



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

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗΣ**  
**ΣΤΟΝ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕ**  
**ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

**ΣΦΗΚΑΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ**  
**ΙΑΤΡΟΣ & ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**

---



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

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗΣ**  
**ΣΤΟΝ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΑ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕ**  
**ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

**ΣΦΗΚΑΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ**  
**ΙΑΤΡΟΣ & ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**

---

Ιωάννινα, 5 Σεπτεμβρίου 2018

Αρ. Πρωτ.: 7

Δ/ΝΣΗ: Παν/πολη Ιωαννίνων, 451 10  
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: (26510) 07265, 07336  
FAX: (26510) 07064  
ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ: Άννα Υφαντή  
e-mail: grambet@cc.uoi.gr

### Β Ε Β Α Ι Ω Σ Η

Βεβαιώνεται ότι ο κ. **Ευάγγελος Σφήκας** του **Νικολάου**, με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνοψης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών (Συνεδρία αριθμ. 185/09-03-2012), έχει γίνει δεκτός για την εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής, σύμφωνα με τον νόμο 3685/2008, άρθρο 9, και τα οριζόμενα στον Κανονισμό Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος, με Επιβλέπουσα την κα. Αμαλία Αφένδρα, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος.

Με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνοψης του Τμήματος (Συνεδρία αριθμ. 200/11-01-2013):

α) ορίστηκε στον κ. Ευάγγελο Σφήκα **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**, αποτελούμενη από τους:

1. Αμαλία Αφένδρα, Επικ. Καθηγήτρια, Τμ. ΒΕΤ, Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Θεολόγο Μιχαηλίδη, Αναπλ. Καθηγητή, Τμ. ΒΕΤ, Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Ευστάθιο Χατζηλουκά, Αναπλ. Καθηγητή, Τμ. ΒΕΤ, Παν/μίου Ιωαννίνων

(β) ορίστηκε το ακόλουθο **θέμα** για τη διδακτορική του διατριβή: *“Μελέτη της ετερόλογης έκφρασης της α-σνονκλείνης στον ζυμομύκητα και της αλληλεπίδρασης της με ενδογενείς μεταβολικούς παράγοντες”*.

Η Γ.Σ.Ε.Σ. του Τμήματος ΒΕΤ στην συνεδρία της αριθμ. 256/20-07-2018, έχοντας υπόψη έγγραφο της τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής με το οποίο διαπιστώνει ότι η πειραματική πορεία της διδακτορικής διατριβής του κ. Σφήκα έχει ολοκληρωθεί, ενέκρινε την έναρξη συγγραφής της διδακτορικής του διατριβής.

Η χρονική διάρκεια για την απόκτηση του Διδακτορικού Διπλώματος δε μπορεί να υπερβαίνει τα δώδεκα (12) εξάμηνα και δε μπορεί να διαρκέσει λιγότερο από έξι (6) εξάμηνα από την ημερομηνία ορισμού της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής.

Η βεβαίωση αυτή χορηγείται στον ενδιαφερόμενο για κάθε χρήση.



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

Προς τους κ.κ.:

1. **Αμαλία-Σοφία Αφένδρα**, Επίκουρη Καθηγήτρια με γνωστικό αντικείμενο «Μικροβιακή Γενετική», Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων - Επιβλέπουσα
2. **Θεολόγο Μιχαηλίδη**, Αναπληρωτή Καθηγητή με γνωστικό αντικείμενο «Μοριακή Γενετική», Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων - Μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής
3. **Ευστάθιο Χατζηλουκά**, Αναπληρωτή Καθηγητή με γνωστικό αντικείμενο «Μοριακή Βιολογία κατά προτίμηση στη Μοριακή Μικροβιολογία», Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων - Μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής
4. **Γεώργιο Θυφρονίτη**, Καθηγητή με γνωστικό αντικείμενο «Κυτταρική & Μοριακή Ανοσολογία», Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. **Δουρής Βασίλειος**, Επίκουρο Καθηγητή με γνωστικό αντικείμενο «Μοριακή Βιολογία», Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. **Μαριρένα Γρηγορίου**, Καθηγήτρια με γνωστικό αντικείμενο «Μοριακή Βιολογία-Αναπτυξιακή Βιολογία», Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης
7. **Αικατερίνη Παλαιολόγου**, Επίκουρη Καθηγήτρια με γνωστικό αντικείμενο «Μοριακή και Κυτταρική Βιολογία με έμφαση στο νευρικό σύστημα», Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης

Θέμα: «Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής του κου Ευάγγελου Σφήκα»

Σας γνωρίζουμε ότι η Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύθεσης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών στη συνεδρίασή της αριθμ. 272/15-11-2019, σας όρισε μέλη της 7μελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την κρίση της διδακτορικής διατριβής που εκπόνησε ο υποψήφιος διδάκτορας κος Ευάγγελος Σφήκας με τίτλο *«Μελέτη της ετερόλογης έκφρασης της α-συνουκλείνης στον ζυμομύκητα και της αλληλεπίδρασής της με ενδογενείς μεταβολικούς παράγοντες»*.

Με εντολή Προέδρου  
Η Γραμματέας του Τμήματος  
ANNA YΦANTH

Κοινοποίηση:  
-Κον Ευάγγελο Σφήκα

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΤΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΣΦΗΚΑ, ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΥ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε σύμφωνα με την υπ' αριθμ. 425/18-11-2019 απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύθεσης του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την κρίση της διδακτορικής διατριβής του κ. Ευάγγελου Σφήκα, συνήλθε σε συνεδρίαση σήμερα στις 21-1-2020 και ώρα 10 πμ στην 1η Αίθουσα Κέντρου Διαχείρισης Δικτύων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και παρακολούθησε τη δημόσια παρουσίαση της διατριβής του υποψήφιου με τίτλο: «Μελέτη της ετερόλογης έκφρασης της α-συνουκλείνης στον ζυμομύκητα και της αλληλεπίδρασής της με ενδογενείς μεταβολικούς παράγοντες.»

Μετά την προφορική παρουσίαση της διατριβής τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής υπέβαλαν ερωτήσεις προς τον υποψήφιο, τόσο γενικού περιεχομένου, όσο και σχετικές με το θέμα της διατριβής. Στη συνέχεια και μετά την αποχώρηση του ακροατηρίου και του υποψηφίου, ακολούθησε διεξοδική συζήτηση μεταξύ των μελών της επιτροπής.


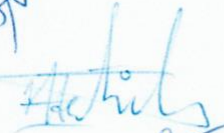





Τα μέλη της επιτροπής δήλωσαν ότι έμειναν απόλυτα ικανοποιημένα από την προφορική παρουσίαση, καθώς και τον όγκο και ποιότητα της ερευνητικής εργασίας.

Η επιτροπή μετά από ψηφοφορία έκρινε ομόφωνα μεταξύ των παρόντων ότι η διατριβή του κ. Ευάγγελου Σφήκα παρουσιάζει εξαιρετική πρωτοτυπία και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην επιστήμη, ο δε υποψήφιος απέκτησε τόσο τις γνώσεις, όσο και την τεχνική κατάρτιση, ώστε να προσεγγίζει με ωριμότητα σύγχρονα ερευνητικά προβλήματα του επιστημονικού του πεδίου.

Μετά από αυτά απεφάσισε ομόφωνα μεταξύ των παρόντων να απονεμίσει τη διατριβή με το βαθμό "άριστα".

Ιωάννινα, 21-1-2020

Η Επιτροπή

1. Αφένδρα Αμαλία-Σοφία, Επίκουρη Καθηγήτρια TBET ΠΙ 
2. Χατζηλουκάς Ευστάθιος, Αναπληρωτής Καθηγητής TBET ΠΙ 
3. Μιχαηλίδης Θεολόγος, Αναπληρωτής Καθηγητής TBET ΠΙ 
4. Ουφροντίτης Γεώργιος, Καθηγητής TBET ΠΙ 
5. Δουρής Βασίλειος, Επίκουρος Καθηγητής TBET ΠΙ 
6. Γρηγορίου Μαριρένα, Καθηγήτρια Τμήματος Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής ΔΠΘ   
Maria Grigoriou
7. Παλαιολόγου Αικατερίνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής ΔΠΘ 

**Αφιερώνεται στην οικογένειά μου**

---

**Η καλή ζωή είναι εκείνη που εμπνέεται από  
την αγάπη και καθοδηγείται από την γνώση.**

**Bertrand Russell**

Βρετανός φιλόσοφος, μαθηματικός και  
ειρηνιστής

---

## Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με τίτλο «Μελέτη της ετερόλογης έκφρασης της α-συνουκλεΐνης στον ζυμομύκητα και της αλληλεπίδρασής της με ενδογενείς μεταβολικούς παράγοντες».

Για την πραγματοποίησή της θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Αμαλία Σοφία Αφένδρα, η οποία αποτέλεσε και την επιβλέπουσα της παρούσας διατριβής. Την ευχαριστώ πολύ για τις γνώσεις που μου μετέδωσε, τις πολύτιμες συμβουλές της και την καθοδήγησή της, την στήριξή της, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την υπομονή και την κατανόηση ακόμη και στις δύσκολες στιγμές. Όλα αυτά έκαναν την συνεργασία μας εκτός από δημιουργική, ανθρώπινη και ευχάριστη.

Στην συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ευστάθιο Χατζηλουκά, ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για όλες τις πολύτιμες συμβουλές του, την καθοδήγησή του, τον χρόνο που μου αφιέρωσε σε πολλές περιπτώσεις, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την μεταξύ μας ερευνητική συνεργασία το έτος 2014-15 και την εκτίμησή του στο πρόσωπο μου.

Να ευχαριστήσω επίσης τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Θεολόγο Μιχαηλίδη, ως το τρίτο μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, για τις επίσης πολύτιμες συμβουλές του, τον χρόνο που έχει διαθέσει για εμένα, την εκτίμηση του σε μένα και την προσφορά του σε πολλά ζητήματα που πραγματοποιήθηκαν με την δική του συμβολή, τόσο σε επίπεδο ιδεών όσο και σε υλικό επίπεδο. Το αντικείμενο της διατριβής αυτής αποτέλεσε δική του πρωτοβουλία και χαίρομαι που συνέβαλα στην υλοποίηση μέρους αυτής.

Θερμές ευχαριστίες να αποδώσω επίσης στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σάββα Χριστοφορίδη και την Δρ. Δέσποινα Γκέκα για όλη την βοήθεια, την προσφορά τους και τον χρόνο που μου διέθεσαν για την χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στην Δρ. Μαρτίνα Σαμωτάκη από το Εργαστήριο Πρωτεϊνικής Χημείας του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», η οποία εργάστηκε για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν και αποτέλεσε πολύτιμη η συμβολή της στην ανακάλυψη σημαντικών και νέων στοιχείων. Την ευχαριστώ πολύ για την άψογη συνεργασία και την διάθεσή της να συμμετάσχει με προθυμία στο αίτημά μας.

Πολλές ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να αποδώσω στα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής της παρούσας διατριβής και αναφέρομαι στον Καθηγητή του TBET κ. Γεώργιο Ουφρονίτη, τον Επίκουρο Καθηγητή του TBET κ. Βασίλειο Δουρή, την Καθηγήτρια κα Μαριρένα Γρηγορίου και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Αικατερίνη Παλαιολόγου του Τμήματος Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Πανεπιστημίου Θράκης. Τους ευχαριστώ για την προθυμία τους και τον χρόνο που αφιέρωσαν στην αξιολόγηση της εν λόγω διατριβής.

---



Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον καθοδηγητή των πρώτων μου χρόνων στο εργαστήριο Δρ. Αναστάσιο Βασιλειάδη, ο οποίος με την υπομονή και την διάθεσή του με βοήθησε στις πρώτες μου πειραματικές δοκιμές και μου έδωσε σημαντική αυτοπεποίθηση για όλη την μετέπειτα πορεία μου. Εκτός από καθοδηγητή, χαίρομαι που απέκτησα έναν καλό φίλο στο πρόσωπό του.

Για την σημαντική καθοδήγηση την οποία έλαβα στην πρώτη μου επαφή με πειράματα πρωτεϊνών οφείλω να ευχαριστήσω την Δρ. Ευτυχία Βασίλη, με την βοήθεια της οποίας πραγματοποιήθηκαν τόσο υλικοτεχνικά όσο και διαδικαστικά οι πρώτες ανοσοαποτυπώσεις της παρούσας διατριβής.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω επίσης στην Δρ. Ευγενία Καραμπίκα για όλη την πολύτιμη βοήθειά της, τις συμβουλές της, τον χρόνο της και την υλικοτεχνική υποστήριξη στα νεότερα πειράματα των ανοσοαποτυπώσεων. Χαίρομαι που η συνεργασία μας εξελίχθηκε σε μία εξαιρετική φιλία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να αποδώσω στον αγαπημένο μου μαθητή και ξεχωριστό μου φίλο βιολόγο Σπύρο Ζόλδερ, για τον χρόνο που περάσαμε μαζί μέσα και έξω από το εργαστήριο, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την βοήθειά του στην μελέτη του στελέχους *trp2Δ*. Χαίρομαι πολύ που τα τελευταία δύο μου χρόνια στα Ιωάννινα απέκτησα έναν πολύ καλό φίλο στο δικό του πρόσωπο.

Χαίρομαι από καρδιάς που όλα τα προηγούμενα χρόνια αποτέλεσα κομμάτι μίας εργαστηριακής οικογένειας και γνώρισα ανθρώπους που εκτιμώ βαθύτατα και είχα την χαρά να συνεργαστώ και να αλληλεπιδράσω μαζί τους στους χώρους των εργαστηρίων. Ευχαριστώ πολύ την Δρ Μάνια Παραπούλη, τον Δρ Δημήτρη Νουτσόπουλο, την Δρ Ελπινίκη Βανδέρα, την Δρ Ιωάννα Μπούμπα, τον αγαπημένο φίλο και συνεργάτη κ. Παναγιώτη Μαγκλάρα, τον αγαπημένο μαθητή και φίλο μου, βιολόγο κ. Μάριο Μητσόπουλο, την βιολόγο και φίλη κα Μαρία Μαυρομμάτη, τον συμφοιτητή μου και συνάδελφο κ. Μιχάλη Φιλίππου και όλα τα παιδιά που έκαναν το πέρασμα τους με τα χρόνια από το εργαστήριο μας. Τους ευχαριστώ για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που διατηρήσαμε στο χώρο εργασίας αλλά και έξω από εκείνον.

Να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη των εργαστηρίων Βιοχημείας, Βιοτεχνολογίας, Ανοσολογίας και Μοριακής Γενετικής του TBE&T και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας, για την καλή συνεργασία και την φιλοξενία τους για τις ανάγκες ορισμένων πειραμάτων.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλους εκείνους τους φίλους που έκανα στα 12 χρόνια που έζησα στην πόλη των Ιωαννίνων για τα όσα περάσαμε μαζί, με ειδική μνεία στους παλιούς μου συμφοιτητές Στελίνα Παπαδάκη και Νίκο Μπούκα.

Τέλος, τις πιο σημαντικές ευχαριστίες οφείλω να αποδώσω στα μέλη της οικογένειάς μου για την αγάπη τους, τα όσα με ενέπνευσαν, την στήριξή τους, υλική και ηθική, και την πίστη τους σε μένα σε όλα αυτά τα 12 χρόνια των σπουδών μου.

---

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.1 Περίληψη.....	1
1.2 Abstract.....	3
<b>2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
<b>2.1. Νευρικό Σύστημα.....</b>	<b>6</b>
2.1.1. Νευρικός Ιστός και Νευρικό Σύστημα.....	6
2.1.2. Νευρώνες.....	7
2.1.3. Νευροεκφυλιστικές Ασθένειες (NDDs).....	8
2.1.4. Νόσος Parkinson (PD).....	9
2.1.5. Νόσος Parkinson και $\alpha$ -συνουκλεΐνη.....	10
2.1.6. Συνουκλεινοπάθειες.....	11
<b>2.2. <math>\alpha</math>-συνουκλεΐνη.....</b>	<b>12</b>
2.2.1. Ιστορικά στοιχεία.....	12
2.2.2. Οικογένεια συνουκλεϊνών.....	13
2.2.3. Δομή και λειτουργία της $\alpha$ -συνουκλεΐνης.....	14
2.2.4. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της $\alpha$ -συνουκλεΐνης.....	16
2.2.5. Παθολογική δομή της $\alpha$ -συνουκλεΐνης.....	18
2.2.6. Παθογένεια μέσω της $\alpha$ -συνουκλεΐνης.....	19
2.2.7. Ισομορφές της $\alpha$ -συνουκλεΐνης.....	20
2.2.8. Μεταλλαγές της $\alpha$ -συνουκλεΐνης.....	22
<b>2.3. Ζυμομύκητας <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>S. cerevisiae</i>).....</b>	<b>24</b>
2.3.1. Γενετική Μηχανική του <i>S. cerevisiae</i> .....	26
2.3.2. Ο <i>S. cerevisiae</i> ως οργανισμός-μοντέλο στον νευροεκφυλισμό.....	27
<b>2.4. Η αυτοφαγία στον <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</b>	<b>29</b>
2.4.1. Μεταγραφική ρύθμιση της αυτοφαγίας.....	31
2.4.2. Σηματοδοτικά μονοπάτια-ρυθμιστές της αυτοφαγίας.....	32
<b>2.5. Ο <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ως οργανισμός-μοντέλο στην κυτταρική γήρανση.....</b>	<b>38</b>

---

2.5.1. Χαρακτηριστικά των κυττάρων <i>S. cerevisiae</i> στην μετα-διαυξική φάση και την στατική φάση.....	39
2.5.2. Σηματοδοτικά μονοπάτια-ρυθμιστές της εισόδου στην μετα-διαυξική και στατική φάση.....	41
2.5.3. Κυτταρική γήρανση και απόκριση στο στρες για τον <i>S. cerevisiae</i> .....	43
2.5.4. Κυτταρική γήρανση: Από τον ζυμομύκητα στα θηλαστικά.....	45
<b>2.6. Η συνθήκη υπεροσμωτικότητας για την επέκταση της μακροζωίας στον <i>S. cerevisiae</i>.</b> .....	47
2.6.1. Ανάλυση του μονοπατιού HOG στον ζυμομύκητα.....	48
<b>2.7. Η τρεχαλόζη στον <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.</b> .....	49
2.7.1. Βιοσύνθεση της τρεχαλόζης στον <i>S. cerevisiae</i> .....	50
2.7.2. Ρύθμιση της παραγωγής τρεχαλόζης στον ζυμομύκητα.....	51
2.7.3. Βιολογικές λειτουργίες της τρεχαλόζης στον <i>S. cerevisiae</i> .....	54
2.7.4. Η τρεχαλόζη ως μέσο αναστολής της πρωτεϊνικής συσσώρευσης.....	55
<b>2.8. Σκοπός της διδακτορικής διατριβής</b> .....	57
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
3.1. Χημικά και όργανα.....	60
<b>3.2. Στελέχη ζυμομυκήτων, βακτηρίων και πλασμίδια</b> .....	61
3.2.1. Περιγραφή πλασμιδιακών φορέων.....	63
<b>3.3. Μέθοδοι</b> .....	67
3.3.1. Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων σε καλλιέργειες.....	67
3.3.2. Ανάπτυξη στελεχών του <i>S. cerevisiae</i> .....	68
3.3.3. Μόνιμη αποθήκευση (stock) καλλιεργειών <i>S. cerevisiae</i> και <i>E. coli</i> .....	69
3.3.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (με χρήση σκευάσματος kit Nucleospin Plasmid cat No 740.588.250) (Macherey Nagel).....	69
3.3.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τον <i>S. cerevisiae</i> (Soni R. and Murray J.A.H., 1992, με ορισμένες τροποποιήσεις).....	69
3.3.6. Απομόνωση γονιδιωματικού-χρωμοσωμικού DNA από κύτταρα <i>S. cerevisiae</i> (Harju et al., 2004 με ορισμένες τροποποιήσεις).....	70
3.3.7. Απομόνωση γονιδιωματικού-χρωμοσωμικού DNA από κύτταρα <i>S. cerevisiae</i> (Looke et al., 2011).....	71

---

3.3.8. Απομόνωση γονιδιωματικού-χρωμοσωμικού DNA από κύτταρα <i>S. cerevisiae</i> (Harju et al., 2004).....	71
3.3.9. Πέψεις του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	72
3.3.10. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction)....	73
3.3.11. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων.....	76
3.3.12. Απομόνωση ζωνών DNA από πήγμα αγαρόζης και καθαρισμός τους (με χρήση σκευάσματος kit Nucleospin Extract II cat. No. 740.609.250).....	77
3.3.13. Κλωνοποίηση αλληλουχιών DNA-Αντίδραση δεσμοποίησης περιοριστικών τμημάτων (ligation).....	78
3.3.14. Μετασχηματισμός <i>E. coli</i> DH5a (Kushner et al.,1978).....	78
3.3.15. Μετασχηματισμός <i>E. coli</i> DH5a (Chung et al.,1988).....	79
3.3.16. Μετασχηματισμός <i>E. coli</i> DH5a (Green et al, 2013) .....	80
3.3.17. Κατασκευή επιδεικτικών κυττάρων του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	82
3.3.18. Μετασχηματισμός του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> με το πλασμίδιο pCM190 ή ανασυνδυασμένων κλώνων του με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation).....	82
3.3.19. Στύπωμα κατά Southern.....	83
3.3.20. Μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA-DNA.....	84
3.3.21. Απομόνωση RNA (με χρήση σκευάσματος kit Nucleospin RNA).....	86
3.3.22. Κατεργασία του δείγματος RNA με DNase (TaKaRa-Recombinant DNase I).....	87
3.3.23. Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA).....	87
3.3.24. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ενίσχυση cDNA (RT-PCR).....	88
3.3.25. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) /Ποσοτική PCR (qPCR).....	89
3.3.26. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Kushnirov et al., 2000).....	96
3.3.27. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και κλασμάτωσή τους (Griffioen et al., 2000).....	97
3.3.28. Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών (Μέθοδος Bradford).....	97
3.2.29. Ηλεκτροφόρηση SDS-πολυακρυλαμιδίου.....	98
3.3.30. Ηλεκτροφορητική Μεταφορά Πρωτεϊνών.....	100

---

3.3.31. Ανοσοδοκιμασία κατά Western (Western Blot, WB).....	100
3.3.32. Αφαίρεση Αντισώματος από μεμβράνη PVDF (Stripping).....	101
3.3.33. Ανοσοφθορισμός για κύτταρα <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	102
3.3.34. Υπερέκφραση πρωτεϊνών με το σύστημα pET(pET system manual, Novagen, 2001).....	103
3.3.35. Καθαρισμός χμαιοικικών πρωτεϊνών His-tagged μέσω χρήσης σκευάσματος kit Protino Ni TED 2000 της Macherey Nagel.....	105
3.3.36. Κατακρήμνιση χμαιοικικών και αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών (Pull-Down Assay).....	105
3.3.37. Στύπωμα Far Western.....	107

#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

<b>Ανίχνευση της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα του <i>S. cerevisiae</i> (ως εξακρίβωση της λειτουργίας του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης)</b> .....	112
--	-----

4.1. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον εντοπισμό της α-συνουκλεΐνης στα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των μετασχηματισμένων κυττάρων <i>S. cerevisiae</i> ...	112
--	-----

<b>Μελέτη της επίδρασης της α-συνουκλεΐνης στη βιωσιμότητα και το φαινότυπο των κυττάρων <i>S. cerevisiae</i></b> .....	114
---	-----

4.2. Καμπύλες ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων <i>S. cerevisiae</i> .....	114
---	-----

4.3. Καμπύλες ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων <i>S. cerevisiae</i> με εξωγενείς παράγοντες τοξικότητας.....	116
--	-----

4.4. Χρονολογική γήρανση των μετασχηματισμένων κυττάρων <i>S. cerevisiae</i> .....	118
--	-----

4.5. Μελέτη της επίδρασης της υψηλής εξωτερικής οσμωτικότητας (high external osmolarity, HEO) στη χρονολογική γήρανση των μετασχηματισμένων κυττάρων <i>S. cerevisiae</i> .....	120
---	-----

4.6. Εντόπιση και κατανομή της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου στα μετασχηματισμένα κύτταρα του <i>S. cerevisiae</i> με ανοσοφθορισμό.....	121
--	-----

4.7. Μελέτη του βαθμού έκφρασης της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων <i>S. cerevisiae</i> .....	125
--	-----

<b>Μελέτη της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται δυνητικά στην εκδήλωση τοξικότητας στα μετασχηματισμένα <i>Saccharomyces cerevisiae</i> σε πραγματικό χρόνο</b> .....	126
---	-----

4.8. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των <i>SNCA</i> , <i>TPS1</i> , <i>TPS2</i> , <i>TSL1</i> , <i>ATG8</i> και <i>TOR1</i> στα κύτταρα <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 με χρήση qPCR.....	127
---	-----

<b>Μεταφορά του πλασμιδίου pCM190 και των ανασυνδυασμένων κλώνων του στα μεταλλαγμένα στελέχη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 <i>tps1Δ</i>, <i>tps2Δ</i> και <i>tsl1Δ</i>.....</b>	<b>134</b>
<b>Μελέτη της επίδρασης της α-συνουκλεΐνης στη βιωσιμότητα και το φαινότυπο των μεταλλαγμένων κυττάρων <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>135</b>
4.9. Καμπύλες ανάπτυξης των μεταλλαγμένων μετασχηματισμένων <i>S.cerevisiae</i> <i>tps1Δ</i> , <i>tps2Δ</i> και <i>tsl1Δ</i> .....	135
4.10. Χρονολογική γήρανση των μεταλλαγμένων μετασχηματισμένων <i>S.cerevisiae</i> <i>tps1Δ</i> , <i>tps2Δ</i> και <i>tsl1Δ</i> .....	137
4.11. Μελέτη των επιπέδων έκφρασης του <i>SNCA</i> στα μεταλλαγμένα στελέχη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>tps1Δ</i> , <i>tps2Δ</i> και <i>tsl1Δ</i> .....	143
4.12. Εντόπιση και κατανομή της εκφραζόμενης α-συνουκλεΐνης στα μεταλλαγμένα στελέχη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>tps1Δ</i> , <i>tps2Δ</i> και <i>tsl1Δ</i> μέσω ανοσοφθορισμού.....	147
<b>Μελέτη της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται δυναμικά στην εκδήλωση τοξικότητας στα μεταλλαγμένα <i>Saccharomyces cerevisiae</i> σε πραγματικό χρόνο.....</b>	<b>153</b>
4.13. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των <i>TPS2</i> , <i>TSL1</i> , <i>ATG8</i> και <i>TOR1</i> στα κύτταρα <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>tps1Δ</i> με χρήση qPCR.....	153
4.14. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των <i>TPS1</i> , <i>TSL1</i> , <i>ATG8</i> και <i>TOR1</i> στα κύτταρα <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>tps2Δ</i> με χρήση qPCR.....	160
4.15. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των <i>TPS1</i> , <i>TPS2</i> , <i>ATG8</i> και <i>TOR1</i> στα κύτταρα <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>tsl1Δ</i> με χρήση qPCR.....	165
<b>Θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη στα κύτταρα <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</b>	<b>170</b>
4.16. Θεραπευτική παρέμβαση στα κύτταρα <i>Saccharomyces cerevisiae</i> με την χρήση τρεχαλόζης και μελέτες βιωσιμότητας.....	170
4.17. Εντόπιση και κατανομή της εκφραζόμενης α-συνουκλεΐνης στα στελέχη του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> μετά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη.....	174
4.18. Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των στελεχών <i>S. cerevisiae</i> BY4741 και <i>tps1Δ</i> στην στατική φάση μετά την θεραπευτική παρέμβαση της τρεχαλόζης.....	186
<b>Μελέτη των αλληλεπιδράσεων της α-συνουκλεΐνης με τις πρωτεΐνες του <i>S.cerevisiae</i>.....</b>	<b>191</b>
4.19. Υπερέκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης.....	192

4.20. Μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης και ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	194
4.21. Αποτελέσματα υγρής χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (LC-MS/MS) για την αναγνώριση των αγνώστων αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών.....	198
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	
5.1 Ανάπτυξη συστήματος μεταφοράς και έκφρασης των μορφών της α-συνουκλεΐνης στον <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	206
5.2 Ανεύρεση τοξικών φαινοτύπων και επιτυχής εφαρμογή της συνθήκης HEO....	207
5.3 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε κρίσιμα μεταβολικά μονοπάτια κατά την παρουσία της α-συνουκλεΐνης.....	209
5.4 Μελέτη των μεταλλαγμένων στελεχών <i>tps1Δ</i> , <i>tps2Δ</i> και <i>ts11Δ</i> .....	212
5.5 Εφαρμογή του θεραπευτικού μοντέλου της τρεχαλόζης.....	216
5.6 <b>Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της α-συνουκλεΐνης</b> .....	218
5.6.1 Η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης στον <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και η συσχέτισή της με την α-συνουκλεΐνη.....	219
5.6.2 Η αλδολάση της διφωσφορικής φρουκτόζης στον <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και η αλληλεπίδρασή της με την α-συνουκλεΐνη.....	223
5.6.3 Η πρωτεΐνη ZPS1 του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	224
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	225
<b>ΠΡΟΣΘΕΤΟ ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ</b> .....	236

## 1.1 Περίληψη

Η α-συνουκλεΐνη αποτελεί μία πρωτεΐνη 140 αμινοξέων η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCA* και εκφράζεται κυρίως στο προσυναπτικό άκρο των ντομαπινεργικών νευρώνων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας των βασικών γαγγλίων του ανθρώπινου εγκεφάλου. Η συσσώρευσή της στο εσωτερικό των νευρώνων οδηγεί στην εκφύλιση τους με αποτέλεσμα την εκδήλωση της νόσου Parkinson.

Ο *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιείται για τη μοντελοποίηση ανθρώπινων νόσων, ειδικότερα νευροεκφυλιστικών διαταραχών, λόγω της υψηλής διατήρησης ομοιοτήτων μηχανισμών στο υποκυτταρικό επίπεδο μεταξύ νευρώνων και ζυμομύκητα.

Στόχο της παρούσας διατριβής αποτέλεσε η εγκατάσταση ενός μοντέλου της νόσου του Parkinson η οποία θα στηριζόταν στη μεταφορά μορφών γονιδίων της α-συνουκλεΐνης στον *Saccharomyces cerevisiae*. Παράλληλα, επιλέχθηκε η επακόλουθη μελέτη της αλληλεπίδρασης της α-συνουκλεΐνης με μεταβολικά μονοπάτια του ζυμομύκητα που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση της τρεχαλόζης και παράγοντες που η παρουσία αυτής ρυθμίζει. Η τρεχαλόζη είναι ένας μη αναγωγικός δισακχαρίτης που απαντάται στους ζυμομύκητες και χαρακτηρίζεται από την ιδιότητά της να διατηρεί τις πρωτεΐνες στην σωστά αναδιπλωμένη τους μορφή και να εμποδίζει το σχηματισμό συσσωματωμάτων, ενώ βοηθά στην αντιμετώπιση πολλών κυτταρικών στρες.

Στα αποτελέσματα της διατριβής πραγματοποιήθηκε και τεκμηριώθηκε η μεταφορά και η έκφραση όλων των διαθέσιμων μορφών της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα του ζυμομύκητα και αποδείχθηκε πως η πρωτεΐνη δεν αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για τον ζυμομύκητα στις πρώτες 24 ώρες της ανάπτυξής του, ενώ οι τοξικές επιδράσεις της εμφανίζονται είτε σε συνδυασμό με την εξωγενή παροχή 1,4-διθειοθρεϊτόλης (DTT) είτε κατά την χρονολογική γήρανση των κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* που την εκφράζουν. Κατά τη μελέτη της βιωσιμότητας εφαρμόστηκε η συνθήκη υψηλής εξωτερικής οσμωτικότητας (HEO) στα κύτταρα με σκοπό να αυξηθεί το εύρος ζωής των ζυμομυκήτων στην χρονολογική γήρανση και αποδείχθηκε πως η συνθήκη ευνόησε την βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσία και απουσία του *SNCA*.

Ακολούθως, διαπιστώθηκε η βαθμιαία αύξηση των επιπέδων έκφρασης της α-συνουκλεΐνης στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων, όπου παρατηρήθηκε μόνο αρχόμενη συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης στον φαινότυπο της χρονολογικής γήρανσης. Στο πλαίσιο αυτό μέσω μελετών της γονιδιακής έκφρασης στην φάση της χρονολογικής γήρανσης διαπιστώθηκαν κατασταλτικά φαινόμενα από την έκφραση της α-συνουκλεΐνης στα μεταγραφικά επίπεδα της συνθάσης της τρεχαλόζης, παρότι το ερέθισμα για την παραγωγή τρεχαλόζης φερόταν αυξημένο. Ακόμη, ανιχνεύθηκαν κατεσταλμένα μεταγραφικά επίπεδα στο σκέλος της αυτοφαγίας από την συνεχόμενη και αυξανόμενη έκφραση του *SNCA*.

Στην συνέχεια, οι μελέτες επεκτάθηκαν σε μεταλλαγμένα στελέχη *S. cerevisiae* ως προς τα τρία μελετώμενα γονίδια του μεταβολισμού της τρεχαλόζης, τα *tps1Δ*, *tps2Δ* και *tsl1Δ*. Στο *tps1Δ* είναι αδύνατη η βιοσύνθεση τρεχαλόζης και εμφάνισε καθ' όλη



την διάρκεια της μελέτης του τοξικότητα στην παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης με αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *SNCA*, μειωμένη βιωσιμότητα κυρίως στην χρονολογική γήρανση και κυτταροπλασματικά συσσωματώματα από την εκθετική φάση ανάπτυξης. Οι μελέτες γονιδιακής έκφρασης ανέδειξαν ένα προφίλ απόκρισης στο στρες από την εκθετική φάση και κατεσταλμένα επίπεδα έκφρασης στις αργότερες φάσεις ανάπτυξης μαρτυρώντας την τοξική κατάληξη των κυττάρων, οπότε φάνηκε πως η συνθήκη HEO αδυνατούσε να βελτιώσει την βιωσιμότητα των κυττάρων απουσία της συνθάσης της τρεχαλόζης. Αντίστοιχα για τα κύτταρα *tps2Δ*, τα οποία δεν βιοσυνθέτουν φωσφατάση της τρεχαλόζης και συσσωρεύουν 6-φωσφο-τρεχαλόζη ως παραπροϊόν, οι μελέτες βιωσιμότητας παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης έδειξαν σημαντική καταστολή και τοξικά φαινόμενα σε σταθερή έκφραση της πρωτεΐνης σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης, ενώ παρατηρήθηκε καθολική εμφάνιση κυτταροπλασματικών εγκλείστων σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης, αναδεικνύοντας τον πιο τοξικό φαινότυπο μεταξύ αυτών που διερευνήθηκαν. Ακόμη, διαπιστώθηκε μια γενικευμένη καταστολή της έκφρασης των περισσοτέρων μελετώμενων γονιδίων παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, αναδεικνύοντας τοξικά φαινόμενα στο μεταβολικό προφίλ των κυττάρων και την αναγκαιότητα της φωσφατάσης για την πλήρωση της συνθήκης HEO. Τέλος, στο στέλεχος *ts11Δ*, στο οποίο το σύμπλοκο βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης έχει απωλέσει μερικώς την ρυθμιστική ευαισθησία του, τα φαινόμενα που παρατηρήθηκαν από την έκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης ήταν πολύ ήπια, χωρίς μεγάλη πτώση της βιωσιμότητας των κυττάρων, χωρίς κυτταροπλασματικά συσσωματώματα της πρωτεΐνης, αλλά με πτώση της έκφρασης του *SNCA* στην στατική φάση, γεγονός που μπορεί να ερμηνεύει τον μη τοξικό φαινότυπο και τα εξισοροπημένα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης που παρατηρήθηκαν. Επίσης, φάνηκε πως η δράση της συνθήκης HEO δεν επηρεάζεται από την απουσία του *Ts1Pr*.

Με την δοκιμή της θεραπείας όλων των κυττάρων με χορήγηση εξωγενούς τρεχαλόζης στη στατική φάση ανάπτυξης παρατηρήθηκε ότι με αυτή την παρέμβαση η βιωσιμότητα των κυττάρων αυξήθηκε, ενώ δεν παρατηρήθηκαν κυτταροπλασματικά έγκλειστα στα κύτταρα που προηγουμένως τα έφεραν. Από τις μελέτες γονιδιακής έκφρασης φάνηκε πως η τρεχαλόζη ενεργοποίησε μεταγραφικά τον μηχανισμό της αυτοφαγίας στα κύτταρα αγρίου τύπου, αλλά αυτό δεν συνέβη στα κύτταρα *tps1Δ*, γεγονός που υποδηλώνει την σημαντικότητα της συνθάσης της τρεχαλόζης ως μόριο απαραίτητο για την μεταγραφική ενεργοποίηση του αυτοφαγικού μηχανισμού.

Τέλος, διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης με πρωτεΐνες του ζυμομύκητα. Για το σκοπό αυτό υπερεκφράστηκε μία χιμαιρική  $\alpha$ -συνουκλεΐνη που υπεβλήθη σε αλληλεπίδραση με ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των αγρίου τύπου κυττάρων και των μεταλλαγμένων κυττάρων *tps1Δ*. Το μόριο που ταυτοποιήθηκε κατ' εξοχήν να αλληλεπιδρά με την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη ήταν η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) και δευτερευόντως η αλδολάση της διφωσφορικής φρουκτόζης. Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλά κυτταρικά μονοπάτια των κυττάρων *S. cerevisiae*.

## 1.2 Abstract

$\alpha$ -synuclein is a protein of 140 amino acids, which is encoded by the gene SNCA and expressed mainly in the presynaptic terminal of the dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta in the basal ganglia of the human brain. Its accumulation in the internal of the neurons results in their degeneration and the manifestation of Parkinson's disease.

*Saccharomyces cerevisiae* is used in modeling human diseases, especially neurodegenerative disorders because of the high conservation of essential mechanisms in the sub-cellular level between yeast and neurons.

The aim of this dissertation was to establish a model of Parkinson's disease by transferring  $\alpha$ -synuclein gene forms to *Saccharomyces cerevisiae* and the subsequent study of  $\alpha$ -synuclein interaction with yeast metabolic pathways implicated in the trehalose biosynthesis and factors that the latter regulates. Trehalose is a non-reducing disaccharide which is found in a plethora of organisms in the nature, including yeasts. It is characterized by its ability to maintain proteins in the right folded formation and inhibit the formation of protein aggregates, while assisting in the confrontation of many kinds of cell stress.

In the results of this work all available forms of  $\alpha$ -synuclein genes were transferred in yeast cells and their expression was confirmed and it has been shown that the protein is not a toxic agent for yeast in the first 24 hours of its life, whereas toxic phenotypes replicated reliably either by the exogenous use of 1,4-dithiothreitol (DTT) or by yeast cell chronological aging in combination with the expression of  $\alpha$ -synuclein. During the viability studies, the high external osmolarity (HEO) condition in the cells was carried out in order to increase the life span of the yeasts in chronological aging and the treatment favored cell viability in the presence as well as in the absence of SNCA.

Afterwards, a gradual increase in  $\alpha$ -synuclein expression levels in the four cell growth phases was confirmed, where only initial accumulation of  $\alpha$ -synuclein was observed in the chronological aging phenotype. Under these observations, gene expression studies were taken place and as resulted of these experiments, in the chronological aging phase, suppression phenomena from the expression of  $\alpha$ -synuclein in the transcriptional levels of trehalose's synthase were observed, although the stimulus for the production of trehalose was increased. In addition, decreased transcriptional levels in the mechanism of autophagy were detected by the continuous and increasing expression of SNCA.

Subsequently, the studies were extended to mutant strains of *S. cerevisiae* for the three studied trehalose metabolism genes, *tps1 $\Delta$* , *tps2 $\Delta$*  and *ts11 $\Delta$* . In *tps1 $\Delta$* , trehalose biosynthesis is impossible and throughout the study it has shown toxicity to the presence of  $\alpha$ -synuclein with elevated levels of SNCA expression, decreased viability, particularly in chronological aging, and cytoplasmic aggregates from the exponential growth phase. Gene expression studies revealed elevated expression levels of some of the studied genes in the exponential phase as a response to stress and suppressed expression levels in the distal growth phases indicating the toxic ending of the cells. These indications showed that the HEO condition was unable to improve the viability

of the cells in the absence of trehalose synthase. Respectively for *tps2Δ* cells, which do not biosynthesize trehalose phosphatase and accumulate 6-phospho-trehalose as a by-product, the viability studies in the presence of  $\alpha$ -synuclein showed significant suppression and toxic effects in stable expression of the protein in all growth phases, while a global appearance of cytoplasmic inclusions was observed in all growth phases, highlighting the most toxic phenomenon. Furthermore, a generalized suppression of the expression in most of the studied genes in the presence of  $\alpha$ -synuclein was observed, revealing toxic effects on the metabolic profile of the cells and the necessity of phosphatase to fill the HEO condition. Finally, in the *ts1Δ* strain, in which the trehalose biosynthesis complex partially lost its sensitivity, the phenomena observed by  $\alpha$ -synuclein expression were very mild, without greatly decreasing the viability of the cells, without cytoplasmic aggregates of the protein, but with a fall in *SNCA* expression in the static phase, which may explain the non-toxic phenotype and the balanced gene expression levels. Additionally, it was noticed that the HEO condition can act without the Tsl1p molecule.

With the therapeutic intervention with exogenous trehalose in all of the studied cells in the static phase, cell viability increased and the cytoplasmic inclusion bodies that the cells previously carried degraded. From the gene expression studies it appeared that trehalose triggered transcriptionally the autophagy mechanism in wild-type cells, but this was impossible to take place in *tps1Δ* cells, noting the importance of trehalose synthase as a molecule necessary for the transcriptional activation of the autophagy mechanism.

The last step of the present study was the investigation of  $\alpha$ -synuclein protein interactions with yeast proteins. For this purpose, a chimeric  $\alpha$ -synuclein that had been overexpressed, was interfaced with total protein lysates from wild type yeast cells and *tps1Δ* mutant cells. The molecule identified primarily to interact with  $\alpha$ -synuclein was glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and secondarily fructose diphosphate aldolase. These proteins appear to play important roles in many cellular pathways of *S. cerevisiae* cells.

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## **2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **2.1. Νευρικό σύστημα**

#### **2.1.1 Νευρικός Ιστός και Νευρικό Σύστημα**

Το νευρικό σύστημα συντονίζει την λειτουργία του συνόλου των κυττάρων του ανθρώπινου σώματος. Οι ποικίλες δομές του νευρικού συστήματος διασυνδέονται στενά μεταξύ τους και διακρίνονται σε δύο μέρη:

- Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), το οποίο αποτελείται από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό.
- Το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα, του οποίου οι νευρικές ίνες εκτείνονται από τον εγκέφαλο ή το νωτιαίο μυελό προς τους μύες, τους αδένες και τα διάφορα αισθητήρια όργανα.

Το περιφερικό νευρικό σύστημα με τη σειρά του διαιρείται σε:

- Προσαγωγό σκέλος, το οποίο αφορά τη μεταφορά πληροφοριών από τους ιστούς και τα όργανα του σώματος στο ΚΝΣ.
- Απαγωγό Σκέλος, το οποίο αφορά την αγωγή ηλεκτρικών σημάτων από το ΚΝΣ προς τα εκτελεστικά κύτταρα (μυϊκά, ενδοκρινικά ή άλλα νευρικά).

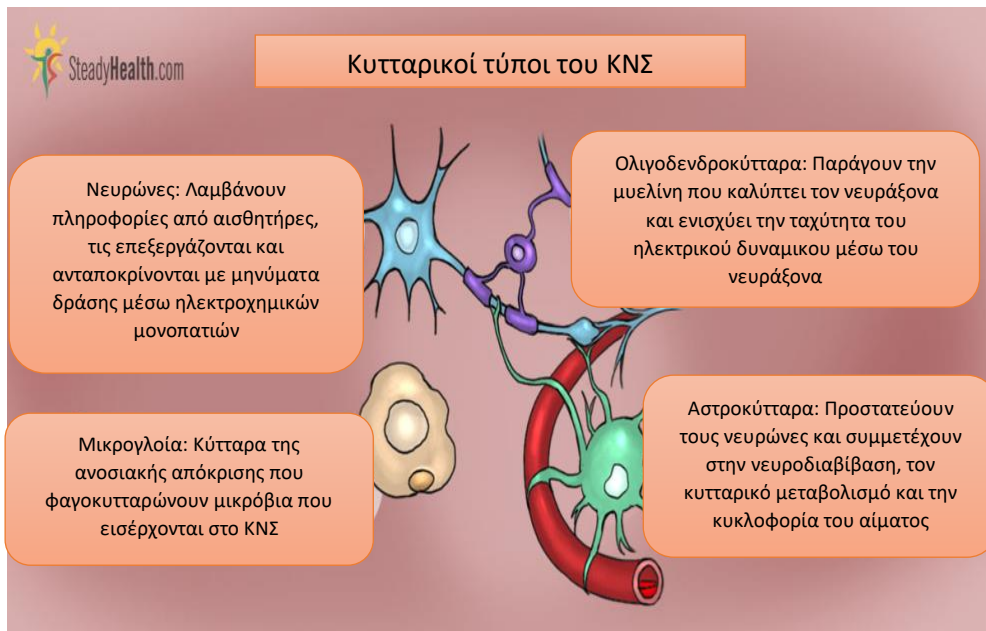
Το απαγωγό σκέλος χωρίζεται σε δύο κατηγορίες:

- Το Σωματικό Νευρικό Σύστημα, αποτελούμενο από όλες τις νευρικές ίνες που κατευθύνονται από το ΚΝΣ προς τα κύτταρα των σκελετικών μυών.
- Το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα, αποτελούμενο από μία αλυσίδα δύο νευρώνων που συνδέονται με μία σύναψη και εκτείνονται μεταξύ του κεντρικού νευρικού συστήματος και των εκτελεστικών οργάνων.

Το αυτόνομο νευρικό σύστημα είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της ομοιόστασης του εσωτερικού περιβάλλοντος του ανθρώπινου οργανισμού και αποτελείται από δύο ανταγωνιστικά σκέλη, το συμπαθητικό και το παρασυμπαθητικό.

Από δομικής άποψης, ο νευρικός ιστός αποτελείται από τους εξής τύπους κυττάρων (εικόνα 2.1):

- Νευρικά κύτταρα ή νευρώνες με πολυάριθμες συνήθως αποφυάδες.
- Διάφορους τύπους νευρογλοιακών κυττάρων με βραχείες αποφυάδες. Τα νευρογλοιακά κύτταρα παίζουν υποστηρικτικό και προστατευτικό ρόλο ως προς τους νευρώνες, συμμετέχοντας στη βιοχημική δραστηριότητα και διατροφή τους, καθώς επίσης και στις αμυντικές διεργασίες του ΚΝΣ
- Ολιγοδενδροκύτταρα τα οποία παράγουν τη μυελίνη που περιβάλλει τους νευρικούς άξονες και με αυτό τον τρόπο αυξάνουν την ταχύτητα των ηλεκτρικών ώσεων που τους διατρέχουν.
- Αστροκύτταρα τα οποία παίζουν προστατευτικό ρόλο, ενώ συμμετέχουν επίσης στη μεταφορά μηνυμάτων, στον κυτταρικό μεταβολισμό αλλά και στη ροή του αίματος.



**Εικόνα 2.1:** Απεικόνιση των διαφόρων τύπων κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος. Γίνεται αναφορά στους νευρώνες, μικρογλοία, ολιγοδενδροκύτταρα, αστροκύτταρα αλλά και στις λειτουργίες τους. (steadyhealth.com)

## 2.1.2 Νευρώνες

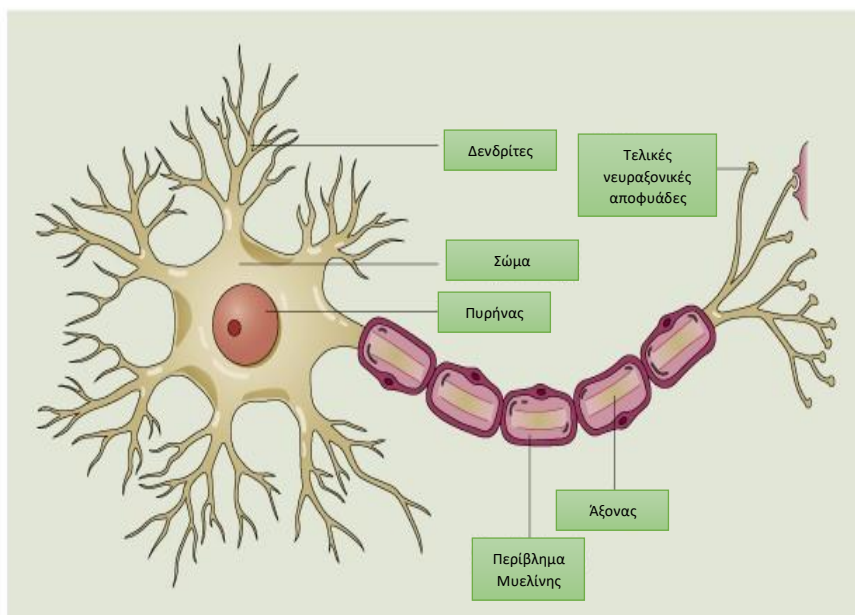
Τα νευρικά κύτταρα ή νευρώνες είναι υπεύθυνα για την υποδοχή, μεταβίβαση και επεξεργασία των ερεθισμάτων, την πυροδότηση ορισμένων κυτταρικών δραστηριοτήτων και την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και άλλων μορίων που είναι φορείς πληροφοριών.

Στους περισσότερους νευρώνες διακρίνονται τρία μέρη (εικόνα 2.2):

- Οι δενδρίτες, οι οποίοι αποτελούν επιμήκεις αποφυάδες εξειδικευμένες στην πρόσληψη ερεθισμάτων από το περιβάλλον, από αισθητικά επιθηλιακά κύτταρα ή άλλους νευρώνες.
- Το κυτταρικό σώμα ή περικάρυο, το οποίο είναι το τροφικό κέντρο ολόκληρου του νευρικού κυττάρου, ενώ ταυτόχρονα έχει και τη δυνατότητα υποδοχής ερεθισμάτων.
- Ο νευράξονας, ο οποίος αποτελεί μία μονήρη αποφυάδα εξειδικευμένη στη παραγωγή ή την μετάδοση νευρικών ώσεων σε άλλα κύτταρα. Οι νευράξονες μπορούν επίσης να δεχθούν και πληροφορίες από άλλα νευρικά κύτταρα.

Οι άξονες των νευρώνων με διάμετρο μεγαλύτερη του 1μm καλύπτονται από μυελίνη, η οποία λειτουργεί ως ηλεκτρικό μονωτικό και συντελεί στην επιτάχυνση της αγωγής ηλεκτρικών σημάτων και την εξοικονόμηση ενέργειας.

Οι τελικές απολήξεις των δενδριτών του νευράξονα έχουν στα άκρα τους διογκώσεις, τα τελικά ή συναπτικά κυστίδια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών.



© 2000 John Wiley & Sons, Inc.

**Εικόνα 2.2:** Η δομή ενός τυπικού νευρώνα

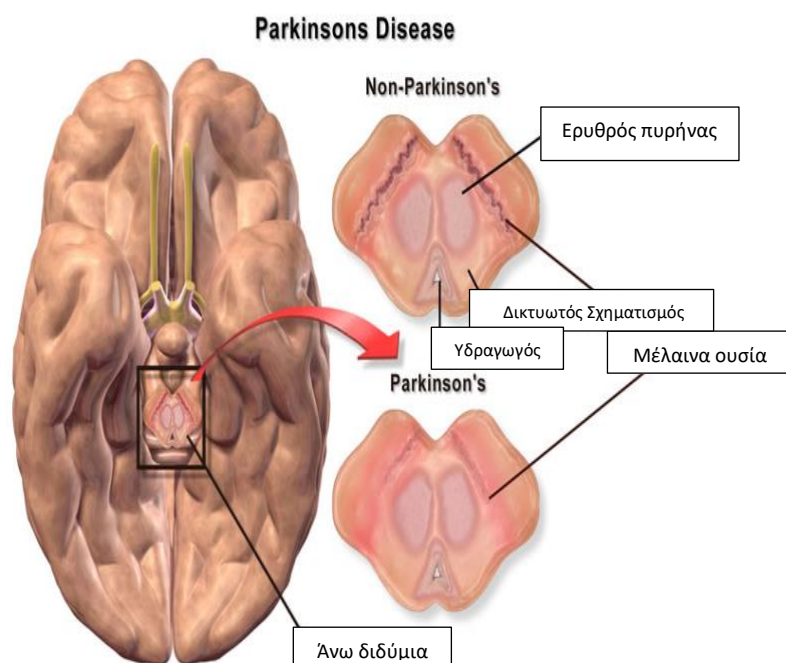
### 2.1.3 Νευροεκφυλιστικές Ασθένειες (NDD's)

Ο νευροεκφυλισμός αποτελεί την παθογένεια των νευρώνων, η οποία υποκινείται από ένα οξύ συμβάν ή μία χρόνια διαταραχή στην κυτταρική λειτουργία. Η πρόοδος του νευροεκφυλισμού μπορεί να είναι ταχεία ή βραδεία και προοδευτική και να οδηγήσει σε νευρωνική απώλεια και δυσλειτουργία με νευροπαθολογικές συνέπειες. Ο οξύς νευροεκφυλισμός μπορεί να προκληθεί από εγκεφαλική ισχαιμία, τοξίνες και τραύματα. Ο χρόνιος νευροεκφυλισμός προκαλείται από διαταραχές όπως η άνοια του Alzheimer, η αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση, η χορεία του Huntington και η νόσος του Parkinson. Στις διάφορες νευρολογικές διαταραχές, διαφορετικοί πληθυσμοί νευρώνων ανευρίσκονται επιλεκτικά ευάλωτοι στην μοριακή παθογένεια της εκφυλιστικής διαδικασίας. Οι μηχανισμοί οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την επιλεκτική αυτή ευαλωτότητα σχετίζονται με συγκεκριμένες ιδιότητες των νευρώνων, συμπεριλαμβανομένων του μεγέθους, του νευραξονικού μήκους, των συνάψεων, του μεταβολισμού τους και ορισμένων γονιδιακών μεταλλαγών. Ο νευροεκφυλισμός μπορεί να προκαλέσει μεγάλο εύρος νευρολογικών και συμπεριφοριστικών διαταραχών / αποκλίσεων που ποικίλουν από απώλεια μνήμης έως παράλυση και θάνατο (Martin, 2002).

Όλο και νεότερα στοιχεία συνηγορούν στο γεγονός ότι η πλειοψηφία των νευροεκφυλιστικών ασθενειών εμφανίζουν κοινούς κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς παθογένειας με κοινό παρονομαστή την συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Αυτές σχηματίζουν συσσωματώματα στα οποία η λανθασμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών παρατηρείται συνήθως στη δομή του β-πτυχωτού φύλλου και ονομάζονται αμυλοειδή (Ross et al., 2004).

### 2.1.4 Νόσος Parkinson (PD)

Μία συχνά απαντώμενη νευροεκφυλιστική ασθένεια είναι η νόσος του Parkinson. Η νόσος αυτή επηρεάζει περίπου το 2% των ατόμων άνω των 65 ετών και το 4-5% των ατόμων άνω των 85 ετών. (Fahn, 2008) Χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη και κλιμακούμενη απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στα βασικά γάγγλια και το σχηματισμό πρωτεϊνικών εγκλείστων στο εσωτερικό των νευρώνων. Τα πρωτεϊνικά αυτά εγκλείστα ονομάζονται Lewy Bodies και εντοπίζονται σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου σε παθολογικές συνθήκες, ειδικότερα της κρίσιμης, για τη νόσο, περιοχής της μέλαινας ουσίας (εικόνα 2.4). (Petrucci et al., 2008)



**Εικόνα 2.3 :** Συγκριτική απεικόνιση της περιοχής της μέλαινας ουσίας (Substantia Nigra) σε παθολογικές και φυσιολογικές συνθήκες. Παρατηρείται ο αποχρωματισμός της περιοχής κατά τις παθολογικές καταστάσεις, φαινόμενο που οφείλεται, σε κυτταρικό επίπεδο, στο σχηματισμό των Lewy Bodies και τη καταστροφή των νευρικών κυττάρων. (pinterest.com)

Η ύπαρξη πρωτεϊνικών εγκλείστων ή/και η απώλεια φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών έχει ως συνέπεια την εμφάνιση τοξικότητας και την καταστροφή των κυττάρων.

Ο παρκινσονισμός χαρακτηρίζεται από τον συνδυασμό ορισμένων από τα εξής έξι ανεξάρτητα κινητικά χαρακτηριστικά: τρόμος ηρεμίας, βραδυκινησία, ακαμψία, απώλεια των αντανακλαστικών στάσης, εύκαμπτη στάση του τραχήλου, του κορμού και των άκρων και το φαινόμενο «παγώματος» (όπου τα κάτω άκρα «κολλούν» στο έδαφος). Δεν είναι απαραίτητο όλα τα έξι κύρια κλινικά χαρακτηριστικά να είναι παρόντα, αλλά τουλάχιστον δύο θα πρέπει να εντοπίζονται πριν να τεθεί η διάγνωση του παρκινσονισμού, με τουλάχιστον ένα από αυτά να είναι ο τρόμος ηρεμίας ή η βραδυκινησία. Από τα έξι κύρια κινητικά συμπτώματα, τα τρία εντοπίζονται από νωρίς στην πορεία της νόσου, ενώ τα υπόλοιπα τρία αργότερα. Τα πρώιμα



συμπτώματα και σημεία είναι ο τρόμος ηρεμίας, η βραδυκινησία και η ακαμψία. (Fahn, 2008)

Τα πρώιμα συμπτώματα σχετίζονται άμεσα με την ανεπάρκεια ντοπαμίνης στην μέλαινα ουσία, λόγω της απώλειας των ντοπαμινεργικών νευρώνων, των οποίων οι νευράξονες εκτείνονται ως το νεοραβδωτό σώμα. Ενώ τα πρώιμα συμπτώματα της νόσου ανταποκρίνονται συνήθως στην θεραπεία (με λεβοντόπα και αγωνιστές ντοπαμίνης), τα όψιμα συμπτώματα δεν ακολουθούν την ίδια τάση. Αυτό οφείλεται στο ότι τα όψιμα συμπτώματα είναι το αποτέλεσμα μη ντοπαμινεργικών επιδράσεων. (Fahn, 2008)

Πέραν των κινητικών συμπτωμάτων της νόσου, τα οποία κυριαρχούν στην κλινικά εικόνα, οι περισσότεροι ασθενείς με νόσο Parkinson έχουν ακόμη κάποια χαρακτηριστικά τα οποία ορίζονται ως μη κινητικά. Αυτά περιλαμβάνουν χαμηλή κινητοποίηση και απάθεια, άνοια, κόπωση, κατάθλιψη, ανησυχία, διαταραχές του ύπνου, δυσκοιλιότητα, διαταραχές στην ούρηση, άλλες εκδηλώσεις από το αυτόνομο νευρικό σύστημα (σεξουαλικές, γαστρεντερολογικές) και αισθητηριακές διαταραχές. (Fahn, 2008)

Οι ασθενείς φέρουν προσδόκιμο ζωής 20 χρόνια από την στιγμή της διάγνωσης ενώ το ποσοστό θνησιμότητας είναι 1,5 φορές μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των συνομήλικων υγιών ατόμων. Ο θάνατος επέρχεται συνήθως είτε λόγω λοιμώξεων μη σχετιζόμενων με την νόσο είτε λόγω των κινητικών προβλημάτων που επηρεάζουν την κινητοποίηση και την αναπνοή και αυξάνουν την πιθανότητα πτώσεων του ατόμου, με επακόλουθο τον φυσικό τραυματισμό. (Fahn, 2008)

Όσον αφορά την θεραπεία χρησιμοποιούνται πολλοί θεραπευτικοί παράγοντες με κυριότερο την λεβοντόπα, η οποία αναπληρώνει την απουσία ντοπαμίνης από το νεοραβδωτό σώμα και βελτιώνει έτσι τα κινητικά προβλήματα της νόσου, χωρίς να επηρεάζει ωστόσο τα μη κινητικά. Στα μειονεκτήματα της λεβοντόπα περιλαμβάνονται διάφορες ανεπιθύμητες ενέργειες όπως η δυσκοιλιότητα και η υπέρταση, αλλά η κυριότερη είναι η σταδιακή μείωση της αποτελεσματικότητας της και τα φαινόμενα on-off τα οποία παρουσιάζει. Όπως γίνεται αντιληπτό, ριζική θεραπεία της νόσου εν τη γενέσει της δεν υπάρχει. Αυτός είναι και ο λόγος που έχουν αυξηθεί σε σημαντικό βαθμό οι μελέτες δοκιμών νέων παραγόντων και φαρμάκων. (Fahn, 2008)

Η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων της νόσου είναι σποραδικής μορφής, χωρίς να εμφανίζεται η νόσος σε άλλα μέλη της οικογενείας του ασθενούς. Όσον αφορά την αιτιοπαθογένεια της νόσου έχουν βρεθεί ορισμένες γονιδιακές μεταλλαγές, χωρίς όμως αυτές να εξηγούν την σποραδικότητα της νόσου, όπου φαίνεται να παίζουν ρόλο τόσο άγνωστης φύσης περιβαλλοντικοί παράγοντες όσο και το γενετικό υπόβαθρο του ασθενούς.

### **2.1.5 Νόσος Parkinson και α-συνουκλεΐνη**

Αρκετοί γενετικοί τόποι φαίνεται να συσχετίζονται με την παθογένεια του οικογενούς Parkinson. Ένας από αυτούς είναι και το γονίδιο *SNCA* της περιοχής PARK1 του χρωμοσώματος 4 που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη. Η συσχέτιση αυτή αποδεικνύεται από τα εξής στοιχεία:

- Η α-συνουκλεΐνη αποτελεί πρωταρχικό συστατικό των Lewy Bodies σε όλους τους ασθενείς με PD, τόσο στην αγρίου τύπου όσο και στην μεταλλαγμένη της μορφή (Spillantini et al., 1997).
- Η οικογενής μορφή της νόσου του Parkinson κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Η σπάνια και πρόωρη εκδήλωση της οικογενούς μορφής συνδέεται με δύο διαφορετικές μεταλλαγές της α-συνουκλεΐνης, οι οποίες σχηματίζουν ινίδια σε κυτταρικό επίπεδο (Polymeropoulos et al., 1997).
- Οι διπλασιασμοί και οι τριπλασιασμοί της περιοχής PARK1 ή του γονιδίου SNCA συνδέονται με την εκδήλωση της νόσου του Parkinson (Singleton et al., 2003, Chartier-Harlin et al., 2004).

### 2.1.6 Συνουκλεΐνοπάθειες

Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για την ονομασία μιας ομάδας νευροεκφυλιστικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από τη συσσώρευση νηματοειδών συσσωματωμάτων της α-συνουκλεΐνης σε έγκλειστα σωματίδια του κυτταροπλάσματος. Κοινό χαρακτηριστικό αυτών των διαταραχών είναι η παθολογική βλάβη που προκαλείται από τα ινώδη συσσωματώματα δομής β-πτυχωτού φύλλου, τα οποία δημιουργούνται από την αδιάλυτη πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη, σε επιλεγμένους πληθυσμούς νευρώνων και κυττάρων γλοίας (εικόνα 2.4). (Spillantini et al., 2000, Marti et al., 2003)

#### Synucleinopathies\*

---

Parkinson disease  
 Sporadic  
 Familial with αS mutations  
 Familial with mutations other than αS  
 Dementia with Lewy bodies  
 "Pure" Lewy body dementia  
 Lewy body variant of Alzheimer disease  
 Familial Alzheimer disease with APP mutations  
 Familial Alzheimer disease with PS-1 mutations  
 Familial Alzheimer disease with PS-2 mutations  
 Down syndrome  
 Multiple system atrophy  
 Shy-Drager syndrome  
 Striatonigral degeneration  
 Olivopontocerebellar atrophy  
 Neurodegeneration with brain iron accumulation, type 1  
 Hallervorden-Spatz syndrome  
 Neuroaxonal dystrophy  
 Other diseases that may have synuclein-immunoreactive lesions  
 Traumatic brain injury  
 Pick disease  
 Amyotrophic lateral sclerosis

---

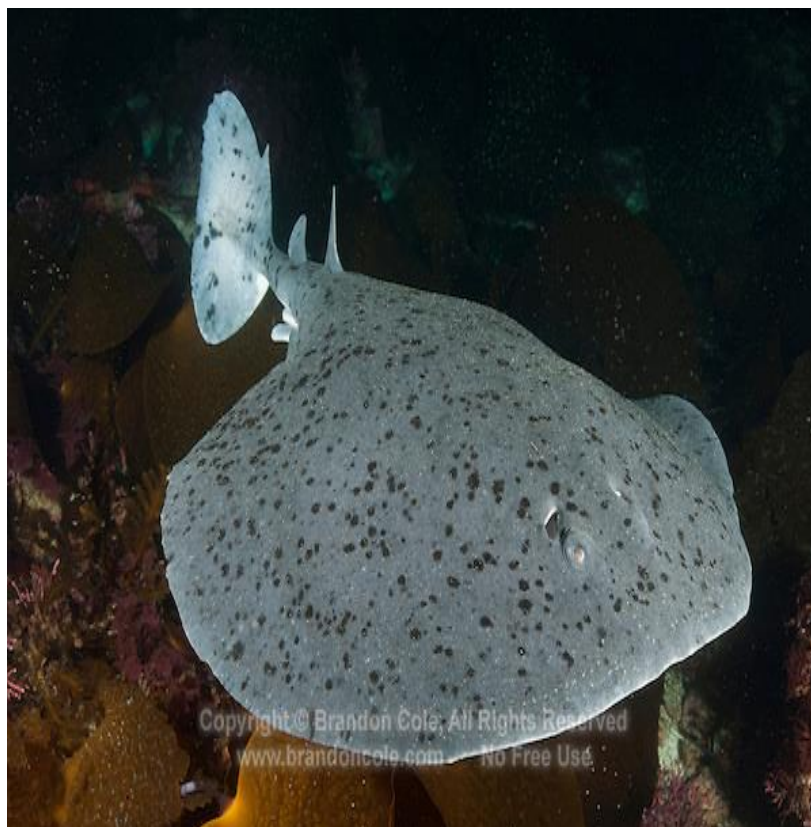
\*αS indicates α-synuclein; APP, amyloid precursor protein; and PS-1 and PS-2, presenilin-1 and -2.

**Εικόνα 2.4 :** Χαρακτηριστικές Συνουκλεΐνοπάθειες (Jama.com)

## **2.2 α-Συνουκλεΐνη**

### **2.2.1 Ιστορικά στοιχεία**

Το 1988 απομονώθηκε από τον υδρόβιο οργανισμό της οικογένειας Torpedinidae, *Torpedo californica* (εικόνα 2.5) μία πρωτεΐνη με τη χρήση ενός αντιορού έναντι χολινεργικών κυστιδίων (Maroteaux et al, 1988). Λόγω του εντοπισμού της στον πυρηνικό φάκελο (nuclear envelope) και στο προσυναπτικό άκρο (presynaptic terminal) των νευρώνων, ονομάστηκε συνουκλεΐνη.



**Εικόνα 2.5:** *Torpedo californica*

Το 1993, κατά τη διάρκεια ερευνών για τη σύνθεση των αμυλοειδών πλακών σε ασθενείς με τη νόσο του Alzheimer απομονώθηκε ένα πεπτιδίο το οποίο διαλυτοποιούνται στις λιπιδικές μεμβράνες και έτσι ορίστηκε ως NAC (Non Amyloid Component). Η πρόδρομος πρωτεΐνη αυτού του πεπτιδίου (NACP) βρέθηκε ως ομόλογη της α-συνουκλεΐνης του αρουραίου (Ueda et al. 1993).

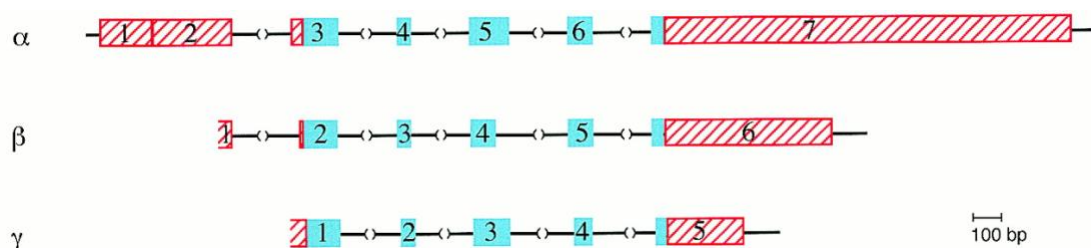
Μέχρι σήμερα οι συμβολισμοί που αφορούν στην α-συνουκλεΐνη είναι οι εξής: SNCA, PD1, MGC110988, NACP, PARK1/4.

## 2.2.2 Οικογένεια συνουκλεϊνών

Οι συνουκλεΐνες είναι μικρές διαλυτές πρωτεΐνες με υπολογισμένη μοριακή μάζα περίπου 14 kD, ενώ η παρατηρούμενη τους μοριακή μάζα είναι περίπου 19-20 kD, γεγονός που υποδεικνύει ότι υφίστανται πιθανή μετα-μεταγραφική τροποποίηση ή αυτό αφορά στην αλληλεπίδρασή της με το SDS κατά την SDS-PAGE (Surguchov, 2008)

Η οικογένεια των συνουκλεϊνών περιλαμβάνει τα εξής μέλη (εικόνα 2.6) :

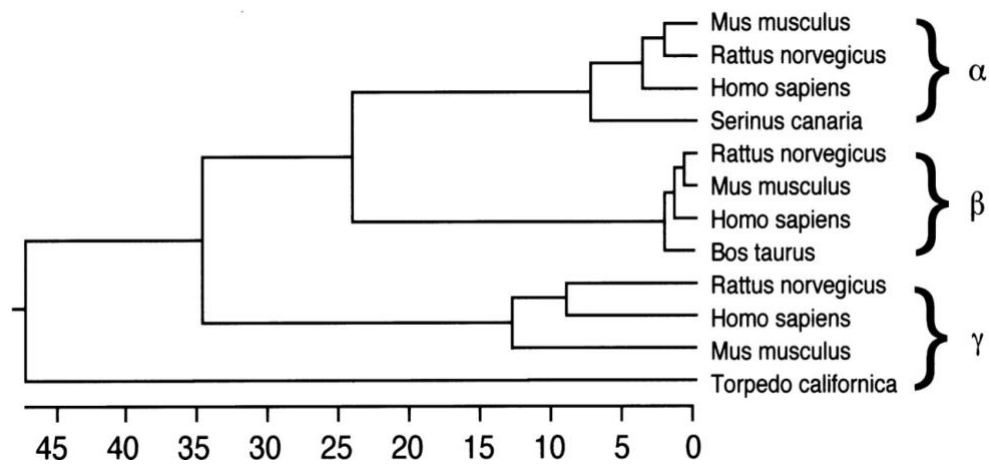
- Την α-συνουκλεΐνη, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCA* που εδράζεται στο χρωμόσωμα 4q21.3-q22 και αποτελείται από 140 αμινοξέα. (Lavedan et al. 1998)
- Την β-συνουκλεΐνη, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCB* που εδράζεται στο χρωμόσωμα 5q35 και αποτελείται από 134 αμινοξέα. (Spillantini et al., 1995)
- Την γ-συνουκλεΐνη, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCG* που εδράζεται στο χρωμόσωμα 10q23 και αποτελείται από 127 αμινοξέα. (Lavedan et al., 1998)



**Εικόνα 2.6:** Χάρτης γονιδίων των συνουκλεϊνών. Το γονίδιο της α-syn (α) είναι οργανωμένο σε 7 εξώνια (5 κωδικά – μπλε χρώμα). Ομοίως της β – syn (β) είναι οργανωμένο σε 6 εξώνια (5 κωδικά) και της γ – syn (γ) είναι οργανωμένο σε 5 εξώνια (όλα κωδικά). Με κόκκινο απεικονίζονται οι αμετάφραστες περιοχές, ενώ τα ιντρόνια αναπαρίστανται με διακεκομμένες γραμμές. (Lavedan et al., 1998)

Όλα τα μέλη της οικογένειας των συνουκλεϊνών παρουσιάζουν μία σειρά από ατελείς επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες με κυριότερες το μοτίβο KTKEGV και το μεταβλητό καρβοξυτελικό άκρο, το οποίο είναι υψηλά όξινο στην α-συνουκλεΐνη. Παρατηρείται επίσης ότι οι συνουκλεΐνες φωσφορυλιώνονται συχνά σε κατάλοιπα σερίνης και τυροσίνης.

Οι α- και β- συνουκλεΐνες εμφανίζουν μεγαλύτερη εξελικτική συγγένεια μεταξύ τους (πιο πρόσφατος κοινός πρόγονος) σε σύγκριση με τη γ- συνουκλεΐνη. (εικόνα 2.7) Σημειώνεται πως δεν έχουν εντοπιστεί ομόλογες πρωτεΐνες σε *E. coli*, *S. cerevisiae*, *C. elegans* ή *D. melanogaster*.



**Εικόνα 2.7:** Φυλογενετικό δένδρο συνουκλεϊνών. (Lavedan et al, 1998)

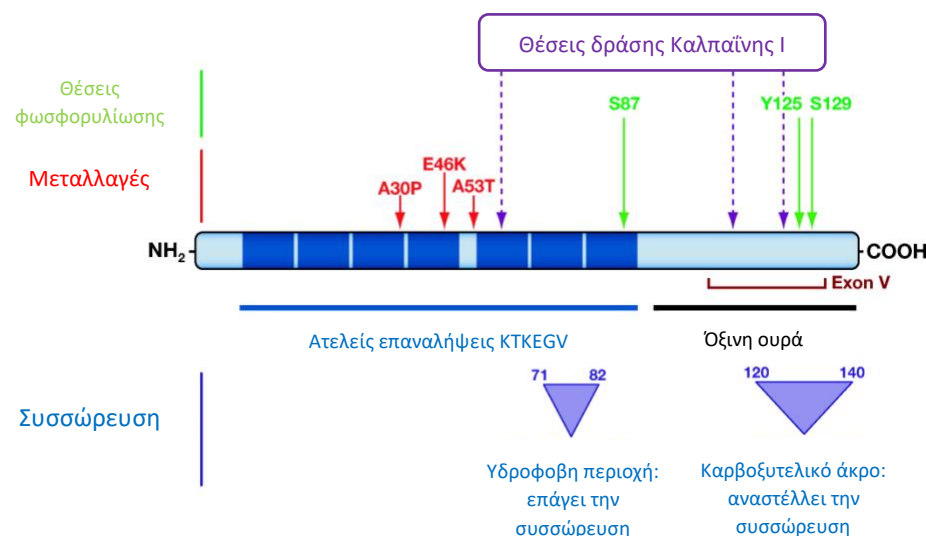
Όλα τα μέλη της οικογένειας εκφράζονται παντού στον ενήλικο εγκέφαλο, αν και υψηλότερα επίπεδα έκφρασης εντοπίζονται στον εγκεφαλικό φλοιό, στον ιππόκαμπο και την συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας, κυρίως σε νευρώνες, με μεγαλύτερη περίσσεια στις προσυναπτικές απολήξεις (Gandhi et al., 2006).

### 2.2.3 Λομή και λειτουργία της α-συνουκλεΐνης

Η α-συνουκλεΐνη είναι μία μικρή πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο προσυναπτικό άκρο των νευρώνων και του κυτταρικού πυρήνα. Αποτελείται από 140 αμινοξέα (εικόνα 2.8) και στην πρωτοταγή της δομή χωρίζεται σε τρεις λειτουργικές περιοχές που προσδίδουν μοναδικές ιδιότητες στην πρωτεΐνη (εικόνες 2.8 & 2.9) (Paleologou et al, 2005, Cookson, 2005).

MDVFMKGLSKAKEGVVAAA EKTQGV AEAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVH  
 G VATVAEKTKEQV TNVGGAVVTGVTAVANAQKTVEGAGSIAAATG FVKKDQ  
 LGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA

**Εικόνα 2.8:** Πρωτοταγής δομή της α-συνουκλεΐνης. Με γκριζα γράμματα οριοθετείται το αμινοτελικό άκρο, με μαύρα έντονα γράμματα το ενδιάμεσο πεπτίδιο NAC και με πλάγια γράμματα το καρβοξυτελικό άκρο. (Paleologou et al., 2005)



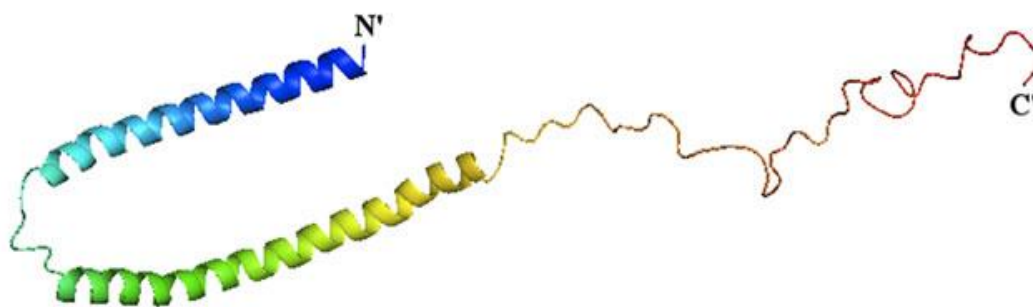
**Εικόνα 2.9:** Λειτουργικές περιοχές της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Παρατηρείται το μη δομημένο μόριο σε ευθύγραμμη μορφή. Αναγράφονται οι ατελείς επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες KTKEGV. Οι χαρακτηριστικές μεταλλαγές της πρωτεΐνης αναγράφονται με κόκκινο στο αμινοτελικό άκρο. Στο καρβοξυτελικό άκρο εντοπίζεται η όξινη ουρά, η οποία φέρει ορισμένες θέσεις φωσφορυλίωσης (πράσινο). Επίσης το καρβοξυτελικό άκρο περιλαμβάνει το εναλλακτικώς ματιζόμενο εξόνιο 5. Η όξινη ουρά της πρωτεΐνης τείνει να μειώνει την συσσώρευση της, ενώ η υδρόφοβη περιοχή στο κέντρο της την επάγει. (Cookson, 2005)

Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 1-60 και αποτελείται από 7 ατελείς επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 11 καταλοίπων στο μοτίβο XKTKE GVXXXA (όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ). (Paleologou et al., 2005, Fonseca et al., 2015) Λόγω των επαναλαμβανόμενων αυτών μοτίβων, το αμινοτελικό άκρο φέρει την ιδιότητα να σχηματίζει 1-2 αμφιπαθείς  $\alpha$ -έλικες, οι οποίες σχετίζονται με την ικανότητα της πρωτεΐνης να δεσμεύεται σε λιπιδιακές μεμβράνες και την ικανότητα της πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες. (Bussell & Eliezer, 2003) Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι όλες οι μελετώμενες μεταλλαγές της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης εδράζονται στο αμινοτελικό της άκρο.

Η κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης αποτελείται από τα κατάλοιπα 61-95 και είναι γνωστή ως NAC (non-amyloid component). Η υψηλά υδρόφοβη αυτή περιοχή περιλαμβάνει 12 αμινοξέα στις θέσεις 71-82 με κρίσιμο ρόλο στον σχηματισμό ινιδίων και συσσωματωμάτων. (Paleologou et al., 2005, Fonseca et al., 2015)

Τα υπόλοιπα 44 αμινοξέα της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης αποτελούν το καρβοξυτελικό άκρο και προσδίδουν αρνητικό φορτίο στην πρωτεΐνη λόγω της πληθώρας γλουταμινικών και ασπαρτικών οξέων. Τα εν λόγω αρνητικά κατάλοιπα φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της συσσωμάτωσης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, παρεμποδίζοντας την συσσώρευση μέσω του σχηματισμού διαλυτών ολιγομερών. (Paleologou et al., 2005, Fonseca et al., 2015) Το καρβοξυτελικό άκρο παραμένει μη δομημένο, ακόμη και κατά την αλληλεπίδρασή του με μεμβρανικά φωσφολιπίδια. Ακόμα, προτείνεται ότι το καρβοξυτελικό άκρο παίζει κάποιο ρόλο στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με μόρια συνοδούς (chaperones). (Fonseca et al., 2015)

Για χρόνια, η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη θεωρούνταν μία δευτεροταγώς μη δομημένη μονομερής πρωτεΐνη. Πρόσφατα προτείνεται από ορισμένες μελέτες ότι λαμβάνει την δομή ενός τετραμερούς ελίκων (εικόνα 2.10), αλλά το αντικείμενο αυτό παραμένει υπό αμφισβήτηση. Παρόλα αυτά, η πιθανότητα η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη να αποτελεί εκ της φύσεώς της δευτεροταγώς δομημένο μόριο έφερε νέες προοπτικές στην διαδικασία ολιγομερισμού και συσσωμάτωσης της εν λόγω πρωτεΐνης, ένα από τα κυριότερα μυστήρια στις τρέχουσες έρευνες. (Fonseca et al., 2015)



**Εικόνα 2.10:** Δομή  $\alpha$ -ελίκας της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. (Ritchie et al, 2012)

Όσον αφορά τις λειτουργίες της α-συνουκλεΐνης, αυτές δεν είναι πλήρως κατανοητές. Δεδομένης της θέσης της α-συνουκλεΐνης στις συναπτικές μεμβράνες, είναι πιθανόν η πρωτεΐνη να διαδραματίζει ένα ρόλο στις συνάψεις ρυθμίζοντας την αποθήκευση των νευροδιαβιβαστών στα συναπτικά κυστίδια στον νευρικό ιστό. (Paleologou et al., 2005) Επίσης αναστέλλει την φωσφολιπάση D2 ρυθμίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση. Ακόμη, συμμετέχει στην νευρωνική πλαστικότητα, την ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση, τον μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων και την συγκέντρωση του συμπλόκου των SNAREs. Τέλος, η α-συνουκλεΐνη φαίνεται να φέρει ρόλο μοριακού συνοδού (chaperone) και για άλλες πρωτεΐνες. (Beyer, 2006, Porova et al., 2015, Kim et al, 2014)

#### **2.2.4 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της α-συνουκλεΐνης**

Η α-συνουκλεΐνη υπόκειται σε πλήθος μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Αυτές περιλαμβάνουν φωσφορυλίωση, ουβικιτινίωση, νιτροποίηση, σουμοϋλίωση, γλυκοζυλίωση ή ακετυλίωση. Είναι γνωστό πως οι τροποποιήσεις αυτές επηρεάζουν την συσσωμάτωσή της και την τοξικότητά της, αλλά η ενδεχόμενη συνδρομή των διαφόρων τροποποιήσεων στους μηχανισμούς της νόσου παραμένει ασαφής. Οι πιο καλά μελετημένες τροποποιήσεις αποτελούν η σουμοϋλίωση και η φωσφορυλίωση. (Porova et al., 2015, Fonseca et al., 2015)

Η σουμοϋλίωση είναι μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση κατά την οποία μικρές πρωτεΐνες ομοιάζουσες με ουβικιτίνη, οι SUMO, δεσμεύονται ομοιοπολικά σε πρωτεΐνες στόχους. Η σουμοϋλίωση εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες όπως η πρωτεϊνική σταθερότητα, η πυρηνική μεταφορά, η απόπτωση, η απόκριση στο στρες και η μεταγραφική ρύθμιση. Η σουμοϋλίωση πραγματοποιείται από μία αντιστρεπτή, εξαρτώμενη από το ATP διαδικασία, όπου η SUMO δεσμεύεται ομοιοπολικά σε κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνών στόχων μέσω ενός θειο-εστερικού δεσμού. Μερικές SUMO ισοπεπτιδάσες μπορούν να αποδεσμεύσουν τον τροποποιητή. Συνεπώς η αντιστρεπτή σουμοϋλίωση είναι μία εξαιρετικά δυναμική διαδικασία, ενώ πολλές πρωτεΐνες υφίστανται άμεσους κύκλους σουμοϋλίωσης και αποδέσμευσης της SUMO. Η SUMO εκφράζεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Τα θηλαστικά διαθέτουν τουλάχιστον τρεις πρωτεΐνες SUMO: SUMO1, SUMO2 και SUMO3. Τα μονοπάτια σουμοϋλίωσης των *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* ή του *Saccharomyces cerevisiae* είναι κρίσιμα. Στον *Saccharomyces cerevisiae* υπάρχει μόνο ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη SUMO, το *SMT3*, το οποίο είναι ομόλογο του *SUMO1* των θηλαστικών, ενώ απουσιάζουν τα υπόλοιπα παράλογα γονίδια, *SUMO2* και *SUMO3*. (Porova et al., 2015 and references therein)

Η σουμοϋλίωση παρουσιάζει αυξανόμενο ενδιαφέρον από την σκοπιά των νευροεκφυλιστικών διαταραχών. Όπως και η ουβικιτίνη, η SUMO εντοπίζεται στα νευρωνικά συσσωματώματα πρωτεϊνών και συσχετίζεται με ορισμένες νευροεκφυλιστικές νόσους. Το γεγονός αυτό γέννησε το ενδιαφέρον για την ταυτοποίηση των στόχων της πρωτεΐνης στο εσωτερικό των συσσωματωμάτων. Αρχικά, διαπιστώθηκε πως η α-συνουκλεΐνη μονοσουμοϋλιώνεται από την SUMO1 *in vitro*. Στην συνέχεια, μία άλλη μελέτη αποκάλυψε την ομοιοπολική τροποποίηση της α-συνουκλεΐνης από την SUMO2 σε εγκεφαλικούς ιστούς διαγονιδιακών ποντικών. Η σύζευξη με την SUMO πραγματοποιείται σε δυο κύρια σημεία σουμοϋλίωσης, τα K96 και K102. Αποδείχθηκε ότι η σουμοϋλίωση προλάμβανε τον

σχηματισμό ινιδίων της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης *in vitro*. Από αυτά τα αποτελέσματα προτάθηκε ότι η σουμοϋλίωση ρυθμίζει αρνητικά τον σχηματισμό συσσωματωμάτων της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, διεγείροντας την διαλυτοποίησή της. (Porova et al., 2015 and references therein)

Πρόσφατα σε μοντέλα ζυμομύκητα διερευνήθηκε η επίδραση της σουμοϋλίωσης στην κυτταρική τοξικότητα από την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη. Παρατηρήθηκε πως ο κυτταρικός μηχανισμός της σουμοϋλίωσης διατηρείται από τους ζυμομύκητες έως τους ανθρώπους. Η αγρίου τύπου  $\alpha$ -συνουκλεΐνη, όπως και η μεταλλαγή A30P, σουμοϋλιώνονται στον ζυμομύκητα στις ίδιες θέσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω και έχουν περιγραφεί ως τα κύρια σημεία σουμοϋλίωσης στους ανθρώπους. Η σουμοϋλίωση προστατεύει τα κύτταρα ζύμης από την τοξικότητα της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και τον σχηματισμό συσσωματωμάτων. Περαιτέρω μελέτες αποκάλυψαν ότι η προστατευτική αυτή δράση της SUMO απαιτεί άμεση τροποποίηση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στις δυο θέσεις σουμοϋλίωσης. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαίωσαν περαιτέρω τον ρόλο της τροποποίησης από την SUMO στην ρύθμιση της κυτταροτοξικότητας από την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη και υποστηρίζουν πως ο ζυμομύκητας μπορεί να χρησιμεύσει ως μοντέλο μελέτης της επίδρασης της SUMO σε κύτταρα που καλούνται να αντιμετωπίσουν υψηλές ποσότητες της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. (Porova et al., 2015 and references therein)

Η φωσφορυλίωση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της εντόπισης της πρωτεΐνης, της συσσωμάτωσής και της τοξικότητάς της. Η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο σερίνης 129 είναι η κύρια μετα-μεταφραστική τροποποίηση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, όπως έχει περιγραφεί σε ανθρώπινα κύτταρα. Περίπου 90% της πρωτεΐνης των Lewy Bodies είναι φωσφορυλιωμένη σε αυτό το κατάλοιπο, ενώ μόνο το 4% του διαλυτού μονομερούς της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης είναι φωσφορυλιωμένη υπό φυσιολογικές συνθήκες. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει μία στενή σχέση ανάμεσα στην φωσφορυλίωση στην σερίνη 129 (S129) και την τάση συσσωμάτωσής της πρωτεΐνης. Οι μεταλλαγές A53T και A30P επηρεάζονται ήπια από την φωσφορυλίωση στην S129 σε σχέση με την αγρίου τύπου μορφή. Σε αντίθεση, η μεταλλαγή E46K βρίσκεται φωσφορυλιωμένη σε σημαντικό βαθμό στην S129 τόσο στις ζύμες όσο και στα κύτταρα θηλαστικών. Αυτή η επίδραση σχετίζεται με αυξημένη συσσώρευση στον πυρήνα και στο ενδοπλασματικό δίκτυο της μεταλλαγής αυτής. (Porova et al., 2015 and references therein)

Παρά τις εκτεταμένες μελέτες, δεν υπάρχει ακόμη ομοφωνία σε σχέση με την επίδραση της φωσφορυλίωσης στην τοξικότητα που διαμεσολαβείται από την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη και την συσσωμάτωσή της, επειδή τα αποτελέσματα στους διάφορους οργανισμούς μοντέλα είναι διαφορετικά. Σε μερικές μελέτες δεν παρατηρείται καμία επίδραση της φωσφορυλίωσης στην τοξικότητα και την συσσώρευση. Μελέτες στην *Drosophila melanogaster* και σε διαγονιδιακά ποντίκια αποκάλυψαν παθογενετικούς ρόλους της φωσφορυλίωσης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στην S129. Μελέτες σε αρουραίους και στον *Caenorhabditis elegans* απέδειξαν αντίθετα μία προστατευτική επίδραση της φωσφορυλίωσης στην S129 έναντι της νευρωνικής δυσλειτουργίας. (Porova et al., 2015 and references therein)

Μερικές κινάσες συμμετέχουν στην φωσφορυλίωση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στην S129 στα ανθρώπινα κύτταρα. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι PLKs 1-3, οι GRKs, οι CK 1 και 2 και η LRRK2. Η φωσφορυλίωση από την GRK5 παίζει σημαντικό ρόλο στην

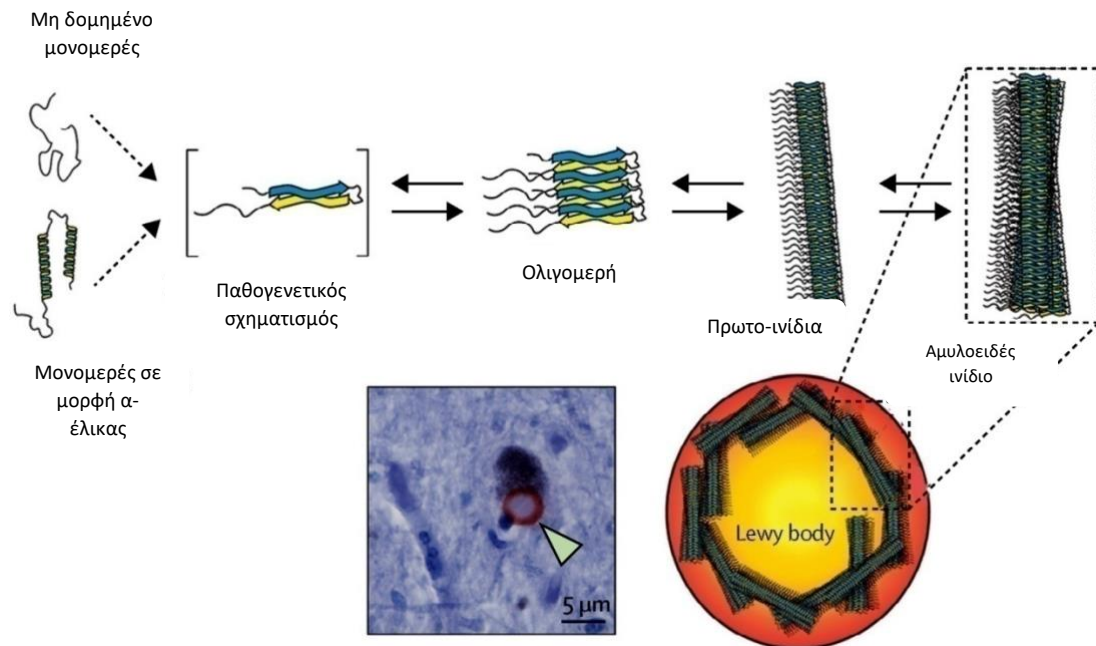


παθογένεση της νόσου του Parkinson. (Popova et al., 2015 and references therein, Fonseca et al., 2015 and references therein)

Ορισμένες ενδογενείς κινάσες φωσφορυλιώνουν επίσης την α-συνουκλεΐνη στην συντηρημένη S129 στον ζυμομύκητα. Οι PLKs και οι CKs διαθέτουν ορθόλογα στον ζυμομύκητα. Η Cdc5 αποτελεί ορθόλογο των PLKs και φωσφορυλιώνει την α-συνουκλεΐνη στην S129, ενώ η υπερέκφραση της Cdc5 παρέχει προστατευτικό ρόλο από την τοξικότητα της α-συνουκλεΐνης. Παράλληλα, έχει αποδειχθεί πως οι κινάσες καζεΐνης CK-1 και CK-2 του ζυμομύκητα φωσφορυλιώνουν την α-συνουκλεΐνη στην S129, ενώ η υπερέκφραση της Yck3, μίας λυσοσωμιακής CK-1 κινάσης του ζυμομύκητα μειώνει την τοξικότητα της α-συνουκλεΐνης. Ακόμη, ένας αριθμός από μελέτες στον ζυμομύκητα υποστηρίζει τον προστατευτικό ρόλο της φωσφορυλίωσης της α-συνουκλεΐνης έναντι της τοξικότητας και του σχηματισμού συσσωματωμάτων. Ο προστατευτικός ρόλος της φωσφορυλίωσης στην S129 περιγράφηκε σε έναν στελεχο-εξαρτώμενο τρόπο στον ζυμομύκητα. Η παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης αυξάνει την τοξικότητα και τις βλάβες της υποκυττάριας κυκλοφορίας κατά ένα τρόπο που σχετίζεται με το γενετικό υπόβαθρο. Πρόσφατες μελέτες στον ζυμομύκητα αποκάλυψαν πως η έκφραση των αλληλομόρφων S129A ή S129G, τα οποία είναι μεταλλάγματα ελαττωματικά ως προς την φωσφορυλίωση, είχε ως αποτέλεσμα την τοξικότητα και των σχηματισμό εγκλειστών. (Popova et al., 2015 and references therein)

### **2.2.5 Παθολογική δομή της α-συνουκλεΐνης**

Η παθολογική μετατροπή της α-συνουκλεΐνης αναφέρεται στην απόκτηση τυχαίας σπειροειδούς μορφής σε δομή β- πτυχωτού φύλλου. Μπορεί να συμβεί σε συνθήκες υπερέκφρασης, μεταλλαγών (σημειακές, διπλασιασμοί, τριπλασιασμοί) ή/και εναλλακτικού ματίσματος του *SNCA*. Η δομή αυτή συνοδεύεται από εκτεταμένη συσσώρευση και σχηματισμό κυτταροπλασματικών εγκλειστών που μοιάζουν με τα νημάτια στα σωμάτια Lewy. Τα εγκλειστα περιέχουν την ίδια την α-συνουκλεΐνη, ουβικιτίνη, λιπίδια και άλλες συνοδές πρωτεΐνες. (Dehay et al., 2015) Το αποτέλεσμα της παθολογικής μετατροπής της α-συνουκλεΐνης παρουσιάζεται στην εικόνα 2.11.

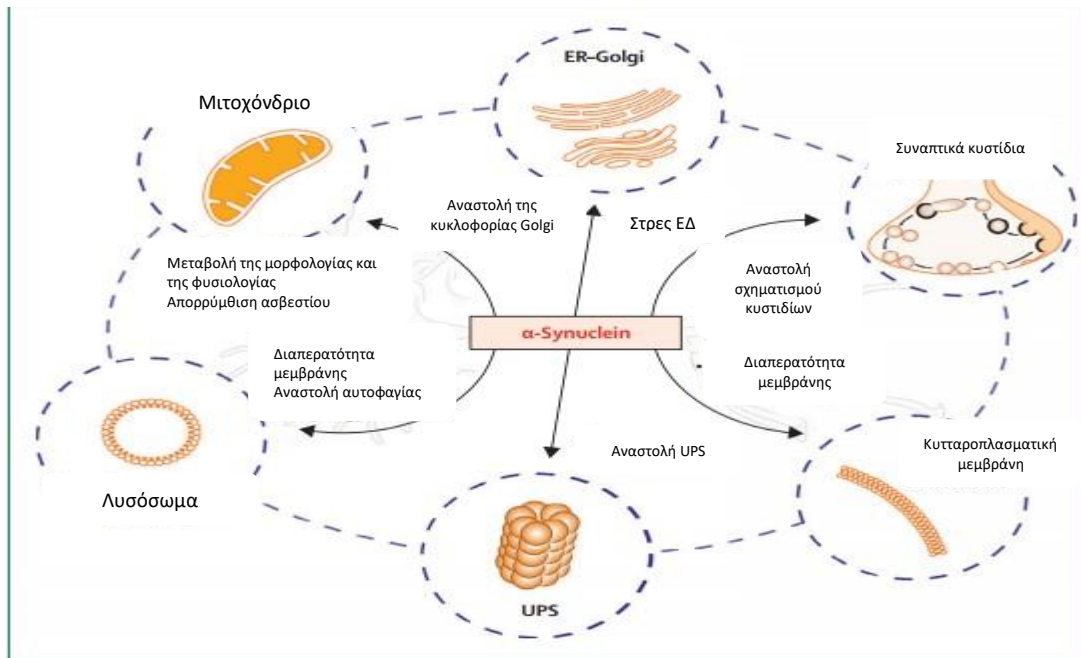


**Εικόνα 2.11:** Παθολογική μετατροπή της α-συνουκλεΐνης. Η α-συνουκλεΐνη βρίσκεται σε μία δυναμική ισορροπία μεταξύ της μη δομημένης της μορφής και της μορφής α-έλικας, στην οποία το μονομερές της πρωτεΐνης μπορεί να συσσωρευθεί πρώτα σε μερικά μικρά διαλυτά ολιγομερή τα οποία σταθεροποιούνται μέσω της δομής β-πτυχωτού φύλλου και έπειτα σε υψηλού μοριακού βάρους αδιάλυτα πρωτο-ινίδια, τα οποία είναι δυνατόν να πολυμεριστούν σε αμυλοειδή ινίδια και να σχηματίσουν τα Lewy Bodies. (Dehay et al., 2015)

## 2.2.6 Παθογένεια μέσω της α-συνουκλεΐνης

Η συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης έχει ποικίλες συνέπειες στο κύτταρο όπως (εικόνα 2.12) (Dehay et al., 2015):

- Αναστολή λειτουργίας του πρωτεασώματος παρά την ουβικουτίνωση της πρωτεΐνης και συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο κύτταρο.
- Στρες του ενδοπλασματικού δικτύου.
- Αναστολή της ενδοκυττάριας κυκλοφορίας (ΕΔ-Golgi).
- Αύξηση της παραγωγής ROS (reactive oxygen species) και οξειδωτικό στρες.
- Τροποποίηση και δυσλειτουργία της μιτοχondριακής μεμβράνης.
- Αναστολή της αυτοφαγίας στα λυσοσώματα



**Εικόνα 2.12:** Κυτταρική παθογένεια και αλληλεπιδράσεις της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Λόγω της βιοχημικής συγγένειας της με τις μεμβράνες, η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη αλληλεπιδρά με πλήθος οργανιδίων του κυττάρου, κατά πρώτο λόγο με την κυτταρική μεμβράνη, όπου ξεκινά και η διαδικασία της συσσώρευσής της. Αλληλεπιδρά επίσης με κυστιδιακές μεμβράνες αναστέλλοντας την λειτουργία των κυστιδίων μεταφοράς. Προκαλεί στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο και την συσκευή Golgi, μεταβάλλει την μορφολογία και φυσιολογία των μιτοχονδρίων, προκαλώντας έτσι οξειδωτικό στρες και απορρύθμιση των επιπέδων του ασβεστίου, και τέλος αναστέλλει την λειτουργία του πρωτεασώματος και των λυσοσωμάτων απορρυθμίζοντας ζωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς όπως η ουβικουτινώση και η αυτοφαγία. (Dehay et al., 2015)

## 2.2.7 Ισομορφές της $\alpha$ -συνουκλεΐνης

Το εναλλακτικό μάτισμα αποτελεί ευέλικτο και κοινό μηχανισμό για τη δημιουργία πολλαπλών mRNAs από ένα μοναδικό μετάγραφο. Οι αλλαγές στη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης που προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα αφορούν λειτουργικές διαφοροποιήσεις λόγω της ειδικής απαλοιφής των λειτουργικών περιοχών (domains) της πρωτεΐνης. Το εναλλακτικό μάτισμα που επιφέρει αλλαγές σε λειτουργικές περιοχές των πρωτεϊνών διαιρείται σε δύο τύπους:

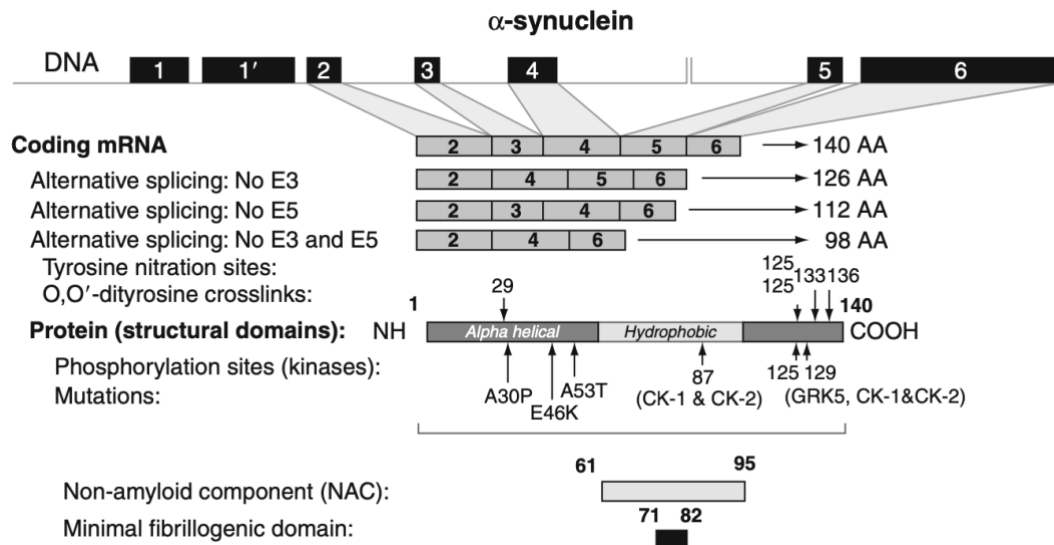
- I. Μάτισμα με συνέπεια την παραγωγή μεταγράφου με την εισαγωγή ενός πρόωρου κωδικονίου λήξης στο πλαίσιο ανάγνωσης του mRNA. Ως αποτέλεσμα του φαινομένου συντίθενται βραχύτερες πρωτεΐνες στο καρβοξυτελικό άκρο.
- II. Μάτισμα με συνέπεια την παραγωγή μεταγράφου με διαγραφές εντός του πλαισίου ανάγνωσης του mRNA. Το μάτισμα αυτό επιφέρει πιθανή απώλεια εξονίων.

Έχουν περιγραφεί τέσσερις διαφορετικές ισομορφές της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (εικόνα 2.13) :

1. Η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη 140, το πλήρες και κύριο μετάγραφο (14,5 kD)

2. Η α-συνουκλεΐνη 126 (13,1 kD)
3. Η α-συνουκλεΐνη 112 (11,4 kD)
4. Η α-συνουκλεΐνη 98 (11 kD)

Οι ισομορφές 126 και 112 προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα των εξονίων 3 και 5 αντίστοιχα και τη διαγραφή κωδικονίων εντός του πλαισίου ανάγνωσης της αντίστοιχης ακολουθίας του εξονίου ενώ η ισομορφή 98 προκύπτει από την διαγραφή κωδικονίων τόσο στο εξόνιο 3 όσο και στο εξόνιο 5 (Beyer, 2006, Bungereoth et al., 2014).



**Εικόνα 2.13:** Απεικόνιση των προϊόντων του εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης και των δομικών αλλαγών της. Παρατηρούνται τα 7 εξόνια του γονιδίου *SNCA* (1, 1', 2, 3, 4, 5, 6) εκ των οποίων τα 5 είναι κωδικά (2, 3, 4, 5, 6) και αποδίδουν προϊόντα mRNA. Κατά το εναλλακτικό μάτισμα επισημαίνεται η διαγραφή του κάθε εξονίου που αποδίδει και την τελική ισομορφή της α-συνουκλεΐνης. (Surguchov, 2008)

#### □ α-συνουκλεΐνη 126

Η ισομορφή αυτή προκύπτει από τη διαγραφή εντός του πλαισίου ανάγνωσης της ακολουθίας του εξονίου 3. Το εξόνιο 3 εντοπίζεται στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και περιλαμβάνει τα κατάλοιπα αμινοξέων 41-54. Η διαγραφή αυτών των κρίσιμων περιοχών επηρεάζει τη σύνδεση της πρωτεΐνης με τη μεμβράνη των νευρικών κυττάρων, διότι, όπως προαναφέρθηκε, ολόκληρη η αμινο-τελική αλληλουχία της α-συνουκλεΐνης είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με τη μεμβράνη. Η απουσία έστω και μίας από τις 7 επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μειώνει δραματικά τις ιδιότητες αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με τις μεμβράνες. Αν ληφθεί υπόψιν και το γεγονός πως η αλληλεπίδραση αυτή αφορά την αρχή της διαδικασίας της συσσώματωσης, αντιλαμβάνεται κανείς πως η α-συνουκλεΐνη 126 παρεμποδίζει τη συσσώρευση και ο σχηματισμός συσσωματώματων αποδυναμώνεται σημαντικά (Beyer, 2006, Bungereoth et al., 2014).

□ α-συνουκλεΐνη 112 (εικόνα 2.14)



**Εικόνα 2.14:** Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της ισομορφής 112 της α-συνουκλεΐνης. Παρατηρείται, σε σύγκριση με την εικόνα 2.4, η απώλεια μέρους του καρβοξυ-τελικού μη δομημένου άκρου της πρωτεΐνης στην δομή της ισομορφής 112. (i-Tasser)

Στην ισομορφή αυτή παρατηρείται η απουσία των αλληλουχιών που σχετίζονται με το εξώνιο 5. Το εξώνιο 5 εντοπίζεται στο καρβοξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα του εναλλακτικού ματίσματος είναι μία πρωτεΐνη με 112 αμινοξέα, της οποίας υπολείπονται τα αμινοξέα 103-130 του αναγνωστικού πλαισίου. Η έλλειψη αυτή μεταφέρεται στην πρωτεΐνη με τη διαγραφή μίας θέσης φωσφορυλίωσης στο κατάλοιπο 129 και τη διατήρηση μίας άλλης στη σερίνη 87. Η συσσωμάτωση της ισομορφής αυτής πιθανόν να σχετίζεται άμεσα με τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης, αλλά λόγω της διαγραφής του καταλοίπου 129 αποδίδεται είτε στη φωσφορυλίωση στη σερίνη 87 είτε σε άλλη δομική μεταβολή της α-συνουκλεΐνης (Beyer, 2006).

Ο βαθμός συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης 140 εξαρτάται από τη συγκέντρωση του βραχυσμένου καρβοξυ-τελικού άκρου. Αυξημένες απαλοιφές σε αυτό, στην αρνητικά φορτισμένη περιοχή, αυξάνουν την τάση της α-συνουκλεΐνης να σχηματίζει ινίδια, αφού καταργείται ο προστατευτικός ρόλος της περιοχής αυτής, όπως αυτός αναλύθηκε ανωτέρω. Επομένως, αναμένεται υψηλότερος ρυθμός συσσωμάτωσης στην α-συνουκλεΐνη 112 σε σχέση με την α-συνουκλεΐνη 140 (Beyer, 2006).

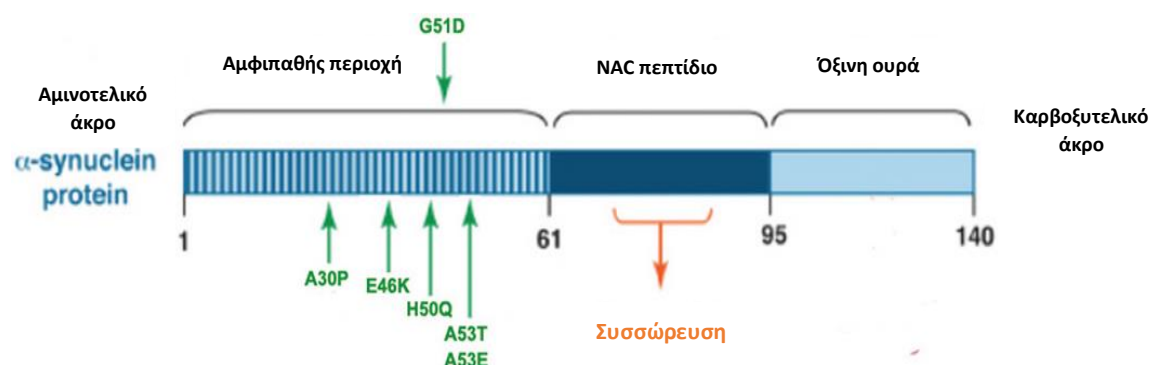
□ α-συνουκλεΐνη 98

Η μικρή αυτή ισομορφή της α-συνουκλεΐνης προέρχεται από την έλλειψη τόσο του εξωνίου 3 όσο και του εξωνίου 5 και χαρακτηρίζεται από τον δραστικό περιορισμό-μείωση του καρβοξυ-τελικού άκρου και την διακοπή της αμινοτελικής περιοχής ελίκων. Η κεντρική περιοχή NAC της πρωτεΐνης παραμένει ανεπηρέαστη και με το αμινοτελικό άκρο συναποτελούν το μόριο της ισομορφής αυτής. Οι δομικές αυτές αλλαγές στο μόριο του κύριου μεταγράφου επιφέρουν επαυξημένη συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης 98, παρόμοια με εκείνη της 112 (Gamez-Valero & Beyer, 2018).

## 2.2.8 Μεταλλαγές της α-συνουκλεΐνης

Έχουν περιγραφεί πέντε σημειακές μεταλλαγές της α-συνουκλεΐνης: η A30P, η A53T, η E46K, η H50Q, η G51D και η A53E. Όλες οι μεταλλαγές συνδέονται με την νόσο του Parkinson, ενώ η E46K έχει συνδεθεί και με τη κληρονομούμενη άνοια με Lewy Bodies. Όλες εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και κατ'

επέκταση επηρεάζουν την αλληλεπίδραση της α-συνουκλεΐνης με τις λιπιδιακές μεμβράνες, ενώ μεταβάλλουν με τις ιδιότητες τους την απαρχή των γεγονότων της ινιδιογένεσης. (Εικόνα 2.15) Πιο καλά χαρακτηρισμένες και μελετημένες είναι οι A53T και A30P.



**Εικόνα 2.15:** Απεικόνιση των μεταλλαγών της α-συνουκλεΐνης. Παρατηρούνται τα σημεία όπου λαμβάνουν χώρα οι μεταλλαγές στο αμινοτελικό άκρο ενώ επισημαίνεται ο σημαντικός ρόλος του πεπτιδίου NAC στην συσσώρευση της της α-συνουκλεΐνης. (Xu et al., 2015)

#### □ Μεταλλαγή A30P

Η μεταλλαγή A30P αναφέρεται στη μεταστροφή της G σε C στη νουκλεοτιδική θέση 88, οπότε προκύπτει προλίνη αντί αλανίνης στη θέση 30 της αμινοξικής αλληλουχίας. Ως εκ τούτου δημιουργείται μία νέα θέση περιορισμού για το ένζυμο *MvaI* στο εξώνιο 3 (εικόνα 2.16).

#### Exon 3 / *MvaI* restriction

	V	A	E	A	A	G	K	T	K
Normal	GTG	GCA	GAA	GCA	GCA	GGA	AAG	ACA	AAA
					↓ <i>MvaI</i>				
Mutant	GTG	GCA	GAA	GCA	CCA	GGA	AAG	ACA	AAA
	V	A	E	A	P	G	K	T	K

**Εικόνα 2.16:** Δημιουργία της νέας θέσης περιορισμού *MvaI* στη μεταλλαγή A30P της α-συνουκλεΐνης.

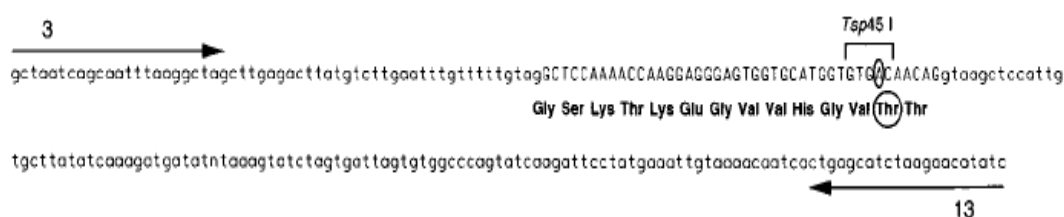
Η μεταλλαγή αυτή εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 1998 σε μία Γερμανική οικογένεια από τους Kruger και συνεργάτες μέσω διερεύνησης 192 ανθρώπων με σποραδική επίπτωση παρκινσονισμού και 7 ανθρώπων με οικογενειακό ιστορικό νόσου Παρκινσον. Από τα στοιχεία που προέκυψαν κατά την τότε μελέτη βρέθηκε πως κληρονομείται αυτοσωμικά και επικρατώς με τα άτομα τα οποία την έφεραν να εμφανίζουν σοβαρά νευρολογικά ελλείματα ολόκληρου του φάσματος της νόσου Πάρκινσον.

Η μεταλλαγή αυτή επιφέρει εξασθένηση της ικανότητας πρόσδεσης της α-συνουκλεΐνης στις κυστιδικές μεμβράνες των εγκεφαλικών κυττάρων, με συνέπεια την αύξηση του επιπέδου της πρωτεΐνης στο εσωτερικό του νευρικού κυττάρου και την παρεκκλίνουσα αλληλεπίδραση με νευροπαθολογικά αποτελέσματα. Αυτό συμβαίνει, επειδή η προλίνη μεταβάλλει την τρισδιάστατη δομή της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου, επάγοντας ένα δομικό σπείραμα στη μέση των αμφιπαθών ελίκων. Η τοξικότητα από την μεταλλαγή αυτή φαίνεται να οφείλεται στο γεγονός ότι η

αδυναμία πρόσδεσης σε κυστίδια μεμβρανών και η αδυναμία αποδιάταξης λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών παρεμποδίζει την αξονική μεταφορά της πρωτεΐνης οδηγώντας σε συσσώρευση και δημιουργία συσσωματωμάτων. (Kruger et al., 1998)

#### □ Μεταλλαγή A53T

Στη μεταλλαγή A53T η α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου υφίσταται μετάπτωση του νουκλεοτιδίου G σε A στη θέση 209 με αποτέλεσμα το σχηματισμό θρεονίνης αντί της αλανίνης στη θέση 53 της αμινοξικής αλληλουχίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία μιας νέας θέσης περιορισμού για το ένζυμο *Tsp45I*. (εικόνα 2.17)



**Εικόνα 2.17:** Μεταλλαγή A53T: με κύκλο απεικονίζεται η θέση της μεταλλαγής στη νουκλεοτιδική και την αμινοξική αλληλουχία, ενώ στο πλαίσιο φαίνεται η νέα θέση περιορισμού.

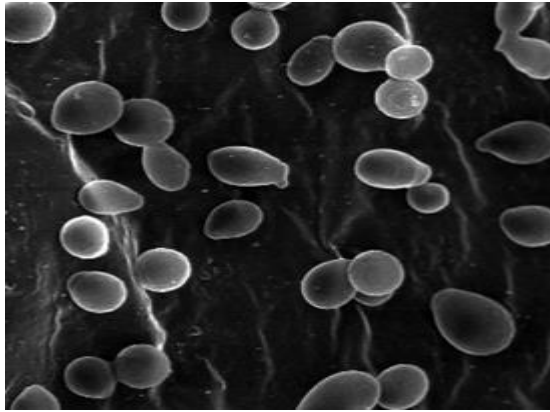
Η μεταλλαγή αυτή εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 1997 σε μία ιταλική γενεαλογία αλλά και σε 3 οικογένειες Ελλήνων και η κληρονομιά της ακολουθεί το αυτοσωμικό επικρατές πρότυπο. Τα άτομα που έφεραν την μεταλλαγή αυτή εμφάνιζαν νόσο Πάρκινσον σε ηλικία 30-50 ετών, οπότε η μεταλλαγή αυτή ενοχοποιήθηκε πρώτη για την οικογενή μορφή της νόσου. (Polymeropoulos et al., 1997)

Η α-συνουκλεΐνη A53T είναι η πρώτη μεταλλαγή που ανιχνεύθηκε. Σχηματίζει ινίδια με γρηγορότερο ρυθμό από την μεταλλαγή A30P και την α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι παθολογικοί μηχανισμοί μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τη μορφή του μεταλλάγματος. Τέλος, η μεταλλαγή A53T μειώνει ελαφρώς την πρόσδεση της α-συνουκλεΐνης σε κυστίδια μεμβρανών. (Stefanis, 2012, Ozansoy et al., 2013)

### 2.3. Ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)

Ο *Saccharomyces cerevisiae* (Εικόνα 2.18) είναι αερόβιος, με διάμετρο 4-5 μm, μικροαερόφιλος, με βέλτιστο pH ανάπτυξης 4.5 και παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην αιθανόλη. Χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα στην οινοποίηση, την αρτοποιία και την ζυθοποιία. Πιστεύεται πως αρχικά απομονώθηκε από την φλούδα των σταφυλιών.

Αποτελεί έναν από τους πιο εκτενώς μελετημένους κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Αναπαράγεται μέσω μίας διαδικασίας διαίρεσης γνωστής ως εκβλάστηση και αναπτύσσεται είτε ως διπλοειδής είτε ως απλοειδής οργανισμός.



**Εικόνα 2.18:** *Saccharomyces cerevisiae*

- Οικολογία του *Saccharomyces cerevisiae*

Πρωτίστως απαντάται σε κορμούς και φύλλα δένδρων, στο έδαφος, όπου διαχειμάζει και σε έντομα. Στα ώριμα φρούτα μεταφέρεται από έντομα και οι πληθυσμοί του είναι κατά πολύ μικρότερου σε σύγκριση με άλλα μικρόβια. Ακόμη, οι βασίλισσες των κοινών σφήκων μπορούν να φέρουν κύτταρα ζυμομύκητα μεταξύ φθινοπώρου και άνοιξης με σκοπό να τα μεταβιβάσουν στους απογόνους τους. Το έντερο μίας κοινής σφήκας φέρει στελέχη του *S. cerevisiae* και ευνοεί την σύζευξη μεταξύ τους προσφέροντας τις περιβαλλοντικές συνθήκες για την δημιουργία σπορίων και την εκβλάστησή τους.

Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *S. cerevisiae* είναι οι 30–35 °C (86–95 °F). (Stefanini et al. 2012, Stefanini 2016)

- Κύκλος ζωής του *Saccharomyces cerevisiae*

Δύο τύποι κυττάρων ζυμομύκητα υπάρχουν: τα απλοειδή και τα διπλοειδή κύτταρα. Τα απλοειδή υπόκεινται σε έναν απλό κύκλο ζωής με μίτωση και ανάπτυξη και υπό συνθήκες υψηλού στρες γενικά αποπίπτουν. Αυτή είναι η φυλετική μορφή του μύκητα. Τα διπλοειδή κύτταρα φέρουν παρόμοιο κύκλο ζωής με μίτωση και ανάπτυξη, αλλά ο μιτωτικός κύκλος ζωής τους διαφέρει σημαντικά σε σχέση με τα απλοειδή. (Zorgo et al., 2013) Υπό συνθήκες στρες, τα διπλοειδή κύτταρα δημιουργούν σπόρια, εισέρχονται στην μείωση και παράγουν απλοειδή σπόρια, τα οποία φέρουν την δυνατότητα ζευγαρώματος. Αυτή είναι η φυλετική μορφή του ζυμομύκητα.

Υπό βέλτιστες συνθήκες, τα κύτταρα ζύμης μπορούν να αναδιπλασιάζονται κάθε 100 λεπτά. (Herskowitz et al., 1998) Παρόλα αυτά, ο ρυθμός ανάπτυξης ποικίλει σημαντικά μεταξύ στελεχών και διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών. (Warringer et al., 2011)

- Θρεπτικές απαιτήσεις του *Saccharomyces cerevisiae*

Όλα τα στελέχη του *S. cerevisiae* μπορούν να αναπτυχθούν σε αερόβιες συνθήκες με πηγή σακχάρου γλυκόζη, μαλτόζη ή τρεχαλόζη, αλλά αποτυγχάνουν να αναπτυχθούν σε λακτόζη και κελλοβιόζη. Όσον αφορά την ζύμωση στον ζυμομύκητα, η γαλακτόζη και η φρουκτόζη έχουν αποδειχθεί τα καλύτερα υποστρώματα. Η ικανότητα του ζυμομύκητα να αναπτύσσεται σε διαφορετικά σάκχαρα εξαρτάται από το αν αναπτύσσεται αερόβια ή αναερόβια. Ορισμένα στελέχη δεν μπορούν να αναπτυχθούν αναερόβια σε σουκρόζη και τρεχαλόζη.



Όλα τα στελέχη μπορούν να χρησιμοποιήσουν την αμμωνία και την ουρία ως πηγές αζώτου, αλλά αδυνατούν να καταβολίσουν τα νιτρικά ιόντα επειδή απουσιάζει από αυτά η ικανότητα να τα ανάγουν σε ιόντα αμμωνίου. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιούν ακόμα αμινοξέα, μικρά πεπτίδια και αζωτούχες βάσεις. Τέλος, ο ζυμομύκητας δεν καταβολίζει εξωκυττάρια πρωτεΐνες επειδή δεν εκκρίνει πρωτεάσες.

Οι ζυμομύκητες απαιτούν φώσφορο για την ανάπτυξή τους και τον αφομοιώνουν ως ιόντα διυδρο-φωσφορικού καθώς και θείο, το οποίο αφομοιώνεται ως θειϊκό ιόν ή ως οργανικά θειούχα συστατικά όπως τα αμινοξέα μεθειονίνη και κυστεΐνη. Ακόμη μέταλλα όπως το μαγνήσιο, ο σίδηρος, το ασβέστιο και ο ψευδάργυρος απαιτούνται για την καλή ανάπτυξη του ζυμομύκητα.

- Σύζευξη του *S. cerevisiae*

Υπάρχουν δύο συζευκτικοί τύποι στους ζυμομύκητες, οι  $\alpha$  και  $\alpha$ , οι οποίοι παρουσιάζονται ως πρωτόγονες εκφάνσεις της σεξουαλικής διαφοροποίησης. Όπως και σε άλλους ευκαρυώτες η σύζευξή τους οδηγεί σε γενετικό ανασυνδυασμό. Δύο απλοειδή κύτταρα του αντίθετου συζευκτικού τύπου μπορούν να συζευχθούν σχηματίζοντας διπλοειδή κύτταρα τα οποία με την σειρά τους μπορούν είτε να σχηματίσουν σπόρια είτε μία νέα γενεά απλοειδών κυττάρων είτε και να παραμείνουν ως διπλοειδή κύτταρα. Η σύζευξη αξιοποιείται ως εργαλείο για την μελέτη γονιδίων, πλασμιδίων και πρωτεϊνών.

### **2.3.1 Γενετική Μηχανική του *S. cerevisiae***

Είναι ο πρώτος ευκαρυωτικός οργανισμός, του οποίου χαρτογραφήθηκε η γονιδιωματική αλληλουχία και το γεγονός αυτό βοήθησε ιδιαίτερα στην χαρτογράφηση και του ανθρώπινου γονιδιώματος. Το γονιδίωμά του έχει μέγεθος  $1,3 \times 10^7$  ζεύγη βάσεων και φέρει 6600 γονίδια με το 80% αυτών να έχουν χαρακτηριστεί πλήρως λειτουργικά. (Tenreiro et al., 2010 and references therein)

Οι ιδιότητες που καθιστούν τον ζυμομύκητα εξαιρετικά λειτουργικό μοντέλο για μελέτες μοριακής γενετικής περιλαμβάνουν την άμεση ανάπτυξη στα κατάλληλα θρεπτικά, την διασπορά των κυττάρων του, την ευκολία ανάπτυξης συστημάτων στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης και κυρίως τα ιδιαίτερα ποικίλα συστήματα μετασχηματισμού DNA. Επίσης επειδή ο ζυμομύκητας μπορεί να υπάρξει στη σταθερή μορφή τόσο των απλοειδών όσο και των διπλοειδών κυττάρων αποτελεί ιδανικό οργανισμό για την πραγματοποίηση διασταυρώσεων κλασικής γενετικής. (Tenreiro et al., 2010 and references therein)

Μία πολύ ενεργή και συνεργατική επιστημονική κοινότητα εγκατέστησε τα τελευταία χρόνια μία σειρά από βιολογικές πηγές (Πίνακας 2.1) όπως τα στελέχη με μεμονωμένες διαγραφές γονιδίων, όπου κάθε κωδική αλληλουχία στο γονιδίωμα του ζυμομύκητα μπορεί να διαγραφεί. Ακόμη, κάθε γονίδιο μπορεί να φέρεται συζευγμένο με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη όπως επίσης και μία συλλογή γονιδίων να υπάρχει σχεδιασμένη για υπερέκφραση πρωτεϊνών. Τέλος, η τεχνική yeast two-hybrid προσφέρει ένα γενετικό μέσο για την ταυτοποίηση της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών *in vivo*. (Tenreiro et al., 2010 and references therein)

Collection	Type	Source/reference
Yeast haploid and diploid deletion strains	Strains with individual genes replaced by the KanMX4 cassette	Winzeler <i>et al.</i> (1999)
Yeast-GFP clone collection	Genome insertions	Huh <i>et al.</i> (2003)
Yeast GST-fusion Collection	Vector library	Martzen <i>et al.</i> (1999)
Yeast-TAP fusion library	Genome insertions	Ghaemmaghami <i>et al.</i> (2003)
Yeast Tet-promoters – γTHC TRIPLES	Promoter-shutoff strains for essential yeast genes	Mnaimneh <i>et al.</i> (2004)
Yeast promoter library constructed in a vector containing two reporter genes (EGFP and lacZ)	Yeast transposon insertion library	Kumar <i>et al.</i> (2002)
	Vector library	Bell <i>et al.</i> (1999)

**Πίνακας 2.1:** Παραδείγματα των διαθέσιμων βιολογικών εργαλείων στην γενετική μηχανική του *S. cerevisiae*. (Tenreiro *et al.*, 2010).

Δεδομένα υψηλής ανάλυσης που έχουν προκύψει από μελέτες λειτουργικής γονιδιωματικής, μεταγραφωμικής, πρωτεωμικής, μεταβολομικής, interactomics (αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών) και locasomics (υποκυτταρικής εντόπισης πρωτεϊνών) στον ζυμομύκητα έχουν οργανωθεί σε δημοσιευμένες βάσεις δεδομένων. (Tenreiro *et al.*, 2010). Αναλυτικά οι αναφερόμενες βάσεις δεδομένων και ο τύπος της καθεμίας παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2.

