίνης (S) - λυσίνης (K) στα κατάλοιπα 855 και 896 αντίστοιχα. Είναι η περιοχή με ενεργότητα πρωτεάσης. Στις θέσεις αμινοξέων 236-247 εντοπίζεται η πιθανή αλληλουχία στόχος που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά στον πυρήνα NLS (Nuclear Localization Signal).

Η ανάλυση αυτή οδήγησε στον εντοπισμό μιας αλληλουχίας NLS, που αποτελείται από 12 αμινοξέα, και εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης στις θέσεις αμινοξέων 236-247, Εικόνα 48. Η αλληλουχία NLS αποτελείται από τα αμινοξέα RRKSKRGGKKEAE. Το παραπάνω εύρημα δίνει μια εξήγηση για το πώς η μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1 εισέρχεται στον πυρήνα, κάτι το οποίο πρέπει να αποδειχθεί με στοχευμένα πειράματα.

Ακολούθησε συγκριτική ανάλυση μεταξύ διαφόρων ειδών, προκειμένου να ελεγχθεί εάν η αλληλουχία στόχος NLS είναι συντηρημένη μεταξύ των ειδών. Η συγκριτική ανάλυση έγινε μεταξύ των ειδών *Homo sapiens* (NP\_004784.2), *Gallus gallus* (XP\_001232112.3), *Xenopus tropicalis* (XP\_002938599.1), *Drosophila melanogaster* (NP\_649133.1) και *Saccharomyces cerevisiae* (NP\_009531.1) (Ομόλογη πρωτεΐνη PIM1) και αποκάλυψε ότι η αλληλουχία στόχος που πιθανά επιτρέπει την είσοδο της LonP1 στον πυρήνα, εντοπίζεται μόνο στο κοτόπουλο και απουσιάζει από τα παρακάτω εξελικτικά είδη, Εικόνα 49.

Saccharomyces	VVEDANNPEDQEST-----SPATPKLEDIVVERIPDSELQHHKRV-----ATEEES	
Drosophila	PIKSRSDPARKPRGRIPRSRTGKSRESAAAEELIQNTLEPPLKSGKVESSSLPKPPT	
Xenopus	----KGE GKKKRRN-----VVPKLT	
Homo	--ENKHKP <b>RRKSKR</b> -----GKKEAE	← NLS
Gallus	----KQKVRRKQKR-----PKKEAE	
	.	.
Saccharomyces	ELDDIQEG--EDINPTEFLKNYNVSLVNVNLNLEDEPFDRKSPVINALTSEILKVFKEISQ	
Drosophila	KIVEPETGAKENVNQSAPSAQ-PVLIVEVENVKQPIY-KQTEEVKALTQEI IKTLRDIIT	
Xenopus	EMEKLEQ---VLIDPSSPP---GVL MVEVDNVAHEDF-QNTEEVKALTAEIVKTIRDIIA	
Homo	EL SARHPA-ELAMEPTPELPA-EVLMVEVENVVHEDF-QVTEEVKALTAEIVKTIRDIIA	
Gallus	EPGAKEQAVEVLDPAASSQ-EVLMVEVENVVHEDF-QITEEVKALTAEIVKTIRDIIA	
	:	:: * : * * * : : . : : * * * * * : : *

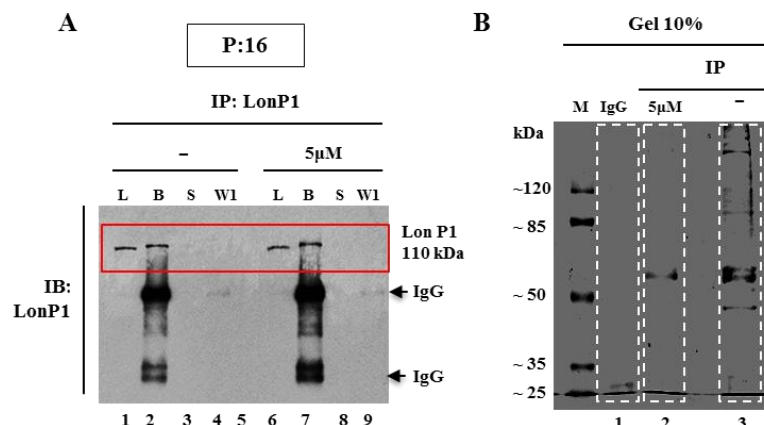
**Εικόνα 49.** Συγκριτική ανάλυση της ομολογίας της NLS αλληλουχίας μεταξύ των ειδών *Homo sapiens* (NP\_004784.2), *Gallus gallus* (XP\_001232112.3), *Xenopus tropicalis* (XP\_002938599.1), *Drosophila melanogaster* (NP\_649133.1) και *Saccharomyces cerevisiae* (NP\_009531.1).

Τα παραπάνω ευρήματα ενισχύουν την υπόθεση της μετακίνησης της LonP1 στον πυρήνα, μέσω της αλληλουχίας στόχου NLS που εντοπίστηκε. Εν κατακλείδι, φαίνεται ότι

οι λειτουργίες της πρωτεΐνης LonP1 δεν περιορίζονται μόνο στο κυτταρικό διαμέρισμα των μιτοχονδρίων, αλλά υπό συνθήκη stress έχει την ικανότητα να εισέρχεται στον πυρήνα, όπου αλληλεπιδρά με το πυρηνικό DNA, χωρίς ωστόσο να γνωρίζουμε συγκεκριμένα σε ποιες θέσεις προσδένεται στο DNA και με ποια γονίδια αλληλεπιδρά.

#### Δ.Β.6 Έλεγχος για πιθανά αλληλεπιδρώντα μόρια με τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1 στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA

Ο εντοπισμός της LonP1 στον πυρήνα δημιούργησε πολλά ερωτηματικά. Στην προσπάθεια μας να κατανοήσουμε την πιθανή λειτουργία της στον πυρήνα, καθώς και πιθανές αλληλεπιδράσεις με πυρηνικά σύμπλοκα πρωτεϊνών ή εμπλοκή στη μεταγραφή πυρηνικών γονιδίων, προχωρήσαμε σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης για τη LonP1 και ακολούθως ανάλυση με φασματομετρία μάζας (mass spectrometry - MS), προκειμένου να ανιχνευθούν τα αλληλεπιδρώντα μόρια που θα διαφωτίσουν το λόγο μετακίνησης, στη γενιά P:16. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν δύο συνθήκες η καλλιέργεια ελέγχου (control, -), δηλαδή καλλιέργεια κυττάρων SH-SY5Y για 16 συνεχόμενες γενιές χωρίς χρήση τοξίνης και καλλιέργεια SH-SY5Y κυττάρων παρουσία τοξίνης 6-OHDA στη συγκέντρωση 5μM στη γενιά P:16. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα στη γενιά P:16, με αντίσωμα έναντι της LonP1. Αρχικά, με πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά western επιβεβαιώθηκε η επιτυχία της ανοσοκατακρήμνισης, Εικόνα 50A (διαδρομές 2 και 7, καλλιέργεια ελέγχου (control, -) και 5μM P:16 αντίστοιχα). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση αυτών σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμιδίου (10%) και στη συνέχεια χρώση του πηκτώματος με διάλυμα χρωστικής Coomassie brilliant blue (συμβατό για MS). Απομονώθηκε το σύνολο της διαδρομής από την πηκτή, όπως εικονίζεται με τη λευκή διακεκομμένη γραμμή και ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων με φασματομετρία μάζας.



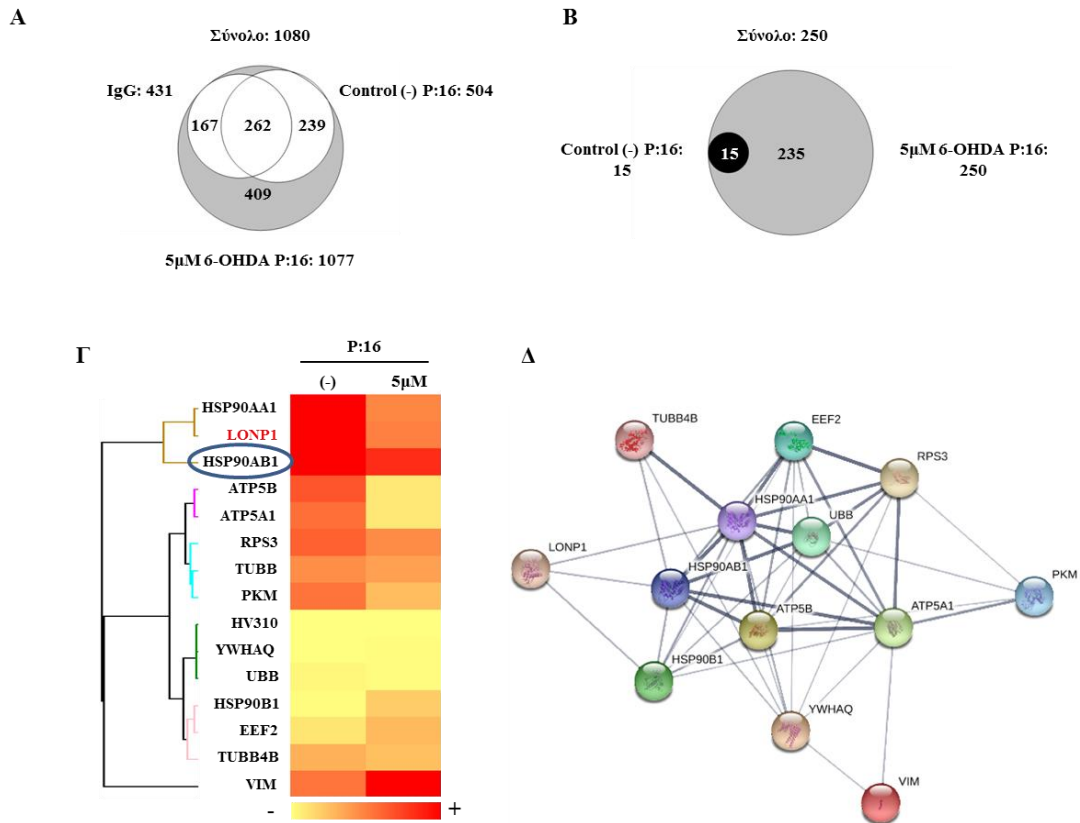


**Εικόνα 50. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη γενιά P:16 για τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1.** **A.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου επιβεβαιώνεται η επιτυχής ανοσοκατακρήμνιση της LonP1 στην καλλιέργεια ελέγχου control (-) και στη συνθήκη 5μM, στη γενιά P:16 (διαδρομές 2 και 7). Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο κυτταρικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα L-Loud, επιπλέον το υπερκείμενο S - Supernatant και η πρώτη πλύση W1- Wash 1 (Υλικά και Μέθοδοι, παράγραφος Γ.2.15). **B.** Απεικόνιση του πηκτώματος SDS – πολυακρυλαμιδίου (10%) μετά τη χρώση με Coomassie brilliant blue (συμβατό για MS) για τις τρεις διαφορετικές συνθήκες, σφαιρίδια πρωτεΐνης G - IgG, 5μM 6-OHDA P:16 και καλλιέργεια ελέγχου (-) P:16 αντίστοιχα. Απομόνωση του συνόλου της διαδρομής, όπως εικονίζεται με τη λευκή διακεκομμένη γραμμή (διαδρομές 1, 2 και 3). Η συνθήκη IgG χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου για την απομάκρυνση του θορύβου από τη χρήση των σφαιριδίων.

Τα δείγματα που στάλθηκαν για ανάλυση αντιστοιχούν στις συνθήκες: 1) σφαιρίδια πρωτεΐνης G - IgG, 2) 5μM 6-OHDA P:16 και 3) καλλιέργεια ελέγχου (-) P:16 αντίστοιχα, Εικόνα 50B (διαδρομές 1, 2 και 3). Η πειραματική αυτή διαδικασία πραγματοποιήθηκε τρεις φορές με τρία ανεξάρτητα κυτταρικά εκχυλίσματα στη γενιά P:16.

#### **Δ.Β.7 Ταυτοποίηση με Φασματομετρία μάζας (MS) των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη LonP1**

Η πρωτεωμική ανάλυση οδήγησε στην ταυτοποίηση και τη σχετική ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών που αποτελούν πιθανά αλληλεπιδρώντα μόρια με την LonP1. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε δείγματα από τρεις διαφορετικές πειραματικές επαναλήψεις (IgG, (-) και 5μM) και είχε ως αποτέλεσμα τη συνολική ταυτοποίηση 1080 πρωτεϊνών (431 στο δείγμα IgG, 504 στο δείγμα (-) και 1077 στο 5μM). Σχεδόν όλες οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα IgG και (-) ταυτοποιήθηκαν και στο δείγμα 5μM, με την προσθήκη 409 πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν μόνο στο δείγμα 5μM, Εικόνα 51A (Παράρτημα, Πίνακας 1). Από αυτό το σύνολο των πρωτεϊνών εμείς επιλέξαμε για περαιτέρω μελέτη μόνο τις πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν και στις τρεις βιολογικές επαναλήψεις στο κάθε δείγμα, προς αποφυγή των ψευδώς θετικά (false positives), Εικόνα 51B (Παράρτημα, Πίνακας 2).



**Εικόνα 51. Ταυτοποίηση των πιθανών αλληλεπιδρώντων μορίων με τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1.** **A.** Διαγραμματική αποτύπωση (venn diagram) του συνολικού αριθμού των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν σχετικά, στις τρεις διαφορετικές συνθήκες και το βαθμό κάλυψης μεταξύ των συνθηκών. Οι τρεις διαφορετικές συνθήκες αφορούν το δείγμα αρνητικού ελέγχου, που περιλαμβάνει μόνο τα σφαιρίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση (IgG), το δείγμα ανοσοκατακρήμνισης για την πρωτεάση LonP1 με πρωτεϊνικό εκχύλισμα καλλιέργειας κυττάρων SH-SY5Y γενιάς P:16 χωρίς επώαση με τοξίνη 6-OHDA, control (-) και το δείγμα ανοσοκατακρήμνισης για την πρωτεάση LonP1 με πρωτεϊνικό εκχύλισμα καλλιέργειας κυττάρων SH-SY5Y γενιάς P:16 με επώαση τοξίνης 6-OHDA σε συγκέντρωση 5µM. Συνολικά για τις τρεις συνθήκες ταυτοποιήθηκαν 1080 πρωτεΐνες. **B.** Διάγραμμα Venn που απεικονίζει τις 250 πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν, και στις τρεις βιολογικές επαναλήψεις, για τα δείγματα control (-) και 5µM στη γενιά P:16, και το βαθμό κάλυψης μεταξύ των δύο συνθηκών. Για το δείγμα control (-) ταυτοποιήθηκαν 15 πρωτεΐνες, ενώ για το δείγμα 5µM 250, με τις 15 από αυτές να είναι κοινές με το δείγμα control (-). **Γ.** Δενδρόγραμμα ιεραρχικής ομαδοποίησης με βάση την σχετική αφθονία των κοινών πρωτεϊνών και θερμική απεικόνιση της σχετικής τους αφθονίας στις δύο διαφορετικές συνθήκες control (-) και 5µM. **Δ.** Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κοινών πρωτεϊνών, κατά STRING. Η εικόνα συνοψίζει την απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων STRING μεταξύ των κοινών πρωτεϊνών στις δύο διαφορετικές συνθήκες control (-) και 5µM. Οι αλληλεπιδράσεις αποτυπώνονται με κυκλικά σημεία, τους κόμβους, και με ακμές ανάμεσα σε κόμβους που συνδέονται. Κάθε κόμβος αναπαριστά μία πρωτεΐνη.

Οι πρωτεΐνες που δεν επιλέχθηκαν θα είναι διαθέσιμες για μελλοντικές μελέτες. Στην παρούσα μελέτη, οι πρωτεΐνες που προτείνονται ως πιθανά αλληλεπιδρώντα μόρια με την LonP1 είναι 250, 15 ταυτοποιήθηκαν για το δείγμα (-) και 250 στο 5μM. Οι 15 από αυτές ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα (-) και 5μM, αποτελούν δηλαδή κοινές πρωτεΐνες, με επιπλέον 235 πρωτεΐνες μοναδικές για το δείγμα 5μM. Οι 15 κοινές πρωτεΐνες απεικονίζονται σε θερμικό χάρτη έπειτα από ιεραρχική ομαδοποίηση με βάση την σχετική τους αφθονία στα δείγματα (-) και 5μM, Εικόνα 51Γ. Στη συνέχεια διερευνήθηκε, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων STRING, το πιθανό δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κοινών πρωτεϊνών. Το δίκτυο αλληλεπιδράσεων αποκάλυψε ότι υπάρχει μια υψηλή ήδη γνωστή αλλά και προβλεπόμενη διαδραστικότητα μεταξύ αυτών, Εικόνα 51Δ.

#### **Δ.Β.8 Ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας για τα πιθανά αλληλεπιδρώντα μόρια με τη LonP1**

Ακολούθως, εφαρμόστηκε περαιτέρω ανάλυση των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών, που ταυτοποιήθηκαν και στις τρεις βιολογικές επαναλήψεις, χρησιμοποιώντας τα λογισμικά προγράμματα GO και KEGG PATHWAY analysis, εξετάζοντας τη συμμετοχή των πρωτεϊνών σε κατηγορίες Γενετικής Οντολογίας. Τα αποτελέσματα της πρωτεωμικής ανάλυσης ομαδοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τους αλγόριθμους της βάσης δεδομένων GO και KEGG PATHWAY analysis και σύμφωνα με το βαθμό εμπλουτισμού τους στα συμμετέχοντα μόρια. Σκοπός αυτής της ανάλυσης ήταν η αποσαφήνιση του πρωτεωμικού προφίλ των πιθανόν αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών. Η ανάλυση παρείχε πολύτιμες πληροφορίες για τις βιολογικές διαδικασίες, τα κυτταρικά διαμερίσματα και τη μοριακή λειτουργία στις οποίες η LonP1 μπορεί να εμπλέκεται, Εικόνα 52 (Παράρτημα, Πίνακες 1-5). Συγκεκριμένα, αποκάλυψε ένα σημαντικό εμπλουτισμό πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε βιολογικές διαδικασίες όπως: η μεταβολική διαδικασία mRNA, η μετάφραση, ο πρωτεϊνικός εντοπισμός και η στόχευση στη μεμβράνη, η μεταβολική διαδικασία, η γονιδιακή έκφραση, ο κυτταρικός κύκλος και πολλές άλλες, Εικόνα 52Α.

A

## GO: Εμπλουτισμός Βιολογικών διαδικασιών

#pathway ID	pathway description	Enrichment
GO.0016071	mRNA metabolic process	24,2
GO.0006412	translation	20,6
GO.0034613	cellular protein localization	19,2
GO.0033365	protein localization to organelle	18,3
GO.0006612	protein targeting to membrane	17,3
GO.0044238	primary metabolic process	17,1
GO.0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	16,9
GO.0010467	gene expression	13,7
GO.0007049	cell cycle	9,4
GO.0008152	metabolic process	8,8
GO.0006396	RNA processing	8,6
GO.0008380	RNA splicing	7,4
GO.0055114	oxidation-reduction process	6,3
GO.0034504	protein localization to nucleus	6,0
GO.0006457	protein folding	5,8
GO.0006950	response to stress	5,2
GO.0042254	ribosome biogenesis	4,6
GO.0046034	ATP metabolic process	4,4
GO.0006270	DNA replication initiation	4,3
GO.0071103	DNA conformation change	4,1
GO.0042770	signal transduction in response to DNA damage	3,7
GO.0016265	death	2,3
GO.0007005	mitochondrion organization	2,1
GO.0006915	apoptotic process	2,0
GO.0007399	nervous system development	1,4

Γ

## GO: Εμπλουτισμός Μοριακής Λειτουργίας

#pathway ID	pathway description	Enrichment
GO.0044822	poly(A) RNA binding	57,3
GO.0003723	RNA binding	53,4
GO.0000166	nucleotide binding	37,9
GO.0005524	ATP binding	25,4
GO.0003676	nucleic acid binding	24,5
GO.0004386	helicase activity	11,5
GO.0008135	translation factor activity, RNA binding	9,1
GO.0016787	hydrolase activity	8,7
GO.0003735	structural constituent of ribosome	8,5
GO.0016887	ATPase activity	8,4
GO.0003678	DNA helicase activity	7,6
GO.0005200	structural constituent of cytoskeleton	5,6
GO.0003729	mRNA binding	5,6
GO.0043566	structure-specific DNA binding	4,6
GO.0008092	cytoskeletal protein binding	4,5
GO.0031625	ubiquitin protein ligase binding	4,0
GO.0016874	ligase activity	2,2
GO.0019900	kinase binding	1,7

B

## GO: Εμπλουτισμός Κυτταρικών Διαμερισμάτων

#pathway ID	pathway description	Enrichment
GO.0070062	extracellular exosome	48,7
GO.0005829	cytosol	46,8
GO.0031982	vesicle	39,7
GO.0005576	extracellular region	28,7
GO.0005634	nucleus	18,3
GO.0022626	cytosolic ribosome	17,9
GO.0005654	nucleoplasm	16,5
GO.0016020	membrane	16,1
GO.0005840	ribosome	13,0
GO.0043226	organelle	12,1
GO.0005730	nucleolus	11,4
GO.0005739	mitochondrion	8,3
GO.0042470	melanosome	7,1
GO.0005681	spliceosomal complex	7,1
GO.0005694	chromosome	5,8
GO.0005856	cytoskeleton	5,1
GO.0042645	mitochondrial nucleoid	5,1
GO.0000228	nuclear chromosome	4,0
GO.0000785	chromatin	3,0
GO.0000502	proteasome complex	3,0

Δ

## KEGG: Εμπλουτισμός Μονοπατιών

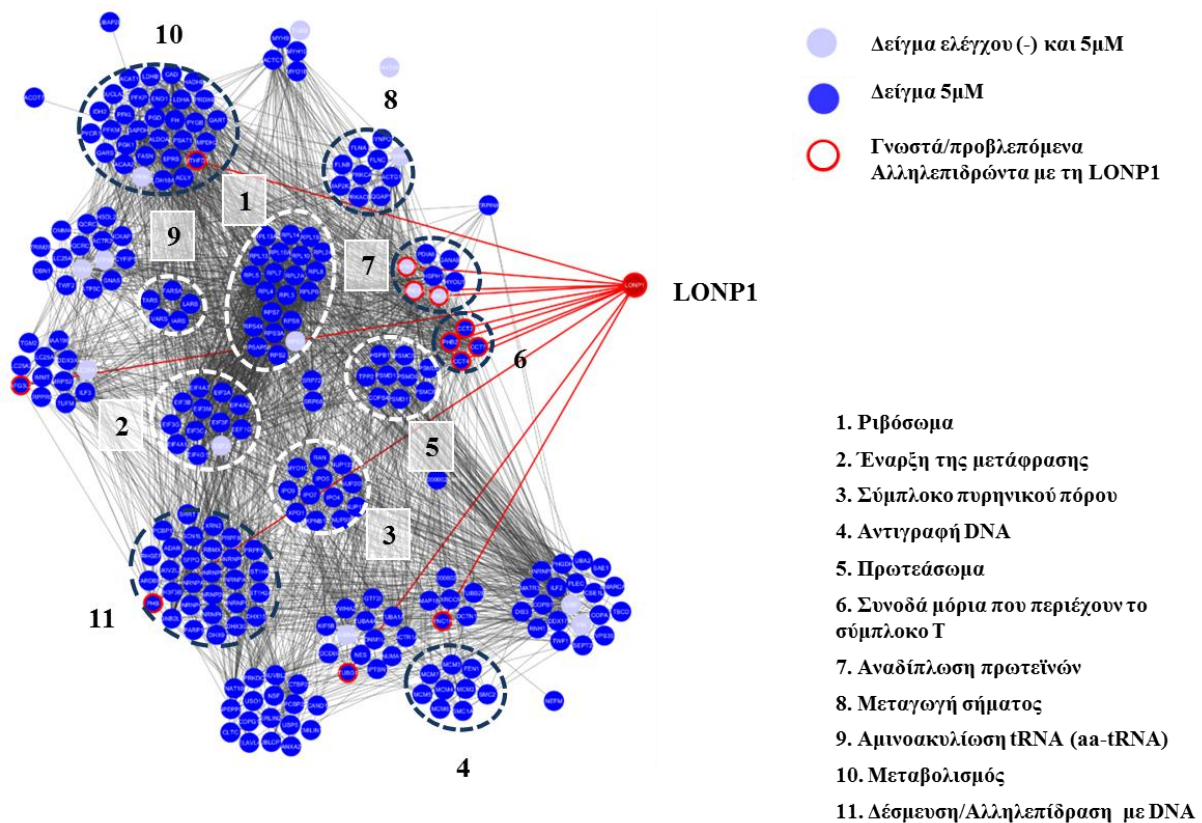
#pathway ID	pathway description	Enrichment
3010	Ribosome	15,0
1230	Biosynthesis of amino acids	8,5
3013	RNA transport	7,6
3030	DNA replication	5,1
3040	Spliceosome	4,9
1100	Metabolic pathways	4,8
10	Glycolysis / Gluconeogenesis	4,8
970	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	4,7
4110	Cell cycle	4,3
3050	Proteasome	3,6
5012	Parkinson's disease	3,1
4066	HIF-1 signaling pathway	1,8
4141	Protein processing in endoplasmic reticulum	1,5

Εικόνα 52. Διαγραμματική αποτύπωση της ανάλυσης Γονιδιακής Οντολογίας των πρωτεϊνών που είναι κοινές και στις τρεις βιολογικές επαναλήψεις μετά από ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων της πρωτεωμικής ανάλυσης με τη χρήση των αλγορίθμων της βάσης δεδομένων GO και KEGG PATHWAY και σύμφωνα με το βαθμό εμπλουτισμού τους στα συμμετέχοντα μόρια. Α. Ομαδοποίηση των πρωτεϊνών βάση της συμμετοχής τους σε Βιολογικές διαδικασίες κατά GO, Β. Κυτταρικά διαμερίσματα κατά GO, Γ. Μοριακή λειτουργία κατά GO και Δ. Μονοπάτια κατά KEGG.

Αναφορικά με τον εντοπισμό των πιθανών αλληλεπιδρώντων μορίων με τη LonP1, η ανάλυση είχε ως αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό πρωτεϊνών οι οποίες πιθανόν εντοπίζονται σε εξωκυτταρικά εξωσωμάτια, στο κυτταρόπλασμα, σε κυστίδια, στην εξωκυττάρια περιοχή, στον πυρήνα, στο ριβόσωμα και στη μεμβράνη, Εικόνα 52B. Η μοριακή λειτουργία των περισσότερων από τις πρωτεΐνες σχετίζεται με την πρόσδεση στο νουκλεϊκό οξύ συμπεριλαμβανομένου του RNA, του mRNA και του DNA, Εικόνα 52Γ. Η ανάλυση του μονοπατιού KEGG αποκάλυψε εμπλουτισμό σε ριβοσωμικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των αμινοξέων, τη μεταφορά RNA, την

αντιγραφή του DNA, το σωματίο συναρμογής (spliceosome), το μεταβολισμό, τον κυτταρικό κύκλο και το πρωτεάσωμα, Εικόνα 52Δ.

Για την καλύτερη κατανόηση των άμεσων και έμμεσων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ταυτοποιημένων αλληλεπιδρώντων, η συγκριτική πρωτεωμική ανάλυση εισήχθη στη βάση δεδομένων STRING, προκειμένου να οπτικοποιηθούν οι καταγεγραμμένες σε αυτή πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Έτσι, προέκυψε ένα δίκτυο γονιδιακών αλληλεπιδράσεων, που επιτρέπει, με μια ματιά, την απεικόνιση των πρωτεϊνικών συσχετίσεων με άλλα πρωτεϊνικά μόρια, το βαθμό ρύθμισης των συμμετεχόντων πρωτεϊνών και την ομαδοποίησή τους βάσει της συμμετοχής τους σε προβλεπόμενα λειτουργικά μονοπάτια, Εικόνα 53.



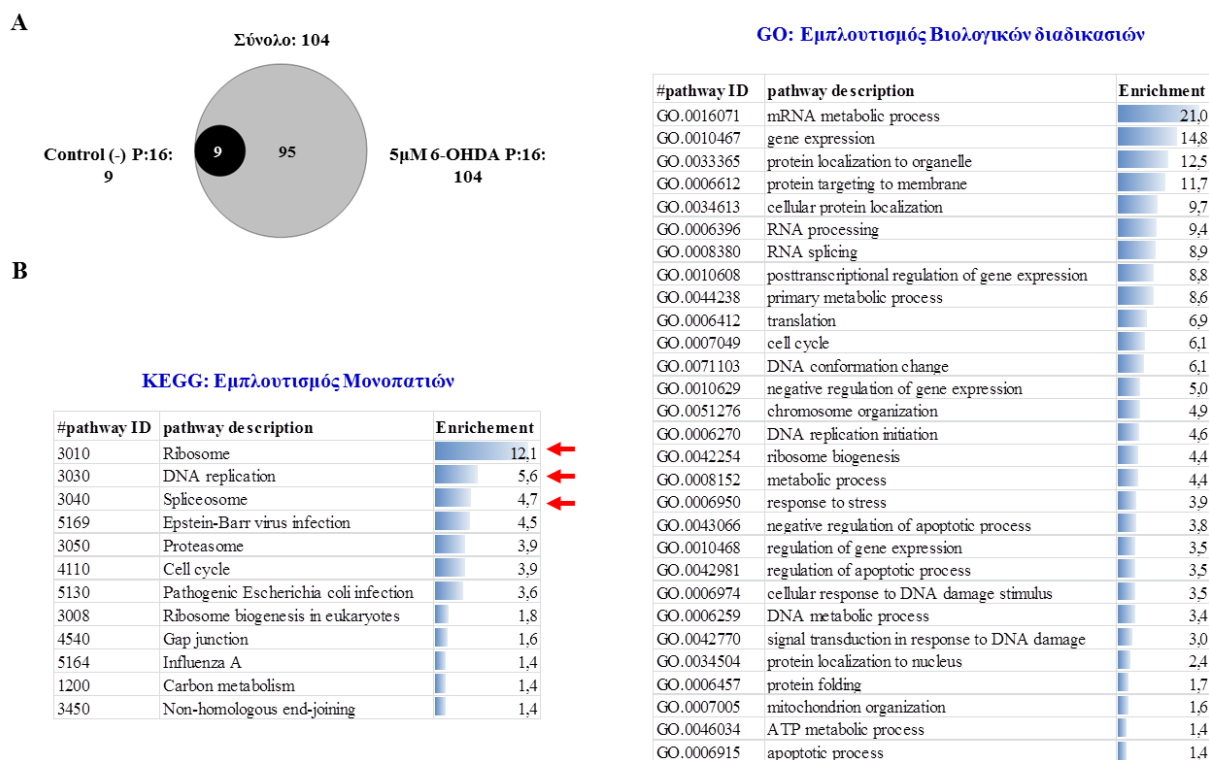
**Εικόνα 53.** Απεικόνιση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πιθανών αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών με τη LonP1 στις δύο διαφορετικές συνθήκες, control (-) και 5μM. Η εικόνα συνοψίζει την αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων STRING, μεταξύ των πρωτεϊνών στις δύο διαφορετικές συνθήκες του μοντέλου χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA, control (-) και 5μM (P:16), και την κατηγοριοποίησή τους σύμφωνα με τη συμμετοχή σε διάφορες βιολογικές διεργασίες (συστάδες πρωτεϊνών αριθμημένες σε ομάδες από το 1-11). Το γράφημα οπτικοποίησης αλληλεπιδράσεων αποτυπώνεται με κυκλικά σημεία για τους κόμβους και με τόξα ανάμεσα στους κόμβους που συνδέονται. Κάθε κόμβος

αναπαριστά μία πρωτεΐνη. Ο κόκκινος κόμβος αναπαριστά την πρωτεΐνη LonP1. Τα κόκκινα τόξα αναπαριστούν τις αλληλεπιδράσεις της LonP1 με 12 γνωστά ή προβλεπόμενα αλληλεπιδρώντα μόρια. Μερικοί κόμβοι συμμετέχουν σε πολλαπλές αλληλεπιδράσεις.

