



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

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

**Διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων της α-συνουκλεΐνης με τις
πρωτεΐνες του *Saccharomyces cerevisiae* και της παραγωγής
τρεχαλόζης ως απόκριση στην τοξικότητα.**

ΤΣΑΠΑΡΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΑΜΑΛΙΑ-ΣΟΦΙΑ ΑΦΕΝΔΡΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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. Για την εκπόνησή της θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας εργασίας κα Αμαλία Σοφία Αφένδρα για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξή της κατά την διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών και το Εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος ΒΕΤ όπου και πραγματοποιήθηκαν οι εμφανίσεις των πειραμάτων Western Blot. Επίσης, πολύτιμες ήταν οι συμβουλές και η βοήθεια του Δρ. Αναστάσιου Βασιλειάδη όπου μαζί με τα υπόλοιπα άτομα των εργαστηρίων Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής δημιούργησαν ένα υπέροχο κλίμα συνεργασίας.

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 κ. Λιακόπουλο Δημήτριο, τον κ. Θεολόγο Μιχαηλίδη και τον κ. Βασίλειο Δουρή του τμήματος ΒΕΤ για τον χρόνο που αφιέρωσαν για την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

1.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η α-συνουκλεΐνη εκφράζεται άφθονα στο προσυναπτικό άκρο των νευρώνων των σπονδυλωτών (συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου) και κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCA*. Σε παθολογικές καταστάσεις, μετατρέπεται από διαμόρφωση α-έλικας σε β-πτυχωτή επιφάνεια και σχηματίζει κυτταροπλασματικά έγκλειστα (Lewy Bodies) με τοξικές συνέπειες για τα κύτταρα καθώς αποτελούν αιτία νευροεκφυλιστικών ασθενειών με κυριότερη την νόσο του Parkinson. Ο *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη μοντελοποίηση των νευροεκφυλιστικών διαταραχών, εφόσον πολλές βασικές κυτταρικές διαδικασίες παραμένουν ισχυρά διατηρημένες μεταξύ αυτού και των ανθρώπινων νευρικών κυττάρων, όπως η αναδίπλωση των πρωτεϊνών και η κυκλοφορία μέσω των μεμβρανών του συστήματος Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου.

Σε προηγούμενες εργασίες έχουν κλωνοποιηθεί γονίδια ορισμένων μορφών της α-συνουκλεΐνης σε στελέχη ζυμομυκήτων. Μεταξύ άλλων έχει μελετηθεί η επαγωγή μεταβολικών μονοπατιών της βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης ως απόκριση στην τοξικότητα που προκαλείται, καθώς και μια πρώτη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων της α-συνουκλεΐνης με τις πρωτεΐνες του ζυμομύκητα η οποία κατέδειξε κυρίως την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης της α-συνουκλεΐνης με την GAPDH του *Saccharomyces cerevisiae* στην φάση της γήρανσης των κυττάρων καθώς και ο προσδιορισμός της παραγόμενης τρεχαλόζης με ενζυμική

μέθοδο σε συγκεκριμένες φάσεις ανάπτυξης κυττάρων του ζυμομύκητα που εκφράζουν την α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου και την μεταλλαγμένη μορφή της A53T.

Για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων, υπερεφκράστηκε, απομονώθηκε και καθαρίστηκε και τακτοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση Western ανασυνδυασμένη α-συνουκλεΐνη με ουρά 6 ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο της. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη δόλωμα σε πειράματα αλληλεπίδρασης συγκατακρίμησης (pull down assay) με ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα του ζυμομύκητα αγρίου τύπου και μεταλλαγμένα *TPS1Δ* με έλλειψη της συνθάσης της τρεχαλόζης από την στατική φάση ανάπτυξης καθώς στη φάση αυτή εκδηλώνεται ο παθολογικός φαινότυπος της α-συνουκλεΐνης. Ως αποτέλεσμα της συγκατακρίμησης, παρατηρήθηκε μια ζώνη στα 19kDa που θεωρείται ότι αντιστοιχεί στην α-συνουκλεΐνη, μια στα 45 kDa καθώς και μια ασθενέστερη στα 35kDa. Η ζώνη των 45 kDa συνεπικουρούμενη από τις άλλες δύο αποτέλεσε το αντικείμενο της περαιτέρω διερεύνησης ώστε να διαπιστωθεί, αν πρόκειται για αλληλεπίδραση της α-συνουκλεΐνης με άλλη πρωτεΐνη μεγαλύτερου μοριακού βάρους.

Η ανοσοδοκιμασία Western που ακολούθησε δεν κατέδειξε αλληλεπίδραση για κανένα από τα δύο στελέχη του ζυμομύκητα, ούτε με αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης αλλά ούτε και με αντίσωμα έναντι της GAPDH, παρόλη την επανειλημμένη πραγματοποίηση των πειραμάτων με ταυτόχρονη βελτίωση των συνθηκών. Αυτό θεωρείται ότι οφείλεται σε τεχνικά προβλήματα τα οποία πρέπει να επιλυθούν, ώστε να επιβεβαιωθεί η αλληλεπίδραση των δυο πρωτεϊνών και να κατανοηθεί ο ρόλος της και οι συνέπειες που ενδέχεται να έχει στα κύτταρα του ζυμομύκητα.

Στο δεύτερο σκέλος της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε ενζυμική μέθοδος με τρεχαλάση για τον ποσοτικό προσδιορισμό τρεχαλόζης σε κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae* στις 4 χαρακτηριστικές φάσεις ανάπτυξης του ζυμομύκητα. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα χωρίς α-συνουκλεΐνη, κύτταρα με α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου και κύτταρα με μεταλλαγμένη A53T συνουκλεΐνη. Στόχος ήταν να διαπιστωθεί πως επηρεάζεται η παραγωγή τρεχαλόζης σε κάθε στέλεχος με την εκάστοτε μορφή α-συνουκλεΐνης.

Από τα πειράματα διαπιστώθηκε πως απουσία α-συνουκλεΐνης η τρεχαλόζη παράγεται κυρίως κατά την στατική φάση ανάπτυξης, γεγονός αναμενόμενο καθώς πρόκειται για φάση ανάπτυξης όπου υπάρχει έλλειψη θρεπτικών συστατικών και τοξικά φαινόμενα για τα κύτταρα με αποτέλεσμα την καταπόνησή τους. Στα κύτταρα με την α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου, η τρεχαλόζη παράγεται νωρίτερα, κορυφώνεται στην μεταδιαυξική φάση και διατηρείται μέχρι την στατική. Αυτό δείχνει πως η παρουσία α-συνουκλεΐνης ωθεί τα κύτταρα στην παραγωγή τρεχαλόζης νωρίτερα στην ανάπτυξη. Τέλος, κύτταρα με μεταλλαγμένη A53T συνουκλεΐνη παράγουν τρεχαλόζη στην μεταδιαυξική φάση ανάπτυξης και η παραγωγή της κορυφώνεται στην στατική φάση. Πρόκειται για την πιο τοξική μορφή

α-συνουκλεΐνης επομένως είναι αναμενόμενο η τρεχαλόζη να παράγεται νωρίς στην ανάπτυξη.

1.2 ABSTRACT

α -synuclein is abundantly expressed in the presynaptic terminal of vertebrate neurons (including humans) and is encoded by the SNCA gene. In pathological conditions, it forms cytoplasmic inclusions (Lewy Bodies) with toxic consequences for cells as they are the cause of neurodegenerative diseases, the most important being Parkinson's disease. *Saccharomyces cerevisiae* is an important tool for modeling neurodegenerative disorders, as many fundamental cellular processes remain highly conserved between it and human neuronal cells, such as protein folding and trafficking through the membranes of the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum.

In previous studies, genes encoding certain forms of α -synuclein have been cloned into yeast strains. Among other findings, the induction of metabolic pathways involved in trehalose biosynthesis has been investigated as a response to the induced toxicity, as well as an initial exploration of the interactions between α -synuclein and yeast proteins, which primarily identified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

The aim of the present study was to investigate the interaction between α -synuclein and GAPDH of *Saccharomyces cerevisiae* during the aging phase, as well as to determine the produced trehalose using an enzymatic method at characteristic growth phases of yeast cells expressing wild-type α -synuclein and its mutant form A53T.

To study protein interactions, recombinant α -synuclein with a 6-histidine tail at its carboxy terminus was overexpressed, isolated, purified and identified by Western immunoblotting. Subsequently, it was used as a bait protein in interaction experiments with total protein extracts from wild-type yeast cells and *TPS1 Δ* mutant cells lacking trehalose synthase, collected during the stationary phase of growth, since the pathological phenotype of α -synuclein is manifested during this phase. As a result of pull down assay, a band at 19kDa, believed to correspond to α -synuclein, was observed, along with one at 45 kDa and a weaker-intensity band at 35kDa. The 45 kDa band, together with the other two, became the focus of further investigation to determine whether it represents an interaction of α -synuclein with another protein of higher molecular weight.

The subsequent Western immunoblotting did not demonstrate any interaction for either yeast strain, neither with an antibody against α -synuclein nor with an antibody against GAPDH, despite repeated experiments with simultaneous improvement of the conditions. This is thought to be due to technical problems that need to be resolved in order to confirm the interaction between the two proteins and to understand its role and the consequences it may have on yeast cells.

In the second part of this work, an enzymatic method with trehalase was used for the quantitative determination of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* cells in the 4 characteristic growth phases of the yeast. Cells lacking α -synuclein, cells with wild-type α -synuclein, and cells with mutant A53T synuclein were used for the experiments. The aim was to determine how trehalose production is affected in each strain with each form of α -synuclein.

The experiments found that in the absence of α -synuclein, trehalose is produced mainly during the static growth phase, which is expected since this is a growth phase where there is lack of nutrients and toxic effects on the cells, resulting in their exhaustion. In cells with wild-type α -synuclein, trehalose is produced earlier, peaks in the post-diauxic phase, and is maintained until the stationary phase. This indicates that the presence of α -synuclein prompts cells to produce trehalose earlier in development. Finally, cells expressing the A53T mutant form of α -synuclein produce trehalose during the post-diauxic phase, and its production peaks in the stationary phase. Since this is the most toxic form of α -synuclein, it is therefore expected that trehalose production is induced early during growth.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗ

2.1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η α-συνουκλεΐνη απομονώθηκε πρώτη φορά το 1988 από το ηλεκτροφόρο σαλάχι *Torpedo californica* της οικογένειας Torpedinidae (Maroteaux et al., 1988). Η ονομασία της οφείλεται στο γεγονός ότι εντοπίστηκε στο προσυναπτικό άκρο των νευρώνων (presynaptic terminal) και στον πυρήνα (nucleus) και κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCA* στους ανθρώπους. Η α-συνουκλεΐνη βρίσκεται σε αφθονία στον εγκέφαλο αλλά εντοπίζεται και σε άλλους ιστούς. Το γονίδιο της συμβολίζεται ως *SNCA*, *PD1*, *PARK1*, *PARK4*.



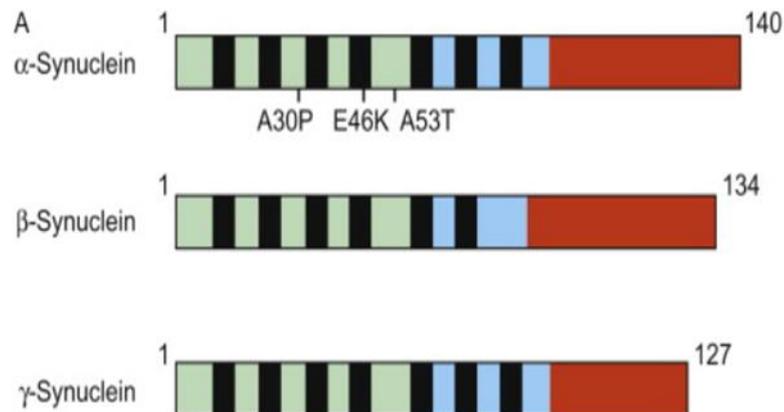
Εικόνα 2.1: *Torpedo californica* (αριστερά), Δομή α-συνουκλεΐνης (Protein Data Bank) (δεξιά).

2.1.2. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΩΝ

Η α-συνουκλεΐνη ανήκει σε μια οικογένεια συνουκλεϊνών η οποία περιλαμβάνει τις α, β και γ- συνουκλεΐνες.

1. α-συνουκλεΐνη: κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCA* και περιέχει 140 αμινοξέα (Lavedan et al. 1998).
2. β-συνουκλεΐνη: κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCB* και περιέχει 134 αμινοξέα (Spillantini et al., 1995)
3. γ-συνουκλεΐνη: κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCG* και περιέχει 127 αμινοξέα (Lavedan et al. 1998)

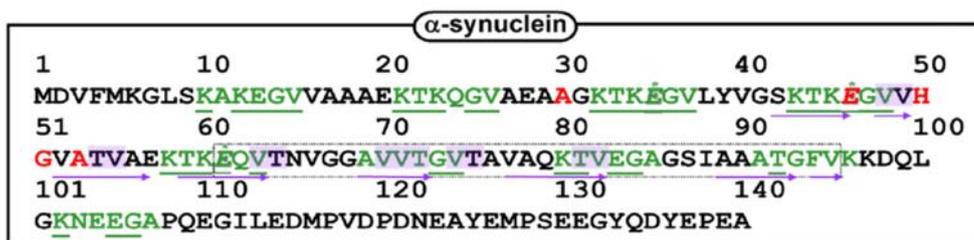
Κοινό χαρακτηριστικό και των τριών είναι η ακολουθία 11 καταλοίπων στο μοτίβο ΧΚΤΚΕG V ΧΧΧΑ (όπου Χ οποιοδήποτε αμινοξύ) η οποία επαναλαμβάνεται 6-7 φορές στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης δίνοντας στο άκρο αυτό την μορφή της α -έλικας. (Lopes da Fonseca et al., 2015). Οι α - και β - συνουκλεΐνες εμφανίζουν μεγαλύτερη εξελικτική συγγένεια μεταξύ τους (πιο πρόσφατος κοινός πρόγονος) σε σύγκριση με τη γ - συνουκλεΐνη.



Εικόνα 2.2: Οικογένεια συνουκλεΐνών. Στην εικόνα φαίνονται και οι τρεις διαφορετικές κατηγορίες, ο αριθμός αμινοξέων της κάθε μιας και με μαύρο συμβολίζονται οι επαναλήψεις της κοινής τους αλληλουχίας (Goedert et al. 2012).

2.1.3. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗΣ

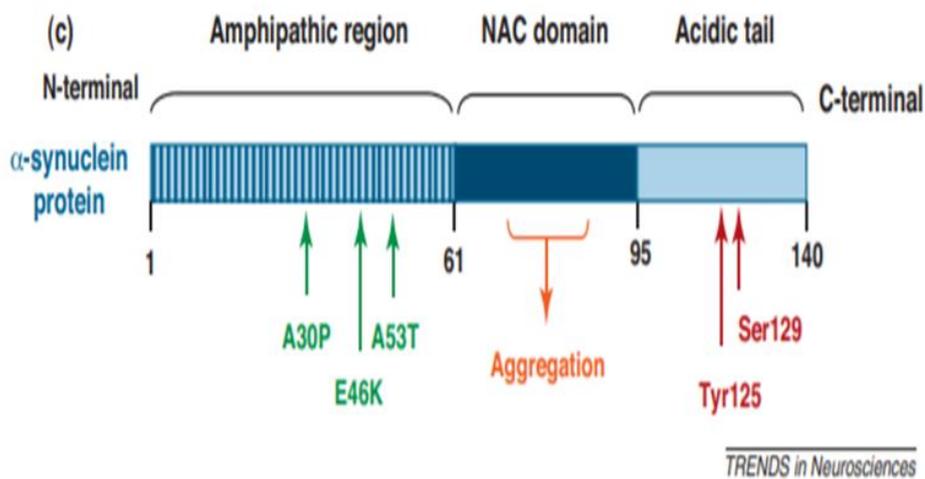
Η α -συνουκλεΐνη είναι μια μικρή διαλυτή πρωτεΐνη 140 αμινοξέων και μοριακού βάρους 14 kD, ενώ η παρατηρούμενη μοριακή μάζα της είναι περίπου 19-20 kD. Υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι αναδιπλωμένη και εντοπίζεται στο προσυναπτικό άκρο των νευρώνων. Κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCA* που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4 (θέση 4q21).



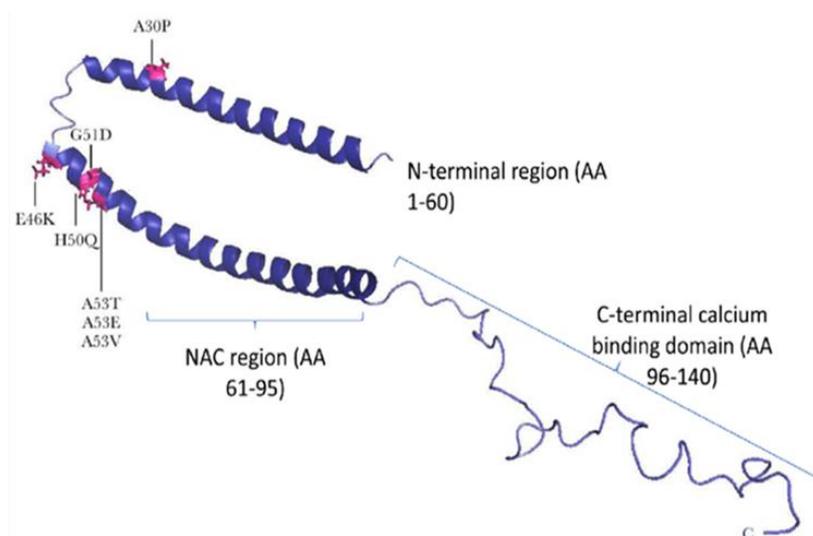
Εικόνα 2.3: Πρωτοταγής δομή α -συνουκλεΐνης: με πράσινο οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που δίνουν την μορφή α -έλικας, με κόκκινο οι θέσεις των μεταλλαγών και με μωβ οι περιοχές που προωθούν την δημιουργία δομών β -πτυχωτής επιφάνειας. (Lucas et al. 2020)

Η πρωτεΐνη αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές που η καθεμία έχει και διαφορετικές ιδιότητες. Το αμινοτελικό άκρο έχει μορφή α -έλικας η οποία οφείλεται σε μια αλληλουχία που επαναλαμβάνεται 6-7 φορές (εικόνα 2.3), και το άκρο αυτό

επιτρέπει την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με λιπίδια και άλλες πρωτεΐνες (Lucas et al., 2020). Η κεντρική υδροφοβική περιοχή (πεπτίδιο NAC) παίζει σημαντικό ρόλο στην συσσωμάτωση της πρωτεΐνης και στην ικανότητά της να σχηματίζει ινίδια, ενώ είναι σχεδόν μη διαλυτή στο νερό. Τέλος, το καρβοξυτελικό άκρο της α -συνουκλείνης είναι αρκετά όξινο και πλούσιο σε προλίνη (Venda et al., 2010). Επίσης, η α -συνουκλείνη ανήκει στην οικογένεια των εγγενώς διαταραγμένων πρωτεϊνών (Intrinsically disordered proteins) καθώς το καρβοξυτελικό της άκρο παραμένει μη δομημένο και δε παρουσιάζει αυστηρή δομή (εικόνα 2.5), γεγονός που υποδηλώνει ότι ο μηχανισμός της συμμετοχής της στις ενδοκυτταρικές διεργασίες περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες με επακόλουθη αλλαγή των λειτουργιών τους (Barinova et al., 2018).



Εικόνα 2.4: Διακρίνονται οι τρεις διαφορετικές περιοχές της α -συνουκλείνης. Με πράσινα βέλη και γράμματα επισημαίνονται οι θέσεις των κυριότερων μεταλλαγών, ενώ με κόκκινα βέλη και γράμματα οι θέσεις στις οποίες πραγματοποιείται φωσφορυλίωση (Venda et al, 2010).



Εικόνα 2.5: Δομή της α-συνουκλεΐνης. Διακρίνεται η α-έλικα καθώς και το καρβοξυτελικό άκρο της το οποίο δεν έχει αυστηρή δομή. Με ροζ σημειώνονται οι θέσεις των μεταλλαγών. (Whittaker et al. 2017)

Η α-συνουκλεΐνη φαίνεται να παίζει πρωταρχικό ρόλο στον έλεγχο της διαθεσιμότητας των κυστιδίων στο προσυναπτικό άκρο καθώς αναστέλλει επιλεκτικά την φωσφολυτάση D2, η οποία επάγει την κίνηση των κυστιδίων, επηρεάζοντας έτσι την συναπτική δραστηριότητα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον ρυθμιστικό ρόλο της α-συνουκλεΐνης στην κίνηση των κυστιδίων αλλά και ρύθμιση του κυτταροσκελετού και της ενδοκύτωσης. Η α-συνουκλεΐνη εμπλέκεται στην συναπτική δραστηριότητα καθώς δρα ως μοριακός συνοδός κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου των SNAREs που είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών από το προσυναπτικό άκρο των νευρώνων (Heiden et al., 2023). Με αυτόν τον τρόπο, η α-συνουκλεΐνη μπορεί να ρυθμίσει την απελευθέρωση ντοπαμίνης στον έλεγχο των εκούσιων και ακούσιων κινήσεων ή μπορεί να επηρεάσει τη μνήμη και τη γνωστική λειτουργία (Kim, et al., 2014). Επιπλέον, η α-συνουκλεΐνη έχει την ικανότητα να προσδένεται σε λιπιδιακές μεμβράνες και να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες.

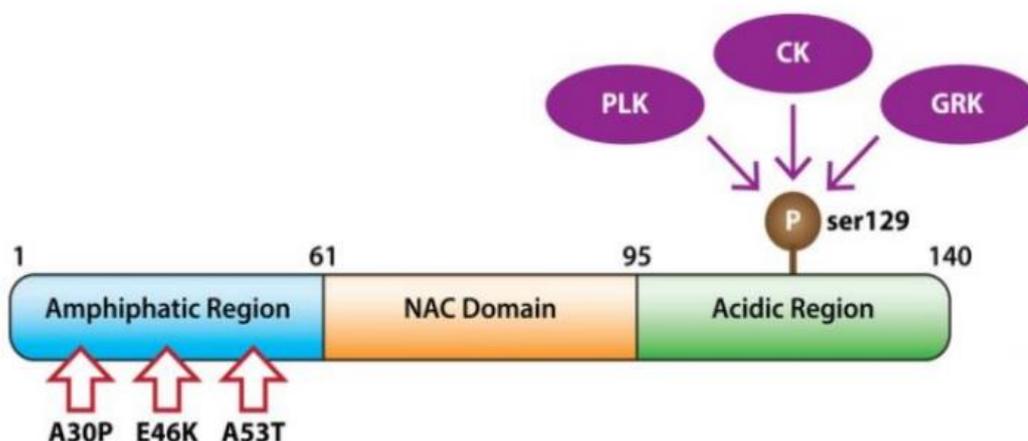
2.1.4. ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΗΣ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗΣ

Η α-συνουκλεΐνη υφίσταται πλήθος μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων: φωσφορυλίωση, ουβικιτινίωση, νιτροποίηση, γλυκοζυλίωση και σουμοϋλίωση. Όλες οι τροποποιήσεις επηρεάζουν την συσσωμάτωση και την τοξικότητα της πρωτεΐνης.

Η πιο κοινή τροποποίηση της α-συνουκλεΐνης είναι η φωσφορυλίωση η οποία πραγματοποιείται στα κατάλοιπα σερίνης S129 και S87 και στα κατάλοιπα τυροσίνης Y125, Y144 και Y135. Η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο σερίνης 129 είναι η κύρια μετα-μεταφραστική τροποποίηση της α-συνουκλεΐνης, με το 90% περίπου της πρωτεΐνης που εντοπίζεται στα Lewy Bodies, σε παθολογικές καταστάσεις, να είναι φωσφορυλιωμένη σε αυτό το κατάλοιπο. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει μία στενή σχέση μεταξύ της φωσφορυλίωσης στην σερίνη 129 (S129) και της τάσης συσσωμάτωσης της πρωτεΐνης. Ακόμη δεν υπάρχει ξεκάθαρη σχέση της επίδρασης της φωσφορυλίωσης με την τοξικότητα που διαμεσολαβείται από την α-συνουκλεΐνη και την συσσωμάτωσή της, επειδή τα αποτελέσματα στους διάφορους οργανισμούς μοντέλα είναι διαφορετικά. Κινάσες που πραγματοποιούν την φωσφορυλίωση της α-συνουκλεΐνης στο κατάλοιπο S129 είναι οι PLKs, GRKs και CK. Η φωσφορυλίωση από την GRK5 παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου του Parkinson (Kawahata et al., 2022).

Συχνή μετα-μεταφραστική τροποποίηση της α-συνουκλεΐνης είναι και η σουμοϋλίωση όπου μία ή περισσότερες πρωτεΐνες SUMO, που μοιάζουν με ουβικιτίνη, δεσμεύονται ομοιοπολικά σε κατάλοιπα λυσίνης πρωτεϊνών στόχων και

μπορεί να επηρεάσουν τη δομή, τη σταθερότητα, τον εντοπισμό και τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Οι SUMO πρωτεΐνες απομακρύνονται από τις πρωτεάσες SENPs. Η SUMO εκφράζεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Τα θηλαστικά διαθέτουν τουλάχιστον τρεις πρωτεΐνες SUMO: SUMO1, SUMO2 και SUMO3. Η σύζευξη με την SUMO στην α -συνουκλείνη πραγματοποιείται σε δυο κύρια σημεία σουμοϋλίωσης, τα K96 και K102. Έχει βρεθεί ότι η σουμοϋλίωση προλαμβάνει τον σχηματισμό ινιδίων της α -συνουκλείνης in vitro προστατεύοντας έτσι από την τοξικότητα της α -συνουκλείνης (Canever et al., 2023). Αντίθετα, στις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ζωικά και κυτταρικά μοντέλα, η επαγωγή της σουμοϋλίωσης οδήγησε σε συσσωμάτωση της α -συνουκλείνης. Επομένως, η επίδραση της σουμοϋλίωσης δεν είναι τελείως αποσαφηνισμένη (Hassanzadeh et al., 2024).



Εικόνα 2.6: Η φωσφορυλίωση της α -συνουκλείνης στο κατάλοιπο S129 από τις εμπλεκόμενες κινάσες (Dzamko et al, 2014).

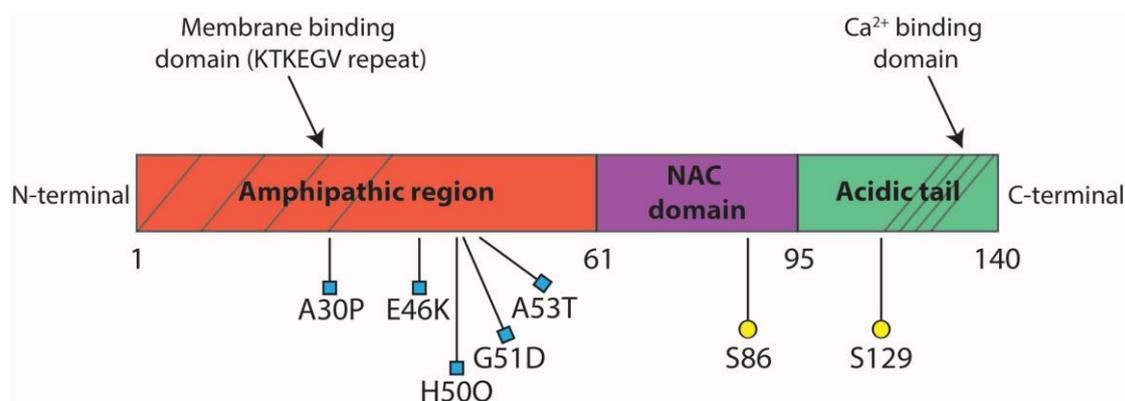
2.1.5. ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ α -ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗΣ

Έχουν απομονωθεί έξι διαφορετικές μεταλλαγές της α -συνουκλείνης, οι A30P, A53T, H50Q, A53E, E46K και G51D. Εντοπίζονται όλες στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και συνδέονται με την νόσο του Parkinson. Οι μεταλλαγές A53T και E46K εμπλέκονται επιπλέον και στην άνοια με σωματίδια Lewy. Η συσώρευση των μεταλλαγών στο άκρο αυτό έχει ως συνέπεια να διαταράσσεται η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με άλλα λιπίδια.

Από τις έξι αυτές μεταλλαγές της πρωτεΐνης οι πιο καλά μελετημένες είναι οι εξής:

- **A30P**: στην μεταλλαγή αυτή έχει συμβεί αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου G από C με αποτέλεσμα να προκύπτει το αμινοξύ προλίνη αντί για αλανίνη στην θέση 30 της αμινοξικής αλληλουχίας.
- **A53T**: στην μεταλλαγή αυτή έχει συμβεί αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου G από A με αποτέλεσμα να προκύπτει το αμινοξύ θρεονίνη αντί για αλανίνη στην θέση 53 της αμινοξικής αλληλουχίας.