Database	Type	Website
<i>Saccharomyces</i> genome database (SGD)	Wide-range information	<a href="http://www.yeastgenome.org/">http://www.yeastgenome.org/</a>
MIPS comprehensive yeast genome database (CYGD)	Wide-range information	<a href="http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/">http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/</a>
European <i>S. cerevisiae</i> archives for functional analysis (EUROSCARF)	Strain and plasmid collections	<a href="http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/">http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/</a>
Yeast microarray global viewer (yGMV)	Microarrays data	<a href="http://transcriptome.ens.fr/ygmw/">http://transcriptome.ens.fr/ygmw/</a>
Database yeast search for transcriptional regulators and consensus tracking (YEAstract)	Transcription regulatory associations	<a href="http://www.yeastract.com/">http://www.yeastract.com/</a>
Profiling of phenotypic characteristics in yeast (PROPHECY)	Phenotypes of deletion strains	<a href="http://prophecy.lundberg.gu.se/">http://prophecy.lundberg.gu.se/</a>
Mitochondrial proteome (MitoP)	Mitochondria-related genes, proteins and diseases	<a href="http://www.mitop.de:8080/mitop2/">http://www.mitop.de:8080/mitop2/</a>
Eukaryotic orthology (YOGY)	Orthologous proteins from eukaryotic organisms	<a href="http://www.bahlerlab.info/YOGY/">http://www.bahlerlab.info/YOGY/</a>
Princeton protein orthology database (P-POD)	Orthologous proteins	<a href="http://ppod.princeton.edu/">http://ppod.princeton.edu/</a>
Yeast protein localization database (YPL.db)	Subcellular localization of yeast proteins	<a href="http://ypl.uni-graz.at/pages/home.html">http://ypl.uni-graz.at/pages/home.html</a>
BioGRID	General repository for interaction datasets	<a href="http://www.thebiogrid.org/">http://www.thebiogrid.org/</a>

**Πίνακας 2.2:** Βάσεις δεδομένων ζυμομύκητα διαθέσιμες στον παγκόσμιο ιστό (Tenreiro *et al.*, 2010).

### **2.3.2 Ο *S. cerevisiae* ως οργανισμός-μοντέλο στον νευροεκφυλισμό.**

Εκ πρώτης όψεως η χρησιμότητα ενός απλού μικροοργανισμού στην μελέτη σύνθετων διαταραχών του εγκεφάλου όπως η νόσος του Parkinson δεν είναι εμφανής. Πράγματι, ο ζυμομύκητας φέρει τους περιορισμούς του, καθώς δεν μπορεί να αναπαράγει τις σύνθετες κυτταρικές αλληλεπιδράσεις του ανθρώπινου εγκεφάλου. Επίσης, διάφορες πρωτεΐνες και κυτταρικά μονοπάτια, τα οποία απαιτούνται για την ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών δεν είναι παρόντα στον ζυμομύκητα. Εν τούτοις, τα κύτταρα ζυμομύκητα κατέχουν ισχυρές ομοιότητες με τα ανθρώπινα. Περίπου το 60 % των γονιδίων του *S. cerevisiae* παρουσιάζουν αλληλουχιακή ομοιότητα με αντίστοιχα ανθρώπινα ορθόλογα γονίδια και από τα ανθρώπινα γονίδια που συσχετίζονται με ανθρώπινες νόσους πάνω από 25 % παρουσιάζουν στενή ομοιότητα με αντίστοιχα του ζυμομύκητα. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι και το γεγονός πως οι δύο τύποι κυττάρων μοιράζονται σημαντικές θεμελιώδεις πτυχές της ευκαρυωτικής κυτταρικής βιολογίας. (Franssens *et al.*, 2013 and references therein) Τα κύτταρα ζύμης, όπως εκείνα των θηλαστικών, είναι ευκαρυωτικά και διακρίνονται

από τους προκαρυώτες από την παρουσία διακριτών οργανιδίων, τα οποία φέρουν τις δικές τους μεμβράνες, όπως ο πυρήνας. Σε πολλές περιπτώσεις, ο ζυμομύκητας αποτέλεσε τον οργανισμό μοντέλο όπου οι κυτταρικές αυτές διεργασίες και τα γενετικά τους στοιχεία διευκρινίστηκαν. Το γεγονός αυτό επιτρέπει σε έναν αριθμό από κυτταρικές-διεργασίες κλειδιά, οι οποίες παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον στην παθογένεια της νόσου του Parkinson, να μελετηθούν διεξοδικά στο καλώς κατανοητό και απλοποιημένο μοντέλο του ζυμομύκητα. Τέτοιες διεργασίες αποτελούν η αναδίπλωση των πρωτεϊνών, τα συστήματα ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών, τα συστατικά των εκκριτικών μονοπατιών και της κυστιδιακής μεταφοράς, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, η αυτοφαγία, οι μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου και επιβίωσης και η κυτταρική γήρανση. (Franssens et al., 2013 and references therein, Khurana et al., 2014 and references therein)

Όσον αφορά τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και τα γεγονότα του οξειδωτικού στρες, τα οποία είναι κρίσιμα στην νόσο του Parkinson, το κεντρικό όργανο παραγωγής των αντιδραστικών ριζών οξυγόνου είναι το μιτοχόνδριο τόσο στους ζυμομύκητες όσο και στα κύτταρα των θηλαστικών. Η δυνατότητα ωστόσο του ζυμομύκητα να αναπτύσσεται υπό συνθήκες ζύμωσης προσφέρει την δυνατότητα μελέτης των μιτοχονδριακών διαταραχών, οι οποίες θα ήταν τοξικές για τα αντίστοιχα κύτταρα θηλαστικών. Ακόμη μέσω του ζυμομύκητα έχουν ανακαλυφθεί πολλά γονίδια της βιολογίας του μιτοχονδρίου που εμπλέκονται στην σχάση και στην σύντηξη των εν λόγω οργανιδίων, γεγονότων που εμπλέκονται επίσης στην διαδικασία του νευροεκφυλισμού. (Khurana et al., 2014 and references therein)

Το εκκριτικό μονοπάτι, μέσω του οποίου οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο στην συσκευή Golgi και έπειτα συσκευάζονται σε κυστίδια προς την κυτταρική μεμβράνη, αποτελεί ιδιαίτερης σημασίας μηχανισμό στους νευρώνες, οι οποίοι απαιτείται να μεταφέρουν πρωτεΐνες σε μεγάλες αποστάσεις προς τα συναπτικά άκρα πολλών νευρών και να απελευθερώσουν τους νευροδιαβιβαστές τους μέσω κυστιδιακής σύντηξης. Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών του μονοπατιού αυτού οφείλεται σε μεγάλο μερίδιο στον ζυμομύκητα. Συγκεκριμένα η σάρωση για μεταλλαγές στο μονοπάτι του ζυμομύκητα, τα προϊόντα των οποίων ευθύνονται για τη συσσώρευση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών, κατέληξε στην ανακάλυψη 23 γονιδίων *SEC*, τα οποία κωδικοποιούν για τα κεντρικά συστατικά του μονοπατιού. Το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, το οποίο προκύπτει από τις λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες τόσο στις ζύμες όσο και στα ανθρώπινα κύτταρα έχει εμπλακεί σε σημαντικό βαθμό στον νευροεκφυλισμό και τις ασθένειες της εγκεφαλικής λευκής ουσία. (Khurana et al., 2014 and references therein)

Επίσης, οι ζυμομύκητες φέρουν ιδιαίτερα συντηρημένους τους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου και επιβίωσης, παρόμοιους με τους αντίστοιχους των νευρώνων και της διαδικασίας της νευρωνικής απώλειας. Τόσο ο αποπτωτικός όσο και ο μη αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος εμπλέκονται στον νευροεκφυλισμό. Διαδικασία όπως η απόπτωση έχει περιγραφεί στον ζυμομύκητα και περιλαμβάνει την συμπύκνωση της χρωματίνης, την αλλοίωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλα γεγονότα. Όλα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο μηχανισμός του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου είναι συντηρημένος μεταξύ των ζυμών και των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Η ύπαρξη του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στις ζύμες προκαλεί κάποια έκπληξη. Ωστόσο ο οργανισμός αποκομίζει περισσότερα πλεονεκτήματα όταν ο πληθυσμός των κυττάρων που συσσωρεύουν οξειδωτικές βλάβες υφίστανται την

διαδικασία της απόπτωσης από το να στερούν από τα γενετικά όμοια γειτονικά τους κύτταρα τα θρεπτικά που μπορούν να τους αποδώσουν στην περίπτωση του μη προγραμματισμένου νεκρωτικού κυτταρικού θανάτου (Khurana et al., 2014 and references therein)

Όταν μοντελοποιείται μία ανθρώπινη νόσος στον ζυμομύκητα, τότε δύο διαφορετικές στρατηγικές μπορούν να εφαρμοστούν. Αν το εμπλεκόμενο στην νόσο γονίδιο φέρει ομόλογο στον ζυμομύκητα, η λειτουργία του μελετάται απευθείας στον μικροοργανισμό μέσω του ενδογενούς γονιδίου του ζυμομύκητα. Αν δεν υπάρχει ομόλογο και το γονίδιο είναι απόν από τον ζυμομύκητα, η νόσος μοντελοποιείται μέσω της ετερόλογης έκφρασης του ανθρώπινου γονιδίου στα κύτταρα της ζύμης. Αυτές οι δυο προσεγγίσεις έχουν ήδη εφαρμοστεί επιτυχώς είτε για την λειτουργική ανάλυση των ομολόγων γονιδίων του ζυμομύκητα με τα αντίστοιχα τους στις ανθρώπινες νόσους είτε για τον χαρακτηρισμό των φαινοτύπων που προκαλούνται από την έκφραση των εν λόγω ανθρώπινων γονιδίων στον ζυμομύκητα. Η πρώτη προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς στις μελέτες των γονιδίων *YHF1* και *SOD1*. Τα γονίδια αυτά είναι τα ομόλογα των αντίστοιχων ανθρώπινων που εμπλέκονται στην αταξία του Friedrich και την αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση αντίστοιχα και αυτές οι μελέτες συνέδραμαν σημαντικά προς την κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας των δυο διαταραχών. Αφετέρου, παραδείγματα της δεύτερης προσέγγισης αποτελούν οι μελέτες των νόσων του Parkinson, του Alzheimer και του Huntington, όπου τα ανθρώπινα γονίδια που προκαλούν τα εκάστοτε ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους εκφράστηκαν στον ζυμομύκητα οδηγώντας στην ανακάλυψη κομβικών μοριακών χαρακτηριστικών παθογένεσης όπως αυτές περιγράφηκαν και ανωτέρω. (Tenreiro et al., 2010 and references therein)

Ο ζυμομύκητας φέρει αναμφισβήτητα περιορισμούς ως προς την χρήση του στην μοντελοποίηση νόσων που προσβάλλουν τους νευρώνες. Οι πιο σημαντικοί αφορούν την χρήση του σε ό,τι έχει να κάνει με την πολυκυτταρικότητα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών καθώς και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων. Αυτές οι σημαντικές πτυχές της βιολογίας της εκάστοτε νόσου περιλαμβάνουν τις ανοσιακές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις, την συναπτική διαβίβαση και τις αλληλεπιδράσεις γλοίας και νευρώνων. Ακόμη, τα κύτταρα θηλαστικών φέρουν και κυτταρικές διεργασίες χωρίς ομολογία με τον ζυμομύκητα. Τέτοιες είναι η π.χ. η απουσία του τυπικού συμπλόκου I στα μιτοχόνδρια του ζυμομύκητα. Επίσης παρότι τα βασικά συστατικά της απόκρισης στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες είναι διατηρημένα, είναι σαφώς πιο πολύπλοκα στα κύτταρα θηλαστικών. Επιπροσθέτως, πολλές νευρικές ιδιότητες με μεγάλη σημασία στον νευροεκφυλισμό όπως η αξονική μεταφορά, η απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και η μυελινοποίηση δεν μπορούν να εκπροσωπηθούν από τους ζυμομύκητες. (Khurana et al., 2014 and references therein)

## **2.4 Η αυτοφαγία στον *Saccharomyces cerevisiae***

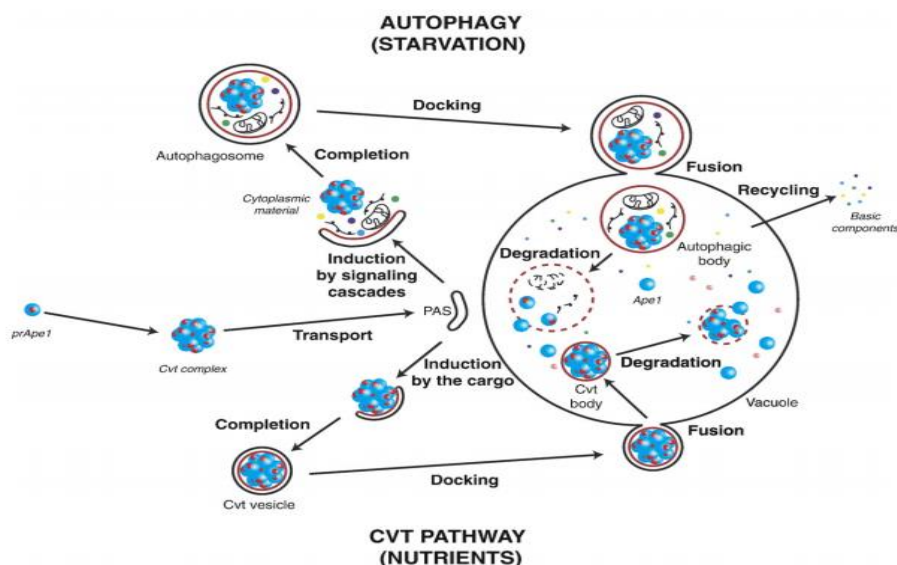
Οι μονοκύτταροι οργανισμοί όπως ο ζυμομύκητας υποβάλλονται σε συνεχείς και ακραίες μεταβολές από τις συνθήκες του εκάστοτε περιβάλλοντος. Για να εξασφαλίσουν την επιβίωσή τους τα κύτταρα πρέπει να είναι ικανά να αντιλαμβάνονται τις εξωγενείς μεταβολές και να πραγματοποιούν αποτελεσματικές αποκρίσεις, οι οποίες τους επιτρέπουν να διατηρήσουν την εσωκυττάρια ομοιόστασή τους. Μία από τις πιο κοινές συνθήκες στρες, τις οποίες τα κύτταρα πρέπει να

αντιμετωπίσουν είναι η ποιότητα και η ποσότητα των θρεπτικών συστατικών, τα οποία είναι διαθέσιμα για αυτά στο περιβάλλον. Όταν τα θρεπτικά στοιχεία περιορίζονται ή εξαντλούνται, ειδικές πρωτεΐνες-αισθητήρες αντιλαμβάνονται αυτές τις μεταβολές και προκαλούν την σηματοδότηση μοριακών μονοπατιών ώστε να παραχθεί μία σειρά αποκρίσεων, οι οποίες θα επιτρέψουν την επιβίωση του κυττάρου κατά την απουσία των θρεπτικών μέσων. Σε αυτές τις συνθήκες, η διατήρηση της κυτταρικής ισορροπίας περιλαμβάνει καλά οργανωμένες μεταβολές του κυτταρικού μηχανισμού, οι οποίες ποικίλλουν από την τροποποίηση στον εντοπισμό ή/και την δραστηριότητα πρωτεϊνών μέχρι την σοβαρή αναδιαμόρφωση των εσωτερικών συστατικών του κυττάρου, όπως οι μεμβράνες και τα υποκυτταρικά οργανίδια, μέσα από καθολικές μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση, μεταγραφή και μετάφραση. (Cebollero et al., 2009 and references therein)

Η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας είναι μία από τις γενικές αποκρίσεις που σηματοδοτούνται στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ώστε να ξεπεράσουν τους θρεπτικούς περιορισμούς τους. Το μονοπάτι της αυτοφαγίας περιλαμβάνει την μεταφορά κυτταροπλασματικών συστατικών (συσσωμάτωμα πρωτεϊνών ή οργανίδια) στο λυσόσωμα των θηλαστικών ή το κενοτόπιο των ζυμομυκήτων για την αποδόμηση τους ώστε να προκύψει μία εσωτερική δεξαμενή μορίων έτοιμων να ανακυκλωθούν. Ο περιορισμός του αζώτου είναι το κυριότερο ερέθισμα, το οποίο οδηγεί στην πιο άμεση ενεργοποίηση της αυτοφαγίας στον ζυμομύκητα, αλλά και άλλοι θρεπτικοί περιορισμοί όπως η έλλειψη πηγής άνθρακα, αυξοτροφικών αμινοξέων και νουκλεϊκών οξέων επίσης ενεργοποιούν την αυτοφαγία σε μικρότερο όμως βαθμό. Μαζί με την λειτουργία της ως προσαρμογέας στις συνθήκες θρεπτικού περιορισμού, η αυτοφαγία είναι σημαντική επίσης για άλλες κυτταρικές και οργανισμικές λειτουργίες. Για παράδειγμα, στους αναπτυσσόμενους ζυμομύκητες, πραγματοποιεί την επιλεκτική μεταφορά των πρόδρομων μορίων των λυσοσωμιακών υδρολασών, της αμινοπεπτιδάσης I (prApe1) και α-μαννοσιδάσης από το κυτταρόπλασμα στο κενοτόπιο, με μία διαδικασία γνωστή ως μονοπάτι Cvt (cytosol to vacuole targeting). Ακόμη, η αυτοφαγία απαιτείται για την αποδόμηση ορισμένων οργανιδίων όπως τα αλλοιωμένα μιτοχόνδρια (μιτοφαγία) και υπεροξυσωμάτια (περοξοφαγία). Οι τελευταίοι δύο τύποι αυτοφαγίας λαμβάνουν μέρος επίσης στα κύτταρα των θηλαστικών, όπου και εκεί η αυτοφαγία συμμετέχει σε πληθώρα ουσιαστών κυτταρικών λειτουργιών. (Cebollero et al, 2009 and references therein)

Μηχανιστικά, η επαγωγή της αυτοφαγίας περιλαμβάνει την de novo βιοσύνθεση κυτταροπλασματικών διπλο-μεμβρανικών κυστιδίων, των αυτοφαγοσωμάτων, τα οποία καταλαμβάνουν μέρος του κυτταροπλάσματος κατά την διάρκεια του σχηματισμού τους. (Εικόνα 2.19) Αφού ολοκληρωθεί η σύνθεσή τους, τα αυτοφαγοσώματα συντήκονται με τα λυσοσώματα/κενοτόπια και απελευθερώνουν στον αυλό των τελευταίων τα εσωτερικά τους κυστίδια. Τα μονο-μεμβρανικά αυτά κυστίδια, αναφερόμενα ως αυτοφαγικά σωμάτια καθώς και το περιεχόμενό τους αποδομείται στην συνέχεια από τις υδρολάσες των λυσοσωμάτων/κενοτοπίων. Τέλος, τα προϊόντα αποδόμησης, που προκύπτουν από αυτή την καταβολική πορεία, μεταφέρονται πίσω στο κυτταρόπλασμα ώστε να χρησιμοποιηθούν εκ νέου από το κύτταρο. Παρότι η πηγή των μεμβρανών για τον σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος είναι ακόμη άγνωστη, η τωρινή θεωρία για τους ζυμομύκητες αναφέρει πως τα μεγάλα αυτά κυστίδια συζεύγγονται σε μία περι-κενοτοπιακή θέση, με το όνομα προ-αυτοφαγοσωμική δομή ή θέση συγκέντρωσης του φαγοφόρου (PAS). Από τις 31 πρωτεΐνες σχετικές με την αυτοφαγία (ATG), που έχουν εντοπιστεί στον ζυμομύκητα μέχρι σήμερα και συμμετέχουν σε διάφορες πτυχές της αυτοφαγίας, οι περισσότερες

σχετίζονται με την PAS και μεσολαβούν τον σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Παρότι σχεδόν όλα τα γονίδια *ATG* απομονώθηκαν αρχικά από τον ζυμομύκητα, ορθόλογα αυτών έχουν εντοπιστεί σε όλο το ευκαρυωτικό βασίλειο, αποκαλύπτοντας τόσο την μοριακή φύση του μηχανισμού όσο και την υψηλή διατήρησή του. (Cebollero et al, 2009 and references therein)



**Εικόνα 2.19:** Αυτοφαγία στον *Saccharomyces cerevisiae*. Υπό συνθήκες θρεπτικού περιορισμού, τα σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποιούν την συγκέντρωση της PAS και την επακόλουθη ανάπτυξή της μέχρι τον σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Κατά την διάρκεια αυτού του γεγονότος, κυτταροπλασματικά συστατικά, όπως οργανίδια, πρωτεΐνες και το oligομερές της prApe1, εσωκλείονται μέσα στο κυστίδιο με την διπλή μεμβράνη. Τα ολοκληρωμένα αυτοφαγοσώματα συντήκονται με το κενοτόπιο και απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους στο εσωτερικό του οργανιδίου. Οι υδρολάσες του κενοτοπίου αποδομούν στην συνέχεια τα αυτοφαγικά σωμάτια και τα περιεχόμενά τους. Τα τελικά βασικά στοιχεία (π.χ. αμινοξέα, σάκχαρα κ.α.) ανακυκλώνονται πίσω στο κυτταρόπλασμα για νέα χρήση. Ακόμη, παρατηρείται το βιοσυνθετικό μονοπάτι Cvt υπό συνθήκες ανάπτυξης του ζυμομύκητα. Η κίνηση του oligομερούς της prApe1 πλησίον της επιφάνειας του κενοτοπίου επάγει την συγκέντρωση της PAS και του κυστιδίου Cvt. Όπως και στο αυτοφαγόσωμα τα κυστίδια Cvt συντήκονται με το κενοτόπιο σχηματίζοντας τα σωμάτια Cvt. Οι υδρολάσες των κενοτοπίων διαρρηγνύουν τις μεμβράνες του κυστιδίου και πρωτεάσες μετατρέπουν την prApe1 στην ενεργή ώριμη μορφή της Ape1. (Cebollero et al, 2009)

## 2.4.1 Μεταγραφική ρύθμιση της αυτοφαγίας

Μία αποτελεσματική αυτοφαγική απόκριση απαιτεί την εκ των άνωθεν ρύθμιση ορισμένων γονιδίων *ATG* και ίσως μερικών ακόμη παραγόντων. Η επαγωγή της αυτοφαγίας υπό συνθήκες αποκλεισμού της πρωτεϊνοσύνθεσης με κυκλοεξιμίδιο οδηγεί στον σχηματισμό μη λειτουργικών και μικρών αυτοφαγοσωμάτων. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η πρωτεϊνοσύνθεση δεν είναι απαραίτητη για την επαγωγή της αυτοφαγίας αλλά κρίσιμη για την παραγωγή κανονικού μεγέθους αυτοφαγοσωμάτων. Κρίσιμη είναι η υπερπαραγωγή της *Atg8*, μίας πρωτεΐνης που μοιάζει με ουβικιτίνη και εμπλέκεται στην μεμβρανική σύντηξη κατά τον σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Η *Atg8* προσδένεται σε φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη από ένα

σύστημα σύζευξης όμοιο με αυτό της ουβικιτίνης. Ως εκ τούτου, έχει τεκμηριωθεί ότι είναι απαραίτητη η πολύ υψηλή υπερέκφραση της Atg8 (περίπου οκταπλάσια επαγωγή), ώστε να μεσολαβήσει τον αυξημένο αριθμό των μεμβρανικών συντήξεων, οι οποίες πραγματοποιούνται κατά την διάρκεια σχηματισμού των μεγάλων αυτοφαγοσωμάτων. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται επίσης από το εύρημα ότι στελέχη στα οποία απουσιάζει η εν λόγω πρωτεΐνη σχηματίζουν ανώμαλα και μικρά αυτοφαγοσώματα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται επίσης σε κύτταρα τα οποία εκφράζουν μεταλλαγμένες μορφές της Atg8, όπου επηρεάζονται μερικώς οι ιδιότητες σύντηξης. Παρά την σημαντικότητα της επαγωγής του ATG8, οι παράγοντες που διέπουν την μεταγραφή του παραμένουν άγνωστοι. (Cebollero et al, 2009 and references therein)

Η μεταγραφή του ATG14 φέρεται επίσης περισσότερο από 20 φορές επαγόμενη κατά την αυτοφαγία. Η Atg14 δεσμεύεται στα Vps34, ATG6/Vps30 και Vps15 για να σχηματίσει το τάξης III σύμπλοκο I της 3-κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, το οποίο συμμετέχει στον σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Η σημασία της επαγωγής αυτής μένει να διερευνηθεί. Παρόλα αυτά είναι γνωστό πως το γονίδιο ATG14 βρίσκεται υπό τον έλεγχο των μεταγραφικών παραγόντων Gln3 και Gen4, υπεύθυνων για την αίσθηση των θρεπτικών στοιχείων στο περιβάλλον και το εσωτερικό του κυττάρου. (Cebollero et al, 2009 and references therein)

Επιπροσθέτως των ATG8 και ATG14, αναλύσεις μικροσυστοιχιών έχουν δείξει πως τα γονίδια ATG1, ATG3, ATG4, ATG5, ATG7, ATG12 και ATG13 αυξάνουν την έκφρασή τους υπό συνθήκες θρεπτικού περιορισμού, αλλά σε μικρότερο βαθμό από τα δύο πρώτα. (Cebollero et al., 2009 and references therein)

#### **2.4.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια-ρυθμιστές της αυτοφαγίας**

Όπως και σε πολλά είδη ευκαρυωτικών οργανισμών, έτσι και στον ζυμομύκητα, η άμεση ρύθμιση της αυτοφαγίας πραγματοποιείται από το μονοπάτι TOR, ειδικά το TORC1 (TOR σύμπλοκο 1). Η πρωτεΐνη TOR ανήκει σε μία οικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνει συντηρημένες πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης-θρεονίνης γνωστές ως κινάσες φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης και αποτελεί τον κυριότερο διαμεσολαβητή σηματοδότησης σχετικό με την παρουσία θρεπτικών στοιχείων. Κατά την παρουσία των προτιμώμενων πηγών αζώτου, το TOR είναι ενεργό και ρυθμίζει θετικά πλήθος αναβολικών μονοπατιών ενώ ταυτόχρονα καταστέλλει διαδικασίες απαραίτητες για την προσαρμογή στην έλλειψη θρεπτικών συστατικών, όπως η αυτοφαγία. Οι συνθήκες θερμιδικού περιορισμού οδηγούν στην αδρανοποίηση του TOR, με αποτέλεσμα την καταστολή των μεταβολικών μονοπατιών, τα οποία απαιτούνται για την κυτταρική αύξηση και την ταυτόχρονη έναρξη μίας γενικευμένης απόκρισης που επιτρέπει στα κύτταρα να προσαρμοστούν στην νέα συνθήκη του περιβάλλοντός τους. (Cebollero et al, 2009 and references therein)

Δύο ομόλογες πρωτεΐνες Tor έχουν ταυτοποιηθεί στον *S. cerevisiae*, οι Tor1 και Tor2 και αλληλεπιδρούν με μερικές πρωτεΐνες ώστε να σχηματίζουν δυο λειτουργικά διακριτά σύμπλοκα. Το σύμπλοκο 1 TOR (TORC1), το οποίο καταστέλλεται από το ανοσοκατασταλτικό φάρμακο ραπαμυκίνη, περιλαμβάνει τις Tor1 ή Tor2 με τις Kog1, Tco89 και Lst8. Το εν λόγω σύμπλοκο συμμετέχει στον έλεγχο μερικών διεργασιών της κυτταρικής ανάπτυξης και του μεταβολισμού, όπως η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου, η βιογένεση των ριβοσωμάτων, η μεταφραστική ρύθμιση και η

πρόσληψη αμινοξέων από περμεάσες. Το σύμπλοκο 2 TOR (TORC2) σχηματίζεται από τις πρωτεΐνες Tor2, Avo1, Avo2, Avo3/Tsc11, Bit61 και Lst8 και ρυθμίζει την πολικότητα στον κυτταροσκελετό της ακτίνης, καθώς και την βιοσύνθεση των σφιγγολιπιδίων. Αξίζει να σημειωθεί πως το TORC2 δεν είναι ευαίσθητο στην ραπαμυκίνη. (Cebollero et al, 2009 and references therein)

Υπάρχουν στοιχεία σύμφωνα με τα οποία το TOR είναι ικανό να αντιλαμβάνεται τα εσωτερικά επίπεδα της γλουταμίνης, ενός κύριου διαμεσολαβητή του μεταβολισμού του αζώτου, τα οποία αποτελούν ένδειξη για το θρεπτικό προφίλ του κυττάρου. Φυσικά, από την άλλη μεριά, όλοι οι καθοδικοί διαμεσολαβητές του κυττάρου οι οποίοι ρυθμίζονται από το TOR άμεσα ή έμμεσα δεν επηρεάζονται από τα επίπεδα γλουταμίνης. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην υπόθεση πως η δραστηριότητα του TOR θα μπορούσε επίσης να είναι υπεύθυνη και για άλλους «αισθητήρες»/ παράγοντες του κυττάρου και κατά συνέπεια η κινάση αυτή να διαμεσολαβεί και να ενορχηστρώνει διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία εξαρτώνται από την θρεπτική κατάσταση του κυττάρου. (Cebollero et al., 2009 and references therein)

Οι αρχικοί καθοδικοί διαμεσολαβητές του μονοπατιού TOR αποτελούν μέλη των οικογενειών της πρωτεϊνικής φωσφατάσης τύπου 2A (PP2A) και της ομοιάζουσας με την PP2A πρωτεΐνης. Οι καταλυτικές υπομονάδες της PP2A σχηματίζουν ετεροτριμερή μαζί με μία πρωτεΐνη γνωστή ως A υπομονάδα και ένα μέλος της ρυθμιστικής υπομονάδας B, το οποίο καθορίζει την ειδικότητα του υποστρώματος και την υποκυττάρια εντόπιση του συμπλόκου. Ακόμη, οι πρωτεΐνες PP2A μπορούν να αλληλεπιδρούν ανεξάρτητα με την Tap42, με την οποία η πρόσδεση σηματοδοτείται από το TORC1 με απευθείας φωσφορυλίωση της Tap42. (Cebollero et al, 2009 and references therein)

Επίσης, η καταστολή της λειτουργίας του TOR μέσω θερμοευαίσθητων μεταλλαγμένων αλληλομόρφων ή ραπαμυκίνης επάγει ορισμένους φαινοτύπους χαρακτηριστικούς για κύτταρα σε θρεπτικό περιορισμό, με ενεργοποιημένη την αυτοφαγία ακόμη και υπό συνθήκες πλούσιες σε θρεπτικά στοιχεία. Με αυτά τα στοιχεία αποδεικνύεται ότι ένα ενεργό μονοπάτι TOR ρυθμίζει αρνητικά την αυτοφαγία μέσω του TORC1. Μία μοριακή μεταβολή η οποία παρατηρείται μετά την καταστολή του TOR είναι η αποφωσφορυλίωση της Atg13, η οποία ενεργοποιεί την αυτοφαγία. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην μετατροπή αυτή είναι άγνωστα, αλλά οι πρωτεΐνες PP2A θεωρούνται οι πιο προφανείς υποψήφιες. Εναλλακτικά, είναι αποδεδειγμένο επίσης ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι TOR διατηρεί τις Atg1 και Atg13 σε μία ανενεργή, υπερ-φωσφορυλιωμένη μορφή. Παραμένει ωστόσο ασαφές αν το TORC1 απευθείας φωσφορυλιώνει τις δύο αυτές πρωτεΐνες ή αν υπεύθυνη για την μετατροπή αυτή είναι κάποια καθοδική κινάση. Αξίζει να σημειωθεί ότι πρόσφατα η Tor1 εντοπίστηκε συγκεντρωμένη στις περι-κενοτοπιακές δομές, πιθανόν στην PAS. Εναλλακτικά, πάντως, ο ενεργός υποπληθυσμός του TORC1 στην κενοτοπιακή επιφάνεια θα μπορούσε να δρα στην μοριακή μηχανή των Atg πρωτεϊνών και από εκεί κατά περίπτωση να συμμετέχει στην ρύθμιση απώτερων σταδίων της αυτοφαγίας. (Cebollero et al, 2009 and references therein)

Ακόμη ένας καθοδικός διαμεσολαβητής του TOR, ο οποίος απευθείας φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται από το TORC1, είναι η πρωτεϊνική κινάση Sch9. Η Sch9 συμμετέχει επίσης στην ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, στη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών, στο εύρος ζωής του ζυμομύκητα και την αντίσταση στο στρες. Η καταστολή της Sch9 είναι ουσιώδης για την επαγωγή της



αυτοφαγίας κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο καταρράκτης σηματοδότησης του TOR βασίζεται σε αυτή την κινάση ώστε να ρυθμίσει ορισμένες πτυχές της αυτοφαγίας. Μέχρι σήμερα ωστόσο, δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα τα οποία να αποδεικνύουν πως η Sch9 ρυθμίζει άμεσα ή έμμεσα την λειτουργία συγκεκριμένων πρωτεϊνών Atg. (Cebollero et al, 2009 and references therein)

Όσον αφορά την μεταγραφική ρύθμιση που προκύπτει από την λειτουργία του TOR επί της αυτοφαγίας, το TOR δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης γονιδίων, τα οποία απαιτούνται για την προσαρμογή στον θερμιδικό περιορισμό και άλλα στρες μέσω της συμμετοχής του στην μεταγραφή τους στο κυτταρόπλασμα. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες περιλαμβάνουν τους Gcn4, Gln3, Gat1, Msn2, Msn4 και Rtg1-Rtg3. Μέσω άμεσης ή έμμεσης φωσφορυλίωσης των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων και/ή των αντίστοιχων κυτταροπλασματικών καταστολέων, το ενεργό TOR προωθεί την αλληλεπίδραση μεταξύ τους προλαμβάνοντας την μεταφορά τους στον πυρήνα. Όταν το TOR καταστέλλεται, η αποφωσφορυλίωση οδηγεί στην απελευθέρωση των μεταγραφικών παραγόντων από τους καταστολείς τους και την επακόλουθη μετατόπισή τους στον πυρήνα, όπου επάγουν μία καθολική μεταγραφική προσαρμοστική απόκριση. Για παράδειγμα ο μεταγραφικός παράγοντας Gln3 και ο καταστολέας του Ure2 παραμένουν φωσφορυλιωμένοι παρουσία των προτιμώμενων πηγών αζώτου και αλληλεπιδρούν στο κυτταρόπλασμα. Η απουσία αζώτου ή η παρουσία ραπαμυκίνης επάγουν την αποφωσφορυλίωση και των δυο από τις PP2-A και η επακόλουθη μεταφορά της Gln3 στον πυρήνα οδηγεί στην μεταγραφή μερικών γονιδίων συμπεριλαμβανομένου του *ATG14*. Η έκφραση του *ATG8* ρυθμίζεται επίσης αρνητικά από το TOR, αλλά όπως αναφέρθηκε δεν είναι γνωστοί οι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την μεταγραφή του εν λόγω γονιδίου. (Cebollero et al, 2009 and references therein)

Πέραν του μονοπατιού TOR, έχει παρατηρηθεί από πολλές μελέτες στον ζυμομύκητα ότι υπάρχουν επιπλέον σηματοδοτικά μονοπάτια όπως αυτό του Ras ή της cAMP εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA), το οποίο συνεργάζεται με το TOR για την ρύθμιση της αυτοφαγίας.

Στον ζυμομύκητα το μονοπάτι Ras/PKA ρυθμίζει τον μεταβολισμό και την κυτταρική ανάπτυξη σε συνδυασμό με την διαθεσιμότητα των πηγών άνθρακα. Στις ζύμες υπάρχουν δυο μέλη GTPασών της οικογένειας Ras, οι Ras1 και Ras2, οι οποίες συνυπάρχουν σε δυο διαφορετικές μορφές εξαρτώμενες από τα νουκλεοτίδια που προσδέονται: Η αδρανής κατάσταση με την πρόσδεση του GDP μετατρέπεται σε ενεργή όταν το GDP ανταλλάσσεται με το GTP. Όταν τα κύτταρα μεταφέρονται από ένα μέσο που περιέχει μία μη-ζυμούμενη πηγή άνθρακα σε ένα μέσο που περιέχει γλυκόζη, οι πρωτεΐνες Ras ενεργοποιούνται και απευθείας προσδέονται στην αδενυλική κυκλάση διεγείροντας την σύνθεση του cAMP. Με την σειρά του το cAMP ενεργοποιεί την PKA προωθώντας την απελευθέρωση των καταλυτικών υπομονάδων Trk1, Trk2 και Trk3 από τον καταστολέα Bcy1. Η φωσφορυλίωση διαφόρων υποστρωμάτων από την PKA έπειτα διεγείρει την απόκριση που επιτρέπει στα κύτταρα να προσαρμοστούν αμέσως στις νέες συνθήκες. (Cebollero et al, 2009 and references therein)

Μερικά πειράματα έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα πως το μονοπάτι Ras/PKA ρυθμίζει αρνητικά την αυτοφαγία. Μορφολογικές αναλύσεις έχουν αποκαλύψει πως υπάρχει μία παρεμπόδιση στον σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Χαρακτηριστικό

παράδειγμα είναι το επικρατές αρνητικό αλληλόμορφο *RAS<sup>ala22</sup>* που επάγει την αυτοφαγία υπό συνθήκες πλούσιες σε θρεπτικά στοιχεία. (Cebollero et al, 2009 and references therein)

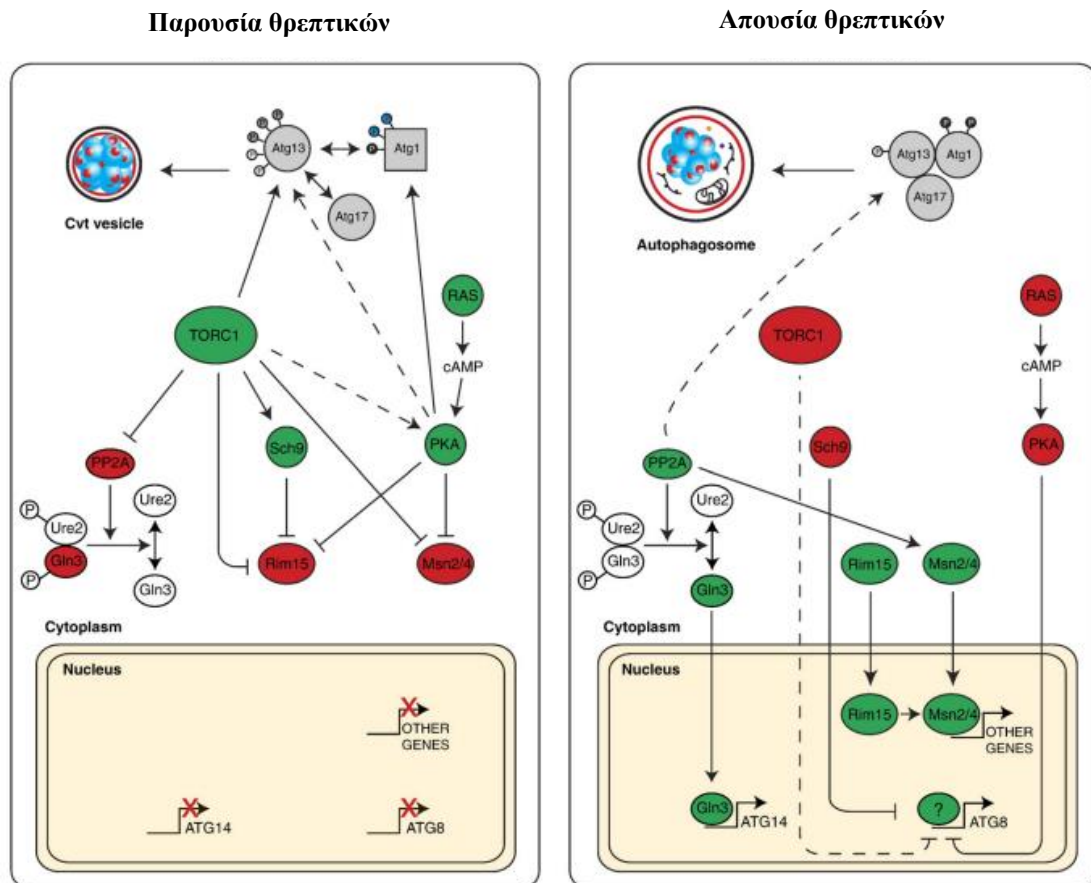
Σε μία πρόσφατη μελέτη που σχεδιάστηκε για τη διερεύνηση εξελικτικά διατηρημένων λειτουργικών αλληλουχιών ταυτοποιήθηκαν δυο πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης της PKA στην Atg1. Πειράματα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* κατέδειξαν πως η PKA τροποποιεί άμεσα την Atg1. Παρατηρήθηκε απροσδόκητα ότι σημειακές μεταλλάξεις στις περιοχές φωσφορυλίωσης της PKA δεν έφεραν καμία επίδραση στην δραστηριότητα της κινάσης στην Atg1, ωστόσο μετέβαλαν την ενδοκυττάρια εντόπιση της πρωτεΐνης. Πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού αποκάλυψαν ότι η αγρίου τύπου Atg1 μετακινείται από την πλέον κυτταροπλασματική της υποκυτταρική κατανομή στα αναπτυσσόμενα κύτταρα σε μία θέση πλησίον της PAS μετά την επαγωγή της αυτοφαγίας. Εν τούτοις, ένα μετάλλαγμα της Atg1, το οποίο δεν φέρει τις δυο θέσεις φωσφορυλίωσης της PKA μόνιμα εντοπίζεται στην PAS σε όλες τις θρεπτικές συνθήκες. Όλα τα παραπάνω δεδομένα τεκμηριώνουν πως το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras/PKA καταστέλλει την αυτοφαγία μέσω αρνητικής ρύθμισης της αλληλεπίδρασης της Atg1 με την PAS, ενώ έχει βρεθεί και συσχέτιση με τις Atg13 και Atg18, καθώς επίσης και σε άλλα βήματα της βιογένεσης του αυτοφαγοσώματος. (Cebollero et al, 2009 and references therein)

Αντίθετα, ο αποκλεισμός της δραστηριότητας της PKA δεν είναι αρκετός για να επάγει την αυτοφαγία σε αναπτυσσόμενα κύτταρα, αλλά απαιτεί επιπλέον και την αναστολή της Sch9. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η Sch9 και κατ' επέκταση ο ανοδικός ρυθμιστής της, το TOR, ρυθμίζουν συμπληρωματικά μονοπάτια κρίσιμα για την επαγωγή της αυτοφαγίας, τα οποία δεν βρίσκονται υπό τον άμεσο έλεγχο του μονοπατιού Ras/PKA. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως σε απουσία της PKA και της Sch9, η απόκριση της αυτοφαγίας είναι λιγότερο άμεση από ότι μετά από χορήγηση ραπαμυκίνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μονοπάτι TOR ρυθμίζει ορισμένες πτυχές της αυτοφαγίας με έναν Sch9-εξαρτώμενο τρόπο. Από τα παραπάνω στοιχεία συμπεραίνεται ότι οι σηματοδοτήσεις από τα μονοπάτια TOR και PKA πρέπει να συνδυάζονται ώστε να ρυθμίζουν με ακρίβεια την αυτοφαγία. Παρατηρήθηκε ακόμη ότι η απόκριση της αυτοφαγίας ενισχύεται από την καταστολή της PKA όταν το μονοπάτι TOR είναι ταυτόχρονα ανενεργό, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με το παραπάνω συμπέρασμα. Ως εκ τούτου, είναι πολύ πιθανό να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών μονοπατιών στον έλεγχο της δραστηριότητας και/ή των επιπέδων ορισμένων πρωτεϊνών σημαντικών για αυτό το μονοπάτι αποδόμησης. Ένα ξεκάθαρο παράδειγμα είναι όπως αναφέρθηκε παραπάνω η Atg1. Ένα άλλο είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες Msn2/4 και Rim15, υπεύθυνα για την ενεργοποίηση των οποίων είναι η PKA. Η Sch9 ρυθμίζει αρνητικά την πυρηνική μετατόπιση της Rim15, ενώ η PKA παρεμποδίζει την δραστηριότητα κινάσης της Rim15 και την πυρηνική εντόπιση μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης. Τέλος, οι μεταγραφικοί παράγοντες Gln2 και Snf1 θα μπορούσαν επίσης να αποτελούν άλλο ένα κοινό σημείο ελέγχου. (Cebollero et al, 2009 and references therein)

Η Snf1 του ζυμομύκητα είναι η ομόλογη της AMP-ενεργοποιούμενης πρωτεϊνικής κινάσης των θηλαστικών και απαιτείται για την ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου σε σχέση με τα επίπεδα της γλυκόζης. Μελέτες εντοπισμού στόχων της Snf1 οδήγησαν στην ταυτοποίηση της Atg1 και Atg13 ως υποψήφιες πρωτεΐνες ρυθμιζόμενες από αυτή την κινάση. Περαιτέρω χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης αυτής κατέδειξε πως η Snf1 αποτελεί ένα θετικό ρυθμιστή της αυτοφαγίας. Ακόμη,

φαίνεται πως η Snf1 πιθανόν ρυθμίζει την αυτοφαγία και σε μεταγραφικό επίπεδο, επειδή ο πυρηνικός εντοπισμός των μεταγραφικών παραγόντων Gln3 και Msn2 επηρεάζεται από αυτή την κινάση. Είναι ακόμη ασαφές πώς η σηματοδότηση που προέρχεται από την δραστηριότητα κινάσης της Snf1 ενοποιείται με τα υπόλοιπα σηματοδοτικά μονοπάτια, αλλά φαίνεται πως το TORC1 δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της Snf1. (Cebollero et al, 2009 and references therein)

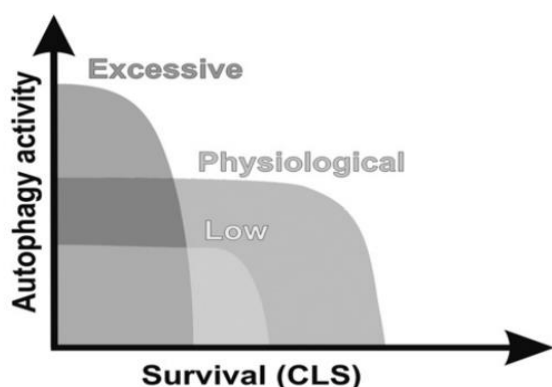
Συνοψίζοντας, η ρύθμιση της αυτοφαγίας παρουσιάζεται στην εικόνα 2.20.



**Εικόνα 2.20:** Ρύθμιση της αυτοφαγίας από τα σηματοδοτικά μονοπάτια TOR και Ras/PKA. Στα αριστερά της εικόνας παρουσιάζεται η καταστολή της αυτοφαγίας παρουσία θρεπτικών συστατικών. Εδώ οι καταρράκτες των μονοπατιών TOR και Ras/PKA είναι ενεργοί και διατηρούν τις Atg1 και Atg13 σε μία υπερφωσφορυλιωμένη μορφή. Η κατάσταση αυτή μειώνει την συγγένεια μεταξύ των δυο αυτών πρωτεϊνών και επίσης μειώνει την μετατόπιση της Atg1 στην θέση PAS, γεγονός που οδηγεί στον σχηματισμό των κυστιδίων Cvt αντί για τα αυτοφαγοσώματα. Το TORC1 επίσης ρυθμίζει αρνητικά τα μέλη της οικογένειας των PP2A φωσφατάσων και θετικά την κινάση Sch9. Κατά συνέπεια, οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι απαιτούνται για την προσαρμοστική απόκριση στην έλλειψη θρεπτικών μέσω παραμένουν στο κυτταρόπλασμα μέσω ποικίλων μηχανισμών. Η PKA επίσης συμμετέχει στην παραμονή των Msn2/4 και Rim15 στο κυτταρόπλασμα. Στο δεξιό πλαίσιο της εικόνας παρουσιάζεται η επαγωγή της αυτοφαγίας κατά την απουσία θρεπτικών. Η απουσία θρεπτικών προκαλεί την αδρανοποίηση του TOR και του Ras/PKA μονοπατιών. Οι φωσφατάσες PP2A διαμεσολαβούν την απελευθέρωση του Gln3 από τον καταστολέα Ure2. Η μετατόπιση του Gln3 στον πυρήνα οδηγεί στην έκφραση πολλών γονιδίων συμπεριλαμβανομένου του *ATG14*. Οι φωσφατάσες PP2A θα μπορούσαν επίσης να εμπλέκονται στην αποφωσφορυλίωση των Atg1 και Atg13, η οποία προωθεί την

αλληλεπίδραση των δυο αυτών πρωτεϊνών και της Atg17 και την συγκέντρωσή του στην θέση PAS. Αυτές οι μεταβολές είναι ουσιώδεις για την δημιουργία του αυτοφαγοσώματος. Άλλο ένα γεγονός επακόλουθο της απενεργοποίησης των δυο σηματοδοτικών μονοπατιών είναι η αποφωσφορυλίωση των Msn2/4 και Rim15 και η επιτυχής μετατόπισή τους στον πυρήνα, όπου επάγουν την μεταγραφή πολλών διαφορετικών γονιδίων. Η έκφραση του *ATG8* ρυθμίζεται επίσης εκ των άνωθεν κάτω από αυτές τις συνθήκες. Οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες παρουσιάζονται σε πράσινο όταν είναι ενεργοί και σε κόκκινο όταν είναι ανενεργοί. Η παρουσία της Atg1 σε τετράγωνο και κύκλο συμβολίζει χαμηλή και υψηλή δραστηριότητα κινάσης αντίστοιχα. Η φωσφορυλίωση από την PKA συμβολίζεται από τις μπλε φωσφορικές ομάδες (P). Η φωσφορυλίωση από το TOR επισημαίνεται με τα γκρι P και η αυτοφωσφορυλίωση της Atg1 με τα μαύρα. Τα συνεχή βέλη επιδεικνύουν τεκμηριωμένες λειτουργικές σχέσεις, ενώ τα διακεκομμένα δυνητικά λειτουργικές. (Cebollero et al, 2009 and references therein)

Στοιχεία που έχουν συλλεχθεί από μία σειρά γενετικές και φαρμακολογικές μελέτες αποκαλύπτουν ότι διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια αλληλεπιδρούν στην αυτοφαγία ώστε το κύτταρο να επιβιώσει. Οι φαρμακολογικές μελέτες της αυτοφαγίας εμφανίζονται ως μία ελκυστική στρατηγική για την καθυστέρηση της κυτταρικής γήρανσης μέσω ανακάλυψης νέων φαρμάκων για το σκοπό αυτό και έχει ήδη ξεκινήσει η ανάπτυξη και η διερεύνηση για φάρμακα που επιδρούν άμεσα ή έμμεσα, μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών, στην ρύθμιση της αυτοφαγίας. Παρόλα αυτά, η πλειοτροπική φύση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την αυτοφαγία και οι πολλαπλές και αντίθετες δράσεις της, κυτταροπροστατευτικές ή επιζήμιες, ανάλογα με την κατάσταση προκαλούν σοβαρούς περιορισμούς. Η κυτταροπροστατευτική δράση της αυτοφαγίας δεν μπορεί να γενικεύεται και παρότι αρχικά η δραστηριότητά της μπορεί να φαίνεται ωφέλιμη για το κύτταρο, η συνεχής ενεργοποίηση της σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο και την μείωση του εύρους ζωής του κυττάρου. (Εικόνα 2.21) (Sampaio-Marquez et al., 2011)



**Εικόνα 2.21:** Ο ρόλος της αυτοφαγίας στην κυτταρική επιβίωση και τον θάνατο. Τα χαμηλά επίπεδα αυτοφαγίας επάγουν την κυτταρική βλάβη, ενώ καταστέλλουν την αποδόμηση των επιβλαβών πρωτεϊνών και οργανιδίων καθώς και την παροχή ενέργειας για ουσιώδεις κυτταρικές λειτουργίες, οδηγώντας σε φαινότυπο κυτταρικής γήρανσης. Τα φυσιολογικά επίπεδα αυτοφαγίας δρουν ως κυτταροπροστατευτικός μηχανισμός και διατηρούν την κυτταρική ομοιόσταση, επιτρέποντας το ισοζύγιο σε πρωτεΐνες και οργανίδια και διατηρώντας τα ενεργειακά επίπεδα σταθερά. Τέλος, εκτεταμένα επίπεδα αυτοφαγίας οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο. (Sampaio-Marquez et al., 2011)

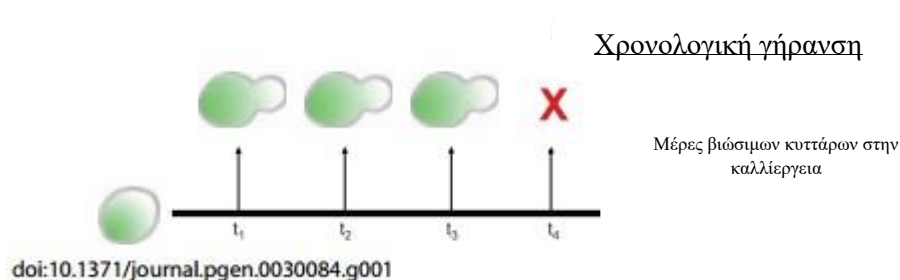
## **2.5 Ο *Saccharomyces cerevisiae* ως οργανισμός-μοντέλο στην κυτταρική γήρανση**

Οι μελέτες γήρανσης εμφανίζουν αυξανόμενο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια στην βιο-ϊατρική έρευνα. Οι λόγοι είναι εμφανείς. Τα δημογραφικά προβλήματα του πλανήτη μεταβάλλονται με γοργούς ρυθμούς, καταλήγοντας σε έναν πληθυσμό με αυξανόμενο αριθμό ηλικιωμένων και ένα μειούμενο αριθμό εργαζόμενων ατόμων να τους υποστηρίζει. Τα ηλικιωμένα άτομα τείνουν να φέρουν χρόνιες νόσους, οι οποίες εκτός του ότι είναι κοστοβόρες, επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα ζωής και την λειτουργικότητά τους. Γεγονός είναι πως από μόνη της η γήρανση αποτελεί ένα παράγοντα κινδύνου για μία σειρά από ασθένειες, οι οποίες καθημερινά μαστίζουν τον παγκόσμιο πληθυσμό. Αν οι ερευνητές μπορέσουν να κατανοήσουν τους μηχανισμούς της γήρανσης και να επιβραδύνουν τον βαθμό της, οι συνέπειες πιθανόν να επιφέρουν μειωμένη επίπτωση και πρόοδο των νόσων, να διευρύνουν το επίπεδο υγείας, να επιτρέψουν στους ηλικιωμένους ανθρώπους να συνεχίσουν να εργάζονται και να αποφύγουν το υψηλό κόστος για την φροντίδα της υγείας. (Longo et al., 2012)

Οι θετικές συνέπειες των επεμβατικών-φαρμακευτικών μεθόδων, οι οποίες στοχεύουν την γήρανση παραμένουν ακόμη ασαφείς, επειδή η γήρανση αποτελεί μία πολύπλοκη και πολυσυστημική διαδικασία, η οποία παραμένει αινιγματική. Εν τούτοις, η έρευνα των τελευταίων δυο δεκαετιών έχει επιφέρει αισιόδοξα αποτελέσματα. Ένα από τα πιο ιδιαίτερα ευρήματα είναι η πιθανότητα να χορηγηθεί ένα κλινικά αποδεκτό φάρμακο, όπως η ραπαμυκίνη, σε ποντίκια ηλικίας 20 μηνών και να επεκταθεί τόσο το εύρος ζωής όσο και το επίπεδο της υγείας τους. Με έκπληξη παρατηρεί κανείς πως πολλά από τα τελευταία ευρήματα στην μελέτη της γήρανσης οφείλονται στον απλό οργανισμό-μοντέλο του ζυμομύκητα. Δύο από τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία μελετώνται στο πλαίσιο της γήρανσης και των ηλικιο-εξαρτώμενων νόσων είναι το μονοπάτι των σιρτουίνων και το μονοπάτι TOR, για τα οποία ο ζυμομύκητας έπαιξε κρίσιμο ρόλο στην ανακάλυψή τους. (Longo et al., 2012 and references therein)

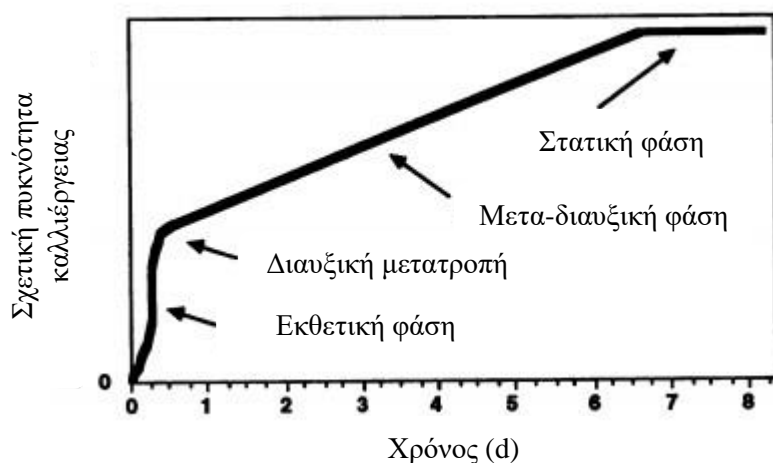
Υπάρχουν δυο κύριες προσεγγίσεις της γήρανσης στον ζυμομύκητα, η αντιγραφική γήρανση και η χρονολογική γήρανση. (Longo et al., 2012 and references therein) Και οι δύο προσεγγίσεις αποτελούν και θα συνεχίσουν να αποτελούν ισχυρά μοντέλα για την κατανόηση της γήρανσης. Για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής θα περιγραφεί η χρονολογική γήρανση και η ρύθμισή της.

Η χρονολογική γήρανση (chronological life span, CLS) του *S. cerevisiae* ορίζεται ως το χρονικό διάστημα εντός του οποίου επιβιώνει ένα μη διαιρούμενο κύτταρο. Η CLS μετράται τυπικά σε μία καλλιέργεια ζυμομύκητα που έχει αναπτυχθεί μέχρι την μετα-διαυξική φάση, οπότε τα περισσότερα κύτταρα εξέρχονται του κυτταρικού κύκλου. (Longo et al., 2012 and references therein) (Εικόνα 2.22)



**Εικόνα 2.22:** Χρονολογική γήρανση των κυττάρων του ζυμομύκητα. Το επίπεδο γήρανσης αντιστοιχεί στο χρονικό διάστημα κατά το οποίο τα κύτταρα παραμένουν βιώσιμα σε μία καλλιέργεια στατικής φάσης. Η βιωσιμότητα υπολογίζεται από το κλάσμα της καλλιέργειας το οποίο είναι ικανό να εισέλθει εκ νέου στον κυτταρικό κύκλο μετά από ένα εκτεταμένο στάδιο γήρανσης. (Longo et al., 2012)

Η μετα-διαυξική φάση είναι η περίοδος που ξεκινά περίπου 24 h μετά τον αρχικό εμβολιασμό της καλλιέργειας, κατά την οποία τα κύτταρα έχουν εξαντλήσει την εξωκυττάρια γλυκόζη, έχουν μειώσει δραματικά την ανάπτυξή τους και μεταβαίνουν μεταβολικά από τις συνθήκες ζύμωσης στην μιτοχονδριακή αναπνοή για την αξιοποίηση της ενέργειάς τους. Η μετα-διαυξική φάση ξεκινά στο τέλος της διαυξικής φάσης μεταξύ της δεύτερης και της έβδομης ημέρας της καλλιέργειας και εξαρτάται από το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από χαμηλά μεταβολικά επίπεδα και αυξημένα επίπεδα της απόκρισης στο στρες. (Longo et al., 2012, Werner-Washburne et al., 1993) (Εικόνα 2.23)



**Εικόνα 2.23:** Φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae*. Διακρίνονται η εκθετική φάση στο διάστημα μέχρι την πρώτη ημέρα των κυττάρων στην καλλιέργεια, η διαυξική στην συμπλήρωση της πρώτης ημέρας, η μετα-διαυξική μεταξύ 2ης και 7ης ημέρας και η έναρξη της στατικής περίπου στην 7η ημέρα. (Werner-Washburne et al., 1993)

### **2.5.1 Χαρακτηριστικά των κυττάρων *S. cerevisiae* στην μετα-διαυξική φάση και την στατική φάση**

Οι προτιμώμενες πηγές άνθρακα και ενέργειας για τα κύτταρα ζύμης είναι τα ζυμούμενα σάκχαρα, όπως η γλυκόζη. Όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε υγρές καλλιέργειες με πλούσια θρεπτικά μέσα, που περιέχουν γλυκόζη, αυτή μεταβολίζεται από τον ζυμομύκητα μέσω της γλυκόλυσης ενώ απελευθερώνεται αιθανόλη. Όταν η γλυκόζη εξαντληθεί, τα κύτταρα εισέρχονται στην μετα-διαυξική φάση, η οποία χαρακτηρίζεται από την μείωση στο επίπεδο ανάπτυξης μέσω μετάβασης του μεταβολισμού από την γλυκόλυση στην αερόβια χρήση της αιθανόλης. Όταν η αιθανόλη με την σειρά της εξαντληθεί καμία άλλη πηγή άνθρακα δεν θα είναι διαθέσιμη και τα κύτταρα θα εισέλθουν στην φάση γήρανσης ή τη στατική φάση G<sub>0</sub>. Αν τα κύτταρα βρίσκονται σε πείνα αζώτου ή φωσφόρου, επίσης εισέρχονται στην γήρανση, εν τούτοις δεν είναι γνωστό αν αναπτύσσονται τα ίδια χαρακτηριστικά με την πείνα για πηγή άνθρακα. (Galdieri et al., 2010 and references therein)

Τα κύτταρα της μετα-διαυξικής και της στατικής φάσης υπόκεινται σε πλήθος καταπονήσεων (στρες), οι οποίες οφείλονται στην έλλειψη θρεπτικών συστατικών και την συσσώρευση τοξικών μεταβολιτών κυρίως από τον οξειδωτικό μεταβολισμό. Τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται με τρόπους που επιτρέπουν την διατήρηση της βιωσιμότητάς τους για εκτεταμένη περίοδο χωρίς την προσθήκη θρεπτικών στοιχείων. Μερικές από τις μεταβολές των κυττάρων της στατικής φάσης αντιστοιχούν σε αυτές των κυττάρων που υφίστανται αποκρίσεις λόγω στρες, όπως η επαγωγή της έκφρασης γονιδίων του θερμικού σοκ *HSP26*, *HSP12*, *HSP82*, *HSP104*, *SSA3* και η συσσώρευση της τρεχαλόζης. (Galdieri et al., 2010 and references therein)

Τα κύτταρα της στατικής φάσης δεν πραγματοποιούν εκβλαστήσεις και περιέχουν πυρηνικό DNA με αδυναμία αντιγραφής. Το ολικό μεταγραφικό επίπεδο είναι περίπου 3-4 φορές χαμηλότερο από τα κύτταρα της εκθετικής φάσης, ενώ η μετάφραση των πρωτεϊνών περιορίζεται στο 0,3%. Τα κύτταρα στην στατική φάση παρουσιάζουν παχιά κυτταρικά τοιχώματα, περιλαμβάνουν μεγαλύτερο αριθμό μιτοχονδρίων και μορφολογικά διακριτά συμπυκνωμένα χρωμοσώματα. Καθώς εισέρχονται στην μετα-διαυξική και την στατική φάση, αρχίζουν να συσσωρεύουν αποθηκευτικά μόρια, όπως γλυκογόνο, τρεχαλόζη, τριακυλογλυκερόλες, πολύ-φωσφορικά ιόντα και να επάγουν την αυτοφαγία. Η συσσώρευση γλυκογόνου πραγματοποιείται πριν την εξάντληση της γλυκόζης και κορυφώνεται στην μετα-διαυξική φάση, ενώ η τρεχαλόζη συσσωρεύεται στην αρχή της μετα-διαυξικής φάσης. Σύμφωνα με το πρότυπο της συσσώρευσης του γλυκογόνου και της κινητοποίησης του, προτείνεται ότι αποτελεί τον κύριο αποθηκευτικό πολυσακχαρίτη. Η τρεχαλόζη συμμετέχει στην προστασία των κυττάρων από διάφορα στρες. Τα κύτταρα στην στατική φάση είναι επίσης πιο ανθεκτικά στο θερμικό και οσμωτικό σοκ, όπως επίσης και στα τοξικά φάρμακα. Σε αντίθεση με τα κύτταρα της εκθετικής φάσης, τα κύτταρα της στατικής φάσης είναι ικανά να επιβιώνουν για εκτεταμένη περίοδο χωρίς θρεπτικά στοιχεία. Εντούτοις η μεταγραφική απόκριση σε μία σειρά καταπονήσεων παραμένει ενεργή όπως και στα κύτταρα της εκθετικής φάσης, ώστε να επάγεται άμεσα η μεταγραφή πολλών γονιδίων στην περίπτωση ανανέωσης των θρεπτικών συστατικών. Με σκοπό τα κύτταρα που εισέρχονται στην στατική φάση να αναπτύξουν αυτά τα χαρακτηριστικά «αντίστασης», απαιτείται να μπορούν να αντιλαμβάνονται την άμεση εξάντληση ενός θρεπτικού στοιχείου με σημαντικό ρόλο για αυτά. Η γήρανση δεν είναι το τελικό αναπτυξιακό αποτέλεσμα κάθε είδους θρεπτικού στρες, αλλά μία από τις κυριότερες εκφάνσεις του θρεπτικού στρες. (Galdieri et al., 2010 and references therein)

Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά των κυττάρων της αντιγραφικής αλλά και της χρονολογικής γήρανσης αποτελεί ο σχηματισμός υψηλού αριθμού εξωχρωμοσωμικών κυκλικών μορίων ριβοσωμικού DNA (rDNA) στο εσωτερικό του κυττάρου. Τα μόρια αυτά φέρουν την ικανότητα να αυτο-αντιγράφονται και να παραμένουν ασύμμετρα στα μητρικά κύτταρα της αντιγραφικής γήρανσης κατά την κυτταρική διαίρεση. Έχει αποδειχθεί πως είναι αποτέλεσμα μη ομόλογου γενετικού ανασυνδυασμού. Ο σχηματισμός τους μπορεί να περιορίσει το εύρος ζωής τόσο στην αντιγραφική γήρανση όσο και στην χρονολογική. (Longo et al, 2012, Lewinska et al., 2014)

### **2.5.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια-ρυθμιστές της εισόδου στην μετα-διαυξική και στατική φάση**

Η έξοδος των κυττάρων της ζύμης από την εκθετική φάση και η είσοδος στην μετα-διαυξική και στατική φάση ρυθμίζονται από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), το μονοπάτι TOR, το μονοπάτι Snf1 και το μονοπάτι Rim15. Η σηματοδότηση των μονοπατιών αυτών μεταβάλλεται ανάλογα με την διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών κατά την μετάβαση από την εκθετική, όπου η γλυκόζη είναι άφθονη, στην μετα-διαυξική όπου τα κύτταρα χρησιμοποιούν την αιθανόλη και την στατική οπότε δεν υπάρχει πηγή άνθρακα. Τα μονοπάτια PKA και TOR είναι αρνητικοί ρυθμιστές της παραπάνω μετάβασης, ενώ τα μονοπάτια Rim15 και Snf1 θετικοί. Τα αναφερόμενα μονοπάτια παρουσιάστηκαν αναλυτικά στο κεφάλαιο της ρύθμισης της αυτοφαγίας, οπότε στο παρόν κεφάλαιο θα αναφερθούν αποκλειστικά οι δράσεις τους στην ρύθμιση της εισόδου στην φάση γήρανσης των κυττάρων ζύμης. (Galdieri et al., 2010 and references therein)

Το μονοπάτι της PKA κατέχει κρίσιμο ρόλο στην απόκριση των κυττάρων στην γλυκόζη και ρυθμίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την ανάπτυξη. Παίζει έναν σημαντικό ρόλο-κλειδί ανασταλτικού χαρακτήρα στην μετάβαση από την εκθετική φάση στην μετα-διαυξική και στατική φάση ανάπτυξης. Τα κύτταρα με αυξημένη δραστηριότητα της PKA αποτυγχάνουν να αποκτήσουν τα τυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων της στατικής φάσης, όπως η ανθεκτικότητα σε υψηλή θερμοκρασία και οσμωτικότητα, ενώ πεθαίνουν πρόωμα στην στατική φάση. Αντίθετα, τα κύτταρα με μειωμένη σηματοδότηση από την PKA παρουσιάζουν τα τυπικά αυτά χαρακτηριστικά ακόμη και όταν η γλυκόζη είναι άφθονη στο θρεπτικό μέσο. Οι στόχοι της PKA, οι οποίοι είναι οι πιο σχετικοί για την είσοδο στην φάση της γήρανσης περιλαμβάνουν τους μεταγραφικούς παράγοντες Msn2/4 και την πρωτεϊνική κινάση Rim15, όπως περιγράφηκαν και νωρίτερα στην εικόνα 2.20 στο κεφάλαιο της αυτοφαγίας. (Galdieri et al., 2010 and references therein)

Η δραστηριότητα του TOR ανταποκρίνεται στις συνθήκες ανάπτυξης και την διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών, κυρίως της πηγής αζώτου. Η αναστολή του TORC1 από την ραπαμυκίνη ή την πείνα αζώτου αποφέρει μειωμένη πρωτεϊνοσύνθεση, επαγωγή της αυτοφαγίας και εισαγωγή στην φάση G<sub>0</sub>. Και οι δυο παρεμβάσεις ενεργοποιούν ορισμένους μεταγραφικούς παράγοντες υπεύθυνους για την απόκριση στο στρες και προκαλούν επαναπρογραμματισμό της γονιδιακής έκφρασης. Οι δυο κύριοι στόχοι του TOR είναι οι πρωτεΐνες Tap42 και Sch9, όπως έχει προαναφερθεί. Η Tap42 ρυθμίζει την δραστηριότητα των φωσφατασών PP2A, μέσω της πρόσδεσής της (που ρυθμίζεται από το TOR μέσω φωσφορυλίωσης) στις καταλυτικές υπομονάδες τους. Στην μετα-διαυξική φάση, όταν το TORC1 καταστέλλεται, η Tap42 αποφωσφορυλιώνεται και απελευθερώνεται από τις καταλυτικές υπομονάδες. Η αναστολή αυτή οδηγεί στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων Gln3 και Gat1, οι οποίοι οδηγούν στην μεταγραφή γονιδίων υπεύθυνων για την αντίληψη αζώτου και άνθρακα στο θρεπτικό μέσο, όταν τα δυο αυτά στοιχεία έχουν εξαντληθεί. Ακόμη, η πρωτεΐνη Sch9, ορθόλογο της κινάσης Akt των θηλαστικών, αποτελεί ρυθμιστή της έναρξης του κυτταρικού κύκλου και συνδέει την βιοσύνθεση των ριβοσωμάτων με το κυτταρικό μέγεθος. Η διαγραφή του *SCH9* προκαλεί ένα φαινότυπο κυττάρων πολύ μικρού μεγέθους και η πείνα άνθρακα ή η καταστολή του TORC1 επάγει την αποφωσφορυλίωση της Sch9 και την αδρανοποίηση της. Η αδρανοποίηση της διεγείρει την μετατόπιση της Rim15

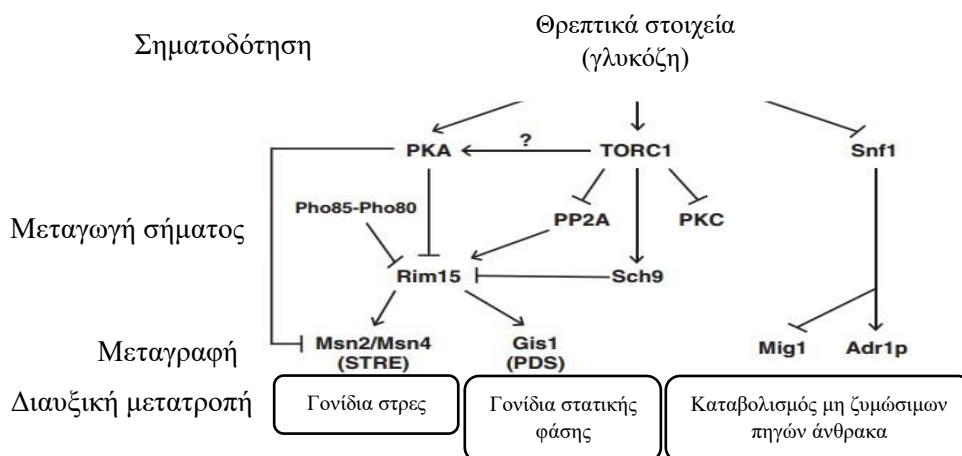


στον πυρήνα, η οποία ρυθμίζει την είσοδο στην φάση γήρανσης. (Galdieri et al., 2010 and references therein)

Η Snf1 αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα ενός συμπλόκου που περιλαμβάνει την ρυθμιστική υπομονάδα Snf4 και μία από τις επιπρόσθετες υπομονάδες Gal183, Sip1 και Sip2. Το σύμπλοκο της Snf1 είναι ενεργό απουσία γλυκόζης και ανενεργό παρουσία της, ενώ μεταλλαγμένα στελέχη με απουσία του *SNF1* αδυνατούν να αναπτυχθούν σε πηγές άνθρακα διαφορετικές της γλυκόζης και πεθαίνουν σύντομα μετά την έναρξη της μετα-διαυξικής φάσης. Φαίνεται πως η Snf1 ενεργοποιεί την μεταγραφή τόσο μέσω ρύθμισης μεταγραφικών παραγόντων, όσο και μέσω επαγωγής στην αναδιάταξη της χρωματίνης. Οι καθοδικοί στόχοι της Snf1 περιλαμβάνουν τον μεταγραφικό καταστολέα Mig1 και τον ενεργοποιητή Adr1. Ο Mig1 καταστέλλει γονίδια στόχους παρουσία γλυκόζης, ενώ η καταστολή υποβοηθάται από την φωσφορυλίωση της Snf1. Ο μεταγραφικός ενεργοποιητής Adr1 ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό μη ζυμώσιμων πηγών άνθρακα. Κατά την εκθετική φάση, ο Adr1 ρυθμίζεται αρνητικά από την PKA. Όταν η γλυκόζη εξαντληθεί κατά την μετα-διαυξική φάση, η Snf1 ενεργοποιεί τον Adr1. Ο μηχανισμός ρύθμισης του Adr1 από τις PKA και Snf1 δεν είναι απόλυτα κατανοητός. Τέλος, η Snf1 ρυθμίζει τους μεταγραφικούς παράγοντες Hsf1 και Msn2/4 ως απόκριση στο στρες έλλειψης άνθρακα. (Galdieri et al., 2010 and references therein)

Η Rim15 αποτελεί μέλος μίας οικογένειας πρωτεϊνικών κινασών. Η απαλοιφή του αντίστοιχου γονιδίου οδηγεί σε ελαττώματα της στατικής φάσης, συμπεριλαμβανομένης της αποτυχίας του ελέγχου στην φάση G<sub>1</sub> του κυτταρικού κύκλου και της επαγωγής της έκφρασης γονιδίων του στρες, της μειωμένης θερμοανθεκτικότητας και της μειωμένης συσσώρευσης τρεχαλόζης και γλυκογόνου. Αντίθετα, η υπερέκφραση του *RIM15* στην εκθετική φάση έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κυτταρικών μεταβολών χαρακτηριστικών για κύτταρα της στατικής φάσης. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων προτείνεται ότι η Rim15 ρυθμίζει θετικά την είσοδο στην φάση G<sub>0</sub>. Η δραστηριότητα της Rim15 παρεμποδίζεται από την PKA μέσω φωσφορυλίωσης, ενώ η πυρηνοκυτταροπλασματική της κατανομή ρυθμίζεται από την Sch9, κλάδο του TORC1. (Galdieri et al., 2010 and references therein)

Συνοψίζοντας τα όσα αναφέρθηκαν παρακάτω παρατίθεται στην εικόνα 2.24 ένα συνολικό διάγραμμα της σηματοδοτικής ρύθμισης στην γήρανση.



**Εικόνα 2.24:** Σχηματική απεικόνιση των σηματοδοτικών μονοπατιών κατά την μετάβαση από την εκθετική στην φάση γήρανσης. Τα μονοπάτια PKA και TORC1 αλληλεπιδρούν και ρυθμίζουν αρνητικά την Rim15 και την μετάβαση στην φάση γήρανσης. Οι στόχοι-κλειδιά

του μονοπατιού ρύθμισης αποτελούν οι παράγοντες Msn2/4. Η Snf1 είναι ενεργή όταν η γλυκόζη εξαντλείται και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον καταβολισμό των μη ζυμώσιμων πηγών άνθρακα. (Galdieri et al., 2010)

### **2.5.3 Κυτταρική γήρανση και απόκριση στο στρες για τον *S. cerevisiae***

Η απόκριση στο στρες αποτελεί μηχανισμό ιδιαίτερης σημασίας για τους μικροοργανισμούς, των οποίων το περιβάλλον είναι εξαιρετικά ποικίλο, και συνθήκες όπως η θερμοκρασία, η οσμωτικότητα και η διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων απέχουν από το να είναι παροδικές, χωρίς κρίσιμες επιπτώσεις στην φυσιολογία των κυττάρων της ζύμης. Μεταξύ των μικροοργανισμών ο *S. cerevisiae* αποτελεί έναν οργανισμό μοντέλο για την μελέτη της απόκρισης των ευκαρυωτικών κυττάρων στο στρες και καθορίζει τον ρόλο κάθε πρωτεΐνης του στρες. Ακόμη, ο μεγάλος βαθμός εξελικτικής διατήρησης των μονοπατιών του στρες μεταξύ των ζυμών και των ανώτερων ευκαρυωτικών σημαίνει ότι ο ζυμομύκητας μπορεί να εξυπηρετήσει ως ένα κατάλληλο μοντέλο για τον χαρακτηρισμό της απόκρισης στο στρες και σε πιο σύνθετους οργανισμούς. (Estruch, 2000 and references therein)

Οι συνθήκες του στρες για τον ζυμομύκητα καθορίζονται ως οι παράγοντες, οι οποίοι προκαλούν πτώση του επιπέδου ανάπτυξης. Ο πίνακας 2.3 παρουσιάζει τέτοιους παράγοντες.

<b>Παράγοντες και καταστάσεις πρόκλησης καταπόνησης στα κύτταρα της ζύμης</b>
Έλλειψη θρεπτικών στοιχείων
Χρήση μη ζυμούμενων πηγών άνθρακα
Οξυγόνο, μεταβολίτες οξυγόνου
Υψηλή θερμοκρασία
Χαμηλή θερμοκρασία
Υψηλή συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων
Υψηλή οσμωτικότητα
Χαμηλό ή υψηλό pH
Επιβλαβείς παράγοντες του DNA
Υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης
Αφυδάτωση-ξηρασία

**Πίνακας 2.3:** Πίνακας παραγόντων στρες στον *S. cerevisiae* (Ruis et al., 1995)

Συνήθως, για κάθε είδος στρες ενεργοποιούνται συγκεκριμένες αποκρίσεις. Εκτός αυτού, υπάρχει τεκμηριωμένα η άποψη για την ύπαρξη ενός συστήματος γενικευμένης απόκρισης στο στρες. Κύτταρα τα οποία έχουν προ-εκτεθεί σε ήπιες και μη βλαπτικές συνθήκες στρες θα αποκτήσουν αντίσταση όχι μόνο στον παράγοντα του στρες αλλά και θα αναπτύξουν ανοχή σε σοβαρά στρες, τα οποία προκαλούνται από άλλους παράγοντες. Για παράδειγμα, ένα ήπιο θερμικό σοκ θα προστατεύσει τα κύτταρα ζύμης από ένα σοβαρό θερμικό σοκ. Επιπροσθέτως, το γεγονός αυτό θα προκαλέσει την ανάπτυξη αντίστασης έναντι οσμωτικού και οξειδωτικού στρες. Οι παρατηρήσεις αυτές αποδεικνύουν πως τα κύτταρα κατέχουν ένα κεντρικό μοριακό

μηχανισμό, ο οποίος μπορεί να ενεργοποιηθεί από ποικίλους παράγοντες και να προστατεύσει τα κύτταρα από έναν αριθμό συνθηκών που απειλούν την επιβίωσή τους. (Ruis et al., 1995 and references therein)

Μερικές πρωτεΐνες ήδη παρούσες σε κύτταρα χωρίς την παρουσία στρες θα ενεργοποιηθούν από την σηματοδότηση του στρες. Τέτοιες άμεσες ή πρώιμες αποκρίσεις, όπως η ενεργοποίηση κινασών ή αυτή του μεταβολισμού της τρεχαλόζης, φαίνεται να έχουν δυο λειτουργίες: να παρέχουν μία ελάχιστη προστασία έναντι αιφνίδιου στρες και να ξεκινούν καθυστερημένες ή αψώτερες αποκρίσεις όπως η σύνθεση πρωτεϊνών του θερμικού σοκ. Οι αψώτερες αποκρίσεις θα προστατεύσουν τα κύτταρα σε πιο μόνιμη και αποτελεσματική βάση επιτρέποντας την προσαρμογή σε πιο επίμονο στρες. (Ruis et al., 1995 and references therein)

Διαφορετικά στρες πιθανόν να εκλύσουν μία γενική απόκριση δημιουργώντας την ίδια ενδοκυττάρια σηματοδότηση. Οι λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες προτείνεται πως φέρουν τέτοιο ρόλο. Εν τούτοις, πολλά στοιχεία υποδεικνύουν πως ο μηχανισμός αυτός δεν είναι ενιαίος και επιπλέον παράμετροι όπως η εσωτερική οξυνοποίηση, οι μεταβολές του κυτταροσκελετού ή οι αλλαγές τα επίπεδα του cAMP πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν. (Ruis et al., 1995 and references therein)

Όπως παρατηρεί κανείς και από τον παραπάνω πίνακα 2.3 πολλά από τα στρες που μπορούν να προκληθούν στο κύτταρο αποτελούν και χαρακτηριστικά της φάσης της κυτταρικής γήρανσης. Ειδικότερα τα στρες της πείνας για θρεπτικά συστατικά και η χρήση μη ζυμώσιμων πηγών άνθρακα, όπως αναλύθηκε και παραπάνω, είναι τα κυριότερα στοιχεία που διέπουν την κυτταρική γήρανση.

Στα προηγούμενα κεφάλαια αναλύθηκαν τα κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια ρύθμισης της γήρανσης και του φαινοτύπου των γηρασμένων κυττάρων και αποδείχθηκε η σχέση των μονοπατιών TOR, Sch9 και PKA με τους μεταγραφικούς παράγοντες Msn2/4. Οι παράγοντες αυτοί είναι και οι κυριότεροι που ρυθμίζουν την γενικευμένη απόκριση στο στρες για τα κύτταρα ζύμης. Τα προαναφερόμενα μονοπάτια είναι υπεύθυνα για την καταστολή της απόκρισης στο στρες, ρυθμίζοντας την εντόπιση των μεταγραφικών παραγόντων Msn2/4. Υπό συνθήκες υψηλής θρεπτικής διαθεσιμότητας οι παράγοντες Msn2/4 διατηρούνται στο κυτταρόπλασμα, όπου είναι αδύνατο να ενεργοποιήσουν την μεταγραφή των γονιδίων του στρες. Υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών, όπως συμβαίνει στην γήρανση, οι Msn2/4 μετατοπίζονται στον πυρήνα, καταλήγοντας σε έναν φαινότυπο ανθεκτικότητας σε οξειδωτικό και θερμικό στρες. Η επέκταση του εύρους ζωής κατά την γήρανση λόγω απαλοιφής του *RAS2* οφείλεται στην ενεργοποίηση των Msn2/4, ενώ η επέκταση λόγω διαγραφής του *SCH9* είναι ανεξάρτητη των εν λόγω μεταγραφικών παραγόντων. Αντίθετα, το τελευταίο σκέλος οφείλεται μερικώς στην ενεργοποίηση της Rim15, η οποία μεσολαβεί την είσοδο στην φάση γήρανσης και την ενεργοποίηση των γονιδίων του στρες κάτω από αυτές τις συνθήκες. (Kaeberlein et al., 2007 and references therein)

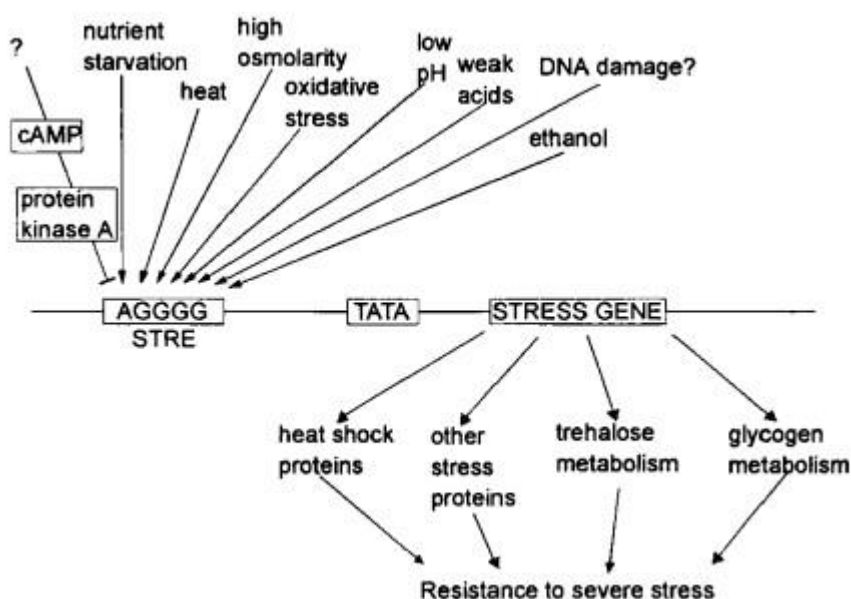
Οι μεταγραφικοί παράγοντες Msn2/4 αποτελούν trans δρώντα στοιχεία για τα οποία έχει βρεθεί πως ελέγχουν cis δρώσες αλληλουχίες. Τα cis ρυθμιστικά στοιχεία που διαμεσολαβούν την μεταγραφική επαγωγή στο στρες και βρίσκονται στον υποκινητή των εκάστοτε γονιδίων ονομάζονται STREs (stress responsive elements) και περιέχουν το μοτίβο αλληλουχίας AGGGG. Οι αλληλουχίες STREs έχουν ανιχνευθεί σε πολλά γονίδια υπεύθυνα για το στρες ενώ σε βιοπληροφορικές αναλύσεις αναφέρεται η ύπαρξη περίπου 186 STRE ρυθμιζόμενων γονιδίων στον ζυμομύκητα.

Εν τούτοις, η παρουσία μίας STRE αλληλουχίας στον υποκινητή ενός γονιδίου δεν υποδηλώνει και την λειτουργικότητα του στοιχείου αυτού. Το στοιχείο STRE είναι λειτουργικό και προς τις δύο κατευθύνσεις (CCCCT ή AGGGG), ενώ μεταβολές των βάσεων του στοιχείου καταργούν εντελώς την λειτουργία του. Αντίθετα, η αποτελεσματικότητα του ως ρυθμιστικού στοιχείου μειώνεται ελάχιστα από μεταβολές στις γειτονικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. (Estruch, 2000 and references therein)

Η παρουσία του στοιχείου STRE στον υποκινητή δεν υποδηλώνει κοινό μοτίβο έκφρασης τα γονίδια που ελέγχονται από αυτά. Παραδείγματος χάριν, η έκφραση των βιοσυνθετικών γονιδίων της τρεχαλόζης, διαφέρει από την έκφραση άλλων γονιδίων που επίσης υπόκεινται στον έλεγχο των STREs. (Estruch, 2000 and references therein)

Πολλά γονίδια είναι υποψήφια για ρύθμιση από την γενικευμένη απόκριση στο στρες. Σε αυτά περιλαμβάνονται γονίδια για τον μεταβολισμό του άνθρακα, μόρια-μεταφορείς, πρωτεάσες και γονίδια με προστατευτικό ρόλο έναντι διαφόρων τύπου στρες όπως τα *HSP104* και *CTT1* και τα γονίδια του μεταβολισμού της τρεχαλόζης *TPS1*, *TPS2*, *TPS3* και *TSL1*. (Estruch, 2000 and references therein)

Μία πιο καθολική απεικόνιση της ρύθμισης μέσω των στοιχείων STREs παρουσιάζεται στην εικόνα 2.25.

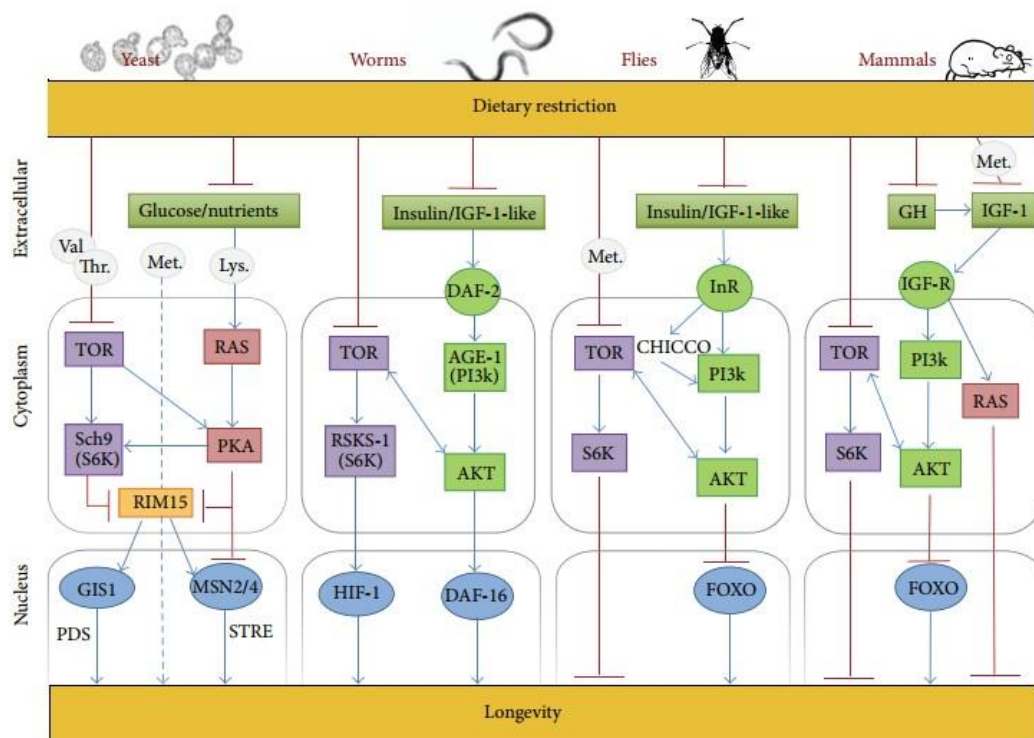


**Εικόνα 2.25:** Ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων στρες μέσω των στοιχείων STREs στους υποκινητές τους. Στρες όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, το οξειδωτικό στρες και η υψηλή οσμωτικότητα ενεργοποιούν την απόκριση στο στρες με κυριότερα χαρακτηριστικά αυτής την παραγωγή πρωτεϊνών του θερμικού σοκ, την παραγωγή της τρεχαλόζης και του γλυκογόνου και άλλων γονιδίων του στρες. (Ruis et al., 1995)

#### 2.5.4 Κυτταρική γήρανση: Από τον ζυμομύκητα στα θηλαστικά

Παραμένει ακόμη ένα ανοικτό ερώτημα κατά πόσο η διαδικασία της γήρανσης έχει διατηρηθεί από τον ζυμομύκητα στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Είναι

ξεκάθαρο πως ορισμένες πτυχές της γήρανσης του ζυμομύκητα είναι ειδικές για τον ίδιο. Ωστόσο, άλλοι μηχανισμοί εμφανίζονται υψηλά διατηρημένοι. Η επέκταση για παράδειγμα του εύρους ζωής από την καταστολή του TOR και την ενεργοποίηση της Sch9/Akt παραμένει ένας διατηρημένος μηχανισμός στις ζύμες, τους σκώληκες, τις φρουτόμυγες και τον άνθρωπο. Αν ένα γνωστό γονίδιο λειτουργεί παρόμοια ώστε να ρυθμίζει την επιβίωση στην γήρανση στους ζυμομύκητες, τους σκώληκες και τα ποντίκια, υπάρχει σημαντική πιθανότητα η λειτουργία αυτή να είναι διατηρημένη και στον άνθρωπο. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την ανίχνευση ομόλογων γονιδίων, μεταξύ ζυμών και των προαναφερόμενων οργανισμών, στον εκάστοτε καταρράκτη των σηματοδοτικών μονοπατιών. (Εικόνα 2.26) Σε αυτή την κατεύθυνση ο ζυμομύκητας ίσως εξυπηρετεί ως το θεμέλιο για την ταυτοποίηση πιθανών στόχων και κατ' επέκταση παρεμβάσεων στην ανθρώπινη μακροζωία και τις ηλικιο-εξαρτώμενες νόσους. (Kaeberlein et al., 2007 and references therein)

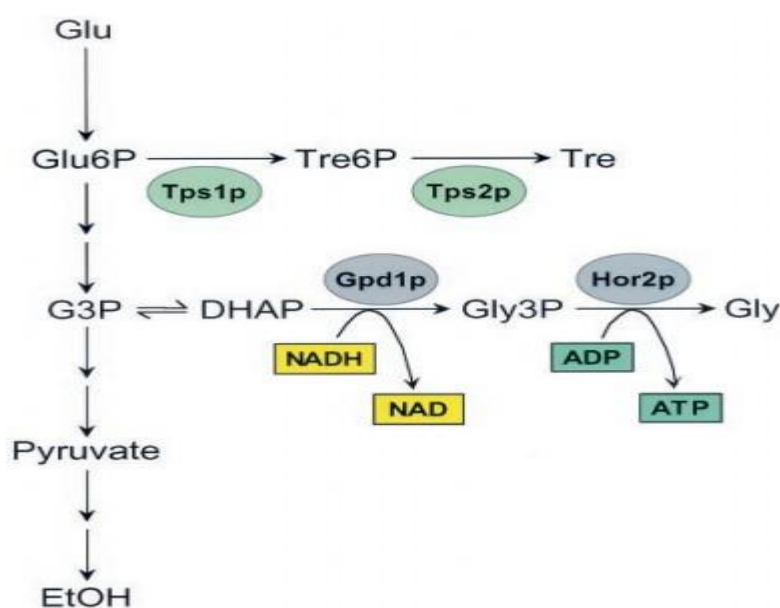


**Εικόνα 2.26:** Σχήμα των σηματοδοτικών μονοπατιών της μακροζωίας σε ποικίλους οργανισμούς (ζύμες, σκώληκες, φρουτόμυγες και θηλαστικά). Τα όμοια χρώματα στις αντίστοιχες περιοχές του κυττάρου υποδηλώνουν τα ορθόλογα γονίδια σε κάθε οργανισμό-μοντέλο. (Santos et al., 2016)

Όλο και νεότερα στοιχεία προκύπτουν, βάσει των οποίων προτείνεται πως η γήρανση καθορίζεται, τουλάχιστον εν μέρει, από προγονικές εξελικτικές προελεύσεις. Λόγω του γεγονότος αυτού, ο ζυμομύκητας παραμένει ένα ισχυρό εργαλείο για την διάκριση γενετικών και βιοχημικών παραγόντων που ρυθμίζουν την μακροζωία. Η γνώση που αποκτάται από την μοριακή βιολογία της γήρανσης του *S. cerevisiae* αποτελεί ένα θεμέλιο πάνω στο οποίο μπορεί να προσεγγιστεί το παζλ της γήρανσης των πολυκύτταρων ιστών και ευκαρυωτών. (Kaeberlein et al., 2007 and references therein)

## 2.6 Η συνθήκη υπεροσμωτικότητας για την επέκταση της μακροζωίας στον *S. cerevisiae*

Τα κύτταρα ζύμης ανταποκρίνονται και σε περιβαλλοντικές συνθήκες διαφορετικές των θρεπτικών, όπως η υψηλή εξωτερική οσμωτικότητα. Για να εξισορροπήσουν την υψηλή οσμωτικότητα των εξωτερικών οσμωτικών ουσιών, συνθέτουν γλυκερόλη και τρεχαλόζη. Το μονοπάτι αυτό της γλυκερόλης υψηλής οσμωτικότητας (high osmolarity glycerol-HOG) διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη Hog1, η οποία μετά από ένα οσμωτικό σοκ φωσφορυλιώνεται αμέσως, μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και ενεργοποιεί γονίδια υπεύθυνα για την οσμωτικότητα. Η ενεργοποίηση της ομάδας αυτής γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την έκλυση της απόκρισης του στρες, ενώ πραγματοποιούνται μεταβολές στον μεταβολισμό του άνθρακα και αυξημένη σύνθεση γλυκερόλης και τρεχαλόζης. (Kaeberlein et al., 2002) (Εικόνα 2.27)



**Εικόνα 2.27:** Η υψηλή οσμωτικότητα καταλήγει σε μία μεταβολική εκτροπή της γλυκόλυσης. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού HOG οδηγεί στην βιοσύνθεση τρεχαλόζης και γλυκερόλης από ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης. (Kaeberlein et al., 2002)

Η αύξηση της βιοσύνθεσης της γλυκερόλης επιτελείται από την μεταγραφική ενεργοποίηση των *GPD1* και *HOR2*, τα οποία κωδικοποιούν για την δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης και την φωσφατάση της φωσφορικής γλυκερόλης αντίστοιχα. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την μετατροπή των φωσφορικής διυδροξυακετόνης (DHAP), παρουσία ADP και NADH σε γλυκερόλη, απελευθερώνοντας NAD και ATP. Επίσης, η τρεχαλόζη συντίθεται από την 6-φωσφορική γλυκόζη από την δραστηριότητα του συμπλόκου της συνθάσης της τρεχαλόζης. (Kaeberlein et al., 2002)

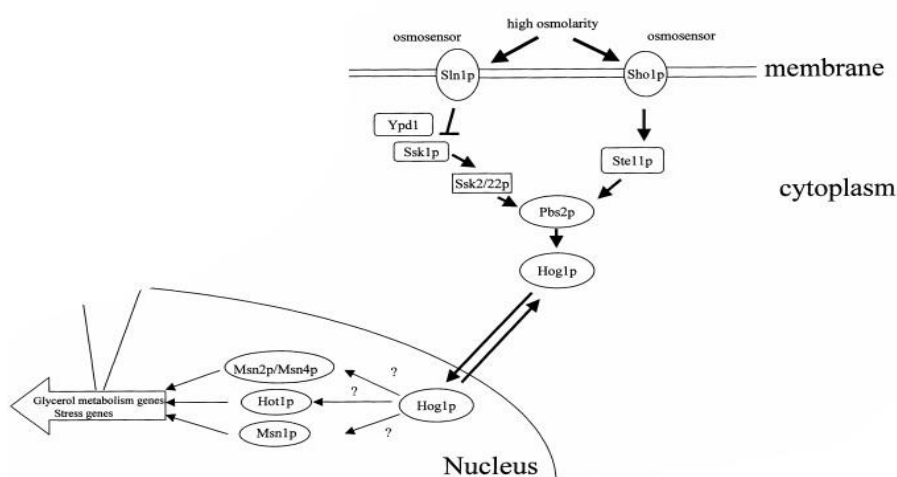
Το 2002 προτάθηκε από τους Kaeberlein και συνεργάτες πως η εφαρμογή υψηλής οσμωτικότητας με υψηλή συγκέντρωση εξωτερικών οσμωλυτών, όταν αυτή εφαρμόζεται από την αρχή της ανάπτυξης των κυττάρων σε καλλιέργεια, προωθεί την επέκταση του εύρους ζωής των κυττάρων ζύμης κατά την χρονολογική γήρανση. Η επέκταση του εύρους ζωής σηματοδοτείται κυριότερα από το μονοπάτι HOG και το

μονοπάτι των σιρτουινών, σε συνδυασμό με όσα σηματοδοτικά μονοπάτια περιγράφηκαν ανωτέρω.

### 2.6.1 Ανάλυση του μονοπατιού HOG στον ζυμομύκητα

Το μονοπάτι HOG αποτελεί το ομόλογο μονοπάτι των MAP κινασών (MAPKs) από τον ζυμομύκητα στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το μονοπάτι HOG περιέχει μία σειρά από MAPKs, η οποία αποτελείται από έναν καταρράκτη κινασών, οι οποίες όταν ενεργοποιούνται, οδηγούν με διαδοχική σειρά στην φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης Hog1. Στον καταρράκτη αυτό η MAPKK η οποία φωσφορυλιώνει την Hog1 είναι η κινάση σερίνης/θρεονίνης Pbs2. Η τελευταία με την σειρά της φωσφορυλιώνεται από τις MAPKKKs Ssk2 και Ssk22. Ο αισθητήρας της εξωτερικής οσμωτικότητας είναι η διαμεμβρανική πρωτεϊνική κινάση Sln1, ενώ υπάρχει και ένας δεύτερος μεμβρανικός οσμωαισθητήρας η Sho1, η οποία μεταβιβάζει το σήμα στην Pbs2 μέσω της MAPKKK Ste11. Η φωσφορυλίωση της Hog1 από την Pbs2 επάγει την πυρηνική συσσώρευση της. Η συσσώρευση αυτή είναι παροδική και συμπίπτει με την οσμωτική επαγωγή μιας ποικιλίας γονιδίων, προτείνοντας έναν ρόλο της Hog1 στην γονιδιακή έκφραση, παρά το ότι η ταυτοποίηση των στόχων της Hog1 παραμένει υπό μελέτη. (Estruch, 2000 and references therein)

Οι πιο σημαντικοί μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην διέγερση του σήματος της γονιδιακής έκφρασης μετά το οσμωτικό σοκ είναι οι Msn2/4, που αναφέρθηκαν και νωρίτερα και δεσμεύονται στα στοιχεία STREs. Στην περίπτωση του οσμωτικού στρες προτείνεται ότι οι παράγοντες αυτοί ελέγχονται από την Hog1. Μέχρι σήμερα, η μόνη άμεση συσχέτιση μεταξύ της Hog1 και των Msn2/4 έχει τεκμηριωθεί στο επίπεδο της διάρκειας της πυρηνικής εντόπισης της Hog1 μετά το οσμωτικό στρες. Έχει προταθεί ότι οι Msn2/4 δρουν παρέχοντας μία πυρηνική «άγκυρα» για την κινάση, η οποία πιθανόν προστατεύει την Hog1 έναντι της δράσης ορισμένων φωσφατασών. (Estruch, 2000 and references therein) (Εικόνα 2.28)



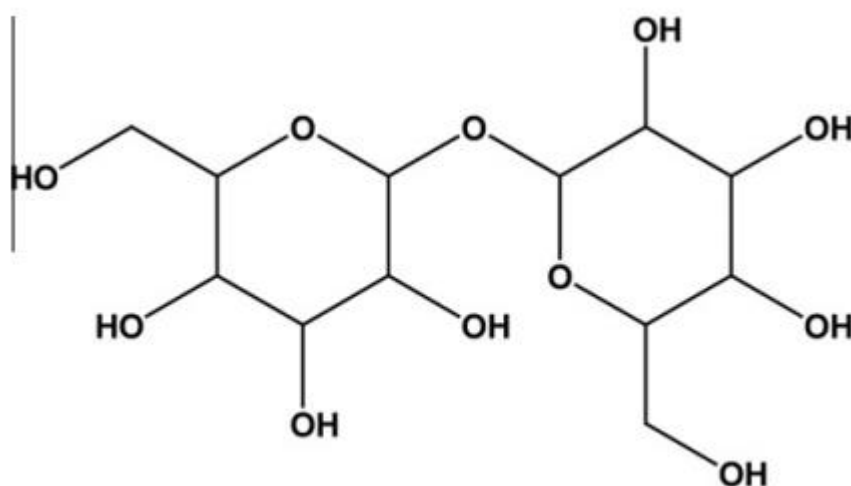
**Εικόνα 2.28:** Η μεταγωγή του σήματος στο μονοπάτι HOG. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η παραγωγή και συσσώρευση γλυκερόλης και τρεχαλόζης σε απόκριση στην αύξηση της εξωτερικής οσμωτικότητας. Ο καταρράκτης των MAPK ρυθμίζεται από τους δυο

μεμβρανικούς οσμωαισθητήρες, Sho1 και Sln1. Η ενεργοποίηση της Hog1 επάγει την γενικευμένη μεταγραφική απόκριση στο στρες. (Estruch, 2000)

Παράλληλα, πολλές μελέτες πραγματοποιούνται τον τελευταίο καιρό με σκοπό την διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ του μονοπατιού HOG και της αυτοφαγίας. Πέραν της γενικευμένης απόκρισης στο στρες που μπορεί έμμεσα να ρυθμίζει την αυτοφαγία, έχει βρεθεί πως το HOG σταθεροποιεί την αυτοφαγία σε ομοιοστατικά επίπεδα υπό την παρουσία οσμωτικού στρες. Αν το *HOG1* απαλοιφθεί τότε η αυτοφαγία ευαισθητοποιείται στην παρουσία οσμωτικότητας και μπορεί να αποβεί μοιραίο φαινόμενο για τα κύτταρα. Όλα αυτά, σε συνδυασμό με την γνώση πως η εξισορροπημένη αυτοφαγία είναι εποικοδομητική για τα κύτταρα, αποδεικνύουν πως το μονοπάτι HOG είναι χρήσιμο στην αποφυγή βλαπτικών συνεπειών του μονοπατιού της αυτοφαγίας. (Liu et al., 2014, Prick et al., 2006)

## 2.7 Η τρεχαλόζη στον *Saccharomyces cerevisiae*

Η τρεχαλόζη είναι ένας μη αναγωγικός δισακχαρίτης της γλυκόζης (εικόνα 2.29), που ανακαλύφθηκε από τον Wiggers το 1832 στην ερυσιβώδη σίκαλη. Μεταγενέστερα, ο Γάλλος χημικός Berthelot ανακάλυψε επίσης την παρουσία του σακχάρου αυτού στο μάννα της ερήμου με το όνομα trehala, το οποίο συντίθεται από τον σκώληκα *Larinus nidificum*, και από το οποίο του δόθηκε τελικά το όνομά του. Στους ζυμομύκητες η παρουσία της τρεχαλόζης εντοπίστηκε από τους Koch και Koch το 1925. Η τρεχαλόζη είναι άφθονα κατανεμημένη στην φύση και μπορεί να εντοπιστεί σε μία μεγάλη ποικιλία οργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες, φυτά, έντομα και ορισμένα ασπόνδυλα. (Nwaka et al., 1998)



**Fig. 1.** Chemical structure of trehalose.

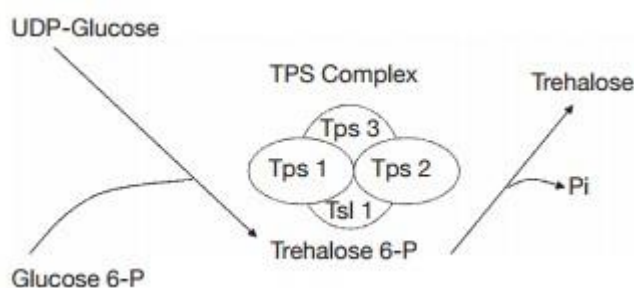
**Εικόνα 2.29:** Χημική δομή της τρεχαλόζης



### 2.7.1 Βιοσύνθεση της τρεχαλόζης στον *S. cerevisiae*

Το πιο κοινό μονοπάτι παραγωγής της τρεχαλόζης περιλαμβάνει δύο ένζυμα: την συνθάση της 6-φωσφορικής τρεχαλόζης, η οποία καταλύει την σύνθεση της 6-φωσφορικής τρεχαλόζης από την 6-φωσφορική γλυκόζη και την UDP γλυκόζη, και την φωσφατάση της 6-φωσφορικής τρεχαλόζης, η οποία αποφωσφορλιώνει την 6-φωσφορική τρεχαλόζη σε τρεχαλόζη. Το μονοπάτι αυτό αναφέρθηκε πρώτη φορά στον ζυμομύκητα από τους Cabib και Leloir το 1958 και παραμένει διατηρημένο σε μία μεγάλη ποικιλία ειδών μεταξύ των άλλων εντόμων, την *E. coli*, ορισμένων νηματωδών και φυτών. (Eleutherio et al., 2015 and references therein)

Στον ζυμομύκητα παρατηρείται το σύμπλοκο βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης (TPS complex). (Εικόνα 2.30) Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από 4 υπομονάδες, δύο ρυθμιστικά ένζυμα και δύο ρυθμιστικές υπομονάδες, γεγονός από το οποίο διαφαίνεται πως η ρύθμιση της παραγωγής της τρεχαλόζης στις ζύμες είναι πιο σύνθετη. (Eleutherio et al., 2015 and references therein)



**Εικόνα 2.30:** Σύμπλοκο βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης (Lejeune et al., 2011)

Πιο αναλυτικά, υπάρχουν 4 υπεύθυνα γονίδια, των οποίων τα προϊόντα συναρμολογούν το σύμπλοκο βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης:

- *TPS1* – υπεύθυνο για την παραγωγή της υπομονάδας για τη συνθάση της 6-φωσφορικής τρεχαλόζης
- *TPS2*–υπεύθυνο για την παραγωγή της υπομονάδας για τη φωσφατάση της 6-φωσφορικής τρεχαλόζης
- *TPS3*- υπεύθυνο για την παραγωγή της μίας ρυθμιστικής υπομονάδας
- *TSL1*- υπεύθυνο για την παραγωγή της δεύτερης ρυθμιστικής υπομονάδας

Ο λόγος για τον οποίο ο *S. cerevisiae* χρησιμοποιεί ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο για την σύνθεση της τρεχαλόζης, ενώ άλλοι οργανισμοί δεν το κάνουν, δεν είναι πλήρως κατανοητός. Πιθανόν αυτό συμβαίνει λόγω της ρυθμιστικής επίδρασης του μεταβολικού ενδιάμεσου, της 6-φωσφορικής τρεχαλόζης, στην γλυκόλυση και την ζύμωση. Άλλη μία πιθανότητα είναι ότι μέχρι τώρα, οι ρυθμιστικές υπομονάδες άλλων οργανισμών δεν έχουν ανακαλυφθεί. (Eleutherio et al., 2015 and references therein)

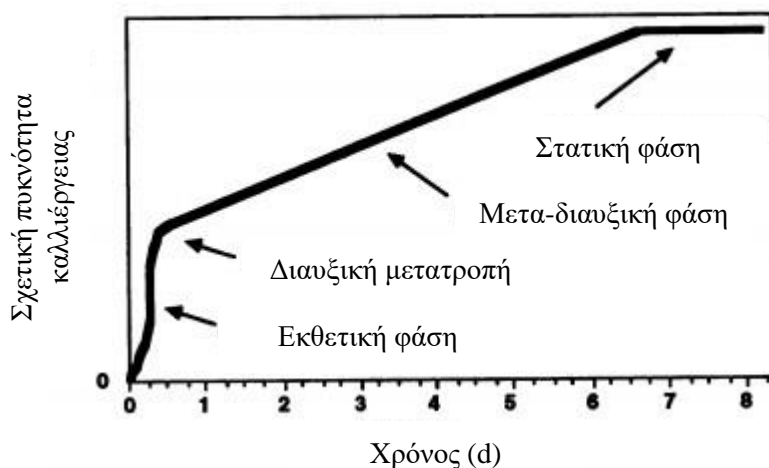
Αρχικά υπήρχε η θεώρηση πως το σύμπλοκο περιλαμβάνει μόνο τις Tps1p, Tps2p και Tsl1p. Η τέταρτη υπομονάδα, η Tps3p, ομόλογη της Tsl1p, εντοπίστηκε αργότερα. Με μεθόδους yeast two-hybrid αποκαλύφθηκε πως οι Tps3p και Tsl1p δεν

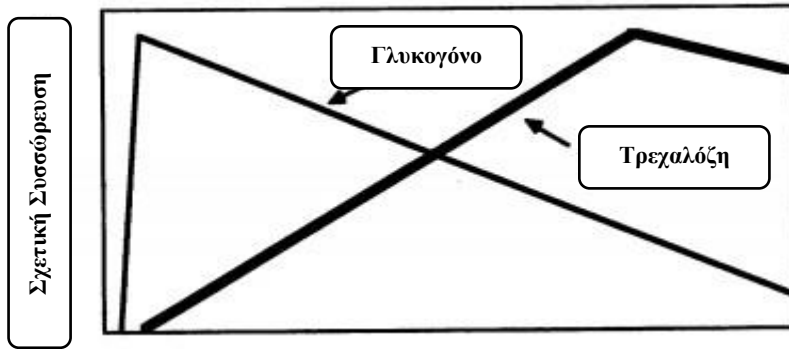
αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, αλλά με τις Trp1p και Trp2p, οι οποίες με την σειρά τους αλληλεπιδρούν η μία με την άλλη. (Eleutherio et al., 2015 and references therein)

Η Trp1p είναι η μικρότερη υπομονάδα μεγέθους 56 kDa, η Trp2p έχει μέγεθος 102 kDa, ενώ οι Trp3p και Tsl1p είναι οι μεγαλύτερες υπομονάδες μεγέθους 123 kDa η καθεμία. Η δομή του συμπλόκου, η οποία ανέρχεται στα 800 kDa, δεν έχει ακόμη διασαφηνιστεί. Ενώ οι λειτουργίες των Trp1p και Trp2p έχουν κατανοηθεί σε μεγάλο βαθμό, οι Trp3p και Tsl1p δεν έχουν μελετηθεί αναλυτικά. Οι υπομονάδες αυτές συνήθως αναφέρονται ως οι ρυθμιστικές υπομονάδες του συμπλόκου TPS. Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν ότι η Tsl1p παίζει δομικό ρόλο στο σύμπλοκο TPS. (Eleutherio et al., 2015 and references therein)

### 2.7.2 Ρύθμιση της παραγωγής της τρεχαλόζης στον ζυμομύκητα

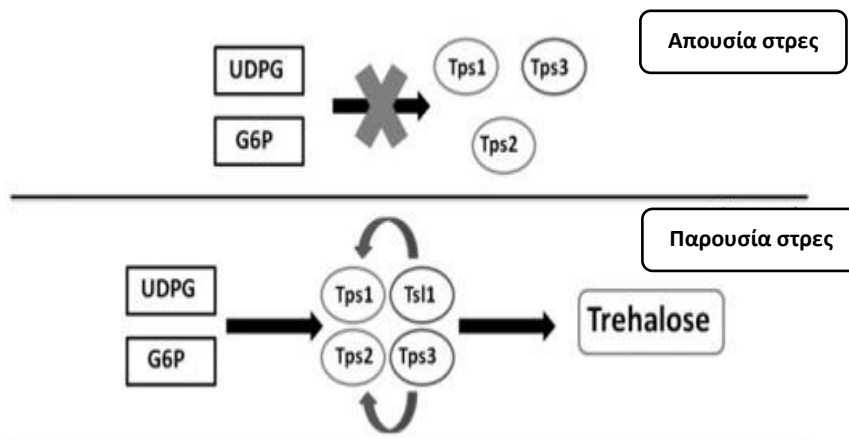
Στον ζυμομύκητα, η δραστηριότητα των Trp1p και Trp2p αυξάνεται σημαντικά σε συνθήκες στρες. Αυτή είναι μία συνέπεια της επαγωγής της έκφρασης όλων των γονιδίων του συμπλόκου, κυρίως όμως του *TSL1*, η έκφραση του οποίου επηρεάζει ισχυρά την δραστηριότητα και ενεργοποίηση της Trp1p. Ακόμη, η υπομονάδα Trp3p φαίνεται να φέρει επαγωγική δράση ως προς την Trp2p. Τα γονίδια του συμπλόκου φέρουν στους υποκινητές τους έναν ποικίλο αριθμό στοιχείων *STRE*. (Eleutherio et al., 2015 and references therein) Κατά συνέπεια, τεράστιες ποσότητες εσωκυττάριας τρεχαλόζης θα συσσωρευθούν για την προσαρμογή στο στρες. Επίσης, όπως έχει περιγραφεί οι συνθήκες στρες λόγω απουσίας θρεπτικών μέσων αυξάνονται στην μετα-διαυξική και στατική φάση όπου και παρατηρείται η μεγαλύτερη ποσότητα τρεχαλόζης που μπορεί να φέρει το κύτταρο καθ' όλη την διάρκεια ζωής του. (Εικόνα 2.31)





**Εικόνα 2.31:** Η αύξηση της σύνθεσης τρεχαλόζης κατά την διάρκεια της ζωής του ζυμομύκητα σε αντιπαράβολη με τις φάσεις ανάπτυξής του. (Werner-Washburne et al., 1993)

Ένα από τα πλέον επικρατή μοντέλα που προτείνονται για την ρύθμιση της βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης και της σχέσης της με το στρες είναι αυτό που παρουσιάζεται στην εικόνα 2.32. Τα κύτταρα τα οποία δεν υπόκεινται σε στρες δεν επιδεικνύουν σημαντικό επίπεδο δραστηριότητας της συνθάσης της τρεχαλόζης, ούτε και σημαντικό επίπεδο ποσότητας τρεχαλόζης. Αυτό οφείλεται στο ότι το σύμπλοκο TPS δεν είναι πλήρως δομημένο στην κατάσταση αυτή. Η υπομονάδα Tsl1p είναι η καθοριστική υπομονάδα του συμπλόκου και είναι εκείνη της οποίας η έκφραση επάγεται πρώτη μετά την εφαρμογή του στρες. Ως εκ τούτου, σε συνθήκες στρες το σύμπλοκο θα σχηματιστεί και η δραστηριότητα της συνθάσης της τρεχαλόζης θα ενεργοποιηθεί με επακόλουθο την συσσώρευση της τρεχαλόζης. (Trevisol et al., 2014 and references therein)



**Εικόνα 2.32:** Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης της παραγωγής της τρεχαλόζης σε απουσία (άνω) και παρουσία (κάτω) συνθηκών στρες. Σε απουσία συνθηκών στρες, το σύμπλοκο TPS δεν είναι πλήρως σχηματισμένο και δεν βιοσυντίθεται τρεχαλόζη από 6-φωσφορική γλυκόζη και UDPG. Υπό συνθήκες στρες η έκφραση του *TSL1* επάγεται και το σύμπλοκο ολοκληρώνεται. Σε αυτή την μορφή, το σύμπλοκο μπορεί να καταλύσει την βιοσύνθεση της τρεχαλόζης. (Trevisol et al., 2014)

Σε πολλές αναφορές εκφράζεται η άποψη ότι ο μεταβολικός έλεγχος του συμπλόκου TPS διενεργείται μέσω γεγονότων φωσφορυλίωσης και πιο συγκεκριμένα προτείνεται ότι η βιοσύνθεση της τρεχαλόζης καταστέλλεται μέσω φωσφορυλίωσης. Βάσει πιο πρόσφατων στοιχείων οι υπομονάδες Tsl1p και Tps3p φέρουν μοτίβα φωσφορυλίωσης από την PKA. (Trevisol et al., 2014 and references therein) Συν τοις άλλοις, το μονοπάτι Ras/PKA φαίνεται να ελέγχει την παραγωγή τρεχαλόζης μέσω

ορισμένων ακόμη αλληλεπιδράσεων. Ένας τρόπος, ο οποίος είναι και ο πιο αποτελεσματικός είναι μέσω του ελέγχου της παραμονής των μεταγραφικών παραγόντων Msn2/4 στο κυτταρόπλασμα. Όπως αναλύθηκε και νωρίτερα οι παράγοντες αυτοί ελέγχουν την μεταγραφή πολλών γονιδίων του στρες, μεταξύ άλλων και των γονιδίων βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης, μέσω πρόσδεσης στα στοιχεία STREs. Άλλος ένας τρόπος ρύθμισης είναι μέσω της καταστολής του καταρράκτη σηματοδότησης της Rim15, το οποίο επενεργεί και προς τους παράγοντες Msn2/4, αλλά και προς τον μεταγραφικό παράγοντα Gis1. (Francois et al., 2012 and references therein)

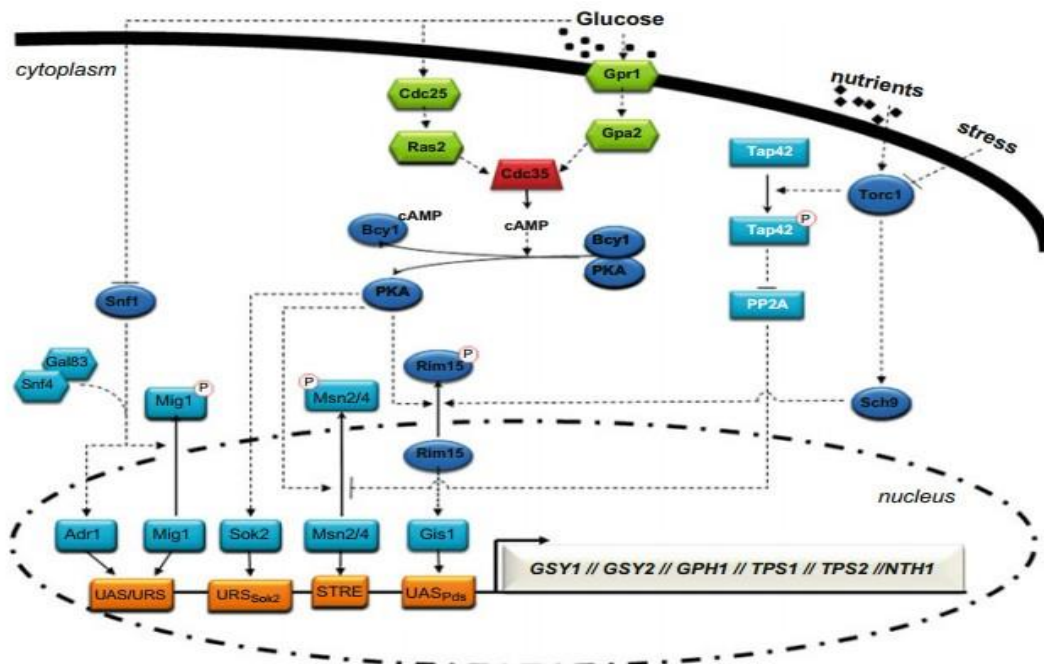
Επιπροσθέτως, υπάρχουν στοιχεία για την εμπλοκή του μονοπατιού TOR στην ρύθμιση της βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης. Η καταστολή του TOR οδηγεί στην πυρηνική εντόπιση των παραγόντων Msn2/4. Η σηματοδότηση αυτή διαμεσολαβείται αρνητικά από την φωσφορυλίωση της Tap42p, η οποία καταστέλλει την PP2A μέσω άμεσης πρόσδεσης. Κατά συνέπεια, η PP2A δεν είναι ικανή να αποφωσφορυλιώσει τους Msn2/4, οπότε αυτοί παραμένουν στο κυτταρόπλασμα και η μεταγραφή των γονιδίων της τρεχαλόζης δεν επάγεται. Το μονοπάτι TOR, παράλληλα, όπως έχει αναλυθεί και παραπάνω, ρυθμίζει αρνητικά την δράση της Rim15 μέσω της κινάσης Sch9. (Francois et al., 2012 and references therein)

Ο συνδυασμός των παραπάνω φέρνει στο φως μία συνεργατική επίδραση των δυο κύριων μεταβολικών μονοπατιών PKA και TOR στους παράγοντες Msn2/4 στην ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων της τρεχαλόζης. Συνεπώς, οποιεσδήποτε μεταβολές στην ισορροπία των PP2A και PKA πιθανόν να επηρεάζουν την έκφραση των εν λόγω γονιδίων και κατ' επέκταση τον μεταβολισμό. Να σημειωθεί ακόμη πως οι μηχανισμοί που προωθούν την έκφραση των γονιδίων της τρεχαλόζης κατά την πείνα αζώτου, του θερμικού και του οσμωτικού στρες βασίζονται στην δραστηριότητα της PP2A ενώ δεν υπάρχουν στοιχεία πως η δραστηριότητα της PKA τροποποιείται κατά την επίδραση αυτών των τύπων του στρες. Το μοντέλο αυτό της συνεργατικής δράσης παρ' όλα αυτά δεν αποκλείει την αυτονομία του καθενός εκ των δυο μεταβολικών μονοπατιών. (Francois et al., 2012 and references therein)

Δύο επιπρόσθετες κινάσες-αισθητήρες των θρεπτικών στοιχείων που φέρονται να συμμετέχουν στην ρύθμιση της βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης αποτελούν η κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση Pho85 και η κινάση Snf1. Η παρουσία των δεσμευτικών περιοχών των μεταγραφικών παραγόντων Adr1 και Mig1 στα περισσότερα από τα σχετιζόμενα με την τρεχαλόζη γονίδια θα μπορούσε να είναι ο μηχανισμός μέσω του οποίου η κινάση Snf1 ασκεί την θετική της μεταγραφική επίδραση, ενώ για την κινάση Pho85 δεν έχουν ακόμη υπάρξει αποσαφηνισμένοι μηχανισμοί. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που προαναφέρθηκαν έχουν σχολιαστεί σε προγενέστερη ενότητα για την συμμετοχή τους στην κυτταρική γήρανση και την απόκριση στο στρες. (Francois et al., 2012 and references therein)

Συνοψίζοντας, το κύριο μεταβολικό μονοπάτι ρύθμισης της τρεχαλόζης αποτελεί η PKA, με τον κύριο μεταβολικό διαμεσολαβητή να είναι η 6-φωσφορική γλυκόζη, ως άμεσο υπόστρωμα της βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης και πιθανό ενεργοποιητή της συνθάσης μέσω πρόσδεσης και παρεμπόδισης γεγονότων φωσφορυλίωσης. Υπό συνθήκες αποτελεσματικής ανάπτυξης και διαθεσιμότητας θρεπτικών ουσιών, όπως η ανάπτυξη σε μέσο πλούσιο σε γλυκόζη, η συσσώρευση της τρεχαλόζης αναστέλλεται επειδή η PKA και το μονοπάτι TOR είναι πλήρως ενεργά, ενώ υπό συνθήκες ανισορροπίας θρεπτικών ουσιών η βιοσύνθεση τρεχαλόζης ευνοείται. (Francois et al.,

2012 and references therein) Μία παρουσίαση όλων των παραπάνω σχέσεων φαίνεται στην εικόνα 2.33.



**Εικόνα 2.33:** Σχηματική παρουσίαση των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην παραγωγή της τρεχαλόζης. Διακρίνονται όπως αναλύθηκαν και στο κείμενο τα μονοπάτια της PKA και του TOR τα οποία ελέγχουν αρνητικά μέσω των μεταγραφικών παραγόντων Msn2/4 και της Rlm15 την μεταγραφή των γονιδίων *TPS1* και *TPS2*, αλλά και των *TPS3* και *TSL1*, τα οποία δεν αναφέρονται στο σχήμα. Στα αριστερά του σχήματος παρατηρείται και η ρύθμιση μέσω της Snf1. (Francois et al., 2012)

### 2.7.3. Βιολογικές λειτουργίες της τρεχαλόζης στον *S. cerevisiae*

Ο *Saccharomyces cerevisiae* βιοσυνθέτει και αποδομεί την τρεχαλόζη και ανάλογα με τις συνθήκες και το στάδιο του κύκλου ζωής του, η τρεχαλόζη μπορεί να αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 1% και περισσότερο από το 23% του ξηρού βάρους των κυττάρων. Οι διακυμάνσεις αυτές και οι μεγάλες ποσότητες που μπορούν να συσσωρευθούν, προτείνουν πως η τρεχαλόζη παίζει ένα σημαντικό ρόλο κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής του ζυμομύκητα. Έχει αποδειχθεί πως μπορεί να λειτουργεί ως μία σημαντική πηγή άνθρακα και αποθήκη ενέργειας σε κύτταρα υπό συνθήκες πείνας, σε κύτταρα υπό αναπνευστική μεταβολική προσαρμογή, στην εκβλάστηση, στα ζωντανά κύτταρα της στατικής φάσης και στα κύτταρα υπό μίτωση κάτω από συνθήκες περιορισμού του άνθρακα και ενέργειας. (Nwaka et al., 1998 and references therein)

Σημαντικός αριθμός αναφορών παρουσιάζουν πως το μόριο της τρεχαλόζης φέρει την μοναδική ιδιότητα να δρα ως υποκατάστατο του μορίου του νερού στην σταθεροποίηση πρωτεϊνών και την αφυδάτωση των κυτταρικών μεμβρανών. Επίσης η τρεχαλόζη προσδίδει θερμοανθεκτικότητα στα κύτταρα με την ιδιότητά της να δρα ως χημικό και μοριακό μόριο-συνοδός. Ακόμη, η τρεχαλόζη κινητοποιείται σε σημαντικό βαθμό βοηθώντας τα κύτταρα στην ανάρρωση τους από διάφορα είδη

στρες όπως το ωσμωτικό και το οξειδωτικό και την τοξικότητα υψηλών ποσοτήτων αιθανόλης. Οι τελευταίες αυτές λειτουργίες της πιθανόν βασίζονται στην ιδιότητά της να προλαμβάνει βλάβες στα πρωτεϊνικά μόρια υπό συνθήκες κυτταρικού στρες. (Nwaka S. et al., 1998 and references therein, Francois et al., 2012 and references therein)

#### **2.7.4 Η τρεχαλόζη ως μέσο αναστολής της πρωτεϊνικής συσσώρευσης**

Η ικανότητα της τρεχαλόζης να παρεμβάλλεται στην λανθασμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών και της συσσώρευσής τους έχει διατυπωθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες. Οι ιδιότητές της αφορούν την σταθεροποίηση των πρωτεϊνών στην μη δομημένη τους μορφή υπό συνθήκες στρες *in vivo* και την παρεμπόδιση της συσσωμάτωσής μετουσιωμένων πρωτεϊνών όταν είναι αδύνατον να αναδομηθούν τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. (Singer et al., 1998)

Πολλές υποθέσεις έχουν εκφραστεί για να εξηγήσουν τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η τρεχαλόζη φέρει τις παραπάνω ιδιότητες. Είναι σημαντικά πιθανή η ικανότητα των οκτώ υδροξυλομάδων της τρεχαλόζης να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τις πρωτεΐνες είτε άμεσα, μέσω των ατόμων N και O των αμινοξικών καταλοίπων, είτε έμμεσα, μέσω του σχηματισμού ενός «κελύφους» μορίων νερού, οδηγώντας τον σχηματισμό συμπολυμερών πρωτεΐνης-νερού-τρεχαλόζης, τα οποία προλαμβάνουν τον σχηματισμό πρωτοϊνιδίων. Ο τελευταίος αυτός μηχανισμός έχει εξακριβωθεί *in vitro* για την αποσυσσώρευση της α-συνουκλεΐνης. Επιπροσθέτως, η τρεχαλόζη είναι ικανή να προστατεύει κύτταρα επάγοντας την διαδικασία της αυτοφαγίας κατά τρόπο ανεξάρτητο του μονοπατιού TOR, ενισχύοντας έτσι την αποσυσσώρευση μεταλλαγμένων πρωτεϊνών μέσω των κενοδομικών/λυσosomalών. (Ruzza et al., 2015, Sarkar et al., 2006)

Όπως αναλύθηκε σε προηγούμενα κεφάλαια η παθογένεια νευροεκφυλιστικών νόσων, όπως η νόσος του Parkinson, η χορεία του Huntington και η άνοια του Alzheimer, οφείλεται στην αποτυχία των εκάστοτε υπεύθυνων πρωτεϊνών να αναδιπλωθούν σωστά και να αποτραπούν φαινόμενα συσσωμάτωσης. Προς αυτή την κατεύθυνση η τρεχαλόζη μπορεί να παίξει σημαντικό θεραπευτικό ρόλο όπως έχει καταγραφεί από πολλές μελέτες. Οι Tanaka και συνεργάτες επέδειξαν την πιθανότητα της τρεχαλόζης να αναχαιτίσει την χορεία του Huntington, αποδεικνύοντας πως λειτουργεί ως καλός αναστολέας της πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης. Οι Liu και συνεργάτες απέδειξαν πως η τρεχαλόζη μπορεί να παρεμποδίσει την συσσωμάτωση των πεπτιδίων Αβ-40 και Αβ-42 της άνοιας του Alzheimer μέσω διαλυτοποίησης *in vitro* των προσχηματισμένων συσσωματωμάτων με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. (Ruzza et al., 2015)

Πρόσφατα, η τρεχαλόζη ελέγχθηκε ως αναστολέας της συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης από τους Zhung και συνεργάτες, αποκαλύπτοντας ότι χαμηλές συγκεντρώσεις τρεχαλόζης *in vitro* αποδιέταξαν προσχηματισμένα πρωτοϊνίδια και ινίδια της μεταλλαγής A53T σε μικρότερα συσσωματώματα ή διαλυμένες άτακτες μορφές. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις τρεχαλόζης η μετατροπή της A53T σε δομή β-πτυχωτού φύλλου επιβραδύνθηκε και ο σχηματισμός των ώριμων ινιδίων προελήφθη. (Ruzza et al., 2015) Παρά τον δοσο-εξαρτώμενο τρόπο επίδρασης, το αν η τρεχαλόζη προλαμβάνει την ινιδιογένεση είτε μέσω της παρεμπόδισης της συσσωμάτωσης πρωτοϊνιδίων της α-συνουκλεΐνης είτε μέσω αποσταθεροποίησης των

πρωτοϊνιδίων είτε με τον συνδυασμό αυτών παραμένει ακόμη αντικείμενο μελέτης. Αν η γνώση αυτή ωστόσο συνδυαστεί με την άποψη πως οι πιο τοξικές μορφές της ασυνουκλεΐνης αποτελούν τα πρώιμα ολιγομερή και τα πρωτοϊνίδια, τότε ένας τέτοιος αναστολέας όπως η τρεχαλόζη θα μπορούσε να συνδράμει σημαντικά στην εγκατάσταση ενός νέου θεραπευτικού μοντέλου.

Επιπλέον των ανωτέρω, ο διττός ρόλος της τρεχαλόζης ως μόριο-σταθεροποιητής των πρωτεϊνών και επαγωγέα της αυτοφαγίας και η υπαρκτή αποτελεσματικότητά της διαφαίνεται από πληθώρα μελετών, οι οποίες περιλαμβάνουν μελέτες της ασυνουκλεΐνης σε ζωικά μοντέλα αλλά και μελέτες της χορείας του Huntington σε μοντέλα ζυμομυκήτων.

## 2.8 Σκοπός της διδακτορικής διατριβής

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε με σκοπό να μελετηθεί η ετερόλογη έκφραση της α-συνουκλεΐνης στον *Saccharomyces cerevisiae* σε σχέση με ορισμένους ενδογενείς μεταβολικούς παράγοντες. Για την επίτευξη των μελετών αυτών χρησιμοποιείται ένα εγκατεστημένο μοντέλο μεταφοράς και έκφρασης γονιδίων των μορφών της α-συνουκλεΐνης μέσω του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pCM190, ο οποίος φέρει το σύστημα έκφρασης tet-off. (Σφήκας Ε., Πτυχιακή εργασία 2011) Η α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου και η ισομορφή 112 είχαν ήδη κλωνοποιηθεί στον εν λόγω φορέα από προηγούμενες εργασίες (Κακανιάρης Ν., Πτυχιακή εργασία 2010, Σφήκας Ε., Πτυχιακή εργασία 2011), ενώ μέρος της διατριβής αυτής περιλαμβάνει και την κλωνοποίηση των μεταλλαγών A53T και A30P στον φορέα pCM190.

Αφού οι ανασυνδυασμένοι φορείς μεταφερθούν στο αγρίου τύπου στέλεχος BY4741 του ζυμομύκητα και εξακριβωθεί η έκφραση των γονιδίων της α-συνουκλεΐνης, θα μελετηθεί η επίδραση της α-συνουκλεΐνης στην κυτταρική βιωσιμότητα του *S. cerevisiae* τόσο κατά την επίδραση ορισμένων εξωγενών παραγόντων τοξικότητας (DTT & DMSO) όσο και κατά την κυτταρική χρονολογική γήρανση. Ο παράγοντας DTT επιλέγεται με σκοπό την αναπαραγωγή στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) των κυττάρων και την μελέτη της βιωσιμότητάς τους παρουσία α-συνουκλεΐνης, η οποία ως γνωστόν από μόνη της σε συνθήκες υπερέκφρασης επηρεάζει την λειτουργία του ΕΔ. Όσον αφορά τον παράγοντα DMSO, αυτός επιλέγεται με σκοπό να προκληθεί σύνθεση φωσφολιπιδίων στα κύτταρα ζύμης και να μελετηθεί η βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσία της α-συνουκλεΐνης, με βάση την γνωστή συγγένεια της με τα όξινα φωσφολιπίδια. Τέλος, η χρονολογική γήρανση σχεδιάζεται με σκοπό να αναπαράγει τις συνθήκες κυτταρικής γήρανσης που επικρατούν στους ανώτερους ευκαρυώτες με τους οποίους, όπως αναλύθηκε ο ζυμομύκητας φέρει πολλές ομοιότητες. Ο λόγος είναι πως η νόσος Parkinson αφορά κυρίως τον ηλικιωμένο πληθυσμό στον άνθρωπο, οπότε επιχειρείται η μελέτη της α-συνουκλεΐνης σε ένα μοντέλο κυτταρικής γήρανσης στον ζυμομύκητα για την εξαγωγή συμπερασμάτων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην κατανόηση της νόσου και στους ανώτερους ευκαρυώτες.

Στην συνέχεια εφαρμόζεται η συνθήκη υψηλής εξωτερικής οσμωτικότητας με σκοπό να επεκταθεί το εύρος ζωής των κυττάρων ενεργοποιώντας το μονοπάτι HOG και καταστέλλοντας τα μονοπάτια TOR και Ras/PKA. Η συνθήκη αυτή οδηγεί στην υψηλή συγκέντρωση τρεχαλόζης στα κύτταρα και στην σταθεροποίηση της αυτοφαγίας σε ομοιοστατικά επίπεδα. Ως εκ τούτου, θα μπορεί να μελετηθεί η επίδραση της α-συνουκλεΐνης σε μεταγραφικό επίπεδο στην συνθήκη αυτή τόσο στα μονοπάτια βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης και του TOR όσο και της αυτοφαγίας μελετώντας το γονίδιο *ATG8*.

Ακολούθως, η μελέτη της α-συνουκλεΐνης και των μεταβολικών μονοπατιών στο μεταγραφικό επίπεδο επεκτείνεται κατά τον ίδιο τρόπο και σε μεταλλαγμένα στελέχη που αφορούν την βιοσύνθεση της τρεχαλόζης: τα *tps1Δ*, *tps2Δ* και *ts11Δ*. Ο σκοπός της μελέτης αυτής είναι να αναδείξει την σημασία του καθενός από τα τρία υπεύθυνου γονιδίου της τρεχαλόζης στην κυτταρική βιολογία του ζυμομύκητα υπό συνθήκες στρες από την συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης και τις μεταβολές που προκύπτουν στα μεταβολικά μονοπάτια υπό την παρουσία της α-συνουκλεΐνης και την έλλειψη του εκάστοτε από τα ανωτέρω γονίδια. Η επιλογή των μεταλλαγμένων



στελεχών πραγματοποιήθηκε ώστε να συμπεριληφθούν τα κρίσιμότερα μόρια του συμπλόκου TPS για την βιοσύνθεση της τρεχαλόζης. Αρχικά, η έλλειψη της συνθάσης της τρεχαλόζης, Trp1p, προσφέρει τις συνθήκες μελέτης των κυττάρων σε παντελή απουσία τρεχαλόζης, οπότε θα μπορούσε να αναδείξει ένα ξεκάθαρο ρόλο από την παρουσία του πολυσακχαρίτη αυτού στα κύτταρα ζύμης. Κατά δεύτερο ρόλο, η έλλειψη της φωσφατάσης της τρεχαλόζης, Trp2p, οδηγεί στην ελάχιστη δυνατή σύνθεση τρεχαλόζης στα κύτταρα και την συσσώρευση 6-φωσφορικής τρεχαλόζης. Τέλος, η έλλειψη του μορίου Tsl1p, αφαιρεί το κρίσιμότερο μόριο-ερέθισμα για την βιοσύνθεση τρεχαλόζης από τα κύτταρα. Στην απουσία του, η τρεχαλόζη συντίθεται αλλά τα κύτταρα αδυνατούν να την συνθέσουν στο μέγιστο δυνατό επίπεδο, το οποίο απαιτείται ώστε να ανταποκριθούν στα στρεσογόνα ερεθίσματα. Όλα αυτά σε συνδυασμό με το γεγονός πως από τα κύτταρα απουσιάζει κάθε φορά ένα κρίσιμο γονίδιο της απόκρισης του στρες.

Έπειτα, με την παρατήρηση του φαινοτύπου της χρονολογικής γήρανσης των μελετώμενων στελεχών ζυμομύκητα και του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης, σχεδιάζεται η θεραπεία των στελεχών με προσθήκη τρεχαλόζης, ούτως ώστε να διασαφηνιστεί αν πράγματι μπορεί ο διασακχαρίτης να αντιστρέψει τα τοξικά φαινόμενα τόσο φαινοτυπικά όσο και μοριακά.

Η διδακτορική αυτή διατριβή έχει επίσης ως στόχο την ανακάλυψη των φυσικά και άμεσα αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών του *S. cerevisiae* με την α-συνουκλεΐνη, οπότε η αναζήτηση αυτή θα αναδείξει πιθανώς νέα γνώση στα μόρια ρυθμιστές της υποκυτταρικής τοξικότητας.

Συνοψίζοντας, με τα αντικείμενα μελέτης της η παρούσα διδακτορική διατριβή μπορεί να συνεισφέρει στην παραγωγή νέας γνώσης σχετικά με την παθογένεια της νόσου του Parkinson. Η συσχέτιση της νόσου με τα υποκυτταρικά μεταβολικά μονοπάτια που επηρεάζονται είναι σημαντική και ίσως κρύβει πολλά κλειδιά για την κατανόηση της παθογένειάς της και της θεραπείας της. Σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης οι αμυντικοί μηχανισμοί του κυττάρου όπως η παραγωγή τρεχαλόζης και η επαγωγή της αυτοφαγίας, οπότε είναι κρίσιμη η κατανόηση της δράσης τους. Επίσης, επιχειρείται η πρόταση της συνθήκης υψηλής εξωτερικής ωσμωτικότητας για την επέκταση του χρόνου επιβίωσης των κυττάρων ζύμης, με σκοπό αυτή να αποτελέσει και μία πρόταση για την αλλαγή των διατροφικών συνηθειών και την πρόληψη νευροεκφυλιστικών νόσων στον άνθρωπο. Συν τοις άλλοις, η ανίχνευση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της α-συνουκλεΐνης στον ζυμομύκητα αποτελεί εν μέρει ανεξερεύνητο πεδίο, αλλά και συνάμα κρίσιμη γνώση με βάση τις ομοιότητες των ανθρώπινων νευρώνων και των κυττάρων ζύμης και την πιθανότητα ανεύρεσης νέων στόχων φαρμάκων για τον άνθρωπο.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1 Χημικά και όργανα**

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα διδακτορική διατριβή ήταν των εταιριών LAB M, Invitrogen, Biolife, SIGMA και MERCK.

Τα όργανα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

**Επωαστήρες:** ZHICHENG- Incubator Shaker ZHWY-200B/ Edmund Buhler- TH30/ Memmert/ MM Medcenter- Incucell

**Συσκευές ηλεκτροφόρησης DNA-RNA-Τροφοδοτικά:** Consort- E844/ Roth Karlsruhe- HU6, HU10, HU13

**Συσκευές ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών-Τροφοδοτικά:** Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell System

**Συσκευή ηλεκτροφορητικής μεταφοράς πρωτεϊνών:** Bio-Rad Mini Trans Blot

**Συσκευή εμφάνισης ανοσοαποτύπωσης:** Bio-Rad ChemiDoc XRS+

**Συσκευές PCR:** MJ RESEARCH- MiniCycler/ Eppendorf- Mastercycler Gradient

**Συσκευή qPCR:** Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR Detection System

**Συνεστιακό μικροσκόπιο:** Leica TCS SP8 MP

**Φυγόκεντροι:** Costar/ Thermo Scientific- Heraeus Pico 21/ Hettich Zentrifugen- Universal 16A/ Hettich Zentrifugen- MIKRO 12-24/ Biofuge- Stratos Heraeus/ Thermo Electron Corporation- IEC Micromax RF

**Πιπέτες:** Gilson P2 (0.2-2μl), P200 (20-200 μl), P1000 (100-1000 μl)/ Thermolab Systems- Finnpipette 2-20 μl, 20-200 μl, 200-1000 μl/ Nichiryo- Nichipet EX 100 2-20 μl, 20-200 μl, 100-1000 μl

**Υδατόλουτρο:** BIOLINE SCIENTIFIC WB5020

**Ψυγειοκαταψύκτες:** Thermo Scientific- Forma 900 Series/ LIEBHERR/ BOSCH Duo system/ Zanussi

**Φούρνος μικροκυμάτων:** Rohnson

**Dry Bath Incubator:** Kisker- CH100/ Bioform Design- TDB-120/ Kisker- MD-02N

**Φωτόμετρα:** HITACHI- U-1500 Spectrophotometer/ Quawell- DNA/Protein Analyzer

**Ζυγοί:** KERN- Max 810 g, d=0,01 g/ KERN- 770 Max 120 g, d=0,0001 g

**Θάλαμος νηματικής ροής (Hood):** BIOAIR INSTRUMENTS- Electronic Autospeed Control m/sec

**Συσκευή Speedvac:** Thermo Savant- ISS110 Speedvac System

**Αυτόκαυστο:** ASTELL SCIENTIFIC AMB 430

**Συσκευή ακτινοβολίας UV:** Vilber Lourmat (Συνοδευόμενη από θάλαμο Kodak-EDAS 290)

**Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης:** Bio-Rad- GenePulser Xcell

**Μαγνητικοί αναδευτήρες:** VELP Scientifica- Zx3/ Kika Werke- RCT Basic (Θερμαινόμενη)

**Λοιπά αναλώσιμα:** Whatman- Απορροφητικό χαρτί / Στατώ/ Eppendorfs/ Ρύγχη για πιπέτες/ Πιπέτες Pasteur/ Λαβίδες/ Τρυβλία/ Whatman- Φίλτρα με διάμετρο πόρων 0,45 µm/ FALCON- Σωλήνες των 10 ml, 50 ml/ Σωλήνες των 10 ml/ Bemis- Parafilm/ Ογκομετρικοί σωλήνες/ Isolab και Simax- Μπουκάλια των 70 ml, 200 ml, 400 ml/ Χωνί/ Bomex και Pyrex- Κωνικές των 50, 100 ml/ Γάντια Latex μίας χρήσεως και γάντια νιτρίλιου/ Υδροβολείς/ Bomex και Simax- Beakers των 100, 500, 1500 ml/ Μαγνητάκια/ Costar-Σιφόνια των 5, 10 ml/ Πουάρ/ Αλουμινοχαρτο/ Σπάτουλες

### **3.2 Στελέχη ζυμομυκήτων, βακτηρίων και πλασμίδια**

Τα στελέχη και τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρουσιάζονται στους πίνακες 3.1, 3.2 και 3.3

**Πίνακας 3.1. Στελέχη *S. cerevisiae***

Στελέχη Ζυμομυκήτων	Γονότυπος	Βιβλιογραφία
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Winston et al., 1995
BY4741 <i>TPS1Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YBR126c::kanMx4</i>	Bell et al., 1998
BY4741 <i>TPS2Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YDR074w::kanMx4</i>	Bell et al., 1998
BY4741 <i>TSL1Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YML100w::kanMx4</i>	Bell et al., 1998

**Πίνακας 3.2. Στελέχη Βακτηρίων**

Στελέχη	Γονότυπος	Βιβλιογραφία
<i>Escherichia coli</i> DH5a	<i>Escherichia coli</i> DH5a <i>supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 recA1</i>	BRL, Gaithersburg, MD
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F- <i>omp T hsdSB (r<sub>B</sub> - m<sub>B</sub> -) gal dcm</i> (DE3)	Novagen

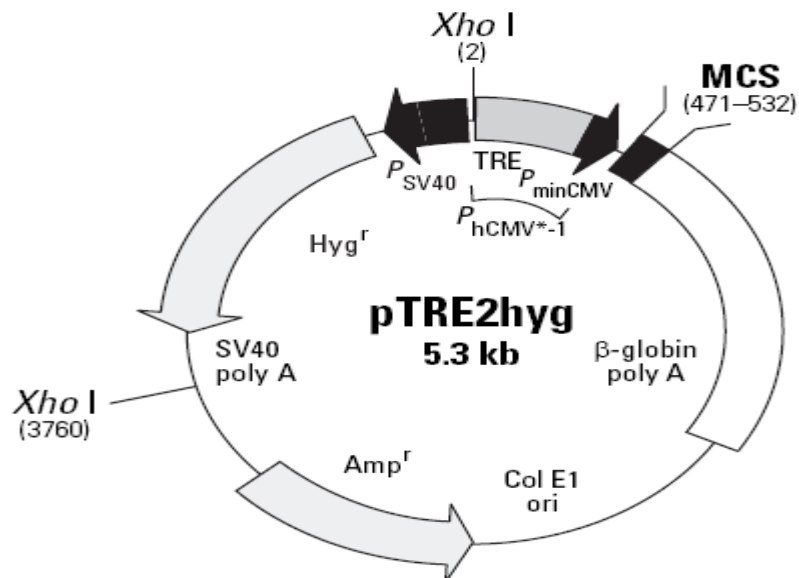
**Πίνακας 3.3. Πλασμίδια**

<b>Πλασμίδια</b>	<b>Φαινοτυπικός δείκτης</b>	<b>Χαρακτηριστικά</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>
pTRE2hyg-A-synA53T	Amp <sup>R</sup>	Φορέας έκφρασης που περιέχει το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης A53T	Pallua, 2001
pTRE2hyg-A-synA30P	Amp <sup>R</sup>	Φορέας έκφρασης που περιέχει το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης A30P	Pallua, 2001
pCM190	Amp <sup>R</sup>	Φορέας έκφρασης κατάλληλος για <i>S.cerevisiae</i>	Gari et al. 1997
pCM190 asynWT	Amp <sup>R</sup>	Φορέας έκφρασης κατάλληλος για <i>S.cerevisiae</i>	Κακaniάρης Ν., Πτυχιακή Εργασία, Ιωάννινα, 2010
pCM190 asyn112	Amp <sup>R</sup>	Φορέας έκφρασης κατάλληλος για <i>S.cerevisiae</i>	Σφήκας Ε., Πτυχιακή Εργασία, Ιωάννινα, 2011
pCM190 asynA53T	Amp <sup>R</sup>	Φορέας έκφρασης κατάλληλος για <i>S.cerevisiae</i>	Σφήκας Ε., Διδακτορική Διατριβή, Ιωάννινα, 2019
pCM190 asynA30P	Amp <sup>R</sup>	Φορέας έκφρασης κατάλληλος για <i>S.cerevisiae</i>	Σφήκας Ε., Διδακτορική Διατριβή, Ιωάννινα, 2019
pET29c(+)	Km <sup>R</sup>	Φορέας υπερέκφρασης πρωτεϊνών	Novagen
pET29c(+)/SNCA	Km <sup>R</sup>	Φορέας υπερέκφρασης πρωτεϊνών	Σφήκας Ε., Διδακτορική Διατριβή, Ιωάννινα, 2019
pBluescript II SK (+)	Amp <sup>R</sup>	Φορέας κλωνοποίησης	Addgene
pBluescript II SK (+)/SNCA	Amp <sup>R</sup>	Φορέας κλωνοποίησης	Σφήκας Ε., Διδακτορική Διατριβή, Ιωάννινα, 2019
pCMVsyn	Amp <sup>R</sup>	Φορέας έκφρασης κατάλληλος για κύτταρα θηλαστικών	Pallua, 2001

### 3.2.1 Περιγραφή πλασμιδιακών φορέων

- Πλασμιδιακός φορέας pTRE2hygA53T και pTRE2hygA30P

Οι μεταλλαγές της α-συνουκλεΐνη, A53T και A30P, είναι κλωνοποιημένες στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pTRE2hyg με PCR μεταξύ των θέσεων *EcoRI* (500bp) και *BglII* (962bp) του πολυσυνδέτη MCS (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3). Ο περιοριστικός χάρτης του μη ανασυνδυασμένου φορέα παρατίθεται στην εικόνα 3.1.

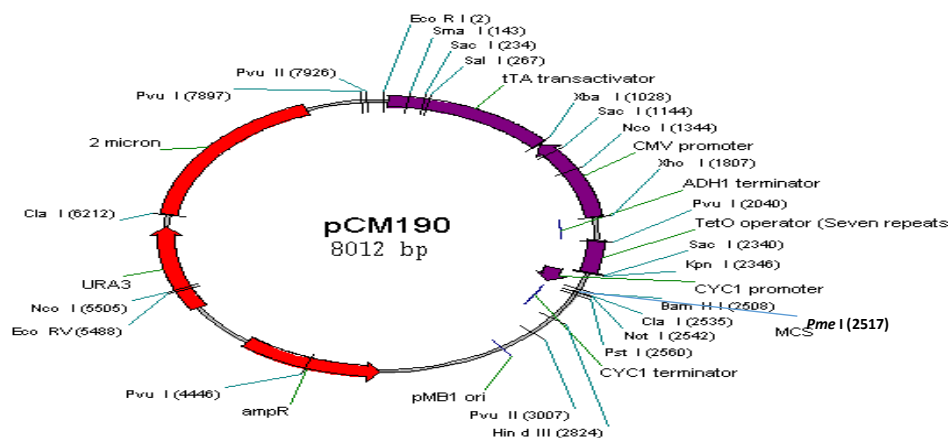


Εικόνα 3.1: Περιοριστικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pTRE2hyg. (Πηγή: Clontech)

- Πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pCM190

Η αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνη είναι κλωνοποιημένη με PCR στις περιοριστικές θέσεις *ClaI* και *PstI* της περιοχής του πολυσυνδέτη MCS, ενώ η ισομορφή της 112 είναι κλωνοποιημένη με PCR στις περιοριστικές θέσεις *BamHI* και *PstI*. Ο περιοριστικός χάρτης του μη ανασυνδυασμένου φορέα pCM190 παρουσιάζεται στην εικόνα 3.2.

ATCC 87662



Εικόνα 3.2: Περιοριστικός χάρτης του φορέα έκφρασης pCM190

Ο συγκεκριμένος φορέας είναι κατάλληλος για την υπερέκφραση γονιδίων στον ζυμομύκητα μέσω του συστήματος tet-off. Η μεταγραφή καθοδηγείται από τον υβριδικό υποκινητή tet O-CYC1 (όπου tet-O ο χειριστής) υπό τον έλεγχο του ενεργοποιητή tTA. Το σύστημα tet-off προέρχεται από την τροποποίηση του οπερονίου της τετρακυκλίνης της *E.coli*.

Στο σύστημα του οπερονίου της τετρακυκλίνης η πρωτεΐνη που προσδίδει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη κωδικοποιείται από ένα τμήμα του τρανσποζονίου *Tn10*.

Απουσία τετρακυκλίνης ο καταστολέας Tet προσδένεται στο χειριστή *tetO*, εμποδίζοντας τη μεταγραφή του γονιδίου που προσδίδει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη. Η προσθήκη τετρακυκλίνης παρεμποδίζει την πρόσδεση του καταστολέα, επιτρέποντας την έναρξη της μεταγραφής.

Στο σύστημα tet-off η τροποποίηση οδήγησε στη δημιουργία ενός υβριδικού μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος ονομάστηκε tTA και έχει την ικανότητα να λειτουργεί και στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στο γονίδιο *tTA* συνδυάζονται τμήματα από δύο διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες: (α) την περιοχή του καταστολέα Tet η οποία προσδένεται στο DNA και (β) το τμήμα μιας πρωτεΐνης του ερπητοϊού VP16, το οποίο ευθύνεται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η υβριδική πρωτεΐνη που προκύπτει (γνωστή και ως Tet-VP16) λειτουργεί ως ενεργοποιητής της μεταγραφής και προσδένεται στο χειριστή *tetO* μόνο απουσία τετρακυκλίνης. Επομένως, όταν ο χειριστής *tetO* εισαχθεί ανοδικά από ένα στοιχειώδη υποκινητή (έναν υποκινητή που είναι πρακτικά ανενεργός όταν δεν βρίσκονται κοντά του περιοχές πρόσδεσης μεταγραφικών ενεργοποιητών), τότε η υβριδική πρωτεΐνη Tet-VP16 προσδένεται σε αυτόν ενεργοποιώντας τη μεταγραφή. Η προσθήκη τετρακυκλίνης εμποδίζει την πρόσδεση του ενεργοποιητή Tet-VP16 στον *tetO* και έτσι η μεταγραφή σταματά. Ως εκ τούτου, το σύστημα tet-off πήρε την ονομασία του επειδή επιτρέπει στον πειραματιστή να απενεργοποιήσει ένα γονίδιο με την προσθήκη τετρακυκλίνης.

Τα προαναφερόμενα στελέχη ζυμομύκητα για την ανάπτυξή τους σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο απαιτούν την παρουσία ουρακίλης λόγω του γονοτύπου τους. Στο γεγονός αυτό στηρίζεται η ανάπτυξη του συστήματος μεταφοράς DNA. Τα μετασχηματισμένα, με το πλασμίδιο pCM190, κύτταρα του ζυμομύκητα μπορούν να επιλέγονται σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο χωρίς ουρακίλη λόγω της παρουσίας στο πλασμίδιο του γονιδίου βιοσύνθεσης της ουρακίλης *URA3*.

- **Πλασμιδιακός φορέας υπερέκφρασης pET29c(+)**

Ο περιοριστικός χάρτης του πλασμιδίου pET29c(+) παρουσιάζεται στην εικόνα 3.3.





Η επιλογή των αποικιών οι οποίες έχουν προσλάβει τον φορέα pBluescript (ανασυνδυασμένο ή μη) πραγματοποιείται στο αντιβιοτικό η αμικικιλίνη. Η ανθεκτικότητα προσίδεται από τη β-λακταμάση, προϊόν του γονιδίου *bla*.

Η επιλογή των ανασυνδυασμένων αποικιών στηρίζεται στην δράση του ενζύμου β-γαλακτοζιδάση και στη χρήση ενός χρωμογόνου υποστρώματος του ενζύμου αυτού, του X-gal (5-βρωμο-4-χλώρο-3-ινδολυλ-β-D-γαλακτοσίδιο). Όταν το X-gal υδρολυθεί από την β-γαλακτοσιδάση παράγεται γαλακτόζη και 5-βρωμο-4-χλωρο-3-υδροξυινδόλιο. Το τελευταίο οξειδώνεται προς 5'5-διβρωμο-4'4-διχλωρο-ινδικό, μία αδιαλυτή ένωση με γαλανό έως έντονο κυανό χρώμα.