Η ομαδοποίηση των πρωτεϊνών, κατά GO και KEGG, αποκάλυψε ότι αναπτύχθηκαν ισχυρές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε ομάδες πρωτεϊνών όπως η μεταφραστική μηχανή συμπεριλαμβανομένου και του ριβοσώματος, το σύμπλοκο έναρξης της μετάφρασης, πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην αμινοακυλίωση του tRNA (aa-tRNA), πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρωτεόσταση (πρωτεάσωμα, αναδίπλωση πρωτεϊνών, συνοδά μόρια που περιέχουν το σύμπλοκο T), την πρόσδεση στο DNA (αντιγραφή του DNA και αλληλεπίδραση), το μεταβολισμό, τη μεταγωγή σήματος και τη μετακίνηση πρωτεϊνών/RNA στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα (σύμπλοκο πυρηνικού πόρου). Ως κύρια απόδειξη της παρούσας μελέτης, 12 γνωστά ή προβλεπόμενα αλληλεπιδρώντα με την LonP1 συμπεριλαμβάνονται στα αποτελέσματα. Αυτά είναι: PHB, PHB2, TUBG1, DYNC1H, AFG3L2, CCT4, CCT7, CCT2, HSP90B1, HSP90AA1, HSP90AB1 και MTHFD1.

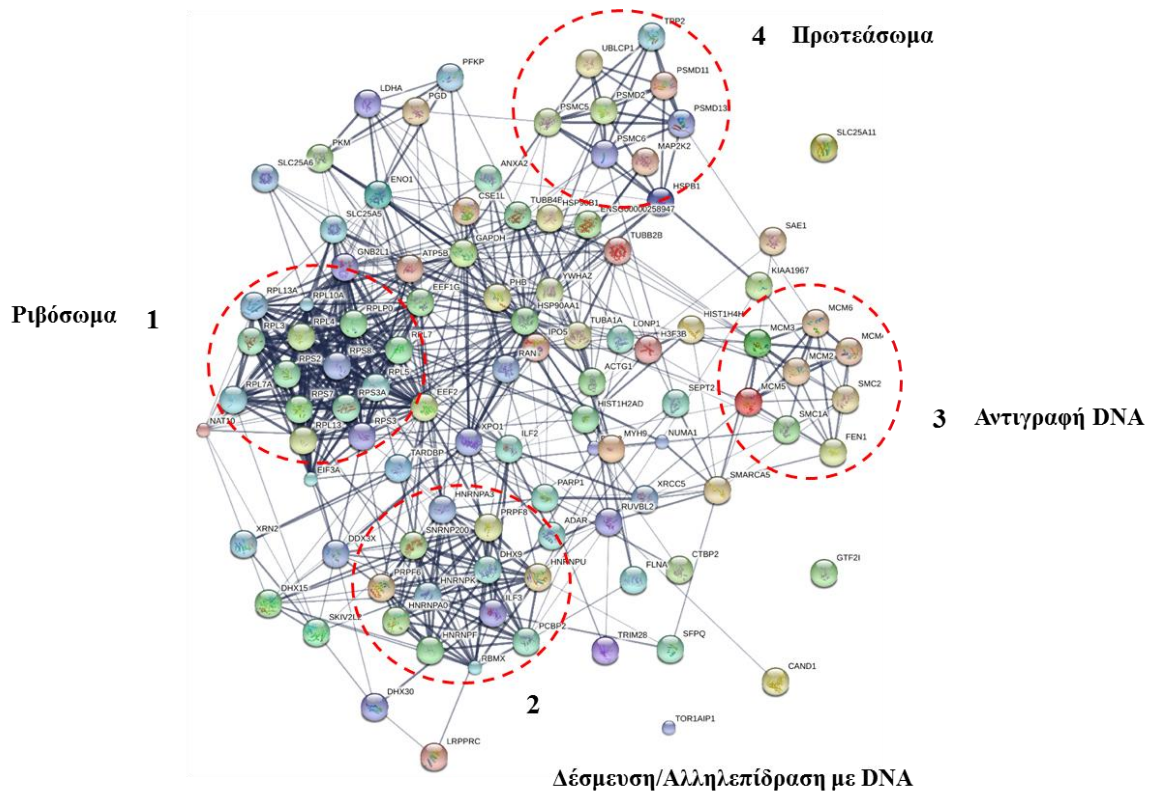
#### **Δ.Β.9 Ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας για τα πιθανά αλληλεπιδρώντα μόρια που εντοπίζονται στον πυρήνα**

Για την καλύτερη κατανόηση των άμεσων και έμμεσων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ταυτοποιημένων αλληλεπιδρώντων, που αφορούν όμως τον εντοπισμό της πρωτεάσης LonP1 στον πυρήνα, ακολούθησε συγκριτική πρωτεωμική ανάλυση μόνο για τις πυρηνικές πρωτεΐνες. Από αυτήν προέκυψε ένα σύνολο 104 πυρηνικών πρωτεϊνών από τις οποίες οι 9 είναι κοινές μεταξύ των δύο συνθηκών, control (-) και 5μM, και οι 95 αφορούν μόνο τη χρόνια συνθήκη stress, δηλαδή το δείγμα 5μM, Εικόνα 54Α.



**Εικόνα 54. Ταυτοποίηση των πιθανών αλληλεπιδρώντων μορίων με τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1 που εντοπίζονται στο κυτταρικό διαμέρισμα του πυρήνα. Α.** Διάγραμμα Venn που απεικονίζει τις 104 πυρηνικές πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν, και στις τρεις βιολογικές επαναλήψεις, για τα δείγματα control (-) και 5μM στη γενιά P:16, και το βαθμό κάλυψης μεταξύ των δύο συνθηκών. Για το δείγμα control (-) ταυτοποιήθηκαν 9 πρωτεΐνες, ενώ για το δείγμα 5μM 104, με τις 9 από αυτές να είναι κοινές με το δείγμα control (-). **Β.** Διαγραμματική αποτύπωση της ανάλυσης Γονιδιακής Οντολογίας των πυρηνικών πρωτεϊνών που είναι κοινές και στις τρεις βιολογικές επαναλήψεις μετά από ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων της πρωτεωμικής ανάλυσης με τη χρήση των αλγορίθμων της βάσης δεδομένων GO και KEGG PATHWAY και σύμφωνα με το βαθμό εμπλουτισμού. Ομαδοποίηση των πρωτεϊνών βάση της συμμετοχής τους σε μονοπάτια κατά KEGG και σε Βιολογικές διαδικασίες κατά GO.

Η ανάλυση, με τη χρήση των αλγορίθμων της βάσης δεδομένων GO και KEGG PATHWAY analysis, παρείχε σημαντικές πληροφορίες για το βαθμό εμπλουτισμού των πρωτεϊνών σε βιολογικές διαδικασίες όπως: η μεταβολική διαδικασία mRNA, η γονιδιακή έκφραση ο πρωτεϊνικός εντοπισμός και η στόχευση στη μεμβράνη, η μετάφραση, η μεταβολική διαδικασία, η μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, ο κυτταρικός κύκλος και πολλές άλλες, Εικόνα 54B.βστη συνέχεια διερευνήθηκε σύμφωνα με τη βάση δεδομένων STRING το πιθανό δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πυρηνικών πρωτεϊνών, προκειμένου να οπτικοποιηθούν οι καταγεγραμμένες σε αυτή πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, Εικόνα 55.



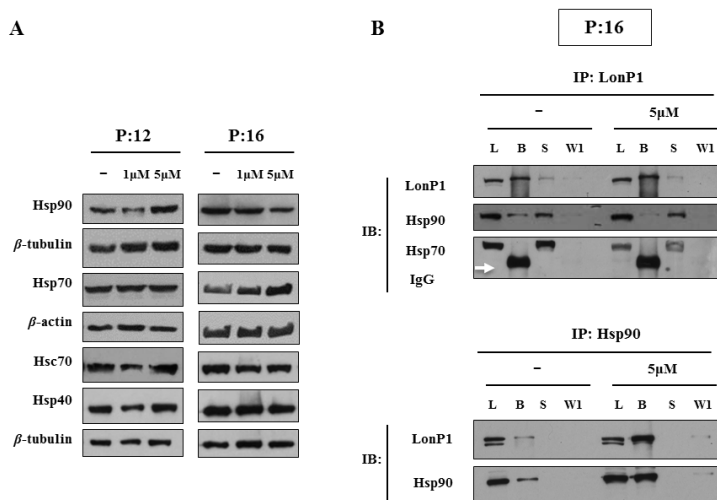
**Εικόνα 55. Απεικόνιση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πυρηνικών πρωτεϊνών κατά STRING.** Η εικόνα συνοψίζει τη σύμφωνα με τη βάση δεδομένων STRING απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πυρηνικών πρωτεϊνών. Οι αλληλεπιδράσεις αποτυπώνονται με κυκλικά σημεία, τους κόμβους, και με ακμές ανάμεσα σε κόμβους που συνδέονται. Κάθε κόμβος αναπαριστά μία πρωτεΐνη. Στο γράφημα οπτικοποίησης η ομαδοποίηση των πρωτεϊνών, κατά GO και KEGG, σύμφωνα με τη συμμετοχή σε διάφορες βιολογικές διεργασίες αποκάλυψε ισχυρές με οικογένειες πρωτεϊνών (συστάδες 1-4) που σχετίζονται με 1: το ριβόσωμα, 2: Δέσμευση/Αλληλεπίδραση με DNA, 3: Αντιγραφή DNA και 4: Πρωτεάσωμα.

Η ομαδοποίηση των πρωτεϊνών, κατά GO και KEGG, αποκάλυψε ισχυρές αλληλεπιδράσεις της LonP1 με οικογένειες πρωτεϊνών (συστάδες 1-4) που σχετίζονται με 1: το ριβόσωμα, 2: Δέσμευση/Αλληλεπίδραση με DNA, 3: Αντιγραφή DNA και 4: Πρωτεάσωμα, Εικόνα 55B. Μεταξύ των πιθανών αλληλεπιδρώντων μορίων εντοπίστηκαν και οι πρωτεΐνες ιστονών H3.3 (P84243), H4 (P62805) και H2A1D (P20671), όπου σε συνδυασμό με όλες τις άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το DNA επιβεβαιώνουν την υπόθεσή μας ότι η μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1 αλληλεπιδρά με το πυρηνικό DNA. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι παραπάνω πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το πυρηνικό DNA ανιχνεύθηκαν μόνο στη συνθήκη ανάλυσης 5μM 6-OHDA P:16, σε συμφωνία με τον πυρηνικό εντοπισμό της LonP1 στα πειράματα ανοσοφθορισμού (Εικόνα 45B) και CBA (Εικόνα 46B).



### Δ.Β.10 Επιβεβαίωση της φυσιολογικής αλληλεπίδρασης της Hsp90 με τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1

Από την πρωτεωμική ανάλυση προέκυψαν ένα σύνολο πρωτεϊνών που αποτελούν πιθανά αλληλεπιδρώντα μόρια με την πρωτεάση LonP1. Σε συμφωνία με την MS ανάλυση που αναφέρθηκε στην παράγραφο Δ.Γ.1 μεταξύ των πρωτεϊνών εντοπίστηκαν αρκετά μέλη της οικογένειας των heat shock πρωτεϊνών (HSPs), όπως η Hsp105/110, η Hsp90 και η Hsp75. Σε αυτό το πλαίσιο ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, στις γενιές P:12 και P:16 τα επίπεδα έκφρασης των heat shock πρωτεϊνών Hsp90, Hsp70, Hsp40 και Hsc70. Διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των Hsp40 και Hsc70 δεν επηρεάστηκε, ενώ παρατηρήθηκε μια αύξηση των επιπέδων της Hsp70 η οποία συνοδεύεται από αντίστοιχη μείωση των επιπέδων της Hsp90 στη γενιά P:16, Εικόνα 56A. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πρωτεωμικής ανάλυσης, η Hsp90 αποτελεί ένα πιθανό αλληλεπιδρών μόριο με τη LonP1. Για το λόγο αυτό αποφασίσαμε να ελέγξουμε την αλληλεπίδραση της πρωτεάσης LonP1 με την πρωτεΐνη Hsp90. Ακολούθησαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά western για την LonP1 και την Hsp90, στα εκχυλίσματα που προέκυψαν από τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Στα εκχυλίσματα αυτά επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση αυτών των δύο πρωτεϊνών σε αυτές τις συνθήκες, Εικόνα 53B. Τέλος ακολούθησε το αντίστροφο πείραμα επιβεβαίωσης της αλληλεπίδρασης, δηλαδή ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα έναντι της Hsp90, και ανοσοαποτύπωση κατά western αρχικά για την Hsp90 και έπειτα για την πρωτεάση LonP1. Στο αντίστροφο πείραμα επίσης επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση της πρωτεάσης LonP1 με την πρωτεΐνη Hsp90, Εικόνα 56B.



**Εικόνα 56. Η Hsp90 αλληλεπιδρά άμεσα με τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1, όπως αποδείχθηκε από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης. Α.**

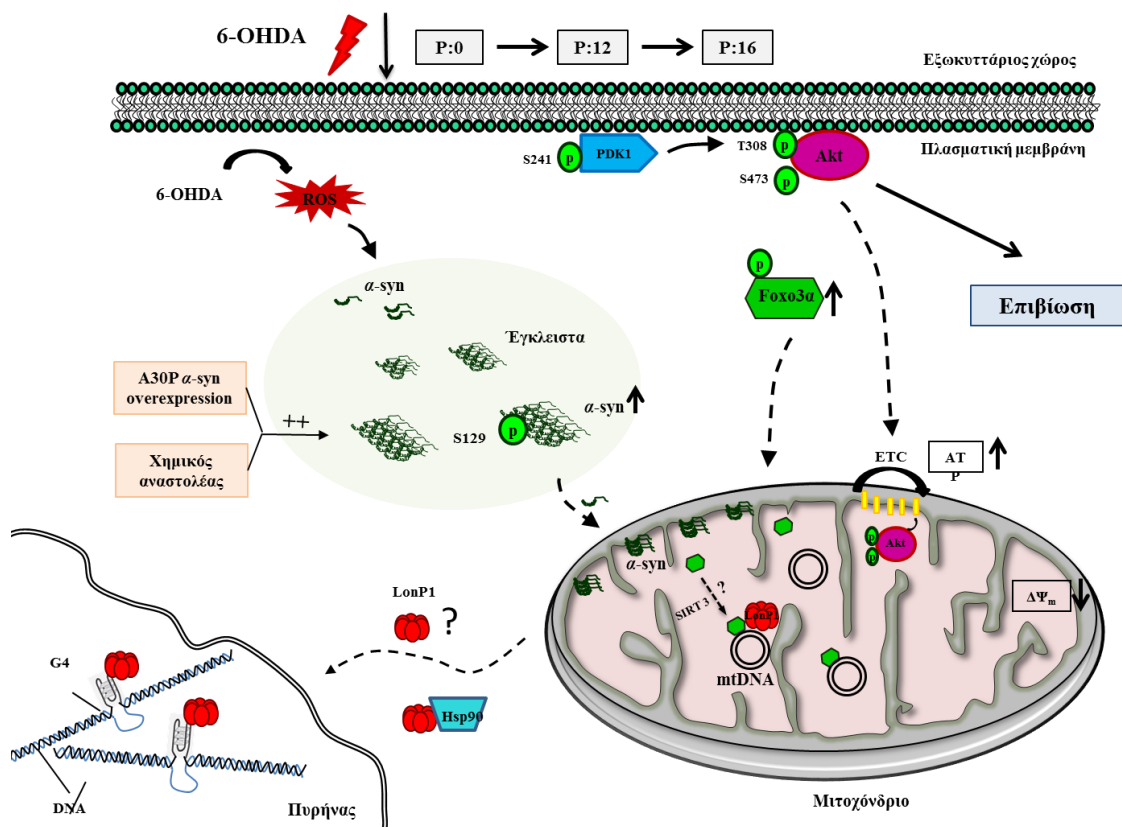
Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τις Heat shock πρωτεΐνες Hsp90, Hsp70, Hsp40 και η Hsc70 στις γενιές P:12 και P:16. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκαν οι β-actin και β-tubulin. **B.**

Ανοσοκατακρήμνιση στη γενιά P:16 για την καλλιέργεια ελέγχου και την καλλιέργεια παρουσία 6-OHDA 5μM, με αντίσωμα έναντι της πρωτεάσης LonP1 και Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τα αντισώματα LonP1 και Hsp90 που αποδεικνύει την αλληλεπίδραση αυτών των μορίων. Εκτός από την Hsp90 ελέγχθηκε

και η Hsp70, ως μέλος των Hsp's πρωτεϊνών, χωρίς ωστόσο να προκύπτει αλληλεπίδραση με την πρωτεάση LonP1. Ανοσοκατακρήμνιση στη γενιά P:16 για την καλλιέργεια ελέγχου και την καλλιέργεια παρουσία 6-OHDA 5μM, με αντίσωμα έναντι της Hsp90. Ανοσοαποτύπωση κατά western για τα αντισώματα LonP1 και Hsp90.

Ανακεφαλαιώνοντας, το σύνολο των παραπάνω ευρημάτων επιβεβαιώνουν την εμπλοκή της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 σε πυρηνικές διεργασίες και ενισχύουν την υπόθεση της αλληλεπίδρασης της με το πυρηνικό DNA, σε συνθήκες σχετικές με τη νόσο του Parkinson. Η υπόθεση μας, για τη συμπεριφορά της μιτοχονδριακής πρωτεάσης στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης για τη νόσο του Parkinson είναι ότι η LonP1 μετακινείται στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρά με το πυρηνικό DNA σε θέσεις σχηματισμού G-quadruplexes, προκειμένου να επάγει ή να αναστείλει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη νόσο του Parkinson. Ωστόσο, επιπρόσθετα στοχευμένα πειράματα απαιτούνται για την επιβεβαίωση της ακριβής θέσης αλληλεπίδρασης με το πυρηνικό γονιδίωμα.

### Η συμπεριφορά της LonP1 στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης για τη νόσο του Parkinson



Εικόνα 57. Πυρηνικός εντοπισμός της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης για τη νόσο του Parkinson.

## Αποτελέσματα Μέρος Γ

*Δημιουργία κυτταροπλασματικών υβριδίων (CYtoplasmic hyBRIDS - cybrids), αντικαθιστώντας τα μιτοχόνδρια υγιών νευρικών κυττάρων με τα μιτοχόνδρια ασθενών με κληρονομική μορφή της νόσου του Parkinson.*

### **Δ.Γ.1. Τα cybrids (CYtoplasmic hyBRID) ως *in vitro* μοντέλο μελέτης της νόσου του Parkinson**

Παράλληλα, προκειμένου να διερευνήσουμε τις μοριακές μεταβολές σε επίπεδο έκφρασης του γονιδιώματος, τόσο στα μιτοχόνδρια όσο και στον πυρήνα, δημιουργήσαμε μια ιδιαίτερη κατηγορία υβριδικών κυτταρικών μοντέλων, που είναι γνωστά ως cybrids (CYtoplasmic hyBRID) (Swerdlow 2007; Borland, Mohanakumar et al. 2009). Αυτές οι υβριδικές σειρές δημιουργούνται μετά από σύντηξη αιμοπεταλίων από ασθενείς (κύτταρα δότες μιτοχονδρίων), με νευρικά κύτταρα-δέκτες από τα οποία έχουν αφαιρεθεί τα μιτοχόνδρια (κύτταρα Rho0 ή ρ<sup>0</sup>) (King and Attardi 1996; Miller, Trimmer et al. 1996). Οι κυτταρικές σειρές ονομάστηκαν πρώτη φορά ως "cybrid" από τους Bunn et al. για να τα διαχωρίσουν από τα "hybrid", που αναφέρονται στην ανάμιξη δύο εμπύρηνων κυττάρων (Bunn, Wallace et al. 1974). Τα PD-cybrids εμφανίζουν πολλά από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που παρατηρούνται στην PD, όπως ο σχηματισμός έγκλειστων τα οποία περιέχουν α-synuclein ή πλήρως σχηματισμένων σωματίων Lewy. Αποτελούν ένα εξαιρετικό μοντέλο για τη μελέτη μοριακών μηχανισμών που συνδέονται με τη νόσο (Trimmer, Swerdlow et al. 2000; Trimmer and Bennett 2009) ενώ πολλές μελέτες υποδηλώνουν ότι το mtDNA ασθενών με PD είναι ικανό να μεταφέρει παθογόνα πληροφορία (Ikebe, Tanaka et al. 1990; de Coo, Smeets et al. 1996; Kosel, Grasbon-Frodl et al. 2000; Simon, Mayeux et al. 2000; Richter, Sonnenschein et al. 2002), Τα PD-cybrids επιτρέπουν τη συγκριτική μελέτη των λειτουργικών ιδιοτήτων των μιτοχονδρίων διαφορετικών ασθενών με PD σε ένα κατά τα άλλα πανομοιότυπο γενετικό υπόβαθρο (αφού ο πυρήνας του υβριδικού κυττάρου προέρχεται από το κύτταρο-δέκτη).

Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τη ρύθμιση της έκφρασης των μιτοχονδριακών γονιδίων και τη συνεισφορά του πυρηνικού γονιδιώματος σε αυτή τη διαδικασία καθώς και στην ακεραιότητα του μιτοχονδριακού DNA. Επιπλέον, περιορισμένες είναι οι γνώσεις

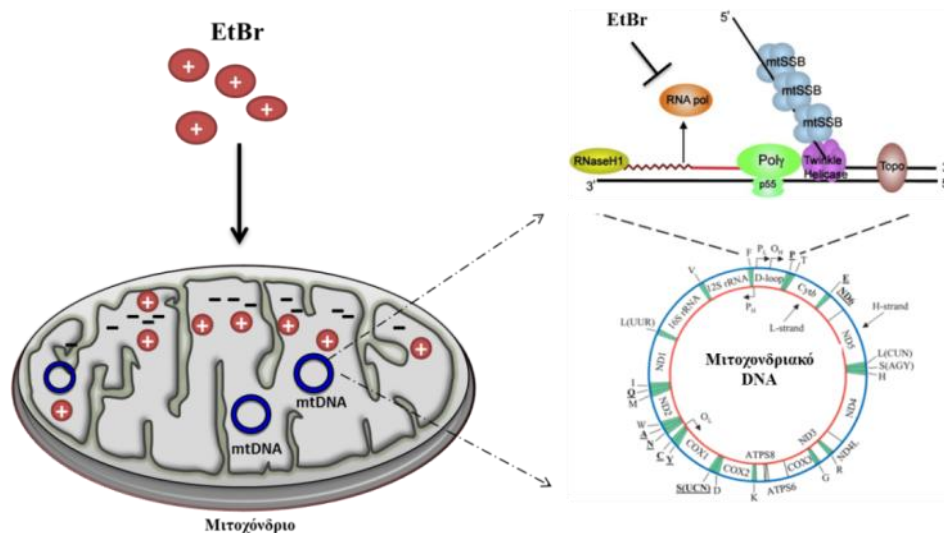
σε ότι αφορά την επίδραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και της μιτοχονδριακής λειτουργίας στην έκφραση γονιδίων του πυρήνα. Η καλύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης των δύο γονιδιωμάτων, και η ταυτοποίηση ενδιάμεσων μορίων και σηματοδοτικών μονοπατιών που τη συντονίζουν είναι σημαντική για την κατανόηση της βιογένεσης των μιτοχονδρίων και της απορρύθμισης της λειτουργίας τους.

### **Δ.Γ.2. Δημιουργία $\rho^0$ κυττάρων (Rho 0).**

Αρχικά, τα πειράματα που εκπονήθηκαν αναφέρονται στο σχηματισμό των  $\rho^0$  κυττάρων και κατά δεύτερον στον επιτυχή σχηματισμό των υβριδικών κυττάρων. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των  $\rho^0$  κυττάρων ήταν η ανθρώπινη νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά SH-SY5Y.  $\rho^0$  Ονομάζονται τα κύτταρα στα οποία απουσιάζει παντελώς το μιτοχονδριακό DNA. Ιστορικά, η πρώτη παρατήρηση κυτταροπλασματικού νουκλεϊκού οξέος, δηλαδή του mtDNA, ονομάστηκε "ρ-νουκλεϊκό οξύ" ή "ρ-DNA" (1949; B. Ephrussi, Hottingueb et al. 1949; B. Ephrussi, Hottingueb et al. 1949) κατά συνέπεια οι κυτταρικές σειρές στις οποίες απουσιάζει το mtDNA ονομάστηκαν  $\rho^0$  κυτταρικές σειρές. Η ικανότητα των κυττάρων να μειώνουν το mtDNA ανακαλύφθηκε πρώτη φορά σε μοντέλα ζυμομύκητα, όπου η φυσική εξάντληση των mtDNA μορίων συνέβαινε σε αναπτυξιακές συνθήκες όπου ευνοούνταν η γλυκόλυση έναντι της μιτοχονδριακής αναπνοής. Οι King and Attardi ήταν οι πρώτοι που δημιούργησαν με επιτυχία  $\rho^0$  κύτταρα από κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος, τις 143B101 και 143B206 (King and Attardi 1989). Η επιτυχής δημιουργία των  $\rho^0$  επιτεύχθηκε με τη χρόνια έκθεση της πατρικής κυτταρικής σειράς στην DNA παρεμβαλλόμενη χρωστική, βρωμιούχο αιθίδιο (King and Attardi 1989; Hayashi, Ohta et al. 1991) Το βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide - EtBr) αποτελεί μια θετικά φορτισμένη ουσία, που της επιτρέπει να συσσωρεύεται στην αρνητικά φορτισμένη μιτοχονδριακή μήτρα, και κατά συνέπεια να παρεμβάλλεται στο αρνητικά φορτισμένο DNA. Η χρωστική αυτή αποτελεί αναστολέα της αντιγραφής του mtDNA. Συγκεκριμένα, αποτελεί ισχυρό αναστολέα της μιτοχονδριακής RNA πολυμεράσης. Η διαδικασία έναρξης της αντιγραφής στα μιτοχόνδρια απαιτεί τη σύνθεση μικρών εκκινητών από την RNA πολυμεράση, που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια σαν σημεία εκκίνησης για την μιτοχονδριακή DNA πολυμεράση (Kasiviswanathan, Collins et al. 2012), Εικόνα 57.

Η μακροχρόνια έκθεση των κυττάρων στον αναστολέα EtBr, έχει ως αποτέλεσμα σταδιακά, λόγω αναστολής της αντιγραφής, κατά την κυτταρική διαίρεση να προκύπτουν

θυγατρικά κύτταρα με μειωμένο αριθμό αντιγράφων mtDNA. Μετά από αρκετούς κύκλους καλλιέργειας, παρουσία του αναστολέα EtBr, τα κύτταρα που προκύπτουν ονομάζονται  $\rho^0$  κύτταρα, και χαρακτηρίζονται από την ολοκληρωτική απαλοιφή του μιτοχondριακού γονιδιώματος. Επιπλέον, στερούνται δραστηριότητας της μιτοχondριακής αναπνευστικής αλυσίδας (ETC), ενώ παρουσιάζουν μιας αυξότροφη σχέση με την ουριδίνη και το πυροσταφυλικό (Desjardins, Frost et al. 1985; King and Attardi 1989).



