

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ, ΙΩΑΝΝΙΝΑ



ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

# Διερεύνηση του ρόλου μίας AAA<sup>+</sup> μιτοχονδριακής πρωτεάσης στην βιολογία του μιτοχονδρίου και την νόσο του Parkinson

ΧΑΤΖΗΝΑΟΥΜ ΙΦΙΓΕΝΕΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

Υπεύθυνος Καθηγητής: κ. Θεολόγος Μιχαλίδης  
Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

**Διερεύνηση του ρόλου μίας AAA<sup>+</sup> μιτοχονδριακής  
πρωτεάσης στην βιολογία του μιτοχονδρίου και  
την νόσο του Parkinson**

**ΧΑΤΖΗΝΑΟΥΜ ΙΦΙΓΕΝΕΙΑ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**Επιτροπή :**

**κ. Θεολόγος Μιχαηλίδης:** Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα  
Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
(Υπεύθυνος)

**κ. Μιχαέλα Φίλιου:** Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογικών  
Εφαρμογών και Τεχνολογιών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Μέλος)

**κ. Μαρίκα Σύρρου:** Καθηγήτρια , Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων(Μέλος)

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

## Πρόλογος – Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο τμήμα Βιοϊατρικών Ερευνών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020 υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή καθηγητή Μοριακής Γενετικής του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών κ. Θεολόγου Μιχαηλίδη.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου **κ. Θεολόγο Μιχαηλίδη** που πρώτα από όλα με εμπιστεύτηκε και με συμπεριέλαβε στο εργαστήριό του δίνοντας μου την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί του. Τον ευχαριστώ ακόμα για την επιστημονική του καθοδήγηση, την άριστη συνεργασία, την υποστήριξη και την ενεργό συμμετοχή του κατά την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μελέτης .

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής κ. Μιχαέλα Φίλιου και κ. Μαρίκα Σύρρου που αφιέρωσαν το χρόνο τους για να αξιολογήσουν την εργασία μου.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα και συνεργάτη μου **Ιωάννη Τσίγκα** που με βοήθησε και με συμβούλεψε καθόλη την διάρκεια αυτής της μελέτης, καθώς και στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια Βασίλη Ευτυχία η οποία ξεκίνησε το συγκεκριμένο project.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου μου για την υπέροχη συνεργασία , Κυριακή Παπαγεωργίου ,Δημήτριο Κατούνη, Αιμιλία Ζησιάδη, Χριστίνα Γαβρούζου, Μαρίνα Μαγουλά, Ευτυχία Κοντίδου, Μαρούσα Δαρσινού, Ιωάννη Χρισανθόπουλο, Μακη Νακα, Μαρία Παπαγεωργίου, Μαρία Παππά και Αθηνά Γενοπούλου.

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

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	- 7 -
ABSTRACT .....	- 9 -
A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	- 10 -
A.1. Νόσος του Parkinson(Parkinson’s Disease.PD).....	- 10 -
A.1.1. Τα κλινικά συμπτώματα της νόσου του Parkinson.....	- 10 -
A.1.2. Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της νόσου Parkinson.....	- 11 -
A.1.3. Η γενετική της νόσου του Parkinson.....	- 13 -
A.1.4. Η φυσιολογική λειτουργία της $\alpha$ -synuclein .....	- 14 -
A.1.5. Ο παθολογικός ρόλος της $\alpha$ -συνουκλείνης .....	- 15 -
A.1.6. Η νόσος του Parkinson αποτελεί μιτοχονδριακή διαταραχή .....	- 17 -
A.1.7. Μοντελοποίηση της νόσου Parkinson .....	- 18 -
A.1.8. Περιβαλλοντικές τοξίνες .....	- 19 -
A2.Μιτοχόνδρια .....	- 20 -
A.2.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	- 20 -
A.2.2 Δομή και οργάνωση του μιτοχονδριακού DNA .....	- 23 -
A.2.3 Επικοινωνία μιτοχονδρίου με άλλα κυτταρικά οργανίδια.....	- 26 -
A.2.3. Επικοινωνία μιτοχονδρίου – Πυρήνα .....	- 26 -
A.2.4. Οξειδωτικό stress.....	- 28 -
A.3.Μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1.....	- 30 -
A.3.1. AAA <sup>+</sup> πρωτεάσες:ATP τροφοδοτούμενες μηχανές πρωτεϊνικής καταστροφής - 30 -	
A.3.2. Μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1.....	- 31 -
A.3.3. Η πρωτεάση Lon στον άνθρωπο .....	- 32 -
A.3.4. Φυσιολογική λειτουργία της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1.....	- 32 -
A.3.5. Κυτταρικός εντοπισμός LonP1 .....	- 33 -
A.3.6. Μηχανισμός δράσης μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 .....	- 34 -
A.3.7. Μιτοχονδριακός μεταβολισμός και πρωτεάση Lon .....	- 35 -
A.3.8. Δράση μοριακού συνοδού (Chaperone activity) .....	- 38 -
A.3.9. Πρόσδεση πρωτεάσης LonP1 με το mtDNA .....	- 38 -
A.3.10. LonP1 και παραγωγή ενέργειας: Διαδικασία OXPHOS.....	- 39 -
A.3.11. Συμμετοχή πρωτεάσης Lon σε νευρολογικές διαταραχές .....	- 40 -
A.3.12. Γενετική της πρωτεΐνης Lon .....	- 44 -
A.3.13. Μετάλλαξη στον γονίδιο της LonP1 (R721G).....	- 47 -
B.ΜΕΘΟΔΟΙ .....	- 49 -
B.1.Καλλιέργεια κυττάρων .....	- 49 -
B.1.1Ανακαλλιέργεια κυττάρων ( SPLIT ) .....	- 49 -

B.1.2. Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο Neubauer .....	50 -
B.1.3. Αποθήκευση κυτταρικών σειρών.....	50 -
B.1.4 Απόψυξη των κυττάρων.....	50 -
B.2 Διαμόλυνση των κυττάρων(Transfection) .....	51 -
B.3. Έμμεσος ανοσοφθορισμός – Ανοσοκυτταροχημεία.....	51 -
B.4.Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από νευρικά κύτταρα.....	53 -
B.5.Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο BRADFORD .....	53 -
B.6.Ανοσοαποτύπωση κατά WESTERN .....	54 -
B.7.Καθαρισμός του DNA με τους οργανικούς διαλύτες φαινόλη και χλωροφόρμιο ...	57 -
B.8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- PCR.....	58 -
B.9.Μετασχηματισμός – Transformation-Επιδεκτικά βακτήρια DH5a.....	59 -
B.10. Εμβολιασμός βακτηριακής καλλιέργειας .....	59 -
B.10.Αποθήκευση βακτηριακών στελεχών(Bacterial Glycerol – Stock ).....	60 -
B.11.Παρασκευή πλασμιδιακού DNAσε μικρή κλίμακα (Mini-prep).....	60 -
B.12.Παρασκευή πλασμιδιακού DNAσε μεγάλη κλίμακα (Midi-prep).....	61 -
B.13. Αντίδραση σύνδεσης (ligation) .....	61 -
B.14.Αντίδραση Klenow .....	61 -
B.15. Αντίδραση Περιοριστικής Πέψης.....	61 -
B.16. Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Αγαρόζης.....	61 -
B.17.Κλωνοποίηση με TOPO TA CLONING KIT .....	62 -
B.18.Διαδικασία διαχωρισμού πρωτεϊνών που συνδέονται με την χρωματίνη (Chromatin Binding Assay, CBA) .....	63 -
B.19.Απομόνωση Πυρηνικού και Κυτταροπλασματικού Πρωτεϊνικού Εκχυλίσματος από Νευρικά Κύτταρα .....	64 -
B.20. Κυτταρικές σειρές .....	65 -
B.20.1.Η Κυτταρική Σειρά Neuro2A (N2A) .....	65 -
B.20.2.Η Κυτταρική σειρά SH-SY5Y .....	65 -
B.20.3.Κυτταρική σειρά CHO:.....	66 -
B.20.4.Κυτταρική σειρά NIH3T3:.....	67 -
Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	68 -
Γ.1. Κατασκευή πλασμιδιακής κατασκευής με σκοπό την υπερέκφραση της πρωτεΐνης Lon .....	68 -
Γ.2. Σχεδιασμός εκκινητών και παραγωγή της LonP1 μέσω PCR.....	75 -
Γ.3. Έλεγχος λειτουργικότητας των νέων πλασμιδιακών φορέων pLonP1-AcGFP-N1 και pLonP1-dsRED-N1.....	79 -
Γ.4. Διαδικασία επιδιόρθωσης πλασμιδιακού φορέα pLonP1-AcGFP .....	82 -

Γ.4.1. 1 <sup>η</sup> αντίδραση Klenow(BamHI) για την κατασκευή πλασμιδιακού φορέα pLonP1(BamHI)-AcGFP .....	- 83 -
Γ.4.2. 2 <sup>η</sup> αντίδραση Klenow AgeI για την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP.....	- 84 -
Γ.5. Έλεγχος λειτουργίας του πλασμιδίου pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP .....	- 85 -
Γ.6. Κατασκευή της μεταλλαγμένης μορφής LonP1(R721G)-Human .....	- 87 -
Γ.6.1. Σχεδιασμός κατάλληλων primers για την εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης R721G στο γονίδιο hLonP1 .....	- 88 -
Γ.6.2. Sequencing για επιβεβαίωση σωστής αλληλουχίας του mtLonP1 .....	- 90 -
Γ.7. Τα κύτταρα SH-SY5Y ως κατάλληλο νευρικό κυτταρικό μοντέλο .....	- 92 -
Γ.8. Ανάπτυξη ενός in vitro κυτταρικού μοντέλου για την νόσο PD μετά από έκθεση στη νευροτοξίνη 6-OHDA και σε Rotenone. ....	- 93 -
Γ.9. Σχηματισμός εγκλείστων α-συνουκλείνης με την χρήση αναστολέα 6-OHDA. ....	- 95 -
7.10. Έλεγχος υπομονάδων συμπλόκων αναπνευστικής αλυσίδας με την χρήση τοξίνης 6- OHDA και με υπερέκφραση LonP1. ....	- 99 -
7.11. Έλεγχος της συμπεριφοράς της μιτοχondριακής πρωτεΐνης LonP1 μετά την προσθήκη τοξινών 6-OHDA και rotenone.....	- 100 -
7.12. Αύξηση πρωτεϊνικών επιπέδων της LonP1 μετά από προσθήκη H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> σε κυτταρική σειρά N2A.....	- 102 -
7.13. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης LonP1 αυξάνονται μέσα σε μία ώρα μετά την προσθήκη H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 150μM/24ώρες, .....	- 104 -
7.14. Έλεγχος κατανομής της πρωτεΐνης LonP1 σε κατάσταση οξειδωτικού στρες.....	- 105 -
7.15. Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης LonP1 στην α- συνουκλείνη. ....	- 107 -
7.16. Έλεγχος συνεντοπισμού p-53 και LonP1 μετά από οξειδωτικό στρες.....	- 108 -
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	- 111 -
Ε.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	-116-

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος του Parkinson (PD) είναι μία προοδευτική κινητική νευροεκφυλιστική διαταραχή η οποία προσβάλλει περίπου το 1% των ενηλίκων ηλικίας μεγαλύτερης των 60 ετών. Οφείλεται στην επιλεκτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας και χαρακτηρίζεται από συσσώρευση συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Η ανάπτυξη κυττάρων κάτω από συνθήκες που επιβαρύνουν την κατάσταση των μιτοχονδρίων, όπως η έκθεση σε νευροτοξίνες που αυξάνουν το φορτίο των ελεύθερων ριζών, οδήγησαν στην ταυτοποίηση της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης LonP1. Η LonP1 είναι μία πρωτεΐνη που είναι ήδη γνωστή για το ρόλο της στην ομαλή λειτουργία των μιτοχονδρίων, παρόλο αυτά συμμετέχει και σε πολλές άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Είναι μία πρωτεΐνη υπεύθυνη για την αποικοδόμηση των λανθασμένα αναδιπλωμένων ή κατεστραμμένων πρωτεϊνών και πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι αποτελεί ένα πολυσύνθετο ένζυμο. Επιπρόσθετες λειτουργίες της είναι η ενεργότητα μορίου-συνοδού (*chaperon*) καθώς και η αλληλεπίδρασή της με το mtDNA. Προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου αποκάλυψαν μία πιθανή σύνδεση αυτής της πρωτεΐνης με την εμφάνιση παθολογικών χαρακτηριστικών της νόσου Parkinson στα νευρικά κύτταρα. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης LonP1 σε καταστάσεις διαφορετικών μορφών κυτταρικού στρες, να χαρακτηριστεί η κατανομή της μέσα στο κύτταρο, να ελεγχθεί πως επιδρά η υπερέκφρασή της στα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης και στην μιτοχονδριακή λειτουργία, καθώς επίσης και να κατασκευασθεί μια μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης αυτής η οποία έχει συσχετισθεί με το σύνδρομο CODAS (*Cerebral, ocular, dental, auricular, skeletal syndrome, MIM 600373*). Ως συνθήκες δημιουργίας οξέος κυτταρικού στρες χρησιμοποιήθηκαν οι τοξίνες 6-OHDA και ροτενόνη (αναστολείς των συμπλόκων I και IV της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης) σε δύο διαφορετικά κυτταρικά μοντέλα, την κυτταρική σειρά SH-SY5Y από νευροβλάστωμα ανθρώπου και την σειρά Neuro2A από νευροβλάστωμα ποντικού. Μελετήθηκε η επίδραση της εξωγενούς LonP1 στα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας, ενώ προκειμένου να ελεγχθεί η ενδοκυττάρια κατανομή της πρωτεΐνης, υποκλωνοποιήθηκε το αντίστοιχο cDNA σε δύο πλασμιδιακούς φορείς, τους pAcGFP-N1 και pDsRED-N1. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαμόλυνσης σε συνθήκες μιτοχονδριακού στρες με ή χωρίς ταυτόχρονη υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης προκειμένου να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση αυτών των δύο μορίων. Διαπιστώσαμε ότι η εξωγενής α-συνουκλεΐνη φαίνεται να αποτελεί στόχο της πρωτεΐνης LonP1 στα νευρικά κύτταρα. Επιπλέον, ο περαιτέρω έλεγχος στο κυτταρικό μοντέλο Neuro2A σε συνθήκες οξέος στρες παρουσία των νευροτοξινών 6-OHDA και ροτενόνης αποκάλυψε μια πιθανή επικοινωνία του μονοπατιού LonP1 με το μονοπάτι PINK1-Parkin. Σε συνθήκες στρες, όπου τα επίπεδα της πρωτεΐνης LonP1 είναι αυξημένα φαίνεται ότι καταστέλλεται η ενεργοποίηση του μονοπατιού PINK1-Parkin. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν και όταν στα κύτταρα εφαρμόστηκαν διαφορετικές συνθήκες στρες, όπως η παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), το οποίο προκαλεί οξειδωτικό στρες με έναν πιο άμεσο μηχανισμό, διαφορετικό από τις δύο νευροτοξίνες. Μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη LonP1 έχουν συσχετισθεί με την εκδήλωση του συνδρόμου CODAS, μια αναπτυξιακή διαταραχή που χαρακτηρίζεται από πληθώρα κλινικών εκδηλώσεων όπως υποτονία, πτώση, απώλεια ακοής, μεταγεννητικό καταρράκτη, καθώς και σκελετικές και οδοντικές ανωμαλίες. Προκειμένου να διερευνησουμε κατά πόσον τέτοιες μεταλλάξεις επηρεάζουν την ενδοκυττάρια κατανομή της LonP1, τη συμμετοχή της στη

μιτοχονδριακή λειτουργία ή την αλληλεπίδρασή της με την α-συνουκλεΐνη, κατασκευάσαμε την μετάλλαξη LonP1-R721G που είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη μεταξύ των ασθενών που πάσχουν από αυτό το σύνδρομο. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας ενθαρρύνουν περαιτέρω μελέτες για την διερεύνηση του ρόλου της πρωτεΐνης LonP1 στην παθογένεση της νόσου Parkinson αλλά και στην κατανόηση πολυσυστηματικών διαταραχών όπως το σύνδρομο CODAS.



## **ABSTRACT**

Parkinson's disease (PD) is a progressive, neurodegenerative movement disorder that affects approximately 1% of adults over 60 years of age. It is characterized by a selective degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra, accumulation of  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) fibrils, and mitochondrial dysfunction. The exposure of neuronal cells in conditions that increase the load of free radicals such as the presence of neurotoxins led to the identification of the mitochondrial protease LonP1. LonP1 is a nuclear encoded, mitochondrial ATP-dependent serine peptidase, already known for its role in the proper functioning of mitochondria, but also involved in many other cellular functions. LonP1 is responsible for the degradation of misfolded or damaged proteins, and recent evidence revealed that it is a multifaceted enzyme, displaying also chaperone activity and binding to mtDNA. Previous experiments in our laboratory have revealed a possible association between LonP1 and the appearance of Parkinson's disease-related features in neuronal cells. The aim of this thesis was to investigate the role of LonP1 protein in different types of cellular stress, to characterize its distribution within the cell, to examine the effects of its overexpression on  $\alpha$ -synuclein turnover and on mitochondrial function, and to construct a mutant form of the protein which has been associated with the CODAS syndrome (Cerebral, ocular, dental, auricular, skeletal syndrome, MIM 600373). Rotenone and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) were used to generate acute stress conditions in two different cell models, namely the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, and Neuro2A, a cell line derived from a mouse neuroblastoma. We analyzed the effect of exogenous LonP1 on the respiratory chain complexes. Moreover, in order to determine the intracellular distribution of the protein, the corresponding cDNA was subcloned into two plasmid vectors, pAcGFP-N1 and pDsRED-N1. Transient transfection experiments of LonP1 with or without concomitant  $\alpha$ -synuclein overexpression were carried out in order to investigate the interaction between these two proteins. The data showed that exogenous  $\alpha$ -synuclein might be a target of LonP1 in the neuronal environment. In addition, further experiments in the Neuro2A cell model under 6-OHDA or rotenone-induced acute stress conditions revealed a possible crosstalk of LonP1 with the PINK1-Parkin pathway. Under stress conditions, where LonP1 protein levels are elevated, the activation of the PINK1-Parkin pathway appears to be suppressed. These observations were confirmed, also when different stress conditions were applied to the cells, such as the presence of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) which induces oxidative stress by a more direct mechanism, different from the two neurotoxins. Mutations in LonP1 protease have been associated with the development of CODAS syndrome, a developmental disorder characterized by a variety of clinical manifestations such as hypotension, falls, hearing loss, postnatal cataracts, as well as skeletal and dental abnormalities. To examine whether such mutations affect LonP1 properties such as its intracellular distribution, its function in mitochondrial homeostasis, or its interaction with  $\alpha$ -synuclein, we constructed the LonP1-R721G mutation, which is the most common among these patients. Collectively, our results encourage further studies aiming to investigate the role of LonP1 protease in the pathogenesis of Parkinson's disease as well as to better understand the underlying mechanisms of multi-system developmental disorders such as CODAS syndrome.

## Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### A.1. Νόσος του Parkinson(Parkinson's Disease. PD)

Η νόσος του Parkinson αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή νευροεκφυλιστική διαταραχή, μετά το Alzheimer (1). Η νόσος προσβάλλει περίπου το 1% των ενηλίκων ηλικίας άνω των 60 ετών, ενώ υπάρχουν περιπτώσεις εμφάνισης και σε ηλικία μικρότερη των 40 ετών (early onset Parkinsonism). Οφείλεται στην εκλεκτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας και χαρακτηρίζεται από συσσώρευση ινιδιακών συσσωματωμάτων μίας πρωτεΐνης, της α-συνουκλεΐνης. Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά είναι η βραδυκινησία, ο τρόμος κατά την ηρεμία, η δυσκαμψία και οι διαταραχές της στάσης και της βάδισης (αστάθεια θέσης) (2). Το 1912 ο Lewy περιέγραψε την παρουσία κυτταροπλασματικών εγκλείστων γνωστά ως σωματίδια Lewy (LBs) στη διάμεση φαιά ουσία του εγκεφάλου ασθενών. Τα σωματίδια του Lewy αποτελούν τυπικό ιστοπαθολογικό γνώρισμα της νόσου με βασικό συστατικό τα ινίδια της α-συνουκλεΐνης. Της εκδήλωσης της νόσου προηγείται πολυετής ασυμπτωματική απώλεια νευρικών κυττάρων, ενώ κατά την έναρξη της νόσου περίπου το 60% των νευρικών κυττάρων στις προσβληθείσες περιοχές του εγκεφάλου έχουν καταστραφεί. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση στην παραγωγή ντοπαμίνης, αλλοιώσεις στα νευρικά γάγγλια και την εμφάνιση των κινητικών συμπτωμάτων. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων της νόσου είναι σποραδική (3), ενώ η αιτιολογία και η παθογένεση παραμένουν αινιγματικές (4). Η νόσος του Parkinson αποτελεί μία πολυπαραγοντική νόσο άμεσα σχετιζόμενη με τη γήρανση. Η προέλευση και η εξέλιξη της φαίνεται να οφείλεται τόσο σε γενετική προδιάθεση όσο και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η τρέχουσα φαρμακολογική θεραπεία περιλαμβάνει τη χρήση ενός πρόδρομου μορίου ντοπαμίνης, της L-DOPA, το οποίο ανακουφίζει τη βραδυκινησία, την αύξηση του μυϊκού τόνου και τον τρόμο, αλλά δεν έχει καμία επίδραση στη μείωση των μη-κινητικών συμπτωμάτων.

#### A.1.1. Τα κλινικά συμπτώματα της νόσου του Parkinson

Τα γενετικά χαρακτηριστικά της νόσου PD είναι ετερογενή και αρκετά γονίδια φαίνονται να εμπλέκονται στην κληρονομική μορφή (familial PD) ενώ σημαντικός αριθμός άλλων γονιδίων έχουν συνδεθεί με παρκινσονιακά σύνδρομα. Γίνεται ολοένα και πιο φανερό, ότι η αιτιολογία της ασθένειας είναι πολυπαραγοντική κάτι που πιθανότατα ισχύει και για τις σποραδικές, ιδιοπαθείς περιπτώσεις της ασθένειας (sporadic PD).

Κλινικά, κάθε ασθένεια που περιλαμβάνει απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων του ραβδωτού σώματος ή μια πιο άμεση βλάβη αυτής της εγκεφαλικής περιοχής που οδηγεί σε παρκινσονισμό (Parkinsonism), ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από τρόμο κατά την ηρεμία, ακαμψία, βραδύτητα ή απουσία εκούσιας κίνησης, ορθοστατική αστάθεια, καθώς και από ορισμένα στερεότυπα χαρακτηριστικά, γνωστά ως “masked faces” και «πάγωμα». Η νόσος PD είναι η πιο κοινή αιτία αυτών των συμπτωμάτων, περίπου σε 80% αυτών των περιπτώσεων.

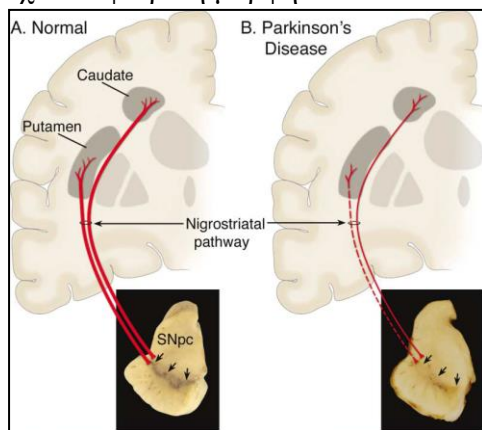


**Εικόνα Α.1 Συμπτώματα νόσου Parkinson**

Διαταραχές του συναισθήματος και της νόησης είναι επίσης συνήθη φαινόμενα, οι ασθενείς γίνονται απόμακροι και παθητικοί, με έλλειψη κινήτρου. Οι απαντήσεις στις ερωτήσεις καθυστερούν και οι νοητικές διαδικασίες επιβραδύνονται. Η κατάθλιψη είναι συχνή και η άνοια είναι πιο συχνή στους παρκινσονικούς ασθενείς ειδικά στους γηραιότερους (5).

#### A.1.2. Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της νόσου Parkinson

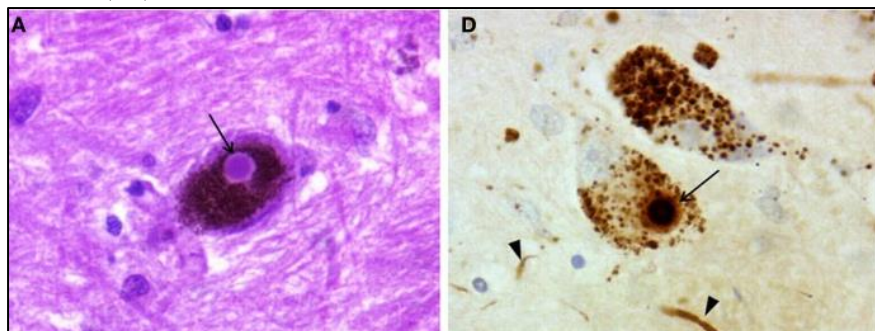
Το κυριότερο παθολογοανατομικό χαρακτηριστικό της νόσου είναι η εκτεταμένη εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Dopaminergic neuron, DA), κυρίως στην περιοχή της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας (substantia nigra pars compacta, SNpc). Το 1912 ο Frederich H. Lewy περιέγραψε την παρουσία κυτταροπλασματικών εγκλείστων στη διάμεση φαιά ουσία του εγκεφάλου ασθενών. Τα κυτταροπλασματικά αυτά εγκλείστα πρωτεϊνών είτε έχουν ατρακτοειδή μορφή και καλούνται νευρίτες του Lewy (Lewy Neurites, LNs), ή εντοπίζονται στο σώμα των ενεχόμενων κυττάρων, έχουν σφαιρική μορφή και αποτελούν τα σωμάτια Lewy (Lewy bodies, LBs) (6).



**Εικόνα Α.2: Παθολογοανατομία της νόσου Parkinson. Σχηματική απεικόνιση της εκφύλισης των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην περιοχή της μέλαινας ουσίας. Α) Σε ένα υγιές άτομο, φυσιολογική εκφύλιση λόγω γήρατος και Β) Εκτεταμένη εκφύλιση λόγω PD (Dzamko 2014).**

Τα σωμάτια του Lewy αποτελούν το δεύτερο τυπικό ιστοπαθολογικό γνώρισμα της PD στους εναπομείναντες ντοπαμινεργικούς νευρώνες της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας, με βασικό συστατικό τα ινίδια της α-συνουκλεΐνης και την ουβικιτίνη (7). Εκτεταμένη έρευνα χαρακτηρισμού των LBs συνέβαλλε στον εντοπισμό περισσότερων από 70 διαφορετικών πρωτεϊνών, που ανήκουν σε 10 διαφορετικές κλάσεις πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων δομικών στοιχείων, πρωτεϊνών που δεσμεύονται στην α-συνουκλεΐνη, πρωτεϊνών που δεσμεύονται στην συμφιλίνη-1, στοιχεία του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε κυτταρικές αποκρίσεις, πρωτεΐνες που σχετίζονται με την φωσφορυλίωση και την μεταγωγή σήματος, πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου, πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος και άλλες (8). Συγκεκριμένα στο εσωτερικό των LBs, εναποτίθεται και συσσωρεύεται κατά κύριο λόγο η φωσφορυλιωμένη μορφή της α-συνουκλεΐνης στο κατάλοιπο Ser129 σχηματίζοντας δομές ινιδίων με β-πτυχωτά φύλλα (9). Μορφολογικά τα σωμάτια Lewy διακρίνονται σε δύο τύπους:

- I. Τα κλασσικά σωμάτια Lewy, είναι εύκολα αναγνωρίσιμα μετά από ιστολογική χρώση σαν μεγάλα σφαιρικά ηωσινόφιλα συσσωματώματα. Αποτελούνται από έναν πυρήνα στο κέντρο και έναν περιφερειακό δακτύλιο. Ο πυρήνας αποτελείται κυρίως από κυστιδιακές δομές αλλά και από ινίδια, ενώ ο δακτύλιος μόνο από ινίδια.
- II. Τα σωμάτια Lewy του φλοιού είναι ελάχιστα καθορισμένες δομές, με ακανόνιστο σχήμα και χωρίς συχνά να εμφανίζουν διακριτό πυρήνα ή δακτύλιο (10).



**Εικόνα A3:** Σωμάτια Lewy στη μέλαινα ουσία ασθενούς με νόσο Parkinson. A) Σωμάτιο Lewy σε νευρώνα στην περιοχή της μέλαινας ουσίας μετά από ιστοχημική χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη. B) Σωμάτιο Lewy σε νευρώνα στην περιοχή της μέλαινας ουσίας μετά από ανοσοιστοχημική χρώση με το αντίσωμα της α-συνουκλεΐνης. Διακρίνεται ένα ενδονευρωνικό σωμάτιο με καφέ χρώμα. Με την κεφαλή του βέλους διακρίνονται οι νευρίτες του Lewy (Taïra et al. 2012).

Υπάρχει πληθώρα ενδείξεων ότι οι νευροπαθολογικές βλάβες στην PD μπορεί να προκύπτουν από το γεγονός ότι η α-συνουκλεΐνη έχει την ικανότητα να εξαπλώνεται σταδιακά στις γειτονικές περιοχές του εγκεφάλου μέσω ενός διακυτταρικού μηχανισμού μετάδοσης. Στηριζόμενοι σε αυτήν την υπόθεση, οι ασθενείς με PD εμφανίζουν συσσωματώματα της παθολογικής μορφής της α-συνουκλεΐνης σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου (11). Η ύπαρξη των σωματίων Lewy δεν περιορίζονται μόνο στην περιοχή της μέλαινας ουσίας, καθώς έχουν και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου όπως στον υπομέλαινα τόπο (locus coeruleus), το ραχιαίο κινητικό πυρήνα (dorsal motor nucleus), στους πυρήνες της ραφής (raphe nucleus), τον οσφρητικό βολβό (olfactory bulb), στους συμπαθητικούς και παρασυμπαθητικούς

μεταγαγγλιονικούς νευρώνες, την αμυγδαλή και τον εγκεφαλικό φλοιό (12). Στην παθολογία των παραπάνω, μη ντοπαμινεργικών περιοχών του εγκεφάλου, οφείλονται πολλά από τα βασικά μη κινητικά συμπτώματα που συνδέονται με την εκδήλωση της νόσου, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την απώλεια της όσφρησης που συνδέεται με την παρουσία των σωματίων και νευριτών Lewy στον οσφρητικό βολβό και στα κέντρα του εγκεφάλου αμυγδαλή και περιρινικός πυρήνας (13). Τέλος τα LBs δεν αποτελούν αποκλειστικότητα της PD. Εναποθέσεις α-συνουκλεΐνης έχουν ανιχνευθεί σε διάφορες νευροεκφυλιστικές διαταραχές όπως η άνοια με Lewy bodies, στο Alzheimer και την ατροφία πολλαπλών συστημάτων. Παρότι τα σωματία Lewy ανακαλύφθηκαν περίπου ένα αιώνα πριν, η σημασία και η συμβολή τους στην παθογένεια της νόσου παραμένει άγνωστη.

#### A.1.3. Η γενετική της νόσου του Parkinson

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

Το πρώτο γονίδιο που συνδέθηκε με τη νόσο Parkinson είναι η α-συνουκλεΐνη-**PARK1/4**. Αρχικά χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 4q21 μία μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου (A53T) (14), ενώ στη συνέχεια η ίδια μετάλλαξη ανακαλύφθηκε σε οικογένειες ελληνικής και ιταλικής καταγωγής με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονομησης (15). Ακολούθησε η ανακάλυψη δύο ακόμα σημειακών μεταλλάξεων (A30P, E46K) σε δύο ξεχωριστές οικογένειες (16). Οι ασθενείς που εκφράζουν τις μεταλλάξεις του γονιδίου συνήθως εμφανίζουν την ασθένεια σε πρώιμο στάδιο. Η άμεση σύνδεση του φυσικού τύπου (Wild Type-WT) του γονιδίου με τη νόσο έγινε από νεότερες μελέτες, οι οποίες αποκάλυψαν ότι ο διπλασιασμός ή ο τριπλασιασμός του γενετικού τόπου ευθύνεται για την εμφάνιση αυτοσωμικού οικογενούς Parkinson (17). Συγκεκριμένα οι ασθενείς που φέρουν τριπλασιασμό του γενετικού τόπου εμφανίζουν πιο έντονα συμπτώματα και σε πιο πρώιμα στάδια συγκριτικά με ασθενείς με διπλασιασμό του γενετικού τόπου. Το παραπάνω εύρημα αποτέλεσε ένδειξη ότι η φυσικού τύπου α-συνουκλεΐνη μπορεί να αποκτήσει παθογόνο δράση και να συμβάλλει στην εμφάνιση και στην πρόοδο της νόσου, με τρόπο δόσο-εξαρτώμενο από την παρουσία της στο κυτταρόπλασμα (18).

Ο γενετικός τόπος **PARK2** ανήκει σε μία E3 λιγάση της ουβικιτίνης, την πρωτεΐνη Parkin (Ring domain-containing E3 ubiquitin ligase). Η Parkin καταλύει την προσθήκη αλυσίδων ουβικιτίνης στις πρωτεΐνες που πρέπει να σηματοδοτηθούν προς αποικοδόμηση στο σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (UPS) και η ανακάλυψη της αποτέλεσε την πρώτη απόδειξη εμπλοκής του UPS στη ντοπαμινεργική εκφύλιση (19). Η Parkin ευθύνεται για το 49% της κληρονομικής και το 19% της σποραδικής μορφής



της νόσου με πρόωμη εμφάνιση (20). Μεταξύ των υποστρωμάτων της έχει αναγνωρισθεί και η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη (21). Επίσης η Parkin εμπλέκεται στην αποικοδόμηση και απομάκρυνση των μιτοχονδρίων που έχουν υποστεί σοβαρές βλάβες μέσα από τη διαδικασία της αυτοφαγίας, γνωστή στην προκειμένη περίπτωση ως μιτοφαγία, που αποτελεί έναν από τους κυριότερους μιτοχονδριακούς μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου (22).

Η **PINK1** είναι μια πρωτεΐνη 581 αμινοξικών καταλοίπων με δραστικότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης, ενώ φέρει και μια αμινοτελική αλληλουχία εισόδου στα μιτοχόνδρια. Στα μιτοχόνδρια, η PINK1 έχει εντοπιστεί σε διάφορες περιοχές συμπεριλαμβανομένης της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, του ενδομεμβρανικού χώρου και της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η αδρανοποίηση της πρωτεΐνης στους ανθρώπινους ντοπαμινεργικούς νευρώνες και η απώλειά της στα πρόδρομα μεσεγκεφαλικά κύτταρα οδηγεί σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία συμπεριλαμβανομένων ανωμαλιών στη μιτοχονδριακή μορφολογία, μειωμένο δυναμικό μεμβράνης, αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών (ROS) και υψηλή ευαισθησία στην απόπτωση (23).

Η **DJ-1** είναι μια πολύ-λειτουργική πρωτεΐνη 189 αμινοξέων με αντιοξειδωτικές ιδιότητες και σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση. Πιστεύεται πως σε φυσιολογικές καταστάσεις η DJ-1 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και σε μικρότερο βαθμό στον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια. Όταν όμως το κύτταρο βρεθεί κάτω από οξειδωτικές συνθήκες η πρωτεΐνη αυτή μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια και έπειτα στον πυρήνα. Η μιτοχονδριακή μεταφορά της DJ-1 έχει συνδεθεί με την ικανότητά της για νευροπροστασία (24).

Μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη **LRRK2** συνδέονται με την πλειοψηφία των οικογενών περιπτώσεων Parkinson, καθώς και με ιδιοπαθείς περιπτώσεις όψιμης έναρξης της νόσου. Πρόκειται για μια κινάση σερίνης/θρεονίνης 2527 αμινοξικών καταλοίπων η οποία περιέχει μια υποπεριοχή κινάσης-κινάσης-κινάσης (MAPKKK), μια υποπεριοχή Roc με ενεργότητα Ras/GTPase, μια αλληλουχία WD40-επαναλήψεων, καθώς και περιοχές πλούσιες σε λευκίνη. Πολλές μεταλλάξεις της συγκεκριμένης πρωτεΐνης οι οποίες οδηγούν σε αυξημένη δραστηριότητα κινάσης της LRRK2, και αυξημένη νευροτοξικότητα *in vitro*, υποδεικνύοντας ένα τοξικό μηχανισμό **gain-of-function** (25).

#### A.1.4. Η φυσιολογική λειτουργία της $\alpha$ -συνουκλεΐνης

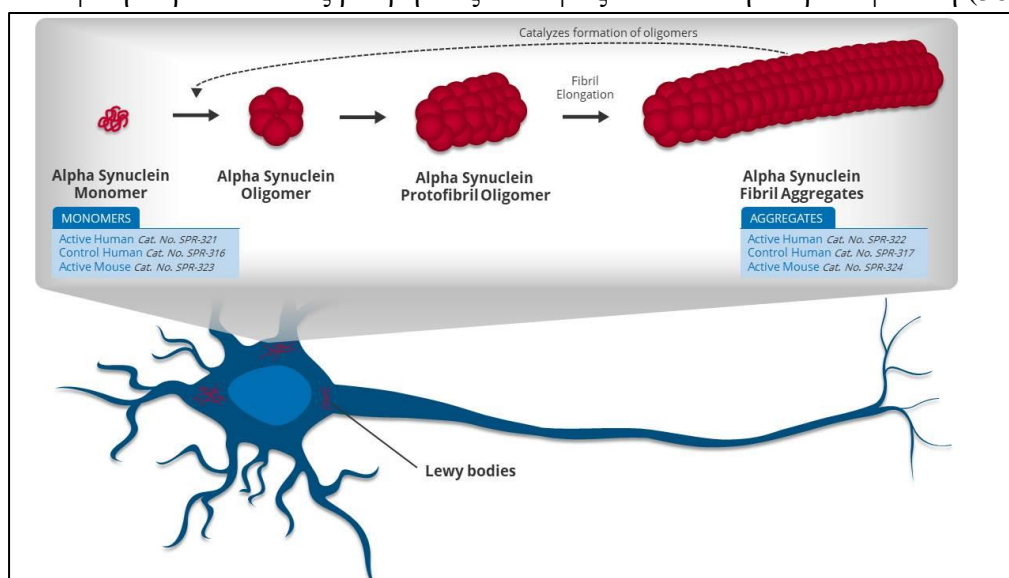
Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη εμπλέκεται στον έλεγχο των διαδικασιών που ρυθμίζονται από τις συναπτικές μεμβράνες (26), συμμετέχει στον έλεγχο της απελευθέρωσης των νευροδιαβιβαστών μέσω της αλληλεπίδρασης της με μέλη των πρωτεϊνών SNARE (**S**NAP(Soluble Attachment Protein)**R**Eceptor) (27). Το σύμπλοκο SNARE αποτελείται από την κυστιδιακή πρωτεΐνη συναπτομπρεβίνη (VAMP) και τις πρωτεΐνες της ενεργούς ζώνης συνταξίνη και SNAP-25. Ειδικότερα η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη προάγει τη συναρμολόγηση του συμπλόκου SNARE μέσω ενός μη ενζυματικού μηχανισμού, το αμινοτελικό άκρο προσδένεται στα φωσφολιπίδια και με το καρβοξυτελικό άκρο να προσδένεται στη συναπτομπρεβίνη II (28), ωστόσο η ακριβής λειτουργία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης παραμένει άγνωστη. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι παίζει το ρόλο πρωτεΐνης συνοδού για το προσυναπτικό πρωτεϊνικό

σύμπλοκο SNARE και ευθύνεται τόσο για την συναρμολόγηση και τον έλεγχο της αποικοδόμησης, καθώς και για την διατήρηση και την κατανομή του, εμπλέκεται δηλαδή άμεσα στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών συμπεριλαμβανομένης και της ντοπαμίνης (29).

#### A.1.5. Ο παθολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης

Ο παθολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης απορρέει από την ενδοκυτταρική συσσωμάτωση της πρωτεΐνης σε αμυλοειδή ινίδια χαρακτηριστικό γνώρισμα των νευρολογικών διαταραχών που ονομάζονται synucleinopathies, συμπεριλαμβανομένης και της νόσου του Parkinson (30) (31). Η α-συνουκλεΐνη σε φυσιολογικές συνθήκες είναι μονομερής ενώ σε μεγάλες συγκεντρώσεις δημιουργεί πρωτοϊνίδια, τα οποία πολυμερίζονται προς ινίδια και αποτελούν βασικό συστατικό των LBs. Διάφοροι παράγοντες όπως η υπερέκφραση της πρωτεΐνης, αλλαγές στο PH, οξειδωτικό στρες, ουβικιτίνωση, η νίτρωση, η συγκέντρωση λιπαρών οξέων, ή λόγω αλληλεπίδρασης με την ντοπαμίνη μπορεί να επάγουν ή να διαμορφώσουν τη δομή και το βαθμό ολιγομερισμού in vitro (32). Μεταξύ αυτών η ουβικιτίνωση, και η φωσφορυλίωση στη σερίνη 129 αποτελούν τις πιο συχνά απαντώμενες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

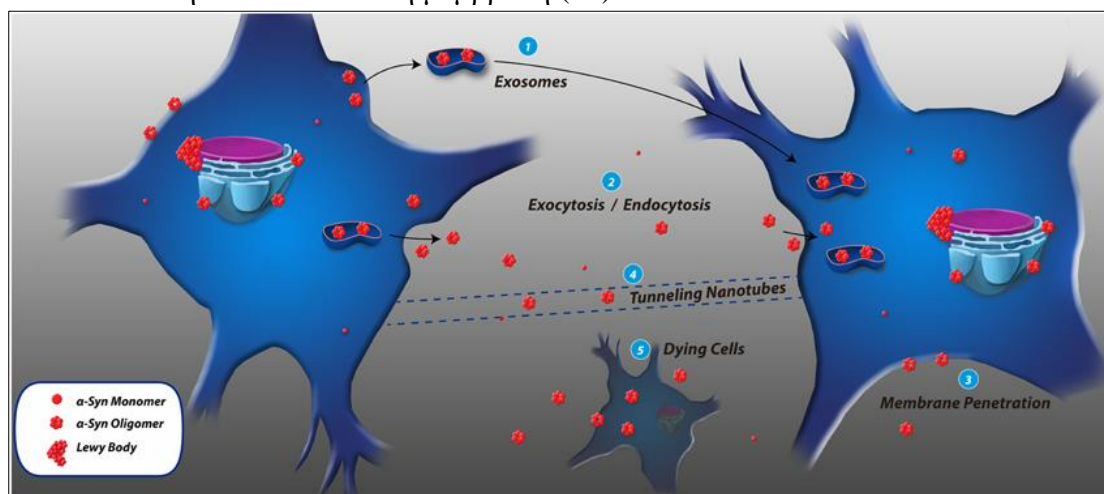
In vitro μελέτες έδειξαν ότι τα πρωτοϊνίδια έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν τη διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης με αποτέλεσμα την αύξηση στην εισροή ασβεστίου από τον εξωκυττάριο στον ενδοκυττάριο χώρο που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (33). Τα ολιγομερή μπορεί να προκαλέσουν επίσης τοξικότητα παρεμβαίνοντας σε διάφορους μηχανισμούς όπως πρόκλησης βλάβης στα μιτοχόνδρια (34), εκκίνηση λυσοσωμικής διαρροής, ή διάσπαση των μικροσωληνίσκων (35). Επιπλέον τα ολιγομερή παρεμβαίνουν στην αξονική μεταφορά των συναπτικών πρωτεϊνών όπως η συναψίνη I προκαλώντας βλάβη στις συνάψεις και πιθανή νευροεκφύλιση (36).



Εικόνα A4: Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης.

Πολλές μελέτες έδειξαν ότι τα διαλυτά ολιγομερή της α-συνουκλεΐνης έχουν μεγαλύτερη τοξικότητα συγκριτικά με τα ινίδια της πρωτεΐνης. Παράγοντες που αναστέλλουν τη μετατροπή των πρωτοϊνιδίων σε ινίδια οδηγούν σε συσσώρευση πρωτοϊνιδίων και επιταχύνουν την εξέλιξη της νόσου Parkinson.

Το 2008, τρεις ανεξάρτητες μελέτες ανέφεραν ότι σε δείγμα ασθενών με νόσο του Parkinson, μετά από μεταμόσχευση εμβρυϊκών νευρώνων μεσεγκεφάλου εντός του ραβδωτού σώματος ανέπτυξαν δομές όμοιες με τα σωμάτια του Lewy στους μεταμοσχευμένους νευρώνες 11,14 και 16 χρόνια μετά την επέμβαση. Αυτό το εύρημα πρότεινε την μετάδοση των σωματιδίων του Lewy στα κύτταρα ξενιστές και οδήγησε στην εικασία ότι οι παθολογικές διαμορφώσεις της α-συνουκλεΐνης μεταδίδονται από κύτταρο σε κύτταρο συμβάλλοντας επιβαρυντικά στην προοδευτική εξέλιξη της νόσου. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από το γεγονός ότι οι ασθενείς με PD εμφανίζουν σωμάτια του Lewy σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (37). Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε και με *in vivo* μελέτες όπου χαρακτηριστικά σε ποντίκια τα οποία υπερεκφράζουν ανθρώπινη α-συνουκλεΐνη παρατηρήθηκε μετάδοση της α-συνουκλεΐνης σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες που μεταμοσχεύθηκαν στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου. Η παρουσία σωματίων του Lewy σε αυτούς τους νευρώνες αποτελεί μία χρόνο-εξαρτώμενη διαδικασία με μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης στα παλαιότερα μοσχεύματα (38). Ωστόσο το σημείο του σώματος από το οποίο ξεκινά η παθογένεια της α-συνουκλεΐνης καθώς και ο μηχανισμός που ενεργοποιείται από την πρόσληψη της παθολογικής α-συνουκλεΐνης από τα κύτταρα δέκτες που οδηγεί στη συσσωμάτωση της παραμένει άγνωστο. Τα κύτταρα δέκτες προσλαμβάνουν τη μη σωστά αναδιπλωμένη α-συνουκλεΐνη η οποία λειτουργεί ως εκμαγείο για την ανάπτυξη συσσωματωμάτων που τελικά οδηγούν στο σχηματισμό σωματίων του Lewy στα κύτταρα δέκτες (39). Αρκετοί μηχανισμοί ευθύνονται για την απελευθέρωση της α-συνουκλεΐνης στον εξωκυττάριο χώρο και τη μετάδοση μεταξύ των κυττάρων. Για παράδειγμα *in vitro* μελέτη στην ανθρώπινη νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά SH-SY5Y απέδειξε ότι η υπερέκφραση της αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνης καθώς και των μεταλλαγών A53T και A30P έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση στον εξωκυττάριο χώρο μέσω της διαδικασίας της εξωκυττάρωσης αφού η απελευθέρωση αναστέλλεται σημαντικά σε θερμοκρασία 18°C. Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα το επαναλαμβανόμενο μοτίβο των 11 αμινοξέων, είναι αυτό που αρχικά έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης, αυτό οδηγεί σε αλλαγές στην δευτεροταγή δομή οι οποίες επιτρέπουν στην α-συνουκλεΐνη να διεισδύει στη μεμβράνη (40).



Εικόνα A5: Μηχανισμοί μετάδοσης της α-συνουκλεΐνης μεταξύ των κυττάρων.

- 1) Τα εξωσώματα είναι μικρά μεμβρανικά κυστίδια που προέρχονται από το μονοπάτι ενδοκύττωσης, τα οποία εγκλωβίζουν στο εσωτερικό τους ολιγομερή α-συνουκλεΐνης και τα απελευθερώνουν στον εξωκυττάριο χώρο. 2) Η α-συνουκλεΐνη συσσωρεύεται στον



εξωκυττάριο χώρο και προσλαμβάνεται από γειτονικά κύτταρα δέκτες με το μονοπάτι της ενδοκύττωσης.3) Η α-συνουκλεΐνη προσδένεται στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου δέκτη διαμέσου της αμινοτελικής περιοχής ,διεισδύει στη μεμβράνη και αποκτά πρόσβαση στο κυτταρόπλασμα 4) μεταξύ των κυττάρων σχηματίζονται νανοσήραγγες,δηλαδή μεμβρανικές γέφυρες επικοινωνίας που αποτελούνται κατά βάση από ακτίνη,μέσω των οποίων μπορεί να μεταδίδεται η α-συνουκλεΐνη, αποτελεί έναν υποθετικό μηχανισμό 5) Τα νεκρά κύτταρα αποτελούν μια σημαντική δεξαμενή παθολογικής α-συνουκλεΐνης η οποία απελευθερώνεται μετά από τη λύση των κυττάρων (Gallegos,Pacheco et al.2015).

Τα εξωσώματα είναι μικρά κυστίδια μεμβράνης που προέρχονται από την ενδοκυτταρική οδό και απελευθερώνονται από τα κύτταρα μέσα στον περιβάλλοντα χώρο. In vitro, ένα ευρύ φάσμα κυττάρων εκκρίνουν εξωσώματα συμπεριλαμβανομένων των νευρώνων και των αστροκυττάρων (41). Τα εξωσώματα που βρίσκονται στον περιβάλλοντα χώρο των κυττάρων και περιέχουν ολιγομερή α-συνουκλεΐνης είναι πιο επιρρεπή στην πρόσληψη από τα κύτταρα δέκτες συγκριτικά με εξωσώματα που δεν περιέχουν ολιγομερή (42), ενώ η δυσλειτουργία των λυσοσωμάτων μπορεί να επιτυγχάνει την απελευθέρωση των εξωσωμάτων (43). Επίσης, η ανταλλαγή ολιγομερών α-συνουκλεΐνης μπορεί να λαμβάνει χώρα διαμέσου των TNTs (tunneling nanotubes) που αποτελούν μεμβρανικές γέφυρες ακτίνης μεταξύ των κυττάρων και λειτουργούν σαν αγωγοί για την ανταλλαγή κυτταροπλασματικών και μεμβρανικών μορίων, οργανιδίων καθώς και μετάδοσης παθογόνων (44). Ωστόσο ένα σημαντικό τμήμα των ολιγομερών α-συνουκλεΐνης που απαντώνται στον διακυτταρικό χώρο προέρχεται από την απελευθέρωση των συσσωματωμάτων από τα νεκρά κύτταρα στις προσβληθείσες περιοχές του εγκεφάλου (45). Τέλος αρκετές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η πρόσληψη της εξωκυττάριας α-συνουκλεΐνης από τα κύτταρα δέκτες γίνεται με το μηχανισμό της ενδοκύττωσης (46).

#### A.1.6. Η νόσος του Parkinson αποτελεί μιτοχονδριακή διαταραχή

Τα πρώτα στοιχεία ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου του Parkinson, έρχονται μετά την παρατήρηση ότι η χρήση από τοξικομανείς νοθευμένων παρασκευασμάτων που περιείχαν 1-μεθυλ-4-φαινύλ-1,2,4,5-τετραυδροπυριδίνη (MPTP), έναν αναστολέα του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας ,προκαλεί παρκινσονισμό (47). Αποδείξεις για τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία προέκυψαν σε ασθενείς με PD, όπου επιβεβαιώθηκε η ανεπαρκής δραστηριότητα του συμπλόκου I στην περιοχή της μέλαινας ουσίας (48). Επιπλέον έχει αναφερθεί ατελής συναρμολόγηση του συμπλόκου I σε ασθενείς με νόσο του Parkinson, στην εγκεφαλική περιοχή του φλοιού (49). Ωστόσο η δυσλειτουργία του συμπλόκου I έχει παρατηρηθεί και σε άλλους ιστούς όπως σε μιτοχόνδρια που απομονώθηκαν από αιμοπετάλια ασθενών με νόσο του Parkinson (50), στους ινοβλάστες, και στους λεμφοβλάστες (51), ενώ πρόσφατα αυτή η δυσλειτουργία επιβεβαιώθηκε και σε απομονωμένα μιτοχόνδρια από μετωπιαίο φλοιό ασθενών (52). Μείωση στη δραστηριότητα του συμπλόκου I παρατηρήθηκε και σε κυτταροπλασματικά υβρίδια, σε κυτταρικές σειρές που περιείχαν μιτοχονδριακό DNA από ασθενείς με την σποραδική μορφή της νόσου.

Αύξηση στρες που προκύπτει από την παραγωγή ROS είναι ένας από τους προτεινόμενους υπεύθυνους μηχανισμούς για την εκλεκτική απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη νόσο του Parkinson. Η καταλυτική υπομονάδα του

συμπλόκου I βρέθηκε να περιέχει οξειδωμένες πρωτεΐνες και η πιθανή συσχέτιση μεταξύ των οξειδωμένων πρωτεϊνών και της μείωσης της μεταφοράς ηλεκτρονίων που παρατηρείται σε ασθενείς με PD δείχνει ότι η οξειδωτική βλάβη σε αυτές τις υπομονάδες μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την ανεπάρκεια του συμπλόκου I (52).

Η εγγύτητα του mtDNA στα κέντρα παραγωγής ROS, καθώς και η απουσία μηχανισμών επιδιόρθωσης και προστατευτικών ιστονών, καθιστούν το mtDNA ευάλωτο σε μεταλλάξεις. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα ποντικών αποδεικνύουν ότι βλάβες στα γονίδια που είναι απαραίτητα για την διατήρηση και τη συγκρότηση του mtDNA συνεπάγονται ανεπαρκή λειτουργία αναπνευστικής αλυσίδας, ενώ φαινοτυπικά παρουσιάζουν χαρακτηριστικά πρόωρης γήρανσης (53). Επιπλέον ο ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων στο mtDNA των ντοπαμινεργικών νευρώνων ασθενών με νόσο Parkinson είναι πολύ υψηλός συγκριτικά με υγιή γερασμένα άτομα (54). Οι νευρώνες της μέλαινας ουσίας φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι σε μεταλλάξεις του mtDNA, δεδομένου ότι οι νευρώνες του υπόκαμπου ή οι πυραμιδικοί νευρώνες γερασμένων ατόμων δεν περιείχαν υψηλό ρυθμό μεταλλάξεων. Παρόλο αυτά δεν υπάρχει ακόμα ισχυρή απόδειξη ότι οι μεταλλάξεις στο mtDNA μπορεί να αποτελέσουν την πρωταρχική αιτία πρόκλησης της νόσου του Parkinson, αλλά φαίνεται πολύ πιθανό οι μεταλλάξεις να συσσωρεύονται κατά την διάρκεια της νόσου σαν συνέπεια αύξησης του κυτταρικού στρες και των λαθών κατά την διάρκεια αντιγραφής του mtDNA. Όταν η συσσώρευση των μεταλλάξεων ξεπεράσει ένα κρίσιμο κατώφλι, προκαλούν αναπνευστική ανεπάρκεια που συμβάλει στην νευροεκφύλιση. Αξίζει να σημειωθεί ότι το σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας είναι ιδιαίτερα ευάλωτο στις μεταλλάξεις μίας και 7 από τις 45 υπομονάδες που είναι απαραίτητες για την λειτουργική συναρμολόγηση του συμπλόκου κωδικοποιούνται από το mtDNA. Δεδομένων των παραπάνω στοιχείων είναι εμφανές ότι τα μιτοχόνδρια αποτελούν ταυτόχρονα πηγή και στόχο των ROS.

#### A.1.7. Μοντελοποίηση της νόσου Parkinson

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

- I. Τοξικά μοντέλα που προκύπτουν από χρήση τοξινών όπως η 6-υδροξυντοπαμίνη (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) ή η ροτενόνη (rotenone) και το παρακουάτ (paraquat).
- II. Γενετικά μοντέλα που προκύπτουν μετά από γενετική τροποποίηση στα γονίδια  $\alpha$ -synuclein, LRRK2, parkin, PINK1 and DJ-1.
- III. Συνδυαστικά μοντέλα, μοντέλα δηλαδή που βασίζονται στη χρήση ενός εκ των παραπάνω περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου και μίας γενετικής τροποποίησης.