Μεταλλαγή A53T: Πρόκειται την πρώτη μεταλλαγή της α-συνουκλεΐνης που ερευνηθήκε. Εντοπίστηκε πρώτη φορά το 1997 σε μία ιταλική και 3 ελληνικές οικογένειες και κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Έχει συνδεθεί στενά με τη νόσο του Parkinson καθώς οδηγεί σε πρώιμη εκδήλωση της ασθένειας (Polymeropoulos et al., 1997). Η A53T σχηματίζει ινίδια με γρηγορότερο ρυθμό από την μεταλλαγή A30P και την α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου και σταθεροποιεί δομές β-πτυχωτής επιφάνειας με αποτέλεσμα να επηρεάζονται διάφορες λειτουργίες του κυττάρου με κυριότερη συναπτική δραστηριότητα. Επίσης, θεωρείται η πιο τοξική από τις υπόλοιπες μεταλλαγές καθώς υπάρχει πιο έντονος και ταχύς εκφυλισμός των νευρώνων και σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα (Kurz et al., 2010). Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι η A53T επάγει πιο έντονα την αυτοφαγία από την α-συνουκλεΐνη αγρίου με αποτέλεσμα την αποδόμηση των συσσωματωμάτων σε μεγαλύτερο βαθμό γεγονός που ενδέχεται να αποτελεί θεραπευτικό στόχο για συνουκλεϊνοπάθειες. Εντούτοις, έχει αποδειχθεί ότι η αύξηση του επιπέδου της αυτοφαγίας αυξάνει την απώλεια μιτοχονδρίων, ενώ παρατηρούνται και αλλαγές στην μορφολογία τους. Επομένως, η αυτοφαγία δεν έχει μονόπλευρο ρόλο, είναι όμως απαραίτητο να υπάρχει ισορροπία (Lu et al., 2015).

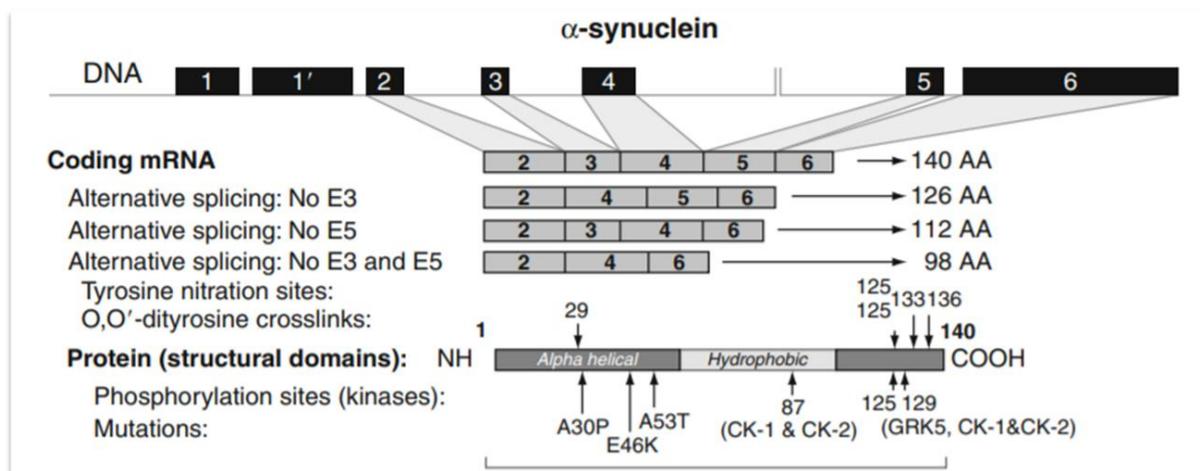


Εικόνα 2.7: Η θέση των μεταλλαγών της α-συνουκλεΐνης. Παρατηρούνται οι 3 περιοχές της πρωτεΐνης, οι μεταλλαγές της και τα κατάλοιπα σερίνης όπου πραγματοποιείται φωσφορυλίωση (Emanuele and Chiergatti, 2015).

2.1.6. ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗΣ

Οι ισομορφές της α-συνουκλεΐνης είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου, στα πλαίσια του οποίου κάποια εξώνια παραλείπονται στην διαδικασία ωρίμανσης του mRNA. Οι τέσσερις ισομορφές της α-συνουκλεΐνης είναι:

- Η α-συνουκλεΐνη 140 που αποτελεί το πλήρες μετάγραφο.
- Η α-συνουκλεΐνη 126
- Η α-συνουκλεΐνη 112
- Η α-συνουκλεΐνη 98



Εικόνα 2.8: Οι ισομορφές της α-συνουκλεΐνης. Σε κάθε ισομορφή διακρίνονται τα εξώνια που έχουν διαγραφεί (Surguchov, 2008).

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 αμφότερων των εξονίων 3 και 5.

Το εξόνιο 3 αντιστοιχεί στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνδεσή της με τη μεμβράνη. Η έλλειψή του μειώνει αυτή την αλληλεπίδραση, κατά συνέπεια η δημιουργία συσσωματώματος ελαττώνεται.

Το εξόνιο 4, κωδικοποιεί την έκφραση του πεπτιδίου NAC της α-συνουκλεΐνης που είναι υπεύθυνο για την ικανότητα της πρωτεΐνης να σχηματίζει ινίδια.

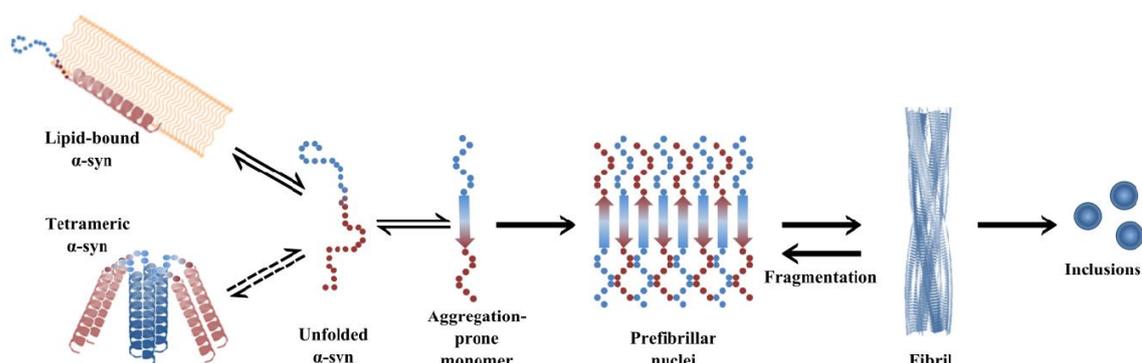
Το εξόνιο 5 αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Γενικά, η συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης σχετίζεται με το μήκος του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης. Αυξημένη βράχυνση συνεπάγεται αυξημένη συσσωμάτωση της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη πιθανότητα δημιουργίας ινιδίων.

Βάσει των παραπάνω, καθώς και της συμμετοχής του αμινοτελικού άκρου στις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών μπορούν εξαχθούν κάποια συμπεράσματα για τις ισομορφές. 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 μειώνεται σημαντικά. Τέλος, παρατηρείται

αυξημένη έκφραση του γονιδίου της ισομορφής 112 στην άνοια με σωματία Lewy, στην οποία παρατηρείται έντονος σχηματισμός ινιδίων (Gámez-Valero & Beyer, 2018, Beyer, 2006).

2.1.7 Η ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗ

Ο παθολογικός φαινότυπος της α-συνουκλεΐνης εκδηλώνεται όταν η πρωτεΐνη αναδιπλώνεται σε τυχαία σπειροειδή μορφή β-πτυχωτής επιφάνειας, δομή που επιτρέπει την συσσώρευση και την παραγωγή κυτταροπλασματικών εγκλείστων όπως τα σωματία Lewy. Τα εγκλείστα περιέχουν α-συνουκλεΐνη, λιπίδια και άλλες πρωτεΐνες. Αρχικά, σχηματίζεται ένας μικρός πυρήνας με λίγα μόρια πρωτεΐνης τα οποία έχουν χάσει την φυσιολογική διαμόρφωση της α-έλικας. Στην συνέχεια, συσσωρεύονται περισσότερα μόρια σχηματίζοντας τα πρωτοϊνίδια. Τελικά, όλη η διαλυτή πρωτεΐνη μετατρέπεται σε αδιάλυτα ινίδια αμυλοειδούς. Η συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης έχει συνέπειες για το κύτταρο επηρεάζοντας άμεσα την βιωσιμότητά του. Αποτέλεσμα της δημιουργίας των εγκλείστων είναι η μη σωστή λειτουργία της σύναψης καθώς απουσία α-συνουκλεΐνης δεν είναι δυνατή η αλληλεπίδραση των συναπτικών κυστιδίων με την πλασματική μεμβράνη (Deyell et al., 2023). Τα συσσωματώματα της πρωτεΐνης ενεργοποιούν την αυτοφαγία με σκοπό να αποδομηθούν. Αντί όμως το αυτοφαγόσωμα να προσδεθεί με τα συσσωματώματα, αυτό στοχεύει, μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού, λειτουργικά μιτοχόνδρια καταστρέφοντάς τα, οδηγώντας στην αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species) στους νευρώνες, γεγονός που πιθανόν να οδηγεί στον εκφυλισμό τους (Choubey et al., 2011). Ακόμη, η συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης αναστέλλει τη λειτουργία του πρωτεασώματος, με αποτέλεσμα την περαιτέρω συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο κύτταρο. Προκαλείται έτσι καταπόνηση στο ενδοπλασματικό δίκτυο, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ενδοκυττάρια κυκλοφορία.



Εικόνα 2.9: Μετάβαση από την φυσιολογική μορφή της α-συνουκλεΐνης στην παθολογική (Cox et al., 2014).

2.2 ΤΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το νευρικό σύστημα συντονίζει την λειτουργία του συνόλου των κυττάρων του ανθρώπινου σώματος. Αποτελείται από:

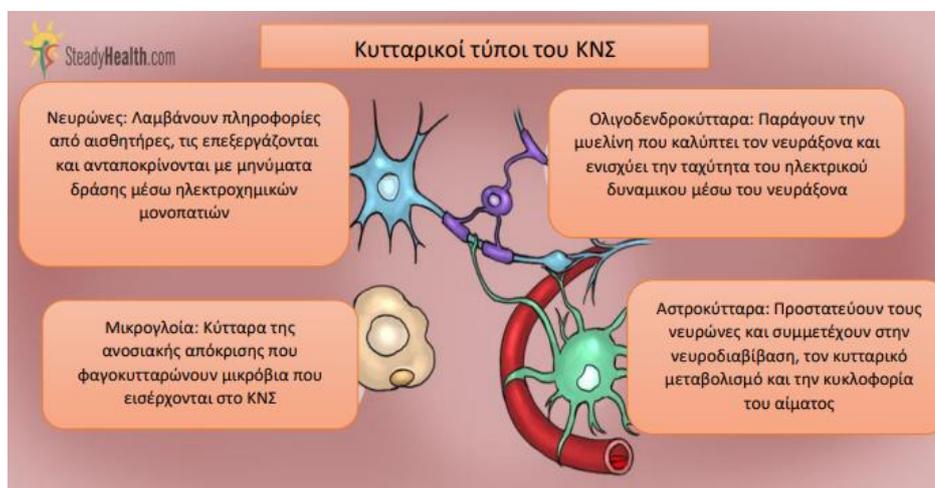
- Το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), στο οποίο περιλαμβάνονται ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός.
- Το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει τις νευρικές ίνες που εκτείνονται από τον εγκέφαλο ή το νωτιαίο μυελό προς τους μύες, τους αδένες και τα διάφορα αισθητήρια όργανα.

Το Περιφερικό Νευρικό Σύστημα διακρίνεται σε προσαγωγό σκέλος, μέσω του οποίου μεταφέρεται η πληροφορία από τους ιστούς και τα όργανα του σώματος στο ΚΝΣ, και απαγωγό σκέλος, μέσω του οποίου μεταφέρεται η πληροφορία από το ΚΝΣ προς τα εκτελεστικά κύτταρα.

Το απαγωγό σκέλος διακρίνεται σε σωματικό (όλες οι νευρικές ίνες που κατευθύνονται από το ΚΝΣ προς τα κύτταρα των σκελετικών μυών) και αυτόνομο νευρικό σύστημα.

Το αυτόνομο νευρικό σύστημα αποτελείται από μία αλυσίδα δύο νευρώνων οι οποίοι συνδέονται με μία σύναψη που εκτείνεται μεταξύ του κεντρικού νευρικού συστήματος και των εκτελεστικών οργάνων. Ρυθμίζει και διατηρεί την ομοιόσταση των οργανισμών μέσω του συμπαθητικού και παρασυμπαθητικού συστήματος.

Ο νευρικός ιστός αποτελείται από τέσσερις τύπους κυττάρων: νευρώνες, μικρογλοία, αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα (εικόνα 2.10).

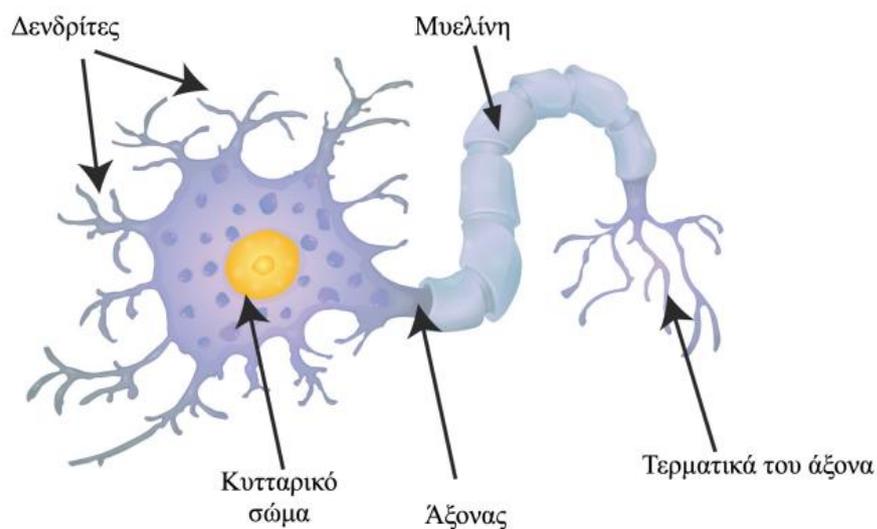


Εικόνα 2.10: Απεικόνιση των διαφόρων τύπων κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος. (steadyhealth.com)

Οι νευρώνες είναι υπεύθυνοι για την λήψη, επεξεργασία και μεταβίβαση ερεθισμάτων και την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών και άλλων μορίων που είναι φορείς πληροφοριών. Οι νευρώνες αποτελούνται από τα εξής μέρη (εικόνα 2.11):

1. Δενδρίτες: πρόκειται για μικρές διακλαδισμένες προεκτάσεις που εκβάλλουν από διάφορα μέρη του κύριου σώματος των νευρώνων. Βασική λειτουργία τους είναι η λήψη των ερεθισμάτων από άλλους νευρώνες.
2. Κυτταρικό σώμα: τμήμα του νευρώνα που περιλαμβάνει τον πυρήνα. Σε αυτό συντίθενται ή δημιουργούνται τα περισσότερα μόρια των νευρώνων και επιτελούνται οι πιο σημαντικές δραστηριότητες για τη διατήρηση της ζωής και τη φροντίδα των λειτουργιών των νευρικών κυττάρων. Διαθέτει ακόμα δυνατότητα υποδοχής ερεθισμάτων.
3. Νευράξονας: λεπτή επιμήκης νευρική ίνα που περιβάλλεται από θήκες μυελίνης, υπεύθυνη για τη μετάδοση των νευρικών σημάτων από το σώμα του άξονα μέχρι τα τερματικά κυστίδια. Μπορεί να δεχτεί και πληροφορίες από άλλα νευρικά κύτταρα.

Οι άξονες των νευρώνων με διάμετρο μεγαλύτερη του 1μm καλύπτονται από μυελίνη, η οποία λειτουργεί ως ηλεκτρικό μονωτικό και συντελεί στην επιτάχυνση της αγωγής ηλεκτρικών σημάτων και την εξοικονόμηση ενέργειας. Οι τελικές απολήξεις των δενδριτών του νευράξονα έχουν στα άκρα τους διογκώσεις, τα τελικά ή συναπτικά κυστίδια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών.



Εικόνα 2.11: Η δομή ενός τυπικού νευρώνα.

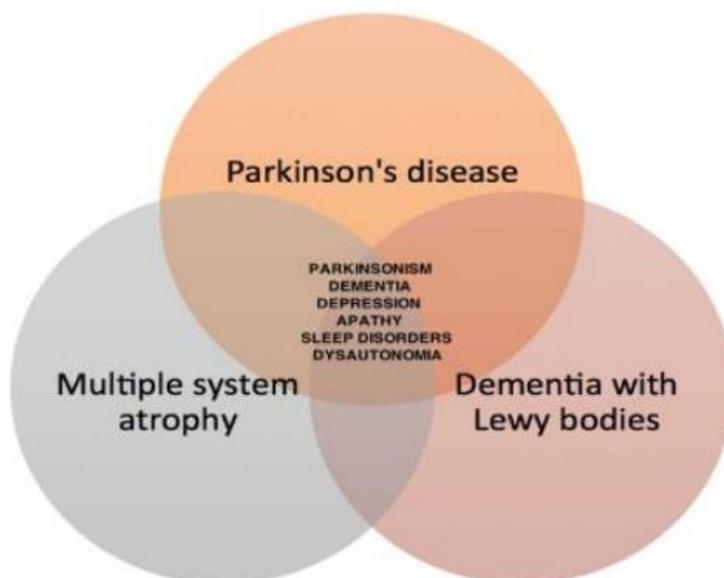
2.3 ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗ

2.3.1. ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΟΠΑΘΕΙΕΣ

Νευροεκφυλιστικές ονομάζονται οι ασθένειες στις οποίες παρατηρείται έκπτωση λειτουργίας αρχικά και εν τέλει θάνατος των νευρώνων. Κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η προοδευτική και μαζική απώλεια κυττάρων του νευρικού συστήματος, τα οποία είναι δύσκολο να αναπληρωθούν. Η εκτεταμένη αυτή απώλεια οδηγεί σε μείωση των σωματικών και νοητικών λειτουργιών του ατόμου και τελικά στο

θάνατο. Αιτία των νευροεκφυλιστικών ασθενειών είναι η συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και η παρουσία εγκλείστων και αμυλοειδών τα οποία προκύπτουν από την συσσώρευση δομών β-πτυχωτής επιφάνειας.

Η α-συνουκλεΐνη εμπλέκεται σε μια σειρά νευροεκφυλιστικών ασθενειών οι οποίες έχουν ονομαστεί συνουκλεϊνοπάθειες (Martí et al., 2003) και χαρακτηρίζονται όλες από την παρουσία συσσωματωμάτων α-συνουκλεΐνης που περιέχουν αδιάλυτη πρωτεΐνη. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται μεταξύ άλλων το Parkinson's, η άνοια με Σωματία Lewy και η Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων.



Εικόνα 2.12: Χαρακτηριστικές συνουκλεϊνοπάθειες με κοινό σύνολο ορισμένα συμπτώματά τους.

2.3.2. ΣΧΕΣΗ ΝΟΣΟΥ PARKINSON'S ΚΑΙ ΑΝΟΙΑΣ ΣΩΜΑΤΙΩΝ LEWY ΜΕ ΤΗΝ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗ

Parkinson's disease (PD):

Πρόκειται για συχνή νευροεκφυλιστική ασθένεια, τα συμπτώματά της οποίας περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων βραδυκίνηση, ακαμψία, απώλεια των αντανακλαστικών στάσης, εκτεταμένη απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στα βασικά γάγγλια και σχηματισμό πρωτεϊνικών εγκλείστων στο εσωτερικό των νευρώνων. Τα εγκλείστα αυτά ονομάζονται σωματία Lewy (Lewy bodies), έχουν ως κύριο συστατικό τους την α-συνουκλεΐνη και παρατηρούνται σε πολλά σημεία του εγκεφάλου σε παθολογικές συνθήκες. Η α-συνουκλεΐνη μπορεί να συμβάλλει στην παθογένεση της PD με διάφορους τρόπους, θεωρείται ωστόσο ότι τα πρωτοϊνίδια είναι εκείνα που μεσολαβούν στη διακοπή της κυτταρικής ομοιόστασης και στον νευρωνικό θάνατο, μέσω επιδράσεων σε διάφορους ενδοκυτταρικούς στόχους, καθώς και στη συναπτική δραστηριότητα (Stefanis, 2012). Η α-συνουκλεΐνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *SNCA* το οποίο εδράζεται στην περιοχή PARK1,

επομένως τυχόν διπλασιασμοί και τριπλασιασμοί τους συνδέονται με την εκδήλωση της νόσου. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων της νόσου είναι σποραδικής μορφής, ενώ υπάρχει και η οικογενής μορφή της νόσου η οποία σχετίζεται με την μεταλλαγή A53T της πρωτεΐνης και οδηγεί σε πρόωμη εμφάνιση της νόσου (Polymeropoulos et al., 1997).

Άνοια Σωματίων Lewy (Dementia with Lewy Bodies,DLB):

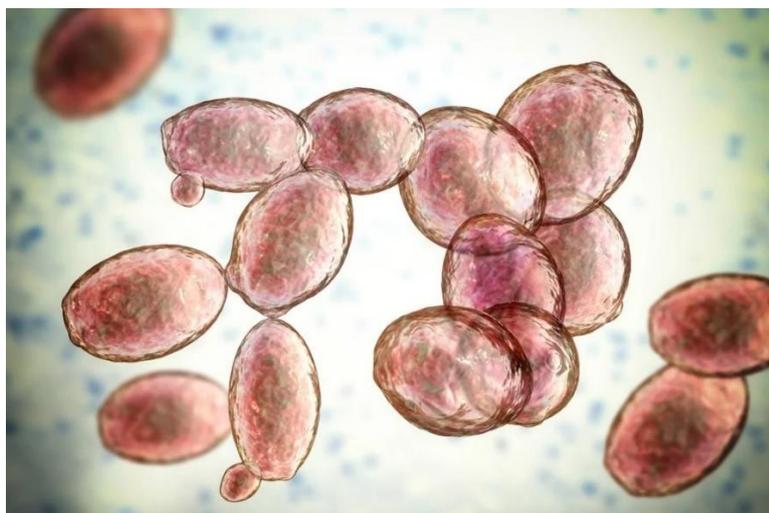
Πρόκειται για συνουκλείνοπάθεια που έχει κοινά χαρακτηριστικά με τις νόσους Parkinson's και Alzheimer. Κύριο στοιχείο της είναι η ύπαρξη των σωματίων Lewy που έχουν ως βασικό συστατικό την α-συνουκλείνη και παρατηρούνται σε όλους τους φλοιούς του εγκεφάλου. Στη νόσο Alzheimer η πρόοδος της ασθένειας είναι σχετικά αργή και επηρεάζει κυρίως τη μνήμη, τη συμπεριφορά και το λόγο. Αντίθετα, στην DLB η πρόοδος της ασθένειας είναι αρκετά πιο γρήγορη και επηρεάζει πολλές και διαφορετικές νοητικές και σωματικές λειτουργίες όπως τη συμπεριφορά, τον ύπνο, την κίνηση κλπ. (Kane et al., 2018). Ο διαχωρισμός της DLB από την Parkinson's έγκειται στο κριτήριο 'κανόνας του ενός έτους', όπου εάν η Parkinson's εμφανιστεί ταυτόχρονα με την άνοια ή μέχρι ένα χρόνο μετά χαρακτηρίζεται ως DLB, ενώ αν προηγηθεί της άνοιας κατά ένα χρόνο η περισσότερο χαρακτηρίζεται ως άνοια στο πλαίσιο της νόσου (Carouch et al., 2018). Σε γενετικό επίπεδο, τρία γονίδια φαίνεται να κατέχουν σημαντικό ρόλο στη νόσο DLB, τα APOE, GBA και SNCA, ενώ εμπλέκονται επίσης τόσο στη νόσο του Alzheimer, όσο και στο Parkinson's.

2.4 SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι μονοκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός που ανήκει στην τάξη *Saccharomycetales* (ασκοσποριογόνες ζύμες). Είναι αερόβιος οργανισμός με κυτταρική διάμετρο 4-5 μm και βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης 30–35 °C και pH 4-5. Χρησιμοποιείται εκτενώς στην αρτοποιία και την παρασκευή αλκοολούχων ποτών. Αναπαράγεται αφυλετικά, αλλά και φυλετικά, όταν κύτταρα διαφορετικού συζευκτικού τύπου συντήκονται και δημιουργούν διπλοειδή κύτταρα από τα οποία προκύπτουν νέα απλοειδή. Αποτελεί έναν από τους καλύτερα μελετημένους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και είναι ο πρώτος μεταξύ αυτών του οποίου χαρτογραφήθηκε η γονιδιωματική αλληλουχία (Tenreiro et al., 2010 και αναφορές εντός).

Ο *S. cerevisiae* διαθέτει ορισμένα σημαντικά κοινά χαρακτηριστικά με αντίστοιχα ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών όπως ο άνθρωπος. Πολλές βασικές κυτταρικές διαδικασίες παραμένουν ισχυρά διατηρημένες μεταξύ αυτού και των ανθρώπινων νευρικών κυττάρων όπως για παράδειγμα η αναδίπλωση των πρωτεϊνών και η κυκλοφορία μέσω των μεμβρανών του συστήματος Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου. Κατά συνέπεια, ο ζυμομύκητας αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη μοντελοποίηση των νευροεκφυλιστικών διαταραχών. Ακόμα, παρουσιάζει μικρό χρόνο διπλασιασμού, μπορεί να καλλιεργηθεί εύκολα, ενώ είναι

δυνατή η εισαγωγή ετερόλογων γονιδίων σε αυτόν, καθώς και η διαγραφή γονιδίων του μέσω τεχνικών της γενετικής μηχανικής που έχουν αναπτυχθεί.



Εικόνα 2.13: Κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* (Sottosanti 2025).

Ο *S. cerevisiae* χρησιμοποιείται ευρέως ως οργανισμός μοντέλο για την μελέτη νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι διαθέτει ορισμένα σημαντικά κοινά χαρακτηριστικά με αντίστοιχα ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών όπως ο άνθρωπος. Πολλά γονιδιά του, περίπου το 60%, εμφανίζουν ομολογία με αντίστοιχα του ανθρώπου και σχετίζονται με διάφορες ασθένειες. Ακόμη, φέρει ιδιαίτερα συντηρημένους τους μηχανισμούς κυτταρικής γήρανσης, θανάτου και αυτοφαγίας, οι οποίοι εμπλέκονται στην παθογένεια νευροεκφυλιστικών νόσων (Franssens et al., 2013).

Ο *Saccharomyces cerevisiae* έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της υπερέκφρασης της α -συνουκλεΐνης καθώς και για τη μελέτη των μεταλλαγών, των ισομορφών και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεών της. Στον ζυμομύκητα, η α -συνουκλεΐνη μπορεί να σχηματίσει συσσωματώματα όπως και στα κύτταρα των θηλαστικών. Η έκφρασή της επηρεάζει τη μεταφορά κυστιδίων, αναστέλλει την φωσφολυτάση D, μπορεί να προκαλέσει μείωση της αποδόμησης πρωτεϊνών μέσω του πρωτεασώματος και της βιωσιμότητας των κυττάρων του ζυμομύκητα στην στατική φάση ανάπτυξης.

Γενικότερα, οι συνθήκες ανάπτυξης ενός οργανισμού όπως για παράδειγμα θερμοκρασία, θρεπτικά συστατικά και pH, μεταβάλλονται κατά την αύξησή του. Οι οργανισμοί έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν μηχανισμούς για να ανταπεξέλθουν σε αυτές τις μεταβολές. Αυτό συμβαίνει και με τον ζυμομύκητα, όταν αντιλαμβάνεται τυχόν μεταβολές στο περιβάλλον του και αποκρίνεται σε αυτές με στόχο την επιβίωσή του. Έχει αποδειχτεί ότι σε συνθήκες καταπόνησης ο ζυμομύκητας ενεργοποιεί ένα γενικευμένο πρότυπο απόκρισης, και όχι μόνο μία συγκεκριμένη απόκριση κατά περίπτωση. Με τον τρόπο αυτό, ο *S. cerevisiae* κατά την έκθεσή του σε ένα είδος στρες είναι ικανός να αποκτά αντοχή σε αυτό και ταυτόχρονα να αποκτά αντοχή και σε ένα διαφορετικό είδος στρες που μπορεί να

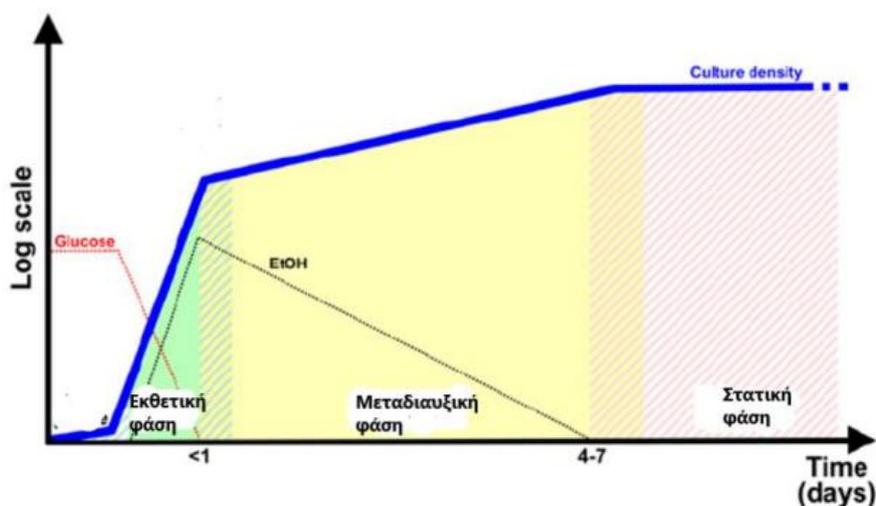
υπάρξει αργότερα κατά την ανάπτυξή του. Για παράδειγμα, σε συνθήκες υψηλής ωσμωτικότητας, οι πρωτεΐνες που θα παραχθούν για την αντιμετώπισή της, μπορούν να αποδειχθούν χρήσιμες σε ένα επερχόμενο θερμικό πλήγμα προσδίδοντάς του αντοχή σε αυτό (Ruis & Schüller, 1995).