**Εικόνα 58. Σχηματική απεικόνιση της αναστολής της αντιγραφής του mtDNA από το Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide - EtBr).** Το θετικά φορτισμένο EtBr εισέρχεται στην αρνητικά φορτισμένη μιτοχondριακή μήτρα και συσσωρεύεται. Το EtBr αναστέλλει την RNA πολυμεράση (RNA pol) να συνθέσει των εκκινητή (οδοντωτή κόκκινη γραμμή) που χρειάζεται για την έναρξη της αντιγραφής από την DNA πολυμεράση (Poly), και ο οποίος αποικοδομείται έπειτα από την πρωτεΐνη RNase H1 (κίτρινο). Στη διχάλα αντιγραφής εντοπίζεται και η μιτοχondριακή ελικάση Twinkle (μωβ), η οποία ξετυλίγει καθοδικά το mtDNA, σχηματίζοντας μια μονόκλωνη θηλιά. Η διατήρηση του DNA στη μονόκλωνη κατάσταση επιτυγχάνεται από την μιτοχondριακή πρωτεΐνη πρόσδεσης σε μονόκλωνο DNA mtSSB (mitochondrial Single Stranded Binding protein) (μπλε), ενώ καθοδικά εντοπίζεται και η μιτοχondριακή τοποϊσομεράση Topo (καφέ) η οποία απελευθερώνει το DNA από τις υπερελικώσεις. [Προσαρμογή και τροποποίηση από (Kasiviswanathan, Collins et al. 2012)]

Στη  $\rho^0$  κατάσταση δεν κωδικοποιούνται οι μιτοχondριακές υπομονάδες των συμπλόκων I και IV της μιτοχondριακής αναπνευστικής αλυσίδας, κατά συνέπεια αποδιοργάνωνεται η αναπνευστική λειτουργία ωθώντας τα κύτταρα στην παραγωγή ενέργειας μέσω της γλυκόλυσης (King and Attardi 1996; Marusich, Robinson et al. 1997). Επιπλέον η απουσία λειτουργικής αναπνευστικής αλυσίδας έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του δυναμικού της μιτοχondριακής μεμβράνης ( $\Delta\Psi_m$ ). Όσον αφορά τα δομικά

χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων έχει παρατηρηθεί η αποδιοργάνωση και η δραματική μείωση των πτυχώσεων (cristae) της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, παρότι δεν παρατηρούνται μεταβολές στην εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη (Gilkerson, Margineantu et al. 2000), ενώ η αξιολόγηση της πρωτεϊνικής σύστασης των μιτοχονδρίων που εμπλέκονται σε άλλες λειτουργίες έδειξαν ότι δεν παρατηρείται καμία μεταβολή (Gilkerson, Margineantu et al. 2000). Στη φάση αυτή τα μιτοχόνδρια έχουν χαρακτηριστεί από κάποιους ερευνητές ως “μιτοειδή” (Swerdlow, Parks et al. 1996).

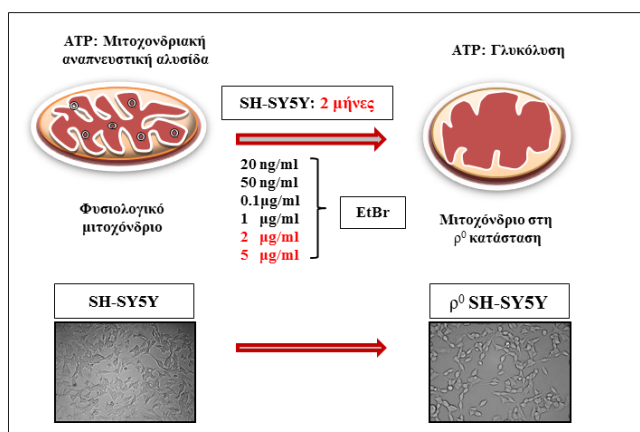
Τα  $\rho^0$  κύτταρα, παρότι είναι απαλλαγμένα από το mtDNA, μπορούν και επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται εφόσον προστίθεται εξωγενώς στο θρεπτικό μέσο πυροσταφυλικό οξύ και ουριδίνη για τη ρύθμιση της οξειδωτικής κατάστασης. Η απαίτηση για ουριδίνη (Uridine) αιτιολογείται από το γεγονός ότι το ένζυμο dihydroorotate dehydrogenase που συμμετέχει στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των πυριμιδινών, εδράζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και για τη λειτουργία του απαιτεί μιτοχονδριακή μεταφορά ηλεκτρονίων. Η προσθήκη ουριδίνης έχει ως αποτέλεσμα να παρακάμπτεται το καταλυόμενο βήμα από το ένζυμο dihydroorotate dehydrogenase στο μονοπάτι σύνθεσης πυριμιδινών (Gregoire, Morais et al. 1984). Η απαίτηση για πυροσταφυλικό (Pyruvate) είναι αναγκαία για τη διατήρηση της κυτταρικής οξειδοαναγωγής. Τα κύτταρα που στερούνται mtDNA στηρίζονται στη γλυκόλυση για την παραγωγή ATP. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η γλυκόλυση αυξάνει τα επίπεδα NADH, ενώ η μιτοχονδριακή αναπνοή παράγει NAD<sup>+</sup>. Ως εκ τούτου, η απουσία μιτοχονδριακής αναπνοής αυξάνει σημαντικά την αναλογία NADH:NAD<sup>+</sup>, παρεμβαίνοντας στη γλυκολυτική ικανότητα. Η συμπλήρωση με πυροσταφυλικό οδηγεί στο σχηματισμό του γαλακτικού, το οποίο με τη σειρά του παράγει NAD<sup>+</sup>, επιτρέποντας έτσι τη γλυκολυτική λειτουργία και την παραγωγή ATP.

Ο σχηματισμός  $\rho^0$  κυττάρων συγκεκριμένα από την κυτταρική σειρά SH-SY5Y περιγράφηκε πρώτη φορά το 1996 (Miller, Trimmer et al. 1996). Τα χαρακτηριστικά των κυττάρων αυτών ήταν σαφώς η μειωμένη δραστηριότητα των συμπλόκων I και IV της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, καθώς και η μειωμένη κατανάλωση οξυγόνου. Επιπλέον παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα παραγωγής ROS και μειωμένη ευαισθησία στις τοξίνες της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας (Miller, Trimmer et al. 1996).

### **Δ.Γ.2.1. Πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για τα ρ<sup>0</sup> κύτταρα.**

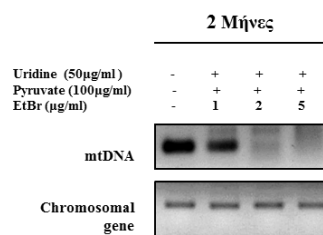
Αρχικά, έγινε καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y παρουσία του αναστολέα EtBr για ένα χρονικό διάστημα περίπου δύο μηνών, Εικόνα 59. Οι συγκεντρώσεις αναστολέα που δοκιμάστηκαν ήταν από 20 ng/ml έως 5 μg/ml. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι συγκεντρώσεις μέχρι 5 μg/ml δεν επηρεάζουν την αντιγραφή του DNA του πυρήνα παρά μόνον των μιτοχονδρίων (Miller, Trimmer et al. 1996). Ως εκ τούτου κατά τη διάρκεια της κυτταρικής ανάπτυξης ο αρχικός αριθμός των μορίων mtDNA μειώνεται σταδιακά με τελικό αποτέλεσμα την πλήρη απουσία mtDNA μορίων στα ρ<sup>0</sup> κύτταρα. Καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής πορείας, το θρεπτικό μέσο εμπλουτίζεται με ουριδίνη και πυροσταφυλικό στις συγκεντρώσεις 50 μg/ml και 100 μg/ml αντίστοιχα. Το εύρος συγκεντρώσεων EtBr που δοκιμάστηκαν είναι 20ng/ml, 50ng/ml, 0,1μg/ml, 1μg/ml, 2μg/ml και 5μg/ml. Η καλλιέργεια των κυττάρων στις συγκεντρώσεις αυτές έγινε σε θρεπτικό μέσο DMEM (high glucose, w/ pyruvate), το οποίο συμπληρώνεται με 5% FBS, 100 μg/ml Pyruvate και 50μg/ml Uridine, με αλλαγή του θρεπτικού μέσου κάθε δύο ημέρες. Μετά από καλλιέργεια διαστήματος 2 μηνών επιβεβαιώθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου η πλήρης απουσία των mtDNA μορίων με τη χρήση ειδικών εκκινήτων που ανιχνεύουν μόνον mtDNA. Εικόνα 59B. Οι συγκεντρώσεις αναστολέα που τελικά οδήγησαν στον επιτυχή σχηματισμό των ρ<sup>0</sup> κυττάρων ήταν οι 2 και 5μg/ml. Στη συγκέντρωση του 1μg/ml παρατηρήθηκε μια μικρή πτώση στα επίπεδα του mtDNA συγκριτικά με την καλλιέργεια ελέγχου, ενώ οι μικρότερες συγκεντρώσεις στο χρονικό διάστημα των 2 μηνών δεν επηρέασαν καθόλου τα επίπεδα. Η μορφολογική παρατήρηση των κυττάρων, Εικόνα 59A, έδειξε ότι το σχήμα των κυττάρων έχει αλλάξει συγκριτικά με την καλλιέργεια ελέγχου SH-SY5Y, πιο στρογγυλό σώμα και μικρότερη επαφή με το υπόστρωμα, ενώ επιπλέον παρατηρήθηκε υποδιπλάσιος ρυθμός πολλαπλασιασμού συγκριτικά με την πατρική SH-SY5Y κυτταρική σειρά, Εικόνα 59Γ. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η καλλιέργεια των ρ<sup>0</sup> κυττάρων απαιτεί την εξωγενή προσθήκη Uridine. Ο έλεγχος επιβίωσης των ρ<sup>0</sup> κυττάρων σε θρεπτικό μέσο απουσία της Uridine, αποκάλυψε ότι τα κύτταρα οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο, Εικόνα 59Γ. Αυτό αποτελεί ένα επιπλέον σημείο ελέγχου για την επιβεβαίωση του επιτυχούς σχηματισμού των ρ<sup>0</sup>. Τέλος, με πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, για την μιτοχονδριακή δομική πρωτεΐνη porin, συστατικό των πόρων της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, επιβεβαιώθηκε ότι δεν ανιχνεύεται καμία μεταβολή στη συνολική μάζα των μιτοχονδρίων στη ρ<sup>0</sup> κατάσταση, Εικόνα 59Δ.

A

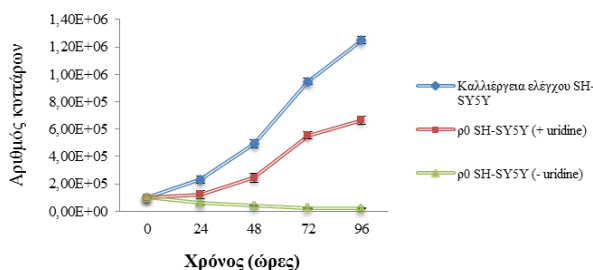


B

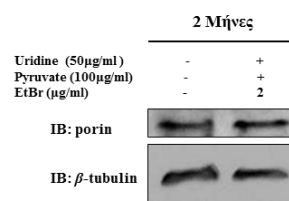
RT-qPCR με ειδικούς εκκινητές που ανιχνεύουν μόνον mtDNA



Γ Ρυθμός ανάπτυξης των των ρ0 κυττάρων συγκριτικά με την πατρική SH-SY5Y



Δ Εκτίμηση της μιτοχονδριακής μάζας μετά από 2 μήνες επόαση με EtBr

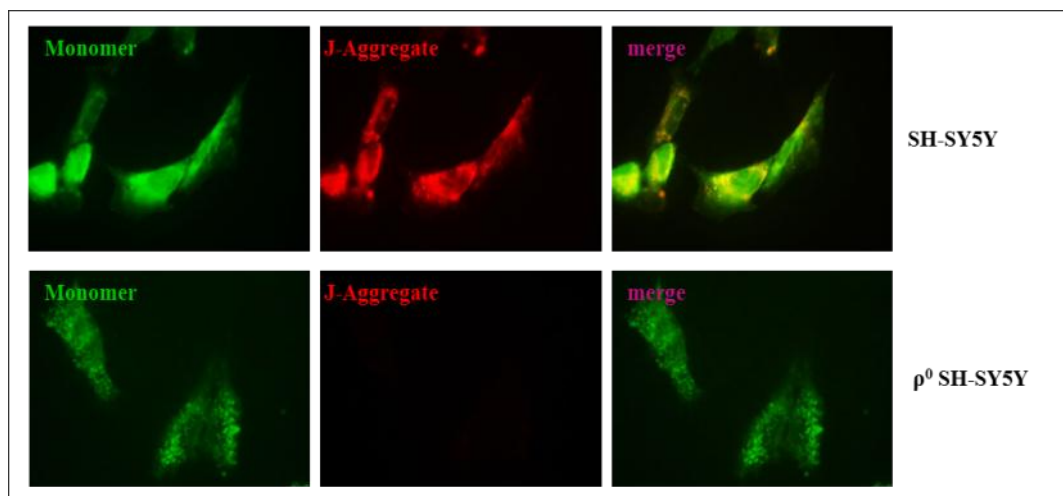


**Εικόνα 59. Διαδικασία δημιουργίας των ρ<sup>0</sup> κυττάρων παρουσία του αναστολέα EtBr.** **A.** Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε. Καλλιέργεια των SH-SY5Y κυττάρων στις συγκεντρώσεις EtBr 20ng/ml, 50ng/ml, 0,1µg/ml, 1µg/ml, 2µg/ml και 5µg/ml για συνολικό χρονικό διάστημα 2 μηνών. Μορφολογική απεικόνιση των ρ<sup>0</sup> κυττάρων συγκριτικά με την πατρική SH-SY5Y (Φακός 20x). **B.** Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με τη χρήση εκκινητών έναντι του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (mtDNA). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για πυρηνικό γονίδιο. Επιβεβαίωση της της απομάκρυνσης του μιτοχονδριακού DNA μετά από 2 μήνες επεξεργασίας με EtBr στις συγκεντρώσεις των 2 και 5µg/ml. **Γ.** Απεικόνιση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των ρ<sup>0</sup> κυττάρων παρουσία ή απουσία της Uridine (n=3). **Δ.** Η συνολική μιτοχονδριακή μάζα δεν μεταβάλλεται στη ρ<sup>0</sup> κατάσταση, όπως επιβεβαιώθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western για τη μιτοχονδριακή δομική πρωτεΐνη porin. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-tubulin.

Για όλες τις προσπάθειες δημιουργίας ρ<sup>0</sup> κυττάρων που ακολούθησαν, υιοθετήθηκε η συγκέντρωση αναστολέα EtBr των 2µg/ml. Επόμενος στόχος ήταν ο έλεγχος του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης ΔΨ<sub>m</sub>. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε η λιπόφιλη κατιονική χρωστική JC-1 η οποία εισέρχεται επιλεκτικά στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων με τρόπο εξαρτώμενο από το δυναμικό της μεμβράνης. Στα ρ<sup>0</sup> κύτταρα διαπιστώθηκε ότι το δυναμικό της μεμβράνης έχει μειωθεί με αποτέλεσμα μετά τη χρώση με τη χρωστική JC-1 να ανιχνεύεται μόνο το πράσινο χρώμα του μονομερούς σε πλήρη



συμφωνία με τους Gilkerson et al., 2000. Αντιθέτως στην καλλιέργεια ελέγχου ανιχνεύονται και οι δύο μορφές της χρωστικής, Εικόνα 60.



**Εικόνα 60.** Έλεγχος του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης  $\Delta\Psi_m$  στα  $\rho^0$  κύτταρα με τη χρήση της χρωστικής JC-1. Στην πατρική σειρά SH-SY5Y ανιχνεύονται και οι δύο μορφές της χρωστικής δηλαδή, και η μονομερής μορφή (πράσινο) και η συσσωμάτωση αυτής (κόκκινο), δείκτης υψηλού  $\Delta\Psi_m$ , ενώ στην  $\rho^0$  κατάσταση ανιχνεύεται μόνο η μονομερής μορφή της χρωστικής, δείκτης χαμηλού  $\Delta\Psi_m$  (Φακός 100x, κλίμακα 25 $\mu$ m).

Συνοψίζοντας, για τη δημιουργία των  $\rho^0$  κυττάρων θεωρήθηκε ως η βέλτιστη συγκέντρωση αναστολέα EtBr η συγκέντρωση των 2 $\mu$ g/ml. Η καλλιέργεια των  $\rho^0$  κυττάρων γίνεται σε θρεπτικό μέσο DMEM (4500mg/liter glucose) το οποίο εμπλουτίζεται με 5% FBS, 50 $\mu$ g/ml Uridine, 100 $\mu$ g/ml pyruvate και 1% Anti-Myc. Η καλλιέργεια παρουσία του αναστολέα γίνεται για συνολικό χρονικό διάστημα 2 μηνών, με αλλαγή θρεπτικού μέσου και ανανέωση του αναστολέα κάθε 2 ημέρες. Μετά την επιτυχή δημιουργία των  $\rho^0$  κυττάρων, καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο απουσία του αναστολέα, ωστόσο εάν τα κύτταρα παραμείνουν σε καλλιέργεια για χρονικό διάστημα πέραν του ενός μήνα, ακολουθεί προσθήκη του αναστολέα για 3 γενιές για να αποφευχθεί το ενδεχόμενο επαναπατρισμού από εναπομείναντα μόρια mtDNA.

### **Δ.Γ.3. Δημιουργία SH-SY5Y Κυτταροπλασματικών Υβριδίων (Cytoplasmic Hybrids, cybrids).**

Τα κυτταροπλασματικά υβρίδια, γνωστά ως cybrids (Cytoplasmic hybrid), είναι κυτταρικές σειρές που προκύπτουν από τη σύντηξη απύρηνων κυττάρων, που περιέχουν μόνο μιτοχονδριακό DNA, με κύτταρα δέκτες στα οποία απουσιάζει το mtDNA-  $\rho^0$

κύτταρα. Στις περισσότερες των περιπτώσεων τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται σαν κύτταρα δότες είναι τα αιμοπετάλια (απύρηνα κύτταρα), ενώ σαν δέκτες η ανθρώπινη νευραβλαστωματική κυτταρική σειρά SH-SY5Y ή η κυτταρική σειρά τερατωκαρκινώματος NT2. Μετά τη σύντηξη τα κύτταρα δέκτες επαναπατρίζονται με το mtDNA των κυττάρων δότες. Το τελικό βήμα περιλαμβάνει το διαχωρισμό από τα κύτταρα που δεν επαναπατρίστηκαν επιτυχώς υπό τον έλεγχο της μεταβολικής διαλογής (Swerdlow, Parks et al. 1996; Ghosh, Swerdlow et al. 1999).

#### **Δ.Γ.3.1. Απομόνωση αιμοπεταλίων από φλεβικό αίμα**

Η διαδικασία απομόνωσης αιμοπεταλίων από φλεβικό αίμα περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

1. Η απομόνωση ικανού αριθμού αιμοπεταλίων απαιτεί 15-20 ml φλεβικό αίμα, το οποίο συλλέγεται σε σωλήνες ηπαρίνης και διατηρείται στον πάγο (ο χρόνος διατήρησης στον πάγο δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 8 ώρες).
2. Κάθε δείγμα αναμιγνύεται με 1/10 του όγκου του με διάλυμα 0.15 M NaCl και 0.1 M sodium citrate (pH 7.0).
3. Ανακίνηση (με αναστροφή) και φυγοκέντρηση του αίματος σε 200 g / 20 min / 12°C.
4. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης συλλέγονται τα 3/4 του υπερκειμένου (πλάσμα), αφήνοντας πίσω τουλάχιστον 3mm του πλάσματος πάνω από την στοιβάδα των ερυθρών αιμοσφαιρίων, για να αποφευχθεί οποιαδήποτε επιμόλυνση από ερυθρά αιμοσφαίρια.
5. Το πλάσμα (βήμα 4) φυγοκεντρείται σε αποστειρωμένο σωλήνα φυγοκέντρησης τύπου falcon των 15ml, στις 2300 g / 4 °C / 30-40 min.
6. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη (το ίζημα περιέχει τα αιμοπετάλια) 2 ml φυσιολογικού ορού ή ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Ακολουθεί ήπια ανάδευση με τη χρήση πιπέτας αποφεύγοντας το σχηματισμό φυσαλίδων.
7. Σε αυτό το σημείο εκτιμάται η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στο πλάσμα μετά από μέτρηση αυτών στο αιμοκυτταρόμετρο.
8. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 10 ml με την προσθήκη φυσιολογικού ορού. Στο στάδιο αυτό είναι δυνατή η αποθήκευση ενός μέρους των αιμοπεταλίων σε ειδικά κρυοφιαλίδια για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε βαθιά κατάψυξη (-196°C), αναμιγνύοντας 1,05 ml εναιωρήματος αιμοπεταλίων με διάλυμα κατάψυξης (freezing mix)

το οποίο περιλαμβάνει 0,15 ml αποστειρωμένο DMSO και 0,30 ml FBS σε συγκέντρωση  $10^7$  κύτταρα/κρυοφιαλίδιο. Μεταφορά αυτού του διαλύματος μαζί με τα κύτταρα σε ένα κρυοφιαλίδιο κατάψυξης. Τοποθέτηση σε ειδικό δοχείο κατάψυξης με ισοπροπανόλη (που επιτρέπει την αργή πτώση της θερμοκρασίας  $\sim 1^\circ / \text{min}$ ) στους  $-80^\circ\text{C}$ . Μετά από 12-24 ώρες, το κρυοφιαλίδιο φυλάσσεται στο υγρό άζωτο ( $-196^\circ\text{C}$ ).

### **Δ.Γ.3.2. Διαδικασία σύντηξης των αιμοπεταλίων (κύτταρα δότες μιτοχονδρίων) με τα $\rho^0$ SH-SY5Y κύτταρα (κύτταρα δέκτες μιτοχονδρίων).**

1. Τα απομονωμένα αιμοπετάλια (βήμα 8, παράγραφος Δ.Γ.3.1.) ( $10^7$  ή  $10^8$ ) φυγοκεντρώνονται στα 2300 g/ 20min/  $15^\circ\text{C}$ .

2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των  $\rho^0$  κυττάρων ( $10^5$  ή  $10^6$ ) στα 300 g/ 5 min.

Απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη 2ml θρεπτικού μέσου DMEM (χωρίς  $\text{Ca}^{2+}$ ), ήπια ανάδευση με πιπέτα για την επαναιώρηση των κυττάρων. Μεταφορά των  $\rho^0$  κυττάρων μετά την επαναιώρηση στο ίζημα αιμοπεταλίων που προέκυψε μετά τη φυγοκέντρηση στο βήμα 1. Στο βήμα αυτό γίνεται ανάμιξη των κυττάρων δέκτες -  $\rho^0$ , με τα κύτταρα δότες (αιμοπετάλια). Επώαση για 10 min αυστηρά στους  $23^\circ\text{C}$ .

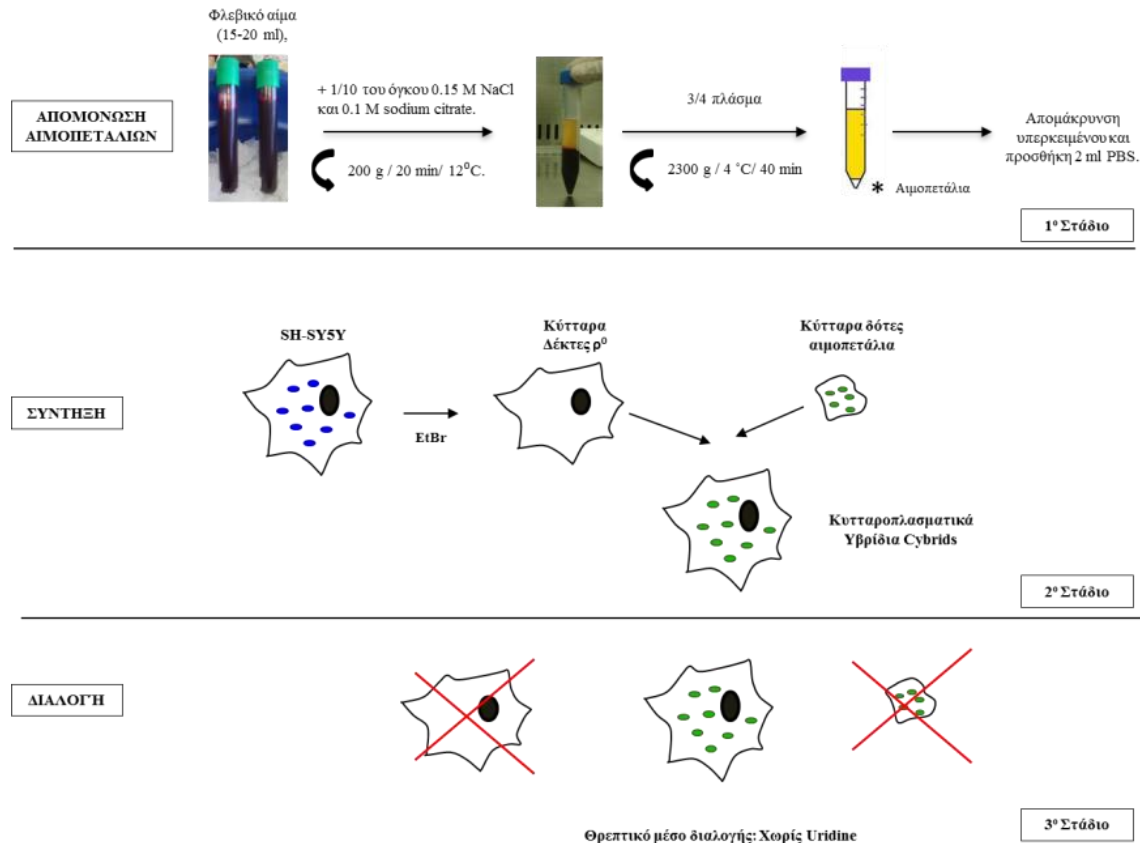
3. Φυγοκέντρηση στα 300 g/10 min , απόρριψη υπερκειμένου και επαναιώρηση σε 100 μl διαλύματος 42% πολυαιθυλενικής γλυκόλης (polyethylene glycol - PEG).

4. Επώαση 1-1.5 min σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη 10 ml θρεπτικού μέσου DMEM που περιλαμβάνει 15% FBS, 50μg/ml Uridine, 100 μg/ml pyruvate και 1% Anti-Myc. Το μείγμα κυττάρων κατανέμεται σε πέντε τρυβλία διαστάσεων 10cm ( $2 \times 10^4$ - $2 \times 10^5$   $\rho^0$  κύτταρα/τρυβλίο).

5. Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα αφήνονται να αναρρώσουν σε  $\rho^0$  θρεπτικό μέσο για μία εβδομάδα (DMEM που περιλαμβάνει 5% FBS, 50μg/ml Uridine, 100 μg/ml pyruvate και 1% Anti-Myc), με αλλαγή θρεπτικού κάθε δύο ημέρες. Στο χρονικό διάστημα της μίας εβδομάδας, γίνεται επαναπατρισμός των  $\rho^0$  κυττάρων με τα μιτοχόνδρια των αιμοπεταλίων και προκύπτουν τα υβριδικά κύτταρα – cybrids. Ωστόσο στην καλλιέργεια παραμένει ένας αριθμός  $\rho^0$  κυττάρων στα οποία δεν έγινε επιτυχής σύντηξη. Για το λόγο αυτό μετά το πέρας της μίας εβδομάδας, γίνεται αντικατάσταση του θρεπτικού μέσου με θρεπτικό μέσο το οποίο δεν περιλαμβάνει uridine, δηλαδή θρεπτικό μέσο «διαλογής» (DMEM που περιλαμβάνει 10% FBS). Σε αυτό το θρεπτικό αναμένεται να επιβιώσουν μόνο τα  $\rho^0$

κύτταρα που επαναπατρίστηκαν με λειτουργικά μιτοχόνδρια αιμοπεταλίων, αφού τα  $\rho^0$  κύτταρα αδυνατούν να επιβιώσουν απουσία uridine (King and Attardi 1989).

6. Έπειτα από διάστημα 2-4 εβδομάδων, μετά τη σύντηξη, στο τρυβλίο έχουν σχηματιστεί μεμονωμένοι κλώνοι Cybrid κυττάρων.



**Εικόνα 61. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας σχηματισμού των Κυτταροπλασματικών υβριδίων (Cytoplasmic Hybrids – Cybrids).** Η διαδικασία περιλαμβάνει τρία στάδια. Στο 1° Στάδιο απεικονίζεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση αιμοπεταλίων από δείγμα φλεβικού αίματος όγκου 15-20 ml. Τα  $\rho^0$  κύτταρα είναι τα κύτταρα δέκτες, δηλαδή τα κύτταρα εκείνα τα οποία θα δεχτούν τα λειτουργικά μιτοχόνδρια και τα αιμοπετάλια είναι τα κύτταρα δότες, δηλαδή τα κύτταρα που θα δώσουν τα λειτουργικά μιτοχόνδρια. Τα Cybrids προκύπτουν μετά από τη διαδικασία της σύντηξης 2° Στάδιο. Η διαλογή των κυττάρων σε αυτά που επαναπατρίστηκαν επιτυχώς με λειτουργικά μιτοχόνδρια γίνεται σε θρεπτικό μέσο διαλογής.

**Σημείωση:** Για κάθε δείγμα αιμοπεταλίων προετοιμάζονται δύο δείγματα  $\rho^0$  κυττάρων ( $10^5$  ή  $10^6$  κύτταρα), το ένα προορίζεται να δεχτεί την επιμόλυνση με τα αιμοπετάλια (κύτταρα δότες μιτοχονδρίων) και το άλλο χρησιμοποιείται ως καλλιέργεια αρνητικού ελέγχου. Ως επιπλέον καλλιέργεια αρνητικού ελέγχου χρησιμοποιείται και ένα δείγμα που περιέχει μόνο αιμοπετάλια.

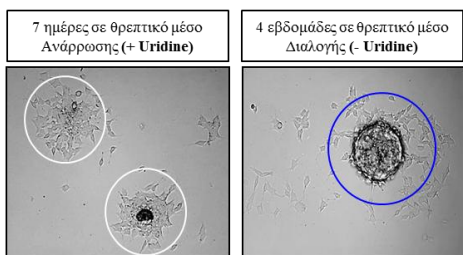
**Πίνακας 8.** Στον πίνακα συμπεριλαμβάνονται τα διαλύματα και τα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των Cybrid κυττάρων.

Διαλύματα και θρεπτικά	Σύσταση
Φυσιολογικός ορός	0.15 M NaCl, 15 mM Tris-HCl, pH 7.4 (25°C)
10x citrate σε φυσιολογικό ορό	0.15 M NaCl, 0.10 M sodium citrate (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O; trisodium salt, dihydrate)
Διάλυμα κατάψυξης (freezing mix)	70% εναιώρημα αιμοπεταλίων (DMEM), 20% FBS, και 10% DMSO
Διάλυμα 42% PEG	Αποστείρωση 8.4 g PEG 1500 σε φλάσκα των 50 ml για 15 λεπτά. Μετά την αποστείρωση το PEG διαλυτοποιείται. Σε θερμοκρασία δωματίου, λίγο πριν αρχίσει να σταθεροποιείται προστίθενται 2 ml DMSO και 9.6 ml DMEM (χωρίς Ca <sup>2+</sup> ). Εάν το PEG σταθεροποιηθεί πριν την προσθήκη του DMSO, γίνεται ανάτηξη σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 65°C. Το διάλυμα PEG διατηρείται σε θερμοκρασία 37°C. Το διάλυμα προετοιμάζεται λίγες ώρες πριν τη χρήση του!!!
Θρεπτικό μέσο ανάρρωσης μετά τη σύντηξη.	DMEM που περιλαμβάνει 10% FBS, 50μg/ml Uridine και 100μg/ml pyruvate.
Θρεπτικό μέσο διαλογής των Cybrids	DMEM (high glucose) που περιλαμβάνει μόνο 10% FBS.