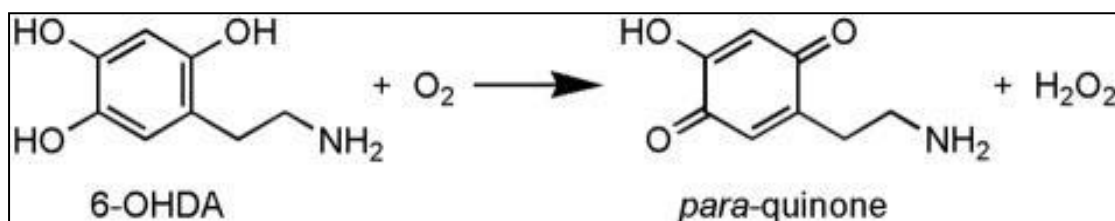
Ιδανικό μοντέλο μελέτης της νόσου Parkinson, είναι ένα μοντέλο που είτε επάγεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες είτε από γενετικούς χειρισμούς, έχει σαν αποτέλεσμα την επιτυχή αναπαραγωγή των χαρακτηριστικών της νόσου, όσο αφορά τις διαταραχές της συμπεριφοράς (κινητικές διαταραχές), τα παθολογικά χαρακτηριστικά

(προοδευτική, επιλεκτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων με ταυτόχρονη παρουσία LBs), καθώς και διαταραχές σε μοριακούς μηχανισμούς. Δυστυχώς όλα τα τρέχοντα ζωικά μοντέλα αδυνατούν να αναπαραστήσουν πλήρως το σύνολο των χαρακτηριστικών που έχουν περιγράψει στη νόσο Parkinson. Πολλά γενετικά Παρκινσονιακά μοντέλα, βασιζόμενα τόσο στον αυτοσωμικό επικρατή όσο και στον αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας, αποτυγχάνουν να οδηγήσουν σε νευροεκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων και σχεδόν όλα δεν οδηγούν στο σχηματισμό των κυτταροπλασματικών εγκλείστων που θυμίζουν τα σωμάτια του Lewy (55). Όσον αφορά τα παρκινσονιακά μοντέλα μελέτης που βασίζονται στη χρήση τοξινών, έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί και έχουν συμβάλει στην κατανόηση μηχανισμών που εμπλέκονται στη νόσο. Επίσης αποτελούν κατάλληλα μοντέλα μελέτης φαρμακολογικών στόχων στη δοκιμή πιθανών θεραπειών. Ωστόσο προς το παρόν δεν υπάρχει υποδειγματικό μοντέλο που να αναπαριστά πλήρως τα φαινοτυπικά και παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου Parkinson.

#### A.1.8. Περιβαλλοντικές τοξίνες

**6-Hydroxydopamine (6-OHDA).** Είναι ένα υδροξυλιωμένο παράγωγο της ντοπαμίνης που πρώτο-απομονώθηκε το 1959 (56). Το πρώτο ζωικό μοντέλο της νόσου PD που σχετίστηκε με ντοπαμινεργικό νευρωνικό θάνατο στη *substantia nigra pars compacta* (SNpc) εμφανίστηκε δύο δεκαετίες αργότερα. Η 6-OHDA έχει υψηλή συγγένεια για μεμβρανικούς μεταφορείς νευροδιαβιβαστών, όπως ο DAT (dopamine transporter), γεγονός που της επιτρέπει να εισέρχεται ελεύθερα στο εσωτερικό των ντοπαμινεργικών και νοραδρενεργικών κυττάρων.

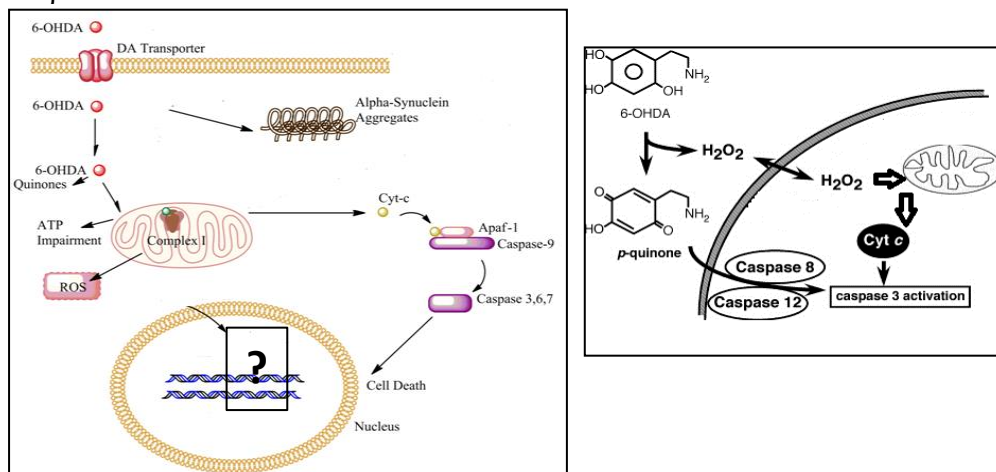
Η τοξίνη 6-OHDA μπορεί να οξειδωθεί με δύο τρόπους: είτε να υποστεί αυτο-οξείδωση εξωκυττάρια, είτε από τη στιγμή που θα εισέλθει μέσα στο κύτταρο να υποστεί ενδοκυττάρια ενζυμική οξείδωση. Σε κάθε περίπτωση, το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία βλαβών λόγω παραγωγής ελεύθερων ριζών (ROS) και υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω της αμινικής οξειδάσης τύπου B και κινονών. Οι κινόνες αδρανοποιούν βιολογικά μακρομόρια αντιδρώντας με τις πυρηνόφιλες ομάδες τους. Τα μεταβολικά τοξικά προϊόντα της νευροτοξίνης έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μηχανισμών που οδηγούν στην αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (MOMP), την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων προ-αποπτωτικών μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που με τη σειρά τους ενεργοποιούν άλλες πρωτεΐνες-τελεστές όπως η κασπάση 3 (57).



Εικόνα Α6: Οξείδωση της 6-OHDA

Η 6-OHDA δεν διαπερνά τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό επομένως αποτυγχάνει να συσσωρευτεί στον εγκέφαλο έτσι ώστε να επιτευχθούν υψηλές νευροτοξικές συγκεντρώσεις γρήγορα.

Οι νευρώνες που πεθαίνουν εμφανίζουν ποικίλη μορφολογία συμπεριλαμβανομένων των χαρακτηριστικών της απόπτωσης. Τέλος, χαρακτηριστικό τη τοξικότητας που επάγεται από την 6-OHDA είναι η αυξημένη γλοιακή αντίδραση που φαίνεται ότι επιδεινώνει την προκαλούμενη από την τοξίνη νευροεκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων.



Εικόνα Α7:Μηχανισμός δράσης της 6-OHDA ,(Ricardo Cabezas et al., May 2013).

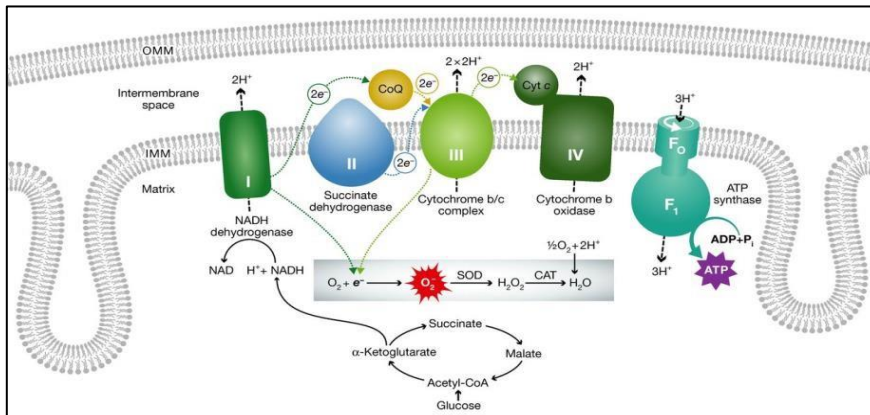
**Rotenone.** Η Ροτενόνη είναι ένα φυσικά παραγόμενο οργανικό μόριο που χρησιμοποιούταν για δεκαετίες για να ελεγχθεί ο πληθυσμός των ψαριών καθώς και ως φυτοφάρμακο σε φυτώρια. Αποτελεί αναστολέα του complex I της αναπνευστικής μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας που μπορεί να περάσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και τις βιολογικές μεμβράνες ανεξάρτητα από υποδοχείς και μεταφορείς. Η αναστολή του complex I από την ροτενόνη έχει καταστροφικές επιδράσεις στο κύτταρο και παραγωγή ROS με αποτέλεσμα το οξειδωτικό στρες (58).

## A2.Μιτοχόνδρια

### A.2.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Τα μιτοχόνδρια είναι μητρικώς κληρονομούμενα κυτταρικά οργανίδια τα οποία συναντώνται σε όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα και εντοπίστηκαν για πρώτη φορά 110 χρόνια πριν στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αποτελούν τα κέντρα παραγωγής ενέργειας με την μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine triphosphate, ATP ) διαμέσου της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (oxidative phosphorylation, OXPHOS) γ 'αυτό και θεωρούνται τα "εργοστάσια παραγωγής ενέργειας" του κυττάρου (59). Τα μιτοχόνδρια «εκμεταλλεύονται» τα παράγωγα του κύκλου του κιτρικού οξέος (citric acid cycle) NADH και FADH ως δότες ηλεκτρονίων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή του ATP. Το βασικό συστατικό για την πραγματοποίηση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι η αναπνευστική αλυσίδα (Electron Transport Chain, ETC) των μιτοχονδρίων η οποία εδράζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και αποτελείται από 4 σύμπλοκα πρωτεϊνών (I,II,III,IV). Η λειτουργία της ETC έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία μιας ηλεκτροχημικής διαβάθμισης φορτίου στη μιτοχονδριακή μεμβράνη η οποία χρησιμοποιείται από το ένζυμο ATP συνθάση για την δημιουργία μορίων ATP (60). Εκτός όμως από τον ενεργειακό τους ρόλο τα πολύπλοκα δομικά χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων τους επιτρέπουν να

συμμετέχουν και σε πλήθος άλλων σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών όπως ο μεταβολισμός των αμινοξέων/λιπιδίων, η ρύθμιση της ομοιόστασης του ασβεστίου και ο έλεγχος του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (programmed cell death, PCD).



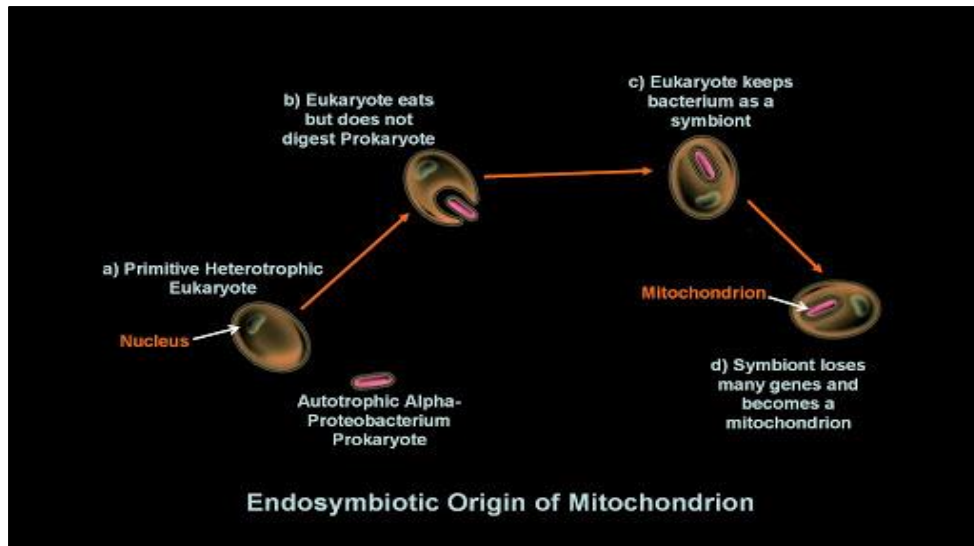
**ΕΙΚΟΝΑ Α8:Η μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC),[ Dorn, 2015].**

Καταλαμβάνουν σημαντικό ποσοστό του κυτταροπλάσματος (18-20%), έχουν μέγεθος από 1 μέχρι 10 μm και απεικονίζονται σαν ένα περίπλοκο κυλινδρικό δίκτυο που εξαπλώνεται σχεδόν σε όλο το κυτταρόπλασμα. Στην πραγματικότητα απαρτίζουν ένα δυναμικό δίκτυο με μεγάλη δομική πλαστικότητα, που ονομάζεται μιτοχονδριακό δίκτυο (mitochondrial network).

Το μιτοχονδριακό δίκτυο βρίσκεται σε μία συνεχόμενη κίνηση και αλλαγή σχήματος μέσω των διαδικασιών σχάσης και σύντηξης, που έχει σαν αποτέλεσμα την εξάπλωση ή τη συρρίκνωση στον κυτταροπλασματικό χώρο, σαν απόκριση σε ποικίλα κυτταρικά σήματα. Το μιτοχονδριακό δίκτυο βρίσκεται σε μία δυναμική ισορροπία, ένα σύνολο αλληλεπιδράσεων καθορίζει και διαμορφώνει τη μορφολογία και το σχήμα του μιτοχονδριακού δικτύου (61). Διαταραχή στην οργάνωση και τη διακίνηση των μιτοχονδρίων αποτελούν κοινό χαρακτηριστικό νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως το Parkinson και η νόσος Huntington (62).

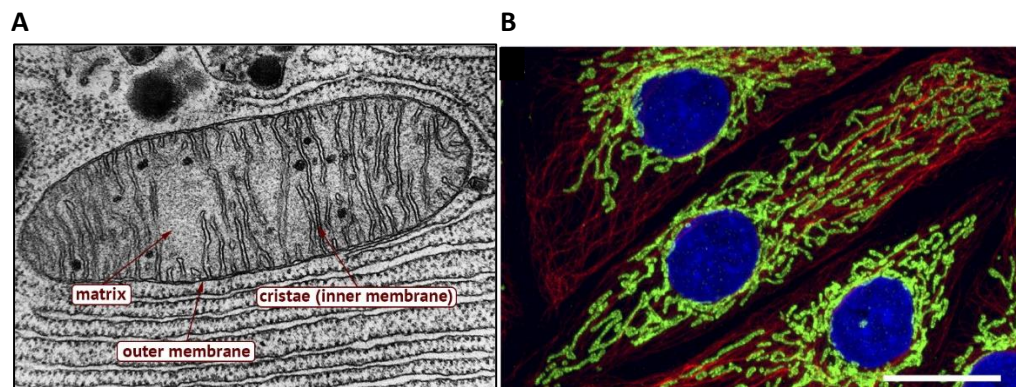
Η βασική υπόθεση της εξελικτικής τους προέλευσης υποδηλώνει ότι προήλθαν από μια συμβιωτική σχέση μεταξύ ευκαρυωτικών κυττάρων και πρωτόγονων βακτηρίων με την ικανότητα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Margulis, 1970).





ΕΙΚΟΝΑ Α9:Απεικόνιση της θεωρίας Ενδοσυμβίωσης,[The virtual fossil Museum].

Σε συμφωνία με αυτήν την υπόθεση, τα μιτοχόνδρια περικλείονται από διπλή μεμβράνη, συμπεριλαμβανομένης μιας διαπερατής εξωτερικής μεμβράνης που είναι δομικά παρόμοια με την πλασματική μεμβράνη και μιας εσωτερικής μεμβράνης που σχηματίζει πολυάριθμες εσωτερικές πτυχώσεις (cristae) και χωρίζει την μιτοχονδριακή μήτρα και τον διαμεμβρανικό χώρο. Οι μεμβράνες αυτές έχουν διαφορετική λιπιδιακή και πρωτεϊνική σύσταση. Η εξωτερική μεμβράνη αποτελείται κυρίως από σύμπλοκα πρωτεϊνών, στην πλειοψηφία τους πορίνες, που σχηματίζουν υδρόφιλους διαύλους και είναι διαπερατή σε μόρια μεγέθους έως και 5 KDa. Αντίθετα η διαπερατότητα της εσωτερικής μεμβράνης χαρακτηρίζεται από μεγάλη επιλεκτικότητα. Είναι η μόνη κυτταρική μεμβράνη που περιέχει στην σύστασή της το φωσφολιπίδιο καρδιολιπίνη (Cardiolipin), και μάλιστα σε μεγάλο ποσοστό, γεγονός που την κάνει ιδιαίτερα στεγανή σε ιόντα. Στην εσωτερική μεμβράνη εδράζονται τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας καθώς και τα σύμπλοκα που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs και στην σύνθεση ATP. Στον εσωτερικό χώρο των μιτοχονδρίων εντοπίζονται δύο διαφορετικά διαμερίσματα, η μιτοχονδριακή μήτρα (Mitochondrial Matrix) καθώς και ο διαμεμβρανικός χώρος. Στην μιτοχονδριακή μήτρα απαντάται το μιτοχονδριακό DNA, κοντά στην εσωτερική μεμβράνη.



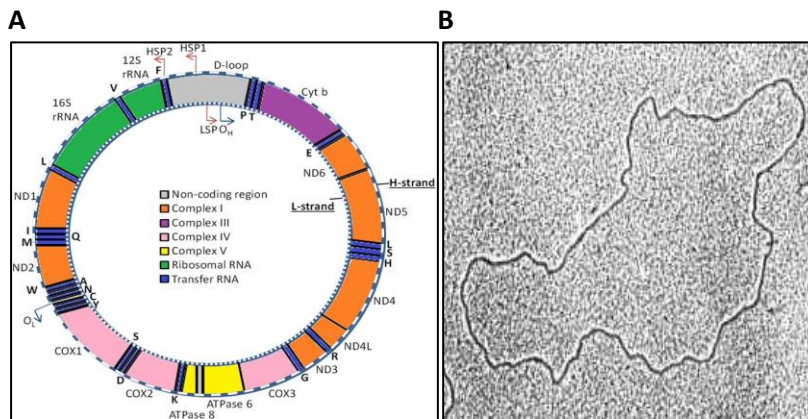
Εικόνα Α10:(Α) Ηλεκτρονιακή μικρογραφία μιτοχονδρίου. (Β) Ενδεικτική εικόνα ανοσοφθορισμού στην οποία αποτυπώνεται το μιτοχονδριακό δίκτυο στα ευκαρυωτικά κύτταρα PtK2. Η σήμανση του μιτοχονδριακού δικτιού έγινε με το αντίσωμα Tom20 (πράσινο), οι

**μικροσωληνίσκοι του κυτταροσκελετού με το αντίσωμα για την  $\alpha$ -tubulin ( κόκκινο ) και η χρώση του πυρήνα έγινε με την χρωστική DAPI (μπλε), (scale bar : 20 $\mu$ m), (Kukat, Wurm et al. 2011).**

#### A.2.2 Δομή και οργάνωση του μιτοχονδριακού DNA

Το εκκεντρικό χαρακτηριστικό των μιτοχονδρίων είναι ότι διαθέτοντας δικό τους γενετικό υλικό και ριβοσώματα , απολαμβάνουν ένα είδος γενετικής αυτονομίας, μίας και είναι ικανά να παράγουν πρωτεΐνες, κατ' εντολήν του μιτοχονδριακού DNA και όχι του DNA του πυρήνα. Ιστορικά η πρώτη παρατήρηση ότι τα μιτοχόνδρια κάνουν ανεξάρτητη σύνθεση πρωτεϊνών και RNA (63), δικαιολογήθηκε από την ανακάλυψη DNA, του μιτοχονδριακού DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) εντός του οργανιδίου (64).

Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA, είναι δίκλωνο, κυκλικό, υπερελικωμένο μόριο DNA το οποίο εντοπίζεται μέσα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αποτελείται από 16,569 ζεύγη βάσεων (base pairs - bp) και δεν περιέχει ιντρόνια σαν ενδιάμεσα των γονιδίων. Η αντιγραφή γίνεται καθ' όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Το mtDNA κωδικοποιεί 13 μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην συναρμολόγηση των συμπλοκών της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι 7 υπομονάδες της αφυδρογονάσης NADH (σύμπλοκο I), μία υπομονάδα της αναγωγάσης του κυτοχρώματος C (σύμπλοκο III), τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος C (σύμπλοκο IV) και δύο υπομονάδες της ATP συνθάσης (σύμπλοκο V). Οι εναπομείναντες υπομονάδες των συμπλόκων, το σύμπλοκο II καθώς και αυτές που συμμετέχουν στην λειτουργική συγκρότηση του οργανιδίου προέρχονται από το χρωμοσωμικό DNA. Επιπλέον το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) κωδικοποιεί και κάποιες πρωτεΐνες της μεταγραφικής και μεταφραστικής μηχανής, συγκεκριμένα, 22 μεταφορικά RNAs (tRNAs) και 2 ριβοσωμικά RNAs (rRNAs), χαρακτηριστικό της ημι – αυτόνομης φύσης του οργανιδίου (65). Οι αλυσίδες του μιτοχονδριακού DNA διαχωρίζονται σε ελαφριά (Light – L) και βαριά (Heavy – H), ανάλογα με το ποσοστό γουανίνης και θυμίνης (G + T) που περιέχουν. Το mtDNA περιέχει και μία μη-κωδική περιοχή που ονομάζεται βρόγχος εκτόπισης (D-Loop), και έχει μέγεθος 1124 ζεύγη βάσεων. Εντοπίζεται μεταξύ των 16024 – 756 bp και αποτελεί το σημείο ελέγχου της έκφρασης του mtDNA μίας και περιέχει τις θέσεις των υποκινητών για την έναρξη της αντιγραφής για την βαριά και την ελαφριά αλυσίδα, καθώς και την περιοχή έναρξης αντιγραφής της βαριάς αλυσίδας (H-strand replication, OH) (66). Σε αυτήν αγκυροβολούν τα μεταγραφικά σύμπλοκα συμπεριλαμβανομένης της RNA πολυμεράσης για τον έλεγχο της μεταγραφής του mtDNA (67). Στο εσωτερικό της εντοπίζονται δύο υπερμεταβλητές περιοχές η HVI και η HV2 (Hypervariable region 1 και 2) στις θέσεις 16.024 - 16.383 και 57-372 αντίστοιχα. Οι περιοχές αυτές αποτελούν σημείο εντοπισμού πολλών mtDNA τροποποιήσεων (68).



**ΕΙΚΟΝΑ Α11:** Α. Σχηματική απεικόνιση του μιτοχondριακού DNA (mtDNA). Το ανθρώπινο μιτοχondριακό γονιδίωμα κωδικοποιεί 13 πρωτεΐνες, συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας ETC. Αυτές είναι 7 υπομονάδες του συμπλόκου I (ND1-6 και ND4L), μία υπομονάδα του συμπλόκου III (CytB), 3 υπομονάδες του συμπλόκου IV (COX I-III) και δύο υπομονάδες του συμπλόκου V (ATPase 6, ATPase 8). Επίσης κωδικοποιεί δύο rRNAs (12S, 16S) και 22 tRNAs. Η περιοχή D-Loop περιέχει τον υποκινητή της βαριάς (H-strand promoter region, HSP) και της ελαφριάς αλυσίδας (L-strand promoter region, LSP), καθώς και την περιοχή έναρξης αντιγραφής της βαριάς αλυσίδας (H-strand replication, OH). Η δεύτερη περιοχή έναρξης αντιγραφής για την ελαφριά αλυσίδα (L-strand replication, OL) αποτελείται μόνο από 30 ζεύγη βάσεων και εντοπίζεται μεταξύ των γονιδίων ND2 και COXI. Β. Απεικόνιση κυκλικού μιτοχondριακού DNA από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [A Textbook of Histology, Chapman and Hall, 12th edition, 1994].

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

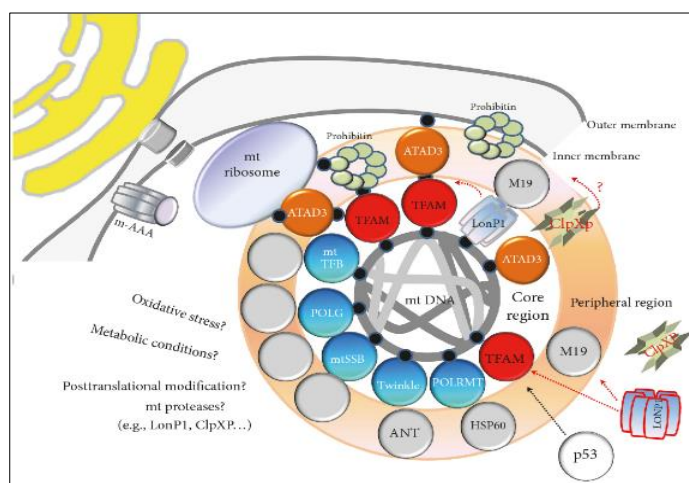
Mitochondrial code						Universal code									
		Second letter							Second letter						
		U	C	A	G		U	C	A	G					
First letter	U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U	UUU	Phe	UCU	UCG	UAC	Tyr	UGU	Cys	U
	C	Phe	Ser	Tyr	Cys	A	UUA	Leu	UCC	UCA	UAA	Stop	UGA	Stop	A
		Leu	Ser	Stop	Trp	G	UUG	Leu	UCG	UAG	UAG	Stop	UGG	Trp	G
A	Leu	Pro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

**ΕΙΚΟΝΑ Α12:** Ο γενετικός κώδικας στα μιτοχόνδρια. Το κωδικόνιο UGA χρησιμοποιείται ως κωδικόνιο τερματισμού στον παγκόσμιο γενετικό κώδικα, αλλά κωδικοποιεί το αμινοξύ τρυπτοφάνη στο mtDNA των θηλαστικών, το κωδικόνιο AUA κωδικοποιεί την ισολευκίνη στον παγκόσμιο γενετικό κώδικα, αλλά κωδικοποιεί την μεθειονίνη στο mtDNA των θηλαστικών, τα κωδικόνια AGA και AGG κωδικοποιούν για αργινίνη στον παγκόσμιο



γενετικό κώδικα αλλά χρησιμοποιούνται για κωδικόνια τερματισμού στο mtDNA των θηλαστικών, [Griffiths, Barrowclough et al. 2004].

Δεδομένης της εξελεγκτικής βακτηριακής προέλευσης των μιτοχονδρίων δεν αποτέλεσε έκπληξη η ομοιότητα οργάνωσης του mtDNA με το βακτηριακό DNA. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα υποβάλλεται σε συμπίεση του όγκου του για να σχηματίσει τα μιτοχονδριακά πυρηνοειδή (mitochondrial nucleoid). Τα μιτοχονδριακά πυρηνοειδή τυπικά έχουν διάμετρο ~100 nm (69) ενώ ένα τελείως κυκλικό χαλαρό mtDNA μόριο μεγέθους 16,6 Kb έχει μήκος της τάξης των ~2μm. Τα πυρηνοειδή είναι εμφανή στο μικροσκόπιο σαν μικρές στικτές δομές που κατανέμονται σε όλο το μιτοχονδριακό δίκτυο (70). Τα μιτοχονδριακά πυρηνοειδή αποτελούνται από ένα σύνολο πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε ένα εύρος λειτουργιών όπως η συσκευασία του mtDNA, η αντιγραφή και η μεταγραφή. Δομικά αποτελούνται από μία κεντρική και μία περιφερική περιοχή, όπου η κεντρική περιοχή περιέχει πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην σύνθεση νουκλεϊκών οξέων, ενώ στην περιφερική περιοχή εντοπίζονται πρωτεΐνες της μεταφραστικής μηχανής καθώς και αυτές που έχουν σχέση με τη συγκρότηση των πρωτεϊνών (71). Ο αριθμός των πυρηνοειδών ανά μιτοχόνδριο κυμαίνεται από 1 έως 10, ενώ κάθε πυρηνοειδές μπορεί να περιέχει από 1 έως 15 αντίγραφα mtDNA σύμφωνα με (SatoH 2004) ή 2 έως 8 σύμφωνα με (Legros, Malka et al. 2004).



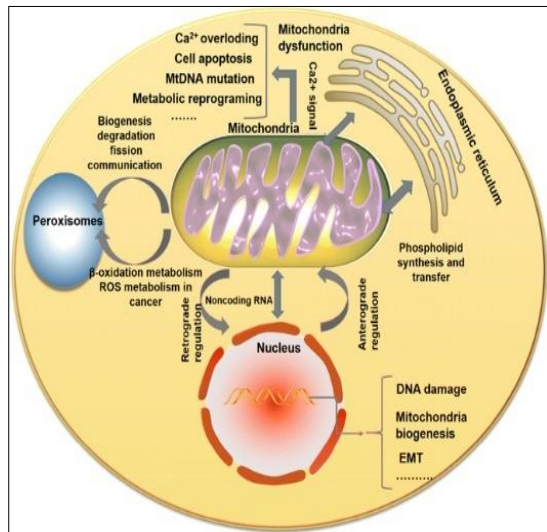
**ΕΙΚΟΝΑ A13:** Η mtSSB (mitochondrial single-strand binding protein) η μιτοχονδριακή πολυμεράση POLG αποτελείται από δύο υπομονάδες στα θηλαστικά την POLGA, είναι η καταλυτική υπομονάδα που έχει δραστηριότητα 3'-5' εξωνουκλεάσης και ευθύνεται για την υψηλή ποιότητα του ενζύμου (72). Η δεύτερη υπομονάδα είναι η POLGB, είναι βοηθητική υπομονάδα, σχηματίζει ετεροδιμερές σε αναλογία 2:1 με την POLGA, σταθεροποιώντας το ένζυμο αυξάνοντας την αποτελεσματικότητά του (73). Επιπλέον πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι η POLGB αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τον αριθμό αντιγράφων του mtDNA (74). Η POLRMT (mtRNA polymerase), ή ελικάση Twinkle, η πρωτεΐνη mtSSB αποτελεί μία εκτυλικτική πρωτεΐνη, μέσω της φυσικής αλληλεπίδρασης με την Twinkle μεσολαβή στην εκτύλιξη του ξετυλίγματος του mtDNA. Η πρωτεΐνη ATAD3 δεν αλληλοεπιδρά άμεσα με το mtDNA, αλλά με το μιτοχονδριακό ριβόσωμα και την εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (75).

Δεν υπάρχουν ιστόνες στο mtDNA, τον ρόλο αυτό αναλαμβάνει ο μεταγραφικός παράγοντας TFAM, μιας και αποτελεί την πιο άφθονη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη, αφού

αντιστοιχούν ~ 900-1000 μόρια TFAM : 1 μόριο mtDNA (76). Συμμετέχει ενεργά στον έλεγχο και την συσκευασία του mtDNA όπως αντίστοιχα οι ιστόνες στο χρωμοσωμικό DNA (77). Επιπλέον η γ-πολυμεράση, το ένζυμο δηλαδή που είναι υπεύθυνο για την αντιγραφή του mtDNA, στερείται της ικανότητας επιδιόρθωσης λαθών, κάτι που έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεταλλάξεων σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με το πυρηνικό DNA. Η απουσία ιντρονίων, ψευδογονιδίων, επαναλαμβανόμενου DNA και μεγάλων ακολουθιών που να παρεμβάλλονται μεταξύ γονιδίων, καθιστά το mtDNA παράδειγμα γενετικής οικονομίας στην φύση. Οι περισσότερες από τις γενετικές αλλαγές που παρατηρούνται είναι απλές αντικαταστάσεις βάσεων, όπως και μικρές προσθήκες ή ελλείματα (ενός ή λίγων νουκλεοτιδίων), ενώ λιγότερες περιλαμβάνουν μεγάλες αλλαγές (μέχρι αρκετές 100άδες νουκλεοτίδια) στο μήκος του μορίου. Οι περισσότερες διαφορές μήκους περιορίζονται στην περιοχή ελέγχου του μορίου D-Loop. Η κληρονομική μεταβίβαση του mtDNA γίνεται μητρικά.

### A.2.3 Επικοινωνία μιτοχονδρίου με άλλα κυτταρικά οργανίδια

Τα μιτοχόνδρια είναι ενεργειακά εργοστάσια κυττάρων και είναι απαραίτητα για ενδοκυτταρικές αλληλεπιδράσεις με άλλα οργανίδια. Αυτά αλληλεπιδρούν με το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα υπεροξυσώματα και τον πυρήνα μέσω της μεταγωγής σήματος, της μεταφοράς κυστιδίων και των θέσεων επαφής με μεμβράνες για τη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού, της βιοσύνθεσης, της ανοσολογικής αντίδρασης και της κυτταρικής κυκλοφορίας [78].

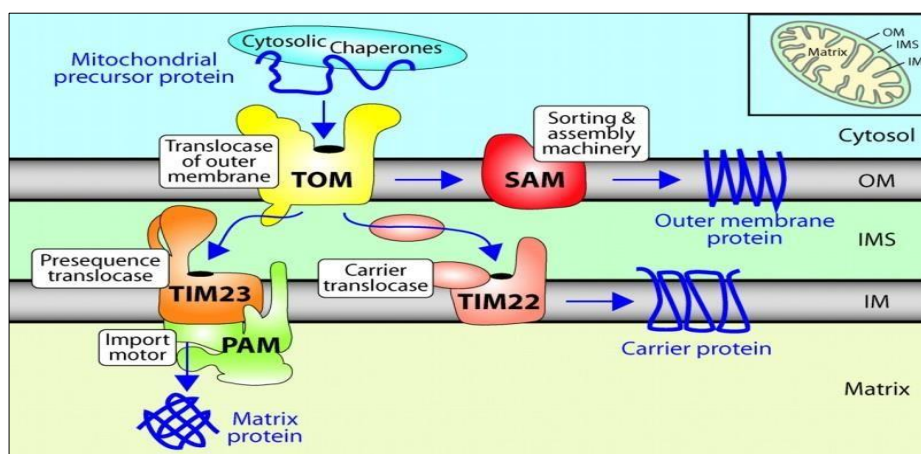


**ΕΙΚΟΝΑ A14:** Επικοινωνία μιτοχονδρίου με τα υπόλοιπα κυτταρικά οργανίδια, [78].

### A.2.3. Επικοινωνία μιτοχονδρίου – Πυρήνα

Ως το μόνο οργανίδιο που διαθέτει ανεξάρτητο γονιδίωμα στο ευκαρυωτικό κύτταρο, το μιτοχόνδριο έχει τη δική του διάρκεια ζωής στον κυτταρικό κύκλο. Ωστόσο, ανάμεσα στις περισσότερες από 1200 μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, μόνο 13 κωδικοποιούνται από το ίδιο το μιτοχόνδριο, και οι περισσότερες από τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από τον πυρήνα. Συντίθενται ως πρόδρομα μόρια στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος και στη συνέχεια εισέρχονται στα

οργανίδια. Οι μιτοχονδριακές μεμβράνες περιέχουν συγκεκριμένες μεταφορικές μηχανές (τρανσλοκάσες ή τρανσλοκόνια) για την αναγνώριση, μετατόπιση και εισαγωγή των πρόδρομων πρωτεϊνών στα διάφορα μιτοχονδριακά διαμερίσματα. Οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες έχουν μία αλληλουχία-οδηγό στο N-τελικό τους άκρο, η οποία απομακρύνεται ταχέως μετά την εισαγωγή τους στο οργανίδιο από μια εξειδικευμένη πρωτεάση (Πεπτιδάση σήματος του μιτοχονδρίου MPP, Matrix Processing Peptidase). Οι αμινοτελικές αλληλουχίες οδηγοί είναι απαραίτητες και επαρκείς για την εισαγωγή των πρωτεϊνών που τις περιέχουν στα μιτοχόνδρια [79]. Με τη βοήθεια μοριακών πρωτεϊνών συνοδών όπως η Hsp70, οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες μεταφέρονται στη γενική πύλη εισόδου των μιτοχονδρίων, το σύμπλοκο TOM (Translocase of the Outer Membrane), από όπου στη συνέχεια ταξινομούνται σε ένα από τα επιμέρους μιτοχονδριακά διαμερίσματα. Οι πρόδρομοι των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης με δομή β-βαρελιού απαιτούν το σύμπλοκο SAM (Sorting and Assembly Machinery) για την μεταφορά τους. Οι πρόδρομες πρωτεΐνες που προορίζονται για τη μήτρα εξαρτώνται από το σύμπλοκο Tim23 (Translocase of the Inner Membrane) της εσωτερικής μεμβράνης και τον συνδεδεμένο με αυτή κινητήρα εισαγωγής ή υποβοήθησης εισόδου PAM (Presequence translocase-Associated Motor) για τη μεταφορά τους διαμέσου της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες μεταφοράς μικρών μορίων (carrier proteins) εισάγονται στην εσωτερική μεμβράνη με τη βοήθεια του συμπλόκου TIM22 [80].



**ΕΙΚΟΝΑ Α15: Μονοπάτια μιτοχονδριακής μεταφοράς στα μιτοχόνδρια [80].**

Η βιογένεση των μιτοχονδρίων ρυθμίζεται από το γονιδίωμα του πυρήνα και το γονιδίωμα των μιτοχονδρίων. Επομένως, υπάρχει ένας ακριβής και αυστηρός ρυθμιστικός μηχανισμός μεταξύ του πυρήνα και των μιτοχονδρίων για τον έλεγχο της σταθερότητας των μιτοχονδρίων. Μια δυσλειτουργική διασταύρωση μεταξύ αυτών των δύο οργανιδίων οδηγεί σε βλάβες στο DNA τόσο στον πυρήνα όσο και στα μιτοχόνδρια, υπερφόρτωση ασβεστίου και ανώμαλη ενεργοποίηση αυξητικών παραγόντων [81], καθώς και διαταραχές του μεταβολισμού που αποτελούν χαρακτηριστικά του καρκίνου [82].

#### A.2.4. Οξειδωτικό stress

Τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια πηγή παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Οι ενεργές ρίζες αποτελούν παραπροϊόντα της κυτταρικής αναπνοής κυρίως του συμπλόκου I αλλά και του III, και συμβάλλουν σημαντικά στο ενδοκυτταρικό οξειδωτικό στρες (83), δηλαδή στην διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των ελεύθερων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού (83). Τα λιπίδια των μεμβρανών των ενδοκυτταρικών οργανιδίων είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στις βλάβες από ROS (κυρίως σε αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξειδωσης), με επιζήμιες επιπτώσεις για τη λειτουργία του κυττάρου. Ο σχηματισμός ROS είναι ανάλογος με την δραστηριότητα της αναπνευστικής αλυσίδας (84). Το σύμπλοκο I και σε μικρότερο βαθμό το σύμπλοκο III της αναπνευστικής αλυσίδας αποτελούν τις κύριες εστίες παραγωγής ROS στα μιτοχόνδρια. Κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, το σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας λειτουργεί σαν σημείο εισόδου των ηλεκτρονίων από την μιτοχονδριακή μήτρα στην αναπνευστική αλυσίδα. Καθώς το μοριακό οξυγόνο ανάγεται σταδιακά σε νερό από τα σύμπλοκα της αλυσίδας, παράγεται ένα μικρό ποσό ιόντων σουπεροξειδίου ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) από τα σύμπλοκα I και III. Τα ιόντα αυτά μπορούν να μετατραπούν σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) από τη δισμουτάση του σουπεροξειδίου, και το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται από την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης σε νερό ( $\text{H}_2\text{O}$ ) και μοριακό οξυγόνο ( $\text{O}_2$ ). Στην αναπνευστική αλυσίδα το 95-99% του οξυγόνου που ανάγεται μετατρέπεται σε νερό, ωστόσο ένα μικρό ποσοστό 1-5% θα οδηγήσει στο σχηματισμό  $\cdot\text{O}_2^-$ .

Το  $\text{H}_2\text{O}_2$  είναι ένα δραστικό μόριο, που μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ελεύθερων ριζών, όπως η ρίζα του ( $\cdot\text{OH}$ ). Είναι σταθερό, διαπερατό στις μεμβράνες και έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής στο κύτταρο. Είναι κυτταροτοξικό αλλά θεωρείται ένας σχετικά ασθενής οξειδωτικός παράγοντας. Ωστόσο παρουσία μεταλλικών ιόντων όπως ο σίδηρος  $\text{Fe}^{2+}$ , το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να μετατραπεί σε πολύ δραστικές ρίζες υδροξυλίου σαν συνέπεια της αντίδρασης Fenton, η οποία προκαλεί σοβαρή οξειδωτική βλάβη στα κυτταρικά συστατικά. Η δραστηριότητα της ρίζας υδροξυλίου είναι εξαιρετικά υψηλή (85), αποτελεί έναν ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο συμπεριλαμβανομένων και των βιολογικών μακρομορίων.

Τα λιπίδια των μεμβρανών που απαντώνται στα ενδοκυτταρικά οργανίδια, είναι ιδιαίτερα ευάλωτα σε βλάβες προκαλούμενες από ελεύθερες ρίζες. Συγκεκριμένα ένας μεγάλος αριθμός τοξικών παραπροϊόντων σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση με τις ελεύθερες ρίζες, που οδηγεί σε μία εξαιρετικά επιζήμια αλυσίδα αντιδράσεων λιπιδικής υπεροξειδωσης. Η βλάβη που δημιουργείται από την λιπιδιακή υπεροξειδωση είναι ιδιαίτερα επιζήμια για τη λειτουργία του κυττάρου (86), αφού αλλάζει την ρευστότητα των κυτταρικών μεμβρανών και μειώνει την ικανότητα διατήρησης μίας εξισορροπημένης βαθμίδας συγκέντρωσης. Αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης (87), συνεπώς προκύπτει απώλεια ενδοκυτταρικών υγρών, μείωση μεταφοράς ηλεκτρονίων στο ενδοπλασματικό δίκτυο και αλλαγές στη μιτοχονδριακή λειτουργία (88).

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

λειτουργία και αλλαγή στην κυτταρική λειτουργία (89). Η οξείδωση των πρωτεϊνών και των αμινοξέων συνοδεύεται από αύξηση στα επίπεδα των ομάδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (90), και των οξειδωμένων αμινοξέων (91). Τα ROS έχουν επίσης την ικανότητα να εξασθενούν τη λειτουργία των συστημάτων πρωτεϊνικής αποδόμησης (UPS) και το μονοπάτι αυτοφαγίας – λυσοσώματος (ALP) με αποτέλεσμα τη συσσώρευση πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κυττάρου (92).

Παρότι το DNA αποτελεί σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο, τα ROS αλληλεπιδρούν με αυτό και προκαλούν μία σειρά από βλάβες όπως τροποποίηση βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών, αλλαγή στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA.

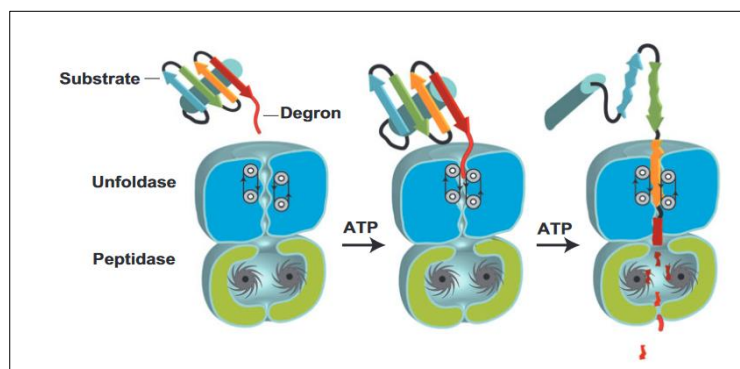
Στις βλαβερές συνέπειες του οξειδωτικού stress το κύτταρο έχει αναπτύξει μία πληθώρα μηχανισμών που ενεργοποιούνται κατά την οξειδωτική βλάβη των μιτοχονδρίων για να διατηρήσουν την κυτταρική ομοιόσταση και τη βιωσιμότητά του. Η απομάκρυνση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβη μέσω των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



### A.3.Μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1

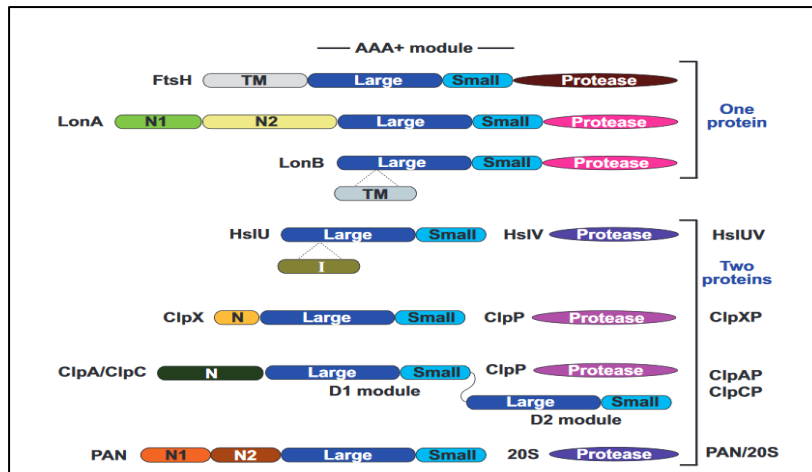
#### A.3.1. AAA<sup>+</sup> πρωτεάσες:ATP τροφοδοτούμενες μηχανές πρωτεϊνικής καταστροφής

Οι κατεστραμμένες ή οι λάθος αναδιπλωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται πρωτεολυτικά, βοηθώντας στην αποφυγή της δυνητικά καταστροφικής συσσώρευσής τους, στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Επιπλέον η αποικοδόμηση χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση τέλεια λειτουργικών πρωτεϊνών για ρυθμιστικούς λόγους, είτε γιατί απλά αυτές δεν χρειάζονται πλέον. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αποικοδόμηση είναι μη αναστρέψιμη επομένως απαιτείται ειδική αναγνώριση πρωτεϊνών για να αποφευχθεί η σπατάλη της καταστροφής. Όλες οι AAA<sup>+</sup> πρωτεάσες περιέχουν τουλάχιστον μία πρωτεΐνη που ανήκει σε υπεροικογένεια των ATPασών που σχετίζονται με ποικίλες κυτταρικές δραστηριότητες (93). Αυτά τα ένζυμα που τροφοδοτούνται με ATP, τυπικά λειτουργούν ως κινητήρες σε ενδοκυτταρικές διεργασίες που απαιτούν μηχανική εργασία (94). Κατά την συναρμολόγησή τους δημιουργούν ένα εξαμερή δακτύλιο με έναν κεντρικό αξονικό πόρο. Η δέσμευση και η υδρόλυση του ATP προκαλεί διαμορφωτικές αλλαγές στην κίνηση του δακτυλίου. Γίνεται αναγνώριση υποστρώματος, ξεδίπλωμα και μετατόπιση του μετουσιωμένου πολυπεπτιδίου διαμέσου του πόρου, σε έναν απομονωμένο θάλαμο αποικοδόμησης μίας διαμερισματοποιημένης πρωτεάσης, όπου λαμβάνει χώρα η πρωτεόλυση.



**ΕΙΚΟΝΑ A16: Βασικός μηχανισμός AAA<sup>+</sup> πρωτεάσης [Sauer RT, Baker TA 2011].**

Οι AAA<sup>+</sup> είναι παρούσες σε όλα τα βασιλεία της ζωής και μπορούν να χωριστούν σε ξεχωριστές οικογένειες με βάση τις αλληλουχίες της ATPάσης, της πρωτεάσης και των βοηθητικών πεδίων (95). Στις οικογένειες Lon και FtsH, τα εξαμερή αποτελούνται από έξι ταυτόσημες υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες περιέχει έναν τομέα AAA<sup>+</sup>, έναν τομέα πρωτεάσης και έναν επιπλέον τομέα. Στις οικογένειες ClpXP, ClpAP και HslUV, οι πρωτεΐνες ClpX, ClpA ή HslU σχηματίζουν ένα εξαμερή δακτύλιο με έξι ταυτόσημες πολυμοριακές υπομονάδες, ενώ οι πρωτεΐνες διαμερίσματος ClpP ή HslV κατασκευάζονται από πολλαπλά αντίγραφα μιας ξεχωριστής πρωτεΐνης που σχηματίζουν δομές με διπλό δακτύλιο με 14 και 12 υπομονάδες, αντίστοιχα. Στην οικογένεια προτάσεων PAN/20S, ο δακτύλιος PAN αποτελείται και πάλι από έξι ταυτόσημες υπομονάδες, αλλά οι 20S πρωτεάσες έχουν διαφορετικές υπομονάδες τοποθετημένες σε δομή α7β7β7α7. Το ευκαρυωτικό πρωτεάσωμα 26S, το οποίο περιέχει περισσότερους από 30 διαφορετικούς τύπους υπομονάδων, είναι η πιο περίπλοκη AAA<sup>+</sup> πρωτεάση.



ΕΙΚΟΝΑ 10. Απεικόνιση τομέων των AAA<sup>+</sup> πρωτεασών, [ Sauer, RT., & Baker, T. A. (2011)].

### A.3.2. Μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1

Οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στα κύτταρα καταστρέφονται συνεχώς από φυσικούς και χημικούς παράγοντες, όπως θερμότητα, ελεύθερες ρίζες και τοξικές ενώσεις. Αυτοί οι παράγοντες μπορεί να προκαλέσουν λανθασμένη αναδίπλωση ή συσσωμάτωση πρωτεϊνών, σχηματισμό προϊόντων προσθήκης και τελικά να οδηγήσουν σε κυτταρική δυσλειτουργία. Όταν οι πρωτεΐνες αυτές συσσωρεύονται στο κύτταρο, αποικοδομούνται επιλεκτικά από διαφορετικά πρωτεολυτικά συστήματα. Στο μιτοχονδριακό πλέγμα, τρεις πρωτεάσες είναι υπεύθυνες για τη λειτουργία αυτή: ClpX, m-AAA και Lon.

Η δραστηριότητα της πρωτεάσης Lon έχει αναγνωριστεί πριν από 30 χρόνια στο *Escherichia coli* και το γονίδιο που κωδικοποιεί την Lon κλωνοποιήθηκε το 1984 (96). Το ανθρώπινο ομόλογο (LONP1, γνωστό ως Lon ή μιτοχονδριακή Lon) αναγνωρίστηκε το 1993 (97), ως πυρηνικό γονίδιο που κωδικοποιεί μία μιτοχονδριακή πρωτεΐνη περίπου 100 kDa (98), και εκφράζεται σε ιστούς και κύτταρα.

Τα τελευταία χρόνια η Lon αποδείχθηκε βασικό συστατικό του μιτοχονδριακού ποιοτικού ελέγχου και ένας σημαντικός παράγοντας στις μιτοχονδριακές αλλοιώσεις που μπορούν να παρατηρηθούν στις χρόνιες ασθένειες και τον καρκίνο.

Η πρωτεάση LonP1 είναι επίσης γνωστή σαν πρωτεάση La. Διατηρείται σε μεγάλο βαθμό σε όλη την εξέλιξη και τα ομόλογα της βρέθηκαν σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς. Στα ευβακτήρια η πρωτεΐνη Lon είναι μια διαλυτή κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, στα αρχαία δεσμεύεται στη μεμβράνη και στα ευκαρυωτικά κύτταρα εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και υπεροξυσώματα (99). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η Lon κωδικοποιείται από ένα πυρηνικό γονίδιο. Μετά από μετάφραση στα ριβοσώματα δημιουργείται ένα πρόδρομο μόριο όπου στην N-τελική περιοχή του φέρει μία μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχο (MTS). Έπειτα εισάγεται από το κυτοσόλιο στην μιτοχονδριακή μήτρα όπου μετατρέπεται στην ώριμη μορφή της, μετά από αποκοπή της αλληλουχίας στόχου MTS. Η μιτοχονδριακή πρωτεάση Lon μοιράζεται την πλειονότητα των ιδιοτήτων της με τη βακτηριακή Lon, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας δέσμευσης της στο DNA και του ουσιαστικού ρόλου στον έλεγχο της ποιότητας των πρωτεϊνών (100).

### A.3.3. Η πρωτεάση LonP1 στον άνθρωπο

Η ανθρώπινη Lon κωδικοποιείται από το γονίδιο LonP1 (γνωστό και ως PRSS15), το οποίο βρίσκεται στην περιοχή p13.2 του χρωμοσώματος 19 (Chr19) και έχει μήκος περίπου 29.000 ζεύγη βάσεων. Το μετάγραφο 1 (variant 1) έχει μήκος 3221 ζεύγη βάσεων και κωδικοποιεί την πιο άφθονη ισόμορφη του ενζύμου (GenBank). Η πρωτεΐνη που παράγεται αποτελείται από 959 αμινοξέα με MW περίπου 107 KDa και μία N-τελική αλληλουχία που στοχεύει την πρωτεΐνη στα μιτοχόνδρια. Η ώριμη πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος περίπου στα 100 KDa (101). Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεάση LonP1 βρίσκεται στην μήτρα του μιτοχονδρίου (102). Συγκεκριμένα κατά 90% είναι διαλυτή στην μιτοχονδριακή μήτρα και το υπόλοιπο μέρος συνδέεται με την εσωτερική μεμβράνη όπου υπάρχουν μιτοχονδριακά νουκλεοειδή (102).

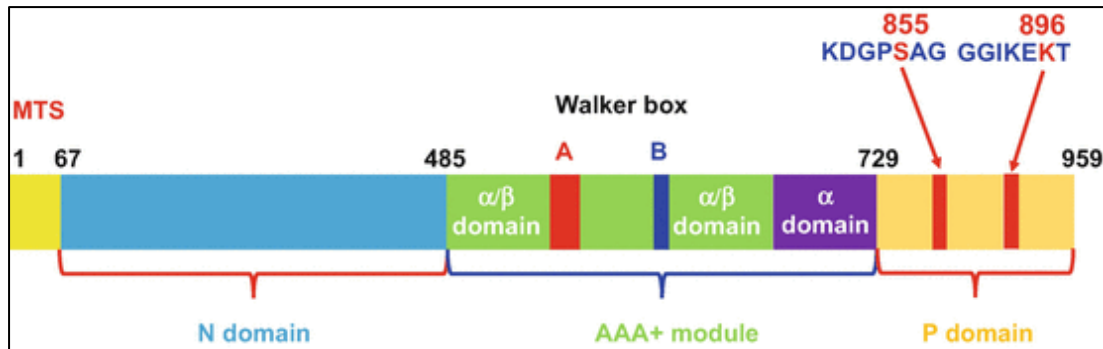
### A.3.4. Φυσιολογική λειτουργία της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1

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

- I. Το αμινοτελικό άκρο (N-terminal domain - N-domain) το οποίο εμπλέκεται στην αναγνώριση και πρόσδεση του υποστρώματος, και εμφανίζει τον υψηλότερο βαθμό απόκλισης τόσο στην σύνθεση των αμινοξέων όσο και στο μήκος (103).
- II. Την ενδιάμεση περιοχή ATPάσης (ATPase domain ή AAA+ module) στο εσωτερικό της οποίας εντοπίζονται δύο μοτίβα Walker Box A και B τα οποία είναι υπεύθυνα για τη δέσμευση και υδρόλυση του ATP, ενώ είναι και υπεύθυνη περιοχή για την πρόσδεση στο mtDNA (103).
- III. Το πεδίο πρωτεάσης (protease domain - P-domain) στο καρβοξυτελικό άκρο, περιέχει την πρωτεολυτική ενεργή θέση που σχηματίζεται από δύο αμινοξέα την Σερίνη (S)855 και την Λυσίνη (K)896, και είναι αυτό που παρουσιάζει την μεγαλύτερη εξελικτική συντήρηση (104).
- IV. Επιπλέον υπάρχει μία πιο μικρή περιοχή μεταξύ των μοτίβων Walker Box A και B, η περιοχή SSD (sensor and substrate discrimination domain), που επίσης εμπλέκεται στην αναγνώριση των υποστρωμάτων της πρωτεάσης.

Επί της ουσίας η πρωτεάση Lon φέρει εντός της ίδιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας τόσο την ενεργότητα ATP-άσης όσο και την πρωτεολυτική δραστικότητα.



