



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Κλωνοποίηση και έκφραση της α -synuclein120aaA53T
στην ανθρώπινη νευροβλαστική κυτταρική σειρά
SH-SY5Y**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΟΡΑΛΗ ΜΑΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2007



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Κλωνοποίηση και έκφραση της α -synuclein120aaA53T
στην ανθρώπινη νευροβλαστική κυτταρική σειρά
SH-SY5Y**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΟΡΑΛΗ ΜΑΡΙΑ

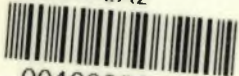
ΛΑΡΙΣΑ 2007



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 5201/1
Ημερ. Εισ.: 04-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΠΟΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087366

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ του ΙΔΡΥΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΤΗΣ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ υπό την επίβλεψη του Ερευνητή Γ' κ. Δημήτριου Βασιλάτη και την βοήθεια της μεταδιδακτορικής ερευνήτριας του εργαστηρίου Ιωάννας Παπαπαναγιώτου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	4
Abstract.....	4
1. Εισαγωγή.....	5
1.1 Ιστορική Αναδρομή	5
1.2 Επιδημιολογία.....	5
1.3 Γενικά Χαρακτηριστικά της Ασθένειας.....	7
1.4 Παθοφυσιολογία της Νόσου	8
1.4.1 Ο εκφυλισμός των ντοπαμινεργικών νευρώνων.....	8
1.4.2 Το σύστημα ουβικουϊτίνης-πρωτεσώματος	11
1.4.3 Σωματία Lewy.....	13
1.5 Παθογένεια-Αιτιολογία της Νόσου.....	13
1.5.1 Περιβαλλοντικοί Υπαίτιοι	13
1.5.2 Γενετικό Υπόβαθρο	14
1.5.3 Οξειδωτικό Στρες και Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία	15
1.6 Η α-συνουκλεΐνη στην Ασθένεια του Πάρκινσον.....	15
1.6.1 Εισαγωγή.....	15
1.6.2 Η δομή της α-συνουκλεΐνης και ο πιθανός της ρόλος.....	16
1.6.3 Οι μεταλλάξεις του γονιδίου.....	18
1.6.4 Η συνάθροιση της α-συνουκλεΐνης.....	19
1.6.5 Ντοπαμίνη, οξειδωτικό στρες και α-συνουκλεΐνη.....	20
2. Σκοπός	23
3. Υλικά και Μέθοδοι	24
3.1 Υλικά.....	24
3.1.1 Αντιδραστήρια.....	24
3.1.2 Χρησιμοποιούμενα μηχανήματα.....	25
3.1.3 Κύτταρα	25
3.1.4 Φορέας	25
3.2 Μέθοδοι.....	27
3.2.1 Παρασκευή απαραίτητων υλικών.....	27
3.2.2 Απομόνωση DNA σε μικρή κλίμακα.....	28
3.2.3 Πέψεις Pctn με HindIII.....	29
3.2.4 Αντίδραση Klenow	30

3.2.5 Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης.....	31
3.2.6 Σύνδεση <i>asyn120aa</i> με <i>Pcmv</i>	32
3.2.7 Μετασχηματισμός κυττάρων.....	33
3.2.8 Πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού <i>XbaI</i> και <i>NdeI</i>	34
3.2.9 Ανάλυση σε πήκτωμα αραρόζης.....	35
3.2.10 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	35
3.2.11 Επιβεβαίωση έδρεσης γονιδίου.....	37
3.2.12 Καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων.....	38
3.2.13 Διαμόλυνση κυττάρων- <i>Transfection</i>	39
3.2.14 Λύση κυττάρων.....	40
3.2.15 Διαχωρισμός Πρωτεϊνών- <i>Western blot</i>	41
4. Αποτελέσματα.....	44
4.1 Κλωνοποίηση του φορέα pRc/cmv.....	44
4.2 Έκφραση της <i>asyn120aaA53T</i>.....	51
5. Συζήτηση.....	56
6. Βιβλιογραφία.....	59
Παραρτήματα.....	64

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος του Πάρκινσον είναι μία από τις πιο κοινές νευροεκφυλιστικές ασθένειες και χαρακτηρίζεται από τρόμο, μυϊκή ακαμψία και βραδυκίνησια. Μελέτες έχουν δείξει επιλεκτική απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας και των σχηματισμό κυτταρολασματικών εγκλειστών (σωμάτια Lewy) σε αυτούς. Οι φυσιολογικές αλλαγές και τα βιοχημικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην επιλεκτική καταστροφή αυτών των νευρώνων παραμένουν ασαφείς. Η α-συνουκλεΐνη αποτελεί βασικό στοιχείο της παθολογίας της νόσου του Πάρκινσον. Η α-συνουκλεΐνη είναι μία μικρή διαλυτή πρωτεΐνη που εκφράζεται αρχικά στα προσυναπτικά άκρα των νευρώνων του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η φυσιολογική λειτουργία της δεν είναι πλήρως κατανοητή, όμως πρόσφατες μελέτες υποθέτουν έναν ρόλο στην ρύθμιση της μεμβρανικής ευστάθειας και στην νευρωνική πλαστικότητα. Διάφοροι παράγοντες, περιβαλλοντικοί και γενετική, μπορεί να οδηγήσουν σε ένα μονοπάτι που εμπλέκει την μη σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης ή την απώλεια λειτουργίας της. Ο τρόπος με τον οποίο μπορεί να συμβάλλει η α-συνουκλεΐνη στην αύξηση νευρωνικής τοξικότητας εμπλέκει διάφορα μονοπάτια όπως την συνάθροιση της ή την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες όπως την 14-3-3 chaperone ή άμεση αλληλεπίδραση με την ντοπαμίνη. Η εργασία αυτή αποσκοπεί στην κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου της α-syn120aaA53T, που κωδικοποιεί για την μεταλλαγμένη και με έλλειψη του C-τελικού άκρου α-συνουκλεΐνη, στα ανθρώπινα νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y.