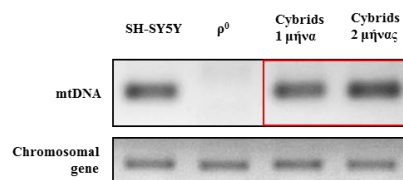
Μια εβδομάδα μετά τη σύντηξη στα τρυβλία καλλιέργειας έχουν ήδη σχηματιστεί αρκετές συστάδες κυττάρων, οι οποίες αποτελούν πιθανούς κλώνους κυττάρων τα οποία έχουν αποκτήσει λειτουργικά μιτοχόνδρια, Εικόνα 62Α. Η καλλιέργεια στο θρεπτικό μέσο «διαλογής» έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση στην καλλιέργεια, μόνον των κυττάρων στα οποία η σύντηξη έγινε επιτυχώς και επιπλέον τα μιτοχόνδρια που εισήχθησαν είναι λειτουργικά, ώστε να επιβιώνουν απουσία ουριδίνης και πυροσταφυλικού. Η καλλιέργεια στο θρεπτικό μέσο διαλογής κρατάει περίπου ένα μήνα. Σε αυτό το χρονικό διάστημα, ο κυτταρικός θάνατος είναι εμφανής (κύτταρα τα οποία δεν προσέλαβαν μιτοχόνδρια πεθαίνουν), ενώ αρχίζουν να αναπτύσσονται σε αργούς ρυθμούς αποικίες των κυττάρων στα οποία ανακτήθηκε επιτυχώς η μιτοχονδριακή λειτουργία, Εικόνα 62Α. Στο τελικό βήμα της διαδικασίας ακολουθεί η απομόνωση των αποικιών. Οι αποικίες καλλιεργούνται ως ανεξάρτητοι κλώνοι για έναν επιπλέον μήνα. Μετά από έναν επιπλέον μήνα καλλιέργειας των αποικιών έγινε έλεγχος για το περιεχόμενο mtDNA μορίων με τη χρήση των ειδικών εκκινητών για το mtDNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

πραγματικού χρόνου. Διαπιστώθηκε ότι η καλλιέργεια των Cybrid κυττάρων για το συνολικό διάστημα των 2 μηνών μετά την απομόνωση των αποικιών, είναι ένα επαρκές χρονικό διάστημα για την ανάκαμψη των κυττάρων, αφού τα επίπεδα του mtDNA είναι παρόμοια με εκείνα της πατρικής κυτταρικής σειράς SH-SY5Y, Εικόνα 62B.

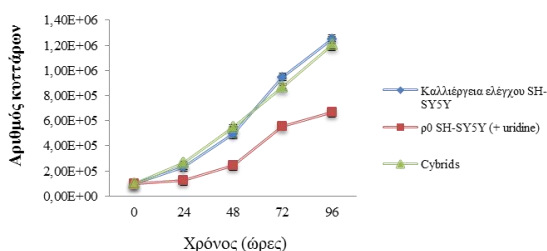
**A** Cybrid αποικίες 1 εβδομάδα μετά τη σύντηξη και 4 εβδομάδες μετά τη διαλογή



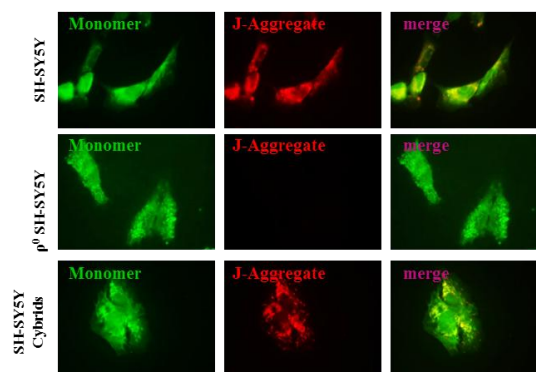
**B** RT-qPCR με ειδικούς εκκινητές που ανιχνεύουν μόνον mtDNA



**Γ** Ρυθμός ανάπτυξης των Cybrid κυττάρων συγκριτικά με την καλλιέργεια ελέγχου SH-SY5Y και τα ρ0 SH-SY5Y



**Δ** Έλεγχος του δυναμικού της μιτοχondριακής μεμβράνης ΔΨ<sub>m</sub> με τη χρωστική JC-1



**Εικόνα 62. Απεικόνιση των cybrid αποικιών όπως αυτές παρατηρήθηκαν στα χρονικά διαστήματα 1 εβδομάδα μετά τη σύντηξη και 4 εβδομάδες μετά τη διαλογή και έλεγχος των ιδιοτήτων πολλαπλασιασμού και του δυναμικού της μιτοχondριακής μεμβράνης. A.** Στις 7 ημέρες μετά τη σύντηξη σε θρεπτικό μέσο ανάρρωσης (+ Ουριδίνη/+ Πυροσταφυλικό) έχουν αρχίσει να σχηματίζονται συστάδες κυττάρων. Στο συνολικό διάστημα των 4 εβδομάδων πριν τη απομόνωση σε θρεπτικό μέσο διαλογής (- Ουριδίνη/ - Πυροσταφυλικό) εικονίζονται ενδεικτικά φωτογραφίες των αποικιών που απομονώθηκαν (Φακός 20x). **B.** Αντίδραση PCR με εκκινητές που ενισχύουν μιτοχondριακές ή χρωμοσωμικές περιοχές. Το mtDNA ανιχνεύεται και πάλι στα Cybrids ήδη 1 μήνα μετά την σύντηξη με τα αιμοπετάλια. **Γ.** Απεικόνιση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των Cybrid κυττάρων συγκριτικά με την καλλιέργεια ελέγχου SH-SY5Y και τα ρ<sup>0</sup> SH-SY5Y κύτταρα. Τα Cybrids μετά από 2 μήνες καλλιέργειας έχουν αποκτήσει τον ίδιο ρυθμό πολλαπλασιασμού με την πατρική κυτταρική σειρά παρουσία ή απουσία της Uridine (n=3). **Δ.** Έλεγχος του δυναμικού της μεμβράνης στα Cybrids με τη χρήση της χρωστικής JC-1. Η συσσώρευση της χρωστικής εντός των μιτοχondρίων είναι αποτέλεσμα του υψηλού δυναμικού της μιτοχondριακής μεμβράνης. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό των «κόκκινων» μιτοχondρίων και επιβεβαιώνει το γεγονός ότι τα ρ<sup>0</sup> κύτταρα απέκτησαν λειτουργικά μιτοχondρία αφού το μεμβρανικό δυναμικό είναι πλέον φυσιολογικό (Φακός 100x, κλίμακα 25μm).

Τέλος, για να επιβεβαιωθεί η λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων, ελέγχθηκε το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης με τη χρήση της χρωστικής JC-1, και όπως αποδείχθηκε τα μιτοχόνδρια στα Cybrids είναι πλήρως λειτουργικά, Εικόνα 61.

Συνολικά έγιναν τρεις επιτυχημένες προσπάθειες σχηματισμού cybrid κυτταρικών σειρών, από τρία ανεξάρτητα δείγματα αίματος. Αυτές οι cybrid κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκαν ως cybrid κυτταρικές σειρές ελέγχου σε μετέπειτα προσπάθειες. Το πλεονέκτημα της παραπάνω πειραματικής σύντηξης είναι μετά από αρκετούς κύκλους επαναλήψεων να προκύπτουν κυτταρικές σειρές που περιέχουν το περιεχόμενο mtDNA της επιλογής μας, υπό τον έλεγχο του πυρηνικού γενετικού και περιβαλλοντικού υπόβαθρου που εμείς επιλέγουμε (Swerdlow, Parks et al. 1996; Ghosh, Swerdlow et al. 1999).

#### **Δ.Γ.4. Δημιουργία Cybrid κυτταρικών σειρών που περιέχουν μιτοχόνδρια ασθενών με την κληρονομική μορφή νόσου του Parkinson.**

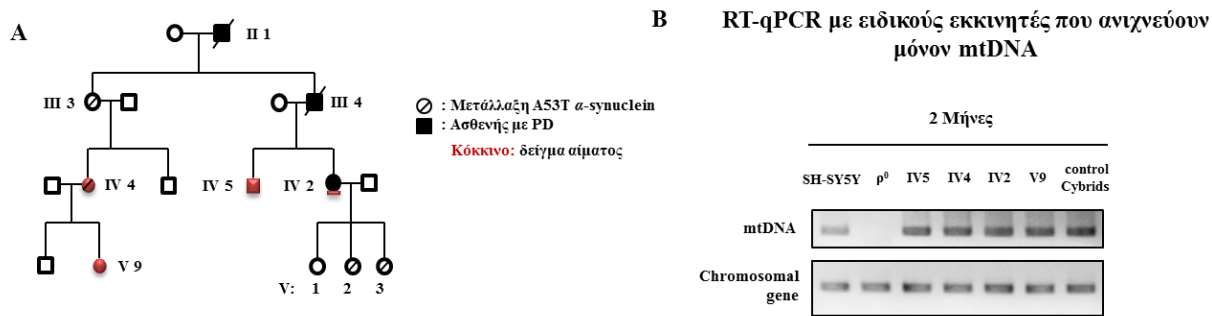
Στη συνέχεια των πειραμάτων μας, αφού επιβεβαιώσαμε την επιτυχία σχηματισμού λειτουργικών cybrid κυτταρικών σειρών, προχωρήσαμε στο σχηματισμό cybrid κυτταρικών σειρών από δείγματα ατόμων με την κληρονομική μορφή της νόσου του Parkinson. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ατόμων από το γενεαλογικό δέντρο που εικονίζεται στην Εικόνα 63. Τα δείγματα αίματος αφορούν τα άτομα:

- IV2: ασθενής με κληρονομική νόσο του Parkinson που φέρει τη σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο της  $\alpha$ -synuclein A53T.
- IV5: αδερφός ασθενούς που δεν έχει εκδηλώσει τη νόσο και δεν φέρει τη σημειακή μετάλλαξη στην  $\alpha$ -synuclein A53T.
- IV4: άτομο που φέρει τη σημειακή μετάλλαξη στην  $\alpha$ -synuclein A53T, αλλά δεν έχει εκδηλώσει τη νόσο.
- V9: κόρη της IV4, που δεν έχει συμπτώματα της νόσου και δεν φέρει τη σημειακή μετάλλαξη  $\alpha$ -synuclein A53T.

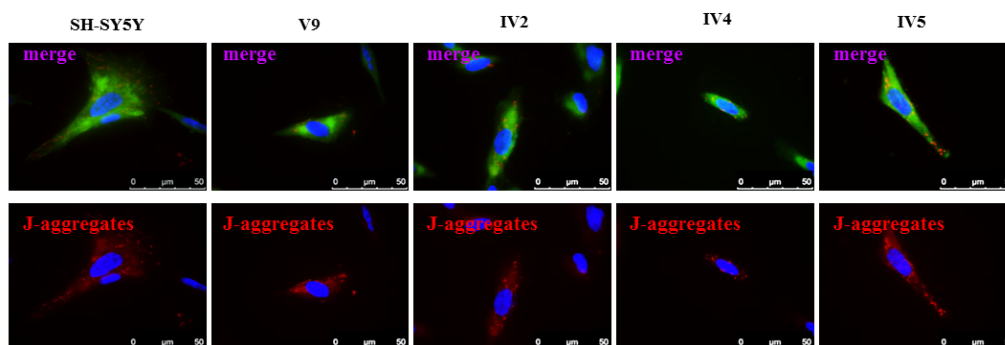
Η σημειακή μετάλλαξη A53T, είναι αποτέλεσμα της σημειακής αντικατάστασης G209A σε επίπεδο γονιδιακής αλληλουχίας, που οδηγεί στην αντικατάσταση του αμινοξέος Αλανίνη (Ala) σε Θρεονίνη (Thr). Η σημειακή αυτή μεταλλαγή εντοπίστηκε αρχικά σε οικογένειες ελληνικής και ιταλικής καταγωγής με τυπική οικογενή νόσο του Parkinson που συνοδεύεται από εμφάνιση σωματίων του Lewy, και κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονομικότητας (Polymeropoulos, Lavedan et al. 1997).

Από το παραπάνω γενεαλογικό δέντρο, Εικόνα 63Α, έγινε αιμοληψία από τα άτομα IV2, IV5, IV4 και V9. Ακολούθησε απομόνωση αιμοπεταλίων και σύντηξη αυτών με  $\rho^0$  SH-SY5Y κύτταρα για τη δημιουργία cybrid κυτταρικών σειρών με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε παραπάνω. Μετά το χρονικό διάστημα των δύο μηνών από την απομόνωση των αποικιών, στο θρεπτικό μέσο διαλογής, έγινε έλεγχος για το περιεχόμενο mtDNA μορίων με τη χρήση των των ειδικών εκκινητών για το mtDNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Διαπιστώθηκε ότι η καλλιέργεια των Cybrid κυττάρων για το συνολικό διάστημα των 2 μηνών μετά την απομόνωση των αποικιών, οδήγησε στο σχηματισμό κυτταρικών σειρών που περιέχουν παρόμοια επίπεδα mtDNA μορίων με εκείνα της πατρικής κυτταρικής σειράς SH-SY5Y. Επιπλέον δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στα επίπεδα των mtDNA μορίων, μεταξύ του ατόμου που πάσχει (IV2) και των υπολοίπων που δεν έχουν εκδηλώσει τη νόσο (V9, IV4 και IV5). Ως καλλιέργεια ελέγχου, εκτός από την πατρική κυτταρική σειρά SH-SY5Y, χρησιμοποιήθηκε και κυτταρική σειρά cybrid από προηγούμενη επιτυχημένη προσπάθεια (cybrid control). Ως αρνητική καλλιέργεια ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά  $\rho^0$  SH-SY5Y που χρησιμοποιήθηκε για τη σύντηξη και το σχηματισμό των cybrids. Στα πλαίσια της μιτοχονδριακής λειτουργίας, ελέγχθηκε το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης με τη χρωστική JC-1, και όπως αποδείχθηκε τα μιτοχόνδρια στα Cybrids που προήλθαν από το γενεαλογικό δέντρο, περιέχουν λειτουργικά μιτοχόνδρια, όπως αποδείχθηκε μετά τη σύγκριση με την καλλιέργεια ελέγχου SH-SY5Y, Εικόνα 63Γ.





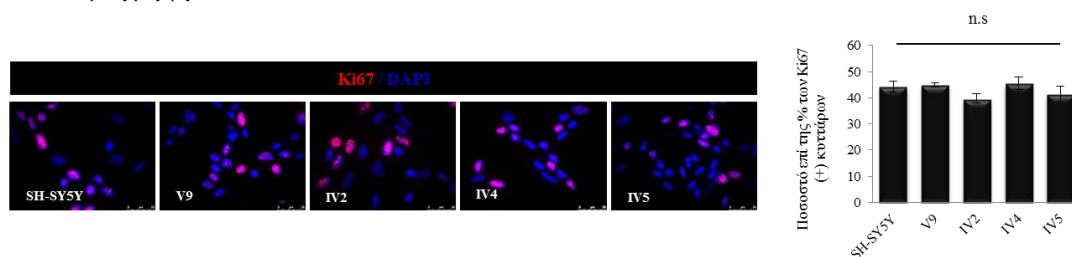
**Γ** Έλεγχος του δυναμικού της μεμβράνης στα Cybrids με τη χρήση της χρωστικής JC-1.



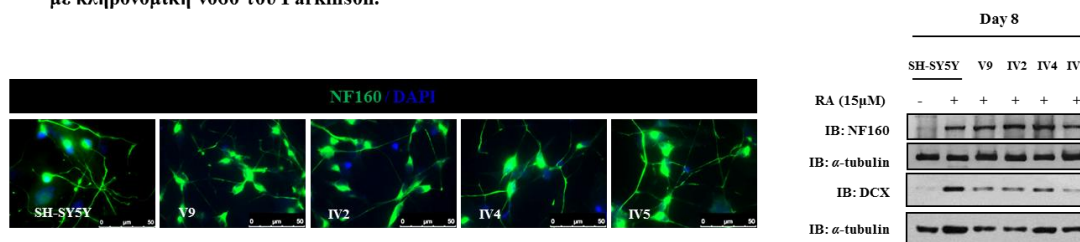
**Εικόνα 63. Κατασκευή cybrid κυτταρικών σειρών από Γενεαλογικό δέντρο με οικογενή νόσο του Parkinson στο οποίο εμφανίζεται η σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο της  $\alpha$ -synuclein, A53T. Α.** Από το γενεαλογικό δέντρο χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος για τη δημιουργία cybrids κυτταρικών σειρών. Στο γενεαλογικό δέντρο το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί στα άτομα από τα οποία έγινε αιμοληψία, και κατά συνέπεια το φλεβικό αίμα χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των αιμοπεταλίων. Το άτομο IV2 πάσχει από τη νόσο του Parkinson και φέρει τη σημειακή μετάλλαξη A53T, ενώ στο άτομο IV4 εμφανίζεται η σημειακή μετάλλαξη A53T, αλλά δεν πάσχει από τη νόσο του Parkinson. Τα άτομα IV5 και V9 είναι υγιή και δεν φέρουν τη μετάλλαξη της  $\alpha$ -synuclein. **Β.** Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με τη χρήση εκκινητών έναντι του μιτοχondριακού γονιδιώματος (mtDNA). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές για πυρηνικό γονίδιο. Επιβεβαίωση της παρουσίας του μιτοχondριακού DNA στις cybrid κυτταρικές σειρές, Ως καλλιέργεια ελέγχου εκτός από την πατρική κυτταρική σειρά SH-SY5Y, χρησιμοποιήθηκε και κυτταρική σειρά cybrid από προηγούμενη επιτυχημένη προσπάθεια (Cybrids control). Ως αρνητική καλλιέργεια ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά  $\rho^0$  SH-SY5Y που χρησιμοποιήθηκε για τη σύντηξη και το σχηματισμό των cybrids. **Γ.** Έλεγχος του δυναμικού της μεμβράνης στα Cybrids με τη χρήση της χρωστικής JC-1. Η συσσώρευση της χρωστικής εντός των μιτοχondρίων είναι αποτέλεσμα του υψηλού δυναμικού της μιτοχondριακής μεμβράνης. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό των «κόκκινων» μιτοχondρίων και επιβεβαιώνει το γεγονός ότι τα  $\rho^0$  κύτταρα απέκτησαν λειτουργικά μιτοχondρία αφού το μεμβρανικό δυναμικό είναι πλέον φυσιολογικό (Φακός 100x, κλίμακα 50μm).

Στη συνέχεια ελέγχθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των Cybrid κυτταρικών σειρών. Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης Ki67, που αποτελεί δείκτη για τον προσδιορισμό του λεγόμενου κλάσματος ανάπτυξης ενός δεδομένου κυτταρικού πληθυσμού. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού σε όλες τις Cybrid κυτταρικές σειρές που δημιουργήθηκαν ήταν ίδιος με την καλλιέργεια ελέγχου SH-SY5Y, Εικόνα 64A. Ένα βασικό χαρακτηριστικό των SHSY5Y κυττάρων είναι η δυνατότητά τους να διαφοροποιούνται προς ώριμα νευρικά κύτταρα σχηματίζοντας εκτεταμένες νευριτικές δομές ενώ κάτω από ορισμένες συνθήκες αποκτούν ντοπαμινεργικά χαρακτηριστικά. Ένα ενδιαφέρον ερώτημα λοιπόν ήταν κατά πόσον τα μιτοχόνδρια ενός ασθενή με νόσο του Parkinson μπορούν να επηρεάσουν το δυναμικό διαφοροποίησης αυτών των κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν παρουσία ρετινοϊκού οξέος συγκέντρωσης 15  $\mu\text{M}$  για 8 ημέρες σε θρεπτικό μέσο με 0,5% FBS, με ανανέωση του θρεπτικού μέσου κάθε δύο ημέρες. Ο έλεγχος της διαφοροποίησης πραγματοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά western και πειράματα ανοσοφθορισμού για τις πρωτεΐνες δείκτες της νευρικής διαφοροποίησης Neurofilament 160 (NF160) και Doublecortin (DCX).

**A** Έλεγχος του ρυθμού πολλαπλασιασμού των Cybrid κυτταρικών σειρών που προήλθαν από Γενεαλογικό δέντρο με οικογενή μορφή νόσου του Parkinson.



**B** Έλεγχος της ικανότητας διαφοροποίησης των Cybrid κυτταρικών σειρών που προήλθαν από το γενεαλογικό δέντρο με κληρονομική νόσο του Parkinson.



**Εικόνα 64.** Έλεγχος του ρυθμού πολλαπλασιασμού και του δυναμικού διαφοροποίησης των Cybrid κυτταρικών σειρών που προήλθαν από Γενεαλογικό δέντρο με οικογενή μορφή νόσου του Parkinson. **A.** Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των cybrids κυτταρικών σειρών είναι σε ίδια επίπεδα με την καλλιέργεια ελέγχου SH-SY5Y, όπως απεικονίζεται στο διάγραμμα ποσοτικοποίησης πειραμάτων ανοσοφθορισμού με τη χρήση αντισώματος για τον δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67. Ενδεικτική εικόνα ανοσοφθορισμού για την πρωτεΐνη Ki67. Η χρώση του πυρήνα έγινε με τη χρωστική DAPI. (Φακός 100x, κλίμακα 25 $\mu\text{m}$ ). **B.** Ενδεικτική εικόνα ανοσοφθορισμού για το δείκτη νευρικής διαφοροποίησης NF160. Η χρώση του πυρήνα

έγινε με τη χρωστική DAPI. (Φακός 100x, κλίμακα 50μm). Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η αύξηση στην έκφραση των πρωτεϊνών DCX και NF160 κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, δηλαδή 8 ημέρες (Day 8) παρουσία RA 15μM. Η αύξηση στους δείκτες διαφοροποίησης παρατηρείται σε όλες τις Cybrid κυτταρικές σειρές, σε παρόμοια επίπεδα με την καλλιέργεια ελέγχου SH-SY5Y. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\alpha$ -tubulin.

Όπως προέκυψε, οι Cybrid κυτταρικές σειρές εκφράζουν τους δείκτες διαφοροποίησης σε συγκρίσιμα επίπεδα με την καλλιέργεια ελέγχου SH-SY5Y, ενώ δεν παρατηρείται καμία ανιχνεύσιμη διαφορά στα cybrids που προέρχονται από τον ασθενή δηλαδή τα IV2, Εικόνα 64B.

#### **Δ.Γ.5. Έλεγχος του mtDNA για μεταλλάξεις ή απαλοιφές στις Cybrid κυτταρικές σειρές που προέρχονται από το γενεαλογικό δέντρο με οικογενή νόσο του Parkinson με την τεχνολογία του «εν τω βάθει» νουκλεοτιδικής αλληλούχισης (Deep Sequencing).**

Επόμενος στόχος ήταν ο έλεγχος νουκλεοτιδικών αλλαγών που μπορεί με το πέρασμα του χρόνου και την εκδήλωση της νόσου να έχουν συσσωρευτεί στη μιτοχονδριακή αλληλουχία. Τα SNPs είναι ο πιο κοινός τύπος της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των ανθρώπων και η πιο κοινή παραλλαγή του mtDNA που είναι γνωστό ότι αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση της νόσου του Parkinson. Η μελέτη των SNPs παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την παρακολούθηση της κληρονομικότητας γονιδίων που ευθύνονται για την εμφάνιση ασθενειών μεταξύ οικογενειών. Η σύγκριση των αλληλουχιών αποκάλυψε μια σειρά από SNPs. Ο έλεγχος αυτός έγινε με τη μεθοδολογία του deep sequencing και αφορά τις cybrid κυτταρικές σειρές IV2, V9, IV4, IV5 και τις καλλιέργειες ελέγχου SH-SY5Y και control cybrid. Αρχικά, έγινε ενίσχυση του mtDNA με PCR, σε δύο μεγάλα τμήματα. Η ενίσχυση έγινε με δύο ζεύγη αλληλεπικαλυπτόμενων εκκινητών, ένα ζεύγος για το τμήμα A και ένα για το τμήμα B, ούτως ώστε να ενισχύεται το σύνολο του mtDNA, με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην παράγραφο Δ.Α.10, Εικόνα 33A. Τα προϊόντα που προκύπτουν από την αντίδραση PCR είναι τα τμήματα A και B μήκους 9289 και 7752bp, Εικόνα 24B. Τα τμήματα A και B που ενισχύονται προορίζονται για ανάλυση ολικής σάρωσης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος χρησιμοποιώντας την τελευταία τεχνολογία της «εν τω βάθει» νουκλεοτιδικής αλληλούχισης (Deep Sequencing). Η συγκριτική ανάλυση έγινε

βάση της αλληλουχίας αναφοράς για το μιτοχονδριακό γονιδίωμα NC\_012920.1 από τη βάση δεδομένων NCBI. Όπως ήταν αναμενόμενο, προέκυψαν κάποιες κοινές θέσεις SNPs για όλα τα δείγματα που αντιστοιχούν στα αποκαλούμενα κοινά πληθυσμιακά SNPs, δηλαδή πολυμορφισμοί που απαντώνται στον ανθρώπινο πληθυσμό σε ποσοστό τουλάχιστον 1%. Συνολικά εντοπίστηκαν 7 κοινά SNPs (m.263A>G, m.750A>G, m.1438A>G, m.4769A>G, m.11016G>A, m.15326A>G και m.16519 T > C), εκ των οποίων δύο εντοπίστηκαν στη μη κωδική περιοχή D-loop (m.263A>G, m.16519T>C), ενώ οι υπόλοιποι σε κωδικές περιοχές. Η συγκριτική ανάλυση αποκάλυψε διαφορετικές θέσεις πολυμορφισμών μεταξύ των δειγμάτων. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι εντοπίστηκαν θέσεις ετεροπλασμίας συγκεκριμένα στον ασθενή IV2 και στον αδελφό IV5 m.1217G>A και ακόμα μία μεταξύ των ατόμων IV2(C), IV4(C) m.6457T>C.

Γεγονός είναι ότι όσον αφορά την αριστερή πλευρά του γενεαλογικού δέντρου τα άτομα III3, IV4 και V9 έχουν ακριβώς τα ίδια SNPs. Το άτομο III3 παρότι έφερε τη μετάλλαξη της  $\alpha$ -synuclein δεν νόσησε ποτέ από τη νόσο του Parkinson, επιπλέον η κόρη IV4 που βρίσκεται στην ηλικία εκδήλωσης των συμπτωμάτων της νόσου δεν υπάρχουν ενδείξεις στο mtDNA που να υποδηλώνουν κάτι τέτοιο. Όσον αφορά τη δεξιά πλευρά του γενεαλογικού δέντρου δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στα SNPs που ανιχνεύτηκαν στο μιτοχονδριακό DNA των δύο αδελφών παρότι το ένα από τα δύο νοσεί. Η σημαντική διαφορά μεταξύ των ατόμων που βρίσκονται στις δύο πλευρές του γενεαλογικού δέντρου είναι ότι στην αριστερή πλευρά του γενεαλογικού δέντρου έχουν συσσωρευτεί στο mtDNA περισσότερα SNPs συγκριτικά με τη δεξιά πλευρά. Κάποια από αυτά, όπως φαίνεται στον Πίνακα 9, έχουν συσχετιστεί με διαταραχές όπως, ο πολυμορφισμός m.3010G>A Cyclic Vomiting Syndrome with Migraine, ο πολυμορφισμός m.4216T>C απαντάται σε ασθενείς με κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber (Leber Hereditary Optic Neuropathy / LHON), είναι μία μιτοχονδριακή νευροεκφυλιστική νόσος που προσβάλλει το οπτικό νεύρο και συχνά χαρακτηρίζεται από αιφνίδια απώλεια όρασης σε νεαρούς ενήλικες φορείς. Ο πολυμορφισμός m.10398A>G έχει χαρακτηριστεί ως προστατευτικός παράγοντας έναντι του PD (Gaweda-Walerych, Maruszak et al. 2008), έχει συσχετιστεί με μακροζωία, αλλοίωση του κυτταρικού pH, μεταβολικό σύνδρομο και κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Τέλος ο πολυμορφισμός m. 13708 G>A έχει συσχετιστεί με τη LHON, αυξημένο κίνδυνο σκλήρυνσης κατά πλάκας, ενώ είναι ένας πολυμορφισμός με υψηλή συχνότητα εμφάνισης σε ασθενείς με PD-ADS.

Και οι δύο πολυμορφισμοί στις θέσεις 10398G και 13708A αποτελούν παρανοηματικές αντικαταστάσεις οι οποίες οδηγούν σε επίπεδο αμινοξικής αλυσίδας αλλαγή από το αμινοξύ της θρεονίνης (Thr) σε αλανίνη (Ala) στο γονίδιο ND3 και από αλανίνη (Ala) σε θρεονίνη (Thr) στο γονίδιο ND5. Τα γονίδια αυτά αποτελούν δύο από τις επτά υπομονάδες του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας που κωδικοποιούνται από το mtDNA. Προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η παρουσία του αλληλομόρφου 10398G παρουσιάζει υψηλότερη συχνότητα στον φυσιολογικό πληθυσμό συγκρινόμενο με ασθενείς με νόσο του Parkinson όπου φαίνεται να επικρατεί το 10398A που αποτελεί αλληλόμορφο κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου (Simon, Mayeux et al. 2000).

Εν κατακλείδι, με βάση τη μεθοδολογία κατασκευής των cybrids που εγκαθιδρύσαμε, αναπτύξαμε cybrid κυτταρικές σειρές οι οποίες περιέχουν μιτοχόνδρια ασθενών με την κληρονομική μορφή της νόσου του Parkinson, καθώς και από υγιή συγγενικά τους άτομα. Ακολούθησε πλήρης χαρακτηρισμός των cybrids, αρχικά όσον αφορά βασικές κυτταρικές ιδιότητες όπως είναι η λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, και η ικανότητα διαφοροποίησης τους, και κατά δεύτερον έγινε έλεγχος του βαθμού των νουκλεοτιδικών αλλαγών που έχουν συσσωρευτεί στη μιτοχονδριακή αλληλουχία, με τη μεθοδολογία του deep sequencing. Το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκαν SNPs στο mtDNA του ασθενούς (IV2), αποτέλεσε μεγάλη έκπληξη. Στην περίπτωση αυτή φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο τόσο οι περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου στους οποίους εκτίθεται το άτομο σε συνδυασμό με το γενετικό υπόβαθρο στην προκειμένη τη μεταλλαγή στο γονίδιο της  $\alpha$ -synuclein.