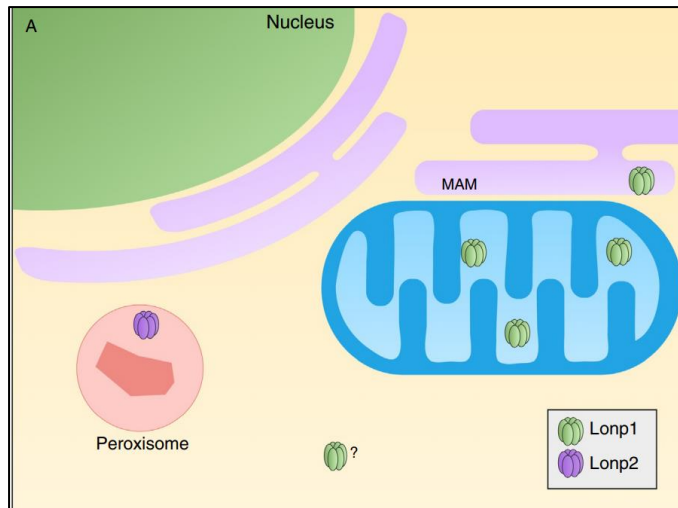


**ΕΙΚΟΝΑ A18:** Σχηματική απεικόνιση των δομικών και λειτουργικών μοτίβων στην πρωτοταγή δομή της ανθρώπινης μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1. Η μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχος MTS της πρόδρομης πρωτεΐνης προσδέεται στην μιτοχονδριακή μηχανή μετατόπισης της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και μεσολαβεί στην εισαγωγή του στην μιτοχονδριακή μήτρα. Η N περιοχή (N domain) στο αμινοτελικό άκρο, είναι εξαιρετικά μεταβλητή, μεσολαβεί στην αναγνώριση και πρόσδεση υποστρώματος. Η περιοχή AAA+, η οποία αποτελείται από τις υποπεριοχές  $\alpha/\beta$  ( $\alpha/\beta$  domain) στις οποίες εντοπίζονται τα μοτίβα Walker Box A και B, υπεύθυνα για την πρόσδεση και υδρόλυση του ATP. Επιπλέον περιέχει μία μικρή  $\alpha$  υποπεριοχή ( $\alpha$  domain). Η P περιοχή (P domain) στο καρβοξυτελικό άκρο, είναι η περιοχή με ενεργότητα πρωτεάσης. Περιέχει το πρωτεολυτικό ενεργό κέντρο που σχηματίζεται από δύο σημαντικά αμινοξέα, την Σερίνη (S) 855 και την Λυσίνη (K) 896 [Lu, B. (2017)].

#### A.3.5. Κυτταρικός εντοπισμός LonP1

Τα μιτοχόνδρια αποτελούνται από δύο μεμβράνες (105), την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη OMM και την εσωτερική IMM οι οποίες διαχωρίζονται από τον διαμεμβρανικό χώρο (106). Ο χώρος εσωτερικά του IMM ονομάζεται μιτοχονδριακή μήτρα. Η OMM φιλοξενεί πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την εισαγωγή ιόντων, λιπιδίων και πρωτεϊνών ενώ η IMM περιέχει τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων ETC που είναι υπεύθυνη για την οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) (106). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η LonP1 είναι μία διαλυτή πρωτεΐνη της μιτοχονδριακής μήτρας. Στον άνθρωπο το μεγαλύτερο ποσοστό (>90%) της LonP1 βρίσκεται στην μιτοχονδριακή μήτρα σε νουκλεοειδή ενώ η υπόλοιπη βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα. Πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης ταυτοποίησαν μία σειρά από πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά η LonP1 όπως σύμπλοκα εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (TIM), τρεις μιτοχονδριακές IM πρωτεάσες AFG3L2, YME1L1 και HTRA2 καθώς και το MICOS. Η αλληλεπίδραση αυτή υποδηλώνει ότι η LonP1 εντοπίζεται κοντά στο IMM (107). Δεδομένου ότι η Lon αλληλεπιδρά επίσης με πρωτεΐνες που ανήκουν σε μιτοχονδριακά ριβοσώματα, είναι πιθανό η Lon να μπορεί να σχηματίσει μία γέφυρα μεταξύ νουκλεοειδών και ριβοσωμάτων όπου μεταγράφονται μετάγραφα προερχόμενα από mtDNA. Μία άλλη μελέτη σε άλλο κυτταρικό μοντέλο, στην κυτταρική σειρά PC3, απέδειξε ότι η Lon αλληλεπιδρά όχι μόνο με διαλυτές πρωτεΐνες αλλά και με υπομονάδες συμπλόκων ETC όπως σύμπλοκο I (NDUFA10) (108), σύμπλοκο III (cytochrome c1) και σύμπλοκο V (ATP5F1A, ATP5F1B, ATP5F1C, ATP5PO) (109) και με πρωτεΐνες εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.

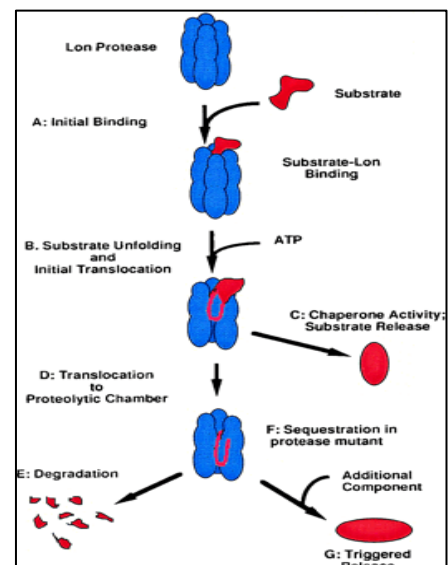
Πρόσφατα η προσοχή έχει δοθεί στην πιθανότητα παρουσίας εξωμιτοχονδριακών ισόμορφων LonP1. Στο ανθρώπινο μεταγράφημα υπάρχουν ισόμορφες LonP1 οι οποίες στερούνται εν μέρει ή και πλήρως την μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχο (MTS). Έτσι υπάρχει η πιθανότητα η Lon να μπορεί να διανεμηθεί εκτός μιτοχονδρίων.



**ΕΙΚΟΝΑ Α19:** Ενδοκυτταρική κατανομή του Lonp1 και της Lonp2. Η Lonp1 έχει αποδειχθεί ότι εντοπίζεται στη μιτοχονδριακή μήτρα, είτε στην ελεύθερη μορφή δεσμευμένων με νουκλεοειδή, κοντά στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, και στις μιτοχονδριακές μεμβράνες (MAM) υπό συνθήκες στρες. Ένας πιθανός κυτοσολικός εντοπισμός προβλέπεται από βιοπληροφορικά εργαλεία, αλλά ποτέ δεν αποδεικνύεται. Το Lonp2 εντοπίζεται στα υπεροξώματα.

#### Α.3.6. Μηχανισμός δράσης μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1

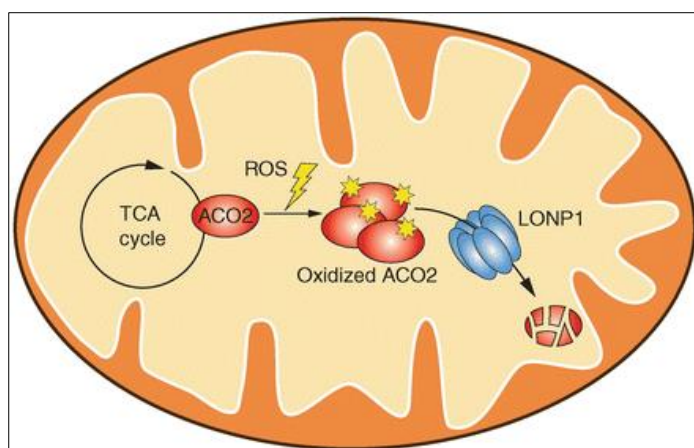
Ο μηχανισμός αναγνώρισης των προς αποικοδόμηση υποστρωμάτων της δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος, αλλά κατά προσέγγιση η διαδικασία αποικοδόμησης αυτών είναι η παρακάτω. Μετά την αρχική αναγνώριση και δέσμευση ενός υποστρώματος, (A) απαιτείται ένα ενεργειακά εξαρτώμενο βήμα για την ξεδίπλωση και την μετατόπιση των υποστρωμάτων μέσω της περιοχής της ΑΤΡάσης, (B) Στην περίπτωση των ΑΤΡάσεων που δεν διαθέτουν περιοχή πρωτεάσης όπως είναι οι Clp ΑΤΡάσεις ή όταν η αποικοδόμηση παρακάμπτεται, η μετατόπιση μπορεί να ακολουθείται από απελευθέρωση της πρωτεΐνης. Σε αυτή την περίπτωση η ΑΤΡάση λειτουργεί σαν μόριο συνοδός και επιτρέπει την αναδίπλωση ή την αναδιαμόρφωση κάποιων υποστρωμάτων, (C). Όταν υπάρχει περιοχή πρωτεάσης τότε η μετατόπιση οδηγεί σε αποικοδόμηση ακολουθούμενη από απελευθέρωση προϊόντων (D και E). Όταν η πρωτεολυτική περιοχή είναι ανενεργή, όπως συμβαίνει σε κάποιες μεταλλάξεις στην LonP1 μπορεί να γίνει απομόνωση των υποστρωμάτων, (F). Σε ορισμένες περιπτώσεις μία ενεργοποιημένη απελευθέρωση κάποιων απομονωμένων υποστρωμάτων θα μπορούσε να είναι ένας τρόπος μεταφοράς μίας ξεδιπλωμένης πρωτεΐνης σε ένα νέο περιβάλλον (G) (110).



**ΕΙΚΟΝΑ Α20:** Σχηματική απεικόνιση της αναγνώρισης και αποικοδόμησης πρωτεϊνικών υποστρωμάτων από την LonP1. [Laurence Van Melderen and Susan, 1999]. Gottesman, 1999]

### A.3.7. Μιτοχονδριακός μεταβολισμός και πρωτεάση LonP1

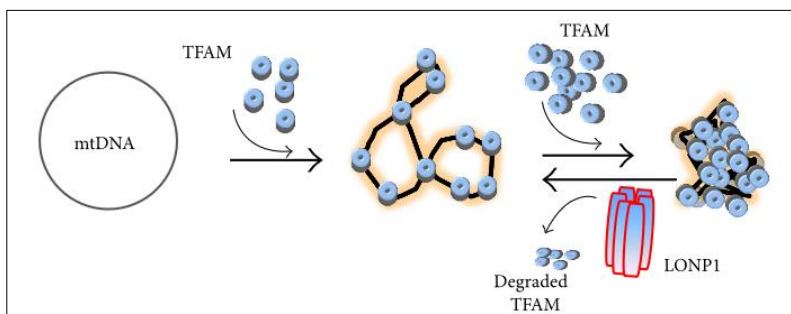
Στα ανθρώπινα κύτταρα, η Lon εμπλέκεται σε διάφορες πτυχές της μιτοχονδριακής βιολογίας, αλληλοεπιδρώντας με πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διάφορες λειτουργίες. Η Lon αποικοδομεί πρωταρχικά τις λανθασμένες και κατεστραμμένες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της μιτοχονδριακής ακονιτάσης (Aco2), της γλουταμινάσης C (GLC), της στεροειδογόνου οξείας ρυθμιστικής πρωτεΐνης (StAR), της συνθετάσης 5-αμινολικής βουλίνης (ALAS-1) και την β-συνθετάση κυσταθειονίνης (CBS) (111). Επίσης ένα ακόμα υπόστρωμα της είναι ο μεταγραφικός παράγοντας A (TFAM) (112). Ένα λοιπόν από τα πιο γνωστά υποστρώματα της Lon είναι η μιτοχονδριακή πρωτεΐνη ακονιτάση (Aconitase), η οποία είναι το ένζυμο που καταλύει έναν αναστρέψιμο ισομερισμό του κιτρικού οξέος σε ισοκιτρικό στον κύκλο του κιτρικού οξέος (κύκλο του Krebs). Είναι ευπαθής σε οξειδωτική αδρανοποίηση και συσσώρευση σε πολλές διαταραχές σχετιζόμενες με την γήρανση. Η LonP1 επιλεκτικά αναγνωρίζει και αποικοδομεί την οξειδωμένη μορφή της ακονιτάσης μετά από αναγνώριση της υδρόφοβης μορφής που προκύπτει από την οξειδωτική τροποποίηση. Με αυτόν τον τρόπο εμποδίζει την εκτεταμένη οξείδωση και συσσώρευση, που θα έθετε σε κίνδυνο την μιτοχονδριακή λειτουργία και την κυτταρική βιωσιμότητα. Η ακονιτάση αποτελεί ένα από τα πολλά πιθανά υποστρώματα της LonP1 στην μιτοχονδριακή μήτρα που αποικοδομούνται επιλεκτικά από την πρωτεάση μετά από οξειδωτική τροποποίηση.



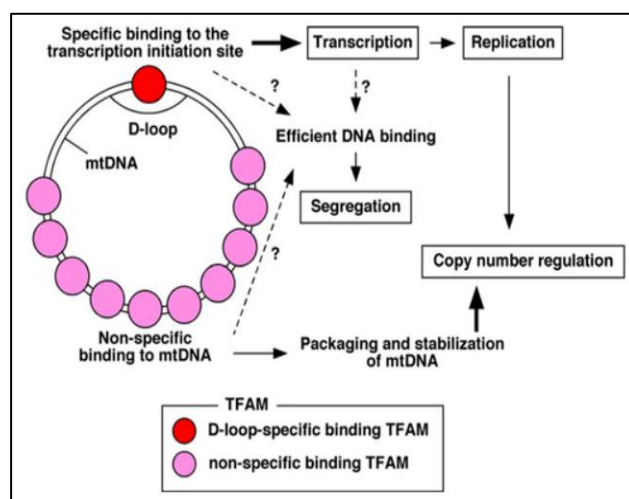
**ΕΙΚΟΝΑ A21:** Σχηματική απεικόνιση πρωτεολυτικής επεξεργασίας οξειδωμένης Aco2 από την πρωτεάση Lon στη μιτοχονδριακή μήτρα [Quirós, P. M. (2018)].

Ένα άλλο υπόστρωμα, πολύ σημαντικό για τη φυσιολογική μιτοχονδριακή λειτουργία, είναι ο μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A (TFAM). Η πρωτεΐνη TFAM έχει την ικανότητα να προσδένεται σε ειδικές θέσεις δέσμησης στο DNA και συγκεκριμένα γύρω από την θέση έναρξης μεταγραφής εντός της περιοχής D-Loop. Με τον τρόπο αυτό εμπλέκεται στη μεταγραφή του mtDNA και κατ' επέκταση στην ενεργοποίηση του αναδιπλασιασμού. Η μη ειδική σύνδεση της πρωτεΐνης TFAM στο DNA καθιστά δυνατή την αναδίπλωση και την σταθεροποίηση του mtDNA και ρυθμίζει τον αριθμό των αντιγράφων του. Το mtDNA αναδιπλώνεται με την βοήθεια των TFAMs, παρόλο αυτά η υπερβολική αναδίπλωση του μπορεί να οδηγήσει σε διακοπή της φυσιολογικής μεταγραφής και αντιγραφής του mtDNA. Όταν η PKA φωσφορυλιώσει το TFAM το οποίο είναι προσδεμένο στο mtDNA, αυτό απελευθερώνεται από το mtDNA, και το ελεύθερο πια φωσφορυλιωμένο TFAM μπορεί να αποικοδομηθεί από την πρωτεΐνη

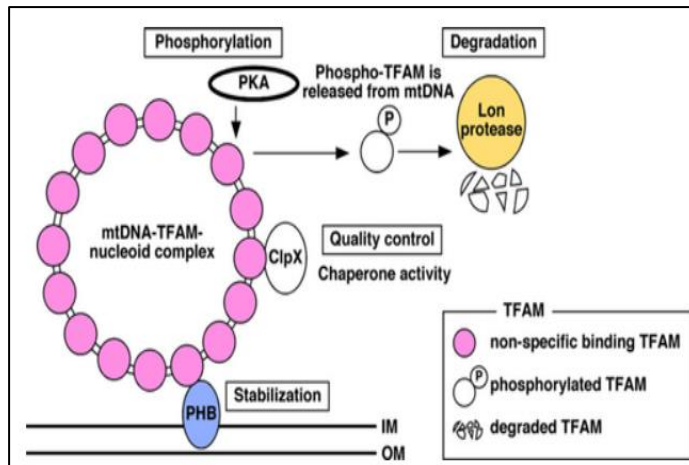
Lon. Η αποσιώπηση της Lon έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της TFAM πρωτεΐνης καθώς και αύξηση στον αριθμό αντιγράφων του mtDNA, ενώ αντίθετα η υπερέκφραση της Lon μειώνει τα επίπεδα της TFAM καθώς και τον αριθμό αντιγράφων του mtDNA (113).



ΕΙΚΟΝΑ Α22: Αναδίπλωση mtDNA από την πρωτεΐνη TFAM και αποικοδόμηση της από την μιτοχονδριακή πρωτεάση Lon [Ryul Lee and Jin Han ,2017].

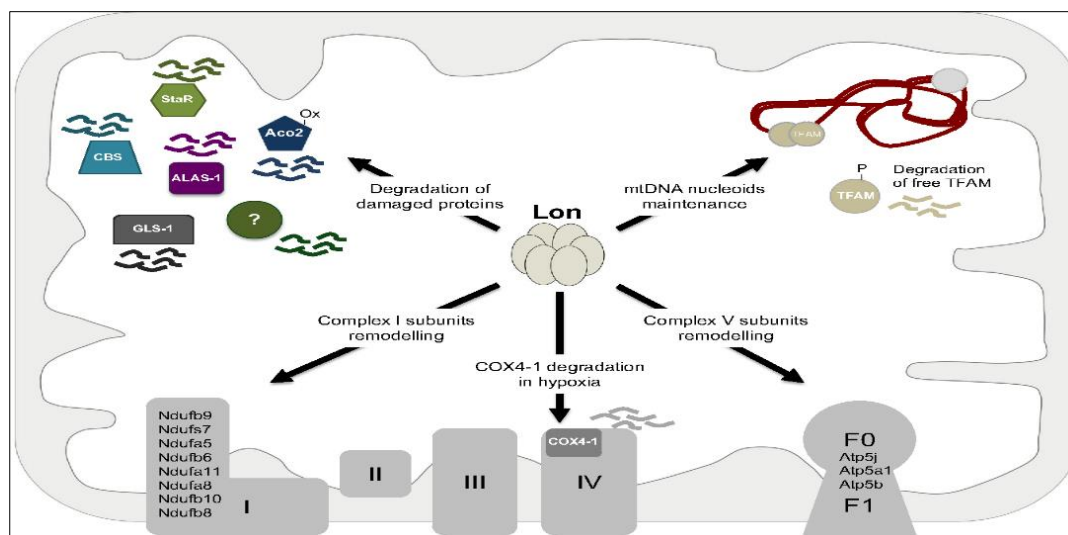


ΕΙΚΟΝΑ Α23: Πλειοτροπική ρύθμιση του mtDNA από την πρωτεΐνη TFAM. Η πρωτεΐνη TFAM έχει την ικανότητα να προσδένεται σε ειδικές θέσεις δέσμευσης στο DNA (κόκκινος κύκλος) και συγκεκριμένα γύρω από την θέση έναρξης μεταγραφής εντός της περιοχής D-Loop. Με τον τρόπο αυτό εμπλέκεται στη μεταγραφή του mtDNA και κατ' επέκταση στην ενεργοποίηση του αναδιπλασιασμού. Η μη ειδική σύνδεση της πρωτεΐνης TFAM στο DNA (ροζ κύκλοι) καθιστά δυνατή την αναδίπλωση και την σταθεροποίηση του mtDNA και ρυθμίζει τον αριθμό των αντιγράφων του (114).



**ΕΙΚΟΝΑ Α24:** Μετα-μεταφραστική ρύθμιση του TFAM. Όταν PKA φωσφορυλιώσει το TFAM το οποίο είναι προσδεμένο στο mtDNA, αυτό απελευθερώνεται από το mtDNA, και το ελεύθερο και φωσφορυλιωμένο TFAM μπορεί να αποικοδομηθεί από την πρωτεΐνη Lon (114).

Επιπλέον η αποσιώπηση της Lon οδηγεί σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα B2 (transcription factor B2 of mitochondria - TFB2M), υποδηλώνοντας ότι μπορεί επίσης να αποτελεί υπόστρωμα της πρωτεάσης. Σε συνθήκες υποξίας, η Lon συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση του ολοενζύμου COX μέσω της αποικοδόμησης της υπομονάδας Cox4-1 (115). Συγκεκριμένα όταν η διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι χαμηλή, ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1α (hypoxia-inducible transcription factor HIF1α προσδένεται στα στοιχεία απόκρισης στην υποξία (hypoxia response elements - HRE), στον υποκινητή του γονιδίου της Lon, οδηγώντας σε αυξορύθμιση της Lon και αποικοδόμηση της υπομονάδας Cox4-1. Την ίδια στιγμή ο HIF-1α οδηγεί στην αυξορύθμιση μίας εναλλακτικής ισόμορφης της Cox4-2, η οποία συναρμολογείται στο σύμπλοκο COX προς αντικατάσταση της υπομονάδας Cox4-1. Τα σύμπλοκα που περιέχουν την υπομονάδα Cox4-2 αποδείχθηκε ότι έχουν βέλτιστη μεταφορά ηλεκτρονίων και κατά συνέπεια αύξηση της αποτελεσματικότητας της αναπνοής σε συνθήκες υποξίας (116). Η ιδιότητα αυτή υποδηλώνει ότι η πρωτεάση Lon μπορεί να έχει και ρόλο μορίου συνοδού (chaperone-like function) που καθορίζει την συναρμολόγηση και την αποσυναρμολόγηση πρωτεϊνών.





**ΕΙΚΟΝΑ Α25: I) Η πρωτεάση LonP1 αποικοδομεί λανθασμένες ή οξειδωμένες πρωτεΐνες , όπως η (Aco2), η GLS-1, η StaR, η CBS και η ALAS-1, II) Ρυθμίζει τον μεταβολισμό του μιτοχονδρίου με την εκλεκτική αποικοδόμηση και την αλληλεπίδραση με ορισμένες υπομονάδες των συμπλόκων του OXPHOS, III) Ρυθμίζει την αντιγραφή και συντήρηση του mtDNA με αποικοδόμηση της φωσφορυλιωμένης μορφής του TFAM (117).**

#### A.3.8. Δράση μοριακού συνοδού (Chaperone activity)

Οι μοριακοί συνοδοί ουσιαστικά δρουν σε de novo αναδιπλωμένες πρωτεΐνες ή για να αναδιπλώσουν τις λανθασμένα πτυχωμένες πρωτεΐνες στην φυσική τους κατάσταση (118). Η Lon συγχωνεύει τις πρωτεολυτικές και τις δράσεις μοριακού συνοδού σε μία απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα, αλλά ενώ η πρωτεολυτική δραστηριότητα περιορίζεται στην περιοχή P, η δραστηριότητα πρόσδεσης προκαλείται από τον τομέα δέσμευσης ATP και τον τομέα N-τελικό τομέα. Οι λειτουργίες τσαπερόνης της Lon εμπλέκονται στη συναρμολόγηση συμπλόκων μιτοχονδριακής μεμβράνης σε ζυμομύκητες και σε ανθρώπους και τουλάχιστον σε ζυμομύκητες αυτές οι λειτουργίες διατηρούνται μετά την απενεργοποίηση της πρωτεολυτικής θέσης και εμποδίζονται όταν μεταλλάσσεται η θέση σύνδεσης ATP. Οι στόχοι της δραστηριότητας της Lon ως μοριακός συνοδός δεν είναι ακόμη γνωστοί. Ωστόσο, χρησιμοποιώντας μια πρωτεωμική προσέγγιση, μια από τις πρώτες προσπάθειες για την ταυτοποίηση τέτοιων στόχων δημιούργησε έναν κατάλογο 76 υποψήφιων πρωτεϊνών που στο τέλος επιτράπη να ταυτοποιηθούν ως συνεργάτες δεσμεύσεως Lon η NADH αφυδρογονάση ουβικινόνη πρωτεΐνη σιδήρου-θείου 8 (NDUFS8), η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 60 (Hsp60) και η mtHsp70 (118). Παρ'όλα αυτά, το αν η Lon βοηθά ή όχι την αναδίπλωση ή / και την επαναδίπλωση αυτών των πρωτεϊνών παραμένει ασαφής.

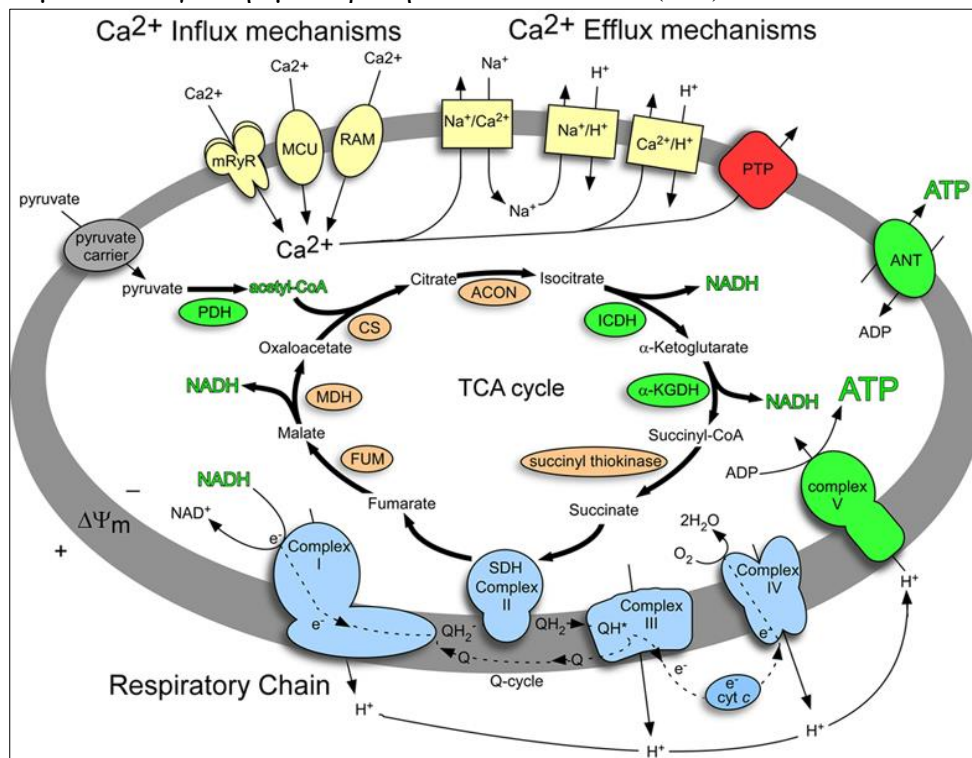
#### A.3.9. Πρόσδεση πρωτεάσης LonP1 με το mtDNA

Εκτός από τις πρωτεολυτικές της ικανότητες και την ικανότητα μορίου-συνοδού η πρωτεάση LonP1 προσδέεται και με το mtDNA. Η δέσμευση με το mtDNA διατηρείται από τα βακτήρια μέχρι και τα θηλαστικά (119). Στο E.Coli η Lon προσδέεται τόσο με το μονόκλωνο DNA (ssDNA) και RNA (ssRNA) όσο και με το δίκλωνο DNA (dsDNA) με έναν μη ειδικό τρόπο, και αυτή η αλληλεπίδραση ενισχύει την ικανότητα της ATPάσης και την πρωτεολυτική της ικανότητα (120). Σε αντίθεση με την βακτηριακή Lon, η ανθρώπινη προσδέεται ειδικά με το ssDNA (119). Συγκεκριμένα η Lon προσδέεται σε αλληλουχίες που περιέχονται στον υποκινητή ελαφριάς αλυσίδας (LSP) στο μη κωδικό DNA και στον υποκινητή της βαριάς αλυσίδας (HSP) στο κωδικό DNA, όπου είναι και οι δύο θέσεις όπου αρχίζει η αντιγραφή και η μεταγραφή του mtDNA (119). In Vitro αναλύσεις έδειξαν ότι η Lon δεσμεύει περιοχές του DNA οι οποίες είναι πλούσιες σε γουανίνη (G-Rich DNA sequences) που έχουν την τάση να σχηματίζουν G-quartets ή G-quadruplex. Ακόμα και αν οι δομές G-quartets μπορεί να υπάρχουν σε πολλές περιοχές πάνω στο mtDNA η Lon στην πραγματικότητα δεν μπορεί να δεσμευτεί σε όλες αυτές. Η παρουσία άλλων πρωτεϊνών καθώς και η μονόκλωνη ή δίκλωνη κατάσταση του mtDNA μπορούν να εμποδίσουν την Lon να προσδεθεί. Επιπλέον η ικανότητα της Lon να προσδέεται στο DNA απαιτεί διαμορφωτικές αλλαγές από την ίδια την Lon, και τέτοιες αλλαγές παρεμποδίζονται από το ATP και ενισχύονται από κάποια υποστρώματα. Αν και υπάρχουν βεβαιότητες ότι η Lon έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του mtDNA καθώς και στην ρύθμιση των αντιγράφων του, η ακριβής λειτουργία παραμένει ασαφής. Χρειάζεται παραπάνω διερεύνηση για το αν η Lon έχει άμεσο ή έμμεσο ρόλο

στην αντιγραφή ή/και την μεταγραφή του mtDNA ή αυτή δρα για να αποικοδομήσει και να ρυθμίσει πρωτεΐνες που σχηματίζουν νουκλεοειδή (121).

#### A.3.10. LonP1 και παραγωγή ενέργειας: Διαδικασία OXPHOS

Το NADH και FADH<sub>2</sub> που παράγονται κατά την διάρκεια του κύκλου του Krebs μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στο σύμπλοκο I και II στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Στην συνέχεια τα ηλεκτρόνια περνούν από το σύμπλοκο III, το κυτόχρωμα C, και το σύμπλοκο IV που μειώνει το μοριακό οξυγόνο, στον τελικό δέκτη ηλεκτρονίων το νερό. Τα πρωτόνια αντλούνται στον διαμεμβρανικό χώρο δημιουργώντας μία ηλεκτροχημική διακύμανση που χρησιμοποιείται από το σύμπλοκο V για την μετατροπή του ADP σε ATP (122).



**ΕΙΚΟΝΑ A26:** Διαδικασία οξειδωτικής φωσφορυλίωσης [Frontiers in Bioscience 14, 1182-1196, January 1, 2009]

Κατά την διάρκεια της αναπνοής δεν μετατρέπεται όλο το οξυγόνο σε νερό, αλλά ένα 1-2% χρησιμοποιείται για να παραχθούν ROS (Reactive Oxygen Species) (123). Η περίσσεια ROS προκαλεί οξειδωτικό στρες που με την σειρά του οδηγεί σε μοριακή βλάβη. Η βλάβη σε ένα από τα συστατικά του OXPHOS μπορεί να οδηγήσει σε διαρροή e<sup>-</sup> που αντιδρούν με το οξυγόνο και παράγουν υπεροξείδιο, το οποίο δημιουργεί και άλλα ROS (123). Η LonP1 αποικοδομεί την υπομονάδα COX4 του συμπλόκου IV (οξειδάση του κυτοχρώματος C) και του συμπλόκου V σε συνθήκες υποξίας και βοηθά στην σταθεροποίηση και την ρύθμιση του NDUFS8 μίας υπομονάδας του συμπλόκου I (124). Η οξειδάση του κυτοχρώματος C (COX) είναι το σύμπλοκο IV της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Είναι ένα διμερές όπου το κάθε μονομερή αποτελείται από 13 υπομονάδες. Τρεις από αυτές κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα και διατηρούνται στα ευκαρυωτικά και αποτελούν τον καταλυτικό τομέα (I,II,III), ενώ οι άλλες δέκα υπομονάδες κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια και έχουν δομικές και ρυθμιστικές λειτουργίες (125). Η υπομονάδα

IV(COX4) είναι υπεύθυνη για την δέσμευση ATP και είναι σε θέση να αναστείλει τη δραστηριότητα του συμπλόκου όταν η αναλογία ATP/ADP είναι αυξημένη (126). Στα θηλαστικά το COX4 υπάρχει σε δύο ισόμορφες COX-1 και COX-2. Σε φυσιολογικές συνθήκες, το COX4-1 mRNA υπάρχει στην υψηλότερη ποσότητα στους περισσότερους ιστούς ενώ το COX4-2 mRNA υπάρχει στην ίδια ποσότητα με το COX4-1 σε αναπνευστικούς ιστούς και στον εγκέφαλο. Σε συνθήκες υποξίας, κάποιιο ιστοί θηλαστικών εμφανίζουν προσαρμοστική απόκριση που βελτιστοποιεί τη δραστηριότητα του COX, να εναλλάσσεται από COX4-1 σε COX4-2, με την COX4-1 να αποικοδομείται επιλεκτικά από την πρωτεάση LonP1 μέσω του διεγερμένου από την υποξία παράγοντα HIF-1 (127). Το HIF-1 είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση της ομοιόστασης του οξυγόνου σε όλα τα είδη μεταζώων. Είναι ένα ετεροδιμερές με μία HIF-1 ή HIF-2 υπομονάδα και μία HIF-1β υπομονάδα. Σε αερόβιες συνθήκες HIF-1 και HIF-2 στοχεύονται για ουβικιτινύλιωση ή για πρωτεασωματική αποικοδόμηση (128). Σε συνθήκες υποξίας το HIF-1 ενεργοποιείται κάτι που οδηγεί σε αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση, όπως η ενεργοποίηση μεταγραφής γονιδίων COX4-2 και LonP1 (129), κάτι που με την σειρά του οδηγεί σε αύξηση επιπέδων mRNA του COX4-2 και πρωτεϊνοσύνθεσης και σε αυξημένη πρωτεόλυση του COX4-1 εξαιτίας της αύξησης στην LonP1. Μειωμένα επίπεδα HIF-1 αλλά όχι του HIF-2 μπλοκάρουν την αποικοδόμηση του COX4-1 ενώ το HIF-1 και το HIF-2α εμπλέκονται στην έκφραση του γονιδίου LonP1. Ως εκ τούτου, η LonP1 σε συνθήκες υποξίας χρειάζεται για να ελαχιστοποιήσει την παραγωγή ROS και να βοηθήσει στην προσαρμογή σε υποξικό περιβάλλον (130).

Το σύμπλοκο I είναι το πρώτο και το μεγαλύτερο ένζυμο του ETC. Καταλύει την οξειδωση του NADH από την ουβικιτίνη δημιουργώντας μία διαμεμβρανική διαβάθμιση πρωτεϊνών και είναι ένας από τους κύριους τόπους παραγωγής κυτταρικού υπεροξειδίου του οξυγόνου. Αποτελείται από 43 υπομονάδες εκ των οποίων οι 7 κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, ενώ οι άλλες από το πυρηνικό γονιδίωμα. Το NDUF8 είναι μία πρωτεΐνη Fe-S μεταφοράς e<sup>-</sup> που ανήκει στο καταλυτικό κέντρο του συμπλόκου I (131). Σε κύτταρα 293T, OEC-MI και FADU η υπερέκφραση της LonP1 αύξησε τα επίπεδα NDUF8. Η αύξηση της LonP1 ίσως να ρυθμίζει την σταθερότητα του NDUF8 που πιθανώς να αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο I.

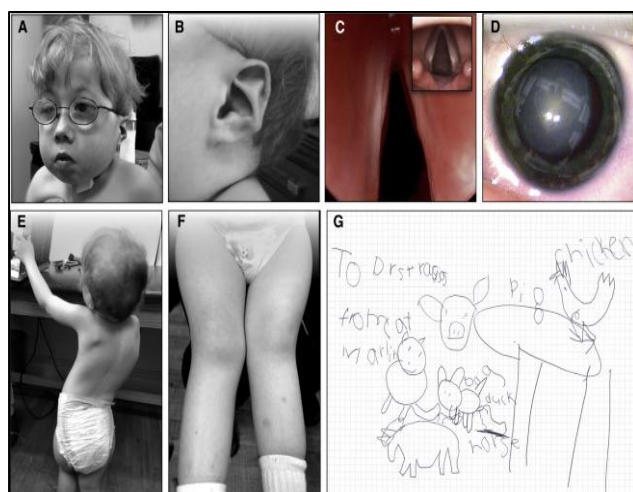
#### A.3.11. Συμμετοχή πρωτεάσης Lon σε νευρολογικές διαταραχές

##### I. Lon και Σύνδρομο CODAS

Μεταξύ των ClpXP, m-AAA και i-AAA, η Lon είναι ένα από τα πιο κύρια ένζυμα με πρωτεολυτική ικανότητα που δρα στην μιτοχονδριακή μήτρα. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της LonP1 έχουν χαρτογραφηθεί και αναγνωρισθεί ως αιτίες για το εγκεφαλικό, οφθαλμικό, σκελετικό, ακουστικό και οδοντικό σύνδρομο (CODAS). Το σύνδρομο CODAS είναι μία αναπτυξιακή νόσος που χαρακτηρίζεται από πληθώρα κλινικών χαρακτηριστικών, συμπεριλαμβανομένης της υποτονίας, πτώσης, απώλεια ακοής, μεταγενετικό καταρράκτη καθώς και σκελετικές και οδοντικές ανωμαλίες (132). Έχουν βρεθεί αρκετές μεταλλάξεις αλλά οι πιο πολλές από αυτές είναι στην περιοχή AAA<sup>+</sup> του μορίου και έχουν σαν αποτέλεσμα υποκαταστάσεις αμινοξέων. In vitro ανάλυση των μεταλλάξεων έδειξε ότι I) Η πρωτεολυτική ικανότητα της Lon διατηρείται για



κάποια υποστρώματα της και για άλλα όχι II) Ο εντοπισμός είναι ακόμα μιτοχονδριακός III) Η ικανότητα σχηματισμού όμο-ολιγομερών είναι εξασθενημένη, (132). Μεταλλάξεις στο γονίδιο της *Lonp1* έχουν σαν αποτέλεσμα την συσσώρευση μη φυσιολογικών πρωτεϊνών ή κατεστραμμένων πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο, κάτι που μπορεί να διαταράσσει την φυσιολογική μιτοχονδριακή λειτουργία. Το σύνδρομο CODAS χαρακτηρίζεται από εγκεφαλικά, οδοντικά, σκελετικά, οφθαλμικά και ακουστικά προβλήματα. Περιγράφηκε πρώτη φορά το 1991 ως ένα σύνδρομο με προβλήματα αναπτυξιακής καθυστέρησης, κρανιοπροσωπικές ανωμαλίες, καταρράκτη, απώλεια ακοής, κοντό ανάστημα, δυσπλασία ισχίου και άλλα. Το CODAS είναι μία πολύ σπάνια ασθένεια καθώς υπήρχαν μόνο τρεις περιπτώσεις μεταξύ 1995-2010 (Βραζιλία, Καναδά και Γαλλία). Είναι ένα σύνδρομο που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κάτι που προτάθηκε πρώτη φορά από τον Shebib το 1991 (133).



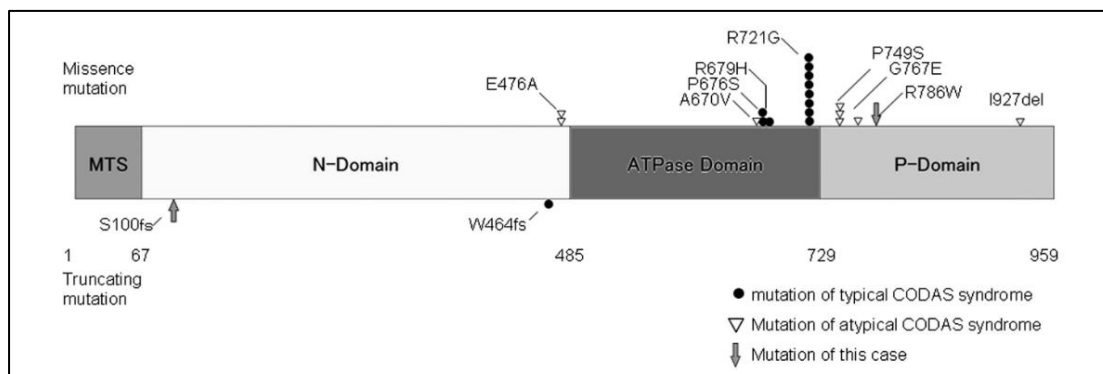
**EIKONA A26:** Φαινότυπος συνδρόμου CODAS. Παιδιά πέντε ετών ομοζυγωτικό στην μετάλλαξη *LONP1* c.2161C>G (p.Arg721Gly). A) Ευρύ κρανίο, πτώση, B) υποπλασία έλικας C) Στένωση αεραγωγών και ατροφικές φωνητικές χορδές, D) καταρράκτης, E+F) σκολίωση και σκελετικά προβλήματα G) Παρά τις αναπτυξιακές δυσκολίες τα παιδιά έχουν αναπτυγμένο λεξιλόγιο και δεξιότητες γραφής και σχεδίασης [Kevin A. Strauss, Robert N. Jinks 2015].

Origin of Sample	n	Ancestry	<i>LONP1</i> Variants		Previously Reported
			Allele 1 <sup>a</sup>	Allele 2 <sup>a</sup>	
Pennsylvania	8	Amish-Swiss	Arg721Gly	Arg721Gly	
Canada	1	Mennonite-German	Pro676Ser	Pro676Ser	Shebib et al., 1991 <sup>1</sup>
Canada	1	Mixed European	Ser631Tyr	Ala724Val	

**EIKONA A27:** Τέσσερις παθογόνες μεταλλάξεις στο γονίδιο *LonP1* ανάμεσα σε δέκα άτομα με σύνδρομο CODAS [Kevin A. Strauss, Robert N. Jinks 2015].

Το κλινικό φάσμα κυμαίνεται από τυπικές περιπτώσεις με πέντε κύρια χαρακτηριστικά έως άτυπες περιπτώσεις με μόνο δύο ή τρία κύρια χαρακτηριστικά. Οι φαινότυποι του συνδρόμου βρέθηκαν πρόσφατα να προκαλούνται από μεταλλάξεις στο γονίδιο της *LonP1*, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μία εξαρτώμενη από ATP πρωτεάση. Στο τυπικό σύνδρομο CODAS με πέντε κύρια χαρακτηριστικά οι παθογόνες μεταλλάξεις συσσωρεύονται κοντά στον τομέα της ATPάσης της *LonP1*. Αντιθέτως στο άτυπο σύνδρομο CODAS χωρίς τα πέντε κύρια χαρακτηριστικά οι παθογόνες μεταλλάξεις εντοπίζονται σε άλλους τομείς. Μέχρι στιγμής ορισμένες μεταλλάξεις στον τομέα της ATPάσης έχουν αναφερθεί ότι έχουν ως αποτέλεσμα την μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα. Δεν υπάρχει μέχρι στιγμής αναφορά για συσχέτιση μεταξύ

μεταλλάξεων εκτός του τομέα της ΑΤΡάσης και την δραστικότητα του ενζύμου. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να επιβεβαιωθεί ο τρόπος με τον οποίο οι μεταλλάξεις εκτός του τομέα της ΑΤΡάσης επηρεάζουν βιοχημικά. Η διανοητική αναπηρία, η ατροφία της παρεγκεφαλίδας, η υποτονία και η υποτροπή είναι κοινά και σε άλλες μιτοχονδριακές παθήσεις. Είναι πιθανό ότι η δυσλειτουργία της Lon, ενός μιτοχονδριακού ενζύμου, οδηγεί σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και θα μπορούσε κατ' επέκταση να οδηγήσει σε παρόμοια χαρακτηριστικά.



**ΕΙΚΟΝΑ A35:** Λειτουργικοί τομείς της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1. Οι μαύροι κύκλοι υποδεικνύουν μεταλλάξεις τυπικού συνδρόμου CODAS και τα λευκά τρίγωνα υποδεικνύουν μεταλλάξεις του άτυπου συνδρόμου CODAS (Τροποποίηση εικόνας από (A novel mutation in the proteolytic domain of LONP1 causes atypical CODAS syndrome)).

## II. Lon και αταξία του Φρίντριχ (Friedreich ataxia (FRDA))

Η αταξία του Φρίντριχ είναι μια γενετική νευροεκφυλιστική ασθένεια που επηρεάζει το κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, την καρδιά, τον σκελετό και το ενδοκρινικό πάγκρεας. Η αιτία της νόσου είναι μία επαναλαμβανόμενη επέκταση του τρι-νουκλεοτιδίου Γουανίνη-Αδενίνη-Αδενίνη (GAA) στο χρωμόσωμα 9q13 το οποίο δημιουργεί πρόβλημα στην μεταγραφή του γονιδίου της φραταξίνης, με αποτέλεσμα την μειωμένη έκφραση της μιτοχονδριακής φραταξίνης, ενός προστάτη του σιδήρου που εμπλέκεται στην ωρίμανση των πρωτεϊνικών συμπλόκων Fe-S (134). Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι η έλλειψη φραταξίνης προκαλεί ανεπάρκεια συμπλόκων αναπνευστικής αλυσίδας I-III, ανεπάρκεια στις ακονιτάσες και μιτοχονδριακή συσσώρευση σιδήρου (135). Τα ίδια ζώα παρουσίαζαν σημαντική αύξηση στα επίπεδα της LonP1. Η αύξηση αυτή συνοδεύτηκε από αύξηση στην πρωτεολυτική δράση της πρωτεάσης Lon καθώς και από μείωση στα μιτοχονδριακά επίπεδα των πρωτεϊνικών συμπλόκων Fe-S. Η επίδραση της αυξητικής ρύθμισης της Lon στην μείωση των επιπέδων των μιτοχονδριακών πρωτεϊνικών συμπλόκων Fe-S κατά την εξέλιξη της νόσου υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες Fe-S ίσως είναι στόχοι της Lon στο FRDA (135).

## III. Lon και σύνδρομο MERRF (Μυοκλονική επιληψία με τραχιές κόκκινες ίνες)

Το σύνδρομο MERRF είναι μία σπάνια μιτοχονδριακή διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μυοκλονικές κρίσεις, μυϊκή αδυναμία, παρεγκεφαλιδική αταξία, καρδιακή ανεπάρκεια και άνοια (136). Η αύξηση των ενεργών μορφών οξυγόνου ή αζώτου, όπως το υπεροξείδιο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το υπεροξείδιο του νατρίου που

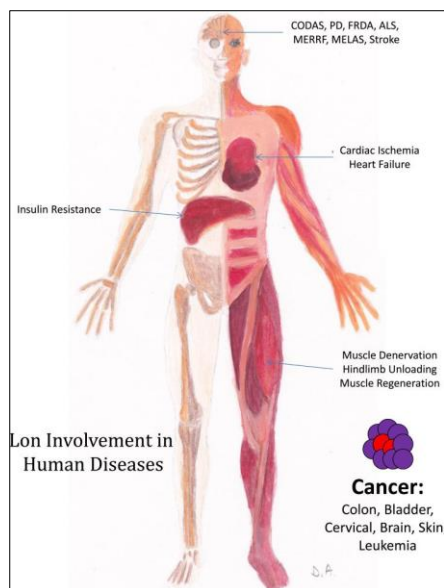
προκαλείται από την δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας λόγω μετάλλαξης του A8344G στο μιτοχονδριακό γονίδιο tRNA<sup>Lys</sup> προκαλεί βλάβες σε πρωτεΐνες που περιέχουν σύμπλοκα Fe-S, όπως είναι η μιτοχονδριακή ακονιτάση, ένα ένζυμο που αποικοδομείται από την Lon (138). Σε MERRF cybrids τα οποία περιέχουν >90% mtDNA με μετάλλαξη A8344G, η δραστηριότητα της ακονιτάσης έχει μειωθεί σημαντικά ενώ αντίθετα η έκφραση της Lon είναι σημαντικά αυξημένη. Εντούτοις, η δραστηριότητα της Lon στα MERRF cybrids ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τα αγρίου τύπου, υποδηλώνοντας ότι η αύξηση της Lon στα MERRF κύτταρα μπορεί να είναι μία αντιστάθμιση για την μείωση της ενζυματικής της δράσης που προκαλείται από οξειδωτική βλάβη.

#### IV. Lon και σύνδρομο MELAS (μυοπάθεια, εγκεφαλοπάθεια, γαλακτική οξέωση, σύνδρομο επεισοδίων τύπου εγκεφαλικού επεισοδίου)

Το σύνδρομο MELAS είναι μία μιτοχονδριακή διαταραχή που συνδέεται με μία αλλαγή από A σε G στην θέση 3243 του μιτοχονδριακού γονιδίου tRNA (Leu(UUR) (139). Στα κύτταρα που προέρχονται από ασθενείς με σύνδρομο MELAS υπάρχει αυξημένη έκφραση της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης Lon, η οποία συσσωρεύεται κατά προτίμηση σε κύτταρα MELAS, που περιέχουν πολυάριθμα μιτοχόνδρια με μεταλλαγμένα γονιδιώματα. Σε αντίθεση με τα MERRF cybrids, η δραστηριότητα της πρωτεΐνης Lon είναι αυξημένη στα κύτταρα MELAS (140).

#### V. Lon και κληρονομική νόσος Parkinson

Το PINK1 (PTEN-induced kinase protein 1- PARK6) κωδικοποιεί μία μιτοχονδριακή κινάση σερίνης / θρεονίνης. Ενεργοποιείται σε συνθήκες οξειδωτικού stress από το σηματοδοτικό μονοπάτι PTEN. Μεταλλάξεις στο γονίδιο PINK1, επηρεάζουν την ικανότητα της πρωτεΐνης να αναγνωρίσει τα υποστρώματα της, με αποτέλεσμα την πρόωμη εκδήλωση της PD. Η PINK1 αποικοδομείται σε υγιή κύτταρα, αλλά συσσωρεύεται επιλεκτικά στην επιφάνεια των αποπολωμένων μιτοχονδρίων αρχίζοντας έτσι την αυτοφαγική αποικοδόμηση. Η μείωση της Lon προκαλεί δραματική συσσώρευση επεξεργασμένων μορφών PINK1 στο μιτοχονδριακό πλέγμα. Οι μορφές PINK1 που συσσωρεύονται κατά την απενεργοποίηση της Lon είναι ικανές να ενεργοποιήσουν την οδό PINK1-Parkin και να στοχεύσουν τα μιτοχόνδρια για αυτοφαγία (141).



**ΕΙΚΟΝΑ 17.** Εκτός από τις παραπάνω νευρολογικές διαταραχές η πρωτεάση Lon έχει συσχετιστεί με καρδιακές διαταραχές, παθολογία σκελετικών μυών, ηπατικές διαταραχές και πολλά είδη καρκίνου [ Thomas RE, Andrews LA, Burman JL, 2014].

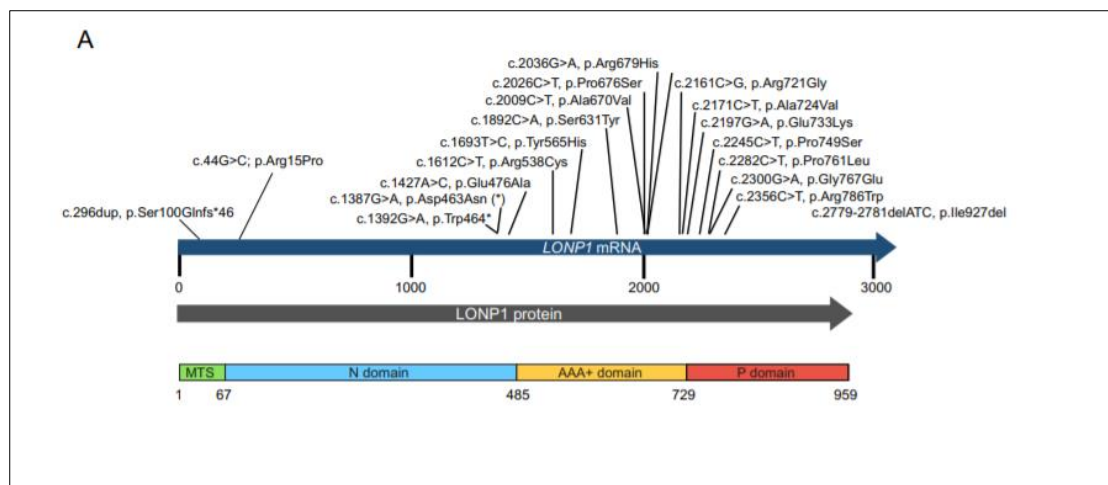
#### A.3.12. Γενετική της πρωτεΐνης Lon

Η ανθρώπινη Lon κωδικοποιείται από το πυρηνικό γονίδιο LonP1 το οποίο αποτελείται από 17 εξόνια κατανεμημένα σε περισσότερο από 28kb γενομικού DNA στο χρωμόσωμα 19p13.3. Σύμφωνα με την Ensembl, από γονίδιο της LonP1 μπορεί να παραχθούν 15 διαφορετικές παραλλαγές ματίσματος μεταξύ των οποίων οι 8 κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Μεταξύ των παραλλαγών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, τρεις βρίσκονται κυρίως σε ανθρώπινα κύτταρα και ονομάζονται μετάγραφο παραλλαγής 1 (Variant 1) NM\_004793.4, μετάγραφο παραλλαγής 2 (Variant 2) NM\_001276479.2 και μετάγραφο παραλλαγής 3 (Variant 3) 3 NM\_001276480. Βέβαια το πιο άφθονο από αυτά είναι το μετάγραφο παραλλαγής 1. Οι κύριες διαφορές μεταξύ των παραλλαγών εντοπίζονται στο τέλος του 5' άκρου. Η παραλλαγή 1 περιλαμβάνει όλα τα εξόνια του γονιδίου, η παραλλαγή 2 χρησιμοποιεί την ίδια θέση έναρξης της μεταγραφής αλλά υφίσταται μία εναλλακτική σύνδεση στο εξόνιο 1 η οποία έχει ως αποτέλεσμα να σχηματίζεται μία πρωτεΐνη η οποία έχει έλλειψη 64 αμινοξέων στο N-τελικό άκρο. Η παραλλαγή 3 χρησιμοποιεί μία διαφορετική θέση έναρξης μεταγραφής, η οποία βρίσκεται πιο μετά από την θέση που χρησιμοποιείται από τις παραλλαγές 1 και 2 και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παραλείπεται εντελώς το πρώτο εξόνιο, οδηγώντας σε μία πρωτεΐνη η οποία δεν έχει τα πρώτα 103 αμινοξέα.

Μεταγραφικά δεδομένα καθώς και πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι η LonP1 εκφράζεται παντού, με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης ανάλογα με τον ιστό και τον τύπο κυττάρων. Τα υψηλότερα επίπεδα mRNA της LonP1 έχουν παρατηρηθεί στους επινεφριδιακούς αδένες, στο συκώτι, στον εγκέφαλο, στην καρδιά, στους σκελετικούς μύες και στον πλακούντα. Τα χαμηλότερα επίπεδα έχουν παρατηρηθεί στα νεφρά, στους πνεύμονες και στο πάγκρεας (142). Λίγα είναι γνωστά για τα χαρακτηριστικά των ρυθμιστικών περιοχών της LonP1. Έχουν εντοπιστεί πιθανές τοποθεσίες σύνδεσης για τους παράγοντες μεταγραφής NRF-2, Nkx-2 και NF-κ B, και Lyf-1 στην εγγύς περιοχή του υποκινητή της LonP1 δείχνοντας ότι η διαγραφή της περιοχής που περιέχει τις συναινετικές αλληλουχίες για τον NRF-2 και NF-κB καταργεί την απόκριση στο οξειδωτικό στρες (143). Σε κύτταρα HEK293, τρεις θέσεις σύνδεσης για τον NRF-2

έχουν ταυτοποιηθεί στην θέση 196,183 και 150 του υποκινητή της LonP1 (144). Ανάλυση ChIP-Seq του NRF-1, ένας μεταγραφικός παράγοντας ζωτικής σημασίας για την βιογένεση των μιτοχονδρίων έδειξε ότι ο υποκινητής της LonP1 είναι ένας από τους στόχους του. Τα επίπεδα της LonP1 αυξάνονται από διαφορετικά ερεθίσματα στρες, συμπεριλαμβανομένου του στρες ενδοπλασματικού δικτύου(ER), υψηλά επίπεδα ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και υποξία (145). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων της LonP1 σε διαφορετικά μοντέλα και συνθήκες κυττάρων. Σε κύτταρα ραβδομυοσάρκωματος το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> διπλασιάζει τα επίπεδα το mRNA της LonP1 (146). Σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές όπως HepG2, WI-38 και SW872 το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> προκαλεί μία αύξηση έως και πέντε φορές στο mRNA της LonP1. Όσο αφορά την υποξία η LonP1 αυξάνεται υπερβολικά στα THP-1, HeLa και στα RKO κύτταρα με χαμηλή ποσότητα οξυγόνου, μέσω δέσμευσης του HIF-1α στον υποκινητή της LonP1 (147). Αξίζει να τονισθεί ότι η αύξηση της LonP1 στα ανθρώπινα κύτταρα καθορίζεται από ερεθίσματα που διατηρούνται έντονα κατά την διάρκεια της εξέλιξης όπως η συσσώρευση μη φυσιολογικών πρωτεϊνών ή το θερμικό σοκ (148).

Μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι η LonP1 μεταφράζεται στο κυτοσόλιο ως μία πρόδρομη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη 959 αμινοξέων με μοριακή μάζα 106KDa, η οποία στην συνέχεια στοχεύει στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου μέσω της μιτοχονδριακής αλληλοσχία στόχου (MTS) που διαθέτει. Στα μιτοχόνδρια η LonP1 υποβάλλεται σε επεξεργασία από μιτοχονδριακά πεπτίδια που αποκόπτουν το MTS μετά την θέση του αμινοξέος 75. Μόλις η Lon εισαχθεί στα μιτοχόνδρια μπορεί να υποστεί μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση που ρυθμίζει την δραστικότητα της. Η LonP1 είναι στόχος φωσφορυλίωσης από την Akt στην Ser173 και Ser181 (149) και ίσως ακετυλιώνεται από την Sirtuin3 στην Lys917. Αυτή η ακετυλίωση μπορεί να επηρεάσει την πρόσβαση υποστρωμάτων στην καταλυτική ενεργή θέση της Lon (150). Μέχρι και σήμερα έχουν περιγραφεί είκοσι παθογόνες μεταλλάξεις στο γονίδιο της LonP1.