ABSTRACT

Parkinson's disease is one of the most common neurodegenerative disorders and is characterized by tremor, muscle rigidity and bradykinesia. Studies show a selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and the formation of fibrillar intraneuronal inclusions (called Lewy bodies). The physiological changes and the biochemical pathways involved in the selective demise of these neurons are still unclear. A-synuclein is a key component of the pathological process of neurodegeneration in Parkinson's disease. Alpha synuclein is a small soluble protein expressed primarily at presynaptic terminals in the central nervous system. The physiological function of a-syn remains to be fully defined, although recent data suggest a role in regulating membrane stability and neuronal plasticity. Various trigger factors, either environmental or genetic, can lead to a cascade of events involving misfolding or loss of function of a-syn. The mechanism by which a-syn induces neuronal cell toxicity may involve multiple pathways, such as aggregation or interaction with other proteins like 14-3-3 chaperon or dopamine itself. During these study we tried to clone and express the gene coding α-syn120aaA53T in SH-SY5Y human neuroblastoma cell lines.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Ο James Parkinson (1755-1824) γενικός ιατρός του Λονδίνου, περιγράφει για πρώτη φορά στο βιβλίο του “*Essay on the Shaking Palse*” το 1817 την νόσο του Πάρκινσον ως «*τρομώδη παράλυση*» παρά το γεγονός ότι τα συμπτώματά της ήταν ήδη γνωστά από τον 17^ο αιώνα⁴. Αρκετές δεκαετίες μετά, το 1868, η ασθένεια γίνεται γνωστή με τον όρο «*νόσος του Πάρκινσον*» (*Parkinson's Disease*) από τον James-Martin Charcot. Έναν αιώνα μετά την περιγραφή της νόσου ο Tretiakoff το 1919 επισημαίνει τις χαρακτηριστικές αλλοιώσεις της στην μέλαινα ουσία του εγκεφάλου. Ανάμεσα στις περιγραφές του περιλαμβάνονται και αυτές των χαρακτηριστικών εγκλείστων που πήραν το όνομα τους από τον Lewy το 1913¹. Ακολουθεί η εύρεση των βιοχημικών αλλαγών του εγκεφάλου την δεκαετία του 1950 από αναφορές του Σουηδού ερευνητή Arvid Carlsson, ο οποίος αργότερα θα κερδίσει το βραβείο Νομπελ. Το 1960 παρατηρείται από τους Ehringer και Hornykiewizt η ύπαρξη μεγάλης μείωσης ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου ασθενών με νόσο Πάρκινσον. Οι πρώτες αναφορές για βελτίωση της κατάστασης ασθενών με νόσο Πάρκινσον έρχονται το 1968 μετά την χορήγηση μεγάλων δόσεων L-dopa από τον Γ.Κοντζιά¹³ σε νοσούντες². Παρά τα θεραπευτικά αποτελέσματα με την L-dopa τα προβλήματα και οι περιορισμοί γίνονται ολοένα και περισσότεροι. Το 1980 το ενδιαφέρον στρέφεται στην υπόθεση της νευροτοξικής αντίληψης με βάση παρατηρήσεων τοξικομάνων που εγκατέστησαν Παρκινσονικό σύνδρομο παρόμοιο της νόσου του Παρκινσον μετά την λήψη της 1-μεθυλο-4-φαινυλο-1,2,3,6 τετραϋδροπυριίνης, MPTP, μιας χημικής πρόσμειξης². Σήμερα, έχει κερδίσει την προσοχή των ερευνητών η συσχέτιση της νόσου με γενετικά ευρήματα ύστερα από την ανακάλυψη γονιδίων του εμπλέκονται στην νόσο του Πάρκινσον⁵.

1.2 Επιδημιολογία

Η ιδιοπαθής νόσος του Πάρκινσον παρατηρείται σε όλες τις χώρες, όλες τις εθνικότητες και όλες τις κοινωνικοοικονομικές τάξεις, αν και η επίπτωση στους μαύρους είναι μόνο το ¼ της επίπτωσης των λευκών. Κατά κανόνα η ασθένεια ξεκινάει μεταξύ της ηλικίας των 40-70 ετών και εμφανίζεται πιο συχνά στους άνδρες⁴.

Μετά τον James Parkinson, που παρουσίασε τις πρώτες επιδημιολογικές μελέτες, ακολούθησε το 1958 ο Kurland στο Rochester (Minnesota) καταγράφοντας ως επιπολασμό

της νόσου 187 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους. Έπεται μεγάλος αριθμός επιδημιολογικών ερευνών με ποικίλα κριτήρια και αποτελέσματα, όπως 20,5/100.000/έτος (Rajput, Rochester, 1987) και 4,5/100.000/έτος (Ashok, Λιβύη, 1986), ο μέσος όρος όμως των τιμών σε 18 μελέτες είναι 15/100.000/έτος, ως επίπτωση της νόσου⁴.

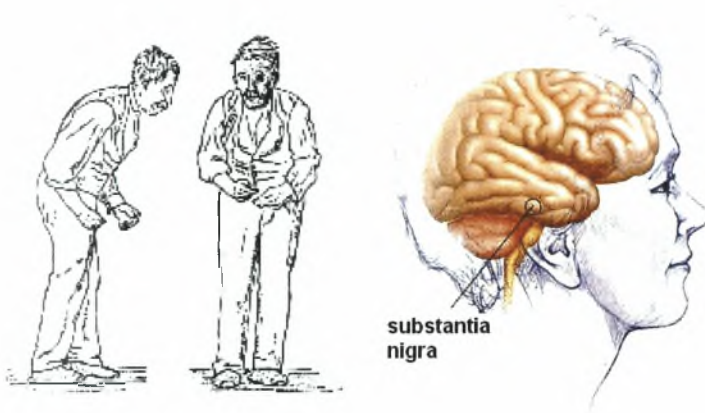
Η συχνότητα της νόσου, ως προς την φυλή, είναι υψηλότερη στην Ευρώπη και την βόρεια Αμερική και χαμηλότερη στην Κίνα, Ιαπωνία και Νότια Αφρική. Στην Β.Αμερική λοιπόν υπάρχουν περίπου 1 εκατομμύριο ασθενείς, που αποτελούν το 1% του πληθυσμού ηλικίας άνω των 65 ετών³, στην Κίνα ο επιπολασμός της νόσου βρέθηκε γύρω στο 60 ανά 100.000 κατοίκους², ενώ στην Ισπανία υπολογίζεται περίπου στο 186/100.000 κάθε χρόνο. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει μια υπεροχή της νόσου στους άνδρες. Έτσι ο λόγος άρρεν / θήλυ για την νόσο του Πάρκινσον διακυμαίνεται από 0,86 (Ιαπωνία) σε 3,7 (Κίνα). Στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ, ο λόγος αυτός κυμαίνεται από 1,79 μέχρι 1,04 αντίστοιχα⁴.