**Πίνακας 9.** Αποτύπωση των αποτελεσμάτων από την ανάλυση της «εν τω βάθει» νουκλεοτιδικής αλληλούχισης (Deep Sequencing) για τις cybrid κυτταρικές σειρές συγκριτικά με την καλλιέργεια ελέγχου SH-SY5Y.

Position	Locus	Type	Zygosity	Reference	Variant	tx Effect	dbsnp	Disease association (Mitomaster)	samples
73	HVS2/ATT/D-Loop/7S DNA	SNP	Hom	A	G	non-coding	rs3087742		III3(A), V9(A), IV4(A), IV5(A)
263	HVS2/OH/ATT/D-Loop	SNP	Hom	A	G	non-coding	rs2853515		ALL, SH-SY5Y
462	ATT/D-Loop	SNP	Hom	C	T	non-coding	rs41402146		III3(A), V9(A), IV4(A)
489	ATT/D-Loop	SNP	Hom	T	C	non-coding	rs28625645		III3(A), V9(A), IV4(A)
750	12S	SNP	Hom	A	G	rRNA	rs2853518		ALL, SH-SY5Y
1217	rRNA	SNP	Het	G	A	rRNA			IV2(C), IV5(C)
1438	12S	SNP	Hom	A	G	rRNA	rs2001030		ALL, SH-SY5Y
2706	16S	SNP	Hom	A	G	rRNA	rs2854128		III3(A), V9(A), IV4(A)
3010	16S	SNP	Hom	G	A	rRNA	rs3928306	Cyclic Vomiting Syndrome with Migraine	III3(A), IV2(A), V1(A), V2(A), V3(A), V9(A), IV4(A), IV5(A)
4216	ND1	SNP	Hom	T	C	non-syn:Y=>H	rs1599988	LHON(Leber Hereditary Optic Neuropathy) / Insulin Resistance /possible adaptive high altitude variant	III3(A), V9(A), IV4(A)
4547	ND2	SNP	Hom	A	G	syn:W=>W			III3(A), V9(A), IV4(A)
4769	ND2	SNP	Hom	A	G	syn:M=>M	rs3021086		ALL, SH-SY5Y
6457	MT-COI	SNP	Het	T	C				IV2(C), IV4(C)
7028	COI	SNP	Hom	C	T	syn:A=>A	rs2015062		III3(A), V9(A), IV4(A)
8269	COII	SNP	Hom	G	A	syn:TERM=>TE RM	rs8896		III3(A), V9(A), IV4(A)
8460	ATPase8	SNP	Hom	A	G	non-syn:N=>S	rs1116906		III3(A), V9(A), IV4(A)
8860	ATPase6	SNP	Hom	A	G	non-syn:T=>A	rs2001031		ALL, SH-SY5Y

10398	ND3	SNP	Hom	A	G	non-syn:T=>A	rs2853826	PD protective factor / longevity / altered cell pH / metabolic syndrome / breast cancer risk	III3(A), V9(A), IV4(A)
10978	ND4	SNP	Hom	A	G	syn:L=>L			III3(A), V9(A), IV4(A)
11016	ND4	SNP	Hom	G	A	non-syn:S=>N			V9(C), IV4(C), IV5(C), IV2(C), SH-SY5Y
11251	ND4	SNP	Hom	A	G	syn:L=>L	rs3915952		III3(A), V9(A), IV4(A)
11719	ND4	SNP	Hom	G	A	syn:G=>G	rs2853495		III3(A), V9(A), IV4(A)
12612	ND5	SNP	Hom	A	G	syn:V=>V	rs28359172		III3(A), V9(A), IV4(A)
12810	ND5	SNP	Hom	A	G	syn:W=>W	rs28359174		III3(A), V9(A), IV4(A)
13708	ND5	SNP	Hom	G	A	non-syn:A=>T	rs28359178	LHON / Increased Multiple Sclerosis risk / higher freq in PD-ADS	III3(A), V9(A), IV4(A)
14766	Cytb	SNP	Hom	C	T	non-syn:T=>I	rs3135031		III3(A), V9(A), IV4(A)
15326	Cytb	SNP	Hom	A	G	non-syn:T=>A	rs2853508		ALL, SH-SY5Y
15452	Cytb	SNP	Hom	C	A	non-syn:L=>I	rs3088309		III3(A), V9(A), IV4(A)
15747	Cytb	SNP	Hom	T	C	non-syn:I=>T			III3(A), V9(A), IV4(A)
16069	ATT/D-Loop/HVS1	SNP	Hom	C	T	non-coding	rs147903261		III3(A), V9(A), IV4(A)
16126	ATT/D-Loop/HVS1/7S DNA	SNP	Hom	T	C	non-coding	rs147029798		III3(A), V9(A), IV4(A)
16145	ATT/D-Loop/HVS1/7S DNA	SNP	Hom	G	A	non-coding	rs41419246		III3(A), V9(A), IV4(A)
16169	ATT/D-Loop/HVS1/7S DNA/TAS	SNP	Hom	C	T	non-coding	rs375568603		III3(A), V9(A), IV4(A)
16222	ATT/D-Loop/HVS1/7S DNA	SNP	Hom	C	T	non-coding			III3(A), V9(A), IV4(A)
16261	ATT/D-Loop/HVS1/7S DNA	SNP	Hom	C	T	non-coding	rs138126107		III3(A), V9(A), IV4(A)
16519	ATT/D-Loop/7S DNA	SNP	Hom	T	C				ALL, SH-SY5Y





## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η νόσος Parkinson αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή χρόνια νευροεκφυλιστική διαταραχή, μετά τη νόσο Alzheimer (Tanner and Aston 2000). Οφείλεται στην εκλεκτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας και χαρακτηρίζεται από συσσώρευση συσσωματωμάτων, ινδιακής φύσης, της πρωτεΐνης  $\alpha$ -synuclein (Spillantini, Schmidt et al. 1997). Πλήθος *in vitro* και *in vivo* μελετών επιβεβαιώνουν την πιθανή συσχέτιση της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας με τις νευροεκφυλιστικές διαταραχές, ενώ η έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες θεωρείται ότι έχει σημαντική συμβολή στην παθογένεση της νόσου του Parkinson. Μετά την πρώτη αναφορά το 2000 (Betarbet, Sherer et al. 2000) ότι η χρόνια έκθεση αρουραίων σε rotenone οδηγεί σε επιλεκτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας, ακολούθησαν αναφορές όπου η χρόνια έκθεση ανθρώπινων νευροβλαστωματικών κυττάρων, σε χαμηλές συγκεντρώσεις αναστολέα, επάγει το σχηματισμό εγκλείστων  $\alpha$ -synuclein στο εσωτερικό των νευρικών κυττάρων (Sherer, Betarbet et al. 2002; Shaikh and Nicholson 2008).

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη ενός *in vitro* συστήματος για τη μοντελοποίηση του προοδευτικού χαρακτήρα της νόσου του Parkinson και τη μελέτη των διαδοχικών γεγονότων έως την εμφάνιση των εγκλείστων της  $\alpha$ -synuclein και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά SH-SY5Y, η οποία κατέχει πολλά από τα χαρακτηριστικά των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Cheung, Lau et al. 2009). Η ήπια πρόκληση οξειδωτικού stress με τη χορήγηση 6-OHDA σε μικρές συγκεντρώσεις οδηγεί στη σταδιακή συσσώρευση ROS προσδίδοντας χαρακτήρα χρόνιας οξειδωτικής κατάστασης. Η χορήγηση 6-OHDA αποτελεί τη μόνη πηγή συσσώρευσης ROS σε ένα σύστημα μελέτης με ντοπαμινεργικά χαρακτηριστικά για ένα χρονικό διάστημα 16 γενεών (passages). Η 6-OHDA, ένα υδροξυλιωμένο ανάλογο της ντοπαμίνης, χρησιμοποιήθηκε στο πρώτο επιτυχές ζωικό μοντέλο μελέτης της νόσου του Parkinson (Ungerstedt 1968). Έκτοτε έχει καθιερωθεί σαν PD μοντέλο μελέτης της εκφύλισης των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην SNpc. Η 6-OHDA συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, όπου οδηγεί στη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου –ROS- (Reactive Oxygen Species) και σε επακόλουθο οξειδωτικό stress (Cohen and Werner 1994), ενώ επηρεάζει και τη μιτοχονδριακή λειτουργία, αφού υπάρχουν ενδείξεις ότι μειώνει την ενεργότητα του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας (Glinka and Youdim 1995).

Η χορήγηση 6-OHDA σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (1 και 5  $\mu\text{M}$ ) για δεκαέξι συνεχόμενες γενιές (16 *passages*) οδήγησε στο σχηματισμό κυτταροπλασματικών εγκλείστων  $\alpha$ -synuclein στα κύτταρα. Η εμφάνιση των εγκλείστων αποτέλεσε το πρώτο παθολογικό χαρακτηριστικό της νόσου του Parkinson που ανιχνεύτηκε στο μοντέλο. Ο σχηματισμός των εγκλείστων που προήλθε από την ενδογενή  $\alpha$ -synuclein, είχε προοδευτικό χαρακτήρα καθώς άρχισαν να φαίνονται στη γενιά P:12, και ο αριθμός των κυττάρων που περιείχαν τα εγκλείστα αυξανόταν σταδιακά μέχρι τη γενιά P:16. Στο σημείο αυτό παρατηρήθηκε και σημαντική αύξηση των συνολικών επιπέδων πρωτεΐνης  $\alpha$ -synuclein. Επιπλέον, ο σχηματισμός των εγκλείστων είχε δόσοεξαρτώμενο χαρακτήρα καθώς στην υψηλή συγκέντρωση τοξίνης (5 $\mu\text{M}$ ) εντοπίζεται μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων συγκριτικά με τη μικρή συγκέντρωση (1 $\mu\text{M}$ ). Το φαινόμενο αυτό έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με προηγούμενη χρόνια μελέτη έκθεσης των κυττάρων SH-SY5Y στην τοξίνη rotenone, αναστολέα του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας (Sherer, Betarbet et al. 2002). Η φωσφορυλίωση της  $\alpha$ -synuclein στο κατάλοιπο σερίνης 129 αποτελεί μια από τις πιο συχνές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης στην PD (Sato, Kato et al. 2013), αφού το 90% της  $\alpha$ -synuclein που απαντάται στα σωματίδια του Lewy είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser129, κάτι το οποίο είναι βιοχημικά ανιχνεύσιμο στον εγκεφαλικό φλοιό, στη μέλαινα ουσία και στο βασικό πυρήνα του Meynert (Walker, Lue et al. 2013). Ο έλεγχος στη γενιά P:16 αποκάλυψε εγκλείστα που περιέκλειαν στον πυρήνα τους τη φωσφορυλιωμένη  $\alpha$ -synuclein στη Ser129, γεγονός που ενισχύει την υπόθεσή ότι το *in vitro* μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη γενιά P:16 προσομοιάζει τα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των σωματίων του Lewy. Τα παραπάνω ευρήματα επιβεβαιώνουν την δήλωση των Lee et al. ότι μια εξασθενημένη μιτοχονδριακή λειτουργία, ως αποτέλεσμα της χορήγησης 6-OHDA, μπορεί να προκαλέσει αυξημένη έκφραση  $\alpha$ -synuclein και να επάγει το σχηματισμό εγκλείστων (Lee, Shin et al. 2002).

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία έχει περιγραφεί εκτενώς στη νόσο του Parkinson. Τα πρώτα στοιχεία ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου, έρχονται μετά την παρατήρηση ότι η συστηματική χρήση παρασκευασμάτων που περιείχαν 1-μεθυλ-4-φαινυλ-1,2,4,5-τετραυδροπυριδίνη (MPTP), έναν αναστολέα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας, προκαλεί παρκινσονισμό (Langston, Ballard et al. 1983). Μείωση στη δραστηριότητα του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας κατά 30% έχει περιγραφεί στον εγκέφαλο, στους μύες, και στα αιμοπετάλια

ασθενών με σποραδική νόσο του Parkinson (Schapira, Cooper et al. 1990), ενώ συνοδεύεται από αύξηση στο οξειδωτικό stress και μείωση στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης  $\Delta\Psi_m$ . Στο μοντέλο μας, η χρήση της λιπόφιλης χρωστικής JC-1 αποκάλυψε μείωση του  $\Delta\Psi_m$  στη γενιά P:16, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των υπομονάδων της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια πηγή παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS). Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου αποτελούν παραπροϊόντα της κυτταρικής αναπνοής και συμβάλλουν σημαντικά στο ενδοκυτταρικό οξειδωτικό stress, δηλαδή στη διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των ελευθέρων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού (Starkov 2008; Murphy 2009). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η συσσώρευση ROS εντός του μιτοχονδρίου οδηγεί στη μείωση των επιπέδων εισαγωγής του ενζύμου MnSOD στο μιτοχόνδριο, αφού η μιτοχονδριακή μηχανή μεταφοράς πρωτεϊνών και ιόντων αποτελεί ευαίσθητο στόχο των ριζών υπεροξειδίου, και κατά συνέπεια λιγότερο λειτουργικό ένζυμο MnSOD υπό οξειδωτικές συνθήκες (Wright, Terada et al. 2001). Επιπλέον μειωμένα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου έχουν επιβεβαιωθεί σε διάφορες νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Evans, Dizdaroglu et al. 2004). Στη γενιά P:16 παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων MnSOD και Cytochrome c, σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη χρόνιας έκθεσης ποντικών στη νευροτοξίνη MPTP για χρονικό διάστημα 6 εβδομάδων (Patki, Che et al. 2009). Η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται και για την πρωτεΐνη Sideroflexin 3 (SfxN3), η οποία ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών που μεταφέρουν ιόντα διαμέσου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, και αποτελεί τον πιθανότερο μεταφορέα σιδήρου εντός του μιτοχονδρίου. Η μειωρύθμιση της πρωτεΐνης SfxN3 έχει επιβεβαιωθεί στη νόσο Parkinson ως απόρροια της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας (Simunovic, Yi et al. 2009). Ο έλεγχος των παραγόμενων επιπέδων ATP αποκάλυψε αύξηση στη γενιά P:16, μια παρατήρηση που έρχεται σε αντίθεση με μελέτες που δείχνουν ότι η συσσώρευση ROS έχει ως συνέπεια τη διατάραξη της ροής ηλεκτρονίων διαμέσου του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας και κατά συνέπεια στη μείωση της μιτοχονδριακής παραγωγής ATP (Chan, DeLanney et al. 1991; Fabre, Monserrat et al. 1999; Drechsel and Patel 2008; Winklhofer and Haass 2010). Τέλος, το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην έκφραση των υπομονάδων της αναπνευστικής αλυσίδας, αποκαλύπτει ότι η διατάραξη του δυναμικού της μεμβράνης αποτελεί ένα γεγονός το οποίο προηγείται χρονικά και πιθανόν η δυσλειτουργία της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας να έπεται. Στη γενιά P:12 δεν παρατηρήθηκε

κάποια ένδειξη για μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, παρότι έχουν ανιχνευτεί έγκλειστα  $\alpha$ -synuclein, κάνοντας σαφή τη χρονική σειρά εμφάνισης των γεγονότων. Το γεγονός αυτό μας επιτρέπει να θεωρήσουμε τη γενιά P:12 ως ένα πρώιμο στάδιο εκδήλωσης της νόσου.

Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία συνοδεύτηκε από έντονη μετατόπιση και συσσώρευση της  $\alpha$ -synuclein στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Ήδη από τη γενιά P:12 παρατηρήθηκε εμπλουτισμός του φυσιολογικού μιτοχονδριακού κλάσματος στην  $\alpha$ -synuclein. Η συσσώρευση της  $\alpha$ -synuclein στα μιτοχόνδρια γίνεται πολύ έντονη στη γενιά P:16, γεγονός το οποίο επίσης έχει προοδευτικό και δοσοεξαρτώμενο χαρακτήρα. Είναι γνωστό ότι η μετατόπιση της  $\alpha$ -synuclein στα μιτοχόνδρια ανθρώπινων ντοπαμινεργικών νευρώνων προκαλεί αναστολή της δραστηριότητας του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας και αύξηση στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), ενώ όταν γίνεται απαλοιφή της μιτοχονδριακής αλληλουχίας στόχου η  $\alpha$ -synuclein αποτυγχάνει να αλληλεπιδράσει με τα μιτοχόνδρια και δεν προκαλεί μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Devi, Raghavendran et al. 2008). Στα μιτοχόνδρια από τη μέλαινα ουσία και το ραβδωτό σώμα ασθενών με PD, έχουν αναφερθεί υψηλά ποσοστά συσσώρευσης της  $\alpha$ -synuclein και μειωμένη δραστηριότητα του συμπλόκου I, κάτι το οποίο δεν ανιχνεύεται στην παρεγκεφαλίδα (Devi, Raghavendran et al. 2008). *In vitro* μελέτες έχουν αποδείξει ότι η  $\alpha$ -synuclein εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Devi, Raghavendran et al. 2008; Liu, Zhang et al. 2009), ενώ άλλες μελέτες δείχνουν ότι η  $\alpha$ -synuclein μπορεί να εντοπιστεί στην εξωτερική μεμβράνη, στον διαμεμβρανικό χώρο και στην εσωτερική μεμβράνη ανάλογα με την κυτταρική σειρά και τις μεταβολές του ενδοκυτταρικού pH (Li, Yang et al. 2007; Cole, Dieuliis et al. 2008; Devi, Raghavendran et al. 2008; Parihar, Parihar et al. 2008; Zhang, Zhang et al. 2008; Liu, Zhang et al. 2009). Είναι ενδιαφέρον ότι υπό όξινες συνθήκες η  $\alpha$ -synuclein εντοπίζεται αποκλειστικά στην εξωτερική μεμβράνη (Cole, Dieuliis et al. 2008). Ωστόσο η τοπολογία της μιτοχονδριακής  $\alpha$ -synuclein και ο λόγος εντοπισμού στα μιτοχόνδρια δεν είναι γνωστός, παρότι υπάρχει άμεση συσχέτιση της μιτοχονδριακής συσσώρευσης της  $\alpha$ -synuclein με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η συσσώρευση μεταλλάξεων στο mtDNA έχει συσχετιστεί με τη γήρανση και τη νευροεκφύλιση, ενώ υψηλά επίπεδα μιτοχονδριακών απαλοιφών έχουν συσχετιστεί με τη γήρανση και τη νόσο του Parkinson (Bender, Krishnan et al. 2006). Στους νευρώνες της μέλαινας ουσίας, σε δείγματα ελέγχου ηλικιωμένων ατόμων καθώς και σε ασθενείς με νόσο του Parkinson, έχουν περιγραφεί πολύ υψηλά επίπεδα μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (~50%) (Bender,

200

Krishnan et al. 2006; Kraytsberg, Kudryavtseva et al. 2006). Ο έλεγχος για σημειακές αλλαγές ή άλλες μεταλλάξεις στο mtDNA, με την τεχνολογία της «εν τω βάθει» νουκλεοτιδικής αλληλούχισης (Deep Sequencing) δεν αποκάλυψε τροποποιήσεις του μιτοχονδριακού DNA στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης. Ωστόσο, υπάρχει ανοιχτό το ενδεχόμενο να υπάρχουν μεταλλαγές ή απαλοιφές οι οποίες να βρίσκονται σε πολύ μικρά μη ανιχνεύσιμα ποσοστά.

Στη γενιά P:16 παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της κινάσης Akt (αυξημένα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων μορφών στα κατάλοιπα Thr308 και Ser473), η οποία σχετίζεται με την ανάγκη επιβίωσης των κυττάρων ως ένας μηχανισμός απόκρισης στο *stress*, μια συμπεριφορά που ενδεχομένως να εξηγεί την παράδοξη αύξηση των επιπέδων ATP στη γενιά P:16. Η ενεργοποίηση αυτή συνοδεύεται από την παρουσία της Akt στα μιτοχόνδρια που αναφέρθηκε παραπάνω. Είναι γνωστό ότι η Akt μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια, όπου κατά κύριο λόγο απαντάται στην ενεργή της μορφή και συγκεκριμένα φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Thr308. Η μετατόπιση της Akt στα μιτοχόνδρια η οποία επιβεβαιώθηκε το 2003, εισάγει στο ερευνητικό ενδιαφέρον ένα νέο πεδίο δράσης τις κινάσης. Γνωστά υποστρώματα της Akt στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων είναι εκτός από την GSK3β, και η β-υπομονάδα της ATP συνθετάσης ή εναλλακτικά το σύμπλοκο V της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας (Bijur and Jope 2003). Η φωσφορυλίωση της ATP συνθετάσης μέσω της κινάσης Akt ρυθμίζει τα επίπεδα παραγωγής του ATP σε σκελετικούς μύες (Hojlund, Wrzesinski et al. 2003), ενώ έχει προταθεί ότι η ενδομιτοχονδριακή Akt παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και το πεπρωμένο των κυττάρων (Antico Arciuch, Galli et al. 2009). Η μετατόπιση της Akt συνοδεύεται από την συσσώρευση και του μεταγραφικού παράγοντα FOXO3a στα μιτοχόνδρια. Ο παράγοντας αυτός ανήκει στην οικογένεια FOXO (*Forkhead transcription factors of the O class*, -FOXOs), και αποτελεί ένα άλλο γνωστό υπόστρωμα της Akt (Kaestner, Knochel et al. 2000). Στους νευρώνες η ενεργοποίηση του παράγοντα FOXO3a έχει διττό ρόλο, είτε λειτουργεί προστατευτικά έναντι τοξικών παραγόντων παρέχοντας ανθεκτικότητα λόγω ενεργοποίησης της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην αποτοξίνωση από τα ROS (Mojsilovic-Petrovic, Nedelsky et al. 2009; Hamanaka and Chandel 2010), είτε επάγει νευρωνικό θάνατο ενεργοποιώντας την απόπτωση (Gilley, Coffey et al. 2003; Davila and Torres-Aleman 2008; Dick and Bading 2010). Σε ασθενείς με νόσο του Parkinson έχει παρατηρηθεί αυξημένη δραστηριότητα των μεταγραφικών παραγόντων FOXO στον εγκέφαλο (Dumitriu, Latourelle et al. 2012), ενώ έχει αναφερθεί και συνεντοπισμός της

πρωτεΐνης FOXO3a με την  $\alpha$ -synuclein στα σωματίδια του Lewy, καθώς και στους Lewy νευρίτες (Su, Liu et al. 2009). Αξίζει να σημειωθεί εδώ, ότι ο παράγοντας FOXO3a απαντάται φυσιολογικά στα μιτοχόνδρια των νευρωνικών κυττάρων, όπου αλληλεπιδρά με το mtDNA στην περιοχή ελέγχου D-loop (Caballero-Caballero, Engel et al. 2013), ενώ εμπλέκεται και στον έλεγχο της μιτοχονδριακής λειτουργίας, καθώς και στη μορφολογία και τη βιογένεση των μιτοχονδρίων (Ferber, Peck et al. 2012).

Όπως προέκυψε από πειράματα ανοσοφθορισμού, η εφαρμογή επιπλέον *stress* στα κύτταρα που βρίσκονται στο πρώιμο στάδιο της γενιάς P:12, μέσω επώασης με υψηλές συγκεντρώσεις των ουσιών rotenone και 6-OHDA για μικρά χρονικά διαστήματα (500nM/5hrs και 25M/24hrs αντίστοιχα), ωθεί τα κύτταρα στο σχηματισμό μεγάλου αριθμού εγκλειστών  $\alpha$ -synuclein. Επιπλέον η χορήγηση 25μM 6-OHDA για 24hrs έχει ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της SFxN3 πρωτεΐνης, ενώ συγχρόνως αυτό συνοδεύεται από αύξηση των ενδογενών επιπέδων της  $\alpha$ -synuclein. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η χρόνια έκθεση ευαισθητοποιεί τα κύτταρα σε επιπρόσθετο *stress*.

Είναι ενδιαφέρον ότι σε πειράματα υπερέκφρασης παρατηρήθηκαν διαφορετικές επιπτώσεις μεταξύ της αγρίου τύπου (WT) και της μεταλλαγμένης μορφής (A30P) της  $\alpha$ -synuclein. Η υπερέκφραση της A30P  $\alpha$ -synuclein στη γενιά P:12, οδηγεί στο σχηματισμό εγκλειστών στις συνθήκες 1 και 5μM 6-OHDA. Αντίθετα, η υπερέκφραση της φυσιολογικής μορφής δεν επάγει το σχηματισμό εγκλειστών. Ο έλεγχος στη γενιά P:9, ως ένα σημείο αναφοράς στο οποίο δεν εντοπίστηκε κανένας παθοφυσιολογικός φαινότυπος, αποκάλυψε επίσης το σχηματισμό εγκλειστών στη μεταλλαγμένη A30P  $\alpha$ -synuclein, με την τάση σχηματισμού να είναι πιο έντονη στη γενιά P:12. Τα πειράματα αυτά δείχνουν ότι η μεταλλαγμένη  $\alpha$ -synuclein έχει πιο ισχυρή τάση σχηματισμού των εγκλειστών συγκριτικά με την WT μορφή. Η σημειακή μετάλλαξη A30P εντοπίστηκε σε οικογένειες με κληρονομικής μορφής νόσο Parkinson και συσχετίστηκε με ασθενείς που εκφράζουν τις μεταλλάξεις του γονιδίου, και συνήθως εμφανίζουν την ασθένεια σε πρώιμο στάδιο. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η A30P παρουσιάζει μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης με τις μεμβράνες, συγκριτικά με την WT και μια άλλη μετάλλαξη (A53T) της  $\alpha$ -synuclein (Auluck, Caraveo et al. 2010), ένα γεγονός που μπορεί να συνδέεται με την πιο έντονη τάση σχηματισμού εγκλειστών. Έτσι λοιπόν, η χρόνια συσσώρευση ROS μέσω της χορήγησης της 6-OHDA οδηγεί στην εκδήλωση διαφορετικών φαινοτυπικών εκβάσεων μεταξύ της αγρίου τύπου (WT) και της

μεταλλαγμένης *α-synuclein* (A30P), με τη δεύτερη να παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία ως προς το σχηματισμό εγκλείστων.

Έλεγχος με φασματοφωτομετρία μάζας σε συνθήκες υπερέκφρασης της αγρίου τύπου *α-synuclein* και επώαση με rotenone, αποκάλυψε ότι οι συνθήκες αυτές επηρεάζουν την έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών ανάμεσα στις οποίες και της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν ότι ενώ η απόκριση στο οξύ *stress* οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης, στο μοντέλο του χρόνιου, ήπιου *stress*, τα επίπεδα της LonP1 παραμένουν σταθερά, παρατηρείται όμως μια έντονη μετατόπισή της στον πυρήνα. Η LonP1 είναι μια πρωτεΐνη απόκρισης στο *stress*, η οποία παρουσιάζει διττή συμπεριφορά (Ngo and Davies 2009; Ngo, Pomatto et al. 2013). Τα επίπεδά της αυξάνονται σε συνθήκες εφαρμογής θερμικού σοκ, στέρησης ορού ή οξειδωτικό στρες για μικρό χρονικό διάστημα (οξύ *stress*), προκειμένου να απομακρυνθούν πρωτεΐνες που έχουν υποστεί βλάβη στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου (Luciakova, Sokolikova et al. 1999; Bender, Leidhold et al. 2010; Ngo, Pomatto et al. 2013). Αντίθετα, τα επίπεδά της μειώνονται στο μυϊκό ιστό γερασμένων ποντικών (Lee, Klopp et al. 1999), σε ποντίκια ετερόζυγα για τη δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) (Bota, Van Remmen et al. 2002), καθώς και σε κύτταρα ασθενών με Κληρονομική Σπαστική Παραπληγία (Hereditary Spastic Paraplegia, SPG13) (Hansen, Corydon et al. 2008). Έχουν καταγραφεί επίσης και περιπτώσεις όπου τα συνολικά πρωτεϊνικά επίπεδα λόγω γήρανσης δεν μεταβάλλονται αλλά παρατηρείται μείωση στην ενεργότητα πρωτεάσης (Bakala, Delaval et al. 2003). Αυτά τα στοιχεία έρχονται σε απόλυτη συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, σε ότι αφορά τη συμπεριφορά της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 σε συνθήκες οξέος και χρόνιου *stress* (Εικόνες 42, 45 και 46 αντίστοιχα).

