



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Ο ρόλος των πρωτεϊνών Hu/ELAVL στη νόσο του Parkinson.”

“The role of Hu/ELAVL proteins in Parkinson's disease.”

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

Ιωάννης Κοσμίδης

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Επαμεινώνδας Δοξάκης

ΑΘΗΝΑ 2024

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Νευροβιολογίας στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Επαμεινώνδας Δοξάκης (επιβλέπων), Ερευνητής Γ', Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Νευροβιολογίας, Κέντρο Βασικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών
- Αιμιλία Ζίφα (συνεπιβλέπων), Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευρολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Καλλιόπη Λιαδάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Επαμεινώνδας Δοξάκης
Ερευνητής Γ'

Αιμιλία Ζίφα
Επίκουρος Καθηγήτρια

Καλλιόπη Λιαδάκη
Επίκουρος Καθηγήτρια

Ιωάννης Κοσμίδης
του Αλεξάνδρου

© 2024

Ιωάννη Κοσμίδη

Απαγορεύεται η με οποιονδήποτε τρόπο, ολική ή μερική αντιγραφή του παρόντος χωρίς προηγούμενη γραπτή άδεια του συγγραφέα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1. Νόσος του Πάρκινσον	12
1.1.1. Παθολογικά χαρακτηριστικά	12
1.1.2. Γενετικό υπόβαθρο	13
1.2. α-Συνουκλεΐνη (SNCA)	14
1.2.1. Το γονίδιο της SNCA	14
1.2.2. Δομή της SNCA	15
1.2.3. Φυσιολογικός ρόλος της SNCA	16
1.2.4. Παθολογικός ρόλος της SNCA	17
1.2.5. Συσχέτιση SNCA με νόσο του Πάρκινσον	18
1.3. DYRK1A (Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A)	19
1.4. Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης	20
1.4.1. Πρωτεΐνες δέσμευσης RNA (RBPs)	20
1.4.2. Λειτουργίες των RBPs	21
1.5. Πρωτεΐνες Hu/ELAVL	24
1.5.1. Δομή των πρωτεϊνών Hu	24
1.5.2. Πρότυπα έκφρασης και υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών Hu	25
1.5.3. Φυσιολογική λειτουργία των πρωτεϊνών Hu	26
1.5.4. Μηχανισμοί δράσης των πρωτεϊνών Hu	26
1.5.5. Παθολογική λειτουργία των πρωτεϊνών Hu	29
1.6. Μηχανισμοί αποικοδόμησης πρωτεϊνών	29
1.6.1. Μονοπάτι Αυτοφαγίας-Λυσοσωμάτων (Autophagy-Lysosome Pathway, ALP)	29
1.7. Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins , HSPs)	31
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	32
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
3.1. Πειραματικά Υλικά	33
3.1.1. Κυτταρικά συστήματα	33
3.1.2. Φορείς κλωνοποίησης	33
3.1.3. Διαλύματα	36
3.1.4. Φαρμακολογικοί παράγοντες	39
3.1.5. Αντισώματα	39
3.1.6. Ζεύγη εκκινητών	40

3.2. Μέθοδοι.....	41
3.2.1. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς	41
3.2.2. Διαμόλυνση κυτταρικής σειράς.....	41
3.2.3. Δοκιμασία ανίχνευσης της βιωσιμότητας των κυττάρων και της κυτταροτοξικότητας.....	41
3.2.4. Απομόνωση RNA	43
3.2.5. Μέτρηση σταθερότητας mRNA	43
3.2.6. RT-PCR	43
3.2.7. qPCR.....	44
3.2.8. Ανοσοστύπωμα κατά Western.....	45
3.2.9. Απομόνωση πρωτεϊνών	45
3.2.10. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης	46
3.2.11. Επώαση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το πρωτογενές αντίσωμα	47
3.2.12. Επώαση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το δευτερογενές αντίσωμα και εμφάνιση εικόνας.....	47
3.2.13. Μέθοδος SUnSET	47
3.2.14. Χρήση λογισμικών προγραμμάτων	48
3.2.15. Στατιστική επεξεργασία.....	48
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	49
4.1. Επίδραση της διαμόλυνση στη βιωσιμότητα των κυττάρων και την κυτταροτοξικότητα.....	49
4.1.1. CCK-8.....	49
4.1.2. LDH	49
4.2. Επίδραση των πρωτεϊνών Hu στα επίπεδα έκφρασης των ενδογενών mRNA της ολικής SNCA, της long SNCA, του pre-mRNA της SNCA και της DYRK1A	51
4.2.1. Ολική SNCA.....	52
4.2.2. Long SNCA	52
4.2.3. Long SNCA/ολική SNCA	53
4.2.4. pre-mRNA SNCA.....	53
4.2.5. pre-mRNA SNCA/ώριμο mRNA SNCA	54
4.2.6. DYRK1A	55
4.3. Ο ρόλος των πρωτεϊνών Hu στη σταθερότητα των mRNA της ολικής SNCA, της long SNCA και της DYRK1A	55
4.3.1. Ολική SNCA.....	56
4.3.2. Long SNCA	57
4.3.3. Long SNCA/Ολική SNCA	58
4.3.4. DYRK1A	59
4.4. Επίδραση των πρωτεϊνών Hu στα επίπεδα των ενδογενών πρωτεϊνών (Hu, SNCA, DYRK1A, p62, LAMP2A και HSC70)	60

4.4.1. panHu.....	60
4.4.2. SNCA.....	62
4.4.3. DYRK1A	63
4.4.4. p62	64
4.4.5. LAMP2A	65
4.4.6. HSC70.....	66
4.5. Ο ρόλος των πρωτεϊνών Hu στη διαδικασία της μετάφρασης.....	67
4.6. Επίδραση των πρωτεϊνών Hu στην δημιουργία συσσωματωμάτων SNCA και στη φωσφορυλίωση της σερίνης 129 της SNCA.....	68
4.6.1. Συσσωματωμένη SNCA	69
4.6.2. p-SNCA	70
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	72
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θέλω να ευχαριστήσω όλους αυτούς που με βοήθησαν για την εκπόνηση της διατριβής. Αρχικά, θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέπων της διατριβής μου κ. Δοξάκη Επαμεινώνδα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την καθοδήγηση που μου έδωσε και την εμπειρία που με βοήθησε να αποκτήσω μέσα στο εργαστήριο. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω την συνεπιβλέπουσα Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας κ. Αιμιλία Ζίφα και την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας κ. Καλλίοπη Λιαδάκη για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή της Πτυχιακής μου Εργασίας. Στη συνέχεια, θέλω να ευχαριστήσω τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Φαίδων-Γιασίν Καττάν και την υποψήφια διδάκτορα Μαριάννα Νάκη, για την άριστη συνεργασία μας, την πολύτιμη βοήθεια τους και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, για τη βοήθεια τους, καθώς και τα άτομα του προσωπικού μου περιβάλλοντος που με στήριξαν για να ολοκληρώσω αυτή την εργασία.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αφιερώνεται στην οικογένεια μου και τη Σοφία, για την υποστήριξη και την αγάπη που μου δίνουν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος του Πάρκινσον (Parkinson's disease, vΠ) αποτελεί τη δεύτερη πιο κοινή εκφυλιστική διαταραχή του νευρικού συστήματος. Τα κύρια χαρακτηριστικά της είναι η απώλεια των νευρικών κυττάρων, που βρίσκονται στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου (substantia nigra pars compacta, SNpc), και η δημιουργία σωματίων Lewy (Lewy bodies, LBs), τα οποία αποτελούνται κυρίως από αδιάλυτες μορφές της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης (SNCA). Σημειακές μεταλλάξεις, και διπλασιασμοί ή τριπλασιασμοί του γενετικού τόπου της SNCA έχουν βρεθεί σε ασθενείς με αυτή τη νόσο, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η SNCA παίζει σημαντικό ρόλο στη vΠ.

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς τα επίπεδα των mRNA και τα επίπεδα των πρωτεϊνών μπορούν να ρυθμιστούν σε διάφορα στάδια της γονιδιακής έκφρασης. Οι πρωτεΐνες δέσμευσης RNA (RNA-Binding proteins, RBPs), όπως οι πρωτεΐνες Hu, έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την εναλλακτική συρραφή των πρόδρομων mRNAs (pre-mRNAs), την πολυαδενυλίωση των mRNAs, τη σταθερότητα ή την αποικοδόμηση τους, τη μεταφορά τους και τη μετάφραση τους.

Επομένως, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του τρόπου ρύθμισης του mRNA της SNCA, της σταθερότητάς του, των πρωτεϊνικών επιπέδων της, της μετάφρασης του ολικού πρωτεώματος και της αποικοδόμησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της από τις πρωτεΐνες Hu, σε συνθήκες υπερέκφρασης και αποσιώπησής τους. Στη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήσαμε πλασμίδια για την υπερέκφραση της ανθρώπινης HuR (hsHuR) και των πρωτεϊνών HuB, HuC και HuD του ποντικού και πλασμίδια για την αποσιώπηση της HuR (shRNA για HuR). Επίσης, ελέγχθηκε ο τρόπος επίδρασης των Hu, όταν υπερεκφράζονται ή όταν γίνεται αποσιώπηση τους, στην πρωτεϊνική συσσώματωση της SNCA και στη φωσφορυλίωση της (p-SNCA στη ser-129). Τέλος, ελέγχθηκε ο τρόπος ρύθμισης του mRNA της κινάσης DYRK1A, της σταθερότητας του, των πρωτεϊνικών επιπέδων της και της αποικοδόμησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της, κατά την υπερέκφραση ή αποσιώπηση των πρωτεϊνών Hu, καθώς αλλαγές στα επίπεδα της πιθανόν να οδηγούν σε αλλαγές στη φωσφορυλίωση και να επηρεάζουν τα επίπεδα της p-SNCA (ser-129).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση των πρωτεϊνών HuB, HuC και HuD επηρέασε τα επίπεδα mRNA της SNCA. Συγκεκριμένα, η HuB αύξησε την ολική SNCA (~290-2550 νουκλεοτίδια στην 3'UTR), η HuC αύξησε την long SNCA (~2552 νουκλεοτίδια στην 3'UTR), και, τέλος, η HuC και η HuD αύξησαν τον λόγο long SNCA/ολική SNCA. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι κάποιες πρωτεΐνες Hu επιδρούν στο στάδιο της μεταγραφής

ή/και της μετάφρασης και της πολυαδενυλίωσης. Επίσης, αποσιώπηση της HuR οδήγησε σε μείωση του pre-mRNA της SNCA και του λόγου pre-mRNA SNCA/ώριμο mRNA SNCA, αποτέλεσμα που, πιθανόν, δείχνει ότι η αναστολή της έκφρασης της HuR ενισχύει την ωρίμανση της SNCA. Τέλος, τα επίπεδα του mRNA της DYRK1A μειώθηκαν, κατά την υπερέκφραση των hsHuR, HuC και HuD.

Η σταθερότητα (ή ο ρυθμός αποικοδόμησης) των mRNA της ολικής SNCA, της long SNCA και της DYRK1A, δεν επηρεάστηκε από την υπερέκφραση ή την αποσιώπηση των πρωτεϊνών Hu. Ακόμη, δεν βρέθηκε κάποια επίδραση στον λόγο long SNCA/ολική SNCA.

Σχετικά με τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SNCA βρέθηκε ότι η υπερέκφραση των hsHuR, HuR, HuC και HuD μειώνει τα επίπεδα της SNCA, ενώ η αποσιώπηση της HuR αυξάνει τα επίπεδα της. Επιπλέον, η HuC και η HuD μειώνουν τα επίπεδα της DYRK1A. Οι μειώσεις αυτές πιθανόν να οφείλονται σε αύξηση του ρυθμού αποικοδόμησης ή σε μείωση του ρυθμού μετάφρασης. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική επίδραση κάποιων Hu στις πρωτεΐνες p62 και HSC70, οι οποίες συμμετέχουν στην αυτοφαγία. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η p62 μειώνεται όταν υπερεκφράζονται η hsHuR, η HuR και η HuC, ενώ η HSC70 αυξάνεται στη hsHuR. Τα αποτελέσματα των πρωτεϊνών p62 και HSC70 υποδεικνύουν ότι ίσως η hsHuR, η HuR και η HuC ενισχύουν το μονοπάτι της μακροαυτοφαγίας, ενώ η hsHuR, πιθανόν, ενισχύει και την αυτοφαγία με τη μεσολάβηση συνοδών πρωτεϊνών (Chaperone-mediated autophagy, CMA). Τέλος, δεν βρέθηκε καμία επίδραση στον υποδοχέα LAMP2A, η οποία καθορίζει τον ρυθμό αυτοφαγίας με CMA.

Ο ρυθμός μετάφρασης του πρωτεώματος φαίνεται να επηρεάζεται από όλες τις πρωτεΐνες Hu. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν υπερεκφράζονται η hsHuR, η HuR, η HuC και η HuD ο ρυθμός μετάφρασης μειώνεται, ενώ όταν υπερεκφράζεται η HuB ο ρυθμός μετάφρασης αυξάνεται. Υπερέκφραση της HuB οδήγησε και σε αύξηση της συσσωματωμένης SNCA. Επομένως, η HuB, ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία συσσωματωμάτων SNCA, καθώς ενισχύει τη μεταγραφή της ολικής SNCA και τη μετάφραση του ολικού πρωτεώματος. Επιπλέον, βρέθηκε σημαντική μείωση της αναλογίας της φωσφορυλιωμένης SNCA στη ser-129 (p-SNCA)/μονομερή SNCA στις υπερεκφρασμένες hsHuR, HuR, HuC και HuD, αποτέλεσμα που δείχνει ότι, πιθανόν, αυτές οι Hu να μειώνουν την τοξικότητα που προκαλεί η SNCA.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα αυτά παρέχουν νέες γνώσεις για τους μοριακούς μηχανισμούς της νΠ και μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη καινοτόμων στρατηγικών θεραπείας, που στοχεύουν τις πρωτεΐνες Hu για τη ρύθμιση της έκφρασης και της συσσώρευσης της SNCA.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder of the nervous system. The main features are the loss of nerve cells in the substantia nigra pars compacta (SNpc), and the formation of Lewy bodies (LBs). LBs mainly comprise insoluble forms of the protein α -synuclein (SNCA). Point mutations and duplications or triplications of the SNCA genetic locus have been found in patients with this disease. These pieces of evidence lead to the conclusion that SNCA plays an important role in PD.

In eukaryotes, mRNA levels and protein levels can be regulated at various stages of gene expression. RNA-binding proteins (RBPs), such as Hu proteins, can regulate alternative splicing of mRNA precursors (pre-mRNA) and polyadenylation of mRNAs. Additionally, RBPs can regulate mRNA stability or degradation, their transport, and, finally, their translation.

The present study aimed to investigate the effects of Hu proteins, under conditions of overexpression and knockdown, on SNCA mRNA, stability, and protein levels, as well as the translation of the whole proteome and the degradation of SNCA protein levels. This study used plasmids to either overexpress human HuR (hsHuR) and mouse HuR, HuB, HuC, and HuD proteins or knockdown HuR (shRNA of HuR). We also tested the effects of Hu proteins when overexpressed or silenced, on the protein aggregation of SNCA and its phosphorylation (p-SNCA on ser-129). Finally, we tested the regulation of DYRK1A mRNA, stability, protein levels, and the degradation of DYRK1A protein levels, upon overexpression or knockdown of Hu proteins, as changes in DYRK1A protein levels are likely to lead to changes in phosphorylation and affect the levels of p-SNCA (ser-129).

The results showed that HuB, HuC and HuD overexpression affected SNCA mRNA levels. Specifically, HuB increased total SNCA (~290-2550 nucleotides in the 3'UTR) and HuC increased long SNCA (~2552 nucleotides in the 3'UTR) transcripts. Also, HuC and HuD increased the long SNCA/total SNCA ratio. These results indicate that some Hu proteins affect the transcription and/or translation and alternative polyadenylation. Additionally, HuR knockdown decreased the SNCA pre-mRNA and the ratio of pre-mRNA/total mature SNCA. These results possibly indicate that inhibition of HuR expression enhances SNCA maturation. Finally, DYRK1A mRNA levels were decreased upon overexpression of hsHuR, HuC, and HuD.

The stability (or degradation rate) of total SNCA, long SNCA, and DYRK1A mRNAs was not affected by overexpression or knockdown of Hu proteins. Furthermore, no effect was found on the long SNCA/total SNCA ratio.

Regarding the SNCA protein levels, hsHuR, HuR, HuC and HuD overexpression decrease the SNCA levels, whereas knockdown HuR increases SNCA levels. In addition, HuC and HuD decreased the levels of DYRK1A. These decreases are likely due to an increase in the degradation rate or a reduction in the translation rate. The results showed a significant effect of some Hu on p62 and HSC70 proteins, which are involved in autophagy. Specifically, p62 decreased when hsHuR, HuR and HuC were overexpressed, while HSC70 increased only with hsHuR. The results indicate that hsHuR, HuR, and HuC may enhance the macroautophagy pathway, while hsHuR probably enhances chaperone-mediated autophagy (CMA). Finally, LAMP2A protein levels were not affected by overexpression or knockdown of Hu proteins. LAMP2A is a receptor on the surface of lysosomes that determines the rate of autophagy by CMA.

The translation rate of the proteome was affected by all Hu proteins. The results showed that the translation rate decreased when hsHuR, HuR, HuC, and HuD were overexpressed. However, HuB was overexpressed, the translation rate increased. Also, HuB overexpression increased aggregated SNCA. HuB, therefore, may play an important role in SNCA aggregate formation, as it enhances transcription of total SNCA and translation of the total proteome. In addition, a significant decrease in the ratio of phosphorylated SNCA at Ser-129 (p-SNCA) to monomeric SNCA was found in overexpressed hsHuR, HuR, HuC, and HuD, a result indicating that, possibly, these Hu proteins reduce SNCA-induced toxicity. Finally, a correlation between DYRK1A levels and p-SNCA was found, as a decrease in DYRK1A levels led to a reduction in p-SNCA levels.

In conclusion, these findings provide new insights into PD's molecular mechanisms and may contribute to developing innovative treatment strategies targeting Hu proteins to modulate SNCA expression and aggregation.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Νόσος του Πάρκινσον

Η νόσος του Πάρκινσον (Parkinson Disease, νΠ) είναι η δεύτερη πιο κοινή νευροεκφυλιστική διαταραχή (Poewe et al. 2017). Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι η νΠ επηρεάζει το 2-3% του πληθυσμού, ηλικίας 60-65 ετών και άνω (Poewe et al. 2017· Jankovic 2008). Τα κύρια κινητικά συμπτώματα της νΠ είναι ο τρόμος, η ακαμψία, η βραδυκίνησια-ακίνησια και η αστάθεια. Ωστόσο, οι ασθενείς εμφανίζουν και μη κινητικά συμπτώματα (Poewe et al. 2017), όπως διαταραχές στην όσφρηση, στον ύπνο, στο αυτόνομο νευρικό σύστημα, καθώς, και ήπιας μορφής κατάθλιψη (Jankovic 2008).

Οι υπάρχουσες θεραπείες επιβραδύνουν την εκδήλωση των κινητικών συμπτωμάτων, αλλά δεν αναστέλλουν την εξέλιξη του νευροεκφυλισμού και, κατά συνέπεια, την εξέλιξη της νόσου (Balestrino and Schapira 2020). Οι περισσότερες θεραπείες στοχεύουν στην αύξηση της ντοπαμίνης στον εγκέφαλο, με υποκατάσταση της με λεβαντόπα (Lim and Zhang 2013). Η λεβαντόπα είναι ένα πρόδρομο μόριο της ντοπαμίνης και χρησιμοποιείται γιατί έχει την ικανότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, να εισέρχεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και, μέσω του ενζύμου L-αμινοξική αποκαρβοξυλάση, να μετατρέπεται σε ντοπαμίνη (Barbeau 1969, Lane 2019).

1.1.1. Παθολογικά χαρακτηριστικά

Το κύριο χαρακτηριστικό της νΠ είναι η απώλεια νευρικών κυττάρων, που βρίσκονται στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου (substantia nigra pars compacta, SNpc). Τα κύτταρα αυτά παράγουν τον νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη με αποτέλεσμα η απώλεια τους να οδηγεί στην διατάραξη της νευροδιαβίβασης κατά μήκος της μελαιοραβδωτής οδού (Jankovic 2008).

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της νΠ είναι η δημιουργία σωματίων Lewy (Lewy bodies, LBs). Τα LBs είναι κυτταροπλασματικά έγκλειστα, τα οποία εντοπίζονται στους εναπομείναντες νευρώνες της μέλαινας ουσίας και αποτελούνται από μη διαλυτές μορφές της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης (SNCA) (Spillantini et al. 1998· Wakabayashi et al. 2013). Τα LBs, εκτός της συμπαγής μοίρας της μέλαινας ουσίας, εντοπίζονται και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου, όπως στον υπομέλαινα τόπο (locus coeruleus), στο ραχιαίο κινητικό πυρήνα (dorsal motor nucleus), στον οσφρητικό βολβό (olfactory bulb), στους συμπαθητικούς και στους παρασυμπαθητικούς μεταγαγγλιακούς νευρώνες (parasympathetic και sympathetic post-ganglionic neurons), στην αμυγδαλή (amygdaloid nucleus) και, τέλος, στον εγκεφαλικό φλοιό (cerebral cortex) (Jellinger et al. 2012· Wakabayashi et al. 2013).

1.1.2. Γενετικό υπόβαθρο

Σημειακές μεταλλάξεις στον γενετικό τόπο της SNCA, όπως οι A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E, A60E και A53T (Kattan et al. 2023· Kruger et al. 1998· Lesage et al. 2013· Pasanen et al. 2014· Proulakis et al. 2013· Oliveira et al. 2021· Zarranz et al. 2004) έχουν βρεθεί σε ασθενείς με αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα της νόσου. Επίσης, διπλασιασμοί και τριπλασιασμοί του γενετικού τόπου της SNCA έχουν βρεθεί σε ασθενείς με αυτήν τη νόσο. Αυτοί οι διπλασιασμοί και οι τριπλασιασμοί μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση των επιπέδων του αγρίου τύπου SNCA, με αποτέλεσμα η SNCA να εμφανίζει μειωμένη διαλυτότητα και να δημιουργούνται αδιάλυτα συσσωματώματα (Cascella et al. 2022· Kurz et al. 2010· Oliveira et al. 2021· Singleton et al. 2003).

Εκτός της SNCA, υπάρχουν κι άλλα γονίδια που σχετίζονται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονόμησης της νόσου. Τα γονίδια αυτά είναι το UCHL1 και το LRRK2, των οποίων οι πρωτεΐνες συμμετέχουν σε οδούς αποικοδόμησης των πρωτεϊνών, όπως στο μονοπάτι ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος και στην αυτοφαγία (Lecker et al. 2006· Li, Tan and Yu 2014). Σε παθολογικές καταστάσεις έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη LRRK2, όπως και η SNCA, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη LAMP2A, εμποδίζοντας την τελευταία να μετατοπιστεί κατά μήκος της λυσοσωματικής μεμβράνης (Orenstein et al. 2013). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αναστέλλεται ο ρυθμός της αυτοφαγίας με τη μεσολάβηση συνοδών πρωτεϊνών (Chaperone-mediated autophagy, CMA) και να εμποδίζεται η πρόσβαση άλλων υποστρωμάτων CMA στο λυσοσωμικό αυλό (Cuervo et al. 2004· Orenstein et al. 2013).

Τέλος, υπάρχουν γονίδια που σχετίζονται με τον υπολειπόμενο τύπο κληρονόμησης. Αυτά τα γονίδια είναι το Parkin/PRKN, το PINK1, το FBXO7 και το DJ-1/PARK7, των οποίων οι πρωτεΐνες εμπλέκονται στη λειτουργία των μιτοχονδρίων, στο οξειδωτικό στρες, στην ουβικιτινίωση, στο μεταβολισμό των λιπιδίων και στην ανακύκλωση των συναπτικών κυστιδίων (Gasser 2009). Το οξειδωτικό στρες, σύμφωνα με μελέτες, επιδρά στις πρωτεΐνες, οδηγώντας σε λανθασμένη αναδίπλωση τους, δημιουργία συσσωματωμάτων και, τέλος, σε νευροεκφυλισμό. Επίσης, αποσιώπηση της Parkin μπορεί να οδηγήσει σε εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Dexter and Jenner 2013· Gautier, Kitada and Shen 2008). Ο νευροεκφυλισμός, με τη σειρά του, επηρεάζει τους μηχανισμούς αποικοδόμησης των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται μεταξύ άλλων και η SNCA (Vekrellis and Stefanis 2012).

1.2. α-Συνουκλεΐνη (SNCA)

Η α-συνουκλεΐνη (SNCA), μαζί με τη β-συνουκλεΐνη και τη γ-συνουκλεΐνη, αποτελούν την οικογένεια των συνουκλεΐνων. Ο ρόλος της SNCA δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως, ωστόσο είναι γνωστό ότι είναι μία νευρωνική πρωτεΐνη, η οποία βρίσκεται στα προσυναπτικά άκρα των νευρώνων, σε ποσοστό έως και το 1% των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, και εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκκρισης των συναπτικών κυστιδίων μέσω αλληλεπίδρασης με το σύμπλοκο SNARE (Gao et al 2023· Maroteaux, Campanelli and Scheller 1988· Stefanis 2012). Η SNCA είναι το κύριο συστατικό των LBs, χαρακτηριστικό το οποίο εμφανίζεται στη νΠ και σε άλλα νευρογλοιακά κυτταροπλασματικά έγκλειστα (Chartier-Harlin et al. 2004· Polymeropoulos et al. 1997· Singleton et al. 2003).

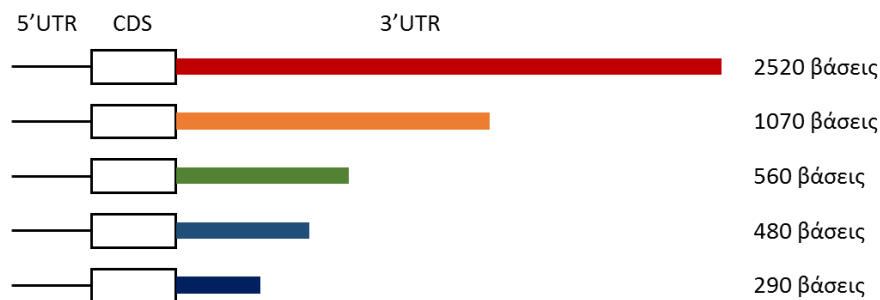
1.2.1. Το γονίδιο της SNCA

Το γονίδιο της SNCA βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4 και, συγκεκριμένα, στη θέση 4q22.1 του μακρού βραχίονα. Το γονίδιο της αποτελείται από 6 εξόνια και μέσω της εναλλακτικής συρραφής μπορούν να προκύψουν 4 διαφορετικά μετάγραφα (mRNA). Τα μετάγραφα αυτά αποτελούνται από 140, 126, 112 και 98 αμινοξέα (McLean et al 2012). Το μετάγραφο με τα 126 αμινοξέα προκύπτει από την παράλειψη του εξωνίου 3, το μετάγραφο με τα 112 αμινοξέα προκύπτει από την παράλειψη του 5, ενώ το μετάγραφο με τα 98 αμινοξέα προκύπτει από την παράλειψη και των 2 εξονίων (εξόνια 3-5) (εικόνα 1).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του πλήρους μεταγράφου της SNCA και των τριών παραλλαγών που προκύπτουν από την παράλειψη συγκεκριμένων εξονίων (εξόνιο 3, εξόνιο 5 και εξόνια 3 και 5). Προσαρμογή εικόνας από McLean et al. 2012.

Εκτός των παραπάνω τεσσάρων μεταγράφων, το γονίδιο της SNCA, μέσω του μηχανισμού της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης, είναι ικανό να παράγει μετάγραφο με πολλά διαφορετικά μήκη στο 3' αμετάφραστο άκρο (3' untranslated region, 3'UTR). Τα μετάγραφα αυτά έχουν 290, 480, 575, 1074 και 2530 βάσεις στο 3'UTR (εικόνα 2) (Marchese et al. 2017) και βρίσκονται σε διαφορετικές αναλογίες στους ασθενείς με νΠ σε σχέση με τα υγιή άτομα (Rhinn et al. 2012).

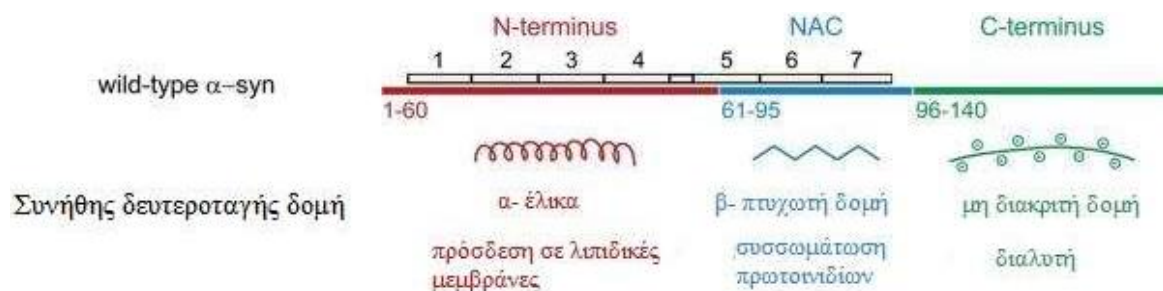


Εικόνα 2. Μετάγραφα της SNCA με διαφορετικά μήκη στο 3'UTR (προσαρμογή από Marchese et al. 2017)

1.2.2. Δομή της SNCA

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (παράγραφος 1.2.1), η κύρια μορφή της SNCA αποτελείται από 140 αμινοξέα. Η αμινοτελική περιοχή της είναι άκρως συντηρημένη, με μεταβλητό αριθμό επαναλήψεων 11 βάσεων, ενώ η καρβοξυτελική περιοχή της είναι λιγότερο συντηρημένη, με υπερίσχυση των όξινων καταλοίπων (Gao et al. 2023· Villar-Pique, Fonseca and Outeiro 2016). Η SNCA δεν έχει αυστηρή δευτεροταγή δομή, γι' αυτό και η λειτουργικότητά της εξαρτάται από μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η φωσφορυλίωση, η διάσπαση, η νίτρωση και η ουβικιτινίωση. Συγκεκριμένα, αποτελείται από 3 περιοχές (εικόνα 3):

- ένα αμφιπαθές αμινοτελικό άκρο (αμινοξικά κατάλοιπα 1-60), το οποίο περιέχει μία επαναλαμβανόμενη αμφιπαθή αλληλουχία, υπεύθυνη για την δέσμευση με λιπίδια, και, πιθανόν, προσδίδει την τάση για την δημιουργία δομών α-έλικας,
- μία ενδιάμεση υδρόφοβη περιοχή (κατάλοιπα 61-95), αναφερόμενη ως NAC (non-amyloid beta component), η οποία εμπλέκεται στη συσσωμάτωση της SNCA και έχει την τάση διαμόρφωσης β-πτυχωτής δομής (γνωστή ως μη-Αβ αμυλοειδές συστατικό των πλακών της νΠ) και
- ένα αρνητικά φορτισμένο καρβοξυτελικό άκρο με κατάλοιπα προλίνης (κατάλοιπα 96-140), το οποίο προσδίδει ευελιξία στη SNCA, με αποτέλεσμα να μην έχει καθορισμένη δομή (Vamvaca, Volles and Lansbury 2009· Villar-Pique, Fonseca and Outeiro 2016).



Εικόνα 3. Δευτεροταγής δομή της SNCA. Παρουσιάζεται το μήκος, η δομή και η λειτουργία των τριών περιοχών της SNCA (προσαρμογή από Vamvaca et al. 2009).

