



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΝΕΥΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

**Διερεύνηση του ρόλου των μιτοχονδρίων και της *α-synuclein* στην εμφάνιση βασικών χαρακτηριστικών της νόσου του Parkinson σε ένα υβριδικό μοντέλο νευρικών κυττάρων**

**ΠΑΠΑΣΤΑΥΡΟΥ ΒΑΝΕΣΑ-ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018



## Πρόλογος – Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοϊατρικών Ερευνών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) κατά το ακαδημαϊκό έτος 2017-2018 υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή καθηγητή Μοριακής Γενετικής του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών κ. Θεολόγου Μιχαηλίδη.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω 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.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της πενταμελούς εξεταστικής επιτροπής κ. Φριλίγγο Ευστάθιο, κ. Τζαβάρα Θεόδωρο, κ. Χατζηλουκά Ευστάθιο και κ. Χριστοφορίδη Σάββα που αφιέρωσαν το χρόνο τους για να αξιολογήσουν την εργασία μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου μου για τη υπέροχη συνεργασία, Κυριακή Παπαγεωργίου, Μαρούσα Δαρσινού, Ιωάννη Τσίγκα, Ευτυχία Βασίλη, Αναστασία Ξαγαρά, Χριστίνα Λαμπροπούλου, Αναστάσιο Μπαλάσκα, Βάσω Γκουβά, Ντιλάυ Σοιχάν, Ευαγγελία Μασούτη, Μαρίνα Μαγουλά και ιδιαίτερα στην συνεργάτιδά μου Χριστίνα Τσαγκογιάννη με την οποία δουλέψαμε μαζί όλο αυτό το διάστημα για την επίτευξη ενός κοινού στόχου.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Ινστιτούτου για το όμορφο κλίμα συνεργασίας και αλληλοβοήθειας που έχει δημιουργηθεί.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Ονάση για την οικονομική υποστήριξη που μου παρείχε κατά την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και τους φίλους μου, που μου συμπαραστάθηκαν στις δύσκολες στιγμές και με βοήθησαν με τις συμβουλές τους.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΣΥΝΟΨΗ</b> .....	5
<b>SYNOPSIS</b> .....	7
<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	8
<b>ΜΕΡΟΣ 1</b> .....	8
<b>1.1 Η νόσος του Parkinson</b> .....	8
Κλινικά - νευροπαθολογικά συμπτώματα .....	8
Αιτιολογία .....	9
Παθογένεση.....	10
Θεραπεία .....	11
<b>1.2 <math>\alpha</math>-synuclein</b> .....	12
Γενικά χαρακτηριστικά .....	12
Φυσιολογική -Παθολογική δράση.....	13
Σημαντικές ιδιότητες της $\alpha$ -syn που σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου του Parkinson .....	14
<b>1.3 Μιτοχόνδρια</b> .....	15
Γενικά χαρακτηριστικά .....	15
Δομή και οργάνωση του μιτοχονδριακού DNA.....	16
Μεταφορά πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια .....	18
Οξειδωτικό στρες .....	19
Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στη νόσο του Parkinson.....	20
Μιτοχόνδρια και $\alpha$ -synuclein .....	21
Επιγενετική ρύθμιση του μιτοχονδρίου.....	23
<b>ΜΕΡΟΣ 2</b> .....	26
<b>2.1 Μονοπάτι σηματοδότησης PI3K-Akt</b> .....	26
Το μονοπάτι IIS και η μιτοχονδριακή λειτουργία .....	26
Το μονοπάτι IIS/AKT και η $\alpha$ -synuclein.....	28
<b>2.2 Μείωση της απόκρισης στην ινσουλίνη</b> .....	28
Μείωση της απόκρισης στον IGF-1 .....	30
<b>ΜΕΡΟΣ 3</b> .....	31
<b>3.1 Μοντελοποίηση της νόσου του Parkinson</b> .....	31
Κυτταρικά μοντέλα .....	31
Κυτταροπλασματικά υβρίδια (Cytoplasmic hybrids- Cybrids).....	32
<b>3.2 6-OHDA</b> .....	34
<b>3.3 SH-SY5Y μια νευρική κυτταρική σειρά μοντέλο για τη νόσο PD</b> .....	35

<b>3.4 Το μοντέλο μας</b> .....	36
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	38
<b>3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	39
<b>3.1 ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	39
3.1.1 Καλλιέργεια κυττάρων .....	39
Ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split).....	39
Αποθήκευση των κυτταρικών σειρών .....	40
Απόψυξη των κυττάρων .....	40
3.1.2 Παρασκευή της τοξίνης 6-OHDA .....	41
3.1.3 Χρήση του αναπτυξιακού παράγοντα IGF-1.....	41
3.1.4 Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα.....	41
Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο BRADFORD.....	42
3.1.5 Διαχωρισμός μιτοχονδριακών - κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων (Subcellular fractionation protocol).....	43
3.1.6 Ανοσοαποτύπωση κατά WESTERN.....	44
Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS-PAGE και ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	45
Πρωτόκολλο ηλεκτρομεταφοράς .....	46
Επίσπαση της μεμβράνης με ειδικά αντισώματα και ανίχνευση των πρωτεϊνών .....	47
3.1.7 Απομόνωση γενωμικού DNA από SH-SY5Y κύτταρα.....	48
Καθαρισμός του DNA με τους οργανικούς διαλύτες φαινόλη και χλωροφόρμιο.....	49
3.1.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- PCR.....	50
3.1.9 Ενίσχυση μιτοχονδριακού DNA.....	51
3.1.10 Έμμεσος ανοσοφθορισμός – Ανοσοκυτταροχημεία.....	52
Ανοσοκυτταροχημεία .....	53
<b>3.2 ΥΛΙΚΑ</b> .....	55
3.2.1 Διαλύματα που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο.....	55
3.2.2 Διαλύματα του εμπορίου .....	57
3.2.3 Αντισώματα και εκκινητές .....	58
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	60
<b>ΜΕΡΟΣ 1: Χαρακτηρισμός του κυτταρικού μοντέλου</b> .....	60
4.1.1 Έλεγχος του mtDNA για σημειακές μεταλλάξεις σε όλες τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν με την τεχνολογία της «εν τω βάθει» νουκλεοτιδικής αλληλούχησης ( <i>Deep Sequencing</i> ). .....	60
4.1.3 Τα cybrids παρουσιάζουν διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας I της αναπνευστικής αλυσίδας. ....	63

<b>ΜΕΡΟΣ 2: Χρήση της τοξίνης 6-υδροξυτοπαμίνη (6-OHDA) ως παράγοντα στρες και μελέτη των επιπτώσεών της στις cybrids κυτταρικές σειρές. ....</b>	<b>65</b>
4.2.1 Η $\alpha$ -synuclein αυξάνεται στο στρες σε όλα τα cybrids και κυρίως στα IV2 και IV5, όπου παρουσιάζει και τα μεγαλύτερα βασικά επίπεδα.....	65
4.2.2 Τα cybrids παρουσιάζουν διαφορές στις μεταβολές της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην μιτοχονδριακή λειτουργία και στην αντιοξειδωτική άμυνα παρουσία και απουσία της τοξίνης. ....	66
4.2.2.1 Τα επίπεδα του παράγοντα PGC-1 $\alpha$ είναι μειωμένα στα κύτταρα IV2 και IV5. ....	66
4.2.2.2 Τα επίπεδα του TFAM δεν μεταβάλλονται στα cybrids παρουσία της τοξίνης 6-OHDA. ....	67
4.2.2.3 Τα επίπεδα του ενζύμου MnSOD δεν μεταβάλλονται σε συνθήκες στρες, ούτε επηρεάζονται από την τοξίνη 6-OHDA, με εξαίρεση τα κύτταρα IV4.....	68
4.2.2.4 Το cytochrome C μειώνεται στην συνθήκη στρες σε όλα τα cybrids. ....	69
4.2.3 Η παρουσία της τοξίνης 6-OHDA ενεργοποιεί τον μηχανισμό της απόπτωσης σε όλες τις υβριδικές σειρές. ....	70
4.2.3.1 Η κασπάση-3 ενεργοποιείται σε συνθήκες στρες σε όλες τις υβριδικές σειρές εκτός από εκείνη των κυττάρων IV4.....	70
4.2.3.2 Η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη BCL2 αυξάνεται σε όλες τις υβριδικές σειρές στις συνθήκες στρες, εκτός από την IV4. ....	71
4.2.4 Η παρουσία της τοξίνης ενεργοποιεί το αυτοφαγικό μονοπάτι σε όλες τις υβριδικές σειρές.....	72
4.2.4.1 Ο δείκτης p62 αυξάνεται σε όλες τις υβριδικές σειρές στην συνθήκη του στρες. .	72
4.2.4.2 Ο δείκτης LC3 αυξάνεται στην συνθήκη του στρες.....	73
4.2.5 Το σύστημα των μοριακών-συνοδών επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία της τοξίνης 6-OHDA στις υβριδικές σειρές. ....	73
4.2.6 Η μιτοχονδριακή μεταφορά πρωτεϊνών έχει διαταραχθεί στα κύτταρα IV2, τα οποία φέρουν τα μιτοχόνδρια της ασθενούς.....	74
4.2.6.1 Ο παράγοντας PGC-1 $\alpha$ δεν εισέρχεται επαρκώς στα μιτοχόνδρια των σειρών IV2 και IV5.....	75
4.2.6.2 Τα μιτοχόνδρια της ασθενούς IV2 δεν δέχονται την μονομερή μορφή της $\alpha$ -synuclein στο εσωτερικό τους. ....	76
4.2.6.3 Το cytochrome C εκλύεται στο κυτταρόπλασμα στην συνθήκη στρες σε όλες τις σειρές εκτός της IV2. ....	76
<b>ΜΕΡΟΣ 3: Έλεγχος της απόκρισης των κυττάρων στον αναπτυξιακό παράγοντα IGF-1. ....</b>	<b>78</b>
3.1 Τα κύτταρα IV4 παρουσιάζουν μειωμένη απόκριση στον IGF-1. ....	78
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>80</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>85</b>

## ΣΥΝΟΨΗ

Η νόσος του Parkinson (PD) αποτελεί την δεύτερη πιο κοινή νευροεκφυλιστική νόσο παγκοσμίως. Είναι μία πολυπαραγοντική νόσος, στην εμφάνιση της οποίας συμβάλλουν τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες, αλλά η ακριβής αιτία της δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ωστόσο, έχει περιγραφεί εκτενώς ως ένας κρίσιμος μηχανισμός για την εμφάνιση και την εξέλιξή της. Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος των μιτοχονδρίων, αναλύθηκαν υβριδικές κυτταρικές σειρές οι οποίες περιέχουν μιτοχόνδρια από δότες με κληρονομική μορφή της νόσου PD που οφείλεται στη μεταλλαγή A53T της  $\alpha$ -synuclein, καθώς και από υγιείς συγγενείς τους. Οι σειρές αυτές επιτρέπουν την μελέτη της επίδρασης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος διαφορετικής προέλευσης στον φαινότυπο κυττάρων με το ίδιο πυρηνικό και κυτταροπλασματικό περιβάλλον. Τον χαρακτηρισμό του μοντέλου, και τη συγκριτική ανάλυση της αλληλουχίας του μιτοχονδριακού DNA, ακολούθησε η μελέτη της απόκρισης των κυττάρων στην νευροτοξίνη 6-OHDA. Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν διαφορές στις μεταβολές της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην μιτοχονδριακή λειτουργία και στην αντιοξειδωτική άμυνα παρουσία της τοξίνης. Τα επίπεδα του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα TFAM και του ενζύμου MnSOD δεν μεταβάλλονται, παρατηρήθηκε όμως ότι ενεργοποιούνται τα μονοπάτια της απόπτωσης και της αυτοφαγίας, καθώς και του συστήματος μοριακών συνοδών-πρωτεϊνών (chaperones) που συμμετέχουν στην ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Κάποιες από τις σειρές, βρέθηκε πως είναι πιο ευαίσθητες, καθώς εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα της  $\alpha$ -synuclein και χαμηλότερα επίπεδα του δείκτη μιτοχονδριακής βιογένεσης PGC-1 $\alpha$ . Διαπιστώσαμε επίσης ότι η μιτοχονδριακή μεταφορά πρωτεϊνών έχει διαταραχθεί στα υβριδικά κύτταρα που φέρουν τα μιτοχόνδρια της ασθενούς, στα οποία μάλιστα δεν μπορεί να εισέλθει η μονομερής μορφή της  $\alpha$ -synuclein (σε αντίθεση με τα άλλα κύτταρα). Τέλος, μια από τις σειρές που ελέγχθηκαν η οποία περιείχε μιτοχόνδρια από ένα άτομο με τη μεταλλαγή στην  $\alpha$ -synuclein, παρουσίασε μειωμένη απόκριση στην προσθήκη του αυξητικού παράγοντα IGF-1. Τα αποτελέσματά μας, υποδηλώνουν μια επικοινωνία μεταξύ των μιτοχονδρίων και του πυρήνα, και ενθαρρύνουν την άποψη για την συμβολή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος στην έκφραση πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν

πρωτεΐνες που συνδέονται τόσο με την λειτουργία των μιτοχονδρίων, όσο και με την απόκριση των κυττάρων στο στρες, και ενδεχομένως να συμβάλλουν στην εμφάνιση του παρκινσονιακού φαινοτύπου. Επιπλέον μελέτες σε αυτά τα μοντέλα αναμένεται να συμβάλλουν στην διαλεύκανση των χαρακτηριστικών αλλαγών που φέρει το μιτοχονδριακό γονιδίωμα οι οποίες είναι ικανές να καθορίσουν την μοίρα ολόκληρου του κυττάρου



## **SYNOPSIS**

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease worldwide. It is a multifactorial disease, in the appearance of which contribute both genetic and environmental factors, however the underlying cause has not yet been elucidated. Mitochondrial dysfunction is considered a critical mechanism for the appearance and evolution of the disease. In order to further investigate the role of mitochondria, we analyzed hybrid cell lines containing mitochondria from donors with an inherited form of PD (due to the  $\alpha$ -synuclein A53T mutation), and from their healthy relatives. These cells allow us to study the effect of mitochondrial genomes on the phenotype of cells with the same nuclear background and cytoplasmic environment. The characterization of the model and the comparative analysis of the mitochondrial DNA sequence were followed by the analysis of the cells' response to the neurotoxin 6-OHDA. The cybrids responded differently in the expression profile changes of genes which are involved in mitochondrial function and antioxidant defense in the presence of toxin. The levels of the mitochondrial transcription factor TFAM and the enzyme MnSOD are not altered, however we observed an activation of apoptosis and autophagy pathways, as well as of chaperones associated with the refolding of misfolded or the degradation of irrecoverable proteins. Some cybrids were found to be more sensitive, as they exhibited higher levels of  $\alpha$ -synuclein and lower levels of the mitochondrial biogenesis regulator PGC-1 $\alpha$ . Interestingly, the mitochondrial transfer of proteins was impaired in the cells carrying the patient's mitochondria, which were also refractory in the entrance of  $\alpha$ -synuclein (in contrast to the other cybrids). Finally, one of the cybrids that carried mitochondria from an individual with the  $\alpha$ -synuclein mutation exhibited a reduced response to IGF-1. Our results reveal a communication between the mitochondria and the nucleus, and support the view that the mitochondrial genome contributes to the expression of nuclear genes encoding proteins associated with mitochondrial function and the cells' response to stressful stimuli, and could be an important factor in the appearance of a parkinsonian phenotype. Additional studies using these models, is expected to help in elucidating the distinctive changes in the mitochondrial genome that are capable to determine the fate of the cell.

# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## ΜΕΡΟΣ 1

### 1.1 Η νόσος του Parkinson

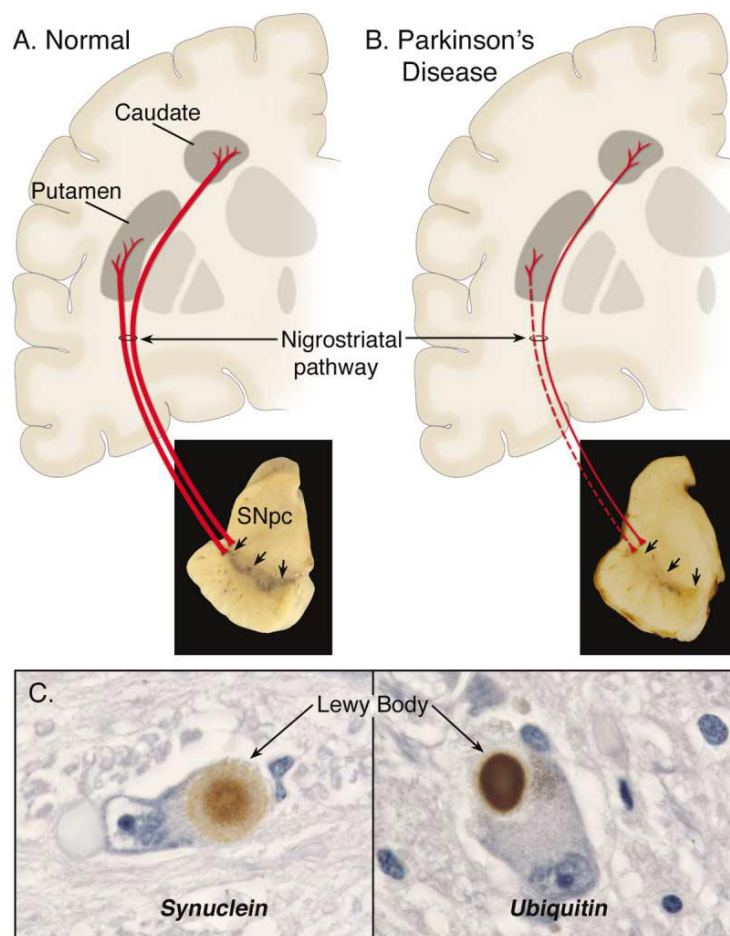
Η νόσος του Parkinson (PD) πήρε το όνομά της από τον Βρετανό γιατρό, James Parkinson που δημοσίευσε την πρώτη περιγραφή της νόσου, στην μελέτη του με τίτλο “*An Essay on the Shaking Palsy*” το 1817. Αποτελεί την δεύτερη πιο κοινή νευροεκφυλιστική νόσο παγκοσμίως μετά τη νόσο Alzheimer και επηρεάζει περίπου το 1% του πληθυσμού άνω των 60 ετών. Είναι μια χρόνια και βραδέως εξελισσόμενη διαταραχή με μέση διάρκεια τα 15 έτη από την αναγνώριση της νόσου μέχρι το θάνατο, αν και τα προσβεβλημένα άτομα μπορεί συχνά να επιβιώνουν δύο δεκαετίες ή περισσότερο.

#### Κλινικά - νευροπαθολογικά συμπτώματα

Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου του Parkinson είναι τα πρωτογενή κινητικά συμπτώματα όπως η βραδυκινησία (δυσκολία ή αποτυχία εκτέλεσης εκούσιων κινήσεων), το τρέμουλο σε καταστάσεις ηρεμίας, η δυσκαμψία και οι διαταραχές της στάσης και της βάδισης (Jankovic, 2008). Παράλληλα η πλειοψηφία των ασθενών εμφανίζει σταδιακά και δευτερογενή μη κινητικά συμπτώματα όπως η δυσλειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος, διαταραχές ύπνου, εύκολη κόπωση, κατάθλιψη και άνοια, τα οποία συνυπάρχουν με τα πρώτα και επηρεάζουν στον ίδιο βαθμό την ποιότητα ζωής του ασθενή.

Ο νευροπαθολογικός χαρακτηρισμός της νόσου περιλαμβάνει (α) την εκτεταμένη και προοδευτική απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην περιοχή της μέλαινας ουσίας συμπαγούς μοίρας (*substantia nigra pars compacta*, SNpc) και (β) την παρουσία ενδοκυτταρικών εγκλείστων, γνωστών ως Lewy bodies (LBs), στα εναπομείναντα ντοπαμινεργικά κύτταρα (**Εικόνα 1**). Τα εγκλείστα αυτά που έχουν σφαιρικό σχήμα βρίσκονται σε όλες τις επηρεαζόμενες περιοχές του εγκεφάλου και αποτελούνται από πλήθος πρωτεϊνών όπως ubiquitin, parkin, κ.α., με κυριότερη την *α-synuclein*, μία πολύ σημαντική πρωτεΐνη για την εξέλιξη της νόσου, στην οποία θα αναφερθούμε εκτενέστερα στην συνέχεια (Forno, 1996)(Spillantini et al., 1998). Η SNpc είναι η πηγή της ντοπαμίνης για τους πυρήνες άλλων βασικών γαγγλίων, οι οποίοι έχουν ως βασικό ρόλο στη εκκίνηση και στη διευκόλυνση της κίνησης. Όταν η

νευροεκφύλιση των νευρώνων αυτών φτάσει στην κατωφλιακή τιμή της τάξης του 60% και την επακόλουθη μείωση της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα κατά 80%, εμφανίζονται τα κινητικά συμπτώματα της νόσου (Shulman et al., 2014).

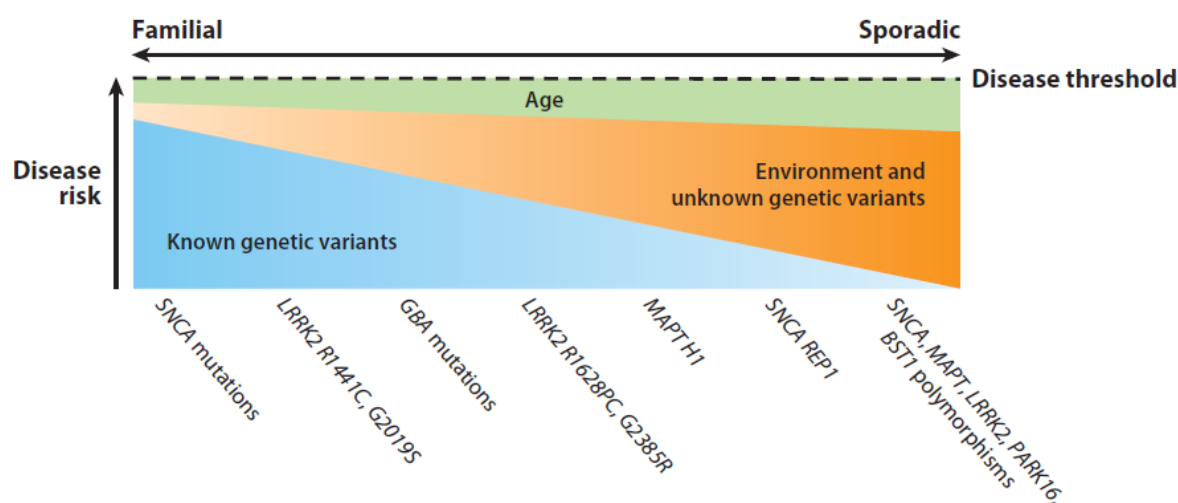


**Εικόνα 1: Η νευροπαθολογία της νόσου του Parkinson.** (A) Σχηματική αναπαράσταση του φυσιολογικού μελανοραβδωτού μονοπατιού (με κόκκινο χρώμα). (B) Σχηματική αναπαράσταση του Παρκινσονιακού μελανοραβδωτού μονοπατιού (με κόκκινο χρώμα). (C) Ανοσοϊστοχημική σήμανση των σωματίων Lewy, σε έναν SNpc ντοπαμινεργικό νευρώνα (Dauer and Serge, 2003) .

### Αιτιολογία

Παρά τις δεκαετίες ερευνών και την πρόοδο που έχει επιτευχθεί, τα αίτια που προκαλούν την νόσο PD παραμένουν ακόμη άγνωστα. Παρότι η αιτιολογία είναι ασαφής, περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες μέσω περίπλοκων αλληλεπιδράσεων, και σε συνδυασμό με τον παράγοντα της ηλικίας, φαίνεται να συμβάλλουν στην παθογένεια της νόσου, επηρεάζοντας πλήθος θεμελιωδών κυτταρικών διαδικασιών (**Εικόνα 2**). Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει τεράστια πρόοδος στην κατανόηση του γενετικού της υποβάθρου. Έχουν βρεθεί 18 γενετικοί τόποι αυξημένου κινδύνου και πολλά γονίδια, μεταλλάξεις στα οποία έχουν συνδεθεί με τη νόσο. Τα σημαντικότερα από αυτά τα γονίδια είναι τα *SNCA*, *PINK1*, *DJI*, *UCHL1*, *PARKIN* και *LRRK2*.

Ωστόσο μόνο το 10% των περιπτώσεων συναντάται στην κληρονομική μορφή της νόσου Parkinson (συνδέεται δηλαδή με μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια). Το υπόλοιπο 90% ανήκει στην σποραδική μορφή της νόσου, δεν έχει δηλαδή συνδεθεί με κάποιους γενετικούς παράγοντες. Πιθανώς η αιτία να προέρχεται από την αλληλεπίδραση γενετικών (αγνώστων ακόμη) και περιβαλλοντικών παραγόντων, πάντα υπό το πρίσμα της ηλικίας όπως προαναφέρθηκε. Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες συγκαταλέγονται η έκθεση σε τοξίνες όπως το 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), φυτοφάρμακα και τραύματα στο κεφάλι.



**Εικόνα 2: Η αναδυόμενη γενετική αρχιτεκτονική της νόσου PD.** Στο μοντέλο αυτό συνοψίζεται η σχετική βαρύτητα των γνωστών μεταλλαγών σε γονίδια που συνδέονται με τη νόσο, σε συνδυασμό με την ηλικία, δυνητικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου και άλλους, άγνωστους γενετικούς τροποποιητές (Shulman et al., 2011).

## Παθογένεση

Αν και οι αιτιολογικοί παράγοντες που οδηγούν στην απώλεια της ντοπαμίνης από τους νευρώνες που βρίσκονται στην περιοχή της SNpc είναι ακόμη ασαφείς, πολλαπλά κυτταρικά γεγονότα φαίνεται ότι συμβάλλουν στην παθογένεση της νόσου PD, συμπεριλαμβανομένων (α) της ενεργειακής κατάρρευσης του κυττάρου, (β) της δυσλειτουργίας του πρωτεασώματος, (γ) του οξειδωτικού στρες, (δ) των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και (ε) της φλεγμονής των νευρώνων. Τα γεγονότα αυτά μπορεί να εμπλέκονται στην εμφάνιση και την εξέλιξη της νόσου με άμεσο ή έμμεσο τρόπο (Maiti et al., 2017).

Είναι ενδιαφέρον ότι όλα αυτά τα φαινόμενα υποδηλώνουν μια σχέση μεταξύ της εναπόθεσης της  $\alpha$ -synuclein και της έναρξης της δυσλειτουργικής μιτοχονδριακής ομοιόστασης, μιας διαδικασίας που αναγνωρίζεται ευρέως ότι έχει κεντρική σημασία στην PD-παθολογία (Camilleri and Vassallo, 2014). Αυτό υποδηλώνει ότι τόσο η παθολογία της  $\alpha$ -synuclein όσο και η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορούν πολύ εύκολα να αποτελέσουν ένα επικίνδυνο ντουέτο η κρίσιμη αλληλεπίδραση του οποίου μπορεί να επηρεάσει την ομοιόσταση και την υγεία των νευρώνων, οδηγώντας έτσι μέσω των διαδικασιών που αναφέρθηκαν παραπάνω στην εκδήλωση των νευροεκφυλιστικών χαρακτηριστικών της νόσου (Zaltieri et al., 2015).

### Θεραπεία

Μέχρι στιγμής, μόνο συμπτωματικές θεραπείες είναι διαθέσιμες, και αν και είναι πολύ χρήσιμες, ιδιαίτερα στα πρώτα στάδια της νόσου, το θεραπευτικό όφελος κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας θεραπείας σταδιακά μειώνεται και οι περισσότεροι ασθενείς αναπτύσσουν κινητικές και ψυχιατρικές παρενέργειες, οι οποίες μπορεί να είναι τόσο εξουθενωτικές όσο η ίδια η ασθένεια. Δεν έχουν βρεθεί ακόμη θεραπευτικές προσεγγίσεις που να στοχεύουν άμεσα τους υποκείμενους παθογενετικούς μηχανισμούς της νόσου ή να σταματούν την εξέλιξή της. Κατά συνέπεια, η διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την παθολογία της νόσου είναι απαραίτητη, προκειμένου να βρεθούν νέοι φαρμακευτικοί στόχοι, και να αναπτυχθούν νέες στρατηγικές για την αντιμετώπισή της.

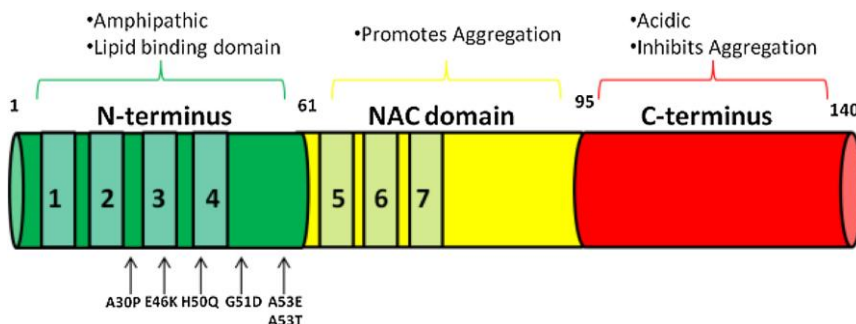
## 1.2 $\alpha$ -synuclein

### Γενικά χαρακτηριστικά

Η  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) είναι μία μικρή πρωτεΐνη 140 αμινοξέων (μεγέθους 14.5 kDa) (Bisaglia et al., 2009), η οποία είναι πολύ συντηρημένη στα σπονδυλωτά και εκφράζεται στις προσυναπτικές νευρικές απολήξεις σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου (Jain et al., 2013). Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στην οικογένεια των συνουκλεϊνών, η οποία αποτελείται από τρία μέλη, την  $\alpha$ -, την  $\beta$ - και την  $\gamma$ - synuclein (Lavedan, 1998), και χαρακτηρίζεται από την απουσία συγκεκριμένης δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής (*intrinsically disordered protein*, IDP) (Deleersnijder et al., 2013). Η αξιοσημείωτη πλαστικότητα της διαμόρφωσής της, της επιτρέπει να υιοθετεί ένα ευρύ φάσμα δυναμικών δομών ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος (Jain et al., 2013).