2.5. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΓΗΡΑΝΣΗ ΣΤΟΝ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Η γήρανση αποτελεί σημαντικό αντικείμενο μελέτης καθώς πολλές ασθένειες κάνουν τότε την εμφάνισή τους. Ο στόχος των ερευνών που εστιάζουν στη γήρανση είναι να κατανοηθούν τα πιθανά αίτια των ασθενειών αλλά και να βρεθούν τρόποι αντιμετώπισής τους. Ο *Saccharomyces cerevisiae* έχει χρησιμοποιηθεί ως οργανισμός μοντέλο για την μελέτη της γήρανσης καθώς φέρει ιδιαίτερα συντηρημένους τους μηχανισμούς της.

Η χρονολογική γήρανση στον ζυμομύκητα *S.cerevisiae* αφορά το διάστημα κατά το οποίο επιβιώνει ένα κύτταρο ζύμης το οποίο πλέον δεν διαιρείται. Μελετάται σε μια καλλιέργεια στην μεταδιαυξική φάση ανάπτυξης, που βρίσκεται μεταξύ της εκθετικής και της στατικής φάσης (Longo et al, 2012).

Αρχικά, ως κύρια πηγή ενέργειας και άνθρακα τα κύτταρα χρησιμοποιούν σάκχαρα όπως η γλυκόζη, η οποία μεταβολίζεται μέσω της γλυκόλυσης προς παραγωγή αιθανόλης. Με την εξάντληση της γλυκόζης μειώνεται η ανάπτυξη των κυττάρων και εισέρχονται στην μεταδιαυξική φάση ανάπτυξης στην οποία καταναλώνεται η αιθανόλη που έχει παραχθεί στην εκθετική φάση (Busti et al, 2010). Αυτό συμβαίνει περίπου 24 ώρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό της καλλιέργειας. Μετά το τέλος της μεταδιαυξικής φάσης τα κύτταρα εισέρχονται στην στατική φάση ανάπτυξης κατά την έβδομη ημέρα περίπου από τον εμβολιασμό της αρχικής καλλιέργειας. Η μεταδιαυξική και η στατική φάση ανάπτυξης χαρακτηρίζονται κυρίως από έλλειψη θρεπτικών συστατικών καθώς η γλυκόζη έχει εξαντληθεί, από συσσώρευση αποθηκευτικών μορίων όπως το γλυκογόνο, καθώς και από συσσώρευση τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την καταπόνηση των κυττάρων. Έτσι, αναπτύσσονται από τα κύτταρα μηχανισμοί απόκρισης στο στρες, όπως είναι η συσσώρευση τρεχαλόζης, με σκοπό την προστασία τους, την αύξηση της ανθεκτικότητάς τους, και τελικά την επιβίωση παρά την έλλειψη θρεπτικών συστατικών (Galdieri et al., 2010 και αναφορές εντός). Στη μεταδιαυξική φάση ανάπτυξης των κυττάρων του ζυμομύκητα επάγεται επιπλέον και η αυτοφαγία. Τέλος, όσον αφορά την στατική φάση, τα κύτταρα είναι πιο ανθεκτικά σε θερμικό και ωσμωτικό σοκ.

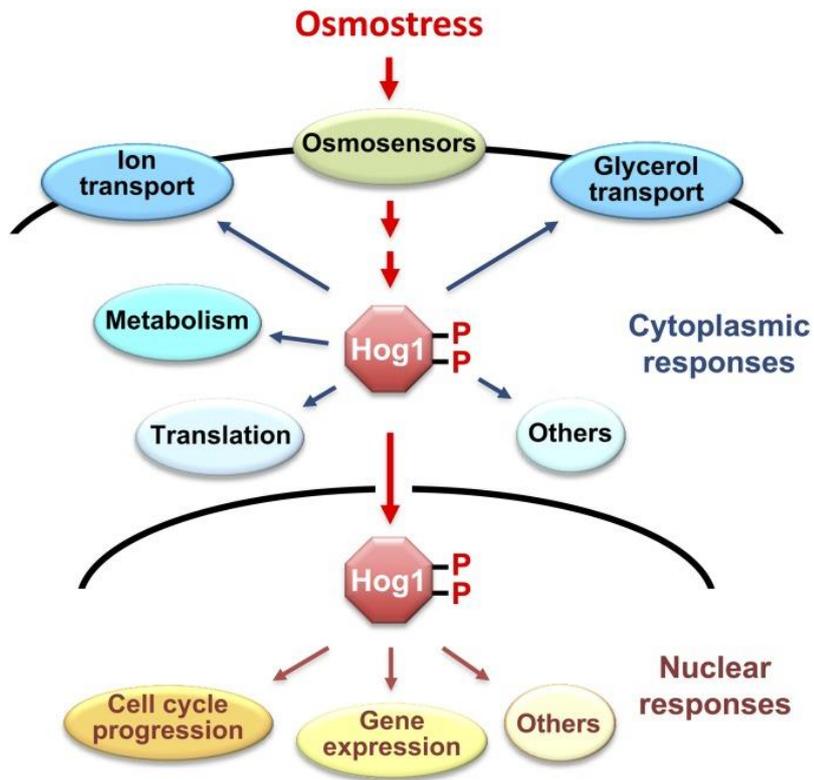


Εικόνα 2.14: Φάσεις ανάπτυξης του *S. cerevisiae* συναρτήσει του χρόνου. Η μπλε γραμμή αναπαριστά την πυκνότητα της καλλιέργειας. Διακρίνονται επίσης οι διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης του ζυμομύκητα. Με διακεκομμένη κόκκινη και πράσινη γραμμή απεικονίζεται η μείωση της γλυκόζης και της αιθανόλης αντίστοιχα (Busti et al., 2010)

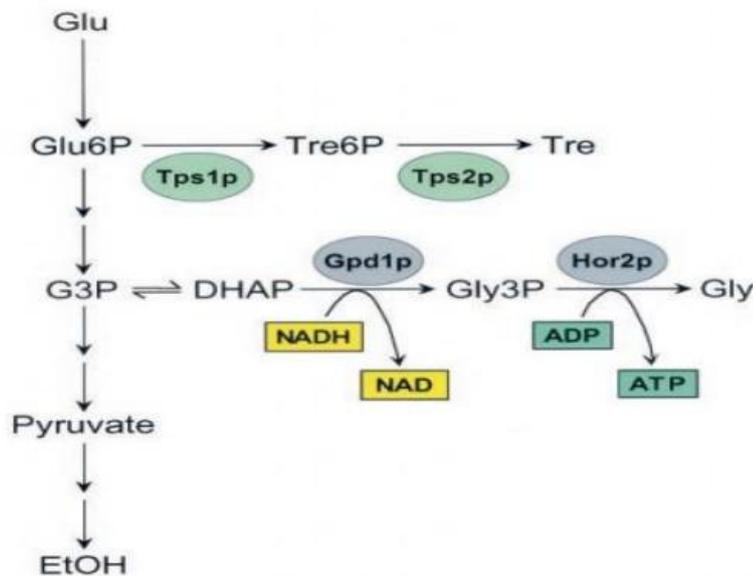
2.6 Η ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ *S. CEREVISIAE* ΣΤΗΝ ΥΨΗΛΗ ΩΣΜΩΤΙΚΟΤΗΤΑ

Μια περιβαλλοντική συνθήκη την οποία τα κύτταρα της ζύμης αντιλαμβάνονται και αποκρίνονται σε αυτήν είναι η υψηλή εξωτερική ωσμωτικότητα. Τα κύτταρα, προκειμένου να εξισορροπήσουν την υψηλή εξωτερική συγκέντρωση ωσμωλυτών, εκτρέπουν την μεταβολική πορεία της γλυκόλυσης προς την βιοσύνθεση γλυκερόλης και τρεχαλόζης. Το μονοπάτι αυτό της γλυκερόλης υψηλής ωσμωτικότητας (high osmolarity glycerol-HOG) διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη Hog1. Συγκεκριμένα, μετά από ένα ωσμωτικό σοκ η πρωτεΐνη Hog1 φωσφορυλιώνεται, μεταφέρεται στον πυρήνα και επάγει την μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων ως απόκριση (εικόνα 2.15). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να αποκρίνονται στο στρες και να υπάρχει αυξημένη παραγωγή γλυκερόλης και τρεχαλόζης (Nadal et al., 2022).

Η ανάπτυξη του ζυμομύκητα παρουσία υψηλής εξωτερικής ωσμωτικότητας παρατείνει τον χρόνο ζωής των κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού Hog1p, οδηγώντας έτσι στην αύξηση της βιοσύνθεσης γλυκερόλης από γλυκολυτικά ενδιάμεσα κατάλοιπα. Ακόμη, η εκτροπή του μονοπατιού της γλυκόλυσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του NAD που συμβάλλει επίσης στην αύξηση του χρόνου ζωής των κυττάρων (εικόνα 2.16) (Kaeberlein et al., 2002).



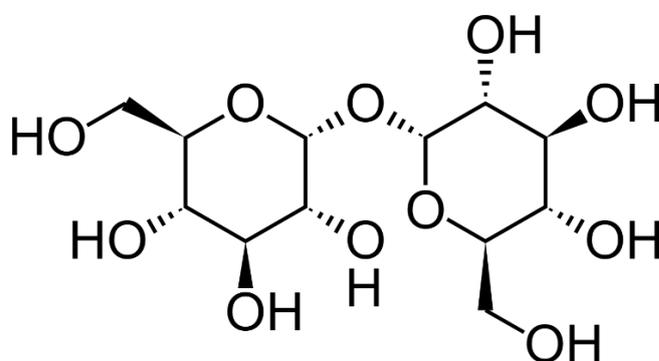
Εικόνα 2.15: Επαγωγή του μονοπατιού HOG. Παρουσία υψηλής εξωτερικής ωσμωτικότητας ειδικοί αισθητήρες ενεργοποιούν την Hog1 η οποία φωσφωρυλιώνεται, μεταφέρεται στον πυρήνα και επάγει την μεταγραφή γονιδίων απόκρισης στο στρες (Saito et al., 2012).



Εικόνα 2.16: Η υψηλή ωσμωτικότητα καταλήγει στη μεταβολική εκτροπή της γλυκόλυσης. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού HOG οδηγεί στην βιοσύνθεση τρεχαλόζης και γλυκερόλης από ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκόλυσης. (Kaeberlein et al., 2002)

2.7. Η ΤΡΕΧΑΛΟΖΗ ΚΑΙ Η ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΣΤΟΝ SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Η τρεχαλόζη είναι ένας μη αναγωγικός δισακχαρίτης στον οποίο δυο μόρια γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με έναν α-1,1-γλυκοζιδικό δεσμό. Η τρεχαλόζη εντοπίστηκε αρχικά στην ερυσσιβώδη σίκαλη, και αργότερα στο μάννα, μια ουσία που παράγεται από σκαθάρια. Υπάρχει άφθονη στην φύση και συναντάται και σε πολλούς οργανισμούς όπως βακτήρια, μύκητες, φυτά και έντομα. Συντίθεται στους οργανισμούς, όταν εκτεθούν σε συνθήκες καταπόνησης, ενώ χαρακτηριστική είναι η αντοχή που προσδίδει σε αυτούς σε παρατεταμένες περιόδους ξηρασίας. Εξαιτίας των ιδιοτήτων της έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει δυναμική για την χρήση της στη βιομηχανία όπως για παράδειγμα στην επεξεργασία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων (Singer et al., 1998).



Εικόνα 2.17: Χημική δομή της τρεχαλόζης.

Η τρεχαλόζη στον ζυμομύκητα χρησιμεύει ως πηγή άνθρακα και αποθήκη ενέργειας σε συνθήκες πείνας. Ορισμένες από τις σημαντικές λειτουργίες της είναι οι εξής (Jain et al., 2008):

- 1) Σταθεροποιεί τις πρωτεϊνικές και κυτταρικές μεμβράνες, καθώς δρα ως υποκατάστατο του νερού και αποτρέπει τη διάσπαση του εσωτερικού των οργανιδίων του κυττάρου, όταν αυτό αφυδατώνεται.
- 2) Προστατεύει τα κύτταρα σε καταστάσεις στρες και βοηθά στην ανάρρωσή τους μετά. Σε καταστάσεις θερμικού σοκ η βιοσύνθεση και η βιοαποδόμησή της αυξάνονται κατακόρυφα.
- 3) Αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες που έχουν αναδιπλωθεί λανθασμένα τόσο άμεσα λόγω της χημικής της δομής, όσο και έμμεσα μέσω της αυτοφαγίας.
- 4) Προστατεύει από τις ελεύθερες ρίζες, τις σταθεροποιεί και παρέχει αντιοξειδωτική δράση.
- 5) Αναστέλλει τη συσσώρευση των πρωτεϊνών μέσω των οκτώ υδροξυλομάδων που διαθέτει στο μόριο της τρεχαλόζης. Οι υδροξυλομάδες σχηματίζουν δεσμούς

υδρογόνου με τις πρωτεΐνες είτε άμεσα είτε έμμεσα οδηγώντας στο σχηματισμό πολυμερών πρωτεΐνης-νερού-τρεχαλόζης τα οποία περιλαμβάνουν σχηματισμό ινιδίων.

Στα βακτήρια υπάρχουν πέντε διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια για την τρεχαλόζη, ενώ στους μύκητες, τα φυτά και τα ζώα υπάρχει μόνο ένα. Αναλυτικότερα, στο *Pimelobacter sp* και στο θερμόφιλο βακτήριο *Thermus sp* η τρεχαλόζη παράγεται από την μαλτόζη ενώ το *Sulfolobus* που ανήκει στα αρχαία, μετατρέπει μαλτοολιγοσακχαρίτες σε τρεχαλόζη. Επιπλέον, κάποιοι βασιδιομύκητες περιέχουν ένα ένζυμο, την φωσφορυλάση της τρεχαλόζης, η οποία συνθέτει τρεχαλόζη από φωσφορική γλυκόζη (glucose-1-phosphate, G1P) και γλυκόζη (Eleutherio et al., 2015).

Στο πιο ευρέως διαδεδομένο μονοπάτι το οποίο ανακαλύφθηκε πρώτη φορά στον *Saccharomyces cerevisiae* το 1958, η αντίδραση της σύνθεσης της τρεχαλόζης περιλαμβάνει δύο στάδια:

1ο στάδιο: ένα μόριο 6-P-γλυκόζης και ένα μόριο UDP-γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας 6-P-φωσφορική τρεχαλόζη, αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο συνθάση της 6-P-φωσφορικής τρεχαλόζης.

2ο στάδιο: η 6-P-φωσφορική τρεχαλόζη μετατρέπεται σε τρεχαλόζη μέσω της φωσφατάσης της 6-P-φωσφορικής τρεχαλόζης.

Το κλασικό αυτό μονοπάτι χρησιμοποιείται από διάφορους οργανισμούς και παρουσιάζει ποικίλες παραλλαγές. Ορισμένα είδη χρησιμοποιούν διαφορετικά υποστρώματα όπως ADP-γλυκόζη αντί για UDP-γλυκόζη.

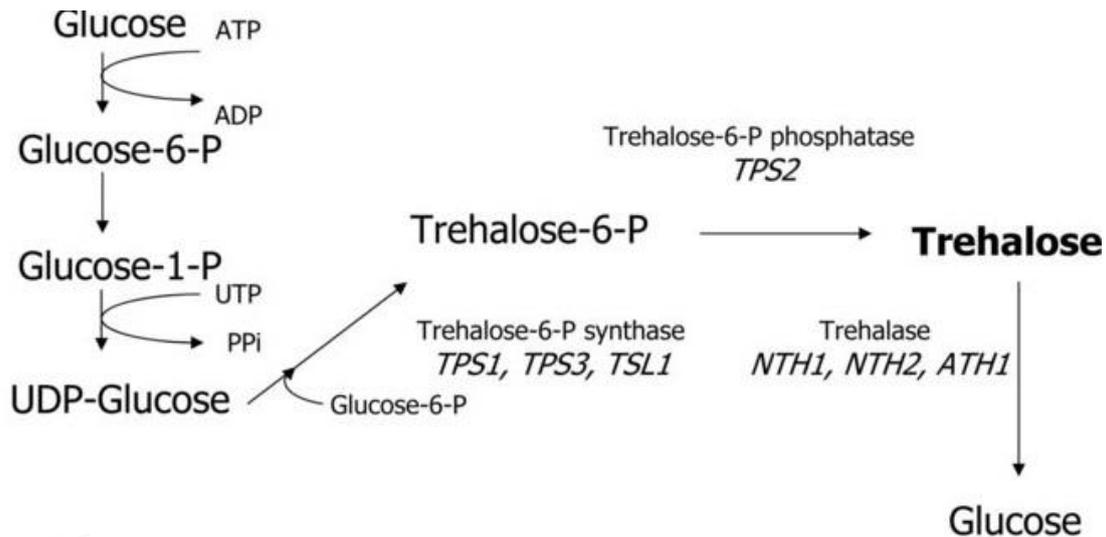
Στον ζυμομύκητα, η τρεχαλόζη συντίθεται από ένα ενζυμικό σύμπλοκο που περιλαμβάνει τέσσερις υπομονάδες, δύο ρυθμιστικές και δύο καταλυτικές. Τα τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες του συμπλόκου είναι:

- TPS1: παραγωγή υπομονάδας για τη συνθάση της 6-φωσφορικής τρεχαλόζης (Trp1p).
- TPS2: παραγωγή υπομονάδας για την φωσφατάση της 6-φωσφορικής τρεχαλόζης (Trp2p).
- TPS3: παραγωγή υπομονάδας Trp3p για την μία ρυθμιστική υπομονάδα, έχει ρυθμιστικό ρόλο και αλληλεπιδρά με την TPS1 και την TSL1.
- TSL1: παραγωγή υπομονάδας Tsl1p για την άλλη ρυθμιστική υπομονάδα, έχει ρυθμιστικό ρόλο, αλληλεπιδρά με την υπομονάδα του γονιδίου TPS1 ενεργοποιώντας την αλλά και με την υπομονάδα του TPS3.

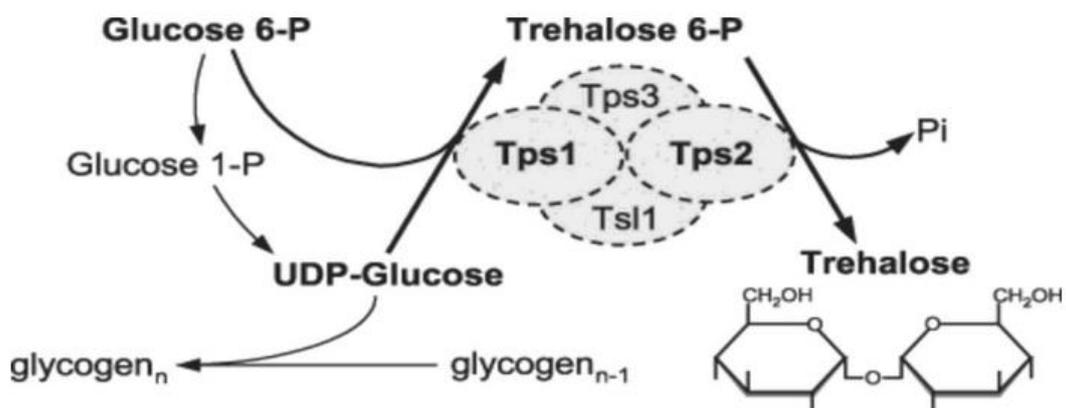
Η συγκέντρωση των Trp1p και Trp2p αυξάνεται σημαντικά σε συνθήκες στρες. Αυτή είναι μία συνέπεια της επαγωγής της έκφρασης του TSL1, η έκφραση του οποίου επηρεάζει ισχυρά την δραστηριότητα και ενεργοποίηση της Trp1p (Eleutherio et al., 2015).

Εκτός από τον *S. cerevisiae* πολλά είδη μυκήτων χρησιμοποιούν το συγκεκριμένο μονοπάτι για παραγωγή τρεχαλόζης με την διαφορά ότι μόνο στον *S. cerevisiae* το ενζυμικό σύμπλοκο αποτελείται από 4 υπομονάδες χωρίς να έχει αποσαφηνιστεί ο λόγος που συμβαίνει αυτό.

Όλοι οι οργανισμοί που διαθέτουν ένα ή περισσότερα μονοπάτια βιοσύνθεσης τρεχαλόζης, έχουν επίσης και ένα ένζυμο αποικοδόμησής της, την τρεχαλάση, η οποία διασπά την τρεχαλόζη σε δύο μόρια γλυκόζης. Στον ζυμομύκητα υπάρχουν 3 τρεχαλάσες, οι Nth1p, Nth2p and Ath1p (Eleutherio et al., 2015).



Εικόνα 2.18: Πορεία βιοσύνθεσης τρεχαλόζης στον *Saccharomyces cerevisiae* μέσω του ενζυμικού συμπλόκου της. Επίσης στην εικόνα φαίνεται και η διάσπαση της τρεχαλόζης σε γλυκόζη με την επίδραση της τρεχαλάσης (Hazelwood et al., 2009).



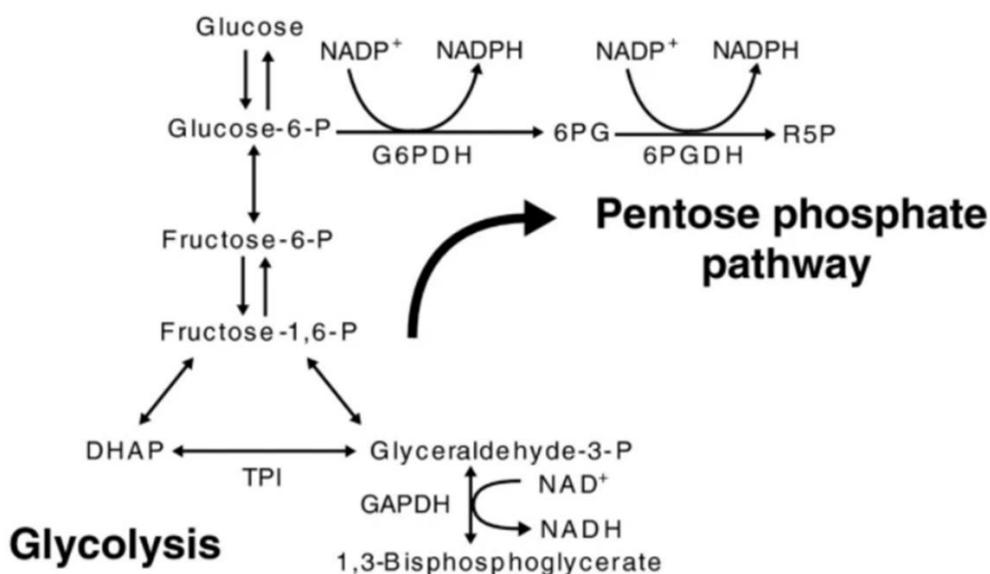
Εικόνα 2.19: Η αντίδραση σύνθεσης της τρεχαλόζης μέσω του ενζυμικού συμπλόκου της. (Gancedo & Flores, 2004).

2.8. ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ ΤΗΣ 3-ΦΩΣΦΩΡΙΚΗΣ ΓΛΥΚΕΡΑΛΔΕΪΔΗΣ (GAPDH)

Η GAPDH (GlycerAldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) είναι ένα σημαντικό ένζυμο του γλυκολυτικού μονοπατιού, το οποίο ελέγχει την κατανομή του άνθρακα στο κύτταρο και διαθέτει πολλές και διαφορετικές λειτουργίες. Η GAPDH καταλύει την οξείδωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης σε 1,3 διφωσφο-γλυκερικό κατά την διαδικασία της γλυκόλυσης σε σύζευξη με την αναγωγή του NAD⁺ σε NADH.

Στη γλυκόλυση, η γλυκόζη μετατρέπεται σε 1,6 φωσφορική φρουκτόζη η οποία διασπάται σε δύο μόρια αποτελούμενα από τρεις άνθρακες (3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη και φωσφορική δι-υδροξυακετόνη, DHAP) τα οποία μπορούν να τροποποιηθούν εκ των έσω από την ισομεράση της φωσφορικής τριόζης (TPI). Η κατάλυση από την GAPDH οδηγεί την ροή του άνθρακα προς την γλυκόλυση, ενώ η καταστολή της GAPDH μπορεί να τροποποιήσει την ροή του άνθρακα. Κατά συνέπεια, η GAPDH εμπλέκεται άμεσα στην κατανομή του άνθρακα για συγκεκριμένες λειτουργίες. Τα κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν εκτροπή της 1,6 φωσφορικής φρουκτόζης προς το μονοπάτι παραγωγής γλυκερόλης που ίσως εξυπηρετεί την απόκριση των κυττάρων στην καταπόνηση που προκαλείται από την αυξημένη οσμωτικότητα. Όταν η παραγωγή είτε της TPI είτε της GAPDH καταστέλλονται, η πορεία εκτρέπεται προς το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών για τη σύνθεση αναγωγικών παραγόντων (NADPH), γεγονός το οποίο αυξάνει την αντοχή στο στρες. Η GAPDH ίσως λειτουργεί ως ένας κυτταρικός διακόπτης της ανταπόκρισης στο οξειδωτικό στρες, ειδικότερα αφού καταλύει ένα κεντρικό και ουσιαστικό βήμα της γλυκόλυσης (Ringel et al., 2013).

Επιπλέον, η GAPDH ίσως έχει πιθανό ρόλο στην παροχή ενέργειας για την συναπτική μετάδοση. Η ενέργεια για τις συνάψεις παρέχεται κυρίως από τα μιτοχόνδρια, όπου το υπόστρωμα τους (ATP) παράγεται από την οξείδωση της γλυκόζης κατά την γλυκόλυση. Η GAPDH είναι μια γλυκολυτική πρωτεΐνη, επομένως, μείωση της δραστηριότητας της GAPDH ενδέχεται να διαταράσσει την λειτουργία των συνάψεων.



Εικόνα 2.20: Εκτροπή του μονοπατιού της γλυκόλυσης από την GAPDH. Όταν η GAPDH και η TPI είναι ενεργές, το μονοπάτι προχωρά προς την γλυκόλυση. Όταν η παραγωγή της GAPDH είτε της TPI καταστέλλονται, το μονοπάτι εκτρέπεται προς αυτό των φωσφορικών πεντοζών όπου συντίθενται αναγωγικοί παράγοντες με αποτέλεσμα να αυξάνεται η αντοχή στο στρες (Grant, 2008).

Η GAPDH έχει την ικανότητα να προσδένεται σε νουκλεϊκά οξέα. Στα μόρια RNA, προσδένεται τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* με την πρόσδεση να λαμβάνει χώρα σε περιοχές πλούσιες σε AU (AU-rich elements, ARE). Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρόσδεση του ενζύμου στα νουκλεϊκά οξέα γίνεται κυρίως μέσω της περιοχής δέσμευσης NAD⁺ στο αμινοτελικό άκρο του ενζύμου. Εντούτοις, υπάρχουν και περιπτώσεις όπου απαιτείται όλο το μόριο GAPDH για την δέσμευση, γεγονός που δείχνει ότι και η καταλυτική επικράτεια του ενζύμου παίζει ρόλο (Nicholls et al., 2012). Ακόμη, η GAPDH φαίνεται να παίζει ρόλο και στο μήκος των τελομερών καθώς διατηρεί και προστατεύει το τελομερικό DNA. Αυτό επιβεβαιώθηκε από έρευνες από τις οποίες διαπιστώθηκε ότι μετά από μερική απενεργοποίηση της GAPDH με χρήση siRNA παρατηρήθηκε ραγδαία μείωση του μήκους των τελομερών, ενώ η υπερέκφραση του ενζύμου απέτρεψε την μείωσή τους (Kosova et al., 2017).