**ΕΙΚΟΝΑ A28: Θέσεις μεταλλάξεων στο γονίδιο της LonP1 που εντοπίστηκαν μέχρι στιγμής και προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο.**



Mutation	Type of mutation	Disease	Reference
c.44G > C; p.Arg15Pro	Missense homozygous mutation	CODAS syndrome, infantile cataract	Khan and AlBakri (2018), Patel et al. (2017)
c.296dup, p.Ser100Glnfs*46	Frameshift mutation, compound heterozygosis with c.2356C > T, p.Arg786Trp	Atypical CODAS syndrome	Inui et al. (2017)
c.810G > A, p.Asp463Asn	Missense homozygous mutation	Classical mitochondrial cytopathy	Hannah-Shmouni et al. (2019)
c.1392G > A, p.Trp464*	Nonsense mutation, compound heterozygosis with c.2036G > A, p.Arg679His	CODAS syndrome	Dikoglu et al. (2015)
c.1427A > C, p.Glu476Ala	Missense substitution, compound heterozygosis with c.2245C > T, p.Pro749Ser	CODAS syndrome	Dikoglu et al. (2015)
c.1612C > T, p.Arg538Cys	Missense homozygous mutation	Infantile cataract	Khan and AlBakri (2018), Patel et al. (2017)
c.1693T > C, p.Tyr565His	Missense substitution, compound heterozygosis with c.2197G > A, p.Glu733Lys	Classical mitochondrial disease	Peter et al. (2018)
c.1892C > A, p.Ser631Tyr	Missense substitution, compound heterozygosis with c.2171C > T, p.Ala724Val	CODAS syndrome	Strauss et al. (2015)
c.2009C > T, p.Ala670Val	Missense substitution, homozygous or compound heterozygosis with c.2779-2781delATC, p.Ile927del	CODAS syndrome	Dikoglu et al. (2015)
c.2014C > T, p.Arg672Cys	Missense homozygous mutation	CODAS syndrome, infantile cataract	Dikoglu et al. (2015), Khan and AlBakri (2018)

*Continued*

c.2026C > T, p.Pro676Ser	Missense homozygous mutation	CODAS syndrome	Strauss et al. (2015)
c.2036G > A, p.Arg679His	Missense substitution compound heterozygosis with c.1392G > A, p.Trp464*	CODAS syndrome	Dikoglu et al. (2015)
c.2161C > G, p.Arg721Gly	Missense homozygous mutation	CODAS syndrome	Strauss et al. (2015)
c.2171C > T, p.Ala724Val	Missense substitution, compound heterozygosis with c.1892C > A, p.Ser631Tyr	CODAS syndrome	Strauss et al. (2015)
c.2197G > A, p.Glu733Lys	Missense substitution, compound heterozygosis with c.1693T > C, p.Tyr565His	Classical mitochondrial disease	Peter et al. (2018)
c.2245C > T, p.Pro749Ser	Missense substitution, compound heterozygosis with c.2300G > A, p.Gly767Glu or c.1427A > C, p.Glu476Ala	CODAS syndrome	Dikoglu et al. (2015)
c.2282C > T, p.Pro761Leu	Missense homozygous mutation	Severe neurodegenerative phenotype	Nimmo et al. (2019)
c.2300G > A, p.Gly767Glu	Missense substitution, compound heterozygosis with c.2245C > T, p.Pro749Ser	CODAS syndrome	Dikoglu et al. (2015)
c.2356C > T, p.Arg786Trp	Missense substitution, compound heterozygosis with c.296dup, p.Ser100Glnfs*46	Atypical CODAS syndrome	Inui et al. (2017)
c.2779-2781delATC, p.Ile927del	In-frame deletion, compound heterozygosis with c.2009C > T, p.Ala670Val	CODAS syndrome	Dikoglu et al. (2015)

#### ΕΙΚΟΝΑ Α29: Μεταλλάξεις στο γονίδιο LonP1, θέση μετάλλαξης και συσχετιζόμενες ασθένειες.

Η συντριπτική πλειονότητα των μεταλλάξεων συσσωρεύονται εντός του τομέα της ΑΤΡάσης και στην πρωτεολυτική περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 631-786, και μόνο τρεις μεταλλάξεις κατανέμονται σε ολόκληρο τον Ν-τομέα. Πέντε μεταλλάξεις έχουν ταυτοποιηθεί ως ομοζυγωτικές ενώ 15 ως ετεροζυγωτικές. Επιπλέον οι πλειονότητα των μεταλλάξεων σχετίζεται με το σύνδρομο CODAS. Δύο μεταλλάξεις έχουν συνδεθεί άτυπα με το CODAS, μία μετάλλαξη σχετίζεται με πυροσταφυλική ανεπάρκεια α-αφυδρογονάσης (PDHAD) και δύο με φαινότυπο που μοιάζει με κλασική μιτοχονδριακή πάθηση.

Οι πρώτες αναφορές ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο της LonP1 είναι υπεύθυνες για ανθρώπινες νόσους δημοσιεύτηκαν για πρώτη φορά το 2015 από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες (151). Εντόπισαν μεταλλάξεις στο γονίδιο της LonP1 οι οποίες είναι υπεύθυνες για το σύνδρομο CODAS, μία πολύπλοκη πολυσυστηματική και αναπτυξιακή διαταραχή. Έκτοτε και άλλες μεταλλάξεις επέκτειναν την λίστα των γνωστών μεταλλάξεων LonP1 που προκαλούν ανθρώπινες ασθένειες ή/και

φαινοτύπους, καθώς και εκτεταμένες κλινικές εκδηλώσεις που σχετίζονται με την LonP1(152). Το σύνδρομο CODAS περιγράφηκε για πρώτη φορά σε μία κοπέλα από τον Καναδά το 1991. Τα επόμενα 20 χρόνια αναφέρθηκαν και άλλες τρεις περιπτώσεις (153). Στην συνέχεια το CODAS εντοπίστηκε και σε άλλους ασθενείς σε διαφορετικές χώρες (153). Αν και το φάσμα των ανατομικών ευρημάτων και των κλινικών εκδηλώσεων είναι πολύ ευρύ μεταξύ των ασθενών, η πλειοψηφία αυτών παρουσίαζε καταρράκτη, επίπεδο πρόσωπο, καθυστερημένη επιφυσιακή οστεοποίηση τόσο στα άνω όσο και στα κάτω άκρα, ήπια έως μέτρια ψυχική και κινητική καθυστέρηση, υποτονία και άλλα. Ορισμένα ελαττώματα όπως η ατροφία εγκεφάλου και διανοητικές αναπηρίες μοιάζουν έντονα με μιτοχονδριακές διαταραχές, ενώ άλλα, συμπεριλαμβανομένων των σκελετικών ανωμαλιών ,δεν αντικατοπτρίζουν φαινοτύπους που σχετίζονται με κλασσικές μιτοχονδριακές παθήσεις. Αυτές οι παρατηρήσεις θα μπορούσαν να υποδηλώσουν ότι η LonP1 έχει ένα διπλό ρόλο ως μιτοχονδριακός συντηρητής που ενεργοποιεί άμεσα τα μιτοχόνδρια και ως ρυθμιστής κάποιων ακόμα μη γνωστών οδών εκτός του μιτοχονδρίου. Διάφορες ομοζυγωτικές (A670V, A672C, P676S, A721G) και ετεροζυγωτικές μεταλλάξεις (W464stop: R679H, P749S: G767E, E476A: A672C, A670V: Δ 927, S631Y: A724V) που προκαλούν το σύνδρομο CODAS έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο της LonP1. Οι περισσότερες βρίσκονται στο τομέα AAA<sup>+</sup> και συγκεκριμένα στο τομέα AAA<sup>+</sup> α. Δομική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μόνο σε ορισμένες μεταλλάξεις.

#### A.3.13. Μετάλλαξη στον γονίδιο της LonP1 (R721G)

Η μετάλλαξη R721G συμμετέχει στον σχηματισμό μίας γέφυρας άλατος με το G654, το οποίο βοηθά στην σταθεροποίηση του ομο-ολιγομερισμού της LonP1 (154). Πειράματα συν-ανοσοκαταβύθισης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών αποκάλυψαν ότι όταν υπάρχει αυτή η μετάλλαξη, τα εξαμερή που σχηματίζει η LonP1 είναι εξασθενημένα ή/και ασταθή, με μειωμένη δραστικότητα ATPάσης αλλά και πρωτεάσης (154). Μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι λόγω μειωμένης δραστικότητας σαν ATPάση αλλά και λόγω μειωμένης πρωτεολυτικής ικανότητας η LonP1-R721G μπορεί να συνεχίσει να αποικοδομεί κάποια υποστρώματα όπως τον μεταγραφικό παράγοντα A(TFAM) αλλά κάποια άλλα όχι, όπως το υπόστρωμα STAR. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη μέχρι σήμερα είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη μεταξύ ασθενών με σύνδρομο CODAS.

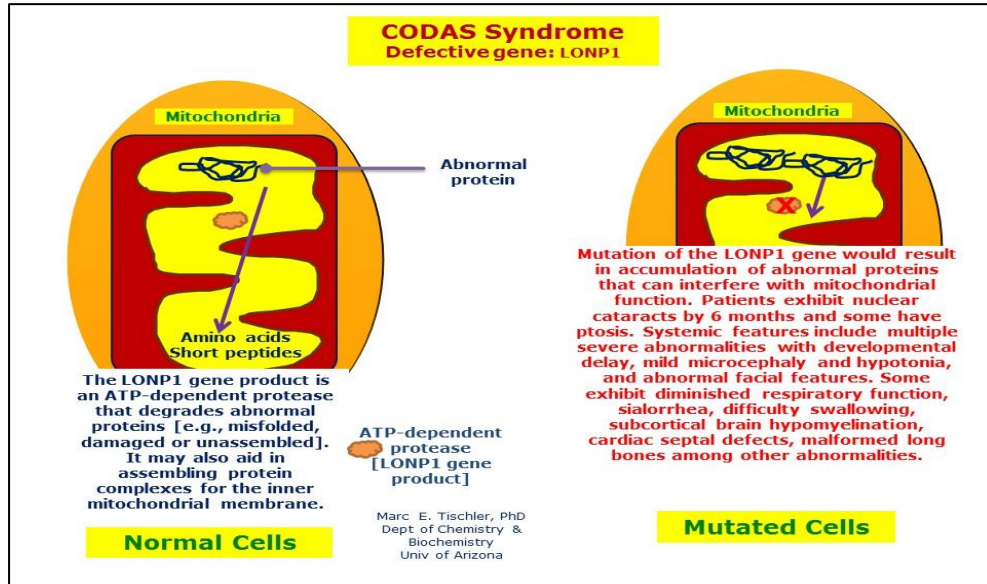
Origin of Sample	n	Ancestry	LONP1 Variants		Previously Reported
			Allele 1 <sup>a</sup>	Allele 2 <sup>a</sup>	
Pennsylvania	8	Amish-Swiss	Arg721Gly	Arg721Gly	
Canada	1	Mennonite-German	Pro676Ser	Pro676Ser	Shebib et al., 1991 <sup>1</sup>
Canada	1	Mixed European	Ser631Tyr	Ala724Val	

<sup>a</sup>In every case, genotyping showed allele segregation consistent with recessive inheritance.

**Εικόνα 1: Μεταλλάξεις στο γονίδιο της LonP1 σε 10 ασθενείς με σύνδρομο CODAS.**

Αξίζει να αναφερθεί ότι η LonP1-R721G δεν έχει την δυνατότητα να αποικοδομεί το MT-CO2, κάτι που οδηγεί σε συσσώρευση πρωτεϊνών και μπορεί να εξηγήσει τις μορφολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στα μιτοχόνδρια ασθενών με σύνδρομο CODAS. Για τους παραπάνω λόγους επιλέχθηκε να κατασκευαστεί η συγκεκριμένη

μετάλλαξη στο εργαστήριο μας και να συγκριθεί με την LonP1 αγρίου τύπου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες όπου η Lon δεν έχει υποστεί μετάλλαξη έχει την ικανότητα να αποικοδομεί πρωτεΐνες οι οποίες είναι λανθασμένες, κατεστραμμένες ή να αποτρέπει την συσσώρευση πρωτεϊνών. Όταν όμως υπάρχει μετάλλαξη στο γονίδιο της LonP1 αυτή υπολειτουργεί και δεν μπορεί πλέον να αποτρέψει την συσσώρευση μη φυσιολογικών πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα μιτοχόνδρια να μην λειτουργούν σωστά και να οδηγούμαστε στο σύνδρομο CODAS.



**ΕΙΚΟΝΑ Α31: Απεικόνιση μιτοχονδρίων σε ασθενείς με σύνδρομο CODAS.**

## **B.ΜΕΘΟΔΟΙ**

### B.1.Καλλιέργεια κυττάρων

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

Τα νευροβλαστωματικά κύτταρα που χρησιμοποιήσα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιλαμβάνει:

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

Απαραίτητη προϋπόθεση πριν την χρήση του ορού (FBS) είναι η θέρμανση του στους 56°C για 30 λεπτά με σκοπό την αδρανοποίηση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος του ορού. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες ενεργοποιούν την ανοσολογική απόκριση και η αδρανοποίηση τους θεωρείται απαραίτητη για την αποφυγή τυχόν λανθασμένων ανοσολογικών αποκρίσεων στο κύτταρο. Ακόμη η θέρμανση του ορού έχει συνδεθεί με την αδρανοποίηση μικροοργανισμών όπως το μυκόπλασμα (BIOCHROM AG, 2005). Η καλλιέργεια γίνεται σε ειδικούς επωαστήρες στις ακόλουθες συνθήκες:

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

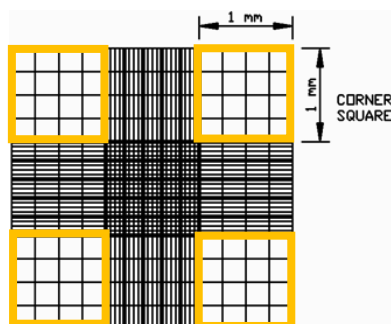
#### B.1.1Ανακαλλιέργεια κυττάρων ( SPLIT )

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

- + Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από το τρυβλίο
- + Πλύση με PBS για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα θρεπτικού μέσου (ο εμβρυϊκός ορός απενεργοποιεί τη θρυψίνη)
- + Αφαίρεση του PBS και προσθήκη 800μl θρυψίνης (για το πιάτο διαμέτρου 100mm)
- + Επώαση στους 37°C για 3-5 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από τον πυθμένα του τρυβλίου
- + Προσθήκη νέου θρεπτικού μέσου και ανάδευση των κυττάρων υπό πίεση με πιπέτα μιας χρήσεως προκειμένου να γίνουν μονήρη
- + Μέτρηση κυττάρων σε πλάκα Neubauer
- + Μεταφορά του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε νέο τρυβλίο με θρεπτικό υλικό
- + Επώαση των κυττάρων στους 37°C. Στις επόμενες 4 με 5 ώρες τα κύτταρα προσκολλώνται ξανά στο υπόστρωμα του τρυβλίου.

### B.1.2. Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο Neubauer

Ο αριθμός των κυττάρων που απαιτείται σε κάθε περίπτωση υπολογίζεται με το αιματοκυτταρόμετρο Neubauer ή πλάκα Neubauer. Προστίθενται 10μl κυτταρικού εναιωρήματος στην πλάκα και μετράτε ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται εντός των τεσσάρων μεγάλων τετραγώνων της πλάκας. Τα τετράγωνα αυτά βρίσκονται στις τέσσερις γωνίες της πλάκας και αποτελούνται από 16 μικρότερα τετράγωνα. Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων προκύπτει από το άθροισμα των κυττάρων που περιλαμβάνονται σε καθένα από τα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα και διαιρείται διά του 4. Ο αριθμός που προκύπτει πολλαπλασιάζεται  $\times 10^4$  και αποτελεί τον αριθμό των κυττάρων της καλλιέργειας ανά ml.



**ΕΙΚΟΝΑ A36: Σχηματική απεικόνιση των σημείων μέτρησης κυττάρων στην πλάκα Neubauer.**

### B.1.3. Αποθήκευση κυτταρικών σειρών

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

- ✚ Θρυψινοποίηση των κυττάρων του τρυβλίου
- ✚ Φυγοκέντρηση του κυτταρικού εναιωρήματος σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 λεπτά/900rpm
- ✚ Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 900μl θρεπτικού μέσου ( 900μl κυτταρικού εναιωρήματος αντιστοιχούν σε ένα κρυοφιαλίδιο)
- ✚ Προσθήκη 900μl διαλύματος κατάψυξης (freezing mix) το οποίο περιλαμβάνει: 50% FBS, 20% DMSO και 30% θρεπτικού υλικού(χωρίς FBS)
- ✚ Μεταφορά του συνολικού όγκου, 1,8ml αυτού του διαλύματος που περιλαμβάνει τα κύτταρα, σε ένα κρυοφιαλίδιο κατάψυξης
- ✚ Τοποθέτηση σε ειδικό δοχείο με ισοπροπανόλη (για αργό και σταδιακό πάγωμα) στους -80 °C. Το διάλυμα αποθήκευσης είναι τοξικό για τα κύτταρα, για αυτό τα κρυοφιαλίδια πρέπει να ψύχονται κατευθείαν μετά την προσθήκη του στο κυτταρικό εναιώρημα
- ✚ Μετά από 12-24 ώρες , το κρυοφιαλίδιο φυλάσσεται στο υγρό άζωτο (-196 °C)

### B.1.4 Απόψυξη των κυττάρων

Η απόψυξη των κυττάρων περιλαμβάνει :

- ✚ Άμεση μεταφορά του κρυοφιαλιδίου από το υγρό άζωτο στους 37 °C, αφού πρώτα καθαριστεί με αιθανόλη 70%
- ✚ Μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος σε ένα σωλήνα φυγοκέντρησης τύπου falcon που περιέχει 8,2ml πλήρους θρεπτικού μέσου και φυγοκέντρηση στα 900rpm/5λεπτά



- ✚ Απομάκρυνση του υπερκείμενου, επαναίωση των κυττάρων σε νέο θρεπτικό μέσο και ανάδευση με πιπέτα μίας χρήσεως
- ✚ Μεταφορά των κυττάρων σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας και τοποθέτηση στους 37 °C μέχρι την επόμενη ανακαλλιέργεια

## B.2 Διαμόλυνση των κυττάρων(Transfection)

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

Η πολυαιθυλεναμίνη (PEI) είναι ένα θετικά φορτισμένο πολυμερές που έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με την ανιονική διπλοστοιβάδα πεπτιδογλυκάνων της κυτταροπλάσματικής μεμβράνης και να εισάγεται στα κύτταρα με ενδοκύττωση. Λειτουργεί σα «σφουγγάρι» πρωτονίων, γι αυτό άλλωστε και προσροφά το DNA. Στο εσωτερικό του μπορεί να αυτουρυθμίζει, το pH προστατεύοντας έτσι το DNA από την αποικοδόμηση.

Η διαδικασία διαμόλυνσης σε κύτταρα Neuro2A με PEI σε ένα 24mm πιάτο είναι η εξής:

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	TUBE D	TUBE P
DMEM	25μl	50 μl
PEI	-	0.5 μl
DNA	1μg	-

- ✚ Tube D: ανάμειξη του DMEM + DNA → vortex για 10 δευτερόλεπτα.
- ✚ Tube P: ανάμειξη του DMEM + PEI → vortex για 10 δευτερόλεπτα.
- ✚ Προσθήκη του tube P στο tube D → vortex για 12 δευτερόλεπτα.
- ✚ Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά και προσθήκη του διαλύματος στα κύτταρα.

## B.3 Έμμεσος ανοσοφθορισμός – Ανοσοκυτταροχημεία

Ο ανοσοφθορισμός είναι μία μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθοριοχρώματα για τον εντοπισμό αντιγόνων ή αντισωμάτων σε κύτταρα (ανοσοκυτταροχημεία, ICC) ή σε ιστούς (ανοσοϊστοχημεία, IHC). Τα φθοριοχρώματα εκπέμπουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος όταν διεγερθούν από ακτινοβολία μεγαλύτερης ενέργειας. Οι χρωστικές αυτές είναι προσδεδεμένες στην περιοχή Fc των αντισωμάτων έτσι ώστε να μην επηρεάζουν την ειδικότητά τους. Κάποιες από τις πιο γνωστές φθορίζουσες χρωστικές είναι η ισοθειοκυανική φλουοροσκεΐνη (FITC), οι χρωστικές Alexa Fluor, η τετραμεθυλοροδαμίνη (Cy3 και Cy5) κ.α. Στον έμμεσο ανοσοφθορισμό το πρώτο αντίσωμα είναι μη σημασμένο και ειδικό για το αντιγόνο που ανιχνεύεται. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με μία χρωστική και ανιχνεύει το πρώτο αντίσωμα. Για τη χρώση του πυρήνα χρησιμοποιούνται ειδικές χρωστικές που προσδένουν το DNA όπως το DAPI και το DRAQ5. Αντίθετα από τα φθοριοχρώματα, αυτές οι χρωστικές μπορούν να ανιχνευθούν και με απλό μικροσκόπιο

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

- ✚ Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πιάτο 24-well στο οποίο έχει προηγηθεί η επίστρωση με γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 11mm
- ✚ Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα και πραγματοποιείται μία πλύση των κυττάρων με 500μl PBS
- ✚ Τα κύτταρα επί των καλυπτρίδων μονιμοποιούνται με 200μl PFA 4% (παραφορμαλδεύδης) για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η παραφορμαλδεύδη αποτρέπει την αποσύνθεση των κυττάρων και “παγώνει” τα αντισώματα και τα κυτταρικά οργανίδια στο ίδιο σημείο. Η παραφορμαλδεύδη σχηματίζει ισχυρούς ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ των κυτταρικών πρωτεϊνών και του περιβάλλοντος τους, διατηρώντας τα στο ίδιο σημείο.
- ✚ Ακολουθούν τρεις πλύσεις με 500μl PBS ,από πέντε λεπτά η κάθε μία. Στο στάδιο αυτό ,τα κύτταρα μπορούν να φυλαχτούν στους 4 °C
- ✚ Οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα μεταφέρονται σε μία κατασκευή που τους παρέχει υγρασία και περιέχει τα εξής: ένα πιάτο κυτταροκαλλιιεργειών μεγάλης διαμέτρου με τρία χαρτιά whatman στο μέγεθος του πιάτου, τα οποία διαβρέχονται με νερό και πάνω τους τοποθετείται πλαστική μεμβράνη τύπου parafilm. Τα τρυβλία τυλίγονται με αλουμινόχαρτο, έτσι ώστε στο εσωτερικό του να υπάρχει απόλυτο σκοτάδι (τα φθοριοχρώματα είναι φωτοευαίσθητα). Οι καλυπτρίδες μεταφέρονται πάνω στην μεμβράνη με την πλευρά των κυττάρων προς τα πάνω

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

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

✚ Οι καλυπτρίδες αφήνονται ολονύκτια να στεγνώσουν. Στη συνέχεια φυλάσσονται σε σκοτεινό μέρος στους 4°C  
Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού ανιχνεύθηκαν μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal microscopy).

#### B.4. Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από νευρικά κύτταρα

Η απομόνωση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος RIPA (Cell Signaling). Το RIPA επιτρέπει την αποτελεσματική λύση των κυττάρων και τη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών, αποφεύγοντας την αποικοδόμηση τους και την παρεμβολή της ανοσοδραστικότητας και βιολογικής δραστηριότητάς τους.

Σύσταση RIPA buffer (10x):

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

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

Η διαδικασία συνίσταται από τα ακόλουθα βήματα:

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

#### B.5. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο BRADFORD

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής πρωτεΐνης απορροφά στα 595 nm.

Πρωτόκολλο αντίδρασης:

- ✚ Δημιουργία πρότυπης καμπύλης απορρόφησης στα 595 nm συναρτήσει της συγκέντρωσης του προτύπου διαλύματος BSA (1mg/ml) σε 1 ml διαλύματος Bradford αραιωμένο 1:5 (0-25 μg πρωτεΐνης). Έπειτα από 5 λεπτά παραμονής τα δείγματα φωτομετρούνται
- ✚ 5μl από κάθε δείγμα αραιώνονται με 45μl νερό (nanopure)

- ✚ Σε κάθε κυψελίδα προστίθενται 950μl διαλύματος Bradford 1X. Έπειτα από 5 λεπτά παραμονής τα δείγματα φωτομετρούνται στα 595 nm

#### B.6. Ανοσοαποτύπωση κατά WESTERN

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

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

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

Οι πρωτεΐνες απομονώνονται και αποδιατάσσονται με θέρμανση στους 95°C για 5 λεπτά, με τη χρήση αποδιατακτικών αναγωγικών παραγόντων (SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη) που περιέχονται στο Laemmli buffer. Η β-μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και το SDS καταστρέφει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και δεσμεύεται στις πρωτεΐνες προσδίδοντάς τους μεγάλο αρνητικό φορτίο. Υπό αυτές τις συνθήκες καταστρέφεται η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να έχουν όμοιες αναλογίες φορτίου/μεγέθους. Επειδή η πρόσδεση με το SDS είναι σχεδόν πάντα ανάλογη με το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και είναι ανεξάρτητη με την αλληλουχία του, τα συμπλέγματα SDS – πολυπεπτιδίου μετακινούνται στη πηκτή πολυακρυλαμιδίου σύμφωνα με το μέγεθος του πολυπεπτιδίου.

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

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

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

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

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

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

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

- ✚ Συναρμολογείτε κατάλληλα η συσκευή γυάλινων πλακών που θα χρησιμοποιηθεί έτσι ώστε να μην υπάρχει διαρροή (Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell, BIORAD).
- ✚ Κατασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού στην κατάλληλη πυκνότητα (ΠΙΝΑΚΑΣ 1)
- ✚ Το μείγμα τοποθετείται πολύ γρήγορα στο σύστημα των γυάλινων πλακών, στην επιφάνεια του προστίθεται ισοπροπανόλη για να ευθυγραμμιστεί η στάθμη και να αποφευχθεί τυχόν εξάτμιση του υγρού
- ✚ Το πήκτωμα αφήνεται σε ηρεμία ~20λεπτά προκειμένου να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός
- ✚ Κατασκευάζεται το πήκτωμα επιστοίβαξης με συγκέντρωση ακρυλαμίδης 4 %
- ✚ Απομακρύνεται η ισοπροπανόλη από το πήκτωμα διαχωρισμού, ξεπλένεται το πήκτωμα με νερό και προστίθεται το διάλυμα του πηκτώματος επιστοίβαξης.
- ✚ Τοποθετείται το ειδικό χτενάκι για την δημιουργία πηγαδιών ,αφήνεται σε ηρεμία για ~15 λεπτά να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός. Στο στάδιο αυτό το πήκτωμα μπορεί να αποθηκευτεί στους 4 °C ή να χρησιμοποιηθεί την ίδια μέρα μετά το πέρας τουλάχιστον 45 λεπτών.
- ✚ Η κατασκευή με το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδική δεξαμενή.
- ✚ Η δεξαμενή γεμίζεται με 1 λίτρο περίπου 1X SDS-PAGE ρυθμιστικό διάλυμα προσέχοντας η στάθμη του να βρίσκεται 1-2 cm πάνω από την επιφάνεια των πηκτών.
- ✚ Ανάμειξη πρωτεϊνών με διάλυμα Laemmli το οποίο περιέχει 4.2% β-μερκαπτοαιθανόλη
- ✚ Θέρμανση των δειγμάτων στους 95 °C για 5 λεπτά και φόρτωσή τους στην πηκτική.
- ✚ Φορτώνεται επίσης και μίγμα με πρότυπες πρωτεΐνες για SDS-PAGE, έτσι ώστε να μπορεί να υπολογιστεί το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θα διαχωριστούν.



- ✚ Η δεξαμενή καλύπτεται και η διάταξη λειτουργεί στα 110 Volt μέχρι η ζώνη της χρωστικής να περάσει στο stacking gel και συνεχίζει στα 150 Volt μέχρι το τέλος.

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

#### Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης:

Μόλις η χρωστική φτάσει στο κάτω μέρος της πηκτής σταματά η ηλεκτροφόρηση, παραλαμβάνεται η πηκτή και αρχίζει η διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη οφείλεται σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις καθώς και σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μεμβράνης και των πρωτεϊνών.

Ακολουθείται η υγρή ηλεκτρομεταφορά:

- ✚ Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κόβεται στο μέγεθος της πηκτής διαχωρισμού και διαβρέχεται με υπερκάθαρο (nanopure) νερό.
- ✚ 2 ειδικά «σφουγγαράκια» και 4 κομμάτια διηθητικού χαρτιού Whatman διαβρέχονται με το διάλυμα υγρής μεταφοράς.
- ✚ τοποθέτηση στην συσκευή υγρής μεταφοράς από κάτω προς τα πάνω των εξής: 1 «σφουγγαράκι», 2 χαρτιά Whatman, η πηκτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, άλλα 2 χαρτιά Whatman και τέλος 1 ακόμη «σφουγγαράκι».
- ✚ Η συσκευή συναρμολογείτε και μεταφέρεται στη δεξαμενή όπου πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών η οποία γεμίζει με 1L υγρό μεταφοράς.
- ✚ Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία (8°C). Ανάλογα με το μέγεθος των υπό αντίχνευση πρωτεϊνών, η μεταφορά γίνεται στα 200mA για 1 ½ έως 4 ½ ώρες.

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

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

Η διαδικασία έχει ως εξής:

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

- ✚ Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα TBS-T
- ✚ Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα επαναιωρείται σε διάλυμα γάλακτος.
- ✚ Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα TBS-T.
- ✚ Ακολουθεί ανίχνευση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

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

- ✚ Μετάβαση σε σκοτεινό θάλαμο.
- ✚ Τοποθέτηση φωτογραφικού φιλμ πάνω στη μεμβράνη για 0,5-45 λεπτά.
- ✚ Επώαση του φιλμ για 1-3 λεπτά σε εμφανιστικό υγρό (developer).
- ✚ Πλύση του φιλμ σε νερό για 30 δευτερόλεπτα με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του developer.
- ✚ Επώαση του φιλμ για 1-2 λεπτά σε υγρό σταθεροποίησης σήματος (fixer).
- ✚ Πλύση του φιλμ με νερό.

Μετά το πέρας της διαδικασίας, η μεμβράνη φυλάσσεται στους -20°C. Μετά το πέρας της διαδικασίας τα φιλμ σκανάρονται και γίνεται επεξεργασία των πρωτεϊνικών ζωνών.

## B.7. Καθαρισμός του DNA με τους οργανικούς διαλύτες φαινόλη και χλωροφόρμιο

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

- ✚ Αρχικά γίνεται προσθήκη ίσου όγκου με το ομογενοποίημα φαινόλης και αναμιγνύονται με αργό ρυθμό έως ότου δημιουργηθούν τρεις φάσεις. Η πάνω φάση είναι υδάτινη (πολική) και περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα, η ενδιάμεση περιέχει τις πρωτεΐνες και η κάτω φάση η οργανική περιέχει τα λιπίδια. Οι πρωτεΐνες βρίσκονται στην ενδιάμεση φάση καθώς αποτελούνται και από υδρόφοβες και από υδρόφιλες περιοχές.
- ✚ Φυγοκέντρηση στον μέγιστο των στροφών για 3 λεπτά.
- ✚ Αφαίρεση της υδατικής φάσης. Προσθήκη σε αυτή ίση ποσότητα χλωροφορμίου και ανάμιξη με αργό ρυθμό. Το χλωροφόρμιο (χλωροφόρμιο / ισοαμυλική αλκοόλη 24:1) απομακρύνει επιπλέον τα λιπίδια και τη φαινόλη από την υδάτινη φάση και μετουσιώνει τις πρωτεΐνες.
- ✚ Φυγοκέντρηση στο μέγιστο των στροφών για 2 λεπτά
- ✚ Απομάκρυνση της πάνω φάσης και προσθήκη 1/10 του όγκου CH<sub>3</sub>COONa και δύο όγκοι του συνολικού απόλυτη αιθανόλη. Ακολουθεί ήπια ανάδευση
- ✚ Μεταφορά του δείγματος στους -80°C/ 1ώρα ή εναλλακτικά -20°C/ ολονύκτια.
- ✚ Φυγοκέντρηση στο μέγιστο των στροφών για 10 λεπτά.
- ✚ Απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη ίσου όγκου αιθανόλης 70%.
- ✚ Φυγοκέντρηση στο μέγιστο των στροφών για 3λεπτά.
- ✚ Απομάκρυνση του υπερκειμένου και επανάληψη της φυγοκέντρησης για μερικά sec. Με τη βοήθεια ενός tip απομακρύνεται η εναπομείνασα αιθανόλη.
- ✚ Στέγνωμα ιζήματος στον πάγκο για 7min.
- ✚ Διαλυτοποίηση σε κατάλληλο όγκο TE (10mM Tris-Cl pH 8.0, 1mM EDTA).

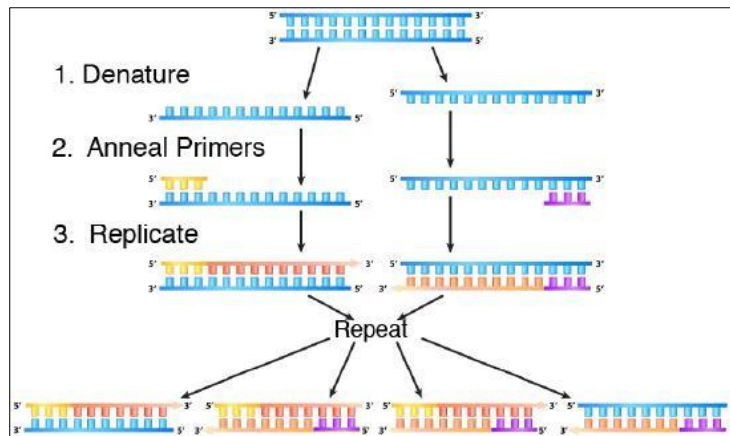
## B.8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- PCR

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

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

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

Για να πραγματοποιηθεί αυτή η αντίδραση απαιτείται στο μίγμα η παρουσία του DNA εκμαγείου, των εκκινητών, οι οποίοι είναι ειδικοί για την υπό εξέταση αλληλουχία, dNTPs, θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, ιόντα μαγνησίου τα οποία αυξάνουν την αποτελεσματικότητα του ενζύμου καθώς και το ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης. Απαιτείται επιπλέον η ύπαρξη ενός ζεύγους εκκινητών. Απουσία αυτών, η αντίδραση δε μπορεί να συμβεί, αφού δεν υπάρχει το απαραίτητο προεξέχον 3' άκρο, από το οποίο η πολυμεράση θα ξεκινήσει τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών βεβαιώνεται ότι το σετ εκκινητών είναι ειδικό μόνο για την υπό έλεγχο περιοχή του γονιδιώματος και δεν παράγει παραπροϊόντα. Γι' αυτό αξιοποιήθηκε η βάση δεδομένων Primer Blast του NCBI. Αν η υπό έλεγχο περιοχή αφορά γονίδιο, οι εκκινητές θα πρέπει να βρίσκονται εντός της κωδικής περιοχής του γονιδίου και να περιλαμβάνουν ένα ιντρόνιο. Οι εκκινητές sense έχουν την ίδια αλληλουχία με τη νοηματική αλυσίδα και είναι συμπληρωματικοί της αντινοηματικής, ενώ το αντίθετο συμβαίνει για τους εκκινητές antisense. Τα σημεία τήξης των εκκινητών (τα οποία εξαρτώνται από την περιεκτικότητα των εκκινητών σε G/C) θα πρέπει να έχουν όσο το δυνατόν μικρότερη διαφορά γίνεται.



ΕΙΚΟΝΑ Α37: Σχηματική απεικόνιση ενός κύκλου PCR,[Kim 2019]

### B.9. Μετασχηματισμός – Transformation-Επιδεκτικά βακτήρια DH5a

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- ✚ Προσθήκη 2-4μl από το επιθυμητό πλασμίδιο ή το ligation σε 50μl επιδεκτικά βακτήρια DH5a. Αναμειγνύω απαλά χωρίς να πιπετάρω.
- ✚ Επώαση σε πάγο για 5-30 λεπτά.
- ✚ Θερμικό-σοκ(Heat-shock) των κυττάρων: Θέρμανση για 30sec στους 42°C χωρίς ανάδευση, με τον τρόπο αυτό το πλασμίδιο εισέρχεται μέσα στα βακτήρια.
- ✚ Κατευθείαν μεταφορά σε πάγο.
- ✚ Προσθήκη 250μl από S.O.C medium σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✚ Ανάδευση βακτηρίων σε οριζόντια θέση στα 200rpm στους 37°C για μία ώρα.
- ✚ Επίστρωση 50μl από τα βακτήρια σε τρυβλίο LB-agar το οποίο περιέχει και το κατάλληλο αντιβιοτικό στο οποίο έχει αντίσταση το πλασμίδιο. Επώαση στους 37°C ολονύκτια.
- ✚ Μετά από 12-16 ώρες γίνεται αποθήκευση του πιάτου στους 4°C και ακολουθείται εμβολιασμός(Inoculation).

### B.10. Εμβολιασμός βακτηριακής καλλιέργειας

- ✚ Σε ένα falcon τοποθετούνται 3-5ml από το LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό στο οποίο έχει αντίσταση το επιθυμητό πλασμίδιο.
- ✚ Χρησιμοποιώντας μία αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα ή αποστειρωμένο tip γίνεται επιλογή των αποικιών από το τρυβλίο LB-agar.
- ✚ Τοποθέτηση του tip μέσα στο falcon με το LB και το αντιβιοτικό.
- ✚ Κάλυψη του falcon με στείρο αλουμινόχαρτο ή με καπάκι που δεν είναι αεροστεγές.
- ✚ Επώαση βακτηριακής καλλιέργειας στους 37°C για 12-18 ώρες υπό ανάδευση (200rpm).

#### B.10.Αποθήκευση βακτηριακών στελεχών(Bacterial Glycerol – Stock )

Η αποθήκευση βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε υπό τη μορφή στοκ γλυκερόλης. Για την παρασκευή τους, 1 όγκος 85% γλυκερόλης προστέθηκε σε 2 όγκους βακτηριακής καλλιέργειας. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και αποθήκευση στους -80°C. Τα αποθηκευμένα βακτηριακά στελέχη μπορούν να χρησιμοποιηθούν εμβολιάζοντας μικρή ποσότητα σε θρεπτικό υλικό ανάπτυξης βακτηρίων.

#### B.11.Παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Mini-prep)

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την απομόνωση καθαρισμένου πλασμιδιακού DNA σε μικρή ποσότητα από υγρές καλλιέργειες μετασηματισμένων βακτηρίων. Το καθαρισμένο DNA χρησιμοποιείται για πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, με σκοπό τον εντοπισμό κλώνων που φέρουν το επιθυμητό ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων. Βασική αρχή της μεθόδου αποτελεί η χρήση αλκαλικού διαλύματος το οποίο λύει τα κύτταρα, ενώ το υψηλό pH προκαλεί αποικοδόμηση του RNA. Επίσης, οι αλκαλικές συνθήκες επιδρούν και στη δομή του DNA, αποδιατάσσοντας το. Επειδή το χρωμοσωμικό DNA είναι πολύ μεγάλο σε μέγεθος, όταν λύνονται τα κύτταρα, σπάει, ενώ το μικρού μεγέθους πλασμιδιακό DNA παραμένει ανέπαφο.

Η διαδικασία είναι η εξής:

- ✚ 2ml από την βακτηριακή καλλιέργεια φυγοκεντρώνται στα 10.000rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✚ Γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου και το ίζημα αναδιαλύεται με την προσθήκη 300μl διαλύματος P1(Resuspension Buffer RES + RNase A), η RNAάση αποικοδομεί το RNA μετά την λύση των κυττάρων.
- ✚ Αφού το ίζημα διαλυθεί καλά ακολουθεί η προσθήκη 300μl από το διάλυμα P2 (Lysis Buffer). Το NaOH προκαλεί λύση των κυττάρων και το SDS διαλυτοποιεί τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες καθώς και το DNA.
- ✚ Το διάλυμα αναδεύεται αργά και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου 5 λεπτά. Δεν πρέπει να επωαστεί για πολύ μεγάλο διάστημα ή να αναδευθεί έντονα γιατί υπάρχει κίνδυνος απελευθέρωσης χρωμοσωμικού DNA.
- ✚ Στην συνέχεια γίνεται προσθήκη διαλύματος P3 (Neutralization buffer). Το μίγμα αναδεύεται τρεις φορές απότομα και επώάζεται 30 λεπτά σε πάγο ώστε να γίνει η κατακρήμνιση πρωτεϊνών.
- ✚ Φυγοκέντρηση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο 4°C , 14.000rpm για 10 λεπτά.
- ✚ 700μl από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε νέο Eppendorf και το ίζημα απορρίπτεται.
- ✚ Προστίθεται 490μl ισοπροπανόλη 100% και αναδεύεται αργά μέχρι να σχηματιστεί μία φάση.
- ✚ Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου,14.000rpm για 10 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου προσεκτικά.
- ✚ Προσθήκη 1ml EtOH 70% και φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου , 14.000rpm για 10 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου προσεκτικά.
- ✚ Επαναδιάλυση πελέτας με 30μl TE ή H<sub>2</sub>O.



### B.12. Παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα (Midi-prep)

Το πλασμίδιο που απομονώθηκε με την διαδικασία του Mini prep ελέγχεται για την ορθότητα του με περιοριστικές πέψεις. Έπειτα παρασκευάζεται σε μεγάλη κλίμακα με την βοήθεια ειδικού KIT (NucleoBond Xtra Midi (Macherey- Nagel, #740410)) και αποθηκεύτε στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### B.13. Αντίδραση σύνδεσης (ligation)

Αντίδραση σύνδεσης (ligation) είναι η ένωση δύο θραυσμάτων νουκλεϊκών οξέων μέσω της δράσης ενός ενζύμου. Το ένζυμο αυτό ονομάζεται T4 λιγάση (T4 ligase Minotech) και καταλύει τον σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της υδροξυλικής ομάδας 3' στο άκρο μιας αλυσίδας DNA και της φωσφορικής ομάδας 5' στο άκρο μιας άλλης. Η αντίδραση έχει ως εξής:

<b>T4 DNA LIGASE</b>	<b>6WU</b>
<b>10X LIGASE BUFFER</b>	2μl
<b>10MM ATP</b>	0.1-2μl
<b>50% W/V PEG 4000</b>	2μl
<b>LINEAR DNA VECTOR</b>	50-100ng
<b>DNA INSERT</b>	1:1-1:5 (vector:insert)
<b>STERILE ULTRAPURE WATER</b>	Up to 20 μl

Γίνεται επώαση του διαλύματος ολονύκτια στους  $-16^{\circ}\text{C}$  ή 2 ώρες στους  $25^{\circ}\text{C}$ .

### B.14. Αντίδραση Klenow

Από τις περισσότερες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, προκύπτουν κολλώδη άκρα. Τα άκρα αυτά, πολλές φορές δεν είναι συμβατά για τη δημιουργία αντιδράσεων σύνδεσης διαφόρων τμημάτων DNA. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται η μεγάλη υπομονάδα του συμπλόκου της DNA πολυμεράσης I, Klenow. Η πρωτεΐνη Klenow, διατηρεί την 5'-3' πολυμεριστική της ενεργότητα, καθώς και την 3'-5' ενεργότητα εξωνουκλεάσης. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων της είναι ικανή να δημιουργεί τυφλά άκρα σε τμήματα DNA (blunt ends). Για την αντίδραση Klenow, χρησιμοποιήθηκε 1unit ενζύμου για κάθε  $\mu\text{g}$  DNA και 10nM dNTPs. Η αντίδραση επωάζεται στους  $25^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά. Στη συνέχεια το ένζυμο αδρανοποιείται προσθέτοντας 10mM EDTA και επωάζοντας στους  $72^{\circ}\text{C}$  για 20 λεπτά.

### B.15. Αντίδραση Περιοριστικής Πέψης

Η αντίδραση της περιοριστική πέψης γίνεται μέσω των ενζύμων περιορισμού. 4-5 Units ενζύμου είναι ικανά να πέψουν  $\sim 1\mu\text{g}$  DNA σε χρονικό διάστημα μίας ώρας. Η τελική συγκέντρωση του DNA της περιοριστικής αντίδρασης θα πρέπει να είναι 100-200 ng/  $\mu\text{l}$ .

### B.16. Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Αγαρόζης

Για την ηλεκτροφόρηση με σκοπό τον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων, χρησιμοποιούνται τα πηκτώματα αγαρόζης. Η πυκνότητα του πηκτώματος εξαρτάται από το μέγεθος του υπό εξέταση νουκλεϊκού οξέος. Μικρά τμήματα νουκλεϊκών οξέων

κινούνται πιο εύκολα και άρα πιο γρήγορα, με αποτέλεσμα να απαιτούν μεγάλη πυκνότητα πηκτώματος, ενώ για τα μεγάλα τμήματα ισχύει το αντίθετο. Για μεγάλα τμήματα απαιτείται πήκτωμα περιεκτικότητας ~ 0,8% σε αγαρόζη, για τα μεσαίου μεγέθους τμήματα απαιτείται περιεκτικότητα ~1-1,2% σε αγαρόζη, ενώ για τα μικρά τμήματα όπως είναι για παράδειγμα τα προϊόντα της PCR που είναι περίπου 300 bp, παρασκευάζεται πηκτή με περιεκτικότητα >1,5% σε αγαρόζη.

Τα νουκλεϊκά οξέα γίνονται ορατά μέσα στο πήκτωμα, μέσω χρώσης με ειδικές χρωστικές, οι οποίες προσδένονται σε αυτά. Έτσι, εκθέτοντας το πήκτωμα σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) αποκαλύπτονται φωτεινές ζώνες που αντιστοιχούν σε νουκλεϊκά οξέα διαφορετικού μεγέθους. Με σκοπό τον προσδιορισμό του μεγέθους των άγνωστων ζωνών, χρησιμοποιούνται δείγματα με τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους, τα οποία συγκρίνονται με τις άγνωστες ζώνες του πηκτώματος.

Η πιο συνηθισμένη χρωστική που χρησιμοποιείται είναι το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), το οποίο όμως είναι εξαιρετικά καρκινογόνο. Άλλες πιο ασφαλείς αλλά και πιο ευαίσθητες χρωστικές είναι το GelRed και το SYBR Green.

- ✚ Για την παρασκευή 1% πηκτής αγαρόζης, 1gr αγαρόζης διαλύεται σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x.
- ✚ Ακολουθεί βρασμός στους 100°C , μέχρι τη δημιουργία ομοιογενούς διαλύματος. Στο διάλυμα προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο συγκέντρωσης 1 mg/ml και αποχύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης για να πήξει.
- ✚ Για να είναι εφικτή η ηλεκτροφόρηση των εκάστοτε δειγμάτων είναι απαραίτητη η ανάμιξη τους με διάλυμα φόρτωσης 4X, καθώς και η εμφύσηση της πηκτής στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X.

### B.17.Κλωνοποίηση με TOPO TA CLONING KIT

Για την κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκε το kit TOPO Cloning TA με πλασμιδιακό φορέα τον pCR 2.1-TOPO. Το σύστημα αυτό εκμεταλλεύεται την ύπαρξη μιας βάσης αδενίνης σε κάθε άκρο των κομματιών DNA, η οποία έχει προστεθεί με την χρήση της Taq πολυμεράσης. Γενικά η διαδικασία περιλαμβάνει προσθήκη Taq πολυμεράσης, το buffer του ενζύμου και δεοξυριβονουκλεοτιδίων αδενίνης (dATP) στα eppendorf, τα οποία περιέχουν τα κομμάτια DNA με τα τυφλά άκρα, και επώαση για 15min στους 72°C. Ο πλασμιδιακός φορέας, που παρέχεται σε γραμμική μορφή με μια βάση T σε κάθε άκρο, υβριδοποιείται με μεγάλη εξειδίκευση με κομμάτια DNA που έχουν βάση αδενίνη στα άκρα τους. Η διαδικασία της κλωνοποίησης γενικά περιλαμβάνει:

- ✚ Ένθεση των κομματιών DNA σε πλασμιδιακό φορέα και επώαση του μίγματος για 30min στους 25°C.
- ✚ Εισαγωγή του πλασμιδίου στα επιδεκτικά κύτταρα E.coli TOP10 του βακτηρίου.
- ✚ Ανάπτυξη των δεκτικών κυττάρων με τον πλασμιδιακό φορέα και την ένθεση σε τρυβλία.

Η αντίδραση TOPO CloningTA έχει ως εξής:

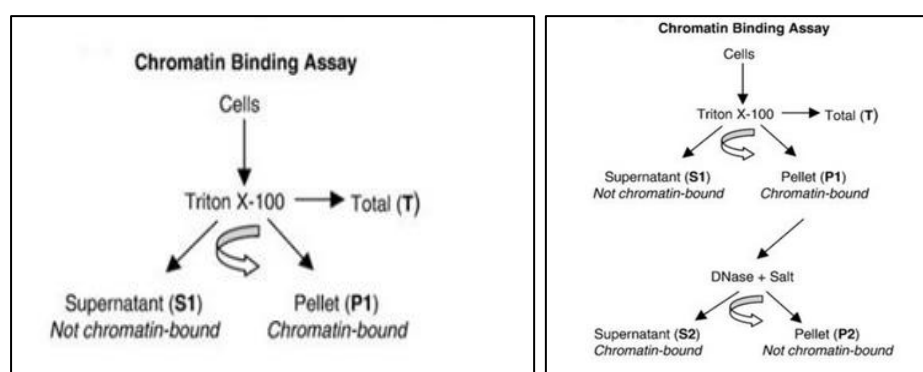
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	VOLUME
<b>ΠΡΟΪΟΝ PCR</b>	0.5-4 μl
<b>ΔΙΑΛΥΜΑ ΑΛΑΤΩΝ</b>	1 μl
<b>TOPO ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΦΟΡΕΑΣ</b>	1 μl
<b>ΝΕΡΟ</b>	Μέχρι 5 μl
<b>ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ</b>	6 μl

Η αντίδραση επώαζεται για 30min στους 25°C και διατηρείται στον πάγο. Ακολουθεί μετασχηματισμός TOP10 δεκτικών κυττάρων.

### B.18. Διαδικασία διαχωρισμού πρωτεϊνών που συνδέονται με την χρωματίνη (Chromatin Binding Assay, CBA)

Το πρωτόκολλο διαχωρισμού πρωτεϊνών που συνδέονται με την χρωματίνη περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- ✚ Πλύση των κυττάρων με 5ml PBS. Διάρρηξη και λύση των κυττάρων για 15 λεπτά/4°C στο buffer CSK I (cytoskeleton buffer I): 10 mM Pipes (pH 6.8), 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, συμπληρώνεται με 1 mM DTT, 1 mM PMSF, protease inhibitor και 0.5% (vol/vol) Triton X-100. Επώαση για 3 λεπτά στους 4 °C.
- ✚ Αποθηκεύεται το 1/10 του εκχύλισματος, αποτελεί το συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων (total fraction, T), το οποίο διαλύεται σε RIPA buffer.
- ✚ Το υπόλοιπο εκχύλισμα διαχωρίζεται ισόποσα σε δύο erpendorfs. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 600g/ 3min/ 4°C. Με την φυγοκέντρηση κατακρημνίζονται οι πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και το πυρηνικό εκχύλισμα, και παραμένουν στο ελαιώρημα οι διαλυτές πρωτεΐνες. Το ελαιώρημα ονομάζεται (S1 – supernatant 1), δηλαδή πρωτεΐνες διαλυτές στο Triton ή πρωτεΐνες που δεν προσδένονται στην χρωματίνη.
- ✚ Η μία από τις δύο πελέτες, η οποία περιέχει τις πρωτεΐνες που προσδένονται στη χρωματίνη, πρωτεΐνες πυρηνικής μήτρας και αδιάλυτες πρωτεΐνες επαναιωρείται στο RIPA buffer, (εκχύλισμα P1).
- ✚ Η δεύτερη πελέτα επαναδιαλύεται σε CSK II buffer (10 mM Pipes (pH 6.8), 50 mM NaCl, 300 mM sucrose, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT), επώαση με DNase/ 30 min και προσθήκη 250 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ 10min/ 25 °C.
- ✚ Φυγοκέντρηση 1200g/ 6min/ 4°C. Απομόνωση υπερκείμενου εκχυλίσματος S2, το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες που απελευθερώθηκαν από την χρωματίνη μετά την επώαση με Dnase και η πελέτα P2 η οποία περιέχει τις αδιάλυτες, κυτταροσκελετικές και πρωτεΐνες της πυρηνικής μήτρας. Η πελέτα P2 επαναδιαλύεται σε RIPA buffer.



ΕΙΚΟΝΑ A38: Σχηματική απεικόνιση πειραματικής πορείας απομόνωσης των πρωτεϊνών που προσδένονται στη χρωματίνη, (Llano et al., 2006).

## B.19.Απομόνωση Πυρηνικού και Κυτταροπλασματικού Πρωτεϊνικού Εκχυλίσματος από Νευρικά Κύτταρα

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση πυρηνικού και κυτταροπλασματικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος είναι το REAP.

- ✚ Αρχικά παρασκευάζεται το διάλυμα Igeral – NP40 10%, από το οποίο στην συνέχεια παρασκευάζεται το 0,1% Igeral – NP40 αραιωμένο σε PBS.
- ✚ Κατά την συλλογή των κυττάρων, αφαιρείται όλο το medium από το πιάτο και εκπλένεται 2 φορές με 4 ml PBS σε κάθε πλύση.
- ✚ Προσθήκη 1 ml (σε 10cm πιάτο) PBS.
- ✚ Τα κύτταρα συλλέγονται με τη βοήθεια ειδικής σπάτουλας (cell scraper) σε φιαλίδιο τύπου erpendorf.
- ✚ Φυγοκέντρηση (spin) για 10 δευτερόλεπτα σε μέγιστη ταχύτητα
- ✚ Απόχυση του υπερκειμένου και διατήρηση των κυττάρων – πελέτας στον πάγο.
- ✚ Ακολουθεί η προσθήκη 900 μl από το κρύο 0,1% NP40 – PBS και επαναιώρηση των κυττάρων (κόβω το tip μπροστά περίπου 3mm για να μην σπάσουν οι πυρήνες).
- ✚ Από το συγκεκριμένο διάλυμα μεταφέρονται περίπου 300 μl σε ένα νέο erpendorf, το οποίο αποτελεί το ολικό εκχύλισμα.
- ✚ Τα υπόλοιπα 600μl, φυγοκεντρούνται σε μέγιστη ταχύτητα για 10 δευτερόλεπτα.
- ✚ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ένα νέο erpendorf και το αφήνω στον πάγο. Αυτό αποτελεί το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα.
- ✚ Η πελέτα επαναδιαλυτοποιείται σε 900μl κρύο 0,1% NP40 – PBS και φυγοκεντρείται σε μέγιστη ταχύτητα για 10 δευτερόλεπτα.
- ✚ Απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας σε 180 μl laemli buffer 1X. Αυτό είναι το πυρηνικό εκχύλισμα.

### Για το ολικό εκχύλισμα:

- ✚ Ανάμιξη 3 όγκων (300 μl) από το δείγμα με 1 όγκο (100 μl) από το laemli buffer 4X
- ✚ Πραγματοποιείται λύση των κυτταρικών μεμβρανών και θραύση των νουκλεϊκών οξέων με την εφαρμογή υπερήχων για 2 φορές, με εναλλάξ 5sec θραύση και 5sec παύση και ένταση 20%.

