



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Διδρυματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Μοριακή-
Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία»

**Μελέτη της έκφρασης της μεταλλαγμένης μορφής A53T της
α-συνουκλεΐνης στον *Saccharomyces cerevisiae* σε συνθήκες
καταπόνησης καθώς και της αλληλεπίδρασής της με ενδογενείς
μεταβολικούς παράγοντες**

ΖΟΛΔΕΡ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Αφένδρα Αμαλία Σοφία

**Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιακής Γενετικής,
Τμήμα ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ**

Διατριβή Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με τίτλο «Μελέτη της έκφρασης της μεταλλαγμένης μορφής A53T της α -συνουκλεΐνης στον *Saccharomyces cerevisiae* σε συνθήκες καταπόνησης καθώς και της αλληλεπίδρασής της με ενδογενείς μεταβολικούς παράγοντες».

Για την εκπόνησή της θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Αμαλία Σοφία Αφένδρα η οποία αποτέλεσε και την επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας. Είναι η δεύτερη φορά που συνεργαζόμαστε μετά την πτυχιακή μου εργασία και η βοήθειά της ήταν ξανά πολύτιμη, όπως και η στήριξη και η εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της ευχάριστης αυτής συνεργασίας.

Άκρως σημαντική ήταν και η βοήθεια και η πολύπλευρη στήριξη από τον Δρ. Ευάγγελο Σφήκα, Ιατρό πλέον αλλά πρωτίστως φίλο που έμαθα πολλά δίπλα του. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Βιολέττα Μαλταμπέ για τη στήριξη και τις χρήσιμες συμβουλές όποτε τις είχα ανάγκη. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Αναστάσιο Βασιλειάδη και κ. Παναγιώτη Μαγκλάρα για τις χρήσιμες συμβουλές τους και για τη συν-δημιουργία ενός υπέροχου κλίματος εργασίας καθώς και όλους τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο για την άψογη συνεργασία σε μια απαιτητική χρονιά για εμένα.

Πολλές ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να αποδώσω στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της παρούσας μελέτης και αναφέρομαι στους Καθηγητές του τμήματος Ιατρικής κ. Ευστάθιο Φριλίγγο και κα Παπαμαρκάκη Θωμάϊ, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Θεολόγο Μιχαηλίδη του TBET και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Ειρήνη Κούκκου του τμήματος Χημείας. Τους ευχαριστώ για την προθυμία τους και τον χρόνο που αφιέρωσαν στην αξιολόγηση της εν λόγω μεταπτυχιακής διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|-----------|
| 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 1 |
| <u>1.1 α-Συνουκλεΐνη</u> | 2 |
| 1.1.α Οικογένεια συνουκλεϊνών..... | 2 |
| 1.1.β Δομή και ιδιότητες της α-συνουκλεΐνης..... | 3 |
| 1.1.γ Α-συνουκλεΐνη και Παθογένεια..... | 5 |
| 1.1.δ Παραλλαγές του μορίου της α-συνουκλεΐνης..... | 6 |
| <u>1.2 Το ανθρώπινο νευρικό σύστημα</u> | 9 |
| <u>1.3 Νευροεκφυλιστικές Ασθένειες (NDDs) και η συσχέτισή τους με την α-συνουκλεΐνη</u> | 11 |
| 1.3.α Νόσος Πάρκινσον (Parkinson disease, PD)..... | 12 |
| 1.3.β Άνοια σωματίων Lewy (Dementia with Lewy Bodies, DLB)..... | 13 |
| <u>1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u> | 14 |
| 1.4.α Η χρήση του <i>S. cerevisiae</i> ως πρότυπου μελέτης των νευροεκφυλιστικών νόσων | 15 |
| 1.4.β Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί της αυτοφαγίας στον <i>S. cerevisiae</i> | 16 |
| 1.4.γ Απόκριση στο στρες: η επαγωγή της στον <i>S. cerevisiae</i> | 18 |
| <u>1.5 Τρεχαλόζη</u> | 20 |
| 1.5.α Η σύνθεση της τρεχαλόζης στον <i>S. cerevisiae</i> | 20 |
| 1.5.β Η μεταγραφική ρύθμιση της τρεχαλόζης στον <i>S. cerevisiae</i> | 21 |
| <u>1.6 <i>S. cerevisiae</i> και κυτταρική γήρανση</u> | 22 |
| 1.6.α Η απόκριση του <i>S. cerevisiae</i> στην υψηλή ωσμωτικότητα..... | 24 |
| <u>1.7 Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής</u> | 25 |
| | |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 27 |
| 2.1 Χημικά και όργανα..... | 28 |
| 2.2 Μικροβιακά Στελέχη και πλασμίδια..... | 29 |
| | |
| 2.3 | |
| Μέθοδοι | 31 |
| 2.3.1 Ανάπτυξη <i>S. cerevisiae</i> | 31 |
| 2.3.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων | 32 |
| 2.3.3 Κατασκευή επιδεκτικών κυττάρων του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.4 Μετασηματισμός του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> με το πλασμίδιο pCM190 με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation) | 33 |
| 2.3.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από τον <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Soni R. and Murray J.A.H., 1992, με ορισμένες τροποποιήσεις)..... | 35 |
| 2.3.6 Καμπύλες χρονολογικής γήρανσης..... | 35 |
| 2.3.7 Απομόνωση RNA | 35 |
| 2.3.8 Σύνθεση cDNA..... | 36 |
| 2.3.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) | 37 |
| 2.3.10 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμέρασης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)..... | 38 |
| 2.3.11 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Kushnirov et al., 2000)..... | 45 |
| 2.3.12 Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών (Μέθοδος Bradford)..... | 46 |
| 2.3.13 Ηλεκτροφόρηση SDS – πολυακρυλαμίδιου..... | 46 |
| 2.3.14 Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών | 48 |
| 2.3.15 Ανοσοδοκιμασία κατά Western (Western Blot, WB)..... | 49 |
| 2.3.16 Ανοσοφθορισμός για κύτταρα <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 49 |
| 2.3.17 Συνεστιακή μικροσκοπία..... | 51 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 53 |
| 3.1 Η επίδραση της υψηλής ωσμωτικότητας στη χρονολογική γήρανση του ανασυνδυασμένου <i>S. cerevisiae</i> BY4741/ α -synA53T..... | 54 |
| 3.2 Εντοπισμός της α -συνουκλεΐνης στα κύτταρα BY4741/ α -synA53T με ανοσοφθορισμό | 55 |
| 3.3 Ανίχνευση της παραγόμενης α -συνουκλεΐνης A53T στον <i>S. cerevisiae</i> BY4741/ α -synA53T | 56 |
| 3.4 Μελέτη του επιπέδου μεταγραφής των γονιδίων <i>TPS1</i> , <i>TPS2</i> , <i>TSL1</i> , <i>ATG8</i> και <i>TOR1</i> στα κύτταρα <i>S. cerevisiae</i> BY4741/ α -synA53T σε πραγματικό χρόνο (qPCR) | 57 |
| 3.5 Η επίδραση της υψηλής ωσμωτικότητας στη χρονολογική γήρανση των ανασυνδυασμένων <i>S. cerevisiae</i> <i>tps1Δ</i> / α -synA53T | 62 |
| 3.6 Εντοπισμός της α -συνουκλεΐνης στα κύτταρα <i>tps1Δ</i> / α -synA53T με ανοσοφθορισμό..... | 63 |
| 3.7 Ανίχνευση της παραγόμενης α -συνουκλεΐνης A53T στο μεταλλαγμένο <i>S. cerevisiae</i> <i>tps1Δ</i> / α -synA53T | 65 |
| 3.8 Μελέτη του επιπέδου μεταγραφής των γονιδίων <i>TPS2</i> , <i>TSL1</i> , <i>ATG8</i> και <i>TOR1</i> στα κύτταρα <i>S. cerevisiae</i> <i>tps1Δ</i> / α -synA53T σε πραγματικό χρόνο (qPCR)..... | 66 |
| 3.9 Η επίδραση της υψηλής ωσμωτικότητας στη χρονολογική γήρανση του | |

| | |
|---|------------|
| ανασυνδυασμένου μεταλλαγμένου <i>S.cerevisiae tps2Δ/α-synA53T</i> | 71 |
| 3.10 Εντοπισμός της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα <i>tps2Δ/α-synA53T</i> με ανοσοφθορισμό | 72 |
| 3.11 Ανίχνευση της παραγόμενης α-συνουκλεΐνης A53T στο μεταλλαγμένο <i>S. cerevisiae tps2Δ/α-synA53T</i> | 74 |
| 3.12 Μελέτη του επιπέδου μεταγραφής των γονιδίων <i>TPS1</i> , <i>TSL1</i> , <i>ATG8</i> και <i>TOR1</i> στα κύτταρα <i>S. cerevisiae tps2Δ/α-synA53T</i> σε πραγματικό χρόνο (qPCR)..... | 75 |
| 3.13 Η επίδραση της υψηλής ωσμωτικότητας στη χρονολογική γήρανση του ανασυνδυασμένου μεταλλαγμένου <i>S.cerevisiae tsl1Δ/α-synA53T</i> | 79 |
| 3.14 Εντοπισμός της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα <i>tsl1Δ/α-synA53T</i> με ανοσοφθορισμό | 81 |
| 3.15 Ανίχνευση της παραγόμενης α-συνουκλεΐνης A53T στο μεταλλαγμένο <i>S. cerevisiae tsl1Δ/α-synA53T</i> | 82 |
| 3.16 Η απόκριση των κυττάρων <i>Saccharomyces cerevisiae</i> μετά από την προσθήκη τρεχαλόζης ως πιθανού θεραπευτικού μέσου του τοξικού φαινότυπου..... | 83 |
| 3.17 Εντοπισμός της α-συνουκλεΐνης A53T στα στελέχη του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> μετά από χορήγηση εξωγενούς τρεχαλόζης..... | 86 |
| 3.18 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των στελεχών <i>S. cerevisiae</i> BY4741 και <i>tps1Δ</i> στην στατική φάση μετά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη..... | 91 |
| 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 97 |
| 4.1 Η επίδραση της α-συνουκλεΐνης A53T στον <i>S. cerevisiae</i> BY4741..... | 98 |
| 4.2 Η επίδραση της α-συνουκλεΐνης A53T στο μεταλλαγμένο παράγωγο <i>S. cerevisiae</i> BY4741 <i>tps1Δ</i> | 101 |
| 4.3 Η επίδραση της α-συνουκλεΐνης A53T στο μεταλλαγμένο παράγωγο <i>S. cerevisiae</i> BY4741 <i>tps2Δ</i> | 102 |
| 4.4 Η επίδραση της α-συνουκλεΐνης A53T στο μεταλλαγμένο παράγωγο <i>S. cerevisiae</i> BY4741 <i>tsl1Δ</i> | 103 |
| 4.5 Η χορήγηση εξωγενούς τρεχαλόζης στα κύτταρα του <i>S. cerevisiae</i> ως μέσου θεραπευτικής παρέμβασης έναντι της τοξικότητας της α-συνουκλεΐνης A53T..... | 104 |
| 5. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ | 107 |
| 5.1 Περίληψη..... | 108 |
| 5.2 Summary..... | 119 |
| 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 111 |

1. Εισαγωγή

1.1 α-Συνουκλεΐνη

Η α-συνουκλεΐνη απομονώθηκε πρώτη φορά το 1988 από το ηλεκτροφόρο σαλάχι *Torpedo californica* της οικογένειας Torpedinidae με τη χρήση ενός αντιορού έναντι χολινεργικών κυστιδίων (Maroteaux, Campanelli, & Scheller, 1988) (εικόνα 1.1). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCA* στους ανθρώπους, βρίσκεται σε αφθονία στον εγκέφαλο αλλά εντοπίζεται και σε άλλους ιστούς. Πήρε το όνομά της από τον εντοπισμό της στο πυρηνικό φάκελο (nuclear envelope) και στο προσυναπτικό άκρο (presynaptic terminal) των νευρώνων.



Εικόνα 1.1: *Torpedo californica*

Στα πλαίσια μελετών σχετικά με τη σύνθεση των αμυλοειδών πλακών σε ασθενείς με τη νόσο του Alzheimer απομονώθηκε ένα πεπτιδίο το οποίο διαλυτοποιούνταν στις λιπιδικές μεμβράνες και ονομάστηκε NAC (Non Amyloid Component). Η πρόδρομη πρωτεΐνη αυτού του πεπτιδίου (NACP) παρουσίασε ομολογία με την α-συνουκλεΐνη του αρουραίου (Ueda et al., 1993).

Οι συμβολισμοί που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς μέχρι και σήμερα για την α-συνουκλεΐνη είναι οι *SNCA*, *PD1*, *MGC110988*, *NACP* και *PARK1/4*.

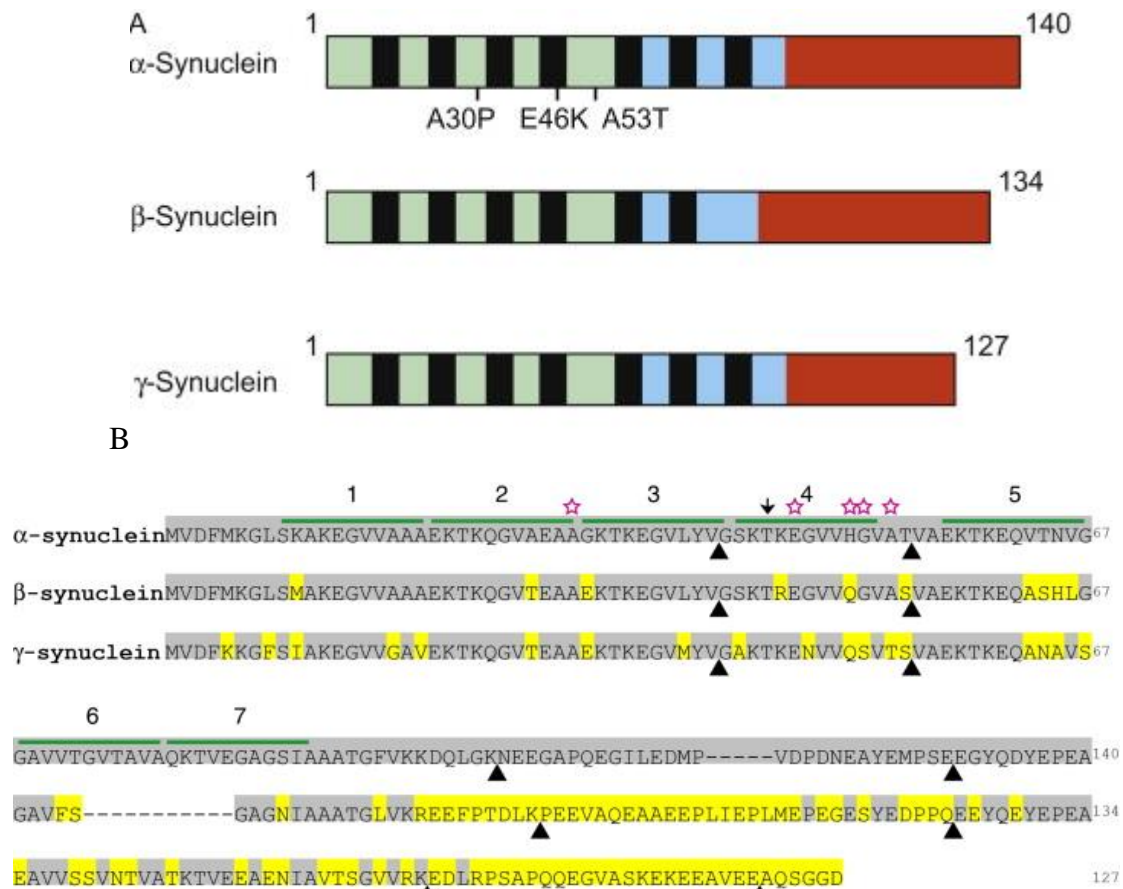
1.1.α Οικογένεια συνουκλεϊνών

Η α-συνουκλεΐνη υπάγεται στην οικογένεια των συνουκλεϊνών στην οποία εντάσσονται μικρές διαλυτές πρωτεΐνες με υπολογισμένη μοριακή μάζα περίπου 14 kD, ενώ η παρατηρούμενη τους μοριακή μάζα είναι περίπου 19-20 kD, γεγονός που υποδηλώνει κάποια πιθανή μετα-μεταγραφική τροποποίηση.

Η οικογένεια των συνουκλεϊνών (εικόνα 1.2) περιλαμβάνει τα εξής μέλη:

- Την α-συνουκλεΐνη, η οποία αποτελείται από 140 αμινοξέα και κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCA* το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 4q21.3-q22. (Campion et al., 1995; Lavedan, 1998), (Chen et al., 1995).
- Την β-συνουκλεΐνη, η οποία αποτελείται από 134 αμινοξέα και κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCB* το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 5q35 (Spillantini, Goedert, & Divane, 1995).

- Την γ -συνουκλεΐνη, η οποία αποτελείται από 134 αμινοξέα και κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCG* το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 10q23 (Lavedan et al., 1998).



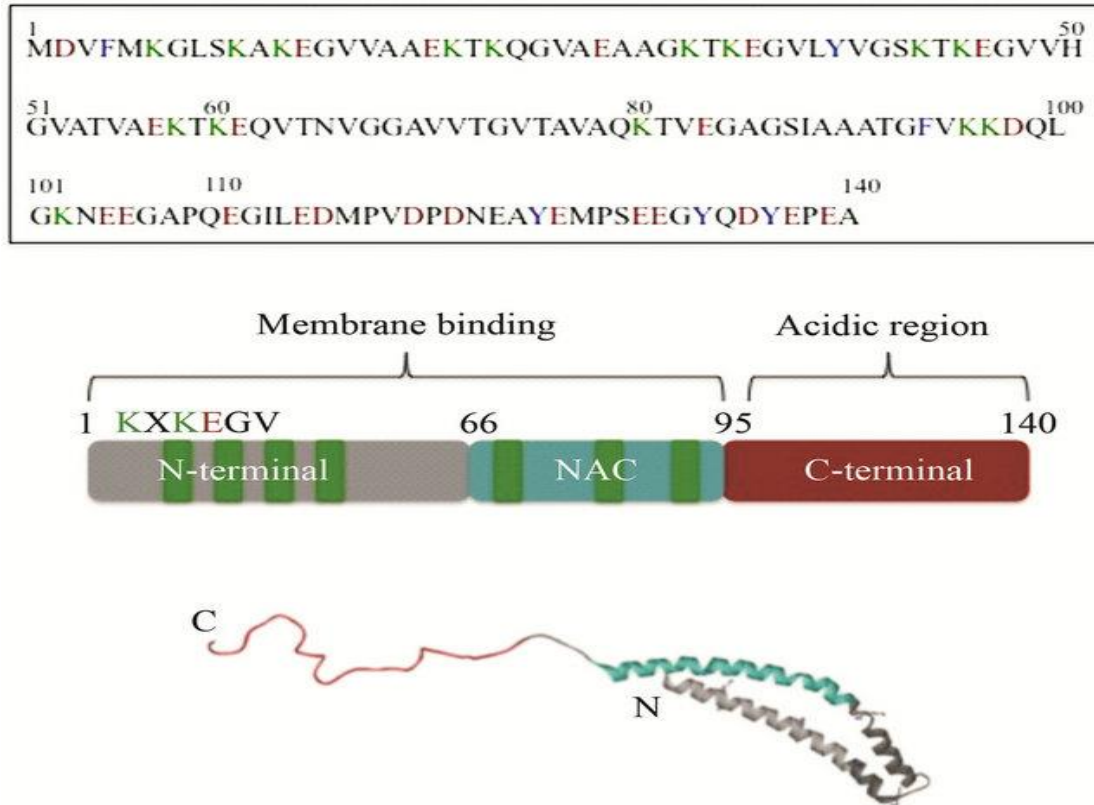
Εικόνα 1.2: (Α) Απεικονίζονται οι τρεις συνουκλεΐνες που εντοπίζονται στο ανθρώπινο γονιδίωμα όπου το εύρος των αμινοξέων τους κυμαίνεται μεταξύ 127 και 140 αμινοξέων. Οι μαύρες μπάρες αποτελούν τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στο αμινοτελικό άκρο, με πράσινο χρώμα οι θετικά φορτισμένες αλληλουχίες, με μπλε οι υδρόφοβες περιοχές και με κόκκινο οι αρνητικά φορτισμένες περιοχές. Επίσης υποδεικνύονται και τρεις μεταλλάξεις που έχουν κομβικό ρόλο στην νόσο του Πάρκινσον (PD). (Β) πρωτεϊνική αλληλουχία των α -, β -, γ -συνουκλεΐνων. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι επτά (7) επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες έντεκα (11) αμινοξέων, τα βέλη υποδεικνύουν τα όρια των εξωνίων ενώ τα αστέρια υποδεικνύουν τα σημεία όπου εδράζονται οι πέντε γνωστές μεταλλάξεις υπεύθυνες για την νόσο του Πάρκινσον (PD). (Goedert & Spillantini, 2012)

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

1.1.β Δομή και ιδιότητες της α -συνουκλεΐνης

Η α -συνουκλεΐνη εντοπίζεται στο προσυναπτικό άκρο των νευρώνων και στον κυτταρικό πυρήνα των σπονδυλωτών. Έχει παρατηρηθεί ότι η θέση της στο κύτταρο μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ΚΝΣ. Αναφορικά με τη δομή της ανήκει στη κατηγορία των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών χωρίς καθορισμένη δευτεροταγή δομή. Η πρωτοταγής της δομή αποτελείται από 7 ατελείς

επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 11 καταλοίπων στο μοτίβο XKTKEGVXXXA (όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ). (Lopes da Fonseca, Villar-Piqué, & Outeiro, 2015; Paleologou, Irvine, & El-Agnaf, 2005) Αυτές οι αλληλουχίες είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό 1-2 αμφιπαθών α-ελίκων στο αμινοτελικό άκρο και σχετίζονται με την ικανότητα της πρωτεΐνης να δεσμεύεται σε λιπιδιακές μεμβράνες και να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες. (Bussell Jr & Eliezer, 2003) Αντιθέτως, το καρβοξυτελικό άκρο της παραμένει μη δομημένο, ακόμη και όταν προσδένεται στα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών. Όσον αφορά το πεπτίδιο NAC της α-συνουκλεΐνης, είναι μια περιοχή υπεύθυνη για την ικανότητα της πρωτεΐνης να σχηματίζει ινίδια αφού πρόκειται για ένα πεπτίδιο με χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. (εικόνα 1.3) (Lopes da Fonseca et al., 2015; Paleologou et al., 2005)



Εικόνα 1.3: Αμινοξική αλληλουχία και δομή α-έλικας της α-συνουκλεΐνης. Διακρίνονται το αμινοτελικό άκρο (τα πρώτα 66 αμινοξέα), το οποίο μαζί με την ενδιάμεση περιοχή NAC (αμινοξέα 66-95) είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδρασή της με τις κυτταρικές μεμβράνες, και το καρβοξυτελικό άκρο το οποίο είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό ινιδίων. (Gonzalez-Horta et al., 2013)

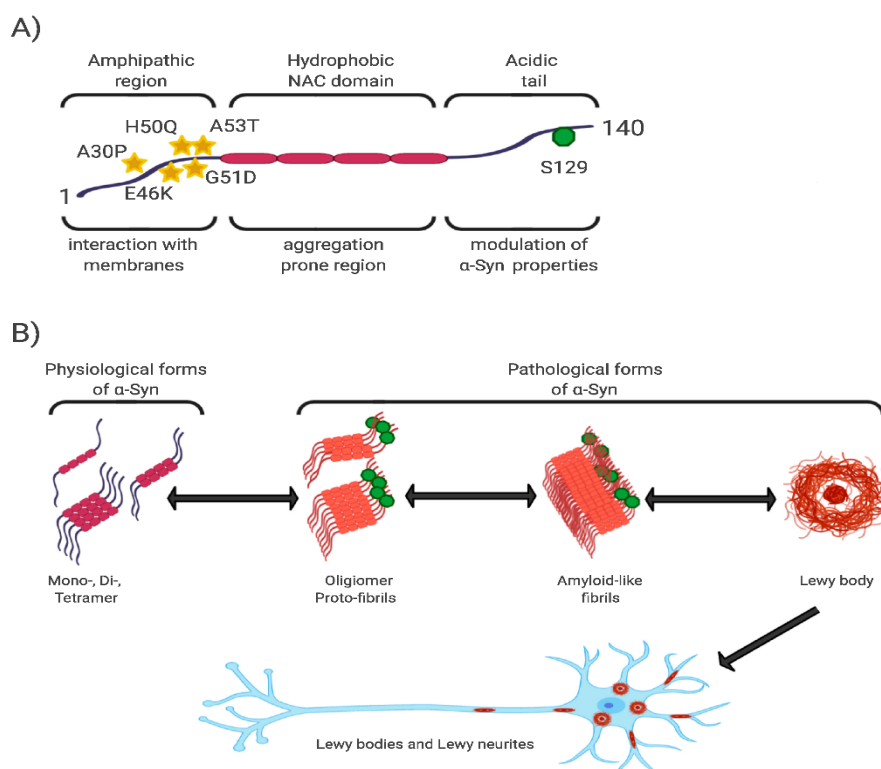
Χαρακτηριστικό της α-συνουκλεΐνης αποτελεί το γεγονός ότι πρόκειται για ένα πολύ δυναμικό μόριο, του οποίου η δευτεροταγής δομή εξαρτάται από το περιβάλλον του. Σε υδατικό διάλυμα η πρωτεΐνη εμφανίζεται σε μία μη αναδιπλωμένη τυχαία σπειρωμένη δομή με το αμινοτελικό της άκρο να έχει τη δυνατότητα να δεσμεύεται σε κυστίδια όξινων φωσφολιπιδίων.

Όσον αφορά την λειτουργία της, η α-συνουκλεΐνη μπορεί και επηρεάζει έμμεσα την αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης λόγω της ιδιότητας που διαθέτει να αναστέλλει επιλεκτικά τη φωσφολιπάση D2 (PLD2), πιθανώς με αλληλεπίδραση μέσω της επιφάνειας της μεμβράνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο στην κίνηση των κυστιδίων, αλλά επίσης και στην επαγόμενη μέσω

σηματοδότησης ρύθμιση του κυτταροσκελετού ή/και της ενδοκύτωσης. Ακόμη, η α -συνουκλεΐνη επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική διαφοροποίηση, ενώ συμμετέχει στην νευρωνική πλαστικότητα και στην αποθήκευση της ντοπαμίνης. Η απελευθέρωσή της της δίνει την δυνατότητα να λειτουργεί ως ρυθμιστής της έκκρισης ενζύμων και νευροδιαβιβαστών στις συνάψεις των νευρωνικών κυττάρων, ενώ φαίνεται να εμπλέκεται επιπλέον και στον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων στο ΚΝΣ. (Beyer, 2006; W. S. Kim, Kågedal, & Halliday, 2014; Popova, Kleinknecht, & Braus, 2015)

1.1.γ α -Συνουκλεΐνη και Παθογένεια

Η α -συνουκλεΐνη αναλόγως του περιβάλλοντός της και των συνθηκών μπορεί να αποκτήσει μια τυχαία σπειροειδή μορφή σε δομή β - πτυχωτού φύλλου. Αυτό μπορεί να συμβεί μετά από υπερέκφραση, μεταλλάξεις (σημειακές, διπλασιασμοί, τριπλασιασμοί) ή/ και εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου *SNCA*, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια παθολογική δομή. Η δομή αυτή υποβοηθά την συσσώρευση και περαιτέρω την παραγωγή κυτταροπλασματικών εγκλείστων όπως τα νημάτια στα Lewy Bodies. Τα εγκλείστα περιέχουν α -συνουκλεΐνη, ουβικιτίνη, λιπίδια και άλλες συνοδές πρωτεΐνες. (Dehay et al., 2015) Το αποτέλεσμα της παθολογικής μετατροπής της α -συνουκλεΐνης παρουσιάζεται αναλυτικά στην εικόνα 1.4.



Εικόνα 1.4: Δομή, ιδιότητες και παθολογική μορφή της α -συνουκλεΐνης. (A) Απλοποιημένο σχήμα της δομής της α -συνουκλεΐνης όπου απεικονίζεται το αμινοτελικό άκρο της και το πεπτίδιο NAC, περιοχές υπεύθυνες για την ικανότητα της πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά με μεμβρανικές δομές. Στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης εντοπίζονται όλες οι πιθανές μεταλλάξεις (απεικονίζονται μεταλλάξεις συσχετιζόμενες με την νόσο Πάρκινσον), το πεπτίδιο NAC ως το πιο υδρόφοβο κομμάτι είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό β -πτυχωτών φύλλων και κατ' επέκταση ινιδίων ενώ το καρβοξυτελικό άκρο παραμένει μη δομημένο. Σε αυτό εντοπίζεται η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο σερίνης 129 η οποία είναι η κύρια μετα-μεταφραστική τροποποίηση της α -συνουκλεΐνης. (B) Η α -συνουκλεΐνη εντοπίζεται ως ένα μη

δομημένο μονομερές ή μετασταθερό τετραμερές. Σε παθολογικές καταστάσεις, υπό την μορφή β-πτυχωτού φύλλου δημιουργούνται ολιγομερή ασταθή ινίδια τα οποία όσο συσσωρεύονται γίνονται και πιο αδρανή. Αυτά απαρτίζουν ουσιαστικά τα σωματίδια Lewy τα οποία και συσσωρεύονται είτε στο σώμα των νευρώνων είτε στον νευρωνικό άξονα. (Fricova et al., 2020)

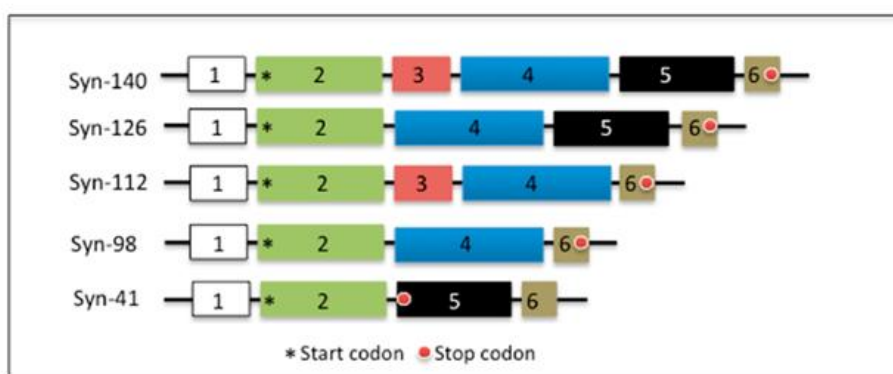
Η συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης προκαλεί πολλαπλές συνέπειες στο κύτταρο επηρεάζοντας άμεσα την βιωσιμότητά του. Αρχικά, παρά την ουβικουτίνωση της, αναστέλλει τη λειτουργία του πρωτεασώματος, με αποτέλεσμα την περαιτέρω συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο κύτταρο. Προκαλείται καταπόνηση στο ενδοπλασματικό δίκτυο, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ενδοκυττάρια κυκλοφορία (ΕΔ-Golgi). Ακόμα εμπλέκεται στην αύξηση της παραγωγής ROS (reactive oxygen species) και οξειδωτικού στρες και στην τροποποίηση της μιτοχondριακής μεμβράνης, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η λειτουργία της, ενώ τέλος αναστέλλει και την αυτοφαγία στα λυσοσώματα. (Dehay et al., 2015)

1.1.δ Παραλλαγές του μορίου της α-συνουκλεΐνης

Ισομορφές

Έχουν απομονωθεί τέσσερις διαφορετικές ισομορφές της α-συνουκλεΐνης. Αυτές προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα μεταξύ διαφορετικών εξονίων, με αποτέλεσμα τη μεταβολή σε λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης. Οι ισομορφές της α-συνουκλεΐνης (εικόνα 1.5) πέραν αυτής του αγρίου τύπου με μήκος 140 αμινοξέα και μοριακό βάρος (MB) 14,5 kD που αντιστοιχεί στο πλήρες και κύριο μετάγραφο είναι:

1. Η α-συνουκλεΐνη 126 (13,1 kD)
2. Η α-συνουκλεΐνη 112 (11,4 kD)
3. Η α-συνουκλεΐνη 98 (11 kD)
4. Η α-συνουκλεΐνη 41



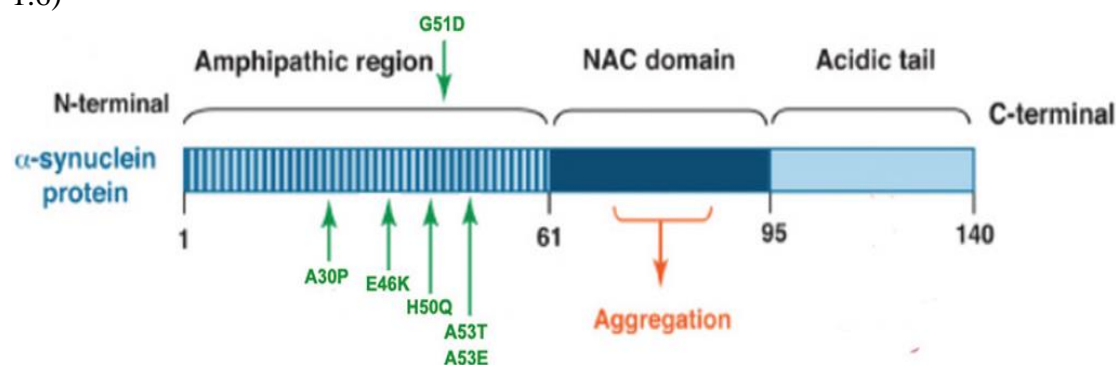
Εικόνα 1.5: Απεικόνιση των προϊόντων του εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης και των δομικών αλλαγών της. Παρατηρούνται τα 6 εξόνια του γονιδίου *SNCA* (1, 2, 3, 4, 5, 6) εκ των οποίων τα 5 είναι κωδικά (2, 3, 4, 5, 6) και αποδίδουν προϊόντα mRNA. (Vinnakota et al., 2018)

Οι ισομορφές 126 και 112 προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα με αποτέλεσμα την απαλοιφή των εξονίων 3 και 5 αντίστοιχα, ενώ στην ισομορφή 98 το εναλλακτικό μάτισμα έχει ως αποτέλεσμα την απαλοιφή αμφοτέρων των εξονίων 3 και 5. Στην ισομορφή 41 το εναλλακτικό μάτισμα έχει ως αποτέλεσμα την απαλοιφή αμφοτέρων των εξονίων 3 και 4.

Το εξόνιο 3 αντιστοιχεί στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης το οποίο είναι άκρως απαραίτητο για τη σύνδεσή της με τη μεμβράνη μέσω των 7 ατελώς επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η έλλειψή του μειώνει αυτή την αλληλεπίδραση, κατά συνέπεια η δημιουργία συσσωματώματος ελαττώνεται. Όσον αφορά το εξόνιο 4, κωδικοποιεί την έκφραση του πεπτιδίου NAC της α-συνουκλεΐνης υπεύθυνου για την ικανότητα της πρωτεΐνης να σχηματίζει ινίδια αφού πρόκειται για ένα πεπτίδιο με χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Το εξόνιο 5, αφετέρου, αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Ο βαθμός συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης 140 εξαρτάται από τη συγκέντρωση του καρβοξυ-τελικού άκρου, με αυξημένες απαλοιφές σε αυτό να ευνοούν την τάση της α-συνουκλεΐνης να σχηματίζει ινίδια, αφού καταργείται ο προστατευτικός ρόλος της περιοχής αυτής. Βάσει του παραπάνω, καθώς και της συμμετοχής του αμινοτελικού άκρου στις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών μπορούν εξαχθούν κάποια χρήσιμα συμπεράσματα για τις ισομορφές. Επομένως, αναμένεται υψηλότερος ρυθμός συσσωμάτωσης στην α-συνουκλεΐνη 112 και 98 σε σχέση με την α-συνουκλεΐνη 140, ενώ στην α-συνουκλεΐνη 126, λόγω μειωμένης αλληλεπίδρασης, η διαδικασία της συσσωμάτωσης επιβραδύνεται και ο σχηματισμός συσσωματωμάτων αποδυναμώνεται σημαντικά. (Gámez-Valero & Beyer, 2018).

Μεταλλαγές

Έχουν απομονωθεί έξι σημειακές μεταλλαγές της α-συνουκλεΐνης: η A30P, η A53T, η E46K, η H50Q, η G51D και η A53E. Όλες οι μεταλλαγές συνδέονται με την νόσο του Parkinson, ενώ η A53T και E46K εμπλέκονται επιπλέον και στην κληρονομική άνοια σωματίων Lewy. Και οι έξι μεταλλαγές εδράζονται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η αλληλεπίδραση της α-συνουκλεΐνης με τις λιπιδιακές μεμβράνες και να επάγεται η παθολογική συσσώρευση της. (Εικόνα 1.6)



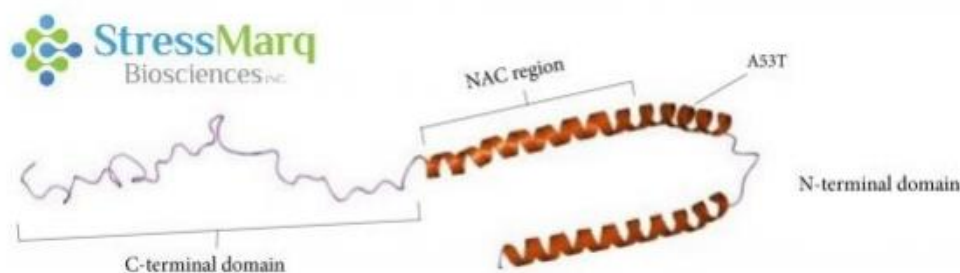
Εικόνα 1.6 : Απεικόνιση των μεταλλαγών της α-συνουκλεΐνης. Φαίνονται τα σημεία όπου εντοπίζονται οι μεταλλαγές στο αμινοτελικό άκρο και το πεπτίδιο NAC που κατέχει σημαντικό ρόλο στην συσσώρευση της της α-συνουκλεΐνης. (Xu & Chan, 2015)

Μεταλλαγή A53T

Πρόκειται για μία μεταλλαγή μετάπτωσης του νουκλεοτιδίου G σε A στη θέση 209 του γονιδίου *SNCA* αγρίου τύπου, με αποτέλεσμα να προκύπτει θρεονίνη αντί της αλανίνης στη θέση 53 της αμινοξικής αλληλουχίας. Η μεταλλαγή αυτή επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό τη νόσο Πάρκινσον, διότι οδηγεί σε πρόωμη εκδήλωση της ασθένειας και μικρότερη διάρκεια της. (Polymeropoulos et al., 1997)

Η A53T (εικόνα 1.7) σχηματίζει ινίδια με ταχύτερο ρυθμό από την α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου και την A30P σε διάλυμα, εντούτοις φαίνεται να επηρεάζει λιγότερο

την επιμήκυνση των ινιδίων. Βάσει θεωρητικών μοντέλων απεικόνισης προτείνεται ότι η μεταλλαγή αυτή οδηγεί σε μεγαλύτερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοτελικού και καρβοξυτελικού άκρου της α -συνουκλεΐνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αποκρύπτεται κατά κάποιο τρόπο η περιοχή NAC της πρωτεΐνης, κατά συνέπεια αυξάνεται και σταθεροποιείται ο σχηματισμός β -πτυχωτών φύλλων. (Conway, Harper, & Lansbury, 1998)



Εικόνα 1.7: Απεικόνιση της A53T σε δευτεροταγή δομή α -συνουκλεΐνης (StressMarq Biosciences Inc.)

Η παραγωγή ινιδίων και β -πτυχωτών φύλλων φαίνεται να επηρεάζει ορισμένες λειτουργίες του κυττάρου. Αρχικά, λόγω της μορφής τους συνδέονται πιο εύκολα σε μεταφορικά κυστίδια επηρεάζοντας την διαπερατότητά τους και τη συνολική μεταφορά της πληροφορίας ανάμεσα στους νευρώνες μέσω των συναπτικών κυστιδίων. Στη συνέχεια, από πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε διαγονιδιακά ποντίκια φαίνεται η περαιτέρω τοξικότητα της συγκεκριμένης μεταλλαγής έναντι της α -συνουκλεΐνης αγρίου τύπου παρουσιάζοντας πιο έντονο και ταχύ εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων και σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα. Ακόμα, όταν η μεταλλαγή της α -συνουκλεΐνης A53T εκφράζεται επιλεκτικά σε αστροκύτταρα του ποντικού, αυτά παραλύουν άμεσα, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κυττάρων μικρογλοίας. Τα κύτταρα αυτά που έχουν την ικανότητα να παράγουν ROS υπό φυσιολογικές συνθήκες φαίνεται να ενεργοποιούνται περισσότερο υπό την έκφραση της συγκεκριμένης μεταλλαγής συγκριτικά με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Χωρίς να έχει αποδειχθεί, θεωρείται πιθανό τα κύτταρα αυτά να ενεργοποιούνται ακόμα περισσότερο στη νόσο Πάρκινσον συμβάλλοντας στον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων, αφού η μεταλλαγή αυτή καθιστά τα κύτταρα πιο ευάλωτα σε οξειδωτικό στρες. (Gu et al., 2010; Kurz et al., 2010) Τέλος, η έκφραση της ανθρώπινης A53T α -συνουκλεΐνης σχετίζεται αρχικά με μειωμένη κινητικότητα των μιτοχονδρίων συγκριτικά με της αγρίου τύπου α -συνουκλεΐνης σε νευρώνες φλοιού ποντικών. Έχει παρατηρηθεί ότι η μείωση της κινητικότητας εντοπίζεται μόνο στα μιτοχόνδρια, ενώ των αυτοφαγοσωμάτων και διάφορων μεταφορικών κυστιδίων παραμένει σταθερή. Όσον αφορά την αναπνευστική λειτουργία των μιτοχονδρίων έχει αποδειχθεί ότι είναι μειωμένη συγκριτικά με την επίδραση της αγρίου τύπου α -συνουκλεΐνης, ενώ μπορεί να επηρεάζεται και το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης. (Li et al., 2013) Αποτέλεσμα αυτού είναι η αυξημένη αυτοφαγία των μιτοχονδρίων των νευρικών κυττάρων λόγω της αναγνώρισής τους ως μη λειτουργικών, γεγονός που οδηγεί σε νευροεκφυλισμό. Όσον αφορά την συσχέτιση της εν λόγω μεταλλαγής με τον μηχανισμό της αυτοφαγίας, έχει παρατηρηθεί ότι η α -συνουκλεΐνη A53T επάγει πιο έντονα την αυτοφαγία από την α -συνουκλεΐνη αγρίου

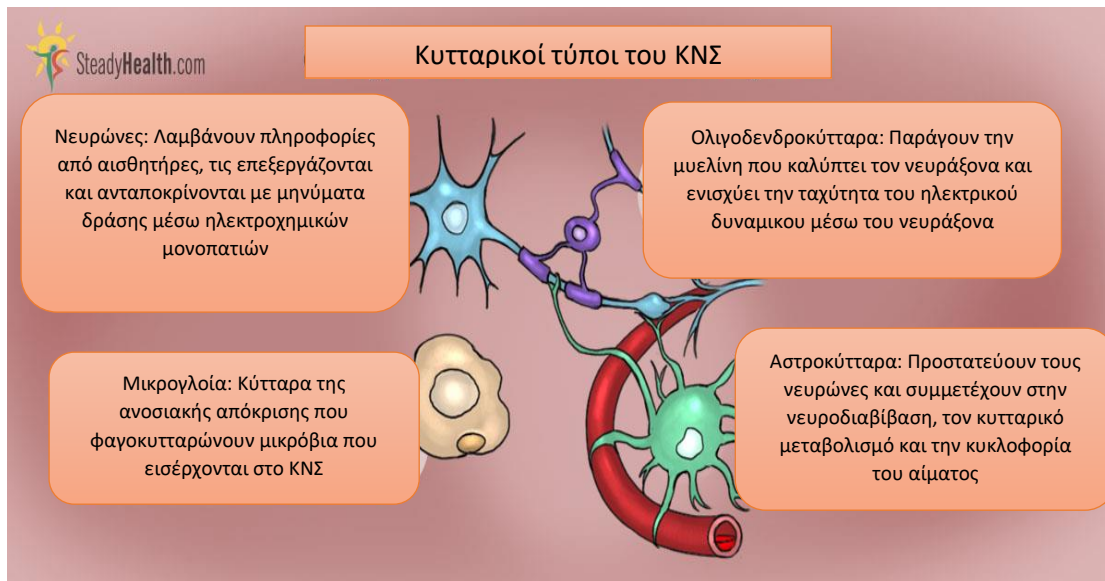
τύπου με σκοπό την αποδόμηση των πιο γρήγορα σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων. Το γεγονός αυτό όντως συμβάλλει στην αποδόμηση των συσσωματωμάτων, ενώ έχει προταθεί και ως θεραπευτική στρατηγική για τις νόσους που βασίζονται σε αυτά. (Lu, Sun, Ma, Qing, & Deng, 2015) Όμως, βάσει πειραμάτων έχει αποδειχθεί ότι αυτή η αυξημένη ενεργοποίηση της αυτοφαγίας εν μέρει επηρεάζει και τα μιτοχόνδρια τα οποία παρουσιάζουν εναλλαγές στην πόλωση των μεμβρανών τους και στην αλλαγή της μορφολογίας τους. Σε πειράματα όπου πραγματοποιήθηκε θεραπεία των νευρώνων με ραπαμυκίνη, ενός ισχυρού επαγωγέα της αυτοφαγίας, για διάστημα 3 ημερών, παρατηρήθηκε ότι η μιτοχονδριακή απώλεια ήταν σε παρόμοια επίπεδα με αυτά παρουσία υπερεκφρασμένης α-συνουκλεΐνης A53T. Φαίνεται κατ' αυτόν τον τρόπο ότι η αυτοφαγία δεν κατέχει έναν μονόπλευρο ρόλο, αλλά είναι απαραίτητο να βρίσκεται σε μια δυναμική ισορροπία. Όμως παρουσία της α-συνουκλεΐνης A53T είναι αρκετά δύσκολο να παραμείνει σταθερή και ίσως αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τον ταχύτερο εκφυλισμό των νευρώνων. (Choubey et al., 2011)

1.2 Το ανθρώπινο νευρικό σύστημα

Το νευρικό σύστημα είναι υπεύθυνο για την ρύθμιση και τον έλεγχο της λειτουργία όλων των οργάνων του ανθρωπίνου σώματος, καθώς επίσης και για την μεταξύ τους συνεργασία. Διακρίνεται στο κεντρικό (ΚΝΣ) και περιφερικό νευρικό σύστημα. Το ΚΝΣ αποτελείται από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό, ενώ στο περιφερικό οι νευρικές ίνες εκτείνονται από τον εγκέφαλο ή το νωτιαίο μυελό προς τους μύες, τους αδένες και τα διάφορα αισθητήρια όργανα.

Το περιφερικό νευρικό σύστημα διακρίνεται στο προσαγωγό και απαγωγό σκέλος. Το πρώτο είναι υπεύθυνο για την μεταφορά της πληροφορίας από τους ιστούς και τα όργανα του σώματος στο ΚΝΣ, ενώ το δεύτερο για την μετάδοση της πληροφορίας από το ΚΝΣ προς τα εκτελεστικά κύτταρα (μυϊκά, ενδοκρινικά ή άλλα νευρικά). Τέλος, το απαγωγό διαιρείται σε σωματικό και αυτόνομο νευρικό σύστημα. Το σωματικό αποτελείται από όλες τις νευρικές ίνες που κατευθύνονται από το ΚΝΣ προς τα κύτταρα των σκελετικών μυών. Το αυτόνομο αποτελείται από μία αλυσίδα δύο νευρώνων που συνδέονται με μία σύναψη εκτεινόμενη μεταξύ του κεντρικού νευρικού συστήματος και των εκτελεστικών οργάνων, ενώ ρυθμίζει και διατηρεί την ομοιόσταση των οργανισμών μέσω του συμπαθητικού και παρασυμπαθητικού συστήματος.

Ο νευρικός ιστός αποτελείται από τέσσερις τύπους κυττάρων. Η δομή και οι ιδιότητές τους παρουσιάζονται στην εικόνα 1.8.



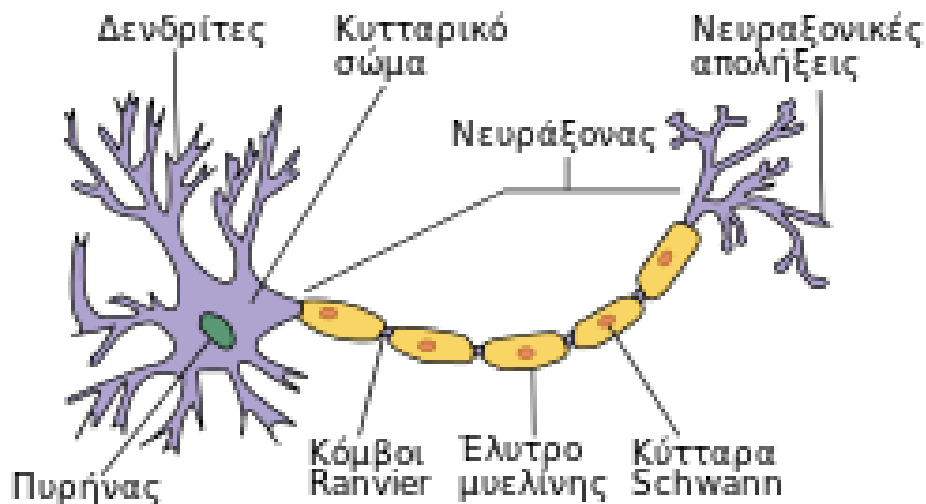
Εικόνα 1.8: Απεικόνιση των διαφόρων τύπων κ�ττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος. (steadyhealth.com)

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

Οι νευρώνες αποτελούνται συνήθως από τα εξής μέρη (εικόνα 1.9):

- Από τους δενδρίτες που είναι υπεύθυνοι για την πρόσληψη ερεθισμάτων από το περιβάλλον, από αισθητικά επιθηλιακά κ�τταρα ή άλλους νευρώνες.
- Από το κυτταρικό σώμα που αποτελεί το τροφικό κέντρο ολόκληρου του νευρικού κ�ττάρου, ενώ παράλληλα διαθέτει δυνατότητα υποδοχής ερεθισμάτων.
- Από το νευράξονα, μία μονή αποφυάδα υπεύθυνη για την παραγωγή ή τη μετάδοση νευρικών ώσεων σε άλλα κ�τταρα, ενώ μπορεί να δεχτεί και πληροφορίες από άλλα νευρικά κ�τταρα.

Οι άξονες των νευρώνων καλύπτονται από μυελίνη που λειτουργεί ως ηλεκτρικό μονωτικό και εμπλέκεται στην ταχεία μετάδοση των ηλεκτρικών σημάτων. Οι τελικές απολήξεις των δενδριτών του νευράξονα έχουν στα άκρα τους διογκώσεις, τα τελικά ή συναπτικά κυστίδια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών.



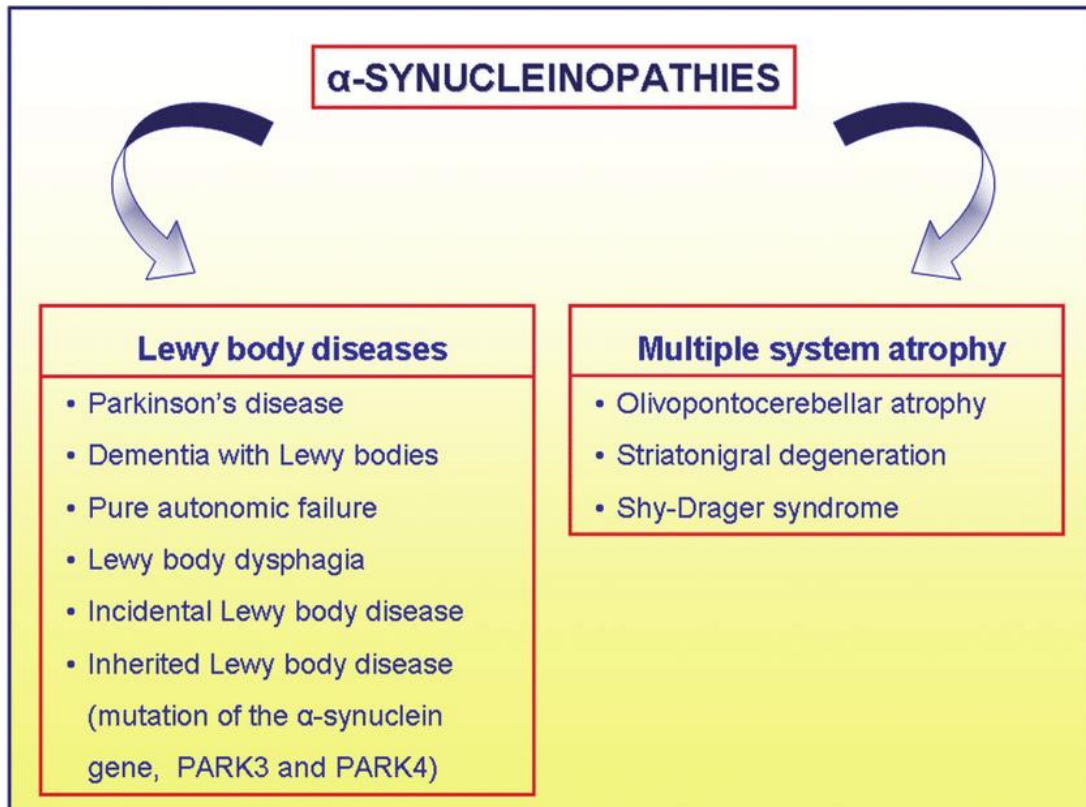
Εικόνα 1.9 : Η δομή ενός τυπικού νευρώνα.