Περαιτέρω έλεγχος για τον πυρηνικό εντοπισμό της LonP1 στον πυρήνα έδειξε ότι εντοπίζεται στο κλάσμα της χρωματίνης. Η μετατόπιση στη χρωματίνη γίνεται πολύ πιο έντονη παρουσία 6-OHDA, με έναν τρόπο ο οποίος εξαρτάται από τη συγκέντρωση της τοξίνης. Η πρόσδεση της ATP-εξαρτώμενης Lon πρωτεάσης στο DNA, είναι μια εξελικτικά συντηρημένη ιδιότητα από τα βακτήρια (La, ομόλογο στα βακτήρια) στον άνθρωπο, γεγονός που υποδηλώνει ότι ίσως να αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό αυτής της πρωτεΐνης. Σε κύτταρα θηλαστικών, ένα σημαντικό ποσοστό της πρωτεάσης που βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μήτρα, εντοπίζεται στα μιτοχονδριακά πυρηνοειδή (Cheng, Kanki et al. 2005; Kucej and Butow 2007; Bogenhagen, Rousseau et al. 2008), και

αλληλεπιδρά με το mtDNA μέσω μιας ειδικής αλληλουχίας πρόσδεσης (Fu and Markovitz 1998; Liu, Lu et al. 2004; Lu, Yadav et al. 2007). Σε αντίθεση με τη βακτηριακή πρωτεάση, η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται σε δίκλωνο DNA (double-stranded DNA, dsDNA), στα ευκαρυωτικά, η Lon πρωτεάση αλληλεπιδρά με μονόκλωνο DNA (single-stranded DNA - ssDNA), μέσω της πρόσδεσής της σε περιοχές πλούσιες σε νουκλεοτιδικές βάσεις γουανίνης (G-rich), τόσο στο DNA όσο και στο RNA (Suzuki, Suda et al. 1994; Van Dyck, Pearce et al. 1994; Haynes, Yang et al. 2010). Μπορούμε να υποθέσουμε ότι η πρόσδεση της Lon στο mtDNA μπορεί να επηρεάζει τις διαδικασίες αντιγραφής ή μεταγραφής, ενώ το γεγονός ότι αποικοδομεί το μιτοχondριακό μεταγραφικό παράγοντα TFAM ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο τον αριθμό αντιγράφων του mtDNA ενισχύει την εμπλοκή της στη μιτοχondριακή μεταγραφική ρύθμιση, και τη βιολογία των μιτοχondρίων (Matsushima, Goto et al. 2010). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η Lon προσδένεται στο mtDNA σε αλληλουχίες που φέρουν τουλάχιστον 4 συνεχόμενα κατάλοιπα G, και έχουν την τάση να σχηματίζουν τετραμερή τα οποία είναι γνωστά ως G-quadruplexes. Στο μιτοχondριακό γονιδίωμα, σε κάθε ~150 νουκλεοτίδια στη βαριά αλυσίδα του mtDNA, εντοπίζονται 4–6 γειτονικά κατάλοιπα γουανίνης που μπορεί δυνητικά να αλληλεπιδράσουν και να σχηματίσουν τέτοιες δομές (Chen, Suzuki et al. 2008). Επιπλέον, G-quadruplexes έχουν εντοπιστεί στις περιοχές των υποκινητών πυρηνικών γονιδίων και λειτουργούν είτε προάγοντας είτε εμποδίζοντας τη μεταγραφή τους (Simonsson, Pecinka et al. 1998; Siddiqui-Jain, Grand et al. 2002).

Τα παραπάνω στοιχεία, σε συνδυασμό με τον εντοπισμό της LonP1 στη χρωματίνη, μας οδηγούν στην υπόθεση ότι η μιτοχondριακή πρωτεάση LonP1 μπορεί να αναγνωρίζει τέτοιες δομές στο πυρηνικό DNA. Ο συγκριτικός έλεγχος με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης για τη LonP1 και ανάλυση MS, μεταξύ των συνθηκών control και 5μM 6-OHDA (P:16), αποκάλυψε την πιθανή αλληλεπίδραση της LonP1 με πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε βιολογικές διαδικασίες που επιτελούνται στον πυρήνα. Η ομαδοποίηση των πρωτεϊνών, κατά GO και KEGG έδειξε ισχυρές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε ομάδες πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη μεταφραστική μηχανή συμπεριλαμβανομένου του ριβοσώματος, του συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης και της αμινοακυλίωσης του tRNA (aa-tRNA), στην πρωτεόσταση (πρωτεόσωμα, αναδίπλωση πρωτεϊνών, συνοδά μόρια που περιέχουν το σύμπλοκο T), στην πρόσδεση στο DNA (αντιγραφή του DNA), στη μετακίνηση πρωτεϊνών/RNA μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος (σύμπλοκα πυρηνικού πόρου). Επιπλέον, μεταξύ των παραπάνω πρωτεϊνών εντοπίστηκαν και ιστόνες.



Τα παραπάνω ευρήματα ενθαρρύνουν την υπόθεση ότι η μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1 μπορεί να εμπλέκεται και σε πυρηνικές διαδικασίες, ωστόσο απαιτούνται επιπρόσθετα, στοχευμένα πειράματα για την επιβεβαίωσή της, και τον εντοπισμό της ακριβούς θέσης αλληλεπίδρασης με το πυρηνικό γονιδίωμα. Σημειώνεται ότι η LonP1 έχει συσχετιστεί σε προηγούμενες μελέτες τόσο με τη γήρανση, όσο και με μιτοχονδριακές διαταραχές όπως το σύνδρομο MELAS (Felk, Ohrt et al. 2010), και η κληρονομική ασθένεια Hereditary Spastic Paraplegia, αλλά είναι η πρώτη φορά που το μόριο αυτό φαίνεται να σχετίζεται και με τη νόσο του Parkinson. Στο μοντέλο μας, παρατηρήθηκε μια έντονη μετατόπιση σημαντικών μορίων για την επιβίωση των κυττάρων (όπως η κινάση Akt και ο μεταγραφικός παράγοντας Foxo3a) στο μικρόκοσμο των μιτοχονδρίων, ως συνοδό χαρακτηριστικό της μετατόπισης της  $\alpha$ -synuclein. Συγχρόνως διαπιστώσαμε μια έντονη μετατόπιση της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 στον πυρήνα και συγκεκριμένα στο κλάσμα της χρωματίνης. Ωστόσο, τα υπεύθυνα μόρια που σηματοδοτούν αυτές τις μετακινήσεις, αλλά και οι διεργασίες που πυροδοτούν στο κυτταρικό διαμέρισμα που εισέρχονται, είτε αυτό είναι τα μιτοχόνδρια είτε ο πυρήνας, είναι σημαντικά ερωτήματα τα οποία αναδύθηκαν από αυτή τη μελέτη, και αξίζει να διερευνηθούν στο μέλλον.



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

6-OHDA: 6-Υδροξυντοπαμίνη, (6-Hydroxydopamine)

8-OHdG: 8-υδροξυ-2-γουανοσίνη (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)

ΔΨm: Δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, (mitochondrial membrane potential)

### A

AD: νόσος του Alzheimer, (Alzheimer's Disease)

ALP: σύστημα αποικοδόμησης αυτοφαγίας-λυσοσώματος, (autophagy-lysosomal pathway)

ALS: αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση, (amyotrophic lateral sclerosis)

α-syn: Alpha-synuclein

ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη, (Adenosine-5'-triphosphate)

### B

### C

C: Κυτταροπλασματικό, (Cytoplasm)

CBA: Chromatin Binding Assay

CL: καρδιολιπίνη, (cardiolipin)

COR: Carboxy-terminal Of Ras

COX: cytochrome c oxidase

CREB: cAMP response element binding

Cybrids: Κυτταροπλασματικά υβρίδια, (Cytoplasmic hybrids)

cyt c: το κυτόχρωμα c, (cytochrome c)

### D

DA: Ντοπαμινεργικός νευρώνας, (Dopaminergic neuron)

DAPI: 4', 6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη, (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DAT: Μεταφορέας ντοπαμίνης, (dopamine transporter)

DCX: Doublecortin

DLB: Άνοια με σωματίδια Lewy, (Dementia with Lewy bodies)

DMSO: διμεθυλο-σουλφοξείδιο, (dimethyl sulfoxide)

dsDNA: double-stranded DNA

DTT: διθειοθρεϊτόλη, (dithiothreitol)

dUMP: μονοφωσφορική δεοξουριδίνη, (deoxyuridine monophosphate)

### E

E2F: eukaryotic transcription factor 2

ECL: ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, (Enhanced Chemilluminescence)

EDTA: EthyleneDiamineTetraAcetic acid

EIF4G1: Ekaryotic translation initiation factor 4 γ 1

EtBr: βρωμιούχο αιθίδιο, (Ethidium bromide)

EtOH: Αιθανόλη, (Ethanol)

## **F**

FA: Φολικό οξύ, (Folic acid)

FACS: (Fluorescence-activated cell sorting)

FBS: Ορός εμβρύου μόσχου, (Fetal Bovine Serum)

FOXOs: Forkhead transcription factors of the O class

## **G**

GRK6: G-protein coupled receptor kinase

GSK-3β: glycogen-synthase kinase-3β

GO: Gene Ontology

## **H**

Hepes: 4-(2-υδροξυ-αιθυλο)-1-πιπεραζινο-αιθανο-θειικό οξύ, (4-(2-hydroxyethyl)-1-

HIF: hypoxia-inducible transcription factor

HP1: Heterochromatin protein 1

HSP: heat shock protein

## **I**

IGF1: Insulin-like growth factor 1

IP: Ανοσοκατακρήμνιση, (Immunoprecipitation)

## **J**

JC-1: 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazole- carbocyanide iodine

## **K**

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

## **L**

LBs: σωματίδια Lewy, (Lewy bodies)

L-dopa: L-3,4-δυδροξυφαινυλαλανίνη, (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)

LN: Νευρίτες Lewy, (Lewy Neurites)

LRRK2: leucine rich repet kinase 2

## **M**

M: Μιτοχονδριακό, (Mitochondrial)

MPTP: 1-μεθυλο-4-φαινυλο-1,2,3,6,-τετραϋδροπυριδίνη, (1-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine)

MS: Φασματομετρία μάζας, (Mass spectrometry)

mtDNA: μιτοχονδριακό DNA, (mitochondrial DNA)

MTS: mitochondrial targeting sequence

mtSSB: mitochondrial single-strand binding protein

**N**

NAC: non-amyloid-β component

NF160: Neuropfilament 160

NF-κB: nuclear factor κappa from B cells

NLS: Nuclear Localization Signal

**O**

OXPPOS: οξειδωτική φωσφορυλίωση, (oxidative phosphorylation)

**P**

PBS: διάλυμα φωσφορικών αλάτων, (phosphate buffered saline)

PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, (Polymerase Chain Reaction)

PD: νόσος του Parkinson (Parkinson's Disease)

PDK1: phosphoinositide-dependent protein kinase-1

PDK2: phosphatidylinositol-dependent kinase-2

PFA: παραφορμαλδεΰδη, (paraformaldehyde)

PINK1: PTEN-induced kinase protein 1

PIP2: phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PtdIns(3,4)P2)

PIP3: phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P3 piperazineethanesulfonic acid ) PKB/Akt: πρωτεϊνική κινάση B/Akt, (Protein kinase B/Akt)

PLK3: Polo-like kinase

PSP: Προοδευτική Υπερπυρηνική Παράλυση, (Progressive supranuclear palsy)

**Q**

**R**

RIPA Buffer: διάλυμα ραδιοανοσοκατακρήμνισης, (Radioimmunoprecipitation Assay Buffer)

RA: all-trans ρετινοϊκό οξύ, (all-trans retinoic acid)

ROS: ενεργές μορφές οξυγόνου, (reactive oxygen species)

## S

SDS: δωδεκυλο-θειικό νάτριο, (sodium dodecyl-sulphate)

Ser: Σερίνη, (Serine)

SfxN3: Siderofflexin 3

SNARE: SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor

SNCA: γονίδιο  $\alpha$ -synuclein, ( $\alpha$ -synuclein gene)

SNP: a single nucleotide polymorphism

SNpc: συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας, (Substantia nigra pars compacta)

ssDNA: single-stranded DNA

## T

TFAM: μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A, (mitochondrial transcription factor A)

TFBM: μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας B, (mitochondrial transcription factor B)

TH: υδροξυλάση της τυροσίνης, (Tyrosine Hydroxylase)

Thr: Θρεονίνη, (Threonine)

TMP: μόνοφωσφορική θυμιδίνη, (thymidine monophosphate)

TNTs: tunneling nanotubes

Tyr: Τυροσίνη, (Tyrosine)

## U

UCH-L1: Ubiquitin C-terminal Hydrolase-L1

UPS: σύστημα αποικοδόμησης ουβικουϊτινης-πρωτεασώματος, (Ubiquitin-proteasome system)

UV: υπεριώδης, (ultra violet)

## V

VPS35: Vacuolar protein sorting-associated protein 35

## W

WB: Ανοσοαποτύπωση κατά western, (Western blot)

WT: Αγρίου τύπου, (wild type)

## X

## Y

## Z

## **ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ**

### **Εισαγωγή**

**Εικόνα 1.** Παθολογοανατομία της νόσου του Parkinson. Σχηματική απεικόνιση της εκφύλισης των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην περιοχή της μέλαινας ουσίας.

**Εικόνα 2.** Σωματία του Lewy στη μέλαινα ουσία ασθενούς με νόσο του Parkinson.

**Εικόνα 3.** Σχηματική αναπαράσταση των δομικών περιοχών της πρωτεΐνης  $\alpha$ -synuclein.

**Εικόνα 4.** Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού συσσωμάτωσης της  $\alpha$ -synuclein.

**Εικόνα 5.** Μηχανισμοί μετάδοσης της  $\alpha$ -synuclein μεταξύ των κυττάρων.

**Εικόνα 6.** Σχηματική απεικόνιση της δομής του μιτοχονδρίου.

**Εικόνα 7.** Σχηματική απεικόνιση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA)

**Εικόνα 8.** Ο γενετικός κώδικας στα μιτοχόνδρια.

**Εικόνα 9.** Δομικό μοντέλο του μιτοχονδριακού πυρηνοειδούς.

**Εικόνα 10.** Η αμινοξική αλληλουχία της  $\alpha$ -synuclein.

**Εικόνα 11.** Οι χημικές δομές των νευροτοξινών που χρησιμοποιούνται στα πιο συχνά μοντέλα μελέτης της νόσου του Parkinson.

**Εικόνα 12.** Σχηματική αναπαράσταση των Cybrids.

### **Υλικά και Μέθοδοι**

**Εικόνα 13.** Κυκλικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pEGFP-N1 στον οποίο έχει ενσωματωθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την ανθρώπινη αγρίου τύπου πρωτεΐνη  $\alpha$ -synuclein (wt).

**Εικόνα 14.** Σχηματική απεικόνιση των σημείων μέτρησης κυττάρων στην πλάκα Neubauer.

**Εικόνα 15.** Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου μέσω κυτταρομετρίας ροής.

**Εικόνα 16.** Σχηματική απεικόνιση ενός κύκλου PCR.

**Εικόνα 17.** Γραφικές παραστάσεις στις οποίες εικονίζεται το κατώφλι του κύκλου στην αρχή της εκθετικής φάσης.

**Εικόνα 18.** Βασικά χαρακτηριστικά της ηλεκτροφόρησης SDS – PAGE.

**Εικόνα 19.** Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας απομόνωσης των πρωτεϊνών που προσδένονται στη χρωματίνη.

**Εικόνα 20.** Σχηματική απεικόνιση του διαχωρισμού κυτταροπλασματικών – μιτοχονδριακών εκχυλισμάτων που ακολουθήθηκε.

**Εικόνα 21.** Αλληλουχία αντιδράσεων κατά το βιοφωταυγειομετρικό προσδιορισμό ATP.

### **Αποτελέσματα**

**Εικόνα 22.** Απεικόνιση του αριθμού των κυττάρων SH-SY5Y παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων της νευροτοξίνης 6-OHDA για 3 ημέρες.

**Εικόνα 23.** Χρόνια έκθεση των κυττάρων SH-SY5Y στη νευροτοξίνη 6-OHDA για 16 γενιές οδηγεί στο σχηματισμό ενδοκυτταρικών εγκλειστών  $\alpha$ -synuclein, ταυτόχρονη αύξηση των ενδογενών επιπέδων της και μείωση στα επίπεδα έκφρασης της Parkin.

**Εικόνα 24.** Τα εγκλειστα  $\alpha$ -synuclein που σχηματίζονται μετά από χρόνια έκθεση των κυττάρων SH-SY5Y στη νευροτοξίνη 6-OHDA για 16 γενιές περιέχουν p- $\alpha$ -syn (S129).

**Εικόνα 25.** Έλεγχος του δυναμικού της μεμβράνης των μιτοχονδρίων ( $\Delta\Psi_m$ ) με τη χρήση της χρωστικής JC-1 και των παραγόμενων επιπέδων ATP, μετά από χρόνια έκθεση των κυττάρων SH-SY5Y στη νευροτοξίνη 6-OHDA.

**Εικόνα 26.** Έλεγχος του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων SH-SY5Y μετά από χρόνια έκθεση στη νευροτοξίνη 6-OHDA.

**Εικόνα 27.** Έλεγχος του δυναμικού διαφοροποίησης των κυττάρων SH-SY5Y μετά από χρόνια έκθεση στη νευροτοξίνη 6-OHDA παρουσία Retinoic Acid (RA) 15 $\mu$ M.

**Εικόνα 28.** Η χρόνια έκθεση των SH-SY5Y κυττάρων στην τοξίνη 6-OHDA έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3/Akt στη γενιά P:16.

**Εικόνα 29.** Η χρόνια έκθεση στη νευροτοξίνη 6-OHDA οδηγεί στην προοδευτική συσσώρευση της  $\alpha$ -synuclein στα μιτοχόνδρια.

**Εικόνα 30.** Θέση δέσμησης του μεταγραφικού παράγοντα FOXO3a, στην περιοχή D-loop του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA).

**Εικόνα 31.** Η χρόνια έκθεση στη νευροτοξίνη 6-OHDA έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του μεταγραφικού παράγοντα FOXO3a στη γενιά P:16 στα μιτοχόνδρια.

**Εικόνα 32.** Έλεγχος των πρωτεϊνών MnSOD, Cyt C και SFXN3 στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA.

**Εικόνα 33.** Ενίσχυση του συνολικού μιτοχονδριακού DNA.



**Εικόνα 34.** Σχηματική απεικόνιση της ομοπλασμίας, κατάσταση στην οποία επηρεάζονται όλα τα αντίγραφα mtDNA του κυττάρου και της ετεροπλασμίας, κατάσταση στην οποία επηρεάζονται μερικά από τα αντίγραφα mtDNA.

**Εικόνα 35.** Χορήγηση φολικού οξέος (Folic Acid - FA) στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA.

**Εικόνα 36.** Έλεγχος του δυναμικού διαφοροποίησης των κυττάρων μετά από χορήγηση FA στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA για το χρονικό διάστημα P:12 – P:20.

**Εικόνα 37.** Έλεγχος της απόκρισης των κυττάρων στη γενιά P:12 σε οξύ stress.

**Εικόνα 38.** Υπερέκφραση της αγρίου τύπου (WT) και της μεταλλαγμένης  $\alpha$ -synuclein (A30P) στη γενιά P:9.

**Εικόνα 39.** Έλεγχος γονιδίων της μιτοχονδριακής λειτουργίας έπειτα από υπερέκφραση της WT και της A30P  $\alpha$ -synuclein στη γενιά P:9 και P:12.

**Εικόνα 40.** Απεικόνιση των μοριακών γεγονότων που παρατηρήθηκαν στη γενιά P:16 στο *in vitro* μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA.

**Εικόνα 41.** Ανίχνευση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών το πρότυπο των οποίων μεταβάλλεται μετά την υπερέκφραση WT και A53T  $\alpha$ -synuclein και έκθεση σε rotenone, αναστολέα του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας.

**Εικόνα 42.** Σχηματική απεικόνιση των δομικών και λειτουργικών μοτίβων στην πρωτοταγή δομή της ανθρώπινης μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1.

**Εικόνα 43.** Σχηματική απεικόνιση της αναγνώρισης και αποικοδόμησης των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων από την πρωτεάση Lon.

**Εικόνα 44.** Η υπερέκφραση της  $\alpha$ -synuclein σε συνδυασμό με την αναστολή της λειτουργίας του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 και το σχηματισμό κυτταροπλασματικών εγκλείστων  $\alpha$ -synuclein.

**Εικόνα 45.** Στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA παρατηρήθηκε έντονη μετατόπιση της LonP1 στον πυρήνα, παρότι τα συνολικά πρωτεϊνικά επίπεδα παραμένουν σταθερά.

**Εικόνα 46.** Η χρόνια έκθεση στη νευροτοξίνη 6-OHDA έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 στη χρωματίνη.

**Εικόνα 47.** Οι σχετικές θέσεις στο mtDNA όπου εντοπίζονται τα G-quadruplexes και οι προβλεπόμενες θέσεις δέσμευσης της LonP1.

**Εικόνα 48.** Η πρωτοταγής αμινοξική αλληλουχία της ανθρώπινης μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1.

**Εικόνα 49.** Συγκριτική ανάλυση της ομολογίας της NLS αλληλουχίας μεταξύ των ειδών *Homo sapiens* (NP\_004784.2), *Gallus gallus* (XP\_001232112.3), *Xenopus tropicalis* (XP\_002938599.1), *Drosophila melanogaster* (NP\_649133.1) και *Saccharomyces cerevisiae* (NP\_009531.1).

**Εικόνα 50.** Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη γενιά P:16 για τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1.

**Εικόνα 51.** Ταυτοποίηση των πιθανών αλληλεπιδρώντων μορίων με τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1.

**Εικόνα 52.** Διαγραμματική αποτύπωση της ανάλυσης Γονιδιακής Οντολογίας των πρωτεϊνών που είναι κοινές και στις τρεις βιολογικές επαναλήψεις μετά από ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων της πρωτεωμικής ανάλυσης με τη χρήση των αλγορίθμων της βάσης δεδομένων GO και KEGG PATHWAY και σύμφωνα με το βαθμό εμπλουτισμού τους στα συμμετέχοντα μόρια.

**Εικόνα 53.** Απεικόνιση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πιθανών αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών με τη LonP1 στις δύο διαφορετικές συνθήκες, control (-) και 5μM.

**Εικόνα 54.** Ταυτοποίηση των πιθανών αλληλεπιδρώντων μορίων με τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1 που εντοπίζονται στο κυτταρικό διαμέρισμα του πυρήνα.

**Εικόνα 55.** Απεικόνιση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πυρηνικών πρωτεϊνών κατά STRING.

**Εικόνα 56.** Η Hsp90 αλληλεπιδρά άμεσα με τη μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1, όπως αποδείχθηκε από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης.

**Εικόνα 57.** Πυρηνικός εντοπισμός της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 στο μοντέλο χρόνιας έκθεσης για τη νόσο του Parkinson.

**Εικόνα 58.** Σχηματική απεικόνιση της αναστολής της αντιγραφής του mtDNA από το Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide - EtBr).

**Εικόνα 59.** Διαδικασία δημιουργίας των ρ0 κυττάρων παρουσία του αναστολέα EtBr.

**Εικόνα 60.** Έλεγχος του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης ΔΨm στα ρ0 κύτταρα με τη χρήση της χρωστικής JC-1.

**Εικόνα 61.** Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας σχηματισμού των Κυτταροπλασματικών υβριδίων (Cytoplasmic Hybrids – Cybrids).

**Εικόνα 62.** Απεικόνιση των cybrid αποικιών όπως αυτές παρατηρήθηκαν στα χρονικά διαστήματα 1 εβδομάδα μετά τη σύντηξη και 4 εβδομάδες μετά τη διαλογή και έλεγχο των ιδιοτήτων πολλαπλασιασμού και του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης.

**Εικόνα 63.** Κατασκευή cybrid κυτταρικών σειρών από Γενεαλογικό δέντρο με οικογενή νόσο του Parkinson στο οποίο εμφανίζεται η σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο της *α-synuclein*, A53T.

**Εικόνα 64.** Έλεγχος του ρυθμού πολλαπλασιασμού και του δυναμικού διαφοροποίησης των Cybrid κυτταρικών σειρών που προήλθαν από Γενεαλογικό δέντρο με οικογενή μορφή νόσο του Parkinson.

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

**Πίνακας 1.** Οι γενετικοί τόποι που έχουν συσχετισθεί μέχρι σήμερα με την κληρονομικότητα της Νόσου του Parkinson.

**Πίνακας 2.** Αντιπροσωπευτικά Πρκινσονιακά μοντέλα θηλαστικών επαγόμενα από τη δράση νευροτοξινών.

**Πίνακας 3.** Γενετικά ζωικά Παρκινσονιακά μοντέλα.

**Πίνακας 4.** Το σύνολο των εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

**Πίνακας 5.** Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμιδίου για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

**Πίνακας 6.** Αποτύπωση των αποτελεσμάτων από την ανάλυση της «εν τω βάθει» νουκλεοτιδικής αλληλούχησης (Deep Sequencing) για το μοντέλο χρόνιας έκθεσης στη νευροτοξίνη 6-OHDA.

**Πίνακας 7.** Στον πίνακα συμπεριλαμβάνονται οι πρωτεΐνες που προέκυψαν μετά την ανάλυση με φασματομετρία μάζας (mass spectrometry-MS) και αντιστοιχούν στη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης με μοριακό βάρος εύρους 103 έως 74 kDa.

**Πίνακας 8.** Στον πίνακα συμπεριλαμβάνονται τα διαλύματα και τα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των Cybrid κυττάρων.

**Πίνακας 9.** Αποτύπωση των αποτελεσμάτων από την ανάλυση της «εν τω βάθει» νουκλεοτιδικής αλληλούχησης (Deep Sequencing) για τις cybrid κυτταρικές σειρές συγκριτικά με την καλλιέργεια ελέγχου SH-SY5Y.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1949). Action de l'acriflavine sur les levures: La mutation petite colonie, Masson et Cie.
- Abecasis, G. R., D. Altshuler, et al. (2010). "A map of human genome variation from population-scale sequencing." Nature 467(7319): 1061-1073.
- Abeliovich, A., Y. Schmitz, et al. (2000). "Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system." Neuron 25(1): 239-252.
- Aivaliotis, M., K. Gevaert, et al. (2007). "Large-scale identification of N-terminal peptides in the halophilic archaea *Halobacterium salinarum* and *Natronomonas pharaonis*." J Proteome Res 6(6): 2195-2204.
- Aivaliotis, M., B. Macek, et al. (2009). "Ser/Thr/Tyr protein phosphorylation in the archaeon *Halobacterium salinarum*--a representative of the third domain of life." PLoS One 4(3): e4777.
- Ajioka, R. S., J. D. Phillips, et al. (2006). "Biosynthesis of heme in mammals." Biochim Biophys Acta 1763(7): 723-736.
- Akhlaq, M. S., H. P. Schuchmann, et al. (1987). "The reverse of the 'repair' reaction of thiols: H-abstraction at carbon by thiyl radicals." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 51(1): 91-102.
- Alam, T. I., T. Kanki, et al. (2003). "Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM." Nucleic Acids Res 31(6): 1640-1645.
- Alim, M. A., Q. L. Ma, et al. (2004). "Demonstration of a role for alpha-synuclein as a functional microtubule-associated protein." J Alzheimers Dis 6(4): 435-442; discussion 443-439.
- Alvarez-Erviti, L., Y. Seow, et al. (2011). "Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission." Neurobiol Dis 42(3): 360-367.
- Amerik, A., V. K. Antonov, et al. (1991). "Site-directed mutagenesis of La protease. A catalytically active serine residue." FEBS Lett 287(1-2): 211-214.
- Anderson, S., A. T. Bankier, et al. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." Nature 290(5806): 457-465.
- Andjelkovic, M., D. R. Alessi, et al. (1997). "Role of translocation in the activation and function of protein kinase B." J Biol Chem 272(50): 31515-31524.
- Anglade, P., S. Vyas, et al. (1997). "Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease." Histol Histopathol 12(1): 25-31.
- Angot, E. and P. Brundin (2009). "Dissecting the potential molecular mechanisms underlying alpha-synuclein cell-to-cell transfer in Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord 15 Suppl 3: S143-147.
- Angot, E., J. A. Steiner, et al. (2012). "Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons in vivo." PLoS One 7(6): e39465.
- Antico Arciuch, V. G., S. Galli, et al. (2009). "Akt1 intramitochondrial cycling is a crucial step in the redox modulation of cell cycle progression." PLoS One 4(10): e7523.
- Asano, T., M. Komatsu, et al. (2011). "Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells." Mol Cell Biol 31(10): 2040-2052.
- Ashburner, M., C. A. Ball, et al. (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." Nat Genet 25(1): 25-29.
- Auluck, P. K., G. Caraveo, et al. (2010). "alpha-Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease." Annu Rev Cell Dev Biol 26: 211-233.
- Auluck, P. K., H. Y. Chan, et al. (2002). "Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease." Science 295(5556): 865-868.
- B. Ephrussi, H. Hottingueb, et al. (1949). Action de l'acriflavine sur les levures. 1. La mutation "petite colonie", Masson et Cie.

- B. Ephrussi, H. Hottingueb, et al., Eds. (1949). Action de l'acriflavine sur les levures. 1. La mutation "petite colonie", Masson et Cie.
- Bakala, H., E. Delaval, et al. (2003). "Changes in rat liver mitochondria with aging. Lon protease-like reactivity and N(epsilon)-carboxymethyllysine accumulation in the matrix." Eur J Biochem 270(10): 2295-2302.
- Bandopadhyay, R. and J. de Bellerocche (2010). "Pathogenesis of Parkinson's disease: emerging role of molecular chaperones." Trends Mol Med 16(1): 27-36.
- Belin, A. C. and M. Westerlund (2008). "Parkinson's disease: a genetic perspective." FEBS J 275(7): 1377-1383.
- Bell, N., V. Hann, et al. (2013). "Store-operated Ca(2+) entry in proliferating and retinoic acid-differentiated N- and S-type neuroblastoma cells." Biochim Biophys Acta 1833(3): 643-651.
- Bellucci, A., M. Zaltieri, et al. (2012). "From alpha-synuclein to synaptic dysfunctions: new insights into the pathophysiology of Parkinson's disease." Brain Res 1476: 183-202.
- Bender, A., K. J. Krishnan, et al. (2006). "High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease." Nat Genet 38(5): 515-517.
- Bender, T., C. Leidhold, et al. (2010). "The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress." Proteomics 10(7): 1426-1443.
- Berardelli, A., J. C. Rothwell, et al. (2001). "Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease." Brain 124(Pt 11): 2131-2146.
- Bernheimer, H., W. Birkmayer, et al. (1973). "Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations." J Neurol Sci 20(4): 415-455.
- Betarbet, R., T. B. Sherer, et al. (2000). "Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease." Nat Neurosci 3(12): 1301-1306.
- Bianchi, M. E. and A. Agresti (2005). "HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation." Curr Opin Genet Dev 15(5): 496-506.
- Biedler, J. L., S. Roffler-Tarlov, et al. (1978). "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones." Cancer Res 38(11 Pt 1): 3751-3757.
- Bielski, B., Cabelli, D. (1985). "Reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>- radicals in aqueous solution." J. Phys. Chem.: 1041-1100.
- Bieschke, J., J. Russ, et al. (2010). "EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity." Proc Natl Acad Sci U S A 107(17): 7710-7715.
- Bijur, G. N. and R. S. Jope (2003). "Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation." J Neurochem 87(6): 1427-1435.
- Bisaglia, M., S. Mammi, et al. (2009). "Structural insights on physiological functions and pathological effects of alpha-synuclein." FASEB J 23(2): 329-340.
- Blin, O., C. Desnuelle, et al. (1994). "Mitochondrial respiratory failure in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy." J Neurol Sci 125(1): 95-101.
- Blount, B. C. and B. N. Ames (1995). "DNA damage in folate deficiency." Baillieres Clin Haematol 8(3): 461-478.
- Blum, D., S. Torch, et al. (2001). "Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease." Prog Neurobiol 65(2): 135-172.
- Bogenghagen, D. F., D. Rousseau, et al. (2008). "The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids." J Biol Chem 283(6): 3665-3675.
- Bonifati, V., P. Rizzu, et al. (2003). "Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism." Science 299(5604): 256-259.