Η  $\alpha$ -synuclein αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές:

- I. Μια αμινοτελική αμφιπαθική αλληλουχία (κατάλοιπα 1-60), η οποία εμπλέκεται στις ιδιότητες πρόσδεσης της στα λιπίδια και σε αυτήν εδράζονται οι συνηθέστερες μεταλλάξεις της πρωτεΐνης που συναντώνται στη νόσο PD (A30P, A53T, E46K, H50Q, G51D, A53E).
- II. Μια κεντρική υδρόφοβη περιοχή (κατάλοιπα 61-95) που ονομάζεται NAC (non-amyloid- $\beta$  component) και είναι απαραίτητη για τη δημιουργία των συσσωματωμάτων.
- III. Το καρβοξυτελικό άκρο (κατάλοιπα 96-140) το οποίο ευθύνεται για την δέσμευση του ασβεστίου και έχει ένα ισχυρό αρνητικό φορτίο επειδή αποτελείται κυρίως από όξινα αμινοξέα. Πρόκειται για μια εγγενώς μη δομημένη περιοχή (Intrinsically Disordered Domain, IDD), η οποία προσδίδει πλαστικότητα στην πρωτεΐνη και παίζει ρυθμιστικό ρόλο στο σχηματισμό των συσσωματωμάτων και των ινιδίων της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της δομής και των επιμέρους περιοχών της  $\alpha$ -synuclein. (Butler et al., 2017)

## Φυσιολογική -Παθολογική δράση

Μελέτες έχουν δείξει ότι η  $\alpha$ -synuclein εμπλέκεται πιθανώς στον έλεγχο διεργασιών που επιτελούνται στις συναπτικές μεμβράνες (Bellucci et al., 2012), και συμμετέχει στην ρύθμιση της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών μέσω της αλληλεπίδρασής της με μέλη της οικογένειας SNARE (Tsigelny et al., 2012). Πιο συγκεκριμένα, η  $\alpha$ -synuclein προάγει την συναρμολόγηση του συμπλόκου SNARE μέσω ενός μη ενζυμικού μηχανισμού, όπου το αμινοτελικό της άκρο προσδένεται στα φωσφολιπίδια και το καρβοξυτελικό άκρο προσδένεται στην πρωτεΐνη synaptobrevin II. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η  $\alpha$ -synuclein παίζει το ρόλο πρωτεΐνης-συνοδού για το προσυναπτικό σύμπλοκο SNARE και ευθύνεται τόσο για την συναρμολόγηση και τον έλεγχο της αποικοδόμησης του όσο και για την διατήρηση και την κατανομή του, μπορεί δηλαδή να εμπλέκεται άμεσα στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών συμπεριλαμβανομένης και της ντοπαμίνης (Burre et al., 2010). Ωστόσο ο ακριβής φυσιολογικός ρόλος της παραμένει ακόμη αβέβαιος.

Η παθολογική της δράση προκαλείται από την ενδοκυτταρική συσσώρευση αμυλοειδών ινιδίων της πρωτεΐνης. Η  $\alpha$ -syn έχει την ικανότητα να σχηματίζει ολιγομερή, ινίδια και συσσωματώματα ινιδίων έπειτα από υπερέκφρασή της, έκθεση σε αλλαγές του pH, οξειδωτικό στρες ή την αλληλεπίδραση με τη ντοπαμίνη (Feng et al., 2010). Αυτές οι παθολογικές μορφές ευθύνονται/διαμορφώνουν μια οικογένεια νευρολογικών διαταραχών, τις συνουκλεινοπάθειες (synucleinopathies), στις οποίες συγκαταλέγεται και η νόσος PD (Danzer et al., 2012).

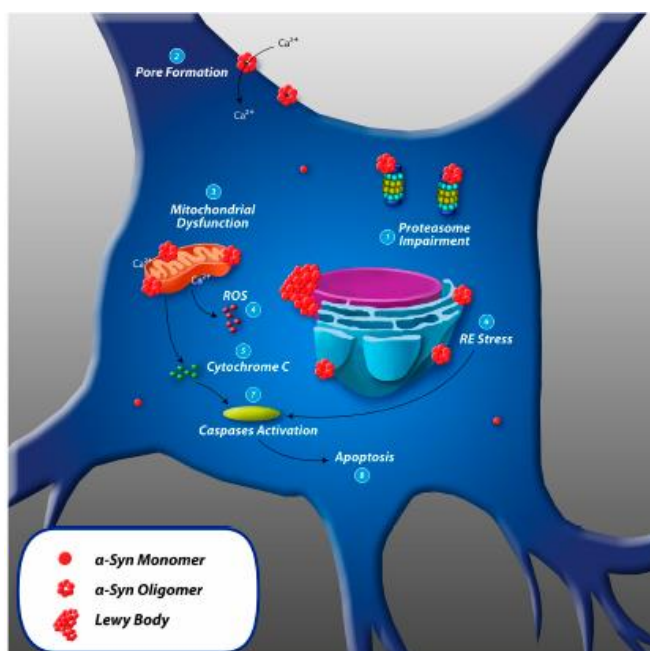
Η  $\alpha$ -syn υφίσταται διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες ενισχύουν τις παθολογικές της ιδιότητες, όπως είναι η φωσφορυλίωση καταλοίπων λυσίνης και τυροσίνης, η ουβικιτινίλωση, η νιτριλίωση και η περικοπή, με κυριότερη την φωσφορυλίωση της σερίνης 129 που αποτελεί την κυρίαρχη τροποποίηση της στα Lewy bodies (LBs), ενός από τα κυριότερα νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου (Ross and Poirier, 2004, Deleersnijder et al., 2013). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της  $\alpha$ -synuclein (SNCA) συνδέονται άμεσα με την έναρξη της νόσου PD. Τόσο η υπερέκφρασή της λόγω διπλασιασμού ή τριπλασιασμού του γονιδίου SNCA, όσο και σημειακές μεταλλαγές στο γονίδιο αυτό οι οποίες οδηγούν στις αμινοξικές αλλαγές (Ala53Thr, Ala30Pro, Glu46Lys) οδηγούν στην εμφάνιση των οικογενών μορφών της νόσου (Xu and Pu, 2016).

## Σημαντικές ιδιότητες της $\alpha$ -syn που σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου του Parkinson

Η  $\alpha$ -synuclein διαθέτει δύο πολύ βασικές ιδιότητες οι οποίες μπορούν να εξηγήσουν την προοδευτικότητα και την μη αναστρεψιμότητα της νόσου PD.

Η πρώτη συνδέεται με την ικανότητά της να μεταφέρεται από νευρώνα σε νευρώνα, διαδίδοντας την παθολογία μέσω ενός μηχανισμού παρόμοιου με αυτό των πρωτεϊνών prion, όπου η μη σωστά αναδιπλωμένη  $\alpha$ -syn προκαλεί την αλλαγή της διαμόρφωσης και την συσσώματωση και της ενδογενούς φυσιολογικής μορφής της πρωτεΐνης. Η μεταφορά αυτή γίνεται μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως η ενδοκυττάρωση με απευθείας είσοδο από την πλασματική μεμβράνη ή μέσω εξωσωμάτων (Gallegos et al., 2015).

Η δεύτερη είναι η ικανότητά της να προκαλεί κυτταρική τοξικότητα, κυρίως όταν βρίσκεται στην ολιγομερική της μορφή. Τα ολιγομερή της  $\alpha$ -syn δεσμεύονται σε διάφορα κυτταρικά οργανίδια και αλλοιώνουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες. Οι πιο μελετημένοι παθογονικοί μηχανισμοί των μεταλλαγμένων μορφών, καθώς και της αγρίου τύπου  $\alpha$ -syn περιλαμβάνουν την αναστολή του πρωτεασώματος, το οξειδωτικό στρες, το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου που οδηγεί σε ενεργοποίηση των κασπασών, την μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και την απελευθέρωση του cytochrome C που ενεργοποιεί επίσης τα μονοπάτια των κασπασών. Ένας ακόμη σημαντικός



μηχανισμός της κυτταροτοξικότητας της  $\alpha$ -syn είναι ο σχηματισμός δομών που μοιάζουν με πόρους (pore-like channels) σε διαφορετικά είδη κυτταρικών μεμβρανών οι οποίοι δρουν ως μη επιλεκτικά κανάλια, επιτρέποντας το πέρασμα μικρών μορίων και κατιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στη νευροτοξικότητα (Εικόνα 4) (Gallegos et al., 2015).

**Εικόνα 4:** Μηχανισμοί τοξικότητας της  $\alpha$ -synuclein και κυτταρικός θάνατος (Gallegos et al., 2015).

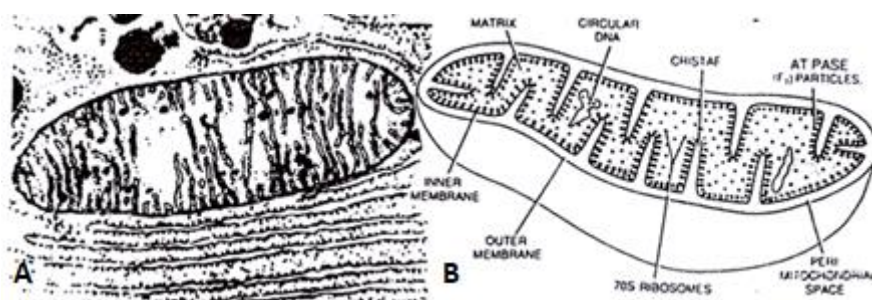


Ο λόγος για τον οποίο η  $\alpha$ -syn είναι σε θέση να μεταφέρει και να προκαλεί τοξικότητα με τόσους πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά μπορεί να οφείλεται στη μεγάλη πλαστικότητα της διαμόρφωσης του μορίου που της επιτρέπει να υιοθετεί ποικίλες δευτεροταγείς δομές υπό διαφορετικές συνθήκες.

### 1.3 Μιτοχόνδρια

#### Γενικά χαρακτηριστικά

Τα μιτοχόνδρια είναι μητρικώς κληρονομούμενα κυτταρικά οργανίδια τα οποία συναντώνται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα και εντοπίστηκαν για πρώτη φορά 110 χρόνια πριν στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Κατανέμονται σε όλη την έκταση του κυτταροπλάσματος σχηματίζοντας ένα δυναμικό δίκτυο. Η βασική υπόθεση της εξελικτικής τους προέλευσης υποδηλώνει ότι προήλθαν από μια συμβιωτική σχέση μεταξύ ευκαρυωτικών κυττάρων και πρωτόγονων βακτηρίων με την ικανότητα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Margulis, 1970). Σε συμφωνία με αυτήν την υπόθεση, τα μιτοχόνδρια περικλείονται από διπλή μεμβράνη: συμπεριλαμβανομένης μιας διαπερατής εξωτερικής μεμβράνης που είναι δομικά παρόμοια με την πλασματική μεμβράνη και μιας εσωτερικής μεμβράνης που σχηματίζει πολυάριθμες εσωτερικές πτυχωσεις (*cristae*) και χωρίζει την μιτοχονδριακή μήτρα και τον διαμεμβρανικό χώρο (Εικόνα 5).

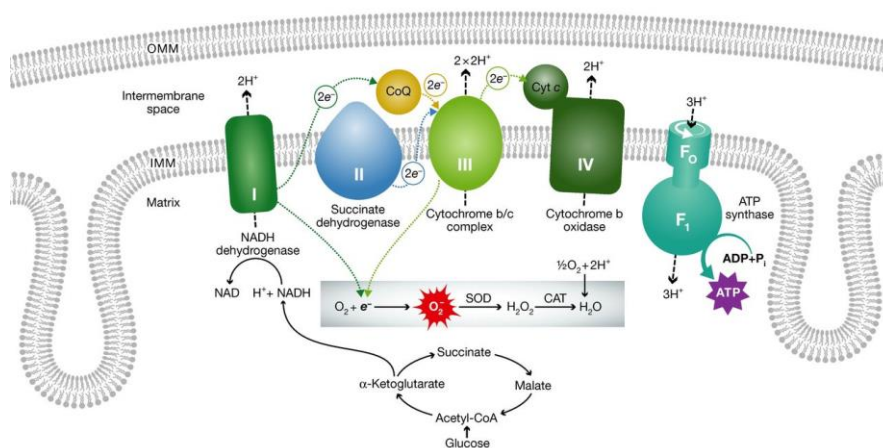


Εικόνα 5: (A) Ηλεκτρονική μικρογραφία μιτοχονδρίου. (B) Σχηματική αναπαράσταση της δομής ενός μιτοχονδρίου (Vandana S, <http://www.biologydiscussion.com>).

Η πρωταρχική λειτουργία τους είναι η παραγωγή ενέργειας με τη μορφή της 5'-τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, γι αυτό και θεωρούνται τα "εργοστάσια παραγωγής ενέργειας" του κυττάρου (Kuznetsov et

al., 2009). Τα μιτοχόνδρια «εκμεταλλεύονται» τα παράγωγα του κύκλου του κιτρικού οξέος (*citric acid cycle*) NADH και FADH ως δότες ηλεκτρονίων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή του ATP. Το βασικό συστατικό για την πραγματοποίηση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι η αναπνευστική αλυσίδα (*Electron Transport Chain, ETC*) των μιτοχονδρίων η οποία εδράζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και αποτελείται από 4 σύμπλοκα πρωτεϊνών (I,II,III,IV) (**Εικόνα 6**). Η λειτουργία της ETC έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία μιας ηλεκτροχημικής διαβάθμισης φορτίου στη μιτοχονδριακή μεμβράνη η οποία χρησιμοποιείται από το ένζυμο ATP συνθάση για την δημιουργία μορίων ATP (Yellen, 2018).

Εκτός όμως από τον ενεργειακό τους ρόλο τα πολύπλοκα δομικά χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων τους επιτρέπουν να συμμετέχουν και σε πλήθος άλλων σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών όπως ο μεταβολισμός των αμινοξέων/

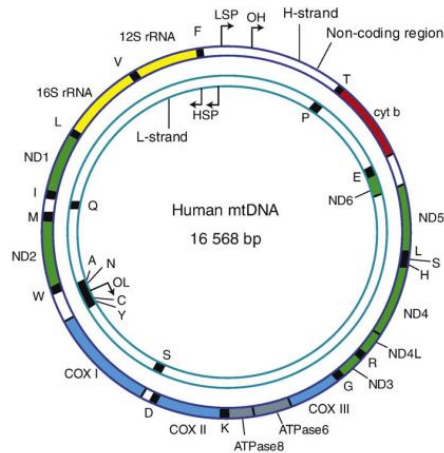


λιπιδίων, η ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου και ο έλεγχος του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (*programmed cell death, PCD*).

**Εικόνα 6:** Η μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) (Dorn, 2015).

### Δομή και οργάνωση του μιτοχονδριακού DNA

Τα μιτοχόνδρια περιέχουν το δικό τους γενετικό υλικό το οποίο είναι διαχωρισμένο και διακριτό από το γονιδίωμα του πυρήνα. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι ένα δίκλωνο, κυκλικό, υπερελικωμένο μόριο DNA το οποίο εντοπίζεται στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου. Το ανθρώπινο mtDNA αποτελείται από 16,569 ζεύγη βάσεων και δεν περιέχει ιντρόνια στο εσωτερικό των γονιδίων. Η αντιγραφή του γίνεται καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Οι αλυσίδες του



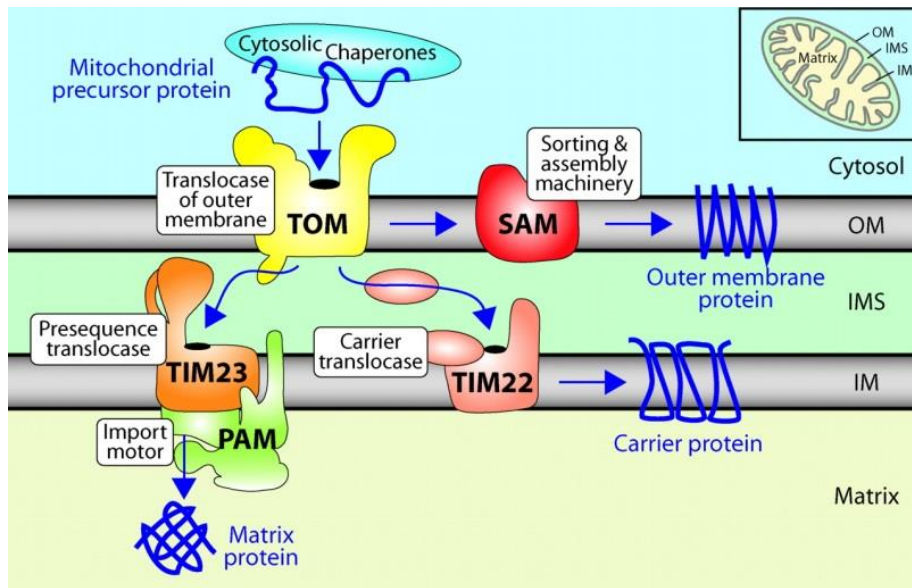
**Εικόνα 7: Το ανθρώπινο μιτοχondριακό γονιδίωμα.** (Wanrooij and Falkenberg, 2010)

mtDNA διαφοροποιούνται μεταξύ τους, καθώς η μία αλυσίδα είναι πλούσια σε βάσεις γουανίνης (βαριά αλυσίδα, H-strand) και η άλλη πλούσια σε κυτοσίνες (ελαφριά αλυσίδα, L-strand) (Nicholls and Minczuk, 2014). Η βαριά αλυσίδα κωδικοποιεί 28 γονίδια και η ελαφριά 9. Από αυτά, τα 13 κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αναπνευστική αλυσίδα, τα 22 μεταφορικά RNAs (tRNAs) και τα εναπομείναντα 2 τις υπομονάδες του ριβοσωμικού RNA (rRNAs), χαρακτηριστικό της ημι-αυτόνομης φύσης του οργανιδίου (Anderson et al., 1981). Στο μιτοχondριακό DNA εντοπίζεται επίσης μία μη-κωδική περιοχή που ονομάζεται βρόγχος εκτόπισης (*displacement loop*, D-loop) και έχει μήκος 1124bp (Εικόνα 7). Αποτελεί σημείο ελέγχου της έκφρασης του mtDNA, αφού περιέχει τις θέσεις υποκινητών για την έναρξη της μεταγραφής και των 2 αλυσίδων (Clayton, 2000). Μεταξύ των γονιδίων υπάρχουν πολύ λίγες μη-κωδικοποιούσες περιοχές, ενώ κάποια γονίδια αλληλεπικαλύπτονται (Anderson et al., 1981). Τα υπόλοιπα γονιδιακά προϊόντα που είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική λειτουργία του μιτοχondρίου κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρήνα (Chial and Craig, 2008). Δεδομένης της εξελικτικής βακτηριακής προέλευσης των μιτοχondρίων δεν αποτελεί έκπληξη η ομοιότητα της οργάνωσης του mtDNA με το βακτηριακό DNA. Το μιτοχondριακό γονιδίωμα συμπιέζεται για να σχηματίσει τα μιτοχondριακά πυρηνοειδή (mitochondrial nucleoids), τα οποία είναι εμφανή στο μικροσκόπιο σαν στικτές δομές που κατανέμονται σε ολόκληρο το μιτοχόνδριο (Alam et al., 2003)(Legros et al., 2004). Τα μιτοχondριακά πυρηνοειδή αποτελούνται από ένα σύνολο πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών όπως το πακετάρισμα του mtDNA, η αντιγραφή και η μεταγραφή. Η σημαντικότερη από αυτές τις πρωτεΐνες φαίνεται πως είναι ο μιτοχondριακός μεταγραφικός παράγοντας A (TFAM), η πιο άφθονη μιτοχondριακή πρωτεΐνη, που αναλαμβάνει το ρόλο των ιστονών στην οργάνωση του μιτοχondριακού DNA (Wanrooij and Falkenberg, 2010).

## Μεταφορά πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια

Παρά το γεγονός ότι τα μιτοχόνδρια περιέχουν το δικό τους DNA, οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια. Συντίθενται ως πρόδρομα μόρια στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος και στη συνέχεια εισέρχονται στα οργανίδια. Οι μιτοχονδριακές μεμβράνες περιέχουν συγκεκριμένες μεταφορικές μηχανές (τρανσλοκάσες ή τρανσλοκόνια) για την αναγνώριση, μετατόπιση και εισαγωγή των πρόδρομων πρωτεϊνών στα διάφορα μιτοχονδριακά διαμερίσματα. Οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες έχουν μία αλληλουχία-οδηγό στο N-τελικό τους άκρο, η οποία απομακρύνεται ταχέως μετά την εισαγωγή τους στο οργανίδιο από μια εξειδικευμένη πρωτεάση (Πεπτιδάση σήματος του μιτοχονδρίου MPP, Matrix Processing Peptidase). Οι αμινοτελικές αλληλουχίες-οδηγοί είναι απαραίτητες και επαρκείς για την εισαγωγή των πρωτεϊνών που τις περιέχουν στα μιτοχόνδρια (Alberts et al., 2002).

Με τη βοήθεια μοριακών πρωτεϊνών συνοδών όπως η Hsp70, οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μεταφέρονται στη γενική πύλη εισόδου των μιτοχονδρίων, το σύμπλοκο TOM (*Translocase of the Outer Membrane*), από όπου στη συνέχεια ταξινομούνται σε ένα από τα επιμέρους μιτοχονδριακά διαμερίσματα. Οι πρόδρομοι των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης με δομή β-βαρελιού απαιτούν το σύμπλοκο SAM (*Sorting and Assembly Machinery*) για την μεταφορά τους. Οι πρόδρομες πρωτεΐνες που προορίζονται για τη μήτρα εξαρτώνται από το σύμπλοκο Tim23 (*Translocase of the Inner Membrane*) της εσωτερικής μεμβράνης και τον συνδεδεμένο με αυτή κινητήρα εισαγωγής ή υποβοήθησης εισόδου PAM (*Presequence translocase-Associated Motor*) για τη μεταφορά τους διαμέσου της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες μεταφοράς μικρών μορίων (*carrier proteins*) εισάγονται στην εσωτερική μεμβράνη με τη βοήθεια του συμπλόκου TIM22 (**Εικόνα 8**) (Wiedemann et al., 2004).



Εικόνα 8: Μονοπάτια μιτοχονδριακής μεταφοράς στα μιτοχόνδρια (Wiedemann et al., 2004).

### Οξειδωτικό στρες

Τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια πηγή παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου (*Reactive Oxygen Species*, ROS). Οι ενεργές ρίζες αποτελούν παραπροϊόντα της κυτταρικής αναπνοής κυρίως του συμπλόκου I αλλά και του III, και συμβάλλουν σημαντικά στο ενδοκυτταρικό οξειδωτικό στρες (Murphy, 2009). Τα λιπίδια των μεμβρανών των ενδοκυτταρικών οργανιδίων είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στις βλάβες από ROS (κυρίως σε αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξειδωσης), με επιζήμιες επιπτώσεις για τη λειτουργία του κυττάρου (Devasagayam and Bloor, 2003). Η συσσώρευση των ROS έχει επίσης ως αποτέλεσμα την οξείδωση των πρωτεϊνών και την απώλεια της κυτταρικής τους λειτουργίας (Halliwell, 1999). Οι ROS έχουν επίσης την ικανότητα να εξασθενούν την λειτουργία των συστημάτων πρωτεϊνικής αποικοδόμησης UPS (*Ubiquitin-Proteasome System*) και του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσosomal σώματος ALP (*Autophagy-Lysosomal Pathway*) με αποτέλεσμα τη συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κυττάρου (Szweda et al., 2002). Τέλος οι ελεύθερες ρίζες αλληλεπιδρούν και με το DNA προκαλώντας του σειρά βλαβών.

Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει πολλούς μηχανισμούς αντιμετώπισης του οξειδωτικού στρες οι οποίοι ενεργοποιούνται κατά την οξειδωτική βλάβη των μιτοχονδρίων προκειμένου να διατηρήσουν την ομοιόσταση και την επιβίωσή τους. Απομακρύνουν λοιπόν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που έχουν υποστεί βλάβη μέσω πρωτεολυτικών μηχανισμών, αποκαθιστούν τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια μέσω

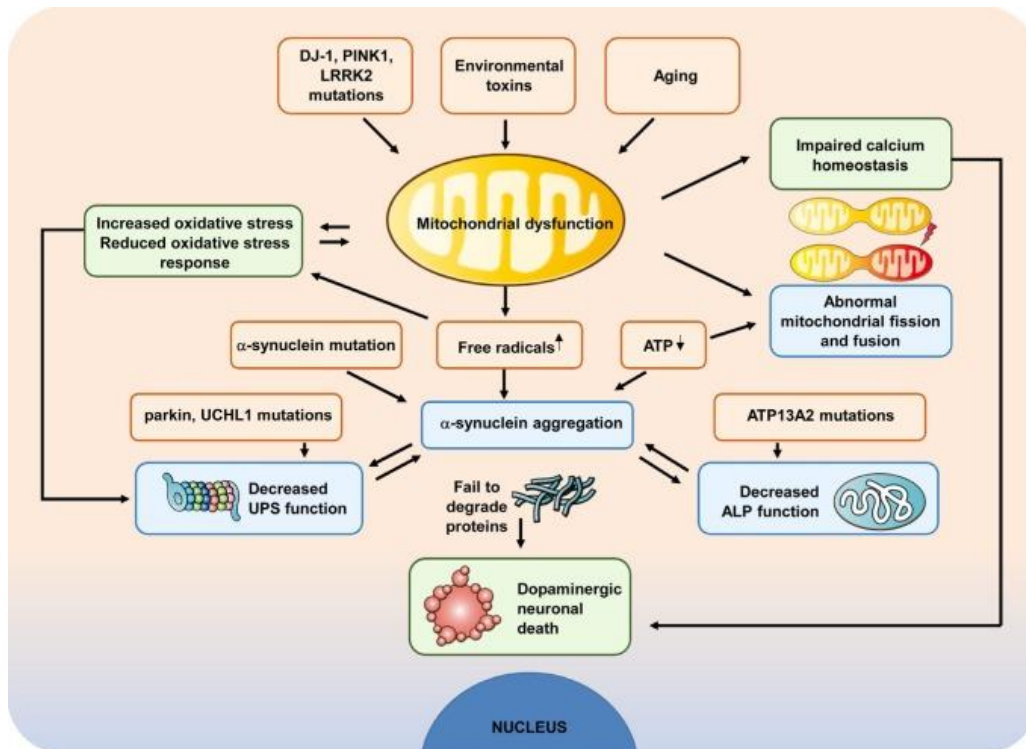
μηχανισμών σχάσης και σύντηξης και απομακρύνουν αυτά που έχουν υποστεί ανεπανόρθωτη βλάβη μέσω της διαδικασίας της αυτοφαγίας.

### Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στη νόσο του Parkinson

Τα τελευταία χρόνια, οι δημοσιεύσεις στο πεδίο της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας που σχετίζεται με τη νόσο PD έχουν αυξηθεί εκθετικά και πολλές μελέτες έχουν καταδείξει ότι μεταβολές στη λειτουργία και την μορφή των μιτοχονδρίων είναι κεντρικής σημασίας στην παθογένεση της. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία χαρακτηρίζεται κυρίως από τη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας του μιτοχονδριακού συμπλόκου I, την απελευθέρωση του cytochrome C, την εξάντληση του ATP και την ενεργοποίηση της κασπάσης 3.

Η μειωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία οδηγεί σε αυξημένο οξειδωτικό στρες και επηρεάζει πλήθος κυτταρικών μονοπατιών, οδηγώντας σε βλάβη των ενδοκυτταρικών συστατικών και στον κυτταρικό θάνατο. Το οξειδωτικό στρες είναι ένας από τους μηχανισμούς θανάτου των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη νόσο PD. Η αιτιοπαθογένεση της σποραδικής μορφής της νόσου είναι πολύπλοκη και σε αυτήν συμβάλλουν τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες επηρεάζουν διάφορες πλευρές της βιολογίας των μιτοχονδρίων, συμπεριλαμβανομένου του κύκλου ζωής τους, της ενεργειακής τους ικανότητας, του ποιοτικού ελέγχου, των δυναμικών μεταβολών της μορφολογίας και της ομοιόστασης (σύντηξη-σχάση), της υποκυτταρικής κατανομής τους (μετακίνησης) και της ρύθμισης των μονοπατιών του κυτταρικού θανάτου (**Εικόνα 9**) (Moon and Paek, 2015).

Πολλά από τα γονιδιακά προϊόντα που σχετίζονται με την PD είναι πρωτεΐνες που εδράζονται φυσιολογικά ή μπορεί να μετατοπιστούν στα μιτοχόνδρια μέσω διαφόρων ερεθισμάτων. Λειτουργούν είτε προστατεύοντας είτε βλάπτοντας τα μιτοχόνδρια. Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια μπορεί να οδηγήσουν σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι τα γονίδια *SNCA*, *LRRK2*, *PARKIN*, *PINK1* και *DJ-1* (Hu and Wang, 2016).



**Εικόνα 9: Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και ο ντοπαμινεργικός κυτταρικός θάνατος στην παθογένεση της νόσου PD.** Πολλοί παράγοντες, όπως το γενετικό υπόβαθρο, η γήρανση, οι περιβαλλοντικές τοξίνες, καθώς και συνδυασμοί τους, έχουν εμπλακεί στην αιτιολογία αυτής της ασθένειας. Η μη φυσιολογική μεταβολική λειτουργία των μιτοχονδρίων, η ανώμαλη μορφολογία και η μειωμένη ισορροπία σχάσης-σύντηξης έχουν παρατηρηθεί σε αρκετές μορφές της νόσου PD. Το αυξημένο οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε εξασθενημένη λειτουργία του συστήματος UPS, επηρεάζοντας έτσι περαιτέρω την επιβίωση των κυττάρων. Όλα αυτά μπορούν άμεσα ή έμμεσα να επηρεάσουν τη λειτουργία των συστημάτων αποικοδόμησης πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των UPS και ALP, και έτσι να προκαλέσουν το θάνατο των ντοπαμινεργικών νευρώνων. (Moon and Paek, 2015).

### Μιτοχόνδρια και $\alpha$ -synuclein

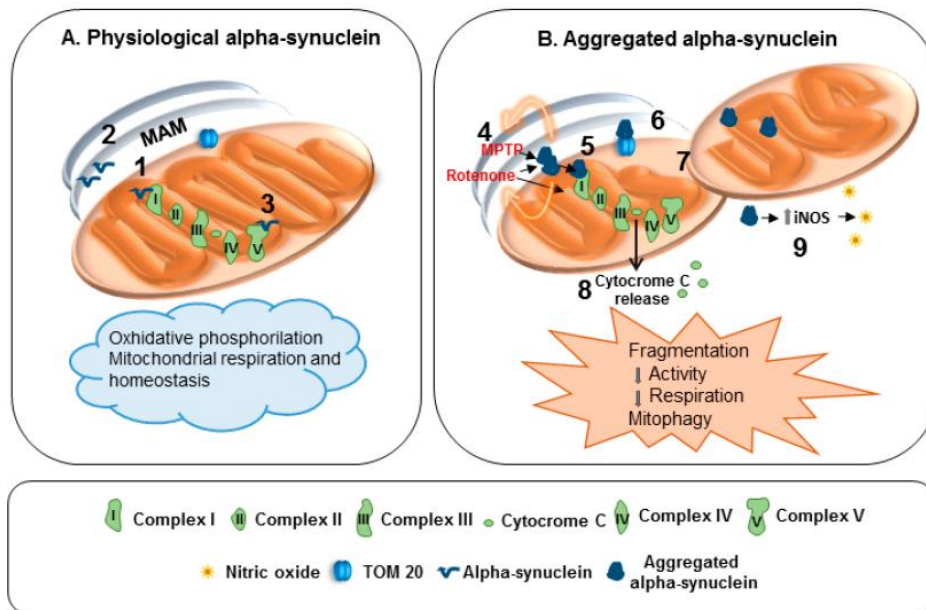
Οι μιτοχονδριακές αλλαγές και η παθολογική εναπόθεση της  $\alpha$ -synuclein παίζουν κεντρικό ρόλο στη νόσο PD. Πολλές μελέτες αναδεικνύουν μια κρίσιμη αλληλεπίδραση μεταξύ των μιτοχονδρίων και της  $\alpha$ -synuclein τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Η πρωτεΐνη αυτή μάλιστα, αναδύεται ως ένας φυσικός διαμορφωτής-κλειδί της μιτοχονδριακής ομοιόστασης.