Διάφορες επιδημιολογικές μελέτες συγκλίνουν στην άποψη ότι η νόσος Πάρκινσον έχει πολυπαραγοντική αιτιολογία στους περισσότερους ασθενείς, έτσι επί πολλές δεκαετίες πιστεύεται ότι υπάρχει γενετική συνιστώσα στην νόσο αλλά η πρωταρχική βλάβη παραμένει άγνωστη⁹. Αν και οι οικογενείς περιπτώσεις είναι αναμφισβήτητα σπάνιες, οι Golbe και συνεργάτες του έχουν περιγράψει δυο μεγάλες οικογένειες στις οποίες προσβλήθηκαν 41 άτομα από 4 γενιές². Από τον Dwork και στην συνέχεια άλλους, περιγράφηκε ότι ο κληρονομήσιμος με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο παρκινσονισμός διαφέρει κλινικά και παθολογοανατομικά από την νόσο του Πάρκινσον⁴. Σε τρεις Ελληνικές οικογένειες, ο Πολυμερόπουλος και οι συνεργάτες του (Polymeropoulos et.al., 1997), ταυτοποίησαν πριν από δέκα χρόνια την γονιδιακή θέση στο χρωμόσωμα 4q που περιέχει μια μετάλλαξη για την α-συνουκλεΐνη, το κυριότερο συστατικό των σωματίων Lewy (Lewy 1913). Γενετικά δεδομένα που έχουν ανασκοπηθεί από τους Dunnett και Bjorklund αφορούν οικογένειες στις οποίες παρατηρήθηκε μενδελικός τρόπος κληρονομής και σχετίζονται με γονιδιακά ελλείμματα σε άλλες θέσεις (ίδιο κυρίως χρωμόσωμα)³.

Η ηλικία, το φύλο, η φυλή, η έκθεση σε τοξικούς παράγοντες, οι λοιμώξεις, οι κακώσεις, ο συγκινησιακός παράγοντας και φυσικά ο γενετικός έχουν εξεταστεί κατά καιρούς ως παράγοντες κινδύνου. Η κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στη νόσο Πάρκινσον θα οδηγήσει στην έγκαιρη ανίχνευση, την πρόληψη και τη θεραπεία της ασθένειας.

1.3 Γενικά Χαρακτηριστικά της Ασθένειας

Η νόσος του Πάρκινσον είναι η δεύτερη, μετά το Alzheimer, πιο κοινή νευροεκφυλιστική νόσος η οποία εξελίσσεται αργά προσβάλλοντας αρχικά το μέρος του εγκεφάλου που είναι υπεύθυνο για την κίνηση⁶. Ο τρόμος των χεριών, των βραχιόνων και άλλων μελών του σώματος, η ακαμψία, η βραδυκίνηση, η έλλειψη ισορροπίας και συντονισμού αποτελούν τα κυριότερα χαρακτηριστικά της νόσου⁵ (εικόνα 1). Επιπλέον, ορισμένοι ασθενείς αντιμετωπίζουν προβλήματα κατά την βάδιση, την ομιλία και τον ύπνο. Οι διαταραχές οφείλονται στον θάνατο των νευρικών κυττάρων της μέλαινα ουσίας (εικόνα 1) η οποία ελέγχει τις εκούσιες κινήσεις και βοηθάει στην ρύθμιση της διάθεσης⁷. Παρότι ο υπόλοιπος εγκέφαλος μπορεί αρχικά να αντισταθμίσει τις βλάβες, όταν χαθεί το 50 έως 80% των κυττάρων της μέλαινα ουσίας (*substantia nigra*) αδύνατη πλέον να το κάνει. Στο σημείο αυτό άλλα τμήματα του εγκεφάλου που μετέχουν στον κινητικό έλεγχο, συμπεριλαμβανομένων των υπόλοιπων βασικών γαγγλίων (μέρος των οποίων είναι η μέλαινα ουσία), του θαλάμου και του φλοιού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων, δεν μπορούν πλέον να συνεργαστούν και οι κινήσεις αποσυντονίζονται και γίνονται ανεξέλεγκτες.



Εικόνα 1 Αναπαράσταση της νόσου του Πάρκινσον (αριστερά) και της μέλαινα ουσίας (δεξιά) από Sir William Richard Gowers από το βιβλίο "Manual of Diseases of the Nervous System", 1886. (*substantia nigra* = μέλαινα ουσία).