- Borland, M. K., K. P. Mohanakumar, et al. (2009). "Relationships among molecular genetic and respiratory properties of Parkinson's disease cybrid cells show similarities to Parkinson's brain tissues." *Biochim Biophys Acta* 1792(1): 68-74.
- Bota, D. A. and K. J. Davies (2001). "Protein degradation in mitochondria: implications for oxidative stress, aging and disease: a novel etiological classification of mitochondrial proteolytic disorders." *Mitochondrion* 1(1): 33-49.
- Bota, D. A., H. Van Remmen, et al. (2002). "Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress." *FEBS Lett* 532(1-2): 103-106.
- Broadley, S. A. and F. U. Hartl (2009). "The role of molecular chaperones in human misfolding diseases." *FEBS Lett* 583(16): 2647-2653.
- Brooks, A. I., C. A. Chadwick, et al. (1999). "Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss." *Brain Res* 823(1-2): 1-10.
- Brown, J. P., S. Couillard-Despres, et al. (2003). "Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis." *J Comp Neurol* 467(1): 1-10.
- Brown, T. A. and D. A. Clayton (2002). "Release of replication termination controls mitochondrial DNA copy number after depletion with 2',3'-dideoxycytidine." *Nucleic Acids Res* 30(9): 2004-2010.
- Bruchelt, G., I. U. Schraufstatter, et al. (1991). "Ascorbic acid enhances the effects of 6-hydroxydopamine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on iron-dependent DNA strand breaks and related processes in the neuroblastoma cell line SK-N-SH." *Cancer Res* 51(22): 6066-6072.
- Brundin, P., J. Y. Li, et al. (2008). "Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread." *Nat Rev Neurosci* 9(10): 741-745.
- Bunn, C. L., D. C. Wallace, et al. (1974). "Cytoplasmic inheritance of chloramphenicol resistance in mouse tissue culture cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 71(5): 1681-1685.
- Burchell, V. S., D. E. Nelson, et al. (2013). "The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy." *Nat Neurosci* 16(9): 1257-1265.
- Burns, R. S., C. C. Chiueh, et al. (1983). "A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(14): 4546-4550.
- Burre, J., M. Sharma, et al. (2010). "Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro." *Science* 329(5999): 1663-1667.
- Caballero-Caballero, A., T. Engel, et al. (2013). "Mitochondrial localization of the forkhead box class O transcription factor FOXO3a in brain." *J Neurochem* 124(6): 749-756.
- Cabeza-Arvelaiz, Y. and R. H. Schiestl (2012). "Transcriptome analysis of a rotenone model of parkinsonism reveals complex I-tied and -untied toxicity mechanisms common to neurodegenerative diseases." *PLoS One* 7(9): e44700.
- Cadet, J. L. and C. Brannock (1998). "Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems." *Neurochem Int* 32(2): 117-131.
- Callio, J., T. D. Oury, et al. (2005). "Manganese superoxide dismutase protects against 6-hydroxydopamine injury in mouse brains." *J Biol Chem* 280(18): 18536-18542.
- Calnan, D. R. and A. Brunet (2008). "The FoxO code." *Oncogene* 27(16): 2276-2288.
- Candas, D. and J. J. Li (2014). "MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx." *Antioxid Redox Signal* 20(10): 1599-1617.
- Candiano, G., M. Bruschi, et al. (2004). "Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis." *Electrophoresis* 25(9): 1327-1333.
- Carrodeguas, J. A., R. Kobayashi, et al. (1999). "The accessory subunit of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA polymerase gamma increases processivity of the catalytic subunit of human DNA polymerase gamma and is related to class II aminoacyl-tRNA synthetases." *Mol Cell Biol* 19(6): 4039-4046.

- Carrodeguas, J. A., K. Theis, et al. (2001). "Crystal structure and deletion analysis show that the accessory subunit of mammalian DNA polymerase gamma, Pol gamma B, functions as a homodimer." Mol Cell 7(1): 43-54.
- Cassarino, D. S., C. P. Fall, et al. (1997). "Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease." Biochim Biophys Acta 1362(1): 77-86.
- Cassarino, D. S., E. M. Halvorsen, et al. (2000). "Interaction among mitochondria, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor-kappaB in cellular models of Parkinson's disease." J Neurochem 74(4): 1384-1392.
- Cerruti, C., D. M. Walther, et al. (1993). "Dopamine transporter mRNA expression is intense in rat midbrain neurons and modest outside midbrain." Brain Res Mol Brain Res 18(1-2): 181-186.
- Chan, P., L. E. DeLanney, et al. (1991). "Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain." J Neurochem 57(1): 348-351.
- Chandra, S., F. Fornai, et al. (2004). "Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions." Proc Natl Acad Sci U S A 101(41): 14966-14971.
- Chartier-Harlin, M. C., J. C. Daxsel, et al. (2011). "Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease." Am J Hum Genet 89(3): 398-406.
- Chartier-Harlin, M. C., J. Kachergus, et al. (2004). "Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease." Lancet 364(9440): 1167-1169.
- Chen, C. and B. H. Paw (2012). "Cellular and mitochondrial iron homeostasis in vertebrates." Biochim Biophys Acta 1823(9): 1459-1467.
- Chen, H., S. M. Zhang, et al. (2004). "Folate intake and risk of Parkinson's disease." Am J Epidemiol 160(4): 368-375.
- Chen, S. H., C. K. Suzuki, et al. (2008). "Thermodynamic characterization of specific interactions between the human Lon protease and G-quartet DNA." Nucleic Acids Res 36(4): 1273-1287.
- Cheng, X., T. Kanki, et al. (2005). "PDIP38 associates with proteins constituting the mitochondrial DNA nucleoid." J Biochem 138(6): 673-678.
- Cheung, Y. T., W. K. Lau, et al. (2009). "Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research." Neurotoxicology 30(1): 127-135.
- Chiacchiera F, S. C. (2010). "The AMPK-FoxO3A axis as a target for cancer treatment." Cell Cycle 6: 1091-1096.
- Chinta, S. J., J. K. Mallajosyula, et al. (2010). "Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo." Neurosci Lett 486(3): 235-239.
- Choi, W. S., S. Y. Yoon, et al. (1999). "Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP+-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK." J Neurosci Res 57(1): 86-94.
- Ciccarone, V., B. A. Spengler, et al. (1989). "Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages." Cancer Res 49(1): 219-225.
- Clayton, D. A. (2000). "Transcription and replication of mitochondrial DNA." Hum Reprod 15 Suppl 2: 11-17.
- Cocheme, H. M. and M. P. Murphy (2008). "Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat." J Biol Chem 283(4): 1786-1798.
- Cohen, G. (1984). "Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons." Neurotoxicology 5(1): 77-82.
- Cohen, G. and P. Werner (1994). "Free radicals, oxidative stress, and neurodegeneration." Neurodegenerative diseases 139-161.



- Cole, N. B., D. Dieuliis, et al. (2008). "Mitochondrial translocation of alpha-synuclein is promoted by intracellular acidification." *Exp Cell Res* 314(10): 2076-2089.
- Consortium, G. O. (2014). Gene Ontology Consortium: going forward, Oxford University Press on behalf of Nucleic Acids Research.
- Cookson, M. R. (2005). "The biochemistry of Parkinson's disease." *Annu Rev Biochem* 74: 29-52.
- Corti, O., S. Lesage, et al. (2011). "What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease." *Physiol Rev* 91(4): 1161-1218.
- Cottrell, D. A., E. L. Blakely, et al. (2001). "Mitochondrial enzyme-deficient hippocampal neurons and choroidal cells in AD." *Neurology* 57(2): 260-264.
- Cox, J. and M. Mann (2012). "1D and 2D annotation enrichment: a statistical method integrating quantitative proteomics with complementary high-throughput data." *BMC Bioinformatics* 13 Suppl 16: S12.
- Cross, J. C., M. L. Flannery, et al. (1995). "Hxt encodes a basic helix-loop-helix transcription factor that regulates trophoblast cell development." *Development* 121(8): 2513-2523.
- Crowther, R. A., S. E. Daniel, et al. (2000). "Characterisation of isolated alpha-synuclein filaments from substantia nigra of Parkinson's disease brain." *Neurosci Lett* 292(2): 128-130.
- Cuervo, A. M., L. Stefanis, et al. (2004). "Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy." *Science* 305(5688): 1292-1295.
- Currais, A., T. Hortobagyi, et al. (2009). "The neuronal cell cycle as a mechanism of pathogenesis in Alzheimer's disease." *Aging (Albany NY)* 1(4): 363-371.
- Danzer, K. M., D. Haasen, et al. (2007). "Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding." *J Neurosci* 27(34): 9220-9232.
- Danzer, K. M., L. R. Kranich, et al. (2012). "Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers." *Mol Neurodegener* 7: 42.
- Datta, S. R., A. Brunet, et al. (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." *Genes Dev* 13(22): 2905-2927.
- Dauer, W., N. Kholodilov, et al. (2002). "Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(22): 14524-14529.
- Dauer, W. and S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." *Neuron* 39(6): 889-909.
- Davila, D. and I. Torres-Aleman (2008). "Neuronal death by oxidative stress involves activation of FOXO3 through a two-arm pathway that activates stress kinases and attenuates insulin-like growth factor I signaling." *Mol Biol Cell* 19(5): 2014-2025.
- Day, B. J., M. Patel, et al. (1999). "A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12760-12765.
- de Coo, I. F., H. J. Smeets, et al. (1996). "Isolated case of mental retardation and ataxia due to a de novo mitochondrial T8993G mutation." *Am J Hum Genet* 58(3): 636-638.
- Dehay, B., M. Bourdenx, et al. (2015). "Targeting alpha-synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations." *Lancet Neurol* 14(8): 855-866.
- Deleersnijder, A., M. Gerard, et al. (2013). "The remarkable conformational plasticity of alpha-synuclein: blessing or curse?" *Trends Mol Med* 19(6): 368-377.
- Desai, V. G., R. J. Feuers, et al. (1996). "MPP(+)-induced neurotoxicity in mouse is age-dependent: evidenced by the selective inhibition of complexes of electron transport." *Brain Res* 715(1-2): 1-8.
- Desjardins, P., E. Frost, et al. (1985). "Ethidium bromide-induced loss of mitochondrial DNA from primary chicken embryo fibroblasts." *Mol Cell Biol* 5(5): 1163-1169.
- Desplats, P., H. J. Lee, et al. (2009). "Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(31): 13010-13015.

- Devasagayam, T. P., K. K. Bloor, et al. (2003). "Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits." *Indian J Biochem Biophys* 40(5): 300-308.
- Devi, L. and H. K. Anandatheerthavarada (2010). "Mitochondrial trafficking of APP and alpha synuclein: Relevance to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's and Parkinson's diseases." *Biochim Biophys Acta* 1802(1): 11-19.
- Devi, L., V. Raghavendran, et al. (2008). "Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain." *J Biol Chem* 283(14): 9089-9100.
- Di Fonzo, A., M. C. Dekker, et al. (2009). "FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome." *Neurology* 72(3): 240-245.
- Di Meo, S. and P. Venditti (2001). "Mitochondria in exercise-induced oxidative stress." *Biol Signals Recept* 10(1-2): 125-140.
- Di Re, M., H. Sembongi, et al. (2009). "The accessory subunit of mitochondrial DNA polymerase gamma determines the DNA content of mitochondrial nucleoids in human cultured cells." *Nucleic Acids Res* 37(17): 5701-5713.
- Dick, O. and H. Bading (2010). "Synaptic activity and nuclear calcium signaling protect hippocampal neurons from death signal-associated nuclear translocation of FoxO3a induced by extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors." *J Biol Chem* 285(25): 19354-19361.
- Dizdaroglu, M., P. Jaruga, et al. (2002). "Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement." *Free Radic Biol Med* 32(11): 1102-1115.
- Drechsel, D. A. and M. Patel (2008). "Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease." *Free Radic Biol Med* 44(11): 1873-1886.
- Duan, W., B. Ladenheim, et al. (2002). "Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease." *J Neurochem* 80(1): 101-110.
- Dumitriu, A., J. C. Latourelle, et al. (2012). "Gene expression profiles in Parkinson disease prefrontal cortex implicate FOXO1 and genes under its transcriptional regulation." *PLoS Genet* 8(6): e1002794.
- Duty, S. and P. Jenner (2011). "Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease." *Br J Pharmacol* 164(4): 1357-1391.
- Ebel, W., M. M. Skinner, et al. (1999). "A conserved domain in Escherichia coli Lon protease is involved in substrate discriminator activity." *J Bacteriol* 181(7): 2236-2243.
- Ebrahimi-Fakhari, D., I. Cantuti-Castelvetri, et al. (2011). "Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of alpha-synuclein." *J Neurosci* 31(41): 14508-14520.
- Ekstrand, M. I., M. Falkenberg, et al. (2004). "Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals." *Hum Mol Genet* 13(9): 935-944.
- Ellis, C. E., E. J. Murphy, et al. (2005). "Mitochondrial lipid abnormality and electron transport chain impairment in mice lacking alpha-synuclein." *Mol Cell Biol* 25(22): 10190-10201.
- Eriksen, J. L., S. Przedborski, et al. (2005). "Gene dosage and pathogenesis of Parkinson's disease." *Trends Mol Med* 11(3): 91-96.
- Esteves, A. R., A. F. Domingues, et al. (2008). "Mitochondrial function in Parkinson's disease cybrids containing an nt2 neuron-like nuclear background." *Mitochondrion* 8(3): 219-228.
- Evans, M. D., M. Dizdaroglu, et al. (2004). "Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance." *Mutat Res* 567(1): 1-61.

- Fabre, E., J. Monserrat, et al. (1999). "Effect of MPTP on brain mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ATP production and on dopamine and DOPAC in the striatum." *J Physiol Biochem* 55(4): 325-331.
- Farrer, M., K. Gwinn-Hardy, et al. (1999). "A chromosome 4p haplotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor." *Hum Mol Genet* 8(1): 81-85.
- Felk, S., S. Ohrt, et al. (2010). "Activation of the mitochondrial protein quality control system and actin cytoskeletal alterations in cells harbouring the MELAS mitochondrial DNA mutation." *J Neurol Sci* 295(1-2): 46-52.
- Feng, L. R. and K. A. Maguire-Zeiss (2010). "Gene therapy in Parkinson's disease: rationale and current status." *CNS Drugs* 24(3): 177-192.
- Ferber, E. C., B. Peck, et al. (2012). "FOXO3a regulates reactive oxygen metabolism by inhibiting mitochondrial gene expression." *Cell Death Differ* 19(6): 968-979.
- Ferger, B., S. Rose, et al. (2001). "6-hydroxydopamine increases hydroxyl free radical production and DNA damage in rat striatum." *Neuroreport* 12(6): 1155-1159.
- Fornai, F., O. M. Schluter, et al. (2005). "Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(9): 3413-3418.
- Forno, L. S., L. E. DeLanney, et al. (1993). "Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations." *Adv Neurol* 60: 600-608.
- Franceschini, A., D. Szklarczyk, et al. (2013). "STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration." *Nucleic Acids Res* 41(Database issue): D808-815.
- Fridovich, I. (1995). "Superoxide radical and superoxide dismutases." *Annu Rev Biochem* 64: 97-112.
- Fu, G. K. and D. M. Markovitz (1998). "The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner." *Biochemistry* 37(7): 1905-1909.
- Fujiwara, H., M. Hasegawa, et al. (2002). "alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions." *Nat Cell Biol* 4(2): 160-164.
- Fukuda, R., H. Zhang, et al. (2007). "HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells." *Cell* 129(1): 111-122.
- Gainetdinov, R. R., F. Fumagalli, et al. (1997). "Dopamine transporter is required for in vivo MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter." *J Neurochem* 69(3): 1322-1325.
- Gallegos, S., C. Pacheco, et al. (2015). "Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinson's disease." *Front Neurosci* 9: 59.
- Gandhi, S., A. Wood-Kaczmar, et al. (2009). "PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death." *Mol Cell* 33(5): 627-638.
- Gasser, T. (2009). "Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies." *Expert Rev Mol Med* 11: e22.
- Gasser, T., B. Muller-Myhsok, et al. (1998). "A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13." *Nat Genet* 18(3): 262-265.
- Gaweda-Walerych, K., A. Maruszak, et al. (2008). "Mitochondrial DNA haplogroups and subhaplogroups are associated with Parkinson's disease risk in a Polish PD cohort." *J Neural Transm (Vienna)* 115(11): 1521-1526.
- Gerdes, J., L. Li, et al. (1991). "Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67." *Am J Pathol* 138(4): 867-873.

- Ghaffarpour, M., R. Mahdian, et al. (2014). "The mitochondrial ATPase6 gene is more susceptible to mutation than the ATPase8 gene in breast cancer patients." Cancer Cell Int 14(1): 21.
- Ghosh, S. S., R. H. Swerdlow, et al. (1999). "Use of cytoplasmic hybrid cell lines for elucidating the role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease." Ann N Y Acad Sci 893: 176-191.
- Gibb, W. R. and A. J. Lees (1991). "Anatomy, pigmentation, ventral and dorsal subpopulations of the substantia nigra, and differential cell death in Parkinson's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry 54(5): 388-396.
- Gilkerson, R. W., D. H. Margineantu, et al. (2000). "Mitochondrial DNA depletion causes morphological changes in the mitochondrial reticulum of cultured human cells." FEBS Lett 474(1): 1-4.
- Gilley, J., P. J. Coffey, et al. (2003). "FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons." J Cell Biol 162(4): 613-622.
- Glinka, Y. Y. and M. B. Youdim (1995). "Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine." Eur J Pharmacol 292(3-4): 329-332.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, et al. (2013). "100 years of Lewy pathology." Nat Rev Neurol 9(1): 13-24.
- Goldberg, M. S., S. M. Fleming, et al. (2003). "Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons." J Biol Chem 278(44): 43628-43635.
- Gomez-Lazaro, M., N. A. Bonekamp, et al. (2008). "6-Hydroxydopamine (6-OHDA) induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation in SH-SY5Y cells." Free Radic Biol Med 44(11): 1960-1969.
- Gonzalez-Horta, A. (2013). "Fluorescence as a Tool to Study Lipid-Protein Interactions: The Case of  $\alpha$ -Synuclein." Open Journal of Biophysics 3: 112-119.
- Goulian, M., B. Bleile, et al. (1980). "Methotrexate-induced misincorporation of uracil into DNA." Proc Natl Acad Sci U S A 77(4): 1956-1960.
- Graziewicz, M. A., M. J. Longley, et al. (2006). "DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair." Chem Rev 106(2): 383-405.
- Greenamyre, J. T., G. MacKenzie, et al. (1999). "Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease." Biochem Soc Symp 66: 85-97.
- Greene, J. C., A. J. Whitworth, et al. (2003). "Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants." Proc Natl Acad Sci U S A 100(7): 4078-4083.
- Greer, E. L. and A. Brunet (2005). "FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression." Oncogene 24(50): 7410-7425.
- Gregoire, M., R. Morais, et al. (1984). "On auxotrophy for pyrimidines of respiration-deficient chick embryo cells." Eur J Biochem 142(1): 49-55.
- Greten-Harrison, B., M. Polydoro, et al. (2010). "Alphabeta-gamma-Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction." Proc Natl Acad Sci U S A 107(45): 19573-19578.
- Griffiths, C. S., G. F. Barrowclough, et al. (2004). "Phylogeny of the Falconidae (Aves): a comparison of the efficacy of morphological, mitochondrial, and nuclear data." Mol Phylogenet Evol 32(1): 101-109.
- Grunblatt, E., S. Mandel, et al. (2001). "Gene expression analysis in N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice model of Parkinson's disease using cDNA microarray: effect of R-apomorphine." J Neurochem 78(1): 1-12.
- Grune, T., P. Michel, et al. (1997). "Increased levels of 4-hydroxynonenal modified proteins in plasma of children with autoimmune diseases." Free Radic Biol Med 23(3): 357-360.

- Gu, M., J. M. Cooper, et al. (1998). "Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease." Ann Neurol 44(2): 177-186.
- Haas, R. H., F. Nasirian, et al. (1995). "Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease." Ann Neurol 37(6): 714-722.
- Halliwell, B. (1999). "Free radicals in biology and medicine." Oxford University Press.
- Halliwell, B. (2001). "Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment." Drugs Aging 18(9): 685-716.
- Hamanaka, R. B. and N. S. Chandel (2010). "Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes." Trends Biochem Sci 35(9): 505-513.
- Hampshire, D. J., E. Roberts, et al. (2001). "Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36." J Med Genet 38(10): 680-682.
- Hansen, C., E. Angot, et al. (2011). "alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells." J Clin Invest 121(2): 715-725.
- Hansen, J., T. J. Corydon, et al. (2008). "Decreased expression of the mitochondrial matrix proteases Lon and ClpP in cells from a patient with hereditary spastic paraplegia (SPG13)." Neuroscience 153(2): 474-482.
- Hara, S., S. Arawaka, et al. (2013). "Serine 129 phosphorylation of membrane-associated alpha-synuclein modulates dopamine transporter function in a G protein-coupled receptor kinase-dependent manner." Mol Biol Cell 24(11): 1649-1660, S1641-1643.
- Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl (2009). "Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo." Nat Struct Mol Biol 16(6): 574-581.
- Hartwell, L. H. and T. A. Weinert (1989). "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." Science 246(4930): 629-634.
- Hasegawa, E., D. Kang, et al. (1997). "A dual effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-analogs on the respiratory chain of bovine heart mitochondria." Arch Biochem Biophys 337(1): 69-74.
- Hashimoto, M., K. Kawahara, et al. (2004). "The Role of alpha-synuclein assembly and metabolism in the pathogenesis of Lewy body disease." J Mol Neurosci 24(3): 343-352.
- Hatano, T., S. Kubo, et al. (2007). "Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts." Hum Mol Genet 16(6): 678-690.
- Hattori, N., M. Tanaka, et al. (1991). "Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondria in Parkinson's disease." Ann Neurol 30(4): 563-571.
- Hauser, M. A., Y. J. Li, et al. (2005). "Expression profiling of substantia nigra in Parkinson disease, progressive supranuclear palsy, and frontotemporal dementia with parkinsonism." Arch Neurol 62(6): 917-921.
- Hayashi, J., S. Ohta, et al. (1991). "Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction." Proc Natl Acad Sci U S A 88(23): 10614-10618.
- Haynes, C. M., Y. Yang, et al. (2010). "The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*." Mol Cell 37(4): 529-540.
- Heikkila, R. E., W. J. Nicklas, et al. (1985). "Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity." Neurosci Lett 62(3): 389-394.
- Hisahara, S. and S. Shimohama (2010). "Toxin-induced and genetic animal models of Parkinson's disease." Parkinsons Dis 2011: 951709.

- Hodara, R., E. H. Norris, et al. (2004). "Functional consequences of alpha-synuclein tyrosine nitration: diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation." J Biol Chem 279(46): 47746-47753.
- Hodgkinson, A. and A. Eyre-Walker (2010). "Human triallelic sites: evidence for a new mutational mechanism?" Genetics 184(1): 233-241.
- Hoglinger, G. U., J. J. Breunig, et al. (2007). "The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease." Proc Natl Acad Sci U S A 104(9): 3585-3590.
- Hojlund, K., K. Wrzesinski, et al. (2003). "Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta -subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes." J Biol Chem 278(12): 10436-10442.
- Hori, O., F. Ichinoda, et al. (2002). "Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: enhanced expression of Lon protease." J Cell Biol 157(7): 1151-1160.
- Hoshi, M., A. Takashima, et al. (1996). "Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain." Proc Natl Acad Sci U S A 93(7): 2719-2723.
- Hsu, L. J., Y. Sagara, et al. (2000). "alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress." Am J Pathol 157(2): 401-410.
- Huang da, W., B. T. Sherman, et al. (2009). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources." Nat Protoc 4(1): 44-57.
- Hudson, B. and J. Vinograd (1967). "Catenated circular DNA molecules in HeLa cell mitochondria." Nature 216(5116): 647-652.
- Ikebe, S., M. Tanaka, et al. (1990). "Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence." Biochem Biophys Res Commun 170(3): 1044-1048.
- Ikeda, Y., S. Tsuji, et al. (2008). "Protective effects of astaxanthin on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells." J Neurochem 107(6): 1730-1740.
- Isobe, C., T. Abe, et al. (2010). "Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the cerebrospinal fluid of patients with living Parkinson's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process." Neurosci Lett 469(1): 159-163.
- Jacinto, E., V. Facchinetti, et al. (2006). "SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity." Cell 127(1): 125-137.
- Jackson, M. J. and S. O'Farrell (1993). "Free radicals and muscle damage." Br Med Bull 49(3): 630-641.
- Jain, N., K. Bhasne, et al. (2013). "Structural and dynamical insights into the membrane-bound alpha-synuclein." PLoS One 8(12): e83752.
- Jankovic, J. (2008). "Parkinson's disease: clinical features and diagnosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry 79(4): 368-376.
- Javitch, J. A., R. J. D'Amato, et al. (1985). "Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity." Proc Natl Acad Sci U S A 82(7): 2173-2177.
- Jellinger, K. A. (2012). "Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts." Mov Disord 27(1): 8-30.
- Jeon, B. S., V. Jackson-Lewis, et al. (1995). "6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death." Neurodegeneration 4(2): 131-137.
- Johnson, R. G., Jr. (1988). "Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport." Physiol Rev 68(1): 232-307.

- Joshi, S., R. Guleria, et al. (2006). "Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells." *Oncogene* 25(2): 240-247.
- Kaestner, K. H., W. Knochel, et al. (2000). "Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors." *Genes Dev* 14(2): 142-146.
- Kanehisa, M., Y. Sato, et al. (2016). "KEGG as a reference resource for gene and protein annotation." *Nucleic Acids Res* 44(D1): D457-462.
- Kasai, H. (1997). "Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis." *Mutat Res* 387(3): 147-163.
- Kasiswathan, R., T. R. Collins, et al. (2012). "The interface of transcription and DNA replication in the mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 1819(9-10): 970-978.
- Keeney, P. M., J. Xie, et al. (2006). "Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled." *J Neurosci* 26(19): 5256-5264.
- Kim, A., M. P. Murphy, et al. (2005). "Mitochondrial redox state regulates transcription of the nuclear-encoded mitochondrial protein manganese superoxide dismutase: a proposed adaptive response to mitochondrial redox imbalance." *Free Radic Biol Med* 38(5): 644-654.
- Kim, W. S., K. Kagedal, et al. (2014). "Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases." *Alzheimers Res Ther* 6(5): 73.
- King, M. P. and G. Attardi (1989). "Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation." *Science* 246(4929): 500-503.
- King, M. P. and G. Attardi (1996). "Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA." *Methods Enzymol* 264: 304-313.
- Kitada, T., S. Asakawa, et al. (1998). "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism." *Nature* 392(6676): 605-608.
- Klein, C. and A. Westenberger (2012). "Genetics of Parkinson's disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(1): a008888.
- Kobayashi, H., S. Oikawa, et al. (2008). "Mechanism of metal-mediated DNA damage and apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuroblastoma SH-SY5Y cells." *Free Radic Res* 42(7): 651-660.
- Kordower, J. H., Y. Chu, et al. (2008). "Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease." *Nat Med* 14(5): 504-506.
- Kosel, S., E. M. Grasbon-Frodl, et al. (2000). "Parkinson disease: analysis of mitochondrial DNA in monozygotic twins." *Neurogenetics* 2(4): 227-230.
- Kosten, J., A. Binolfi, et al. (2014). "Efficient modification of alpha-synuclein serine 129 by protein kinase CK1 requires phosphorylation of tyrosine 125 as a priming event." *ACS Chem Neurosci* 5(12): 1203-1208.
- Kraytberg, Y., E. Kudryavtseva, et al. (2006). "Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons." *Nat Genet* 38(5): 518-520.
- Krige, D., M. T. Carroll, et al. (1992). "Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group." *Ann Neurol* 32(6): 782-788.
- Kubista, M., J. M. Andrade, et al. (2006). "The real-time polymerase chain reaction." *Mol Aspects Med* 27(2-3): 95-125.
- Kucej, M. and R. A. Butow (2007). "Evolutionary tinkering with mitochondrial nucleoids." *Trends Cell Biol* 17(12): 586-592.
- Kukat, C., C. A. Wurm, et al. (2011). "Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(33): 13534-13539.