Η GAPDH αλληλεπιδρά με DNA που έχει υποστεί βλάβες και έχει συσχετιστεί με ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου. Κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες, όταν το DNA έχει υποστεί βλάβη, λαμβάνει χώρα ταυτόχρονη νιτροζυλίωση και μετατόπιση της GAPDH στον πυρήνα. Εκεί η GAPDH μπορεί είτε να δεσμευτεί στην πολυμεράση 1 της πολύ(ADP-ριβόζης) (PARP1, πυρηνικό ένζυμο που συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA) ή απευθείας στο κατεστραμμένο DNA. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η PARP1 επάγεται από την παρουσία του DNA και την δέσμευση της GAPDH και συνθέτει πολυ(ADP-ριβόζη) χρησιμοποιώντας NAD⁺. Υπερενεργοποίηση της PARP1 καταστρέφει το ενδοκυτταρικό NAD⁺, επομένως η θέση δέσμευσης NAD⁺ της GAPDH ελευθερώνεται και το ένζυμο μπορεί να δεσμεύσει το DNA. Εάν ένα τμήμα μονόκλωνου DNA περιέχει θραύσμα, η GAPDH προσδένεται ομοιοπολικά σε

εκείνη την περιοχή και σχηματίζει ένα πολύ σταθερό σύμπλοκο με το DNA. Στην περίπτωση αυτή το σύμπλοκο αποτελεί ένα 'αυτοκτονικό σήμα' που εμποδίζει την επιδιόρθωση του DNA στην περίπτωση που συσσωρεύονται πολλές βλάβες και μπορεί να είναι ένας παράγοντας που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (Butera et al., 2019).

Ακόμη, το γλυκολυτικό αυτό ένζυμο έχει συσχετιστεί και με την απόπτωση. Η GAPDH φαίνεται να παίζει ρόλο στην απόπτωση των νευρώνων καθώς η παρουσία της στον πυρήνα σχετίζεται με την έναρξη πολλών αποπτωτικών μονοπατιών. Μια υπόθεση είναι πως το ένζυμο προσδέεται σε μεταλλαγμένες πρωτεΐνες που συνδέονται με ασθένειες όπως HD και AD, μετατοπίζεται στον πυρήνα και συμμετέχει στην έναρξη της απόπτωσης (Butera et al., 2019). Στο κυτοσόλιο, η GAPDH συμμετέχει και εκεί στην απόπτωση αυτή την φορά αποτρέποντάς την, μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Η GAPDH φωσφωρυλιώνεται από την Akt2 στην περιοχή δέσμευσης της Siah1 (E3 ubiquitin-protein ligase SIAH1) αποτρέποντας την πρόσδεσή της και την απόπτωση. Αυτός ο μηχανισμός εντοπίστηκε σε καρκινικά κύτταρα καρκίνου των ωθηκών τα οποία επιβιώνουν και αποφεύγουν την απόπτωση (Huang, Q. et al., 2011). Τέλος, υπάρχει συσχετισμός μεταξύ της αυτοφαγίας και της μετατόπισης της GAPDH σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα και κυρίως στον πυρήνα. Ο μοριακός μηχανισμός της αυτοφαγίας που επάγεται από την GAPDH δεν είναι ακόμη πλήρως αποσαφηνισμένος, ωστόσο θεωρείται πως ελέγχει την αυτοφαγία μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων με ρυθμιστικές πρωτεΐνες του πυρήνα.

2.9 Η GAPDH ΣΤΟΝ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Το γονιδίωμα του ζυμομύκητα περιέχει τρία διαφορετικά γονίδια για την GAPDH, τα TDH1, TDH2 και TDH3, που κωδικοποιούν τα ισόένζυμα GAPDH 1, GAPDH 2 και GAPDH 3 αντίστοιχα. Και τα τρία ισόένζυμα φέρουν ομοιότητες στην αμινοξική τους αλληλουχία. Όλες οι μορφές του ενζύμου καταλύουν την οξείδωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης σε 1,3 διφωσφο-γλυκερίνη κατά την διαδικασία της γλυκόλυσης με ταυτόχρονη αναγωγή του NAD⁺ σε NADH. Η μεταγραφή των τριών γονιδίων δεν ρυθμίζεται συντονισμένα, ενώ τα κύτταρα του ζυμομύκητα δεν εκφράζουν το ίδιο επίπεδο για καθένα από τα τρία ισόένζυμα στην πορεία της ανάπτυξής τους. Τα TDH2 και TDH3 εκφράζονται σε όλη την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ενώ το TDH1 μεταγράφεται κυρίως κατά την στατική φάση ή κατά την υποβολή των κυττάρων σε θερμικό στρες (Ringel et al., 2013 και αναφορές εντός).

Έχει βρεθεί ότι η ισομορφή Tdh3 της GAPDH εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο του ζυμομύκητα και συγκεκριμένα στην είσοδο στην στατική φάση, όπου διατηρεί τα κύτταρα σε μία μη μιτωτική κατάσταση ως απόκριση στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Στις ζύμες, σε περιόδους οξειδωτικού στρες, πραγματοποιείται θείωση σε κατάλοιπα κυστεΐνης του ενεργού κέντρου της Tdh3

και αυτό οδηγεί σε αδρανοποίηση του ενζύμου. Έτσι η Tdh3 είναι ελεύθερη να εξυπηρετήσει άλλες ανάγκες, ώστε να διατηρηθεί η εσωκυττάρια ομοιόσταση. Η Tdh3 ενεργοποιείται ξανά σε κατάλληλη χρονική στιγμή, αφού έχει ξεπεραστεί το οξειδωτικό στρες (Ringel et al., 2013).

Στον ζυμομύκητα, η GAPDH σχετίζεται με την ρύθμιση της κυτταρικής γήρανσης. Η GAPDH, ειδικά η Tdh3 αλληλεπιδρά με την σιρτουΐνη 2 (Sir2) η οποία απακετυλώνει τις ιστόνες και καταστέλλει την μεταγραφή των γονιδίων κοντά στα τελομερή. Κύτταρα με έλλειψη της Tdh3 είναι ελαττωματικά ως προς την διευθέτηση των τελομερών. Η πρόσδεση της Tdh3 πραγματοποιείται κατά τρόπο εξαρτώμενο από την Sir2, ενώ σε κύτταρα με έλλειψη της Tdh3 η σύνδεση της Sir2 στα τελομερή μειώνεται. Άρα, η Tdh3 δρα απευθείας στις περιοχές δράσης της Sir2. Επομένως η Tdh3 επάγει την αποσιώπηση στα κύτταρα ζύμης ανεξάρτητα του ρόλου της στην γλυκόλυση, λόγω της μετατόπισής της στον πυρήνα και της επίδρασής της στην καταλυτική ικανότητα της Sir2.

2.10. Η ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ GAPDH ΜΕ ΤΗΝ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗ

Για την άμεση συσχέτιση της GAPDH και της α-συνουκλεΐνης, τα μόνα στοιχεία της διεθνούς βιβλιογραφίας προέρχονται από μοντέλα σε κύτταρα θηλαστικών, από τα οποία επιβεβαιώνεται η φυσική αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών.

Αρχικά, παρατηρήθηκε ο ρόλος της GAPDH ως προ-αποπτωτική πρωτεΐνη στην συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης και την επαγωγή στον σχηματισμό των Σωματίων Lewy (Tsuchiya et al., 2005). Η GAPDH φέρεται θειωμένη και ουβικουιτινωμένη λόγω οξειδωτικού στρες και η υπερέκφραση της αποτελεί ένα αποπτωτικό σήμα κυτταρικού θανάτου. Αντίθετα με αυτό, άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι η GAPDH συσσωρεύεται και αλληλεπιδρά με γλυκοζαμίμες προστατεύοντας από την τοξικότητα της α-συνουκλεΐνης (Barinova et al., 2018).

Για την GAPDH υπάρχουν ενδείξεις ότι εμπλέκεται στην παθογένεση του Parkinson's καθώς έχει εντοπισθεί μαζί με την α-συνουκλεΐνη σε σωματία Lewy στον εγκέφαλο ασθενών, ενώ ενδεχομένως παίζει ρόλο στον σχηματισμό των σωματίων αυτών. Είναι πιθανό η πρόσδεση της α-συνουκλεΐνης στο γλυκολυτικό ένζυμο να επηρεάζει τον ενεργειακό μεταβολισμό. Ακόμη, η αλληλεπίδρασή τους ίσως επηρεάζει την κύρια λειτουργία της α-συνουκλεΐνης που είναι η απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών στην σύναψη. Κατά συνέπεια, η αλληλεπίδραση αυτή θα μπορούσε να είναι η αιτία χαρακτηριστικών παθολογικών αλλαγών που παρατηρούνται στο Parkinson's όπως επαγωγή της απόπτωσης, σχηματισμός αμυλοειδών δομών διατάραξη ενεργειακού μεταβολισμού και νευροδιαβίβασης (Barinova et al., 2018).

Επίσης, έχει παρατηρηθεί σε πειράματα in vitro ότι η α-συνουκλεΐνη προσδένεται στην GAPDH. Η πρόσδεση της α-συνουκλεΐνης σε κατάλοιπα του ενεργού κέντρου της GAPDH οδηγεί στην αδρανοποίηση του ενζύμου, μειώνει την

θερμοανθεκτικότητά του και αυξάνει την τάση για συσσωμάτωση της α -συνουκλεΐνης (Barinova et al., 2018).

Λόγω της αλληλεπίδρασης της με την α -συνουκλεΐνη η GAPDH φέρεται αδρανοποιημένη, οπότε το υπόστρωμα της, η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη, συσσωρεύεται και γλυκοζυλιώνει την α -συνουκλεΐνη, με αποτέλεσμα την μη αμυλοειδή μετατροπή της. Έτσι, η 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη αποτελεί ένα αμυντικό μηχανισμό έναντι της συσσωμάτωσης της α -συνουκλεΐνης. Πρόκειται για ένα ανατροφοδοτικό μηχανισμό όπου η γλυκοζυλίωση της α -συνουκλεΐνης οδηγεί σε ενίσχυση της πρόσδεσης της GAPDH σε αυτή και σε περαιτέρω αδρανοποίηση του ενζύμου.

Άρα, η α -συνουκλεΐνη συμμετέχει στην αδρανοποίηση της GAPDH μαζί και με άλλους τοξικούς παράγοντες κατά την έκφρασή της. Η αλληλεπίδραση της α -συνουκλεΐνης με την GAPDH, με βάση και τα όσα αναφέρθηκαν, φαίνεται να παραμένει ασαφής.

2.11 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η α -συνουκλεΐνη είναι μια πρωτεΐνη του νευρικού συστήματος με ποικίλες λειτουργίες και εκφράζεται άφθονα στο προσυναπτικό άκρο των νευρώνων των σπονδυλωτών (συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου). Σε παθολογικές καταστάσεις υπερεκφράζεται και δημιουργεί κυτταροπλασματικά έγλειστα (Σωματία Lewy) που επιδρούν αρνητικά στα κύτταρα και αποτελούν αιτία ασθενειών όπως το Parkinson.

Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιείται ως μοντέλο για την μελέτη της α -συνουκλεΐνης αλλά και για την μελέτη ασθενειών που σχετίζονται με αυτή καθώς πολλές βασικές κυτταρικές διαδικασίες παραμένουν ισχυρά διατηρημένες μεταξύ αυτού και των ανθρώπινων νευρικών κυττάρων, όπως η αναδίπλωση των πρωτεϊνών και η κυκλοφορία μέσω των μεμβρανών του συστήματος Golgi και του ενδοπλασματικού δικτύου.

Στο εργαστήριό μας έχουν κλωνοποιηθεί τύποι γονιδίων της α -συνουκλεΐνης σε φορέα κατάλληλο για κύτταρα ζυμομυκήτων υπό τον έλεγχο υβριδικού υποκινητή ρυθμιζόμενου από το σύστημα tet-off και έχει μελετηθεί αρκετά αναλυτικά την έκφρασή τους στο ζυμομύκητα, την τοξικότητα που προκαλεί σε διάφορες συνθήκες και την επαγωγή μεταβολικών μονοπατιών του ζυμομύκητα που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση της τρεχαλόζης η οποία παράγεται ως απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης. Ακόμα, μια πρώτη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων της α -συνουκλεΐνης με τις πρωτεΐνες του *S. cerevisiae* κατέδειξε κυρίως την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι:

- Η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της α -συνουκλεΐνης με την GAPDH του *Saccharomyces cerevisiae* στην φάση της γήρανσης των κυττάρων. Το γονίδιο

SNCA θα υπερκεκφραστεί στην *E.coli* ώστε να παραχθεί ανασυνδυασμένη α-συνουκλεΐνη. Στην συνέχεια, θα χρησιμοποιηθεί σε πειράματα συγκατακρίμνησης με τις πρωτεΐνες του ζυμομύκητα, ώστε να εντοπιστούν τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, ενώ για την ανίχνευση της αλληλεπίδρασης της α-συνουκλεΐνης με την GAPDH θα πραγματοποιηθούν πειράματα Western με τα κατάλληλα αντισώματα.

- Προσδιορισμός της παραγόμενης τρεχαλόζης με ενζυμική μέθοδο σε χαρακτηριστικές φάσεις ανάπτυξης του ζυμομύκητα. Η ποσότητα της τρεχαλόζης θα προσδιοριστεί σε κύτταρα του ζυμομύκητα που δεν φέρουν α-συνουκλεΐνη, καθώς και αυτών που εκφράζουν α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου και A53T. Η χρήση διαφορετικών στελεχών και φάσεων ανάπτυξης έχει ως στόχο την μελέτη της επίδρασής της στην παραγωγή της τρεχαλόζης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Χημικά και όργανα

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

Τα όργανα που 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+

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- Finnpiquette 2-20 μl, 20-200 μl, 200-1000 μl/ Nichiryo- Nichipet EX 100 2-20μl, 20-200 μl, 100-1000 μl

Υδατόλουτρο: BIOLINE SCIENTIFIC WB5020

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

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

Αυτόκαυστο: ASTELL SCIENTIFIC AMB 430

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

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

Λοιπά αναλώσιμα: Whatman- Απορροφητικό χαρτί / Στατώ/ Eppendorfs/ Ρύγχη για πιπέτες/ Πιπέτες Pasteur/ Λαβίδες/ Τρυβλία/ Whatman- Φίλτρα με διάμετρο πόρων 0,45 μm/ FALCON- Σωλήνες των 10 ml, 50 ml/ Σωλήνες των 10 ml/ BemisParafilm/ 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-Σιφώνια των 5, 10 ml/ Πουάρ/ Αλουμινόχαρτο/Σπάτουλες

3.2 ΣΤΕΛΕΧΗ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ, ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στους πίνακες 3.1 και 3.2, ενώ τα πλασμίδια στον πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.1. Στελέχη *S. cerevisiae*

Στέλεχος	Γονότυπος	Βιβλιογραφία
BY4741 (αγρίου τύπου)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Winston et al., 1995
BY4741 <i>TPS1Δ</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YBR126c::kanMx4</i>	Bell et al., 1998

Πίνακας 3.2. Βακτηριακά Στελέχη

<i>Escherichia coli</i>	Γονότυπος	Βιβλιογραφία
DH5a	<i>F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17 (rk- mk +), λ</i>	Hanahan, 1983BRL
BL21 (DE3)	<i>F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Studier and Moffatt, 1986

Πίνακας 3.3. Πλασμίδια

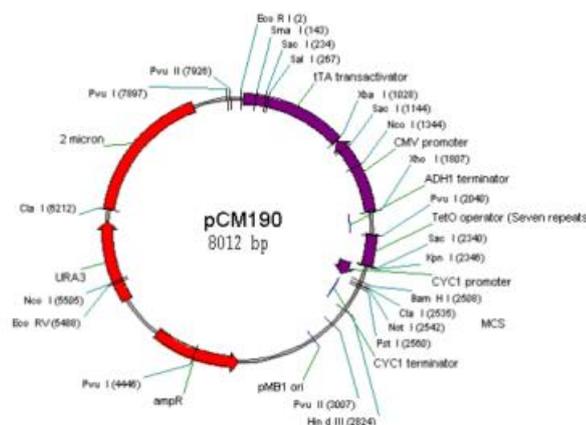
Πλασμίδια	Φαινοτυπικός δείκτης	Χαρακτηριστικά	Βιβλιογραφία
pCM190	AmpR, URA3	Φορέας έκφρασης για <i>S.cerevisiae</i>	Gari et al. 1997
pCM190 asynWT	AmpR, URA3	Φορέας έκφρασης για <i>S.cerevisiae</i> με το γονίδιο της α-	Κακαλιάρης Ν., Πτυχιακή Εργασία, Ιωάννινα, 2010

		συνουκλεΐνης αγρίου τύπου	
pCM190 asynA53T	AmpR, URA3	Φορέας έκφρασης για <i>S.cerevisiae</i> με την μεταλλαγή A53T του γονιδίου της α- συνουκλεΐνης	Σφήκας Ε., Διδακτορική Διατριβή, Ιωάννινα, 2019
pET29c(+)	KmR	Φορέας υπερέκφρασης	Novagen
pET29c asynWT	KmR	Φορέας υπερέκφρασης με το γονίδιο της α- συνουκλεΐνης αγρίου τύπου	Σφήκας Ε., Διδακτορική Διατριβή, Ιωάννινα, 2019

ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ pCM190:

Τα κύρια χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου πλασμιδίου είναι:

- Η ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη ως δείκτης επιλογής στην *E. coli*
- Η παρουσία του γονιδίου βιοσύνθεσης της ουρακίλης URA3 καθώς τα μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο αυτό κύτταρα του ζυμομύκητα μπορούν να επιλέγονται σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο χωρίς ουρακίλη
- Το σύστημα tet-off μέσω του οποίου απενεργοποιείται ένα γονίδιο με την προσθήκη τετρακυκλίνης. Βασίζεται στον υβριδικό υποκινητή tet O-CYC1, διαθέτει ενεργότητα τόσο καταστολέα και ενεργοποιητή της μεταγραφής και είναι λειτουργικός στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Απουσία τετρακυκλίνης στο μέσο ανάπτυξης ο καταστολέας προσδένεται στον χειριστή tetO και καταστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη. Η παρουσία τετρακυκλίνης παρεμποδίζει την πρόσδεση του καταστολέα, κατά συνέπεια πραγματοποιείται η μεταγραφή του γονιδίου.



Εικόνα 3.1: Πλασμιδιακός και γενετικός χάρτης του pCM190.

3.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Η ανάπτυξη του βακτηρίου *E.coli* σε υγρή καλλιέργεια γίνεται στο θρεπτικό μέσο LB (Luria Broth), η σύσταση του οποίου είναι:

- NaCl 1% w/v
- Tryptone 1% w/v
- Yeast Extract 0.5% w/v

Για την ανάπτυξη του *E.coli* σε στερεό θρεπτικό (Luria agar, LA) προστίθεται 2% w/v άγαρ στο LB.

Τα υγρά και τα στερεά θρεπτικά μέσα αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο σε συνθήκες 121°C/ 1,2 bar/ 15 min.

Η ανάπτυξη του *E.coli* πραγματοποιείται στους 37°C. Οι υγρές καλλιέργειες αναπτύσσονται υπό ανάδευση (225rpm).

Για την ανάπτυξη των κυττάρων BL21 (DE3) στο θρεπτικό μέσο προστέθηκε το αντιβιοτικό καναμυκίνη από διάλυμα στοκ 50 mg/mL σε τελική συγκέντρωση 50 µg/mL.

3.4 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Η ανάπτυξη των ζυμομυκήτων σε υγρές καλλιέργειες πραγματοποιείται στο πλήρες θρεπτικό μέσο YPD (Yeast Peptone Dextrose), η σύσταση του οποίου είναι:

- Yeast extract 1% w/v
- Peptone 2% w/v
- Glucose 2 % w/v

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου προστίθεται στο παραπάνω διάλυμα 2% άγαρ.

Τα υγρά και τα στερεά θρεπτικά μέσα αποστειρώνονται όπως παραπάνω.

Για την ανάπτυξη των στελεχών του ζυμομύκητα που περιέχουν το πλασμίδιο pCM190 ή τα παράγωγά του χρησιμοποιήθηκε το ελάχιστο θρεπτικό μέσο yeast synthetic drop-out media supplement without uracil. Η ουρακίλη, απαραίτητη για την ανάπτυξη του ζυμομύκητα, συντίθεται μέσω του γονιδίου URA3 που εδράζεται στο pCM190 και αποτελεί το μέσο επιλογής του.

Η σύσταση του συγκεκριμένου θρεπτικού μέσου είναι η ακόλουθη:

- Yeast nitrogen base without amino acids 6.7 g/L

- Yeast synthetic drop-out media supplement without uracil 1.92 g/L
- Sorbitol 18% w/v
- Γλυκόζη 40 mL/L από διάλυμα στοκ 50% w/ *
- Ιστιδίνη 76 mg/L από διάλυμα στοκ 760 mg/L*
- Μεθειονίνη 76mg/L από διάλυμα στοκ 760 mg/L*
- Λευκίνη 380 mg/L από διάλυμα στοκ 3,8 g/L*

*Αποστειρώνεται ξεχωριστά με φίλτρο 0,22 μm και προστίθεται στο θρεπτικό μέσο μετά την αποστείρωσή του.

Στην περίπτωση που απαιτείται η ανάπτυξη του ζυμομύκητα σε συνθήκες υψηλής εξωτερικής ωσμωτικότητας προστίθεται στο παραπάνω θρεπτικό μέσο σορβιτόλη σε τελική συγκέντρωση 18% w/v.

Το θρεπτικό αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 121°C.

Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου στο παραπάνω θρεπτικό προστίθεται 2% άγαρ πριν την αποστείρωση στο αυτόκαυστο.

Η ανάπτυξη του *S. cerevisiae* πραγματοποιείται στους 30°C. Οι υγρές καλλιέργειες αναπτύσσονται υπό ανάδευση (180 rpm).

3.5 ΜΟΝΙΜΗ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ (STOCK) ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ΚΑΙ *E. COLI*

Σε ειδικά σωληνάρια (cryovials) προστίθενται 0,5 ml 100% w/v γλυκερόλης και 1 ml υγρής καλλιέργειας πλήρους ανάπτυξης του ζυμομύκητα ή της *E.coli*. Στη συνέχεια, ακολουθεί ανάμιξη στο vortex και αποθήκευση στους -80 °C.

Τα κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) αποθηκεύονται με γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 15%.

3.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ *E. COLI* (ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΚΙΤ Nucleospin Plasmid cat No 740 588.250)(Macherey-Nagel)

Η μέθοδος στηρίζεται στην δέσμευση του DNA σε στήλη ανταλλαγής και έκλουσής του από αυτή με ρυθμιστικό διάλυμα TE. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας.

3.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v και ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE. Αρχικά, ζυγίζεται η αγαρόζη σε κωνική φιάλη και προστίθεται κατάλληλη ποσότητα 1x TAE. Ακολουθεί θέρμανση του διαλύματος μέχρι βρασμού,

ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει διαυγές. Το διάλυμα στην συνέχεια αφήνεται να κρυώσει και πριν πήξει προστίθεται σε αυτό διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 5μg/mL. Το μίγμα τοποθετείται σε ειδική φόρμα και αφήνεται έως ότου πήξει. Έπειτα, τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και σε αυτή προστίθεται διάλυμα 1x TAE μέχρι να καλυφθεί το πήκτωμα και αφαιρούνται τα χτενάκια που χρησιμεύουν ώστε να δημιουργηθούν τα πηγαδάκια.

Στα δείγματα που θα ηλεκτροφορηθούν προστίθεται διάλυμα φόρτωσης GLB (gel loading buffer) σε αναλογία 5:1.

Στην συνέχεια, σε κάθε πηγαδάκι του gel προστίθεται ένα δείγμα DNA. Επιπλέον, σε ένα πηγαδάκι προστίθεται και λ/HindIII. Αφού φορτωθούν όλα τα δείγματα, συνδέεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης με την μονάδα τάσης. Όταν τα δείγματα διανύσουν μια συγκεκριμένη απόσταση, η παροχή ρεύματος διακόπτεται και το πήγμα αφαιρείται για να φωτογραφηθεί σε πλάκα με λάμπες UV.

Τα διαλύματα της ηλεκτροφόρησης είναι:

- TAE (Tris-acetate): 0.04M Tris, 0.001M EDTA pH 8.0 με οξικό οξύ (αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου). Συνήθως παρασκευάζεται σε διάλυμα stock TAE 50x και αραιώνεται κατάλληλα.
- Βρωμιούχο αιθίδιο: 3mg/mL, pH8.0 (αποθήκευση στους 4°C)
- Διάλυμα φόρτωσης (GLB): 0.25% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης, 0.25% w/v κυανολικό ξυλένιο, 30% w/v γλυκερόλη (αποθηκεύεται στους 4°C)
- λ/HindIII: 100μl λ/HindIII και 400μl H₂O. Επώαση για 3 λεπτά στους 60°C, προσθήκη 100μl gel loading buffer(GLB), ανάδευση (vortex) και αποθηκεύεται στους 4°C

3.8 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E. COLI* BL21 (DE3) (CHUNG ET AL.,1988)

Πρόκειται για μία γρήγορη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα *E.coli*. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή των πλασμιδιακών φορέων υπερέκφρασης στα κύτταρα BL21(DE3).

- Κύτταρα *E.coli* BL21 (DE3) εμβολιάζονται σε 5 ml LB και επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση από την προηγούμενη (περίπου 16 h). (προκαλλιέργεια)
- Την επόμενη, η προκαλλιέργεια αραιώνεται 1:20 (v/v) και επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση για περίπου 2 h.(OD600 μεταξύ 0.3-0.6)
- Όταν επιτευχθεί η επιθυμητή OD, από την προκαλλιέργεια λαμβάνονται δείγματα του 1 ml, για κάθε δείγμα που θα υποστεί μετασχηματισμό, ενώ συμπεριλαμβάνονται επιπλέον δύο δείγματα, ένα για τον θετικό και ένα για τον αρνητικό μάρτυρα.

- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 8.000rpm για 5 min στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα εκπλένονται με 1 ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 8000rpm για 5 min στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε όγκο 1/10 διαλύματος TSB (Transformation and Storage Buffer) στους 4°C.
- Το εναιώρημα επωάζεται στον πάγο για 10 min.
- Ακολούθως, γίνεται προσθήκη 50ng-100pg DNA γνωστού δείγματος πλασμιδίου στον θετικό μάρτυρα και ορισμένης ποσότητας DNA του δείγματος πλασμιδίου προς μετασχηματισμό. Στο δείγμα του αρνητικού μάρτυρα δεν προστίθεται ποσότητα DNA.
- Τα δείγματα επιστρέφονται στον πάγο για 5-30 min. (Δεν απαιτείται θερμικό σοκ)
- Στην συνέχεια, προστίθενται σε κάθε δείγμα 0.9 ml TSB που περιέχει 20mM γλυκόζης και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C υπό ανάδευση για 60 min.
- Πραγματοποιείται επίστρωση σε θρεπτικό μέσο, το οποίο περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Γίνεται επίστρωση 200μl θετικού μάρτυρα σε ένα τρυβλίο, 200μl αρνητικού μάρτυρα σε ένα άλλο και 200μl του δείγματος ενδιαφέροντος σε ένα τρυβλίο.
- Τα τρυβλία παραμένουν στον θάλαμο νηματικής ροής (hood) μέχρι να στεγνώσουν και κατόπιν επωάζονται στους 37°C για τουλάχιστον 18h.

Η σύσταση του διαλύματος TSB είναι η ακόλουθη:

LB pH 6.1, 10% PEG 3.35, 5% DMSO, 10 mM MgCl₂ και 10 mM MgSO₄

3.9 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* (KUSHNIROV ET AL., 2000)

- 15mL καλλιέργειας φυγοκεντρούνται στα 12.000g για 2 λεπτά.
- Ακολουθεί πλύση με απιονισμένο-αποστειρωμένο νερό (1mL).
- Στην συνέχεια, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στα 12.000g για 2 λεπτά.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο και διατηρείται το ίζημα.
- Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 100μl απιονισμένο-αποστειρωμένο νερό.
- Προσθήκη 100μl 0.2M NaOH.
- Το μίγμα επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στα 12.000g και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
- Το ίζημα επαναιωρείται σε 50μl Laemmli Sample Buffer.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12.000g για 2 λεπτά και διατηρείται το υπερκείμενο σε νέο Eppendorf.
- Βρασμός για 5 λεπτά στους 95°C.
- Αποθήκευση στους -80°C.

Laemmli Sample Buffer: Tris-HCl pH 6.8 0.06M, Γλυκερόλη 5%, SDS 2%, 4% Β-μερκαπτοαιθανόλη (προστίθεται πριν την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών), 0.0025% κυανού της βρωμοφαινόλης

3.10 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΖΥΜΗΣ

- 15 mL καλλιέργειας φυγοκεντρώνται στα 12.000rpm για 3 λεπτά.
- Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος με 300μl διαλύματος λύσης.
- Προσθήκη 1μl αναστολέα πρωτεασών.
- Προσθήκη σφαιριδίων υάλου (glass beads) διαμέτρου 600μm σε αντιστοιχία όγκου 50μl και ακολουθεί ανάδευση στο vortex για 10 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 30 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο Eppendorf και ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός με Bradford και SDS-page ηλεκτροφόρηση ή αποθήκευση στους -80°C.

