

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Η επίδραση της RNA Binding Protein FMRP στη νόσο του Πάρκινσον”

Μαρίνα Σδράκα

Πατρώνυμο : Νικόλαος Σδράκας

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΘΟΔΗΓΗΣΗ : Επαμεινώνδας Δοξάκης, Ερευνητής Γ', Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Νευροβιολογίας, Κέντρο Βασικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Επαμεινώνδας Δοξάκης, Ερευνητής Γ', Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Νευροβιολογίας, Κέντρο Βασικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών
- Αιμιλία Ζίφα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας
- Καλλιόπη Λιαδάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας

ΑΘΗΝΑ 2025

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Επαμεινώνδας Δοξάκης, Ερευνητής Γ', Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Νευροβιολογίας, Κέντρο Βασικής Έρευνας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Υπογραφή

- Αιμιλία Ζίφα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Υπογραφή

- Καλλιόπη Λιαδάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Υπογραφή

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Βασικών Νευροεπιστημών του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.). Την επιστημονική επίβλεψη της διατριβής είχε αναλάβει ο κ. Επαμεινώνδας Δοξάκης τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος της επιστημονικής του ομάδας, για την καθοδήγηση, την υποστήριξη, την ανεκτικότητα και τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας Αιμιλία Ζίφα και την Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας Καλλιόπη Λιαδάκη για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή της Προπτυχιακής μου Εργασίας.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την συνεργασία και τη βοήθεια που μου προσέφεραν.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαιτέρως την οικογένεια μου για την αγάπη και τη συνεχή στήριξη τους σε κάθε βήμα της ζωής μου.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ABSTRACT	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1. Η νόσος του Πάρκινσον	9
1.1 Παθολογικό προφίλ.....	9
1.2 Γενετικό υπόβαθρο	10
1.3 Αιτιολογία παθογένειας	10
2. Η α-συνουκλεΐνη	11
2.1 Το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης	11
2.2 Η δομή της α-συνουκλεΐνης	12
2.3 Έκφραση της α-συνουκλεΐνης και φυσιολογικός ρόλος	13
2.4 Παθολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης	13
2.5 Παθολογία και συσχέτιση της α-συνουκλεΐνης με τη νόσο Πάρκινσον	14
3. Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης	16
3.1 Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης	16
3.2 Ρύθμιση έκφρασης της α-συνουκλεΐνης.....	16
4. Πρωτεΐνες δέσμησης RNA	17
4.1 Λειτουργίες των RBPs	17
5. Η πρωτεΐνη FMRP	20
5.1 Το γονίδιο της FMRP	20
5.2 Λειτουργίες της FMRP	21
5.3 FMRP και νόσος του Πάρκινσον.....	21
6. Μηχανισμοί αποικοδόμησης των πρωτεϊνών.....	22
6.1 Μονοπάτι Ουβικουιτίνης Πρωτεασώματος (Ubiquitin Proteasome Pathway, UPP).....	22
6.2 Μονοπάτι Αυτοφαγίας-Λυσοσωμάτων (Autophagy Lysosome Pathway, ALP)	23
ΥΛΙΚΑ	24
Κυτταρικά συστήματα	24
Φορείς κλωνοποίησης.....	24

Φαρμακολογικοί αναστολείς	25
Χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την καλλιέργεια των κυττάρων, τη διαμόλυνση και την επιμόλυνση	25
Διαλύματα-Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο ανοσοστύπωμα κατά Western.....	26
Αντισώματα για ανοσοστύπωμα κατά Western	27
Διαλύματα – Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών.....	27
Διαλύματα-Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην απομόνωση RNA, στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), στην αντίδραση <i>in vitro</i> μεταγραφής και στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR).....	27
ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με βιοτινυλιωμένο RNA.....	29
Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών	30
Διαμόλυνση κυττάρων	30
Απομόνωση RNA	30
Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής.....	31
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο -Ποσοτική PCR (qPCR-Real time PCR)	31
Δοκιμασία ακτινομυκίνης D	31
Απομόνωση πρωτεϊνών.....	32
Ανοσοστύπωμα κατά Western.....	32
Ανάλυση αναστολής πρωτεασώματος.....	32
Στατιστική επεξεργασία.....	33
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
1. Δημιουργία pCMV6-Empty από pCMV6-FMRP για χρήση του ως control στην πειραματική διαδικασία ...	34
2. Η Μέθοδος διαμόλυνσης των κυττάρων με pCMV6, siRNA-CONTROLS και siRNA-FMRP παρουσιάζει ελάχιστη τοξικότητα στα κύτταρα.....	35
3. Η FMR προσδένεται στο 3' αμετάφραστο άκρο του mRNA της α-συνουκλεΐνης	36
4. Η υπερέκφραση και η αποσιώπηση της FMRP μειώνει τα επίπεδα mRNA συνουκλεΐνης.....	37
5. Η υπερέκφραση της FMRP οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της ενδογενούς α-συνουκλεΐνης ενώ η αποσιώπηση δεν επιφέρει κάποια σημαντική αλλαγή	38
6. Η υπερέκφραση της FMRP αυξάνει της συσσωμάτωση και την φωσφορυλίωση της α-συνουκλεΐνης σε επίπεδο πρωτεΐνης ενώ η αποσιώπηση δεν επηρεάζει σημαντικά την συσσωμάτωση αλλά μειώνει την φωσφορυλιωμένης μορφή της α-συνουκλεΐνης.	40

7. Η FMRP επηρεάζει την σταθερότητα του mRNA της α -συνουκλείνης	41
8. Η FMRP επηρεάζει τα επίπεδα των πρωτεϊνών p62/SQSTM1 και LAMP2 της αυτοφαγίας.	42
9. Η υπερέκφραση της FMRP επάγει τον καταβολισμό των ουβικουιτινιωμένων πρωτεϊνών ενώ η αποσιώπησή της τον αναστείλει.....	43
Συζήτηση.....	44
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	45

ABSTRACT

Protein α -synuclein (SNCA) is primarily located at the presynaptic termini of neurons and is involved in synaptic plasticity and vesicle trafficking. Although its function is not fully understood, it is thought to regulate the docking of synaptic vesicles during neurotransmitter release. Abnormal expression of SNCA is associated with diseases such as Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy, playing a critical role in neurodegeneration. Researchers have mainly focused on the misfolding and aggregation of SNCA, while its mRNA regulatory networks have been less studied.

RNA-binding proteins (RBPs) play a crucial role at various stages of the mRNA life cycle, from splicing and alternative polyadenylation to nuclear export, cellular localization, stability, and translation regulation. This study focuses on identifying the lifecycle points of SNCA mRNA influenced by the RNA-binding protein FMRP.

FMRP is an important postsynaptic protein that regulates gene expression and can lead to neurodegeneration when mutated. This research examines the impact of FMRP on α -synuclein, a neurodegenerative protein associated with Parkinson's disease and other α -synucleinopathies. FMRP acts as a regulator of α -synuclein through the 3'UTR, affecting its transcription, localization, and stability of transcripts. Moreover, FMRP is involved in protein degradation pathways, with changes in its levels linked to neurodegenerative disorders. The findings of this study suggest that modulating FMRP might provide a therapeutic target for alleviating symptoms in patients with α -synucleinopathies.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη (SNCA) εντοπίζεται κυρίως στις προσυναπτικές απολήξεις των νευρώνων και εμπλέκεται στη συναπτική πλαστικότητα και τη διακίνηση κυστίτιδων. Αν και η λειτουργία της δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως, θεωρείται ότι ρυθμίζει την πρόσδεση των συναπτικών κυστίτιδων κατά την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών. Μη φυσιολογική έκφρασή της συνδέεται με νόσους όπως η νόσος του Πάρκινσον (νΠ), η άνοια με σωμάτια Lewy και η ατροφία πολλαπλών συστημάτων, παίζοντας κρίσιμο ρόλο στον νευροεκφυλισμό. Οι μελετητές έχουν εστιάσει κυρίως στη λανθασμένη αναδίπλωση και συσσώρευση της SNCA, ενώ τα ρυθμιστικά δίκτυα του mRNA της έχουν μελετηθεί λιγότερο.

Οι πρωτεΐνες δέσμησης RNA (RBPs) παίζουν κρίσιμο ρόλο σε διάφορα στάδια του κύκλου ζωής του mRNA, από τη διαδικασία του ματίσματος και της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης έως τη μεταφορά του mRNA εκτός πυρήνα, την κυτταρική του κατανομή, τη σταθερότητα και τη ρύθμιση της μετάφρασής του. Η παρούσα μελέτη εστιάζει στον εντοπισμό των σημείων του κύκλου ζωής του mRNA της α-συνουκλεΐνης που φαίνεται να επιδρά η RNA Binding Protein FMRP.

Η FMRP είναι μια σημαντική μετασυναπτική πρωτεΐνη που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων και μπορεί να οδηγήσει σε νευροεκφυλισμό όταν είναι μεταλλαγμένη. Στην παρούσα έρευνα, μελετήθηκε η επίδραση της FMRP στην α-συνουκλεΐνη, μια νευροεκφυλιστική πρωτεΐνη που σχετίζεται με την νόσο του Πάρκινσον και άλλες α - συνουκλεινοπάθειες. Η FMRP λειτουργεί ως ρυθμιστής της α-συνουκλεΐνης μέσω του 3'UTR, επηρεάζοντας τη μεταγραφή, την τοποθέτηση και τη σταθερότητα των μεταγράφων. Επιπλέον, η FMRP εμπλέκεται στα μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών, με μεταβολές στα επίπεδα της να σχετίζονται με νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Τα ευρήματα αυτής της έρευνας δείχνουν ότι η ρύθμιση της FMRP μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση συμπτωμάτων σε ασθενείς με α-συνουκλεινοπάθειες.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η νόσος του Πάρκινσον

Η νόσος του Πάρκινσον (Parkinson's disease, PD) είναι μία χρόνια νευροεκφυλιστική νόσος και μία από τις συχνότερες νόσους που επηρεάζουν το κεντρικό νευρικό σύστημα με συχνότητα 1% στον πληθυσμό άνω των 65 ετών και περισσότερο από 4% στον πληθυσμό άνω των 85 ετών ¹

Η κλινική εικόνα της νόσου αποτελείται από κινητικά προβλήματα όπως τρόμο ηρεμίας, δυσκαμψία και βραδυκινησία. Πέραν των κινητικών συμπτωμάτων, οι ασθενείς εμφανίζουν διαταραχές στην όσφρηση και στον ύπνο, δυσκοιλιότητα καθώς και άλλες διαταραχές του αυτόνομου νευρικού συστήματος, ήπιας μορφής κατάθλιψη, και σε μεγάλη ηλικία, έκπτωση των νοητικών λειτουργιών². Έως και σήμερα δεν υπάρχει θεραπεία για τη νόσο, ωστόσο, έχει επιτευχθεί η επιβράδυνση της εκδήλωσης των παραπάνω κινητικών συμπτωμάτων κυρίως με τη χρήση φαρμάκων. Οι περισσότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις, στοχεύουν στην έμμεση αύξηση της ντοπαμίνης στον εγκέφαλο, όπως στην υποκατάστασή της με λεβοντόπα (L-DOPA) ³. Η επιλογή της L-DOPA γίνεται, διότι έχει την ικανότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, να εισέρχεται στο ΚΝΣ και στο περιφερικό νευρικό σύστημα και να μετατρέπεται σε ντοπαμίνη από το ένζυμο L-αμινοξική αποκαρβοξυλάση ⁴.

1.1 Παθολογικό προφίλ

Η νόσος του Πάρκινσον χαρακτηρίζεται από απώλεια νευρικών κυττάρων, κυρίως στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου (Substantia nigra pars compacta, SNpc). Τα κύτταρα της παραπάνω περιοχής παράγουν τον νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη, ως εκ τούτου ο εκφυλισμός τους διαταράσσει τη νευροδιαβίβαση κατά μήκος της μελαινораβδωτής οδού ⁵.

Κύριο παθολογικό χαρακτηριστικό της νόσου, αποτελούν τα κυτταροπλασματικά έγκλειστα που παρατηρούνται στους εναπομείναντες νευρώνες της μέλαινας ουσίας, τα οποία ονομάζονται σωμάτια Lewy (LBs, Lewy bodies) και μεταξύ άλλων αποτελούνται από μη διαλυτές μορφές της α-συνουκλεΐνης. Τα LBs 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 παρασυμπαθητικούς μεταγαγγλιακούς νευρώνες (parasympathetic και sympathetic post-ganglionic neurons), στην αμυγδαλή (amygdaloid nucleus) και στον εγκεφαλικό φλοιό (cerebral cortex)⁶.

1.2 Γενετικό υπόβαθρο

Σε γενετικό επίπεδο, έχουν ταυτοποιηθεί σημειακές μεταλλάξεις αλλά και διπλασιασμοί ή τριπλασιασμοί του γενετικού τόπου της α-συνουκλεΐνης σε ασθενείς με αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα της νόσου. Ορισμένες σημειακές μεταλλάξεις αντικατάστασης που έχουν καταγραφεί είναι οι A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E και A53T^{7,8,9,10,11,12}. Αυτοί οι διπλασιασμοί ή τριπλασιασμοί του γενετικού τόπου της α-συνουκλεΐνης μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση των επιπέδων του mRNA και της πρωτεΐνης και τελικά στη δημιουργία αδιάλυτων συσσωματωμάτων, όπως έχει βρεθεί σε δείγματα εγκεφάλου ασθενών¹³. Παρ' όλα αυτά, τόσο η αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνη όσο και οι μορφές που έχουν προκύψει από τα μεταλλαγμένα μετάγραφα, εμφανίζουν εξ ίσου μειωμένη διαλυτότητα σε υδατικό διάλυμα, με αποτέλεσμα να έχουν ίσως παρόμοια συνεισφορά στο σχηματισμό τοξικών ινιδίων¹⁴.

Πέραν της *SNCA*, έχουν συσχετιστεί τα γονίδια *UCHL1*, *LRRK2* με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονομής της νΠ. Οι πρωτεΐνες που προκύπτουν από τα γονίδια αυτά μετέχουν, μεταξύ άλλων σηματοδοτικών οδών, σε οδούς αποικοδόμησης των πρωτεϊνών, και πιο συγκεκριμένα στο μονοπάτι ουβικουιτίνης πρωτεασώματος και σε αυτό της αυτοφαγίας^{15,16}. Ακόμη, για τα γονίδια *PRKN*, *PINK1*, *FBXO7* και *DJ-1* εμφανίζεται υπολειπόμενος τύπος κληρονομικότητας της νΠ. Οι πρωτεΐνες που προκύπτουν από τα παραπάνω γονίδια μετέχουν στη λειτουργία των μιτοχονδρίων, στο οξειδωτικό στρες, στην ουβικιτινίωση, στο μεταβολισμό των λιπιδίων αλλά και στη βιογένεση και ανακύκλωση των συναπτικών κυστιδίων¹⁴⁵.

1.3 Αιτιολογία παθογένειας

Το επίπεδο στο οποίο η κληρονομικότητα επηρεάζει την επιρρέπεια στην ανάπτυξη νόσου του Πάρκινσον δεν έχει αποσαφηνισθεί, αλλά τις τελευταίες δυο δεκαετίες υπάρχει σημαντική πρόοδος στην διερεύνηση της μεντελικής συνισταμένης της νόσου. Συγγενείς πρώτου βαθμού παρκινσονικών ασθενών παρουσιάζουν 2-3 φορές υψηλότερη πιθανότητα να ασθενήσουν οι ίδιοι^{17,18}. Σήμερα θεωρείται πως η γενετική παίζει ρόλο περίπου στο 5% των περιπτώσεων και προτείνεται πως μονογονιδιακές μορφές της νόσου αποτελούν το 5-10% των περιστατικών¹⁹. Επικρατής τύπος κληρονομικότητας έχει εντοπιστεί στα γονίδια *SNCA*, *LRRK2*, *VPS35*, *EIF4G1*, *DNAJC13*, και *CHCHD2* και υπολειπόμενος στα γονίδια *PRKN*, *PINK1*, και *DJ-1*. Οι πρωτεΐνες που προκύπτουν από τα αναφερθέντα γονίδια εμπλέκονται στη λειτουργία των μιτοχονδρίων, το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος, την δυναμική και κινητικότητα κυστιδίων, το μονοπάτι αυτοφαγίας- λυσοσώματος και το οξειδωτικό στρες²⁰. Επομένως βλάβες στους μηχανισμούς αυτούς αποτελούν από τις πλέον μελετημένες οδούς μέσω των οποίων επάγεται παθολογία στη νόσο Πάρκινσον. Οφειλόμενες σε απώλεια ή δυσλειτουργία των πρωτεϊνών άμεσα εμπλεκόμενες στις διαδικασίες αλλά και έμμεσα μέσα από αλλοίωση της κυστιδικής διακίνησης, οι παραπάνω μεταβολές είναι ικανές να αφήσουν τα κύτταρα ευαίσθητα στα ινίδια α-συνουκλεΐνης²¹ και ικανά να συνεισφέρουν στην περαιτέρω συσσωρεύσή τους και διακυτταρική μετάδοσή τους²². Δεδομένων των ιδιαίτερων μεταβολικών αναγκών τις οποίες παρουσιάζουν πολωμένα κύτταρα όπως οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες²³ δεν ξαφνιάζει το γεγονός πως προβλήματα στην κυτταρική σηματοδότηση που διέπει τους μηχανισμούς μιτοχονδριακής βιογένεσης, της μετακίνησης, της δυναμικής σύντηξης – διάσπασης μιτοχονδρίων, της μιτοφαγίας, αλλά και της ίδιας της αναπνευστικής αλυσίδας έχουν την ικανότητα να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο με επακόλουθο την επιδείνωση της παθολογίας²⁴. Πέρα από τους μηχανισμούς κυτταρικής βλάβης εντός των ντοπαμινεργικών νευρώνων, η φλεγμονή στο νευρικό σύστημα έχει αναγνωριστεί

για τη συνεισφορά της στην παθολογία της νόσου του Πάρκινσον²⁵. Αυξημένη σηματοδότηση από υπερ-ενεργοποιημένη μικρογλοία ²⁶, αστροκύτταρα σε 'Α1' μοίρα και κυτταροτοξικά κύτταρα ²⁷ μπορούν να δράσουν ανεξάρτητα ή συνεργατικά για να μεσολαβήσουν στο θάνατο των ντοπαμινεργικών νευρώνων.

2. Η α-συνουκλεΐνη

Η α-συνουκλεΐνη (SNCA) ανήκει στην οικογένεια των συνουκλεϊνών μαζί με τη β-συνουκλεΐνη και τη γ-συνουκλεΐνη. Αποτελεί μια πρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται κυρίως στα προσυναπτικά άκρα των νευρώνων και έχει αποδειχθεί ότι καταλαμβάνει έως και το 1% των συνολικών πρωτεϊνών στο νευρωνικό κυτοσόλιο ^{28,29}. Η λειτουργία αυτής παραμένει άγνωστη, αλλά είναι πιθανόν να εμπλέκεται στην συναπτική νευροδιαβίβαση. Η α-συνουκλεΐνη έχει ταυτοποιηθεί ως το κύριο συστατικό των σωμάτων Lewy (Lewy bodies), το παθολογικό χαρακτηριστικό της νόσου του Πάρκινσον και άλλων νευρογλοιακών κυτταροπλασματικών εγκλείστων^{7,30}

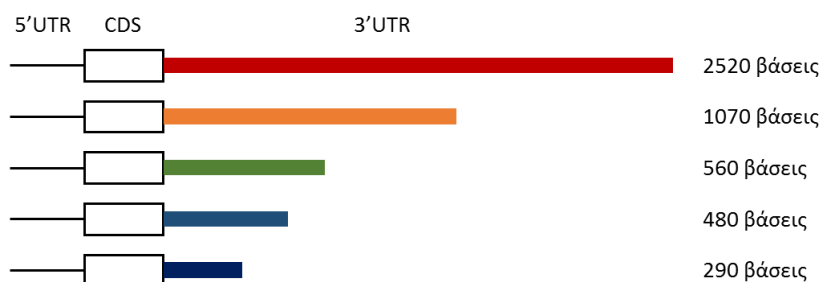
2.1 Το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης

Το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης εντοπίζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 4 (4q22.1) και αποτελείται από 6 εξώνια. Στον άνθρωπο, έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 4 διαφορετικά μετάγραφα (mRNA) τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές της α-συνουκλεΐνης (Εικόνα 1). Η μετάφραση όλων των εξωνίων οδηγεί στην παραγωγή της πρωτεΐνης που αποτελείται από 140 αμινοξέα ενώ η απουσία των εξωνίων 3, 5 ή και των δύο, οδηγούν στην παραγωγή των ισομορφών που αποτελούνται από 126, 112 και 98 αμινοξέα, αντίστοιχα³¹.



Εικόνα 1. Το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης εδράζεται στο χρωμόσωμα 4, εναλλακτικό μάτισμα των 6 εξωνίων της παράγει τέσσερις διαφορετικές ισομορφές.

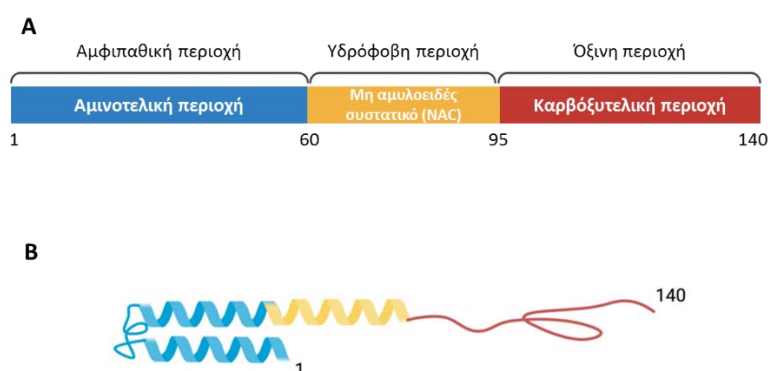
Το εξώνιο 6 περιλαμβάνει το 3' αμετάφραστο άκρο (3' untranslated region – 3'UTR) του γονιδίου το οποίο με τη σειρά του μέσα από το μηχανισμό της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης είναι ικανό να παράγει πολλά διαφορετικά μήκη στο τελικό μετάγραφο. Πιο συγκεκριμένα έχουν αναγνωριστεί 3'UTR με μήκη 290, 480, 560, 1070 και 2520 βάσεων (Εικόνα 2) σε διαφορετικές αναλογίες στους ασθενείς με Πάρκινσον σε σχέση με υγιή άτομα³². Επιπλέον το μήκος του 3'UTR του mRNA της α-συνουκλεΐνης βρέθηκε να επηρεάζει τα επίπεδα μετάφρασης σε in vitro μοντέλο³³.



Εικόνα 2. Η διαδικασία της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης παράγει πέντε διαφορετικές ισομορφές του 3' αμετάφραστου άκρου της α-συνουκλεΐνης³³.

2.2 Η δομή της α-συνουκλεΐνης

Η α-συνουκλεΐνη αποτελείται από 140 αμινοξέα. Παρουσιάζει άκρως διατηρημένη αμινοτελική περιοχή, με μεταβλητό αριθμό επαναλήψεων 11 βάσεων και μια λιγότερο συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή, με υπερίσχυση των όξινων κατάλοιπων³⁴. Η α-συνουκλεΐνη στερείται σταθερής δευτεροταγούς δομής, επομένως η λειτουργικότητα αυτής βασίζεται σε μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση, η νίτρωση, η διάσπαση και η ουβικιτινίωση. Περιλαμβάνει τρεις κύριες περιοχές: (i) το αμινοτελικό άκρο (1-60 αμινοξέα), το οποίο περιέχει μια πολλαπλά επαναλαμβανόμενη αμφίφιλη αλληλουχία (KTEGV), είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση αυτής σε λιπιδικές μεμβράνες και μπορεί να προκαλέσει τη διαμόρφωση δομής α-έλικας, (ii) την κεντρική περιοχή (61-95 αμινοξέα), γνωστή ως NAC (non-amyloid beta component), η οποία είναι εξαιρετικά υδρόφοβη και εμπλέκεται στη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης με την τάση διαμόρφωσης β-πτυχωτής δομής και είναι γνωστή ως το μη-αβ αμυλοειδές συστατικό των πλακών της νόσου Alzheimer και, (iii) το καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 96-140), αρνητικά φορτισμένο κι εμπλουτισμένο σε κατάλοιπα προλίνης, το οποίο παρέχει ευελιξία στο πολυπεπίδιο της α-συνουκλεΐνης προσδίδοντας της μια ακαθόριστη δομή^{35,36}.