### Για το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα:

- ✚ Ανάμιξη 3 όγκων (600 μl) από το δείγμα με 1 όγκο (200 μl) από το laemli buffer 4X

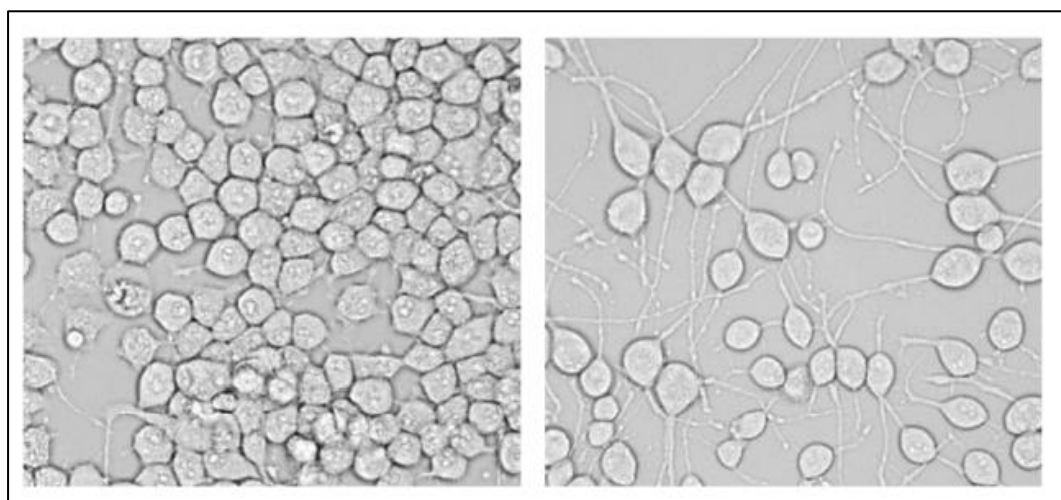
### Για το πυρηνικό εκχύλισμα:

- ✚ Η επαναιώρηση έχει ήδη γίνει σε 180 μl laemli buffer 1X και τέλος ακολουθεί εφαρμογή υπερήχων για 2 φορές, με εναλλάξ 5sec θραύση και 5sec παύση και ένταση 20%.

## B.20. Κυτταρικές σειρές

### B.20.1. Η Κυτταρική Σειρά Neuro2A (N2A)

Τα κύτταρα Neuro2A (N2A) είναι μία νευροβλαστωματική σειρά, η οποία προέρχεται από ποντικό. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά παρουσιάζει νευρική μορφολογία και τα κύτταρα αυτά διατηρούν το δυναμικό διαφοροποίησης τους αποκρινόμενα σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι για παράδειγμα το ρετινοϊκό οξύ (RA). Την ικανότητα διαφοροποίησής τους διατηρούν καθώς έχουν απομονωθεί από την νευρική ακρολοφία σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσιάζουν αρκετές ιδιότητες των νευρώνων και χαρακτηρίζονται από πυραμιδικό κυτταρικό σώμα και εμφανίζουν προεκβολές-νευρίτες. Χρησιμοποιούνται σε μελέτες νευριτικής αύξησης, νευροτοξικότητας, ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης αλλά και στην νόσο Alzheimer (Salto et al.).

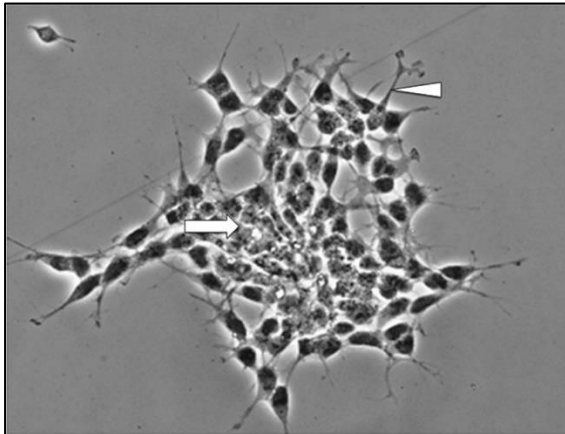


**ΕΙΚΟΝΑ A39:** Αδιαφοροποίητα (αριστερά) και διαφοροποιημένα μετά από προσθήκη ρετινοϊκού οξέος (δεξιά) κύτταρα Neuro2A σε συνθήκες καλλιέργειας DMEM + 10% FBS

### B.20.2. Η Κυτταρική Σειρά SH-SY5Y

Η νευρική κυτταρική σειρά SH-SY5Y είναι μια τρις-κλωνοποιημένη σειρά, η οποία προέρχεται από την πατρική σειρά SK-N-SH. Τα κύτταρα αυτά απομονώθηκαν από βιοψία μυελού των οστών ενός τετράχρονου κοριτσιού, που έπασχε από νευροβλάστωμα συμπαθητικο-αδρενεργικής γαγγλιακής προέλευσης στις αρχές της δεκαετίας του 1970 (Biedler et al.). Αρχισαν, όμως να χρησιμοποιούνται ευρέως ως μοντέλα για την μελέτη των ιδιοτήτων των νευρικών κυττάρων από τις αρχές του 1980. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά εμφανίζει δύο διακριτούς φαινότυπους. Ο N-type (Neuronal) εμφανίζει νευροβλαστικό φαινότυπο και έχει την ικανότητα διαφοροποίησης, ενώ ο S-type (Schwannian) εμφανίζει επιθηλιακό φαινότυπο. Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y προήλθε από τα N-type κύτταρα της πατρικής σειράς SK-N-SH, παρόλα αυτά περιέχουν και ένα μικρό ποσοστό S-type (Forster et al.). Τέλος, τα αδιαφοροποίητα κύτταρα χαρακτηρίζονται από μη πολωμένο κυτταρικό σώμα και από τον σχηματισμό συσσωματωμάτων.

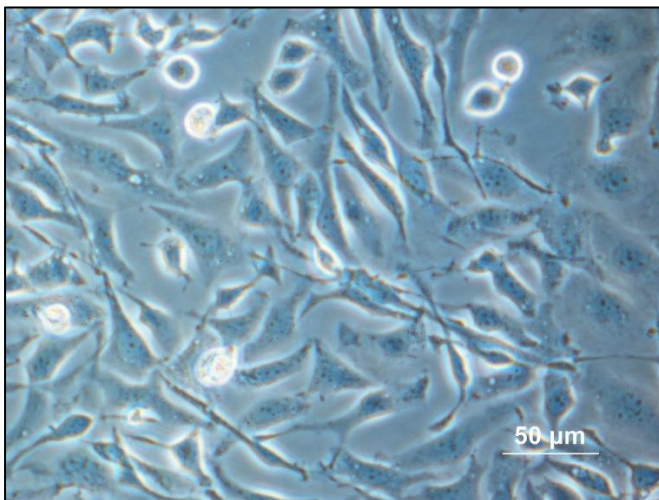




**ΕΙΚΟΝΑ Α40:** Αδιαφοροποίητα κύτταρα SH-5YSY. Χαρακτηρίζονται από το σχηματισμό συσσωματωμάτων και στοιβάδων κατά την καλλιέργειά τους (προσαρμογή και τροποποίηση από Jane Kovalevich and Dianne Langford, 2013).

#### Β.20.3.Κυτταρική σειρά CHO:

Τα κύτταρα ωοθήκης κινέζικου χάμστερ (CHO) είναι μια επιθηλιακή κυτταρική σειρά που προέρχεται από την ωοθήκη του κινέζικου χάμστερ, που χρησιμοποιείται συχνά σε βιολογική και ιατρική έρευνα και εμπορικά στην παραγωγή θεραπευτικών πρωτεϊνών. Έχουν βρει ευρεία χρήση σε μελέτες γενετικής, διαλογής τοξικότητας, διατροφής και γονιδιακής έκφρασης, ιδιαίτερα για την έκφραση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών. Τα κύτταρα CHO είναι οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι ξενιστές θηλαστικών για βιομηχανική παραγωγή θεραπευτικών ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών.



**ΕΙΚΟΝΑ Α41:** Chinese hamster ovary (CHO) cells, Wikipedia.

#### B.20.4.Κυτταρική σειρά NIH-3T3:

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά NIH-3T3. Πρόκειται για κύτταρα εμβρυονικών ινοβλαστών ποντικού τα οποία ξεκίνησαν από μια κυτταρική γραμμή που απομονώθηκε το 1962 στο Τμήμα Παθολογίας του Πανεπιστημίου της Νέας Υόρκης. Το 3T3 αναφέρεται στο πρωτόκολλο μεταφοράς και εμβολιασμού κυττάρων της γραμμής και σημαίνει «μεταφορά σε 3 μέρες, εμβολιασμός  $3 \times 10^5$  κυττάρων». Χρησιμοποιώντας αυτό το πρωτόκολλο, η αθάνατοποιημένη κυτταρική σειρά αρχίζει να αναπτύσσεται και να σταθεροποιείται στην καλλιέργεια μετά από περίπου 20-30 γενεές ανάπτυξης *in vitro*. Οι επιστήμονες που καλλιέργησαν αρχικά αυτή την σειρά ήταν οι George Todaro και Howard Green και έλαβαν τα κύτταρα από ινοβλάστες εμβρυϊκού ελβετικού αλφικού ποντικού. Η κυτταρική γραμμή έχει έκτοτε γίνει μια τυποποιημένη κυτταρική σειρά ινοβλαστών



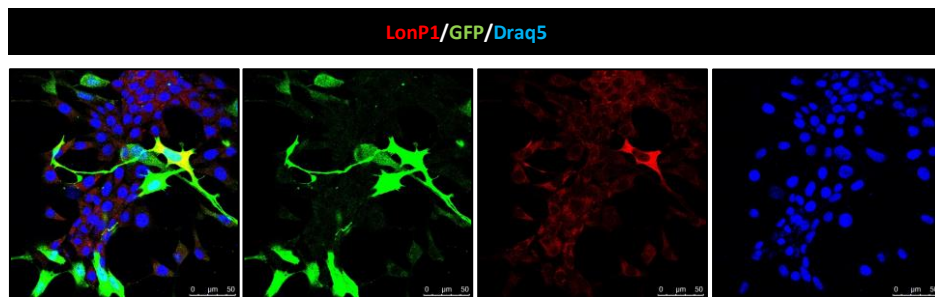
**ΕΙΚΟΝΑ A41: NIH/3T3 κυτταρική σειρά, Wikipedia.**

## Γ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Γ.1. Κατασκευή πλασμιδιακού φορέα με σκοπό την υπερέκφραση της πρωτεΐνης LonP1

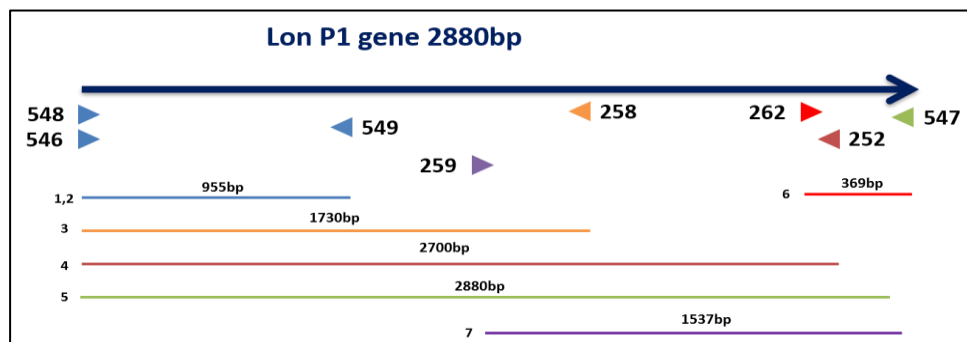
Με σκοπό να υπερεκφραστεί η πρωτεΐνη Lon, υποκλωνοποιήθηκε το ανθρώπινο γονίδιο Lonp1 σε δύο νέους πλασμιδιακούς φορείς. Η LonP1 αρχικά βρισκόταν στον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης PCMV6-XL4 παρόλο αυτά δεν μπόρεσε να πραγματοποιηθεί υπερέκφραση του γονιδίου LonP1 σε ικανοποιητικό ποσοστό σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές όπως τις 3T3, Neuro2A και SH-SY5Y. Για τον λόγο αυτό υποκλωνοποιήθηκε σε δύο νέους πλασμιδιακούς φορείς, στον AcGFP1-N1 και στον pDsRED-Monomer-N1.

#### Κύτταρα 3T3



Εικόνα Γ1: Διαμόλυνση κυττάρων 3T3 ταυτόχρονα με τα πλασμίδια pAcGFP1-N1 και με PCMV6-XL4-LonP1 όπου παρατηρείται ότι η υπερέκφραση του γονιδίου LonP1 δεν πραγματοποιείται σε ικανοποιητικό ποσοστό. Το ποσοστό υπερέκφρασης είναι 1/90 κύτταρα. Χρώση πυρήνων: DRAQ5.Φακός 63X.

Ξεκίνησε προσπάθεια δοκιμής διάφορων εκκινητών που υπήρχαν στο εργαστήριο μας ώστε με τον κατάλληλο συνδυασμό τους να παραχθεί όλο το επιθυμητό γονίδιο LonP1 μεγέθους 2880bp.



ΕΙΚΟΝΑ Γ2: Πιθανοί συνδυασμοί εκκινητών και οι θέσεις τους πάνω στο γονίδιο LonP1.

**262:**TCACACACATCCACCTGCCATGTGC  
**546:**CTTAAGCTTATGGCGGCGAGCACT  
**547:**GGTTCAAGGCAATGATGTCC  
**548:**CAGGATCCTAACCGTTCCAC  
**549:**CTTAAGCTTATGGCGGCGAGCACTGGCT  
**252:**GCAATGGTCTTCTCCTTGATGC  
**258:**CTTCAGACACTGGATGATCTTCCC  
**259:**GGACAACCACTCCTCTGAGTTC

Εικόνα Γ3: Αλληλουχίες εκκινητών και οι αριθμοί που αντιστοιχεί ο καθένας.

### PCR.1

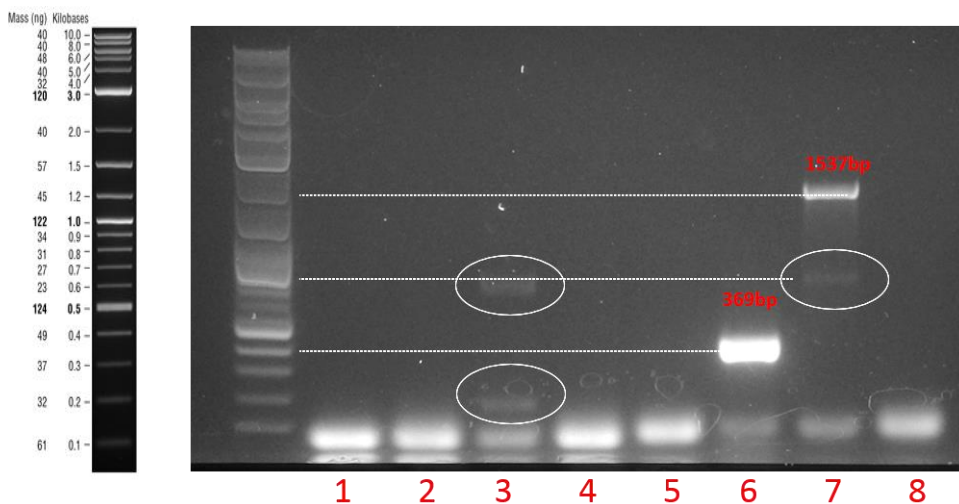
Η πρώτη PCR έγινε με την χρήση πολυμεράσης Taq και με διαφορετικό συνδυασμό εκκινητών ώστε να ελεγχθεί εάν παράγονται τα συγκεκριμένα τμήματα του γονιδίου καθώς και να γίνει έλεγχος στην λειτουργία των εκκινητών που υπήρχαν στο εργαστήριο στις παρακάτω συνθήκες:

A/A	Primer set	Temp (°C)
1	548-549	60
2	546-549	60
3	546-258	60
4	546-252	60
5	546-547	60
6	262-547	60
7	259-547	60
8	546-547	60

### PCR PROGRAM

94°C 2MIN	
94°C 30SEC	} X40
60°C 30 SEC	
72°C 2MIN	
72°C 10MIN	
4°C	

REAGENTS	X1	X10	INITIAL CONC.	FINAL CONC.
H <sub>2</sub> O	37,4μl	374 μl		
10X BUFFER	5 μl	50 μl	10x	1x
DNTPS	0,4μl	4 μl	25mM	0,2mM
PRIMER-S	1 μl	- μl	20pmol/μl	0,4pmol
PRIMER-A	1 μl	- μl	20pmol/μl	0,4pmol
MGCL2	3	30	67mM	1,34mM
TEMPLATE	2μl (2ngr)			
TAQ(MINOTECH)	0.2 μl	2 μl	5U/μl	0.025U/μl



**ΕΙΚΟΝΑ Γ3: 1% πήκτωμα αγαρόζης με GelRed (4μl/100ml), 90Volt 40λεπτά.**

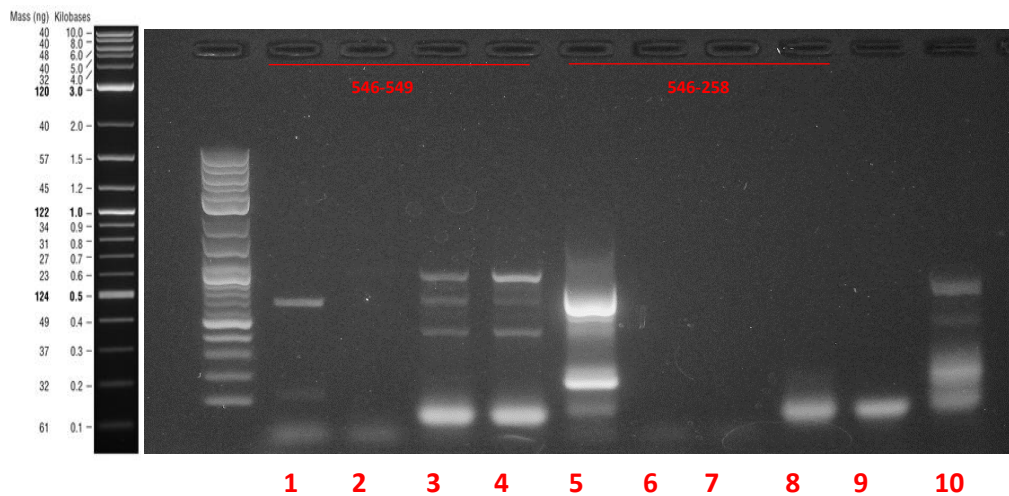
Παρατηρείται ότι σε κάθε συνδυασμό των εκκινητών 548 και 546 η PCR δεν έχει δουλέψει. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι η θερμοκρασία του annealing που πραγματοποιήθηκε στους 60°C δεν ήταν η κατάλληλη ή ότι η αλληλουχία των 546 και 548 δεν ταυτίζεται σε κάποια νουκλεοτίδια κοντά στο 3' του εκκινητή με την αλληλουχία της LonP1 του PCMV6-XL4 λόγω SNPs. Οι εκκινητές με αριθμό 262,547 και 259 λειτουργούν ικανοποιητικά και παράγουν στις συνθήκες αυτές το επιθυμητό τμήμα του γονιδίου. Ακολούθησε δεύτερη προσπάθεια με αλλαγή στις συνθήκες, συγκεκριμένα έγινε PCR για τα προϊόντα 546-549 και 546-258 σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες (72°C 68.6°C, 61.4°C και 56.2 °C). Επιπλέον πραγματοποιήθηκε rePCR για την τρίτη συνθήκη σε θερμοκρασία annealing 61.4°C με τα ζεύγη εκκινητών 546-549 και 546-258.

## PCR.2

REAGENTS	X1	X10	INITIAL CONC.	FINAL CONC.
H <sub>2</sub> O	37,4μl	374 μl		
10X BUFFER	5 μl	50 μl	10x	1x
DNTPS	0,4μl	4 μl	25mM	0,2mM
PRIMER-S	1 μl	- μl	20pmol/μl	0,4pmol
PRIMER-A	1 μl	- μl	20pmol/μl	0,4pmol
MGCL2	3	30	67mM	1,34mM
TEMPLATE	2μl (2ngr)			
TAQ(MINOTEC H)	0.2 μl	2 μl	5U/μl	0.025U/μl
FINAL VOLUME	50 μl			



A/A	PRIMER SET	TEMP (°C)	PCR PROGRAM
1	546-549	72	94°C 2MIN
2	546-549	68.6	94°C 30SEC
3	546-549	61.4	60°C 30 SEC } X40
4	546-549	56.2	72 °C 1.5MIN }
5	546-258	72	72 °C 10MIN
6	546-258	68.6	4 °C
7	546-258	61.4	
8	546-258	56.2	
9	546-549	rePCR 3 *61.4	
10	546-258	rePCR 3 *61.4	



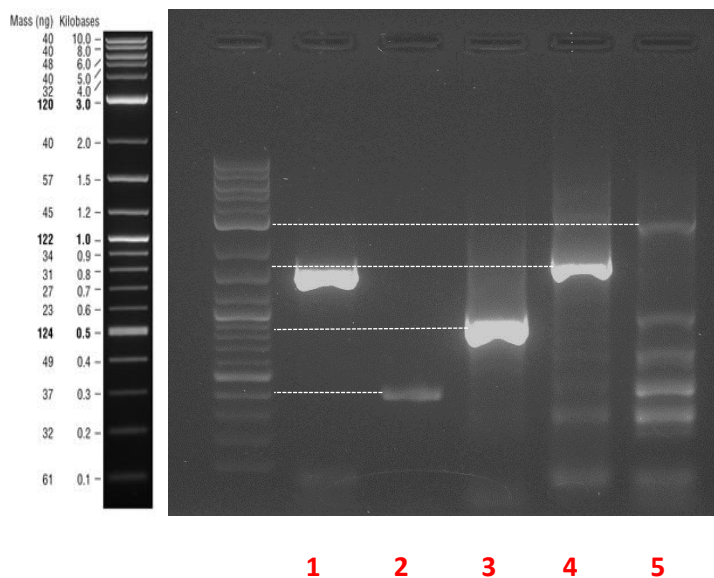
**ΕΙΚΟΝΑ Γ4: 1% πήκτωμα αραρόζης με GelRed (4μl/100ml), 90Volt 40λεπτά.**

Σε αυτή την περίπτωση οι ζώνες οι οποίες θα περιμέναμε για το ζεύγος εκκινητών 546-549 είναι στα 955bp ενώ για το ζεύγος 546-258 είναι στα 1730bp. Όσο αφορά το ζεύγος εκκινητών 546-549 δεν παράγεται ούτε και σε αυτές τις συνθήκες το επιθυμητό τμήμα του γονιδίου. Όσο αφορά το ζεύγος εκκινητών 546-258 δεν παράγεται ούτε και σε αυτή την περίπτωση το επιθυμητό τμήμα αλλά και εικόνα μας δείχνει ότι ο εκκινητής 258 δεν είναι λειτουργικός. Συνεχίζοντας ελέγχθηκαν άλλα ζεύγη εκκινητών για την παραγωγή διαφορετικών τμημάτων του γονιδίου.

### PCR.3

REAGENTS	X1	X10	INITIAL.CONC.	FINAL CONC.
H <sub>2</sub> O	37,4μl	374 μl		
10x Buffer	5 μl	50 μl	10x	1x
DNTPs	0,4μl	4 μl	25mM	0,2mM
Primer-s	1 μl	- μl	20pmol/μl	0,4pmol
Primer-a	1 μl	- μl	20pmol/μl	0,4pmol
MgCl <sub>2</sub>	3	30	67mM	1,34mM
Template	2μl(2ngr)			
Taq(Minotech)	0.2 μl	2 μl	5U/μl	0.025U/μl
Final volume	50 μl			

A/A	PRIMER SET	TEMP (°C)	PCR PROGRAM
<b>1</b>	259-547	60	98°C 30SEC
<b>2</b>	259-258	65	98°C 5SEC
<b>3</b>	548-549	65	65°C 30 SEC } X40
<b>4</b>	548-258	65	72 °C 1MIN } X40
<b>5</b>	548-547	65	72 °C 2MIN
			4 °C



**ΕΙΚΟΝΑ Γ5: 1% πήκτωμα αραρόζης με GelRed (4μl/100ml), 90Volt 40λεπτά.**

Όσο αφορά τα ζεύγη εκκινητών 259-547,259-258,548-549 και 548-258 τα τμήματα του γονιδίου παράγονται σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό. Στο ζεύγος 548-547 που παράγει όλο το γονίδιο της LonP1 παρατηρείται ζώνη στα 2880bp παρόλο αυτά όμως οι συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές καθώς δεν παράγεται μόνο αυτό αλλά υπάρχουν και αρκετές μη ειδικές ζώνες χαμηλότερα. Παρόλο αυτά θετικό είναι το γεγονός ότι υπάρχει προϊόν στα 2880bp και λόγο αυτού χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια μόνο το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών σε διαφορετικές συνθήκες καθώς και με διαφορετικά ήδη PCR. Έγινε δοκιμή με PCR-TOUCH UP και PCR-TOUCH DOWN. Για ακόμα καλύτερα αποτελέσματα επιλέχθηκε αυτή την φορά η Q5 πολυμεράση.

## PCR.4

REAGENTS	X1	INITIAL CONC	FINAL CONC.
H2O	11,3μl		
5X BUFFER	5 μl	5x	1x
DNTPS	0,2μl	25mM	0,2mM
PRIMER-S	0,625μl	20pmol/μl	0,4pmol
PRIMER-A	0,625 μl	20pmol/μl	0,4pmol
ENHANCER	5 μl		1x
TEMPLATE	2μl (2ngr)		
Q5 BIOLABS	0.25 μl	0,25U/μl	0.02U/μl
FINAL VOLUME	25 μl		

### PCR PROGRAM

98°C 30SEC
98°C 5SEC
50-72 °C 30 SEC
72 °C 2MIN
4 °C

### Συνθήκες για annealing:

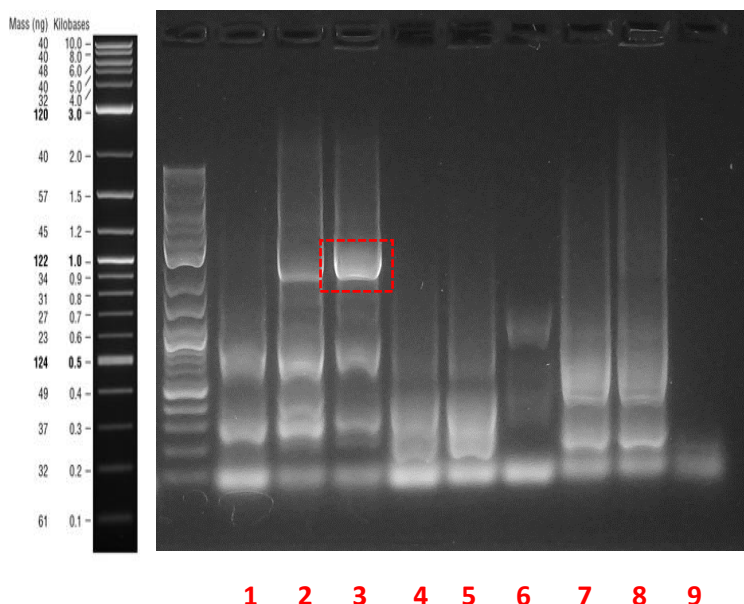
- 1: σταθερά 60 °C για 40 κύκλους
- 2: 60 °C για 20 κύκλους/65 °C για 20 κύκλους
- 3:σταθερά 65 °C για 40 κύκλους

### PCR-TOUCH DOWN

- 4:2 κύκλοι 72°C και κάθε 2 κύκλοι -1°C ..... 52°C(template x1)
- 5:2 κύκλοι 72°C και κάθε 2 κύκλοι -1°C ..... 52°C(template x2)
- 6:H<sub>2</sub>O

### PCR-TOUCH UP

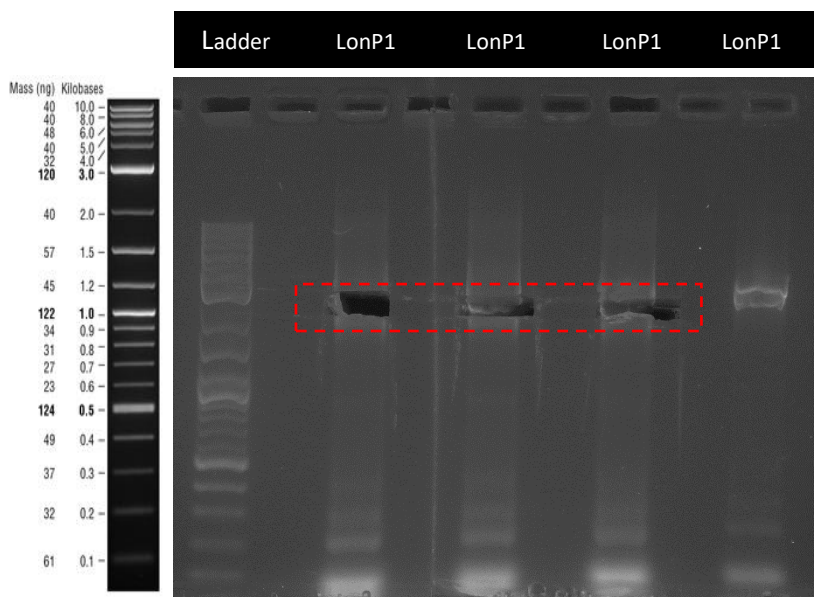
- 7:2 κύκλοι 52°C και κάθε 2 κύκλοι +1°C ..... 72°C(template x1)
- 8:2 κύκλοι 52°C και κάθε 2 κύκλοι +1°C ..... 72°C(template x2)
- 9:H<sub>2</sub>O



ΕΙΚΟΝΑ Γ5: 1% πήκτωμα αгарόζης με GelRed (4μl/100ml), 90Volt 40λεπτά.

Η PCR-TOUCH UP και TOUCH DOWN δεν έδωσαν κάποιο αποτέλεσμα, δεν μπόρεσε να παραχθεί όλο το επιθυμητό γονίδιο της LonP1. Παρόλο αυτά παρατηρήθηκε ότι σε annealing 65°C αυτή την φορά υπάρχει πιο ενισχυμένη η ζώνη στα 2880bp κάτι που είναι ενθαρρυντικό για την συνέχεια και για την απομόνωση της επιθυμητής μπάντας. Ακολούθησε τελική PCR με σκοπό την απομόνωση της μπάντας στα 2880bp (Gel extraction), το προϊόν PCR μοιράστηκε στην πηκτική για ακριβέστερη απομόνωση.

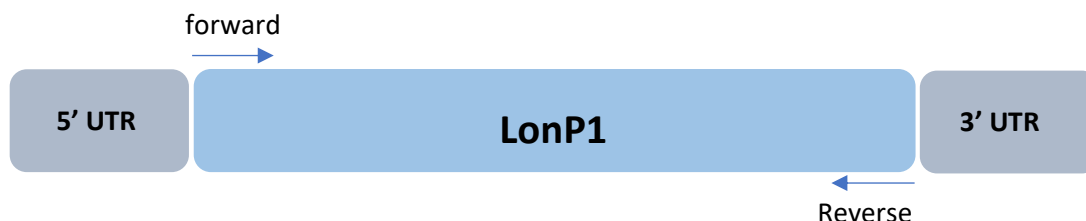
REAGENTS	VTEL=75ML	PCR PROGRAM
H <sub>2</sub> O	33,9 μl	98°C 30SEC
5x buffer Q5	15μl	98°C 5SEC
dNTPs	0,6μl	65°C 30 SEC } X40
Primers(a,s)	1,875μl	72 °C 1MIN }
Q5 pol	0,75μl	72 °C 2MIN
Q5 enhancer	15μl	4 °C
plasmid	6μl	



**ΕΙΚΟΝΑ Γ6: 1% πήκτωμα αγαρόζης με GelRed (4μl/100ml), 90Volt 40λεπτά. Απομόνωση με Gel extraction επιθυμητής μπάντας στα 2880bp.**

Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στον σχεδιασμό των εκκινητών για την παραγωγή μίας γονιδιακής αλληλουχίας η οποία δεν είναι καλό να υπερβαίνει κατά πολύ των αριθμό νουκλεοτιδίων του αρχικού γονιδίου. Επίσης δόθηκε προσοχή στην διατήρηση του πλαισίου ανάγνωσης ώστε εξ 'αρχής να σχεδιαστεί in frame, συνυπολογίζοντας και προμελετώντας το ακριβές σημείο του πλασμιδιακού φορέα που θα εντεθεί στο γονίδιο.

## Γ.2. Σχεδιασμός εκκινητών και παραγωγή της LonP1 μέσω PCR



**ΕΙΚΟΝΑ Γ7:Σημεία εκκινητών πάνω στο γονίδιο LonP1.**

Και οι δύο εκκινητές σχεδιάστηκαν έτσι ώστε στην άκρη του καθενός να υπάρχει θέση αναγνώρισης από περιοριστικά ένζυμα. Αυτό επιλέχθηκε διότι εύκολα στην συνέχεια θα μπορεί να εισαχθεί το γονίδιο στους νέους πλασμιδιακούς φορείς.

**Forward: Θέση αναγνώρισης από HindIII**

**Reverse: θέση αναγνώρισης από BamHI**

5'-CTT**AAGCTT**ATGGCGGCGAGCACT-3'

5'-CAG**GATCCTAA**CCGTTCCAC-3'

↑  
Κωδικόνιο  
έναρξης

↑  
Μεταλλαγμένο  
Κωδικόνιο λήξης

Επιπλέον επιλέχθηκε ο Reverse εκκινητής να σχεδιαστεί με μετάλλαξη στο κωδικόνιο λήξης ώστε να μπορούμε να αξιοποιήσουμε την θέση αναγνώρισης από το ένζυμο BamHI.

- Ακολούθησε **PCR-CLEAN UP** με σκοπό τον καθαρισμό και απομόνωση όλου του γονιδίου LonP1.
- Δημιουργία **A-OVERHANGS** με PCR με σκοπό την εισαγωγή του γονιδίου σε πλασμιδιακό φορέα TOPO TA.

REAGENTS	VOL	°C	TIME
Pcr product	-	94	2 min
dATP(10mM)	0,4μl	72	20 min
Pcr buffer 10X	5μl	4	∞
MgCL <sub>2</sub>	3μl		
Polymer Taq	0,2μl		

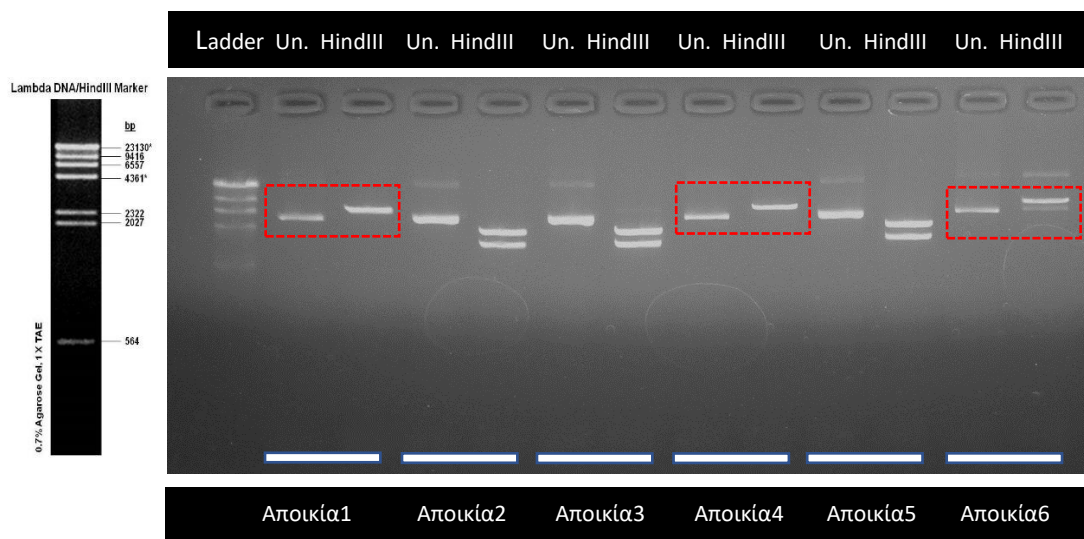
- Αντίδραση εισαγωγής στον TOPO TA και επώαση 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



REAGENTS	VOL.
PCR product	3μl
Salt	1μl
TOPO	0,5μl
H <sub>2</sub> O	1,5μl

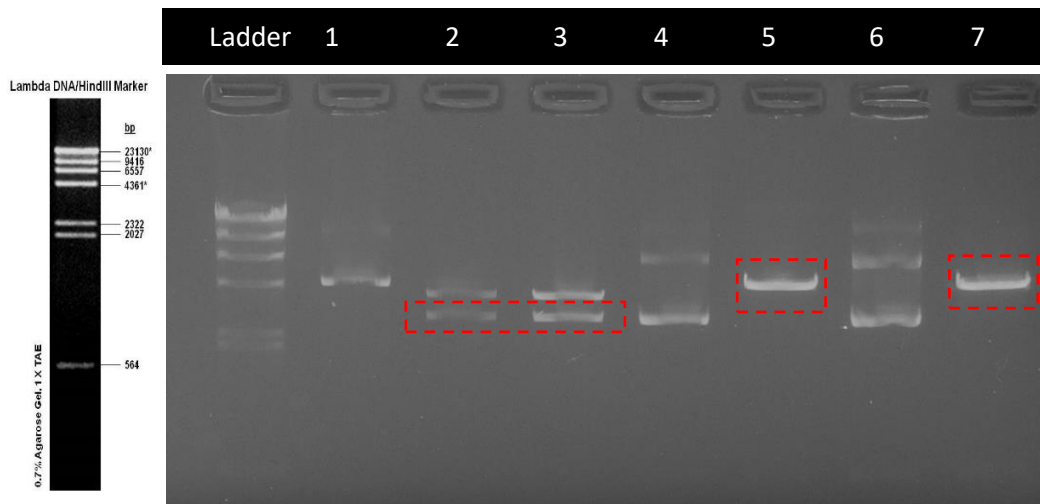
- Ακολούθησε διαδικασία μετασχηματισμού σε επιδεκτικά βακτήρια DH5a,επίστρωση σε τρυβλίο με LB-agar, εμβολιασμός και τέλος παρασκευή πλασμιδιακού DNAσε μικρή κλίμακα (Mini-prep).

Για να ελεγχθεί εάν η ένθεση στον πλασμιδιακό φορέα έχει γίνει σωστά , έγινε διαγνωστικός έλεγχος με περιοριστικές πέψεις και συγκεκριμένα με την χρήση του ενζύμου HindIII το οποίο γραμμοποιεί το επιθυμητό πλασμίδιο. Μετά την γραμμοποίηση του πλασμιδίου λαμβάνεται προϊόν μεγέθους 7580bp. Πραγματοποιήθηκαν πέψεις σε 6 διαφορετικές αποικίες.



**ΕΙΚΟΝΑ Γ7:** 1% πήκτωμα αγαρόζης με GelRed (4μl/100ml), 90Volt. Διαγνωστικές πέψεις με περιοριστικό ένζυμο HindIII.

Από τις παραπάνω πέψεις το συμπέρασμα είναι ότι κατάλληλες είναι οι αποικίες 1 , 4 και 6, οπότε μία από αυτές θα επιλεγεί για την συνέχεια. Για να γίνει εφικτή η ένθεση όλου του γονιδίου της LonP1 αξιοποιήθηκαν οι θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων των σχεδιασμένων εκκινητών. Ακολούθησαν διπλές περιοριστικές πέψεις με τα ένζυμα HindIII και BamHI στον πλασμιδιακό φορέα TOPO-TA-LonP1 και στους δύο νέους πλασμιδιακούς φορείς, τον AcGFP1-N1 και τον pDsRED-Monomer-N1. Τέλος πραγματοποιήθηκε απομόνωση των επιθυμητών μαντών (Gel extraction) από την πηκτή αγαρόζης.

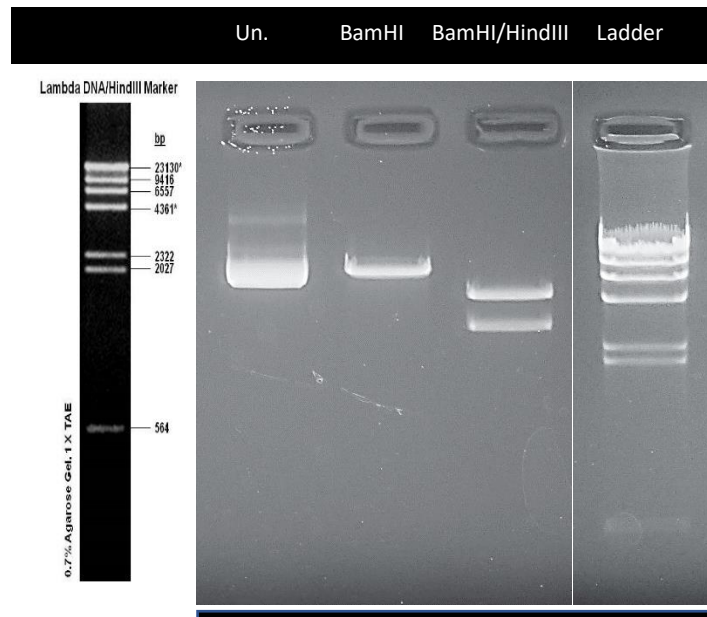


**ΕΙΚΟΝΑ Γ8:** 1% πήκτωμα αγαρόζης με GelRed (4μl/100ml), 90Volt. Διπλές πέψεις με περιοριστικά ένζυμά HindIII και BamHI.

1	LAMDAHINDIII
2	TOPO-TA-LonP1 Un.
3	TOPO-TA-LonP1 BamHI/HindIII
4	TOPO-TA-LonP1 BamHI/HindIII
5	pAcGFP-N1un (4.7Kb)
6	pAcGFP-N1 BamHI-HindIII
7	dsRED-N1un (4.7Kb)
8	dsRED-N1 BamHI-HindIII

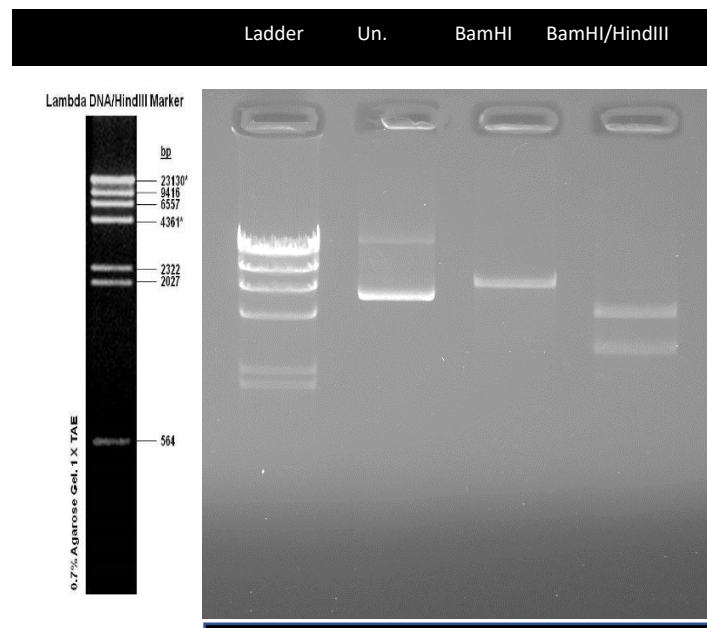
Ακολούθησε απομόνωση των επιθυμητών μπαντών του γονιδίου LonP1 καθώς και των δύο γραμμοποιημένων πλασμιδιακών φορέων. Μετά από διπλή περιοριστική πέψη με BamHI και HindIII στο πλασμίδιο TOPO-TA-LonP1 εξάγεται όλο το γονίδιο και πολύ εύκολα εισάγεται στους νέους πλασμιδιακούς φορείς που έχουν κοπεί κατά τον ίδιο τρόπο.

- **PCR-CLEAN UP** με σκοπό τον καθαρισμό και απομόνωση του επιθυμητού γονιδίου αλλά και των γραμμοποιημένων πλασμιδιακών φορέων.
- Αντίδραση σύνδεσης (ligation)
- Μετασχηματισμός σε επιδεικτικά βακτήρια DH5a, επίστρωση σε τρυβλίο με LB-agar, εμβολιασμός και τέλος παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Mini-prep).



**pAcGFP-N1-LonP1**

**ΕΙΚΟΝΑ Γ9: 1% πήκτωμα αгарόζης με GelRed (4μl/100ml), 90Volt. Διαγνωστικές πέψεις για τον έλεγχο επιτυχούς ένθεσης του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα pAcGFP-N1.**



**dsRED-N1-LonP1**

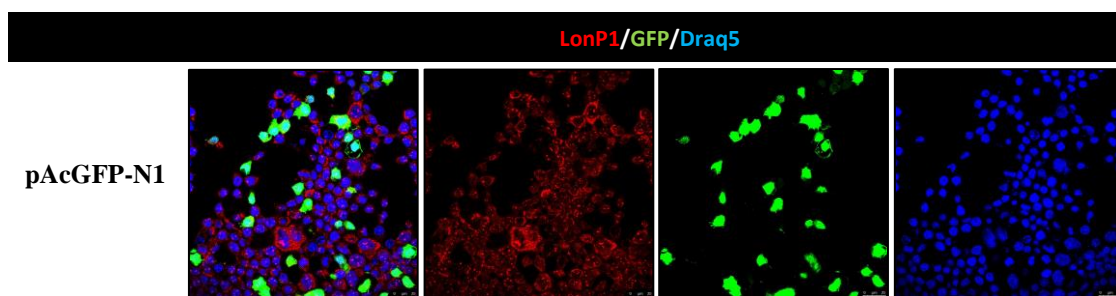
**ΕΙΚΟΝΑ Γ9: 1% πήκτωμα αгарόζης με GelRed (4μl/100ml), 90Volt. Διαγνωστικές πέψεις για τον έλεγχο επιτυχούς ένθεσης του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα dsRED-N1.**

Παρατηρείται ότι και τα δύο πλασμίδια αφενός γραμμοποιούνται και αφετέρου όταν γίνει διπλή πέψη εξάγεται όλο το γονίδιο της LonP1 μεγέθους 2880bp.

### Γ.3. Έλεγχος λειτουργικότητας των νέων πλασμιδιακών φορέων pLonP1-AcGFP-N1 και pLonP1-dsRED-N1

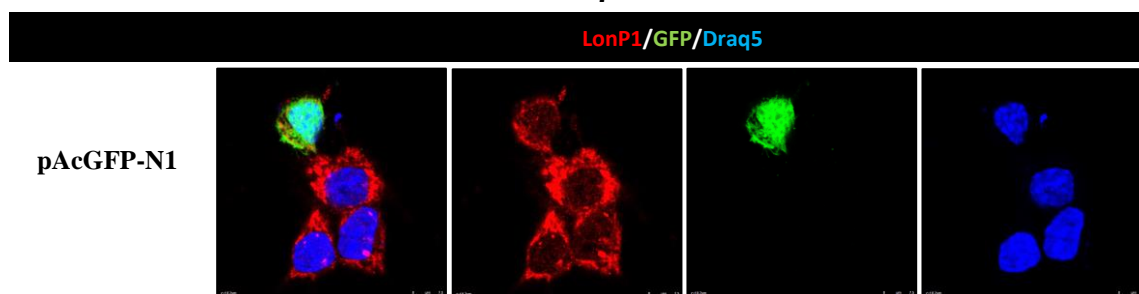
Οι νέοι πλασμιδιακοί φορείς οι οποίοι παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μας είναι απαραίτητο να ελεγχθούν ως προς την λειτουργικότητά τους. Συγκεκριμένα ελέγχθηκε εάν η πρωτεΐνη LonP1 εκφράζεται, καθώς και εάν αναγνωρίζεται από το αντίσωμα Anti-LonP1(Rabbit) κατά την διαδικασία του ανοσοφθορισμού (ICC). Εάν κατά τον ανοσοφθορισμό ο πλασμιδιακός φορέας pLonP1-AcGFP-N1 φθορίζει πράσινο χρώμα και ο pLonP1-dsRED-N1 φθορίζει κόκκινο χρώμα, σημαίνει ότι έχει διατηρηθεί το πλαίσιο ανάγνωσης και οι δύο πλασμιδιακοί φορείς είναι in frame με το GFP και το dsRED αντίστοιχα. Είναι σημαντικό κατά την διαδικασία της παρασκευής των πλασμιδίων να μην έχει καταστραφεί το γονίδιο αλλά και να διατηρηθεί το πλαίσιο ανάγνωσης (In frame). Ακολούθησε πείραμα διαμόλυνσης κυττάρων, συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Neuro2A, με την μέθοδο κατιονικών πολυμερών (PEI) και έπειτα ακολούθησε ανοσοφθορισμός (ICC).

#### Κύτταρα Neuro2A



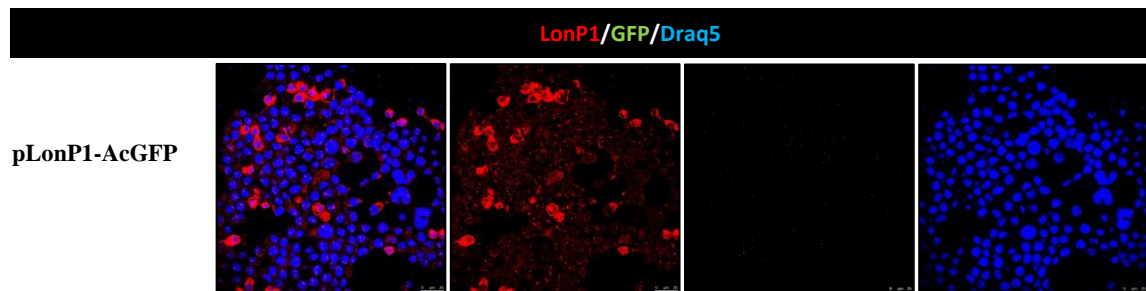
ΕΙΚΟΝΑ Γ10: Διαμόλυνση κυττάρων Neuro2A με το πλασμίδιο pAcGFP-N1 και χρήση πρωτογενούς αντισώματος LonP1(anti-Rabbit Red). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5(blue). Φακός 63X.

#### Κύτταρα Neuro2A



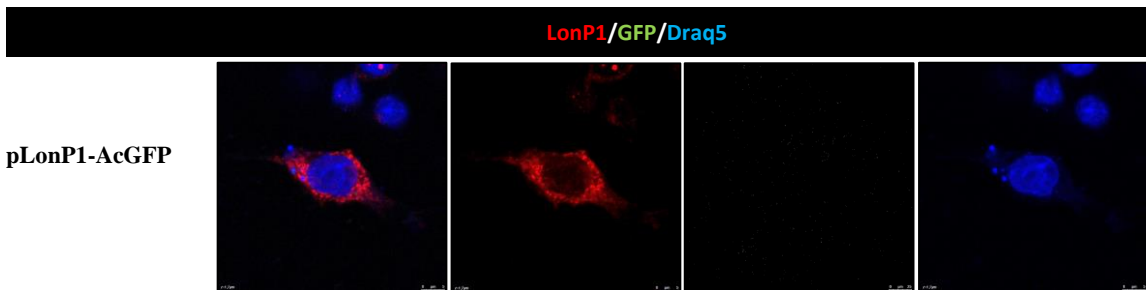
ΕΙΚΟΝΑ Γ11: Διαμόλυνση κυττάρων Neuro2A με το πλασμίδιο pAcGFP-N1 και χρήση πρωτογενούς αντισώματος LonP1(anti-Rabbit Red). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5 (blue). Φακός 100X.

## Κύτταρα Neuro2A



ΕΙΚΟΝΑ Γ12: Διαμόλυνση κυττάρων Neuro2A με το πλασμίδιο pLonP1-AcGFP και χρήση πρωτογενούς αντισώματος LonP1(anti-Rabbit Red). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5(blue). Φακός 63X.

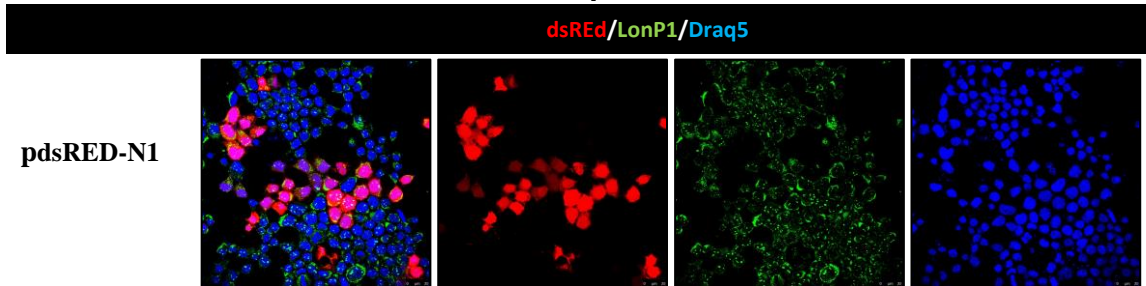
## Κύτταρα Neuro2A



ΕΙΚΟΝΑ Γ13: Διαμόλυνση κυττάρων Neuro2A με το πλασμίδιο pLonP1-AcGFP και χρήση πρωτογενούς αντισώματος LonP1(anti-Rabbit Red). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5(blue). Φακός 100X.

Μετά από την διαδικασία του ανοσοφθορισμού (ICC) παρατηρείται ότι το γονίδιο της LonP1 εκφράζεται καθώς αναγνωρίζεται από το αντίσωμα Anti-LonP1(Rabbit). Η πρωτεΐνη Lon εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα (κόκκινο χρώμα). Παρόλο αυτά όμως δεν παρατηρείται το πράσινο φθορίζον χρώμα του GFP, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι χάλασε το πλαίσιο ανάγνωσης (Frame) κατά την παρασκευή του πλασμιδιακού φορέα pLonP1-AcGFP.

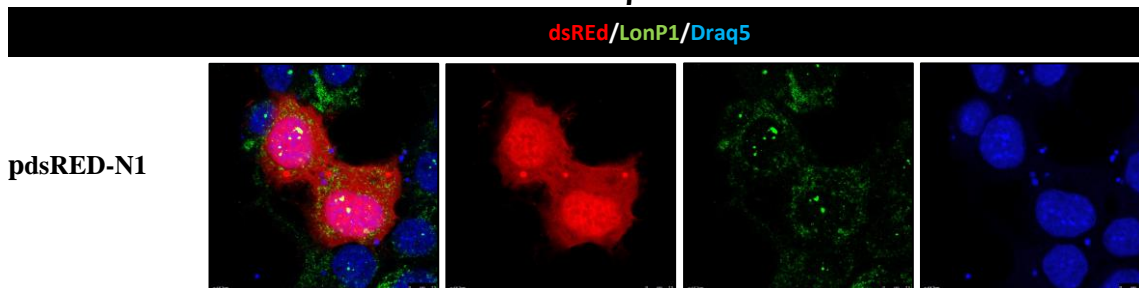
## Κύτταρα Neuro2A



ΕΙΚΟΝΑ Γ14: Διαμόλυνση κυττάρων Neuro2A με το πλασμίδιο pdsRED-N1 και χρήση πρωτογενούς αντισώματος LonP1(anti-Rabbit Green). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5(blue). Φακός 63X.

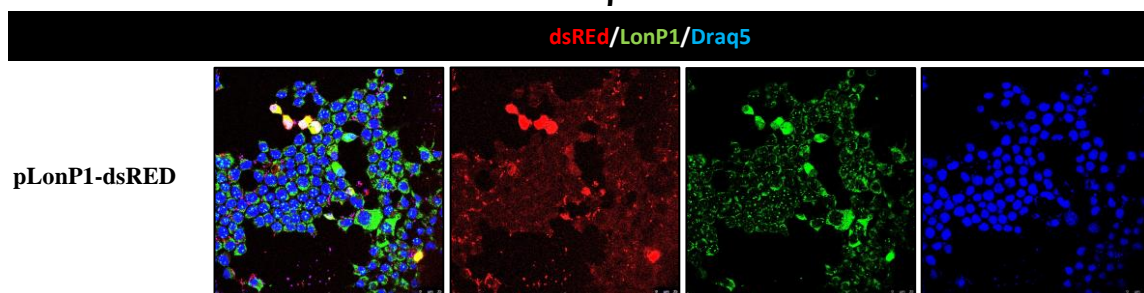


### Κύτταρα Neuro2A



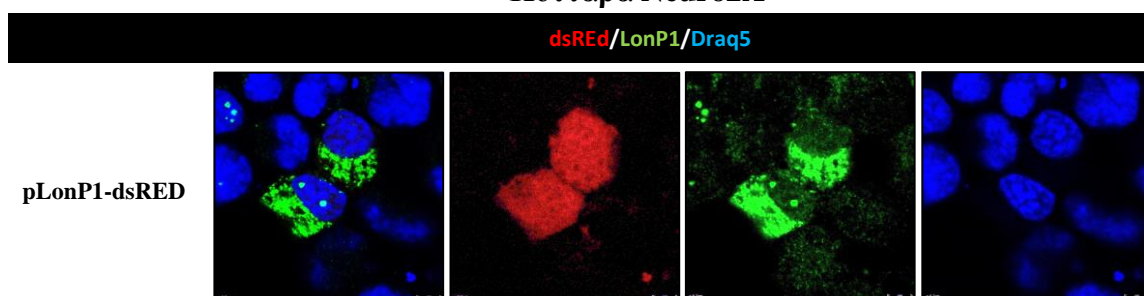
**ΕΙΚΟΝΑ Γ15:** Διαμόλυνση κυττάρων Neuro2A με το πλασμίδιο pdsRED-N1 και χρήση πρωτογενούς αντισώματος LonP1(anti-Rabbit Green). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5(blue). Φακός 100X.