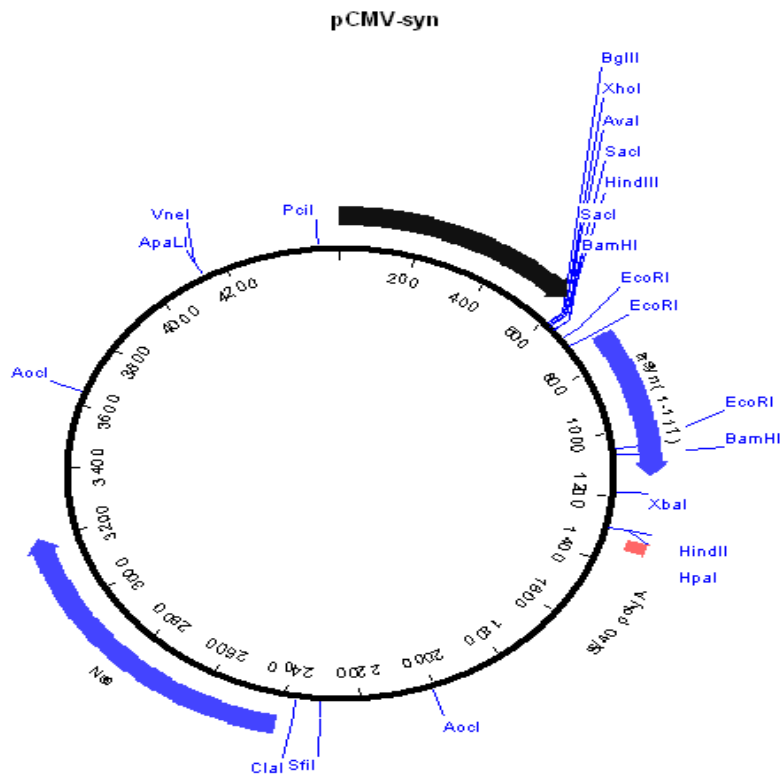
Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pBluescript φέρει την ρυθμιστική περιοχή (υποκινητή, χειριστές) του οπερονίου της λακτόζης και ένα τμήμα του γονιδίου *lacZ*, το οποίο κωδικοποιεί την βιοσύνθεση της β-γαλακτοζιτάσης. Το τμήμα αυτό κωδικοποιεί τα πρώτα 146 αμινοξικά κατάλοιπα του αμινοτελικού άκρου του ενζύμου και συμπληρώνεται από το προϊόν του ενδογενούς χρωμοσωμικού *lacZ*, όταν το πλασμίδιο εισέλθει στον ξενιστή του. Τα στελέχη του *E. coli* που χρησιμοποιούνται ως ξενιστές φέρουν συνήθως ένα μεταλλαγμένο *lacZ* από το οποίο απουσιάζουν τα κωδικόνια 11-41. Κατά συνέπεια, η δράση της β-γαλακτοζιτάσης στα κύτταρα προέρχεται από την δράση των επιμέρους πολυπεπτιδίων, μία διαδικασία που ονομάζεται α-συμπληρωματικότητα.

Ανοδικά του τμήματος του γονιδίου *lacZ* στον pBluescript εδράζεται η περιοχή του πολυσυνδέτη, η οποία έχει εντεθεί με τρόπο ώστε να μην διαταρράσσεται το πλαίσιο ανάγνωσης του πλασμιδιακού *lacZ*. Συνεπώς το γονιδιακό αυτό τμήμα είναι σε θέση να συμμετέχει επιτυχώς στην α-συμπλήρωση και τα κύτταρα που το φέρουν να συνθέτουν λειτουργική β-γαλακτοζιτάση και παρουσία X-gal να χρωματίζονται κυανά. Αντιθέτως, όταν η επιτυχής δεσμοποίηση εισαγάγει στον πολυσυνδέτη μία ένθεση το πλαίσιο ανάγνωσης του *lacZ* καταστρέφεται και το γονίδιο αδρανοποιείται. Ως εκ τούτου, οι αποικίες που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο θα χρωματίζονται λευκές, επειδή δεν παράγεται σε αυτά τα κύτταρα λειτουργική β-γαλακτοζιτάση και δεν υδρολύεται το X-gal, το οποίο έχει προστεθεί στο στερεό θρεπτικό μέσο.

Διάλυμα X-gal stock: 20 mg/ml με τελική συγκέντρωση στον μετασχηματισμό 20 μg/ml.

- **Πλασμιδιακός φορέας pCMVsyn**

Ο φορέας pCMVsyn αποτελεί τον αρχικό φορέα στον οποίο βρισκόταν κλωνοποιημένο το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου και στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την ενίσχυση του γονιδίου *SNCA* μέσω PCR. Ο περιοριστικός του χάρτης φαίνεται στην εικόνα 3.5.



Εικόνα 3.5: Περιοριστικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pCMVsyn

### 3.3 Μέθοδοι

#### 3.3.1 Ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων σε καλλιέργειες

Η ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli* σε υγρές καλλιέργειες πραγματοποιείται στο πλήρες θρεπτικό μέσο LB (Luria Broth) (Luria and Delbruck, 1943), του οποίου η σύσταση φαίνεται στον πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.4: Θρεπτικό *E. coli*

#### Luria Broth

NaCl	1% w/v
Τρυπτόνη	1% w/v
Εκχύλισμα Ζύμης	0.5% w/v

Για την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων σε στερεό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιείται LB με προσθήκη 2% άγαρ και γίνεται επίστρωση σε τρυβλία. Τα παραπάνω θρεπτικά υλικά αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 1.4 bar.

Η θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 37°C. Στην περίπτωση ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό υλικό οι καλλιέργειες ανακινούνται στις 225 rpm περίπου.

### 3.3.2 Ανάπτυξη στελεχών του *S. cerevisiae*

Η ανάπτυξη των ζυμομυκήτων σε υγρές καλλιέργειες πραγματοποιείται στο πλήρες θρεπτικό μέσο YPD (Yeast Peptone Dextrose), η σύσταση του οποίου αναφέρεται στον πίνακα 3.5.

**Πίνακας 3.5:** Πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *S. cerevisiae*

#### Yeast Peptone Dextrose

Εκχύλισμα ζύμης	1% w/v
Πεπτόνη	2% w/v
Γλυκόζη	2% w/v

Το μίγμα των δύο πρώτων συστατικών αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο, ενώ η γλυκόζη παρασκευάζεται σε διάλυμα stock 20% w/v, αποστειρώνεται ξεχωριστά με φίλτρο 0.22 μm και προστίθεται στο ήδη αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό.

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου προστίθεται στο παραπάνω διάλυμα 2% άγαρ. Στην συνέχεια, το θρεπτικό μέσο αποστειρώνεται, προστίθεται η γλυκόζη και ακολουθεί η επίστρωση στα τρυβλία. Η θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 30°C. Στην περίπτωση ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό υλικό οι καλλιέργειες ανακινούνται στις 170 rpm περίπου.

Επιπροσθέτως, κατά τον μετασχηματισμό των στελεχών του ζυμομύκητα με το πλασμίδιο pCM190, η ανάπτυξη και η επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών επιτυγχάνονται με την χρησιμοποίηση του ελάχιστου θρεπτικού μέσου yeast synthetic drop-out media supplement without uracil (Kaiser et al., Methods in Yeast Genetics, a Cold Spring Harbor Laboratory Manual, 1994). Η σύσταση του συγκεκριμένου θρεπτικού μέσου για τα διαφορετικά στελέχη του *S. cerevisiae*, κατά την ανάπτυξή τους σε υγρές καλλιέργειες, φαίνεται στον πίνακα 3.6. Το εν λόγω μέσο περιέχει μία πηγή αζώτου για τον ζυμομύκητα χωρίς την παρουσία αμινοξέων, ένα μέσο αποκλεισμού της ουρακίλης από το θρεπτικό υλικό, την γλυκόζη, ως πηγή σακχάρων, και τα απαραίτητα αμινοξέα για την ανάπτυξη του κάθε στελέχους, σύμφωνα με τον γονότυπό του. Τονίζεται ότι η γλυκόζη αποτελεί τοξικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του στελέχους *tps1Δ*, οπότε στην θέση της χρησιμοποιείται η μαλτόζη στην ίδια σύσταση.

**Πίνακας 3.6:** Ελάχιστο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του *S. cerevisiae* για τα στελέχη BY4741

#### Yeast synthetic drop-out media supplement without uracil

Πηγή αζώτου ζύμης χωρίς αμινοξέα	6.7g/L
Συνθετικό μέσο-συμπλήρωμα ζύμης αποκλεισμού της ουρακίλης	1.92 g/L
Γλυκόζη (ή Μαλτόζη)	40 ml/L
Ιστιδίνη	76 mg/L
Λευκίνη	380 mg/L

Μεθειονίνη	76 mg/L
------------	---------

Η γλυκόζη ή η μαλτόζη παρασκευάζεται σε διάλυμα stock 50% w/v και αποστειρώνεται ξεχωριστά με φίλτρο 0.22 μm. Το διάλυμα κάθε αμινοξέος με συγκέντρωση 76 mg/L παρασκευάζεται σε stock 0.076 % w/v και αποστειρώνεται με φίλτρο 0.22 μm. Η λευκίνη με συγκέντρωση 380 mg/L παρασκευάζεται σε stock 0.38 % w/v.

Οι απαιτούμενες ποσότητες των διαλυμάτων της γλυκόζης και των αμινοξέων προστίθενται στο ήδη αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό.

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου προστίθενται στο παραπάνω διάλυμα 20 g/L άγαρ, πριν την αποστείρωση στο αυτόκαυστο. Μετά την αποστείρωση ακολουθεί επίστρωση σε τρυβλία. Η θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 30°C. Στην περίπτωση ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό μέσο οι καλλιέργειες ανακινούνται στις 170 rpm περίπου.

Τέλος, στην περίπτωση παρασκευής είτε υγρού είτε στερεού μέσου για την ανάπτυξη του ζυμομύκητα σε συνθήκες υψηλής εξωτερικής ωσμωτικότητας προστίθεται σορβιτόλη 18%.

### **3.3.3 Μόνιμη αποθήκευση (stock) καλλιεργειών *Saccharomyces cerevisiae* και *E.coli***

Σε ειδικά σωληνάρια προστίθενται 0,5 ml 100% w/v γλυκερόλης και 1 ml υγρής καλλιέργειας είτε του στελέχους ζυμομύκητα είτε του στελέχους της *E.coli*. Στη συνέχεια ακολουθεί ανάδευση στο vortex και τοποθέτηση στους -80°C.

### **3.3.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (με χρήση σκευάσματος kit Nucleospin Plasmid cat No 740 588.250) (Macherey-Nagel)**

Η μέθοδος στηρίζεται στην ειδική δέσμευση του DNA σε στήλη ανταλλαγής και στην συνέχεια την έκλουσή του από αυτή με ρυθμιστικό διάλυμα TE και εφαρμόζεται σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας.

### **3.3.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τον *Saccharomyces cerevisiae* (Soni R. and Murray J.A.H., 1992, με ορισμένες τροποποιήσεις)**

- Από την προηγούμενη ημέρα αναπτύσσεται καλλιέργεια 1.5 ml του *Saccharomyces cerevisiae* σε υγρό θρεπτικό μέσο Yeast synthetic drop-out media supplement without uracil, με την παρουσία των κατάλληλων, για το κάθε στέλεχος του ζυμομύκητα, αμινοξέων και την απαραίτητη συγκέντρωση τετρακυκλίνης σε περίπτωση που το πλασμίδιο προς μετασχηματισμό είναι ανασυνδυασμένο, στους 30 °C ανάδευση.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στα 12000 rpm για 4 min.

- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 100 μl διαλύματος 2.5 M LiCl, 50 mM Tris-HCl (pH=8.0), 20 mM EDTA (pH=8.0), 4% Triton X-100.
- Προστίθενται 100 μl διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1 v/v).
- Το μίγμα αναδεύεται σε vortex για 10 min.
- Στην συνέχεια, το δείγμα επωάζεται στους 65 °C για 5 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14000 rpm για 5 min.
- Συλλέγεται η (άνω) υδατική φάση, χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση, και γίνεται καταβύθιση σε 600 μl απόλυτης αιθανόλης.
- Το δείγμα επωάζεται στον πάγο για 15 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12000 rpm για 10 min.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξηραίνεται στο speed vac, ώστε να αποβληθεί όλη η αιθανόλη.
- Το ίζημα επαναιωρείται σε 30 μl TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH=8.0).

Το DNA, που απομονώνεται μέσω της παραπάνω μεθόδου, δεν είναι ανιχνεύσιμο στην ηλεκτροφόρηση και οπωσδήποτε δεν αποτελεί ικανοποιητικό υπόστρωμα για αντιδράσεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Κατά συνέπεια, κρίνεται αναγκαίος ο μετασχηματισμός του συγκεκριμένου δείγματος DNA σε κύτταρα *E.coli* DH5a, ώστε να ανακτηθεί πλήρως το πλασμιδιακό DNA που ήταν μετασχηματισμένο στον ζυμομύκητα.

### **3.3.6 Απομόνωση γονιδιωματικού-χρωμοσωμικού DNA από κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* (Harju et al., 2004 με ορισμένες τροποποιήσεις)**

- Καλλιέργεια 5 ml κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο από την προηγούμενη.
- Όταν η καλλιέργεια αναπτυχθεί, μεταφέρεται σε eppendorf των 1,5 ml και φυγοκεντρείται στα 12000g για 5 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθεται στο κυτταρικό ίζημα 200 μl Harju buffer.
- Ακολουθεί προσθήκη 50 μl RNase A και τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 10 λεπτά.
- Προστίθενται σφαιρίδια υάλου διαμέτρου 600 μm σε αντιστοιχία όγκου 50 μl και τα δείγματα αναδεύονται στο vortex για 2-3 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 12000g.
- Αφαιρούνται τα κύτταρα σε λύση στον πυθμένα του eppendorf με την πιπέτα και τοποθετούνται σε νέο eppendorf.
- Προστίθενται 400 μl 1:1 TE/φαινόλης, ακολουθεί vortex και φυγοκέντρηση για 4 λεπτά στις 12000xg.
- Η άνω υδατική φάση συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέο eppendorf.
- Προστίθενται 400 μl 4:1 φαινόλης/χλωροφόρμιου, ακολουθεί vortex των δειγμάτων και φυγοκέντρηση για 4 λεπτά στις 12000g.
- Η άνω υδατική φάση συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέο eppendorf
- Προστίθεται 1 ml αιθανόλης σε κάθε δείγμα και γίνεται ανάμειξη.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 6 λεπτά στις 12000g και η αιθανόλη απορρίπτεται.

- Ακολουθεί μια πλύση με 1 ml 70% αιθανόλη, ανάδευση των δειγμάτων και φυγοκέντρωση για 6 λεπτά στις 12000g.
- Απορρίπτεται η αιθανόλη και στη συνέχεια τα δείγματα οδηγούνται για ξήρανση στο speed vac.
- Τέλος το ίζημα επαναιωρείται σε 50 μl TE και επωάζεται στους 37 °C για 10 λεπτά για πλήρη διαλυτοποίηση

Σύσταση Harju-buffer: 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 1 mM EDTA

### **3.3.7 Απομόνωση γονιδιωματικού-χρωμοσωμικού DNA από κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* (Looke et al., 2011)**

Η εν λόγω μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως για την απομόνωση DNA, που θα χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα σε αντιδράσεις PCR.

1. Καλλιέργεια 5 ml κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο από την προηγούμενη.
2. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 5 min στα 8000g.
3. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 200 μl διαλύματος LiAc 200 mM/SDS 1%.
4. Γίνεται επώαση του εναιωρήματος για 5 min στους 70 °C.
5. Προστίθενται 300 μl 100% αιθανόλης και γίνεται ανάδευση με vortex.
6. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 3 min στα 15000 g.
7. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και πραγματοποιείται έκπλυση του ιζήματος με 70% αιθανόλη
8. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 3 min στα 15000 g.
9. Το ίζημα διαλύεται σε 50 μl TE και τα κυτταρικά υπολείμματα απορρίπτονται με μία φυγοκέντρωση των 15 sec στα 15000 g.
10. Το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε νέο eppendorf.
11. Στο τελικό στάδιο προστίθενται 5 μl RNase A και γίνεται επώαση για 30 min στους 37 °C για τις βέλτιστες συνθήκες δράσης της.

### **3.3.8 Απομόνωση γονιδιωματικού-χρωμοσωμικού DNA από κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* (Harju et al., 2004)**

Η παρούσα μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα κύτταρα ζύμης με στόχο την πέψη τους και την μετέπειτα υβριδοποίηση τους κατά Southern με δείγμα σημασμένου rDNA ζυμομύκητα.

- Καλλιέργεια 5 ml κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο από την προηγούμενη.
- Όταν η καλλιέργεια αναπτυχθεί, μεταφέρεται σε eppendorf των 1,5 ml και φυγοκεντρείται στα 12000g για 5 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθεται στο κυτταρικό ίζημα 200 μl Harju buffer.

- Ακολουθεί προσθήκη 50 µl RNase A και τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 10 λεπτά.
- Τα δείγματα μεταφέρονται στους -80 °C για 2 min (μέχρι να παγώσουν πλήρως) και έπειτα αμέσως σε υδατόλουτρο των 95 °C για 1 min.
- Η διαδικασία πήξης-τήξης επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά και ακολουθεί vortex για 30 sec.
- Στην συνέχεια σε κάθε δείγμα προστίθενται 200 µl χλωροφορμίου και ακολουθεί vortex για 2 min.
- Φυγοκέντρηση στα 15000g για 3 min.
- Συλλέγεται η άνω υδατική φάση και μεταφέρεται σε νέο eppendorf.
- Προστίθενται 400 µl παγωμένης απόλυτης αιθανόλης και τα δείγματα αφήνονται για καταβύθιση 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 15000g για 5 min και απορρίπτεται η αιθανόλη.
- Ακολουθεί μια πλύση με 0,5 ml 70% αιθανόλη, ανάδευση των δειγμάτων και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 12000g.
- Απορρίπτεται η αιθανόλη και στη συνέχεια τα δείγματα οδηγούνται για ξήρανση στο speed vac.
- Τέλος το ίζημα επαναιωρείται σε 50 µl TE και επωάζεται στους 37 °C για 10 λεπτά για πλήρη διαλυτοποίηση

Σύσταση Harju-buffer: 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 1 mM EDTA

### **3.3.9 Πέψεις του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες**

Τα ένζυμα και τα buffer που χρησιμοποιούνται είναι προϊόντα της εταιρείας TAKARA.

Για κάθε περιοριστική πέψη προστίθενται με την εξής σειρά τα ακόλουθα:

- H<sub>2</sub>O, εφόσον είναι απαραίτητο για την συμπλήρωση του τελικού όγκου της αντίδρασης
- DNA
- Buffer στο 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης
- Περιοριστικό ένζυμο, ανάλογα με την ποσότητα του DNA προς πέψη. Στην περίπτωση διαγνωστικής πέψης, αρκούν 4-5 Units.

Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σύντομα και ήπια και επωάζεται στην θερμοκρασία δράσης του περιοριστικού ενζύμου. Σε περίπτωση προσθήκης περισσότερων του ενός περιοριστικών ενζύμων στην αντίδραση, λαμβάνονται οι συνθήκες που απαιτούνται για τον συνδυασμό της δράσης των διαφορετικών ενζύμων. Η επώαση των αντιδράσεων πέψης διαρκεί 2-3 h σε περιπτώσεις διαγνωστικών πέψεων και στις 16 h σε περιπτώσεις πέψεων μεγάλης ποσότητας DNA, όπως κατά την απαίτηση απομόνωσης συγκεκριμένων ζωνών από το πήγμα αгарόζης.

### 3.3.10 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction)

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) μία συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενισχύεται με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές από μία θερμοσταθερή DNA πολυμεράση. Οι εκκινητές είναι μικρά τμήματα μονόκλωνου DNA (συνήθως 18-25 νουκλεοτίδια), τα οποία προσδένονται σε ταυτόσημες (ή σχεδόν ταυτόσημες) αλληλουχίες, που περικλείουν την περιοχή προς ενίσχυση.

Η PCR αποτελείται από διάφορα θερμοκικά στάδια. Στο πρώτο στάδιο το προς ενίσχυση υπόστρωμα DNA μετουσιώνεται, στο δεύτερο στάδιο οι εκκινητές προσδένονται στις μονόκλωνες συμπληρωματικές τους αλυσίδες DNA και στο τρίτο στάδιο η DNA πολυμεράση συνθέτει μία νέα μονόκλωνη αλυσίδα χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την προς ενίσχυση αλυσίδα. Η σύνθεση γίνεται προς την κατεύθυνση 5'→3' και οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες χρησιμεύουν και εκείνες με την σειρά τους ως εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο της αντίδρασης. Θεωρητικά, το προς ενίσχυση τμήμα DNA ενισχύεται μέσω της αντίδρασης 2<sup>n</sup> φορές μετά από n κύκλους. Το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει το υπόστρωμα-εκμαγείο DNA, τους εκκινητές, τα dNTPs, την DNA πολυμεράση, MgCl<sub>2</sub> και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου. Σε κάθε πείραμα πραγματοποιείται και μία αντίδραση που περιέχει όλα τα παραπάνω εκτός του υποστρώματος και αντιπροσωπεύει τον αρνητικό μάρτυρα.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή παρουσιάζονται στον πίνακα 3.7.

**Πίνακας 3.7: Εκκινητές των αντιδράσεων PCR της παρούσας διατριβής.** Παρουσιάζεται το όνομα, η αλληλουχία, το σημείο τήξης, το μέγεθος νουκλεοτιδίων και η χρήση του καθενός εκκινητή στην παρούσα διατριβή. Στις αλληλουχίες των εκκινητών SNCANdeIF και SNCASalIR παρουσιάζονται με έντονη γραμματοσειρά τα διαφορετικά από την αρχική αλληλουχία του DNA νουκλεοτίδια, ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις αναγνώρισης για τα ένζυμα *NdeI* και *SalI* στον ανοδικό και καθοδικό εκκινητή αντίστοιχα, οι οποίες φαίνονται υπογραμμισμένες.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία	Σημείο τήξης (°C)	Μέγεθος	Χρήση
SNCAF	GAGGGAGTTGTGGCTACTGC	61,4	20	PCR
SNCAR	CCCAACCTGGTCTTTTTGAC	57,3	20	PCR
SNCARTF	GCAACAGTGGCTGAGAAG	56,0	18	qPCR
SNCARTR	GGCTTCAGGTTTCGTAGTCTT	57,3	20	qPCR
SNCANdeIF	GGAATTCATTACA <b>T</b> ATGGATG	57,6	24	Υπερέκφραση
SNCASalIR	AGATATTT <b>CGT</b> CGACTTCAGG	55,9	21	Υπερέκφραση
TPS1F	AGGTTCTTAATCCTGAGTGA	55,9	21	qPCR
TPS1R	CCCAGAAGGCAGAAGTGTAT	57,3	20	qPCR
TPS2F	GATCTGGACGATGACCCACT	59,4	20	qPCR
TPS2R	TTCCGCGTAATTTCTCCATC	55,3	20	qPCR
TSL1F	CGGCAGCTCAATTTCTTTTC	55,3	20	qPCR
TSL1R	TTCAAGCACAGGAGACGATG	57,3	20	qPCR
ATG8F	GGATACCTGTGATTTGCGAA	55,3	20	qPCR
ATG8R	CCGTCCTTATCCTTGTGTTC	57,3	20	qPCR
TOR1F	CGGATGCAATCTTGGTTCT	55,3	20	qPCR



TOR1R	TACCGTCAATCCGCACATTA	55,3	20	qPCR
ACT1F	GCCTTCTACGTTTCCATCCA	57,3	20	qPCR
ACT1R	GGCCAAATCGATTCTCAAAA	53,2	20	qPCR
ALG9F	CACGGATAGTGGCTTTGGTGAACAA TTAC	61,3	29	qPCR
ALG9R	TATGATTATCTGGCAGGAAAGAACT TGGG	59,8	29	qPCR
TAF10F	ATATTCCAGGATCAGGTCTTCCGTAG C	61,5	27	qPCR
TAF10R	GTAGTCTTCTCATTCTGTTGATGTTG TTCTTG	58,5	32	qPCR

Η ενίσχυση του γονιδίου αγρίου τύπου της ασυνουκλεΐνης, της ισομορφής 112 και των δύο μεταλλαγών A53T και A30P της α-συνουκλεΐνης πραγματοποιήθηκε με την χρήση των εκκινητών SNCAF και SNCAR με υποστρώματα τα πλασμιδιακά εκχυλίσματα ζυμομυκήτων ή/και *E. coli*. Η αντίδραση PCR είχε την εξής αναλογία:

Αντιδραστήρια Stock	Τελικές συγκεντρώσεις	Ποσότητα
dNTPs (40mM)	0.8mM (4x0.2mM)	0.5 μl
Ανοδικός εκκινητής (SNCAF) 10μM	0.5 μM	1.25 μl
Καθοδικός εκκινητής (SNCAR) 10μM	0.5 μM	1.25 μl
5x Buffer	1x Buffer	5 μl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1.5 mM	0.5 μl
DMSO (100%)	5-7,5%	Κατά αναλογία
DNA	10 ng πλασμιδιακό DNA	10ng
Ένζυμο KAPA2G Fast (2U/μl)	0,2U/μl	0.1 μl
H <sub>2</sub> O		Όσο απαιτείται
Τελικός Όγκος		25 μl

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής (πρόγραμμα της συσκευής-θερμοκυκλοποιητή PCR):

1ο βήμα: 95 °C/1 min

2ο βήμα: 95 °C/10 sec

3ο βήμα: 57 °C/10 sec

4ο βήμα: 72 °C/1 sec

5ο βήμα: 29 κύκλοι των βημάτων 2-4

6ο βήμα: 72 °C/1 min

7ο βήμα: 4 °C/24 h

Η ενίσχυση των γονιδίων *TPS1*, *TSL1*, *TPS2*, *TOR1*, *ATG8* και *25S rDNA* πραγματοποιήθηκε με τους αντίστοιχους εκκινητές του πίνακα 3.7 για το κάθε γονίδιο και την εξής σύσταση αντίδρασης PCR:

Αντιδραστήρια Stock	Τελικές συγκεντρώσεις	Ποσότητα
dNTPs (40mM)	0.3 mM το καθένα	0.75 μl
Ανοδικός εκκινητής 10μM	0.3 μM	0.75 μl
Καθοδικός εκκινητής 10μM	0.3 μM	0.75 μl
5x Buffer	1x Buffer	5 μl
DNA	100 ng γονιδιωματικό DNA	100 ng
Ένζυμο (1U/μl)	0,5 U/μl	0.5 μl
H <sub>2</sub> O		Όσο απαιτείται
Τελικός Όγκος		25 μl

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής (πρόγραμμα της συσκευής-θερμοκυκλοποιητή PCR):

1ο βήμα: 95 °C/3 min

2ο βήμα: 98 °C/20 sec

3ο βήμα: 60-75 °C/15 sec

4ο βήμα: 72 °C/1 min

5ο βήμα: 29 κύκλοι των βημάτων 2-4

6ο βήμα: 72 °C/1 min

7ο βήμα: 4 °C/24 h

Οι παραπάνω συνθήκες εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης με θέσεις περιορισμού *NdeI* και *SalI* στα δύο άκρα του, ώστε να καταστεί δυνατή η κλωνοποίησή του στον φορέα υπερέκφρασης pET29c(+).(+) . Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pCMVsyn σε ποσότητα 10 ng.

### **3.3.11 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων**

Η ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης επιτρέπει την ανίχνευση, τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση ή και τον καθαρισμό διαφόρων μορίων και τμημάτων DNA. Υπάρχουν δύο τύποι ηλεκτροφόρησης, η διαγνωστική και η παρασκευαστική. Η διαγνωστική ηλεκτροφόρηση επιτρέπει την ανίχνευση της ύπαρξης ενός μορίου DNA, τον διαχωρισμό του από άλλα μόρια DNA και τον καθορισμό του μεγέθους του, ενώ η παρασκευαστική επιτρέπει επιπλέον τον καθαρισμό ενός τμήματος DNA από άλλα μόρια νουκλεϊκών οξέων.

Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται αφ' ενός μεν στην ηλεκτρική αγωγιμότητα των υδατικών διαλυμάτων των νουκλεϊκών οξέων και αφ' ετέρου στο γεγονός ότι οι πόροι της αγαρόζης επιτρέπουν τη διέλευση των μορίων DNA αλλά με διαφορετική ταχύτητα που οφείλεται στο μέγεθός και την διαμόρφωσή τους.

Τα μόρια του DNA στο υδατικό διάλυμα είναι πολυανιόντα φορτισμένα αρνητικά στις φωσφορικές ομάδες τους, οπότε υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου οδεύουν προς την κάθοδο. Η παρεμπόδιση οφείλεται στις τριβές που προκαλούνται κατά την διέλευση των μορίων δια μέσου των πόρων του πηκτώματος. Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, τόσο μικρότερη η διάμετρος των πόρων και συνεπώς τόσο μεγαλύτερη η τριβή που αναπτύσσεται κατά την προσπάθεια διέλευσης των μορίων. Ως εκ τούτου, το μέγεθος των πόρων καθορίζει την ταχύτητα μετακίνησης των μορίων κατά μήκος του πηκτώματος, επιτρέποντας στα μικρά μόρια να διέλθουν απρόσκοπτα, ή με μικρότερη καθυστέρηση σε σχέση με τα μεγαλύτερα, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των μικρότερων από τα μεγαλύτερα μόρια DNA.

Η ανίχνευση των μορίων του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης επιτελείται μέσω προσθήκης στο πήκτωμα ορισμένης ποσότητας βρωμιούχου αιθιδίου. Η ένωση αυτή φέρει την ιδιότητα να δεσμεύεται μεταξύ δύο επάλληλων βάσεων του DNA και όταν ακτινοβοληθεί με υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 300nm να φθορίζει. Λόγω της εκλεκτικής συσσωρεύσής του στο DNA, η ένταση του φθορισμού είναι μεγαλύτερη στα σημεία που υπάρχει DNA, σε σύγκριση με το λοιπό υπόβαθρο του πηκτώματος.

Στα δείγματα DNA που προορίζονται για ηλεκτροφόρηση προστίθεται διάλυμα φόρτωσης GLB (gel loading buffer) σε αναλογία 5:1.

Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v και ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE, μέσω του οποίου διαχέεται ομοιόμορφα το ηλεκτρικό ρεύμα.

Καταρχήν, ζυγίζεται η αγαρόζη και τοποθετείται σε κωνική φιάλη με την κατάλληλη ποσότητα 1xTAE. Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού, έως ότου γίνει διαυγές, και αφήνεται να κρυώσει μέχρι τους 50-60 °C. Ακολούθως, προστίθεται η απαιτούμενη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (τελική συγκέντρωση 5 µg/ml). Το μίγμα αποχύνεται στην ειδικά συναρμολογημένη φόρμα υποδοχής της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφήνεται μέχρι να στερεοποιηθεί πλήρως. Στην συνέχεια, προστίθεται 1xTAE, μέχρι να καλυφθεί η επιφάνεια του πηκτώματος, και αφαιρούνται τα χτενάκια, μέσω των οποίων δημιουργούνται τα πηγαδάκια ή φρεάτια.

Σε κάθε ένα πηγαδάκι προστίθεται και ένα δείγμα DNA. Αφού ολοκληρωθεί η φόρτωση των δειγμάτων, η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με την μονάδα τάσης, όπου εφαρμόζονται 5V/cm. Όταν τα δείγματα διανύσουν μια συγκεκριμένη

απόσταση η οποία εξαρτάται από τον επιθυμητό βαθμό διαχωρισμού τους (συνήθως τα 2/3 του μήκους του ηλεκτρόφωρου) η παροχή ρεύματος διακόπτεται και το πήγμα αφαιρείται για να φωτογραφηθεί πάνω σε πλάκα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Στην ηλεκτροφόρηση δειγμάτων ολικού ευκαρυωτικού RNA, όπως αυτό του ζυμομύκητα, το ακέραιο (μη εκφυλισμένο) ολικό RNA θα παρουσιάζει ευκρινώς τις ζωνώσεις των 28S και 18S rRNA. Η ζώνη του 28S rRNA θα πρέπει να παρουσιάζει περίπου διπλάσια ένταση από εκείνη του 18S rRNA. Αυτή η αναλογία 2/1 αποτελεί μία καλή ένδειξη ότι το δείγμα RNA δεν έχει εκφυλιστεί. Τα μερικώς εκφυλισμένα δείγματα RNA έχουν εμφάνιση κατακερματισμένου νουκλεϊκού οξέος, ενώ απουσιάζουν οι ευκρινείς ζωνώσεις που αντιστοιχούν στις δύο μεγάλες ριβοσωμικές υπομονάδες και η αναλογία 2/1 παύει να ισχύει. Το εντελώς εκφυλισμένο RNA θα φέρει την εικόνα ενός πολύ χαμηλού μοριακού βάρους κατακερματισμένου δείγματος. Γενικά κατά την ηλεκτροφόρηση RNA φορτώνονται 200 ng δείγματος σε πήκτωμα αгарόζης 1,8% με τελική συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου 10 µg/ml. Η αύξηση αυτή της συγκέντρωσης αгарόζης εξυπηρετεί την μετακίνηση των μονόκλωνων μορίων του RNA σε ένα περιβάλλον με αυξημένη διάμετρο πόρων της αгарόζης, οπότε καθίσταται δυνατός τόσο ο έλεγχος του βαθμού διαχωρισμού των ζωνώσεων όσο και δυνατή η ακεραιότητα των μονόκλωνων (και ευάλωτων σε υψηλές θερμοκρασίες) μορίων. Ταυτόχρονα με την διπλάσια συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου σε σχέση με την ηλεκτροφόρηση DNA καθίσταται δυνατή η παρατήρηση της αναλογίας έντασης των ζωνώσεων των 28S και 18S rRNA, για την μελέτη της ακεραιότητας του δείγματος.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στην διαδικασία της ηλεκτροφόρησης είναι η ακόλουθη:

TAE (Tris-acetate) : 0.04M Tris, 0.001M EDTA, pH 8.0 με οξικό οξύ. (Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου)

Συνήθως παρασκευάζεται διάλυμα stock TAE 50x

Βρωμιούχο αιθίδιο: 3mg/ml, pH 8.0 (Αποθήκευση στους 4°C)

Διάλυμα φόρτωσης (GLB): 0.25% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης,

0.25% w/v κυανολικό ξυλένιο, 30% w/v γλυκερόλη (Αποθήκευση στους 4°C)

λ / HindIII : 100 µl λ / HindIII και 400 µl H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί επώαση για 3 min στους 60°C, προστίθενται 100 µl gel loading buffer (GLB), ακολουθεί ανάδευση (vortex) και αποθήκευση στους 4°C.

### **3.3.12 Απομόνωση ζωνών DNA από πήγμα αгарόζης και καθαρισμός τους (με χρήση σκεύασματος kit NucleoSpin Extract II cat. No. 740.609.250)**

Καταρχήν, αποκόπτεται η ζώνη ενδιαφέροντος από το πήγμα αгарόζης, αφού εντοπιστεί μέσω της ακτινοβολίας UV. Στην συνέχεια, υπολογίζεται το βάρος της και ακολουθούνται τα βήματα καθαρισμού σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου της κατασκευάστριας εταιρείας.

Η μέθοδος στηρίζεται στην ειδική δέσμευση του DNA σε στήλη με βάση το pH και στην συνέχεια την έκλουσή του από αυτή με ρυθμιστικό διάλυμα TE ή αποστειρωμένο απιονισμένο H<sub>2</sub>O.

### **3.3.13 Κλωνοποίηση αλληλουχιών DNA-Αντίδραση δεσμοποίησης περιοριστικών τμημάτων (ligation)**

Η κλωνοποίηση τμήματος DNA σε κατάλληλο φορέα προϋποθέτει την αντίδραση περιοριστικής πέψης της αλληλουχίας DNA με το κατάλληλο ένζυμο. Με το αντίστοιχο ένζυμο πρέπει να έχει υποστεί πέψη και ο φορέας, ώστε να δημιουργηθούν τα ίδια συμπληρωματικά άκρα, εάν πρόκειται για προεξέχοντα άκρα. Στην περίπτωση δημιουργίας αμβλείων άκρων από το περιοριστικό ένζυμο, θα πρέπει τόσο ο φορέας όσο και το τμήμα DNA-ένθεση να φέρουν αμβλεία άκρα για την επιτυχία της κλωνοποίησης.

Στην συνέχεια πραγματοποιείται η αντίδραση δεσμοποίησης του φορέα με το τμήμα DNA (ένθεση-ligation).

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης στον φορέα pCM190 σχεδιάστηκε η παρακάτω σύσταση με αναλογία συγκέντρωσης ένθεσης/φορέα ίση με 5/1 σε ολική συγκέντρωση μορίων της αντίδρασης 20 ng:

10μl pCM190

11.5μl DNA που περιέχει το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης A53T ή A30P

2.5μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος T4 DNA λιγάσης

1μl T4 DNA λιγάση

0.5μl H<sub>2</sub>O

25μl τελικός όγκος αντίδρασης

Επισημαίνεται πως το ένζυμο T4 DNA λιγάση, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την σύνδεση των περιοριστικών τμημάτων και στις δύο περιπτώσεις, σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ του 5'-φωσφορικού και του 3'-υδροξυλικού άκρου μορίων DNA.

Αντίστοιχα, οι αντιδράσεις δεσμοποίησης του γονιδίου *SNCA* αγρίου τύπου σε πρώτη φάση στον φορέα pBluescript II SK (+) και διαδοχικά στον pET29c(+) σχεδιάστηκαν με αναλογία μορίων φορέα/ένθεση ίση με 1/3 σε τελική συγκέντρωση DNA 20 ng.

Στην συνέχεια, κάθε μίγμα της αντίδρασης δεσμοποίησης χρησιμοποιείται, σε κάθε περίπτωση, για τον μετασχηματισμό κυττάρων *E.coli* DH5a.

### **3.3.14 Μετασχηματισμός *E. coli* DH5a (Kushner et al. 1978)**

- Κύτταρα *E.coli* DH5a εμβολιάζονται σε 5 ml LB και επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση από την προηγούμενη (περίπου 16 h). (προκαλλιέργεια)
- Η προκαλλιέργεια αραιώνεται 1:20 (v/v) και επωάζεται στους 37 °C υπό ανάδευση για περίπου 2 h.(OD<sub>600</sub>=0.45)

- Από την προκαλλιέργεια αυτή λαμβάνονται δείγματα του 1 ml, για κάθε δείγμα που θα υποστεί μετασχηματισμό (δείγμα δεσμοποίησης), ενώ συμπεριλαμβάνονται επιπλέον δύο δείγματα, ένα για τον θετικό μάρτυρα και ένα για τον αρνητικό μάρτυρα.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 8000 rpm για 5 min.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα εκπλένονται με 1 ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 8000 rpm για 5 min.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 1 ml κρύου διαλύματος πλύσης I (ήπια επαναιώρηση των κυττάρων).
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 8000 rpm για 5 min.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 1 ml κρύου διαλύματος πλύσης II (κατασκευής επιλεκτικών κυττάρων) και στη συνέχεια επωάζεται στον πάγο για 30 min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 8000 rpm για 10 min.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 0.1 ml διαλύματος πλύσης II (1:10 του αρχικού όγκου της καλλιέργειας) με προσοχή.
- Αφού έχουν τοποθετηθεί στον πάγο, προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες DNA:
  - a) Στο δείγμα που αποτελεί τον θετικό μάρτυρα προστίθενται 50 ng γνωστού πλασμιδίου.
  - b) Στο δείγμα προς μετασχηματισμό προστίθενται 10 μl του μίγματος της αντίδρασης δεσμοποίησης.
  - c) Στο δείγμα που αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα δεν προστίθεται DNA.
- Τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 30 min.
- Πραγματοποιείται θερμικό σοκ με την προσθήκη των δειγμάτων στους 43.5 °C για 45 sec και αμέσως μετά στον πάγο για 2 min.
- Κάθε δείγμα εμβολιάζεται σε 0.9 ml LB και αφήνεται για ανάρρωση στους 37 °C για 1 h υπό ήπια ανάδευση.
- Τα δείγματα επιστρώνονται σε θρεπτικό μέσο LA, το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Γίνεται επίστρωση 200 μl θετικού μάρτυρα σε ένα τρυβλίο, 200 μl αρνητικού μάρτυρα σε ένα άλλο, ενώ το δείγμα από το προϊόν της δεσμοποίησης διαμοιράζεται σε πέντε τρυβλία από 200 μl σε καθένα.
- Τα τρυβλία παραμένουν στον θάλαμο νηματικής ροής μέχρι να στεγνώσουν και κατόπιν επωάζονται στους 37°C για τουλάχιστον 18 h.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται φαίνεται ακολούθως:

Διάλυμα I: 10 mM RbCl, 10 mM MOPS pH 7.0

Διάλυμα II: 10 mM RbCl, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM MOPS pH 6.5

### **3.3.15 Μετασχηματισμός *E. coli* DH5a (Chung et al. 1988)**

Πρόκειται για μία γρήγορη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα *E. coli*.

- Κύτταρα *E.coli* DH5a εμβολιάζονται σε 5 ml LB και επωάζονται στους 37 °C υπό ανάδευση από την προηγούμενη (περίπου 16 h). (προκαλλιέργεια)
- Η προκαλλιέργεια αραιώνεται 1:20 (v/v) και επωάζεται στους 37 °C υπό ανάδευση για περίπου 2 h.(OD<sub>600</sub>=0.45)
- Από την προκαλλιέργεια αυτή λαμβάνονται δείγματα του 1 ml, για κάθε δείγμα που θα υποστεί μετασχηματισμό, ενώ συμπεριλαμβάνονται επιπλέον δύο δείγματα, ένα για τον θετικό μάρτυρα και ένα για τον αρνητικό μάρτυρα.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 8.000rpm για 5 min στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα εκπλένονται με 1 ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 8000 rpm για 5 min στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε όγκο 1/10 διαλύματος TSB (Transformation and Storage Buffer) στους 4 °C.
- Το εναιώρημα επωάζεται στον πάγο για περίπου 10 min.
- Ακολούθως, γίνεται προσθήκη 50 ng DNA γνωστού δείγματος πλασμιδίου στον θετικό μάρτυρα και ορισμένης ποσότητας DNA του δείγματος πλασμιδίου προς μετασχηματισμό. Στο δείγμα του αρνητικού μάρτυρα δεν προστίθεται ποσότητα DNA.
- Τα δείγματα επιστρέφονται στον πάγο για 5-30 min. (Δεν απαιτείται θερμικό σοκ)
- Στην συνέχεια, προστίθενται σε κάθε δείγμα 0.9 ml TSB που περιέχει 20 mM γλυκόζης και τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C υπό ανάδευση για 60 min.
- Πραγματοποιείται επίστρωση σε θρεπτικό μέσο LA, το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Γίνεται επίστρωση 200 μl θετικού μάρτυρα σε ένα τρυβλίο, 200 μl αρνητικού μάρτυρα σε ένα άλλο και 200 μl του δείγματος ενδιαφέροντος σε ένα τρυβλίο.
- Τα τρυβλία παραμένουν στον θάλαμο νηματικής ροής (hood) μέχρι να στεγνώσουν και κατόπιν επωάζονται στους 37°C overnight (τουλάχιστον 18 h).

Η σύσταση του διαλύματος TSB είναι η ακόλουθη:

LB pH 6.1, 10% PEG 3.35, 5% DMSO, 10 mM MgCl<sub>2</sub> και 10 mM MgSO<sub>4</sub>

### **3.3.16 Μετασχηματισμός *E. coli* DH5a (Green et al. 2013)**

Πρόκειται για μία γρήγορη μέθοδο παρασκευής επιδεκτικών κυττάρων με υψηλή αποδοτικότητα που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή είτε πλασμιδιακού DNA είτε προϊόντος δεσμοποίησης σε κύτταρα *E. coli*.

#### **Παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων**

- Από μια προκαλλιέργεια *E. coli* DH5a ενοφθαλμίζεται σε 100 ml υγρό μέσο LB κατάλληλος όγκος σε αραιώση 1/20 της αρχικής και η συγκεκριμένη καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C υπό ανάδευση έως ότου η οπτική πυκνότητα OD<sub>600</sub> να αντιστοιχεί στο εύρος τιμών 0,4-0,5.
- Η καλλιέργεια τοποθετείται στον πάγο για 10 min.
- Στη συνέχεια η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 5 min στους 4°C στις 8000rpm.

- Γίνεται μια πλύση με 5 ml με κρύο αποστειρωμένο απιονισμένο νερό, ενώ οι καλλιέργειες βρίσκονται μονίμως στο πάγο.
- Αφού απορριφθεί το υπερκείμενο το ίζημα επαναιωρείται σε 20ml παγωμένου διαλύματος TfbI.
- Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 15 min στον πάγο.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στους 4 °C στις 8000rpm.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεχτικά και το ίζημα σε κάθε σωληνάκι επαναιωρείται σε 1 ml TfbII στον πάγο.
- Το εναιώρημα κατανέμεται σε σωληνάκια erpendorf με 50 μl στο καθένα, τα οποία διατηρούνται στους -80°C.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο είναι η εξής:

TfbI : RbCl 100 mM, CH<sub>3</sub>COOK 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, MnCl<sub>3</sub> 50 mM, 15% v/v γλυκερόλη, pH 5,8 με αραιωμένο οξικό οξύ 2N και αποστείρωση με φιλτράρισμα.

TfbII: MOPS 10mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, RbCl 10 mM, 15% v/v γλυκερόλη, pH 6,5 με αραιωμένο NaOH 10N και αποστείρωση με φιλτράρισμα

#### **Μετασχηματισμός επιδεικτικών κυττάρων *E.coli***

- Τα επιδεικτικά κύτταρα μεταφέρονται από τους -80 °C στον πάγο.
- Ακολούθως προστίθεται 10pg-100ng DNA σε κάθε erpendorf από τα παραπάνω κύτταρα.
- Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30 min.
- Ακολουθεί θερμικό σοκ στα κύτταρα για 30 sec στους 42°C.
- Επανατοποθετούνται στον πάγο για 2 min.
- Προστίθεται 1 ml διαλύματος SOC στο κάθε erpendorf.
- Στη συνέχεια αυτά τοποθετούνται στους 37 °C υπό ανάδευση για 1 ώρα.
- Τέλος, ακολουθεί επίστρωση των δειγμάτων σε στερεό θρεπτικό μέσο με το εκάστοτε μέσο επιλογής. Επιστρώνονται 200 μl κυττάρων στα οποία δεν προστέθηκε DNA και αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα σε ένα τρυβλίο και 200 μl μετασχηματισμένων κυττάρων και επωάζονται στους 37°C για τουλάχιστον 18 ώρες.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο είναι η εξής:

**SOB:** 2 % w/v Tryptone peptone, 0.5 % w/v Yeast extract, 5M NaCl, 1M KCl. Γίνεται ρύθμιση του pH στο 7.0. Προστίθεται αποστειρωμένο 1M MgCl<sub>2</sub> και αποστειρωμένο 1M MgSO<sub>4</sub>.

**SOC:** Σε διάλυμα SOB, προστίθενται 2 % v/v αποστειρωμένης (με φίλτρο) 1M γλυκόζης.



### **3.3.17 Κατασκευή επιδεκτικών κυττάρων του *Saccharomyces cerevisiae***

- Κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* εμβολιάζονται σε υγρή καλλιέργεια 5 ml YPD και επωάζονται για 16 ώρες στους 30 °C υπό ανάδευση. (προκαλλιέργεια)
- Σε κωνική φιάλη προστίθενται 100 ml YPD και εμβολιάζονται με 20 μl κυττάρων του *Saccharomyces cerevisiae* από την προκαλλιέργεια. Η φιάλη επωάζεται στους 30 °C υπό ανάδευση για 20 ώρες. Ο χρόνος διπλασιασμού του *Saccharomyces cerevisiae* στους 30 °C υπό ανάδευση είναι περίπου 2 h.
- Την επόμενη ημέρα, γίνεται έλεγχος της οπτικής απορρόφησης (OD) της ανακαλλιέργειας στα 600 nm, με την επιθυμητή τιμή να είναι η 1-1,2.
- Η καλλιέργεια μοιράζεται ισόποσα σε δυο σωληνάρια των 50 ml. Η διαδικασία συνεχίζεται με τα σωληνάκια να βρίσκονται μονίμως μέσα σε πάγο.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 8000 rpm για 5 min στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά και τα σωληνάρια τοποθετούνται στον πάγο φέροντας το ίζημα.
- Ακολουθεί μια πλύση με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό.
- Στη συνέχεια προστίθενται σε κάθε σωληνάριο 12,5 ml διαλύματος LiAc 100mM/DTT 10 mM/Tris 10 mM pH 7.5/EDTA 1 mM.
- Γίνεται επώαση στο διάλυμα LiAc/DTT/TE για 1 ώρα στον πάγο με σκοπό οι μεμβράνες των κυττάρων να γίνουν ευάλωτες.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 8000 rpm για 5 min στους 4 °C και στη συνέχεια 2 ακόμα πλύσεις με 25 ml αποστειρωμένο νερό.
- Στην συνέχεια, προστίθενται 5 ml από διάλυμα αποστειρωμένης κρύας σορβιτόλης 1M σε κάθε σωληνάκι.
- Κατόπιν, το ίζημα σε κάθε σωληνάριο επαναιωρείται σε 200 μl διαλύματος αποστειρωμένης κρύας σορβιτόλης 1M και πραγματοποιείται επανένωση του περιεχομένου των 2 σωληναρίων.
- Το εναιώρημα κατανέμεται σε σωληνάκια erpendorf με 50 μl στο καθένα, τα οποία διατηρούνται στους -80 °C.

### **3.3.18 Μετασχηματισμός του *Saccharomyces cerevisiae* με το πλασμίδιο pCM190 ή ανασυνδυασμένων κλώνων του με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)**

- Για την διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης χρησιμοποιούνται 50 μl επιδεκτικών κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* (διατηρούνται στους -80 °C), τα οποία αφήνονται να ξεπαγώσουν ομαλά στον πάγο. Επιπλέον, στον πάγο τοποθετούνται μία κυψελίδα 0.2 cm καθώς και 200ng DNA προς μετασχηματισμό.
- Στο σωληνάτιο erpendorf με τα επιδεκτικά κύτταρα προστίθεται το διάλυμα DNA, ακολουθεί ήπια ανάδευση και επιστροφή στον πάγο για 1 min.
- Το μίγμα του erpendorf μεταφέρεται στην κυψελίδα, η οποία τοποθετείται στην συσκευή και εφαρμόζεται το ηλεκτρικό πεδίο με συνθήκες C=15 μF, PC=200 Ohm, V=1.5 kV.

- Αμέσως μετά, προστίθεται στην κυβελίδα 1 ml διαλύματος κρύας σορβιτόλης 1 M και ακολουθεί ανάδευση. Στην συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρονται σε erpendorf.
- Ακολουθεί επίστρωση των δειγμάτων σε στερεό θρεπτικό μέσο Yeast synthetic drop-out media supplement without uracil με την παρουσία των κατάλληλων, για το κάθε στέλεχος του ζυμομύκητα, αμινοξέων και την απαραίτητη συγκέντρωση τετρακυκλίνης σε περίπτωση που το πλασμίδιο προς μετασχηματισμό είναι ανασυνδυασμένο. Επιστρώνονται 200 μl σορβιτόλης 1 M που αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα σε ένα τρυβλίο και 200 μl μετασχηματισμένων κυττάρων από το δείγμα του μετασχηματισμού καθώς και από δύο διαδοχικές αραιώσεις του με διάλυμα σορβιτόλης 1 M.
- Τα τρυβλία αφήνονται στον θάλαμο νηματικής ροής μέχρι να στεγνώσουν και κατόπιν τοποθετούνται για επώαση στους 30°C για 3-5 ημέρες.

Η σύσταση του διαλύματος σορβιτόλης είναι 1 M και η αποστείρωση πραγματοποιείται στο αυτόκαυστο.

### **3.3.19 Στύπωμα κατά Southern**

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται υβριδισμός DNA, το οποίο έχει ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα αγαρόζης. Το DNA του πηκτώματος μεταφέρεται αντιγραφικά σε ειδικό φίλτρο, με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρήσει τις ίδιες ακριβώς θέσεις με εκείνες που κατείχε στο πήκτωμα, και υφίσταται υβριδισμό με κατάλληλα ιχνηθετημένο DNA. Οι περιοχές του υβριδισμού ανιχνεύονται μέσω χρωμογόνου αντίδρασης που βασίζεται στο μέσο ιχνηθέτησης του DNA.

#### **Μεταφορά του DNA σε φίλτρο**

- Από το πήκτωμα απομακρύνονται με νυστέρι οι περιοχές που δεν θα μεταφερθούν και λαμβάνονται οι τελικές διαστάσεις του.
- Το πήκτωμα μεταφέρεται σε δοχείο που περιέχει 300 ml διαλύματος μετουσίωσης και εμβαπτίζεται σε αυτό για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανακίνηση.
- Ακολούθως, το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε 300 ml εξουδετέρωσης, όπως προηγουμένως.
- Σε ρηχό και πλατύ δοχείο, το οποίο περιέχει διάλυμα 10xSSC σχεδόν μέχρι το χείλος του, στηρίζεται γυάλινη πλάκα. Στην επιφάνεια της τοποθετείται ένα φύλλο διηθητικού χαρτιού Whatmann 3MM σε σχήμα γέφυρας, σύμφωνα με τις διαστάσεις του πηκτώματος, έτσι ώστε οι δύο άκρες του να βυθίζονται στο διάλυμα μέχρι τον πυθμένα του δοχείου. Αφού το φύλλο διαποτιστεί μέχρι πάνω από το διάλυμα 10xSSC, απομακρύνονται οι φυσαλίδες με τη βοήθεια ράβδου υάλου.
- Πάνω στο φύλλο Whatmann 3MM τοποθετείται το πήκτωμα αγαρόζης ανεστραμμένο. Οι φυσαλίδες αέρος απομακρύνονται όπως προηγουμένως. Τα τμήματα του στρώματος Whatmann που έμειναν ακάλυπτα από το πήκτωμα καλύπτονται με αλουμινόχαρτο.
- Στην επιφάνεια του πηκτώματος τοποθετείται φίλτρο νάυλον, διαστάσεων ίδιων με αυτών του πηκτώματος, αφού προηγουμένως έχει διαβραχεί σε διάλυμα 2xSSC. Οι φυσαλίδες απομακρύνονται όπως προηγουμένως.

- Το φίλτρο καλύπτεται από δύο φύλλα Whatmann 3MM ίδιων διαστάσεων με του πηκτώματος, τα οποία έχουν επίσης διαβραχεί σε διάλυμα 2x SSC. Οι φυσαλίδες απομακρύνονται κατά τον ίδιο τρόπο.
- Στην επιφάνεια των φύλλων Whatmann 3MM τοποθετείται παχύ στρώμα απορροφητικού χαρτιού, το οποίο συμπιέζεται ελαφρά με αντικείμενο βάρους 500 g περίπου.
- Το DNA συμπαρασύρεται από το διάλυμα 10x SSC, το οποίο κινείται ανοδικά από τα φύλλα Whatmann 3MM, που βρίσκονται βυθισμένα στο δοχείο προς το στρώμα του απορροφητικού χαρτιού, και με τον τρόπο αυτό μεταφέρεται από το πήκτωμα στο φίλτρο πάνω στο οποίο έχει την τάση να προσδένεται με ασθενείς δεσμούς. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς του DNA πρέπει να υπάρχει συνεχές απόθεμα διαλύματος 10xSSC στο δοχείο. Επίσης, τα στρώματα απορροφητικού χαρτιού που υγραίνονται πρέπει να αντικαθίστανται από στεγνά.
- Η μεταφορά στο φίλτρο, υπό αυτές τις συνθήκες, διαρκεί 18-20 h.
- Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία μεταφοράς, αφαιρούνται το βάρος, το απορροφητικό χαρτί και τα δύο φύλλα Whatmann 3MM. Το πήκτωμα μαζί με το φίλτρο αναστρέφονται και τοποθετούνται σε στεγνή επιφάνεια. Στην συνέχεια σημειώνονται οι θέσεις των φρεατίων του πηκτώματος πάνω στο φίλτρο με μολύβι, ώστε να διακρίνεται η μία άκρη που αντιστοιχεί στο πήκτωμα.
- Το πήκτωμα απορρίπτεται. Το φίλτρο εμβαπτίζεται σε διάλυμα 6x SSC και εκπλένεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου με πολύ ήπια ανακίνηση.
- Κατόπιν, το φίλτρο τοποθετείται στην επιφάνεια διηθητικού χαρτιού και αφού στεγνώσει τελείως εκτίθεται σε UV για 2-5 min

Με τον τρόπο αυτό, το DNA που έχει μεταφερθεί στο φίλτρο στερεώνεται πάνω σε αυτό με ισχυρούς δεσμούς.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στη παρούσα μέθοδο είναι η εξής:

Διάλυμα Μετουσίωσης: 0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl

Διάλυμα Εξουδετέρωσης: 1 M Tris-HCl pH=8.0, 1.5 M NaCl

Διάλυμα 20xSSC: 3 M NaCl, 0.3 M κιτρικό νάτριο

### **3.3.20 Μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA-DNA**

#### **Μη ραδιενεργός υβριδισμός DNA – DNA με χρήση τροποποιημένου συστήματος ιχνηθέτησης και ανίχνευσης DNA, DIG DNA Labeling and Detection kit (Boehringer Mannheim, cat. No. 11 093 657 910).**

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα των μονόκλωνων αλυσίδων μορίων DNA να υβριδοποιούνται σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με άλλα μονόκλιωνα μόρια DNA. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να ελεγχθούν δύο διαφορετικά μόρια DNA για το αν έχουν ομόλογες περιοχές. Με το συγκεκριμένο σύστημα χρησιμοποιείται η διγοξυγενίνη (ένα στεροειδές απτένιο) για ιχνηθέτηση DNA και RNA. Η μέθοδος περιλαμβάνει 3 στάδια: σήμανση του DNA με Dig-11 -dUTP,

υβριδοποίηση του ιχνηθετημένου DNA με το DNA στόχο και ανοσολογικό εντοπισμό με χρωμογόνο αντίδραση

### **Σήμανση του DNA**

- Σε ένα eppendorf προστίθενται έως 10 mg γραμμικού απομονωμένου DNA προς σήμανση σε τελικό όγκο 15  $\mu$ l.
- Το DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95 – 100  $^{\circ}$ C για 10 min και στη συνέχεια τοποθετείται κατευθείαν σε πάγο.
- Προστίθενται 2  $\mu$ l μίγματος εξανουκλεοτιδίων.
- Προστίθενται 2  $\mu$ l μίγμα dNTP, τα οποία περιέχουν το ιχνηθετημένο νουκλεοτίδιο
- Προστίθεται 1  $\mu$ l ενζύμου Klenow.
- Το διάλυμα αναδεύεται και επωάζεται στους 37 $^{\circ}$ C για 20 h.
- Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 2  $\mu$ l EDTA 0.2 M ή/και με θέρμανση του δείγματος στους 65  $^{\circ}$ C.

### **Υβριδισμός σημασμένου DNA με ιχνηθετημένο DNA**

- Το φίλτρο με το DNA τοποθετείται σε ειδική φιάλη μαζί με τουλάχιστον 20 ml διαλύματος προϋβριδισμού ανά 100  $\text{cm}^2$  φίλτρου, για τον προϋβριδισμό. Κατόπιν, η φιάλη μεταφέρεται σε φούρνο υβριδισμού στους 68  $^{\circ}$ C για τουλάχιστον 1 h ανακινούμενη.
- Το σημασμένο DNA θερμαίνεται στους 100  $^{\circ}$ C για 5 min και αμέσως μετά τοποθετείται στον πάγο, λίγο πριν αφαιρεθεί το διάλυμα προϋβριδισμού.
- Η φιάλη με το φίλτρο αφαιρείται από το φούρνο υβριδισμού και αποχύνεται το διάλυμα προϋβριδισμού.
- Το διάλυμα με το σημασμένο DNA προστίθεται σε 3.5 ml διαλύματος υβριδισμού (το οποίο είναι ήδη σε θερμοκρασία 68  $^{\circ}$ C).
- Το διάλυμα με το σημασμένο DNA προστίθεται στη φιάλη με το φίλτρο.
- Η φιάλη επωάζεται στους 68  $^{\circ}$ C ανακινούμενη μέχρι την επομένη.
- Όταν ολοκληρωθεί ο υβριδισμός ακολουθούν δύο πλύσεις για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου με 50 ml διαλύματος πλύσης I ανά 100  $\text{cm}^2$  φίλτρου.
- Έπονται 2 πλύσεις για 15 min στους 68  $^{\circ}$ C με 50 ml διαλύματος πλύσης II ανά 100  $\text{cm}^2$  φίλτρου.

Η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στην μέθοδο για πήκτωμα 100  $\text{cm}^2$  είναι η ακόλουθη:

Διάλυμα προϋβριδισμού-υβριδισμού:

5xSSC, 0.1% w/v N-λαυροϋλοσαρκοσινικό νάτριο, 0.02% w/v SDS, 1% w/v αντιδραστήριο αποκλεισμού. Η διατήρηση του διαλύματος γίνεται στους -20 $^{\circ}$ C.

Διάλυμα πλύσης I: 2xSSC, 0.1% w/v SDS

Διάλυμα πλύσης II: 0.5xSSC, 0.1% w/v SDS

### **Εμφάνιση του υβριδισμού**

- Πλύση του φίλτρου με 50 ml Washing buffer για 1-5 min υπό ανάδευση.
- Επώαση για 30 min σε 100 ml Blocking solution.
- Επώαση για 30 min σε 20 ml Antibody solution.
- Πλύση του φίλτρου δύο φορές για 15 min σε 100 ml Washing buffer.

- Επώαση σε 20 ml Detection buffer για 2-5 min.
- Επώαση σε 10 ml φρέσκου Colorsubstrate solution σε σκοτάδι μέχρι την επομένη χωρίς ανακίνηση.
- Μετά την ολοκλήρωση της εμφάνισης, η αντίδραση σταματά με πλύση του φίλτρου για 5 min σε 50 ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού. Οι όγκοι των παραπάνω διαλυμάτων ισχύουν για φίλτρο 100 cm<sup>2</sup>.

Η σύσταση των διαλυμάτων της μεθόδου είναι η εξής:

Washing buffer: 0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, 0.3% v/v Tween 20 [pH=7.5]

Detection buffer: 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl [pH=9.5]

Maleic Acid buffer: 0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl [pH=7.5]

Blocking solution 1x: 1% Blocking reagent (bottle 10) διαλύεται σε Maleic Acid buffer με ανάδευση και θέρμανση στους 65 °C.

Antibody solution (20 ml): Φυγοκέντρηση του Anti-Digoxigenin-AP (vial 8) στα 10000 rpm για 5 min. 1:5000 (150 mV/ml) vial 8, 20 ml Blocking solution. Η φύλαξη του παραγματοποιείται στους 2-8°C για 12 h.

Colorsubstrate solution (10 ml): Διάλυση 200 μl NBT/BCIP (vial 9) σε 10 ml Detection buffer. Το συγκεκριμένο διάλυμα είναι ευαίσθητο στο φως.

### **3.3.21 Απομόνωση RNA (με χρήση σκευάσματος kit NucleoSpin RNA)**

Η μέθοδος απομόνωσης βασίζεται στην πρόσδεση του RNA σε ειδική στήλη πυριτίου και στην απομάκρυνση όλων των υπολοίπων συστατικών του κυττάρου. Ταυτόχρονα στηρίζεται και στη χρήση DNAσών που βοηθούν στην απομάκρυνση του DNA το οποίο παρουσιάζει τάση πρόσδεσης στη μεμβράνη φέροντας έτσι κινδύνους εμφάνισης επιμολύνσεων στο τελικό μείγμα.

Για την απομόνωση του RNA και όλους τους χειρισμούς στους οποίους αυτό εμπλέκεται πρέπει να λάβει χώρα ο καθαρισμός των δοχείων και των αναλωσίμων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν με DMPC (Dimethyl Monocarbonate), το οποίο βοηθά στην απομάκρυνση των RNAσών που θα διασπάσουν το RNA και θα αλλοιώσουν την ποιότητα του δείγματος που θα απομονωθεί.

1) Σε δοχείο που θα χρησιμοποιηθεί για erpendorfs προστίθενται 100 ml dH<sub>2</sub>O και 0,1 ml (δηλαδή 0,1 %) DMPC. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 30-45 min. Ύστερα με το υγρό μίγμα πλένονται τα κουτιά για τα ρύγχη

2) Ακολουθεί αποστείρωση στους 121 °C, για 30 min ούτως ώστε το DMPC να απενεργοποιηθεί.

3) Το δοχείο και τα κουτιά αφήνονται να στεγνώσουν σε θάλαμο ξήρανσης των 60 °C και ύστερα πληρούνται με τα αναλώσιμα για να αποστειρωθούν εκ νέου.

Ο χειρισμός του DMPC λαμβάνει χώρα σε απαγωγό και η επαφή με τα αναλώσιμα πρέπει να γίνεται με γάντια.

### **3.3.22 Κατεργασία του δείγματος RNA με DNase (TaKaRa-Recombinant DNase I)**

- Πραγματοποιείται η κατεργασία με DNase I ως εξής:

Απομονωμένο RNA	Ολική ποσότητα
10 x DNase I Buffer	6,5 μl
Recombinant DNase I	1 μl (5 Units)
Αναστολέας RNάσης	0,5 μl (20 Units)
DEPC Water	Μέχρι τελικό όγκο ίσο με 65 μl

Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 37 °C για 30 min

- Ακολουθεί θερμική κατεργασία του δείγματος για την καταστροφή του ενζύμου και τον τερματισμό της αντίδρασης. Προστίθενται σε αυτό 2,5 μl EDTA 0,5 M και επωάζεται στους 80 °C για 2 min. Ύστερα ο όγκος του δείγματος αυξάνεται μέχρι τα 100 μl με προσθήκη DMPC νερού.
- Στην συνέχεια το RNA καταβυθίζεται με προσθήκη 10 μl οξικού νατρίου συγκέντρωσης 3 M και 250 μl παγωμένης απόλυτης αιθανόλης και στην συνέχεια ανάδευση και παραμονή στους -80 °C για 2 min.
- Ακολουθεί γυροκέντρωση στα 12.000 rpm, για 10 min, στους 4 °C και απόρριψη του υπερκειμένου.
- Το ίζημα εκπλένεται με 150 μl παγωμένης 70% αιθανόλης και φυγοκεντρείτε στα 12.000 rpm για 5 min στους 4 °C. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκειμένου.
- Το ίζημα ξηραίνεται και διαλύεται σε 50 μl DEPC νερό.
- Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα 1,8 % w/v αγαρόζης και 0,1 % w/v βρωμιούχου αιθιδίου.

### **3.3.23 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)**

Η μέθοδος βασίζεται στην δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης που μετατρέπει το RNA σε cDNA και ύστερα στη χρήση αυτού για διαδικασίες όπως η PCR, ή η κλωνοποίηση σε φορέα για δημιουργία βιβλιοθηκών. Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μία RNA-κατευθυνόμενη DNA πολυμέραση. Σε αυτή την περίπτωση οι γενετικές πληροφορίες μεταβιβάζονται από το RNA στο DNA. Η αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει μία αλυσίδα συμπληρωματική στο εκμαγείο RNA, κατευθυνόμενη από έναν εκκινητή με συμπληρωματικές βάσεις με το RNA, ο οποίος διαθέτει ένα ελεύθερο 3'-OH άκρο. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιείται για την σύνθεση cDNA από mRNA καθοδηγούμενο από έναν όλιγο-dT εκκινητή, λόγω του γεγονότος ότι ο εκκινητής αυτός φέρει συμπληρωματικότητα με την αλληλουχία πολύ-A στο 3' άκρο των ευκαρυωτικών μορίων mRNA. Η υπόλοιπη αλυσίδα cDNA συντίθεται παρουσία των τεσσάρων dNTPs. Το RNA αυτού του υβριδίου RNA-DNA υδρολύεται εν συνεχεία σε υψηλότερο pH. Το 3' άκρο του DNA που σχηματίστηκε δημιουργεί μία δομή φουρκέτας και εκκινεί την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA.

Το πρωτόκολλο πραγματοποιείται με το RT-PCR Kit της εταιρείας TaKaRa.

1) Πραγματοποίηση της αντίδρασης:

Μίγμα dNTP (10 mM το καθένα)	1 $\mu$ l
Εκκινητής ολιγο-dT (2.5 mM)	1 $\mu$ l
Υπόστρωμα RNA 100pg-1ng	8 $\mu$ l

2) Ακολουθεί επώαση για 5 min, στους 65  $^{\circ}$ C και ύστερα μεταφορά στους 4  $^{\circ}$ C.

3) Προετοιμασία του μίγματος της παρακάτω αντίδρασης:

Μίγμα της αντίδρασης από τα βήματα 1,2	10 $\mu$ l
5x Buffer Primescript	4 $\mu$ l
Αναστολέας RNase 40 U/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
PrimeScript RTase	0,5 $\mu$ l
RNase free dH <sub>2</sub> O	5 $\mu$ l

4) Επώαση στους 42  $^{\circ}$ C για 30 min, ύστερα στους 95  $^{\circ}$ C για 5 min και στην συνέχεια επιστροφή στους 4  $^{\circ}$ C.

### **3.3.24 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ενίσχυση cDNA (RT-PCR)**

Πραγματοποίηση PCR:

10x PCR Buffer II PCR	5 $\mu$ l
Μίγμα dNTP (10 mM το καθένα)	2 $\mu$ l
Ανοδικός εκκινητής 20 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l
Καθοδικός εκκινητής 20 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l
TaKaRa Ex Taq 5U/ $\mu$ L	0,5 $\mu$ l
Μίγμα Αντίστροφου μεταγράφου	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	Συμπλήρωση έως τα 50 $\mu$ l

Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι οι εξής:

1. 94  $^{\circ}$ C/3 min
2. 94  $^{\circ}$ C/30 sec

3. 55-60 °C/30 sec
4. 72 °C/1min
5. επανάληψη των βημάτων 2 έως 4 για 29 κύκλους
6. 72 °C/10min
7. 4 °C/24 h

Οι RT-PCR πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την ενίσχυση των mRNA των γονιδίων *SNCA*, *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *ATG8* και *TOR1*. Για όλα τα γονίδια οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν έχουν ήδη παρατεθεί στον πίνακα 3.7 στην ενότητα 3.3.10 της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμέρασης.

### **3.3.25 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμέρασης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)/Ποσοτική PCR (qPCR)**

#### **Αρχή της μεθόδου**

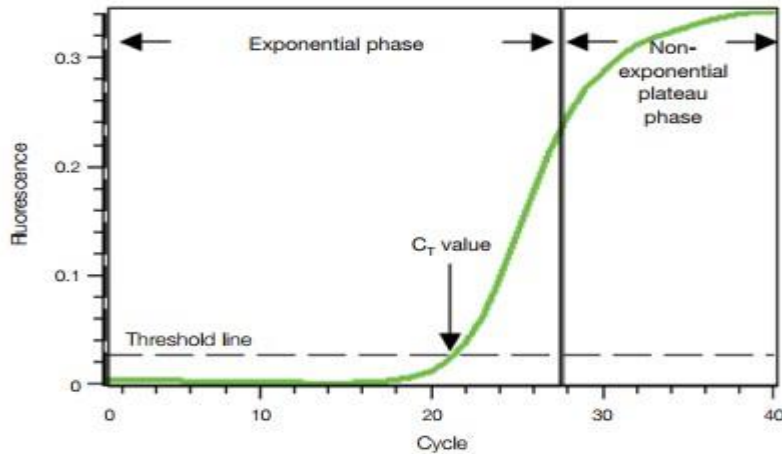
Στην συμβατική PCR, το ενισχυμένο προϊόν ανιχνεύεται μέσω αναλύσεων μετά το πέρας της αντίδρασης, όπως η ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης. Σε αντίθεση με την συμβατική PCR, η Real-Time PCR επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των συσσωρευόμενων προϊόντων καθώς η αντίδραση βρίσκεται σε εξέλιξη. Αυτός είναι και ο λόγος, για τον οποίο της δόθηκε η ονομασία PCR «πραγματικού χρόνου».

Στην Real-Time PCR η ανίχνευση των προϊόντων είναι εφικτή μέσω της χρήσης φθορίζοντων μορίων, τα οποία αντικατοπτρίζουν την αύξηση της ποσότητας του νεοσυντιθέμενου DNA μέσω της ανάλογης αύξησης του σήματος φθορισμού. Τα φθορίζοντα μόρια που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό φέρουν χρωστικές, οι οποίες προσδένονται στο DNA, αλλά και εκκινητές των αντιδράσεων σημασμένους με φθορίζουσες αλληλουχίες. Για την ανίχνευση του σήματος του φθορισμού χρησιμοποιούνται ειδικές συσκευές εξοπλισμένες με μονάδες ανίχνευσης σήματος φθορισμού με ικανότητα ανίχνευσης κατά την διάρκεια της ενίσχυσης του DNA. Ο μετρούμενος φθορισμός αντανακλά την ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος σε κάθε κύκλο της PCR.

Το κύριο πλεονέκτημα της Real-Time PCR έναντι της συμβατικής PCR είναι ότι η πρώτη επιτρέπει τον καθορισμό του αριθμού αντιγράφων του υποστρώματος στην έναρξη της αντίδρασης με αποτελεσματικότητα και υψηλή ευαισθησία. Τα αποτελέσματα της Real-Time PCR μπορούν να είναι είτε ποιοτικά (απουσία ή παρουσία μίας αλληλουχίας) είτε ποσοτικά (αριθμός αντιγράφων του DNA) εξαιτίας του οποίου λαμβάνει και την ονομασία ποσοτική PCR (qPCR). Επιπλέον, τα αποτελέσματα της Real-Time PCR μπορούν να αξιολογηθούν χωρίς διαγνωστική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα. Τέλος, επειδή οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται και αναλύονται σε ένα κλειστό σύστημα, οι πιθανότητες επιμόλυνσης είναι μειωμένες και η αναγκαιότητα για περαιτέρω επεξεργασία των δειγμάτων μετά την ενίσχυση ουσιαστικά απουσιάζει.

Για την κατανόηση της λειτουργίας της Real-Time PCR παρατίθεται ως παράδειγμα η εικόνα 3.3





**Εικόνα 3.3:** Γράφημα ενίσχυσης προϊόντος στην Real-Time PCR (Bio-Rad Bulletin 5279)

Στο παραπάνω γράφημα, ο κύκλος της PCR παρουσιάζεται στον άξονα των X και ο ανιχνεύσιμος φθορισμός από την αντίδραση ενίσχυσης, ο οποίος είναι ανάλογος με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος στο σωληνάκι της κάθε αντίδρασης, στον άξονα των Y.

Η καμπύλη της ενίσχυσης φέρει δύο φάσεις, μία εκθετική φάση και μία μη εκθετική φάση-πλατώ. Κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης, η ποσότητα του προϊόντος της PCR διπλασιάζεται περίπου σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Καθώς η αντίδραση εξελίσσεται, τα συστατικά της καταναλώνονται και τελικά ένα ή περισσότερα από αυτά εκμηδενίζονται. Στο σημείο αυτό, η αντίδραση επιβραδύνεται και εισέρχεται στην φάση πλατώ (28-40 κύκλους).

Αρχικά, ο φθορισμός παραμένει σε χαμηλά επίπεδα και οποιεσδήποτε αυξομειώσεις του δεν ανιχνεύονται (κύκλοι 1-18), παρά την εκθετική συσσώρευση προϊόντος. Σύντομα, έχει πλέον συσσωρευθεί αρκετό ενισχυμένο προϊόν για να αποδώσει ένα ανιχνεύσιμο σήμα φθορισμού. Ο αριθμός του κύκλου στον οποίο συμβαίνει αυτό καλείται κύκλος-ουδός (threshold cycle- $C_t$ ). Εφόσον η τιμή του  $C_t$  μετράται στην εκθετική φάση, όπου τα αντιδραστήρια δεν περιορίζονται, μέσω της qPCR μπορεί να υπολογιστεί αξιόπιστα και με ακρίβεια η αρχική ποσότητα του υποστρώματος, που είναι παρούσα στην αντίδραση.

Η τιμή  $C_t$  της αντίδρασης καθορίζεται κυρίως από την ποσότητα του υποστρώματος, που είναι παρούσα στην αρχή της αντίδρασης ενίσχυσης. Αν αυτή είναι μεγάλη τότε θα απαιτηθούν σχετικά λιγότεροι κύκλοι ενίσχυσης για να συσσωρευθεί αρκετό προϊόν, ώστε να αναπαραχθεί ένα σήμα φθορισμού ανώτερο του ουδού. Κατά συνέπεια, η αντίδραση θα έχει χαμηλό ή πρώιμο  $C_t$ . Αντίθετα, αν η ποσότητα του υποστρώματος είναι μικρή στην αρχή της αντίδρασης, περισσότεροι κύκλοι ενίσχυσης θα απαιτηθούν για την αναπαραγωγή σήματος φθορισμού ανώτερου του ουδού. Συνεπώς, η αντίδραση θα έχει ένα υψηλό ή αργότερο  $C_t$ . Η σχέση αυτή καθορίζει την βάση του ποσοτικού στοιχείου της Real-Time PCR.

Από την στιγμή που η ποσοτικοποίηση στηρίζεται στην παραπάνω σχέση, μία ιδανική μελέτη Real-Time PCR είναι απόλυτα ουσιώδης για την ακριβή και αναπαράξιμη ποσοτικοποίηση του δείγματος της αντίδρασης.

Τα θεμέλια μίας ιδανικής μελέτης Real-Time PCR είναι:

- Ευθύγραμμη καμπύλη αναφοράς ( $R_2 > 0.98$ )
- Υψηλή αποδοτικότητα της ενίσχυσης (90-110%)
- Συνέπεια μεταξύ ταυτόσημων αντιδράσεων

Μία ισχυρή μέθοδος ελέγχου της πιστότητας της αντίδρασης είναι η κατασκευή πρότυπης καμπύλης μέσω της ενίσχυσης διαδοχικών αραιώσεων ενός υποστρώματος με γνωστή συγκέντρωση. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με παραμέτρους τον λογάριθμο της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος (ή τον παράγοντα της αραιώσης του, σε άγνωστες ποσότητες) σε σχέση με την τιμή  $C_i$ , η οποία ανιχνεύθηκε κατά την ενίσχυση και αντιστοιχεί σε κάθε αραιώση του υποστρώματος. Από την καμπύλη αναφοράς εξάγεται η εξίσωση της βέλτιστης ευθείας και η τιμή του  $R_2$ , τα οποία χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της μελέτης.

Η τιμή του  $R_2$  της καμπύλης αναφοράς αναπαριστά το πόσο καλά τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόζονται στην βέλτιστη ευθεία. Η ευθυγράμμιση των δεδομένων παρουσιάζει ένα μέτρο της μεταβλητότητας ανάμεσα στα ταυτόσημα δείγματα της μελέτης και κατά πόσο η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης είναι η ίδια για διαφορετικούς αριθμούς αντιγράφων του αρχικού υποστρώματος. Μία σημαντική διαφορά στις παρατηρούμενες τιμές  $C_i$  μεταξύ των ταυτόσημων δειγμάτων θα μειώσει την τιμή του  $R_2$ .

Η αποδοτικότητα της αντίδρασης,  $E$ , υπολογίζεται από την κλίση της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$E = 10^{-1/\text{κλίση}}$$

Ιδανικά, η ποσότητα του προϊόντος της PCR θα διπλασιάζεται τέλεια κατά την διάρκεια κάθε κύκλου της εκθετικής ενίσχυσης. Αυτό μεταφράζεται σε μία αποδοτικότητα της ενίσχυσης ίση με 2, οπότε με χρήση της παραπάνω εξίσωσης και η ιδανική κλίση της καμπύλης θα είναι ίση με -3.32.

Η αποδοτικότητα της ενίσχυσης επίσης παρουσιάζεται ως ποσοστό %, δηλαδή το ποσοστό του υποστρώματος που ενισχύεται σε κάθε κύκλο. Για την μετατροπή της τιμής  $E$  σε ποσοστό ισχύει ο παρακάτω τύπος:

$$\% \text{ Αποδοτικότητα} = (E - 1) \times 100\%$$

Μία αποδοτικότητα κοντά στο 100% είναι η καλύτερη ένδειξη μίας αξιόπιστης και αναπαραγωγίσιμης μελέτης. Χαμηλές αποδοτικότητες (<90%) πιθανόν να οφείλονται σε κακό σχεδιασμό των εκκινητών ή μη βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης. Μεγάλες αποδοτικότητες (>110%) πιθανόν οφείλονται σε σφάλμα πιπεταρίσματος στις διαδοχικές αραιώσεις, συν-ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων, όπως τα διμερή των εκκινητών, ή παρουσία αναστολέων των αντιδράσεων.

### **Χρωστικές προσδεδεμένες στο DNA**

Η πιο κοινή χρωστική με ιδιότητα να προσδένεται στο DNA για την Real-Time PCR και χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής είναι η SYBR Green I, η οποία προσδένεται μη ειδικά στην διπλή έλικα του DNA. Η χρωστική αυτή εκπέμπει ελάχιστο σήμα φθορισμού όταν υφίσταται ελεύθερη στο διάλυμα της, ενώ ο φθορισμός αυξάνεται πάνω από 1000 φορές όταν προσδένεται στο δίκλωνο DNA. Κατά συνέπεια, το ολικό σήμα φθορισμού της αντίδρασης είναι ανάλογο της ποσότητας του δίκλωνου DNA, που είναι παρόν, και αυξάνεται καθώς η αλληλουχία-στόχος ενισχύεται.

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης των χρωστικών αυτών περιλαμβάνουν την απλοποίηση στην σχεδίαση της μελέτης (σχεδιασμός μόνο των εκκινητών της αντίδρασης), την ικανότητα μελέτης πολλαπλών γονιδίων άμεσα, το μικρότερο κόστος και την ικανότητα να εκτελείται μία ανάλυση με την εξαγωγή καμπύλης τήξης, ώστε να ελεγχθεί η εξειδίκευση της αντίδρασης ενίσχυσης.

Η ανάλυση της καμπύλης τήξης των προϊόντων χρησιμοποιείται για να αναγνωρίζονται διαφορετικά προϊόντα της αντίδρασης, συμπεριλαμβανομένων των μη ειδικών. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ενίσχυσης, μία καμπύλη τήξης αναπαράγεται μέσω αύξησης της θερμοκρασίας διαδοχικά κατά μικρές προσαυξήσεις και ανιχνεύοντας το σήμα του φθορισμού σε κάθε στάδιο. Καθώς το δίκλωνο DNA στην αντίδραση μετουσιώνεται, ο φθορισμός μειώνεται. Το πρώτο αρνητικό παράγωγο στην μεταβολή του φθορισμού φέρεται σε διάγραμμα με αναφορά της θερμοκρασίας τήξης. Μέσω μίας χαρακτηριστικής κορυφής στην θερμοκρασία τήξης του προϊόντος (θερμοκρασία στην οποία το 50% των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA διαχωρίζεται) διακρίνεται το εν λόγω προϊόν σε σχέση με άλλα, όπως τα διμερή των εκκινητών, τα οποία τήκονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Το κυριότερο μειονέκτημα των χρωστικών είναι στερούνται ειδικότητας πρόσδεσης στο DNA, δηλαδή μπορούν να προσδεθούν σε οποιοδήποτε μόριο DNA. Κατά συνέπεια, η παρουσία μη ειδικών προϊόντων στην qPCR πιθανόν να συνεισφέρει στον ολικό ανιχνευόμενο φθορισμό και να επηρεάζει την ακρίβεια της ποσοτικοποίησης.

### **Σχεδίαση του ενισχυόμενου προϊόντος και των εκκινητών της αντίδρασης**

Για την σχεδίαση του ενισχυόμενου προϊόντος οι εξής κανόνες:

- Να φέρει μέγεθος 75-200 bp. Τα τμήματα μικρού μεγέθους τυπικά ενισχύονται με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, ενώ παράλληλα το ελάχιστο μέγεθος των 75 bp το καθιστά αναγκαίο ώστε να διακρίνεται από τα διμερή των εκκινητών, που πιθανόν να υπάρξουν.
- Είναι καλό να αποφεύγονται υποστρώματα με μεγάλες (>4) επαναλήψεις μίας βάσης.
- Να διατηρείται το περιεχόμενο γουανίνης-κυτοσίνης (GC content) του ενισχυόμενου τμήματος σε ποσοστό 50-60%

Για την σχεδίαση των εκκινητών, εφαρμόζονται οι παρακάτω οδηγίες:

- Να φέρουν περιεχόμενο γουανίνης-κυτοσίνης (GC content) σε ποσοστό 50-60%.
- Το σημείο τήξης τους να διατηρείται μεταξύ 50-65 °C.
- Να αποφεύγονται επαναλήψεις G ή C μεγαλύτερες από τρεις βάσεις
- Οι G και οι C να εδράζονται στο άκρο της αλληλουχίας των εκκινητών.
- Να ελέγχεται η (μη) συμπληρωματικότητα των εκκινητών για την αποφυγή σχηματισμού διμερών.

### **Μέθοδοι ανάλυσης των αποτελεσμάτων της Real-Time PCR/qPCR**

Υπάρχουν δύο στρατηγικές ανάλυσης των αποτελεσμάτων στις αντιδράσεις Real-Time PCR/qPCR, η απόλυτη ποσοτικοποίηση και η σχετική ποσοτικοποίηση.

1. Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιούνται πρότυπες καμπύλες για τον προσδιορισμό του αριθμού αντιγράφων ή της συγκέντρωσης ενός δείγματος. Διαδοχικές αραιώσεις ενός δείγματος γνωστής ποσότητας (ανασυνδυασμένο

πλασμιδιακό DNA, γονιδιωματικό DNA, προϊόν PCR ή και cDNA με το γονίδιο στόχο) συσχετίζονται γραμμικά με τις τιμές  $C_i$ . Ως εκ τούτου είναι δυνατός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης αγνώστων δειγμάτων με βάση τις τιμές  $C_i$  που λαμβάνουν μετά το πέρας της αντίδρασης.

2. Στην μέθοδο σχετικής ποσοτικοποίησης υπολογίζεται ο λόγος της ποσότητας ενός μορίου στόχου στο δείγμα μελέτης προς την αντίστοιχη ποσότητα σε ένα δείγμα αναφοράς, το οποίο χρησιμοποιείται ως βαθμονομητής. Τα αποτελέσματα από αυτό τον τρόπο ποσοτικοποίησης εκφράζονται ως σχετικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων.

Τόσο για την απόλυτη όσο και για την σχετική ποσοτικοποίηση, οι τιμές που λαμβάνονται από την πειραματική διαδικασία της αντίδρασης θα πρέπει να κανονικοποιούνται με τέτοιο τρόπο ώστε τα δεδομένα να αποκτούν βιολογική σημασία. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση των κανονικοποιητών. Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση, οι κανονικοποιητές χρησιμοποιούνται για την προσαρμογή των λαμβανόμενων τιμών του μορίου στόχου της αντίδρασης στην μονάδα ποσότητας του δείγματος μελέτης. Στην σχετική ποσοτικοποίηση, οι κανονικοποιητές εξασφαλίζουν πως οι λαμβανόμενες τιμές του μορίου στόχου της αντίδρασης είναι συγκρίσιμες μεταξύ ταυτόσημων ποσοτήτων του δείγματος. Παρότι ο κανονικοποιητής για κάθε μέθοδο ποσοτικοποίησης μπορεί να αποτελεί είτε τον αριθμό των κυττάρων για την απομόνωση του υποστρώματος, είτε τα  $\mu\text{g}$  των νουκλεϊκών οξέων που λειτουργούν ως εκμαγείο της qPCR είτε το επίπεδο έκφρασης ενός γονιδίου αναφοράς, οι δύο πρώτες προσεγγίσεις χρησιμοποιούνται πιο συχνά κατά την απόλυτη ποσοτικοποίηση, ενώ η τρίτη τυπικά χρησιμοποιείται για την σχετική ποσοτικοποίηση. Το γονίδιο αναφοράς είναι ένα γονίδιο του οποίου το επίπεδο έκφρασης είναι συνεχές και σταθερό μεταξύ όλων των υπό μελέτη δειγμάτων και του οποίου η έκφραση δεν επηρεάζεται από την πειραματική διαδικασία. Η χρήση ενός γονιδίου αναφοράς αποτελεί πλεονέκτημα ιδιαίτερα όταν η ακριβής ποσοτικοποίηση της ποσότητας RNA που χρησιμοποιείται δεν είναι εφικτή, όπως στις περιπτώσεις όπου μόνο μία μικρή ποσότητα αρχικού υποστρώματος είναι διαθέσιμη.

Για την σχετική ποσοτικοποίηση, η οποία και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή, υπάρχουν τρεις πρακτικές εφαρμογές ανάλυσης των αποτελεσμάτων του πειράματος: η μέθοδος Livak-2- $\Delta\Delta C_T$ , η μέθοδος  $\Delta C_i$  με την χρήση ενός γονιδίου αναφοράς και η μέθοδος Pfaffl.

#### Η μέθοδος Livak-2- $\Delta\Delta C_T$

Η μέθοδος Livak-2- $\Delta\Delta C_T$  αποτελεί εύχρηστη και εύκολη μέθοδος ανάλυσης. Σε αυτή προϋποτίθεται πως τόσο το μελετώμενο γονίδιο όσο το γονίδιο αναφοράς φέρουν αποδοτικότητα της ενίσχυσης περίπου ίση με 100% με μέγιστο όριο απόκλισης μεταξύ τους το 5%. Πριν χρησιμοποιηθεί η εν λόγω μέθοδος είναι απαραίτητο να υπολογιστούν οι αποδοτικότητες της ενίσχυσης για κάθε γονίδιο, είτε μελετώμενο, είτε αναφοράς.

Αφού επιβεβαιωθεί πως το γονίδιο στόχος και το γονίδιο αναφοράς φέρουν την ίδια αποδοτικότητα της ενίσχυσης, υπολογίζεται η σχετική διαφορά του επιπέδου έκφρασης στα διάφορα δείγματα σύμφωνα με τα παρακάτω βήματα:

Αρχικά, κανονικοποιούνται οι τιμές  $C_i$  του γονιδίου στόχου με αυτές του γονιδίου αναφοράς της ίδιας συνθήκης (μελέτης ή βαθμονόμησης):

$$\Delta C_T(\text{μελέτης}) = C_T(\text{γονιδίου στόχου, μελέτης}) - C_T(\text{γονίδιο αναφοράς, μελέτης})$$

$$\Delta CT(\text{βαθμονόμησης}) = C_T(\text{γονιδίου στόχου, βαθμονόμησης}) - C_T(\text{γονιδίου αναφοράς, βαθμονόμησης})$$

Στην συνέχεια, οι τιμές  $\Delta CT$  της μελετώμενης συνθήκης κανονικοποιούνται με τις αντίστοιχες της συνθήκης βαθμονόμησης.

$$\Delta \Delta CT = \Delta CT(\text{μελέτης}) - \Delta CT(\text{βαθμονόμησης})$$

Τέλος, υπολογίζεται ο λόγος έκφρασης για αποδοτικότητα=2 ή 100%

$$2^{-\Delta \Delta CT} = \text{Κανονικοποιημένος λόγος έκφρασης}$$

Το αποτέλεσμα που λαμβάνεται αποτελεί την πολλαπλάσια αύξηση (ή μείωση) του γονιδίου στόχου στο δείγμα μελέτης σε σχέση με το δείγμα βαθμονόμησης και είναι κανονικοποιημένο στην έκφραση του γονιδίου αναφοράς. Η κανονικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου στόχου σε εκείνη του γονιδίου αναφοράς αντισταθμίζει την οποιαδήποτε διαφορά στην ποσότητα του δείγματος.

Αν οι αποδοτικότητες της ενίσχυσης μεταξύ των δύο γονιδίων διαφέρουν, μπορεί κανείς είτε να βελτιστοποιήσει ή/και να ανασχεδιάσει τις μελέτες ή να χρησιμοποιήσει την μέθοδο Pfaffl, η οποία και θα περιγραφεί πιο κάτω. Αν αντίθετα η αποδοτικότητα της ενίσχυσης είναι η ίδια για τα δύο γονίδια αλλά όχι ίση με 2, τότε στον ανωτέρω τύπο η τιμή 2 αντικαθίσταται από την ευρεθείσα τιμή της αποδοτικότητας.

Η μέθοδος  $\Delta CT$  με την χρήση ενός γονιδίου αναφοράς

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία παραλλαγή της μεθόδου Livak, είναι εύκολη στην εφαρμογή της και ουσιαστικά αποδίδει τα ίδια αποτελέσματα με την πρώτη. Σε αντίθεση με την προηγούμενη μέθοδο, η παρούσα χρησιμοποιεί την διαφορά της τιμής  $C_T$  του γονιδίου στόχου από την αντίστοιχη τιμή του γονιδίου αναφοράς.

$$2^{\Delta CT} = 2^{(C_T \text{ γονιδίου αναφοράς} - C_T \text{ γονιδίου στόχου})}$$

Παρά την απλότητα της, η μέθοδος αυτή αποτελεί πράγματι κανονικοποιημένη έκφραση, στην οποία λαμβάνεται υπόψιν και η έκφραση του γονιδίου αναφοράς. Η ουσιαστική διαφορά των αποτελεσμάτων είναι ότι η τιμή των δειγμάτων βαθμονόμησης δεν είναι ίση με 1. Αν τα αποτελέσματα υπολογιστούν σε αυτή τη μορφή και για τις δύο συνθήκες (μελέτης και βαθμονόμησης) και διαιρεθούν μεταξύ τους, τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι τα ίδια με την μέθοδο Livak.

Η μέθοδος Pfaffl

Όπως αναφέρθηκε η μέθοδος Livak είναι έγκυρη υπό την προϋπόθεση ότι η αποδοτικότητα της ενίσχυσης μεταξύ του γονιδίου στόχου και του γονιδίου αναφοράς είναι η ίδια. Αν οι αποδοτικότητες των δύο ενισχυόμενων προϊόντων δεν είναι ίδιες, πρέπει να χρησιμοποιηθεί μία εναλλακτική προσέγγιση ώστε να καθοριστεί η σχετική έκφραση του γονιδίου στόχου στα διάφορα δείγματα. Για τον καθορισμό του λόγου έκφρασης μεταξύ του δείγματος μελέτης και του δείγματος βαθμονόμησης, χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:

$$\text{Αναλογία} = \frac{(E_{\text{γονιδίου στόχου}})^{\Delta CT_{\text{γονιδίου στόχου}}(\text{συνθήκη βαθμονόμησης} - \text{συνθήκη μελέτης})}}{(E_{\text{γονιδίου αναφοράς}})^{\Delta CT_{\text{γονιδίου αναφοράς}}(\text{συνθήκη βαθμονόμησης} - \text{συνθήκη μελέτης})}}$$

όπου E οι τιμές των αποδοτικότητων της ενίσχυσης για κάθε γονίδιο.

Ο παραπάνω τύπος προϋποθέτει πως η αποδοτικότητα της ενίσχυσης είναι ίδια για κάθε γονίδιο σε κάθε συνθήκη, αλλά δεν είναι απαραίτητο να είναι ίδια μεταξύ του γονιδίου αναφοράς και στόχου.

Αν στην μέθοδο Pfaffl η αποδοτικότητα και για τα δύο γονίδια προκύπτει ίση με 2 τότε αποδεικνύεται και προκύπτει η μέθοδος Livak.

Τέλος, λόγω της στατιστικής επεξεργασίας και του στατιστικού σχεδιασμού της πειραματικής διαδικασίας είναι απαραίτητο να υπολογίζεται και η τυπική απόκλιση κάθε τιμής του λόγου που προκύπτει από οποιοδήποτε από τους τρεις τρόπους ανάλυσης καθώς και η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων. Η τυπική απόκλιση υπολογίζεται από τον μαθηματικό τύπο  $s = \sqrt{s_1^2 + s_2^2}$ , όπου  $s_1$  η τυπική απόκλιση της μίας τιμής  $\Delta C_T$  και  $s_2$  η τυπική απόκλιση της άλλης τιμής  $\Delta C_T$  που χρησιμοποιείται στην εκάστοτε εξίσωση. Η στατιστική σημαντικότητα υπολογίζεται με την εξαγωγή της τιμής  $p$ , με την χρήση ενός  $t$ -test στις τιμές των  $\Delta C_T$  για κάθε συνθήκη μελέτης και βαθμονόμησης, και με καθορισμένο όριο τιμής  $p \leq 0,05$  για την απόρριψη της μηδενικής συνθήκης και την αποδοχή στατιστικής σημαντικότητας.

### Πειραματικό σκέλος

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε ήταν προσαρμοσμένη για την ενίσχυση τμημάτων μεγέθους 100-120 βάσεων από δείγματα ολικού RNA ζυμομύκητα από τα τέσσερα μελετώμενα στελέχη σε 2 βήματα. Από κάθε μελετώμενη συνθήκη, είτε συνθήκη μελέτης είτε βαθμονόμησης, απομονώθηκαν τρία δείγματα RNA, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία τριών cDNA της κάθε συνθήκης.

Το κάθε cDNA συντίθεται με την παρακάτω διαδικασία:

1. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε πάγο
2. Προετοιμασία του μίγματος της παρακάτω αντίδρασης:

5x PrimeScript Buffer	2 $\mu$ l
Prime Script Enzyme mix	0.5 $\mu$ l
Εκκινητές Ολιγο-dT 50 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l
Τυχαία 6-μερή 100 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l
Συγκέντρωση RNA ίση με 500 ng	-
RNase free water	Μέχρι 10 $\mu$ l τελικό όγκο

3. Ακολουθεί επώαση για 15 min, στους 37  $^{\circ}$ C, ύστερα στους 85  $^{\circ}$ C για 5 sec και τέλος είτε μεταφέρονται στους 4  $^{\circ}$ C είτε αποθηκεύονται στους -20  $^{\circ}$ C.

Με την χρήση ενός εξ αυτών των cDNA πραγματοποιήθηκε στο πρώτο στάδιο των μελετών η εύρεση των αποδοτικοτήτων ενίσχυσης για κάθε ζεύγος εκκινητών των γονιδίων που θα μελετούνταν καθώς και η επιλογή του κατάλληλου τίτλου αραίωσης του cDNA, με τον οποίο θα πραγματοποιούνταν στην συνέχεια οι κύριες μελέτες έκφρασης γονιδίων. Για την μελέτη αποδοτικότητας της ενίσχυσης και την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης κάθε δείγμα διαδοχικής αραίωσης φορτώνεται στην πλακέτα εις διπλούν.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι κύριες μελέτες έκφρασης γονιδίων όπου για το κάθε cDNA που δημιουργήθηκε στην πειραματική πλακέτα φορτώθηκαν τρία

ταυτόσημα δείγματα αντιδράσεων, ώστε να εξασφαλίζεται η επαναληψιμότητα της αντίδρασης.

Η αντίδραση Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε με τα αντιδραστήρια του Kara SYBR Fast qPCR Kit της εταιρείας Kara Biosystems σύμφωνα με τις οδηγίες του εγχειριδίου. Η συσκευή της Real-Time PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το CFX96 Touch της εταιρείας Bio Rad. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό CFX Manager της εταιρείας Bio Rad.

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε στη συσκευή της q-PCR περιελάμβανε τα εξής βήματα:

1. 95 °C/3min
2. 95 °C/10sec
3. 57.3 °C/30 sec και ανάγνωση πλακέτας
4. Επαναφορά στο βήμα 2 για 39 ακόμα κύκλους
5. 95 °C/10 sec
6. Καμπύλη τήξης από 50 °C έως 95 °C με βήμα αύξησης 0,5 °C για 5 sec και ανάγνωση πλακέτας
7. 10 °C/10 min

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αφορούσαν τα γονίδια *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *ATG8*, *TOR1*, *ACT1*, *SNCA*, *ALG9* και *TAF10*, οι εκκινητές των οποίων παρατέθηκαν ανωτέρω στον πίνακα 3.7 της ενότητας 3.4.10 για την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμέρασης.

### **3.3.26 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από *Saccharomyces cerevisiae* (Kushnirov et al., 2000)**

Η μέθοδος αντιστοιχεί σε απομόνωση πρωτεϊνών από  $1.2 \times 10^8$  κύτταρα.

1. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στα 12000 g για 2 min (eppendorf) και διατηρείται το ίζημα.
2. Ακολουθεί πλύση με απιονισμένο-αποστειρωμένο νερό (1ml)
3. Στην συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση στα 12000 g για 2 min και διατήρηση του ιζήματος.
4. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 100μl απιονισμένο-αποστειρωμένο νερό.
5. Προστίθενται 100 μl 0.2 M NaOH.
6. Το μίγμα επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Έπεται φυγοκέντρηση 1 min στα 12000 g και διατήρηση του ιζήματος.
8. Γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων σε 50 μl Laemmli Sample Buffer.
9. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12000 g για 2 min και διατηρείται το υπερκείμενο σε νέο eppendorf
10. Ακολουθεί βρασμός για 5 λεπτά στους 95 °C.

Σύσταση Laemmli Sample Buffer: Tris –HCl pH 6.8 0.06 M, 5 % Γλυκερόλη, SDS 2 %, 4% Β-μερκαπτο-αιθανόλη, 0.0025 % κυανούνη της βρωμοφαινόλης

### **3.3.27 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από *Saccharomyces cerevisiae* και κλασμάτωση τους (Griffioen et al., 2000)**

1. Η καλλιέργεια ζυμομύκητα αφήνεται να αναπτυχθεί μέχρι η οπτική πυκνότητα OD<sub>600</sub> να είναι ίση με 2-3
2. Γίνεται φυγοκέντρηση κυττάρων στα 12000 g για 2 min από την οποία διατηρείται το ίζημα.
3. Ακολουθεί πλύση με απιονισμένο-αποστειρωμένο νερό (1ml)
4. Στην συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στα 12000 g για 2 min και διατήρηση του ιζήματος.
5. Το ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα 10 mM Tris–HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 10% Γλυκερόλη, 5 mM EDTA, 1 mM DTT και προστίθενται 10μl μίγματος αναστολέα πρωτεασών.
6. Τα κύτταρα λύνονται με την χρήση σφαιριδίων υάλου διαμέτρου 600μm σε αντιστοιχία όγκου 50 μl και vortex 10 min.
7. Φυγοκέντρηση στα 12000 g για 2 min και διατήρηση του υπερκείμενου.
8. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται στα 16000 g για 30 min.
9. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης αποτελεί το διαλυτό κλάσμα πρωτεϊνών και μεταφέρεται σε νέο eppendorf, ενώ το ίζημα το μη διαλυτό, το οποίο διαλυτοποιείται σε Laemmli Sample Buffer.

Αναστολέας πρωτεασών: Έτοιμο προπαρασκευασμένο μίγμα από την εταιρεία Sigma-Aldrich κατάλληλο για κυτταρικά εκχυλίσματα ζύμης, το οποίο περιέχει AEBSF 100 mM, E-64 1.4 mM, Pepstatin A 2.2 mM και 1,10-Phenanthroline, 500 mM.

### **3.3.28 Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών (Μέθοδος Bradford)**

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών ενός κυτταρικού εκχυλίσματος προσδιορίζεται με την χρωματομετρική μέθοδο Bradford (Bradford 1976), η οποία στηρίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, να συνδέεται με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον, με αποτέλεσμα την μεταβολή του χρώματός της. Η ελεύθερη χρωστική έχει μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής, στα 595 nm. Η συγκεκριμένη μέθοδος πλεονεκτεί, σε σύγκριση με άλλες αντίστοιχες μεθόδους, στην υψηλή εξειδίκευση ως προς τις πρωτεΐνες (επηρεάζεται λιγότερο από κοινά αντιδραστήρια και μη πρωτεϊνικά συστατικά, που πιθανώς περιέχονται στα δείγματα).



Αναλυτικά, 40μl από το δείγμα αντιδρά με το αντιδραστήριο Bradford [αραιωμένο 1:4 (v/v) σε dH<sub>2</sub>O] (Bio Rad) σε όγκο 2.5 ml για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια γίνεται μέτρηση της απορρόφησης.

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών υπολογίζεται βάσει πρότυπης καμπύλης ανάφορας που κατασκευάζεται από τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (O.D.) γνωστών συγκεντρώσεων (0,5 μg, 1 μg, 2 μg, 5 μg, 10 μg, 15 μg, 20 μg, 25 μg και 30 μg) προτύπων διαλυμάτων αλβουμίνης από ορό βοός (Bovine Serum Albumin, BSA, 1 mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O), ενώ λαμβάνεται υπόψιν και ο όγκος του δείγματος.

### **3.3.29 Ηλεκτροφόρηση SDS - πολυακρυλαμίδιου**

#### **Αρχή της μεθόδου**

Σχεδόν όλες οι αναλυτικές ηλεκτροφορήσεις των πρωτεϊνών πραγματοποιούνται σε πήγματα πολυακρυλαμίδιου υπό συνθήκες οι οποίες διασφαλίζουν την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις αντίστοιχες πολυπεπτιδικές τους υπομονάδες και ταυτόχρονα αποτρέπουν τον σχηματισμό συσσωματωμάτων. Συνήθως χρησιμοποιείται το ισχυρά ιονικό απορρυπαντικό SDS σε συνδυασμό με έναν αναγωγικό παράγοντα και την υψηλή θερμοκρασία για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών πριν την φόρτωση των δειγμάτων στο πήγμα. Επιπλέον με την προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης στα δείγματα αποφεύγεται η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών. Τα μετουσιωμένα πολυπεπτιδία προσδένονται στο SDS ανάλογα με το μοριακό τους βάρος (αυτός είναι και ο λόγος που τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται στο πήγμα με βάση το μέγεθος του πολυπεπτιδίου) και έτσι φορτίζονται αρνητικά.

Στις περισσότερες περιπτώσεις η SDS-PAGE (SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis) πραγματοποιείται σε διαφορετική τιμή pH, όπου το ρυθμιστικό διάλυμα στη δεξαμενή έχει διαφορετικό pH και ιονική ισχύ από αυτό που χρησιμοποιείται για να παρασκευαστεί το πήγμα. Τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται προς τα κάτω όταν περάσει ηλεκτρικό ρεύμα από τα ηλεκτρόδια. Όταν περάσουν πια μέσω του πήγματος επιστοίβαξης (stacking gel) το οποίο έχει μεγάλο πορώδες, τα συμπλέγματα κατακάθονται σε μια πολύ λεπτή ζώνη στην επιφάνεια του πήγματος διαχωρισμού (separating gel).

Τα πήγματα πολυακρυλαμίδιου συντίθενται από αλυσίδες πολυμερισμού ακρυλαμίδιου οι οποίες είναι συνδεδεμένες με δις-ακρυλαμίδιο. Με την προσθήκη TEMED κατά την παρασκευή των πηγμάτων επιταχύνεται ο πολυμερισμός του ακρυλαμίδιου και του δις-ακρυλαμίδιου και καταλύεται ο σχηματισμός ελεύθερων ριζών οι οποίες παρέχονται από το υπερθειικό αμμώνιο (APS, ammonium persulfate). Η διαχωριστική ικανότητα αυτών των πηγμάτων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του πολυακρυλαμίδιου στο πήγμα.

#### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ**

<b>Separating Gel</b>	<b>8 %</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>	<b>Stacking Gel</b>
Acryl:Bis (29:1)	2.69 ml	3.33 ml	4 ml	5 ml	0.85 ml
1.5M Tris pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	1.3 ml Tris pH 6.8

Απεσταγμένο Νερό	4.75 ml	4 ml	3.44 ml	2.44 ml	2.8 ml
10% SDS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	50 μl
10% APS	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	20 μl
TEMED	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl	5 μl

ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟΥΝ ΣΕ ΔΥΟ ΠΛΗΡΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΑ

### Παρασκευή του πηκτώματος πολυακριλαμιδίου

1. Προετοιμάζεται η συσκευή στήριξης όπως αναφέρεται στο εγχειρίδιο
2. Παρασκευάζεται το διάλυμα του πηκτώματος διαχωρισμού με την επιθυμητή συγκέντρωση (ανάλογα με το μοριακό βάρος των μελετώμενων πρωτεϊνών) σε σωληνάκι των 10 ml.
3. Τοποθετείται στη συσκευή το διάλυμα του πηκτώματος διαχωρισμού προσεκτικά με την χρήση πιπέτας ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων. Η ποσότητα που εισέρχεται στη συσκευή είναι περίπου 5-6 ml ανά πήκτωμα. Είναι χρήσιμο να τοποθετηθεί νερό πάνω από το διάλυμα ώστε η επιφάνεια του να γίνει πιο λεία και ομαλή.
4. Όταν το πήκτωμα πήξει, αφαιρείται το νερό με τη χρήση χαρτιού
5. Παρασκευάζεται το διάλυμα του πηκτώματος επιστοιβάξης και προστίθεται με τον ίδιο τρόπο όπως το διάλυμα του πηκτώματος διαχωρισμού. Συνήθως 1ml είναι αρκετό.
6. Τοποθετούνται τα χτενάκια που θα δημιουργήσουν τις θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων.
7. Όταν το διάλυμα του πηκτώματος επιστοιβάξης πολυμεριστεί τα πηκτώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα ή να αποθηκευτούν στη δεξαμενή βυθισμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1X SDS-PAGE και να χρησιμοποιηθούν την επόμενη.

### Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και χρώση με Coomassie Blue

1. Προετοιμάζεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης όπως αναφέρεται στο εγχειρίδιο και τοποθετούνται οι τράπεζες με τα πηκτώματα.
2. Η δεξαμενή γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα 1X SDS-PAGE
3. Ετοιμάζονται και φορτώνονται τα δείγματα μετά από βρασμό 5 λεπτών στους 95 °C.
4. Η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται στα 120V μέχρι το μέτωπο των πρωτεϊνών να περάσει στο πήκτωμα διαχωρισμού και στην συνέχεια στα 200V μέχρι το μέτωπο των χρωστικών να απέχει περίπου 1cm από το τέλος του πηκτώματος.
5. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα κυανού κουμάσης (Coomassie Blue) και αναδεύεται για τουλάχιστον 45 λεπτά.
6. Το πήκτωμα εκπλένεται με διάλυμα αποχρωματισμού (Destain) υπό ανάδευση για δύο φορές: μία για 5 λεπτά και μία ολονύκτια.

### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE**

Διάλυμα Χρωματισμού	Διάλυμα Αποχρωματισμού	SDS – PAGE (X10)
0.1 % Κυανού της Κουμάσης	10 % Μεθανόλη ή Αιθανόλη	192mM Γλυκίνη
10% Οξικό Οξύ	10 % Οξικό Οξύ	25 mM Tris
40% Μεθανόλη		0,1% SDS

### **3.3.30 Ηλεκτροφορητική Μεταφορά Πρωτεϊνών**

Για την διεξαγωγή ανοσοαποτύπωσης κατά Western, ακολουθεί ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο πήκτωμα διαχωρισμού σε μεμβράνη PVDF μεγέθους πόρων 0.2  $\mu\text{m}$ , όπου αποτυπώνονται όπως ακριβώς έχουν διαχωριστεί στην ηλεκτροφόρηση SDS (Towbin, Staehelinetal. 1979; Burnette 1981). Πριν την έναρξη της μεταφοράς η μεμβράνη υφίσταται ενεργοποίηση για 30 sec σε μεθανόλη, ώστε να ενεργοποιηθεί. Στην συνέχεια, το πήκτωμα, η μεμβράνη, 6 χαρτιά Whatman No 3 και 2 σπόγγοι, διαβρέχονται με διάλυμα μεταφοράς, τοποθετούνται στην ειδική συσκευή μεταφοράς μεταξύ των δύο πόλων, με την εξής διάταξη από την άνοδο προς την κάθοδο: 1 σπόγγος-3 χαρτιά Whatman-μεμβράνη PVDF-πήκτωμα-3 χαρτιά Whatman-1 σπόγγος. Η τοποθέτηση γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται η παγίδευση φυσαλίδων. Η μεταφορά επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής έντασης και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς. Οι πρωτεΐνες, που είναι αρνητικά φορτισμένες λόγω του SDS, κινούνται από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο της συσκευής όπου βρίσκεται η μεμβράνη, πάνω στην οποία δεσμεύονται. Συνίσταται η συσκευή να είναι τοποθετημένη σε πάγο υπό ανάδευση, για την αποφυγή ανόδου της θερμοκρασίας. Στην παρούσα διατριβή η μεταφορά πραγματοποιείται στα 100 V για 40 min, λόγω της μελέτης πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους.

Διάλυμα μεταφοράς: 25 mM Tris, 250 mM γλυκίνη και 20% (v/v) μεθανόλη

### **3.3.31 Ανοσοδοκιμασία κατά Western (Western Blot, WB)**

Με τη μέθοδο της ανοσοδοκιμασίας κατά Western, μπορεί να γίνει εκλεκτική ανίχνευση μιας πρωτεΐνης-στόχου, επάνω στη μεμβράνη PVDF με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος που έχει παρασκευαστεί για το συγκεκριμένο αντιγόνο (Burnette 1981). Οι πρωτεΐνες που μεταφέρονται στις μεμβράνες, δεσμεύονται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων διατηρώντας τις αντιγονικές τους ιδιότητες και έτσι διευκολύνεται η αναγνώρισή τους από τα αντισώματα. Η παρασκευή εξειδικευμένων αντισωμάτων επιτρέπει την επιλεκτική ανίχνευση πρωτεϊνών που διαφέρουν ελάχιστα, όπως στην περίπτωση πρωτεϊνών της ίδιας οικογένειας ή πρωτεϊνών που διαφέρουν μόνο ως προς τη φωσφορυλίωση τους σε κάποιο αμινοξικό κατάλοιπο. Η ανίχνευση της υπό μελέτη πρωτεΐνης γίνεται έμμεσα, δηλαδή αρχικά ένα ειδικό αντίσωμα (πρωτογενές αντίσωμα) προσδένεται σε αυτήν επάνω στη μεμβράνη PVDF και στη συνέχεια ένα δεύτερο αντίσωμα (δευτερογενές αντίσωμα), συζευγμένο με ένα ένζυμο, αναγνωρίζει το πρώτο αντίσωμα. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος γίνεται μέσω του εντοπισμού του δευτερογενούς αντισώματος με

κατάλληλη μέθοδο, όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση, είναι αυτή της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL-Enhanced Chemiluminescence).

Η διαδικασία που ακολουθείται στην ανάλυση κατά Western είναι η ακόλουθη: Αρχικά η μεμβράνη PVDF επωάζεται υπό ήπια ανάδευση για 30 min σε 4% παραφορμαλδεΐδη, ώστε να πραγματοποιηθεί σταθεροποίηση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση υπό συνεχή ανάδευση στους 4 °C με διάλυμα δέσμευσης μη-ειδικών θέσεων [5% (w/v) BSA σε διάλυμα έκπλυσης TBS-T (Tris-buffered saline-Tween-20)]. Την επομένη, η μεμβράνη επωάζεται για 2 ώρες με κατάλληλο αντίσωμα, το οποίο είναι αραιωμένο σε διάλυμα 3% BSA (w/v) σε TBS-T, υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθούν εκπλύσεις της μεμβράνης (5 x 10 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση), και επώασή της με δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει την περιοχή Fc του πρώτου αντισώματος και είναι αραιωμένο σε διάλυμα 5% (w/v) σκόνης γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά σε TBS-T, για μία ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση. Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε (anti-rabbit, ανάλογο με το πρώτο αντίσωμα) είναι συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης (HRP). Αφού η μεμβράνη της εκπλυθεί (5 x 10 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση), εφαρμόζεται η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Σε αυτή, η μεμβράνη επωάζεται για 5 min σε διάλυμα ECL και μεταφέρεται σε ειδική συσκευή εμφάνισης, όπου λαμβάνονται διαδοχικές λήψεις του σήματος σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, συνήθως μέχρι το σήμα να κορεστεί.

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα anti-A-synuclein (1/1000), anti-PGK1 (1/10000) (μάρτυρας ισοφόρτωσης) (Acris Antibodies GmbH) και anti-Cdc28 (1/500) (μάρτυρας ισοφόρτωσης) (Santa-Cruz Biotechnology).

TBS-T (Tris-buffered saline-Tween-20): 0.1M Tris/HCl pH 7.6, 0.2M NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20.

### **3.3.32 Αφαίρεση Αντισώματος από μεμβράνη PVDF (Stripping)**

Η αφαίρεση ενός αντισώματος από την μεμβράνη PVDF (stripping) αποτελεί μια διαδικασία ιδιαίτερα χρήσιμη στην περίπτωση όπου χρειάζεται να ελεγχθεί το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων, όταν χρησιμοποιείται αντίσωμα έναντι μιας πρωτεΐνης μάρτυρα ή στην περίπτωση που τα συγκεκριμένα δείγματα είναι σπάνια και δεν υπάρχει η δυνατότητα για παρασκευή πολλών μεμβρανών (Legocki and Verma 1981; Kaufmann, Ewing et al. 1987). Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι δυνατόν να αφαιρεθεί το αντίσωμα και αφού απομακρυνθούν πλήρως οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την παραπάνω διαδικασία, μπορεί να ακολουθήσει επώαση με διαφορετικό πρωτογενές αντίσωμα.

Η διαδικασία περιλαμβάνει:

1. Επώαση της μεμβράνης για 10 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, σε διάλυμα αποκόλλησης των αντισωμάτων.
2. Επανάληψη του βήματος 1.
3. Έκπλυση της μεμβράνης με 1x PBS για 10 min
4. Επανάληψη του βήματος 3.
5. Έκπλυση της μεμβράνης με 1x TBS-T για 5 min
6. Επανάληψη του βήματος 5.

7. Μετά το πέρας των πλύσεων η μεμβράνη είναι έτοιμη για νέα επώαση σε διάλυμα δέσμευσης μη-ειδικών θέσεων

1x PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

Διάλυμα αποκόλλησης των αντισωμάτων: 1,5 % γλυκίνη, 0,1 % SDS, 1% v/v Tween-20, pH 2,2

### **3.3.33 Ανοσοφθορισμός για κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae***

- Υγρή καλλιέργεια κυττάρων ζυμομύκητα 10ml αφήνεται να αναπτυχθεί έως η OD<sub>600</sub> να μετρηθεί περίπου 0,5-1. Εναλλακτικά, από καλλιέργεια οποιασδήποτε ηλικίας υπολογίζεται ο απαιτούμενος όγκος ώστε να συλλεγούν  $6,3 \times 10^7$  κύτταρα.
- Φυγοκέντρωση στα 12000 g για 5 min και απόρριψη του υπερκειμένου

#### **Σταθεροποίηση-στερέωση των κυττάρων (Fixation)**

- Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1 ml 4% παραφορμαλδεΐδης
- Ακολουθεί επώαση στους 30 °C υπό ανάδευση για 15 min

#### **Δημιουργία σφαιροπλαστών και διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος**

- Φυγοκέντρωση στα 5000 g για 1 min. Επισημαίνεται πως σε αυτά τα στάδια τα κύτταρα είναι ευάλωτα σε λύση λόγω κατεργασίας στα κυτταρικά τους τοιχώματα, οπότε κάθε ακραία συνθήκη κατεργασίας μειώνει την επιβίωση ακέραιων κυττάρων στο τέλος του πειράματος.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 1 ml διαλύματος δημιουργίας σφαιροπλαστών (spheroplasting solution).
- Ακολουθεί επώαση για 30 min στους 30 °C.
- Φυγοκέντρωση στα 5000 g για 1 min. Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 0,5 ml SHA buffer/1% Triton X-100.
- Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση (2 φορές) με 1 ml SHA buffer.
- Τελική επαναιώρηση σε 100 μl (όσα μl απαιτούνται για τελική OD<sub>600</sub> ίση με 24).

SHA buffer: 1M σορβιτόλη, 0.1 M HEPES pH 7.5

Spheroplasting solution: Σε SHA προστίθενται 0.2 % (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη και 50 U/ml λυτικάση.

#### **Προετοιμασία των καλυπτρίδων**

- Προσθήκη 50 μl Alcian blue σε κάθε καλυπτρίδα και επώαση για 1 h.
- Γίνεται πλύση των καλυπτρίδων με νερό και αφήνονται να στεγνώσουν.
- Προσθήκη 50 μl των κυττάρων σε κάθε καλυπτρίδα και επώαση για 1 h.
- Μετά την επώαση αναρροφάται με την πιπέτα το υγρό που έχει απομείνει στις καλυπτρίδες.
- Ακολουθεί επώαση με 30 μl διαλύματος αποκλεισμού WT buffer για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση αναρροφάται το υγρό που έχει απομείνει στις καλυπτρίδες.

WT buffer: 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween-20, 5% BSA

#### **Επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα**

- Προσθήκη 30 µl πρωτογενούς αντισώματος στην καλυπτρίδα, το οποίο έχει διαλυθεί σε WT buffer. Ακολουθεί επώαση στους 4 °C overnight.
- Πλύση (5 φορές) με 30 µl WT buffer.

#### **Επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα**

- Προσθήκη 50 µl δευτερογενούς αντισώματος στην καλυπτρίδα, το οποίο έχει διαλυθεί σε WT buffer. Ακολουθεί επώαση σε σκοτεινό θάλαμο για 90 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση (3 φορές) με 100 µl WT buffer.

#### **Συγκόλληση των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρο**

- Γίνεται μία πλύση των καλυπτρίδων με απιονισμένο νερό και αφήνονται να στεγνώσουν
- Οι καλυπτρίδες συγκολλούνται σε αντικειμενοφόρο με Prolong mounting medium και αφήνονται να στεγνώσουν για 3 min.
- Ακολουθεί παρατήρηση στο μικροσκόπιο

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH) ως πρωτογενές αντίσωμα και το Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 της Thermo Scientific ως δευτερογενές αντίσωμα (1/1000).

### **3.3.34 Υπερέκφραση πρωτεϊνών με το σύστημα pET (pET system manual, Novagen, 2001)**

#### **Αρχή της μεθόδου**

Το σύστημα pET είναι ένα από τα πιο ισχυρά συστήματα που έχουν αναπτυχθεί για την κλωνοποίηση και την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο βακτήριο *E.coli*. Τα γονίδια προς υπερέκφραση κλωνοποιούνται στους φορείς pET υπό τον έλεγχο της μεταγραφής του βακτηριοφάγου T7. Η έκφραση πραγματοποιείται από την RNA πολυμεράση του T7 στα κύτταρα ξενιστές. Η RNA πολυμεράση του T7 είναι τόσο επιλεκτική και δραστική ώστε σχεδόν όλο το ενεργειακό και μεταβολικό απόθεμα του κυττάρου να χρησιμοποιείται τελικά για την έκφραση του γονιδίου-στόχου. Είναι ενδεικτικό ότι σε μικρό χρονικό διάστημα μετά την επαγωγή παράγεται σχεδόν το 50% της επιθυμητής πρωτεΐνης. Ένα ακόμη σημαντικό πλεονέκτημα του συστήματος είναι η ικανότητα να διατηρεί τα γονίδια-στόχους ουσιαστικά μη αντιγραφόμενα σε μη-επαγόμενη κατάσταση. Τα υπό έκφραση γονίδια μεταφέρονται αρχικά σε κύτταρα ξενιστές, τα οποία δεν περιέχουν το γονίδιο της RNA πολυμεράσης του T7, μειώνοντας έτσι την πλασμιδιακή αστάθεια, η οποία οφείλεται στην παραγωγή πρωτεϊνών οι οποίες είναι τοξικές για τα κύτταρα του ξενιστή. Στην συνέχεια μεταφέρονται σε ξενιστές έκφρασης οι οποίοι περιέχουν ένα χρωμοσωμικό αντίγραφο του γονιδίου της RNA πολυμεράσης του T7, υπό τον έλεγχο του υποκινητή *lacUV5* και η έκφραση επάγεται με την προσθήκη IPTG [στην παρούσα διατριβή κύτταρα *E. coli* BL21(DE3)].

## Κλωνοποίηση σε φορείς έκφρασης pET

Όλοι οι φορείς pET διαθέτουν κωδικόνια λήξης της μετάφρασης σε όλα τα τρία πλαίσια ανάγνωσης που περιέχουν εγγύς των περιοχών κλωνοποίησης και σήμανσης (tag) καθώς επίσης και μία καθοδική περιοχή λήξης της μεταγραφής του T7. Η περιοχή αυτή δεν είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική έκφραση των πιο πολλών πρωτεϊνών, ωστόσο σημειώνεται πως μερικοί φορείς pET διαθέτουν το γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη στην ίδια κατεύθυνση μεταγραφής με το γονίδιο στόχος. Αν η περιοχή λήξης της μεταγραφής του T7 αφαιρεθεί κατά τη κλωνοποίηση, η IPTG-εξαρτώμενη συσσώρευση της β-λακταμάσης παρατηρείται ταυτόχρονα με την πρωτεΐνη στόχο, εξαιτίας της αποτελεσματικής μεταγραφής της RNA πολυμέρασης του T7.

Οι φορείς pET ακόμη διαθέτουν διάφορες αλληλουχίες στην περιοχή του πολυσυνδέτη κατάλληλες, οι οποίες κωδικοποιούν ένα μεγάλο αριθμό πεπτιδίων σήμανσης για την δημιουργία χμαιοικικών πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό βοηθά στην εύκολη ανίχνευση, την εντόπιση, τον καθαρισμό και την απομόνωση των πρωτεϊνών στόχων στην μορφή χμαιοικικών μορίων. Ο τρόπος κλωνοποίησης είναι εκείνος που καθορίζει εάν η πρωτεΐνη στόχος θα φέρει οποιαδήποτε σήμανση ή επιπρόσθετα αμινοξέα του φορέα και τελικά θα εκφραστεί ως χμαιοικική πρωτεΐνη.

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pET29c(+) ο οποίος διαθέτει μία αλληλουχία σήμανσης του γονιδίου στόχου με την προσθήκη μίας ουράς 6 καταλοίπων ιστιδίνης στο καρβοξυ-τελικό άκρο της χμαιοικικής πρωτεΐνης.

## Πειραματική πορεία

Η διαδικασία που ακολουθείται στην υπερέκφραση των πρωτεϊνών με το σύστημα pET είναι η ακόλουθη:

1. Κλωνοποίηση του μελετώμενου γονιδίου στον πλασμιακό φορέα υπερέκφρασης pET29c(+) .
2. Μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο κατά Chung et al.
3. Επιλογή μονής αποικίας και εμβολιασμός της σε 5 ml LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό και επώαση στους 37 °C overnight (προκαλλιέργεια)
4. Το επόμενο πρωί πραγματοποιείται αραίωση της προκαλλιέργειας κατά 1/20 σε 10 ml LB και επώαση στους 37 °C έως ότου η οπτική της πυκνότητα να είναι ίση με  $O.D._{600nm}=0,4-0,6$ .
5. Γίνεται προσθήκη IPTG 0,5 mM.
6. Ακολουθεί δειγματοληψία όγκου 1 ml καλλιέργειας σε χρόνους: 0 min, 30 min, 1h, 2h, 4h μετά την προσθήκη του IPTG.
7. Φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm για 3 min
8. Επαναιώρηση του ιζήματος σε 100 µl 1x Laemmli Sample Buffer
9. Αποθήκευση στους -20 °C ή πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE αφού τα δείγματα επωαστούν για 5 min στους 95 °C.

### **3.3.35 Καθαρισμός χιμαιρικών πρωτεϊνών His-tagged μέσω χρήσης του συστήματος Protino Ni TED 2000 της Macherey Nagel**

Οι στήλες του συγκεκριμένου πακέτου αντιδραστηρίων επιτρέπουν τον γρήγορο και αποτελεσματικό καθαρισμό μίας ανασυνδυασμένης χιμαιρικής πρωτεΐνης σημασμένης με ουρά πολύ-ιστιδίνης μέσω ακινητοποιημένης χρωματογραφίας αλληλεπίδρασης μετάλλου. Οι στήλες αποτελούνται από μία ξηρά ρητίνη κατασκευασμένη από οξείδιο του πυριτίου, η οποία περιέχει ιόντα Ni<sup>2+</sup>. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών στην στήλη βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ της ουράς πολύ-ιστιδίνης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και των ακινητοποιημένων ιόντων Ni<sup>2+</sup>.

Η διαδικασία καθαρισμού ξεκινά με μία καλλιέργεια όγκου 80-800 ml στην οποία έχει πραγματοποιηθεί επαγωγή για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Μετά την κυτταρική λύση το καθαρισμένο ακατέργαστο κυτταρικό λύμα φορτώνεται στην στήλη. Μετά τις απαραίτητες πλύσεις της στήλης για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών του ξενιστή η πρωτεΐνη στόχος εκλύεται με ιμιδαζόλιο, το οποίο ανταγωνίζεται την πρόσδεση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στα ιόντα Ni<sup>2+</sup>.

Μετά το πέρας της διαδικασίας καθαρισμού, η συγκέντρωση της καθαρισμένης πρωτεΐνης προσδιορίζεται με φωτομέτρηση στα 280nm.

### **3.3.36 Κατακρήμνιση χιμαιρικών και αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών (Pull-Down Assay)**

#### **Αρχή της μεθόδου**

Η κατακρήμνιση χιμαιρικών και αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών χρησιμοποιείται για τον καθορισμό μίας φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ 2 ή και παραπάνω πρωτεϊνών. Η διαδικασία αυτή είναι χρήσιμη τόσο ώστε να αποδείξει την ύπαρξη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, όσο και να τις τεκμηριώσει, αν αυτές έχουν προηγουμένως περιγραφεί από άλλες μεθόδους.

Η κατακρήμνιση χιμαιρικών και αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών αποτελεί μία μορφή καθαρισμού των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών μέσω χρωματογραφίας συγγένειας κατά την οποία χρησιμοποιείται μία πρωτεΐνη-«δόλωμα». Οι μεθοδολογίες της χρωματογραφίας συγγένειας αυξάνουν σημαντικά την ταχύτητα και την αποτελεσματικότητα του καθαρισμού των πρωτεϊνών και παρέχουν την τεχνολογική πλατφόρμα για την ταυτόχρονη απομόνωση των πιθανών προσδετών με τους οποίους αλληλεπιδρά η πρωτεΐνη-«δόλωμα».

Στην εν λόγω μέθοδο, μία πρωτεΐνη «δόλωμα» σημαίνεται και προσκολλάται σε ένα ακινητοποιημένο υλικό συγγένειας κατάλληλο για την πρόσδεση της αντίστοιχης σήμανσης, εγκαθιστώντας κατά αυτό τον τρόπο μία δευτερογενή υποστήριξη συγγένειας για τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη-«δόλωμα». Η δευτερογενής αυτή κατάσταση συγγένειας της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης-«δολώματος» επωάζεται στην συνέχεια με την πρωτεϊνική πηγή, η οποία περιέχει δυνητικά πρωτεϊνικά μόρια ως «λεία» της πρωτεΐνης-«δολώματος», όπως ένα κυτταρικό λύμα. Βασική προϋπόθεση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνικών μορίων αποτελεί η χαμηλή αλατότητα των διαλυμάτων λύσης των κυττάρων, τόσο κατά την απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης όσο και κατά την παρασκευή του κυτταρικού λύματος. Η αλατότητα αυτή δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 150-200 mM



συνολικής περιεκτικότητας στα διαλύματα λύσης. Ο τρόπος έκλουσης των πρωτεϊνών εξαρτάται από τον προσδέτη συγγένειας και ποικίλει από μόρια-ανταγωνιστές του προσδέτη έως χαμηλό pH ή αναγωγικό ρυθμιστικό διάλυμα, όπως το Laemmli Sample Buffer.

Στην παρούσα διατριβή η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που καθαρίστηκε και αποτέλεσε την πρωτεΐνη δόλωμα φέρει στο καρβοξυτελικό άκρο της μία ουρά έξι καταλοίπων ιστιδίνης. Ως εκ τούτου ως ακινητοποιημένο υλικό συγγένειας προς αυτή χρησιμοποιήθηκε η Ni-NTA αραρόζη. Πρόκειται για μία ρητίνη με τον χηλικό προσδέτη NTA, ο οποίος φέρει τα ιόντα Ni<sup>2+</sup>, ακινητοποιημένο σε 6% διασυνδεδεμένα σφαιρίδια αραρόζης. Όπως περιγράφηκε και ανωτέρω η ουρά ιστιδινών των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών δεσμεύεται στα ιόντα Ni<sup>2+</sup> και η έκλουσή της μπορεί να γίνει με την χρήση διαλύματος ιμιδαζολίου.

Ακόμη, το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων *S. cerevisiae* αποτέλεσε το κυτταρικό λύμα για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών .

### Πειραματική πορεία

- Πραγματοποιείται η παρασκευή του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των κυττάρων ζύμης.
  1. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση από την καλλιέργεια (12.000 rpm για 3 min) και επαναιωρούνται σε 300 μl διαλύματος λύσης με την προσθήκη 1 μl μίγματος αναστολέα πρωτεασών.
  2. Σε αυτά προστίθενται σφαιρίδια υάλου μέχρι το ύψος των 50 μl περίπου και ακολουθεί vortex για 10 min.
  3. Στην συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 30 min στους 4 °C.
  4. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης συλλέγεται σε νέο Eppendorf και αποτελεί το κυτταρικό λύμα της κατακρήμνισης.
  5. Το λύμα αυτό υπόκειται σε ποσοτικοποίηση μέσω αντίδρασης Bradford ή SDS-PAGE και χρώση με Coomassie.
- Στην συνέχεια πραγματοποιείται επώαση 1 mg ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με 5 μg ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης overnight στους 4 °C υπό ανάδευση.
- Την επόμενη ημέρα προετοιμάζεται η στήλη της Ni-NTA αραρόζης σε ένα Eppendorf.
  1. Η Ni-NTA αραρόζη επαναιωρείται πλήρως μέσω ήπιας ανακίνησης
  2. Αμέσως γίνεται μεταφορά 20 μl του αρχικού υλικού περιεκτικότητας 50% σε νέο Eppendorf για τον σχηματισμό 10 μl στήλης.
  3. Η στήλη φυγοκεντρείται για 5 min στα 500 rpm και το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται.
  4. Προστίθενται στην στήλη 10 όγκοι στήλης (100 μl διαλύματος λύσης), ώστε να ισοσταθμιστεί το υλικό.

5. Η στήλη φυγοκεντρείται για 5 min στα 500 rpm και το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται.

- Το μίγμα των πρωτεϊνών φορτώνεται στην στήλη και επωάζεται με αυτή για 1 h στους 4 °C υπό ανάδευση.
- Η στήλη φυγοκεντρείται για 5 min στα 500 rpm και το υπερκείμενο μίγμα φυλάσσεται σε νέο Eppendorf για περαιτέρω ανάλυση.
- Η στήλη εκπλένεται με 10 όγκους στήλης (100 μl διαλύματος λύσης) με ήπια ανάμιξη.
- Η στήλη φυγοκεντρείται για 5 min στα 500 rpm και το υπερκείμενο έκπλυμα φυλάσσεται σε νέο Eppendorf για περαιτέρω ανάλυση.
- Το βήμα της πλύσης επαναλαμβάνεται για μία ακόμη φορά και το έκπλυμα συλλέγεται σε νέο Eppendorf για περαιτέρω ανάλυση.
- Τέλος, με σκοπό την αποδέσμευση των πρωτεϊνών από την στήλη το υλικό επαναιωρείται σε 20 μl Laemmli Sample Buffer και βράζεται στους 95 °C για 5 min.
- Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των δειγμάτων, η οποία συμπεριλαμβάνει και όλα τα δείγματα που απομονώθηκαν κατά τις πλύσεις καθώς και το αρχικό πρωτεϊνικό μίγμα για συγκριτική ανάλυση.
- Το πήγμα πολυακρυλαμιδίου μετά την ηλεκτροφόρηση υπόκειται σε χρώση με Coomassie.

Διάλυμα λύσης: 25 mM Tris-HCl pH 7, 100 mM NaCl.

### **3.3.37 Στύπωμα Far Western**

#### **Αρχή της μεθόδου (Wu et al., 2007)**

Η ανάλυση Far Western blot αποτελεί μία εναλλακτική μέθοδο ανάλυσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών, η οποία περιλαμβάνει την ανίχνευση πρωτεϊνών οι οποίες έχουν διαχωριστεί μετά από ηλεκτροφόρηση μέσω σημασμένων πρωτεϊνών-«δολωμάτων» και την εντόπιση των αλληλεπιδράσεών τους μέσω πολλαπλών μεθόδων. Τα τελευταία χρόνια η ανάλυση Far Western blot χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων μεταξύ υποδοχέα-προσδέτη και την σάρωση βιβλιοθηκών για αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες. Με την μέθοδο αυτή είναι εφικτό να μελετηθούν οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών, να διερευνηθούν οι αλληλεπιδρώσες αλληλουχίες με την χρήση συνθετικών πεπτιδίων ως ανιχνευτές (probes) και να αναγνωριστούν αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών ακόμη και χωρίς την χρήση αντιγονο-ειδικού αντισώματος.

Ως μέθοδος είναι παρόμοια με την ανοσοαποτύπωση κατά Western. Στην τελευταία, ένα αντίσωμα χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των υποψήφιων αντιγόνων σε μία μεμβράνη, ενώ στο Far Western Blot, μία σημασμένη πρωτεΐνη-«δόλωμα» χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής μίας αλληλεπιδρώσας πρωτεΐνης-«λείας» στην μεμβράνη. Το δείγμα (συνήθως αποτελεί ένα κυτταρικό λύμα) που περιέχει την άγνωστη πρωτεΐνη-«λεία» διαχωρίζεται μέσω SDS PAGE ή native PAGE και

μεταφέρεται σε μεμβράνη. Μετά την μεταφορά, η μεμβράνη υφίσταται επώαση με διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων και επωάζεται με την γνωστή σημασμένη πρωτεΐνη-«δόλωμα», η οποία πρέπει να βρίσκεται σε αυτούσια μορφή. Μετά την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών το σύστημα αντίσωσης, το οποίο εξαρτάται από την πρωτεΐνη-«δόλωμα» ανιχνεύει την ζώνη που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη-«λεία». Το σύστημα αντίσωσης συνήθως αποτελεί ένα αντίσωμα έναντι του τύπου σήμανσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ή ένα αντίσωμα ειδικό για την ίδια την πρωτεΐνη, όπως στην κλασική ανοσοαποτύπωση.

Η διαδικασία του Far Western Blot θα πρέπει να εφαρμόζεται με προσοχή ώστε να διατηρηθούν οι αυτούσιες μορφές και οι συνθήκες αλληλεπίδρασης των μελετώμενων πρωτεϊνών. Οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες είναι πιθανό να μην αλληλεπιδρούν με τον αντίστοιχο προσδέτη τους, με αποτέλεσμα την αποτυχία αντίσωσης μίας αλληλεπίδρασης. Εναλλακτικά, οι πρωτεΐνες με μη αυτούσια μορφή πιθανό να αλληλεπιδρούν με καινοφανείς τεχνητούς τρόπους, με αποτέλεσμα την αντίσωση ψευδώς θετικών αλληλεπιδράσεων. Η πρωτεΐνη-«λεία» συγκεκριμένα υποβάλλεται σε πολλά βήματα προετοιμασίας, τα οποία είναι πιθανό να ευθύνονται για σημαντικές συνέπειες στην αντίσωση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

Κατά την μεταφορά των πρωτεϊνών στην μεμβράνη οι πρωτεΐνες ως επί το πλείστο αποκτούν εκ νέου την αυτούσια μορφή τους, αφού οι αναγωγικοί παράγοντες εξαλείφονται κατά την διαδικασία μεταφοράς. Εάν υπάρχει υποψία πως αυτό δεν συμβαίνει κρίνεται απαραίτητο να προστεθεί στην διαδικασία ένα βήμα μετουσίωσης/επαναδιάταξης, το οποίο επιτυγχάνεται με την χρήση της υδροχλωρικής γουανιδίνης.

### **Πειραματική πορεία**

- 100 μg από κάθε δείγμα πρωτεϊνών ηλεκτροφορούνται σε SDS-PAGE και μεταφέρονται σε μεμβράνη κατά την διαδικασία που περιγράφηκε στα αντίστοιχα κεφάλαια της παρούσας ενότητας.
- Στην συνέχεια η μεμβράνη PVDF επωάζεται υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα AC με 6 M υδροχλωρικής γουανιδίνης για 30 min. Έπειτα, γίνεται πλύση σε διάλυμα AC με 3 M υδροχλωρικής γουανιδίνης για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν πλύσεις με διάλυμα AC με 0,1 M υδροχλωρικής γουανιδίνης για 30 min στους 4 °C και τέλος με διάλυμα AC για 1 h στους 4 °C. Κατά το στάδιο αυτό γίνεται η μετουσίωση/επαναδιάταξη των πρωτεϊνών στην μεμβράνη.
- Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα δέσμευσης μη-ειδικών θέσεων 5% (w/v) BSA σε διάλυμα έκπλυσης PBS-T [Διάλυμα PBS με 0.1% (v/v) Tween-20] για 1 h και υπό συνεχή ανάδευση.
- Ακολούθως, η μεμβράνη επωάζεται overnight στους 4 °C με 5 μg καθαρής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης-«δολώματος» σε 5 ml ειδικού διαλύματος πρωτεϊνικής δέσμευσης (PBB) υπό συνεχή ανάδευση.
- Στην συνέχεια η μεμβράνη εκπλένεται (3 x 10 min, υπό συνεχή ανάδευση).
- Έπειτα, η μεμβράνη επωάζεται overnight με κατάλληλο αντίσωμα έναντι της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, το οποίο είναι αραιωμένο σε διάλυμα 3% BSA (w/v) σε PBS-T, υπό συνεχή ανάδευση.
- Ακολουθούν εκπλύσεις της μεμβράνης (5 x 10 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση).

- Η μεμβράνη επωάζεται με δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει την Fc περιοχή του πρώτου αντισώματος και είναι αραιωμένο σε διάλυμα 5% (w/v) σκόνης γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά σε PBS-T, για μία ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση. Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε (anti-rabbit, ανάλογα με το πρώτο αντίσωμα) είναι συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης (HRP).
- Ακολουθούν εκπλύσεις της μεμβράνης (5 x 10 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση).
- Τέλος, εφαρμόζεται η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Σε αυτή, η μεμβράνη επωάζεται για 5 min σε διάλυμα ECL και μεταφέρεται σε ειδική συσκευή εμφάνισης, όπου λαμβάνονται διαδοχικές λήψεις του σήματος σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, συνήθως μέχρι το σήμα να κορεστεί.

Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το anti-A-synuclein (1/500) (Acris Antibodies GmbH).

Διάλυμα PBS: 4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 16 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 115 mM NaCl (pH 7,4)

Διάλυμα AC & PBB: 100 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7,6), 0,5 mM EDTA, 10 % γλυκερόλη, 0,1% Tween-20, 2 % BSA, 1 mM DTT. Να παρασκευάζεται πάντα φρέσκο.



## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

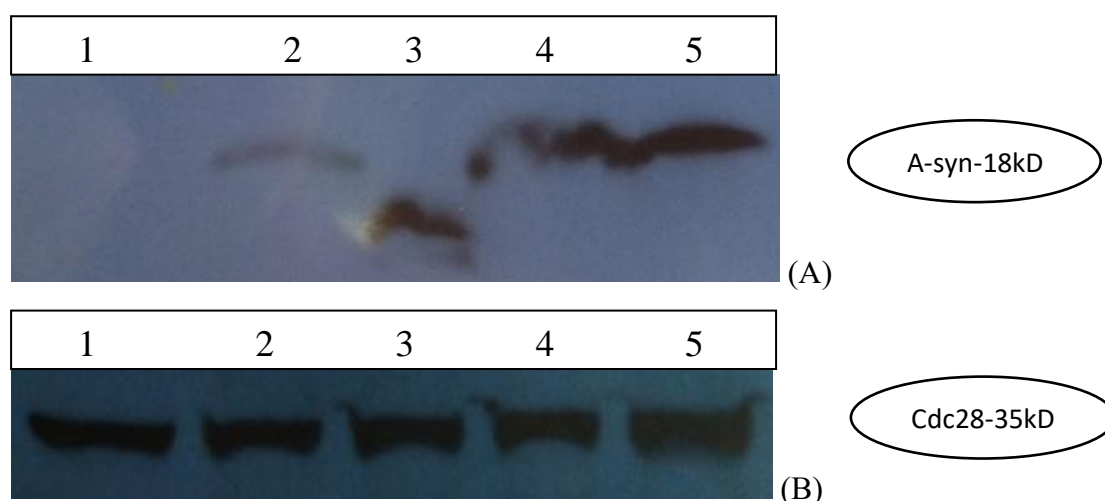
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Ανίχνευση της $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα κύτταρα του *S. cerevisiae* (ως εξακρίβωση της λειτουργίας του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης)

Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης των μεταλλαγών A53T και A30P της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pCM190, καθώς και την εξακρίβωση της παρουσίας τους στα πλασμιδιακά εκχυλίσματα των κυττάρων *S. cerevisiae* πραγματοποιήθηκε επίσης και η ανίχνευση του μεταγραφικού RNA κάθε μορφής ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, ώστε να εξακριβωθεί και η μεταγραφή τους (τα εν λόγω αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Πρόσθετο Υλικό, ενότητες Π1-Π3). Κατόπιν της ανίχνευσης του μεταγραφικού RNA για κάθε τύπο της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης πραγματοποιήθηκε εν συνεχεία ο εντοπισμός της πρωτεΐνης στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα του ζυμομύκητα, ως διερεύνηση της μετάφρασής της.

### 4.1 Ανοσοαποτύπωση Western για τον εντοπισμό της $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των μετασχηματισμένων κυττάρων *S. cerevisiae*

Για τον εντοπισμό κάθε μορφής  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα κύτταρα του ζυμομύκητα πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση Western με υπόστρωμα τα ολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών των μετασχηματισμένων κυττάρων που απομονώθηκαν σε προηγούμενο βήμα. Οι πρωτεΐνες των κυττάρων BY4741/pCM190 αποτέλεσαν τον αρνητικό μάρτυρα παρουσίας της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα κύτταρα ζυμομύκητα. Το μοριακό βάρος της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης 140 είναι 18 kD, ενώ της ισομορφής 112 14 kD. Η συγκέντρωση κάθε πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που φορτώθηκε ήταν 100  $\mu$ g, ποσοτικοποιημένη με καμπύλη Bradford. Ως πρότυπο ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη Cdc28, η οποία διατηρεί σταθερή έκφραση σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης των ζυμομυκήτων με μοριακό βάρος 35 kD. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης για τις δύο πρωτεΐνες παρουσιάζονται στην εικόνα 4.1.



**Εικόνα 4.1:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον εντοπισμό της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (A) και του μάρτυρα ισοφόρτωσης Cdc28 (B) στα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των μετασχηματισμένων κυττάρων *S. cerevisiae*. Φορτώθηκαν 100  $\mu$ g πρωτεΐνης από κάθε δείγμα

πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα anti- $\alpha$ -synuclein (1/1000) (Acris Antibodies) και anti-Cdc28 (1/500) (Santa Cruz Biotechnology).

Διαδρομή 1: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190

Διαδρομή 2: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asynWT

Διαδρομή 3: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asyn112

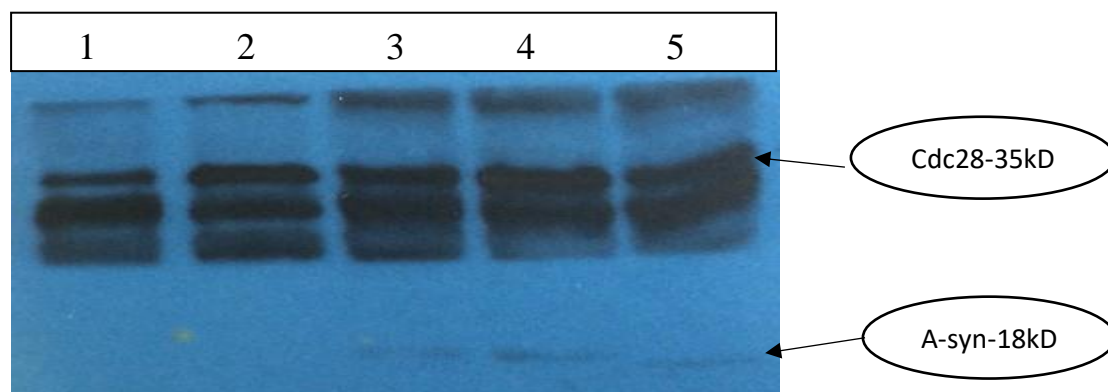
Διαδρομή 4: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asynA53T

Διαδρομή 5: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asynA30P

Στο φίλμ του Western φαίνεται κατ' αρχήν ότι στον αρνητικό μάρτυρα των πρωτεϊνών από τα κύτταρα BY4741/pCM190 (διαδρομή 1) δεν παρατηρείται εντοπισμός πρωτεΐνης όπως και αναμενόταν, ενώ παρατηρείται σήμα όμοιας έντασης στην πρωτεΐνη Cdc28. Ως εκ τούτου, το πείραμα διασφαλίζεται ως προς τον εντοπισμό της σωστής πρωτεΐνης στα υπόλοιπα εκχυλίσματα πρωτεϊνών καθώς και την ισοφόρτωση των δειγμάτων, αντίστοιχα. Παρατηρείται σήμα σε όλα τα δείγματα που αναμενόταν να φέρουν την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη (Διαδρομές 2, 3, 4 και 5), οπότε γίνεται αντιληπτό πως η πρωτεΐνη συντίθεται σε κάθε πληθυσμό μετασχηματισμένων κυττάρων. Η ισομορφή 112 εντοπίζεται σε χαμηλότερο μοριακό βάρος, γεγονός αναμενόμενο, όπως προαναφέρθηκε. Όσον αφορά την ποσότητα, παρατηρείται χαμηλότερης έντασης σήμα στην παρουσία της αγρίου τύπου  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε σχέση με τις υπόλοιπες μορφές, οι οποίες εμφανίζουν υψηλό σήμα. Πιθανόν τα γονίδια της ισομορφής 112 και οι μεταλλάξεις A53T και A30P εκφράζονται στο ζυμομύκητα σε μεγαλύτερο βαθμό από αυτό του αγρίου τύπου, χωρίς να αποκλείεται και η ενδεχόμενη συσσώρευσή τους στα κύτταρα του ζυμομύκητα. Το γεγονός αυτό θεωρητικά αποτελεί σημείο τοξικότητας για τους κυτταρικούς πληθυσμούς, τόσο στους νευρώνες όσο και στις ζύμες.

Στην συνέχεια, με την ίδια μεθοδολογία θεωρήθηκε αναγκαίο να διερευνηθεί και η λειτουργία του συστήματος μεταγραφής tet-off υπό τον έλεγχο του οποίου είναι κλωνοποιημένες οι διάφορες μορφές του *SNCA*. Κατά συνέπεια, απομονώθηκαν εκ νέου ολικές πρωτεΐνες των μετασχηματισμένων κυττάρων, ωστόσο αυτή την φορά στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης τους προστέθηκε 1  $\mu\text{g/ml}$  τετρακυκλίνη, ώστε να κατασταλεί η μεταγραφή του κάθε γονιδίου *SNCA*. Η συγκέντρωση αυτή είναι ίδια με εκείνη που προστέθηκε στα τρυβλία μετά από κάθε μετασχηματισμό στα εν λόγω κύτταρα και σύμφωνα με την βιβλιογραφία είναι ικανή να καταστείλει την μεταγραφή γονιδίων ελεγχόμενων από το σύστημα tet-off.

Και σε αυτή την περίπτωση φορτώθηκαν 100  $\mu\text{g/ml}$  ολικής πρωτεΐνης και ο μάρτυρας ισοφόρτωσης ήταν η πρωτεΐνη Cdc28. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης ελέγχου της έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης παρουσία τετρακυκλίνης παρουσιάζονται στην εικόνα 4.2.





**Εικόνα 4.2:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον εντοπισμό της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και του μάρτυρα ισοφόρτωσης Cdc28 στα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των μετασχηματισμένων κυττάρων *S. cerevisiae* παρουσία τετρακυκλίνης. Φορτώθηκαν 100  $\mu$ g πρωτεΐνης από κάθε δείγμα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα anti- $\alpha$ -synuclein (1/1000) (Acris Antibodies) και anti-Cdc28 (1/500) (Santa Cruz Biotechnology).

Διαδρομή 1: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190

Διαδρομή 2: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asynWT

Διαδρομή 3: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asynA30P

Διαδρομή 4: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asynA53T

Διαδρομή 5: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asyn112

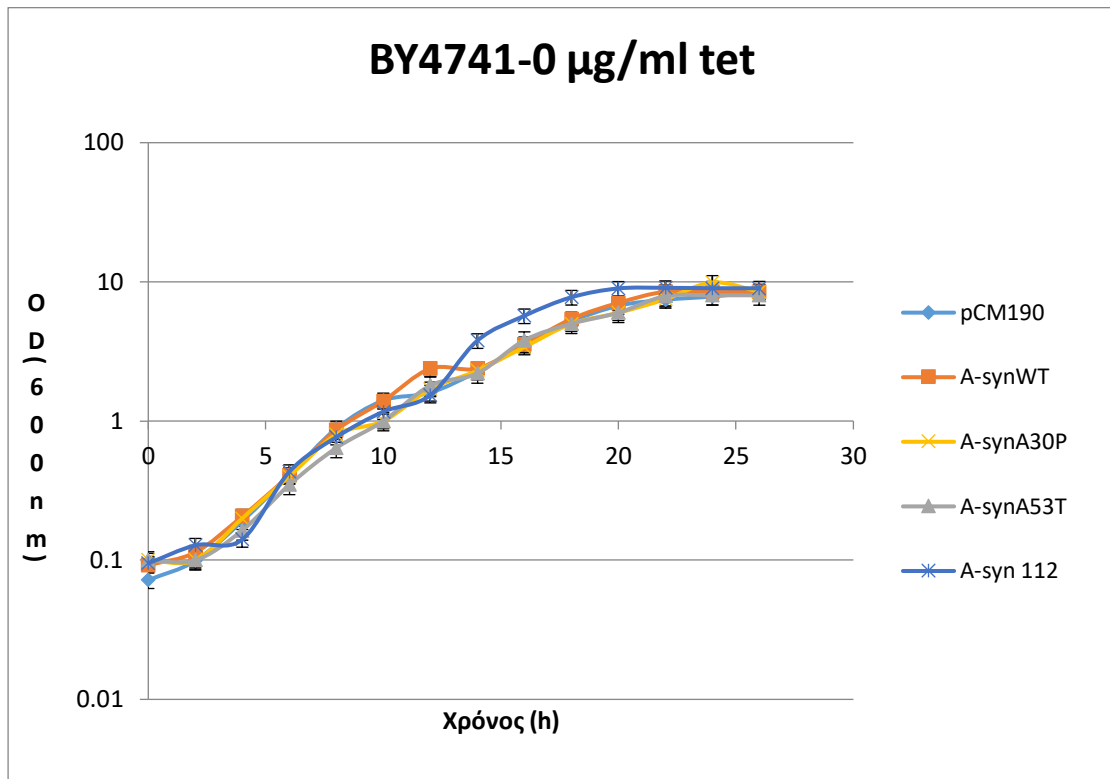
Και σε αυτή την ανοσοαποτύπωση παρατηρείται πως δεν υπάρχει ενισχυόμενο σήμα στο μέγεθος της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα κύτταρα BY4741/pCM190 (Διαδρομή 1), οπότε η ανίχνευση της εν λόγω πρωτεΐνης είναι σωστή στα υπόλοιπα δείγματα. Ακόμη, και εδώ η ισοφόρτωση των δειγμάτων ήταν επιτυχημένη σύμφωνα με το σήμα που λαμβάνεται από την ανοσοαποτύπωση για την Cdc28. Ακόμη να αναφερθεί πως κατά την εν λόγω ανοσοαποτύπωση παρατηρήθηκαν σήματα από μη ειδική πρόσδεση του πρωτογενούς αντισώματος έναντι της Cdc28 άνωθεν και κάτωθεν των σημάτων ενδιαφέροντος στα 35 kD. Αυτό αποτελεί συχνό αλλά όχι βέβαιο φαινόμενο κατά την χρήση του συγκεκριμένου αντισώματος σύμφωνα και με την βιβλιογραφία και για τον λόγο αυτό στην συνέχεια ο δείκτης ισοφόρτωσης των πειραμάτων ανοσοαποτύπωσης αντικαθίσταται από την πρωτεΐνη PGK1. Στα εκχυλίσματα που φέρουν την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη (Διαδρομές 2, 3, 4, 5) πράγματι παρατηρείται μειωμένη έκφραση παρουσία τετρακυκλίνης, ειδικότερα αν η έκφραση αυτή συγκριθεί με εκείνη της εικόνας 4.4 όπου απουσιάζει η τετρακυκλίνη. Μάλιστα, στην αγρίου τύπου μορφή (διαδρομή 2) η έκφραση δείχνει να είναι μηδαμινή ή έστω να ξεπερνάει την ευαισθησία ανίχνευσης της μεθόδου. Ακόμη, η έκφραση στις υπόλοιπες μορφές δείχνει να μειώνεται στον ίδιο βαθμό. Ως εκ τούτου, το συμπέρασμα που προκύπτει είναι πως το σύστημα μεταγραφής λειτουργεί τόσο στην έκφραση της πρωτεΐνης, η οποία ελέγχθηκε σε πρώτη φάση, όσο και στην καταστολή ή μερική καταστολή της έκφρασής της.

## **Μελέτη της επίδρασης της $\alpha$ -συνουκλεΐνης στη βιωσιμότητα και το φαινότυπο των κυττάρων *S. cerevisiae***

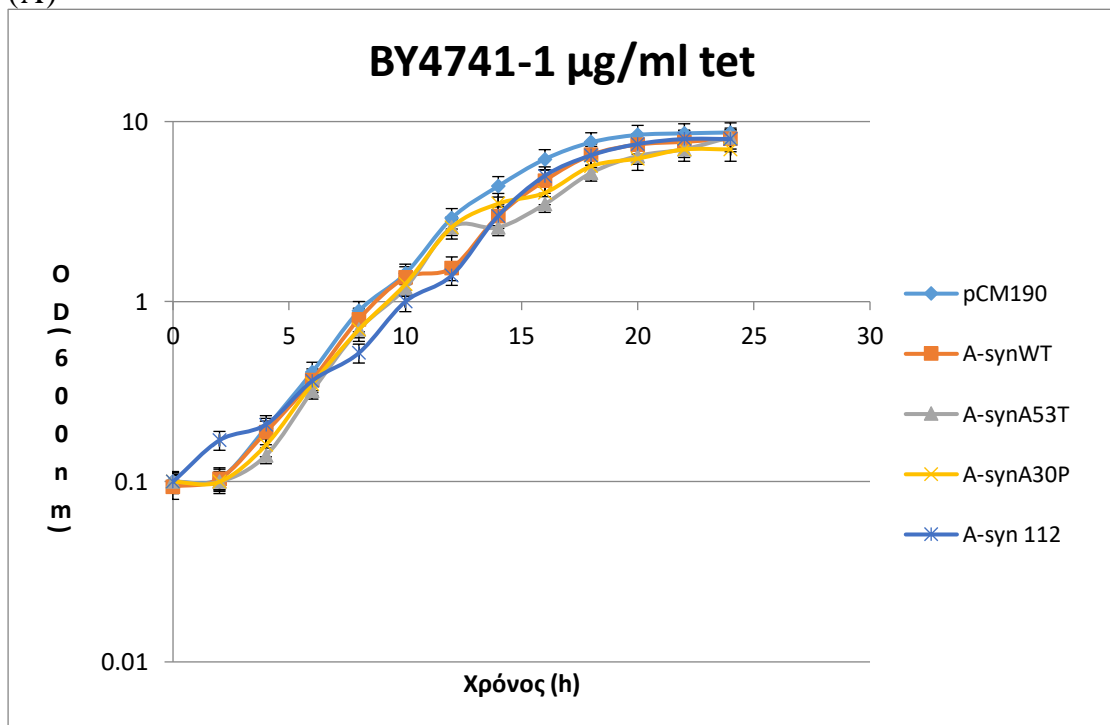
### **4.2 Καμπύλες ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων *S. cerevisiae***

Μετά και την επιβεβαίωση της μεταγραφής και μετάφρασης των διαφόρων μορφών του γονιδίου της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα κύτταρα BY4741, κρίθηκε απαραίτητο να μελετηθεί η ανάπτυξή τους συναρτήσει της επαγωγής και της καταστολής της έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου. Για τον λόγο αυτό, κατασκευάστηκαν ξεχωριστές καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων BY4741 με κάθε τύπο του *SNCA* αλλά και τον φορέα pCM190 ως αρνητικό μάρτυρα παρουσίας της. Κάθε καμπύλη ανάπτυξης προέκυψε από τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm συναρτήσει του χρόνου της υγρής καλλιέργειας του εκάστοτε στελέχους. Οι καλλιέργειες αναπτύσσονται στους 30 °C σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο yeast synthetic drop-out media supplement without uracil για να διατηρείται το πλασμίδιο, και παρουσία 18% σορβιτόλης, ώστε να εξασφαλίζεται η συνθήκη της υψηλής εξωκυττάριας οσμωτικότητας. Η ρύθμιση της έκφρασης του κάθε γονιδίου της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης

πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη ή μη τετρακυκλίνης στο θρεπτικό μέσο σε τελική συγκέντρωση 1  $\mu\text{g/ml}$ . Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν κατά τις πρώτες 25 ώρες ανάπτυξης των κυττάρων με αρχική οπτική πυκνότητα στα 600 nm ίση με 0,1. Οι καμπύλες ανάπτυξης παρουσιάζονται στην εικόνα 4.3.



(A)



(B)

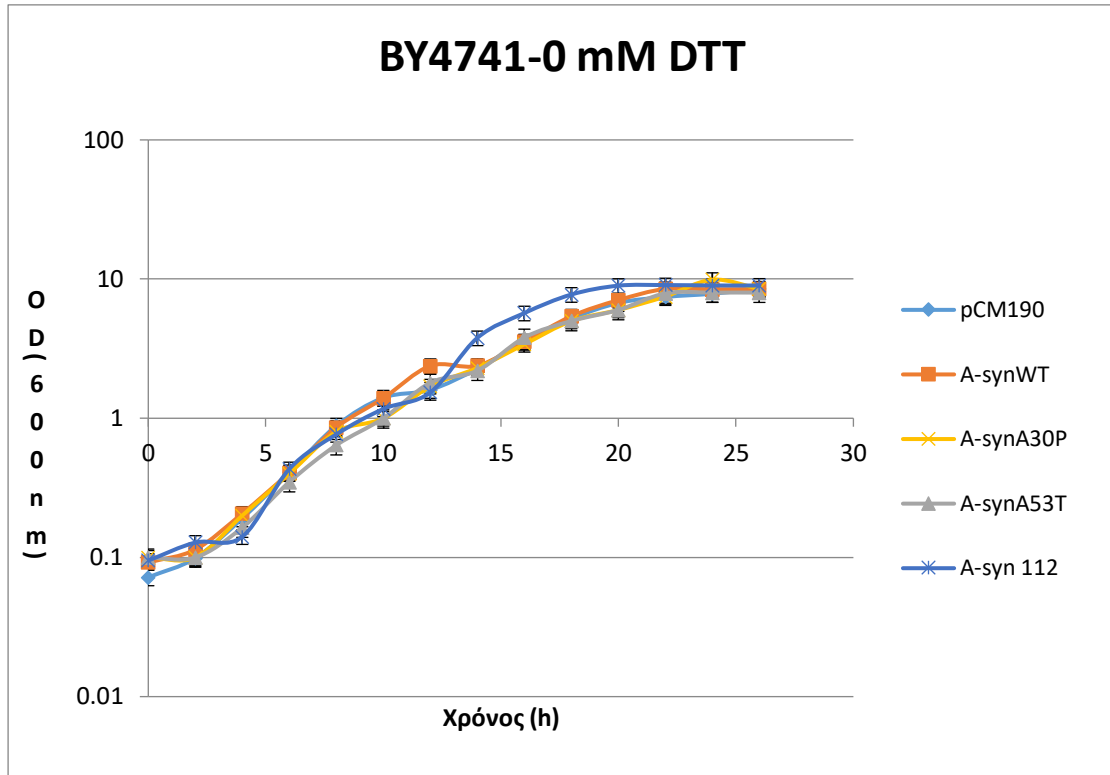
**Εικόνα 4.3:** Καμπύλες ανάπτυξης του μετασχηματισμένου στελέχους BY4741 απουσία (A) και παρουσία (B) 1 µg/ml τετρακυκλίνης για την ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης.

Όπως γίνεται αντιληπτό, με τη σύγκριση των δύο ανωτέρω καμπυλών ανάπτυξης για οποιοδήποτε τύπο μετασχηματισμένων κυττάρων, η παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης ή/και η έκφρασή της δεν επιφέρει κάποιο τοξικό φαινότυπο στην ανάπτυξη των κυττάρων BY4741 για τις πρώτες 25 ώρες ανάπτυξης. Όλες οι καμπύλες παρατηρείται να συγκλίνουν σε ίδιες τιμές οπτικής πυκνότητας καθ' όλη την διάρκεια της εκθετικής φάσης μέχρι και την έναρξη της μετα-διαυξικής στις 24 ώρες ζωής της κάθε καλλιέργειας ανεξάρτητα με την έκφραση οποιασδήποτε μορφής του γονιδίου της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης απουσία τετρακυκλίνης. Κατά συνέπεια, ένα βέβαιο συμπέρασμα, το οποίο μπορεί να εξαχθεί με βάση τις παραπάνω συνθήκες ανάπτυξης και της έκφρασης ή μη του κάθε τύπου γονιδίου, είναι πως η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη δεν επιβαρύνει την ανάπτυξη του ζυμομύκητα ως μεμονωμένος παράγοντας στις πρώτες 24 ώρες ανάπτυξης.

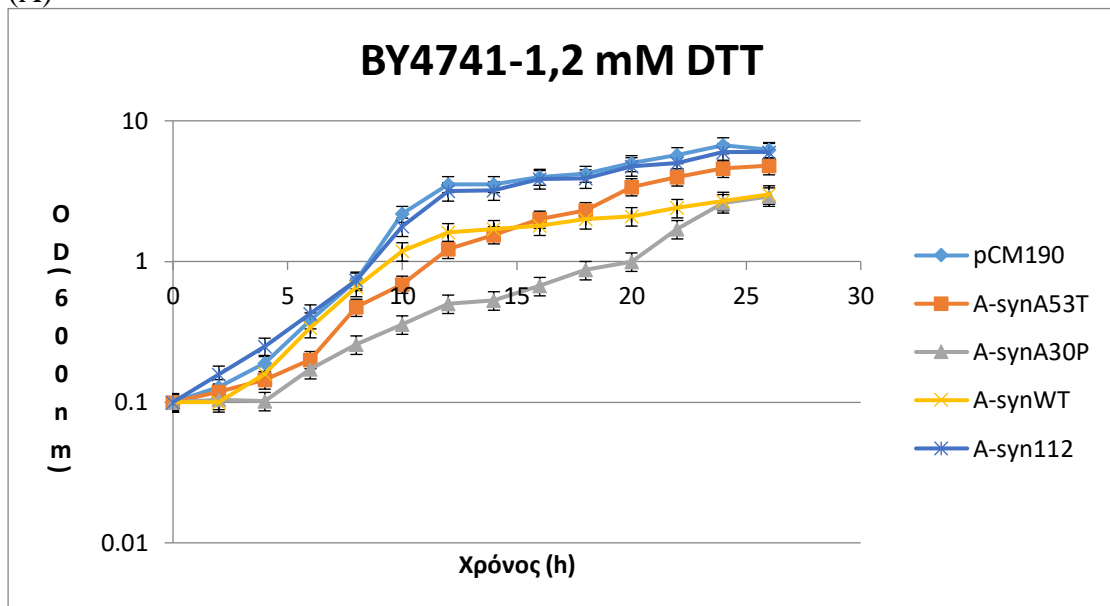
### **4.3 Καμπύλες ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων *S. cerevisiae* με εξωγενείς παράγοντες τοξικότητας**

Μετά και την διαπίστωση πως η οποιαδήποτε μορφή της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης δεν επιφέρει από μόνη της τοξικές συνέπειες, επηρεάζοντας την βιωσιμότητα των κυττάρων ζύμης, μελετήθηκαν ορισμένοι πιθανοί εξωγενείς παράγοντες τοξικότητας. Ο σκοπός ήταν οι παράγοντες αυτοί σε συνδυασμό με την παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης να έχουν ως αποτέλεσμα έναν δυνητικά τοξικό φαινότυπο, ικανό και για περαιτέρω μελέτη.

Δύο κατάλληλοι παράγοντες για την μελέτη της τοξικότητας της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Outeiro T.F., 2004) είναι η 1,4-διθειοθρεϊτόλη (DTT) και το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Η DTT αποτελεί ένα πολύ ισχυρό αναγωγικό μέσο- το οποίο δεν επιτρέπει στους δισουλφιδικούς δεσμούς να σχηματιστούν στο περιβάλλον του ενδοπλασματικού δικτύου. Λόγω του ρόλου της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στην ενδοκυττάρια κυκλοφορία και της μεταφοράς της σε κυστίδια, η DTT αναμενόταν να επάγει αυξημένη τοξικότητα παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Η βιωσιμότητα των κυττάρων του ζυμομύκητα που εκφράζουν την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη παρουσία της DTT στο θρεπτικό μέσο μελετήθηκε με την κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης μέσω μέτρησης της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm, όπως και προηγουμένως. Στην εικόνα 4.4 παρουσιάζεται η συγκριτική ανάλυση στις καμπύλες ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων BY4741 απουσία και παρουσία 1,2 mM DTT.



(A)



(B)

**Εικόνα 4.4:** Καμπύλες ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων BY4741 απουσία (A) και παρουσία (B) DTT.

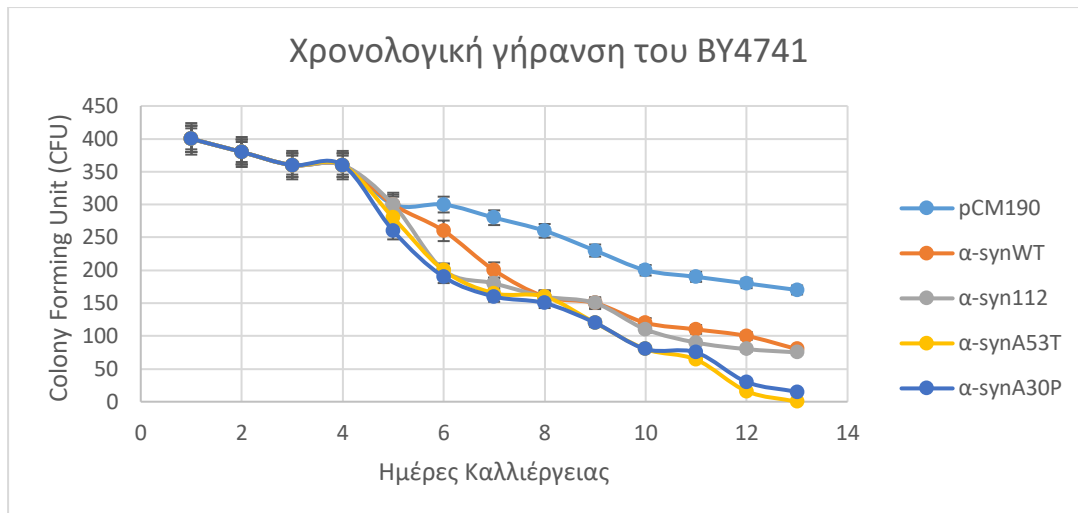
Συγκρίνοντας κανείς τις καμπύλες ανάπτυξης στις δύο συνθήκες παρατηρεί, όπως ήταν αναμενόμενο, ότι η προσθήκη του μέσου αυτού στις καλλιέργειες μειώνει την βιωσιμότητα των κυττάρων ανεξάρτητα από την παρουσία της α-συνουκλείνης. Αυτό γίνεται αντιληπτό από τις καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων BY4741/pCM190, όπου παρουσία της DTT τα εν λόγω κύτταρα δεν αναπτύσσονται μέχρι το μέγιστο της οπτικής πυκνότητας που επιτυγχάνουν απουσία της DTT. Ωστόσο, οι επιδράσεις είναι

ήπιες σε σχέση με τα κύτταρα που φέρουν μορφές του *SNCA*. Όσον αφορά τις καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων που φέρουν τις διάφορες μορφές του *SNCA*, φαίνεται πως η βιωσιμότητα μειώνεται ακόμη περισσότερο παρουσία τόσο της DTT όσο και της α-συνουκλεΐνης και ειδικά των μορφών του αγρίου τύπου και των σημειακών μεταλλαγών της. Ενώ απουσία της DTT η παρουσία της α-συνουκλεΐνης δεν επιφέρει κάποιο τοξικό φαινότυπο, η ταυτόχρονη παρουσία των δύο τοξικών παραγόντων εμποδίζει την ανάπτυξη των κυττάρων μέχρι το μέγιστο δυνατό σημείο που μπορούν να επιτύχουν απουσία της DTT. Ιδιαίτερα χαρακτηριστική είναι η σημαντική πτώση της βιωσιμότητας παρουσία DTT και της μεταλλαγής A30P, όπου τα κύτταρα ουσιαστικά έχουν απωλέσει την εκθετική τους φάση με την δυνατότητα αναδιπλασιασμού κάθε δύο ώρες. Συν τοις άλλοις, τόσο η αγρίου τύπου μορφή όσο και η μεταλλαγή A53T επιφέρουν τοξικό φαινότυπο παρουσία της DTT, μιας και υπάρχουν σαφείς διαφορές στην βιωσιμότητά τους σε σχέση με τα BY4741/pCM190, αλλά και όλους τους υπόλοιπους κυτταρικούς πληθυσμούς απουσία DTT.

#### **4.4 Χρονολογική γήρανση των μετασχηματισμένων κυττάρων *S. cerevisiae***

Στην συνέχεια, τα μετασχηματισμένα κύτταρα του ζυμομύκητα υποβλήθηκαν στη διαδικασία της χρονολογικής γήρανσης, η οποία αναλύθηκε στο κεφάλαιο της εισαγωγής. Ο σκοπός ήταν να διερευνηθεί η επίδραση κάθε μορφής της α-συνουκλεΐνης σε έναν γηρασμένο πληθυσμό κυττάρων, έτσι ώστε να γίνει μία απόπειρα μοντελοποίησης της νόσου Parkinson, η οποία αποτελεί, ως γνωστόν, νόσο της τρίτης ηλικίας. Όπως περιγράφηκε και νωρίτερα, τα κύτταρα στην φάση γήρανσης (μετά τις 8 d καλλιέργειας) υφίστανται πληθώρα στρες (στρεσογόνων παραγόντων) λόγω της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων, οπότε η προσθήκη ενός δυνητικά τοξικού παράγοντα, όπως η α-συνουκλεΐνη, πιθανώς να οδηγούσε και σε τοξικό φαινότυπο.

Η κατασκευή των καμπυλών γήρανσης πραγματοποιήθηκε μετά από τον υπολογισμό του παράγοντα CFU μετά από επίστρωση ίσου αριθμού κυττάρων από κάθε στέλεχος ζυμομύκητα σε τρυβλία ελάχιστου θρεπτικού μέσου με την παρουσία 18% σορβιτόλης, ώστε να τηρηθεί η συνθήκη της υψηλής εξωκυττάριας οσμωτικότητας, σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα με διαφορά 24 ωρών για διάστημα 13 ημερών. Ο υπολογισμός του CFU πραγματοποιήθηκε μετά από ανάπτυξη των αποικιών ζυμομύκητα έπειτα από επώαση των τρυβλίων για 2 ημέρες στους 30 °C. Τα κύτταρα BY4741/pCM190 χρησιμοποιήθηκαν και εδώ ως αρνητικός μάρτυρας παρουσίας της α-συνουκλεΐνης και των επιδράσεών της. Οι καμπύλες γήρανσης του στελέχους BY4741 παρουσιάζονται στην εικόνα 4.5.



**Εικόνα 4.5:** Χρονολογική γήρανση των μετασχηματισμένων κυττάρων του στελέχους ζυμομύκητα BY4741

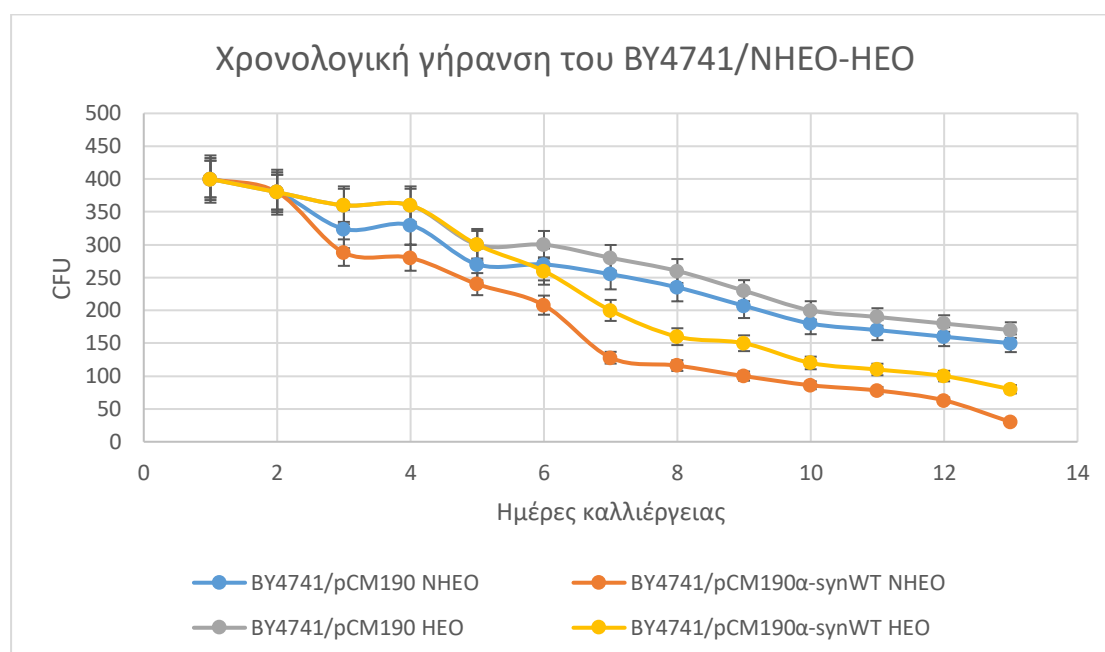
Όπως παρατηρείται από την εικόνα της χρονολογικής γήρανσης οι πέντε κυτταρικοί πληθυσμοί συγκλίνουν από την αρχή της μεταδιαυξικής φάσης, στις 24 ώρες καλλιέργειας μέχρι το μεγαλύτερο διάστημα της προόδου της στην πέμπτη μέρα καλλιέργειας. Οι πρώτες ήπιες διαφοροποιήσεις λαμβάνουν χώρα κατά την έκτη και έβδομη μέρα καλλιέργειας, θεωρητικά δηλαδή πλησιάζοντας προς το τέλος της μεταδιαυξικής φάσης. Οι διαφοροποιήσεις αυτές διακρίνονται από την πτώση στην βιωσιμότητα των γηρασμένων κυττάρων, τα οποία φέρουν οποιαδήποτε μορφή της α-συνουκλεΐνης. Στην χρονολογική πορεία, τα κύτταρα θεωρητικά εισέρχονται στην στατική φάση στην όγδοη μέρα, οπότε και στις καμπύλες γήρανσης οι διαφοροποιήσεις στην βιωσιμότητα λόγω της παρουσίας κάθε μορφής του *SNCA* εγκαθίστανται σε σημαντικό βαθμό και συνεχίζονται μέχρι την δέκατη τρίτη μέρα. Ως εκ τούτου, παρατηρείται ένας επιβαρυσμένος φαινότυπος παρουσία της α-συνουκλεΐνης στο πλαίσιο της κυτταρικής γήρανσης, οπότε και το μοντέλο αυτό μπορεί να αξιοποιηθεί για την μελέτη της πρωτεΐνης και της παθογένειας της.

Παράλληλα, όσον αφορά την σύγκριση στην βιωσιμότητα μεταξύ των διαφόρων μορφών της α-συνουκλεΐνης, παρατηρείται πως παρά την σύγκλιση των εν λόγω κυτταρικών πληθυσμών σχεδόν σε όλο το στάδιο της γήρανσης, εντοπίζονται σημαντικές διαφοροποιήσεις από το αψώτερο στάδιο των 12 ημερών. Αυτές αφορούν τα κύτταρα που φέρουν τις σημειακές μεταλλάξεις A53T και A30P, των οποίων η βιωσιμότητα ουσιαστικά εκμηδενίζεται την δέκατη τρίτη μέρα. Ταυτόχρονα παρουσία της αγρίου τύπου μορφής και της ισομορφής 112 τα κύτταρα σταθεροποιούνται σε ένα ενδιάμεσο βαθμό βιωσιμότητας μεταξύ του αρνητικού μάρτυρα και της παρουσίας των μεταλλαγών. Το αποτέλεσμα αυτό συμβαδίζει με την υπόθεση πως οι σημειακές μεταλλάξεις αποτελούν πιο τοξικές μορφές του *SNCA* και επιταχύνουν την διαδικασία του κυτταρικού θανάτου.

Η συνθήκη της υψηλής εξωκυττάριας οσμωτικότητας δεν φαίνεται να επιδρά ευεργετικά διασώζοντας τα κύτταρα από την πτώση της βιωσιμότητάς τους, όπως θα αναμενόταν. Για το λόγο αυτό, διερευνάται στη συνέχεια αν και κατά πόσο η συνθήκη αυτή τουλάχιστον επιβραδύνει την εμφάνιση του τοξικού φαινοτύπου που παρατηρείται στην χρονολογική γήρανση.

#### 4.5 Μελέτη της επίδρασης της υψηλής εξωτερικής οσμωτικότητας (high external osmolarity, HEO) στη χρονολογική γήρανση των μετασχηματισμένων κυττάρων *S. cerevisiae*

Με βάση όσα αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο εισαγωγής η συνθήκη HEO οδηγεί σε επέκταση του εύρους ζωής των ζυμομυκήτων και αποτελεί ευεργετικό στοιχείο για την επιβίωσή τους. Θεωρήθηκε επομένως χρήσιμο να μελετηθεί κατά πόσο επεκτείνεται το εύρος ζωής των ζυμομυκήτων που φέρουν την αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνη, σε σχέση με την ανάπτυξη στο ελάχιστο θρεπτικό μέσο χωρίς την παρουσία της σορβιτόλης. Για το λόγο αυτό εκτελέστηκαν πειράματα χρονολογικής γήρανσης μεταξύ κυττάρων που υποβλήθηκαν στην συνθήκη και κυττάρων απουσία της συνθήκης. Και εδώ τα κύτταρα BY4741/pCM190 αποτέλεσαν τον αρνητικό μάρτυρα παρουσίας της α-συνουκλεΐνης, τόσο απουσία HEO (Non-HEO-NHEO), όσο και παρουσία HEO. Τα αποτελέσματα της χρονολογικής γήρανσης των εν λόγω κυττάρων παρατίθενται στην εικόνα 4.6.



**Εικόνα 4.6:** Χρονολογική γήρανση των κυττάρων BY4741/pCM190 και BY4741/pCM190α-synWT απουσία (NHEO) και παρουσία HEO.

Κατά πρώτο λόγο, από τη σύγκριση των δυο κυτταρικών πληθυσμών μεταξύ τους για κάθε συνθήκη, επιβεβαιώνεται και εδώ η παρατήρηση της χρονολογικής γήρανσης του προηγούμενου κεφαλαίου: η α-συνουκλεΐνη προκαλεί πτώση της κυτταρικής βιωσιμότητας είτε στην μία συνθήκη είτε στην άλλη, σε σχέση με την βιωσιμότητα των κυττάρων που δεν την φέρουν. Η χρήση της συνθήκης HEO δεν είναι ικανή να αντιστρέψει το φαινόμενο, όπως σχολιάστηκε ήδη στο προηγούμενο πείραμα, ωστόσο υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις συγκριτικά με τη συνθήκη NHEO.

Συγκεκριμένα, στα κύτταρα BY4741/pCM190, ενώ κατά τις δύο πρώτες ημέρες οι δύο πληθυσμοί συγκλίνουν, στην συνέχεια τα κύτταρα παρουσία HEO εμφανίζουν ηπιότερη πτώση στην βιωσιμότητά τους σε σχέση με εκείνα απουσία HEO. Ο κυτταρικός πληθυσμός απουσία HEO παραμένει συνεχώς μειωμένος σε σχέση με εκείνον παρουσία HEO σε όλο το στάδιο της μεταδιαυξικής φάσης και της στατικής φάσης. Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και από τη σύγκριση των πληθυσμών των

κυττάρων BY4741/pCM190asynWT μεταξύ τους. Τα κύτταρα BY4741/pCM190asynWT παρουσία ΗΕΟ εμφανίζουν σε όλη την διάρκεια της γήρανσής τους υψηλότερο τίτλο σε σχέση με εκείνα απουσία ΗΕΟ, ακόμη και αν τελικά ο πληθυσμός τους μειώνεται σε χαμηλό επίπεδο. Κατά συνέπεια, η συνθήκη ΗΕΟ επιδρά ευεργετικά στο ζυμομύκητα επεκτείνοντας το εύρος ζωής του. Επιπλέον δείχνει να μετριάξει ή/και να καθυστερεί τις επιβλαβείς συνέπειες της α-συνουκλεΐνης, έστω και αν εκείνες είναι αναπόφευκτες.

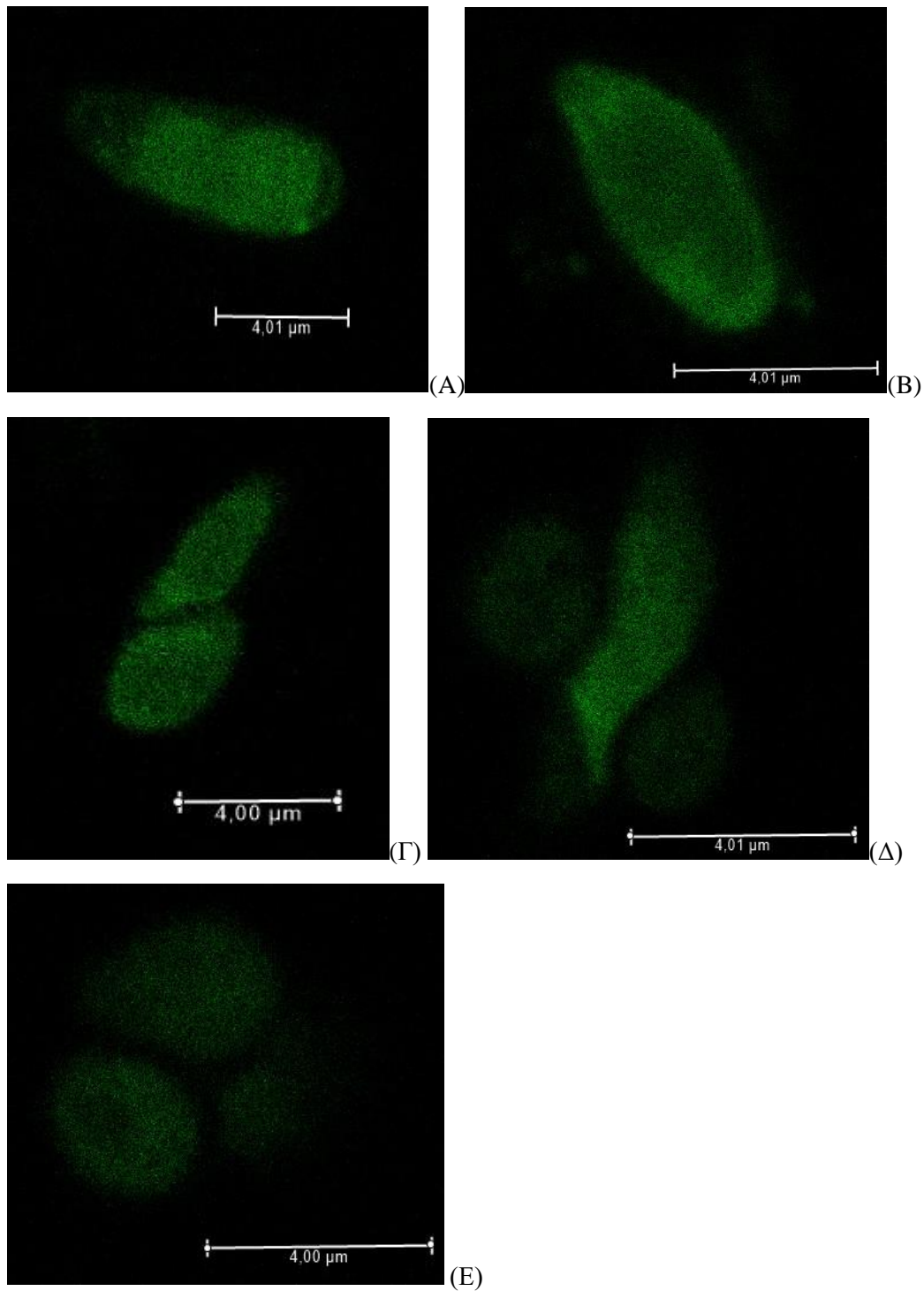
Άλλη μία σημαντική παρατήρηση προκύπτει από τη σύγκριση των κυττάρων BY4741/pCM190 απουσία ΗΕΟ με τα BY4741/pCM190asynWT παρουσία ΗΕΟ μεταξύ τους. Από την σύγκριση αυτή προκύπτει πως ακόμη και με την εφαρμογή της ΗΕΟ ο πληθυσμός των κυττάρων που φέρουν την α-συνουκλεΐνη δεν φέρει επίπεδα βιωσιμότητας όμοια με εκείνα απουσία τόσο της α-συνουκλεΐνης όσο και της ΗΕΟ στα ατώτερα στάδια της γήρανσης (μετά τις 7 ημέρες), γεγονός που αναδεικνύει σημαντικά τις τοξικές επιδράσεις της α-συνουκλεΐνης σε αυτό το στάδιο ζωής του ζυμομύκητα.

#### **4.6 Εντόπιση και κατανομή της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου στα μετασχηματισμένα κύτταρα του *S. cerevisiae* με ανοσοφθορισμό**

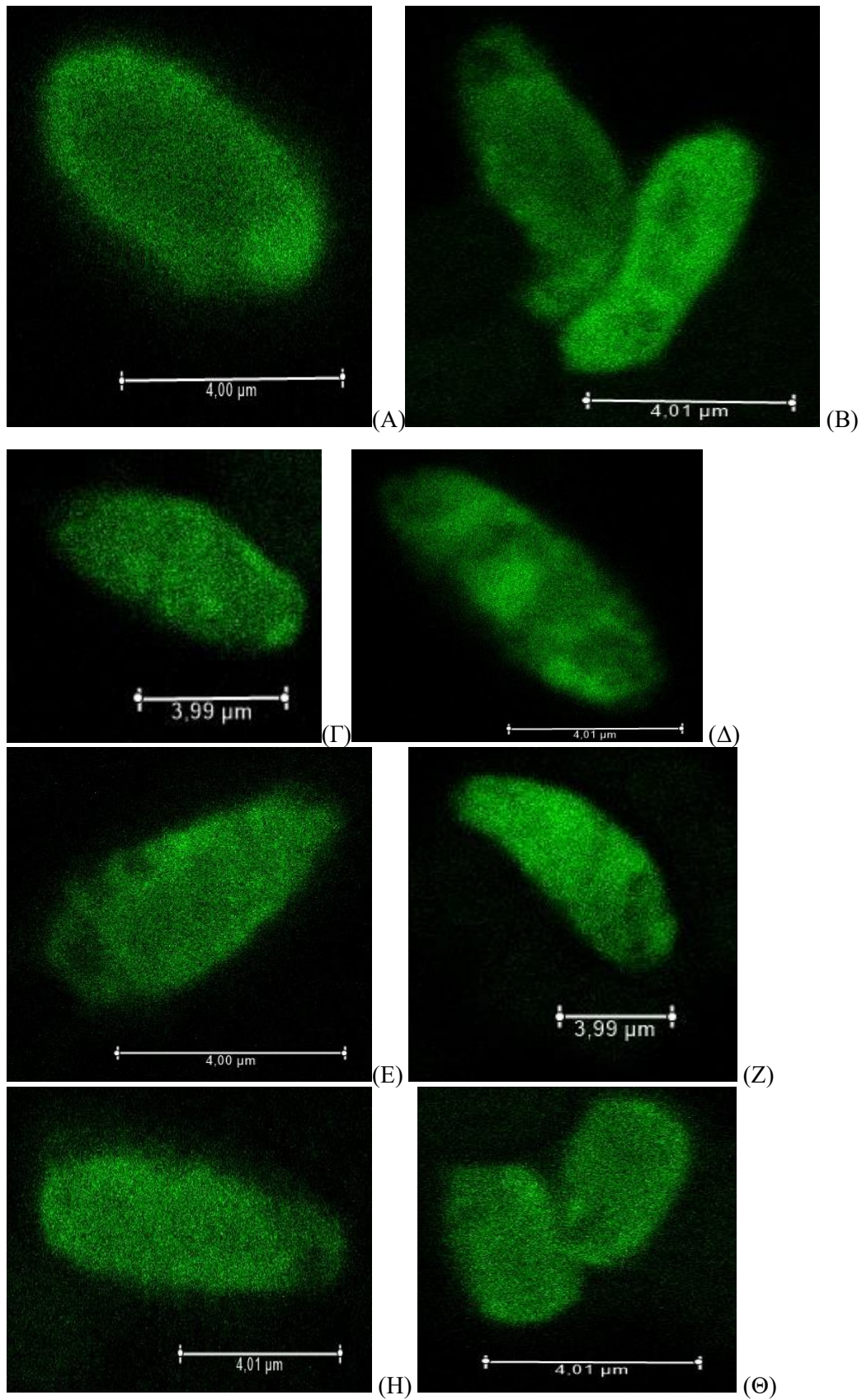
Μετά την ανεύρεση του τοξικού φαινοτύπου της χρονολογικής γήρανσης για τα κύτταρα που φέρουν μορφές του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού με στόχο την παρατήρηση της εντόπισης και της κατανομής της αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα των ζυμομυκήτων BY4741. Τα κύτταρα που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο είχαν αναπτυχθεί σε συνθήκη υψηλής εξωτερικής οσμωτικότητας, η οποία, όπως διαφάνηκε και από τα προηγούμενα πειράματα, συντελεί στην αύξηση της βιωσιμότητάς τους και τη μείωση των πιθανών τοξικών επιπτώσεων από την παρουσία της α-συνουκλεΐνης. Στόχος ήταν να διαπιστωθεί, αν στη συνθήκη ΗΕΟ προκύπτουν διαφορές στην κατανομή που αποκτά στα κύτταρα η α-συνουκλεΐνη ως προς αυτήν που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία ελλείψει ΗΕΟ.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ανοσοφθορισμού επιλέχθηκαν κύτταρα που αντιστοιχούσαν σε δύο από τις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων ζύμης: στην εκθετική φάση, όπου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Dixon et al., 2005) δεν ανιχνεύεται τοξικότητα, καθώς και στη στατική φάση-κυτταρική γήρανση, όπου παρατηρείται και ο τοξικός φαινότυπος. Οι πιο αντιπροσωπευτικές εικόνες που ελήφθησαν κατά την συνεστιακή μικροσκοπία στην εκθετική φάση ανάπτυξης παρουσιάζονται στην εικόνα 4.7, ενώ εκείνες της στατικής φάσης στην εικόνα 4.8.





**4.7: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της α-συνουκλεΐνης σε κύτταρα εκθετικής φάσης ανάπτυξης του *S. cerevisiae*. (Κλίμακα 4 μm) Στις εικόνες Α, Γ, Δ, Ε παρατηρούνται κύτταρα με κυτταροπλασματική κατανομή της α-συνουκλεΐνης, ενώ παρατηρήθηκε και μεμβρανική εντόπιση στο κύτταρο της εικόνας Β. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]**



**4.8: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε κύτταρα στατικής φάσης ανάπτυξης-φάσης γήρανσης του *S. cerevisiae*. (Κλίμακα 4  $\mu\text{m}$ )**  
 Τα κύτταρα στις εικόνες A, B και Θ (δεξιά) φέρουν μεμβρανική εντόπιση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Τα κύτταρα στις εικόνες Γ, Δ, E, Z, H και Θ (αριστερά) φέρουν

κυτταροπλασματική κατανομή της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Ακόμη, τα κύτταρα στις εικόνες Γ, Δ και Ε φαίνεται να παρουσιάζουν κυτταροπλασματικά συσσωματώματα της πρωτεΐνης. [Κλίμακα 4  $\mu\text{m}$ , anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]

Στις φωτογραφίες της εικόνας 4.7 που αφορούν τα πειράματα ανοσοφθορισμού στην εκθετική φάση ανάπτυξης, παρατηρούνται κυρίως κύτταρα με κυτταροπλασματική κατανομή της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και κατά πολύ μικρότερη μεμβρανική εντόπισή της (ένα κύτταρο-φωτογραφία Β). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη, η οποία εκφράζεται από το σύστημα μεταγραφής tet-off, μεταφράζεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο και εκκρίνεται στο κυτταρόπλασμα ή οδηγείται στην μεμβράνη. Οι φαινότυποι που παρατηρούνται δεν συνδέονται με τοξικές επιπτώσεις στο κύτταρο, οι οποίες υποδηλώνονται από την παρουσία κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων. Ωστόσο, στα κύτταρα όπου η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη εντοπίζεται στην μεμβράνη, η κατανομή αυτή ερμηνεύεται ενδεχομένως ως ένα στάδιο προγενέστερο της τοξικότητας, κυριότερα αν τα κύτταρα συνεχίσουν να εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης.

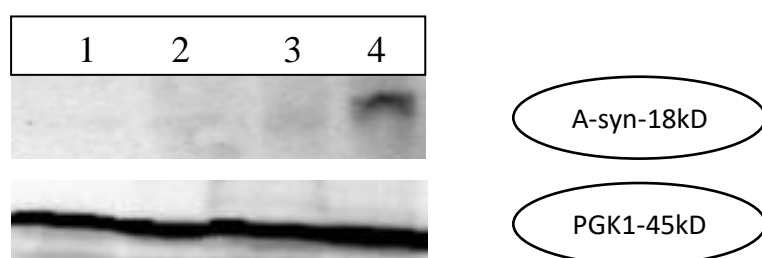
Στις φωτογραφίες της εικόνας 4.8 που αφορούν τα πειράματα ανοσοφθορισμού στη στατική φάση-φάση γήρανσης των κυττάρων ζύμης, παρατηρούνται κύτταρα τα οποία ως επί το πλείστον εμφανίζουν κυτταροπλασματική (φωτογραφίες Γ, Δ, Ε, Ζ, Η, καθώς και Θ αριστερά) ή μεμβρανική εντόπιση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (Α, Β, καθώς και Θ δεξιά), Επισημαίνεται επιπλέον, αν και αρκετά πιο σπάνια, η ανεύρεση πιθανών κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων, όπως αυτά εμφανίζονται στις φωτογραφίες Γ, Δ και Ε. Όπως παρατηρήθηκε και κατά τη μελέτη της χρονολογικής γήρανσης των κυττάρων ζύμης, τα κύτταρα που έφεραν την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη αγρίου τύπου δεν εμφάνιζαν ακραία πτώση της βιωσιμότητάς τους (Εικόνα 4.5). Η παρατήρηση του φαινοτύπου εκείνου συμβαδίζει και με τα στοιχεία που λαμβάνονται από τις εικόνες του μικροσκοπίου, στις οποίες η εμφάνιση των τοξικών συσσωματωμάτων αφορά μικρό πληθυσμό κυττάρων. Παράλληλα, συγκρίνοντας τις φωτογραφίες των κυττάρων στην εκθετική με εκείνες στην στατική φάση παρατηρεί κανείς την μετατόπιση του φαινοτύπου προς την πιο τοξική μορφή του. Η συχνότερη εμφάνιση της μεμβρανικής εντόπισης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, αλλά και η απαρχή της παρατήρησης των κυτταροπλασματικών εγκλείστων μαρτυρούν τα αρχικά στάδια ενός τοξικού φαινοτύπου κυριότερα σχετιζόμενου είτε με υψηλές δόσεις έκφρασης της πρωτεΐνης είτε με μακροχρόνια έκθεση στην έκφρασή της. Παρόλ' αυτά το κύτταρο κρίνοντας κυρίως από τις ήπιες διακυμάνσεις της βιωσιμότητας της υγρής καλλιέργειας και την απουσία πολλών κυτταροπλασματικών εγκλείστων φαίνεται να υφίσταται ένα ήπιας μορφής στρες.

Από τα παραπάνω συνδυαστικά αποτελέσματα ενισχύεται και η άποψη για την ευεργετική επίδραση της σορβιτόλης που προστίθεται στο θρεπτικό μέσο των καλλιιεργειών για την εφαρμογή της συνθήκης της υψηλής εξωτερικής ωσμωτικότητας. Σε μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας (Outeiro et al. 2003, Sharma et al. 2006, Brandis et al., 2005, Soper et al., 2008, Chen et al., 2005, Guedes et al., 2016, Sampaio-Marques et al., 2012, Dixon et al., 2005) όπου αυτή η συνθήκη δεν εφαρμοζόταν, παρατηρήθηκε κυρίως μεμβρανική εντόπιση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης από την εκθετική φάση ανάπτυξης, η οποία στα αργότερα στάδια ζωής των κυττάρων κατά την χρονολογική γήρανση οδηγούσε σε σχηματισμό κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων. Στην παρούσα διατριβή φαίνεται ότι με την εφαρμογή της συνθήκης επιβραδύνονται τα τοξικά αποτελέσματα από την παρουσία της  $\alpha$ -

συνουκλεΐνης, ενώ η εμφάνιση των κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων καθυστερεί σε ορισμένο βαθμό.

#### **4.7 Μελέτη του βαθμού έκφρασης της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων *S. cerevisiae***

Για να επιβεβαιωθούν τα συμπεράσματα που έχουν εξαχθεί από τα πειράματα της παρούσας ενότητας, πρέπει να διερευνηθεί η ποσότητα της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου που συντίθεται στα κύτταρα του ζυμομύκητα στα κομβικά στάδια της ανάπτυξής του. Κατά συνέπεια, σχεδιάστηκε να μελετηθεί η έκφρασή της από την αρχή της ζωής των κυττάρων στην υγρή καλλιέργεια, κατά την προ-εκθετική φάση με οπτική πυκνότητα  $OD_{600nm}=0,6$ , την εκθετική φάση με οπτική πυκνότητα  $OD_{600nm}=2$ , την μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης στην οποία εισέρχεται ο ζυμομύκητας μετά τις 24 πρώτες ώρες ζωής και την στατική φάση με αρχικό όριο την όγδοη ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων ζύμης. Η μελέτη αυτή επιτεύχθηκε με την συλλογή των κυττάρων στις προαναφερθείσες φάσεις ανάπτυξης και την απομόνωση των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων τους. Στην συνέχεια τα εκχυλίσματα αυτά υποβλήθηκαν σε ανοσοδοκιμασία κατά Western με αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης. Στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου φορτώθηκαν 100 μg ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των κυττάρων BY4741/pCM190asynWT από καθεμιά από τις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης. Η πρωτεΐνη PGK1 (45 kD), της οποίας η έκφραση παραμένει σταθερή και υψηλή σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης των ζυμομυκήτων αποτέλεσε το μάρτυρα ισοφόρτωσης .



#### **4.9: Ανοσοαποτύπωση Western για τον εντοπισμό της α-συνουκλεΐνης και του μάρτυρα ισοφόρτωσης PGK1 στα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα του *S. cerevisiae***

**BY4741/pCM190asynWT από τις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης.** Φορτώθηκαν 100 μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα anti- $\alpha$ -synuclein (1/1000) (Acris Antibodies) και anti-PGK1 (1/10000) (Acris Antibodies)

Διαδρομή 1: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asynWT στην προεκθετική φάση ανάπτυξης

Διαδρομή 2: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asynWT στην εκθετική φάση ανάπτυξης

Διαδρομή 3: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asyn112 στην μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης

Διαδρομή 4: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asynA53T στην στατική φάση ανάπτυξης

Απο τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης παρατηρείται κατ' αρχήν η ορθή φόρτωση ίσης ποσότητας πρωτεϊνικού εκχυλίσματος στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου, όπως φαίνεται από τα επίπεδα έκφρασης της PGK1 σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης του ζυμομύκητα. Στην συνέχεια, όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου, αυτά φαίνονται να αυξάνονται βαθμιαία από την μία φάση ανάπτυξης στην διαδοχική της, ώσπου στο στάδιο της στατικής φάσης να επιτυγχάνεται η μέγιστη παρατηρούμενη έκφραση. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με

τους παρατηρούμενους φαινοτύπους των δύο προηγούμενων πειραμάτων. Συγκεκριμένα, στη χρονολογική γήρανση των κυττάρων του ζυμομύκητα που εκφράζουν το *SNCA*, η βιωσιμότητά τους μειώνεται σταδιακά από την αρχή της ανάπτυξης μέχρι τη φάση γήρανσης, όπου παρατηρείται και η μεγαλύτερη πτώση. Αντίστοιχα, από τις εικόνες της συνεστιακής μικροσκοπίας παρατηρείται σταδιακή αύξηση της ποσότητας συνουκλεΐνης στα κύτταρα, η οποία απεικονίζεται από τη συσσώρευσή της στο κυτταρόπλασμα (εκθετική φάση) έως τον εντοπισμό της στη μεμβράνη και ενίοτε σε συσσωματώματα (φάση γήρανσης). Στην ανοσοαποτύπωση αποτυπώνεται η μικρή ποσότητα σύνθεσης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στις τρεις πρώτες φάσεις, για να φθάσει ένα αξιοσημείωτο μέγιστο στη φάση της γήρανσης. Αυτό ερμηνεύεται από το γεγονός ότι η προεκθετική, εκθετική και μεταδιαυξική φάση έχουν πολύ μικρή χρονική απόσταση μεταξύ τους, σε αντίθεση με τη στατική φάση-φάση γήρανσης η οποία είναι χρονικά πολύ πιο απομακρυσμένη από τις άλλες τρεις. Εάν υπήρχε μεγάλη ποσότητα παραγωγής της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στις πιο πρώιμες αναπτυξιακές φάσεις από αυτήν της γήρανσης, θα αναμενόταν και η κυτταροπλασματική συσσώρευσή της με την μορφή εγκλείστων στο αντίστοιχο στάδιο εντόπισης της πρωτεΐνης στην μεμβράνη στις πρώτες φάσεις ανάπτυξης. Ωστόσο, στην παρούσα περίπτωση βαθμιαίας αύξησης της έκφρασης τα συμπτώματα της τοξικότητας από την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη είναι ήπια και η κατανομή της στο κύτταρο αφορά το κυτταρόπλασμα και την μεμβράνη με σποραδική μόνο εμφάνιση συσσωματωμάτων. Αυτά τα επίπεδα έκφρασης είναι πιθανό να επηρεάζονται και από την συνθήκη υψηλής εξωτερικής ωσμωτικότητας, ως απόκριση προς την οποία προκαλείται αύξηση της βιοσύνθεσης τρεχαλόζης και γλυκερόλης, ουσιών με σημαντική προστατευτική ικανότητα έναντι πρωτεοπαθειών. Τέλος, τα παρατηρούμενα χαμηλά επίπεδα της εκθετικής φάσης συμφωνούν και με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης που ανιχνεύθηκαν και στην ανοσοαποτύπωση της ενότητας 4.1, όπου είχαν επίσης χρησιμοποιηθεί δείγματα πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων της εκθετικής φάσης ανάπτυξης.

### **Μελέτη της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται δυνητικά στην εκδήλωση τοξικότητας στα μετασηματισμένα *Saccharomyces cerevisiae* σε πραγματικό χρόνο**

Υπό το πρίσμα των ανωτέρω παρατηρήσεων όσον αφορά τους φαινοτύπους χρονολογικής γήρανσης, την έκφραση και την εντόπιση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στο εσωτερικό των κυττάρων σχεδιάστηκε η μελέτη της έκφρασης ορισμένων γονιδίων, που θα βοηθούσε στην ανάδειξη των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την τοξικότητα που διαμεσολαβείται από την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη, καθώς και της μεταβολικής κατάστασης του κυττάρου ζυμομύκητα παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν να μελετηθούν γονίδια υπεύθυνα για το μεταβολισμό της τρεχαλόζης λόγω του σημαντικού ρόλου τον οποίο διαδραματίζει ο πολυσακχαρίτης αυτός στην απόκριση στο στρες για τα κύτταρα ζύμης, κυριότερα όταν αυτό είναι πρωτεοτοξικό ή/και οσμωτικό όπως αναλύθηκε στο αντίστοιχο κεφάλαιο της εισαγωγής, αλλά και της θεραπευτικής του εφαρμογής σε νευροεκφυλιστικές νόσους όπως έχει διαφανεί από την διεθνή βιβλιογραφία και αναλύεται και στο κεφάλαιο της Εισαγωγής. Επιπλέον μελετήθηκαν και γονίδια των οποίων τα προϊόντα σχετίζονται με παράγοντες που επηρεάζονται από την παρουσία της τρεχαλόζης, όπως η αυτοφαγία, οι μηχανισμοί «αίσθησης» θρεπτικών στοιχείων, τα οποία εξίσου κατέχουν σημαντική θέση στην μοριακή ενορχήστρωση των μηχανισμών απόκρισης στο στρες.

Ακόμη, την μελέτη των εν λόγω γονιδίων ενισχύει και η εφαρμογή της συνθήκης HEO, δεδομένου ότι η βιοσύνθεση της τρεχαλόζης αυξάνεται σε αυτή και τα μονοπάτια της αυτοφαγίας σταθεροποιούνται κατά της εφαρμογή της. Κατά συνέπεια τα γονίδια που μελετήθηκαν ήταν τα εξής: *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *ATG8* και *TOR1*. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η μεταγραφική τους πορεία σε PCR πραγματικού χρόνου.

#### **4.8 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των *SNCA*, *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *ATG8* και *TOR1* στα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 με χρήση qPCR**

Μετά την εξακρίβωση της μεταγραφής των ανωτέρω γονιδίων (Πρόσθετο Υλικό-ενότητα Π5) κρίθηκε σκόπιμο να πραγματοποιηθούν πειράματα qPCR, ώστε να αποκτηθεί μία εικόνα των μεταβολών στην γονιδιακή έκφραση που λαμβάνουν χώρα παρουσία της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα ζυμομύκητα.

Συγκεκριμένα, στόχος ήταν να διερευνηθούν οι μεταβολές των επιπέδων έκφρασης στα γονίδια που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό της τρεχαλόζης *TPS1*, *TPS2* και *TSL1*. Μέσω των αποτελεσμάτων αυτών θα παρέχονταν ενδείξεις σχετικά με την πιθανή αυξομείωση των επιπέδων τρεχαλόζης στο εσωτερικό των κυττάρων υπό την παρουσία ενός στρεσογόνου παράγοντα όπως η α-συνουκλεΐνη. Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο της Εισαγωγής στην παρούσα διατριβή, η έκφραση των γονιδίων της τρεχαλόζης επάγεται σημαντικά σε γενικευμένες συνθήκες πληθώρας στρες, ώστε να εξυπηρετηθεί η επιβίωση των κυττάρων. Ακόμη, με βάση την βιοχημική της δομή η τρεχαλόζη αποτελεί ένα παράγοντα αποδιάταξης πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, με σημαντικές δυνατότητες θεραπευτικής παρέμβασης στις πρωτεοπάθειες. Τέλος, με τις ποσοτικές εκτιμήσεις των επιπέδων έκφρασης δίνεται η δυνατότητα να μελετηθεί και η παρέμβαση της συνθήκης HEO στον μεταβολισμό της τρεχαλόζης παρουσία της α-συνουκλεΐνης, όποτε να προκύψουν συμπεράσματα, τα οποία οδηγούν στους ανωτέρω εμφανιζόμενους φαινοτύπους.

Εκτός των γονιδίων βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης, μελετήθηκε και το γονίδιο *ATG8*, το προϊόν του οποίου παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της αυτοφαγίας στα κενοτόπια του ζυμομύκητα. Μέσω της μελέτης των επιπέδων έκφρασής του δίνεται η δυνατότητα να εκτιμηθεί η μεταγραφική επαγωγή ή καταστολή του σημαντικού αυτού αμυντικού μηχανισμού απέναντι σε πρωτεοτοξικό στρες, υπό την παρουσία της α-συνουκλεΐνης. Άλλωστε και στην διεθνή βιβλιογραφία (Sampaio-Marquez et al., 2011 και 2016) προτείνεται η μεταγραφική ενεργοποίηση του μηχανισμού της αυτοφαγίας για την διάσωση του κυττάρου από την συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, καθώς και η καταστολή του έπειτα από την γενικευμένη εγκατάσταση των τοξικών φαινοτύπων. Ταυτόχρονα, με βάση τα δεδομένα πως η τρεχαλόζη αποτελεί παράγοντα επαγωγής της αυτοφαγίας κρίθηκε απαραίτητη η συγκριτική μελέτη των επιπέδων έκφρασης των βιοσυνθετικών γονιδίων του δισακχαρίτη με τα επίπεδα του *ATG8*.

Συμπληρωματικά των παραπάνω γονιδίων μελετήθηκε και το γονίδιο *TOR1*. Όπως αναλύθηκε, το προϊόν του γονιδίου αυτού αποτελεί μέρος του συμπλόκου TORC1, το οποίο ρυθμίζει έναν καταρράκτη φωσφορυλιώσεων που αφορούν πλήθος μεταβολικών μονοπατιών και σχετίζονται με την αξιοποίηση και την αίσθηση θρεπτικών στοιχείων στο περιβάλλον των κυττάρων του *S. cerevisiae*. Ακόμη, το σύμπλοκο αυτό ρυθμίζει κατασταλτικά μηχανισμούς όπως την ενεργοποίηση της

αυτοφαγίας και έμμεσα την μεταγραφή των βιοσυνθετικών γονιδίων της τρεχαλόζης. Επιπλέον με την συγκριτική τους μελέτη μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για το κατά πόσο η επαγωγή της αυτοφαγίας από την τρεχαλόζη αποτελεί παράγοντα ανεξάρτητο του μονοπατιού Tor, όπως έχει διασαφηνιστεί στα κύτταρα θηλαστικών. Ως εκ τούτου, η ταυτόχρονη μελέτη του συνδυασμού των γονιδίων αυτών δίδει πληροφορίες σχετικές με την μεταβολική κατάσταση του κυττάρου με κεντρικό άξονα την διακύμανση της παραγωγής τρεχαλόζης και τους μηχανισμούς που επηρεάζει ή την επηρεάζουν.

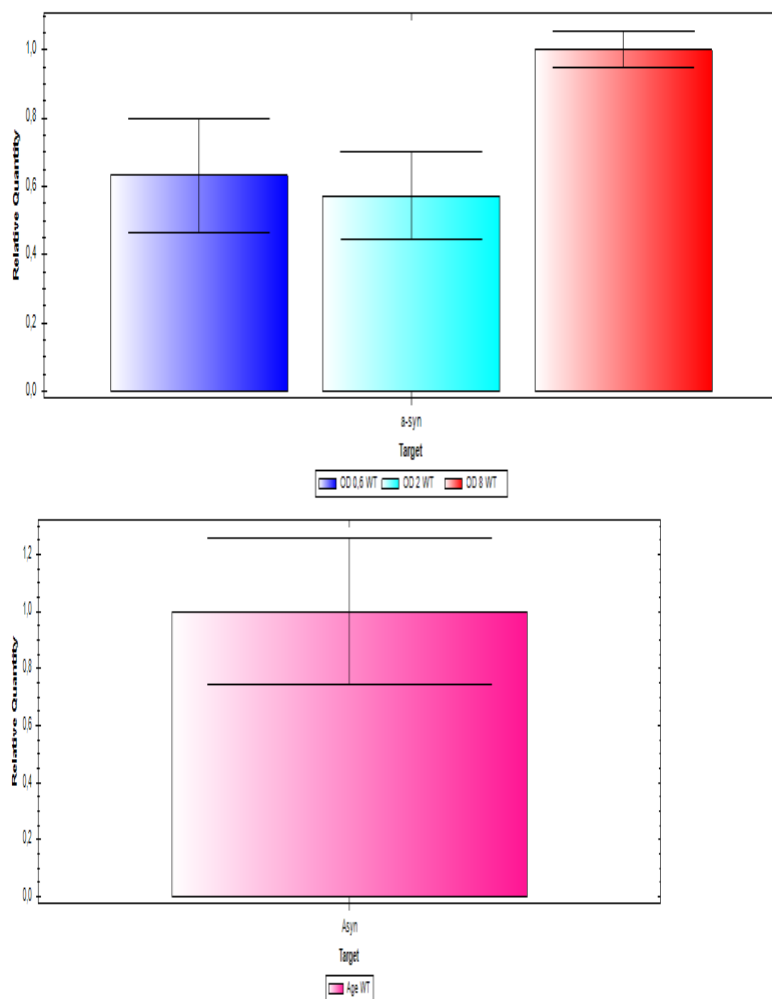
Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα qPCR για το γονίδιο *SNCA*, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να συγκριθούν με εκείνα της ανοσοαποτύπωσης και να διαπιστωθεί, αν το επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου στα κύτταρα συμβαδίζει με την παραγωγή της α-συνουκλεΐνης στις τέσσερις μελετώμενες φάσεις ανάπτυξης του ζυμομύκητα.

Οι μελέτες qPCR πραγματοποιήθηκαν με την απομόνωση τριών δειγμάτων RNA από κάθε μελετώμενη συνθήκη και από τα οποία δημιουργήθηκαν τρία αντίστοιχα cDNA. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν οι τέσσερις κομβικές φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων ζύμης (όπως διαπιστώνεται και από τις καμπύλες χρονολογικής γήρανσης): η προ-εκθετική φάση με οπτική πυκνότητα  $OD_{600nm}=0,6$ , η εκθετική φάση με οπτική πυκνότητα  $OD_{600nm}=2$ , η μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης στην οποία εισέρχεται ο ζυμομύκητας μετά τις 24 πρώτες ώρες ζωής και η στατική φάση με αρχικό όριο την όγδοη ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων ζύμης. Σε κάθε συνθήκη, το δείγμα μελέτης ήταν ο πληθυσμός των κυττάρων BY4741/pCM190asynWT, δηλαδή παρουσία της α-συνουκλεΐνης, και το δείγμα βαθμονόμησης ο πληθυσμός των κυττάρων BY4741/pCM190, δηλαδή απουσία έκφρασης της α-συνουκλεΐνης. Γίνεται έτσι αντιληπτό πως επιδιώχθηκε, οι μελέτες των γονιδίων να συμπεριλαμβάνουν τον παράγοντα του χρόνου από την μία φάση ανάπτυξης στην διαδοχική της, ώστε να προκύψει στα αποτελέσματα ένα μεταβολικό προφίλ που θα αναδείκνυε τις πιθανές μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης σε οποιαδήποτε ηλικία του ζυμομύκητα. Τέλος, σημειώνεται ότι η ανάπτυξη των κυττάρων τόσο απουσία όσο και παρουσία της α-συνουκλεΐνης πραγματοποιήθηκε παρουσία ΗΕΟ.

## Αποτελέσματα q-PCR

Πρώτο βήμα στις μελέτες της qPCR αποτέλεσε το βήμα αποδοτικότητας της ενίσχυσης των συγκεκριμένων γονιδίων και των εκκινητών της αντίδρασης, το οποίο και περιγράφεται αναλυτικά στο Πρόσθετο Υλικό-ενότητα Π6. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε το δεύτερο και κυρίως τμήμα της q-PCR. Σε αυτό δοκιμάστηκαν ως υποστρώματα τα cDNA των 4 βιολογικών συνθηκών που αντιστοιχούν σε συγκέντρωση RNA 0,5 ng. Η ενίσχυση των τμημάτων των γονιδίων *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *ATG8*, *TOR1* και *SNCA* πραγματοποιήθηκε μαζί με το γονίδιο αναφοράς *ACT1*, ενώ το πρωτόκολλο ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ίδιο πρωτόκολλο 40 κύκλων ενίσχυσης με το βήμα απόδοσης της ενίσχυσης. Στο συγκεκριμένο βήμα το κάθε γονίδιο στο κάθε δείγμα cDNA ελέγχθηκε εις τριπλούν. Απαραίτητη ήταν και η παρουσία των αρνητικών μαρτύρων χωρίς υπόστρωμα αντίδρασης, ενώ οι αρνητικοί μάρτυρες μη αντίστροφης μεταγραφής ελέγχθηκαν με απλή PCR, χωρίς να παρουσιάσουν κάποιο προϊόν.

Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης αυτά αναλύθηκαν με την χρήση του λογισμικού CFX Manager της εταιρεία BioRad. Τα επίπεδα έκφρασης του SNCA στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του ζυμομύκητα φαίνονται στην εικόνα 4.10.



**Εικόνα 4.10: Επίπεδα έκφρασης του SNCA στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων *S. cerevisiae* BY4741.** Με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης του SNCA στην προεκθετική φάση, με γαλάζιο στην εκθετική φάση, με κόκκινο στην μεταδιαυξική φάση και με ροζ στην στατική φάση.

Με βάση την παραπάνω εικόνα, τα επίπεδα έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης δείχνουν να αυξάνονται συν τω χρόνω. Πιο συγκεκριμένα, δείχνουν να παραμένουν σταθερά στην προ-εκθετική και εκθετική φάση, ενώ στην συνέχεια αυξάνονται στην μεταδιαυξική και παραμένουν σταθερά έως την φάση γήρανσης. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν να συμβαδίζουν με εκείνα της ανοσοαποτύπωσης Western για την μελέτη της έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του ζυμομύκητα. Η συμφωνία αυτή ενισχύει σημαντικά την υπόθεση πως τα συμπτώματα της ήπιας τοξικότητας στα κύτταρα λαμβάνουν χώρα σε συνθήκες χαμηλής έκφρασης του SNCA, η οποία σταδιακά αυξάνεται και φτάνει στην κορύφωσή της μόνο στο στάδιο της γήρανσης, όπου παρατηρήθηκαν και τα λίγα συσσωματώματα, ενώ η κυριότερη εντόπιση της πρωτεΐνης αφορούσε την μεμβράνη.

Τα αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των υπολοίπων γονιδίων πραγματοποιήθηκαν με την μέθοδο Pfaffl, ενώ ταυτόχρονα η στατιστική



σημαντικότητα των αποτελεσμάτων εκφράστηκε με την χρήση του t-test και την εξαγωγή της τιμής p.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η συνθήκη βαθμονόμησης προέκυψε από την μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα BY4741/pCM190, δηλαδή κύτταρα που δεν έφεραν το *SNCA* και ως μηδενική υπόθεση ορίστηκε η προ-εκθετική φάση των εν λόγω κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1.

**Πίνακας 4.1: Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae* με μηδενική υπόθεση την προεκθετική φάση της συνθήκης βαθμονόμησης.** Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με EXP η εκθετική φάση, με PD η μετά-διαυξική φάση και με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η αναλογία συνθηκών που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά για τον υπολογισμό του μέσου όρου.

<i>TPS1</i>							
Απουσία <i>SNCA</i>				Παρουσία <i>SNCA</i>			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
PE/PE	1,00	0,96-1,03	1	PE/PE	0,98	0,95-1,29	0,7401525
EXP/PE	1,86	1,74-1,98	0,0661671	EXP/PE	1,65	1,61-1,69	0,111785412
PD/PE	38,30	38,06-38,65	2,94043E-08	PD/PE	18,55	18,24-18,80	7,36636E-08
ST/PE	196,07	183,9-209,7	5,13748E-09	ST/PE	72,81	72,41-73,20	5,42955E-09

<i>TPS2</i>							
Απουσία <i>SNCA</i>				Παρουσία <i>SNCA</i>			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
PE/PE	1,00	0,84-1,18	1	PE/PE	0,87	0,79-1,00	0,262958195
EXP/PE	1,10	1,00-1,21	0,495176	EXP/PE	1,60	1,46-1,95	0,050697
PD/PE	8,44	6,31-11,10	3,73598E-05	PD/PE	9,67	9,53-9,80	1,06102E-06
ST/PE	7,76	7,32-8,29	2,37882E-07	ST/PE	6,70	6,57-6,84	3,24019E-10

<i>TSL1</i>							
Απουσία <i>SNCA</i>				Παρουσία <i>SNCA</i>			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
PE/PE	1,00	0,69-1,45	1	PE/PE	1,67	1,30-2,00	0,347935
EXP/PE	3,10	2,60-3,70	0,025205	EXP/PE	2,27	1,78-2,88	0,061195
PD/PE	26,07	20,56-33,02	6,49219E-06	PD/PE	42,77	38,86-47,16	8,9412E-11
ST/PE	12,77	10,22-16,09	4,55241E-07	ST/PE	21,05	16,48-26,80	1,3395E-07

TORI							
Απουσία SNCA				Παρουσία SNCA			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
PE/PE	1,00	0,98-1,01	1	PE/PE	0,94	0,89-0,95	0,976744898
EXP/PE	1,18	1,17-1,20	0,179594	EXP/PE	0,67	0,63-0,72	0,56633
PD/PE	1,91	1,50-2,39	0,013507	PD/PE	2,56	2,36-2,77	0,004839
ST/PE	4,49	4,15-4,73	6,85659E-05	ST/PE	4,17	3,79-4,63	0,001178502

ATG8							
Απουσία SNCA				Παρουσία SNCA			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
PE/PE	1,00	0,99-1,009	1	PE/PE	1,52	1,40-1,78	0,637613
EXP/PE	0,068	0,061-0,076	0,196287387	EXP/PE	0,053	0,048-0,059	0,265190251
PD/PE	7,00	6,49-7,60	1,52185E-07	PD/PE	3,26	2,35-4,42	1,17205E-06
ST/PE	29,30	27,90-30,60	9,84749E-10	ST/PE	18,06	17,07-19,08	1,07924E-10

Εναλλακτικά αυτής της προσέγγισης σύγκρισης της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των δύο κυτταρικών πληθυσμών παρατίθεται στο Πρόσθετο Υλικό-Πίνακας Π1 μία δεύτερη προσέγγιση όπου ως μηδενική υπόθεση ορίστηκε η αντίστοιχη φάση ανάπτυξης της συνθήκης βαθμονόμησης για την συνθήκη μελέτης. Ωστόσο, αντιλαμβάνεται κανείς πως οι δύο πίνακες ανάλυσης (ο πίνακας 4.1 και εκείνος του Π1), άρα και οι δύο διαφορετικές προσεγγίσεις αποτελούν απλώς μία διαφορετική έκφραση του ίδιου αποτελέσματος, η οποία θεωρείται πως ενισχύεται αλληλένδετα μεταξύ των δύο αναλύσεων. Ως εκ τούτου, αφού οι δύο προσεγγίσεις φαίνεται να συμφωνούν μεταξύ τους, ο σχολιασμός των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται ενιαία.

Κατά πρώτο λόγο, όσον αφορά τα αποτελέσματα έκφρασης του *TPSI*, φαίνεται πως στις πρώτες φάσεις ανάπτυξης, την προ-εκθετική και την εκθετική φάση, η παρουσία της α-συνουκλείνης δεν προκαλεί κάποια σημαντική απόκλιση στην έκφρασή του σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης στις συνθήκες απουσίας του *SNCA*. Τα επίπεδα έκφρασης δείχνουν να αυξάνονται συν τω χρόνω, γεγονός αναμενόμενο, αφού η βιοσύνθεση της τρεχαλόζης, άρα και της συνθάσης, αυξάνεται σε ατώτερες φάσεις ανάπτυξης του κυττάρου. Θα ανέμενε κανείς πως παρουσία της α-συνουκλείνης θα υπήρχαν συνθήκες στρες, οι οποίες θα αύξαναν σε ορισμένο βαθμό την μεταγραφή της συνθάσης, ώστε να παραχθεί περισσότερη τρεχαλόζη, βοηθητική για το κύτταρο, ωστόσο η χαμηλή έκφραση της α-συνουκλείνης σε αυτές τις φάσεις ανάπτυξης μαζί με την εντόπιση της στο κυτταρόπλασμα χωρίς τον σχηματισμό συσσωματωμάτων δεν αποτελούν στοιχεία πρωτεοτοξικού στρες. Κατά συνέπεια, τα ομοιοστατικά επίπεδα συνθάσης της τρεχαλόζης κρίνονται αναμενόμενα. Σημειώνεται επίσης πως στην κατεύθυνση αυτή βοηθά και η συνθήκη HEO που εφαρμόστηκε ώστε να αυξηθεί το εύρος ζωής των κυττάρων. Εν τούτοις, όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης του *TPSI* στην μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης και την στατική φάση, αυτά εμφανίζονται σημαντικά κατεσταλμένα παρουσία της α-συνουκλείνης σε σχέση με εκείνα απουσία αυτής. Ιδιαίτερα στην φάση γήρανσης των κυττάρων εμφανίζεται σημαντική καταστολή των μεταγραφικών επιπέδων της συνθάσης της τρεχαλόζης. Αυτή είναι και η φάση ανάπτυξης στην οποία παρατηρήθηκε και νωρίτερα ο τοξικός φαινότυπος κατά την χρονολογική γήρανση των κυττάρων και η οποία σχετίζεται με τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης του *SNCA*, μεμβρανική εντόπιση και σχηματισμό μικρού αριθμού συσσωματωμάτων. Κρίνοντας αποκλειστικά από την καταστολή των επιπέδων του γονιδίου αυτού, οδηγείται κανείς στο συμπέρασμα πως τα κύτταρα

υφίστανται ενδεχόμενο σημαντικό στρες κατά την παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και για το λόγο αυτό πιθανότατα δεν συνθέτουν την απαιτούμενη ποσότητα τρεχαλόζης για τις ανάγκες της στατικής φάσης, όπως υποδηλώνεται από το μειωμένο επίπεδο παραγωγής mRNA του αντίστοιχου γονιδίου.

Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης του *TPS2*, γονιδίου υπεύθυνου για την βιοσύνθεση της φωσφατάσης της τρεχαλόζης, αυτά δεν φαίνονται να παρουσιάζουν τις ίδιες σημαντικές μεταβολές με την συνθάση της τρεχαλόζης. Όπως και για την συνθάση, τα επίπεδα της φωσφατάσης φαίνονται να αυξάνονται κατά την παρέλευση του χρόνου, γεγονός το οποίο παραμένει αναμενόμενο με βάση την φυσιολογία του *S. cerevisiae*. Μάλιστα, δείχνουν να σταθεροποιούνται μεταξύ μετα-διαυξικής και στατικής φάσης. Τα επίπεδα έκφρασης αποδίδονται εξισορροπημένα μεταξύ των δύο πληθυσμών, εκτός της μικρής απόκλισης στην φάση γήρανσης, όπου παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης παρατηρείται μικρή καταστολή της έκφρασης, γεγονός το οποίο όμως παραμένει σημαντικό. Ως εκ τούτου, λαμβάνοντας υπόψιν την συνολική εικόνα των *TPS1* και *TPS2* θα μπορούσε να υποθεθεί πως η παραγωγή της τρεχαλόζης είναι κατεσταλμένη παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε σχέση με την απουσία αυτής. Φαίνεται λοιπόν πως σε αυτή την φάση γήρανσης η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη αντιστρέφει τις ευεργετικές συνέπειες της συνθήκης HEO, καταστέλλοντας τα μεταγραφικά επίπεδα των βιοσυνθετικών γονιδίων της τρεχαλόζης και αλλάζοντας τον φαινότυπο προς πιο τοξικές μορφές.

Την εικόνα της κατάστασης του συμπλόκου βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης την συμπληρώνει η έκφραση του γονιδίου *TSL1*, της πιο καθοριστικής ρυθμιστικής υπομονάδας για την ενεργοποίηση του συμπλόκου TPS. Και σε αυτό το γονίδιο τα επίπεδα έκφρασης στις πρώτες φάσεις ανάπτυξης, την προ-εκθετική και την εκθετική, παραμένουν εξισορροπημένα μεταξύ των δύο κυτταρικών πληθυσμών. Τα επίπεδα έκφρασης κατ' επέκταση και αυτού του γονιδίου συμφωνούν με την εικόνα που παρατηρήθηκε σε αυτές τις φάσεις ανάπτυξης με βάση τα επίπεδα έκφρασης των βιοσυνθετικών γονιδίων της τρεχαλόζης. Το σύμπλοκο TPS βρίσκεται σε ομοιοστατική ισορροπία στις πρώτες φάσεις ανάπτυξης, οι οποίες σχετίζονται με χαμηλή έκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και μη τοξικό φαινότυπο. Το πιο σημαντικό εύρημα ωστόσο παρατηρείται στις αψότερες φάσεις ανάπτυξης, κατά την μετα-διαυξική φάση και την στατική φάση. Σε αυτές τις φάσεις παρατηρείται υψηλή άνοδος της έκφρασης του *TSL1* παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε σχέση με απουσία αυτής. Το εύρημα αυτό ερμηνεύεται από τις αρχόμενες συνθήκες στρες που φαίνεται να υπάρχουν στο κύτταρο με βάση την άνοδο στην έκφραση του *SNCA* και ταυτόχρονα την είσοδο στην στατική φάση. Ως εκ τούτου, σύμφωνα με όσα είναι γνωστά για την λειτουργία του *TSL1* γίνεται αντιληπτό πως υπάρχει αυξημένη έκφραση του αρχικού σηματοδοτικού μόριου του συμπλόκου TPS, ωστόσο το ερέθισμα αυτό δεν φαίνεται να μεταφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των βιοσυνθετικών γονιδίων της τρεχαλόζης με βάση τα ευρήματα της έκφρασης των τελευταίων στις αψότερες φάσεις ανάπτυξης και ιδιαίτερα στην φάση γήρανσης.

Παράλληλα με την εικόνα της κατάστασης του συμπλόκου TPS μελετήθηκε και η έκφραση του γονιδίου *TOR1*. Η μελέτη της έκφρασής του θα παρουσίαζε πληροφορίες σχετικές με την γενικότερη μεταβολική κατάσταση του κυττάρου, ως μέρος του συμπλόκου TORC1, το οποίο ρυθμίζει σε σημαντικό βαθμό την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου ζυμομύκητα μέσω ενός καταρράκτη φωσφορυλιώσεων. Υπενθυμίζεται πως έμμεσα, μέσω της κινάσης Rim15, την οποία το σύμπλοκο TORC1 απενεργοποιεί, ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση γονιδίων του

στρες όπως εκείνα που αφορούν την βιοσύνθεση της τρεχαλόζης και την αυτοφαγία. Από την μελέτη του *TORI* προέκυψε κυρίως ένα σημαντικό εύρημα, το οποίο αφορούσε το επίπεδο έκφρασης του στην εκθετική φάση. Σε αυτό το στιγμιότυπο ζωής του ζυμομύκητα παρατηρήθηκε καταστολή των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, γεγονός το οποίο ερμηνεύεται ως αποτέλεσμα στρεσογόνων συνθηκών. Σε όλες τις υπόλοιπες φάσεις ανάπτυξης τα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των δύο συνθηκών παρατηρούνται ταυτόσημα. Με δεδομένο πως λόγω της συνθήκης HEO το σύμπλοκο TORC1 θα έχει κατασταλεί εκ των προτέρων, φαίνεται πως η παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης δεν το επηρεάζει σημαντικά. Παρ' όλα αυτά το εύρημα μείωσης της έκφρασής του στην εκθετική φάση θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως ένα αρχικό ερέθισμα συνθηκών στρες οι οποίες εγκαθίστανται κυρίως αργότερα στις απώτερες φάσεις ανάπτυξης και πιο ειδικά στην γήρανση, όπως έχει αποδειχθεί. Ωστόσο το αποτέλεσμα αυτό παραμένει προς συζήτηση με δεδομένο πως η έκφραση του *TORI* δεν ανιχνεύεται κατεσταλμένη στην μετα-διαυξική και στατική φάση. Μία εξήγηση πάντως θα μπορούσε να δοθεί από το γεγονός πως ο ζυμομύκητα παρουσία της HEO δεν χρησιμοποιεί το μεταβολικό μονοπάτι TOR για τις πρωτεύουσες μεταβολικές του ανάγκες.

Τέλος, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ATG8*, κύριου ρυθμιστικού επαγωγέα της αυτοφαγίας στον *S. cerevisiae*. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4.1, τα επίπεδα έκφρασης διακυμαίνονται σημαντικά και δείχνουν να επηρεάζονται από την παρουσία τόσο της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης όσο και της συνθήκης HEO. Λόγω της HEO κρίνεται πως τα μεταγραφικά επίπεδα αυτοφαγίας όπως αποτυπώνονται από το μελετώμενο γονίδιο μειώνονται κατά μεγάλο βαθμό από την προ-εκθετική στην εκθετική φάση, δεδομένου πως σε αυτό το στάδιο τα κύτταρα αξιοποιούν πληθώρα θρεπτικών στοιχείων και δεν είναι απαραίτητο να φέρουν ενεργοποιημένο τον μηχανισμό της αυτοφαγίας, οπότε επιφέρεται μία ισορροπία ομοιοστατικών φαινομένων. Στην συνέχεια, αντιθέτως, και καθώς τα κύτταρα εισέρχονται στην μετα-διαυξική φάση και έπειτα στην γήρανση ο μηχανισμός της αυτοφαγίας ήταν αναμενόμενο να ενεργοποιηθεί μεταγραφικά για την καλύτερη επιβίωση των κυττάρων. Παράλληλα, η παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και η έκφρασή της από την αρχή της ζωής του κυττάρου φαίνεται να προκαλεί στην προ-εκθετική φάση μία πολύ μικρή αύξηση των επιπέδων του *ATG8*, γεγονός αναμενόμενο αφού η αυτοφαγία χρησιμεύει ως αμυντικός μηχανισμός έναντι πρωτεοπαθειών. Υπενθυμίζεται ωστόσο πως η έκφραση του *SNCA* στην φάση αυτή είναι η χαμηλότερη που παρατηρήθηκε οπότε και η μεταγραφική επαγωγή της αυτοφαγίας είναι αναμενόμενο πως δεν θα παρουσίαζε μεγάλες διακυμάνσεις. Στην συνέχεια της ζωής του ζυμομύκητα, τα επίπεδα μεταγραφής του *ATG8* δείχνουν να καταστέλλονται παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης ειδικότερα και πάλι στις απώτερες φάσεις ανάπτυξης όπου παρατηρήθηκε και η μέγιστη έκφραση του *SNCA* και ο φαινότυπος τοξικότητας. Τούτο κρίνεται αναμενόμενο και σύμφωνα με πολλά στοιχεία άλλων μελετών, μιας και η τοξικότητα μέσω της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης συμπεριλαμβάνει την καταστολή του αμυντικού μηχανισμού της αυτοφαγίας τόσο μεταγραφικά όσο και μηχανιστικά.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της qPCR συνετέλεσαν στην εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων σχετικών με την μεταβολική κατάσταση των κυττάρων ζυμομύκητα και ειδικότερα της βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης, της αυτοφαγίας και της αίσθησης θρεπτικών στοιχείων. Φαίνεται πως αυτά τα συμπεράσματα συμβαδίζουν με τους εκάστοτε παρατηρούμενους φαινοτύπους, τοξικούς ή μη. Κατά τα πρώτα στάδια ζωής των κυττάρων φαίνεται πως η συνθήκη HEO δρα ευεργετικά και καταστέλλει τοξικές συνέπειες που προκύπτουν από την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη ταυτόχρονα με την μικρή

έκφραση αυτής, χωρίς την εμφάνιση συσσωματωμάτων και μεμβρανικής εντόπισης. Στα στάδια αυτά τα κύτταρα παρουσιάζουν ένα εξισορροπημένο μεταγραφικό προφίλ, το οποίο μόνο από μικρές μεταβολές στην γονιδιακή έκφραση μαρτυρά την παρουσία στρες από την α-συνουκλεΐνη. Όσο η ηλικία του κυττάρου αυξάνεται, το μεταγραφικό προφίλ μαρτυρά ισχυρές συνέπειες από την παρουσία της α-συνουκλεΐνης, την υψηλότερή της έκφραση και την μεμβρανική της εντόπιση ή/και την κυτταροπλασματική της συσσωμάτωση. Τα κύτταρα παρουσία της α-συνουκλεΐνης ενδεχομένως να βιοσυνθέτουν μικρότερες ποσότητες τρεχαλόζης, παρότι υπάρχει ισχυρό το ερέθισμα παραγωγής της. Μάλιστα, με την μεταγραφική καταστολή των βιοσυνθετικών γονιδίων της τρεχαλόζης και της ταυτόχρονης ύπαρξης του *SNCA* στο εσωτερικό των κυττάρων καταστέλλεται και ο μηχανισμός της αυτοφαγίας με τρόπο ανεξάρτητο του μονοπατιού TOR. Γίνεται έτσι αντιληπτό πως το κύτταρο στερείται δύο σημαντικών αμυντικών μηχανισμών, την μεταγραφική ενεργοποίηση για την βιοσύνθεση της τρεχαλόζης και την αυτοφαγία, παρότι με την εφαρμογή της HEO η τοξικότητα της α-συνουκλεΐνης φαινόταν αρχικά να επιβραδύνεται.

### **Μεταφορά του πλασμιδίου pCM190 και των ανασυνδυασμένων κλώνων του στα μεταλλαγμένα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 *tps1Δ*, *tps2Δ* και *ts11Δ*.**

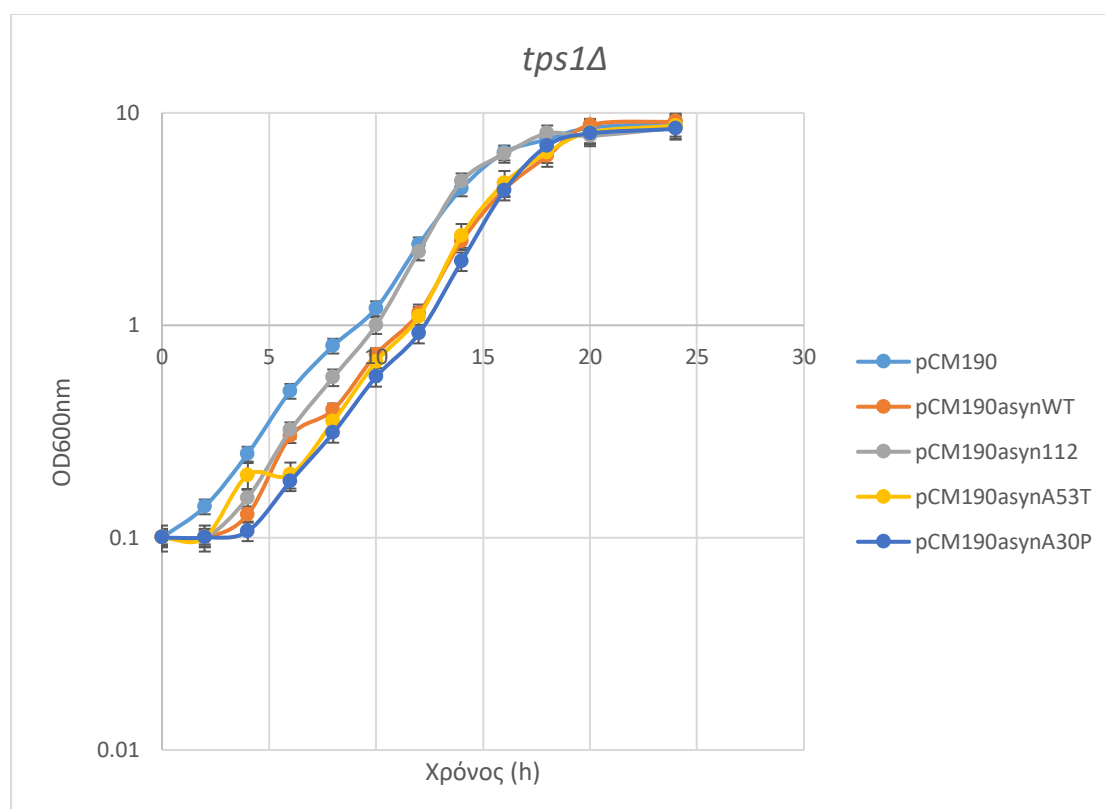
Μετά την μελέτη των κυττάρων *S. cerevisiae* BY4741 αγρίου τύπου και των φαινοτύπων που εμφανίζουν υπό την παρουσία της α-συνουκλεΐνης, θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθούν πιο ευαίσθητα στελέχη ζυμομύκητα τα οποία θα αναπαρήγαγαν ένα σταθερό μοντέλο τοξικότητας. Η επιλογή των στελεχών αυτών πραγματοποιήθηκε με στόχο να διερευνηθεί, παράλληλα με την τοξικότητα ή το στρες που επάγει η α-συνουκλεΐνη, και η εξάρτηση των φαινομένων αυτών από τον μεταβολισμό της ενδογενούς τρεχαλόζης. Επομένως, επιλέχθηκαν να μελετηθούν τα στελέχη *tps1Δ*, *tps2Δ* και *ts11Δ* (Κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, Πίνακας 3.1) . Όπως είναι γνωστό από την διεθνή βιβλιογραφία (Kyryakov et al., 2012) αλλά και αναμενόμενο με βάση την λειτουργία του *TPS1*, τα κύτταρα που έχουν απωλέσει την δραστηριότητα της συνθάσης της τρεχαλόζης αδυνατούν να βιοσυνθέσουν τρεχαλόζη σε οποιαδήποτε μορφή. Οπότε στερούνται του πλήθους των ευεργετικών δράσεων του δισακχαρίτη, οι οποίες αναλύθηκαν στην ενότητα της εισαγωγής. Τα κύτταρα του στελέχους *tps2Δ* έχουν απωλέσει την παραγωγή της φωσφατάσης της τρεχαλόζης και επομένως συσσωρεύουν 6-φωσφοτρεχαλόζη, η οποία δεν είναι δυνατό να αξιοποιηθεί από το κύτταρο όπως το πλήρες μόριο, επομένως η συσσώρευσή της μπορεί να επιφέρει τοξικότητα για το ίδιο. Παράλληλα, έχει αναφερθεί ότι τόσο η συνθάση, όσο και η φωσφατάση της τρεχαλόζης αλληλεπιδρούν με την κινάση Rim15, οπότε μπορεί κανείς να υποθέσει την σημαντικότητά της και στην γενικευμένη απόκριση στο στρες για τους ζυμομύκητες. Τέλος, για το στέλεχος *ts11Δ* είναι γνωστό πως μπορεί να βιοσυνθέσει τρεχαλόζη, αλλά φέρει αποσταθεροποιημένο το σύμπλοκο TPS, το οποίο δεν ανταποκρίνεται με την ίδια αποτελεσματικότητα στα ερεθίσματα του κυττάρου για την παραγωγή τρεχαλόζης σε σχέση με τα κύτταρα BY4741 αγρίου τύπου.

Η ενότητα του μετασχηματισμού των μεταλλαγμένων κυττάρων και ο εντοπισμός των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης του *SNCA* ανά στέλεχος κυττάρων παρουσιάζονται στο Πρόσθετο Υλικό-ενότητα Π7.

## Μελέτη της επίδρασης της $\alpha$ -συνουκλεΐνης στη βιωσιμότητα και το φαινότυπο των μεταλλαγμένων κυττάρων *S. cerevisiae*

### 4.9 Καμπύλες ανάπτυξης των μεταλλαγμένων μετασχηματισμένων *S.cerevisiae tps1Δ, tps2Δ* και *ts11Δ*

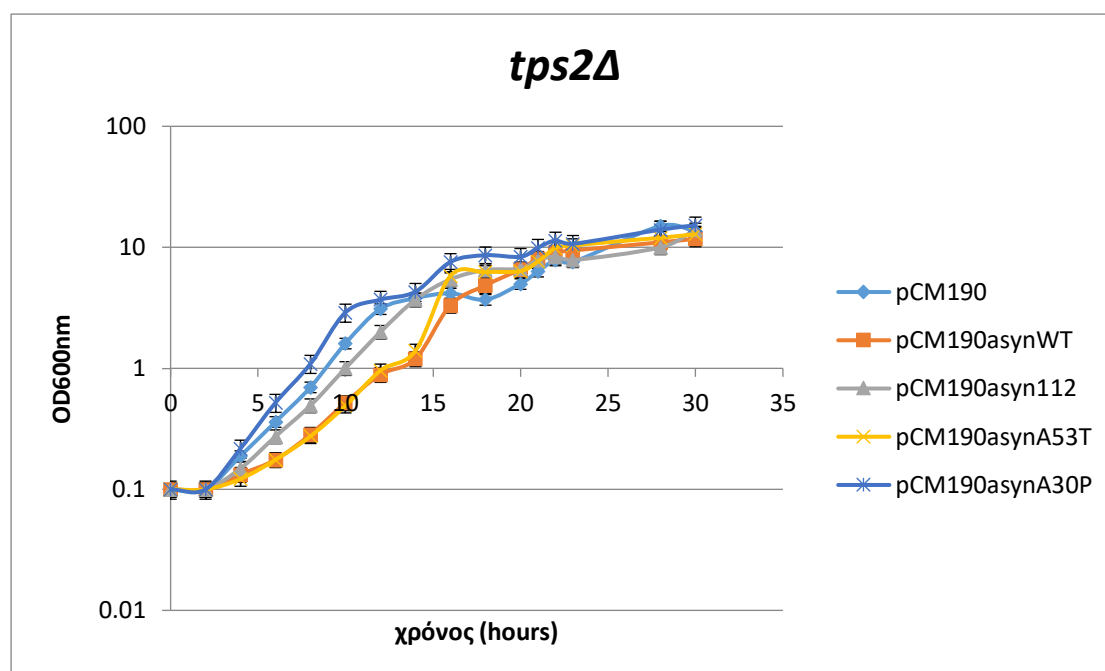
Εφόσον η παρουσία της εκάστοτε μορφής του γονιδίου *SNCA* επιβεβαιώθηκε όπως παρατηρήθηκε από τις πειραματικές διαδικασίες, το επόμενο βήμα ήταν η μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και των μεταλλαγμένων μορφών της. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή καμπυλών ανάπτυξης. Αυτές προέκυψαν μέσω μετρήσεων της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm από καλλιέργειες μετασχηματισμένων κυττάρων, οι οποίες αναπτύχθηκαν στους 30 °C σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο yeast synthetic drop-out media supplement without uracil, ώστε να διατηρήσουν το πλασμίδιο. Ακόμη, εφαρμόστηκε και εδώ η συνθήκη HEO με την προσθήκη 18% σορβιτόλης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν κατά τις πρώτες 24-30 ώρες ανάπτυξης των κυττάρων με αρχική οπτική πυκνότητα στα 600 nm ίση με 0,1. Οι καμπύλες των κυττάρων *tps1Δ*, *tps2Δ* και *ts11Δ* παρουσιάζονται στις εικόνες 4.11, 4.12 και 4.13 αντίστοιχα. Για το στέλεχος *tps2Δ* οι καμπύλες κατασκευάστηκαν στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας Ζόλδερ Σ., 2017, ωστόσο παρατίθενται και εδώ κατόπιν άδειας του συγγραφέα για συγκριτικούς λόγους.



**Εικόνα 4.11:** Καμπύλες ανάπτυξης 24 h του μετασχηματισμένου στελέχους *tps1Δ*

Παρατηρώντας το γράφημα της εικόνας 4.11 αντιλαμβάνεται κανείς μία σαφή διαφοροποίηση στην ανάπτυξη των κυττάρων. Ενώ κατά την προεκθετική φάση ανάπτυξης οι κυτταρικοί πληθυσμοί δείχνουν να συγκλίνουν σε ανάπτυξη, κατά την είσοδο στην εκθετική παρατηρείται ήπια επιβράδυνση της ανάπτυξης στα κύτταρα παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης αγρίου τύπου, A53T και A30P, σε σχέση με εκείνα

παρουσία του pCM190 ή της ισομορφής 112, τα οποία φέρουν ταυτόσημη ανάπτυξη. Για τις πρώτες τρεις μορφές μάλιστα τα κύτταρα δείχνουν να συγκλίνουν σε ανάπτυξη. Εν τούτοις, η παρουσία τους δείχνει απλώς να επιβραδύνει την ανάπτυξη των κυττάρων στην εκθετική φάση χωρίς όμως αυτά να χάνουν την δυνατότητα να εισέλθουν από τις 20 h και έπειτα στην μετα-διαυξική φάση. Αυτός ο φαινότυπος αποτελεί ένα νεότερο δεδομένο στην φυσιολογία του ζυμομύκητα, καθώς σε καμία προηγούμενη μελέτη κυτταρικής ανάπτυξης της διεθνούς βιβλιογραφίας δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην εκθετική φάση παρουσία οποιασδήποτε μορφής του *SNCA*, εκτός της περίπτωσης χρήσης εξωγενών παραγόντων τοξικότητας. Η ταυτόχρονη απουσία τρεχαλόζης και παρουσία  $\alpha$ -συνουκλεΐνης φαίνεται να εγκαθιστά ήπιες συνθήκες στρες, οι οποίες για αυτές τις πρώτες φάσεις ανάπτυξης δεν αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα στην φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων.



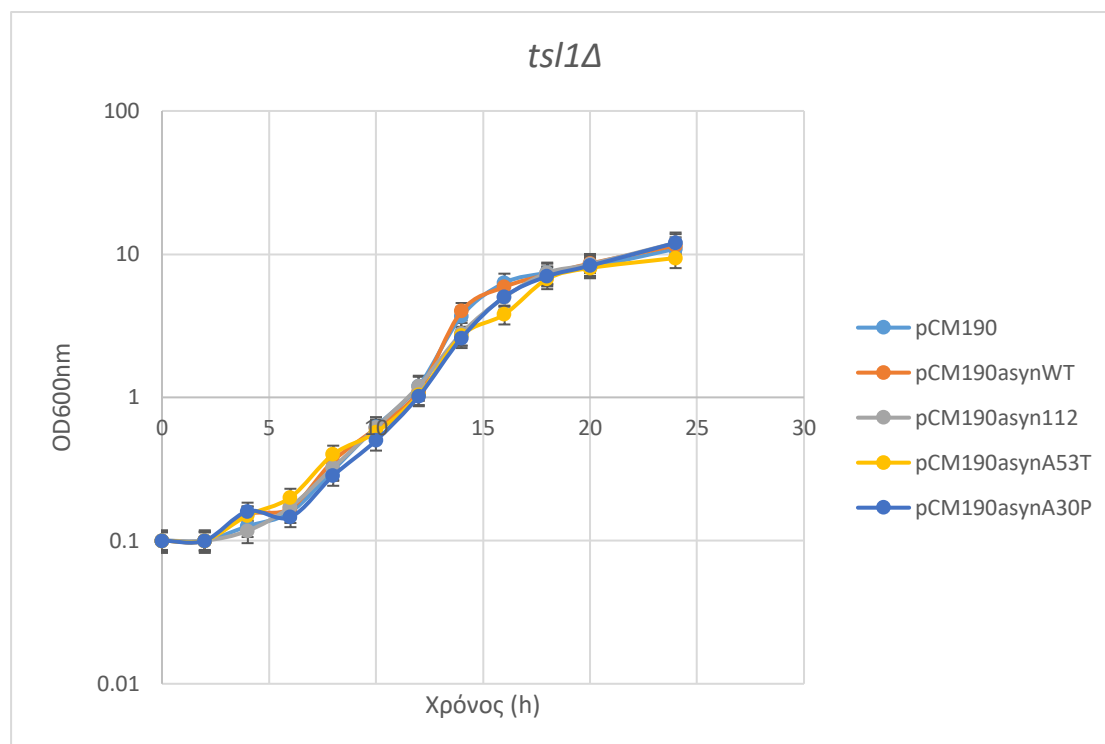
**Εικόνα 4.12:** Καμπύλες ανάπτυξης 24 h του μετασηματισμένου στελέχους *tps2Δ*

Σε ό,τι αφορά τα κύτταρα *tps2Δ* αρχικά παρατηρείται πως εκείνα που περιέχουν τις μορφές του *SNCA* αγρίου τύπου και A53T εμφανίζουν σημαντικά μειωμένη ανάπτυξη στην εκθετική φάση (μέχρι τις 16 h) σε σύγκριση με τα κύτταρα που φέρουν τον μη ανασυνδυασμένο φορέα pCM190. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ιδιαίτερα τοξική τάση των δύο παραπάνω μορφών. Όσον αφορά τα κύτταρα που φέρουν τη μεταλλαγή A30P, φαίνεται να παρουσιάζουν όμοια ανάπτυξη με εκείνα του φορέα-μάρτυρα pCM190. Ακόμη, στα κύτταρα που περιέχουν την ισομορφή 112 παρατηρείται ότι ο κυτταρικός τους πληθυσμός δείχνει να συγκλίνει με εκείνον των κυττάρων που περιέχουν τον μη ανασυνδυασμένο φορέα.

Όσον αφορά την μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης των κυττάρων (μετά τις πρώτες 24 h) παρατηρείται ότι οι κυτταρικοί πληθυσμοί αρχίζουν να συγκλίνουν στο ίδιο επίπεδο οπτικής πυκνότητας, γεγονός που υποδηλώνει μία ανάκαμψη των επιβαρυνμένων κυττάρων από το στρες της εκθετικής φάσης.

Ως εκ τούτου, κρίνεται πως η παρουσία της αγρίου τύπου  $\alpha$ -συνουκλεΐνης ή της μεταλλαγής A53T στα μεταλλαγμένα κύτταρα *tps2Δ* φαίνεται να επιβαρύνουν

σημαντικά την βιωσιμότητα και να αποδίδουν έναν ιδιαίτερα τοξικό φαινότυπο, συγκριτικά πιο επιβαρυνμένο από εκείνα των κυττάρων *tps1Δ*.



**Εικόνα 4.13:** Καμπύλες ανάπτυξης 24 h του μετασχηματισμένου στελέχους *ts1Δ*

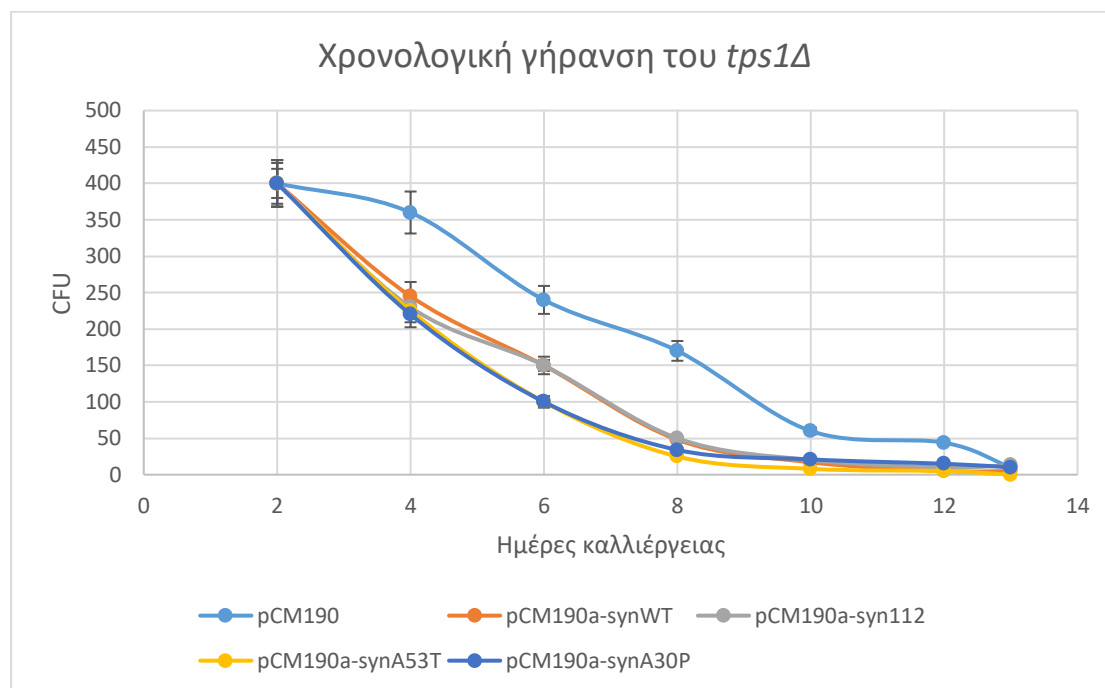
Τέλος, στις καμπύλες ανάπτυξης των κυττάρων *ts1Δ* παρατηρήθηκε πως η παρουσία οποιασδήποτε μορφής του *SNCA* δεν επιφέρει κάποια μεταβολή στην ανάπτυξη των κυττάρων συγκριτικά με τα κύτταρα που περιέχουν τον μη ανασυνδυασμένο φορέα και έχουν το ρόλο του αρνητικού μάρτυρα. Φαίνεται πως παρά την απουσία του γονιδίου *TS1*, η παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης δεν είναι και πάλι αρκετή ώστε να αναπαράγει κάποιο τοξικό φαινότυπο, όπως στο στέλεχος BY4741 αγρίου τύπου. Αυτό το εύρημα είναι αντίθετο με βιβλιογραφικές πηγές όπου αναφέρεται ότι το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσιάζει μεγάλο βαθμό θνησιμότητας παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Ωστόσο ο αντίθετος αυτός φαινότυπος πιθανόν να οφείλεται στην εφαρμογή της συνθήκης HEO, η οποία να δρα ευεργετικά για την ανάπτυξη των κυττάρων.

#### **4.10 Χρονολογική γήρανση των μεταλλαγμένων μετασχηματισμένων *S.cerevisiae tps1Δ, tps2Δ* και *ts1Δ***

Στην συνέχεια, η μελέτη των μετασχηματισμένων μεταλλαγμένων κυττάρων του ζυμομύκητα επεκτάθηκε σε πειράματα χρονολογικής γήρανσης, ώστε να διερευνηθεί η βιωσιμότητα των κυττάρων σε αυτή την συνθήκη. Οι μελέτες της μετα-διαυξικής και στατικής φάσης θεωρούνται άλλωστε και πιο κρίσιμες σε αυτά τα μεταλλάγματα, όχι μόνο λόγω της μοντελοποίησης της γήρανσης των ανθρώπινων κυττάρων, αλλά και λόγω των μεταβολών που παρουσιάζουν στην βιοσύνθεση της τρεχαλόξης. Εξάλλου είναι γνωστό πως η τρεχαλόξη συσσωρεύεται κυρίως στις φάσεις αυτές ως απόκριση στις αυξημένες συνθήκες στρες των κυττάρων και θεωρείται κρίσιμος παράγοντας αντοχής σε αυτές.

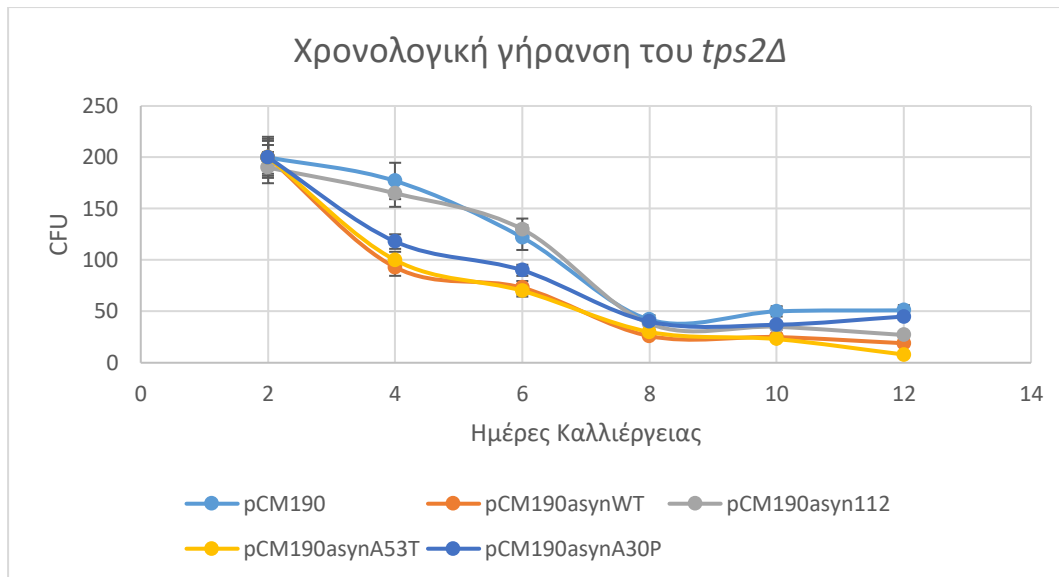


Οι καμπύλες χρονολογικής γήρανσης των μεταλλαγμένων μετασχηματισμένων κυττάρων *tps1Δ*, *tps2Δ* και *tsl1Δ* κατασκευάστηκαν με τον ίδιο πειραματικό σχεδιασμό όπως στην γήρανση των αγρίου τύπου BY4741. Τα γραφήματα τους παρουσιάζονται στις εικόνες 4.14, 4.15 και 4.16 αντίστοιχα.



**Εικόνα 4.15:** Χρονολογική γήρανση του μετασχηματισμένου στελέχους *tps1Δ*

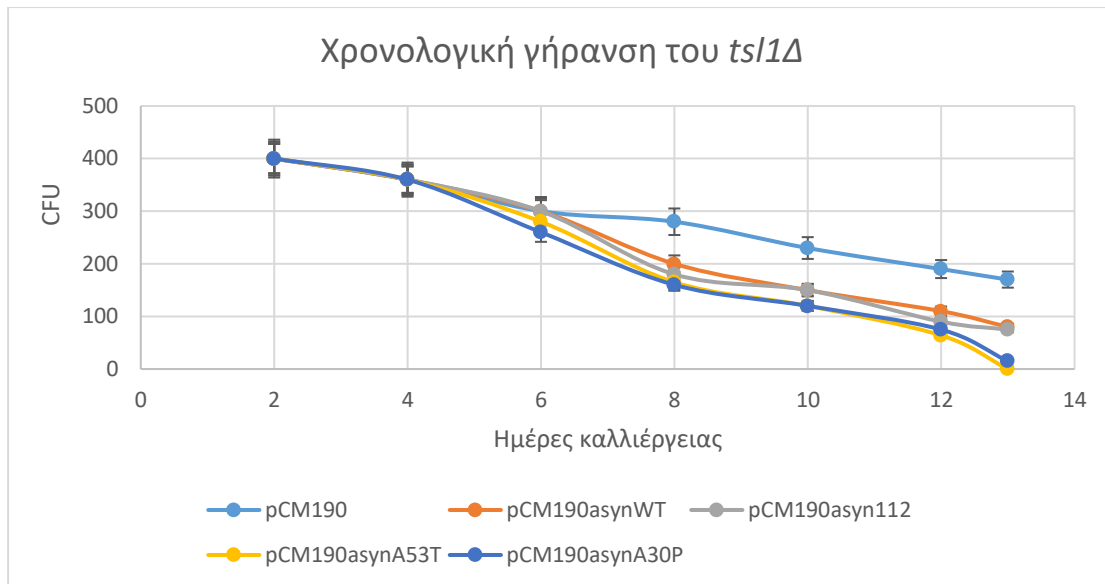
Στην παραπάνω γραφική παράσταση το πρώτο που παρατηρεί κανείς είναι η μειωμένη βιωσιμότητα των μεταλλαγμένων μετασχηματισμένων κυττάρων συγκριτικά με το στέλεχος που περιέχει τον φορέα pCM190 και αντιστοιχεί στον αρνητικό μάρτυρα. Συγκεκριμένα, στην αφετηρία της μετα-διαυξικής φάσης κατά την δεύτερη μέρα όλοι οι τύποι κυττάρων ξεκινούν με ίσο αριθμό αποικιών. Εντούτοις, κατά την 4η μέρα υφίστανται σημαντική πτώση της βιωσιμότητας τους όσα κύτταρα φέρουν τις μορφές του *SNCA* σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Στην πορεία του χρόνου και κατά την 6η μέρα καλλιέργειας παρατηρείται στα κύτταρα με τις σημειακές μεταλλάξεις A53T και A30P του *SNCA* περαιτέρω πτώση της βιωσιμότητας συγκριτικά με αυτά που φέρουν τις μορφές αγρίου τύπου και ισομορφής 112. Την 8η μέρα καλλιέργειας των κυττάρων και μέχρι και τη 12η όλα τα κύτταρα που φέρουν οποιαδήποτε μορφή του *SNCA* συγκλίνουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα βιωσιμότητας σε σχέση με εκείνα με τον μη ανασυνδυασμένο φορέα, για να εκμηδενιστούν σχεδόν τελείως τις επόμενες ημέρες συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα στο τέλος του πειράματος (13η ημέρα).



**Εικόνα 4.16:** Χρονολογική γήρανση του μετασηματισμένου στελέχους *tps2Δ*

Όπως παρατηρήθηκε και στις καμπύλες ανάπτυξης, έτσι και στα διαγράμματα της γήρανσης τα κύτταρα με την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη αγρίου τύπου και εκείνα με την μεταλλαγή της A53T επιβαρύνθηκαν περισσότερο όσον αφορά την βιωσιμότητα τους σε σύγκριση με τα κύτταρα που περιέχουν τον μη ανασυνδυασμένο φορέα και την ισομορφή 112. Επιπλέον, αντίθετα με την καμπύλη ανάπτυξης, φαίνεται στη γήρανση ότι επιβαρύνθηκε σχεδόν εξίσου και η καλλιέργεια με τη μεταλλαγή A30P. Συγκεκριμένα, και σε αυτή την περίπτωση κυτταρικής γήρανσης οι κυτταρικοί πληθυσμοί φέρουν κοινή αφετηρία μετρούμενων αποικιών. Εντούτοις, η βιωσιμότητα των κυττάρων που φέρουν τις παραπάνω μορφές της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης παρουσιάζουν μειωμένη βιωσιμότητα μέχρι και την 6η ημέρα χρονολογικής γήρανσης συγκριτικά με αυτά που φέρουν την ισομορφή 112 και τον φορέα pCM190. Όλα τα κύτταρα συγκλίνουν στην 8η μέρα γήρανσης και καταλήγουν στην 12η ημέρα με λίγες διαφοροποιήσεις.

Ως εκ τούτου, παρατηρείται ότι οι πιο τοξικές μορφές  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε αυτό το στέλεχος είναι η αγρίου τύπου και οι μεταλλαγές A30P και A53T καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του κυττάρου.

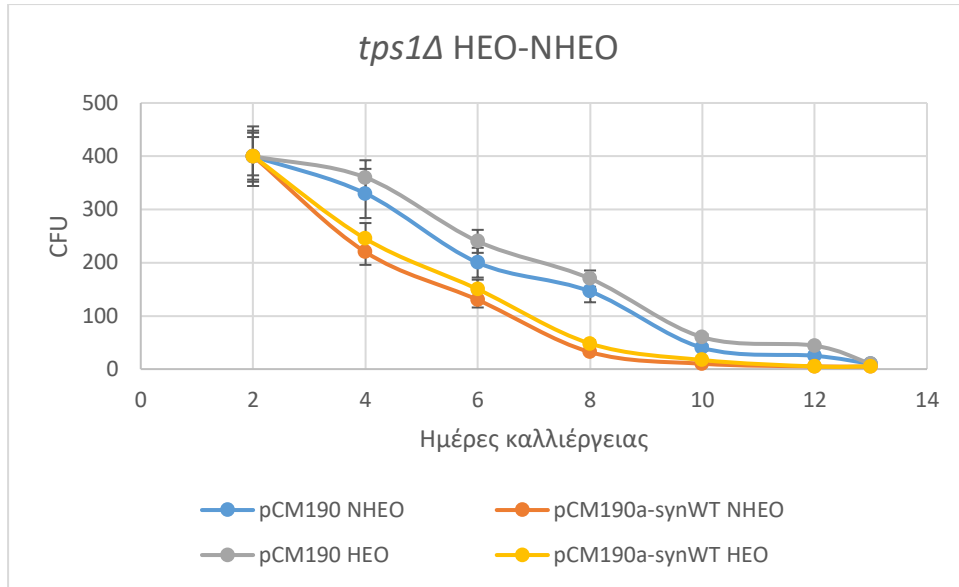


**Εικόνα 4.17:** Χρονολογική γήρανση του μετασηματισμένου στελέχους *ts1Δ*

Όσον αφορά το στέλεχος *ts1Δ*, φαίνεται πως η χρονολογική του γήρανση αποδίδει μόνο ήπια φαινόμενα στην τοξικότητα που διαμεσολαβείται από την α-συνουκλεΐνη ή τις μεταλλαγμένες μορφές της. Με βάση την παραπάνω γραφική παράσταση χρονολογικής γήρανσης οι πρώτες διαφοροποιήσεις στην κυτταρική βιωσιμότητα υπό την παρουσία της α-συνουκλεΐνης συγκριτικά με τα κύτταρα του μη ανασυνδυσμένου φορέα εμφανίζονται κατά την 8η μέρα ζωής των καλλιέργειών, όπου τα κύτταρα τα οποία φέρουν μορφές του *SNCA* παρουσιάζουν μεγαλύτερη θνησιμότητα. Ωστόσο, με βάση τις τιμές που λαμβάνουν οι τιμές CFU στην συγκεκριμένη χρονική περίοδο οι διαφοροποιήσεις αυτές κρίνεται πως αποτυπώνουν μία ήπιας μορφής στρες. Στην πάροδο του χρόνου, οι διαφορές αυτές συνεχίζουν να εμφανίζονται σε σταθερό ρυθμό και επίπεδο, τηρουμένης και της πτώσης στην βιωσιμότητας των *ts1Δ*/pCM190.

Κατά συνέπεια κρίνεται πως η παρουσία οποιασδήποτε μορφής του *SNCA* και η απουσία του *ts1Δ* δεν αναπαράγει κάποιο τοξικό φαινότυπο εξαρτώμενο από την α-συνουκλεΐνη. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα στοιχεία της διεθνούς βιβλιογραφίας (Willingham et al., 2003), αλλά συμφωνεί με τον συλλογισμό πως παρά την σημαντικότητα του μορίου Tsl1p για το σύμπλοκο TPS, τα πιο τοξικά φαινόμενα αποδίδονται κατά την απουσία των βιοσυνθετικών γονιδίων της τρεχαλόζης.

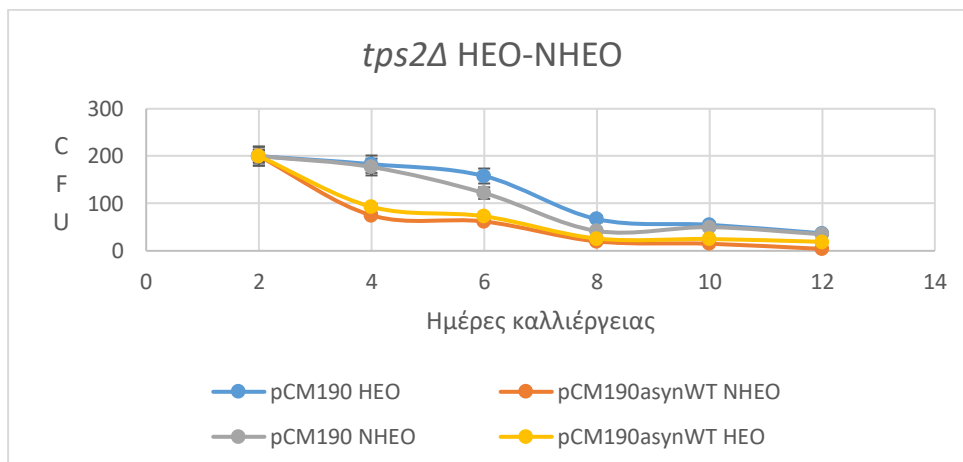
Επιπροσθέτως των παραπάνω συμβατικών καμπυλών χρονολογικής γήρανσης, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί το εύρος ζωής των μεταλλαγμένων μετασηματισμένων στελεχών που περιείχαν την α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου συγκριτικά με αυτά που περιείχαν τον πλασμιδιακό φορέα pCM190, τόσο παρουσία της συνθήκης υψηλής εξωτερικής οσμωτικότητας (HEO) όσο και απουσία αυτής (NHEO). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, παρουσία σορβιτόλης 18% ο μεταβολισμός των κυττάρων εκτρέπεται στην βιοσύνθεση γλυκερόλης και τρεχαλόζης ως κύρια μεταβολικά θρεπτικά στοιχεία. Η συγκριτική καταγραφή του φαινοτύπου στα μεταλλαγμένα στελέχη υπό τις δύο αυτές συνθήκες παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι η βιοσύνθεση της τρεχαλόζης αναμένεται ελαττωματική. Οι γραφικές παραστάσεις της χρονολογικής γήρανσης των μεταλλαγμένων κυττάρων *tps1Δ*, *tps2Δ* και *ts1Δ* στις συνθήκες HEO και NHEO παρουσιάζονται στις εικόνες 4.18, 4.19 και 4.20, αντίστοιχα.



**Εικόνα 4.18:** Χρονολογική γήρανση του μετασηματισμένου στελέχους *tps1Δ* παρουσία HEO και απουσία HEO (NHEO)

Από τη σύγκριση των δύο κυτταρικών πληθυσμών *tps1Δ*/pCM190 στις δύο συνθήκες διακρίνεται μία ήπια ευεργετική δράση της HEO. Συγκεκριμένα, μετά την 2η ημέρα τα κύτταρα παρουσία HEO εμφανίζουν ηπιότερη πτώση στην βιωσιμότητά τους σε σχέση με εκείνα απουσία HEO (κυρίως κατά την 6η ημέρα), έως ότου έρθουν σε σύγκλιση μετά τη 12η ημέρα. Αφετέρου, στα κύτταρα *tps1Δ*/pCM190a-synWT φαίνεται πως η συνθήκη HEO φέρει πολύ μικρή αύξηση στην κυτταρική βιωσιμότητα με τις τιμές των σχηματιζόμενων αποικιών να διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους σε όλα τα στάδια της χρονολογικής γήρανσης.

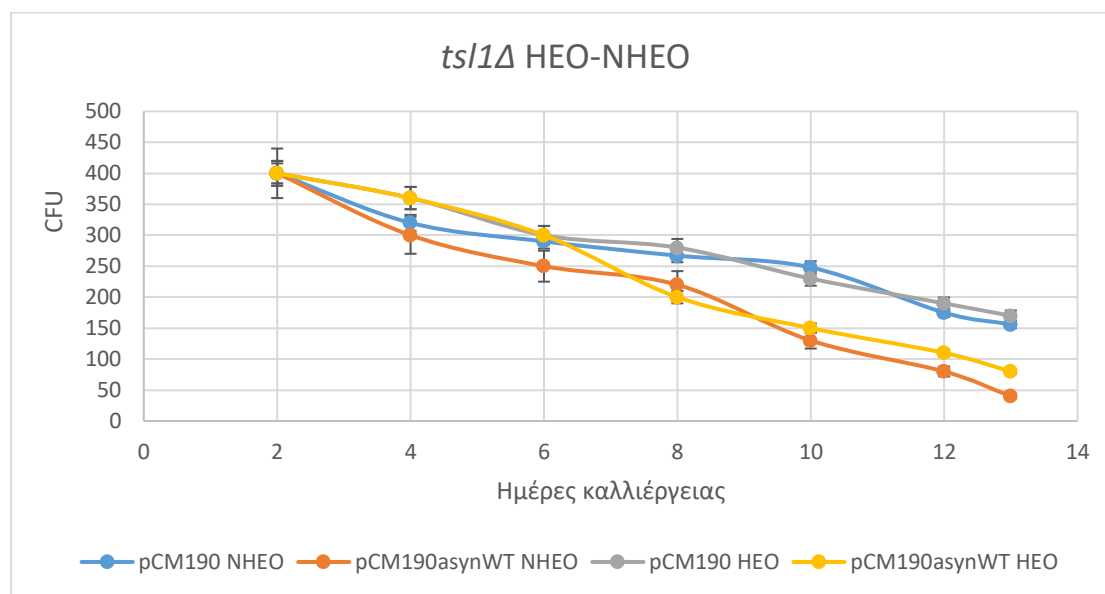
Δεδομένου ότι η συνθήκη HEO ωθεί τα κύτταρα να παράγουν γλυκερόλη και τρεχαλόζη, στα μεταλλαγμένα στελέχη ενδεχομένως παράγεται σχεδόν αποκλειστικά μόνο γλυκερόλη, στην οποία μπορεί να οφείλεται η μικρή ευεργετική δράση στη βιωσιμότητα κατά τη γήρανση. Η παρουσία της α-συνουκλεΐνης καταργεί πιθανότατα και αυτή την μικρή θετική επίδραση, φαινόμενο το οποίο αποδεικνύει πως ο συνδυασμός της α-συνουκλεΐνης με την απουσία της τρεχαλόζης αποτελεί ένα επιβαρυντικό στοιχείο για τα κύτταρα ζυμομυκήτων.



**Εικόνα 4.19:** Χρονολογική γήρανση του μετασηματισμένου στελέχους *tps2Δ* παρουσία HEO και απουσία HEO (NHEO)

Από την σύγκριση των πληθυσμών *tps2Δ*/pCM190 στις δύο συνθήκες (εικόνα 4.19) φαίνεται πως η ευεργετική δράση της συνθήκης HEO περιορίζεται στην μετα-διαυξική φάση μετά την 4<sup>η</sup> και μέχρι την 8<sup>η</sup> ημέρα. Εν τούτοις, όπως παρατηρήθηκε και στην απουσία της συνθάσης, κατά την απουσία της φωσφατάσης της τρεχαλόζης η συνθήκη HEO ελάχιστα βελτιώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων που φέρουν το SNCA, όπως προκύπτει από την σύγκριση των *tps2Δ*/pCM190asynWT μεταξύ τους στις δύο συνθήκες.

Φαίνεται λοιπόν πως η παρουσία της φωσφατάσης της τρεχαλόζης αποτελεί επίσης σημαντική παράμετρο για την ευεργετική επίδραση της HEO παρουσία της ασυνουκλεΐνης, ενώ η απουσία της δεν αποδεικνύεται το ίδιο σημαντική για την δράση της HEO στην γενικότερη βιωσιμότητα κυττάρων ζύμης χωρίς ετερόλογου-εξωγενούς πρωτεοτοξικού στρες.



**Εικόνα 4.20:** Χρονολογική γήρανση του μετασχηματισμένου στελέχους *ts1Δ* παρουσία HEO και απουσία HEO (NHEO)

Από τη σύγκριση των δύο κυτταρικών πληθυσμών *ts1Δ*/pCM190 μεταξύ των δύο συνθηκών διαπιστώνεται ότι στην ουσία δεν υπάρχει ευεργετική επίδραση της συνθήκης HEO σε καμία φάση της ηλικίας τους. Αυτό μπορεί να αποτελεί γεγονός αναμενόμενο με βάση την σημαντικότητα της ρυθμιστικής υπομονάδας Tsl1p για την ρύθμιση του συμπλέγματος βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης. Εν τη απουσία της, το σύμπλοκο πιθανότατα δεν φέρει την ίδια ευαισθησία ρύθμισης οπότε και πιθανότατα δεν παράγονται σημαντικές ποσότητες τρεχαλόζης ικανές για την ευεργετική επίδραση της HEO.

Παράλληλα, κατά την σύγκριση των κυττάρων *ts1Δ*/pCM190asynWT στις δύο συνθήκες μεταξύ τους διαπιστώνεται πως υπάρχει μία ήπια ευεργετική επίδραση της HEO στην κυτταρική βιωσιμότητα κατά τις ημέρες 4 και 6, ενώ και στο τέλος της στατικής φάσης, τις 13 ημέρες καλλιέργειας, τα κύτταρα παρουσία HEO παρουσιάζουν ανώτερο κατώφλι βιωσιμότητας από ότι απουσία HEO. Φαίνεται επομένως πως η συνθήκη HEO προσδίδει παρουσία του SNCA μία ηπιότερη πτώση στην κυτταρική βιωσιμότητα.

Συνοψίζοντας, παρατηρείται συνολικά η αναγκαιότητα και των τριών γονιδίων του συμπλέγματος TPS για την ευεργετική επίδραση της συνθήκης ΗΕΟ στα κύτταρα ζύμης γεγονός που αναδεικνύει και τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν τα μόρια αυτά στις συνθήκες στρες και προσαρμογής στο στρες για τα εν λόγω κύτταρα.

#### **4.11 Μελέτη των επιπέδων έκφρασης του *SNCA* στα μεταλλαγμένα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae tps1Δ, tps2Δ* και *tsl1Δ***

Έπειτα από τις μελέτες βιωσιμότητας των μεταλλαγμένων στελεχών ζυμομύκητα, στις οποίες παρατηρήθηκαν ποικίλες συνέπειες της παρουσίας της α-συνουκλεΐνης σε αυτά, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης στην διάρκεια ζωής των κυττάρων ζυμομύκητα σε συνδυασμό με τα επίπεδα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης και να αποκτηθεί μία αντίληψη της υπερέκφρασής ή/και συσσωμάτωσής της στην πάροδο του χρόνου σε συνδυασμό με την απουσία κάθε γονιδίου υπεύθυνου για τον μεταβολισμό της τρεχαλόζης στο εκάστοτε μεταλλαγμένο στέλεχος. Για την προσέγγιση αυτή ακολουθήθηκαν δύο πειραματικές διαδικασίες όπως και προηγουμένως: η ανοσοδοκιμασία κατά Western και η qPCR.

Κατά την ανοσοδοκιμασία κατά Western απομονώθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από το κάθε μεταλλαγμένο στέλεχος στις τέσσερις μελετώμενες φάσεις ανάπτυξης στην συνθήκη ΗΕΟ: την προ-εκθετική φάση με οπτική πυκνότητα  $OD_{600nm}=0,6$ , την εκθετική φάση με οπτική πυκνότητα  $OD_{600nm}=2$ , την μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης στην οποία εισέρχεται ο ζυμομύκητας μετά τις 24 πρώτες ώρες ζωής και την στατική φάση με αρχικό όριο την όγδοη ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων ζύμης. Έπειτα 100 μg αυτών μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη και επώαστηκαν με αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης. Ο μάρτυρας ισοφόρτωσης ήταν και σε αυτή την περίπτωση η πρωτεΐνη PGK1.