1.3 Νευροεκφυλιστικές Ασθένειες (NDDs) και η συσχέτισή τους με την α-συνουκλεΐνη

Πρόκειται για διαταραχές που χαρακτηρίζονται από βαθμιαία και εκτεταμένη νευρωνική και συναπτική απώλεια στις φλοιώδεις και υποφλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου. Κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η προοδευτική και μαζική απώλεια κυττάρων του νευρικού συστήματος, τα οποία σε αντίθεση με άλλα είδη κυττάρων είναι δύσκολο να αναπληρωθούν. Η εκτεταμένη αυτή απώλεια οδηγεί σε θεαματική μείωση των σωματικών και νοητικών λειτουργιών του ατόμου και τελικά στο θάνατο.

Όλο και περισσότερες μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι κοινός παρονομαστής της πλειοψηφίας των νευροεκφυλιστικών ασθενειών είναι η συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων κρίσιμων πρωτεϊνών για το κύτταρο. Αυτή η συσσώρευση εμφανίζεται με τη μορφή ενδοκυτταρικών εγκλείστων ή εξωκυτταρικών εναποθέσεων στους νευρώνες, κατάσταση που αποτελεί και τη βάση της παθογένειας των νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό της συσσώρευσης των πρωτεϊνών αυτών είναι και η δομή του β-πτυχωτού φύλλου που προκύπτει και ονομάζονται αμυλοειδή. (Ross & Poirier, 2004)

Μια από τις κρίσιμες αυτές πρωτεΐνες που η συσσώρευση της οδηγεί στη παραπάνω παθογένεια είναι και η α-συνουκλεΐνη. Σχηματίζει νηματοειδή συσσωματώματα σε έγκλειστα σωμάτια του κυτταροπλάσματος (Lewy bodies) τα οποία δημιουργούνται από την αδιάλυτη πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη. Ο όρος συνουκλεινοπάθειες χρησιμοποιείται ακριβώς για αυτή την ομάδα νευροεκφυλιστικών διαταραχών (Εικόνα 1.10).

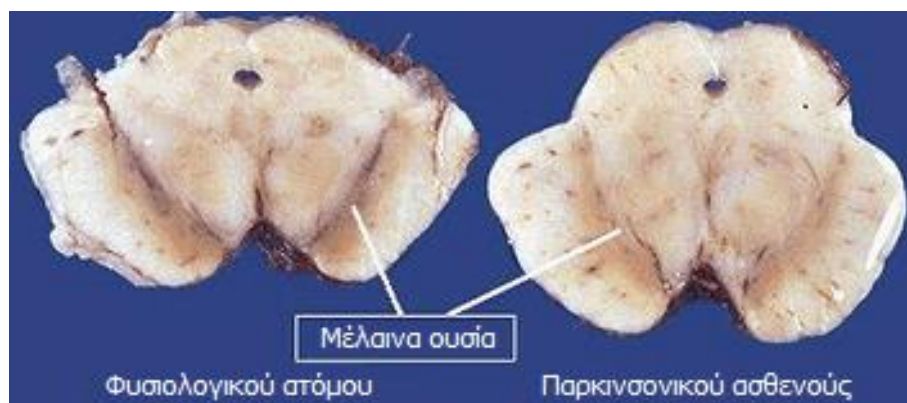


Εικόνα 1.10: Χαρακτηριστικές Συνουκλεινοπάθειες.

1.3.α Νόσος Πάρκινσον (Parkinson's disease, PD)

Πρόκειται για μια νευροεκφυλιστική ασθένεια η οποία εντοπίζεται συχνά και επηρεάζει περίπου το 2% των ατόμων άνω των 65 ετών και το 4-5% των ατόμων άνω των 85 ετών (Fahn, 2008). Τα ανεξάρτητα μεταξύ τους κινητικά χαρακτηριστικά του παρκινσονισμού είναι τα εξής: τρόμος ηρεμίας, βραδυκινησία, ακαμψία, απώλεια των αντανακλαστικών στάσης, εύκαμπτη στάση του τραχήλου, του κορμού και των άκρων και το φαινόμενο «παγώματος» (όπου τα κάτω άκρα «κολλούν» στο έδαφος). Ακριβώς επειδή είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους δεν είναι απαραίτητο να είναι όλα παρόντα, αλλά τουλάχιστον δύο θα πρέπει να εντοπίζονται για τη διάγνωση του παρκινσονισμού, με τουλάχιστον ένα από αυτά να είναι ο τρόμος ηρεμίας ή η βραδυκινησία.

Στα συμπτώματα περιλαμβάνεται επίσης εκτεταμένη και κλιμακούμενη απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στα βασικά γάγγλια και ο σχηματισμός πρωτεϊνικών εγκλειστών στο εσωτερικό των νευρώνων. Τα εγκλειστα αυτά ονομάζονται σωματίδια Lewy (Lewy Bodies) και έχουν ως βασικό συστατικό τους την α-συνουκλειΐνη. Ο εντοπισμός τους γίνεται σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου σε παθολογικές συνθήκες, με κυριότερη αυτή της μέλαινας ουσίας (εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.11: Συγκριτική απεικόνιση της περιοχής της μέλαινας ουσίας (Substantia Nigra) σε φυσιολογικές (αριστερά) και παθολογικές (δεξιά) συνθήκες. Παρατηρείται ο αποχρωματισμός της περιοχής κατά τις παθολογικές καταστάσεις, φαινόμενο που οφείλεται, σε κυτταρικό επίπεδο, στο σχηματισμό των σωματίων Lewy (Bodies) και την καταστροφή των νευρικών κυττάρων. (VIARTIS: «history of Parkinson's disease»)

Πολλά στοιχεία μελετών συσχετίζουν την α-συνουκλεΐνη με την εκδήλωση της νόσου, αφού αποτελεί και τη βάση των σωματίων Lewy. Η α-συνουκλεΐνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCA* της περιοχής *PARK1*. Τυχόν διπλασιασμοί και τριπλασιασμοί της περιοχής *PARK1* ή του γονιδίου *SNCA* συνδέονται με την εκδήλωση της νόσου του Πάρκινσον. Η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων της νόσου είναι σποραδικής μορφής. Παρόλ' αυτά η οικογενή μορφή της νόσου του Πάρκινσον, η οποία κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο, συνδέεται με την α-συνουκλεΐνη A53T, μια μεταλλαγή της α-συνουκλεΐνης με αποτέλεσμα την πρόωμη εκδήλωση της νόσου. (Polymeropoulos et al., 1997)

1.3.β. Άνοια σωματίων Lewy (Dementia with Lewy Bodies, DLB)

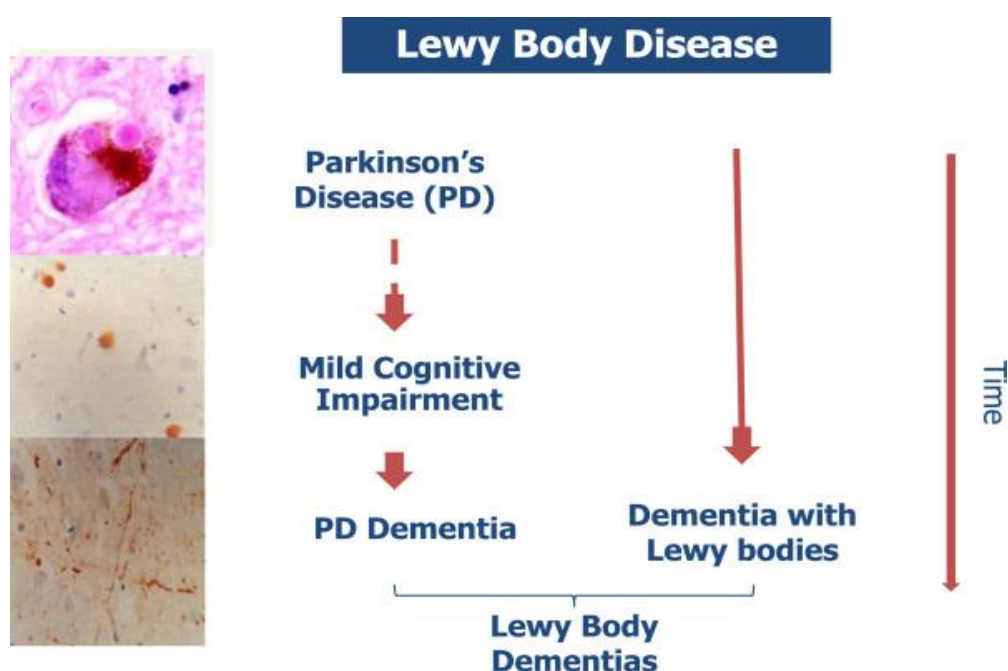
Πρόκειται για ακόμα μια νευροεκφυλιστική ασθένεια που ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των συνουκλείνοπαθειών. Η άνοια σωματίων Lewy (DLB) μοιράζεται αρκετά κλινικά, παθολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά με τις νόσους Πάρκινσον και Alzheimer. Τα εμφανή συμπτώματά της συμπίπτουν με αυτά της νόσου Πάρκινσον έως και στο 85% των ασθενών, ενώ δεν είναι απαραίτητο να υπάρχει οικογενειακό ιστορικό της νόσου. Είναι άμεσα σχετιζόμενη με την ηλικία με βασικό χαρακτηριστικό την άνοια, η οποία συνοδεύεται συχνά με παρκινσονισμό. Άλλα χαρακτηριστικά της είναι η προοδευτική γνωστική έλλειψη, διακυμάνσεις στην προσοχή, οπτικές ψευδαισθήσεις, διαταραχές ύπνου REM και η περιορισμένη αυτόνομη λειτουργία του πάσχοντος. Όλα τα παραπάνω επηρεάζουν την καθημερινότητα του. (Outeiro et al., 2019)

Λόγω των τόσων κοινών συμπτωμάτων καθίσταται πολύ δύσκολη η διαφοροποίηση της από τη νόσο Πάρκινσον. Και οι δύο ασθένειες έχουν ως βάση τα σωματίνα Lewy ως τοξικό παράγοντα, με πρωταρχικό συστατικό την α-συνουκλεΐνη. Ο κύριος σκοπός των μελετών αποσκοπεί στο διαχωρισμό των ασθενειών αυτών με σκοπό την καλύτερη αντιμετώπισή τους. Βασικό κριτήριο για τον εντοπισμό και διαχωρισμό της άνοιας σωματίων Lewy από τη νόσο Πάρκινσον αποτελεί ο «κανόνας του ενός έτους» ('one year rule'), όπου εάν ο παρκινσονισμός εμφανίζεται μαζί με την άνοια ή μέχρι ένα χρόνο μετά χαρακτηρίζεται ως DLB, ειδάλως αν προηγείται της άνοιας κατά ένα χρόνο η περισσότερο χαρακτηρίζεται ως άνοια στα πλαίσια της νόσου

Πάρκινσον (Parkinson's Disease Dementia, PDD). (Capouch, Farlow, & Brosch, 2018)

Ακόμα, τα σωματία Lewy στην PD εντοπίζονται κυρίως στους νευρώνες της μέλαινας ουσίας, ενώ στην DLB κατανομούνται διάχυτα σε όλους τους φλοιούς του εγκεφάλου. Περαιτέρω μελέτες δείχνουν ότι περιπτώσεις DLB εμφανίζουν παρόμοια ιστοπαθολογικά στοιχεία με τη νόσο του Alzheimer και σε μικρότερο βαθμό απώλειας των ντοπαμινεργικών νευρώνων που αποτελεί σήμα κατατεθέν της PDD. (Capouch et al., 2018)

Σε γενετικό επίπεδο, μέχρι σήμερα τρία γονίδια φαίνεται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στη νόσο DLB, τα *APOE*, *GBA* και *SNCA*, ενώ συμμετέχουν επίσης τόσο στη νόσο του Alzheimer, όσο και στην PD. Βέβαια, είναι αναγκαίες περαιτέρω μελέτες και προσπάθειες για την κατανόηση του γενετικού υπόβαθρου της νόσου, ώστε να υπάρξει η καλύτερη δυνατή αντιμετώπιση. (Capouch et al., 2018)



Εικόνα 1.12 : Ασθένειες σωματίων Lewy. Τόσο η PDD όσο και η DLB ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. Βασικό κριτήριο για τον διαχωρισμό τους αποτελεί ο 'κανόνας του ενός έτους (<one year rule>) όπου εάν ο παρκινσονισμός εμφανίζεται μαζί ή εντός ενός χρόνου με την άνοια χαρακτηρίζεται ως DLB, ειδάλλως αν ο παρκινσονισμός προηγείται της άνοιας κατά ένα χρόνο η περισσότερο χαρακτηρίζεται ως PDD. (Donaghy & McKeith, 2014)

1.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Ο *Saccharomyces cerevisiae* (Εικόνα 1.13) είναι ο γνωστότερος ζυμομύκητας και ένας από τους εκτενέστερα μελετημένους κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Είναι αερόβιος και μικροαερόφιλος με διάμετρο 4-5 μm και βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης 30–35 °C και pH 4.5. Στη φύση εντοπίζεται κυρίως στα σταφύλια. Χρησιμοποιείται στην αρτοποιία και την παρασκευή αλκοολούχων ποτών ως καλλιέργεια εκκίνησης της ζύμωσης. Αναπαράγεται αφυλετικά, αλλά και φυλετικά, όταν κύτταρα διαφορετικού συζευκτικού τύπου συντήκονται σε ενδιάμεσα διπλοειδή κύτταρα από τα οποία προκύπτουν νέα απλοειδή. Αναπτύσσεται σε μία ποικιλία σακχάρων ανάλογα με το αν οι συνθήκες είναι αερόβιες ή αναερόβιες.



Εικόνα 1.13 : *Saccharomyces cerevisiae*.

Ο *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί οργανισμό μοντέλο για γενετικές και μοριακές μελέτες λόγω των ιδιοτήτων του, όπως εύκολη και ταχεία ανάπτυξη σε κοινά θρεπτικά μέσα και εύκολη εφαρμογή μεθόδων ανασυνδυασμού. Η νουκλεοτιδική του αλληλουχία έχει προσδιοριστεί με μέγεθος περίπου $1,2 \times 10^7$ bp και πάνω από 6200 γονίδια, η πλειοψηφία των οποίων έχει ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί. (Tenreiro, Munder, Alberti, & Outeiro, 2013) Ακόμα, μελέτες πρωτεωμικής και μεταβολομικής, καθώς και διαθέσιμα μεταλλαγμένα στελέχη με απαλοιφές συγκεκριμένων γονιδίων συμπληρώνουν τις εκτεταμένες γνώσεις για το ζυμομύκητα και είναι κατατεθειμένες σε δημόσιες βάσεις δεδομένων.

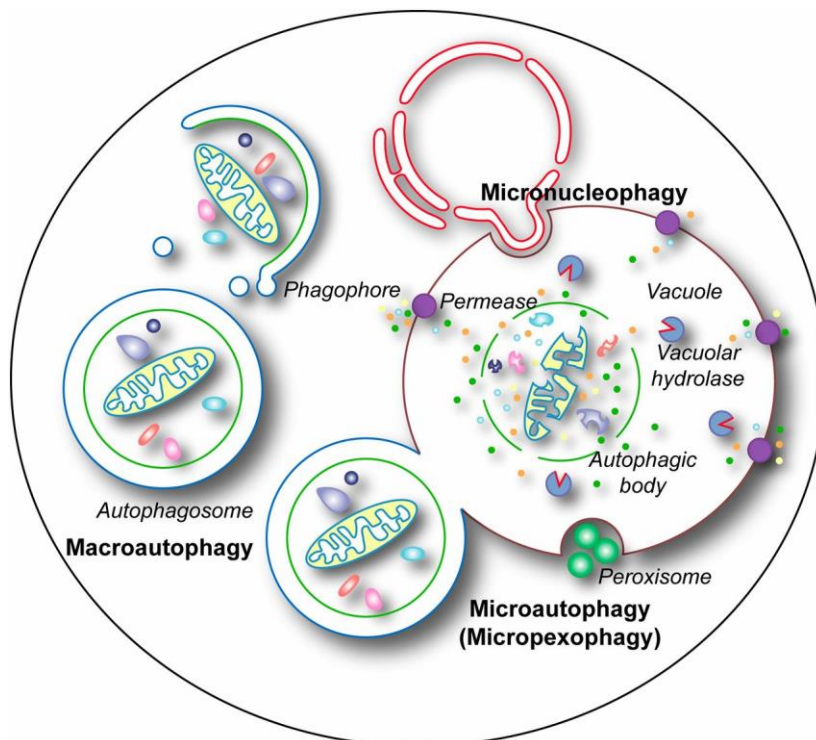
1.4.α Η χρήση του *S. cerevisiae* ως πρότυπου μελέτης των νευροεκφυλιστικών νόσων

Ο ζυμοκύκητας *Saccharomyces cerevisiae* ανήκει στους μονοκύτταρους κατώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Εντούτοις, διαθέτει ορισμένα σημαντικά κοινά χαρακτηριστικά με αντίστοιχα ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών όπως ο άνθρωπος. Περισσότερα από τα μισά γονίδια του ζυμομύκητα εμφανίζουν ομολογία με αντίστοιχα (ανθρώπινα) του ανθρώπου, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και ορισμένα που σχετίζονται με ασθένειες του ανθρώπου. Ακόμα, τα κύτταρα της ζύμης έχουν χρησιμοποιηθεί ως αντιπροσωπευτικά των ευκαρυωτικών για τη διερεύνηση πολλών κυτταρικών διεργασιών σε ανώτερους οργανισμούς που όμως δεν έχουν επηρεαστεί από την εξελικτική απόσταση. Τέτοιες είναι η αναδίπλωση των πρωτεϊνών και τα συστήματα ποιοτικού ελέγχου τους, καθώς και τα στοιχεία της έκκρισης και της κυστιδιακής μεταφοράς. Ακόμα οι ζυμομύκητες φέρουν ιδιαίτερα συντηρημένους τους μηχανισμούς κυτταρικής γήρανσης, θανάτου και επιβίωσης, όπως και της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων και της αυτοφαγίας. (Franssens et al., 2013; Khurana & Lindquist, 2010)

Η πλειοψηφία των παραπάνω μηχανισμών εμπλέκεται στην παθογένεια νευροεκφυλιστικών νόσων όπως της Πάρκινσον και της άνοιας σωματίων Lewy. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη μελέτη τους σε ένα εύχρηστο και απλοποιημένο μοντέλο όπως αυτό του ζυμομύκητα. Εντούτοις, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν ότι τα κύτταρα των ανώτερων θηλαστικών όπως ο άνθρωπος παρουσιάζουν αυξημένη πολυπλοκότητα συγκριτικά με αυτά του ζυμομύκητα, ενώ η ύπαρξη των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων στους πολυκύτταρους οργανισμούς αποτελεί συνθήκη που απουσιάζει από το ζυμομύκητα.

1.4.β Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί της αυτοφαγίας στον *S. cerevisiae*

Η αυτοφαγία αποτελεί μια από τις πιο διατηρημένες και σημαντικές διαδικασίες για την επιβίωση των ευκαρυωτικών κυττάρων. Για να διατηρηθούν στη ζωή σε δυσμενείς συνθήκες, όπως η στέρηση θρεπτικών ουσιών, τα κύτταρα αποδομούν τα δικά τους κυτταρικά συστατικά με τη βοήθεια των λυσοσωμάτων/κενοτοπίων. Η απομόνωση και η παροχή κυτταρικών συστατικών στο λυτικό κύκλο πραγματοποιείται μέσω της αυτοφαγίας. Σε αυτή τη διαδικασία, το φαγοφόρο παράγει ένα κυστίδιο διπλής μεμβράνης στο κυτοσόλιο, το οποίο περικλείει κυτταρικά συστατικά ή οργανίδια τα οποία υπολειτουργούν δημιουργώντας το αυτοφαγόσωμα. Μόλις δημιουργηθεί το αυτοφαγόσωμα, η εξωτερική του μεμβράνη συντήκεται με αυτήν των λυσοσωμάτων/κενοτοπίων με αποτέλεσμα η εσωτερική μεμβράνη του αυτοφαγόσωματος και του περιεχομένου της να εκτίθενται σε μια σειρά υδρολυτικών ενζύμων. Τα προϊόντα διάσπασης απελευθερώνονται ξανά στην συνέχεια στο κυτοσόλιο προς επαναχρησιμοποίηση από το κύτταρο. (εικόνα 1.14) Με αυτό τον τρόπο η αυτοφαγία κατέχει ιδιαίτερο ρόλο στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης. (Cebollero & Reggiori, 2009)



Εικόνα 1.14 :Αυτοφαγία στον ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.(Reggiori & Klionsky, 2013)

Κομβικό ρόλο στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας διαδραματίζει η οικογένεια των γονιδίων *ATG*. Τον πιο σημαντικό κατέχει η πρωτεΐνη *Atg8* η οποία παράγεται σε μεγάλη ποσότητα και εμπλέκεται στη μεμβρανική σύντηξη κατά τον σχηματισμό του αυτοφαγόσωματος. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι κατά το σχηματισμό των αυτοφαγόσωμάτων το γονίδιο *ATG8* υπερεκφράζεται σε περίπου οκταπλάσιο βαθμό, με αποτέλεσμα να παράγεται η απαραίτητη ποσότητα της *Atg8*, ώστε να πραγματοποιηθούν όλες οι απαιτούμενες μεμβρανικές συντήξεις. Η αναγκαιότητα αυτής της υπερέκφρασης επιβεβαιώθηκε από πειράματα σε στελέχη στα οποία ή απουσίαζε το γονίδιο *ATG8* ή είχε υποστεί κάποια κρίσιμη μεταλλαγή, με

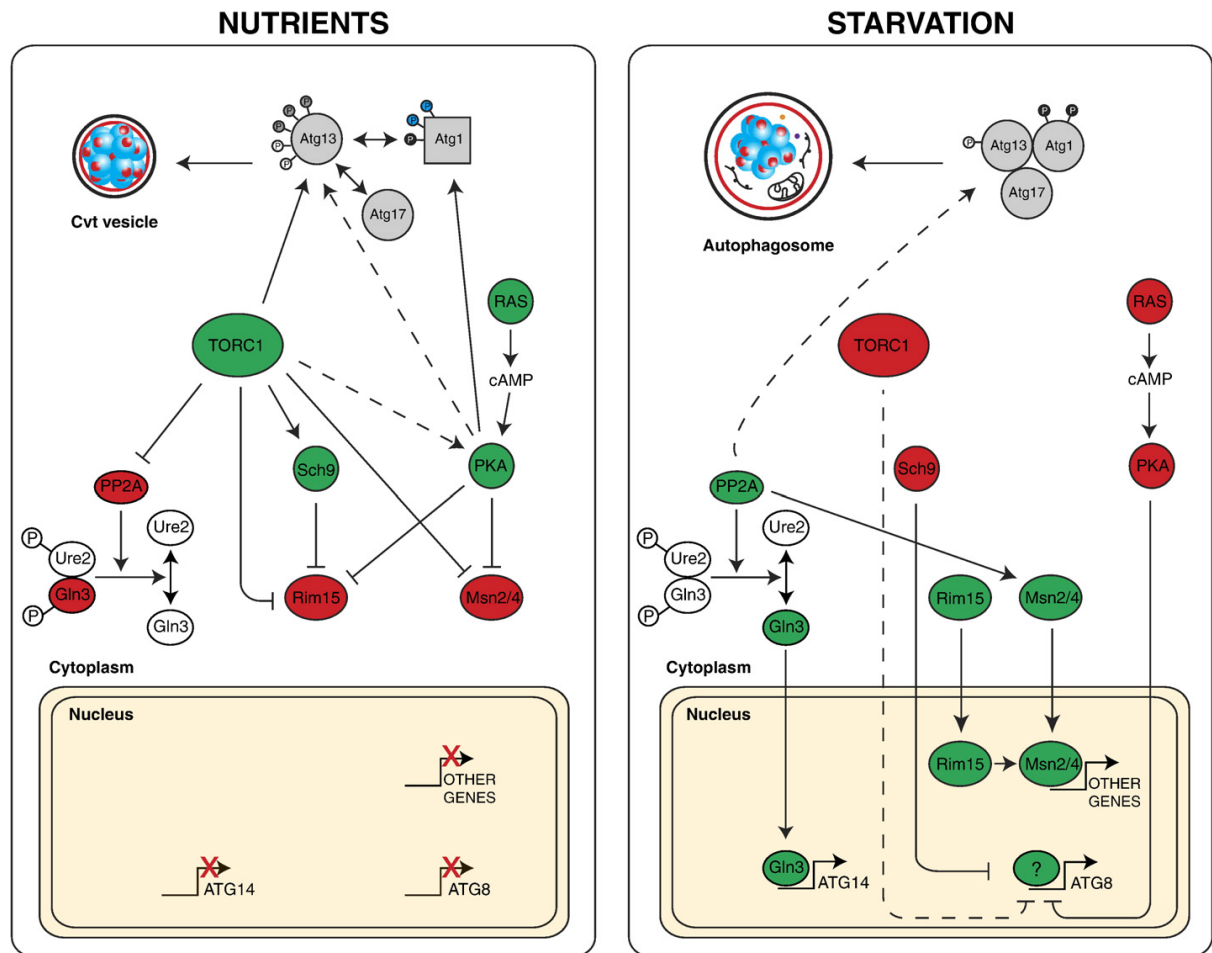
αποτέλεσμα το σχηματισμό μικρών και ανώμαλων αυτοφαγοσωμάτων. Παρόμοια εικόνα μη λειτουργικών αυτοφαγοσωμάτων προκύπτει και σε περιπτώσεις όπου η πρωτεϊνοσύνθεση σταματήσει για κάποιο λόγο, όπως π.χ. μετά από επίδραση με κυκλοεξιμίδιο, οπότε τα αυτοφαγοσώματα που προκύπτουν είναι πάλι μικρότερα από τα φυσιολογικά. Ένα πιθανό συμπέρασμα σε αυτή την περίπτωση θα ήταν ότι η πρωτεϊνοσύνθεση δεν είναι απαραίτητη για την επαγωγή της αυτοφαγίας αλλά κρίσιμη για την παραγωγή κανονικού μεγέθους αυτοφαγοσωμάτων. Παρά το σημαντικό ρόλο του, οι παράγοντες που ενεργοποιούν την μεταγραφή του *ATG8* δεν έχουν αποσαφηνιστεί. (Cebollero & Reggiori, 2009; Huang & Klionsky, 2002; Inoue & Klionsky, 2010)

Ένα ακόμη γονίδιο που φαίνεται να συμμετέχει σε μεγάλο βαθμό είναι το *ATG14*. Σε συνθήκες ενεργοποίησης της αυτοφαγίας το επίπεδο μεταγραφής του αυξάνεται πάνω από 20 φορές. Η *Atg14* έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στα *Vps34*, *ATG6/Vps30* και *Vps15*, για να σχηματίσει το τάξης III σύμπλοκο I της 3-κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, το οποίο εμπλέκεται στη δημιουργία του αυτοφαγοσώματος. Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει διαπιστωθεί πως υπόκειται στον έλεγχο των μεταγραφικών παραγόντων *Gln3* και *Gcn4*, υπεύθυνων για την αίσθηση των θρεπτικών στοιχείων στο περιβάλλον και το εσωτερικό του κυττάρου. (Cebollero & Reggiori, 2009; Huang & Klionsky, 2002; Inoue & Klionsky, 2010)

Εκτός από τα γονίδια *ATG8* και *ATG14*, έχει αποδειχτεί από αναλύσεις μικροσυστοιχιών ότι τα γονίδια *ATG1*, *ATG3*, *ATG4*, *ATG5*, *ATG7*, *ATG12* και *ATG13* αυξάνουν την έκφρασή τους υπό συνθήκες θρεπτικού περιορισμού, αλλά σε μικρότερο βαθμό από τα δύο πρώτα. (Cebollero & Reggiori, 2009)

Η επαγωγή της αυτοφαγίας ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από τη σηματοδότηση του κυτταρικού μονοπατιού TOR (Target Of Rapamycin). Αυτό το μονοπάτι ενεργοποιείται από την ύπαρξη θρεπτικών ουσιών για το κύτταρο, ενώ αποτελεί παράλληλα και στόχο της ραπαμυκίνης. Στο ζυμομύκητα *S. cerevisiae* υπάρχουν δύο ομόλογα γονίδια *TOR*, τα *TOR1* και *TOR2*. Αυτά οδηγούν στην έκφραση των πρωτεϊνών *TOR1* και *TOR2* αντίστοιχα, οι οποίες με τη σειρά τους συνθέτουν δύο πρωτεϊνικά σύμπλοκα: το *TORC1*, το οποίο περιλαμβάνει την *TOR1* και/ή την *TOR2*, και το *TORC2*, το οποίο περιέχει μόνο την *TOR2*. Το *TORC1* παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία στην ραπαμυκίνη, ενώ η πιθανή απενεργοποίησή του από τη ραπαμυκίνη διεγείρει την επαγωγή της αυτοφαγίας. Επομένως, παρατηρείται ότι το *TORC1* λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του μεταγραφικού μονοπατιού TOR αναστέλλει τη μεταγραφή απαραίτητων γονιδίων για να ενεργοποιηθεί η αυτοφαγία στο κύτταρο όπως παραδείγματος χάριν συμβαίνει με τα γονίδια *Rim15*, *ATG8* και *ATG14*. (Cebollero & Reggiori, 2009)

Εκτός από το *TORC1*, η Ras/cAMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση A (PKA) κατέχει επίσης ρυθμιστικό ρόλο στην επαγωγή της αυτοφαγίας. Το κυτταρικό μονοπάτι Ras/PKA εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη σε απόκριση εξωκυττάρων θρεπτικών συστατικών, αλλά και συνθηκών στρες, όπως και το αντίστοιχο του TOR. Όταν υπάρχει υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, ενεργοποιείται το μεταγραφικό μονοπάτι Ras, με αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του cAMP. Με τη σειρά του αυτό ρυθμίζει θετικά την δραστηριότητα της PKA με αποτέλεσμα να την καθιστά έναν ακόμη αρνητικό ρυθμιστή της αυτοφαγίας μέσω καθοδικών μορίων όπως το *Rim15* και οι μεταγραφικοί παράγοντες *Msn2/4*. (εικόνα 1.15) (Cebollero & Reggiori, 2009)



Εικόνα 1.15 : Ρύθμιση της αυτοφαγίας από τις οδούς σηματοδότησης TOR και Ras/cAMP εξαρτώμενο από την PKA. Παρουσία θρεπτικών ουσιών η αυτοφαγία παραμένει ανενεργή και επικρατεί μεταγραφική καταστολή, εφόσον είναι ενεργά τα μονοπάτια TOR και Ras/cAMP, ενώ η στέρση θρεπτικών συστατικών και η παρουσία κυτταρικού στρες προκαλούν την απενεργοποίηση των οδών σηματοδότησης TOR και Ras/cAMP, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας. (Cebollero & Reggiori, 2009)

1.4.γ Απόκριση στο στρες: η επαγωγή της στον *S. cerevisiae*

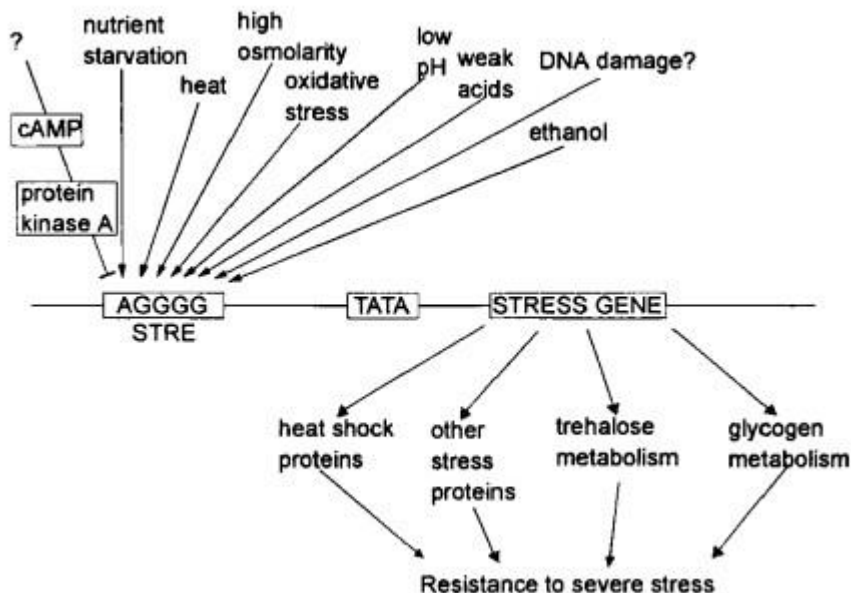
Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες αναπτύσσεται ένας οργανισμός (όπως περιβάλλον ανάπτυξης, θρεπτικά στοιχεία, ωσμωτικότητα, pH, θερμοκρασία) μεταβάλλονται συνεχώς. Κάθε οργανισμός έχει αναπτύξει τις κατάλληλες διαδικασίες για την απόκριση σε αυτές τις μεταβολές, οι οποίες, όταν τείνουν στα άκρα, οδηγούν σε κατάσταση καταπόνησης (στρες). Επειδή ο βαθμός εξελικτικής διατήρησης των μονοπατιών που ακολουθούνται για την αντιμετώπιση των συνθηκών στρες μεταξύ των ζυμών και των ανώτερων ευκαρυωτικών είναι αρκετά μεγάλος, ο ζυμομύκητας μπορεί να αποτελέσει ένα κατάλληλο μοντέλο για τον χαρακτηρισμό της απόκρισης στο στρες που αντιστοιχεί εν δυνάμει και σε πιο σύνθετους οργανισμούς. (Estruch, 2000)

Έχει αποδειχτεί ότι σε καταστάσεις στρες ο ζυμομύκητας ενεργοποιεί ένα γενικευμένο πρότυπο απόκρισης σε αυτό, και όχι μόνο μία συγκεκριμένη απόκριση στο εκάστοτε είδος στρες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τη στιγμή που εκτίθεται σε ένα είδος στρες, ταυτόχρονα να αποκτά αντοχή και σε ένα δεύτερο είδος στρες που

μπορεί να επέλθει, διαφορετικό από το πρώτο. Παραδείγματος χάριν, σε συνθήκες υψηλής ωσμωτικότητας, οι υπεύθυνες πρωτεΐνες που θα παραχθούν για την αντιμετώπιση της, μπορούν να αποδειχθούν χρήσιμες σε ένα επερχόμενο θερμικό σοκ προσδίδοντάς του αντοχή σε αυτό. Επομένως τα κύτταρα αυτά διαθέτουν έναν μοριακό μηχανισμό που μπορεί να ενεργοποιηθεί από διαφορετικούς παράγοντες, αλλά τους προσφέρει τη δυνατότητα να ανταπεξέλθουν σε παραπάνω από μια αντίξοες για το κύτταρο συνθήκες. (Ruis & Schüller, 1995)

Οι κυριότεροι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν τη γενικευμένη απόκριση στο στρες για τα κύτταρα της ζύμης είναι οι Msn2/4. Εκτός από το σημαντικό ρόλο που κατέχουν στην έναρξη της αυτοφαγίας, είναι υπεύθυνοι για την ρύθμιση της γενικευμένης απόκρισης στο στρες. Κάτω από τέτοιες συνθήκες επάγεται η μεταφορά τους στον πυρήνα μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών TOR, Sch9 και PKA που αναλύθηκαν παραπάνω, ενώ απουσία στρες παραμένουν στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 1.15 δεξιά και αριστερά αντίστοιχα).

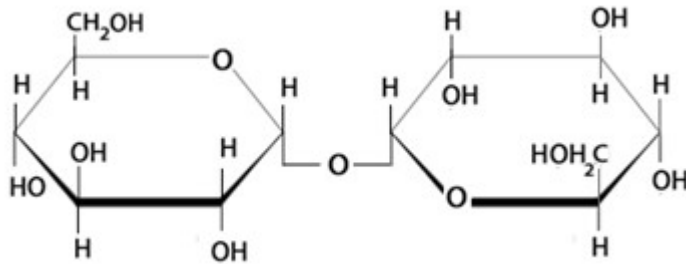
Οι μεταγραφικοί παράγοντες Msn2/4 δρουν *in trans* σε αντίστοιχες αλληλουχίες *cis*. Τα *cis* ρυθμιστικά αυτά στοιχεία εδράζονται στον υποκινητή των επαγόμενων γονιδίων, ονομάζονται STREs (stress responsive elements) και περιέχουν το μοτίβο αλληλουχίας AGGGG. Μια τέτοια περίπτωση αποτελούν και τα γονίδια του μεταβολισμού της τρεχαλόζης *TPS1*, *TPS2*, *TPS3* και *TSL1* που θα αναλυθούν στη συνέχεια. Τα STREs εντοπίζονται και ανοδικά γονιδίων που δεν επάγονται με το στρες. Η παρουσία του στοιχείου STRE στον υποκινητή δεν υποδηλώνει ότι όλα τα γονίδια που ελέγχουν τα στοιχεία αυτά δείχνουν ένα καθολικό μοτίβο έκφρασης παρόλο αυτά πολλά εκφράζονται ανά ομάδες. (Estruch, 2000) Η ρύθμιση μέσω των στοιχείων STREs παρουσιάζεται στην εικόνα 1.16.



Εικόνα 1.16: Ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων στρες μέσω των στοιχείων STREs στους υποκινητές τους. Διάφορα είδη στρες όπως η έλλειψη θρεπτικών, το θερμικό σοκ ή η υψηλή ωσμωτικότητα ενεργοποιούν την απόκριση στο στρες. Αυτή περιλαμβάνει την παραγωγή πρωτεϊνών του θερμικού σοκ, τρεχαλόζης και γλυκογόνου, καθώς και την επαγωγή άλλων γονιδίων ως απόκριση στο στρες. (Ruis & Schüller, 1995)

1.5 Τρεχαλόζη

Πρόκειται για έναν φυσικό δισακχαρίτη που σχηματίζεται από ένα α , α -1,1-γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ δύο μορίων α -γλυκόζης. (Εικόνα 1.17)



Εικόνα 1.17: Χημικός τύπος της τρεχαλόζης

Η τρεχαλόζη εντοπίστηκε αρχικά στην ερυσσιβώδη σίκαλη, και αργότερα στο μάννα, μια ουσία που παράγεται από σκαθάρια. Συντίθεται σε βακτήρια, μύκητες, φυτά, και ζώα ασπόνδυλα, όταν αυτά εκτεθούν σε συνθήκες καταπόνησης, ενώ χαρακτηριστική είναι η αντοχή που προσδίδει σε αυτά σε παρατεταμένες περιόδους ξηρασίας.

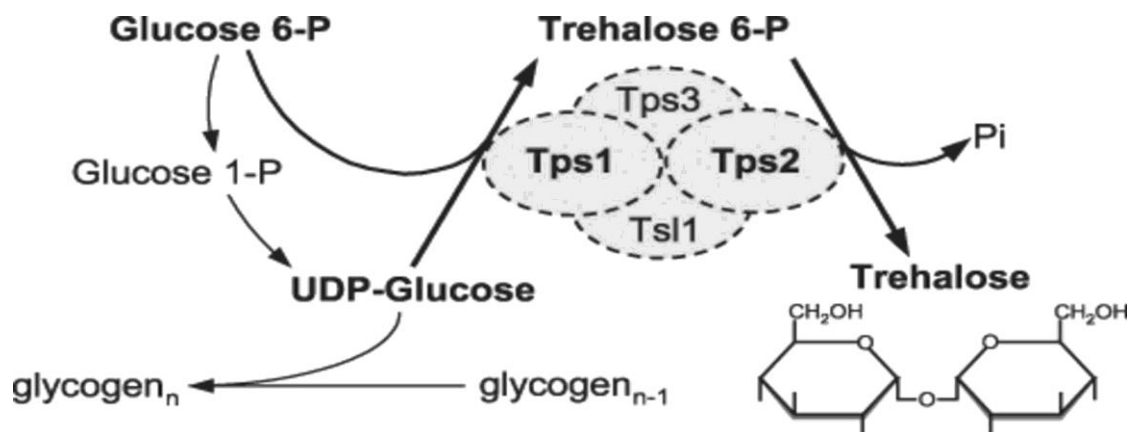
Η τρεχαλόζη στο ζυμομύκητα χρησιμεύει ως πηγή άνθρακα και αποθήκη ενέργειας σε συνθήκες πείνας. Ακόμα, κατέχει κύριο ρόλο στην προστασία του κυττάρου από στρεσογόνους παράγοντες, η οποία ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο. Στο πλαίσιο αυτό, συμμετέχει στην αποδιάταξη των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (misfolded proteins) τόσο άμεσα λόγω της χημικής της δομής, όσο και έμμεσα μέσω της αυτοφαγίας (mTOR-independent), καθώς και στη σταθερότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Αυτό ενισχύεται από πειραματικά αποτελέσματα *in vitro* όπου προσχηματισμένα πρωτοϊνίδια και ινίδια της μεταλλαγής A53T αποδιάταχθηκαν σε μικρότερα συσσωματώματα ή διαλυμένες άτακτες μορφές (Ruzza et al., 2015). Όπως προαναφέρθηκε κατέχει σημαντικό ρόλο στην αποτροπή της διάσπασης του εσωτερικού των οργανιδίων του κυττάρου, όταν τα κύτταρα αφυδατώνονται. Σε καταστάσεις θερμικού σοκ η βιοσύνθεση και η βιοαποδόμησή της αυξάνονται κατακόρυφα, με τη μέγιστη παραγωγή τρεχαλόζης να παρατηρείται σε θερμοκρασίες άνω των 40 °C. Ακόμα, σε συνθήκες ωσμωτικού στρες παράγονται υψηλά επίπεδα γλυκερόλης και τρεχαλόζης. Τέλος, η τρεχαλόζη προστατεύει το ζυμομύκητα από ελεύθερες ρίζες αφού μπορεί και τις σταθεροποιεί, ενώ διαθέτει και αντιοξειδωτική δράση. (François, Walther, & Parrou, 2012; Nwaka & Holzer, 1997)

1.5.α Η σύνθεση της τρεχαλόζης στον *S. cerevisiae*

Η αντίδραση σύνθεσης της τρεχαλόζης περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο, ένα μόριο 6-P-γλυκόζης και ένα μόριο UDP-γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας 6-P-φωσφοτρεχαλόζη μέσω του ενζύμου συνθάση της 6-P-φωσφοτρεχαλόζης. Στη συνέχεια, η 6-P-φωσφοτρεχαλόζη μετατρέπεται σε τρεχαλόζη μέσω της φωσφατάσης της 6-P-φωσφοτρεχαλόζης. Στο ζυμομύκητα, η αντίδραση καταλύεται από ένα μεγάλο ενζυμικό σύμπλοκο (Εικόνα 1.18) που περιλαμβάνει δύο καταλυτικές και δύο ρυθμιστικές υπομονάδες οι οποίες κωδικοποιούνται από τα εξής γονίδια: (Eleutherio, Panek, De Mesquita, Trevisol, & Magalhães, 2015)

- *TPS1*: κωδικοποιεί τη συνθάση της 6-P-φωσφοτρεχαλόζης (Tps1p).

- *TPS2*: κωδικοποιεί τη φωσφατάση της 6-P-φωσφοτρεχαλόζης (Trps2p).
- *TPS3*: κωδικοποιεί τη ρυθμιστική υπομονάδα Trps3p η οποία έχει έναν ρυθμιστικό ρόλο ως προς το ενζυμικό σύμπλεγμα ενώ αλληλεπιδρά τόσο με την Trps1p όσο και με την Tsl1p
- *TSL1*: κωδικοποιεί τη ρυθμιστική υπομονάδα Tsl1p, έχει επίσης έναν ρυθμιστικό ρόλο ως προς το ενζυμικό σύμπλεγμα ενώ αλληλεπιδρά σε πολύ μεγάλο βαθμό με την υπομονάδα του γονιδίου *TPS1*- συνθάση της 6-P-Φωσφοτρεχαλόζης ενεργοποιώντας την αλλά και με αυτή του *TPS3*.



Εικόνα 1.18 : Η αντίδραση σύνθεσης της τρεχαλόζης μέσω του ενζυμικού συμπλόκου της. (Gancedo & Flores, 2004)

Στον ζυμομύκητα, η συγκέντρωση των Trps1p και Trps2p αυξάνεται σημαντικά σε συνθήκες στρες. Αυτή είναι μία συνέπεια της επαγωγής της έκφρασης όλων των γονιδίων του συμπλόκου, κυρίως όμως του *TSL1*, η έκφραση του οποίου επηρεάζει ισχυρά την δραστηριότητα και ενεργοποίηση της Trps1p. Ακόμη, η υπομονάδα Trps3p φαίνεται να φέρει επαγωγική δράση ως προς την Trps2p. (Eleutherio et al., 2015)

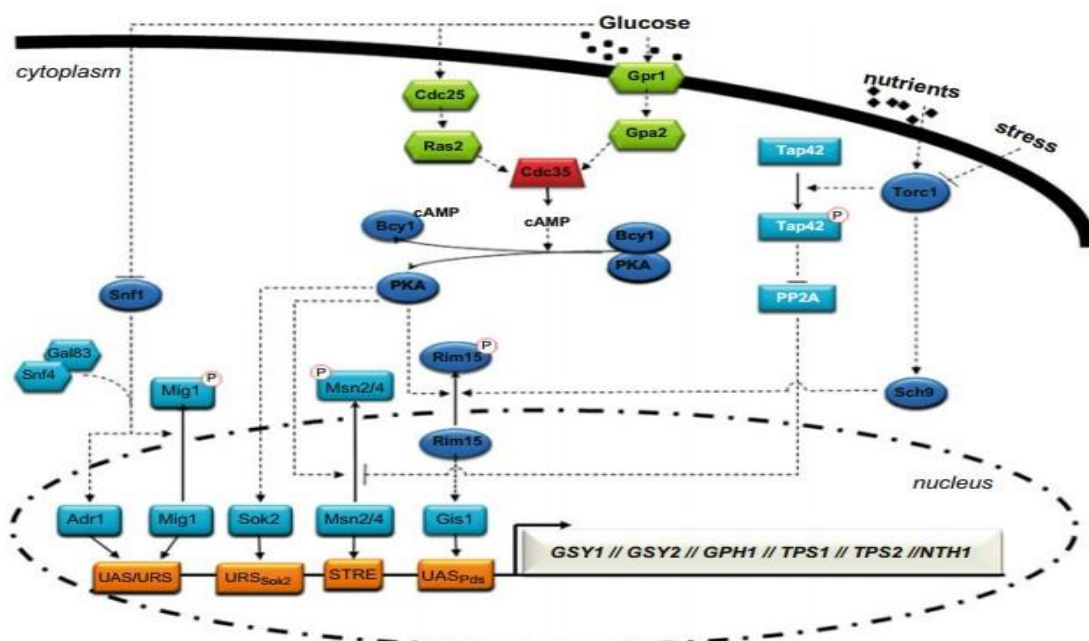
1.5.β Η μεταγραφική ρύθμιση της τρεχαλόζης στον *S. cerevisiae*

Τα επίπεδα τρεχαλόζης στα κύτταρα του ζυμομύκητα ποικίλλουν σημαντικά ανάλογα με την ανάπτυξη, τις θρεπτικές ουσίες και τις καταστάσεις στρες. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στις κύριες οδούς αντίληψης θρεπτικών ουσιών μέσω των κυτταρικών μονοπατιών PKA-Ras και TOR.