- Kushkuley, J., W. K. Chan, et al. (2009). "Neurofilament cross-bridging competes with kinesin-dependent association of neurofilaments with microtubules." *J Cell Sci* 122(Pt 19): 3579-3586.
- Langston, J. W., P. Ballard, et al. (1983). "Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis." *Science* 219(4587): 979-980.
- Larsson Forsell, P. K., B. P. Kennedy, et al. (1999). "The human calcium-independent phospholipase A2 gene multiple enzymes with distinct properties from a single gene." *Eur J Biochem* 262(2): 575-585.
- Larsson, N. G. (2010). "Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging." *Annu Rev Biochem* 79: 683-706.
- Lashuel, H. A., C. R. Overk, et al. (2013). "The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target." *Nat Rev Neurosci* 14(1): 38-48.
- Lavedan, C. (1998). "The synuclein family." *Genome Res* 8(9): 871-880.
- Lee, C. (2009) "Go for your PCR."
- Lee, C. and M. H. Yu (2005). "Protein folding and diseases." *J Biochem Mol Biol* 38(3): 275-280.
- Lee, C. K., R. G. Klopp, et al. (1999). "Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction." *Science* 285(5432): 1390-1393.
- Lee, H. J., S. Y. Shin, et al. (2002). "Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors." *J Biol Chem* 277(7): 5411-5417.
- Leeuwenburgh, C., P. A. Hansen, et al. (1999). "Oxidized amino acids in the urine of aging rats: potential markers for assessing oxidative stress in vivo." *Am J Physiol* 276(1 Pt 2): R128-135.
- Legros, F., F. Malka, et al. (2004). "Organization and dynamics of human mitochondrial DNA." *J Cell Sci* 117(Pt 13): 2653-2662.
- LeRoy, E., R. Boyer, et al. (1998). "The ubiquitin pathway in Parkinson's disease." *Nature* 395(6701): 451-452.
- Lessmann, E., M. Ngo, et al. (2007). "Oxysterol-binding protein-related protein (ORP) 9 is a PDK-2 substrate and regulates Akt phosphorylation." *Cell Signal* 19(2): 384-392.
- Levine, B. and D. J. Klionsky (2004). "Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy." *Dev Cell* 6(4): 463-477.
- Levine, R. L. (2002). "Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease." *Free Radic Biol Med* 32(9): 790-796.
- Li, C. and M. F. Beal (2005). "Leucine-rich repeat kinase 2: a new player with a familiar theme for Parkinson's disease pathogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(46): 16535-16536.
- Li, J., V. N. Uversky, et al. (2001). "Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein." *Biochemistry* 40(38): 11604-11613.
- Li, J. Y., E. Englund, et al. (2008). "Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation." *Nat Med* 14(5): 501-503.
- Li, N., K. Ragheb, et al. (2003). "Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production." *J Biol Chem* 278(10): 8516-8525.
- Li, W. W., R. Yang, et al. (2007). "Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice." *Neuroreport* 18(15): 1543-1546.
- Li, Y. J., W. K. Scott, et al. (2002). "Age at onset in two common neurodegenerative diseases is genetically controlled." *Am J Hum Genet* 70(4): 985-993.
- Lill, R. (2009). "Function and biogenesis of iron-sulphur proteins." *Nature* 460(7257): 831-838.
- Lin, W. and U. J. Kang (2008). "Characterization of PINK1 processing, stability, and subcellular localization." *J Neurochem* 106(1): 464-474.



- Lindersson, E., R. Beedholm, et al. (2004). "Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers." J Biol Chem 279(13): 12924-12934.
- Liu, G., C. Zhang, et al. (2009). "alpha-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity." Neurosci Lett 454(3): 187-192.
- Liu, T., B. Lu, et al. (2004). "DNA and RNA binding by the mitochondrial Lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate." J Biol Chem 279(14): 13902-13910.
- Liu, Y., L. Fallon, et al. (2002). "The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility." Cell 111(2): 209-218.
- Liu, Y., A. Roghani, et al. (1992). "Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium." Proc Natl Acad Sci U S A 89(19): 9074-9078.
- Lopes, F. M., R. Schroder, et al. (2010). "Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies." Brain Res 1337: 85-94.
- Lotharius, J., L. L. Dugan, et al. (1999). "Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons." J Neurosci 19(4): 1284-1293.
- Lu, B., S. Yadav, et al. (2007). "Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance." J Biol Chem 282(24): 17363-17374.
- Luciakova, K., B. Sokolikova, et al. (1999). "Enhanced mitochondrial biogenesis is associated with increased expression of the mitochondrial ATP-dependent Lon protease." FEBS Lett 444(2-3): 186-188.
- Lucking, C. B., A. Durr, et al. (2000). "Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene." N Engl J Med 342(21): 1560-1567.
- Luk, K. C., C. Song, et al. (2009). "Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells." Proc Natl Acad Sci U S A 106(47): 20051-20056.
- Luthman, J., A. Fredriksson, et al. (1989). "Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage." Behav Brain Res 33(3): 267-277.
- MacGregor, J. T., R. Schlegel, et al. (1990). "Cytogenetic damage induced by folate deficiency in mice is enhanced by caffeine." Proc Natl Acad Sci U S A 87(24): 9962-9965.
- MacLeod, D., J. Dowman, et al. (2006). "The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology." Neuron 52(4): 587-593.
- Manning-Bog, A. B., A. L. McCormack, et al. (2002). "The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein." J Biol Chem 277(3): 1641-1644.
- Maraganore, D. M., T. G. Lesnick, et al. (2004). "UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene." Ann Neurol 55(4): 512-521.
- Margulis, L. (1970). "Origin of eukaryotic cells." Yale University Press.
- Maroteaux, L., J. T. Campanelli, et al. (1988). "Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal." J Neurosci 8(8): 2804-2815.
- Martinez-Vicente, M., Z. Tallozy, et al. (2008). "Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy." J Clin Invest 118(2): 777-788.
- Martinez, T. N. and J. T. Greenamyre (2012). "Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease." Antioxid Redox Signal 16(9): 920-934.
- Marusich, M. F., B. H. Robinson, et al. (1997). "Expression of mtDNA and nDNA encoded respiratory chain proteins in chemically and genetically-derived Rho0 human fibroblasts: a comparison of subunit proteins in normal fibroblasts treated with

- ethidium bromide and fibroblasts from a patient with mtDNA depletion syndrome." Biochim Biophys Acta 1362(2-3): 145-159.
- Mata, I. F., P. J. Lockhart, et al. (2004). "Parkin genetics: one model for Parkinson's disease." Hum Mol Genet 13 Spec No 1: R127-133.
- Matsuda, N., S. Sato, et al. (2010). "PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy." J Cell Biol 189(2): 211-221.
- Matsushima, Y., Y. Goto, et al. (2010). "Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM)." Proc Natl Acad Sci U S A 107(43): 18410-18415.
- Mc, L. J., G. L. Cohn, et al. (1958). "Incorporation of labeled amino acids into the protein of muscle and liver mitochondria." J Biol Chem 233(3): 657-663.
- McCormack, A. L., M. Thiruchelvam, et al. (2002). "Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat." Neurobiol Dis 10(2): 119-127.
- Mei, Y., Y. Zhang, et al. (2009). "FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signaling in response to cytokine deprivation." Proc Natl Acad Sci U S A 106(13): 5153-5158.
- Mendez, I., A. Vinuela, et al. (2008). "Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years." Nat Med 14(5): 507-509.
- Mercuri, N. B. and G. Bernardi (2005). "The 'magic' of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy?" Trends Pharmacol Sci 26(7): 341-344.
- Miller, G. W., R. R. Gainetdinov, et al. (1999). "Dopamine transporters and neuronal injury." Trends Pharmacol Sci 20(10): 424-429.
- Miller, S. W., P. A. Trimmer, et al. (1996). "Creation and characterization of mitochondrial DNA-depleted cell lines with "neuronal-like" properties." J Neurochem 67(5): 1897-1907.
- Mills, R. E., C. T. Luttig, et al. (2006). "An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome." Genome Res 16(9): 1182-1190.
- Mojsilovic-Petrovic, J., N. Nedelsky, et al. (2009). "FOXO3a is broadly neuroprotective in vitro and in vivo against insults implicated in motor neuron diseases." J Neurosci 29(25): 8236-8247.
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." Biochem J 417(1): 1-13.
- Mytilineou, C., P. Werner, et al. (1994). "Impaired oxidative decarboxylation of pyruvate in fibroblasts from patients with Parkinson's disease." J Neural Transm Park Dis Dement Sect 8(3): 223-228.
- Nakajima, A., K. Kataoka, et al. (2003). "BRPK, a novel protein kinase showing increased expression in mouse cancer cell lines with higher metastatic potential." Cancer Lett 201(2): 195-201.
- Nakamura, K., V. M. Nemani, et al. (2011). "Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein." J Biol Chem 286(23): 20710-20726.
- Narendra, D. P., S. M. Jin, et al. (2010). "PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin." PLoS Biol 8(1): e1000298.
- Nass, S. (1969). "The significance of the structural and functional similarities of bacteria and mitochondria." Int Rev Cytol 25: 55-129.
- Nass, S., M. M. Nass, et al. (1965). "Deoxyribonucleic Acid in Isolated Rat-Liver Mitochondria." Biochim Biophys Acta 95: 426-435.
- Ngo, J. K. and K. J. Davies (2007). "Importance of the Lon protease in mitochondrial maintenance and the significance of declining Lon in aging." Ann N Y Acad Sci 1119: 78-87.

- Ngo, J. K. and K. J. Davies (2009). "Mitochondrial Lon protease is a human stress protein." Free Radic Biol Med 46(8): 1042-1048.
- Ngo, J. K., L. C. Pomatto, et al. (2013). "Upregulation of the mitochondrial Lon Protease allows adaptation to acute oxidative stress but dysregulation is associated with chronic stress, disease, and aging." Redox Biol 1: 258-264.
- Nichols, W. C., N. Pankratz, et al. (2002). "Linkage stratification and mutation analysis at the Parkin locus identifies mutation positive Parkinson's disease families." J Med Genet 39(7): 489-492.
- Nicklas, W. J., I. Vyas, et al. (1985). "Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine." Life Sci 36(26): 2503-2508.
- Nieto, M., F. J. Gil-Bea, et al. (2006). "Increased sensitivity to MPTP in human alpha-synuclein A30P transgenic mice." Neurobiol Aging 27(6): 848-856.
- Nomura, K., J. Kato, et al. (2004). "Effects of inorganic polyphosphate on the proteolytic and DNA-binding activities of Lon in Escherichia coli." J Biol Chem 279(33): 34406-34410.
- Nunnari, J. and A. Suomalainen (2012). "Mitochondria: in sickness and in health." Cell 148(6): 1145-1159.
- Onyango, I. G., J. B. Tuttle, et al. (2005). "Activation of p38 and N-acetylcysteine-sensitive c-Jun NH2-terminal kinase signaling cascades is required for induction of apoptosis in Parkinson's disease cybrids." Mol Cell Neurosci 28(3): 452-461.
- Orrenius, S. and B. Zhivotovsky (2005). "Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free." Nat Chem Biol 1(4): 188-189.
- Ovadia, A., Z. Zhang, et al. (1995). "Increased susceptibility to MPTP toxicity in middle-aged rhesus monkeys." Neurobiol Aging 16(6): 931-937.
- Oyarce, A. M. and P. J. Fleming (1991). "Multiple forms of human dopamine beta-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells." Arch Biochem Biophys 290(2): 503-510.
- Ozawa, T. (1997). "Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging." Physiol Rev 77(2): 425-464.
- Öztaç E, T. A. (2003). "A cell protective mechanism in a murine model of Parkinson's disease." Turk J Med Sci 33: 295-299.
- Paisan-Ruiz, C., K. P. Bhatia, et al. (2009). "Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism." Ann Neurol 65(1): 19-23.
- Paisan-Ruiz, C., S. Jain, et al. (2004). "Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease." Neuron 44(4): 595-600.
- Pankratz, N., W. C. Nichols, et al. (2003). "Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37." Am J Hum Genet 72(4): 1053-1057.
- Papanastasiou, M., G. Orfanoudaki, et al. (2013). "The Escherichia coli peripheral inner membrane proteome." Mol Cell Proteomics 12(3): 599-610.
- Parihar, M. S., A. Parihar, et al. (2008). "Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress." Cell Mol Life Sci 65(7-8): 1272-1284.
- Park, C. B. and N. G. Larsson (2011). "Mitochondrial DNA mutations in disease and aging." J Cell Biol 193(5): 809-818.
- Parker, W. D., Jr., J. K. Parks, et al. (2008). "Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex." Brain Res 1189: 215-218.
- Paterna, J. C., A. Leng, et al. (2007). "DJ-1 and Parkin modulate dopamine-dependent behavior and inhibit MPTP-induced nigral dopamine neuron loss in mice." Mol Ther 15(4): 698-704.
- Patki, G., Y. Che, et al. (2009). "Mitochondrial dysfunction in the striatum of aged chronic mouse model of Parkinson's disease." Front Aging Neurosci 1: 3.

- Perez, F. A., W. R. Curtis, et al. (2005). "Parkin-deficient mice are not more sensitive to 6-hydroxydopamine or methamphetamine neurotoxicity." BMC Neurosci 6: 71.
- Pesah, Y., T. Pham, et al. (2004). "Drosophila parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress." Development 131(9): 2183-2194.
- Peserico, A., F. Chiacchiera, et al. (2013). "A novel AMPK-dependent FoxO3A-SIRT3 intramitochondrial complex sensing glucose levels." Cell Mol Life Sci 70(11): 2015-2029.
- Petit, A., T. Kawarai, et al. (2005). "Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations." J Biol Chem 280(40): 34025-34032.
- Piacentini, M., L. Piredda, et al. (1996). "Differential growth of N- and S-type human neuroblastoma cells xenografted into scid mice. correlation with apoptosis." J Pathol 180(4): 415-422.
- Piccoli, C., A. Sardanelli, et al. (2008). "Mitochondrial respiratory dysfunction in familial parkinsonism associated with PINK1 mutation." Neurochem Res 33(12): 2565-2574.
- Pilger, A. and H. W. Rudiger (2006). "8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures." Int Arch Occup Environ Health 80(1): 1-15.
- Pino, E., R. Amamoto, et al. (2014). "FOXO3 determines the accumulation of alpha-synuclein and controls the fate of dopaminergic neurons in the substantia nigra." Hum Mol Genet 23(6): 1435-1452.
- Plotegher, N., E. Greggio, et al. (2014). "Biophysical groundwork as a hinge to unravel the biology of alpha-synuclein aggregation and toxicity." Q Rev Biophys 47(1): 1-48.
- Podhajski, A., A. Musso, et al. (2012). "Common pathogenic effects of missense mutations in the P-type ATPase ATP13A2 (PARK9) associated with early-onset parkinsonism." PLoS One 7(6): e39942.
- Polymeropoulos, M. H., J. J. Higgins, et al. (1996). "Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23." Science 274(5290): 1197-1199.
- Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, et al. (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." Science 276(5321): 2045-2047.
- Poole, A. C., R. E. Thomas, et al. (2008). "The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology." Proc Natl Acad Sci U S A 105(5): 1638-1643.
- Radak, Z., T. Kaneko, et al. (1999). "The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes." Free Radic Biol Med 27(1-2): 69-74.
- Rappsilber, J., U. Ryder, et al. (2002). "Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome." Genome Res 12(8): 1231-1245.
- Rawal, P., V. B. Kumarasetti, et al. (2006). "Genome-wide prediction of G4 DNA as regulatory motifs: role in Escherichia coli global regulation." Genome Res 16(5): 644-655.
- Reeve, A. K., K. J. Krishnan, et al. (2008). "Nature of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons." Am J Hum Genet 82(1): 228-235.
- Reidy, J. A. (1987). "Folate- and deoxyuridine-sensitive chromatid breakage may result from DNA repair during G2." Mutat Res 192(3): 217-219.
- Reinke, V., H. E. Smith, et al. (2000). "A global profile of germline gene expression in C. elegans." Mol Cell 6(3): 605-616.
- Richardson, J. R., Y. Quan, et al. (2005). "Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone." Toxicol Sci 88(1): 193-201.
- Richter, C., J. W. Park, et al. (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." Proc Natl Acad Sci U S A 85(17): 6465-6467.
- Richter, G., A. Sonnenschein, et al. (2002). "Novel mitochondrial DNA mutations in Parkinson's disease." J Neural Transm (Vienna) 109(5-6): 721-729.

- Ridet, J. L., J. C. Bensadoun, et al. (2006). "Lentivirus-mediated expression of glutathione peroxidase: neuroprotection in murine models of Parkinson's disease." Neurobiol Dis 21(1): 29-34.
- Ridge, P. G., T. J. Maxwell, et al. (2012). "Mitochondrial genomic analysis of late onset Alzheimer's disease reveals protective haplogroups H6A1A/H6A1B: the Cache County Study on Memory in Aging." PLoS One 7(9): e45134.
- Ross, C. A. and M. A. Poirier (2004). "Protein aggregation and neurodegenerative disease." Nat Med 10 Suppl: S10-17.
- Ross, R. A., J. L. Biedler, et al. (2003). "A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors." Cancer Lett 197(1-2): 35-39.
- Ross, R. A., B. A. Spengler, et al. (1995). "Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells." Cell Growth Differ 6(4): 449-456.
- Rubinsztein, R. (2006). "The role of intracellular protein degradation pathways in neurodegeneration." Nature 443: 780-786.
- Saigoh, K., Y. L. Wang, et al. (1999). "Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice." Nat Genet 23(1): 47-51.
- Saiki, R. K., Gelfand D.H., et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science 239: 487-491.
- Sakaguchi-Nakashima, A., J. Y. Meir, et al. (2007). "LRK-1, a C. elegans PARK8-related kinase, regulates axonal-dendritic polarity of SV proteins." Curr Biol 17(7): 592-598.
- Sambrook, J. and D. Russell, Eds. (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato, H., T. Kato, et al. (2013). "The role of Ser129 phosphorylation of alpha-synuclein in neurodegeneration of Parkinson's disease: a review of in vivo models." Rev Neurosci 24(2): 115-123.
- Satoh, M., Kuroiwa, T (2004). "Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell." Exp Cell Res 96: 137-140.
- Schapira, A. H., J. M. Cooper, et al. (1990). "Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease." J Neurochem 54(3): 823-827.
- Scholzen, T. and J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." J Cell Physiol 182(3): 311-322.
- Schon, E. A. and S. Przedborski (2011). "Mitochondria: the next (neurode)generation." Neuron 70(6): 1033-1053.
- Schultheis, P. J., T. T. Hagen, et al. (2004). "Characterization of the P5 subfamily of P-type transport ATPases in mice." Biochem Biophys Res Commun 323(3): 731-738.
- Scott, D. A., I. Tabarean, et al. (2010). "A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in alpha-synuclein-induced neurodegeneration." J Neurosci 30(24): 8083-8095.
- Senoh, S. (1959). "Chemical, enzymatic and metabolic studies on the mechanism of oxidation of dopamine." J Am Chem Soc 81: 6236-6240.
- Senoh, S. (1959). "Nonenzymatic conversions of dopamine to norepinephrine and trihydroxyphenethylamine." J Am Chem Soc 81: 6222-6231.
- Shaikh, S. and L. F. Nicholson (2008). "Advanced glycation end products induce in vitro cross-linking of alpha-synuclein and accelerate the process of intracellular inclusion body formation." J Neurosci Res 86(9): 2071-2082.
- Sharma, H., A. Singh, et al. (2005). "Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer." Cancer Cell Int 5: 34.
- Sheehan, J. P., R. H. Swerdlow, et al. (1997). "Altered calcium homeostasis in cells transformed by mitochondria from individuals with Parkinson's disease." J Neurochem 68(3): 1221-1233.

- Sherer, T. B., R. Betarbet, et al. (2002). "An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage." *J Neurosci* 22(16): 7006-7015.
- Sherer, T. B., J. H. Kim, et al. (2003). "Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation." *Exp Neurol* 179(1): 9-16.
- Shevchenko, A., M. Wilm, et al. (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." *Anal Chem* 68(5): 850-858.
- Shimizu, K., K. Ohtaki, et al. (2001). "Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat." *Brain Res* 906(1-2): 135-142.
- Siddiqui-Jain, A., C. L. Grand, et al. (2002). "Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18): 11593-11598.
- Sidell, N. (1982). "Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro." *J Natl Cancer Inst* 68(4): 589-596.
- Simon-Sanchez, J., C. Schulte, et al. (2009). "Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease." *Nat Genet* 41(12): 1308-1312.
- Simon, D. K., R. Mayeux, et al. (2000). "Mitochondrial DNA mutations in complex I and tRNA genes in Parkinson's disease." *Neurology* 54(3): 703-709.
- Simonsson, T., P. Pecinka, et al. (1998). "DNA tetraplex formation in the control region of c-myc." *Nucleic Acids Res* 26(5): 1167-1172.
- Simunovic, F., M. Yi, et al. (2009). "Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology." *Brain* 132(Pt 7): 1795-1809.
- Singleton, A. B., M. Farrer, et al. (2003). "alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease." *Science* 302(5646): 841.
- Smith, C. K., T. A. Baker, et al. (1999). "Lon and Clp family proteases and chaperones share homologous substrate-recognition domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12): 6678-6682.
- Smith, W. W., Z. Pei, et al. (2005). "Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51): 18676-18681.
- Snyder, S. H. and R. J. D'Amato (1985). "Predicting Parkinson's disease." *Nature* 317(6034): 198-199.
- Soloway, S. B. (1976). "Naturally occurring insecticides." *Environ Health Perspect* 14: 109-117.
- Song, D. D. (2004). "Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human alpha-synuclein transgenic mice after treatment with MPTP." *Exp Neurol* 186: 158-172.
- Spengler, B. A., D. L. Lazarova, et al. (1997). "Cell lineage and differentiation state are primary determinants of MYCN gene expression and malignant potential in human neuroblastoma cells." *Oncol Res* 9(9): 467-476.
- Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, et al. (1997). "Alpha-synuclein in Lewy bodies." *Nature* 388(6645): 839-840.
- St John, J. C., J. Facucho-Oliveira, et al. (2010). "Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells." *Hum Reprod Update* 16(5): 488-509.
- Stadtman, E. R. and R. L. Levine (2000). "Protein oxidation." *Ann N Y Acad Sci* 899: 191-208.
- Starkov, A. A. (2008). "The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling." *Ann N Y Acad Sci* 1147: 37-52.
- Steiner, J. A., E. Angot, et al. (2011). "A deadly spread: cellular mechanisms of alpha-synuclein transfer." *Cell Death Differ* 18(9): 1425-1433.

- Stockl, M. T., N. Zijlstra, et al. (2013). "alpha-Synuclein oligomers: an amyloid pore? Insights into mechanisms of alpha-synuclein oligomer-lipid interactions." Mol Neurobiol 47(2): 613-621.
- Strauss, K. M., L. M. Martins, et al. (2005). "Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease." Hum Mol Genet 14(15): 2099-2111.
- Su, B., H. Liu, et al. (2009). "Ectopic localization of FOXO3a protein in Lewy bodies in Lewy body dementia and Parkinson's disease." Mol Neurodegener 4: 32.
- Sulzer, D. (2007). "Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease." Trends Neurosci 30(5): 244-250.
- Suzuki, C. K., K. Suda, et al. (1994). "Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration." Science 264(5156): 273-276.
- Suzuki, Y., Y. Imai, et al. (2001). "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death." Mol Cell 8(3): 613-621.
- Swerdlow, R. H. (2007). "Mitochondria in cybrids containing mtDNA from persons with mitochondrialopathies." J Neurosci Res 85(15): 3416-3428.
- Swerdlow, R. H., J. K. Parks, et al. (2001). "Biochemical analysis of cybrids expressing mitochondrial DNA from Contursi kindred Parkinson's subjects." Exp Neurol 169(2): 479-485.
- Swerdlow, R. H., J. K. Parks, et al. (1996). "Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease." Ann Neurol 40(4): 663-671.
- Szweda, P. A., B. Friguet, et al. (2002). "Proteolysis, free radicals, and aging." Free Radic Biol Med 33(1): 29-36.
- Takahashi, H. and K. Wakabayashi (2001). "The cellular pathology of Parkinson's disease." Neuropathology 21(4): 315-322.
- Takahashi, T., Y. Deng, et al. (1994). "Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system." J Neural Transm Gen Sect 98(2): 107-118.
- Takahashi, T., W. Maruyama, et al. (1997). "Cytotoxicity of endogenous isoquinolines to human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells." J Neural Transm (Vienna) 104(1): 59-66.
- Tanaka, Y., S. Engelender, et al. (2001). "Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis." Hum Mol Genet 10(9): 919-926.
- Tanner, C. M. and D. A. Aston (2000). "Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes." Curr Opin Neurol 13(4): 427-430.
- Tanner, C. M., F. Kamel, et al. (2011). "Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease." Environ Health Perspect 119(6): 866-872.
- Tatton, N. A. and S. J. Kish (1997). "In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining." Neuroscience 77(4): 1037-1048.
- Taylor, R. W. and D. M. Turnbull (2005). "Mitochondrial DNA mutations in human disease." Nat Rev Genet 6(5): 389-402.
- Taylor, W. R. and G. R. Stark (2001). "Regulation of the G2/M transition by p53." Oncogene 20(15): 1803-1815.
- Terzioglu, M. and D. Galter (2008). "Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models." FEBS J 275(7): 1384-1391.
- Thiruchelvam, M., A. McCormack, et al. (2003). "Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype." Eur J Neurosci 18(3): 589-600.

- Thomas, B., A. S. Mandir, et al. (2011). "Resistance to MPTP-neurotoxicity in alpha-synuclein knockout mice is complemented by human alpha-synuclein and associated with increased beta-synuclein and Akt activation." *PLoS One* 6(1): e16706.
- Thomas, B., R. von Coelln, et al. (2007). "MPTP and DSP-4 susceptibility of substantia nigra and locus coeruleus catecholaminergic neurons in mice is independent of parkin activity." *Neurobiol Dis* 26(2): 312-322.
- Tieu, K. (2011). "A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* 1(1): a009316.
- Tofaris, G. K., R. Layfield, et al. (2001). "alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome." *FEBS Lett* 509(1): 22-26.
- Trimmer, P. A. and J. P. Bennett, Jr. (2009). "The cybrid model of sporadic Parkinson's disease." *Exp Neurol* 218(2): 320-325.
- Trimmer, P. A., R. H. Swerdlow, et al. (2000). "Abnormal mitochondrial morphology in sporadic Parkinson's and Alzheimer's disease cybrid cell lines." *Exp Neurol* 162(1): 37-50.
- Tsigelny, I. F., Y. Sharikov, et al. (2012). "Role of alpha-synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation." *FEBS J* 279(6): 1000-1013.
- Tufi, R., S. Gandhi, et al. (2014). "Enhancing nucleotide metabolism protects against mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in a PINK1 model of Parkinson's disease." *Nat Cell Biol* 16(2): 157-166.
- Ueda, K., H. Fukushima, et al. (1993). "Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23): 11282-11286.
- Ulmer, T. S., A. Bax, et al. (2005). "Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein." *J Biol Chem* 280(10): 9595-9603.
- Ulusoy, A., R. Rusconi, et al. (2013). "Caudo-rostral brain spreading of alpha-synuclein through vagal connections." *EMBO Mol Med* 5(7): 1119-1127.
- Ungerstedt, U. (1968). "6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons." *Eur J Pharmacol* 5(1): 107-110.
- Valente, E. M., A. R. Bentivoglio, et al. (2001). "Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36." *Am J Hum Genet* 68(4): 895-900.
- Valente, E. M., S. Salvi, et al. (2004). "PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism." *Ann Neurol* 56(3): 336-341.
- van der Horst, A. and B. M. Burgering (2007). "Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(6): 440-450.
- Van Dyck, L., D. A. Pearce, et al. (1994). "PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 269(1): 238-242.
- Van Kampen, J. M., E. G. McGeer, et al. (2000). "Dopamine transporter function assessed by antisense knockdown in the rat: protection from dopamine neurotoxicity." *Synapse* 37(3): 171-178.
- Veech, G. A., J. Dennis, et al. (2000). "Disrupted mitochondrial electron transport function increases expression of anti-apoptotic bcl-2 and bcl-X(L) proteins in SH-SY5Y neuroblastoma and in Parkinson disease cybrid cells through oxidative stress." *J Neurosci Res* 61(6): 693-700.
- Venkatesh, S., J. Lee, et al. (2012). "Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease." *Biochim Biophys Acta* 1823(1): 56-66.
- Vila, M., V. Jackson-Lewis, et al. (2001). "Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5): 2837-2842.



- Vila, M., D. Ramonet, et al. (2008). "Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: new clues." J Neurochem 107(2): 317-328.
- Vilarino-Guell, C., C. Wider, et al. (2011). "VPS35 mutations in Parkinson disease." Am J Hum Genet 89(1): 162-167.
- Wakabayashi, K., K. Tanji, et al. (2007). "The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates." Neuropathology 27(5): 494-506.
- Walker, D. G., L. F. Lue, et al. (2013). "Changes in properties of serine 129 phosphorylated alpha-synuclein with progression of Lewy-type histopathology in human brains." Exp Neurol 240: 190-204.
- Wang, H., Z. Zhang, et al. (2014). "The contribution of Cdc2 in rotenone-induced G2/M arrest and caspase-3-dependent apoptosis." J Mol Neurosci 53(1): 31-40.
- Winklhofer, K. F. and C. Haass (2010). "Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease." Biochim Biophys Acta 1802(1): 29-44.
- Wintersberger, E. (1964). "[DNA-Dependent Rna Synthesis in Rat Liver Mitochondria]." Hoppe Seylers Z Physiol Chem 336: 285-288.
- Witt, S. N. (2010). "Hsp70 molecular chaperones and Parkinson's disease." Biopolymers 93(3): 218-228.
- Wong, M. L. and J. F. Medrano (2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation." Biotechniques 39(1): 75-85.
- Wright, G., K. Terada, et al. (2001). "Oxidative stress inhibits the mitochondrial import of preproteins and leads to their degradation." Exp Cell Res 263(1): 107-117.
- Xiong, H., D. Wang, et al. (2009). "Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation." J Clin Invest 119(3): 650-660.
- Yasuhara, T., K. Hara, et al. (2007). "Increased 8-OHdG levels in the urine, serum, and substantia nigra of hemiparkinsonian rats." Brain Res 1133(1): 49-52.
- Yoshii, S. R., C. Kishi, et al. (2011). "Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane." J Biol Chem 286(22): 19630-19640.
- Yoshino, H., Y. Nakagawa-Hattori, et al. (1992). "Mitochondrial complex I and II activities of lymphocytes and platelets in Parkinson's disease." J Neural Transm Park Dis Dement Sect 4(1): 27-34.
- Zanellati, M. C., V. Monti, et al. (2015). "Mitochondrial dysfunction in Parkinson disease: evidence in mutant PARK2 fibroblasts." Front Genet 6: 78.
- Zhang, L., C. Zhang, et al. (2008). "Semi-quantitative analysis of alpha-synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: an immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody." Brain Res 1244: 40-52.
- Zhang, Z., T. Wang, et al. (2009). "6-OHDA induces cycle reentry and apoptosis of PC12 cells through activation of ERK1/2 signaling pathway." J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 29(1): 97-100.
- Zhu, M., W. Li, et al. (2012). "Role of alpha-synuclein protein levels in mitochondrial morphology and cell survival in cell lines." PLoS One 7(4): e36377.
- Zhu, X., A. Babar, et al. (2006). "LRRK2 in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies." Mol Neurodegener 1: 17.
- Zigoneanu, I. G., Y. J. Yang, et al. (2012). "Interaction of alpha-synuclein with vesicles that mimic mitochondrial membranes." Biochim Biophys Acta 1818(3): 512-519.

Zimprich, A., A. Benet-Pages, et al. (2011). "A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease." Am J Hum Genet 89(1): 168-175.

Zimprich, A., S. Biskup, et al. (2004). "Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology." Neuron 44(4): 601-607.