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

3.11 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD)

Η συγκέντρωση του συνόλου των πρωτεϊνών ενός κυτταρικού εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (Bradford 1976). Πρόκειται για χρωματομετρική μέθοδο που βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, να προσδένεται στις πρωτεΐνες υπό όξινες συνθήκες, με αποτέλεσμα την μεταβολή του χρώματός της. Η ελεύθερη χρωστική έχει μέγιστο απορρόφησης στα 465nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής, στα 595nm. Η συγκεκριμένη μέθοδος υπερτερεί σε σχέση με άλλες επειδή είναι απλά και γρήγορη, ενώ παρουσιάζει μεγάλη εξειδίκευση, γεγονός που παρακάμπτει εμπόδια όπως την παρεμπόδιση από κοινά αντιδραστήρια και μη πρωτεϊνικά συστατικά, που ενδεχομένως περιέχονται στα δείγματα.

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών υπολογίζεται βάσει πρότυπης καμπύλης αναφοράς που κατασκευάζεται από τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (O.D.) γνωστών συγκεντρώσεων (0,5μg, 1μg, 2μg, 5μg, 10μg, 15μg, 20μg, 2μg και 30 μg) προτύπων διαλυμάτων αλβουμίνης ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA, 1mg/ml σε ddH₂O), ενώ λαμβάνεται υπόψιν και ο όγκος του δείγματος.

Αρχικά, για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης:

- Σε 800μl διαλύματος BSA με γνωστή συγκέντρωση προστίθενται 200μl αντιδραστηρίου Bradford (Bradford Reagent, 5x, SERVA Cat. No. 39222).
- Ακολουθεί ανάδευση στο vortex και επώαση για 5 λεπτά.

- Στην συνέχεια, τα δείγματα φωτομετρούνται στα 595nm.

Για την μέτρηση των δειγμάτων πρωτεΐνης, στην ποσότητα προς μέτρηση (συνήθως 40-50μl) προστίθεται Η₂O μέχρι τελικό όγκο 800μl και ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία ταυτόχρονα με τα δείγματα BSA.

3.12 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ SDS-ΠΟΛΥΑΚΡΙΛΑΜΙΔΙΟΥ (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε πηκτή (gel) πολυακρυλαμιδίου με αποδιατακτικές συνθήκες. Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες τους επιτυγχάνεται με χρήση του ισχυρού απορρυπαντικού SDS σε συνδυασμό με την β-μερκαπτο-αιθανόλη ως αναγωγικό παράγοντα η οποία διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνικών μορίων. Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες προσδένονται στο SDS ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου μετακινούνται στην πηκτή προς τον θετικό πόλο καθώς διαθέτουν αρνητικό φορτίο λόγω του SDS με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους.

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου παράγεται από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου παρουσία του δις-ακρυλαμιδίου που δρα ως παράγων διασύνδεσης των πολυμερισμένων αλυσίδων. Ο πολυμερισμός καταλύεται από το TEMED, ενώ το υπερθεϊκό αμμώνιο (APS, ammonium persulfate) παρέχει τις ελεύθερες ρίζες. Η διαχωριστική ικανότητα αυτών των πηγμάτων εξαρτάται από την συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου στο πήγμα.

Η πηκτή αποτελείται από δυο μέρη με διαφορετική σύσταση. Το άνω μέρος της αποτελεί την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel), έχει μεγάλους πόρους και χαμηλότερο pH, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να κινούνται ομοιόμορφα και να σχηματίζουν μια πολύ λεπτή ζώνη στην άκρη του. Αυτό εξασφαλίζει την ταυτόχρονη έναρξη του διαχωρισμού στο δεύτερο μέρος της πηκτής, που αποτελεί την πηκτή διαχωρισμού (separating gel), καταλαμβάνει τη μεγαλύτερη επιφάνεια και διαθέτει υψηλότερο pH και μικρούς πόρους επιτρέποντας στις πρωτεΐνες να διαχωριστούν με βάση το μέγεθός τους δίνοντας λεπτές, ευθείες και διακριτές ζώνες.

Η σύσταση της πηκτής επιστοίβαξης και διαχωρισμού είναι η ακόλουθη (ποσότητες για 2 πηκτές):

Separating gel	12%	Stacking gel
Acryl:Bis (29:1)	4mL	0.85mL
1.5M Tris pH 8.8	2.5mL	1.3mL Tris 0,5M pH 6.8
Απεσταγμένο νερό	4mL	2.8mL
10% w/v SDS	100μL	50μL
10% w/v APS	50μL	20μL
TEMED	20μL	5μL

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ GEL:

- Προετοιμάζεται η συσκευή στήριξης όπως αναφέρεται στο εγχειρίδιο για τη Mini-PROTEAN Tetra cell της εταιρίας Bio-Rad.
- Παρασκευάζεται το διάλυμα για την πηκτή διαχωρισμού σε σωληνάκι των 10mL.
- Τοποθετείται στην συσκευή το διάλυμα με πιπέτα από τις γωνίες ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων. Η ποσότητα που εισέρχεται στη συσκευή είναι περίπου 5-6mL ανά πηκτή.
- Πάνω από το διάλυμα τοποθετείται ισοπροπανόλη ή νερό ώστε η επιφάνεια της πηκτής να γίνει πιο λεία και ομαλή.
- Όταν η πηκτή σταθεροποιηθεί, αφαιρείται η ισοπροπανόλη ή το νερό με την χρήση χαρτιού.
- Παρασκευάζεται το διάλυμα για την πηκτή διαχωρισμού και προστίθεται επάνω από την σταθεροποιημένη πηκτή διαχωρισμού με πιπέτα από τις γωνίες ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων. Η ποσότητα που εισέρχεται στην συσκευή είναι περίπου 1-2mL.
- Τοποθετούνται τα χτενάκια που θα δημιουργήσουν τα πηγαδάκια μέσα στα οποία θα φορτωθούν τα δείγματα.
- Όταν σταθεροποιηθεί και το δεύτερο διάλυμα η πηκτή πολυακρυλαμίδιου αφαιρείται από τη συσκευή στήριξης και είναι έτοιμη για να χρησιμοποιηθεί άμεσα. Εναλλακτικά, μπορεί να αποθηκευτεί στην δεξαμενή βυθισμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x SDS-PAGE και να χρησιμοποιηθεί την επόμενη.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ:

- Προετοιμάζεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης όπως αναφέρεται στο εγχειρίδιο και τοποθετούνται οι τράπεζες με τα πηκτώματα.
- 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.
- Προετοιμάζονται τα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν. Σε κάθε δείγμα προστίθεται β-μερκαπτοαιθανόλη (1μl σε 10μl δείγμα) και ακολουθεί βρασμός για 5 λεπτά στους 95°C ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες.
- Φορτώνονται τα δείγματα στα πηγαδάκια και επίσης φορτώνονται και 3μl protein marker σε ένα πηγαδάκι.
- Καλύπτεται η δεξαμενή και συνδέονται τα ηλεκτρόδια με την μονάδα τάσης.
- Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης είναι 120V μέχρι το μέτωπο των πρωτεϊνών να απέχει περίπου ένα εκατοστό από το τέλος του stacking gel. Από το σημείο αυτό και μετά η ένταση ρυθμίζεται στα 200V έως το μέτωπο των πρωτεϊνών να φτάσει 1 εκατοστό από το τέλος του πηκτώματος διαχωρισμού.

- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, αφαιρούνται οι τράπεζες, ξεχωρίζονται τα πηκτώματα και τοποθετούνται σε δοχεία.
- Καλύπτονται με διάλυμα χρωματισμού (Coomassie Blue) και αναδεύονται για 45 λεπτά.
- Αφαιρείται το διάλυμα χρώσης και προστίθεται χρησιμοποιημένο διάλυμα αποχρωματισμού (Destain) για τουλάχιστον 15 λεπτά υπό ανάδευση.
- Αφαιρείται το διάλυμα αποχρωματισμού και τοποθετείται καθαρό διάλυμα αποχρωματισμού (Destain) και τα πηκτώματα αφήνονται σε ολονύκτια ανάδευση.

Διάλυμα χρωματισμού: 0.1g κυανού της κουμάσης, 40mL νερό, 50mL μεθανόλη, 10mL οξικό οξύ

Διάλυμα αποχρωματισμού: 10% Μεθανόλη ή Αιθανόλη, 10% οξικό οξύ

SDS-PAGE (10x): 144g γλυκίνη, 30g TRIZMA base, 50mL SDS 10% (or 5g DSD)

3.13 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΙΤΙΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Όταν η πηκτή πολυακρυλαμίδιου πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε πείραμα ανοσοαποτύπωσης Western, πραγματοποιείται ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών της πηκτής σε μεμβράνη PVDF μεγέθους πόρων 0.2 μm, όπου αποτυπώνονται όπως ακριβώς έχουν διαχωριστεί στην ηλεκτροφόρηση SDS.

Στη συνέχεια, διαβρέχονται με διάλυμα μεταφοράς η πηκτή, η μεμβράνη, τρία χαρτιά Whatman No3 και 2 σπόγγοι και τοποθετούνται στην ειδική συσκευή μεταφοράς, ανάμεσα στους δύο πόλους με την ακόλουθη σειρά προς την κάθοδο: 1 σπόγγος, 3 χαρτιά Whatman, η μεμβράνη PVDF, το πήκτωμα, 3 χαρτιά Whatman και 1 σπόγγος. Κατά την τοποθέτησή απαιτείται προσοχή ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες λόγω του SDS και κινούνται από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο της συσκευής όπου είναι τοποθετημένη η μεμβράνη.

Η μεταφορά τους επιτυγχάνεται με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής έντασης και γίνεται σε ειδική συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Η συσκευή πρέπει να είναι τοποθετημένη σε πάγο υπό ανάδευση, για να αποφευχθεί η άνοδος της θερμοκρασίας, το οποίο βλάπτει τις πρωτεΐνες. Η μεταφορά πραγματοποιείται στα 100V για 40-60 λεπτά.

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

3.14 ΑΝΟΣΟΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT, WB) (BURNETTE 1981)

Η ανοσοδοκιμασία Western επιτρέπει την εκλεκτική ανίχνευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης-στόχου στην επιφάνεια μεμβράνης PVDF μέσω κατάλληλου αντισώματος το οποίο προσδένεται εξειδικευμένα στο συγκεκριμένο αντιγόνο. Οι πρωτεΐνες είναι δεσμευμένες στη μεμβράνη με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, κατά συνέπεια διατηρούν τις αντιγονικές τους ιδιότητες και εξακολουθούν να είναι ανιχνεύσιμες από τα αντισώματα.

Η ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης πραγματοποιείται σε δύο στάδια: Αρχικά, το εξειδικευμένο προς την πρωτεΐνη αντίσωμα (πρωτογενές) προσδένεται επάνω στην μεμβράνη. Κατόπιν, ένα δευτερογενές αντίσωμα το οποίο είναι συζευγμένο με κάποιο ένζυμο προσδένεται στη σταθερή περιοχή Fc του πρωτογενούς αντισώματος. Επομένως, ο εντοπισμός της πρωτεΐνης-στόχου πραγματοποιείται μέσω της ανίχνευσης της ενεργότητας του δευτερογενούς αντισώματος.

Η διαδικασία που ακολουθείται κατά την ανοσοδοκιμασία Western είναι η ακόλουθη:

- Επώαση της μεμβράνης PVDF σε διάλυμα δέσμησης μη-ειδικών θέσεων (blocking) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση.
- Ολονύκτια επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα αραιωμένο σε διάλυμα blocking στους 4°C (ψυχρό θάλαμο) υπό ήπια ανάδευση.
- Εκπλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα TBS-T (5 x 10 λεπτά, υπό ανάδευση) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επώαση της με το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει την σταθερή περιοχή Fc του πρωτογενούς και είναι αραιωμένο σε διάλυμα blocking για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση.
- Εκπλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα TBS-T (5 x 10 λεπτά, υπό ανάδευση).

Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε (anti-mouse), ανάλογα με το πρώτο αντίσωμα, είναι συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης χρένου (HRP, Horseradish Peroxidase), η ενεργότητα του οποίου ανιχνεύεται με διάφορους τρόπους. Στην παρούσα εργασία η ανίχνευση της πρωτεΐνης – στόχου πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της ενισχυμένης χημιοφωταύγειας (ECL, Enhanced Chemiluminescence). Σε αυτή, η μεμβράνη επωάζεται για 5 λεπτά σε διάλυμα ECL. Η HRP οξειδώνει τη λουμινόλη που είναι το κύριο συστατικό του διαλύματος ECL με αποτέλεσμα την παραγωγή φωτός που ανιχνεύεται σε ειδική συσκευή εμφάνισης. Εκεί, λαμβάνονται διαδοχικές λήψεις του σήματος σε διαφορετικούς χρόνους συνήθως μέχρι το σήμα να κορεστεί.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:

- Διάλυμα δέσμησης μη-ειδικών θέσεων (blocking): διάλυμα 5% (w/v) σκόνης γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά σε TBS-T.
- TBS-T (Tris-buffered saline-Tween-20): 0.1M Tris/HCl pH 7.6, 0.2M NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20.

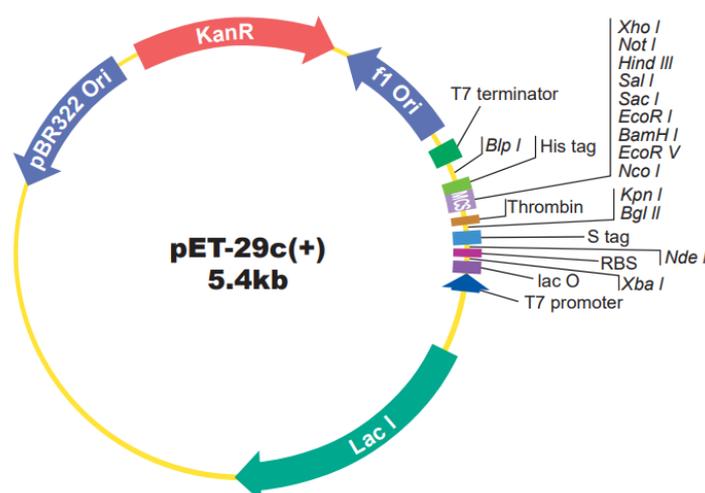
ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ:

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα anti-A-synuclein (1/500) (Cell Signaling 2642S), α-synuclein (211): sc-12767 (1/500)(Santa-Cruz Biotechnology) και anti-GAPDH (1/500) (60004-1-Ig, Proteintech Europe).

Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα m-IgGκ BP-HRP: sc-516102 (Santa Cruz Biotechnology) (1/5000) και goat anti-mouse IgG (Genscript A00160), αντίστοιχα.

3.15 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ pET (pET SYSTEM MANUAL, NOVAGEN,2001)

Το σύστημα pET είναι ένα ισχυρό σύστημα κλωνοποίησης και υπερέκφρασης στο βακτήριο *E.coli*. Τα γονίδια προς υπερέκφραση κλωνοποιούνται στους φορείς pET μέσω του συστήματος μεταγραφής που καθοδηγείται από τα ρυθμιστικά στοιχεία του βακτηριοφάγου T7. Η RNA πολυμεράση του T7 παρέχεται από το στέλεχος BL21 (DE3) στο οποίο έχει εισαχθεί το αντίστοιχο γονίδιο υπό τον έλεγχο του υποκινητή lac, είναι δε τόσο δραστική ώστε μεγάλο μέρος του ενεργειακού και μεταβολικού αποθέματος του κυττάρου χρησιμοποιείται για την έκφραση του γονιδίου στόχου. Η έκφραση επάγεται με την προσθήκη IPTG.



Εικόνα 3.2: Πλασμιδιακός χάρτης του pET29c (+).

Κλωνοποίηση σε φορείς έκφρασης pET

Όλοι οι φορείς pET διαθέτουν κωδικόνια λήξης της μετάφρασης σε όλα τα τρία πλαίσια ανάγνωσης που περιέχουν εγγύς των περιοχών κλωνοποίησης και σήμανσης (tag) καθώς επίσης και μία καθοδική περιοχή λήξης της μεταγραφής του T7.

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

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

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

- Το προς μελέτη γονίδιο κλωνοποιείται στον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης pET29c(+) με τέτοιο τρόπο ώστε η χιμαιρική πρωτεΐνη που θα προκύψει να φέρει 6 ουρές ιστιδίνης στο καρβοξυτελικό άκρο.
- Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο εισάγεται με μετασχηματισμό σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3).
- Από τα τρυβλία του μετασχηματισμού επιλέγεται μονή αποικία από την οποία δημιουργείται προκαλλιέργεια.
- Την επομένη πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια 1/20 από την προκαλλιέργεια και επωάζεται στους 37°C έως ότου η οπτική της πυκνότητα φτάσει σε εύρος O.D.600=0,4-0,6.
- Ακολουθεί προσθήκη 0,5mM IPTG.
- Συνεχίζεται η επώαση στους 37°C υπό ανάδευση για 4 ώρες, στη διάρκεια των οποίων λαμβάνεται δείγμα 1mL στους χρόνους 0 min, 1h, 2h, 3h και 4h από την στιγμή της προσθήκης του IPTG.
- Μετά την συλλογή κάθε δείγματος ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12.000rpm για 3 λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου.
- Το ίζημα επαναιωρείται σε 100μl 1x Laemmli Sample Buffer (ή Loading Buffer).
- Αποθήκευση στους -20°C ή πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE αφού τα δείγματα επωαστούν για 5min στους 95°C.

3.16 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ HIS-TAGGED ΜΕΣΩ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ Protino Ni TED 2000 ΤΗΣ MACHEREY-NAGEL

Το σύστημα της σειράς Protino χρησιμοποιείται για την απομόνωση και εκλεκτικό καθαρισμό μίας ανασυνδυασμένης χιμαιρικής πρωτεΐνης σημασμένης με ουρά πολύ-ιστιδίνης μέσω χρωματογραφίας συγγένειας. Οι στήλες καθαρισμού αποτελούνται από ξηρή ρητίνη με βάση το πυρίτιο, η οποία περιέχει ιόντα Ni²⁺ ακινητοποιημένα στον χηλικό παράγοντα TED (τρις-καρβοξυ-μεθυλο-αιθυλενοδιαμίνη). Ο υποδοχέας TED δεσμεύει τις 5 από τις 6 θέσεις συντονισμού του ιόντος Ni²⁺ αφήνοντας μία θέση διαθέσιμη για σύνδεση με το κατάλοιπο ιστιδίνης.

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό της χιμαιρικής πρωτεΐνης χρησιμοποιείται καλλιέργεια όγκου μέχρι 800 ml που έχει υποστεί τη διαδικασία επαγωγής για την παραγωγή της πρωτεΐνης. Τα κύτταρα της καλλιέργειας υφίστανται λύση και το καθαρισμένο ακατέργαστο κυτταρικό λύμα φορτώνεται στην στήλη. Μετά τις απαραίτητες πλύσεις για την απομάκρυνση των μη ειδικά δεσμευμένων πρωτεϊνών του ξενιστή η πρωτεΐνη στόχος εκλύεται με ιμιδαζόλιο, το οποίο ανταγωνίζεται την πρόσδεση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στα ιόντα Ni²⁺.

- Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας (800ml) στα 6.000g στους 4°C και διατηρείται το ίζημα.
- Προετοιμασία των διαλυμάτων που απαιτούνται:
Α) Σε 2,5ml LEW BUFFER 8x προστίθενται 17,5ml νερό (σύνολο 20ml για μία στήλη)
Β) Σε 3ml ELUTION BUFFER 4x προστίθενται 9ml νερό (σύνολο 12ml για μία στήλη)
- Επαναιώρηση 1g ιζήματος σε 2-5ml LEW BUFFER (στον πάγο).
- Προσθήκη λυσοζύμης σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml και ανάδευση για 30 λεπτά στον πάγο.
- Επίδραση στα κύτταρα με υπερήχους ώστε να σπάσουν στα κύτταρα.
- Φυγοκέντρηση στα 1000g για 30 λεπτά στους 4°C και διατήρηση του υπερκείμενου.
- Στην στήλη φορτώνονται 4 ml 1x LEW BUFFER.
- Στην συνέχεια, στην στήλη φορτώνεται το υπερκείμενο και απορρίπτεται ότι περάσει μέσα από την στήλη.
- Ακολουθούν 2 πλύσεις με 4ml 1x LEW BUFFER και απορρίπτεται ότι περάσει μέσα από την στήλη.
- Ακολουθούν 3 εκλούσεις με 3ml 1x ELUTION BUFFER και διατηρείται ότι περάσει από την στήλη.
- Ακολουθεί SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση για να διαπιστωθεί η απομόνωση της πρωτεΐνης.

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

3.17 ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΩΝΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (PULL DOWN ASSAY)

Η δοκιμασία κατακρήμνισης (pull-down) είναι μια τεχνική καθαρισμού συγγένειας *in vitro* που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των φυσικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο (ή και παραπάνω) πρωτεϊνών.

Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιείται μια πρωτεΐνη ως «δόλωμα» για τον εντοπισμό και τη «σύλληψη» κάποιας πρωτεΐνης με την οποία ενδεχομένως αλληλεπιδρά σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον, και η οποία αποτελεί την «λεία» της πρωτεΐνης-«δόλωμα».

Η πρωτεΐνη-«δόλωμα» σημαίνεται κατάλληλα (για το λόγο αυτό ονομάζεται συχνά πρωτεΐνη – ετικέτα) και επωάζεται με μια πηγή πρωτεΐνης (για παράδειγμα, κυτταρικό λύμα ή εκχύλισμα ιστού) που περιέχει δυνητικά πρωτεϊνικά μόρια ως «λεία» με τα οποία αλληλεπιδρά η πρωτεΐνη-«δόλωμα». Στη συνέχεια, το μίγμα αυτό προστίθεται σε κάποιο υλικό χημικής συγγένειας κατάλληλο για την πρόσδεση της πρωτεΐνης-«δόλωμα», η οποία τώρα φέρει προσδεσμένη σε αυτήν την πρωτεΐνη- «λεία». Ακολουθούν εκπλύσεις για την απομάκρυνση των μη ειδικών πρωτεϊνών σύνδεσης, η έκλυση του συμπλόκου «δόλωμα-λεία», και η ταυτοποίηση μέσω Western blot.

Σημαντικό κριτήριο για την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών μορίων αποτελεί η χαμηλή αλατότητα των διαλυμάτων λύσης των κυττάρων, τόσο κατά την απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης όσο και κατά την παρασκευή του κυτταρικού λύματος. Ο τρόπος έκλυσης των πρωτεϊνών εξαρτάται από το υλικό πρόσδεσης χημικής συγγένειας.

Στην παρούσα εργασία η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη-δόλωμα έφερε στο καρβοξυτελικό άκρο της μία ουρά έξι καταλοίπων ιστιδίνης ως ετικέτα. Μετά την υπερέκφραση και τον καθαρισμό της, επωάστηκε με ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων *S. cerevisiae* προκειμένου να προσδεθούν σε αυτήν οι πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά. Για τον εντοπισμό των αλληλοεπιδρώντων πρωτεϊνών και τη «σύλληψη» της πρωτεΐνης «λείας» το παραπάνω μίγμα ακινητοποιήθηκε σε αгарόζη Ni-NTA. Πρόκειται για μία ρητίνη που αποτελείται από εναιώρημα σφαιριδίων αγαρόζης στα οποία είναι διασυνδεδεμένος ο χηλικός παράγοντας NTA (νιτριλοξικό οξύ) με ακινητοποιημένα ιόντα Ni²⁺. Ο υποδοχέας NTA δεσμεύει τις 4 από τις 6 θέσεις συντονισμού του ιόντος Ni²⁺ αφήνοντας δυο θέσεις διαθέσιμες για σύνδεση με το κατάλοιπο ιστιδίνης. Η πρωτεΐνη-«δόλωμα», καθώς και όσα μόριά της έχουν προσδεθεί με τυχόν πρωτεΐνη-«λεία», προσδένεται στο Ni²⁺ μέσω των καταλοίπων ιστιδίνης. Η πρωτεΐνη εκλύεται με διάλυμα ιμιδαζόλιου.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Παρασκευάζεται ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων ζύμης σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 3.10.
- 1mg από το παραπάνω ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα αναμιγνύεται με 5μg ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και επωάζεται στους 4 ο C ολονύκτια υπό ανάδευση.
- Την επόμενη ημέρα προετοιμάζεται η στήλη της Ni-NTA αγαρόζης σε ένα Eppendorf.
 - 1) Η Ni-NTA αγαρόζη επαναιωρείται πλήρως μέσω ήπιας ανακίνησης.
 - 2) Αμέσως γίνεται μεταφορά 20ml του αρχικού υλικού περιεκτικότητας 50% σε νέο Eppendorf για τον σχηματισμό 10ml στήλης.
 - 3) Η στήλη φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στα 500rpm και το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται.
 - 4) Προστίθενται στην στήλη 10 όγκοι στήλης (100ml διαλύματος λύσης), ώστε να ισοσταθμιστεί το υλικό.
 - 5) Η στήλη φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στα 500rpm και το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται.
- Το μίγμα των πρωτεϊνών φορτώνεται στην στήλη και επωάζεται με αυτή για 1h στους 4°C υπό ανάδευση.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης για 5 min/ 500rpm. Το υπερκείμενο αποθηκεύεται σε νέο Eppendorf για περαιτέρω ανάλυση.
- Η στήλη εκπλένεται με 10 όγκους στήλης (100ml διαλύματος λύσης) με ήπια ανακίνηση.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση της στήλης για 5 min/ 500rpm. Το υπερκείμενο της έκπλυσης αποθηκεύεται σε νέο Eppendorf για περαιτέρω ανάλυση.
- Επαναλαμβάνονται τα δυο προηγούμενα βήματα (2 η έκπλυση).
- Το υλικό της στήλης επαναιωρείται σε 20ml Laemmli Sample Buffer και υφίσταται βρασμό στους 95 ο C / 5 min, έτσι ώστε οι πρωτεΐνες να αποδεσμευτούν από τη στήλη.
- Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE των δειγμάτων, η οποία συμπεριλαμβάνει και όλα τα δείγματα που απομονώθηκαν κατά τις πλύσεις καθώς και το αρχικό πρωτεϊνικό μίγμα για συγκριτική ανάλυση.
- Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE με τα δείγματα από κάθε στάδιο της παραπάνω διαδικασίας (περιλαμβάνονται και οι πλύσεις), καθώς και το αρχικό πρωτεϊνικό μίγμα για συγκριτική ανάλυση.

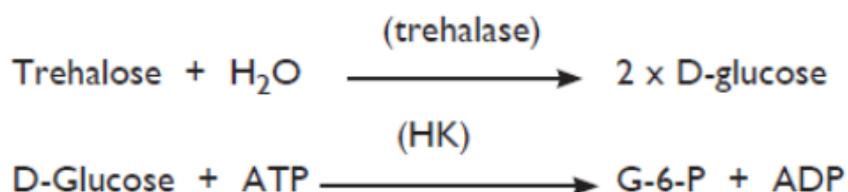
Διάλυμα λύσης: 25 mM Tris-HCl pH 7, 100 mM NaCl.

3.18 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΕΧΑΛΟΖΗΣ ΣΤΟΝ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Η ποσότητα της τρεχαλοζης που παράγεται στα κύτταρα του *S. cerevisiae* προσδιορίστηκε ενζυμικά μέσω του πακέτου αντιδραστηρίων Trehalose assay kit (K-TREH) της εταιρείας Megazyme.

Αρχή της μεθόδου

Αρχικά, η τρεχαλόζη υδρολύεται από το ένζυμο τρεχαλάση σε δύο μόρια D-γλυκόζης. Κατόπιν, η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται από μία εξοκινάση παρουσία ATP και μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη (G-6-P).

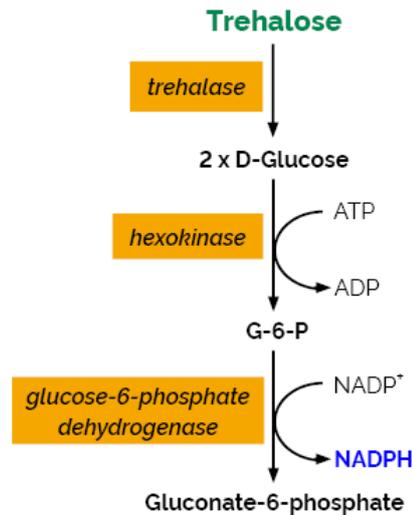


Στην συνέχεια, η 6-φωσφορική γλυκόζη παρουσία του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης οξειδώνεται από το συνένζυμο NADP⁺ σε 6-φωσφογλυκονικό οξύ.



Κατά την μετατροπή αυτή απελευθερώνεται NADPH στοιχειομετρικά ίσο με την ποσότητα της D-γλυκόζης και επομένως διπλάσιο της αρχικής τρεχαλόζης.

Το NADPH προσδιορίζεται ποσοτικά μπορεί με μέτρηση της απορρόφησης στα 340nm και κατ' αντιστοιχία προσδιορίζεται και αυτή της τρεχαλόζης.



Εικόνα 3.3: Επιγραμματική απεικόνιση της αρχής της μεθόδου.

Η ποσότητα της παραγόμενης τρεχαλόζης προσδιορίστηκε σε 4 διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων του ζυμομύκητα: προεκθετική, εκθετική, στατική και φάση γήρανσης.