Αφενός, το μονοπάτι μεταγραφικής ρύθμισης cAMP/PKA έχει την δυνατότητα να καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης με τρεις διαφορετικούς τρόπους δράσης. Αποτελεσματικότερος φαίνεται να είναι ο περιορισμός των μεταγραφικών παραγόντων Msn2/4p στο κυτταρόπλασμα, ο οποίος επιτυγχάνεται με τη φωσφορυλίωσή τους από την PKA. Αυτό έχει ως συνέπεια την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης αφού πλέον οι Msn2/4p δεν μπορούν να προσδεθούν στις ειδικές αλληλουχίες STRE ανοδικά των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή τρεχαλόζης. Στο δεύτερο μηχανισμό εμπλέκεται ο μεταγραφικός καταστολέας Sok2p αφού όλα τα σημαντικά γονίδια τρεχαλόζης φέρουν ένα συντηρημένο μοτίβο για SOK2 στην περιοχή του υποκινητή τους. Οπότε όσο παραμένει μη κατεσταλμένο το μονοπάτι cAMP/PKA τόσο θα παραμένει ενεργός ο μεταγραφικός καταστολέας Sok2p και θα εμποδίζει την

μεταγραφή των γονιδίων. Ένα ακόμα μονοπάτι μεταγραφικής ρύθμισης μέσω της PKA είναι και ο έλεγχος του καταρράκτη Rim15-Gis1p. Όταν η PKA παραμένει ενεργή, φωσφορυλιώνει τη πρωτεΐνη Rim-15 με αποτέλεσμα να μην μπορεί να εισέλθει στο πυρήνα να ενεργοποιήσει το μεταγραφικό παράγοντα Gis1p και την μεταγραφή των γονιδίων τρεχαλόζης. (Francois et al., 2012)

Αφετέρου, το μονοπάτι TORC1 επηρεάζει τη μεταγραφή των γονιδίων αυτών τόσο μέσω των μεταγραφικών παραγόντων Msn2/4, όσο και μέσω του καταρράκτη Rim15-Gis1p. Συγκεκριμένα, το σύμπλεγμα TORC1 μπορεί και ελέγχει αρνητικά τη πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα Msn2/4 στον υποκινητή των γονιδίων μέσω της φωσφορυλίωσης μιας πρωτεΐνης, της Tap42p. Η φωσφορυλιωμένη αυτή πρωτεΐνη αναστέλλει με της σειρά της τη δράση της φωσφατάσης PP2A, η οποία έχει ως λειτουργία την αποφωσφορυλίωση των Msn2/4 και έχει ως συνέπεια την αδυναμία μεταγραφής των γονιδίων που επάγονται από τα Msn2/4. Επιπροσθέτως, το TORC1 έχει δειχθεί ότι ελέγχει αρνητικά τον καταρράκτη Rim15-Gis1p μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης Sch9 η οποία φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη Rim-15 με αποτέλεσμα την παραμονή του μεταγραφικού παράγοντα Gis1p στο κυτταρόπλασμα όπως ακριβώς συμβαίνει με τους μεταγραφικούς παράγοντες Msn2/4.(εικόνα 1.19) (Francois et al., 2012)



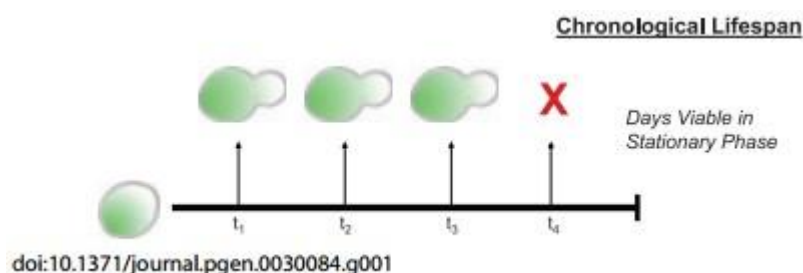
Εικόνα 1.19: Σχηματική απεικόνιση του μεταγραφικού ελέγχου της τρεχαλόζης από τις οδούς ανίχνευσης θρεπτικών ουσιών που εξαρτώνται από τις κινάσες PKA και TORC1 στον *S. cerevisiae*. (Francois et al., 2012)

1.6 *S. cerevisiae* και κυτταρική γήρανση

Η γήρανση αποτελεί σημαντικό αντικείμενο μελέτης, εφόσον πολλές ασθένειες κάνουν τότε την εμφάνισή τους. Οι μελέτες επικεντρώνονται κυρίως στην κατανόηση των μηχανισμών της γήρανσης, ώστε να ερμηνευθεί κατά το δυνατόν ο λόγος εμφάνισης των χρόνιων νόσων. Ο *S. cerevisiae* χρησιμοποιείται ως οργανισμός μοντέλο για τη μελέτη της γήρανσης. Δύο κρίσιμα μονοπάτια που αποτελούν αντικείμενο μελέτης γι' αυτό το σκοπό είναι το μονοπάτι PKA-Ras και αυτό των

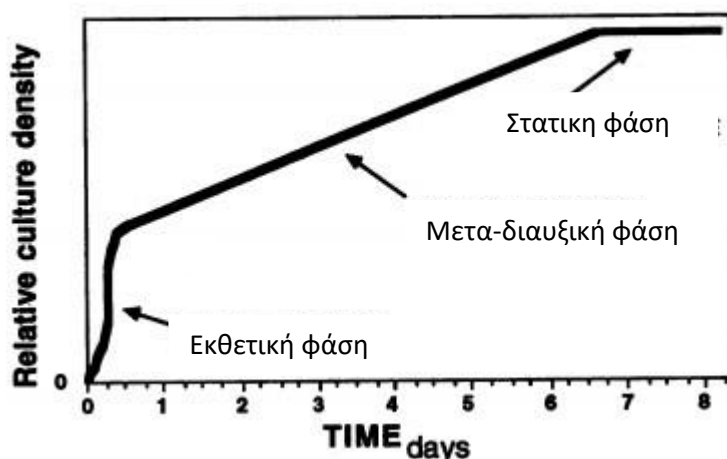
σιρτουϊνών. (Lin et al., 2002) Σε αυτή τη μελέτη για την ανακάλυψή τους κομβική σημασία είχε ο ζυμομύκητας *S. cerevisiae*. (Longo, Shadel, Kaeberlein, & Kennedy, 2012)

Δύο ειδών τύποι γήρανσης παρατηρούνται στο ζυμομύκητα: η αντιγραφική και η χρονολογική. Η αντιγραφική γήρανση αναφέρεται στην χρονική περίοδο κατά την οποία ένα κύτταρο, μετά τον κανονικό αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων, εισέρχεται σε μία φάση όπου ο ρυθμός διαίρεσής του μειώνεται σημαντικά, πριν ακολουθήσει κυτταρική λύση. Η χρονολογική γήρανση (chronological life span, CLS) στον ζυμομύκητα ορίζεται ως το χρονικό διάστημα κατά το οποίο επιβιώνει ένα κύτταρο ζύμης που δεν διαιρείται πλέον. Για να προκύψουν τέτοια κύτταρα, αναπτύσσεται μία καλλιέργεια ζυμομύκητα μέχρι την μετα-διαυξική φάση, όπου τα περισσότερα κύτταρα εξέρχονται του κυτταρικού κύκλου. (Longo et al., 2012) (Εικόνα 1.20)



Εικόνα 1.20 : Χρονολογική γήρανση των κυττάρων ζυμομύκητα. (Longo et al., 2012)

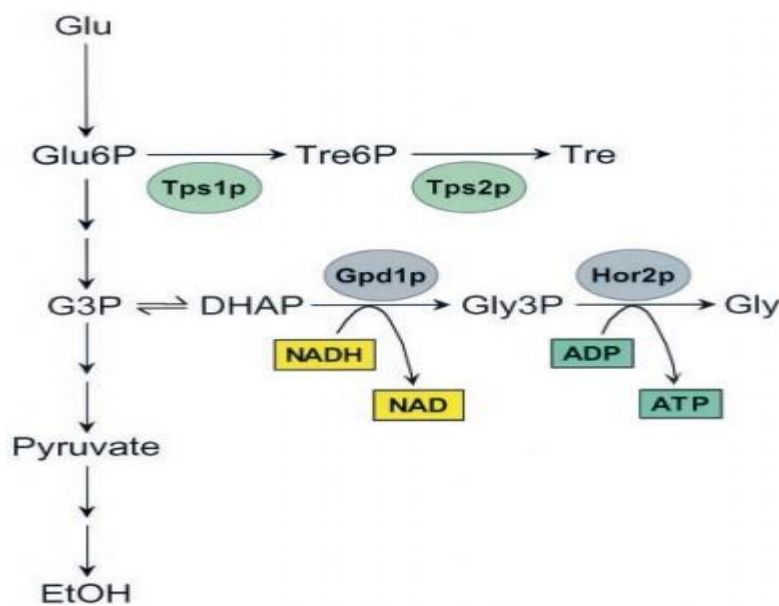
Μόλις η εξωκυττάρια γλυκόζη καταναλωθεί, η ανάπτυξη των κυττάρων αρχίζει να μειώνεται απότομα. Αυτό το χρονικό σημείο αποτελεί την έναρξη της μετα-διαυξικής φάσης, η οποία παρατηρείται περίπου 24 h μετά τον αρχικό εμβολιασμό της καλλιέργειας. Η στατική φάση ξεκινά στο τέλος της μετα-διαυξικής φάσης μεταξύ της δεύτερης και της έβδομης ημέρας της καλλιέργειας και εξαρτάται από το θρεπτικό ανάπτυξης. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από χαμηλό μεταβολικό επίπεδο και αυξημένο επίπεδο της απόκρισης στο στρες. (Longo et al., 2012) (Εικόνα 1.21)



Εικόνα 1.21: Οι φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae*. Διακρίνεται η εκθετική φάση στο διάστημα μέχρι την πρώτη ημέρα των κυττάρων στην καλλιέργεια, η μετα-διαυξική μεταξύ 2^{ης} και 7^{ης} ημέρας και η έναρξη της στατικής περίπου στην 7^η ημέρα. (Werner-Washburne et al., 1993)

1.6.α Η απόκριση του *S. cerevisiae* στην υψηλή ωσμωτικότητα

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ένα από τα είδη στρες στα οποία μπορεί να επέλθει ο ζυμομύκητας είναι και η παρουσία υψηλής ωσμωτικότητας η οποία προκαλείται από την υψηλή συγκέντρωση εξωτερικών ωσμωλυτών. Τα κύτταρα του ζυμομύκητα, για να εξισορροπήσουν την υψηλή συγκέντρωση των εξωτερικών ωσμωλυτών, πραγματοποιούν μεταβολική εκτροπή της γλυκόλυσης προς εσωτερική βιοσύνθεση γλυκερόλης και τρεχαλόζης. Κύριος διαμεσολαβητής απόκρισης της υψηλής ωσμωτικότητας είναι η πρωτεΐνη Hog1 μέσω της οποίας ενεργοποιείται το μονοπάτι HOG (high osmolarity glycerol). Το μονοπάτι HOG του ζυμομύκητα αντιστοιχεί στο μονοπάτι των MAP κινασών (MAPKs) των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών. (Han et al., 1994) Αμέσως μόλις επέλθει το ωσμωτικό σοκ, η πρωτεΐνη Hog1 φωσφορυλιώνεται και μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα όπου και μπορεί να ενεργοποιήσει τα αντίστοιχα γονίδια στρες. Κομβικό ρόλο και γι' αυτή την απόκριση κατέχουν οι μεταγραφικοί παράγοντες Msn2/4 οι οποίοι βοηθούν στην διατήρηση της Hog1 στον πυρήνα, με αποτέλεσμα την αυξημένη σύνθεση γλυκερόλης και τρεχαλόζης. (Kaeberlein et al., 2002, και αναφορές εντός) (Εικόνα 1.22)



Εικόνα 1.22: Η ενεργοποίηση του μονοπατιού HOG οδηγεί στην βιοσύνθεση τρεχαλόζης και γλυκερόλης από ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης. (Kaeberlein et al., 2002)

Η ανάπτυξη του ζυμομύκητα παρουσία υψηλής συγκέντρωσης εξωτερικών ωσμωλυτών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ζωής των κυττάρων. Η απόκριση σε αυτού του είδους την υψηλή ωσμωτικότητα απαιτεί όπως και στην περίπτωση του θερμιδικού περιορισμού (caloric restriction, CR) την παρουσία του *SIR2*. Αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχει κοινός μηχανισμός ρύθμισης για την αύξηση του χρόνου ζωής. Έχειδειχθεί ότι η υψηλή ωσμωτικότητα παρατείνει το χρόνο ζωής μέσω της ενεργοποίησης του Hog1p, οδηγώντας έτσι στην αύξηση της βιοσύνθεσης

γλυκερόλης από γλυκολυτικά ενδιάμεσα κατάλοιπα. Αυτή η μεταβολική εκτροπή έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του επιπέδου του NAD, με αποτέλεσμα τη διέγερση του Sir2p και την επαγωγή της μακροζωίας.

Τα κύτταρα του ζυμομύκητα, για να εξισορροπήσουν την υψηλή συγκέντρωση των εξωτερικών ωσμωλυτών, συνθέτουν εσωτερικά γλυκερόλη και τρεχαλόζη. Αυτό το μονοπάτι απόκρισης (high osmolarity glycerol, HOG) ενεργοποιείται από την Hog1p. Η παρουσία των εξωτερικών ωσμωλυτών (μη μεταβολίσιμων) επάγει το παραπάνω μονοπάτι.

Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής

Μεταξύ των διαφόρων τύπων α-συνουκλεΐνης που έχουν χαρακτηριστεί στον άνθρωπο, η μεταλλαγή A53T προκαλεί αυξημένη ενδοκυττάρια τοξικότητα, ενώ εμπλέκεται και στην κληρονομική άνοια με σωμάτια Lewy. Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι η έκφραση της μεταλλαγμένης μορφής A53T της α-συνουκλεΐνης στον *S. cerevisiae* και η μελέτη της επίδρασής της στη βιωσιμότητα των κυττάρων, με στόχο τη συμβολή στη διερεύνηση και την κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στην τοξικότητα.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την A53T έχει κλωνοποιηθεί σε φορέα κατάλληλο για κύτταρα ζυμομυκήτων υπό τον έλεγχο υβριδικού υποκινητή ρυθμιζόμενου από το σύστημα tet-off και μεταφέρεται σε στελέχη του ζυμομύκητα. Τα ανασυνδυασμένα κύτταρα αναπτύσσονται και στη συνέχεια αφήνονται σε χρονολογική γήρανση, ώστε να μιμηθούν τις συνθήκες των ανθρώπινων κυττάρων στα οποία οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές εμφανίζονται σε προχωρημένη ηλικία. Η ανάπτυξή τους θα πραγματοποιηθεί σε συνθήκες υψηλής ωσμωτικότητας κατά την οποία επάγεται η βιοσύνθεση της τρεχαλόζης. Η τρεχαλόζη λόγω και των ιδιοτήτων της ενδεχομένως να προστατεύει το ζυμομύκητα σε κάποιο βαθμό από την τοξική επίδραση της A53T. Εκτός από το στέλεχος αγρίου τύπου BY4741 μελετώνται και παράγωγά του που φέρουν μεταλλαγή στα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της τρεχαλόζης και συγκεκριμένα τα μεταλλάγματα *tps1Δ*, *tps2Δ* και *tsl1Δ*. Σκοπός της μελέτης αυτής είναι να αναδείξει την σημασία του καθενός από τα τρία υπεύθυνα γονίδια της τρεχαλόζης στην κυτταρική βιολογία του ζυμομύκητα σε συνθήκες καταπόνησης από την συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης A53T, αλλά και τις μεταβολές που προκύπτουν κατά την έλλειψη του εκάστοτε από τα ανωτέρω γονίδια. Ακόμα ανιχνεύεται η παρουσία αλλά και πιο συγκεκριμένα ο εντοπισμός της α-συνουκλεΐνης A53T στα κύτταρα της ζύμης. Τέλος, επιχειρείται θεραπεία των κυττάρων μέσω χορήγησης εξωγενούς τρεχαλόζης, ώστε να διαπιστωθεί αν με αυτόν τον τρόπο αυτά είναι σε θέση να ξεπεράσουν την τοξική κατάσταση που επιβάλλει η έκφραση της α-συνουκλεΐνης A53T.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Χημικά και όργανα

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

Τα όργανα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

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

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

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

Συσκευή ηλεκτροφορητικής μεταφοράς πρωτεϊνών: Bio-Rad Mini Trans Blot

Συσκευή εμφάνισης ανοσοαποτύπωσης: Bio-Rad ChemiDoc XRS+

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

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

Συνεστιακό μικροσκόπιο: Leica TCS SP8 MP

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

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

μl, 20-200 μl, 100-1000 μl

Υδατόλουτρο: BIOLINE SCIENTIFIC WB5020

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

Φούρνος μικροκυμάτων: Rohson

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

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

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

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

Συσκευή Speedvac: Thermo Savant- ISS110 Speedvac System

Αυτόκαυστο: ASTELL SCIENTIFIC AMB 430

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

Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης: Bio-Rad- GenePulser Xcell

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

Εργαστηριακά αναλώσιμα: Whatman- Απορροφητικό χαρτί / Στατώ/ Eppendorfs/ Ρύγχη για

πιπέτες/ Πιπέτες Pasteur/ Λαβίδες/ Τρυβλία/ Whatman- Φίλτρα με διάμετρο

πόρων 0,45 μm/ FALCON- Σωλήνες των 10 ml, 50 ml/ Σωλήνες των 10 ml/ Bemis-

Parafilm/ Ογκομετρικοί σωλήνες/ Isolab και Simax- Μπουκάλια των 70 ml, 200 ml,

400 ml/ Χωνί/ Bomex και Pyrex- Κωνικές των 50, 100 ml/ Γάντια Latex μίας χρήσεως

και γάντια νιτριλίου/ Υδροβολείς/ Bomex και Simax- Beakers των 100, 500, 1500 ml/

Μαγνητάκια/ Costar- Σιφόνια των 5, 10 ml/ Πουάρ/ Αλουμινόχαρτο/ Σπάτουλες

2.2 Μικροβιακά Στελέχη και πλασμίδια

Τα στελέχη και τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 2.1. Στελέχη *S. cerevisiae*

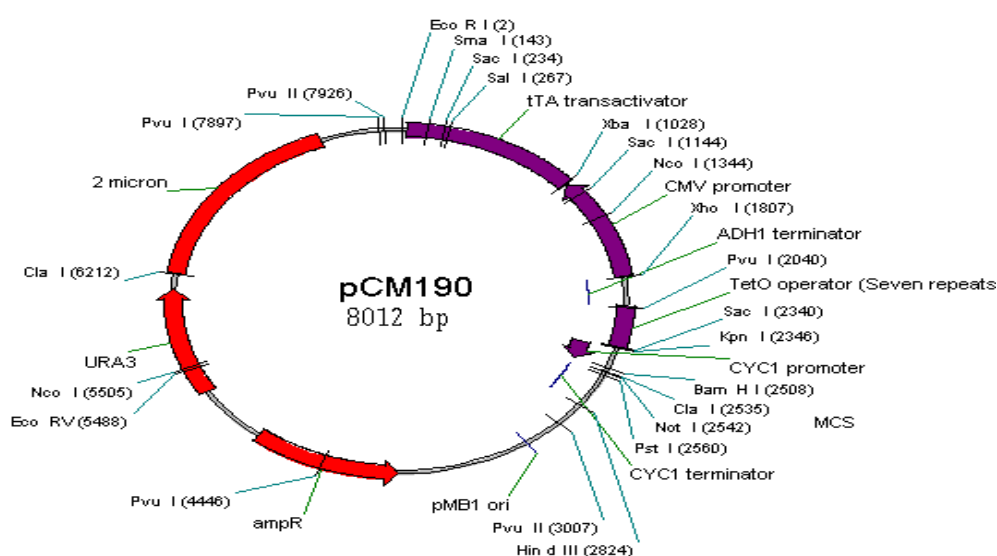
| Στελέχη Ζυμομυκήτων | Γονότυπος | Βιβλιογραφία |
|----------------------------|--|---------------------|
| BY4741 | <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> | Giaever et al. 2002 |
| BY4741 <i>tps1Δ</i> | <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YBR126c::kanMx4</i> | Bell et al. 1998 |
| BY4741 <i>tps2Δ</i> | <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YDR074w::kanMx4</i> | Bell et al. 1998 |
| BY4741 <i>ts11Δ</i> | <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YML100w::kanMx4</i> | Bell et al. 1998 |

Πίνακας 2.2 Πλασμίδια

| Πλασμίδια | Φαινοτυπικός δείκτης | Χαρακτηριστικά | Βιβλιογραφία |
|-----------------|----------------------|--|----------------------------------|
| pCM190 | AmpR, URA3 | Φορέας έκφρασης κατάλληλος για <i>S.cerevisiae</i> | E. Gari et al. 1996 |
| pCM190 asynWT | AmpR, URA3 | Φορέας έκφρασης κατάλληλος για <i>S.cerevisiae</i> | Σφήκας κ. ά. 2011 |
| pCM190 asynA53T | AmpR, URA3 | Φορέας έκφρασης κατάλληλος για <i>S.cerevisiae</i> | Ζόλδερ Σ. 2017. Πτυχιακή Εργασία |

Η αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνη και η α-συνουκλεΐνη A53T είναι κλωνοποιημένες στον πλασμιαδικό φορέα pCM190 στην περιοχή του πολυσυνδέτη MCS. Ο περιοριστικός χάρτης του pCM190 παρουσιάζεται στην εικόνα 2.1.

ATCC 87662



Εικόνα 2.1: Περιοριστικός χάρτης του φορέα έκφρασης pCM190

Ο πλασμιαδικός φορέας pCM190 (Gari, Piedrafita, Aldea, & Herrero, 1997) χρησιμοποιείται για την έκφραση γονιδίων στον ζυμομύκητα. Η έκφρασή τους καθοδηγείται από το σύστημα tet-off, το οποίο προέρχεται από την τροποποίηση του οπερονίου της τετρακυκλίνης της *E.coli*. Η τροποποίηση που επιτρέπει τη λειτουργία του συστήματος και στα ευκαρυωτικά κύτταρα περιλαμβάνει τον υβριδικό μεταγραφικό παράγοντα tTA που αποτελεί συνδυασμό δύο διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων: (α) την περιοχή του καταστολέα Tet η οποία προσδένεται στο DNA και (β) το τμήμα μιας πρωτεΐνης του ερπητοϊού VP16, το οποίο ευθύνεται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Ο tTA (ή αλλιώς Tet-VP16) προσδένεται στο χειριστή *tetO* μόνο απουσία τετρακυκλίνης. Όταν ένας χειριστής *tetO* εδράζεται ανοδικά ενός στοιχειώδους υποκινητή, ανενεργού χωρίς άλλες

περιοχές πρόσδεσης μεταγραφικών ενεργοποιητών, η μεταγραφή θα ενεργοποιηθεί εφόσον η υβριδική πρωτεΐνη Tet-VP16 προσδεθεί σε αυτόν. Η μεταγραφή σταματά, όταν στο μέσο προστεθεί τετρακυκλίνη που θα παρεμποδίσει την πρόσδεση του ενεργοποιητή Tet-VP16 στον *tetO*.

2.3 Μέθοδοι

2.3.1 Ανάπτυξη *S. cerevisiae*

Ο ζυμομύκητας αναπτύσσεται σε πλήρες θρεπτικό μέσο YPD (Yeast Peptone Dextrose) με την εξής σύσταση:

Πίνακας 2.3 Yeast Peptone Dextrose

| | |
|---------------------------------|--------|
| Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract) | 1% w/v |
| Πεπτόνη | 2% w/v |
| Γλυκόζη | 2% w/v |

Η γλυκόζη παρασκευάζεται σε διάλυμα stock 50% w/v, αποστειρώνεται ξεχωριστά με φίλτρο 0.22 μm και προστίθεται στο ήδη αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό.

Το ελάχιστο θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το yeast synthetic drop-out media supplement without uracil. Πρόκειται για ένα θρεπτικό μέσο από το οποίο απουσιάζει η ουρακίλη (Kaiser, Michaelis, & Mitchell, 1994). Το BY4741 και τα μεταλλαγμένα παράγωγά του έχουν θρεπτική απαίτηση ουρακίλης για την ανάπτυξή τους σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο. Όσα από αυτά είναι μετασηματισμένα με τον πλασμιδιακό φορέα pCM190, καθώς και με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που έχουν προκύψει από αυτόν, αναπτύσσονται σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο χωρίς ουρακίλη, λόγω της παρουσίας στο πλασμίδιο του γονιδίου βιοσύνθεσης της ουρακίλης *URA3*.

Πίνακας 2.4 Yeast synthetic drop-out media supplement without uracil

| | |
|--|--------------------------------|
| Yeast nitrogen base without amino acids | 6.7g/L |
| Yeast synthetic drop-out media supplement without uracil | 1.92 g/L |
| Γλυκόζη ή μαλτόζη* | 40 ml/L από στοκ 50% w/v** |
| Ιστιδίνη | 76 mg/L από στοκ 0.076 % w/v** |
| Λευκίνη | 380 mg/L από στοκ 0.38 % w/v** |
| Μεθειονίνη | 76 mg/L από στοκ 0.076 % w/v** |

* Η γλυκόζη είναι τοξική για το στέλεχος *tps1Δ*. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται στη θέση της μαλτόζη.

**Αποστειρώνονται με φίλτρο 0.22 μm και προστίθενται στο ελάχιστο θρεπτικό μέσο μετά την αποστείρωσή του.

Συνθήκη υψηλής εξωτερικής ωσμωτικότητας

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η υψηλή συγκέντρωση εξωτερικών ωσμωλυτών έχει ως αποτέλεσμα την εκτροπή της γλυκόλυσης προς τη βιοσύνθεση γλυκερόλης και τρεχαλόζης, ενώ αυξάνεται η διάρκεια ζωής των κυττάρων.

Στην παρούσα εργασία η συνθήκη αυτή εφαρμόστηκε, ώστε τα κύτταρα να ανταπεξέλθουν όσο το δυνατόν περισσότερο στην έκφραση της τοξικής μεταλλαγής της α -συνουκλεΐνης A53T, ενώ παράλληλα αποτέλεσε ερέθισμα για την παραγωγή τρεχαλόζης από πρόωμο σημείο ανάπτυξης της καλλιέργειας.

Για την εφαρμογή υψηλής εξωτερικής ωσμωτικότητας χρησιμοποιήθηκε σορβιτόλη (μη μεταβολίσιμο σάκχαρο από τον ζυμομύκητα) σε τελική συγκέντρωση 18%.

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου προστίθεται 2% άγαρ στο αντίστοιχο θρεπτικό υγρό μέσο πριν την αποστείρωση. Όλα τα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο στους 121 °C και πίεση 1,5 bar για 10-20 λεπτά. Οι υγρές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν στους 30°C υπό ανάδευση, ενώ οι στερεές στατικά.

Τα στελέχη αποθηκεύονται στους -80°C ως υγρή καλλιέργεια 1 ml από το τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης αφού αναμιχθεί με 0,5 ml γλυκερίνης 100%.

2.3.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

Η ανίχνευση, η παρατήρηση και ο διαχωρισμός των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ένα πολυμερές πολυσακχαρίτη. Τα νουκλεϊκά οξέα διαθέτουν ασθενές αρνητικό φορτίο, επομένως με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου μετακινούνται προς το θετικό πόλο μέσα στο πλέγμα της αγαρόζης με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους. Άλλοι παράγοντες που παίζουν ρόλο στη μετακίνηση των νουκλεϊκών οξέων είναι η δομή τους, η συγκέντρωση της αγαρόζης, η τάση του ηλεκτρικού πεδίου και η δομή των νουκλεϊκών οξέων.

Ο εντοπισμός των νουκλεϊκών οξέων (μορίων του DNA ή RNA) στο πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται μέσω του βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο προστίθεται στο διάλυμα της αγαρόζης. Αυτό έχει την ιδιότητα να εισχωρεί μεταξύ της διπλής έλικας των νουκλεϊκών οξέων με αποτέλεσμα τη δημιουργία συμπλόκου που είναι ορατό μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Καταρχάς, παρασκευάζεται διάλυμα αγαρόζης συνήθως 1% σε διάλυμα 1xTAE με βρασμό, ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη. Όταν η θερμοκρασία έχει κατέλθει στους 50°C, προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 5μg/ml. Το διάλυμα αποχύνεται στην ειδική τράπεζα της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί. Στη συνέχεια η τράπεζα τοποθετείται στη συσκευή, καλύπτεται με διάλυμα 1xTAE και τότε αφαιρούνται τα χτενάκια, οπότε αποκαλύπτονται τα πηγαδάκια.

Στα δείγματα που προορίζονται για ηλεκτροφόρηση προστίθεται διάλυμα φόρτωσης GLB (gel loading buffer) σε αναλογία 5:1 και τοποθετούνται στα πηγαδάκια. Στη συνέχεια η συσκευή συνδέεται με τη μονάδα τάσης και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε συνθήκες 5V/cm. Όταν τα δείγματα έχουν διανύσει την κατάλληλη απόσταση στο πήκτωμα, η ηλεκτροφόρηση διακόπτεται και αυτό μεταφέρεται σε πλάκα υπεριώδους ακτινοβολίας όπου παρατηρείται και φωτογραφίζεται.

Διαλύματα:

TAE (Tris-acetate): 40mM Tris, 1mM EDTA, 20mM οξικό οξύ. Παρασκευάζεται σε stock 50x και αραιώνεται κατάλληλα πριν τη χρήση.

Βρωμιούχο αιθίδιο: 3mg/ml. Αποθηκεύεται στους 4°C.

Διάλυμα φόρτωσης (GLB): 0.25% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης, 0.25% w/v κυανολικό ξυλένιο, 30% w/v γλυκερόλη (Αποθήκευση στους 4°C)

λ/HindIII : 100 μl διαλύματος λ HindIII αραιώνονται σε 400 μl H₂O και επωάζονται στους 60°C / 3 min. Κατόπιν προστίθενται 100 μl (GLB), και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

2.3.3 Κατασκευή επιδεικτικών κυττάρων του *Saccharomyces cerevisiae*

Για την κατασκευή επιδεικτικών κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* προστίθενται αρχικά 100 ml YPD σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη και εμβολιάζεται με 20ml κυττάρων του *Saccharomyces cerevisiae* από ήδη υπάρχουσα προκαλλιέργεια. Η φιάλη τοποθετείται σε κατάλληλο επωαστήρα στους 30°C υπό ανάδευση overnight. Γνωρίζοντας ότι ο χρόνος διπλασιασμού του *Saccharomyces cerevisiae* στους 30°C υπό ανάδευση είναι περίπου 2 h την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται έλεγχος της οπτικής απορρόφησης (OD) της ανακαλλιέργειας στα 600 nm, με την επιθυμητή τιμή να είναι η 1-1,2. Εφόσον αυτό συμβαίνει ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Η καλλιέργεια μοιράζεται ισόποσα σε δυο σωληνάκια των 50 ml παραμένοντας πλέον μονίμως μέσα σε πάγο.
- Φυγοκεντρώνονται στα 8000 rpm για 5 min στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά και τα δοχεία τοποθετούνται στον πάγο φέροντας το ίζημα.
- Ακολουθεί πλύση με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό.
- Προσθήκη 25 ml διαλύματος LiAc 100mM/DTT 10mM/Tris 10mM pH 7.5/EDTA 1mM, δηλαδή από 12,5 ml σε κάθε σωληνάκι.
- Επώαση στο διάλυμα LiAc/DTT/TE για 1 ώρα στον πάγο με σκοπό οι μεμβράνες των κυττάρων να γίνουν πιο ευάλωτες.
- Φυγοκεντρώνονται στα 8000 rpm για 5 min στους 4°C και ακολουθούν 2 ακόμα πλύσεις με 25 ml αποστειρωμένο νερό.
- Προστίθενται 5 ml από διάλυμα αποστειρωμένης παγωμένης σορβιτόλης 1M σε κάθε σωληνάκι.
- Το ίζημα σε κάθε σωληνάκι επαναιωρείται σε 200 μl διαλύματος αποστειρωμένης παγωμένης σορβιτόλης 1M και πραγματοποιείται επανένωση των 2 σωληναριων.
- Το εναίωρημα κατανέμεται σε σωληνάκια erpendorf με 50 μl στο καθένα, τα οποία διατηρούνται στους -80°C και περιέχουν τα επιδεικτικά κύτταρα ζύμης με οπτική πυκνότητα 1-1,2.

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

10xTE buffer: Tris 2 M, EDTA 0.5 M .
DTT 1 M
Lithium Acetate 1 M

1 M Sorbitol :Η αποστείρωση πραγματοποιείται στο αυτόκαυστο.

2.3.4 Μετασηματισμός του *Saccharomyces cerevisiae* με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)

- Για την διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης χρησιμοποιούνται 40μl επιλεκτικών κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* (διατηρούνται στους -80°C), τα οποία αφήνονται να ξεπαγώσουν ομαλά στον πάγο. Επιπλέον, στον πάγο τοποθετούνται μία κυψελίδα 0.2 cm καθώς και 5 μl, αραιωμένου σε διάλυμα αποστειρωμένου απιονισμένου H₂O κατά 50 %, δείγματος DNA του pCM190 ή ανασυνδυασμένων κλώνων του.
Πριν την χρήση της, η κυψελίδα υφίσταται καθαρισμό με αιθανόλη, απιονισμένο νερό, αφήνεται να στεγνώσει στον θάλαμο νηματικής ροής (hood) και τέλος τοποθετείται κάτω από λάμπα UV.
- Στο erppendorf με τα επιλεκτικά κύτταρα προστίθεται το δείγμα DNA, ακολουθεί ήπια ανάδευση και επιστροφή στον πάγο για 1 min.
- Επιλέγεται το κατάλληλο πρόγραμμα από την συσκευή. Από την οθόνη Home, πληκτρολογούνται κατά σειρά η επιλογή Pre-set protocols, Fungal Protocols και επιλέγεται το πρόγραμμα *S.cerevisiae* για τα 0.2 cm κυψελίδας. (C=15μF, PC=200 ohm, V=1.5 kV)
- Το μίγμα του erppendorf μεταφέρεται στην κυψελίδα, η οποία τοποθετείται στην συσκευή και εφαρμόζεται το ηλεκτρικό πεδίο.
- Αμέσως μετά, προστίθεται στην κυψελίδα 1 ml διαλύματος κρύας σορβιτόλης 1 M και ακολουθεί ανάδευση. Στην συνέχεια, τα κύτταρα μεταφέρονται σε erppendorf.
- Ακολουθεί επίστρωση των δειγμάτων σε στερεό θρεπτικό μέσο Yeast synthetic drop-out media supplement without uracil με την παρουσία των κατάλληλων, για το κάθε στέλεχος του ζυμομύκητα, αμινοξέων και την απαραίτητη συγκέντρωση τετρακυκλίνης σε περίπτωση που το πλασμίδιο προς μετασηματισμό είναι ανασυνδυασμένο. Επιστρώνονται 200 μl σορβιτόλης 1 M που αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα σε ένα τρυβλίο, 200 μl μετασηματισμένων κυττάρων, κάθε φορά, σε τρία τρυβλία, 200 μl 1/10 αραιωμένου δείγματος μετασηματισμένων κυττάρων, κάθε φορά σε τέσσερα τρυβλία και 200 μl 1/100 αραιωμένου δείγματος μετασηματισμένων κυττάρων, κάθε φορά σε δύο τρυβλία.

Επισημαίνεται πως οι αραιώσεις των κυττάρων πραγματοποιούνται με διάλυμα σορβιτόλης 1 M.

- Τα τρυβλία αφήνονται στον θάλαμο νηματικής ροής μέχρι να στεγνώσουν και κατόπιν τοποθετούνται για επώαση στους 30°C για 72 h.

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

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

- Καλλιέργεια 1.5 ml του *Saccharomyces cerevisiae* αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο Yeast synthetic drop-out media supplement without uracil, με την παρουσία των κατάλληλων, για το κάθε στέλεχος του ζυμομύκητα, αμινοξέων και την απαραίτητη συγκέντρωση τετρακυκλίνης σε περίπτωση που το πλασμίδιο προς μετασχηματισμό είναι ανασυνδυασμένο. Η καλλιέργεια αφήνεται στους 30°C ανάδευση από την προηγούμενη.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στα 12000 rpm για 4 min.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 100 μl διαλύματος 2.5 M LiCl, 50 mM Tris-HCl (pH=8.0), 20 mM EDTA (pH=8.0), 4% Triton X-100.
- Προστίθενται 100 μl διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1 v/v).
- Το μίγμα αναδεύεται σε vortex για 10 min.
- Στην συνέχεια, το δείγμα επωάζεται στους 65°C για 5 min χωρίς ανάδευση.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14000 rpm για 5 min.
- Συλλέγεται η (άνω) υδατική φάση, χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση, και γίνεται καταβύθιση σε 600 μl απόλυτης αιθανόλης.
- Το δείγμα επωάζεται στον πάγο για 15 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12000 rpm για 10 min.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξηραίνεται στο speed vac, ώστε να αποβληθεί όλη η αιθανόλη.
- Το ίζημα επαναιωρείται σε 30 μl TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH=8.0).

2.3.6 Καμπυλες χρονολογικής γήρανσης

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες ελάχιστου θρεπτικού μέσου στο οποίο είχε προστεθεί διάλυμα σορβιτόλης 18% για διάστημα 11 ημερών. Σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα ίσου αριθμού κυττάρων από κάθε στέλεχος (ο οποίος εξακριβώθηκε μέσω φωτομέτρησης της καλλιέργειας), τα οποία επιστρώνονταν σε τρυβλία μετά από κατάλληλες αραιώσεις. Ο υπολογισμός του CFU πραγματοποιήθηκε μετά από ανάπτυξη των αποικιών ζυμομύκητα με επώαση των τρυβλίων για 2 ημέρες στους 30 °C. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται και οι χρονολογικές γηράνσεις των κυττάρων-μαρτύρων BY4741/pCM190, *tps1Δ*/ pCM190, *tps2Δ*/ pCM190, *tsl1Δ*/pCM190 αλλά και παρουσία της αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνης οι οποίες αναδημοσιεύονται από την διδακτορική διατριβή Σφήκας Ε., 2020 με την σύμφωνη γνώμη του συγγραφέα για συγκριτικούς λόγους.

2.3.7 Απομόνωση RNA

Όλα τα αναλώσιμα που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του RNA πρέπει να καθαριστούν με DMPC (Dimethyl Dicarboxylate) για την απομάκρυνση των RNAσών, ως εξής:

- 1) Διάλυμα DMPC 0,1 % v/v επωάζεται στους 37 °C για 30-45 min.

- 2) Με το διάλυμα εκπλένονται όλα τα κουτιά για τα ρύγχη και τα δοχεία για Eppendorf.
- 3) Τα δοχεία/κουτιά αποστειρώνονται στους 121 °C, για 30 min, ώστε να απενεργοποιηθεί το DMPC.
- 4) Στη συνέχεια αφήνονται να στεγνώσουν σε θάλαμο ξήρανσης των 60 °C και ύστερα πληρούνται με τα αναλώσιμα για να αποστειρωθούν εκ νέου.

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

Το RNA απομονώνεται με το πακέτο έτοιμων αντιδραστηρίων NucleoSpin RNA. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην εκλεκτική πρόσδεση του RNA σε στήλη πυριτίου. Το τελικό προϊόν εκλύεται κατάλληλα, μετά από τις απαραίτητες εκπλύσεις και επίδραση με DNάση για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων DNA

Η επίδραση με DNάση πραγματοποιείται σύμφωνα με τις παρακάτω συνθήκες:

| | |
|---------------------|----------------------|
| 10 x DNase I Buffer | 6,5 μl |
| Recombinant DNase I | 1 μl |
| Αναστολέας RNάσης | 0,5 μl |
| RNA | 20-50 μg |
| DEPC Water | Η κατάλληλη ποσότητα |
| Τελικός όγκος | 65 μl |

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

Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 2,5 μl EDTA 0,5 M και επώαση στους 80 °C για 2 min, οπότε το ένζυμο απενεργοποιείται.

Η απομόνωση του RNA ολοκληρώνεται ως εξής:

- Προσθήκη νερού DEPC μέχρι όγκο 100 μl.
- Καταβύθιση του RNA με 10 μl οξικού νατρίου 3 M και 250 μl παγωμένης απόλυτης αιθανόλης στους -80 °C για 2 min.
- Φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm, για 10 min, στους 4 °C και απόρριψη υπερκειμένου.
- Πλύση του ιζήματος με 150 μl παγωμένης 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm για 5 min στους 4 °C. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκειμένου.
- Ξήρανση ιζήματος.
- Διάλυση σε 50 μl DEPC νερό.
- Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτωμα 1,8 % w/v αγαρόζης και 0,1 % w/v βρωμιούχου αιθιδίου.

2.3.8 Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA πραγματοποιείται με το έτοιμο πακέτο αντιδραστηρίων RT-PCR της εταιρείας TaKaRa.

Η μέθοδος βασίζεται στην δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης που μετατρέπει το RNA σε cDNA και ύστερα στη χρήση αυτού για διαδικασίες όπως η PCR, ή κλωνοποίηση σε φορέα για δημιουργία βιβλιοθηκών.

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

1) Πραγματοποίηση της αντίδρασης:

| | |
|------------------------|-----------|
| dNTP Mixture 10mM each | 1 μ l |
| Oligo dT Primer 2.5 mM | 1 μ l |
| Template RNA 100pg-1ng | 8 μ l |

2) Ακολουθεί επώαση για 5 min, στους 65 °C και ύστερα μεταφέρουμε στους 4 °C.

3) Προετοιμασία του μίγματος της παρακάτω αντίδρασης:

| | |
|--|-------------|
| Μίγμα της αντίδρασης από τα βήματα 1,2 | 10 μ l |
| 5x Buffer Primescript | 4 μ l |
| RNAse Inhibitor 40 U/ μ l | 0,5 μ l |
| PrimeScript RTase | 0,5 μ l |
| RNAse free dH2O | 5 μ l |

4) Επώαση στους 42°C για 30 min, ύστερα στους 95 °C για 5 min και στην συνέχεια επιστροφή στους 4 °C.

2.3.9 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μία μέθοδο στην οποία μία συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία ενισχύεται με συγκεκριμένους εκκινητές και την βοήθεια της DNA πολυμεράσης. Οι εκκινητές είναι μικρά τμήματα DNA, τα οποία προσδένονται σε ταυτόσημες (ή σχεδόν ταυτόσημες) αλληλουχίες, οι οποίες περικλείουν την περιοχή που πρόκειται να ενισχυθεί.

Η PCR αποτελείται από διάφορα θερμοκικά στάδια. Στο πρώτο στάδιο το προς ενίσχυση υπόστρωμα DNA ή cDNA μετουσιώνεται, στο δεύτερο στάδιο οι εκκινητές ενώνονται με τις μονόκλωνες συμπληρωματικές τους αλυσίδες DNA και στο τρίτο στάδιο η DNA πολυμεράση συνθέτει μία νέα μονόκλωνη αλυσίδα χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο την προς ενίσχυση αλυσίδα. Η σύνθεση γίνεται προς την κατεύθυνση 5'→3' και οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες χρησιμεύουν και εκείνες με την σειρά τους ως εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο της αντίδρασης. Θεωρητικά, το προς ενίσχυση τμήμα DNA ενισχύεται μέσω της αντίδρασης 2^v φορές μετά από n κύκλους. Το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει το υπόστρωμα-εκμαγείο DNA, τους εκκινητές, τα dNTPs, την DNA πολυμεράση, MgCl₂ και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου.

Πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της PCR με σκοπό την ενίσχυση κωδικών τμημάτων των γονιδίων *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *ATG8* και *TOR1* στα cDNAs που δημιουργήθηκαν. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Γονίδιο *TPS1*

TPS1 ανοδικός εκκινητής: AGGTTTCCTTAATCCTGAGTGA

TPS1 καθοδικός εκκινητής: CCCAGAAGGCAGAAAGTGTAT

Γονίδιο *TSL1*

TSL1 ανοδικός εκκινητής: CGGCAGCTCAATTTCTTTTC

TSL1 καθοδικός εκκινητής: TTCAAGCACAGGAGACGATG

Γονίδιο *TPS2*

TPS2 ανοδικός εκκινητής: GATCTGGACGATGACCCACT

TPS2 καθοδικός εκκινητής: TTCCGCGTAATTTCTCCATC

Γονίδιο *TOR1*

TOR1 ανοδικός εκκινητής: CGGATGCAATTCTTGGTTCT

TOR1 καθοδικός εκκινητής: TACCGTCAATCCGCACATTA

Γονίδιο *ATG8*

ATG8 ανοδικός εκκινητής: GGATACCTGTGATTTGCGAA

ATG8 καθοδικός εκκινητής: CCGTCCTTATCCTTGTGTTC

Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή της PCR είναι η DNA πολυμεράση KAPA HiFi .

Το μίγμα της αντίδρασης παρασκευάστηκε σύμφωνα τις παρακάτω αναλογίες:

| Αντιδραστήρια Stock | Τελικές συγκεντρώσεις | Δείγμα 1 Αρνητικός μάρτυρας | Δείγμα προς ενίσχυση αμπλικονίου |
|---------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| dNTPs (40mM) | 0.3 mM το καθένα | 0.75 μl | 0.75 μl |
| Ανοδικός εκκινητής | 0.3 μM | 0.75 μl | 0.75 μl |
| Καθοδικός εκκινητής | 0.3 μM | 0.75 μl | 0.75 μl |
| 5x Buffer | 1x Buffer | 5 μl | 5 μl |
| DNA | 100 ng γονιδιωματικό DNA | - | 100 ng |
| Ένζυμο (1U/μl) | | 0.5 μl | 0.5 μl |
| H ₂ O | | 17.25 μl | Όσο απαιτείται |
| Τελικός Όγκος | | 25 μl | 25 μl |

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

1ο βήμα: 95 °C/3 min

2ο βήμα: 98 °C/20 sec

3ο βήμα: 60-75 °C/15 sec

4ο βήμα: 72 °C/1 min

5ο βήμα: 29 κύκλοι των βημάτων 2-4

6ο βήμα: 72 °C/1 min

7ο βήμα: 4 °C/24 h

2.3.10 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμέρασης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Αρχή της μεθόδου

Η Real-Time PCR (PCR «πραγματικού χρόνου») επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των συσσωρευόμενων προϊόντων, όταν η αντίδραση βρίσκεται σε εξέλιξη. Τα προϊόντα ανιχνεύονται μέσω φθορίζοντων μορίων. Το σήμα τους αντιστοιχεί στην αύξηση της ποσότητας του νεοσυντιθέμενου DNA μέσω της ανάλογης αύξησης του σήματος φθορισμού. Τα φθορίζοντα μόρια που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό περιλαμβάνουν χρωστικές, οι οποίες προσδένονται στο DNA, αλλά και εκκινητές των αντιδράσεων σημασμένους με φθορίζουσες αλληλουχίες. Για την ανίχνευση του σήματος του φθορισμού χρησιμοποιούνται ειδικές συσκευές εξοπλισμένες με μονάδες ανίχνευσης σήματος φθορισμού κατά την διάρκεια της ενίσχυσης του DNA. Ο μετρούμενος φθορισμός αντανακλά την ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος σε κάθε κύκλο της PCR.

Το κύριο πλεονέκτημα της Real-Time PCR έναντι της συμβατικής PCR είναι ότι η πρώτη επιτρέπει τον καθορισμό του αριθμού αντιγράφων του υποστρώματος στην έναρξη της αντίδρασης με αποτελεσματικότητα και υψηλή ευαισθησία. Τα αποτελέσματα της Real-Time PCR μπορούν να είναι είτε ποιοτικά (απουσία ή παρουσία μίας αλληλουχίας) είτε ποσοτικά (αριθμός αντιγράφων του DNA). Στην τελευταία αυτή χρήση λαμβάνει και την ονομασία ποσοτική PCR (qPCR). Επιπλέον, τα αποτελέσματα της Real-Time PCR μπορούν να αξιολογηθούν χωρίς διαγνωστική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα.

Τα θεμέλια μίας ιδανικής μελέτης Real-Time PCR είναι:

- Ευθύγραμμη καμπύλη αναφοράς ($R^2 > 0.98$)
- Υψηλή αποδοτικότητα της ενίσχυσης (90-110%)
- Συνέπεια μεταξύ ταυτόσημων αντιδράσεων

Μία ισχυρή μέθοδος ελέγχου της πιστότητας της αντίδρασης είναι η κατασκευή πρότυπης καμπύλης μέσω της ενίσχυσης διαδοχικών αραιώσεων ενός υποστρώματος με γνωστή συγκέντρωση. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με παραμέτρους τον λογάριθμο της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος (ή τον παράγοντα της αραιώσης του, σε άγνωστες ποσότητες) σε σχέση με την τιμή C_t , η οποία ανιχνεύθηκε κατά την ενίσχυση και αντιστοιχεί σε κάθε αραιώση του υποστρώματος. Από την καμπύλη αναφοράς εξάγεται η εξίσωση της βέλτιστης ευθείας και η τιμή του R^2 , τα οποία χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της μελέτης.

Η τιμή του R^2 της καμπύλης αναφοράς αναπαριστά το πόσο καλά τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόζονται στην βέλτιστη ευθεία. Η ευθυγράμμιση των δεδομένων παρουσιάζει ένα μέτρο της μεταβλητότητας ανάμεσα στα ταυτόσημα δείγματα της μελέτης και κατά πόσο η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης είναι η ίδια για διαφορετικούς αριθμούς αντιγράφων του αρχικού υποστρώματος. Μία σημαντική διαφορά στις παρατηρούμενες τιμές C_t μεταξύ των ταυτόσημων δειγμάτων θα μειώσει την τιμή του R^2 .

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

$$E=10^{-1/\text{κλίση}}$$

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

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

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

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

Η μέθοδος Pfaffl

Αν οι αποδοτικότητες των δύο ενισχυόμενων προϊόντων δεν είναι ίδιες, πρέπει να χρησιμοποιηθεί μία εναλλακτική προσέγγιση ώστε να καθοριστεί η σχετική έκφραση του γονιδίου στόχου στα διάφορα δείγματα. Για τον καθορισμό του λόγου έκφρασης μεταξύ του δείγματος μελέτης και του δείγματος βαθμονόμησης, χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:

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

Όπου E οι τιμές των αποδοτικότητας της ενίσχυσης για κάθε γονίδιο.

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

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

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

Πειραματικό σκέλος

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

Το κάθε cDNA συντίθεται με την παρακάτω διαδικασία:

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

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

3. Ακολουθεί επώαση για 15 min, στους 37 °C, ύστερα στους 85 °C για 5 sec και τέλος είτε μεταφέρονται στους 4 °C είτε αποθηκεύονται στους -20 °C.

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

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι κύριες μελέτες έκφρασης γονιδίων όπου για το κάθε cDNA που δημιουργήθηκε στην πειραματική πλακέτα φορτώθηκαν τρία ταυτόσημα δείγματα αντιδράσεων, ώστε να εξασφαλίζεται η επαναληψιμότητα της αντίδρασης.

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

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

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

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αφορούσαν τα γονίδια *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *ATG8*, *TOR1*, *ACT1*, *ALG9* και *TAF10*. Οι εκκινητές των πέντε πρώτων γονιδίων παρατέθηκαν και ανωτέρω, ενώ των *ACT1*, *ALG9* και *TAF10* ήταν οι ακόλουθοι:

Γονίδιο *ACT1*

ACT1 ανοδικός εκκινητής: GCCTTCTACGTTTCCATCCA

ACT1 καθοδικός εκκινητής: GGCCAAATCGATTCTCAAAA

Γονίδιο *ALG9*

ALG9 ανοδικός εκκινητής: CACGGATAGTGGCTTTGGTGAACAATTAC

ALG9 καθοδικός εκκινητής: TATGATTATCTGGCAGGAAAGAACTTGGG

Γονίδιο *TAF10*

TAF10 ανοδικός εκκινητής: ATATTCCAGGATCAGGTCTTCCGTAGC

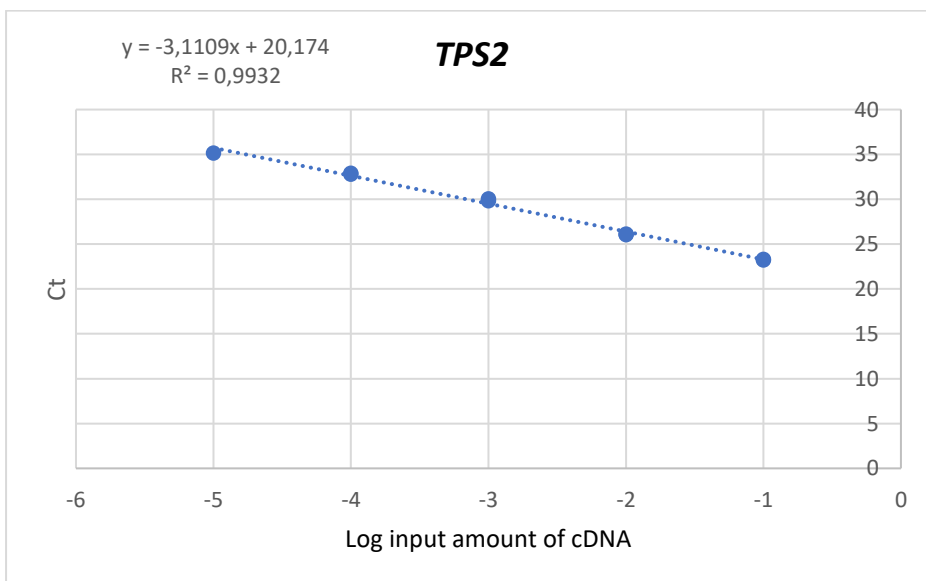
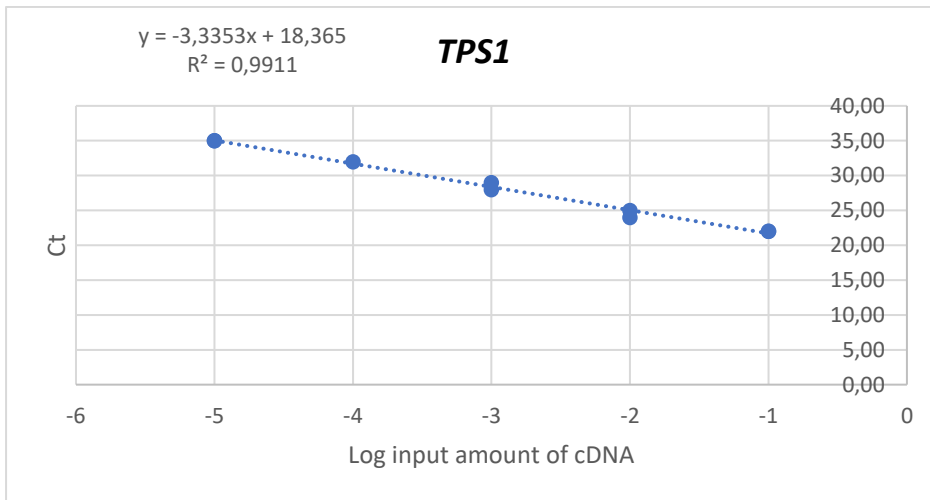
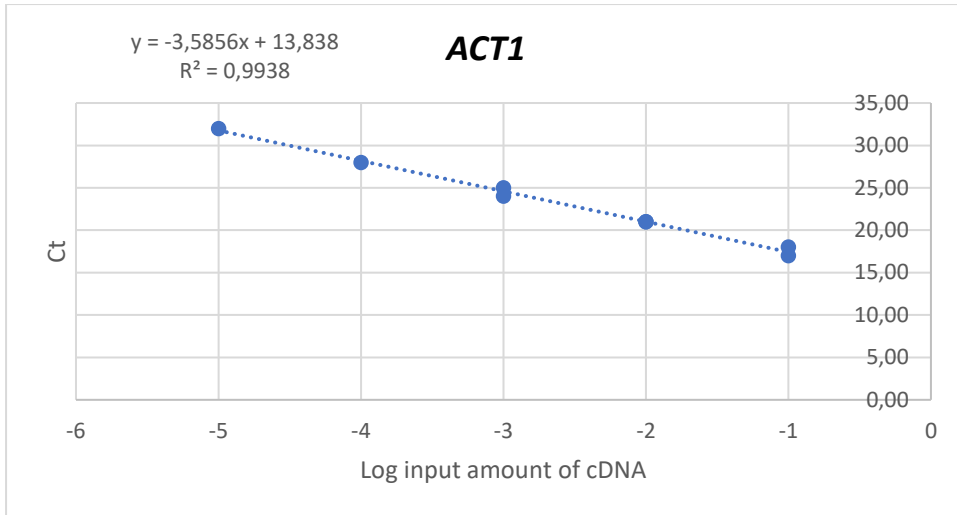
TAF10 καθοδικός εκκινητής: GTAGTCTTCTCATTCTGTTGATGTTGTTCTTG

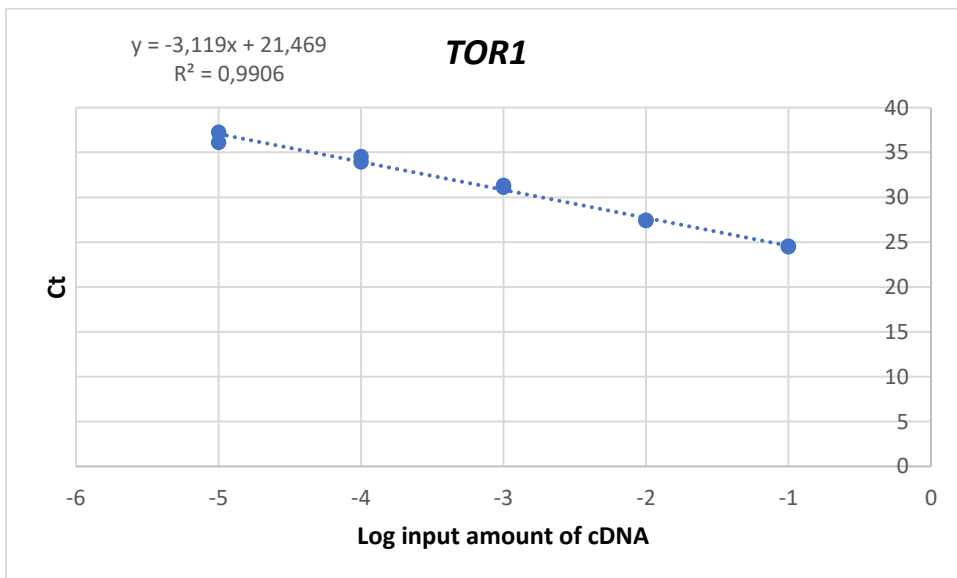
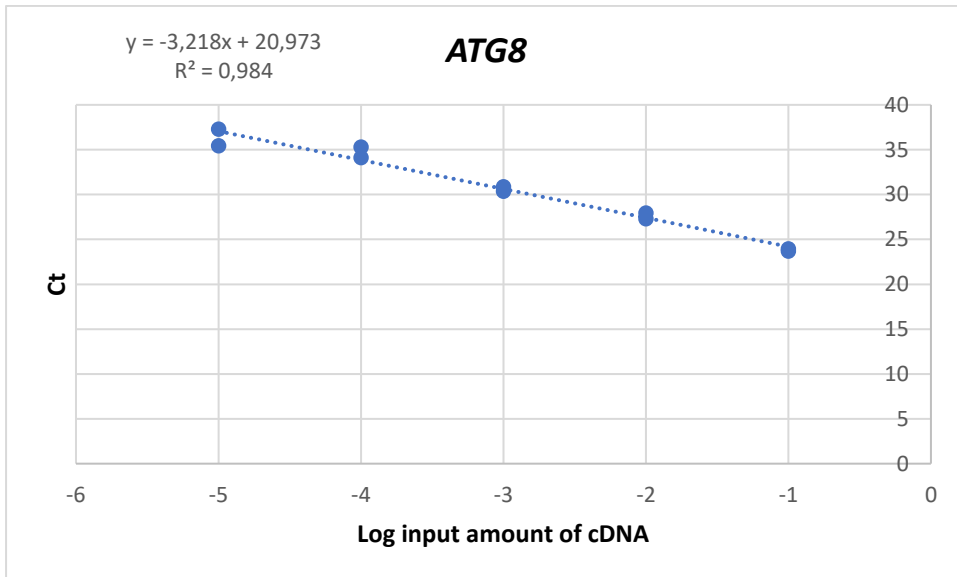
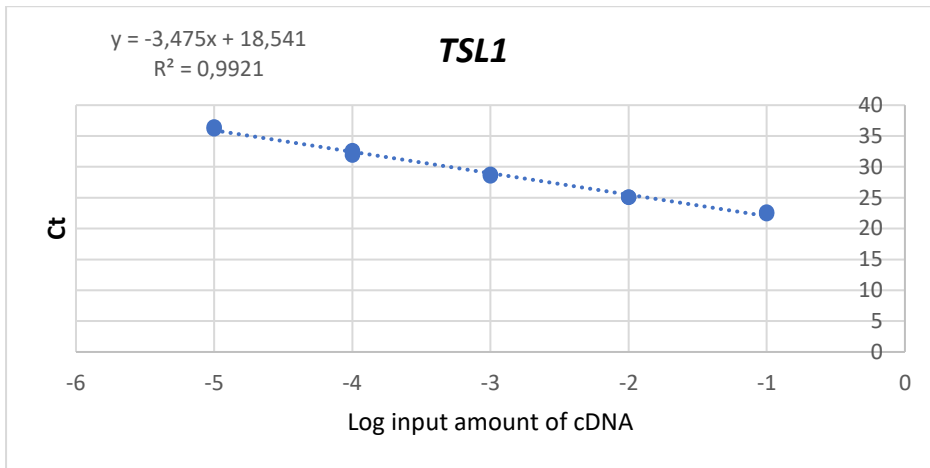
Αποδοτικότητα της ενίσχυσης στις μελέτες qPCR (amplification efficiency)

Πρώτο βήμα της διαδικασίας μελετών qPCR είναι η εύρεση της αποδοτικότητας της ενίσχυσης (amplification efficiency). Στο βήμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν όλα τα ζεύγη εκκινητών όλων των μελετώμενων γονιδίων με υπόστρωμα cDNA από την εκθετική φάση ανάπτυξης (OD= 2) σε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Αυτό γίνεται, για να εκτιμηθεί η καταλληλότερη συγκέντρωση υποστρώματος για μια συγκεκριμένη συγκέντρωση εκκινητών, το καταλληλότερο γονίδιο αναφοράς, η επαναληψιμότητα της διαδικασίας αλλά και η αποδοτικότητα των εκκινητών και κατ' επέκταση της ενίσχυσης. Η εκτίμηση της καταλληλότερης συγκέντρωσης βασίζεται στην τιμή C_i , η οποία αντιπροσωπεύει τον αριθμό των απαραίτητων κύκλων ενίσχυσης στον οποίο οι τιμές των σημάτων φθορισμού φανερώνουν την εκκίνηση της εκθετικής ενίσχυσης του προϊόντος. Σε απόλυτες τιμές το εύρος των τιμών C_i καθορίζεται μεταξύ 20-30, ώστε οι αναλύσεις να λαμβάνουν χώρα μεταξύ μεγάλου και συνάμα επαρκούς αριθμού ενισχυόμενων μορίων.