### Κύτταρα Neuro2A



**ΕΙΚΟΝΑ Γ16:** Διαμόλυνση κυττάρων Neuro2A με το πλασμίδιο pLonP1-dsRED και χρήση πρωτογενούς αντισώματος LonP1(anti-Rabbit Green). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5(blue). Φακός 63X.

### Κύτταρα Neuro2A

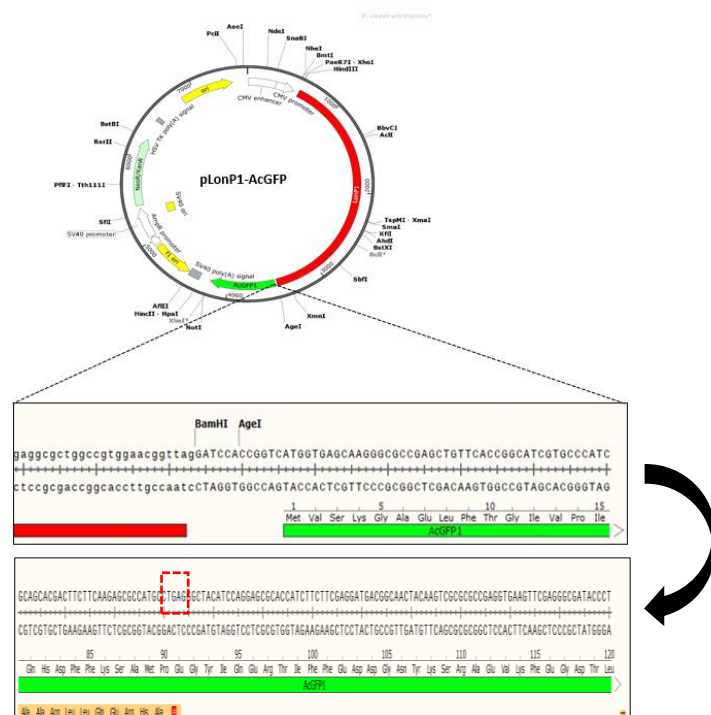


**ΕΙΚΟΝΑ Γ17:** Διαμόλυνση κυττάρων Neuro2A με το πλασμίδιο pLonP1-dsRED και χρήση πρωτογενούς αντισώματος LonP1(anti-Rabbit Green). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5(blue). Φακός 100X.

Το γονίδιο της LonP1 εκφράζεται και από τον πλασμιδιακό φορέα pLonP1-dsRED καθώς αναγνωρίζεται και αυτό από το αντίσωμα Anti-LonP1 (Rabbit). Και σε αυτή την περίπτωση η Lon εντοπίζεται ειδικά στα μιτοχόνδρια όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα (πράσινο χρώμα). Παρόλο αυτά υπάρχει και σε αυτόν τον πλασμιδιακό φορέα πρόβλημα διότι ενώ το φθορίζον κόκκινο χρώμα του dsRED φαίνεται, δεν είναι ειδικό, δηλαδή δεν συνεντοπίζεται με το πράσινο χρώμα του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε. Και σε αυτή την περίπτωση, επειδή και τα δύο πλασμίδια παρασκευάστηκαν κατά τον ίδιο τρόπο, είναι πιθανό να έχει χαλάσει το πλαίσιο ανάγνωσης (frame) του πλασμιδιακού φορέα pLonP1-dsRED.

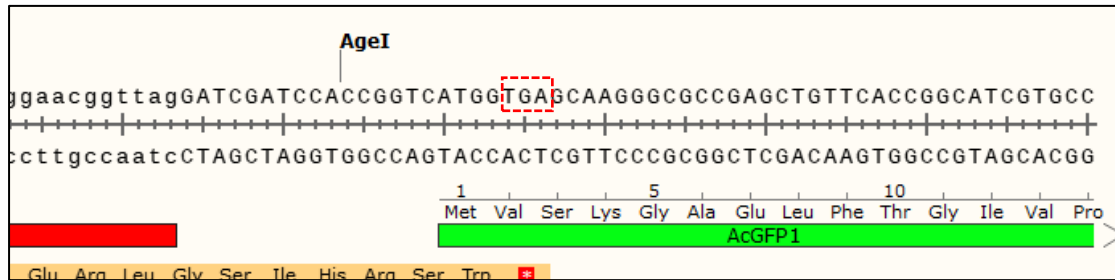
#### Γ.4. Διαδικασία επιδιόρθωσης πλασμιδιακού φορέα pLonP1-AcGFP

Το λάθος το οποίο συνέβη κατά την παρασκευή των δύο πλασμιδιακών φορέων ξεκίνησε από την αρχή. Οι εκκινητές που υπήρχαν στο εργαστήριο μας δεν διατήρησαν σωστό το πλαίσιο ανάγνωσης (in frame) μετά την ένθεση του γονιδίου στους συγκεκριμένους πλασμιδιακούς φορείς. Συγκεκριμένα όταν το γονίδιο εισάγεται στον νέο πλασμιδιακό φορέα για να διατηρηθεί το πλαίσιο ανάγνωσης σωστό χρειάζονται επιπλέον δύο νουκλεοτίδια. Η BamHI χάλασε το πλαίσιο ανάγνωσης (frame) με αποτέλεσμα είναι να δημιουργείται κωδικόνιο λήξης στα πρώτα 100 αμινοξέα του GFP και να μην μπορεί να εκφραστεί.



**ΕΙΚΟΝΑ Γ18: Απεικόνιση πλασμιδιακού φορέα pLonP1-AcGFP.Α)Πλαίσιο ανάγνωσης μετά την ένθεση του γονιδίου LonP1 στον πλασμιδιακό φορέα AcGFP-N1,Β)Η BamHI χάλασε το πλαίσιο ανάγνωσης (frame) του GFP με αποτέλεσμα να δημιουργείται κωδικόνιο λήξης στα πρώτα 100 αμινοξέα του GFP.**

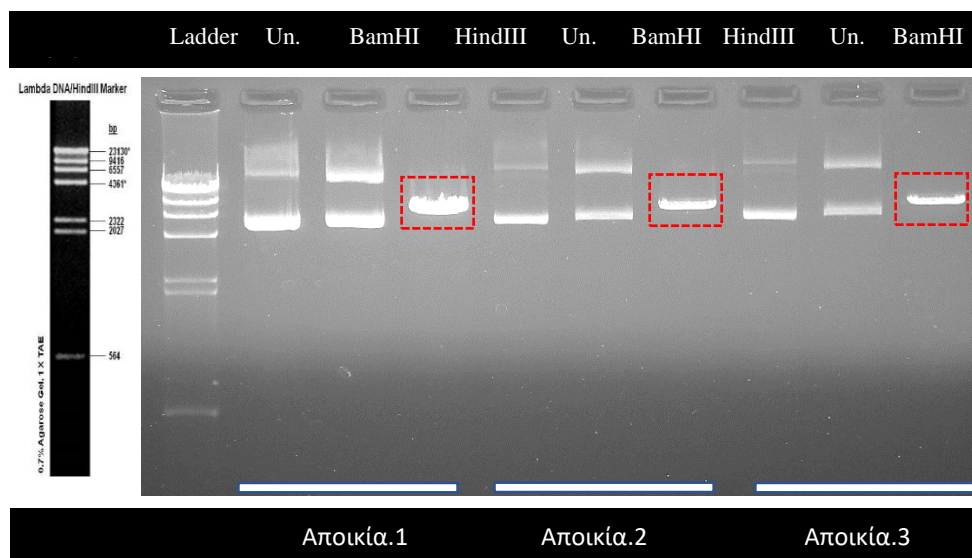
Μεταξύ αλληλουχίας LonP1 και GFP υπάρχουν θέσεις αναγνώρισης από δύο περιοριστικά ένζυμα, την BamHI και την AgeI. Θα αξιοποιηθούν αυτά τα ένζυμα ώστε με δύο αντιδράσεις Klenow να διορθωθεί το πλαίσιο ανάγνωσης. Η πρώτη αντίδραση Klenow με το περιοριστικό ένζυμο BamHI παράγει το πλασμίδιο pLonP1(BamHI)-AcGFP που θα είναι λειτουργικό και παράλληλα ισοδύναμο με pLonP1-AcGFP (STOP) καθώς μετά από την συγκεκριμένη αντίδραση εισάγεται κωδικόνιο λήξης μεταξύ LonP1 και GFP.



**ΕΙΚΟΝΑ Γ19:** Απεικόνιση αλληλουχίας πλασμιδιακού φορέα pLonP1(BamHI)-AcGFP μετά από αντίδραση Klenow (BamHI). Με κόκκινο πλαίσιο διακρίνεται το κωδικόνιο λήξης που δημιουργείται.

#### Γ.4.1. 1<sup>η</sup> αντίδραση Klenow (BamHI) για την κατασκευή πλασμιδιακού φορέα pLonP1(BamHI)-AcGFP

Αρχικά πραγματοποιήθηκε στο πλασμίδιο pLonP1-AcGFP πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BamHI και έπειτα καθαρισμός του DNA με την διαδικασία φαινόλης-χλωροφόρμιο. Στην συνέχεια έγινε η πρώτη αντίδραση Klenow, απομόνωση επιθυμητής μπάνας (Gel extraction), καθαρισμός του DNA με PCR Clean up KIT, αντίδραση σύνδεσης (ligation), μετασηματισμός σε επιδεκτικά βακτήρια DH5a, επίστρωση σε τρυβλίο με LB-agar, εμβολιασμός και τέλος παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Mini-prep). Τέλος ακολούθησε διαγνωστικός έλεγχος με περιοριστικές πέψεις για να ελεγχθεί εάν η αντίδραση Klenow έγινε με επιτυχία.

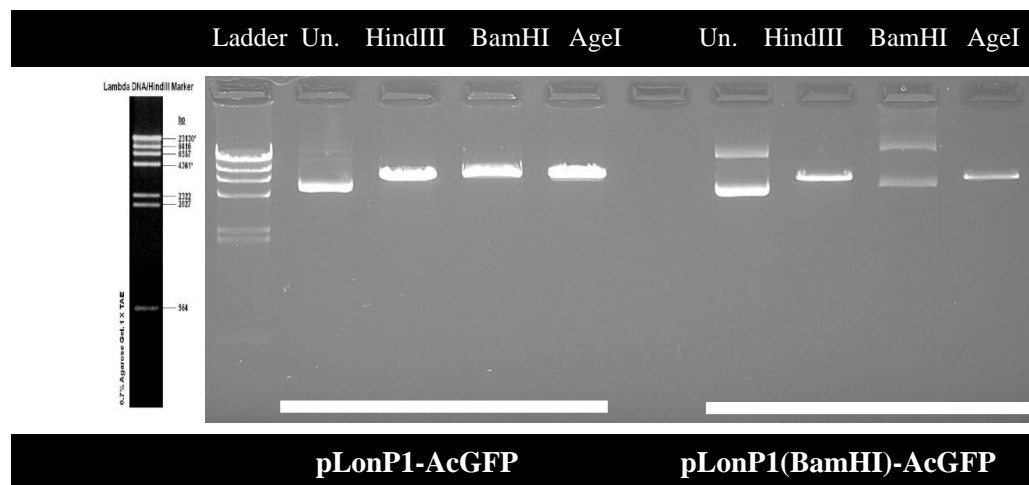


**ΕΙΚΟΝΑ Γ20:** 1% πήκτωμα αгарόζης με GelRed (4μl/100ml), 90Volt. Διαγνωστικές πέψεις με περιοριστικό τα ένζυμα HindIII και BamHI.

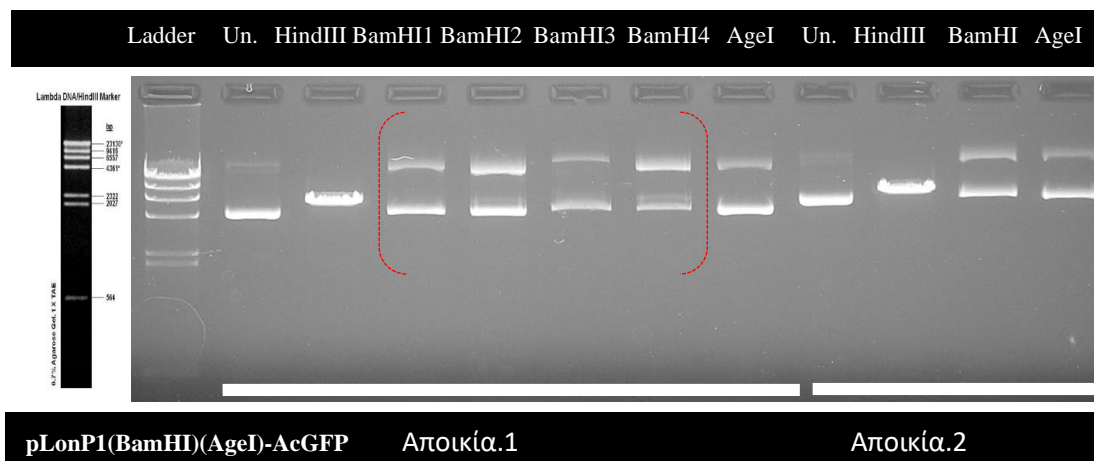
Και οι τρεις αποικίες που επιλέχθηκαν (κόκκινο πλαίσιο) για Παρασκευή πλασμιδίου σε μικρή κλίμακα (Mini Prep) είναι θετικές. Το ένζυμο BamHI δεν μπορεί πλέον να αναγνωρίσει και να κόψει το DNA καθώς έχει χαλάσει η θέση αναγνώρισης για το συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο. Το γραμμοποιημένο πλασμίδιο που προκύπτει μετά από περιοριστική πέψη με HindIII έχει μέγεθος 7578bp.

Γ.4.2. 2<sup>η</sup> αντίδραση Klenow AgeI για την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP.

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με παραπάνω αλλά η περιοριστική πέψη αυτή την φορά έγινε με το ένζυμο AgeI. Ακολούθησε διαγνωστικός έλεγχος με περιοριστικές πέψεις για να ελεγχθεί εάν η αντίδραση Klenow έγινε με επιτυχία.



**ΕΙΚΟΝΑ Γ21:** 1% πήκτωμα αγαρόζης με EtBr (5μl/100ml), 90Volt. Διαγνωστικές πέψεις με περιοριστικά ένζυμα HindIII, BamHI και AgeI.



**ΕΙΚΟΝΑ Γ22:** 1% πήκτωμα αγαρόζης με EtBr (5μl/100ml), 90Volt. Διαγνωστικές πέψεις του πλασμιδίου pAcGFP-N1-LonP1(BamHI)(AgeI) με περιοριστικά ένζυμα HindIII, BamHI και AgeI.

Και οι δύο αποικίες είναι θετικές και οι αντιδράσεις Klepnow έχουν πραγματοποιηθεί. Στην πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BamHI ελέγχθηκαν και κάποια διαφορετικά buffer που υπήρχαν στο εργαστήριο για την καταλληλότητα τους (κόκκινο πλαίσιο). Το πλασμίδιο μετά από αυτή την διαδικασία είναι GFP φθορίζον καθώς διορθώθηκε το πλαίσιο ανάγνωσης (in Frame).

#### Γ.5. Έλεγχος λειτουργίας του πλασμιδίου pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP

Πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων και συγκεκριμένα της κυτταρικής σειράς CHO, με την μέθοδο κατιονικών πολυμερών (PEI), με τον νέο πλασμιδιακό φορέα pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP. Σκοπός είναι να ελεγχθεί εάν έχει διορθωθεί το πλαίσιο ανάγνωσης του πλασμιδιακού φορέα και το πλασμίδιο φθορίζει πράσινο χρώμα (GFP). Έπειτα ακολούθησε διαδικασία ανοσοφθορισμού (ICC).

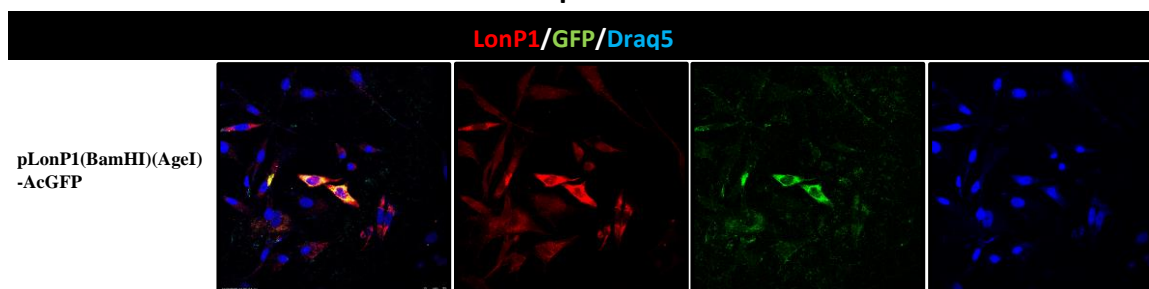
#### Κύτταρα CHO



**ΕΙΚΟΝΑ Γ23:** Διαμόλυνση κυττάρων CHO με το πλασμίδιο pAcGFP-N1 και χρήση πρωτογενούς αντισώματος LonP1(anti-Rabbit Red). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5 (blue). Φακός 63X.

Η ενδογενή πρωτεΐνη LonP1 εντοπίζεται μιτοχondριακά. Η διαμόλυνση με τον πλασμιδιακό φορέα pAcGFP-N1 χρησιμοποιήθηκε ως control.

#### Κύτταρα CHO

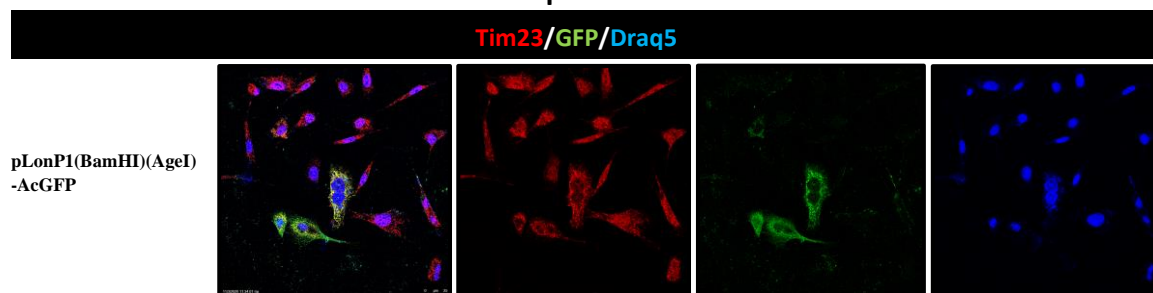


**ΕΙΚΟΝΑ Γ24:** Διαμόλυνση κυττάρων CHO με τον πλασμιδιακό φορέα pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP και χρήση πρωτογενούς αντισώματος LonP1(anti-Rabbit Red). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5 (blue). Φακός 63X.



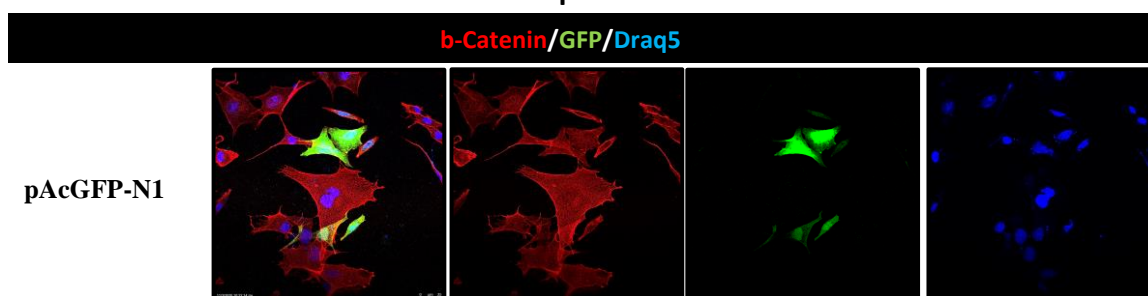
Το τελικό πλασμίδιο που κατασκευάστηκε διορθώθηκε καθώς εκφράζεται η πρωτεΐνη Lon αλλά και το GFP σε ικανοποιητικό βαθμό. Επιπλέον υπάρχει συνεντοπισμός GFP και αντισώματος για LonP1 (Anti-LonP1, Rabbit). Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν και άλλα δύο αντισώματα για να επιβεβαιωθεί η μιτοχondριακή κατανομή του πλασμιδιακού φορέα pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP. Ως μιτοχondριακός δείκτης χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα για την πρωτεΐνη εσωτερικής μιτοχondριακής μεμβράνης Tim23 ενώ ως κυτταροπλασματικός δείκτης το αντίσωμα για β-κατενίνη.

#### Κύτταρα CHO



**ΕΙΚΟΝΑ Γ25:** Διαμόλυνση κυττάρων CHO με το πλασμίδιο pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP και χρήση πρωτογενούς αντισώματος Tim23 (anti-Rabbit Red). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5 (blue). Φακός 63X.

#### Κύτταρα CHO

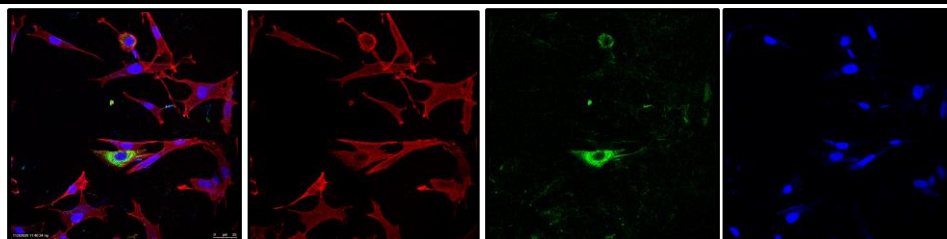


**ΕΙΚΟΝΑ Γ26:** Διαμόλυνση κυττάρων CHO με το πλασμίδιο pAcGFP-N1 και χρήση πρωτογενούς αντισώματος b-Catenin (anti-Rabbit Red). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5 (blue). Φακός 63X.

## Κύτταρα CHO

b-Catenin/GFP/Draq5

pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP



**ΕΙΚΟΝΑ Γ27:** Διαμόλυνση κυττάρων CHO με το πλασμίδιο πλασμίδιο pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP και χρήση πρωτογενούς αντισώματος b-Catenin (anti-Rabbit Red). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5(blue). Φακός 63X.

Υπάρχει συνεντοπισμός πλασμιδιακού φορέα pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP με τον μιτοχondριακό δείκτη Tim23, κάτι που αποτελεί ένδειξη ότι το νέο πλασμίδιο είναι πλήρως λειτουργικό και εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Ένας ακόμη δείκτης που χρησιμοποιήθηκε είναι η β-κατενίνη. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης, μας επιβεβαίωσε ότι η Lon εντοπίζεται μιτοχondριακά.

### Γ.6. Κατασκευή της μεταλλαγμένης μορφής LonP1(R721G)-Human

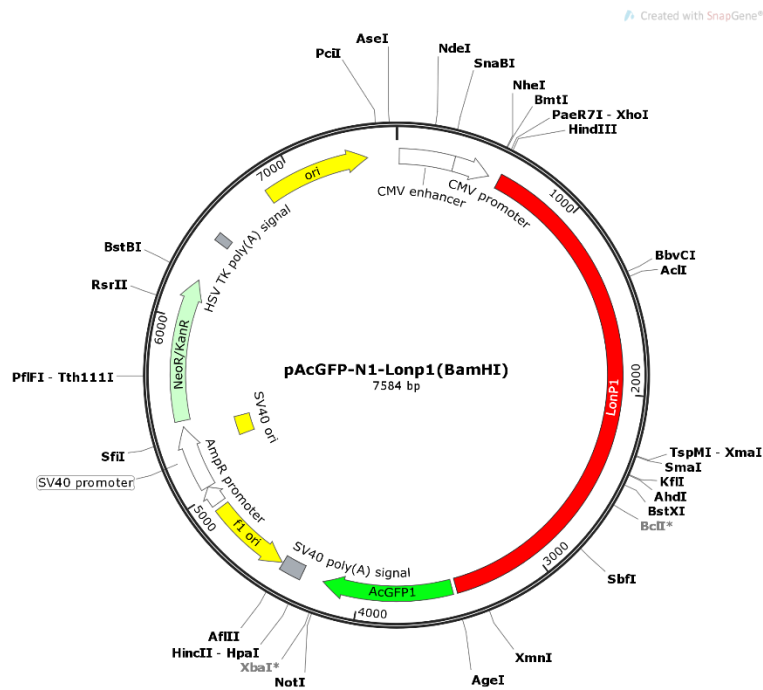
Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή η LonP1 εμπλέκεται στο σύνδρομο CODAS. Μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο γονίδιο της LonP1 είναι η αιτία για την εκδήλωση αυτού του συνδρόμου. Μέχρι σήμερα όσες μεταλλάξεις έχουν βρεθεί και σχετίζονται με το σύνδρομο αυτό βρίσκονται στην περιοχή της ATPάσης του μορίου. Η πιο συχνή μετάλλαξη είναι η σημειακή μετάλλαξη στο 721<sup>ο</sup> αμινοξύ της πρωτεΐνης Lon όπου η αργινίνη μετατρέπεται σε γλυκίνη. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την κατασκευή της mtLonP1 είναι τα ακόλουθα:

- Σχεδιασμός κατάλληλων εκκινητών για την εισαγωγή της σημειακής μετάλλαξης R721G στο γονίδιο LonP1.
- Χρήση ειδικού Kit μεταλλάξεων (Q5<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit)
- Sequencing για επιβεβαίωση της σωστής αλληλουχίας του mtLonP1

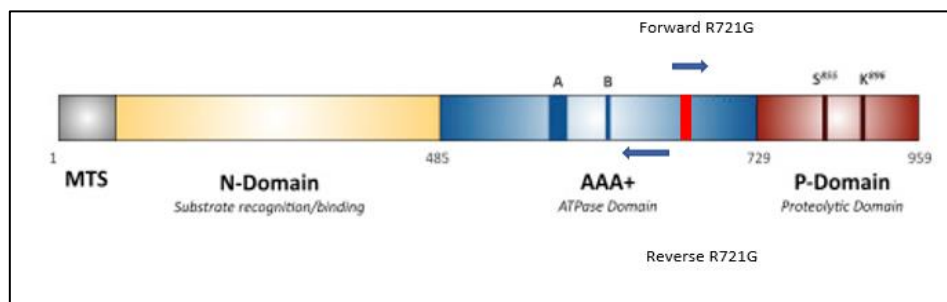
Το πλασμίδιο που επιλέχθηκε να γίνει η μετάλλαξη είναι το pLonP1(BamHI)-AcGFP γιατί με εύκολο τρόπο μπορεί να διαχωρίζεται από το WT-LonP1 το οποίο είναι GFP φθορίζον και να ανιχνεύεται στον ανοσοφθορισμό (ICC) με την βοήθεια του αντισώματος (anti-Rabbit Red).

Γ.6.1. Σχεδιασμός κατάλληλων primers για την εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης R721G στο γονίδιο hLonP1

Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε σαν εκμαγείο για την σύνθεση της μεταλλαγμένης μορφής της LonP1 είναι το pLonP1(BamHI)-AcGFP.

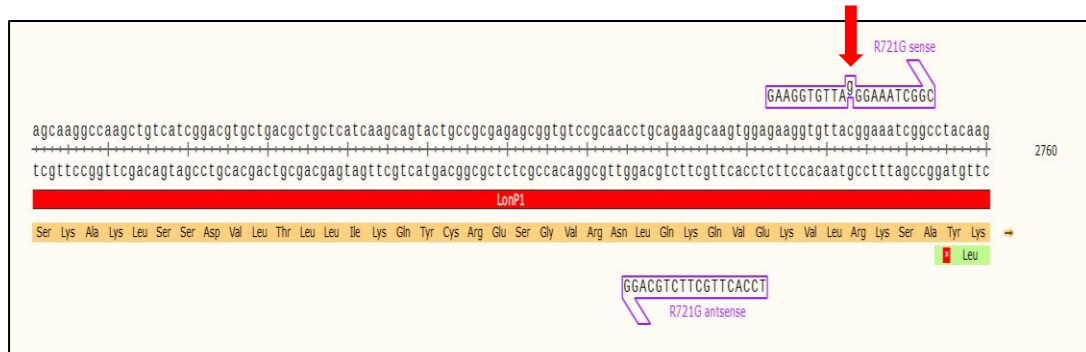


ΕΙΚΟΝΑ Γ28: Πλασμιδιακός χάρτης που περιέχει ένθεση την human LonP1.



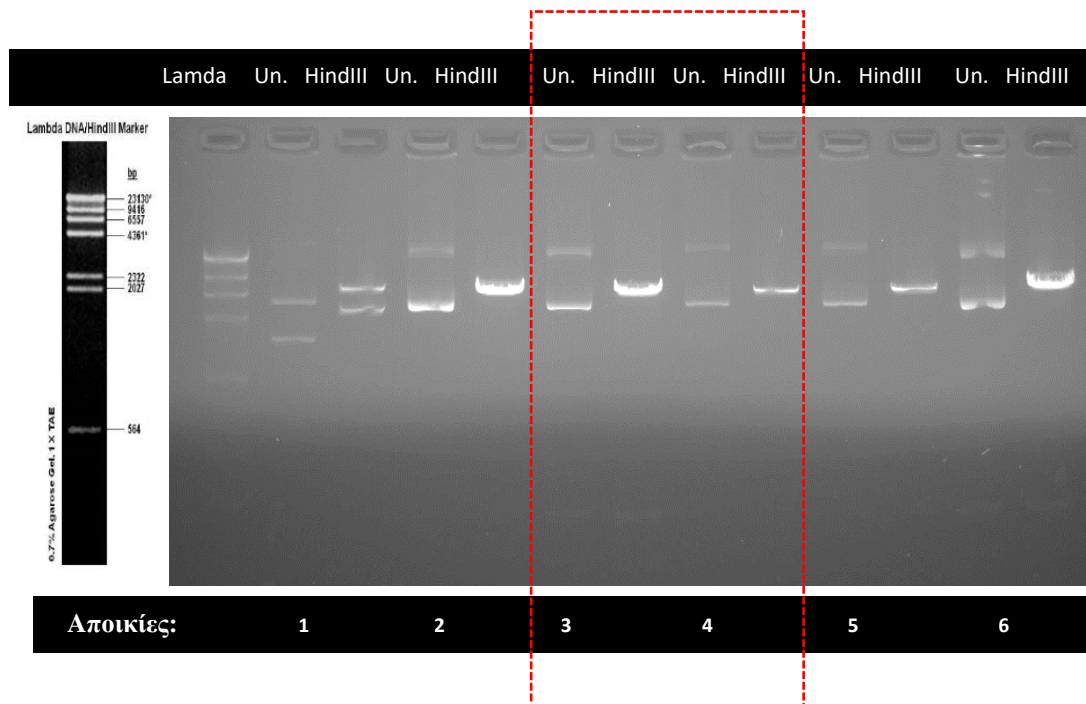
ΕΙΚΟΝΑ Γ29: Απεικόνιση μετάλλαξης R721G καθώς και θέσεων των εκκινητών πάνω στο γονίδιο της hLonP1. Ο Forward εκκινητής περιλαμβάνει την μετάλλαξη.

Ο Forward εκκινητής έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε η επιθυμητή μετάλλαξη να βρίσκεται στο κέντρο του primer και κοντά στο 5' άκρο του να υπάρχουν τουλάχιστον 10 νουκλεοτίδια. Ο Reverse primer έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε το 5' άκρο του να βρίσκεται ακριβώς στο τέλος του 5' άκρου του Forward primer.



**ΕΙΚΟΝΑ Γ30:** Αλληλουχία του γονιδίου hLonP1 και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την μετάλλαξη R721G. Με το κόκκινο βέλος διακρίνεται η σημειακή μετάλλαξη της κοτοσίνης σε γουανίνη που είναι υπεύθυνη για την μετατροπή της αργινίνης σε γλοκίνη.

Αφού ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του Q5<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit έγινε η PCR και η αντίδραση KLD, ακολούθησε μετασχηματισμός σε επιδεικτικά βακτήρια DH5α, επίστρωση σε τρυβλίο με LB-agar, εμβολιασμός και τέλος παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (Mini-prep).



**ΕΙΚΟΝΑ Γ31:** 1% πήκτωμα αγαρόζης με EtBr (5μl/100ml), 90Volt. Διαγνωστικές πέψεις του πλασμιδίου mtLonP1 με το ένζυμο HindIII.

Επιλέχθηκαν έξι αποικίες για να γίνει περιοριστική πέψη με το περιοριστικό ένζυμο HindIII το οποίο γραμμοποιεί το πλασμίδιο. Από αυτές επιλέχθηκαν η αποικία 3 και η αποικία 4 ώστε να σταλούν για sequencing και να διαπιστωθεί εάν έχει γίνει όντως η μετάλλαξη.

### Γ.6.2. Sequencing για επιβεβαίωση σωστής αλληλουχίας του mtLonP1

Κατάλληλη ποσότητα πλασμιδιακού DNA στάλθηκε για sequencing. Επιλέχθηκε εκκινητής ώστε να "διαβάσει" την περιοχή της σημειακής μετάλλαξης R721G. Για sequencing επίσης στάλθηκε το πλασμίδιο WtLonP1 που παρασκευάστηκε ως control.



**ΕΙΚΟΝΑ Γ32: Αλληλουχία γονιδίου LonP1 και ο εκκινητής που επιλέχθηκε για το sequencing. Ο εκκινητής είναι ο 252RTa και διακρίνεται με το κόκκινο πλαίσιο ενώ με μπλε πλαίσιο διακρίνεται η περιοχή της μετάλλαξης (SnapGene).**



Το αποτέλεσμα του sequencing φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:

Query	1	CCCAGCGGWCITGCCGTGAGGGAGMTTCGCCAGTCATGGCCAGATTCTGCCGGACAGGCC	60
Sbjct	1	CCCCGGGACTTGGCGTGAGGGAGMTTCGCCAGTCATGGCCAGATTCTGCCGGACAGGCC	60
Query	61	TGCCCATGGCCAGGGACAGCAGGGCCGTGACGATGGTGCAGCCTGCGCTTGGGCCGTCTCT	120
Sbjct	61	TGCCCATGGCCAGGGACAGCAGGGCCGTGACGATGGTGCAGCCTGCGCTTGGGCCGTCTCT	120
Query	121	TGGGGTGGCGCCCTCGGGCACATGCAGGTGGATGTGTGAGGTCACCAGGTAGTCATTGG	180
Sbjct	121	TGGGGTGGCGCCCTCGGGCACATGCAGGTGGATGTGTGAGGTCACCAGGTAGTCATTGG	180
Query	181	CGGGGCGTGTGCATGAGGAAGGCTCTGGCGAAGGTGTAGGCTATGCGGGCGCTCTCTCT	240
Sbjct	181	CGGGGCGTGTGCATGAGGAAGGCTCTGGCGAAGGTGTAGGCTATGCGGGCGCTCTCTCT	240
Query	241	TCATCACCTCCCCAGCTGGCCTGTCCACCTCCAGGCTGCCATCCTTGTCCACCTTGGCAT	300
Sbjct	241	TCATCACCTCCCCAGCTGGCCTGTCCACCTCCAGGCTGCCATCCTTGTCCACCTTGGCAT	300
Query	301	CCTTGTCTGTGGCCGTCTCAGGGATGTCTCCACAAACAGCGTGGAGCCTCCCATTTGGCG	360
Sbjct	301	CCTTGTCTGTGGCCGTCTCAGGGATGTCTCCACAAACAGCGTGGAGCCTCCCATTTGGCG	360
Query	361	TCCAGGCCAGCCCCATGACCACGCGGGGGTGTACGTCATACATGCGCTCCACGGTGA	420
Sbjct	361	TCCAGGCCAGCCCCATGACCACGCGGGGGTGTACGTCATACATGCGCTCCACGGTGA	420
Query	421	ACACGGGCTTCCCCACGAAGTCTGCAGGTTCTCGGGCGTCCACTCCACGGACTCGGCCT	480
Sbjct	421	ACACGGGCTTCCCCACGAAGTCTGCAGGTTCTCGGGCGTCCACTCCACGGACTCGGCCT	480
Query	481	CGCCGCTGACAACTTGTAGGCCGATTCGGTAAACACTTCTCCACTTGGCTTCTGCAGGT	540
Sbjct	481	CGCCGCTGACAACTTGTAGGCCGATTCGGTAAACACTTCTCCACTTGGCTTCTGCAGGT	540
Query	541	TGCGGACACCGCTCTCGCGGCAGTACTGCTTGTATGAGCAGCGTCAGCAGTCCGATGACA	600
Sbjct	541	TGCGGACACCGCTCTCGCGGCAGTACTGCTTGTATGAGCAGCGTCAGCAGTCCGATGACA	600
Query	601	GCTTGGCCTTGTCTCATCCAGCCACACAGGGCGGAGCCTGGGGCACCAGGTAGCGCT	660
Sbjct	601	GCTTGGCCTTGTCTCATCCAGCCACACAGGGCGGAGCCTGGGGCACCAGGTAGCGCT	660
Query	661	CCGCAATGGCCAGCTTCTCCTGGGCCACGTAGCCCGACACGTTGATCATCTCCATACGGT	720
Sbjct	661	CCGCAATGGCCAGCTTCTCCTGGGCCACGTAGCCCGACACGTTGATCATCTCCATACGGT	720
Query	721	CTCGAGCGGGCTCGGGGATGGTGTCCGTGACGTTGGCCGTGCAGATGAACAGCACCTTGG	780
Sbjct	721	CTCGAGCGGGCTCGGGGATGGTGTCCGTGACGTTGGCCGTGCAGATGAACAGCACCTTGG	780
Query	781	ACAAGTCCACGGGCACGTCCAGGTAGTGGTCCAGGAAGTTGGCATTCTGCTCTGGGTCCA	840
Sbjct	781	ACAAGTCCACGGGCACGTCCAGGTAGTGGTCCAGGAAGTTGGCATTCTGCTCTGGGTCCA	840
Query	841	GCAGTCCAGCAGTGCAGCAGCGGTCGCCCTGGTAGCCTCGGGCCGATCTTGT-CACCT	899
Sbjct	841	GCAGTCCAGCAGTGCAGCAGCGGTCGCCCTGGTAGCCTCGGGCCGATCTTGTCCACCT	900
Query	900	CGTCGATGAGGATCAGGGGTTCTCCGTCTTGGTCTTC-TCAACACTGGATGATCTTCCG	958
Sbjct	901	CGTCGATGAGGATCAGGGGTTCTCCGTCTTGGTCTTCTTCAACACTGGATGATCTTCCG	960
Query	959	GGCATGGGCCACGTAGTCCGCTKGTGGCCCTTGATCTCACCCMCGTCAGT-ATGCCCG	1017
Sbjct	961	GGCATGGGCCACGTAGTCCGCT-GTGGCCCTTGATCTCAGCA-CGTGATCATGCCCG	1018

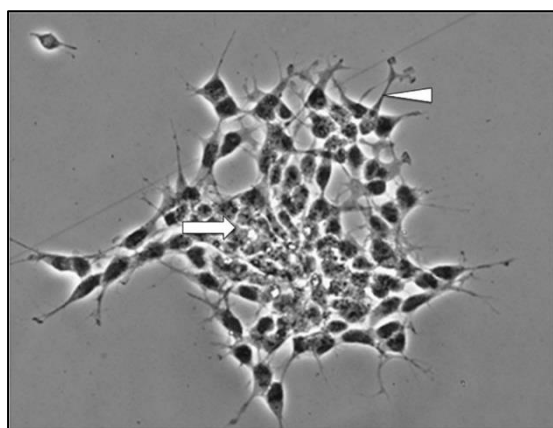
**ΕΙΚΟΝΑ Γ32:** Σύγκριση αλληλουχίας Wt LonP1 με mtLonP1. Με κόκκινο πλαίσιο απεικονίζεται η περιοχή της σημειακής μετάλλαξης.

Παρατηρείται ότι υπάρχει πλήρης ομολογία γύρω από την περιοχή της μετάλλαξης κάτι που σημαίνει ότι η μετάλλαξη στο ανθρώπινο γονίδιο LonP1 έχει γίνει με επιτυχία. Επίσης με το sequencing στον πλασμιδιακό φορέα pLonP1(BamHI)-AcGFP επιβεβαιώθηκε ότι η διαδικασία της κατασκευής του είναι σωστή, καθώς δεν καταστράφηκε η αλληλουχία του γονιδίου της LonP1.

### Γ.7. Τα κύτταρα SH-SY5Y ως κατάλληλο νευρικό κυτταρικό μοντέλο

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήσαμε είναι η ανθρώπινη νευροβλαστωματική κυτταρική σειρά SH-SY5Y. Το νευροβλάστωμα είναι καρκίνος της παιδικής ηλικίας του συμπαθητικού νευρικού συστήματος που προέρχεται από κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας. Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y αποτελεί υπόκλωνο της κυτταρικής σειράς SK-N-SH, που προήλθε από βιοψία του μυελού των οστών ασθενούς με νευροβλάστωμα προέλευσης από τα συμπαθητικά αδρενεργικά γάγγλια στις αρχές του 1970. Η κυτταρική σειρά SK-N-SH περιέχει πληθυσμούς κυττάρων με τρεις διαφορετικούς φαινότυπους: τα νευροβλαστικά κύτταρα με νευρωνικό φαινότυπο (N type), τα νεοπλάσματά κύτταρα, είναι πολυδύναμα πρόδρομα Schwann κύτταρα και είναι έντονα προσκολλημένα στο υπόστρωμα (S-type), και τον ενδιάμεσο τύπο που μπορεί να είναι κύτταρα που αντιπροσωπεύουν είτε ένα βλαστοκύτταρο είτε ένα ενδιάμεσο στάδιο μεταξύ S- και N- τύπου (I type) (155). Τα κύτταρα N-τύπου αποτελούν τα κακοήθη κύτταρα του νευροβλαστώματος, ενώ τα S-τύπου φαίνεται να είναι μη κακοήθη. Η SH-SY5Y κυτταρική σειρά αποτελεί μία συγκριτικά ομοιογενή νευροβλαστωματική σειρά νευρωνικού τύπου (N-type) μιας και περιέχει N-τύπου κύτταρα σε ποσοστό 80% έναντι των S-τύπου που εντοπίζονται σε ποσοστό 20% στον κυτταρικό πληθυσμό.

Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y αποτελεί ένα δημοφιλές πειραματικό μοντέλο για την νόσο του Parkinson μιας και κατέχει πολλά χαρακτηριστικά των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Παθολογικά η νόσος του Parkinson χαρακτηρίζεται από την απώλεια των ντοπαμινεργικών κυττάρων του μεσεγκεφάλου. Τα χαρακτηριστικά που το καθιστούν κατάλληλο για την μελέτη της νόσου είναι πρώτον ότι έχουν την ικανότητα να εκφράζουν ντοπαμίνη και νοραδρεναλίνη επειδή εκφράζουν τυροσίνη και β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης, (Oyarce and Fleming 1991). Δεύτερον τα SH-SY5Y κύτταρα εκφράζουν το μεταφορέα ντοπαμίνης (dopamine transporter, DAT), μία πρωτεΐνη που απαντάται μόνο στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Η πρωτεΐνη DAT ρυθμίζει την ομοιοστάση της ντοπαμίνης μέσω ειδικής πρόσληψης και παγίδευσης της. Και τρίτον τα SH-SY5Y κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμους λειτουργικούς νευρώνες υπό την παρουσία κάποιων παραγόντων όπως ρετινικό οξύ (RA).



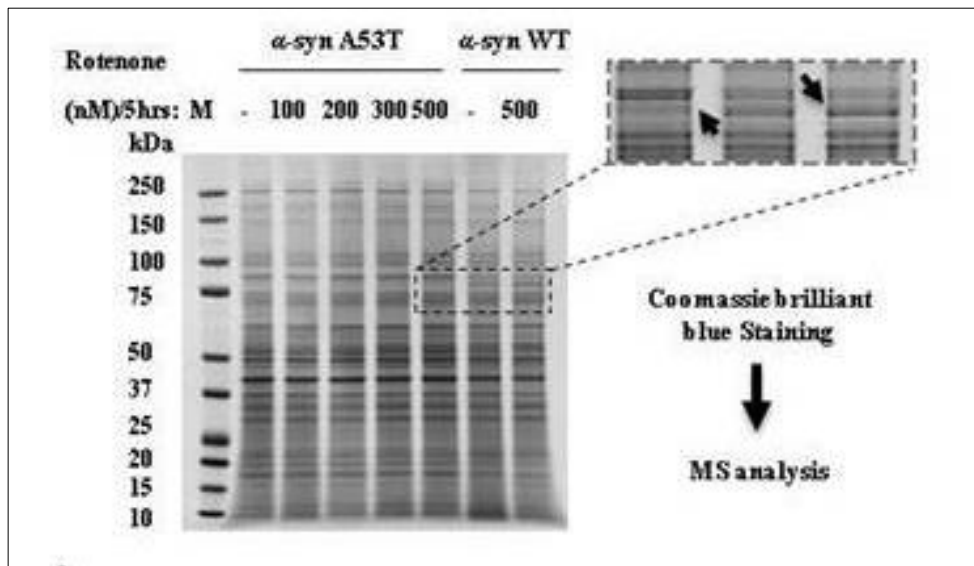
**ΕΙΚΟΝΑ Γ32:** Αδιαφοροποίητα κύτταρα SH-SY5Y. Χαρακτηρίζονται από σχηματισμό συσσωματωμάτων και στοιβάδων κατά την καλλιέργειά τους (Jane Kovalevich and Dianne Langford, 2013).

#### Γ.8. Ανάπτυξη ενός in vitro κυτταρικού μοντέλου για την νόσο PD μετά από έκθεση στη νευροτοξίνη 6-OHDA και σε Rotenone.

Προηγούμενα πειραματικά αποτελέσματα, που έλαβαν χώρα στο εργαστήριο μας, ταυτοποίησαν την μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1 σε χρόνιο μοντέλου μελέτης της νόσου Parkinson. Χρησιμοποιήθηκαν δύο παράγοντες κινδύνου που έχουν ενοχοποιηθεί για την νόσο Parkinson, ένας γενετικός παράγοντας και συγκεκριμένα η υπερέκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, και ένας περιβαλλοντικός παράγοντας, η τοξίνη ροτενόνη. Σκοπός ήταν η συνεργατική μελέτη αυτών των παραγόντων στη βιολογία και την λειτουργία του μιτοχονδρίου δεδομένου ότι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία έχει συνδεθεί με την νόσο Parkinson.

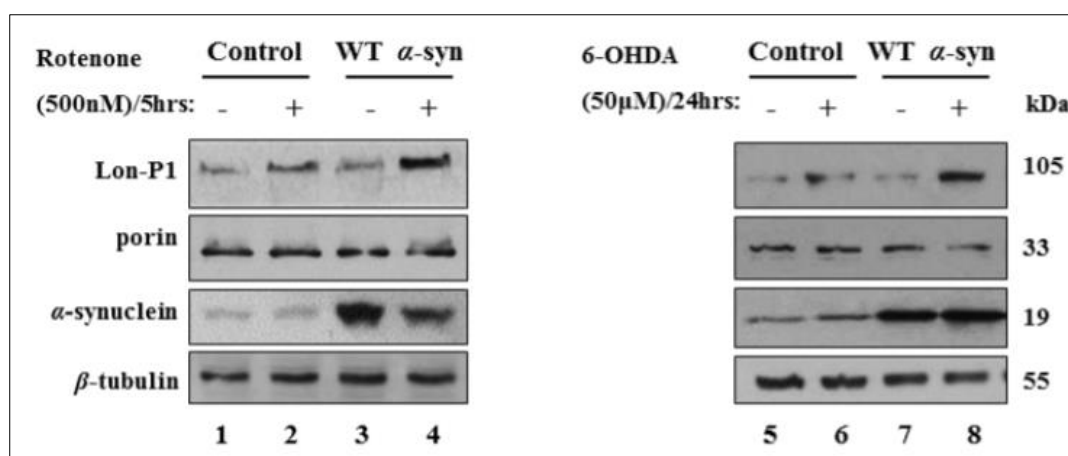
Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν μόνιμα διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές SH-SY5Y για την αγρίου τύπου  $\alpha$ -συνουκλεΐνη καθώς και την μεταλλαγμένη  $\alpha$ -συνουκλεΐνη στην θέση 53 της αμινοξικής αλληλουχίας (A53T  $\alpha$ -συν). Έγινε επώαση κυττάρων με ένα εύρος συγκεντρώσεων rotenone μεταξύ των 100nM έως 500nM. Η ροτενόνη είναι αναστολέας του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, (156). Επιλέχθηκε μία ήπια συγκέντρωση αναστολέα των 100nM που δεν έχει αντίκτυπο στην λειτουργία του μιτοχονδρίου και μία ακραία των 500nM που είχε διαπιστωθεί σε προηγούμενα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής της Βασίλη Ευτυχίας, ότι οδηγεί στην παραγωγή ROS, μείωση των παραγόμενων επιπέδων ATP, κατακερματισμό του DNA, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και ενεργοποίηση της δραστηριότητας της caspase 3. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων σε αυτές τις συγκεντρώσεις και έπειτα ελέγχθηκε η επίδραση των παραγόντων αυτών στη λειτουργία των μιτοχονδρίων.

Συγκεκριμένα έγινε απομόνωση μιτοχονδριακών εκχυλισμάτων, ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδιου και χρώση πηκτώματος με διάλυμα χρωστικής κυανό του Coomassie (Coomassie brilliant blue). Έγινε αποκοπή ζωνών που εντοπίστηκε κάποια μεταβολή, και ανάλυση αυτών με φασματομετρία μάζας (mass spectrometry - MS). Η φασματομετρία μάζας πραγματοποιήθηκε με την χρήση ιονισμού μέσω Ηλεκτροψεκασμού (ElectoSpray Ionization – ESI) και επεξεργασία δειγμάτων με αναλυτή LTQ Orbitrap.



**ΕΙΚΟΝΑ Γ33:** Ανίχνευση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών το πρότυπο των οποίων μεταβάλλεται μετά την υπερέκφραση WT και A53T *α-syn* και έκθεση σε rotenone. Με το βέλος διακρίνεται η μπάντα που αντιστοιχεί στην LonP1.

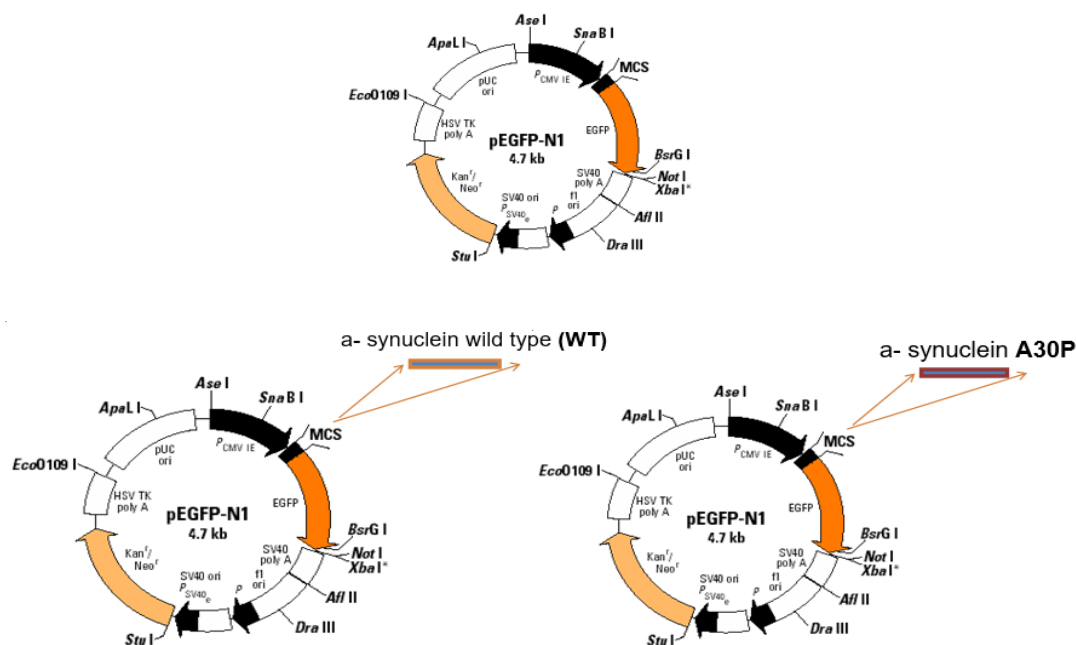
Μεταξύ πρωτεϊνών που προέκυψαν μετά την ανάλυση με φασματομετρία μάζας και αντιστοιχούν στην μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης ανιχνεύθηκε και η μιτοχονδριακή πρωτεάση LonP1. Στην συνέχεια έγινε διαμόλυνση των SH-SY5Y κυττάρων με πλασμιδιακούς φορείς που εξέφραζαν την αγρίου τύπου *α-syn* και ακολούθως εφαρμογή stress με τις νευροτοξίνες rotenone και 6-OHDA στις συγκεντρώσεις 500nM/5hrs και 50μM/24hrs αντίστοιχα. Στα πειράματα επιβεβαιώθηκε η αυξητική τάση έκφρασης της LonP1 παρουσία αναστολέων. Η αύξηση των επιπέδων της γίνεται ακόμα πιο έντονη όταν συνοδεύεται από υπερέκφραση της Wt *α-syn*.



**ΕΙΚΟΝΑ Γ34:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνονται οι μεταβολές στην έκφραση της LonP1, κατά την υπερέκφραση της Wt *α-syn*, παρουσία rotenone και 6-OHDA. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης χρησιμοποιήθηκε η *β-τουμπουλίνη* και ως μιτοχονδριακός δείκτης ισοφόρτωσης η πορίνη.

### Γ.9. Σχηματισμός εγκλείστων α-συνουκλεΐνης με την χρήση αναστολέα 6-OHDA.

Η υπερέκφραση α-συνουκλεΐνης σε συνδυασμό με την αναστολή μιτοχονδριακής λειτουργίας έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό εγκλείστων α-συνουκλεΐνης στο εσωτερικό των κυττάρων, ένα χαρακτηριστικό που οφείλεται επίσης στην συνεργατική δράση των δύο παραγόντων, μιας και μόνο η υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης δεν αποτελεί ικανό παράγοντα για τον σχηματισμό εγκλείστων. Ο σχηματισμός των εγκλείστων αποτελεί το πιο σημαντικό παθολογικό χαρακτηριστικό της νόσου Parkinson. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν μόνιμα διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές SH-SY5Y για την αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνη καθώς και την μεταλλαγμένη α-συνουκλεΐνη στην θέση 53 της αμινοξικής αλληλουχίας (A53T α-συν). Έγινε επώαση των κυττάρων με την νευροτοξίνη 6-OHDA στην συγκέντρωση 50μM/24hrs. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχθηκε γιατί έχει αντίκτυπο στην λειτουργία του μιτοχονδρίου, καθώς προκαλεί μείωση στην δραστικότητα του συμπλόκου I στην αναπνευστική αλυσίδα του μιτοχονδρίου, αλλά και γιατί δεν προκαλεί σημαντικό κυτταρικό θάνατο.