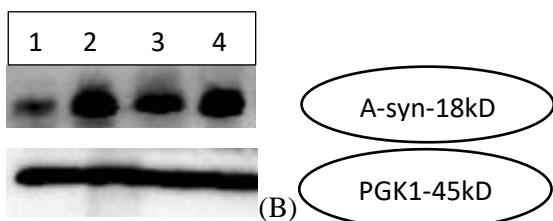
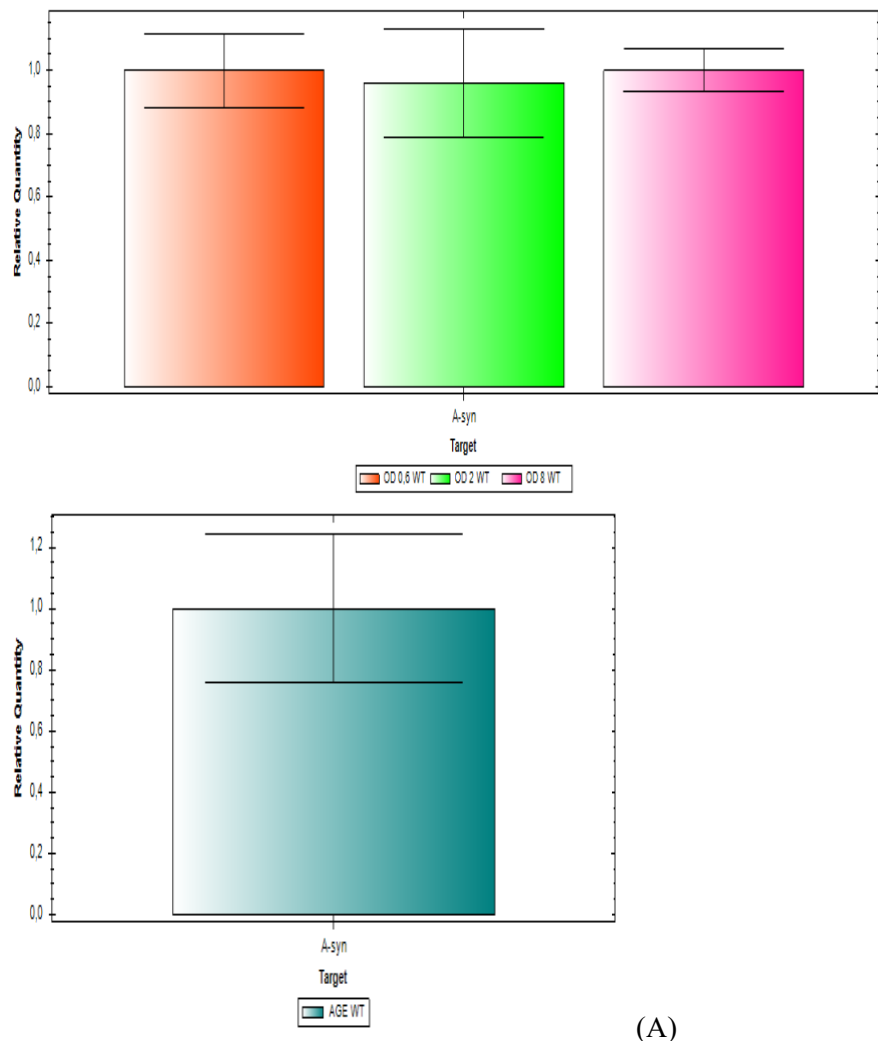
Για τις μελέτες της έκφρασης της α-συνουκλεΐνης μέσω qPCR, πραγματοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση απομόνωση τριών ολικών RNA από τρεις διαφορετικές καλλιέργειες ζυμομυκήτων για κάθε στέλεχος και για κάθε μελετώμενη φάση ανάπτυξης στην συνθήκη ΗΕΟ. Στην συνέχεια κατασκευάστηκαν τα cDNA από κάθε δείγμα RNA της κάθε βιολογικής συνθήκης για κάθε στέλεχος. Για την εκτέλεση των αντιδράσεων qPCR χρησιμοποιήθηκαν εκείνα τα cDNA που αντιστοιχούσαν σε συγκέντρωση RNA 0,5 ng. Το κάθε cDNA φορτώθηκε για αντίδραση εις τριπλούν για να επιτευχθεί στατιστική σημαντικότητα. Μαζί με την ενίσχυση των cDNA του *SNCA* ενισχύθηκαν και τα cDNA του *ACT1*, το οποίο αποτέλεσε το γονίδιο αναφοράς των αντιδράσεων. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε αυτοματοποιημένα μέσω του λογισμικού CFX Manager της εταιρείας Bio-Rad με εφαρμογή της μεθόδου  $\Delta C_T$  με την χρήση ενός γονιδίου αναφοράς.

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για τις μελέτες qPCR ήταν το ίδιο με προηγουμένως και αναφέρεται στην αντίστοιχη ενότητα στα Υλικά και Μέθοδοι. Απαραίτητη ήταν και η παρουσία των αρνητικών μαρτύρων χωρίς υπόστρωμα αντίδρασης, ενώ οι αρνητικοί μάρτυρες μη αντίστροφης μεταγραφής ελέγχθηκαν με απλή PCR, χωρίς να παρουσιάσουν κάποιο προϊόν.

Τα αποτελέσματα της έκφρασης της α-συνουκλεΐνης στο επίπεδο των πρωτεϊνών και του mRNA για τις 4 φάσεις ανάπτυξης παρουσιάζονται από κοινού για το κάθε

στέλεχος, ώστε να διευκολύνεται και η συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Δυστυχώς, οι μελέτες qPCR για το στέλεχος *tps2Δ* δεν απέδωσαν αποτελέσματα ανάλυσης, πιθανότατα λόγω της ίδιας της παθογένειας που χαρακτηρίζει την βιολογία του εν λόγω στελέχους και της ποιότητας του RNA που απομονώθηκε τόσο στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας Ζόλδερ Σ., 2017, όσο και στα πλαίσια της παρούσας διατριβής. Για το λόγο αυτό για το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσιάζεται μόνο η ανοσοδοκιμασία κατά Western, η οποία εκτελέστηκε στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας Ζόλδερ Σ., 2017 και παρουσιάζεται εδώ κατόπιν άδειας του συγγραφέα.

Οι εικόνες 4.21, 4.22 και 4.23 περιλαμβάνουν τις αναλύσεις έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης για τα στελέχη *tps1Δ*, *tps2Δ* και *tsl1Δ*, αντίστοιχα.

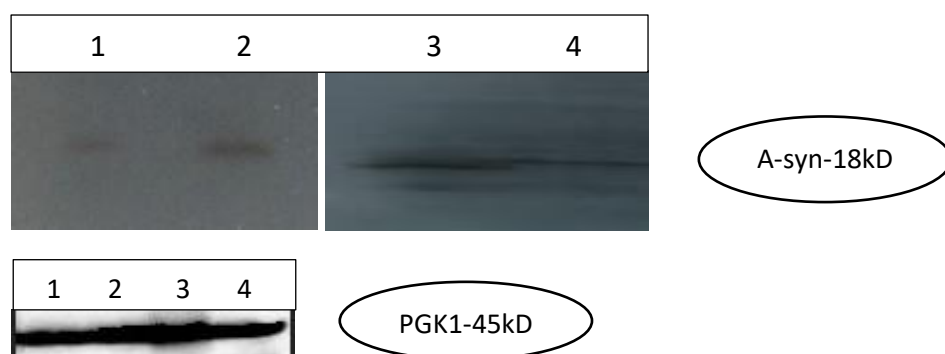


**Εικόνα 4.21: Επίπεδα έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στο στέλεχος *tps1Δ* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae*. (A) Μελέτες qPCR. Η σχετική έκφραση απεικονίζεται στην προ-εκθετική φάση με πορτοκαλί, στην εκθετική φάση με πράσινο, στη μετα-διαυξική φάση με ροζ και στη στατική φάση με μπλε. (B) Ανοσοδοκιμασία κατά Western.**

Φορτώθηκαν 100 μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα anti- $\alpha$ -synuclein (1/1000) (Acris Antibodies) και anti-PGK1 (1/10000) (Acris Antibodies). Επίπεδο έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και της PGK1 στην προεκθετική φάση ανάπτυξης (1), στην εκθετική φάση ανάπτυξης (2), στην μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης (3) και στην στατική φάση ανάπτυξης (4).

Οι παρατηρήσεις αυτές βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της ανοσοδοκιμασίας Western τουλάχιστον για τις τρεις από τις 4 φάσεις ανάπτυξης που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, όπου φαίνεται ότι η ποσότητα της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης αυξάνεται από την προ-εκθετική φάση στην εκθετική φάση και παραμένει στο ίδιο υψηλό σταθερό επίπεδο έκφρασης στις άλλες δύο φάσεις ανάπτυξης. Ακόμα, συμπληρώνουν και ερμηνεύουν και σε ορισμένο βαθμό τον φαινότυπο των καμπυλών ανάπτυξης και ειδικότερα της χρονολογικής γήρανσης, όπου υπήρχε πραγματική επιβάρυνση παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης.

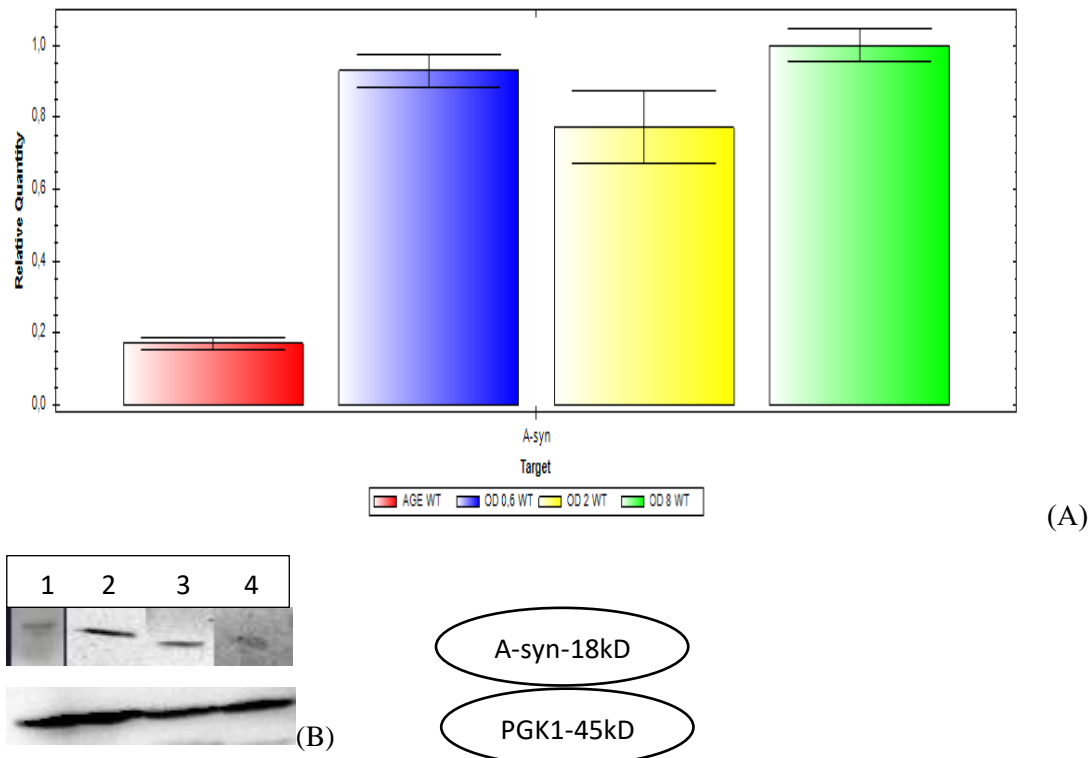
Η έκφραση του *SNCA* στο στέλεχος *tps1Δ* είναι σχεδόν διπλάσια συγκριτικά με αυτή του αγρίου τύπου BY4741 (Παράγραφος 4.7) στις δύο πρώτες φάσεις ανάπτυξης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο της τρεχαλόζης παρουσία ενός τοξικού παράγοντα όπως η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη, αλλά και το ότι η συνθήκη HEO δεν δρα το ίδιο αποτελεσματικά στα μεταλλαγμένα κύτταρα, όπως το πράττει στα αγρίου τύπου. Το τελευταίο άλλωστε αποτελεί και αναμενόμενο γεγονός αφού το μεταλλαγμένο κύτταρο στερείται τον έναν από τους δύο εναλλακτικούς μεταβολίτες που βιοσυνθέτει στην συνθήκη HEO (γλυκερόλη και τρεχαλόζη).



**Εικόνα 4.22: Επίπεδα έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στο στέλεχος *tps2Δ* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae* μέσω ανοσοδοκιμασίας κατά Western.** Φορτώθηκαν 100 μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα anti- $\alpha$ -synuclein (1/1000) (Acris Antibodies) και anti-PGK1 (1/10000) (Acris Antibodies). Επίπεδο έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και της PGK1 στην προεκθετική φάση ανάπτυξης (1), στην εκθετική φάση ανάπτυξης (2), στην μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης (3) και στην στατική φάση ανάπτυξης (4).

Για το στέλεχος *tps2Δ*, όπως παρατηρείται στην εικόνα 4.22, τα επίπεδα έκφρασης βαίνουν αυξανόμενα από την προεκθετική στην εκθετική φάση και σταθεροποιούνται στα επίπεδα αυτά μέχρι την στατική φάση. Για την εξαγωγή συμπερασμάτων απαιτούνται επιπλέον πειράματα που θα περιλαμβάνουν πιο ευαίσθητες μεθόδους.





**Εικόνα 4.23: Επίπεδα έκφρασης της α-συνουκλεΐνης στο στέλεχος *tps1Δ* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae*. (A) Μελέτες qPCR. Με μπλε απεικονίζεται η σχετική έκφραση στην προ-εκθετική φάση, με κίτρινο η σχετική έκφραση στην εκθετική φάση, με πράσινο η σχετική έκφραση στην μετα-διαυξική φάση και με κόκκινο η σχετική έκφραση στην στατική φάση. (B) Ανοσοδοκιμασία κατά Western. Φορτώθηκαν 100 μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα anti-α-synuclein (1/1000) (Acris Antibodies) και anti-PGK1 (1/10000) (Acris Antibodies). Επίπεδο έκφρασης της α-συνουκλεΐνης και της PGK1 στην προεκθετική φάση ανάπτυξης (1), στην εκθετική φάση ανάπτυξης (2), στην μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης (3) και στην στατική φάση ανάπτυξης (4).**

Αναφορικά, τώρα, με τα επίπεδα έκφρασης της α-συνουκλεΐνης στο στέλεχος *ts11Δ*, σύμφωνα με τις μελέτες qPCR της εικόνας 4.23 φαίνεται πως το *SNCA* μεταγράφεται σε υψηλά και σχετικά εξισορροπημένα επίπεδα στις πρώτες φάσεις ανάπτυξης με μικρές διακυμάνσεις. Το γεγονός, ωστόσο, που προκαλεί έκπληξη ως μη αναμενόμενο είναι η μειωμένη έκφραση του γονιδίου στην στατική φάση.

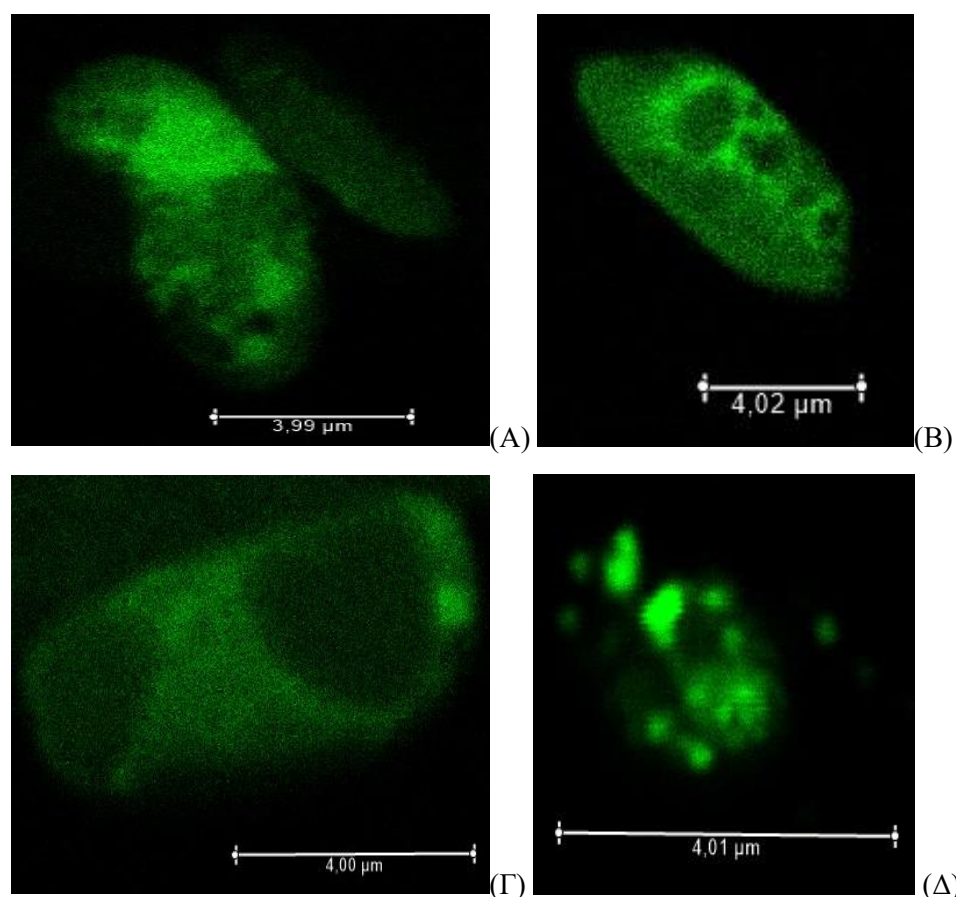
Αντίστοιχα, τα ανιχνευόμενα επίπεδα στην ανοσοδοκιμασία κατά Western (εικόνα 4.23, B) φαίνεται να συμφωνούν με εκείνα του ενισχυόμενου mRNA της qPCR. Παρατηρείται και με αυτή την μέθοδο ότι τα επίπεδα έκφρασης είναι υψηλότερα στις πρώτες φάσεις ανάπτυξης έναντι της στατικής.

Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν με την ήπια τοξικότητα που εμφανίζεται στο στέλεχος αυτό από την επίδραση της α-συνουκλεΐνης. Φαίνεται πως ο κυριότερος λόγος της ταυτόσημης με το αγρίου τύπου στέλεχος βιωσιμότητας αποτελεί η μείωση της έκφρασης του *SNCA* στην στατική φάση. Ακόμη, η μειωμένη έκφραση στην στατική φάση αποτελεί και τον πιθανό λόγο για τον οποίο, στην παρούσα εργασία, δεν παρατηρείται ο ακραία τοξικός φαινότυπος, αντίθετα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Willingham et al., 2003).

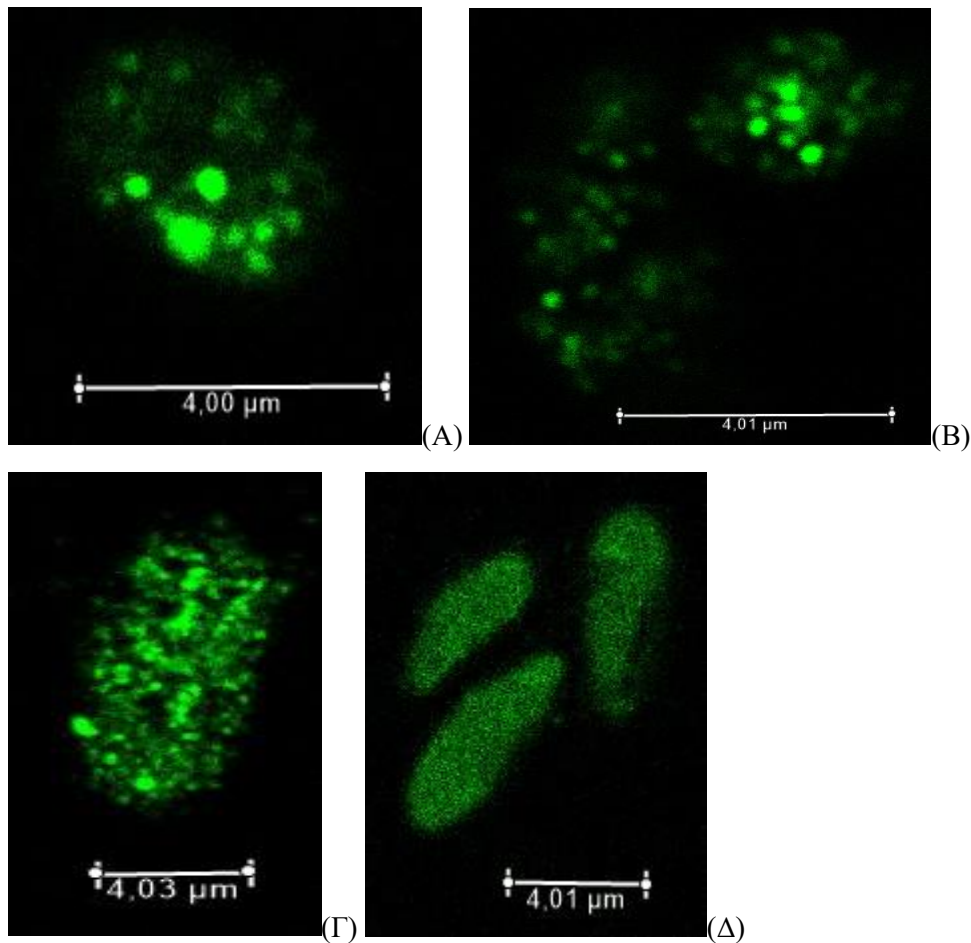
#### 4.12 Εντόπιση και κατανομή της εκφραζόμενης $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα μεταλλαγμένα στελέχη *S. cerevisiae tps1Δ*, *tps2Δ* και *tsl1Δ* μέσω ανοσοφθορισμού

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού με στόχο την παρατήρηση του εντοπισμού και της κατανομής της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα μεταλλαγμένα στελέχη. Όπως και κατά την μελέτη του BY4741, ο ανοσοφθορισμός στα μεταλλαγμένα στελέχη πραγματοποιήθηκε στην εκθετική και την στατική φάση.

Οι φωτογραφίες που ελήφθησαν κατά την συνεστιακή μικροσκοπία για το στέλεχος *tps1Δ* παρουσιάζονται στις εικόνες 4.24 και 4.25 για την εκθετική και την στατική φάση αντίστοιχα.



**Εικόνα 4.24:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε κύτταρα εκθετικής φάσης ανάπτυξης του *S. cerevisiae tps1Δ*. (Κλίμακα 4  $\mu\text{m}$ ) Στις εικόνες Α, Β και Δ παρατηρούνται κύτταρα με κυτταροπλασματικά συσσωματώματα και περιοργανιδιακή κατανομή, ενώ στην εικόνα Γ παρατηρείται και κυτταροπλασματική κατανομή της πρωτεΐνης. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]



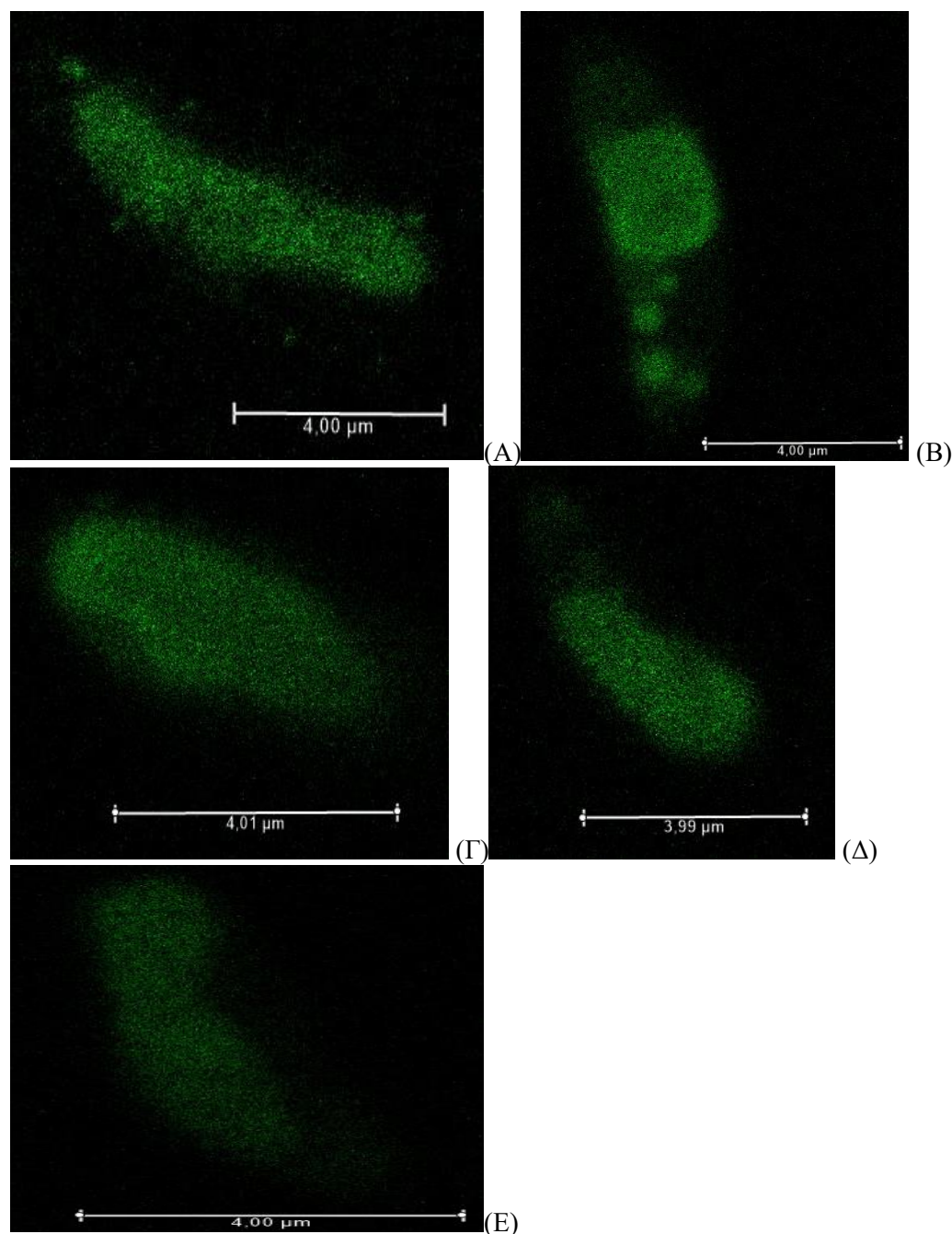
**Εικόνα 4.25:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε κύτταρα στατικής φάσης ανάπτυξης του *S. cerevisiae tps1Δ*. (Κλίμακα 4  $\mu\text{m}$ ) Στις εικόνες A, B και Γ παρατηρούνται κύτταρα με κυτταροπλασματικά συσσωματώματα, ενώ στην εικόνα Δ παρατηρείται και κυτταροπλασματική κατανομή της πρωτεΐνης. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]

Παρατηρώντας τις φωτογραφίες της εικόνας 4.24 για την εκθετική φάση του *tps1Δ*, αντιλαμβάνεται κανείς πως τα φαινόμενα τοξικότητας για το στέλεχος αυτό ξεκινούν από νωρίς στην ηλικιακή του πορεία. Η εικόνα της κυτταροπλασματικής συσσωμάτωσης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στην πλειονότητα των κυττάρων αποτελεί σίγουρα ένα τοξικό φαινόμενο, για το οποίο υπήρχε ήδη η υποψία εγκατάστασής του από τον φαινότυπο της καμπύλης ανάπτυξης των 24 h του στελέχους αυτού μαζί με τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης. Μάλιστα, το φαινόμενο τοξικότητας ενισχύεται περαιτέρω καθώς τα κύτταρα περνούν στην στατική φάση (Εικόνα 4.25) υπό τα συνεχώς αυξημένα επίπεδα έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Η συσσωμάτωση της πρωτεΐνης αυξάνεται περισσότερο και έτσι μπορεί να ερμηνευτεί ο φαινότυπος και της χρονολογικής γήρανσης για το συγκεκριμένο μεταλλαγμένο στέλεχος.

Οι παραπάνω εικόνες αποτελούν σημαντικά ευρήματα, ιδιαίτερα αν συγκριθούν με εκείνες για το στέλεχος BY4741, για το οποίο ο φαινότυπος έφερε ήπια φαινόμενα τοξικότητας. Η σύγκριση των δύο στελεχών προσφέρει την δυνατότητα ανάδειξης της σημασίας της τρεχαλόζης για τις κυτταρικές λειτουργίες και το πρωτεοτοξικό στρες. Στο στέλεχος στο οποίο δεν υπάρχει βιοσύνθεση της τρεχαλόζης η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη συσσωρεύεται από τα πρώιμα στάδια ζωής του κυττάρου έως τα απώτερα, γεγονός

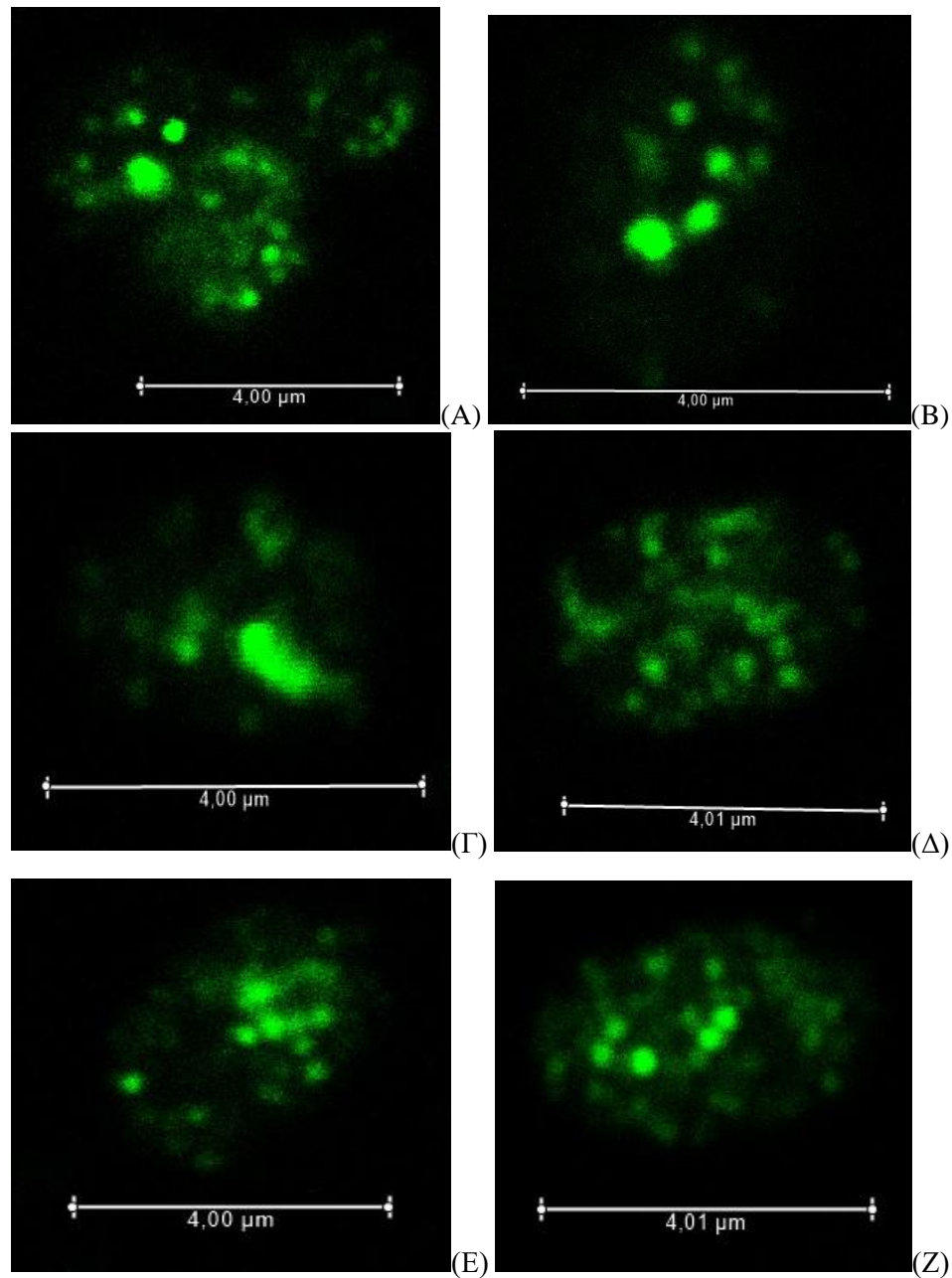
που αποτελεί σπάνιο φαινόμενο για τα κύτταρα αγρίου τύπου. Είναι γνωστό ότι η απουσία τρεχαλόζης στερεί από το κύτταρο τις ευεργετικές της δράσεις στην αποδιάταξη λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, ενώ αποσυντονίζει πιθανότατα την εκκαθάρισή τους μέσω της ρύθμισης της αυτοφαγίας.

Οι φωτογραφίες που ελήφθησαν κατά την συνεστιακή μικροσκοπία για το στέλεχος *tps2Δ* για την εκθετική και την στατική φάση παρουσιάζονται στις εικόνες 4.26 και 4.27 αντίστοιχα.



**Εικόνα 4.26:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε κύτταρα εκθετικής φάσης ανάπτυξης του *S. cerevisiae tps2Δ*. (Κλίμακα 4  $\mu\text{m}$ ) Στις εικόνες A, Δ και E παρατηρούνται κύτταρα με κυτταροπλασματική κατανομή της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, ενώ στην εικόνα Γ παρατηρείται εντόπισή της στην μεμβράνη. Στην εικόνα B παρατηρούνται κυτταροπλασματικά συσσωματώματα. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris

Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]

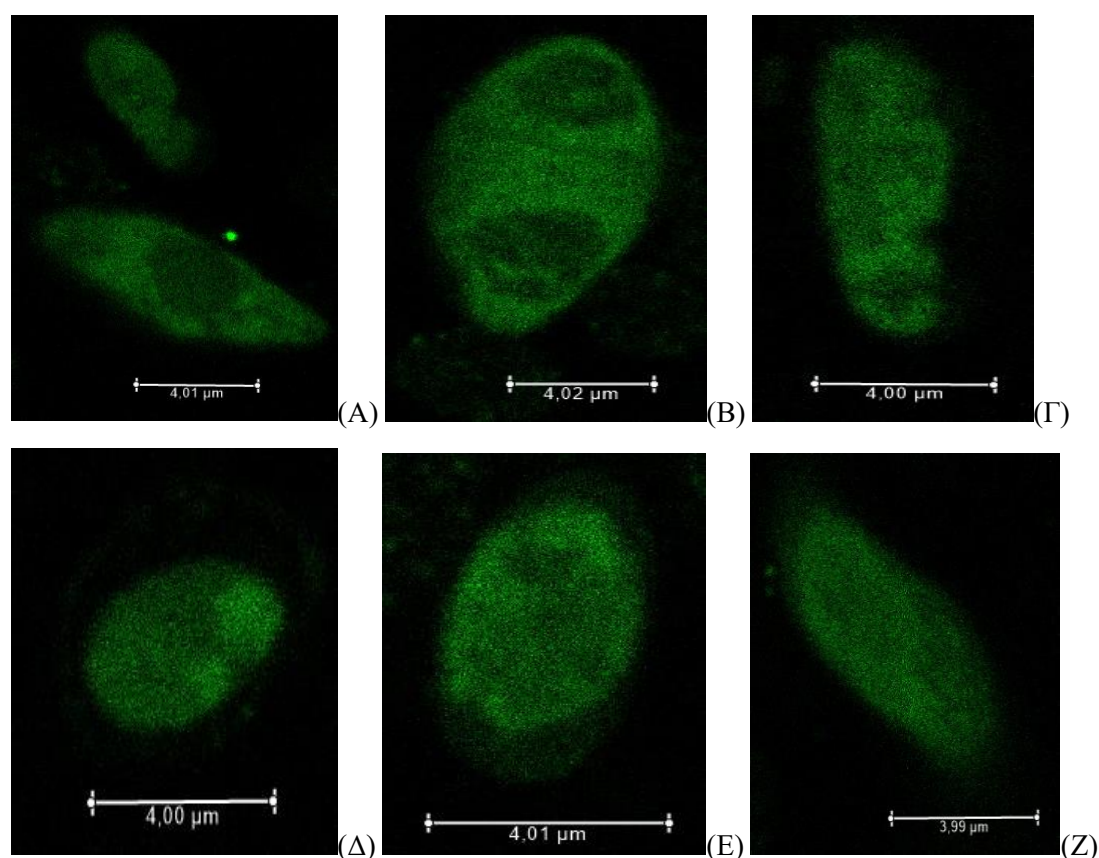


**Εικόνα 4.27:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στην στατική φάση ανάπτυξης του *S. cerevisiae tps2Δ*. (Κλίμακα 4  $\mu\text{m}$ ) Σε όλες τις εικόνες παρατηρούνται κυτταροπλασματικά συσσωματώματα. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]

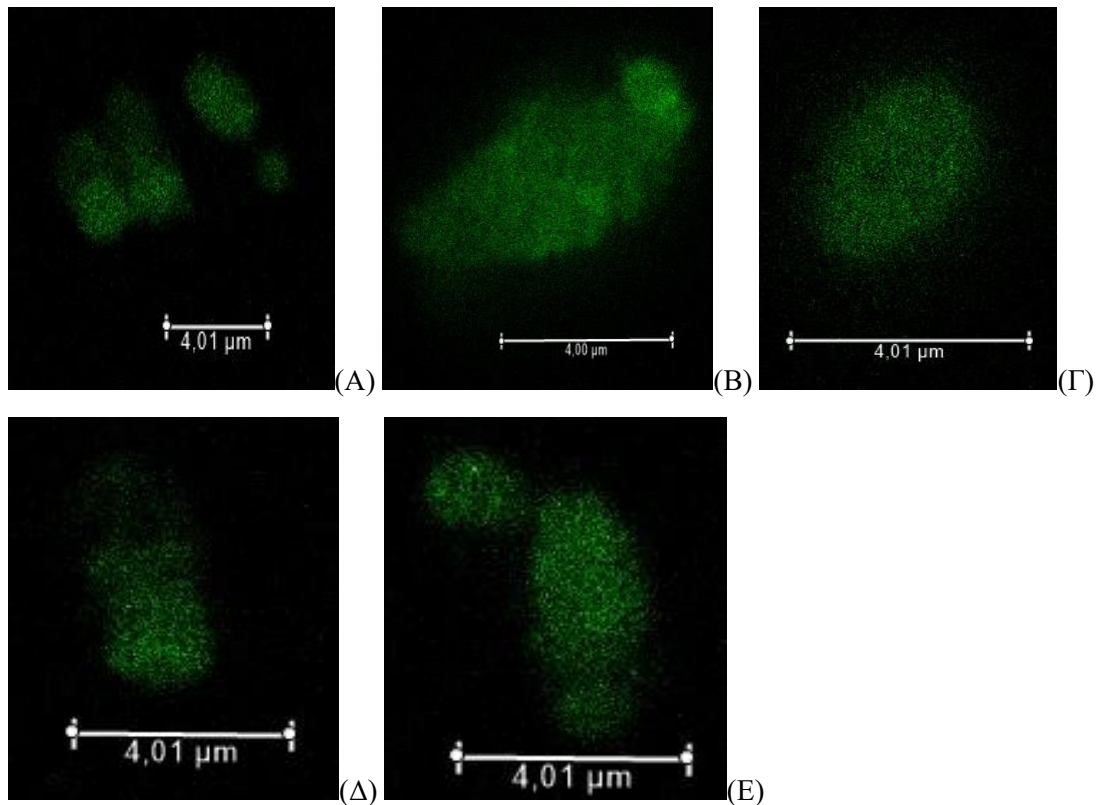
Από τις φωτογραφίες του μικροσκοπίου για το στέλεχος *tps2Δ* παρατηρείται μικτός φαινότυπος εντοπισμού της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στο πρώιμο στάδιο ανάπτυξης με κυτταροπλασματική και μεμβρανική κατανομή αλλά και παρουσία συσσωματωμάτων (Εικόνα 4.26). Στη στατική φάση παρατηρούνται καθολικά κυτταροπλασματικά συσσωματώματα τα οποία παραπέμπουν σε ισχυρά τοξική επίδραση.

Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία ιδιαίτερα με το φαινότυπο της χρονολογικής γήρανσης, όπου το στέλεχος παρουσία του *SNCA* παρουσιάζει εμφανώς μειωμένη βιωσιμότητα σε σύγκριση με το αντίστοιχο στέλεχος αγρίου τύπου, παρά την εφαρμογή της συνθήκης ΗΕΟ και το μέτριο επίπεδο έκφρασης της α-συνουκλεΐνης στο *tps2Δ*. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το γονίδιο της φωσφατάσης της τρεχαλόζης αποτελεί και αυτό ιδιαίτερα σημαντικό συστατικό για την εφαρμογή της συνθήκης. Ακόμα, η συσσώρευση της 6-φωσφοτρεχαλόζης ενδέχεται να έχει τοξικές συνέπειες στα κύτταρα και άρα αποτελεί έναν επιπρόσθετο επιβαρυντικό παράγοντα στον ήδη τοξικό φαινότυπο που απορρέει από την αυξημένη έκφραση του *SNCA*.

Τέλος, η μελέτη της εντόπισης και της κατανομής της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα των μεταλλαγμένων στελεχών ζυμομύκητα ολοκληρώθηκε με τον ανοσοφθορισμό στο στέλεχος *ts11Δ*. Οι φωτογραφίες μικροσκοπίας για την εκθετική και την στατική φάση του εν λόγω στελεχούς παρουσιάζονται στις εικόνες 4.28 και 4.29, αντίστοιχα.



**Εικόνα 4.28:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της α-συνουκλεΐνης σε κύτταρα εκθετικής φάσης ανάπτυξης του *S. cerevisiae ts11Δ*. (Κλίμακα 4 μm) Στις εικόνες A, B, Γ και Δ παρατηρούνται κύτταρα με κυτταροπλασματική κατανομή της α-συνουκλεΐνης, ενώ στις εικόνες E και Z παρατηρείται και μεμβρανική εντόπισή της. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]



**Εικόνα 4.29:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε κύτταρα στατικής φάσης ανάπτυξης του *S. cerevisiae ts11Δ*. (Κλίμακα 4  $\mu\text{m}$ ) Σε όλες τις εικόνες παρατηρούνται κύτταρα με κυτταροπλασματική κατανομή της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]

Όπως είχαν αναδείξει και οι προηγούμενες μεθοδολογίες μελέτης του στελέχους *ts11Δ*, από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι το παρόν στέλεχος δεν φαίνεται να αναπαράγει κάποιο επιβαρυνμένο φαινότυπο, εφόσον καθ' όλη την διάρκεια ζωής τους τα συγκεκριμένα μεταλλαγμένα κύτταρα εμφανίζουν σχεδόν αποκλειστικά μόνο κυτταροπλασματική εντόπιση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και καθόλου συσσωματώματα αυτής. Τα στοιχεία αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της qPCR και της ανοσοαποτύπωσης όπου απεικονίζεται με σαφήνεια η μείωση της έκφρασής της στο στάδιο της στατικής φάσης. Ο φαινότυπος των εν λόγω κυττάρων παρουσιάζει ομοιότητα με εκείνον των κυττάρων BY4741, γεγονός που υποδηλώνει ότι η όποια επίδραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης είναι ήπια παρά την έλλειψη του *TSL1*. Επίσης, διαφαίνεται πως η συνθήκη HEO μπορεί να φέρει επίδραση όπως αυτή του αγρίου τύπου στελέχους, παρά την σημαντικότητα που μπορεί να φέρει η απουσία της ρύθμισης από το Tsl1p και την μέτρια απορρύθμιση του βιοσυνθετικού συμπλόκου TPS.

Παρατηρώντας, πλέον συνολικά τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων που αφορούσαν τη βιωσιμότητα, την έκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και την κατανομή της στα μεταλλαγμένα στελέχη μπορεί κανείς να χαρακτηρίσει ως μείζονος σημασίας για την εκδηλωμένη τοξικότητα τα βιοσυνθετικά γονίδια της τρεχαλόζης και ήσσονος σημασίας το ρυθμιστικό της μόριο. Άλλωστε είναι δεδομένο πως το *ts11Δ* βιοσυνθέτει ικανοποιητικές ποσότητες τρεχαλόζης, ενώ τα *tps1Δ* και *tps2Δ* φέρουν σημαντικότερη επιβάρυνση της βιοσύνθεσής της (Kyryakov et al., 2012).

**Μελέτη της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται δυνητικά στην εκδήλωση τοξικότητας στα μεταλλαγμένα *Saccharomyces cerevisiae* σε πραγματικό χρόνο**

**4.13 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των *TPS2*, *TSL1*, *ATG8* και *TOR1* στα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae tps1Δ* με χρήση qPCR**

Όπως και στα κύτταρα αγρίου τύπου BY4741 έτσι και στα κύτταρα *tps1Δ* πραγματοποιήθηκε η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των *TPS2*, *TSL1*, *ATG8* και *TOR1*, ώστε να διερευνηθούν και σε αυτή την περίπτωση μεταβολικά μονοπάτια και στοιχεία που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση της τρεχαλόζης ή ρυθμίζονται από αυτήν.

Τα πειράματα qPCR πραγματοποιήθηκαν και αναλύθηκαν όπως αναφέρεται στην ενότητα Υλικά & Μέθοδοι καθώς και στην παράγραφο 4.8 της παρούσας ενότητας με τις ίδιες συνθήκες και μεθοδολογίες καθολικά.

Για κάθε συνθήκη υπήρξε το δείγμα μελέτης, το οποίο αποτελούσε τον πληθυσμό των κυττάρων παρουσία της α-συνουκλεΐνης και το δείγμα βαθμονόμησης, δηλαδή ο πληθυσμός των κυττάρων *tps1Δ* απουσία έκφρασης της α-συνουκλεΐνης (*tps1Δ* /pCM190) και ως μηδενική υπόθεση ορίστηκε η προ-εκθετική φάση των τελευταίων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.

**Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPS2*, *TSL1*, *ATG8* και *TOR1* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae tps1Δ* με μηδενική υπόθεση την προ-εκθετική φάση της συνθήκης βαθμονόμησης.** Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με EXP η εκθετική φάση, με PD η μετά-διαυξική φάση και με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η αναλογία συνθηκών που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά για τον υπολογισμό του μέσου όρου.

<i>TPS2</i>							
Απουσία SNCA				Παρουσία SNCA			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
PE/PE	1,00	0,92-1,08	1	PE/PE	0,73	0,71-0,75	0,014689
EXP/PE	0,89	0,88-0,90	0,010281	EXP/PE	1,658	1,657-1,660	0,231076
PD/PE	3,04	2,99-3,11	4,26016E-05	PD/PE	2,12	2,11-2,13	0,000844342
ST/PE	1,66	1,64-1,67	0,037347136	ST/PE	1,82	1,79-1,84	0,067125224

<i>TSL1</i>							
Απουσία SNCA				Παρουσία SNCA			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
PE/PE	1,00	0,96-1,04	1	PE/PE	0,397	0,39-0,40	6,99075E-05
EXP/PE	1,92	1,73-2,13	0,180207608	EXP/PE	1,98	1,86-2,10	0,266729326
PD/PE	12,58	12,00-13,22	5,91422E-10	PD/PE	12,88	12,45-13,30	6,02291E-10
ST/PE	7,20	6,96-7,52	3,12408E-08	ST/PE	6,533	6,532-6,560	1,22462E-07



ATG8							
Απουσία SNCA				Παρουσία SNCA			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
PE/PE	1,00	0,95-1,04	1	PE/PE	1,10	0,96-1,20	0,992813
EXP/PE	0,80	0,68-0,94	0,769401	EXP/PE	1,16	1,06-1,28	0,980292
PD/PE	35,13	32,48-38,00	2,16856E-05	PD/PE	30,71	29,50-31,90	3,73326E-05
ST/PE	11,06	9,69-12,60	0,000367	ST/PE	7,00	6,59-7,43	3,73326E-05

TOR1							
Απουσία SNCA				Παρουσία SNCA			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
PE/PE	1,00	0,952-1,05	1	PE/PE	0,56	0,50-0,61	0,093317
EXP/PE	1,28	1,26-1,33	0,017082	EXP/PE	0,68	0,66-0,69	0,004971
PD/PE	3,97	3,75-4,24	3,84262E-07	PD/PE	6,84	6,46-7,24	5,97408E-11
ST/PE	5,20	4,79-5,65	5,95603E-08	ST/PE	3,53	3,51-3,55	1,704E-08

Ομοίως με προηγουμένως, εναλλακτικά αυτής της προσέγγισης σύγκρισης της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των δύο κυτταρικών πληθυσμών παρατίθεται στο Πρόσθετο Υλικό-Πίνακας Π2 μία δεύτερη προσέγγιση όπου ως μηδενική υπόθεση ορίστηκε η αντίστοιχη φάση ανάπτυξης της συνθήκης βαθμονόμησης για την συνθήκη μελέτης. Εφόσον όπως παρατηρείται οι δύο προσεγγίσεις φαίνεται να συμφωνούν μεταξύ τους, ο σχολιασμός των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται ενιαία.

Σε ό,τι αφορά το γονίδιο *TPS2*, το επίπεδο έκφρασής του παρουσίασε ήπια διακύμανση. Παρατηρήθηκε κάποια άνοδος της έκφρασής του παρουσία της α-συνουκλείνης στην εκθετική φάση ανάπτυξης που θα μπορούσε να αποδοθεί σε μία τάση του στελέχους να συνθέσει τρεχαλόζη ως απόκριση στις στρεσογόνες επιδράσεις της α-συνουκλείνης. Στη μετα-διαυξική φάση η έκφραση του γονιδίου φαίνεται να καταστέλλεται, γεγονός αξιοσημείωτο εφόσον στη φάση αυτή παρατηρείται η έναρξη βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης υπό φυσιολογικές συνθήκες. Στη στατική φάση τα επίπεδα του γονιδίου μεταξύ των συνθηκών απουσίας και παρουσίας του *SNCA* δείχνουν να εξισορροπούνται. Υπενθυμίζεται ότι παρόμοια φαινόμενα ήπιας επίδρασης της α-συνουκλείνης στα επίπεδα έκφρασης του *TPS2* παρατηρήθηκαν και στην μελέτη των κυττάρων αγρίου τύπου BY4741. Από την άλλη πλευρά, η απουσία του *TPS1* μπορεί να επισκιάζει σημαντικά στοιχεία για τα μεταβολικά φαινόμενα που διαδραματίζονται στα κύτταρα. Για το λόγο αυτό έλαβαν χώρα αναλύσεις των μελετών qPCR με διαφοροποίηση της συνθήκης βαθμονόμησης, όπως θα συζητηθεί παρακάτω.

Από την μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του *TSL1* στα κύτταρα *tps1Δ*, προέκυψε ότι εκτός από ένα αρχικό στρες που προκαλεί η έκφραση της α-συνουκλείνης στην προ-εκθετική φάση των κυττάρων, τα επίπεδα έκφρασης του παραμένουν εξισορροπημένα μεταξύ των δύο συνθηκών στις υπόλοιπες φάσεις ανάπτυξης. Συνολικά λοιπόν για τα κύτταρα *tps1Δ* θα μπορούσε κανείς να υποθέσει πως το σύμπλοκο TPS φέρεται ήδη επιβαρυνμένο ακόμη και απουσία του *SNCA* και κατ' επέκταση η παρουσία της α-συνουκλείνης στις παρούσες συνθήκες σύγκρισης δεν μπορεί να αναδείξει σημαντικές διαφορές ακόμη και υπό την συνθήκη HEO στην οποία έχουν αναπτυχθεί τα κύτταρα.

Στην συνέχεια, αναφορικά με τα επίπεδα έκφρασης του αυτοφαγικού ρυθμιστή *Atg8*, παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις της έκφρασής του, παρόμοιες με εκείνες

των αγρίου τύπου κυττάρων. Συγκεκριμένα, στην προ-εκθετική και εκθετική φάση ανάπτυξης φαίνεται ότι η έκφραση του γονιδίου στα κύτταρα *tps1Δ* υπό τη συνθήκη HEO βρίσκεται σε ομοιοστατικά επίπεδα ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Αντιθέτως, υπό την παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης φαίνεται να εγκαθίστανται κατασταλτικά φαινόμενα έκφρασης του γονιδίου στις μετα-διαυξική και στατική φάσεις ανάπτυξης, με την στατική να αποτελεί και το πιο βέβαιο εύρημα της παρούσας μελέτης με βάση την σημαντική απόκλιση στις αναλογίες έκφρασης μεταξύ των δύο συνθηκών σύγκρισης. Τούτο αποτελεί και σε αυτή την περίπτωση στοιχείο αναμενόμενο με βάση τα γνωστά κατασταλτικά φαινόμενα στην μεταγραφική του που ασκεί η συνεχής και υψηλή έκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης έως την ηλικία γήρανσης.

Τέλος, αναμφίβολα τα πιο σημαντικά ευρήματα στην συνολική μελέτη γονιδίων στα κύτταρα *tps1Δ* παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης ελήφθησαν από την μελέτη της έκφρασης του *TORI*. Κατά τις πρώτες φάσεις ανάπτυξης ο κύριος αυτός μεταβολικός ρυθμιστής πληθώρας σημαντικών μονοπατιών φέρεται μεταγραφικά κατεσταλμένος παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, γεγονός που αποτελεί απόρροια των στρεσογόνων συνθηκών που υφίστανται τα κύτταρα. Έπειτα τα επίπεδα έκφρασής του αυξάνονται στην μετα-διαυξική φάση, αναδεικνύοντας όμως μια ασυμφωνία στην χρονολογική ενεργοποίηση της μεταγραφής του με βάση το γεγονός πως στην φάση αυτή το *TORI* φυσιολογικά φέρεται κατεσταλμένο. Ωστόσο, η καταστολή της έκφρασής του στην στατική φάση, αποτελεί σημαντικό στοιχείο της τοξικής κατάληξης των κυττάρων, παρά και την εφαρμογή της συνθήκης HEO. Τέλος, πρέπει να επισημανθεί η σημαντικότερη αλλοίωση της ρυθμιστικής σχέσης *ATG8* και μονοπατιού TOR υπό την παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Παρά την μείωση των επιπέδων έκφρασης του *TORI* στις τρεις από τις μελετώμενες φάσεις ανάπτυξης ο αυτοφαγικός μηχανισμός, όπως αυτός μπορεί να αντικατοπτρίζεται από τα επίπεδα μεταγραφής του *ATG8*, φέρεται ανεξάρτητος της έκφρασης του *TORI* και πάντως όχι αυξημένος.

Συνοψίζοντας, τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν ήπιες επιδράσεις της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στην μεταγραφή των υπολοίπων γονιδίων του μεταβολισμού της τρεχαλόζης, υπό την ταυτόχρονη απουσία της συνθάσης της τρεχαλόζης, ενώ παράλληλα επαναλαμβάνονται τα φαινόμενα της μεταγραφικής καταστολής του αυτοφαγικού ρυθμιστή στις απώτερες φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων ζύμης. Ακόμη, τα κύτταρα φέρουν επιβαρυνμένο μεταβολικό προφίλ όπως προκύπτει από την μελέτη του *TORI* με σημαντικότερη την αλλοίωση μοριακών συσχετισμών όπως η σχέση *ATG8* και μονοπατιού TOR. Τα αποτελέσματα αυτά υπενθυμίζεται πως συνοδεύονται από σημαντική πτώση της κυτταρικής βιωσιμότητας, ιδιαίτερα στην κυτταρική χρονολογική γήρανση παρουσία του *SNCA*, αλλά και από αυξημένα επίπεδα έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης μαζί με τον σχηματισμό κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων. Συνδυάζοντας όλα τα ανωτέρω αντιλαμβάνεται κανείς την πραγματική επιβάρυνση των κυττάρων *tps1Δ* παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, τουλάχιστον στο μεταγραφικό υπόβαθρο των μελετώμενων μεταβολικών στοιχείων.

Συμπληρωματικά με τις προηγούμενες αναλύσεις των αποτελεσμάτων της qPCR για τα κύτταρα *tps1Δ*, ήταν απαραίτητο να πραγματοποιηθούν επίσης αναλύσεις για την ανάδειξη των διαφορών στην γονιδιακή έκφραση μεταξύ των κυττάρων *tps1Δ* και των κυττάρων αγρίου τύπου BY4741. Η ανάλυση αυτή θα αναδείκνυε στο μεταγραφικό υπόβαθρο τα πραγματικά μεταβολικά γεγονότα που δύνανται να διαδραματίζονται τόσο στην απουσία της συνθάσης της τρεχαλόζης και την

ταυτόχρονη παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Κατά συνέπεια, στις αναλύσεις αυτές υπήρξε μεταβολή στις συνθήκες βαθμονόμησης και μελέτης των αναλύσεων.

Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης για κάθε φάση ανάπτυξης ξεχωριστά με συνθήκη βαθμονόμησης τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα BY4741/pCM190 και συνθήκη μελέτης τα επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα *tps1Δ*/pCM190 στις τέσσερις μελετώμενες φάσεις ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών θα αναδείκνυαν τις μεταβολές που προκαλούνται στο προφίλ έκφρασης των γονιδίων αποκλειστικά εν τη απουσία της συνθάσης της τρεχαλόζης. Επίσης, ήταν σημαντικό τα στοιχεία αυτά να χρησιμοποιηθούν ως μία κατάσταση-μάρτυρας για την μελέτη της επίδρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στο υπόβαθρο της απουσίας της τρεχαλόζης.

Έπειτα με την ίδια προσέγγιση, πραγματοποιήθηκε για κάθε φάση ξεχωριστά η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης με συνθήκη βαθμονόμησης τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα BY4741/pCM190 και συνθήκη μελέτης τα επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα *tps1Δ*/pCM190asynWT στις τέσσερις μελετώμενες φάσεις ανάπτυξης. Με τον τρόπο αυτό μελετάται η επίδραση της απουσίας της τρεχαλόζης από τα κύτταρα μαζί με την ταυτόχρονη παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στο προφίλ της έκφρασης των μελετώμενων γονιδίων σε σχέση με τα αγρίου τύπου κύτταρα.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης με τις δύο παραπάνω αναλύσεις παρουσιάζονται στους πίνακες 4.3 και 4.4.

**Πίνακας 4.3: Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPS2*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των *S. cerevisiae tps1Δ* και BY4741 με μηδενική υπόθεση την αντίστοιχη φάση της συνθήκης βαθμονόμησης των BY4741 για την κάθε συνθήκη μελέτης των *tps1Δ*.** Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με EXP η εκθετική φάση, με PD η μετα-διαυξική φάση και με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η φάση ανάπτυξης, στην οποία αντιστοιχεί η κάθε τιμή του λόγου έκφρασης.

Αναλογία=Απουσία <i>TPS1</i> /Παρουσία <i>TPS1</i>						
	<i>TOR1</i>			<i>ATG8</i>		
	Mean	S.D.	P Value	Mean	S.D.	P value
<b>PE</b>	0,98	0,89-1,07	0,651286562	0,37	0,36-0,53	0,002597503
<b>EXP</b>	1,92	1,87-1,97	0,010825501	4,32	3,10-4,61	0,386174843
<b>PD</b>	2,03	1,59-2,46	0,035843895	1,84	1,59-2,13	0,202539384
<b>ST</b>	5,92	5,77-6,08	0,375694418	2,10	1,86-2,48	0,000472777

Αναλογία=Απουσία <i>TPS1</i> /Παρουσία <i>TPS1</i>						
	<i>TPS2</i>			<i>TSL1</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
<b>PE</b>	1,35	1,19-1,52	1,39069E-06	2,67	2,45-3,15	0,002737261
<b>EXP</b>	4,60	4,49-4,72	3,69745E-07	1,32	1,11-1,36	0,047238332
<b>PD</b>	2,00	1,66-2,51	0,184637728	2,08	2,05-2,10	0,000732495
<b>ST</b>	1,19	1,18-1,23	0,732501933	2,43	2,42-2,46	0,186778502

**Πίνακας 4.4: Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPS2*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των *S. cerevisiae tps1Δ* και BY4741 με μηδενική υπόθεση την αντίστοιχη φάση της συνθήκης βαθμονόμησης των BY4741 για την κάθε συνθήκη**

**μελέτης των *tps1Δ*.** Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με EXP η εκθετική φάση, με PD η μετα-διαυξική φάση και με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η φάση ανάπτυξης, στην οποία αντιστοιχεί η κάθε τιμή του λόγου έκφρασης.

Αναλογία=Απουσία <i>TPS1</i> και Παρουσία <i>SNCA</i> /Παρουσία <i>TPS1</i>						
	<i>TPS2</i>			<i>TSL1</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
<b>PE</b>	4,13	3,58-4,66	3,01797E-05	1,73	1,35-2,20	0,169093832
<b>EXP</b>	8,53	8,41-8,67	7,77153E-09	2,64	2,55-2,70	0,438173742
<b>PD</b>	1,42	1,12-1,81	0,469530682	2,04	2,02-2,20	0,00041086
<b>ST</b>	1,335	1,333-1,338	0,609668174	2,23	2,09-2,38	0,242000262

Αναλογία= Απουσία <i>TPS1</i> και Παρουσία <i>SNCA</i> /Παρουσία <i>TPS1</i>						
	<i>TOR1</i>			<i>ATG8</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
<b>PE</b>	0,62	0,57-0,65	0,298264803	0,42	0,36-0,50	0,000960138
<b>EXP</b>	0,60	0,56-0,88	0,001049668	6,00	5,40-7,30	0,224551151
<b>PD</b>	3,85	2,99-5,19	0,000802097	1,58	1,49-1,60	0,171538546
<b>ST</b>	0,77	0,69-0,86	0,10407069	0,075	0,07-0,08	2,35242E-07

Με την χρήση και την εξαγωγή των παραπάνω αναλύσεων, πράγματι, υπήρχε σημαντικό κέρδος στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την μεταβολική κατάσταση των κυττάρων απουσία τρεχαλόζης και παρουσία της α-συνουκλεΐνης.

Αρχικά, όσον αφορά τον υπολειπόμενο μεταβολισμό της τρεχαλόζης και την έκφραση της φωσφατάσης της τρεχαλόζης από το *TPS2*, παρατηρούνται στοιχεία τα οποία διαφέρουν σημαντικά από τον κάθε μεμονωμένο τύπο κυττάρου που μελετήθηκε προηγουμένως. Τα κύτταρα του *tps1Δ* που φέρουν την α-συνουκλεΐνη στην προ-εκθετική φάση και την εκθετική φάση εμφανίζουν σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου με τετραπλασιασμό και διπλασιασμό της έκφρασής του σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης απουσία α-συνουκλεΐνης στα *tps1Δ*. Οι μεταβολές αυτές πιθανότατα οφείλονται στην απόκριση του στρες που προκαλείται κατά την παρουσία της α-συνουκλεΐνης και την προσπάθεια του κυττάρου να ενεργοποιήσει τον υπολειπόμενο μεταβολισμό της τρεχαλόζης. Υπενθυμίζεται φυσικά πως οι υποκινητές των γονιδίων βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης φέρουν αλληλουχίες απόκρισης στο στρες (STREs). Οι αυξήσεις στην γονιδιακή έκφραση του *TPS2* μαρτυρούν ακόμη την αδυναμία της συνθήκης HEO να διατηρήσει σε ομοιοστατικά μεταγραφικά επίπεδα το μεταβολικό προφίλ απουσία του *TPS1*. Στην συνέχεια και στις απώτερες φάσεις ανάπτυξης η αύξηση αυτή παύει να ισχύει και τα φαινόμενα εξισορροπούνται, πιθανότατα λόγω της κατάληξης στον τοξικό φαινότυπο όπως άλλωστε αναδείχθηκε από τις μελέτες βιωσιμότητας και την συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης.

Δεύτερον, όσον αφορά την εικόνα έκφρασης του *TSL1* και τις διαφορές της ανάμεσα στους δύο τύπους κυττάρων υπήρχαν επίσης σημαντικές παρατηρήσεις. Κατά την απουσία της συνθάσης της τρεχαλόζης το ρυθμιστικό της μόριο στα κύτταρα *tps1Δ* φέρεται λογικά σε αυξημένη έκφραση σε σχέση με τα αγρίου τύπου κύτταρα, πιθανότατα με στόχο να αυξηθούν τα επίπεδα βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης. Το γεγονός αυτό όμως δεν συμβαίνει στην εκθετική φάση, όπως φαίνεται από τον πίνακα

4.3, ίσως λόγω της ΗΕΟ ή των χαρακτηριστικών που φέρει η εκθετική φάση με την αξιοποίηση των θρεπτικών στοιχείων. Παρότι λοιπόν τα επίπεδα του *TSL1* στην εκθετική φάση βρίσκονται σε ισορροπία απουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, αυτό δεν ισχύει στην συνθήκη παρουσίας του *SNCA*. Τότε η έκφραση αυτή αυξάνεται σύμφωνα με τον πίνακα 4.4 και πάλι δηλώνοντας τις συνθήκες στρες από την παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Όπως είχε παρατηρηθεί στις μελέτες qPCR των BY4741 το γονίδιο *TSL1* αυξανόταν στις αργότερες φάσεις ανάπτυξης παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Αυτό δεν συμβαίνει στο *tps1Δ* στις ίδιες φάσεις επειδή όπως φαίνεται το ερέθισμα έλλειψης της συνθάσης αποτελεί ισχυρότερο παράγοντα πίεσης σε σχέση με την παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Ωστόσο, με βάση τα δεδομένα έκφρασης του *SNCA* στα αγρίου τύπου και στα μεταλλαγμένα κύτταρα, λόγω αυξημένης έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα *tps1Δ* τα στάδια εγκατάστασης της τοξικότητας επιταχύνονται και το στρες κάνει την εμφάνισή του από την εκθετική φάση με τον σχηματισμό συσσωματωμάτων, οπότε και η επίδραση της πρωτεΐνης στα εν λόγω κύτταρα και στην έκφραση του *TSL1* φέρεται από την εκθετική φάση ανάπτυξης.

Περνώντας στην ανάλυση της έκφρασης του *TOR1*, παρατηρεί κανείς παρόμοια στοιχεία με την προηγούμενη ανάλυση για τα κύτταρα *tps1Δ*. Στην απουσία της συνθάσης της τρεχαλόζης από τα κύτταρα, το γονίδιο *TOR1* φέρεται να αυξάνει το επίπεδο έκφρασής του από την μία φάση ανάπτυξης στην επόμενη, σε σχέση με τα κύτταρα αγρίου τύπου. Εν τούτοις, αυτό δεν συμβαίνει παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Κατά την παρουσία του *SNCA* τα κύτταρα *tps1Δ* εμφανίζουν καταστολή των επιπέδων έκφρασης στις προ-εκθετική, εκθετική και στατική φάση ανάπτυξης. Στην μετα-διαυξική φάση τα επίπεδα δείχνουν να συγκλίνουν ή να εμφανίζονται ήπια αυξημένα παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Η μείωση των επιπέδων όμως στις αντίστοιχες φάσεις ανάπτυξης αποτελεί και εδώ το σημαντικότερο εύρημα. Την εικόνα στρες και απόκρισης στο στρες στην προ-εκθετική φάση και την εκθετική φάση, την οποία παρατηρεί κανείς και από τα παραπάνω υπεύθυνα γονίδια του μεταβολισμού της τρεχαλόζης συμπληρώνει η εικόνα έκφρασης του *TOR1* παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα *tps1Δ*. Η μεταγραφική καταστολή του γονιδίου που σημειώνεται μπορεί να ερμηνευτεί ως αποτέλεσμα ενδοκυττάριου στρες και ενεργοποίησης της απόκρισης στο στρες, όπως άλλωστε παρατηρείται και από την άνοδο στην έκφραση των *TPS2* και *TSL1*. Παράλληλα, η καταστολή των επιπέδων του *TOR1* παρουσία του *SNCA* στα κύτταρα *tps1Δ* αποτελεί βεβαιότατα μία ισχυρή ένδειξη της τοξικής κατάληξης των εν λόγω κυττάρων πάντα και με βάση τον φαινότυπο στις μελέτες βιωσιμότητας και συνάμα τα υψηλά επίπεδα έκφρασης  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και κυτταροπλασματικής συσσωματώσης.

Το προφίλ στην μελέτη της γονιδιακής έκφρασης συμπληρώθηκε με την μελέτη των επιπέδων μεταγραφής του *ATG8*. Με δεδομένο ότι η τρεχαλόζη απουσιάζει και αποτελεί επαγωγέα της αυτοφαγίας, είναι πιθανό τα κύτταρα *tps1Δ* να συσσωρεύουν λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό είναι πιθανό και το *ATG8* να φέρει αυξημένη έκφραση στα μεταλλαγμένα κύτταρα σε σχέση με τα αγρίου τύπου. Υπήρχαν όμως σαφείς διαφοροποιήσεις κατά την παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Σύμφωνα με τους παραπάνω πίνακες παρατηρήθηκε περαιτέρω άνοδος της μεταγραφής του *ATG8*, άρα και πιθανότατα περαιτέρω ενεργοποίηση του μηχανισμού της αυτοφαγίας παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα κύτταρα *tps1Δ* σε σχέση με τα αγρίου τύπου κύτταρα κατά την εκθετική φάση, ενώ στην προ-εκθετική η έκφραση του γονιδίου αποδείχθηκε ανεπηρέαστη. Η αύξηση του *ATG8* στο στάδιο της εκθετικής φάσης για τα κύτταρα που φέρουν την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη αποτελεί

αναμενόμενο στοιχείο σε συνδυασμό με τα ευρήματα στις μεταβολές της έκφρασης για τα υπόλοιπα γονίδια και σχετίζεται με την γενικευμένη απόκριση στο στρες. Η αυτοφαγία, ειδικά, αποτελεί άμεσο αμυντικό μηχανισμό για την αποσυσσώρευση των κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων τα οποία εμφανίζονται στα μεταλλαγμένα αυτά κύτταρα. Η άνοδος της αυτοφαγίας μάλιστα στην φάση αυτή φαίνεται πιθανό να εξαρτάται και από την πτώση της μεταγραφής του *TOR1*. Στην πορεία του χρόνου και στην μετα-διαυξική φάση τα επίπεδα έκφρασης του *ATG8* έρχονται σε ισορροπία πιθανώς όμως και λόγω σταδιακής έκπτωσης του μηχανισμού. Το πιο εντυπωσιακό ωστόσο εύρημα παρατηρείται στα επίπεδα μεταγραφής της στατικής φάσης στα κύτταρα *tps1Δ* υπό την παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, όπου ο λόγος της σχετικής έκφρασης τείνει πολύ κοντά στο μηδέν, ενώ στα κύτταρα μάρτυρες *tps1Δ* εν τη απουσία του *SNCA* το *ATG8* μεταγράφεται σε διπλάσιο βαθμό από ότι στα κύτταρα αγρίου τύπου. Η πτώση αυτή αναμενόταν και οφείλεται στην μεγάλη επίδραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στην βιωσιμότητα των κυττάρων σε μία ηλικιακή φάση με την μέγιστη εμφάνιση συσσωματωμάτων. Ωστόσο, για την φάση αυτή στην οποία τα μεταγραφικά επίπεδα του αυτοφαγικού γονιδίου καταστέλλονται σημαντικά μπορεί να αναφερθεί πως αυτό αποτελεί γεγονός ανεξάρτητο των επιπέδων μεταγραφής του *TOR1*, των οποίων η μεταγραφική καταστολή δεν ακολουθείται και από άνοδο της μεταγραφής του *ATG8*.

Ως εκ τούτου, συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των μελετών της qPCR για το στέλεχος *tps1Δ*, η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των μελετώμενων γονιδίων με εκείνα των αγρίου τύπου κυττάρων ανέδειξε πολύ σημαντικά συμπεράσματα. Τα συμπεράσματα αυτά περιγράφουν την εγκατάσταση συνθηκών στρες από την αρχή της ζωής των μεταλλαγμένων κυττάρων ζύμης παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, με την εκδήλωση σημαντικών παραμέτρων της απόκρισης του στρες. Η μεταγραφική ενεργοποίηση του υπολειπόμενου μεταβολισμού της τρεχαλόζης, η μεταγραφική καταστολή του μονοπατιού TOR και η περαιτέρω άνοδος της μεταγραφής του *ATG8* αποτελούν σαφώς τέτοιες παραμέτρους. Επιπροσθέτως, λαμβάνεται υπόψιν η ταυτόχρονη εμφάνιση κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων από την εκθετική φάση, η ήπια πτώση της βιωσιμότητας και η υψηλή έκφραση του *SNCA* που παρατηρήθηκαν από τις προηγούμενες μελέτες. Κατά συνέπεια, συμβαίνει μία αλληλουχία γεγονότων η οποία συν τω χρόνο οδηγεί στον φαινότυπο της κυτταρικής γήρανσης με σταθερά υψηλά επίπεδα έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, αύξηση του αριθμού συσσωματωμάτων στο κυτταρόπλασμα, πιθανή καταστολή του μονοπατιού TOR και των αυτοφαγικών επιπέδων και αλλοίωση της μεταξύ τους σχέσης. Μάλιστα, όλα τα παραπάνω δείχνουν και την αδυναμία της συνθήκης HEO να εγκαταστήσει έναν πιο ήπιο φαινότυπο απουσία του *tps1Δ* και παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, όπως φαίνεται να τον εγκαθιστά στα κύτταρα αγρίου τύπου. Είναι σημαντικό λοιπόν να εκφραστεί πως σε αυτή την συνθήκη, όπου μάλιστα λείπει και ένας από τους κύριους μεταβολικούς παράγοντες της συνθήκης, η HEO αποτυγχάνει να εξισορροπήσει τα τοξικά φαινόμενα και η δράση της στα μεταβολικά μονοπάτια που ρυθμίζει, μεταξύ άλλων την αυτοφαγία, εκμηδενίζεται, αναδεικνύοντας έτσι ως απαραίτητο στοιχείο την τρεχαλόζη για την εξυπηρέτηση της δράσης της.

#### 4.14 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των *TPS1*, *TSL1*, *ATG8* και *TOR1* στα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae tps2Δ* με χρήση qPCR

Οι μελέτες της έκφρασης των μελετώμενων γονιδίων των σημαντικών αυτών μεταβολικών μονοπατιών συνεχίστηκαν στα κύτταρα *tps2Δ*. Τα κύτταρα αυτά δεν βιοσυνθέτουν την φωσφατάση της τρεχαλόζης και συσσωρεύουν 6-φωσφοτρεχαλόζη, η οποία δύναται να αποβαίνει τοξικό στοιχείο σε μεγάλες ποσότητες. Στις προηγούμενες μελέτες του στελέχους αυτού, η α-συνουκλεΐνη επιφέρει την εγκατάσταση τοξικότητας από την αρχή ζωής των κυττάρων ζύμης έως την κυτταρική γήρανση. Ο σχηματισμός συσσωματωμάτων αποδείχθηκε πως ξεκινά από την εκθετική φάση, ώσπου στην στατική είναι καθολικός στο εσωτερικό των κυττάρων.

Η μεθοδολογία και ο τρόπος ανάλυσης των εν λόγω μελετών δεν διέφερε σε τίποτα σε σχέση με τις προηγούμενες περιπτώσεις αντιδράσεων qPCR που εκτελέστηκαν και αναλύθηκαν για τα κύτταρα BY4741 και *tps1Δ*. Η πλειονότητα των μελετών για τα μεταλλαγμένα κύτταρα *tps2Δ* πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της πτυχιακής εργασίας Ζόλδερ Σ., 2017, αλλά αναπαράγεται κατόπιν άδειας του συγγραφέα.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων της γονιδιακής έκφρασης για τον ίδιο τύπο κυττάρων παρουσιάζονται στον πίνακα 4.5 και η εναλλακτική προσέγγιση σύγκρισης στο Πρόσθετο Υλικό-Πίνακας Π3. Διευκρινίζεται πως στην στατική φάση των *tps2Δ* δεν κατέστη δυνατή η μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων του *TOR1*, λόγω προβλημάτων στην ποιότητα του RNA που απομονώνεται από τον συγκεκριμένο τύπο κυττάρων.

**Πίνακας 4.5: Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPS1*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae tps2Δ* με μηδενική υπόθεση την προ-εκθετική φάση της συνθήκης βαθμονόμησης.** Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με EXP η εκθετική φάση, με PD η μετά-διαυξική φάση και με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η αναλογία συνθηκών που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά για τον υπολογισμό του μέσου όρου.

<i>TPS1</i>							
Απουσία SNCA				Παρουσία SNCA			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
PE/PE	1,00	0,95-1,05	1	PE/PE	0,60	0,40-0,84	0,475209
EXP/PE	0,60	0,49-0,73	0,255987	EXP/PE	0,30	0,20-0,45	0,216664
PD/PE	1,05	0,87-1,30	0,31578	PD/PE	0,14	0,129-0,16	0,002986
ST/PE	1,54	1,28-1,85	0,433687	ST/PE	1,69	1,43-2,00	0,097881

<i>TSL1</i>							
Απουσία SNCA				Παρουσία SNCA			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
PE/PE	1,00	0,46-2,16	1	PE/PE	1,57	0,84-2,91	0,616416
EXP/PE	1,14	0,65-2,00	0,876522	EXP/PE	0,66	0,33-1,30	0,540147
PD/PE	0,53	0,30-0,93	0,172101	PD/PE	0,22	0,13-0,39	0,14428
ST/PE	5,30	3,09-9,13	0,0679	ST/PE	6,51	4,22-10,01	0,127017

<i>TORI</i>							
Απουσία <i>SNCA</i>				Παρουσία <i>SNCA</i>			
	MEAN	SE	P value		MEAN	SE	P value
PE/PE	1,00	0,71-1,39	1	PE/PE	1,34	0,94-2,09	0,379705
EXP/PE	6,49	5,25-8,00	0,081338	EXP/PE	8,08	6,41-10,20	0,065963
PD/PE	2,93	2,32-3,69	0,374283	PD/PE	2,35	1,97-2,78	0,352369
ST/PE	-	-	-	ST/PE	-	-	-

<i>ATG8</i>							
Απουσία <i>SNCA</i>				Παρουσία <i>SNCA</i>			
	MEAN	SE	P value		MEAN	SE	P value
PE/PE	1,00	0,52-1,90	1	PE/PE	0,98	0,50-1,89	0,913435
EXP/PE	6,83	3,93-11,84	0,055038	EXP/PE	0,57	0,38-0,86	0,194821
PD/PE	2,78	1,25-6,90	0,118024	PD/PE	0,42	0,27-0,66	0,075369
ST/PE	23,15	16,58-34,2	0,000681	ST/PE	24,5	16,87-36,42	0,005162

Αρχικά, στην μελέτη των επιπέδων έκφρασης της συνθάσης της τρεχαλόζης από το γονίδιο *TPSI* παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα κατασταλτικά φαινόμενα επίδρασης της α-συνουκλεΐνης. Από την προ-εκθετική φάση, έπειτα στην εκθετική και έως την μετα-διαυξική το γονίδιο *TPSI* παρουσία της α-συνουκλεΐνης φέρει μειούμενη έκφραση σε όλο και χαμηλότερα επίπεδα με την πάροδο του χρόνου. Αυτό μαρτυρά την εγκατάσταση ενός τοξικού φαινομένου ήδη από τις πρώτες φάσεις ζωής των ζυμομυκήτων παρουσία του *SNCA*, το οποίο δεν αντιστρέφεται και πάλι από την συνθήκη HEO που εφαρμόστηκε. Ίδια κατασταλτικά φαινόμενα στην έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου εμφανίστηκαν επίσης και κατά την μελέτη των BY4741, αλλά στα αργότερα στάδια ζωής. Ωστόσο στα μεταλλαγμένα κύτταρα *tps2Δ*, όπως παρατηρήθηκε η πτώση της βιωσιμότητας είναι χαρακτηριστική από τις πρώτες ώρες ζωής της καλλιέργειας έως την γήρανση με χαρακτηριστική την εμφάνιση συσσωματωμάτων. Στην στατική φάση τα φαινόμενα καταστολής της γονιδιακής έκφρασης εξισορροπούνται πιθανόν λόγω της εγκατάστασης του τοξικού φαινοτύπου από την απουσία της φωσφατάσης της τρεχαλόζης μεμονωμένα.

Παράλληλα με την μελέτη του *TPSI*, χρήσιμα στοιχεία λαμβάνονται και με την μελέτη του *TSL1*. Παρά τις μεγάλες αποκλίσεις στην τυπική απόκλιση κατά την προ-εκθετική φάση είναι πιθανό στο χρονικό αυτό σημείο το γονίδιο να φέρεται σε αυξημένη έκφραση. Η έκφραση αυτή παροδικά μειώνεται και όπως και στο *TPSI* υπάρχει καταστολή των επιπέδων του κατά την εκθετική φάση και την μετα-διαυξική φάση. Τα γεγονότα αυτά και στο συγκεκριμένο στέλεχος, όπως και στο BY4741 δηλώνουν μία κατάσταση κατά την οποία τα κύτταρα προσπαθούν να συνθέσουν τρεχαλόζη ενεργοποιώντας την μεταγραφή των υπολοίπων γονιδίων κατά την προ-εκθετική φάση αλλά αποτυγχάνουν να το πράξουν στον μέγιστο δυνατό βαθμό και στην συνέχεια τα μεταγραφικά επίπεδα τόσο του *TPSI* όσο και του *TSL1* καταστέλλονται από κοινού.

Στην συνέχεια, στην μελέτη του γονιδίου *TORI* παρατηρήθηκαν φαινόμενα ισορροπίας μεταξύ των συνθηκών παρουσίας και απουσίας *SNCA* και η έκφραση της α-συνουκλεΐνης δεν δείχνει να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασής του σε ιδιαίτερο βαθμό.

Παρά την μη επίδραση της α-συνουκλεΐνης στα μεταγραφικά επίπεδα του *TORI* η επίδρασή της στα επίπεδα του *ATG8* ήταν σημαντική. Κατά την μελέτη των



αποτελεσμάτων αντιλαμβάνεται κανείς την πολύ δραματική καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου, άρα και την πολύ πιθανή καταστολή του μηχανισμού της αυτοφαγίας κατά τις πρώτες φάσεις ανάπτυξης, όπως συμβαίνει και στον μεταβολισμό της τρεχαλόζης. Η καταστολή αυτή φέρεται ανεξάρτητη κατ' επέκταση του μονοπατιού TOR και επισυμβαίνει πράγματι σε ένα περιβάλλον έλλειψης του φυσιολογικού μορίου της τρεχαλόζης και συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης. Και σε αυτή την περίπτωση η συνθήκη HEO αδυνατεί να εξισορροπήσει τα τοξικά κυτταρικά φαινόμενα και να επαναφέρει τα μεταγραφικά επίπεδα του αυτοφαγικού γονιδίου σε ομοιοστατικά επίπεδα όπως το πραγματοποιεί στα κύτταρα αγρίου τύπου για τις πρώιμες φάσεις ανάπτυξης. Τέλος, τα μεταγραφικά επίπεδα του *ATG8* της στατικής φάσης φαίνεται να εξισορροπούνται πιθανόν λόγω της τοξικής κατάληξης των κυττάρων.

Συνοψίζοντας για τις αναλύσεις αποκλειστικά στα κύτταρα *tps2Δ* φαίνεται πως ο τοξικός φαινότυπος που αποτυπώνεται στις πρώιμες φάσεις ανάπτυξης και οδηγεί από νωρίς στην ανάπτυξη συσσωματωμάτων επιφέρει επίσης σημαντικές μεταβολές στο μεταβολικό προφίλ των κυττάρων με μεταγραφική καταστολή του υπολειπόμενου μεταβολισμού της τρεχαλόζης και της αυτοφαγίας. Όλα αυτά βέβαια, είναι πιθανόν να συμβαίνουν λόγω και της ταυτόχρονης συσσώρευσης τόσο της α-συνουκλεΐνης όσο και της 6 φωσφο-τρεχαλόζης.

Όπως πραγματοποιήθηκε και για τα κύτταρα *tps1Δ*, ήταν σκόπιμο και για τα κύτταρα *tps2Δ* να πραγματοποιηθούν αναλύσεις με αλλαγές στις συνθήκες βαθμονόμησης ως προς τα κύτταρα αγρίου τύπου. Άλλωστε, από τις αντίστοιχες αναλύσεις των *tps1Δ* αποτυπώθηκαν σημαντικές επιδράσεις της α-συνουκλεΐνης στο υπόβαθρο ενός μεταλλαγμένου κυττάρου.

Κατά τον ίδιο τρόπο με προηγούμενως λοιπόν, πραγματοποιήθηκαν και οι αντίστοιχες αναλύσεις των *tps2Δ* ως προς τα BY4741 και παρουσιάζονται στους πίνακες 4.6 και 4.7.

**Πίνακας 4.6: Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPS1*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των *S. cerevisiae tps2Δ* και BY4741 με μηδενική υπόθεση την αντίστοιχη φάση της συνθήκης βαθμονόμησης των BY4741 για την κάθε συνθήκη μελέτης των *tps2Δ*.** Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με EXP η εκθετική φάση, με PD η μετα-διαυξική φάση και με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η φάση ανάπτυξης, στην οποία αντιστοιχεί η κάθε τιμή του λόγου έκφρασης.

Αναλογία=Απουσία <i>TPS2</i> /Παρουσία <i>TPS2</i>						
	<i>TPS1</i>			<i>TSL1</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
<b>PE</b>	40	34,03-47,01	0,000135942	5,96	4,22-8,42	0,086175
<b>EXP</b>	3,14	2,76-3,57	0,000499043	2,20	1,80-2,68	0,033794
<b>PD</b>	0,27	0,262-0,284	0,0427128	0,123	0,10-0,14	3,36953E-06
<b>ST</b>	0,076	0,069-0,085	0,7871433	2,60	2,55-2,64	0,088845088

Αναλογία=Απουσία <i>TPS2</i> /Παρουσία <i>TPS2</i>						
	<i>TOR1</i>			<i>ATG8</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
<b>PE</b>	0,12	0,09-0,15	0,583146	0,98	0,63-1,51	0,004623
<b>EXP</b>	1,56	1,41-1,70	0,055227	92,31	69,86-121,38	6,94999E-05
<b>PD</b>	0,43	0,33-0,55	0,005784	0,41	0,35-0,48	0,820167305
<b>ST</b>	-	-	-	0,67	0,65-0,69	0,216240138

**Πίνακας 4.7: Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPS1*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των *S. cerevisiae tps2Δ* και BY4741 με μηδενική υπόθεση την αντίστοιχη φάση της συνθήκης βαθμονόμησης των BY4741 για την κάθε συνθήκη μελέτης των *tps2Δ*.** Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με EXP η εκθετική φάση, με PD η μετα-διαυξική φάση και με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η φάση ανάπτυξης, στην οποία αντιστοιχεί η κάθε τιμή του λόγου έκφρασης.

Αναλογία=Απουσία <i>TPS2</i> και Παρουσία <i>SNCA</i> /Παρουσία <i>TPS2</i>						
	<i>TPS1</i>			<i>TSL1</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
<b>PE</b>	5,93	4,19-8,41	0,003667022	6,99	4,4-9,3	0,014073473
<b>EXP</b>	1,59	1,05-2,39	0,032923716	1,27	0,85-1,89	0,964975585
<b>PD</b>	0,036	0,032-0,041	0,001776371	0,05	0,047-0,053	3,0604E-09
<b>ST</b>	0,084	0,077-0,092	0,22218331	3,07	2,76-3,36	0,29652515

Αναλογία=Απουσία <i>TPS2</i> και Παρουσία <i>SNCA</i> /Παρουσία <i>TPS2</i>						
	<i>TOR1</i>			<i>ATG8</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
<b>PE</b>	0,38	0,29-0,49	0,537657	1,04	0,59-1,54	0,004453679
<b>EXP</b>	1,92	1,88-1,98	0,000123	7,79	6,29-9,63	0,071046473
<b>PD</b>	0,34	0,26-0,45	0,006067	0,059	0,055-0,062	4,27549E-05
<b>ST</b>	-	-	-	0,67	0,65-0,69	0,968022559

Με βάση τα δεδομένα που παρουσιάζονται στις παραπάνω αναλύσεις φαίνεται πως τα μεταβολικά φαινόμενα που επιφέρονται της παρουσίας της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα *tps2Δ* σε σχέση με τα αγρίου τύπου κύτταρα αποτελούν μεγέθυνση των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα στα μεταλλαγμένα κύτταρα κατά την σύγκριση των συνθηκών απουσία και παρουσίας του *SNCA*.

Κατά την μελέτη της έκφρασης του *TPS1* στα κύτταρα *tps2Δ* απουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης τα επίπεδα μεταγραφής βαίνουν συνεχώς μειούμενα σε σχέση με τα αντίστοιχα των κυττάρων αγρίου τύπου ξεκινώντας από πάρα πολύ υψηλά επίπεδα έκφρασης. Ωστόσο, κατά την παρουσία του *SNCA*, τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης φέρονται συνεχώς μειωμένα σε σχέση με την συνθήκη μάρτυρα και απεικονίζουν την ιδιαίτερα σημαντική μείωση των επιπέδων της συνθάσης και την αλλοίωση του υπολειπόμενου μεταβολισμού της τρεχαλόζης από τις αρχικές φάσεις ανάπτυξης. Ιδιαίτερα σε αυτή την ανάλυση αναδεικνύονται οι σημαντικές κατασταλτικές επιδράσεις της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στην συνθάση της τρεχαλόζης και σε αυτό το στέλεχος με την διαφορά πως πρόκειται για την αρχή της ζωής των κυττάρων. Ακόμη αντικατοπτρίζεται εδώ και η πραγματική εξισορρόπηση των επιπέδων έκφρασης στην

στατική φάση, όπου οι δύο αναλογίες έκφρασης εξισώνονται σε πολύ χαμηλές τιμές, οι οποίες και αποδεικνύουν την πραγματική εξάντληση στην μεταγραφή της συνθάσης.

Συμπληρώνοντας τα εναπομείναντα υπεύθυνα γονίδια της βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης με την μελέτη του *TSL1*, παρατηρήθηκαν και με αυτή την προσέγγιση ανάλυσης παρόμοια στοιχεία με προηγούμενως αλλά όπως και στο *TPS1* τα στοιχεία αυτά αποτελούσαν μεγέθυνση των προηγούμενων. Και στην παρούσα ανάλυση το γονίδιο αυτό φέρει εξισορροπημένη ή αυξημένη σε ένα βαθμό έκφραση στην προ-εκθετική φάση ανάπτυξης παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, ενώ στην εκθετική και την μετα-διαυξική η καταστολή των επιπέδων έκφρασης είναι κυρίαρχη στα ίδια κύτταρα. Τα δεδομένα αυτά μαζί με εκείνα για την έκφραση της συνθάσης αποτυπώνουν και εδώ ένα πιθανό αυξημένο αρχικό ερέθισμα σύνθεσης τρεχαλόζης για τα κύτταρα τα οποία, όπως υποδηλώνεται, αποτυγχάνουν να την βιοσυνθέσουν στα φυσιολογικά ανώτερα επίπεδα, έστω και ως το στάδιο της 6-φωσφοτρεχαλόζης. Τελικά, καταλήγοντας στην στατική φάση φαίνεται πως επέρχεται ένα φαινόμενο συνεχούς σταθερής έκφρασης του *TSL1*, το οποίο δεν επηρεάζεται από την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη και δείχνει να αφορά την ούτως ή άλλως χαμηλή έκφραση της συνθάσης. Σε αυτή την περίπτωση κυττάρων φαίνεται επίσης πως για την δράση της ΗΕΟ απαιτείται και η δράση της φωσφατάσης, οπότε και αυτός είναι και ο λόγος που αποτυγχάνει και σε αυτό το μεταλλαγμένο στέλεχος να επιδράσει ευεργετικά στην βιωσιμότητα και να αναστείλει τους τοξικούς φαινοτύπους που εγκαθίστανται.

Προχωρώντας στον σχολιασμό των επιπέδων έκφρασης του *TOR1*, παρατηρούνται και σε αυτή την ανάλυση τα εξισορροπημένα επίπεδα που φάνηκαν και στην προηγούμενη προσέγγιση. Δεδομένα η άνοδος των επιπέδων μεταγραφής του *TOR1* στην εκθετική και η μείωσή του στην συνέχεια αποτελούν φυσιολογικά στοιχεία, οπότε δεν παρουσιάζεται κάποια εξάρτηση της έκφρασης του γονιδίου τόσο από την έλλειψη της φωσφατάσης όσο και από την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη για αυτά τα μεταλλαγμένα κύτταρα.

Τέλος, με την μελέτη των επιπέδων έκφρασης του *ATG8* ολοκληρώθηκε και αυτή η διεξοδική μελέτη για τα κύτταρα *tps2Δ*. Και σε αυτή την προσέγγιση ανάλυσης οι μεταβολές των επιπέδων έκφρασης ακολούθησαν το προφίλ που είχε παρουσιαστεί κατά τις προηγούμενες αναλύσεις. Δηλαδή, μία αρχική εξίσωση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ απουσίας και παρουσίας του *SNCA* στην προ-εκθετική φάση και έπειτα την παρουσία ισχυρής καταστολής των μεταγραφικών επιπέδων εν τη παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στην εκθετική και μετα-διαυξική φάση. Στην συνέχεια και στην στατική φάση τα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των δύο συνθηκών εξισώνονται και διατηρούν χαμηλά πρότυπα μεταγραφής του γονιδίου.

Κλείνοντας και αυτή την ενότητα μελετών qPCR, επίσης στο μεταλλαγμένο στέλεχος *tps2Δ* παρατηρήθηκαν πολύ σημαντικά φαινόμενα μεταγραφικής καταστολής των γονιδίων της βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης και της αυτοφαγίας. Ο επιβαρυσμένος αυτός φαινότυπος φαίνεται να εγκαθίσταται από τις πρώιμες φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae* και στην στατική φάση τα κύτταρα να ισορροπούν τον μεταβολισμό τους στην κατάσταση τοξικότητας. Όλα τούτα σε συνδυασμό με την εμφάνιση κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων, σταθερής έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και πτώσης της βιωσιμότητας σύμφωνα με τα πρότερα δεδομένα. Σημαντικό επίσης στοιχείο αποτελεί πως η συνθήκη ΗΕΟ δεν αντιστρέφει και σε αυτό το στέλεχος την

τοξικότητα της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης επιδεικνύοντας την αναγκαιότητα ύπαρξης της φωσφατάσης της τρεχαλόζης για την ευεργετική δράση της.

#### **4.15 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των *TPS1*, *TPS2*, *ATG8* και *TOR1* στα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae tsl1Δ* με χρήση qPCR**

Οι μελέτες της γονιδιακής έκφρασης για το κάθε μεταλλαγμένο στέλεχος τερματίστηκαν με την διερεύνηση των επιπέδων μεταγραφής των μελετώμενων γονιδίων στο στέλεχος *tsl1Δ*. Υπενθυμίζεται στην φάση αυτή, πως τα συγκεκριμένα κύτταρα έχουν απωλέσει την παραγωγή του Tsl1p, του κυριότερου ρυθμιστικού μόριου, υπεύθυνο για το αρχικό ερέθισμα βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης από το σύμπλοκο TPS. Όπως είχε αποδειχθεί προηγουμένως στα εν λόγω κύτταρα ο φαινότυπος της χρονολογικής γήρανσης φέρει ήπιες επιδράσεις από την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη μιας και η έκφρασή της στα απώτερα στάδια ανάπτυξης φέρεται μειωμένη. Επίσης, τα κυτταροπλασματικά συσσωματώματα είναι απόντα καθ' όλη την διάρκεια ζωής του κυττάρου και φαίνεται πως η συνθήκη ΗΕΟ ασκεί την ίδια ευεργετική δράση σε αυτό το στέλεχος με εκείνη των αγρίου τύπου κυττάρων.

Η μεθοδολογία και ο τρόπος ανάλυσης των εν λόγω μελετών δεν διέφερε σε τίποτα σε σχέση με τις προηγούμενες περιπτώσεις αντιδράσεων qPCR που εκτελέστηκαν και αναλύθηκαν για τα κύτταρα BY4741, *tps1Δ* και *tps2Δ*.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων της γονιδιακής έκφρασης για τον ίδιο τύπο κυττάρων παρουσιάζονται στον πίνακα 4.8 και η εναλλακτική προσέγγιση σύγκρισης όπως και σε προηγούμενες αναλύσεις στο Πρόσθετο Υλικό-Πίνακας Π4.

**Πίνακας 4.8: Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPS1*, *TPS2*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae tsl1Δ* με μηδενική υπόθεση την προ-εκθετική φάση της συνθήκης βαθμονόμησης.** Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με EXP η εκθετική φάση, με PD η μετά-διαυξική φάση και με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η αναλογία συνθηκών που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά για τον υπολογισμό του μέσου όρου.

<i>TPS1</i>							
Απουσία SNCA				Παρουσία SNCA			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
PE/PE	1,00	0,995-1,004	1	PE/PE	0,85	0,83-0,88	0,06842
EXP/PE	1,446	1,443-1,449	0,008855	EXP/PE	1,36	1,24-1,49	0,016028
PD/PE	6,80	6,46-7,20	1,32349E-08	PD/PE	5,51	5,44-5,58	4,80448E-12
ST/PE	3,81	3,70-3,94	3,47738E-11	ST/PE	4,26	4,17-4,47	4,99155E-09

<i>TPS2</i>							
Απουσία <i>SNCA</i>				Παρουσία <i>SNCA</i>			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
PE/PE	1,00	0,93-1,06	1	PE/PE	0,96	0,91-1,02	0,486147538
EXP/PE	2,59	2,50-2,70	5,65968E-06	EXP/PE	2,48	2,28-2,70	0,00069821
PD/PE	3,88	3,38-4,48	3,79866E-06	PD/PE	3,40	3,19-3,59	7,01325E-09
ST/PE	2,06	1,87-2,26	4,86137E-06	ST/PE	1,75	1,60-1,90	0,000178472

<i>TOR1</i>							
Απουσία <i>SNCA</i>				Παρουσία <i>SNCA</i>			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
PE/PE	1,00	0,92-1,07	1	PE/PE	1,20	1,14-1,26	0,330057892
EXP/PE	1,20	1,14-1,27	0,401974021	EXP/PE	1,37	1,32-1,43	0,236542556
PD/PE	4,65	4,41-4,93	5,09017E-09	PD/PE	3,36	3,28-3,45	2,80169E-07
ST/PE	3,22	3,07-3,38	7,11637E-07	ST/PE	2,83	2,69-2,96	1,13747E-06

<i>ATG8</i>							
Απουσία <i>SNCA</i>				Παρουσία <i>SNCA</i>			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
PE/PE	1,00	0,93-1,07	1	PE/PE	1,13	1,08-1,17	0,409522926
EXP/PE	2,35	2,25-2,46	1,05021E-06	EXP/PE	2,51	2,41-2,61	3,24978E-06
PD/PE	28,3	25,9-30,9	7,14697E-10	PD/PE	28,71	27,38-30,0	1,14628E-13
ST/PE	25,23	24,16-26,25	3,85764E-14	ST/PE	31,8	28,9-34,9	5,56247E-13

Αρχικά, όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης της συνθάσης της τρεχαλόζης από το γονίδιο *TPS1* φαίνεται πως στα εν λόγω μεταλλαγμένα κύτταρα εμφανίζονται πολύ ήπιες διακυμάνσεις της μεταγραφής του, οι οποίες εξαρτώνται από την α-συνουκλείνη. Κατά την προ-εκθετική φάση παρουσιάζεται μία ήπια καταστολή των επιπέδων, η οποία στην συνέχεια αποκαθίσταται στην διάρκεια της εκθετικής φάσης και να επανεμφανίζεται κατά την μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης, χωρίς ωστόσο μεγάλες διαφορές μεταξύ των συνθηκών απουσίας και παρουσίας του *SNCA*. Στην στατική φάση, επίσης τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης ισορροπούν και δείχνουν όμοια μεταξύ των δύο συνθηκών. Μπορεί τα πλαίσια σύγκρισης να είναι πολύ στενά μεταξύ των δύο συνθηκών, ωστόσο οι ήπιες αυτές επιδράσεις της α-συνουκλείνης με τρόπο κατασταλτικό θυμίζουν τις αντίστοιχες κατασταλτικές επιδράσεις που αποδείχθηκαν από τις προηγούμενες μελέτες στα υπόλοιπα στελέχη που μελετήθηκαν.

Περνώντας έπειτα στην μελέτη των επιπέδων της μεταγραφής του γονιδίου της φωσφατάσης της τρεχαλόζης, *TPS2*, παρατηρεί κανείς μία απόλυτη ισορροπία μεταξύ των δύο συνθηκών σύγκρισης σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης. Αν πράγματι υπάρχουν κατασταλτικές επιδράσεις από την έκφραση της α-συνουκλείνης αυτές λαμβάνουν χώρα κατά την μετα-διαυξική και την στατική φάση, ωστόσο οι τυπικές αποκλίσεις των δύο συνθηκών φέρουν επικαλύψεις, οπότε δεν αποτελούν τεκμηριωμένα στοιχεία. Άλλωστε, η επίδραση της έκφρασης της α-συνουκλείνης στην φωσφατάση έχει αποτυπωθεί και από τα προηγούμενα μελετώμενα στελέχη ως ένα ήπιο ή ουδέτερο φαινόμενο, ιδιαίτερα κατά την μελέτη των BY4741, με τα οποία τα κύτταρα *ts1Δ* ομοιάζουν φαινοτυπικά σε ό,τι αφορά τόσο την ενδοκυτταρική εντόπιση της α-συνουκλείνης όσο και κατά τις μελέτες βιωσιμότητας στις γραφικές παραστάσεις χρονολογικής γήρανσης. Κρίνοντας, πλέον, συνολικά από τα μεταγραφικά επίπεδα

των δύο βιοσυνθετικών γονιδίων της τρεχαλόζης, φαίνεται πως η επίδραση της α-συνουκλεΐνης αμυδρή επιρροή είναι πιθανό να φέρει στην βιοσύνθεση τρεχαλόζης και κατά συνέπεια η συσσώρευση του δισακχαρίτη είναι πιθανό να λαμβάνει χώρα σε φυσιολογικά πλαίσια παρά την έλλειψη του *TSL1*. Ένα σημαντικός λόγος για να συμβαίνει αυτή η παρατήρηση αποτελεί πιθανόν και η συνθήκη ΗΕΟ, η οποία είναι πιθανό να σταθεροποιεί την βιοσύνθεση της τρεχαλόζης με την δική της επαγωγή.

Στην συνέχεια, όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης του *TOR1*, φαίνεται και σε αυτή την περίπτωση πως πράγματι οι συνέπειες της έκφρασης της α-συνουκλεΐνης διαδράμουν σε ήπιο βαθμό. Καθώς στην προ-εκθετική φάση και στην εκθετική τα επίπεδα έκφρασης φέρονται σε εξίσωση, όταν επέρχεται η μετα-διαυξική και στην συνέχεια η στατική φάση η παρουσία της α-συνουκλεΐνης έχει ως αποτέλεσμα μία ήπια πτώση των επιπέδων του γονιδίου, δείγμα πιθανού αρχόμενου στρες, χωρίς ωστόσο και πάλι η μείωση αυτή να αντανακλά θεαματικές μεταβολές. Άλλωστε η μείωση των επιπέδων έκφρασης της α-συνουκλεΐνης στην στατική φάση δεν μπορεί, όπως αποδεικνύεται να εγκαταστήσει ένα σταθερό προφίλ τοξικότητας.

Τέλος, κατά την μελέτη του αυτοφαγικού μηχανισμού, μέσω της έκφρασης του *ATG8*, παρατηρήθηκε και εδώ ισορροπία των επιπέδων της μεταγραφής του γονιδίου μεταξύ των δύο συνθηκών κατά την προ-εκθετική, την εκθετική και την μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης, ενώ στην στατική φάση φαίνεται να υπάρχει αύξηση των επιπέδων έκφρασης. Το φαινόμενο αυτό, εξαρτώμενο όπως φαίνεται και από την μείωση της μεταγραφής του *TOR1*, είναι πιθανό να οφείλεται στην συσσώρευση που έχει επέλθει από την έκφραση της α-συνουκλεΐνης στις προηγούμενες φάσεις ανάπτυξης και η οποία είναι πιθανό να καθαιρείται από την αυτοφαγία, στο έδαφος της πτώσης της έκφρασης του *SNCA* στην συγκεκριμένη φάση ανάπτυξης. Συν τοις άλλοις, τα κυτταροπλασματικά συσσωματώματα είναι απόντα από τα μεταλλαγμένα αυτά κύτταρα σε οποιαδήποτε φάση ανάπτυξης. Επίσης, για την ισορροπία στην σχετική έκφραση του γονιδίου στις δύο συνθήκες για τις τρεις πρώτες φάσεις ανάπτυξης, μπορεί να εκφραστεί πιθανόν επίσης ως αποτέλεσμα της δράσης της συνθήκης ΗΕΟ, φέροντας την αυτοφαγία σε ομοιοστατικά επίπεδα.

Συνοψίζοντας στο στάδιο αυτό για την επίδραση της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα *ts11Δ*, οι συνέπειες από την έκφραση της πρωτεΐνης παρουσιάζονται ήπιες και αποδράμουν χωρίς να δημιουργούν τοξικό προφίλ. Όλα αυτά πηγάζουν από τα ευρήματα πως δεν παρατηρούνται κυτταροπλασματικά συσσωματώματα, η έκφραση της πρωτεΐνης μειώνεται στο στάδιο γήρανσης των κυττάρων και οι μεταβολές στην έκφραση των μελετώμενων γονιδίων φέρονται ήπιες, με σημειακές παρατηρήσεις φαινομένων στρες, το οποίο φαίνεται να αντιμετωπίζεται. Συγκρίνοντας τον φαινότυπο αυτό με τα προηγούμενα μελετώμενα κύτταρα, δηλώνεται ξεκάθαρα η ομοιότητα των *ts11Δ* με τα κύτταρα BY4741, αλλά πιθανότατα και η ευεργετική δράση της συνθήκης ΗΕΟ να διατηρήσει τα κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες.

Κατά τον ίδιο τρόπο με προηγουμένως, πραγματοποιήθηκαν και οι αντίστοιχες αναλύσεις των *ts11Δ* ως προς τα BY4741 και παρουσιάζονται στους πίνακες 4.9 και 4.10.

**Πίνακας 4.9: Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPS1*, *TPS2*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των *S. cerevisiae ts11Δ* και BY4741 με μηδενική υπόθεση την αντίστοιχη φάση της συνθήκης βαθμονόμησης των BY4741 για την κάθε συνθήκη μελέτης των *ts11Δ*.** Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη,

αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με EXP η εκθετική φάση, με PD η μετα-διαυξική φάση και με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η φάση ανάπτυξης, στην οποία αντιστοιχεί η κάθε τιμή του λόγου έκφρασης.

Αναλογία=Απουσία <i>TSLI</i> /Παρουσία <i>TSLI</i>						
	<i>TPS2</i>			<i>TPS1</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
PE	1,28	1,15-1,43	0,334854999	0,223	0,218-0,227	0,059053061
EXP	3,03	2,97-3,09	2,5571E-05	1,24	1,16-1,34	0,06944359
PD	0,58	0,44-0,79	0,051210804	0,28	0,27-0,30	0,002172938
ST	0,34	0,33-0,35	0,00437598	0,038	0,028-0,051	7,04335E-10

Αναλογία=Απουσία <i>TSLI</i> /Παρουσία <i>TSLI</i>						
	<i>TORI</i>			<i>ATG8</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
PE	0,917	0,904-0,929	0,79921679	0,101	0,097-0,105	0,603582938
EXP	0,929	0,885-0,977	0,10074096	3,471	3,07-3,89	0,68335229
PD	2,23	1,72-2,88	0,048197269	0,407	0,366-0,450	0,07016757
ST	0,65	0,61-0,66	0,022470257	0,070	0,068-0,074	4,81828E-06

**Πίνακας 4.10: Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPS1*, *TPS2*, *TORI* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των *S. cerevisiae tsIIΔ* και BY4741 με μηδενική υπόθεση την αντίστοιχη φάση της συνθήκης βαθμονόμησης των BY4741 για την κάθε συνθήκη μελέτης των *tsIIΔ*.** Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με EXP η εκθετική φάση, με PD η μετα-διαυξική φάση και με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η φάση ανάπτυξης, στην οποία αντιστοιχεί η κάθε τιμή του λόγου έκφρασης.

Αναλογία=Απουσία <i>TSLI</i> και Παρουσία <i>SNCA</i> /Παρουσία <i>TSLI</i>						
	<i>TPS2</i>			<i>TPS1</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
PE	1,03	0,92-1,16	0,07744356	1,39	1,33-1,43	0,175166411
EXP	2,90	2,69-3,13	0,000573314	1,17	1,14-1,20	0,050877774
PD	0,51	0,39-0,67	0,018091833	0,24	0,23-0,25	0,000165048
ST	0,287	0,285-0,293	0,002453851	0,035	0,032-0,037	1,75839E-06

Αναλογία=Απουσία <i>TSLI</i> και Παρουσία <i>SNCA</i> /Παρουσία <i>TSLI</i>						
	<i>TORI</i>			<i>ATG8</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
PE	1,102	1,02-1,10	0,635501795	0,1145	0,114-0,115	0,399686705
EXP	1,06	1,02-1,09	0,213040785	3,70	3,30-4,10	0,641459162
PD	1,61	1,26-2,05	0,288921465	0,42	0,38-0,45	0,048053396
ST	0,57	0,53-0,63	0,014925755	0,089	0,088-0,090	0,001291879

Αρχικά, αναφορικά με τα επίπεδα έκφρασης του *TPS1* μεταξύ των συγκρινόμενων συνθηκών, παρατηρούνται και σε αυτή την προσέγγιση ανάλυσης περίπου παρόμοια στοιχεία με τα προηγούμενα που αφορούσαν αποκλειστικά τα μεταλλαγμένα κύτταρα

*ts11Δ*. Το γονίδιο φέρει κατεσταλμένη έκφραση παρουσία της α-συνουκλεΐνης στην προ-εκθετική φάση, στην συνέχεια ισορροπεί στην εκθετική του φάση με τα επίπεδα του μάρτυρα και έπειτα υφίσταται πολύ ήπια κατασταλτική επίδραση στην μετα-διαυξική φάση. Παράλληλα, στην στατική φάση παρατηρούνται και σε αυτή την προσέγγιση φαινόμενα εξισορρόπησης μεταξύ των δύο συνθηκών σύγκρισης. Είναι γεγονός, πως ακόμη και αυτές οι ήπιες επιδράσεις της έκφρασης της α-συνουκλεΐνης αποτελούν σημαντικά στοιχεία, εφόσον έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες των υπολοίπων μελετώμενων κυττάρων. Σε γενικές γραμμές ωστόσο όσες μεταβολές εκδηλώνονται στα κυτταρικά φαινόμενα αποτελούν ουσιαστικά τις συνέπειες έλλειψης του *TS11*, παρά της έκφρασης της α-συνουκλεΐνης.

Στην μελέτη της έκφρασης του *TPS2* παρατηρήθηκε και σε αυτή την προσέγγιση πολύ ήπια έως καθόλου επίδραση της α-συνουκλεΐνης στις μεταβολές της μεταγραφής του. Ενώ ως την μετα-διαυξική φάση τα επίπεδα του παρουσία της α-συνουκλεΐνης συγκλίνουν σε σχέση με εκείνα απουσία αυτής, η μόνη σημαντική επίδραση σημειώνεται κατά την στατική φάση με την εμφάνιση μίας ήπιας καταστολής των επιπέδων έκφρασης της φωσφατάσης.

Φαίνεται λοιπόν και στην σύγκριση των κυττάρων *ts11Δ* με τα κύτταρα αγρίου τύπου πως η α-συνουκλεΐνη ελάχιστες αλλοιώσεις μπορεί να προκαλεί στα επίπεδα έκφρασης των βιοσυνθετικών γονιδίων της τρεχαλόζης και κατ' επέκταση της ίδιας της βιοσύνθεσης του δισακχαρίτη στα μεταλλαγμένα κύτταρα σε σχέση με τα αγρίου τύπου. Παρ' όλα αυτά υφίστανται ορισμένες μόνο ήπιες κατασταλτικές επιδράσεις, οι οποίες έχουν εμφανιστεί σε μεγαλύτερο βαθμό στα υπόλοιπα μελετώμενα είδη κυττάρων, μεταλλαγμένων ή αγρίου τύπου και δείχνουν καθορισμένες. Και εδώ θα πρέπει να σημειωθεί πως ο ήπιος αυτός φαινότυπος είναι πιθανό να προέρχεται από την εγκατάσταση της συνθήκης HEO λόγω της σταθεροποίησης του συμπλόκου TPS με την ενεργοποίηση του μεταβολικού αυτού μονοπατιού.

Στην μελέτη του μεταβολικού μονοπατιού TOR, μέσω της διερεύνησης της γονιδιακής έκφρασης του *TOR1*, δεν διαπιστώθηκαν ιδιαίτερα σημαντικές μεταβολές της έκφρασής του που να εξαρτώνται από την έκφραση της α-συνουκλεΐνης. Φαίνεται πως τα επίπεδα έκφρασης μεταξύ μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου κυττάρων φέρουν την ίδια διακύμανση σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης του ζυμομύκητα. Μία υπόνοια καταστολή των επιπέδων έκφρασης είναι πιθανό να υπάρχει στην στατική φάση, η οποία και θα μπορούσε να σχετίζεται με αρχόμενο στρες, ωστόσο οι τυπικές αποκλίσεις των συγκρινόμενων τιμών επικαλύπτονται και δεν επιτρέπουν τεκμηρίωση του γεγονότος.

Τελευταίο γονίδιο των μελετών υπό αυτή την προσέγγιση ανάλυσης αποτέλεσε το *ATG8*. Όπως παρατηρήθηκε και με τα υπόλοιπα γονίδια, και σε αυτό το γονίδιο τα επίπεδα του παρουσία α-συνουκλεΐνης στα μεταλλαγμένα κύτταρα φέρονται ισορροπημένα με εκείνα των αγρίου τύπου κυττάρων απουσία του *SNCA* σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης. Πιθανή εξαίρεση ωστόσο αποτελεί η στατική φάση μιας και παρά τις πολύ μικρές τιμές έκφρασης υπάρχει μία ήπια αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων του αυτοφαγικού γονιδίου παρουσία της α-συνουκλεΐνης. Η αύξηση αυτή φαίνεται να συνδυάζεται με την επίσης πιθανή μείωση της έκφρασης του *TOR1*. Αν αυτά ληφθούν υπόψιν, δηλώνουν πράγματι μία αρχόμενη κατάσταση στρες, η οποία ωστόσο φέρεται πολύ ήπια και διαδράμει ευνοϊκά για τα μεταλλαγμένα κύτταρα.

Τόσο οι πρώτες παρατηρήσεις των αναλύσεων της qPCR όσο και οι τελευταίες για το εν λόγω στέλεχος συμφωνούν στα κυτταρικά φαινόμενα που διαδραματίζονται υπό



την επίδραση ή όχι της α-συνουκλεΐνης στα μεταλλαγμένα κύτταρα *ts1Δ*. Και σε αυτό το σημείο για το στέλεχος αυτό υπενθυμίζονται η απουσία κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων, η χαμηλή έκφραση της α-συνουκλεΐνης στην στατική φάση και η ομοιότητα στην κυτταρική βιωσιμότητα της χρονολογικής γήρανσης με τα αγρίου τύπου κύτταρα. Μπορεί, ως εκ τούτου, να θεωρηθεί πως τα κύτταρα αυτά αποδεικνύονται ευεργετημένα από την συνθήκη ΗΕΟ, με την έννοια της απεικόνισης ενός φυσιολογικού φαινοτύπου.

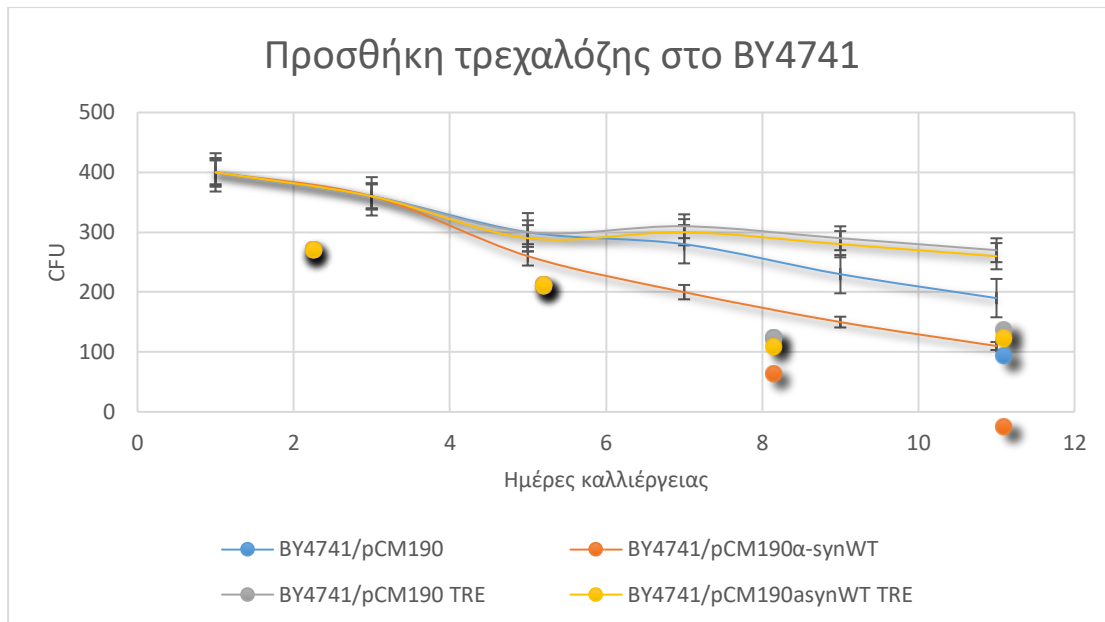
## **Θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη στα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae***

### **4.16 Θεραπευτική παρέμβαση στα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* με την χρήση τρεχαλόζης και μελέτες βιωσιμότητας**

Έπειτα από την διερεύνηση των φαινοτύπων της α-συνουκλεΐνης και της εξάρτησής τους από κρίσιμα μεταβολικά μονοπάτια σε όλο το εύρος ζωής των ζυμομυκήτων στην συνθήκη ΗΕΟ, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η ανάπτυξη και η βιωσιμότητά τους με την προσθήκη τρεχαλόζης στο θρεπτικό μέσο ως θεραπευτική παρέμβαση στα στρεσαρισμένα κύτταρα. Η παρέμβαση αυτή περιλάμβανε όλα τα μελετώμενα στελέχη *S. cerevisiae*, τόσο του αγρίου τύπου BY4741 όσο και τα μεταλλαγμένα στελέχη *tps1Δ*, *tps2Δ* και *ts1Δ*. Η τρεχαλόζη προστέθηκε την πέμπτη ημέρα καλλιέργειας κατά την μετα-διαυξική φάση σε τελική συγκέντρωση 4%. Η συγκεκριμένη χρονική στιγμή για την προσθήκη επιλέχθηκε, επειδή κατά τη χρονολογική γήρανση εκδηλώθηκε ο πλέον τοξικός φαινότυπος για κάθε συνθήκη που μελετήθηκε, ενώ παγιώθηκε σε όλα τα κύτταρα από την έκτη έως την όγδοη ημέρα ζωής. Το γεγονός αυτό τεκμηριώθηκε για όλα τα στελέχη. Συνεπώς, η τρεχαλόζη θεωρητικά θα δρούσε ως μέτρο τόσο πρόληψης των φαινομένων της στατικής φάσης όσο και θεραπείας για όσα στελέχη φέρονται επηρεασμένα από την έκφραση της α-συνουκλεΐνης. Η συγκέντρωση επιλέχθηκε με βάση παρόμοιες μελέτες στην διεθνή βιβλιογραφία (Chaudhary et al., 2014).

Στην πρώτη φάση της παρέμβασης αυτής μελετήθηκε η κυτταρική βιωσιμότητα με την κατασκευή καμπυλών χρονολογικής γήρανσης για όλα τα στελέχη ζυμομυκήτων παρουσία και απουσία του *SNCA*, καθώς και προσθήκης ή όχι τρεχαλόζης στα ίδια κύτταρα.

Η χρονολογική γήρανση κατά την θεραπευτική παρέμβαση της τρεχαλόζης στο στέλεχος αγρίου τύπου BY4741 παρουσιάζεται στην εικόνα 4.30.

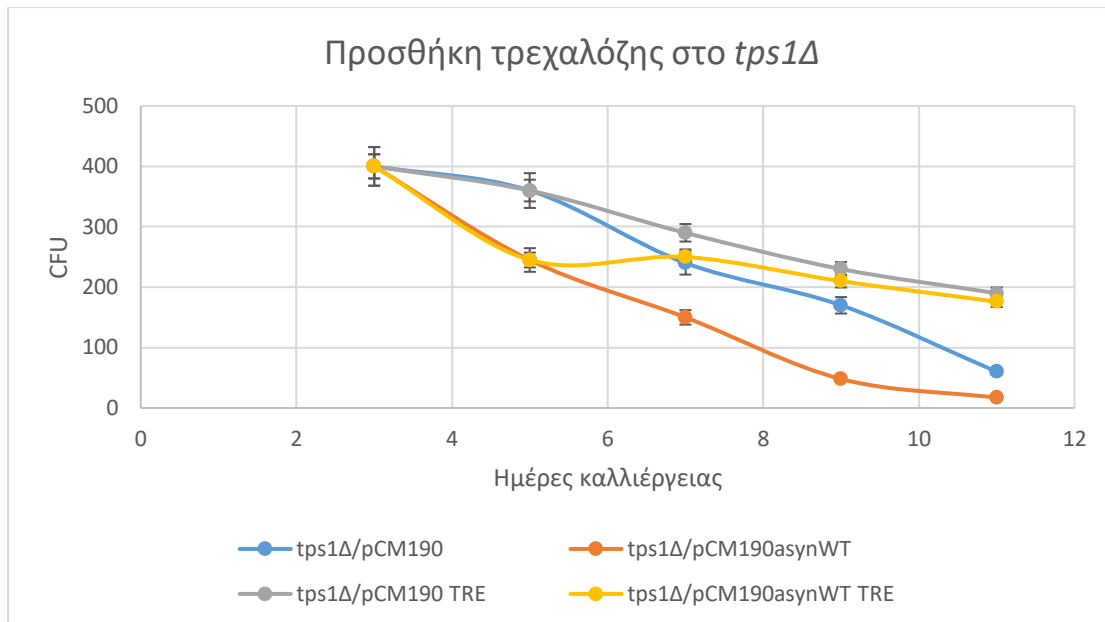


**Εικόνα 4.30:** Χρονολογική γήρανση του στελέχους ζυμομύκητα BY4741 κατά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη 4%.

Από την παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι η προσθήκη τρεχαλόζης στο θρεπτικό μέσο αυξάνει την βιωσιμότητα των κυττάρων τόσο απουσία όσο και παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και διευρύνει το εύρος ζωής τους κατά την χρονολογική γήρανση. Ενώ η διεύρυνση αυτή είναι ήπια για τα κύτταρα του φορέα-μάρτυρα, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση της βιωσιμότητας παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, τέτοιο ώστε οι δύο κυτταρικοί πληθυσμοί παρουσία τρεχαλόζης να συγκλίνουν, αλλά και να σταθεροποιούνται σε όμοια υψηλά επίπεδα βιωσιμότητας χωρίς μάλιστα να υπάρχει πτώση στα αργότερα στάδια γήρανσης έως και την δωδέκατη ημέρα.

Τα παραπάνω γεγονότα θα μπορούσαν να θεωρηθούν και κατά κάποιο τρόπο αναμενόμενα με βάση το γεγονός πως αυξάνεται το ποσοστό της τρεχαλόζης στα κύτταρα σε μία φάση όπου έχουν ήδη συσσωρεύσει την μέγιστη δυνατή ποσότητα. Η αύξηση αυτή σαφώς εξυπηρετεί με λογικό τρόπο τις ενεργειακές ανάγκες των κυττάρων. Ακόμη, η αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων που έφεραν το γονίδιο της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης αποτελεί ιδιαίτερο εύρημα με βάση την καταγραφή της δυνατότητας των κυττάρων αυτών να εξισορροπούν μετά την θεραπευτική παρέμβαση με εκείνα του φορέα μάρτυρα. Για το λόγο αυτό σε επόμενη ενότητα αναλύθηκαν περαιτέρω ορισμένες παράμετροι της αύξησης αυτής.

Στην συνέχεια, στην εικόνα 4.31 παρουσιάζονται οι καμπύλες χρονολογικής γήρανσης κατά την προσθήκη τρεχαλόζης στο στέλεχος *tps1Δ*.

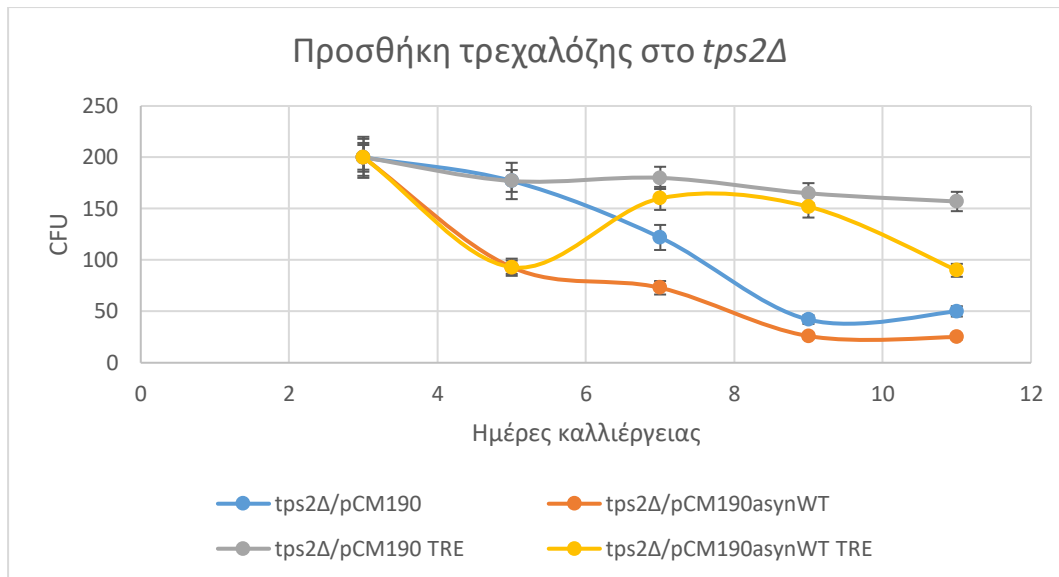


**Εικόνα 4.31:** Χρονολογική γήρανση του στελέχους ζυμομύκητα *tps1Δ* κατά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη 4%.

Και στην περίπτωση του στελέχους *tps1Δ* η θεραπευτική παρέμβαση της τρεχαλόζης φαίνεται να αποβαίνει σημαντική. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.31, στο στέλεχος αυτό η προσθήκη τρεχαλόζης αυξάνει σε μεγαλύτερο βαθμό την κυτταρική βιωσιμότητα αν κρίνει κανείς από την αύξηση στον αριθμό σχηματιζόμενων αποικιών στα κύτταρα του φορέα-μάρτυρα μεταξύ των συνθηκών προσθήκης ή μη τρεχαλόζης. Επίσης, τα δεδομένα που ίσχυαν και για το στέλεχος αγρίου τύπου φαίνεται να ισχύουν και σε αυτό, σε ό,τι αφορά τα κύτταρα που φέρουν την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη. Κατά την προσθήκη τρεχαλόζης υφίσταται σημαντική αύξηση της βιωσιμότητάς τους με συνέπεια την εξίσωσή τους με τα αντίστοιχα κύτταρα του φορέα και την σταθεροποίησή του σε υψηλά επίπεδα ως την ενδέκατη ημέρα ζωής.

Οι παρατηρήσεις αυτές υπενθυμίζεται, φυσικά, πως συμβαίνουν σε κύτταρα, τα οποία δεν βιοσυνθέτουν τρεχαλόζη, οπότε είναι σημαντική η ανάδειξη του γεγονότος πως με την προσθήκη του δισακχαρίτη εξωγενώς τα επίπεδα βιωσιμότητας φτάνουν σε υψηλά επίπεδα και η εξαρτώμενη από την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη τοξικότητα απαλοίζεται έως και τις απότερες μέρες καλλιέργειας.

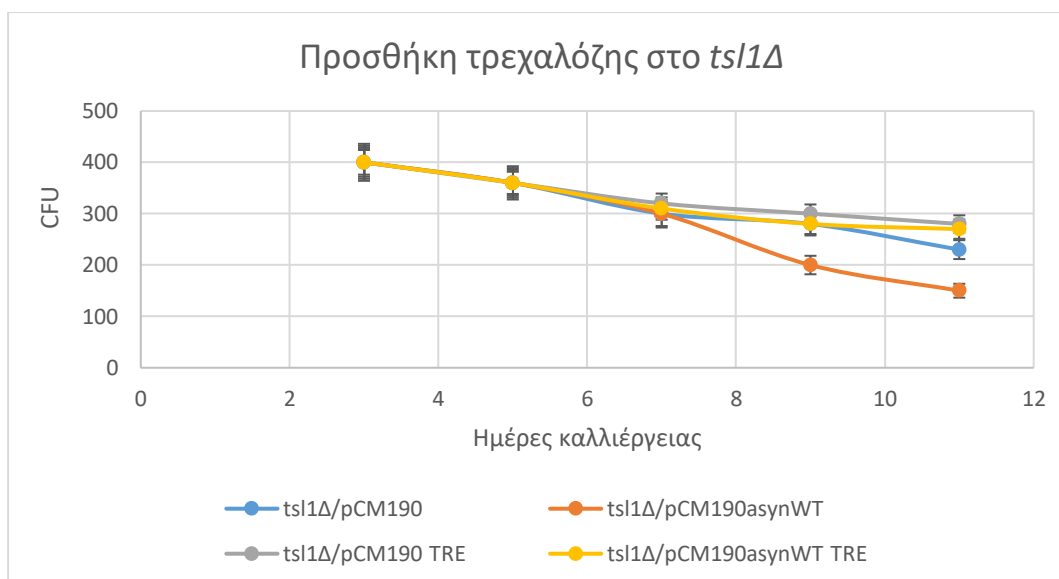
Στην εικόνα 4.32 παρουσιάζονται οι καμπύλες χρονολογικής γήρανσης κατά την προσθήκη τρεχαλόζης στο στέλεχος *tps2Δ*.



**Εικόνα 4.32:** Χρονολογική γήρανση του στελέχους ζυμομύκητα *tps2Δ* κατά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη 4%.

Η εξωγενής χορήγηση τρεχαλόζης αποδείχθηκε ευνοϊκή και για το στέλεχος *tps2Δ*. Ωστόσο παρατηρούνται ορισμένες διαφοροποιήσεις σε σχέση με τα προηγούμενα δύο στελέχη. Ενώ κατά την προσθήκη τρεχαλόζης στα κύτταρα του φορέα-μάρτυρα, η κυτταρική βιωσιμότητα αυξάνεται και παραμένει σταθερή έως τις έντεκα ημέρες καλλιέργειας, κατά την παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης μπορεί να συμβαίνει αύξηση της βιωσιμότητας, αλλά στην ενδέκατη ημέρα η βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσία του *SNCA* μειώνεται εκ νέου και αποκλίνει των κυττάρων του φορέα. Το γεγονός αυτό δηλώνει πιο ασθενείς επιδράσεις της τρεχαλόζης στα κύτταρα παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και εκ νέου τονίζει την υψηλή τοξικότητα του εν λόγω στελέχους στην έκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, παρά την παρέμβαση της τρεχαλόζης.

Τέλος, οι μελέτες βιωσιμότητας της θεραπευτικής παρέμβασης με τρεχαλόζη ολοκληρώθηκαν με την μελέτη του *ts1Δ*. Στην εικόνα 4.33 παρουσιάζονται οι καμπύλες χρονολογικής γήρανσης κατά την προσθήκη τρεχαλόζης στο συγκεκριμένο στέλεχος.



**Εικόνα 4.33:** Χρονολογική γήρανση του στελέχους ζυμομύκητα *ts11Δ* κατά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη 4%.

Είχε αποδειχθεί και από προηγούμενες μελέτες βιωσιμότητας πως το στέλεχος *ts11Δ* φέρει πολύ ήπιο φαινότυπο παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης με χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης και απουσία τοξικότητας. Κατά την προσθήκη τρεχαλόζης, όπως αναμενόταν, επετεύχθη αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας, η οποία ήταν ελάχιστα αυξημένη για τα κύτταρα του φορέα-μάρτυρα και αρκετά αυξημένη για εκείνα που έφεραν την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη (Εικόνα 4.33). Οι δύο κυτταρικοί πληθυσμοί μετά την προσθήκη τρεχαλόζης αποκτούν παρόμοια επίπεδα βιωσιμότητας και σταθεροποιούνται και σε αυτό το στέλεχος σε υψηλές τιμές από την αρχή της παρέμβασης.

Ως εκ τούτου, για όλα τα στελέχη η παρέμβαση της προσθήκης 4% τρεχαλόζης στο μέσο ανάπτυξης αποδείχθηκε ευεργετική και αύξησε την βιωσιμότητα όλων των τύπων κυττάρων, υπογραμμίζοντας την σημασία της για την φυσιολογία του *S. cerevisiae*. Η τελευταία παρατήρηση άλλωστε εξάγεται από την μελέτη των μεταλλαγμένων στελεχών, ιδιαίτερα εκείνων που αφορούν τα βιοσυνθετικά γονίδια της.

#### **4.17 Εντόπιση και κατανομή της $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* μετά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη.**

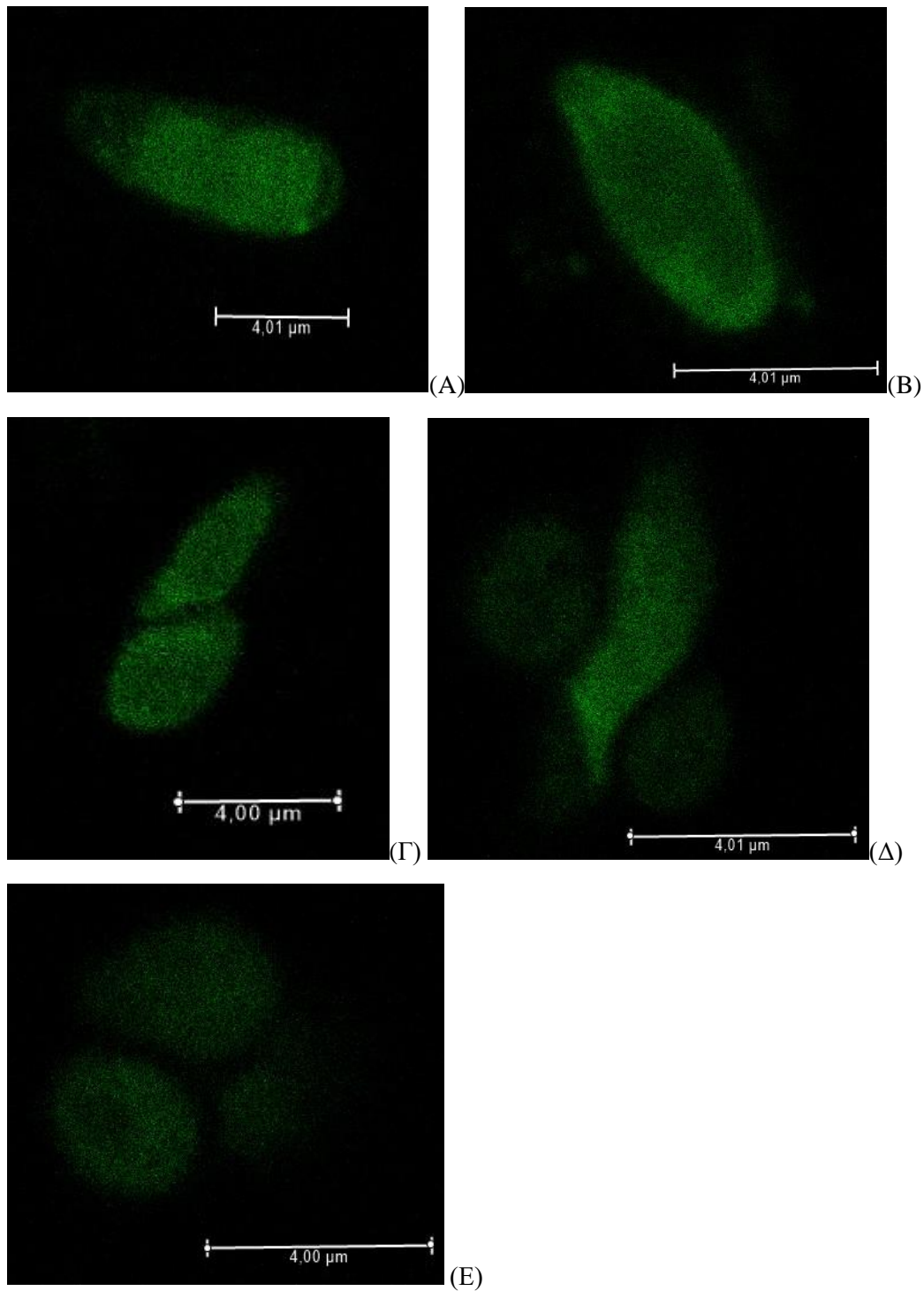
Όπως είχε αναλυθεί και στο κεφάλαιο της Εισαγωγής της παρούσας διατριβής, η τρεχαλόζη φέρει πολλές και σημαντικές ιδιότητες για την αντιμετώπιση πλήθους στρες για τα κύτταρα των ζυμομυκήτων. Κρίσιμη θεωρείται η συμμετοχή της στην αντιμετώπιση του πρωτεοτοξικού στρες, τόσο άμεσα λόγω της δυνατότητας να αποδιατάσσει λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες μέσω της δομής της, όσο και έμμεσα μέσω της επαγωγής του αυτοφαγικού μηχανισμού.

Κατά συνέπεια, κρίθηκε σκόπιμο, μετά την προσθήκη τρεχαλόζης, ως θεραπευτικό μέσο για τα κύτταρα, να διερευνηθεί στην παρούσα συνθήκη η εντόπιση και η κατανομή της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα κύτταρα. Με αυτό τον τρόπο θα πραγματοποιούνταν επίσης και μία συγκριτική ανάλυση για την επιτυχία ή όχι της παρέμβασης αυτής στην αποδιάταξη των κυτταροπλασματικών εγκλείστων που φαίνεται να σχηματίζονται σε ορισμένα από τα μελετώμενα στελέχη.

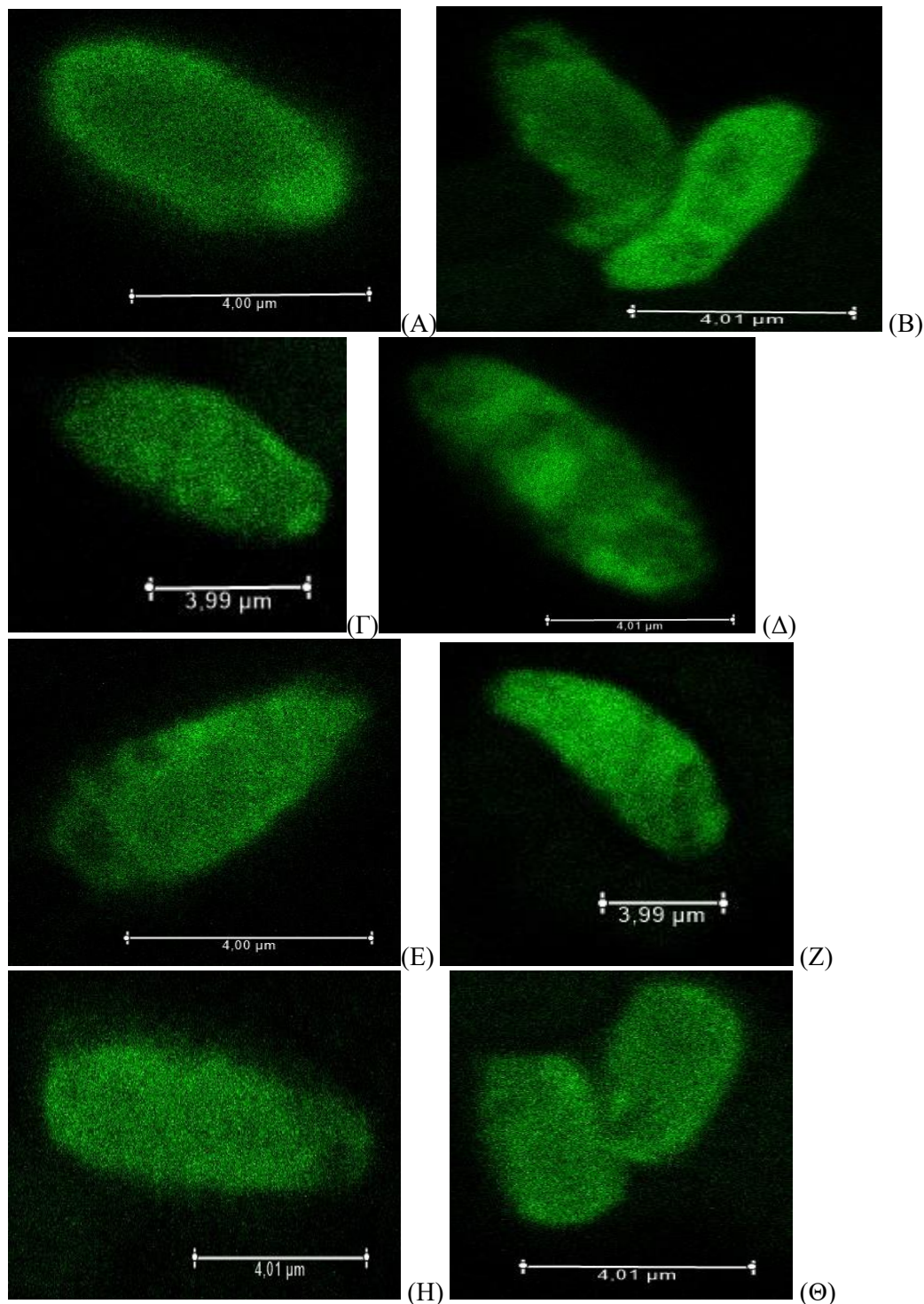
Οι μελέτες της εντόπισης και της κατανομής της πρωτεΐνης στα κύτταρα περιλάμβαναν και σε αυτή την περίπτωση τον ανοσοφθορισμό της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και την παρατήρηση των κυττάρων στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

Η θεραπευτική παρέμβαση πραγματοποιήθηκε ακριβώς με τον ίδιο τρόπο της προηγούμενης ενότητας στην πέμπτη ημέρα καλλιέργειας κατά την μετα-διαυξική φάση και τα κύτταρα συλλέχθηκαν για παρατήρηση κατά την όγδοη ημέρα.