Η κατεργασία των κυττάρων για τον ποσοτικό προσδιορισμό της τρεχαλόζης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται από του Bandara et al. (2009), ως εξής:

- 15ml καλλιέργειας κυττάρων ζύμης από κάθε φάση ανάπτυξης φυγοκεντρώνται για 5 min/3.313g/4°C.
- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και ακολουθεί πλύση με 0,1M Phosphate Buffer (pH 5,9), ώστε να απομακρυνθεί η εξωτερική γλυκόζη.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση όπως παραπάνω και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
- Το ίζημα χρησιμοποιείται αμέσως ή φυλάσσεται στους -80°C για να χρησιμοποιηθεί αργότερα (τα κύτταρα από τους -80°C θα πρέπει να λιώσουν σε πάγο).
- Το ίζημα επαναιωρείται σε 0,25M Na₂CO₃ για 1x10⁸ κύτταρα/ml.
- Στην συνέχεια λαμβάνεται 1ml δείγματος από το παραπάνω το οποίο υφίσταται βρασμό για 20min προκειμένου να εξαχθεί η ενδοκυτταρική γλυκόζη.
- Αφού κρυώσει το δείγμα, φυγοκεντρείται στα 12.000g/3min ώστε να αφαιρεθούν τα κυτταρικά υπολείμματα.
- Το υπερκείμενο διαμοιράζεται σε aliquots των 300μl στα οποία πραγματοποιείται η μέτρηση τρεχαλόζης.

Μέτρηση τρεχαλόζης

Σε κάθε αλίκυοτ (300μl) προστίθενται 150μl οξικό οξύ 1M, και στην συνέχεια προστίθενται:

- I. 650 μl νερό
- II. 100 μl buffer ιμιδαζολίου: 2M ιμιδαζόλιο, 100mM MgCl₂, 0.02% w/v νατραζίδιο, pH 7.0 (Bottle 1)
- III. 50 μl NADP⁺/ATP (Bottle 2)
- IV. 10 μl HK/G-6-PDH (Bottle 3)

Τα δείγματα επωάζονται στους 28°C για 10min.

Στην συνέχεια, προστίθενται 10μl τρεχαλάσης (Bottle 4) και τα δείγματα επωάζονται στους 28°C / 20min.

Ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 340nm.

Πραγματοποιείται μια μέτρηση πριν την προσθήκη τρεχαλάσης και μια μετά.

Επίσης, απαιτείται και ένας αρνητικός μάρτυρας χωρίς τρεχαλάση.

Τέλος, από τις μετρήσεις τις απορρόφησης στα 340nm υπολογίζεται η ποσότητα της τρεχαλόζης σε g/L για κάθε φάση ανάπτυξης του ζυμομύκητα με βάση μια μαθηματική πράξη που δίνεται σε ένα αρχείο excel από την εταιρία που προμηθευτήκαμε το kit.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

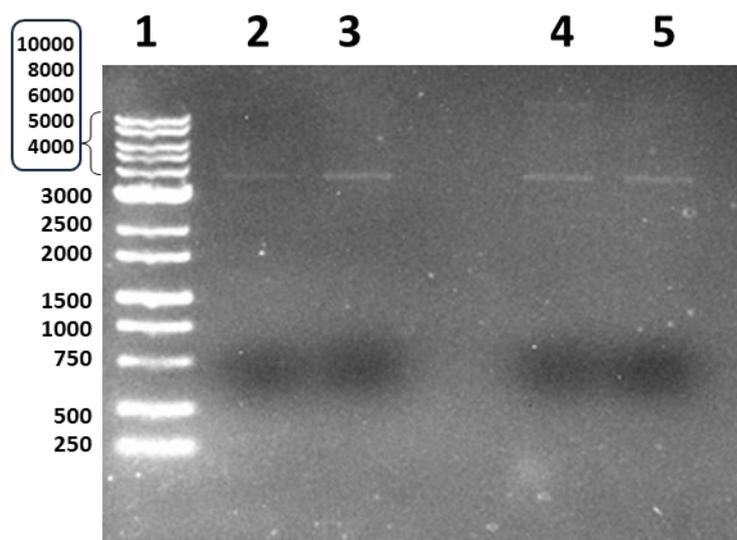
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ GARDH ΣΤΟΝ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης της α-συνουκλεΐνης με το ένζυμο GARDH στον ζυμομύκητα. Για να επιτευχθεί αυτό πρώτο βήμα είναι η κλωνοποίηση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης στον πλασμιδιακό φορέα υπερέκφρασης pET29c(+) και μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli*. Στην συνέχεια, ακολουθεί υπερέκφραση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης ώστε να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα συγκατακρίμνησης με ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα του ζυμομύκητα και να διαπιστωθεί η ζητούμενη αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών.

4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *SNCA* ΣΤΟΝ ΦΟΡΕΑ pET29c(+) ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E. COLI*

Το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης *SNCA* είναι κλωνοποιημένο στον φορέα υπερέκφρασης pET29c(+) έτσι ώστε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη να φέρει μία ουρά έξι καταλοίπων ιστιδίνης στο καρβοξυ-τελικό άκρο της (Σφήκας *E.*, 2020). Η σήμανση αυτή είναι απαραίτητη για τον μετέπειτα καθαρισμό της και την χρήση της σε μελέτες πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδίου pET29c(+)/*SNCA* καθώς και του pET29c που θα χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας από κύτταρα *E. coli* DH5a. Τα αποτελέσματα της απομόνωσης επιβεβαιώθηκαν με ηλεκτροφόρηση (εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1: Απομόνωση του πλασμιδίου pET29c(+)/*SNCA* από κύτταρα *E. coli* DH5a. Διαδρομή 1: 1kb ladder

Διαδρομή 2: pET29c(+)/SNCA, 300ng/μl

Διαδρομή 3: pET29c(+)/SNCA, 90ng/μl

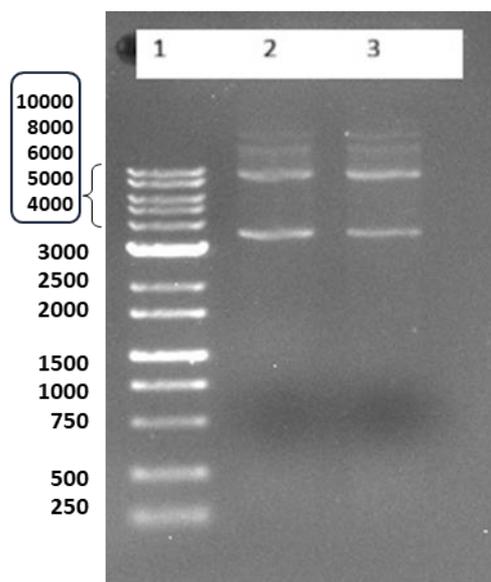
Διαδρομή 4: pET29c(+), 120ng/μl

Διαδρομή 5: pET29c(+), 83ng/μl

4.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E. COLI* BL21 (DE3) ΜΕ ΤΟΝ ΦΟΡΕΑ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗΣ pET29c(+)

Μετά την απομόνωση πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* BL21(DE3), στα οποία θα πραγματοποιηθεί η υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης με τα pET29c (+)/SNCA και pET29c (+).

Κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο και επιστρώθηκαν σε τρυβλία LB agar με καναμυκίνη για την επιλογή των κυττάρων τα οποία έχουν προσλάβει το πλασμίδιο. Στα τρυβλία του μετασχηματισμού αναπτύχθηκαν αποικίες, μερικές από τις οποίες επιλέχθηκαν, καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο και απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA τους για να διαπιστωθεί η παρουσία των πλασμιδίων (εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.2: Απομόνωση των πλασμιδίων pET29c(+)/SNCA και pET29c(+) από κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3).

Διαδρομή 1: 1 kb ladder

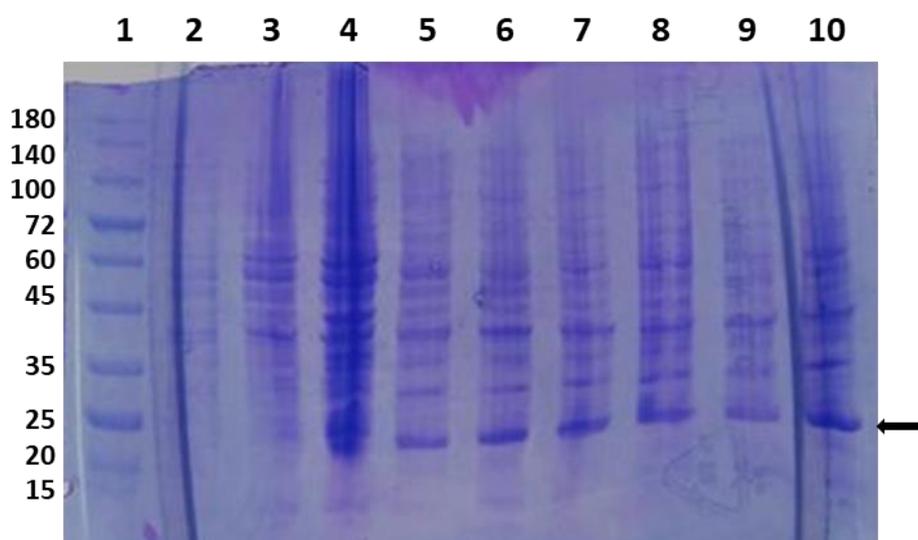
Διαδρομή 2: pET29c(+)/SNCA σε ποσότητα 200ng/μl

Διαδρομή 3: pET29c(+)/SNCA σε ποσότητα 200ng/μl

4.3 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗΣ

Μετά την επιβεβαίωση της παρουσίας του επιθυμητού πλασμιδίου στα κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση σε δύο δείγματα BL21(DE3)/pET29c(+)/SNCA (α και β), το καθένα από τα οποία προερχόταν από διαφορετική αποικία. Η υπερέκφραση πραγματοποιήθηκε αρχικά σε μικρή κλίμακα με όγκο καλλιέργειας 10 ml, ώστε να διερευνηθεί η απόδοση του προϊόντος. Υπερέκφραση πραγματοποιήθηκε και στο BL21(DE3)/pET29c(+) που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Από τα προηγούμενα πειράματα ήταν γνωστό ότι ο μέγιστος χρόνος υπερέκφρασης της α -syn δεν υπερέβαινε τις 2 ώρες. Κατά συνέπεια, λήφθηκαν δείγματα καθεμιάς από τις παραπάνω καλλιέργειες στον χρόνο 0, 1h και 2h και πραγματοποιήθηκε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και χρώση με Coomassie Blue όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.12 (εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE από την υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης α -συνουκλεΐνης σε μικρή κλίμακα (με βέλη υποδεικνύεται το αναμενόμενο μοριακό βάρος για την ανασυνδυασμένη α -συνουκλεΐνη)

Διαδρομή 1: protein marker

Διαδρομή 2: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21 (DE3)/ pET29c(+), t=0

Διαδρομή 3: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21 (DE3)/ pET29c(+), t=1h

Διαδρομή 4: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21 (DE3)/ pET29c(+), t=2h

Διαδρομή 5: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21 (DE3)/ pET29c(+)/SNCA, t=0 (α)

Διαδρομή 6: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21 (DE3)/ pET29c(+)/SNCA, t=1h (α)

Διαδρομή 7: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21 (DE3)/ pET29c(+)/SNCA, t=2h (α)

Διαδρομή 8: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21 (DE3)/ pET29c(+)/SNCA, t=0 (β)

Διαδρομή 9: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21 (DE3)/ pET29c(+)/SNCA, t=1h (β)

Διαδρομή 10: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21 (DE3)/ pET29c(+)/SNCA, t=2h (β)

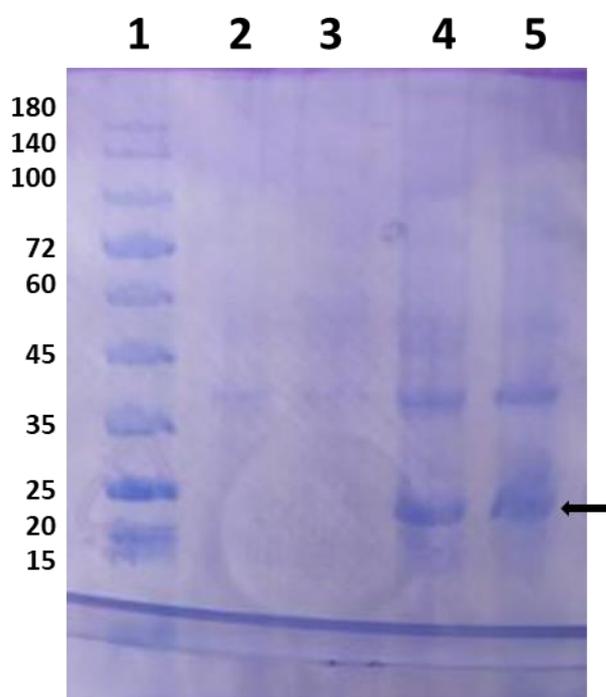
Στην παραπάνω εικόνα διακρίνεται η υπερέκφραση του γονιδίου SNCA. Στα δείγματα πρωτεϊνών που αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα δεν παρατηρείται

υπερέκφραση (διαδρομές 2,3 και 4). Στα δείγματα που φέρουν το γονίδιο *SNCA* παρατηρήθηκε υπερέκφραση σχεδόν από τον χρόνο προσθήκης του IPTG, ενώ η ποσότητα της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης αυξήθηκε με την πάροδο του χρόνου καθώς η εντονότερη ζώνη εμφανίστηκε στις 2h (διαδρομές 7 και 10), μεταξύ του μεγέθους των 20-25kDa των πρότυπων πρωτεϊνών στο κατά προσέγγιση αναμενόμενο MB. Επομένως, οι 2 h μετά την έναρξη της υπερέκφρασης αποτέλεσαν την κατάλληλη χρονική στιγμή ώστε να πραγματοποιηθεί υπερέκφραση σε μεγάλη κλίμακα και στη συνέχεια καθαρισμός της παραγόμενης πρωτεΐνης.

4.4 ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΚΛΙΜΑΚΑ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗΣ

Μετά την επιτυχημένη υπερέκφραση της ανασυνδυσασμένης α-συνουκλεΐνης σε μικρή κλίμακα, ακολούθησε υπερέκφραση σε μεγάλη κλίμακα με όγκο καλλιέργειας 800 ml. Υπερέκφραση πραγματοποιήθηκε και στο BL21 (DE3)/ pET29c(+) που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Δείγματα από τις παραπάνω καλλιέργειες ελήφθησαν στον χρόνο 0 και 2h, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS-PAGE και ακολούθησε χρώση με Coomassie Blue όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.12 (εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE από την υπερέκφραση της ανασυνδυσασμένης α-συνουκλεΐνης σε μεγάλη κλίμακα (με βέλη υποδεικνύεται το αναμενόμενο μοριακό βάρος για την ανασυνδυσασμένη α-συνουκλεΐνη).

Διαδρομή 1: protein marker

Διαδρομή 2: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21 (DE3) /pET29c(+), t=0

Διαδρομή 3: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21 (DE3)/ pET29c(+), t=2h

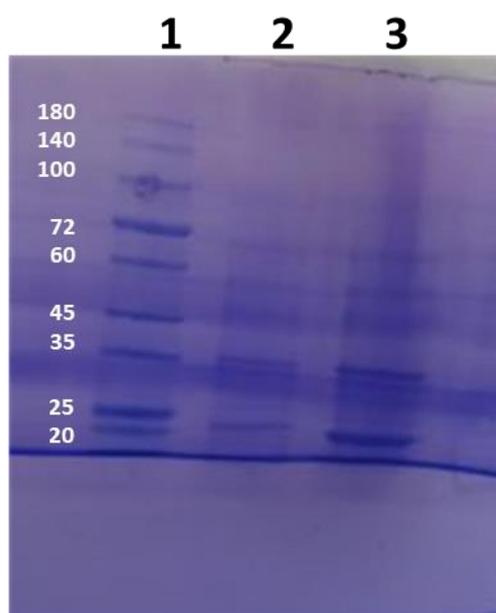
Διαδρομή 4: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21(DE3)/ pET29c(+)/SNCA, t=0

Διαδρομή 5: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21(DE3)/pET29c(+)/SNCA, t=2h

Από την παραπάνω εικόνα διαπιστώθηκε υπερέκφραση σε μεγάλη κλίμακα. Στα δείγματα πρωτεϊνών του μη ανασυνδυασμένου φορέα δεν παρατηρείται υπερέκφραση (διαδρομές 2 και 3). Στην συνέχεια, στα δείγματα του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, παρατηρείται ήδη από τον μηδενικό χρόνο έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης καθώς παρατηρείται ζώνη στα 19-20 kD περίπου (διαδρομή 4). Στην διαδρομή 5, στις 2 ώρες μετά την έναρξη της υπερέκφρασης παρατηρείται έντονη έκφραση της α -συνουκλεΐνης.

Ο καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με το kit Protino Ni TED 2000 της εταιρείας Macherey Nagel όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.16. Από κάθε βήμα του καθαρισμού της πρωτεΐνης λήφθηκε δείγμα για να ελεγχθεί με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση για τυχόν διαφυγή της πρωτεΐνης. Επίσης, από τα τρία δείγματα έκλουσης της πρωτεΐνης από την στήλη Ni TED ηλεκτροφορήθηκαν 20μl σε πηκτή SDS-PAGE για την ποιοτική αναγνώριση της καθαρισμένης α -συνουκλεΐνης. Στην ηλεκτροφόρηση παρατηρήθηκε αφενός μεν ποσότητα πρωτεΐνης στα δείγματα των εκπλύσεων (που οφείλεται πιθανότατα σε μη ικανοποιητική δέσμευση στην στήλη), αφετέρου δε και άλλες ζώνες εκτός από την αναμενόμενη στα δείγματα των εκλούσεων, γεγονός που υποδηλώνει μη ικανοποιητικό καθαρισμό. Εφαρμόστηκε δεύτερος καθαρισμός χωρίς αποτέλεσμα (δεν παρουσιάζονται οι εικόνες των ηλεκτροφορήσεων).

Κατά συνέπεια, επαναλήφθηκε η υπερέκφραση σε μεγάλη κλίμακα με τις ίδιες συνθήκες. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS-PAGE (εικόνα 4.5).



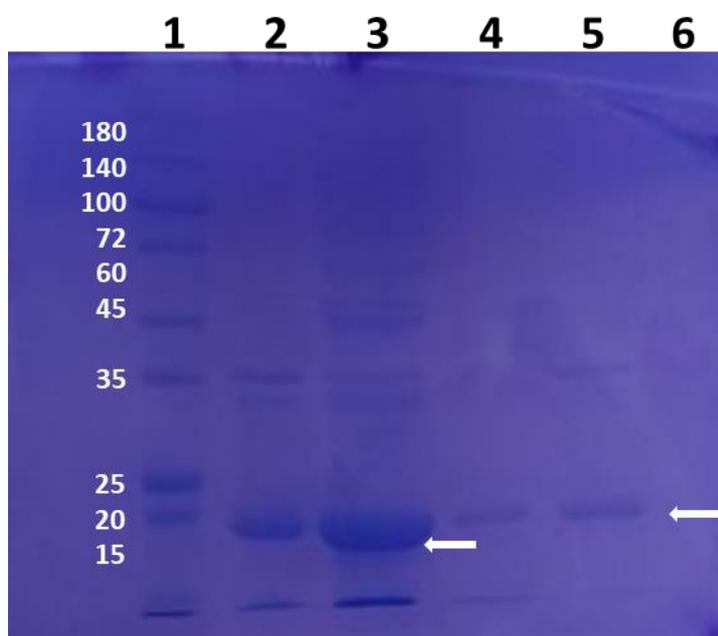
Εικόνα 4.5: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE από την 2^η υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης α -συνουκλεΐνης σε μεγάλη κλίμακα.

Διαδρομή 1: protein marker

Διαδρομή 2: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21(DE3)/pET29c(+)/SNCA, t=0

Διαδρομή 3: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21(DE3)/pET29c(+)/SNCA, t=2h

Από την παραπάνω εικόνα διαπιστώθηκε η παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Ακολούθησε καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης όπως προηγουμένως. Δείγμα από κάθε βήμα καθαρισμού ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή SDS-PAGE (εικόνα 4.6).



Εικόνα 4.6: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE από κάθε στάδιο του καθαρισμού της ανασυνδυασμένης α -συνουκλεΐνης.

Διαδρομή 1: protein marker

Διαδρομή 2: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21 (DE3)/pET29c(+), t=2h

Διαδρομή 3: Δείγμα που συλλέχθηκε μετά την δέσμευση της α -συνουκλεΐνης στη στήλη

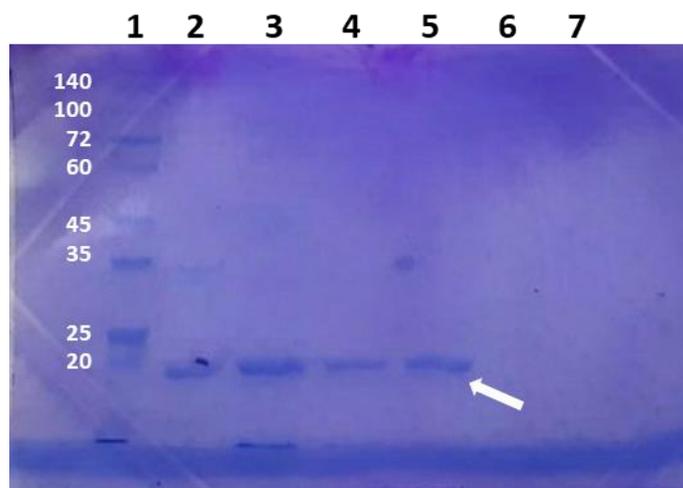
Διαδρομή 4: Δείγμα που συλλέχθηκε μετά την πλύση της στήλης

Διαδρομή 5: Πρωτεϊνικό κλάσμα από την πρώτη έκλουση

Διαδρομή 6: Πρωτεϊνικό κλάσμα από την δεύτερη έκλουση

Αυτή τη φορά παρατηρήθηκε πολύ καθαρότερο τελικό προϊόν, αλλά σε μικρή ποσότητα, εφόσον η πρωτεΐνη δεσμεύτηκε ελάχιστα στην στήλη, όπως φαίνεται από το δείγμα 3.

Το κλάσμα αυτό χρησιμοποιήθηκε εκ νέου για καθαρισμό. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην παρακάτω ηλεκτροφόρηση (εικόνα 4.7).



Εικόνα 4.7: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE από κάθε στάδιο του καθαρισμού του κλάσματος 3 (με βέλος υποδεικνύεται η ζώνη του αναμενόμενου μοριακού βάρους της πρωτεΐνης).

Διαδρομή 1: protein marker

Διαδρομή 2: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21(DE3)/ pET29c(+), t=2h.

Διαδρομή 3: Δείγμα που συλλέχθηκε μετά τη δέσμευση της α-συνουκλεΐνης στη στήλη.

Διαδρομή 4: Δείγμα που συλλέχθηκε μετά την πλύση της στήλης.

Διαδρομή 5: Πρωτεϊνικό κλάσμα από την πρώτη έκλουση.

Διαδρομή 6: Πρωτεϊνικό κλάσμα από την δεύτερη έκλουση.

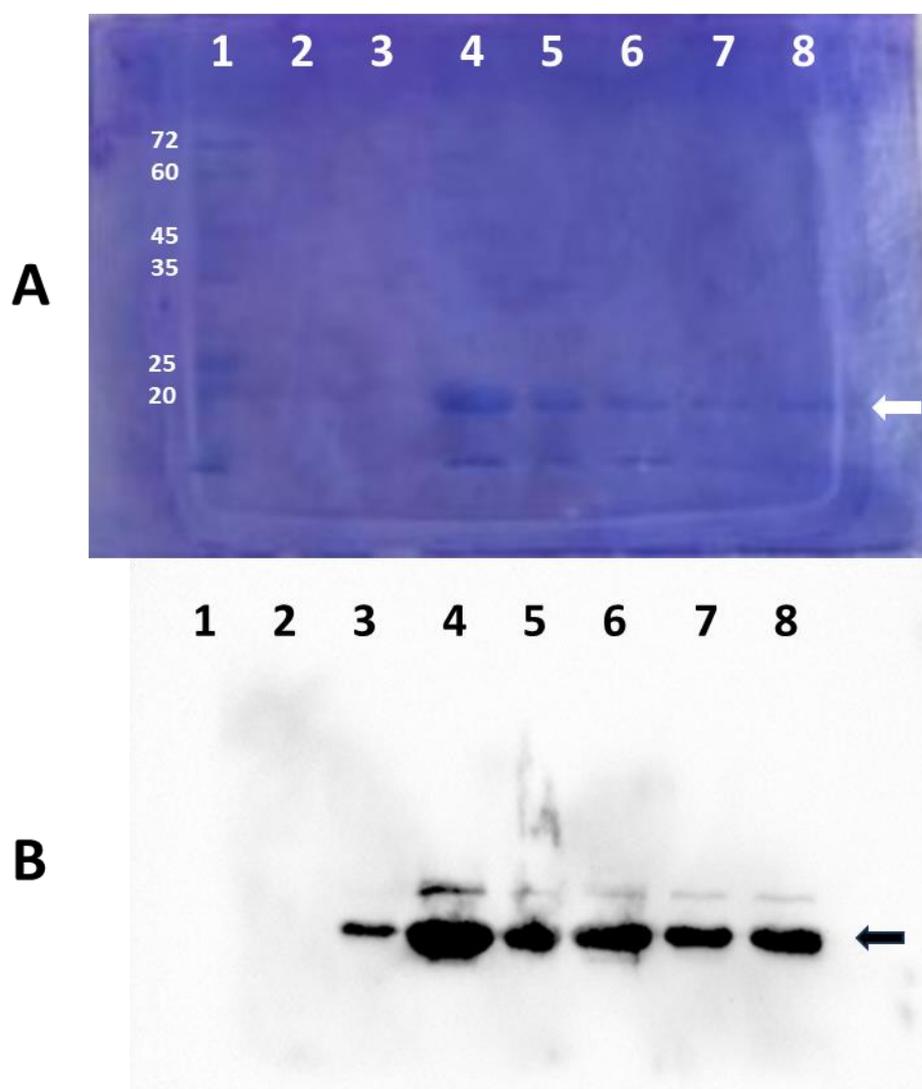
Διαδρομή 7: Πρωτεϊνικό κλάσμα από την τρίτη έκλουση.

Από την εικόνα παρατηρείται σήμα στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της α-συνουκλεΐνης. Εντούτοις, παρατηρήθηκε σήμα και στα στάδια του καθαρισμού, γεγονός που υποδηλώνει ότι κάποια ποσότητα ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης δεν δεσμεύτηκε στην στήλη και απελευθερώθηκε από αυτή (διαδρομές 3 και 4). Από τα δείγματα των εκλούσεων, στο δείγμα της πρώτης έκλουσης παρατηρείται ευδιάκριτη ζώνη στα 20 kDa περίπου, γεγονός που υποδηλώνει πως η μέγιστη ποσότητα της ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης βρίσκεται στο πρώτο κλάσμα έκλουσης του καθαρισμού (διαδρομή 5). Επίσης, το δείγμα 5 παρουσιάζει ικανοποιητική ποσότητα και υψηλή καθαρότητα. Στα δείγματα των άλλων δύο εκλούσεων δεν παρατηρείται ποσότητα πρωτεΐνης (διαδρομές 6 και 7). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο πρώτο δείγμα της έκλουσης προσδιορίστηκε στα 0,5 mg/ml με την μέθοδο Bradford.

4.5 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ WESTERN (WESTERN BLOT)

Για να διαπιστωθεί ότι το προϊόν της υπερέκφρασης αντιστοιχούσε πράγματι στην α-συνουκλεΐνη, τα πρωτεϊνικά δείγματα από την υπερέκφραση της μεγάλης κλίμακας καθώς και τα δείγματα από τα διάφορα στάδια του καθαρισμού της πρωτεΐνης, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS-PAGE.

Πραγματοποιήθηκαν δύο ίδιες ηλεκτροφορήσεις: στη μία πηκτή έγινε χρώση με Coomassie Blue ενώ η δεύτερη υποβλήθηκε σε ανοσοαποτύπωση κατά Western. Για την ταυτοποίησή τους χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της α -συνουκλεΐνης (anti- A-synuclein (1/500), Cell Signaling). Η εμφάνιση της ανοσοδοκιμασίας φαίνεται στην εικόνα 4.8.



Εικόνα 4.8: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (A) και Ανοσοαποτύπωση Western (B) για τα δείγματα της υπερέκφρασης και τα στάδια του καθαρισμού της πρωτεΐνης.

Διαδρομή 1: protein marker

Διαδρομή 2: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21(DE3)/ pET29c(+), t=2h ως αρνητικός μάρτυρας.

Διαδρομή 3: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21(DE3)/ pET29c(+)/SNCA, t=0.

Διαδρομή 4: Πρωτεϊνικό εκχύλισμα BL21(DE3)/ pET29c(+)/SNCA, t=2h.

Διαδρομές 5 και 6: Δείγμα μετά την δέσμευση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στην στήλη.

Διαδρομή 7: Δείγμα από την πλύση της στήλης.

Διαδρομή 8: Δείγμα από την πρώτη έκλουση της α -συνουκλεΐνης.