1.2.3. Φυσιολογικός ρόλος της SNCA

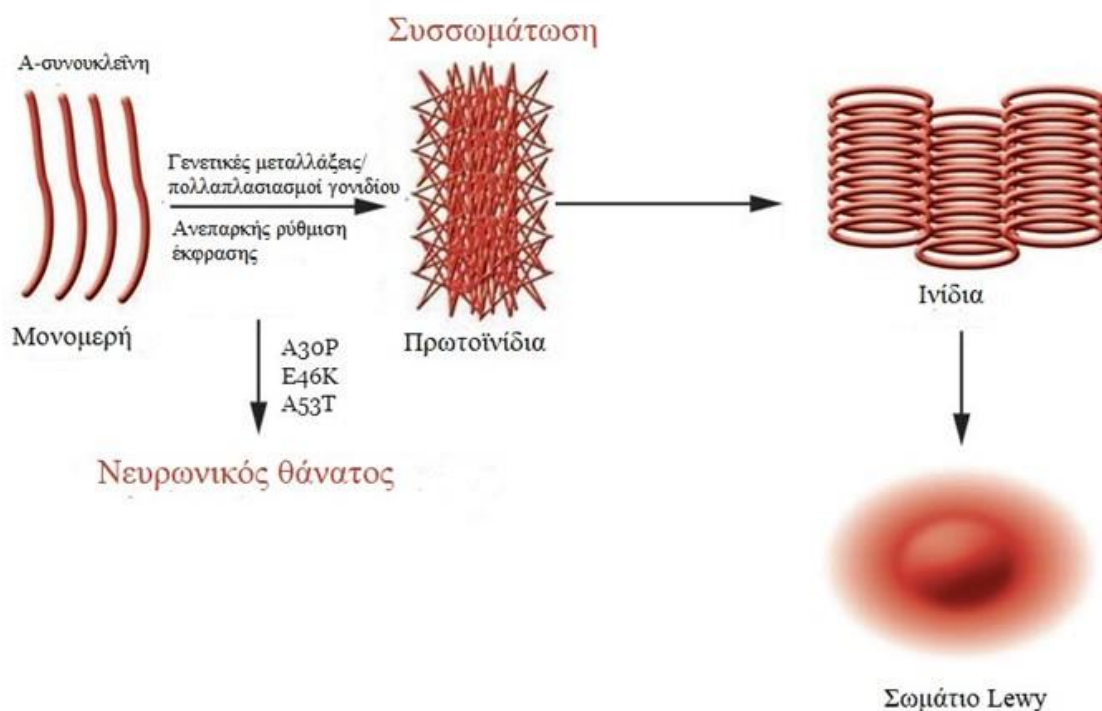
Σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας που έχουν γίνει με αντισώματα σε υγιείς εγκεφάλους, έχει βρεθεί ότι η SNCA εκφράζεται κυρίως στα προσυναπτικά άκρα και λιγότερο στο σώμα των νευρικών κυττάρων (Gao et al. 2023· Kahle 2008· Kurz et al. 2010). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η SNCA αυξάνεται, κατά τη γήρανση, στους νευρώνες της μέλαινας ουσίας (Chu and Kordower 2007). Τέλος, η έκφραση της φαίνεται ότι επάγεται κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Ωστόσο, σε συνθήκες που μεταβάλλεται η πλαστικότητα του νευρικού συστήματος ή σε συνθήκες φλεγμονής γίνεται διαφορετική ρύθμιση των επιπέδων της. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω δεδομένων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα (in-vivo και in-vitro), όπου έγινε υπερέκφραση ή αποσιώπηση της SNCA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχαν αλλαγές στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών και, επομένως, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η SNCA μπορεί να επηρεάσει τη συναπτική διαβίβαση (Abeliovich et al. 2000· Kholodilov et al. 1999· Kurz et al. 2010· Murphy et al. 2000). Συγκεκριμένα, ο ρόλος της SNCA, πιθανόν να είναι, η αρνητική ρύθμιση της νευροδιαβίβασης. Το συμπέρασμα αυτό βγήκε από το γεγονός ότι στους μύες όπου δεν εκφραζόταν η SNCA, υπήρχε αυξημένη απελευθέρωση της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα (Abeliovich et al. 2000· Kurz et al. 2010· Zaltieri et al. 2015). Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι η SNCA αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της δυναμικής των συναπτικών κυστιδίων κατά τη μεταβίβαση του σήματος και, ίσως, συμμετέχει στη βιογένεση των συναπτικών κυστιδίων λόγω επίδρασης της στον μεταβολισμό του φωσφαδιτικού οξέος (Murphy et al. 2000· Kurz et al. 2010· Zaltieri et al. 2015). Από την άλλη, είναι πιθανό η SNCA να δρα ως συνοδός πρωτεΐνη με την CSP-α (Cystein-string protein), κατά τη δημιουργία του συμπλόκου SNARE. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στη δέσμευση του καρβοξυτελικού άκρου της SNCA στη synaptobrevin-2 (VAMP-2) και στην απελευθέρωση των συναπτικών κυστιδίων. Επομένως, η κύρια λειτουργία της SNCA φαίνεται να είναι ο έλεγχος της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών μέσω δράσης της στο σύμπλοκο SNARE (Burre et al. 2010· Kattan et al 2023).

Τέλος, η SNCA, φυσιολογικά εκφράζεται και σε άλλα κύτταρα εκτός των νευρικών, όπως τα ερυθροκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Ωστόσο δεν έχει γίνει ακόμα γνωστή η λειτουργία της σ' αυτά τα κύτταρα (Barbour et al. 2008).

1.2.4. Παθολογικός ρόλος της SNCA

Έχει βρεθεί ότι η SNCA είναι το κύριο συστατικό των LBs και των νευριτών Lewy (LNs) (Spillantini et al. 1998· Xilouri, Brekk and Stefanis 2016). Τα LBs και οι LNs είναι πρωτεϊνικά ενδοκυτταρικά έγκλειστα, τα οποία είναι χαρακτηριστικά γνωρίσματα της νΠ και της άνοιας με σωμάτια Lewy (DLB) (Spillantini et al. 1998· Kattan et al. 2023). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η SNCA σχετίζεται και με άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως η ατροφία πολλαπλών συστημάτων (MSA), ο εκφυλισμός παρουσία σιδήρου στον εγκέφαλο αλλά και με νόσους, που είναι γνωστές ως α-συνουκλεϊνοπάθειες (Kahle 2008· Kattan et al. 2023· Koukouraki and Doxakis 2016).

Σε παθολογικές καταστάσεις (γενετικές μεταλλάξεις, πολλαπλασιασμός γονιδίου ή ανεπαρκής ρύθμιση έκφρασης) τα μονομερή SNCA αναδιπλώνονται λανθασμένα δημιουργώντας ολιγομερή. Αυτά τα ολιγομερή συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα, ενώνονται μεταξύ τους, σχηματίζουν τα τοξικά πρωτοινίδια και, τέλος, τα αδιάλυτα ινίδια, τα οποία είναι το συστατικό των LBs (Giasson et al 1999· Savitt, Dawson and Dawson 2006· Spillantini et al. 1998). Η παραπάνω διαδικασία παρουσιάζεται στην **εικόνα 4**.



Εικόνα 4. Στάδια μετατροπή της μονομερής SNCA σε σωμάτιο Lewy (προσαρμογή από Savitt, Dawson and Dawson 2006).

Τα LBs περιέχουν κατά 90% SNCA, η οποία είναι φωσφορυλιωμένη (p-SNCA) στο κατάλοιπο σερίνη-129 (Ser-129), ενώ οι εγκέφαλοι υγιών ατόμων περιέχουν μόνο ~4%. Βάσει αυτού, συμπεραίνεται ότι η p-SNCA (Ser-129) έχει την ικανότητα να προάγει την

αύξηση των ολιγομερών SNCA, να επιταχύνει τον σχηματισμό συσσωματωμάτων SNCA και να οδηγεί σε νευρικό εκφυλισμό και νευρωνικό θάνατο (Rieger et al. 2011· Sugeno et al. 2008). Ωστόσο, υπάρχουν και έρευνες που αναφέρουν ότι η έκφραση της p-SNCA (ser 129) σε διαγονιδιακά ποντίκια δεν οδηγεί στη δημιουργία συσσωματωμάτων, αποτέλεσμα αντίθετο με αυτά που αναφέρονται παραπάνω (Escobar et al. 2014). Τέλος, έρευνα που έγινε σε zebrafish αναφέρει ότι η SNCA, πιθανόν, φωσφορυλιώνεται λόγω αύξηση τη συγκέντρωσης της και ότι η συσσωμάτωση της δεν σχετίζεται με την φωσφορυλίωση της ser-129 (Weston et al. 2021). Η φωσφορυλίωση της p-SNCA (ser-129) επιτυγχάνεται μέσω κυρίως των πρωτεϊνικών κινάσων polo-like (polo-like kinases, PLKs) και συγκεκριμένα μέσω της PLK2 (Bergeron et al. 2014· Kofoed et al. 2017).

1.2.5. Συσχέτιση SNCA με νόσο του Πάρκινσον

Έρευνες αναφέρουν ότι ασθενείς με νΠ έχουν αυξημένα επίπεδα SNCA με πολυμορφισμούς στο 3'UTR (Sotiriou et al. 2009). Βάσει αυτού του αποτελέσματος, αλλά και αυτών που έχουν αναφερθεί παραπάνω (παράγραφοι 1.1.2 και 1.2.4), αποδεικνύεται ότι τα αυξημένα επίπεδα SNCA σχετίζονται με προδιάθεση για νΠ και άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους. Επίσης, φαίνεται ότι τα LBs παίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό εκφυλισμό (Vekrellis and Stefanis 2012), αν και υπάρχουν έρευνες που αναφέρουν πως ίσως έχουν προστατευτικό ρόλο, απομονώνοντας τα επιβλαβή μόρια από το κυτταρόπλασμα (Chartier and Duyckaerts 2017).

Παρόλο που υπάρχουν αυτά τα δεδομένα, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως τα στοιχεία που αποδεικνύουν την καθολική αύξηση της SNCA στους εγκεφάλους ασθενών με νΠ δεν είναι επαρκή. Μελέτες in vitro έχουν δείξει πως η έκφραση της μεταλλαγμένης SNCA, πιθανόν ευαισθητοποιεί τους νευρώνες σε τοξικές προκλήσεις. Επίσης, η υπερέκφραση της φυσιολογικής ή μεταλλαγμένης SNCA, σε νευρικά κύτταρα τρωκτικών και μη ανθρώπινων πρωτευόντων, οδηγεί σε προοδευτική κινητική δυσλειτουργία, αντίστοιχη με τα κινητικά συμπτώματα ασθενών με νΠ (Kirik et al. 2002· Lo Bianco et al. 2002· Oliveras-Salva et al. 2013). Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες με διαφορετικά αποτελέσματα, όπως των Dachsel και συν. (2007), που αναφέρουν ότι ασθενείς με νΠ εμφανίζουν μείωση της έκφρασης του mRNA της SNCA στους νευρώνες της μέλαινας ουσίας. Από αυτές τις μελέτες, φαίνεται ότι τα επίπεδα της SNCA δεν αυξάνονται γενικά σε όλους τους ασθενείς, αλλά, κυρίως, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει αύξηση της σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου (μέλαινα ουσία) και αύξηση των αδιάλυτων συστατικών της, συμπεριλαμβανομένων των μονομερών και ολιγομερών μορφών (Tong et al. 2010). Ακόμη, υπάρχουν έρευνες που ενισχύουν την υπόθεση της διακυτταρικής μεταφοράς των τοξικών μορφών της SNCA από πάσχοντα

εγκεφαλικά κύτταρα σε υγιή εγκεφαλικά κύτταρα. Η μεταφορά αυτή οδηγεί στη μετάδοση της νόσου και στα υπόλοιπα κύτταρα (Angot et al. 2012).

Τέλος, έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση της SNCA επάγει την έκκριση της στα νευρικά κύτταρα (Lee 2008). Γι' αυτό τον λόγο, πολλές έρευνες έχουν ασχοληθεί με τους μηχανισμούς αποικοδόμησής της, χωρίς όμως να έχουν καταλήξει σε κάποιο γενικό συμπέρασμα. Οι πιθανοί μηχανισμοί αποικοδόμησης της SNCA είναι η αποικοδόμηση μέσω πρωτεασώματος, μέσω αυτοφαγίας CMA και μακροαυτοφαγίας στα λυσοσώματα (Cuervo et al. 2004· Ebrahimi-Fakhari et al. 2011· Vogiatzi et al. 2008). Οι μηχανισμοί αυτοί φαίνεται ότι επηρεάζονται από τις συνουκλείνοπάθειες. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί μείωση διαφόρων λυσοσωμικών δεικτών σε νευρώνες της μέλαινας ουσίας και αναστολή της αυτοφαγίας με CMA, λόγω σύνδεσης της μεταλλαγμένης SNCA στη LAMP2A, ενός υποδοχέα του λυσοσώματος (Chu et al. 2009· Oliveira et al. 2021) και λόγω διαταραχής της αλληλεπίδρασης HSC70-LAMP2A από τη μεταλλαγμένη SNCA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω συσσώρευση SNCA που οδηγεί σε περαιτέρω διαταραχή των συστημάτων αποικοδόμησης των πρωτεϊνών (Cuervo et al. 2004· Oliveira et al 2021· Xilouri et al. 2009). Επομένως, βάσει αυτών των ερευνών προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αναστολή της έκφρασης της SNCA και, γενικά η ρύθμιση των επιπέδων της, μπορεί να οδηγήσει σε έλεγχο των συμπτωμάτων που σχετίζονται με τη νΠ και άλλες συνουκλείνοπάθειες.

1.3. DYRK1A (Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A)

Η DYRK1A είναι μία κινάση, η οποία καταλύει τη φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης, αλλά μπορεί, επίσης, να αυτοφωσφορυλιωθεί και σε κατάλοιπα τυροσίνης. Μαζί με τις DYRK1B, DYRK2, DYRK3 και DYRK4 αποτελούν την υποοικογένεια DYRK. Η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει διάφορες κυτταρικές διεργασίες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του εγκεφάλου, από την εμβρυογένεση έως την γήρανση (Arbones et al. 2019). Το γονίδιο της DYRK1A βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21 και, συγκεκριμένα, στη θέση 21q22.2. Αποτελείται από 15 εξώνια και κωδικοποιεί δύο πρωτεϊνικές ισομορφές με 763 και 754 αμινοξέα, ενώ το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης βρίσκεται στη μέση της αμινοξικής της αλληλουχίας (Arbones et al. 2019).

Γενετικές αλλαγές της DYRK1A σχετίζονται με νοητική υστέρηση, σύνδρομο Down, αλλά και με νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως η νόσος Αλτσχάιμερ και η νΠ. Στις νευροεκφυλιστικές νόσους, τα επίπεδα της DYRK1A φαίνεται ότι απορρυθμίζονται και, πιθανόν, γίνονται αλλαγές στη φωσφορυλίωση. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη αυτή έχει την ικανότητα να φωσφορυλιώνει την SNCA στη ser-87, ωστόσο δεν είναι σαφές ακόμα αν

μπορεί να φωσφορυλιώσει την ser-129 (Arbones et al. 2019), μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που ίσως ευθύνεται για τη δημιουργία συσσωματωμάτων SNCA (Rieker et al. 2011). Οι Yong και συν. (2023), σύμφωνα με πειράματα που πραγματοποίησαν, βρήκαν ότι αποσιώπηση του γονιδίου της DYRK1A μειώνει την έκφραση της p-SNCA (ser-129), επομένως είναι πολύ πιθανό η DYRK1A να επηρεάζει τα επίπεδα της p-SNCA (ser-129).

1.4. Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης

Η ρύθμιση των επιπέδων των mRNA και των πρωτεϊνικών επιπέδων, στα ευκαρυωτικά κύτταρα, μπορεί να γίνει σε διάφορα στάδια της γονιδιακής έκφρασης. Αυτά τα στάδια είναι:

- i) η μεταγραφή,
- ii) το στάδιο μετά τη μεταγραφή (κατά την ωρίμανση και την πολυαδενυλίωση του pre-mRNA, την εξαγωγή του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και κατά τη ρύθμιση της σταθερότητας ή της αποικοδόμησης του mRNA),
- iii) η μετάφραση και
- vi) το στάδιο μετά τη μετάφραση.

Υπεύθυνες για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι κάποιες ειδικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται σε αλληλουχίες RNA, γνωστές και ως πρωτεΐνες δέσμησης RNA (RNA-Binding proteins, RBPs). Οι RBPs συνδέονται με αλληλουχίες RNA, ωστόσο εξωγενή ή ενδοκυττάρια σήματα, καθώς και η αναγνώριση διαφορετικών αλληλουχιών επηρεάζουν τον χρόνο και τη θέση πρόσδεσης τους σ' αυτά. Άλλα μόρια που μπορούν να ρυθμίσουν την γονιδιακή έκφραση είναι τα miRs και τα μη-κωδικά μεγάλου μήκους RNAs (long non-coding RNAs, LncRNAs) (Dreyfuss, Kim and Kataoka 2002).

1.4.1. Πρωτεΐνες δέσμησης RNA (RBPs)

Οι RBPs είναι πρωτεΐνες με μεγάλη ετερογένεια και ποικιλομορφία και, συνήθως, δεσμεύουν στόχους mRNA μέσω περιοχών δέσμησης RNA (RNA-Binding domains, RBDs), οι οποίες βρίσκονται σε πολλά αντίγραφα (2 ή 3) και/ή σε διαφορετικούς συνδυασμούς μέσα στη πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, μία RBP αναγνωρίζει 2-6 νουκλεοτίδια σε μια αλληλουχία RNA και συνδέεται μαζί της. Η συγγένεια σύνδεσης της πρωτεΐνης με το RNA είναι ανάλογη των περιοχών δέσμησης που έχει η πρωτεΐνη (Maris, Dominguez and Allain 2005).

Οι RBPs διακρίνονται σε 4 κατηγορίες:

- i) τις πρωτεΐνες με τους τρεις μονόκλωνους τομείς αναγνώρισης RNA που περιλαμβάνουν το μοτίβο αναγνώρισης RNA (RRM) (Daubner, Clery and Allain 2013),

- ii) τις πρωτεΐνες με τις ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (HNRNP) με περιοχή πρόσδεσης KH (Nicastro, Taylor and Ramos 2015),
- iii) τις πρωτεΐνες με την περιοχή δαχτύλου-ψευδαργύρου (zinc finger, ZF) (Nguyer et al. 2011) και
- vi) τις πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν τις διπλές ελικοειδείς δομές RNA (dsRBD) (Gleghorn and Maquat 2014).

1.4.2. Λειτουργίες των RBPs

Ο ρόλος των RBPs είναι κυρίως να ρυθμίζουν την εναλλακτική συρραφή, την έκφραση των mRNA αλλά και την επιδιόρθωση του DNA. Τα στάδια που μπορούν να επηρεάσουν οι RBPs είναι από την μεταγραφή έως τη μετάφραση. Επομένως, οποιαδήποτε διαταραχή στη λειτουργία των RBPs μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα των mRNA και των πρωτεϊνών και, κατά συνέπεια, να επηρεάσει την κυτταρική λειτουργία (Doxakis 2014· Ravanidis, Kattan and Doxakis 2018).

Εναλλακτική συρραφή

Η εναλλακτική συρραφή είναι η διαδικασία, κατά την οποία, από ένα pre-mRNA μπορούν να προκύψουν διαφορετικά mRNA. Οι RBPs παίζουν σημαντικό ρόλο σ' αυτήν τη διαδικασία, καθώς ρυθμίζουν μέσω εναλλακτικής συρραφής το 74% των ανθρώπινων γονιδίων που εκφράζουν mRNAs (Jonhson et al. 2003). Οι νευρωνικές πρωτεΐνες Nova είναι ένα παράδειγμα RBPs, οι οποίες ελέγχουν την εναλλακτική συρραφή mRNAs που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με λειτουργικό ρόλο στην συναπτική δραστηριότητα και πλαστικότητα. Διαταραχή των πρωτεϊνών αυτών σε ορισμένους καρκίνους, εκτός του νευρικού συστήματος, εκδηλώνεται σαν αυτοάνοση παρανεοπλασματική νευρολογική διαταραχή (Buckanovich et al. 1993).

Πολυαδενυλίωση

Υπολογίζεται ότι λόγω της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης, το 50-75% των γονιδίων μπορούν να εκφράσουν διαφορετικά μετάγραφα. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχτεί ότι mRNAs με διαφορετικό μήκος στο 3'UTR μπορούν να παραχθούν από το ίδιο γονίδιο. Το μήκος των 3'UTR εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο και από τη φάση του κυτταρικού κύκλου, στην οποία βρίσκεται το κύτταρο. Τα mRNA με μικρό μήκος στο 3'UTR συναντώνται όταν το κύτταρο πολλαπλασιάζεται, ενώ τα mRNA με μεγαλύτερο μήκος στο 3'UTR συναντώνται κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων και την ανάπτυξη του οργανισμού, κυρίως του κεντρικού νευρικού συστήματος (Ji et al. 2009· Paschou et al. 2012). Επίσης, έρευνες αναφέρουν ότι το μήκος των 3'UTRs σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τη σταθερότητα

και την έκφραση του γονιδίου. Επομένως, ισομορφές με βραχεία 3'UTR είναι πιο σταθερές, έχουν υψηλότερη μεταγραφική ικανότητα και μεγαλύτερη παραγωγή πρωτεΐνης επειδή διαφεύγουν μηχανισμούς που μειώνουν τα επίπεδα των μακρών 3'UTR ή εξασθενούν τη μετάφραση τους (Matoulkova et al. 2012· Mayr 2017).

Η πολυαδενυλίωση, όπως και η εναλλακτική συρραφή, είναι μια διαδικασία που επηρεάζεται από τις RBPs. Η πολυαδενυλίωση ενός mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και, όπως αναφέρεται και παραπάνω, επηρεάζει τη σταθερότητά του, αλλά και τη μετάφρασή του. Με εξαίρεση τα mRNA των ιστονών, τα ευκαρυωτικά mRNAs λαμβάνουν ένα 3' πολύ (A) άκρο μήκους περίπου 200-250 νουκλεοτιδίων (Charlesworth, Meijer and de Moor 2013· Minvielle-Sebastia and Keller 1999).

Η διαδικασία της πολυαδενυλίωσης πραγματοποιείται σε 2 στάδια. Στο πρώτο στάδιο το μετάγραφο διασπάται μεταξύ της εξαιρετικά συντηρημένης περιοχής AAUAAA και μιας ακολουθίας πλούσιας σε U / GU, ενώ στο δεύτερο στάδιο γίνεται η προσθήκη του πολύ (A) άκρου, με τη βοήθεια της πολύ (A) πολυμεράσης (Charlesworth, Meijer and de Moor 2013· Minvielle-Sebastia and Keller 1999). Ένα από τα κύρια πρωτεϊνικά σύμπλοκα που συμμετέχουν στην πολυαδενυλίωση, είναι το CPSF, το οποίο αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PABPN1 και ενεργοποιούν την πολύ (A) πολυμεράση (Ryan et al. 2004· Bienroth et al. 1991).

Ρύθμιση σταθερότητας ή αποικοδόμησης των mRNAs

Σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα των mRNAs παίζουν οι περιοχές πλούσιες σε αδενίνη και ουρακίλη (adenylate/uridylate-rich elements, AREs). Τα AREs αποτελούνται από 5 (AUUUA) ή και παραπάνω νουκλεοτίδια (UAUUUAU) και ο αριθμός τους μπορεί να επηρεάσει την εξέλιξη του mRNA (Barreu, Paillard and Osborne 2005).

Οι RBPs συνεργάζονται ή ανταγωνίζονται με microRNAs για να συνδεθούν σε AREs (ARE-BPs) και καθορίζουν την εξέλιξη των mRNA (Ho and Marsden 2014). Συγκεκριμένα, μπορούν είτε να συμβάλλουν στην αποικοδόμηση των mRNAs στρατολογώντας διάφορους παράγοντες (Labno, Tomecki and Dziembowski 2016) είτε να επηρεάσουν θετικά τη σταθερότητα και τη μετάφραση των mRNA (Doxakis 2014· Keene 1999).

Δημιουργία ριβονουκλεοπρωτεϊνικών κοκκίων (RNP) και κοκκίων στρες (SG)

Οι RBPs έχουν την ικανότητα να προσελκύουν κι άλλες RBPs (ίδιες ή διαφορετικές), με αποτέλεσμα να κατασκευάζονται μεγάλα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά (ribonucleoproteins, RNPs) κοκκία στο σκελετό του mRNA-στόχου. Οι αλληλεπιδράσεις των RBPs με το mRNA, στα RNP κοκκία, είναι αυτές που καθορίζουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό του mRNA, καθώς

και την επακόλουθη μετάφραση του ή αποικοδόμηση του. Ο παράγοντας που επηρεάζει τα RNPs κοκκία είναι το τοπικό περιβάλλον. Σε ακραίες κυτταρικές συνθήκες (π.χ. θερμικό ή οξειδωτικό στρες) τα RNPs κοκκία συναθροίζονται και δημιουργούν αναστρέψιμα κοκκία στρες (stress granules, SGs). Τα SGs, με τη σειρά τους, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την μετάφραση για να ελαχιστοποιηθεί η βλάβη που σχετίζεται με την καταπόνηση. Για να επιτευχθεί αυτό, RBPs, μαζί με το σύμπλεγμα eIF3 και την πρωτεΐνη σύνδεσης πολύ (A) άκρων, μεταφέρονται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα των κυττάρων. Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι μεταλλάξεις στις RBPs οδηγούν σε σχηματισμό λανθασμένων SGs υποδηλώνοντας ότι η λανθασμένη θέση των mRNA μέσα στο κύτταρο ή/και η απώλεια της λειτουργικότητας των RBPs μπορεί να είναι κοινό χαρακτηριστικό των νευροεκφυλιστικών νόσων (Doxakis 2014· Protter and Parker 2016). Επίσης, μεταλλάξεις στις RBPs επηρεάζουν την μετακίνηση τους μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, με αποτέλεσμα να παραμένουν περισσότερο στο κυτταρόπλασμα (Chou et al. 2018· Li et al. 2013). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να επάγεται η δημιουργία των SG (Li et al. 2013· Ramaswami, Taylor and Parker 2013), και να αλλάζει η μετάφραση (Anderson and Kerdesha 2009) όπως και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (Li et al. 2013).

Μεταφορά του mRNA

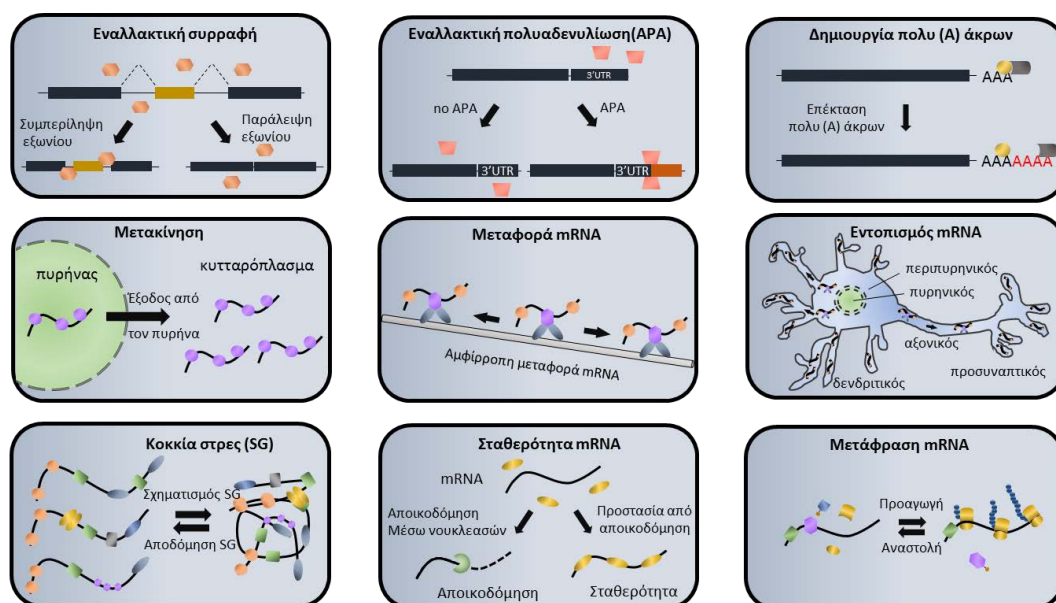
Η μεταφορά του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα πραγματοποιείται, μόνο εφόσον έχει ολοκληρωθεί η μεταγραφή, η ωρίμανση και η επεξεργασία των 3' UTR. Στη διαδικασία αυτή, το mRNA αλληλεπιδρά με RBPs και δημιουργείται ένα σύμπλοκο που έχει τη δυνατότητα να διέλθει από τους πυρηνικούς πόρους και να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, έρευνες αναφέρουν πως οι RBPs, πιθανόν, να έχουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά του mRNA κατά μήκος των νευρώνων και των δενδριτών, στον υποκυτταρικό εντοπισμό ή στην τοπική μετάφραση που εξαρτάται από την κυτταρική δραστηριότητα (Doxakis 2014· Narayanan et al. 2008). Τέλος, οι Lal και συν. (2004) αναφέρουν ότι διαφορετικές RBPs έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με το ίδιο mRNA σε διαφορετικές θέσεις δέσμευσης ή να ανταγωνίζονται για την ίδια θέση σύνδεσης, αυξάνοντας την πολυπλοκότητα της ρύθμισης.

Μετάφραση του mRNA

Πολλές RBPs ρυθμίζουν τη διαδικασία της μετάφρασης, κυρίως, κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης. Συγκεκριμένα, υπάρχουν RBPs, όπως η πρωτεΐνη ZBP1, οι οποίες συνδέονται με το mRNA διαφόρων γονιδίων και καταστέλλουν τη μετάφρασή του παρεμποδίζοντας την έναρξή της (Huttelmaier et al. 2005), αλλά και RBPs, όπως οι Hu, που συμβάλλουν στη μεταφορά των mRNAs στους δενδρίτες και στα

προσυναπτικά άκρα, για να ακολουθήσει η μετάφρασή τους (Ravanidis, Kattan and Doxakis 2018· Sosanya et al. 2015· Vanevski and Xu 2015· Hao et al. 2017).

Στην **εικόνα 5** απεικονίζονται οι λειτουργίες των RBPs.



Εικόνα 5. Απεικόνιση των λειτουργιών των RBPs (προσαρμογή από Ravanidis et al. 2018).

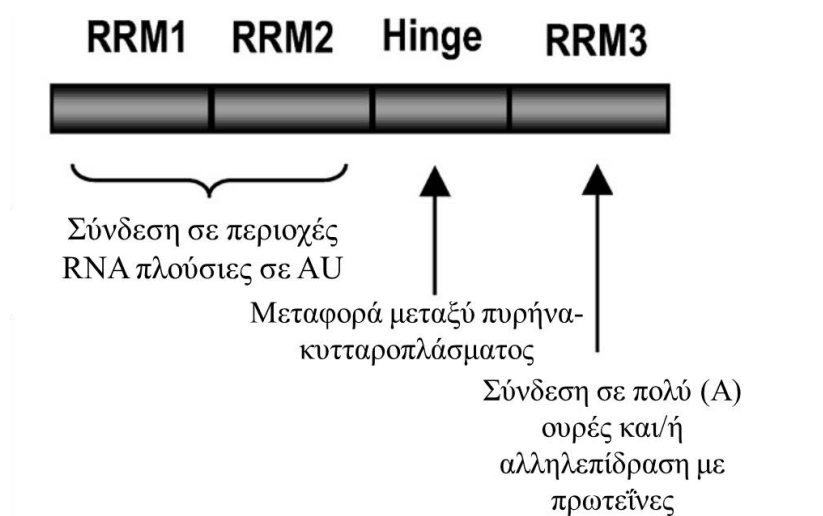
1.5. Πρωτεΐνες Hu/ELAVL

Οι πρωτεΐνες Hu των θηλαστικών είναι ομόλογες της νευρωνικής ELAV (embryonic lethal abnormal vision) πρωτεΐνης της *Drosophila melanogaster* και αποτελούνται από 4 μέλη, γνωστά ως HuR, HuB, HuC και HuD (Doxakis 2014· Hinman and Lou 2008). Επίσης, οι πρωτεΐνες Hu είναι οι καλύτερα χαρακτηρισμένες RBPs, με ρόλους που εκτείνονται σε όλα τα στάδια του μεταβολισμού του mRNA, συμπεριλαμβανομένων της εναλλακτικής συρραφής, της σταθερότητας του mRNA, της μεταφοράς του mRNA και της μετάφρασης (Doxakis 2014). Η HuR εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, ενώ η HuB, η HuC και η HuD εκφράζονται στους νευρώνες, με τη διαφορά ότι η HuB εκφράζεται και στις γονάδες (Doxakis 2014· Ince-Dunn et al. 2012· Ravanidis, Kattan and Doxakis 2018).

1.5.1. Δομή των πρωτεϊνών Hu

Οι πρωτεΐνες Hu είναι κατά 70% ομόλογες σε πρωτεϊνικό επίπεδο και έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να συνδέονται σε RNA με AREs (Hinman and Lou 2008). Αυτό οφείλεται στα 3 μοτίβα αναγνώρισης RNA (RNA recognition motifs, RRM) που περιέχουν οι πρωτεΐνες Hu, τα οποία είναι το RRM1, το RRM2 και το RRM3 (**εικόνα 6**) (Doxakis 2014· Fragkouli et al. 2017). Συγκεκριμένα, σε μελέτες όπου ελέγχθηκε η κρυσταλλική δομή, αλλά και σε μελέτες NMR, βρέθηκε ότι το RRM1 και το RRM2 σχηματίζουν μία σχισμή όπου το

RNA εισέρχεται και συνδέεται μαζί τους (Fragkouli et al. 2017· Hinman and Lou 2008). Επίσης, το RRM3 φαίνεται ότι βοηθά στη διατήρηση της σταθερότητας αυτού του συμπλέγματος (RNA-πρωτεΐνης) και ότι μπορεί να συνδεθεί με ουρές πολύ (A) ή να εμπλακεί σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Colombrita, Silani and Ratti 2013· Fragkouli et al. 2017). Μεταξύ των RRM2 και RRM3 υπάρχει μία ακόμη συντηρημένη περιοχή, η οποία ονομάζεται περιοχή άρθρωσης. Η περιοχή αυτή είναι λιγότερο συντηρημένη και πιστεύεται πως λόγω της αλληλουχίας της επιτρέπει στις πρωτεΐνες Hu να μετακινούνται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και αντίστροφα (Colombrita, Silani and Ratti 2013). Επίσης, φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Fragkouli et al. 2017)



Εικόνα 6. Δομή των πρωτεϊνών Hu και οι λειτουργίες των επιμέρους περιοχών (προσαρμογή από Hinman and Lou 2008).