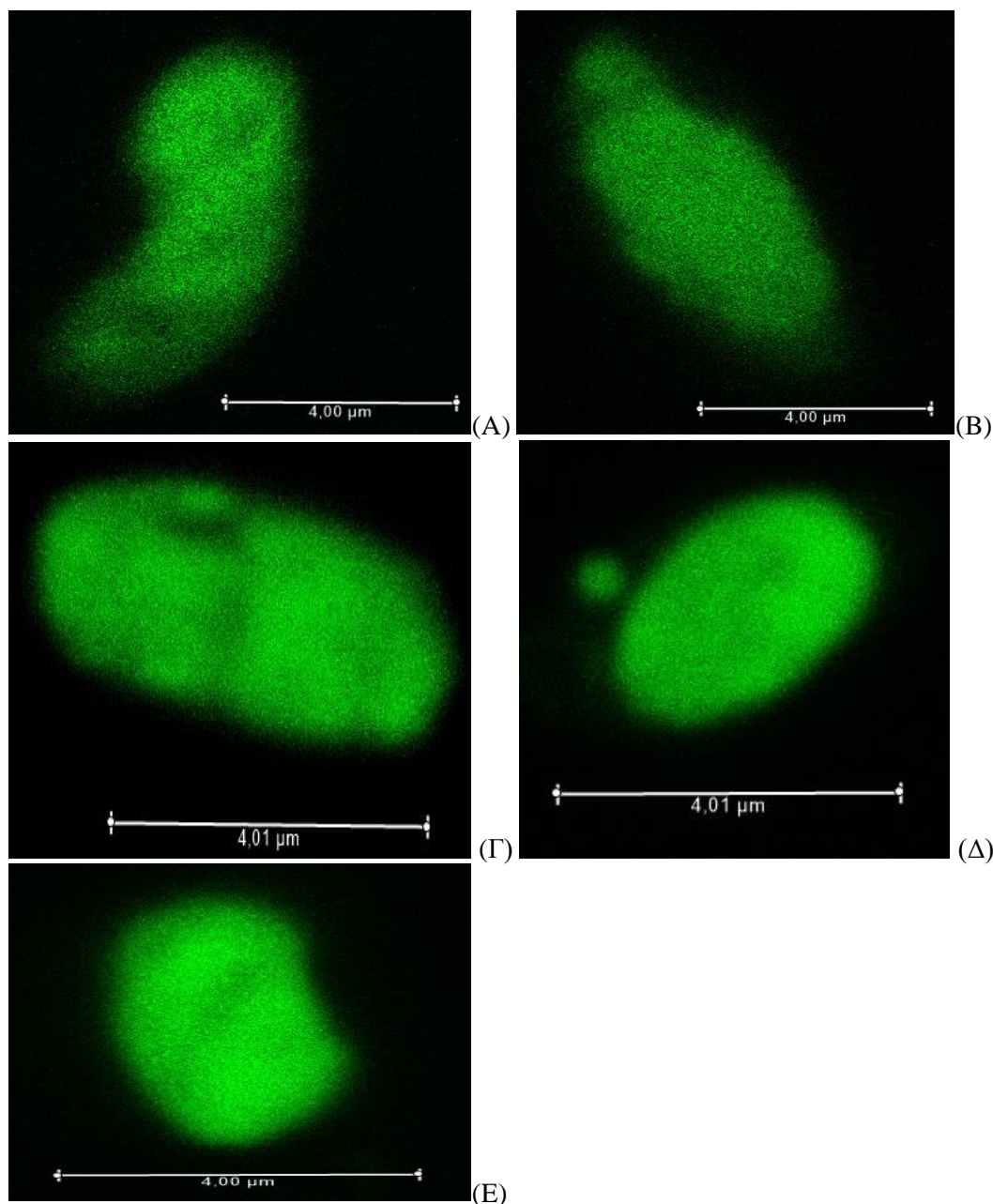
Οι φωτογραφίες που αφορούσαν το στέλεχος BY4741 μετά την παρέμβαση με τρεχαλόζη παρουσιάζονται στην εικόνα 4.36 και αντιπαραβάλλονται με εκείνες σε συνθήκες απουσίας τρεχαλόζης από την ενότητα 4.6 οι οποίες για λόγους σύγκρισης παρουσιάζονται εκ νέου στις εικόνες 4.34 και 4.35.



**4.34:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της α-συνουκλεΐνης σε κύτταρα εκθετικής φάσης ανάπτυξης του *S. cerevisiae* χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης. (Κλίμακα 4 μm) Στις εικόνες A, Γ, Δ, E παρατηρούνται κύτταρα με κυτταροπλασματική κατανομή της α-συνουκλεΐνης, ενώ παρατηρήθηκε και μεμβρανική εντόπιση στο κύτταρο της εικόνας B. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]



**4.35:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της  $\alpha$ -συνουκλείνης σε κύτταρα στατικής φάσης ανάπτυξης-φάσης γήρανσης του *S. cerevisiae* χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης. (Κλίμακα 4  $\mu\text{m}$ ) Τα κύτταρα στις εικόνες A, B και Θ (δεξιά) φέρουν μεμβρανική εντόπιση της  $\alpha$ -συνουκλείνης. Τα κύτταρα στις εικόνες Γ, Δ, E, Z, H και Θ (αριστερά) φέρουν κυτταροπλασματική κατανομή της  $\alpha$ -συνουκλείνης. Ακόμη, τα κύτταρα στις εικόνες Γ, Δ και E φαίνεται να παρουσιάζουν κυτταροπλασματικά συσσωματώματα της πρωτεΐνης. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]



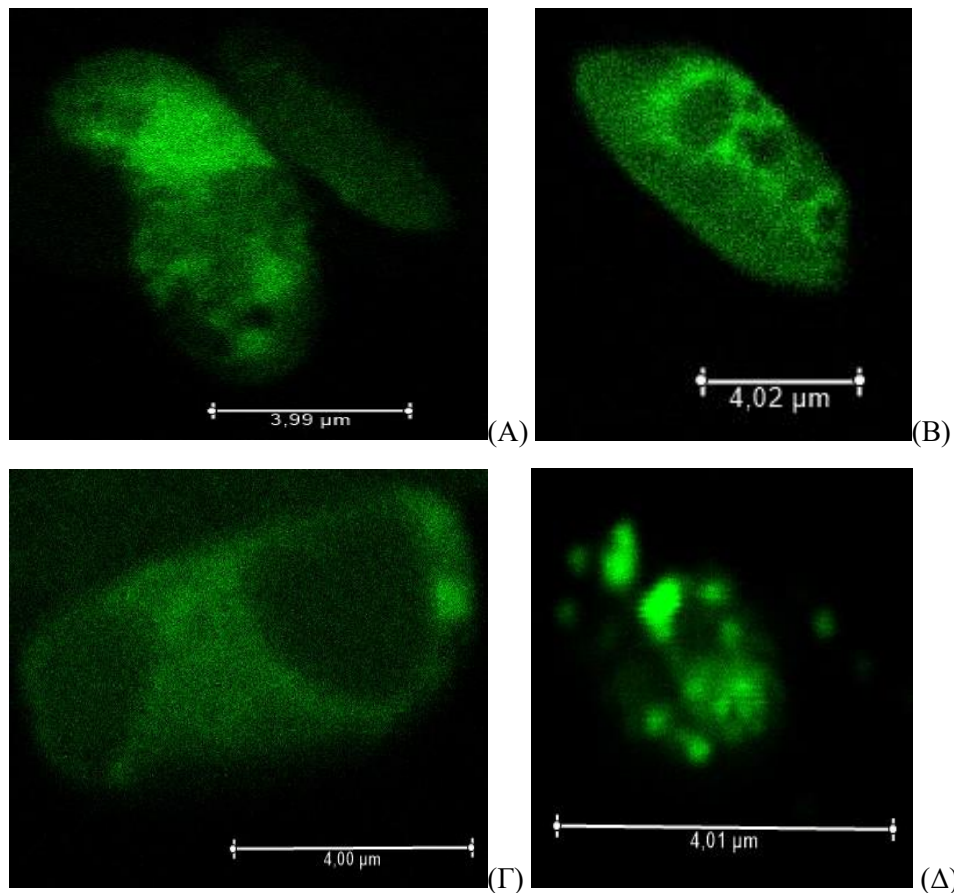
**Εικόνα 4.36:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για την κατανομή και εντόπιση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στο στέλεχος BY4741 κατά την στατική φάση ανάπτυξης μετά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη. (Κλίμακα 4  $\mu\text{m}$ ) Παρατηρούνται κυρίως κύτταρα με κυτταροπλασματική κατανομή της πρωτεΐνης (Α, Β, Γ και Ε), ενώ εντοπίστηκε και ένα κύτταρο με μεμβρανική εντόπιση της πρωτεΐνης (Δ). [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]

Σύμφωνα με τις φωτογραφίες της εικόνας 4.36 στην στατική φάση των κυττάρων BY4741 μετά την προσθήκη τρεχαλόζης η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη φέρει κυρίως κυτταροπλασματική εντόπιση και μικρή πιθανότητα εμφάνισης στην κυτταρική μεμβράνη. Συγκρίνοντας τα δεδομένα αυτά με εκείνα του πρώτου ανοσοφθορισμού για τα αντίστοιχα κύτταρα χωρίς την παρέμβαση της τρεχαλόζης (εικόνα 4.34 και 4.35), αντιλαμβάνεται κανείς πως κατά την παρέμβαση το ποσοστό των κυττάρων με κυτταροπλασματική εντόπιση έχει αυξηθεί, η μεμβρανική εντόπιση είναι σπάνια παρατήρηση, ενώ τα κυτταροπλασματικά έγκλειστα, τα οποία σπάνια εμφανίζονταν

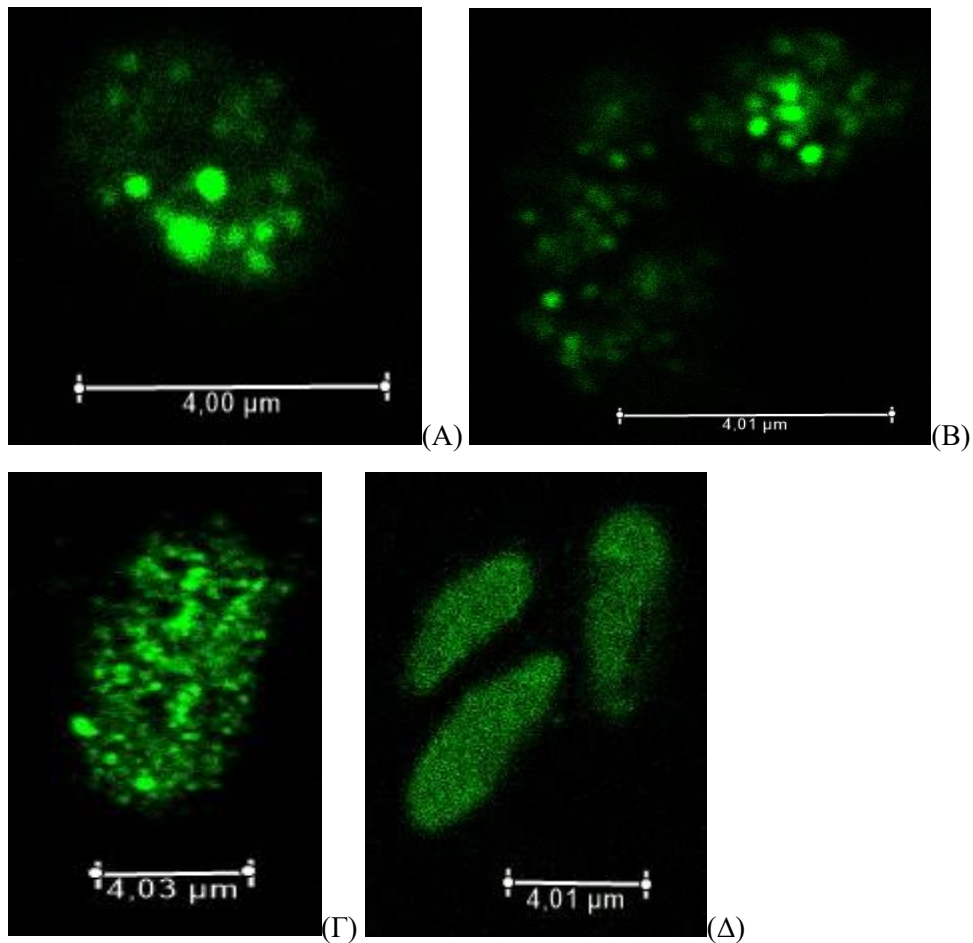


χωρίς την θεραπευτική παρέμβαση, στην περίπτωση αυτή είναι εντελώς απόντα. Η τρεχαλόζη φαίνεται πως ήρε την τοξική πορεία από την έκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και μέσω αυτής εμφανίστηκε ένας φαινότυπος, όμοιος με την εκθετική φάση των ίδιων κυττάρων (εικόνα 4.34). Σε κάθε περίπτωση, ωστόσο, για τα συγκεκριμένα κύτταρα ο φαινότυπος δεν εμφανιζόταν σε οποιοδήποτε βαθμό ιδιαίτερα τοξικός, παρ' όλα αυτά με την προσθήκη τρεχαλόζης η πορεία προς την τοξικότητα φαίνεται να παρεμποδίστηκε και η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη απέκτησε την εντόπιση που έφερε κατά τα πρώτα στάδια της έκφρασής της στην εκθετική φάση.

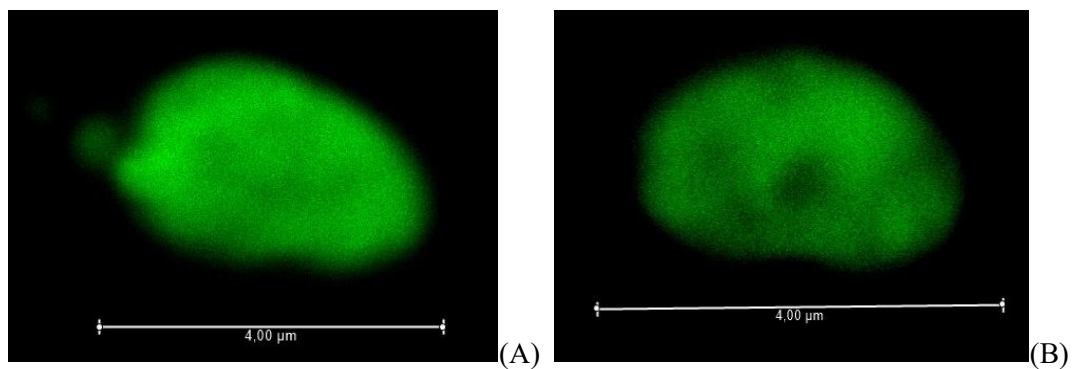
Το επόμενο στέλεχος μελέτης κατά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη αποτέλεσε το *tps1Δ*. Οι φωτογραφίες που αφορούσαν το συγκεκριμένο στέλεχος χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης και εκείνες μετά την παρέμβαση με τρεχαλόζη παρουσιάζονται στις εικόνες 4.37, 4.38 και 4.39 αντίστοιχα.

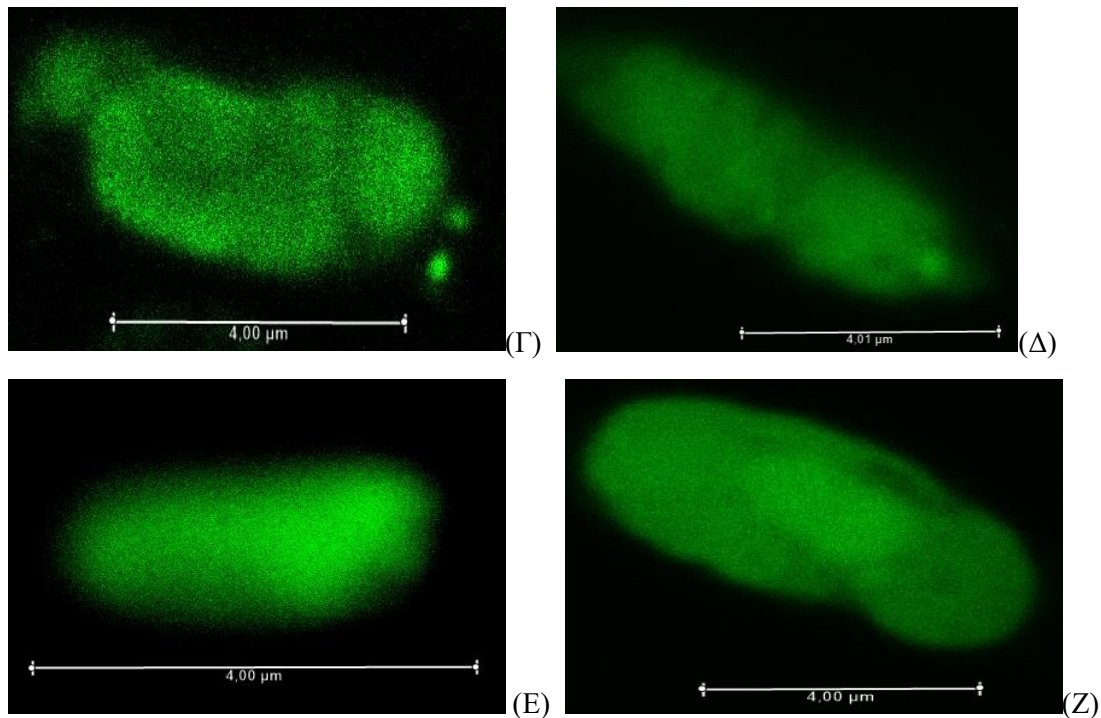


**Εικόνα 4.37:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε κύτταρα εκθετικής φάσης ανάπτυξης του *S. cerevisiae tps1Δ* χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης. (Κλίμακα 4  $\mu\text{m}$ ) Στις εικόνες A, B και Δ παρατηρούνται κύτταρα με κυτταροπλασματικά συσσωματώματα και περιοργανιδιακή κατανομή, ενώ στην εικόνα Γ εμφανίζεται και κυτταροπλασματική εντόπιση της πρωτεΐνης. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]



**Εικόνα 4.38:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε κύτταρα στατικής φάσης ανάπτυξης του *S. cerevisiae tps1Δ* χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης. (Κλίμακα 4  $\mu\text{m}$ ) Στις εικόνες Α, Β και Γ παρατηρούνται κύτταρα με κυτταροπλασματικά συσσωματώματα, ενώ στην εικόνα Δ λαμβάνεται και κυτταροπλασματική εντόπιση της πρωτεΐνης. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]

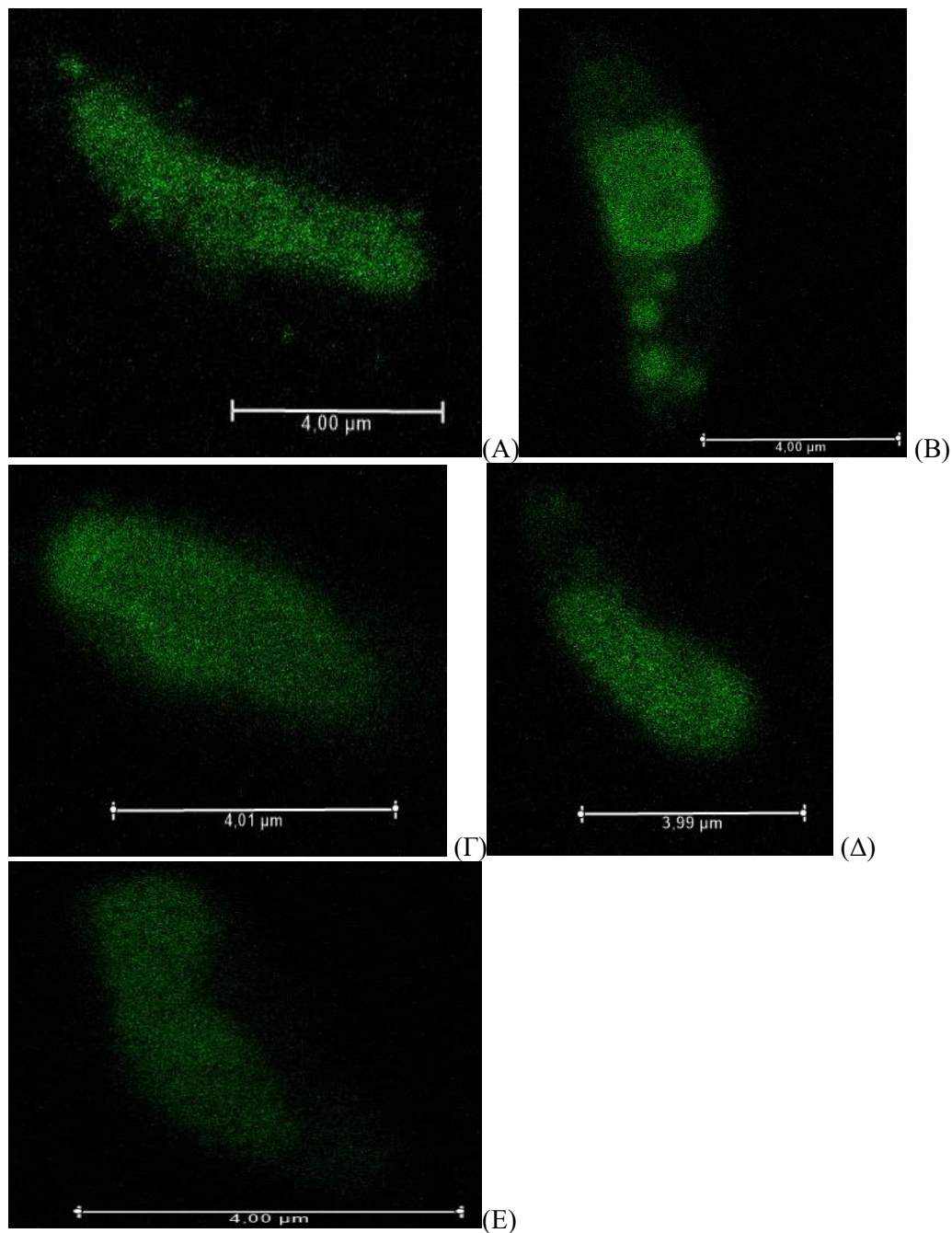




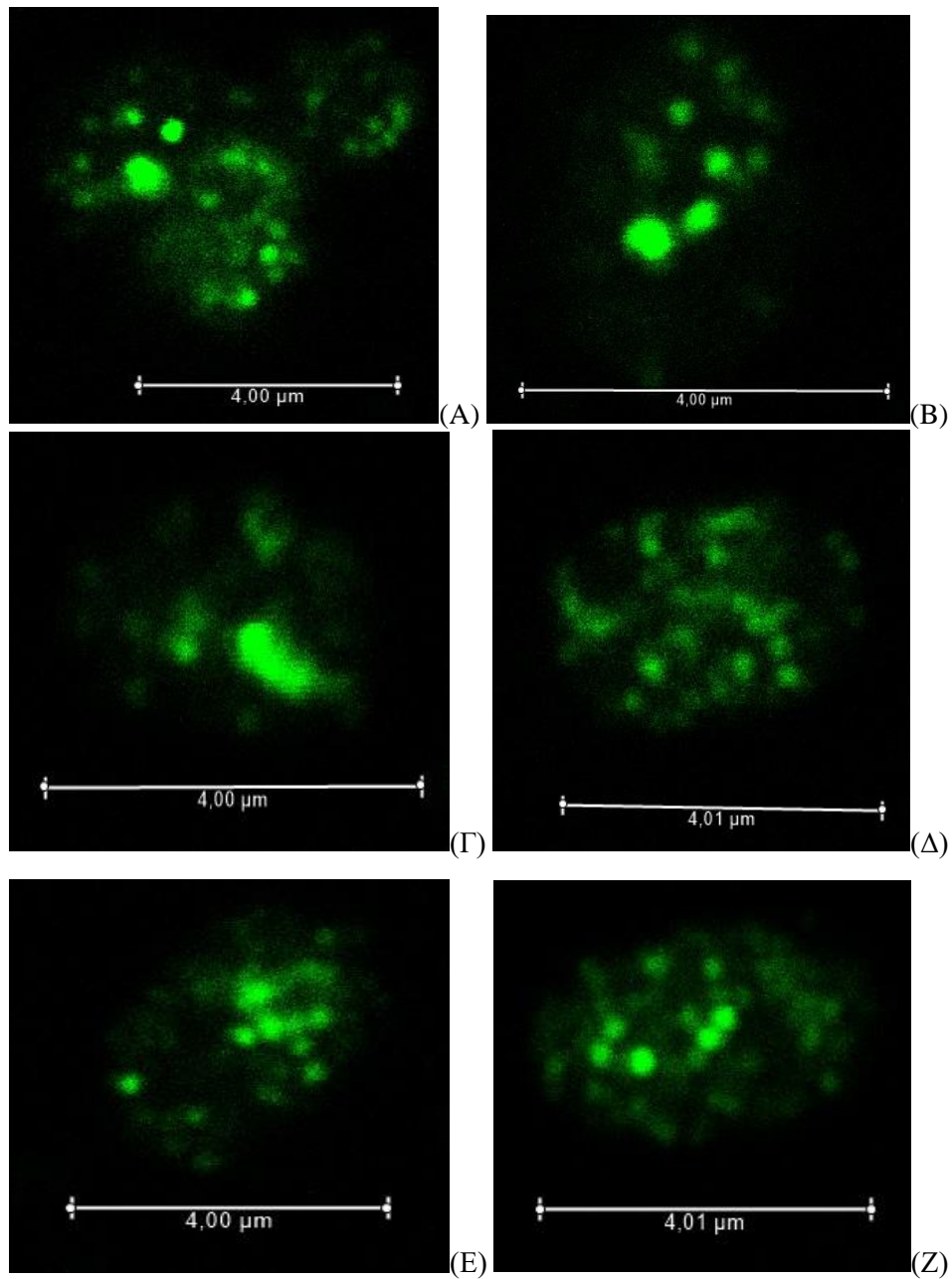
**Εικόνα 4.39:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για την κατανομή και εντόπιση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στο στέλεχος *tps1Δ* κατά την στατική φάση ανάπτυξης μετά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη. (Κλίμακα 4  $\mu\text{m}$ ) Παρατηρούνται κυρίως κύτταρα με κυτταροπλασματική κατανομή της πρωτεΐνης (A, B, Δ, E και Z) ενώ εντοπίστηκε και ένα κύτταρο με μεμβρανική εντόπιση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (Γ). Στα κύτταρα (B) και (Δ) πιθανόν να υπάρχουν λίγα (1-2) κυτταροπλασματικά έγκλειστα. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]

Στο στέλεχος *tps1Δ*, το οποίο ελλείπει της συνθάσης της τρεχαλόζης, δεν βιοσυνθέτει τρεχαλόζη, είχαν αρχικά παρατηρηθεί έντονα φαινόμενα συσσωμάτωσης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης από τις πρώτες φάσεις ζωής των μεταλλαγμένων κυττάρων (εικόνα 4.37) με βαθμιαία επιδείνωση του φαινότυπου στην στατική φάση (εικόνα 4.38). Το φαινόμενο αυτό δείχνει να αντιστρέφεται κατά την παρέμβαση της τρεχαλόζης, όπου παρατηρούνται πλέον κύτταρα με κυτταροπλασματική κατανομή της πρωτεΐνης στην στατική φάση και ελάχιστα με μεμβρανική εντόπιση (εικόνα 4.39), ένας φαινότυπος αρκετά σπάνιος ακόμη και στην εκθετική φάση του στελέχους αυτού χωρίς την θεραπευτική παρέμβαση. Μάλιστα, οι εικόνες αυτές είναι ίδιες με εκείνες του αγρίου τύπου στελέχους, όπως περιγράφησαν προηγουμένως (εικόνα 4.36). Μετά την παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται σε σημαντικό βαθμό η ευεργετική δράση της τρεχαλόζης, μιας και σε συνθήκες απουσίας της, η εξωγενής προσθήκη της επαναφέρει τον φαινότυπο στα φυσιολογικά του πλαίσια. Παράλληλα το γεγονός αυτό ενισχύει και τα δεδομένα για τον ρόλο που διαδραματίζει στο πρωτεοτοξικό στρες με την σημαντική μείωση των συσσωματωμάτων ως πρωταρχικό χαρακτηριστικό της δράσης της.

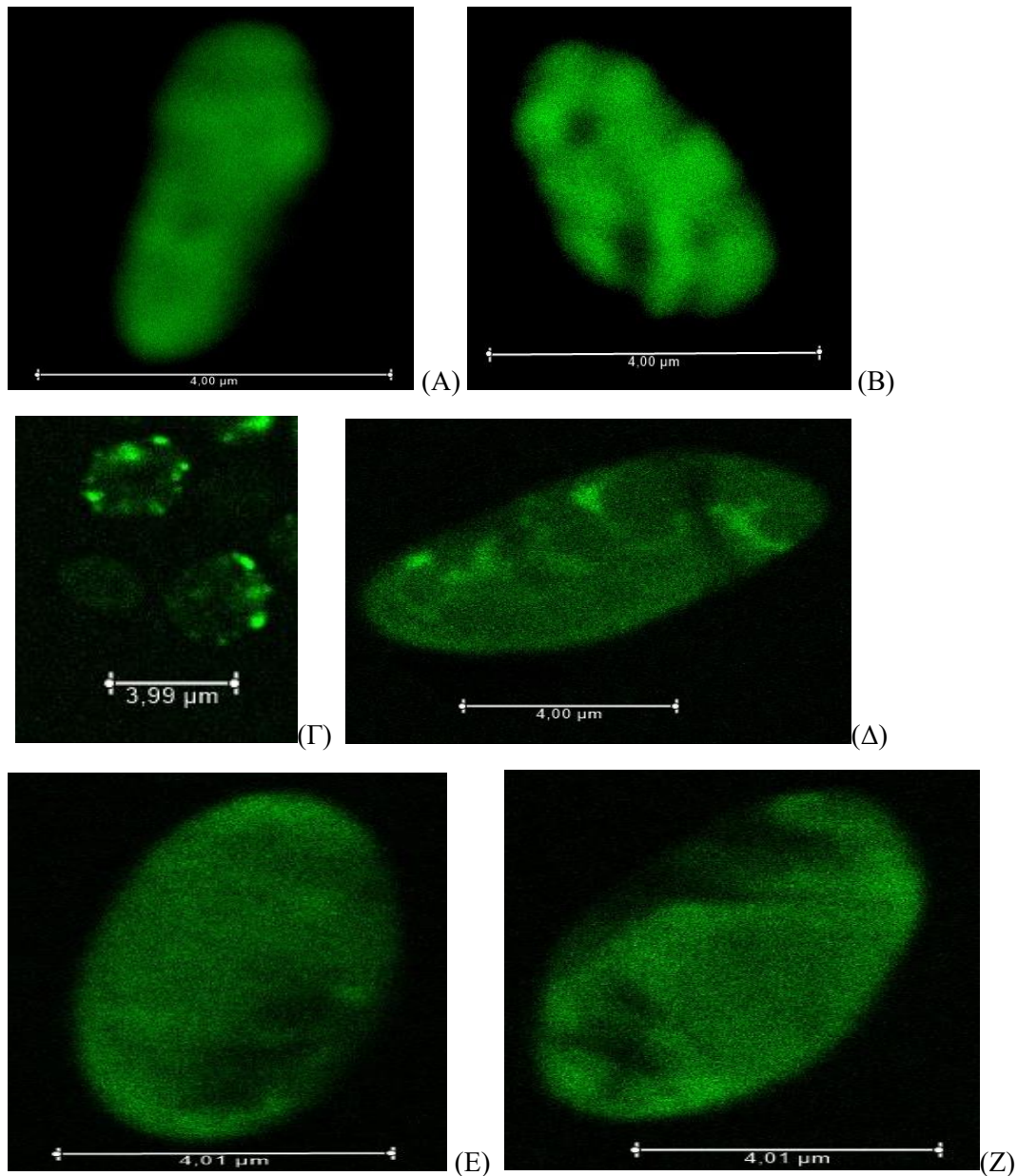
Στην συνέχεια μελετήθηκε το στέλεχος *tps2Δ*, του οποίου οι φωτογραφίες του ανοσοφθορισμού χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης και κατά την παρέμβαση τρεχαλόζης παρουσιάζονται στις εικόνα 4.40, 4.41 και 4.42 αντίστοιχα.



**Εικόνα 4.40:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε κύτταρα εκθετικής φάσης ανάπτυξης του *S. cerevisiae tps2Δ* χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης. (Κλίμακα 4  $\mu\text{m}$ ) Στις εικόνες Α, Δ και Ε παρατηρούνται κύτταρα με κυτταροπλασματική εντόπιση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, ενώ στην εικόνα Γ λαμβάνεται και μεμβρανική κατανομή της. Στην εικόνα Β παρατηρούνται κυτταροπλασματικά συσσωματώματα. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]



**Εικόνα 4.41:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στην στατική φάση ανάπτυξης του *S. cerevisiae tps2Δ* χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης. (Κλίμακα 4  $\mu\text{m}$ ) Σε όλες τις εικόνες παρατηρούνται κυτταροπλασματικά συσσωματώματα. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]

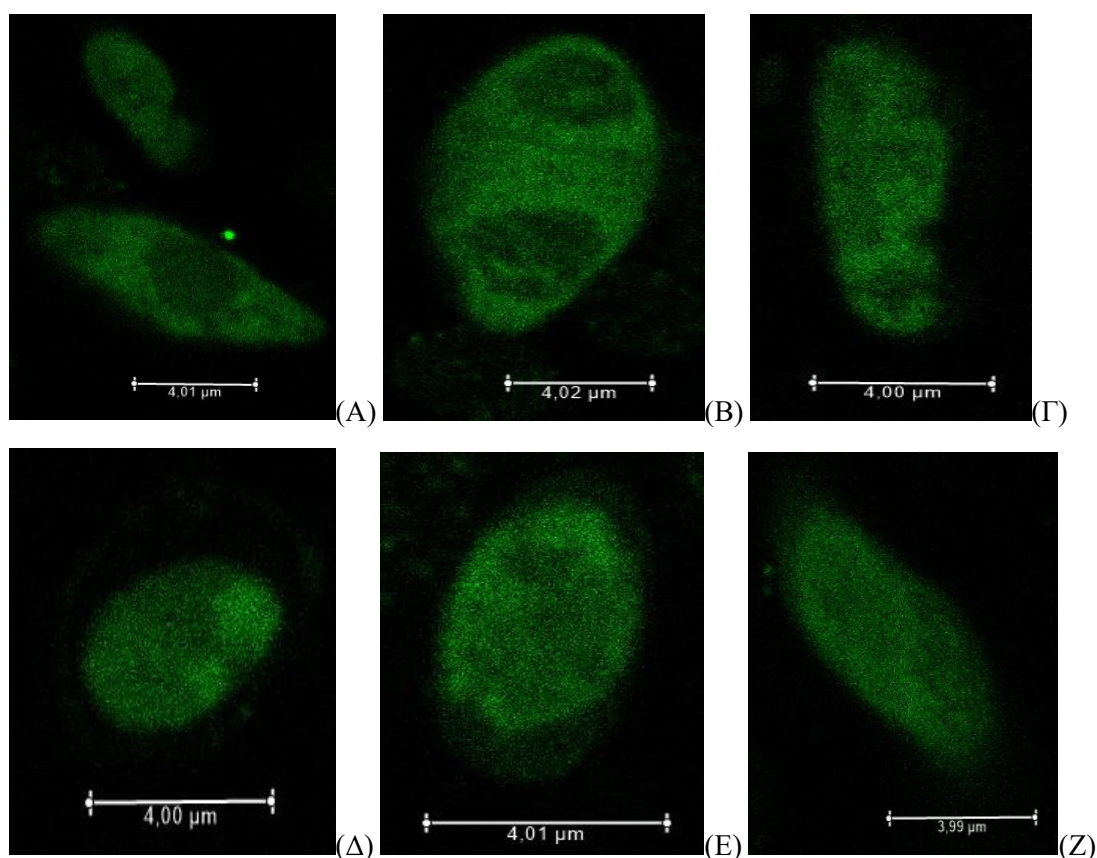


**Εικόνα 4.42:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για την κατανομή και εντόπιση της α-συνουκλεΐνης στο στέλεχος *tps2Δ* κατά την στατική φάση ανάπτυξης μετά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη. (Κλίμακα 4 μm) Παρατηρούνται διάφοροι φαινότυποι. Στα κύτταρα (A), (B), (Δ), (Z) εμφανίζεται κυτταροπλασματική εντόπιση της α-συνουκλεΐνης, καθώς και κυτταροπλασματικά έγκλειστα. Στην φωτογραφία (Z) είναι πιθανή και μεμβρανική εντόπιση. Στην φωτογραφία (Γ) εντοπίζονται κύτταρα με κυτταροπλασματικά έγκλειστα. Στην φωτογραφία (E) παρατηρείται κύτταρο με μεμβρανική εντόπιση της πρωτεΐνης. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]

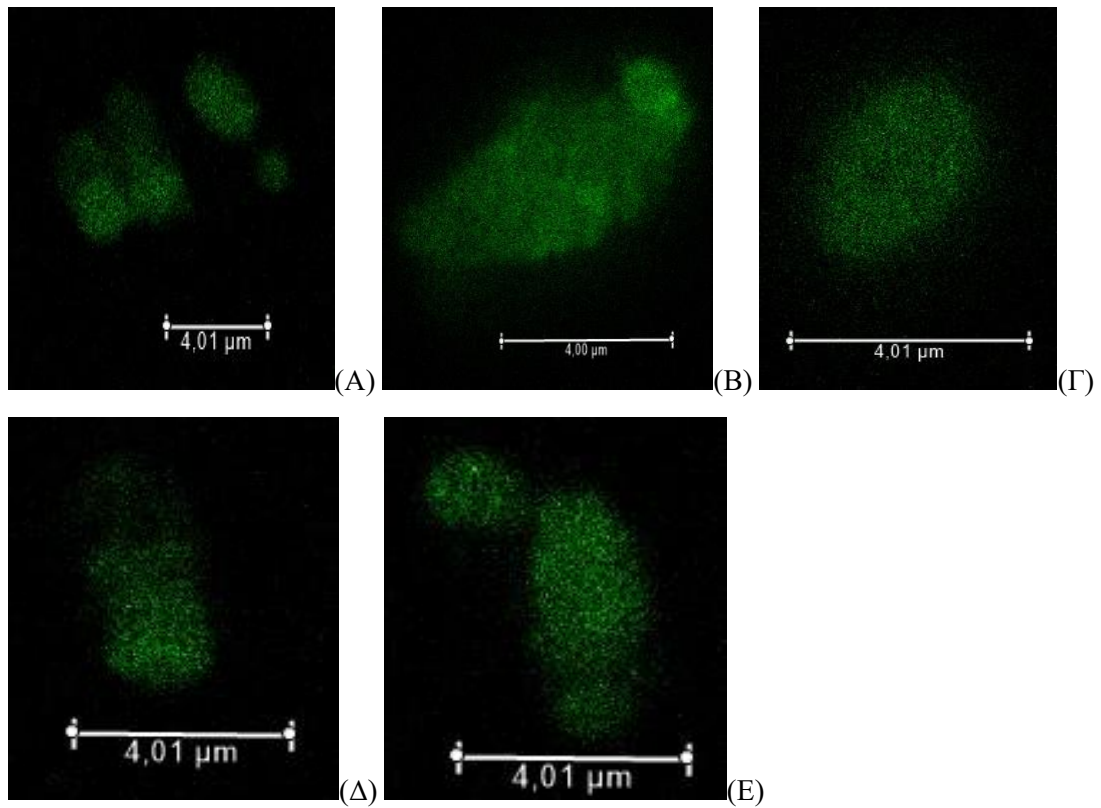
Στο μεταλλαγμένο στέλεχος *tps2Δ* τα φαινόμενα τοξικότητας ήταν ιδιαίτερα έντονα με την εμφάνιση κυτταροπλασματικών εγκλείστων από την αρχή της εκθετικής φάσης (εικόνα 4.40), έως καθολική εμφάνιση εγκλείστων στην φάση γήρανσης (εικόνα 4.41). Κατά την προσθήκη τρεχαλόζης στην μετα-διαυξική φάση, η εικόνα των τοξικών φαινοτύπων βελτιώθηκε σημαντικά, χωρίς να υπάρξει όμως και καθολική θεραπεία όλων των κυττάρων, όπως στα προηγούμενα στελέχη.

Παρατηρήθηκαν κύτταρα τόσο με κυτταροπλασματική κατανομή όσο και με μεμβρανική εντόπιση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, καθώς και ταυτόχρονη εμφάνιση κυτταροπλασματικών εγκλείστων (εικόνα 4.42). Όλα αυτά συνηγορούν στην μεγάλη τοξικότητα που παρουσιάζεται στο εν λόγω στέλεχος από την έκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και φαίνεται πως αυτή δεν δύναται να αντιστραφεί καθολικά ακόμη και με την παρέμβαση της τρεχαλόζης. Άλλωστε, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι πιθανό η ταυτόχρονη συσσώρευση της 6-φωσφο-τρεχαλόζης να αποβαίνει επίσης τοξική για το κύτταρο και η τρεχαλόζη να αδυνατεί να άρει όλα τα τοξικά φαινόμενα που συμβαίνουν στο συγκεκριμένο μεταλλαγμένο στέλεχος.

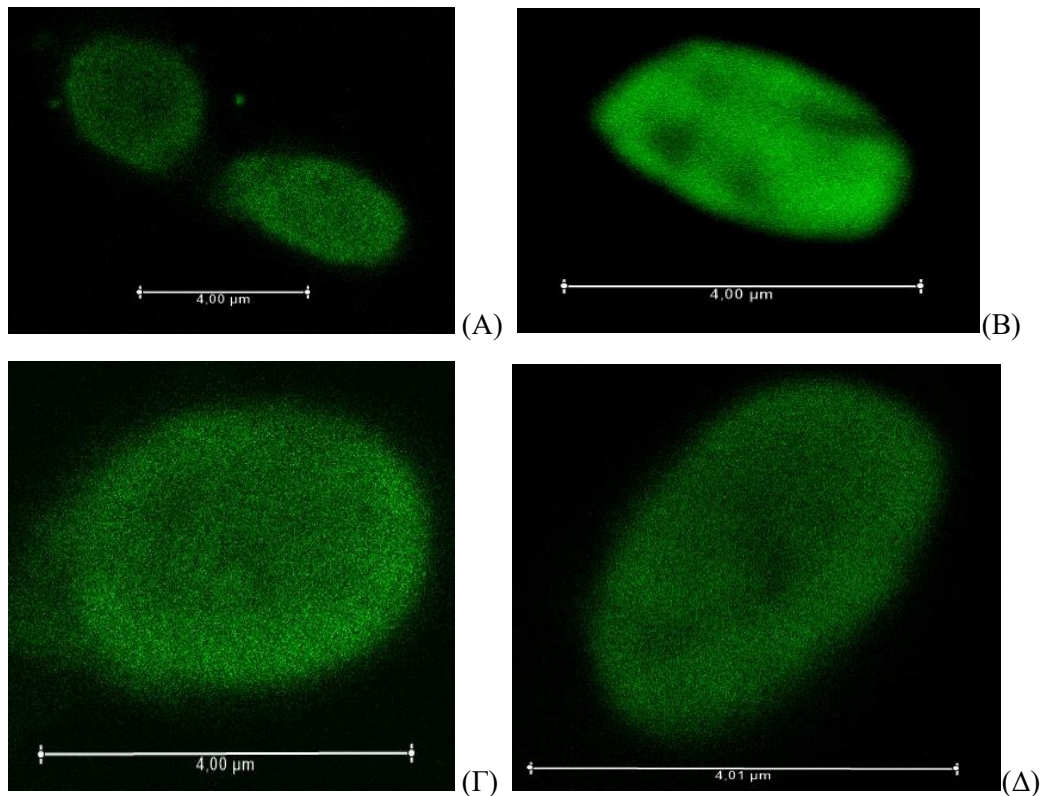
Οι παρούσες μελέτες έλαβαν τέλος με την μελέτη της εντόπισης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στο μεταλλαγμένο στέλεχος *ts11Δ*. Οι φωτογραφίες που αφορούσαν το συγκεκριμένο στέλεχος χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης και μετά από την προσθήκη αυτής παρουσιάζονται στις εικόνες 4.43, 4.44 και 4.45.



**Εικόνα 4.43:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε κύτταρα εκθετικής φάσης ανάπτυξης του *S. cerevisiae ts11Δ* χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης. (Κλίμακα 4  $\mu$ m) Στις εικόνες A, B, Γ και Δ παρατηρούνται κύτταρα με κυτταροπλασματική εντόπιση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, ενώ στις εικόνες E και Z λαμβάνεται και μεμβρανική κατανομή της. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]



**Εικόνα 4.44:** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για τον ανοσοφθορισμό της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε κύτταρα στατικής φάσης ανάπτυξης του *S. cerevisiae ts11Δ* χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης. (Κλίμακα 4  $\mu\text{m}$ ) Σε όλες τις εικόνες παρατηρούνται κύτταρα με κυτταροπλασματική εντόπιση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]





**Εικόνα 4.45: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας για την κατανομή και εντόπιση της α-συνουκλεΐνης στο στέλεχος *ts11Δ* κατά την στατική φάση ανάπτυξης μετά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη. (Κλίμακα 4 μm)** Παρατηρούνται κύτταρα με κυτταροπλασματική κατανομή της α-συνουκλεΐνης (Α, Β και Γ) και μεμβρανική εντόπιση (Α και Δ) της πρωτεΐνης. [anti-A-synuclein (1/100) (Acris Antibodies GmbH), Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Absorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (1/1000) (Thermo Scientific)]

Όλα τα στοιχεία που είχαν μελετηθεί και προηγουμένως για το μεταλλαγμένο στέλεχος *ts11Δ* αναδείκνυαν ήπια ή μηδαμινή τοξικότητα από την έκφραση της α-συνουκλεΐνης, της οποίας η έκφραση στην στατική φάση μειωνόταν. Κατά συνέπεια αναμενόταν ότι η προσθήκη τρεχαλόζης μικρές διαφοροποιήσεις θα προσέδιδε στο εν λόγω στέλεχος, το οποίο και επιβεβαιώθηκε. Και σε αυτή την περίπτωση, το στέλεχος παρουσίασε μη τοξικό φαινότυπο με κυτταροπλασματική κατανομή της α-συνουκλεΐνης και μεμβρανική εντόπιση.

Κατά συνέπεια, οι παραπάνω μελέτες σχετικά με την προσθήκη τρεχαλόζης στα μελετώμενα στελέχη ζυμομύκητα συμπληρώνουν τους φαινοτύπους της χρονολογικής γήρανσης κατά την συγκεκριμένη παρέμβαση. Για τα στελέχη BY4741 και κυρίως το *tps1Δ* υπήρχε καθολική θεραπεία των κυτταροπλασματικών εγκλείστων ενώ τα κύτταρα *tps2Δ* επωφελήθηκαν σημαντικά από την παρέμβαση χωρίς ωστόσο να συμβαίνει καθολική άρση του τοξικού φαινοτύπου. Στο στέλεχος *ts11Δ* ο φαινότυπος παρέμεινε σταθερός χωρίς ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις σε σχέση με την φυσιολογική πορεία άνευ της παρέμβασης.

#### **4.18 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των στελεχών *S. cerevisiae* BY4741 και *tps1Δ* στην στατική φάση μετά την θεραπευτική παρέμβαση της τρεχαλόζης**

Μετά την επιτυχή και θετική παρέμβαση της τρεχαλόζης στην βιωσιμότητα των στελεχών του ζυμομύκητα, θεωρήθηκε χρήσιμο να διερευνηθεί εκ νέου η γονιδιακή έκφραση σε ποσοτικό επίπεδο μέσω qPCR για ορισμένα από τα στελέχη και σε ορισμένα από τα μελετώμενα γονίδια.

Τα στελέχη που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν εκείνα που έδειξαν και την μεγαλύτερη ανταπόκριση στην θεραπευτική παρέμβαση της τρεχαλόζης, δηλαδή το αγρίου τύπου BY4741 και κυριότερα το *tps1Δ*. Αντίθετα, το στέλεχος *tps2Δ*, παρά το τοξικό προφίλ που παρουσίαζε, εμφάνιζε σημαντικές τυπικές αποκλίσεις στις μετρήσεις γονιδιακής έκφρασης και η μελέτη του θα μπορούσε να αποδειχθεί προβληματική. Άλλωστε δεν αποτέλεσε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος, στο οποίο η δράση της τρεχαλόζης ήταν καθολικά ευεργετική και η εν γένει επιβάρυνση που εμφανίζει φαίνεται να προκαλεί προβλήματα στην ποιότητα του απομονωμένου RNA. Τέλος, το *ts11Δ* φαίνεται να μην έχρηζε περαιτέρω ανάλυσης, μιας και ο φαινότυπός του ήταν εκ των προτέρων της παρέμβασης μη τοξικός.

Όσον αφορά τα γονίδια που μελετήθηκαν, αυτά αποτέλεσαν τα *TPS1* και *ATG8* για τα BY4741 και το *ATG8* για το *tps1Δ*. Το *TPS1* επιλέχθηκε να μελετηθεί στα BY4741 λόγω της καταστολής που εμφάνιζε κατά την παρουσία της α-συνουκλεΐνης στις πρώτες μελέτες γονιδιακής έκφρασης, οπότε η καταγραφή των επιπέδων μεταγραφής μετά την προσθήκη τρεχαλόζης φέρει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Συν τοις άλλοις, η μελέτη του προσφέρει την δυνατότητα ελέγχου της δράσης της εξωγενούς

τρεχαλόζης, αφού αναμενόταν τα επίπεδα του γονιδίου να κατασταλούν παρουσία του εξωγενούς δισακχαρίτη, δεδομένου πως τα κύτταρα δεν θα βιοσυνθέτουν πλέον την ενδογενή τρεχαλόζη. Επιπλέον, το *ATG8* μελετήθηκε και στα δύο στελέχη που επιλέχθηκαν, μιας και εμφάνισε χαρακτηριστικές διακυμάνσεις (καταστολή των επιπέδων του) στις προηγούμενες μελέτες και χρήζει νεότερης διερεύνησης λαμβάνοντας επίσης υπόψιν πως η τρεχαλόζη αποτελεί επαγωγέα της αυτοφαγίας.

Οι μελέτες qPCR πραγματοποιήθηκαν με την απομόνωση τριών RNA από την στατική φάση (8 d) μετά από την προσθήκη τρεχαλόζης κατά την πέμπτη ημέρα καλλιέργειας και από τα οποία δημιουργήθηκαν τρία αντίστοιχα cDNA. Για την συνθήκη αυτή υπήρξε το δείγμα μελέτης, το οποίο αποτελούσε τον πληθυσμό των κυττάρων ζυμομύκητα στελέχους BY4741 ή *tps1Δ* παρουσία της α-συνουκλεΐνης και το δείγμα βαθμονόμησης, δηλαδή ο πληθυσμός των κυττάρων απουσία έκφρασης της α-συνουκλεΐνης (BY4741 ή *tps1Δ/pCM190*). Σημειώνεται επίσης πως η ανάπτυξη των κυττάρων τόσο απουσία όσο και παρουσία της α-συνουκλεΐνης πραγματοποιήθηκε παρουσία ΗΕΟ.

Τα πειράματα qPCR πραγματοποιήθηκαν και αναλύθηκαν όπως αναφέρεται στην ενότητα Υλικά & Μέθοδοι καθώς και στην παράγραφο 4.19 της παρούσας ενότητας με τις ίδιες συνθήκες και μεθοδολογίες καθολικά.

Όπως είχε πραγματοποιηθεί και στις προηγούμενες μελέτες για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR επιλέχθηκαν δύο προσεγγίσεις, όσον αφορά την μηδενική υπόθεση του λόγου έκφρασης. Στην πρώτη προσέγγιση ως μηδενική υπόθεση ορίστηκε η προ-εκθετική φάση των κυττάρων BY4741 ή *tps1Δ/pCM190*, στην οποία δεν έχει προστεθεί τρεχαλόζη. Στην δεύτερη προσέγγιση ως μηδενική υπόθεση ορίστηκε η αντίστοιχη φάση ανάπτυξης της συνθήκης βαθμονόμησης για την συνθήκη μελέτης στο κάθε στέλεχος.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων της γονιδιακής έκφρασης κατά την θεραπευτική παρέμβαση της τρεχαλόζης με τις δύο εναλλακτικές προσεγγίσεις για το στέλεχος BY4741 παρουσιάζονται στους πίνακες 4.11 και 4.12 αντίστοιχα.

**Πίνακας 4.11: Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPS1* και *ATG8* στην στατική φάση ανάπτυξης του *S. cerevisiae* BY4741 με μηδενική υπόθεση την προ-εκθετική φάση της συνθήκης βαθμονόμησης χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης.** Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα και TRE+ η προσθήκη τρεχαλόζης εξωγενώς. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η αναλογία συνθηκών που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του μέσου όρου.

<i>TPS1</i>							
Απουσία <i>SNCA</i>				Παρουσία <i>SNCA</i>			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
ST TRE+/PE	14,12	13,88-14,29	3,93204E-07	ST TRE+/PE	17,31	16,6-17,96	4,51741E-07

<i>ATG8</i>							
Απουσία <i>SNCA</i>				Παρουσία <i>SNCA</i>			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
ST TRE+/PE	5,863	5,859-6,078	2,56195E-07	ST TRE+/PE	11,66	11,23-12,09	8,80565E-08

**Πίνακας 4.12: Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPSI* και *ATG8* στην στατική φάση ανάπτυξης του *S. cerevisiae* BY4741 με μηδενική υπόθεση την αντίστοιχη φάση της συνθήκης βαθμονόμησης για την κάθε συνθήκη μελέτης.** Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με ST συμβολίζεται η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα και TRE+ η προσθήκη τρεχαλόζης εξωγενώς.

Αναλογία=Παρουσία <i>SNCA</i> /Απουσία <i>SNCA</i>						
BY4741	<i>TPSI</i>			<i>ATG8</i>		
	MEAN	SD	P value	MEAN	SD	P value
ST TRE+	1,22	1,19-1,23	0,078902721	1,97	1,88-2,10	6,49629E-05

Σύμφωνα με την πρώτη προσέγγιση ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης και μηδενική υπόθεση την προεκθετική φάση της συνθήκης βαθμονόμησης χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης (Πίνακας 4.11), το γονίδιο *TPSI* μετά την προσθήκη τρεχαλόζης παρουσιάζει ήπια αυξημένα επίπεδα παρουσία του *SNCA* σε σχέση με την απουσία του. Το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί ιδιαίτερο εύρημα, ειδικότερα αν συγκρίνει κανείς την έκφραση του γονιδίου αυτού στα ίδια κύτταρα της στατικής φάσης χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης (Ενότητα 4.8, Πίνακας 4.1). Κατά τις τότε μελέτες το γονίδιο παρουσίαζε σημαντική πτώση της έκφρασης του κατά την έκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε σχέση με τα κύτταρα που δεν την έφεραν και αναδείκνυε πιθανά σημαντικά προβλήματα στην βιοσύνθεση της ενδογενούς τρεχαλόζης. Στην περίπτωση της προσθήκης της τρεχαλόζης τα επίπεδα του *TPSI* στο σύνολο των κυττάρων μειώνονται σημαντικά σε σχέση με την μη προσθήκη, γεγονός αναμενόμενο όπως προαναφέρθηκε. Ωστόσο, η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου κατά την παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στην παρέμβαση της τρεχαλόζης, αναδεικνύει, όπως φαίνεται, την παρουσία του στρες από την έκφραση της πρωτεΐνης, οδηγώντας πιθανόν τον φαινότυπο σε ένα πρωιμότερο στάδιο στρεσογόνων καταστάσεων από αυτές που είχαν ήδη εγκατασταθεί πριν την παρέμβαση. Κατά συνέπεια, παρουσία της εξωγενούς τρεχαλόζης, φαίνεται να καταργούνται οι κατασταλτικές επιδράσεις της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στην μεταγραφή της συνθάσης της τρεχαλόζης και τα κύτταρα βρίσκονται σε στάδιο απόκρισης στο στρες, χωρίς την εγκατάσταση κάποιου τοξικού φαινοτύπου.

Στην συνέχεια, η μελέτη της έκφρασης του *ATG8* οδήγησε επίσης σε σημαντικές παρατηρήσεις με πολύ όμοια στοιχεία σε σχέση με την έκφραση της συνθάσης της τρεχαλόζης. Στην προσθήκη τρεχαλόζης τα συνολικά επίπεδα έκφρασης του αυτοφαγικού γονιδίου παρατηρούνται μειωμένα, γεγονός το οποίο ερμηνεύεται από την ευεργετική δράση της τρεχαλόζης στην ανάκαμψη από το στρες κατά την χρονολογική τους γήρανση. Παράλληλα, τα επίπεδα του γονιδίου αυξάνονται παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης κατά την προσθήκη τρεχαλόζης σε σχέση με την συνθήκη απουσίας του *SNCA*. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με την γνώση πως η τρεχαλόζη αποτελεί επαγωγέα της αυτοφαγίας και αναδεικνύει, όπως όλα δείχνουν, τον μηχανισμό με τον οποίο τα κύτταρα αποσυσσωρεύουν τα αρχόμενα κυτταροπλασματικά έγκλειστα που είχαν παρατηρηθεί στο εν λόγω στέλεχος στην στατική φάση χωρίς την παρέμβαση της τρεχαλόζης. Παράλληλα, αν κανείς συγκρίνει και σε αυτή την περίπτωση τα επίπεδα έκφρασης στην προσθήκη τρεχαλόζης σε σχέση με εκείνα χωρίς την παρέμβαση (Πίνακας 4.1), παρατηρεί πως κατά την παρέμβαση η κατασταλτική επίδραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στην έκφραση

του *ATG8* όχι μόνο αίρεται στην παρουσία της εξωγενούς τρεχαλόζης αλλά το φαινόμενο αντιστρέφεται με την αύξηση της μεταγραφής του, ενισχύοντας την παραπάνω άποψη περί κάθαρσης των συσσωρευόμενων πρωτεϊνών μέσω του αυτοφαγικού μηχανισμού.

Μία περαιτέρω αξιολόγηση των φαινομένων που περιγράφησαν παραπάνω αποτελεί η μελέτη του Πίνακα 4.12 με την δεύτερη προσέγγιση ανάλυσης της qPCR.

Με βάση τα στοιχεία του πίνακα τα επίπεδα έκφρασης του *TPS1* κατά την προσθήκη της τρεχαλόζης, εξισορροπούνται μεταξύ των συνθηκών παρουσία και απουσίας του *SNCA*. Το αποτέλεσμα αυτό συγκρινόμενο με εκείνο της αντίστοιχης προσέγγισης στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 7 αναδεικνύει την αύξηση των επιπέδων του *TPS1* παρουσία της α-συνουκλεΐνης στην παρέμβαση της τρεχαλόζης, την στιγμή που χωρίς την παρέμβαση η έκφραση της συνθάσης της τρεχαλόζης φέρεται κατεσταλμένη, παρουσία της α-συνουκλεΐνης. Επιπλέον, η μικρή αυτή αύξηση είναι ικανή να ερμηνευτεί ως μία κατάσταση απόκρισης στο στρες με την μετατόπιση του φαινοτύπου σε πιο πρωιμότερα στάδια τοξικότητας.

Αντίστοιχα στην έκφραση του *ATG8*, τα παρατηρούμενα αποτελέσματα αποτέλεσαν χαρακτηριστικά ευρήματα. Η καταστολή των επιπέδων μεταγραφής του γονιδίου παρουσία της α-συνουκλεΐνης χωρίς την παρέμβαση της τρεχαλόζης μετατράπηκε σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης κατά την προσθήκη του δισακχαρίτη στο θρεπτικό μέσο, αναδεικνύοντας την ενεργοποίηση του αυτοφαγικού μηχανισμού με την δράση της εξωγενούς τρεχαλόζης. Παράλληλα, η παραπάνω παρατήρηση συμφωνεί με την ενεργοποίηση της γενικευμένης απόκρισης στο στρες που διαφαίνεται από τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *TPS1* στην παρέμβαση της τρεχαλόζης παρουσία της α-συνουκλεΐνης.

Κατά συνέπεια, οι δύο προσεγγίσεις συμφωνούν στην ερμηνεία των φαινομένων που διαφαίνονται των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης και αναδεικνύουν την κατάσταση των κυττάρων BY4741 που αναζωογονούνται από την δράση της εξωγενούς τρεχαλόζης και ενεργοποιούν ενδογενείς μηχανισμούς αντιμετώπισης του στρες.

Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης του *ATG8* στο στέλεχος *tps1Δ* αυτά αναφέρονται με τις δύο εναλλακτικές προσεγγίσεις στους πίνακες 4.13 και 4.14 αντίστοιχα.

**Πίνακας 4.13: Αποτελέσματα qPCR για το γονίδιο *ATG8* στην στατική φάση ανάπτυξης του *S. cerevisiae tps1Δ* με μηδενική υπόθεση την προ-εκθετική φάση της συνθήκης βαθμονόμησης χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης.** Παρουσιάζεται ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης και η τυπική απόκλιση του (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα και TRE+ η προσθήκη τρεχαλόζης εξωγενώς. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η αναλογία συνθηκών που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του μέσου όρου.

<i>ATG8</i>							
Απουσία <i>SNCA</i>				Παρουσία <i>SNCA</i>			
	MEAN	SD	P value		MEAN	SD	P value
ST TRE+/PE	15,1	14,7-15,4	0,000405055	ST TRE+/PE	7,05	6,77-7,25	0,000442319

**Πίνακας 4.14: Αποτελέσματα qPCR για το γονίδιο *ATG8* στην στατική φάση ανάπτυξης του *S. cerevisiae tps1Δ* με μηδενική υπόθεση την αντίστοιχη φάση της συνθήκης βαθμονόμησης για την κάθε συνθήκη μελέτης.** Παρουσιάζεται ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με ST συμβολίζεται η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα και TRE+ η προσθήκη τρεχαλόζης εξωγενώς.

Αναλογία=Παρουσία <i>SNCA</i> /Απουσία <i>SNCA</i>			
<i>tps1Δ</i>	<i>ATG8</i>		
	MEAN	SD	P value
ST TRE+	0,850	0,847-0,856	0,235127954

Σύμφωνα με την πρώτη προσέγγιση ανάλυσης στον Πίνακα 4.13, τα φαινόμενα καταστολής των μεταγραφικών επιπέδων του *ATG8* από την επίδραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης παραμένουν παρά την παρέμβαση της τρεχαλόζης. Μάλιστα, συγκρίνοντας τα δεδομένα έκφρασης του πίνακα αυτού με την αντίστοιχη ανάλυση στην Ενότητα 4.19 (Πίνακας 4.3) παρατηρεί κανείς πως παρά την άνοδο της έκφρασης του γονιδίου στα κύτταρα του φορέα, αυτό δεν συμβαίνει στην παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, στην οποία συνθήκη τα κατεσταλαμένα επίπεδα μεταγραφής παραμένουν ίδια μεταξύ των συνθηκών προσθήκης και μη προσθήκης τρεχαλόζης στο θρεπτικό μέσο. Το αποτέλεσμα αυτό αναδεικνύει την αναγκαιότητα της συνθάσης της τρεχαλόζης στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας για το πρωτεοτοξικό στρες, δεδομένων και των προηγούμενων παρατηρήσεων στα κύτταρα αγρίου τύπου, στα οποία ο μηχανισμός ενεργοποιήθηκε μετά την προσθήκη τρεχαλόζης. Άλλωστε είναι δεδομένη βιβλιογραφικά η αλληλεπίδραση της συνθάσης με την κινάση Rim15, βασικό ρυθμιστή της αυτοφαγίας του *S. cerevisiae* (Reinders et al., 1998).

Περαιτέρω ανάλυση του φαινομένου πραγματοποιείται με την δεύτερη προσέγγιση ανάλυσης των αποτελεσμάτων της qPCR. Σύμφωνα με τον πίνακα 4.14, τα επίπεδα της έκφρασης του *ATG8* στα μεταλλαγμένα κύτταρα *tps1Δ* στην προσθήκη τρεχαλόζης παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, υφίσταται πολύ μικρή άνοδο σε σχέση με την απουσία της παρέμβασης (Πρόσθετο Υλικό-Πίνακας Π2) και αυτό το γεγονός συμφωνεί σε ορισμένο βαθμό με την πρώτη προσέγγιση.

Κατά συνέπεια, και με τις δύο προσεγγίσεις παρατηρούνται τα ίδια φαινόμενα καταστολής της έκφρασης του αυτοφαγικού γονιδίου από την έκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης ακόμη και στην προσθήκη τρεχαλόζης ως θεραπευτικό μέσο, δηλώνοντας την σημασία της συνθάσης της τρεχαλόζης ως μόριο σηματοδότησης στην ρύθμιση της αυτοφαγίας κατά την παρουσία πρωτεοτοξικού στρες.

Όπως πραγματοποιήθηκε και προηγουμένως για κάθε μεταλλαγμένο στέλεχος η σύγκριση των τιμών στην σχετική γονιδιακή έκφραση κατά την παρέμβαση της τρεχαλόζης επεκτάθηκε με αλλαγή στην συνθήκη βαθμονόμησης ως προς το στέλεχος αγρίου τύπου. Οπότε σε αυτές τις αναλύσεις έκφρασης την συνθήκη βαθμονόμησης αποτέλεσαν τα κύτταρα BY4741/pCM190 της στατικής φάσης χωρίς την παρέμβαση της τρεχαλόζης και η σύγκριση των δύο τύπου κυττάρων του φορέα αποτέλεσε την συνθήκη αναφοράς-μάρτυρα για την εξαγωγή συμπερασμάτων της δράσης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης.

Ως εκ τούτου, οι νέες αναλύσεις με αλλαγή στην συνθήκη βαθμονόμησης παρουσιάζονται στους πίνακες 4.15 και 4.16.

**Πίνακας 4.15: Αποτελέσματα qPCR για το γονίδιο *ATG8* στην στατική φάση ανάπτυξης των *S. cerevisiae tps1Δ* και BY4741 με μηδενική υπόθεση την αντίστοιχη φάση της**

#### συνθήκης βαθμονόμησης των BY4741 για την συνθήκη μελέτης των *tps1Δ*.

Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ .

Αναλογία=Απουσία <i>TPS1</i> υπό TRE+/Παρουσία <i>TPS1</i>			
	<i>ATG8</i>		
	Mean	S.D.	P value
Στατική φάση	0,15	0,13-0,17	0,000370053

#### Πίνακας 4.16: Αποτελέσματα qPCR για το γονίδιο *ATG8* στην στατική φάση ανάπτυξης των *S. cerevisiae tps1Δ* και BY4741 με μηδενική υπόθεση την αντίστοιχη φάση της συνθήκης βαθμονόμησης των BY4741 για την συνθήκη μελέτης των *ts1Δ*.

Παρουσιάζεται ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ .

Αναλογία=Απουσία <i>TPS1</i> και παρουσία <i>SNCA</i> υπό TRE+/Παρουσία <i>TPS1</i>			
	<i>ATG8</i>		
	Mean	S.D.	P value
Στατική φάση	0,13	0,12-0,14	0,000171504

Όπως παρατηρήθηκε και στις προηγούμενες αναλύσεις, οι τιμές της σχετικής έκφρασης του *ATG8* παραμένουν ίδιες μεταξύ των συνθηκών απουσίας και παρουσίας της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και σε αυτή την ανάλυση. Στην συνέχεια, συγκρίνοντας τις τιμές των κυττάρων του φορέα με τις αντίστοιχες της ενότητας 4.13 (Πίνακας 4.3) παρατηρεί κανείς την πτώση της έκφρασης του γονιδίου και στην συνθήκη μάρτυρα, πιθανότατα λόγω της ευεργετικής δράσης της τρεχαλόζης. Αντίθετα, η έκφραση του γονιδίου ελάχιστα αυξάνεται με την προσθήκη τρεχαλόζης εν τη παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (Σύγκριση πίνακα 4.16 με πίνακα 4.4) και ισορροπεί με τις τιμές των κυττάρων του φορέα. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τις προηγούμενες παρατηρήσεις για τα κύτταρα *tps1Δ* και παρατηρείται σταθερή διατήρηση της καταστολής της έκφρασης του γονιδίου παρουσία του *SNCA*.

Συνοψίζοντας λοιπόν, κάθε τύπος ανάλυσης ανέδειξε τα ίδια χαρακτηριστικά στην έκφραση του *ATG8*, με την προσθήκη τρεχαλόζης να μην βελτιώνει τις κατασταλτικές επιδράσεις της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και να αναδεικνύεται επίσης η αναγκαιότητα της συνθάσης της τρεχαλόζης στην ρύθμιση του αυτοφαγικού μηχανισμού εν τη παρουσία ενός τοξικού παράγοντα όπως η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη. Κρίνεται λοιπόν πως τα έγκλειστα, τα οποία εξαφανίστηκαν μετά την προσθήκη τρεχαλόζης δεν αποσυσσωρεύθηκαν με την χρήση της αυτοφαγίας, αλλά πιθανόν αποκλειστικά από την άμεση δράση της τρεχαλόζης ως μόριο με ιδιότητες κάθαρσης των συσσωματωμάτων λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών.

#### Μελέτη των αλληλεπιδράσεων της $\alpha$ -συνουκλεΐνης με τις πρωτεΐνες του *S. cerevisiae*

Έπειτα από τις σημαντικές παρατηρήσεις των επιβαρυσμένων φαινοτύπων, των μελετών της γονιδιακής έκφρασης και της θεραπευτικής παρέμβασης με την τρεχαλόζη θεωρήθηκε απαραίτητο να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση της  $\alpha$ -

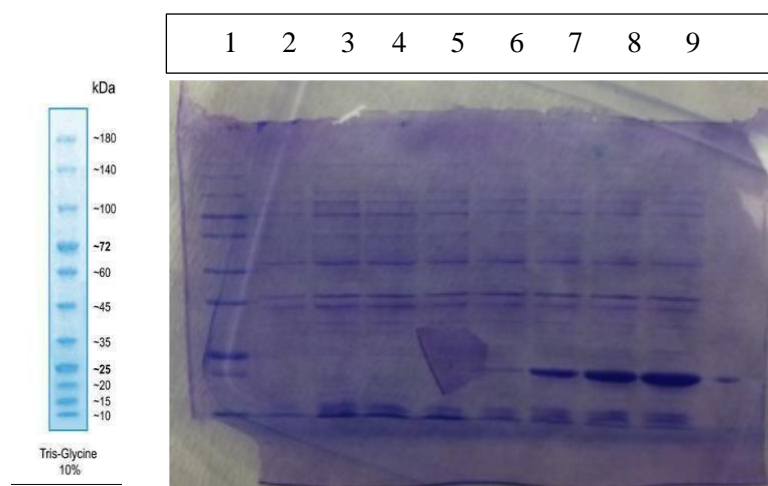
συνουκλεΐνης με άλλα πιθανά πρωτεϊνικά μόρια του *S. cerevisiae*, τόσο στο στέλεχος αγρίου τύπου όσο και στο στέλεχος *tps1Δ*, το οποίο δεν παράγει τρεχαλόζη.

Για να επιτευχθούν οι συγκεκριμένες μελέτες σχεδιάστηκε η κλωνοποίηση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης pET29c(+). Τα εν λόγω αποτελέσματα παρουσιάζονται στο πρόσθετο υλικό της παρούσας διατριβής.

#### **4.19 Υπερέκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης $\alpha$ -συνουκλεΐνης**

Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του *SNCA* στον φορέα pET29c(+), σχεδιάστηκε (Πρόσθετο Υλικό-ενότητα Π8) η υπερέκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, η οποία μετά την έκφρασή της από το σύστημα pET που χρησιμοποιήθηκε θα έφερε μία ουρά έξι καταλοίπων ιστιδίνης στο καρβοξυ-τελικό άκρο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η σήμανση αυτή αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για τον μετέπειτα καθαρισμό της και την χρήση της σε μελέτες πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

Μετά την επιβεβαίωση της παρουσίας του επιθυμητού πλασμιδίου στα κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση αρχικά σε μικρή κλίμακα με όγκο καλλιέργειας 10 ml, ώστε να διερευνηθεί η απόδοση του συστήματος υπερέκφρασης. Ταυτόχρονα με την κύρια υπερέκφραση έλαβε χώρα και η ίδια διαδικασία για τον μη ανασυνδυασμένο pET29c(+), ώστε να χρησιμεύσει συγκριτικά ως αρνητικός μάρτυρας. Τα δείγματα των διαφόρων χρόνων της υπερέκφρασης και των αρνητικών μαρτύρων φορτώθηκαν σε πήκτωμα SDS-PAGE και χρωματίστηκαν με Coomassie Brilliant Blue. Η χρώση του πηκτώματος και η παρουσίαση των δειγμάτων φαίνονται στην εικόνα 4.46.



**Εικόνα 4.46:** Υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε μικρή κλίμακα

Διαδρομή 1: Protein Ladder

Διαδρομή 2: Δείγμα πρωτεϊνών pET29c(+) για t=0

Διαδρομή 3: Δείγμα πρωτεϊνών pET29c(+) για t=30 min

Διαδρομή 4: Δείγμα πρωτεϊνών pET29c(+) για t=1 h

Διαδρομή 5: Δείγμα πρωτεϊνών pET29c(+) για t=2 h

Διαδρομή 6: Δείγμα πρωτεϊνών pET29c(+)/*SNCA* για t=0

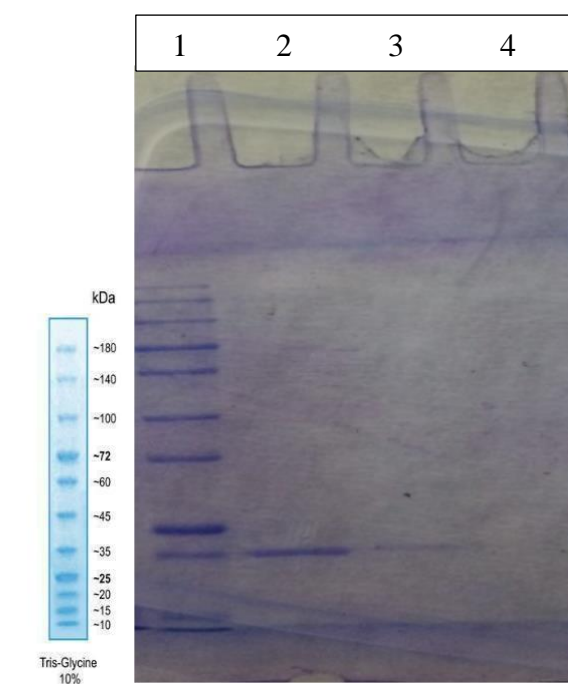
Διαδρομή 7: Δείγμα πρωτεϊνών pET29c(+)/*SNCA* για t=30 min

Διαδρομή 8: Δείγμα πρωτεϊνών pET29c(+)/SNCA για t=1 h

Διαδρομή 9: Δείγμα πρωτεϊνών pET29c(+)/SNCA για t=2 h

Από την εικόνα της υπερέκφρασης φαίνεται αρχικά ότι διασφαλίζεται η πιστότητα του πειράματος, μιας και στις πρωτεΐνες των δειγμάτων του μη ανασυνδυασμένου φορέα δεν παρατηρείται υπερέκφραση σε οποιαδήποτε πρωτεΐνη. Στην συνέχεια, στα δείγματα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, παρατηρείται πως ακόμα και από τον μηδενικό χρόνο, την στιγμή προσθήκης του IPTG, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη αρχίζει να εκφράζεται σε ορατή ποσότητα με την ζώνη της να αντιστοιχεί στα 19 kD περίπου. Στην πάροδο του χρόνου η ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης βαθμιαία αυξάνεται και παρατηρούνται πράγματι σημαντικά υψηλές ποσότητες της από την 1 h και έπειτα με μέγιστο παραγόμενο ποσό στις 2 h. Κατά συνέπεια, με την τελευταία παρατήρηση, οι 2 h μετά την έναρξη της υπερέκφρασης αποτέλεσαν την κατάλληλη χρονική στιγμή ώστε να πραγματοποιηθεί στην συνέχεια καθαρισμός της παραγόμενης πρωτεΐνης, ύστερα από υπερέκφραση σε μεγάλη κλίμακα με όγκο καλλιέργειας 800 ml.

Ο καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με το kit Protino Ni TED 2000 της εταιρείας Macherey Nagel. Ενδεικτικά 20 μl από τα τρία κλάσματα έκλουσης της πρωτεΐνης από την στήλη Ni TED, φορτώθηκαν σε πήκτωμα SDS-PAGE για την ποιοτική αναγνώριση της καθαρισμένης α-συνουκλείνης και την σχετική ποσοτικοποίηση της. Η χρώση του πήκτωματος πολυακρυλαμίδιου με τα καθαρισμένα κλάσματα της πρωτεΐνης αποδίδεται στην εικόνα 4.47.



**Εικόνα 4.47:** Χρώση των καθαρισμένων κλασμάτων της καθαρισμένης α-συνουκλείνης  
Διαδρομή 1: Protein Ladder

Διαδρομή 2: Κλάσμα πρωτεΐνης από την πρώτη έκλουση

Διαδρομή 3: Κλάσμα πρωτεΐνης από την δεύτερη έκλουση

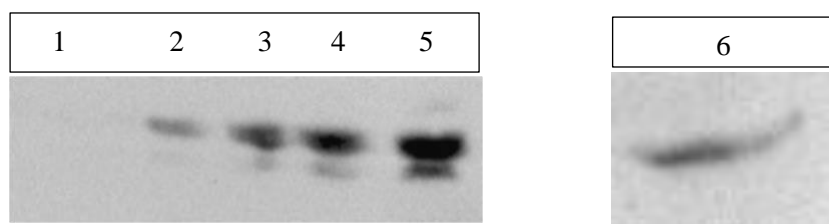
Διαδρομή 4: Κλάσμα πρωτεΐνης από την τρίτη έκλουση

Από την εικόνα 4.47 φαίνεται πως η μέγιστη ποσότητα της ανασυνδυασμένης α-συνουκλείνης βρίσκεται στο πρώτο κλάσμα έκλουσης του καθαρισμού, ενώ μικρότερη ποσότητα υπάρχει στο δεύτερο κλάσμα έκλουσης. Κατά συνέπεια, το



πρώτο κλάσμα του τελικού καθαρισμένου προϊόντος μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο και με την μέθοδο Bradford και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα 3 mg/ml.

Στην συνέχεια, για την πλήρη ταυτοποίηση των προϊόντων της υπερέκφρασης, είτε στην μικρή κλίμακα είτε κατά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης, τα αντίστοιχα δείγματα πρωτεϊνών υποβλήθηκαν σε ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η ανοσοαποτύπωση περιελάμβανε τα δείγματα των πρωτεϊνών των *E. coli* BL21 (DE3)/ pET29c(+)/SNCA για τους μελετώμενους χρόνους υπερέκφρασης στην μικρή κλίμακα, καθώς και το πρώτο κλάσμα της καθαρισμένης πρωτεΐνης με συγκέντρωση φόρτωσης στην SDS-PAGE τα 3 μg. Τα συγκεκριμένα δείγματα επώαστηκαν με αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης για την ταυτοποίηση τους και η εμφάνιση της ανοσοδοκιμασίας φαίνεται στην εικόνα 4.48.



**Εικόνα 4.48:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τα δείγματα υπερέκφρασης μικρής κλίμακας και το καθαρισμένο πρώτο κλάσμα έκλυσης της πρωτεΐνης.

Διαδρομή 1: Δείγμα πρωτεϊνών pET29c(+) για t=2 h ως αρνητικός μάρτυρας

Διαδρομή 2: Δείγμα πρωτεϊνών pET29c(+)/SNCA για t=0

Διαδρομή 3: Δείγμα πρωτεϊνών pET29c(+)/SNCA για t=30 min

Διαδρομή 4: Δείγμα πρωτεϊνών pET29c(+)/SNCA για t=1 h

Διαδρομή 5: Δείγμα πρωτεϊνών pET29c(+)/SNCA για t=2 h

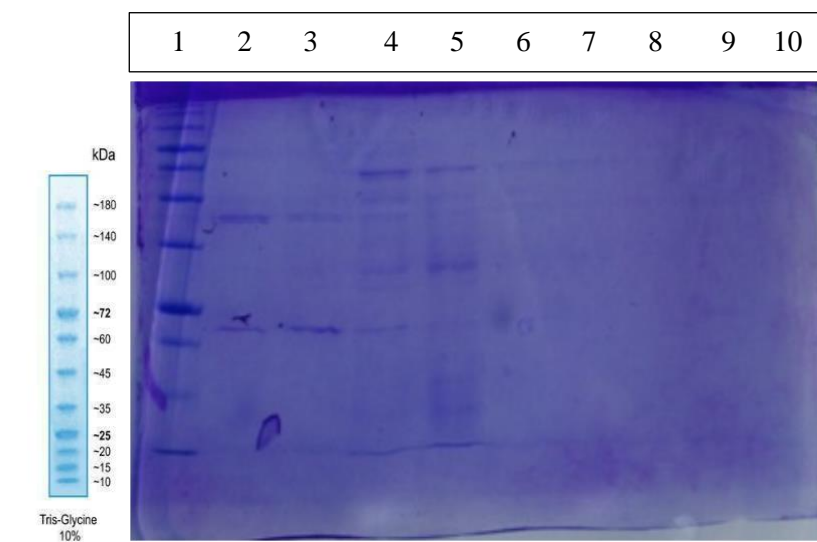
Διαδρομή 6: Κλάσμα πρωτεΐνης από την πρώτη έκλυση

Με την παραπάνω ανοσοαποτύπωση τελικά ταυτοποιήθηκαν τα προϊόντα της υπερέκφρασης ως δείγματα α-συνουκλεΐνης, μιας και ο αρνητικός μάρτυρας δεν παρουσίασε κάποιο σήμα. Ως εκ τούτου και το διαθέσιμο αντίσωμα λειτούργησε έναντι του ανασυνδυασμένου μορίου της τελικής πρωτεΐνης με τα έξι κατάλοιπα ιστιδίνης.

#### **4.20 Μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης και ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων του *Saccharomyces cerevisiae***

Η κλωνοποίηση του γονιδίου SNCA στον φορέα υπερέκφρασης πραγματοποιήθηκε με σκοπό η ανασυνδυασμένη α-συνουκλεΐνη να παραχθεί, να καθαριστεί και να αποτελέσει ένα εργαλείο μελέτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Για τον λόγο αυτό, στην συνέχεια, απαιτήθηκε να μελετηθεί η αλληλεπίδραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης με τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα της στατικής φάσης όλων των στελεχών του ζυμομύκητα, τα οποία και εξέφραζαν ήδη το γονίδιο της ενδογενούς α-συνουκλεΐνης. Η στατική φάση επιλέχθηκε, επειδή αποτέλεσε και την φάση στην οποία στα περισσότερα στελέχη παρατηρήθηκαν και τα περισσότερα τοξικά φαινόμενα από την έκφραση της α-συνουκλεΐνης. Άλλωστε, η φάση αυτή φέρει πλήθος μορίων εκφραζόμενων ως απόκριση στο στρες και προσομοιάζει την κατάσταση του κυττάρου κατά την ενδογενή έκφραση της α-συνουκλεΐνης.

Σε πρώτη φάση, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες συγκατακρήμνισης πρωτεϊνών. Τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των στελεχών ζυμομύκητα απομονώθηκαν με μηχανική λύση και οι πρωτεΐνες επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ουδέτερου pH και χαμηλής αλατότητας ώστε να επιτραπούν οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Στην συνέχεια, τα εκχυλίσματα αυτά ποσοτικοποιήθηκαν με καμπύλη Bradford και κατά την συγκατακρήμνιση επώαστηκαν 1 mg από το κάθε πρωτεϊνικό εκχύλισμα με 5 μg χμιαϊκής α-συνουκλεΐνης. Τα ολικά μίγματα με την χμιαϊκή α-συνουκλεΐνη και το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων ζυμομύκητα επώαστηκαν με την στήλη Ni-NTA και εκπλύθηκαν δύο φορές έως το στάδιο της έκλουσης. Τον αρνητικό μάρτυρα των δοκιμασιών αποτέλεσε η στήλη Ni-NTA μετά από επώαση με ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων BY4741 χωρίς την χμιαϊκή α-συνουκλεΐνη και την ταυτόχρονη επεξεργασία της με τις ίδιες πειραματικές συνθήκες με εκείνες των δειγμάτων της συγκατακρήμνισης. Για τα στελέχη *tps2Δ* και *ts11Δ*, δεν επευτεύχθησαν οι μελέτες συγκατακρήμνισης, ενώ ήταν επιτυχείς για τα BY4741 και *tps1Δ*. Τα αποτελέσματά τους παρουσιάζονται στην χρώση της SDS-PAGE της εικόνας 4.49.



**Εικόνα 4.49:** Δοκιμασίες συγκατακρήμνισης πρωτεϊνών για τα στελέχη BY4741 και *tps1Δ*  
 Διαδρομή 1: Protein Ladder

Διαδρομή 2: Δοκιμασία συγκατακρήμνισης για τα κύτταρα BY4741

Διαδρομή 3: Δοκιμασία συγκατακρήμνισης για τα κύτταρα *tps1Δ*

Διαδρομή 4: Ολικό εκχύλισμα μετά την συγκατακρήμνιση για τα κύτταρα BY4741

Διαδρομή 5: Ολικό εκχύλισμα μετά την συγκατακρήμνιση για τα κύτταρα *tps1Δ*

Διαδρομή 6: 1<sup>η</sup> πλύση της στήλης μετά την συγκατακρήμνιση για τα κύτταρα BY4741

Διαδρομή 7: 1<sup>η</sup> πλύση της στήλης μετά την συγκατακρήμνιση για τα κύτταρα *tps1Δ*

Διαδρομή 8: 2<sup>η</sup> πλύση της στήλης μετά την συγκατακρήμνιση για τα κύτταρα BY4741

Διαδρομή 9: 2<sup>η</sup> πλύση της στήλης μετά την συγκατακρήμνιση για τα κύτταρα *tps1Δ*

Διαδρομή 10: Αρνητικός μάρτυρας της συγκατακρήμνισης-Προϊόν επώασης της στήλης με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων BY4741 χωρίς την χμιαϊκή α-συνουκλεΐνη

Κατά πρώτο λόγο, η πιστότητα της παραπάνω διαδικασίας εξασφαλίζεται με την μελέτη του αρνητικού μάρτυρα της συγκατακρήμνισης. Όπως παρατηρείται, στην διαδρομή 10 της παραπάνω εικόνας, δεν φαίνεται η στήλη νικελίου από μόνη της να δεσμεύει μη ειδικά πρωτεΐνες του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με το οποίο επώαστηκε. Στη συνέχεια, σε αμφότερα τα προϊόντα συγκατακρήμνισης στις διαδρομές 2 και 3 παρατηρείται η δέσμευση της χμιαϊκής α-συνουκλεΐνης στην στήλη με την

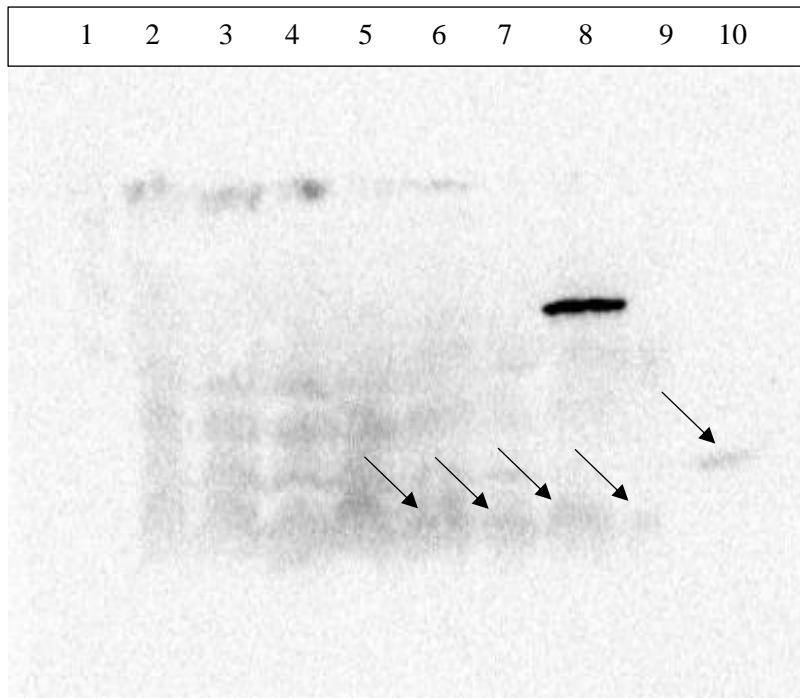
εμφάνιση της ζώνης των 19 περίπου kD, αλλά και τα προϊόντα αλληλεπίδρασης με αυτή στα μοριακά μεγέθη μεταξύ 35 και 45 kD με τις χαρακτηριστικά εμπλουτισμένες ζώνες των αγνώστων αυτών πρωτεϊνών και για τα δύο μελετώμενα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα.

Τα αποτελέσματα της συγκατακρήμνισης ενισχύονται περαιτέρω με την παρατήρηση των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων μετά την δοκιμασία, καθώς οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνές φαίνεται να έχουν αφαιρεθεί από το ολικό εκχύλισμα του κάθε στελέχους και να έχουν δεσμευτεί και αυτές πιο ειδικά στην στήλη νικελίου μαζί με την χμαιοική. Συν τοις άλλοις, στην ειδικότητα δέσμευσης-αλληλεπίδρασης βοηθά και η μελέτη των συλλεγόμενων πλύσεων της στήλης, μιας και κατά τις πρώτες πλύσεις (Διαδρομές 6 & 7) και στα δύο δείγματα φαίνεται να εκπλένονται οι μη ειδικές δεσμεύσεις, εφόσον φαίνονται ζώνες των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, ενώ κατά τις δεύτερες πλύσεις, ελάχιστες ζώνες πρωτεϊνών είναι ορατές, ενισχύοντας έτσι την ειδικότητα των δεσμευμένων-αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών στην στήλη νικελίου.

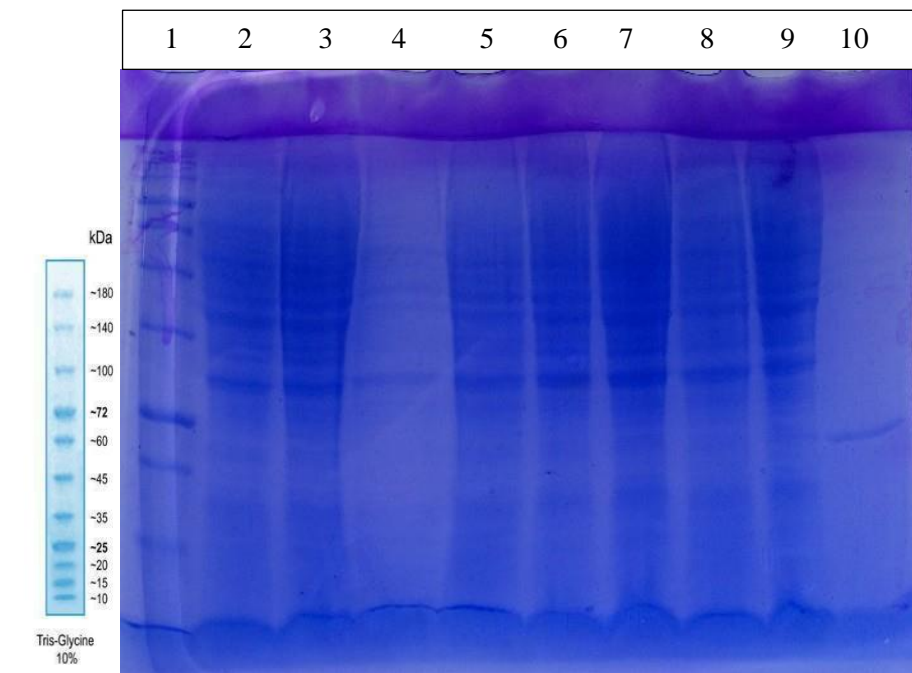
Κρίνεται επομένως ότι οι κύριες πρωτεΐνες αγνώστου ταυτότητας που αλληλεπιδρούν με την χμαιοική α-συνουκλείνη και για τα δύο στελέχη κυττάρων διαθέτουν MB περίπου 40 kD.

Επιπλέον των δοκιμασιών συγκατακρήμνισης κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθούν οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και με Far Western Blot, ώστε με την συνισταμένη των αποτελεσμάτων των δύο πειραματικών μεθόδων να αυξηθεί η ακρίβεια της ταυτοποίησης των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που πράγματι υφίστανται μεταξύ της χμαιοικής α-συνουκλείνης και του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από το εκάστοτε μελετώμενο στέλεχος.

Στην SDS-PAGE του Far Western Blot φορτώθηκαν 100 μg ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων της στατικής φάσης όλων των μελετώμενων στελεχών ζυμομύκητα απουσία και παρουσία της ενδογενώς εκφραζόμενης α-συνουκλείνης, καθώς και 5 μg χμαιοικής πρωτεΐνης. Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF, η τελευταία επώαστηκε με 5 μg διαλύματος χμαιοικής πρωτεΐνης και έπειτα με αντίσωμα έναντι της α-συνουκλείνης. Ταυτόχρονα με την ανοσοαποτύπωση τα ίδια δείγματα πρωτεϊνών φορτώθηκαν σε δεύτερο πήκτωμα SDS-PAGE και χρωματίστηκαν με Coomassie. Η εμφάνιση της ανοσοδοκιμασίας και η χρώση των μελετώμενων δειγμάτων φαίνεται στην εικόνα 4.50.



(A)



(B)

**Εικόνα 4.50:** Εμφάνιση Far Western Blot (A) και χρώση των μελετώμενων σε αυτό πρωτεϊνικών δειγμάτων (B). Με βέλη υποδεικνύονται τα σήματα της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα εκχυλίσματα.

Διαδρομή 1: Protein Ladder

Διαδρομή 2: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα *ts11Δ*/pCM190

Διαδρομή 3: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα *tps2Δ*/pCM190

Διαδρομή 4: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα BY4741/pCM190

Διαδρομή 5: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα *tps1Δ*/pCM190

Διαδρομή 6: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα *ts11Δ*/pCM190asynWT

Διαδρομή 7: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα *tps2Δ*/pCM190asynWT

Διαδρομή 8: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα BY4741/pCM190asynWT

Διαδρομή 9: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα *tps1Δ*/pCM190asynWT

Διαδρομή 10: Καθαρισμένη χιμαιρική  $\alpha$ -συνουκλεΐνη

Κατά πρώτο λόγο, μέσω της χρώσης διαπιστώνεται η ικανοποιητική ισοφόρτωση των αντίστοιχων πρωτεϊνικών δειγμάτων. Στην συνέχεια, με τη χρήση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων χωρίς την ενδογενή  $\alpha$ -συνουκλεΐνη ως αρνητικούς μάρτυρες (Διαδρομές 2-5) εξασφαλίζεται η ειδική δέσμευση του αντισώματος. Αντίστοιχα, ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιούνται τα ενδογενή επίπεδα  $\alpha$ -συνουκλεΐνης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων που την φέρουν (Διαδρομές 6-10). Παρόλο το μη υψηλό σήμα, καθίστανται εντούτοις ορατά στις ζώνες των 18 kD ένα επίπεδο χαμηλότερα της χημεικής  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (βέλη στην εικόνα 4.82A). Στην συνέχεια και την κυρίως διαδικασία, η μόνη αλληλεπίδραση πρωτεϊνών που ανιχνεύτηκε με την παρούσα μέθοδο αφορούσε όπως φαίνεται τις πρωτεΐνες των κυττάρων BY4741/pCM190asynWT (Διαδρομή 8). Το σήμα αυτής της αλληλεπίδρασης δείχνει πολύ ισχυρό και ταυτόχρονα ειδικό, ενώ στο μέγεθος της αλληλεπιδράσεως αγνώστου ταυτότητας πρωτεΐνης συμφωνεί με το αποτέλεσμα της δοκιμασίας συγκατακρήμνισης που παρουσιάστηκε προηγουμένως. Και σε αυτή την περίπτωση δεν επετεύχθη η αναγνώριση αλληλεπιδράσεων στα υπόλοιπα δείγματα. Το γεγονός αυτό αποδίδεται ενδεχομένως σε τεχνικούς παράγοντες, δεδομένης της πληθώρας των παραγόντων που εμπλέκονται στη μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων όπως το pH, η αλατότητα αλλά και πιο ειδικά στην περίπτωση του Far Western Blot η απόκτηση της αυτούσιας δομής των πρωτεϊνών είτε κατά το στάδιο της μεταφοράς στην μεμβράνη είτε κατά την μείωση της συγκέντρωσης της υδροχλωρικής γουανιδίνης στα διαλύματα επώασης της μεμβράνης κατά την διαδικασία.

Παρά, λοιπόν τις τεχνικές δυσκολίες στις παραπάνω μελέτες, φαίνεται να ανιχνεύτηκαν πράγματι ακριβείς πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις στο μέγεθος των 40 περίπου kD, μιας και οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύονται από δύο ανεξάρτητες στις αρχές τους μεθόδους μελέτης.

Μετά τις σημαντικές αυτές παρατηρήσεις, οι ζώνες των αγνώστου ταυτότητας πρωτεϊνών μεγέθους περίπου 40 kD από τις δοκιμασίες συγκατακρήμνισης αποκόπηκαν με νυστέρι από το πήκτωμα και στάλθηκαν για την ταυτοποίηση της αμινοξικής τους αλληλουχίας μέσω χρήσης φασματοσκοπίας μάζας.

#### **4.21 Αποτελέσματα υγρής χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (LC-MS/MS) για την αναγνώριση των αγνώστων αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών**

Η ταυτοποίηση των αγνώστου ταυτότητας πρωτεϊνικών μορίων μεγέθους περίπου 40 kD, τα οποία ανιχνεύτηκαν να αλληλεπιδρούν με την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη αναλύθηκαν με ταυτόχρονη φασματοσκοπία μάζας και υγρή χρωματογραφία προκειμένου να αναγνωριστεί η αμινοξική τους αλληλουχία. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια συνεργασίας με το τμήμα Χημείας Πρωτεϊνών του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών 'Αλέξανδρος Φλέμινγκ' και η αναγνώριση των πρωτεϊνών έλαβε χώρα μέσω αναζήτησης στην βάση δεδομένων UniProt.

Σε ό,τι αφορά τις αλληλεπιδράσεις που ανιχνεύτηκαν στις πρωτεΐνες του στελέχους BY4741, οι 4 κυριότερες παρουσιάζονται στον πίνακα 4.17, ενώ ο αναλυτικός πίνακας των ευρημάτων της LC-MS/MS παρουσιάζεται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6.

**Πίνακας 4.17:** Αποτελέσματα υγρής χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (LC-MS/MS) για την ζώνη της SDS-PAGE με τις κυριότερες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη

για το στέλεχος BY4741. Πραγματοποιήθηκε αναζήτηση των ευρισκόμενων αλληλουχιών στην βάση δεδομένων Uniprot. Παρουσιάζεται ο κωδικός ένταξης (accession number) στην βάση δεδομένων, η περιγραφή (Description) του πρωτεϊνικού μορίου, το score αντιστοίχισης σε κάθε πρωτεΐνη, το ποσοστό κάλυψης (Coverage) της αλληλούχισης του πρωτεϊνικού μορίου, ο αριθμός των στοιχίσεων του φάσματος των πεπτιδίων (#PSM), ο ολικός αριθμός διακριτών αλληλουχιών για τα πεπτίδια της κάθε πρωτεϊνικής ομάδας (#Peptides), ο αριθμός των αμινοξέων του πρωτεϊνικού μορίου (#AAs), το μοριακό βάρος σε kD (MW) και το υπολογιζόμενο ισοηλεκτρικό σημείο του κάθε μορίου (Calc. pI). Το score αντιστοίχισης αποτελεί το σύνολο των επιμέρους score όλων των παρατηρούμενων φασμάτων μάζας, τα οποία μπορούν να αντιστοιχούν σε αλληλουχίες αμινοξέων στο εσωτερικό της πρωτεΐνης. Ένα πολύ υψηλό score αναδεικνύει μία πολύ αξιόπιστη αντιστοιχία. Το ποσοστό κάλυψης (coverage) αποτελεί το % ποσοστό της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, το οποίο έχει εξακριβωθεί από ταυτοποιημένα πεπτίδια. Υπολογίζεται διαιρώντας τον αριθμό των αμινοξέων σε όλα τα ταυτοποιημένα πεπτίδια με τον ολικό αριθμό αμινοξέων ολόκληρης της πρωτεϊνικής αλληλουχίας. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή αυτή τόσο πιο βέβαιο το αποτέλεσμα που αναπαράγεται. Η τιμή #PSM αποτελεί τον ολικό αριθμό των ταυτοποιημένων πεπτιδικών αλληλουχιών που αντιστοιχούν στην ευρισκόμενη πρωτεΐνη. Όσο υψηλότερη είναι και αυτή η τιμή τόσο πιο αξιόπιστη είναι η ταυτοποίηση της αλληλουχίας. Η τιμή #PSM μπορεί να είναι υψηλότερη από τον αριθμό των πεπτιδίων που ταυτοποιούνται για μία πρωτεΐνη με υψηλό score λόγω του ότι ορισμένα πεπτίδια μπορεί να ταυτοποιούνται επανειλημμένως. Τέλος, η τιμή #Peptides αποτελεί τον ολικό αριθμό διακριτών πεπτιδίων που ταυτοποιούνται να ανήκουν σε μία πρωτεϊνική ομάδα.

Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSM	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P00358	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TDH2 PE=1 SV=3 - [G3P2_YEAST]	161,77	41,57	13	68	332	35,8	6,96
P00359	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TDH3 PE=1 SV=3 - [G3P3_YEAST]	153,28	41,57	15	63	332	35,7	6,96
P00360	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TDH1 PE=1 SV=3 - [G3P1_YEAST]	113,86	50,60	13	47	332	35,7	8,28
P14540	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=FBA1 PE=1 SV=3 - [ALF_YEAST]	47,87	26,18	6	20	359	39,6	5,78

Q12512	Protein ZPS1 OS= <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ZPS1 PE=3 SV=1 - [ZPS1_YEAST]	54,86	16,87	7	21	249	27,5	5,02
--------	--	-------	-------	---	----	-----	------	------

Από τις παραμέτρους του παραπάνω πίνακα διαφαίνεται πως τα κυριότερα μόρια που αναγνωρίστηκαν στο κομμάτι του πηκτώματος SDS-PAGE που αποκόπηκε αποτελούν οι τρεις μορφές της αφυδρογονάσης της 3-φωσφο-γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) οι οποίες αποτελούν γλυκολυτικά ένζυμα του *S. cerevisiae*. Η πιστότητα του αποτελέσματος εξασφαλίζεται από τις υψηλές τιμές στις παραμέτρους αξιολόγησης της ευαισθησίας της μεθόδου, με κυριότερες το Score, το Coverage, το #PSM και το #Peptides. Συνδυάζοντας τις υψηλές αυτές τιμές με την ένταση της ζώνης στην SDS-PAGE, δηλαδή του μορίου που βρίσκεται σε υψηλές ποσότητες, αυξάνεται η πιθανότητα ακρίβειας της μεθόδου, όσον αφορά την ταυτοποίηση του μορίου. Το εύρημα αυτό αποτέλεσε πρωτοφανές στοιχείο για τα μοντέλα συνουκλεινοπαθειών στον ζυμομύκητα και έρχεται απολύτως νεότερων βιβλιογραφικών μελετών, ώστε να υπάρξουν νεότεροι συσχετισμοί στην μοριακή παθοφυσιολογία των τοξικών γεγονότων που παρατηρήθηκαν να λαμβάνουν χώρα κατά την διάρκεια της παρούσας διατριβής.

Μικρότερη πιθανότητα αλληλεπίδρασης φαίνεται να παρουσιάζουν άλλες εντοπιζόμενες πρωτεΐνες με λιγότερο υψηλές τιμές στις παραμέτρους τους, όπως η αλδολάση της διφωσφορικής φρουκτόζης και η πρωτεΐνη ZPS του ζυμομύκητα οι οποίες φέρουν αρκετά υψηλό Score, ωστόσο το Coverage παραμένει σε χαμηλά πλαίσια, κατά συνέπεια δεν έχει αναγνωριστεί το μεγαλύτερο τμήμα της αλληλουχίας των μορίων αυτών. Παρ' όλα αυτά σαφώς και αυτά τα αποτελέσματα θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψιν.

Στις υπόλοιπες ταυτοποιημένες πρωτεΐνες κρίνεται πως οι παράμετροι αξιολόγησης λαμβάνουν πολύ χαμηλές τιμές με αποτέλεσμα να φέρουν μικρότερη σημαντικότητα στην μελέτη τους, ως πιθανά ψευδώς θετικά αλληλεπιδρώντα μόρια.

Στην συνέχεια, τα κυριότερα αποτελέσματα της LC-MS/MS για το στέλεχος *tps1Δ* αποδίδονται στον πίνακα 4.18 και τα πλήρη στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6. Αυτά αντιστοιχούν στην δεύτερη ζώνη SDS-PAGE των προϊόντων συγκατακρήμνισης που συζητήθηκαν στην προηγούμενη ενότητα.

**Πίνακας 4.18:** Αποτελέσματα υγρής χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (LC-MS/MS) για την ζώνη της SDS-PAGE με τις κυριότερες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά η α-συνουκλεινη για το στέλεχος *tps1Δ*. Πραγματοποιήθηκε αναζήτηση των ευρισκόμενων αλληλουχιών στην βάση δεδομένων Uniprot. Παρουσιάζεται ο κωδικός ένταξης (accession number) στην βάση δεδομένων, η περιγραφή (Description) του πρωτεϊνικού μορίου, το score αντιστοίχισης σε κάθε πρωτεΐνη, το ποσοστό κάλυψης (Coverage) της αλληλούχισης του πρωτεϊνικού μορίου, ο αριθμός των στοιχίσεων του φάσματος των πεπτιδίων (#PSM), ο ολικός αριθμός διακριτών αλληλουχιών για τα πεπτιδία της κάθε πρωτεϊνικής ομάδας (#Peptides), ο αριθμός των αμινοξέων του πρωτεϊνικού μορίου (#AAs), το μοριακό βάρος σε kD (MW) και το υπολογιζόμενο ισοηλεκτρικό σημείο του κάθε μορίου (Calc. pI).

Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSM	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P00358	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TDH2 PE=1 SV=3 - [G3P2_YEAST]	230,84	48,49	15	93	332	35,8	6,96
P00359	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TDH3 PE=1 SV=3 - [G3P3_YEAST]	235,83	56,93	17	94	332	35,7	6,96
P00360	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TDH1 PE=1 SV=3 - [G3P1_YEAST]	171,53	47,89	12	68	332	35,7	8,28
P14540	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=FBA1 PE=1 SV=3 - [ALF_YEAST]	21,17	18,66	4	9	359	39,6	5,78
Q12512	Protein ZPS1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ZPS1 PE=3 SV=1 - [ZPS1_YEAST]	12,07	15,66	4	5	249	27,5	5,02

Για το στέλεχος *tps1Δ*, όπως αναδεικνύει ο πίνακας 4.18, φαίνεται να υπήρξε μεγαλύτερη ειδικότητα στην αλληλεπίδραση της α-συνουκλεΐνης με τις μορφές της GAPDH. Οι τρεις μορφές του ενζύμου ήταν εκείνες που αναγνωρίστηκαν κατά κόρον στο δείγμα της SDS-PAGE, φέροντας πολύ υψηλές τιμές αξιολόγησης της ταυτοποίησης με υψηλό Score, Coverage, #PSM και #Peptides. Το αποτέλεσμα ενισχύεται από την ίδια παρατήρηση και για το αγρίου τύπου στέλεχος, οπότε παρατηρείται πως δύο διαφορετικά δείγματα για δύο διαφορετικού τύπου κύτταρα έφεραν το ίδιο αποτέλεσμα.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης για την αλδολάση της διφωσφορικής φρουκτόζης και την πρωτεΐνη ZPS του ζυμομύκητα στο μεταλλαγμένο στέλεχος έφεραν πολύ χαμηλότερες τιμές στις παραμέτρους αξιολόγησης οπότε λαμβάνονται μεν υπόψιν, αλλά όχι τόσο ισχυρά όσο για τα κύτταρα αγρίου τύπου. Κάθε άλλη πρωτεΐνη που ανιχνεύτηκε φέρει πολύ χαμηλές τιμές στην αξιολόγηση της αλληλούχισής της οπότε θεωρήθηκε ήσσονος σημασίας.

Επιπλέον των παραπάνω δεδομένων κρίθηκε χρήσιμο να πραγματοποιηθεί και μία συνολική εκτίμηση των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης με τα συγκεντρωτικά δεδομένα της ταυτοποίησης για όλες τις πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν στα δύο



δείγματα κυττάρων. Άλλωστε τα κύτταρα αγρίου τύπου θεωρητικά διέφεραν μεταξύ τους μόνο κατά την παρουσία της συνθάσης της τρεχαλόζης σε σχέση με τα μεταλλαγμένα.

Ο πίνακας των κυριότερων αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών και των στοιχείων τους αποτελεί ο πίνακας 4.19 ενώ τα πλήρη στοιχεία αυτής της ανάλυσης αποδίδονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6.

**Πίνακας 4.19:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα γρήρης χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (LC-MS/MS) για τις δύο ζώνες της SDS-PAGE με τις κυριότερες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη για τα στελέχη BY4741 και *tps1Δ*. Πραγματοποιήθηκε αναζήτηση των ευρισκόμενων αλληλουχιών στην βάση δεδομένων Uniprot. Παρουσιάζεται ο κωδικός ένταξης (accession number) στην βάση δεδομένων, η περιγραφή (Description) του πρωτεϊνικού μορίου, το συνολικό ποσοστό κάλυψης ( $\Sigma$ Coverage) της αλληλούχισης του πρωτεϊνικού μορίου, ο συνολικός αριθμός των στοιχίσεων του φάσματος των πεπτιδίων ( $\Sigma$ #PSM), ο ολικός αριθμός διακριτών αλληλουχιών για τα πεπτίδια της κάθε πρωτεϊνικής ομάδας ( $\Sigma$ #Peptides), ο αριθμός των αμινοξέων του πρωτεϊνικού μορίου (#AAs), το μοριακό βάρος σε kD (MW) και το υπολογιζόμενο ισοηλεκτρικό σημείο του κάθε μορίου (Calc. pI). Παράλληλα, στην παρούσα ανάλυση συμπεριλαμβάνεται η παράμετρος  $\Sigma$ #Proteins, η οποία αντιστοιχεί στο ολικό αριθμό των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών στην ομάδα πρωτεϊνών η οποία αποτελείται από μία κύρια πρωτεΐνη. Η παράμετρος  $\Sigma$ #Unique Peptides αφορά τον αριθμό των ταυτοποιημένων μοναδικών αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μία ομάδα πρωτεϊνών και δεν αναγνωρίζονται σε άλλες πρωτεϊνικές ομάδες.

Accession	Description	$\Sigma$ Coverage	$\Sigma$ # Proteins	$\Sigma$ # Unique Peptides	$\Sigma$ # Peptides	$\Sigma$ # PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P00358	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TDH2 PE=1 SV=3 - [G3P2_YEAST]	48,49	2	3	15	161	332	35,8	6,96
P00359	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TDH3 PE=1 SV=3 - [G3P3_YEAST]	56,93	2	5	17	157	332	35,7	6,96

P00360	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TDH1 PE=1 SV=3 - [G3P1_YEAST]	52,71	1	10	15	115	332	35,7	8,28
P14540	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=FBA1 PE=1 SV=3 - [ALF_YEAST]	26,18	1	6	6	29	359	39,6	5,78
Q12512	Protein ZPS1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ZPS1 PE=3 SV=1 - [ZPS1_YEAST]	16,87	1	7	7	26	249	27,5	5,02

Η παραπάνω ανάλυση συμπληρώνει την εικόνα που σχηματίστηκε από την δύο προηγούμενες αναλύσεις ξεχωριστά για το κάθε στέλεχος. Αποδίδεται πως η κάλυψη της αλληλούχησης ήταν η βέλτιστη στις πρωτεΐνες που βρίσκονταν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, όπως οι μορφές της GAPDH, αλλά και ότι οι υψηλές τιμές Σ#PSM συνοδεύονται από ικανοποιητικό αριθμό μοναδικών πεπτιδικών αλληλουχιών που χαρακτηρίζουν την ομάδα των πρωτεϊνών GAPDH (Σ#Unique Peptides). Παράλληλα, μικρότερη πιθανότητα να φέρουν αλληλεπιδράσεις με την α-συνουκλεΐνη φέρουν οι αλδολάση της διφωσφορικής φρουκτόζης και πρωτεΐνη ZPS του ζυμομύκητα. Ωστόσο φυσικά λαμβάνονται σοβαρά υπόψιν φέροντας ικανοποιητικές τιμές Σ#PSM και ικανοποιητικό αριθμό μοναδικών πεπτιδικών αλληλουχιών που να χαρακτηρίζουν τα μόρια τους ξεχωριστά (Σ#Unique Peptides).



## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1 Ανάπτυξη συστήματος μεταφοράς και έκφρασης μορφών της α-συνουκλεΐνης στον *Saccharomyces cerevisiae*

Η α-συνουκλεΐνη είναι μία πρωτεΐνη 140 αμινοξέων, η οποία εκφράζεται άφθονα από το προσυναπτικό άκρο των νευρώνων των σπονδυλωτών κυρίως στην συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας στα βασικά γάγγλια. Είναι υπεύθυνη για ποικίλες λειτουργίες των κυττάρων του νευρικού συστήματος, αλλά πρωτίστως είναι γνωστή για τις παθολογικές καταστάσεις που προκαλεί στους ανθρώπινους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, με κυριότερο εκφραστή αυτών την νόσο του Parkinson. Οι παθολογικές της ιδιότητες προκύπτουν ως επί το πλείστον από την υπερέκφρασή της στον ηλικιωμένο πληθυσμό, ενώ για την παθογένεια της οικογενούς μορφής της νόσου του Parkinson ευθύνονται οι σημειακές της μεταλλαγές όπως οι A53T και A30P. Το κύριο παθολογοανατομικό χαρακτηριστικό της νόσου αποτελούν τα σωματίδια Lewy που αποτελούνται από συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης, ουβικουιτίνης και άλλων συνοδών πρωτεϊνών. Η συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης προκαλείται κυρίως από τροποποίηση της δευτεροταγούς δομής της από δομή α-έλικας σε β-πτυχωτό φύλλο. (Dehay et al., 2015, Paleologou et al., 2005)

Με την πάροδο των ετών, χρήσιμος οργανισμός-μοντέλο για την μελέτη των συνουκλεΐνοπαθειών έχει υπάρξει ο *Saccharomyces cerevisiae*, ο οποίος μοιράζεται πολλά κοινά με τους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς σε επίπεδο κυτταρικής βιολογίας και οργάνωσης.

Στα πρώτα στάδια της παρούσας διατριβής τέθηκε ως στόχος να δημιουργηθεί ένα σταθερό σύστημα για την μεταφορά και την έκφραση των διαφόρων μορφών της α-συνουκλεΐνης στον *Saccharomyces cerevisiae*. Η εγκατάσταση του μοντέλου αυτού κινήθηκε στα πρότυπα της πρώτης δημοσιευμένης εργασίας μοντελοποίησης της νόσου του Parkinson στον ζυμομύκητα από τους Outeiro και Lindquist το 2003. Σημαντική διαφορά του παρόντος συστήματος σε σχέση με το πρώτο δημοσιευμένο σύστημα αποτελεί η χρήση του φορέα έκφρασης pCM190, κατάλληλου για κύτταρα *S. cerevisiae*, ο οποίος για τον έλεγχο της έκφρασης οποιουδήποτε γονιδίου φέρει το σύστημα tet-off. Μέχρι σήμερα, στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε η πρώτη προσπάθεια αξιοποίησης του tet-off για την έκφραση της α-συνουκλεΐνης. Η πλειονότητα των δημοσιευμένων μελετών, μεταξύ των οποίων και η προαναφερθείσα χρησιμοποίησε ως μέθοδο έκφρασης πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν υποκινητές των γονιδίων ευαίσθητους στην παρουσία γαλακτόζης στο θρεπτικό μέσο (Outeiro et al. 2003, Sharma et al. 2006, Brandis et al., 2005, Soper et al., 2008, Chen et al., 2005). Άλλες εργασίες αξιοποίησαν το αντίστροφο του συστήματος tet-off, το σύστημα tet-on, κατά το οποίο η προσθήκη τετρακυκλίνης ή δοξυκυκλίνης επάγει την γονιδιακή έκφραση μέσω του φορέα (Sampaio Marques et al., 2012).

Η εγκατάσταση του μοντέλου της α-συνουκλεΐνης στον *S. cerevisiae* είχε ξεκινήσει με την κλωνοποίηση των γονιδίων της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου και της ισομορφής 112 στο φορέα έκφρασης pCM190 και τη μεταφορά τους στα κύτταρα ζύμης. (Πτυχιακή Εργασία Σφήκας Ε., 2011). Στο πρώτο στάδιο της παρούσας διατριβής οι σημειακές μεταλλαγές της α-συνουκλεΐνης A53T και A30P κλωνοποιήθηκαν επίσης στον ίδιο φορέα έκφρασης υπό τον έλεγχο του υβριδικού υποκινητή του συστήματος tet-off. Στην συνέχεια, οι ανασυνδυασμένοι φορείς μεταφέρθηκαν με την σειρά τους στα κύτταρα ζυμομύκητα BY4741. Κατά τον ίδιο

τρόπο με προηγουμένως η παρουσία των δύο γονιδίων στα πλασμιδιακά εκχυλίσματα των μετασηματισμένων κυττάρων επιβεβαιώθηκε με νεότερα πειράματα υβριδισμού, αλλά και με PCR (Πρόσθετο Υλικό Π1 & Π2).

Στην συνέχεια σχεδιάστηκαν πειράματα ελέγχου για την ετερόλογη έκφραση των διαφόρων μορφών της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα *S. cerevisiae*. Η μεταγραφή της κάθε μορφής του *SNCA* από τον υποκινητή του συστήματος tet-off ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε με RT-PCR και η μετάφραση με ανοδοκιμασία κατά Western (Εικόνα 4.1). Κατά το στάδιο αυτό διαπιστώθηκε η έκφραση των μεταλλαγών της πρωτεΐνης σε πιο υψηλά επίπεδα από την αγρίου τύπου, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανότητα συσσωμάτωσης σε τέτοια επίπεδα έκφρασης. Έπειτα το σύστημα tet-off ελέγχθηκε για την απόδοση του με την προσθήκη τετρακυκλίνης και την επανάληψη νέων ανοσοδοκιμασιών κατά Western (Εικόνα 4.2). Με τις μεθόδους αυτές, διαπιστώθηκε η μείωση όλων των επιπέδων έκφρασης στις διάφορες μορφές της α-συνουκλεΐνης, κυριότερα στην αγρίου τύπου για την οποία πλέον τα επίπεδα έκφρασης αποδείχθηκαν μη ανιχνεύσιμα.

## **5.2 Ανεύρεση τοξικών φαινοτύπων και επιτυχής εφαρμογή της συνθήκης ΗΕΟ**

Μετά τους επιτυχείς ελέγχους για την ομαλή και αναμενόμενη έκφραση της α-συνουκλεΐνης από το εγκατεστημένο σύστημα, σχεδιάστηκαν καμπύλες ανάπτυξης, για την μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας στις πρώτες 24 h παρουσία και απουσία τετρακυκλίνης για τον έλεγχο της μεταγραφής του γονιδίου και τον αποκλεισμό πιθανών τοξικών επιδράσεων από την έκφρασή του (Εικόνες 4.3). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά παρατηρήθηκε πως η α-συνουκλεΐνη δεν αποτελεί τοξικό στοιχείο για τα κύτταρα του ζυμομύκητα για τις πρώτες φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων του. Το στοιχείο αυτό έρχεται σε συμφωνία με τις πρώτες μελέτες του ίδιου αντικειμένου και συνολικά αποδεικνύεται πως απαιτούνται περαιτέρω παράγοντες τοξικότητας για την εκδήλωση τοξικού φαινοτύπου εξαρτώμενου από την α-συνουκλεΐνη, όπως εξωγενείς παράγοντες τοξικότητας ή/και αύξηση των επιπέδων της έκφρασης της α-συνουκλεΐνης με διπλασιασμό του γονιδίου (Outeiro et al. 2003, Sharma et al. 2006, Kukreja, 2009, Lee et al., 2008).

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω στοιχεία της διεθνούς βιβλιογραφίας, θεωρήθηκε σκόπιμο να αναπαραχθούν και στο συγκεκριμένο μοντέλο συνουκλεϊνοπάθειας ορισμένοι τοξικοί φαινότυποι, οι οποίοι θα βασίζονταν στην παθογένεια μέσω χρήσης εξωγενών παραγόντων. Επιλέχθηκε ο παράγοντας 1,4-δι-θειο-θρεϊτόλη (DTT) για τον οποίο είναι γνωστό πως προκαλεί στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο και αναστέλλει τον σχηματισμό των δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των πρωτεϊνών (Outeiro PhD, 2004). Ένας τέτοιος παράγοντας με την ταυτόχρονη παρουσία της α-συνουκλεΐνης και τον τοξικό ρόλο που μπορεί να παίξει στο ενδοπλασματικό δίκτυο ανέδειξε πράγματι τοξικές συνέπειες στην κυτταρική βιωσιμότητα με την υψηλότερη επιβάρυνση να λαμβάνει χώρα εν τη παρουσία της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου και τις σημειακές μεταλλαγές της (Εικόνα 4.4). Άλλωστε ήταν ήδη γνωστό από την μελέτη των Dixon και συνεργατών (2005) πως η πρωτεΐνη αγρίου τύπου και η A53T χρησιμοποιούν το εκκριτικό σύστημα του ζυμομύκητα και το ενδοπλασματικό δίκτυο για την κατανομή τους στο κύτταρο, οπότε η αναπαραγωγή της τοξικότητας έδειχνε αναμενόμενη. Παράλληλα, για την σημειακή μεταλλαγή A30P, η οποία αδυνατεί να

εκκριθεί από το κυτταρικό εκκριτικό σύστημα, η περαιτέρω επιβάρυνση με τον παράγοντα αυτό οδήγησε στην μεγαλύτερη θνησιμότητα μεταξύ των διαφόρων μορφών της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα ζύμης.

Στη διεθνή βιβλιογραφία παρουσιάζονται ολοένα και αυξανόμενα τα δεδομένα σχετικά με την μελέτη της α-συνουκλεΐνης σε μοντέλα κυτταρικής χρονολογικής γήρανσης του *S. cerevisiae* (Sampaio Marques et al. 2016 & 2011, Guedes et al., 2016, Chen et al., 2005, Buttner et al., 2007). Όπως αναλύθηκε και στο κεφάλαιο της εισαγωγής φαίνεται πράγματι να υπάρχουν πολλές κυτταρικές ομοιότητες των κυττάρων ζύμης με τους νευρώνες, οι οποίες επεκτείνονται και στα κυτταρικά φαινόμενα της χρονολογικής γήρανσης. Κατά συνέπεια, με την εγκατάσταση ενός μοντέλου χρονολογικής γήρανσης στον ζυμομύκητα φαίνεται να επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό ένα «οικείο» κυτταρικό περιβάλλον δράσης της α-συνουκλεΐνης, το οποίο ομοιάζει σε μεγάλο βαθμό με τους φαινοτύπους γήρανσης των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών. Συν τοις άλλοις, είναι δεδομένο πως οι συνουκλεϊνοπάθειες προσβάλλουν ως επί το πλείστον τον γηρασμένο ανθρώπινο πληθυσμό, οπότε η μοντελοποίηση της νόσου στον ζυμομύκητα γίνεται πιο ακριβής.

Σύμφωνα λοιπόν με όλα τα παραπάνω θεωρήθηκε κρίσιμο στοιχείο για την παρούσα διατριβή να αναπαραχθούν οι τοξικοί φαινότυποι της χρονολογικής γήρανσης και για το παρόν μοντέλο μελέτης της α-συνουκλεΐνης στον ζυμομύκητα. Παράλληλα ωστόσο, υπήρξε μία διαφοροποίηση της μελέτης αυτής σε σχέση με τις προηγούμενες που αναφέρθηκαν, η οποία αφορούσε την εφαρμογή της συνθήκης της υψηλής εξωκυττάριας οσμωτικότητας (HEO) στα κύτταρα. Η συνθήκη αυτή εκτρέπει τον μεταβολισμό των κυττάρων από την κλασική ζύμωση προς την βιοσύνθεση γλυκερόλης και τρεχαλόζης από την αρχή της ζωής τους, με σκοπό την αξιοποίησή τους ως πρώτες πηγές ενέργειας. Το γεγονός αυτό οδηγεί τα κύτταρα σε αυξημένη μακροζωία και ανθεκτικότητα σε πολλές πηγές στρες (Kaeberlein et al., 2002, Buttner et al. 2009). Άρα λοιπόν δοκιμάστηκε η διάσωση των τοξικών φαινοτύπων χρονολογικής γήρανσης που παρατηρήθηκαν από άλλες μελέτες αξιοποιώντας την συνθήκη HEO.

Από τις μελέτες χρονολογικής γήρανσης (εικόνα 4.5) παρατηρήθηκε πράγματι πως η παρουσία της οποιαδήποτε μορφής α-συνουκλεΐνης επιβαρύνει την κυτταρική βιωσιμότητα κατά την είσοδο στην στατική φάση των ζυμομυκήτων, ενώ οι πιο επιβλαβείς μορφές της πρωτεΐνης για αυτές τις συνθήκες εκδηλώνονται από τις σημειακές της μεταλλαγές. Παρά την εφαρμογή της συνθήκης HEO, ο κυτταρικός πληθυσμός σε παρουσία οποιασδήποτε μορφής της α-συνουκλεΐνης έφθινε σημαντικά σε βιωσιμότητα συν τω χρόνο, οπότε φάνηκε πως η συνθήκη αυτή δεν μπορεί να αντιστρέψει τα φαινόμενα τοξικότητας. Το επόμενο ερώτημα, ωστόσο, αποτέλεσε το αν η συγκεκριμένη συνθήκη μπορούσε να επιβραδύνει την εμφάνιση του τοξικού φαινοτύπου. Η επιβράδυνση αυτή και η ευεργετική δράση της HEO παρατηρήθηκε όντως με την μελέτη των δεδομένων ανάπτυξης των κυττάρων απουσία και παρουσία της συνθήκης HEO με τον συνδυασμό στην απουσία και παρουσία της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου (εικόνα 4.6).

Την εικόνα σχετικά με την ευεργετική δράση της συνθήκης HEO συμπλήρωσαν οι μελέτες εντόπισης και κατανομής της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου στο εσωτερικό των κυττάρων, καθώς και η μελέτη των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης στην πάροδο του χρόνου, στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των ζυμομυκήτων. Στις μελέτες της κατανομής της πρωτεΐνης διαπιστώθηκε η απουσία κυτταροπλασματικών

εγκλείστων και η κυτταροπλασματική κατανομή της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου στην εκθετική φάση, ένας φαινότυπος ο οποίος δεν χαρακτηρίζεται τοξικός (εικόνα 4.7). Κατά την φάση γήρανσης (εικόνα 4.8) τα κύτταρα εμφάνισαν μεμβρανική εντόπιση της α-συνουκλεΐνης με ορισμένο αριθμό κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων, φαινότυπος ο οποίος προάγει σίγουρα κυτταρικό στρες και αποτελεί προοίμιο τοξικών συνεπειών. Παράλληλα αποδείχθηκε ότι η έκφραση της α-συνουκλεΐνης αυξάνεται βαθμιαία από την μία φάση ανάπτυξης στην διαδοχική της και φθάνει στο μέγιστο επίπεδο κατά την στατική φάση (εικόνα 4.9). Ως εκ τούτου, υπάρχει άμεση συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της α-συνουκλεΐνης με την εντόπισή της στο εσωτερικό του κυττάρου, με την πρωτεΐνη να κατανέμεται στο κυτταρόπλασμα σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης και να εντοπίζεται στην μεμβράνη ή σε συσσωματώματα σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης.

Τα παραπάνω δεδομένα έρχονται σε συμφωνία σχετικά με την έκκριση της πρωτεΐνης από το ενδοπλασματικό δίκτυο του ζυμομύκητα και την μετέπειτα εντόπισή της στην κυτταρική μεμβράνη όπως είχε παρατηρηθεί στην πρώτη μελέτη του αντικειμένου αυτού (Dixon et al., 2005). Ωστόσο, με την εφαρμογή της συνθήκης ΗΕΟ στο παρόν μοντέλο υπάρχουν ορισμένες διαφοροποιήσεις. Συγκεκριμένα, παρουσία υψηλής οσμωτικότητας φαίνεται να καθυστερείται η μεμβρανική εντόπιση και ο σχηματισμός συσσωματωμάτων, γεγονός τα οποία εμφανίζονται στο στάδιο της εκθετικής φάσης στην ανωτέρω μελέτη. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι απαιτείται να παρέλθει σημαντικό χρονικό διάστημα έκθεσης στην α-συνουκλεΐνη για την εμφάνιση τοξικού φαινοτύπου, όπως παρατηρήθηκε στην στατική φάση.

Κατά συνέπεια, κρίνεται πως η συνθήκη ΗΕΟ επιτυγχάνει την εξισορρόπηση της φυσιολογίας του κυττάρου κατά την εκθετική φάση με χαμηλά επίπεδα έκφρασης της α-συνουκλεΐνης και απουσία επιβαρυσμένου φαινοτύπου τόσο στις μελέτες βιωσιμότητας όσο και στις εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας. Ο τοξικός φαινότυπος κάνει την εμφάνιση του κατά την στατική φάση του ζυμομύκητα ταυτόχρονα με τα μέγιστα παρατηρούμενα επίπεδα έκφρασης της α-συνουκλεΐνης, την πτώση του επιπέδου βιωσιμότητας, αλλά και την εμφάνιση μεμβρανικής εντόπισης και κυτταροπλασματικών εγκλείστων της πρωτεΐνης. Εντούτοις, κατά τη συνθήκη ΗΕΟ, η πτώση της βιωσιμότητας στη στατική φάση αργεί να εμφανιστεί, γεγονός που καταδεικνύει τη χρησιμότητά της. Ως εκ τούτου, μπορεί να προταθεί η αξιοποίησή της στην περαιτέρω μοριακή θεραπευτική παρέμβαση σε οποιοδήποτε ευκαρυωτικό οργανισμό, δεδομένης της ομοιότητας όλων των ανώτερων ευκαρυωτικών με τον ζυμομύκητα στα κυτταρικά μονοπάτια που συμμετέχουν στην ολοκλήρωση της.

### **5.3 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε κρίσιμα μεταβολικά μονοπάτια κατά την παρουσία της α-συνουκλεΐνης**

Τα αποτελέσματα από τα πειράματα βιωσιμότητας των κυττάρων ζυμομύκητα παρουσία της α-συνουκλεΐνης και της συνθήκης ΗΕΟ αποτέλεσαν το ερέθισμα για την μελέτη ορισμένων κρίσιμων μεταβολικών μονοπατιών τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και των οποίων ο ρόλος στην τοξικότητα από την α-συνουκλεΐνη μπορεί επίσης να θεωρηθεί ξεχωριστός. Η μελέτη των εν λόγω μεταβολικών μονοπατιών πραγματοποιήθηκε με qPCR, με στόχο να αναδειχθούν διαφορές της γονιδιακής έκφρασης σε μόρια σημαντικά για τα μονοπάτια αυτά στην παράμετρο του χρόνου, με την μελέτη των τεσσάρων φάσεων ανάπτυξης του ζυμομύκητα.



Σε πρώτη φάση, αναλύθηκε η έκφραση του γονιδίου *SNCA* στην προ-εκθετική φάση, την εκθετική φάση, την μετα-διαυξική φάση και την στατική φάση. Τα αποτελέσματα για τα επίπεδα της μεταγραφής του γονιδίου και εκείνα της μετάφρασης της πρωτεΐνης στο προηγούμενο βήμα ανέδειξαν βαθμιαία αυξανόμενα επίπεδα της έκφρασης του *SNCA* συν τω χρόνω (εικόνα 4.9).

Στην συνέχεια επιλέχθηκε να μελετηθεί ο ρόλος του μεταβολισμού της τρεχαλόζης και των γονιδίων που τον ρυθμίζουν: του *TPS1*, υπεύθυνου για την παραγωγή της συνθάσης της τρεχαλόζης, του *TPS2*, υπεύθυνου για την φωσφατάση της τρεχαλόζης και του *TSL1*, κυριότερου ρυθμιστικού μορίου για την έναρξη λειτουργίας του συμπλόκου TPS και ενεργοποιητή της συνθάσης. Τα γονίδια αυτά, εκτός του κύριου ρόλου τους στην βιοσύνθεση της τρεχαλόζης, αποτελούν μέρος της γενικευμένης απόκρισης του στρες για τον *S. cerevisiae* και η μεταγραφή τους αυξάνεται σε παρουσία πληθώρας παραγόντων στρες, μεταξύ των οποίων και το πρωτεοτοξικό στρες (Eleutherio E. et al., 2015, Nwaka S. et al., 1998, Francois J.M. et al., 2012). Άλλωστε, είναι γνωστό πως ο ίδιος ο δισακχαρίτης της τρεχαλόζης αποτελεί μόριο σταθεροποίησης για τις στρεσογόνες συνθήκες της μετα-διαυξικής και της στατικής φάσης του ζυμομύκητα με πληθώρα ευεργετικών επιδράσεων κατά την διάρκειά τους, οπότε και αυξάνεται η βιοσύνθεσή του. (Nwaka S. et al., 1998, Francois J.M. et al., 2012). Η συσχέτιση της τρεχαλόζης με την α-συνουκλεΐνη διερευνήθηκε λόγω των ιδιοτήτων του δισακχαρίτη να αποσυσσωρεύει λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και συσσωματώματα αυτών αφενός (Singer M. A. et al., 1998), αλλά και να επάγει την αυτοφαγία, έναν κύριο μηχανισμό άμυνας έναντι πρωτεοτοξικού στρες, αφετέρου (Ruzza P. et al., 2015, Sarkar S. et al., 2006). Επιπλέον, κατά την εφαρμογή της συνθήκης HEO η βιοσύνθεση της τρεχαλόζης αυξάνεται και θεωρήθηκε σημαντικό να διευκρινιστεί κατά πόσο αυτό βοηθά τα κύτταρα να επιβιώσουν παρουσία της α-συνουκλεΐνης με ανάδειξη γεγονότων στους μοριακούς μηχανισμούς.

Οι μελέτες της γονιδιακής έκφρασης (Πίνακας 4.1) αποκάλυψαν εξισορρόπηση της γονιδιακής έκφρασης των *TPS1*, *TPS2* και *TSL1* στην προ-εκθετική και την εκθετική φάση ανάπτυξης παρουσία της α-συνουκλεΐνης σε σχέση με απουσία αυτής. Το γεγονός αυτό ήρθε σε συμφωνία με την χαμηλή έκφραση της α-συνουκλεΐνης και τον μη τοξικό φαινότυπο από τις προηγούμενες μελέτες στις αντίστοιχες φάσεις ανάπτυξης, οπότε θεωρήθηκε αναμενόμενο ο μεταβολισμός της τρεχαλόζης όπως αντικατοπτρίζεται από τα μεταγραφικά επίπεδα των υπεύθυνων γονιδίων να βρίσκεται σε ομοιοστατικά επίπεδα. Στην πάροδο του χρόνου και κατά την είσοδο στην μετα-διαυξική φάση και έπειτα στην στατική φάση, έλαβαν χώρα οι πρώτες διαφοροποιήσεις στην γονιδιακή έκφραση από την παρουσία της α-συνουκλεΐνης. Η έκφραση των βιοσυνθετικών γονιδίων *TPS1* και *TPS2*, ειδικότερα του *TPS1*, παρατηρήθηκε κατεσταλμένη κατά την παρουσία της α-συνουκλεΐνης σε σχέση με την συνθήκη απουσίας της, ενώ πολύ ιδιαίτερο εύρημα αποτέλεσε η άνοδος στην έκφραση του *TSL1* στην παρουσία της α-συνουκλεΐνης. Όλα τούτα σχηματίζουν μία εικόνα πιθανής αδυναμίας των κυττάρων παρουσία της α-συνουκλεΐνης να βιοσυνθέσουν ικανοποιητικά επίπεδα τρεχαλόζης, παρά το γεγονός πως το ερέθισμα παραγωγής της από το ρυθμιστικό μόριο Tsl1p είναι ενισχυμένο. Η κατάσταση αυτή συμφωνεί με την εικόνα στρες και τοξικότητας που παρατηρήθηκε στις μελέτες βιωσιμότητας και απεικόνισης της α-συνουκλεΐνης στην στατική φάση καθώς και την αυξανόμενη έκφραση της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα συν το χρόνο.

Ακόμη, μελετήθηκε το μεταβολικό μονοπάτι Tor, με την μελέτη των επιπέδων έκφρασης του *TOR1*. Το συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι ρυθμίζει την απόκριση

των κυττάρων στην αίσθηση θρεπτικών στοιχείων, κυρίως αζώτου. Κύριο ρόλο φέρει επίσης στην αρνητική ρύθμιση της αυτοφαγίας, της απόκρισης στο στρες και έμμεσα, μέσω του Rim15, στην βιοσύνθεση της τρεχαλόζης, οπότε γίνεται αντιληπτό πως καταστέλλεται παρουσία οποιουδήποτε στρεσογόνου παράγοντα (Cebollero E. et al., 2009, Inoue Y. et al., 2010, Kaeberlein M. et al., 2007). Η καταστολή του Tor πραγματοποιείται και με την χρήση της συνθήκης HEO, οπότε ο μεταβολισμός εκτρέπεται της ζύμωσης των υδατανθράκων, την οποία ρυθμίζει. Ωστόσο, οποιαδήποτε μεταβολή λάμβανε χώρα στο μονοπάτι από την παρουσία της α-συνουκλεΐνης θα αναδείκνυε πιθανές επιδράσεις από την συγκεκριμένη στρεσογόνο κατάσταση, αλλά και αλλοιώσεις στις σχέσεις του μονοπατιού με τους υπόλοιπους μελετώμενους μεταβολικούς παράγοντες. Τα επίπεδα μεταγραφής του *TOR1* παρουσία του *SNCA* απεδείχθησαν αμετάβλητα σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης εκτός της εκθετικής, όπου ανιχνεύθηκαν ήπια κατεσταλμένα. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παρουσία της συνθήκης HEO που εκτρέπει την λειτουργία του μονοπατιού σε δευτερεύοντα ρόλο, οπότε φαίνεται πως η α-συνουκλεΐνη δεν το επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό. Ωστόσο, ακόμη και αυτή η ήπια πτώση των επιπέδων έκφρασης στην εκθετική φάση μαρτυρά μία ήπια κατάσταση στρες από την παρουσία της. Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί ως εύρημα αρχόμενου στρες μιας και οι φαινότυποι που ακολουθούν αυτόν της εκθετικής φάσης και αναφέρονται στην μετα-διαυξική φάση και την στατική φάση παρουσιάζονται τοξικοί κατά τις μελέτες βιωσιμότητας και μικροσκοπίας, παράλληλα με την αύξηση στην έκφραση της α-συνουκλεΐνης.

Παράλληλα με την έκφραση των παραπάνω γονιδίων μελετήθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης του *ATG8*. Το εν λόγω γονίδιο αποτελεί σημαντικό εκφραστή της ενεργοποίησης της αυτοφαγίας στον ζυμομύκητα. Η αυτοφαγία, ως μηχανισμός ανακύκλωσης περιττών μεταβολικών παραπροϊόντων των αιώτερων φάσεων ανάπτυξης του *S. cerevisiae* και άλλων οργανισμών έχει συσχετιστεί σημαντικά με την κάθαρση των κυττάρων από λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, ενώ είναι χαρακτηριστική η ενεργοποίησή της στις αιώτερες φάσεις ανάπτυξης των οργανισμών (Cebollero E. et al, 2009, Inoue Y et al., 2010, Huang WP. et al., 2002). Μάλιστα, είναι άμεση η συμμετοχή του μηχανισμού στην τοξικότητα από την α-συνουκλεΐνη, όπως αποδεικνύεται από πολλές μελέτες τόσο στον ζυμομύκητα όσο και σε ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Sampaio Marques et al., 2016, Sarkar et al., 2007, Ahlstrand et al., 2010, Pellens et al., 2005, Winslow et al., 2010, Webb et al., 2003). Παρόλη την αποτελεσματική της δράση, η αυτοφαγία μπορεί να κατασταλεί υπό συνεχείς συνθήκες στρες, ενώ θεωρείται πως και η υπερ-ενεργοποίησή της μπορεί να αποβεί μοιραία για τα κύτταρα, λόγω κατανάλωσης κρίσιμων στοιχείων του κυττάρου όπως τα μιτοχόνδρια (Sampaio-Marquez B. et al., 2011) Κατά συνέπεια, για την ευεργετική του δράση ο μηχανισμός πρέπει να βρίσκεται σε ισορροπία, γεγονός στο οποίο συνδράμει η εφαρμογή της συνθήκης HEO στα κύτταρα (Liu L. et al., 2014, Prick T. et al., 2006). Πέραν ωστόσο της επίδρασης της συνθήκης HEO, στο παρόν μοντέλο ζυμομύκητα η αυτοφαγία μελετάται και σε συνδυασμό με το μονοπάτι Tor, από το οποίο ρυθμίζεται κυρίως, αλλά και από την παρουσία της τρεχαλόζης, ενός μορίου γνωστού επαγωγέα του μηχανισμού κατά τρόπο ανεξάρτητο του Tor.

Στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα μεταγραφής του *ATG8* στην προ-εκθετική φάση πιθανόν να φέρονται ελάχιστα αυξημένα παρουσία της α-συνουκλεΐνης σε σχέση με απουσία αυτής, γεγονός που μαρτυρά την πιθανή ήπια ενεργοποίηση του μηχανισμού σε αυτή την φάση, γεγονός αναμενόμενο αφού η αυτοφαγία αυξάνεται σε όλα τα

μοντέλα συνουκλεινοπάθειας. Η ήπια πάντως αυτή αύξηση θεωρείται αποτέλεσμα της συνθήκης HEO, μιας και δεν παρατηρούνται θεαματικές αυξήσεις των επιπέδων έκφρασης όπως στα υπόλοιπα μοντέλα (Samraio Marques et al., 2016 & 2011). Η προαγωγή της εξισορρόπησης άλλωστε, φαίνεται από την πλήρη ισορροπία στα επίπεδα έκφρασης στην εκθετική φάση. Αντίθετα, η α-συνουκλεΐνη λόγω και της αυξανόμενης έκφρασής της και της μακροχρόνιας έκθεσης των κυττάρων σε αυτή, φαίνεται να καταστέλλει τα επίπεδα του γονιδίου, πιθανότατα και τον αυτοφαγικό μηχανισμό, στην μετα-διαυξική φάση και κυρίως στην στατική φάση ανάπτυξης. Υπενθυμίζεται φυσικά και εδώ πως σε αυτή την φάση παρατηρήθηκε και η αρχόμενη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με τις κατασταλτικές επιδράσεις της α-συνουκλεΐνης στην αυτοφαγία όπως προτείνεται από πολλές μελέτες. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό, επίσης, αποτελεί το γεγονός ότι αυτή η μείωση των επιπέδων μεταγραφής του γονιδίου δεν σχετίζεται με τα επίπεδα μεταγραφής του *TORI*, τα οποία δεν φέρουν αυξομειώσεις, ενώ η καταστολή αυτή φαίνεται να είναι ανεξάρτητη του μονοπατιού αυτού. Η αιτιολόγηση του γεγονότος αυτού και εδώ μπορεί να αποδοθεί στην συνθήκη HEO, όπου το Tor θεωρητικά είναι κατεσταλμένο και η αυτοφαγία βρίσκεται σε ομοιοστατικά επίπεδα.