Με την παραπάνω ανοσοαποτύπωση ταυτοποιήθηκαν τα προϊόντα της υπερέκφρασης ως δείγματα α -συνουκλεΐνης. Συγκεκριμένα, στις διαδρομές 1 και 2

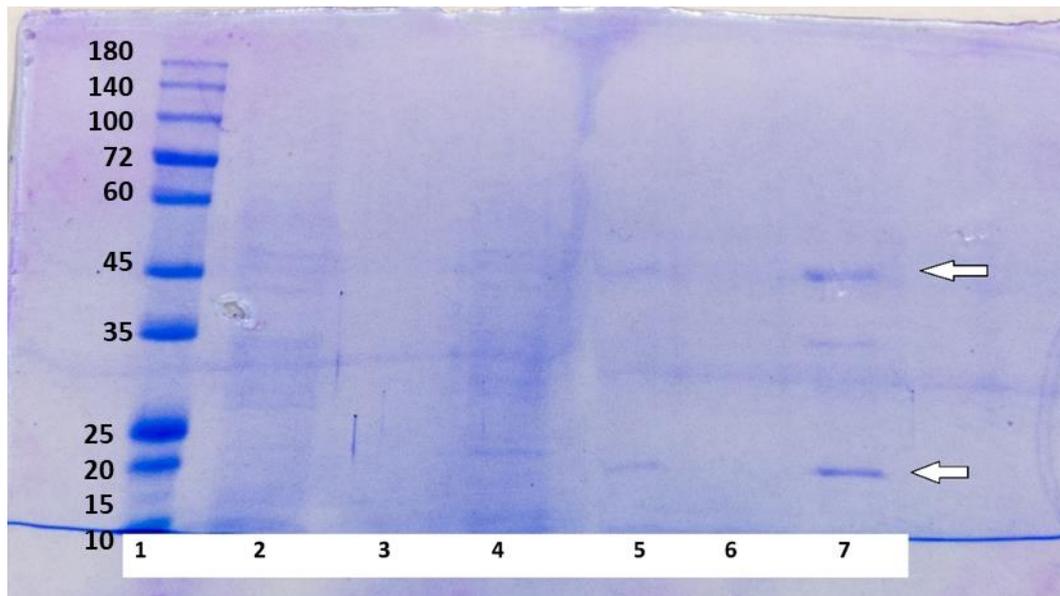
δεν παρατηρήθηκε κάποιο σήμα, γεγονός αναμενόμενο καθώς πρόκειται για τον marker και το δείγμα του αρνητικού μάρτυρα που περιλαμβάνει τον μη ανασυνδυασμένο φορέα, αντίστοιχα. Στην διαδρομή 3 παρατηρείται σήμα καθώς πρόκειται για την α-συνουκλεΐνη στο χρόνο 0 της υπερέκφρασης και το σήμα αυτό γίνεται εντονότερο στην διαδρομή 4 όπου αφορά το δείγμα μετά τις 2 ώρες όπου σημειώνεται η μέγιστη υπερέκφραση. Στις διαδρομές 5,6 και 7 βρίσκονται δείγματα από τα βήματα του καθαρισμού της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και παρατηρείται σήμα διότι πρόκειται για α-συνουκλεΐνη που δεν δεσμεύτηκε στην στήλη καθαρισμού και απελευθερώθηκε από αυτή, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 4.5. Τέλος, στην διαδρομή 8 απεικονίζεται η καθαρισμένη α-συνουκλεΐνη.

4.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ GAPDH ΤΟΥ SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Η ανασυνδυασμένη α-συνουκλεΐνη που απομονώθηκε από την υπερέκφραση του γονιδίου SNCA χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα συγκατακρίμνησης με τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τη στατική φάση των *S. cerevisiae* BY4741 και TPS1Δ. Χρησιμοποιήθηκαν τα αρχικά στελέχη που δεν έφεραν το γονίδιο SNCA, ώστε κατά πρώτον να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα του πειράματος και να εντοπιστεί τυχόν μη ειδική δέσμευση της α-συνουκλεΐνης με άλλες πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν στελέχη με το γονίδιο SNCA για να εντοπιστεί αλληλεπίδραση της α-συνουκλεΐνης με πρωτεΐνες από τη στατική φάση, στην οποία συμβαίνουν και οι περισσότερες καταπονήσεις και τοξικά φαινόμενα παρουσία της, όταν αυτή εκφράζεται στον ζυμομύκητα. Τέλος, θα ανιχνευθεί η ταυτότητα των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών, και συγκεκριμένα της GAPDH, για την οποία υπάρχουν ενδείξεις αλληλεπίδρασης.

Για το πείραμα της συγκατακρίμνησης (pull down assay) απομονώθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από *S. cerevisiae* BY4741 και TPS1Δ όπως περιγράφεται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι. Στη συνέχεια, 1mg πρωτεΐνης από καθένα επώαστηκε με 5μg χιμαιρικής α-συνουκλεΐνης. Καθένα από αυτά τα μίγματα προστέθηκε σε υλικό της στήλης Ni-NTA με την οποία αφέθηκε για αλληλεπίδραση, και κατόπιν πραγματοποιήθηκε έκπλυση δύο φορές πριν την έκλυση.

Ο αρνητικός μάρτυρας του πειράματος ήταν το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων BY4741 ή TPS1Δ το οποίο επώαστηκε με το υλικό της Ni-NTA χωρίς την χιμαιρική α-συνουκλεΐνη και υπέστη επεξεργασία με τις ίδιες πειραματικές συνθήκες με εκείνες των δειγμάτων της συγκατακρίμνησης. Όλα τα δείγματα στην συνέχεια φορτώθηκαν σε πήκτωμα για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και τα αποτελέσματα φαίνονται στις παρακάτω εικόνες (εικόνα 4.9 και 4.10).



Εικόνα 4.9: Πείραμα συγκατακρίμησης για το στέλεχος BY4741. Με λευκά βέλη επισημαίνεται η θέση της ανασυνδυασμένης α -συνουκλεΐνης (κάτω) και μια ευδιάκριτη ζώνη σε MB ~ 45kDa

Διαδρομή 1: Protein marker

Διαδρομή 2: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το στέλεχος BY4741.

Διαδρομή 3: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα του BY4741 χωρίς την χιμαιρική α -συνουκλεΐνη μετά από επώαση με Ni-NTA (αρνητικός μάρτυρας της συγκατακρίμησης).

Διαδρομή 4: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα του BY4741 με την χιμαιρική α -συνουκλεΐνη μετά από επώαση με Ni-NTA.

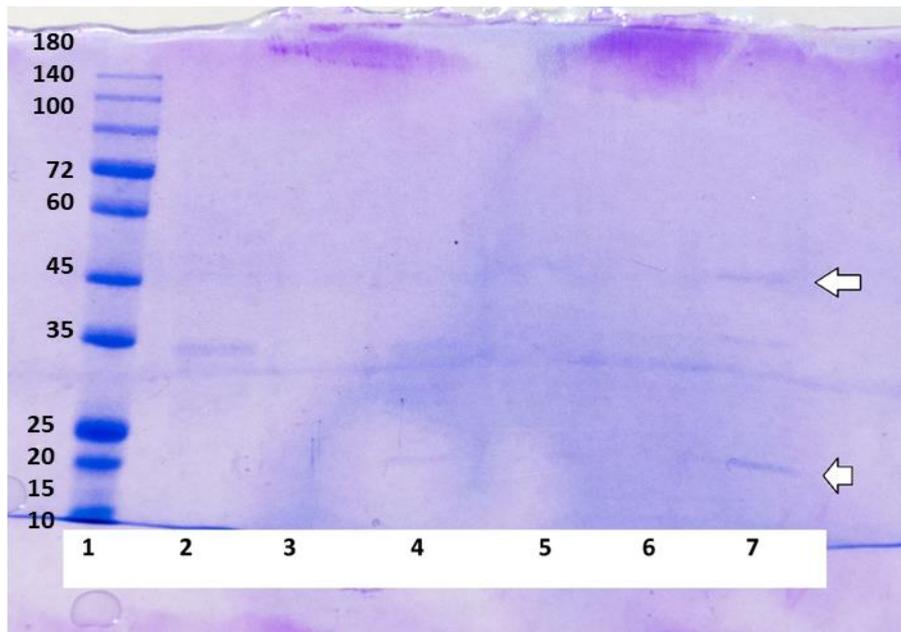
Διαδρομή 5: 1^η πλύση της στήλης μετά την συγκατακρίμηση

Διαδρομή 6: 2^η πλύση της στήλης μετά την συγκατακρίμηση

Διαδρομή 7: Τελικό προϊόν από την συγκατακρίμηση της χιμαιρικής α -συνουκλεΐνης με πρωτεϊνικό εκχύλισμα του BY4741.

Για το στέλεχος BY4741 (εικόνα 4.9) το πείραμα συγκατακρίμησης ήταν επιτυχημένο. Αρχικά, στην διαδρομή 3 του αρνητικού μάρτυρα, παρατηρείται ότι το υλικό της στήλης Ni-NTA δεν συγκρατεί με μη ειδική δέσμευση πρωτεϊνικό υλικό του εκχυλίσματος με το οποίο επωάστηκε. Στο τελικό προϊόν της συγκατακρίμησης (διαδρομή 7) παρατηρούνται δύο ζώνες: μια στα 19-20 kDa, μια ασθενέστερης έντασης στα 35kDa και μια περίπου στα 45 kDa. Η ζώνη στα 19-20 kDa θεωρείται ότι αντιστοιχεί στην δέσμευση της χιμαιρικής α -συνουκλεΐνης στην στήλη, ενώ η ζώνη των 45 kDa αναμένεται να περιέχει την α -συνουκλεΐνη μαζί με πρωτεΐνη από το εκχύλισμα του BY4741. Η εμφάνιση της ζώνης στο συγκεκριμένο MB παραπέμπει σε πιθανή αλληλεπίδραση με την GAPDH, όπως έχει φανεί σε προηγούμενα πειράματα (Σφήκας Ε., 2000). Η δέσμευση της α -συνουκλεΐνης στη στήλη αποδεικνύεται ειδική εφόσον το υπόλοιπο πρωτεϊνικό εκχύλισμα του BY4741 δεν προσδέθηκε σε αυτήν και αποδεσμεύτηκε είτε άμεσα (διαδρομή 4) είτε μετά από τις εκπλύσεις (διαδρομές 5 και 6).

Με τον ίδιο τρόπο πραγματοποιήθηκε πείραμα συγκατακρίμησης και για το στέλεχος TPS1Δ.



Εικόνα 4.10: Πείραμα συγκατακρίμνησης για το στέλεχος TPS1Δ. Με λευκά βέλη επισημαίνεται η θέση της ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης (κάτω) και μια ευδιάκριτη ζώνη σε MB ~ 45kDa.

Διαδρομή 1: Protein marker

Διαδρομή 2: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από το στέλεχος TPS1Δ.

Διαδρομή 3: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα του TPS1Δ χωρίς τη χιμαιρική α-συνουκλεΐνη μετά από επώαση με Ni-NTA (αρνητικός μάρτυρας της συγκατακρήμνησης)

Διαδρομή 4: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα του TPS1Δ με τη χιμαιρική α-συνουκλεΐνη μετά από επώαση με Ni-NTA

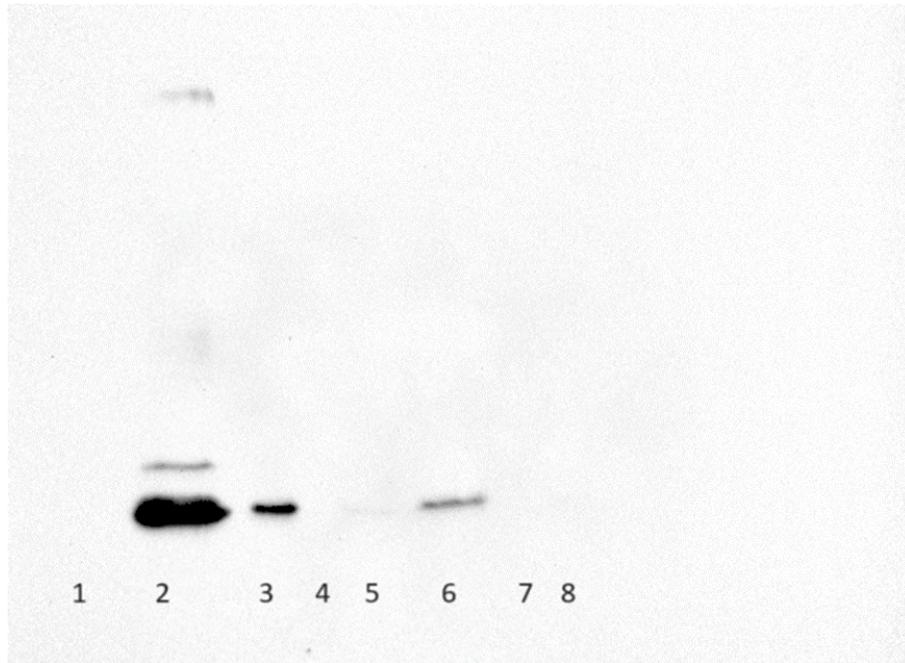
Διαδρομή 5: 1^η πλύση της στήλης μετά την συγκατακρήμνηση

Διαδρομή 6: 2^η πλύση της στήλης μετά την συγκατακρήμνηση

Διαδρομή 7: Τελικό προϊόν από την συγκατακρίμνηση της χιμαιρικής α-συνουκλεΐνης με πρωτεϊνικό εκχύλισμα του TPS1Δ.

Όμοια είναι τα αποτελέσματα της συγκατακρήμνησης και για το στέλεχος TPS1Δ (εικόνα 4.10). Στον αρνητικό μάρτυρα (διαδρομή 3) δεν παρατηρήθηκε μη ειδική δέσμευση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος του TPS1Δ με το υλικό της στήλης Ni-NTA που επώαστηκε. Στο τελικό προϊόν της συγκατακρήμνησης (διαδρομή 7) παρατηρούνται και εδώ δύο ζώνες στα 19-20 kDa και στα 45 kDa. Η δέσμευση της α-συνουκλεΐνης στη στήλη φαίνεται ειδική, εφόσον το υπόλοιπο πρωτεϊνικό εκχύλισμα δεν προσδέθηκε σε αυτήν, αν και η συγκέντρωση των πρωτεϊνών εδώ είναι μικρότερη.

Στην συνέχεια κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η ταυτότητα των πρωτεϊνών που αντιστοιχούσαν στις ζώνες που δεσμεύτηκαν ειδικά στη στήλη. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE με τα αντιπροσωπευτικά δείγματα της συγκατακρήμνησης των δυο στελεχών και ανοσοδοκιμασία Western με αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 4.11.



Εικόνα 4.11: Ανοσοαποτύπωση Western για τα δείγματα της υπερέκφρασης.

Διαδρομή 1: protein marker

Διαδρομή 2: Ανασυνδυασμένη α-συνουκλεΐνη

Διαδρομή 3: Τελικό προϊόν από την συγκατακρήμιση της χιμαιρικής α-συνουκλεΐνης με πρωτεϊνικό εκχύλισμα του BY4741.

Διαδρομή 4: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα του BY4741 με την χιμαιρική α-συνουκλεΐνη μετά από επώαση με Ni-NTA

Διαδρομή 5: Δείγμα από την έκπλυση της στήλης του BY4741

Διαδρομή 6: Τελικό προϊόν από την συγκατακρήμιση της χιμαιρικής α-συνουκλεΐνης με πρωτεϊνικό εκχύλισμα του TPS1Δ

Διαδρομή 7: Ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα του TPS1Δ με την χιμαιρική α-συνουκλεΐνη μετά από επώαση με Ni-NTA

Διαδρομή 8: Δείγμα από την έκπλυση της στήλης του TPS1Δ.

Από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης φαίνεται ότι στην διαδρομή 2 παρατηρείται σήμα για την ανασυνδυασμένη α-συνουκλεΐνη (θετικός μάρτυρας) στο αναμενόμενο μοριακό βάρος, γεγονός που σημαίνει ότι το αντίσωμα προσδέεται στην μελετώμενη πρωτεΐνη. Στις διαδρομές 3 και 6 όπου έχουν φορτωθεί τα προϊόντα από την συγκατακρήμιση της χιμαιρικής α-συνουκλεΐνης με τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των BY4741 και TPS1Δ παρατηρείται σήμα μόνο στο μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στην α-συνουκλεΐνη. Η ζώνη μεγαλύτερου MB που μεταναστεύει στα 45kDa και εμφανίστηκε στα πειράματα της συγκατακρήμισης δεν έδωσε θετικό σήμα.

Το γεγονός αυτό μπορεί να σημαίνει ότι:

- Η ζώνη μεγαλύτερου MB που μεταναστεύει στα 45kDa δεν εμπεριέχει α-συνουκλεΐνη και για το λόγο αυτό δεν αντέδρασε με το αντίσωμα.

- Η ποσότητα της α-συνουκλεΐνης που τυχόν περιέχεται στη ζώνη των 45kDa είναι πολύ μικρή και δεν μεταφέρθηκε στη μεμβράνη ή (λιγότερο πιθανό) δεν αντέδρασε με το αντίσωμα.

Επαναλήφθηκαν τα πειράματα της συγκατακρήμνισης και του Western με διαφορετικής εταιρείας αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης, το οποίο όμως ήταν ακόμα λιγότερο αποτελεσματικό.

Επίσης πραγματοποιήθηκαν και αντίστοιχα πειράματα με αντίσωμα έναντι της GAPDH το οποίο δεν έδωσε θετικό αποτέλεσμα.

Ακόμα, τροποποιήθηκαν οι συνθήκες της συγκατακρήμνισης με αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, του υλικού της στήλης και των χρόνων συνεπώασης, πάλι χωρίς θετικό αποτέλεσμα.

Κατά συνέπεια τα πειράματα αυτά δεν ήταν δυνατόν να ολοκληρωθούν στην παρούσα εργασία.

Οι δυσκολίες που παρουσιάστηκαν ενδεχομένως οφείλονται σε ένα η περισσότερα από τα εξής:

- Η προμήθεια αντισώματος έναντι της α-συνουκλεΐνης από διαφορετική εταιρεία (η προηγούμενη καταργήθηκε).
- Πιθανή αλλοίωση του υλικού Ni-NTA.
- Δυσκολία απομόνωσης μεγάλης συγκέντρωσης πρωτεϊνών.

Επομένως θα πρέπει να διερευνηθούν και να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω προκειμένου να ολοκληρωθούν τα πειράματα σε περαιτέρω μελλοντική μελέτη.

ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΤΡΕΧΑΛΟΖΗΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ SACCHAROMYCES CEREVISIAE ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΦΑΣΕΙΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.

Όπως αναφέρθηκε στο σκοπό της παρούσας διατριβής, στο εργαστήριό μας έχουν κλωνοποιηθεί τύποι γονιδίων της α-συνουκλεΐνης σε φορέα κατάλληλο για κύτταρα ζυμομυκήτων και έχει μελετηθεί μεταξύ άλλων η επαγωγή μεταβολικών μονοπατιών του ζυμομύκητα που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση της τρεχαλόζης ως απόκριση στην καταπόνηση του κυττάρου από την τοξικότητα της α-συνουκλεΐνης. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης παρουσία της α-συνουκλεΐνης. Κρίθηκε επομένως απαραίτητο να προσδιοριστεί η ποσότητα της τρεχαλόζης που συντίθεται σε συγκεκριμένες φάσεις ανάπτυξης σε κύτταρα *S. cerevisiae* τα οποία εκφράζουν την α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου καθώς και την μεταλλαγμένη μορφή της A53T.

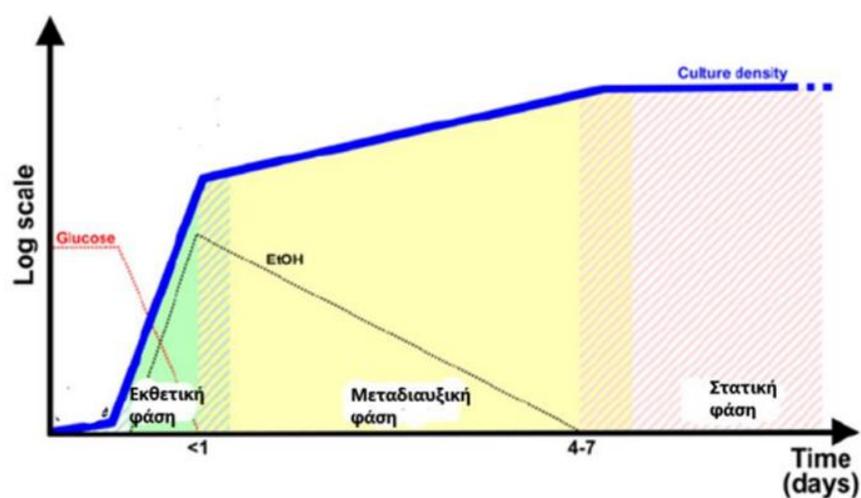
Ο ποσοτικός προσδιορισμός της τρεχαλόζης πραγματοποιήθηκε ενζυμικά όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Συνοπτικά, η τρεχαλόζη διασπάται από την τρεχαλάση σε δύο μόρια D-γλυκόζης, η οποία φωσφορυλιώνεται από μία εξοκινάση

και μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη (G-6-P). Στη συνέχεια, η G-6-P οξειδώνεται από το συνένζυμο NADP⁺ και μετατρέπεται σε 6-φωσφογλυκονικό παρουσία του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Κατά την μετατροπή αυτή απελευθερώνεται NADPH στοιχειομετρικά ίσο με την ποσότητα της D-γλυκόζης και επομένως διπλάσιο της αρχικής τρεχαλόζης.

Το NADPH προσδιορίζεται ποσοτικά με μέτρηση της απορρόφησης στα 340nm και επομένως με την μέτρησή του μπορεί να προσδιοριστεί και η τρεχαλόζη.

Ο προσδιορισμός της τρεχαλόζης πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα από 4 διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης του ζυμομύκητα:

- Προεκθετική (OD=0.6)
- Εκθετική (OD=2.0)
- Μεταδιαυξική (OD=8.0)
- Στατική (8^η ημέρα από τον αρχικό εμβολιασμό της καλλιέργειας)



Εικόνα 4.11: Φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων του ζυμομύκητα.

Η τρεχαλόζη μετρήθηκε στα εξής στελέχη του ζυμομύκητα:

- *S.cerevisiae* BY4741/pCM190
- *S.cerevisiae* BY4741/a-synWT
- *S.cerevisiae* BY4741/a-synA53T
- *S.cerevisiae* TPS1Δ/pCM190
- *S.cerevisiae* TPS1Δ/a-synWT
- *S.cerevisiae* TPS1Δ/a-synA53T

Το BY4741/pCM190 είναι το στέλεχος αγρίου τύπου το οποίο χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τη μελέτη της παραγωγής τρεχαλόζης στις διάφορες φάσεις ανάπτυξης.

Τα BY4741/a-synWT και BY4741/a-synA53T συνθέτουν α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου και μεταλλαγμένη α-συνουκλεΐνη (A53T) αντίστοιχα. Ο προσδιορισμός της παραγόμενης τρεχαλόζης σε αυτά συγκριτικά με του πρότυπου θα παρέχει ενδείξεις κατά πόσον η έκφραση των γονιδίων της α-συνουκλεΐνης επηρεάζει την σύνθεση της τρεχαλόζης.

Το *TPS1Δ* χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας καθώς έχει έλλληψη του γονιδίου *TPS1* και δεν παράγει τρεχαλόζη.

Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στον αριθμό των κυττάρων ο οποίος έπρεπε να είναι κατά προσέγγιση 10^8 ανά ενζυμικό προσδιορισμό. Για το σκοπό αυτό, για κάθε δείγμα κυττάρων που λαμβανόταν από κάθε φάση ανάπτυξης πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις και εμβολιασμοί σε τρυβλία πριν αυτά αποθηκευτούν στους -80°C . Μετά την ανάπτυξη των αποικιών υπολογιζόταν ο αριθμός κυττάρων και λαμβανόταν η κατάλληλη ποσότητα από το αποθηκευμένο δείγμα για την κατεργασία και την ενζυμική δοκιμή.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε 3 φορές για το κάθε στέλεχος του ζυμομύκητα και για τον υπολογισμό της τρεχαλόζης λήφθηκε υπόψιν ο μέσος όρος των μετρήσεων.

Για τον υπολογισμό της ποσότητας της παραγόμενης τρεχαλόζης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Mega-CalCTM της Megazyme. Για το κάθε στέλεχος που συλλέχθηκε σε συγκεκριμένη φάση ανάπτυξης πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις της απορρόφησης στα 340 nm, μία πριν την προσθήκη τρεχαλάσης (χρόνος 0) και μία 20 λεπτά μετά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες 1 και 2 για κάθε στέλεχος αντίστοιχα.

Πίνακας 1: Παραγωγή τρεχαλόζης (mg/l) από το στέλεχος αγρίου τύπου BY4741 με τις δύο μορφές της α-συνουκλεΐνης σε διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης του ζυμομύκητα.

Φάσεις ανάπτυξης	pCM190	SD	asynWT	SD	A53T	SD
PRE	1 mg/l	1	5 mg/l	4	1 mg/l	0,6
EXP	2 mg/l	1,5	6 mg/l	1,5	4 mg/l	1
PD	3 mg/l	2,5	40 mg/l	5,5	30 mg/l	2
ST	32 mg/l	2,6	40 mg/l	6,7	40 mg/l	7

PRE: προεκθετική, EXP: εκθετική, PD: μετα-διαυξική, ST: στατική φάση ανάπτυξης

pCM190: κύτταρα με τον φορέα χωρίς α-συνουκλεΐνη

α-synWT: κύτταρα που φέρουν α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου

A53T: κύτταρα που φέρουν μεταλλαγμένη α-συνουκλεΐνη A53T

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 1, φαίνεται ότι απουσία α-συνουκλεΐνης (BY4741/pCM190) η παραγωγή της τρεχαλόζης παρατηρείται στη στατική φάση ανάπτυξης. Σε αυτή τη φάση τα θρεπτικά συστατικά εξαντλούνται, παράλληλα με τη συσσώρευση τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να καταπονούνται. Η παραγωγή τρεχαλόζης στη στατική φάση συμβαίνει ως αμυντική απόκριση των κυττάρων στο στρες με σκοπό την επιβίωσή τους.

Παρουσία α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου (BY4741/α-synWT) τα κύτταρα παράγουν τρεχαλόζη νωρίτερα, με την μέγιστη ποσότητα να κορυφώνεται στην μεταδιαυξική φάση ανάπτυξης και να διατηρείται μέχρι και την στατική. Φαίνεται λοιπόν, ότι η καταπόνηση των κυττάρων από την παρουσία της α-συνουκλεΐνης οδηγεί στην πρόωπη παραγωγή τρεχαλόζης. Η α-synWT ανιχνεύεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ζυμομύκητα και η παρουσία της επηρεάζει την βιωσιμότητά τους μετά τη μεταδιαυξική φάση (Σφήκας Ε., 2020).

Ως προς την μεταλλαγμένη α-συνουκλεΐνη A53T, πρόκειται για τον τοξικότερο φαινότυπο της α-συνουκλεΐνης σύμφωνα με τα ως τώρα γνωστά στοιχεία. Δημιουργεί συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ζυμομύκητα, γεγονός που οδηγεί σε μεγαλύτερη καταπόνησή τους συγκριτικά με την α-synWT. Όπως και στην περίπτωση της α-συνουκλεΐνης αγρίου τύπου, έτσι και παρουσία της A53T η τρεχαλόζη αυξάνεται στη μεταδιαυξική φάση ανάπτυξης και κορυφώνεται στη στατική. Η ποσότητά της είναι ανάλογη με αυτήν στην περίπτωση της α-synWT. Δεν γνωρίζουμε αν και κατά πόσον θα μπορούσε να αυξηθεί, εντούτοις η υψηλή τοξικότητα της A53T ενδεχομένως παίζει κάποιον περιοριστικό ρόλο.

Πίνακας 2: Παραγωγή τρεχαλόζης (mg/l) από το μεταλλαγμένο στέλεχος *TPS1Δ* με τις δύο μορφές της α-συνουκλεΐνης σε διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης του ζυμομύκητα.