Στο βήμα της αποδοτικότητας της ενίσχυσης χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα ποσότητες cDNA που αντιστοιχούν σε συγκέντρωση 50 ng RNA ανά αντίδραση και 4 υπο-δεκαπλάσιες και διαδοχικές αραιώσεις αυτής. Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε για τα υπό μελέτη γονίδια *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *ATG8* και *TOR1* καθώς και για τα υποψήφια γονίδια αναφοράς *ACT1*, *ALG9* και *TAF10* τα οποία επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν με σκοπό την ανάλυση των αποτελεσμάτων με σχετική ποσοτικοποίηση. Κάθε αντίδραση σε αυτή τη διαδικασία για τα παραπάνω γονίδια πραγματοποιήθηκε εις διπλούν, ενώ απαραίτητη ήταν και η παρουσία των αρνητικών μαρτύρων χωρίς υπόστρωμα αντίδρασης.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής κατασκευάστηκαν και παρουσιάζονται οι πρότυπες καμπύλες αποδοτικότητας των εκκινητών του εκάστοτε προς μελέτη γονιδίου αλλά και του γονιδίου αναφοράς.





Εικόνα 2.3: Πρότυπες καμπύλες και βέλτιστες ευθείες των μελετώμενων γονιδίων της qPCR

Σε κάθε μία από τις πρότυπες καμπύλες των μελετώμενων γονιδίων θα πρέπει να εμφανίζεται τιμή $R^2 > 0,98$ ώστε να υπάρχει γραμμικότητα και επαναληψιμότητα των τιμών που λαμβάνονται για κάθε αντίδραση qPCR. Για τα γονίδια *ALG9* και *TAF10* αυτό δεν επετεύχθη, οπότε και απορρίφθηκαν από κάθε επόμενη μελέτη.

Για τα υπόλοιπα γονίδια των οποίων η τιμή R^2 αποτελούσε έγκυρο αποτέλεσμα υπολογίστηκαν οι αποδοτικότητες ενίσχυσης των εκκινητών τους, οι οποίες προέκυψαν από τον τύπο E (efficiency) = $10^{-1/κλίση}$. Υπενθυμίζεται πως το επιτρεπόμενο όριο αποδοτικότητας για την εγκυρότητα των μελετών qPCR αποτελούν τιμές $E=1,9-2,1$ ή 90%-110%. Οπότε οι τιμές που προέκυψαν ήταν οι εξής:

- I. Ef(*ACT1*)=1,95
- II. Ef(*TPS1*)=2
- III. Ef(*TPS2*)=2
- IV. Ef(*TSL1*)=1,96
- V. Ef(*ATG8*)=2
- VI. Ef(*TOR1*)=2,1

Οι τιμές αυτές βρίσκονται στα επιθυμητά πλαίσια και το πρώτο στάδιο των μελετών qPCR θεωρήθηκε επιτυχημένο ως προς την εγκυρότητα και την επαναληψιμότητα που διέπουν την τεχνική.

Επίσης, μετά την απόρριψη των άλλων δύο υποψηφίων γονιδίων αναφοράς *ALG9* και *TAF10*, χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς κάθε μελέτης το *ACT1* (ακτίνη).

Η συγκέντρωση υποστρώματος cDNA σε κάθε αντίδραση ήταν εκείνη που αντιστοιχούσε σε 0,5 ng RNA. Επιλέχθηκε, διότι οι λαμβανόμενες τιμές C_i τόσο όλων των υπό μελέτη γονιδίων όσο και του γονιδίου αναφοράς συνέκλιναν σε αυτή τη συγκέντρωση που βρισκόταν επιπλέον εντός του ιδανικού εύρους μεταξύ των 20 έως 30 κύκλων ενίσχυσης.

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

- Ανάπτυξη κυττάρων σε καλλιέργειες των 5 ml.
- Φυγοκέντρηση 12000 g / 2 min.
- Έκπλυση του κυτταρικού ιζήματος με 1 ml απιονισμένου αποστειρωμένου νερού.
- Φυγοκέντρηση 12000 g / 2 min.
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 100μl απιονισμένου αποστειρωμένου νερού.
- Προσθήκη 100 μl 0.2 M NaOH και επώαση 5 min / θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση 12000 g / 1 min.
- Επαναιώρηση του ιζήματος σε 50 μl Laemmli Sample Buffer.
- Φυγοκέντρηση στα 12000 g για 2 min και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο Eppendorf.
- Βρασμός για 5 λεπτά στους 95 °C.

Πλέον τα δείγματα είναι έτοιμα προς περαιτέρω επεξεργασία-ηλεκτροφόρηση ειδάλως δύναται να αποθηκευτούν σε καταψύκτη θερμοκρασία -80°C .

Laemmli Sample Buffer: Tris -HCl pH 6.8 0.06 M, Glycerol 5 %, SDS 2 %, 4% Β-μερκαπτο-αιθανόλη, 0.0025 % κυανού της βρωμοφαινόλης

2.3.12 Ποσοτικός Προσδιορισμός Πρωτεϊνών (Μέθοδος Bradford)

Προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που περιέχεται σε ένα κυτταρικό εκχύλισμα, χρησιμοποιείται η χρωματομετρική μέθοδος Bradford (Bradford 1976). Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, να συνδέεται με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον, οπότε και μεταβάλλεται το χρώμα της. Η ελεύθερη χρωστική απορροφά στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής στα 595 nm.

Σε συγκεκριμένο όγκο του δείγματος προστίθεται αντιδραστήριο Bradford [1:4 (v/v) σε ddH₂O] (Bio Rad) και αφήνεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τα πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης ορού βοός συγκέντρωσης 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 και 30 μg (Bovine Serum Albumin, BSA, 1 mg/ml σε ddH₂O) από τα οποία θα σχεδιαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Στη συνέχεια γίνεται η μέτρηση της OD στα 595 nm σε όλα τα δείγματα και κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών είναι αυτή που αντιστοιχεί στην OD του δείγματος βάσει της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, αφού ληφθεί υπόψιν και ο όγκος του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε.

2.3.13 Ηλεκτροφόρηση SDS - πολυακρυλαμίδιου

Αρχή της μεθόδου

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

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

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

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ

| Separating Gel | 8 % | 10% | 12% | 15% | Stacking Gel |
|------------------|---------|---------|---------|---------|--------------------|
| Acryl:Bis (29:1) | 2.69 ml | 3.33 ml | 4 ml | 5 ml | 0.85 ml |
| 1.5M Tris pH 8.8 | 2.5 ml | 2.5 ml | 2.5 ml | 2.5 ml | 1.3 ml Tris pH 6.8 |
| Αποσταγμένο Νερό | 4.75 ml | 4 ml | 3.44 ml | 2.44 ml | 2.8 ml |
| 10% SDS | 100 μl | 100 μl | 100 μl | 100 μl | 50 μl |
| 10% APS | 50 μl | 50 μl | 50 μl | 50 μl | 20 μl |
| TEMED | 20 μl | 20 μl | 20 μl | 20 μl | 5 μl |

ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΟΥΝ ΣΕ ΔΥΟ ΠΛΗΡΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΑ

Παρασκευή του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

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

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και χρώση με Coomassie Blue

1. Προετοιμάζεται η συσκευή Ηλεκτροφόρησης όπως αναφέρεται στο εγχειρίδιο και τοποθετούνται οι τράπεζες με τα πηκτώματα.
2. Η δεξαμενή γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα 1X SDS-PAGE
 - Φαίνονται οι ενδείξεις για 2 ή 4 πηκτώματα ώστε να καθοριστεί ο τελικός όγκος του διαλύματος της δεξαμενής
 - Σε περίπτωση μονού αριθμού πηκτωμάτων, τότε γεμίζονται σαν να ήταν ζυγός ο αριθμός για να αποφευχθεί η υπερθέρμανση της δεξαμενής

- ο Αν υπάρχει ένα πήκτωμα μόνο, τοποθετείται το στεγανό τοίχωμα
3. Ετοιμάζονται και φορτώνονται τα δείγματα μετά από βρασμό 5 λεπτών στους 95 °C.
 4. Καλύπτεται η δεξαμενή και συνδέονται τα ηλεκτρόδια με τη μονάδα τάσης
 5. Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης είναι 120V μέχρι το μέτωπο των πρωτεϊνών να περάσει στο πήκτωμα διαχωρισμού και στην συνέχεια στα 200V μέχρι το μέτωπο των χρωστικών να απέχει περίπου 1cm από το τέλος του πήκτωματος.
 6. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, αφαιρούνται οι τράπεζες, ξεχωρίζονται τα πηκτώματα και τοποθετούνται σε δοχεία.
 7. Καλύπτονται τα πηκτώματα με διάλυμα χρωματισμού (Coomassie Blue).
 - η χρώση πραγματοποιείται υπό ανάδευση για τουλάχιστον 45 λεπτά.
 8. Αφαιρείται το διάλυμα χρώσης και προστίθεται χρησιμοποιημένο διάλυμα αποχρωματισμού (Destain) για 5 λεπτά υπό ανάδευση.
 9. Αφαιρείται το ακάθαρτο (ή καθαρό διάλυμα αποχρωματισμού) και τοποθετείται καθαρό διάλυμα αποχρωματισμού (Destain) και τα πηκτώματα αφήνονται να αποχρωματιστούν ολονύκτια.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΑ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-PAGE

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

2.3.14 Ηλεκτροφορητική μεταφορά Πρωτεϊνών

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης για την διεξαγωγή ανοσοαποτύπωσης κατά Western, ακολουθεί ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο πήκτωμα διαχωρισμού σε μεμβράνη PVDF μεγέθους πόρων 0.2 μm, όπου αποτυπώνονται όπως ακριβώς έχουν διαχωριστεί στην ηλεκτροφόρηση SDS (Towbin, Staehelin et al. 1979; Burnette 1981). Πριν την έναρξη της μεταφοράς η μεμβράνη ενεργοποιείται για 30 sec σε μεθανόλη, ώστε να ενεργοποιηθεί. Στην συνέχεια, το πήκτωμα, η μεμβράνη, 6 χαρτιά Whatman No 3 και 2 σπόγγοι, διαβρέχονται με διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer) [25 mM Tris, 250 mM γλυκίνη και 20% (v/v) μεθανόλη], τοποθετούνται στη συσκευή μεταφοράς, ανάμεσα στους δυο πόλους, με την εξής διάταξη από την άνοδο προς την κάθοδο: 1 σπόγγος-3 χαρτιά Whatman-μεμβράνη PVDF-πήκτωμα-3 χαρτιά Whatman-1 σπόγγος. Η τοποθέτηση γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται η παγίδευση φυσαλίδων. Η μέθοδος βασίζεται στο ότι οι πρωτεΐνες, που είναι αρνητικά φορτισμένες λόγω του SDS, κινούνται από τον αρνητικό πόλο προς τον θετικό πόλο της συσκευής. Η μεταφορά επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής έντασης και γίνεται σε ειδική συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Η συσκευή συνίσταται να είναι τοποθετημένη σε πάγο υπό ανάδευση, για την αποφυγή ανόδου της θερμοκρασίας, φαινόμενο βλαπτικό για τις πρωτεΐνες. Στην παρούσα διατριβή η μεταφορά πραγματοποιείται στα 100 V σε χρόνο 40 min, λόγω μελέτης μικρού μοριακού βάρους πρωτεϊνών.

2.3.15 Ανοσοδοκιμασία κατά Western (Western Blot, WB)

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

Η διαδικασία που ακολουθείται στην ανάλυση κατά Western είναι η ακόλουθη: Αρχικά η μεμβράνη PVDF επωάζεται υπό ήπια ανάδευση για 30 min σε 4% παραφορμαλδεΐδη, ώστε να πραγματοποιηθεί σταθεροποίηση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη. Ακολουθεί επώαση overnight υπό συνεχή ανάδευση στους 4 °C με διάλυμα δέσμευσης μη-ειδικών θέσεων [5% (w/v) BSA σε διάλυμα έκπλυσης TBS-T (Tris-buffered saline-Tween-20) το οποίο περιέχει: 0.1M Tris/HCl pH 7.6, 0.2M NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20]. Την επόμενη ημέρα, η μεμβράνη επωάζεται για 2 ώρες με κατάλληλο αντίσωμα, το οποίο είναι αραιωμένο σε διάλυμα 3% BSA (w/v) σε TBS-T, υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθούν εκπλύσεις της μεμβράνης (5 x 10 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση), και επώασή της με δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει την Fc περιοχή του πρώτου αντισώματος και είναι αραιωμένο σε διάλυμα 5% (w/v) σκόνης γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά σε TBS-T, για μία ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση. Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε (anti-rabbit, ανάλογα με το πρώτο αντίσωμα) είναι συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης (HRP). Αφού η μεμβράνη της εκπλυθεί (5 x 10 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση), εφαρμόζεται η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Σε αυτή, η μεμβράνη επωάζεται για 5 min σε διάλυμα ECL και μεταφέρεται σε ειδική συσκευή εμφάνισης, όπου λαμβάνονται διαδοχικές λήψεις του σήματος σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, συνήθως μέχρι το σήμα να κορεστεί.

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα anti- α -synuclein (1/1000) (Cell signaling Antibodies) και anti-PGK1 (1/10000) (μάρτυρας ισοφόρτωσης) (Acris Antibodies GmbH).

2.3.16 Ανοσοφθορισμός για κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae*

- Υγρή καλλιέργεια κυττάρων ζυμομύκητα 10ml αφήνεται να αναπτυχθεί έως η OD₆₀₀ να μετρηθεί περίπου 0,5-1. Εναλλακτικά, από καλλιέργεια οποιασδήποτε ηλικίας υπολογίζεται ο απαιτούμενος όγκος ώστε να συλλεγούν $6,3 \times 10^7$.
- Φυγοκέντρωση στα 12000 g για 5 min και απόρριψη του υπερκειμένου

Σταθεροποίηση-στερέωση των κυττάρων (Fixation)

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

Δημιουργία σφαιροπλαστών και διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος

- Φυγοκέντρηση στα 5000 g για 1 min. Επισημαίνεται πως σε αυτά τα στάδια τα κύτταρα είναι ευάλωτα σε λύση λόγω κατεργασίας στα κυτταρικά τους τοιχώματα, οπότε κάθε ακραία συνθήκη κατεργασίας μειώνει την επιβίωση ακέραιων κυττάρων στο τέλος του πειράματος.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 1 ml spheroplasting solution.
- Ακολουθεί επώαση για 30 min στους 30 °C.
- Φυγοκέντρηση στα 5000 g για 1 min. Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 0,5 ml SHA buffer/1% Triton X-100.
- Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πλύση (2 φορές) με 1 ml SHA buffer.
- Τελική επαναιώρηση σε 100 μl (όσα μl απαιτούνται για τελική OD₆₀₀ ίση με 24).

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

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

Προετοιμασία των καλυπτρίδων

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

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

Επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα

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

Επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα

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

Συγκόλληση των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρο

- Γίνεται μία πλύση των καλυπτρίδων με απιονισμένο νερό και αφήνονται να στεγνώσουν

- Οι καλυπτρίδες συγκολλούνται σε αντικειμενοφόρο με Prolong mounting medium και αφήνονται να στεγνώσουν για 3 min.
- Ακολουθεί παρατήρηση στο μικροσκόπιο

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

2.3.17 Συνεστιακή μικροσκοπία

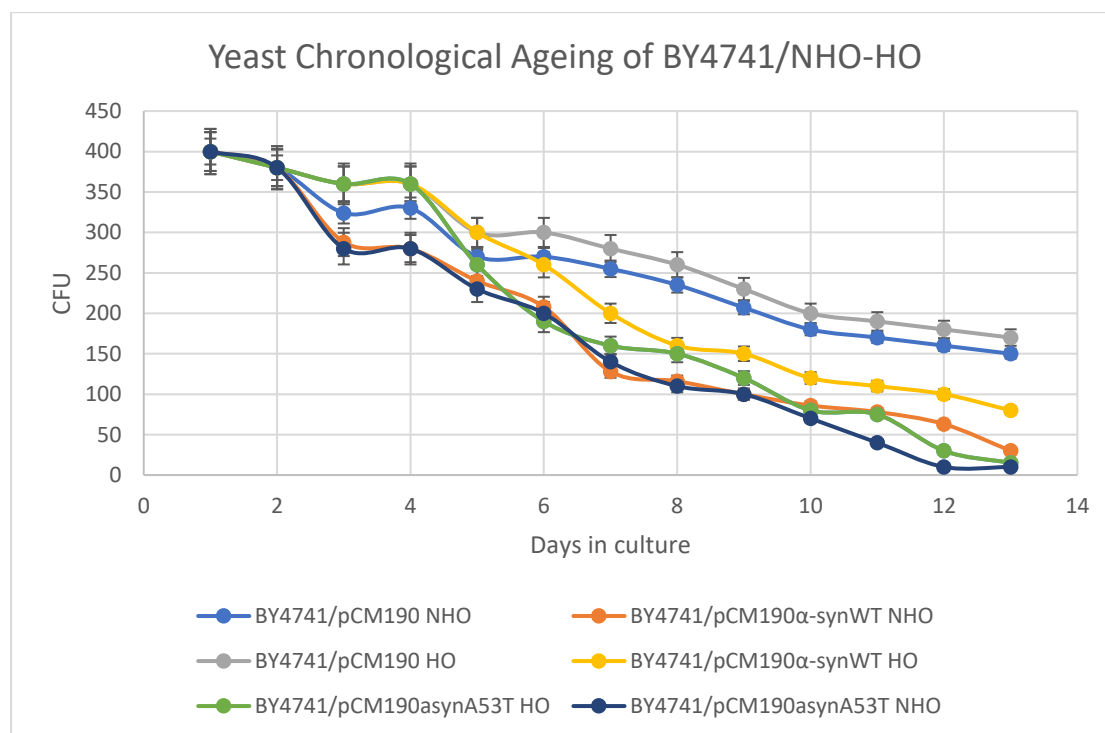
Τα δείγματα εξετάστηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS-SP1 και Leica SP5 TCSII ενώ οι φωτογραφίες αναλύθηκαν με χρήση των λογισμικών Fiji (NIH Image), LAS AF Lite (Leica) ή Adobe Photoshop (Adobe) Software.

3. Αποτελέσματα

3.1 Η επίδραση της υψηλής ωσμωτικότητας στη χρονολογική γήρανση του ανασυνδυασμένου *S. cerevisiae* BY4741/ α -synA53T

Τα κύτταρα του ζυμομύκητα που έχουν εισέλθει στη φάση της γήρανσης (μετά τις 8 ημέρες καλλιέργειας) υφίστανται καταπόνηση λόγω της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων. Η συνθήκη υψηλής ωσμωτικότητας ευνοεί την επέκταση του εύρους ζωής τους. Στον αντίποδα αυτού, η παρουσία της α -syn A53T σε αυτά πιθανώς θα τα επιβάρυνε περαιτέρω με έναν πιο τοξικό φαινότυπο. Θεωρήθηκε επομένως χρήσιμο να μελετηθεί η επίδρασή της υψηλής ωσμωτικότητας σε κύτταρα ζυμομύκητα που περιέχουν την A53T και διανύουν τη φάση της γήρανσης. Με αυτό τον τρόπο γίνεται ένα είδος παραλληλισμού με τη νόσο Parkinson που εκδηλώνεται στην τρίτη ηλικία.

Η διαδικασία της χρονολογικής γήρανσης καθώς και η κατασκευή των αντίστοιχων καμπυλών περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Παράλληλα με το BY4741/pCM190 α synA53T χρησιμοποιήθηκε το BY4741/pCM190 ως αρνητικός μάρτυρας παρουσία (HO) και απουσία (NHO) υψηλής ωσμωτικότητας. Η βιωσιμότητα των κυττάρων παρατίθεται στην εικόνα 3.1, στην οποία έχει προστεθεί και η βιωσιμότητα παρουσία της αγρίου τύπου μορφής α -συνουκλεΐνης για συγκριτικούς λόγους.



Εικόνα 3.1: Χρονολογική γήρανση των κυττάρων BY4741/pCM190, BY4741/pCM190 α synWT (Ε. Σφήκας, διδακτορική διατριβή 2020) και BY4741/pCM190 α synA53T απουσία (NHO) και παρουσία HO.

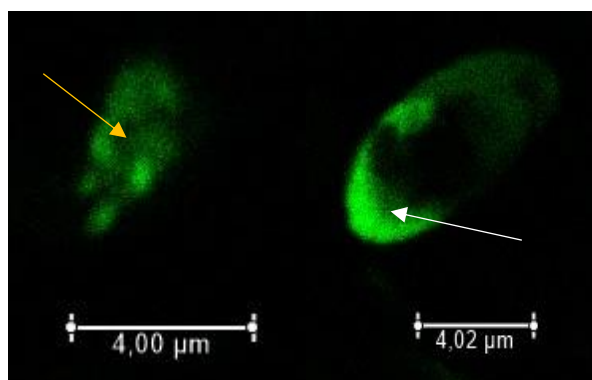
Από τη σύγκριση των κυτταρικών πληθυσμών μεταξύ τους για τις δυο συνθήκες, παρατηρείται αρχικά ότι η α -συνουκλεΐνη προκαλεί πτώση της κυτταρικής βιωσιμότητας είτε στην μία συνθήκη είτε στην άλλη, σε σχέση με την βιωσιμότητα των κυττάρων που δεν την φέρουν. Η εξωτερική ωσμωτικότητα βοηθά έως ένα σημείο, αλλά δεν είναι ικανή να αναστρέψει το φαινόμενο.

Στα κύτταρα BY4741/pCM190, κατά τις δύο πρώτες ημέρες οι δύο πληθυσμοί συγκλίνουν, ενώ στην συνέχεια τα κύτταρα παρουσία HO εμφανίζουν ηπιότερη

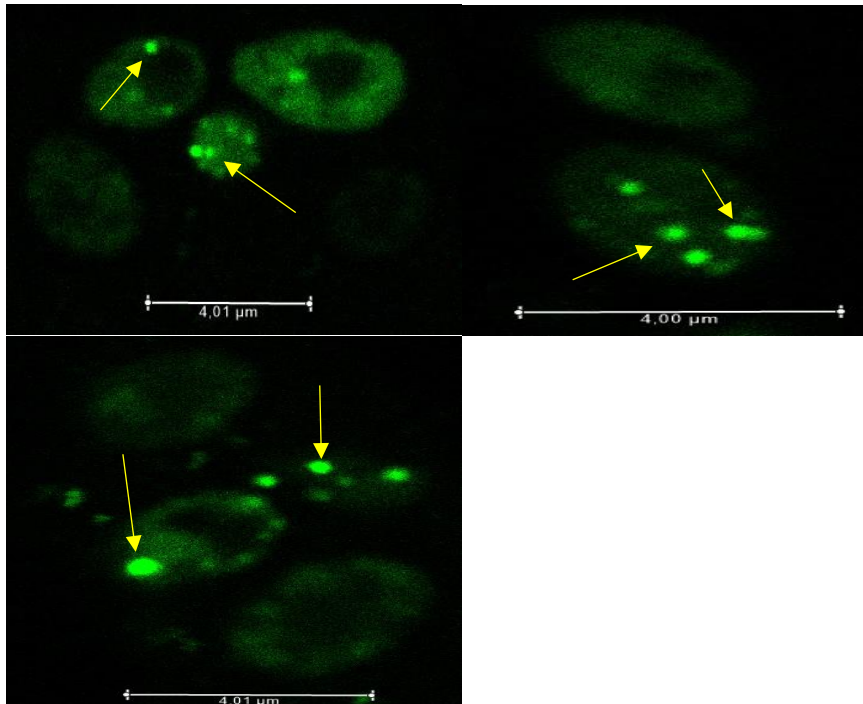
πτώση στην βιωσιμότητά τους σε όλη τη χρονολογική γήρανση σε σχέση με εκείνα απουσία ΗΟ. Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και από τη σύγκριση των πληθυσμών των κυττάρων BY4741/pCM190asynWT μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα BY4741/pCM190asynWT παρουσία ΗΟ εμφανίζουν σε όλη την διάρκεια της γήρανσής τους ηπιότερη πτώση στην βιωσιμότητά τους σε σχέση με εκείνα απουσία ΗΟ, ακόμη και αν τελικά ο πληθυσμός τους μειώνεται αρκετά προς το τέλος της μελέτης. Όσον αφορά τα κύτταρα με την α -synA53T, παρατηρείται απόκλιση στην ΗΟ και στην ΝΗΟ συνθήκη στο διάστημα των πρώτων 2 – 5 ημερών κατά την μεταδιαυξική φάση, ενώ στη συνέχεια το φαινόμενο αυτό υποχωρεί κάπως συντηρώντας την βιωσιμότητα ελάχιστα αυξημένη παρουσία σορβιτόλης. Στην σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών φαίνεται ότι η α -synA53T είναι πιο τοξική από την asynWT με τον πληθυσμό BY4741/pCM190asynWT απουσία ΗΟ να ακολουθεί στην τοξικότητα. Κατά συνέπεια, υπό τη συνθήκη ΗΟ επεκτείνεται το εύρος ζωής του ζυμομύκητα παρουσία της α -synA53T μόνο κατά το πρώτο χρονικό διάστημα.

3.2 Εντοπισμός της α -συνουκλεΐνης στα κύτταρα BY4741/ α -synA53T με ανοσοφθορισμό

Η διερεύνηση της α -synA53T στο εσωτερικό των κυττάρων του ζυμομύκητα που φέρουν το αντίστοιχο γονίδιο πραγματοποιήθηκε με πειράματα ανοσοφθορισμού. Τα κύτταρα που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο είχαν αναπτυχθεί σε συνθήκη υψηλής ωσμωτικότητας. Επιλέχθηκαν δύο φάσεις ανάπτυξης για την παρατήρηση: η εκθετική φάση ($OD_{600nm}=2$), κατά την οποία δεν ανιχνεύεται τοξικότητα, και η στατική φάση που αντιστοιχεί στην κυτταρική γήρανση (όγδοη ημέρα), κατά την οποία παρατηρείται και η τοξική επίδραση. Τα αποτελέσματα από αντιπροσωπευτικές εικόνες της συνεστιακής μικροσκοπίας στην εκθετική φάση ανάπτυξης παρουσιάζονται στην εικόνα 3.2, ενώ στη στατική φάση στην εικόνα 3.3.



3.2 Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού της α -synA53T σε κύτταρα BY4741/ α -synA53T εκθετικής φάσης ανάπτυξης (Κλίμακα 4 μ m). Με το πορτοκαλί βέλος υποδεικνύονται περιοχές όπου παρατηρείται φθορισμός στο εσωτερικό των κυττάρου, ενώ με το λευκό βέλος περιοχές όπου ο φθορισμός εντοπίζεται κοντά στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης



3.3 Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού της α -synA53T σε κύτταρα BY4741/ α -synA53T στατικής φάσης ανάπτυξης (Κλίμακα 4 μ m). Με τα βέλη υποδεικνύονται περιοχές φθορισμού στο εσωτερικό του κυττάρου που μοιάζουν με κυτταροπλασματικά συσσωματώματα.

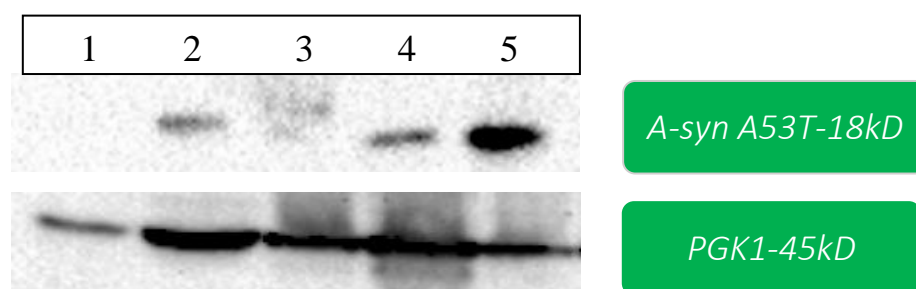
Από τις φωτογραφίες της συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού στην εκθετική φάση φαίνεται ότι η α -synA53T εντοπίζεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα, αλλά και συγκεντρωμένη στο εσωτερικό της μεμβράνης. Η πρώτη εικόνα βρίσκεται σε συμφωνία με το φαινότυπο που αντιστοιχεί σε μη τοξική επίπτωση στο κύτταρο, ενώ η δεύτερη που αντιστοιχεί στον εντοπισμό στη μεμβράνη θα μπορούσε ενδεχομένως να υποδηλώνει ένα αρχικό στάδιο της τοξικότητας.

Στις φωτογραφίες της συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού στη στατική φάση της γήρανσης εντοπίζονται πολλαπλές έντονες περιοχές φθορισμού στο εσωτερικό των κυττάρων που υποδηλώνουν συσσωμάτωση της α -synA53T. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται επίσης σε συμφωνία με τα πειράματα της χρονολογικής γήρανσης, στα οποία τα κύτταρα της ζύμης που έφεραν την α -synA53T εμφάνιζαν πτώση της βιωσιμότητάς τους, καθώς τα συσσωματώματα της α -συνουκλεΐνης προκαλούν τοξικότητα στα κύτταρα. Επομένως στη στατική φάση παρατηρείται μεταβολή του φαινοτύπου σε μια πιο τοξική μορφή. Οπότε η εικόνα των πειραμάτων επαληθεύει τις καμπύλες χρονολογικής γήρανσης για τα κύτταρα αυτά.

3.3 Ανίχνευση της παραγόμενης α -συνουκλεΐνης A53T στον *S. cerevisiae* BY4741/ α synA53T

Η παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T (18 kD) στα κύτταρα εξακριβώθηκε με πειράματα ανοσοδοκιμασίας Western με αντίσωμα έναντι της α -συνουκλεΐνης στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα δειγμάτων των κυττάρων *S. cerevisiae*. Τα δείγματα αυτά ελήφθησαν από τέσσερις φάσεις ανάπτυξης: την προ-εκθετική με $OD_{600nm}=0.6$ (PE), την εκθετική με $OD_{600nm}=2$ (EXP), την μετα-διαυξική μετά τις 24 πρώτες ώρες ανάπτυξης (PD) και την στατική με αρχικό όριο την όγδοη ημέρα καλλιέργειας των

κυττάρων ζύμης (ST). Στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου φορτώθηκαν 100 μg ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των κυττάρων BY4741/pCM190 α synA53T από κάθε φάση ανάπτυξης. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα BY4741/pCM190. Τα δείγματα της πηκτής μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF και ακολούθησε ανοσοδοκιμασία Western με αντίσωμα έναντι της α -συνουκλείνης (18 kD). Για τη διαπίστωση της ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης PGK1 (45 kD) η οποία εκφράζεται σταθερά και σε υψηλό επίπεδο στον ζυμομύκητα σε όλες τις φάσεις ανάπτυξής του. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αποτυπώνονται στην εικόνα 3.4.



Εικόνα 3.4: Ανοσοαποτύπωση Western για τον εντοπισμό της α -συνουκλείνης A53T και του μάρτυρα ισοφόρτωσης PGK1 στα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα του BY4741/ α -synA53T. Φορτώθηκαν 100 μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.
 Διαδρομή 1: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190
 Διαδρομή 2: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190 α -synA53T-PE
 Διαδρομή 3: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190 α syn A53T-EXP
 Διαδρομή 4: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190 α synA53T-PD
 Διαδρομή 5: Ολικές πρωτεΐνες BY4741/pCM190 α synA53T-ST

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται αρχικά ότι η ισοφόρτωση των δειγμάτων ήταν ικανοποιητική. Στη διαδρομή 1 όπου έχει φορτωθεί ο αρνητικός μάρτυρας δεν εντοπίζεται έκφραση της α -synA53T, ενώ η πρωτεΐνη PGK1 φαίνεται παρούσα (αν και με ασθενέστερο σήμα συγκριτικά με αυτό των υπόλοιπων δειγμάτων). Όσον αφορά την α -συνουκλείνη A53T, εμφανίζεται σε όλα τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα του BY4741/pCM190 α -synA53T με το μέγιστο της έκφρασής της να εντοπίζεται στη στατική φάση ανάπτυξης. Αυτό το εύρημα συμπίπτει με την εικόνα των κυττάρων της στατικής φάσης στην μικροσκοπία και την πτώση της βιωσιμότητας στην καμπύλη γήρανσης.

3.4 Μελέτη του επιπέδου μεταγραφής των γονιδίων *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *ATG8* και *TOR1* στα κύτταρα *S. cerevisiae* BY4741/pCM190 α -synA53T σε πραγματικό χρόνο (qPCR)

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η τρεχαλόζη αποτελεί μεταξύ άλλων και ένα παράγοντα αποδιάταξης των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων που ενεργοποιείται σε συνθήκες καταπόνησης για την επιβίωση των κυττάρων. Επομένως, από τη διακύμανση της έκφρασης των γονιδίων *TPS1*, *TPS2* και *TSL1* που εμπλέκονται στη σύνθεση της τρεχαλόζης (όπως αναλύθηκε στην εισαγωγή) μπορούν να προκύψουν ενδείξεις σχετικά με την πιθανή αυξομείωση των επιπέδων τρεχαλόζης στο εσωτερικό των κυττάρων υπό την παρουσία ενός στρεσογόνου παράγοντα όπως η μεταλλαγμένη α -συνουκλείνη. Εξάλλου, η σύνθεση της τρεχαλόζης επάγεται από την εφαρμογή της υψηλής ωσμωτικότητας στην ανάπτυξη των κυττάρων.

Το προϊόν του γονιδίου *ATG8* εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της αυτοφαγίας και παίζει κρίσιμο ρόλο στη διάσωση του κυττάρου από την συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Με τη διερεύνηση της μεταγραφής του δίνεται η δυνατότητα να εκτιμηθεί το επίπεδο λειτουργίας του μηχανισμού αυτού, ο οποίος αποτελεί άμυνα έναντι του πρωτεοτοξικού στρες που προκαλεί η παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T. Επιπλέον, η συγκριτική μελέτη των επιπέδων έκφρασης των βιοσυνθετικών γονιδίων του δισακχαρίτη με τα επίπεδα του *ATG8* θα δώσει περαιτέρω πληροφορίες για την αλληλεπίδρασή τους, εφόσον η τρεχαλόζη αποτελεί παράγοντα επαγωγής της αυτοφαγίας,

Το προϊόν του γονιδίου *TOR1* αποτελεί μέρος του συμπλόκου TORC1 και συμμετέχει στη ρύθμιση ενός καταρράκτη φωσφορυλιώσεων που σχετίζονται με την αξιοποίηση και την αίσθηση θρεπτικών στοιχείων στο περιβάλλον από τα κύτταρα του *S. cerevisiae*. Το σύμπλοκο TORC1 καταστέλλει μεταξύ άλλων την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, άρα και έμμεσα την μεταγραφή των βιοσυνθετικών γονιδίων της τρεχαλόζης. Το επίπεδο έκφρασής του μπορεί να αποκαλύψει τυχόν συσχετισμό μεταξύ της διαδικασίας της αυτοφαγίας και του συμπλόκου TORC1, αλλά και της παραγωγής τρεχαλόζης κατά την έκφραση της α -συνουκλεΐνης A53T.

Η μελέτη του επιπέδου μεταγραφής πραγματοποιήθηκε με qPCR. Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν εκκινητές, η καταλληλότητα των οποίων διαπιστώθηκε πρώτα με απλή PCR στο γονιδιωματικό DNA του *S. cerevisiae* BY4741 και στη συνέχεια με RT-PCR στο ολικό RNA του παραπάνω στελέχους, έτσι ώστε να εξακριβωθεί η μεταγραφή των παραπάνω γονιδίων (Ζόλδερ Σ., 2017, Sfikas E., Zolder S. et al. 2017)

Οι μελέτες qPCR πραγματοποιήθηκαν με την απομόνωση τριών δειγμάτων RNA από κάθε μελετώμενη συνθήκη και από τα οποία δημιουργήθηκαν τρία αντίστοιχα cDNA. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν οι τέσσερις κομβικές φάσεις ανάπτυξης όπως και στην ανοσοαποτύπωση Western: την προ-εκθετική με $OD_{600nm}=0,6$, την εκθετική με $OD_{600nm}=2$, την μετα-διαυξική μετά τις 24 πρώτες ώρες ανάπτυξης και την στατική με αρχικό όριο την όγδοη ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων ζύμης. Η ανάπτυξη των κυττάρων τόσο απουσία όσο και παρουσία της μεταλλαγμένης α -συνουκλεΐνης πραγματοποιήθηκε παρουσία υψηλής οσμωτικότητας.

Σε κάθε συνθήκη, το δείγμα μελέτης ήταν ο πληθυσμός των κυττάρων BY4741/pCM190asynA53T, δηλαδή παρουσία της μεταλλαγμένης α -συνουκλεΐνης, ενώ το δείγμα βαθμονόμησης ο πληθυσμός των κυττάρων BY4741/pCM190, δηλαδή απουσία έκφρασης της α -συνουκλεΐνης A53T. Γίνεται έτσι αντιληπτό πως επιδιώχθηκε, η μελέτη της μεταγραφής των γονιδίων να περιλαμβάνουν τον παράγοντα του χρόνου από την μία φάση ανάπτυξης στην διαδοχική της, ώστε να προκύψει στα αποτελέσματα ένα μεταβολικό προφίλ που θα αναδείκνυε τις πιθανές μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης κάθε ηλικιακή φάση του ζυμομύκητα.

Αποτελέσματα q-PCR

Μετά την εύρεση της απόδοσης της ενίσχυσης εφαρμόστηκε το δεύτερο και κυρίως τμήμα του πειράματος της q-PCR. Σε αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα τα cDNAs των 4 βιολογικών συνθηκών που αντιστοιχούν σε με συγκέντρωση RNA 0,5 ng. Η ενίσχυση των τμημάτων των γονιδίων *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *ATG8* και *TOR1*

πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα με το γονίδιο αναφοράς *ACT1*, ενώ το πρωτόκολλο ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ίδιο πρωτόκολλο 40 κύκλων ενίσχυσης με το βήμα απόδοσης της ενίσχυσης. Στο συγκεκριμένο βήμα, το κάθε γονίδιο στο κάθε δείγμα cDNA ελέγχθηκε εις τριπλούν. Απαραίτητη ήταν και η παρουσία των αρνητικών μαρτύρων χωρίς υπόστρωμα αντίδρασης.

Τα αποτελέσματα των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων αναλύθηκαν με την μέθοδο Pfaffl, ενώ εξετάστηκε και η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων με την χρήση του t-test και την εξαγωγή της τιμής p.

Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε ανάλυση της μεταγραφικής κατάστασης των γονιδίων για κάθε φάση ανάπτυξης ξεχωριστά με συνθήκη βαθμονόμησης τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων στα κύτταρα BY4741/pCM190 της προ-εκθετικής φάσης. Ύστερα πραγματοποιήθηκε ανάλυση με συνθήκη βαθμονόμησης την αντίστοιχη φάση της συνθήκης μελέτης για μια διαφορετική προσέγγιση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα των προσεγγίσεων βρίσκονται στους πίνακες 3.1 και 3.2.

Πίνακας 3.1: qPCR για τα μετάγραφα των *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του BY4741/A53T. Η βαθμονόμηση έγινε βάσει της προ-εκθετικής φάσης ανάπτυξης των κυττάρων απουσία α-συνουκλεΐνης (άκρη αριστερά του πίνακα). Mean: Μέσος όρος της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. PE: προ-εκθετική φάση. EXP: εκθετική φάση. PD: μετα-διαυξική φάση. ST: στατική φάση.

| <i>TPS1</i> | | | | | | |
|-------------|----------------|-------------|-------------|-------|-------------|-------------|
| | Vector control | | | A53T | | |
| | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | P value |
| PE/PE | 1,00 | 0,96-1,03 | 1 | 26,48 | 25,98-26,88 | 0,000968 |
| EXP/PE | 1,86 | 1,74-1,98 | 0,0661671 | 7,64 | 7,40-7,86 | 0,0013 |
| PD/PE | 38,30 | 38,06-38,65 | 2,94043E-08 | 21,59 | 21,52-21,64 | 3,361E-06 |
| ST/PE | 196,07 | 183,9-209,7 | 5,13748E-09 | 41,01 | 39,52-42,57 | 1,07867E-08 |

| <i>TPS2</i> | | | | | | |
|-------------|----------------|------------|-------------|------|-----------|----------|
| | Vector control | | | A53T | | |
| | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | P value |
| PE/PE | 1,00 | 0,84-1,18 | 1 | 2,92 | 2,91-2,92 | 0,025939 |
| EXP/PE | 1,10 | 1,00-1,21 | 0,495176 | 3,85 | 3,78-3,94 | 0,002276 |
| PD/PE | 8,44 | 6,31-11,10 | 3,73598E-05 | 2,84 | 2,63-3,07 | 0,008126 |
| ST/PE | 7,76 | 7,32-8,29 | 2,37882E-07 | 1,8 | 1,68-1,94 | 0,046879 |

| <i>TSL1</i> | | | | | | |
|-------------|----------------|-------------|-------------|-------|-------------|-----------|
| | Vector control | | | A53T | | |
| | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | P value |
| PE/PE | 1,00 | 0,69-1,45 | 1 | 11,93 | 11,07-12,85 | 0,021898 |
| EXP/PE | 3,10 | 2,60-3,70 | 0,025205 | 9,46 | 8,01-11,09 | 0,0013 |
| PD/PE | 26,07 | 20,56-33,02 | 6,49219E-06 | 21,73 | 19,75-24,06 | 5,324E-05 |
| ST/PE | 12,77 | 10,22-16,09 | 4,55241E-07 | 2,79 | 2,05-3,81 | 0,1765 |

| ATG8 | | | | | | |
|----------------|-------|-------------|-------------|-------|------------|-------------|
| Vector control | | | A53T | | | |
| | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | P value |
| PE/PE | 1,00 | 0,99-1,009 | 1 | 0,95 | 0,94-0,97 | 4,91526E-05 |
| EXP/PE | 0,068 | 0,061-0,076 | 0,196287387 | 0,32 | 0,30-0,34 | 0,000294862 |
| PD/PE | 7,00 | 6,49-7,60 | 1,52185E-07 | 3,61 | 3,60-3,61 | 1,4977E-07 |
| ST/PE | 29,30 | 27,90-30,60 | 9,84749E-10 | 11,03 | 10,9-11,11 | 1,06092E-08 |

| TOR1 | | | | | | |
|----------------|------|-----------|-------------|-------|------------|--------------|
| Vector control | | | A53T | | | |
| | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | P value |
| PE/PE | 1,00 | 0,98-1,01 | 1 | 0,48 | 0,47-0,49 | 0,493847 |
| EXP/PE | 1,18 | 1,17-1,20 | 0,179594 | 1,97 | 1,95-1,98 | 0,95899663 |
| PD/PE | 1,91 | 1,50-2,39 | 0,013507 | 13,89 | 13,8-13,95 | 2,000996E-06 |
| ST/PE | 4,49 | 4,15-4,73 | 6,85659E-05 | 1,78 | 1,6-1,99 | 0,02411935 |

Πίνακας 3.2: qPCR για τα μετάγραφα των *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του BY4741/A53T. Η βαθμονόμηση έγινε βάσει της αντίστοιχης φάσης της συνθήκης που μελετήθηκε. Mean: Μέσος όρος της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. PE: προ-εκθετική φάση. EXP: εκθετική φάση. PD: μετα-διαυξική φάση. ST: στατική φάση.

| Αναλογία= παρουσία asynA53T/απουσία asynA53T | | | | | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|------------|-------------|-------------|----------|
| | <i>TPS1</i> | | | <i>TPS2</i> | | | <i>TSL1</i> | | |
| | Mean | R.V. | P value | Mean | R.V. | P Value | Mean | R.V. | P value |
| PE | 26,48 | 25,98-26,88 | 0,000968 | 2,92 | 2,91-2,92 | 0,025939 | 11,93 | 11,07-12,85 | 0,021898 |
| EXP | 4,09 | 3,86-4,33 | 0,007694203 | 3,48 | 3,45-3,6 | 0,004487 | 3,05 | 2,84-3,3 | 0,059236 |
| PD | 0,64 | 0,62-0,65 | 0,955339385 | 0,34 | 0,30-0,39 | 0,1735015 | 0,83 | 0,81-0,84 | 0,213797 |
| ST | 0,20 | 0,20-0,21 | 3,52545E-07 | 0,21 | 0,2-0,28 | 4,4592E-07 | 0,21 | 0,17-0,28 | 0,001245 |

| Αναλογία= παρουσία asynA53T/απουσία asynA53T | | | | | | |
|--|-------------|------------|-------------|-------------|-----------|-------------|
| | <i>TOR1</i> | | | <i>ATG8</i> | | |
| | Mean | R.V. | P value | Mean | R.V. | P value |
| PE | 0,48 | 0,47-0,49 | 0,493847 | 0,95 | 0,94-0,97 | 4,91526E-05 |
| EXP | 1,45 | 1,43-1,47 | 0,687752959 | 4,75 | 4,75-4,76 | 0,101862922 |
| PD | 10,68 | 9,79-11,62 | 0,001230553 | 0,51 | 0,49-0,53 | 0,067634236 |
| ST | 0,25 | 0,24-0,25 | 8,39587E-05 | 0,30 | 0,3-0,37 | 1,77019E-08 |

Το επίπεδο μεταγραφής του *TPS1* που κωδικοποιεί τη συνθάση της τρεχαλόζης παρατηρείται εξαιρετικά αυξημένο στην προ-εκθετική και εκθετική φάση ανάπτυξης συγκριτικά προς τις αντίστοιχες απουσία α -συνουκλείνης A53T. Αυτό έχει μια λογική εξήγηση η οποία στηρίζεται αφενός στην αυξανόμενη έκφραση της A53T, όπως παρατηρήθηκε στην προηγούμενη ενότητα και αφετέρου στην τοξικότητα της μεταλλαγής, άρα της καταπόνησης που υφίστανται τα κύτταρα από τα πρώτα στάδια της ανάπτυξής τους. Ενδεχομένως είναι άμεση η ανάγκη παραγωγής τρεχαλόζης που

είναι βοηθητική για το κύτταρο από τις πρώιμες φάσεις ανάπτυξης γι' αυτό και ενεργοποιείται η μεταγραφή του *TPS1*. Κατά τη μετα-διαυξική και τη στατική φάση ανάπτυξης, το επίπεδο μεταγραφής του *TPS1* εμφανίζεται σημαντικά κατεσταλμένο παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T, σε σχέση με εκείνο απουσία της. Φαίνεται πως η τοξικότητα που επιβάλλεται εντός των κυττάρων με τη συσσώρευσή της είναι τέτοια, που ούτε η συνθήκη υψηλής ωσμωτικότητας βοηθά στη παραμονή της υψηλής μεταγραφικής κατάστασης του γονιδίου *TPS1* στις αψότερες φάσεις ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα των δύο προσεγγίσεων συμβαδίζουν στην ίδια εικόνα.

Το επίπεδο μεταγραφής του *TPS2*, γονιδίου υπεύθυνου για την βιοσύνθεση της φωσφατάσης της τρεχαλόζης, ακολουθεί αυτό του *TPS1*, ωστόσο σε χαμηλότερο επίπεδο. Συγκεκριμένα, φαίνεται να αυξάνεται κατά την προ-εκθετική και εκθετική φάση ανάπτυξης, ενώ στις επόμενες δυο φάσεις ανάπτυξης εμφανίζεται σημαντική καταστολή του μεταγραφικού του επιπέδου, όπως συνέβη και με το *TPS1*. Ως εκ τούτου, αν ληφθεί υπόψη η συνολική εικόνα των *TPS1* και *TPS2*, θα μπορούσε να εκτιμηθεί ότι η παραγωγή της τρεχαλόζης φαίνεται να καταστέλλεται σημαντικά παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T συγκριτικά με τα κύτταρα που δεν εκφράζουν την α -συνουκλεΐνη.