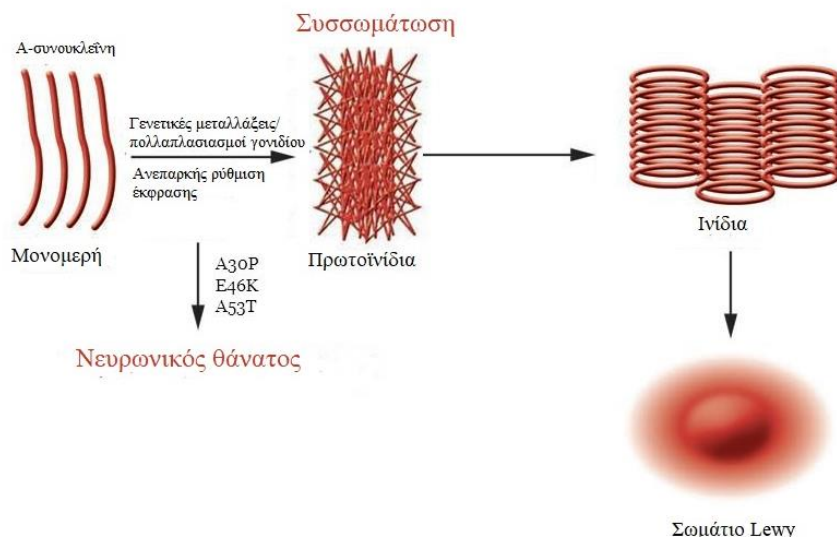
Εικόνα 3 Σχηματική απεικόνιση της πρωτοταγούς (Α) και δευτεροταγούς (Β) δομής της α-συνουκλεΐνης. Η πρωτεΐνη αποτελείται από τρεις κύριες περιοχές: μια αμφιπαθή αμινοτελική περιοχή (1-60), το μη-αμυλοειδές συστατικό (NAC) (61-95) και μια όξινη καρβοξυτελική περιοχή (96- 140)³⁶.

2.3 Έκφραση της α-συνουκλεΐνης και φυσιολογικός ρόλος

Όσον αφορά στον εντοπισμό της πρωτεΐνης, σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας υγιών εγκεφάλων με αντισώματα που αναγνωρίζουν την α-συνουκλεΐνη, διαπιστώθηκε έκφραση της πρωτεΐνης κυρίως στα προσυναπτικά άκρα και λιγότερο στο σώμα³⁷. Έχει, ακόμη, καταγραφεί αύξηση της α-συνουκλεΐνης στους νευρώνες της μέλαινας ουσίας κατά τη διαδικασία της γήρανσης³⁸. Η έκφραση της α-συνουκλεΐνης επάγεται κατά την νευρωνική ανάπτυξη, και μεταβάλλεται σε καταστάσεις φλεγμονής ή αλλαγής της πλαστικότητας. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, πειράματα *in-vivo* και *in-vitro*, κατά τα οποία η απουσία ή η υπερέκφρασή της α-συνουκλεΐνης αποκάλυψαν αλλαγές στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών, διαπιστώθηκε πως η α-συνουκλεΐνη μπορεί να διαμορφώνει τη συναπτική διαβίβαση^{39,40,41}. Ο ρόλος της α-συνουκλεΐνης στη συναπτική διαβίβαση πιθανόν να είναι αρνητικός, καθώς, σε μύες όπου δεν εκφράζεται η α-συνουκλεΐνη, παρατηρήθηκε αυξημένη απελευθέρωση της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα⁴¹. Επίσης, είναι πιθανόν η α-συνουκλεΐνη να συμμετέχει στη βιογένεσή των συναπτικών κυστιδίων μέσω επίδρασης στον μεταβολισμό του φωσφατιδικού οξέος καθώς έχει την ικανότητα ρύθμισης της δυναμικής των συναπτικών κυστιδίων κατά τη μεταβίβαση του σήματος⁴⁰. Επιπλέον, υπάρχει η υπόθεση πως, η α-συνουκλεΐνη δρα ως συνοδός πρωτεΐνη μαζί με την CSP-α (Cystein-string protein), κατά τη συγκρότηση του συμπλόκου SNARE και κατά αυτή τη συνεργασία μπορεί να πραγματοποιείται δέσμευση του καρβοξυτελικού άκρου της α-συνουκλεΐνης με την synaptobrevin-2 (VAMP-2) και στη συνέχεια απελευθέρωση των συναπτικών κυστιδίων. Κατά συνέπεια, κύρια λειτουργία της α-συνουκλεΐνης στο ΚΝΣ, μπορεί να είναι ο έλεγχος απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών μέσω της δράσης της στο σύμπλοκο SNARE^{42,43}. Εκτός του ΚΝΣ, η α-συνουκλεΐνη, φυσιολογικά, εκφράζεται σε αφθονία στα ερυθροκύτταρα και στα αιμοπετάλια με τη λειτουργία αυτή να παραμένει άγνωστη⁴⁴.

2.4 Παθολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης

Η α-συνουκλεΐνη ταυτοποιήθηκε το 1997, ως το κύριο συστατικό των σωμάτων Lewy (LBs) καθώς και των νευριτών Lewy (LNs), πρωτεϊνικά ενδοκυτταρικά έγκλειστα που είναι χαρακτηριστικά γνωρίσματα της ασθένειας του Πάρκινσον (PD) καθώς και της άνοιας με σωμάτια Lewy (DLB)⁴⁵. Εκτός των παραπάνω, η α-συνουκλεΐνη έχει συσχετιστεί και με άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως η ατροφία πολλαπλών συστημάτων (MSA), ο εκφυλισμός παρουσία σιδήρου στον εγκέφαλο (τύπου I) αλλά και με άλλες νόσους, που είναι γνωστές ως α-συνουκλεΐνοπάθειες³⁷. Σε παθολογικές καταστάσεις, η μη-αναδιπλωμένη α-συνουκλεΐνη αποκτά μια σφαιρική διαμόρφωση και μπορεί να συσσωρευτεί στο κυτταρόπλασμα. Με την αύξηση της συγκέντρωσής της οι «σφαιρικές διαμορφώσεις» μπορούν να ενωθούν και να σχηματίσουν τοξικά πρωτοϊνίδια και στη συνέχεια αδιάλυτα ινίδια, που αποτελούν συστατικό των σωμάτων Lewy, τα οποία σχετίζονται με νευρικό εκφυλισμό και νευρωνικό θάνατο^{14,45}. Η αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της α-συνουκλεΐνης στον εγκέφαλο ασθενών εντοπίζεται κυρίως στη μέλαινα ουσία με αύξηση των αδιάλυτων συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των μονομερών και ολιγομερών μορφών⁴⁶.



Εικόνα 4: Τα στάδια ολιγομερισμού της α-συνουκλεΐνης έως τον σχηματισμό σωματίων Lewy. Η τάση της πρωτεΐνης για συσσωμάτωση επηρεάζεται και από γενετικές μεταλλάξεις όπως οι A30P, E46K, A53T⁴⁷.

2.5 Παθολογία και συσχέτιση της α-συνουκλεΐνης με τη νόσο Πάρκινσον

Πληθώρα μελετών καταδεικνύει τη σχέση μεταξύ της συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης και του φαινοτύπου της νόσου του Πάρκινσον. Τα υψηλά επίπεδα της διαλυτής ολιγομερούς μορφής, αντί της αδιάλυτης μορφής ινιδίων της α-συνουκλεΐνης προτείνεται πλέον ως παθογόνο είδος στην νΠ⁴⁸. Τα διαλυτά ολιγομερή α-συνουκλεΐνης μπορούν να διαταράξουν τις μεμβράνες^{49,50} και να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο τόσο σε *in vitro*^{51,52} όσο και σε ζωικά μοντέλα^{53,54}.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο της SNCA και διπλασιασμός ή τριπλασιασμός του γονιδίου οδηγούν σε οικογενή και σποραδική μορφή της νόσου^{55,56}. Έξι επικρατείς μεταλλάξεις (A30P, E46K, A53T, A53E, H50Q, G51D) και μία πρόσφατα αναφερθείσα A53V έχουν αποκαλυφθεί μέχρι σήμερα, οι οποίες συνδέονται γενετικά με κάποια οικογενή μορφή της νόσου⁵⁷.

Η πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη υφίσταται εκτεταμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσης, της νιτροζυλίωσης και ουβικουιτίνωσης, οι οποίες φαίνεται να ευνοούν τον ολιγομερισμό⁵⁸ και είναι επαυξημένες στους εγκεφάλους των ασθενών με νΠ, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτές οι τροποποιήσεις μπορεί να συμβάλλουν στην παθολογία της νΠ. Στους εγκεφάλους με νΠ που περιέχουν σωματία Lewy⁵⁹ περίπου το 90% της α-συνουκλεΐνης περιέχει φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο σερίνη-129 (Ser-129), σε αντίθεση με το ~4% στους εγκεφάλους υγιών ατόμων. Η φωσφορυλίωση της α-συνουκλεΐνης στη Ser-129 είναι ικανή να προάγει τη συσώρευση ολιγομερούς α-συνουκλεΐνης *in vitro*⁶⁰, να επιταχύνει το σχηματισμό α-συνουκλεϊνικών συσσωματώσεων⁶¹, και να οδηγήσει σε νευρωνική απώλεια όταν συνυπάρχει με ανεβασμένα συνολικά επίπεδα έκφρασης α-συνουκλεΐνης, όπως φάνηκε σε *in vitro* μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν α-συνουκλεΐνη^{62,63}. Επιπλέον, μελέτες δείχνουν ότι η υπερφωσφορυλίωση της α-συνουκλεΐνης μπορεί να επηρεάσει τη διαλυτότητά της⁶⁴, τις ιδιότητες δέσμευσης της μεμβράνης και την υποκυτταρική κατανομή της, ευνοώντας έτσι μια παθογόνο κατάσταση⁶⁵.

Μια εναλλακτική οδός συσσώρευσης διαλυτών ολιγομερών α-συνουκλεΐνης αποτελεί η δυσλειτουργία στους μηχανισμούς κάθαρσης της α-συνουκλεΐνης από τα πρωτεολυτικά συστήματα. Το σύστημα ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος είναι κυρίως υπεύθυνο για την αποικοδόμηση των βραχύβιων διαλυτών πρωτεϊνών⁶⁶, ενώ η οδός αυτοφαγίας-λυσosώματος αποικοδομεί μακρομόρια μακράς διάρκειας ζωής, κυτταρικά συστατικά και δυσλειτουργικά οργάνδια⁶⁷. Όσον αφορά το λυσosώμα, άτομα με ετερόζυγη μετάλλαξη στη λυσοσωμική υδρολάση GCase (η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο GBA1) παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης σποραδικής νΠ⁶⁸, παρόλο που η μετάλλαξη οδηγεί σε ήπια μείωση στην συνολική ποσότητα GCase. Πιθανολογείται πως η συσσώρευση του κύριου υποστρώματος της GCase, του γλυκοσυλκεραμιδίου (GluCer) είναι εν μέρει υπεύθυνο για την αντίστροφη συσχέτιση α-συνουκλεΐνης και GCase. Το GluCer μπορεί να αλληλεπιδράσει άμεσα με την α-συνουκλεΐνη και να προωθήσει τη διαμορφωτική μετατροπή σε τοξικά ολιγομερή και αμυλοειδογόνα ινίδια⁶⁹. Η αυτοφαγία, και ειδικότερα η αυτοφαγία με τη μεσολάβηση συνοδών (CMA) έχει προταθεί ότι επηρεάζει τον κύκλο εργασιών και τον μεταβολισμό της α-συνουκλεΐνης. Η CMA είναι μια επιλεκτική μορφή αυτοφαγίας που συχνά αξιοποιείται ως αντίδραση στο κυτταρικό στρες⁷⁰.

Υπάρχουν δεδομένα τα οποία υποδηλώνουν πως η α-συνουκλεΐνη μπορεί να επηρεάσει την μιτοχονδριακή ομοιόσταση παρεμβαίνοντας στη σωστή δυναμική της σύντηξης/διάσπασης των μιτοχονδρίων, επηρεάζοντας τη δυναμική εισαγωγής πρωτεϊνών καθώς και να οδηγήσει σε αναστολή του μιτοχονδριακού συμπλέγματος I⁷¹, δυσλειτουργίες οι οποίες συνυπάρχουν με την νΠ. Δεδομένης της συγγένειας της α-συνουκλεΐνης για μεμβράνες υψηλής καμπυλότητας, ανθεκτικές σε απορρυπαντικά, εμπλουτισμένες σε χοληστερόλη, σφινγολιπίδια και όξινα φωσφολιπίδια όπως η καρδιολιπίνη^{72,73}, η συσχέτιση α-συνουκλεΐνης με τα μιτοχόνδρια μελετάται εκτενώς. Μετά τη δέσμευση σε λιπιδικές μεμβράνες και κυστίδια, η α-συνουκλεΐνη είναι ικανή να υιοθετήσει αμφίπαθη δομή α-έλικας, η οποία θεωρείται ότι αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην αρχική διαδικασία του ολιγομερισμού καθώς ευνοεί το σχηματισμό ινιδίων^{74,75}.

Μια εναλλακτική οδός επιδείνωσης της βιωσιμότητας των ντοπαμινεργικών νευρώνων σε περιπτώσεις συσσώρευσης α-συνουκλεΐνης είναι μέσω της επαγωγής φλεγμονής²⁵. Ο εγκέφαλος είναι εξαιρετικά ευάλωτος στο οξειδωτικό στρες σε σύγκριση με τα περιφερειακά όργανα λόγω των υψηλών επιπέδων πολυακόρεστων λιπαρών και της σχετικά χαμηλής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας⁷⁶. Τόσο τα πρωτο-ινίδια τα οποία ενδοκυτταρόνονται από τη μικρογλοία στα πλαίσια αποπτωτικού θανάτου των νευρώνων, ή μέσω μηχανισμών κυτταρικής απελευθέρωσης^{77,78}, όσο και η σηματοδότηση μέσω κυτταροκινών η οποία εκκρίνεται από τους επηρεασμένους νευρώνες έχουν την ικανότητα να οδηγήσουν στην ενεργοποίησή της μικρογλοίας και επάγουν αυξημένη παραγωγή ROS^{78,79} και φαγοκυτταρική δραστηριότητα²⁶. Η ενεργοποιημένη μικρογλοία με την σειρά της εκκρίνει IL-1α, TNF-α και πρωτεΐνη συμπληρώματος C1Q, μόρια ικανά να προκαλέσουν τα αστροκύτταρα να υιοθετήσουν μια προφλεγμονώδη "A1" μοίρα, πράγμα που σημαίνει πως δεν συμμετέχουν πια στο σχηματισμό συνάψεων, χάνουν τη φαγοκυτταρική τους δραστηριότητα και είναι άμεσα νευροτοξικά⁸⁰. Τέλος, τα πεπτίδια που προέρχονται από την α-συνουκλεΐνη δρουν ως αντιγονικοί επίτοποι και μεσολαβούν σε απαντήσεις βοηθητικών και κυτταροτοξικών T κυττάρων σε ασθενείς με νΠ²⁷. Το παρών, σε συνδυασμό με τα δεδομένα πως τα ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα αλλά και οι ανθρώπινοι ντοπαμινεργικοί νευρώνες είναι αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα που μπορούν να ενεργοποιήσουν

τα Τ κύτταρα⁸¹ πιθανόν να επιταχύνει τον μεσολαβούμενο από Τ κύτταρα θάνατο των ντοπαμινεργικών νευρώνων.

3. Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης

3.1 Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, πραγματοποιείται ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων σε διάφορα στάδια της γονιδιακής έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, η ρύθμιση αυτή γίνεται κατά τη μεταγραφή, μετά τη μεταγραφή, με ωρίμανση και πολυαδενυλίωση του πρόδρομου mRNA, εξαγωγή του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και η ρύθμιση της σταθερότητας ή της αποικοδόμησής του, κατά τη μετάφραση και μετά τη μετάφραση. Οι ρυθμιστικές αυτές διαδικασίες διαμεσολαβούνται κυρίως από ειδικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα πρόσδεσης σε δομές ή αλληλουχίες RNA (RNA-Binding proteins, RBPs), αλλά και από miRs ή μη-κωδικά μεγάλου μήκους RNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs). Αν και όλες οι RBPs συνδέονται με RNAs, η αναγνώριση διαφορετικών αλληλουχιών και τα εξωγενή ερεθίσματα ή ενδοκυττάρια σήματα, επηρεάζουν σημαντικά το χρόνο ή την θέση πρόσδεσής τους σε αυτά⁸². Παρά το γεγονός ότι οι RBPs μπορούν να επηρεάσουν τα μεταγραφικά/μεταφραστικά επίπεδα μιας πρωτεΐνης, δεν έχει μελετηθεί, επί του παρόντος, η επίδραση τους στη ρύθμιση της α-συνουκλεΐνης.

3.2 Ρύθμιση έκφρασης της α-συνουκλεΐνης

Δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα για την ρύθμιση έκφρασης της α-συνουκλεΐνης, παρά τη συμβολή της σε ένα ευρύ φάσμα νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα, σε μεταγραφικό επίπεδο, θετική ρύθμιση φαίνεται να έχουν οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA1⁸³ και ZSCAN21⁸⁴. Σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, η α-συνουκλεΐνη ρυθμίζεται από τη σύνδεση των microRNAs (miRs) -7 και -153 στο 3'αμετάφραστο άκρο του RNA με αποτέλεσμα τη μείωση των mRNA και πρωτεϊνικών επιπέδων της^{85,86}. Ρυθμιστικοί μηχανισμοί όμως μπορεί να δρουν και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Για παράδειγμα, αρνητική ρύθμιση των επιπέδων της α-συνουκλεΐνης γίνεται μέσω των συστημάτων αποικοδόμησης του κυττάρου, ενώ δυσλειτουργία αυτών οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της και πιθανόν σε παθολογικό φαινότυπο⁸⁷. Μετα-μεταφραστική ρύθμιση θεωρείται και μια τροποποίηση όπως η φωσφορυλίωση στη σερίνη 129 (Ser 129) και στην τυροσίνη 125 (Tyr 125), του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης, καθώς μπορεί να επηρεάσει την τάση της πρωτεΐνης για δημιουργία συσσωματωμάτων⁸⁸. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με την ανασκόπηση των Venda et al. 2010⁸⁸, η φωσφορυλίωση στη σερίνη 129 (Ser 129) ενισχύει την πιθανότητα δημιουργίας πρωτοϊνιδίων, ενώ η φωσφορυλίωση στην τυροσίνη 125 (Tyr 125) φαίνεται να την καταστέλλει. Ακόμη, σε μελέτη των Kim et al. 2006⁸⁹, ταυτοποιήθηκε μια νέα θέση φωσφορυλίωσης της α-συνουκλεΐνης στη σερίνη 87 (Ser 87) από την κινάση Dyrk1A. Το γονίδιο για την Dyrk1A εδράζεται στο χρωμόσωμα 21 και η υπερέκφραση αυτής σχετίζεται με την κλινική εικόνα του συνδρόμου Down, με χαρακτηριστική την νευροϊνιδιακή εκφύλιση του εγκεφάλου των ασθενών⁹⁰. Είναι επίσης πιθανόν να συμβάλλει και στην παθολογία της νόσου Αλτσχάιμερ^{91,92}. Τέλος, το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης, μπορεί να υποστεί και επιγενετική ρύθμιση όπως είναι η μεθυλίωση εντός του εσωνίου 1 που οδηγεί σε μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας, όπως επιβεβαιώνεται και από μελέτες σε εγκεφάλους ασθενών με σποραδική μορφή της ν.Π⁹³.

4. Πρωτεΐνες δέσμησης RNA

Σε δομικό επίπεδο, οι RBPs εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια και ποικιλομορφία. Οι κλασσικές RBPs δεσμεύουν στόχους mRNA μέσω διατηρούμενων περιοχών δέσμησης RNA (RBDs) που συνήθως βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα (συνήθως δύο ή τρία) και / ή σε διαφορετικούς συνδυασμούς εντός της ίδιας πρωτεΐνης. Μια περιοχή δέσμησης συνήθως αναγνωρίζει 2-6 νουκλεοτίδια σε μια αλληλουχία RNA και επομένως όσο περισσότερες περιοχές δέσμησης έχει μια πρωτεΐνη τόσο πιο ισχυρή είναι η σύνδεσή της με το RNA-στόχο⁹⁴. Διακρίνονται σε τέσσερις ευρείες κατηγορίες:

- i. Αυτές με τους τρεις μονόκλωνους τομείς αναγνώρισης RNA που περιλαμβάνουν το μοτίβο αναγνώρισης RNA (RRM)⁹⁵
- ii. Τις ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (HNRNP) με περιοχή πρόσδεσης KH⁹⁶
- iii. Αυτές με περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου (Znf)⁹⁷ και
- iv. Εκείνες που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν διπλές ελικοειδείς δομές RNA (dsRBD)⁹⁸

Γενικά, κάθε RBD έχει ενδιαμέση συγγένεια και ειδικότητα για τους στόχους RNA ωστόσο, η ισχυρή και επιλεκτική δέσμηση επιτυγχάνεται με τη συνδυαστική χρήση παρακείμενων RBD. Επιπλέον, οι περισσότερες RBPs έχουν εγγενώς περιοχές χωρίς σαφή δομή, που χαρακτηρίζονται από μονότονες επαναλήψεις διακριτών αμινοξέων όπως οι επαναλήψεις R / G, S / R και K / R που εμποδίζουν την αναδίπλωση σε σταθερή δευτερογενή ή τριτογενή δομή⁹⁹.

4.1 Λειτουργίες των RBPs

Οι RBPs λειτουργούν σε διάφορα στάδια του κύκλου ζωής του RNA, από τη μεταγραφή, την εναλλακτική συρραφή, την πολυαδενυλίωση, έως και τη μεταφορά και τη μετάφραση του. Διατάραξη πολύ-λειτουργίας των RBPs μπορεί να οδηγήσει σε απορρύθμιση της πρωτεϊνικής ομοιόστασης της κυτταρικής λειτουργίας^{100,101}.