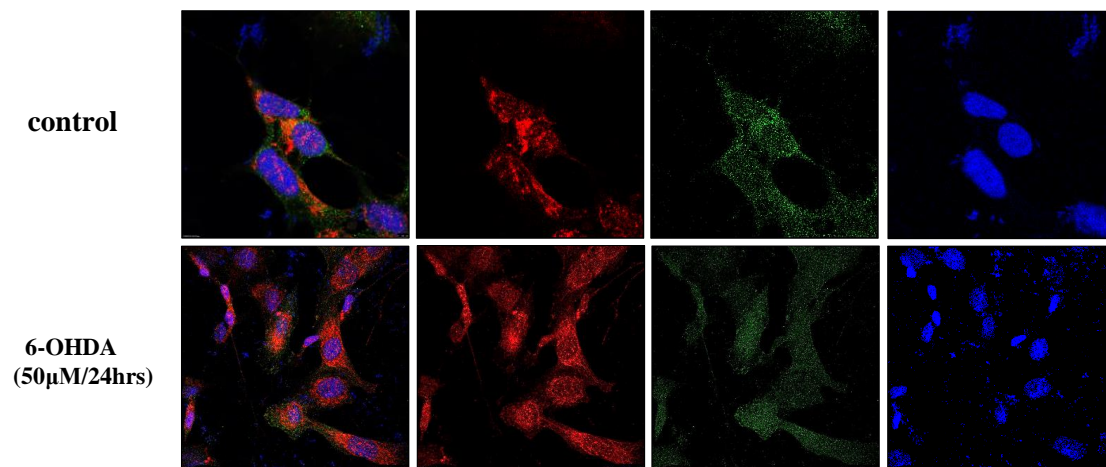


**ΕΙΚΟΝΑ Γ35:** Χάρτες των τριών ειδών πλασμιδίων που αποτελούν την Stable κυτταρική σειρά SH-SY5Y.



## Κύτταρα Stable-pEGFP SH-SY5Y

LonP1/ $\alpha$ -syn/Draq5

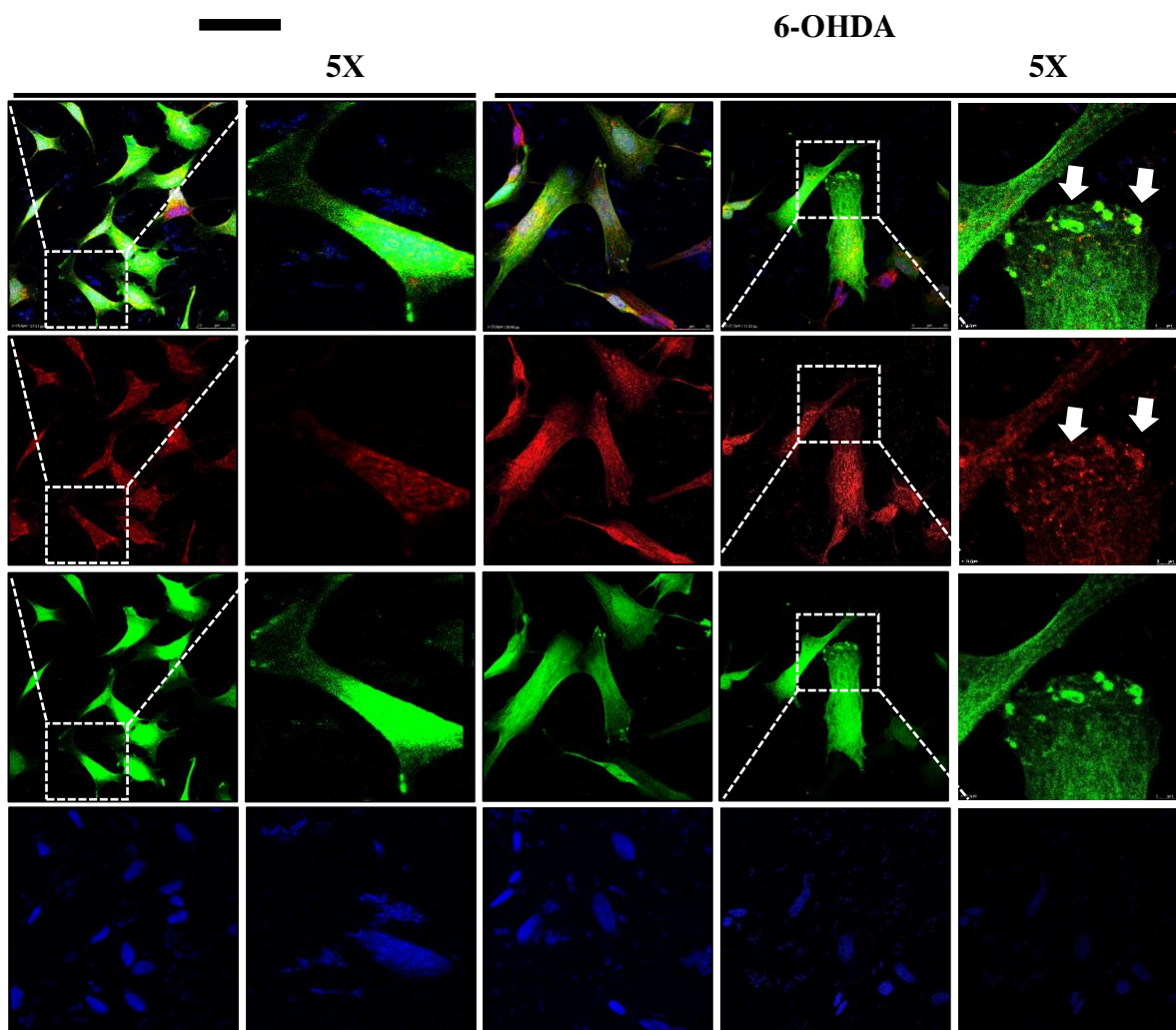


**ΕΙΚΟΝΑ Γ36:** Μόνιμα διαμολυσμένη κυτταρική σειρά με πλασμίδιο pEGFP-N1 και παράλληλα προσθήκη νευροτοξίνης 6-OHDA (50 $\mu$ M/24hrs). Χρήση πρωτογενούς αντισώματος LonP1 (anti-Rabbit Red) και  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (anti-Mouse Green). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5(blue). Φακός 63X.

Μόνιμα διαμολυσμένη κυτταρική σειρά SH-SY5Y με τον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N1 χρησιμοποιήθηκε ως control. Έγινε προσθήκη νευροτοξίνης 6-OHDA σε συγκέντρωση 50 $\mu$ M για 24 ώρες, με σκοπό την μείωση δραστηριότητας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Κατά την διαδικασία του ανοσοφθορισμού (ICC) παρατηρείται ότι η πρωτεΐνη LonP1 κατανέμεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε η τοξίνη 6-OHDA η μιτοχονδριακή κατανομή είναι πιο ευδιάκριτη, χωρίς να παρατηρείται κάποια άλλη μεταβολή στην εικόνα των κυττάρων. Η κατανομή της ενδογενούς  $\alpha$ -συνουκλεΐνης δεν μεταβάλλεται μετά την χρήση νευροτοξίνης αλλά ούτε εντοπίζεται και σχηματισμός εγκλείστων  $\alpha$ -συνουκλεΐνης.

## Κύτταρα Stable-pEGFP-asynWT SH-SY5Y

LonP1/a-syn/Draq5

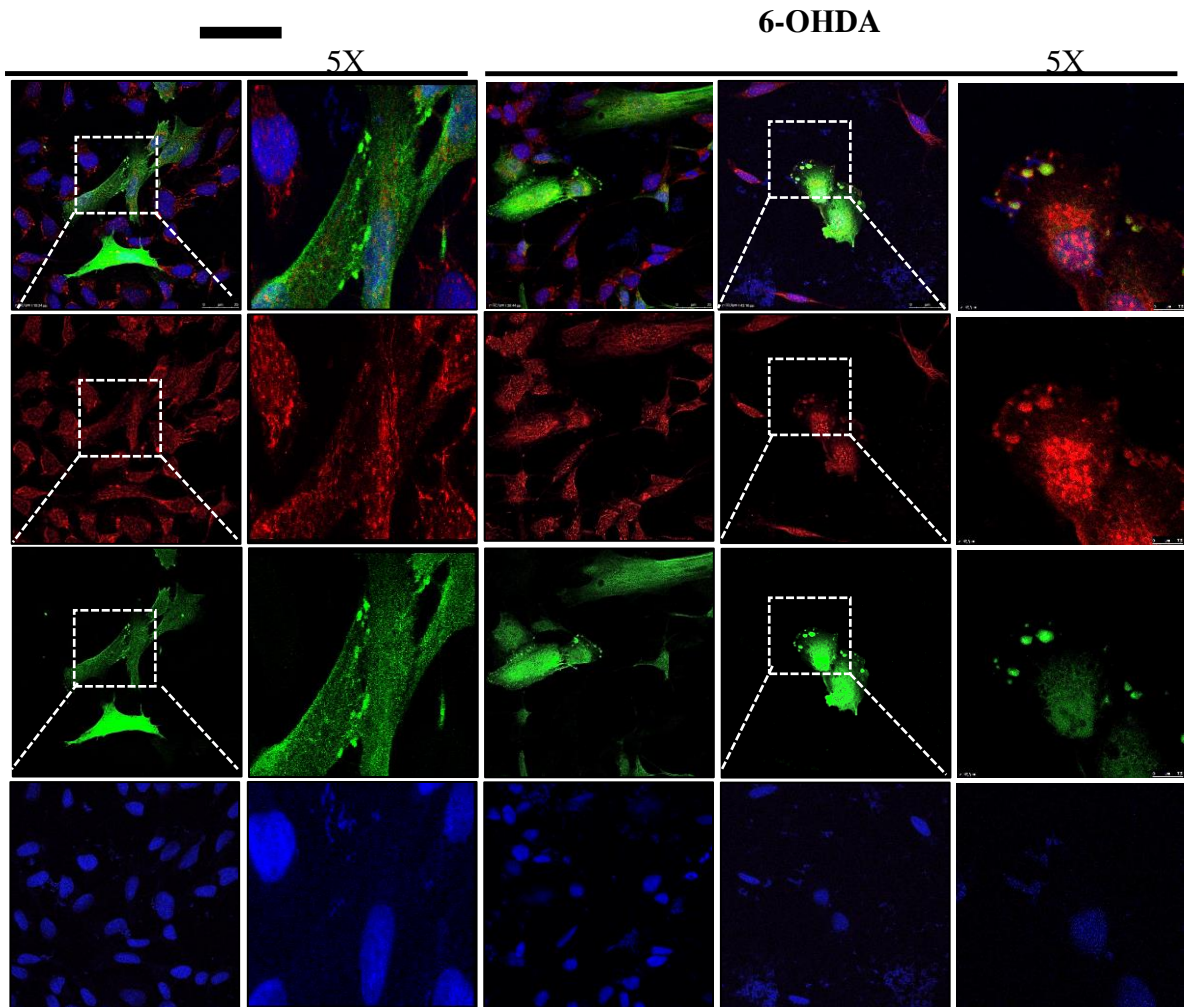


**ΕΙΚΟΝΑ Γ37:** Μόνιμα διαμολυσμένη κυτταρική σειρά με πλασμίδιο pEGFP-asynWT παράλληλα με την προσθήκη νευροτοξίνης νευροτοξίνης 6-OHDA (50μM/24hrs). Χρήση πρωτογενούς αντισώματος LonP1(anti-Rabbit Red) και α-συνουκλεΐνης (anti-Mouse Green). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5 (blue). Φακός 63X.

Η υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου (a-syn WT) στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό εγκλείστων σε αρκετά κύτταρα. Η τάση σχηματισμού είναι πολύ πιο έντονη κατά την υπερέκφραση α-συνουκλεΐνης WT παράλληλα με την χρήση τοξίνης 6-OHDA αφού αριθμητικά εντοπίστηκαν περισσότερα κύτταρα. Είναι σαφές ότι κατά την υπερέκφραση α-συνουκλεΐνης WT παράλληλα με την χρήση τοξίνης τα έγκλειστα α-συνουκλεΐνης συνεντοπίζονται με την πρωτεΐνη LonP1 όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα με λευκά βέλη. Αυτό δεν συμβαίνει παρόλο αυτά στην περίπτωση που μόνο υπερεκφράζεται η α-συνουκλεΐνη WT χωρίς την παράλληλη χρήση νευροτοξίνης.

## Κύτταρα Stable-pEGFP-asynA30P SH-SY5Y

LonP1/ $\alpha$ -syn/Draq5



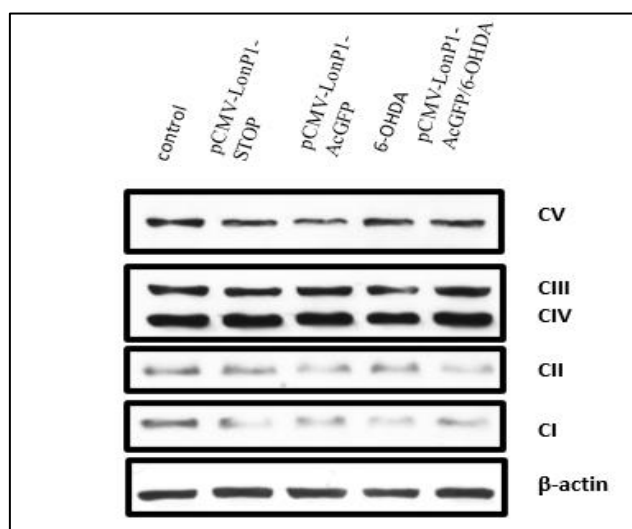
**ΕΙΚΟΝΑ Γ38:** Μόνιμα διαμολυσμένη κυτταρική σειρά με πλασμίδιο pEGFP-asynA30P παράλληλα με την χρήση νευροτοξίνης 6-OHDA 50μM/24hrs. Χρήση πρωτογενούς αντισώματος LonP1(anti-Rabbit Red) και  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (anti-Mouse Green). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5(blue). Φακός 63X,100X.

Η μεταλλαγμένη μορφή  $\alpha$ -συνουκλεΐνης A30P έχει μεγαλύτερη τάση σχηματισμού εγκλείστων συγκριτικά με την  $\alpha$ -συνουκλεΐνη αγρίου τύπου ( $\alpha$ -syn WT). Όλα τα κύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν την μετάλλαξη A30P σχηματίζουν εγκλείστα ακόμα και χωρίς την προσθήκη τοξίνης. Στην περίπτωση αυτή δεν υπάρχει συνεντοπισμός εγκλείστων  $\alpha$ -συνουκλεΐνης με την πρωτεΐνη LonP1. Παρόλο αυτά στην περίπτωση που υπερεκφραστεί το μετάλλαγμα A30P, παράλληλα με την χρήση τοξίνης όχι μόνο παρατηρείται σχηματισμός εγκλείστων αρκετά μεγάλου μεγέθους αλλά και ξεκάθαρος συνεντοπισμός με την πρωτεΐνη LonP1. Η σημειακή μετάλλαξη A30P εντοπίστηκε σε οικογένειες με κληρονομικής μορφής Parkinson και συσχετίστηκε με ασθενείς που εκφράζουν τις μεταλλάξεις του γονιδίου και συνήθως εμφανίζουν την ασθένεια σε πρώιμο στάδιο. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η A30P εμφανίζει μειωμένη

συγγένεια πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης με τις μεμβράνες, συγκριτικά με την WT και A53T συνουκλείνη (157). Η A30P όπως και η WT, δεν έχει συγκεκριμένη δομή, αλλά έχει μεγαλύτερη ικανότητα να σχηματίζει β-πτυχωτά φύλλα, η οποία προσδίδει στην πρωτεΐνη μία αυξητική τάση συσσωμάτωσης (157). Ωστόσο αποτελεί παράδοξο το γεγονός ότι η μετάλλαξη A30P έχει μειωμένη ικανότητα αλληλεπίδρασης με τις μεμβράνες, στην πράξη δύναται να παράγει είδη ολιγομερών που παρουσιάζουν παθογόνες επιδράσεις. Συνοψίζοντας η χορήγηση 6-OHDA μέσα σε 24 ώρες οδηγεί στην εκδήλωση διαφορετικής συμπεριφοράς μεταξύ της αγρίου τύπου α-συνουκλείνη (WT) και της μεταλλαγμένης (A30P), με την δεύτερη να παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία ως προς τον σχηματισμό εγκλείστων. Στις περιπτώσεις που έχω υπερέκφραση είτε αγρίου τύπου α-συνουκλείνη είτε της μετάλλαξης A30P παράλληλα με την χρήση τοξίνης, η πρωτεΐνη Lon έχει την τάση να συνεντοπίζεται με τα εγκλείστα αλλά και να σχηματίζει συσσωματώματα. Η τάση αυτή της πρωτεΐνης Lon προκαλεί αίσθηση και δημιουργεί ερωτήματα σχετικά με τον ρόλο της καθώς είναι μία πρωτεάση που συμμετέχει στον ποιοτικό έλεγχο πρωτεϊνών αλλά και αποικοδομεί πρωτεΐνες που έχουν υποστεί βλάβη και η συσσώρευσή τους μπορεί να προκαλέσει διαταραχή στην ομοίωση του κυττάρου.

#### 7.10. Έλεγχος υπομονάδων συμπλόκων αναπνευστικής αλυσίδας με την χρήση τοξίνης 6-OHDA και με υπερέκφραση LonP1.

Ακολούθησαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western όπου ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης υπομονάδων των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, συγκεκριμένα μία υπομονάδα για το κάθε σύμπλοκο (C I, C II, CIII, και CV). Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Neuro2A και έγινε υπερέκφραση των πλασμιδιακών φορέων pLonP1(BamHI)-AcGFP και pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP οι οποία παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μας, παράλληλα με την προσθήκη αναστολέα 6-OHDA στην συγκέντρωση 50μM/24hrs. Ο λόγος που έγινε το παρακάτω πείραμα είναι για να ελεγχθεί οποιαδήποτε αλλαγή στα πρωτεϊνικά επίπεδα των υπομονάδων, η οποία να μπορεί να συσχετιστεί με υπολειτουργία της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας.





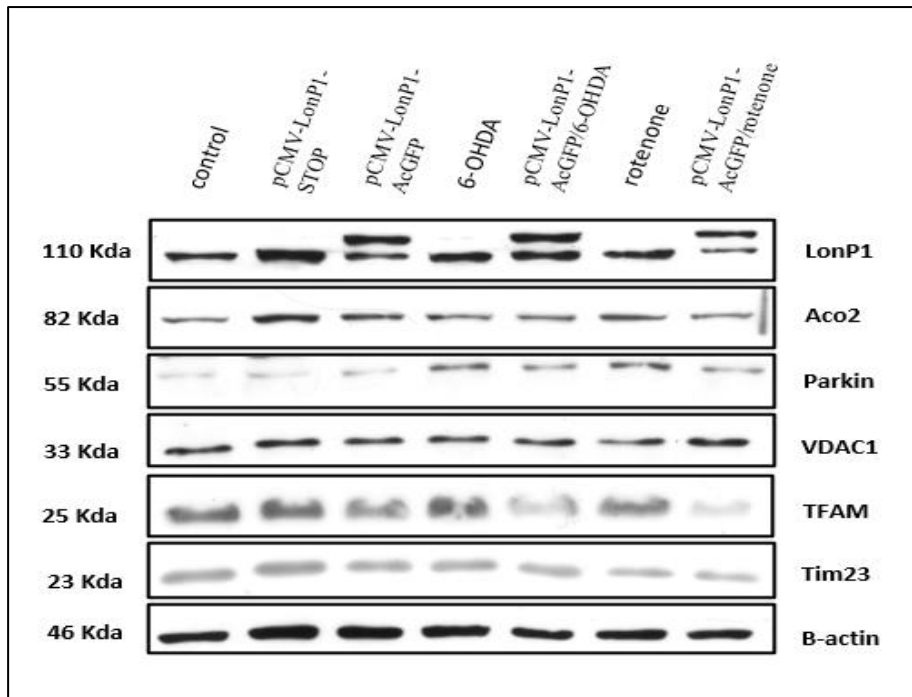
**ΕΙΚΟΝΑ Γ39: Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η έκφραση των υπομονάδων των συμπλόκων C I, C II, CIII, και CV της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-actin.**

Μέχρι σήμερα από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης LonP1 έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων καθώς και της δραστηριότητας του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Στην παραπάνω εικόνα διακρίνεται μία μικρή μείωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του C I όταν υπερεκφράζονται και οι δύο πλασμιδιακοί φορείς της πρωτεΐνης LonP1. Ένας από τους ρόλους της πρωτεΐνης LonP1 είναι να ρυθμίζει τον μεταβολισμό του μιτοχονδρίου με την εκλεκτική αποικοδόμηση και την αλληλεπίδραση με ορισμένες υπομονάδες των συμπλόκων του OXPHOS. Όσο αφορά το C I παρατηρείται μείωση των επιπέδων του μετά την προσθήκη του αναστολέα 6-OHDA όμως τα επίπεδα του αυξάνονται όταν παράλληλα υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη Lon. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του CIII μειώνονται μετά το μιτοχονδριακό στρες, και επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα όταν παράλληλα υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη Lon. Όσο αφορά το CV σύμπλοκο παρατηρείται μία μείωση στα επίπεδα του όταν υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη Lon, αλλά τα επίπεδα ξανά αυξάνονται μετά από την χρήση τοξίνης.

#### 7.11. Έλεγχος της συμπεριφοράς της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης LonP1 μετά την προσθήκη τοξινών 6-OHDA και rotenone.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση των πλασμιδιακών φορέων pLonP1(BamHI)-AcGFP και pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP στην κυτταρική σειρά Neuro2A, ενώ παράλληλα προστέθηκαν οι αναστολείς 6-OHDA και rotenone στις συγκεντρώσεις 50μM/24hrs και 500nM/24hrs αντίστοιχα. Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι να εκλεχθεί για πρώτη φορά οι υπερέκφραση των πλασμιδίων που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μας με ανοσοαποτύπωση κατά Western καθώς και να εκλεχθούν τα πρωτεϊνικά επίπεδα πιθανών υποστρωμάτων της πρωτεΐνης LonP1 κάτω από συνθήκες stress. Επιπλέον εκλέχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα μιτοχονδριακών πρωτεϊνών που βρίσκονται στην εσωτερική και εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη όπως η VDAC1 και το Tim23.





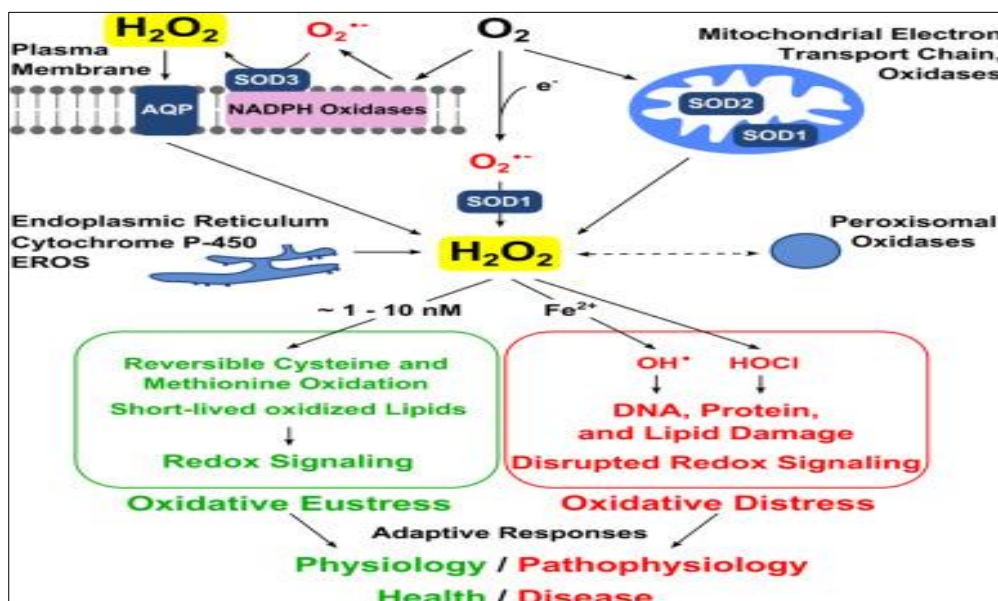
**ΕΙΚΟΝΑ Γ40:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western μετά από διαμόλυνση κυττάρων Neuro2A με τους πλασμιδιακούς φορείς pLonP1(BamHI)-AcGFP και pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP και παράλληλη προσθήκη αναστολέων 6-OHDA και rotenone στις συγκεντρώσεις 50μM/24hrs και 500nM/24hrs αντίστοιχα. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

Με τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western ελέγχθηκαν εάν επηρεάζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης. Όσο αφορά την πρωτεΐνη Lon φαίνεται ότι και οι δύο πλασμιδιακοί φορείς που παρασκευάστηκαν υπερεκφράζονται σε ικανοποιητικό επίπεδο. Η μιτοχondριακή ακονιτάση (Aco2) αποτελεί ένα από τα πολλά πιθανά υποστρώματα της LonP1 στη μιτοχondριακή μήτρα που αποικοδομούνται επιλεκτικά από την πρωτεάση μετά από οξειδωτική τροποποίηση. Στις συνθήκες αυτές τα επίπεδα της ακονιτάσης παραμένουν σταθερά κάτι που είναι λογικό γιατί η πρωτεάση LonP1 αναγνωρίζει και αποικοδομεί μόνο την οξειδωμένη μορφή της ακονιτάσης. Ένα δεύτερο σημαντικό υπόστρωμα της LonP1 που είναι σημαντικό για τη φυσιολογική μιτοχondριακή λειτουργία, είναι ο μιτοχondριακός μεταγραφικός παράγοντας A(TFAM). Όταν η PKA φωσφορυλιώσει το TFAM το οποίο είναι προσδεδεμένο στο mtDNA, αυτό απελευθερώνεται από το mtDNA, και το ελεύθερο πια φωσφορυλιωμένο TFAM μπορεί να αποικοδομηθεί από την πρωτεΐνη Lon. Από την βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι η υπερέκφραση της LonP1 μειώνει τα επίπεδα του TFAM. Στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρείται ότι κατά την προσθήκη τοξινών τα επίπεδα του TFAM παραμένουν σταθερά και ίσα με τα επίπεδα του control. Η μείωση στα επίπεδα του TFAM παρατηρείται μόνο όταν παράλληλα με την προσθήκη τοξινών υπερεκφράζεται και η πρωτεΐνη LonP1. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ίσως το TFAM να είναι υπόστρωμα της Lon κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες στρες. Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι ελέγχθηκε εάν σε αυτές τις συνθήκες επηρεάζονται τα επίπεδα έκφρασης μιτοχondριακών πρωτεϊνών εσωτερικής και εξωτερικής μιτοχondριακής μεμβράνης όπως το Tim23 και η VDAC1 χωρίς ωστόσο καμία μεταβολή στα πρωτεϊνικά τους επίπεδα. Η Parkin είναι μία E3 λιγάση της ουβικιτίνης. Καταλύει την προσθήκη αλυσίδων ουβικιτίνης στις πρωτεΐνες που πρέπει να

σηματοδοτηθούν προς αποικοδόμηση στο σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (UPS), ενώ μεταξύ των υποστρωμάτων της έχει αναγνωριστεί και η α-συνουκλείνη. Στο παραπάνω πείραμα παρατηρείται μία αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Parkin κατά την προσθήκη και 6-OHDA αλλά και ροτενόνης. Παρόλο αυτά, τα επίπεδα της μειώνονται όταν παράλληλα με την προσθήκη τοξινών γίνεται υπερέκφραση της πρωτεΐνης Lon. Αυτό ίσως μπορεί να μας οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι όταν στο μιτοχόνδριο υπάρχουν αυξημένα ποσοστά πρωτεΐνης Lon σε συνθήκες στρες, να μην είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (UPS).

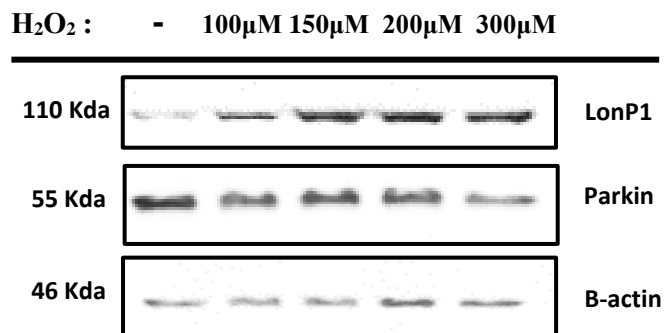
### 7.12. Αύξηση πρωτεϊνικών επιπέδων της LonP1 μετά από προσθήκη H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε κυτταρική σειρά N2A.

Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα των ενδιάμεσων μορφών αναγωγής του O<sub>2</sub> (158). Λόγω του ότι δεν έχει ηλεκτρικό φορτίο, μπορεί εύκολα να διαχέεται μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, μια ιδιότητα πολύ σημαντική για τη φυσιολογική του δράση, αν και υπάρχει μια ειδική πρωτεΐνη (ακουαπορίνη) στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων που έχει την ικανότητα να διευκολύνει τη μεταφορά του. Όταν προστεθεί στο θρεπτικό υλικό κυττάρων σε καλλιέργεια σε συγκεντρώσεις μΜ προξενεί βλάβες και, τελικά, επιφέρει τον θάνατο σε πολλά είδη κυττάρων. Ελάχιστες απ' αυτές τις βλάβες είναι άμεσες, ενώ οι περισσότερες είναι έμμεσες, κυρίως στο DNA, τα λιπίδια και τις περισσότερες πρωτεΐνες, μιας και το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> δεν αντιδρά απευθείας με αυτά τα μόρια. Πιστεύεται ότι το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> διαπερνά πρώτα την κυτταρική μεμβράνη και έπειτα αντιδρά ενδοκυττάρια με διάφορα κέντρα μετάλλων μετάπτωσης (κυρίως Fe), δημιουργώντας δραστικές ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου ή άλλους παράγοντες με παρόμοια υψηλή δραστηριότητα (158).



ΕΙΚΟΝΑ Γ41: Μηχανισμός δράσης H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

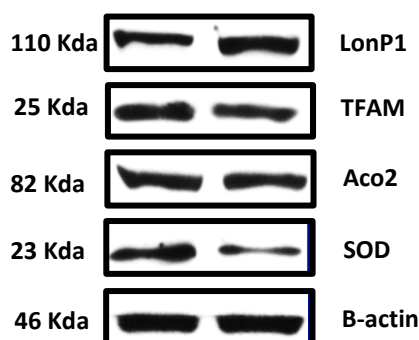
Σε κυτταρική σειρά Neuro2A έγινε προσθήκη  $H_2O_2$  σε ένα εύρος συγκεντρώσεων  $100\mu M - 300\mu M$  με σκοπό να προκληθεί οξειδωτικό στρες στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του  $H_2O_2$  τόσο αυξάνονται και τα επίπεδα της πρωτεΐνης LonP1. Συγκεκριμένα η αύξηση παρατηρείται έντονα από την συγκέντρωση των  $150\mu M$ . Στην συγκέντρωση  $300\mu M$  τα επίπεδα της πρωτεΐνης Parkin μειώνονται αισθητά σε σχέση με το control ενώ μικρή μείωση στα επίπεδά της φαίνονται και από τα  $100\mu M H_2O_2$ . Συνδυαστικά με το παραπάνω πείραμα, παρατηρείται μείωση στα επίπεδα της Parkin κάτω από διαφορετικές συνθήκες στρες (6-OHDA, ροτερόνη,  $H_2O_2$ ). Επιβεβαιώνεται ότι η μείωση αυτή συμβαίνει λόγω αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης Lon, και ίσως οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι και σε αυτή την περίπτωση δεν είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (UPS).



**ΕΙΚΟΝΑ Γ42:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η αύξηση των επιπέδων της LonP1 όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του  $H_2O_2$  για 24 ώρες. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

Για να ελεγχθεί τι συμβαίνει στα πιθανά υποστρώματα της LonP1 στις συγκεκριμένες συνθήκες στρες χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση των  $300\mu M$  όπου είναι μία ακραία συγκέντρωση καθώς μετά από αυτή παρατηρείται κυτταρικός θάνατος σε ποσοστό  $> 70\%$ .

$H_2O_2$ :    -     $300\mu M$

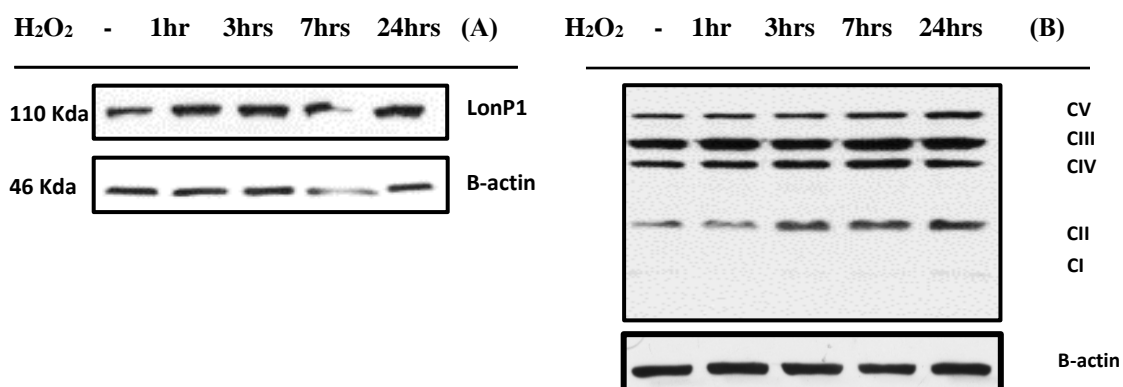


**ΕΙΚΟΝΑ Γ43:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η αύξηση των επιπέδων της LonP1 στην συγκέντρωση  $300\mu M/24hrs$ . Έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων πιθανών υποστρωμάτων της. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

Στο παραπάνω πείραμα επιβεβαιώνεται η αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της LonP1 μετά από προσθήκη  $H_2O_2$  300 $\mu$ M/24ώρες. Παρόλο αυτά στις συγκεκριμένες συνθήκες δεν φαίνεται κάποια αλλαγή στην ακονιτάση (Aco2) αλλά διακρίνεται μία πολύ μικρή μείωση στα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα A(TFAM) που υποδηλώνει ότι ίσως να αποτελεί υπόστρωμα της πρωτεΐνης Lon κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες στρες. Αξίζει να τονιστεί ότι υπάρχει μία έντονη μείωση στα επίπεδα του SOD μετά από το οξειδωτικό στρες. Η δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (SOD) είναι ένα ένζυμο που καταλύει τις αντιδράσεις μετατροπής της δραστηκής ρίζας του οξυγόνου ( $O_2^{\cdot -}$ ) είτε προς μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ) είτε προς υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Η SOD δρα τόσο ως αντιοξειδωτικό, όσο και ως αντιφλεγμονώδες στο σώμα, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες.

### 7.13. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης LonP1 αυξάνονται μέσα σε μία ώρα μετά την προσθήκη $H_2O_2$ 150 $\mu$ M/24ώρες.

Στο παρακάτω πείραμα προστέθηκε το  $H_2O_2$  στην συγκέντρωση των 150 $\mu$ M. Ο λόγος που επιλέχθηκε η συγκεκριμένη συγκέντρωση είναι γιατί σε αυτή παρατηρήθηκε η πρώτη έντονη αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της LonP1. Έγινε προσθήκη του  $H_2O_2$  για διαφορετικές ώρες ώστε να ελεγχθεί πιο συγκεκριμένα ο χρόνος που ξεκινάει να αυξάνεται η LonP1. Επιπλέον στις ίδιες συνθήκες ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης υπομονάδων των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, συγκεκριμένα μία υπομονάδα για το κάθε σύμπλοκο (C I, C II, CIII, και CV). Ο λόγος που έγινε το παρακάτω πείραμα είναι για να ελεγχθεί οποιαδήποτε αλλαγή στα πρωτεϊνικά επίπεδα των υπομονάδων κατά την διάρκεια μίας άλλης μορφής στρες διαφορετικής από την νευροτοξίνη 6-OHDA.

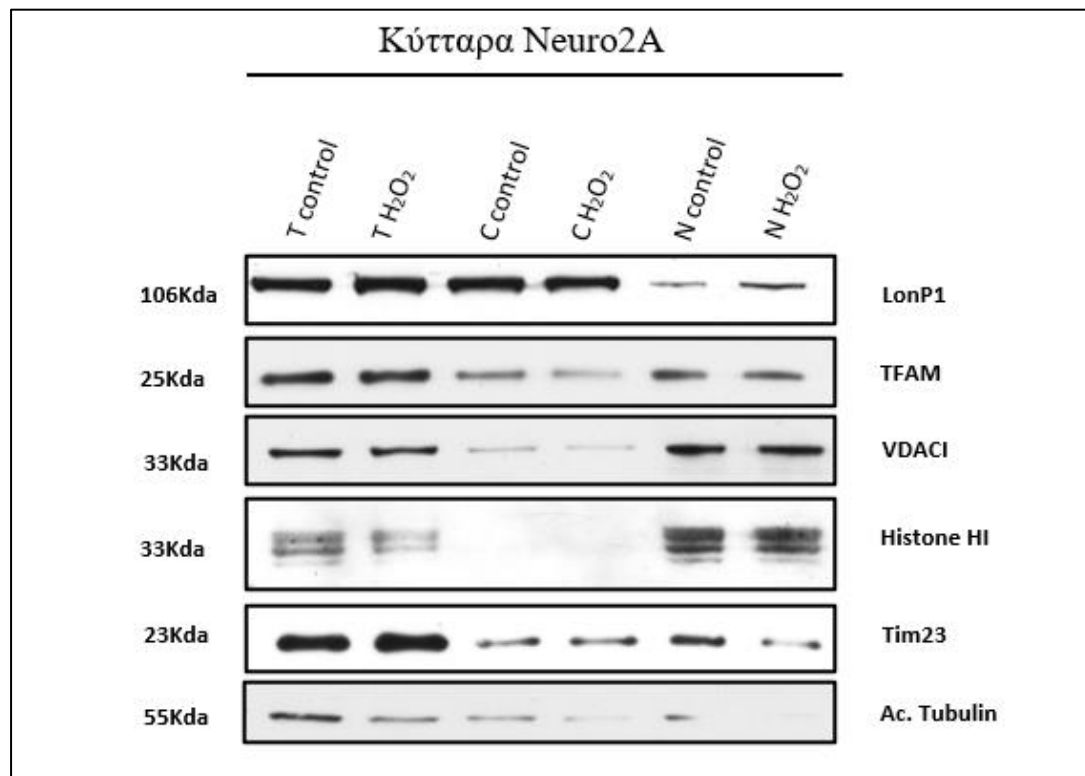


**ΕΙΚΟΝΑ Γ44:** (A) Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η αύξηση των επιπέδων της LonP1 από την πρώτη ώρα κατά την προσθήκη  $H_2O_2$  150 $\mu$ M. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -ακτίνη. (B) 1: Ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου αποτυπώνεται η έκφραση των υπομονάδων των συμπλόκων C I, C II, CIII, και CV της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -actin.

Έγινε προσθήκη  $H_2O_2$  150 $\mu$ M στην κυτταρική σειρά Neuro2A και παρατηρήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της LonP1 μετά από 1,3,7,και 24 ώρες μετά την προσθήκη του  $H_2O_2$ . Η LonP1 φαίνεται να αυξάνεται μετά από μία ώρα και η αύξηση αυτή παραμένει σταθερή τις υπόλοιπες ώρες. Το γεγονός αυτό ίσως μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αύξηση αυτή οφείλεται σε μεταφραστικό φαινόμενο ή σταθεροποιείται ο ρυθμός αποικοδόμησης της. Όσο αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υπομονάδων των συμπλόκων της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας δεν υπάρχει καμία αλλαγή στα σύμπλοκα CV,CIII,CIV και CI. Παρόλο αυτά υπάρχει μία σταδιακή αύξηση στα επίπεδα του CII όσο περνούν οι ώρες μετά την προσθήκη του  $H_2O_2$  ενώ η πρώτη αλλαγή στα επίπεδα του CII γίνεται εμφανής από τις πρώτες 3 ώρες.

#### 7.14: Έλεγχος κατανομής της πρωτεΐνης LonP1 σε κατάσταση οξειδωτικού στρες.

Για τον βιοχημικό προσδιορισμό της κατανομής της πρωτεΐνης LonP1, πραγματοποιήθηκε απομόνωση πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων. Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Neuro2A και πραγματοποιήθηκε προσθήκη  $H_2O_2$  150 $\mu$ M για 24 ώρες. Ο σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι να προσδιορισθεί πιο συγκεκριμένα η αύξηση της πρωτεΐνης LonP1 μετά από το οξειδωτικό στρες.



**ΕΙΚΟΝΑ Γ45:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την ανίχνευση της κατανομής της LonP1 σε ολικά, κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων Neuro2A μετά από οξειδωτικό στρες. Για τον έλεγχο καθαρότητας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ως κυτταροπλασματικός δείκτης η ακετυλιωμένη τουμπουλίνη και ως

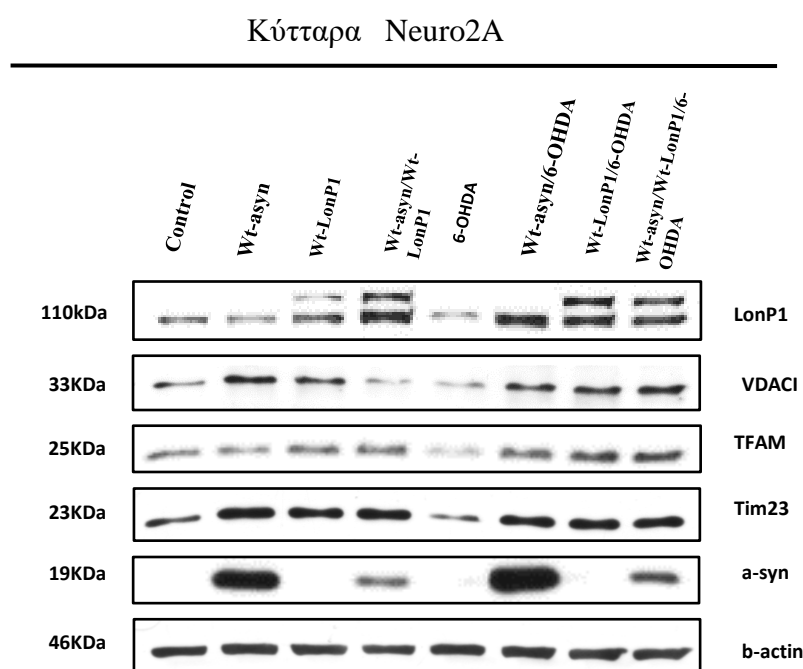


**πυρηνικός δείκτης η ιστόνη 1-H1.T (total): ολικά εκχυλίσματα, C (cytoplasmic): κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα και N (nuclear): πυρηνικά εκχυλίσματα.**

Από το παραπάνω πείραμα παρατηρείται ότι η διαδικασία απομόνωσης εκχυλισμάτων έγινε σωστά και ότι τα δείγματα εμφανίζουν αυξημένη καθαρότητα, καθώς η τουμπουλίνη ανιχνεύεται στα ολικά και στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα, ενώ η ιστόνη H1 στα ολικά και στα πυρηνικά εκχυλίσματα. Σχετικά με την LonP1 παρατηρείται για άλλη μία φορά στα ολικά εκχυλίσματα η αύξηση των επιπέδων της κατά το οξειδωτικό στρες. Παρόλο αυτά τα επίπεδά της στα κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα είναι όμοια ενώ φαίνεται μία μικρή αύξηση στα πυρηνικά εκχυλίσματα κατά την προσθήκη του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Επιπλέον ο μεταγραφικός παράγοντας A (TFAM) φαίνεται να μην παρουσιάζει καμία αλλαγή στα επίπεδα του στην συγκεκριμένη συγκέντρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150μM/24ώρες). Στην συνέχεια ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα διάφορων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών εσωτερικής και εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης όπως το Tim23 και VDAC1. Όσο αφορά την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη το VDAC1 παραμένει σταθερό ενώ αντίθετα όσο αφορά την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, στο Tim23 παρατηρείται μία μείωση των επιπέδων της στα πυρηνικά εκχυλίσματα κατά το οξειδωτικό στρες. Η ανησυχία στο συγκεκριμένο πείραμα είναι ότι και οι τρεις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες TFAM, Tim23, VDAC1 ανιχνεύονται στα πυρηνικά εκχυλίσματα κάτι που μας δείχνει ότι τα μιτοχόνδρια με την συγκεκριμένη μέθοδο περνάνε στα πυρηνικά εκχυλίσματα και δεν υπάρχει καθαρότητα ώστε να βγάλουμε ένα πιο σωστό συμπέρασμα για την αύξηση της πρωτεΐνης LonP1. Ο λόγος που πιθανότατα να συμβαίνει αυτό ίσως είναι ότι τα μιτοχόνδρια είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος ή έχουν κάποια χαρακτηριστικά που τα βοηθά να συμπαρασύρονται στα πυρηνικά εκχυλίσματα. Παρόλο αυτά εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι παρόλο που υπάρχουν μιτοχόνδρια στα πυρηνικά εκχυλίσματα τα επίπεδα TFAM και VDAC1 είναι σταθερά ενώ του Tim23 μειωμένα στην συνθήκη στρες. Έτσι η αύξηση της LonP1 στα πυρηνικά εκχυλίσματα στις συνθήκες στρες αποτελεί ένα ερώτημα και αξίζει να ερευνηθεί περαιτέρω. Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν είναι τόσο αξιόπιστη ώστε να καταλήξουμε σε ένα σωστό συμπέρασμα για την κατανομή της πρωτεΐνης LonP1.

### 7.15. Μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης LonP1 στην $\alpha$ -συνουκλείνη.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω σε προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο μας έγινε διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y με πλασμιδιακούς φορείς που εξέφραζαν την αγρίου τύπου  $\alpha$ -συνουκλείνη (WT  $\alpha$ -syn) και ακολούθως εφαρμογή στρες με δύο διαφορετικούς αναστολείς της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Οι αναστολείς που επιλέχθηκαν είναι οι νευροτοξίνες rotenone και 6-OHDA στις συγκεντρώσεις 500nM/5hrs και 50μM/24hrs αντίστοιχα. Στα πειράματα αυτά επιβεβαιώθηκε η αυξητική τάση έκφρασης της LonP1 παρουσία αναστολέων και με ταυτόχρονη υπερέκφραση της αγρίου τύπου  $\alpha$ -συνουκλείνης (Wt- $\alpha$ syn). Για τον λόγο αυτό θεωρήθηκε σημαντικό να διερευνηθεί η επίδραση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης LonP1 παράλληλα με την εφαρμογή στρες στα πρωτεϊνικά επίπεδα της  $\alpha$ -συνουκλείνης. Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε είναι τα Neuro2A κύτταρα. Έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με τους πλασμιδιακούς φορείς pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP και pEGFP-N1- $\alpha$ -synWT και η προσθήκη νευροτοξίνης 6-OHDA στην συγκέντρωση 50μM για 24 ώρες.



**ΕΙΚΟΝΑ Γ46:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western μετά από επιμόλυνση κυττάρων N2A με τους πλασμιδιακούς φορείς pLonP1(BamHI)(AgeI)-AcGFP και pEGFP- $\alpha$ -syn με ταυτόχρονη προσθήκη αναστολέα 6-OHDA στην συγκέντρωση 50μM/24hr. Ως κυτταροπλασματικός δείκτης ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ -ακτίνη.

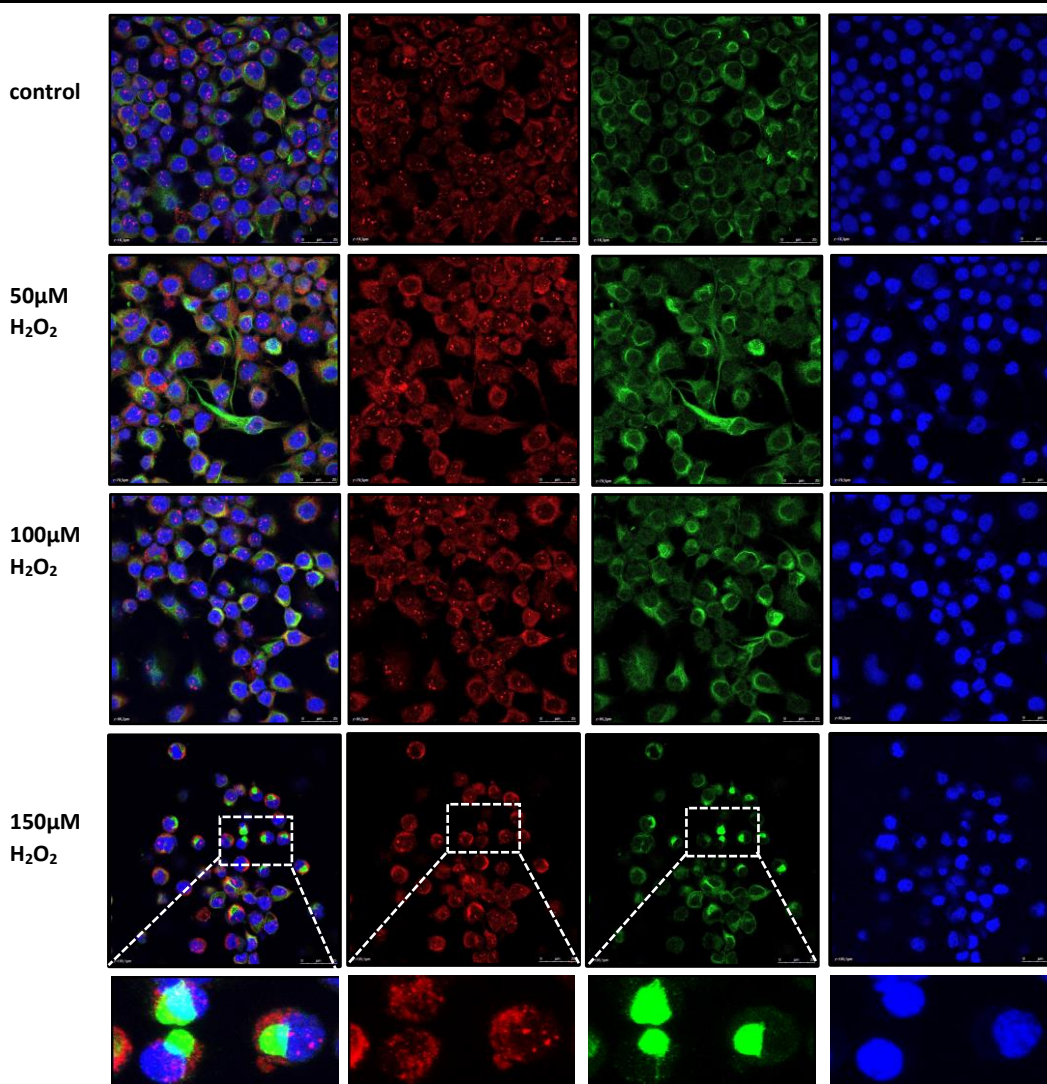
Στο παραπάνω πείραμα παρατηρείται για άλλη μία φορά ότι και στην κυτταρική σειρά Neuro2A τα επίπεδα της πρωτεΐνης LonP1 αυξάνονται παρουσία αναστολέα 6-OHDA (50μM/24ώρες) και με την ταυτόχρονη υπερέκφραση αγρίου τύπου α-συνουκλείνης (α-syn WT). Η ταυτόχρονη παρουσία ενός επιγενετικού παράγοντα που επηρεάζει τα μιτοχόνδρια (6-OHDA) και ενός γενετικού παράγοντα που συνδέεται με την νόσο Parkinson, όπως η υπερέκφραση της α-συνουκλείνης αυξάνουν την ενδογενή LonP1. Αυτό ίσως μπορεί να συμβαίνει γιατί το κύτταρο συνδυαστικά με τους δύο παράγοντες "αναστατώνεται" περισσότερο από ότι με την νευροτοξίνη 6-OHDA μόνη της. Παρουσία μιτοχονδριακού στρες, τα πρωτεϊνικά επίπεδα διάφορων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών μειώνονται δείχνοντας μία πιθανή μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Ελέγχθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης Tim23 που ανήκει στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, της VDAC1 που είναι πρωτεΐνη εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης καθώς και του μεταγραφικού παράγοντα A (TFAM). Η αύξηση στα επίπεδα της LonP1 ίσως και να δρα προστατευτικά διότι βοηθάει στην διατήρηση των επιπέδων των τριών μιτοχονδριακών πρωτεϊνών Tim23, VDAC1 και TFAM. Είναι ευδιάκριτη η σημαντική μείωση στα επίπεδα της α-συνουκλείνης όταν υπερεκφράζεται παράλληλα η LonP1. Η μείωση αυτή συμβαίνει και σε συνθήκες μιτοχονδριακού στρες. Γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η εξωγενής α-συνουκλείνη ίσως και να είναι στόχος της πρωτεΐνης LonP1 σε νευρικά κύτταρα.

#### 7.16. Έλεγχος συνεντοπισμού p-53 και LonP1 μετά από οξειδωτικό στρες.

Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι διερευνάτε ο τρόπος με τον οποίο η LonP1 ρυθμίζει την διαδικασία της απόπτωσης μέσω της αρμοδιότητας της σαν πρωτεΐνη συνοδός (Chaperone). Μελέτες έχουν δείξει ότι διάφορες μορφές στρες προκαλούν μεταφορά του p53 στα μιτοχόνδρια με τρόπο ανεξάρτητο από την μεταγραφή. Επιπλέον έχειδειχτεί ότι η Lon αλληλεπιδρά με το p53 στα μιτοχόνδρια και περιορίζει την απόπτωση που προκαλείται από το p53 υπό οξειδωτικό στρες (159). Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Neuro2A και για την δημιουργία οξειδωτικού στρες το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε συγκεντρώσεις 50μM, 100μM και 150μM για 3 και 7 ώρες. Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος είναι να ελέγξουμε εάν η πρωτεΐνη Lon συμπεριφέρεται με παρόμοιο τρόπο και στο δικό μας μοντέλο νευρικών κυττάρων Neuro2A, καθώς και να ελέγξουμε την αλληλεπίδραση της Lon με το p53.

### Κύτταρα Neuro2A-3hrs(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

LonP1/p-53/Draq5



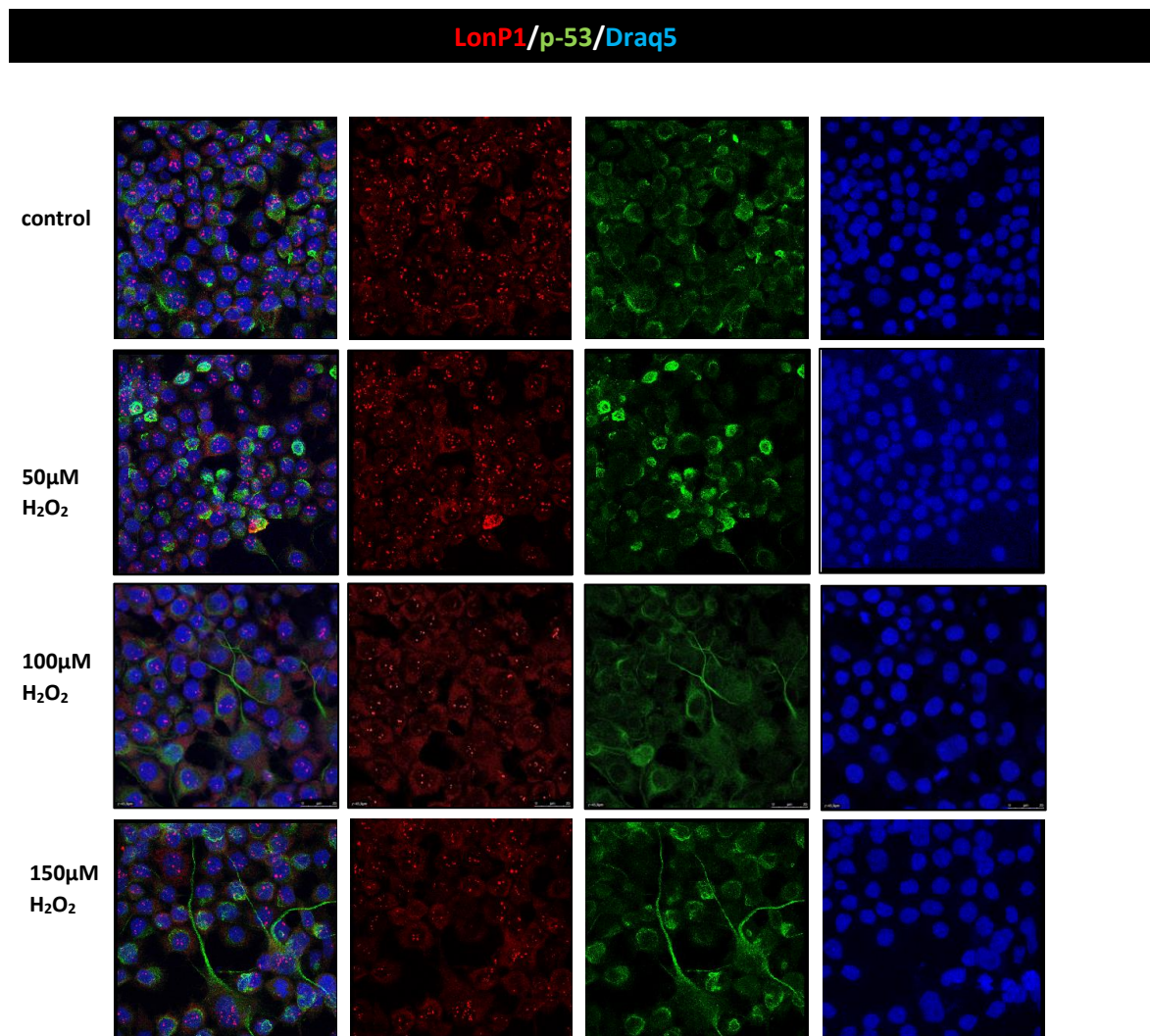
**ΕΙΚΟΝΑ Γ47:** Ανοσοφθορισμός στην κυτταρική σειρά Neuro2A μετά την χρήση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 3 ώρες. Χρήση πρωτογενούς αντισώματος LonP1(anti-Rabbit Red) και p-53 (anti-Mouse Green). Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5 (blue). Φακός 63X.