1.5.2. Πρότυπα έκφρασης και υποκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών Hu

Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης, τα πρότυπα έκφρασης διαφέρουν μεταξύ των πρωτεϊνών Hu. Έχει βρεθεί ότι σε ιστό εγκεφάλου ποντικών, η HuB εκφράζεται σε αρχικό στάδιο στους πρώιμους μετα-μιτωτικούς νευρώνες στο εξωτερικό στρώμα της κοιλίας και, λιγότερο, στο ενδιάμεσο στρώμα της κοιλίας και στο στρώμα του φλοιού (Ravanidis, Kattan and Doxakis 2018). Η HuD, από την μεριά της, εκφράζεται κυρίως στο ενδιάμεσο στρώμα της κοιλίας και λιγότερο στη κοιλιακή ζώνη και το στρώμα του φλοιού, ενώ η HuC εκφράζεται μόνο στο στρώμα του φλοιού (Okano and Darnell et al. 1997· Ravanidis, Kattan and Doxakis 2018). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι όλοι οι νευρώνες εκφράζουν κάποιο από τα mRNAs των Hu. Στον νεοφλοιό, όλοι οι νευρώνες εκφράζουν την πρωτεΐνη HuC, αλλά ελάχιστοι τις HuB και HuD. Η HuB και η HuD έχουν παρόμοια πρότυπα έκφρασης, ωστόσο δεν έχουν πάντα παρόμοιο μηχανισμό δράσης κατά την ανάπτυξη (Doxakis 2014). Για παράδειγμα, η HuB ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστοκυττάρων, ενώ η HuD έχει αρνητικό

αντίκτυπο σε αυτή τη διαδικασία. Γενικά όμως, στόχος τους είναι να διεγείρουν την ανάπτυξη των νευριτών και τη διαφοροποίηση των νευρώνων (Doxakis 2014).

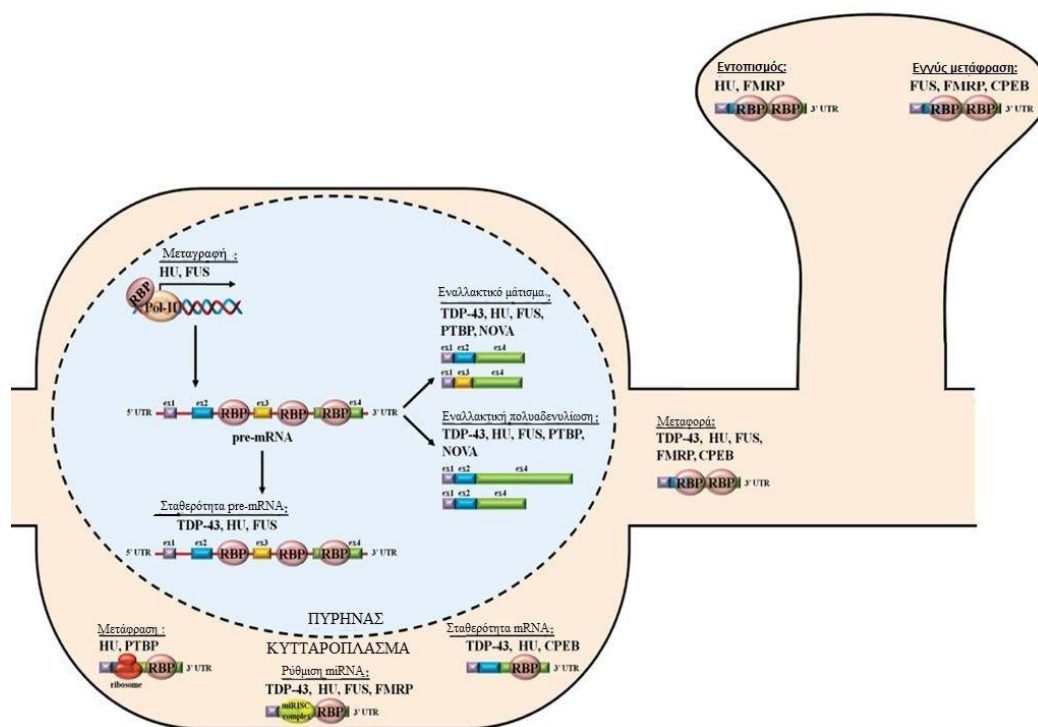
Διαφορές εμφανίζονται και στον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών Hu. Η HuR εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ η HuC βρίσκεται τόσο στον πυρήνα, όσο και στο κυτταρόπλασμα (Peng et al. 1998· Ravanidis, Kattan and Doxakis 2018). Τέλος, η HuB και η HuD εντοπίζονται, κυρίως, στο κυτταρόπλασμα (Bolognani et al. 2006· Ravanidis, Kattan and Doxakis 2018).

1.5.3. Φυσιολογική λειτουργία των πρωτεϊνών Hu

Ύστερα από μελέτες που έχουν γίνει, έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες Hu παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην πλαστικότητα των νευρώνων (Ravanidis, Kattan and Doxakis 2018). Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (παράγραφος 1.5.2), η HuB φαίνεται πως ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστοκυττάρων, ενώ η HuD φαίνεται ότι την αναστέλλει (Akamatsu et al 2005· Doxakis 2014· Okano et al 2005· Yano et al. 2005). Πειράματα αποσιώπησης της HuD σε επίμυες έδειξαν πρόωμη εμβρυική ανάπτυξη, αναστολή της επέκτασης των νευριτών και χαμηλές επιδόσεις σε δοκιμασίες με περιστρεφόμενο κύλινδρο. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν διαταραχή στο συντονισμό των κινήσεων και αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι η HuD είναι απαραίτητη για την έξοδο των νευρικών βλαστοκυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο (Akamatsu et al 2005). Επιπλέον, επίμυες στους οποίους είχε γίνει αποσιώπηση της HuC βρέθηκε αυθόρμητη επιληπτική δραστηριότητα λόγω της μειωμένης απελευθέρωσης του γλουταμινικού οξέος, ενώ διαγονιδιακοί επίμυες για τη HuD εμφάνισαν μεγαλύτερη ικανότητα διατήρησης της μνήμης (Ince-Dunn et al. 2012).

1.5.4. Μηχανισμοί δράσης των πρωτεϊνών Hu

Οι πρωτεΐνες Hu μπορούν να ρυθμίσουν τα επίπεδα διαφόρων mRNA αλλά και τα επίπεδα πολλών πρωτεϊνών μέσα από διάφορους μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, οι Hu μπορούν να επηρεάσουν το στάδιο της μεταγραφής, της σταθερότητας του pre-mRNA, της εναλλακτικής συρραφής, της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης, της σταθερότητας του mRNA, της ρύθμισης του mRNA, του υποκυτταρικού εντοπισμού, της μεταφοράς, και της μετάφρασης (**εικόνα 7**) (Bronicki and Jasmin 2013· Doxakis 2014).



Εικόνα 7. Απεικόνιση των λειτουργιών των πρωτεϊνών Hu (προσαρμογή από Doxakis et al. 2014).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (παράγραφος 1.4.1), οι πρωτεΐνες Hu έχουν την ικανότητα συνδέονται σε RNA μέσω των AREs και να επιδρούν στην έκφραση τους (Hinman and Lou 2008). Συγκεκριμένα, δημιουργούν σύμπλοκα μεταξύ τους ή με άλλες πρωτεΐνες και επιδρούν στη διαδικασία της μεταγραφής και της εναλλακτικής συρραφής (Zhou et al. 2011). Επίσης, μπορούν να επηρεάσουν άμεσα ή έμμεσα την εναλλακτική συρραφή, καθώς και να ρυθμίσουν την διαδικασία εναλλακτικής συρραφής και άλλων ρυθμιστών της εναλλακτικής συρραφής, του NOVA-1 και της AUF1 (Doxakis 2014· Fragkouli et al. 2017).

Μελέτες έχουν δείξει πως έως το 30% των θέσεων δέσμευσης των Hu έχουν εντοπιστεί στο εσωτερικό ιντρονίων, αποτέλεσμα που εξηγεί την υψηλή τους συγκέντρωση στον πυρήνα (Ince-Dunn et al. 2012· Lebedeva et al. 2011· Doxakis 2014· Ravanidis, Kattan and Doxakis 2018). Επίσης, βρέθηκε ότι η σύνδεση των Hu στα ιντρόνια, εκτός από τον έλεγχο των διαδικασιών ωρίμανσης-συρραφής, πολλές φορές συνοδεύεται με δέσμευση των Hu στο 3'UTR, ενισχύοντας την σταθερότητα του pre-mRNA (Mukherjee et al. 2011).

Ένα άλλο στάδιο που μπορούν να επηρεάσουν οι Hu είναι το στάδιο της εναλλακτικής πολυαδενύλωσης (Ravanidis, Kattan and Doxakis 2018). Σε έρευνες που έχουν γίνει σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές έχει βρεθεί ότι οι Hu μεσολαβούν στην επέκταση του 3'UTR της HuR, ωστόσο δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό (Mansfield et al. 2012, Hilgers 2015). Επίσης, δεδομένα δείχνουν ότι οι Hu μπορούν να

αλληλεπιδράσουν με υποκινητές των γονιδίων στόχων, που περιέχουν την αλληλουχία GAGA, είτε άμεσα είτε έμμεσα (Hilgers 2015).

Οι πρωτεΐνες Hu μπορούν, επίσης, να ρυθμίσουν την σταθερότητα των mRNA-στόχων. Η ρύθμιση αυτή επιτυγχάνεται με την πρόσδεση των Hu στο 3'UTR, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η αποικοδόμηση των mRNA και να ενισχύεται, εμμέσως, η παραγωγή πρωτεϊνών (Doxakis 2014· Fragkouli et al. 2017). Επίσης, οι πρωτεΐνες Hu ανταγωνίζονται τα miRNA, ενισχύοντας την σταθεροποίηση των mRNAs-στόχων (Ravanidis, Kattan and Doxakis 2018). Ωστόσο, οι πρωτεΐνες Hu δεν σταθεροποιούν όλα τα mRNAs που περιέχουν τις αλληλουχίες πρόσδεσης. Σημαντικό ρόλο στην σύνδεση παίζουν οι συνθήκες και ο τύπος του κυττάρου (Fan and Steiz 1998). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο παίζει και η αλληλεπίδραση των Hu με άλλες πρωτεΐνες, καθώς τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που δημιουργούνται μεταβάλλουν την ικανότητα δέσμευσή τους με mRNAs (Hinman and Lou 2008). Έρευνες έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση της HuR με την AUF1, τόσο στον πυρήνα όσο στο κυτταρόπλασμα, μπορεί να οδηγήσει σε σταθεροποίηση ή αποσταθεροποίηση των mRNAs-στόχων (David et al 2007· Fragkouli et al. 2017). Η ρύθμιση της σταθεροποίηση των mRNA-στόχων από τις πρωτεΐνες Hu γίνεται είτε μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ίδιων των Hu (Abdelmohsen et al. 2007), είτε μέσω σχηματισμού ολιγομερών πάνω στα μετάγραφα (Fialcowitz-White et al. 2007).

Η σύνδεση των πρωτεϊνών Hu στα mRNA-στόχους δεν σχετίζεται μόνο με τα παραπάνω στάδια, αλλά παίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο στη μεταφορά των mRNAs από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και στον υποκυτταρικό εντοπισμό τους. Η μεταφορά των mRNAs, όπως του CD83, από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται η συγκέντρωση τους στο κυτταρόπλασμα και, κατά συνέπεια, και ο ρυθμός μετάφρασης τους (Prechtel et al. 2006). Σχετικά με τον υποκυτταρικό εντοπισμό, έχει βρεθεί ότι υπάρχει συσχέτιση της σύνδεσης των Hu με τον εντοπισμό διαφόρων mRNAs (π.χ. της Gap43 και της Tau) στους άξονες και τους δενδρίτες των νευρικών κυττάρων (Ravanidis, Kattan and Doxakis 2018· Sosanya et al. 2015· Vanevski and Xu 2015· Hao et al. 2017).

Τέλος, οι πρωτεΐνες Hu μπορούν να ρυθμίσουν τη μετάφραση των mRNAs, είτε άμεσα είτε έμμεσα, επιδρώντας σε διάφορους μηχανισμούς. Η ικανότητα των Hu να δεσμεύονται στο 5'UTR ή 3'UTR των mRNAs-στόχων μπορεί να επιδράσει θετικά ή αρνητικά στη μετάφραση αυτών των στόχων. Ο Galban και συν. (2008) αναφέρουν ότι η σύνδεση των Hu σ' αυτές τις περιοχές αυξάνει την πρόσληψη των στόχων από πολυσώματα, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πρωτεϊνοσύνθεση. Ωστόσο, σύνδεση των Hu σε 5'UTR, που είναι πλούσια σε ουρακίλες (U), οδηγούν σε αναστολή της μετάφρασης των στόχων τους (Galban et al. 2008). Επιπλέον,

αναστολή της μετάφρασης μπορεί να γίνει και μέσω σύνδεσης των Hu στο 3' UTR, όπως γίνεται όταν η HuR αλληλεπιδρά με το Wnt-5 (Leanderson, Riesbeck and Anderson 2006).

1.5.5. Παθολογική λειτουργία των πρωτεϊνών Hu

Στον άνθρωπο, οι πρωτεΐνες Hu έχουν συσχετιστεί με την παρανεοπλασματική νευροπάθεια (σύνδρομο αντι-Hu), η οποία χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργίες του εγκεφαλικού στελέχους και της παρεγκεφαλίδας, αισθητικές νευροπάθειες, απώλεια βραχυπρόθεσμης μνήμης, μυελίτιδα και επιληπτικές κρίσεις (Ravanidis, Kattan and Doxakis 2018). Το σύνδρομο αντι-Hu είναι αποτέλεσμα μιας αυτοάνοσης ανοσολογικής απόκρισης στις νευρωνικές Hu που εκφράζονται μη φυσιολογικά σε ορισμένους όγκους, όπως είναι το νευροβλάστωμα (Doxakis 2014· Pignolet, Gebauer and Liblau 2013· Ravanidis, Kattan and Doxakis 2018).

1.6. Μηχανισμοί αποικοδόμησης πρωτεϊνών

Τα επίπεδα πρωτεϊνών, στο εσωτερικό του κυττάρου, ελέγχονται από τον ρυθμό σύνθεσης και τον ρυθμό αποικοδόμησής τους. Κύριοι λόγοι που επηρεάζουν τον ρυθμό αποικοδόμησης είναι η ποσότητα των πρωτεϊνών, η λειτουργία τους και οι βλαβερές συνέπειες που μπορεί να εμφανίζουν μέσα στο κύτταρο. Δύο από τα κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών είναι το μονοπάτι ουβικουτίνης-πρωτεασώματος και το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσωσωμάτων (Cooper and Hausman 2004). Παρακάτω θα αναφερθεί μόνο το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσωσωμάτων, καθώς στην έρευνα δεν μελετήθηκε κάποιος παράγοντας σχετικά με το μονοπάτι ουβικουτίνης-πρωτεασώματος.

1.6.1. Μονοπάτι Αυτοφαγίας-Λυσωσωμάτων (Autophagy-Lysosome Pathway, ALP)

Το μονοπάτι της αυτοφαγίας-λυσωσωμάτων είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση των εκφυλισμένων πρωτεϊνών και των διάφορων οργανιδίων του κυττάρου. Στο μονοπάτι αυτό περιλαμβάνονται η αυτοφαγία με CMA, η μακροαυτοφαγία και η μικροαυτοφαγία. Κοινό χαρακτηριστικό και των τριών είναι η μεταφορά ενδοκυτταρικών συστατικών στα λυσοσώματα και η ανακύκλωση τους, ώστε να μπορούν να ξαναχρησιμοποιηθούν τα δομικά τους στοιχεία. Επίσης, τα λυσοσώματα, μέσω της ενδοκυττάρωσης, μπορούν να δέχονται εξωκυττάριο υλικό και συστατικά της πλασματικής μεμβράνης (Grant and Donaldson 2009· Xilouri, Brekk and Stefanis, 2016).

Η αποικοδόμηση της SNCA πραγματοποιείται, πιθανόν, μέσω των μονοπατιών αυτοφαγίας με CMA και της μακροαυτοφαγίας (Alvarez-Erviti et al 2010· Grant and Donaldson 2009· Vogiatzi et al. 2008). Επομένως, παρακάτω θα γίνει αναφορά μόνο σ' αυτά τα δύο μονοπάτια και δεν θα γίνει κάποια αναφορά στη μικροαυτοφαγία.

Αυτοφαγία με CMA

Η αυτοφαγία με CMA είναι μία διαδικασία, όπου δεν περιλαμβάνεται ο σχηματισμός αυτοφαγοσωμάτων. Στη διαδικασία αυτή, οι πρωτεΐνες-στόχοι αναγνωρίζονται από την HSC70 και, με τη βοήθεια της, μεταφέρονται στη λυσοσωμική μεμβράνη. Η HSC70 αναγνωρίζει πρωτεΐνες που έχουν την αλληλουχία KFERQ (μοτίβο στόχευσης της αυτοφαγίας CMA) ή παρόμοιες αλληλουχίες. Το μοτίβο στόχευσης της αυτοφαγίας με CMA εμφανίζεται περίπου στο 30% των κυτοσωλικών πρωτεϊνών, αλλά και σε πρωτεΐνες που έχουν δεχτεί μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Dice 1990· Patel and Cuervo 2015). Στη συνέχεια, στη λυσοσωμική μεμβράνη οι πρωτεΐνες-στόχοι αλληλεπιδρούν με την LAMP2A, μια μονομερή πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο απαραίτητο για τη μετατόπιση του πρωτεϊνικού υποστρώματος (Cuervo and Dice 1996· Patel and Cuervo 2015). Επομένως, τα επίπεδα της LAMP2A καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τον ρυθμό της αυτοφαγίας με CMA και, άρα, τον ρυθμό αποικοδόμησης των πρωτεϊνών (Bandyopadhyay et al. 2008).

Μακροαυτοφαγία

Σε σύγκριση με την αυτοφαγία με CMA, στη μακροαυτοφαγία η αποικοδόμηση τμημάτων του κυτταροπλάσματος αλλά και των κυτταρικών οργανιδίων γίνεται μέσω αυτοφαγοσωμάτων. Τα αυτοφαγοσώματα είναι δομές με διπλή μεμβράνη, όπου στο εσωτερικό τους συσσωρεύονται τα κυτταρικά οργανίδια που θα αποικοδομηθούν. Αυτές οι δομές ενώνονται με τα λυσοσώματα και δημιουργούν το αυτολυσόσωμα. Με τη σειρά του, το αυτολυσόσωμα ρίχνει το pH στο εσωτερικό του ενεργοποιώντας τις υδρολάσες, οι οποίες αποικοδομούν τις πρωτεΐνες. Τα ελεύθερα αμινοξέα που δημιουργούνται, απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα και μπορούν να ξαναχρησιμοποιηθούν από το κύτταρο (Xilouri, Brekk and Stefanis 2016). Στους νευρώνες, τα αυτοφαγοσώματα δημιουργούνται κυρίως στα αξονικά άκρα και μεταφέρονται προς το σώμα του κυττάρου για να μπορέσουν να ανακυκλώσουν τα μιτοχόνδρια και τα συσσωματώματα πρωτεϊνών, που βρίσκονται στους άξονες (Maday and Holzbaur 2014· Frake et al. 2015).

Η μακροαυτοφαγία ρυθμίζεται, αρνητικά ή θετικά, από ένα πλήθος μοριακών σημάτων. Τέτοια μόρια είναι το σύμπλοκο mTORC1, το οποίο είναι ο κύριος αρνητικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας (Lan et al. 2017· Znfien and Klionsky 2009), η LC3, η οποία αποτελεί μέρος ενός συστήματος πρόσδεσης απαραίτητο για τον σχηματισμό και την επιμήκυνση της αυτοφαγοσωματικής μεμβράνης (Xilouri, Brekk and Stefanis 2016) και το σύμπλοκο VPS34, το οποίο προσελκύει πρωτεΐνες για τη δημιουργία του αυτοφαγοσώματος (Znfien and

Klionsky 2009). Τέλος, σημαντικό ρόλο παίζουν διάφοροι αυτοφαγικοί υποδοχείς, όπως η πρωτεΐνη p62/SQSTM1, που αναγνωρίζει λάθος αναδιπλωμένες ή συσσωματωμένες πρωτεΐνες και τις μεταφέρει στο αυτοφαγόσωμα για αποικοδόμηση (Cicchini, Karantza and Xia 2015).

1.7. Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins , HSPs)

ΟΙ HSPs είναι μία οικογένεια μοριακών συνοδών, οι οποίες συμμετέχουν στην αναδίπλωση και στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Επομένως, παίζουν σημαντικό ρόλο στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπου κοινό χαρακτηριστικό τους είναι οι λάθος αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Κατά τη διάρκεια ή μετά τη μετάφραση, οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες των πρωτεϊνών αναδιπλώνονται, με τη βοήθεια των HSPs, και δημιουργούνται λειτουργικές δομές (Jones, Moussaud and McLean, 2014). Ωστόσο, κατά τη διεργασία αυτή, πολλές φορές δημιουργούνται λανθασμένες δομές (περιττές ή επιβλαβείς), καθώς οι HSPs αποτυγχάνουν να αναδιπλώσουν σωστά τις πρωτεΐνες. Οι λανθασμένες δομές, στη συνέχεια, μεταφέρονται στο πρωτεάσωμα ή στην αυτοφαγία, μέσω των HSPs (Jones, Moussaud and McLean, 2014).

Οι HSPs, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι μία οικογένεια μοριακών συνοδών που ταξινομούνται βάσει του μοριακού τους βάρους. Οι δύο κυριότερες οικογένειες μοριακών συνοδών στα θηλαστικά είναι η HSP70 και η HSP90 (Jones, Moussaud and McLean, 2014). Στην οικογένεια των HSP70 συγκαταλέγεται μια πρωτεΐνη, η οποία ονομάζεται HSPA8, γνωστή και ως HSC70. Η HSC70 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των αδιάλυτων μετουσιωμένων πρωτεϊνών, αποτρέποντας την κακή αναδίπλωση τους και τη συσσώρευση τους (Chen et al. 2024). Συγκεκριμένα, η HSC70 μεταφέρει αυτές τις πρωτεΐνες στο LAMP2A, προκειμένου να ξεκινήσει η αποικοδόμησή τους (Wang et al. 2020).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η SNCA παίζει σημαντικό ρόλο στις νευροεκφυλιστικές παθήσεις, όπως η νΠ, ωστόσο οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, σχετικά με τη διαλεύκανση του μηχανισμού ρύθμισης των επιπέδων της, είναι λίγες. Επομένως, σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη του τρόπου ρύθμισης του mRNA της SNCA, της σταθερότητας του, των πρωτεϊνικών επιπέδων της, της μετάφρασης του ολικού πρωτεώματος και της αποικοδόμησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της από τις πρωτεΐνες Hu. Η επίδραση των πρωτεϊνών Hu στη SNCA διερευνήθηκε τόσο σε συνθήκες υπερέκφρασης, αλλά και σε συνθήκες αποσιώπησης. Επίσης, ελέγχθηκε ο τρόπος επίδρασης των Hu, όταν υπερεκφράζονται ή όταν γίνεται αποσιώπηση, στην πρωτεϊνική συσσώματωση της SNCA και στη φωσφορυλίωση της (p-SNCA στη ser-129). Τέλος, ελέγχθηκε ο τρόπος ρύθμισης του mRNA της DYRK1A, της σταθερότητας του, των πρωτεϊνικών επιπέδων της και της αποικοδόμησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της, όταν υπερεκφράζονται ή αποσιωπώνονται οι πρωτεΐνες Hu, καθώς αλλαγές στα επίπεδα της πιθανόν να οδηγούν σε αλλαγές στη φωσφορυλίωση και να επηρεάζουν τα επίπεδα της p-SNCA (ser-129).

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Πειραματικά Υλικά

3.1.1. Κυτταρικά συστήματα

SK-N-SH κύτταρα νευροβλαστώματος ανθρώπου

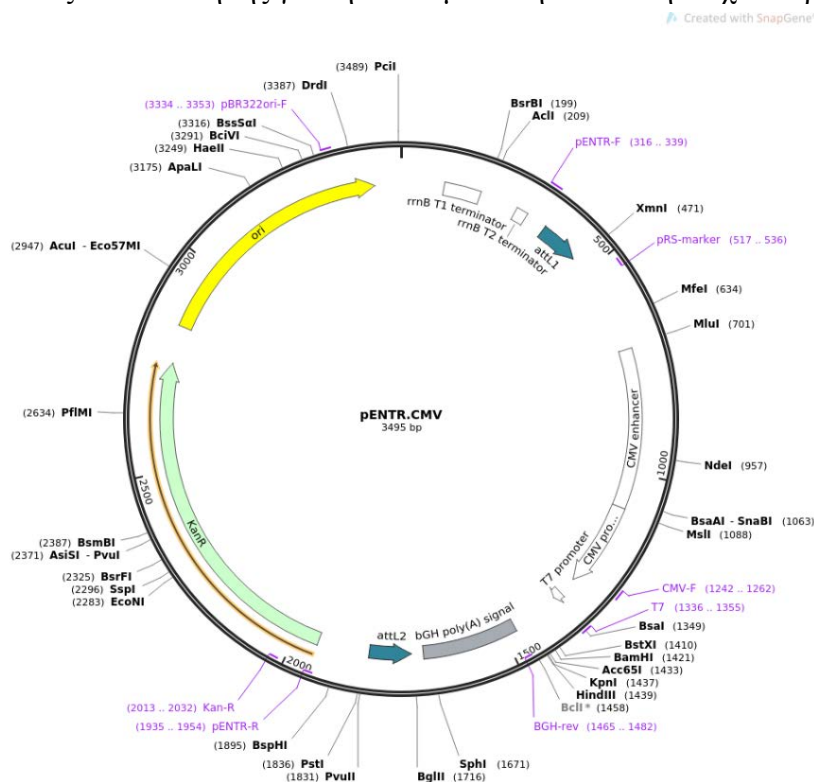
Τα SK-N-SH είναι κύτταρα νευροβλαστώματος ανθρώπου, τα οποία χρησιμοποιούνται ως πρότυπο σύστημα μελέτης. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν SNCA και έχουν απομονωθεί από μεταστατικό καρκίνο μυελού των οστών, ενός κοριτσιού ηλικίας 4 ετών (Gautier et al. 2021).

3.1.2. Φορείς κλωνοποίησης

Πλασμιδιακός φορέας pENTR.CMV

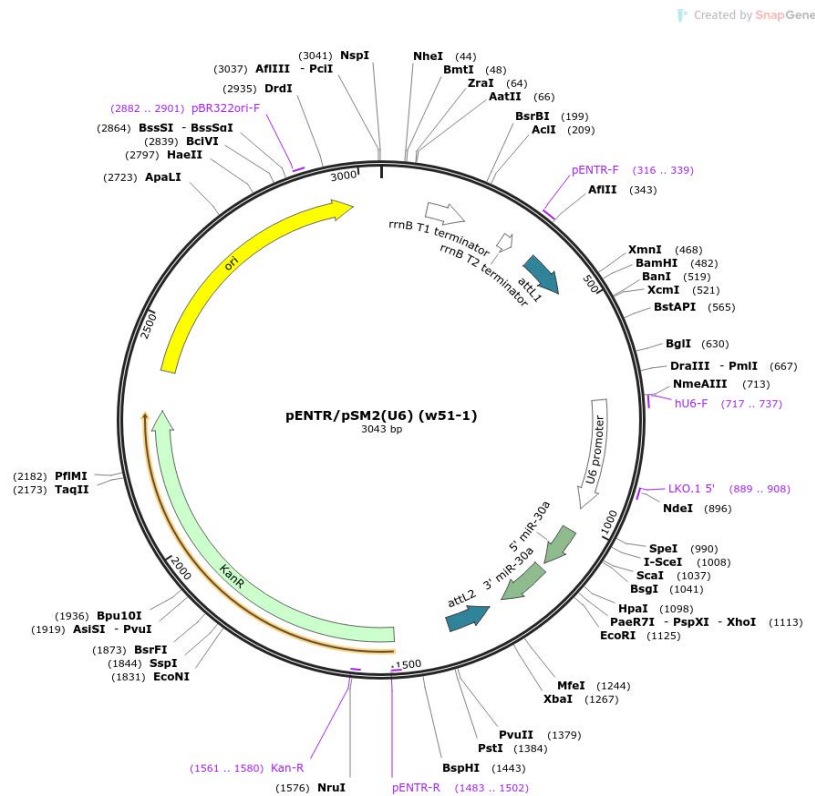
Για την κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις homo sapiens HuR (hsHuR), mus musculus HuR (HuR), mus musculus HuB (HuB), mus musculus HuC (HuC) και mus musculus HuD (HuD) χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pENTR.CMV (ThermoFisher scientific, Reinach, Switzerland). Ο φορέας pENTR.CMV διαθέτει τα εξής (εικόνα 8):

- α) γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη, το οποίο είναι απαραίτητο για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών E. Coli που φέρουν τον σωστό φορέα,
- β) τον υποκινητή CMV ανοδικά των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης και
- γ) πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης για την ενσωμάτωση των αλληλουχιών προς μελέτη.



Εικόνα 8: Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pENTR.CMV.

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν την LacZ-shRNA και το shRNA για HuR χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pENTR/U6, ο οποίος έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με τον pENTR.CMV, με τη διαφορά ότι ως υποκινητής χρησιμοποιείται το U6 και όχι ο CMV (εικόνα 9).

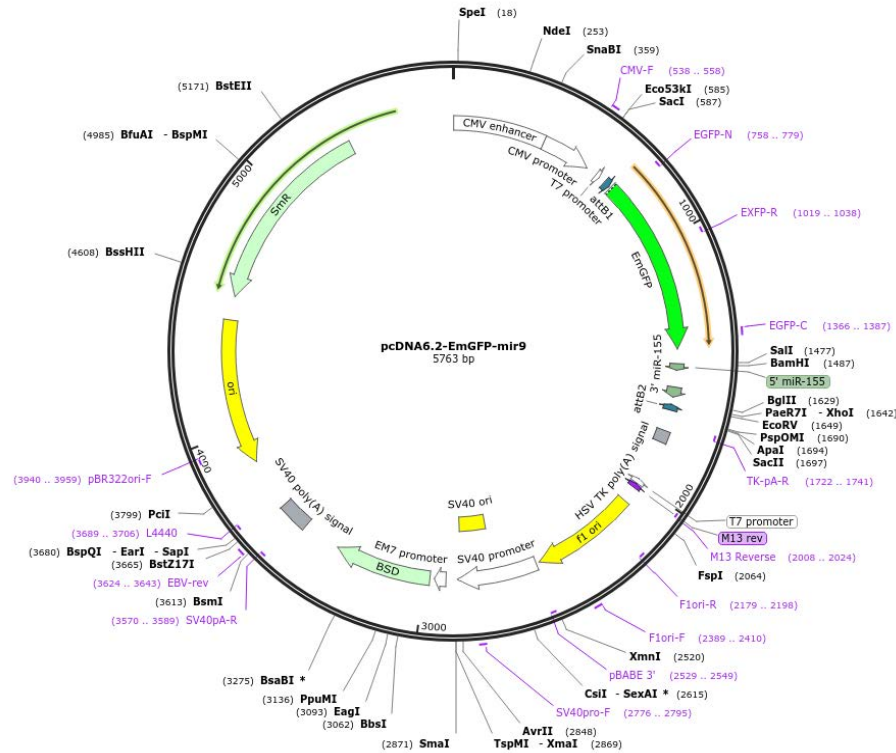


Εικόνα 9: Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pENTR/U6.

Πλασμιδιακός φορέας pcDNA6.2-EmGFP

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν την Control si (scramble) και το shRNA για HuR χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA6.2 (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA), ο οποίος περιέχει (εικόνα 10):

- γονίδιο ανθεκτικότητας στη σπεκτινομυκίνη, το οποίο είναι απαραίτητο για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών E. Coli που φέρουν τον σωστό φορέα,
- τον υποκινητή CMV ανοδικά των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης,
- πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης για την ενσωμάτωση των αλληλουχιών προς μελέτη και
- EmGFP ως δείκτη διαμόλυνσης.

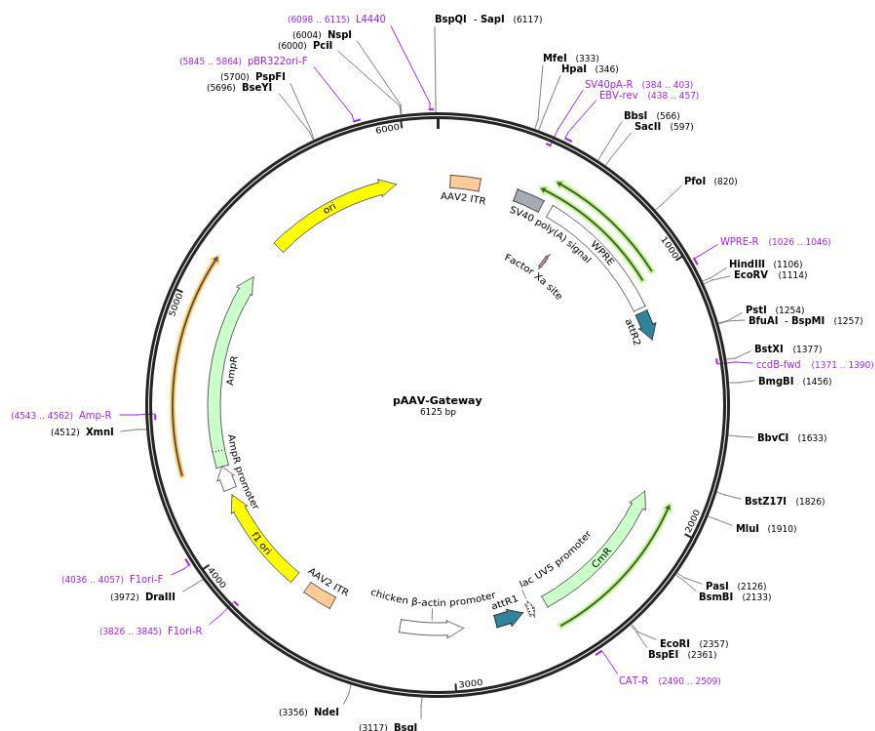


Εικόνα 10: Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pcDNA6.2-EmGFP.