Εναλλακτική Συρραφή

Τουλάχιστον το 74% των ανθρώπινων γονιδίων εκφράζουν mRNAs τα οποία πρόκειται να υποστούν εναλλακτική συρραφή¹⁰². Τη διαδικασία αυτή ρυθμίζουν οι RBPs. Για παράδειγμα, οι νευρωνικές πρωτεΐνες της οικογένειας Nova ελέγχουν την εναλλακτική συρραφή πολλών πρόδρομων μορίων mRNA αναγνωρίζοντας την αλληλουχία YCAY στα εσώνια (όπου Y πυριμιδίνη, U ή C). Η πλειοψηφία των στόχων των πρωτεϊνών Nova είναι mRNAs που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με λειτουργικό ρόλο στη συναπτική δραστηριότητα και πλαστικότητα. Η μη φυσιολογική έκφραση των πρωτεϊνών Nova σε

ορισμένους καρκίνους εκτός του ΝΣ, εκδηλώνεται σαν αυτοάνοση παρανεοπλασματική νευρολογική διαταραχή¹⁰³

Πολυαδενυλίωση

Έχει αποδειχθεί πως από το ίδιο γονίδιο μπορεί να παραχθούν μόρια mRNA με διαφορετικό μήκος 3'UTR ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο ή τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται το κύτταρο. Έτσι, 3'UTR μικρού μήκους, συναντώνται στη φάση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ενώ μεγαλύτερου μήκους 3'UTR σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των κυττάρων και την ανάπτυξη του οργανισμού εν γένει, αλλά και συγκεκριμένα του ΚΝΣ^{104,105}. Η πολύδενυλίωση ενός mRNA, η οποία εξαρτάται από RBPs, έχει ισχυρή επίδραση στη μεταφορά του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, τη μετάφραση καθώς και στη σταθερότητά του. Όλα τα ευκαρυωτικά mRNAs, με εξαίρεση τα mRNA των ιστονών, υφίστανται επεξεργασία ώστε να λάβουν 3' πολυ (A) άκρα μήκους περίπου 200 νουκλεοτιδίων¹⁰⁶.

Κατά την πολυαδενυλίωση το μετάγραφο διασπάται μεταξύ της εξαιρετικά συντηρημένης περιοχής AAUAAA και μιας ακολουθίας πλούσιας σε U/GU και μετά την περιοχή διάσπασης, η πολυ (A) πολυμεράση προσθέτει το πολυ (A) άκρο¹⁰⁶. Έχει δειχθεί ότι η οικογένεια των HU καταστέλλει την προσθήκη του πολυ(A) άκρου μέσω της πρόσδεσής της στην ακολουθία πλούσια σε U/GU. Επίσης, η εναλλακτική πολυαδενυλίωση φαίνεται να επηρεάζει τον εντοπισμό των mRNAs. Για παράδειγμα, το mRNA του νευροτροφικού παράγοντα BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) επεξεργάζεται σε δύο μετάγραφα με ένα μακρύ 3'UTR ή ένα βραχύ 3'UTR, που κωδικοποιούν την ίδια πρωτεΐνη. Το mRNA με το βραχύ 3'UTR απαντάται στο σώμα των νευρώνων, ενώ το mRNA με το μακρύ 3'UTR στους δενδρίτες. Η RBP CPEB1 μεσολαβεί στη στόχευση του BDNF στους δενδρίτες και η RBP HuD στη σταθερότητα του mRNA με το μακρύ 3'UTR, μέσω της πρόσδεσής της στην ακολουθία πλούσια σε AU¹⁰⁰.

Μεταφορά του mRNA

Για την εξαγωγή του mRNA από τον πυρήνα, δημιουργείται ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών με το μόριο mRNA, στη συνέχεια το σύμπλοκο μετατοπίζεται διαμέσου των πυρηνικών πόρων και τελικά απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν και RBPs¹⁰⁷. Οι RBPs ελέγχουν τη μεταφορά mRNA κατά μήκος των νευρώνων και των δενδριτών, τον υποκυτταρικό εντοπισμό ή την τοπική μετάφραση που εξαρτάται από την κυτταρική δραστηριότητα^{108,100}. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι διαφορετικές RBPs μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το ίδιο RNA σε διαφορετικές θέσεις δέσμευσης ή να ανταγωνίζονται για την ίδια θέση σύνδεσης αυξάνοντας την πολυπλοκότητα της ρύθμισης¹⁰⁹.

Μετάφραση του mRNA

Στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο επίπεδο της μετάφρασης συμμετέχουν πολλές RBPs και πραγματοποιείται με σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης. Μάλιστα, κατά τη διαφοροποίηση ή τον σχηματισμό των συνάψεων, πολλές RBPs συμβάλλουν στη μεταφορά των mRNAs στους δενδρίτες και στα προσυναπτικά άκρα, για να ακολουθήσει η μετάφρασή τους. Παράδειγμα τέτοιας πρωτεΐνης αποτελεί η FMRP η οποία, συμβάλλει στη μεταφορά και μετάφραση πολλών mRNAs στις συνάψεις. Δυσλειτουργία της FMRP, σχετίζεται άμεσα με το σύνδρομο του Εύθραυστου Χ (Fragile-X Syndrome) ¹¹⁰.

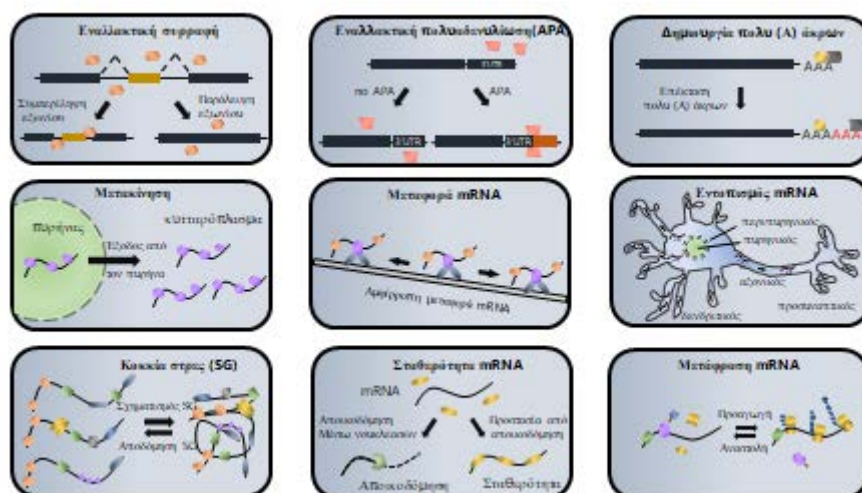
Ρύθμιση της σταθερότητας ή αποικοδόμησης των mRNAs

Ο κύκλος ζωής και η σταθερότητά του mRNA επηρεάζονται μεταξύ άλλων από στοιχεία ARE (περιοχές πλούσιες σε αδενίνη και ουρακίλη), που αποτελούνται από πέντε (AUUUA) ή και παραπάνω νουκλεοτίδια. Ένα μετάγραφο μπορεί να περιέχει παραπάνω του ενός ARE ενώ ο αριθμός αυτός μπορεί να καθορίσει την εξέλιξη του μορίου. Υπάρχουν πρωτεΐνες πρόσδεσης σε AREs (ARE-BPs), που συμβάλουν στην αποικοδόμηση του mRNA με στρατολόγηση διαφόρων παραγόντων^{111,112}. Οι RBPs συμμετέχουν στη ρύθμιση της αποικοδόμησης των mRNAs μέσω ανταγωνισμού πρόσδεσης με αποσταθεροποιητικές πρωτεΐνες επηρεάζοντας θετικά τη σταθερότητα και μετάφραση των μορίων mRNA που είναι πλούσια σε AU σε διάφορους ιστούς, όπως είναι ο εγκέφαλος. Παράδειγμα τέτοιων πρωτεϊνών είναι οι ELAV / Hu που συμμετέχουν σε διεργασίες πρόληψης της αποικοδόμησης καθώς περιέχουν περιοχές πρόσδεσης σε αδενίνη και ουρακίλη και σταθεροποιούν πληθώρα μορίων όπως τα c-fos, GM-CSF, και EGF113.

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

Τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά την μεταγραφή, οι RBPs συνδέονται με τους στόχους mRNA για τη διευκόλυνση της επεξεργασίας των προ-mRNAs. Προσελκύοντας κι άλλες ίδιες ή διαφορετικές RBPs, κατασκευάζουν μεγαλύτερα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά κοκκία (RNP) γύρω από το σκελετό του mRNA στόχου. Η αλληλεπίδραση μεταξύ δεσμευμένων RBP και του mRNA καθορίζει τελικά τον εντοπισμό του μεταγραφήματος και την επακόλουθη μετάφραση ή αποικοδόμηση. Τα RNP κοκκία είναι εξαιρετικά δυναμικά στη φύση, συναρμολογούνται και διαχωρίζονται ανάλογα με το τοπικό περιβάλλον. Σε ακραίες συνθήκες κυτταρικού στρες, όπως υποξία, θερμικό σοκ ή οξειδωτικό στρες, συναθροίζονται και συσχεύονται σε αναστρέψιμα κοκκία στρες χωρίς μεμβράνη (SGs) τα οποία αναστέλλουν τη μετάφραση, προκειμένου να διατηρηθεί η ενέργεια και να ελαχιστοποιηθεί η βλάβη που σχετίζεται με την καταπόνηση. Αυτή η επίδραση προκαλείται κυρίως από τη μεταφορά στο κυτταρόπλασμα RBPs όπως οι TIA1 / TIAR, η G3BP, το σύμπλεγμα eIF3 και η πρωτεΐνη σύνδεσης πολυ (A) άκρων (PABP). Αξίζει να αναφερθεί ότι, πολλές μεταλλάξεις που αφορούν RBPs (π.χ., TDP43, FUS, TIA1) σχετίζονται με την αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση και την μετωποκροταφική άνοια (ALS / FTD). Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν στον σχηματισμό παράτυπων SGs τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*

υποδηλώνοντας ότι η εσφαλμένη θέση mRNA ή και η απώλεια της λειτουργίας RBPs μπορεί να είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό των παθογενών νευροεκφυλιστικών μηχανισμών^{100,114}.



Εικόνα 5: Απεικόνιση των ρόλων των RBPs (Προσαρμογή από Ravanidis et al., 2018¹⁰¹).

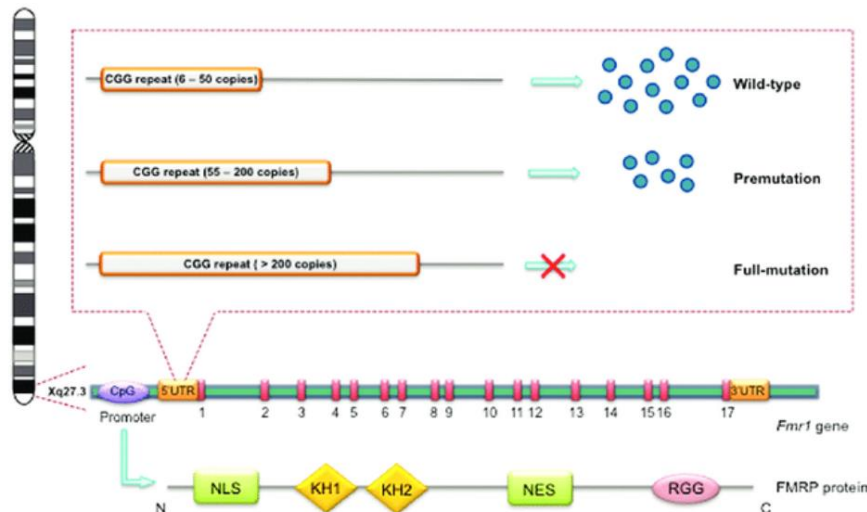
5. Η πρωτεΐνη FMRP

Η FMRP (**Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1**) πρωτεΐνη αποτελεί μια πολυλειτουργική δεσμευτική πρωτεΐνη που συνδέεται με mRNAs και πρωτεΐνες στον εγκέφαλο. Αποτελεί μια πρωτεΐνη δέσμευσης RNA που είναι μέρος ενός σωματιδίου ριβονουκλεοπρωτεΐνης που σχετίζεται με ενεργά μεταφραστικά πολυριβωσώματα και η οποία μπορεί να μετατοπίζεται μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος¹¹⁵. Είναι απαραίτητη για την φυσιολογική γνωστική ανάπτυξη και τη γυναικεία αναπαραγωγική λειτουργία. Οι μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου μπορεί να οδηγήσουν σε σύνδρομο εύθραυστου X, διανοητική αναπηρία, πρόωρη ωθητική ανεπάρκεια, αυτισμό, νόσο του Πάρκινσον¹⁴⁶, αναπτυξιακές καθυστερήσεις και άλλα γνωστικά ελλείμματα¹¹⁶.

5.1 Το γονίδιο της FMRP

Το Fmr1 γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα Xq27.3. Αποτελείται από 17 εξώνια και χαρακτηρίζεται από την παρουσία ασταθών πολυμορφικών επαναλήψεων αλληλουχίας CGG στο 5'UTR. Τα κανονικά αλληλόμορφα έχουν 6 έως 50 αντίγραφα επαναλήψεων CGG, τα προ μεταλλαγμένα αλληλόμορφα έχουν 55 έως 200 επαναλήψεις και τα πλήρως μεταλλαγμένα αλληλόμορφα έχουν περισσότερες από 200 επαναλήψεις. Ενώ η συνθήκη προμετάλλαξης προκαλεί τη μείωση του επιπέδου FMRP (μπλε κουκκίδες), η κατάσταση πλήρους μετάλλαξης σχετίζεται με υπερμεθυλίωση των επαναλήψεων CGG και της νήσου CpG έναντι στον προαγωγέα Fmr1, προκαλώντας έτσι τη μεταγραφική σίγαση του γονιδίου. Το FMRP αποτελείται από ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και ένα σήμα πυρηνικής εξαγωγής (NES), δύο τομείς ομολογίας

ριβονουκλεοπρωτεΐνης K (KH1-KH2), ένα σύμπλεγμα υπολειμμάτων αργινίνης και γλυκίνης (πλαίσιο RGG)¹¹⁷.



Εικόνα 6 .Γονίδιο *Fmr1* και δομή εύθραυστης πρωτεΐνης νοητικής καθυστέρησης X (FMRP)

5.2 Λειτουργίες της FMRP

Η FMRP παρουσιάζει πολλές λειτουργίες, η πληθώρα των οποίων σχετίζεται με το πολυριβόσωμα και που παίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη των νευρώνων και τη συναπτική πλαστικότητα μέσω της ρύθμισης του εναλλακτικού ματίσματος mRNA, της σταθερότητας του mRNA, της δενδριτικής μεταφοράς mRNA και της μετασυναπτικής τοπικής πρωτεϊνικής σύνθεσης των mRNA-στόχων^{118,119,120,121}.

Λειτουργεί ως ρυθμιστής mRNA μεσολαβώντας στο σχηματισμό κάποιου διαμερίσματος χωρίς μεμβράνη διαχωρισμένου φάσης: υφίσταται διαχωρισμό υγρής-υγρής φάσης κατά τη δέσμευση σε mRNAs στόχους, οδηγώντας στη συναρμολόγηση mRNA σε κοκκία κυτταροπλασματικής ριβονουκλεοπρωτεΐνης που συγκεντρώνουν mRNA με σχετικούς ρυθμιστικούς παράγοντες¹²².

Επίσης παίζει ρόλο στην εναλλακτική συναρμογή του δικού του mRNA¹²³ και λειτουργεί και ως ενεργοποιητής μετάφρασης mRNA ενός υποσυνόλου δενδριτικών mRNA στις συνάψεις¹²⁴. Συνδέεται σε συναινετικές αλληλουχίες RNA 5'-ACU[GU]-3' και/ή 5'-[AU]GGA-3' εντός στόχων mRNA, κυρίως σε κωδικοποιητική αλληλουχία (CDS) και 3'-αμετάφραστη περιοχή (UTR) και λιγότερο συχνά σε 5'-UTR¹²⁵ και παίζει σημαντικό ρόλο στην εξαγωγή πυρηνικών mRNA¹²⁶.

5.3 FMRP και νόσος του Πάρκινσον

Η νόσος του Πάρκινσον (PD) είναι η πιο κοινή νευροεκφυλιστική κινητική διαταραχή και χαρακτηρίζεται από την προοδευτική απώλεια ντοπαμινεργικών (DA) νευρώνων στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNc) και αυξημένη ποσότητα της α-συνουκλεΐνης στους νευρώνες. Αν και ο

ακριβής μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου με τη μεσολάβηση της α-συνουκλεΐνης παραμένει αδιευκρίνιστος, πρόσφατη έρευνα προτείνει ότι οι επαγόμενες από την α-συνουκλεΐνη αλλοιώσεις στη νευρωνική διεγερσιμότητα συμβάλλουν στον κυτταρικό θάνατο στην νόσο του Πάρκινσον. Επειδή η FMRP ελέγχει την έκφραση και τη λειτουργία πολυάριθμων νευρωνικών γονιδίων που σχετίζονται με τη νευρωνική διεγερσιμότητα και τη συναπτική λειτουργία, ερευνήθηκε ο ρόλος της σε παθολογικές αλλαγές που σχετίζονται με α-συνουκλεΐνη. Βρέθηκε ότι η FMRP μειώνεται σε καλλιέργειες DA νευρώνων και στον εγκέφαλο του ποντικίου ως απόκριση στην υπερέκφραση α-συνουκλεΐνης ¹²⁷. Επιπλέον, το FMRP μειώθηκε στο SNc των ασθενών με Πάρκινσον και σε ασθενείς με πρώιμα στάδια τυχαίας σωματικής νόσου Lewy (iLBD) ¹²⁷. Σε αντίθεση με το σύνδρομο εύθραυστου X, η έκφραση του FMR1 σε απόκριση στην α-συνουκλεΐνη ρυθμίστηκε από έναν μηχανισμό που περιλάμβανε την Πρωτεϊνική Κινάση C (PKC) και την πρωτεΐνη που δεσμεύει το στοιχείο απόκρισης cAMP (CREB). Συνοπτικά, τα αποτελέσματά αποκαλύψαν έναν πιθανό ρόλο του FMRP στη νόσο του Πάρκινσον και υποστηρίζουν την εξέταση γονιδίων που ρυθμίζονται από το FMRP στην εξέλιξη της νόσου ¹²⁷.

6. Μηχανισμοί αποικοδόμησης των πρωτεϊνών

Τα επίπεδα των πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κυττάρου ελέγχονται από το ρυθμό με τον οποίο συντίθενται, αλλά και από το ρυθμό με τον οποίο ανοικοδομούνται. Ο ρυθμός αποικοδόμησης των πρωτεϊνών εξαρτάται από την ποσότητά τους, τη λειτουργία τους και από το αν έχουν βλαβερές συνέπειες στο κύτταρο. Πρωτεΐνες με ρυθμιστικό ρόλο, όπως μεταγραφικοί παράγοντες ή ελαττωματικά μόρια πρωτεϊνών έχουν μικρό χρόνο ημιζωής και αποικοδομούνται γρήγορα. Δύο από τα κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών είναι το μονοπάτι ουβικιτίνης- πρωτεασώματος και το μονοπάτι της αυτοφαγίας που καταλήγει στα λυσοσώματα ¹²⁸.

Σε νευροεκφυλιστικές νόσους όπως η νόσος του Πάρκινσον, παρατηρείται συσσώρευση παθολογικών πρωτεϊνών. Βλάβη στην ενεργότητα του πρωτεασώματος και της αυτοφαγίας προκαλεί τη συσσωμάτωση και το σχηματισμό εγκλείστων των πρωτεϊνών που φυσιολογικά καταστρέφονται. Επομένως, η ρύθμιση του πρωτεασώματος και της αυτοφαγίας μπορεί να αποτρέψει τον σχηματισμό εγκλείστων και να μειώσει την πρόοδο των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και των ασθενειών που προκαλούνται από τη συσσώρευση ανώμαλων πρωτεϊνών ^{129,130}.

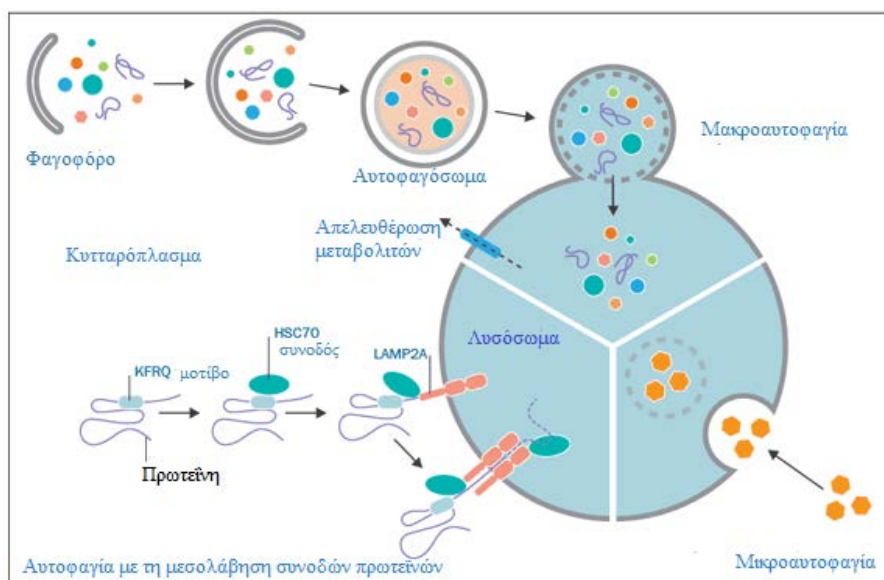
6.1 Μονοπάτι Ουβικουιτίνης Πρωτεασώματος (Ubiquitin Proteasome Pathway, UPP)

Το μονοπάτι ουβικουιτίνης πρωτεασώματος χαρακτηρίζεται από συντονισμένες ενέργειες των ενζύμων που συνδέουν τις αλυσίδες του πολυπεπτιδίου της ουβικουιτίνης (Ub) σε πρωτεΐνες για να τις σημάνουν για αποικοδόμηση ¹³¹. Αυτή η διαδικασία σήμανσης ακολουθείται από αναγνώριση των πρωτεϊνών από το πρωτεάσωμα 26S, ένα πολύ μεγάλο σύμπλοκο πολυκαταλυτικής πρωτεάσης που αποικοδομεί τις ουβικιτινιωμένες πρωτεΐνες σε μικρά πεπτίδια ¹³².

6.2 Μονοπάτι Αυτοφαγίας-Λυσοσωμάτων (Autophagy Lysosome Pathway, ALP)

Το μονοπάτι της αυτοφαγίας είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση τόσο των εκφυλισμένων πρωτεϊνών όσο και των κυτταρικών οργανιδίων. Στον όρο αυτοφαγία περιλαμβάνονται όλα τα αυτοφαγικά μονοπάτια δηλαδή η μακροαυτοφαγία, η αυτοφαγία με τη μεσολάβηση συνοδών πρωτεϊνών (chaperone-mediated autophagy, CMA) και η μικροαυτοφαγία. Κοινό χαρακτηριστικό τους είναι ότι περιλαμβάνουν τη μεταφορά ενδοκυττάρων συστατικών σε λυσοσώματα και την επακόλουθη επαναχρησιμοποίηση των δομικών στοιχείων που προκύπτουν. Τα λυσοσώματα μπορούν να λαμβάνουν επίσης συστατικά πλασματικής μεμβράνης και να εσωτερικεύουν εξωκυττάριο υλικό μέσω της διαδικασίας της ενδοκύτωσης^{133,134}.

Όσον αφορά την αποικοδόμηση της α-συνουκλείνης, μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή επιτελείται από τα μονοπάτια της μακροαυτοφαγίας και της αυτοφαγίας με τη μεσολάβηση συνοδών πρωτεϊνών^{135,136,137,138}.



Εικόνα 7: Οι τύποι της αυτοφαγίας (Προσαρμογή από www.novusbio.com).

ΥΛΙΚΑ

Κυτταρικά συστήματα

SK-N-SH Κύτταρα Νευροβλαστώματος Ανθρώπου

Πρόκειται για κύτταρα νευροβλαστώματος ανθρώπου που χρησιμοποιούνται ευρέως σαν πρότυπο σύστημα μελέτης. Τα SK-N-SH απομονωθήκαν από μεταστατικό καρκίνο μυελού των οστών από ένα κορίτσι ηλικίας 4 χρονών και εκφράζουν την α-συνουκλεΐνη.