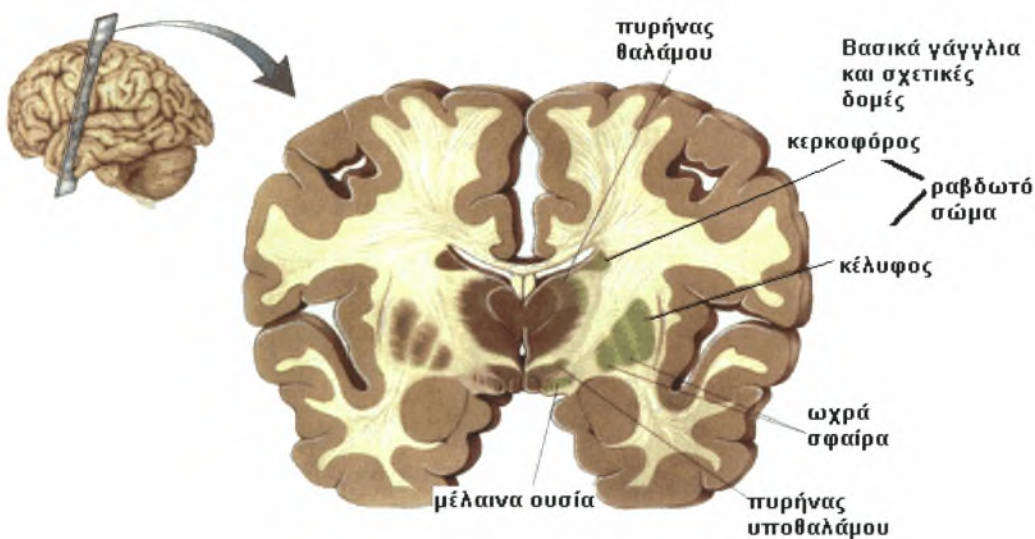
Μέχρι σήμερα η νόσος του Πάρκινσον δεν έχει επιβραδυνθεί, προληφθεί ή αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά. Οι δύο συνήθεις μορφές θεραπευτικής αντιμετώπισης περιλαμβάνουν τα φάρμακα, με δημοφιλέστερο την λεβοντόπα ή L-dopa, και την χειρουργική επέμβαση που καταφέρνουν να μειώσουν μόνο τα συμπτώματα. Καμιά θεραπεία νευροπροστασίας ή νευροανάπλασης δεν έχει επιτευχθεί⁸.

1.4 Παθοφυσιολογία της Νόσου του Πάρκινσον

1.4.1 Ο εκφυλισμός των ντοπαμινεργικών νευρώνων

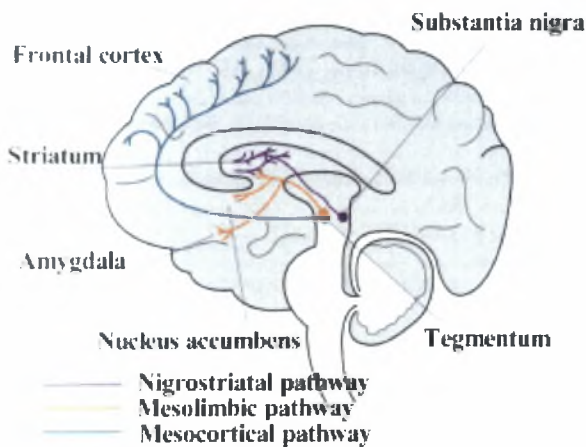
Η νόσος του Πάρκινσον είναι αποτέλεσμα δυσλειτουργίας της ντοπαμινεργικής νευροδιαβίβασης στα **βασικά γάγγλια**, που περιέχουν το μεγαλύτερο μέρος των ντοπαμινεργικών νευρώνων του εγκεφάλου. Η βασική ανατομική αλλοίωση που παρατηρείται στον εγκέφαλο των ασθενών είναι η εκφύλιση των κεχρωσμένων νευρώνων της **μέλαινας ουσίας**¹⁰.

Στα βασικά γάγγλια παραδοσιακά υπάγονται ο κερκοφόρος πυρήνας και ο φακοειδής πυρήνας, που έχει δύο τμήματα το κέλυφος και την ωχρά σφαίρα τα οποία αναφέρονται ως **ραβδωτό σώμα** (*stratum*)^{4,12}. Σύμφωνα με σύγχρονες απόψεις στα βασικά γάγγλια υπάγονται επίσης η **μέλαινα ουσία** και ο υποθαλάμιος πυρήνας του Luys, οι οποίοι συνδέονται λειτουργικά με το ραβδωτό σώμα και την ωχρά σφαίρα (αποτελείται από ένα εξωτερικό τμήμα, *GPallidum external*, και ένα εσωτερικό *GPallidum internal*)⁴. Η μέλαινα ουσία αποτελείται από δυο τμήματα, την συμπαγή μοίρα (*SNpc*), που είναι πλούσια σε ντοπαμίνη και την μη ντοπαμινεργική δικτυωτή μοίρα (*SNpr*). Άλλες περιοχές που παίζουν ρόλο στην λειτουργία των βασικών γαγγλίων είναι ο φλοιός και ο υποθάλαμος (εικόνα 2).



Εικόνα 2. Απεικόνιση των βασικών γαγγλίων και σχετικών δομών, *Parkinson's disease: Diagnosis and clinical management*.

Υπάρχουν τρεις βασικοί ντοπαμινεργικοί οδοί στον εγκέφαλο: α) η **μελανοραδβωτή** (*nigrostriatal pathway*), που συνδέει την μέλαινα ουσία με το ραβδωτό σώμα και εμπλέκεται στην ρύθμιση της κίνησης του σώματος¹¹, β) η **μεσοφλοιϊκή** (*mesocortical*), που συνδέει τη μέλαινα ουσία με το φλοιό του ρινεγκεφαλικού συστήματος και γ) η **μεσοοριαία**

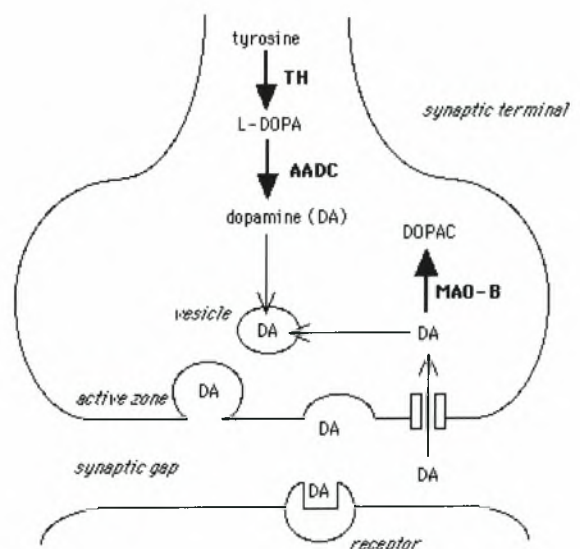


Εικόνα 3 Βασικά Ντοπαμινεργικά συστήματα.
Maurice Victor, *Principles of Neurology*3