Πλασμιδιακός φορέας pAAV

Ο πλασμιδιακός φορέας pAAV-Gateway (Addgene, Watertown, Massachusetts, USA) χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του γονιδίου της SNCA με μήκος 2550 βάσεων στην 3'UTR. Ο φορέας αυτός έχει (εικόνα 11):

- δυο γονίδια ανθεκτικότητας, ένα ως προς την χλωραμφενικόλη και ένα ως προς την αμπικιλίνη, τα οποία είναι απαραίτητα για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών E. Coli με τον σωστό φορέα και
- πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης για την ενσωμάτωση των αλληλουχιών προς μελέτη.



Εικόνα 11: Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pAAV Gateway.

3.1.3. Διαλύματα

Διαλύματα-αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την καλλιέργεια και την διαμόλυνση των κυττάρων:

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - high glucose (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Ορός εμβρύου βοός (FBS) προϊόν της εταιρίας ThermoFisher Scientific.
- Θρυψίνη (Sigma-Aldrich).
- Μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης: Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich).
- JetOptimus (Polyplus, Illkirch, France) για τη διαμόλυνση των κυττάρων SK-N-SH.

Διαλύματα-αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της βιωσιμότητας και της κυτταροτοξικότητας των κυττάρων

- Η ανίχνευση της βιωσιμότητας των κυττάρων έγινε με το Cell Counting Kit-8 (CCK-8, MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA).
- Η ανίχνευση της κυτταροτοξικότητας των κυττάρων έγινε με το kit Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}, το οποίο περιείχε:
 - Catalyst (Roche) για την κατάλυση της αντίδρασης.
 - Dye solution (Roche) για την χρώση της αντίδρασης.

- Lysis solution (Roche) για την λύση των κύτταρων.

Διαλύματα-αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του RNA

- TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA): χρησιμοποιήθηκε για να απομονωθεί το συνολικό RNA από την κυτταρική σειρά SK-N-SH.
- Βρωμο-χλωρο-προπάνιο (BCP, αγορασμένο από την Molecular Research Center): χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία τριών φάσεων:
 - 1) υδάτινη φάση (περιέχει το RNA)
 - 2) λευκή μεσόφαση (περιέχει το DNA)
 - 3) οργανική φάση (περιέχει τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια)
- Ισοπροπανόλη (Carlo Erba, Milano, Italy): χρησιμοποιήθηκε 100% ισοπροπανόλη για την κατακρήμνιση του RNA
- Αιθανόλη (VWR chemicals, Pennsylvania, USA): χρησιμοποιήθηκε 75% αιθανόλη για έκπλυση του ιζήματος

Διαλύματα-αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

- Τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (Deoxynucleoside Triphosphates, d-NTPs): χρησιμοποιήθηκε μείγμα τεσσάρων νουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dCTP και dGTP), της εταιρίας ThermoFisher Scientific.
- Τυχαία εξαμερή (Random hexamers, RH): έγινε χρήση τυχαίων εξαμερή εκκινητών (μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων μήκους 6 βάσεων), καθώς θεωρείται πως επιτυγχάνεται πληρέστερη κάλυψη κατά μήκος όλων των μορίων RNA, προϊόν της εταιρίας Macrogen (Seoul, South Korea).
- 5x First Strand Buffer (5x FS Buffer, αγορασμένο από την ThermoFisher Scientific): παρέχει τις κατάλληλες συνθήκες για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής, της εταιρίας ThermoFisher Scientific.
- Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol, DTT): διευκολύνει την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής διασπώντας τους δισουλφορικούς δεσμούς στα RNA, της εταιρίας ThermoFisher Scientific.
- Ένζυμο Moloney Murine Leukemia Virus Transcriptase (M-MLV): το συγκεκριμένο ένζυμο χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής, καθώς συνθέτει μόρια DNA χρησιμοποιώντας ως πρότυπο μόρια RNA, προϊόν της εταιρίας ThermoFisher Scientific.

Διαλύματα-αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR)

- d-NTPs (ThermoFisher Scientific): χρησιμοποιήθηκε μείγμα τεσσάρων νουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dCTP και dGTP).
- 10x Taq buffer B (Kapa Biosystems, Massachusetts, USA): ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο χρησιμοποιείται για να διατηρείται σταθερό το pH της αντίδρασης. Περιέχει ιόντα Mg^{2+} , τα οποία είναι απαραίτητος συμπαράγοντας της DNA πολυμεράσης.
- Εκκινητές (Primers): χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών για κάθε mRNA μετάγραφο.
- SYBR Green I (Roche, Basel, Switzerland): μη ειδική φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση της qPCR.
- Kapa Taq polymerase (Kapa Biosystems): είναι DNA πολυμεράση (ένζυμο), το οποίο, χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο, επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας dNTPs.

Διαλύματα-αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο ανοσοσύστημα κατά Western

- Διάλυμα λύσης κυττάρων: παρασκευάστηκε διάλυμα 25 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε μείγμα αναστολέων πρωτεασών (complete™, Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) και μείγμα αναστολέων φωσφατασών (PhosSTOP™, Roche).
- Διάλυμα Laemmli 6x: παρασκευάστηκε διάλυμα 375 mM Tris με pH 6.8, 10% SDS, 50% γλυκερόλη, 10% β-μερκαπτοαιθανόλη και 0.03% μπλε βρωμοφαινόλη, το οποίο διατηρήθηκε στους - 20°C.
- Μείγμα δεικτών γνωστού μοριακού βάρους για τις πρωτεΐνες: BlueStar Prestained Protein Marker (MWP03, Tokyo, Japan).
- SDS-PAGE 5X (Running buffer): το 1 Lt περιείχε 94 g γλυκίνη, 15.1 gr Tris, 25 mL SDS 20% και ddH₂O
- Transfer buffer 1x: το 1 Lt περιείχε 200 mL μεθανόλης, 3.03 g Tris-Base και 14.4 g γλυκίνη και ddH₂O.
- Protran® μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Whatman, Kent, UK): χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταφορά των πρωτεϊνών.
- Χρωστική Ponceau: τα 100 mL περιείχαν 0.1 g Ponceau, 5 mL οξικό οξύ και ddH₂O.

- Διάλυμα TBS: τα 500 mL περιείχαν 15 mL NaCl, 12.5 mL 1M Tris (pH 7.5) και 472.5 mL ddH₂O.
- Διάλυμα TBS-T: τα 500 mL περιείχαν 15 mL NaCl, 12.5 mL 1M Tris (pH 7.5), 472 mL ddH₂O και 500 μ L Tween-20.
- ECL (Enhanced Chemiluminescence): χρησιμοποιήθηκε για την ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (Clarity, Bio-Rad, California, USA)

3.1.4. Φαρμακολογικοί παράγοντες

- Ακτινομυκίνη D: αναστολέας της μεταγραφής (MedChemExpress).

3.1.5. Αντισώματα

Πρωτογενή αντισώματα

- SNCA (BD 610787): μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την SNCA (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Phospho-SNCA (ab168381): μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την SNCA φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 129 (Abcam, Cambridge, United Kingdom).
- GAPDH (HRP-60004): αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει την GAPDH (Horseradish Peroxidase, Proteintech Europe, Manchester, UK).
- PanHu (13032-1-AP): μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει όλες τις Hu (R, B, C και D), της εταιρίας Proteintech Europe
- DYRK1A (sc-100376): μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την DYRK1A (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- p62/SQSTM1 (sc-28359): αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει την p62 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- LAMP2A (sc-18822): μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την LAMP2A (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- HSC70 (MA5-32002): μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την HSC70 (Invitrogen).
- Puromycin (3002 15 90): μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την πουρομυκίνη (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Δευτερογενή αντισώματα

- Anti-rabbit IgG-HRP: αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G του κουνελιού (CST#7074, Cell Signaling Technologies).

- Anti-mouse IgG-HRP: αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G του ποντικίου (CST#7076, Cell Signaling Technologies).

3.1.6. Ζεύγη εκκινήτων

Τα ζεύγη εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν για τα γονίδια ενδιαφέροντος αναφέρονται παρακάτω:

- Για Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)
Forward: 5'-GCACCACCAACTGCTTAG-3'
Reverse: 5'-GCCATCCACAGTCTTCTG-3'
- Για U6
Forward: 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'
Reverse: 5'-TTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'
- Για ολική SNCA (290-2550 νουκλεοτίδια στην 3'UTR της SNCA)
Forward: 5'-GAAATATCTTTGCTCCCAGT-3'
Reverse: 5'-ACATTGGAAGTGGAGCACTTG-3'
- Για long SNCA (2550 νουκλεοτίδια στην 3'UTR της SNCA)
Forward: 5'-TGACGGTAATTTTTGAGCAGTGAA-3'
Reverse: 5'-GCTTCCTGAAAAGGCTTATATGACTTAA-3'
- Για intron 3 – exon 4 mRNA SNCA (pre-mRNA SNCA)
Forward: 5'-ACAGGTGTATGGAAGCCGAT-3'
Reverse: 5'-ACCACTGCTCCTCCAACATT-3'
- Για exon 4 – exon 6 mRNA SNCA (ώριμο mRNA SNCA)
Forward: 5'-GGCTTTGTCAAAAAGGACCA-3'(20mer)
Reverse: 5'-GGATGGAACATCTGTCAGCA-3'(20mer)
- Για HuR
Forward: 5'-TGTTCTCTCGGTTTGGGCGGAT-3')
Reverse: 5'-TCTTCTGCCTCCGACCGTTTGT-3'
- Για DYRK1A
Forward: 5'-CCTTGCCATTGATATGTGGTCCC-3'
Reverse: 5'-GCAGGTGGAATACCCAGAACTTC-3'

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς

Τα ανθρώπινα νευροβλαστικά κύτταρα SK-N-SH αναπτύχθηκαν σε κλίβανο επώασης με σταθερή θερμοκρασία 37 °C, 5% συγκέντρωση CO₂ και σχετική υγρασία 95%. Ο χειρισμός των κυττάρων έγινε σε θάλαμο νηματικής ροής.

Το θρεπτικό ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το DMEM με υψηλή συγκέντρωση σε γλυκόζη συμπληρωμένο με 10% (v/v) ορού εμβρύου βοός και 1% μείγματος αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

3.2.2. Διαμόλυνση κυτταρικής σειράς

Με τον όρο «διαμόλυνση» εννοείται η εισαγωγή εξωγενών νουκλεϊκών οξέων (π.χ. πλασμίδια) σε κυτταρικές σειρές. Η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε μέσω κατιοντικών λιπιδίων και συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο JetOptimus για την εισαγωγή των πλασμιδίων.

Βάσει των οδηγιών της εταιρίας, συγκεκριμένη ποσότητα νουκλεϊκού οξέος αναμίχθηκε με το λιπίδιο σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και επώαστηκε για 15 min ώστε να δημιουργηθούν μικκύλια. Στη συνέχεια, προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα από εναιώρημα κυττάρων και ακολούθησε αναμονή 10 min ώστε να πραγματοποιηθεί η διαμόλυνση. Τέλος, προστέθηκε το θρεπτικό ανάπτυξης και η αντίδραση μεταφέρθηκε σε πηγάδι, όπου επώαστηκε για 48 h. Για τον έλεγχο του ποσοστού διαμόλυνσης (επιθυμητό >50%) έγινε μία δοκιμαστική διαμόλυνση, με πλασμίδιο που περιείχε GFP, η οποία ελέγχθηκε σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού LEICA με φίλτρο για το πράσινο χρώμα. Συγκεκριμένα, όσα κύτταρα είχαν ενσωματώσει τον φορέα διαμόλυνσης είχαν πράσινο φθορισμό. Εφόσον υπήρχε το επιθυμητό ποσοστό ακολουθούσε η συλλογή αυτών των κυττάρων για περαιτέρω πειραματικές δοκιμασίες.

3.2.3. Δοκιμασία ανίχνευσης της βιωσιμότητας των κυττάρων και της κυτταροτοξικότητας

Ο έλεγχος της βιωσιμότητας των κυττάρων και της κυτταροτοξικότητας έγινε με 2 διαφορετικούς μεθόδους, με το Cell Counting Kit-8 (CCK-8) και με το Cytotoxicity Detection Kit (LDH).

Το CCK-8 χρησιμοποιείται για την μελέτη της επαγωγής και της αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε οποιοδήποτε in vitro μοντέλο. Παρέχει την δυνατότητα να γίνουν γρήγορες και μη επεμβατικές αναλύσεις χρησιμοποιώντας το υδατοδιαλυτό άλας τετραζολίου, WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-

2H-tetrazolium, monosodium salt], το οποίο παράγει, μέσω αναγωγής παρουσία ηλεκτρονίου, την φορμαζάνη, μια υδατοδιαλυτή χρωστική. Το CCK-8 είναι έτοιμο προς χρήση διάλυμα και όντας μη ραδιενεργό, επιτρέπει ευαίσθητες χρωματομετρικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό του αριθμού των ζωντανών κυττάρων σε αναλύσεις κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξικότητας. Οι αφυδρογονάσεις μειώνουν το WST-8 στα κύτταρα με αποτέλεσμα να παράγεται ένα πορτοκαλί χρώματος προϊόν (φορμαζάνη), το οποίο είναι διαλυτό στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Η ποσότητα της χρωστικής φορμαζάνη, η οποία παράγεται από τις αφυδρογονάσεις, είναι ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων.

Για την πραγματοποίηση της μέτρησης προστέθηκαν 15 μ L CCK-8, 2 h πριν την 48^η ώρα, σε κάθε συνθήκη που είχε υποστεί διαμόλυνση και, μετά το πέρας των 2 h, χρησιμοποιώντας τη συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών της εταιρείας TECAN μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 450 nm.

Με το LDH μπορεί να υπολογισθεί ο αριθμός των νεκρών κυττάρων, ο αριθμός των ζώντων κυττάρων και, κατά συνέπεια, το ποσοστό της κυτταροτοξικότητας. Η δοκιμασία αυτή είναι μία μη ραδιενεργή δοκιμασία απελευθέρωσης [3H]-θυμιδίνης και [51Cr] που επιτρέπει χρωματομετρικές αναλύσεις για ποσοτικό προσδιορισμό του κυτταρικού θανάτου και λύση των κυττάρων, με βάση τη μέτρηση της δραστηριότητας της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) που απελευθερώνεται από το κυτοσόλιο νεκρών κυττάρων.

Για τη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε ένα 96-well διάφανο plate, στο οποίο προστέθηκαν 50 μ L θρεπτικού υλικού (χωρίς FBS) και 50 μ L θρεπτικού υλικού από το κάθε δείγμα, το οποίο είχε διαμολυνθεί και επωαστεί για 48 h. Επίσης, κατά την διαμόλυνση είχε προστεθεί μία ακόμα συνθήκη, η οποία είχε σκέτο θρεπτικό υλικό. Έπειτα, προστέθηκε σε κάθε διαμολυσμένο πηγάδι 5 μ L Lysis Solution και έγινε ανάδευση στα 600 rpm για 15 min. Μετά την ανάδευση, 10 μ L από το κάθε πηγαδάκι μεταφέρθηκαν στο 96-well plate (lysate), όπου προστέθηκαν 90 μ L θρεπτικού (χωρίς FBS). Στη συνέχεια, έγινε ανάμειξη 100 μ L Dye solution με 2 μ L Catalyst και προστέθηκαν 102 μ L του διαλύματος σε κάθε πηγάδι. Ακολούθησε ανάδευση για 30 s στα 600 rpm, επώαση στο σκοτάδι για 3 min και, τέλος, η μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 492 nm στους χρόνους 0, 3, 6, 9, 12 και 15 min, χρησιμοποιώντας τη συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών της εταιρείας TECAN.

Για τις 2 παραπάνω μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα TECAN SPARK® MULTIMODE MICROPLATE READER (Männedorf, canton of Zürich, Switzerland), το οποίο έχει τη δυνατότητα μέτρησης φθορισμού.

3.2.4. Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση του ολικού RNA (48 h μετά την διαμόλυνση) αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό από τα πηγάδια και προστέθηκε το αντιδραστήριο TRI Reagent (μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και θειοκυανικής γουανιδίνης). Το μείγμα TRI Reagent-κύτταρα μεταφέρθηκε σε σωληνάρια και, αφού αναδεύτηκε σε vortex για 10 s, αφέθηκε για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τα 5 min, προστέθηκε BCP, και τα σωληνάρια αναδεύτηκαν ξανά για 10 s και φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 13.000 rpm για 15 min στους 4 °C. Από την φυγοκέντρωση δημιουργήθηκαν 3 φάσεις, από τις οποίες η ανώτερη (περιείχε το RNA) συλλέχθηκε σε νέα σωληνάρια και προστέθηκε ίσος όγκος ισοπροπανόλης 100%. Η μεσαία φάση περιείχε το DNA, ενώ η κατώτερη φάση περιείχε τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Τα σωληνάρια αναδεύτηκαν σε vortex για 1 s, τοποθετήθηκαν στον πάγο για 30 min και ακολούθησε φυγοκέντρωση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 13.000 rpm για 30 min στους 4 °C. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, καθώς το RNA, λόγω του βάρους του, αναμένεται να έχει κατακρημνισθεί ως ορατό ίζημα με ημιδιαφανές χρώμα. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν δύο εκπλύσεις του ιζήματος με διάλυμα αιθανόλης 75%, ακολουθούμενες από φυγοκέντρωση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 13.000 rpm για 3 min στους 4 °C, φυγοκέντρωση στις 13.000 rpm για 1 min στους 4 °C, ξήρανση του RNA για 2 min, ώστε να μην υπάρχει υγρασία, και επαναιώρηση του ιζήματος σε ddH₂O χωρίς RNase.

3.2.5. Μέτρηση σταθερότητας mRNA

Η ακτινομυκίνη D είναι ένας μη αναστρέψιμος αναστολέας της μεταγραφής, ο οποίος δεσμεύεται στο DNA με αποτέλεσμα να μην επιτρέπει την δράση της RNA πολυμεράσης. Επομένως, επωάζοντας τα κύτταρα με ακτινομυκίνη D σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα και ποσοτικοποιώντας τα mRNA ενδιαφέροντος, μπορεί να προσδιοριστεί ο ρυθμός αποικοδόμησης τους (ή σταθεροποίησης τους). Κατά τη δοκιμασία, ως ώρα 0 ορίστηκε η 48^η ώρα μετά την διαμόλυνση. Τα κύτταρα της ώρας 0 δεν επώαστηκαν με ακτινομυκίνη D. Τα υπόλοιπα κύτταρα επώαστηκαν με ακτινομυκίνη D (7.5 µg/mL) στις 3, 6 και 9 h πριν την 48^η ώρα. Στην συνέχεια την 48^η ώρα απομονώθηκε το ολικό RNA και αναλύθηκαν τα επίπεδα των mRNA με qPCR.

3.2.6. RT-PCR

Η RT-PCR είναι μία εργαστηριακή τεχνική, κατά την οποία γίνεται αντίστροφη μεταγραφή του «πρότυπου» RNA σε cDNA (complementary DNA), με τελικό σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό του RNA. Για την αντίδραση αυτή, υπεύθυνο είναι το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (M-MLV). Ένα ένζυμο που φυσιολογικά βρίσκεται σε RNA-ιούς και

μετατρέπει το μονόκλωνο RNA των ρετροϊών σε δίκλωνο DNA, ώστε να ενσωματωθεί στο DNA των κυττάρων του ξενιστή. Τα πειραματικά υλικά-αντιδραστήρια που χρειάστηκαν για την πραγματοποίηση της τεχνικής αυτής ήταν τα εξής: μόρια RNA, ddH₂O χωρίς RNase, RH, d-NTPs, 5x FS Buffer, DTT και το ένζυμο M-MLV. Η επιλογή των RH σε σχέση με τους ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο και τους oligo-dt εκκινητές έγινε, διότι οι RH επιτυγχάνουν πληρέστερη κάλυψη όλων των μορίων RNA.

Μετά την απομόνωση του RNA, δημιουργήθηκε για κάθε δείγμα ένα διάλυμα, το οποίο περιείχε 5 μ L δείγματος RNA, 2 μ L ddH₂O χωρίς RNase, 2 μ L RH (100 pmole) και 1 μ L d-NTPs (10 mM). Τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) για 5 min στους 65 °C. Έπειτα, τοποθετήθηκαν σε cryobox και ακολούθησε η δημιουργία του δεύτερου διαλύματος. Το δεύτερο διάλυμα περιείχε τα 10 μ L του πρώτου διαλύματος, 3.5 μ L ddH₂O χωρίς RNase, 4 μ L 5x FS Buffer, 2 μ L DTT (100 mM) και 0.5 μ L ενζύμου M-MLV (συνολικός όγκος 20 μ L). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν ξανά στον θερμικό κυκλοποιητή για να συνεχιστεί η διαδικασία της RT-PCR. Ακολούθησαν 10 min στους 25 °C για την υβριδοποίηση των RH στο RNA, 60 min στους 37 °C για την σύνθεση cDNA και 5 min στους 75 °C για την καταστροφή του ενζύμου M-MLV. Τέλος, τα δείγματα αφαιρέθηκαν από τον θερμικό κυκλοποιητή και ήταν πλέον έτοιμα για να χρησιμοποιηθούν στην qPCR.

3.2.7. qPCR

Η qPCR είναι μία τεχνική, η οποία συνδυάζει την ενίσχυση μιας αλληλουχίας DNA στόχου με την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης αυτού του DNA. Αυτό επιτυγχάνεται λόγω της σύνδεσης μιας φθορίζουσας ουσίας με το προϊόν που παράγεται. Η φθορίζουσα ουσία ανιχνεύεται από τον θερμοκυκλοποιητή και ο θερμοκυκλοποιητής δίνει το κατάλληλο σήμα. Η ποσοτικοποίηση γίνεται μέσω της τιμής Ct (threshold cycle), τιμή που ερμηνεύει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού σε κάθε δείγμα να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Επομένως, η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη με την συγκέντρωση του υποστρώματος (χαμηλότερη τιμή Ct αντιστοιχεί σε υψηλότερη συγκέντρωση υποστρώματος και το αντίστροφο).

Η φθορίζουσα ουσία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η SYBR Green I, μια φωτοευαίσθητη ουσία που ενσωματώνεται ισχυρά σε δίκλωνο DNA (πολύ ασθενή σύνδεση σε μονόκλωνο DNA) και επιτρέπει την ανίχνευση των προϊόντων DNA. Συγκεκριμένα, η αύξηση των προϊόντων DNA αυξάνει την ένταση του φθορισμού και, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, την ανίχνευση από τον θερμοκυκλοποιητή. Η qPCR χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των επιπέδων των

γονιδίων ενδιαφέροντος σε σύγκριση με γονίδια ελέγχου (ενδογενή γονίδια σταθερής έκφρασης, housekeeping genes).

Για τη λειτουργία της αντίδρασης, τα δείγματα cDNA αραιώθηκαν κατά 12 φορές με ddH₂O χωρίς RNase και, στη συνέχεια, αναδεύτηκαν με την χρήση πιπέτας. Δημιουργήθηκαν διαλύματα με τους κατάλληλους εκκινητές (primer mix) για κάθε ζεύγος εκκινητών και η κάθε αντίδραση περιείχε 10 µL αραιωμένου κατά 12 φορές δείγματος cDNA, 5.6 µL ddH₂O χωρίς RNase, 2 µL 10x Taq buffer B, 0.4 µL d-NTPs (10 mM), 1 µL εκκινητών (5 µM), 0.9 µL χρωστικής SYBR GREEN I (1x) και 0.08 µL Kapa Taq polymerase (5 unit), με τελικό όγκο αντίδρασης τα 20 µL. Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε 3 φορές. Για την qPCR χρησιμοποιήθηκαν μικροπλακέτες με 96 θέσεις, ειδικές για την συγκεκριμένη διεργασία (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, Roche). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στη μικροπλακέτα και η μικροπλακέτα σφραγίστηκε αεροστεγώς, με συγκεκριμένη μεμβράνη. Έπειτα, φυγοκεντρήθηκε στα 1300 rpm υπό συνεχή ανάδευση για 30 s. Τέλος, η μικροπλακέτα τοποθετήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή (CFX Opus 96, Bio-Rad) για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση ήταν το Bio-Rad CFX Maestro και το πρωτόκολλο ενίσχυσης περιείχε 41 κύκλους, με κάθε κύκλο να περιλαμβάνει 10 s στους 95 °C για την επίτευξη της αποδιάταξης και 30 s στους 60 °C για την υβριδοποίηση των εκκινητών στα μονόκλωνα μόρια DNA και για την επιμήκυνσή τους. Τέλος, παράγεται η καμπύλη τήξης του προϊόντος σε θερμοκρασίες από 65 έως 95 °C με βήμα το 0.5 °C. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, έγινε κανονικοποίηση των τιμών Ct των γονιδίων ενδιαφέροντος ως προς τις τιμές Ct των ενδογενών γονιδίων σταθερής έκφρασης GAPDH και U6, σύμφωνα με την μέθοδο ΔΔCt (Livak and Schmittgen, 2001).

3.2.8. Ανοσοστύπωμα κατά Western

Το ανοσοστύπωμα κατά Western χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος. Η συλλογή των κυττάρων και η απομόνωση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων έγινε 48 h μετά την διαμόλυνση.

3.2.9. Απομόνωση πρωτεϊνών

Για τη λύση των κυττάρων, αρχικά, αφαιρέθηκε το θρεπτικό ανάπτυξης και προστέθηκε στα πηγάδια το διάλυμα λύσης (25 mM Tris με pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1x αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών). Έπειτα, το plate αναδεύτηκε στα 200 rpm για 30 min στον πάγο, ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα από των πυθμένα των πηγαδιών. Στη συνέχεια, τα δείγματα συλλέχθηκαν σε σωληνάρια, φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 13.000 rpm στους 4 °C για 30 λεπτά και το υπερκείμενο, το οποίο περιείχε

τις πρωτεΐνες, συλλέχθηκε σε καινούρια σωληνάρια. Τέλος, προστέθηκε το διάλυμα Laemmli 6x και τα δείγματα θερμάνθηκαν για 5 min στους 100 °C.

3.2.10. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Για να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12-15% (SDS-PAGE). Στη συνέχεια, ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, κατά την οποία οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος, καθώς μετακινούνταν από τον θετικό προς τον αρνητικό πόλο (υπό σταθερό ηλεκτρικό πεδίο), εξαιτίας του SDS στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό, το οποίο έχει την ικανότητα να φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών να γίνεται βάσει του μοριακού τους βάρους και όχι λόγω του ισοηλεκτρικού τους σημείου.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αποτελείται από 2 ξεχωριστά πηκτώματα, το πήκτωμα επιστοιβαξης (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (running ή separating gel). Το πήκτωμα επιστοιβαξης βρίσκεται στο πάνω μέρος του συνολικού πηκτώματος, ενώ το πήκτωμα διαχωρισμού βρίσκεται στο κάτω μέρος του πηκτώματος. Η πυκνότητα στο πήκτωμα επιστοιβαξης είναι μικρότερη από του πηκτώματος διαχωρισμού, λόγω της μικρότερης συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδης. Επίσης, τα pH μεταξύ των πηκτωμάτων διαφέρουν (6.8 και 8.8 pH αντίστοιχα). Έτσι, τα δείγματα κινήθηκαν μαζί ως τα όρια των 2 πηκτωμάτων, ενώ στο πήκτωμα διαχωρισμού κινήθηκαν βάσει του μοριακού τους βάρους.

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για περίπου 20-25 min στα 100 Volt, ώστε να εισέλθουν από το πήκτωμα επιστοιβαξης στο πήκτωμα διαχωρισμού και, έπειτα, για περίπου 60 min στα 120 Volt για να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες. Κατά την ηλεκτροφόρηση, ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν έλεγχος των ζωνών του μάρτυρα. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης τοποθετήθηκε σε συσκευή ηλεκτρομεταφοράς. Για την ηλεκτρομεταφορά (μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης) χρησιμοποιήθηκε μία κασετίνα, στην οποία τοποθετήθηκαν κατά σειρά από την μαύρη προς την λευκή πλευρά τα εξής υλικά: ένα σφουγγάρι, ένα απορροφητικό χαρτί Whatmann, το πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου, μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ένα απορροφητικό χαρτί Whatmann και ένα σφουγγάρι. Όλα τα υλικά, προτού χρησιμοποιηθούν, επώαστηκαν στο διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer). Transfer buffer τοποθετήθηκε και στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς. Η διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς πραγματοποιήθηκε σε δωμάτιο ψύξης (4 °C). Το τροφοδοτικό έντασης ρυθμίστηκε στα 390 mA και η διαδικασία διήρκησε περίπου 90 min. Μετά την διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς, ακολούθησε χρώση

της μεμβράνης με χρωστική Ponceau, ώστε να ελεγχθεί αν έχει επιτευχθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πύκνωμα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Τέλος, η μεμβράνη ξεπλύθηκε σε διάλυμα TBS-T για 2 min και επώαστηκε για 60 min, σε θερμοκρασία δωματίου, σε παρασκευασμένο διάλυμα TBS-T με 5% w/v άπαχο γάλα, για να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις.

3.2.11. Επώαση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το πρωτογενές αντίσωμα

Μετά την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ειδικό αντίσωμα ενδιαφέροντος. Έπειτα, το δοχείο, το οποίο περιείχε την μεμβράνη και το αντίσωμα, επώαστηκε για τουλάχιστον 16 h σε αναδευτήρα στους 4 °C σε δωμάτιο ψύξης. Όλα τα αντισώματα διαλύθηκαν σε διάλυμα TBS-T περιεκτικότητας 2.5% άπαχου γάλακτος.

3.2.12. Επώαση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το δευτερογενές αντίσωμα και εμφάνιση εικόνας

Μετά την επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, έγινε απόρριψη του αντισώματος (πρωτογενούς) και ακολούθησαν 3 εκπλύσεις (της μεμβράνης) των 5 min με διάλυμα TBS-T. Στη συνέχεια, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη 1 h επώασης, έγινε ξανά απόρριψη του αντισώματος (δευτερογενούς) και επαναλήφθηκαν 3 πλύσεις των 5 min με διάλυμα TBS-T. Οι εκπλύσεις της μεμβράνης, καθώς και η επώαση της μεμβράνης, έγιναν σε αναδευτήρα στα 100 rpm. Επίσης, όλα τα αντισώματα διαλύθηκαν σε διάλυμα TBS-T περιεκτικότητας 2.5% άπαχου γάλακτος. Έπειτα, για να μπορέσει να γίνει η εμφάνιση της εικόνας, αναμίχθηκαν ίσοι όγκοι αντιδραστηρίων του εμπορικού αντιδραστηρίου ECL, με το οποίο καλύφθηκε η μεμβράνη και επώαστηκε στο σκοτάδι για 5 min. Το διάλυμα ECL είναι ένα μίγμα λουμινόλης και H₂O₂, το οποίο αντιδρά με το δευτερογενές αντίσωμα και, συγκεκριμένα, με την υπεροξειδάση που περιέχει. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, το H₂O₂ να διασπάται από την υπεροξειδάση, και να παράγονται ρίζες οξυγόνου, οι οποίες αντιδρούν με την λουμινόλη, προκαλώντας την απελευθέρωση φωτονίων. Τέλος, η μεμβράνη τοποθετήθηκε στο μηχάνημα Vilber (Marne-la-Vallée, France), το οποίο δίνει την δυνατότητα εμφάνιση εικόνας με κατάλληλη έκθεση φωτός και κατάλληλο χρόνο έκθεσης. Οι εικόνες που προέκυψαν από την παραπάνω εμφάνιση αναλύθηκαν με χρήση του προγράμματος ImageJ και η ένταση του σήματος ποσοτικοποιήθηκε για κάθε πρωτεΐνη και για κάθε δείγμα ξεχωριστά.

3.2.13. Μέθοδος SUnSET

Η πουρομυκίνη είναι ένα αντιβιοτικό, που μπορεί να συνδεθεί στο καρβοξυτελικό άκρο μια αμινοξικής αλυσίδας, κατά τη διαδικασία της μετάφρασης, και να την αποδεσμεύσει από το

ριβόσωμα. Επομένως, επωάζοντας τα κύτταρα, που έχουν διαμολυνθεί, με πουρομυκίνη δίνεται η δυνατότητα να γίνει μέτρηση της πρωτεϊνοσύνθεσης με τη μέθοδο SUnSET (Surface Sensing of Translation) (Schmid et al. 2009). Στη δοκιμασία αυτή, τα κύτταρα επωάστηκαν με πουρομυκίνη (5 mM) 20 min πριν την συλλογή τους (48^η ώρα), έπειτα, χρησιμοποιήθηκε ανοσοστύπωμα κατά Western και, τέλος, έγινε επώαση με αντίσωμα έναντι της πουρομυκίνης. Η πουρομυκίνη προσδένεται στο καρβοξυτελικό άκρο της υπό μετάφρασης αμινοξικής αλυσίδας και την αποδεσμεύει από το ριβόσωμα.