Βακτήρια

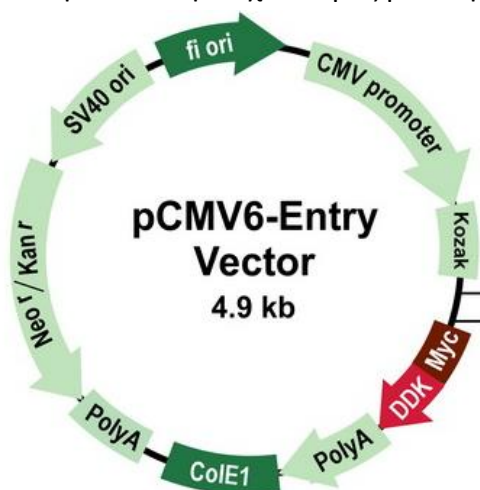
NEB Stable Competent *E.coli*

Προκειμένου να φτιάξουμε στο εργαστήριο το pCMV6-Empty πλασμίδιο που θα χρησιμοποιούσαμε σαν control (αρνητικό μάρτυρα) για τα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε τα NEB Stable Competent *E.Coli* βακτήρια της εταιρείας Biolabs και πρόκειται για χημικά ικανά κύτταρα *E.Coli* καταλληλά για μετασχηματισμό υψηλής απόδοσης.

Φορείς κλωνοποίησης

Πλασμιδιακός φορέας pCMV6

Ο Πλασμιδιακός φορέας pCMV6 (Origene) χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του γονιδίου FMRP και σαν control (αρνητικός μάρτυρας). Ο φορέας pCMV6 διαθέτει α) γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμικίνη, απαραίτητο για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών *E.coli* που φέρουν τον σωστό φορέα. β) τον υποκινητή CMV ανοδικά των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης, γ) πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης για την ενσωμάτωση των αλληλουχιών προς μελέτη.



Εικόνα 8: Πλασμιδιακός φορέας pCMV6

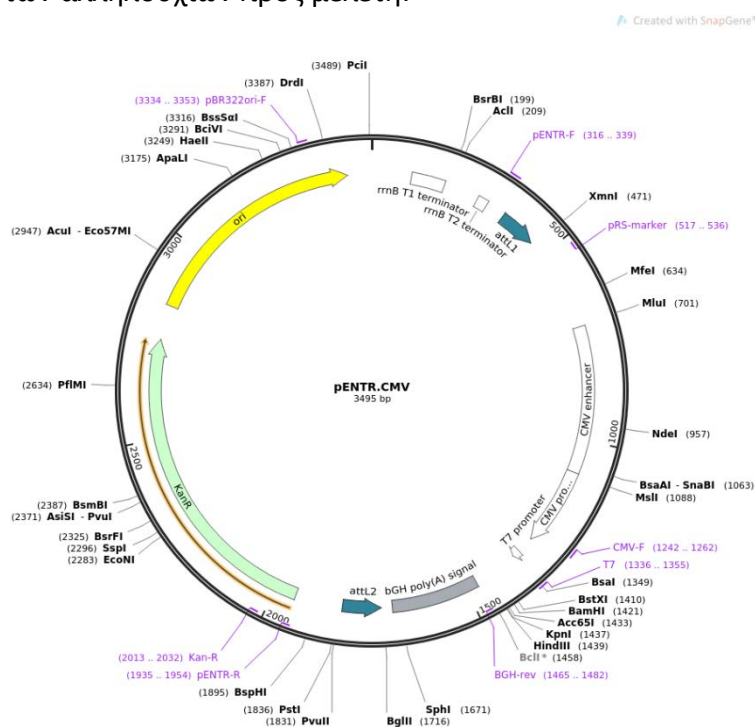
Λοιποί Πλασμιδιακοί φορείς

Πλασμιδιακοί φορείς Ub-G76V-GFP, Ub-R-GFP και Ub-M-GFP

Οι Πλασμιδιακοί φορείς Ub-G76V-GFP (#11941) , Ub-R-GFP (#11939) και Ub-M-GFP (#11938)(Addgene) χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση του μονοπατιού ουβικουιτίνης – πρωτεασώματος¹³⁹.

Πλασμιδιακός φορέας pENTR GD

Ο Πλασμιδιακός φορέας pENTR.GD (ThermoFisher) χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του γονιδίου της SNCA. Ο φορέας pENTR.GD διαθέτει: α) γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη, απαραίτητο για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών E. Coli που φέρουν τον σωστό φορέα, β) τον υποκινητή CMV ανοδικά των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης, γ) πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης για την ενσωμάτωση των αλληλουχιών προς μελέτη.



Εικόνα 9: Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pENTR.GD.

Φαρμακολογικοί αναστολείς

- Ακτινομυκίνη D: αναστολέας της μεταγραφής, προϊόν MedChemExpress.

Χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την καλλιέργεια των κυττάρων, τη διαμόλυνση και την επιμόλυνση

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - high glucose: Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA.
- Όρος εμβρύου βοός: ThermoFisher Scientific, Reinach, Switzerland.
- Θρυψίνη: Sigma-Aldrich.

- Μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνη:, Sigma-Aldrich.
- Η διαμόλυνση των κυττάρων SK-N-SH, στα πειράματα επισήμανσης εγγύτητας, έγινε με τη χρήση των αντιδραστηρίου JetPrime & JetOptimus, Polyplus.

Διαλύματα-Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της βιωσιμότητας των κυττάρων- Δοκιμασία Κυτταροτοξικότητας

Cell Counting Kit-8 (CCK-8), στην κάθε συνθήκη προστέθηκαν 10 μ l και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 450 nm χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών, προϊόν της εταιρείας Dojindo.

Το Cell Counting Kit-8 (CCK-8), παρέχει την δυνατότητα για τη μελέτη της επαγωγής και αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε οποιοδήποτε μοντέλο in vitro. Επιτρέπει πολύ ταχείες 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 μια υδατοδιαλυτή χρωστική φορμαζάνη με αναγωγή παρουσία ηλεκτρονίου. Το CCK-8 είναι διάλυμα έτοιμο για χρήση. Το CCK-8, όντας μη ραδιενεργό, επιτρέπει ευαίσθητες χρωματομετρικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων σε αναλύσεις κυτταρικού πολλαπλασιασμού και Κυτταροτοξικότητας. Το WST-8 μειώνεται από τις αφυδρογονάσεις στα κύτταρα για να δώσουν ένα προϊόν πορτοκαλί χρώματος (φορμαζάνη), το οποίο είναι διαλυτό στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Η ποσότητα της χρωστικής φορμαζάνη που παράγεται από τις αφυδρογονάσεις στα κύτταρα είναι ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων.

Διαλύματα-Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο ανοσοσύστημα κατά Western

- Διάλυμα λύσης κυττάρων: 25 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.16% Sodium Deoxycholate, 0.16% SDS.
- Μείγμα δεικτών γνωστού μοριακού βάρους για τις πρωτεΐνες: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#SM0671), ThermoFisher Scientific.
- Laemmli Buffer 6X: 375 mM Tris pH 6.8, 10% SDS, 50% glycerol, 10% mercaptoethanol, 0.03% bromophenol blue. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους -20 °C.
- Protran® μεμβράνες νιτροκυταρίνης: Χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταφορά των πρωτεϊνών και ήταν της εταιρείας Whatman, Kent, UK.
- Αντιδραστήρια ECL: Χρησιμοποιήθηκαν για την ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, της εταιρείας Bio-Rad
- SDS-PAGE 5X (Running Buffer): 15.1 g/l Tris-Base και 72 g/l γλυκίνης σε ddH₂O. Στο τελικό διάλυμα προστέθηκε SDS έτσι ώστε να έχει περιεκτικότητα 0.1 %.
- Transfer Buffer 1X: 2 lt διαλύματος περιέχουν 12.1 g Tris-Base, 58 g γλυκίνης, 2 g SDS και 400ml μεθανόλης.
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBS 10X: Μετά την παρασκευή του, έγινε ρύθμιση του pH στο 7.4 με την προσθήκη HCl.
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1X: Για την παρασκευή 500 ml διαλύματος αναμίχθηκαν 50 ml TBS 10X με 500 μ l Tween-20 και διαλύθηκαν σε 450 ml ddH₂O.

Αντισώματα για ανοσοσύτρωμα κατά Western

Πρωτογενή αντισώματα:

- α-synuclein: το syn1 (#) της BD Biosciences που είναι μονοκλωνικό.
- GAPDH HRP (60004): αντίσωμα που αναγνωρίζει την GAPDH και είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase). Προμηθεύτηκε από την εταιρεία Proteintech Europe, Manchester, UK.
- FMRP: Proteintech (13755-1-AP)
- P62: Santa Cruz Biotechnology (sc-28359)
- LAMP: Santa Cruz Biotechnology (sc-18822)
- UB-M, UB-R, UB-G: αντίσωμα που αναγνωρίζει την GFP και είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση. Προμηθεύτηκε από την εταιρεία Proteintech (HRP-66002)
- SNCA (phospho-129): Της abcam ab168381

Δευτερογενή αντισώματα:

- Anti-rabbit IgG-HRP: αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G του κουνελιού (CST#7074), από την εταιρεία Cell Signaling Technologies.
- Anti-mouse IgG-HRP: αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G του ποντικίου (CST#7076) από την εταιρεία Cell Signaling Technologies.

Διαλύματα – Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών

- Διάλυμα για τη λύση των κυττάρων: παρασκευάστηκε διάλυμα PLB (Polysome Lysis Buffer) με 10 mM HEPES pH 7.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5% NP-40
- Διάλυμα επώασης και έκπλυσης σφαιριδίων: NT2 με υψηλότερη συγκέντρωση σε χλωριούχο νάτριο (NaCl). Παρασκευάστηκε διάλυμα 50 mM TRIS-HCl pH 7.4, 250 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05% Tween20.
- Laemmli Buffer 6X: 375 mM Tris pH 6.8, 6% SDS, 40% glycerol, 30% mercaptoethanol, 0.005% bromophenol blue. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους -20 °C.
- Μαγνητικά σφαιρίδια: Magnetic PureProteome™ A/G Mix (Merck/Millipore, Burlington, MA, USA)

Διαλύματα-Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην απομόνωση RNA, στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), στην αντίδραση *in vitro* μεταγραφής και στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR)

- RNAzol® RT: Πρόκειται για αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για να απομονωθεί το συνολικό RNA από δείγματα ανθρώπινης και ζωικής προέλευσης (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA).
- Phenol/Chloroform: Χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του RNA μετά την αντίδραση της *in vitro* μεταγραφής. Προϊόν της Fisher BioReagents, Fair Lawn, NJ, USA.
- Ένζυμο MMLV: Χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής καθώς μπορεί να συνθέτει μόρια DNA με πρότυπο μόρια RNA. Προϊόν της εταιρείας ThermoFisher Scientific.

- Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol, DTT): Διευκολύνει την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής διαλύοντας τους δισουλφορικούς δεσμούς στα RNA, προϊόν της εταιρείας ThermoFisher Scientific.
- RNaseOUT™: Αναστολέας των ενζύμων που έχουν δραστικότητα ριβονουκλεάσης. Προϊόν της ThermoFisher Scientific.
- Νουκλεοτίδια-Deoxynucleoside Triphosphates (dNTPs): Τριφωσφορικά νουκλεοτίδια ως ισομοριακό μείγμα τεσσάρων νουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dCTP και dGTP), της ThermoFisher Scientific.
- Τυχαία εξαμερή (Random hexamers): Οι εκκινητές αυτοί απαρτίζονται από ένα μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων μήκους 6 βάσεων που έχουν τυχαία νουκλεοτιδική σύσταση. Θεωρείται ότι με τη χρήση του μίγματος των τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών επιτυγχάνεται πληρέστερη κάλυψη όλων των μορίων RNA Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).
- Ρυθμιστικό διάλυμα στους αντίδρασης με Mg^{2+} : Χρησιμοποιείται προκειμένου να διατηρείται σταθερό το pH της αντίδρασης. Περιέχει επίσης ιόντα Mg^{2+} που είναι απαραίτητος συμπαράγοντας της DNA πολυμεράσης. Προϊόν της ThermoFisher Scientific.
- Dream Taq polymerase: DNA πολυμεράση που επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο από την εταιρεία ThermoFisher Scientific.
- SYBR Green: Μη ειδική φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της ποσοτικής PCR (qPCR), από την εταιρεία Roche.
- T7 RNA polymerase: Χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να γίνει η *in vitro* μεταγραφή του DNA σε RNA. Προϊόν της εταιρείας Takara, Otsu, Japan.
- DNase I: για την αποικοδόμηση του DNA μετά την *in vitro* μεταγραφή, από την New England Biolabs, Connecticut, USA.
- LR clonase II: Χρησιμοποιήθηκε για τον ανασυνδυασμό των pENTR και pAD πλασμιδίων . Προϊόν της ThermoFisher Scientific.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Μετασχηματισμός Βακτηρίων

Για το μετασχηματισμό βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν τα δεκτικά σε πλασμίδια κύτταρα NEB Stable (New England Biolabs C3040I). Το πλασμίδιο επωάζεται με τα βακτήρια για 30 λεπτά στον πάγο πριν πραγματοποιηθεί θερμικό σοκ (30 δευτερόλεπτα στους 42°C και 5 λεπτά στον πάγο). Έπειτα, προστίθεται υγρό θρεπτικό ανάπτυξης LB broth και τα βακτήρια επωάζονται για 50 λεπτά στους 37°C υπό ανάδευση με σκοπό την έκφρασή των ενζύμων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά από τα μετασχηματισμένα βακτήρια. Μετά το πέρας των 50 λεπτών τα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν, το υπερκείμενο πλην 100μL αφαιρέθηκε και τέλος τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν και επιστώθηκαν σε τρυβλίο με αντιβιοτικό αντίστοιχο με το υπό μετασχηματισμό πλασμίδιο (Ampicillin: 100μg/mL, Kanamycin: 80μg/mL).

Gel Agarose

Χρησιμοποιήθηκε gel 0.8 % σε διάλυμα TBE με χρήση EtBr και δείκτη μοριακού βάρους τον Ladder Gene Ruler 1kb plus.

Απομόνωση τμήματος DNA από το Gel Αγαρόζης

Η απομόνωση τμημάτων DNA από το Gel Αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με την χρήση του PureLink™ Quick Gel Extraction Kit της Thermo Fisher.

Απομόνωση πλασμιδίου

Η απομόνωση των πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε με χρήση του PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit της Thermo fischer

Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με βιοτινυλιωμένο RNA

Με χρήση PCR πολλαπλασιάστηκαν διαφορετικά τμήματα συμπληρωματικού DNA από το ώριμο mRNA της συνουκλεΐνης (5'UTR, CDS, 3'UTR₅₇₀, and 3'UTR₂₅₅₀). Σε κάθε περίπτωση ο εμπρόσθιος εκκινητής περιείχε και ακολουθία υποκινητή T7 RNA πολυμεράσης 5'-AGTAATACACTCACTATAGGG-3'. Για την in vitro μεταγραφή μια αντίδραση 20μL περιέχουσα 0.75μg cDNA, 1× T7 buffer, 2μL 50mM DTT, 0.5μL αναστολέα RNAσών (RNAaseOUT, ThermoFisher), 2μL (20 mM A/U/G, 16.3 mM C, 3.7 mM biotin-11-CTP, Roche) NTPs, 1μL T7 RNA πολυμεράση (Takara Bio, Kusatsu, Japan) επωάστηκε στους 42°C για 2 ώρες. Το cDNA αφαιρέθηκε με χρήση DNAασης I (NEB) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C

και το RNA απομονώθηκε με κατακρήμνιση με LiCl και προετοιμάστηκε προσθέτοντας 2μg σε 100μL διαλύματος (10mM Tris pH7.0, 0.1M KCl, και 10mM MgCl₂), θερμαίνοντας το μίγμα στους 90°C για 2 λεπτά, τοποθετώντας το στον πάγο για 2 λεπτά και αφήνοντάς το σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά ώστε να δημιουργηθεί η σωστή δευτεροταγής δομή.

Για την κατακρήμνιση πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ένας εγκέφαλος μυός μεταγεννητικής ημέρα 3 ή 10⁷ κύτταρα SK-N-SH για κάθε συνθήκη αναλόγως το πείραμα. Τα κύτταρα εκπλύθηκαν με παγωμένο PBS πριν επαναιωρηθούν σε 350μL διαλύματος NT2 (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂, 0.05%NP-40 και 1X αναστολείς πρωτεασών). Το μίγμα επώαστηκε για 45 λεπτά στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση, φυγοκεντρήθηκε στα 13,000 rpm για 10 λεπτά και το υπερκείμενο αναμίχθηκε με το διάλυμα ανιχνευτή και τοποθετήθηκαν σε συνεχή ανάδευση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, προστέθηκαν 50μL μαγνητικών σφαιριδίων στρεπταβιδίνης (η στρεπταβιδίνη παρουσιάζει υψηλή συγγένεια με τη βιοτίνη του RNA ανιχνευτή) και επαναλήφθηκε η δώρη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Τέλος, τα σφαιρίδια πλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα NT2 ώστε να αφαιρεθούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις πριν προστεθεί μίγμα NT2 με 1× διάλυμα Laemmli, και επωαστούν στους 100°C για 15 λεπτά ώστε να απελευθερωθούν οι δεσμευμένες πρωτεΐνες.

Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Η ανάπτυξη κυττάρων έγινε σε κλίβανο επώασης με σταθερή θερμοκρασία 37°C, 5% συγκέντρωση CO₂ και σχετική υγρασία 95%. Ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής. Το θρεπτικό ανάπτυξης για τα ανθρώπινα νευροβλαστικά κύτταρα SK-N-SH και για τα ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα HEK293A ήταν DMEM υψηλής συγκέντρωσης σε γλυκόζη συμπληρωμένο με 10% (v/v) ορού εμβρύου βοός και 1% μείγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

Διαμόλυνση κυττάρων

Για την εισαγωγή εξωγενών νουκλεϊκών οξέων (πλασμίδια, siRNA κτλ) στις κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκε η διαμόλυνση μέσω κατιονικών λιπιδίων και συγκεκριμένα των αντιδραστηρίων JetOptimus για πλασμίδια και JetPrime για siRNA. Η κατάλληλη ποσότητα νουκλεϊκού οξέος σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας αναμειγνύεται με το λιπίδιο σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και επωάζονται για 15 λεπτά ώστε να δημιουργηθούν μικκύλια. Στην αντίδραση προστίθεται εναιώρημα κυττάρων και ακολουθεί επιπλέον αναμονή 10 λεπτών ώστε να πραγματοποιηθεί η διαμόλυνση. Τέλος, προστίθεται θρεπτικό ανάπτυξης και η αντίδραση μεταφέρεται σε πηγάδι για επώαση. Δοκιμαστική διαμόλυνση με πλασμίδιο το οποίο εκφράζει emGFP έδειξε 80% ποσοστό διαμόλυνσης έπειτα από 48 ώρες.

Απομόνωση RNA

Η απομόνωση ολικού RNA πραγματοποιήθηκε 48 ώρες μετά την διαμόλυνση, ξεκινώντας με αφαίρεση του θρεπτικού ανάπτυξης και προσθήκη TRI Reagent, ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και θειοκυανικής γουανιδίνης. Το μείγμα κυττάρων-TRI μεταφέρεται σε σωληνάρια, υπόκεινται σε έντονη ανάδευση σε αναμεικτή vortex και έπειτα από 5 λεπτά προστίθεται BCP (βρωμοχλωροπροπάνιο) και

τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13,000 στροφές ανά λεπτό (rpm) στους 4°C με σκοπό τον διαχωρισμό των φάσεων. Το RNA βρίσκεται διαλυμένο στην διάφανη υδατική φάση, το DNA στην λευκή μεσόφαση και οι πρωτεΐνες και λιπίδια στην οργανική φάση. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο στο οποίο προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης. Το νέο μείγμα επωάζεται 25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται στις 13,000 στροφές στους 4°C για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το RNA αναμένεται να έχει κατακρημνισθεί και να είναι ορατό ως ημιδιαφανές ιζημα. Ακολουθούν δύο εκπλήσεις του ιζήματος με 75% αιθανόλη, ξήρανση του ιζήματος και επαναιώρηση σε διπλά απιονισμένο νερό.

Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής

Αρχικά 0.5μg RNA αναμίχθηκαν με 50pmole μίγματος εξαμερών με τυχαία αλληλουχία και 0.5mM μίγματος μονο-δεοξυ-νουκλεοτιδίων (dNTPs) θερμάνθηκαν στους 65°C για 5 λεπτά πριν τοποθετηθούν στον πάγο. Στο δείγμα προστίθεται νέο αντιδραστήριο με 1x ρυθμιστικό διάλυμα, διθειοθρεϊτόλη (DTT, 10mM τελική συγκέντρωση) και αντίστροφη μεταγραφάση M-MLV με τελικό όγκο 20μL και επωάζεται στους 25°C για 10 λεπτά, στους 37°C για 1 ώρα και στους 85°C για 5 λεπτά.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο -Ποσοτική PCR (qPCR-Real time PCR)

Το προϊόν της αντίστροφης μεταγραφής αραιώθηκε 12 φορές, με τελικό όγκο 240μL από τα οποία 10μL χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ποσοτική αντίδραση, αναμεμιγμένα με 10μL αντιδραστήριου με τελικά χαρακτηριστικά 1X ρυθμιστικό διάλυμα, 0.2mM dNTPs, 0.25pmole από κάθε εκκινητή, 1X SybrGreen, και 5 unit της πολυμεράσης DreamTaq. Η αντίδραση αρχικά θερμαίνεται στους 95°C για 5 λεπτά, ακολουθούν 35 κύκλοι 95°C (10 δευτερόλεπτα) και 60°C (30 δευτερόλεπτα) και τελικά παράγεται καμπύλη τήξης του προϊόντος σε εύρος θερμοκρασιών 65-95°C με βήμα 0.5°C. Χρησιμοποιήθηκε ο κυκλοποιητής CFX Opus 96 (Bio-Rad) και το λογισμικό CFX Maestro για την ανάλυση.

Δοκιμασία ακτινομυκίνης D

Η ακτινομυκίνη D είναι μη αναστρέψιμος αναστολέας της μεταγραφής, δεσμεύεται στο DNA και δεν επιτρέπει την δράση της RNA πολυμεράσης. Επομένως, ποσοτικοποιώντας τα mRNA ενδιαφέροντος μετά από διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης των κυττάρων στην ακτινομυκίνη D μπορούμε να προσδιορίσουμε τον ρυθμό αποικοδόμησής τους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ορίζοντας τις 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση ως ώρα 0, τα κύτταρα επώαστηκαν με ακτινομυκίνη D (7,5μg/mL) για 3, 6 και 9 ώρες πριν απομονωθεί το ολικό RNA και αναλυθούν τα επίπεδα των mRNA τα οποία μας ενδιαφέρουν με qPCR.

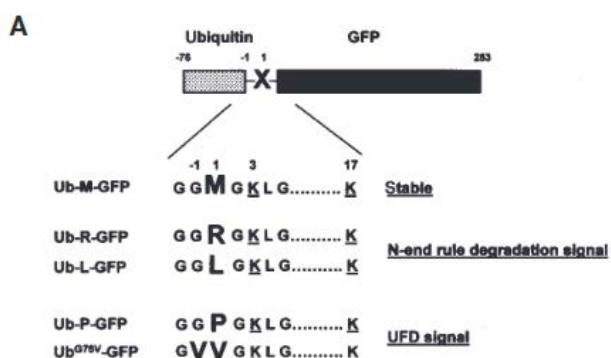
Απομόνωση πρωτεϊνών

Για τη λύση των κυττάρων με σκοπό την απομόνωση πρωτεϊνών 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση, αφαιρείται το θρεπτικό ανάπτυξης και προστίθεται το διάλυμα λύσης (25mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100 και 1x αναστολείς πρωτεασών). Το μείγμα μεταφέρετε σε σωληνάριο στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση για 30 λεπτά πριν φυγοκεντρηθεί στις 13.000 rpm στους 4°C για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες, μεταφέρετε σε νέο σωληνάριο, προστίθεται 6x διάλυμα Laemmli και θερμαίνεται για 5 λεπτά στους 100°C πριν την χρήση σε ανοσοστύπωμα κατά Western.