οδηγεί σε αλλαγές στην δραστηριότητα της νευρωνικής περιμέτρου, μαζί με αυτή των βασικών γαγγλίων που είναι υπεύθυνα για την ρύθμιση της κίνησης¹, αναστέλλοντας το άμεσο κινητικό κύκλωμα (προάγει την κίνηση) και διεγείροντας το έμμεσο κινητικό κύκλωμα (αναστέλει την κίνηση), προκαλώντας έτσι κινητικές διαταραχές. Οι εκφυλισθέντες νευρώνες της SNpc εμφανίζουν μείωση του μήκους των δενδριτών και αλλοιώσεις του κυτταροσκελετικού τους συστήματος^{3,4}. Σύμφωνα με πολλούς ερευνητές ο θάνατος των κυττάρων επέρχεται με τον μηχανισμό της απόπτωσης, όπου αρχικά καταστρέφεται ο πυρήνας και ακολουθεί η βλάβη των οργανιδίων και του κυτταροπλάσματος^{4,14}.

Από βιοχημικής πλευράς, η ντοπαμίνη αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους νευροδιαβιβαστές του εγκεφάλου (εικόνες4,5). Συντίθεται στα προσυναπτικά άκρα των νευρώνων μέσω ενός μονοπατιού που περιλαμβάνει διάφορους μεταβολίτες. Αρχικά η **τυροσίνη** μετατρέπεται σε **L-ντόπα** μέσω του ενζύμου **υδροξυλάση της τυροσίνης (TH)**. Ακολουθεί η μετατροπή της L-ντόπα σε **ντοπαμίνη** από το ένζυμο **αποκαρβοξυλάση (AADC)**. Τα συντεθειμένα μόρια ντοπαμίνης αποθηκεύονται σε κυστίδια (VMAT-2). Αφού η ντοπαμίνη απελευθερωθεί στην συναπτική σχισμή τα εναπομείναντα μόρια παραλαμβάνονται από ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς πίσω στο προσυναπτικό άκρο. Εκεί

(*mesolimbic*) που συνδέει την μέλαινα ουσία με άλλα μέρη του ρινεγκεφαλικού συστήματος¹ (εικόνα 3). Οι δύο τελευταίες σχετίζονται με συναισθηματικές αποκρίσεις, επιθυμίες, επιβράβευση, δευτερογενή συμπεριφορά. Διαταραχή της ντοπαμίνης σε αυτά τα μονοπάτια εξηγεί την νευροψυχιατρική παθολογία που συνδέεται με την νόσο Πάρκινσον¹¹. Ο εκφυλισμός των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μελανοραβδωτής οδούς

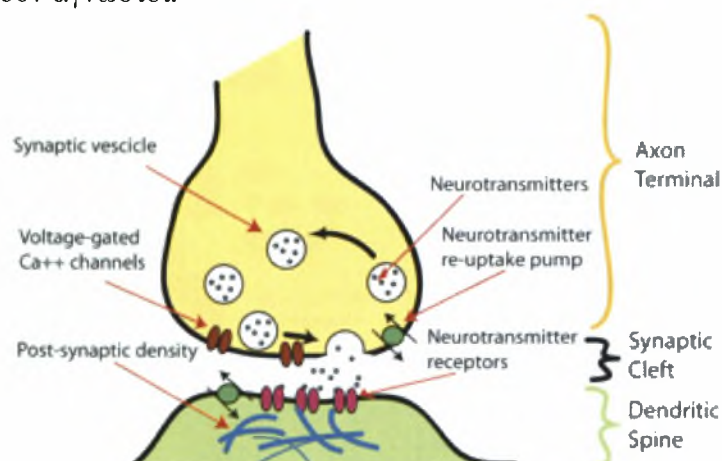


Εικόνα 4. Μεταβολικό μονοπάτι ντοπαμίνης.
Vermeulen, 1994

είτε αποθηκεύονται ξανά σε κυστίδια ντοπαμίνης είτε μεταβολίζονται σε **υδροξυφαινυλοξικό οξύ (DOPAC)** από ένζυμα που καλούνται **μονοαμινοξυδάσες τύπου Β (MOA-B)**¹⁵.

Η ντοπαμίνη απαντά σε μεγάλες ποσότητες στους νευρώνες της μελανοραβδωτής οδού αλλά και σε περιοχές των βασικών γαγγλίων, του υποθαλάμου και του θαλάμου όπου αποθηκεύεται σε προσυναπτικά κυστίδια¹. Ο νευροδιαβιβαστής αυτός ασκεί την μετασυναπτική του δράση μέσω ειδικών υποδοχέων. Πρακτικά οι ντοπαμινεργικοί υποδοχείς χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: στους **D1 ή τύπου 1** οι οποίοι δραστηριοποιούν την αδενυλκυκλάση και στους **D2 ή τύπου 2** που αναστέλλουν αδενυλκυκλάση. Οι D1 και D2 υποδοχείς εντοπίζονται σε διαφορετικά κυκλώματα στα βασικά γάγγλια (άμεσο και έμμεσο), που παίζουν διαφορετικό ρόλο στην ρύθμιση της κίνησης⁴.

Όπως προαναφέρθηκε, η ντοπαμινεργική μελανοραβδωτή οδός παίζει ρυθμιστικό ρόλο στα δύο κυκλώματα των βασικών γαγγλίων. Στο άμεσο κύκλωμα, μέσω των D1 ντοπαμινεργικών υποδοχέων, η ντοπαμίνη έχει διεγερτική δράση, ενώ στο έμμεσο κύκλωμα μέσω D2 υποδοχέων έχει κατασταλτική. Στην νόσο του Πάρκινσον, η μείωση των επιπέδων ντοπαμίνης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας του έμμεσου και την μείωση της δραστηριότητας του άμεσου κυκλώματος. Η τελική επίδραση της ελάττωσης της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα είναι η αναστολή των από τον φλοιό ερχόμενων κινήσεων, δηλαδή περιορίζονται οι αυτόματες και συνδυασμένες κινήσεις και έχουμε ακίνησία/βραδυκίνησία^{4,11}. Με βάση όλα τα προηγούμενα ερμηνεύονται κάποια σημεία της παθολογίας της νόσου, οι μηχανισμοί όμως που συμβάλλουν στα υπόλοιπα χαρακτηριστικά της νόσου παραμένουν άγνωστοι.