Πράγματι, η  $\alpha$ -synuclein αλληλεπιδρά φυσιολογικά με τη δομή MAM (*Mitochondria-Associated ER Membranes*) η οποία είναι πολύ σημαντική για την επικοινωνία ER και μιτοχονδρίων, καθώς επίσης και με το σύμπλοκο I της

αναπνευστικής αλυσίδας και την ATP συνθάση (**Εικόνα 10A**) (Devi et al., 2008)(Chinta et al., 2010). Το N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης είναι απαραίτητο τόσο για την αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο I όσο και για τον έλεγχο της νευρωνικής μορφολογίας των μιτοχονδρίων στους νευρώνες (Pozo Devoto et al., 2017)( Bose and Beal, 2016). Όταν η *α-synuclein* σχηματίζει συσσωματώματα οι λειτουργίες του συμπλόκου I υπονομεύονται (**Εικόνα 10B**). Επιπλέον, η συσσώρευση της *α-synuclein* και η απώλεια της λειτουργίας της μπορούν επίσης να επηρεάσουν σημαντικά την ομοιόσταση των μιτοχονδρίων, δυσχεραίνοντας την είσοδο των πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια μέσω άμεσης αναστολής του υποδοχέα Tom20 ο οποίος βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη τους (Di Maio et al., 2016). Προκαλείται έτσι απελευθέρωση του cytochrome C από τα μιτοχόνδρια, και μια αύξηση του ασβεστίου και του νιτρικού οξειδίου με ακόλουθο μιτοχονδριακό οξειδωτικό στρες (Parihar et al., 2008). Παρόμοια τα ινίδια της *α-synuclein* προκαλούν επίσης μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μέσω επαγωγής της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (*inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS*) και των επιπέδων του νιτρικού οξειδίου (Εικόνα 10B), συμβάλλοντας στην δημιουργία αυξανόμενων επιπέδων νιτροσυλιωμένων πρωτεϊνών (Tapias et al., 2017). Επιπλέον η *α-synuclein* εμποδίζει την αναστολή των προ-αποπτωτικών μονοπατιών μέσω ρύθμισης της πρωτεϊνικής κινάσης MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Musgrove et al., 2013).

Αντίστροφα, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί επίσης να οδηγήσει στην συσσωμάτωση και εναπόθεση της *α-synuclein*. Συνεπώς, η μιτοχονδριακή υγεία έχει σημασία για την εξασφάλιση της σωστής εκπλήρωσης των φυσιολογικών λειτουργιών της *α-synuclein*. Έτσι λοιπόν, τα μιτοχόνδρια και η *α-synuclein* αποκαλύπτονται ως δύο καλοί «συνεργάτες», που συμβάλλουν στην διασφάλιση της σωστής λειτουργίας των υγιών νευρώνων. Γι'αυτό και διαταραχές στην αλληλεπίδραση *α-synuclein*/μιτοχονδρίων μπορούν εύκολα να οδηγήσουν σε νευρωνική εξασθένιση. Σύμφωνα με αυτό το σενάριο, οι μιτοχονδριακές αλλαγές και η συσσώρευση της *α-synuclein* μπορούν αμφότερα να θέσουν σε κίνδυνο τη λειτουργία του νευρικού κυττάρου μέσω της δημιουργίας ενός φαύλου αυτό-ενισχυόμενου κύκλου, όπου μπορεί καθένας από τους δύο παράγοντες να προωθήσει την επιζήμια δράση του άλλου σε έναν διαρκή «αγώνα». Η μελέτη της αλληλεπίδρασης *α-synuclein*/μιτοχονδρίων σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις στην υγεία και τις ασθένειες είναι επομένως ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στόχων για τη νόσο PD (Faustini et al., 2017).





**Εικόνα 10: Οι επιδράσεις της φυσιολογικής και της συσσωματωμένης  $\alpha$ -synuclein στα μιτοχόνδρια.** (A) 1: Η  $\alpha$ -synuclein ελέγχει τη στόχευση των πρωτεϊνών και τη μιτοχονδριακή μορφολογία. 2: Αλληλεπίδραση με τη δομή MAM. 3: Αλληλεπίδραση με τη συνθάση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). (B) 4: Η ανασταλκτική δράση της 1-μεθυλ-4-φαινυλ-1,2,3,6-τετραϋδροπυριδίνης (MPTP) και της ροτενόνης επί του συμπλόκου I ενισχύεται από την  $\alpha$ -synuclein. 5: Δυσλειτουργία του συμπλόκου I. 6: Μειωμένη εισαγωγή μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. 7: Μιτοχονδριακός κατακερματισμός και μιτοφαγία. 8: Απελευθέρωση του cytochrome C. 9: Επαγωγή της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (iNOS) και παραγωγή νιτρικού οξειδίου (Faustini et al., 2017).

### Επιγενετική ρύθμιση του μιτοχονδρίου

Ο όρος επιγενετική αναφέρεται στην μελέτη των κληρονομικών φαινοτυπικών αλλαγών που δεν οφείλονται σε μεταβολές στην ακολουθία του DNA (Dupont et al., 2009) και μπορεί να διερευνηθεί σε διάφορα επίπεδα. Χωρίζεται σε δύο μεγάλες περιοχές: την επιγενετική του πυρηνικού DNA και την επιγενετική του μιτοχονδριακού DNA.

Σε ότι αφορά το πρώτο, οι κύριοι μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση του DNA, αλλαγές στην δομή των ιστονών, καθώς και στα επίπεδα διαφόρων κατηγοριών μικρών ρυθμιστικών, μη κωδικών RNA. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί που διαμορφώνουν την κατάσταση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος φαίνεται να είναι παρόμοιοι σε σχέση με τη μεθυλίωση του DNA και ως ένα βαθμό στο ρόλο των μη κωδικών RNA, ωστόσο αυτά που γνωρίζουμε είναι ακόμη πολύ λίγα. Το πυρηνικό DNA τυλίγεται γύρω από τα οκταμερή των ιστονών,

κάτι που δεν συμβαίνει με το μιτοχονδριακό DNA, το οποίο μαζί με ειδικές πρωτεΐνες οργανώνεται σε ψευδο-διαμερίσματα (με την έννοια ότι είναι δομές που δεν περιβάλλονται από κάποια μεμβράνη) που ονομάζονται πυρηνοειδή (Stimpfel et al., 2018).

Η επιγενετική των μιτοχονδρίων άρχισε να μελετάται σε μεγαλύτερη έκταση τα τελευταία 10 χρόνια, όταν νέες προηγμένες τεχνολογίες μοριακής βιολογίας έκαναν δυνατή την έρευνα αυτή. Στις πρώτες μελέτες της μεθυλίωσης του mtDNA (Dawid, 1974) (Nass, 1973) αλλά και σε πιο πρόσφατες (Hong et al., 2013), τα αποτελέσματα ήταν αντιφατικά, δείχνοντας είτε χαμηλό επίπεδο μεθυλίωσης του mtDNA ή ακόμη και καθόλου μεθυλίωση. Παρόλα αυτά η μεθυλίωση στο mtDNA φαίνεται ότι δεν είναι τυχαίο γεγονός αφού εμφανίζεται στο δινουκλεοτίδιο CpG με συχνότητα 3 έως 5% (Pollack et al., 1984).

Πρόσφατα, δείχθηκε ότι το προϊόν ενός εναλλακτικού μεταγράφου της DNA μεθυλοτρανσφεράσης 1 (mtDNMT1) είναι υπεύθυνο για αυτήν την τροποποίηση (Shock et al., 2011). Αυτό το ένζυμο κωδικοποιείται στον πυρήνα, μαζί με άλλες DNMTs (Chestnut et al., 2011) αλλά μπορεί να μεταφερθεί στα μιτοχόνδρια χάρη σε μια συντηρημένη αλληλουχία-οδηγό η οποία βρίσκεται ανοδικά της θέσης έναρξης της μετάφρασης (Shock et al., 2011). Οι Shock et al. έδειξαν επίσης ότι η έκφραση του ενζύμου DNMT1 που μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια ρυθμίζεται από τους μεταγραφικούς παράγοντες NRF1 και PGC-1α, οι οποίοι ενεργοποιούν μιτοχονδριακά γονίδια που εδράζονται στον πυρήνα, ως απάντηση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Η υπερέκφραση της mtDNMT1 έχει ως αποτέλεσμα εξειδικευμένες επιδράσεις στη μιτοχονδριακή μεταγραφή: το γονίδιο *ND6* (το μόνο γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη στον κλώνο L) να καταστέλλεται, ενώ στον κλώνο H το γονίδιο *ND1* ενεργοποιείται σημαντικά (Shock et al., 2011). Εκτός από το mtDNMT1, κανένα άλλο ένζυμο που να εμπλέκεται ειδικά στην μεθυλίωση ή την υδροξυμεθυλίωση του mtDNA δεν έχει βρεθεί. Παρόλα αυτά, πολλά τέτοια ένζυμα έχουν ανιχνευθεί σε μιτοχονδριακά εκχυλίσματα, όπως η DNMT3B και οι πρωτεΐνες TET1 και TET2 (Bellizzi et al., 2013) (Dzitoyeva et al., 2012).

Τέλος, πολυάριθμοι παράγοντες όπως το είδος του κυττάρου (Wong et al., 2013), η κατάσταση της διαφοροποίησης (Bellizzi et al., 2013), η ηλικία (Dzitoyeva et al., 2012), αλλά και διάφορες ασθένειες (Infantino et al., 2011), έχουν συσχετιστεί με τα πρότυπα μεθυλίωσης του mtDNA. Για παράδειγμα, σε ασθενείς με σύνδρομο Down το μέσο επίπεδο μεθυλίωσης του mtDNA βρέθηκε να είναι σχεδόν το μισό σε

σχέση με τα υγιή άτομα. Δεν είναι όμως σαφές εάν η μειωμένη μεθυλίωση του mtDNA είναι το αποτέλεσμα ή το αίτιο της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας.

Η περαιτέρω μελέτη της δυσλειτουργικής μεθυλίωσης του mtDNA μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση των μιτοχονδριακών ασθενειών, καθώς μόνο το 15% αυτών μπορεί να εξηγηθεί με βάση τις αλλαγές στην αλληλουχία του mtDNA. (Dim Mauro and Davidzon , 2005)

## ΜΕΡΟΣ 2

### 2.1 Μονοπάτι σηματοδότησης PI3K-Akt

Το μονοπάτι PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)–Akt (protein kinase B) είναι ένα από τα σημαντικότερα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, το οποίο προάγει την κυτταρική ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και την επιβίωση, καταστέλλοντας παράλληλα τις αποπτωτικές διεργασίες. Στο νευρικό περιβάλλον το μονοπάτι αυτό προωθεί επίσης την επέκταση των νευριτών (δενδριτών και αξόνων) κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος, σε απόκριση σε παράγοντες όπως η νευροτροφίνη BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*). Πέρα από τον ρόλο του στην ανάπτυξη της δομής του εγκεφάλου, το μονοπάτι αυτό ρυθμίζει επίσης και την συναπτική πλαστικότητα, κυρίως στην περιοχή του ιπποκάμπου (Heras-Sandoval et al., 2014). Για τους παραπάνω λόγους η απορρύθμιση της σηματοδότησης PI3K/Akt επηρεάζει σημαντικά την μοίρα των κυττάρων.

Το μονοπάτι IIS [*insulin/IGF1 (insulin-like growth factor 1) signalling*] είναι πολύ συντηρημένο, και ρυθμίζεται από πεπτιδικούς προσδέτες όπως ο IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), ένα πολυ-λειτουργικό πεπτίδιο, δομικά παρόμοιο με την ινσουλίνη, το οποίο είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική εμβρυϊκή ανάπτυξη αλλά και την ενήλικη ζωή (Vardatsikos et al., 2009). Οι βιολογικές επιδράσεις του IGF-1 διαμεσολαβούνται κυρίως από τον διαμεμβρανικό υποδοχέα IGF-1R (IGF-1 receptor), ο οποίος φωσφορυλιώνει διάφορα υποστρώματα ενεργοποιώντας τα μονοπάτια MAPK/ERK και PI3K/AKT (Kooijman, 2006). Ο IGF-1 εικάζεται ότι μπορεί να έχει ένα νευροπροστατευτικό ρόλο στη νόσο PD επειδή οι υποδοχείς του συναντώνται σε σχετικά υψηλά επίπεδα στην περιοχή SNpc του ανθρώπινου εγκεφάλου (De Keyser et al, 1994). Τα επίπεδα του IGF-I μειώνονται κατά 14% κάθε δεκαετία. Αυτή η προοδευτική μείωση θα μπορούσε να είναι εν μέρει υπεύθυνη για την γεροντική και νευροεκφυλιστική αλλοίωση του εγκεφάλου.

#### Το μονοπάτι IIS και η μιτοχονδριακή λειτουργία

Η σηματοδότηση IIS εμπλέκεται άμεσα στη μιτοχονδριακή λειτουργία, καθώς έχει δείχθει ότι υποστηρίζει την λειτουργική ακεραιότητα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω της καταστολής του μονοπατιού FoxO1 (*Forkhead box protein O1*)-HMOX1 (*heme oxygenase (decycling)*). Το μονοπάτι αυτό όταν είναι ενεργό,

διαταράσσει τα σύμπλοκα III και IV της αναπνευστικής αλυσίδας, και μειώνει τον λόγο NAD(+)/NADH και την παραγωγή ATP. Η μείωση των επιπέδων NAD<sup>+</sup> αναστέλλει την ενεργότητα της αποακετυλάσης SIRT1, και κατά συνέπεια της αποακετυλίωσης και ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα PGC-1α (peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α), ο οποίος είναι σημαντικός για την βιογένεση των μιτοχονδρίων (Cheng et al, 2010).

Τα μιτοχόνδρια από την άλλη πλευρά, είναι πηγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Αν και τα υψηλά επίπεδα H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συνδέονται με το οξειδωτικό στρες, τα χαμηλότερα επίπεδα εμπλέκονται στη ρύθμιση των μονοπατιών της οξειδοαναγωγικά-ευαίσθητης σηματοδότησης (*redox-sensitive signaling pathways, RSPs*) (Rigoulet et al, 2011). Συγκεκριμένα ρυθμίζουν τη σηματοδότηση της ινσουλίνης, μέσω των οξειδοαναγωγικά-ευαίσθητων καταλοίπων κυστεΐνης στις εμπλεκόμενες φωσφατάσες PPT1B (*protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1*) και PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*). Το μονοπάτι της ινσουλίνης ενεργοποιείται από την φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης στους υποδοχείς της ινσουλίνης και του IGF1, καθώς και των πρωτεϊνών IRS (*insulin receptor substrate*) που μεταβιβάζουν το σήμα στο εσωτερικό του κυττάρου, διατηρείται δε σε ισορροπία μέσω της δράσης εξειδικευμένων φωσφατασών (PTPases, *protein tyrosine phosphatases*). Η ενεργότητα αυτών των φωσφατασών ρυθμίζεται με τη σειρά της από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει το κατάλοιπο κυστεΐνης που απαιτείται για την καταλυτική τους δράση. Η ινσουλίνη μέσω ενός αρχικού οξειδωτικού σήματος που δρα σε αυτό το κατάλοιπο, αδρανοποιεί τις φωσφατάσες, ευνοώντας έτσι την αυτοφωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης των υποδοχέων της ινσουλίνης ενισχύοντας μέσω αυτού του μηχανισμού την αρχική σηματοδότηση (Storozhevnykh et al, 2007). Με άλλα λόγια, η ινσουλίνη επάγει αρχικά την παραγωγή χαμηλών επιπέδων H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, τα οποία είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση του μονοπατιού της (*redox priming*) (Mahadev et al, 2001). Η δυνατότητα ενεργοποίησης του μονοπατιού IRS χωρίς τη συμμετοχή της σύνδεσης προσδέτη-υποδοχέα μέσω του μηχανισμού *redox priming*, υποδηλώνει ότι το ενδογενές H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που παράγεται από τα μιτοχόνδρια μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της βιολογίας του κυττάρου.

Επιπλέον, μετά τη διέγερση από την ινσουλίνη, η ενεργή Akt είναι σε θέση να μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια κυττάρων νευροβλαστώματος, όπου φωσφορυλιώνει την κινάση GSK3β, καθώς και την β υπομονάδα της ATPάσης (Bijur and Jope,

2003), δρώντας έτσι ευεργετικά στην ενεργειακή ικανότητα των μιτοχονδρίων. Το μιτοχονδριακό  $H_2O_2$  φαίνεται ότι εμπλέκεται στη μετατόπιση της κυτταροπλασματικής Akt (φωσφορυλιωμένης στη Ser473) στα μιτοχόνδρια. Όταν μπει στα μιτοχόνδρια, η Akt φωσφορυλιώνεται περαιτέρω στη Thr308, ένα βήμα που απαιτείται για την περαιτέρω παλινδρόμηση της στους πυρήνες και την πρόοδο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Antico Arciuch et al, 2009).

### Το μονοπάτι IIS/AKT και η $\alpha$ -synuclein

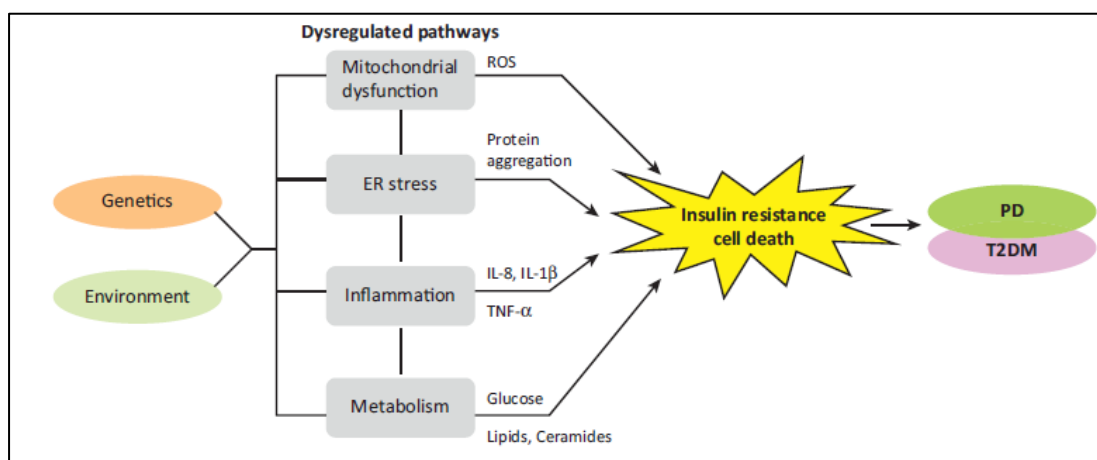
Έχει δειχθεί ότι η  $\alpha$ -synuclein αποτελεί έναν συν-ρυθμιστή της ενεργοποίησης της AKT που προκαλείται από τον IGF-1. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι τόσο η εξάλειψή της, όσο και η αυξημένη έκφραση της  $\alpha$ -synuclein, καθώς και η υπερέκφραση μεταλλαγμένων μορφών της, μειώνουν την ενεργοποίηση της AKT από τον IGF-1. Η φυσιολογική μορφή της  $\alpha$ -synuclein αλληλεπιδρά με την AKT και μπορεί να ενισχύσει τη διαλυτότητα της και την εντόπισή της στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αντίθετα, η μεταλλαγμένη μορφή της  $\alpha$ -synuclein δεν αλληλεπιδρά με την AKT, παρεμποδίζει όμως την αλληλεπίδραση της φυσιολογικής  $\alpha$ -synuclein με την AKT και καταστέλλει την ενεργοποίησή της. Θεωρείται λοιπόν ότι υψηλά επίπεδα της  $\alpha$ -synuclein μπορούν να οδηγούν σε εσφαλμένο εντοπισμό και/ή συσσωμάτωση με την AKT, και κατά συνέπεια στην απενεργοποίηση της τελευταίας. Γι αυτό και η έκφραση της  $\alpha$ -synuclein θα πρέπει να ρυθμίζεται αυστηρά και να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα (Chung et al, 2011).

Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι η νόσος Parkinson, που συνδέεται με την μετάλλαξη της  $\alpha$ -synuclein, μπορεί να οφείλεται και στην απορρύθμιση του καταρράκτη της AKT σηματοδότησης.

## **2.2 Μείωση της απόκρισης στην ινσουλίνη**

Με βάση πρόσφατα ευρήματα, έχει προκύψει μια ενδιαφέρουσα υπόθεση που υποστηρίζει ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η φλεγμονή, και οι διαταραχές στο μεταβολισμό μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση της απόκρισης στην ινσουλίνη και τελικά, σε διαβήτη ή /και νευροεκφυλισμό (Εικόνα 11). Σε μια παλαιότερη μελέτη, η μείωση της απόκρισης στην ινσουλίνη

βρέθηκε να χαρακτηρίζει το 62% των PD ασθενών με άνοια, από τους οποίους το 30% παρουσίαζε έλλειψη ανεκτικότητας στη γλυκόζη (Bosco et al., 2012).



**Εικόνα 11:** Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να προκαλούν τη δυσλειτουργία συνηθισμένων σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία οδηγούν προοδευτικά σε νευροεκφυλισμό και εμφάνιση διαβήτη (Santiago and Potashkin, 2013).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι υποδοχείς της ινσουλίνης είναι άφθονοι στην περιοχή της μέλαινας ουσίας. Είναι επίσης γνωστό ότι ο θάνατος των νευρικών κυττάρων στην περιοχή αυτή μειώνει τα επίπεδά τους (Takahashi et al., 1996). Έτσι, η μειωμένη σηματοδότηση της ινσουλίνης επηρεάζει την πρόσληψη και το μεταβολισμό της γλυκόζης στη μέλαινα ουσία, διαταράσσοντας τη νευρική λειτουργία με αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυττάρου λόγου ATP/ADP, η οποία οδηγεί σε αδρανοποίηση των ATP-εξαρτώμενων διαύλων καλίου ( $K_{ATP}$  channels, *ATP-sensitive potassium channels*). Τα επίπεδα της γλυκόζης και οι μεταβολές στους διαύλους καλίου επηρεάζουν επίσης και την απελευθέρωση της ντοπαμίνης από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Levin, 2000). Είναι ενδιαφέρον ότι, η ινσουλίνη έχει βρεθεί επίσης να συμμετάσχει στον σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων που παρατηρούνται σε μερικούς ασθενείς με PD.

Αξίζει τέλος να σημειωθεί ότι, η μειωμένη ικανότητα των μιτοχονδρίων να οξειδώνουν λιπαρά οξέα συσχετίζεται με την μείωση της απόκρισης στην ινσουλίνη (Kah et al., 2006). Ωστόσο, παραμένει άγνωστο ακόμη εάν η μείωση της απόκρισης στην ινσουλίνη απλά συνδέεται με, είναι συνέπεια, ή αποτελεί την αιτία της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων (Bonnard et al., 2008).

## Μείωση της απόκρισης στον IGF-1

Έχει προταθεί ότι ο IGF-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην νευροεκφύλιση, λόγω της μειωμένης απόκρισης σε αυτόν τον παράγοντα που προκύπτει από φλεγμονή ή τοξικές βλάβες (Trejo et al., 2004), και αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ένα ρόλο για τον IGF-1 στην εμφάνιση της νόσου PD. Η υπερέκφραση του IGF-1 προστατεύει τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες από την τοξικότητα της 6-υδροξυντοπαμίνης (6-OHDA) σε αρουραίους, ενώ σε ασθενείς με PD, τα επίπεδα του IGF-1 είναι υψηλότερα τόσο στον ορό όσο και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF, *cerebrospinal fluid*) σε σύγκριση με υγιή δείγματα ελέγχου (Santiago and Potashkin, 2013). Επιπλέον, η GSK-3b μπορεί επίσης να συμβάλλει στην μείωση της απόκρισης στην ινσουλίνη μέσω επαγωγής της πρωτεασωμικής αποικοδόμησης του IRS1 (Leng et al., 2010). Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι πολυμορφισμοί στο γονίδιο *GSK-3b* έχουν σχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου PD (Kwok et al., 2005), τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η ινσουλίνη, ο IGF-1, η GSK-3b, και η σηματοδότηση AKT παίζουν έναν σύνθετο και διασυνδεδεμένο ρόλο στην εμφάνιση της μείωσης της απόκρισης στην ινσουλίνη και της νόσου PD.

Ο ακριβής μηχανισμός που συνδέει τη ρύθμιση της ινσουλίνης και τον μεταβολισμό της γλυκόζης με τη νευροεκφύλιση παραμένει ασαφής. Ωστόσο, είναι ενδιαφέρον ότι φάρμακα για την ευαισθητοποίηση στην ινσουλίνη είναι νευροπροστατευτικά για την PD καθώς φαίνεται να άρουν τις επιπτώσεις της φλεγμονής και της μειωμένης απόκρισης στην ινσουλίνη. Αντιστρόφως, ορισμένα από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά για ασθενείς με PD, όπως η Levodopa και η Bromocriptine επηρεάζουν και τη ρύθμιση της ινσουλίνης.



## **ΜΕΡΟΣ 3**

### **3.1 Μοντελοποίηση της νόσου του Parkinson**

#### **Κυτταρικά μοντέλα**

Η νόσος Parkinson, όπως προαναφέρθηκε, είναι πολυπαραγοντική και κλινικά ετερογενής. Η αιτιολογία της παραμένει ασαφής και μόνο λίγοι μηχανισμοί του νευροκυτταρικού μονοπατιού έχουν διασαφηνιστεί μέχρι σήμερα. Σε μία λοιπόν τόσο πολύπλοκη παθολογική διαδικασία κρίνεται απαραίτητη η δημιουργία πειραματικών μοντέλων που θα απλοποιήσουν την μελέτη των διαφορετικών δικτύων πρωτεϊνών και γονιδίων που συμμετέχουν σε αυτή. Πράγματι, έχουν αναπτυχθεί πολλά κυτταρικά και ζωικά μοντέλα με σκοπό την διευκρίνιση συγκεκριμένων πτυχών της νευροεκφυλιστικής διαδικασίας, καθώς και τον καλύτερο χαρακτηρισμό της σχετικής σειράς των παθολογικών μηχανισμών, διότι επιτρέπουν την ανάλυση ενός τόσο σύνθετου φαινομένου σε απλούστερα μοριακά γεγονότα (Alberio et al., 2012).

Οι κύριες βιοχημικές οδοί (όπως η απόπτωση, η μιτοχονδριακή βλάβη και η δυσλειτουργική μιτοφαγία, καθώς και το οξειδωτικό στρες, ή το στρες που επάγεται από τις μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και την ελαττωματική απομάκρυνση τους), έχουν διερευνηθεί ευρέως σε κυτταρικές σειρές, οι οποίες είτε έχουν υποστεί γενετική τροποποίηση, είτε έχουν καλλιεργηθεί παρουσία τοξινών που σχετίζονται με την PD (όπως το MPP+ [*1-methyl-4-phenylpyridinium*], το φυσικό ζιζανιοκτόνο ροτενόνη, η 6-OHDA, το DAQ [*Dopamine o-quinone*], αλλά και η ίδια η ντοπαμίνη), καθώς και με συνδυασμό των δύο αυτών προσεγγίσεων. Ο κεντρικός ρόλος της *α-synuclein*, έχει δημιουργήσει επίσης πολλά μοντέλα που στοχεύουν στην αποσαφήνιση της συμβολής της στη δυσλειτουργία διαφόρων κυτταρικών διεργασιών.

Οι μελέτες σε κυτταρικά μοντέλα μπορούν να πραγματοποιηθούν με στοχευμένες (μοριακές, βιοχημικές ή φαρμακολογικές) ή πιο ευρείες (πρωτεωμικές ή μεταγραφωματικές) προσεγγίσεις (Alberio and Fasano, 2011). Οι κυτταρικές σειρές είναι επίσης χρήσιμες για προκαταρκτική μελέτη νέων υποθετικών θεραπευτικών ουσιών και, σε σχέση με τα ζωικά μοντέλα, έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορεί να διαθέτουν ανθρώπινο γενετικό υπόβαθρο. Σε κάθε περίπτωση όμως, δεν παύουν να αποτελούν απλοποιημένα συστήματα, τα οποία δεν μπορούν να αναπαραγάγουν

πλήρως ένα δίκτυο ντοπαμινεργικών νευρώνων ή να αντικατοπτρίσουν ολόκληρη την παθογενετική ροή της νόσου. Συμπερασματικά λοιπόν, τα κλασικά κυτταρικά μοντέλα φαίνεται να είναι η σωστή επιλογή για προκαταρκτικές μελέτες της μοριακής δράσης νέων φαρμάκων ή πιθανών τοξινών, καθώς και για την κατανόηση του ρόλου μεμονωμένων γενετικών παραγόντων και των επιμέρους μοριακών μηχανισμών.

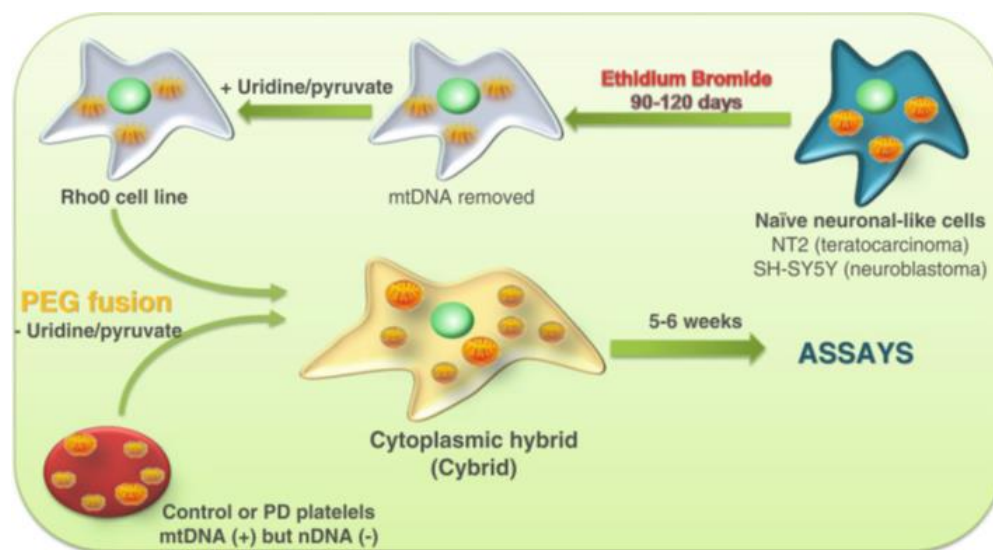
### Κυτταροπλασματικά υβρίδια (Cytoplasmic hybrids- Cybrids)

Τα κυτταροπλασματικά υβρίδια, γνωστά ως cybrids (cytoplasmic hybrids), αποτελούν ένα καινοτόμο κυτταρικό σύστημα το οποίο προσφέρει δυνατότητες για τη στοχευμένη μελέτη της μιτοχονδριακής λειτουργίας και της επίδρασής της σε πλήθος ασθενειών. Είναι μάλιστα ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την νόσο του Parkinson, όπου η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία όπως είδαμε παραπάνω, αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό ή, ενδεχομένως, και πρωταρχικό παράγοντα στην εμφάνιση και εξέλιξη της παθολογίας της νόσου. Οι κυτταρικές αυτές σειρές είναι απαλλαγμένες από ορισμένα προβλήματα που σχετίζονται με γενετικά ζωικά και νευροτοξικά μοντέλα της PD.