Η βιοσύνθεση της τρεχαλόζης ρυθμίζεται από το γονίδιο *TSL1* που κωδικοποιεί τη μια σημαντική ρυθμιστική υπομονάδα για την ενεργοποίηση του συμπλόκου TPS. Παρατηρείται και εδώ το ίδιο φαινόμενο, δηλαδή εξαιρετικά υψηλή μεταγραφή του γονιδίου στις πρώτες φάσεις ανάπτυξης, προ-εκθετική και εκθετική, ώστε το κύτταρο να αντεπεξέλθει στο διαφαινόμενο έντονο στρες που υπόκειται με την επαγωγή της σύνθεσης της τρεχαλόζης από το γονιδιακό προϊόν του *TSL1*. Ενώ, αντίστοιχα με τα υπόλοιπα γονίδια του συμπλόκου TPS, στη μετα-διαυξική φάση διατηρεί το ίδιο περίπου επίπεδο με του αρνητικού μάρτυρα απουσία του γονιδίου της α -συνουκλεΐνης, για να εμφανίσει πτώση και καταστολή της μεταγραφής του στη στατική φάση ανάπτυξης. Τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου φαίνεται να παρουσιάζονται λοιπόν σταθερά υψηλά παρουσία της μεταλλαγής A53T έως και την μεταδιαυξική φάση, ως μία απόκριση των κυττάρων στο στρες που προκύπτει από την α -συνουκλεΐνη εκδηλώνοντας το ερέθισμα για βιοσύνθεση περισσότερης τρεχαλόζης. Στην στατική φάση, η μεταγραφική καταστολή του γονιδίου συνοδεύει την καταστολή των βιοσυνθετικών γονιδίων της τρεχαλόζης και αναδεικνύει την τοξική κατάληξη των κυττάρων.

Η μεταγραφική πορεία του γονιδίου *TOR1* (εμπλέκεται στην καταστολή των γονιδίων που σχετίζονται με το στρες, όπως της αυτοφαγίας και της βιοσύνθεσης τρεχαλόζης), εμφανίζει πτώση στην προ-εκθετική φάση ανάπτυξης παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T, γεγονός που υποδηλώνει ότι το κύτταρο βρίσκεται σε κατάσταση στρες. Στην εκθετική φάση ανάπτυξης παρουσιάζεται κάποια αύξηση του μεταγραφικού επιπέδου του γονιδίου, ενώ στην μετα-διαυξική φάση φθάνει σε πολύ υψηλό επίπεδο. Αν αυτά τα δεδομένα για το TOR αναλυθούν ανεξάρτητα από τα υπόλοιπα μεταγραφικά επίπεδα των υπό μελέτη γονιδίων, παρουσιάζουν μια μη στρεσογόνα κατάσταση για το κύτταρο, τουλάχιστον στην εκθετική και μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης. Αυτό όμως δεν συμβαδίζει ούτε με την πτώση της βιωσιμότητας των κυττάρων, ούτε με την αυξημένη μεταγραφική πορεία των γονιδίων βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης, οπότε θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως μεταγραφική απορρύθμιση εντός του κυττάρου, κατάσταση που είναι πολύ πιθανό να βρίσκεται το κύτταρο. Στη συνέχεια στη στατική φάση ανάπτυξης η μεταγραφική πτώση του γονιδίου TOR είναι κατακόρυφη,

χαρακτηριζόμενη έως και κατεσταλμένη. Οπότε το αρχικό στρες που μεταφράζεται από την μείωση της μεταγραφής του γονιδίου επανεμφανίζεται στη φάση γήρανσης.

Διερευνήθηκε, τέλος, η μεταγραφική πορεία του γονιδίου *ATG8*, το οποίο διαδραματίζει κύριο ρόλο στην επαγωγή της αυτοφαγίας στον *S. cerevisiae*. Στην εκθετική φάση ανάπτυξης το γονίδιο *ATG8* παρουσιάζει αύξηση της μεταγραφής του, ανταποκρινόμενο πιθανώς στην παρουσία της A53T που αυξάνεται. Στη συνέχεια φαίνεται ότι η τάση αυτή υποχωρεί με την περαιτέρω αύξηση της A53T, ενώ η αυτοφαγία περιορίζεται ακόμα περισσότερο στην στατική φάση ανάπτυξης. Οπότε ο αμυντικός αυτός μηχανισμός των κυττάρων έναντι των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και της συσσώρευσής τους δείχνει να καταστέλλεται στο σημείο αυτό σε μεταγραφικό επίπεδο.

Από τα αποτελέσματα της qPCR που αποτυπώνουν την πορεία της μεταγραφής των παραπάνω γονιδίων στα κύτταρα του ζυμομύκητα BY4741/*asynA53T* προκύπτουν ορισμένα συμπεράσματα. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι η μεταλλαγμένη μορφή της α -συνουκλεΐνης A53T επιβαρύνει ιδιαίτερα τα κύτταρα, περισσότερο ακόμα και από την αγρίου τύπου μορφή. (Ε. Σφήκας, διδακτορική διατριβή, 2020) Κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης τους φαίνεται ότι προσπαθούν να ανταπεξέλθουν στο έντονο στρες που υπόκεινται, ενώ στη συνέχεια αδυνατούν να συνεχίσουν σε αυτό το μοτίβο. Με την πάροδο του χρόνου, η επιβαρυντική κατάσταση πιθανώς καταστέλλει και το μηχανισμό της αυτοφαγίας, χωρίς αυτή να επηρεάζεται από το μονοπάτι TOR. Μάλιστα, τα μεταγραφικά επίπεδα του *ATG8* και του *TPS2* δεν μεταβάλλονται με το ίδιο πρότυπο και μπορεί να δηλωθεί πως η πρόσφατα περιγραφείσα σχέση των δύο μορίων παραβλάπεται από την παρουσία της α -συνουκλεΐνης (Kim et al., 2020). Κατά συνέπεια, η τοξική επίδραση της A53T έχει ως αποτέλεσμα την αποσιώπηση τόσο της βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης, όσο και της αυτοφαγίας.

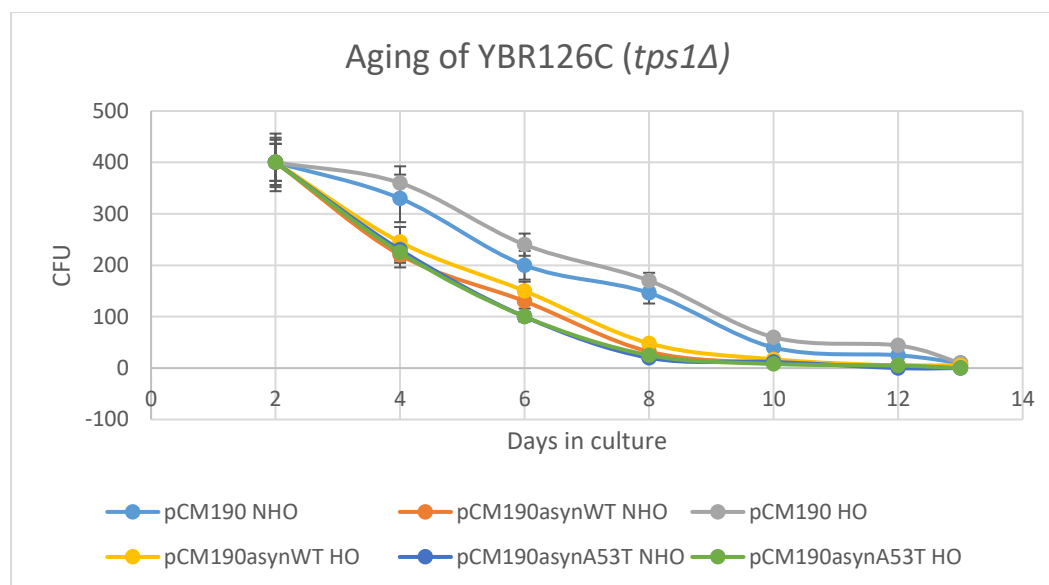
3.5 Η επίδραση της υψηλής ωσμωτικότητας στη χρονολογική γήρανση των ανασυνδυασμένων *S. cerevisiae tps1Δ / α -synA53T*

Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της τρεχαλόζης στην τοξικότητα που δημιουργεί η α -συνουκλεΐνη A53T μελετήθηκαν και παράγωγα του *S. cerevisiae* BY4741 που έφεραν μεταλλαγές στα γονίδια βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης. Θεωρείται ότι η τρεχαλόζη συμβάλλει στην αντιμετώπιση των συνθηκών στρες από τον ζυμομύκητα λόγω των ιδιοτήτων της. Κατά συνέπεια, η τοξικότητα στα εν λόγω στελέχη αναμένεται ισχυρότερη, επειδή η βιοσύνθεση της τρεχαλόζης πρόκειται να είναι ελάχιστη έως μηδαμινή λόγω της μη έκφρασης κάποιου από τα γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή της.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα χρονολογικής γήρανσης για το μεταλλαγμένο στέλεχος *S. cerevisiae* BY4741/*tps1Δ*/ α -*synA53T*, από το οποίο λείπει η ενεργότητα της συνθάσης της τρεχαλόζης, ώστε να διερευνηθεί η βιωσιμότητά του παρουσία α -συνουκλεΐνης A53T.

Η διαδικασία της χρονολογικής γήρανσης καθώς και η κατασκευή των αντίστοιχων καμπυλών περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι στην ενότητα 2.3.6. Αντιθέτως με τα κύτταρα BY4741/*asynA53T* η βιοσύνθεση της τρεχαλόζης αναμένεται ελαττωματική ελλείπει της συνθάσης της τρεχαλόζης του συμπλόκου TPS. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε το *tps1Δ* /pCM190 ως αρνητικός μάρτυρας παρουσία (HO) και απουσία (NHO) υψηλής ωσμωτικότητας. Η βιωσιμότητα των

κυττάρων παρατίθεται στην εικόνα 3.5, στην οποία έχει προστεθεί και η βιωσιμότητα παρουσία της αγρίου τύπου μορφής α -συνουκλεΐνης για συγκριτικούς λόγους.



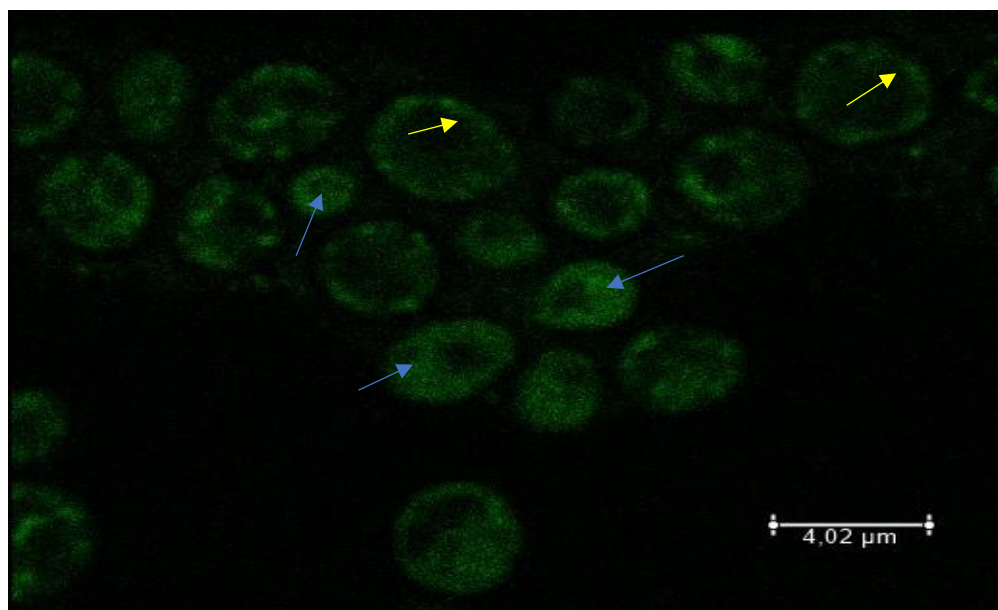
Εικόνα 3.5: Χρονολογική γήρανση του μετασηματισμένου στελέχους *tps1Δ* παρουσία HO και απουσία HO (NHO)

Το πρώτο που διαπιστώνεται είναι ότι το στέλεχος αυτό παρουσιάζει χαμηλότερη βιωσιμότητα από αυτό του αγρίου τύπου (Εικόνα 3.1), ανεξάρτητα από το αν εκφράζει ή όχι οποιαδήποτε μορφή α -συνουκλεΐνης. Από τη σύγκριση των κυτταρικών πληθυσμών *tps1Δ*/pCM190 στις δύο συνθήκες διακρίνεται μια ήπια ευεργετική δράση της HO. Όσον αφορά την βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσία α -συνουκλεΐνης τα αποτελέσματα δεν εμφανίζουν σημαντική διακύμανση. Αρχικά, σε αυτά με την αγρίου τύπου μορφή α -συνουκλεΐνης η διαφορά στη βιωσιμότητα είναι ελάχιστη, ενώ σε αυτά με την μεταλλαγμένη μορφή α -συνουκλεΐνης A53T η διαφορά βιωσιμότητας εκμηδενίζεται σε όλα τα στάδια της χρονολογικής γήρανσης. Στην σύγκριση των κυτταρικών πληθυσμών με την α -συνουκλεΐνη αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένης μορφής η διαφορά που εντοπίζεται είναι μικρή και εμφανίζεται μεταξύ της 4^{ης} και της 8^{ης} ημέρας, όπου τα κύτταρα παρουσία της μεταλλαγής εμφανίζονται πιο επιβαρυνμένα. Επίσης, η συνθήκη HO φαίνεται να διευκολύνει ελάχιστα τα κύτταρα παρουσία της αγρίου τύπου α -συνουκλεΐνης, ενώ παρουσία της μεταλλαγής της δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση. Τα αποτελέσματα αυτά αποτυπώνουν την αναγκαιότητα ύπαρξης της συνθάσης της τρεχαλόζης για την ευεργετική δράση της HO.

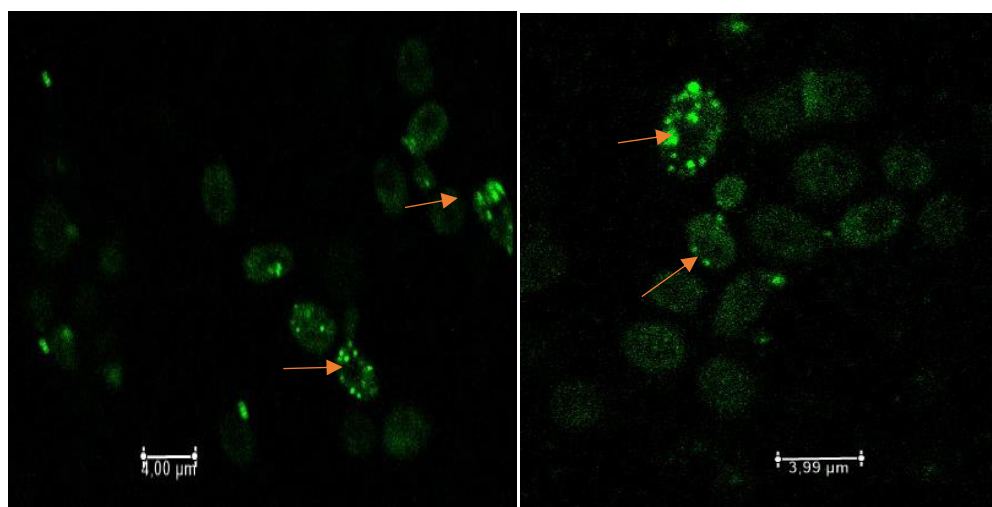
3.6 Εντοπισμός της α -συνουκλεΐνης στα κύτταρα *tps1Δ*/ α -synA53T με ανοσοφθορισμό

Η διερεύνηση της α -synA53T στο εσωτερικό των κυττάρων του ζυμομύκητα που φέρουν το αντίστοιχο γονίδιο πραγματοποιήθηκε με πειράματα ανοσοφθορισμού. Τα κύτταρα που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο είχαν αναπτυχθεί σε συνθήκη υψηλής ωσμωτικότητας. Επιλέχθηκαν δύο φάσεις ανάπτυξης για την παρατήρηση: η εκθετική φάση ($OD_{600nm}=2$), κατά την οποία δεν ανιχνεύεται τοξικότητα, και η στατική φάση που αντιστοιχεί στην κυτταρική γήρανση (όγδοη ημέρα), κατά την οποία παρατηρείται και η τοξική επίδραση. Τα αποτελέσματα από αντιπροσωπευτικές

εικόνες της συνεστιακής μικροσκοπίας στην εκθετική φάση ανάπτυξης παρουσιάζονται στην εικόνα 3.6, ενώ στη στατική φάση στην εικόνα 3.7.



Εικόνα 3.6: Εικόνα συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού της α -synA53T σε κύτταρα *tps1Δ/a-synA53T* εκθετικής φάσης ανάπτυξης (Κλίμακα 4 μm). Με το μπλε βέλος υποδεικνύονται περιοχές όπου εντοπίζεται φθορισμός στο εσωτερικό των κυττάρων, ενώ με το κίτρινο βέλος περιοχές όπου ο φθορισμός εντοπίζεται κοντά στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης.



Εικόνα 3.7: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού της α -synA53T σε κύτταρα *tps1Δ/a-synA53T* στατικής φάσης ανάπτυξης (Κλίμακα 4 μm). Με τα πορτοκαλί βέλη υποδεικνύονται περιοχές φθορισμού στο εσωτερικό του κυττάρου που μοιάζουν με κυτταροπλασματικά συσσωματώματα.

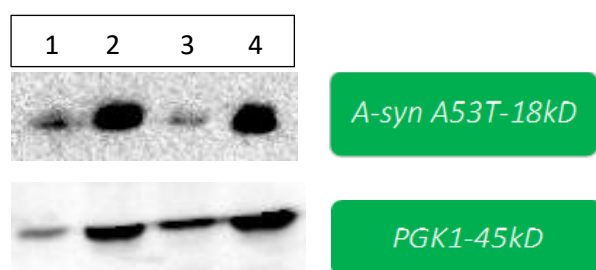
Από τις φωτογραφίες της συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού στην εκθετική φάση φαίνεται ότι η α -synA53T εντοπίζεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα, αλλά και συγκεντρωμένη στο εσωτερικό της μεμβράνης, φαίνεται δηλαδή ότι υπάρχει ένα αρχικό στάδιο τοξικότητας.

Στις φωτογραφίες της συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού στη στατική φάση της γήρανσης εντοπίζονται κυτταροπλασματικά συσσωματώματα, τα οποία

αντιστοιχούν σε τοξικό φαινόμενο, γεγονός που συμπίπτει με τον φαινότυπο της χρονολογικής γήρανσης για το συγκεκριμένο μεταλλαγμένο στέλεχος.

3.7 Ανίχνευση της παραγόμενης α-συνουκλεΐνης A53T στο μεταλλαγμένο *S. cerevisiae tps1Δ*

Η παρουσία της α-συνουκλεΐνης A53T στα κύτταρα εξακριβώθηκε με πειράματα ανοσοδοκιμασίας Western με αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα δειγμάτων των κυττάρων *tps1Δ*. Τα δείγματα αυτά ελήφθησαν από τέσσερις φάσεις ανάπτυξης: την προ-εκθετική με $OD_{600nm}=0.6$, την εκθετική με $OD_{600nm}=2$, την μετα-διαυξική μετά τις 24 πρώτες ώρες ανάπτυξης και την στατική με αρχικό όριο την όγδοη ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων ζύμης. Στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου φορτώθηκαν 100 μg ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των κυττάρων *tps1Δ/pCM190asynA53T* από κάθε φάση ανάπτυξης. Τα δείγματα της πηκτής μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF και ακολούθησε ανοσοδοκιμασία Western με αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης (18 kD). Για τη διαπίστωση της ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης PGK1 (45 kD) η οποία εκφράζεται σταθερά και σε υψηλό επίπεδο στον ζυμομύκητα σε όλες τις φάσεις ανάπτυξής του. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αποτυπώνονται στην εικόνα 3.8.



Εικόνα 3.8: Ανοσοαποτύπωση Western για τον εντοπισμό της α-συνουκλεΐνης A53T και του μάρτυρα ισοφόρτωσης PGK1 στα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα του *tps1Δ /α-synA53T*. Φορτώθηκαν 100 μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.
Διαδρομή 1: Ολικές πρωτεΐνες *tps1Δ /pCM190α-synA53T-PE*
Διαδρομή 2: Ολικές πρωτεΐνες *tps1Δ /pCM190asyn A53T-EXP*
Διαδρομή 3: Ολικές πρωτεΐνες *tps1Δ /pCM190asynA53T-PD*
Διαδρομή 4: Ολικές πρωτεΐνες *tps1Δ /pCM190asynA53T-ST*

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται αρχικά ότι η ισοφόρτωση των δειγμάτων ήταν σχετικά ικανοποιητική. Η A53T συσσωρεύεται νωρίς στα κύτταρα *tps1Δ* συγκριτικά με τα επίπεδα έκφρασης στο στέλεχος αγρίου τύπου BY4741 (εικόνα 3.7). Το αυξημένο επίπεδο από τις πρώτες δύο φάσεις ανάπτυξης έως και την στατική δικαιολογεί τον επιβαρυνόμενο φαινότυπο των κυττάρων αυτών που εμφανίζεται στις καμπύλες βιωσιμότητας. Η εικόνα μιας πρόωρης γήρανσης από την έκτη ημέρα ανάπτυξης των κυττάρων μπορεί να αποτελεί και άμεσο αποτέλεσμα της συσσώρευσης αυτής.

3.8 Μελέτη του επιπέδου μεταγραφής των γονιδίων *TPS2*, *TSL1*, *ATG8* και *TOR1* στα κύτταρα *S. cerevisiae tps1Δ/α-synA53T* σε πραγματικό χρόνο (qPCR)

Η μελέτη του επιπέδου μεταγραφής των ανωτέρω γονιδίων πραγματοποιήθηκε με πειράματα qPCR, ώστε να διερευνηθεί η έκφρασή τους σε συνδυασμό με την παρουσία της α-συνουκλεΐνης A53T στα κύτταρα του *tps1Δ/α-synA53T*. Τα πειράματα qPCR πραγματοποιήθηκαν και αναλύθηκαν όπως αναφέρεται στην ενότητα Υλικά & Μέθοδοι 2.3.10 καθώς και στην παράγραφο 3.4 της παρούσας ενότητας με τις ίδιες συνθήκες και μεθοδολογίες.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση της μεταγραφικής κατάστασης των γονιδίων για κάθε φάση ανάπτυξης ξεχωριστά με συνθήκη βαθμονόμησης τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων στα κύτταρα *tps1Δ/pCM190* της προ-εκθετικής φάσης. Ύστερα πραγματοποιήθηκε ανάλυση με συνθήκη βαθμονόμησης την αντίστοιχη φάση της συνθήκη μελέτης για μια διαφορετική προσέγγιση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα των προσεγγίσεων βρίσκονται στον πίνακα 3.3 και 3.4.

Πίνακας 3.3: qPCR για τα μετάγραφα των *TPS2*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *tps1Δ/A53T*. Συνθήκη βαθμονόμησης: επίπεδο έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα *tps1Δ/pCM190* της προεκθετικής φάσης ανάπτυξης. Συνθήκη μελέτης: επίπεδο έκφρασης στα κύτταρα *tps1Δ/pCM190 αsynA53T* στις τέσσερις μελετώμενες φάσεις ανάπτυξης (άκρη αριστερά του πίνακα). Mean: Μέσος όρος της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. PE: προ-εκθετική φάση. EXP: εκθετική φάση. PD: μετα-διαυξική φάση. ST: στατική φάση.

| <i>TPS2</i> | | | | | | |
|----------------|------|-----------|-------------|-----------|-------------|-------------|
| Vector control | | | | α-synA53T | | |
| | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | Pvalue |
| PE/PE | 1,00 | 0,92-1,08 | 1 | 0,34 | 0,34-0,35 | 0,00279 |
| EXP/PE | 0,89 | 0,88-0,90 | 0,010281 | 2,94 | 2,89-3,0 | 0,07397602 |
| PD/PE | 3,04 | 2,99-3,11 | 4,26016E-05 | 0,30 | 0,29-0,31 | 3,44941E-05 |
| ST/PE | 1,66 | 1,64-1,67 | 0,037347136 | 0,622 | 0,621-0,626 | 0,033868347 |

| <i>TSL1</i> | | | | | | |
|----------------|-------|-------------|-------------|-----------|-----------|------------|
| Vector control | | | | α-synA53T | | |
| | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | P value |
| PE/PE | 1,00 | 0,96-1,04 | 1 | 0,27 | 0,25-0,29 | 0,00196938 |
| EXP/PE | 1,92 | 1,73-2,13 | 0,180207608 | 0,93 | 0,92-1 | 0,809593 |
| PD/PE | 12,58 | 12,00-13,22 | 5,91422E-10 | 1,30 | 1,24-1,30 | 0,607053 |
| ST/PE | 7,20 | 6,96-7,52 | 3,12408E-08 | 1,55 | 1,53-1,55 | 0,105063 |

| <i>ATG8</i> | | | | | | |
|----------------|-------|-------------|-------------|-------------------|-----------|------------|
| Vector control | | | | α -synA53T | | |
| | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | P value |
| PE/PE | 1,00 | 0,95-1,04 | 1 | 0,5 | 0,49-0,51 | 0,038047 |
| EXP/PE | 0,80 | 0,68-0,94 | 0,769401 | 0,8 | 0,69-0,95 | 0,736899 |
| PD/PE | 35,13 | 32,48-38,00 | 2,16856E-05 | 4,06 | 3,85-4,27 | 0,005186 |
| ST/PE | 11,06 | 9,69-12,60 | 0,000367 | 5,17 | 5,92-5,45 | 2,5088E-05 |

| <i>TOR1</i> | | | | | | |
|----------------|------|------------|-------------|-----------|-----------|----------|
| Vector control | | | | A-synA53T | | |
| | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | P value |
| PE/PE | 1,00 | 0,952-1,05 | 1 | 1,00 | 0,94-1,05 | 0,093868 |
| EXP/PE | 1,28 | 1,26-1,33 | 0,017082 | 1,14 | 1,13-1,16 | 0,326101 |
| PD/PE | 3,97 | 3,75-4,24 | 3,84262E-07 | 0,81 | 0,8-0,81 | 0,666567 |
| ST/PE | 5,20 | 4,79-5,65 | 5,95603E-08 | 5,18 | 5,1-5,2 | 0,000236 |

Πίνακας 3.4: qPCR για τα μετάγραφα των *TPS2*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *tps1Δ/A53T*. Συνθήκη βαθμονόμησης: επίπεδο έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα *tps1Δ/pCM190* των αντίστοιχων φάσεων. Συνθήκη μελέτης: επίπεδο έκφρασης στα κύτταρα *tps1Δ/pCM190* α synA53T στις τέσσερις μελετώμενες φάσεις ανάπτυξης (άκρη αριστερά του πίνακα). Mean: Μέσος όρος της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. PE: προ-εκθετική φάση. EXP: εκθετική φάση. PD: μετα-διαυξική φάση. ST: στατική φάση.

| Αναλογία = <i>tps1Δ</i> Παρουσία α -synA53T / <i>tps1Δ</i> Απουσία α -synA53T | | | | | | |
|---|-------------|-----------|-------------|-------------|-----------|------------|
| | <i>TPS2</i> | | | <i>TSL1</i> | | |
| | Mean | R.V. | P value | Mean | R.V. | P value |
| PE | 0,34 | 0,34-0,35 | 0,00279 | 0,27 | 0,25-0,29 | 0,00196938 |
| EXP | 4,14 | 4,05-4,24 | 0,012146578 | 0,5 | 0,43-0,59 | 0,189373 |
| PD | 0,1 | 0,1-0,1 | 1,91204E-06 | 0,27 | 0,25-0,28 | 0,00143969 |
| ST | 0,36 | 0,36-0,37 | 0,000992745 | 0,21 | 0,21-0,21 | 1,3646E-05 |

| Αναλογία = <i>tps1Δ</i> Παρουσία α -synA53T / <i>tps1Δ</i> Απουσία α -synA53T | | | | | | |
|---|-------------|-----------|----------|-------------|-----------|-------------|
| | <i>TOR1</i> | | | <i>ATG8</i> | | |
| | Mean | R.V. | P value | Mean | R.V. | P value |
| PE | 1 | 0,94-1,05 | 0,093868 | 0,5 | 0,49-0,51 | 0,038047 |
| EXP | 0,77 | 0,73-1,06 | 0,007726 | 1,18 | 1,02-1,37 | 0,89612 |
| PD | 0,2 | 0,2-0,28 | 0,004203 | 0,11 | 0,1-0,12 | 5,35954E-06 |
| ST | 1,56 | 1,51-1,62 | 0,526267 | 0,5 | 0,49-0,5 | 0,049833 |

Και οι δυο παραπάνω συγκριτικές αναλύσεις αποτελούν την διαφορετική όψη του ίδιου νομίσματος, με την πρώτη να αποδίδει περισσότερο την τάση μεταγραφής και την δεύτερη την μεταγραφική κατάσταση συγκριτικά φάση προς φάση. Στην πρώτη γίνεται συγκριτική ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ των κυττάρων με την προ-εκθετική φάση των κυττάρων *tps1Δ/pCM190* ενώ στη δεύτερη με την αντίστοιχη φάση ανάπτυξης.

Αφενός, παρατηρείται μεταγραφική καταστολή του *TPS2* παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T σχεδόν σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης με εξαίρεση αυτή της εκθετικής. Προ-εκθετικά η μεταγραφή του κυμαίνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, όπως και στην μετα-διαυξική και στατική φάση ανάπτυξης όπου παρατηρείται η έναρξη βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης σε φυσιολογικές συνθήκες. Αντιθέτως η εκθετική φάση ανάπτυξης μοιάζει να είναι η μόνη κατά την οποία παρατηρείται αύξηση της μεταγραφής του μεταφραζόμενη ως απόκριση προς την παραγωγή τρεχαλόζης, ώστε να αντιμετωπιστεί η στρεσογόνο κατάσταση. Το μεταγραφικό επίπεδο του *TSL1*, αφετέρου, το οποίο διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο για την ενεργοποίηση του συμπλόκου, υπόκειται σε ακόμα μεγαλύτερη μείωση. Παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T είναι αισθητά χαμηλότερο σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης συγκριτικά με αυτό απουσία α -συνουκλεΐνης A53T, ενώ στην μετα-διαυξική και στατική φάση ανάπτυξης η μεταγραφή του γονιδίου είναι σημαντικά κατεσταλμένη. Η κατάσταση αυτή συμπληρώνει σε μεγάλο βαθμό τη γενικότερη εικόνα που λαμβάνεται για τον υπολειπόμενο μεταβολισμό της τρεχαλόζης σε μεταγραφικό επίπεδο αναδεικνύοντας την ιδιαίτερη κατασταλτική επίδραση της μεταλλαγμένης μορφής της α -συνουκλεΐνης έναντι των κυττάρων απουσία α -συνουκλεΐνης A53T. Ενδεχομένως, η απουσία του γονιδίου *TPS1*, το προϊόν του οποίου συνθέτει την φωσφοτρεχαλόζη που αποτελεί το υπόστρωμα για την ενεργότητα του *TPS2*, σε συνδυασμό με την τοξικότητα της A53T, να οδηγεί στην παραπάνω κατασταλτική εικόνα μεταγραφικά.

Το γονίδιο *ATG8*, κομβικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας, υπολείπεται μεταγραφικά σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T. Πρόκειται για μια αναμενόμενη κατάσταση με βάση τα κατασταλτικά φαινόμενα στην μεταγραφή που ασκεί η συνεχής και υψηλή έκφραση της α -συνουκλεΐνης, και περισσότερο ακόμα η πιο τοξική μεταλλαγή της A53T.

Τέλος, το μεταγραφικό επίπεδο του *TOR1* αποτυπώνεται κατά κάποιον τρόπο διαφορούμενο, διότι δεν φαίνεται να επηρεάζεται τόσο στην προ-εκθετική όσο και στην εκθετική φάση ανάπτυξης, παρόλο το υψηλό στρες λόγω της απουσίας της Trp1p και της παρουσίας της α -συνουκλεΐνης A53T. Στη συνέχεια όμως, στην μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης παρατηρείται καταστολή ως ενδεχόμενη απόρροια της τοξικότητας στο κύτταρο, ενώ στην στατική φάση παρουσιάζεται σε ισορροπία με την συνθήκη-μάρτυρα. Πρόκειται για διακυμάνσεις οι οποίες αναδεικνύουν ήπιες μεταβολές στο μεταβολικό μονοπάτι ανεξάρτητες από τους παράγοντες στρες που αναφέρθηκαν.

Συνοψίζοντας, τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν την περαιτέρω τοξικότητα σε μεγάλο βαθμό της α -συνουκλεΐνης A53T έναντι των κυττάρων απουσία α -συνουκλεΐνης και κατά πόσο επηρεάζει κατασταλτικά την μεταγραφή των υπολειπόμενων γονιδίων του μεταβολισμού της τρεχαλόζης, υπό την ταυτόχρονη απουσία της συνθάσης της τρεχαλόζης. Ακόμα, η αυτοφαγία φαίνεται πλήρως κατεσταλμένη στα κύτταρα *tps1Δ* παρουσία της συγκεκριμένης μεταλλαγής, ενώ οι μεταβολές των μεταγραφικών επιπέδων του *ATG8* δεν έρχονται σε συμφωνία με αυτές στο *TOR1*, φαινόμενο που μεταφράζεται ως αλλοίωση στην γνωστή σχέση των μοριακών μονοπατιών.

Συμπληρωματικά της παραπάνω ανάλυσης των αποτελεσμάτων της qPCR για το μεταγραφικό προφίλ των κυττάρων *tps1Δ*, κρίθηκε απαραίτητη η σύγκρισή τους με αυτό των κυττάρων αγρίου τύπου BY4741. Με αυτό τον τρόπο θα υπήρχε μια πιο σφαιρική εικόνα για την μεταγραφική ρύθμισή των παραπάνω γονιδίων τόσο στην

απουσία της συνθάσης της τρεχαλόζης όσο και στην ταυτόχρονη παρουσία της α-συνουκλείνης A53T.

Αρχικά στον πίνακα 3.5 παρατίθεται η ανάλυση της μεταγραφικής κατάστασης για κάθε φάση ανάπτυξης ξεχωριστά με συνθήκη βαθμονόμησης το επίπεδο μεταγραφής των γονιδίων στα κύτταρα BY4741/pCM190 και συνθήκη μελέτης τα μεταγραφικά επίπεδα στα κύτταρα *tps1Δ*/pCM190 στις τέσσερις μελετώμενες φάσεις ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών αναδεικνύουν τις μεταβολές που προκαλούνται στο προφίλ έκφρασης των γονιδίων αποκλειστικά από την απουσία της συνθάσης της τρεχαλόζης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μία κατάσταση-μάρτυρας για την μελέτη της επίδρασης της α-συνουκλείνης A53T απουσία της τρεχαλόζης. Οι αναλύσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής Σφήκας Ε., 2020 και αναδημοσιεύονται εδώ με άδεια του συγγραφέα στον πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5: qPCR για τα μετάγραφα των *TPS2*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των *tps1Δ* και BY4741. Συνθήκη μελέτης: η εκάστοτε φάση ανάπτυξης των *tps1Δ*. Συνθήκη βαθμονόμησης: η αντίστοιχη φάση ανάπτυξης των κυττάρων BY4741. Η φάση ανάπτυξης δίνεται στην άκρη αριστερά του πίνακα. Mean: Μέσος όρος της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. PE: προ-εκθετική φάση. EXP: εκθετική φάση. PD: μετα-διαυξική φάση. ST: στατική φάση.

| Αναλογία=Απουσία <i>TPS1</i> /Παρουσία <i>TPS1</i> | | | | | | |
|--|-------------|-----------|-------------|-------------|-----------|-------------|
| | <i>TPS2</i> | | | <i>TSL1</i> | | |
| | Mean | R.V. | P value | Mean | R.V. | P value |
| PE | 1,35 | 1,19-1,52 | 1,39069E-06 | 2,67 | 2,45-3,15 | 0,002737261 |
| EXP | 4,60 | 4,49-4,72 | 3,69745E-07 | 1,32 | 1,11-1,36 | 0,047238332 |
| PD | 2,00 | 1,66-2,51 | 0,184637728 | 2,08 | 2,05-2,10 | 0,000732495 |
| ST | 1,19 | 1,18-1,23 | 0,732501933 | 2,43 | 2,42-2,46 | 0,186778502 |

| Αναλογία=Απουσία <i>TPS1</i> /Παρουσία <i>TPS1</i> | | | | | | |
|--|-------------|-----------|-------------|-------------|-----------|-------------|
| | <i>TOR1</i> | | | <i>ATG8</i> | | |
| | Mean | R.V. | P Value | Mean | R.V. | P value |
| PE | 0,98 | 0,89-1,07 | 0,651286562 | 0,37 | 0,36-0,53 | 0,002597503 |
| EXP | 1,92 | 1,87-1,97 | 0,010825501 | 4,32 | 3,10-4,61 | 0,386174843 |
| PD | 2,03 | 1,59-2,46 | 0,035843895 | 1,84 | 1,59-2,13 | 0,202539384 |
| ST | 5,92 | 5,77-6,08 | 0,375694418 | 2,10 | 1,86-2,48 | 0,000472777 |

Έπειτα πραγματοποιήθηκε για κάθε φάση ξεχωριστά η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης με συνθήκη βαθμονόμησης τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα BY4741/pCM190 και συνθήκη μελέτης τα επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα *tps1Δ*/pCM190asynA53T στις τέσσερις μελετώμενες φάσεις ανάπτυξης. Με τον τρόπο αυτό μελετάται η επίδραση της απουσίας της τρεχαλόζης από τα κύτταρα μαζί με την ταυτόχρονη παρουσία της α-συνουκλείνης A53T στο προφίλ της μεταγραφής των μελετώμενων γονιδίων συγκριτικά με τα αγρίου τύπου κύτταρα.

Πίνακας 3.6: qPCR για τα μετάγραφα των *TPS2*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των *tps1Δ*/pCM190asynA53T και BY4741/pCM190. Συνθήκη μελέτης: η εκάστοτε φάση ανάπτυξης των *tps1Δ*/pCM190asynA53T. Συνθήκη βαθμονόμησης: η αντίστοιχη φάση ανάπτυξης των κυττάρων BY4741/pCM190. Η φάση ανάπτυξης δίνεται στην άκρη αριστερά του πίνακα. Mean: Μέσος όρος της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των

εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. PE: προ-εκθετική φάση. EXP: εκθετική φάση. PD: μετα-διαυξική φάση. ST: στατική φάση.

| Αναλογία=Απουσία <i>TPS1</i> και Παρουσία <i>SNCA A53T</i> /Παρουσία <i>TPS1</i> | | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|------------|
| | <i>TPS2</i> | | | <i>TSL1</i> | | |
| | Mean | R.V. | P value | Mean | R.V. | P value |
| PE | 2,01 | 1,90-2,11 | 0,095446039 | 1,19 | 1,01-1,40 | 0,28497607 |
| EXP | 15,47 | 15,38-15,82 | 0,000331175 | 1,36 | 1,31-1,42 | 0,31224554 |
| PD | 0,21 | 0,19-0,27 | 0,000246484 | 0,21 | 0,21-0,22 | 0,01784008 |
| ST | 0,42 | 0,42-0,42 | 6,58268E-06 | 0,53 | 0,50-0,58 | 4,9813E-07 |

| Αναλογία=Απουσία <i>TPS1</i> και Παρουσία <i>SNCA A53T</i> /Παρουσία <i>TPS1</i> | | | | | | |
|--|-------------|-----------|----------|-------------|-------------|------------|
| | <i>TOR1</i> | | | <i>ATG8</i> | | |
| | Mean | R.V. | P value | Mean | R.V. | P value |
| PE | 0,63 | 0,60-0,67 | 0,138507 | 0,185 | 0,180-0,187 | 0,040612 |
| EXP | 0,95 | 0,94-0,96 | 0,654052 | 5,12 | 4,84-5,43 | 0,199127 |
| PD | 0,41 | 0,37-0,46 | 0,148678 | 0,212 | 0,210-0,217 | 0,003235 |
| ST | 0,64 | 0,64-0,65 | 0,001609 | 0,053 | 0,051-0,058 | 0,00049783 |

Με την χρήση των παραπάνω δύο αναλύσεων, αποτυπώνονται κάποια σημαντικά στοιχεία σχετικά με την μεταγραφική κατάσταση των κυττάρων απουσία τρεχαλόζης και παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T.

Αρχικά σχετικά με την φωσφατάση της τρεχαλόζης και το γονίδιο *TPS2* μπορεί να παρατηρήσει κανείς ότι παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T τα μεταγραφικά επίπεδα του στην προ-εκθετική και εκθετική φάση ανάπτυξης φέρονται αυξημένα ενώ στην μετα-διαυξική και στατική φάση η εικόνα αυτή αντιστρέφεται. Ιδιαίτερη αύξηση μεταγραφικά παρουσιάζεται στην εκθετική φάση, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως απόκριση των κυττάρων να ενεργοποιήσουν τον υπολειπόμενο μεταβολισμό της τρεχαλόζης ως απάντηση στο στρες που προκαλείται από την παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T. Στις αιώτερες φάσεις ανάπτυξης αυτή η μεταγραφική ενίσχυση παύει να υφίσταται και παρατηρείται σημαντική καταστολή των επιπέδων μεταγραφής της φωσφατάσης της τρεχαλόζης, πιθανό αποτέλεσμα της τοξικής κατάληξης των κυττάρων.

Όσον αφορά το γονίδιο *TSL1* το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση ολόκληρου του συμπλόκου TPS και το ρυθμιστικό μόριο της συνθάσης της τρεχαλόζης *Trp1p*, φαίνεται να ακολουθεί το μοτίβο μεταγραφής του *TPS2*. Πιο συγκεκριμένα, στον πίνακα 3.5 απουσία της α -συνουκλεΐνης A53T τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *TSL1* απουσία της συνθάσης της τρεχαλόζης παρατηρούνται σταθερά αυξημένα. Κάτι τέτοιο δεν σημειώνεται παρουσία της μεταλλαγής της α -συνουκλεΐνης. Συγκριτικά η μεταγραφή του γονιδίου μειώνεται τόσο στην προ-εκθετική όσο και στην εκθετική φάση ανάπτυξης ενώ στην μετα-διαυξική και στατική φάση ανάπτυξης σχεδόν εκμηδενίζεται, πιθανώς λόγω της τοξικότητας που έχει εγκατασταθεί στον πληθυσμό *tps1Δ/pCM190asynA53T*.

Αναφορικά τώρα με το μεταγραφικό επίπεδο του γονιδίου *TOR* αυτό που φαίνεται είναι ότι η ενεργοποιημένη μεταγραφική κατάσταση απουσία της *SNCA A53T* καταστέλλεται παρουσία της. Πρόκειται για ένα γονίδιο που καταστέλλεται σε συνθήκες στρες και αυτό επιβεβαιώνεται και στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης. Η

καταστολή αυτή παρουσία του γονιδίου *SNCA A53T* μπορεί να ερμηνευτεί ως αποτέλεσμα ενδοκυττάριου στρες και ενεργοποίησης της απόκρισης στο στρες, ενώ αποτελεί ακόμα μια ένδειξη της σημαντικής τοξικότητας της συγκεκριμένης μεταλλαγής.

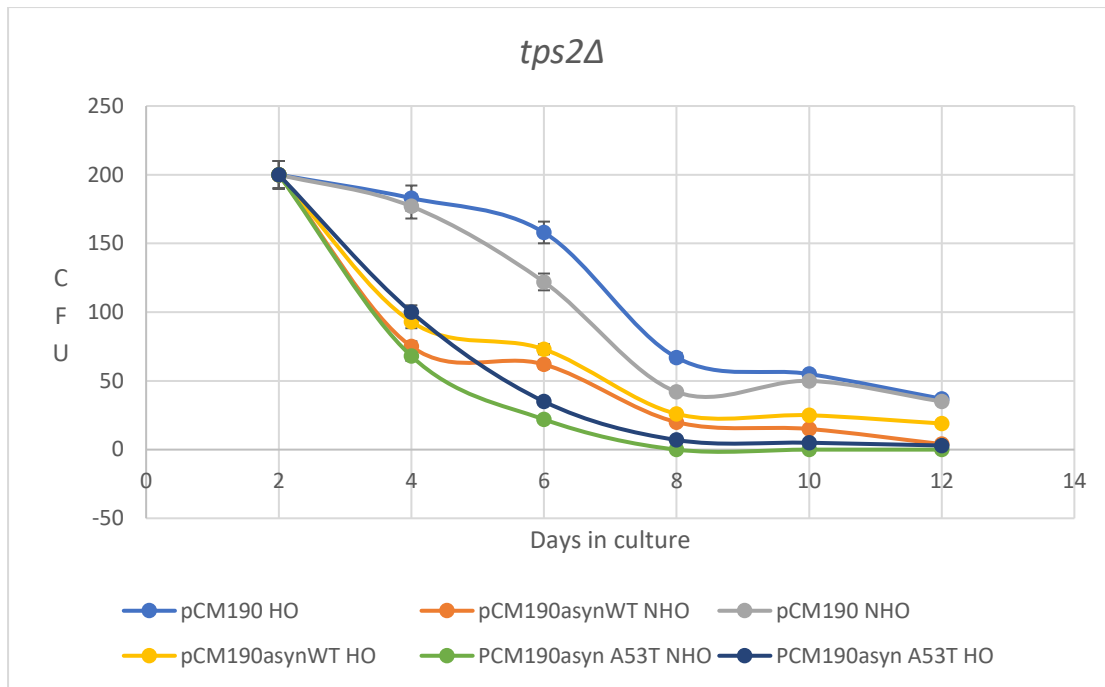
Περνώντας στο τελευταίο γονίδιο μελέτης *ATG8*, και κομβικό επαγωγέα για την διαδικασία της αυτοφαγίας η ανάλυση και εδώ επιβεβαιώνει την παραπάνω εικόνα που έχει διαμορφωθεί στα κύτταρα παρουσία της *SNCA A53T*. Η μεταγραφή του φέρεται αυξημένη μόνο στην εκθετική φάση ανάπτυξης ενώ σε όλες τις υπόλοιπες κατεσταλμένη. Πρόκειται για ένα σημαντικό εύρημα αφού απουσία τρεχαλόζης και *SNCA A53T* το γονίδιο παρουσιάζεται μεταγραφικά αυξημένο ενώ στα κύτταρα *tps1Δ/pCM190asynA53T* όπου η συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών παρατηρείται αυξημένη, αδυνατεί να ενεργοποιηθεί μεταγραφικά.

Συνοψίζοντας, σε αυτή την ανάλυση και σύγκριση σε μεταγραφικό επίπεδο για το στέλεχος *tps1Δ* και το αντίστοιχο αγρίου τύπου εξάγονται κάποια χρήσιμα συμπεράσματα. Χρησιμοποιώντας τον πίνακα 3.5 ως βάση της ανάλυσης φαίνεται πως η απουσία τρεχαλόζης με παράλληλη έκφραση της *SNCA A53T* επιβαρύνει σε μεγάλο βαθμό τα κύτταρα. Η μεταγραφική ενεργοποίηση του υπολειπόμενου μεταβολισμού της τρεχαλόζης και το πρώτο ερέθισμα για σχηματισμό του συμπλόκου TPS μέσω του *TSL1* φθίνει και μετά την εκθετική φάση σχεδόν χάνεται. Παρά την καταστολή του μονοπατιού *TOR* σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης το κρίσιμο γονίδιο για την επαγωγή της αυτοφαγίας *ATG8* παραμένει ενεργό μόνο κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης. Σε αυτό το σημείο εντοπίζεται και πιθανή μεταγραφική απορρύθμιση παρουσία της *SNCA A53T* αλλοιώνοντας τη μεταξύ τους σχέση. Μάλιστα, όλα τα παραπάνω δείχνουν και την αδυναμία της συνθήκης HO να εγκαταστήσει έναν πιο ήπιο φαινότυπο απουσία του γονιδίου *TPS1* και παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T, όπως φαίνεται να τον εγκαθιστά στα κύτταρα αγρίου τύπου.

3.9 Η επίδραση της υψηλής ωσμωτικότητας στη χρονολογική γήρανση του ανασυνδυασμένου μεταλλαγμένου *S.cerevisiae tps2Δ/α-synA53T*

Στην συνέχεια ακολούθησε η μελέτη της χρονολογικής γήρανσης του μεταλλαγμένου στελέχους *S. cerevisiae tps2Δ/α-synA53T*, από το οποίο απουσιάζει η ενεργότητα της φωσφατάσης της τρεχαλόζης, ώστε να διερευνηθεί η βιωσιμότητά του παρουσία α -συνουκλεΐνης A53T. Η τοξικότητα στο εν λόγω στέλεχος αναμένεται ακόμα υψηλότερη, αφού εκτός από την συσσώρευση της μεταλλαγμένης α -συνουκλεΐνης, απουσία του *Trp2p* συσσωρεύεται πιθανώς στο εσωτερικό των κυττάρων κάποια ποσότητα 6-φωσφοτρεχαλόζης που έχει αναφερθεί ως τοξική για τα κύτταρα.

Η διαδικασία της χρονολογικής γήρανσης καθώς και η κατασκευή των αντίστοιχων καμπυλών περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι 2.3.6. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *tps2Δ/pCM190* ως αρνητικός μάρτυρας παρουσία (HO) και απουσία (NHO) υψηλής ωσμωτικότητας. Η βιωσιμότητα των κυττάρων παρατίθενται στην εικόνα 3.9, στην οποία έχει προστεθεί και η βιωσιμότητα παρουσία της αγρίου τύπου μορφής α -συνουκλεΐνης για συγκριτικούς λόγους.

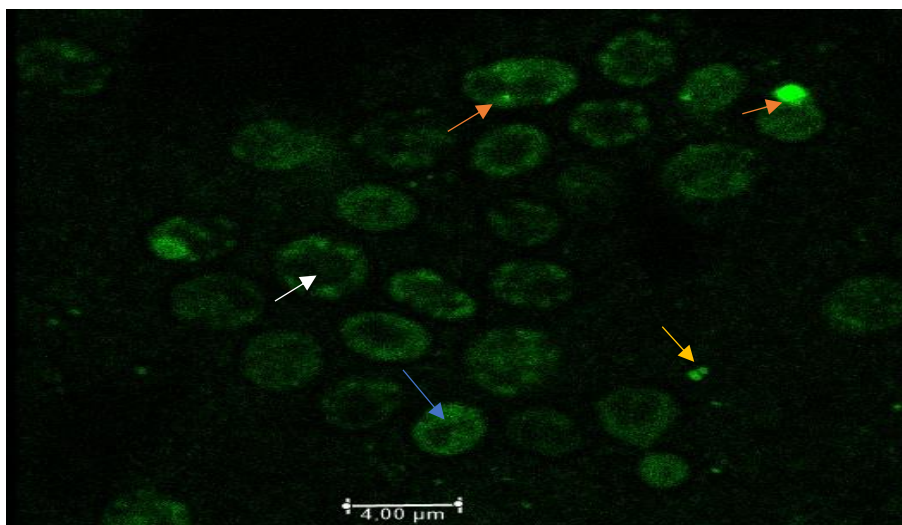


Εικόνα 3.9: Χρονολογική γήρανση του μετασχηματισμένου στελέχους *tps2Δ* παρουσία HO και απουσία HO (NHO)

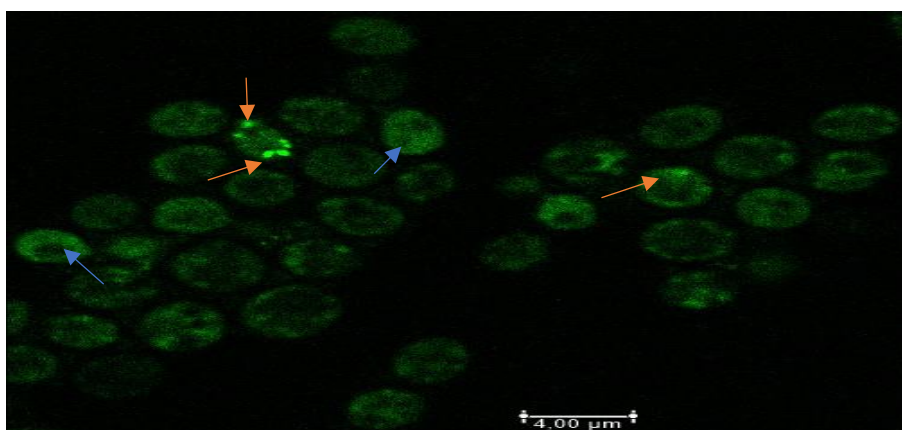
Από τη σύγκριση των κυτταρικών πληθυσμών φαίνεται ότι η παρουσία της α -συνουκλεΐνης (αγρίου τύπου ή A53T) προκαλεί ιδιαίτερη πτώση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με την βιωσιμότητα των κυττάρων που δεν την φέρουν. Η παρουσία της συνθήκης HO δείχνει να έχει μικρή ευεργετική δράση κυρίως μεταξύ της 4^{ης} και 8^{ης} ημέρας της μετα-διαυξικής φάση ανάπτυξης. Εντούτοις, όπως παρατηρήθηκε και στο μεταλλαγμένο στέλεχος *tps1Δ*, η ευεργετική δράση της υψηλής ωσμωτικότητας φαίνεται να μην προκαλεί ιδιαίτερη διαφορά στη βιωσιμότητα των κυτταρικών πληθυσμών που φέρουν οποιαδήποτε μορφή της α -συνουκλεΐνης. Η συνθήκη HO φαίνεται να επιδρά ευεργετικά σε μικρό βαθμό έως την 6^η ημέρα, ενώ στη συνέχεια παρουσία οποιασδήποτε μορφής α -συνουκλεΐνης οι πληθυσμοί εξισώνονται σε βιωσιμότητα στις δύο συνθήκες που επικρατούν. Φαίνεται λοιπόν πως η παρουσία της φωσφατάσης της τρεχαλόζης αποτελεί επίσης σημαντική παράμετρο για την ευεργετική επίδραση της HO παρουσία της α -συνουκλεΐνης αγρίου τύπου και μεταλλαγής.