Εικόνα 5. Γενικό σχεδιάγραμμα νευρωνικής επικοινωνίας. *Wikipedia commons*

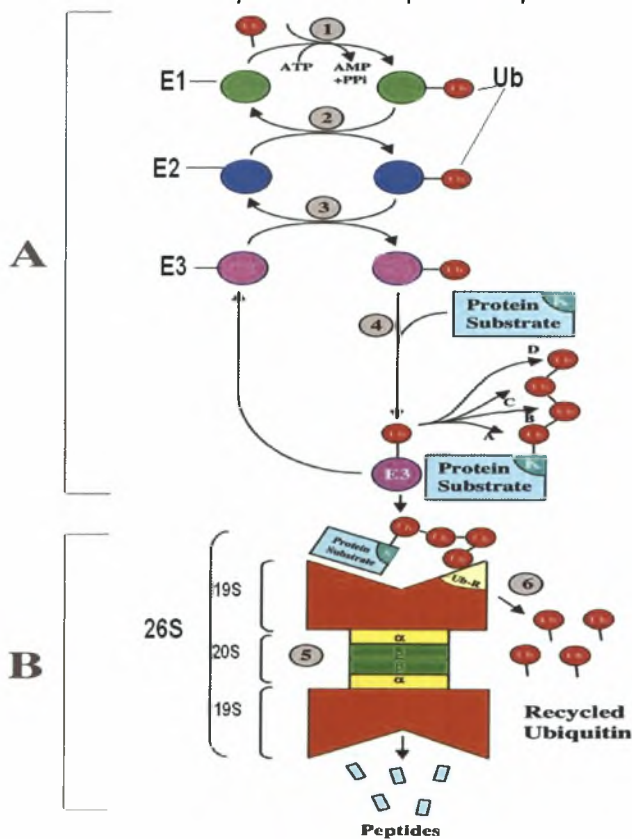
Ένα επιπλέον πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό γνώρισμα στην νόσο Πάρκινσον είναι η απώλεια **νευρομελανίνης** στην SNpc. Η νευρομελανίνη δημιουργείται από την ντοπαμίνη

με αυτό-οξειδωση, που οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών, και εναποτίθεται υπό την μορφή κοκκίων πρωτεΐνης μέσα στους νευρώνες^{3,4,10}. Με το θάνατο των κυττάρων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας (*Substantia Nigra pars compacta*) η νευρομελανίνη απελευθερώνεται και εντοπίζεται είτε εξωκυττάρια είτε μέσα στα μακροφάγα κύτταρα που την προσλαμβάνουν¹⁶.

1.4.2 Το σύστημα ουβικουΐτινης-πρωτεοσώματος

Διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως οι νόσος Alzheimer, η ασθένεια Parkinson, η νόσος του Huntington και η πλευρική μυοτροφική σκλήρυνση εμφανίζουν κοινούς κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς όπως η πρωτεϊνική συνάθροιση και η δημιουργία εγκλείστων¹⁷. Οι απόψεις των επιστημόνων δίστανται ως προς το αν τα συσσωματώματα των πρωτεϊνών προκαλούν τις βλάβες ή αν δρουν προστατευτικά επιχειρώντας να απομακρύνουν τοξικά μόρια από τους νευρώνες⁷.

Οι πολυ-ουβικουΐτινώση των πρωτεϊνών είναι το αποτέλεσμα ενός κυτταρικού



συστήματος που αναγνωρίζει **μη σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες ή ανεπιθύμητες για το κύτταρο** και τις σημαδεύει προς αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα διαμέσου μιας εν σειράς δραστηριότητας τριών ενζύμων^{6,17}. Σε αυτό το σύστημα, πολλαπλά μόρια μιας μικρής πρωτεΐνης, της **ουβικουΐτινης**, συνενώνονται με πρωτεΐνες-υποστρώματα μέσα από μια σειρά ενζυματικών δράσεων (εικόνα 6). Πρώτα το ένζυμο E1 ενεργοποιεί την ουβικουΐτινη μέσω μιας διαδικασίας εξαρτώμενης από ATP (βήμα 1^ο). Έπειτα η ενεργοποιημένη πλέον ουβικουΐτινη περνά στο ένζυμο E2 (βήμα 2^ο) που χρησιμεύει ως γέφυρα για την μεταφορά

μορίων ουβικουΐτινης στις πρωτεΐνες-υποστρώματα μέσω των ειδικών ενζύμων E3 (*ubiquitin E3 ligase*). Μόλις οι πρωτεΐνες αυτές αποκτήσουν τέσσερα μόρια ουβικουΐτινης (βήμα 4^ο) παραλαμβάνονται από την 19S υπομονάδα του 26S πρωτεοσώματος