Ανοσοστύπωμα κατά Western

Ίσες ποσότητες πρωτεΐνης διαχωρίστηκαν σε 12% ή 15% πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE) υπό αποδιατακτικές συνθήκες πριν μεταφερθούν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υπέστη επώαση με 5% άπαχο γάλα σε διάλυμα TBS με 0.1% Tween-20 για 1 ώρα και επώαστηκε για 16 ώρες στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση με πρωτογενή αντισώματα. Την επόμενη ημέρα, στη μεμβράνη έγιναν 3 πεντάλεπτες πλύσεις με TBST πριν επωαστεί με διάλυμα περιέχον το δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση. Η οπτικοποίηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με χρήση αντιδραστηρίου ECL. Το διάλυμα ECL είναι μίγμα H₂O₂ και λουμινόλης που αντιδρά με το ένζυμο υπεροξειδάση του δεύτερου αντισώματος. Η υπεροξειδάση διασπά το H₂O₂ και παράγονται ρίζες O₂, οι οποίες αντιδρούν με τη λουμινόλη και απελευθερώνουν φωτόνια που προσβάλλουν το φωτογραφικό φιλμ. Η εμφάνιση του φιλμ πραγματοποιήθηκε είτε σε ειδικό μηχάνημα εμφάνισης (Optimax 2010) σε σκοτεινό θάλαμο είτε με τη χρήση οπτικοποιητή με κάμερα (Vilber Fusion FX). Τα φιλμ πυκνομετρήθηκαν και η ένταση του φωτισμού κάθε πρωτεϊνικής ζώνης αναλύθηκε με το πρόγραμμα ImageJ.

Ανάλυση αναστολής πρωτεασώματος



Χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια τα οποία παράγουν χίμαιρες ουβικουιτίνης-GFP με παραλλαγές στην αμινοξική ακολουθία του συνδέτη¹³⁹. Το ub-M-GFP, χρησιμοποιείται ως πλασμίδιο ελέγχου καθώς η μεθειωνίνη στη θέση 1 του συνδέτη του προσδίδει σταθερότητα σύμφωνα με το μοντέλο αποικοδόμησης βάσει του αμινοτελικού άκρου. Εν αντιθέσει, το ub-R-GFP αναμένεται να υπόκεινται σε έντονη αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα και τέλος το

ub-G76V-GFP περιέχει επαναλαμβανόμενες βαλίνες στις θέσεις -1 και 1 του συνδέτη οι οποίες αποτρέπουν την αποκόλληση της ουβικουιτίνης από το GFP. Η αδυναμία υδρόλυσης αποτελεί σηματοδότηση για αποικοδόμηση μέσα από το μονοπάτι προσδεσμένης ουβικουιτίνης (Ubiquitin-fusion degradation pathway). Οπτικοποίηση και ποσοτικοποίηση των τετμημένων τμημάτων (X-GFP) και μετά κανονικοποίηση με βάση το ub-M-GFP δηλώνει την σχετική αναστολή του πρωτεασώματος.

TECAN THE SPARK® MULTIMODE MICROPLATE READER

Το συγκεκριμένο μηχάνημα παρέχει τη δυνατότητα μέτρησης φθορισμού. Χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων.

Χρήση λογισμικών προγραμμάτων

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω λογισμικά προγράμματα:

- Microsoft Office Word 2010, για τη συγγραφή της διατριβής,
 - EndNote X5, για την εισαγωγή των βιβλιογραφικών αναφορών,
 - Adobe Photoshop CC, για την επεξεργασία των εικόνων,
 - Microsoft Office Excel 2010 για την μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων,
 - ImageJ για την ανάλυση των ζωνών από το ανασοστύπωμα κατά Western και του φθορισμού από τη μικροσκοπία φθορισμού και τη συνεστιακή μικροσκοπία,
 - GraphPad Prism 6 (Windows Version 6.01).
- SnapGene , για ανάλυση και σχηματική απεικόνιση των πλασμιδιακών χαρτών.

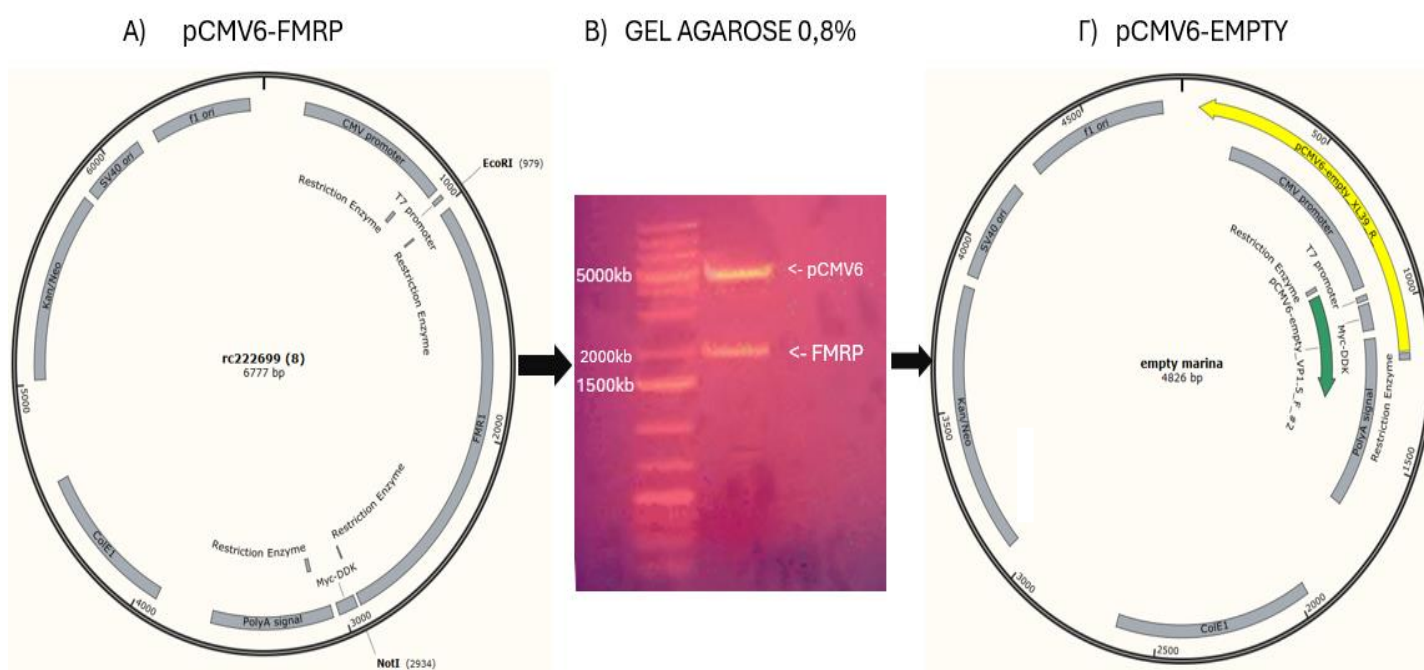
Στατιστική επεξεργασία

Όλες οι τιμές των αποτελεσμάτων συνιστούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων $\pm$ τυπική απόκλιση (SD). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο εκάστοτε δείγμα και το δείγμα μάρτυρα προσδιορίστηκαν με εφαρμογή του Student's t-test (όταν συγκρίνονταν 2 ομάδες αποτελεσμάτων). Η σύγκριση μεταξύ πολλαπλών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε – όπου ήταν απαραίτητη – με τη βοήθεια της μεθόδου ελέγχου διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's test ανάλυση. Σε κάθε περίπτωση, ως στατιστικά σημαντικές κρίθηκαν οι τιμές για τις οποίες ισχύει: $p < 0.05$. Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism 8.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Δημιουργία pCMV6-Empty από pCMV6-FMRP για χρήση του ως control στην πειραματική διαδικασία

Ο διαθέσιμος Πλασμιδιακός μας φορέας ήταν το pCMV6-FMRP ωστόσο προκειμένου να προχωρήσουμε στα πειράματά μας έπρεπε να διαθέτουμε ένα control σαν αρνητικό μάρτυρα. Για αυτό λοιπόν τον λόγο κόψαμε το pCMV6-FMRP με τα περιοριστικά ένζυμα NotI-HF και EcoRI-HF προκειμένου να αποκόψουμε το γονίδιο της FMRP από τον πλασμιδιακό μας φορέα. Έπειτα τρέξαμε το δείγμα μας σε gel Αγαρόζης 0.8% και προέκυψαν δυο τμήματα μήκους 4822kb (pCMV6 φορέας) και 1955kb (το γονίδιο της FMRP) (Εικόνα 1). Στη συνέχεια απομονώσαμε τα τμήματα αυτά από το gel Αγαρόζης μέσω του του PureLink™ Quick Gel Extraction Kit της Thermo Fisher. Έπειτα πραγματοποιήσαμε ένωση των δύο θραυσμάτων του φορέα pCMV6 μέσω του ενζύμου T4 Λιγάση. Προχωρώντας κάναμε μετασχηματισμό βακτηρίων NEB Stable με το pCMV6-Empty από εκεί απομονώσαμε αποικίες και με την χρήση του PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit της Thermo fischer απομονώσαμε το προς μελέτη πλασμίδιο και έπειτα στείλαμε τα δείγματα μας για sequencing προκειμένου να δούμε εάν δημιουργήθηκε το pCMV6-EMPTY που θα χρησιμοποιούσαμε για τα πειράματά μας και τα αποτελέσματα ήταν επιτυχή (Εικόνα 1).

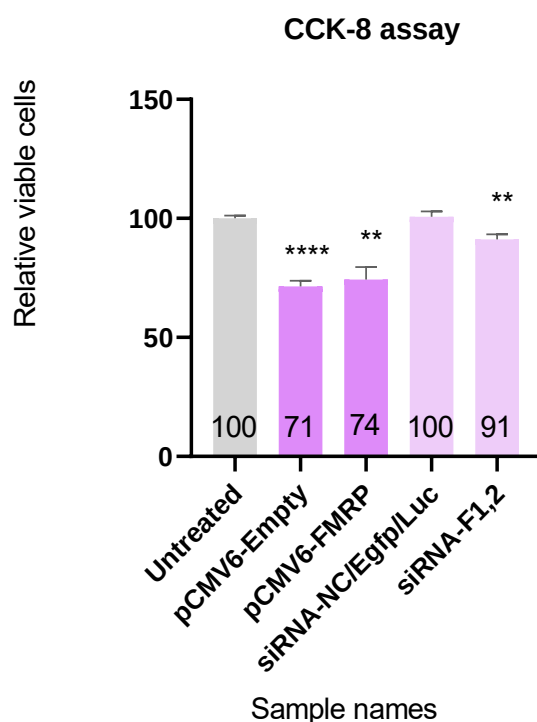


Εικόνα 1: Α) Σχηματικός χάρτης πλασμιδιακού φορέα pCMV6-FMRP, Β) gel agarose τμήμα FMRP και φορέα pCMV6, Γ) Σχηματικός χάρτης πλασμιδιακού φορέα pCMV6-empty μετά από το sequencing. Η απεικόνιση των χαρτών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SnapGene .

2. Η Μέθοδος διαμόλυνσης των κυττάρων με pCMV6, siRNA-CONTROLS και siRNA-FMRP παρουσιάζει ελάχιστη τοξικότητα στα κύτταρα.

Προκειμένου να δούμε σε τι βαθμό τα πλασμίδια και siRNA που χρησιμοποιούμε επηρεάζουν την βιωσιμότητα των κυττάρων μας ώστε να συνεχίσουμε τα πειράματα πραγματοποιήσαμε το cell viability assay test που ποσοτικοποιεί τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν, διαμόλυνση των SK-N-SH κυττάρων με τα πλασμίδια pCMV6-EMPTY, pCMV6-FMRP, siRNA-CONTROLS (mix των siRNA-Luc/egfp/nc), siRNA-F1.2 (mix siRNA-f1/f2) και επώαση τους για 48 ώρες. Μετά το πέρας των 48 ωρών προσθέσαμε 10 μ L διαλύματος CCK-8 σε κάθε well του plate με προσοχή να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες, γιατί παρεμβαίνουν στην οπτική πυκνότητα.

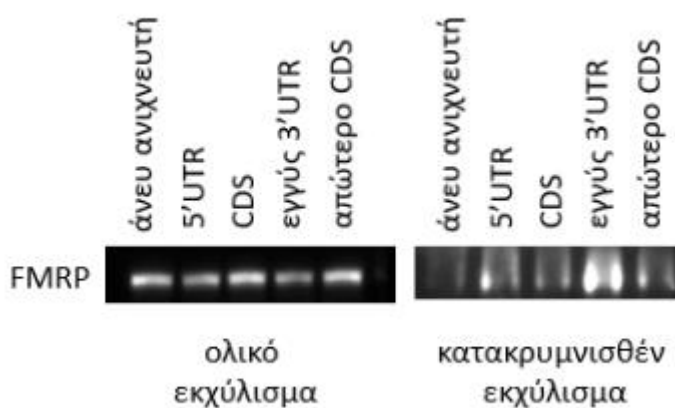
Το plate επώάζεται για 3 ώρες στον κλίβανο. Τέλος πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπιακών. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζουν ελάχιστη τοξικότητα στα κύτταρα επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε επόμενα πειράματα (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Ποσοτικοποίηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων ύστερα από την δοκιμασία καταμέτρησης της βιωσιμότητας τους συγκριτικά με το untreated. Τα pCMV6-EMPTY και pCMV6-FMRP ρίχνουν το 30% περίπου του survival των κυττάρων. Το siRNA-CONTROLS δεν το επηρεάζει ενώ το siRNA-F1.2 το ρίχνει περίπου 10%. Αριθμός επαναλήψεων $n=3$. Student's t-test (** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001).

3. Η FMR προσδένεται στο 3' αμετάφραστο άκρο του mRNA της α-συνουκλεΐνης

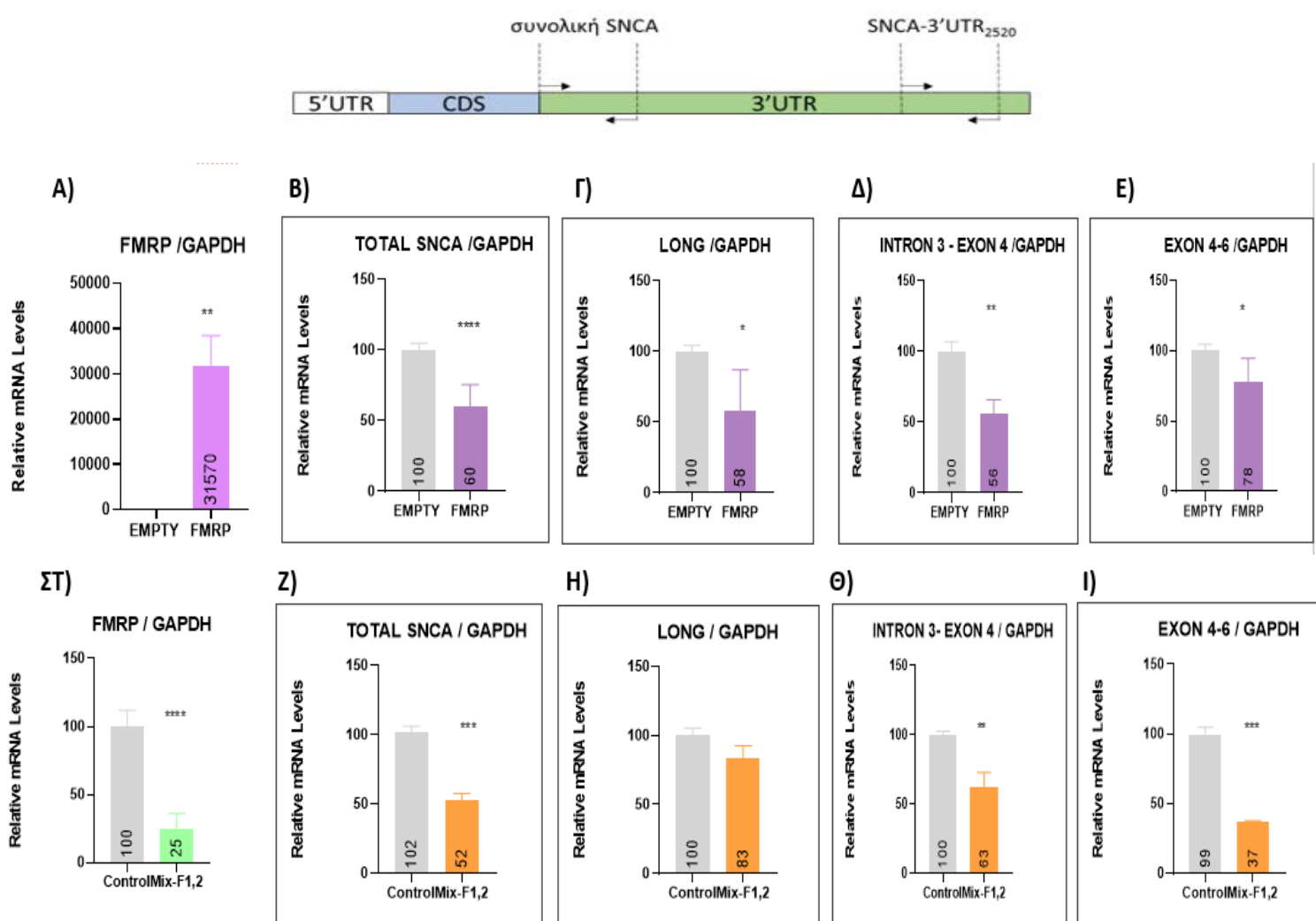
Αρχικά, με σκοπό την επαλήθευση του ευρήματος συγγένειας FMRP-α-συνουκλεΐνης διερευνήθηκε η πιθανότητα πρόσδεσης της FMRP σε άλλα τμήματα του mRNA. Παράχθηκαν ανιχνευτές-τμήματα βιοτινυλιωμένου RNA τα οποία αντιστοιχούν σε περιοχές του mRNA της α-συνουκλεΐνης (5' αμετάφραστο άκρο ή 5'UTR, κωδικεύουσα περιοχή ή CDS, εγγύς 3'UTR έως τις πρώτες 560 βάσεις αυτού, απώτερο 3'UTR από την 600ή έως την 2520ή βάση του και τέλος ολόκληρο το 3'UTR). Οι ανιχνευτές επώσθησαν αρχικά με εκχύλισμα ανθρώπινων νευροβλαστικών κυττάρων SK-N-SH και έπειτα με μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης. Η συγγένεια βιοτίνης-στρεπταβιδίνης οδηγεί στην συγκράτηση του ανιχνευτή στα σφαιρίδια, μαζί με πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται σε αυτόν. Το προϊόν αναλύθηκε σε ανοσοσύτρωμα κατά Western με αντίσωμα αντί-FMRP (Εικόνα 3). Βρέθηκε πως η FMRP έχει συγγένεια με το 3'UTR, με εντονότερη παρουσία στο εγγύς 3'UTR χωρίς να συνδέεται στο 5'UTR ή την κωδικεύουσα περιοχή.



Εικόνα 3: Η FMRP προσδένεται στο 3'UTR της α-συνουκλεΐνης. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών εκχυλίσματος κυττάρων SK-N-SH με βιοτινυλιωμένου ανιχνευτές για τις λειτουργικές και ρυθμιστικές περιοχές του mRNA της α-συνουκλεΐνης (αριθμός επαναλήψεων n=1).

4. Η υπερέκφραση και η αποσιώπηση της FMRP μειώνει τα επίπεδα mRNA συνουκλεΐνης

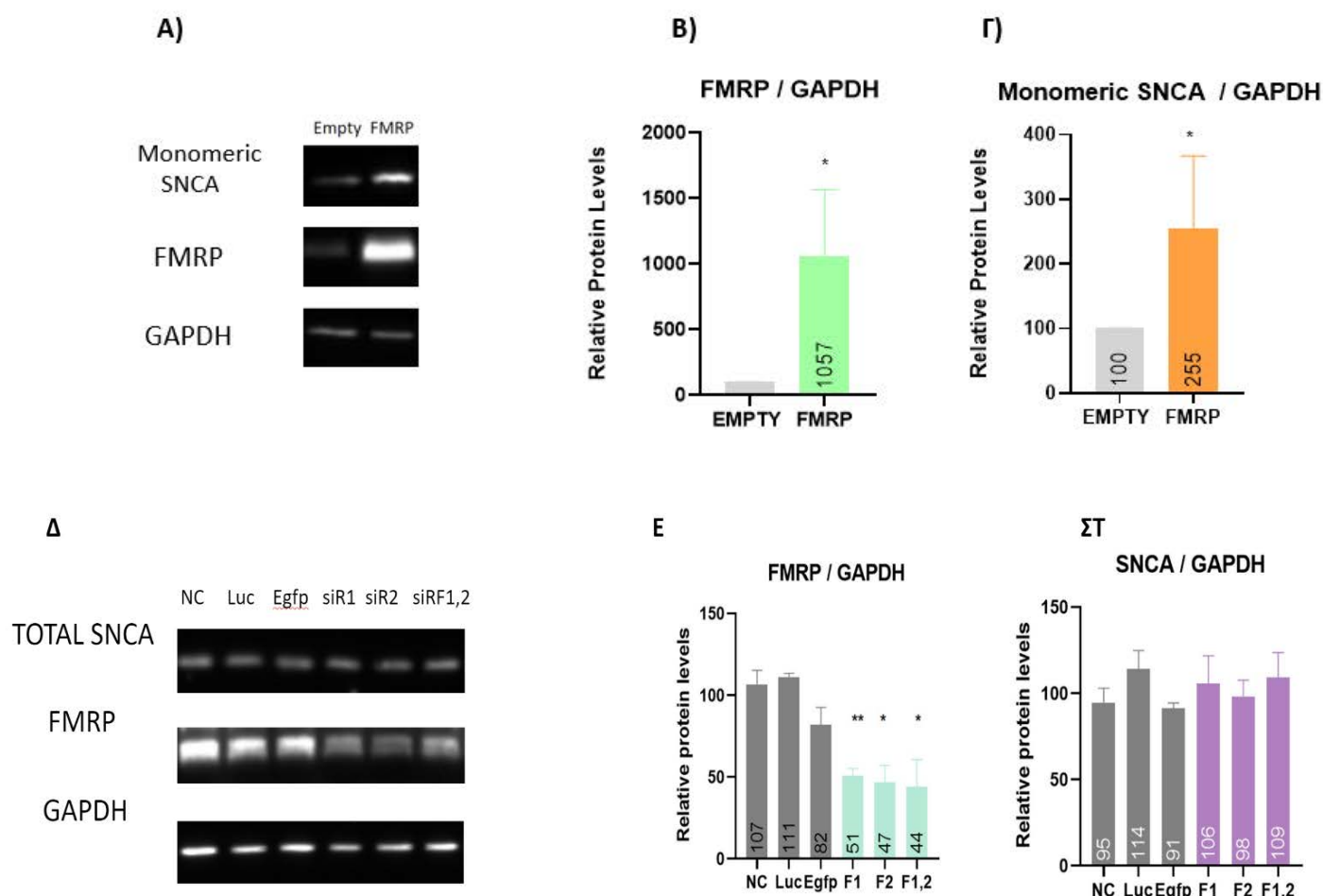
Για να ελέγξουμε τον τρόπο με τον οποίο επιδρά η FMRP στο mRNA της α-συνουκλεΐνης πραγματοποιήσαμε διαμόλυνση κυττάρων SK-N-SH, τα οποία είτε υπερεκφράζουν την FMRP είτε την αποσιωπούν. Έπειτα από 48 ώρες απομονώθηκε το RNA, παράχθηκε cDNA και ελέγχθηκαν τα επίπεδα του mRNA της α-συνουκλεΐνης με RT-qPCR. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα σετ εκκινήτων: το πρώτο ενισχύει τις πρώτες 75 βάσεις του 3'UTR και συμβολίζει το σύνολο των ισομορφών καθώς οι βάσεις αυτές είναι κοινές. Το δεύτερο ενισχύει το τμήμα βάσεων 2101-2208 και αντιστοιχεί την ισομορφή με μήκος 2520, η δεύτερη πιο κοινή σύμφωνα με πειράματα Northern³². Τέλος το τέταρτο ενισχύει το τμήμα Intron3-Exon4 του mRNA της α-συνουκλεΐνης αυτό το σετ μπαίνει για να δούμε αν επιδρά η FMRP σε επίπεδο μεταγραφής, που ακόμα είναι μέσα τα ιντρόνια στο mRNA. Δηλαδή για να καταλάβουμε αν και σε αυτό το στάδιο επηρεάζει τη συνουκλεΐνη η FMRP. Τα πλάσμιδια ήταν αποτελεσματικά στο να μεταβάλλουν τα επίπεδα του mRNA της FMRP (Εικ. 4 Α,ΣΤ). Σε όλες τις προς μελέτη περιπτώσεις η FMRP επέφερε μείωση των συνολικών επιπέδων του mRNA της α-συνουκλεΐνης σε σύγκριση με το control (Εικ.4).