Τα cybrids δημιουργούνται ύστερα από σύντηξη δωρηθέντων αιμοπεταλίων (τα οποία περιέχουν μιτοχονδριακό DNA, mtDNA) από ανθρώπους που πάσχουν από Parkinson ή από υγιείς εθελοντές, με κύτταρα που τους έχει «αφαιρεθεί» το mtDNA (κύτταρα ρ<sup>0</sup>). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ευρύτατα η νευροβλαστωματική σειρά SH-SY5Y, καθώς και η κυτταρική σειρά ανθρώπινου τερατοκαρκινώματος NT2. Οι δύο αυτές σειρές χρησιμοποιούνται επειδή διαμολύνονται εύκολα, εκφράζουν νευρωνικά χαρακτηριστικά και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Μετά τη σύντηξη, τα κύτταρα-δέκτες που αποκτούν τα μιτοχόνδρια των αιμοπεταλίων επιλέγονται σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο διαλογής. Έπειτα από αρκετούς κύκλους επαναλήψεων της διαλογής, καταλήγουμε στην παραγωγή υβριδικών κυτταρικών κλώνων που χαρακτηρίζονται από ένα κοινό γενετικό και περιβαλλοντικό υποβάθρου και διαφέρουν μεταξύ τους μόνο στην πηγή των μιτοχονδριακών τους γονιδίων (**Εικόνα 12**) (Swerdlow, et al., 1996, Ghosh, et al., 1999).

Η λογική αυτού του μοντέλου είναι ότι οι διαφορές μεταξύ των κυτταρικών σειρών που δημιουργούνται από μεμονωμένα άτομα και ασθενείς με βάση τον

κλινικό τους φαινότυπο (π.χ. PD) προέρχονται από το mtDNA του δότη το οποίο εκφράζεται στο ίδιο πυρηνικό υπόβαθρο. Έτσι, οι σειρές cybrids μπορούν να αναδείξουν λειτουργικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων χωρίς ωστόσο να καθορίζουν ποιες είναι αυτές οι διαφορές. Τα συστήματα αυτά αντιπροσωπεύουν επίσης ένα νέο βήμα προς την εξατομικευμένη ιατρική, με στόχο τη δοκιμή κάθε φάρμακου σε ένα μοντέλο με το μιτοχονδριακό γενετικό υπόβαθρο του ασθενούς. Επειδή τα παρκινσονιακά μοντέλα cybrids μπορούν να δημιουργηθούν από ασθενείς σε όλα τα στάδια της νόσου, παρέχουν επίσης ένα παράθυρο στα πρώιμα στάδια της παθογένεσης αλλά και της εξέλιξης της PD που δεν είναι εύκολα εφικτό από τα παθολογικά δείγματα (Trimmer PA and Bennett JP Jr, 2009).

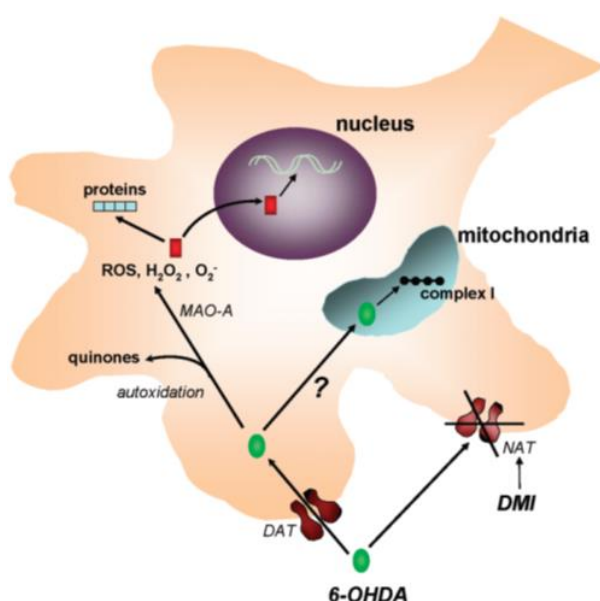


**Εικόνα 12: Δημιουργία υβριδικών κυτταρικών σειρών (cybrids).** Τα κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο εξαλείφει αποτελεσματικά το λειτουργικό mtDNA με αποτέλεσμα την δημιουργία μιας κυτταρικής σειράς Rho0 ( $\rho^0$ ). Εν συνεχεία τα κύτταρα  $\rho^0$  συντήκονται με αιμοπετάλια ασθενών, τα οποία περιέχουν μιτοχόνδρια αλλά όχι πυρήνες. Αυτό δημιουργεί υβριδικά κύτταρα τα οποία μπορούν να απομονωθούν και να αναπτυχθούν κανονικά. Οι διαφορές στη λειτουργία μεταξύ των κυτταρικών σειρών θεωρείται ότι προκύπτουν από διαφορές στο mtDNA τους. (Arduíno et al., 2015)

### 3.2 6-OHDA

Από την πρώτη περιγραφή της το 1959, η νευροτοξίνη 6-OHDA, έχει διαδραματίσει θεμελιώδη ρόλο στην προκλινική έρευνα για τη νόσο του Parkinson. Η 6-OHDA είναι ένα δομικό ανάλογο των κατεχολαμινών ντοπαμίνη και νοραδρεναλίνη, και ασκεί τις τοξικές της επιδράσεις στους κατεχολαμινεργικούς νευρώνες. Χρησιμοποιείται για την δημιουργία πειραματικών μοντέλων της νόσου τόσο *in vitro* (μέσω της επώασης των κυττάρων παρουσία της) όσο και *in vivo* (κυρίως μέσω της συστηματικής έγχυσής της σε περιοχές του εγκεφάλου).

Η ενδοκυτταρική συσσώρευση της 6-OHDA διαμεσολαβείται από τους μεμβρανικούς μεταφορείς ντοπαμίνης ή νοραδρεναλίνης (DAT {*Dopamine Transporter*} και NAT {*Noradrenaline Transporter*} αντίστοιχα), οι οποίοι αναγνωρίζουν και προσλαμβάνουν την 6-OHDA, λόγω της δομικής ομοιότητάς της με τις ενδογενείς κατεχολαμίνες. Η τοξίνη αυτή φαίνεται ότι δρα κυρίως δημιουργώντας οξειδωτικό στρες καθώς όταν εγχύεται στον εγκέφαλο, είτε οξειδώνεται από την μονοαμινοξειδάση (MAO-A), είτε υφίσταται ισχυρή αυτο-οξείδωση παράγοντας κυτταροτοξικό  $H_2O_2$ , ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) και κινόνες κατεχολαμινικών που προσβάλλουν πυρηνόφιλες ομάδες στο εσωτερικό των κυττάρων (Simola et al., 2007)). Αυξήσεις στα επίπεδα των ουσιών αυτών οδηγούν στην ταχεία εξάντληση των ενδοκυτταρικών αντιοξειδωτικών ενζύμων, προκαλώντας ανωμαλίες στη δομή και το μεταβολισμό των κυττάρων, οδηγώντας τελικά σε βλάβη



Εικόνα 13: Μηχανισμοί της επαγόμενης από 6-OHDA κυτταροτοξικότητας. (Simola et al., 2007)

του νευρικού κυττάρου (Blum et al, 2001) (Εικόνα 13).

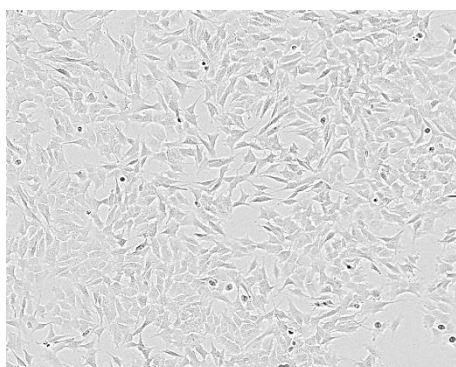
Εκτός από την επιδείνωση του ενδοκυτταρικού οξειδωτικού στρες, η 6-OHDA ενδέχεται να προκαλεί νευροτοξικότητα μεταβάλλοντας και τη μιτοχονδριακή λειτουργία, αφού έχει αναφερθεί ότι μειώνει τη δραστηριότητα του συμπλόκου I σε απομονωμένα μιτοχόνδρια εγκεφάλου (Glinka and Youdim, 1995). Είναι ενδιαφέρον ότι στα νευροβλαστω-

ματικά κύτταρα SH-SY5Y, η τοξική δράση της 6-OHDA δεν συνοδεύεται από μείωση της παραγωγής ATP, του λόγου ATP/ADP ή του κυτταρικού περιεχομένου NAD<sup>+</sup> (Storch et al, 2000), γεγονός που δείχνει ότι η αναστολή της μιτοχονδριακής αναπνοής δεν είναι ο κύριος μηχανισμός 6-OHDA τοξικότητας. Ωστόσο, η 6-OHDA μπορεί να επάγει μια ROS-σχετιζόμενη κατάρρευση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και είναι ένας ισχυρός αποσυζεύκτης της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (**Εικόνα 13**).

Τα παραπάνω δεδομένα εμπλέκουν τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία στην τοξικότητα της 6-OHDA, αν και πρέπει να διευκρινιστούν περαιτέρω. Αυτές οι αλλαγές θα μπορούσαν να οδηγήσουν όχι μόνο σε μεταβολές του δυναμικού της μεμβράνης, αλλά επίσης, *in vivo*, σε ελαττωματική αποθήκευση της ντοπαμίνης σε κυστίδια, η οποία μπορεί να αυξήσει τα κυτταροπλασματικά επίπεδα αυτού του νευροδιαβιβαστή, οδηγώντας έτσι σε κυτταρικό θάνατο (Uhl, 1998).

### **3.3 SH-SY5Y μια νευρική κυτταρική σειρά μοντέλο για τη νόσο PD**

Η νευρική κυτταρική σειρά SH-SY5Y είναι ένας υποκλώνος της σειράς SK-N-SH που είχε αρχικά απομονωθεί από βιοψία μυελού των οστών ενός ασθενούς με νευροβλάστωμα συμπαθο-αδρενεργικής προέλευσης στις αρχές της δεκαετίας 1970 (Biedler et al., 1973). Αυτή η κυτταρική σειρά έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως πρότυπο νευρώνων από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 καθώς τα κύτταρα αυτά έχουν πολλές βιοχημικές και λειτουργικές ιδιότητες των νευρικών κυττάρων. Είναι ετερογενής και αποτελείται από δύο κυρίως τύπους κυττάρων, τα κύτταρα τύπου N (N type), τα οποία έχουν χαρακτηριστικά νευρικών κυττάρων ή νευροβλαστών, και τα κύτταρα τύπου S (S type), με χαρακτηριστικά παρόμοια με τα κύτταρα Schwann (Xie et al., 2010).



**Εικόνα 14: Κύτταρα SH-SY5Y σε καλλιέργεια.**

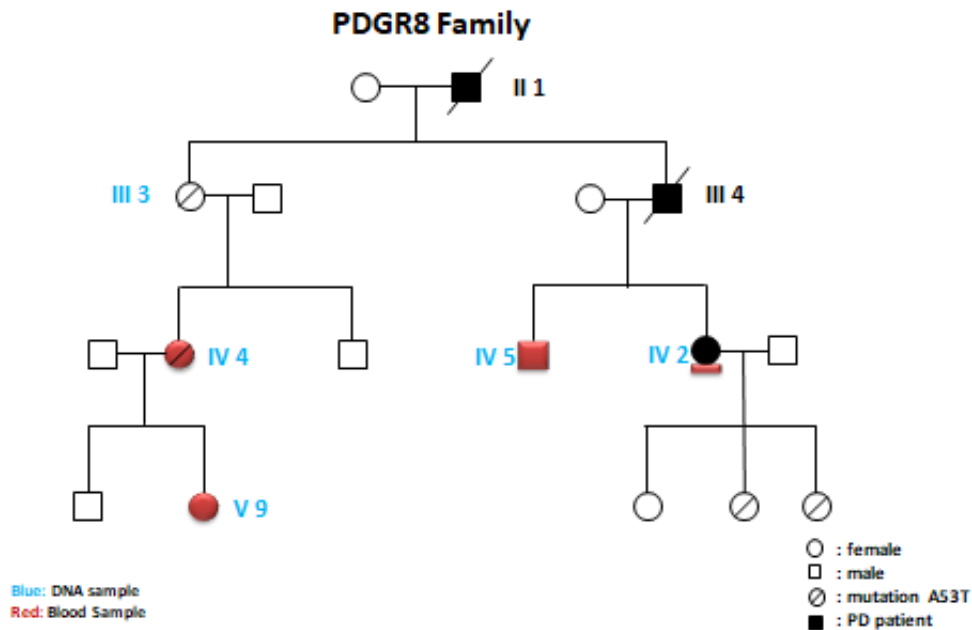
Αποτελούν ένα από τα πιο δημοφιλή μοντέλα για τη μελέτη της νόσου του Parkinson καθώς κατέχουν πολλά χαρακτηριστικά των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Έχουν την ικανότητα να συνθέτουν ντοπαμίνη (DA) και νοραδρεναλίνη (NA), επειδή εκφράζουν τα ένζυμα υδροξυλάση της τυροσίνης (*tyrosine*

*hydroxylase*, TH) το οποίο μετατρέπει την τυροσίνη σε L-dopa που είναι πρόδρομο μόριο της ντοπαμίνης, καθώς και ντοπαμινική-β-υδροξυλάση (*dopamine-β-hydroxylase*, DBH) που την μετατρέπει σε NA (Oyarce and Fleming, 1991). Επιπλέον, εκφράζουν τον μεταφορέα της ντοπαμίνης DAT, μια πρωτεΐνη που εκφράζεται μόνο στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες εντός του κεντρικού νευρικού συστήματος και ρυθμίζει την ομοιόσταση της DA (Takahashi et al, 1994). Τέλος, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ένα πιο έκδηλο ντοπαμινεργικό νευρικό φαινότυπο παρουσία συγκεκριμένων παραγόντων, προσομοιάζοντας με πρωτογενείς μεσεγκεφαλικούς νευρώνες. Επιπλέον, τα κύτταρα SH-SY5Y μπορούν να πολλαπλασιάζονται σε καλλιέργεια για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να μολύνονται, μια προϋπόθεση για την ανάπτυξη ενός *in vitro* μοντέλου κυττάρων.

### **3.4 Το μοντέλο μας**

Για τα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε το κυτταρικό μοντέλο των κυτταροπλασματικών υβριδίων (*cybrids*). Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία των κυττάρων ρ<sup>0</sup> ήταν SH-SY5Y. Τα *cybrids* δημιουργήθηκαν από την σύντηξη των κυττάρων αυτών με απομονωμένα αιμοπετάλια δοτών με κληρονομική μορφή της νόσου του Parkinson, καθώς και από υγιείς συγγενείς τους. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ατόμων από το γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας που απεικονίζεται στην παρακάτω εικόνα (Papapetropoulos et al., 2001) (**Εικόνα 15**). Τα δείγματα αίματος αφορούν τα άτομα:

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



**Εικόνα 15:** Γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας PDGR8 (Papapetropoulos et al., 2001).

Η μετάλλαξη A53T, είναι αποτέλεσμα της σημειακής αντικατάστασης G209A σε επίπεδο DNA αλληλουχίας, η οποία οδηγεί στην αντικατάσταση του αμινοξέος Αλανίνη (Ala) σε Θρεονίνη (Thr). Η σημειακή αυτή μετάλλαξη που όπως προαναφέρθηκε σχετίζεται με την εμφάνιση της νόσου του Parkinson, εντοπίστηκε αρχικά σε οικογένειες ελληνικής και ιταλικής καταγωγής με τυπική οικογενή μορφή που συνοδεύεται από εμφάνιση σωματίων του Lewy και κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο (Polymeropoulos et al., 1997).

## **2. ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν να ελεγχθεί η συμβολή των μιτοχονδρίων στην εμφάνιση χαρακτηριστικών της νόσου του Parkinson. Για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε η επίδραση μιτοχονδρίων διαφορετικής προέλευσης στον φαινότυπο κυττάρων με το ίδιο πυρηνικό υπόβαθρο. Τα μιτοχόνδρια αυτά προήλθαν από άτομα ενός γενεαλογικού δέντρου με κληρονομική μορφή της νόσου PD. Στις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν χορηγήθηκε η τοξίνη 6-OHDA ως ένας επιπλέον παράγοντας στρες που θα βοηθούσε στην αποκάλυψη φαινοτύπων που σχετίζονται με την επίδραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος των ατόμων-δοτών των μιτοχονδρίων στην κυτταρική λειτουργία. Τέλος στοχεύσαμε στην συσχέτιση των φαινοτύπων αυτών με συγκεκριμένες γενετικές και πιθανές επιγενετικές διαφορές των διαφορετικών μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων.



## **3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3.1 ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1.1 Καλλιέργεια κυττάρων**

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

Οι κυτταρικές σειρές των cybrids καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο RPMI με 15% fetal bovine serum (FBS) και 1% αντιβιοτικό (Antibiotic/Antimycotic) και αναπτύσσονται σε ειδικούς επωαστήρες με σταθερές συνθήκες 37°C και 5% περιεκτικότητα σε CO<sub>2</sub>. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία καλλιέργειας με επίστρωση που ευνοεί την προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα.

Απαραίτητη προϋπόθεση πριν τη χρήση του ορού (FBS) είναι η θέρμανση του στους 56°C για 30 min με σκοπό την αδρανοποίηση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος του ορού, προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν ανοσολογικές αποκρίσεις

#### **Ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split)**

Για να διατηρηθεί η κυτταροκαλλιέργεια, όταν τα κύτταρα καλύψουν το 80-90% της επιφάνειας του τρυβλίου, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια (ή passage) σε νέο τρυβλίο με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης. Η θρυψίνη είναι μια πρωτεάση η οποία προκαλεί διάσπαση των αμινοξικών δεσμών μεταξύ των κυττάρων και την αποκόλλησή τους από την επιφάνεια του τρυβλίου. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από το τρυβλίο.
- Πλύση με PBS για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα θρεπτικού μέσου (ο εμβρυϊκός ορός απενεργοποιεί τη θρυψίνη).
- Αφαίρεση του PBS και προσθήκη 800μl θρυψίνης (για το πιάτο διαμέτρου 100mm).
- Επώαση στους 37°C για 3-5 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από τον πυθμένα του τρυβλίου.

- Προσθήκη νέου θρεπτικού μέσου και ανάδευση των κυττάρων υπό πίεση με πιπέτα μιας χρήσεως προκειμένου να γίνουν μονήρη.
- Μέτρηση κυττάρων σε πλάκα Neubauer.
- Μεταφορά του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε νέο τρυβλίο με θρεπτικό υλικό.
- Επώαση των κυττάρων στους 37°C. Στις επόμενες 4 με 5 ώρες τα κύτταρα προσκολλώνται ξανά στο υπόστρωμα του τρυβλίου.

### Αποθήκευση των κυτταρικών σειρών

Τα κύτταρα μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε βαθιά κατάψυξη (-196 °C) με την παρακάτω διαδικασία:

- Θρυψινοποίηση των κυττάρων του τρυβλίου, όπως και στη διαδικασία του split.
- Φυγοκέντρηση του κυτταρικού εναιωρήματος σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 λεπτά, στα 1500 rpm.
- Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου (υπερκείμενο) και επαναδιάλυση σε 900μl νέου μέσου (900μl κυτταρικού εναιωρήματος αντιστοιχούν σε ένα κρυοφιαλίδιο)
- Προσθήκη 900μl διαλύματος κατάψυξης (freezing mix) που περιέχει: 50% FBS, 20% DMSO, 30% θρεπτικό μέσο
- Μεταφορά του συνολικού όγκου, 1,8ml αυτού του διαλύματος που περιέχει τα κύτταρα, σε ένα κρυοφιαλίδιο κατάψυξης
- Άμεση μεταφορά του κρυοφιαλιδίου σε δοχείο ισοπροπανόλης (για αργό και σταδιακό πάγωμα) στους -80 °C.
- Μετά από 12-24 h, το κρυοφιαλίδιο μεταφέρεται και φυλάσσεται στο υγρό άζωτο (-196 °C)

### Απόψυξη των κυττάρων

Η απόψυξη των κυττάρων περιλαμβάνει:

- Άμεση μεταφορά του κρυοφιαλιδίου από το υγρό άζωτο στους 37 °C.
- Μεταφορά των κυττάρων σε πιάτο με θρεπτικό μέσο.
- Αλλαγή θρεπτικού μέσου μόλις τα κύτταρα κολλήσουν στο τρυβλίο.

### 3.1.2 Παρασκευή της τοξίνης 6-OHDA

Η προετοιμασία της τοξίνης 6-OHDA (Sigma, H116-5MG) για να εισαχθεί στην καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται στο δωμάτιο κυτταροκαλλιεργειών και ακολουθεί τα ίδια ασηπτικά πρωτόκολλα.

- Προσθήκη 2ml ασκορβικό οξύ 0.01% στα 5mg της τοξίνης 6-OHDA. Έτσι προκύπτει ένα διάλυμα συγκέντρωσης 10 mM τοξίνης.
  - Το δείγμα χωρίζεται σε 40 aliquot (φιαλίδια καλυμμένα με αλουμινοχαρτο), 50μl/φιαλίδιο και φυλάσσεται στους -20 °C.
- Οι παραπάνω διαδικασίες γίνονται στο σκοτάδι καθώς η τοξίνη είναι φωτοευαίσθητη.

### 3.1.3 Χρήση του αναπτυξιακού παράγοντα IGF-1

Της προσθήκης του IGF-1 προηγείται η προετοιμασία του κατεψυγμένου aliquot του και η προετοιμασία των κυττάρων. Η διαδικασία έχει ως εξής:

#### Προετοιμασία IGF-1

- Παραλαβή του aliquot των 2 μl που βρίσκεται στους -80°C και ένα γρήγορο spin αυτού.
- Αραίωση με 18μl θρεπτικού μέσου κυττάρων (RPMI χωρίς ορό) και η συγκέντρωση γίνεται 50μg/ml.
- Γίνεται αραίωση ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση.

#### Προετοιμασία κυττάρων

- Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από το πιάτο καλλιέργειας.
- Πλύση με PBS 2 φορές.
- Προσθήκη RPMI χωρίς ορό. Αφήνουμε τα κύτταρα σε αυτό το θρεπτικό για 24 ώρες.
- Αφαίρεση του θρεπτικού και προσθήκη νέου θρεπτικού RPMI+ IGF-1 20 ng/μl.
- Επώαση για 30 λεπτά παρουσία του παράγοντα και απομόνωση πρωτεϊνών.

### 3.1.4 Απομόνωση πρωτεϊνών από κύτταρα

Η απομόνωση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος RIPA. Το RIPA επιτρέπει την αποτελεσματική λύση των κυττάρων και τη

διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών, αποφεύγοντας την αποικοδόμηση τους και την παρεμβολή της ανοσοδραστικότητας και βιολογικής δραστηριότητάς τους.

Σύσταση RIPA buffer (10x):

- 50mM Tris pH 7-8
- 150 mM NaCl
- 0.1% SDS
- 0.5% sodium deoxycholate
- 1% Triton X 100 or NP-40

Παρασκευάζεται διάλυμα λύσης (Lysis buffer) με 1% διάλυμα RIPA και 1% αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitors) αραιωμένα σε νερό.

Η διαδικασία συνίσταται από τα ακόλουθα βήματα:

- Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με PBS.
- Προσθήκη διαλύματος λύσης και επώαση για 5 λεπτά πάνω στον πάγο (για ένα 10 cm dish χρησιμοποιούνται 150 μl του διαλύματος, ενώ για ένα 60 mm dish χρησιμοποιούνται 75 μl)
- Τα κύτταρα συλλέγονται με ειδική σπάτουλα και μεταφέρονται σε φιαλίδιο τύπου erpendorf στον πάγο.
- Ακολουθεί λύση των κυτταρικών μεμβρανών και θραύση των νουκλεϊνικών οξέων με την εφαρμογή υπερύχων (sonication) με ένταση 30%, 4sec, με εναλλάξ 0.5 sec θραύση και 0.5 sec παγόλουτρο.
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14,000g στους 4°C.
- Συλλογή υπερκείμενου για χρήση και αποθήκευση στους -80°C.

### Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο BRADFORD

Ο ποσοτικός προσδιορισμός 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 595 nm.

Πρωτόκολλο αντίδρασης:

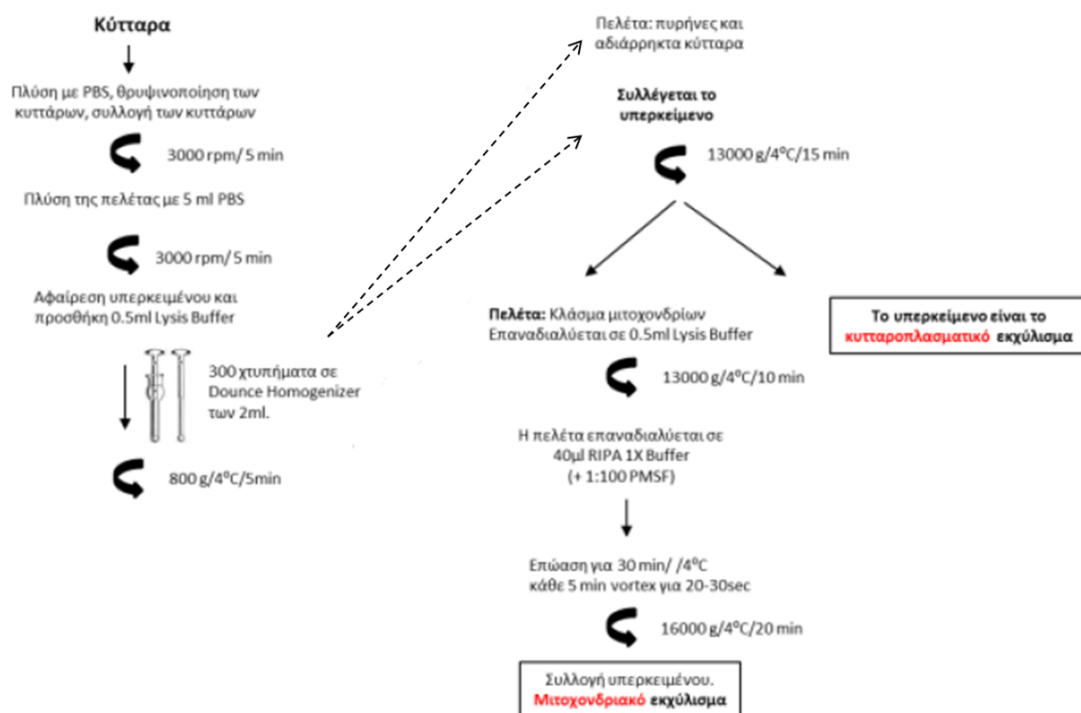
- Δημιουργία πρότυπης καμπύλης απορρόφησης στα 595 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης του προτύπου διαλύματος BSA (1mg/ml) σε 1 ml διαλύματος Bradford αραιωμένο 1:5 (0-25 µg πρωτεΐνης). Έπειτα από 5 λεπτά παραμονής τα δείγματα φωτομετρούνται.
- Ποσότητα 2µl δείγματος αραιώνεται σε 1ml αραιωμένου Bradford 1:5, παραμένει για 5 λεπτά και φωτομετρείται στα 595 nm.

### 3.1.5 Διαχωρισμός μιτοχονδριακών - κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων (Subcellular fractionation protocol)

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

- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο καλλιέργειας και πλύση με διάλυμα PBS.
- Αφαίρεση του PBS και προσθήκη 800µl θρυψίνης (για πιάτο διαμέτρου 100mm), επώαση στους 37°C για 3 λεπτά για την αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα του τρυβλίου.
- Πλύση της πελέτας κυττάρων με 5ml PBS και επανάληψη της φυγοκέντρωσης.
- Η πελέτα επαναδιαλύεται σε 0.5ml διαλύματος λύσης.  
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.
- Φυγοκέντρωση στις 800 g/4°C/5 λεπτά. Στο στάδιο αυτό καθιζάνουν οι πυρήνες και τα αδιάρρηκτα κύτταρα.
- Συλλέγεται το υπερκείμενο και φυγοκεντρείται στις 13.000 g /4°C /15 λεπτά. Το υπερκείμενο αποτελεί το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα και η πελέτα αποτελεί το εκχύλισμα στο οποίο εντοπίζονται τα μιτοχόνδρια.
- Η πελέτα επαναδιαλύεται άμεσα σε 0.4ml Lysis Buffer και φυγοκεντρείται στις 13.000 g /4°C /15 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση.
- Η πελέτα επαναδιαλύεται σε 40µl RIPA Buffer (που περιλαμβάνει 1:100 PMSF) και ακολουθεί επώαση για 30λεπτά στον πάγο (vortexing για 20-30 sec κάθε 5min).

- Φυγοκέντρηση στις 16.000 g /4°C /20 λεπτά.
- Συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο αποτελεί το κλάσμα των μιτοχονδρίων (σχηματική απεικόνιση, Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση του διαχωρισμού κυτταροπλασματικών-μιτοχονδριακών εκχυλισμάτων που ακολουθήθηκε.

### 3.1.6 Ανοσοαποτύπωση κατά WESTERN

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 ενζυματικών μεθόδων. Η μέθοδος αυτή αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια:

- Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS – πολυακρυλαμιδίου.
- Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.
- Επώαση της μεμβράνης με αντισώματα.
- Ανίχνευση των πρωτεϊνών.

## Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS-PAGE και ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Οι πρωτεΐνες απομονώνονται και αποδιατάσσονται με θέρμανση στους 95°C για 5 λεπτά, με τη χρήση αποδιατακτικών αναγωγικών παραγόντων (SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη) που περιέχονται στο Laemmli buffer. Η β-μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και το SDS καταστρέφει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και δεσμεύεται στις πρωτεΐνες προσδίδοντάς τους μεγάλο αρνητικό φορτίο. Υπό αυτές τις συνθήκες καταστρέφεται η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να έχουν όμοιες αναλογίες φορτίου/μεγέθους.

Για την κατάλληλη ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών απαιτείται πήγμα πολυακρυλαμίδης (PAGE) το οποίο αποτελείται από 2 διακριτά μέρη:

- **Stacking gel** 5%: Σκοπός του είναι να στοιβάξει τις πρωτεΐνες έτσι ώστε να ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση από το ίδιο σημείο.
- **Separation gel** 10 έως 15% (ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών που θα ανιχνευθούν): Σκοπός του είναι να διαχωρίσει τις πρωτεΐνες.

Τα συστατικά και οι αναλογίες για κάθε τύπο πηκτής φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 1:** Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμίδιου για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE.

Πηκτή διαχωρισμού (separating)	8%	10%	12%	15%	Πηκτή επιστοίβαξης (stacking) 5%
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
Τελικός όγκος	10ml	10ml	10ml	10ml	4ml

Πρωτόκολλο ηλεκτροφόρησης:

- Στήνεται κατάλληλα η συσκευή σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή (Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell, BIORAD) και τοποθετείται στην ειδική δεξαμενή.
- Η δεξαμενή γεμίζεται με 1L SDS-PAGE ρυθμιστικό διάλυμα, προσέχοντας η στάθμη του να βρίσκεται 1-2cm πάνω από την επιφάνεια των πηκτών.
- Ανάμειξη πρωτεϊνών με διάλυμα Laemmli το οποίο περιέχει 4.2% β-μερκαπτοαιθανόλη
- Θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C για 5 λεπτά και φόρτωσή τους στην πηκτή.
- Φορτώνεται επίσης και μίγμα με πρότυπες πρωτεΐνες για SDS-PAGE, έτσι ώστε να μπορεί να υπολογιστεί το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θα διαχωριστούν.
- Η δεξαμενή καλύπτεται και η διάταξη λειτουργεί στα 110 Volt μέχρι η ζώνη της χρωστικής να περάσει στο stacking gel και συνεχίζει στα 150 Volt μέχρι το τέλος.

Κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται δείκτης μοριακών βαρών, καθώς οι ζώνες του δείκτη είναι χρωματισμένες, είναι εύκολο να ελεγχθεί η πορεία της ηλεκτροφόρησης.

### Πρωτόκολλο ηλεκτρομεταφοράς

Μόλις η χρωστική φτάσει στο κάτω μέρος της πηκτής σταματά η ηλεκτροφόρηση, παραλαμβάνεται η πηκτή και αρχίζει η διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς 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.

Ακολουθείται η υγρή ηλεκτρομεταφορά:

- Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κόβεται στο μέγεθος της πηκτής διαχωρισμού και διαβρέχεται με υπερκάθαρο (nanopure) νερό.
- 2 ειδικά «σφουγγαράκια» και 4 κομμάτια διηθητικού χαρτιού Whatman διαβρέχονται με το διάλυμα υγρής μεταφοράς.



- τοποθέτηση στην συσκευή υγρής μεταφοράς από κάτω προς τα πάνω των εξής: 1 «σφουγγαράκι», 2 χαρτιά Whatman, η πηκτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, άλλα 2 χαρτιά Whatman και τέλος 1 ακόμη «σφουγγαράκι».
- Η συσκευή συναρμολογείται και μεταφέρεται στη δεξαμενή όπου πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών η οποία γεμίζει με 1L υγρό μεταφοράς.
- Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία (8 °C). Ανάλογα με το μέγεθος των υπό αντίχνευση πρωτεϊνών, η μεταφορά γίνεται στα 200mA για 1 ½ έως 4 ½ ώρες.

### Επώαση της μεμβράνης με ειδικά αντισώματα και αντίχνευση των πρωτεϊνών

Χρησιμοποιούνται 2 αντισώματα για την αντίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Το πρωτογενές αντίσωμα είναι ειδικό για την υπό έλεγχο πρωτεΐνη. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (horseradish peroxide). Στη συνέχεια, με την αξιοποίηση μίας τεχνικής χημειοφωταύγειας (ECL), το HRP αντιδρά με το παρεχόμενο υπόστρωμα και παράγει φως. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εντοπιστούν ακόμα και πολύ μικρές ποσότητες πρωτεΐνης. Χρησιμοποιούνται φωτογραφικά φιλμ, τα οποία “καίγονται” από το παραγόμενο φως και απεικονίζεται σε αυτά η ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη επώαζεται με διάλυμα γάλακτος για 1ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (blocking). Η καζεΐνη του γάλακτος μπλοκάρει όλες τις μη ειδικές θέσεις δέσμευσης των αντισωμάτων, αφήνοντας εκτεθειμένες μόνο τις θέσεις στις οποίες βρίσκονται οι πρωτεΐνες.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης των 5 λεπτών με διάλυμα TBS-T (TBS buffer/Tween 20).
- Επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα ολονύκτια στους 4°C ή για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Το πρωτογενές αντίσωμα επαναιωρείται σε διάλυμα TBS-T+Gelatin 2% ή TBS-T +BSA .
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα TBS-T.

- Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα επαναιωρείται σε διάλυμα αποκλεισμού.

- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα TBS-T.

- Ακολουθεί ανίχνευση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

Αξιοποιείται το kit Clarity Western ECL Substrate της εταιρείας Biorad. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη επώαση της μεμβράνης με 800μL από το διάλυμα εμφάνισης του kit σε συνθήκες σκότους για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, η μεμβράνη τοποθετείται στην κασέτα εμφάνισης.

- Μετάβαση σε σκοτεινό θάλαμο.

- Τοποθέτηση φωτογραφικού φιλμ πάνω στη μεμβράνη για 0,5-45 λεπτά.

- Επώαση του φιλμ για 1-3 λεπτά σε εμφανιστικό υγρό (developer).

- Πλύση του φιλμ σε νερό για 30 δευτερόλεπτα με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του developer.

- Επώαση του φιλμ για 1-2 λεπτά σε υγρό σταθεροποίησης σήματος (fixer).

- Πλύση του φιλμ με νερό.

Μετά το πέρας της διαδικασίας, η μεμβράνη φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Μετά το πέρας της διαδικασίας τα φιλμ σκανάρονται και γίνεται επεξεργασία των πρωτεϊνικών ζωνών.

### 3.1.7 Απομόνωση γενωμικού DNA από SH-SY5Y κύτταρα

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

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

- Αφαίρεση του PBS και προσθήκη 800μl θρυψίνης (για πιάτο διαμέτρου 100mm), επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}$ / 3 λεπτά για την αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα του τρυβλίου.

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

- Η πελέτα επαναδιαλύεται σε 300-500μL διαλύματος λύσης. Διάλυμα λύσης: 10mM Tris pH 7.5, 100mM EDTA pH 8, SDS 0,5%, RNaseA 200μg/ml.

- Επώαση για 30 λεπτά/  $37^{\circ}\text{C}$ .

- Στο υπερκείμενο γίνεται πέψη με την προσθήκη 15μl Proteinase K (stock 15mg/ml) και επώαση για 1 ώρα/ 55°C.
- Ακολουθεί καθαρισμός με τους οργανικούς διαλύτες φαινόλη και χλωροφόρμιο για την απομάκρυνση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών.

#### 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:

- Αρχικά γίνεται προσθήκη ίσου όγκου με το ομογενοποίηση 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.
- Φυγοκέντρηση στον μέγιστο των στροφών για 3 λεπτά.
- Αφαίρεση της υδατικής φάσης. Προσθήκη σε αυτή ίση ποσότητα χλωροφορμίου και ανάμιξη 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.
- Φυγοκέντρηση στο μέγιστο των στροφών για 2 λεπτά.
- Απομάκρυνση της πάνω φάσης και προσθήκη 1/10 του όγκου CH<sub>3</sub>COONa και δύο όγκοι του συνολικού απόλυτη αιθανόλη. Ακολουθεί ήπια ανάδευση.
- Μεταφορά του δείγματος στους -80°C/ 1ώρα ή εναλλακτικά -20°C/ ολονύκτια.
- Φυγοκέντρηση στο μέγιστο των στροφών για 10 λεπτά.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη ίσου όγκου αιθανόλης 70%.
- Φυγοκέντρηση στο μέγιστο των στροφών για 3λεπτά.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου και επανάληψη της φυγοκέντρωσης για μερικά sec. Με τη βοήθεια ενός tip απομακρύνεται η εναπομείνασα αιθανόλη.
- Στέγνωμα ιζήματος στον πάγκο για 7min.
- Διαλυτοποίηση σε κατάλληλο όγκο TE (10mM Tris-Cl pH 8.0, 1mM EDTA).

### 3.1.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- PCR

Η αντίδραση PCR είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την ενίσχυση μίας αλληλουχίας DNA μέσω ενζυμικής αντίδρασης *in vitro*.

Η PCR βασίζεται στη λειτουργία του θερμικού κυκλοποιητή. Το μηχάνημα αυτό εκθέτει τα αντιδραστήρια σε διαφορετικές θερμοκρασίες με συνεχή θέρμανση και ψύξη. Αυτό επιτρέπει την πραγματοποίηση διαδοχικών αντιδράσεων που απαιτούν διαφορετικές θερμοκρασίες. Αποτελείται από 3 διακριτά στάδια-αντιδράσεις: στο πρώτο, η δίκλωνη έλικα του DNA αποδιατάσσεται, στο δεύτερο οι εκκινητές προσδένονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μόριο-στόχο και στο τρίτο η DNA πολυμεράση συνθέτει μία καινούρια μονόκλωνη αλυσίδα από κάθε εκκινητή. Κάθε ένα από τα τρία στάδια απαιτεί διαφορετική θερμοκρασία. Στις PCR αξιοποιούνται συνήθως θερμοανθεκτικές πολυμεράσες, οι οποίες πραγματοποιούν τον πολυμερισμό σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες, χωρίς να καταστρέφονται από την θερμοκρασία που απαιτείται για την αποδιάταξη των δύο κλώνων του DNA. Η πιο συνηθισμένη πολυμεράση που χρησιμοποιείται στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμερισμού είναι η Taq.

Η σύνθεση γίνεται με κατεύθυνση 5'→3' και οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες χρησιμεύουν στη συνέχεια ως εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο. Ο αριθμός των αντιγράφων του εν λόγω μορίου αυξάνεται εκθετικά.

Για να πραγματοποιηθεί αυτή η αντίδραση απαιτείται στο μίγμα η παρουσία του DNA εκμαγείου, των εκκινητών, οι οποίοι είναι ειδικοί για την υπό εξέταση αλληλουχία, dNTPs, θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, ιόντα μαγνησίου τα οποία αυξάνουν την αποτελεσματικότητα του ενζύμου καθώς και το ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης.

Απαιτείται επιπλέον η ύπαρξη ενός ζεύγους εκκινητών. Απουσία αυτών, η αντίδραση δε μπορεί να συμβεί, αφού δεν υπάρχει το απαραίτητο προεξέχων 3' άκρο, από το οποίο η πολυμεράση θα ξεκινήσει τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας.

Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών βεβαιώνεται ότι το σετ εκκινητών είναι ειδικό μόνο για την υπό έλεγχο περιοχή του γονιδιώματος και δεν παράγει παραπροϊόντα. Γι αυτό αξιοποιήθηκε η βάση δεδομένων Primer Blast του NCBI. Αν η υπό έλεγχο περιοχή αφορά γονίδιο, οι εκκινητές θα πρέπει να βρίσκονται εντός της

κωδικής περιοχής του γονιδίου και να περιλαμβάνουν ένα ιντρόνιο. Οι εκκινητές sense έχουν την ίδια αλληλουχία με τη νοηματική αλυσίδα και είναι συμπληρωματικοί της αντινοηματικής, ενώ το αντίθετο συμβαίνει για τους εκκινητές antisense. Τα σημεία τήξης των εκκινητών (τα οποία εξαρτώνται από την περιεκτικότητα των εκκινητών σε G/C) θα πρέπει να έχουν όσο το δυνατόν μικρότερη διαφορά γίνεται.

### 3.1.9 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:

Takara LA Taq 0.5μl

10x LA PCR Buffer 5μl

DNTPs Mixture (2.5mM) 8μl

Γενωμικό DNA 50ng μl

εκκινητής sense 0.5 μl (10pmol/αντίδραση)

εκκινητής antisense 0.5μl (10pmol/αντίδραση)

H<sub>2</sub>O ... μl

Τελικός όγκος αντίδρασης: 50μl

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

#### Τμήμα A: Πρόγραμμα

94°/3min

94°/15sec

58°/30sec

72°/10min

#### Τμήμα B: Πρόγραμμα

94°/3min

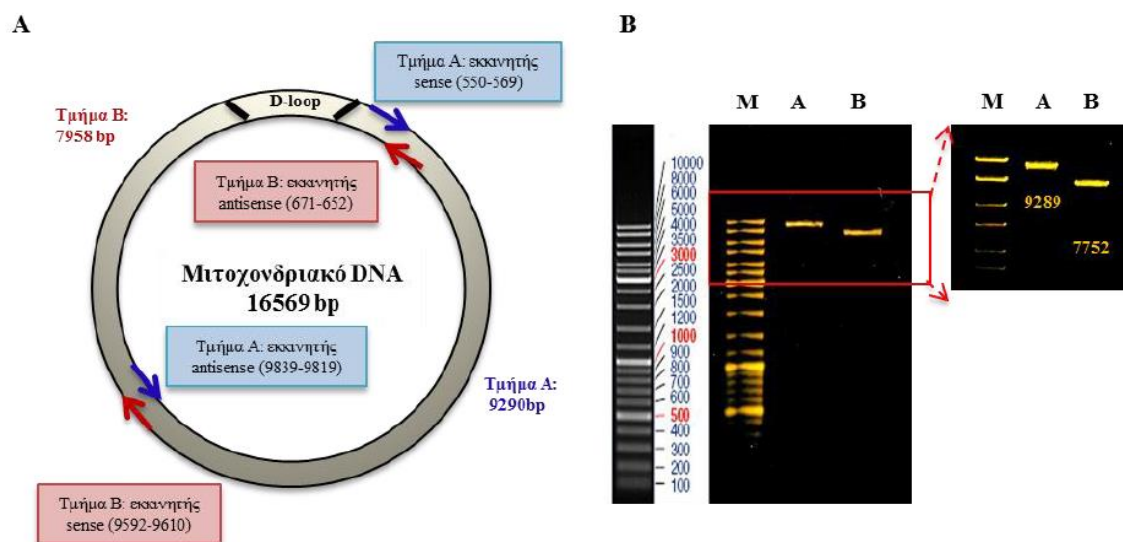
94°/15sec

54°/30sec

68°/10min

72°/10min

Οι εκκινητές για τα τμήματα A και B αναγράφονται στον Πίνακα 4. Τα προϊόντα της PCR ελέγχονται σε πηκτική αгарόζης 1% , στα 50V/ 1½ ώρα. 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.



**Εικόνα 21: Ενίσχυση του συνολικού μιτοχονδριακού DNA.** Α. Η θέση εντοπισμού των εκκινητών για τα τμήματα A και B πάνω στο mtDNA. Β. Αντιπροσωπευτική Εικόνα, των τμημάτων A και B, που ενισχύονται με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης –PCR (Βασιλή, 2016).

### 3.1.10 Έμμεσος ανοσοφθορισμός – Ανοσοκυτταροχημεία

Ο ανοσοφθορισμός είναι μία μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθοριοχρώματα για τον εντοπισμό αντιγόνων ή αντισωμάτων σε κύτταρα (ανοσοκυτταροχημεία, ICC) ή σε ιστούς (ανοσοϊστοχημεία, IHC). Τα φθοριοχρώματα εκπέμπουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος όταν διεγερθούν από ακτινοβολία μεγαλύτερης ενέργειας. Οι χρωστικές αυτές είναι προσδεσμένες στην περιοχή Fc των αντισωμάτων έτσι ώστε να μην επηρεάζουν την ειδικότητά τους. Κάποιες από τις πιο γνωστές φθορίζουσες χρωστικές είναι η ισοθειοκυανική φλουορσκεΐνη (FITC), οι χρωστικές Alexa Fluor, η τετραμεθυλοροδαμίνη (Cy3 και Cy5) κ.α. Στον έμμεσο ανοσοφθορισμό το πρώτο αντίσωμα είναι μη σημασμένο και ειδικό για το αντιγόνο που ανιχνεύεται. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με μία χρωστική και ανιχνεύει το πρώτο αντίσωμα.

Για τη χρώση του πυρήνα χρησιμοποιούνται ειδικές χρωστικές που προσδένουν το DNA όπως το DAPI και το DRAQ5. Αντίθετα από τα φθοριοχρώματα, αυτές οι χρωστικές μπορούν να ανιχνευθούν και με απλό μικροσκόπιο φθορισμού.

### Μονιμοποίηση κυττάρων

Η μονιμοποίηση των κυττάρων γίνεται με τη χρήση παραφορμαλδεΐδης. Η παραφορμαλδεΐδη αποτρέπει την αποσύνθεση των κυττάρων και “παγώνει” τα αντισώματα και τα κυτταρικά οργανίδια στο ίδιο σημείο. Η παραφορμαλδεΐδη σχηματίζει ισχυρούς ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των κυτταρικών πρωτεϊνών και του περιβάλλοντος τους, διατηρώντας τα στο ίδιο σημείο.

Ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

- Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πιάτο 24-well. Πριν την επίστρωση των κυττάρων έχει προηγηθεί επίστρωση γυάλινων αποστειρωμένων καλυπτρίδων διαμέτρου 11mm
- Αφαιρείται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας από τα wells και ακολουθεί μία πλύση με PBS.
- Τα κύτταρα μονιμοποιούνται με τη χρήση 250μL διαλύματος παραφορμαλδεΐδης (PFA) 4% για κάθε well για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με PBS.
- Σε αυτό το στάδιο είναι δυνατόν να διατηρηθούν τα κύτταρα για μερικές μέρες στους 4°C.

### Ανοσοκυτταροχημεία

Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες μεταφέρονται σε κατασκευή που τους παρέχει υγρασία. Χρησιμοποιείται τρυβλίο κυτταροκαλλιέργειών μεγάλης διαμέτρου με 3 χαρτιά Whatman στο μέγεθος του πιάτου, τα οποία διαβρέχονται με νερό και πάνω τους τοποθετείται πλαστική μεμβράνη τύπου parafilm. Τα τρυβλία τυλίγονται με αλουμινόχαρτο, έτσι ώστε στο εσωτερικό του να υπάρχει απόλυτο σκοτάδι (τα φθοριοχρώματα είναι φωτοευαίσθητα). Οι καλυπτρίδες μεταφέρονται πάνω στην μεμβράνη του τρυβλίου με την πλευρά των κυττάρων προς τα πάνω.

Το διάλυμα ανοσοφθορισμού (ICC Buffer) που χρησιμοποιείται συμβάλλει στον αποκλεισμό μη ειδικών θέσεων, καθώς επίσης αυξάνει τη διαπερατότητα των μεμβρανών, προκειμένου να εισέλθουν τα αντισώματα στο εσωτερικό του κυττάρου και των οργανιδίων.

- Τα κύτταρα επωάζονται με 50μL διαλύματος ανοσοφθορισμού για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
- Αφαιρείται το διάλυμα ανοσοφθορισμού και προστίθενται 50μL αντισώματος στην κατάλληλη αραιώση. Το αντίσωμα αραιώνεται σε διάλυμα ανοσοφθορισμού. Οι καλυπτρίδες επωάζονται ολονύκτια στους 4°C.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις με διάλυμα ανοσοφθορισμού, 5 λεπτών οι δύο πρώτες και 30 λεπτών η τελευταία.
- Προστίθενται 50μL διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος στην κατάλληλη αραιώση και επωάζεται για 2ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντίσωμα αραιώνεται σε διάλυμα ανοσοφθορισμού. Από αυτό το σημείο και μετά είναι πολύ σημαντικό οι καλυπτρίδες να διατηρούνται στο σκοτάδι.
- Ακολουθούν 4 πλύσεις με PBS των 5 λεπτών η καθεμία.
- Προσθήκη 50μL της χρωστικής DAPI (αραιωμένη σε PBS) και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αφαίρεση της χρωστικής DAPI και προσθήκη της χρωστικής DRAQ5. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθούν 3 πλύσεις με TBS των 5 λεπτών η καθεμία
- Τέλος, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται με την επιφάνεια των κυττάρων προς τα κάτω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, στο σημείο που προηγουμένως έχει τοποθετηθεί μικρή ποσότητα μέσου στερέωσης (mounting medium).
- Οι καλυπτρίδες αφήνονται ολονύκτια να στεγνώσουν. Στη συνέχεια φυλάσσονται σε σκοτεινό μέρος στους 4°C.

Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού ανιχνεύθηκαν μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal microscopy).



## **3.2 ΥΛΙΚΑ**

### **3.2.1 Διαλύματα που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο**

#### **Laemmli Buffer 4x (12mL)**

για φόρτωση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης

- 2.2mL 1M Tris pH 6.8
- 4.4 Glycerol 100%
- 4.4mL SDS 10%
- 0.5mL Bromophenol blue 1%
- 0.5mL β-mercaptoethanol

Χρησιμοποιείται χωρίς αραιώση. Η ποσότητα ανά δείγμα είναι περίπου το 1/3 του όγκου του δείγματος.

#### **TGS 10x (1L)**

Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου

- 30.2gr TriBase
- 144 Glycine
- 10gr SDS

Αραιώνονται σε 1L υπερκάθαρο νερό και προστίθεται HCl μέχρι pH 8.3.

#### **Transfer Buffer 10x (1L)**

Ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών

- 111.66gr Glycine
- 29.32gr TrisBase

Αραίωση σε 1L υπερκάθαρο νερό.

Για να χρησιμοποιηθεί αραιώνεται σε 1x με καθαρή μεθανόλη και νερό. Για την παρασκευή 1L ρυθμιστικού διαλύματος απαιτούνται 100mL από το Transfer Buffer, 200mL μεθανόλη και 700mL νερό. Όλα τα παραπάνω συστατικά διατηρούνται σε χαμηλή θερμοκρασία.

#### **TBS 20x (1L)**

Ρυθμιστικό διάλυμα για Western Blot και ανοσοφθορισμό

- 160gr NaCl
- 60gr TrisBase
- 4gr KCl

Αραίωση σε 1L υπερκάθαρο νερό και προσθήκη HCl μέχρι το pH να φτάσει 7.4.

#### Διάλυμα πλύσης TBS-T

Για να παρασκευαστούν 500mL διαλύματος πλύσης των μεμβρανών νιτροκυτταρίνης απαιτείται:

- 495mL TBS 1x
- 5mL Tween 20 10%

Το διάλυμα αναδεύεται για 5 λεπτά πριν χρησιμοποιηθεί.

#### Διάλυμα αποκλεισμού (Blocking buffer)

100mL διαλύματος αποκλεισμού παρασκευάζονται με:

- 5gr γάλα σκόνη
- 95mL TBS 1x
- 1mL Tween 20 10%

Πριν τη χρήση, το διάλυμα αναδεύεται για 15 λεπτά. Στη συνέχεια διατηρείται στους 4°C έως 4 ημέρες.

#### TAE 50x (1L)

Ρυθμιστικό διάλυμα για ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων και παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

- 242gr TrisBase
- 57.1gr CH<sub>3</sub>COOH
- 100mL EDTA 0.5M pH 8.0

Αραίωση σε 1L υπερκάθαρο νερό.

#### Loading dye 5x για νουκλεϊκά οξέα

- 50% glycerol 50%
- 20mM EDTA
- Orange G dye

### ICC Buffer 1x

- 1% FBS
- 0.1% Triton-X

Τα παραπάνω διαλύονται σε διάλυμα TBS 1x.

### **3.2.2 Διαλύματα του εμπορίου**

- RIPA Buffer (Cell signaling)
- Protease Inhibitors mini tablets (Thermo Fischer)
- Μάρτυρας μοριακών βαρών νουκλεϊκών οξέων GeneRuler 1kb (Thermo Fischer)
- Μάρτυρας μοριακών βαρών πρωτεϊνών MWP04 Nippon Genetics
- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης GE Healthcare, 10600002
- Αντιδραστήριο Bradford Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, 5000006
- Αντίστροφη μεταγραφή RevertAid Thermo Scientific
- RQ1 RNase-Free DNase kit (Promega, M6101)
- Υποστρώματα ECL για εμφάνιση κατά την ανοσοαποτύπωση
  - Lumilight western blotting Substrate, Roche, 1201520001
  - Clarity Western ECL Blotting Substrate, Biorad
- NucleoZOL, Macherey-Nagel
- Αντιδραστήρια για PCR της εταιρείας Minotech (Taq Polymerase, Taq Buffer 10x, MgCl<sub>2</sub> 25mM, dNTPs)

### Διαλύματα κυτταροκαλλιιεργειών

- RPMI 1640 Medium Gibco
- FBS Gibco

### 3.2.3 Αντισώματα και εκκινητές

#### Πρωτογενή αντισώματα

**Πίνακας 2:** Το σύνολο των πρωτογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Αντίσωμα	Ζώο	Αραίωση για ICC	Αραίωση για WB	Εταιρία	Αριθμός καταλόγου
VDAC1	mouse	-	1:1000	Santa cruz	sc-390996
OXPPOS cocktail	mouse	-	1:250	Abcam	ab110413
$\alpha$ -synuclein	mouse	-	1:400	BD Biosciences	610786
b-actin	mouse	-	1:10000	Millipore	MAB1501
PGC-1a	rabbit	-	1:2000	Novusbio	NBP1-04676
TFAM	mouse	-	1:1000	Abnova	H00007019-B01P
MnSOD	rabbit	-	1:1000	Enzo Life Sciences	ADI-SOD-110
Cytochrome C	mouse	-	1:1000	Abcam	ab13575
Caspase 3	rabbit	-	1:1000	Cell Signalling	9662
BCL2	mouse	-	1:1000	Santa cruz	sc-7382
P-62	rabbit	-	1:1000	Abcam	ab91526
LC3	mouse	-	1:500	Novus Biologicals	100-223
HsP90	rat	-	1:1000	Millipore	386041
HsP70	mouse	-	1:500	Enzo Life Sciences	ADI-SPA-810
b-tubulin	rabbit	-	1:10000	Abcam	ab6046
Tim23	mouse	-	1:1200	BD Biosciences	611222
P-S6	rabbit	1:500	1:1000	Cell Signalling	9208

### Δευτερογενή αντισώματα

**Πίνακας 3:** Το σύνολο των δευτερογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Αντίσωμα	Προσδέτης	Χρήση	Αραίωση	Εταιρεία	Κωδικός
Goat anti-rabbit	Alexa Fluor 488	ICC	1:1000	Thermo Scientific	27034
Goat anti-mouse	HRP	Western Blot	1:2000	Jackson ImmunoResearch	115-035-003
Goat anti-rat	HRP	Western Blot	1:2000	Jackson ImmunoResearch	112-035-003
Goat anti-rabbit	HRP	Western Blot	1:2500	Thermo Scientific	31460

### Εκκινητές

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

Εκκινητές	Αλληλουχία (5'→3')	Θέσεις αναγνώρισης	Μέγεθος προϊόντος PCR
mtDNA-fragment A-s	AACCAAACCCCAAAGACACC	550-569	9289
mtDNA-fragment A-a	GCCAATAATGACGTGAAGTCC	9839-9819	
mtDNA-fragment B-s	TCCCACTCCTAAACACATCC	9592-9610	7752
mtDNA-fragment B-a	AGAAAGGCTAGGACCAAACC	671-652	

## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **ΜΕΡΟΣ 1: Χαρακτηρισμός του κυτταρικού μοντέλου**

#### **4.1.1 Έλεγχος του mtDNA για σημειακές μεταλλάξεις σε όλες τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν με την τεχνολογία της «εν τω βάθει» νουκλεοτιδικής αλληλούχισης (*Deep Sequencing*).**

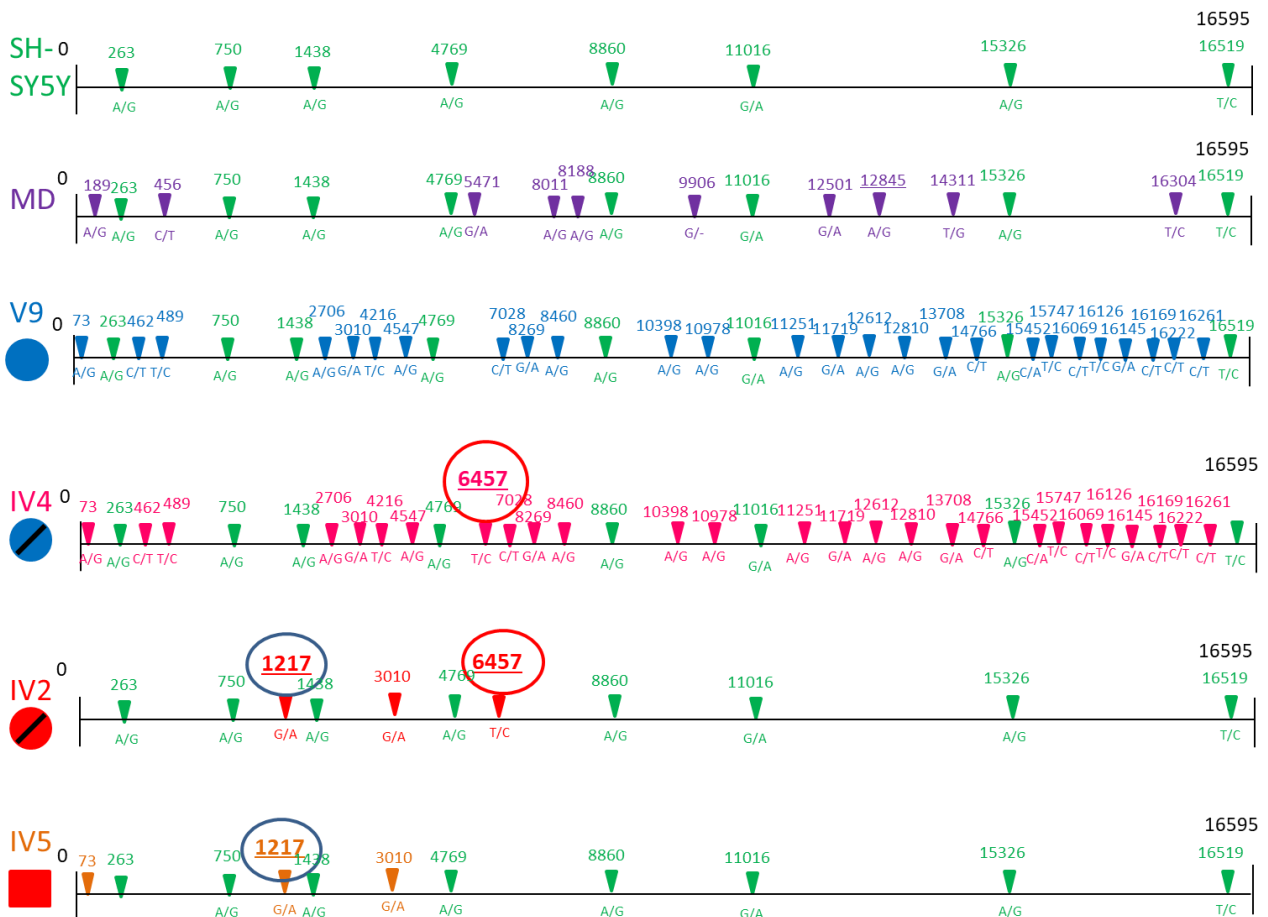
Αρχικά πρώτος και βασικότερος μας στόχος ήταν η επιβεβαίωση της επιτυχούς σύντηξης των νευρικών κυττάρων-δεκτών (SH-SY5Y) με τα μιτοχόνδρια των μελών της οικογένειας με την οικογενή νόσο του Parkinson, όπως και του μη συγγενικού υγιούς ατόμου που χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου. Παράλληλα έγινε και ο έλεγχος νουκλεοτιδικών αλλαγών (*single-nucleotide polymorphism*, SNPs) που μπορεί με την πάροδο του χρόνου και την εκδήλωση της νόσου να συσσωρεύτηκαν στη μιτοχονδριακή αλληλουχία. Τα SNPs αποτελούν τον συχνότερο τύπο της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των ανθρώπων. Η μελέτη τους παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την παρακολούθηση της κληρονομικότητας γονιδίων που ευθύνονται για την εμφάνιση ασθενειών μεταξύ οικογενειών. Κάποιοι πολυμορφισμοί μπορεί να αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου PD, ενώ άλλοι παράγοντες προστασίας (van der Walt et al., 2003).