Συνολικά, η εκτίμηση των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης προσέδωσε σημαντικά στοιχεία στην μελέτη των αναπαραγώμενων φαινοτύπων από την παρουσία της α-συνουκλεΐνης. Κατά τις πρώτες φάσεις ανάπτυξης όπου φαίνεται να δρα η συνθήκη HEO, ο μεταβολισμός τη τρεχαλόζης φέρεται σε μεταγραφική ισορροπία, ενώ ήπια σημάδια στρες φαίνονται μόνο από την καταστολή των επιπέδων του *TORI* και την πολύ ήπια πιθανή άνοδο της αυτοφαγίας. Ο φαινότυπος στις μελέτες βιωσιμότητας αποδεικνύεται μη επιβαρυνμένος, τα επίπεδα έκφρασης της α-συνουκλεΐνης βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα και η πρωτεΐνη φέρεται κατανεμημένη στο κυτταρόπλασμα. Αντίθετα, στις αργότερες φάσεις ανάπτυξης, τα κύτταρα παρουσία της α-συνουκλεΐνης πιθανότατα φέρουν μειωμένη βιοσύνθεση τρεχαλόζης, παρά την ύπαρξη ενισχυμένου ερεθίσματος βιοσύνθεσής της, γεγονός που εκδηλώνεται ως κατάληξη τοξικών επιδράσεων. Στο πλαίσιο αυτό ο αυτοφαγικός μηχανισμός αξιολογείται πιθανότατα κατεσταλμένος, ανεξάρτητα από τα επίπεδα ενεργοποίησης του μονοπατιού Tor. Ασφαλώς, με τις υποκείμενες παρατηρήσεις μπορεί να πραγματοποιηθεί και η συσχέτιση πως με κατεσταλμένη την βιοσύνθεση της τρεχαλόζης παρατηρείται κατεσταλμένη και η αυτοφαγία, οπότε διαφαίνεται και η μεταξύ τους σχέση. Το πλαίσιο αυτό συμπλήρωσε την παρατηρούμενη εικόνα πτώσης της βιωσιμότητας των κυττάρων που φέρουν το *SNCA* στην χρονολογική γήρανση, τα μέγιστα εκφραζόμενα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης και την αρχόμενη συσσωμάτωσή της μαζί με την μεμβρανική της εντόπιση.

#### **5.4 Μελέτη των μεταλλαγμένων στελεχών *tps1Δ*, *tps2Δ* και *ts11Δ***

Μία καινοτομία της παρούσας διατριβής αποτέλεσε ασφαλώς η μελέτη της ετερόλογης έκφρασης της α-συνουκλεΐνης σε μεταλλαγμένα στελέχη ως προς τον μεταβολισμό της τρεχαλόζης. Η προσπάθεια της συσχέτισης των δύο παραγόντων, δηλαδή της τρεχαλόζης και της α-συνουκλεΐνης πραγματοποιήθηκε όπως έγινε αντιληπτό και από τις μελέτες του αγρίου τύπου στελέχους όσον αφορά τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης στα τρία υπεύθυνα γονίδια για τον μεταβολισμό της τρεχαλόζης. Ωστόσο, με την χρήση των μεταλλαγμένων στελεχών η διερεύνηση αυτή απέκτησε διαφορετικό χαρακτήρα, όπου η σημαντικότητα του κάθε γονιδίου

συμπεριλήφθηκε κάθε φορά ξεχωριστά κατά τις συνθήκες απουσίας του από το γονιδίωμα και την φυσιολογία του *S. cerevisiae*. Παράλληλα, η χρήση της συνθήκης ΗΕΟ αποτέλεσε επίσης σημαντικό στοιχείο, μιας και ενεργοποιούσε από τις αρχικές φάσεις ανάπτυξης για το εκάστοτε στέλεχος την μεταγραφή των υπολοίπων συμπληρωματικών γονιδίων υπεύθυνων για την παραγωγή των μελών του συμπλόκου TPS.

Με την μελέτη του *tps1Δ* επετεύχθη η μελέτη της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε ένα στέλεχος το οποίο αδυνατεί να βιοσυνθέσει οποιαδήποτε μορφή τρεχαλόζης (Kyryakov et al., 2012). Με την απουσία τρεχαλόζης αναπαράγεται έτσι ένα μοντέλο έλλειψης ενός κύριου προστατευτικού παράγοντα για τα κύτταρα σε πρωτεοπάθειες, οπότε τα κύτταρα αυτά χάνουν την δυνατότητα αποσυσώρευσης λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και ενεργοποίησης της αυτοφαγίας από την τρεχαλόζη. Φυσικά, φέρουν μειονεκτήματα όσον αφορά την θερμοανθεκτικότητα, την αντοχή του κυτταρικού τοιχώματος και την εύρεση αξιοποιήσιμων πηγών ενέργειας κατά τις απότερες φάσεις ανάπτυξης. Ειδική αναφορά θα πρέπει επίσης να γίνει και στην γνωστή αλληλεπίδραση της συνθάσης της τρεχαλόζης με την πρωτεΐνη-κινάση Rim15, κύριου ρυθμιστή της απόκρισης στο στρες και της εισόδου στην στατική φάση του ζυμομύκητα (Reinders et al., 1998), η οποία ρυθμίζεται αρνητικά από το σύμπλοκο TORC1. Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης είναι πιθανή και μία πιο ειδική δράση της συνθάσης της τρεχαλόζης σε παράγοντες κατά την απόκριση στο στρες, όπως η αυτοφαγία.

Με τις μελέτες βιωσιμότητας του εν λόγω μεταλλαγμένου στελέχους φάνηκε αρχικά μία ήπια κατάσταση στρες κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης παρουσία των αγρίου τύπου, A53T και A30P μορφών της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (Εικόνα 4.11) η οποία συνεχίστηκε με μία κατάσταση σημαντικά επιβαρυνμένης βιωσιμότητας από τις πρώτες ημέρες χρονολογικής γήρανσης των κυττάρων (Εικόνα 4.15) παρουσία οποιασδήποτε μορφής της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης ιδιαίτερα των σημειακών μεταλλαγών της. Αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό πως ο φαινότυπος της στατικής φάσης εμφανίζεται κατά την 6η ημέρα χρονολογικής γήρανσης στο συγκεκριμένο στέλεχος σε σχέση με την 8η ημέρα γήρανσης των αγρίου τύπου κυττάρων παρουσία των μορφών του *SNCA*. Ο επιβαρυνμένος αυτός φαινότυπος της χρονολογικής γήρανσης δεν αποδεικνύεται ότι ωφελείται σε σημαντικό βαθμό από την συνθήκη ΗΕΟ (Εικόνα 4.18), στοιχείο αναμενόμενο μιας και η βιοσύνθεση της τρεχαλόζης, μέσω της συνθήκης, έχει παρεμποδιστεί με την απουσία του *tps1Δ*.

Οι μελέτες έκφρασης και μικροσκοπίας για την  $\alpha$ -συνουκλεΐνης αγρίου τύπου αποκάλυψαν σταθερά πολύ υψηλά επίπεδα παραγωγής της πρωτεΐνης σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων (Εικόνα 4.21) και αρχόμενη συσσωμάτωση από την εκθετική φάση ανάπτυξης (Εικόνα 4.24), η οποία στην στατική φάση (Εικόνα 4.25) εντατικοποιείται και παρατηρείται ένας πολύ τοξικός φαινότυπος με πολυάριθμα κυτταροπλασματικά συσσωματώματα. Τα στοιχεία αυτά σαφώς και αποτελούν αναμενόμενα δεδομένα με βάση τον αναλυθέντα ρόλο της τρεχαλόζης στην σχέση της με τις πρωτεοπάθειες.

Οι μελέτες της γονιδιακής έκφρασης (Πίνακας 4.2) στα ίδια με παραπάνω μελετώμενα γονίδια καθ' όλη την διάρκεια ζωής του ζυμομύκητα ανέδειξαν ήπιες επιδράσεις της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στην μεταγραφή των γονιδίων του μεταβολισμού της τρεχαλόζης, υπό την ταυτόχρονη απουσία της συνθάσης της τρεχαλόζης. Παράλληλα, επαναλαμβάνονται τα φαινόμενα μεταγραφικής καταστολής της αυτοφαγίας στις

απώτερες φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων ζύμης, ενώ τα κύτταρα φέρουν επιβαρυνμένο μεταβολικό προφίλ, όπως προκύπτει από την μελέτη του *TOR1*, με σημαντικότερη την αλλοίωση μοριακών συσχετισμών όπως τη σχέση αυτοφαγίας και μονοπατιού Tor.

Η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των μελετώμενων γονιδίων στο μεταλλαγμένο στέλεχος με εκείνα των αγρίου τύπου κυττάρων (Πίνακες 4.3 & 4.4) ανέδειξε πολύ σημαντικά συμπεράσματα, τα οποία περιγράφουν την εγκατάσταση συνθηκών στρες από την αρχή της ζωής των μεταλλαγμένων κυττάρων ζύμης παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, με την εκδήλωση σημαντικών παραμέτρων της απόκρισης του στρες. Η μεταγραφική ενεργοποίηση του υπολειπόμενου μεταβολισμού της τρεχαλόζης, η καταστολή του μονοπατιού Tor και η περαιτέρω άνοδος της μεταγραφής του *ATG8* αποτελούν σαφώς τέτοιες παραμέτρους.

Κατά συνέπεια, συμβαίνει μία αλληλουχία γεγονότων η οποία συν τω χρόνω οδηγεί στον φαινότυπο της κυτταρικής γήρανσης με σταθερά υψηλά επίπεδα έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, αύξηση του αριθμού συσσωματωμάτων στο κυτταρόπλασμα, πιθανή καταστολή του μονοπατιού Tor και των αυτοφαγικών επιπέδων και αλλοίωση της μεταξύ τους σχέσης. Μάλιστα, όλα τα παραπάνω δείχνουν και την αδυναμία της συνθήκης HEO να εγκαταστήσει έναν πιο ήπιο φαινότυπο απουσία του *tps1Δ* και παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, όπως φαίνεται να τον εγκαθιστά στα κύτταρα αγρίου τύπου. Είναι σημαντικό λοιπόν να τονιστεί ότι σε αυτή την συνθήκη, όπου μάλιστα λείπει και ένας από τους κύριους μεταβολικούς παράγοντες της συνθήκης, η HEO αποτυγχάνει να εξισορροπήσει τα τοξικά φαινόμενα και η δράση της στα μεταβολικά μονοπάτια που ρυθμίζει μεταξύ άλλων την αυτοφαγία εκμηδενίζεται, αναδεικνύοντας έτσι ως απαραίτητο στοιχείο την τρεχαλόζη για την εξυπηρέτηση της δράσης της.

Στην συνέχεια έλαβε χώρα η μελέτη του στελέχους *tps2Δ*, από το οποίο απουσιάζει η φωσφατάση της τρεχαλόζης και λόγω αυτού φαίνεται να συσσωρεύει 6-φωσφορική τρεχαλόζη ως εναλλακτικό και ενδιάμεσο προϊόν της βιοσύνθεσης μέσω του συμπλόκου TPS. Η 6-φωσφορική τρεχαλόζη κατά την στατική φάση όπου και συσσωρεύεται μπορεί να αποβεί τοξικός παράγοντας για τα κύτταρα λόγω υψηλής ανόδου της οσμωτικής πίεσης.

Στις μελέτες βιωσιμότητας του συγκεκριμένου μεταλλαγμένου στελέχους παρουσία των διαφόρων μορφών της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης διαπιστώθηκαν σημαντικά επιβαρυνόμενοι φαινότυποι στην βιωσιμότητα από την εκθετική φάση ανάπτυξης στα κύτταρα που εξέφραζαν την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη αγρίου τύπου και A53T (Εικόνα 4.12). Μάλιστα η πτώση της βιωσιμότητας χαρακτηρίζεται πιο μεγάλη από την αντίστοιχη του στελέχους *tps1Δ*, το οποίο είχε αναγνωριστεί ως τοξικό στέλεχος στην έκφραση του *SNCA* και η τρεχαλόζη είναι εντελώς απύσχα. Στις μελέτες χρονολογικής γήρανσης (Εικόνα 4.16) το φαινόμενο επιβάρυνσης των κυττάρων από τις μορφές αγρίου τύπου και A53T εγκαταστάθηκε περαιτέρω, με τα κύτταρα να εισάγονται στην στατική φάση από την 6η ημέρα, όπως συνέβη και στο στέλεχος *tps1Δ*. Παράλληλα, ανάδειχθηκε και η πιο ήπια τοξικότητα της μεταλλαγής A30P. Και στην περίπτωση του εν λόγω στελέχους η συνθήκη HEO δεν έφερε καμία ευεργετική επίδραση υπό την παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (Εικόνα 4.19), λαμβανομένου φυσικά υπόψιν πως η επίδρασή της δεν αποδεικνύεται ιδιαίτερα ευεργετική γενικότερα για τα συγκεκριμένα κύτταρα.

Από τις μελέτες έκφρασης και μικροσκοπίας της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης για το στέλεχος *tps2Δ* διαπιστώθηκε σταθερή έκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης αγρίου τύπου στις

τέσσερις φάσεις ζωής του ζυμομύκητα (Εικόνα 4.22) και καθολική εμφάνιση κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων από την εκθετική φάση ανάπτυξης έως την στατική φάση (Εικόνες 4.26 & 4.27). Τα γεγονότα αυτά συμπλήρωσαν την εικόνα σημαντικής τοξικότητας μέσω της α-συνουκλεΐνης, όπως προέκυπτε από τις μελέτες βιωσιμότητας.

Αντίστοιχα επιβαρυνμένα ήταν τα επίπεδα έκφρασης των μελετώμενων γονιδίων στις μελέτες qPCR (Πίνακες 4.5, 4.6 & 4.7), τα οποία αποκάλυψαν και την μεταβολική επιβάρυνση των κυττάρων. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων του μεταβολισμού της τρεχαλόζης φέροταν σημαντικά κατεσταλμένα από τις πρώτες φάσεις ανάπτυξης, όπως και συνέβη και με την μεταγραφή του *ATG8*, γεγονός τα οποία αναδείχθηκαν ακόμη περισσότερο στην σύγκριση των δεδομένων με εκείνα των αγρίου τύπου κυττάρων.

Ως εκ τούτου, τα κύτταρα *tps2Δ* ανέδειξαν τον πιο επιβαρυνμένο φαινότυπο που αναπαράχθηκε κατά τις μελέτες της παρούσας διατριβής, με μία εικόνα γενικευμένης τοξικότητας για τα κύτταρα από την παρουσία της α-συνουκλεΐνης. Η εικόνα αυτή είναι πιθανό να έχει προκύψει και από την συσσώρευση της 6-φωσφο-τρεχαλόζης, οπότε συνολικά τα κύτταρα να υφίστανται τόσο πρωτεο-τοξικό όσο και υπεροσμωτικό στρες. Συν τοις άλλοις, αναδείχθηκε εκ νέου η αδυναμία της συνθήκης ΗΕΟ να βελτιώσει την βιωσιμότητα των κυττάρων, οπότε γίνεται αντιληπτό πως απαιτείται ως δεδομένη η παρουσία της φωσφατάσης για την ευεργετική δράση της ΗΕΟ.

Η μελέτη των μεταλλαγμένων στελεχών ολοκληρώθηκε με το στέλεχος *ts11Δ*, το οποίο έχει απωλέσει την δυνατότητα παραγωγής του ρυθμιστικού μορίου Tsl1p, πρωτεΐνης υπεύθυνης για την έναρξη της λειτουργίας του συμπλόκου TPS, ειδικότερα της συνθάσης της τρεχαλόζης. Παρ' όλη την σημαντικότητα της λειτουργίας του ο δισακχαρίτης της τρεχαλόζης μπορεί να βιοσυντεθεί και κατά την απουσία του μορίου αυτού, ωστόσο το σύμπλοκο TPS δεν φέρει την ίδια ευαισθησία ρύθμισης με την φυσιολογική του κατάσταση (Kyryakov et al., 2012, Trevisol E. et al., 2014).

Παρότι σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία το στέλεχος *ts11Δ* αποδεικνύεται ασθενικό κατά την έκφραση της α-συνουκλεΐνης (Willingham et al., 2003), τούτο δεν παρατηρήθηκε στις μελέτες της παρούσας διατριβής. Στις μελέτες βιωσιμότητας τα κύτταρα του μεταλλαγμένου στελέχους ομοιάζαν σε μεγάλο βαθμό με εκείνα του αγρίου τύπου κυττάρων με τις πρώτες 24 h να μην εμφανίζουν διαφορές της βιωσιμότητας των κυττάρων (Εικόνα 4.13) ενώ κατά την χρονολογική γήρανση η στατική φάση ξεκινούσε την εμφάνισή της κατά την 8η περίπου ημέρα (Εικόνα 4.17). Η έκφραση της α-συνουκλεΐνης μόνο ήπιο στρες φαίνεται να προκαλεί με τις μεταλλαγμένες μορφές της να είναι εκείνες που το προκαλούν ως επί το πλείστο και κυριότερα στις τελευταίες ημέρες χρονολογικής γήρανσης. Η συνθήκη ΗΕΟ φαίνεται να προσφέρει πολύ ήπια ευεργετική επίδραση στην βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσία της α-συνουκλεΐνης (Εικόνα 4.20) στις ημέρες της μετα-διαυξικής φάσης, ενώ αυτή φαίνεται να είναι ειδική για την τοξική επίδραση της α-συνουκλεΐνης, δεδομένου πως τα κύτταρα του μάρτυρα δεν την εμφάνισαν. Συνολικά, ωστόσο, φαίνεται η συνθήκη ΗΕΟ να απαιτεί την πληρότητα του συμπλόκου TPS για την ευνοϊκή της επίδραση στα κύτταρα, με την υπομονάδα Tsl1p να είναι και εκείνη απαραίτητη.

Στις μελέτες έκφρασης και μικροσκοπίας της α-συνουκλεΐνης διαπιστώθηκε σταθερή έκφραση της πρωτεΐνης μέχρι την μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης ενώ στην συνέχεια

η έκφραση της μειώθηκε δραματικά και ανεξήγητα (Εικόνα 4.23). Η εντόπισή της στα κύτταρα αφορούσε κυρίως το κυτταρόπλασμα ως διάχυτα κατανεμημένη σε αυτό ενώ λίγα κύτταρα έφεραν μεμβρανική εντόπιση, ένας φαινότυπος που παρέμεινε σταθερός σε όλη την διάρκεια ζωής των κυττάρων από την εκθετική φάση ως την γήρανση (Εικόνες 4.28 & 4.29). Ωστόσο, αυτός ο φαινότυπος είναι βέβαιο πως οφείλεται και στην μειωμένη έκφραση του *SNCA* στην στατική φάση.

Οι επιδράσεις της έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στο μελετώμενο μεταβολικό προφίλ (Πίνακες 4.8, 4.9 & 4.10) δεν ανέδειξαν ιδιαίτερες συνέπειες, πέρα από ορισμένες παρατηρήσεις αρχόμενου στρες, όπως η πολύ ήπια πιθανή καταστολή των επιπέδων έκφρασης των βιοσυνθετικών γονιδίων της τρεχαλόζης και η μεταγραφική ενεργοποίηση της αυτοφαγίας στις απώτερες φάσεις ανάπτυξης με πιθανή ερμηνεία την κάθαρση από την συσσώρευση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης από προηγούμενες φάσεις ανάπτυξης.

Μπορεί, ως εκ τούτου, να θεωρηθεί πως τα κύτταρα αυτά αποδεικνύονται ευεργετημένα από την συνθήκη HEO όπως και τα BY4741, με την έννοια της απεικόνισης ενός φυσιολογικού φαινοτύπου χωρίς να επισυμβαίνουν δραματικές μεταβολικές διαφοροποιήσεις και με δεδομένη την χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης στην στατική φάση ανάπτυξης. Μάλιστα, με βάση όλα τα παραπάνω, ίσως και τα εν λόγω κύτταρα, παρά την απουσία του *TS1I* να παρουσίασαν καλύτερη ισορροπία στο βιολογικό τους προφίλ σε σχέση με τα αγρίου τύπου, δεδομένων των μεταβολών της γονιδιακής έκφρασης που τα τελευταία παρουσίασαν.

## **5.5 Εφαρμογή του θεραπευτικού μοντέλου της τρεχαλόζης**

Από τη μελέτη της βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης σε συνδυασμό με την έκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης προέκυψαν ποικίλα συμπεράσματα, όπως συζητήθηκε και ανωτέρω. Σε καμία μελέτη ωστόσο, όπως αυτές έλαβαν χώρα, δεν παρατηρήθηκε διάσωση των κυττάρων από τις τοξικές συνέπειες της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί στα ενδογενή επίπεδα τρεχαλόζης. Άλλωστε, φαίνεται πως ο τοξικός παράγοντας της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης διαταράσσει όλη την φυσιολογία του *Saccharomyces cerevisiae* με τρόπο τέτοιο ώστε να καθίσταται αδύνατη η επωφελής δράση της τρεχαλόζης στα συνεχώς ή μόνιμα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Παράλληλα βέβαια, η απουσία των προϊόντων των βιοσυνθετικών γονιδίων που απαρτίζουν το σύμπλοκο TPS ανέδειξε πολύ τοξικότερους φαινοτύπους σε συνδυασμό με την έκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε σχέση με την παρουσία τους, αναδεικνύοντας την σημαντικότητα του διασακχαρίτη για τα κύτταρα ζύμης υπό αυτές τις συνθήκες στρες.

Συνεπώς, επιλέχθηκε να εγκατασταθεί ένα θεραπευτικό μοντέλο με την χρήση της τρεχαλόζης εξωγενώς για όλα τα μελετώμενα στελέχη και να διερευνηθεί η ωφέλιμη ή όχι δράση της στα εκάστοτε επίπεδα παθογένειας της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης μεταξύ των στελεχών όπως παρατηρήθηκαν. Ως χρονική στιγμή της παρέμβασης επιλέχθηκε η μετα-διαυξική φάση με σκοπό να μελετηθεί, αν θα επιφέρει βελτίωση των φαινομένων τοξικότητας της στατικής φάσης. Η εξωγενής χορήγηση τρεχαλόζης έχει χρησιμοποιηθεί στον ζυμομύκητα θεραπευτικά με επιτυχία σε πρωτεοπάθειες κατά την μοντελοποίηση της νόσου Huntington (Chaudhary et al., 2014, Saleh et al., 2014). Παρότι στον ζυμομύκητα έχουν υπάρξει λίγες εργασίες χρήσης της, αυτό δεν ισχύει για μοντέλα νευροεκφυλισμού κυττάρων θηλαστικών ή ανθρώπινων νευρικών

κυττάρων με πληθώρα αναφορών της ευεργετικής της δράσης (Zhang et al., 2014, Aguib et al., 2014, Sarkar et al., 2007, Renna et al., 2010, Yu et al., 2012).

Με την εφαρμογή της θεραπευτικής αυτής παρέμβασης επετεύχθη πράγματι μεταβολή των τοξικών φαινομένων που αποτυπώνονταν στις μελέτες βιωσιμότητας και τις μελέτες μικροσκοπίας. Τα στελέχη BY4741, *tps1Δ* και *ts11Δ* εμφάνισαν όλα βελτίωση της βιωσιμότητας τους στην χρονολογική γήρανση με διατήρηση του υγιούς φαινοτύπου μέχρι και τις απότερες ημέρες γήρανσης (Εικόνες 4.30, 4.31 & 4.33). Αντίθετα, τα κύτταρα *tps2Δ* μπορεί να εμφάνισαν βελτίωση της βιωσιμότητας τους, αλλά το θεραπευτικό αποτέλεσμα απέτυχε να διατηρηθεί σταθερό στις επόμενες ημέρες γήρανσης (Εικόνα 4.32), γεγονός που αναδεικνύει και σε αυτή την περίπτωση την επιβάρυνση που διέρχεται το συγκεκριμένο μεταλλαγμένο στέλεχος από την έκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Επιπροσθέτως, η εντόπιση και η κατανομή της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης μεταβλήθηκε σημαντικά σε σχέση με προηγούμενους. Για το στέλεχος BY4741 η πρωτεΐνη μετέβη σε κυτταροπλασματική διάχυτη κατανομή αναδεικνύοντας πως ακόμη και τα λίγα συσσωματώματα που σχηματίζονταν εξαφανίστηκαν με την χορήγηση τρεχαλόζης (Εικόνα 4.36). Αντίστοιχα, για το στέλεχος *tps1Δ* η πρωτεΐνη έλαβε κυτταροπλασματική διάχυτη κατανομή και ενίοτε μεμβράνικη εντόπιση σε αντίθεση με τον πρότερο φαινότυπο έντονης συσσωμάτωσης της πρωτεΐνης (Εικόνα 4.39). Τα έγκλειστα  $\alpha$ -συνουκλεΐνης δεν εξαφανίστηκαν με την ίδια επιτυχία στα κύτταρα *tps2Δ* αποδίδοντας έναν μικτό φαινότυπο στην εντόπιση της πρωτεΐνης και συμφωνώντας με τις μελέτες βιωσιμότητας για την παραμονή της τοξικότητας (Εικόνα 4.42). Στο στέλεχος *ts11Δ* υπήρχε παρόμοια κατανομή της πρωτεΐνης με προηγούμενους, μιας και δεν είχε παρουσιάσει σε οποιαδήποτε μελέτη του φαινόμενα τοξικότητας (Εικόνα 4.45).

Στις μελέτες της γονιδιακής έκφρασης επιλέχθηκαν να μελετηθούν τα κύτταρα αγρίου τύπου και *tps1Δ* στην στατική φάση μετά την παρέμβαση, ως εκείνα που απέδωσαν τους πιο διακριτούς φαινότυπους σε ό,τι αφορά τα μεταβολικά γεγονότα που διέρχονται τα κύτταρα. Μελετήθηκαν κυρίως τα προηγούμενους κατεσταλμένα επίπεδα έκφρασης του *ATG8*, ώστε να διερευνηθεί αν η κάθαρση των εγκλειστων πραγματοποιείται από την αυτοφαγία, αλλά και τα επίπεδα έκφρασης του *TPS1*, ώστε να μελετηθεί η απόκριση της ενδογενούς τρεχαλόζης στην χορήγηση της εξωγενούς. Παράλληλα μελετήθηκε έτσι και η σημαντικότητα της συνθάσης της τρεχαλόζης ως μόριο στην επαγωγή της αυτοφαγίας μέσω της τρεχαλόζης, λαμβάνοντας υπόψιν και την αλληλεπίδρασή της με την κινάση Rim15.

Με την προσθήκη τρεχαλόζης οι κατασταλτικές επιδράσεις της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στην έκφραση της συνθάσης της τρεχαλόζης και του *ATG8* αντιστράφηκαν και τα δύο γονίδια αύξησαν τα επίπεδα έκφρασής τους στα κύτταρα αγρίου τύπου, υποδεικνύοντας απλώς την απόκριση στο στρες από την παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και όχι την τοξική κατάληξη από αυτή (Πίνακες 4.11 & 4.12). Παράλληλα, επιβεβαιώθηκε η μεταγραφική ενεργοποίηση της αυτοφαγίας παρουσία της εξωγενούς τρεχαλόζης προτείνοντας την κάθαρση των μεγάλων επιπέδων της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης από τον εν λόγω αμυντικό μηχανισμό των κυττάρων. Στα κύτταρα *tps1Δ*, η μεταγραφική ενεργοποίηση της αυτοφαγίας από την τρεχαλόζη φάνηκε να μην είναι ιδιαίτερα αποδοτική, μιας και η άνοδος των επιπέδων έκφρασης του *ATG8* ήταν σε χαμηλά πλαίσια, με παραμονή των κατασταλτικών επιδράσεων της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (Πίνακες 4.13, 4.14, 4.15 & 4.16). Αυτό αναδεικνύει τελικά την αναγκαιότητα της συνθάσης της τρεχαλόζης για την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, μέσω της Rim15 κατά τις συνθήκες πρωτεο-τοξικότητας. Κρίνεται λοιπόν πως τα



έγκλειστα, τα οποία εξαφανίστηκαν μετά την προσθήκη τρεχαλόζης, δεν αποσυσσωρεύθηκαν ως επί το πλείστον με την χρήση της αυτοφαγίας, αλλά πιθανόν αποκλειστικά από την άμεση δράση της τρεχαλόζης ως μόριο με ιδιότητες κάθαρσης των συσσωματωμάτων λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών.

## 5.6 Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της $\alpha$ -συνουκλεΐνης

Οι μελέτες της παρούσας διατριβής ολοκληρώθηκαν με την διερεύνηση των φυσικών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης με τις πρωτεΐνες του *Saccharomyces cerevisiae*. Έως σήμερα δεν έχουν υπάρξει πολλές αναφορές της διεθνούς βιβλιογραφίας σε σχέση με τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης για τα κύτταρα ζύμης και ίσως είναι σε κάποιο βαθμό αναμενόμενο λόγω και της ετερόλογης έκφρασης που λαμβάνει χώρα στα μοντέλα της νόσου Parkinson στον ζυμομύκητα. Όσες αλληλεπιδράσεις έχουν τεκμηριωθεί πραγματοποιήθηκαν με άμεση συσχέτιση των παραγόντων αυτών με την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη, χωρίς η τελευταία να έχει υποβληθεί ως πρωτεΐνη-“δόλωμα” σε ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Οι γνωστές αλληλεπιδράσεις της στα κύτταρα ζύμης αφορούν την πρωτεΐνη-κινάση Cdc5 (Wang et al., 2012) και την λιγάση της ουβικουιτίνης Rsp5 και διάφορες μορφές αυτής (Wijayanti et al., 2015). Εν τούτοις, σαφώς λόγω της υψηλής ομοιότητας των κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* και των κυττάρων θηλαστικών, πολλές αναγωγές των γνωστών αλληλεπιδράσεων της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς μπορούν να πραγματοποιηθούν για τον ζυμομύκητα. Ωστόσο, τίποτα δεν μπορεί να φαίνεται βέβαιο χωρίς πρώτα να έχει αποδειχθεί.

Για την μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη υπερεκφράστηκε από κατάλληλο σύστημα και η καθαρισμένη της σημασμένη μορφή τέθηκε σε αλληλεπίδραση με τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων BΥ4741 και *tps1Δ* για να αναδειχθούν διαφορές στην ταυτοποίηση των αλληλεπιδράσεων που μπορεί να οφείλονται στην έλλειψη τρεχαλόζης. Επίσης, οι ολικές πρωτεΐνες προέρχονταν από την στατική φάση, ώστε να αναπαραχθεί ο φαινότυπος συσσωμάτωσης της πρωτεΐνης, ειδικά για τα κύτταρα *tps1Δ* με τον χαρακτηριστικά τοξικό φαινότυπο. Με τις μεθόδους της συγκατακρήμνισης πρωτεϊνών και του Far Western Blot εντοπίστηκαν ζώνες αγνώστων αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών με μοριακό βάρος περίπου 40 kD (Εικόνες 4.49 & 4.50).

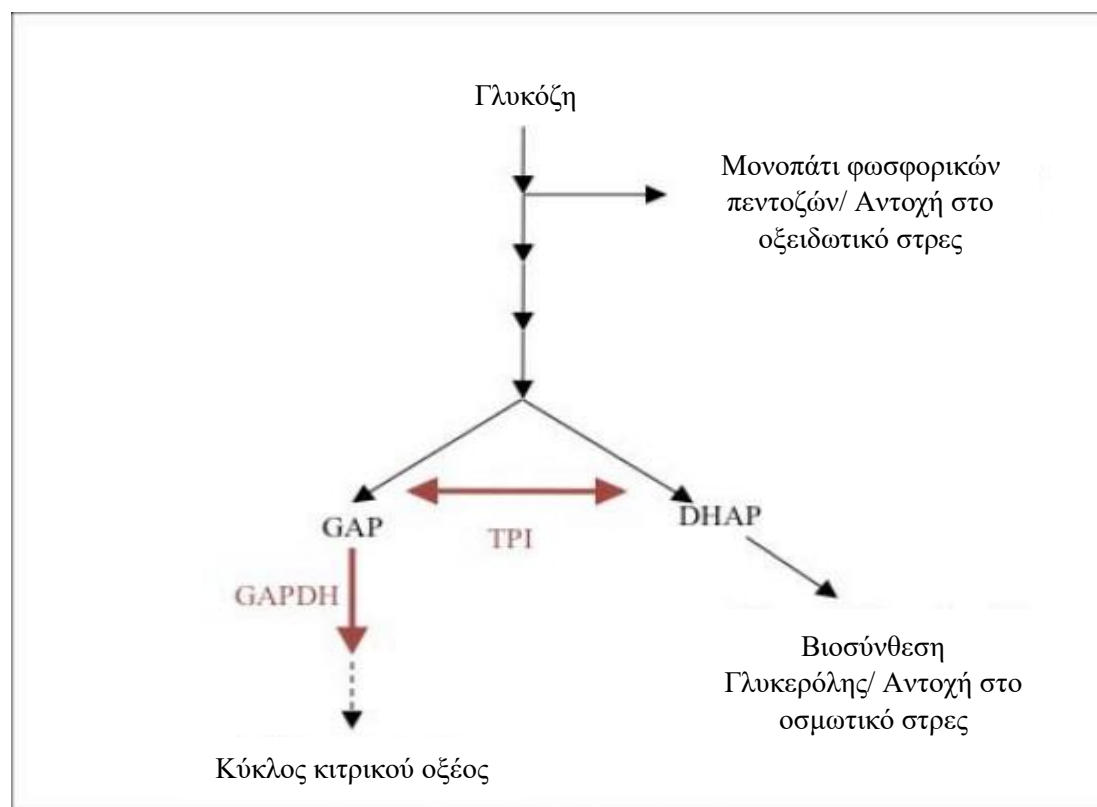
Η φασματοσκοπία μάζας που έλαβε χώρα για την ταυτοποίηση των προϊόντων συγκατακρήμνισης (Πίνακες 4.17, 4.18 & 4.19) ανέδειξε ως πρώτη υποψήφια πρωτεΐνη την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH) και στις τρεις διαφορετικές μορφές της (1, 2 και 3) με πολύ αξιόπιστες παραμέτρους ταυτοποίησης. Αυτή η αλληλεπίδραση αφορούσε και τους δύο τύπους κυττάρων που μελετήθηκαν και ήταν η κυρίαρχη αλληλεπίδραση που εντοπίστηκε για τα κύτταρα *tps1Δ* έναντι άλλων πρωτεϊνών που η αλληλούχισή τους ήταν πολύ λιγότερο ακριβής. Για τα κύτταρα BΥ4741 εντοπίστηκαν επίσης με καλά ποσοστά αλληλούχισης οι πρωτεΐνες αλδολάση της δι-φωσφορικής φρουκτόζης και ZPS1 (Zinc-and pH-regulated surface protein).

### **5.6.1 Η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης στον *Saccharomyces cerevisiae* και η συσχέτισή της με την $\alpha$ -συνουκλεΐνη**

Το γονιδίωμα του ζυμομύκητα περιέχει τρία διαφορετικά γονίδια για την κωδικοποίηση ενός ισοενζύμου της GAPDH το καθένα. Τα γονίδια αυτά ονομάζονται *TDH1*, *TDH2* και *TDH3* και κωδικοποιούν τα ισοένζυμα GAPDH 1, GAPDH 2 και GAPDH 3 αντίστοιχα. Όλες οι μορφές του ενζύμου καταλύουν την οξείδωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης σε 1,3 διφωσφο-γλυκερίνη κατά την διαδικασία της γλυκόλυσης σε σύζευξη με την αναγωγή του NAD<sup>+</sup> σε NADH. Σε πρόσφατες μελέτες προτείνεται πως οι μορφές GAPDH 2 και GAPDH 3 φέρουν επικαλυπτόμενες λειτουργίες, ομοιάζοντας κατά 98% στην αμινοξική τους αλληλουχία και 96% στην πρωτεϊνική τους ταυτότητα. Αντιθέτως, η GAPDH 1 αποκλίνει με μόλις 94% αλληλουχιακή ομοιότητα και 88% αλληλουχιακή ταυτότητα σε σχέση με την GAPDH 3. Η μεταγραφή των τριών γονιδίων δεν ρυθμίζεται συντονισμένα και τα κύτταρα του ζυμομύκητα δεν εκφράζουν τα ίδια επίπεδα των τριών μορφών καθ' όλη την διάρκεια της ανάπτυξής τους. Παρότι τα *TDH2* και *TDH3* εκφράζονται ενιαία κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, το *TDH1* μεταγράφεται κυρίως κατά την στατική φάση ή κατά την υποβολή των κυττάρων σε θερμικό στρες. Μελέτες αποδεικνύουν πως η πρωτεΐνη Tdh3 φέρει δραστικότητα GAPDH στον ζυμομύκητα με συνεισφορά 50-60%, η οποία ακολουθείται από την Tdh2 με 25-30% και την Tdh1 με 10-15%. Αυτές οι αναλογίες παραμένουν οι ίδιες είτε τα κύτταρα αναπτύσσονται σε γλυκόζη είτε σε αιθανόλη (McAlister and Holland, 1985a). *In vivo*, οι Tdh3 και Tdh2 λειτουργούν ως καταλυτικά ενεργά ομοτετραμερή. Παρά την αλληλουχιακή και λειτουργική ομοιότητα, τα τρία ισοένζυμα διαφέρουν στην ρύθμιση της καταλυτικής δραστηριότητας και ίσως παίζουν διακριτούς ρόλους και εκτός του μονοπατιού της γλυκόλυσης. (Ringel et al., 2013 and references therein)

Η GAPDH θεωρείται ως ένα πολύ δυναμικό στοιχείο του γλυκολυτικού μονοπατιού, το οποίο ελέγχει την κατανομή του άνθρακα στο κύτταρο. Στην γλυκόλυση, η Tdh3 καταλύει την 1,6 φωσφορική φρουκτόζη σε δύο μόρια αποτελούμενα από τρεις άθρακες τα οποία μπορούν να τροποποιηθούν εκ των έσω από την ισομεράση της φωσφορικής τριόζης (TPI). Η κατάλυση από την GAPDH καθοδηγεί την ροή του άνθρακα προς την γλυκόλυση και η καταστολή της GAPDH μπορεί να τροποποιήσει την ροή άνθρακα. Τα παρακάτω παραδείγματα αναδεικνύουν πως η GAPDH στοχεύει και κατανέμει τον άνθρακα για συγκεκριμένες λειτουργίες. Αρχικά, τα κύτταρα εναλλακτικά της ζύμωσης μπορούν να εκτρέψουν την 1,6 φωσφορική φρουκτόζη προς το μονοπάτι παραγωγής γλυκερόλης (όπως και στην συνθήκη ΗΕΟ) και η ρύθμιση μέσω της GAPDH 3 ίσως εξυπηρετεί την απόκριση των κυττάρων στο στρες της αυξημένης οσμωτικότητας. Το οξειδωτικό στρες επάγει μία ποικιλία μεταβολών στο μεταβολικό προφίλ, οι οποίες είναι πιθανό να επηρεάζουν και την δραστηριότητα της Tdh3. Για παράδειγμα, η δραστηριότητα της TPI, η οποία καταλύει την έσω-μετατροπή της 3-φωσφο-γλυκεραλδεΐδης και της φωσφορικής διυδροξυ-ακετόνης (DHAP), μειώνεται σε γεγονότα οξειδωτικού στρες προκαλώντας την συσσώρευση της DHAP. Η καταστολή είτε της TPI είτε της GAPDH σε απόκριση στο οξειδωτικό στρες ελαχιστοποιεί την ροή άνθρακα μέσω της γλυκόλυσης και τα κύτταρα ενεργοποιούν ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών (PPP), ώστε να βιοσυνθέσουν αναγωγικούς παράγοντες (NADPH) για να ανταπεξέλθουν στην οξειδωτική βλάβη. *In silico* αναλύσεις προτείνουν πως η GAPDH ίσως λειτουργεί ως ένας κυτταρικός διακόπτης της ανταπόκρισης στο οξειδωτικό στρες, ειδικότερα αφού καταλύει ένα κεντρικό και

ουσιαστικό βήμα της γλυκόλυσης. (Ringel et al., 2013 and references therein)  
Ενδεικτικά τα παραπάνω στοιχεία φαίνονται στην εικόνα 5.1.



**Εικόνα 5.1:** Εκτροπές του μονοπατιού της γλυκόλυσης σε περιβαλλοντικό στρες στον *S. cerevisiae*. Όταν είτε η TPI είτε η GAPDH (με κόκκινο) καταστέλλονται, τα κύτταρα ζύμης συσσωρεύουν προϊόντα του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών, το οποίο αυξάνει την αντοχή στο στρες. GAP=3-φωσφορική γλυκεραλδεΰδη, DHAP= φωσφορική δι-υδροξυ-ακετόνη. (Ringel et al., 2013)

Η GAPDH έχει επίσης συσχετιστεί με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου με την υπερέκφραση της Tdh3 να συνδέεται με τα σημεία ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης. Μέσω της δράσης της ως μεταβολικός αισθητήρας, η Tdh3 πιθανόν παίζει κάποιο ρόλο στην είσοδο των κυττάρων ζυμομύκητα στην στατική φάση και/ή διατηρεί τα κύτταρα σε μία μη μιτωτική κατάσταση σε απόκριση στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Στις ζύμες σε περιόδους οξειδωτικού στρες πραγματοποιείται θείωση σε κατάλοιπα κυστεΐνης του ενεργού κέντρου της Tdh3 και αυτό οδηγεί σε αδρανοποίηση του ενζύμου. Παρότι τόσο η Tdh2 όσο και η Tdh3 μπορούν να υφίστανται θείωση *in vitro*, οι μελέτες *in vivo* αποδεικνύουν πως μόνο η Tdh3 μπορεί να τροποποιηθεί. Παρά το ότι άλλοι τύποι πρωτεϊνικών τροποποιήσεων απαιτούν ένζυμα, για την διαδικασία θείωσης δεν υπάρχουν αναφορές για την απαίτησή τους. Η άπο-θείωση ωστόσο διαμεσολαβείται από ένζυμα και ρυθμίζεται από μία ειδική μονοθειο-γλουταρεδοξίνη. Οπότε τα κύτταρα επενδύουν ενέργεια για την αδρανοποίηση της Tdh3 και την ενεργοποιούν εκ νέου σε κατάλληλη χρονική στιγμή αφού έχει ξεπεραστεί το οξειδωτικό στρες. Με την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες η τοξικότητα του υπεροξειδίου του υδρογόνου προκαλεί καρβονυλίωση (και συνεπώς καταστολή) ορισμένων γλυκολυτικών ενζύμων μεταξύ των οποίων και οι Tdh2 και Tdh3. Συνολικά μέσω της καταστολής της δραστηριότητας της Tdh3 ως GAPDH μέσω της καρβονυλίωσης και της θείωσης, τα γεγονότα αυτά μπορούν να απελευθερώσουν την Tdh3 προς την εξυπηρέτηση άλλων κυτταρικών ρόλων με

σκοπό την διατήρηση της εσωκυττάριας ομοιόστασης. Ένας τέτοιος ρόλος αποτελεί και η μεταγραφική αποσιώπηση. (Ringel et al., 2013)

Η GAPDH έχει μελετηθεί εκτενώς στα μετάζωα, όπου νέες μη γλυκολυτικές λειτουργίες συνεχώς τεκμηριώνονται. Για παράδειγμα, η έκθεση σε οξειδωτικούς παράγοντες προκαλεί τροποποιήσεις του ενεργού κέντρου της GAPDH, το οποίο χαρακτηρίζει ίσως την απώλεια της καταλυτικής της δραστηριότητας στα προ-αποπτωτικά κύτταρα, ενώ παράλληλα εγκαθίσταται η πυρηνική της συσσωμάτωση. Ακόμη, η πυρηνική αυτή μετατόπιση έχει παρατηρηθεί σε αποπτωτικά κύτταρα με την GAPDH να φέρεται ως μοριακός συνοδός προ-αποπτωτικών μορίων στον πυρήνα. Η ανθρώπινη GAPDH στον πυρήνα έχει αποδειχθεί να φέρει λειτουργίες που σχετίζονται με βλάβες στο DNA. Η GAPDH των θηλαστικών περιέχει μία μοναδική αλληλουχία πυρηνικής μετατόπισης, απύσα στους ζυμομύκητες, η οποία εξυπηρετεί την πυρηνική μετατόπιση σε απόκριση στο γενετοξικό στρες. Στα κύτταρα των θηλαστικών η GAPDH μεταβάλλει την εντόπιση της από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και αντίστροφα, αναδεικνύοντας τις μη γλυκολυτικές λειτουργίες της και συνδέοντας τον κυτταρικό μεταβολισμό και το ενδοκυτταρικό περιβάλλον με τις μεταγραφικές μεταβολές. (Ringel et al., 2013)

Στον πυρήνα, οι GAPDH των θηλαστικών εμπλέκονται σε ποικιλία λειτουργιών οι οποίες συμπεριλαμβάνουν μεταγραφική ρύθμιση και τροποποίηση στην δομή της χρωματίνης. Επίσης τα εν λόγω ένζυμα έχουν ταυτοποιηθεί ως πρωτεΐνες προσδεδεμένες των τελομερών, οι οποίες λειτουργούν για την διατήρηση του μήκους των τελομερών, το οποίο μειώνεται δραματικά σε απουσία της GAPDH. (Ringel et al., 2013)

Στο παραπάνω πλαίσιο της ρύθμισης της GAPDH επί της χρωματίνης υπάρχει σημαντική συσχέτιση του ενζύμου με την ρύθμιση της κυτταρικής γήρανσης στο ζυμομύκητα. Αυτό, αρχικά επιτυγχάνεται με την τεκμηριωμένη φυσική αλληλεπίδραση της GAPDH (ειδικότερα της Tdh3) με την σιρτουΐνη 2. Η σιρτουΐνη 2 (Sir2) αποτελεί το κύριο μέλος της μεγάλης οικογένειας των NAD<sup>+</sup>-εξαρτώμενων απακετυλασών, διατηρήμενη ανάμεσα στα τρία βασίλεια της ζωής. Η πρωτεΐνη αυτή απακετυλώνει τις ιστόνες ως μέρος του μηχανισμού αποσιώπησης, ο οποίος καταστέλλει την μεταγραφή των γονιδίων εγγύς των τελομερών. Στις περιοχές αυτές, η Sir2 δρα σε σύνδεση με τις Sir3 και Sir4. Επίσης, σημαντικός είναι ο ρόλος της στην μείωση των φαινομένων μη ομόλογου συνδυασμού στις επαναλήψεις του rDNA (μειώνοντας την δημιουργία κυκλικών μορίων rDNA-τοξικών στοιχείων για τα γηρασμένα κύτταρα).

Ως εκ τούτου, έχει βρεθεί πως κύτταρα με έλλειψη της Tdh3 φέρουν ελαττώματα στην διεύθυνση των τελομερών και της αποσιώπησης των rDNA. Η πρόσδεση, κατ' επέκταση της Tdh3 στα τελομερή και τις αλληλουχίες των rDNA πραγματοποιείται κατά τρόπο εξαρτώμενο από την Sir2. Παράλληλα, σε κύτταρα με έλλειψη της Tdh3 η σύνδεση της Sir2 στα τελομερή μειώνεται. Συνοψίζοντας αυτές τις παρατηρήσεις προτείνεται πως η Tdh3 δρα απευθείας στις περιοχές δράσης της Sir2, ώστε να επηρεάζουν από κοινού την αποσιώπηση. Επιπλέον, φαίνεται πως η Tdh3 επάγει την αποσιώπηση στα κύτταρα ζύμης ανεξάρτητα του ρόλου της στην γλυκόλυση, λόγω της μετατόπισής της στον πυρήνα και λόγω του ότι η αποσιώπηση δεν φαίνεται να οφείλεται σε καταλυτική δραστηριότητα της ίδιας αλλά στην επίδραση της στην καταλυτική ικανότητα της Sir2. (Ringel et al., 2013)

Με βάση τις πληροφορίες που υπάρχουν από τα κύτταρα θηλαστικών η GAPDH φαίνεται να αλληλεπιδρά επίσης με την AMP-ενεργοποιούμενη πρωτεϊνική κινάση (AMPK) και μαζί να ενεργοποιούν την σιρτουΐνη 1 των θηλαστικών, ομόλογη της σιρτουΐνης 2 του ζυμομύκητα. Η σιρτουΐνη 1, όπως και η 2, εκτός του τεκμηριωμένου ρόλου τους για την αποσιώπηση και την καταστολή του μη ομόλογου ανασυνδυασμού των rDNAs, συμμετέχει και στην ρύθμιση της αυτοφαγίας υπό συνθήκες έλλειψης γλυκόζης. Φαίνεται μάλιστα πως ο συνδετικός κρίκος στην ρύθμιση της αυτοφαγίας από την AMPK είναι η αλληλεπίδρασή της με την GAPDH και την σιρτουΐνη 1.

Στον *Saccharomyces cerevisiae* η φυσική αλληλεπίδραση της ομόλογης της AMPK των θηλαστικών, κινάσης Snf1 με τα τρία ισοένζυμα της GAPDH έχει επίσης τεκμηριωθεί (Nicastro et al., 2015), χωρίς όμως να υπάρχουν πολλά στοιχεία για τις λειτουργίες αυτής της αλληλεπίδρασης. Οι δράσεις της Snf1 υφίστανται κυρίως σε συνθήκες έλλειψης γλυκόζης και έχουν αναλυθεί στο κεφάλαιο της εισαγωγής. Υπενθυμίζεται και εδώ πως η Snf1 ενεργοποιείται στην γενικευμένη απόκριση στο στρες και την κυτταρική γήρανση των κυττάρων ζυμομύκητα και φέρεται να παίζει και εκείνη σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της αυτοφαγίας και της βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης, πέρα από τις υπόλοιπες λειτουργίες της όπως η αναδιάταξη της χρωματίνης.

Περνώντας πλέον στην άμεση συσχέτιση της GAPDH και της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, τα μόνα στοιχεία της διεθνούς βιβλιογραφίας προέρχονται από μοντέλα σε κύτταρα θηλαστικών, τα οποία και επιβεβαιώνουν την φυσική αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών (Tsuchiya et al., 2005, Barinova et al., 2018, Avila et al., 2014). Η πρώτη αναφορά συσχέτισης πραγματοποιήθηκε από τους Tsuchiya και συνεργάτες και αφορά τον ρόλο της GAPDH ως προ-αποπτωτική πρωτεΐνη στην συσσωμάτωση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης και την επαγωγή στον σχηματισμό των Lewy Bodies. Μάλιστα αναφέρεται πως η GAPDH φέρεται θειώμενη και ουβικουιτινωμένη λόγω οξειδωτικού στρες και η υπερέκφραση της αποτελεί ένα αποπτωτικό σήμα κυτταρικού θανάτου. Στην αντίθετη πλευρά οι Barinova και συνεργάτες απέδειξαν την θεραπευτική δράση της GAPDH κατά την συσσωρεύσή της και την αλληλεπίδρασή της με γλυκοζαμινογλυκάνες και την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη. Κατά την εργασία αυτή, η αλληλεπίδραση της GAPDH με τις γλυκοζαμινογλυκάνες οδηγεί στον σχηματισμό πρωτο-ινιδίων της GAPDH με προστατευτικό ρόλο στην τοξικότητα από την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη. Τα πρωτοϊνίδια αυτά προκύπτουν από τον καταμερισμό του ενζύμου από την μορφή του τετραμερούς στην μορφή διμερών μορίων. Περαιτέρω διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των δύο μορίων προέκυψε από την εργασία των Barinova και συνεργάτες το 2018. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη *in vitro* προσδένεται στην θετικά φορτισμένη περιοχή της GAPDH που φέρει το NAD<sup>+</sup>. Επίσης, φάνηκε πως η πρόσδεση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε οξειδωμένα κατάλοιπα κυστεΐνης του ενεργού κέντρου της GAPDH κατέληξε στην επακόλουθη αδρανοποίηση του ενζύμου, μείωσε την θερμοανθεκτικότητά του και αύξησε την τάση για συσσωμάτωση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Ταυτόχρονα, το σύμπλοκο αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών προστάτευσε την αμυλοειδή μετατροπή της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης.

Με νεότερη εργασία τους οι Barinova και συνεργάτες το 2019 μελέτησαν περαιτέρω την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών δίνοντας έμφαση στην κύρια λειτουργία της GAPDH να καταλύει την οξείδωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης σε 1,3 διφωφο-γλυκερίνη. Λόγω της αλληλεπίδρασης της με την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη η GAPDH

φέρεται αδρανοποιημένη, οπότε το υπόστρωμα της, η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, συσσωρεύεται και φέρει την δυνατότητα να γλυκοζυλιώνει την α-συνουκλεΐνη, γεγονός το οποίο αποτελεί το αίτιο της μη αμυλοειδούς μετατροπής της α-συνουκλεΐνης. Κατά συνέπεια, η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη αναδεικνύεται ως ένα επιπλέον άμεσος αμυντικός μηχανισμός έναντι της συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης. Μάλιστα, τα γεγονότα αυτά φαίνεται να φέρουν ένα ανατροφοδοτικό μηχανισμό κατά τον οποίο η γλυκοζυλίωση της α-συνουκλεΐνης οδήγησε σε ενίσχυση της πρόσδεσης της GAPDH σε αυτή και σε περαιτέρω αδρανοποίηση του ενζύμου σύμφωνα με εργασία των Semenyuk και συνεργατών το 2019.

Συνοψίζοντας, στο αντικείμενο της συζήτησης για την παρούσα διατριβή, η πρόβλεψη που μπορεί να πραγματοποιηθεί για τις συνέπειες της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών μπορεί να στηριχθεί στον φαινότυπο των κυττάρων του ζυμομύκητα. Τα κύτταρα BY4741 και *tps1Δ* της στατικής φάσης έφεραν τοξικούς φαινοτύπους, ειδικότερα τα δεύτερα, και παρουσίασαν μία κατάσταση αρχόμενης ή εγκατεστημένης συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης. Ειδικότερα, είναι γνωστό πως κατά την τοξικότητα της α-συνουκλεΐνης αυτό που συμβαίνει στο εσωτερικό των κυττάρων είναι επίσης αποτέλεσμα οξειδωτικού στρες, οπότε είναι πιθανό η α-συνουκλεΐνη να συμμετέχει στην αδρανοποίηση της GAPDH μαζί και με άλλους τοξικούς παράγοντες κατά την έκφρασή της. Η αλληλεπίδραση της α-συνουκλεΐνης με την GAPDH, με βάση και τα όσα αναφέρθηκαν, φαίνεται να παραμένει ασαφής ως προς την πρόκληση τοξικότητας στα κύτταρα ζύμης κρίνοντας από την σχέση της με την Snf1 κινάση, την τρεχαλόζη και την αυτοφαγία ή την ευεργετική της δράση στην αντιρρόπηση της τοξικότητας κρίνοντας από τα δεδομένα των *in vitro* μελετών και των μελετών σε κύτταρα θηλαστικών. Παράλληλα, να αναφερθεί πως η α-συνουκλεΐνη στις ζύμες, όπως και στους νευρώνες μοιράζεται κοινές περιοχές κατανομής με την GAPDH, μιας και οι δύο εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα και την λιπιδική διπλοστιβάδα.

### **5.6.2 Η αλδολάση της διφωσφορικής φρουκτόζης στον *Saccharomyces cerevisiae* και η αλληλεπίδρασή της με την α-συνουκλεΐνη**

Η αλδολάση της διφωσφορικής φρουκτόζης αποτελεί μία πρωτεΐνη του ζυμομύκητα που κωδικοποιείται από το γονίδιο *FBA1*. Η πρωτεΐνη φέρει 359 αμινοξέα και μοριακό βάρος 39 kD. Εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στα μιτοχόνδρια σε παρουσία οξειδωτικού στρες. Ως ένζυμο συμμετέχει στην διαδικασία της γλυκόλυσης και της γλυκονογένεσης μετατρέποντας την 1,6 διφωσφορική φρουκτόζη σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και φωσφορική δι-υδροξυακετόνη, ενώ συμμετέχει και στον μεταβολισμό των αντιδραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) στα μιτοχόνδρια κατά την πρόκληση οξειδωτικού στρες. Αποτελεί ζωτικής σημασίας μόριο, μιας και σε απουσία του τα κύτταρα αναπτύσσονται πολύ καθυστερημένα στα συμβατικά θρεπτικά μέσα ενώ αναφέρεται πως φέρουν αδυναμία στην εκβλάστηση. (Schwelberger et al., 1989, Rinnerthaler et al., 2006, Lobo et al., 1984)

Κάθε μόριο αλδολάσης αποτελείται από δύο ταυτόσημες υπομονάδες των 39 kD, από τις οποίες η καθεμία φέρει ισχυρά προσδεδεμένο ένα άτομο ψευδαργύρου, το οποίο αποτελεί σημαντικό στοιχείο του ενεργού κέντρου. (Compango et al., 1991)

Η έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για την παραγωγή των γλυκονογενετικών ενζύμων αποτελεί αντικείμενο της καταστολής από την παρουσία γλυκόζης. Επιπλέον της μεταγραφικής ρύθμισης (μέσω καταβολικής καταστολής), τα επίπεδα της αλδολάσης στα κύτταρα ρυθμίζονται από την αποικοδόμηση των εν λόγω πρωτεϊνών όταν σε

λιμοκτονημένα για γλυκόζη κύτταρα προστεθεί στο μέσο νέα πηγή γλυκόζης. Κατά συνέπεια, φαίνεται να υπάρχουν δύο μονοπάτια αποικοδόμησης της αλδολάσης: το μονοπάτι του πρωτεασώματος, το οποίο δρα ως επακόλουθο της βραχυπρόθεσμης λιμοκτονίας για γλυκόζη και το μονοπάτι της αυτοφαγίας (των κενοδοπιών), το οποίο λειτουργεί ως μακροπρόθεσμο επακόλουθο της λιμοκτονίας για γλυκόζη. Η μεταγραφική ρύθμιση του *FBP1* πραγματοποιείται κυρίως από το μονοπάτι της Snf1 και του παράγοντα καταστολής Mig1p, χωρίς ωστόσο να έχουν διασαφηνιστεί οι ρόλοι τους πλήρως. (Klein et al., 1998, Mercado et al., 1994, Hung et al., 2004)

Εκτός του ρόλου της στο μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης και της γλυκονεογένεσης δεν έχουν αποδειχθεί άλλοι ρόλοι του ενζύμου στα κύτταρα ζύμης.

Η αλληλεπίδρασή της με την (φωσφορυλιωμένη) α-συνουκλεΐνη έχει αποδειχθεί και σε κύτταρα *Mus Musculus* (Mc Farland et al., 2008), χωρίς όμως να υπάρχει διαυγής συσχέτιση της με μοριακά γεγονότα για συγκεκριμένες λειτουργίες. Στοιχείο σημαντικό ωστόσο αποτελεί η κοινή εντόπιση των δύο πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

### **5.6.3 Η πρωτεΐνη ZPS1 του *Saccharomyces cerevisiae***

Η πρωτεΐνη ZPS1 αποτελεί ένα μόριο 249 αμινοξέων και 27,5 kD. Η φυσιολογική της λειτουργία είναι άγνωστη και φέρεται να εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα και στο κενοτόπιο. Χαρακτηρίζεται ως μία πρωτεΐνη του κυτταρικού τοιχώματος τροποποιούμενη από γλυκοζο-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι ευρέως διαδεδομένες στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στους μύκητες εντοπίζονται είτε στο κυτταρικό τοίχωμα είτε στην κυτταρική μεμβράνη. Είναι πιθανό να εμπλέκονται στην βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και την αναδιαμόρφωσή του, να καθορίζουν την υδροφοβικότητά του και την αντιγονικότητά του. Η αλληλουχία της φέρει ομοιότητες με τις μεταλλοπρωτεάσες ψευδαργύρου και υπερέκφρασή της αποικοδομεί εξωκυττάρια πρωτεΐνες, ώστε να προσλαμβάνονται από το κύτταρο πρωτεΐνες που προσδένουν ψευδάργυρο σε περίπτωση έλλειψης του ιχνοστοιχείου. (De Groot et al., 2003, Lyon et al., 2000)

Η μεταγραφή της ZPS1 ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα Zap1p, ο οποίος αποτελεί έναν αισθητήρα των ενδοκυττάρια επιπέδων ψευδαργύρου και επάγει την μεταγραφή γονιδίων σε κατάσταση έλλειψης ψευδαργύρου. (Lyons et al., 2000) Ακόμη, ο Zap1p αλληλεπιδρά με την κινάση Rim101p και μαζί ρυθμίζουν θετικά την μεταγραφή της ZPS1 τόσο για την έλλειψη ψευδαργύρου όσο και σε αλκαλικό pH και στην απόκριση σε αυτό.

Σημειώνεται πως δεν έχει αναφερθεί αλληλεπίδραση της α-συνουκλεΐνης με την ZPS1 ή παρόμοιες πρωτεΐνες σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



## 6. Βιβλιογραφία

1. Aguib Y., Heiseke A., Gilch S., Riemer C., Baier M., Ertmer A., Schätzl H. (2014). Autophagy induction by trehalose counter-acts cellular prion-infection. *Autophagy* 5:3, 361-369.
2. Ahlstrand K., Sullivan P. (2010). Genetic Evidence in Yeast Model Implicates Autophagy in the Degradation of Parkinson's Disease Protein  $\alpha$ -Synuclein. *Eukaryon*, Vol. 6, 96-104.
3. Barinova K., Khomyakova E., Semenyuk P., Schmalhausen E., Muronetz V. (2018). Binding of alpha-synuclein to partially oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induces subsequent inactivation of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 642, 10–22.
4. Barinova K., Serebryakova M., Sheval E., Schmalhausen E., Muronetz V. (2019). Modification by glyceraldehyde-3-phosphate prevents amyloid transformation of alpha-synuclein. *BBA - Proteins and Proteomics*, Vol. 1867, 396–404.
5. Bell W, Sun W, Hohmann S, Wera S, Reinders A, De Virgilio C, Wiemken A, Thevelein JM (1998). Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J Biol Chem* 273(50):33311-9.
6. Beyer K. (2006). A -synuclein structure, post-transcriptional modification and alternative splicing as aggregation enhancers, *Acta Neuropathol* Vol. 112, 237-251.
7. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* Vol 72: 248-54.
8. Brandis K., Shrestha R. (2005). A-Synuclein Toxicity and Localization in Yeast that Lack Superoxide Dismutases. *Eukaryon*, Vol. 1, 102-108.
9. Bungeroth M., Appenzeller S., Regulin A., Völker W., Lorenzen I., Grötzinger J., Pendziwiat M., Kuhlenbäumer G. (2014). Differential aggregation properties of alpha-synuclein isoforms *Neurobiology of Aging* 35, 1913-1919.
10. Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." *Anal Biochem* Vol 112(2): 195-203.
11. Burtner C., Murakami C.J., Kennedy B.K., Kaeberlein M. (2009). A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell Cycle* 8:8, 1256-1270.
12. Bussell R., Eliezer D. (2001). Residual Structure and Dynamics in Parkinson's Disease-associated Mutants of  $\alpha$ -Synuclein. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 276, 45996-46003.

13. Buttner S., Bitto A., Ring J., Augsten M., Zabrocki P., Eisenberg T., Jungwirth H., Hutter S., Carmona-Gutierrez D., Kroemer G., Winderickx J., Frank Madeo F. (2007). Functional Mitochondria Are Required for A-Synuclein Toxicity in Aging Yeast. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 283, No. 12, 7554–7560.
14. Cebollero E., Reggiori F. (2009). Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* Vol. 1793, 1413–1421.
15. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destée A. (2004). *Lancet*. Vol 364 (9440):1167-9.
16. Chaudhary R.K., Kardani J., Singh K., Banerjee R., Roy I. (2014). Deciphering the Roles of Trehalose and Hsp104 in the Inhibition of Aggregation of Mutant Huntingtin in a Yeast Model of Huntington’s Disease. *Neuromol Med* Vol. 16, 280–291.
17. Chen Q., Thorpe J., Keller J. (2005). A-Synuclein Alters Proteasome Function, Protein Synthesis, and Stationary Phase Viability, *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 280, No. 34, 30009–30017.
18. Chung, C. T. and Miller, R. H. (1988). A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Research*. 16 (8):3580
19. Compagno C., Ranzi B.M., Martegani E. (1991). The promoter of *Saccharomyces cerevisiae FBAI* gene contains a single positive upstream regulatory element. *FEBS Letters* Vol. 293, 97-100.
20. Cookson M.R. (2005). The Biochemistry Of Parkinson’s Disease. *Annu. Rev. Biochem.* Vol. 74, 29–52.
21. De Groot P.W.J., Hellingwerf K., Klis F.M. (2003). Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* Vol. 20, 781–796.
22. Dehay B., Bourdenx M., Gorry P., Przedborski S., Vila M., Hunot S., Andrew Singleton A., Olanow C., Merchant K., Bezard E., Petsko G., Meissner W. (2015). Targeting  $\alpha$ -synuclein for treatment of Parkinson’s disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol* 2015; 14: 855–66.
23. Dixon C., Mathias N., Zweig R.M., Davis D.A. Gross D.S. (2005). A-Synuclein Targets the Plasma Membrane via the Secretory Pathway and Induces Toxicity in Yeast, *Genetics* 170: 47–59.
24. Eleutherio E., Panek A., De Mesquita J.F., Trevisol E., Magalhães R. (2015). Revisiting yeast trehalose metabolism. *Curr Genet* Vol. 61, 263-274.
25. Estruch F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews* Vol. 24, 469-486.
26. Fonseca T.L., Villar-Piqué A., Outeiro T.F. (2015). The Interplay between Alpha-Synuclein Clearance and Spreading. *Biomolecules* 2015, Vol. 5, 435-471.
27. Francois J.M., Walther T., Parrou J. (2012). Genetics and Regulation of Glycogen and Trehalose Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbial Stress Tolerance for Biofuels, Microbiology Monographs* 22. 29-55.
28. Franssens V., Bynens T., Van den Brande J., Van der Meer K., Verduyck M., Winderickx J. (2013). The Benefits of Humanized Yeast Models to Study

- Parkinson's Disease, Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2013.
29. Gamez-Valero A., Beyer K. (2018). Alternative Splicing of Alpha- and Beta-Synuclein Genes Plays Differential Roles in Synucleinopathies. *Genes* 2018, 9, 63.
  30. Gari E, Piedrafita L, Aldea M, Herrero E. (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. Vol 13:837–848.
  31. Galdieri L., Mehrotra S., Yu S., Vancura A. (2010). Transcriptional Regulation in Yeast during Diauxic Shift and Stationary Phase. *OMICS A Journal of Integrative Biology* Vol. 14, 629-638.
  32. Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Véronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, André B, Arkin AP, Astromoff A, El-Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A, Entian KD, Flaherty P, Foury F, Garfinkel DJ, Gerstein M, Gotte D, Güldener U, Hegemann JH, Hempel S, Herman Z, Jaramillo DF, Kelly DE, Kelly SL, Kötter P, LaBonte D, Lamb DC, Lan N, Liang H, Liao H, Liu L, Luo C, Lussier M, Mao R, Menard P, Ooi SL, Revuelta JL, Roberts CJ, Rose M, Ross-Macdonald P, Scherens B, Schimmack G, Shafer B, Shoemaker DD, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Strathern JN, Valle G, Voet M, Volckaert G, Wang CY, Ward TR, Wilhelmy J, Winzeler EA, Yang Y, Yen G, Youngman E, Yu K, Bussey H, Boeke JD, Snyder M, Philippsen P, Davis RW, Johnston M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*. Vol 418(6896):387-91.
  33. Griffioen G, Duhamel H, Van Damme N, Pellens K, Zabrocki P, Pannecouque C, Van Leuven F, Winderickx J, Wera S (2000). A yeast-based model of  $\alpha$ -synucleinopathy identifies compounds with therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta* Vol 1762, 312 – 318
  34. Guedes A., Ludovico P., Sampaio-Marques B. (2016) Caloric restriction alleviates alpha-synuclein toxicity in aged yeast cells by controlling the opposite roles of Tor1 and Sir2 on autophagy. *Mech. Ageing Dev.*
  35. Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnol.* Vol 4:8.
  36. Herskowitz I (1988). "Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiol. Rev.* 52 (4): 536–53.
  37. Hung G., Brown C.R., Wolfe A.B., Liu J., Chiang H. (2004). Degradation of the Gluconeogenic Enzymes Fructose-1,6-bisphosphatase and Malate Dehydrogenase Is Mediated by Distinct Proteolytic Pathways and Signaling Events. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 279, No. 47, 49138–49150.
  38. Inoue Y., Klionsky D.J. (2010). Regulation of macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* Vol. 21, 664–670.
  39. Kaeberlein M, Burtner CR, Kennedy BK (2007) Recent developments in yeast aging. *PLoS Genet* 3(5): e84.
  40. Kaeberlein M., Andalis A.A., Fink G.R., Guarente L. (2002). High Osmolarity Extends Life Span In *Saccharomyces Cerevisiae* By A Mechanism Related To Calorie Restriction. *Molecular And Cellular Biology* Vol. 22, No. 22, 8056–8066.

41. Kaiser C, Michaelis S, Mitchell A (1994) *Methods in Yeast Genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*.
42. Kaufmann, S., C. Ewing, et al. (1987). "The erasable western blot." *Annal Biochem* 161: 89-95.
43. Khurana V., Lindquist S. (2010). Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast?. *Nature Reviews Neuroscience* 11.6, 436- 449.
44. Kim W.S., Kågedal K., Halliday G. (2014). Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. *Alzheimer's Research & Therapy* 2014, 6:73.
45. Klein C., Olsson L., Nielsen J. (1998). Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae* : the role of *MIG1* in metabolic functions. *Microbiology* Vol. 144, 13-24.
46. Kruger R., Kuhn W., Muller Th., Voitalla D., Graeber M., Kosel S., Przuntek h., Epplen J.T., Ludger S., Riess O. (1998). Ala30 mutation in the gene encoding  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics* Vol. 18, 106-108.
47. Kukreja L. (2009). Evaluating Factors That Affect -Synuclein Toxicity in Yeast Models: Protein Concentration, Phospholipids, & Oxidants. *Eukaryon* Vol. 5.
48. Kushner, S. R. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI derived plasmids, p. 17-23. *In*: H. W. Boyer and S. Nicosia (ed.), *Genetic engineering*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
49. Kushnirov V (2000). Rapid and Reliable Protein extraction from yeast. *Yeast* Vol 16: 857-860
50. Kyryakov P., Beach A., Richard V.R., Burstein M.T., Leonov A., Levy S., Titorenko V.I. (2012). Caloric restriction extends yeast chronological lifespan by altering a pattern of age-related changes in trehalose concentration. *Frontiers in Physiology* Vol 3, Article 256.
51. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
52. Lavedan Christian. (1998). The synuclein family, *Genome Research* Vol. 8, 871-880.
53. Lee I., Kim H., Kim M., Hahn J., Paik S. (2008). Dequalinium-Induced Cell Death of Yeast Expressing  $\alpha$ -Synuclein-GFP Fusion Protein. *Neurochem Res* 33:1393–1400.
54. Legocki, R. and D. Verma (1981). "Multiple immunoreplica technique: Screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel." *Annal Biochem* 111: 385-392.
55. Lejeune A., Delvigne F., Thonart F. (2011). Trehalose as a stress marker of the physiological impact of mixing on yeast production: scale-down reactors and minibioreactors investigations. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14(S2), 531-536

56. Lewinska A., Miedziak B., Kulak K., Molon M., Wnuk M. (2014). Links between nucleolar activity, rDNA stability, aneuploidy and chronological aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biogerontology* Vol. 15, 289–316.
57. Liu L., Sakakibara K., Chen Q., Okamoto K. (2014). Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell Research* Vol. 24, 787-795.
58. Longo V.D., Shadel G.S., Kaerberlein M., Kennedy B. (2012). Replicative and Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metabolism* Vol.16, 18-31.
59. Lööke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. (2011) Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*. Vol 50(5):325-8.
60. Lyon T.J., Gasch A.P., Gaither L.A., Botstein D., Brown P.O., Eide D. (2000). Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *PNAS* Vol. 97, 7957–7962.
61. Maroteaux L., Campanelli J.T., Scheller R.H. (1988). Synuclein: A Neuron-Specific Protein Localized to the Nucleus and Presynaptic Nerve Terminal. *The Journal of Neuroscience* Vol. 8(8): 2804-2815
62. Marti M., Tolosa E., Campdelacreu J. (2003). Clinical Overview of the Synucleinopathies. *Movement Disorders* Vol. 18, Suppl. 6, S21–S27.
63. Martin L. (2002). Neurodegenerative Disorders. *Encyclopedia of the Human Brain* Vol. 3, 441-463.
64. McFarland M., Ellis C., Markey S.P., Nussbaum R.L.(2008). Proteomics Analysis Identifies Phosphorylation-dependent  $\alpha$ -Synuclein Protein Interactions. *Molecular & Cellular Proteomics* Vol. 7, 2123–2137.
65. Mercado J.J., Smith R., Sogliocco F.A., Brown A.J.P., Gancedo J.M. (1994). The levels of yeast gluconeogenic mRNAs respond to environmental factors. *Eur. J. Biochem.* Vol 224, 473-481.
66. Nicastro R., Tripodi F., Gaggini M., Castoldi A., Reghellin V., Nonnis S., Tedeschi G., Coccetti P. (2015). Snf1 Phosphorylates Adenylate Cyclase and Negatively Regulates Protein Kinase A-dependent Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 290, No. 41, 24715–24726.
67. Nwaka  $\Sigma$ . and Holzer H. (1998). Molecular Biology of Trehalose and the Trehalases in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol. 58, 1999-2224.
68. Outeiro F. T., DeVit J.M., Lindquist S. (2003). Yeast cells provide insight into alpha synuclein biology and pathobiology. *Science*, Vol. 302, 1772-1775.
69. Outeiro T.F. (2004). Yeast As A Model Organism To Study Diseases Of Protein Misfolding. Doctoral Thesis.
70. Ozansoy M., Nazli Başak A. (2013). The Central Theme of Parkinson' s Disease:  $\alpha$ -Synuclein. *Mol Neurobiol* (2013) Vol. 47:460–465.
71. Paleologou K.E., Irvine G.B., El-Agnaf O.M.A. (2005).  $\alpha$ -Synuclein aggregation in neurodegenerative diseases and its inhibition as a potential therapeutic strategy, *Biochemical Society Transactions* Volume 33, 1106-1110.
72. Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanasiadou A., Papapetropoulos, Johnson W.G., Kazzarini A.M., Duvoisin R.C., Di Lorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L. (1997). Mutations in

- the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* Vol. 276, 2045-1047.
73. Popova B., Kleinknecht A., Braus G.H. (2015). Posttranslational Modifications and Clearing of  $\alpha$ -Synuclein Aggregates in Yeast. *Biomolecules* 2015, 5, 617-634.
  74. Prick T., Thumm M., Ohrer K.K., Aussinger D.H., Vom Dahl S. (2006). In Yeast, Loss Of Hog1 Leads To Osmosensitivity Of Autophagy. *Biochem. J.* Vol. 394, 153–161.
  75. Reinders A., Burckert N., Boller T., Wiemken A., Virgilio C. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes & Development* Vol. 12, 2943–2955
  76. Renna M., Jimenez-Sanchez M., Sarkar S., Rubinsztein D. (2010). Chemical inducers of autophagy that enhance the clearance of mutant proteins in neurodegenerative diseases. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 285, No. 15, 11061–11067.
  77. Ringel A. (2009). Tdh3 (a GAPDH isozyme) is a novel regulator of Sir2-mediated transcriptional silencing in yeast. Bachelor thesis.
  78. Ringel AE, Ryznar R, Picariello H, Huang K-I, Lazarus AG (2013) Yeast Tdh3 (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) Is a Sir2-Interacting Factor That Regulates Transcriptional Silencing and rDNA Recombination. *PLoS Genet* 9(10): e1003871.
  79. Ross C.A., Poirier M.A. (2004). Protein aggregation and Neurodegenerative Disease. *Nature Medicine* Vol 10, S10-S14.
  80. Ruis H., Schuller C. (1995). Stress signaling in yeast. *Bioassays* Vol. 17, No 11, 959-965.
  81. Ruzza P., Hussain R., Biondi B., Calderan A., Tessari I., Bubacco L., Siligardi J. (2015). Effects of Trehalose on Thermodynamic Properties of  $\alpha$ -Synuclein Revealed through Synchrotron Radiation Circular Dichroism, *Biomolecules* 5, 724-734.
  82. Saleh A.A., Gune U.S., Chaudhary R.K., Turakhiya A.P., Roy I. (2014). Roles of Hsp104 and trehalose in solubilisation of mutant huntingtin in heat shocked *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochimica et Biophysica Acta* Vol. 1843, 746–757.
  83. Sampaio-Marques B., Felgueiras C., Silva A., Rodrigues F., Ludovico P. (2011). Yeast chronological lifespan and proteotoxic stress: is autophagy good or bad?. *Biochemical Society Transactions* Vol. 39, 1466-1470.
  84. Sampaio-Marques B., Felgueiras C., Silva A., Rodrigues M., Tenreiro S., Franssens V., Reichert A.S., Outeiro T.F., Winderickx J., Ludovico P. (2016). *SNCA* ( $\alpha$ -synuclein)-induced toxicity in yeast cells is dependent on Sir2-mediated mitophagy, *Autophagy*, 8:10, 1494-1509.
  85. Santos J., Leitão-Correia F., Sousa M., Leão C. (2016). Dietary Restriction and Nutrient Balance in Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Vol. 2016, Article ID 4010357, 10 pages.
  86. Singer M., Lindquist S. (1998). Multiple Effects of Trehalose on Protein Folding *In Vitro* and *In Vivo*. *Molecular Cell*, Vol. 1, 639–648.
  87. Singleton A.B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralina T., Dutra A., Nussbaum R., Lincoln S., Crawley A.,

- Hanson M., Maraganore D., Adler C., Cookson M.R., Muentner M., Baptista M., Miller D., Blancato J., Hardy J., Gwinn-Hardy K. (2003).  $\alpha$ -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science* Vol. 302, Issue 5646, pp. 841.
88. Sarkar S., Janet E., Davies J.E., Zebo Huang Z., Tunnacliffe A., Rubinsztein D.C. (2007). Trehalose, A Novel Mtor-Independent Autophagy Enhancer, Accelerates The Clearance Of Mutant Huntingtin And A-Synuclein. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 282, No. 8, 5641–5652.
  89. Semenyuk P., Barinova K., Muronetz V. (2019). Glycation of  $\alpha$ -synuclein amplifies the binding with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 127, 278–285.
  90. Sharma N., Brandis K. A., Herrera S.K., Johnson B. E., Vaidya T., Shrestha R., DebBurman S.K. (2006). A-Synuclein Budding Yeast Model; Toxicity Enhanced by Impaired Proteasome and Oxidative Stress. *Journal of Molecular Neuroscience* Vol.28, 161-178.
  91. Singer M., Lindquist S. (1998). Multiple Effects of Trehalose on Protein Folding *In Vitro* and *In Vivo*. *Molecular Cell*, Vol. 1, 639–648.
  92. Soni R., Murray J.A. (1992) A rapid and inexpensive method for isolation of shuttle vector DNA from yeast for the transformation of *E.coli*. *Nucleic Acids Res.* Vol 20(21): 5852.
  93. Soper J.H., Roy S., Stieber A., Lee E., Wilson R.B., Trojanowski J.Q., Burd C.G., Lee V. (2008). A-Synuclein-induced Aggregation of Cytoplasmic Vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 19, 1093–1103.
  94. Spillantini M.G., Goedert M. (2000) The  $\alpha$ -Synucleinopathies: Parkinson's Disease, Dementia With Lewy Bodies, And Multiple System Atrophy. *Annals New York Academy Of Sciences*, 16-27.
  95. Stefanini I, Dapporto L, Berná L, Polsinelli M, Turillazzi S, Cavalieri D (2016), Social wasps are a *Saccharomyces* mating nest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(8):2247-51
  96. Stefanini I, Dapporto L, Legras JL, Calabretta A, Di Paola M, De Filippo C, Viola R, Capretti P, Polsinelli M, Turillazzi S, Cavalieri D (2012) Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(33):13398-403.
  97. Stefanis L. (2012).  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* Vol 4:a009399.
  98. Surguchov A. (2008). *Molecular and Cellular Biology of Synucleins* international. *Review of Cell and Molecular Biology*, Volume 270, 225-317
  99. Tenreiro S., Munder M.C., Alberti S., Outeiro T.F. (2013). Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. *Journal Of Neurochemistry* Vol. 127, 438–452.
  100. Tenreiro S., Outeiro T.F. (2010). Simple is good: yeast models of neurodegeneration. *FEMS Yeast Res* 10, 970–979.
  101. Trevisol E.T.V., Panek A.D., DeMesquita J.F., Eleutherio E.C.A. (2014). Regulation of the yeast trehalose-synthase complex by cyclic AMP-dependent phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta* Vol. 1840, 1646–1650.

102. Towbin, H., Staehelin, et al. (1979). " Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354.
103. Uéda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 90, pp. 11282-11286.
104. Wang J., Jiang J.C., Jazwinski S.M. (2010). Gene regulatory changes in yeast during life extension by nutrient limitation. *Exp Gerontol.* Vol. 45(7-8), 621-631.
105. Warringer J, Zörgö E, Cubillos FA, Zia A, Gjuvslund A, Simpson JT, Forsmark A, Durbin R, Omholt SW, Louis EJ, Liti G, Moses A, Blomberg A (2011). "Trait variation in yeast is defined by population history". *PLoS Genet.* 7 (6): e1002111.
106. Watson D.J., Myers M.R., Caudy A.A., Witkowski A.J. (2007). Ανασυνδυασμένο DNA (3η έκδοση): Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Μπάσδρα Ι., Αλεξανδρούπολη.
107. Webb J. L., Ravikumar B., Atkins J., Skepper J. N., Rubinsztein D.C. (2003). A-Synuclein Is Degraded by Both Autophagy and the Proteasome. *The journal of biological chemistry* Vol. 278, No. 27, Issue of July 4, pp. 25009–25013.
108. Werner-Washburne M., Braun E., Johnston G.C., Singer R.A. (1993). Stationary Phase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* Vol. 57, No. 2, 383-401.
109. Willingham S, Outeiro TF, DeVit MJ, Lindquist SL, Muchowski PJ (2003). Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein. *Science* Vol 302(5651):1769-72
110. Wijayanti I., Watanabe D., Oshiro S., Takagi H. (2015). Isolation and functional analysis of yeast ubiquitin ligase Rsp5 variants that alleviate the toxicity of human a-synuclein. *J. Biochem.* Vol. 157(4), 251–260.
111. Winslow A.R., Chen C., Corrochano S., Acevedo-Arozena A., Gordon D.E., Peden A.A., Lichtenberg M., Menzies F.M., Ravikumar B., Imarisio S., Brown S., O’Kane C.J., Rubinsztein D.C. (2010) A-Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson’s disease. *J. Cell Biol.* Vol. 190 No. 6 1023–1037.
112. Winston F, Dollard C, Ricupero-Hovasse SL. (1995) Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast.* 11(1):53-5.
113. Wu Y., Li Q., Chen X. (2007). Detecting protein–protein interactions by Far Western Blotting *Nature Protocols* Vol.2, No.12, 3278-3284
114. Yu W., Jiang T., Lan D., Lu J., Yue Z., Wang J., Zhou P. (2012). Trehalose inhibits fibrillation of A53T mutant alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 523, 144–150.
115. Zhang X., Chen S., Song L., Tang Y., Shen Y, Jia L., Le W. (2014). MTOR-independent, autophagic enhancer trehalose prolongs motor neuron survival and ameliorates the autophagic flux defect in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* 10:4, 588–602.



116. Zörgö E, Chwialkowska K, Gjuvsland AB, Garré E, Sunnerhagen P, Liti G, Blomberg A, Omholt SW, Warringer J (2013). "Ancient evolutionary trade-offs between yeast ploidy states". *PLoS Genet.* **9** (3): e1003388.
117. Γελαδάς Ν., Τσακόπουλος Μ. (2001). Φυσιολογία του ανθρώπου Ι (8η έκδοση): Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη, Αθήνα.
118. Κίττας Χ., (2004): Βασική Ιστολογία: Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα.
119. Σφήκας Ευάγγελος. (2011). Πτυχιακή Εργασία, Ιωάννινα 2011.
120. Ζόλδερ Σπυρίδων. (2017). Πτυχιακή Εργασία, Ιωάννινα 2017.

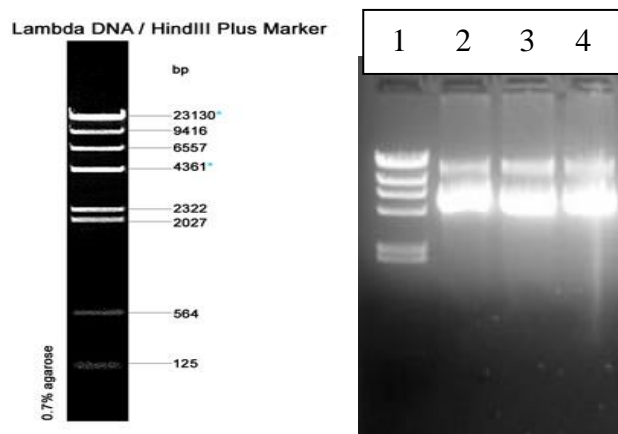


**ΠΡΟΣΘΕΤΟ ΥΛΙΚΟ  
ΚΑΙ  
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ**

## **Π1 Κλωνοποίηση των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης της α-συνουκλεΐνης στον πλασμιδιακό φορέα ζυμομόκητα pCM190.**

### **Π1.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E. coli* DH5a**

Παραθέτονται οι απομονώσεις των πλασμιδιακών DNA που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και κλωνοποίηση των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης των μορφών της α-συνουκλεΐνης στον φορέα έκφρασης pCM190.



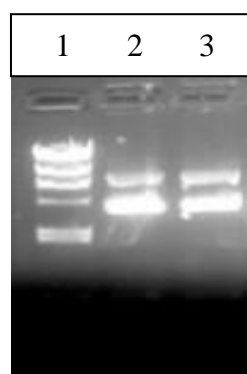
**Εικόνα Π.1:** Προφίλ των μοριακών βάρων του  $\lambda$ HindIII και πλασμιδιακή απομόνωση.

Διαδρομή 1:  $\lambda$ HindIII

Διαδρομή 2: pCM190

Διαδρομή 3: pCM190asynWT

Διαδρομή 4: pCM190asyn112



**Εικόνα Π.2:** Απομόνωση pTRE2hyg/asynA53T και pTRE2hyg/asynA30P

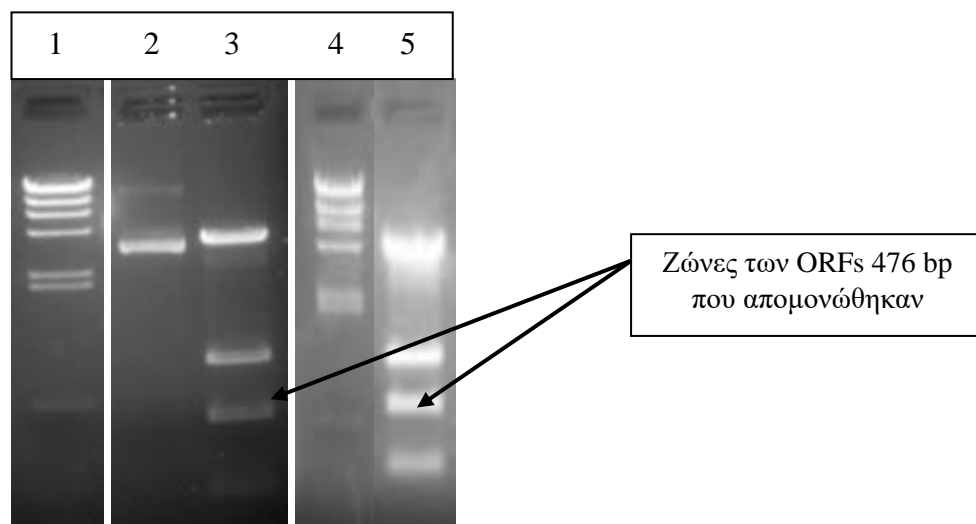
Διαδρομή 1:  $\lambda$ HindIII

Διαδρομή 2: pTRE2hyg/asynA53T

Διαδρομή 3: pTRE2hyg/asynA30P

## Π1.2 Απομόνωση των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs) της α-συνουκλεΐνης A53T και A30P από τους φορείς pTRE2hyg και κλωνοποίησή τους στον φορέα pCM190

Παραθέτονται οι εικόνες ηλεκτροφορήσεων των συνδυαστικών πέψεων που πραγματοποιήθηκαν για την δημιουργία της ένθεσης και του φορέα κλωνοποίησης και οι ζώνες που απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν σε κάθε περίπτωση.



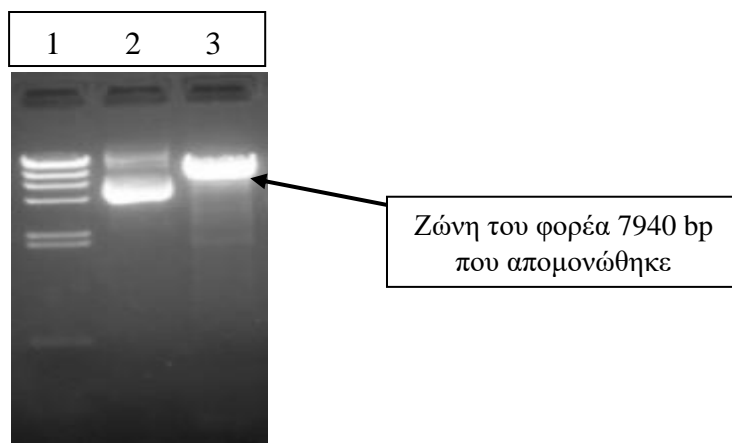
**Εικόνα Π.3:** Συνδυαστικές περιοριστικές πέψεις των pTRE2hyg/asynA53T και pTRE2hyg/asynA30P με τα ένζυμα *SmaI* και *PstI* για την απομόνωση των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης της α-συνουκλεΐνης A53T και A30P. (Για την επιλογή των πέψεων- ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1)

Διαδρομή 1 & 4:  $\lambda$ /*HindIII*

Διαδρομή 2: άκοπο πλασμίδιο pTRE2hyg/asynA53T

Διαδρομή 3: pTRE2hyg/asynA53T/ *SmaI* και *PstI*

Διαδρομή 5: pTRE2hyg/asynA30P/ *SmaI* και *PstI*



**Εικόνα Π.4:** Συνδυαστική περιοριστική πέψη του φορέα pCM190 με τα ένζυμα *PmeI* και *PstI*.

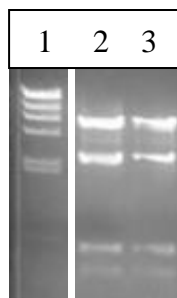
Διαδρομή 1:  $\lambda$ /*HindIII*

Διαδρομή 2: pCM190 άκοπο

Διαδρομή 3: pCM190/ *PmeI* και *PstI*

Στην συνέχεια, τα τμήματα των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης που απομονώθηκαν δεσμοποιήθηκαν το καθένα ξεχωριστά με αυτό του απομονωμένου φορέα pCM190 και ακολούθησε χημικός μετασχηματισμός σε κύτταρα *E. coli* DH5a.

Από τις αποικίες που προέκυψαν επιλέχθηκαν ορισμένες από τις οποίες απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA και στην συνέχεια υπέστη διαγνωστική πέψη με το ένζυμο *EcoRI*. Εφόσον έχει πραγματοποιηθεί η δεσμοποίηση, μετά την αντίδραση πέψης αναμένεται να εμφανιστούν τέσσερις ζώνες στην εικόνα ηλεκτροφόρησης με μέγεθος περίπου 5500, 2600, 311 και 139 bp. Στην εικόνα Π.5 παρουσιάζονται ενδεικτικά από μία για κάθε κλωνοποίηση.



**Εικόνα Π.5:** Πέψη των υποψήφιων κλώνων pCM190asynA53T και pCM190asynA30P  
Διαδρομή 1:  $\lambda$ /*HindIII*  
Διαδρομή 2: pCM190asynA53T/*EcoRI*  
Διαδρομή 3: pCM190asynA30P/*EcoRI*

### **Π1.3 Μετασχηματισμός *S.cerevisiae* BY4741 με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pCM190asynA53T και pCM190asynA30P**

Ο μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο που αναφέρεται στην ενότητα 3.3.18 του κεφαλαίου Υλικά και Μέθοδοι. Για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το ελάχιστο θρεπτικό μέσο yeast synthetic drop-out media supplement without uracil στο οποίο θα αναπτυχθούν μόνο τα μετασχηματισμένα κύτταρα που φέρουν το pCM190 ή τα ανασυνδυασμένα παράγωγά του στα οποία εδράζεται το γονίδιο *URA3* υπεύθυνο για την βιοσύνθεση της ουρακίλης που είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των κυττάρων του ζυμομύκητα βάσει του γονοτύπου του αντίστοιχου στελέχους (Υλικά και Μέθοδοι, ενότητα 3.2.)

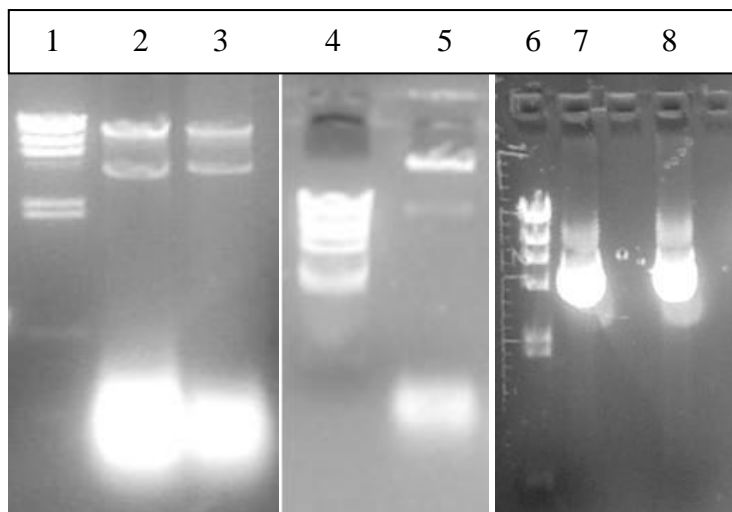
Επιπλέον, τα τρυβλία περιέχουν τετρακυκλίνη σε τελική συγκέντρωση 1  $\mu\text{g/ml}$ . Υπενθυμίζεται εδώ ότι η τετρακυκλίνη ρυθμίζει την μεταγραφή του γονιδίου της ασυνουκλείνης μέσω τους συστήματος tet-off του πλασμιδίου pCM190. Η απουσία της οδηγεί σε υπερέκφραση του γονιδίου, η οποία πιθανόν να είναι θνησιγόνος για τα κύτταρα. Αντίθετα, η παρουσία του αντιβιοτικού εμποδίζει την έκφραση του γονιδίου και κατά συνέπεια τα κύτταρα δύνανται να επιβιώνουν. (Υλικά και Μέθοδοι, ενότητα 3.2.1)

Στα τρυβλία του μετασχηματισμού παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη συγκέντρωση τετρακυκλίνης (1  $\mu\text{g/ml}$ ) είναι κατάλληλη για την διακοπή της μεταγραφής του γονιδίου και, κατ' επέκταση, την πιθανή βιωσιμότητα των κυττάρων του *S.cerevisiae* τα οποία έχουν προσλάβει τον ανασυνδυασμένο κλώνο.

## **Π2 Εντοπισμός των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων στα κύτταρα του *S. cerevisiae*.**

### **Π2.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τον *Saccharomyces cerevisiae* BY4741**

Παραθέτονται οι εικόνες των ηλεκτροφορήσεων των απομονωμένων πλασμιδιακών εκχυλισμάτων.



**Εικόνα Π.6:** Ολικό πλασμιδιακό DNA από κύτταρα *S.cerevisiae* BY4741

Διαδρομές 1, 4 & 6:  $\lambda$ /*Hind*III

Διαδρομή 2: BY4741/pCM190asynA53T

Διαδρομή 3: BY4741/pCM190asyn30P

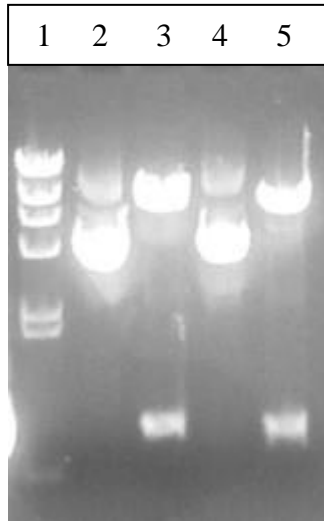
Διαδρομή 5: BY4741

Διαδρομή 7: Άκοπο pCM190asynA53T από *E.coli* DH5a

Διαδρομή 8: Άκοπο pCM190asynA30P από *E.coli* DH5a

Στο πλασμιδιακό πρότυπο μεταξύ των δειγμάτων που απομονώθηκαν από τα μετασχηματισμένα κύτταρα ζύμης διακρίνεται μία επιπλέον ζώνη DNA περίπου στο επίπεδο της ζώνης των 4361 bp του  $\lambda$ /*Hind*III έναντι του DNA του αρχικού στελέχους. Για να διασαφηνιστεί όμως πως το εν λόγω DNA περιέχει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, ορισμένη ποσότητα του κάθε δείγματος DNA χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό σε κύτταρα *E. coli* DH5a, τα οποία επιλέχθηκαν στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη.

Από τον μετασχηματισμό στα DH5a προέκυψαν αρκετές αποικίες, από τις οποίες επιλέχθηκε μία κάθε περίπτωση (με το pCM190asynA53T και με το pCM190asynA30P) και απομονώθηκε το πλασμιδιακό τους DNA. Για να εξακριβωθεί περαιτέρω η ταυτότητα των επιθυμητών πλασμιδίων στα κύτταρα της *E.coli*, πραγματοποιήθηκαν σε αυτά διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα *Kpn*I που αναγνωρίζει μία θέση στο pCM190 και *Pst*I που αναγνωρίζει τη μία θέση κλωνοποίησης των γονιδίων των μεταλλαγών της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Από αυτή την πέψη αναμένεται η εμφάνιση δύο ζωνών, 7850 bp και 700 bp περίπου. Στη μικρή ζώνη εμπεριέχεται το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης οποιασδήποτε μορφής. Η συνδυαστική πέψη των δύο κλώνων φαίνεται στην εικόνα Π.7.



**Εικόνα Π.7:** Πλασμιδιακά DNA pCM190asynA53T και pCM190asynA30P από *E. coli* και πέψεις αυτών

Διαδρομή 1:  $\lambda$ /HindIII

Διαδρομή 2: pCM190asynA53T άκοπο

Διαδρομή 3: pCM190asynA53T/KpnI και PstI

Διαδρομή 4: pCM190asynA30P άκοπο

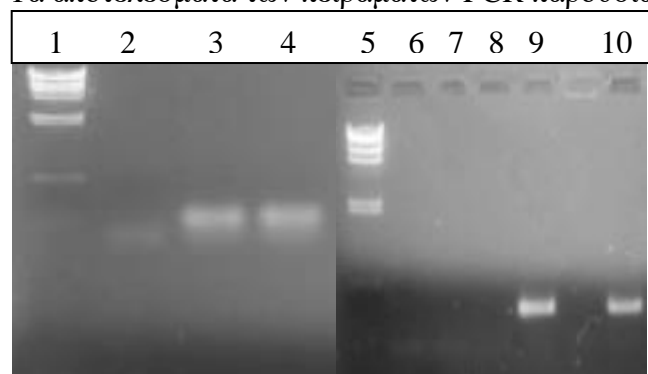
Διαδρομή 5: pCM190asynA30P/KpnI και PstI

Στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης παρατηρήθηκαν οι αναμενόμενες ζώνες, επομένως συμπεραίνεται ότι η ανάκτηση των επιθυμητών πλασμιδίων από τα κύτταρα *E. coli* ήταν επιτυχής.

## **Π2.2 PCR για τον εντοπισμό του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του SNCA στα πλασμιδιακά εκχύλισμα του *S. cerevisiae***

Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της ύπαρξης του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης της α-συνουκλείνης A53T ή της A30P στα κύτταρα του ζυμομύκητα πραγματοποιήθηκαν πειράματα PCR με υπόστρωμα το πλασμιδιακό εκχύλισμα του *S.cerevisiae*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι SNCAF και SNCAR (Υλικά και Μέθοδοι, ενότητα 3.3.10). Η θέση πρόσδεσης τους εδράζεται στο εσωτερικό του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης με αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος τα 270 bp (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2) και είναι κοινή για όλες τις μορφές του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης της α-συνουκλείνης που μελετώνται στην παρούσα διατριβή.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων PCR παρουσιάζονται στην εικόνα Π.8.





**Εικόνα Π.8:** Εντοπισμός των διαφόρων μορφών του γονιδίου της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα πλασμιδιακά εκχυλίσματα του *S. cerevisiae*.

Διαδρομές 1 & 5:  $\lambda$ HindIII

Διαδρομή 2: αρνητικός μάρτυρας της PCR (χωρίς υπόστρωμα DNA)

Διαδρομή 3: προϊόν PCR του BY4741/pCM190asynA53T

Διαδρομή 4: προϊόν PCR του BY4741/pCM190asynA30P

Διαδρομή 6: αρνητικός μάρτυρας της PCR (χωρίς υπόστρωμα DNA)

Διαδρομή 7: PCR με υπόστρωμα DNA BY4741

Διαδρομή 8: PCR με υπόστρωμα DNA BY4741/pCM190

Διαδρομή 9: προϊόν PCR του BY4741/pCM190asynWT

Διαδρομή 10: προϊόν PCR του BY4741/pCM190asyn112

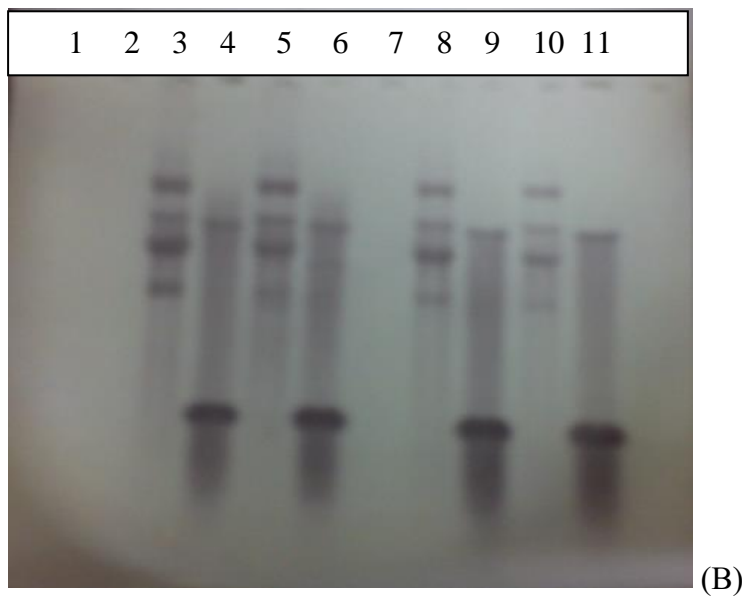
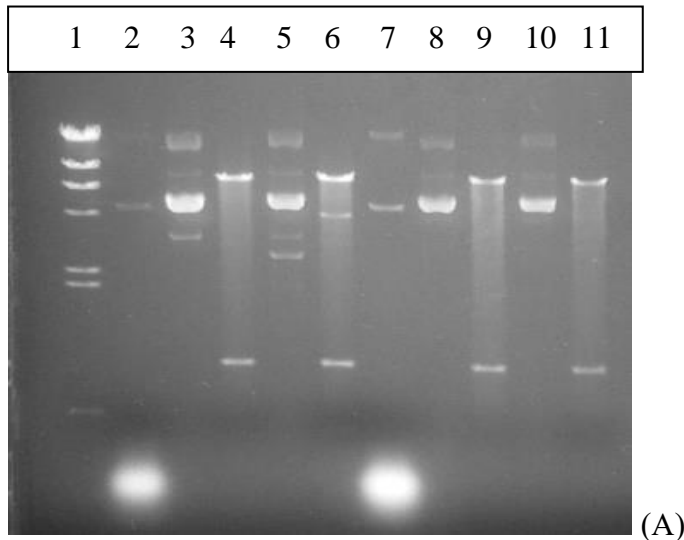
Παρατηρείται ότι ο εντοπισμός του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης ήταν επιτυχής αφού σε όλα τα δείγματα πλασμιδιακού εκχυλίσματος όπου εμπεριέχονταν οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι του pCM190 εμφανίζεται προϊόν στο αναμενόμενο μέγεθος. Παράλληλα, η μη ενίσχυση κάποιου προϊόντος στον αρνητικό μάρτυρα εξασφαλίζει την πιστότητα της αντίδρασης.

### **Π2.3 Υβριδισμός κατά Southern για τον εντοπισμό των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης των μεταλλαγών της $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα κύτταρα *S. cerevisiae***

Τα πλασμιδιακά εκχυλίσματα από *S. cerevisiae* και *E. coli* χρησιμοποιήθηκαν σε υβριδισμό κατά Southern.

Το σημασμένο DNA προήλθε από το προϊόν PCR που περιγράφηκε παραπάνω και αποτελεί την εσωτερική περιοχή του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης αγρίου τύπου. Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω είναι κοινό για όλες τις μορφές του SNCA.

Το πήκτωμα αγαρόζης και το φίλτρο υβριδισμού παρατίθενται στην εικόνα Π.9.



**Εικόνα Π.9:** Υβριδισμός με το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Πήκτωμα αγαρόζης (A) και φίλτρο υβριδισμού (B)

Διαδρομή 1:  $\lambda$ /HindIII

Διαδρομή 2: BY4741/pCM190asynA53T

Διαδρομή 3: *E.coli*/pCM190asynA53T άκοπο

Διαδρομή 4: *E.coli*/pCM190asynA53T/*KpnI* και *PstI*

Διαδρομή 5: *E.coli*/pCM190asynA53T από BY4741 άκοπο

Διαδρομή 6: *E.coli*/pCM190asynA53T/*KpnI* και *PstI* από BY4741

Διαδρομή 7: BY4741/pCM190asynA30P

Διαδρομή 8: *E.coli*/pCM190asynA30P άκοπο

Διαδρομή 9: *E.coli*/pCM190asynA30P/*KpnI* και *PstI*

Διαδρομή 10: *E.coli*/pCM190asynA30P από BY4741 άκοπο

Διαδρομή 11: *E.coli*/pCM190asynA30P/*KpnI* και *PstI* από BY4741

Σε θεωρητικό επίπεδο, τα πρότυπα υβριδισμού των ανασυνδυασμένων φορέων που απομονώθηκαν από κύτταρα *E.coli* θα παρείχαν μία συγκριτική μελέτη με τα πρότυπα υβριδισμού με τα αντίστοιχα πλασμίδια που απομονώθηκαν από κύτταρα *S. cerevisiae*. Ως εκ τούτου, θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί η εισαγωγή των επιθυμητών πλασμιδίων στα κύτταρα του ζυμομύκητα, άρα και η εισαγωγή του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης A53T ή A30P σε αυτά.

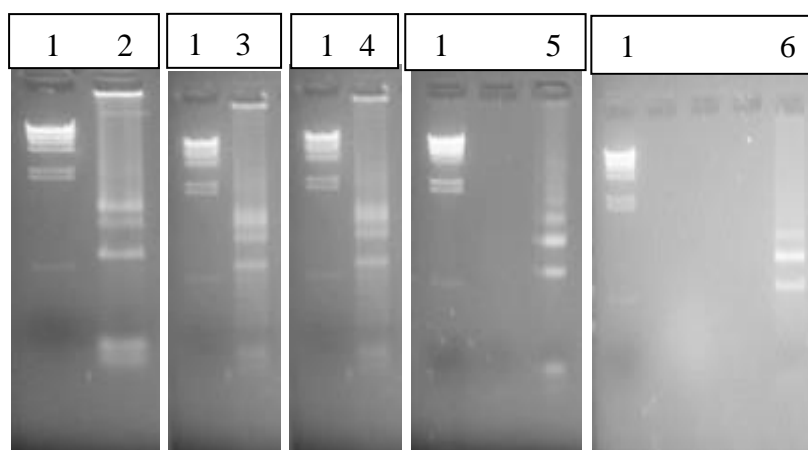
Από το φίλτρο του υβριδισμού παρατηρείται ότι δεν εμφανίστηκε σήμα στην διαδρομή 1 του αρνητικού μάρτυρα  $\lambda$ /*Hind*III, οπότε εξασφαλίζεται η πιστότητα του πειράματος και του σημασμένου DNA. Ακόμη, δεν παρατηρήθηκε υβριδισμός στα πλασμιδιακά εκχυλίσματα από *S. cerevisiae* BY4741 (Διαδρομές 2 και 7), πιθανότατα λόγω χαμηλής ποσότητας DNA. Ισχυρό σήμα υβριδισμού εντοπίστηκε στα δείγματα των περιοριστικών πέψεων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων από την *E. coli* (Διαδρομές 4, 6, 9 και 11) και συγκεκριμένα στην ζώνη μεγέθους 700 bp που φέρει το κλωνοποιημένο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. Το ασθενές σήμα υβριδισμού στο μεγαλύτερο μεγέθους τμήμα των πέψεων στις ίδιες διαδρομές πιθανότατα οφείλεται στην παρουσία άκοπου DNA. Υψηλό σήμα υβριδισμού παρατηρήθηκε επίσης, όπως αναμενόταν και στα άκοπα πλασμιδιακά εκχυλίσματα από *E. coli*. Ακριβώς το ίδιο πρότυπο υβριδισμού εμφανίστηκε και στα αντίστοιχα δείγματα της *E. coli*, άκοπα και κομμένα, που προέκυψαν από τα μετασχηματισμένα κύτταρα του ζυμομύκητα. Από το γεγονός αυτό συμπεραίνεται και η παρουσία της κάθε μεταλλαγής της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στα κύτταρα ζυμομύκητα BY4741.

### **Π3 Διερεύνηση της λειτουργίας των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης του SNCA στο επίπεδο της μεταγραφής τους**

#### **Π3.1 Απομόνωση ολικού RNA από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *S. cerevisiae* BY4741**

Πραγματοποιήθηκαν απομονώσεις ολικού RNA από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *S. cerevisiae* BY4741 που περιέχουν όλες τις μελετώμενες μορφές του γονιδίου της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, καθώς και τον μη ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης pCM190 ως αρνητικό μάρτυρα, με σκοπό την χρήση τους ως υπόστρωμα σε αντιδράσεις RT-PCR για την ανίχνευση των αντίστοιχων mRNA.

Η απομόνωση ήταν επιτυχής, όπως φαίνεται και στην εικόνα Π.10.



**Εικόνα Π.10:** Απομονώσεις ολικού RNA από τα μετασχηματισμένα κύτταρα του *S. cerevisiae*

Διαδρομή 1:  $\lambda$ /*Hind*III

Διαδρομή 2: ολικό RNA από κύτταρα BY4741/pCM190

Διαδρομή 3: ολικό RNA από κύτταρα BY4741/pCM190asynWT

Διαδρομή 4: ολικό RNA από κύτταρα BY4741/pCM190asynI12

Διαδρομή 5: ολικό RNA από κύτταρα BY4741/pCM190asynA53T

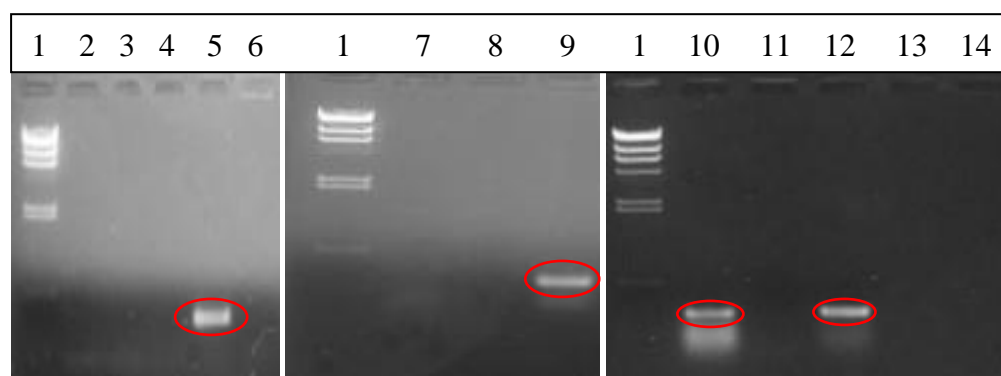
Διαδρομή 6: ολικό RNA από κύτταρα BY4741/pCM190asynA30P

Στην συνέχεια, τα παρασκευάσματα RNA χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση cDNA από αυτά.

### **Π3.2 RT-PCR για τον εντοπισμό των μεταγράφων των γονιδίων της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα *S.cerevisiae***

Τα παρασκευάσματα cDNA από τα ολικά RNA των κυττάρων *S.cerevisiae* χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα σε πειράματα RT-PCR με σκοπό να εντοπιστούν τα μεταγραφα των γονιδίων της α-συνουκλεΐνης WT, 112, A53T και A30P. Οι εκκινητές ήταν οι SNCAF και SNCAR (Υλικά και Μέθοδοι, ενότητα 3.3.10 και ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2), από τους οποίους προκύπτει μέγεθος προϊόντος 270 bp.

Τα αποτελέσματα των RT-PCR παρουσιάζονται στην εικόνα Π.11.



**Εικόνα Π.11:** RT-PCR για την ενίσχυση των μεταγράφων των γονιδίων της α-συνουκλεΐνης στο RNA των μετασχηματισμένων κυττάρων *S. cerevisiae*. Με κόκκινο κύκλο περιβάλλονται τα προϊόντα ενίσχυσης του cDNA κάθε μορφής του *SNCA*.

Διαδρομή 1:  $\lambda$ HindIII

Διαδρομές 2,7 και 11: αρνητικοί μάρτυρες της RT-PCR (χωρίς υπόστρωμα cDNA ή RNA)

Διαδρομή 3: αρνητικός μάρτυρας της RT-PCR-μη αντίστροφης μεταγραφής στο RNA των BY4741/pCM190 (υπόστρωμα RNA)

Διαδρομή 4: αρνητικός μάρτυρας της RT-PCR-μη αντίστροφης μεταγραφής στο RNA των BY4741/pCM190asynWT (υπόστρωμα RNA)

Διαδρομή 5: cDNA του *SNCA* WT

Διαδρομή 6: cDNA από κύτταρα BY4741/pCM190

Διαδρομή 8: αρνητικός μάρτυρας της RT-PCR-μη αντίστροφης μεταγραφής στο RNA των BY4741/pCM190asyn112 (υπόστρωμα RNA)

Διαδρομή 9: cDNA του *SNCA* 112

Διαδρομή 10: cDNA του *SNCA* A53T

Διαδρομή 12: cDNA του *SNCA* A30P

Διαδρομή 13: αρνητικός μάρτυρας της RT-PCR-μη αντίστροφης μεταγραφής στο RNA των BY4741/pCM190asynA53T (υπόστρωμα RNA)

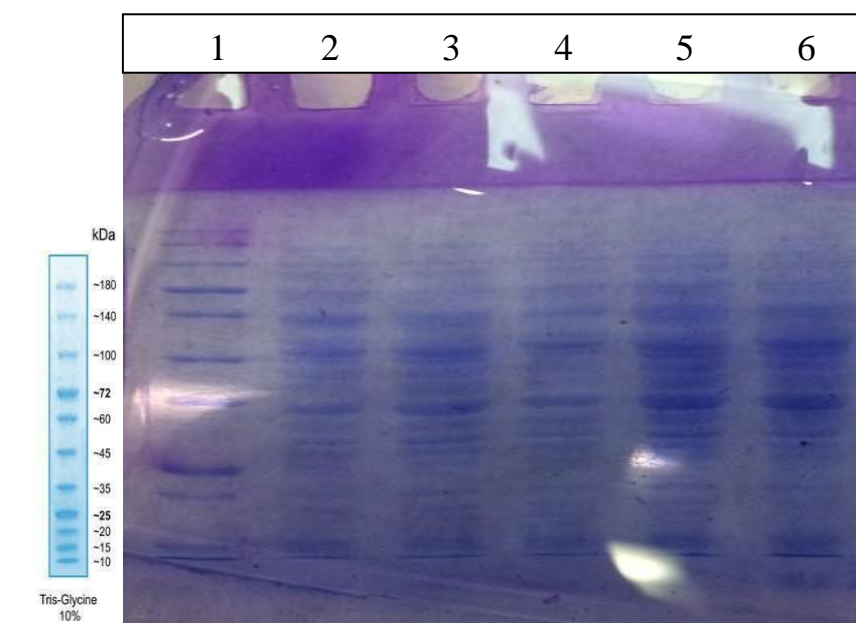
Διαδρομή 14: αρνητικός μάρτυρας της RT-PCR-μη αντίστροφης μεταγραφής στο RNA των BY4741/pCM190asynA30P (υπόστρωμα RNA)

Στην ηλεκτροφόρηση εμφανίζονται οι ζώνες του αναμενόμενου μεγέθους στις διαδρομές που αντιστοιχούν στις αντιδράσεις με το cDNA της κάθε μορφής του *SNCA*. Συμπεραίνεται επομένως ότι κάθε τύπος του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης μεταγράφεται από το σύστημα μεταγραφής του tet-off υπό το οποίο κλωνοποιήθηκε.

Η πιστότητα και ασφάλεια των αποτελεσμάτων εξακριβώνεται από τους αρνητικούς μάρτυρες της RT-PCR, καθώς δεν υπάρχουν προϊόντα της αντίδρασης τόσο στα δείγματα χωρίς υπόστρωμα νουκλεϊκού οξέος όσο και στους μάρτυρες με υπόστρωμα το RNA του κάθε δείγματος κυττάρων, καθώς επίσης και σε αυτούς που φέρουν το φορέα χωρίς το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης.

#### **Π4 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών των μετασχηματισμένων κυττάρων του *S. cerevisiae* και χρώση με Coomassie Blue για την ποσοτικοποίησή τους.**

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από τα μετασχηματισμένα κύτταρα BY4741 και χρώση με Coomassie Blue, ώστε να χρησιμοποιηθούν σε ανοσοαποτύπωση Western για τον εντοπισμό της α-συνουκλεΐνης. Η εικόνα της χρώσης των απομονωμένων πρωτεϊνών παρουσιάζεται στην εικόνα Π.12. Η συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford.



**Εικόνα Π.12:** Χρώση ολικών πρωτεϊνών των μετασχηματισμένων κυττάρων *S. cerevisiae* με Coomassie Blue

Διαδρομή 1: Μάρτυρας μοριακών βαρών SDS-PAGE

Διαδρομή 2: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190

Διαδρομή 3: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asynWT

Διαδρομή 4: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asyn112

Διαδρομή 5: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asynA53T

Διαδρομή 6: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190asynA30P

Η απομόνωση και η χρώση κρίθηκαν επιτυχημένες, μιας και παρατηρούνται πρωτεϊνικές ζώνες σε όλο το μήκος του ηλεκτώματος πολυακρυλαμιδίου.

## **Π5.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA του *Saccharomyces cerevisiae* και πραγματοποίηση PCR για την ανίχνευση γονιδίων υπό μελέτη**

Κατά συνέπεια στην πρώτη φάση απομονώθηκε το γονιδιωματικό DNA από τα κύτταρα *S. cerevisiae* BY4741. Η φωτογραφία της ηλεκτροφόρησής του παρουσιάζεται στην εικόνα Π.13.

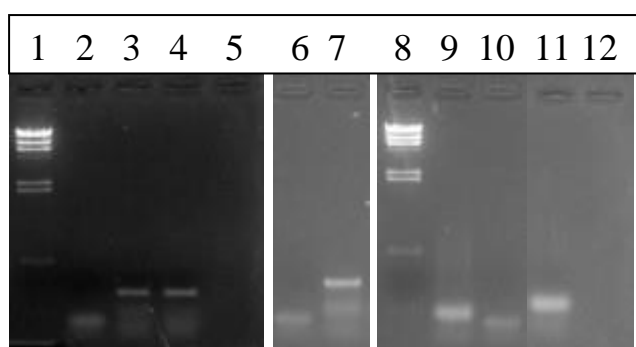


**Εικόνα Π.13: Απομόνωση γονιδιωματικού DNA *S. cerevisiae***

Διαδρομή 1:  $\lambda$ HindIII

Διαδρομή 2: Γονιδιωματικό DNA *S. cerevisiae* BY4741

Παράλληλα, με βάση τις αλληλουχίες των παραπάνω γονιδίων σχεδιάστηκαν εκκινητές για την πραγματοποίηση της qPCR (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3). Στη συνέχεια, οι εκκινητές αυτοί χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα PCR με υπόστρωμα το παραπάνω γονιδιωματικό DNA από *S. cerevisiae* BY4741, ώστε να ελεγχθεί η σωστή πρόσδεσή τους στις αντίστοιχες γονιδιακές περιοχές και να εξασφαλιστούν οι συνθήκες της αντίδρασης. Με αυτό τον τρόπο θα εξασφαλιζόταν η πιστότητα των προϊόντων μελλοντικών πειραμάτων. Τα πειράματα PCR πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το αντίστοιχο πρωτόκολλο όπως αναφέρεται για τα εκάστοτε γονίδια στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR παρουσιάζονται στην εικόνα Π.14.



**Εικόνα Π.14: Ηλεκτροφόρηση αгарόζης των προϊόντων PCR που αντιστοιχούν σε περιοχές των μελετώμενων γονιδίων του γονιδιωματικού DNA από *S.cerevisiae* BY4741**

Διαδρομές 1 και 8:  $\lambda$ HindIII

Διαδρομή 2: Αρνητικός μάρτυρας PCR για το *ATG8*

Διαδρομή 3: Προϊόν PCR από την περιοχή του *ATG8* (αναμενόμενο μέγεθος 226 bp)

Διαδρομή 4: Προϊόν PCR από την περιοχή του *TSL1* (αναμενόμενο μέγεθος 200 bp)

Διαδρομή 5: Αρνητικός μάρτυρας PCR για το *TSL1*

Διαδρομή 6: Αρνητικός μάρτυρας PCR για το *TPS1*

Διαδρομή 7: Προϊόν PCR από την περιοχή του *TPS1* (αναμενόμενο μέγεθος 191 bp)

Διαδρομή 9: Προϊόν PCR από την περιοχή του *TPS2* (αναμενόμενο μέγεθος 189 bp)

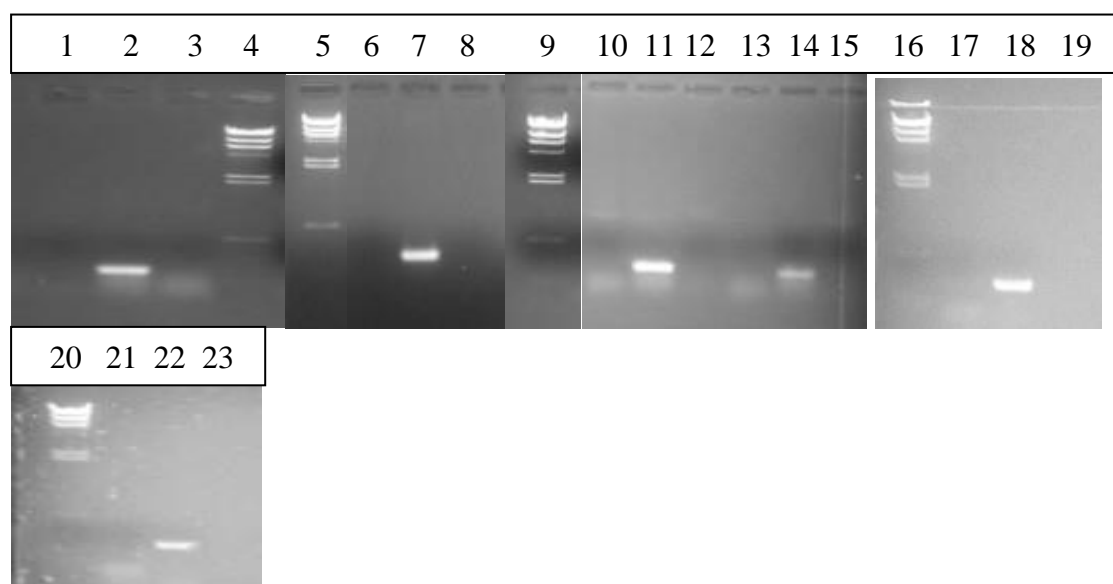
Διαδρομή 10: Αρνητικός μάρτυρας PCR για το *TPS2*

Διαδρομή 11: Προϊόν PCR από την περιοχή του *TOR1* (αναμενόμενο μέγεθος 192 bp)  
 Διαδρομή 12: Αρνητικός μάρτυρας PCR για το *TOR1*

Από την ηλεκτροφόρηση φαίνεται ότι κάθε προϊόν PCR φέρει το αναμενόμενο μέγεθος που προέκυψε από το σχεδιασμό των εκκινητών για κάθε τμήμα των γονιδίων. Το προϊόν του *ATG8* φέρει μέγεθος 226 bp, του *TSL1* 200 bp, του *TPS1* 191 bp, του *TPS2* 189 bp και του *TOR1* 192 bp. (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3). Κατά συνέπεια, η ενίσχυση των τμημάτων των μελετώμενων γονιδίων στο γονιδιωματικό DNA του ζυμομύκητα ήταν επιτυχής και οι σχεδιασμένοι εκκινητές είναι ειδικοί των αλληλουχιών για τις οποίες σχεδιάστηκαν.

## **Π5.2 RT-PCR για τον εντοπισμό των μεταγράφων των μελετώμενων γονιδίων στα κύτταρα *S.cerevisiae***

Έπειτα από την επιτυχή ενίσχυση των τμημάτων των μελετώμενων γονιδίων στο γονιδιωματικό DNA των κυττάρων του ζυμομύκητα κρίθηκε σκόπιμο να ελεγχθεί και η ύπαρξη των μεταγράφων τους στο mRNA που συλλέγεται κατά την απομόνωση του ολικού RNA των κυττάρων. Ο έλεγχος αυτός διασφαλίζει τη διεξαγωγή των μελετών Real Time PCR/qPCR, οι οποίες θα ακολουθήσουν και περιγράφονται πιο κάτω. Ακόμη ελέγχθηκε και το προϊόν της RT-PCR του *SNCA* με νέους εκκινητές, κατάλληλους για μελέτες Real Time PCR/qPCR. (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3). Τα παρασκευάσματα cDNA από τα ολικά RNA των κυττάρων *S.cerevisiae* που απομονώθηκαν σε προγενέστερα πειράματα (ενότητα Π3.1) χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για τις αντιδράσεις RT-PCR, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναφέρεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι (ενότητα 3.3.24). Τα προϊόντα των αντιδράσεων RT-PCR παρουσιάζονται στην εικόνα Π.15.



**Εικόνα Π.15: RT-PCR για τον εντοπισμό των μεταγράφων των μελετώμενων γονιδίων στο ολικό RNA από κύτταρα *S.cerevisiae***

Διαδρομή 4, 5, 9, 16 & 20: λ *Hind*III

Διαδρομή 1: αρνητικός μάρτυρας μη αντίστροφης μεταγραφής/ *TSL1* (υπόστρωμα RNA)

Διαδρομή 3: cDNA *TSL1*

Διαδρομή 4: αρνητικός μάρτυρας της RT-PCR (χωρίς υπόστρωμα cDNA ή RNA)/ *TSL1*

Διαδρομή 6: αρνητικός μάρτυρας μη αντίστροφης μεταγραφής/*SNCA* (υπόστρωμα RNA)

Διαδρομή 7: cDNA *SNCA*  
Διαδρομή 8: αρνητικός μάρτυρας της RT-PCR (χωρίς υπόστρωμα cDNA ή RNA)/ *SNCA*  
Διαδρομή 10: αρνητικός μάρτυρας μη αντίστροφης μεταγραφής/ *TPS1* (υπόστρωμα RNA)  
Διαδρομή 11: cDNA *TPS1*  
Διαδρομή 12: αρνητικός μάρτυρας της RT-PCR (χωρίς υπόστρωμα cDNA ή RNA)/*TPS1*  
Διαδρομή 13: αρνητικός μάρτυρας μη αντίστροφης μεταγραφής/ *ATG8* (υπόστρωμα RNA)  
Διαδρομή 14: cDNA *ATG8*  
Διαδρομή 15: αρνητικός μάρτυρας της RT-PCR (χωρίς υπόστρωμα cDNA ή RNA)/ *ATG8*  
Διαδρομή 17: αρνητικός μάρτυρας μη αντίστροφης μεταγραφής/ *TPS2* (υπόστρωμα RNA)  
Διαδρομή 18: cDNA *TPS2*  
Διαδρομή 19: αρνητικός μάρτυρας της RT-PCR (χωρίς υπόστρωμα cDNA ή RNA)/ *TPS2*  
Διαδρομή 21: αρνητικός μάρτυρας μη αντίστροφης μεταγραφής/ *TOR1* (υπόστρωμα RNA)  
Διαδρομή 22: cDNA *TOR1*  
Διαδρομή 23: αρνητικός μάρτυρας της RT-PCR (χωρίς υπόστρωμα cDNA ή RNA)/ *TOR1*

Όπως παρατηρείται από τις εικόνες των RT-PCR, κάθε μελετώμενο γονίδιο φέρει μετάγραφο το οποίο ενισχύεται κατά τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν στα αναμενόμενα πρότυπα μεγέθους, όπως αναφέρθηκαν και στην προηγούμενη ενότητα. Ακόμη το μέγεθος του τμήματος του μεταγράφου του *SNCA* ανέρχεται στα 180 bp, όπως και αναμένεται. Επιπλέον, η πιστότητα των αποτελεσμάτων διασφαλίζεται και από το γεγονός πως σε κανενός είδους αρνητικό μάρτυρα των RT-PCR δεν λαμβάνονται ζώνες που να αντιστοιχούν σε κάποιο προϊόν ενίσχυσης, εκτός των διμερών που σχηματίζουν σε ορισμένες περιπτώσεις οι εκκινητές των αντιδράσεων.

## **Π6 Αποδοτικότητα της ενίσχυσης στις μελέτες qPCR (amplification efficiency)**

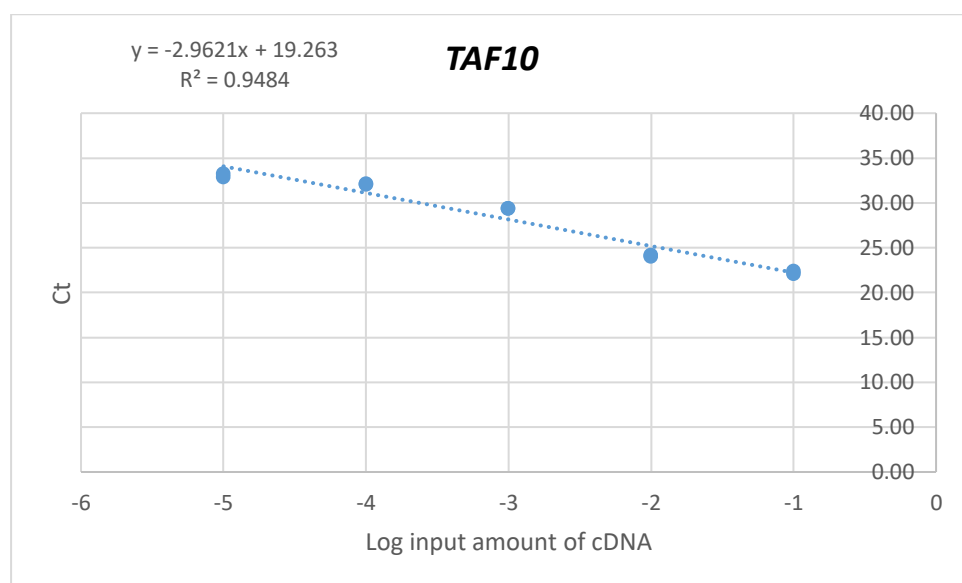
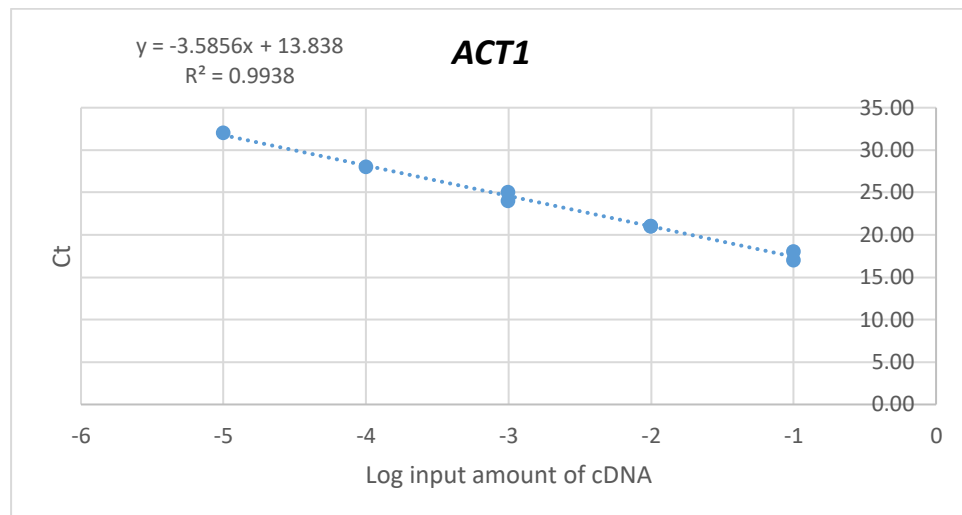
Πρώτο βήμα της διαδικασίας μελετών qPCR είναι η εύρεση της αποδοτικότητας της ενίσχυσης (amplification efficiency). Στο βήμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν όλα τα ζεύγη εκκινητών όλων των μελετώμενων γονιδίων με υπόστρωμα cDNA από την εκθετική φάση ανάπτυξης ( $OD=2$ ) σε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Αυτό γίνεται, για να εκτιμηθεί η καταλληλότερη συγκέντρωση υποστρώματος για μια συγκεκριμένη συγκέντρωση εκκινητών, το καταλληλότερο γονίδιο αναφοράς, η επαναληψιμότητα της διαδικασίας αλλά και η αποδοτικότητα των εκκινητών και κατ' επέκταση της ενίσχυσης. Η εκτίμηση της καταλληλότερης συγκέντρωσης βασίζεται στην τιμή  $C_i$ , η οποία αντιπροσωπεύει τον αριθμό των απαραίτητων κύκλων ενίσχυσης στον οποίο οι τιμές των σημάτων φθορισμού φανερώνουν την εκκίνηση της εκθετικής ενίσχυσης του προϊόντος. Σε απόλυτες τιμές το εύρος των τιμών  $C_i$  καθορίζεται μεταξύ 20-30, ώστε οι αναλύσεις να λαμβάνουν χώρα μεταξύ μεγάλου και συνάμα επαρκούς αριθμού ενισχυόμενων μορίων.

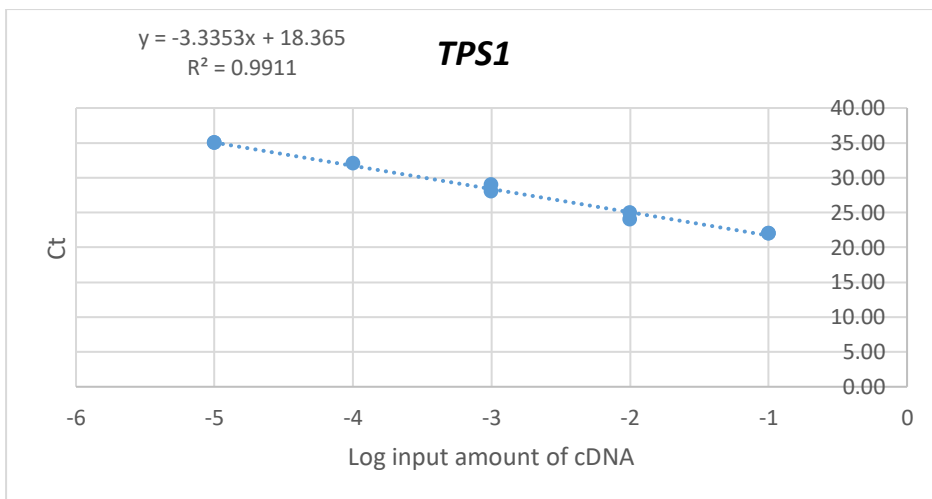
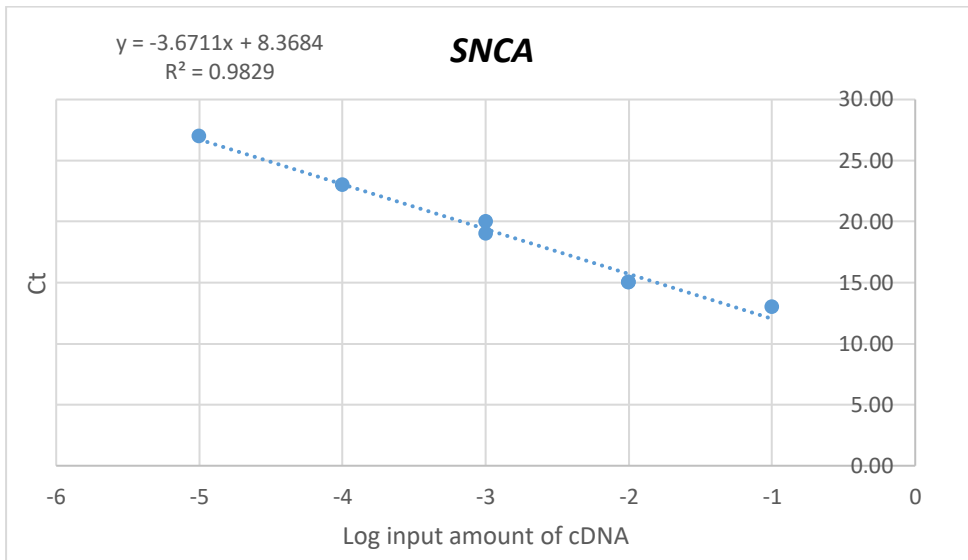
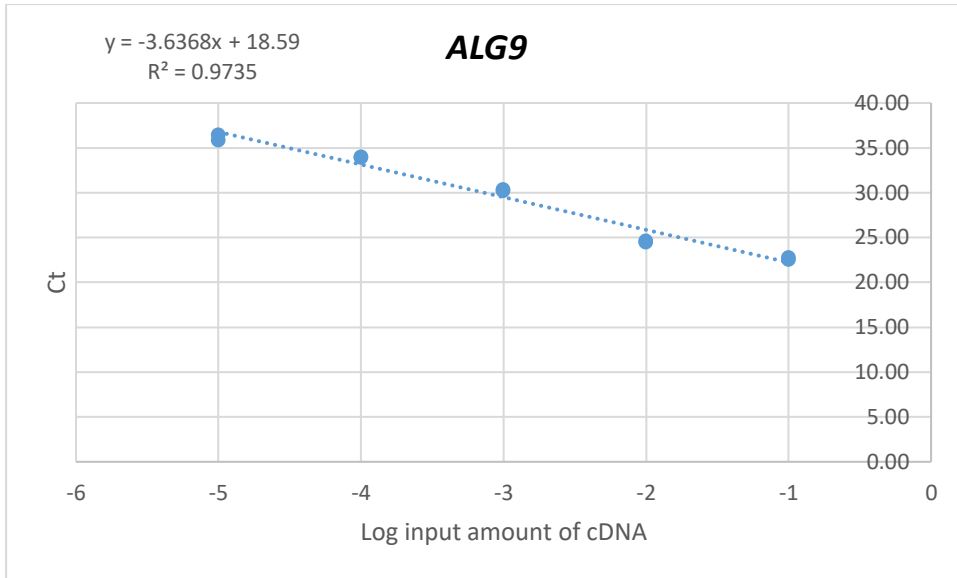
Στο βήμα της αποδοτικότητας της ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα ποσότητες cDNA που αντιστοιχούν σε συγκέντρωση 50 ng RNA ανά αντίδραση και 4 υπο-δεκαπλάσιες και διαδοχικές αραιώσεις αυτής. Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε για τα υπό μελέτη γονίδια *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *ATG8*, *TOR1* και *SNCA* καθώς και για τα υποψήφια γονίδια αναφοράς *ACT1*, *TAF10* και *ALG9*, τα οποία επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν με σκοπό την ανάλυση των αποτελεσμάτων με σχετική ποσοτικοποίηση (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3). Κάθε αντίδραση σε αυτή τη διαδικασία για τα παραπάνω γονίδια πραγματοποιήθηκε εις διπλούν, ενώ απαραίτητη ήταν και η παρουσία των αρνητικών μαρτύρων χωρίς υπόστρωμα αντίδρασης.