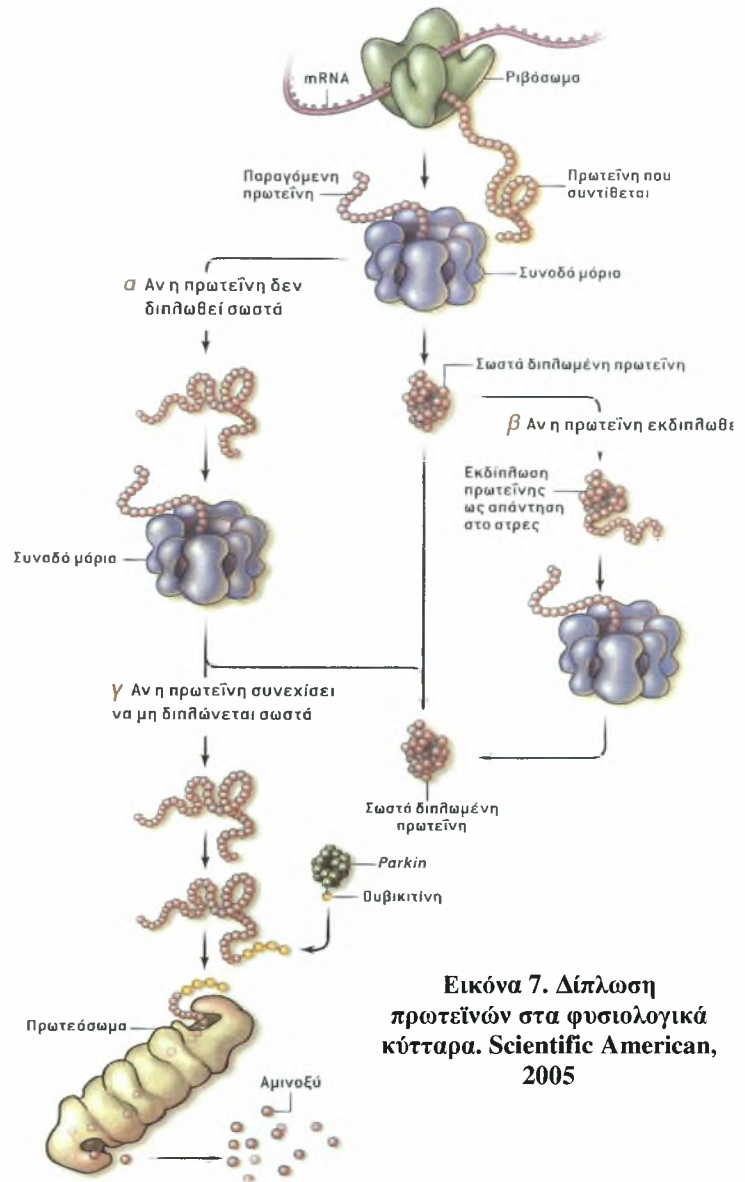
Εικόνα 6. Σύστημα ουβικουΐτινης-πρωτεοσώματος και αποικοδόμηση πρωτεϊνών σε φυσιολογικά κύτταρα. (Ciechanover, 1998).

όπου αποδεσμεύονται από τα μόρια ουβικουΐτινης (βήμα 6^ο) και παραδίδονται στην 20S υπομονάδα (βήμα 5^ο). Η υπομονάδα αυτή φέρει τριπλή υδρολυτική ενεργότητα (τρυσίνης, χυμοθριψίνη, κασπάση) και τελικά αποικοδομεί τις πρωτεΐνες-υποστρώματα¹⁸.

Τα τελευταία χρόνια, πολλοί επιστήμονες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η νόσος του Πάρκινσον εμφανίζεται όταν δυσλειτουργούν το σύστημα των **συνοδών μορίων** (το υπεύθυνο εκείνο σύστημα για την δίπλωση των παραγόμενων πρωτεϊνών στην σωστή τρισδιάστατη δομή) και εκείνο της ουβικουΐτινης-πρωτεοσώματος⁷.

Υποστηρίζουν ότι η διαδικασία πρόκλησης της ασθένειας μπορεί να είναι η εξής: Κάποια μορφή βλάβης στα νευρικά κύτταρα της μέλαινα ουσίας πυροδοτεί έναν καταρράκτη κυτταρικού στρες¹⁹. Λόγω του στρες συσσωρεύονται πολλές εσφαλμένα διπλωμένες πρωτεΐνες, οι οποίες μπορεί αρχικά να λειτουργούν προστατευτικά διότι συγκεντρώνονται όλες μαζί για να μην δημιουργήσουν προβλήματα σε άλλα μέρη του κυττάρου. Τα συνοδά μόρια (*chaperons*) τότε αρχίζουν την αναδίπλωση και το σύστημα αποικοδόμησης ξεκινά να αποβάλει τις πρωτεΐνες εκείνες που δεν μπορούν να επανέλθουν στην φυσιολογική τους μορφή.

Όταν όμως η παραγωγή των εσφαλμένα διπλωμένων πρωτεϊνών είναι τόσο μεγάλη ώστε να μην μπορεί το κύτταρο να ανταποκριθεί στην επιδιόρθωσή τους, εμφανίζονται προβλήματα: το σύστημα ουβικουΐτινης-πρωτεοσώματος αναστέλλεται, τα συνοδά μόρια εξαντλούνται, τοξικές πρωτεΐνες συσσωρεύονται^{17,18,19}. Ακολουθεί ο θάνατος των νευρικών κυττάρων.



Εικόνα 7. Δίπλωση πρωτεϊνών στα φυσιολογικά κύτταρα. *Scientific American*, 2005

1.4.3 Σωματία Lewy

Χαρακτηριστικό παθολογοανατομικό εύρημα στην νόσο Πάρκινσον είναι τα σωματία Lewy (*πρωτεϊνικά συσσωματώματα*) και οι δυστροφικοί νευρίτες (Lewy neurites). Πρόκειται για ηωσινόφιλα κυτταροπλασματικά έγκλειστα αποτελούμενα από ένα πυκνό πυρήνα περιστοιχισμένο από ίνες ακτινωτής συμμετρίας μήκους 10-14nm^{5,26}. Η **α -συνουκλεΐνη** (που έχει την ικανότητα πολυμερισμού σε ινίδια των 10nm *in vitro*) αποτελεί το κυριότερο αρχικό δομικό συστατικό των σωματίων Lewy²⁷. Η εύρεση της μεταλλαγμένης αυτής πρωτεΐνης, σε ασθενείς με κληρονομήσιμη και σποραδική νόσο, μπορεί να δώσει στοιχεία για τον μηχανισμό που υποκινεί το σχηματισμό των σωματίων Lewy στα ντοπαμινεργικά κύτταρα της μέλαινας ουσίας του μεσεγκεφάλου των ασθενών.