Στα δείγματα έγινε ανάλυση ολικής σάρωσης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος έπειτα από ενίσχυση του mtDNA με τη χρήση δύο ζευγών αλληλεπικαλυπτόμενων εκκινητών με την μέθοδο της PCR. Η ολική σάρωση πραγματοποιήθηκε με την χρήση της τεχνολογίας της «εν τω βάθει» νουκλεοτιδικής αλληλούχισης (*Deep Sequencing*) και η συγκριτική ανάλυση έγινε βάση της αλληλουχίας αναφοράς για το μιτοχονδριακό γονιδίωμα από τη βάση δεδομένων NCBI (Vasili, 2016).

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.11016G>A, m.15326A>G και m.16519T>C) που απεικονίζονται με πράσινο χρώμα (**Εικόνα 22**). Η συγκριτική ανάλυση αποκάλυψε και νέες, διαφορετικές θέσεις πολυμορφισμών μεταξύ των δειγμάτων. Πιο σημαντικές από αυτές φαίνεται να είναι

οι θέσεις ετεροπλάσμιας m.1217G>A που εντοπίστηκε στον ασθενή IV2 και τον αδελφό του IV5, καθώς και m.6457T>C που εντοπίστηκε στα άτομα IV2 και IV4. Η αλλαγή m.1217G>A εντοπίζεται στο εσωτερικό του γονιδίου 12S rRNA (γενετικός τύπος *MT-RNR1*) και η m.6457T>C στο εσωτερικό του γονιδίου της υπομονάδας I της οξειδάσης του κυτοχρώματος C (*cytochrome c oxidase subunit I*) που αποτελεί τμήμα της αναπνευστικής αλυσίδας του μιτοχονδρίου. Μάλιστα η συγκεκριμένη σημειακή μεταλλαγή οδηγεί στην μη-συνώνυμη μετατροπή του αμινοξέος βαλίνη (Val) σε αλανίνη (Ala).

Από τα αποτελέσματα της νουκλεοτιδικής ανάλυσης επιβεβαιώθηκε επίσης η κοινή προέλευση των μιτοχονδρίων της αριστερής πλευράς του δέντρου δηλαδή της IV4 και της κόρης της V9 καθώς και της δεξιάς πλευράς δηλαδή των δύο αδελφών IV2 και IV5. Αυτό γίνεται φανερό από το γεγονός ότι τα δύο αυτά ζεύγη ατόμων έχουν τα ίδια SNPs (ανά δύο ίδια) που κληρονόμησαν από τις μητέρες τους. Η σημαντική διαφορά μεταξύ των ατόμων που βρίσκονται στις δύο πλευρές του γενεαλογικού δέντρου είναι ότι αυτά στην αριστερή πλευρά έχουν συσσωρεύσει στο mtDNA τους πολύ περισσότερα SNPs συγκριτικά με τη δεξιά πλευρά. Το γεγονός αυτό αποτελεί έκπληξη καθώς θα περίμενε κανείς το άρρωστο άτομο IV2 να είναι αυτό που θα έχει συσσωρεύσει τις περισσότερες αλλαγές στο mtDNA του, τόσο συγκριτικά με τον υγιή αδελφό του (IV5) που έχουν κοινό mtDNA, όσο και σε σχέση με τους υγιείς συγγενείς του (IV4, V9).

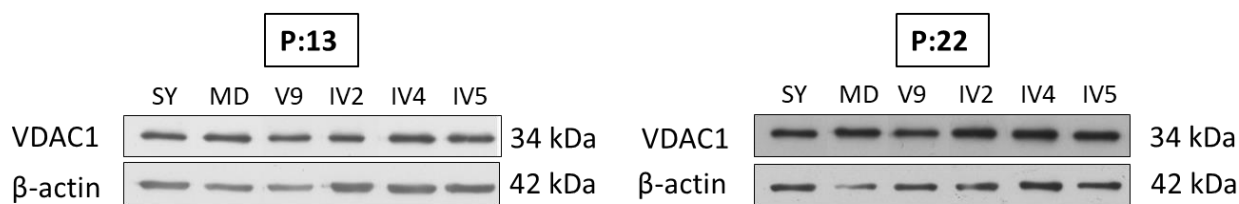


Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση των SNPs που ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο της «εν τω βάθει» νουκλεοτιδικής αλληλούχησης των τεσσάρων διαφορετικών υβριδικών σειρών συγκριτικά με την καλλιέργεια ελέγχου (SH-SY5Y) και την υβριδική σειρά αναφοράς (MD). Σε κύκλους περιλαμβάνονται ενδεικτικά δύο από τα σημαντικότερα SNPs που διαφοροποιούν τα cybrids μεταξύ τους.

#### 4.1.2 Τα cybrids έχουν την ίδια ποσότητα μιτοχονδριακού περιεχομένου.

Ακολούθησε έλεγχος της μιτοχονδριακής περιεκτικότητας των cybrids με την χρήση του αντισώματος της VDAC1 (*voltage-dependent anion channel 1*). Η VDAC1 είναι μια πρωτεΐνη που σχηματίζει πόρους και εκφράζεται σε όλες τις ευκαρυωτικές μιτοχονδριακές μεμβράνες (Sampson et al., 1997), συμπεριλαμβανομένων αυτών στον ανθρώπινο εγκέφαλο (Menard et al., 1994). Η πρωτεΐνη αυτή, σχηματίζει ένα κανάλι στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και ελέγχει την ροή των μεταβολιτών στο εσωτερικό του. Χρησιμοποιείται ως δείκτης ελέγχου του μιτοχονδριακού περιεχομένου του κυττάρου καθώς τα επίπεδά της δεν μεταβάλλονται.





**Εικόνα 23:** Έλεγχος της ποσότητας του μιτοχονδριακού περιεχομένου των cybrids. Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η σταθερή έκφραση της πρωτεΐνης VDAC1 στη γενιά P:13 και P:22. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -actin.

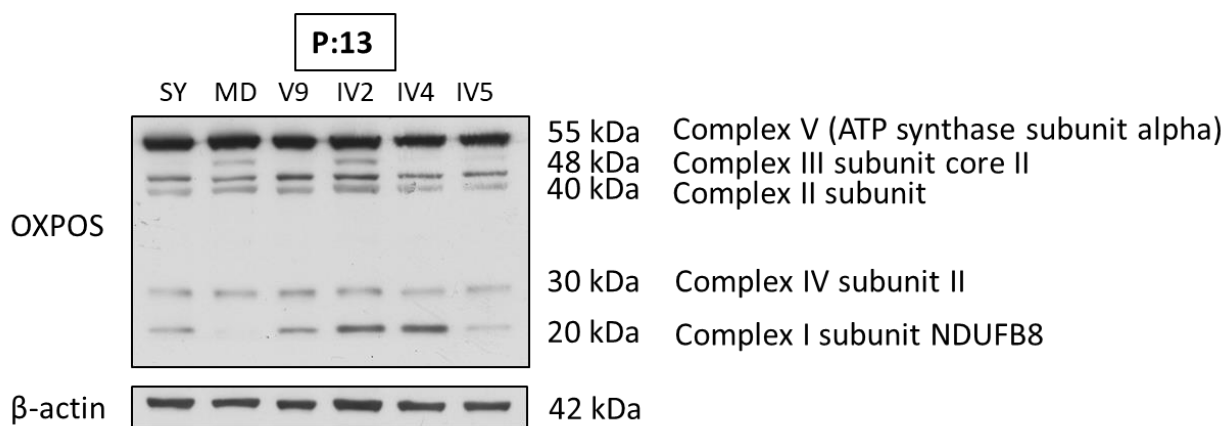
Παρατηρούμε ότι όλα τα cybrids φέρουν την ίδια ποσότητα μιτοχονδριακού περιεχομένου, κάτι που δεν αλλάζει με την πάροδο των κυτταρικών γενεών (passages). Αυτό υποδεικνύει ότι οι κυτταρικές μας σειρές διατηρούν τα μιτοχόνδρια των δοτών τους για πολλές γενεές μετά την δημιουργία τους και άρα τυχόν διαφορές που θα προκύψουν ανάμεσα τους δεν θα οφείλονται στην ποσότητα των μιτοχονδρίων τους αλλά στην ποιότητα αυτών.

#### 4.1.3 Τα cybrids παρουσιάζουν διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας I της αναπνευστικής αλυσίδας.

Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) όπως προαναφέρθηκε είναι απαραίτητη για την λειτουργία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης των μιτοχονδρίων και για την σωστή λειτουργία του κυττάρου. Στη νόσο PD έχει βρεθεί μάλιστα, ότι τα σύμπλοκα I και III σε πολλές περιπτώσεις υπολειτουργούν. Το σύμπλοκο I είναι ένα σημαντικό σημείο εισόδου της αναπνευστικής αλυσίδας και η ανεπάρκεια του μπορεί να μεταφραστεί σε μια δραματική απώλεια βιοενεργειακών λειτουργιών και μεγάλη αστάθεια των μιτοχονδρίων. Η ελαττωματική του λειτουργία αποτελεί σημαντικό βήμα στον καταρράκτη των γεγονότων που οδηγούν στο θάνατο των ντοπαμινεργικών κυττάρων. Η μειωμένη δραστηριότητα του συμπλόκου I έχει παρατηρηθεί στα μιτοχόνδρια τόσο των αιμοπεταλίων, όσο και της μέλαινας ουσίας και του μετωπιαίου φλοιού του εγκεφάλου ασθενών με Parkinson. Επιπλέον, σε μία παλαιότερη μελέτη, με μοντέλα cybrid από μιτοχόνδρια ασθενών με PD, βρέθηκε ότι η δράση του συμπλόκου I είναι χαμηλότερη από τον μέσο όρο (Marella et al., 2009).

Για τους λόγους αυτούς έγινε έλεγχος των επιπέδων των συμπλόκων (I, II, III, IV και V) της αναπνευστικής αλυσίδας με την χρήση του κοκτέιλ αντισωμάτων OXPOS. Το κοκτέιλ αυτό περιέχει 5 αντισώματα, έναντι κάθε μίας από τις

υπομονάδες της ETC. Συγκεκριμένα, την υπομονάδα NDUFB8 του συμπλόκου I (20 kDa), την υπομονάδα II του συμπλόκου IV (30 kDa), την υπομονάδα του συμπλόκου II (40 kDa), την υπομονάδα II του συμπλόκου III (48 kDa) και την υπομονάδα α της ATP συνθάσης του συμπλόκου V (55 kDa).



**Εικόνα 24:** Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας. Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου γίνεται χρήση του κοκτέιλ αντισωμάτων OXPOS στη γενιά P:13. Αποτυπώνεται η σταθερή έκφραση των συμπλόκων II-V και η αυξημένη έκφραση του συμπλόκου I στις κυτταρικές σειρές IV2 και IV4. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -actin.

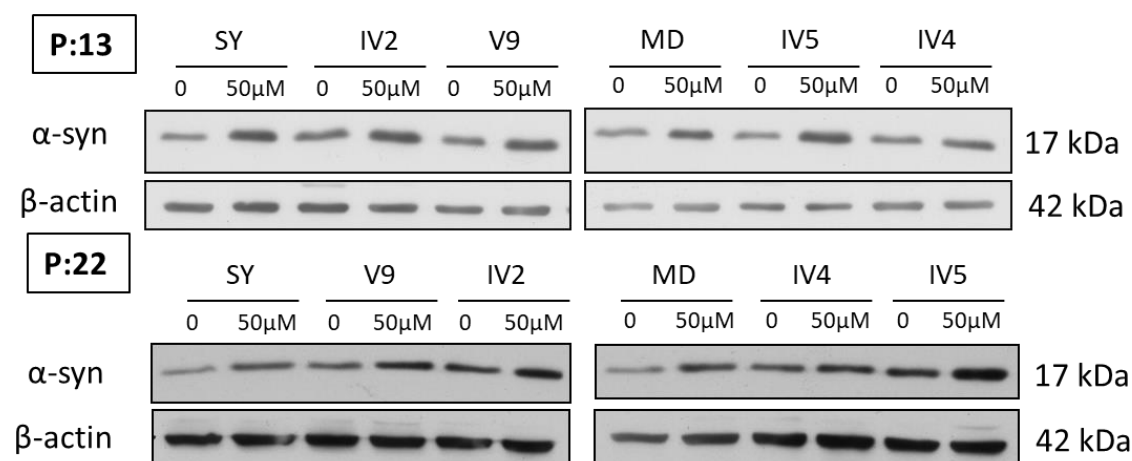
Παρατηρήθηκε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας είναι αυξημένα στην περίπτωση των κυττάρων IV2 (της ασθενούς) και του IV4 (που φέρει τη μετάλλαξη για την  $\alpha$ -synuclein, αλλά δεν νοσεί). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα δύο αυτά άτομα που παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα του συμπλόκου I, είχε δειχθεί προηγουμένως από τη νουκλεοτιδική ανάλυση ότι φέρουν μία μεταλλαγή στη θέση 6457, η οποία βρίσκεται στο εσωτερικό του γονιδίου που κωδικοποιεί την υπομονάδα I της οξειδάσης του κυτοχρώματος C (σύμπλοκο I).

## **ΜΕΡΟΣ 2: Χρήση της τοξίνης 6-υδροξυτοπαμίνη (6-OHDA) ως παράγοντα στρες και μελέτη των επιπτώσεών της στις cybrids κυτταρικές σειρές.**

Στα πειράματα που ακολουθούν έγινε χρήση της τοξίνης 6-OHDA η οποία, όπως προαναφέρθηκε χρησιμοποιείται ευρέως για την δημιουργία πειραματικών μοντέλων της νόσου του Parkinson. Η τοξίνη αυτή δημιουργεί οξειδωτικό στρες στο κύτταρο και επηρεάζει την λειτουργία της οξειδωτικής σ. Στα ακόλουθα πειράματα, τα κύτταρα επώαστηκαν σε συγκέντρωση της τοξίνης 50μM για 24 ώρες και έπειτα συλλέχθηκαν. Η χρήση της τοξίνης είχε ως σκοπό την προσθήκη ενός επιπλέον παράγοντα στρες στα κύτταρα που θα μπορούσε πιθανά να οδηγήσει στην εμφάνιση διαφορών μεταξύ των cybrids με διαφορετικό μιτοχονδριακό περιεχόμενο, ιδανικά των κυττάρων IV2 (πάσχον άτομο) με τα υπόλοιπα, οι οποίες δεν θα ήταν εμφανείς σε φυσιολογικές συνθήκες καλλιέργειας. Άλλωστε η PD είναι μια πολυπαραγοντική νόσος και η εμφάνισή της είναι αποτέλεσμα συνδυασμού τόσο γενετικών όσο και περιβαλλοντικών παραγόντων. Τα κύτταρα απομονώθηκαν και μελετήθηκαν σε δύο διαφορετικές γενεές (P:13, P:22) ώστε να τους δοθεί αρκετός χρόνος προσαρμογής στο νέο περιβάλλον.

### **4.2.1 Η $\alpha$ -synuclein αυξάνεται στο στρες σε όλα τα cybrids και κυρίως στα IV2 και IV5, όπου παρουσιάζει και τα μεγαλύτερα βασικά επίπεδα.**

Αρχικά μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της μονομερούς μορφής της  $\alpha$ -synuclein, του βασικότερου δείκτη προόδου της νόσου του Parkinson.



**Εικόνα 25:** Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της  $\alpha$ -syn πριν και μετά την προσθήκη της τοξίνης **6-OHDA**. Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης  $\alpha$ -synuclein παρουσία και απουσία τοξίνης στις γενεές P:13 και P:22. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -actin.

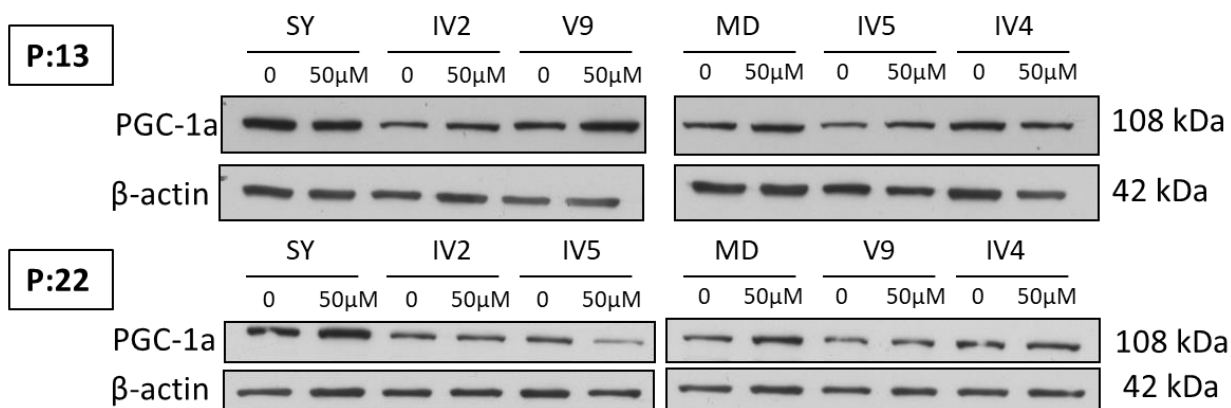
Παρατηρήθηκε ότι η παρουσία της τοξίνης 6-OHDA αύξησε τα επίπεδα της  $\alpha$ -syn σε όλα τα cybrids, με την αύξηση αυτή να είναι λίγο μεγαλύτερη στην περίπτωση των IV2 και IV5 και στις δύο γενεές που ελέγχθηκαν. Μάλιστα φαίνεται ότι και τα βασικά επίπεδα της πρωτεΐνης είναι υψηλότερα στην περίπτωση του IV2 και στις δύο γενεές, ενώ του IV5 στην γενεά P:22.

#### **4.2.2 Τα cybrids παρουσιάζουν διαφορές στις μεταβολές της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην μιτοχονδριακή λειτουργία και στην αντιοξειδωτική άμυνα παρουσία και απουσία της τοξίνης.**

Στην συνέχεια αποφασίσαμε να μελετήσουμε την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην μιτοχονδριακή λειτουργία και στην αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου, όπως ο μεταγραφικός συνενεργοποιητής PGC-1 $\alpha$ , ο μεταγραφικός ενεργοποιητής TFAM, και τα ένζυμα MnSOD και cytochrome C.

##### **4.2.2.1 Τα επίπεδα του παράγοντα PGC-1 $\alpha$ είναι μειωμένα στα κύτταρα IV2 και IV5.**

Ο παράγοντας PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ) αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της μιτοχονδριακής βιογένεσης και λειτουργίας. Δρα ως συνενεργοποιητής των μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στη ρύθμιση των πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην μιτοχονδριακή παραγωγή ενέργειας και στην σύνθεση του ATP. Πρόσφατα μάλιστα έχει δείχθηκε ότι ο PGC-1 $\alpha$  ρυθμίζει την ισορροπία μιτοχονδριακής σύντηξης και σχάσης (Lai et al., 2014).

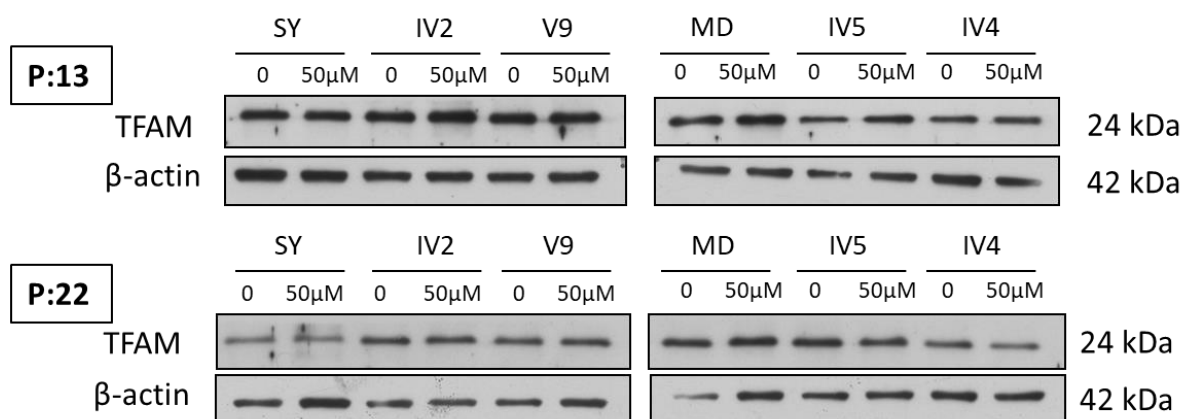


**Εικόνα 26:** Έλεγχος των επιπέδων του παράγοντα PGC-1α πριν και μετά την προσθήκη της τοξίνης 6-OHDA. Αντιπροσωπευτικό πείραμα ανοσοαποτύπωσης κατά Western στο οποίο αποτυπώνονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης PGC-1α παρουσία και απουσία τοξίνης στις γενιές P:13κ και P:22. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-actin.

Τα επίπεδα του PGC-1α δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα από την προσθήκη της τοξίνης αλλά φαίνεται να είναι μειωμένα στα κύτταρα της ασθενούς (IV2) και του αδερφού της (IV5) και στις δύο χρονικές περιόδους που μελετήθηκαν.

#### 4.2.2.2 Τα επίπεδα του TFAM δεν μεταβάλλονται στα cybrids παρουσία της τοξίνης 6-OHDA.

Ο μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας TFAM (*Mitochondrial transcription factor A*) κωδικοποιείται από το πυρηνικό γονιδίωμα και η έκφρασή του ρυθμίζεται από τον PGC-1α. Πέραν του δομικού του ρόλου ως «ιστόνη» του mtDNA, ο TFAM εμπλέκεται σε πολλές λειτουργίες όπως η αντιγραφή, η μεταγραφή και πιθανά και η επιδιόρθωσή του. Η ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων του TFAM με το mtDNA είναι ζωτικής σημασίας λοιπόν για τη ρύθμιση της μιτοχονδριακής βιογένεσης. Αυτή η ρύθμιση μπορεί να επιτευχθεί μέσω πολλαπλών μηχανισμών μεταξύ των οποίων είναι και η μεταβολή της ικανότητας πρόσδεσης του TFAM στο mtDNA, καθώς και ο έλεγχος της έκφρασής του (Picca and Lezza, 2015).

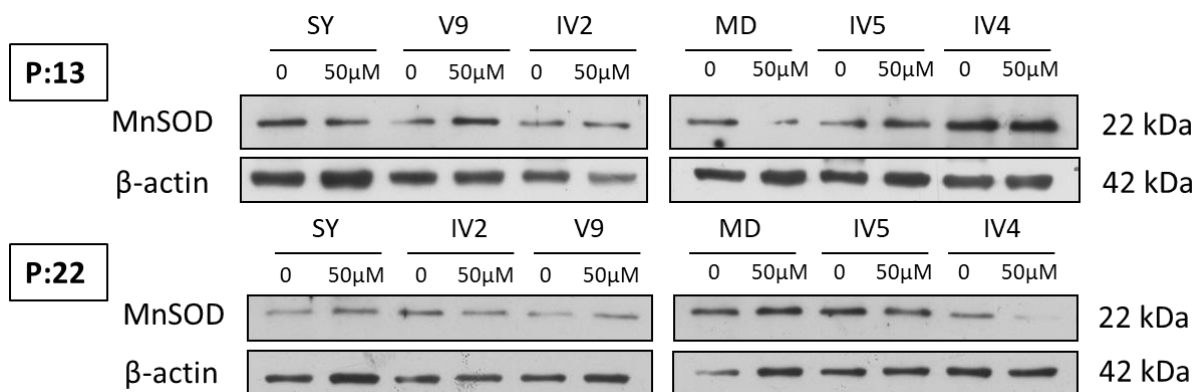


**Εικόνα 27:** Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα TFAM πριν και μετά την προσθήκη της τοξίνης 6-OHDA. Αντιπροσωπευτικό πείραμα ανοσοαποτύπωσης κατά Western όπου αποτυπώνονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης TFAM παρουσία και απουσία τοξίνης στην γενιά P:13 και P:22. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -actin.

Παρατηρείται ότι τα επίπεδα του TFAM δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα από την προσθήκη της τοξίνης και είναι παρόμοια μεταξύ των cybrids.

#### 4.2.2.3 Τα επίπεδα του ενζύμου MnSOD δεν μεταβάλλονται σε συνθήκες στρες, ούτε επηρεάζονται από την τοξίνη 6-OHDA, με εξαίρεση τα κύτταρα IV4

Το υπεροξειδίο της δισμουτάσης του μαγγανίου (MnSOD, *manganese-dependent superoxide dismutase*) ανήκει στην οικογένεια των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και συμμετέχει στην αντιοξειδωτική άμυνα εντός της μιτοχονδριακής μήτρας. Συγκεκριμένα, συμμετέχει στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου  $\cdot\text{O}_2^-$  στο σημείο παραγωγής τους, ούτως ώστε τα υπεροξειδία να μην διαπερνούν τις μεμβράνες και προκαλούν επιπτώσεις στα βιομόρια. Μειωμένα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου έχουν παρατηρηθεί σε διάφορες νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Evans et al., 2004).

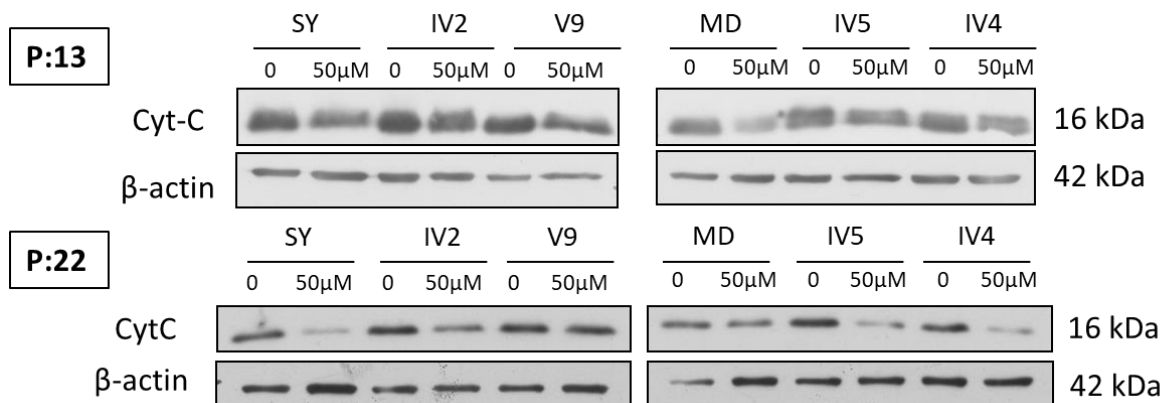


**Εικόνα 28:** Έλεγχος των επιπέδων του ενζύμου MnSOD πριν και μετά την προσθήκη της τοξίνης 6-OHDA. Ανοσοαποτύπωση κατά Western στην οποία φαίνεται η έκφραση της πρωτεΐνης MnSOD παρουσία και απουσία τοξίνης στις γενιές P:13 και P:22. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -actin.

Τα επίπεδα του MnSOD δεν φαίνεται να επηρεάζονται από την παρουσία του στρες στις υβριδικές σειρές, με εξαίρεση τα κύτταρα IV4 στη γενεά P:22.

#### 4.2.2.4 Το cytochrome C μειώνεται στην συνθήκη στρες σε όλα τα cybrids.

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



**Εικόνα 29:** Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του cytochrome C πριν και μετά την προσθήκη της τοξίνης 6-OHDA. Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η έκφραση της πρωτεΐνης cytochrome C παρουσία και απουσία τοξίνης στις γενιές P:13 και P:22. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -actin.

Η προσθήκη της τοξίνης 6-OHDA οδηγεί στην μείωση των επιπέδων του cytochrome C σε όλες τις κυτταρικές σειρές και σε όλες τις γενεές που μελετήθηκαν. Η μείωση του cytochrome C μπορεί να εξηγείται από το γεγονός ότι σε συνθήκες

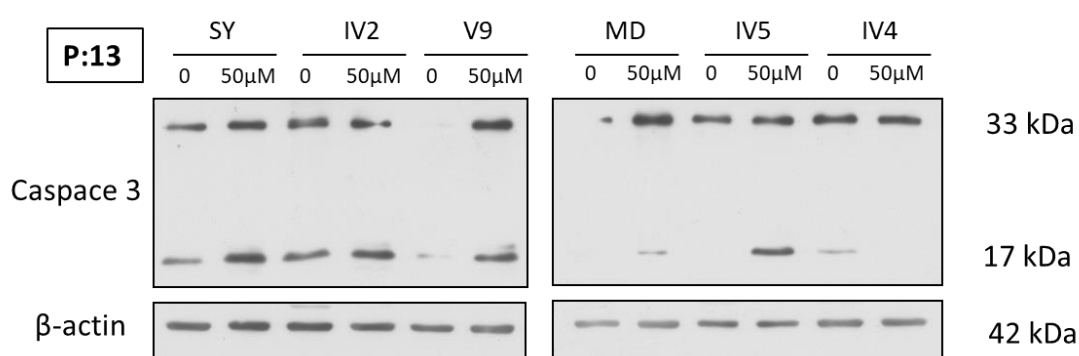
στρες εκλύεται από το μιτοχόνδρια και ασκεί τις επιδράσεις του στο κυτταρόπλασμα όπου και μπορεί να αποικοδομηθεί.

#### 4.2.3 Η παρουσία της τοξίνης 6-OHDA ενεργοποιεί τον μηχανισμό της απόπτωσης σε όλες τις υβριδικές σειρές.

Καθώς παρατηρήθηκε ότι η τοξίνη μεταβάλλει τα επίπεδα του cytochrome C στις υβριδικές σειρές, αποφασίσαμε να μελετήσουμε περαιτέρω το μονοπάτι της απόπτωσης στα κύτταρα αυτά.

##### 4.2.3.1 Η κασπάση-3 ενεργοποιείται σε συνθήκες στρες σε όλες τις υβριδικές σειρές εκτός από εκείνη των κυττάρων IV4.

Η ενεργότητα της κασπάσης-3 είναι ένα σήμα κατατεθέν της απόπτωσης και αποτελεί δείκτη της καθώς μαζί με τις κασπάσες 6 και 7 αποτελεί μόριο εκτελεστή της. Η ενεργοποίησή της έχει ως εξής: αρχικά το cytochrome C εκλύεται από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα όπου έρχεται σε επαφή με την πρωτεΐνη Araf-1. Η σύνδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί την προκασπάση-3 μέσω πρωτεόλυσης.



**Εικόνα 30: Μεταβολές των επιπέδων της κασπάσης-3 πριν και μετά την προσθήκη της τοξίνης 6-OHDA.** Αντιπροσωπευτικό πείραμα ανοσοαποτύπωσης κατά Western όπου αποτυπώνεται η έκφραση της κασπάσης-3 παρουσία και απουσία τοξίνης στη γενιά P:13. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -actin.