3.2.14. Χρήση λογισμικών προγραμμάτων

Τα λογισμικά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν:

- Microsoft Office Word 2010 (για τη συγγραφή της διατριβής)
- Microsoft Office Excel 2010 (για τη μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων)
- Bio-Rad CFX Maestro (για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR)
- EvolutionCapt Edge, Vilber (για την εμφάνιση των ζωνών από το ανοσοστύπωμα κατά Western)
- ImageJ (για την ανάλυση των ζωνών από το ανοσοστύπωμα κατά Western)
- GraphPad Prism 8, Windows Version 8.0.1 (για την δημιουργία γραφημάτων και την στατιστική επεξεργασία)

3.2.15. Στατιστική επεξεργασία

Για τον έλεγχο της ομαλότητας της κατανομής των τιμών της κάθε μεταβλητής χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες Shapiro-Wilk, Anderson-Darling, D'Agostino-Pearson omnibus και Kolmogorov-Smirnov. Όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση (M.O. $\pm$ T.A) και αποτελούνται από τουλάχιστον τρεις ανεξάρτητες μετρήσεις. Η σύγκριση μεταξύ της συνθήκης-ελέγχου (empty) και των υπολοίπων συνθηκών (hsHuR, HuR, HuB, HuC και HuD) έγινε με ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (One-way ANOVA) ή, όπου ήταν αναγκαίο, με εφαρμογή του Student's t-test (παράγραφος 4.3), ενώ η σύγκριση μεταξύ της συνθήκης-ελέγχου (ctrl shRNAs) και της αντίστοιχης συνθήκης (HuR shRNAs) έγινε με εφαρμογή του Student's t-test. Όπου δεν υπήρχε ομαλή κατανομή των τιμών χρησιμοποιήθηκε το Kruskal-Wallis test και το Kolmogorov-Smirnov test αντίστοιχα. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε σε $p < 0.05$ και η στατιστική επεξεργασία έγινε με το λογισμικό GraphPad Prism 8.0.1.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

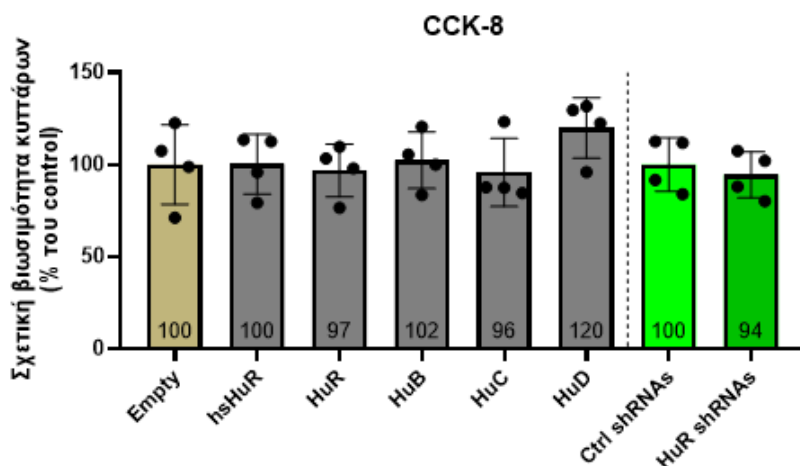
4.1. Επίδραση της διαμόλυνση στη βιωσιμότητα των κυττάρων και την κυτταροτοξικότητα

Για να ελεγχθεί η επίδραση της διαμόλυνσης στη βιωσιμότητα των κυττάρων και την κυτταροτοξικότητα χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι CCK-8 και LDH, αντίστοιχα.

4.1.1. CCK-8

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων SK-N-SH με πλασμιδιακούς φορείς που είτε υπερεκφράζουν τις πρωτεΐνες Hu (hsHuR, HuR, HuB, HuC και HuD), είτε αποσιωπούν την HuR (shRNA για HuR). Επίσης, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με τους αντίστοιχους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (empty και control shRNAs), ώστε να μπορεί να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων. Τα δείγματα επώαστηκαν για 46 h και, ύστερα, προστέθηκαν 15 μ L αντιδραστηρίου CCK-8. Ακολούθησαν 2 h επώασης και η μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων βρέθηκε ότι οι πλασμιδιακοί φορείς, που χρησιμοποιήθηκαν, δεν επηρεάζουν την βιωσιμότητα των κυττάρων (εικόνα 12). Επομένως, ήταν κατάλληλοι για να χρησιμοποιηθούν σε επόμενα πειράματα.



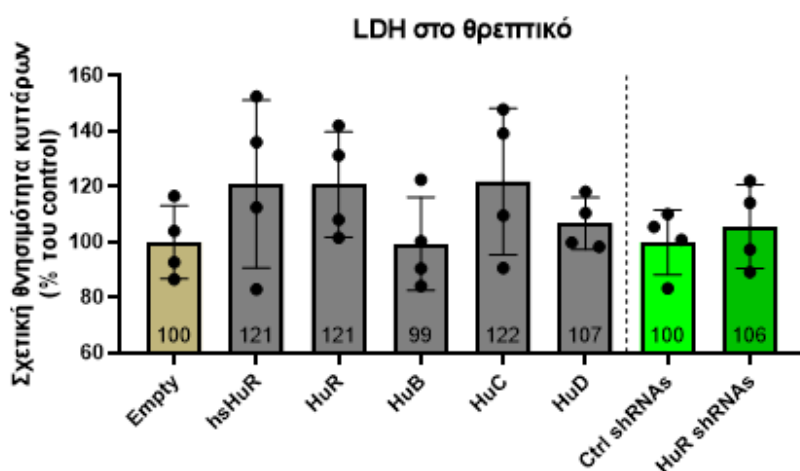
Εικόνα 12: Ποσοτικοποίηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου, με την μέθοδο CCK-8 (M.O. $\pm$ T.A). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 4 πειραματικές επαναλήψεις (n = 4).

4.1.2. LDH

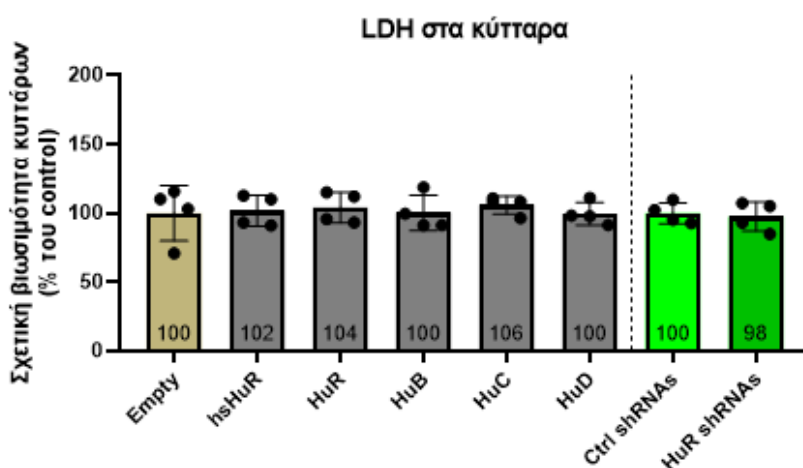
Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν και στη μέθοδο CCK-8. Με τη μέθοδο LDH μπορεί να ελεγχθεί ο αριθμός των νεκρών κυττάρων, ο

αριθμός των ζωντανών κυττάρων και, κατά συνέπεια, η κυτταροτοξικότητα (λόγος νεκρών/ζωντανών κυττάρων). Μετά τις 48 h επώασης, (έχει προηγηθεί διαμόλυνση) μία ποσότητα υλικού πάρθηκε από κάθε δείγμα, πριν (για τη μέτρηση του αριθμού των νεκρών κυττάρων) και μετά τη λύση (για τη μέτρηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων) των κυττάρων και αναμείχθηκε με 100 μ L Dye solution και 2 μ L Catalyst. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στα 492 nm.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων βρέθηκε ότι οι πλασμιδιακοί φορείς, που χρησιμοποιήθηκαν, δεν επηρεάζουν τον αριθμό των νεκρών (εικόνα 13) και των ζωντανών κυττάρων (εικόνα 14), καθώς δεν υπάρχει καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά.

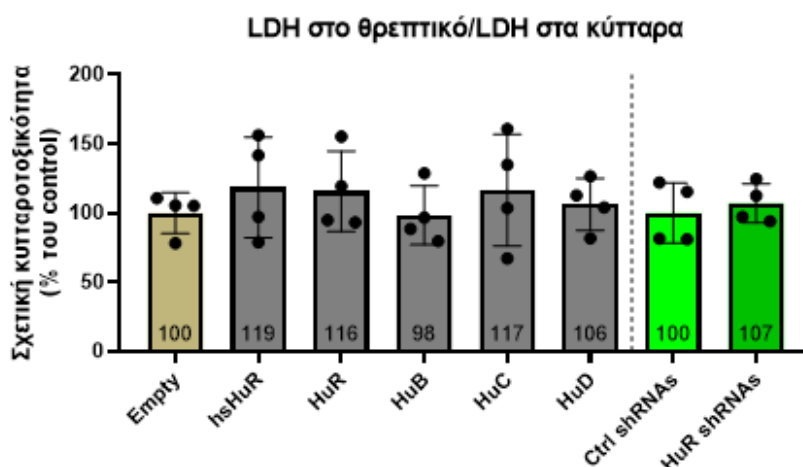


Εικόνα 13: Ποσοτικοποίηση του αριθμού των νεκρών κυττάρων συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου, με την μέθοδο LDH (M.O. $\pm$ T.A). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 4 πειραματικές επαναλήψεις (n = 4).



Εικόνα 14: Ποσοτικοποίηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου, με την μέθοδο LDH (M.O. $\pm$ T.A). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 4 πειραματικές επαναλήψεις (n = 4).

Επίσης, σύμφωνα με την **εικόνα 15** δεν παρουσιάζεται κυτταροτοξικότητα. Επομένως, επαληθεύτηκε το γεγονός, ότι οι πλασμιδιακοί φορείς μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε επόμενα πειράματα.



Εικόνα 15: Ποσοτικοποίηση του λόγου των νεκρών/ζωντανών κυττάρων συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου, με την μέθοδο LDH (M.O. $\pm$ T.A). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 4 πειραματικές επαναλήψεις (n = 4).

4.2. Επίδραση των πρωτεϊνών Hu στα επίπεδα έκφρασης των ενδογενών mRNA της ολικής SNCA, της long SNCA, του pre-mRNA της SNCA και της DYRK1A

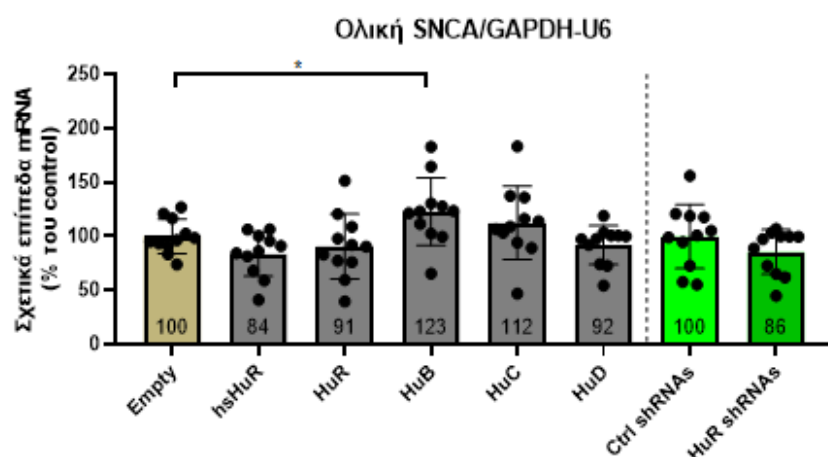
Για να ελεγχθεί ο τρόπος με τον οποίο επιδρούν οι πρωτεΐνες Hu στα επίπεδα έκφρασης του mRNA της ολικής SNCA και της long SNCA (mRNA με διαφορετικό μήκος στην 3'UTR, με ~290-2550 και ~2550 νουκλεοτίδια, αντίστοιχα), του pre-mRNA της SNCA και της DYRK1A έγινε διαμόλυνση των κυττάρων SK-N-SH με πλασμιδιακούς φορείς που είτε υπερεκφράζουν τις πρωτεΐνες Hu (hsHuR, HuR, HuB, HuC και HuD), είτε αποσιωπούν την πρωτεΐνη HuR (shRNA για HuR). Επίσης, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με τους αντίστοιχους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (empty και control shRNA), ώστε να μπορεί να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων. Τέλος, εξετάστηκε η επίδραση στους λόγους long SNCA/ολικής SNCA και pre-mRNA SNCA/ώριμο mRNA SNCA. Στη μελέτη αυτή δεν χρησιμοποιήθηκαν shRNA για τις HuB, HuC και HuD, καθώς αυτές οι Hu δεν εκφράζονται στα κύτταρα SK-N-SH.

Μετά από 48 h επώασης, έγινε συλλογή των κυττάρων, απομόνωση του RNA, παραγωγή cDNA μέσω της RT-PCR και έλεγχος των επιπέδων των παραπάνω mRNA πραγματοποιώντας qPCR. Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των mRNA ως

γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν το GAPDH και το U6. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στην παράγραφο 3.1.6.

4.2.1. Ολική SNCA

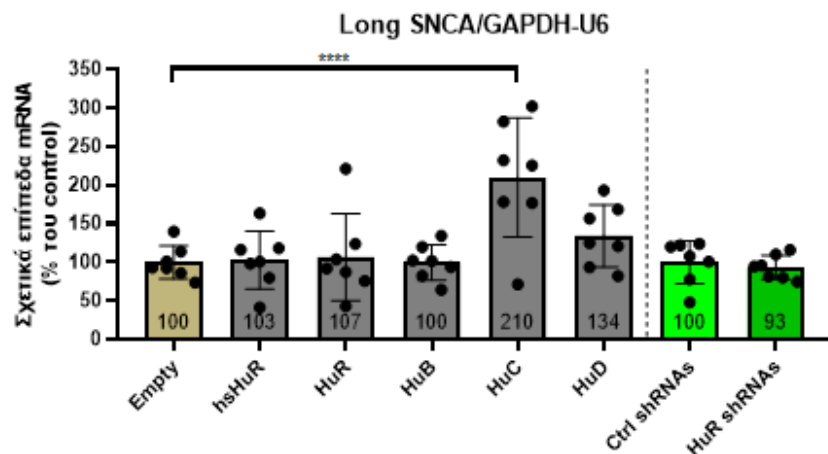
Σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς mRNA της ολικής SNCA, βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση κατά την υπερέκφραση της HuB, σε σύγκριση με το empty (εικόνα 16). Από το γράφημα φαίνεται ότι η HuB αύξησε κατά 23% την ολική SNCA (Kruskal-Wallis test, $p < 0.046$), ενώ, οι υπόλοιπες Hu, καθώς και η αποσιώπηση της HuR δεν φαίνεται να επηρέασαν τα επίπεδα του mRNA.



Εικόνα 16: Ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA της ολικής SNCA συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (M.O. $\pm$ T.A). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 11 πειραματικές επαναλήψεις ($n = 11$).

4.2.2. Long SNCA

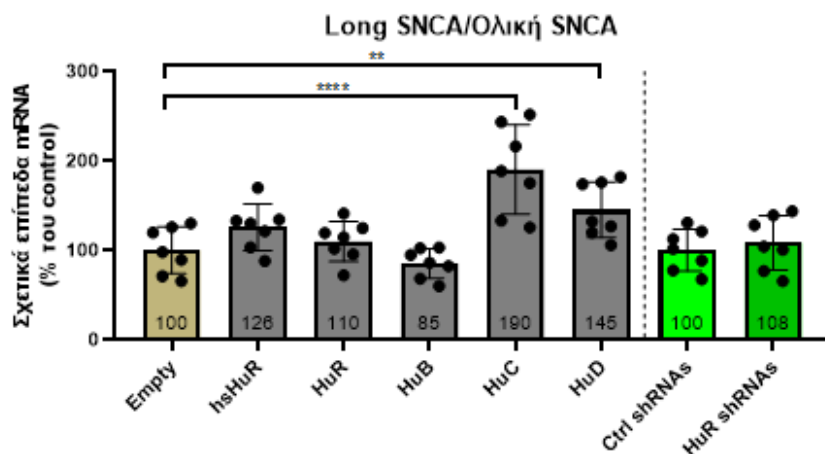
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση της υπερεκφρασμένης HuC, σε σύγκριση με το empty, στα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς mRNA της long SNCA (εικόνα 17). Τα επίπεδα του mRNA αυξήθηκαν κατά 110% με την HuC (one-way ANOVA, $p < 0.0001$). Οι υπόλοιπες Hu, καθώς και η αποσιώπηση της HuR δεν επηρέασαν τα επίπεδα του mRNA.



Εικόνα 17: Ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA της long SNCA συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (M.O. $\pm$ T.A). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 7 πειραματικές επαναλήψεις (n = 7).

4.2.3. Long SNCA/ολική SNCA

Σχετικά με τον λόγο long SNCA/ολική SNCA, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση όταν υπερεκφράζονται η HuC και η HuD, σε σύγκριση με το empty (εικόνα 18). Ο λόγος long SNCA/ολική SNCA αυξήθηκε στη HuC κατά 90% και στη HuD κατά 45% (one-way ANOVA, $p < 0.0001$ και $p = 0.008$ αντίστοιχα). Οι υπόλοιπες Hu, όπως και η αποσιώπηση της HuR δεν επηρέασαν τον λόγο long SNCA/ολική SNCA.

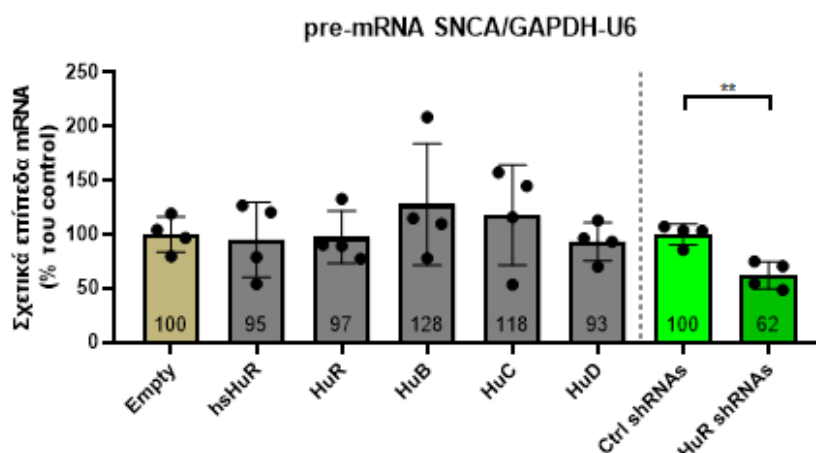


Εικόνα 18: Ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του λόγου long SNCA/ολικής SNCA συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (M.O. $\pm$ T.A). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 7 πειραματικές επαναλήψεις (n = 7).

4.2.4. pre-mRNA SNCA

Σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς pre-mRNA SNCA, βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση κατά την αποσιώπηση της HuR (shRNA για HuR), σε

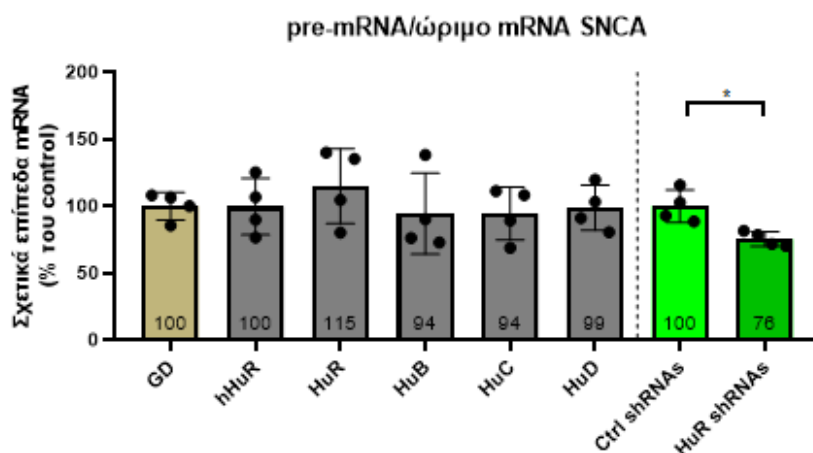
σύγκριση με το control shRNA (**εικόνα 19**). Συγκεκριμένα, η αποσιώπηση της HuR οδήγησε σε μείωση του pre-mRNA κατά 38% (Student's t-test, $p = 0.003$), ενώ οι υπερεκφρασμένες Hu δεν επηρέασαν τα επίπεδα του pre-mRNA.



Εικόνα 19: Ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του pre-mRNA της SNCA συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (M.O. $\pm$ T.A.). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 4 πειραματικές επαναλήψεις ($n = 4$).

4.2.5. pre-mRNA SNCA/ώριμο mRNA SNCA

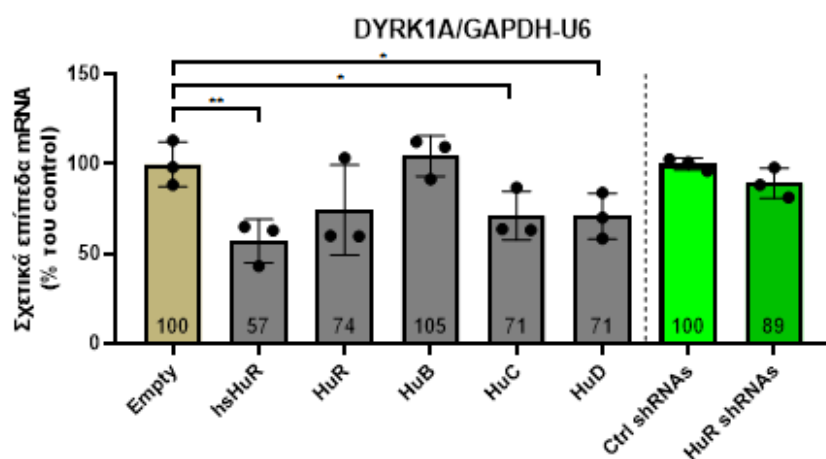
Όσον αφορά τον λόγο pre-mRNA SNCA/ώριμο mRNA SNCA, τα αποτελέσματα έδειξαν, όπως και στην προηγούμενη παράγραφο, ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση κατά την αποσιώπηση της HuR (shRNA για HuR), σε σύγκριση με το control shRNA (**εικόνα 20**). Κατά την αποσιώπηση της HuR, ο λόγο pre-mRNA SNCA/ώριμο mRNA SNCA μειώθηκε κατά 24% (Student's t-test, $p = 0.0102$), ωστόσο οι υπερεκφρασμένες Hu δεν επηρέασαν τον λόγο pre-mRNA SNCA/ώριμο mRNA SNCA.



Εικόνα 20: Ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του λόγου pre-mRNA SNCA/ώριμου mRNA SNCA συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (Μ.Ο. $\pm$ Τ.Α). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 4 πειραματικές επαναλήψεις (n = 4).

4.2.6. DYRK1A

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση των υπερεκφρασμένων hsHuR, HuC και HuD σε σύγκριση με το empty, στα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς mRNA της DYRK1A (**εικόνα 21**). Συγκεκριμένα, η hsHuR, η HuC και η HuD μείωσαν τα επίπεδα του mRNA κατά 43%, 29% και 29% αντίστοιχα (one-way ANOVA, $p < 0.005$, $p = 0.04$ και $p = 0.03$). Οι υπόλοιπες Hu, καθώς και η αποσιώπηση της HuR δεν επηρέασαν τα επίπεδα του mRNA.



Εικόνα 21: Ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA της DYRK1A συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (Μ.Ο. $\pm$ Τ.Α). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 3 πειραματικές επαναλήψεις (n = 3).

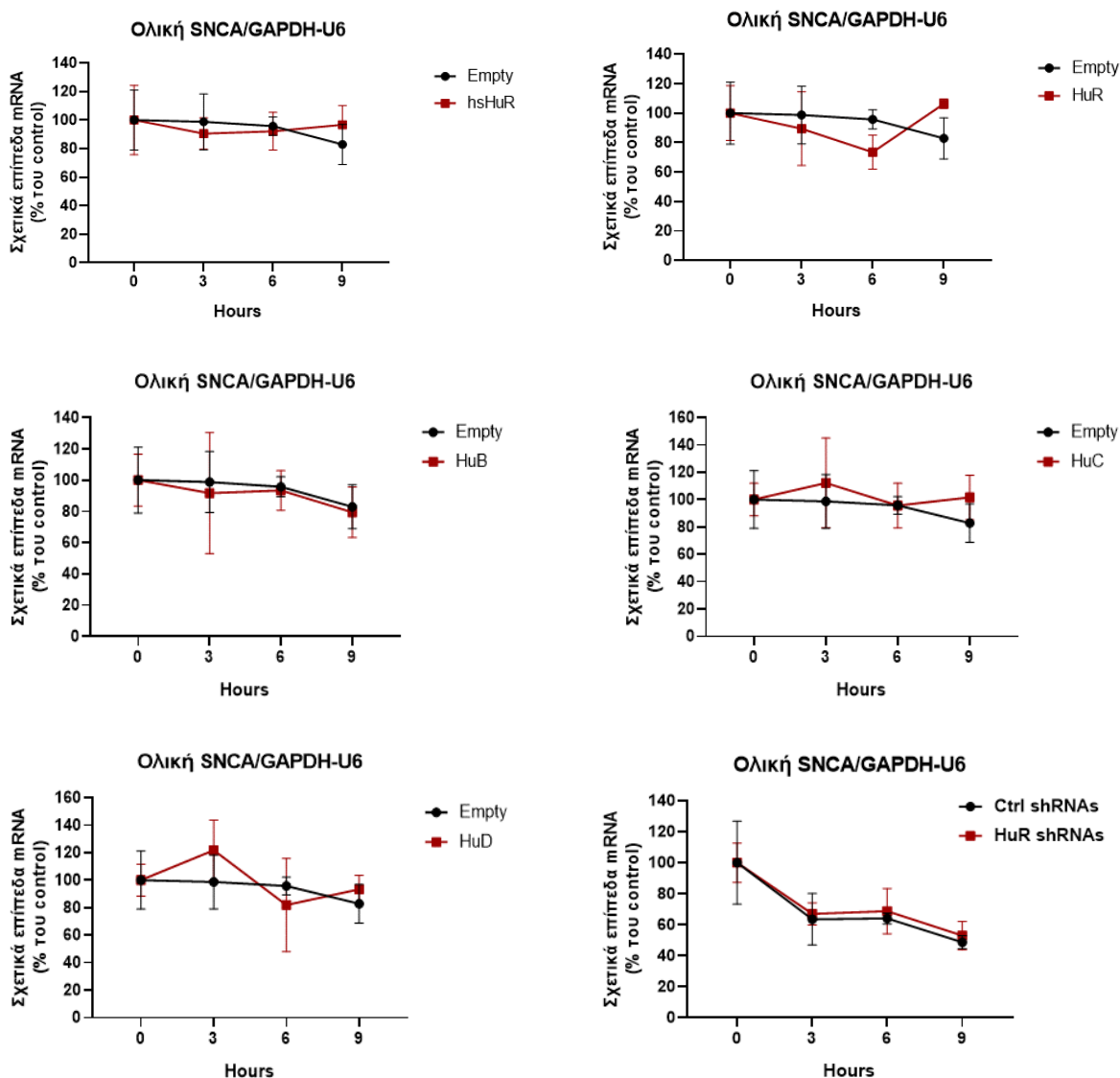
4.3. Ο ρόλος των πρωτεϊνών Hu στη σταθερότητα των mRNA της ολικής SNCA, της long SNCA και της DYRK1A

Μετά τον έλεγχο της επίδρασης των πρωτεϊνών Hu στα επίπεδα έκφρασης των mRNA της ολικής SNCA, της long SNCA, του pre-mRNA της SNCA και της DYRK1A, το επόμενο βήμα ήταν να ελεγχθεί αν η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Hu ή η αποσιώπηση της πρωτεΐνης HuR επηρεάζουν την σταθερότητα (ή ρυθμό αποικοδόμησης) αυτών των mRNA, με εξαίρεση το pre-mRNA της SNCA, καθώς και τον λόγο long SNCA/ολική SNCA. Ο λόγος εξαίρεσης του pre-mRNA της SNCA είναι ότι η μέτρηση αυτή γίνεται για να βρεθεί αν κάποια πρωτεΐνη Hu σταθεροποιεί κάποιο από τα mRNA και όχι το pre-mRNA. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι πλασμιδιακοί φορείς. Μετά τις 48 h επώασης, έγινε συλλογή των

κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί ακτινομυκίνη D 3, 6 και 9 h πριν την 48^η ώρα, και των κυττάρων της ώρας 0 (απουσία ακτινομυκίνης D). Έπειτα, ακολούθησε απομόνωση του RNA, RT-PCR και qPCR για να ποσοτικοποιηθούν τα παραπάνω mRNA. Η ακτινομυκίνη D (μη αναστρέψιμος αναστολέας της μεταγραφής) είναι ο παράγοντας που μας επιτρέπει να ελέγξουμε αν οι πρωτεΐνες Hu επηρεάζουν τον ρυθμό αποικοδόμησης (ή σταθεροποίησης) αυτών των mRNA. Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των mRNA ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν το GAPDH και το U6.

4.3.1. Ολική SNCA

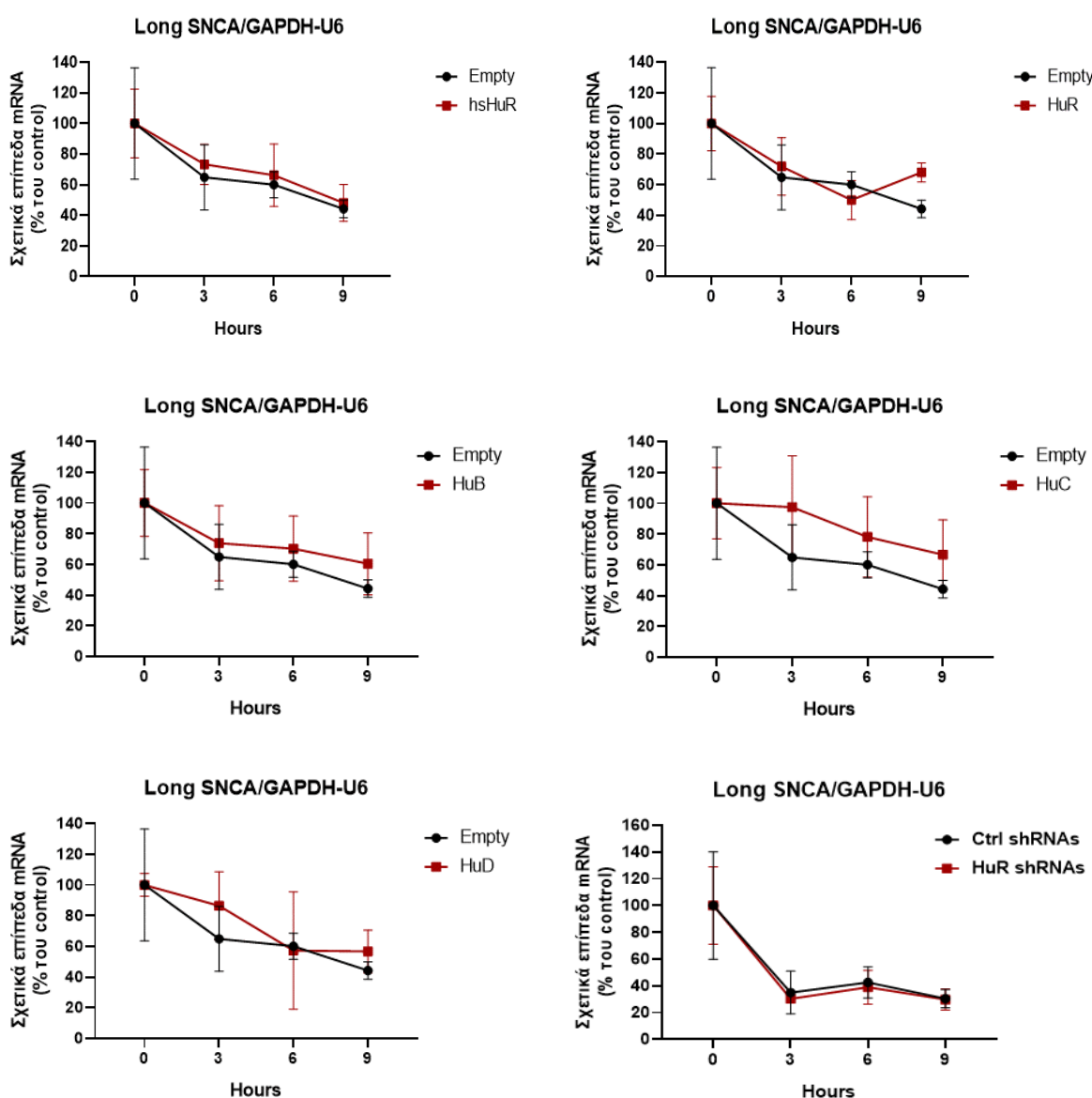
Σχετικά με τα επίπεδα του ενδογενούς mRNA της ολικής SNCA, δεν βρέθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά. Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Hu, όπως και η αποσιώπηση της HuR δεν επηρέασαν την σταθερότητα του mRNA σε σύγκριση με το empty και το control shRNA (εικόνα 22).