3.10 Εντοπισμός της α -συνουκλεΐνης στα κύτταρα *tps2Δ*/ α -synA53T με ανοσοφθορισμό

Η διερεύνηση της α -syn A53T στο εσωτερικό των κυττάρων του ζυμομύκητα που φέρουν το αντίστοιχο γονίδιο πραγματοποιήθηκε με πειράματα ανοσοφθορισμού. Τα κύτταρα που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο είχαν αναπτυχθεί σε συνθήκη υψηλής ωσμωτικότητας. Επιλέχθηκαν δύο φάσεις ανάπτυξης για την παρατήρηση: η εκθετική φάση ($OD_{600nm}=2$), κατά την οποία δεν ανιχνεύεται τοξικότητα, και η στατική φάση που αντιστοιχεί στην κυτταρική γήρανση (όγδοη ημέρα), κατά την οποία παρατηρείται και η τοξική επίδραση. Τα αποτελέσματα από αντιπροσωπευτικές εικόνες της συνεστιακής μικροσκοπίας στην εκθετική φάση ανάπτυξης παρουσιάζονται στην εικόνα 3.10, ενώ στη στατική φάση στην εικόνα 3.11.



Εικόνα 3.10: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού της α -synA53T σε κύτταρα *tps2Δ/a-synA53T* εκθετικής φάσης ανάπτυξης (Κλίμακα 4 μ m). Με το μπλε βέλος υποδεικνύονται περιοχές όπου παρατηρείται φθορισμός στο εσωτερικό του κυττάρου, με το λευκό βέλος περιοχές όπου ο φθορισμός εντοπίζεται κοντά στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης, ενώ με πορτοκαλί βέλος υποδεικνύονται περιοχές φθορισμού στο εσωτερικό του κυττάρου που μοιάζουν με κυτταροπλασματικά συσσωματώματα.



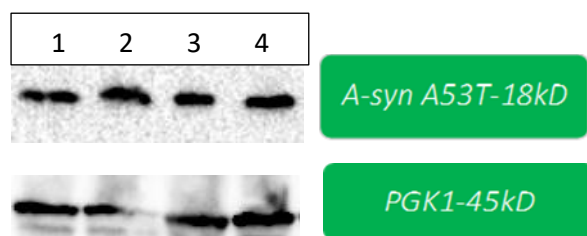
Εικόνα 3.11: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού της α -synA53T σε κύτταρα *tps2Δ/a-synA53T* στατικής φάσης ανάπτυξης (Κλίμακα 4 μ m). Με το μπλε βέλος υποδεικνύονται περιοχές όπου παρατηρείται φθορισμός στο εσωτερικό του κυττάρου, ενώ με πορτοκαλί βέλος υποδεικνύονται περιοχές φθορισμού στο εσωτερικό του κυττάρου που μοιάζουν με κυτταροπλασματικά συσσωματώματα. Σε όλες τις εικόνες παρατηρούνται κυτταροπλασματικά συσσωματώματα.

Από τις φωτογραφίες της συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού παρατηρείται μικτός φαινότυπος εντοπισμού της μεταλλαγμένης α -συνουκλεΐνης A53T στην εκθετική φάση ανάπτυξης με κυτταροπλασματική και μεμβρανική κατανομή αλλά και παρουσία συσσωματωμάτων (Εικόνα 3.10). Στη στατική φάση αυτή η εικόνα φαίνεται να διατηρείται και να ενισχύεται με την εμφάνιση πολλαπλών έντονων περιοχών φθορισμού στο εσωτερικό των κυττάρων που υποδηλώνουν συσσωμάτωση της α -synA53T. Τα στοιχεία αυτά παραπέμπουν σε φαινόμενα τοξικότητας που εμφανίζονται από νωρίς για το στέλεχος *tps2Δ* και διατηρούνται έως την στατική φάση ανάπτυξης με ακόμα μεγαλύτερη τοξική επίδραση.

Τα αποτελέσματα αυτά για το στέλεχος *tps2Δ* συμβαδίζουν με το φαινότυπο της χρονολογικής γήρανσης όπου η βιωσιμότητα του στελέχους είναι εμφανώς μειωμένη σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Ακόμα και η εφαρμογή της συνθήκης HO δεν φαίνεται να βοηθά το κύτταρο να ανταπεξέλθει στην τοξικότητα, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση για την σημαντικότητα της ενεργότητας φωσφατάσης της τρεχαλόζης για την ευεργετική δράση της συνθήκης.

3.11 Ανίχνευση της παραγόμενης α-συνουκλεΐνης A53T στο μεταλλαγμένο *S. cerevisiae tps2Δ*

Η έκφραση της α-συνουκλεΐνης A53T στα κύτταρα εξακριβώθηκε με πειράματα ανοσοδοκιμασίας Western με αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα δειγμάτων των κυττάρων *tps2Δ*. Τα δείγματα αυτά ελήφθησαν από τέσσερις φάσεις ανάπτυξης: την προ-εκθετική με $OD_{600nm}=0.6$, την εκθετική με $OD_{600nm}=2$, την μετα-διαυξική μετά τις 24 πρώτες ώρες ανάπτυξης και την στατική με αρχικό όριο την όγδοη ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων ζύμης. Στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου φορτώθηκαν 100 μg ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των κυττάρων *tps2Δ/pCM190asynA53T* από κάθε φάση ανάπτυξης. Τα δείγματα της πηκτής μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF και ακολούθησε ανοσοδοκιμασία Western με αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης (18 kD). Για τη διαπίστωση της ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης PGK1 (45 kD) η οποία εκφράζεται σταθερά και σε υψηλό επίπεδο στον ζυμομύκητα σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης του. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αποτυπώνονται στην εικόνα 3.12.



Εικόνα 3.12: Ανοσοαποτύπωση Western για τον εντοπισμό της α-συνουκλεΐνης A53T και του μάρτυρα ισοφόρτωσης PGK1 στα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα του *tps2Δ /α-synA53T*. Φορτώθηκαν 100 μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.

Διαδρομή 1: Ολικές πρωτεΐνες *tps2Δ /pCM190α-synA53T-PE*

Διαδρομή 2: Ολικές πρωτεΐνες *tps2Δ /pCM190asyn A53T-EXP*

Διαδρομή 3: Ολικές πρωτεΐνες *tps2Δ /pCM190asynA53T-PD*

Διαδρομή 4: Ολικές πρωτεΐνες *tps2Δ /pCM190asynA53T-ST*

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται αρχικά ότι η ισοφόρτωση των δειγμάτων ήταν ικανοποιητική. Παρατηρείται η σταθερά υψηλή παραγωγή της α-συνουκλεΐνης A53T σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης. Η εικόνα αυτή συμβαδίζει με τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας όπου ανιχνεύεται έντονη παρουσία της A53T στα κύτταρα σε ποικίλες διαμορφώσεις, αλλά και με τις καμπύλες βιωσιμότητας κατά τη γήρανση, με τη γενική διαπίστωση πρόκειται για ένα ιδιαίτερα επιβαρυσμένο στέλεχος.

3.12 Μελέτη του επιπέδου μεταγραφής των γονιδίων *TPS1*, *TSL1*, *ATG8* και *TOR1* στα κύτταρα *S. cerevisiae tps2Δ/α-synA53T* σε πραγματικό χρόνο (qPCR)

Η μελέτη του επιπέδου μεταγραφής των ανωτέρω γονιδίων πραγματοποιήθηκε με πειράματα qPCR, ώστε να διερευνηθεί η έκφρασή τους σε συνδυασμό με την παρουσία της α-συνουκλεΐνης A53T στα κύτταρα του *tps2Δ/α-synA53T*. Τα πειράματα qPCR πραγματοποιήθηκαν και αναλύθηκαν όπως αναφέρεται στην ενότητα Υλικά & Μέθοδοι καθώς και στην παράγραφο 4.4 της παρούσας ενότητας με τις ίδιες συνθήκες και μεθοδολογίες. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση της μεταγραφικής κατάστασης για κάθε φάση ανάπτυξης ξεχωριστά με συνθήκη βαθμονόμησης τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα *tps2Δ/pCM190* της προ-εκθετικής φάσης αλλά και των αντίστοιχων φάσεων με συνθήκη μελέτης τα επίπεδα μεταγραφής στα κύτταρα *tps2Δ/pCM190 asynA53T* στις τέσσερις μελετώμενες φάσεις ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.7 και 3.8

Πίνακας 3.7: qPCR για τα μετάγραφα των *TPS1*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *tps2Δ/pCM190asynA53T*. Συνθήκη μελέτης: η εκάστοτε φάση ανάπτυξης των *tps2Δ/pCM190asynA53T*. Συνθήκη βαθμονόμησης: επίπεδο έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα *tps2Δ/pCM190* της προ-εκθετικής φάσης ανάπτυξης Η φάση ανάπτυξης δίνεται στην άκρη αριστερά του πίνακα. Mean: Μέσος όρος της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. PE: προ-εκθετική φάση. EXP: εκθετική φάση. PD: μετα-διαωξική φάση. ST: στατική φάση.

| <i>TPS1</i> | | | | | | |
|----------------|------|-----------|----------|------|-----------|-------------|
| Vector control | | | | A53T | | |
| | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | Pvalue |
| PE/PE | 1,00 | 0,95-1,05 | 1 | 0,22 | 0,18-0,26 | 0,004774 |
| EXP/PE | 0,60 | 0,49-0,73 | 0,255987 | 0,23 | 0,19-0,28 | 0,004460218 |
| PD/PE | 1,05 | 0,87-1,30 | 0,31578 | 0,40 | 0,20-1,24 | 0,88808884 |
| ST/PE | 1,54 | 1,28-1,85 | 0,433687 | 4,65 | 3,28-6,50 | 0,048517081 |

| <i>TSL1</i> | | | | | | |
|----------------|------|-----------|----------|-------|------------|-------------|
| Vector control | | | | A53T | | |
| | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | P value |
| PE/PE | 1,00 | 0,46-2,16 | 1 | 0,49 | 0,35-0,49 | 0,422277169 |
| EXP/PE | 1,14 | 0,65-2,00 | 0,876522 | 0,24 | 0,22-0,26 | 0,148693214 |
| PD/PE | 0,53 | 0,30-0,93 | 0,172101 | 2,16 | 0,58-2,97 | 0,073638054 |
| ST/PE | 5,30 | 3,09-9,13 | 0,0679 | 15,82 | 9,33-26,78 | 0,020305748 |

| <i>ATG8</i> | | | | | | |
|----------------|-------|------------|----------|-------|-------------|-------------|
| Vector control | | | | A53T | | |
| | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | P value |
| PE/PE | 1,00 | 0,52-1,90 | 1 | 0,29 | 0,23-0,37 | 0,049885029 |
| EXP/PE | 6,83 | 3,93-11,84 | 0,055038 | 0,14 | 0,11-0,18 | 0,035536928 |
| PD/PE | 2,78 | 1,25-6,90 | 0,118024 | 1,01 | 0,64-1,58 | 0,49884175 |
| ST/PE | 23,15 | 16,58-34,2 | 0,000681 | 22,21 | 18,52-26,46 | 0,007453923 |

| TOR1 | | | | | | |
|----------------|------|-----------|----------|-------|-------------|-------------|
| Vector control | | | | A53T | | |
| | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | P value |
| PE/PE | 1,00 | 0,71-1,39 | 1 | 2,73 | 2,44-3,04 | 0,310920391 |
| EXP/PE | 6,49 | 5,25-8,00 | 0,081338 | 2,07 | 1,98-2,17 | 0,220814472 |
| PD/PE | 2,93 | 2,32-3,69 | 0,374283 | 26,25 | 16,96-40,56 | 0,085412691 |
| ST/PE | - | - | - | 32,18 | 24,50-42,37 | 0,011890368 |

Πίνακας 3.8: qPCR για τα μετάγραφα των *TPS1*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *tps2Δ/pCM190asynA53T* και *tps2Δ/pCM190*. Συνθήκη βαθμονόμησης: επίπεδο έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα *tps2Δ/pCM190* των αντίστοιχων φάσεων. Συνθήκη μελέτης: επίπεδο έκφρασης στα κύτταρα *tps2Δ/pCM190 asynA53T* στις τέσσερις μελετώμενες φάσεις ανάπτυξης (άκρη αριστερά του πίνακα). Η βαθμονόμηση έγινε βάσει της αντίστοιχης φάσης της συνθήκης που μελετήθηκε. Mean: Μέσος όρος της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. PE: προ-εκθετική φάση. EXP: εκθετική φάση. PD: μετα-διαυξική φάση. ST: στατική φάση.

| Αναλογία= <i>tps2Δ</i> Παρουσία <i>asynA53T</i> / <i>tps2Δ</i> Απουσία <i>asynA53T</i> | | | | | | |
|--|-------------|-----------|-------------|-------------|-----------|-------------|
| | <i>TPS1</i> | | | <i>TSL1</i> | | |
| | Mean | R.V. | P value | Mean | R.V. | P value |
| PE | 0,22 | 0,18-0,26 | 0,004774435 | 0,49 | 0,35-0,49 | 0,422277169 |
| EXP | 0,40 | 0,38-0,41 | 0,007196831 | 0,21 | 0,20-0,21 | 0,000417428 |
| PD | 0,26 | 0,21-0,32 | 0,38021317 | 5,57 | 5,30-5,86 | 2,2466E-07 |
| ST | 3,02 | 2,56-3,57 | 0,106558555 | 2,96 | 2,43-3,61 | 0,173757149 |

| Αναλογία= <i>tps2Δ</i> Παρουσία <i>asynA53T</i> / <i>tps2Δ</i> Απουσία <i>asynA53T</i> | | | | | | |
|--|-------------|------------|-------------|-------------|-----------|-------------|
| | <i>TOR1</i> | | | <i>ATG8</i> | | |
| | Mean | R.V. | P value | Mean | R.V. | P value |
| PE | 2,73 | 2,44-3,04 | 0,310920391 | 0,29 | 0,23-0,37 | 0,049885029 |
| EXP | 0,32 | 0,30-0,36 | 0,011002955 | 0,03 | 0,01-0,04 | 0,000101406 |
| PD | 8,69 | 6,56-12,22 | 0,054845368 | 0,34 | 0,23-0,49 | 0,251001917 |
| ST | - | - | - | 0,88 | 0,74-1,06 | 0,212210293 |

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι δύο αυτές συγκριτικές αναλύσεις αποτελούν την διαφορετική όψη του ίδιου νομίσματος, με την πρώτη να αποδίδει περισσότερο την τάση μεταγραφής και την δεύτερη την μεταγραφική κατάσταση συγκριτικά φάση προς φάση, επομένως ο σχολιασμός θα είναι κοινός.

Ως προς το γονίδιο *TPS1* της συνθάσης της τρεχαλόζης, παρατηρείται μεταγραφική καταστολή του υπό την επίδραση της α -συνουκλεΐνης A53T. Αυτή αποτυπώνεται τόσο στη προ-εκθετική φάση όσο και στην εκθετική και μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης. Το γεγονός συνηγορεί επιπλέον υπέρ του τοξικού φαινοτύπου που αναδύεται από τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του κυττάρου έως τη γήρανση. Στη στατική φάση ανάπτυξης, ωστόσο, το επίπεδο μεταγραφής του γονιδίου αυξάνεται αρκετά. Αυτό φαίνεται να συμβαίνει λόγω του ιδιαίτερα τοξικού φαινοτύπου που εμφανίζεται στα κύτταρα από την προ-εκθετική φάση ανάπτυξης με αποτέλεσμα να συμβαίνει μια πιθανή μεταγραφική απορρύθμιση.

Το *TSL1* παρουσιάζει επίσης χαμηλό μεταγραφικό επίπεδο στην προ-εκθετική και εκθετική φάση ανάπτυξης παρουσία της A53T. Στη μετα-διαυξική και στατική φάση

ανάπτυξης η κατάσταση αυτή φαίνεται να αλλάζει άρδην με την αύξηση των μεταγραφών του γονιδίου χωρίς αυτή να συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση αυτών του *TPS1* επίσης στη μετα-διαυξική, όπως θα αναμενόταν. Πιθανόν, λόγω του πρώιμου τοξικού φαινότυπου, να συμβαίνει και σε αυτό το γονίδιο πιθανή μεταγραφική απορρύθμιση.

Αναφορικά με το γονίδιο *TOR1* παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα μεταγραφής του δεν φαίνεται να επηρεάζονται αρνητικά από την έκφραση της α -συνουκλεΐνης A53T. Ενώ η έκφρασή της φαίνεται να αντιστοιχεί σε τοξικότητα των κυττάρων, άρα επιπλέον στρες γι' αυτά, η μεταγραφή του γονιδίου δεν φαίνεται να καταστέλλεται. Μία πιθανή ερμηνεία θα μπορούσε να είναι ότι η ήδη αρκετά επιβαρυνόμενη κατάσταση των κυττάρων *tps2Δ* μειώνει την περαιτέρω εμφάνιση της επίδρασης της α -συνουκλεΐνης A53T.

Η συγκριτική μελέτη αυτή ολοκληρώνεται με το μεταγραφικό προφίλ του γονιδίου *ATG8*. Παρατηρείται ότι τα μεταγραφικά του επίπεδα μειώνονται αισθητά σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης παρουσία α -συνουκλεΐνης A53T. Ιδιαίτερα στην εκθετική φάση ανάπτυξης, ένα χρονικό σημείο κομβικό για τους υπό μελέτη κυτταρικούς πληθυσμούς από τις προηγούμενες μελέτες qPCR, ένα σημαντικό γονίδιο για την αυτοφαγία φαίνεται εντελώς κατεσταλμένο. Μια μικρή αύξηση φαίνεται να παρατηρείται κατά την στατική φάση ανάπτυξης, θεωρείται όμως ότι τότε έχει επέλθει εξισορρόπηση λόγω της εγκατάστασης τοξικού φαινοτύπου στα κύτταρα *tps2Δ*.

Συνοψίζοντας σε αυτή τη συγκριτική μελέτη φαίνεται πως εγκαθίσταται ένας τοξικός φαινότυπος στα κύτταρα *tps2Δ* από τις πρώιμες φάσεις ανάπτυξης παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να επιφέρει αλλαγές στο μεταγραφικό προφίλ των γονιδίων καταστέλλοντας ουσιαστικά την μεταγραφή των υπόλοιπων γονιδίων που σχετίζονται με την τρεχαλόζη αλλά και την αυτοφαγία. Είναι πιθανό για αυτή την κατάσταση να μην ευθύνεται μόνο η συσσώρευση της τοξικής α -συνουκλεΐνης A53T αλλά και αυτή της 6 φωσφο-τρεχαλόζης.

Όπως συνέβη και για τα κύτταρα *tps1Δ*, έτσι και για τον πληθυσμό κυττάρων *tps2Δ* κρίθηκε απαραίτητο να πραγματοποιηθεί συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR με αυτά των κυττάρων αγρίου τύπου BY4741 παρουσία και απουσία α -συνουκλεΐνης A53T. Οι συγκριτικές αναλύσεις που έλαβαν χώρα είναι ακριβώς ίδιες με τις αντίστοιχες με τα κύτταρα *tps1Δ* και παρουσιάζονται στους πίνακες 3.9 και 3.10. Οι αναλύσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής Σφήκας Ε., 2020 και αναδημοσιεύονται εδώ με άδεια του συγγραφέα στον πίνακα 3.9.

Πίνακας 3.9: qPCR για τα μετάγραφα των *TPS1*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *tps2Δ/pCM190*. Συνθήκη βαθμονόμησης: επίπεδο έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα BY4741/pCM190 των αντίστοιχων φάσεων. Συνθήκη μελέτης: επίπεδο έκφρασης στα κύτταρα *tps2Δ/pCM190* στις τέσσερις μελετώμενες φάσεις ανάπτυξης (άκρη αριστερά του πίνακα). Η βαθμονόμηση έγινε βάσει της αντίστοιχης φάσης της συνθήκης που μελετήθηκε. Mean: Μέσος όρος της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. PE: προ-εκθετική φάση. EXP: εκθετική φάση. PD: μετα-διαυξική φάση. ST: στατική φάση.

| Αναλογία=Απουσία <i>TPS2</i> /Παρουσία <i>TPS2</i> | | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-------------|
| | <i>TPS1</i> | | | <i>TSL1</i> | | |
| | Mean | R.V. | P value | Mean | R.V. | P value |
| PE | 40 | 34,03-47,01 | 0,000135942 | 5,96 | 4,22-8,42 | 0,086175 |
| EXP | 3,14 | 2,76-3,57 | 0,000499043 | 2,20 | 1,80-2,68 | 0,033794 |
| PD | 0,27 | 0,262-0,284 | 0,0427128 | 0,123 | 0,10-0,14 | 3,36953E-06 |
| ST | 0,076 | 0,069-0,085 | 0,7871433 | 2,60 | 2,55-2,64 | 0,088845088 |

| Αναλογία=Απουσία <i>TPS2</i> /Παρουσία <i>TPS2</i> | | | | | | |
|--|-------------|-----------|----------|-------------|--------------|-------------|
| | <i>TOR1</i> | | | <i>ATG8</i> | | |
| | Mean | R.V. | P value | Mean | R.V. | P value |
| PE | 0,12 | 0,09-0,15 | 0,583146 | 0,98 | 0,63-1,51 | 0,004623 |
| EXP | 1,56 | 1,41-1,70 | 0,055227 | 92,31 | 69,86-121,38 | 6,94999E-05 |
| PD | 0,43 | 0,33-0,55 | 0,005784 | 0,41 | 0,35-0,48 | 0,820167305 |
| ST | - | - | - | 0,67 | 0,65-0,69 | 0,216240138 |

Πίνακας 3.10: qPCR για τα μεταγράφα των *TPS1*, *TSL1*, *TOR1* και *ATG8* στις τέσσερις φάσεις ανάπτυξης του *tps2Δ/pCM190 asynA53T* και *BY4741/pCM190*. Συνθήκη βαθμονόμησης: επίπεδο έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα *BY4741/pCM190* των αντίστοιχων φάσεων. Συνθήκη μελέτης: επίπεδο έκφρασης στα κύτταρα *tps2Δ/pCM190 asynA53T* στις τέσσερις μελετώμενες φάσεις ανάπτυξης (άκρη αριστερά του πίνακα). Η βαθμονόμηση έγινε βάσει της αντίστοιχης φάσης της συνθήκης που μελετήθηκε. Mean: Μέσος όρος της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. PE: προ-εκθετική φάση. EXP: εκθετική φάση. PD: μετα-διαυξική φάση. ST: στατική φάση.

| Αναλογία= <i>tps2Δ</i> και Παρουσία <i>SNCA A53T</i> /Παρουσία <i>TPS2</i> | | | | | | |
|--|-------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | <i>TPS1</i> | | | <i>TSL1</i> | | |
| | Mean | R.V. | P value | Mean | R.V. | P value |
| PE | 2,15 | 2,13-2,17 | 0,002707243 | 2,97 | 2,70-3,26 | 0,017006826 |
| EXP | 1,25 | 1,24-1,28 | 0,097128708 | 0,474 | 0,472-0,478 | 0,040944465 |
| PD | 0,07 | 0,06-0,08 | 0,123792177 | 0,82 | 0,79-0,86 | 0,040294947 |
| ST | 0,23 | 0,20-0,27 | 0,204627825 | 7,42 | 5,57-9,82 | 0,439983373 |

| Αναλογία= <i>tps2Δ</i> και Παρουσία <i>A53T SNCA</i> /Παρουσία <i>TPS2</i> | | | | | | |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | <i>TOR1</i> | | | <i>ATG8</i> | | |
| | Mean | R.V. | P value | Mean | R.V. | P value |
| PE | 0,772 | 0,771-0,776 | 0,333418503 | 0,283 | 0,281-0,284 | 0,002519686 |
| EXP | 0,50 | 0,47-0,52 | 0,118232938 | 3,47 | 3,54-3,96 | 0,557115059 |
| PD | 3,89 | 3,02-4,98 | 0,214084771 | 0,14 | 0,11-0,16 | 0,100904558 |
| ST | - | - | - | 0,60 | 0,49-0,72 | 0,04306043 |

Οι συγκριτικές αναλύσεις που συμπεριλαμβάνουν και τα κύτταρα αγρίου *BY4741* αποτυπώνουν την ήδη επιβαρυσμένη κατάσταση των κυττάρων *tps2Δ* και αναδεικνύουν καλύτερα την τοξικότητα της κατάστασης παρουσία της μεταλλαγής της α-συνουκλεΐνης *A53T*.

Ξεκινώντας με την μεταγραφική κατάσταση του *TPS1* παρουσία α-συνουκλεΐνης *A53T* παρατηρείται σημαντική καταστολή των μεταγραφικών του επιπέδων κατά την

παρέλευση του χρόνου από την μία φάση ανάπτυξης στην επόμενη. Το ιδιαίτερο στρες που φαίνεται να υπόκεινται τα κύτταρα *tps2Δ* οδηγεί σε σημαντική καταστολή τα επίπεδα της συνθάσης από την έναρξη της ζωής των κυττάρων φτάνοντας στην μετα-διαυξική και στατική φάση ανάπτυξης όπου έχουν κατασταλεί πλήρως. Το στρες οδηγεί τα κύτταρα σε μία τοξική κατάληξη όπως παρατηρείται από το σύνολο των μελετών.

Συνεχίζοντας στο έτερο γονίδιο του συμπλόκου TPS, το *TSL1* παρουσιάζει μια εικόνα παρόμοια του *TPS1*. Παρουσία της μεταλλαγής της α-συνουκλεΐνης στην προ-εκθετική και εκθετική φάση ανάπτυξης παρατηρείται σημαντική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου. Σχετικά με την στατική φάση ανάπτυξης όπου φαίνεται πως τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου αυξάνονται δεν θεωρείται ότι επηρεάζεται από την α-συνουκλεΐνη A53T αλλά περισσότερο από τον τοξικό φαινότυπο που επικρατεί τη χρονική στιγμή αυτή και την πολύ πιθανή μεταγραφική απορρύθμιση που έχει επιφέρει.

Αναφορικά με το *TOR1* τα μεταγραφικά του επίπεδα παρουσιάζουν αυξομειώσεις πιο ανάμεσα στις τρεις φάσεις ανάπτυξης που έχουν αναλυθεί. Στην προκειμένη περίπτωση δεν φαίνεται να επηρεάζονται τόσο από την παρουσία της α-συνουκλεΐνης A53T αλλά ούτε και από την απουσία της φωσφατάσης της τρεχαλόζης.

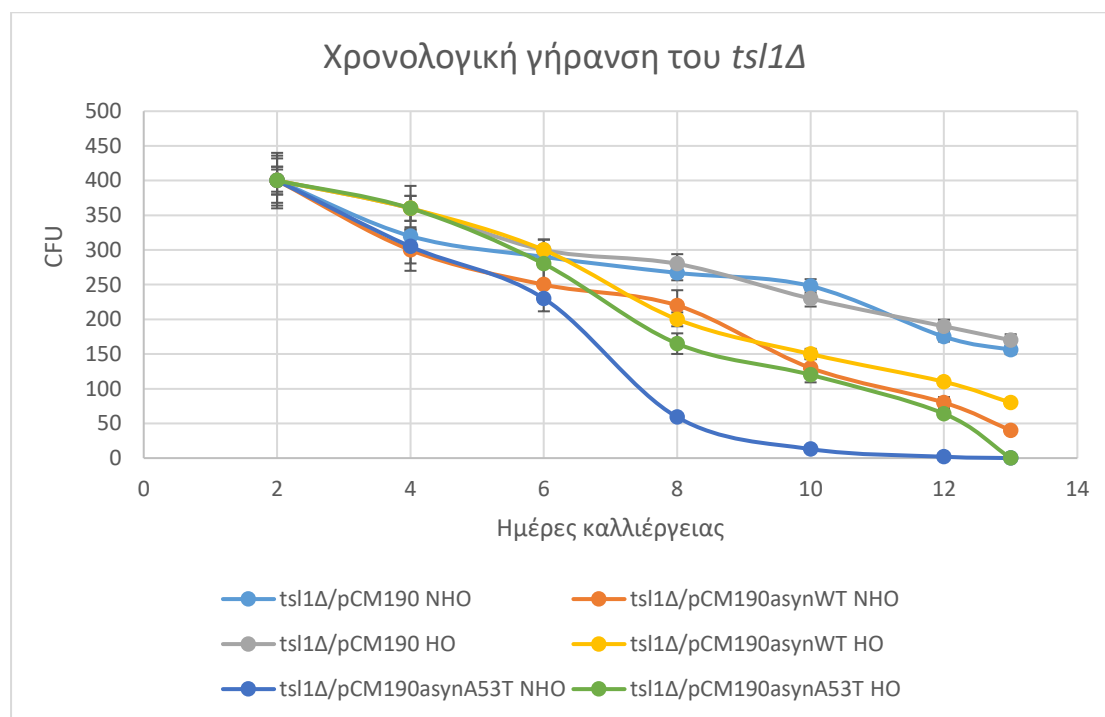
Η συγκριτική μελέτη ολοκληρώνεται με τον σχολιασμό της μεταγραφικής κατάστασης του *ATG8*. Στην προκειμένη περίπτωση αυτό που παρατηρείται είναι ότι τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου μειώνονται σημαντικά παρουσία της μεταλλαγής της α-συνουκλεΐνης. Αυτό αποτυπώνεται κυρίως στην εκθετική φάση ανάπτυξης όπου απουσία της α-συνουκλεΐνης A53T τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου παρουσιάζονται σημαντικά αυξημένα, οπότε κατά την έκφραση της σημειακής μεταλλαγής της α-συνουκλεΐνης φέρονται σε σημαντική μεταγραφική καταστολή.

Κλείνοντας τις συγκριτικές αναλύσεις των αποτελεσμάτων της qPCR για τα κύτταρα *tps2Δ* προκύπτουν κάποια χρήσιμα συμπεράσματα. Αρχικά φαίνεται η έλλειψη της φωσφατάσης της τρεχαλόζης να επιβαρύνει αρκετά περισσότερο τα κύτταρα από τον πληθυσμό των *tps1Δ*. Παρουσία της α-συνουκλεΐνης A53T παρατηρείται μεταγραφική καταστολή των υπό μελέτη γονιδίων από τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των κυττάρων και εγκατάσταση ενός άκρως τοξικού φαινοτύπου για τα κύτταρα που επιβεβαιώνεται και από τις καμπύλες βιωσιμότητας. Σημαντικό επίσης στοιχείο αποτελεί πως η συνθήκη HO δεν αντιστρέφει και σε αυτό το στέλεχος την τοξικότητα της α-συνουκλεΐνης A53T αναδεικνύοντας την αναγκαιότητα ύπαρξης της φωσφατάσης της τρεχαλόζης για την ευεργετική δράση της.

3.13 Η επίδραση της υψηλής ωσμωτικότητας στη χρονολογική γήρανση του ανασυνδυασμένου μεταλλαγμένου *S.cerevisiae* *tsl1Δ/A53T*

Στην συνέχεια ακολούθησε η μελέτη της χρονολογικής γήρανσης του μεταλλαγμένου στελέχους *S. cerevisiae* *tsl1Δ/A53T* από το οποίο απουσιάζει η ρυθμιστική υπομονάδα Tsl1p που διαδραματίζει κύριο ρόλο στην ενεργοποίηση του ενζυμικού συμπλόκου βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Willingham et al., 2003), το στέλεχος αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερος τοξικό φαινότυπο παρουσία της α-συνουκλεΐνης με πολύ μικρή βιωσιμότητα.

Η διαδικασία της χρονολογικής γήρανσης καθώς και η κατασκευή των αντίστοιχων καμπυλών περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι 2.3.6. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε το *tsl1Δ* /pCM190 ως αρνητικός μάρτυρας παρουσία (HO) και απουσία (NHO) υψηλής ωσμωτικότητας. Η βιωσιμότητα των κυττάρων παρατίθενται στην εικόνα 3.13, στην οποία έχει προστεθεί και η βιωσιμότητα παρουσία της αγρίου τύπου μορφής α-συνουκλεΐνης για συγκριτικούς λόγους.



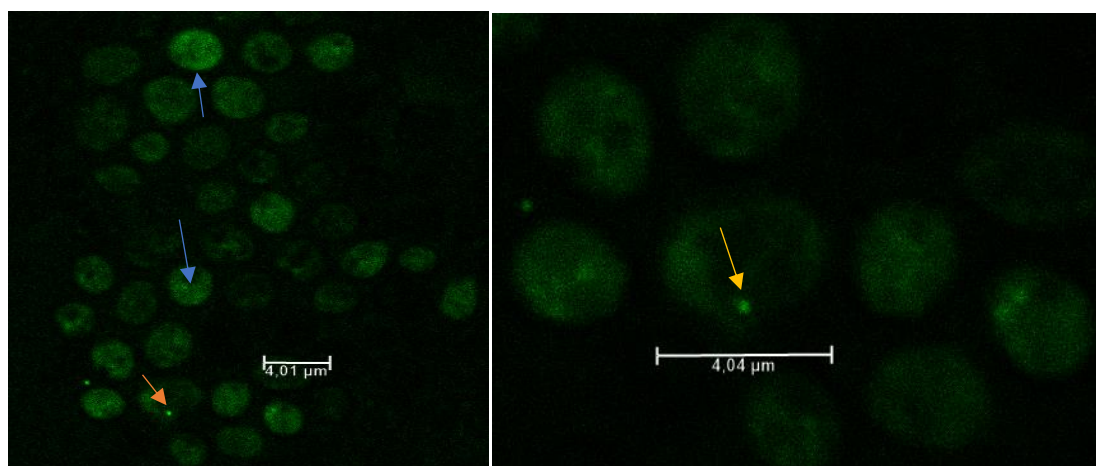
Εικόνα 3.13: Χρονολογική γήρανση του μετασηματισμένου στελέχους *ts1Δ* παρουσία ΗΕΟ και απουσία ΗΕΟ (NHEO)

Από τη σύγκριση των δύο κυτταρικών πληθυσμών *ts1Δ*/pCM190 μεταξύ των δύο συνθηκών δεν διαπιστώνεται κάποια ιδιαίτερη διαφορά στην βιωσιμότητά τους. Γενικά, παρατηρείται ότι το *ts1Δ*, τόσο απουσία όσο και παρουσία οποιασδήποτε μορφής α-συνουκλεΐνης (με εξαίρεση αυτή της A53T σε NHO), όχι μόνο έχει υψηλότερο επίπεδο βιωσιμότητας συγκριτικά με τα υπόλοιπα δυο μεταλλαγμένα στελέχη *tps1Δ* και *tps2Δ*, αλλά το επίπεδο αυτό είναι παρόμοιο με του στελέχους αγρίου τύπου BY4741. Σημαντική όμως διαφορά αποτυπώνεται στους κυτταρικούς πληθυσμούς που φέρουν την A53T σε συνθήκη NHO, όπου η βιωσιμότητα σημειώνει σημαντική πτώση μετά την 6^η ημέρα χρονολογικής γήρανσης. Εντούτοις, η υψηλή ωσμωτικότητα λειτουργεί ευεργετικά στην φάση αυτή με αποτέλεσμα να αυξάνεται σημαντικά η βιωσιμότητα των κυττάρων.

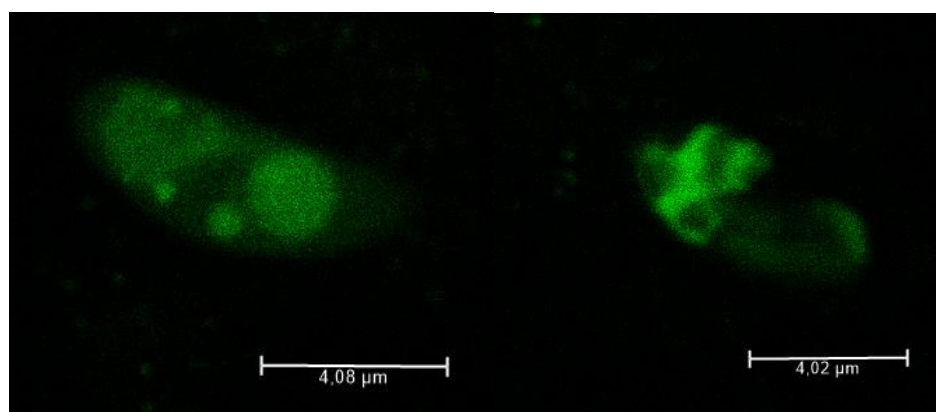
Απουσία της υπομονάδας Tsl1p, θα αναμενόταν κάποια διαταραχή στη ρύθμιση του συμπλόκου. Εντούτοις, η διαταραχή αυτή δεν φαίνεται να επηρεάζει την ευεργετική δράση της HO.

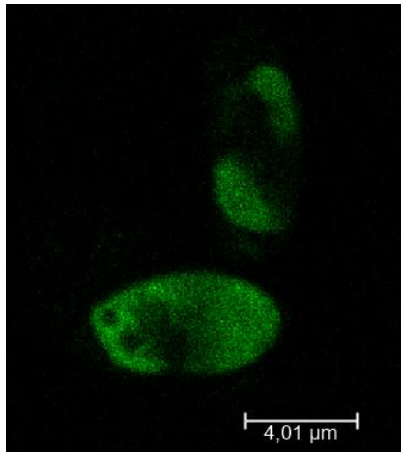
3.14 Εντοπισμός της α -συνουκλεΐνης στα κύτταρα *ts11Δ*/ α -synA53T με ανοσοφθορισμό

Η διερεύνηση της α -synA53T στο εσωτερικό των κυττάρων *ts11Δ* του ζυμομύκητα που φέρουν το αντίστοιχο γονίδιο πραγματοποιήθηκε με πειράματα ανοσοφθορισμού. Τα κύτταρα που παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο είχαν αναπτυχθεί σε συνθήκη υψηλής ωσμωτικότητας. Επιλέχθηκαν δύο φάσεις ανάπτυξης για την παρατήρηση: η εκθετική φάση ($OD_{600nm}=2$), κατά την οποία δεν ανιχνεύεται τοξικότητα, και η στατική φάση που αντιστοιχεί στην κυτταρική γήρανση (όγδοη ημέρα), κατά την οποία παρατηρείται και η τοξική επίδραση. Τα αποτελέσματα από αντιπροσωπευτικές εικόνες της συνεστιακής μικροσκοπίας στην εκθετική φάση ανάπτυξης παρουσιάζονται στην εικόνα 3.14, ενώ στη στατική φάση στην εικόνα 3.15.



Εικόνα 3.14: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού της α -synA53T σε κύτταρα *ts11Δ*/ α -synA53T εκθετικής φάσης ανάπτυξης (Κλίμακα 4 μ m). Με το μπλε βέλος υποδεικνύονται περιοχές όπου παρατηρείται φθορισμός στο εσωτερικό του κυττάρου ενώ με πορτοκαλί βέλος υποδεικνύονται περιοχές φθορισμού στο εσωτερικό του κυττάρου που μοιάζουν με κυτταροπλασματικά συσσωματώματα.





Εικόνα 3.15: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού της α -synA53T σε κύτταρα *ts11Δ*/ α -synA53T στατικής φάσης ανάπτυξης (Κλίμακα 4 μ m). Σε όλες τις εικόνες παρατηρούνται κύτταρα με κυτταροπλασματική εντόπιση της α -συνουκλεΐνης.

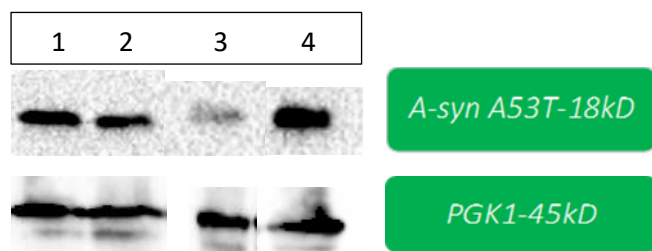
Από τις φωτογραφίες της συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού παρατηρείται ότι στο στέλεχος *ts11Δ* η κατανομή της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης εντοπίζεται κατά κύριο λόγο κυτταροπλασματικά. Στην προ-εκθετική φάση ανάπτυξης η κατανομή ήταν κυρίως κυτταροπλασματική, ενώ εντοπίστηκαν ελάχιστα κύτταρα με συσσωματώματα, και στη στατική φάση ανάπτυξης κυρίως κυτταροπλασματική. Φαίνεται επομένως ότι στο *ts11Δ* δεν αναπαράγεται κάποιος επιβαρυνμένος φαινότυπος, ενώ η επίδραση της A53T όπως φάνηκε και από τις καμπύλες βιωσιμότητας είναι ήπια.

Συνοψίζοντας, έχοντας μια συνολική εικόνα των παραπάνω πειραμάτων ανοσοφθορισμού μπορεί κανείς να ισχυριστεί ότι τα βιοσυνθετικά γονίδια της τρεχαλόζης *TPS1* και *TPS2* κατέχουν σημαντικό ρόλο στο επίπεδο της τοξικότητας που θα επικρατήσει στα παραπάνω στελέχη παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T. Ακόμα παρατηρείται πως το ρυθμιστικό μόριο Tsl1p του συμπλέγματος TPS δεν δείχνει να επιβαρύνει περαιτέρω το κύτταρο αναφορικά με την τοξικότητα που επικρατεί αφού πιθανώς δημιουργούνται ικανοποιητικές ποσότητες τρεχαλόζης για τα κύτταρα *ts11Δ*.

3.15 Ανίχνευση της παραγόμενης α -συνουκλεΐνης A53T στο μεταλλαγμένο *S. cerevisiae ts11Δ*

Η παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T στα κύτταρα εξακριβώθηκε με πειράματα ανοσοδοκιμασίας Western με αντίσωμα έναντι της α -συνουκλεΐνης στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα δειγμάτων των κυττάρων *ts11Δ*. Τα δείγματα αυτά ελήφθησαν από τέσσερις φάσεις ανάπτυξης: την προ-εκθετική με $OD_{600nm}=0.6$, την εκθετική με $OD_{600nm}=2$, την μετα-διαυξική μετά τις 24 πρώτες ώρες ανάπτυξης και την στατική με αρχικό όριο την όγδοη ημέρα καλλιέργειας των κυττάρων ζύμης. Στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου φορτώθηκαν 100 μ g ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος των κυττάρων *ts11Δ* /pCM190asynA53T από κάθε φάση ανάπτυξης. Τα δείγματα της πηκτής μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF και ακολούθησε ανοσοδοκιμασία Western με αντίσωμα έναντι της α -συνουκλεΐνης (18 kD). Για τη διαπίστωση της ισοφόρτωσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης PGK1 (45 kD) η οποία εκφράζεται σταθερά και σε υψηλό επίπεδο στον ζυμομύκητα σε όλες

τις φάσεις ανάπτυξης του. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αποτυπώνονται στην εικόνα 3.16.



Εικόνα 3.16: Ανοσοαποτύπωση Western για τον εντοπισμό της α-συνουκλεΐνης A53T και του μάρτυρα ισοφόρτωσης PGK1 στα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα του *ts11Δ/α-synA53T*. Φορτώθηκαν 100 μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.

Διαδρομή 1: Ολικές πρωτεΐνες *ts11Δ* /pCM190α-synA53T-PE

Διαδρομή 2: Ολικές πρωτεΐνες *ts11Δ* /pCM190αsyn A53T-EXP

Διαδρομή 3: Ολικές πρωτεΐνες *ts11Δ* /pCM190αsynA53T-PD

Διαδρομή 4: Ολικές πρωτεΐνες *ts11Δ* /pCM190αsynA53T-ST

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται αρχικά ότι η ισοφόρτωση των δειγμάτων ήταν ικανοποιητική. Η έκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα από την έναρξη της ζωής των κυττάρων, ενώ και στην στατική φάση ανάπτυξης δείχνει να διατηρείται η κατάσταση αυτή. Μια υποχώρηση της έκφρασής της φαίνεται να εντοπίζεται κατά την μετά-διαυξική φάση ανάπτυξης αλλά στην στατική εμφανίζεται ξανά πιο έντονη από κάθε άλλη φάση ανάπτυξης. Η εικόνα που δείχνει να μην διαφέρει πολύ από την αντίστοιχη του στελέχους *tps2Δ*. Εντούτοις η ποσότητα της A53T στο *ts11Δ* δεν φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερος τοξικά τα κύτταρα, εφόσον παρουσιάζουν ικανοποιητική βιωσιμότητα κατά τη γήρανση και κυτταροπλασματική κατανομή της A53T στο εσωτερικό τους.

3.16 Η απόκριση των κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae* μετά από την προσθήκη τρεχαλόζης ως πιθανού θεραπευτικού μέσου του τοξικού φαινότυπου

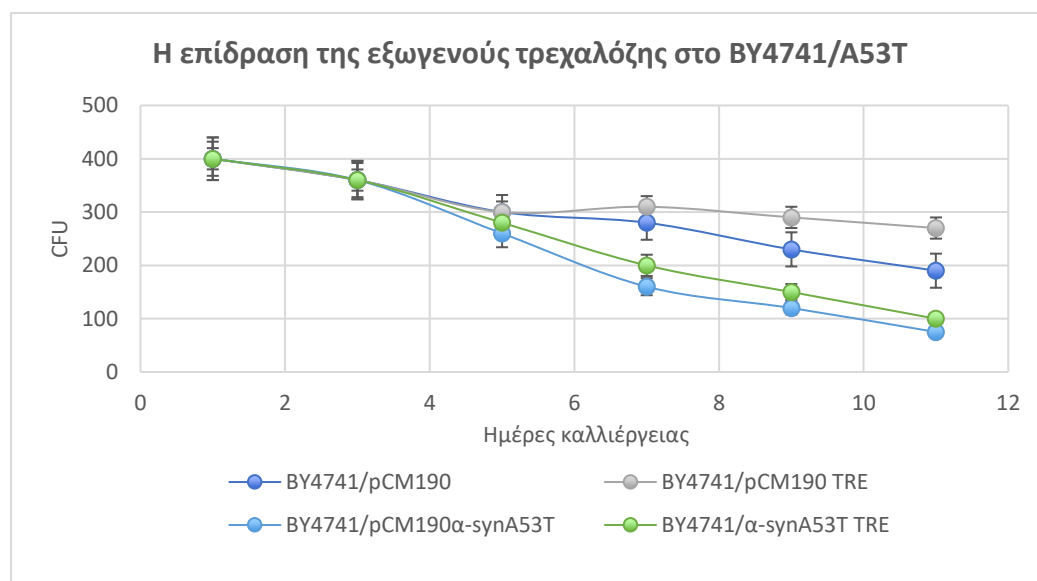
Αφού μελετήθηκε η επίδραση της μεταλλαγής της α-συνουκλεΐνης A53T τόσο στα κύτταρα αγρίου τύπου όσο και στα μεταλλαγμένα στελέχη, η εμφάνιση σημαντικής τοξικότητας στους φαινοτύπους παρόλο την υψηλή ωσμωτικότητα (HO) δεν απέδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα.

Γι αυτό θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί μια πιθανή θεραπεία. Τα παραπάνω πειράματα επαναλήφθηκαν με προσθήκη εξωκυττάριας τρεχαλόζης στο θρεπτικό μέσο κατά την πέμπτη ημέρα καλλιέργειας, στο οποίο διατηρήθηκε η συνθήκη HO. Η χρονολογική στιγμή αυτή επιλέχθηκε, διότι για τα περισσότερα στελέχη αποτελούσε ένα διάστημα στο οποίο η δράση οποιασδήποτε θεραπευτικής παρέμβασης θα επέφερε πιθανή τροποποίηση στην βιωσιμότητα των καταπονημένων κυττάρων στην φάση γήρανσης, οπότε θα ήταν δυνατό με αυτό τον τρόπο να παρατηρηθεί αν μπορεί να έχει θεραπευτική δράση η τρεχαλόζη. Η συγκέντρωση επιλέχθηκε με βάση παρόμοιες μελέτες στην διεθνή βιβλιογραφία (Chaudhary et al., 2014).

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν καμπύλες χρονολογικής γήρανσης για όλα τα μελετώμενα στελέχη ζυμομύκητα απουσία και παρουσία α-συνουκλεΐνης A53T

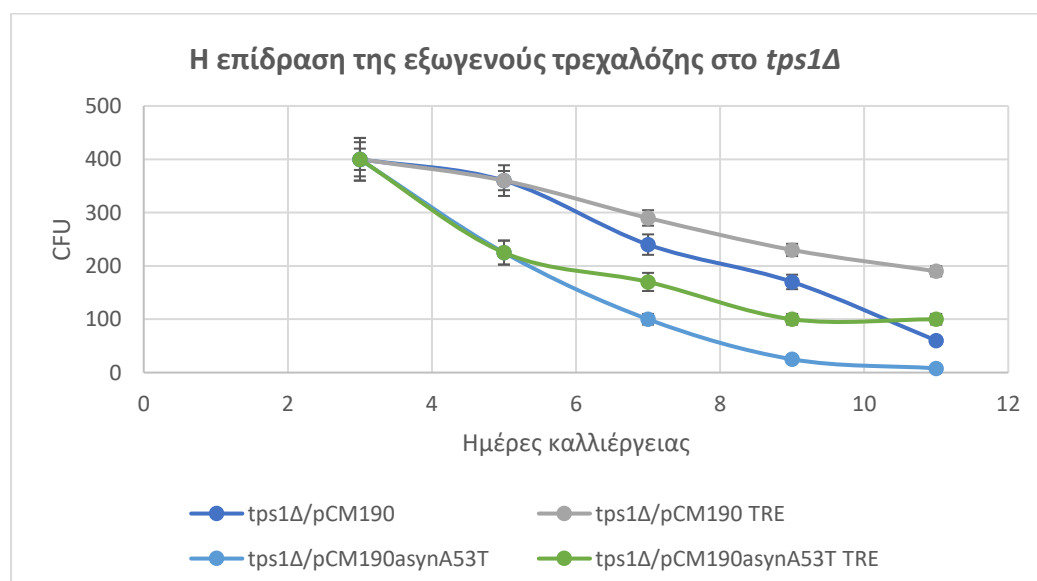
καθώς και προσθήκη ή μη τρεχαλόζης για να διαπιστωθεί κάποια θεραπευτική δράση φαινοτυπικά.

Η χρονολογική γήρανση κατά την θεραπευτική παρέμβαση της τρεχαλόζης στα υπό μελέτη στελέχη παρουσιάζεται στις παρακάτω εικόνες.



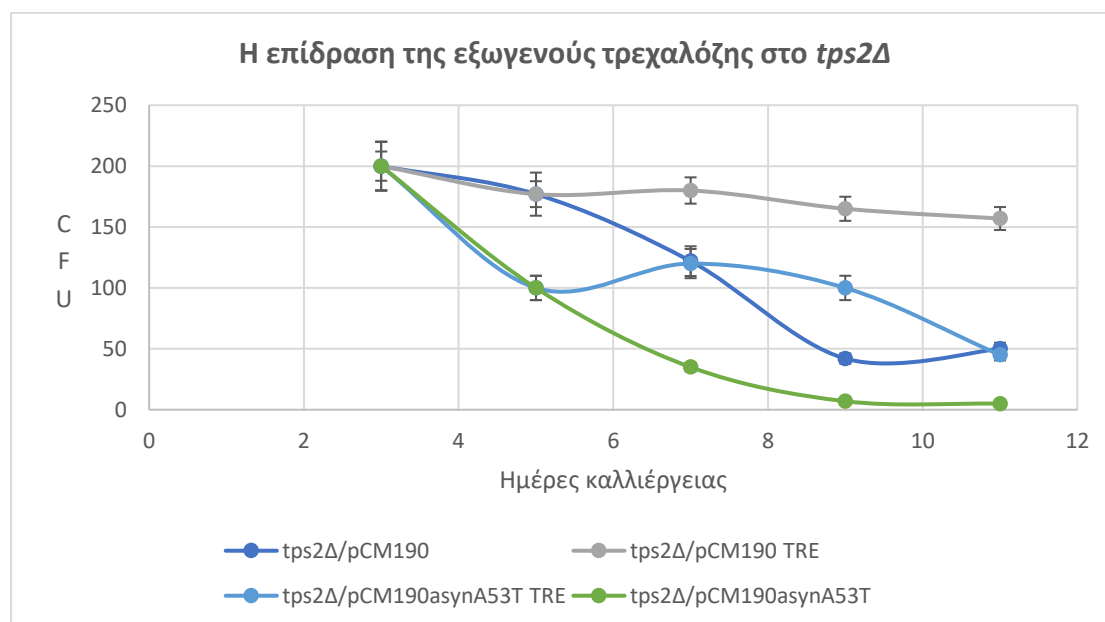
Εικόνα 3.17: Χρονολογική γήρανση του στελέχους ζυμομύκητα BY4741 κατά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη 4%.