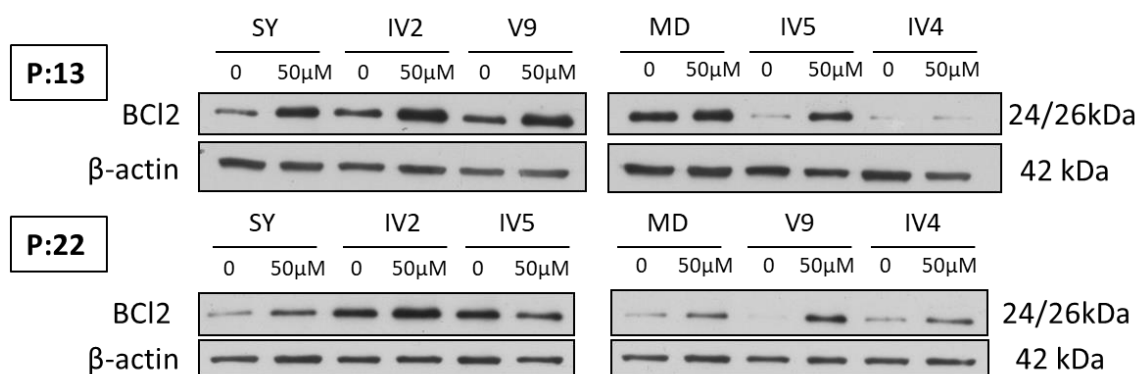
Παρατηρούμε ότι η προσθήκη της τοξίνης 6-OHDA που είδαμε προηγουμένως ότι οδηγεί σε μείωση του κυτοχρώματος C αυξάνει την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 σε όλες τις υβριδικές σειρές, όπως φαίνεται από την αύξηση των



επιπέδων της ενεργούς μορφής της (17 kDa). Άρα, η έκλυση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της απόπτωσης στις κυτταρικές μας σειρές εκτός της IV4 στην οποία δεν εμφανίζεται η ενεργή μορφή της κασπάσης-3.

#### 4.2.3.2. Η αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη BCL2 αυξάνεται σε όλες τις υβριδικές σειρές στις συνθήκες στρες, εκτός από την IV4.

Η πρωτεΐνη BCL2 εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, όπου παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση και στην αναστολή των δράσεων των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών αναστέλλοντας έτσι το μονοπάτι της απόπτωσης.



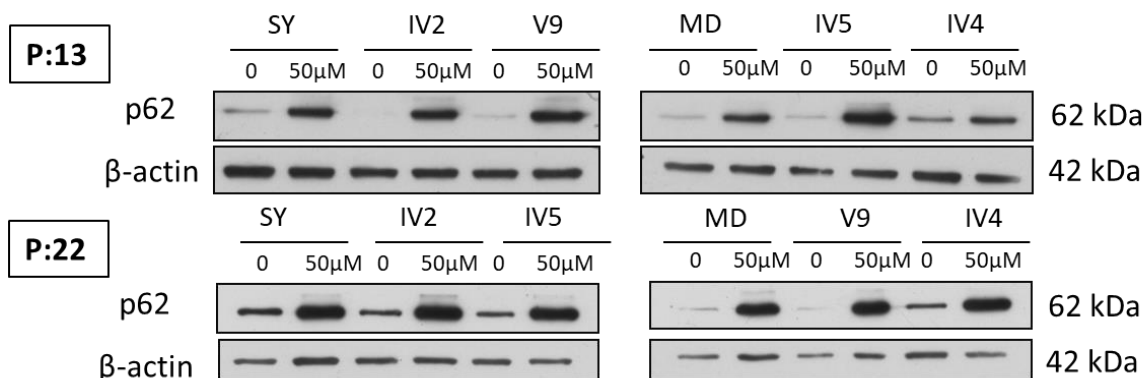
**Εικόνα 31: Έλεγχος των επιπέδων του BCL2 πριν και μετά την προσθήκη της τοξίνης 6-OHDA.** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η έκφραση της πρωτεΐνης BCL2 παρουσία και απουσία τοξίνης στις γενιές P:13 και P:22. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-actin.

Παρατηρούμε ότι τα επίπεδα του BCL2 αυξάνονται παρουσία της τοξίνης σε όλες τις περιόδους, και στις δύο χρονικές στιγμές που ελέγχθηκαν (με μόνη εξαίρεση τα κύτταρα IV4, στη γενεά P:13), γεγονός που υποδηλώνει την προσπάθεια των κυττάρων να επιβιώσουν από το στρες που προκαλείται από την 6-OHDA.

#### 4.2.4 Η παρουσία της τοξίνης ενεργοποιεί το αυτοφαγικό μονοπάτι σε όλες τις υβριδικές σειρές.

Η αυτοφαγία είναι μια καταβολική οδός στην οποία κανονικά ή δυσλειτουργικά κυτταρικά συστατικά που συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης αποικοδομούνται μέσω του λυσοσώματος και ανακυκλώνονται. Κατά τη διάρκεια της αυτοφαγίας, η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη LC3 λιπιδιώνεται και προσλαμβάνεται στις αυτοφαγοσωματικές μεμβράνες. Το αυτοφαγόσωμα συνδέεται στη συνέχεια με το λυσόσωμα για να σχηματίσει το αυτολυσόσωμα, στο οποίο συμβαίνει η διάσπαση του αυτοφαγοσωμικού κυστιδίου και του περιεχομένου του. Η πρωτεΐνη p62, η οποία σχετίζεται με ουβικιτινίωση, συνδέεται με την LC3, και χρησιμοποιείται επίσης για την παρακολούθηση της αυτοφαγικής ροής. Τα κύτταρα που υποβάλλονται σε αυτοφαγία επιδεικνύουν τον συν-εντοπισμό των p62, LC3 μαζί με λυσοσωμικούς δείκτες (Pugsley, 2017).

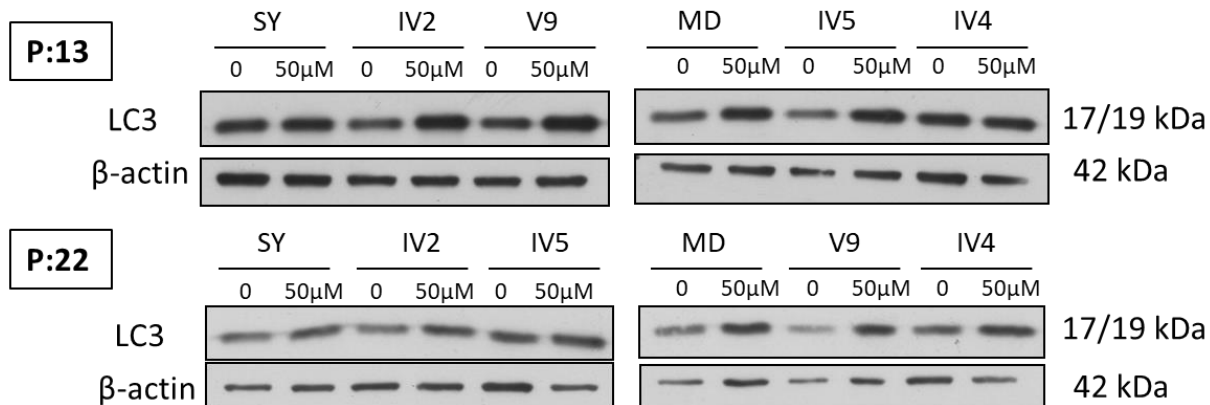
##### 4.2.4.1 Ο δείκτης p62 αυξάνεται σε όλες τις υβριδικές σειρές στην συνθήκη του στρες.



**Εικόνα 32:** Έλεγχος των επιπέδων του p62 πριν και μετά την προσθήκη της τοξίνης 6-OHDA. Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η έκφραση της πρωτεΐνης p-62 παρουσία και απουσία τοξίνης στις γενιές P:13 και P:22. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-actin.

Ο δείκτης της αυτοφαγίας p62 αυξάνεται στην συνθήκη του στρες σε όλες τις κυτταρικές σειρές, και στις δύο γενεές. Η αύξησή του ωστόσο, στα κύτταρα IV4 είναι μικρότερη στην γενεά P:13 σε σχέση με τα άλλα cybrids, αλλά φτάνει στα επίπεδά τους στη γενεά P:22.

#### 4.2.4.2 Ο δείκτης LC3 αυξάνεται στην συνθήκη του στρες.

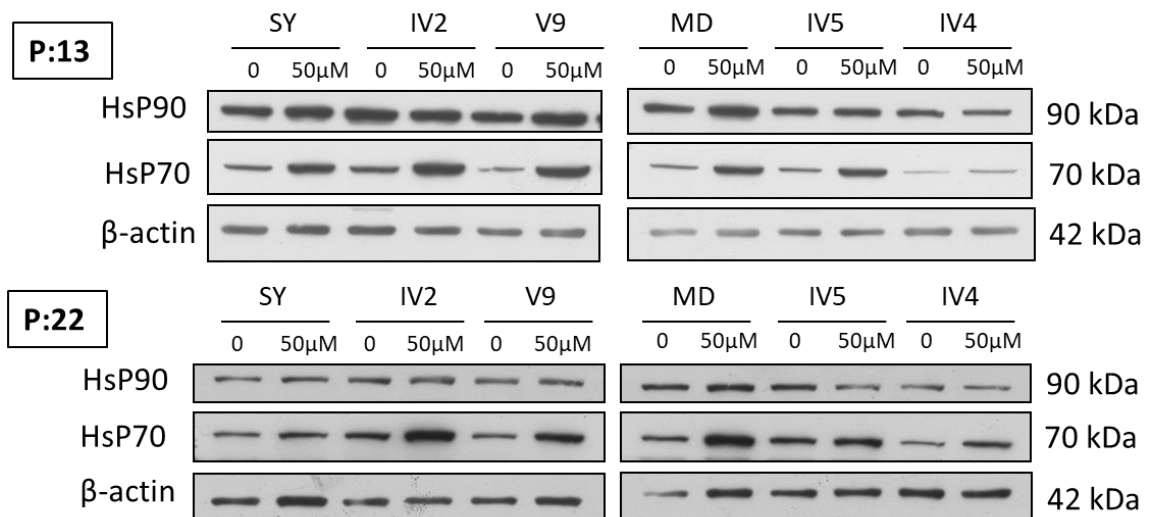


**Εικόνα 33:** Έλεγχος των επιπέδων του LC3 πριν και μετά την προσθήκη της τοξίνης 6-OHDA. Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η έκφραση της πρωτεΐνης LC3 παρουσία και απουσία τοξίνης στις γενιές P:13 και P:22. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-actin.

Αντίστοιχα, όπως αναμενόταν ο δείκτης LC3 έχει ακριβώς την ίδια συμπεριφορά με το p62, δηλαδή αυξάνεται στην συνθήκη του στρες σε όλες τις κυτταρικές σειρές και στις δύο γενεές, αλλά συγκριτικά λιγότερο στην νεότερη γενεά των κυττάρων IV4.

#### 4.2.5 Το σύστημα των μοριακών-συνοδών επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία της τοξίνης 6-OHDA στις υβριδικές σειρές.

Το σύστημα μοριακών-συνοδών ρυθμίζει την σωστή αναδίπλωση και ωρίμανση των πρωτεϊνών, στοχεύοντας επίσης και τις μη σωστά αναδιπλωμένες ή συσσωματωμένες πρωτεΐνες για εκ νέου αναδίπλωση ή αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα. Κύριοι αντιπρόσωποι του μονοπατιού αυτού είναι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ Hsp70 και Hsp90. Η πρωτεΐνη Hsp70 δρα επιπλέον και ως μεταφορέας πρωτεϊνών, μεταφέροντας για παράδειγμα όπως προαναφέρθηκε, μιτοχondριακές πρωτεΐνες στη γενική πύλη εισόδου των μιτοχondρίων, το σύμπλεγμα TOM. Η πρωτεΐνη Hsp70 μάλιστα έχει προταθεί ότι παίζει νευροπροστατευτικό ρόλο στη νόσο PD (Auluck et al., 2002).



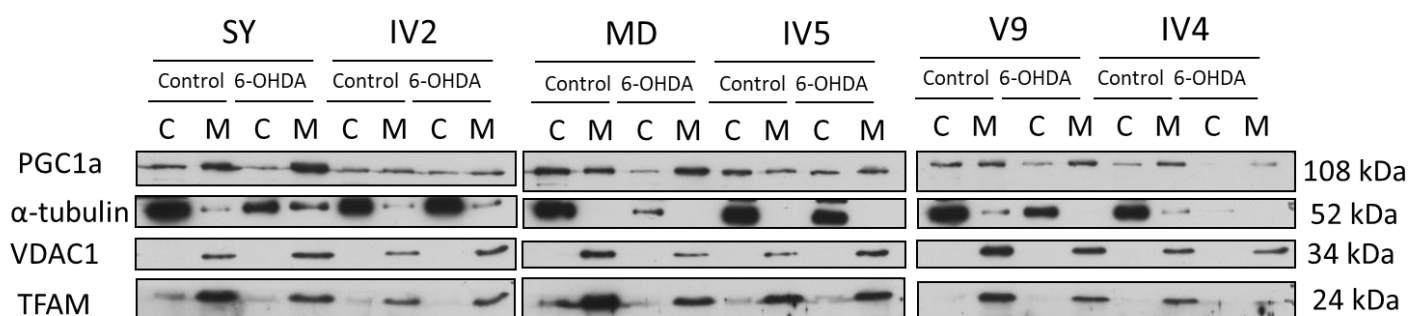
**Εικόνα 34:** Έλεγχος των επιπέδων των heat shock πρωτεϊνών 70 και 90 πριν και μετά την προσθήκη της τοξίνης 6-OHDA. Αντιπροσωπευτική εικόνα ανοσοαποτύπωσης κατά Western όπου αποτυπώνονται οι μεταβολές στην έκφραση των πρωτεϊνών Hsp70 και Hsp90 παρουσία και απουσία τοξίνης στις γενιές P:13 και P:22. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-actin.

Τα επίπεδα της Hsp90 δεν επηρεάζονται στην συνθήκη στρες σε αντίθεση με την Hsp70 όπου παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της σε όλα τα cybrids εκτός του IV4. Η διαφορά αυτή ωστόσο παρατηρείται μόνο στη γενεά P:13 και χάνεται στην P:22 όπου παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της Hsp70 παρουσία της τοξίνης.

#### 4.2.6 Η μιτοχονδριακή μεταφορά πρωτεϊνών έχει διαταραχθεί στα κύτταρα IV2, τα οποία φέρουν τα μιτοχόνδρια της ασθενούς.

Στην συνέχεια για μια βαθύτερη ματιά στη λειτουργία των μιτοχονδρίων έγινε διαχωρισμός των μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. Με αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η μελέτη της κατανομής των διαφόρων πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα σε σχέση με τα μιτοχόνδρια. Οι πρωτεΐνες οι οποίες μελετήθηκαν είναι ο PGC-1α, η α-synuclein και το cytochrome C.

4.2.6.1 Ο παράγοντας PGC-1α δεν εισέρχεται επαρκώς στα μιτοχόνδρια των σειρών IV2 και IV5.

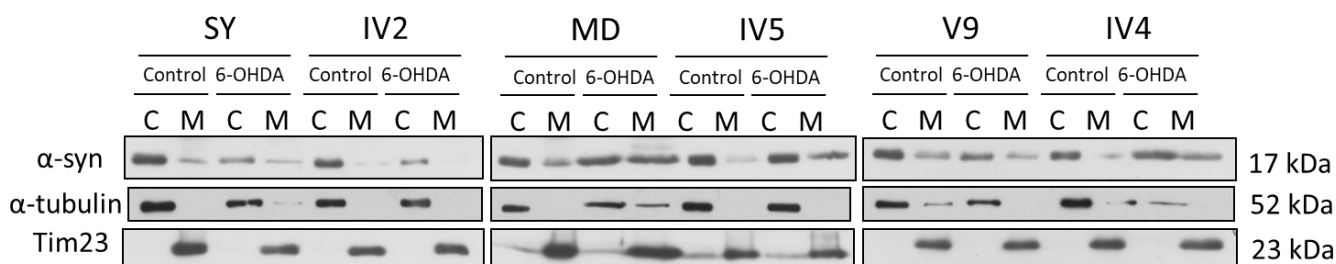


**Εικόνα 35:** Έλεγχος των επιπέδων και της κατανομής του PGC-1α στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια πριν και μετά την προσθήκη της τοξίνης 6-OHDA. Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η έκφραση της πρωτεΐνης PGC-1α στο κυτταρόπλασμα (C) και στα μιτοχόνδρια (M), παρουσία και απουσία τοξίνης στην γενιά P:8. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η α-tubulin ενώ ως μιτοχονδριακός δείκτης ισοφόρτωσης οι πρωτεΐνες VDAC1 και TFAM.

Παρατηρείται ότι ο PGC-1α κατανέμεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στα μιτοχόνδρια και δεν επηρεάζεται ούτε η έκφραση ούτε η κατανομή του παρουσία της τοξίνης. Επίσης φαίνεται ότι τόσο στα κύτταρα αναφοράς (SY και MD) όσο και στα cybrids της αριστερής πλευράς του δένδρου (IV4 και V9) τα επίπεδά του είναι υψηλότερα στο μιτοχονδριακό εκχύλισμα ενδεικτικό της δράσης του παράγοντα αυτού στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Αυτό όμως δεν συμβαίνει στα δύο αδέρφια IV2 και IV5 όπου τα επίπεδα της πρωτεΐνης είναι παρόμοια στο μιτοχονδριακό και το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα. Η μείωση αυτή των επιπέδων του PGC-1α στο μιτοχονδριακό εκχύλισμα μπορεί να φανερώνει μία μείωση της ικανότητας εισόδου του παράγοντα αυτού στο μιτοχόνδριο. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με το προηγούμενο αποτέλεσμα για τον συνενεργοποιητή PGC-1α (Εικόνα 26) όπου τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής ήταν χαμηλότερα στην περίπτωση των σειρών IV2 και IV5.

4.2.6.2 Τα μιτοχόνδρια της ασθενούς IV2 δεν δέχονται την μονομερή μορφή της  $\alpha$ -synuclein στο εσωτερικό τους.

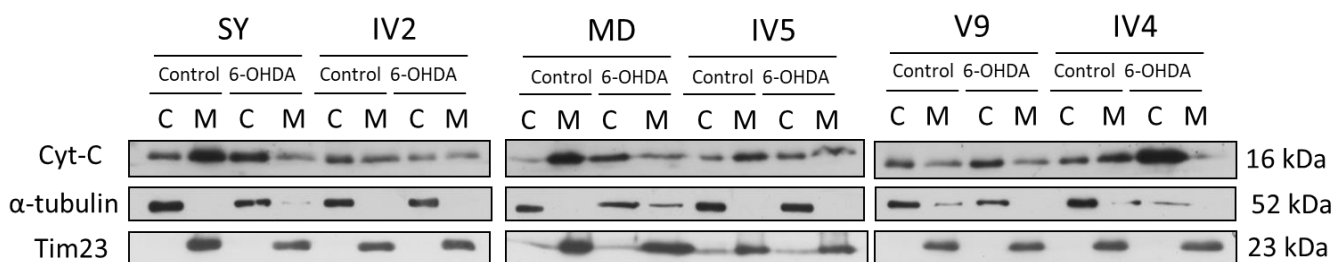
Η  $\alpha$ -synuclein όπως προαναφέρθηκε έχει την ικανότητα να εισέρχεται στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου μέσω της αλληλουχίας οδηγού στο N-τελικό της άκρο και να ασκεί εκεί φυσιολογικά τις δράσεις της στον έλεγχο της μορφολογίας και μιτοχονδριακής λειτουργίας.



**Εικόνα 36:** Έλεγχος των επιπέδων και της κατανομής της  $\alpha$ -syn στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια πριν και μετά την προσθήκη της τοξίνης 6-OHDA. Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η έκφραση της πρωτεΐνης  $\alpha$ -syn στο κυτταρόπλασμα (C) και στα μιτοχόνδρια (M), παρουσία και απουσία τοξίνης στην γενιά P:8. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\alpha$ -tubulin ενώ ως μιτοχονδριακός δείκτης ισοφόρτωσης η πρωτεΐνη Tim23.

Παρατηρείται ότι η μονομερής μορφή της  $\alpha$ -synuclein βρίσκεται κυρίως στο κυτταροπλασματικό εκχύλισμα αλλά και στο μιτοχονδριακό σε μικρότερο βέβαια βαθμό όπως αναμενόταν. Στα κύτταρα όμως με τα μιτοχόνδρια της ασθενούς IV2, η μονομερής μορφή απουσιάζει από τα μιτοχόνδρια. Η απουσία αυτή μπορεί να οφείλεται στην αδυναμία εισόδου του μορίου αυτού στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου.

4.2.6.3 Το cytochrome C εκλύεται στο κυτταρόπλασμα στην συνθήκη στρες σε όλες τις σειρές εκτός της IV2.



**Εικόνα 37:** Έλεγχος των επιπέδων και της κατανομής του cytochrome C στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια πριν και μετά την προσθήκη της τοξίνης 6-OHDA. Ανοσοαποτύπωση κατά

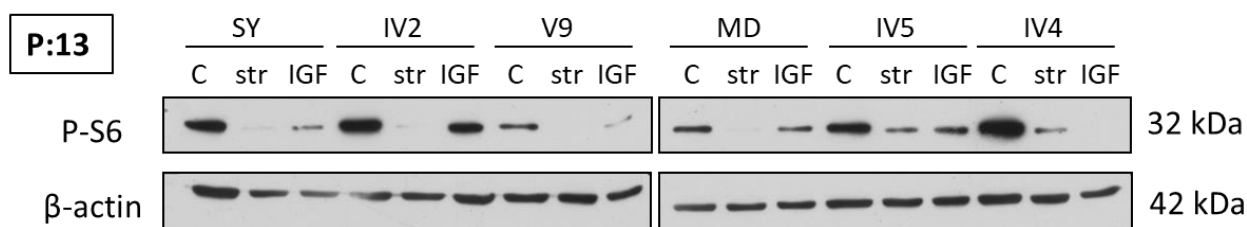
Western όπου αποτυπώνεται η έκφραση της πρωτεΐνης cytochrome C στο κυτταρόπλασμα (C) και στα μιτοχόνδρια (M), παρουσία και απουσία τοξίνης στην γενιά P:8. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\alpha$ -tubulin ενώ ως μιτοχονδριακός δείκτης ισοφόρτωσης η πρωτεΐνη Tim23.

Παρατηρείται ότι στα περισσότερα cybrids απουσία τοξίνης το cytochrome C βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο μιτοχονδριακό εκχύλισμα, ενώ παρουσία της τοξίνης το cytochrome C εκλύεται από τα μιτοχόνδρια και έτσι βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Αυτό όμως δεν συμβαίνει στην περίπτωση της ασθενούς IV2 όπου τα επίπεδα του cytochrome C βρίσκονται σε παρόμοια επίπεδα στα δύο διαμερίσματα παρουσία και απουσία τοξίνης.

### ΜΕΡΟΣ 3: Έλεγχος της απόκρισης των κυττάρων στον αναπτυξιακό παράγοντα IGF-1.

#### 3.1 Τα κύτταρα IV4 παρουσιάζουν μειωμένη απόκριση στον IGF-1.

Η ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 είναι συστατικό της ριβοσωμικής υπομονάδας 40S, και η φωσφορυλίωσή της γίνεται από το IGF1/mTOR μονοπάτι σηματοδότησης (μέσω της κινάσης p70S6K), αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την σύνθεση των πρωτεϊνών στο ριβόσωμα. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιείται ως ένας δείκτης ενεργότητας του μονοπατιού αυτού.

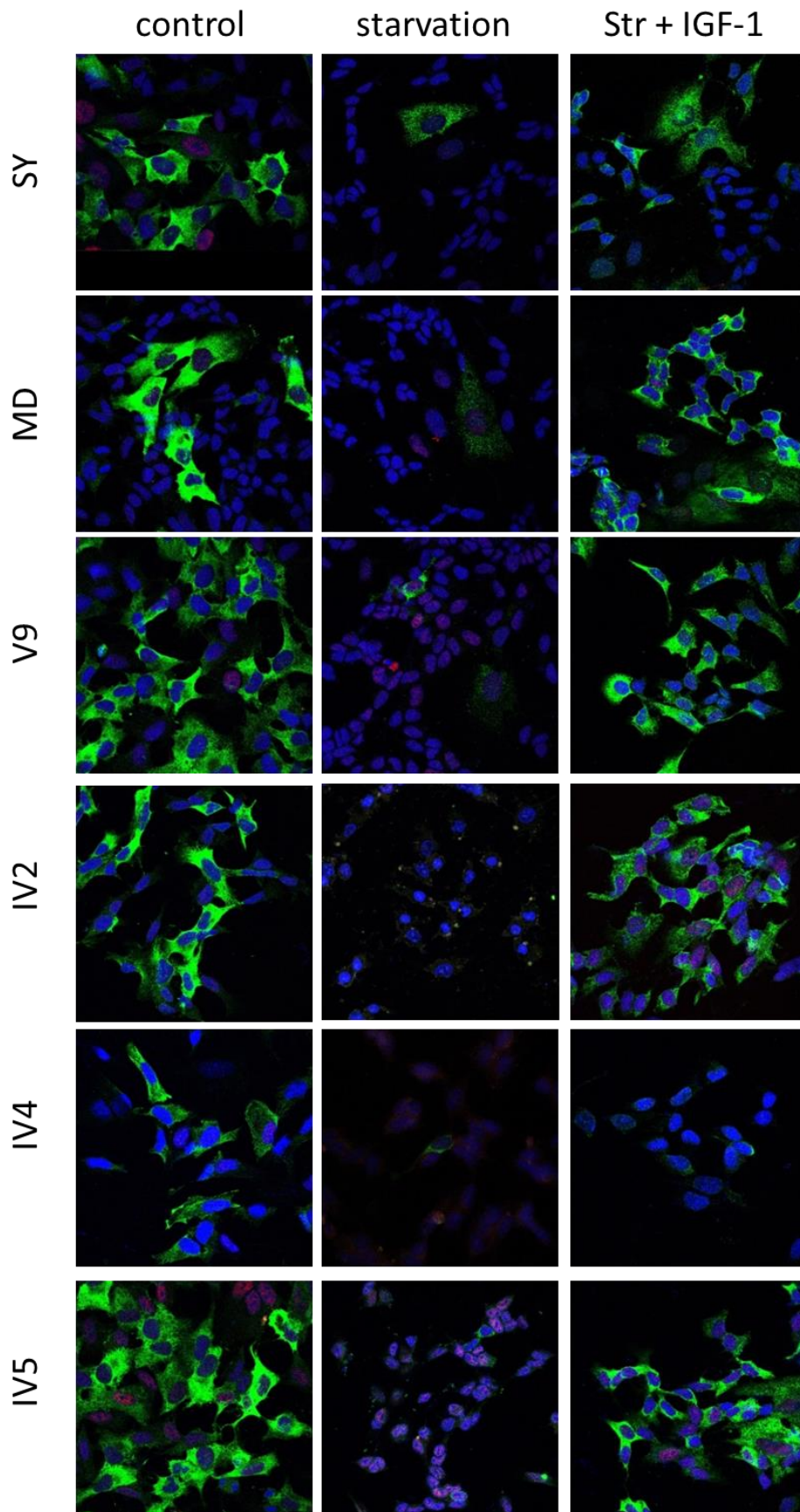


**Εικόνα 38:** Έλεγχος της ενεργότητας του μονοπατιού PI3K/Akt. Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης p-S6 σε φυσιολογικές συνθήκες (C), συνθήκες νηστείας 24 ωρών χωρίς ορό (str) και στην προσθήκη IGF-1 έπειτα από νηστεία 24 ωρών (IGF) στην γενιά P:13. Ως δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη β-actin.

Παρατηρούμε ότι τα επίπεδα της P-S6 είναι υψηλά στην συνθήκη ελέγχου (control), υποδηλώνοντας τη συνεχή ενεργότητα του μονοπατιού και σχεδόν μηδενίζονται στην συνθήκη της νηστείας (απουσία ορού) όπου το μονοπάτι απενεργοποιείται. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης S6 αυξάνονται εκ νέου μετά την προσθήκη του IGF-1 σε όλες τις υβριδικές σειρές, εκτός των IV4.

Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και με πειράματα ανοσοφθορισμού.





**Εικόνα 39: Έλεγχος της ενεργότητας του μονοπατιού PI3K/Akt.** Ενδεικτική Εικόνα ανοσοφθορισμού στην γενιά P:13 με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι του phosphor-S6 (πράσινο). Η χρώση του πυρήνα έγινε με την χρωστική DRAG5(μπλε). Φακός 100x.

Control: φυσιολογική συνθήκη, Starvation: συνθήκη νηστείας, Str+IGF-1: προσθήκη IGF-1 έπειτα από νηστεία 24 ωρών.

## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Η νόσος του Parkinson αποτελεί την δεύτερη πιο κοινή νευροεκφυλιστική νόσο παγκοσμίως μετά τη νόσο Alzheimer. Οφείλεται στην εκλεκτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας και χαρακτηρίζεται από την συσσώρευση ενδοκυτταρικών εγκλείστων, της πρωτεΐνης  $\alpha$ -synuclein. Η αιτιολογία της νόσου παραμένει ασαφής, ωστόσο, περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες μέσω περίπλοκων αλληλεπιδράσεων σε συνδυασμό με τον παράγοντα της ηλικίας, φαίνεται να συμβάλλουν στην παθογένεια της, επηρεάζοντας πλήθος θεμελιωδών κυτταρικών διαδικασιών. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία έχει περιγραφεί εκτενώς ως ένας κρίσιμος μηχανισμός για την εμφάνιση της νόσου. Το πρώτο στοιχείο που υποστήριξε την συμμετοχή της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων στην PD παθογένεση, ήταν η ανεπάρκεια του συμπλόκου I στην μέλαινα ουσία ασθενών με PD (Schapira et al., 1990).

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της συμβολής των μιτοχονδρίων στην εμφάνιση της νόσου. Για το σκοπό αυτό αξιοποιήθηκε το κυτταρικό μοντέλο των κυτταροπλασματικών υβριδίων (cybrids), το οποίο επιτρέπει την μελέτη της επίδρασης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος στην κυτταρική φυσιολογία και χρησιμοποιείται στην έρευνα νευροεκφυλιστικών αλλά και άλλων ασθενειών. Συγκεκριμένα, για τη δημιουργία των κυτταροπλασματικών υβριδίων χρησιμοποιήθηκαν μιτοχόνδρια από μία οικογένεια με ιστορικό της κληρονομικής μορφής της νόσου, προκειμένου να ερευνηθεί η επίδραση των μιτοχονδρίων διαφορετικής προέλευσης στον φαινότυπο κυττάρων με το ίδιο πυρηνικό υπόβαθρο.

Ο χαρακτηρισμός του μοντέλου επιβεβαίωσε την επιτυχή δημιουργία των cybrids και ανέδειξε δύο σημαντικά SNPs: το m.1217G>A (κύτταρα ασθενούς IV2 και IV5), και το m.6457T>C (κύτταρα IV2 και IV4). Τα κύτταρα βρέθηκε ότι διατηρούν την ίδια ποσότητα μιτοχονδριακού περιεχομένου, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι οι διαφορές που παρουσίασαν δεν οφείλονται στην ποσότητα των μιτοχονδρίων τους αλλά στην ποιότητα αυτών. Τα κύτταρα IV2 και IV4 παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα του συμπλόκου I της ETC, κάτι που φαίνεται να συνδέεται με την μεταλλαγή m.6457T>C, που φέρουν αυτά τα κύτταρα. Η μεταλλαγή αυτή βρίσκεται στο εσωτερικό του γονιδίου που κωδικοποιεί την υπομονάδα I της οξειδάσης του κυτοχρώματος C (σύμπλοκο I). Είναι πιθανό να έχει οδηγήσει σε αλλαγή της

στερεοδιαμόρφωσης ή/και μείωση της δραστηριότητας της υπομονάδας I, την οποία το κύτταρο προσπαθεί να αντισταθμίσει αυξάνοντας τα πρωτεϊνικά της επίπεδα. Η μειωμένη δραστηριότητα του συμπλόκου I σχετίζεται άμεσα με την νόσο του Parkinson.