Στην συνθήκη control η ενδογενής πρωτεΐνη εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Όσο αφορά το p53 παρατηρείται ότι εντοπίζεται κυρίως πολικά στα κύτταρα ενώ η LonP1 φαίνεται να το περιβάλλει. Στις τρεις ώρες μετά την προσθήκη H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50μM τα κύτταρα αρχίζουν και σχηματίζουν νευρίτες ο σχηματισμός των οποίων πιθανώς σχετίζεται με την παρουσία στρες ενώ η συμπεριφορά της πρωτεΐνη LonP1 δεν παρουσιάζει κάποια αλλαγή. Κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100μM το p53 γίνεται πιο έντονο και φαίνεται να εμφανίζει πιο έντονη πολικότητα γεγονός που γίνεται ακόμη πιο έντονο όταν αυξάνεται και άλλο η συγκέντρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150μM. Παρόλο αυτά δεν παρατηρείται κάποιος συνεντοπισμός p-53 με LonP1



καθώς σε όλες τις περιπτώσεις η Lon φαίνεται να περιβάλλει το p53. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη τοξίνης στις ίδιες συγκεντρώσεις αλλά για 24 ώρες.

#### Κύτταρα Neuro2A-24hrs(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)



**ΕΙΚΟΝΑ Γ48:**Ανοσοφθορισμός στην κυτταρική σειρά Neuro2A μετά την χρήση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 24 ώρες.Χρήση πρωτογενούς αντισώματος LonP1(anti-Rabbit Red) και p-53 (anti-Mouse Green).Η χρώση πυρήνων έγινε με την χρωστική Draq5(blue).Φακός 63X

Στις 24 ώρες μετά την προσθήκη H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> διακρίνεται μία διαφορετική συμπεριφορά στα κύτταρα σε σχέση με τις τρεις ώρες. Αρχικά από τα 50μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> γίνεται εμφανής η πιο έντονη πολικότητα του p-53 όμοια με αυτή στα 100μM/3ώρες H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Μετά την προσθήκη 100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> τα κύτταρα ξεκινούν και δημιουργούν νευρίτες οι οποίοι γίνονται λίγο πιο έντονη στα 150μM.Βέβαια σε καμία περίπτωση από αυτές δεν υπάρχει συνεντοπισμός LonP1 και p-53 στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Η πρωτεΐνη Lon παραμένει σταθερή και όμοια με το control σε όλες τις συνθήκες.



## Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η νόσος του Parkinson αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή, χρόνια νευροεκφυλιστική διαταραχή, μετά τη νόσο Alzheimer. Οφείλεται στην εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας και χαρακτηρίζεται από συσσώρευση συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης. Πλήθος *in vivo* και *in vitro* μελετών έχουν επιβεβαιώσει την αιτιολογική σχέση της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας με τις νευροεκφυλιστικές διαταραχές, ενώ η έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες θεωρείται ότι έχει σημαντική συμβολή στην παθογένεση της νόσου. Μετά την πρώτη αναφορά το 2000 ότι η χρόνια έκθεση αρουραίων στην τοξίνη rotenone (η οποία χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο ευρέος φάσματος, ζιζανιοκτόνο και παρασιτοκτόνο), οδηγεί σε επιλεκτική εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, *in vitro* μελέτες από άλλες ομάδες αλλά και τη δική μας, έδειξαν ότι η παρατεταμένη έκθεση νευρικών κυττάρων σε χαμηλές συγκεντρώσεις τοξινών όπως η ροτενόνη ή η συνθετική νευροτοξίνη 6-OHDA, επάγει το σχηματισμό εγκλείστων α-συνουκλεΐνης στο εσωτερικό τους.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης των διαδοχικών κυτταρικών αλλαγών που οδηγούν στην εμφάνιση παρκινσονιακών χαρακτηριστικών σε ένα *in vitro* σύστημα νευροβλαστωματικών κυττάρων της σειράς SH-SY5Y στο εργαστήριο μας, αποκαλύφθηκε η πιθανή συσχέτιση της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 με την νόσο Parkinson. Η πρωτεομική ανάλυση με φασματομετρία μάζας σε συνθήκες υπερέκφρασης της αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνης και ταυτόχρονης επώασης με την νευροτοξίνη ροτενόνη, έδειξε ότι ο συνδυασμός αυτών των δύο συνθηκών επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων πρωτεϊνών ανάμεσα στις οποίες και της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1. Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν ότι η απόκριση στο οξύ στρες που προκαλούν αυτές οι τοξίνες οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης, μόνο όταν συνδυάζεται ο γενετικός παράγοντας, δηλαδή η υπερέκφραση της αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνης με ένα περιβαλλοντικό παράγοντα όπως η παρουσία της νευροτοξίνης ροτενόνη ή η 6-OHDA σε υψηλή συγκέντρωση. Σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης, παρατηρήσαμε ότι όταν υπερεκφράζεται η αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνη (α-syn WT) ή η μεταλλαγμένη μορφή της A30P, σχηματίζονται συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης. Μάλιστα, η A30P έχει μεγαλύτερη τάση ως προς τον σχηματισμό εγκλείστων καθώς όλα τα διαμολυσμένα κύτταρα σχηματίζουν εγκλείστα α-συνουκλεΐνης. Είναι ενδιαφέρον ότι όταν υπερεκφράζονται αυτές οι δύο μορφές α-συνουκλεΐνης παράλληλα με την χρήση τοξίνης 6-OHDA, τα συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης και στις δύο περιπτώσεις συνεντοπίζονται με την πρωτεΐνη LonP1. Μια σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε ανάμεσα στην συνουκλεΐνη αγρίου τύπου και του μεταλλάγματος A30P παρουσία μιτοχονδριακού στρες, ήταν ότι στην δεύτερη τα εγκλείστα είναι αρκετά μεγαλύτερα σε μέγεθος.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης LonP1 σε καταστάσεις διαφορετικών τύπων οξέος στρες, να χαρακτηριστεί η κατανομή της μέσα στο κύτταρο, και να ελεγχθεί τι προκαλεί η υπερέκφρασή της στη μιτοχονδριακή λειτουργία και τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης, έτσι ώστε να δούμε αν σχετίζεται με κάποιο τρόπο με την νόσο του Parkinson. Ένας ακόμη στόχος ήταν να κατασκευάσουμε μια μεταλλαγμένη μορφή της LonP1, η οποία έχει συσχετισθεί με το σύνδρομο CODAS (*Cerebral, ocular, dental, auricular, skeletal syndrome, MIM*

600373) με απώτερο στόχο να κατανοήσουμε ποια από τις λειτουργίες αυτής της πρωτεΐνης έχει επηρεαστεί από την συγκεκριμένη μετάλλαξη (R721G).

Η LonP1 είναι μία πρωτεΐνη απόκρισης στο στρες, η οποία παρουσιάζει διττή συμπεριφορά. Τα επίπεδα της αυξάνονται σε συνθήκες εφαρμογής θερμικού σοκ, στέρησης ορού ή οξειδωτικού στρες για μικρό χρονικό διάστημα (οξύ στρες), προκειμένου να απομακρυνθούν πρωτεΐνες που έχουν υποστεί βλάβη και οι οποίες βρίσκονται στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου. Αντίθετα τα επίπεδα της μειώνονται στο μυϊκό ιστό γερασμένων ποντικών, σε ποντίκια ετερόζυγα για το γονίδιο που κωδικοποιεί την δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (SOD), καθώς και σε κύτταρα ασθενών με κληρονομική σπαστική παραπληγία (μία νόσο που έχει συνδεθεί με μετάλλαξη στο γονίδιο SPG13 (*Spastic Paraplegia 13*), το οποίο κωδικοποιεί την μιτοχονδριακή πρωτεΐνη συνοδό Hsp60). Έχουν καταγραφεί επίσης περιπτώσεις όπου τα συνολικά πρωτεϊνικά επίπεδα της LonP1 λόγω γήρανσης δεν μεταβάλλονται αλλά παρατηρείται μείωση στην ενεργότητα πρωτεΐνης.

Εξαιτίας προβλημάτων στα ρυθμιστικά στοιχεία του πλασμιδιακού φορέα LonP1 που διαθέταμε στο εργαστήριο μας (pCMV6-XL4-LonP1), προκειμένου να μπορέσουμε να υπερεκφράσουμε το γονίδιο της LonP1, έπρεπε να το υποκλωνοποιήσουμε σε δύο άλλους πλασμιδιακούς φορείς, τον pAcGFP-N1 και τον pDdsRED-N1. Διαπιστώσαμε ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης LonP1 στα νευρικά κύτταρα, σε συνδυασμό με συνθήκες μιτοχονδριακού στρες (με τις νευροτοξίνες 6-OHDA και rotenone) οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της ενδογενούς πρωτεΐνης. Παρατηρήσαμε επίσης μια σημαντική μείωση στα επίπεδα του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα A (TFAM) που μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι μπορεί να αποτελεί υπόστρωμα της πρωτεΐνης LonP1 κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες. Εντύπωση προκάλεσε το γεγονός ότι στις ίδιες συνθήκες η πρωτεΐνη Parkin αυξάνεται ενώ όταν παράλληλα υπερεκφράζεται και η πρωτεΐνη LonP1, επέρχεται μείωση στα επίπεδά της. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι ίσως κατά το μιτοχονδριακό στρες να μην είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση του μονοπατιού PINK1-Parkin όταν υπάρχουν αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης Lon στο κυτταρικό περιβάλλον. Η παρατήρηση αυτή είναι αρκετά ενδιαφέρουσα αν συνδυαστεί με το γεγονός ότι σε όμοιες συνθήκες, δηλαδή κατά την ταυτόχρονη παρουσία ενός γενετικού παράγοντα ( $\alpha$ -συνουκλείνη) και ενός περιβαλλοντικού παράγοντα (τοξίνες) που μεμονωμένα έχουν συνδεθεί με την νόσο, αυξάνονται τα επίπεδα της ενδογενούς πρωτεΐνης LonP1.

Παρατηρήσαμε επίσης μια σημαντική μείωση στα επίπεδα της  $\alpha$ -συνουκλείνης όταν υπάρχει ταυτόχρονη υπερέκφραση LonP1 είτε παρουσία στρες είτε όχι. Ίσως λοιπόν η εξωγενής  $\alpha$ -συνουκλείνη να αποτελεί στόχο της πρωτεΐνης LonP1 στα νευρικά κύτταρα.

Παράλληλα ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα διάφορων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών όπως οι Tim23, VDAC1 και TFAM. Διαπιστώσαμε μια εμφανή μείωση στα επίπεδα αυτών των τριών πρωτεϊνών στα κύτταρα μετά από μιτοχονδριακό στρες, ενώ όταν υπάρχει εξωγενής LonP1 τα επίπεδα και των τριών αυτών πρωτεϊνών αυξάνονται ξανά, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ίσως η LonP1 να δρα προστατευτικά και να βοηθά στην διατήρηση των επιπέδων τους και την ομοιόσταση του μιτοχονδρίου.

Προκειμένου να ελεγχθεί η συμπεριφορά της LonP1 κάτω από άλλες συνθήκες οξέος στρες, επιλέχθηκε το  $H_2O_2$ . Το  $H_2O_2$  είναι ένα πολύ σταθερό μόριο και διαπερατό στις μεμβράνες των κυττάρων. Έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής και όταν εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων αντιδρά με πολλά μεταλλικά ιόντα. Κυρίως αντιδρά με  $Fe^{+2}$  και μετατρέπεται μέσω αντιδράσεων Fenton σε δραστικές ρίζες υδροξυλίου  $OH \cdot$ . Η δραστικότητα της ρίζας υδροξυλίου είναι αρκετά υψηλή και έχει την ικανότητα να αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα συστατικά του κυττάρου αλλά και με πολλά

βιολογικά μακρομόρια, όπως με DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια, δημιουργώντας έτσι οξειδωτικό στρες. Παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα της ενδογενούς LonP1 αυξάνονταν σταδιακά όσο αυξανόταν και η συγκέντρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ο μεταγραφικός παράγοντας A (TFAM) φαίνεται ότι και σε αυτές τις συνθήκες στρες αποτελεί υπόστρωμα της LonP1, καθώς τα επίπεδα του μειώνονται με την αύξηση της πρωτεΐνης LonP1. Όπως και στην περίπτωση του 6-OHDA, παρουσία και αυτής της μορφής στρες, τα επίπεδα της πρωτεΐνης Parkin αυξάνονται ενώ μειώνονται με ταυτόχρονη υπερέκφραση της Lon P1. Επιβεβαιώνεται έτσι το κύτταρο «προτιμά» να μην ενεργοποιεί το μονοπάτι PINK1/Parkin=όταν υπάρχει δυνατότητα να αυξηθούν τα επίπεδα της LonP1 στο κυτταρικό σύστημα. Παρατηρώντας την συμπεριφορά της πρωτεΐνης LonP1 μετά από την προσθήκη H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για διαφορετικές ώρες καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η LonP1 αυξάνεται ταχύτατα, την πρώτη κιόλας ώρα μετά την επαγωγή του στρες. Ίσως αυτό να οφείλεται σε αυξημένη μετάφραση του αντίστοιχου mRNA ή σε μείωση του ρυθμού αποικοδόμησής της.

Πειράματα για τον έλεγχο κατανομής της LonP1 δεν μας βοήθησαν να καταλήξουμε σε ένα σωστό συμπέρασμα καθώς η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση κυτταροπλασματικών-πυρηνικών εκχυλισμάτων δεν ήταν αξιόπιστη. Παρατηρήθηκαν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες στα πυρηνικά εκχυλίσματα κάτι που μπορεί να συνέβη ίσως γιατί τα μιτοχόνδρια είναι αρκετά μεγάλα σε μέγεθος είτε γιατί απέκτησαν κάποια χαρακτηριστικά που τα βοήθησε να συμπαρασυρθούν στα πυρηνικά εκχυλίσματα. Χρειάζεται να βρεθεί μία πιο αξιόπιστη μέθοδος έτσι ώστε να καταλήξουμε σε ένα συμπέρασμα για την σωστή κατανομή της LonP1 κάτω από συνθήκες στρες, και όχι μόνο.

Στο μόριο της LonP1 έχουν βρεθεί διάφορες μεταλλάξεις οι οποίες εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή της ATPάσης. Το κατάλοιπο R721 βοηθά στον σχηματισμό μίας γέφυρας άλατος με το G654, η οποία βοηθά στην σταθεροποίηση του ομο-ολιγομερισμού της LonP1. Όταν όμως υπάρχει η μετάλλαξη R721G τότε δεν σχηματίζεται αυτή η γέφυρα άλατος και το μόριο αποσταθεροποιείται. Πειράματα συν-ανοσοκαταβύθισης μετά από υπερέκφραση των αντίστοιχων cDNAs αποκάλυψαν ότι όταν υπάρχει αυτή η μετάλλαξη, τα εξαμερή που σχηματίζει η LonP1 είναι ασταθή, με μειωμένη δραστηριότητα ATPάσης αλλά και πρωτεολυτική ικανότητα. Είναι βέβαια γνωστό ότι ακόμη και έτσι, η LonP1-R721G μπορεί να συνεχίσει να αποικοδομεί κάποια υποστρώματα όπως τον μεταγραφικό παράγοντα A (TFAM) αλλά κάποια άλλα όχι, όπως για παράδειγμα την πρωτεΐνη STAR. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη μέχρι σήμερα είναι η πιο συχνά εμφανιζόμενη μεταξύ ασθενών με το σύνδρομο CODAS. Στο εργαστήριο μας επιλέξαμε να δημιουργήσουμε την συγκεκριμένη μετάλλαξη έτσι ώστε την να συγκρίνουμε με την συμπεριφορά της αγρίου τύπου LonP1. Ο πλασμιδιακός φορέας στον οποίο έγινε η μετάλλαξη της LonP1 παρασκευάστηκε στο εργαστήριο μας και είναι ο pLonP1(STOP)-AcGFP, γεγονός που επιτρέπει την εύκολη ανίχνευση της πρωτεΐνης.

Συμπερασματικά, η συγκεκριμένη μελέτη ανοίγει ορίζοντες για να διερευνηθεί καλύτερα ο ρόλος της μιτοχονδριακής πρωτεάσης LonP1 στην παθογένεση της νόσου Parkinson, και να κατανοηθεί η αλληλεπίδραση αυτής της πρωτεΐνης με την ασυνουκλείνη αλλά και με το μονοπάτι PINK1-Parkin. Επιπλέον, η μετάλλαξη που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο μας, στο γονίδιο της LonP1, μπορεί σε μελλοντικά πειράματα να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε πώς η συγκεκριμένη αλλαγή από R σε G μπορεί να έχει αντίκτυπο στην λειτουργία των μιτοχονδρίων και με ποιους μηχανισμούς οδηγεί στον πλειοτροπικό φαινότυπο του συνδρόμου CODAS.

## **E. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**

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

ΔΨm: Δυναμικό μιτοχονδριακής μεμβράνης

A.

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

ALP: Σύστημα αποικοδόμησης αυτοφαγίας – λυσοσώματος, (autophagy-lysosomal pathway).

a-syn: Alpha-synuclein.

ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη, (Adenosine-5'-triphosphate).

B.

C.

C: κυτταροπλασματικό, (Cytoplasm).

CBA: Chromatin Binding Assay.

COX: cytochrome c oxidase.

cyt c: κυτόχρωμα C, (cytochrome c).

D.

DA: Ντοπαμινεργικός νευρώνας, (Dopaminergic neuron).

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

DAT: Μεταφορέας ντοπαμίνης, (dopamine transporter).

DMSO: διμέθυλο-σουλφοξείδιο, (dimethyl sulfoxide).

dsDNA: double-stranded DNA.

E.

ECL: ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, (Enhanced Chemilluminescence).

EDTA: EthyleneDiamineTetraAcetic acid.

EtBr: βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium bromide).

EtOH: αιθανόλη, (Ethanol).

F.

G.

H.

HIF: hypoxia-inducible transcription factor.

HP1: Heterochromatin protein 1.

HSP: heat shock protein.

I.

J.

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

K.

L.

LBS: συσσωματώματα Lewy, (Lewy bodies).

L-dopa: L-3,4-δευδροξυφαινυλαλανίνη, (L-3,4-dihydroxyphenylalanine).

LN: Νευρίτες Lewy, (Lewy Neurites).

LRRK2: leucine rich repeat kinase 2.

M.

MPTP: 1-μέθυλο-4-φαίνυλο-1,2,3,6-τετραυδροπυριδίνη, (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine).

MS: φασματομετρία μάζας, (Mass spectrometry).

mtDNA: μιτοχονδριακό DNA, (mitochondrial DNA).

MTS: mitochondrial targeting sequence.

mtSSB: mitochondrial single-strand binding protein.

N.

NF-κB: nuclear factor kappa from B cells.

NLS: Nuclear Localization Signal.

O.

OXPPOS: οξειδωτική φωσφορύλιωση, (oxidative phosphorylation).

P.

PBS: διάλυμα φωσφορικών αλάτων, (phosphate buffered saline).

PCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, (Polymerase Chain Reaction).

PD: νόσος του Parkinson (Parkinson's Disease).

PFA: παραφορμαλδεύδη, (paraformaldehyde).

PINK1: PTEN-induced kinase protein 1.

Q.

R.

RIPA Buffer: διάλυμα ραδιοανοσοκακκήμησης, (Radio immunoprecipitation Assay Buffer).

ROS: ενεργές ρίζες οξυγόνου, (reactive oxygen species) .

S.

SDS: δωδέκυλο-θειικό νάτριο, (sodium dodecyl-sulphate).

Ser: Σερίνη, (Serine).

SNARE: SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor.

SNCA: γονίδιο α-synuclein, (α-synuclein gene).

SNP: a single nucleotide polymorphism.

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

ssDNA: single-stranded DNA.

T.

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

TNTs: tunneling nanotubes.

Tyr: Τυροσίνη, (Tyrosine).

U.

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

V.

W.

WB: Ανοσοαποτύπωση κατά western, (Western blot).

WT: αγρίου τύπου, (wild type).



X.  
Y.  
Z.

## **Z. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- 1) Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes ,C M Tanner , D A Aston,2000.
- 2) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis .J Jankovic ,2008.
- 3) Parkinson-related parkin reduces  $\alpha$ -Synuclein phosphorylation in a gene transfer model.Preeti J Khandelwal , Sonya B Dumanis, Li Rebekah Feng, Kathleen Maguire-Zeiss, Gw Rebeck, Hilal A Lashuel, Charbel Eh Moussa ,2010.
- 4) Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread,Patrik Brundin , Jia-Yi Li, Janice L Holton, Olle Lindvall, Tamas Revesz,2008.
- 5) William Dauer and Serge Przedborski, Neuron, September 2003.
- 6) The cellular pathology of Parkinson's disease,H Takahashi , K Wakabayashi,2001.
- 7) Alpha-synuclein in Lewy bodies,M G Spillantini, M L Schmidt, V M Lee, J Q Trojanowski, R Jakes, M Goedert,1997.
- 8) The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates,Koichi Wakabayashi , Kunikazu Tanji, Fumiaki Mori, Hitoshi Takahashi ,2007
- 9) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions,Hideo Fujiwara <sup>1</sup> , Masato Hasegawa, Naoshi Dohmae, Akiko Kawashima, Eliezer Masliah, Matthew S Goldberg, Jie Shen, Koji Takio, Takeshi Iwatsubo,2002)
- 10)The cellular pathology of Parkinson's disease,H Takahashi , K Wakabayashi,2001.
- 11)Caudo-rostral brain spreading of  $\alpha$ -synuclein through vagal connections,Ayse Ulusoy , Raffaella Rusconi, Blanca ,Pérez-Revuelta, Ruth E Musgrove, Michael Helwig, Bettina Winzen-Reichert, Donato A Di Monte ,2013.
- 12)Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts,Kurt A Jellinger,2012.
- 13)Immunohistochemical, volumetric, and functional neuroimaging studies in patients with idiopathic Parkinson's disease T Hummel , M Witt, H Reichmann, A Welge-Luessen, A Haehner ,2010.
- 14)Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23,M H Polymeropoulos <sup>1</sup> , J J Higgins, L I Golbe, W G Johnson, S E Ide, G Di Iorio, G Sanges, E S Stenroos, L T Pho, A A Schaffer, A M Lazzarini, R L Nussbaum, R C Duvoisin ,1996.
- 15)Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease,M H Polymeropoulos <sup>1</sup> , C Lavedan, E Leroy, S E Ide, A Dehejia, A Dutra, B Pike, H Root, J Rubenstein, R Boyer, E S Stenroos, S Chandrasekharappa, A Athanassiadou, T Papapetropoulos, W G Johnson, A M Lazzarini, R C Duvoisin, G Di Iorio, L I Golbe, R L Nussbaum ,1997.
- 16)Parkinson's disease: A genetic perspective,Andrea C. Belin ,Marie Westerlund,2008.
- 17)alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease,A B Singleton <sup>1</sup> , M Farrer, J Johnson, A Singleton, S Hague, J Kachergus, M Hulihan, T Peuralinna, A Dutra, R Nussbaum, S Lincoln, A Crawley, M Hanson, D Maraganore, C Adler, M R Cookson, M Muentert, M Baptista, D Miller, J Blancato, J Hardy, K Gwinn-Hardy ,2003.
- 18)Can Interactions Between  $\alpha$ -Synuclein, Dopamine and Calcium Explain Selective Neurodegeneration in Parkinson's Disease?,Michael R. Post, Ori J. Lieberman, and Eugene V. Mosharov ,2018.

- 19) Parkin genetics: one model for Parkinson's disease, Ignacio F. Mata, Paul J. Lockhart, Matthew J. Farrer, 2004.
- 20) Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene, C B Lücking<sup>1</sup>, A Dürr, V Bonifati, J Vaughan, G De Michele, T Gasser, B S Harhangi, G Meco, P Denèfle, N W Wood, Y Agid, A Brice, French Parkinson's Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease, 2000.
- 21) Cell systems and the toxic mechanism(s) of  $\alpha$ -synuclein, Mark R Cookson and Marcel van der Brug, 2005.
- 22) Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane, Saori R Yoshii<sup>1</sup>, Chieko Kishi, Naotada Ishihara, Noboru Mizushima, 2011.
- 23) The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology, Angela C Poole<sup>1</sup>, Ruth E Thomas, Laurie A Andrews, Heidi M McBride, Alexander J Whitworth, Leo J Pallanck, 2008.
- 24) Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation, Hui Xiong<sup>1</sup>, Danling Wang, Linan Chen, Yeun Su Choo, Hong Ma, Chengyuan Tang, Kun Xia, Wei Jiang, Ze'ev Ronai, Xiaoxi Zhuang, Zhuohua Zhang, 2009.
- 25) Genetic Etiology of Parkinson Disease Associated with Mutations in the *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *PARK7*, and *LRRK2* Genes: A Mutation Update, Karen Nuytemans,<sup>1,2</sup> Jessie Theuns,<sup>1,2</sup> Marc Cruts,<sup>1,2</sup> and Christine Van Broeckhoven, 2004.
- 26) From  $\alpha$ -synuclein to synaptic dysfunctions: new insights into the pathophysiology of Parkinson's disease, Arianna Bellucci<sup>1</sup>, Michela Zaltieri, Laura Navarria, Jessica Grigoletto, Cristina Missale, Pierfranco Spano, 2012.
- 27) Role of  $\alpha$ -synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation, Igor F Tsigelny<sup>1</sup>, Yuriy Sharikov, Wolfgang Wrasidlo, Tania Gonzalez, Paula A Desplats, Leslie Crews, Brian Spencer, Eliezer Masliah, 2012.
- 28) Systematic Mutagenesis of  $\alpha$ -Synuclein Reveals Distinct Sequence Requirements for Physiological and Pathological Activities, Jacqueline Burré,<sup>1</sup> Manu Sharma,<sup>1</sup> and Thomas C. Südhof,<sup>1</sup> 2010.
- 29) Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro, Jacqueline Burré<sup>1</sup>, Manu Sharma, Theodoros Tsetsenis, Vladimir Buchman, Mark R Etherton, Thomas C Südhof, 2010.
- 30) Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells, Kelvin C Luk<sup>1</sup>, Cheng Song, Patrick O'Brien, Anna Stieber, Jonathan R Branch, Kurt R Brunden, John Q Trojanowski, Virginia M-Y Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers Karin M Danzer, Lisa R Kranich, Wolfgang P Ruf, Ozge Cagsal-Getkin, Ashley R Winslow, Liya Zhu, Charles R Vanderburg & Pamela J McLean Lee, 2012.
- 31) The remarkable conformational plasticity of alpha-synuclein: blessing or curse? Angélique Deleersnijder<sup>1</sup>, Melanie Gerard, Zeger Debyser, Veerle Baekelandt, 2013.
- 32) Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding Karin M Danzer<sup>1</sup>, Dorothea Haasen, Anne R Karow, Simon Moussaud, Matthias Habeck, Armin Giese, Hans Kretzschmar, Bastian Hengerer, Marcus Kostka, 2007.

- 33)  $\alpha$ -Synuclein Promotes Mitochondrial Deficit and Oxidative Stress,<sup>\*†</sup> Yutaka Sagara,<sup>†</sup> Armando Arroyo,<sup>‡</sup> Edward Rockenstein,<sup>†</sup> Abbyann Sisk,<sup>†</sup> Margaret Mallory,<sup>†</sup> Jeff Wong,<sup>‡</sup> Takato Takenouchi,<sup>†</sup> Makoto Hashimoto,<sup>†</sup> and Eliezer Masliah 2007
- 34) Demonstration of a role for alpha-synuclein as a functional microtubule-associated protein, Muhammad Abdul Alim, 2004.
- 35) A Pathologic Cascade Leading to Synaptic Dysfunction in  $\alpha$ -Synuclein-Induced Neurodegeneration, David A Scott, Justin V Tabarean, 2010
- 36) Oxidative and nitrative alpha-synuclein modifications and proteostatic stress: implications for disease mechanisms and interventions in synucleinopathies Stefan Schildknecht, Hanne R. Gerding, Christiaan Karreman, Malte Drescher, Hilal A. Lashuel, Tiago F. Outeiro, Donato A. Di Monte, Marcel Leist, 2013.
- 37) Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein., Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, Spencer B, Masliah E, Lee SJ, 2009.
- 38) Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons in vivo Elodie Angot<sup>1</sup>, Jennifer A Steiner, Carla M Lema Tomé, Peter Ekström, Bengt Mattsson, Anders Björklund, Patrik Brundin, 2012.
- 39) Dissecting the potential molecular mechanisms underlying alpha-synuclein cell-to-cell transfer in Parkinson's disease, Elodie Angot<sup>1</sup>, Patrik Brundin, 2009.
- 40) Role of  $\alpha$ -synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation, Igor F Tsigelny<sup>1</sup>, Yuriy Sharikov, Wolfgang Wrasidlo, Tania Gonzalez, Paula A Desplats, Leslie Crews, Brian Spencer, Eliezer Masliah, 2012.
- 41) Dissecting the potential molecular mechanisms underlying alpha-synuclein cell-to-cell transfer in Parkinson's disease, Elodie Angot<sup>1</sup>, Patrik Brundin, 2009.
- 42) Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers Karin M Danzer, Lisa R Kranich, Wolfgang P Ruf, Ozge Cagsal-Getkin, Ashley R Winslow, Liya Zhu, Charles R Vanderburg & Pamela J McLean, 2012.
- 43) Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission Lydia Alvarez-Erviti<sup>1</sup>, Yiqi Seow, Anthony H Schapira, Chris Gardiner, Ian L Sargent, Matthew J A Wood, J Mark Cooper, 2011.
- 44) Dissecting the potential molecular mechanisms underlying alpha-synuclein cell-to-cell transfer in Parkinson's disease, Elodie Angot<sup>1</sup>, Patrik Brundin, 2009.
- 45)  $\alpha$ -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells, Christian Hansen<sup>1</sup>, Elodie Angot, Ann-Louise Bergström, Jennifer A Steiner, Laura Pieri, Gesine Paul, Tiago F Outeiro, Ronald Melki, Pekka Kallunki, Karina Fog, Jia-Yi Li, Patrik Brundin, 2011.
- 46) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. J W Langston, P Ballard, J W Tetrud, I Irwin, 1983.
- 47) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease, A H Schapira<sup>1</sup>, J M Cooper, D Dexter, J B Clark, P Jenner, C D Marsden, 1990.
- 48) Complex I Deficiency in Parkinson's Disease Frontal Cortex W. Davis Parker, Jr., M.D., Janice K. Parks, B.S., and Russell H. Swerdlow, M.D., 2008.
- 49) A <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy study of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with Parkinson's disease D.J.Taylor<sup>a</sup>D.Krige<sup>bc</sup>P.R.J.Barnes<sup>ad</sup>G.J.Kemp<sup>a</sup>M.T.Carroll<sup>b</sup>V.M.Mann<sup>b</sup>J.M.Cooper<sup>b</sup>C.D.Marsden<sup>c</sup>A.H.V.Schapira, 1992.

- 50) Impaired oxidative decarboxylation of pyruvate in fibroblasts from patients with Parkinson's disease C. Mytilineou Ph.D., P. Werner, S. Molinari, A. Di Rocco, G. Cohen & M. D. Yahr ,1994.
- 51) Complex I Deficiency in Parkinson's Disease Frontal Cortex W. Davis Parker, Jr., M.D., Janice K. Parks, B.S., and Russell H. Swerdlow, M.D.,2008.
- 52) Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled Paula M Keeney <sup>1</sup> , Jing Xie, Roderick A Capaldi, James P Bennett Jr ,2006.
- 53) Mitochondrial DNA mutations in disease, aging, and neurodegeneration Amy K Reeve <sup>1</sup> , Kim J Krishnan, Doug Turnbull ,2008.
- 54) High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease Andreas Bender <sup>1</sup> , Kim J Krishnan, Christopher M Morris, Geoffrey A Taylor, Amy K Reeve, Robert H Perry, Evelyn Jaros, Joshua S Hersheson, Joanne Betts, Thomas Klopstock, Robert W Taylor, Douglass M Turnbull ,2006.
- 55) Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models,Mügen Terzioglu ,Dagmar Galter,2008.
- 56) Senoh S, Witkop B 1959. Nonenzymatic conversions of dopamine to norepinephrine and trihydroxyphenethylamine,1959.
- 57) (Maria Gomez-Lazaro et al., Free Radical Biology and Medicine 2008).
- 58) Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease Caroline M. Tanner,<sup>1</sup> Freya Kamel,<sup>2</sup> G. Webster Ross,<sup>3</sup> Jane A. Hoppin,<sup>2</sup> Samuel M. Goldman,<sup>1</sup> Monica Korell,<sup>1</sup> Connie Marras,<sup>4</sup> Grace S. Bhudhikanok,<sup>1</sup> Meike Kasten,<sup>5</sup> Anabel R. Chade,<sup>6</sup> Kathleen Comyns,<sup>1</sup> Marie Barber Richards,<sup>2,7</sup> Cheryl Meng,<sup>1</sup> Benjamin Priestley,<sup>1</sup> Hubert H. Fernandez,<sup>8</sup> Franca Cambi,<sup>9</sup> David M. Umbach,<sup>10</sup> Aaron Blair,<sup>11</sup> Dale P. Sandler,<sup>2</sup> and J. William Langston , 2011.
- 59) The cell-type specificity of mitochondrial dynamics ,Andrey V Kuznetsov <sup>1</sup> , Martin Hermann, Valdur Saks, Paul Hengster, Raimund Margreiter ,2009.
- 60) Roles of mitochondria in neuronal development,Geurim Son<sup>1</sup> and Jinju Han .2018.
- 61) Mitochondria: In Sickness and in Health,Jodi Nunnari<sup>1,\*</sup> and Anu Suomalainen,2017.
- 62) Mitochondria: the next (neurode)generation ,Eric A Schon <sup>1</sup> , Serge Przedborski.2011.
- 63) Wintersberger E 1964. [DNA-dependent RNA synthesis in rat liver mitochondria],1964.
- 64) Mitochondrial DNA: II. Structure and physicochemical properties of isolated DNA Author links open overlay panelMargit M.K.Nass,1969.
- 65) Sequence and organization of the human mitochondrial genome S. Anderson, A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Staden & I. G. Young ,1981.
- 66) Transcription and replication of mitochondrial DNA David A. Clayton,2000.
- 67) Release of replication termination controls mitochondrial DNA copy number after depletion with 2',3'-dideoxycytidine Timothy A. Brown and David A. Clayton ,2002.
- 68) Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer Himani Sharma, Archana Singh, Chandresh Sharma, Sunesh Kumar Jain & Neeta Singh,2005.



- 69) Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA, Christian Kukat<sup>1</sup>, Christian A Wurm, Henrik Spåhr, Maria Falkenberg, Nils-Göran Larsson, Stefan Jakobs. 2011.
- 70) Alam TI, Kanki T, Muta T, Ukaji K, Abe Y, Nakayama H, Takio K, Hamasaki N, Kang D 2003. Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM.
- 71) The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids, Daniel F Bogenhagen<sup>1</sup>, Denis Rousseau, Stephanie Burke, 2008.
- 72) DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair, Maria A Graziewicz<sup>1</sup>, Matthew J Longley, William C Copeland
- 73) Carrodeguas JA, Kobayashi R, Lim SE, Copeland WC, Bogenhagen DF (1999) The accessory subunit of *X. laevis* mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  increases processivity of the catalytic subunit of human DNA polymerase  $\gamma$  and is related to class II amino acyl tRNA synthetases
- 74) Di Re M, Sembongi H, He J, Reyes A, Yasukawa T, Martinsson P, Bailey LJ, Goffart S, Boyd-Kirkup JD, Wong TS, et al. 2009. The accessory subunit of mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  determines the DNA content of mitochondrial nucleoids in human cultured cells.
- 75) Mitochondrial Nucleoid: Shield and Switch of the Mitochondrial Genome, Sung Ryul Lee<sup>1</sup> and Jin Han, 2017.
- 76) Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals Mats I Ekstrand<sup>1</sup>, Maria Falkenberg, Anja Rantanen, Chan Bae Park, Martina Gaspari, Kjell Hultenby, Pierre Rustin, Claes M Gustafsson, Nils-Göran Larsson, 2004.
- 77) HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation, Marco E Bianchi<sup>1</sup>, Alessandra Agresti, 2005.
- 78) Communication between mitochondria and other organelles: a brand-new perspective on mitochondria in cancer, MengFang Xia<sup># 1 2 3</sup>, YaZhuo Zhang<sup># 1 2 3</sup>, Ke Jin<sup>2</sup>, ZiTong Lu<sup>2</sup>, Zhaoyang Zeng<sup>1 2 3</sup>, Wei Xiong, 2019.
- 79) Molecular Biology of the Cell, 4th edition, Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2002.
- 80) Wiedemann N, et al. (2004) Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway. 2004.
- 81) HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation, Marco E Bianchi<sup>1</sup>, Alessandra Agresti, 2005.
- 82) Effects of tumor metabolic microenvironment on regulatory T cells Yi-an Wang,<sup>1,2</sup> Xiao-Ling Li,<sup>1,2</sup> Yong-Zhen Mo,<sup>2</sup> Chun-Mei Fan,<sup>2</sup> Le Tang,<sup>1,2</sup> Fang Xiong,<sup>2</sup> Can Guo,<sup>2</sup> Bo Xiang,<sup>1,2</sup> Ming Zhou,<sup>1,2</sup> Jian Ma,<sup>1,2</sup> Xi Huang,<sup>2,3</sup> Xu Wu,<sup>2,4</sup> Yong Li,<sup>2,5</sup> Gui-Yuan Li,<sup>1,2</sup> Zhao-yang Zeng,<sup>1,2</sup> and Wei Xion, 2018.
- 83) How mitochondria produce reactive oxygen species, Michael P Murphy, 2009.
- 84) Mitochondria in exercise-induced oxidative stress S Di Meo<sup>1</sup>, P Venditti. 2001.
- 85) Akhlaq and Von Sonntag, 1986, M.S. Akhlaq, C. Von Sonntag Free radical induced elimination of H<sub>2</sub>S from dithiothreitol—a chain reaction, J. Am. Chem. Soc., 108 (1986).
- 86) Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits, T P A Devasagayam<sup>1</sup>, K K Bloor, T Ramasarma, 2003.
- 87) The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes, Z Radák<sup>1</sup>, T Kaneko, S Tahara, H Nakamoto, H Ohno, M Sasvári, C Nyakas, S Goto, 1999.

- 88) Jackson, M. J., and S. O'Farrell. 1993. Free radicals and muscle dam-age
- 89) Increased levels of 4-hydroxynonenal modified proteins in plasma of children with autoimmune diseases T Grune <sup>1</sup>, P Michel, N Sitte, W Eggert, H Albrecht-Nebe, H Esterbauer, W G Siems ,1997.
- 90) A global profile of germline gene expression in *C. elegans* V Reinke <sup>1</sup>, H E Smith, J Nance, J Wang, C Van Doren, R Begley, S J Jones, E B Davis, S Scherer, S Ward, S K Kim ,2000.
- 91) Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine ,C Leeuwenburgh <sup>1</sup>, P A Hansen, J O Holloszy, J W Heinecke ,1999.
- 92) Age-dependent declines in proteasome activity in the heart ,Anne-Laure Bulteau <sup>1</sup>, Luke I Szweda, Bertrand Friguet ,2002.
- 93) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes ,A F Neuwald <sup>1</sup>, L Aravind, J L Spouge, E V Koonin ,1999.
- 94) AAA+ proteins: have engine, will work ,Phyllis I Hanson <sup>1</sup>, Sidney W Whiteheart ,1995.
- 95) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions E C Schirmer <sup>1</sup>, J R Glover, M A Singer, S Lindquist ,1996
- 96) A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease.N Wang, S Gottesman, M C Willingham, M M Gottesman, and M R Maurizi,1993.
- 97) Substitution of PIM1 Protease in Mitochondria by *Escherichia coli* Lon Protease, Ulrike Teichmann, Luc van Dyck, Bernard Guiard‡, Heinrich Fischer§, Rudi Glockshuber§, Walter Neupert, and Thomas Langer,1996.
- 98) Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration,CK Suzuki, K Suda, N Wang, G Schatz,1994.
- 99) Protein quality control: triage by chaperones and proteases S Gottesman <sup>1</sup>, S Wickner, M R Maurizi .2013.
- 100) Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon proteaseSundararajan Venkatesh,<sup>a</sup> Jae Lee,<sup>a</sup> Kamendra Singh,<sup>b</sup> Irene Lee,<sup>c</sup> and Carolyn K. Suzuki,2013.
- 101) processing, and localization of human Lon protease N Wang <sup>1</sup>, M R Maurizi, L Emmert-Buck, M M Gottesman ,1994
- 102) DNA and RNA binding by the mitochondrial lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate Tong Liu <sup>1</sup>, Bin Lu, Irene Lee, Gabriela Ondrovicová, Eva Kutejová, Carolyn K Suzuki ,2004.
- 103) A Conserved Domain in *Escherichia coli* Lon Protease Is Involved in Substrate Discriminator Activity, Ebel, Skinner et al. 1999.
- 104) Crystal structure of the AAA+ domain of *E. coli* Lon protease at 1.9 Å resolutionIstvan Botos,<sup>a</sup>Edward E. Melnikov,<sup>b</sup>Scott Cherry,<sup>a</sup>Anna G. Khalatova,<sup>b</sup>Fatima S. Rasulova,<sup>c</sup>Joseph E. Tropea,<sup>a</sup>Michael R. Maurizi,<sup>c</sup>Tatyana V. Rotanova,<sup>b</sup>Alla Gustchina,<sup>a</sup>and Alexander Wlodawer,2004.
- 105) The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageingTomer Shpilka & Cole M. Haynes,2018.

- 106) Cardiolipin and mitochondrial cristae organization Author links open overlay panel Nikita Ikon Robert O. Ryan, 2017.
- 107) LONP1 Is Required for Maturation of a Subset of Mitochondrial Proteins, and Its Loss Elicits an Integrated Stress Response Olga Zurita Rendón, Eric A. Shoubridge, 2018.
- 108) Acute increases in *O*-GlcNAc indirectly impair mitochondrial bioenergetics through dysregulation of LonP1-mediated mitochondrial protein complex turnover JaLessa N. Wright, Gloria A. Benavides, Michelle S. Johnson, Willayat Wani, 2019.
- 109) Permeability transition in human mitochondria persists in the absence of peripheral stalk subunits of ATP synthase Jiuya He, Joe Carroll, Shujing Ding, Ian M. Fearnley, and View ORCID Profile John E. Walker, 2017.
- 110) Substrate sequestration by a proteolytically inactive Lon mutant Laurence Van Melder and Susan Gottesman, 1999
- 111) silencing of mitochondrial Lon protease deeply impairs mitochondrial proteome and function in colon cancer cells. Lara Gibellini, Marcello Pinti, Federica Boraldi, Valentina Giorgio, Paolo Bernardi Gianluca Carnevale, 2014.
- 112) Phosphorylation of human TFAM in mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA+ Lon protease Bin Lu<sup>1</sup>, Jae Lee, Xiaobo Nie, Min Li, Yaroslav I Morozov, Sundararajan Venkatesh, Daniel F Bogenhagen, Dmitry Temiakov, Carolyn K Suzuki, 2013.
- 113) Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM) Yuichi Matsushima,<sup>a,b</sup> Yu-ichi Goto,<sup>b</sup> and Laurie S. Kaguni, 2010.
- 114) Dynamic regulation of mitochondrial genome maintenance in germ cells Katsumi Kasashima<sup>1</sup>, Yasumitsu Nagao<sup>2</sup>, Hitoshi Endo, 2010.
- 115) HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells Ryo Fukuda<sup>1</sup>, Huafeng Zhang, Jung-whan, Kim, Larissa Shimoda, Chi V Dang, Gregg L Semenza, 2007.
- 116) Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria enhanced expression of Lon protease, Osamu Hori,<sup>1,6</sup> Fusae Ichinoda,<sup>1</sup> Takashi Tamatani,<sup>1</sup> Atsushi Yamaguchi,<sup>2,6</sup> Naoya Sato,<sup>3</sup> Kentaro Ozawa,<sup>1,6</sup> Yasuko Kitao,<sup>1</sup> Mayuki Miyazaki,<sup>1</sup> Heather P. Harding,<sup>4</sup> David Ron,<sup>4</sup> Masaya Tohyama,<sup>2,6</sup> David M Stern,<sup>5</sup> and Satoshi Ogawa, 2002.
- 117) Mitochondrial Lon protease at the crossroads of oxidative stress, ageing and cancer Marcello Pinti<sup>1</sup>, Lara Gibellini<sup>2</sup>, Yongzhang Liu<sup>3</sup>, Shan Xu<sup>3</sup>, Bin Lu<sup>3</sup>, Andrea Cossarizza, 2015.
- 118) LONP1 Is Required for Maturation of a Subset of Mitochondrial Proteins, and Its Loss Elicits an Integrated Stress Response Olga Zurita Rendón, Eric A. Shoubridge, 2018.
- 119) The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single-stranded, site-specific, strand-specific manner G K Fu<sup>1</sup>, D M Markovitz, 1998.
- 120) Identification and purification of the Lon+ (capR+) gene product, a DNA-binding protein B A Zehnauer, E C Foley, G W Henderson, A Markovitz, 1981.
- 121) The influence of ATP-dependent proteases on a variety of nucleoid-associated processes. Ambro L, Pevala V, Bauer J, Kutejová E, 2012.
- 122) Mitochondrial energetics in the kidney Pallavi Bhargava & Rick G. Schnellmann, 2017.
- 123) Human mitochondrial DNA replication machinery and disease. Author links open overlay panel Matthew J Young<sup>1</sup> William C Copeland, 2016.
- 124) Mitochondrial LON protease-dependent degradation of cytochrome c oxidase subunits under hypoxia and myocardial ischemia Author links open overlay

- panel Naresh B. V. Sepuri<sup>a12</sup> Rajesh Angireddy<sup>a1</sup> Satish Srinivasan<sup>a</sup> Manti Guha<sup>a</sup> Joseph Spear<sup>a</sup> Bin Lu<sup>b3</sup> Hindupur K. Anandatheerthavarada<sup>a</sup> Carolyn K. Suzuki<sup>b</sup> Narayan G. Avadhani<sup>a</sup>, 2017.
- 125) Evolution of the oxygen sensitivity of cytochrome *c* oxidase subunit 4. K. M. Kocha, K. Reilly, D. S. M. Porplycia, J. McDonald, T. Snider, and C. D. Moyes, 2015.
- 126) Extramitochondrial ATP/ADP-ratios regulate cytochrome *c* oxidase activity via binding to the cytosolic domain of subunit IV, Napiwotzki, J., Kadenbach, B., 1998.
- 127) HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells. Ryo Fukuda<sup>12</sup> Huafeng Zhang<sup>12</sup> Jung-whan Kim<sup>13</sup> Larissa Shimoda<sup>3</sup> Chi V. Dang<sup>34</sup> Gregg L. Semenza. 2007
- 128) Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions. ITS STABILIZATION BY HYPOXIA DEPENDS ON REDOX-INDUCED CHANGES\* Susana Salceda and Jaime Caro, 1997.
- 129) HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells, Ryo Fukuda<sup>12</sup> Huafeng Zhang<sup>12</sup> Jung-whan Kim<sup>13</sup> Larissa Shimoda<sup>3</sup> Chi V. Dang<sup>34</sup> Gregg L. Semenza, 2007.
- 130) Mitochondrial LON protease-dependent degradation of cytochrome *c* oxidase subunits under hypoxia and myocardial ischemia Naresh B. V. Sepuri<sup>a12</sup> Rajesh Angireddy<sup>a1</sup> Satish Srinivasan<sup>a</sup> Manti Guha<sup>a</sup> Joseph Spear<sup>a</sup> Bin Lu<sup>b3</sup> Hindupur K. Anandatheerthavarada<sup>a</sup> Carolyn K. Suzuki<sup>b</sup> Narayan G. Avadhani, 2017.
- 131) The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria. Sergio Papa Pietro Luca Martino, Giuseppe Capitanio, Antonio Gaball, Domenico De Rasmio, Anna Signorile, Vittoria Petruzzella, 2012.
- 132) CODAS syndrome is associated with mutations of LONP1, encoding mitochondrial AAA+ Lon protease. Strauss KA<sup>1</sup>, Jinks RN<sup>2</sup>, Puffenberger EG<sup>3</sup>, Venkatesh S<sup>4</sup>, Singh K<sup>5</sup>, Cheng I<sup>6</sup>, Mikita N<sup>6</sup>, Thilagavathi J<sup>4</sup>, Lee J<sup>4</sup>, Sarafianos S<sup>7</sup>, Benkert A<sup>3</sup>, Koehler A<sup>2</sup>, Zhu A<sup>2</sup>, Trovillion V<sup>2</sup>, McGlincy M<sup>2</sup>, 2015.
- 133) Newly recognized syndrome of cerebral, ocular, dental, auricular, skeletal anomalies: CODAS syndrome--a case report S M Shebib<sup>1</sup>, M H Reed, E P Shuckett, H G Cross, J B Perry, A E Chudley, 1991.
- 134) Friedreich's ataxia: Pathology, pathogenesis, and molecular genetics Arnulf H. Koepfen. 2011.
- 135) Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia A Rötig<sup>1</sup>, P de Lonlay, D Chretien, F Foury, M Koenig, D Sidi, A Munnich, P Rustin, 1997.
- 136) The Diabetes Drug Target MitoNEET Governs a Novel Trafficking Pathway to Rebuild an Fe-S Cluster into Cytosolic Aconitase/Iron Regulatory Protein 1\* Ioana Ferecatu,<sup>‡</sup> Sergio Gonçalves,<sup>‡</sup> Marie-Pierre Golinelli-Cohen,<sup>‡§</sup> Martin Clémancey,<sup>¶</sup> Alain Martelli, Sylvie Riquier,<sup>‡</sup> Eric Guittet,<sup>‡</sup> Jean-Marc Latour,<sup>¶</sup> Hélène Puccio, Jean-Claude Drapier,<sup>‡</sup> Ewen Lescop,<sup>‡</sup> and Cécile Bouton, 2014.
- 137) Approach to Neurometabolic Diseases from a Pediatric Neurological Point of View Parvaneh, 2015.
- 138) Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress Daniela A Bota<sup>1</sup>, Holly Van Remmen, Kelvin J A Davies. 2002.
- 139) Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease D C Wallace, J M Shoffner, R L Watts, J L Juncos, A Torroni. 1992.

- 140) Expression and significance of respiratory chain enzyme of cells in urine sediment in MELAS syndrome]. Wu HR<sup>1</sup>, Ma YN, Qi Y, Liu HG, 2013.
- 141) PINK1-Parkin pathway activity is regulated by degradation of PINK1 in the mitochondrial matrix Ruth E Thomas<sup>1</sup>, Laurie A Andrews<sup>1</sup>, Jonathon L Burman<sup>1</sup>, Wen-Yang Lin<sup>2</sup>, 2014.
- 142) LonP1 Differently Modulates Mitochondrial Function and Bioenergetics of Primary Versus Metastatic Colon Cancer Cells Lara Gibellini,<sup>1</sup> Lorena Losi,<sup>2</sup> Sara De Biasi,<sup>2</sup> Milena Nasi,<sup>3</sup> Domenico Lo Tartaro,<sup>1</sup> Simone Pecorini,<sup>3</sup> Simone Patergnani,<sup>4</sup> Paolo Pinton,<sup>4</sup> Anna De Gaetano,<sup>3</sup> Gianluca Carnevale,<sup>3</sup> Alessandra Pisciotta,<sup>3</sup> Francesco Mariani,<sup>5</sup> Luca Roncucci,<sup>5</sup> Anna Iannone,<sup>5</sup> Andrea Cossarizza,<sup>1</sup> and Marcello Pinti, 2018.
- 143) NF-κB, inflammation and metabolic disease Rebecca G. Baker, Matthew S. Hayden, and Sankar Ghosh, 2003.
- 144) Transcriptional activation of LON Gene by a new form of mitochondrial stress: A role for the nuclear respiratory factor 2 in StAR overload response (SOR), Assaf Bahat, 2015.
- 145) Protein quality control at the interface of endoplasmic reticulum and mitochondria by Lon protease Ashutosh K Pandey<sup>1</sup> and Sundararajan Venkatesh, 2017.
- 146) Upregulation of the mitochondrial Lon Protease allows adaptation to acute oxidative stress but dysregulation is associated with chronic stress, disease, and aging, Jenny Ngo, 2013.
- 147) UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1α Yoko Goto, Lihua Zeng, Chan Joo Yeom, Yuxi Zhu, Akiyo Morinibu, 2014.
- 148) Production of abnormal proteins in E. coli stimulates transcription of lon and other heat shock genes S A Goff, A L Goldberg, 1985.
- 149) Akt phosphorylation of mitochondrial Lonp1 protease enables oxidative metabolism and advanced tumor traits, Jagadish C. Ghosh, 2019.
- 150) Silencing of mitochondrial Lon protease deeply impairs mitochondrial proteome and function in colon cancer cells Lara Gibellini Marcello Pinti Federica Boraldi Valentina Giorgio Paolo Bernardi Regina Bartolomeo Milena Nasi Sara De Biasi Sonia Missiroli Gianluca Carnevale Lorena Losi, 2014.
- 151) Mutations in LONP1, a mitochondrial matrix protease, cause CODAS syndrome, Esra Dikoglu, 2015.
- 152) Expanding the Clinical Spectrum of *LONP1*-Related Mitochondrial Cytopathy Fady Hannah-Shmouni<sup>1 2</sup>, Lauren MacNeil<sup>3 4</sup>, Lauren Brady<sup>5</sup>, Mats I Nilsson<sup>5</sup>, Mark Tarnopolsky, 2019.
- 153) Mutations in *LONP1*, a mitochondrial matrix protease, cause CODAS syndrome Esra Dikoglu, Ali Alfaiz, Maria Gorna, Deborah Bertola, Jong Hee Chae, 2015.
- 154) CODAS Syndrome Is Associated with Mutations of *LONP1*, Encoding Mitochondrial AAA<sup>+</sup> Lon Protease Kevin A. Strauss,<sup>1,2,3,14,\*</sup> Robert N. Jinks,<sup>3,14</sup> Erik G. Puffenberger,<sup>1,3,14</sup> Sundararajan Venkatesh,<sup>4</sup> Kamalendra Singh,<sup>4,6</sup> Itean Cheng,<sup>5</sup> Natalie Mikita,<sup>5</sup> Jayapalraja Thilagavathi,<sup>4</sup> Jae Lee,<sup>4</sup> Stefan Sarafianos,<sup>6</sup> Abigail Benkert,<sup>1,3</sup> Alanna Koehler,<sup>3</sup> Anni Zhu,<sup>3</sup> Victoria Trovillion,<sup>3</sup> Madeleine McGlincy,<sup>3</sup> Thierry Morlet,<sup>7</sup> Matthew Deardorff,<sup>8,9</sup> A. Micheil Innes,<sup>10</sup> Chitra Prasad,<sup>11</sup> Albert E. Chudley,<sup>12,13</sup> Irene Nga Wing Lee,<sup>5</sup> and Carolyn K. Suzu, 2015



- 155) Lipopolysaccharide-mediated protein expression profiling on neuronal differentiated SH-SY5Y cells Nando Dulal Das, Mi Ran Choi, Kyoung Hwa Jung, Ji Hyun Park, 2012.
- 156) A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease Kim Tieu, 1995.
- 157)  $\alpha$ -Synuclein: membrane interactions and toxicity in Parkinson's disease. Pavan K Auluck<sup>1</sup>, Gabriela Caraveo, Susan Lindquist, 2004.
- 158) Chapter One - The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide, Christine C. Winterbourn, 2013.
- 159) Mitochondrial Lon sequesters and stabilizes p53 in the matrix to restrain apoptosis under oxidative stress via its chaperone activity Ya-Ju Sung, Ting-Yu Kao, Cheng-Liang Kuo, Chi-Chen Fan, 2018.