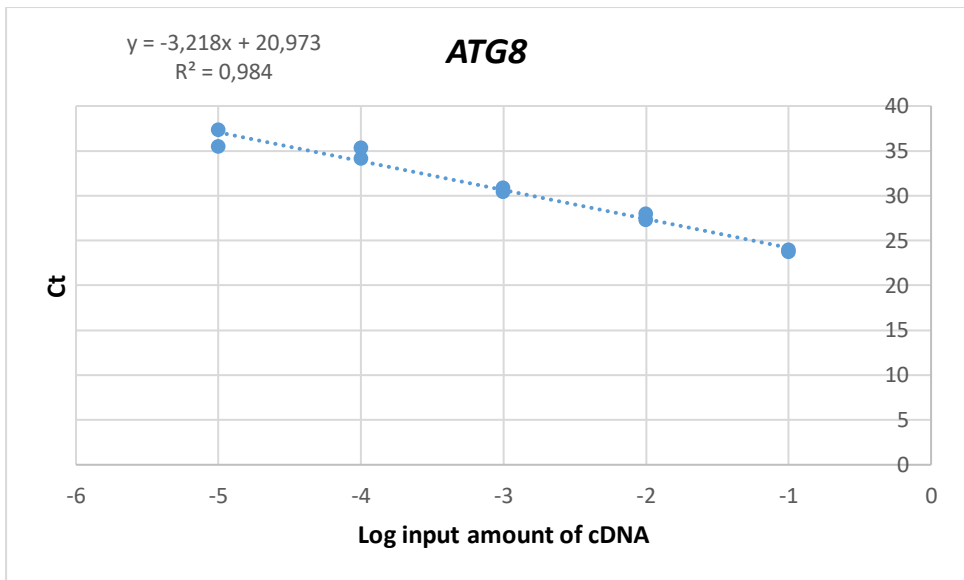
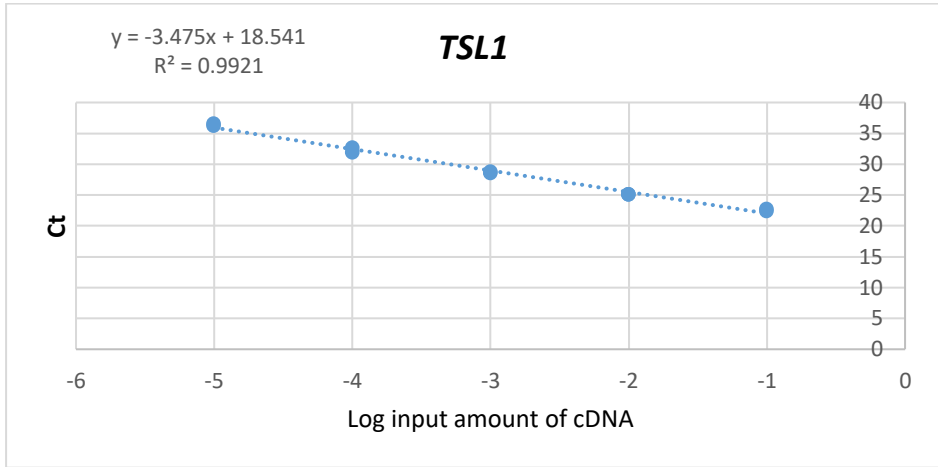
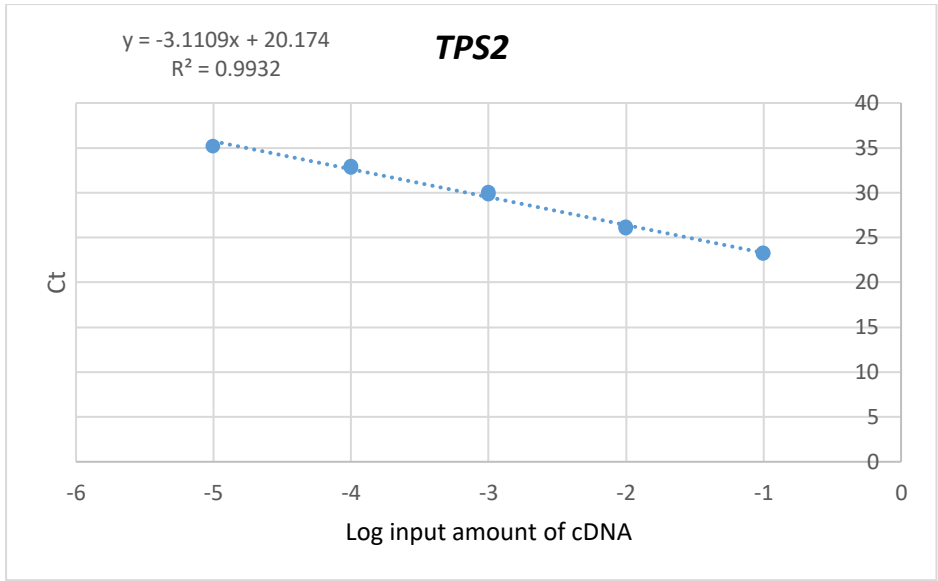


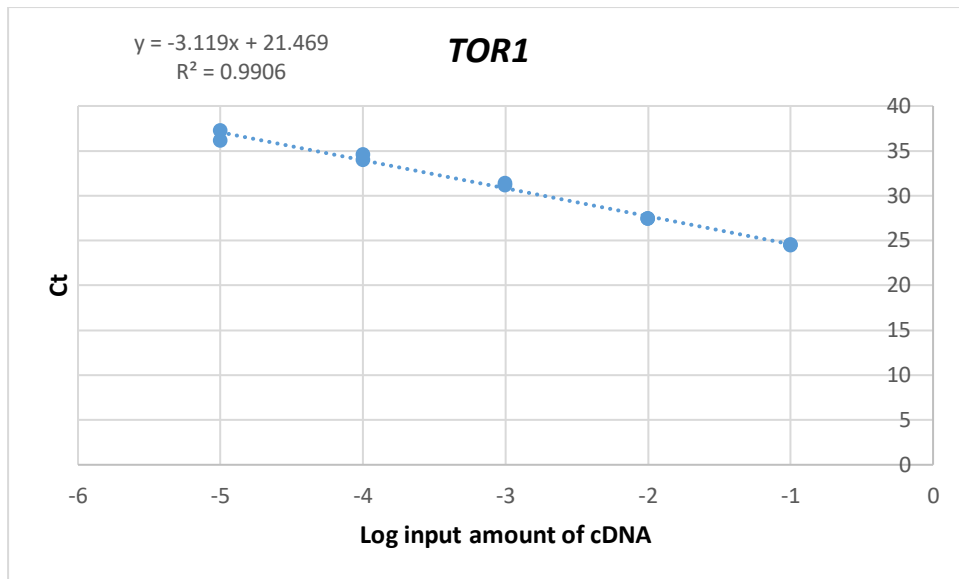
Το θερμοκρασιακό προφίλ-πρωτόκολλο όλων των αντιδράσεων qPCR της παρούσας διατριβής αποδίδεται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής κατασκευάστηκαν και παρουσιάζονται στην εικόνα Π.16 οι πρότυπες καμπύλες αποδοτικότητας των εκκινητών του εκάστοτε προς μελέτη γονιδίου αλλά και των υποψήφιων γονιδίων αναφοράς.









**Εικόνα Π.16: Πρότυπες καμπύλες και βέλτιστες ευθείες των μελετώμενων γονιδίων της qPCR**

Σε κάθε μία από τις πρότυπες καμπύλες των μελετώμενων γονιδίων θα πρέπει να εμφανίζεται τιμή  $R^2 > 0,98$  ώστε να υπάρχει γραμμικότητα και επαναληψιμότητα των τιμών που λαμβάνονται για κάθε αντίδραση qPCR. Για τα γονίδια *ALG9* και *TAF10* αυτό δεν επετεύχθη, οπότε και απορρίφθηκαν από κάθε επόμενη μελέτη.

Για τα υπόλοιπα γονίδια των οποίων η τιμή  $R^2$  αποτελούσε έγκυρο αποτέλεσμα υπολογίστηκαν οι αποδοτικότητες ενίσχυσης των εκκινητών τους, οι οποίες προέκυψαν από τον τύπο  $E$  (efficiency) =  $10^{-1/\text{κλίση}}$ . Υπενθυμίζεται πως το επιτρεπόμενο όριο αποδοτικότητας για την εγκυρότητα των μελετών qPCR αποτελούν τιμές  $E=1,9-2,1$  ή 90%-110%. Οπότε οι τιμές που προέκυψαν ήταν οι εξής:

- I.  $Ef(ACT1)=1,95$
- II.  $Ef(SNCA)=1,87$
- III.  $Ef(TPS1)=2$
- IV.  $Ef(TPS2)=2$
- V.  $Ef(TSL1)=1,96$
- VI.  $Ef(ATG8)=2$
- VII.  $Ef(TOR1)=2,1$

Οι τιμές αυτές βρίσκονται στα επιθυμητά πλαίσια και το πρώτο στάδιο των μελετών qPCR θεωρήθηκε επιτυχημένο ως προς την εγκυρότητα και την επαναληψιμότητα που διέπουν την τεχνική.

Επίσης, μετά την απόρριψη των άλλων δύο υποψηφίων γονιδίων αναφοράς *ALG9* και *TAF10*, χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς κάθε μελέτης το *ACT1* (ακτίνη).

Η συγκέντρωση υποστρώματος cDNA σε κάθε αντίδραση ήταν εκείνη που αντιστοιχούσε σε 0,5 ng RNA. Επιλέχθηκε, διότι οι λαμβανόμενες τιμές  $C_t$  τόσο όλων των υπό μελέτη γονιδίων όσο και του γονιδίου αναφοράς συνέκλιναν σε αυτή τη συγκέντρωση που βρισκόταν επιπλέον εντός του ιδανικού εύρους μεταξύ των 20 έως 30 κύκλων ενίσχυσης.

## Πίνακας Π.1

Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae* με μηδενική υπόθεση την αντίστοιχη φάση της συνθήκης βαθμονόμησης για την κάθε συνθήκη μελέτης. Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με EXP η εκθετική φάση, με PD η μετα-διαυξική φάση και με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η φάση ανάπτυξης, στην οποία αντιστοιχεί η κάθε τιμή του λόγου έκφρασης.

Αναλογία=Παρουσία <i>SNCA</i> /Απουσία <i>SNCA</i>									
	<i>TPS1</i>			<i>TPS2</i>			<i>TSL1</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P Value	Mean	S.D.	P value
<b>PE</b>	0,98	0,95-1,29	0,7401525	0,87	0,79-1,00	0,262958	1,67	1,30-2,00	0,347935
<b>EXP</b>	1,05	1,00-1,12	0,8935643	1,50	1,22-1,68	0,073249	0,71	0,70-0,72	0,42915
<b>PD</b>	0,45	0,42-0,47	0,4727547	1,14	0,97-1,40	0,738766	2,40	1,99-2,90	0,269433
<b>ST</b>	0,28	0,27-0,30	6,29944E-05	0,83	0,829-0,84	0,14056	2,97	2,52-3,56	0,001037

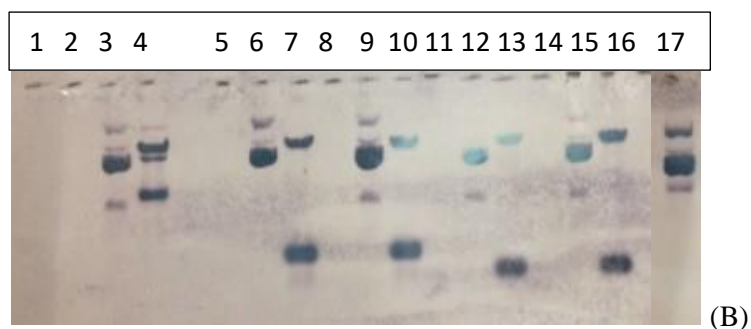
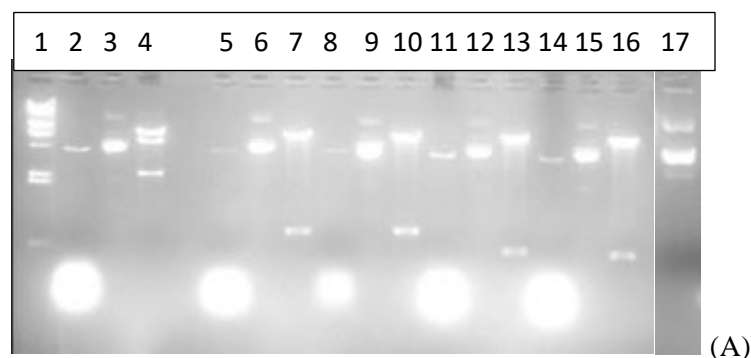
Αναλογία=Παρουσία <i>SNCA</i> /Απουσία <i>SNCA</i>						
	<i>TOR1</i>			<i>ATG8</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
<b>PE</b>	0,94	0,89-0,95	0,976745	1,52	1,40-1,78	0,070438775
<b>EXP</b>	0,65	0,58-0,73	0,076236	0,40	0,38-0,42	0,053731489
<b>PD</b>	1,29	1,16-1,43	0,37	0,90	0,70-1,10	0,139818517
<b>ST</b>	1,16	1,14-1,20	0,664215	0,43	0,23-0,63	0,006471589

## Π.7 Μετασχηματισμός του πλασμιδίου pCM190 και των ανασυνδυασμένων κλώνων του στα μεταλλαγμένα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 για τη βιοσύνθεση της τρεχαλόζης

Από τις αποικίες ζυμομυκήτων που προέκυψαν στα τρυβλία του μετασχηματισμού απομονώθηκαν τα πλασμιδιακά τους DNA, τα οποία για να ανακτηθούν μετασχηματίστηκαν εκ νέου σε κύτταρα *E. coli* DH5a. Το σύνολο των πλασμιδιακών εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από τα παραπάνω στελέχη ζυμομυκήτων υποβλήθηκαν σε υβριδισμό κατά Southern, με μόριο-ιχνηθέτη το ίδιο τμήμα DNA του γονιδίου *SNCA*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στον προηγούμενο υβριδισμό στην παράγραφο Π2.4 των Παραρτημάτων και είχε προέλθει από αντίδραση PCR. Ο σκοπός του υβριδισμού αφορούσε την επιβεβαίωση της ύπαρξης της εκάστοτε μορφής του γονιδίου στα μελετώμενα μεταλλαγμένα στελέχη. Για τον διαχωρισμό των τμημάτων των ένθεσης από τον ανασυνδυασμένο φορέα στην πηκτή αгарόζης σχεδιάστηκαν κατάλληλες περιοριστικές πέψεις που αφορούσαν την περιοχή του πολυσυνδέτη στον φορέα έκφρασης ή θέσεις κοντινές σε αυτόν. Η περιοριστική πέψη του pCM190 σχεδιάστηκε ώστε να διαχωρίζεται στην ζώνη χαμηλού μοριακού βάρους η περιοχή του πολυσυνδέτη. Τα αναμενόμενα μεγέθη των ζωνών είναι 5719 bp και 2293 bp. Εάν ο πολυσυνδέτης έφερε επιπλέον κάποια ένθεση DNA, όπως το γονίδιο *SNCA*, το μέγεθος της ζώνης χαμηλότερου μοριακού βάρους θα αύξανε κατά περισσότερα από 500 περίπου bp. Στην συνέχεια, για κάθε δείγμα πλασμιδικού DNA προς μελέτη σχεδιάστηκαν περιοριστικές πέψεις, οι οποίες διαχώριζαν την περιοχή

του πολυσυνδέτη μαζί με το γονίδιο SNCA για τα δείγματα pCM190asynWT και pCM190asyn112 (διαδρομές 7 και 10) και την περιοχή του γονιδίου για τα δείγματα pCM190asynA53T και pCM190asynA30P. Για το δείγμα pCM190asynWT η περιοριστική πέψη αποδίδει μία ζώνη μεγάλου μοριακού βάρους ίση με 7706 bp και μία χαμηλότερου 814 bp, η οποία αντιστοιχεί στο τμήμα του φορέα με την ένθεση. Για το δείγμα pCM190asyn112 η περιοριστική πέψη αποδίδει μία ζώνη μεγάλου μοριακού βάρους ίση με 7534 bp και μία χαμηλότερου 860bp, η οποία αντιστοιχεί στο τμήμα του φορέα με την ένθεση. Για τα δείγματα pCM190asynA53T και pCM190asynA30P πραγματοποιήθηκαν πέψεις οι οποίες αναγνωρίζουν σημεία εντός της αντίστοιχης ένθεσης και αποδίδουν μία ζώνη υψηλού μοριακού βάρους 8.180 bp και μία μικρότερη με μέγεθος 394 bp, η οποία αντιστοιχεί στο μεγαλύτερο τμήμα της αρχικής ένθεσης.

Οι εικόνες των ηλεκτροφορήσεων των πλασμιδιακών DNA και των αντίστοιχων φίλτρων υβριδισμού για τον κάθε τύπο μεταλλαγμένου κυττάρου παρουσιάζονται στις εικόνες Π.17, Π.18 και Π.19.



**Εικόνα Π.17: Υβριδισμός κατά Southern με το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης για τα πλασμιδιακά εκχλίσματα των κυττάρων BY4741 *tps1Δ*. Πήκτωμα αγαρόζης (A) και φίλτρο υβριδισμού (B)**

Διαδρομή 1:  $\lambda$  *Hind*III

Διαδρομή 2: BY4741/ *tps1Δ*/ pCM190

Διαδρομή 3: *E.coli*/ pCM190

Διαδρομή 4: πέψη/ *E.coli*/ pCM190 με *Sal*I και *Pst*I

Διαδρομή 5: BY4741/ *tps1Δ*/ pCM190asynWT

Διαδρομή 6: *E.coli*/ pCM190asynWT

Διαδρομή 7: πέψη/ *E.coli*/ pCM190asynWT με *Hind*III

Διαδρομή 8: BY4741/ *tps1Δ*/ pCM190asyn112

Διαδρομή 9: *E.coli*/ pCM190asyn112

Διαδρομή 10: πέψη/ *E.coli*/ pCM190asyn112 με *Kpn*I και *Hind*III

Διαδρομή 11: BY4741/ *tps1Δ*/ pCM190asynA53T

Διαδρομή 12: *E.coli*/ pCM190asyn A53T  
Διαδρομή 13: πέψη/ *E.coli*/ pCM190asynA53T με *Bam*HI  
Διαδρομή 14: BY4741/ *tps1Δ*/ pCM190asynA30P  
Διαδρομή 15: *E.coli*/ pCM190asynA30P  
Διαδρομή 16: πέψη/ *E.coli*/ pCM190asynA30P με *Bam*HI  
Διαδρομή 17: θετικός μάρτυρας BY4741/ pCM190asynWT

Με βάση την εικόνα του παραπάνω υβριδισμού, θα πρέπει αρχικά να αναφερθεί πως οι αρνητικοί μάρτυρες του πειράματος αποτέλεσαν ο δείκτης μοριακών βαρών  $\lambda$ /*Hind*III και το πλασμίδιο pCM190 είτε άκοπο είτε κομμένο (διαδρομές 3 και 4). Ο  $\lambda$ /*Hind*III πράγματι δεν παρουσίασε κάποιο σήμα υβριδισμού. Ωστόσο στα δείγματα του pCM190 παρατηρείται ισχυρό σήμα υβριδισμού, γεγονός το οποίο είχε παρατηρηθεί και στο παρελθόν (Σφήκας E., Πτυχιακή Εργασία, 2011) και οφείλεται σε μικρή αλληλουχιακή ομοιότητα του *SNCA* με τον εν λόγω πλασμιδιακό φορέα. Παράλληλα ο θετικός μάρτυρας του πειράματος αποτέλεσε το πλασμίδιο pCM190asynWT στην διαδρομή 17, το οποίο και ορθώς έχει παρουσιάσει έντονο σήμα υβριδισμού.

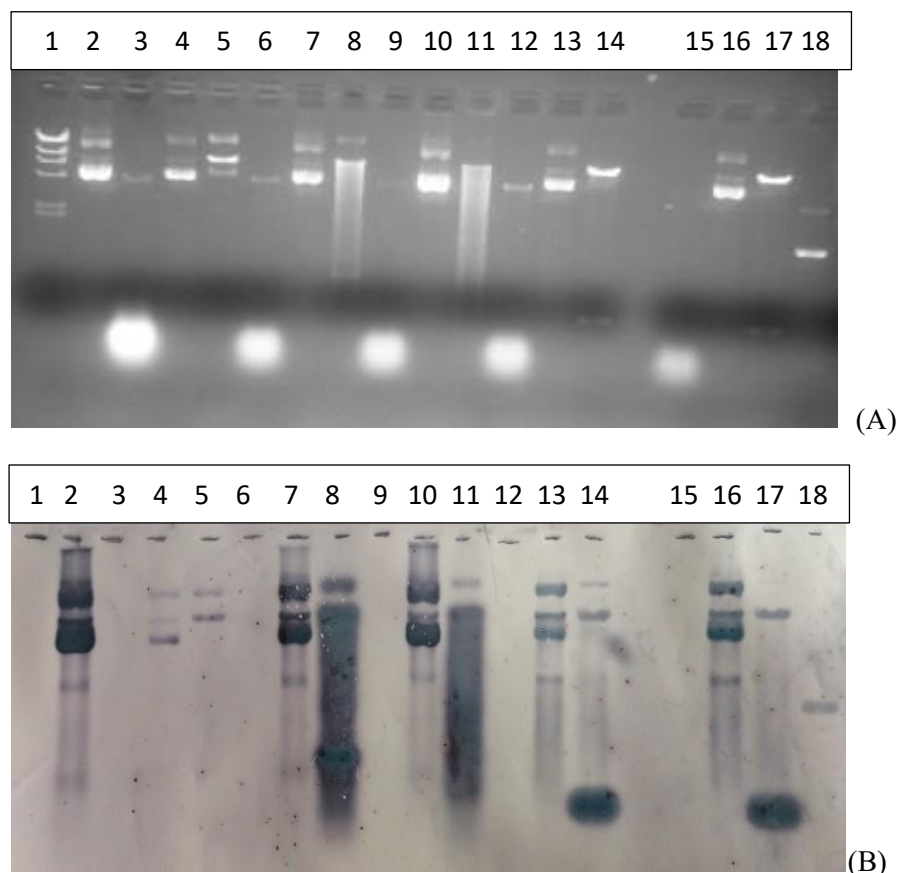
Ο υβριδισμός ήταν επιτυχημένος τόσο στα άκοπα δείγματα των ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών DNA (διαδρομές 6, 9, 12 και 15) όσο και στα δείγματα των περιοριστικών πέψεων (διαδρομές 7, 10, 13 και 16), ιδιαίτερα στα υψηλής έντασης σήματα που αντιστοιχούν στις ζώνες χαμηλού μοριακού βάρους, όπου βρίσκεται και η ένθεση της εκάστοτε μορφής του *SNCA*. Οι ζώνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους στις περιοριστικές πέψεις περιέχουν κυρίως το τμήμα του φορέα χωρίς την ένθεση, ωστόσο φαίνεται να παρουσιάζουν σήμα υβριδισμού λόγω πιθανών άκοπων μορίων DNA που παρέμειναν μετά την πέψη.

Τέλος, όπως είχε διαφανεί και στον προηγούμενο υβριδισμό στην παράγραφο 4.6 τα πλασμιδιακά εκχυλίσματα που προέρχονται από την απομόνωση από κύτταρα ζυμομυκήτων (διαδρομές 5, 8, 11 και 14) δεν παρουσίασαν σήμα υβριδισμού, πιθανότατα λόγω χαμηλής συγκέντρωσης DNA. Αυτός είναι και ένας από τους λόγους που για να υπάρξει πλήρης ανάκτηση των αρχικών πλασμιδίων απαιτείται εκ νέου μετασχηματισμός των απομονωθέντων σε κύτταρα *E. coli* DH5a.

Συνοψίζοντας και σχολιάζοντας συνολικά τα αποτελέσματα του υβριδισμού κρίνεται πως ο μετασχηματισμός των ανασυνδυασμένων κλώνων του pCM190 στα κύτταρα *tps1Δ* ήταν επιτυχημένος, μιάς και επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης στα πλασμιδιακά εκχυλίσματα των κυττάρων.

Στον παρακάτω υβριδισμό ο οποίος έλαβε χώρα για τα πλασμιδιακά εκχυλίσματα των κυττάρων BY4741 *tps2Δ* στο πήκτωμα αγαρόζης περιέχονταν τα αντίστοιχα πλασμιδιακά DNA όπως και σε εκείνον για τα κύτταρα BY4741 *tps1Δ* με την ίδια σχεδίαση όσον αφορά τις περιοριστικές πέψεις. Εκείνο που διαφοροποιήθηκε ωστόσο ήταν η πραγματοποίηση περιοριστικής πέψης του φορέα pCM190 με ένα μόνο ένζυμο, την *Bam*HI, το οποίο αναγνωρίζει μία μοναδική θέση περιορισμού στον πολυσυνδέτη του πλασμιδίου και η φόρτωση ενός δείγματος πλασμιδιακού DNA του φορέα κλωνοποίησης pBluescript II SK (+). Ο σχεδιασμός αυτός πραγματοποιήθηκε λόγω της αδυναμίας του pCM190 να λειτουργήσει ικανοποιητικά ως αρνητικός μάρτυρας υβριδισμού, γεγονός το οποίο προέκυψε από προηγούμενους υβριδισμούς λόγω αλληλουχιακής ομοιότητας με το *SNCA*. Κατά συνέπεια σχεδιάστηκε να φορτωθεί ως αρνητικός μάρτυρας ο φορέας pBluescript II SK(+) και να πραγματοποιηθεί περιοριστική πέψη του pCM190 σε μία μοναδική θέση ώστε να διαφαίνεται η πραγματική διαφοροποίηση μοριακών μεγεθών μεταξύ κλώνων και

φορέα στην ηλεκτροφόρηση και τον υβριδισμό. Άλλωστε η *Bam*HI, όπως μαρτυρούν και οι πέψεις των pCM190asynA53T και pCM190asynA30P αναγνωρίζει μία θέση περιορισμού και εσωτερικά του γονιδίου *SNCA*.



**Εικόνα Π.18: Υβριδισμός κατά Southern με το γονίδιο της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης για τα πλασμδιακά εκγλιίσματα των κυττάρων BY4741 *tps2Δ*. Πήκτωμα αραρόζης (A) και φίλτρου υβριδισμού (B)**

Διαδρομή 1:  $\lambda$ / *Hind*III

Διαδρομή 2: θετικός μάρτυρας BY4741/ pCM190asynWT

Διαδρομή 3: BY4741/ *tps2Δ*/ pCM190

Διαδρομή 4: *E.coli*/ pCM190

Διαδρομή 5: πέψη/ *E.coli*/ pCM190 με *Bam*HI

Διαδρομή 6: BY4741/ *tps2Δ*/ pCM190asynWT

Διαδρομή 7: *E.coli*/ pCM190asynWT

Διαδρομή 8: πέψη/ *E.coli*/ pCM190asynWT με *Hind*III

Διαδρομή 9: BY4741/ *tps2Δ*/ pCM190asyn112

Διαδρομή 10: *E.coli*/ pCM190asyn112

Διαδρομή 11: πέψη/ *E.coli*/ pCM190asyn112 με *Kpn*I και *Hind*III

Διαδρομή 12: BY4741/ *tps2Δ*/ pCM190asynA53T

Διαδρομή 13: *E.coli*/ pCM190asyn A53T

Διαδρομή 14: πέψη/ *E.coli*/ pCM190asynA53T με *Bam*HI

Διαδρομή 15: BY4741/ *tps2Δ*/ pCM190asynA30P

Διαδρομή 16: *E.coli*/ pCM190asynA30P

Διαδρομή 17: πέψη/ *E.coli*/ pCM190asynA30P με *Bam*HI

Διαδρομή 18: pBluescript II SK+

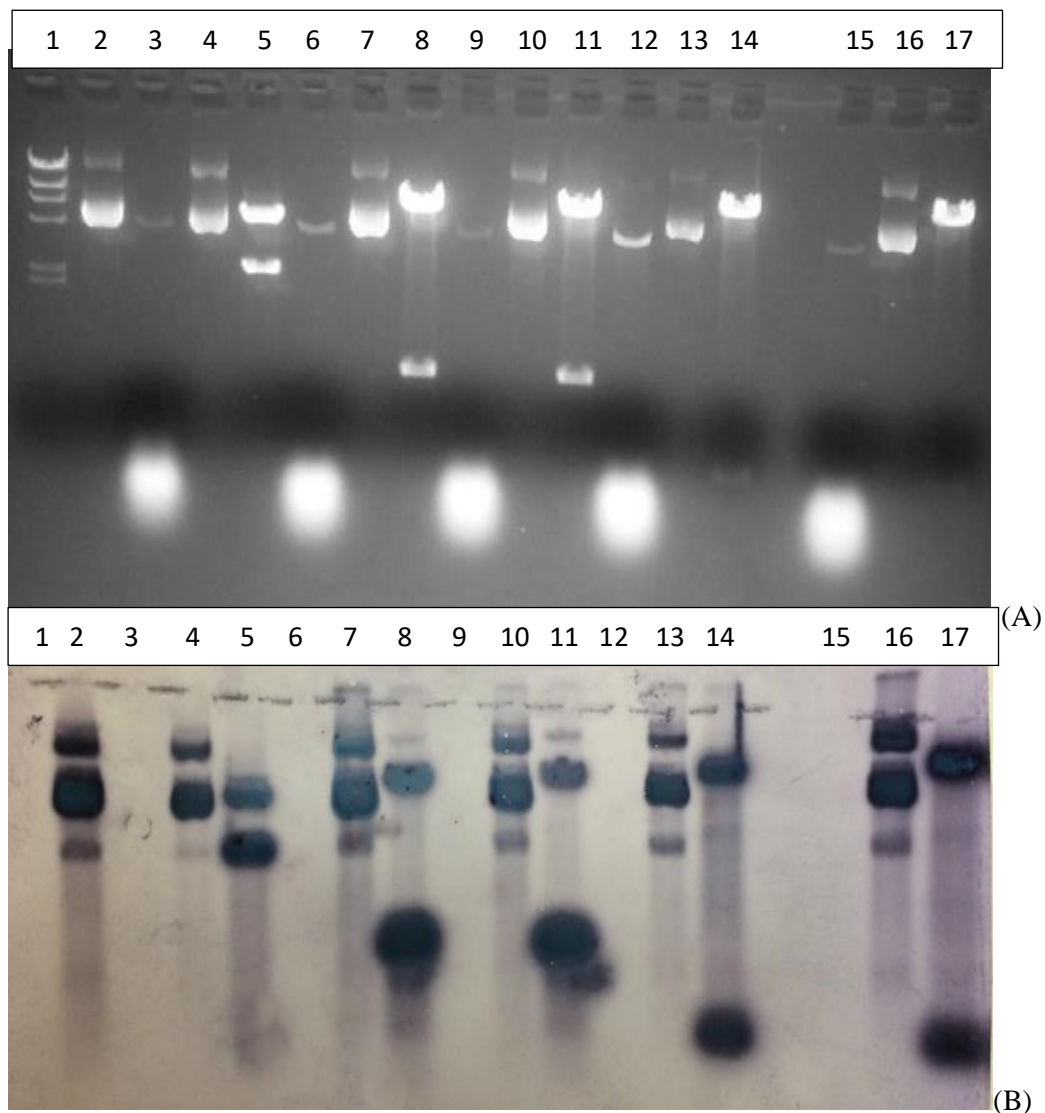
Σε αυτόν τον υβριδισμό οι αρνητικοί μάρτυρες ήταν οι  $\lambda$ /*Hind*III, pCM190 και pBluescript II SK+. Ο  $\lambda$ /*Hind*III πράγματι δεν παρουσίασε σήμα υβριδισμού, ενώ ο



pBluescript II SK+ (διαδρομή 18) πράγματι λειτούργησε καλύτερα από τον pCM190 ως αρνητικός μάρτυρας, αφού παρουσίασε χαμηλό σήμα υβριδισμού, το οποίο δύναται να παρατηρηθεί σε μεγάλη ποσότητα DNA ή μικρή ομολογία βάσεων. Σε αυτό τον υβριδισμό ωστόσο, λειτούργησε καλύτερα και ο pCM190 ως αρνητικός μάρτυρας (διαδρομές 4 και 5), ο οποίος παρουσίασε χαμηλό σήμα υβριδισμού. Παράλληλα παρά την μερική αντίδραση περιοριστικής πέψης, το δείγμα του φορέα δεν παρουσιάζει ζώνες με χαμηλό μοριακό βάρος, εν τη απουσία ένθεσης. Επίσης, ως θετικός μάρτυρας φορτώθηκε το πλασμίδιο pCM190asynWT (διαδρομή 2), το οποίο και παρουσίασε υψηλό σήμα υβριδισμού.

Στα υπόλοιπα δείγματα ο υβριδισμός παρουσίασε τα αναμενόμενα σήματα τόσο στα άκοπα DNA όσο και ειδικότερα στις ζώνες χαμηλού μοριακού βάρους των περιοριστικών πέψεων, οι οποίες περιείχαν και το εκάστοτε τμήμα του *SNCA* (διαδρομές 8, 14 και 17). Δυστυχώς, στις πέψεις των pCM190asynWT (διαδρομή 8) και pCM190asyn112 (διαδρομή 11) με το ένζυμο *HindIII* πραγματοποιήθηκε κατακερματισμός του DNA λόγω ατελούς δράσης του ενζύμου και παρότι στο πρώτο δείγμα το προϊόν χαμηλού μοριακού βάρους που αντιστοιχεί στην περιοχή του *SNCA* είναι ορατό, τούτο δεν συνέβη στο δεύτερο δείγμα. Παρ' όλ' αυτά θεωρείται πως ο υβριδισμός ήταν επιτυχημένος αφού λαμβάνεται υψηλό σήμα τόσο στα άκοπα όσο και κομμένα DNA τους. Επισημαίνεται και εδώ πως ο υβριδισμός των περιοριστικών πέψεων στις υψηλού μοριακού βάρους ζώνες, πιθανόν οφείλεται σε μερική περιοριστική αντίδραση πέψης και υπολειπόμενου άκοπου DNA. Τέλος, και σε αυτόν τον υβριδισμό παρατηρήθηκε απουσία σήματος στα πλασμιδιακά εκχυλίσματα των κυττάρων ζυμομύκητα, για του λόγους που αναφέρθηκαν και ανωτέρω.

Συνοψίζοντας και για αυτόν τον υβριδισμό κρίνεται πως ο μετασχηματισμός των ανασυνδυασμένων κλώνων του pCM190 στα κύτταρα *tps2Δ* ήταν επιτυχημένος, αφού και εδώ επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης στα πλασμιδιακά εκχυλίσματα των κυττάρων του *S. cerevisiae*.



**Εικόνα Π.19:** Υβριδισμός κατά Southern με το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης για τα πλασμιδιακά εκχυλίσματα των κυττάρων BY4741 *tsl1Δ*. Πήκτωμα αγαρόζης (A) και φίλτρου υβριδισμού (B)

Διαδρομή 1:  $\lambda$  *Hind*III

Διαδρομή 2: θετικός μάρτυρας BY4741/ pCM190asynWT

Διαδρομή 3: *E.coli*/ pCM190

Διαδρομή 4: πέψη/ *E.coli*/ pCM190 με *Sal*I και *Pst*I

Διαδρομή 5: BY4741/ *tsl1Δ*/ pCM190asynWT

Διαδρομή 6: *E.coli*/ pCM190asynWT

Διαδρομή 7: πέψη/ *E.coli*/ pCM190asynWT με *Hind*III

Διαδρομή 8: BY4741/ *tsl1Δ*/ pCM190asyn112

Διαδρομή 9: *E.coli*/ pCM190asyn112

Διαδρομή 10: πέψη/ *E.coli*/ pCM190asyn112 με *Kpn*I και *Hind*III

Διαδρομή 11: BY4741/ *tsl1Δ*/ pCM190asynA53T

Διαδρομή 12: *E.coli*/ pCM190asyn A53T

Διαδρομή 13: πέψη/ *E.coli*/ pCM190asynA53T με *Bam*HI

Διαδρομή 14: BY4741/ *tsl1Δ*/ pCM190asynA30P

Διαδρομή 15: *E.coli*/ pCM190asynA30P

Ολοκληρώνοντας τον σχολιασμό των υβριδισμών ο τελευταίος αφορούσε τα πλασμιδιακά εκχυλίσματα των κυττάρων BY4741 *ts1Δ* και σχεδιάστηκε με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες με εκείνον των κυττάρων *tps1Δ*. Αρνητικοί μάρτυρες του εν λόγω υβριδισμού ήταν οι *λ/Hind*III και pCM190. Για τον πρώτο δεν παρατηρήθηκε σήμα υβριδισμού, ενώ για τον δεύτερο παρατηρήθηκε το ίδιο ακριβώς φαινόμενο υψηλού σήματος με προηγουμένως, το οποίο αναλύθηκε και παραπάνω. Και πάλι ως θετικός μάρτυρας φορτώθηκε το πλασμίδιο pCM190asynWT (διαδρομή 2), το οποίο και παρουσίασε υψηλό σήμα υβριδισμού.

Για τα υπόλοιπα δείγματα παρατηρήθηκαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα υβριδισμού, όπως αυτά σχολιάστηκαν αντίστοιχα και για τον υβριδισμό των κυττάρων BY4741 *tps1Δ*.

Κλείνοντας το κεφάλαιο των υβριδισμών, κρίνεται πως οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι του pCM190 μετασηματίστηκαν επιτυχώς στα κύτταρα BY4741 *tps1Δ*, *tps2Δ* και *ts1Δ* και τα μελετώμενα στελέχη φέρουν το γονίδιο *SNCA*. Το αποτέλεσμα αυτό έδωσε την δυνατότητα νεότερων μελετών πλέον στα μεταλλαγμένα στελέχη με σκοπό την διερεύνηση των επιδράσεων της α-συνουκλεΐνης σε αυτά.

## Πίνακας Π.2

**Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPS2*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae tps1Δ* με μηδενική υπόθεση την αντίστοιχη φάση της συνθήκης βαθμονόμησης για την κάθε συνθήκη μελέτης.** Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με EXP η εκθετική φάση, με PD η μεταδιαυξική φάση και με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η φάση ανάπτυξης, στην οποία αντιστοιχεί η κάθε τιμή του λόγου έκφρασης.

Αναλογία=Παρουσία <i>SNCA</i> /Απουσία <i>SNCA</i>						
	<i>TPS2</i>			<i>TSL1</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
PE	0,73	0,71-0,75	0,014689	0,397	0,39-0,40	6,99075E-05
EXP	1,86	1,80-1,90	0,000504	1,03	0,96-1,10	0,190324818
PD	0,71	0,67-0,72	0,15774	1,01	0,98-1,05	0,631798397
ST	1,15	1,14-1,25	0,817314	0,90	0,89-0,91	0,311112803

Αναλογία=Παρουσία <i>SNCA</i> /Απουσία <i>SNCA</i>						
	<i>TOR1</i>			<i>ATG8</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
PE	0,56	0,50-0,61	0,093317	1,10	0,96-1,20	0,992813
EXP	0,53	0,52-0,54	0,050072	1,46	1,30-1,60	0,77853
PD	1,86	1,70-2,00	0,001194	0,90	0,80-1,00	0,933028
ST	0,70	0,65-0,73	0,065526	0,63	0,54-0,74	0,270689

### Πίνακας Π.3

Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPSI*, *TSLI*, *TORI* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae tps2Δ* με μηδενική υπόθεση την αντίστοιχη φάση της συνθήκης βαθμονόμησης για την κάθε συνθήκη μελέτης. Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με EXP η εκθετική φάση, με PD η μετα-διαυξική φάση και με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η φάση ανάπτυξης, στην οποία αντιστοιχεί η κάθε τιμή του λόγου έκφρασης.

Αναλογία=Παρουσία <i>SNCA</i> /Απουσία <i>SNCA</i>						
	<i>ATG8</i>			<i>TORI</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
PE	0,98	0,50-1,89	0,913435	1,34	0,94-2,09	0,379705
EXP	0,083	0,061-0,11	0,000417	1,30	1,23-1,38	0,619209
PD	0,14	0,11-0,19	0,001353	1,26	1,14-1,38	0,812941
ST	0,99	0,96-1,02	0,170748	-	-	-

Αναλογία=Παρουσία <i>SNCA</i> /Απουσία <i>SNCA</i>						
	<i>TPSI</i>			<i>TSLI</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
PE	0,60	0,40-0,84	0,475209	1,57	0,84-2,91	0,616416
EXP	0,50	0,48-0,53	0,68341	0,57	0,36-0,90	0,357098
PD	0,134	0,130-0,138	0,016025	0,42	0,35-0,51	0,665193
ST	1,10	1,03-1,14	0,26557	1,26	1,20-1,69	0,242277

### Πίνακας Π.4

Αποτελέσματα qPCR για τα γονίδια *TPSI*, *TPS2*, *TORI* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae tsl1Δ* με μηδενική υπόθεση την αντίστοιχη φάση της συνθήκης βαθμονόμησης για την κάθε συνθήκη μελέτης. Παρουσιάζεται ανά γονίδιο ο μέσος όρος (mean) της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών και η τυπική απόκλιση τους (SD). Ακόμη, αποδίδεται η τιμή p value με όριο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Με PE συμβολίζεται η προ-εκθετική φάση, με EXP η εκθετική φάση, με PD η μετα-διαυξική φάση και με ST η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα. Στα αριστερά κάθε τιμής του μέσου όρου αποδίδεται η φάση ανάπτυξης, στην οποία αντιστοιχεί η κάθε τιμή του λόγου έκφρασης.

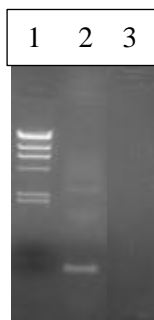
Αναλογία=Παρουσία <i>SNCA</i> /Απουσία <i>SNCA</i>						
	<i>TORI</i>			<i>ATG8</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
PE	1,20	1,14-1,26	0,330057892	1,13	1,08-1,17	0,409523
EXP	1,14	1,11-1,17	0,51772824	1,06	1,00-1,13	0,753825
PD	0,730	0,724-0,735	0,021595686	1,01	0,94-1,08	0,664763
ST	0,89	0,89-1,15	0,317239532	1,26	1,19-1,38	0,049331

Αναλογία=Παρουσία <i>SNCA</i> /Απουσία <i>SNCA</i>						
	<i>TPS2</i>			<i>TPS1</i>		
	Mean	S.D.	P value	Mean	S.D.	P value
<b>PE</b>	0,96	0,91-1,02	0,486148	0,85	0,83-0,88	0,06842
<b>EXP</b>	0,96	0,89-1,04	0,01278	0,94	0,87-1,03	0,59083
<b>PD</b>	0,87	0,77-0,99	0,224051	0,81	0,76-0,85	0,144439
<b>ST</b>	0,85	0,77-0,94	0,265435	1,120	1,110-1,123	0,386241

## **Π.8 Κλωνοποίηση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του *SNCA* στον φορέα υπερέκφρασης pET29c(+)**

Πρώτο βήμα στην διαδικασία αυτή αποτέλεσε η κλωνοποίηση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου στον φορέα υπερέκφρασης πρωτεϊνών pET29c(+) με σκοπό την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Ο πρωταρχικός σχεδιασμός αφορούσε την ενίσχυση και την απομόνωση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του *SNCA* από τον φορέα έκφρασης κυττάρων θηλαστικών pCMVsyn μέσω της PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση αποδίδονται στην ενότητα της PCR στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι της παρούσας διατριβής. Οι εκκινητές αυτοί έφεραν τροποποιήσεις της αρχικής αλληλουχίας του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης στα δύο του άκρα, ώστε να κατασκευαστούν κατάλληλες περιοριστικές θέσεις των ενζύμων *NdeI* και *SalI* και να εξυπηρετηθεί η μετέπειτα κλωνοποίηση του αμπλικονίου στον pET29c(+). Το αναμενόμενο μέγεθος του αμπλικονίου ήταν 420 bp. (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4)

Ως εκ τούτου, το αποτέλεσμα της PCR με εκμαγείο DNA τον φορέα pCMVsyn φαίνεται στην ηλεκτροφόρηση της εικόνας Π.20.



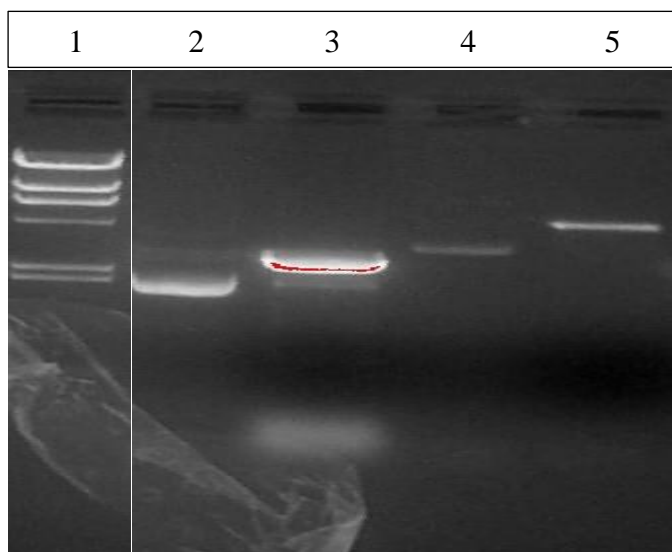
**Εικόνα Π.20:** PCR για την απομόνωση του γονιδίου *SNCA* με σκοπό την κλωνοποίηση σε φορέα υπερέκφρασης  
 Διαδρομή 1: λ/*HindIII*  
 Διαδρομή 2: Προϊόν της PCR  
 Διαδρομή 3: Αρνητικός μάρτυρας της PCR χωρίς εκμαγείο DNA

Κατά συνέπεια, η PCR θεωρήθηκε επιτυχημένη, δεδομένου ότι παραλήφθηκε ένα προϊόν στο αναμενόμενο μέγεθος του αμπλικονίου και ο αρνητικό μάρτυρας δεν παρουσίασε κάποιο προϊόν. Η ζώνη αυτή έπειτα αποκόπηκε από το πήκτωμα αгарόζης και καθαρίστηκε, ώστε να αποτελέσει το προϊόν της ένθεσης για την δεσμοποίηση με τον φορέα υπερέκφρασης.

Πριν την άμεση κλωνοποίηση του παραπάνω προϊόντος της PCR στον φορέα pET29c(+) κρίθηκε αναγκαίο η παραπάνω ζώνη να κλωνοποιηθεί στον φορέα κλωνοποίησης pBluescript II SK (+), ώστε να επιτευχθεί μέσω αυτού η ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής του αλληλουχίας και να διερευνηθεί αν κατά την PCR προέκυψαν σφάλματα στην αντιγραφή του αμπλικονίου.

Συνεπώς, οι φορείς pBluescript II SK (+) και pET29c(+) απομονώθηκαν από κύτταρα *E.coli* DH5a και ο πρώτος υπέστη περιοριστική πέψη με το ένζυμο *SmaI*, ενώ ο δεύτερος υπέστη συνδυαστική περιοριστική πέψη με τα ένζυμα *NdeI* και *SalI* για την τελική κλωνοποίηση. Οι περιοριστικές πέψεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τους περιοριστικούς χάρτες του κάθε πλασμιδίου από την ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Το προϊόν πέψης του pBluescript II SK (+) αποδίδει τον γραμμικό φορέα σε μέγεθος περίπου 2900 bp, ενώ το προϊόν πέψης του pET29c(+) αποδίδει τον γραμμικό φορέα σε μέγεθος περίπου 5270 bp. Το ένζυμο *SmaI* αποδίδει αμβλεία άκρα κατά την περιοριστική του δράση και αποτελεί χρήσιμη επιλογή στην κλωνοποίηση προϊόντων PCR, δεδομένου πως τα προϊόντα αυτά δημιουργούνται με αμβλεία άκρα επίσης. Αντίθετα, τα ένζυμα *NdeI* και *SalI* αποδίδουν και τα δύο προεξέχοντα άκρα, συμπληρωματικά με τα άκρα που δημιουργούνται μετά από περιοριστική πέψη στο προϊόν της PCR οπότε έτσι διασφαλίζονταν η σωστή διευθέτηση του προσανατολισμού του εντιθέμενου τμήματος στον φορέα pET29c(+) και η κλωνοποίηση εντός αναγνωστικού πλαισίου.

Οι απομονώσεις των δύο φορέων και οι ανωτέρω περιοριστικές τους πέψεις παρουσιάζονται στην ηλεκτροφόρηση της εικόνας Π.21.



**Εικόνα Π.21:** Απομόνωση των πλασμιδικών φορέων pBluescript II SK (+) και pET29c(+) και περιοριστικές πέψεις αυτών

Διαδρομή 1: λHindIII

Διαδρομή 2: Ακοπο pBluescript II SK (+)

Διαδρομή 3: Πέψη pBluescript II SK (+)/SmaI

Διαδρομή 4: Ακοπο pET29c(+)

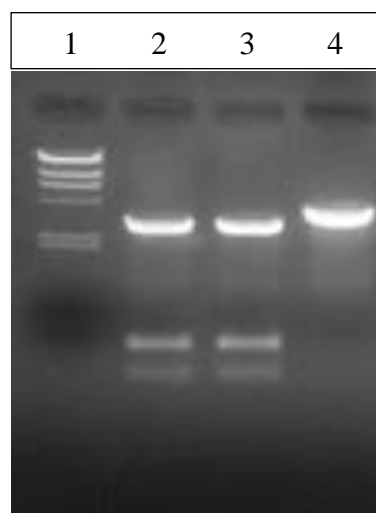
Διαδρομή 5: Πέψη pET29c(+)/NdeI & SalI

Η απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων κρίθηκε επιτυχημένη με βάση την εικόνα Π.21, όπως και οι περιοριστικές τους πέψεις, με τις ζώνες τους να φέρουν το αναμενόμενο μέγεθος. Οι ζώνες των γραμμικών πλασμιδιακών φορέων μετά τις

πέψεις αποκόπηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και καθαρίστηκαν και αποτέλεσαν τους φορείς της διαδικασίας δεσμοποίησης στην μετέπειτα πορεία.

Κατά πρώτο λόγο έλαβε χώρα η δεσμοποίηση του προϊόντος της PCR στον φορέα κλωνοποίησης pBluescript II SK (+). Το δείγμα της δεσμοποίησης μεταφέρθηκε με μετασχηματισμό σε κύτταρα *E. coli* DH5a και στα τρυβλία του μετασχηματισμού πραγματοποιήθηκε επιλογή των ανασυνδυασμένων αποικιών με την χρήση του X-gal εκτός του αντιβιοτικού ανθεκτικότητας στο πλασμίδιο.

Δύο λευκές αποικίες των ανασυνδυασμένων κλώνων του pBluescript II SK (+) συλλέχθηκαν και αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες και απομονώθηκε το πλασμιδιακό τους DNA και υπέστη περιοριστική πέψη με *EcoRI*, η οποία αναγνωρίζει δύο θέσεις περιορισμού εντός της ένθεσης και μία εντός του πλασμιδιακού φορέα και στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο θα απέδιδε τρεις ζώνες με μεγέθη 345 bp, 110 bp και 2900 bp. Παράλληλα, ο μη ανασυνδυασμένος φορέας υπέστη επίσης πέψη με το ίδιο ένζυμο ως δείγμα μάρτυρας. Η ηλεκτροφόρηση των περιοριστικών πέψεων που αναφέρθηκαν παρουσιάζεται στην εικόνα Π.22.



**Εικόνα Π.22:** Διαγνωστικές περιοριστικές πέψεις των υποψήφιων κλώνων pBluescript II SK (+)/SNCA και του μη ανασυνδυασμένου pBluescript II SK (+) με το ένζυμο *EcoRI*.

Διαδρομή 1:  $\lambda$ /HindIII

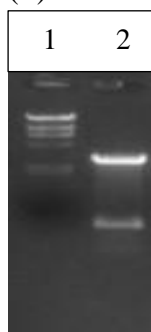
Διαδρομές 2 & 3: Πέψη pBluescript II SK (+)/SNCA

Διαδρομή 4: Πέψη pBluescript II SK (+)

Από την παραπάνω εικόνα παρατηρείται πως στις διαδρομές των υποψήφιων κλώνων παραλήφθηκαν τα αναμενόμενα μεγέθη ζωνών, οπότε κρίθηκε πως η κλωνοποίηση στον φορέα κλωνοποίησης pBluescript II SK (+) ήταν επιτυχής.

Στην συνέχεια, ο εν λόγω ανασυνδυασμένος φορέας εστάλη για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της ένθεσης, με σκοπό να διαπιστωθούν τυχόν σφάλματα που έλαβαν χώρα κατά την αντίδραση της PCR. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού αυτού μελετήθηκαν και διαπιστώθηκε η 100% ομοιότητα του προϊόντος της PCR με το γονίδιο της  $\alpha$ -συνουκλείνης. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας αποδίδονται στην ενότητα των παραρτημάτων της παρούσας διατριβής (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5).

Στην συνέχεια, ο ανασυνδυασμένος κλώνος pBluescript II SK (+)/SNCA υπέστη περιοριστική πέψη με τα ένζυμα *NdeI* και *SalI*, ώστε να γίνει η μετάβαση της διαδικασίας στην δεσμοποίηση του προϊόντος της PCR στον pET29c(+). Η εικόνα Π.23 παρουσιάζει την ηλεκτροφόρηση με το προϊόν της πέψης του pBluescript II SK (+)/SNCA.

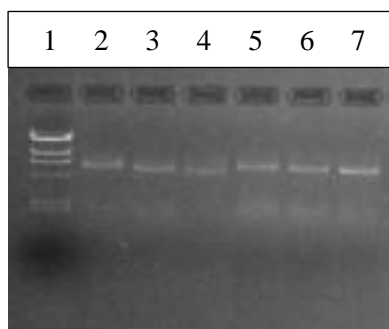


**Εικόνα Π.23:** Παρασκευαστική περιοριστική πέψη του pBluescript II SK (+)/SNCA με τα ένζυμα *NdeI* και *SalI*  
 Διαδρομή 1: λ/*HindIII*  
 Διαδρομή 2: Πέψη pBluescript II SK (+)/SNCA

Η παρασκευαστική πέψη ήταν επιτυχημένη, εφόσον λήφθηκε η ζώνη των 420 bp, οπότε η ζώνη αυτή αποκόπηκε από το πήκτωμα αγαρόζης και καθαρίστηκε ώστε να αποτελέσει την ένθεση στην δεσμοποίηση με τον φορέα pET29c(+) στις αντίστοιχες περιοριστικές του θέσεις.

Το μίγμα αυτής της αντίδρασης δεσμοποίησης μεταφέρθηκε με μετασχηματισμό σε κύτταρα *E. coli* DH5a και από τις αποικίες των τρυβλίων του μετασχηματισμού επιλέχθηκαν έξι από αυτές για την μετέπειτα καλλιέργειά τους σε υγρό θρεπτικό μέσο και την πλασμιδιακή τους απομόνωση.

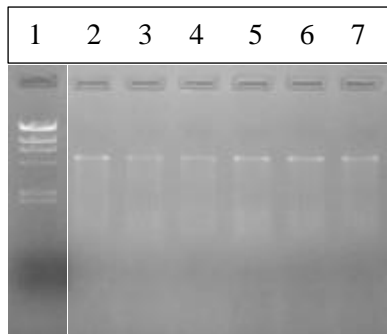
Το αποτέλεσμα της πλασμιδιακής απομόνωσης των υποψηφίων κλώνων του pET29c(+)/SNCA παρουσιάζεται στην εικόνα Π.24.



**Εικόνα Π.24:** Απομόνωση υποψηφίων κλώνων pET29c(+)/SNCA  
 Διαδρομή 1: λ/*HindIII*  
 Διαδρομές 2-7: Υποψήφιοι κλώνοι pET29c(+)/SNCA

Οι παραπάνω υποψήφιοι κλώνοι στην συνέχεια υπέστησαν περιοριστική πέψη με τα ένζυμα *NdeI* και *XhoI*, ώστε σύμφωνα με τον περιοριστικό χάρτη του φορέα, το τμήμα που περιέχει την ένθεση ίσο με 440 bp να απομονωθεί στα κατώτερα μεγέθη DNA κατά την ηλεκτροφόρηση. Η εικόνα Π.25 αποδίδει τα προϊόντα των περιοριστικών αυτών πέψεων στους έξι υποψηφίους κλώνους.



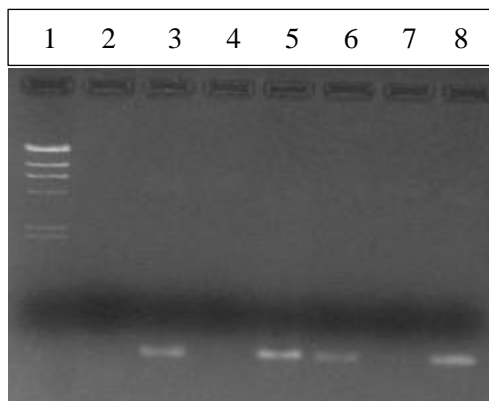


**Εικόνα Π.25:** Διαγνωστικές πέψεις των υποψήφιων κλώνων pET29c(+)/SNCA με τα ένζυμα *NdeI* και *XhoI*

Διαδρομή 1:  $\lambda$ /*HindIII*

Διαδρομές 2-7: Πέψεις υποψήφιων κλώνων pET29c(+)/SNCA

Από την παραπάνω εικόνα, είναι δυνατό στην διαδρομή 2 να παρατηρηθεί ένα τμήμα DNA, το οποίο να αντιστοιχεί σε μέγεθος 440 bp, ωστόσο σε καμία άλλη διαδρομή δεν επετεύχθη η διάκριση αντίστοιχων τμημάτων. Για το λόγο αυτό, ακόμη και αν εύκολα ή δύσκολα για τον πρώτο υποψήφιο κλώνο υπήρξε διάκριση της ζώνης της ένθεσης, επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί αντίδραση PCR για την ενίσχυση του εσωτερικού τμήματος του SNCA μεγέθους 270 bp σε όλα τα δείγματα των υποψήφιων κλώνων, με εκκινητές τους ίδιους που είχαν χρησιμοποιηθεί και κατά την εντόπιση του γονιδίου στα πλασμιδιακά εκχυλίσματα του ζυμομύκητα στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων PCR παρουσιάζονται στην ηλεκτροφόρηση της εικόνας Π.26.



**Εικόνα Π.26:** PCR για την ενίσχυση του εσωτερικού τμήματος του SNCA στους υποψήφιους κλώνους pET29c(+)/SNCA

Διαδρομή 1:  $\lambda$ /*HindIII*

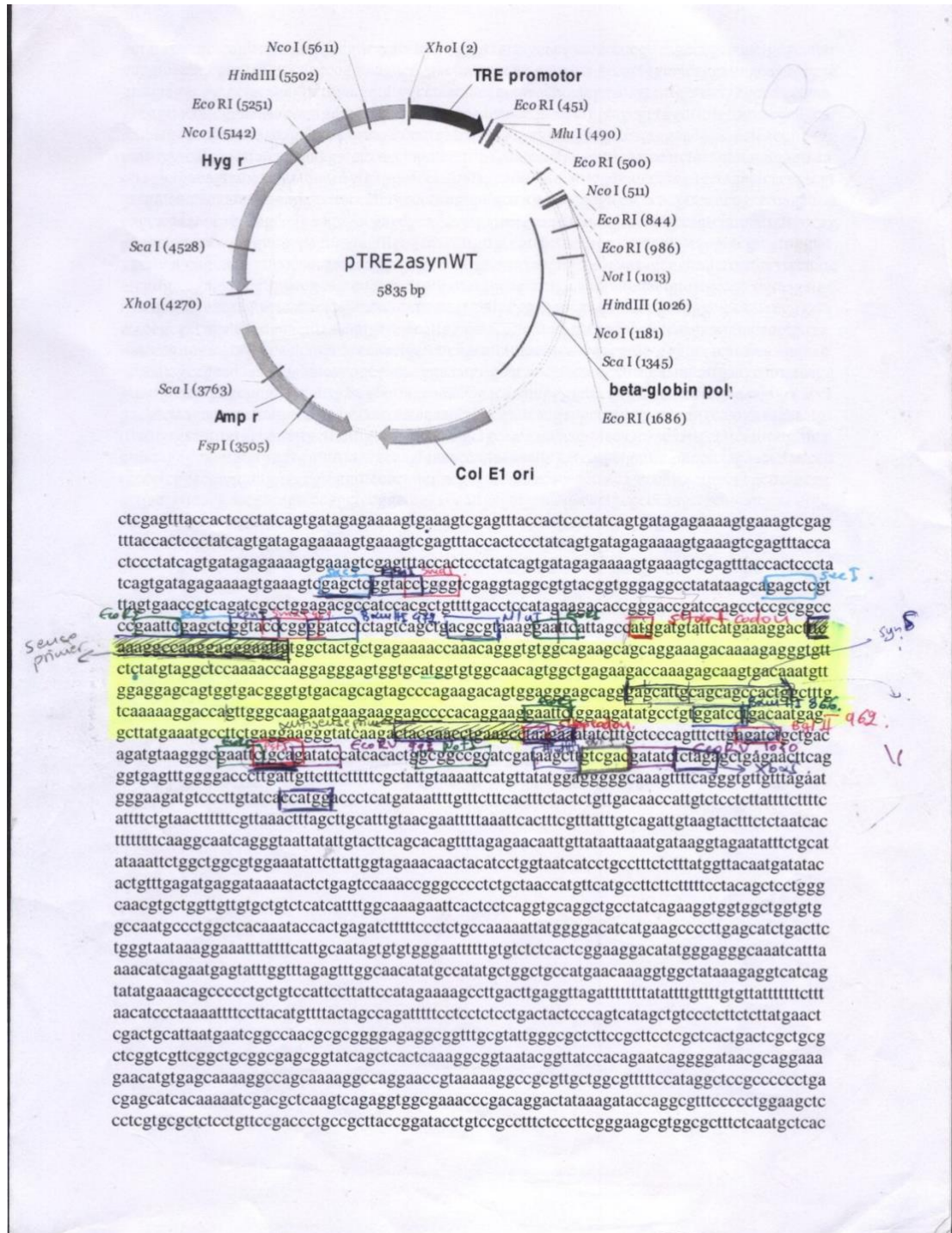
Διαδρομή 2: Αρνητικός μάρτυρας της PCR χωρίς εκμαγείο DNA

Διαδρομές 3-8: Προϊόν PCR με εκμαγείο τον καθένα υποψήφιο κλώνου pET29c(+)/SNCA 1-6

Από την παραπάνω εικόνα φαίνεται πως παρά την αδυναμία να τεκμηριωθεί η επιτυχία της κλωνοποίησης στις αντιδράσεις των περιοριστικών πέψεων, μέσω της PCR ανιχνεύθηκαν και τεκμηριώθηκαν πέντε από τους έξι υποψήφιους κλώνους pET29c(+)/SNCA. Οι διαδρομές 3, 5, 6 και 8 φέρουν ξεκάθαρα προϊόντα ενίσχυσης του τμήματος του SNCA, αλλά επίσης και στην διαδρομή 7 παρατηρείται μία αχνή ζώνη ίση με τα αντίστοιχα μεγέθη των υπολοίπων. Η πιστότητα της αντίδρασης επίσης εξακριβώνεται από την έλλειψη προϊόντος στο δείγμα του αρνητικού μάρτυρα. Συνεπώς όλοι οι εν λόγω υποψήφιοι κλώνοι που απέδωσαν προϊόν PCR αποτελούν και τους επιβεβαιωμένους κλώνους.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Περιοριστικός χάρτης των pTRE2hyg A-syn A53T και A30P



gctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccaccgctgcgctfat  
ccgtaactatcgtcttgagccaaccggtaagacacgacttatgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgag  
gtatgtaggcggctctacagagttcttgaagtgggtgacctaacctacggctacactagaaggacagatttggatctgcgctctgctgaa  
gccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaacaaccaccgctggtagcgggtgtttttgttgcgaagcagca  
gattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaactcacgttaagg  
gattttggtcagattatcaaaaaggatcttccctagatccttttaataaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatagataaa  
cttggctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcagatctgtctatctgttcatcatagttgctgactccccgtctg  
gtagataactacgatacggggagggttaccatctggccccagtctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttat  
cagcaataaacccagccgggaaggccgagcgcagaagtggctctgcaactttatccgctccatccagcttataaattgttccgg  
gaagctagagtaagtagttccagtaataagttgcaacgtgttgcctatgctacagggcatggtgtcagcctcgtctgttggat  
ggcttcaactcgggttccaacatcaaggcagttacatgatccccatgttggcaaaaaagcggtagcctctcggctcccg  
atcgttgcagaagtaagttggccgagttatcactcatggtatggcagcactgcataatfcttactgcatgcatcccgtaagatgc  
ttttgtgactggtgagfacticcaacgaatctgagaatagttatgctcggcagaccgagttgctctgcccgcgtcaaatagggata  
ataccgcccacatagcagaactttaaaagtgtctcatcttggaaaacgttctcggggcgaacacactcaagatcttaccgcttga  
gatccagttcagatgaaccactcgtgcaccaactgatctcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaaaggaag  
gcaaaatgcccaaaaaagggaataaggcgcacacggaatgtgaaatactatactctcttttcaatattatgaagcatttatcagg  
gtattgtctcagcggatacatattgaaatgatttagaaaaataacaatagggttccgcacattccccgaaaaagtgccacct  
gacgtctaaagaaccattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgtatcacgagcccttctcagcagcagtaaaaaatgc  
ttatttggaaattgtgatgctattgcttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttacaacaacaattgcattatttatgttca  
ggctcagggggaggtgtgggggtttttaaagcaagtaaaacctctacaatgtggatggctgattatgatcctctagaactctattcct  
tgcctcggacgagtgctggggcgtcttccactatcggcagtagtacttctacacagccatcgtccagacggccgctctcgg  
gcatttgtgtaccccagactcccggctccgacgagattgcgtcgcacgacctgcgccaaagctcactatcgaatgc  
cgtcaaccaagctctgataagttggtcaagaccaatgcggagcatatacggccggagccggcgcgacctcgaagctccggatgcc  
tccgctcgaagtagcgcgtctgctcctacacaagccaaccacggcctccagaagaagatgttggcagcctcgtattgggaatccc  
gaacatcgctcgtcagtcgaatgaccgctgttatgcggccattgtccgtcagcagattgttggagccgaaatccgctgcacgaggt  
cccggacttggggcagctcctcggccaaaagcatcagctcagcagcctcgcgcagcggacgactgacggtgtctccatcaca  
gtttgccagtgatacacatggggatcagcaatcgcgcataatgaaatcacgccatgtagtattgaccgattccttgcggtccgaatgg  
ccgaaccgctcgtctggctaaagtcggccgagcgtcgcacatccatggcctccgaccggctgcagaacagcggcgagttcgg  
ttcaggcaggtcttgaacgtgacacctgtgcacggcggagatgcaataggtcaggctctcgtgattccccaatgtcaagcaact  
ccggaaatcgggagcgcggccgatgcaaaagtccgataaaacataacgatctttagaaaccatcggcgcagctatttaccgcaagga  
catatccacggcctcctacatgaaagctgaaagcacgagattctcgcctccagagctgcatcaggtcggagacgctgtcgaacttt  
cgatcagaacttctgcagacgctcgggtgagttcaggcttttcatggaaacttttgcaaaagcctaggcctcaaaaaagcctct  
cactacttctgaaatgctcagagccgagcggcctcgcctctgcataataaaaaaattagtcagccatggggcggagaatgg  
gcggaaactggcggagttaggcgggagggcgggagttaggcgggactatggtgctgactaattgagatgcatgctttgcata  
cttctcgtcgtggggagcctgggacttccacactggtgctgactaattgagatgcatgctttgcatacttgcctgctggggagc  
ctggggacttccacaccctaactgacaca

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Πλήρης αλληλουχία όλων των μελετώμενων μορφών του *SNCA* και εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις PCR εσωτερικά της περιοχής του. Παρουσιάζονται σε παρένθεση τα σημεία των σημειακών μεταλλαγών στο αγρίου τύπου γονίδιο, με απουσιοποιητικά η περιοχή απαλοιφής στο DNA της ισομορφής 112, με μωβ τα κωδικόνια έναρξης και λήξης και σημειωμένοι με χρώμα ο ανοδικός και ο καθοδικός εκκινητής ενιαία για όλες τις μορφές του γονιδίου.

*SNCA* WT ή A53T ή A30P

*SNCA* 112

```
ATG GATGTATTTCATGAAAGGACTTTCAAAGG (C) CCAAG GAGGGAGTTGTGGCTACTGC
T
ATG GATGTATTTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAG GAGGGAGTTGTGGCTACTGC T
GAGAAAACCAAACAGGGTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGTTCCTC
GAGAAAACCAAACAGGGTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGTTCCTC
TATGTAGGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAG
TATGTAGGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAG
AAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTG (A) GTGACGGGTGTGACAGC
A
AAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGTGACGGGTGTGACAGCA
GTAGCCCAGAAGACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCATTGCAGCAGCCACTGGCTTT GTC
GTAGCCCAGAAGACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCATTGCAGCAGCCACTGGCTTT CTC
AAAAAGGACCAGTTGGG CAAGAATGAAGAAGGAGCCCCACAGGAAGGAATTCTGGAA
AAAAAGGACCAGTTGGG CAA-----
GATATGCCTGTGGATCCTGACAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAAGGGTAT
-----GGAAGGGTAT
CAAGACTACGAACCTGAAGCC TAA
CAAGACTACGAACCTGAAGCC TAA
```

### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

- Αλληλουχία του *SNCA* WT, εκκινητές και προϊόν ενίσχυσης για τις ανάγκες των μελετών qPCR. Με > και < υποσημειώνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών.

```
1  ATGGATGTATTTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGCTACTGCTGAG
61  AAAACCAAACAGGGTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGTCTCTATGTA
121 GGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCAA
      >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
181 GAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACGGGTGTGACAGCAGTAGCCCAGAAG
241 ACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCATTCGAGCAGCCACTGGCTTTGTCAAAAAGGACCAGTTG
301 GGCAAGGAAGGGTATCAAGACTACGAACCTGAAGCCTAA
      <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
```

- Αλληλουχία της κωδικής περιοχής του *TPS1* στο γονιδίωμα του *Saccharomyces cerevisiae*, εκκινητές και προϊόν ενίσχυσης για τις ανάγκες των μελετών qPCR. Με > και < υποσημειώνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών.

```
1  ATGACTACGGATAACGCTAAGGCGCAACTGACCTCGTCTTCAGGGGGTAACATTATTTGTG
61  GTGTCCAACAGGCTTCCCGTGACAATCACTAAAAACAGCAGTACGGGACAGTACGAGTAC
121 GCAATGTTCGTCCGGAGGGCTGGTCCAGGCGTGGGAAAGGGTTGAAGAAGACGTACACTTTC
181 AAGTGGTTCCGGATGGCCTGGGCTAGAGATTCCCTGACGATGAGAAGGATCAGGTGAGGAAG
241 GACTTGCTGGAAAAGTTTAATGCCGTACCCATCTTCCTGAGCGATGAAATCGCAGACTTA
301 CACTACAACGGGTTTCAGTAATTCTATTCTATGGCCGTTATTCCATTACCATCCTGGTGAG
361 ATCAATTTTCGACGAGAATGCGTGGTTGGCATACAACGAGGCAAACCAGACGTTACCAAC
421 GAGATTGCTAAGACTATGAACCATAACGATTTAATCTGGGTGCATGATTACCATTTGATG
481 TTGGTTCCGGAAATGTTGAGAGTCAAGATTCACGAGAAGCAACTGCAAAACGTTAAGGTC
541 GGGTGGTTTCCTGCACACACCATTCCCTTCGAGTGAAATTTACAGAATCTTACCTGTCAGA
```





1381 TCGCACATGTCGAACTTTTTATGCTACGGAAATCCATTGATCTTAAGTGAGTTTTCTGGC  
1441 TCTAGTAACGTATTGAAAGATGCCATTGTGGTTAACCCATGGGATTCGGTGGCCGTGGCT  
1501 AAATCTATTAACATGGCTTTGAAATGGACAAGGAAGAAAAGTCCAATTTAGAATCAAAA  
1561 TTATGGAAAGAAGTTCTACAATTCAAGATTGGACTAATAAGTTTTTGAGTTCATTAAAG  
1621 GAACAGGCGTCATCTAATGATGATATGGAAAGGAAAATGACTCCAGCACTTAATAGACCT  
1681 GTTCTTTTAGAAAATTACAAGCAGGCTAAGCGTAGATTGTTCTTTTTGATTACGATGGT  
1741 ACTTTGACCCCAATTGTCAAAGACCCAGCTGCAGCTATTCCATCGGCAAGACTTTATACA  
1801 ATTCTACAAAAATTATGTGCTGATCCTCATAATCAAATCTGGATTATTTCTGGTCGTGAC  
1861 CAGAAGTTTTTGAACAAGTGGTTAGGCGGTAAACTTCCTCAACTGGGTCTAAGTGCGGAG  
1921 CATGGATGTTTCATGAAAGATGTTTCTTGCCAAGATTGGGTCAATTTGACCGAAAAAGTT  
1981 GATATGTCTTGGCAAGTACGCGTCAATGAAGTGATGGAAGAATTTACCACAAGGACCCCA  
2041 GGTTCATTCATCGAAAGAAAGAAAGTCGCTCTAACTTGGCATTATAGACGTACC GTTCCA  
2101 GAATTGGGTGAATTCCACGCCAAAGAACTGAAAGAAAAATTGTTATCATTACTGATGAC  
2161 TTTGATTTAGAGGTCATGGATGGTAAAAGCAAACATTGAAGTTCGTCCAAGATTCGTCAAC  
2221 AAAGGTGAAATAGTCAAGAGACTAGTCTGGCATCAACATGGCAAACCACAGGACATGTTG  
2281 AAGGGAATCAGTGAAAACTACCTAAGGATGAAATGCCTGATTTTGTATTATGTTTGGGT  
2341 GATGACTTCACTGACGAAGACATGTTTAGACAGTTGAATACCATTGAACTTGTTGGAAA  
2401 GAAAAATATCCTGACCAAAAAAATCAATGGGGCAACTACGGATTCTATCCTGTCACTGTG  
2461 GGATCTGCATCCAAGAAAAGTGTGCGCAAAGGCTCATTTAACCGATCCTCAGCAAGTCCTG  
2521 GAGACTTTAGGTTTACTTGTGGTGATGTCTCTCTCTTCCAAAGTGCTGGTACGGTCGAC  
2581 CTGGATTCCAGAGGTCATGTCAAGAATAGTGAGAGCAGTTTGAAATCAAAGCTAGCATCT



2641 AAAGCTTATGTTATGAAAAGATCGGCTTCTTACACCGGCGCAAAGGTTTGA

- Αλληλουχία της κωδικής περιοχής του *TSL1* στο γονιδίωμα του *Saccharomyces cerevisiae*, εκκινητές και προϊόν ενίσχυσης για τις ανάγκες των μελετών qPCR. Με > και < υποσημειώνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών.

1 ATGGCTCTCATCGTGGCATCTTTGTTTTTGGCCCTACCAACCACAATTCGAGCTTGACACC  
61 TCTCTCCCTGAGAACTCGCAGGTGGACTCATCTCTCGTGAACATCCAGGCTATGGCCAAT  
121 GACCAACAGCAACAACGTGCGCTTCTAACAACATCTCACAGGAATCATTTGGTCGCGCCA  
181 GCACCAGAACAAGGTGTCCCCCAGCAATCTCAAGGAGTGCCACCAGGTCACCCAGTGCT  
241 TTCAACCGCGCCTCGTCTACGACAAATACTGCCACTTTAGATGATCTTGTCTCTTCGGAC  
301 ATATTCATGGAAAACCTTGACTGCGAATGCAACTACCTCACATACGCCAACAAAGCAAGACT  
361 ATGCTTAAACCCCGGAAAAATGGTTCCGTGGAACGATTCTTCTCCCCTTCTTCCAATATT  
421 CCCACGGATCGCATCGCATCGCCAATCCAGCATGAGCATGACTCCGGTTTCGAGAATTGCT  
481 TCGCCAATCCAACAGCAACAGCAGGACCCACGACCAACTTATTAAAGAACGTCAACAAG  
541 TCATTGTTAGTGCCTCACTGTTGAACAACACCTCACAACTAGCCTAGAAGGACCCAAC  
601 AACCACATTGTTACCCCGAAAATCGAGGGCGGGCAACAGGCCTACTTCGGCGGCTACTTCT  
661 TTAGTTAATAGGACCAAACAAGGTTTCGGCCTCCTCTGGATCTTCTGGGTCTTCTGCGCCA  
721 CCTTCCATTAAAAGGATTACGCCCCACTTGACTGCGTCTGCTGCAAAACAGCGTCCCTTA  
781 TTGGCTAAACAGCCTTCTAATCTGAAATATTCGGAGTTAGCAGATATTTTCGTCGAGTGAG  
841 ACGTCTTCGCAGCATAATGAGTCGGACCCGGATGATCTAACTACTGCCCTGACGAGGAA  
901 TATGTTTCTGATTTGGAAAATGGATGACGCGAAGCAGGACTACAAGGTTCCAAAGTTCGGC  
961 GGCTATTCCAATAAACTTAAACTTAAGAAAATATGCGCTGTTAAGGTCATCTCAGGAGCTG

1021 TTTAGCCGTCTTCCATGGTCGATCGTTCCCTCTATCAAAGGTAATGGCGCCATGAAGAAC  
1081 GCCATAAACACTGCAGTCTTGGAGAATATCATTCCGCACCGTCATGTTAAGTGGGTCGGT  
1141 ACCGTCGGAATCCCAACGGATGAGATTCCGGAAAAATATCCTTGCGAACATCTCTGACTCT  
1201 TTAAAAGACAAGTACGACTCCTATCCTGTCCCTTACGGACGACGACACCTTCAAAGCCGCA  
1261 TACAAAACTACTGTAAACAAATCTTGTGGCCTACGCTGCATTACCAGATTCCAGACAAT  
1321 CCGAACTCGAAGGCTTTTGAAGATCACTCTTGGAAAGTTCTATAGAACTTAAACCAAAGG  
1381 TTTGCGGACGCGATCGTTAAAATCTATAAGAAAGGTGACACCATCTGGATTCATGATTAC  
1441 CATTTAATGCTGGTTCCGCAGATGGTGAGAGACGTCTTGCCTTTTGCCAAAATAGGATTT  
1501 ACCTTACATGTCTCGTTCCCCAGTAGTGAAGTGTTTAGGTGTCTGGCTCAGCGTGAGAAG  
1561 ATCTTAGAAGGCTTGACCGGTGCAGACTTTGTTCGGCTTCCAGACGAGGGAGTATGCAAGA  
1621 CATTTCTTACAGACGTCTAACCGTCTGCTAATGGCGGACGTGGTACATGATGAAGAGCTA  
1681 AAGTATAACGGCAGAGTCGTTTCTGTGAGGTTACCCAGTTGGTATCGACGCCTTTGAT  
1741 TTGCAATCGCAATTGAAGGATGGAAGTGTCAATGCAATGGCGTCAATTGATTTCGTGAAAGA  
1801 TGGCAAGGGAAAAAACTAATTGTGTGTCGTGATCAATTCGATAGAATTAGAGGTATTCAC  
1861 AAGAAATTGTTGGCTTATGAAAAATCTTGGTCGAAAATCCGGAATACGTGGAAAAATCG  
1921 ACTTTAATTCAAAATCTGTATTGGAAGCAGTAAGGATGTAGAACTGGAGCGCCAGATCATG  
1981 ATTGTCGTGGATAGAATCAACTCGCTATCCACCAATATTAGTATTTCTCAACCTGTGGTG  
2041 TTTTTGCATCAAGATCTAGATTTTTCTCAGTATTTAGCTTTGAGTTCAGAGGCAGATTTG  
2101 TTCGTAGTCAGCTCTCTAAGGGAAGGTATGAACTTGACATGTCACGAATTTATCGTTTTGT  
2161 TCTGAGGACAAAAATGCTCCCCTACTGTTGTCAGAATTTACTGGTAGTGCATCTTTATTG



1 ATGGAACCGCATGAGGAGCAGATTTGGAAGAGTAAACTTTTGAAAGCGGCTAACAACGAT  
61 ATGGACATGGATAGAAATGTGCCGTTGGCACCGAATCTGAATGTGAATATGAACATGAAA  
121 ATGAATGCGAGCAGGAACGGGGATGAATTCGGTCTGACTTCTAGTAGGTTTGATGGAGTG  
181 GTGATTGGCAGTAATGGGGATGTAAATTTTAAGCCATTTTGGAGAAAATTTCCGCGAA  
241 TTAACCAGTGATTACAAGGAGGAACGAAAAATTGCCAGTATTTTCATTATTTGATCTACTA  
301 GTATCCTTGGAACATGAATTGTCGATAGAAGAGTTCCAAGCAGTTTCAAATGACATAAAC  
361 AATAAGATTTTGGAGCTGGTCCATACAAAAAACGAGCACTAGGGTAGGGGCTGTTCTA  
421 TCCATAGACACTTTGATTTTCATTCTACGCATATACTGAAAGGTTGCCTAACGAACTTCA  
481 CGACTGGCTGGTTACCTTCGAGGGCTAATACCTTCTAATGATGTAGAGGTCATGAGACTC  
541 GCTGCAAAGACTCTGGGCAAGTTAGCCGTTCCAGGAGGTACATATACCTCTGATTTTCGTG  
601 GAATTTGAGATAAAGTCTTGCTTAGAATGGCTTACTGCCTCCACGGAAAAGAATTCATTC  
661 TCGAGTTCGAAGCCAGACCATGCTAAACATGCTGCGCTTCTGATTATAACAGCGTTGGCA  
721 GAGAATTGTCCTTATTTACTCTACCAATACTTGAATTCCATACTAGATAACATTTGGAGA  
781 GCACTAAGAGACCCACATTTGGTGATCAGAATTGATGCGTCCATTACATTGGCCAAATGT  
841 CTTTCCACCCTACGAAATAGGGATCCTCAGTTAACTAGCCAGTGGGTGCAGAGATTGGCT  
901 ACAAGTTGTGAATACGGATTTCAAGTAAACACATTAGAATGCATCCATGCAAGTTTGTG  
961 GTTTATAAGGAAATCTTGTTTTTTGAAGGATCCCTTTTTTGAATCAAGTGTTTCGACCAAATG  
1021 TGTCTAAATTGCATAGCTTATGAAAATCATAAAGCGAAAATGATTAGAGAAAAGATTTAC  
1081 CAGATTGTTCCCCTATTAGCATCGTTCAATCCTCAATTATTTGCTGGCAAATATTTGCAC  
1141 CAAATTATGGACAACCTATTTAGAGATTTTAACCAATGCTCCAGCAAATAAAATACCACAT  
1201 CTCAAAGATGACAAACCACAGATTTTAATATCGATTGGTGATATTGCATATGAAGTCGGG

1261 CCCGATATCGCACCTTATGTGAAACAAATTCCTTGATTATATTGAACATGATTTACAGACG  
1321 AAATTCAAATTCAGAAAGAAATTTGAAAATGAAATTTTCTACTGCATCGGAAGATTGGCA  
1381 GTTCCCTTGGGCCCCGTTCTAGGTAAATTTATAAACAGAAATATACTGGACCTGATGTTT  
1441 AAATGCCCTCTTTCCGACTATATGCAGGAAACGTTTCAAATTCCTGACTGAGAGAATACCA  
1501 TCACTAGGCCCCAAAATAAATGACGAGTTGCTTAACCTAGTCTGTTCAACCTTATCTGGA  
1561 ACACCATTTATCCAGCCAGGGTCACCAATGGAGATACCATCGTTTTTCGAGAGAAAGAGCA  
1621 AGAGAATGGAGAAATAAAAAACATCCTACAGAAAACCTGGTCAAAGTAACGATGATAATAAT  
1681 GATATAAAAATCATTATACAAGCTTTTAGAATGTTAAAAAATATCAAAAGCAGATTTTCG  
1741 TTGGTGAATTCGTGAGAATTGTTGCACTTTCTTACATTGAGCATAACAGATCCCAGAGTA  
1801 AGGAAACTAGCTGCGTTGACATCTTGTGAAAATTTACGTCAAGGATAACATCTGCAAACAA  
1861 ACATCACTACACTCTCTGAACACTGTATCTGAAAGTGTATCAAAGCTTCTAGCCATTACG  
1921 ATTGCGGACCCCTTTACAAGATATCCGTTTAGAAGTTTTAAAGAATCTTAATCCATGTTTC  
1981 GATCCCCAGTTGGCACAACCAGATAATTTGAGACTCTTGTTTACTGCACTGCACGATGAG  
2041 TCGTTCAATATTCAGTCAGTAGCAATGGAGCTTGTCGGTAGGTTGTCTTCCGTAAACCCT  
2101 GCATACGTCATCCCATCGATAAGAAAAATACTACTGGAACCTGCTAACAAAATTTAAATTC  
2161 TCAACTTCTTCTCGAGAAAAGGAAGAACTGCCAGTTTGTATGTACTCTTATCAGGTTCG  
2221 AGTAAAGATGTTGCGAAACCTTATATCGAACCTCTTTTAAATGTTCTTTTACCAAATTC  
2281 CAAGATACCTCTTCAACGGTTGCATCAACTGCACTGAGAACTATAGGTGAGCTATCTGTT  
2341 GTAGGGGGCGAAGATATGAAGATATATCTTAAGGATTTGTTTCCTTTAATTATCAAAACA  
2401 TTTCAAGATCAATCAAACCTTTCAAGAGAGAAGCTGCACTTAAGGCCCTTGGTCAACTT

2461 GCAGCCTCATCTGGTTACGTGATAGATCCTTTACTCGACTATCCCGAATTATTGGGTATA  
2521 TTGGTGAATATATTGAAGACAGAAAACTCTCAAAAATATTAGGAGACAAACAGTCACTTTG  
2581 ATAGGTATACTGGGAGCTATCGACCCATATCGCCAAAAAGAACGTGAGGTTACCTCTACT  
2641 ACCGATATATCTACAGAACAGAACGCCCCGCCTATCGACATTGCTCTTCTCATGCAGGGC  
2701 ATGTCTCCTTCGAATGATGAGTATTATAACCACTGTTGTCATTCACTGCCTGCTAAAAATC  
2761 CTAAAAGATCCATCCCTATCATCTTACCACACTGCCGTGATCCAAGCGATTATGCATATT  
2821 TTTCAAACCCCTTGGTCTAAAATGTGTTTCATTCTTGGACCAGATCATCCCAACTATTTTG  
2881 GACGTAATGCGTACATGCTCTCAGTCACTATTAGAATTTTACTTCCAACAGCTTTGCTCT  
2941 TTGATTATTATCGTAAGGCAACACATAAGACCTCATGTCGATTCTATATTCCAGGCTATC  
3001 AAAGATTTTTCTTCGGTTGCTAAGCTACAAATAACGCTTGTAAGTGTTATTGAAGCAATA  
3061 TCAAAGGCTCTGGAGGGTGAATTCAAAAAGATTGGTCCCTCTTACTCTGACCTTGTTCCCTT  
3121 GTAATTTTGGAGAATGACAAGTCTAGTGACAAGGTCCTCTCCAGAAGGGTATTGAGACTG  
3181 TTAGAATCGTTTGGTCCTAACTTAGAAGGTTATTTCGCATTTGATTACACCCAAGATAGTT  
3241 CAAATGGCAGAATTCACCAGCGGGAACCTACAAAAGGTCGCAATAATTACTATTGGCAAA  
3301 CTGGCCAAGGATGTTGACCTTTTTGAGATGTCTCAAGAATTGTTCACTCTTTACTTAGG  
3361 GTAATAAGTTCAACAACGAGTGACGAACTCTCAAAAAGTCATTATGAATACTTTAAGTCTA  
3421 CTGCTAATACAAATGGGCACATCCTTTGCTATCTTCATCCCTGTCATTAATGAAGTTTTA  
3481 ATGAAGAAACATATTCAACACACAATATATGATGACTTGACAAACAGAATATTAAACAAT  
3541 GATGTTTTACCCACAAAAATTCTTGAAGCAAATACAACGGATTATAAGCCCGCGGAACAA  
3601 ATGGAGGCAGCAGATGCTGGGGTCGAAAAATTACCTATAAACCAATCAGTTTTGAAAAGT

3661 GCATGGAATTCTAGCCAACAAAGAACTAAAGAAGATTGGCAGGAATGGAGCAAACGTCTA  
3721 TCCATTCAATTATTAAAAGAGTCACCCTCCCATGCTCTAAGAGCTTGTTCAAATCTTGCA  
3781 AGCATGTATTATCCACTAGCCAAGAACTTTTTAATACCGCATTCGCATGTGTTTGGACC  
3841 GAACTTTATAGCCAATATCAAGAAGATTTAATTGGGTCATTATGTATAGCCTTATCTTCT  
3901 CCCTTAAATCCACCAGAAAATACATCAAACATTGTTAAACCTGGTAGAATTTATGGAACAC  
3961 GATGACAAGGCATTACCAATACCAACTCAAAGCCTGGGCGAGTATGCTGAAAGATGTCAC  
4021 GCCTATGCCAAAGCGCTACATTATAAAGAGATTAAATTTATTAAAGAGCCTGAGAACTCA  
4081 ACTATTGAATCATTGATCAGCATTAAACAACCAGCTGAATCAAACGGATGCTGCAATTGGT  
4141 ATATTAAAGCATGCCCAACAACATCATTCACTTCAATTAAAGGAGACATGGTTTGAAAAA  
4201 TTAGAGCGTTGGGAAGATGCACTACATGCTTATAATGAACGTGAAAAGGCAGGTGATACT  
4261 TCCGTGAGCGTTACACTCGGTAAGATGAGATCCCTTCATGCCCTTGGCGAATGGGAACAG  
4321 TTGTCGCAATTGGCAGCTAGAAAAGTGAAAAGTTTCGAAGCTACAACTAAGAAGCTAATA  
4381 GCTCCCTTGGCAGCTGGTGCTGCGTGGGGTTGGGAGAGTGGGATATGCTTGAGCAATAT  
4441 ATCAGCGTTATGAAACCTAAATCTCCAGATAAGGAATTTTTTGGATGCAATTTTATACTTG  
4501 CACAAGAATGATTACGACAATGCTAGTAAGCATATATTAAACGCCAGAGATTTGCTTGTG  
4561 ACTGAAATTTCCGCGTTGATCAATGAAAGTTATAATAGAGCATATAGCGTTATTGTTAGA  
4621 ACTCAAATAATAACAGAGTTTTGAGGAAATCATCAAGTATAAAACAATTGCCACCTAATTCC  
4681 GAGAAAAA ACTTCACTATCAAAAATCTTTGGACAAAAAAGACTGCTGGGCTGCCAAAAAAT  
4741 GTCGATTTATGGCAAAGAGTGCTTAGAGTAAGATCATTGGTAATAAAGCCCAAGCAAGAC  
4801 CTGCAAATATGGATAAAAATTTGCAAATTTGTGCAGAAAAATCTGGTAGAATGAGGCTAGCA  
4861 AATAAGGCATTGAATATGCTACTAGAAGGAGGCAACGATCCTAGTTTACCAAATACGTTT





6121 TATTATAACGTCTTCAGAAAAATAACACGTCAAATACCACAGTTACAAACCTTAGACTTA  
6181 CAGCATGTTTCTCCCCAGCTTCTGGCTACTCATGATCTCGAATTGGCTGTTCTGGGACA  
6241 TATTTCCAGGAAAACCTACCATTAGAATAGCGAAGTTTGAGCCATTATTTTCTGTGATC  
6301 TCTTCGAAGCAAAGGCCAAGAAAATTCTCCATCAAGGGTAGCGACGGTAAAGATTATAAA  
6361 TACGTTTTAAAGGGACATGAAGATATAAGACAAGATAGCCTTGTTATGCAATTATTTGGT  
6421 CTAGTTAACACTTTGTTGAAGAATGATTCAGAGTGTTTCAAGAGACATTTGGATATCCAA  
6481 CAATACCCGGCTATTCCATTGTCGCCTAAATCTGGTTTACTAGGATGGGTACCAAATAGT  
6541 GACACATTCCACGTTTTGATCAGAGAACACCGTGATGCCAAAAAAATTCGGTTGAACATT  
6601 GAACATTGGGTTATGTTACAAATGGCCCCGATTATGAGAAATTTGACTCTTTTACAAAAA  
6661 ATTGAAGTATTCACGTACGCTTTAGATAATACAAAAGGCCAAGACCTTTATAAAAATATTA  
6721 TGGTTAAAGAGTAGGTCGTCAGAGACATGGCTAGAACGTAGAACAACCTTATACGAGATCT  
6781 TTAGCAGTTATGTCCATGACTGGTTATATTTCTGGGACTAGGTGATCGCCATCCAAGCAAC  
6841 CTGATGCTAGATAGAATCACCGGTAAAGTTATCCACATTGATTTTCGGCGATTGTTTTGAA  
6901 GCTGCCATCTTAAGAGAAAAGTATCCAGAAAAAGTGCCATTTAGACTAACTAGGATGTTA  
6961 ACATACGCAATGGAAGTTAGTGGAATTGAAGGCAGTTTCCGAATTACTTGTGAAAATGTC  
7021 ATGAGAGTCTTAAGAGATAATAAAGAATCATTAATGGCGATCTTGGAAGCTTTTTCGCTT  
7081 GATCCTTTGATCCATTGGGGATTTGATTTACCGCCACAAAACTTACTGAGCAAACCTGGA  
7141 ATTCCTTTGCCGTTGATTAATCCTAGTGAATTATTAAGGAAGGGGCAATTACTGTCGAA  
7201 GAAGCGGCAAATATGGAAGCAGAACAACAAAATGAGACCAAAAACGCCAGAGCAATGCTT  
7261 GTTTTGAGACGTATTACAGATAAAATTAACGGGCAATGATATCAAGAGGTTCAATGAATTA



- Αλληλουχία της κωδικής περιοχής του *TAF10* στο γονιδίωμα του *Saccharomyces cerevisiae*, εκκινητές και προϊόν ενίσχυσης για τις ανάγκες των μελετών qPCR. Με κίτρινο υποσημειώνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών, οι οποίες και οριοθετούν το προϊόν της PCR.

ATGGATTTTGAGGAAGATTACGATGCGGAGTTTGATGATAATCAAGAAGGACAATTAGAA  
 ACACCTTTTCCATCGGTTGCGGGAGCCGATGATGGGGACAATGATAATGATGACTCTGTC  
 GCAGAAAACATGAAGAAGAAGCAAAAAGAGAGAGGCTGTAGTGGATGATGGGAGTGAAAAAT  
 GCATTTGGTATACCCGAATTTACAAGAAAAGATAAGACTCTGGAGGAGATTCTAGAGATG  
 ATGGACAGTACTCCTCCTATCATTTCCCGATGCAGTAATAGACTACTATTTAACCAAAAAC  
 GGGTTTAACGTAGCAGATGTACGAGTGAACGACTTTTAGCACTTGCTACTCAGAAAATTT  
 GTTAGTGATATAGCTAAGGATGCCTACGAATATTCCAGGATCAGGTCTTCCGTAGCGGTA  
 TCTAATGCTAACAACAGTCAGGCGAGAGCTAGGCAGCTATFGCAAGGACAGCAACAGCCT  
 GCGTGCAGCAGATTTCAACAACAACATCAACAGAATGAGAAGACTACAGCAAGCAAA  
 GTTGTCTGACGGTGAACGATCTCAGTAGCGCTGTTGCTGAATACGGGCTCAATATAGGT  
 CGCCAGACTTTTATCGTTAG

- Αλληλουχία της κωδικής περιοχής του *ALG9* στο γονιδίωμα του *Saccharomyces cerevisiae*, εκκινητές και προϊόν ενίσχυσης για τις ανάγκες των μελετών qPCR. Με κίτρινο υποσημειώνονται οι αλληλουχίες των εκκινητών, οι οποίες και οριοθετούν το προϊόν της PCR.

ATGAAATGCAAGGCGGTAACCATTAGTTTTATTAATGTTGTTATTTTTAACAAGAGTATAT  
 ATTACAGCCGACATTTCTCGTTAAATTTTCAGATTGCGATGAAACTTTTAATTAATGGGAACCA  
 TTAATTTATTTGGTACGTGGATTTGGTAAACAAACCTGGGAATATTCACCCGAGTATTTCT  
 ATTAGATCATGGGCTTTCTTATTTACCTTTTACTGTATTTCTTATCCAGTAAACAAAATTT  
 ACTGACCTAGAAAGTCATTTGGAACTTTTTCATCACAAGAGCATGCTTAGGCTTTTTTAGT  
 TTTATCATGGAATTTAAACTACATCGTGAATTTGCAGGCAGCTTGGCATTGCAAAATCGCA  
 AATATTTGGATTAATTTTCCAATTTGTTTAAATCCGGGCTGGTTCATGCATCTGTGGAATTA  
 TTGCCTTCTGCCGTTGCCATGTTGTTGTATGTAGGTGCCACCAGACACTCTCTACGCTAT  
 CTGTCCACTGGGTCTACTTCTAACTTTACGAAAAGTTTAGCGTACAATTTTCTGGCTAGT  
 ATACTAGGCTGGCCATTTGTTTAAATTTTAAAGCTTGCCATTAATGTTTACATTAACCTTTT  
 AACCATAGAATTAATTTCTACCATCAGAACCAGCTTTCGACTGCTGTTTGATATTTTCAATG  
 ACTGCATTTGCTGTGATTGTCACTGACAGTATATTTTACGGGAAGCTTGCTCCTGTATCA  
 TGGAACATCTTAATTTTACAATGTCATTAATGCAAGTGAGGAATCTGGCCCAAATATTTT  
 GGGGTTGAGCCATGGTACTACTATCCACTAAATTTGTTACTGAATTTCCCACTGCCTGTG  
 CTAGTTTTAGCTATTTTTGGGAATTTTCCATTTGAGATTAATGGCCATTAATGGGCATCATTA  
 TTCACATGGATTGCCGTTTTCACTCAACAACCTCACAAAAGAGGAAAGATTTCTCTATCCA  
 ATTTACGGGTTAATAACTTTGAGTGCAAGTATCGCCTTTTACAAAGTGTGAATCTATTC  
 AATAGAAAAGCCGATTTCTTAAAAAAGGTATAAAGTTGTCAGTTTTATTAATTTGTTGCAGGC  
 CAGGCAATGTACCGGATAGTGGCTTTGGTGAACAATTACACAGCTCCTATAGCCGCTAC  
 GAGCAATTTTCTTCACTAAATCAAGGTGGTGTGAAGGCACCGGTAGTGAATGTATGTACG  
 GGACGTGAATGGTATCACTTCCCAAGTTCTTTCTGCTGCCAGATAATCATAAGCCTAAAA  
 TTTGTTAAATCTGGATTTGATGGTCTTCTTCCAGGTGATTTTCCAGAGAGTGGTTCTATTT  
 TTCAAAAAGATTAGAATTTACCTAAGGGAATGAATAACAAGAATATATATGATACCGGT  
 AAAGAGTGGCCGATCACTAGATGTGATTAATTTTATTTGACATCGTCGCCCAATAAATTTA  
 ACAAAGACGTTTTTCAACCCTCTACATCTGATGGATAACTGGAATAAGCTGGCATGTGCT  
 GCATTCATCGACGGTGAATAATCTAAGATTTTGGGTAGAGCATTTTACGTACCGGAGCCA  
 ATCAACCGAATCATGCAATAGTTTTACCAAAACAATGGAATCAAGTGTACGGTGTTCGT  
 TACATTTGATTACTGTTTTGTTTTGAAAAACCAACTGAGACTACTAATTGA

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

Αλληλουχία του pCMVsyn. Με κίτρινο υποσημειώνονται οι περιοχές των εκκινήτων του *SNCA* για την PCR, με σκοπό την μετέπειτα κλωνοποίηση στον pET29(+). Οι αυθεντικοί εκκινήτες αναγράφονται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι και φέρουν τροποποιήσεις την νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας με σκοπό τον σχηματισμό κατάλληλων θέσεων περιορισμού. Με έντονα γράμματα φέρονται τα κωδικόνια έναρξης και λήξης του γονιδίου *SNCA*.

```
TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT
AGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAA
ATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATT
GACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA
GGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGT
AAACTGCCCACCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC
AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTC
CTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC
CATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGA
TAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCA
TTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACG
GGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACG
CAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA
GCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTA
CCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTGGTACCGAGCTCG
GATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCC
TTGACGACAGTGTGGTGTAAGGAAATTCATTAGCCATGGGA
TCATTATCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGT
GTGGCTACTGCTGAGAAAACCAAACAGGGTGTGGCAGAAG
CAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGTCTCTATGTAGGCTC
CAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGCATGGTGTGGCAACAGTG
GCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAG
CAGTGGTGACGGGTGTGACAGCAGTAGCCCAGAAGACAGT
GGAGGGAGCAGGGAGCATTGCAGCAGCCACTGGCTTTGTC
AAAAAGGACCAGTTGGGCAAGAATGAAGAAGGAGCCCCAC
AGGAAGGAATTCTGGAAGATATGCCTGTGGATCCTGACAA
TGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAAGGGTATCAAGAC
TACGAACTGGAAGCCTAAGAAAATATCTTTGCTCCAGTTT
CTTGAGATCCACCGGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGC
CATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTTTAAAAAAC
TCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGC
AATTGTGTGTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGT
TACAAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAAATAAAG
CATTTTTTTCCTGCAATCTAGTGTGGTTTTGTCCAAACT
CATCAATGTATCTTAAGGCGTAAATTTGTAAGCGTTAATAT
TTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTTTGTAAATCAGCTCA
TTTTTTAAACCAATAGGCCGAAAATCGGCAAAATCCCTTATA
AATCAAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTGTTCC
AGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCGTGGACTCC
AACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCC
CACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTC
GAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCATAAAGGGAGC
CCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGG
CGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAG
GGCGTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACC
ACACCCGCCGCGCTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTACAG
GTGGCACTTTTCGGGGAAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTG
TTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATG
AGACAAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAA
```

GGAAGAGTCCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTG  
TGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAG  
GCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAAC  
CAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGT  
ATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCC  
CGCCCCCTAACTCCGCCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCCAG  
TTCCGCCCCATCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTT  
ATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCCTCTGAGCTAT  
TCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTT  
TTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCG  
CATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCC  
GCTTGGGTGGAGAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAAC  
AGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTC  
AGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTG  
TCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGC  
TATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGT  
GCTCGACGTTGCTACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTA  
TTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACC  
TTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAAT  
GCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTC  
GACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTC  
GGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGA  
AGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACGTTTCGCCAGG  
CTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGTA  
CCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAA  
TGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGT  
GTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTG  
ATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGGCAATGGGCTGACCCGCTT  
CCTCGTGTCTTACGTTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGC  
ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGG  
GACTCTGGGGTTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAAC  
CTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATG  
AAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTG  
GATGATCCTCCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTC  
GCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGA  
CAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAG  
ACAGAATAAAAACGCACGGTGTGGGTCGTTTGTTCATAAA  
CGCGGGGTTCCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCC  
CACCGAGACCCCATTTGGGGCCAATACGCCCGGCTTCTTC  
CTTTTCCCCACCCACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCCA  
GGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAG  
CCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAAC  
TCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTT  
GATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGT  
TCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAAGATCAAAGGATC  
TTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTG  
CAAACAAAAAACCAACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGC  
CGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGG  
CTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTG  
TAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCAC  
CGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGC  
TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGAC  
TCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCT  
GAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAAC  
GACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGA  
GAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGT  
ATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAG  
GGAGCTTCCAGGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCCT  
GTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGT  
GATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAG  
CAACGCGGCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTTGCTGGCCT

TTTGCTCACATGTTCTTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTG  
TGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5

Ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της ένθεσης του *SNCA* στον pBluescript SK II (+)

GGAGGAAATTCATTACATATGGATGTATTTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTG  
GCTACTGCTGAGAAAACCAAACAGGGTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGTCT  
CTATGTAGGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTGAGAAGACCA  
AAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACGGGTGTGACAGCAGTAGCCAGAAAGACA  
GTGGAGGGAGCAGGGAGCATTGCAGCAGCCACTGGCTTTGTCAAAAAGGACCAGTTGGGCAAGAA  
TGAAGAAGGAGCCCCACAGGAAGGAAATCTGGAAGATATGCCTGTGGATCCTGACAAATGAGGCTT  
ATGAAATGCCTTCTGAGGAAGGGTATCAAGACTACGAACCTGAAGTCGACGAAATATCT

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6

**Πίνακας Π6.1:** Αποτελέσματα υγρής χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (LC-MS/MS) για την ζώνη της SDS-PAGE με τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά η  $\alpha$ -συνουκλείνη για το στέλεχος B4741 (οι 4 κυριότερες φέρονται σκιασμένες). Πραγματοποιήθηκε αναζήτηση των ευρισκόμενων αλληλουχιών στην βάση δεδομένων Uniprot. Παρουσιάζεται ο κωδικός ένταξης (accession number) στην βάση δεδομένων, η περιγραφή (Description) του πρωτεϊνικού μορίου, το score αντιστοίχισης σε κάθε πρωτεΐνη, το ποσοστό κάλυψης (Coverage) της αλληλούχισης του πρωτεϊνικού μορίου, ο αριθμός των στοιχίσεων του φάσματος των πεπτιδίων (#PSM), ο ολικός αριθμός διακριτών αλληλουχιών για τα πεπτίδια της κάθε πρωτεϊνικής ομάδας (#Peptides), ο αριθμός των αμινοξέων του πρωτεϊνικού μορίου (#AAs), το μοριακό βάρος σε kD (MW) και το υπολογιζόμενο ισοηλεκτρικό σημείο του κάθε μορίου (Calc. pI). Το score αντιστοίχισης αποτελεί το σύνολο των επιμέρους score όλων των παρατηρούμενων φασμάτων μάζας, τα οποία μπορούν να αντιστοιχούν σε αλληλουχίες αμινοξέων στο εσωτερικό της πρωτεΐνης. Ένα πολύ υψηλό score αναδεικνύει μία πολύ αξιόπιστη αντιστοιχία. Το ποσοστό κάλυψης (coverage) αποτελεί το % ποσοστό της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, το οποίο έχει εξακριβωθεί από ταυτοποιημένα πεπτίδια. Υπολογίζεται διαιρώντας τον αριθμό των αμινοξέων σε όλα τα ταυτοποιημένα πεπτίδια με τον ολικό αριθμό αμινοξέων ολόκληρης της πρωτεϊνικής αλληλουχίας. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή αυτή τόσο πιο βέβαιο το αποτέλεσμα που αναπαράγεται. Η τιμή #PSM αποτελεί τον ολικό αριθμό των ταυτοποιημένων πεπτιδικών αλληλουχιών που αντιστοιχούν στην ευρισκόμενη πρωτεΐνη. Όσο υψηλότερη είναι και αυτή η τιμή τόσο πιο αξιόπιστη είναι η ταυτοποίηση της αλληλουχίας. Η τιμή #PSM μπορεί να είναι υψηλότερη από τον αριθμό των πεπτιδίων που ταυτοποιούνται για μία πρωτεΐνη με υψηλό score λόγω του ότι ορισμένα πεπτίδια μπορεί να ταυτοποιούνται επανειλημμένως. Τέλος, η τιμή #Peptides αποτελεί τον ολικό αριθμό διακριτών πεπτιδίων που ταυτοποιούνται να ανήκουν σε μία πρωτεϊνική ομάδα.

P00817	P00549	P00560	P00924	P00925	Q12512	P14540	P00360	P00359	P00358	Accession
Inorganic pyrophosphatase OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=IPPI1 PE=1 SV=4 - [IPYR_Y EAST]	Pyruvate kinase 1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=CDC19 PE=1 SV=2 - [KPYK1_Y EAST]	Phosphoglycerate kinase OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PGK1 PE=1 SV=2 - [PGK_Y EAST]	Enolase 1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ENO1 PE=1 SV=3 - [ENO1_Y EAST]	Enolase 2 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ENO2 PE=1 SV=2 - [ENO2_Y EAST]	Protein ZPS1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ZPS1 PE=3 SV=1 - [ZPS1_Y EAST]	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=FBA1 PE=1 SV=3 - [ALF_YEAST]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=TDH1 PE=1 SV=3 - [G3P1_Y EAST]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=TDH3 PE=1 SV=3 - [G3P3_Y EAST]	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=TDH2 PE=1 SV=3 - [G3P2_Y EAST]	Description
9,11	21,53	28,76	28,90	35,51	54,86	47,87	113,86	153,28	161,77	Score
17,77	19,00	24,76	25,63	33,87	16,87	26,18	50,60	41,57	41,57	Coverage
4	8	8	9	11	7	6	13	15	13	# Peptides
4	10	11	13	16	21	20	47	63	68	# PSM
287	500	416	437	437	249	359	332	332	332	# AAs
32,3	54,5	44,7	46,8	46,9	27,5	39,6	35,7	35,7	35,8	MW [kDa]
5,58	7,68	7,61	6,62	6,00	5,02	5,78	8,28	6,96	6,96	calc. pI

Q07551	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=YDL124W PE=1 SV=1 - [KAR_Y EAST]	P07257	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=QCR2 PE=1 SV=1 - [QCR2_Y EAST]	P15019	Transaldolase OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=TAL1 PE=1 SV=4 - [TAL1_Y EAST]	P00830	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ATP2 PE=1 SV=2 - [ATPB_Y EAST]	P53252	Sphingolipid long chain base-responsive protein PIL1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PIL1 PE=1 SV=1 - [PIL1_Y EAST]	P00330	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ADH1 PE=1 SV=5 - [ADH1_Y EAST]	P38077	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ATP3 PE=1 SV=1 - [ATPG_Y EAST]	P29311	Protein BMH1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=BMH1 PE=1 SV=4 - [BMH1_Y EAST]	P34730	Protein BMH2 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=BMH2 PE=1 SV=3 - [BMH2_Y EAST]	P02994	Elongation factor 1-alpha OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=TEF1 PE=1 SV=1 - [EF1A_Y EAST]	P10591	Heat shock protein SSA1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=SSA1 PE=1 SV=4 - [HSP71_Y EAST]	P17505	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=MDH1 PE=1 SV=2 - [MDHM_Y EAST]
4,08	8,90	14,70	12,22	16,13	12,22	9,66	9,17	3,84	5,16	7,93	5,06	9,90	7,40										
8,33	8,88	18,21	12,33	22,99	12,33	13,57	16,09	4,18	7,49	12,45	2,62	8,88	14,97										
2	4	6	5	6	5	4	4	1	2	3	1	4	3										
2	4	6	5	7	5	4	4	1	2	3	2	4	3										
312	642	368	511	335	511	339	348	311	267	273	458	642	334										
35,5	69,6	40,5	54,8	37,0	54,8	38,3	36,8	34,3	30,1	31,0	50,0	69,6	35,6										
6,19	5,11	7,96	5,71	6,43	5,71	4,63	6,68	9,31	4,88	4,88	9,04	5,11	8,47										



Q08686	Thiosulfate sulfurtransferase TUM1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ITU M1 PE=1 SV=1 - [THTR_YEAST]	Q9HEQ9	Single-stranded TG1-3 DNA-binding protein OS=Schizosaccharomyces pombe (strain ATCC 972 / ATCC 24843) OX=2848 12 GN=tcg1 PE=1 SV=3 - [TCG1_SCHPO]	P50095	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 3 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=IMD 3 PE=1 SV=1 - [IMDH3_YEAST]	Q07653	Protein HBT1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=HBT 1 PE=1 SV=1 - [HBT1_YEAST]	P54114	Aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] 2 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ALD 3 PE=1 SV=1 - [ALDH3_YEAST]	P53228	Transaldolase NQM1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=NQ M1 PE=1 SV=1 - [TAL2_YEAST]	P05317	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=RPP 0 PE=1 SV=2 - [RLA0_YEAST]	P26321	60S ribosomal protein L5 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=RPL 5 PE=1 SV=4 - [RL5_YEAST]	P38715	NADPH-dependent aldose reductase GRE3 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=GRE 3 PE=1 SV=1 - [GRE3_YEAST]	P17128	Actin OS=Kluyveromyces lactis (strain ATCC 8585 / CBS 2359 / DSM 70799 / NBRC 1267 / NRRL Y-1140 / WM37) OX=2845 90 GN=ACT PE=3 SV=2 - [ACT_KLULA]	P37012	Phosphoglucomutase 2 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PG M2 PE=1 SV=1 - [PGM2_YEAST]	P06169	Pyruvate decarboxylase isozyme 1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PDC 1 PE=1 SV=7 - [PDC1_YEAST]
	0,00			5,08	2,04		5,21	6,86	2,76	2,02	4,29	4,59	6,74	9,20									
	0,00	0,00	5,53	12,31	3,21	3,03	5,60	5,81	5,60	5,60	5,81	5,60	6,85	5,51									
		2	2	3	1	1	2	3	1	1	2	2	3	2									
		2	2	3	1	1	2	3	1	1	2	2	3	4									
304	349	523	506	333	312	297	375	327	375	375	327	375	569	563									
34,2	38,0	56,5	55,4	37,2	33,7	33,7	41,6	37,1	41,6	41,6	37,1	41,6	63,0	61,5									
6,06	5,62	7,40	5,76	6,38	4,83	6,83	5,58	7,08	5,58	5,58	7,08	5,58	6,62	6,19									

P19263	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14	OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92	GN=RGR 1 PE=1 SV=2 - [MED14_YEAST]	2,17	0,74	1	1	1082	123,3	8,75
P13185	Serine/threonine protein kinase KIN1	OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92	GN=KIN 1 PE=1 SV=3 - [KIN1_YEAST]	0,00	1064	1	1	500	55,3	6,19
P17709	Glucokinase-1	OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92	GN=GLK 1 PE=1 SV=1 - [HXKG_YEAST]	2,28	2,80	1	1	500	55,3	6,19
P40531	Protein GVP36	OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92	GN=GVP 36 PE=1 SV=1 - [GVP36_YEAST]	2,66	4,29	1	1	326	36,6	4,97
P32324	Elongation factor 2	OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92	GN=EFT 1 PE=1 SV=1 - [EF2_YEAST]	2,45	1,66	1	1	842	93,2	6,32
A7A1G0	ATP-dependent RNA helicase DBP9	OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain YJM789) OX=3077 96	GN=DBP 9 PE=3 SV=1 - [DBP9_YEAST]	2,49	3,37	1	1	594	68,0	9,19
A6ZPU3	ATP-dependent RNA helicase DBP4	OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain YJM789) OX=3077 96	GN=DBP 4 PE=3 SV=1 - [DBP4_YEAST]	2,35	1,17	1	1	770	87,1	7,42
P07251	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92	GN=ATP 1 PE=1 SV=5 - [ATPA_YEAST]	2,28	2,02	1	1	545	58,6	9,04
P38115	D-arabinose dehydrogenase [NAD(P)+] heavy chain	OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92	GN=ARA 1 PE=1 SV=1 - [ARA1_YEAST]	0,00	344			344	38,9	5,96
P21192	Metallothionein expression activator	OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92	GN=ACE 2 PE=1 SV=1 - [ACE2_YEAST]	0,00	770			770	86,6	8,31
P47147	Phosphonitride 3-phosphate	OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92	GN=YM R1 PE=1 SV=1 - [YMR1_YEAST]	2,35	1,74	1	2	688	80,1	7,59
P32366	V-type proton ATPase subunit d	OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92	GN=VM A6 PE=1 SV=2 - [VA0D_YEAST]	2,12	2,90	1	1	345	39,8	4,60

P10664	60S ribosomal protein L4-A OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=RPL4A PE=1 SV=4 - [RL4A_YEAST]	P10963	Phosphoenolpyruvate carboxylase (ATP) OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PCK1 PE=1 SV=2 - [PCKA_YEAST]	P32263	Pyroline-5-carboxylate reductase OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PRO3 PE=1 SV=1 - [P5CR_YEAST]	P32473	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PDB1 PE=1 SV=2 - [ODPB_YEAST]	P40010	Nuclear GTP-binding protein NUG1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=NUG1 PE=1 SV=1 - [NUG1_YEAST]	A6ZPE5	Nucleolar protein 58 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain YJM789) OX=3077 96 GN=NOP58 PE=3 SV=1 - [NOP58_YEAST]	P40965	MutS protein homolog 4 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=MSH4 PE=1 SV=2 - [MSH4_YEAST]
	2,17		2,84								2,23		
	2,76		2,37								0,00	1,14	
	1		1									1	
	1		1									1	
	362		530								520	878	
	39,1		63,0								57,7	99,2	
	10,64		6,46								8,88	7,28	

Q03102	Uncharacterized membrane protein YML131W OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=YM L131W PE=1 SV=1 - [YMN1_ YEAST]	P41940	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PSA PE=1 SV=2 - [MPG1_ YEAST]	P47143	Adenosine kinase OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=AD O1 PE=1 SV=1 - [ADK_Y EAST]	O00370	LINE-1 retrotransposable element ORF2 protein OS=Homo sapiens OX=9606 PE=1 SV=1 - [LORF2_ HUMAN]	Q12363	Transcriptional modulator WTM1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=WT M1 PE=1 SV=1 - [WTM1_ YEAST]	Q75D20	RNA polymerase II transcription factor B subunit 3 OS=Ashbya gossypii (strain ATCC 10895 / CBS 109.51 / FGSC 9923 / NRRL Y-1056) OX=284811 GN=TFB3 PE=3 SV=1 - [TFB3_ASH GO]
2,16	2,33	2,19	2,40	0,00	2,75	0,00	1	1	1	1	
2,74	4,99	3,53	0,00	2,75	0,00	0,00	1	1	1	1	
365	361	340	1275	437	437	318	437	437	437	318	
40,0	39,5	36,3	148,9	48,4	48,4	37,7	48,4	48,4	48,4	37,7	
8,13	6,34	5,16	9,66	5,16	5,16	5,63	5,16	5,16	5,16	5,63	

**Πίνακας Π6.2:** Αποτελέσματα υγρής χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (LC-MS/MS) για την ζώνη της SDS-PAGE με τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά η α-συνουκλείνη για το στέλεχος *tps1Δ* (οι 4 κυριότερες φέρονται σκιασμένες). Πραγματοποιήθηκε αναζήτηση των ευρισκόμενων αλληλουχιών στην βάση δεδομένων Uniprot. Παρουσιάζεται ο κωδικός ένταξης (accession number) στην βάση δεδομένων, η περιγραφή (Description) του πρωτεϊνικού μορίου, το score αντιστοίχισης σε κάθε πρωτεΐνη, το ποσοστό κάλυψης (Coverage) της αλληλούχισης του πρωτεϊνικού μορίου, ο αριθμός των στοιχίσεων του φάσματος των πεπτιδίων (#PSM), ο ολικός αριθμός διακριτών αλληλουχιών για τα πεπτίδια της κάθε πρωτεϊνικής ομάδας (#Peptides), ο αριθμός των αμινοξέων του πρωτεϊνικού μορίου (#AAs), το μοριακό βάρος σε kD (MW) και το υπολογιζόμενο ισοηλεκτρικό σημείο του κάθε μορίου (Calc. pI).

Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSM	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P00358	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=TDH PE=1 SV=3 - [G3P2_Y EAST]	230,84	48,49	15	93	332	35,8	6,96

P07257	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / 204508 / S288c) OX=559292 GN=MDH1 PE=1 SV=2	2	GN=QCR2 PE=1 SV=1	[QCR2_Y EAST]	40,5	7,96
P00817	Inorganic pyrophosphatase	OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=IPPI1 PE=1 SV=4	3	[IPYR_Y EAST]	6,74	13,59	5,58
P00549	Pyruvate kinase 1	OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=CDC19 PE=1 SV=2	2	[KPYK1_YEAST]	4,31	4,80	7,68
P00560	Phosphoglycerate kinase	OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=PGK1 PE=1 SV=2	2	[PGK_Y EAST]	4,08	5,29	7,61
P00924	Enolase 1	OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ENO1 PE=1 SV=3	1	[ENO1_Y EAST]	2,45	3,43	6,62
P00925	Enolase 2	OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ENO2 PE=1 SV=2	1	[ENO2_Y EAST]	2,45	3,43	6,00
Q12512	Protein ZPS1	OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ZPS1 PE=3 SV=1	4	[ZPS1_Y EAST]	12,07	15,66	5,02
P14540	Fructose-bisphosphate aldolase	OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=FBA1 PE=1 SV=3	4	[ALF_YEAST]	21,17	18,66	5,78
P00360	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TDH1 PE=1 SV=3	12	[G3P1_Y EAST]	171,53	47,89	8,28
P00359	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3	OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TDH3 PE=1 SV=3	17	[G3P3_Y EAST]	235,83	56,93	6,96
1			4				
1			4				
368			334				
40,5			35,6				
7,96			8,47				

P06169	Pyruvate decarboxylase isozyme 1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PDC1 PE=1 SV=7 - [PDC1_YEAST]	P00830	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ATP2 PE=1 SV=2 - [ATPB_YEAST]	P15019	Transaldolase OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=TAL1 PE=1 SV=4 - [TAL1_YEAST]
Q07551	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=YDL124W PE=1 SV=1 - [KAR_YEAST]	P00330	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ADH1 PE=1 SV=5 - [ADH1_YEAST]	P53252	Sphingolipid long chain base-responsive protein PIL1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PIL1 PE=1 SV=1 - [PIL1_YEAST]
P10591	Heat shock protein SSA1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=SSA1 PE=1 SV=4 - [HSP71_YEAST]	P38077	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ATP3 PE=1 SV=1 - [ATPG_YEAST]	P00330	Alcohol dehydrogenase 1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ADH1 PE=1 SV=5 - [ADH1_YEAST]
P02994	Elongation factor 1-alpha OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=TEF1 PE=1 SV=1 - [EF1A_YEAST]	P29311	Protein BMH1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=BMH1 PE=1 SV=4 - [BMH1_YEAST]	P34730	Protein BMH2 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=BMH2 PE=1 SV=3 - [BMH2_YEAST]
P07551	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=YDL124W PE=1 SV=1 - [KAR_YEAST]	P34730	Protein BMH2 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=BMH2 PE=1 SV=3 - [BMH2_YEAST]	P02994	Elongation factor 1-alpha OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=TEF1 PE=1 SV=1 - [EF1A_YEAST]
P10591	Heat shock protein SSA1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=SSA1 PE=1 SV=4 - [HSP71_YEAST]	P02994	Elongation factor 1-alpha OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=TEF1 PE=1 SV=1 - [EF1A_YEAST]	P10591	Heat shock protein SSA1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=SSA1 PE=1 SV=4 - [HSP71_YEAST]
Q07551	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=YDL124W PE=1 SV=1 - [KAR_YEAST]	P07551	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=YDL124W PE=1 SV=1 - [KAR_YEAST]	Q07551	NADPH-dependent alpha-keto amide reductase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=YDL124W PE=1 SV=1 - [KAR_YEAST]
P06169	Pyruvate decarboxylase isozyme 1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PDC1 PE=1 SV=7 - [PDC1_YEAST]	P06169	Pyruvate decarboxylase isozyme 1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PDC1 PE=1 SV=7 - [PDC1_YEAST]	P06169	Pyruvate decarboxylase isozyme 1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PDC1 PE=1 SV=7 - [PDC1_YEAST]
0,00		0,00		0,00	
563		563		563	
61,5		61,5		61,5	
6,19		6,19		6,19	
5,19		5,19		5,19	
8,33		8,33		8,33	
2		2		2	
2		2		2	
312		312		312	
642		642		642	
69,6		69,6		69,6	
5,11		5,11		5,11	
9,04		9,04		9,04	
4,88		4,88		4,88	
31,0		31,0		31,0	
30,1		30,1		30,1	
34,3		34,3		34,3	
36,8		36,8		36,8	
38,3		38,3		38,3	
54,8		54,8		54,8	
37,0		37,0		37,0	
6,43		6,43		6,43	
6,68		6,68		6,68	
4,63		4,63		4,63	
5,71		5,71		5,71	
511		511		511	
339		339		339	
348		348		348	
311		311		311	
8,06		8,06		8,06	
2,21		2,21		2,21	
2,78		2,78		2,78	
2,74		2,74		2,74	
1		1		1	
1		1		1	
335		335		335	
0,00		0,00		0,00	

Q08686	Thiosulfate sulfurtransferase TUM1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=TU M1 PE=1 SV=1 - [THTR_YEAST]	Q9HEQ9	Single-stranded TGI-3 DNA-binding protein OS=Schizosaccharomyces pombe (strain ATCC 972 / ATCC 24843) OX=2848 12 GN=tcg1 PE=1 SV=3 - [TCG1_SCHPO]	P50095	Inosine-5-phosphate dehydrogenase 3 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=IMD 3 PE=1 SV=1 - [IMDH3_YEAST]	Q07653	Protein HBT1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=HBT 1 PE=1 SV=1 - [HBT1_YEAST]	P54114	Aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] 2 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ALD 3 PE=1 SV=1 - [ALDH3_YEAST]	P53228	Transaldolase NQM1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=NQ M1 PE=1 SV=1 - [TAL2_YEAST]	P05317	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=RPP 0 PE=1 SV=2 - [RLA0_YEAST]	P26321	60S ribosomal protein L5 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=RPL 5 PE=1 SV=4 - [RL5_YEAST]	P38715	NADPH-dependent aldose reductase GRE3 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=GRE 3 PE=1 SV=1 - [GRE3_YEAST]	P17128	Actin OS=Kluyveromyces lactis (strain ATCC 8585 / CBS 2359 / DSM 70799 / NBRC 1267 / ATCC 204508 / NRRL Y-1140 / WM37) OX=284590 GN=ACT PE=3 SV=2 - [ACT_KLU LA]	P37012	Phosphoglucomutase 2 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PG M2 PE=1 SV=1 - [PGM2_YEAST]
5,13	7,24	2	2	304	34,2	6,06	4,15	1,72	4,15	2,29	0,00	1,43	0,00	0,00	7,05	4,99	4,85	2,21	2,06	2,20	
		1	1	523	113,5	6,38	1			1,43	0,00	1,43	0,00	0,00	7,05	4,99	4,85	2,21	2,06	2,20	
		2	2	523	113,5	6,38	1			1,43	0,00	1,43	0,00	0,00	7,05	4,99	4,85	2,21	2,06	2,20	
		349	349	523	113,5	6,38	1046	506	506	1046	333	1046	506	333	312	312	297	327	375	569	
		38,0	38,0	56,5	113,5	6,38	113,5	55,4	55,4	113,5	37,2	113,5	55,4	37,2	33,7	33,7	33,7	37,1	41,6	63,0	
		5,62	5,62	7,40	6,38	6,38	6,38	5,76	5,76	6,38	6,38	6,38	5,76	6,38	4,83	4,83	6,83	7,08	5,58	6,62	

P13185	Serine/threonine protein kinase KIN1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=KIN1 1 PE=1 SV=3 - [KIN1_YEAST]	P40531	Protein GVP36 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=GVP36 1 PE=1 SV=1 - [GVP36_YEAST]	P32324	Elongation factor 2 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=EFT1 1 PE=1 SV=1 - [EF2_YEAST]	A7A1G0	ATP-dependent RNA helicase DBP9 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain YJM789) OX=3077 96 GN=DBP9 9 PE=3 SV=1 - [DBP9_YEAST]	A6ZPU3	ATP-dependent RNA helicase DBP4 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain YJM789) OX=3077 96 GN=DBP4 4 PE=3 SV=1 - [DBP4_YEAST]	P07251	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ATP1 1 PE=1 SV=5 - [ATPA_YEAST]	P38115	D-arabinose dehydrogenase [NAD(P)+] heavy chain OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ARAI2 2 PE=1 SV=1 - [ARAI_YEAST]	P21192	Metallothionein expression activator OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ACE2 2 PE=1 SV=1 - [ACE2_YEAST]	P47147	Phosphonitride 3-phosphate OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=YMRI 1 PE=1 SV=1 - [YMR1_YEAST]	P32366	V-type proton ATPase subunit d OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=VMA6 6 PE=1 SV=2 - [VAO6_YEAST]
	2,10		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,59	2,13	0,00	2,90	2,16	2,16	2,90	2,16	2,90		
	1								1	1			1	1			1	1	
	1064	326	842	770	594	770	545	344	688	770	545	688	345	345	688	345	345	345	
	120,0	36,6	93,2	87,1	68,0	87,1	58,6	38,9	80,1	86,6	58,6	80,1	39,8	39,8	80,1	39,8	39,8	39,8	
	8,72	4,97	6,32	7,42	9,19	7,42	9,04	5,96	7,59	8,31	9,04	7,59	4,60	4,60	7,59	4,60	4,60	4,60	



P25332	Ribokinase OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=RBK1 PE=1 SV=2 - [RBSK_YEAST]	P19736	Pre-mRNA splicing factor PRP9 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PRP9 PE=1 SV=1 - [PRP9_YEAST]	P27616	Phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthase OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=ADE1 PE=1 SV=2 - [PUR7_YEAST]	P32598	Serine/threonine protein phosphatase PP1-2 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=GLC7 PE=1 SV=1 - [PP12_YEAST]	P10963	Phosphoenolpyruvate carboxylkinase (ATP) OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PCK1 PE=1 SV=2 - [PCKA_YEAST]	P32263	Pyrroline-5-carboxylate reductase OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PRO3 PE=1 SV=1 - [P5CR_YEAST]	P32473	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PDB1 PE=1 SV=2 - [ODPB_YEAST]	P40010	Nuclear GTP-binding protein NUG1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=NUG1 PE=1 SV=1 - [NUG1_YEAST]	P6ZPE5	Nucleolar protein 58 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain YJM789) OX=3077 96 GN=NOP58 PE=3 SV=1 - [NOP58_YEAST]	P40965	MutS protein homolog 4 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=MSH4 PE=1 SV=2 - [MSH4_YEAST]	P19263	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=RGR1 PE=1 SV=2 - [MED14_YEAST]
2,35		2,04				0,00			2,21	3,56	2,23	2,35				0,00					
3,60	0,00	1,51	0,00	0,00	4,55	5,74	1,73	3,33	4,55	5,74	1,73	3,33	0,00	0,00	0,00	0,00					
1		1			1	1	1		1	1	1	1									
1		1			1	1	1		1	1	1	1									
333	306	530	312	549	286	366	520	511	286	366	520	511	878	1082							
36,9	34,6	63,0	35,9	60,9	30,1	40,0	57,7	56,9	30,1	40,0	57,7	56,9	99,2	123,3							
5,29	5,95	6,46	5,49	6,34	5,48	5,30	8,88	8,94	5,48	5,30	8,88	8,94	7,28	8,75							

Q03102	Uncharacterized membrane protein YML131W OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=YML131W PE=1 SV=1 - [YMN1_Y EAST]						365	40,0	8,13
P41940	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=PSA1 PE=1 SV=2 - [MPG1_Y EAST]						361	39,5	6,34
P47143	Adenosine kinase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=AD01 PE=1 SV=1 - [ADK_Y EAST]						340	36,3	5,16
O00370	LINE-1 retrotransposable element ORF2 protein OS=Homo sapiens OX=9606 PE=1 SV=1 - [LORF2_HUMAN]		2,31				1	1	
P12363	Transcriptional modulator WT1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=WTM1 PE=1 SV=1 - [WTM1_YEAST]						437	48,4	5,36
Q75D20	RNA polymerase II transcription factor B subunit 3 OS=Ashbya gossypii (strain ATCC 10895 / CBS 109.51 / FGSC 9923 / NRRL Y-1056) OX=284811 GN=RPL4A PE=1 SV=4 - [RL4A_Y EAST]		2,58				318	37,7	5,63
Q10664	60S ribosomal protein L4-A OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=RPL4A PE=1 SV=4 - [RL4A_Y EAST]						362	39,1	10,64
			0,00				0,00		
			1				1		
			1				1		
			1275				1275		
			148,9				148,9		
			9,66				9,66		

**Πίνακας Π6.3:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα υγρής χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (LC-MS/MS) για τις δύο ζώνες της SDS-PAGE με τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρά η ασυνουκλεΐνη για τα στελέχη BY4741 και *tps1Δ* (οι 4 κυριότερες φέρονται σκιασμένες). Πραγματοποιήθηκε αναζήτηση των ευρισκόμενων αλληλουχιών στην βάση δεδομένων Uniprot. Παρουσιάζεται ο κωδικός ένταξης (accession number) στην βάση δεδομένων, η περιγραφή (Description) του πρωτεϊνικού μορίου, το συνολικό ποσοστό κάλυψης (ΣCoverage) της αλληλούχισης του πρωτεϊνικού μορίου, ο συνολικός αριθμός των στοιχίσεων του φάσματος των πεπτιδίων (Σ#PSM), ο ολικός αριθμός διακριτών αλληλουχιών για τα πεπτίδια της κάθε πρωτεϊνικής ομάδας (Σ#Peptides), ο αριθμός των αμινοξέων του πρωτεϊνικού μορίου (#AAs), το μοριακό βάρος σε kD (MW) και το υπολογιζόμενο ισοηλεκτρικό σημείο του κάθε μορίου (Calc. pI). Παράλληλα, στην παρούσα ανάλυση συμπεριλαμβάνεται η παράμετρος Σ#Proteins, η οποία αντιστοιχεί στο ολικό αριθμό των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών στην ομάδα πρωτεϊνών η οποία αποτελείται από μία κύρια πρωτεΐνη. Η παράμετρος Σ#Unique Peptides αφορά τον αριθμό των ταυτοποιημένων μοναδικών αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μία ομάδα πρωτεϊνών και δεν αναγνωρίζονται σε άλλες πρωτεϊνικές ομάδες.

P00549	P00560	P00924	P00925	Q12512	P14540	P00360	P00359	P00358	Accession
Pyruvate kinase 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=CDC1 PE=1 SV=2 - [KPYK1_YEAST]	Phosphoglycerate kinase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=PGK1 PE=1 SV=2 - [PGK_YEAST]	Enolase 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ENO1 PE=1 SV=3 - [ENO1_YEAST]	Enolase 2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ENO2 PE=1 SV=2 - [ENO2_YEAST]	Protein ZPS1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ZPS1 PE=3 SV=1 - [ZPS1_YEAST]	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=FBA1 PE=1 SV=3 - [ALF_YEAST]	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TDH1 PE=1 SV=3 - [G3P1_YEAST]	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 3 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TDH3 PE=1 SV=3 - [G3P3_YEAST]	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TDH2 PE=1 SV=3 - [G3P2_YEAST]	Description
19,00	24,76	25,63	33,87	16,87	26,18	52,71	56,93	48,49	$\Sigma$ Coverage
5	2	1	1	1	1	1	2	2	$\Sigma$ # Proteins
8	7	3	4	7	6	10	5	3	$\Sigma$ # Unique Peptides
8	8	9	11	7	6	15	17	15	$\Sigma$ # Peptides
12	13	14	17	26	29	115	157	161	$\Sigma$ # PSMs
500	416	437	437	249	359	332	332	332	# AAs
54,5	44,7	46,8	46,9	27,5	39,6	35,7	35,7	35,8	MW [kDa]
7,68	7,61	6,62	6,00	5,02	5,78	8,28	6,96	6,96	calc. pI

P29311	Protein BMHI OS=Sacc haromyce cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=BM HI PE=1 SV=4 - [BMHI_ YEAST]	P38077	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Saccharo myces cerevisiae (strain ATCC (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATP3 PE=1 SV=1 - [ATPG_YEA ST]	P00330	Alcohol dehydrogena se 1 OS=Sacchar omyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ADHI PE=1 SV=5 - [ADHI_YE AST]	P53252	Sphingolipid long chain base- responsive protein PIL1 OS=Saccharo myces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=PIL1 PE=1 SV=1 - [PIL1_YEAS T]	P00830	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Saccharo myces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATP2 PE=1 SV=2 - [ATPB_YEA ST]	P15019	Transaldolas e OS=Sacchar omyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TAL1 PE=1 SV=4 - [TAL1_YEA ST]	P07257	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Saccharo myces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=QCR2 PE=1 SV=1 - [QCR2_YEA ST]	P17505	Malate dehydrogenase , mitochondrial OS=Saccharo myces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=MDHI PE=1 SV=2 - [MDHM_YE AST]	P00817	Inorganic pyrophosph atase OS=Saccha romyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=55929 2 GN=IPPI PE=1 SV=4 - [IPYR_YE AST]
12,73	12,22	16,09	13,57	12,33	22,99	18,21	27,54	17,77									
1	1	2	2	1	1	1	1	2									
1	2	3	4	4	6	6	5	3									
3	3	4	4	5	6	6	6	4									
4	4	4	5	6	7	7	7	7									
267	311	348	339	511	335	368	334	287									
30,1	34,3	36,8	38,3	54,8	37,0	40,5	35,6	32,3									
4,88	9,31	6,68	4,63	5,71	6,43	7,96	8,47	5,58									

P53228	Transaldolase NQM1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=NQ M1 PE=1 SV=1 - [TAL2_Y EAST]	P05317	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 2 GN=RPP0 PE=1 SV=2 - [RLA0_YEAST]	P26321	60S ribosomal protein L5 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=RPL5 PE=1 SV=4 - [RL5_YEAST]	P38715	NADPH-dependent aldose reductase GRE3 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 2 GN=GRE3 PE=1 SV=1 - [GRE3_YEAST]	P17128	Actin OS=Kluyveromyces lactis (strain ATCC 8585 / CBS 2359 / DSM 70799 / NBRC 1267 / NRRL Y-1140 / WM37) OX=284590 GN=ACT PE=3 SV=2 - [ACT_KLU LA]	P37012	Phosphoglucomutase 2 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PG M2 PE=1 SV=1 - [PGM2_YEAST]	P06169	Pyruvate decarboxylase isozyme 1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=PDC1 PE=1 SV=7 - [PDC1_YEAST]	P07551	NADPH-dependent alpha-ketamide reductase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=YDL12 4W PE=1 SV=1 - [KAR_YEAST]	P10591	Heat shock protein SSA1 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=SSA1 PE=1 SV=4 - [HSP71_YEAST]	P02994	Elongation factor 1-alpha OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=TEF1 PE=1 SV=1 - [EF1A_YEAST]	P34730	Protein BMH2 OS=Sacc haromyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=5592 92 GN=BMH2 PE=1 SV=3 - [BMH2_YEAST]
12,31	7,05	10,77	5,81	5,60	8,79	5,51	8,33	8,88	5,02	12,45											
1	1	1	1	3	2	1	1	5	5	1											
2	2	2	2	2	3	2	2	3	2	1											
3	2	3	2	2	4	2	2	4	2	3											
3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4											
333	312	297	327	375	569	563	312	642	458	273											
37,2	33,7	33,7	37,1	41,6	63,0	61,5	35,5	69,6	50,0	31,0											
6,38	4,83	6,83	7,08	5,58	6,62	6,19	6,19	5,11	9,04	4,88											

A6ZPU3	ATP-dependent RNA helicase DBP4 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain YJM789) OX=307796 GN=DBG4 PE=3 SV=1 - [DBP4_YEAST]	P54114	Aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) 204508 / S288c) OX=559292 GN=HBT1 PE=1 SV=1 - [HBT1_YEAST]	P54114	Aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) 204508 / S288c) OX=559292 GN=ALD3 PE=1 SV=1 - [ALDH3_YEAST]
P07251	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATP1 PE=1 SV=5 [ATPA_YEAST]	Q07653	Protein HBT1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=HBT1 PE=1 SV=1 - [HBT1_YEAST]	Q07653	Protein HBT1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=HBT1 PE=1 SV=1 - [HBT1_YEAST]
P38115	D-arabinose dehydrogenase [NAD(P)+] heavy chain OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ARA1 PE=1	P50095	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 3 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=IMD3 PE=1 SV=1 - [IMDH3_YEAST]	P50095	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 3 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=IMD3 PE=1 SV=1 - [IMDH3_YEAST]
P21192	Metallothionein expression activator OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ACE2 PE=1 SV=1 - [ACE2_YEAST]	Q9HEQ9	Single-stranded TG1-3 DNA-binding protein OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) OX=284812 GN=tcg1 PE=1 SV=3 [TCG1_SCHPO]	Q9HEQ9	Single-stranded TG1-3 DNA-binding protein OS=Schizosaccharomyces pombe (strain 972 / ATCC 24843) OX=284812 GN=tcg1 PE=1 SV=3 [TCG1_SCHPO]
P47147	Phosphoinositide 3-phosphate OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=YMR1 PE=1 SV=1 - [YMR1_YEAST]	Q08686	Thiosulfate sulfurtransferase TUM1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TUM1 PE=1 SV=1 - [THTR_YEAST]	Q08686	Thiosulfate sulfurtransferase TUM1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=TUM1 PE=1 SV=1 - [THTR_YEAST]
P32366	V-type proton ATPase subunit d OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=VM A6 PE=1 SV=2 - [VA0D_YEAST]	P32366	V-type proton ATPase subunit d OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=VM A6 PE=1 SV=2 - [VA0D_YEAST]	P32366	V-type proton ATPase subunit d OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=VM A6 PE=1 SV=2 - [VA0D_YEAST]
P47147	Phosphoinositide 3-phosphate OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=YMR1 PE=1 SV=1 - [YMR1_YEAST]	P47147	Phosphoinositide 3-phosphate OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=YMR1 PE=1 SV=1 - [YMR1_YEAST]	P47147	Phosphoinositide 3-phosphate OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=YMR1 PE=1 SV=1 - [YMR1_YEAST]
P38115	D-arabinose dehydrogenase [NAD(P)+] heavy chain OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ARA1 PE=1	P38115	D-arabinose dehydrogenase [NAD(P)+] heavy chain OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ARA1 PE=1	P38115	D-arabinose dehydrogenase [NAD(P)+] heavy chain OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ARA1 PE=1
P07251	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATP1 PE=1 SV=5 [ATPA_YEAST]	P07251	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATP1 PE=1 SV=5 [ATPA_YEAST]	P07251	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ATP1 PE=1 SV=5 [ATPA_YEAST]
A6ZPU3	ATP-dependent RNA helicase DBP4 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain YJM789) OX=307796 GN=DBG4 PE=3 SV=1 - [DBP4_YEAST]	P54114	Aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) 204508 / S288c) OX=559292 GN=ALD3 PE=1 SV=1 - [ALDH3_YEAST]	P54114	Aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) 204508 / S288c) OX=559292 GN=ALD3 PE=1 SV=1 - [ALDH3_YEAST]
1,17	2,02	1,43	1,43	1,43	5,53
2	1	1	1	1	2
1	1	1	1	1	2
1	1	1	1	1	2
1	1	1	1	1	2
770	545	770	770	770	506
87,1	58,6	86,6	86,6	86,6	55,4
7,42	9,04	8,31	8,31	8,31	5,76

P32263	Pyrroline-5-carboxylate reductase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=PRO3 PE=1 SV=1 - [P5CR_YEAST]	P32473	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=PDB1 PE=1 SV=2 - [ODPB_YEAST]	P40010	Nuclear GTP-binding protein NUG1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=NUG1 PE=1 SV=1 - [NUG1_	A6ZPE5	Nucleolar protein 58 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain YJM789) OX=307796 GN=NOP58 PE=3 SV=1 - [NOP58_YEAS7]	P40965	MutS protein homolog 4 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=MSH4 PE=1 SV=2 - [MSH4_YEAST]	P19263	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 14 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=RGR1 PE=1 SV=2 - [MED14_YEAST]	P40531	Protein GVP36 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=GVP36 PE=1 SV=1 - [GVP36_YEAST]	P32324	Elongation factor 2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=EFT2 PE=1 SV=1 - [EF2_YEAST]	P7A1G0	ATP-dependent RNA helicase DBP9 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=307796 GN=DBP9 PE=3 SV=1 - [DBP9_YEAS7]
4,55	5,74	1,73	3,33	1,14	0,74	1,22	2,80	4,29	1,66	3,37							
1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1							
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1							
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1							
286	366	520	511	878	1082	1064	500	326	842	594							
30,1	40,0	57,7	56,9	99,2	123,3	120,0	55,3	36,6	93,2	68,0							
5,48	5,30	8,88	8,94	7,28	8,75	8,72	6,19	4,97	6,32	9,19							

P41940	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=PSAI PE=1 SV=2- [MPG1_YEAST]	O00370	LINE-1 retrotransposable element ORF2 protein OS=Homo sapiens OX=9606 PE=1 SV=1- [LORF2_HUMAN]	Q12363	Transcriptional modulator WTM1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=WTM1 PE=1 SV=1- [WTM1_YEAST]	Q75D20	RNA polymerase II transcription factor B subunit 3 OS=Ashbya gossypii (strain ATCC 10895 / CBS 109.51 / FGSC 9923 / NRRL Y-1056) OX=284811 GN=TFB3 PE=3 SV=1- [TFB3_ASHGO]	P10664	60S ribosomal protein L4-A OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=RPL4A PE=1 SV=4- [RL4A_YEAST]	P25332	Ribokinase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=RBK1 PE=1 SV=2- [RBSK_YEAST]	P27616	Phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthase OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=ADE1 PE=1 SV=2- [PUR7_YEAST]	P19736	Pre-mRNA-splicing factor PRP9 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=PRP9 PE=1 SV=1- [PRP9_YEAST]	P32598	Serine/threonine protein phosphatase PPI-2 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=GLC7 PE=1 SV=1- [PPI2_YEAST]	P10963	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=PCK1 PE=1 SV=2- [PCKA_YEAST]
4,99	1	1,49	1	2,75	5,66	2,76	3,60	3,92	1,51	4,17	2,37								
1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1								
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
361	340	1275	437	318	362	333	306	530	312	549									
39,5	36,3	148,9	48,4	37,7	39,1	36,9	34,6	63,0	35,9	60,9									
6,34	5,16	9,66	5,36	5,63	10,64	5,29	5,95	6,46	5,49	6,34									



Q03102	Uncharacterized membrane protein YML131W OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=YML131W PE=1 SV=1 - [YMNI_YE AST]	2,74	1	1	1	1	365	40,0	8,13
--------	--	------	---	---	---	---	-----	------	------