Η προσθήκη της τοξίνης 6-OHDA, προκάλεσε την ενεργοποίηση των μονοπατιών της απόπτωσης και της αυτοφαγίας, καθώς και αυτό του θερμικού σοκ. Οι cybrids κυτταρικές σειρές εμφανίζουν την ίδια απόκριση στο στρες με τις σειρές ελέγχου για τις παραπάνω διαδικασίες. Αυτό υποδεικνύει ότι τα διαφορετικά τους μιτοχόνδρια δεν είναι επαρκή για να επηρεάσουν αυτά τα απαραίτητα για την επιβίωση κυτταρικά μονοπάτια.

Τα κύτταρα IV2 και IV5, βρέθηκε πως είναι πιο ευαίσθητα συγκριτικά με τα υπόλοιπα, καθώς εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα του δείκτη μιτοχονδριακής βιογένεσης PGC-1a, όπως επίσης και διαταραγμένη μιτοχονδριακή μεταφορά της πρωτεΐνης αυτής. Ο PGC-1a κατανέμεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στα μιτοχόνδρια, ενώ τα επίπεδά του είναι υψηλότερα στο μιτοχονδριακό εκχύλισμα ενδεικτικό της δράσης του παράγοντα αυτού στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Αυτό όμως δεν συμβαίνει στα δύο αδέρφια IV2 και IV5 όπου τα επίπεδα της πρωτεΐνης είναι ίσα στο μιτοχονδριακό και το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα. Η μείωση αυτή των επιπέδων του PGC-1a στο μιτοχονδριακό εκχύλισμα φανερώνει πιθανά την μείωση της ικανότητας εισόδου του παράγοντα αυτού στο μιτοχόνδριο. Το γεγονός ότι ένας μεταγραφικός παράγοντας εισέρχεται στο μιτοχόνδριο δεν αποτελεί έκπληξη, καθώς είναι γνωστό ότι αρκετοί πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες έχουν χαρακτηριστεί ως άμεσοι ρυθμιστές της έκφρασης μιτοχονδριακών γονιδίων όπως ο CREB, ο p53 κ.α. (Leigh-Brown et al., 2010). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο PGC-1a έχει προστατευτικό ρόλο στην PD. Η έκφραση πολλών γονιδίων στόχων του, μειώνεται σε ασθενείς με PD (Zheng et al., 2010) και έχει παρατηρηθεί ότι τα knock-out ποντίκια είναι πιο ευαίσθητα στο MPTP, ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για μοντελοποίηση της νόσου PD (St-Pierre et al., 2006). Η μείωση της πρωτεΐνης αυτής στα κύτταρα δείχνει ότι είναι πιο ευάλωτα στο στρες και κατ'επέκταση στον νευρικό θάνατο. Επιπλέον, παρουσιάζεται η ικανότητα εισαγωγής του PGC-1a στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου και άρα η πιθανή δράση του εκεί, μέσω τις δέσμευσής του σε ειδικές περιοχές του μιτοχονδριακού γονιδιώματος καθώς αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα. Μέχρι στιγμής αυτός ο ρόλος του PGC-1a δεν είναι γνωστός βιβλιογραφικά.

Η ευαισθησία των κυττάρων IV2 και IV5, αναδεικνύεται επίσης από το γεγονός ότι εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα της  $\alpha$ -synuclein παρουσία και απουσία στρες. Επιπλέον, στα κύτταρα IV2 (της ασθενούς), η μονομερής μορφή της  $\alpha$ -syn απουσιάζει από τα μιτοχόνδρια. Η απουσία αυτή οφείλεται πιθανά είτε στην αδυναμία εισόδου του μορίου αυτού στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου είτε στην συσσωμάτωσή της στο εσωτερικό του, που όμως δεν μπορεί να ανιχνευτεί παρά μόνο με την χρήση ειδικού αντισώματος. Είναι γνωστό ότι η συσσωμάτωση της  $\alpha$ -synuclein οδηγεί σε δυσλειτουργία του συμπλόκου I και επηρεάζει σημαντικά την ομοιόσταση των μιτοχονδρίων. Επιπλέον, τα κύτταρα IV2, παρουσιάζουν μειωμένη έκλυση του cytochrome C στο κυτταρόπλασμα παρουσία τοξίνης. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται είτε σε δυσλειτουργία της οξειδάσης του κυτοχρώματος C που είναι υπεύθυνη για την έξοδό του από το μιτοχόνδριο ή σε γενικότερη μειωμένη δραστηριότητα της αναπνευστικής αλυσίδας.

Στον έλεγχο της υπόθεσης της ανθεκτικότητας στην ινσουλίνη, τα κύτταρα IV4 παρουσίασαν μειωμένη απόκριση στην προσθήκη του αναπτυξιακού παράγοντα IGF-1. Η ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη (insulin resistance, IR) είναι μια παθολογική κατάσταση στην οποία τα κύτταρα του σώματος αποτυγχάνουν να ανταποκριθούν φυσιολογικά στην ορμόνη. Η ινσουλίνη διαπερνά τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό και επηρεάζει ένα μεγάλο αριθμό διεργασιών του εγκεφάλου όπως η ρύθμιση της επιβίωσης των νευρικών κυττάρων, η νευροδιαβίβαση και η διατήρηση της καλής κατάστασης των συνάψεων, στοιχεία απαραίτητα για την ομαλή λειτουργία του εγκεφάλου. Ολοένα και περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι διαδικασίες ανάλογες με αυτές που διέπουν την ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη στην περιφέρεια συμβαίνουν και στον εγκέφαλο ασθενών με PD που δεν είναι διαβητικοί (Athauda and Foltynie, 2016). Το αποτέλεσμα αυτό, φαίνεται να επιβεβαιώνει την ύπαρξη της ανθεκτικότητας στην ινσουλίνη, δυστυχώς όμως δεν έγινε και σε μεγαλύτερη γενεά ώστε να μπορέσουμε να δούμε αν διατηρείται με το πέρασμα του χρόνου

Συμπερασματικά, παρατηρούμε ότι οι υβριδικές κυτταρικές σειρές που δημιουργήσαμε, οι οποίες βρίσκονται υπό τον έλεγχο ενός κοινού πυρηνικού γενετικού και περιβαλλοντικού υποβάθρου και διαφέρουν μεταξύ τους μόνο στην πηγή των μιτοχονδριακών γονιδίων τους κατάφεραν να παρουσιάσουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Οι διαφορές αυτές οφείλονται αποκλειστικά στο mtDNA του κάθε δότη. Τα άτομα του δέντρου έχουν ανά δύο το ίδιο mtDNA το οποίο και έχουν κληρονομήσει από την μητέρα τους· τα IV2 και IV5 άτομα είναι αδέρφια, ενώ τα IV4

και V9, μάνα και κόρη αντίστοιχα. Η μόνη διαφορά είναι ότι τα άτομα IV2 και IV4 φέρουν την ετεροπλάσμια m.6457T>C και έχουν την μετάλλαξη A53T της *α-synuclein* στον πυρήνα τους.

Τα κύτταρα των ατόμων IV4 και V9, παρά το κοινό τους mtDNA παρουσίασαν πολλές διαφορές μεταξύ τους, κυρίως στη γενεά P:13. Τα IV4 μάλιστα ήταν αυτά που εμφάνισαν διαφορετικό φαινότυπο σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα cybrids στη γενεά P:13, οι οποίες όμως εξομαλύνθηκαν αργότερα στη γενεά P:22. Επιπλέον τα κύτταρα IV4 ήταν τα μόνα που εμφάνισαν μειωμένη απόκριση στον IGF-1.

Τα κύτταρα των ατόμων IV2 και IV5, εμφάνισαν σχεδόν τον ίδιο φαινότυπο για όλα τα μόρια που ελέγχθηκαν. Παρουσιάστηκαν δηλαδή, πιο ευαίσθητα στο στρες σε σχέση με τα υπόλοιπα, αλλά διαφοροποιήθηκαν στην ικανότητά τους να μεταφέρουν πρωτεΐνες εντός και εκτός του μιτοχονδρίου. Εκεί μάλιστα, διαφοροποιήθηκαν τα κύτταρα της ασθενούς με PD (IV2) από όλα τα υπόλοιπα καθώς εμφάνισαν δυσλειτουργία του μονοπατιού αυτού, αναδεικνύοντας την σημασία της δυσλειτουργικής μεταφοράς πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο για την εμφάνιση της νόσου PD.

Οι πολύ μικρές διαφορές λοιπόν, των ατόμων στο mtDNA τους δεν επαρκούν για την εξήγηση των σημαντικών φαινοτυπικών διαφορών που εμφανίζουν τα κύτταρα αυτά. Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να θυμηθούμε και μία ακόμη διαφορά που εμφανίζουν. Τα μιτοχόνδρια των ατόμων IV2 και IV4 βρισκόντουσαν υπό τον έλεγχο ενός πυρηνικού γονιδιώματος που έφερε την μετάλλαξη A53T της *α-synuclein*, η οποία έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση της οικογενούς μορφής της νόσου PD. Από το γεγονός αυτό προκύπτει η υπόθεση ότι τα μιτοχόνδρια αυτά ζώντας σε ένα περιβάλλον με επιπλέον «γονιδιακή πίεση» συσώρευσαν σχετιζόμενες επιγενετικές αλλαγές στο γονιδίωμά τους. Οι αλλαγές αυτές όπως φάνηκε ήταν αρκετές ώστε να διαφοροποιήσουν τον φαινότυπο των κυττάρων αυτών από κύτταρα που φέρουν το ίδιο mtDNA αλλά δεν έχουν ζήσει σε επιβαρυσμένο περιβάλλον.

Η συγκεκριμένη μελέτη λοιπόν, ανέδειξε συνολικά την ικανότητα των μιτοχονδριακών αλλαγών, τόσο μέσω σημειακών μεταλλάξεων όσο και πιθανών επιγενετικών τροποποιήσεων, να επιδρούν στην έκφραση πυρηνικών γονιδίων και να καθορίζουν με αυτόν τον τρόπο την μοίρα ολόκληρου του κυττάρου. Ωστόσο, κρίνεται απαραίτητος ο πιο ειδικός έλεγχος του περιεχομένου mtDNA των cybrids με

μία πιο ευαίσθητη μέθοδο ανάλυσης ολικής σάρωσης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Ο έλεγχος αυτός θα μπορέσει να αποκαλύψει πιθανές ετεροπλασμίες που βρίσκονται σε μικρότερο ποσοστό στα κύτταρα αλλά και να δώσει το ποσοστό των ετεροπλασμιών που έχουν ήδη βρεθεί. Το ποσοστό της ετεροπλασμίας καθορίζει την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων και διαφέρει για κάθε μεταλλαγή. Ο πιο λεπτομερής λοιπόν έλεγχος του mtDNA θα δώσει μια ξεκάθαρη εικόνα των χαρακτηριστικών αλλαγών και της έκτασης τους, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την φαινοτυπική διαφοροποίηση των κυττάρων που μελετήθηκαν.

## **BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ**

**Alam TI, Kanki T, Muta T, Ukaji K, Abe Y, Nakayama H, Takio K, Hamasaki N, Kang D**, Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. Nucleic Acids Res. 2003 Mar 15;31(6):1640-5.

**Alberio T, Fasano M**, Proteomics in Parkinson's disease: an unbiased approach towards peripheral biomarkers and new therapies. J Biotechnol. 2011 Dec 20;156(4):325-37.

**Alberio T, Lopiano L, Fasano M**, Cellular models to investigate biochemical pathways in Parkinson's disease. FEBS J. 2012 Apr;279(7):1146-55.

**Alberts B, Johnson A, Lewis J et al**, Molecular Biology of the Cell. 4th edition. 2002 (chapter 14).

**Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG**, Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 1981 Apr 9;290(5806):457-65.

**Antico Arciuch VG, Galli S, Franco MC, Lam PY, Cadenas E, Carreras MC, Poderoso JJ**, Akt1 intramitochondrial cycling is a crucial step in the redox modulation of cell cycle progression. PLoS One. 2009 Oct 21;4(10):e7523.

**Arduino DM, Esteves AR, Swerdlow RH, Cardoso SM**, A cybrid cell model for the assessment of the link between mitochondrial deficits and sporadic Parkinson's disease. Methods Mol Biol. 2015;1265:415-24.

**Athauda D, Foltynie T**, Insulin resistance and Parkinson's disease: A new target for disease modification? Prog Neurobiol. 2016 Oct - Nov;145-146:98-120.

**Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM, Bonini NM**, Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a Drosophila model for Parkinson's disease. Science. 2002 Feb 1;295(5556):865-8.

**Bellizzi D, D'Aquila P, Scafone T, Giordano M, Riso V, Riccio A, Passarino G**, The control region of mitochondrial DNA shows an unusual CpG and non-CpG methylation pattern. DNA Res. 2013 Dec;20(6):537-47.

**Bellucci A, Zaltieri M, Navarria L, Grigoletto J, Missale C, Spano P**, From  $\alpha$ -synuclein to synaptic dysfunctions: new insights into the pathophysiology of Parkinson's disease. Brain Res. 2012 Oct 2;1476:183-202.

**Biedler JL, Helson L, Spengler BA**, Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. Cancer Res. 1973 Nov;33(11):2643-52.

**Bijur GN, Jope RS**, Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. J Neurochem. 2003 Dec;87(6):1427-35.

**Bisaglia M, Mammi S, Bubacco L**, Structural insights on physiological functions and pathological effects of alpha-synuclein. FASEB J. 2009 Feb;23(2):329-40.

**Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM**, Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. Prog Neurobiol. 2001 Oct;65(2):135-72.

**Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseume E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J**, Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. J Clin Invest. 2008 Feb;118(2):789-800.

**Bosco D, Plastino M, Cristiano D, Colica C, Ermio C, De Bartolo M, Mungari P, Fonte G, Consoli D, Consoli A, Fava A**, Dementia is associated with insulin resistance in patients with Parkinson's disease. J Neurol Sci. 2012 Apr 15;315(1-2):39-43.

**Bose A, Beal MF**, Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. J Neurochem. 2016 Oct;139 Suppl 1:216-231.

**Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC**, Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. Science. 2010 Sep 24;329(5999):1663-7.

**Butler B, Sambo D, Khoshbouei H**, Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission, J Chem Neuroanat. 2017 Oct;83-84:41-49.

**Camilleri A, Vassallo N**, The centrality of mitochondria in the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. CNS Neurosci Ther. 2014 Jul;20(7):591-602.

**Cheng Z, Tseng Y, White MF**, Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. Trends Endocrinol Metab. 2010 Oct;21(10):589-98.

**Chestnut BA, Chang Q, Price A, Lesuisse C, Wong M, Martin LJ**, Epigenetic regulation of motor neuron cell death through DNA methylation. J Neurosci. 2011 Nov 16;31(46):16619-36.

**Chial, H, Craig J**, mtDNA and Mitochondrial Diseases. Nature Education. 2008 1(1), 217.



**Chinta SJ1, Mallajosyula JK, Rane A, Andersen JK,** Mitochondrial  $\alpha$ -synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. Neurosci Lett. 2010 Dec 17;486(3):235-9.

**Chung JY, Lee SJ, Lee SH, Jung YS, Ha NC, Seol W, Park BJ,** Direct interaction of  $\alpha$ -synuclein and AKT regulates IGF-1 signaling: implication of Parkinson disease. Neurosignals. 2011;19(2):86-96.

**Clayton DA,** Transcription and replication of mitochondrial DNA. Hum Reprod. 2000 Jul;15 Suppl 2:11-7.

**Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, Cagsal-Getkin O, Winslow AR, Zhu L, Vanderburg CR, McLean PJ,** Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. Mol Neurodegener. 2012 Aug 24;7:42.

**Dawid IB,** 5-methylcytidylic acid: absence from mitochondrial DNA of frogs and HeLa cells. Science. 1974 Apr 5;184(4132):80-1.

**De Keyser J, Wilczak N, De Backer JP, Herroelen L, Vauquelin G,** Insulin-like growth factor-I receptors in human brain and pituitary gland: an autoradiographic study. Synapse. 1994 Jul;17(3):196-202.

**Deleersnijder A, Gerard M, Debyser Z, Baekelandt V,** The remarkable conformational plasticity of alpha-synuclein: blessing or curse? Trends Mol Med. 2013 Jun;19(6):368-77.

**Devasagayam TP, Boloor KK, Ramasarma T,** Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. Indian J Biochem Biophys. 2003 Oct;40(5):300-8.

**Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK,** Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. J Biol Chem. 2008 Apr 4;283(14):9089-100.

**Di Maio R, Barrett PJ, Hoffman EK, Barrett CW, Zharikov A, Borah A, Hu X, McCoy J, Chu CT, Burton EA, Hastings TG, Greenamyre JT,**  $\alpha$ -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. Sci Transl Med. 2016 Jun 8;8(342):342ra78.

**Dimauro S, Davidzon G,** Mitochondrial DNA and disease. Ann Med. 2005;37(3):222-32.

**Dorn GW,** Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change. EMBO Mol Med. 2015 Jul;7(7):865-77.

**Dupont C, Armant DR, Brenner CA**, Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. Semin Reprod Med. 2009 Sep;27(5):351-7.

**Dzitoyeva S, Chen H, Manev H**, Effect of aging on 5-hydroxymethylcytosine in brain mitochondria. Neurobiol Aging. 2012 Dec;33(12):2881-91.

**Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS**, Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutat Res. 2004 Sep;567(1):1-61.

**Faustini G, Bono F, Valerio A, Pizzi M, Spano P, Bellucci A**, Mitochondria and  $\alpha$ -Synuclein: Friends or Foes in the Pathogenesis of Parkinson's Disease? Genes (Basel). 2017 Dec 8;8(12). pii: E377.

**Feng LR, Federoff HJ, Vicini S, Maguire-Zeiss KA**, Alpha-synuclein mediates alterations in membrane conductance: a potential role for alpha-synuclein oligomers in cell vulnerability. Eur J Neurosci. 2010 Jul;32(1):10-7.

**Forno LS**, Neuropathology of Parkinson's disease. J Neuropathol Exp Neurol. 1996 Mar;55(3):259-72.

**Glinka YY, Youdim MB**, Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. Eur J Pharmacol. 1995 Mar 16;292(3-4):329-32.

**Ghosh SS, Swerdlow RH, Miller SW, Sheeman B, Parker WD Jr, Davis RE**, 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. 1999;893:176-91.

**Halliwell B and Gutteridge J. M. C**, Free Radicals in Biology and Medicine. 1999 Oxford University Press.

**Heras-Sandoval D, Pérez-Rojas JM, Hernández-Damián J, Pedraza-Chaverri J**, The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. Cell Signal. 2014 Dec;26(12):2694-701.

**Hu Q, Wang G**, Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Transl Neurodegener. 2016 Jul 22;5:14.

**Hong EE, Okitsu CY, Smith AD, Hsieh CL**, Regionally specific and genome-wide analyses conclusively demonstrate the absence of CpG methylation in human mitochondrial DNA. Mol Cell Biol. 2013 Jul;33(14):2683-90.

**Infantino V, Castegna A, Iacobazzi F, Spera I, Scala I, Andria G, Iacobazzi V**, Impairment of methyl cycle affects mitochondrial methyl availability and glutathione level in Down's syndrome. Mol Genet Metab. 2011 Mar;102(3):378-82.

**Jain N, Bhasne K, Hemaswathi M, Mukhopadhyay S**, Structural and dynamical insights into the membrane-bound  $\alpha$ -synuclein. PLoS One. 2013 Dec 20;8(12):e83752.

**Jankovic J**, Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2008 Apr;79(4):368-76.

**Joshua M. Shulman, Philip L. De Jager and Mel B. Feany**, Parkinson's Disease: Genetics and Pathogenesis. Annu Rev Pathol. 2011;6:193-222.

**Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM**, Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature. 2006 Dec 14;444(7121):840-6.

**Kooijman R**, Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I. Cytokine Growth Factor Rev. 2006 Aug;17(4):305-23.

**Kuznetsov AV, Hermann M, Saks V, Hengster P, Margreiter R**, The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. Int J Biochem Cell Biol. 2009 Oct;41(10):1928-39.

**Kwok JB, Hallupp M, Loy CT, Chan DK, Woo J, Mellick GD, Buchanan DD, Silburn PA, Halliday GM, Schofield PR**, GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. Ann Neurol. 2005 Dec;58(6):829-39.

**Lai L, Wang M, Martin OJ, Leone TC, Vega RB, Han X, Kelly DP**, A role for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 (PGC-1) in the regulation of cardiac mitochondrial phospholipid biosynthesis. J Biol Chem. 2014 Jan 24;289(4):2250-9.

**Lavedan C**, The synuclein family. Genome Res. 1998 Sep;8(9):871-80.

**Legros F, Malka F, Frachon P, Lombès A, Rojo M**, Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. J Cell Sci. 2004 Jun 1;117(Pt 13):2653-62.

**Leigh-Brown S, Enriquez JA, Odom DT**, Nuclear transcription factors in mammalian mitochondria. Genome Biol. 2010;11(7):215.

**Leng S, Zhang W, Zheng Y, Liberman Z, Rhodes CJ, Eldar-Finkelman H, Sun XJ**, Glycogen synthase kinase 3 beta mediates high glucose-induced ubiquitination and proteasome degradation of insulin receptor substrate 1. J Endocrinol. 2010 Aug;206(2):171-81.

**Levin BE**, Glucose-regulated dopamine release from substantia nigra neurons. Brain Res. 2000 Aug 25;874(2):158-64.

**Mahadev K, Wu X, Zilbering A, Zhu L, Lawrence JT, Goldstein BJ**, Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the

distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem. 2001 Dec 28;276(52):48662-9.

**Maiti P, Manna J, Dunbar GL**, Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments. Transl Neurodegener. 2017 Oct 25;6:28.

**Marella M, Seo BB, Yagi T, Matsuno-Yagi A**, Parkinson's disease and mitochondrial complex I: a perspective on the Ndi1 therapy. J Bioenerg Biomembr. 2009 Dec;41(6):493-7.

**Margulis L**, Recombination of non-chromosomal genes in Chlamydomonas: assortment of mitochondria and chloroplasts? J Theor Biol. 1970 Feb;26 (2):337-42.

**Ménard G, Evrard B, Bureau M, Trottier S**, Cerebral distribution of the B-36 VDAC protein in rat, cow and man brain: immunocytochemical study. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 1994 May;40(3):295-300.

**Monique G.P. van der Wijst and Marianne G. Rots**, Mitochondrial epigenetics: an overlooked layer of regulation? Trends Genet. 2015 Jul;31(7):353-6.

**Moon HE, Paek SH**, Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. Exp Neurobiol. 2015 Jun;24(2):103-16.

**Murphy MP**, How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J. 2009 Jan 1;417(1):1-13.

**Musgrove RE, King AE, Dickson TC**,  $\alpha$ -Synuclein protects neurons from apoptosis downstream of free-radical production through modulation of the MAPK signalling pathway. Neurotox Res. 2013 May;23(4):358-69.

**Nass MM**, Differential methylation of mitochondrial and nuclear DNA in cultured mouse, hamster and virus-transformed hamster cells. In vivo and in vitro methylation. J Mol Biol. 1973 Oct 15;80(1):155-75.

**Nicholls TJ, Minczuk M**, In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. Exp Gerontol. 2014 Aug;56:175-81.

**Orrenius S, Zhivotovsky B**, Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free. Nat Chem Biol. 2005 Sep;1(4):188-9.

**Oyarce AM, Fleming PJ**, Multiple forms of human dopamine beta-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. Arch Biochem Biophys. 1991 Nov 1;290(2):503-10.

**Papapetropoulos S, Paschalis C, Athanassiadou A, Papadimitriou A, Ellul J, Polymeropoulos MH, Papapetropoulos T**, Clinical phenotype in patients with

alpha-synuclein Parkinson's disease living in Greece in comparison with patients with sporadic Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2001 May;70(5):662-5.

**Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P**, Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. Cell Mol Life Sci. 2008 Apr;65(7-8):1272-84.

**Picca A, Lezza AM**, Regulation of mitochondrial biogenesis through TFAM-mitochondrial DNA interactions: Useful insights from aging and calorie restriction studies. Mitochondrion. 2015 Nov;25:67-75.

**Pollack Y, Kasir J, Shemer R, Metzger S, Szyf M**, Methylation pattern of mouse mitochondrial DNA. Nucleic Acids Res. 1984 Jun 25;12(12):4811-24.

**Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL**, Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science. 1997 Jun 27;276(5321):2045-7.

**Pozo Devoto VM, Dimopoulos N, Alloatti M, Pardi MB, Saez TM, Otero MG, Cromberg LE, Marín-Burgin A, Scassa ME, Stokin GB, Schinder AF, Sevlever G, Falzone TL**,  $\alpha$ Synuclein control of mitochondrial homeostasis in human-derived neurons is disrupted by mutations associated with Parkinson's disease. Sci Rep. 2017 Jul 11;7(1):5042.

**Pugsley HR**, Assessing Autophagic Flux by Measuring LC3, p62, and LAMP1 Co-localization Using Multispectral Imaging Flow Cytometry. J Vis Exp. 2017 Jul 21;(125).

**Rigoulet M, Yoboue ED, Devin A**, Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling. Antioxid Redox Signal. 2011 Feb 1;14(3):459-68.

**Ross CA, Poirier MA**, Protein aggregation and neurodegenerative disease. Nat Med. 2004 Jul;10 Suppl:S10-7.

**Sampson MJ, Lovell RS, Craigen WJ**, The murine voltage-dependent anion channel gene family. Conserved structure and function. J Biol Chem. 1997 Jul 25;272(30):18966-73.

**Santiago JA, Potashkin JA**, Shared dysregulated pathways lead to Parkinson's disease and diabetes. Trends Mol Med. 2013 Mar;19(3):176-86.

**Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD,** Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. J Neurochem. 1990 Mar;54(3):823-7.

**Shock LS, Thakkar PV, Peterson EJ, Moran RG, Taylor SM,** DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 1;108(9):3630-5.

**Simola N, Morelli M, Carta AR,** The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. Neurotox Res. 2007 Apr;11(3-4):151-67.

**Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M,** alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 May 26;95 (11):6469-73.

**St-Pierre J1, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM,** Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. Cell. 2006 Oct 20;127(2):397-408.

**Stimpfel M, Jancar N, Virant-Klun I,** New Challenge: Mitochondrial Epigenetics? Stem Cell Rev. 2018 Feb;14(1):13-26.

**Storch A, Kaftan A, Burkhardt K, Schwarz J,** 6-Hydroxydopamine toxicity towards human SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells: independent of mitochondrial energy metabolism. J Neural Transm (Vienna). 2000;107 (3):281-93.

**Storozhevych TP, Senilova YE, Persiyantseva NA, Pinelis VG, Pomytkin IA,** Mitochondrial respiratory chain is involved in insulin-stimulated hydrogen peroxide production and plays an integral role in insulin receptor autophosphorylation in neurons. BMC Neurosci. 2007 Oct 8;8:84.

**Swerdlow RH, Parks JK, Miller SW, Tuttle JB, Trimmer PA, Sheehan JP, Bennett JP Jr, Davis RE, Parker WD Jr,** Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. Ann Neurol. 1996 Oct;40(4):663-71.

**Szweda PA, Friguet B, Szweda LI,** Proteolysis, free radicals, and aging. Free Radic Biol Med. 2002 Jul 1;33(1):29-36.

**Takahashi M, Yamada T, Tooyama I, Moroo I, Kimura H, Yamamoto T, Okada H,** Insulin receptor mRNA in the substantia nigra in Parkinson's disease. Neurosci Lett. 1996 Feb 9;204(3):201-4.

**Takahashi T1, Deng Y, Maruyama W, Dostert P, Kawai M, Naoi M,** 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. 1994;98 (2):107-18.

**Tapias V, Hu X, Luk KC, Sanders LH3, Lee VM, Greenamyre JT,** Synthetic alpha-synuclein fibrils cause mitochondrial impairment and selective dopamine neurodegeneration in part via iNOS-mediated nitric oxide production. Cell Mol Life Sci. 2017 Aug;74(15):2851-2874.

**Trejo JL, Carro E, Garcia-Galloway E, Torres-Aleman I,** Role of insulin-like growth factor I signaling in neurodegenerative diseases. J Mol Med (Berl). 2004 Mar;82(3):156-62.

**Trimmer PA, Bennett JP Jr,** The cybrid model of sporadic Parkinson's disease. Exp Neurol. 2009 Aug;218(2):320-5.

**Tsigelny IF, Sharikov Y, Wrasidlo W, Gonzalez T, Desplats PA, Crews L, Spencer B, Masliah E,** Role of  $\alpha$ -synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation. FEBS J. 2012 Mar;279(6):1000-13.

**Uhl GR,** Hypothesis: the role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease. Ann Neurol. 1998 May;43(5):555-60.

**Vardatsikos G, Sahu A, Srivastava AK,** The insulin-like growth factor family: molecular mechanisms, redox regulation, and clinical implications. Antioxid Redox Signal. 2009 May;11(5):1165-90.

**Vasili E,** 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. Διδακτορική Διατριβή, 2016

**van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Haines JL, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A, Hiner BC, Jankovic J, Ondo WG, Allen FH Jr, Goetz CG, Small GW, Mastaglia F, Stajich JM, McLaurin AC, Middleton LT, Scott BL, Schmechel DE, Pericak-Vance MA, Vance JM,** Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. Am J Hum Genet. 2003 Apr;72(4):804-11.

**Wanrooij S, Falkenberg M,** The human mitochondrial replication fork in health and disease. Biochim Biophys Acta. 2010 Aug;1797(8):1378-88.

**Wiedemann N, Frazier AE, Pfanner N,** The protein import machinery of mitochondria. J Biol Chem. 2004 Apr 9;279(15):14473-6.

**Wilkins HM, Carl SM, Swerdlow RH**, Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrialopathies. Redox Biol. 2014;2:619-31.

**William Dauer and Serge Przedborski**, Parkinson's Disease: Mechanisms and Models, Neuron. 2003 Sep 11;39(6):889-909.

**Wong M, Gertz B, Chestnut BA, Martin LJ**, Mitochondrial DNMT3A and DNA methylation in skeletal muscle and CNS of transgenic mouse models of ALS. Front Cell Neurosci. 2013 Dec 25;7:279.

**Xie HR1, Hu LS, Li GY**, SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Chin Med J (Engl). 2010 Apr 20;123(8):1086-92.

**Xu L, Pu J**, Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: From Pathogenetic Dysfunction to Potential Clinical Application. Parkinsons Dis. 2016;2016:17 20621.

**Yellen G**, Fueling thought: Management of glycolysis and oxidative phosphorylation in neuronal metabolism. J Cell Biol. 2018 Jul 2;217(7):2235-2246.

**Zaltieri M, Longhena F, Pizzi M, Missale C, Spano P, Bellucci A**, Mitochondrial Dysfunction and  $\alpha$ -Synuclein Synaptic Pathology in Parkinson's Disease: Who's on First? Parkinsons Dis. 2015;2015:108029.

**Zheng B, Liao Z, Locascio JJ, Lesniak KA, Roderick SS, Watt ML, Eklund AC, Zhang-James Y, Kim PD, Hauser MA, Grünblatt E, Moran LB, Mandel SA, Riederer P, Miller RM, Federoff HJ, Wüllner U, Papapetropoulos S, Youdim MB, Cantuti-Castelvetri I, Young AB, Vance JM, Davis RL, Hedreen JC, Adler CH, Beach TG, Graeber MB, Middleton FA, Rochet JC, Scherzer CR; Global PD Gene Expression (GPEX) Consortium.** PGC-1 $\alpha$ , a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. Sci Transl Med. 2010 Oct 6;2(52):52ra73.