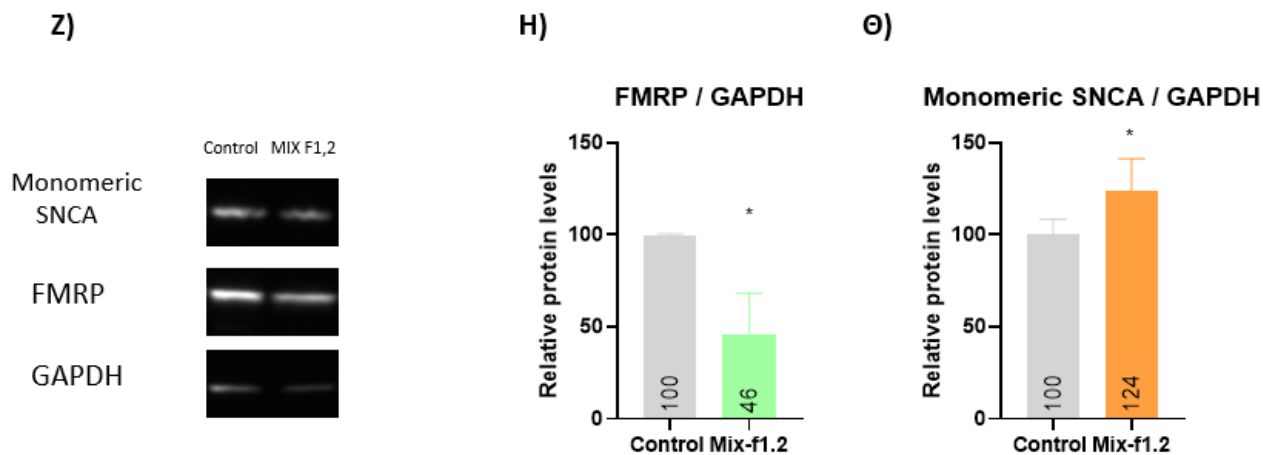


Εικόνα 4. Η επίδραση της FMRP στα επίπεδα του mRNA της α-συνουκλεΐνης. Υπερέκφραση και αποσιώπηση της FMRP σε κύτταρα SK-N-SH μέσω διαμόλυνσης για 48 ώρες πριν την απομόνωση και ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA. **Α, ΣΤ.** Μέτρηση επιπέδων FMRP mRNA προς έλεγχο της ποιότητας διαμόλυνσης. Επίπεδα διαφορετικών ισομορφών συνολικού mRNA (**Β,Γ,Δ,Ε**) α-συνουκλεΐνης με ταυτόχρονη υπερέκφραση FMRP. Επίπεδα διαφορετικών ισομορφών συνολικού mRNA (**Ζ,Η,Θ,Ι**) α-συνουκλεΐνης μετά από αποσιώπηση FMRP. Μέσος όρος $\pm$ SD, n=4 Student's t-test (* ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001).

5. Η υπερέκφραση της FMRP οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της ενδογενούς α-συνουκλεΐνης ενώ η αποσιώπηση δεν επιφέρει κάποια σημαντική αλλαγή

Σε πρώτο στάδιο, εξετάστηκε η επίδραση της υπερέκφρασης ή αποσιώπησης της FMRP στα ενδογενή πρωτεϊνικά επίπεδα α-συνουκλεΐνης. Πραγματοποιήσαμε διαμόλυνση κυττάρων SK-N-SH, τα οποία είτε υπερεκφράζουν την FMRP είτε την αποσιωπούν και έπειτα από 48 ώρες πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των πρωτεϊνών και ανάλυση των δειγμάτων με ανοσοσύτρωμα κατά Western με σκοπό την ποσοτικοποίηση των επιπέδων FMRP, α-συνουκλεΐνης και GAPDH (πρωτεΐνη με σταθερή έκφραση η οποία χρησιμοποιήθηκε ως παρονομαστής στην ποσοτικοποίηση). Τα πλάσμιδια επέφεραν την επιθυμητή αύξηση ή μείωση των επιπέδων FMRP (Εικόνα 5 Β,Ε). Η υπερέκφραση FMRP οδήγησε σε αύξηση των ενδογενών επιπέδων α-συνουκλεΐνης (Εικ.5Γ) όπως και η αποσιώπηση της. Στην αρχή τα πειράματα της αποσιώπησης πραγματοποιήθηκαν με τα siRNA-luc, siRNA-mimic, siRNA-Egfp και τα siRNA-F1, siRNA-F2. Εφόσον είδαμε ότι λειτουργούν, στα επόμενα χρησιμοποιήσαμε σαν control ένα mix των siRNA-luc, siRNA-mimic, siRNA-Egfp και ένα mix των siRNA-F1, siRNA-F2 με στόχο το βέλτιστο αποτέλεσμα. (Εικόνα 5)

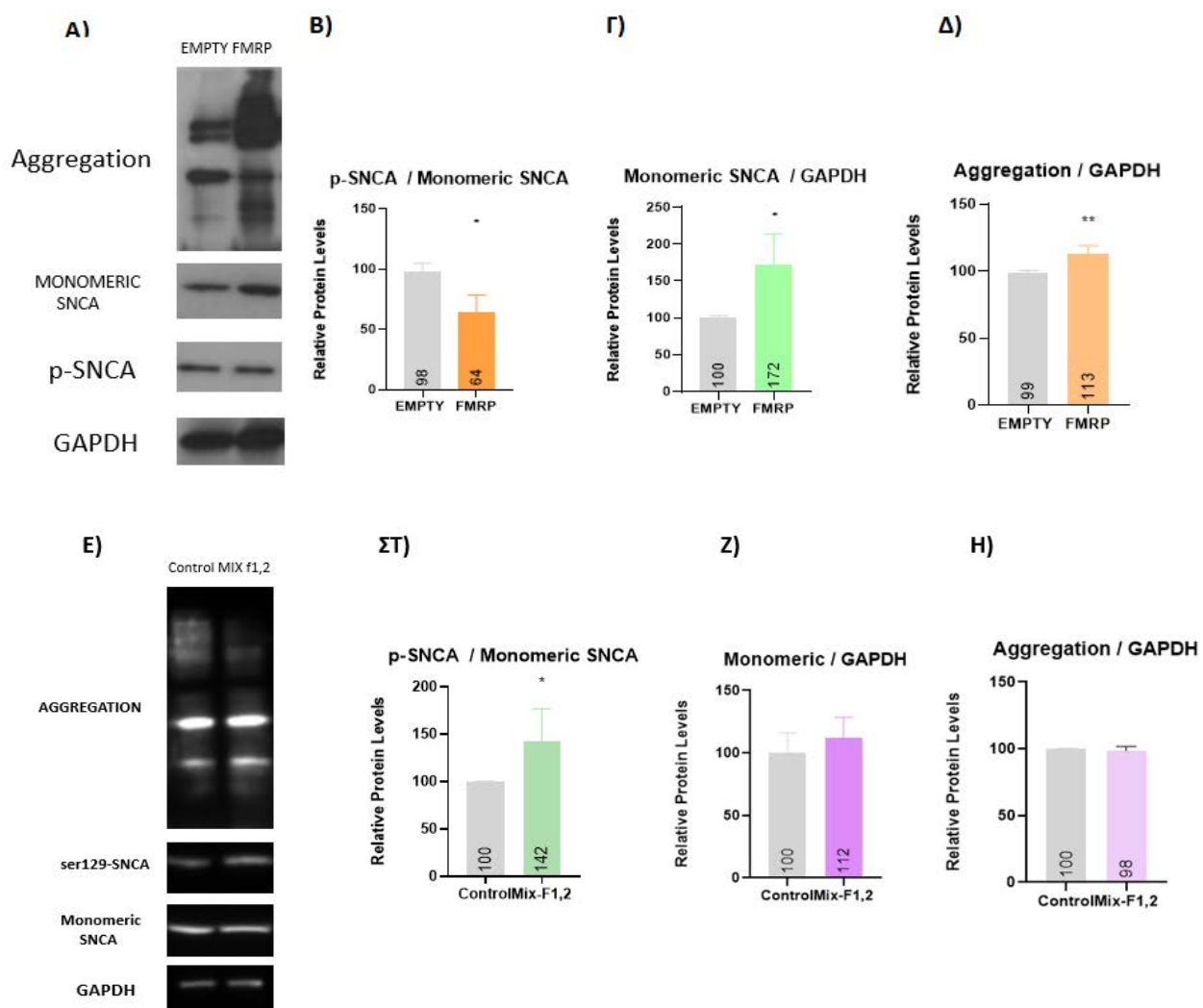




Εικόνα 5. Η επίδραση της FMRP στα πρωτεϊνικά επίπεδα της α-συνουκλεΐνης. Υπερέκφραση και αποσιώπηση της FMRP σε κύτταρα SK-N-SH μέσω διαμόλυνσης για 48 ώρες και ποσοτικοποίηση των επιπέδων με ανοσοσύτρωμα κατά Western στην περίπτωση της υπερέκφρασης (Α) και αποσιώπησης (Δ,Ζ) FMRP. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων FMRP (Β,Ε,Η) και SNCA (Γ,ΣΤ,Θ). Μέσος όρος $\pm$ SD, n=4, Student's t-test, (* $\leq$ 0.05, ** $\leq$ 0.01, *** $\leq$ 0.001)

6 .Η υπερέκφραση της FMRP αυξάνει της συσσωμάτωση και την φωσφορυλίωση της α-συνουκλεΐνης σε επίπεδο πρωτεΐνης ενώ η αποσιώπηση δεν επηρεάζει σημαντικά την συσσωμάτωση αλλά μειώνει την φωσφορυλιωμένης μορφή της α-συνουκλεΐνης.

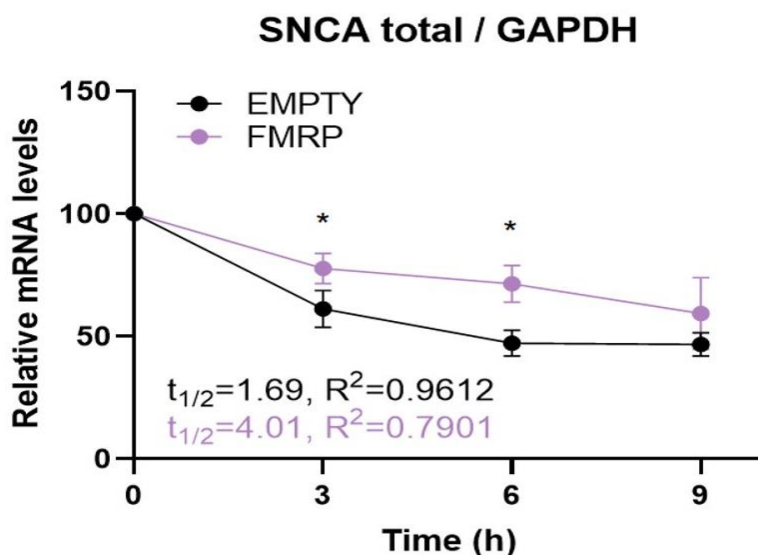
Για την αξιολόγηση του ρόλου της FMRP στα συσσωματώματα και της φωσφορυλιωμένη μορφή της α-συνουκλεΐνης πραγματοποιήθηκαν πειράματα συν-υπερέκφρασης α-συνουκλεΐνης και FMRP ή κοντρόλ στην κυτταρική σειρά SK-N-SH που διήρκεσαν 48 ώρες. Με ανοσοσύτρωμα κατά Western εξετάστηκε η αλλαγή των πρωτεϊνικών επιπέδων της α-συνουκλεΐνης σε κατάσταση συσσωμάτωσης αλλά και φωσφορυλίωση στη σερίνη 129 (Εικόνα 6). Ως πρωτεΐνες αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν το GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase). Παρατηρήθηκε πως η FMRP πρωτεΐνη αυξάνει τόσο τα επίπεδα της συσσωματωμένης α-συνουκλεΐνης όσο και της φωσφορυλιωμένης μορφής της σε σύγκριση με το control μας. (Εικόνα 6)



Εικόνα 6. Η επίδραση της FMRP στη συσσωμάτωση και της φωσφορυλιωμένης στη σερίνη 129 μορφή της α-συνουκλεΐνης. Απεικόνιση των συσσωματωμάτων της α-συνουκλεΐνης, της φωσφορυλιωμένης α-συνουκλεΐνης και των πρωτεϊνών αναφοράς GAPDH και με τη μέθοδο ανοσοσύτρωσης κατά Western, μετά από υπερέκφραση (A) και αποσιώπηση (E) της α-συνουκλεΐνης με επιμόλυνση των κυττάρων SK-N-SH. Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης μορφής σύγκρισή με την μονομερή μορφή της α-συνουκλεΐνης κατά την υπερέκφραση (B) και την αποσιώπηση (ΣΤ). Ποσοτικοποίηση της μονομερής και της συσσωματωμένης μορφής της α-συνουκλεΐνης κατά την υπερέκφραση (Γ,Δ) και κατά την αποσιώπηση (Ζ,Η) της FMRP. Μέσος όρος $\pm$ SD, n=4, Student's t-test, (* $\leq$ 0.05, ** $\leq$ 0.01, *** $\leq$ 0.001).

7. Η FMRP επηρεάζει την σταθερότητα του mRNA της α-συνουκλεΐνης

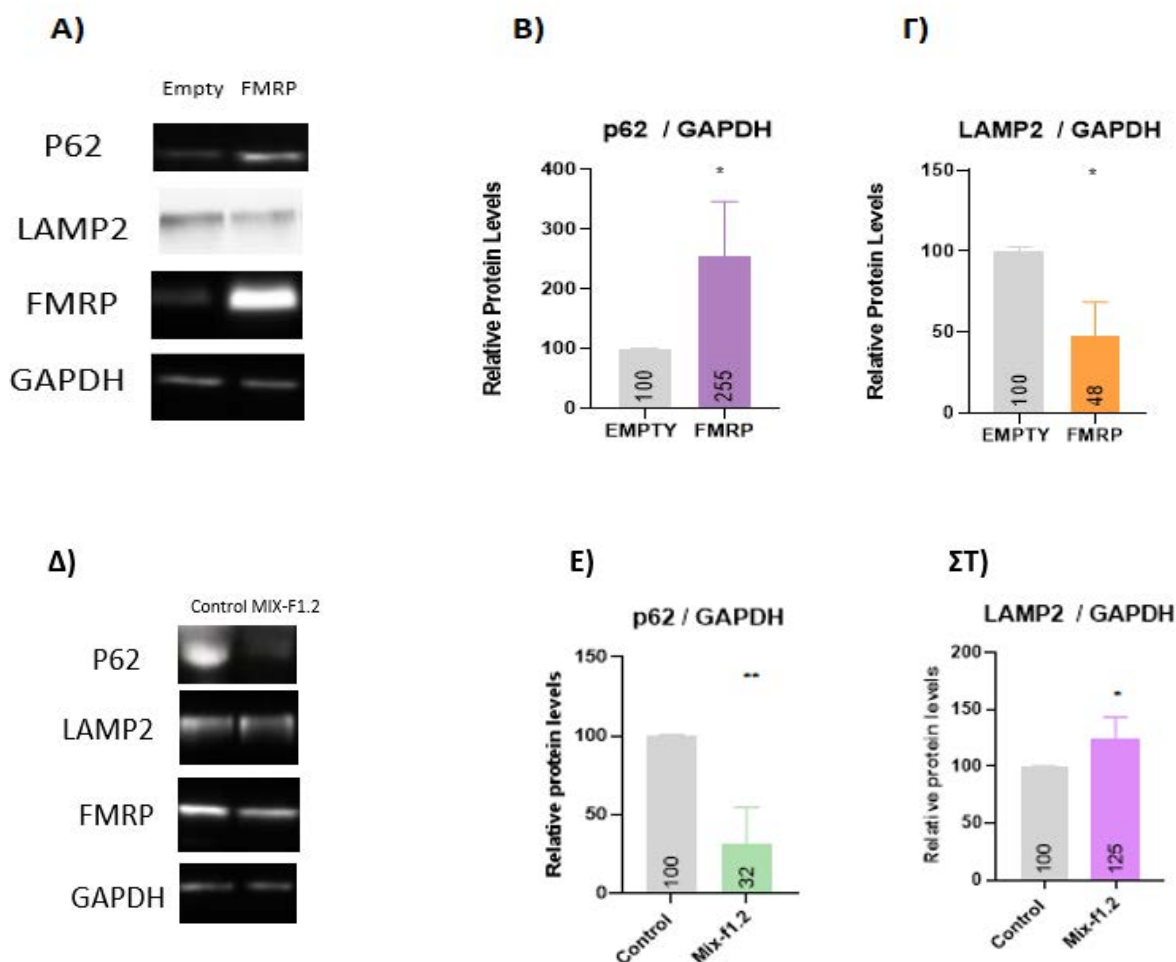
Δεδομένου της αύξησης των επιπέδων της ενδογενούς SNCA και μείωσης των επιπέδων mRNA μέσω της υπερέκφραση της FMRP μελετήθηκε η επίδραση της στη σταθερότητα του mRNA της α-συνουκλεΐνης. Σε κύτταρα SK-N-SH πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με σκοπό την υπερέκφραση FMRP. Έπειτα από 48 ώρες προστέθηκε στο θρεπτικό ανάπτυξης ο μη αντιστρεπτός αναστολέας της μεταγραφής ακτινομυκίνη D και συλλέχθηκαν κύτταρα πριν την επώαση και έπειτα από 3, 6 ή 9 ώρες επώασης. Καθώς έχει διακοπεί η μεταγραφή, εάν ποσοτικοποιήσουμε τα mRNA ενδιαφέροντος (έπειτα από απομόνωση RNA των δειγμάτων, αντίστροφη μεταγραφή και RT-qPCR) μπορούμε να οπτικοποιήσουμε το ρυθμό καταστροφής των mRNA τα οποία υπήρχαν στο κύτταρο πριν προσθέσουμε τον αναστολέα. Ελέγξαμε το συνολικό mRNA της α-συνουκλεΐνης. Η υπερέκφραση της FMRP σταθεροποίησε το συνολικό mRNA συναρτήσει του χρόνου. (Εικόνα 7)



Εικόνα 7. Η FMRP επηρεάζει την σταθερότητα του mRNA της α-συνουκλεΐνης. Για τη μέτρηση τα της σταθερότητας του συνολικού SNCA mRNA πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση της FMRP σε κύτταρα SK-N-SH μέσω διαμόλυνσης για 48 ώρες πριν την επώαση με ακτινομυκίνη D για 0,3,6 ή 9 ώρες. Τα επίπεδα mRNA ποσοτικοποιήθηκαν με RT-qPCR. Μέσος όρος $\pm$ SD. Αριθμός επαναλήψεων n=3, μη γραμμική παλινδρόμηση (one phase decay, $Y_0=100$), Student's t-test για τις επιμέρους συγκρίσεις (* ≤ 0.05).

8. Η FMRP επηρεάζει τα επίπεδα των πρωτεϊνών p62/SQSTM1 και LAMP2 της αυτοφαγίας.

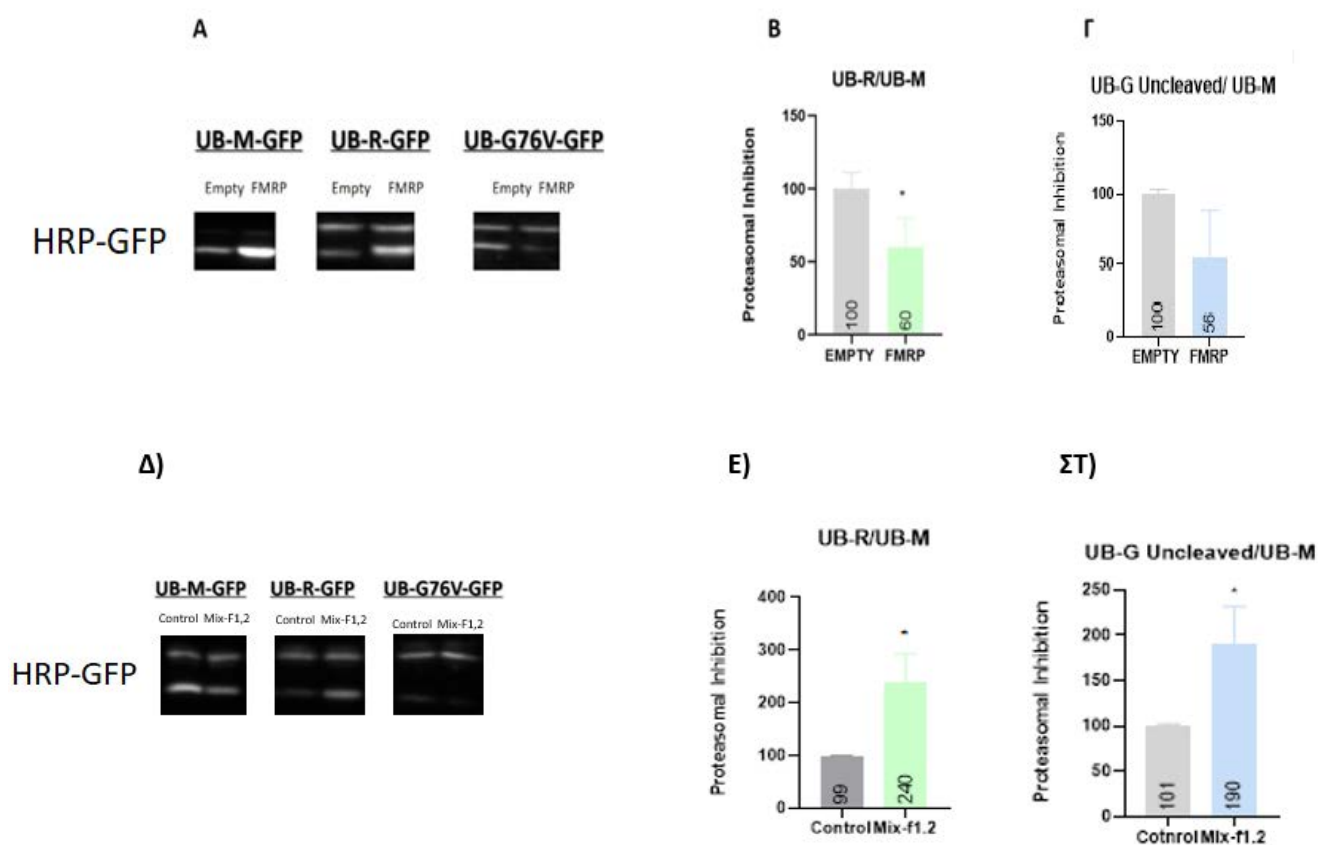
Παράλληλα με το πρωτεύσωμα, διερευνήθηκε η πιθανή επίδραση της FMRP στον καταβολισμό της α -συνουκλείνης μέσα από το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσωσμάτων. Αρχικά, ελέγχθηκαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης p62, η οποία ενσωματώνεται στα αυτοφαγισώματα μέσα από αλληλεπίδραση με την LC3B και καταναλώνεται κατά την μακροαυτοφαγία, όπως και τα επίπεδα της LAMP2A, πρωτεΐνη ικανή να οδηγήσει στην στρατολόγηση πρωτεϊνών με το μοτίβο KFERQ, όπως η α -συνουκλείνη, στα λυσωσώματα για αποικοδόμηση. Έπειτα από υπερέκφραση ή αποσιώπηση της FMRP μέσα από διαμόλυνση με πλασμίδια για 48 ώρες μετρήθηκαν τα επίπεδα των προαναφερθέντων πρωτεϊνών με ανοσοοστύπωμα κατά Western. Διακύμανση στην έκφραση FMRP επέφερε αλλαγή στα επίπεδα των p62 και LAMP2 (Εικόνα 8). Στην περίπτωση της υπερέκφρασης εμφανίζεται μείωση των επιπέδων LAMP2 και αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης p62 κάτι το οποίο αφήνει υποψίες ότι ίσως με την επίδραση της FMRP πρωτεΐνης κλείνει το μονοπάτι της αυτοφαγίας ωστόσο χρίζει περαιτέρω μελέτης. Στην αποσιώπηση της FMRP φαίνεται να έχουμε τα αντίθετα αποτελέσματα (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Η FMRP επηρεάζει τα επίπεδα των πρωτεϊνών p62 και LAMP2 της αυτοφαγίας. Πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση ή αποσιώπηση FMRP μέσω διαμόλυνσης κυττάρων SK-N-SH για 48 ώρες ακολούθησε απομόνωση πρωτεϊνών, Οπτικοποίηση (Α,Δ) και ποσοτικοποίηση των επιπέδων p62 (Β,Ε) και LAMP2 (Γ,ΣΤ) με ανοσοοστύπωμα κατά Western. Μέσος όρος $\pm$ SD, n=3

9. Η υπερέκφραση της FMRP επάγει τον καταβολισμό των ουβικουτινιωμένων πρωτεϊνών ενώ η αποσιώπησή της τον αναστείλει.