Εικόνα 22: Ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA της ολικής SNCA συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου στις 0, 3, 6 και 9 h (Μ.Ο. $\pm$ Τ.Α). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 3 πειραματικές επαναλήψεις (n = 3).

4.3.2. Long SNCA

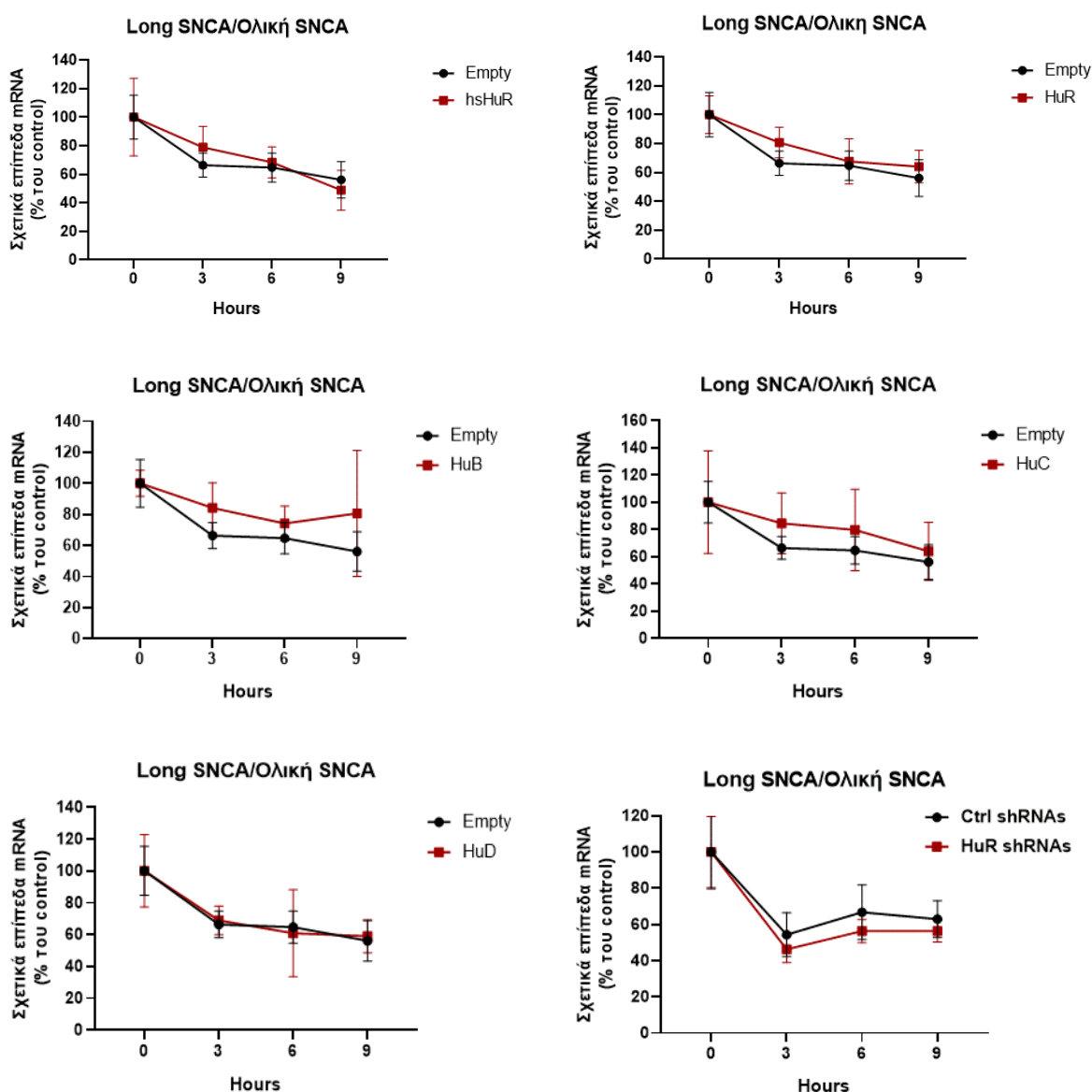
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρχε κάποια στατιστικώς σημαντική επίδραση στα επίπεδα του ενδογενούς mRNA της long SNCA. Επομένως, οι υπερεκφρασμένες Hu, καθώς και η αποσιώπηση της HuR δεν επηρέασαν την σταθερότητα του mRNA σε σύγκριση με τα αντίστοιχα control τους (εικόνα 23).



Εικόνα 23: Ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA της long SNCA συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου στις 0, 3, 6 και 9 h (M.O. $\pm$ T.A). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 3 πειραματικές επαναλήψεις (n = 3).

4.3.3. Long SNCA/Ολική SNCA

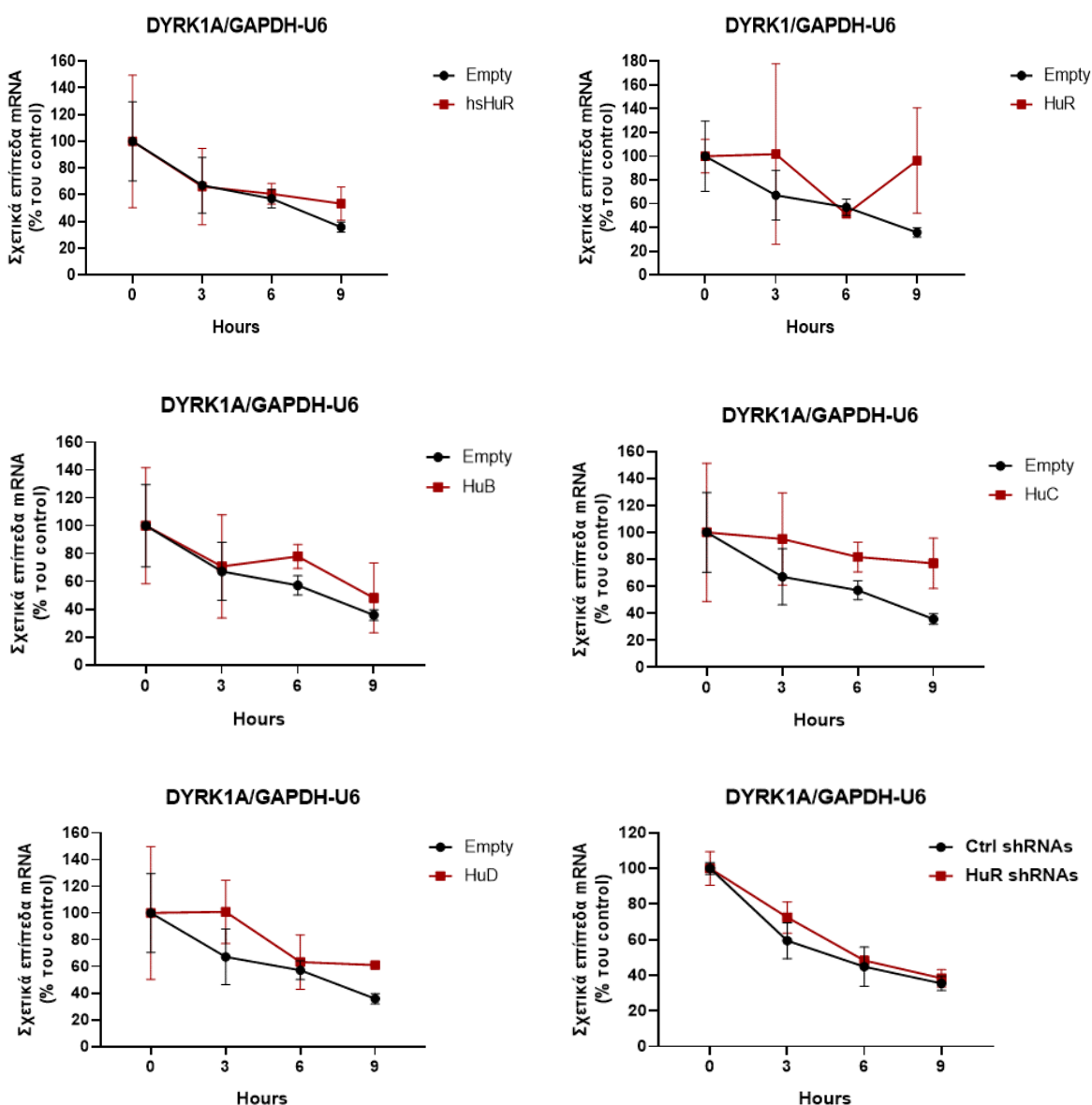
Όσον αφορά τον λόγο long SNCA/ολική SNCA, επίσης δεν βρέθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική επίδραση. Συγκεκριμένα, οι υπερεκφρασμένες Hu, καθώς και η αποσιώπηση της HuR δεν επηρέασαν τον λόγο long SNCA/ολική SNCA σε σύγκριση με τα αντίστοιχα control τους (εικόνα 24).



Εικόνα 24: Ποσοτικοποίηση του λόγου long SNCA/ολικής SNCA συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου στις 0, 3, 6 και 9 h (M.O. $\pm$ T.A). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 3 πειραματικές επαναλήψεις (n = 3).

4.3.4. DYRK1A

Όπως και στα προηγούμενα αποτελέσματα έτσι κι εδώ, η σταθερότητα του ενδογενούς mRNA της DYRK1A δεν επηρεάστηκε από τις υπερεκφρασμένες Hu, αλλά ούτε και όταν έγινε αποσιώπηση της HuR σε σύγκριση με τα αντίστοιχα control τους. Στην **εικόνα 25** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, όπου φαίνεται πως δεν υπάρχει κάποια στατιστικώς σημαντική επίδραση.



Εικόνα 25: Ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του mRNA της DYRK1A συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου στις 0, 3, 6 και 9 h (M.O. ± T.A). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 3 πειραματικές επαναλήψεις (n = 3).

4.4. Επίδραση των πρωτεϊνών Hu στα επίπεδα των ενδογενών πρωτεϊνών (Hu, SNCA, DYRK1A, p62, LAMP2A και HSC70)

Παραπάνω ελέγχθηκε ο τρόπος με τον οποίο επιδρούν οι πρωτεΐνες Hu στα επίπεδα έκφρασης του mRNA (παράγραφος 4.2) και στον ρυθμό αποικοδόμησης τους (παράγραφος 4.3). Επομένως, το επόμενο πείραμα ήταν να ελεγχθεί αν η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Hu ή η αποσιώπηση της πρωτεΐνης HuR επηρεάζουν τα επίπεδα συγκεκριμένων ενδογενών πρωτεϊνών (Hu, SNCA, DYRK1A, p62, LAMP2A και HSC70/HSPA8). Οι πρωτεΐνες Hu ελέγχθηκαν, ώστε να επιβεβαιωθεί η λειτουργία των πλασμιδιακών φορέων, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν γιατί:

- η SNCA είναι το κύριο συστατικό των LBs, χαρακτηριστικό της νΠ
- η DYRK1A ίσως φωσφορυλιώνει την SNCA (ser-129), η οποία αποτελεί το 90% των LBs, και, πιθανόν, επηρεάζει τα επίπεδα της,
- η p62 είναι δείκτης της μακροαυτοφαγίας (αυξημένη p62 σημαίνει ότι δεν λειτουργεί το αυτοφαγόσωμα, ενώ μειωμένη p62, το αντίστροφο),
- η LAMP2A καθορίζει τον ρυθμό της αυτοφαγίας με CMA (αυξημένη LAMP2A σημαίνει ότι λειτουργεί η αυτοφαγία με CMA, ενώ μειωμένη LAMP2A το αντίστροφο)
- και η HSC70 ενισχύει την αναδίπλωση ή την αποικοδόμηση της SNCA για να μειωθούν τα συσσωματώματά της και μεταφέρει τη SNCA στη LAMP2A (αυξημένη HSC70 σημαίνει ότι λειτουργεί η αυτοφαγία CMA, ενώ μειωμένη HSC70 το αντίθετό).

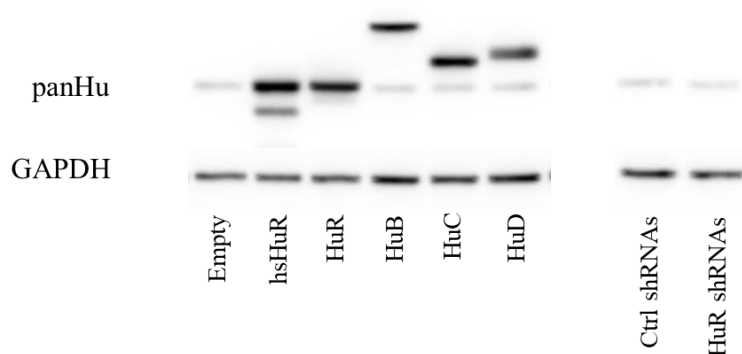
Προτού ξεκινήσει το πείραμα ελέγχθηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις hsHuR, HuR, HuB, HuC, HuD και το shRNA για HuR με την χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει όλες τις Hu (panHu). Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι πλασμιδιακοί φορείς. Μετά από 48 h επώασης, πραγματοποιήθηκε συλλογή των κυττάρων, απομόνωση των πρωτεϊνών και ανάλυση των δειγμάτων με ανοσοστύπωμα κατά Western με σκοπό την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των παραπάνω πρωτεϊνών. Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών ως πρωτεΐνη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το GAPDH.

4.4.1. panHu

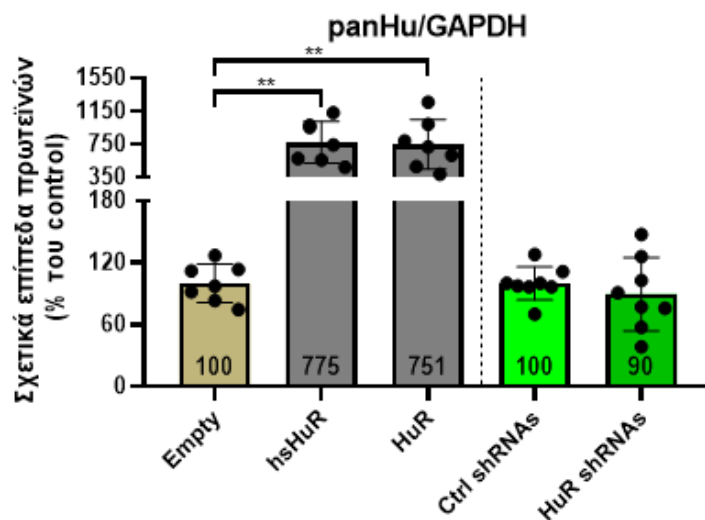
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τις hsHuR, HuR, HuB, HuC και HuD υπερεκφράζουν αυτές τις πρωτεΐνες. Σχετικά με την hsHuR και την HuR υπήρξε στατιστικώς σημαντική αύξηση, κατά 675% και 651% αντίστοιχα (Kruskal-Wallis test, $p = 0.0014$ και $p = 0.017$) σε σύγκριση με το empty (**εικόνα 26, Α και Β**). Οι υπόλοιπες Hu, σύμφωνα με την **εικόνα 26 (Α)** εμφανίζουν υπερέκφραση, ωστόσο δεν παρουσιάζονται στην

εικόνα 26 (B), καθώς αυτές οι Hu, όπως αναφέρεται και στη παράγραφο 4.2, δεν εκφράζονται στα SK-N-SH, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει σύγκριση με κάποιο control (Fragkouli et al. 2017). Το shRNA για την HuR δεν οδήγησε στην αποσιώπηση της πρωτεΐνης HuR, καθώς δεν υπήρξε κάποια στατιστικώς σημαντική μείωση (μόνο 10%). Αυτή η μικρή μείωση μπορεί να οφείλεται στο μεγάλο χρόνο ημιζωής που, πιθανόν, να έχει η HuR, με αποτέλεσμα να έχει παραμείνει μεγάλη ποσότητα της αρχικής πρωτεΐνης στο κύτταρο. Ωστόσο, έγινε έλεγχος και σε επίπεδο mRNA (**εικόνα 26, Γ**) και βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική μείωση του mRNA της HuR σε σύγκριση με control της (αποσιώπηση της HuR), κατά 71% (Student's t-test, $p < 0.0001$).

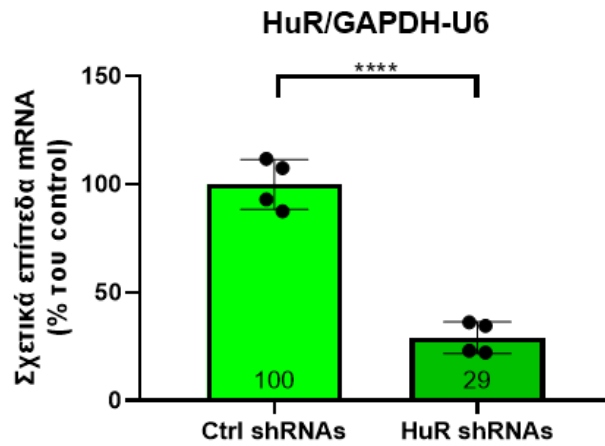
A)



B)



Γ)

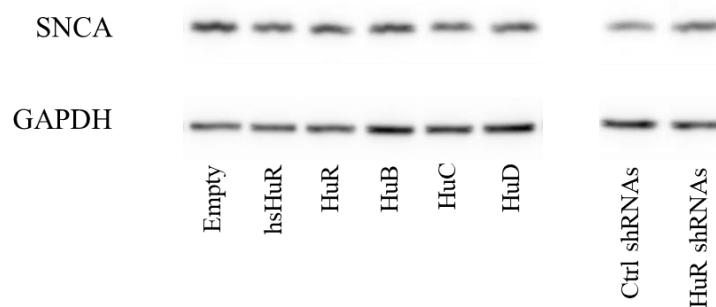


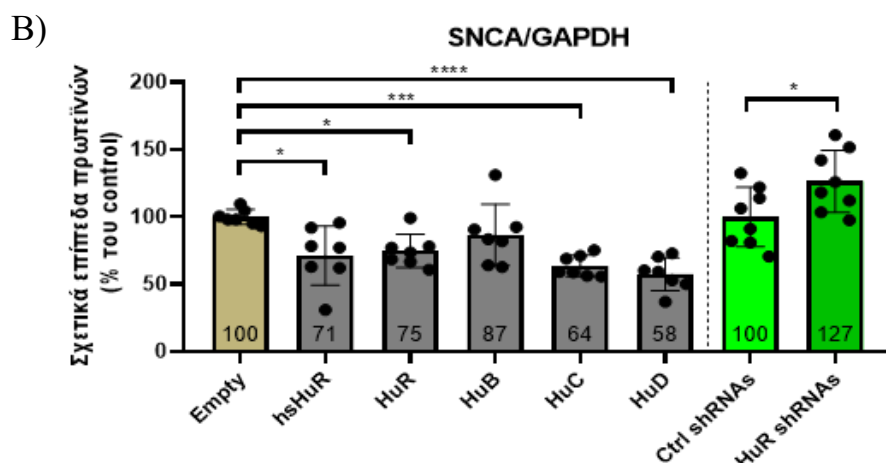
Εικόνα 26: **A)** Απεικόνιση των Hu με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης μετά από υπερέκφραση των Hu ή αποσιώπηση της HuR κατά Western. **B)** Ποσοτικοποίηση των σχετικών πρωτεϊνικών επιπέδων της HuR συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (Μ.Ο. ± Τ.Α). Τα αποτελέσματα της υπερέκφρασμένης HuR προέρχονται από 7 πειραματικές επαναλήψεις (n = 7), ενώ τα αποτελέσματα του shRNA για HuR προέρχονται από 8 πειραματικές επαναλήψεις (n = 8). **Γ)** Ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης της HuR συγκριτικά με τον πλασμιδιακό φορέα ελέγχου (Μ.Ο. ± Τ.Α). Τα αποτελέσματα του shRNA για HuR προέρχονται από 4 πειραματικές επαναλήψεις (n = 4).

4.4.2. SNCA

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση κατά την υπερέκφραση των Hu (εκτός την HuB), σε σύγκριση με το empty, στα πρωτεϊνικά επίπεδα της SNCA (**εικόνα 27, Α και Β**). Συγκεκριμένα, η hsHuR, HuR, HuC και HuD μείωσαν την SNCA κατά 29%, 25%, 36% και 42%, αντίστοιχα (Kruskal-Wallis test, $p = 0.011$, $p = 0.022$, $p = 0.002$ και $p < 0.0001$). Επίσης, σημαντική επίδραση βρέθηκε και κατά την αποσιώπηση της HuR (**εικόνα 27, Α και Β**), καθώς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SNCA αυξήθηκαν κατά 27% (Student's t-test, $p = 0.033$).

A)



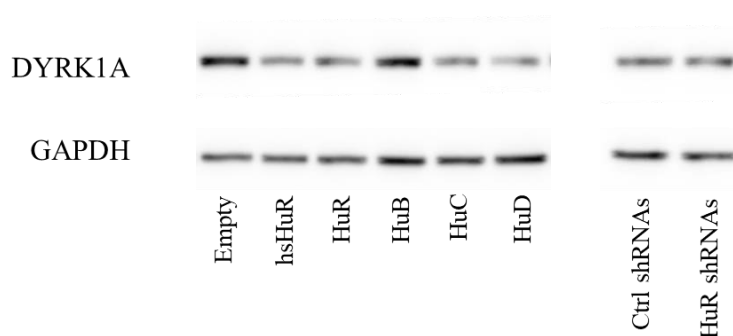


Εικόνα 27: Α) Απεικόνιση της SNCA με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης μετά από υπερέκφραση των Hu ή αποσιώπηση της HuR κατά Western. **Β)** Ποσοτικοποίηση των σχετικών πρωτεϊνικών επιπέδων της SNCA συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (M.O. $\pm$ T.A). Τα αποτελέσματα των υπερεκφρασμένων Hu προέρχονται από 7 πειραματικές επαναλήψεις ($n = 7$), ενώ τα αποτελέσματα του shRNA για HuR προέρχονται από 8 πειραματικές επαναλήψεις ($n = 8$).

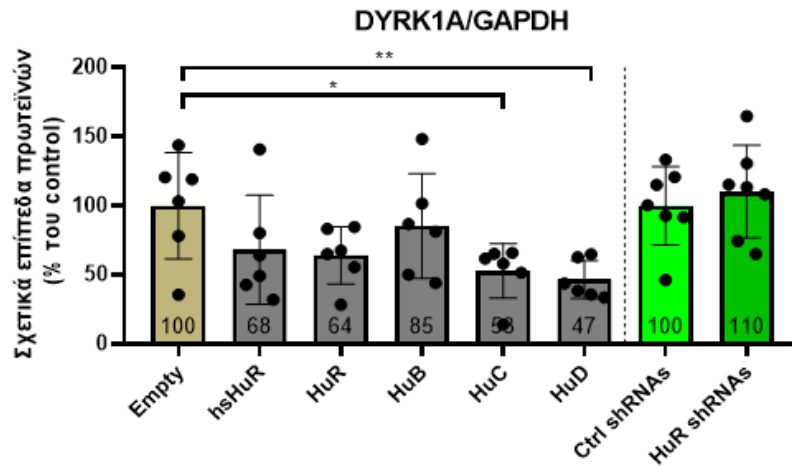
4.4.3. DYRK1A

Σχετικά με τα πρωτεϊνικά επίπεδα της DYRK1A, βρέθηκε ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική μείωση κατά την υπερέκφραση των HuC και HuD σε σύγκριση με το empty (**εικόνα 28, Α και Β**), ενώ οι υπόλοιπες Hu, όπως και η αποσιώπηση της HuR δεν είχαν κάποια επίδραση. Τα επίπεδα της DYRK1A μειώθηκαν στη HuC κατά 44% και στην HuD κατά 53% (Kruskal-Wallis test, $p = 0.048$ και $p = 0.007$).

A)



B)

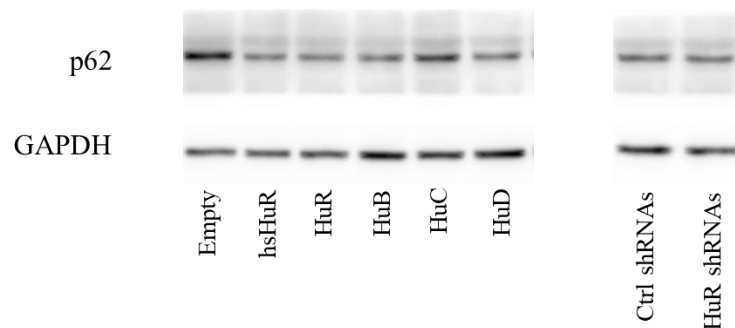


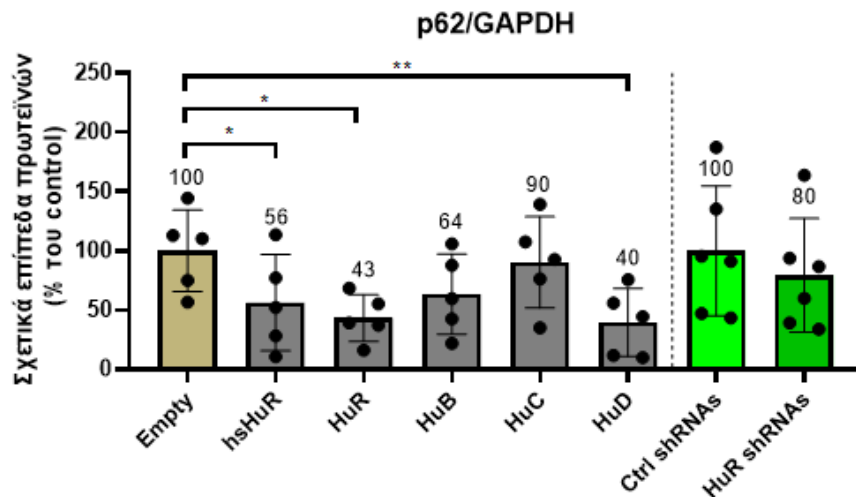
Εικόνα 28: Α) Απεικόνιση της DYRK1A με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης μετά από υπερέκφραση των Hu ή αποσιώπηση της HuR κατά Western. Β) Ποσοτικοποίηση των σχετικών πρωτεϊνικών επιπέδων της DYRK1A συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (M.O. $\pm$ T.A). Τα αποτελέσματα των υπερεκφρασμένων Hu προέρχονται από 7 πειραματικές επαναλήψεις ($n = 6$), ενώ τα αποτελέσματα του shRNA για HuR προέρχονται από 8 πειραματικές επαναλήψεις ($n = 7$).

4.4.4. p62

Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p62, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση κατά την υπερέκφραση των hsHuR, HuR και HuD σε σύγκριση με το empty (εικόνα 29, Α και Β). Συγκεκριμένα, η hsHuR, HuR και HuD μείωσαν την p62 κατά 44%, 57% και 60%, αντίστοιχα (one-way ANOVA, $p = 0.049$, $p = 0.012$ και $p = 0.008$). Οι υπόλοιπες Hu, καθώς και η αποσιώπηση της HuR δεν επηρέασαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p62.

A)



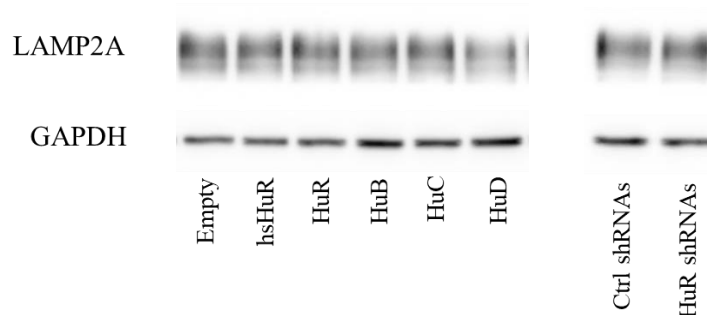


Εικόνα 29: Α) Απεικόνιση της p62 με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης μετά από υπερέκφραση των Hu ή αποσιώπηση της HuR κατά Western. Β) Ποσοτικοποίηση των σχετικών πρωτεϊνικών επιπέδων της p62 συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (M.O. $\pm$ T.A). Τα αποτελέσματα των υπερεκφρασμένων Hu προέρχονται από 5 πειραματικές επαναλήψεις (n = 5), ενώ τα αποτελέσματα του shRNA για HuR προέρχονται από 6 πειραματικές επαναλήψεις (n = 6).

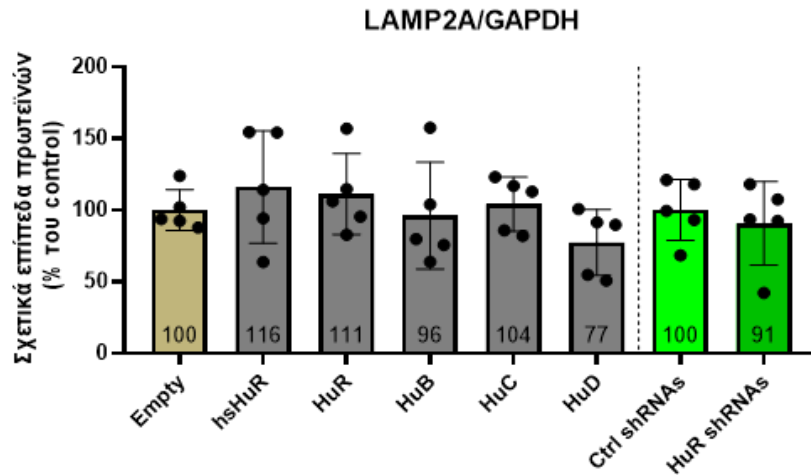
4.4.5. LAMP2A

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρξε κάποια στατιστικώς σημαντική επίδραση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της LAMP2A. Επομένως, οι υπερεκφρασμένες Hu, καθώς και η αποσιώπηση της HuR δεν επηρέασαν την LAMP2A σε σύγκριση με τα αντίστοιχα control τους (εικόνα 30, Α και Β).

A)



B)

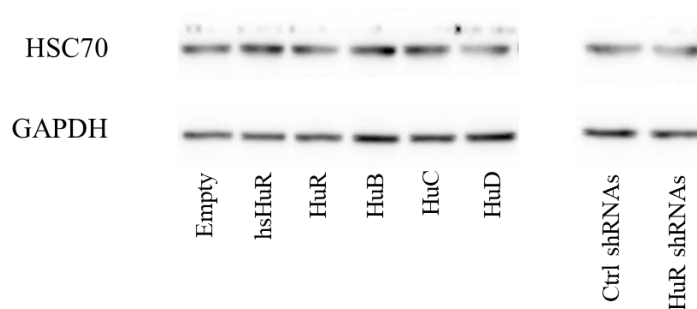


Εικόνα 30: **A)** Απεικόνιση της LAMP2A με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης μετά από υπερέκφραση των Hu ή αποσιώπηση της HuR κατά Western. **B)** Ποσοτικοποίηση των σχετικών πρωτεϊνικών επιπέδων της LAMP2A συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (M.O. $\pm$ T.A.). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 5 πειραματικές επαναλήψεις ($n = 5$).

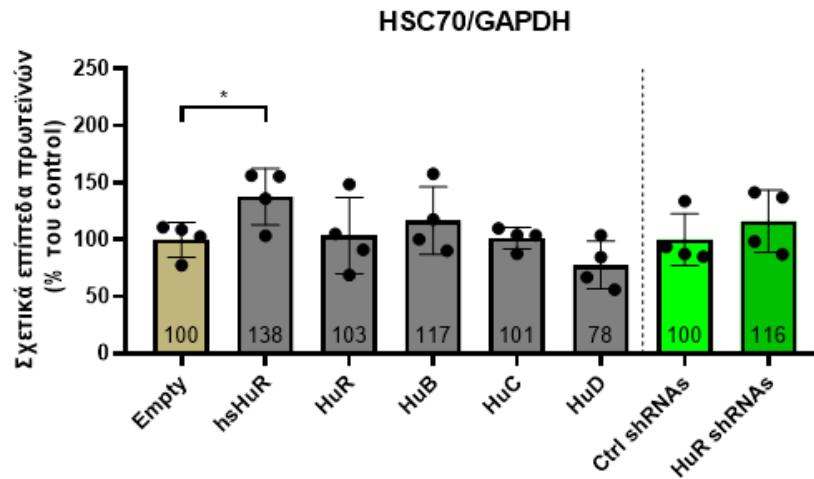
4.4.6. HSC70

Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της HSC70, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση κατά την υπερέκφραση της hsHuR σε σύγκριση με το empty (**εικόνα 31, A και B**). Τα επίπεδα της HSC70 αυξήθηκαν κατά 38% με την hsHuR (one-way ANOVA, $p = 0.037$). Οι υπόλοιπες Hu, καθώς και η αποσιώπηση της HuR δεν επηρέασαν τα επίπεδα της HSC70.