Φάσεις ανάπτυξης	<i>TPS1Δ</i>					
	pCM190	SD	asynWT	SD	A53T	SD
PRE	0 mg/l	0	0 mg/l	0	0 mg/l	0
EXP	0 mg/l	0	0 mg/l	0	0 mg/l	0
PD	0 mg/l	0	0 mg/l	0	3 mg/l	0,6
ST	0 mg/l	0	7 mg/l	5,8	24 mg/l	7

PRE: προεκθετική, EXP: εκθετική, PD: μετα-διαυξική, ST: στατική φάση ανάπτυξης

pCM190: κύτταρα με τον φορέα χωρίς α-συνουκλεΐνη

α-synWT: κύτταρα που φέρουν α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου

A53T: κύτταρα που φέρουν μεταλλαγμένη α-συνουκλεΐνη A53T

Το στέλεχος BY4741 *TPS1Δ* του ζυμομύκητα χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ως αρνητικός μάρτυρας για την μέτρηση της παραγόμενης τρεχαλόζης. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία το στέλεχος αυτό δεν παράγει τρεχαλόζη καθώς έχει έλλειψη του γονιδίου της συνθάσης της 6-φωσφορικής τρεχαλόζης (*TPS1*), απαραίτητο ένζυμο για την βιοσύνθεσή της. Πράγματι από τον Πίνακα 2 φαίνεται ότι απουσία α-

συνουκλείνης αλλά και παρουσία συνουκλείνης αγρίου τύπου δεν παρατηρείται παραγωγή τρεχαλόζης σε κανένα από τα 4 στάδια ανάπτυξης. Εντούτοις, στο *TPS1Δ/A53T* εμφανίστηκε ένα διαφορετικό και μη αναμενόμενο αποτέλεσμα: ανιχνεύθηκε ποσότητα τρεχαλόζης κατά την στατική φάση ανάπτυξης. Το γεγονός αυτό δεν αιτιολογείται από όσα είναι ως τώρα γνωστά για το στέλεχος *TPS1Δ*. Σημειώνεται ότι η παραγωγή τρεχαλόζης παρατηρήθηκε στα κύτταρα *TPS1Δ/A53T*, όταν αυτά βρίσκονται πλέον στο στάδιο της γήρανσης όπου υφίστανται διάφορες μορφές καταπόνησης, ενώ είναι ήδη επιβαρυνμένα από την παρουσία της μεταλλαγής *A53T* που θεωρείται η πιο τοξική της α -συνουκλείνης. Θα πρέπει επομένως μελλοντικά να διερευνηθεί κατά πόσον στο στέλεχος *TPS1Δ* υπό την πίεση του τοξικού φαινοτύπου της *A53T* ενεργοποιούνται μηχανισμοί που έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση τρεχαλόζης κατά την φάση της γήρανσης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η α-συνουκλεΐνη είναι μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο προσυναπτικό άκρων των νευρώνων και έχει ποικίλες λειτουργίες. Υπερέκφρασή της οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με συνουκλεϊνοπάθειες όπως το Parkinson στο οποίο εμπλέκονται κυρίως οι μεταλλαγμένες μορφές της (A53T και A30P). Κύριο χαρακτηριστικό των ασθενειών αυτών είναι η ύπαρξη των σωματίων Lewy που δημιουργούνται από συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης τα οποία προκαλούνται κυρίως από τροποποίηση της δευτεροταγούς δομής της από δομή α-έλικας σε β-πτυχωτό φύλλο.

Η α-συνουκλεΐνη έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες και μια από αυτές είναι και η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH). Η GAPDH αποτελεί ένα πολύ σημαντικό γλυκολυτικό ένζυμο που καταλύει οξείδωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης σε 1,3 διφωσφο-γλυκερικό κατά την διαδικασία της γλυκόλυσης σε σύζευξη με την αναγωγή του NAD⁺ σε NADH. Επίσης, έχει πολύ σημαντικό ρόλο καθώς ελέγχει την κατανομή του άνθρακα στο κύτταρο, μπορεί να συνδέεται με DNA και RNA και σχετίζεται με τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση.

Ο *Saccharomyces cerevisiae* αποτελεί οργανισμό μοντέλο για την μελέτη νευροεκφυλιστικών ασθενειών καθώς, παρόλη την εξελικτική απόσταση μεταξύ των κυττάρων της ζύμης και των νευρώνων, πολλές βασικές κυτταρικές διαδικασίες παραμένουν ισχυρά διατηρημένες μεταξύ αυτού και των ανθρώπινων νευρικών κυττάρων.

Όταν τα κύτταρα της ζύμης αναπτύσσονται σε συνθήκες υψηλής εξωτερικής ωσμωτικότητας, προκειμένου να εξισορροπήσουν τη συγκέντρωση των ωσμωλυτών, εκτρέπουν την μεταβολική πορεία της γλυκόλυσης προς την βιοσύνθεση γλυκερόλης και τρεχαλόζης (Nadal et al., 2022). Η τρεχαλόζη μεταξύ των άλλων ιδιοτήτων της προστατεύει τα κύτταρα σε συνθήκες καταπόνησης, αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες που έχουν αναδιπλωθεί λανθασμένα τόσο άμεσα λόγω της χημικής της δομής, όσο και έμμεσα μέσω της αυτοφαγίας, και αναστέλλει τη συσώρευση των πρωτεϊνών.

Στο εργαστήριό μας έχουν κλωνοποιηθεί τύποι γονιδίων της α-συνουκλεΐνης σε φορέα κατάλληλο για κύτταρα ζυμομυκήτων υπό τον έλεγχο υβριδικού υποκινητή ρυθμιζόμενου από το σύστημα tet-off και έχει μελετηθεί η έκφρασή τους στο ζυμομύκητα και η τοξικότητα που προκαλούν σε διάφορες συνθήκες, καθώς και η επαγωγή μεταβολικών μονοπατιών του ζυμομύκητα που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση της τρεχαλόζης η οποία παράγεται ως απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης. Ακόμα, μια πρώτη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων της α-συνουκλεΐνης με τις πρωτεΐνες του *S. cerevisiae* κατέδειξε κυρίως την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν αφενός μεν η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της α-συνουκλεΐνης με την GAPDH του *Saccharomyces cerevisiae*, αφετέρου δε ο προσδιορισμός της παραγόμενης τρεχαλόζης στις φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων

S. cerevisiae τα οποία εκφράζουν την α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου καθώς και την μεταλλαγμένη μορφή της A53T.

GAPDH

Σε πειράματα που έχουν γίνει στο παρελθόν στο εργαστήριο μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της α-συνουκλεΐνης με τις πρωτεΐνες του ζυμομύκητα. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε συγκατακρήμιση χιμαιρικής α-συνουκλεΐνης με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων του *S. cerevisiae* BY4741 από το οποίο παρατηρήθηκε επιπλέον της α-συνουκλεΐνης μια πρωτεϊνική ζώνη μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Η ζώνη αυτή παρουσίασε θετικό σήμα μετά από far western με αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης. Από την ανάλυση του περιεχομένου της ζώνης η κύρια πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε ήταν η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH). Είναι γνωστό για τα κύτταρα των θηλαστικών ότι η GAPDH αλληλεπιδρά με την α-συνουκλεΐνη. Εντούτοις είναι η πρώτη φορά που παρατηρείται αυτού του είδους η αλληλεπίδραση στον ζυμομύκητα.

Κρίθηκε επομένως σκόπιμο να επαληθευτεί και να εδραιωθεί περαιτέρω αυτό το εύρημα.

Για την μελέτη των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων πραγματοποιήθηκε παραγωγή της ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης με ουρά 6 ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο της. Έπειτα, η χιμαιρική πρωτεΐνη αφέθηκε σε αλληλεπίδραση με τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα ζυμομύκητα και ακολούθησε πείραμα συγκατακρήμισης. Χρησιμοποιήθηκαν στελέχη αγρίου τύπου BY4741 αλλά και μεταλλαγμένα στελέχη TPS1Δ για να αναδειχθούν διαφορές στην ταυτοποίηση των αλληλεπιδράσεων που μπορεί να οφείλονται στην έλλειψη τρεχαλόζης. Τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προέρχονταν από την στατική φάση ανάπτυξης καθώς στην φάση αυτή εκδηλώνεται ο παθολογικός φαινότυπος της α-συνουκλεΐνης. Στην συνέχεια, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων της συγκατακρήμισης, χρώση με Coomassie Blue και Western Blot για τον εντοπισμό των ζωνών αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, σαφής ρόλος της αλληλεπίδρασης της α-συνουκλεΐνης με την GAPDH δεν υπάρχει. Η αλληλεπίδραση αυτή ίσως επηρεάζει βασικές λειτουργίες της α-συνουκλεΐνης όπως η απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών στην σύναψη. Όμοια, ίσως επηρεάζονται λειτουργίες της GAPDH κάτι που μπορεί να επηρεάσει γενικά τον ενεργειακό μεταβολισμό καθώς πρόκειται για ένα σημαντικό γλυκολυτικό ένζυμο. Έρευνες έχουν δείξει ότι κατά την πρόσδεση της α-συνουκλεΐνης σε κατάλοιπα του ενεργού κέντρου του ένζυμο, η GAPDH αδρανοποιείται.

Στο πείραμα συγκατακρήμισης και μετά τη χρώση με Coomassie Blue παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση της α-συνουκλεΐνης με πρωτεΐνη μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Συγκεκριμένα, τόσο στα κύτταρα αγρίου τύπου όσο και στα μεταλλαγμένα εντοπίστηκαν ζώνες στα 45 kDa περίπου, γεγονός που υποδηλώνει ότι μετά την

επάωση της α-συνουκλεΐνης με ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ζύμης παρατηρείται συγκατακρίμνηση με άλλο πρωτεϊνικό προϊόν.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανοσοδοκιμασία Western από την οποία δεν διαπιστώθηκε αλληλεπίδραση για κανένα από τα δύο στελέχη του ζυμομύκητα, ούτε με αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης αλλά ούτε και με αντίσωμα έναντι της GAPDH.

Παρόλο που τα πειράματα της συγκατακρίμνησης επαναλήφθηκαν με αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, του υλικού της στήλης και των χρόνων συνεπάωσης, δεν υπήρξε θετικό αποτέλεσμα.

Στην ενότητα των αποτελεσμάτων αναλύονται ορισμένοι τεχνικοί λόγοι στους οποίους μπορεί να οφείλεται αυτό. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η χρήση αντισώματος έναντι της α-συνουκλεΐνης από διαφορετική εταιρεία λόγω κατάργησης της προηγούμενης, πιθανή αλλοίωση του υλικού Ni-NTA, καθώς και η δυσκολία απομόνωσης μεγάλης συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Αυτά θα πρέπει να διερευνηθούν σε περαιτέρω μελλοντική μελέτη με σκοπό την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης των δυο πρωτεϊνών, ώστε να κατανοηθεί ο ρόλος της και οι συνέπειες που ενδέχεται να έχει στα κύτταρα του ζυμομύκητα.

ΤΡΕΧΑΛΟΖΗ

Ο *Saccharomyces cerevisiae* βιοσυνθέτει και αποδομεί την τρεχαλόζη ανάλογα με τις συνθήκες και το στάδιο του κύκλου ζωής του. Έχει αποδειχθεί πως μπορεί να λειτουργεί ως μία σημαντική πηγή άνθρακα και αποθήκη ενέργειας σε κύτταρα υπό συνθήκες πείνας και επίσης, προστατεύει τα κύτταρα σε συνθήκες καταπόνησης.

Σε πειράματα που έχουν γίνει στο παρελθόν στο εργαστήριο μελετήθηκε η επαγωγή μεταβολικών μονοπατιών του ζυμομύκητα που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση της τρεχαλόζης ως απόκριση στην καταπόνηση του κυττάρου από την τοξικότητα της α-συνουκλεΐνης. Σε κύτταρα ζυμομυκήτων που εκφράζουν τύπους γονιδίων της α-συνουκλεΐνης παρατηρήθηκε μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης. Κρίθηκε επομένως απαραίτητο να προσδιοριστεί η ποσότητα της τρεχαλόζης που συντίθεται σε συγκεκριμένες φάσεις ανάπτυξης σε κύτταρα *S. cerevisiae* τα οποία εκφράζουν την α-συνουκλεΐνη αγρίου τύπου, την μεταλλαγμένη A53T, καθώς και απουσία αυτής.

Από αυτές τις τρεις κατηγορίες κυττάρων συλλέχθηκαν δείγματα σε 4 διαφορετικές φάσεις ανάπτυξής του με σκοπό τη μέτρηση της παραγωγής της τρεχαλόζης συναρτήσει του χρόνου. Για τον προσδιορισμό της χρησιμοποιήθηκε μια ενζυμική μέθοδος στην οποία χρησιμοποιείται τρεχαλάση που διασπά την τρεχαλόζη σε δύο μόρια γλυκόζης. Στην συνέχεια, τα κύτταρα υπέστησαν την κατάλληλη επεξεργασία, υποβλήθηκαν σε ενζυμική δοκιμασία και υπολογίστηκε η ποσότητα τρεχαλόζης για το κάθε στέλεχος σε συγκεκριμένη φάση ανάπτυξης.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων φαίνεται πως απουσία α-συνουκλεΐνης η τρεχαλόζη ανιχνεύεται κατά τη στατική φάση, γεγονός αναμενόμενο καθώς στην

φάση αυτή συσσωρεύονται στρεσογόνοι παράγοντες για τα κύτταρα. Η τρεχαλόζη παράγεται ως απόκριση σε αυτούς τους παράγοντες με σκοπό την επιβίωση των κυττάρων. Αντίθετα, παρουσία της α -συνουκλεΐνης που καταπονεί τα κύτταρα, η τρεχαλόζη ανιχνεύεται από την μετα- διαυξική φάση. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το μεταγραφικό επίπεδο των γονιδίων βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης αυξάνεται νωρίς κατά την ανάπτυξη, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει τάση για παραγωγή της νωρίτερα και είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων (Σφήκας Ε., 2020).

Η παρουσία της μεταλλαγμένης α -συνουκλεΐνης A53T οδηγεί και αυτή σε πρόωμη παραγωγή τρεχαλόζης κατά την ανάπτυξη. Το επίπεδο μεταγραφής των γονιδίων βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης στα κύτταρα αυτά αυξάνεται ήδη από την προεκθετική φάση ανάπτυξης. Η A53T διαθέτει τον τοξικότερο φαινότυπο της α -συνουκλεΐνης σύμφωνα με τα ως τώρα γνωστά στοιχεία. Δημιουργεί συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ζυμομύκητα, γεγονός που οδηγεί σε μεγαλύτερη καταπόνησή τους συγκριτικά με την α -synWT, η οποία ανιχνεύεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα χωρίς συσσωματώματα (Ζόλδερ Σ., 2020). Η ποσότητά της είναι ανάλογη με αυτήν στην περίπτωση της α -synWT.

Ως αρνητικός μάρτυρας των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το μεταλλαγμένο στέλεχος TPS1 Δ του ζυμομύκητα το οποίο δεν παράγει τρεχαλόζη λόγω έλλειψης του γονιδίου της συνθάσης της τρεχαλόζης. Πράγματι, στα κύτταρα του στελέχους αυτού δεν παρατηρήθηκε παραγωγή τρεχαλόζης σε καμία φάση ανάπτυξης παρουσία αλλά και απουσία α -συνουκλεΐνης. Εξαιρέση αποτέλεσαν κύτταρα με μεταλλαγμένη α -συνουκλεΐνη στα οποία κατά την φάση της γήρανσης παρατηρήθηκε μια σχετικά μικρή αλλά όχι αμελητέα παραγωγή τρεχαλόζης, γεγονός οπωσδήποτε μη αναμενόμενο. Από την αναζήτηση στην βιβλιογραφία δεν εντοπίστηκε κάποιο εναλλακτικό μονοπάτι βιοσύνθεσης της τρεχαλόζης στον ζυμομύκητα που να εξηγεί το γεγονός αυτό.

Στον, *Saccharomyces cerevisiae* το γονίδιο TPS1 κωδικοποιεί την συνθάση της 6-φωσφορικής τρεχαλόζης η οποία καταλύει το πρώτο στάδιο στην βιοσύνθεση της τρεχαλόζης παράγοντας 6-φωσφορική τρεχαλόζη από γλυκόζη και UDP-γλυκόζη. Στο μεταλλαγμένο παράγωγο tps1 Δ το γονίδιο αυτό έχει διαγραφεί πλήρως με αποτέλεσμα την αδυναμία σύνθεσης τρεχαλόζης (van Dijck et al, 1995). Το tps1 Δ παρουσιάζει επιπλέον μια σειρά άλλων φαινοτύπων που περιλαμβάνουν θερμοευαισθησία, αύξηση παραγωγής γλυκογόνου και αδυναμία σποριογένεσης (Chen et al, 2022). Ακόμη, το tps1 Δ δεν αναπτύσσεται παρουσία γλυκόζης, ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι ένα πολύ μικρό κλάσμα κυττάρων του μπορεί να αναπτυχθεί σε γλυκόζη, κατάσταση που περιγράφεται ως persistent-like. Διαπιστώθηκε ότι το φαινόμενο αυτό δεν οφείλεται σε γενετικές μεταβολές, αλλά σε συγκεκριμένο αλληλόμορφο του γονιδίου MKT1 που έχει ρυθμιστικό ρόλο σε πολλές διεργασίες και αλληλεπιδρά με το θρεπτικό περιβάλλον του κυττάρου (Gibney et al, 2020).

Η μοναδική περίπτωση ανίχνευσης τρεχαλόζης στο tps1 Δ που αναφέρεται στην βιβλιογραφία αποδίδεται στην πρόσληψή της μέσω του μεταφορέα Agt1 (Alpha-

glucoside transporter 1), μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που λειτουργεί ως συμμεταφορέας -γλυκοσιδίων/πρωτονίων (H^+). Το *trp1Δ* μπορεί μέσω αυτού του μεταφορέα να προσλάβει τρεχαλόζη από τα θρεπτικά μέσα που περιέχουν εκχύλισμα ζύμης (το οποίο περιέχει τρεχαλόζη) (Plourde-Owobi et al, 1999). Η *Agt1* μπορεί να μεταφέρει τρεχαλόζη και σακχαρόζη καθώς και μαλτόζη, μαλτοτριόζη και α-μεθυλογλυκοζίτη (Stambuk και de Araujo, 2001).

Για την μέτρηση της τρεχαλόζης στην παρούσα εργασία τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε yeast synthetic drop-out media supplement without uracil στο οποίο είχε προστεθεί yeast nitrogen base without amino acids. Αυτά τα θρεπτικά μέσα κατά κανόνα δεν περιέχουν τρεχαλόζη, θα μπορούσαν όμως να υπάρχουν ίχνη της, ανάλογα με την καθαρότητα κάθε σκευάσματος.

Το ερώτημα είναι, αν υπό την πίεση του τοξικού φαινοτύπου της *A53T*, ιδιαίτερα στην φάση της γήρανσης, το *trp1Δ* ενεργοποίησε κάποιο μηχανισμό μεταφοράς με σκοπό να προσλάβει ίχνη τρεχαλόζης που τυχόν υπήρχαν στο θρεπτικό μέσο ως απόκριση στην καταπόνηση που προήλθε από την παρουσία της *A53T*.

Η ανίχνευση της έκφρασης της *Agt1* στο μεταγραφικό επίπεδο θα μπορούσε να απαντήσει κάποια ερωτήματα, ωστόσο χρειάζεται σαφώς περαιτέρω μελέτη των ιδιοτήτων του συγκεκριμένου στελέχους για την μελέτη αυτού του ευρήματος.

Συμπερασματικά, η παρουσία διάφορων μορφών α-συνουκλεΐνης αλλά και οι διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης των κυττάρων του ζυμομύκητα επηρεάζουν την παραγωγή τρεχαλόζης. Από όλα τα παραπάνω είναι προφανές πως η παρουσία α-συνουκλεΐνης οδηγεί σε πρώιμη παραγωγή τρεχαλόζης από τα κύτταρα του ζυμομύκητα. Αυτό ίσως να αποτελεί πιθανή απόκριση των κυττάρων στην τοξικότητα της α-συνουκλεΐνης καθώς παράγουν τρεχαλόζη με σκοπό την προστασία τους και την επιβίωσή τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bandara A., Fraser S., Chambers P., Stanley G., (2009). Trehalose promotes the survival of *Saccharomyces cerevisiae* during lethal ethanol stress, but does not influence growth under sublethal ethanol stress. *FEMS Yeast Res* 9 1208–1216.
- Barinova K., Khomyakova E., Semenyuk P., Schmalhausen E., Muronetz V. (2018), Binding of alpha-synuclein to partially oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induces subsequent inactivation of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 642 10-22.
- Beyer K. (2006). A -synuclein structure, post-transcriptional modification and alternative splicing as aggregation enhancers, *Acta Neuropathol* Vol. 112, 237-251.
- Busti S., Coccetti P., Alberghina L., Vanoni M. (2010), Glucose Signaling-Mediated Coordination of Cell Growth and Cell Cycle in *Saccharomyces Cerevisiae*, *Sensors*,10(6), 6195-6240.
- Butera G., Mullapilly N., Masetto F., Palmieri M., Scupoli M., Pacchiana R., Donadelli M., (2019). Regulation of Autophagy by Nuclear GAPDH and Its Aggregates in Cancer and Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 20(9), 2062.
- Canever J., Soares E., C.P. de Avelar N., Cimarosti H. (2023), Targeting α -synuclein post-translational modifications in Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research* Volume 439, 114204.
- Capouch, S.D., Farlow, M.R. & Brosch, J.R. (2018). A Review of Dementia with Lewy Bodies' Impact, Diagnostic Criteria and Treatment. *Neurol Ther* 7, 249–263
- Choubey V., Safiulina D., Vaarmann A., Cagalinec M., Wareski P., Kuum M., Zharkovsky A., & Kaasik A. (2011), Mutant A53T α -Synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy, *Journal of Biological Chemistry*, 286(12),10814–10824.
- Chris M Grant (2008). Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress. *Journal of Biology*, Volume 7, 1.
- Cohen M., Philippe B., Lipke P., (2020). Enzymatic Analysis of Yeast Cell Wall-Resident GAPDH and Its Secretion. *Molecular Biology and Physiology* Volume 5, Issue 6
- Cox D., Carver J., Ecroyd H. (2014), Preventing α -synuclein aggregation: The role of the small heat-shock molecular chaperone proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. Volume 1842, Issue 9, Pages 1830-1843
- Deyell J., Sriparna M., Ying M., Mao X., (2023), The Interplay between α -Synuclein and Microglia in α -Synucleinopathies. *International Journal of Molecular Sciences* 24(3), 2477.

- Dzamko N., Zhou J., Huang Y., Halliday G. (2014), Parkinson's disease-implicated kinases in the brain; insights into disease pathogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience* Volume 7.
- Eleutherio E., Panek A., De Mesquita J.F., Trevisol E., Magalhães R. (2015). Revisiting yeast trehalose metabolism. *Curr Genet* Vol. 61, 263-274.
- Emanuele M., Chierregatti E., (2015), Mechanisms of Alpha-Synuclein Action on Neurotransmission: Cell-Autonomous and Non-Cell Autonomous Role. *Biomolecules* 5(2), 865-892.
- Franssens V., Bynens T., Van den Brande J., Van der Meeren K., Verduyck M., Winderickx J. (2013). The Benefits of Humanized Yeast Models to Study Parkinson's Disease, Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2013
- Galdieri L., Mehrotra S., Yu S., Vancura A. (2010). Transcriptional Regulation in Yeast during Diauxic Shift and Stationary Phase. *OMICS A Journal of Integrative Biology* Vol.14, 629-638.
- Gamez-Valero A., Beyer K. (2018), Alternative Splicing of Alpha- and Beta-Synuclein Genes Plays Differential Roles in Synucleinopathies. *Genes* 9(2), 63.
- Goedert M., Ghetti B., Spillantini M. (2012), *Frontotemporal Dementia: Implications for Understanding Alzheimer Disease*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Huang Q., Lan F., Zheng Z., Xie F., Han J., Dong L., Xie Y., Zheng F., (2011). Akt2 Kinase Suppresses Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH)-mediated Apoptosis in Ovarian Cancer Cells via Phosphorylating GAPDH at Threonine 237 and Decreasing Its Nuclear Translocation. *Journal of Biological Chemistry* Volume 286, Issue 49, Pages 42211-42220
- Kaeberlein M., Andalis A.A., Fink G.R., Guarente L. (2002). High Osmolarity Extends Life Span In *Saccharomyces Cerevisiae* By A Mechanism Related To Calorie Restriction. *Molecular And Cellular Biology* Vol. 22, No. 22, 8056–8066.
- Kane J., Surendranathan A., Bentley A., Barker S., Taylor J., Thomas A., Allan L., McNally R., James P., McKeith I., Burn D., O'Brein J. (2018). Clinical prevalence of Lewy body dementia. *Alz Res Therapy* 10, 19.
- Kawahata I., Finkelstein D., Fukunaga K. (2022). Pathogenic Impact of α -Synuclein Phosphorylation and Its Kinases in α -Synucleinopathies. *International Journal of Molecular Sciences* 23(11), 6216.
- Kim W.S., Kågedal K., Halliday G. (2014). Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. *Alzheimer's Research & Therapy* 2014, 6:73.
- Kosova A., Khodyreva S., Lavrik O., (2017). Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in DNA repair. *Biochemistry Moscow* 82, 643–654.
- Kumar Jain N., Roy I., (2010). Trehalose and Protein Stability, *Current Protocols in Protein Science* 4.9.1-4.9.12.

- Kurz A., Double K., Lastres-Becker I., Tozzi A., Tantucci M., Bockhart V., Bonin M., Garcia-Arencibia M., Nuber S., Schlaudraff F., Liss B., Fernandez-Ruiz J., Gerlach M. (2010), A53T-Alpha-Synuclein Overexpression Impairs Dopamine Signaling and Striatal Synaptic Plasticity in Old Mice. *PloS one*.
- Lavedan Christian. (1998). The synuclein family, *Genome Research* Vol. 8, 871-880.
- Longo V.D., Shadel G.S., Kaeberlein M., Kennedy B. (2012). Replicative and Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metabolism* Vol.16,18-31
- Lopes da Fonseca T., Villar-Pique A., Fleming Outeiro T. (2015), The Interplay between Alpha-Synuclein Clearance and Spreading. *Biomolecules* 5(2), 435-471.
- Lucas H., Fernandez R. (2020), Navigating the dynamic landscape of alpha-synuclein morphology: a review of the physiologically relevant tetrameric conformation. *Neural Regeneration Research* 15(3):407
- Maroteaux L., Campanelli J.T., Scheller R.H. (1988). Synuclein: A Neuron Specific Protein Localized to the Nucleus and Presynaptic Nerve Terminal. *The Journal of Neuroscience* Vol. 8(8): 2804-2815
- Marti M., Tolosa E., Campdelacreu J. (2003). Clinical Overview of the Synucleinopathies. *Movement Disorders* Vol. 18, Suppl. 6, S21–S27.
- Nadal E., Posas F., (2022). The HOG pathway and the regulation of osmoadaptive responses in yeast. *FEMS Yeast Research*, Volume 22, Issue 1, foac013
- Nicholls C., Li H., Liu J., (2012). GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 39, 674–679
- Plourde-Owobi L, Durner S, Parrou JL, Wiczorke R, Goma G, Francois J (1999) AGT1, encoding an alpha-glucoside transporter involved in uptake and intracellular accumulation of trehalose in *Sac charomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181(12):3830 3832
- Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanasiadou A., Papapetropoulos, Johnson W.G., Kazzarini A.M., Duvoisin R.C., Di Lorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L. (1997). Mutations in the a-synuclein gene identified in families with Parkinson’s disease. *Science* Vol. 276, 2045-1047.
- Ringel AE, Ryznar R, Picariello H, Huang K-l, Lazarus AG (2013) Yeast Tdh3 (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) Is a Sir2-Interacting Factor That Regulates Transcriptional Silencing and rDNA Recombination. *PLoS Genet* 9(10): e1003871
- Ruis H., Schuller C. (1995). Stress signaling in yeast. *Bioassays* Vol. 17, No11, 959-965

- Saito H., Posas F., (2012). Response to Hyperosmotic Stress, *Genetics*, Volume 192, Issue 2, Pages 289–318
- Semenyuk P., Barinova K., Muronetz V., (2019). Glycation of α -synuclein amplifies the binding with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *International Journal of Biological Macromolecules* 127, 278-285.
- Soll L., Eisen J., Vargas K., Medeiros A., Hammar K., Morgan J., (2020). A-synuclein 112 Impairs Synaptic Vesicle Recycling Consistent With Its Enhanced Membrane Binding Properties. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Volume 8, Article 405.
- Spillantini M.G., Goedert M. (2000) The α -Synucleinopathies: Parkinson's Disease, Dementia With Lewy Bodies, And Multiple System Atrophy. *Annals New York Academy Of Sciences*, 16-27
- Stambuk BU, De Araujo PS, Panek AD, Serrano R (1996) Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 237(3):876–881
- Stefanis L. (2012). α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* Vol 4:a009399.
- Tenreiro S., Munder M.C., Alberti S., Outeiro T.F. (2013). Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. *Journal Of Neurochemistry* Vol. 127, 438–452
- Tsuchiya K., Tajima H., Kuwae T., Takeshima T., Nakano T., Tanaka M., Sunaga K., Fukuhara Y., Nakashima K., Ohama E., Mochizuki H., Mizuno Y., Katsube N., Ishitani R.,(2005). Pro-apoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes the formation of Lewy body-like inclusions. *European Journal of Neuroscience* Volume 21 Issue 2
- Van Dijk P., Colavizza D., Smet P., Thevelein J., (1995). Differential Importance of Trehalose in Stress Resistance in Fermenting and Nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 61, p. 109-115.
- Venda L., Cragg S., Buchman V., Wade-Martins R. (2010), α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends In Neuroscience* Volume 33, Issue 12p559-568.
- Whittaker H., Qui Y., Bettencourt C., Houlden H. (2017), Multiple system atrophy: Genetic risks and alpha-synuclein mutations. *F1000Research*, 6(F1000 Faculty Rev):2072
- Ζόλδερ Σπυρίδων (2021). Μεταπτυχιακή Εργασία, Ιωάννινα 2021
- Σφήκας Ευάγγελος. (2020). Διδακτορική Εργασία, Ιωάννινα 2020
- Τσαπάρα Αικατερίνη (2022), Διπλωματική Εργασία, Ιωάννινα 2022