Στην προσπάθειά μας να εξηγήσουμε τα αυξημένα επίπεδα συνουκλεΐνης από την υπερέκφραση της Fmrp χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια τα οποία παράγουν χίμαιρες ουβικουτίνης-GFP με παραλλαγές στην αμινοξική ακολουθία του συνδέτη. Το ub-M-GFP, χρησιμοποιείται ως πλασμίδιο ελέγχου καθώς η μεθειονίνη στη θέση 1 του συνδέτη του προσδίδει σταθερότητα σύμφωνα με το μοντέλο αποικοδόμησης βάσει του αμινοτελικού άκρου (N-end rule). Εν αντιθέσει, το ub-R-GFP αναμένεται να υπόκειται έντονη αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα και τέλος το ub-G76V-GFP περιέχει επαναλαμβανόμενες βαλίνες στις θέσεις -1 και 1 του συνδέτη οι οποίες αποτρέπουν την αποκόλληση της ουβικουτίνης από το GFP. Η αδυναμία υδρόλυσης αποτελεί σηματοδότηση για αποικοδόμηση μέσα από το μονοπάτι προσδεδεμένης ουβικουτίνης (Ubiquitin-fusion degradation pathway). Οπτικοποίηση και ποσοτικοποίηση των τετμημένων τμημάτων (X-GFP) και μετά κανονικοποίηση με βάση το ub-M-GFP δηλώνει την σχετική αναστολή του πρωτεασώματος. Τα παραπάνω συνδιαμολύνθηκαν σε SK-N-SH κύτταρα ταυτόχρονα με πλασμίδια κατάλληλα να προκαλέσουν υπερέκφραση FMRP. Ανοσοσύτρωμα κατά Western έδειξε μειωμένα επίπεδα ουβικουτινίων παρουσία FMRP ενώ απουσία αυξημένα (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Η υπερέκφραση της FMRP επάγει τον καταβολισμό των ουβικουτινιωμένων πρωτεϊνών ενώ η αποσιώπησή της τον αναστείλει. Διαμόλυνση κυττάρων SK-N-SH με τα πλασμίδια Ub-M-GFP (μεγάλος χρόνος ζωής, θετικός μάρτυρας διαμόλυνσης) και τα Ub-R-GFP & Ub-G76V-GFP (αποικοδομούνται ταχέως από το πρωτεάσωμα) ταυτόχρονα με υπερέκφραση FMRP. Απομόνωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος 48 ώρες μετά και ανοσοσύτρωμα κατά Western (**A,Δ**). Ποσοτικοποίηση των λόγων Ub-R-GFP / Ub-M-GFP (**B,E**) & Ub-G76V-GFP / Ub-M-GFP (**Γ,ΣΤ**) για υπερέκφραση και αποσιώπηση της FMRP αντίστοιχα. Μέσος όρος $\pm$ SD, n=4, T-test για της επιμέρους συγκρίσεις (* ≤ 0.05).

Συζήτηση

Η α-συνουκλεΐνη, συσχετίζεται με νευροεκφυλιστικές παθήσεις όπως είναι η νόσος του Πάρκινσον και συγγενείς νευροεκφυλιστικές καταστάσεις γνωστές με τον όρο α-συνουκλεϊνοπάθειες. Για το λόγο αυτό, πολλές μελέτες έχουν στραφεί, στη διερεύνηση ενδοκυτταρικών μηχανισμών αποικοδόμησης της περίσσειας της α-συνουκλεΐνης ενώ είναι περιορισμένος ο αριθμός των μελετών που αφορούν στη ρύθμιση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της ^{140,141,142,143}.

Είναι γνωστό πως στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων, μπορεί να πραγματοποιείται σε πολλά στάδια τα οποία συνήθως διαμεσολαβούνται από ειδικές πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα πρόσδεσης σε δομές ή αλληλουχίες RNA (RBPs) ⁸². Οι RBPs συμμετέχουν σε διάφορες διεργασίες της βιολογίας του RNA ενώ η μη σωστή/συντονισμένη λειτουργία αυτών των πολύπλοκων σταδίων μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες ¹⁰⁰.

Επιπλέον, πραγματοποιείται ρύθμιση των επιπέδων των πρωτεϊνών στο εσωτερικό του κυττάρου από τους μηχανισμούς αποικοδόμησης πρωτεϊνών, δηλαδή το μονοπάτι της ουβικιτίνης – πρωτεασώματος και το μονοπάτι αυτοφαγίας και βλάβη στην ενεργότητα τους προκαλεί τη συσσωμάτωση και το σχηματισμό εγκλείστων των πρωτεϊνών που φυσιολογικά καταστρέφονται. Παρά τη σημασία των μηχανισμών αποικοδόμησης στις συνουκλεϊνοπάθειες, ο κυρίως μηχανισμός αποικοδόμησης της α-συνουκλεΐνης δεν είναι ακόμα καθορισμένος. Είναι πιθανόν, η μονομερής α-συνουκλεΐνης να αποικοδομείται τόσο μέσω πρωτεασώματος όσο και μέσω αυτοφαγίας στα λυσοσώματα ^{135,136,144}.

Η FMRP που είναι η προς μελέτη πρωτεΐνη της παρούσας έρευνας είναι μια σημαντική μετασυναπτική πρωτεΐνη που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων αλλά μπορεί και να οδηγήσει σε νευροεκφυλισμό όταν είναι μεταλλαγμένη και θέλαμε να διαπιστώσουμε πώς τα επίπεδα έκφρασής της μπορούν να επηρεάσουν άλλες νευροεκφυλιστικές διαδικασίες εστιάζοντας στην α-συνουκλεΐνη μια νευροεκφυλιστική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στις α-συνουκλεϊνοπάθειες. Επομένως στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η επίδραση που εμφανίζει η FMRP στην α-συνουκλεΐνη τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδο RNA.

Συνολικά η FMRP αποτελεί ρυθμιστή της α-συνουκλεΐνης μέσα από το 3'UTR και μέσω του ρόλου της ως ρυθμιστή του πρωτεϊνικού καταβολισμού. Η FMRP φαίνεται να εμπλέκεται σε πολλαπλά στάδια στον κύκλο ζωής του mRNA της α-συνουκλεΐνης συμμετέχοντας στη ρύθμιση της μεταγραφής, της τοποθέτησης και το χρόνο ζωής των μεταγράφων. Επίσης φαίνεται να έχει και ενεργό ρόλο στα διάφορα μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών καθώς υπό την υπερέκφραση της ή την αποσιώπηση της παρατηρούνται μεταβολές στα επίπεδα των πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε αυτά.

Η σημασία των παραπάνω ευρημάτων σχετίζεται άμεσα τόσο με τη ν.Π. καθώς και με άλλες α-συνουκλεϊνοπάθειες. Με δεδομένο ότι παρατηρούνται σε εγκεφάλους ατόμων με νευροεκφυλιστικές νόσους διαταραχές στα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης και συσσώρευση της σε τοξικές συγκεντρώσεις, ο έλεγχος της έκφρασης της FMRP, μπορεί να αποτελέσει στόχο για την αντιμετώπιση ορισμένων συμπτωμάτων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Campbell M. , Myers al .2020 “Parkinson disease clinical sybtypes: kye features & clinical milestones .” *Annals of Clinical and Translational Neurology*.Volume 7,Issue 8. P.1272-1283.
2. Jankovic, J. 2008. “Parkinson’s Disease: Clinical Features and Diagnosis.” *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 79 (4): 368–76. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>.
3. Järvelin, Aino I., Marko Noerenberg, Ilan Davis, and Alfredo Castello. 2016. “The New (Dis)Order in RNA Regulation.” *Cell Communication and Signaling: CCS* 14 (April): 9. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0132-3>
4. Kurt A. 2012. “Neuropathology of Sporadic Parkinson’s Disease: Evaluation and Changes of Concepts.” *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 27 (1): 8–30. <https://doi.org/10.1002/mds.23795>.
5. Jankovic, J. 2008. “Parkinson’s Disease: Clinical Features and Diagnosis.” *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 79 (4): 368–76. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>..
6. Jellinger, Kurt A. 2012. “Neuropathology of Sporadic Parkinson’s Disease: Evaluation and Changes of Concepts.” *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 27 (1): 8–30. <https://doi.org/10.1002/mds.23795>.
7. Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, et al. 1997. “Mutation in the Alpha-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson’s Disease.” *Science (New York, N.Y.)* 276 (5321): 2045–47.
8. Krüger, R., W. Kuhn, T. Müller, D. Woitalla, M. Graeber, S. Kösel, H. Przuntek, J. T. Epplen, L. Schöls, and O. Riess. 1998. “Ala30Pro Mutation in the Gene Encoding Alpha-Synuclein in Parkinson’s Disease.” *Nature Genetics* 18 (2): 106–8. <https://doi.org/10.1038/ng0298-106>.
9. Zarranz, Juan J., Javier Alegre, Juan C. Gómez-Esteban, Elena Lezcano, Raquel Ros, Israel Ampuero, Lídice Vidal, et al. 2004. “The New Mutation, E46K, of Alpha-Synuclein Causes Parkinson and Lewy Body Dementia.” *Annals of Neurology* 55 (2): 164–73. <https://doi.org/10.1002/ana.10795>.
10. Proukakis, Christos, Christopher G. Dudzik, Timothy Brier, Donna S. MacKay, J. Mark Cooper, Glenn L. Millhauser, Henry Houlden, and Anthony H. Schapira. 2013. “A Novel α -Synuclein Missense Mutation in Parkinson Disease.” *Neurology* 80 (11): 1062–64. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828727ba>.
11. Lesage, Suzanne, Mathieu Anheim, Franck Letournel, Luc Bousset, Aurélie Honoré, Nelly Rozas, Laura Pieri, et al. 2013. “G51D α -Synuclein Mutation Causes a Novel Parkinsonian-Pyramidal Syndrome.” *Annals of Neurology* 73 (4): 459–71. <https://doi.org/10.1002/ana.23894>.
12. Pasanen, Petra, Liisa Myllykangas, Maija Siitonen, Anna Raunio, Seppo Kaakkola, Jukka Lyytinen, Pentti J. Tienari, Minna Pöyhönen, and Anders Paetau. 2014. “Novel α -Synuclein Mutation A53E Associated with Atypical Multiple System Atrophy and Parkinson’s Disease-Type Pathology.” *Neurobiology of Aging* 35 (9): 2180.e1-5. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.024>.
13. Singleton, A. B., M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hulihan, et al. 2003. “Alpha-Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson’s Disease.” *Science (New York, N.Y.)* 302 (5646): 841. <https://doi.org/10.1126/science.1090278>.
14. (Giasson, B. I., K. Uryu, J. Q. Trojanowski, and V. M. Lee. 1999. “Mutant and Wild Type Human Alpha-Synucleins Assemble into Elongated Filaments with Distinct Morphologies in Vitro.” *The Journal of Biological Chemistry* 274 (12): 7619–22.
15. Lecker, Stewart H., Alfred L. Goldberg, and William E. Mitch. 2006. “Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States.” *Journal of the American Society of Nephrology* 17 (7): 1807–19. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006010083>.
16. Li, Jie-Qiong, Lan Tan, and Jin-Tai Yu. 2014. “The Role of the LRRK2 Gene in Parkinsonism.” *Molecular Neurodegeneration* 9 (November). <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-47>.

17. Savica, R., Cannon-Albright, L.A., and Pulst, S. (2016). Familial aggregation of Parkinson disease in Utah: A population-based analysis using death certificates. *Neurology Genetics* 2. 10.1212/NXG.0000000000000065
18. Sveinbjörnsdóttir, S., Hicks, A.A., Jónsson, T., Pétursson, H., Guðmundsson, G., Frigge, M.L., Kong, A., Gulcher, J.R., and Stefánsson, K. (2000). Familial Aggregation of Parkinson's Disease in Iceland. *New England Journal of Medicine* 343, 1765–1770. 10.1056/NEJM200012143432404.
19. Lill, C.M. (2016). Genetics of Parkinson's disease. *Molecular and Cellular Probes* 30, 386–396. 10.1016/j.mcp.2016.11.001
20. Panicker, N., Ge, P., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2021). The cell biology of Parkinson's disease. *J Cell Biol* 220. 10.1083/jcb.202012095.
21. Hunn, B.H.M., Cragg, S.J., Bolam, J.P., Spillantini, M.-G., and Wade-Martins, R. (2015). Impaired intracellular trafficking defines early Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences* 38, 178–188. 10.1016/j.tins.2014.12.009.
22. Bae, E.-J., Kim, D.-K., Kim, C., Mante, M., Adame, A., Rockenstein, E., Ulusoy, A., Klinkenberg, M., Jeong, G.R., Bae, J.R., et al. (2018). LRRK2 kinase regulates α -synuclein propagation via RAB35 phosphorylation. *Nat Commun* 9, 3465. 10.1038/s41467-018-05958-z.
23. Misgeld, T., and Schwarz, T.L. (2017). Mitostasis in Neurons: Maintaining Mitochondria in an Extended Cellular Architecture. *Neuron* 96, 651–666. 10.1016/j.neuron.2017.09.055.
24. Cookson, M.R. (2012). Parkinsonism Due to Mutations in PINK1, Parkin, and DJ-1 and Oxidative Stress and Mitochondrial Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a009415. 10.1101/cshperspect.a009415.
25. Rocha, E.M., De Miranda, B., and Sanders, L.H. (2018). Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 109, 249–257. 10.1016/j.nbd.2017.04.004.
26. Milner, R., and Campbell, I.L. (2003). The Extracellular Matrix and Cytokines Regulate Microglial Integrin Expression and Activation¹. *The Journal of Immunology* 170, 3850–3858. 10.4049/jimmunol.170.7.3850.
27. Sulzer, D., Alcalay, R.N., Garretti, F., Cote, L., Kanter, E., Agin-Liebes, J., Liong, C., McMurtrey, C., Hildebrand, W.H., Mao, X., et al. (2017). T cells from patients with Parkinson's disease recognize α -synuclein peptides. *Nature* 546, 656–661. 10.1038/nature22815.
28. Stefanis, Leonidas. 2012. " α -Synuclein in Parkinson's Disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (2): a009399. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>.
29. Maroteaux, L., J. T. Campanelli, and R. H. Scheller. 1988. "Synuclein: A Neuron-Specific Protein Localized to the Nucleus and Presynaptic Nerve Terminal." *Journal of Neuroscience* 8 (8): 2804–15. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-08-02804.1988>.
30. Chartier-Harlin, Marie-Christine, Jennifer Kachergus, Christophe Roumier, Vincent Mouroux, Xavier Douay, Sarah Lincoln, Clotilde Levecque, et al. 2004. "Alpha-Synuclein Locus Duplication as a Cause of Familial Parkinson's Disease." *Lancet (London, England)* 364 (9440): 1167–69. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17103-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17103-1).
31. Mehra, S., Sahay, S., and Maji, S.K. (2019). α -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1867, 890–908. 10.1016/j.bbapap.2019.03.001.
32. Rhinn, H., Qiang, L., Yamashita, T., Rhee, D., Zolin, A., Vanti, W., and Abeliovich, A. (2012). Alternative α -synuclein transcript usage as a convergent mechanism in Parkinson's disease pathology. *Nat Commun* 3, 1084. 10.1038/ncomms2032.
33. Marchese, D., Botta-Orfila, T., Cirillo, D., Rodriguez, J.A., Livi, C.M., Fernández-Santiago, R., Ezquerra, M., Martí, M.J., Bechara, E., and Tartaglia, G.G. (2017). Discovering the 3' UTR-mediated regulation of alpha-synuclein. *Nucleic Acids Res* 45, 12888–12903. 10.1093/nar/gkx1048.
34. George, Julia M. 2002. "The Synucleins." *Genome Biology* 3 (1): reviews3002.1-reviews3002.6.
35. Villar-Piqué, Anna, Tomás Lopes da Fonseca, and Tiago Fleming Outeiro. 2016. "Structure, Function and Toxicity of Alpha-Synuclein: The Bermuda Triangle in Synucleinopathies." *Journal of Neurochemistry* 139 (S1): 240–55. <https://doi.org/10.1111/jnc.13249>.

36. Vamvaca, Katherina, Michael J. Volles, and Peter T. Lansbury. 2009. "The First N-Terminal Amino Acids of α -Synuclein Are Essential for α -Helical Structure Formation In Vitro and Membrane Binding in Yeast." *Journal of Molecular Biology* 389 (2): 413–24. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.021>.
37. Kahle, Philipp J. 2008. "Alpha-Synucleinopathy Models and Human Neuropathology: Similarities and Differences." *Acta Neuropathologica* 115 (1): 87–95. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0302-x>.
38. Chu, Yaping, and Jeffrey H. Kordower. 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?" *Neurobiology of Disease* 25 (1): 134–49. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.08.021>.
39. Kholodilov, Nikolai G., Michael Neystat, F. Oo Tinmarla, E. Lo Steven, Kristin E. Larsen, David Sulzer, and Robert E. Burke. 1999. "Increased Expression of Rat Synuclein in the Substantia Nigra Pars Compacta Identified by mRNA Differential Display in a Model of Developmental Target Injury." *Journal of Neurochemistry* 73 (6): 2586–99. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0732586.x>.
40. Murphy et al. 2000. "Synucleins Are Developmentally Expressed, and α -Synuclein Regulates the Size of the Presynaptic Vesicular Pool in Primary Hippocampal Neurons | *Journal of Neuroscience*." 2000. <http://www.jneurosci.org/content/20/9/3214.long>.
41. Abeliovich et al. 2000. "Mice Lacking α -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System: Neuron." 2000. [https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273\(00\)80886-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627300808867%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273(00)80886-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627300808867%3Fshowall%3Dtrue).
42. Burré, Jacqueline, Manu Sharma, Theodoros Tsetsenis, Vladimir Buchman, Mark Etherton, and Thomas C. Südhof. 2010. " α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro." *Science (New York, N.Y.)* 329 (5999): 1663–67. <https://doi.org/10.1126/science.1195227>.
43. Chandra, Sreenganga, Gilbert Gallardo, Rafael Fernández-Chacón, Oliver M. Schlüter, and Thomas C. Südhof. 2005. "Alpha-Synuclein Cooperates with C α SP α in Preventing Neurodegeneration." *Cell* 123 (3): 383–96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.028>.
44. Barbour, Robin, Kristin Kling, John P. Anderson, Kelly Banducci, Tracy Cole, Linnea Diep, Michael Fox, et al. 2008. "Red Blood Cells Are the Major Source of Alpha-Synuclein in Blood." *Neuro-Degenerative Diseases* 5 (2): 55–59. <https://doi.org/10.1159/000112832>.
45. Spillantini, M. G., R. A. Crowther, R. Jakes, M. Hasegawa, and M. Goedert. 1998. "Alpha-Synuclein in Filamentous Inclusions of Lewy Bodies from Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (11): 6469–73.
46. Tong, Junchao, Henry Wong, Mark Guttman, Lee C. Ang, Lysia S. Forno, Mitsunobu Shimadzu, Ali H. Rajput, et al. 2010. "Brain Alpha-Synuclein Accumulation in Multiple System Atrophy, Parkinson's Disease and Progressive Supranuclear Palsy: A Comparative Investigation." *Brain: A Journal of Neurology* 133 (Pt 1): 172–88. <https://doi.org/10.1093/brain/awp282>.
47. Savitt, J.M., Valina L. Dawson, and Ted M. Dawson. 2006. "Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: Molecules to Medicine." 2006. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1483178/>.
48. Lashuel, H.A., Overk, C.R., Oueslati, A., and Masliah, E. (2013). The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci* 14, 38–48. 10.1038/nrn3406.
49. van Rooijen, B.D., Claessens, M.M.A.E., and Subramaniam, V. (2008). Membrane binding of oligomeric α -synuclein depends on bilayer charge and packing. *FEBS Letters* 582, 3788–3792. 10.1016/j.febslet.2008.10.009.
50. Volles, M.J., Lee, S.-J., Rochet, J.-C., Shtilerman, M.D., Ding, T.T., Kessler, J.C., and Lansbury Jr., P.T. (2001). Vesicle permeabilization by protofibrillar α -synuclein: Implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry* 40, 7812–7819. 10.1021/bi0102398.
51. Danzer, K.M., Haasen, D., Karow, A.R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B., and Kostka, M. (2007). Different species of α -synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *Journal of Neuroscience* 27, 9220–9232. 10.1523/JNEUROSCI.2617-07.2007.

52. Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W., and Glabe, C.G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486–489. 10.1126/science.1079469.
53. Karpinar, D.P., Balija, M.B.G., Kügler, S., Opazo, F., Rezaei-Ghaleh, N., Wender, N., Kim, H.-Y., Taschenberger, G., Falkenburger, B.H., Heise, H., et al. (2009). Pre-fibrillar α -synuclein variants with impaired β -structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *The EMBO Journal* 28, 3256–3268. 10.1038/emboj.2009.257.
54. Winner, B., Jappelli, R., Maji, S.K., Desplats, P.A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., et al. (2011). In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4194–4199. 10.1073/pnas.1100976108.
55. Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., Weir, D., Thompson, C., Szu-Tu, C., Trinh, J., et al. (2013). Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Movement Disorders* 28, 811–813. 10.1002/mds.25421.
56. Singleton, A.B., Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., et al. (2003). α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science* 302, 841. 10.1126/science.1090278.
57. Guo, Y., Sun, Y., Song, Z., Zheng, W., Xiong, W., Yang, Y., Yuan, L., and Deng, H. (2021). Genetic Analysis and Literature Review of SNCA Variants in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci* 13, 648151. 10.3389/fnagi.2021.648151.
58. Barrett, P.J., and Timothy Greenamyre, J. (2015). Post-translational modification of α -synuclein in Parkinson's disease. *Brain Research* 1628, 247–253. 10.1016/j.brainres.2015.06.002.
59. Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K., and Iwatsubo, T. (2002). α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4, 160–164. 10.1038/ncb748.
60. Anderson, J.P., Walker, D.E., Goldstein, J.M., de Laat, R., Banducci, K., Caccavello, R.J., Barbour, R., Huang, J., Kling, K., Lee, M., et al. (2006). Phosphorylation of Ser-129 Is the Dominant Pathological Modification of α -Synuclein in Familial and Sporadic Lewy Body Disease*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 29739–29752. 10.1074/jbc.M600933200.
61. Sugeno, N., Takeda, A., Hasegawa, T., Kobayashi, M., Kikuchi, A., Mori, F., Wakabayashi, K., and Itoyama, Y. (2008). Serine 129 Phosphorylation of α -Synuclein Induces Unfolded Protein Response-mediated Cell Death*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 23179–23188. 10.1074/jbc.M802223200.
62. Rieker, C., Dev, K.K., Lehnhoff, K., Barbieri, S., Ksiazek, I., Kauffmann, S., Danner, S., Schell, H., Boden, C., Ruegg, M.A., et al. (2011). Neuropathology in Mice Expressing Mouse Alpha-Synuclein. *PLOS ONE* 6, e24834. 10.1371/journal.pone.0024834.
63. Wakamatsu, M., Ishii, A., Ukai, Y., Sakagami, J., Iwata, S., Ono, M., Matsumoto, K., Nakamura, A., Tada, N., Kobayashi, K., et al. (2007). Accumulation of phosphorylated α -synuclein in dopaminergic neurons of transgenic mice that express human α -synuclein. *Journal of Neuroscience Research* 85, 1819–1825. 10.1002/jnr.21310.
64. Zhou, J., Broe, M., Huang, Y., Anderson, J.P., Gai, W.-P., Milward, E.A., Porritt, M., Howells, D., Hughes, A.J., Wang, X., et al. (2011). Changes in the solubility and phosphorylation of α -synuclein over the course of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 121, 695–704. 10.1007/s00401-011-0815-1.
65. Visanji, N.P., Wislet-Gendebien, S., Oschipok, L.W., Zhang, G., Aubert, I., Fraser, P.E., and Tandon, A. (2011). Effect of Ser-129 Phosphorylation on Interaction of α -Synuclein with Synaptic and Cellular Membranes*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 35863–35873. 10.1074/jbc.M111.253450.
66. Goldberg, A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895–899. 10.1038/nature02263.
67. Klionsky, D.J., and Emr, S.D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717–1721. 10.1126/science.290.5497.1717.
68. Sidransky, E., Samaddar, T., and Tayebi, N. (2009). Mutations in gba are associated with familial parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology* 73, 1424–1426. 10.1212/WNL.0b013e3181b28601.

69. Mazzulli, J.R., Xu, Y.-H., Sun, Y., Knight, A.L., McLean, P.J., Caldwell, G.A., Sidransky, E., Grabowski, G.A., and Krainc, D. (2011). Gaucher Disease Glucocerebrosidase and α -Synuclein Form a Bidirectional Pathogenic Loop in Synucleinopathies. *Cell* 146, 37–52. 10.1016/j.cell.2011.06.001.
70. Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (2000). Age-related Decline in Chaperone-mediated Autophagy *. *Journal of Biological Chemistry* 275, 31505–31513. 10.1074/jbc.M002102200.
71. Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B.M., Avadhani, N.G., and Anandatheerthavarada, H.K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem* 283, 9089–9100. 10.1074/jbc.M710012200.
72. Jensen, M.B., Bhatia, V.K., Jao, C.C., Rasmussen, J.E., Pedersen, S.L., Jensen, K.J., Langen, R., and Stamou, D. (2011). Membrane Curvature Sensing by Amphipathic Helices: A SINGLE LIPOSOME STUDY USING α -SYNUCLEIN AND ANNEXIN B12*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 42603–42614. 10.1074/jbc.M111.271130.
73. Middleton, E.R., and Rhoades, E. (2010). Effects of Curvature and Composition on α -Synuclein Binding to Lipid Vesicles. *Biophysical Journal* 99, 2279–2288. 10.1016/j.bpj.2010.07.056.
74. Bayer, T.A., Jäkälä, P., Hartmann, T., Havas, L., McLean, C., Culvenor, J.G., Li, Q.-X., Masters, C.L., Falkai, P., and Beyreuther, K. (1999). α -Synuclein accumulates in Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies but not in Alzheimer's disease β -amyloid plaque cores. *Neuroscience Letters* 266, 213–216. 10.1016/S0304-3940(99)00311-0.
75. Tsigelny, I.F., Sharikov, Y., Wrasidlo, W., Gonzalez, T., Desplats, P.A., Crews, L., Spencer, B., and Masliah, E. (2012). Role of α -synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation. *The FEBS Journal* 279, 1000–1013. 10.1111/j.1742-4658.2012.08489.x.
76. Sanders, L.H., and Timothy Greenamyre, J. (2013). Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radical Biology and Medicine* 62, 111–120. 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.003.
77. Goedert, M., Falcon, B., Clavaguera, F., and Tolnay, M. (2014). Prion-like Mechanisms in the Pathogenesis of Tauopathies and Synucleinopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14, 495. 10.1007/s11910-014-0495-z.
78. Su, X., Maguire-Zeiss, K.A., Giuliano, R., Prifti, L., Venkatesh, K., and Federoff, H.J. (2008). Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging* 29, 1690–1701. 10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.006.
79. Hoenen, C., Gustin, A., Birck, C., Kirchmeyer, M., Beaume, N., Felten, P., Grandbarbe, L., Heuschling, P., and Heurtaux, T. (2016). Alpha-Synuclein Proteins Promote Pro-Inflammatory Cascades in Microglia: Stronger Effects of the A53T Mutant. *PLOS ONE* 11, e0162717. 10.1371/journal.pone.0162717.
80. Liddel, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.-S., Peterson, T.C., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487. 10.1038/nature21029.
81. Cebrián, C., Zucca, F.A., Mauri, P., Steinbeck, J.A., Studer, L., Scherzer, C.R., Kanter, E., Budhu, S., Mandelbaum, J., Vonsattel, J.P., et al. (2014). MHC-I expression renders
82. Dreyfuss, Gideon, V. Narry Kim, and Naoyuki Kataoka. 2002. "Messenger-RNA-Binding Proteins and the Messages They Carry." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3 (3): 195–205. <https://doi.org/10.1038/nrm760>
83. Scherzer, Clemens R., Jeffrey A. Grass, Zhixiang Liao, Imelda Pepivani, Bin Zheng, Aron C. Eklund, Paul A. Ney, et al. 2008. "GATA Transcription Factors Directly Regulate the Parkinson's Disease-Linked Gene Alpha-Synuclein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (31): 10907–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802437105>.
84. Clough, R. Lee, and Leonidas Stefanis. 2007. "A Novel Pathway for Transcriptional Regulation of Alpha-Synuclein." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (2): 596–607. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7111com>.
85. Doxakis, Epaminondas. 2010. "Post-Transcriptional Regulation of Alpha-Synuclein Expression by Mir-7 and Mir-153." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (17): 12726–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.086827>.

86. Junn, Eunsung, Kang-Woo Lee, Byeong Seon Jeong, Teresa W. Chan, Joo-Young Im, and M. Maral Mouradian. 2009. "Repression of Alpha-Synuclein Expression and Toxicity by MicroRNA-7." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (31): 13052–57. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906277106>.
87. Xilouri, Maria, Tereza Vogiatzi, Kostas Vekrellis, and Leonidas Stefanis. 2008. "Alpha-Synuclein Degradation by Autophagic Pathways: A Potential Key to Parkinson's Disease Pathogenesis." *Autophagy* 4 (7): 917–19.
88. Venda, Lara Lourenço, Stephanie J. Cragg, Vladimir L. Buchman, and Richard Wade-Martins. 2010. "α-Synuclein and Dopamine at the Crossroads of Parkinson's Disease." *Trends in Neurosciences* 33 (12): 559–68. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.09.004>.
89. Kim, Eun Joo, Jee Young Sung, Hyun Jung Lee, Hyewhon Rhim, Masato Hasegawa, Takeshi Iwatsubo, Do Sik Min, Jongsun Kim, Seung R. Paik, and Kwang Chul Chung. 2006. "Dyrk1A Phosphorylates α-Synuclein and Enhances Intracellular Inclusion Formation." *Journal of Biological Chemistry* 281 (44): 33250–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606147200>
90. Liu, Fei, and et al. 2008. "Overexpression of Dyrk1A Contributes to Neurofibrillary Degeneration in Down Syndrome." 2008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2518253/>.
91. Kimura, R. 2007. "The DYRK1A Gene, Encoded in Chromosome 21 Down Syndrome Critical Region, Bridges between Beta-Amyloid Production and Tau Phosphorylation in Alzheimer... - PubMed - NCBI." 2007. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17135279>.
92. Wiseman, Frances K., and et al. 2015. "A Genetic Cause of Alzheimer Disease: Mechanistic Insights from Down Syndrome." 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4678594/>
93. Jowaed, Ahmad, Ina Schmitt, Oliver Kaut, and Ullrich Wüllner. 2010. "Methylation Regulates Alpha-Synuclein Expression and Is Decreased in Parkinson's Disease Patients' Brains." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (18): 6355–59. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6119-09.2010>.
94. Maris, Christophe, Cyril Dominguez, and Frédéric H.-T. Allain. 2005. "The RNA Recognition Motif, a Plastic RNA-Binding Platform to Regulate Post-Transcriptional Gene Expression." *The FEBS Journal* 272 (9): 2118–31. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04653.x>.
95. Daubner, Gerrit M., Antoine Cléry, and Frédéric H.-T. Allain. 2013. "RRM-RNA Recognition: NMR or Crystallography...and New Findings." *Current Opinion in Structural Biology* 23 (1): 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.11.006>.
96. Nicastro, Giuseppe, Ian A. Taylor, and Andres Ramos. 2015. "KH-RNA Interactions: Back in the Groove." *Current Opinion in Structural Biology* 30 (February): 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.01.002>.
97. Nguyen, Cuong D., Robyn E. Mansfield, Wilfred Leung, Paula M. Vaz, Fionna E. Loughlin, Richard P. Grant, and Joel P. Mackay. 2011. "Characterization of a Family of RanBP2-Type Zinc Fingers That Can Recognize Single-Stranded RNA." *Journal of Molecular Biology* 407 (2): 273–83. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.12.041>.
98. Gleghorn, Michael L., and Lynne E. Maquat. 2014. "'Black Sheep' That Don't Leave the Double-Stranded RNA-Binding Domain Fold." *Trends in Biochemical Sciences* 39 (7): 328–40. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.05.003>.
99. Järvelin, Aino I., Marko Noerenberg, Ilan Davis, and Alfredo Castello. 2016. "The New (Dis)Order in RNA Regulation." *Cell Communication and Signaling: CCS* 14 (April): 9. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0132-3>.
100. Doxakis, Epaminondas.. 2014. "RNA Binding Proteins: A Common Denominator of Neuronal Function and Dysfunction." *Neuroscience Bulletin* 30 (4): 610–26. <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1443-7>.
101. Ravanidis, Stylianos, Fedon-Giasin Kattan, and Epaminondas Doxakis. 2018. "Unraveling the Pathways to Neuronal Homeostasis and Disease: Mechanistic Insights into the Role of RNA-Binding Proteins and Associated Factors." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082280>.
102. Johnson, Jason M., John Castle, Philip Garrett-Engele, Zhengyan Kan, Patrick M. Loerch, Christopher D. Armour, Ralph Santos, Eric E. Schadt, Roland Stoughton, and Daniel D. Shoemaker. 2003. "Genome-Wide Survey of Human Alternative Pre-mRNA Splicing with Exon Junction Microarrays." *Science (New York, N.Y.)* 302 (5653): 2141–44. <https://doi.org/10.1126/science.1090100>.

103. Buckanovich, R. J., J. B. Posner, and R. B. Darnell. 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.
104. Ji, Zhe, Ju Youn Lee, Zhenhua Pan, Bingjun Jiang, and Bin Tian. 2009. "Progressive Lengthening of 3' Untranslated Regions of MRNAs by Alternative Polyadenylation during Mouse Embryonic Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (17): 7028–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900028106>.
105. Paschou, Maria, Maria D. Paraskevopoulou, Ioannis S. Vlachos, Pelagia Koukouraki, Artemis G. Hatzigeorgiou, and Epaminondas Doxakis. 2012. "MiRNA Regulons Associated with Synaptic Function." *PLoS One* 7 (10): e46189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046189>.
106. Minvielle-Sebastia, L., and W. Keller. 1999. "mRNA Polyadenylation and Its Coupling to Other RNA Processing Reactions and to Transcription." *Current Opinion in Cell Biology* 11 (3): 352–57. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80049-0](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80049-0).
107. Grüter, P., C. Taberner, C. von Kobbe, C. Schmitt, C. Saavedra, A. Bachi, M. Wilm, B. K. Felber, and E. Izaurralde. 1998. "TAP, the Human Homolog of Mex67p, Mediates CTE-Dependent RNA Export from the Nucleus." *Molecular Cell* 1 (5): 649–59.
108. Narayanan, Usha, Vijayalaxmi Nalavadi, Mika Nakamoto, George Thomas, Stephanie Ceman, Gary J. Bassell, and Stephen T. Warren. 2008. "S6K1 Phosphorylates and Regulates Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) with the Neuronal Protein Synthesis-Dependent Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Cascade." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (27): 18478–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800055200>.
109. Lal, Ashish, Krystyna Mazan-Mamczarz, Tomoko Kawai, Xiaoling Yang, Jennifer L. Martindale, and Myriam Gorospe. 2004. "Concurrent versus Individual Binding of HuR and AUF1 to Common Labile Target MRNAs." *The EMBO Journal* 23 (15): 3092–3102. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600305>.
110. Christie, Sean B., Michael R. Akins, James E. Schwob, and Justin R. Fallon. 2009. "The FXG: A Presynaptic Fragile X Granule Expressed in a Subset of Developing Brain Circuits." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (5): 1514–24. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3937-08.2009>.
111. Barreau, Carine, Luc Paillard, and H. Beverley Osborne. 2005. "AU-Rich Elements and Associated Factors: Are There Unifying Principles?" *Nucleic Acids Research* 33 (22): 7138–50. <https://doi.org/10.1093/nar/gki1012>.
112. Łabno, Anna, Rafał Tomecki, and Andrzej Dziembowski. 2016. "Cytoplasmic RNA Decay Pathways - Enzymes and Mechanisms." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1863 (12): 3125–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.023>.
113. Keene, J. D. 1999. "Why Is Hu Where? Shuttling of Early-Response-Gene Messenger RNA Subsets." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1): 5–7.
114. Protter, David S. W., and Roy Parker. 2016. "Principles and Properties of Stress Granules." *Trends in Cell Biology* 26 (9): 668–79. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.004>.
115. B Bardoni, A Schenck, J L Mandel. 2001. "The Fragile X mental retardation protein" *Brain Research Bulletin* 56(3-4):375-82. doi: 10.1016/s0361-9230(01)00647-5
116. "FMR1 Gene-Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1" *GeneCard-The Human Gene Database Protein Coding* (Updated: Jan 3, 2024 ; GCOXP148000 ; GIFTs: 53)
117. Silvia Bassani,Jonathan Zapata,Laura Gerosa, Edoardo Moretto, Luca Murru and Maria Passafaro.2013. "The Neurobiology of X-Linked Intellectual Disability" *The Neuroscientis* 19(5). https://www.researchgate.net/publication/244990900_The_Neurobiology_of_X-Linked_Intellectual_Disability
118. Rachid Mazroui, Marc-Etienne Huot, Sandra Tremblay , Christine Filion, Yves Labelle, Edouard W Khandjian " Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression"
119. Marie-Cécile Didiot, Zhaoxia Tian, Céline Schaeffer, Murugan Subramanian, Jean-Louis Mandel, and Hervé Moine . 2008.The G-quartet containing FMRO binding side in FMR1 mRNA is a potent exonic splicing enhancer ." *Nucleic Acids Res.*" 2008 Sep; 36(15): 4902–4912.
120. Elias G Bechara, Marie Cecile Didiot, Mireille Melko, Laetitia Davidovic et al. 2009. " A Novel Function for Fragile X Mental Retardation Protein in Translational Activation". " *PLoS Biol*". 2009 Jan; 7(1): e1000016.

121. Manuel Ascano, Jr., Neelanjana Mukherjee, Pradeep Bandaru,¹ et al. 2012. "FMR1 targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression". *Nature*. 2012 Dec 20; 492(7429): 382–386.
122. Brian Tsang, Jason Arsenault, Robert M Vernon, Hong Lin, Nahum Sonenberg, Lu-Yang Wang, Alaji Bah, Julie D Forman-Kay. 2019. "Phosphoregulated FMRP phase separation models activity-dependent translation through bidirectional control of mRNA granule formation". *Proc Natl Acad Sci USA* 2019 Mar 5; 116(10): 4218–4227.
123. Marie-Cécile Didiot, Zhaoxia Tian, Céline Schaeffer, Murugan Subramanian, Jean-Louis Mandel, Hervé Moine. 2008. "The G-quartet containing FMRP binding site in FMR1 mRNA is a potent exonic splicing enhancer." *Nucleic Acids Res* 2008 Sep; 36(15): 4902–12.
124. Elias G Bechara, Marie Cecile Didiot, Mireille Melko, Laetitia Davidovic, Mounia Bensaid, Patrick Martin, Marie Castets, Philippe Pognonec, Edouard W Khandjian, Hervé Moine, Barbara Bardoni. 2009. "A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation". *PLoS Biol* 2009 Jan 20; 7(1): e16.
125. Manuel Ascano Jr¹, Neelanjana Mukherjee, Pradeep Bandaru, Jason B Miller, Jeffrey D Nusbaum, David L Corcoran, Christine Langlois et al. 2012. "FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression". *Nature* 2012 Dec 20; 492(7429): 382–6
126. Phillip J Hsu, Hailing Shi, Allen C Zhu, Zhike Lu, Nimrod Miller, Brittany M Edens, Yongchao C Ma, Chuan He. 2019. "The RNA-binding protein FMRP facilitates the nuclear export of N6-methyladenosine-containing mRNAs". *J Biol Chem*. 2019 Dec 27; 294(52): 19889–19895
127. Yi Tan, Carmelo Sgobio, Thomas Arzberger, Felix Machleid, et al. 2019. "Loss of fragile X mental retardation protein precedes Lewy pathology in Parkinson's disease." *Acta Neuropathologica*. 139(2): 319–345. doi: 10.1007/s00401-019-02099-5
128. Cooper, G. M., and R. E. Hausman. 2004. *The Cell: A Molecular Approach*. 3rd ed. Washington D. C.: ASM Press.
129. Tsuchiya, Yoshiki, Hiroaki Taniguchi, Yoshiyuki Ito, Tomoko Morita, M. Rezaul Karim, Norihito Ohtake, Kousuke Fukagai, et al. 2013. "The Casein Kinase 2-Nrf1 Axis Controls the Clearance of Ubiquitinated Proteins by Regulating Proteasome Gene Expression." *Molecular and Cellular Biology* 33 (17): 3461–72. <https://doi.org/10.1128/MCB.01271-12>
130. Nixon, Ralph A. 2013. "The Role of Autophagy in Neurodegenerative Disease." *Nature Medicine* 19 (8): 983–97. <https://doi.org/10.1038/nm.3232>
131. Glickman, Michael H., and Aaron Ciechanover. 2002. "The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction." *Physiological Reviews* 82 (2): 373–428. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2001>.
132. Baumeister, W., J. Walz, F. Zühl, and E. Seemüller. 1998. "The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease." *Cell* 92 (3): 367–80
133. Xilouri, Maria, Oeystein Roed Brekk, and Leonidas Stefanis. 2016. "Autophagy and Alpha-Synuclein: Relevance to Parkinson's Disease and Related Synucleopathies." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 31 (2): 178–92. <https://doi.org/10.1002/mds.26477>
134. Grant, Barth D., and Julie G. Donaldson. 2009. "Pathways and Mechanisms of Endocytic Recycling." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (9): 597–608. <https://doi.org/10.1038/nrm2755>.
135. Cuervo, Ana Maria, Leonidas Stefanis, Ross Fredenburg, Peter T. Lansbury, and David Sulzer. 2004. "Impaired Degradation of Mutant Alpha-Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy." *Science (New York, N.Y.)* 305 (5688): 1292–95. <https://doi.org/10.1126/science.1101738>.
136. Vogiatzi, Tereza, Maria Xilouri, Kostas Vekrellis, and Leonidas Stefanis. 2008. "Wild Type Alpha-Synuclein Is Degraded by Chaperone-Mediated Autophagy and Macroautophagy in Neuronal Cells. - PubMed - NCBI." 2008.
137. Alvarez-Erviti, Lydia, Maria C. Rodriguez-Oroz, J. Mark Cooper, Cristina Caballero, Isidro Ferrer, Jose A. Obeso, and Anthony H. V. Schapira. 2010. "Chaperone-Mediated Autophagy Markers in Parkinson Disease Brains." *Archives of Neurology* 67 (12): 1464–72. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.198>.
138. Vekrellis, Kostas, and Leonidas Stefanis. 2012. "Targeting Intracellular and Extracellular Alpha-Synuclein as a Therapeutic Strategy in Parkinson's Disease and Other Synucleinopathies." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 16 (4): 421–32. <https://doi.org/10.1517/14728222.2012.674111>

139. Dantuma, N.P., Lindsten, K., Glas, R., Jellne, M., and Masucci, M.G. (2000). Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells. *Nat Biotechnol* 18, 538–543. 10.1038/75406
140. Chiba-Falek, Ornit, Jeffrey W. Touchman, and Robert L. Nussbaum. 2003. "Functional Analysis of Intra-Allelic Variation at NACP-Rep1 in the Alpha-Synuclein Gene." *Human Genetics* 113 (5): 426–31. <https://doi.org/10.1007/s00439-003-1002-9>.
141. Sotiriou, Sotiria, Gretchen Gibney, Andreas D. Baxevanis, and Robert L. Nussbaum. 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." *Neuroscience Letters* 461 (2): 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.034>.
142. Angot, Elodie, Jennifer A. Steiner, Carla M. Lema Tomé, Peter Ekström, Bengt Mattsson, Anders Björklund, and Patrik Brundin. 2012. "Alpha-Synuclein Cell-to-Cell Transfer and Seeding in Grafted Dopaminergic Neurons in Vivo." *PloS One* 7 (6): e39465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039465>.
143. Lee, Seung-Jae. 2008. "Origins and Effects of Extracellular α -Synuclein: Implications in Parkinson's Disease." *Journal of Molecular Neuroscience* 34 (1): 17–22. <https://doi.org/10.1007/s12031-007-0012-9>.
144. Ebrahimi-Fakhari, Darius, Ippolita Cantuti-Castelvetri, Zhanyun Fan, Edward Rockenstein, Eliezer Masliah, Bradley T. Hyman, Pamela J. McLean, and Vivek K. Unni. 2011. "Distinct Roles in Vivo for the Ubiquitin-Proteasome System and the Autophagy-Lysosomal Pathway in the Degradation of α -Synuclein." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (41): 14508–20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1560-11.2011>.
145. Gasser, Thomas. 2009. "Molecular Pathogenesis of Parkinson Disease: Insights from Genetic Studies." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 11 (July): e22.
146. R J Hagerman, M Leehey, W Heinrichs et al. 2001. "Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X". *"Neurology"* . 2001 Jul 10;57(1):127-