A)



B)



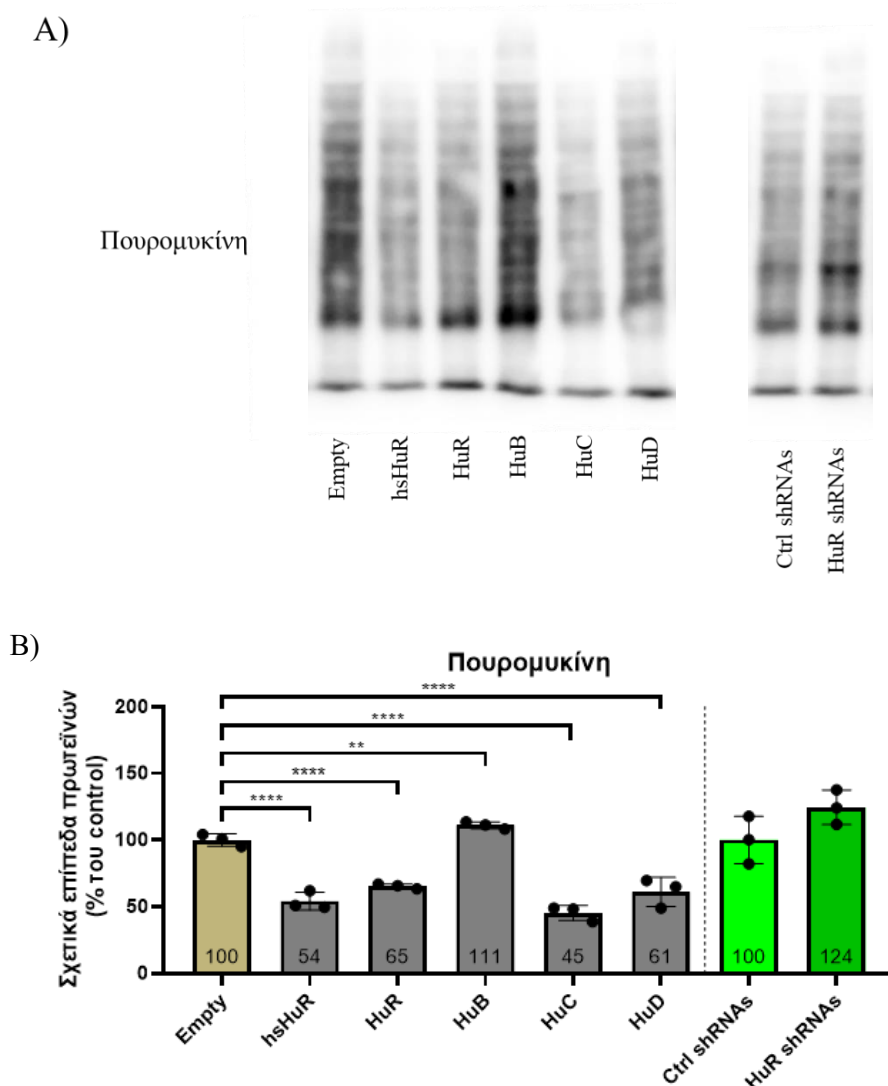
Εικόνα 31: Α) Απεικόνιση της HSC70 με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης μετά από υπερέκφραση των Hu ή αποσιώπηση της HuR κατά Western. Β) Ποσοτικοποίηση των σχετικών πρωτεϊνικών επιπέδων της HSC70 συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (M.O. $\pm$ T.A.). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 4 πειραματικές επαναλήψεις (n = 4).

4.5. Ο ρόλος των πρωτεϊνών Hu στη διαδικασία της μετάφρασης

Η πουρομυκίνη είναι ένα αντιβιοτικό που έχει την ικανότητα να συνδεθεί, κατά τη διαδικασία της μετάφρασης, στο καρβοξυτελικό άκρο μια αμινοξικής αλυσίδας και να την αποδεσμεύσει από το ριβόσωμα. Επομένως, μέσω της πουρομυκίνης ελέγχθηκε αν η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Hu ή η αποσιώπηση της πρωτεΐνης HuR επηρεάζουν την διαδικασία της μετάφρασης του πρωτεώματος. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν και στα προηγούμενα πειράματα. Μετά από 48 h επώασης, έγινε συλλογή των κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί πουρομυκίνη 20 min πριν την 48^η ώρα. Ακολούθησε απομόνωση των πρωτεϊνών και ανάλυση των δειγμάτων με ανοσοστύπωμα κατά Western με σκοπό την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της πουρομυκίνης. Για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της πουρομυκίνης χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτη αναφοράς τα controls (empty και control shRNA).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση των υπερεκφρασμένων Hu, σε σύγκριση με το empty, στη διαδικασία της μετάφρασης (**εικόνα 32, Α και Β**). Συγκεκριμένα, η HuB αύξησε κατά 11% το ολικό πρωτέωμα (one-way ANOVA, $p < 0.047$), ενώ οι hsHuR, HuR, HuC και HuD μείωσαν το ολικό πρωτέωμα στα

SK-N-SH κατά 46%, 35% 55% και 39%, αντίστοιχα (one-way ANOVA, $p < 0.0001$). Η αποσιώπηση της HuR δεν φαίνεται να επηρέασε τα επίπεδα μετάφρασης.



Εικόνα 32: A) Απεικόνιση της πουρομικίνης με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης μετά από υπερέκφραση των Hu ή αποσιώπηση της HuR κατά Western. B) Ποσοτικοποίηση των σχετικών πρωτεϊνικών επιπέδων της πουρομικίνης συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (M.O. $\pm$ T.A). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 3 πειραματικές επαναλήψεις ($n = 3$).

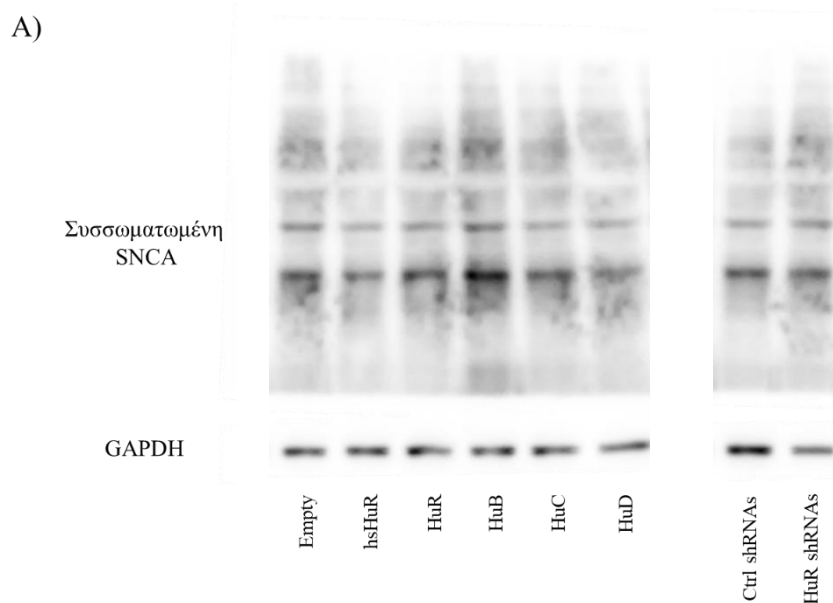
4.6. Επίδραση των πρωτεϊνών Hu στην δημιουργία συσσωματωμάτων SNCA και στη φωσφορυλίωση της σερίνης 129 της SNCA

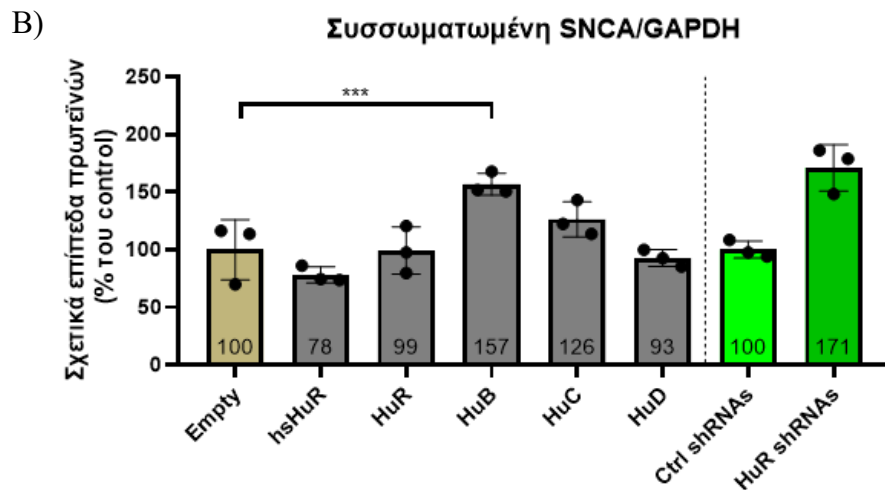
Τέλος, ελέγχθηκε αν η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Hu ή η αποσιώπηση της πρωτεΐνης HuR οδηγούν στη δημιουργία συσσωματωμάτων SNCA και στη φωσφορυλίωση της SNCA (p-SNCA στη ser-129). Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι πλασμιδιακοί φορείς,

με την διαφορά ότι σε κάθε δείγμα προστέθηκε και ο πλασμιδιακός φορέας pAAV-Gateway (Addgene) για την κλωνοποίηση του γονιδίου της SNCA με μήκος 2550 βάσεων στην 3'UTR. Μετά από 48 h επώασης, έγινε συλλογή των κυττάρων, απομόνωση των πρωτεϊνών και ανάλυση των δειγμάτων με ανοσοστύπωμα κατά Western για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της συσσωματωμένης SNCA, της μονομερούς SNCA και της p-SNCA (ser-129). Για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της συσσωματωμένης SNCA χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς το GAPDH, ενώ για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της p-SNCA (ser-129) χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς η SNCA.

4.6.1. Συσσωματωμένη SNCA

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση κατά την υπερέκφραση της HuB, σε σύγκριση με το empty, στη συσσωμάτωση της SNCA (**εικόνα 33, Α και Β**). Από το γράφημα φαίνεται ότι η HuB αύξησε κατά 57% τα επίπεδα συσσωμάτωσης της SNCA (one-way ANOVA, $p = 0.0009$). Οι υπόλοιπες Hu, όπως και η αποσιώπηση της HuR δεν φαίνεται να επηρέασαν τα επίπεδα συσσωμάτωσης της SNCA.

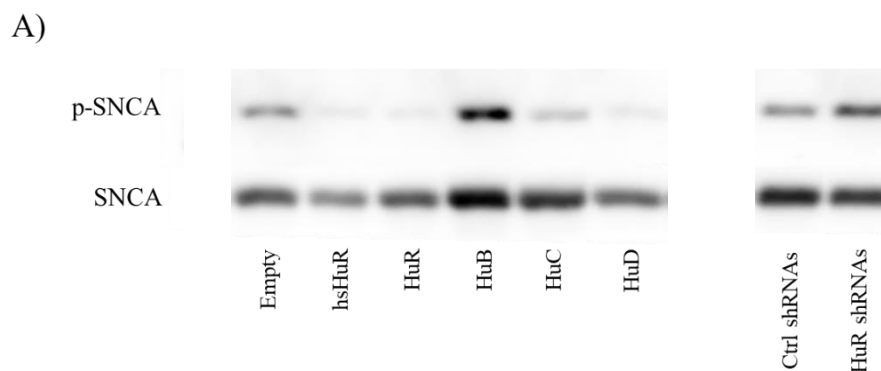




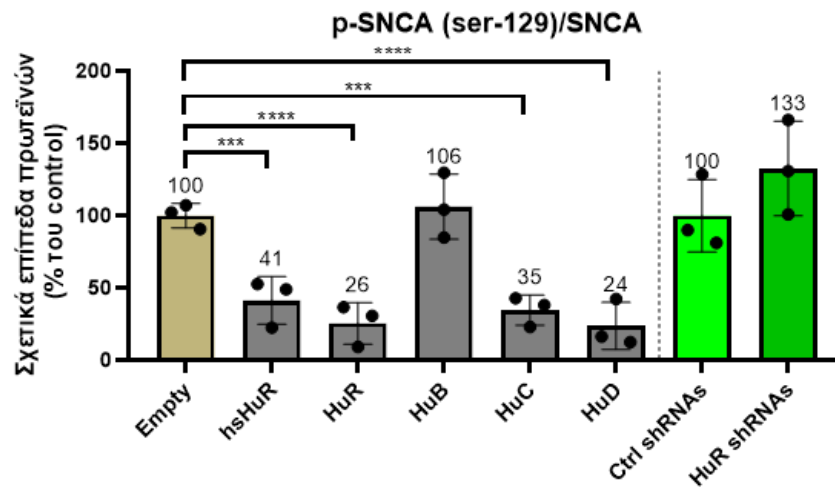
Εικόνα 33: Α) Απεικόνιση της συσσωματωμένης SNCA με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης μετά από υπερέκφραση των Hu ή αποσιώπηση της HuR κατά Western. Β) Ποσοτικοποίηση των σχετικών πρωτεϊνικών επιπέδων της συσσωματωμένης SNCA συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (M.O. $\pm$ T.A). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 3 πειραματικές επαναλήψεις (n = 3).

4.6.2. p-SNCA

Σχετικά με τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p-SNCA (ser-129), τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικώς σημαντική επίδραση όταν υπερεκφράζονται οι hsHuR, HuR, HuC και η HuD, σε σύγκριση με το empty (εικόνα 34, Α και Β). Συγκεκριμένα, οι hsHuR, HuR, HuC και η HuD μείωσαν την αναλογία p-SNCA (ser-129) προς συνολική μονομερή SNCA κατά 59%, 74%, 65% και 76%, αντίστοιχα (one-way ANOVA, $p = 0.006$, $p < 0.0001$, $p = 0.0002$, και $p < 0.0001$). Η υπερεκφρασμένη HuB και η αποσιώπηση της HuR δεν φαίνεται να επηρέασαν τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της p-SNCA (ser-129).



B)



Εικόνα 34: **A)** Απεικόνιση του λόγου p-SNCA/SNCA με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης μετά από υπερέκφραση των Hu ή αποσιώπηση της HuR κατά Western. **B)** Ποσοτικοποίηση των σχετικών πρωτεϊνικών επιπέδων του λόγου p-SNCA/SNCA συγκριτικά με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου (M.O. $\pm$ T.A). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 3 πειραματικές επαναλήψεις ($n = 3$).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η SNCA είναι μία νευρωνική πρωτεΐνη, η οποία έχει συσχετιστεί με τη νΠ και με άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους όταν βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα (Sotiriou 2012), ενώ η συσσώρευσή της φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό εκφυλισμό (Vekrellis and Stefanis 2012). Τα LBs περιέχουν κατά 90% SNCA, η οποία είναι φωσφορυλιωμένη στη ser-129. Ο ακριβής ρόλος της p-SNCA δεν είναι ακόμα γνωστός, καθώς υπάρχουν έρευνες που αναφέρουν πως προάγουν τη δημιουργία συσσωματωμάτων SNCA (Rieger et al. 2011· Sugeno et al 2008) και έρευνες που αναφέρουν πως δεν σχετίζεται με την συσσωμάτωση της SNCA (Escobar et al. 2014· Weston et al. 2021). Παρ' όλο που δεν είναι γνωστός ακόμη ο ακριβής ρόλος της, πρόσφατη έρευνα βρήκε ότι τα επίπεδα της p-SNCA επηρεάζονται ανάλογα από τα επίπεδα της DYRK1A (Yong et al. 2023). Σχετικά με την SNCA υπάρχουν, επίσης, δεδομένα που ενισχύουν την υπόθεση της διακυτταρικής μεταφοράς των τοξικών μορφών της από πάσχοντα εγκεφαλικά κύτταρα σε υγιή εγκεφαλικά κύτταρα, διαδικασία που οδηγεί στη μετάδοση της νόσου στα υπόλοιπα κύτταρα (Angot et al. 2012). Τέλος, έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση της SNCA επάγει την έκκριση της στα νευρικά κύτταρα (Lee 2008). Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει το συμπέρασμα ότι η ρύθμιση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της SNCA και της DYRK1A ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των συμπτωμάτων που σχετίζονται με τη νΠ και άλλες συνουκλεϊνοπάθειες.

Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί μπορούν να ρυθμίσουν τα επίπεδα των mRNA σε διάφορα στάδια της γονιδιακής έκφρασης (Dreyfuss, Kim and Kataoka 2002). Ένας τρόπος ρύθμισης είναι μέσω των RBPs. Οι RBPs, όπως οι πρωτεΐνες της οικογένειας Hu, μπορούν να ρυθμίσουν την εναλλακτική συρραφή των πρόδρομων mRNAs, την πολυαδενυλίωση των mRNAs, τη σταθερότητα ή την αποικοδόμηση τους, τη μεταφορά τους και τη μετάφραση τους (Doxakis 2014· Ravanidis, Kattan and Doxakis 2018).

Στη παρούσα εργασία, οι πρωτεΐνες Hu υπερεκφράστηκαν ή αποσιωπήθηκε η HuR ώστε να μελετηθεί ο τρόπος που ρυθμίζουν το mRNA της SNCA και της DYRK1A, την σταθερότητα τους, τα πρωτεϊνικά επίπεδα τους, τη μετάφραση του ολικού πρωτεώματος και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών τους. Επίσης, ελέγχθηκε ο τρόπος επίδρασης των Hu, όταν υπερεκφράζονται ή όταν γίνεται αποσιώπηση της HuR, στην πρωτεϊνική συσσωμάτωση της SNCA και στη φωσφορυλίωση της (p-SNCA στη ser-129).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση κάποιων πρωτεϊνών Hu, καθώς, και η αποσιώπηση της πρωτεΐνης HuR, μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα του pre-mRNA της SNCA, των ισομορφών του mRNA της SNCA και του mRNA της DYRK1A. Συγκεκριμένα,

βρέθηκε ότι η HuB αυξάνει τα επίπεδα της ολικής SNCA, η HuC αυξάνει τα επίπεδα της long SNCA και οι hsHuR, HuC και HuD μειώνουν τα επίπεδα mRNA της DYRK1A. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι κάποιες πρωτεΐνες Hu επιδρούν στο στάδιο της μεταγραφής ή/και της μετάφρασης και της πολυαδενυλίωσης. Επίσης, η HuC και η HuD αυξάνουν τον λόγο long SNCA/ολική SNCA, υποδεικνύοντας ότι η HuC ίσως δρα θετικά στη δημιουργία της long SNCA, ενώ ότι η HuD έχει μία τάση για αύξηση της long SNCA και μείωση της ολικής SNCA. Σχετικά με το pre-mRNA της SNCA βρέθηκε ότι η αποσιώπηση της HuR μειώνει τα επίπεδα του, αποτέλεσμα που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ίσως η απουσία της HuR οδηγεί σε ταχύτερη ωρίμανση του pre-mRNA της SNCA ή/και εμποδίζει τη μεταγραφή της. Ωστόσο, η αποσιώπηση της HuR οδηγεί και σε μείωση του λόγου pre-mRNA SNCA/ώριμο mRNA SNCA, οπότε είναι πιο πιθανό η απουσία της HuR να οδηγεί σε ταχύτερη ωρίμανση της.

Ενώ φαίνεται ότι υπάρχουν κάποιες σημαντικές επιδράσεις των πρωτεϊνών Hu ή της αποσιώπησης της HuR στο στάδιο της μεταγραφής, της πολυαδενυλίωσης και της ωρίμανσης, δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια σημαντική επίδραση στη σταθερότητα (ή στο ρυθμό αποικοδόμησης) των mRNA της ολικής SNCA, της long SNCA και της DYRK1A. Ακόμη, δεν βρέθηκε κάποια επίδραση στον λόγο long SNCA/ολική SNCA. Επομένως, φαίνεται ότι πρωτεΐνες Hu δεν έχουν κάποιο σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα (ή την αποικοδόμηση) των ισομορφών του mRNA της SNCA και του mRNA της DYRK1A. Ωστόσο, οι Marchese και συν. (2017) βρήκαν ότι αποσιώπηση της HuR (ELAVL1) οδηγεί σε μείωση των επιπέδων του mRNA της SNCA, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η HuR παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση του mRNA της SNCA. Η ασυμφωνία των αποτελεσμάτων αυτών μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς κάθε κυτταρική σειρά φαίνεται να επηρεάζει διαφορετικά τον χρόνο ημιζωής της SNCA, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται, πιθανόν, και τα επίπεδα ενδογενούς SNCA. Οι Masato και Bubacco (2024), αναφέρουν ότι σε κυτταρικές σειρές όπως τα ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού (HEK293), τα πρωτογενή νευρικά κύτταρα φλοιού ποντικών (DIV 10) και κύτταρα υποκλώνοι των SK-N-SH (SH-SY5Y) η ενδογενής SNCA έχει χρόνο ημιζωής ~7 h, 145 h και 52 h, αντίστοιχα.

Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SNCA, βρέθηκε ότι υπερέκφραση των hsHuR, HuR, HuC και HuD μειώνουν τα επίπεδα της, ενώ η αποσιώπηση της HuR αυξάνει τα επίπεδα της. Αυτό το γεγονός οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ίσως αυτές οι Hu αναστέλλουν τη μετάφραση ή επάγουν την αποικοδόμηση της. Τα αποτελέσματα αυτά ωστόσο, έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Marchese και συν. (2017), όπου βρήκαν ότι η HuR εμφανίζει μία τάση για

αύξηση της SNCA. Η ασυμφωνία αυτή μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν (κύτταρα SK-N-SH στη παρούσα έρευνα και κύτταρα HeLa στην έρευνα των Marchese και συν.), όπως αναφέρεται και παραπάνω. Τέλος, βρέθηκε ότι η HuC και η HuD μειώνουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της DYRK1A, ενώ η hsHuR και η HuR έχουν μία τάσης για μείωση των επιπέδων της. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι, ίσως, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της DYRK1A σε αυτές τις Hu μειώνονται λόγω μείωσης του ρυθμού της μεταγραφής (hsHuR, HuC και HuD), μείωσης του ρυθμού της αποικοδόμησης, μείωση του ρυθμού μετάφρασης, λόγω συνδυασμού δύο από των παραπάνω λόγων ή λόγω και των τριών διαδικασιών.

Προκειμένου να βρεθεί η αιτία που μειώνονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SNCA και της DYRK1A όταν υπερεκφράζονται κάποιες Hu ή αυξάνονται τα επίπεδα της SNCA όταν γίνεται αποσιώπηση της HuR, ελέγχθηκαν τα επίπεδα πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη διαδικασία της αποικοδόμησης της SNCA. Συγκεκριμένα, ύστερα από υπερέκφραση των Hu ή αποσιώπηση της HuR, μετρήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των p62 (δείκτης της μακροαυτοφαγίας), LAMP2A και HSC70 (πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αυτοφαγία με CMA). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση των hsHuR, HuR και HuD μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα της p62, δεδομένα που αποδεικνύουν ότι αυτές οι Hu ενισχύουν την μακροαυτοφαγία. Επίσης, η hsHuR, πιθανόν, ενισχύει την αυτοφαγία με CMA, καθώς αυξάνει τα επίπεδα της HSC70. Επομένως, φαίνεται η hsHuR, η HuR και η HuD μειώνουν τα επίπεδα της SNCA και της DYRK1A λόγω αύξησης του ρυθμού της αποικοδόμησης τους, ενώ η HuC μειώνει τα επίπεδα τους, πιθανόν, μέσω άλλη διαδικασίας, πχ επεμβαίνοντας στη μετάφραση της SNCA.

Εκτός από τη διαδικασία της αποικοδόμησης, για την μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της SNCA και της DYRK1A ελέγχθηκε και η διαδικασία της μετάφρασης του πρωτεώματος, μέσω της μεθόδου SUnSET. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι hsHuR, HuR, HuC και HuD μείωσαν σημαντικά το ολικό πρωτέωμα, ενώ η HuB αύξησε το ολικό πρωτέωμα. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, αλλά και των αποτελεσμάτων της προηγούμενης παραγράφου, φαίνεται ότι η hsHuR, η HuR και η HuD ενισχύουν την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και αναστέλλουν την μετάφραση, ενώ η HuC φαίνεται ότι παρόλο που αναστέλλει τη διαδικασία της μετάφρασης, ενισχύει την μεταγραφή της long SNCA, η οποία συνθέτει λιγότερη πρωτεΐνη (Marchese και συν. 2017). Η HuB, απ' τη μεριά της, φαίνεται να ενισχύει τη διαδικασία της μετάφρασης, καθώς και τη μεταγραφή της ολικής SNCA αφού, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αυξάνει τα επίπεδα mRNA της ολικής SNCA. Γι' αυτό τον λόγο

ίσως, η υπερέκφραση της HuB εμφανίζει και μια πιο μικρή τάση για μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της SNCA και της DYRK1A.

Τέλος, εφόσον εξετάστηκαν όλα τα παραπάνω, ελέγχθηκε αν η υπερέκφραση των Hu ή η αποσιώπηση της HuR επηρεάζει τη συσσωμάτωση της SNCA και τη φωσφορυλίωση της στη ser-129. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο η HuB επηρεάζει την συσσωμάτωση της SNCA, αυξάνοντας τα επίπεδα της. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί και με όλα τα προηγούμενα αποτελέσματα που έχουν βρεθεί για τη HuB, καθώς έχει βρεθεί ότι ενισχύει την μεταγραφή της ολικής SNCA, έχει τη μικρότερη τάση για μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της SNCA, δεν επιδρά στον ρυθμό αποικοδόμησης και αυξάνει τον ρυθμό μετάφρασης του πρωτεώματος. Όλες οι υπόλοιπες Hu δρουν ανασταλτικά ως προς τη συσσωμάτωση της SNCA, καθώς ρίχνουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SNCA μέσω αύξησης του ρυθμού της αποικοδόμησης ή/και μέσω μείωσης του ρυθμού μετάφρασης του πρωτεώματος, με εξαίρεση την HuC, η οποία αυξάνει και τη μεταγραφή της long SNCA. Τα επίπεδα της p-SNCA (ser-129) συμφωνούν με όλα τα παραπάνω δεδομένα, καθώς οι hsHuR, HuR, HuC και HuD μειώνουν τα επίπεδα της, ενώ η HuB δεν έχει κάποια επίδραση. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με τη θεωρία ότι η SNCA ίσως φωσφορυλιώνεται λόγω αύξησης της συγκέντρωσης της (Weston et al. 2021). Επίσης, συμφωνούν και με τα αποτελέσματα του Yong και συν. (2023), οι οποίοι βρήκαν ότι η αποσιώπηση του γονιδίου DYRK1A μειώνει την έκφραση της p-SNCA (ser-129), καθώς και στη παρούσα έρευνα βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα της DYRK1A και της p-SNCA (ser-129) σε κάποιες Hu. Ωστόσο, δεν φαίνεται η p-SNCA (ser-129) να προάγει την αύξηση των ολιγομερών SNCA και, κατ' επέκταση, των συσσωματωμάτων SNCA (Rieger et al. 2011 Sugeno et al. 2008) καθώς, μείωση της δεν επηρεάζει τη συσσωμάτωση της SNCA. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες Hu επιδρούν στα επίπεδα του mRNA και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SNCA είτε αυξάνοντας είτε μειώνοντας τα επίπεδα της (**πίνακας 1**), με αποτέλεσμα να έχουν, ίσως, σημαντικό ρόλο στη νΠ. Επίσης, οι πρωτεΐνες Hu, πιθανόν επιδρούν στα επίπεδα του mRNA και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της DYRK1A, μειώνοντας τα επίπεδα τους, αποτέλεσμα που οδηγεί, ίσως, στη μείωση της p-SNCA (ser-129). Στον **πίνακα 2** παρουσιάζονται οι επιδράσεις των Hu στα στάδια της πολυαδενυλίωσης και της ωρίμανσης του mRNA της SNCA, της μεταγραφής και της σταθερότητας των mRNA της SNCA και της DYRK1A, της μετάφρασης του ολικού πρωτεώματος και στη διαδικασία της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών τους. Επίσης παρουσιάζεται η επίδραση τους στα πρωτεϊνικά επίπεδα της SNCA και της DYRK1A, στη συσσωμάτωση της SNCA και στη φωσφορυλίωση της (ser-129). Επομένως, περαιτέρω έρευνα των πρωτεϊνών Hu, και, γενικά των RBPs, θα μπορούσε

να οδηγήσει στην εύρεση θεραπευτικών στόχων για την αντιμετώπιση της νΠ, αλλά και άλλων νευροεκφυλιστικών νόσων.

Πίνακας 1. Συνολική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας. Με + συμβολίζεται η αύξηση των επιπέδων του κάθε δείκτη σε σύγκριση με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου, με – η μείωση των επιπέδων του κάθε δείκτη σε σύγκριση με τους πλασμιδιακούς φορείς ελέγχου και με n.s. η μη στατιστικώς σημαντική επίδραση (not significant). Ο αριθμός των * καθορίζει τον βαθμό στατιστικής σημαντικότητας (* = $p < 0.05$, ** = $p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$ και **** = $p \leq 0.0001$).

mRNAs	hsHuR	HuR	HuB	HuC	HuD	HuR shRNAs
Ολική SNCA	n.s.	n.s.	+ (*)	n.s.	n.s.	n.s.
Long SNCA	n.s.	n.s.	n.s.	+ (***)	n.s.	n.s.
Long SNCA/Ολική SNCA	n.s.	n.s.	n.s.	+ (****)	+ (**)	n.s.
pre-mRNA SNCA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	- (**)
pre-mRNA SNCA/ώριμο mRNA SNCA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	- (*)
DYRK1A	- (**)	n.s.	n.s.	- (*)	- (*)	n.s.
Σταθερότητα ολικής SNCA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Σταθερότητα long SNCA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Σταθερότητα long SNCA/ολικής SNCA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Σταθερότητα DYRK1A	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HuR						+ (****)
Πρωτεΐνες	hsHuR	HuR	HuB	HuC	HuD	HuR shRNAs
panHu	+ (**)	+ (**)				n.s.
SNCA	- (*)	- (*)	n.s.	- (***)	- (****)	+ (*)
DYRK1A	n.s.	n.s.	n.s.	- (*)	- (**)	n.s.
p62	- (*)	- (*)	n.s.	n.s.	- (**)	n.s.
LAMP2A	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HSC70	+ (*)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Πουρομυκίνη	- (****)	- (****)	+ (*)	- (****)	- (****)	n.s.
Συσσωματωμένη SNCA	n.s.	n.s.	+ (***)	n.s.	n.s.	n.s.
p-SNCA (ser-129)	- (***)	- (****)	n.s.	- (***)	- (****)	n.s.

Πίνακας 2. Συνολική απεικόνιση των σταδίων που επηρεάζουν οι πρωτεΐνες Hu. Με n.s. συμβολίζεται η μη στατιστικώς σημαντική επίδραση (not significant).

Στάδια	hsHuR	HuR	HuB	HuC	HuD	HuR shRNAs
Ωρίμανση	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	αύξηση
Πολυαδενυλίωση	n.s.	n.s.	n.s.	αύξηση (long SNCA, long SNCA/ολική SNCA)	αύξηση (long SNCA/ολική SNCA)	n.s.
Μεταγραφή	μείωση (DYRK1A)	n.s.	αύξηση (ολική SNCA)	μείωση (DYRK1A)	μείωση (DYRK1A)	n.s.
Σταθερότητα mRNA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Μετάφραση πρωτεώματος	μείωση	μείωση	αύξηση	μείωση	μείωση	n.s.
Αποικοδόμηση πρωτεϊνών	αύξηση (μακρ/γία, αυτοφαγία με CMA)	αύξηση (αυτοφαγία με CMA)	n.s.	n.s.	αύξηση (αυτοφαγία με CMA)	n.s.
Πρωτεϊνικά επίπεδα SNCA	μείωση	μείωση	n.s.	μείωση	μείωση	αύξηση
Πρωτεϊνικά επίπεδα DYRK1A	n.s.	n.s.	n.s.	μείωση	μείωση	n.s.
Συσσωμάτωση SNCA	n.s.	n.s.	αύξηση	n.s.	n.s.	n.s.
Φωσφορυλίωση της SNCA (ser-129)	μείωση	μείωση	n.s.	μείωση	μείωση	n.s.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdelmohsen, K. and Gorospe, M. (2010). Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 1 (2): 214-29.
- Abdelmohsen, K., Pullmann Jr, R., Lal, A., Kim, H. H., Galban, S., Yang, X., Blethrow, J. D., Walker, M., Shubert, J., Gillespie, D. A., Furneaux, H., and Gorospe, M. (2007). Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell*, 25 (4): 543-557.
- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W. H., Castillo, P. E., Shinsky, N., Verdugo, J. M. G., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D., and Rosenthal, A. (2000). Mice Lacking α -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System. *Neuron*, 25 (1), 239-252.
- Akamatsu, W., Fujihara, H., Mitsushashi, T., Yano, M., Shibata, S., Hayakawa, Y., Okano, H. J., Sakakibara, S. I., Takano, H., Takano, T., Takahashi, T., Noda, T., Okano, H. (2005). The RNA-Binding Protein HuD Regulates Neuronal Cell Identity and Maturation. *Proc Natl Acad U S A*, 102 (12): 4625–30.
- Alvarez-Erviti, L., Rodriguez-Oroz, M. C., Cooper, J. M., Caballero, C., Ferrer, I., Obeso, J. A., and Schapira, A. H. V. (2010). Chaperone-Mediated Autophagy Markers in Parkinson Disease Brains. *Arch Neurol.*, 67 (12): 1464–72.
- Anderson, P. and Kedersha, N. (2009). RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 10 (6): 430-6.
- Angot, E., Steiner, J. A., Tomé, C. M. L., Ekström, P., Mattsson, B., Björklund, A., and Brundin, P. (2012). Alpha-Synuclein Cell-to-Cell Transfer and Seeding in Grafted Dopaminergic Neurons in Vivo. *PLoS One*, 7 (6): e39465.
- Arbones, M. L., Thomazeau, A., Nakano-Kobayashi, A., Hagiwara, M., Delabar, J., M. (2019). DYRK1A and cognition: A lifelong relationship. *Pharmacol Ther.*, 194: 199-221.
- Balestrino, R., and Schapira A. H. V. (2020). Parkinson Disease. *Eur J Neurol.*, 29, 27-42.
- Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., and Cuervo, A. M. (2008). The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane. *Mol Cell Biol*, 28 (18): 5747–63.
- Barbeau, A. (1969). L-Dopa Therapy in Parkinson's Disease. *Can Med Assoc J.*, 101 (13): 59–68.