Για το αγρίου τύπου στέλεχος BY4741 παρατηρείται ότι η προσθήκη τρεχαλόζης ευνοεί τη βιωσιμότητα ακόμα και όταν απουσιάζει η A53T, όπως εκδηλώνεται στον αρνητικό μάρτυρα BY4741/pCM190. Εντούτοις, παρουσία της α-συνουκλεΐνης A53T η τρεχαλόζη φαίνεται να μην βοηθά τόσο τα κύτταρα στην περαιτέρω επιβίωση τους. Οι δύο καμπύλες που αντιστοιχούν στην παρουσία της A53T συγκλίνουν καθ' όλη την χρονολογική γήρανση με μικρή μόνο απόκλιση παρουσία τρεχαλόζης, χωρίς να διαφαίνεται πως τα κύτταρα δύνανται να ανταποκριθούν στη θεραπευτική δράση της. Η παραπάνω χρονολογική γήρανση επαληθεύει τα μέχρι τώρα αποτελέσματα σχετικά με την ιδιαίτερη τοξικότητα που παρουσιάζει η συγκεκριμένη μεταλλαγή στη βιωσιμότητα των κυττάρων.



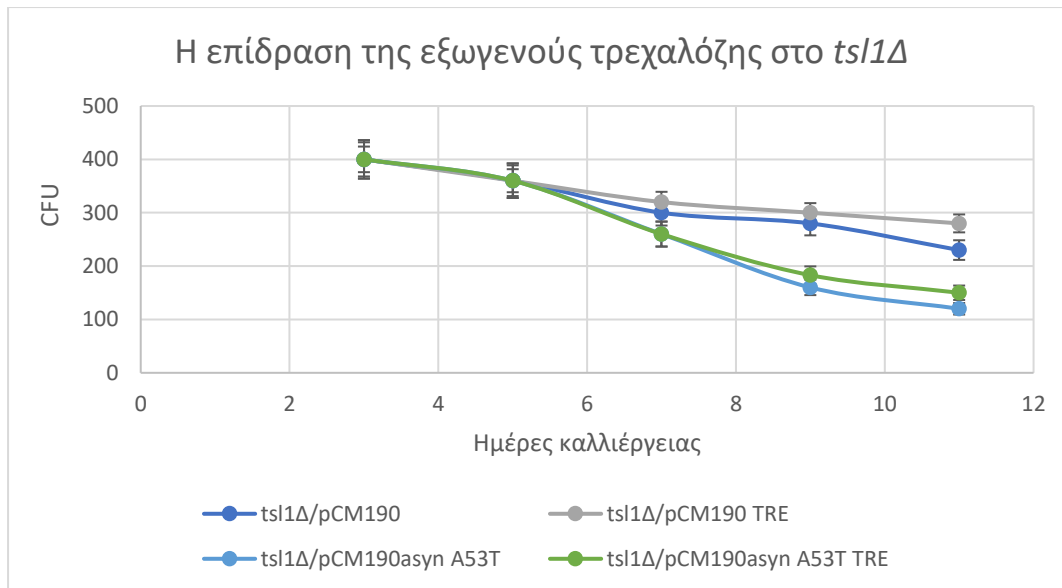
Εικόνα 3.18: Χρονολογική γήρανση του στελέχους ζυμομύκητα *tps1Δ* κατά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη 4%.

Στο μεταλλαγμένο στέλεχος *tps1Δ* αποτυπώνεται η εμφανής θεραπευτική δράση της εξωκυττάριας τρεχαλόζης απουσία της α -συνουκλεΐνης από τις καμπύλες του αρνητικού μάρτυρα *tps1Δ*/pCM190, από τις οποίες παρατηρείται σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας. Χαρακτηριστική είναι η διαφορά από το BY4741 στην αντίδραση των κυττάρων *tps1Δ* παρουσία της A53T. Η τρεχαλόζη στο θρεπτικό μέσο επιφέρει αισθητή αύξηση της βιωσιμότητας των κυττάρων η οποία διατηρείται έως και τη ενδέκατη μέρα καλλιέργειας περιορίζοντας την τοξικότητα της α -συνουκλεΐνης A53T συγκριτικά με την απουσία της τρεχαλόζης.



Εικόνα 3.19: Χρονολογική γήρανση του στελέχους ζυμομύκητα *tps2Δ* κατά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη 4%.

Η παροχή εξωγενούς τρεχαλόζης στα κύτταρα που έχουν απωλέσει το γονίδιο *TSP2* φαίνεται πως δεν έχει την ίδια θεραπευτική δράση σε όλες τις περιπτώσεις. Όσον αφορά τα κύτταρα απουσία της A53T παρατηρείται ότι η εξωκυττάρια τρεχαλόζη στο θρεπτικό μέσο ευνοεί σε μεγάλο βαθμό την περαιτέρω επιβίωσή του *tps2Δ*/pCM190 έως και την ενδέκατη μέρα μελέτης. Στην περίπτωση της α -συνουκλεΐνης A53T φαίνεται ότι η προσθήκη εξωγενούς τρεχαλόζης βοηθά τα κύτταρα στην αύξηση της βιωσιμότητάς τους μέχρι την 9^η ημέρα. Στη συνέχεια όμως αυτή δεν διατηρείται, αλλά εμφανίζει μία ελαφρώς πτωτική τάση, πιθανότατα λόγω της τοξικότητας που επιφέρει στα κύτταρα η A53T. Τα γεγονότα αυτά αναδεικνύουν την εδραιωμένη τοξικότητα που αποτυπώθηκε και από τα προηγούμενα πειράματα στο μεταλλαγμένο αυτό στέλεχος.



Εικόνα 3.20 :Χρονολογική γήρανση του στελέχους ζυμομύκητα *ts1Δ* κατά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη 4%.

Από τα προηγούμενα πειράματα διαπιστώθηκε ότι το στέλεχος *ts1Δ* παρουσία α-συνουκλεΐνης A53T εμφανίζει μια πιο ήπια μορφή τοξικότητας πλησιάζοντας περισσότερο την εικόνα των κυττάρων αγρίου τύπου παρά τα υπόλοιπα δυο μεταλλαγμένα στελέχη. Με την προσθήκη τρεχαλόζης, η απόκλιση στη βιωσιμότητα του αρνητικού μάρτυρα *tps1Δ/pCM190* είναι μικρή, ενώ παρουσία της α-συνουκλεΐνης A53T φαίνεται πως η θεραπευτική δράση ξεκινά την ένατη μέρα και γίνεται λίγο πιο έντονη τις επόμενες δυο ημέρες προσφέροντας μικρή αύξηση στη βιωσιμότητα.

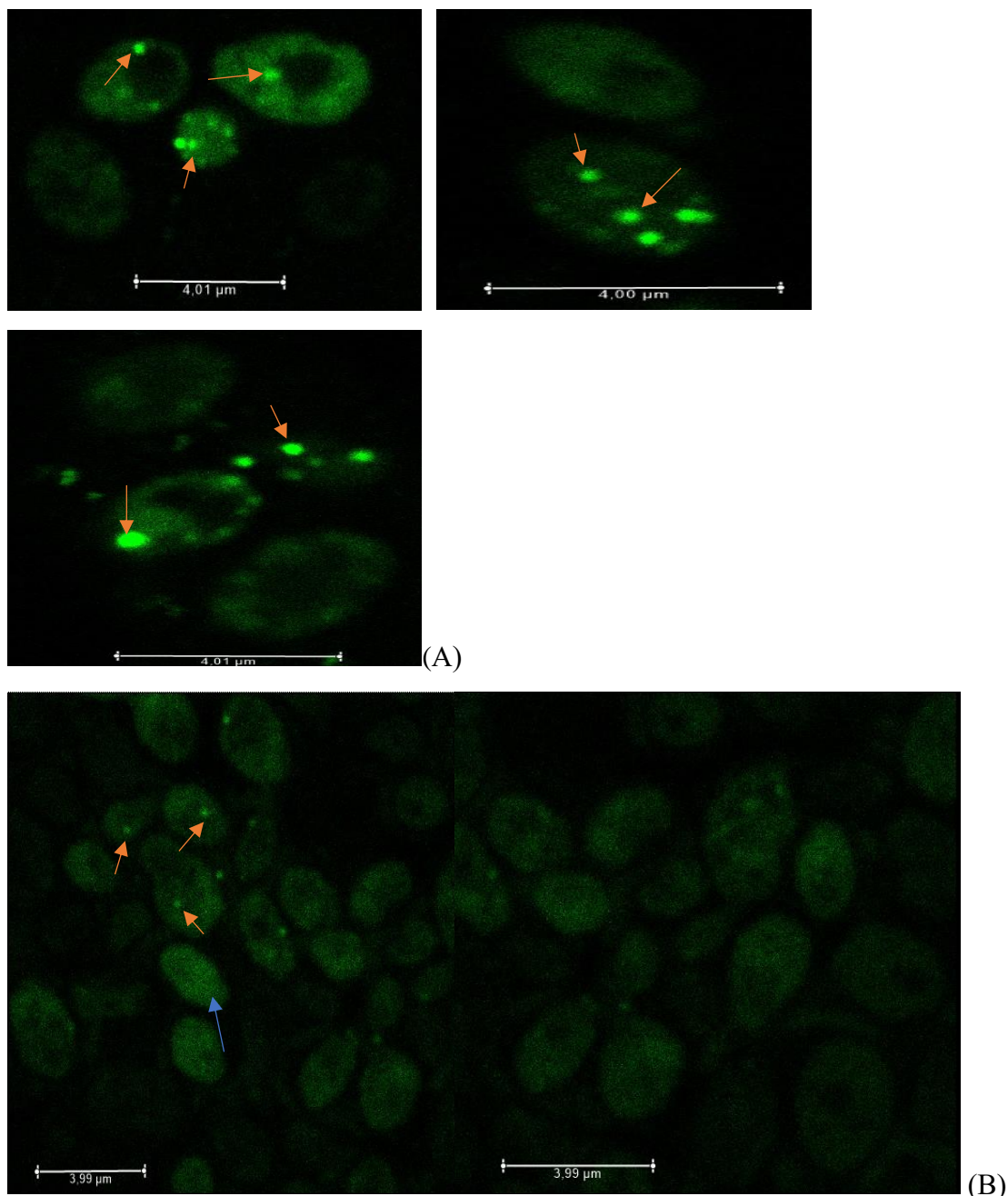
Εν κατακλείδι, η προσθήκη τρεχαλόζης αδιαμφισβήτητα έχει θετική επίδραση στην βιωσιμότητα των περισσότερων κυττάρων. Συγκεκριμένα, στα στελέχη που απουσιάζει η A53T βελτιώνεται σημαντικά η βιωσιμότητα των μεταλλαγμένων *tps1Δ* και *tps2Δ*. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο, εφόσον η χορήγηση τρεχαλόζης συμπληρώνει την έλλειψη που λόγω των μεταλλαγών τους φαίνεται να έχουν. Στο BY4741 έχει ικανοποιητική, ενώ στο *ts1Δ* μικρή θετική επίδραση. Στα μεταλλαγμένα στελέχη *tps1Δ/α-synA53T* και *tps2Δ/α-synA53T* παρουσιάζεται πάλι ικανοποιητική αύξηση της βιωσιμότητας, παρά τις ιδιαιτερότητες που σημειώνονται στο δεύτερο. Στον αντίποδα, τα BY4741/*α-synA53T* και *ts1Δ/α-synA53T* εμφάνισαν ελάχιστη θετική επίδραση στη βιωσιμότητά τους. Δύο ενδεχόμενα μελλοντικών μελετών θα μπορούσαν να είναι η δοκιμή υψηλότερων δόσεων τρεχαλόζης για τα πιο επιβαρυνόμενα κύτταρα, αλλά και η επανάληψη της εξωγενούς χορήγησης σε μεταγενέστερο στάδιο κατά την στατική φάση.

3.17 Εντοπισμός της α-συνουκλεΐνης A53T στα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* μετά από χορήγηση εξωγενούς τρεχαλόζης

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η παρουσία της α-συνουκλεΐνης A53T στα κύτταρα των στελεχών του *S. cerevisiae* μετά την θεραπεία με τρεχαλόζη. Η τρεχαλόζη εμπλέκεται στην αποδιάταξη λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, επομένως η προσθήκη της θα μπορούσε να συσχετιστεί με τυχόν μεταβολή της εικόνας που θα παρουσίαζε η A53T στο εσωτερικό των κυττάρων. Για το σκοπό αυτό η διερεύνηση της A53T

πραγματοποιήθηκε με πειράματα ανοσοφθορισμού. Καλλιέργεια από κάθε στέλεχος *S. cerevisiae* αναπτύχθηκε σε συνθήκη υψηλής ωσμωτικότητας με χορήγηση τρεχαλόζης 4% την 5^η ημέρα ανάπτυξης. Η παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο πραγματοποιήθηκε την 8^η ημέρα (στατική φάση) κατά την οποία παρατηρείται και η τοξική επίδραση. Στη εικόνα 3.21 παρουσιάζονται για κάθε στέλεχος αντιπροσωπευτικές εικόνες της συνεστιακής μικροσκοπίας στη στατική φάση μετά την παρέμβαση με τρεχαλόζη αντιπαραβαλλόμενες με εκείνες απουσία της.

➤ **BY4741/ α -synA53T**

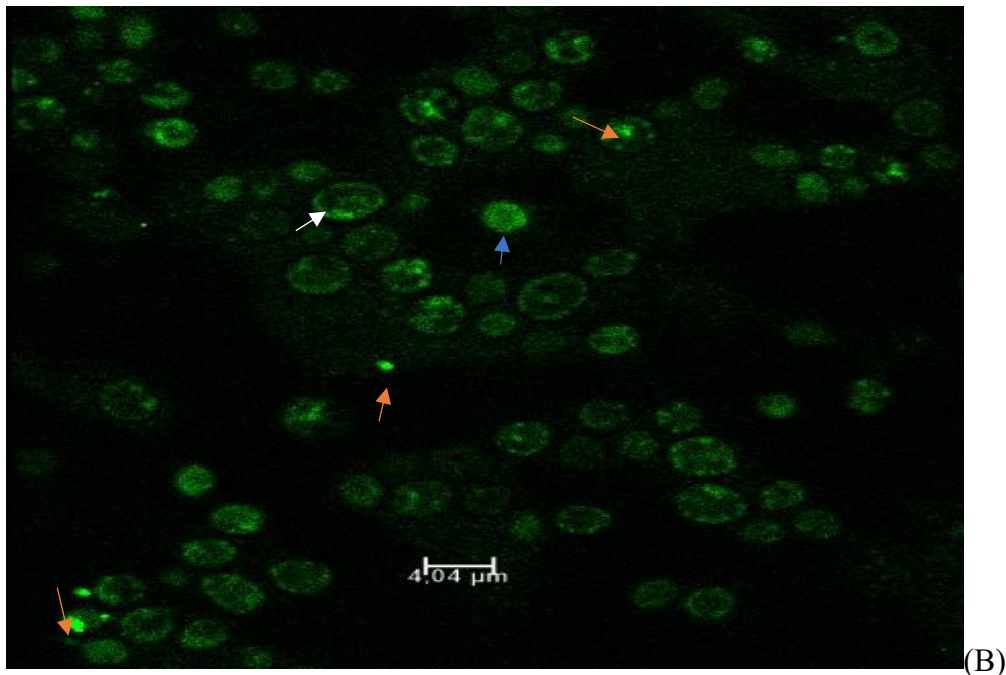
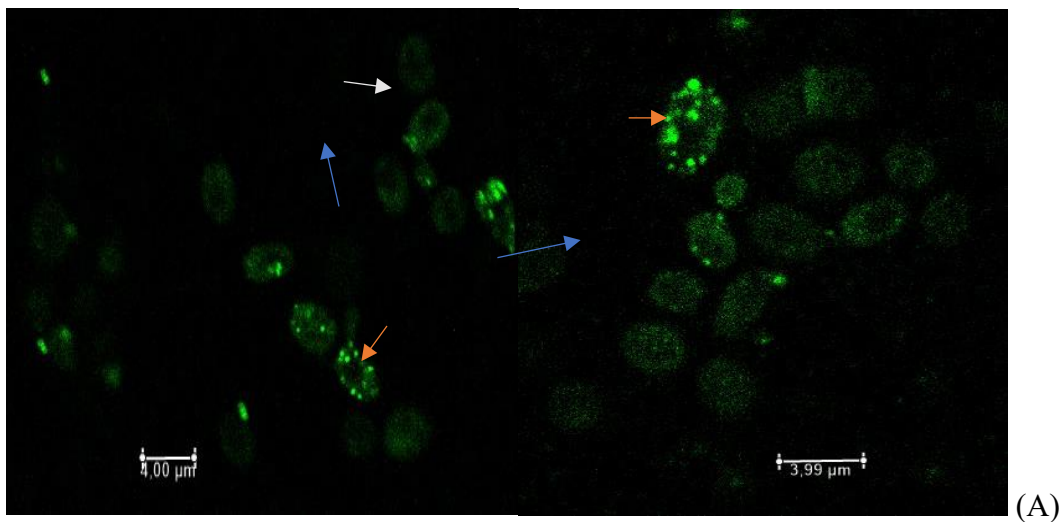


Εικόνα 3.21: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού της α -synA53T σε κύτταρα BY4741/ α -synA53T στατικής φάσης ανάπτυξης χωρίς (A) και με (B) προσθήκη τρεχαλόζης. (Κλίμακα 4 μ m) Παρατηρούνται κυτταροπλασματικά

συσσωματώματα (πορτοκαλί βέλος) και κυτταροπλασματική κατανομή της α-συνουκλεΐνης A53T (μπλε βέλος).

Αυτό που παρατηρεί κανείς στην εικόνα 3.21, όπου απεικονίζονται κύτταρα αγρίου τύπου BY4741 στη στατική φάση ανάπτυξης μετά την προσθήκη τρεχαλόζης, είναι πως η α-συνουκλεΐνη A53T εντοπίζεται κυρίως κυτταροπλασματικά με την ύπαρξη κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων να είναι παρούσα ενώ η μεμβρανική κατανομή απουσιάζει. Συγκρίνοντας την εικόνα αυτή με την αντίστοιχη χωρίς την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη αυτό που παρατηρείται είναι ότι η τρεχαλόζη εμφάνισε αποτελεσματικότητα έως ένα σημείο αφού τα συσσωματώματα με την τοξική μορφή των εγκλείστων είναι πιθανώς λιγότερα αλλά ακόμα εμφανή μετά την θεραπεία με την κυτταροπλασματική κατανομή της α-συνουκλεΐνης A53T να έχει αυξηθεί.

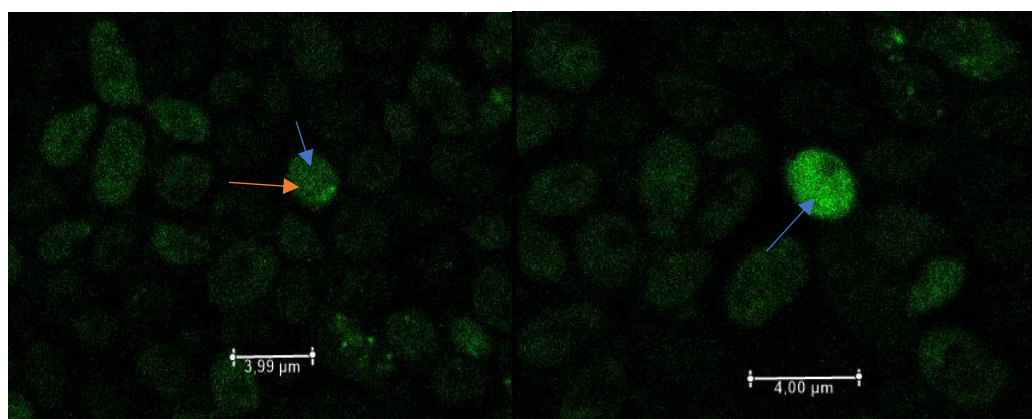
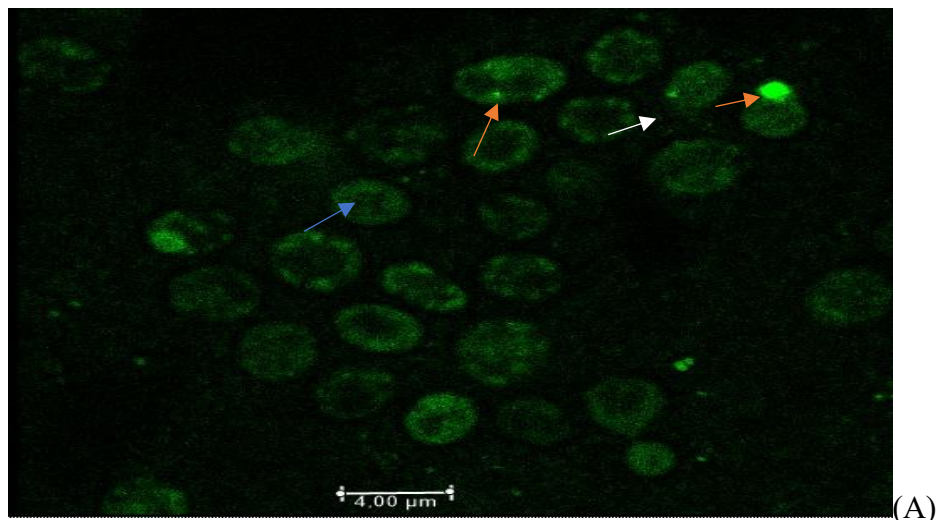
➤ *tps1Δ/A53T*

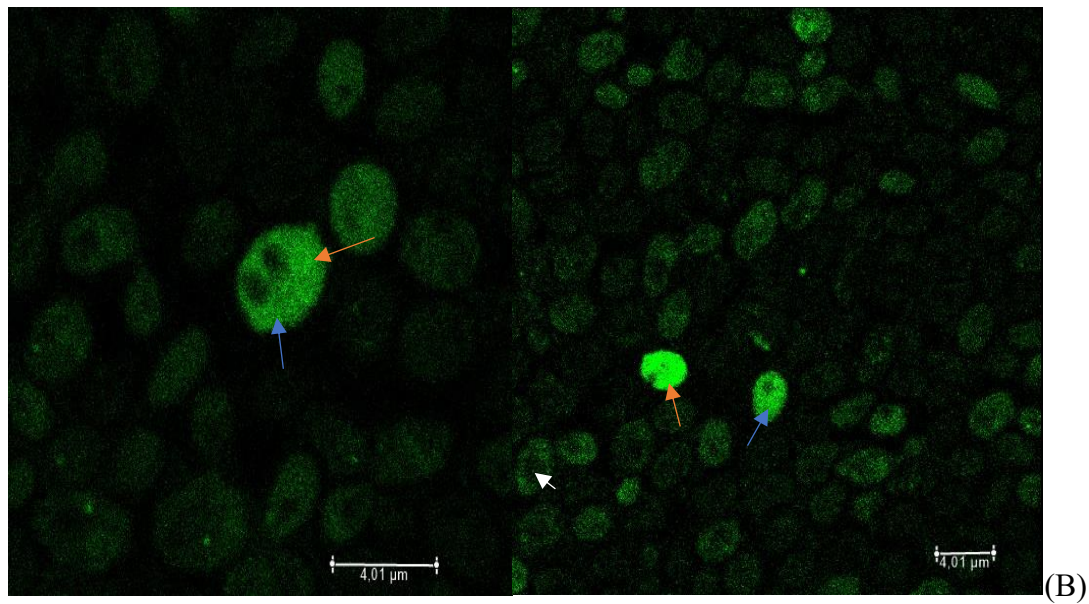


Εικόνα 3.22: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού της α -synA53T σε κύτταρα *tps1Δ/α-synA53T* στατικής φάσης ανάπτυξης χωρίς (A) και με (B) προσθήκη τρεχαλόζης. (Κλίμακα 4 μ m) Παρατηρείται κυτταροπλασματική κατανομή της α -συνουκλεΐνης A53T με μπλε βέλη, μεμβρανική κατανομή με λευκά βέλη και κυτταροπλασματικά συσσωματώματα που αναδεικνύονται με πορτοκαλί βέλη.

Παρατηρώντας κάποιος συγκριτικά τις παραπάνω φωτογραφίες της εικόνας 3.22 αυτό που διακρίνει είναι ότι στη στατική φάση ανάπτυξης μετά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη λαμβάνεται ένας μικτός φαινότυπος με κάθε πιθανή κατανομή και εντόπιση της α -συνουκλεΐνης A53T. Η παρέμβαση της τρεχαλόζης φαίνεται να μειώσει σε ορισμένο βαθμό τα κυτταροπλασματικά συσσωματώματα, ωστόσο αυτά δεν εξαλείφθηκαν, ενώ επίσης μεγάλος αριθμός κυττάρων εμφανίζει μεμβρανική εντόπιση της α -συνουκλεΐνης A53T. Οι παρατηρήσεις αυτές φαίνεται να συμφωνούν με τους παρατηρούμενους φαινότυπους των μελετών βιωσιμότητας όπου η τρεχαλόζη δεν εμφανίστηκε αποτελεσματική στην αναστροφή του τοξικού φαινοτύπου.

➤ *tps2Δ/A53T*

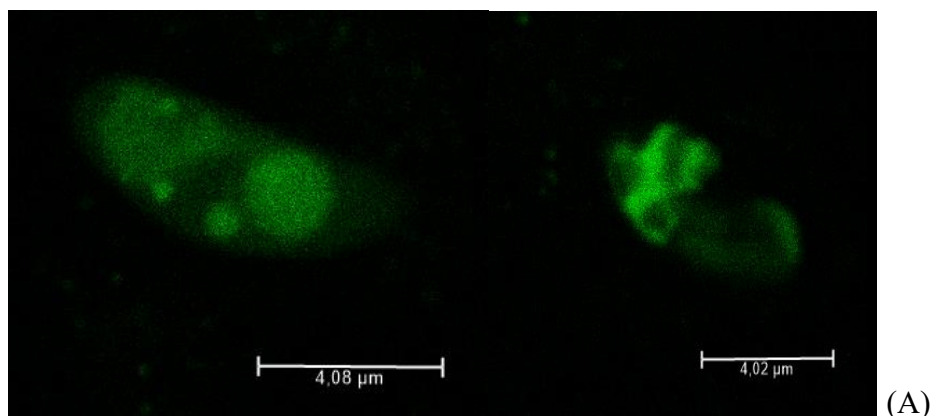


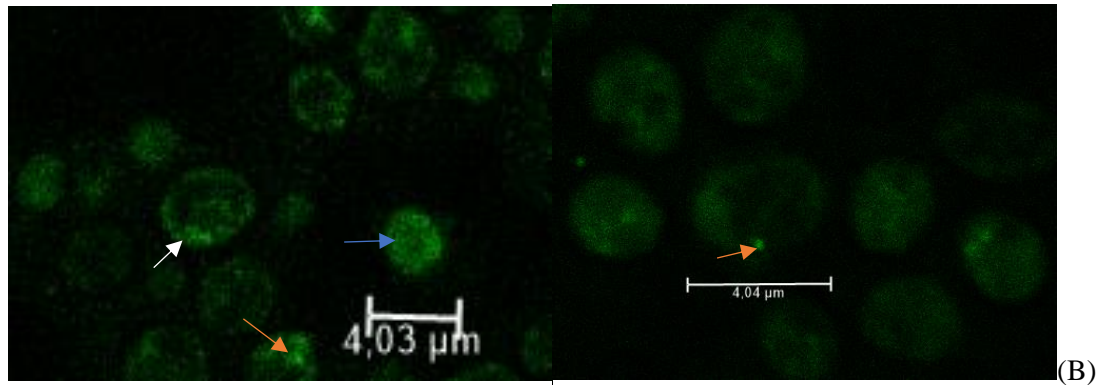


Εικόνα 3.23: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού της α -synA53T σε κύτταρα *tps2Δ/α-synA53T* στατικής φάσης ανάπτυξης χωρίς (A) και με (B) προσθήκη τρεχαλόζης. (Κλίμακα 4μm) Παρατηρείται κυτταροπλασματική κατανομή της α -συνουκλεΐνης A53T με μπλε βέλη, μεμβρανική κατανομή με λευκά βέλη και κυτταροπλασματικά συσσωματώματα που αναδεικνύονται με πορτοκαλί βέλη.

Αναφορικά τώρα με το στέλεχος *tps2Δ*, που φαίνεται να παρουσιάζει την μεγαλύτερη τοξικότητα από όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, εμφάνισε επίσης στοιχεία τοξικού φαινοτύπου και μετά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη. Πιο συγκεκριμένα παρουσιάζεται πάλι ένας μικτός φαινότυπος από κυτταροπλασματική κατανομή της α -συνουκλεΐνης A53T, μεμβρανική κατανομή της και κυτταροπλασματικά συσσωματώματα. Βέβαια μπορεί να παρατηρηθεί ότι η έντονη μεμβρανική εντόπιση μετά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη φαίνεται να υποχωρεί αυξάνοντας την κυτταροπλασματική κατανομή. Οπότε έως ένα σημείο φαίνεται πως η τρεχαλόζη χαρακτηρίζεται ως θετική παρέμβαση αλλά δεν μπορεί να άρει την ήδη υπάρχουσα τοξική κατάσταση εντός του κυττάρου. Η βιωσιμότητα των κυττάρων που εμφανίστηκε παραπάνω μειωμένη (καμπύλες χρονολογικής γήρανσης) παρά την προσθήκη τρεχαλόζης στο θρεπτικό υπόστρωμα φαίνεται να επαληθεύεται και στα πειράματα του ανοσοφθορισμού αφού ο φαινότυπος των κυττάρων επιβεβαιώνει αυτήν την τοξική κατάσταση.

➤ *tsl1Δ/A53T*





Εικόνα 3.24: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού της α -synA53T σε κύτταρα *ts11Δ/a-synA53T* στατικής φάσης ανάπτυξης χωρίς (A) και με (B) προσθήκη τρεχαλόζης. (Κλίμακα 4 μ m) Παρατηρείται κυτταροπλασματική κατανομή της α -συνουκλεΐνης A53T με μπλε βέλη, μεμβρανική κατανομή με λευκά βέλη και κυτταροπλασματικά συσσωματώματα που αναδεικνύονται με πορτοκαλί βέλη.

Τέλος όσον αφορά το μεταλλαγμένο στέλεχος *ts11Δ*, όπως διαπιστώθηκε και από την εικόνα των κυττάρων χωρίς την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη τόσο στην χρονολογική γήρανση όσο και στα πειράματα ανοσοφθορισμού η τοξικότητα που επικρατεί εντός των κυττάρων παρουσιάζεται πιο ήπια έως μηδαμινή συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη του *S. cerevisiae* που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, πριν και μετά την προσθήκη τρεχαλόζης στο θρεπτικό μέσο τα κύτταρα παρουσιάζουν κυτταροπλασματική και μεμβρανική κατανομή της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Κατά συνέπεια η ευεργετική δράση της τρεχαλόζης δεν εμφανίζει ιδιαίτερες μεταβολές στην εντόπιση της α -συνουκλεΐνης στο στέλεχος αυτό.

Συμπερασματικά, δύναται να δηλωθεί πως η παροχή εξωγενούς τρεχαλόζης ευνόησε έως ένα σημείο την βιωσιμότητα των παραπάνω στελεχών άλλων λιγότερο και άλλων περισσότερο. Αρκετά θετική θα μπορούσε να χαρακτηριστεί η παροχή τρεχαλόζης στο μεταλλαγμένο στέλεχος *tps1Δ* ενώ λιγότερο ευνοϊκή για το άγριο στέλεχος και το *tps2Δ*. Όσον αφορά το μεταλλαγμένο στέλεχος *ts11Δ* η θετική αυτή παρέμβαση δεν γίνεται να κριθεί διότι η τοξικότητα που επικρατεί στο συγκεκριμένο στέλεχος παρουσία της μεταλλαγής της α -συνουκλεΐνης είναι ελάχιστη.

3.18 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των στελεχών *S. cerevisiae* BY4741 και *tps1Δ* στην στατική φάση μετά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη

Έπειτα από την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη στην βιωσιμότητα των στελεχών του ζυμομύκητα, κρίθηκε σκόπιμο να επανεξεταστεί η μεταγραφική κατάσταση σε ορισμένα κρίσιμα γονίδια σε συγκεκριμένα στελέχη. Αυτό πραγματοποιήθηκε μέσω qPCR για τα στελέχη του αγρίου τύπου BY4741 και το *tps1Δ*, τα οποία και ανέδειξαν την μεγαλύτερη δυνατή απόκριση στην θεραπευτική παρέμβαση της τρεχαλόζης, στις μελέτες της παρούσας διπλωματικής εργασίας για την α -συνουκλεΐνη A53T. Αναφορικά με το στέλεχος *tps2Δ*, το ιδιαίτερα τοξικό προφίλ που εμφάνισε αλλά και η ελάχιστη θετική επίδραση της θεραπευτικής παρέμβασης με τρεχαλόζη στάθηκε ανασταλτικός παράγοντας μελέτης, ενώ το *ts11Δ*, φαίνεται να μην εμφανίζει ιδιαίτερη τοξικότητα στον φαινότυπό του ακόμα και χωρίς την παροχή τρεχαλόζης.

Τα γονίδια που μελετήθηκαν ήταν αυτά του *TPSI* και *ATG8*. Ένα κύριο γονίδιο του συμπλέγματος TPS και ένα γονίδιο κρίσιμο για την επαγωγή της αυτοφαγίας, με σημαντικές διακυμάνσεις σε πολλές προηγούμενες μελέτες. Μάλιστα η τρεχαλόζη όπως έχει προαναφερθεί λειτουργεί και αυτή ως επαγωγέας της αυτοφαγίας, οπότε οι εν λόγω μελέτες βοηθούν στην περαιτέρω κατανόηση και μελέτη των σχέσεων μεταξύ των ανωτέρω μορίων.

Τα υπό μελέτη δείγματα σε αυτά τα πειράματα qPCR προέρχονται από την στατική φάση χρονολογικής γήρανσης κατά την όγδοη ημέρα και έπειτα από την προσθήκη τρεχαλόζης την πέμπτη ημέρα ανάπτυξης. Και στην προκειμένη περίπτωση η αρχή της μεθόδου παραμένει ακριβώς ίδια όπως συνέβη και στα παραπάνω πειράματα qPCR και αναφέρεται και στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι 2.3.10.

Χρησιμοποιήθηκαν και εδώ παραπάνω από μία προσεγγίσεις για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR που σχετίζονται με την συνθήκη βαθμονόμησης.

Αρχικά και για τα δύο στελέχη, BY4741 και *tps1Δ*, ως συνθήκη βαθμονόμησης ορίστηκε η προ-εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης και απουσία α-συνουκλεΐνης A53T. Έπειτα ως συνθήκη βαθμονόμησης ορίστηκε η αντίστοιχη φάση ανάπτυξης για την συνθήκη μελέτης, δηλαδή η στατική φάση εν προκειμένω ύστερα από προσθήκη τρεχαλόζης και απουσία α-συνουκλεΐνης A53T. Στον πίνακα 3.11 παρατίθεται η πρώτη προσέγγιση για το BY4741 και η μεταγραφική κατάσταση κάθε γονιδίου στην στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων BY4741/pCM190αsynA53T χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης για άμεση συγκριτική ανάλυση. Στον πίνακα 3.12 αποτυπώνεται η δεύτερη προσέγγιση της ανάλυσης για το στέλεχος BY4741. Για μια πιο ολοκληρωμένη και σωστή εξαγωγή συμπερασμάτων κρίθηκε αναγκαίο πρώτα να παρουσιαστούν τα αποτελέσματα μελέτης του φορέα-μάρτυρα που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής Σφήκας Ε., 2020 (πίνακας 3.11).

Πίνακας 3.11: qPCR για τα γονίδια *TPSI* και *ATG8* στην στατική φάση ανάπτυξης του BY4741 μετά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη. Συνθήκη βαθμονόμησης: επίπεδο έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα BY4741/pCM190 στην προ-εκθετική φάση ανάπτυξης χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης. Συνθήκη μελέτης: επίπεδο έκφρασης στα κύτταρα BY4741/pCM190 στην στατική φάση ανάπτυξης με προσθήκη τρεχαλόζης. Mean: Μέσος όρος της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. PE: προ-εκθετική φάση. ST: στατική φάση και TRE+: η προσθήκη τρεχαλόζης εξωγενώς.

| <i>TPSI</i> | | | | | | |
|-------------------|-------|-------------|-------------|--------------------|-----------|-------------|
| Απουσία α-synA53T | | | | Παρουσία α-synA53T | | |
| BY4741 | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | P Value |
| ST TRE+/PE | 14,12 | 13,88-14,29 | 3,93204E-07 | 5,76 | 5,50-6,02 | 0,000308109 |

| <i>ATG8</i> | | | | | | |
|-------------------|-------|-------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|
| Απουσία α-synA53T | | | | Παρουσία α-synA53T | | |
| BY4741 | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | P value |
| ST TRE+/PE | 5,863 | 5,859-6,078 | 2,56195E-07 | 12,22 | 11,98-12,46 | 2,23563E-08 |

Πίνακας 3.12: qPCR για τα γονίδια *TPSI* και *ATG8* στην στατική φάση ανάπτυξης του *BY4741/pCM190 asynA53T* μετά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη. Συνθήκη βαθμονόμησης: επίπεδο έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα *BY4741/pCM190* στην αντίστοιχη φάση ανάπτυξης (στατική φάση) χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης. Συνθήκη μελέτης: επίπεδο έκφρασης στα κύτταρα *BY4741/pCM190asynA53T* στην στατική φάση ανάπτυξης. Mean: Μέσος όρος της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. PE: προ-εκθετική φάση. ST: στατική φάση. Με ST συμβολίζεται η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων ζυμομύκητα και TRE+ η προσθήκη τρεχαλόζης εξωγενώς.

| Αναλογία=Παρουσία <i>a-syn</i> A53T/Απουσία <i>a-syn</i> A53T | | | | | | |
|---|-------------|-----------|-------------|-------------|-----------|-------------|
| BY4741 | <i>TPSI</i> | | | <i>ATG8</i> | | |
| | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | P value |
| ST TRE+ | 0,40 | 0,38-0,43 | 1,37578E-05 | 2,1 | 2,04-2,15 | 1,66362E-09 |

Αναφορικά με την πρώτη προσέγγιση για το γονίδιο *TPSI* προκύπτουν κάποια χρήσιμα συμπεράσματα για τα μεταγραφικά επίπεδα του από τους πίνακες 3.11 και 3.12. Αρχικά συγκρίνοντας τους πίνακες 3.1 και 3.11 παρατηρείται πως επέρχεται μείωση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου μετά την προσθήκη τρεχαλόζης γεγονός που συμβαδίζει με τα όσα θα αναμενόταν αφού πλέον τα κύτταρα χρησιμοποιούν την εξωγενή παρά την ενδογενή μορφή της τρεχαλόζης. Παρουσία της μεταλλαγμένης μορφής A53T, παρατηρούνται εκ νέου τα κατασταλτικά φαινόμενα στην μεταγραφή του γονιδίου της συνθάσης, δείγμα των εμμενόντων συνθηκών τοξικότητας ακόμη και μετά την προσθήκη τρεχαλόζης. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν και με τις μελέτες βιωσιμότητας και τον φαινότυπο στις μελέτες μικροσκοπίας, όπου η τρεχαλόζη δεν ωφέλησε ιδιαίτερα την κυτταρική βιωσιμότητα.

Ακολούθως για το γονίδιο *ATG8*, το οποίο αποτελεί επαγωγέα της αυτοφαγίας κατά την παρουσία της μορφής A53T παρουσιάζεται αύξηση των μεταγραφικών του επιπέδων. Αυτό είναι κάτι που αναμενόταν βάσει βιβλιογραφίας αφού η παρουσία τρεχαλόζης αποτελεί επαγωγέα της αυτοφαγίας. Από την πρώτη προσέγγιση ανάλυσης των αποτελεσμάτων και τον πίνακα 3.11, τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου φαίνονται αρκετά αυξημένα παρουσία της μεταλλαγής της *a-syn* κλειψίνης. Η αυξημένη μεταγραφική ενεργοποίηση της αυτοφαγίας επιβεβαιώνεται και στη δεύτερη προσέγγιση που έλαβε χώρα παρουσία της μεταλλαγής της *a-syn* κλειψίνης στη συγκριτική ανάλυση των αντίστοιχων στατικών φάσεων. Τέλος αν γίνει σύγκριση των συγκεκριμένων αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα του πίνακα 3.1 φαίνεται πως αίρεται η κατασταλτική δράση της *a-syn* κλειψίνης A53T στην μεταγραφή του γονιδίου *ATG8* και μάλιστα ότι αντιστρέφεται η κατάσταση και αυξάνεται η μεταγραφή του γονιδίου παρουσία της εξωγενούς τρεχαλόζης. Το γεγονός αυτό αποτυπώνει επίσης μία κατάσταση απόκρισης στο στρες και ένα φαινότυπο μετατόπισης των φαινομένων τοξικότητας σε προωμότερα στάδια.

Αντίστοιχη πορεία ακολουθήθηκε και για το στέλεχος *tps1Δ*, με τις δύο προσεγγίσεις ανάλυσης δεδομένων να παρουσιάζονται στους πίνακες 3.13 και 3.14.

Πίνακας 3.13: qPCR για το γονίδιο *ATG8* στην στατική φάση ανάπτυξης του *tps1Δ*, μετά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη. Συνθήκη βαθμονόμησης: επίπεδο έκφρασης του γονιδίου στα κύτταρα *tps1Δ/pCM190* στην προ-εκθετική φάση ανάπτυξης χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης. Συνθήκη μελέτης: επίπεδο έκφρασης στα κύτταρα *tps1Δ/pCM190* στην στατική φάση ανάπτυξης με προσθήκη τρεχαλόζης. Mean: Μέσος όρος της

αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. PE: προ-εκθετική φάση. ST: στατική φάση και TRE+: η προσθήκη τρεχαλόζης εξωγενώς.

| ATG8 | | | | | | |
|--------------|------|-----------|-------------|--------------------|------------|----------|
| Απουσία SNCA | | | | Παρουσία SNCA A53T | | |
| <i>tps1Δ</i> | MEAN | R.V. | P value | MEAN | R.V. | P value |
| ST TRE+/PE | 15,1 | 14,7-15,4 | 0,000405055 | 31,52 | 31,06-31,7 | 0,000193 |

Πίνακας 3.14: : qPCR για το γονίδιο ATG8 στην στατική φάση ανάπτυξης του *tps1Δ*/pCM190α-synA53T μετά την θεραπευτική παρέμβαση με τρεχαλόζη. Συνθήκη βαθμονόμησης: επίπεδο έκφρασης του γονιδίου στα κύτταρα *tps1Δ* /pCM190 στην αντίστοιχη φάση ανάπτυξης (στατική φάση) χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης. Συνθήκη μελέτης: επίπεδο έκφρασης στα κύτταρα *tps1Δ* /pCM190α-synA53T στην στατική φάση ανάπτυξης με προσθήκη τρεχαλόζης. Mean: Μέσος όρος της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$. PE: προ-εκθετική φάση. ST: στατική φάση. ST: στατική φάση και TRE+: η προσθήκη τρεχαλόζης εξωγενώς.

| Αναλογία=Παρουσία α-synA53T /Απουσία α-synA53T | | | | | | | |
|--|------|----------|----------|---------|------|-----------|----------|
| <i>tps1Δ</i> | ATG8 | | | | | | |
| | MEAN | R.V. | P value | | MEAN | R.V. | P value |
| ST | 0,5 | 0,49-0,5 | 0,049833 | ST TRE+ | 2 | 1,98-2,01 | 0,020197 |

Σχετικά με την πρώτη προσέγγιση της ανάλυσης των αποτελεσμάτων qPCR από τους πίνακες 3.13 και 3.14 προκύπτει ότι τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου ATG8 παρουσία της α-συνουκλεΐνης A53T και με την εφαρμογή εξωγενούς τρεχαλόζης εμφανίζουν αρκετά μεγάλη αύξηση. Ως γνωστόν η τρεχαλόζη ευνοεί την διαδικασία της αυτοφαγίας και ήταν αναμενόμενο αυτό να αποτυπωθεί και σε μεταγραφικό επίπεδο.

Η κατάσταση αυτή επιβεβαιώνεται και από την δεύτερη προσέγγιση ανάλυσης όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 3.14. Στην συγκριτική ανάλυση των αντίστοιχων δύο στατικών φάσεων γήρανσης (Πίνακας 4.4) ανάμεσα στα κύτταρα του φορέα και σε αυτά με την α-συνουκλεΐνη A53T η μεταγραφική κατάσταση του γονιδίου παρουσιάζεται μειωμένη κατά το ήμισυ στα κύτταρα *tps1Δ*/pCM190α-synA53T. Όμως έπειτα από την προσθήκη τρεχαλόζης και στους δυο πληθυσμούς τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου σχεδόν διπλασιάζονται παρουσία της μεταλλαγής της α-συνουκλεΐνης, γεγονός που επαληθεύει τα ευρήματα της πρώτης προσέγγισης ανάλυσης. Τα φαινόμενα αυτά είναι ενδεικτικά μίας κατάστασης μετατόπισης των φαινομένων τοξικότητας της μορφής A53T προς την γενικευμένη απόκριση στο στρες για τα κύτταρα με υψηλά επίπεδα μεταγραφής του αυτοφαγικού γονιδίου. Μάλιστα, μπορεί να ισχυριστεί κανείς πως τα συσσωματώματα που εξαφανίστηκαν μετά την εφαρμογή της εξωγενούς τρεχαλόζης ενδέχεται να διαλύθηκαν με την ενεργοποίηση του αυτοφαγικού μηχανισμού.

Όπως έχει πραγματοποιηθεί και παραπάνω για τα μεταλλαγμένα στελέχη, έτσι και σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεταγραφικής κατάστασης του γονιδίου παρουσία τρεχαλόζης με τα αντίστοιχα του

αγρίου στελέχους ζυμομύκητα. Γι' αυτό το λόγο ως συνθήκη βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκε η στατική φάση ανάπτυξης των κυττάρων BY4741/pCM190 χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης (Πίνακας 3.16). Για να υπάρξει όμως πιο ολοκληρωμένη προσέγγιση αρχικά παρατίθεται η σύγκριση των δύο τύπου κυττάρων που φέρουν τον φορέα μάρτυρα-φορέα ως συνθήκη αναφοράς για πιο ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση της α -συνουκλεΐνης A53T (πίνακας 3.15). Οι αναλύσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής Σφήκας Ε., 2020 και αναδημοσιεύονται εδώ με άδεια του συγγραφέα στον πίνακα 3.15.

Πίνακας 3.15: qPCR για το γονίδιο *ATG8* στην στατική φάση ανάπτυξης των *S. cerevisiae tps1Δ* και BY4741. Συνθήκη βαθμονόμησης: επίπεδο έκφρασης του γονιδίου στα κύτταρα BY4741/pCM190 στην αντίστοιχη φάση ανάπτυξης (στατική φάση) χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης. Συνθήκη μελέτης: επίπεδο έκφρασης στα κύτταρα *tps1Δ* /pCM190 στην στατική φάση ανάπτυξης με προσθήκη τρεχαλόζης. Mean: Μέσος όρος της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$, ST: στατική φάση

| Αναλογία=Απουσία <i>TPS1</i> υπό TRE+/Παρουσία <i>TPS1</i> | | | |
|--|-------------|-----------|-------------|
| | <i>ATG8</i> | | |
| | Mean | R.V. | P value |
| ST | 0,15 | 0,13-0,17 | 0,000370053 |

Πίνακας 3.16: qPCR για το γονίδιο *ATG8* στην στατική φάση ανάπτυξης των *tps1Δ* και BY4741. Συνθήκη βαθμονόμησης: επίπεδο έκφρασης του γονιδίου στα κύτταρα BY4741/pCM190 στην αντίστοιχη φάση ανάπτυξης (στατική φάση) χωρίς την προσθήκη τρεχαλόζης. Συνθήκη μελέτης: επίπεδο έκφρασης του γονιδίου στα κύτταρα *tps1Δ* /pCM190asynA53T στην στατική φάση ανάπτυξης με προσθήκη τρεχαλόζης. Mean: Μέσος όρος της αναλογίας έκφρασης μεταξύ των εκάστοτε συνθηκών. SD: τυπική απόκλιση. P value: η τιμή με όριο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0,05$, ST: στατική φάση

| Αναλογία=Απουσία <i>TPS1</i> και Παρουσία <i>SNCA</i> A53T υπό TRE+/Παρουσία <i>TPS1</i> | | | |
|--|-------------|-----------|------------|
| | <i>ATG8</i> | | |
| | Mean | R.V. | P value |
| ST | 0,307 | 0,23-0,31 | 4,1345E-09 |

Παρατηρώντας τους πίνακες 3.15 και 3.16 και συγκρίνοντας τις δυο αναλύσεις η συνολική εικόνα που προκύπτει ταιριάζει με τις παραπάνω προσεγγίσεις που αναλύθηκαν. Παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου σχεδόν διπλασιάζονται επαληθεύοντας την θετική επίδραση της μεταλλαγής στο γονίδιο *ATG8* παρουσία εξωγενούς τρεχαλόζης. Ωστόσο, ο διπλασιασμός αυτός στα επίπεδα έκφρασης δεν κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα, οπότε ο ισχυρισμός πως τα συσσωματώματα καθαιρέθηκαν από τον μηχανισμό της αυτοφαγίας ενδεχομένως αποδυναμώνεται μετά από αυτό το εύρημα.

Κατά συνέπεια, όλα τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τις προηγούμενες παρατηρήσεις για τα κύτταρα *tps1Δ* που εμφάνισαν και την μεγαλύτερη διαφορά βιωσιμότητας στην προσθήκη τρεχαλόζης. Η αυξημένη τοξικότητα της συγκεκριμένης μεταλλαγής φαίνεται πως ενεργοποιεί σε μεγάλο βαθμό την διαδικασία της αυτοφαγίας στο μεταλλαγμένο στέλεχος με την προσθήκη τρεχαλόζης. Τα ευρήματα αυτά δεν ήταν τόσο έντονα στην σύγκριση με το αγρίο

τύπου στέλεχος. Η φαινοτυπική βελτίωση που παρουσίασαν τα κύτταρα με την προσθήκη τρεχαλόζης και η μείωση των κυτταροπλασματικών εγκλείστων πιθανώς αποδίδεται στις άμεσες βιοχημικές ιδιότητες του μορίου της τρεχαλόζης παρά στην επαγωγή της αυτοφαγίας μεταγραφικά.

4. Συζήτηση

Συζήτηση

Η α-συνουκλεΐνη αποτελεί κεντρικό αντικείμενο έρευνας στις παθολογικές καταστάσεις που προκαλούνται στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του ανθρώπου, κυρίως όταν υπερεκφράζεται στον ηλικιωμένο πληθυσμό. Η συνθήκη αυτή οδηγεί στη δημιουργία συσσωματωμάτων στο εσωτερικό των νευρώνων, γνωστών και ως σωμάτια Lewy (Lewy bodies), με τοξικές συνέπειες για τα κύτταρα.

Στη συγκεκριμένη εργασία διερευνήθηκε η ετερόλογη έκφραση της α-συνουκλεΐνης A53T, μίας σημειακής μεταλλαγής της πρωτεΐνης του αγρίου τύπου, σε στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae*, και συγκεκριμένα η τοξικότητα που προκαλεί στα κύτταρα, καθώς και η συσχέτισή της με βασικούς μεταβολικούς παράγοντες των κυττάρων του ζυμομύκητα. Επιλέχθηκε η συγκεκριμένη μορφή, διότι σε αυτήν αποδίδεται η μεγαλύτερη τοξικότητα και για το λόγο αυτό συγκεντρώνει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Ο *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιείται για τη μελέτη των νευροεκφυλιστικών διαταραχών, εφόσον πολλές βασικές κυτταρικές διαδικασίες παραμένουν ισχυρά διατηρημένες μεταξύ αυτού και των ανθρώπινων νευρικών κυττάρων παρόλη την εξελικτική απόσταση μεταξύ των κυττάρων της ζύμης και των νευρώνων. Κάποιοι σημαντικοί περιορισμοί βέβαια παραμένουν στο ζυμομύκητα αφού απουσιάζει η πολυκυτταρικότητα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών καθώς και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων όμως έχει χρησιμοποιηθεί ως οργανισμός-μοντέλο για την μελέτη των συνουκλεΐνοπαθειών (Outeiro TF et al. 2003).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος αγρίου τύπου BY4741, καθώς και μεταλλαγμένα παράγωγά του που είχαν απωλέσει κατά σειρά τη λειτουργικότητα των γονιδίων *TPS1*, *TPS2* και *TSL1*. Πρόκειται για κομβικά γονίδια που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση της τρεχαλόζης η οποία εμπλέκεται στη γενικευμένη απόκριση στο στρες, των οποίων η απουσία έκφρασης μεμονωμένα αναμένεται να επιβαρύνει την τοξικότητα εντός των κυττάρων. Η διερεύνηση της A53T στα κύτταρα αυτά θα αποκαλύψει το ρόλο αυτών των γονιδίων.