- Barbour, R., Kling, K., Anderson, J. P., Banducci, K., Cole, T., Diep, L., Fox, M., Goldstein, J. M., Soriano, F., Seubert, P., Chilcote, T. J. (2008). Red Blood Cells Are the Major Source of Alpha-Synuclein in Blood. *Neurodegener Dis.*, 5 (2): 55–59.
- Barreau, C., Paillard, L., and Osborne. H. B. (2005). AU-Rich Elements and Associated Factors: Are There Unifying Principles?. *Nucleic Acids Res.*, 33 (22): 7138–50.
- Bergeron, M., Motter, R., Tanaka, P., Fauss, D., Babcock, M., Chiou, S-S., Nelson, S., San Pablo, F., Anderson, J. P. (2014). In vivo modulation of polo-like kinases supports a key role for PLK2 in Ser129 α -synuclein phosphorylation in mouse brain. *Neuroscience*, 256: 72-82.
- Bienroth, S., Wahle, E., Suter-Crazzolaram, C., Keller, W. (1991). Purification of the cleavage and polyadenylation factor involved in the 3'-processing of messenger RNA precursors. *J Biol Chem.*, 266 (29) 19768-76.
- Bolognani, F., Tanner, D. C., Merhege, M., Deschenes-Furry, J., Jasmin, B., Perrone-Bizzozero, N. I. (2006). In vivo post-transcriptional regulation of GAP-43 mRNA by overexpression of the RNA-binding protein HuD. *J Neurochem.*, 96 (3): 790–801.
- Bronicki, L. M., and Jasmin. B. J. (2013). Emerging Complexity of the HuD/ELAVL4 Gene; Implications for Neuronal Development, Function, and Dysfunction. *RNA*, 19 (8): 1019–37.
- Buckanovich, R. J., Posner, J. B. and Darnell, R. B. (1993). Nova, the Paraneoplastic Ri Antigen, Is Homologous to an RNA-Binding Protein and Is Specifically Expressed in the Developing Motor System. *Neuron*, 11 (4): 657–72.
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M., and Südhof. T. C. (2010). α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro. *Science*, 329 (5999): 1663–67.
- Casella, R., Bigi, A., Cremades, N., Cecchi, C. (2022). Effects of oligomer toxicity, fibril toxicity and fibril spreading in synucleinopathies. *Cell Mol Life Sci.*, 79: 174.
- Charlesworth, A., Meijer, H. A., de Moor, C. H. (2013). Specificity factors in cytoplasmic polyadenylation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 4 (4): 437-61.
- Chartier, S. and Duyckaerts, C. (2018). Is Lewy pathology in the human nervous system chiefly an indicator of neuronal protection or of toxicity?. *Cell Tissue Res.*, 373 (1): 149-160.
- Chartier-Harlin, M. C., Kachergus, J., Roumier, C., Mouroux, V., Douay, X., Lincoln, S., Levecque, C., Larvor, L., Andrieux, J., Hulihan M., Waucquier, N., Defebvre, L.,

- Amouyel, P., Farrer M., Destee, A. (2004). Alpha-Synuclein Locus Duplication as a Cause of Familial Parkinson's Disease. *Lancet*, 364(9440):1167-9.
- Chen, Q., Chen, Y., Bao, C., Xiang, H., Gao, Q., Mao, L. (2024). Mechanism and complex roles of HSC70/HSPA8 in viral entry. *Virus Res*, 347: 199433.
- Chou, C-C., Zhang, Y., Umoh, M. E., Vaughan, S. W., Lorenzini, I., Liu, F., Sayegh, M., Donlin-Asp, P. G., Chen, Y. H., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Powers, M. P., Kukar, T., Hales, C. M., Gearing, M., Cairns, N. J., Boylan, K. B., Dickson, D. W., Rademakers, R., Zhang, Y-J., Petrucelli, L., Sattler, R., Zarnescu, D. C., Glass, J. D., Rossol, W. (2018). TDP-43 pathology disrupts nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic transport in ALS/FTD. *Nat. Neurosci.*, 21 (2): 228-239.
- Chu, Y., Dodiya, H., Aebischer, P., Olanow, C. W., and Kordower, J. H. (2009). Alterations in Lysosomal and Proteasomal Markers in Parkinson's Disease: Relationship to Alpha-Synuclein Inclusions. *Neurobiol Dis.*, 35 (3): 385–98.
- Chu, Y., and Kordower, J. H. (2007). Age-Associated Increases of Alpha-Synuclein in Monkeys and Humans Are Associated with Nigrostriatal Dopamine Depletion: Is This the Target for Parkinson's Disease?. *Neurobiol Dis.*, 25 (1): 134–49.
- Cicchini, M, V Karantza, and B Xia. 2015. Molecular Pathways: Autophagy in Cancer--a Matter of Timing and Context. *Clin Cancer Res.*, 21 (3): 498-504.
- Colombrita, C., Onesto, E., Megiorni, F., Pizzuti, A., Baralle, F. E., Buratti, E., Silani, V., and Ratti, A. (2012). TDP43 and FUS RNA-Binding Proteins Bind Distinct Sets of Cytoplasmic Messenger RNAs and Differently Regulate Their Post-Transcriptional Fate in Motoneuron-like Cells. *J Biol Chem.*, 287 (19): 15635–47.
- Cooper, G. M., and Hausman, R. E. (2004). *The Cell: A Molecular Approach*, 3rd ed. Washington D. C.: ASM Press.
- Cuervo, A. M., and Dice, J. F. (1996). A Receptor for the Selective Uptake and Degradation of Proteins by Lysosomes. *Science*, 273 (5274): 501–3.
- Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T. and Sulzer, D. (2004). Impaired Degradation of Mutant Alpha-Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science*, 305 (5688): 1292–95.
- Dachsel, J. C., Lincoln, S.J., Gonzalez, J., Ross, O. A., Dickson, D. W, and Farrer, M. J. (2007). The ups and downs of α -synuclein mRNA expression. *Mov Disord*, 22 (2): 293-295.
- Daubner, G. M., Cléry, A., and Allain, F. H.-T. (2013). RRM-RNA Recognition: NMR or Crystallography...and New Findings. *Curr Opin Struct Biol*, 23 (1): 100–108.

- David, P.S., Tanveer, R., and Port, J. D. (2007). FRET-detectable interactions between the ARE binding proteins, HuR and p37AUF1. *RNA*, 13 (9): 1453–1468.
- Dexter, D. T., and Jenner, P. (2013). Parkinson Disease: From Pathology to Molecular Disease Mechanisms. *Free Radicl Biol Med*, 62: 132–44.
- Dice, J. F. (1990). Peptide Sequences That Target Cytosolic Proteins for Lysosomal Proteolysis. *Trends Biochem Sci.*, 15 (8): 305–9.
- Doxakis, E. (2014). RNA binding proteins: a common denominator of neuronal function and dysfunction. *Neurosci Bull.*, 30 (4): 610-26.
- Dreyfuss, G., Kim, N. V., and Kataoka. N. (2002). Messenger-RNA-Binding Proteins and the Messages They Carry. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 3 (3): 195–205.
- Ebrahimi-Fakhari, D., Cantuti-Castelvetri, I., Fan, Z., Rockenstein, E., Masliah, E., Hyman, B. T., McLean, P. J., and Unni, V. K. (2011). Distinct Roles in Vivo for the Ubiquitin-Proteasome System and the Autophagy-Lysosomal Pathway in the Degradation of α -Synuclein. *J Neurosci.*, 31 (41): 14508–20.
- Escobar, V. D., Kuo, Y-M., Orrison, B. M., Giasson, B. I., Nussbaum, R. L. (2014). Transgenic mice expressing S129 phosphorylation mutations in α -synuclein. *Neurosci Lett.*, 563: 96-100.
- Fan, X. C., and Steitz, J. A., (1998). HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (26): 15293–15298.
- Fialcowitz-White, E.J., Brewer, B. Y., Ballin, J. D., Willis, C. D., Toth, E. A., and Wilson G. M. (2007). Specific protein domains mediate cooperative assembly of HuR oligomers on AU-rich mRNA-destabilizing sequences. *J Biol Chem*, 282 (29) 20948–20959.
- Fragkouli, A., Koukouraki, P., Vlachos, I. S., Paraskevopoulou, M. D. Hatzigeorgiou A. G., and Doxakis, E. (2017). Neuronal ELAVL proteins utilize AUF-1 as a co-partner to induce neuron-specific alternative splicing of APP. *Sci Rep.*, 14 (7): 44507.
- Frake, R. A., Ricketts, T., Menzies, F. M., Rubinsztein, D. C. (2015). Autophagy and neurodegeneration. *J Clin Invest.*, 125 (1): 65-74.
- Galban, S., Kuwano, Y., Pullmann Jr, P., Martindale, J. L., Kim, H. H., Lal, A., Abdelmohsen, K., Yang, X., Dang, Y., Liu, J. O., Lewis, S. M., Holcik, M., and Gorospe, M. (2008). RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol*, 28 (1): 93-107.
- Gao, V., Briano, J. A., Komer, L. E., and Burre, K. (2023). Functional and Pathological Effects of α -Synuclein on Synaptic SNARE Complexes. *J Mol Biol*, 435(1): 167714.

- Gasser, T. (2009). Molecular Pathogenesis of Parkinson Disease: Insights from Genetic Studies. *Expert Rev Mol Med*, 11: e22.
- Gautier, C. A., Kitada, T., and Shen, J. (2008). Loss of PINK1 Causes Mitochondrial Functional Defects and Increased Sensitivity to Oxidative Stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (32): 11364–69.
- Gautier, T., Thirant, C., Delattre, O., Janoueix-Lerosey, I. (2021). Plasticity in Neuroblastoma Cell Identity Defines a Noradrenergic-to-Mesenchymal Transition (NMT). *Cancers*, 13 (12): 2904
- Gleghorn, M. L., and Maquat. L. E. (2014). Black Sheep' That Don't Leave the Double-Stranded RNA-Binding Domain Fold. *Trends Biochem Sci*, 39 (7): 328–40.
- Giasson, B. I., Uryu, K., Trojanowski, J. Q., and Lee. V. M. (1999). Mutant and Wild Type Human Alpha-Synucleins Assemble into Elongated Filaments with Distinct Morphologies in Vitro. *J Biol Chem.*, 274 (12): 7619–22.
- Grant, B. D., and Donaldson, J. G. (2009). Pathways and Mechanisms of Endocytic Recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 10 (9): 597–608.
- Hao le, T., Duy, P. Q., An, M., Talbot, J., Lyer, C. C., Wolman, M., Beattie, C. E. (2017). HuD and the Survival Motor Neuron Protein Interact in Motoneurons and Are Essential for Motoneuron Development, Function, and mRNA Regulation. *J Neurosci.*, 37 (48): 11559–11571.
- Hilgers, V. (2015). Alternative polyadenylation coupled to transcription initiation: Insights from ELAV-mediated 3' UTR extension. *RNA Biol.*, 12 (9): 918-921.
- Hinman, M. N., and Lou. H. (2008). Diverse Molecular Functions of Hu Proteins. *Cell Mol Life Sci*: 65 (20): 3168–81.
- Ho, J. J. D. and Marsden, P. A. (2014). Competition and collaboration between RNA-binding proteins and microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 5 (1): 69-86.
- Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G. J., Condeelis, J., Singer, R. H. (2005). Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature*, 438 (7067): 512-5.
- Ince-Dunn, G., Okano, H. J., Jensen, K. B., Park, W. Y., Zhong, R., Ule, J., Mele, A., Fak, J. J., Yang, C., Zhang, C., Yoo, J., Herre, M., Okano, H., Noebels, J. L., Darnell, R. B. (2012). Neuronal Elav-like (Hu) proteins regulate RNA splicing and abundance to control glutamate levels and neuronal excitability. *Neuron*, 75 (6): 1067-1080.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson disease: Clinical Features and Diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79 (4): 368-76.

- Jellinger, K. A. (2012). Neuropathology of Sporadic Parkinson's Disease: Evaluation and Changes of Concepts. *Mov Disord.*, 27 (1): 8–30.
- Ji, Z., Lee, J. Y., Pan, Z., Jiang, B., and Tian, B. (2009). Progressive Lengthening of 3' Untranslated Regions of MRNAs by Alternative Polyadenylation during Mouse Embryonic Development. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106 (17): 7028–33.
- Johnson, J. M., Castle, J. Garrett-Engele, P., Kan, Z., Loerch, P. M., Armour, C. D., Santos, R., Schadt, E. E., Stoughton, R., and Shoemaker, D. D. (2003). Genome-Wide Survey of Human Alternative Pre-mRNA Splicing with Exon Junction Microarrays. *Science*, 302 (5653): 2141–44.
- Jones, D. R., Moussaud, S., McLean, P. (2014) Targeting heat shock proteins to modulate α -synuclein toxicity. *Ther Adv Neurol Disord.*, 7 (1): 33-51.
- Kahle, P. J. (2008). Alpha-Synucleinopathy Models and Human Neuropathology: Similarities and Differences. *Acta Neuropathol.*, 115 (1): 87–95.
- Kapeli, K., Martinez, F. J., Yeo, G. W. (2017). Genetic mutations in RNA-binding proteins and their roles in ALS. *Hum Genet.*, 136 (9): 1193-1214.
- Kattan, F. G., Koukouraki, P., Anagnostopoulos, A., Tsangaris, G., Doxakis, E. (2023). RNA binding protein AUF1/HNRNPD regulates nuclear export, stability, and translation of SNCA transcripts. *Open Biol.*, 13 (11): 230158.
- Keene, J. D. (1999). Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (1): 5-7.
- Kholodilov, N. G., Neystat, M., Tinmarla, F. Oo., Lo, S. E., Larsen, K. E., Sulzer, D., and Burke R. E., (1999). Increased Expression of Rat Synuclein in the Substantia Nigra Pars Compacta Identified by mRNA Differential Display in a Model of Developmental Target Injury. *J Neurochem.*, 73 (6): 2586–99.
- Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y. S., Bjørkøy, G., Nunn, J. L., Bruun, J. A., Shvets, E., McEwan, D. G., Clausen, T. H., Wild, P., Bilusic, I., Theurillat, J. P., Overvatn, A., Ishii, T., Elazar, Z., Komatsu, M., Dikic, I., and Johansen T. (2009). A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates. *Mol Cell*, 33 (4): 505–16.
- Kofoed, R. H., Zheng, J., Ferreira, N., Lykke-Andersen, S., Salvi, M., Betzer, C., Reimer, L., Jensen, T. H., Fog, K., Jensen, P. H. (2017). Polo-like kinase 2 modulates α -synuclein protein levels by regulating its mRNA production. *Neurobiol. Dis.*, 106: 49-62.
- Koukouraki, P., and Doxakis, E. (2016). Constitutive translation of human α -synuclein is mediated by the 50-untranslated region. *Open Biol.*, 6 (4): 160022

- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Schöls, L. and Riess, O. (1998). Ala30Pro Mutation in the Gene Encoding Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease. *Nat Genet.*, 18 (2): 106–8.
- Kurz, A., Double, K. L., Lastres-Becker, I., Tozzi, A., Tantucci, M., Bockhart, V., Bonin, M., Garcia-Arencibia, M. Number, S., Schlaudraff, F., Liss, Birgit, Fernandez-Ruiz, J., Gerlach, M., Wullner, U., Luddens, H., Calabresi, P., Auburger, G., Gispert, S. (2010). A53T-Alpha-Synuclein Overexpression Impairs Dopamine Signaling and Striatal Synaptic Plasticity in Old Mice. *PLoS One*, 5 (7): e11464.
- Labno, A., Tomecki, R., Dziembowski, A. (2016). Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1863 (12): 3125-3147.
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J. L., and Gorospe, M. (2004). Concurrent versus Individual Binding of HuR and AUF1 to Common Labile Target MRNAs. *EMBO J.*, 23 (15): 3092–3102.
- Lan, A. P., Chen, J., Zhao, Y., Chai, Z., and Hu. Y. (2017). MTOR Signaling in Parkinson's Disease. *Neuromolecular Med*, 19 (1): 1–10.
- Lane, E. L. (2018). L-DOPA for Parkinsons' disease-a bittersweet pill. *Eur J Neurosci*, 49: 384–398.
- Lebedeva, S., Jens, M., Theil, K., Schwanhauser, B., Selbach, M., Landthaler, M., Rajewsky, N. (2011). Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Mol Cell*, 43 (3): 340-52.
- Leak, R. K. (2014). Heat shock proteins in neurodegenerative disorders and aging. *J Cell Commun Signal.*, 8 (4): 293-310.
- Leandersson, K., Riesbeck, K., and Andersson, T. (2006). Wnt-5a mRNA translation is suppressed by the Elav-like protein HuR in human breast epithelial cells. *Nucleic Acids Res*, 34 (14): 3988–3999.
- Lecker, S. H., Goldberg, A. L., and Mitch, W. E. (2006). Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *J Am Soc Nephrol.*, 17 (7): 1807–19.
- Lee, S. J. (2008). Origins and Effects of Extracellular α -Synuclein: Implications in Parkinson's Disease. *J Mol Neurosci.*, 34 (1): 17–22
- Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L. Honoré, A., Rozas, N., Pieri, L. Madiona, K., Durr, A., Melki, R., Verny, C., Brice, A. (2013). G51D α -Synuclein Mutation Causes a Novel Parkinsonian-Pyramidal Syndrome. *Anns Neurol.*, 73 (4): 459–71.

- Li, J. Q., Tan, L., and Yu, J. T. (2014). The role of the LRRK2 gene in Parkinsonism. *Mol Neurodegener.*, 9: 47
- Lim, K. L., and Zhang C. W. (2013). Molecular Events Underlying Parkinson's Disease - an Interwoven Tapestry. *Front Neurol.*, 4: 33.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Lo Bianco, C., Ridet, J. L., Schneider, B. L., Deglon, N., and Aebischer, P. (2002). α -Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proc. Natl Acad. Sci U S A.*, 99 (16): 10813-10818.
- Maday, S., and Holzbaur, E. L. F. (2014). Autophagosome Biogenesis in Primary Neurons Follows an Ordered and Spatially Regulated Pathway. *Dev Cell*, 30 (1): 71-85.
- Mansfield, K. D., and Keene, J. D. (2012). Neuron-specific ELAV/Hu proteins suppress HuR mRNA during neuronal differentiation by alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res*, 40 (6): 2734-2746.
- Marchese, D., Botta-Orfilia, T., Cirillo, D., Rodriguez, J. A., Livi, C. M., Fernandez-Santiago, R., Ezquerra, M., Marti, M. J., Bechara, E., and Tartaglia, G. (2017). Discovering the 3' UTR-mediated regulation of alpha-synuclein. *Nucleic Acids Res.*, 45 (22): 12888-12903.
- Maris, C., Dominguez, C., and Allain. F. H.-T. (2005). The RNA Recognition Motif, a Plastic RNA-Binding Platform to Regulate Post-Transcriptional Gene Expression. *FEBS J.*, 272 (9): 2118–31.
- Maroteaux, L., Campanelli, J. T., and Scheller, R. H. (1988). Synuclein: A Neuron-Specific Protein Localized to the Nucleus and Presynaptic Nerve Terminal. *J Neurosci*, 8(8):2804-15.
- Masato, A. and Bubacco, L. (2024). The α Synuclein half-life conundrum. *Neurobiol. Dis.*, 196: 106524.
- Matoulkova, E., Michalova, E., Vojtesek, B., and Hrstka, R. (2012). The role of the 3' untranslated region in posttranscriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol.*, 9 (5): 563-76.
- Mayr, C. (2017). Regulation by 3'-Untranslated Regions. *Annu Rev Genet.*, 51: 171-194.
- McLean, J. R., Hallett, P. J, Cooper, O., Stanley, M., Isacson, O. (2012). Transcript expression levels of full-length alpha-synuclein and its three alternatively spliced variants in

- Parkinson's disease brain regions and in a transgenic mouse model of alpha-synuclein overexpression. *Mol Cell Neurosci.*, 49 (2): 230-9.
- Minvielle-Sebastia, L., and Keller. W. (1999). mRNA Polyadenylation and Its Coupling to Other RNA Processing Reactions and to Transcription. *Curr Opin Cell Biol.*, 11 (3): 352–57
- Mukherjee N., Corcoran, D. L., Nusbaum, J. D., Reid, D. W., Georgiev, S., Hafner, M., Ascano Jr, M., Tuschl, T., Ohler, U., Keene, J. D. (2011). Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability. *Mol Cell*, 43 (3): 327-329.
- Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (2000). Synucleins Are Developmentally Expressed, and α -Synuclein Regulates the Size of the Presynaptic Vesicular Pool in Primary Hippocampal Neurons. *J Neurosci*, 20 (9): 3214-20.
- Narayanan, R. K., Mangelsdorf, M., Panwar, A., Butler, T. J., Noakes, P. G., and Wallace R. H. (2013). Identification of RNA Bound to the TDP43 Ribonucleoprotein Complex in the Adult Mouse Brain. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.*, 14 (4): 252–60.
- Nicastro, G., Taylor, I. A., and Ramos, A. (2015). KH-RNA Interactions: Back in the Groove. *Curr Opin Cell Biol.*, 30: 63–70.
- Nguyen, C. D., Mansfield, R. E., Leung, W., Vaz, P. M., Loughlin, F. E., Grant, R. P., and Mackay. J. P. (2011). Characterization of a Family of RanBP2-Type Zinc Fingers That Can Recognize Single-Stranded RNA. *J Mol Biol.*, 407 (2): 273–83.
- Okano, H. J., and Darnell, R. B., (1997). A Hierarchy of Hu RNA Binding Proteins in Developing and Adult Neurons. *J Neurosci.*, 17 (9): 3024–37.
- Okano, H., Kawahara, H., Toriya, M., Nakao, K., Shibata, S., and Imai, T. (2005). Function of RNA-Binding Protein Musashi-1 in Stem Cells. *Exp Cell Res*, 306 (2): 349–56.
- Oliveira, L. M. A., Gasser, T., Edwards, R., Zweckstetter, M., Melki, R., Stefanis, L., Lashuel, H. A., Sulzer, D., Vekrellis, K., Halliday, G. M., Tomlinson, J. J., Schlossmacher, M., Jensen, P. H., Schulze-Hentrich, J., Riess, O., Hirst, W., El-Agnaf, O., Mollehuier, B., Lansbury P., Outeiro, T. F. (2021). Alpha-synuclein research: defining strategic moves in the battle against Parkinson's disease. *Npj Parkinsons Dis.*, 7 (1): 65.
- Oliveras-Salva, M., Van der Perren, A., Casadei, N., Stroobants, S., Number, S., D'Hooge, R., Van den Haute, C., and Baekelandt, V. (2013). rAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein

- aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.*, 8: 44.
- Orenstein, S. J., Kuo, S-H., Tasset, I., Arias, E., Koga, H., Fernandez-Carasa, I., Cortes, E., Honig, L. S., Dauer, W., Consiglio, A., Raya, A., Sulzer, D., Cuervo, A. M. (2013). Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat Neurosci.*, 16 (4): 394-406.
- Ramaswami, M., Taylor, J. P., Parker, R. (2013). Altered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders. *Cell*, 154 (4): 727-36.
- Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., Pentti J. T., Pöyhönen, M., and Paetau, A. (2014). Novel a-Synuclein Mutation A53E Associated with Atypical Multiple System Atrophy and Parkinson's Disease-Type Pathology. *Neurobiol Aging.*, 35 (9): 2180.e1-5.
- Paschou, M., Paraskevopoulou, M. D., Vlachos, I. S., Koukouraki, P., Hatzigeorgiou, A. G., and Doxakis, E. (2012). MiRNA Regulons Associated with Synaptic Function. *PLoS One*, 7 (10): e46189.
- Patel, B., and Cuervo, A. M. (2015). Methods to study chaperone-mediated autophagy. *Methods*, 75: 133-40.
- Peng, S. S., Chen, C. Y., Xu, N., Shyu, A. B. (1998). RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J*, 17 (12): 3461–3470.
- Pignolet, B. S., Gebauer, C. M., Liblau, R. S. (2013). Immunopathogenesis of paraneoplastic neurological syndromes associated with anti-hu antibodies: A beneficial antitumor immune response going awry. *Oncoimmunology*, 2 (12): e27384.
- Rieker, C., Dev, K. K., Lehnhoff, K., Barbieri, S., Ksiazek, I., Kauffmann, S., Danner, S., Schell, H., Boden, C., Ruegg, M. A., Kahle, P. J., van der Putten, H., Shimshek, D. R. (2011). Neuropathology in Mice Expressing Mouse Alpha-Synuclein. *PLoS One*, 6 (9): e24834.
- 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., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di lorio, G., Golbe, L. I., Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the Alpha-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science*, 276 (5321): 2045–47.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A. E., Lang, A. E. (2017). Parkinson Disease. *Nat Rev Dis Primers*, 3: 17013.

- Prechtel, A. T., Chemnitz, J., Schirmer, S., Ehlers, C., Langbein-Detsch, I., Stulke, J., Dabauvalle, M. C., Kehlenbach, R. H., and Hauber, J. (2006). Expression of CD83 is regulated by HuR via a novel cis-active coding region RNA element. *J Biol Chem*, 281 (16): 10912–10925.
- Protter, D. S. W., and Parker. P. (2016). Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol.*, 26 (9): 668–79.
- Proukakis, C., Dudzik, C. G., Brier, T., MacKay, D. S., Cooper, J. M., Millhauser, G. L., Houlden, H., and Schapira, A. H. (2013). A Novel α -Synuclein Missense Mutation in Parkinson Disease. *Neurology.*, 80 (11): 1062–64.
- Ravanidis, S., Kattan, F. G., Doxakis, E. (2018). Unraveling the Pathways to Neuronal Homeostasis and Disease: Mechanistic Insights into the Role of RNA-Binding Proteins and Associated Factors. *Int J Mol Sci*, 19 (8): 2280.
- Rhinn, H., Qiang, L., Yamashita, T., Rhee, D., Zolin, A., Vanti, W. and Abeliovich, A. (2012). α -Synuclein transcript alternative 3'UTR usage as a convergent mechanism in Parkinson's disease pathology. *Nat. Commun*, 3: 1084.
- Ryan, K., Calvo, O., and Manley, J. L. (2004). Evidence that polyadenylation factor CPSF-73 is the mRNA 3' processing endonuclease. *RNA*, 10 (4): 565-73.
- Savitt, J. M., Dawson, V. L., and Dawson. T. M. (2006). Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: Molecules to Medicine. *J Clin Invest*, 116 (7): 1744-54.
- Schimdt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M., Pierre, P. (2009). SUNSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods*, 6 (4): 275-7
- Singleton, A. B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Pearlina, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M. R., Muenter, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J., Gwinn-Hardy K. (2003). Alpha-Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science*, 302 (5646): 841.
- Sosanya, N. M., Cacheaux, L. P., Workman, E. R., Niere, F., Perrone-Bizzozero, N. I., Raad-Graham, K. F. (2015). Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Tagging Promotes Dendritic Branch Variability through the Capture of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II α (CaMKII α) mRNAs by the RNA-binding Protein HuD, *J Biol Chem.*, 290 (26): 16357–16371.
- Sotiriou, S., Gibney G., Baxevanis, A. D., and Nussbaum. R. L. (2009). A Single Nucleotide Polymorphism in the 3'UTR of the SNCA Gene Encoding Alpha-Synuclein Is a New Potential Susceptibility Locus for Parkinson Disease. *Neurosci Letts*, 461 (2): 196–201.

- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes R., Hasegawa, M., and Goedert, M. (1998). Alpha-Synuclein in Filamentous Inclusions of Lewy Bodies from Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (11): 6469–73.
- Stefanis, L. (2012). α -Synuclein in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2 (2): a009399.
- Sugeno, N., Takeda, A., Hasegawa, T., Kobayashi, M., Kikuchi, A., Mori, F., Wakabayashi, K., Itoyama, Y. (2008). Serine 129 Phosphorylation of α -Synuclein Induces Unfolded Protein Response-mediated Cell Death. *J Biol Chem*, 283 (34): 23179-88.
- Tong, J., Wong H., Guttman, M., Ang L. C., Forno, L. S., Shimadzu, M., Rajput, A. H., Muentner, M. D., Kish, S. J., Hornykiewicz, O., Furukawa, Y. (2010). Brain Alpha-Synuclein Accumulation in Multiple System Atrophy, Parkinson's Disease and Progressive Supranuclear Palsy: A Comparative Investigation. *Brain*, 133 (Pt 1): 172–88.
- Vamvaca, K., Volles, M. J. and Lansbury, P. T. (2009). The First N-terminal Amino Acids of α -Synuclein Are Essential for α -Helical Structure Formation In Vitro and Membrane Binding in Yeast. *J mol biol.*, 389 (2): 413–424.
- Vanevski, F., and Xu, B. (2015). HuD interacts with Bdnf mRNA and is essential for activity-induced BDNF synthesis in dendrites. *PloS One*, 10 (2): e0117264.
- Villar-Piqué, A., da Fonseca, T. L., and Outeiro T. F. (2016). Structure, Function and Toxicity of Alpha-Synuclein: The Bermuda Triangle in Synucleinopathies. *J Neurochem.*, 139 (S1): 240–255.
- Vekrellis, K., and Stefanis, L. (2012). Targeting Intracellular and Extracellular Alpha-Synuclein as a Therapeutic Strategy in Parkinson's Disease and Other Synucleinopathies. *Expert Opin Ther Targets*, 16 (4): 421–32.
- Vogiatzi, T., Xilouri, M., Vekrellis, K., and Stefanis, L. (2008). Wild Type Alpha-Synuclein Is Degraded by Chaperone-Mediated Autophagy and Macroautophagy in Neuronal Cells. *J Biol Chem*. 283 (35): 23542-56
- Wakabayashi, K., Tanji, K., Odagiri, S., Miki, Y., Takahashi, H. (2012). The Lewy Body in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Disorders. *Mol. Neurobiol.*, 47: 495-508.
- Weston, L. J., Cook, Z. T., Stackhouse, T. L., Sal, M. K., Schultz, B. I., Tobias, Z. J. C., Osterberg, V. R., Brockway, N. L., Pizano, S., Glover, G., Weissman, T. A., Unni, V. K. (2021). In vivo aggregation of presynaptic alpha-synuclein is not influenced by its phosphorylation at serine-129. *Neurobiol. Dis.*, 152: 105291.

- Xilouri, M., Brekk, O. R., and Stefanis, L. (2016). Autophagy and Alpha-Synuclein: Relevance to Parkinson's Disease and Related Synucleopathies. *Mov Disord.*, 31 (2): 178–92.
- Xilouri, M., Vogiatzi, T., Vekrellis, K., Park, D., and Stefanis, L. (2009). Aberrant Alpha-Synuclein Confers Toxicity to Neurons in Part through Inhibition of Chaperone-Mediated Autophagy. *PLoS One*, 4 (5): e5515.
- Yano, M., Okano, H. J., and Okano, H. (2005). Involvement of Hu and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in neuronal differentiation through p21 mRNA posttranscriptional regulation. *J Biol Chem*, 280 (13): 12690-12699.
- Yong, Y., Wu, Q., Meng, X., Lu, R., Xia, H., Pei, F., Yang, X. (2023). Dyrk1a Phosphorylation of α -Synuclein Mediating Apoptosis of Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease. *Parkinson Dis.*, 2023: 8848642.
- Zaltieri, M., Grigoletto, J., Longhena, F., Navarria, L., Favero, G., Castrezzati, S., Colivicchi, M. A., Corte, L. D., Rezzani, R., Pizzi, M., Benfenati, F., Spillantini, M., G., Missale, C., Spano, P. F., and Bellucci, A. (2015). α -synuclein and synapsin III cooperatively regulate synaptic function in dopamine neurons. *J Cell Sci*, 128, 2231-2243.
- Zarranz, J. J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J. C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodeiguez, O., Atares, B., Llorens, V., Tortosa, E. G., del Ser, T., Munoz, D. G., and de Yebenes, J. G. (2004). The New Mutation, E46K, of Alpha-Synuclein Causes Parkinson and Lewy Body Dementia. *Ann Neurol.*, 55 (2): 164–73.
- Zhifen, Y., and Klionsky, D. J. (2009). Mammalian Autophagy: Core Molecular Machinery and Signaling Regulation. *Curr Opin Cell Biol.*, 22 (2): 124-31.
- Zhou H. L, Hinman, M. N., Barron, V. A., Geng, C., Zhou G., Luo, G. Siegel R. E., Lou, H. (2011). Hu proteins regulate alternative splicing by inducing localized histone hyperacetylation in an RNA-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108 (36): 627-635.