Η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε συνθήκη υψηλής ωσμωτικότητας (High Osmolarity, HO) προκειμένου να αυξηθεί το εύρος ζωής τους. Αυτή η συνθήκη προσφέρει στα κύτταρα μακροζωία και περαιτέρω ανθεκτικότητα σε στρεσογόνες καταστάσεις, διότι εκτρέπει από νωρίς τον μεταβολισμό των κυττάρων προς τη βιοσύνθεση τρεχαλόζης και γλυκερόλης που θα αποτελέσουν την κύρια πηγή ενέργειας (Kaeberlein et al., 2002, Burtner et al. 2009).

4.1 Η επίδραση της α-συνουκλεΐνης A53T στον *S. cerevisiae* BY4741

Αναμφισβήτητα, η παρουσία της α-συνουκλεΐνης A53T επιβαρύνει σημαντικά το εύρος ζωής των κυττάρων του ζυμομύκητα συγκριτικά με τα κύτταρα που δεν την εκφράζουν (αρνητικός μάρτυρας). Η συνθήκη της υψηλής ωσμωτικότητας ευνοεί τη

βιωσιμότητα των κυττάρων μόνο κατά το πρώτο χρονικό διάστημα της ανάπτυξης, η οποία εμφανίζεται αυξημένη συγκριτικά με την ανάπτυξη στο συνηθισμένο θρεπτικό μέσο. Από την 5^η ημέρα η βιωσιμότητα ελαττώνεται και εξισώνεται στα δύο διαφορετικά θρεπτικά μέσα.

Τα πειράματα του ανοσοφθορισμού για το παραπάνω στέλεχος κατέδειξαν κυρίως μεμβρανική εντόπιση της α -συνουκλεΐνης A53T στην εκθετική φάση ανάπτυξης, γεγονός που εξηγεί ένα αρχικό στάδιο τοξικότητας. Στις αψώτερες φάσεις ανάπτυξης εντοπίζεται κυρίως κυτταροπλασματικά με χαρακτηριστική την εμφάνιση συσσωματωμάτων. Μέσω αυτής της εικόνας μπορεί να ερμηνευθεί και ο τοξικός φαινότυπος που λαμβάνεται κατά τη γήρανση. Η ποσότητα της α -συνουκλεΐνης A53T επιβεβαιώνεται από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης Western όπου παρατηρείται ότι αυξάνεται βαθμιαία συν τω χρόνω με τη μέγιστη συγκέντρωση να εντοπίζεται στη στατική φάση ανάπτυξης.

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι κατά την εκθετική φάση η κατανομή της α -συνουκλεΐνης στα κύτταρα του ζυμομύκητα παρατηρείται κυρίως στις μεμβράνες, ενώ στη στατική φάση σε μορφή κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η τοξικότητα που εδραιώνεται τελικά στα κύτταρα. (Dixon, Mathias, Zweig, Davis, & Gross, 2005; Outeiro & Lindquist, 2003; Sharma et al., 2006) Η υψηλή ωσμωτικότητα που εφαρμόζεται στις συνθήκες ανάπτυξης και δρα ευεργετικά στη μακροζωία των κυττάρων του ζυμομύκητα, φαίνεται να παρέχει κάποια μικρή υποχώρηση αυτού του τοξικού φαινομένου τουλάχιστον στην περίπτωση της αγρίου τύπου α -συνουκλεΐνης (Sfikas E., Zolder S. et al. 2017). Εντούτοις, δεν παρατηρείται το ίδιο παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T, γεγονός που επιβεβαιώνει την αυξημένη τοξικότητά της και στα κύτταρα του ζυμομύκητα.

Στη συνέχεια μελετήθηκε το επίπεδο μεταγραφής των γονιδίων *TPS1*, *TPS2* και *TSL1* που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της τρεχαλόζης, του γονιδίου *ATG8* που στα πλαίσια της αυτοφαγίας συντελεί στην απομάκρυνση των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, καθώς και του γονιδίου *TOR1* που σχετίζεται με την αίσθηση θρεπτικών στοιχείων στο περιβάλλον. Όλα τα παραπάνω γονίδια σχετίζονται μεταξύ τους, εφόσον καθένα από αυτά κατέχει ξεχωριστό ρόλο ως προς την εκδήλωση πρωτεοτοξικού στρες μέσα από κρίσιμα μεταβολικά μονοπάτια. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με qPCR σε τέσσερις φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων (προ-εκθετική, εκθετική, μετα-διαυξική και στατική) για να εντοπιστεί η μεταγραφική μεταβολή του καθενός ξεχωριστά με τη πάροδο του χρόνου αλλά και η συσχέτισή τους.

Η τρεχαλόζη είναι ένας σταθεροποιητικός δισακχαρίτης με ιδιότητα την αποσυσώρευση-αποδιάταξη λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και συσσωματωμάτων που προκαλούν στρες στο κύτταρο (Singer M. A. et al., 1998), ενώ δρα και ως ενεργοποιητής της αυτοφαγίας (Ruzza P. et al., 2015, Sarkar S. et al., 2006). Τα γονίδια *TPS1*, *TPS2* και *TSL1* διαθέτουν STREs cis δρώντα στοιχεία ανοδικά των υποκινητών τους υπεύθυνα για την ρύθμιση και συμμετοχή στην γενικευμένη κυτταρική απόκριση στο στρες. Η συνθήκη της υπερωσμωτικότητας ευνοεί την παραγωγή τρεχαλόζης και γλυκερόλης. Το γεγονός ότι η α -συνουκλεΐνη A53T παρουσιάζει ιδιαίτερα αυξημένη συσώρευση αποτελεί έναν ακόμη λόγο μελέτης της μεταγραφικής ενεργοποίησης του συμπλόκου TPS.

Τα τρία αυτά γονίδια ακολουθούν ένα κοινό μοτίβο μεταγραφής παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T. Στην προ-εκθετική και εκθετική φάση ανάπτυξης, το κύτταρο,

για να ανταπεξέλθει στην τοξική κατάσταση-στρες που υπόκειται, φαίνεται να ενεργοποιεί τα γονίδια βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης, όπως αποτυπώνεται από τα υψηλά μεταγραφικά επίπεδά τους συγκριτικά με την απουσία α-συνουκλεΐνης A53T. Αυτό όμως δεν συνεχίζεται στην μετα-διαυξική και στατική φάση ανάπτυξης, με το επίπεδο μεταγραφής των γονιδίων να μειώνεται σημαντικά συγκριτικά με το αντίστοιχο απουσία της μεταλλαγής της α-συνουκλεΐνης. Συγκριτικά με την αγρίου τύπου, παρατηρείται μεγαλύτερη μεταγραφική ενεργοποίηση των βιοσυνθετικών γονιδίων παρουσία της μεταλλαγής της α-συνουκλεΐνης κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης.

Η καταπόνηση στο κύτταρο επάγει το μεταβολικό μονοπάτι TOR το οποίο ρυθμίζει αρνητικά την αυτοφαγία. Είναι επομένως αναμενόμενο να επηρεάζει την παραγωγή τρεχαλόζης που συντίθεται κυρίως σε συνθήκες στρες για το κύτταρο. Προ-εκθετικά παρατηρείται καταστολή των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου, ενδεικτικό στοιχείο έντονου στρες λόγω της παρουσίας της α-συνουκλεΐνης A53T. Αντίθετα, κάτι τέτοιο δεν φαίνεται να αποτυπώνεται μεταγραφικά στις επόμενες φάσεις ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, στην εκθετική και ιδιαίτερα στη μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης παρατηρείται μεταγραφική αύξηση συγκριτικά με την απουσία α-συνουκλεΐνης, το οποίο θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως μεταβολική αποδιοργάνωση του κυτταρικού μονοπατιού.

Η επαγωγή της αυτοφαγίας ανιχνεύεται έμμεσα μέσω της έκφρασης του γονιδίου *ATG8*. Πρόκειται για έναν μηχανισμό που συμμετέχει στην προστασία των κυττάρων από την λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών στον ζυμομύκητα και η ενεργοποίησή του στις απώτερες φάσεις ανάπτυξης εξυπηρετεί την ανακύκλωση τυχόν παραπροϊόντων του μεταβολισμού και για περαιτέρω επιβίωση. (Cebollero & Reggiori, 2009; Inoue & Klionsky, 2010) Τα μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου ακολουθούν αυτά των γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή τρεχαλόζης, δηλαδή ενεργοποίηση στις πρώιμες φάσεις ανάπτυξης με το μέγιστο επίπεδο να σημειώνεται στην εκθετική. Αυτό το εύρημα συμβαδίζει με τη βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία το προϊόν του γονιδίου *TPS2* ρυθμίζει θετικά την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας με αυξημένη την έκφραση του *ATG8* (Kim et al., 2020). Τα γεγονότα αυτά μπορούν να ερμηνευθούν ως μια απόκριση του κυττάρου, ώστε να ανταπεξέλθει στην τοξικότητα που προκαλεί η α-συνουκλεΐνη A53T. Στην συνέχεια όμως παρατηρείται μειωμένη έκφραση στις υπόλοιπες φάσεις ανάπτυξης. Φαίνεται ότι ο μηχανισμός της αυτοφαγίας ενεργοποιείται, για να ανταπεξέλθει στην αυξημένη συσσώρευση της πρωτεΐνης, ενώ στις απώτερες φάσεις ανάπτυξης και ιδιαίτερα στη γήρανση το μεταγραφικό επίπεδο του γονιδίου μειώνεται και ταυτόχρονα παρατηρείται αύξηση των συσσωματωμάτων στο εσωτερικό των κυττάρων. Επομένως η αυτοφαγία παραμένει αρχικά ενεργή και σε υψηλά επίπεδα, συμβάλλοντας στην αποσυσσώρευση της πρωτεΐνης, ενώ όταν μειώνεται η δράση της αυτό αντικατοπτρίζεται στο εσωτερικό των κυττάρων με μια τοξική για αυτά κατάσταση. Ίσως η δράση της να μειώνεται, ακριβώς επειδή αυξάνεται η α-συνουκλεΐνη A53T και αυτό αντιμετωπίζεται όλο και ασθενέστερα από το κύτταρο.

Συμπερασματικά, επιβεβαιώνεται η τοξική δράση της α-συνουκλεΐνης A53T στο αγρίου τύπου *S.cerevisiae* BY4741, η οποία περιορίζεται μεν από τη συνθήκη της υψηλής ωσμωτικότητας, αλλά μόνο μέχρι την εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων. Η μέγιστη δυνατότητα απόκρισης στο στρες που παρατηρείται συμβαδίζει με την υψηλότερη παρατηρούμενη μεταγραφική ενεργοποίηση των μηχανισμών βιοσύνθεσης τρεχαλόζης και ενεργοποίησης της αυτοφαγίας. Στην πορεία αυτοί οι

δύο μηχανισμοί δείχνουν να υποχωρούν από τις τοξικές επιδράσεις της α -συνουκλεΐνης A53T, όπως αναδεικνύεται μεταγραφικά. Επιπλέον, η σχέση μεταξύ των γονιδίων *TOR1* και *ATG8* φαίνεται να υφίσταται μία πιθανή μεταγραφική απορρύθμιση που εγκαθίσταται πλέον στα κύτταρα.

4.2 Η επίδραση της α -συνουκλεΐνης A53T στο μεταλλαγμένο παράγωγο *S. cerevisiae* BY4741 *tps1Δ*

Για να διερευνηθεί ο ρόλος της ενδογενούς τρεχαλόζης του ζυμομύκητα σε σχέση με την α -συνουκλεΐνη A53T, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί ο ρόλος των τριών γονιδίων *tps1Δ*, *tps2Δ* και *tsl1Δ* που εμπλέκονται στη βιοσύνθεσή της. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T σε μεταλλαγμένα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* ως προς τη βιοσύνθεση της τρεχαλόζης, καθένα από τα οποία έχει απωλέσει ξεχωριστά τη λειτουργικότητα ενός από τα παραπάνω γονίδια. Κατ' αυτόν τον τρόπο δίνεται έμφαση στη σημαντικότητα του κάθε γονιδίου και αποκαλύπτεται περαιτέρω η σχέση τόσο η μεταξύ τους, όσο και με τα υπόλοιπα μελετώμενα γονίδια. Η μελέτη των στελεχών αυτών πραγματοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση υπό υψηλή ωσμωτικότητα, ώστε να επάγονται τα γονίδια του συμπλόκου TPS από την αρχή της κυτταρικής ανάπτυξης.

Το στέλεχος *tps1Δ*, το οποίο έχει απωλέσει την λειτουργικότητα του γονιδίου *TPS1*, είναι ελλειμματικό ως προς τη βιοσύνθεση τρεχαλόζης. (Kyryakon et al., 2012) Κατά συνέπεια, αναμένεται από τα κύτταρα αυτά να μην διαθέτουν οποιαδήποτε ευεργετική δράση που προέρχεται από την τρεχαλόζη με κυριότερες στην προκειμένη περίπτωση την αποσυσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας. Πράγματι, από τα πειράματα βιωσιμότητας προέκυψε ότι η α -συνουκλεΐνη A53T προκαλεί στα κύτταρα *tps1Δ* ακόμα μεγαλύτερη επιβάρυνση από ότι στα κύτταρα του αγρίου τύπου BY4741. Εξάλλου, το *tps1Δ* στη γήρανση είναι πιο ευαίσθητο από τα κύτταρα του αγρίου τύπου BY4741. Η υψηλή ωσμωτικότητα δεν αυξάνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων, γεγονός αναμενόμενο εφόσον το συγκεκριμένο στέλεχος είναι ελλειμματικό ως προς τη σύνθεση τρεχαλόζης. Τα αποτελέσματα της συνεστιακής μικροσκοπίας επιβεβαιώνουν τον παραπάνω φαινότυπο με την εμφάνιση κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων από την εκθετική φάση ανάπτυξης που εντάθηκε κατά την γήρανση των κυττάρων. Το ίδιο διαφαίνεται και στην ανοσοαποτύπωση Western όπου η ποσότητα της α -συνουκλεΐνης A53T είναι ιδιαίτερα υψηλή από την εκθετική φάση ανάπτυξης και παραμένει έτσι μέχρι τη στατική.

Η μελέτη σε μεταγραφικό επίπεδο παρουσία και απουσία της α -συνουκλεΐνης A53T ανέδειξε έντονη την επίδρασή της σε όλα τα μελετώμενα γονίδια. Καταρχάς, παρατηρήθηκε μία γενική εικόνα καταστολής της μεταγραφής των *TPS2*, *TSL1* και *ATG8* στις περισσότερες φάσεις ανάπτυξης. Εξάιρεση αποτελεί η εκθετική φάση κατά την οποία το επίπεδο μεταγραφής των *TPS2* και *ATG8* αυξήθηκε ελαφρά, προκειμένου πιθανώς να αντεπεξέλθει στην τοξική κατάσταση που επιβάλλει η A53T. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, όπου αναφέρεται ότι η μεταγραφή του γονιδίου *TPS2* ρυθμίζει θετικά αυτήν του *ATG8* (Kim et al., 2020).

Όμοια εικόνα προκύπτει και από την σύγκριση των μεταγραφικών επιπέδων του μεταλλαγμένου στελέχους παρουσία της α -συνουκλεΐνης A53T με αυτά των κυττάρων αγρίου τύπου. Η μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση των *TPS2*, *TSL1* και *ATG8* εντοπίζεται ξανά στην εκθετική φάση, γεγονός που υποδηλώνει κι εδώ ότι

μέσω του *TPS2* ενεργοποιείται και η μεταγραφή του *ATG8* πριν την πλήρη καταστολή τους. Στις επόμενες φάσεις ανάπτυξης η μεταγραφή φαίνεται να βρίσκεται υπό καταστολή. Παράλληλα υπάρχει μεταγραφική καταστολή του μονοπατιού TOR, σύμφωνη με την μεταγραφική απόκριση των υπολοίπων μελετώμενων γονιδίων. Από τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων που αποτυπώνουν έως ένα σημείο την μεταβολική κατάσταση των κυττάρων προκύπτει ότι οι συνθήκες καταπόνησης εδραιώνονται από την αρχή της ζωής των κυττάρων, χωρίς αυτά να μπορούν να αντιδράσουν αποτελεσματικά. Η εικόνα αυτή που παρουσιάζει το συγκεκριμένο στέλεχος σε μεταγραφικό επίπεδο εν τέλει συμβαδίζει απόλυτα με τον φαινότυπο των κυττάρων και την τοξικότητα που εμφανίζουν.

Συμπερασματικά επομένως διαπιστώνεται ότι στο μεταλλαγμένο στέλεχος *tps1Δ* η επίδραση της A53T ήταν ιδιαίτερα επιβαρυντική. Η συνθήκη της τρεχαλόζης φαίνεται να είναι απαραίτητη, ώστε η συνθήκη υψηλής ωσμωτικότητας να είναι αποτελεσματική στον όποιο βαθμό έναντι της α -συνουκλεΐνης A53T.

4.3 Η επίδραση της α -συνουκλεΐνης A53T στο μεταλλαγμένο παράγωγο *S. cerevisiae* BY4741 *tps2Δ*

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η μελέτη του στελέχους *tps2Δ*, από το οποίο απουσιάζει η φωσφατάση της τρεχαλόζης. Κατά συνέπεια, παρατηρείται συσσώρευση της ενδιάμεσης 6-φωσφο-τρεχαλόζης, προϊόν που θεωρείται τοξικό. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη συσσώρευση της α -συνουκλεΐνης A53T αναμένεται να οδηγήσει σε μια ακόμη πιο επιβαρυνμένη κατάσταση τα κύτταρα δημιουργώντας ακόμα πιο έντονο στρες.

Από τις καμπύλες βιωσιμότητας αυτού του στελέχους διαπιστώνεται ότι τα κύτταρα παρουσία οποιασδήποτε μορφής α -συνουκλεΐνης εμφανίζουν επιβαρυνμένο φαινότυπο, ιδιαίτερα παρουσία της μεταλλαγής α -συνουκλεΐνης A53T. Όταν απουσιάζει η α -συνουκλεΐνη, η συνθήκη υψηλής ωσμωτικότητας δρα ευεργετικά στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Και ενώ παρουσία της αγρίου τύπου α -συνουκλεΐνης η επίδραση της HO παρουσιάζεται ελάχιστη, παρουσία της πιο τοξικής μεταλλαγής της αποδεικνύεται πως ο ευεργετικός αυτός παράγοντας αδυνατεί να ωφελήσει τα κύτταρα. Το γεγονός αυτό αρχικά οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πέραν της συνθάσης της τρεχαλόζης, η φωσφατάση της τρεχαλόζης είναι επίσης απαραίτητη για την ευεργετική δράση της συνθήκης HO.

Τα αποτελέσματα της συνεστιακής μικροσκοπίας επιβεβαιώνουν τον παραπάνω επιβαρυνμένο φαινότυπο με την εμφάνιση κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων από την πρώιμη φάση ανάπτυξης που διατηρήθηκαν έως και την φάση γήρανσης. Το ίδιο συμβαίνει και στην ανοσοαποτύπωση Western όπου η ποσότητα της α -συνουκλεΐνης A53T είναι σταθερά υψηλή σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης.

Η επιβαρυνμένη όμως εικόνα αυτή των κυττάρων αποτυπώνεται και σε μεταγραφικό επίπεδο στις μελέτες qPCR των μελετώμενων γονιδίων. Στην πρώτη σύγκριση απουσία και παρουσία α -συνουκλεΐνης A53T στο εν λόγω στέλεχος το μεταγραφικό επίπεδο των υπόλοιπων βιοσυνθετικών γονιδίων της τρεχαλόζης παραμένει χαμηλό, ενώ το ίδιο συμβαίνει με το γονίδιο *ATG8* σε όλες τις φάσεις ανάπτυξης, ακόμα και στην εκθετική (σε αντίθεση με το *tps1Δ*), γεγονός που υποδεικνύει καταστολή της αυτοφαγίας. Η εικόνα αυτή της μεταγραφικής κατάστασης της αυτοφαγίας στην εκθετική φάση ανάπτυξης δεν έχει εμφανιστεί σε κανένα άλλο στέλεχος: αντίθετα,

στην συγκεκριμένη φάση ανάπτυξης εντοπίζεται συνήθως το μέγιστο δυνατό επίπεδο μεταγραφής του *ATG8*. Σε αυτή την κατάσταση πολύ πιθανό ρόλο ενδέχεται να διαδραματίζει η απουσία του *TPS2*, ενός γονιδίου που αποδεδειγμένα ρυθμίζει θετικά τη μεταγραφική ενεργοποίηση του *ATG8* (B. Kim, Lee, Choi, & Huh, 2020). Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύθηκαν ακόμα περισσότερο όταν έγινε σύγκριση με αυτά του αγρίου στελέχους, αποδεικνύοντας την πλέον επιβαρυσμένη κατάσταση των κυττάρων σε όλα τα επίπεδα. Στην προκειμένη συγκριτική μελέτη φαίνεται ότι το μεταγραφικό επίπεδο των υπόλοιπων βιοσυνθετικών γονιδίων της τρεχαλόζης αλλά και του επαγωγέα της αυτοφαγίας *ATG8* μειώνεται σημαντικά στα κύτταρα *tps2Δ* παρουσία της μεταλλαγμένης α -συνουκλεΐνης.

Συμπερασματικά, το στέλεχος *tps2Δ* εμφάνισε τον πιο επιβαρυσμένο φαινότυπο σε όλες τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, αναδεικνύοντας μια γενικευμένη τοξικότητα παρουσία της μεταλλαγής της α -συνουκλεΐνης. Αυτό πιθανώς να οφείλεται και στην ενδεχόμενη συσσώρευση της 6-φωσφοτρεχαλόζης επιβαρύνοντας ακόμα περισσότερο το κύτταρο.

4.4 Η επίδραση της α -συνουκλεΐνης A53T στο μεταλλαγμένο παράγωγο *S. cerevisiae* BY4741 *ts11Δ*

Το στέλεχος *ts11Δ* έχει απωλέσει την ικανότητα παραγωγής της υπομονάδας Tsl1p που ρυθμίζει την ενεργοποίηση του συμπλόκου TPS και ειδικότερα της συνθάσης της τρεχαλόζης. Η απουσία του μορίου αυτού δεν εμποδίζει την παραγωγή ολοκληρωμένης μορφής τρεχαλόζης, παρά μόνο επηρεάζει την ευαισθησία ως προς την ρύθμιση παραγωγής της (Kyryakov et al., 2012, Trevisol E. et al., 2014).

Από τις καμπύλες βιωσιμότητας διαπιστώθηκε ότι παρουσία υψηλής ωσμωτικότητας το *ts11Δ* τείνει περισσότερο προς την εικόνα που παρουσίασε το αγρίου τύπου στέλεχος παρουσία της μεταλλαγής της α -συνουκλεΐνης παρά προς τα μεταλλαγμένα στελέχη. Παρά την αποδεδειγμένη ιδιαίτερη τοξικότητα της μεταλλαγής της α -συνουκλεΐνης A53T, τα αποτελέσματα από την παρουσία της δεν αποκλίνουν ιδιαίτερα από αυτά παρουσία της αγρίου τύπου μορφής α -συνουκλεΐνης προσεγγίζοντας τα αντίστοιχα του αγρίου στελέχους BY4741. Η εικόνα αυτή έρχεται σε αντίθεση με την διεθνή βιβλιογραφία όπου το στέλεχος *ts11Δ* παρουσιάζεται ασθενικό παρουσία α -συνουκλεΐνης (Willingham, Outeiro, DeVit, Lindquist, & Muchowski, 2003), αν και στην παρούσα εργασία η βιωσιμότητα των κυττάρων απουσία της συνθήκης HO δεν αποκλίνει ιδιαίτερα από αυτή των υπόλοιπων μεταλλαγμένων στελεχών. Ενδεχομένως η συνθήκη υπερωσμωτικότητας μπορεί και συμβάλλει, ώστε να αντισταθμιστεί η απουσία της υπομονάδας Tsl1p, και έτσι να παράγεται πιθανώς λιγότερη ποσότητα τρεχαλόζης, επαρκής ωστόσο για την ευεργετική δράση της HO.

Η ποσότητα της α -συνουκλεΐνης A53T είναι σταθερά υψηλή σε όλες σχεδόν τις φάσεις ανάπτυξης, όπως φαίνεται και στην ανοσοαποτύπωση Western. Εντούτοις αυτό δεν αποτυπώνεται με συσσωματώματα, αλλά κυρίως με κυτταροπλασματική και μεμβρανική κατανομή της πρωτεΐνης, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της συνεστιακής μικροσκοπίας. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με την εικόνα της βιωσιμότητας των κυττάρων.

Συμπερασματικά, το στέλεχος *ts11Δ*, φαίνεται να ευνοείται σαφώς από την συνθήκη της υπερωσμωτικότητας. Επιπλέον, είναι το μόνο από τα μεταλλαγμένα στελέχη στο

οποίο η συνθήκη HO βελτίωσε σε σημαντικό βαθμό την βιωσιμότητα του η οποία έφθασε το επίπεδο του BY4741. Παρά την απουσία του ρυθμιστικού γονιδίου *TSL1* και την υψηλή έκφραση της α-συνουκλεΐνης A53T, το βιολογικό προφίλ του *tsl1Δ* εμφάνισε παρόμοια ισορροπία με αυτό των κυττάρων του αγρίου τύπου.

4.5 Η χορήγηση εξωγενούς τρεχαλόζης στα κύτταρα του *S. cerevisiae* ως μέσο θεραπευτικής παρέμβασης έναντι της τοξικότητας της α-συνουκλεΐνης A53T

Από όλα τα παραπάνω καθίσταται προφανές ότι η μεταλλαγμένη α-συνουκλεΐνη A53T επιβαρύνει σε μεγάλο βαθμό την βιωσιμότητα των κυττάρων του ζυμομύκητα. Αυτό αποτυπώνεται ιδιαίτερα στα μεταλλαγμένα στελέχη, γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία της τρεχαλόζης για την αντιμετώπιση της συσσώρευσης πρωτεϊνών. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε η προσθήκη εξωγενούς τρεχαλόζης σε όλα τα στελέχη, ώστε να διερευνηθεί, αν όντως έχει ωφέλιμα αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της παθογένειας που δημιουργεί η α-συνουκλεΐνη A53T. Η προσθήκη τρεχαλόζης πραγματοποιήθηκε την πέμπτη ημέρα ανάπτυξης των κυττάρων κατά την μετα-διαυξική φάση ανάπτυξης, για να μελετηθεί τυχόν μεταβολή στη βιωσιμότητα των κυττάρων στην στατική φάση. Έως τώρα το συγκεκριμένο θεραπευτικό μοντέλο έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο σε κύτταρα θηλαστικών αλλά και ανθρώπινων νευρικών κυττάρων όπου έχει διαπιστωθεί η ευεργετική δράση της τρεχαλόζης. (Aguib et al., 2009; Renna, Jimenez-Sanchez, Sarkar, & Rubinsztein, 2010; Sarkar, Davies, Huang, Tunnacliffe, & Rubinsztein, 2007) Λιγότερες μελέτες υπάρχουν για εφαρμογή του σε κύτταρα ζυμομύκητα σε αντίστοιχη μοντελοποίηση πρωτεοπαθειών όπως η νόσος Huntington με τα αποτελέσματα ωστόσο να κρίνονται ως επιτυχημένα. (Chaudhary, Kardani, Singh, Banerjee, & Roy, 2014; Saleh, Gune, Chaudhary, Turakhiya, & Roy, 2014)

Όλα τα υπό μελέτη στελέχη παρουσία της α-συνουκλεΐνης A53T εμφάνισαν μια μικρή αύξηση της βιωσιμότητας, ωστόσο αυτή δεν διατηρήθηκε έως το τέλος της γήρανσης. Μάλιστα στο μεταλλαγμένο στέλεχος *tps2Δ* η προσθήκη εξωγενούς τρεχαλόζης δεν παρουσίασε καμία θεραπευτική δράση και τα κύτταρα εμφάνισαν την ίδια τοξικότητα που είχαν χωρίς όμως να προσεγγίζουν τη βιωσιμότητα απουσία α-συνουκλεΐνης, ούτε και τα αντίστοιχα της θεραπείας της αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνης. (Ζόλδερ Σ., 2017, Sfikas E., Zolder S. et al. 2017) Αυτές οι μικρές μεταβολές αποτυπώθηκαν και στον εντοπισμό και την κατανομή της πρωτεΐνης στα κύτταρα. Η παρουσία κυτταροπλασματικών συσσωματωμάτων στα στελέχη BY4741, *tps1Δ* και *tps2Δ* μειώθηκε, χωρίς να εξαλειφθεί, ενώ παράλληλα υπήρχε κυτταροπλασματική και μεμβρανική κατανομή της πρωτεΐνης.

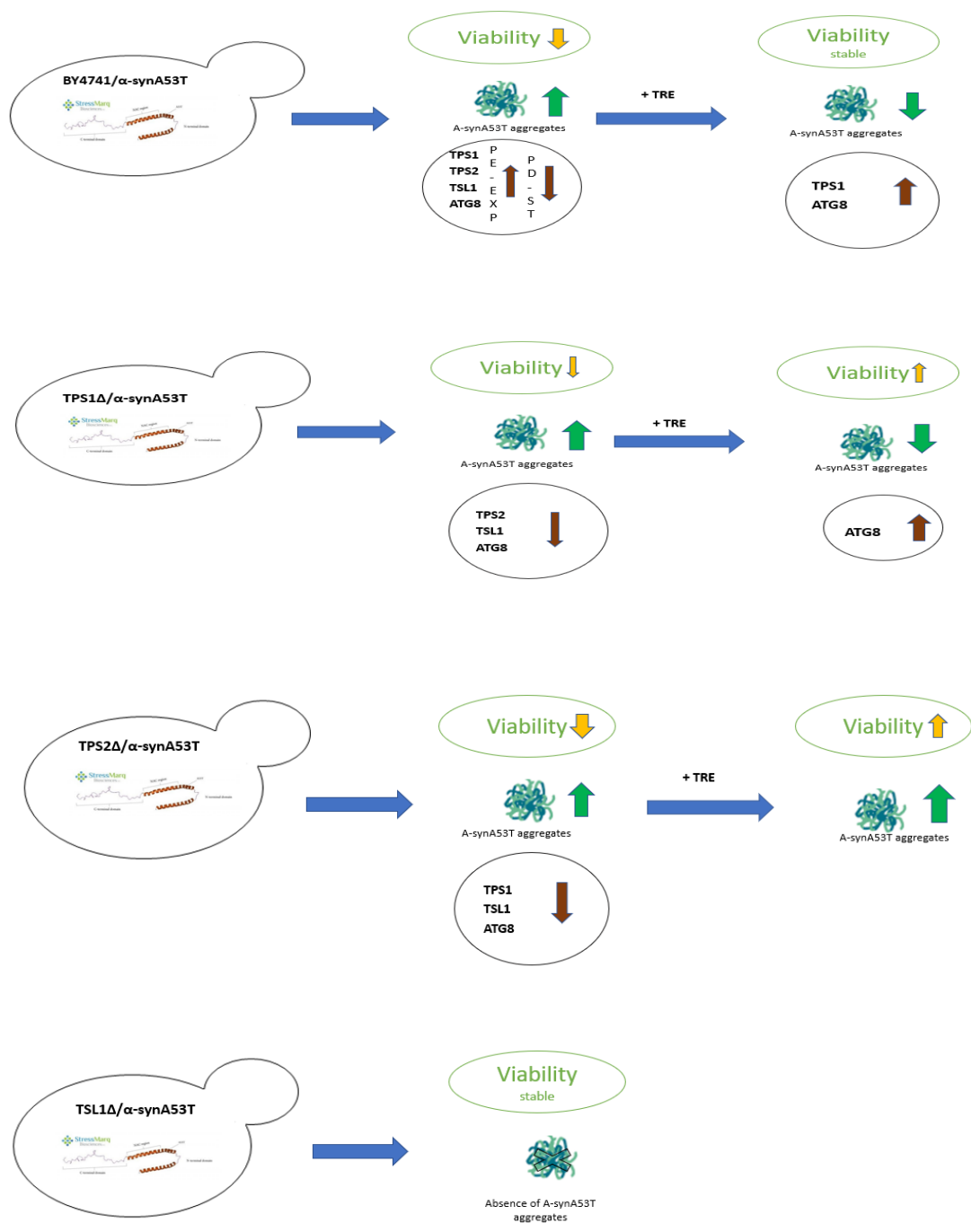
Το στέλεχος *tsl1Δ* εξ' αρχής είχε παρουσιάσει έναν πιο ήπιο φαινότυπο με ολιγάριθμα κυτταροπλασματικά συσσωματώματα οπότε η κατανομή και ο εντοπισμός της α-συνουκλεΐνης A53T δεν μετατοπίστηκε ιδιαίτερα παρουσία τρεχαλόζης.

Η μελέτη ολοκληρώθηκε με τη διερεύνηση του μεταγραφικού επιπέδου των γονιδίων *ATG8* και *TPS1* στο BY4741 και του *ATG8* στο *tps1Δ* ύστερα από τη χορήγηση τρεχαλόζης. Τα γονίδια επιλέχθηκαν ως εκπρόσωποι της διερεύνησης για την επαγωγή της αυτοφαγίας και του βιοσυνθετικού συμπλόκου της τρεχαλόζης, αντίστοιχα, ενώ από τα στελέχη μελετήθηκαν αυτά που ανταποκρίθηκαν στην προσθήκη της τρεχαλόζης.

Στο αγρίου τύπου στέλεχος παρατηρήθηκε αύξηση του μεταγραφικού επιπέδου του *ATG8* έπειτα από την προσθήκη εξωγενούς τρεχαλόζης. Αυτό δείχνει ότι η διαδικασία της αυτοφαγίας ενεργοποιείται περισσότερο παρουσία της παρεχόμενης τρεχαλόζης, γεγονός αναμενόμενο βάσει βιβλιογραφίας. Αυτό υποδηλώνει πιθανή διαλυτοποίηση κάποιων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και μείωση της κατασταλτικής δράσης της τοξικής μεταλλαγής. Αντιστρόφως ανάλογη εικόνα παρουσιάζει το γονίδιο της συνθάσης της τρεχαλόζης *TPS1* όπου εμφανίζει πτώση μεταγραφικά. Θεωρητικά η παροχή τρεχαλόζης αναμένεται να περιορίσει έως ένα βαθμό τις ανάγκες των κυττάρων για παραγωγή τρεχαλόζης, κάτι το οποίο επαληθεύεται και από τα κύτταρα απουσία α-συνουκλεΐνης.

Στο *tps1Δ* αυτό που συμβαίνει στο γονίδιο επαγωγέα της αυτοφαγίας δεν φαίνεται να αλλάζει ιδιαίτερα μοτίβο συγκριτικά με τα κύτταρα αγρίου τύπου. Το *ATG8* φαίνεται να ενεργοποιείται σε μεγάλο βαθμό και στα δύο στελέχη και στην προκειμένη περίπτωση παρουσιάζοντας αρκετή σταθερότητα στην σχέση μεταξύ αυτοφαγίας και προσθήκης τρεχαλόζης. Βέβαια παρά την αύξηση που παρατηρείται συγκριτικά με τα κύτταρα απουσία α-συνουκλεΐνης, φαίνεται πως δεν επαρκεί για την περαιτέρω βιωσιμότητα των κυττάρων *tps1Δ/pCM190asynA53T* παρουσία τρεχαλόζης. Τα ευρήματα στην σύγκριση μεταλλαγμένων κυττάρων με τα αγρίου τύπου κύτταρα ανέδειξαν μικρές διακυμάνσεις της μεταγραφικής απόκρισης του γονιδίου στην εξωγενή τρεχαλόζη. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στην θεώρηση πως για την μείωση των κυτταροπλασματικών εγκλείστων είναι πιθανότερα υπεύθυνες οι άμεσες βιοχημικές ιδιότητες του μορίου της τρεχαλόζης παρά η μεταγραφική επαγωγή της αυτοφαγίας. Οπότε καταλήγει κανείς πως το *TPS1* είναι απαραίτητο για την κανονική ενεργοποίηση της αυτοφαγίας για να μπορεί να είναι αποδοτική ως διαδικασία.

Η παροχή εξωγενούς τρεχαλόζης φάνηκε να δρα ευεργετικά στα κύτταρα και να βελτιώνει την κατάστασή τους σε διαφορετικό βαθμό για κάθε στέλεχος, με ήπιες κυρίως επιδράσεις και αναδεικνύοντας μικτούς φαινοτύπους. Ίσως αξίζει να επιχειρηθούν ανάλογα πειράματα με χορήγηση μεγαλύτερης ποσότητας εξωγενούς τρεχαλόζης κατά την έναρξη της θεραπευτικής παρέμβασης, είτε με σταθερή χορήγηση αυτής ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Μια τέτοια προσπάθεια ίσως ευνοούσε τα κύτταρα στην προσπάθεια να ανταπεξέλθουν την τοξικότητα που έχει εδραιωθεί λόγω της μεταλλαγής της α-συνουκλεΐνης A53T και στην καλύτερη ενεργοποίηση της αυτοφαγίας και σταθεροποίησή της σε υψηλά επίπεδα.



5 Περιλήψεις

5.1 Περίληψη

Η α-συνουκλεΐνη σε παθολογικές καταστάσεις υπερεκφράζεται σχηματίζοντας κυτταροπλασματικά έγκλειστα που εμπλέκονται σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές της προχωρημένης ηλικίας. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της μεταλλαγής της α-συνουκλεΐνης A53T (που προκαλεί αυξημένη τοξικότητα) με μεταβολικά μονοπάτια του *Saccharomyces cerevisiae* που σχετίζονται με την κυτταρική γήρανση.

Για το σκοπό αυτό η α-συνουκλεΐνη A53T κλωνοποιήθηκε στον *S. cerevisiae* και μελετήθηκε η ανάπτυξη και η βιωσιμότητα των ανασυνδυασμένων κυττάρων σε υψηλή ωσμωτικότητα. Η συνθήκη αυτή αυξάνει το εύρος ζωής και την παραγωγή τρεχαλόζης η οποία συντελεί στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών και εμποδίζει το σχηματισμό συσσωματωμάτων, ενώ επάγει έμμεσα την αυτοφαγία.

Η βιωσιμότητα των κυττάρων αγρίου τύπου παρουσίασε σημαντική πτώση, συνοδευόμενη από πολυάριθμα πρωτεϊνικά συσσωματώματα και έντονη παρουσία της πρωτεΐνης στα κύτταρα, όπως διαπιστώθηκε με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωση Western.

Ακόμα ποιο επιβαρυνμένος φαινότυπος στη βιωσιμότητα και την παρουσία συσσωματωμάτων παρατηρήθηκε σε στελέχη που έφεραν μεταλλαγές σε γονίδια βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης, μελέτη που αποσκοπούσε στη διερεύνηση του ρόλου της σε συνθήκες καταπόνησης του ζυμομύκητα από την συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης A53T.

Από τη μελέτη της μεταγραφής των γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή τρεχαλόζης, την αυτοφαγία και την αίσθηση θρεπτικών συστατικών διαπιστώθηκε μία γενικευμένη μεταγραφική καταστολή, γεγονός που αναδεικνύει μία τάση απορρύθμισης των σχετικών μηχανισμών του κυττάρου από τη δράση της A53T.

Η χορήγηση εξωγενούς τρεχαλόζης με σκοπό την αναστροφή κατά το δυνατόν των τοξικών συνεπειών της α-συνουκλεΐνης A53T παρουσίασε μόνο σε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος ήπια βελτίωση, εντούτοις τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα εξακολουθούσαν να είναι παρόντα σε σημαντικό βαθμό.

Τα πειράματα αυτά καταδεικνύουν ότι θα πρέπει να αναζητηθούν νέοι τρόποι αντιμετώπισης των τοξικών συνεπειών της α-συνουκλεΐνης A53T.

5.2 Summary

Under pathological conditions, α -synuclein is overexpressed and forms cytoplasmic inclusions which are involved in progressive neurodegenerative disorders. In this dissertation, the interaction of α -synuclein point mutation A53T (which causes increased toxicity) with metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae*, associated with cellular aging, was examined.

For this purpose, α -synuclein A53T was transferred into *S. cerevisiae* cells, whose growth and viability were studied at high osmolality. Under this condition, the lifespan as well as the production of trehalose were increased. Trehalose contributes to the proper protein folding and prevents the formation of aggregates, while autophagy is induced indirectly. The viability of wild-type cells carrying α -synuclein A53T was significantly declined. In addition, α -synuclein's high expression and numerous aggregates in the cells were observed, as indicated by Western immunoblotting and immunofluorescence microscopy.

In order to investigate the role of α -synuclein in yeast stress conditions, α -synuclein A53T accumulation was performed. An even more aggregated phenotype was observed in strains carrying mutations in trehalose biosynthesis genes.

Gene transcription studies regarding trehalose production, autophagy and nutrient sensing revealed a generalized transcriptional suppression, which indicates a tendency to deregulate these mechanisms due to α -synuclein A53T toxicity.

Administration of exogenous trehalose, in order to reverse as far as possible the toxic effects of α -synuclein A53T, showed only a slight improvement in one mutant, although protein aggregates were still considerably present.

This study demonstrates that new ways of dealing with the toxic effects of α -synuclein A53T should be sought.

6. Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

1. Aguib, Y., Heiseke, A., Gilch, S., Riemer, C., Baier, M., Ertmer, A., & Schätzl, H. M. (2009). Autophagy induction by trehalose counter-acts cellular prion-infection. *Autophagy*, 5(3), 361-369.
2. Beyer, K. (2006). α -Synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. *Acta neuropathologica*, 112(3), 237-251.
3. Bussell Jr, R., & Eliezer, D. (2003). A structural and functional role for 11-mer repeats in α -synuclein and other exchangeable lipid binding proteins. *Journal of molecular biology*, 329(4), 763-778.
4. Champion, D., Martin, C., Heilig, R., Charbonnier, F., Moreau, V., Flaman, J. M., . . . Frebourg, T. (1995). The NACP/synuclein gene: chromosomal assignment and screening for alterations in Alzheimer disease. *Genomics*, 26(2), 254-257.
5. Capouch, S. D., Farlow, M. R., & Brosch, J. R. (2018). A review of dementia with lewy bodies' impact, diagnostic criteria and treatment. *Neurology and therapy*, 7(2), 249-263.
6. Cebollero, E., & Reggiori, F. (2009). Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793(9), 1413-1421.
7. Chaudhary, R. K., Kardani, J., Singh, K., Banerjee, R., & Roy, I. (2014). Deciphering the roles of trehalose and Hsp104 in the inhibition of aggregation of mutant huntingtin in a yeast model of Huntington's disease. *Neuromolecular medicine*, 16(2), 280-291.
8. Chen Q., Thorpe J., Keller J. (2005). A-Synuclein Alters Proteasome Function, Protein Synthesis, and Stationary Phase Viability, *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 280, No. 34, 30009–30017.
9. Choubey, V., Safiulina, D., Vaarmann, A., Cagalinec, M., Wareski, P., Kuum, M., . . . Kaasik, A. (2011). Mutant A53T α -synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10814-10824.
10. Conway, K. A., Harper, J. D., & Lansbury, P. T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant α -synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nature medicine*, 4(11), 1318-1320.
11. Dehay, B., Bourdenx, M., Gorry, P., Przedborski, S., Vila, M., Hunot, S., . . . Bezard, E. (2015). Targeting α -synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *The Lancet Neurology*, 14(8), 855-866.
12. Dixon, C., Mathias, N., Zweig, R. M., Davis, D. A., & Gross, D. S. (2005). α -Synuclein targets the plasma membrane via the secretory pathway and induces toxicity in yeast. *Genetics*, 170(1), 47-59.
13. Donaghy, P. C., & McKeith, I. G. (2014). The clinical characteristics of dementia with Lewy bodies and a consideration of prodromal diagnosis. *Alzheimer's research & therapy*, 6(4), 1-12.

14. Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J. F., Trevisol, E., & Magalhães, R. (2015). Revisiting yeast trehalose metabolism. *Current genetics*, *61*(3), 263-274.
15. Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS microbiology reviews*, *24*(4), 469-486.
16. Fahn, S. (2008). How do you treat motor complications in Parkinson's disease: medicine, surgery, or both? *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, *64*(S2), S56-S64.
17. François, J. M., Walther, T., & Parrou, J. L. (2012). Genetics and regulation of glycogen and trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* *Microbial stress tolerance for biofuels* (pp. 29-55): Springer.
18. Franssens, V., Bynens, T., Van den Brande, J., Vandermeeren, K., Verduyck, M., & Winderickx, J. (2013). The benefits of humanized yeast models to study Parkinson's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2013*.
19. Fricova, D., Harsanyiova, J., & Kralova Trancikova, A. (2020). Alpha-Synuclein in the Gastrointestinal Tract as a Potential Biomarker for Early Detection of Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 8666.
20. Gámez-Valero, A., & Beyer, K. (2018). Alternative splicing of alpha-and beta-synuclein genes plays differential roles in synucleinopathies. *Genes*, *9*(2), 63.
21. Gancedo, C., & Flores, C.-L. (2004). The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS yeast research*, *4*(4-5), 351-359.
22. Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., & Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *13*(9), 837-848.
23. Goedert, M., & Spillantini, M. G. (2012). Synucleinopathies and tauopathies *Basic Neurochemistry* (pp. 829-843): Elsevier.
24. Gonzalez-Horta, A., Hernandez, B. G., & Chavez-Montes, A. (2013). Fluorescence as a tool to study lipid-protein interactions: the case of α -synuclein.
25. Gu, X.-L., Long, C.-X., Sun, L., Xie, C., Lin, X., & Cai, H. (2010). Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T α -synuclein causes neurodegeneration in mice. *Molecular brain*, *3*(1), 1-16.
26. Han, J., Lee, J., Bibbs, L., & Ulevitch, R. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, *265*(5173), 808-811.
27. Huang, W.-P., & Klionsky, D. J. (2002). Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell structure and function*, *27*(6), 409-420.
28. Inoue, Y., & Klionsky, D. J. (2010). *Regulation of macroautophagy in Saccharomyces cerevisiae*. Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology.
29. Kaerberlein, M., Andalis, A. A., Fink, G. R., & Guarente, L. (2002). High osmolarity extends life span in *Saccharomyces cerevisiae* by a mechanism related to calorie restriction. *Molecular and cellular biology*, *22*(22), 8056-8066.
30. Kaiser, C., Michaelis, S., & Mitchell, A. (1994). Methods in yeast genetics.

- Khurana, V., & Lindquist, S. (2010). Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(6), 436-449.
31. Kim, B., Lee, Y., Choi, H., & Huh, W.-K. (2020). The trehalose-6-phosphate phosphatase Tps2 regulates ATG8 transcription and autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy*, 1-15.
32. Kim, W. S., Kågedal, K., & Halliday, G. M. (2014). Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. *Alzheimer's research & therapy*, *6*(5), 1-9.
33. Kurz, A., Double, K. L., Lastres-Becker, I., Tozzi, A., Tantucci, M., Bockhart, V., . . . Schlaudraff, F. (2010). A53T-alpha-synuclein overexpression impairs dopamine signaling and striatal synaptic plasticity in old mice. *PloS one*, *5*(7), e11464.
34. Kyrjakov, P., Beach, A., Richard, V. R., Burstein, M. T., Leonov, A., Levy, S., & Titorenko, V. (2012). Caloric restriction extends yeast chronological lifespan by altering a pattern of age-related changes in trehalose concentration. *Frontiers in physiology*, *3*, 256.
35. Lavedan, C. (1998). The synuclein family. *Genome research*, *8*(9), 871-880.
- Li, L., Nadanaciva, S., Berger, Z., Shen, W., Paumier, K., Schwartz, J., . . . Dunlop, J. (2013). Human A53T α -synuclein causes reversible deficits in mitochondrial function and dynamics in primary mouse cortical neurons. *PloS one*, *8*(12), e85815.
36. Lin, S.-J., Kaeberlein, M., Andalis, A. A., Sturtz, L. A., Defossez, P.-A., Culotta, V. C., . . . Guarente, L. (2002). Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature*, *418*(6895), 344-348.
37. Longo, V. D., Shadel, G. S., Kaeberlein, M., & Kennedy, B. (2012). Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell metabolism*, *16*(1), 18-31.
38. Lopes da Fonseca, T., Villar-Piqué, A., & Outeiro, T. F. (2015). The interplay between alpha-synuclein clearance and spreading. *Biomolecules*, *5*(2), 435-471.
39. Lu, J., Sun, F., Ma, H., Qing, H., & Deng, Y. (2015). Comparison between α -synuclein wild-type and A53T mutation in a progressive Parkinson's disease model. *Biochemical and biophysical research communications*, *464*(4), 988-993.
40. Maroteaux, L., Campanelli, J. T., & Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *Journal of Neuroscience*, *8*(8), 2804-2815.
41. Nwaka, S., & Holzer, H. (1997). Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, *58*, 197-237.
42. Outeiro, T. F., Koss, D. J., Erskine, D., Walker, L., Kurzawa-Akanbi, M., Burn, D., . . . Thomas, A. (2019). Dementia with Lewy bodies: an update and outlook. *Molecular neurodegeneration*, *14*(1), 1-18.
43. Outeiro, T. F., & Lindquist, S. (2003). Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science*, *302*(5651), 1772-1775.
44. Paleologou, K., Irvine, G., & El-Agnaf, O. (2005). α -Synuclein aggregation in neurodegenerative diseases and its inhibition as a potential therapeutic strategy. *Biochemical Society Transactions*, *33*(5), 1106-1110.
- Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S.,

- Athanasiaidou A., Papapetropoulos, Johnson W.G., Kazzarini A.M., Duvoisin R.C., Di Lorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L. (1997). Mutations in the a-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* Vol. 276, 2045-1047.
45. Popova, B., Kleinknecht, A., & Braus, G. H. (2015). Posttranslational modifications and clearing of α -synuclein aggregates in yeast. *Biomolecules*, 5(2), 617-634.
 46. Reggiori, F., & Klionsky, D. J. (2013). Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *Genetics*, 194(2), 341-361.
 47. Renna, M., Jimenez-Sanchez, M., Sarkar, S., & Rubinsztein, D. C. (2010). Chemical inducers of autophagy that enhance the clearance of mutant proteins in neurodegenerative diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11061-11067.
 48. Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine*, 10(7), S10-S17.
 49. Ruis, H., & Schüller, C. (1995). Stress signaling in yeast. *Bioessays*, 17(11), 959-965.
 50. Ruzza, P., Hussain, R., Biondi, B., Calderan, A., Tessari, I., Bubacco, L., & Siligardi, G. (2015). Effects of trehalose on thermodynamic properties of alpha-synuclein revealed through synchrotron radiation circular dichroism. *Biomolecules*, 5(2), 724-734.
 51. Saleh, A. A., Gune, U. S., Chaudhary, R. K., Turakhiya, A. P., & Roy, I. (2014). Roles of Hsp104 and trehalose in solubilisation of mutant huntingtin in heat shocked *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(4), 746-757.
 52. Sarkar, S., Davies, J. E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., & Rubinsztein, D. C. (2007). Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5641-5652.
 53. Sharma, N., Brandis, K. A., Herrera, S. K., Johnson, B. E., Vaidya, T., Shrestha, R., & DebBurman, S. K. (2006). α -synuclein budding yeast model. *Journal of Molecular Neuroscience*, 28(2), 161-178.
 54. Spillantini, M. G., Goedert, M., & Divane, A. (1995). Assignment of human {alpha}-synuclein (SNCA) and {beta}-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics*, 27(2).
 55. Tenreiro, S., Munder, M. C., Alberti, S., & Outeiro, T. F. (2013). Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. *Journal of neurochemistry*, 127(4), 438-452.
 56. Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., . . . Saitoh, T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(23), 11282-11286.
 57. Vinnakota, R. L., Yedlapudi, D., Manda, K. M., Bhamidipati, K., Bommakanti, K. T., RangaLakshmi, G. S., & Kalivendi, S. V. (2018). Identification of an Alternatively Spliced α -Synuclein Isoform That Generates a 41-Amino Acid N-Terminal Truncated Peptide, 41-syn: Role in Dopamine Homeostasis. *ACS chemical neuroscience*, 9(12), 2948-2958.

58. Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G., & Singer, R. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 57(2), 383-401.
59. Willingham, S., Outeiro, T. F., DeVit, M. J., Lindquist, S. L., & Muchowski, P. J. (2003). Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or α -synuclein. *Science*, 302(5651), 1769-1772.
60. Xu, S., & Chan, P. (2015). Interaction between neuromelanin and alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Biomolecules*, 5(2), 1122-1142.
61. Ζόλδερ Σπυρίδων. (2017). Πτυχιακή Εργασία, Ιωάννινα 2017
62. Σφήκας Ευάγγελος. (2020). Διδακτορική Εργασία, Ιωάννινα 2020
63. Sfikas E., Zolder S., Afendra A.-S., Toxicity of α -synuclein in *Saccharomyces cerevisiae* under high external osmolarity and absence of genes related to trehalose's biosynthesis. 7ο συνέδριο της Ελληνικής Επιστημονικής Εταιρείας 'Μικροβιόκοσμος', Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα 2017.