1.5 Παθογένεια- Αιτιολογία της Νόσου

Η αιτιολογία της νόσου του Πάρκινσον δεν είναι γνωστή. Οι περισσότερες περιπτώσεις έχουν περιγραφεί ως **ιδιοπαθής** (μη ειδική αιτία) Παρκινσονισμός. Πιθανολογείται ότι η νόσος προκαλείται ως συνέπεια συνδυασμού επίδρασης διάφορων εξωγενών (ιοί, τοξίνες, υποκινούμενοι από φάρμακα, τραύμα στο κεφάλι) και ενδογενών παραγόντων (γενετικοί, πρόωρη γήρανση, οξειδωτικό στρες, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία). Μεγάλο ποσοστό ασθενών πιστεύεται ότι εμφανίζουν **σποραδική νόσο** ως αποτέλεσμα γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, ενώ κάποιες περιπτώσεις οφείλονται αποκλειστικά σε **γενετικούς παράγοντες**²⁰.

1.5.1 Περιβαλλοντικοί Υπαίτιοι

Η ιδέα ότι η νόσος του Πάρκινσον μπορεί να προκαλείται από κάποιον περιβαλλοντικό παράγοντα κυκλοφορεί εδώ και δεκαετίες. Τα αποδεικτικά στοιχεία εμφανίστηκαν όμως στις αρχές του 1980 όταν ο J.William Langston, του Ινστιτούτου της Καλιφόρνιας, μελέτησε μια ομάδα ναρκομανών που έπειτα από την χρήση μιας συνθετικής μορφής ηρωίνης ανέπτυξαν παρκινσονικό σύνδρομο^{7,8,21}. Βρέθηκε ότι η συγκεκριμένη παρτίδα περιείχε μία πρόσμειξη με την ονομασία **MPTP** (*μεθυλ-φαινυλ-τετραϋδροπυριδίνη*), ένωση που μπορεί να νεκρώσει τους νευρώνες στην περιοχή της μέλαινα ουσίας του εγκεφάλου.

Η ουσία MPTP μεταβολίζεται στην νευρολογία από τη MAO-B σε MPDP⁺, το οποίο μετατρέπεται σε MPP⁺²². Το MPP⁺ εισέρχεται στις απολήξεις των ντοπαμινεργικών νευρώνων με ειδικό μεταφορέα της ντοπαμίνης και προσλαμβάνεται με ενεργειακό

μηχανισμό από τα μιτοχόνδρια όπου αναστέλλει τη λειτουργία του συμπλέγματος I της αναπνευστικής αλυσίδας^{22,23}. Αποτέλεσμα της διαταραχής αυτής είναι η μείωση παραγωγής ATP, η διαταραχή της ομοιόστασης του ασβεστίου και τέλος ο κυτταρικός θάνατος.

Στα επόμενα χρόνια αναζητήθηκαν και άλλες ουσίες με παρόμοια δράση. Υπεύθυνα θεωρήθηκαν, ύστερα από πειράματα σε ζώα, ορισμένα ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα και μυκητοκτόνα όπως το paraquat και το maneb^{7,8}. Τέλος βρέθηκε ότι το εντομοκτόνο ροτενόνη, που χρησιμοποιείται σε βιολογικές καλλιέργειες, είναι ικανό να προκαλέσει συσσωμάτωση πρωτεϊνών, να νεκρώσει ντοπαμινεργικούς νευρώνες και να αναστείλει την δράση κυτταρικών οργανιδίων που παράγουν ενέργεια προκαλώντας κινητικές διαταραχές.

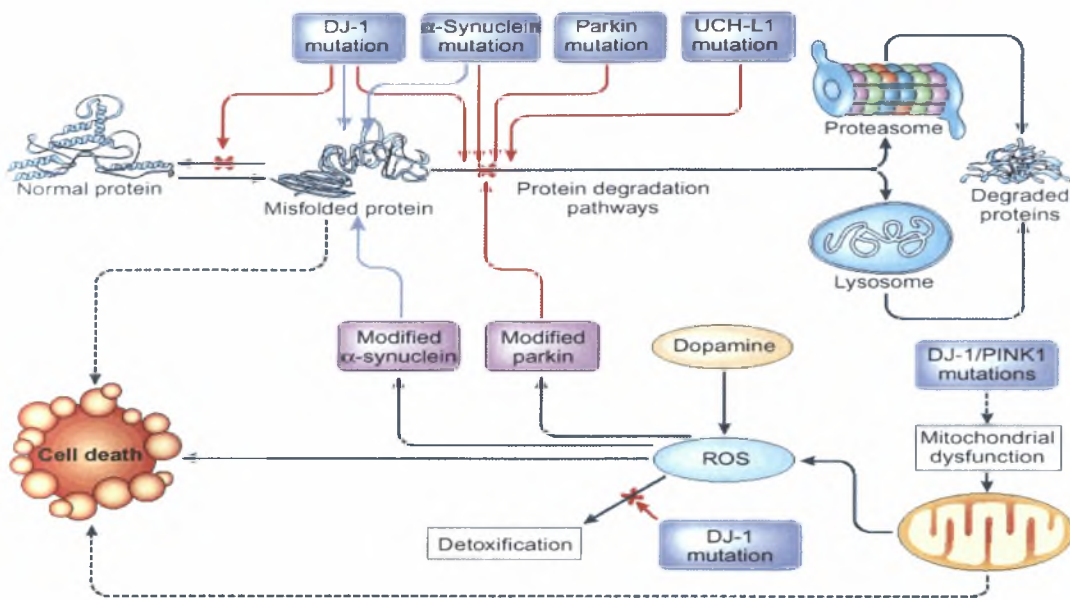
1.5.2 Γενετικό Υπόβαθρο

Τα τελευταία χρόνια έχει ανακαλυφθεί ένας σημαντικός αριθμός μεταλλάξεων σε διάφορα γονίδια που εμπλέκονται στην νόσο Πάρκινσον (πίνακας 1). Η αρχή έγινε το 1997 όταν οι Μιχαήλ Πολυμερόπουλος και συνεργάτες εντόπισαν σε ιταλικές και ελληνικές οικογένειες, που εμφάνιζαν μια κληρονομική μορφή της νόσου, μια μετάλλαξη σε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη α-συνουκλείνη²⁴. Η **α-συνουκλείνη** είναι το σημαντικότερο συστατικό των σωματίων Lewy. Η πρωτεΐνη **parkin** χρησιμεύει ως E3 πρωτεΐνη στο σύστημα ουβικουτινώσεως. Η **uchL1** είναι ένα από τα συστατικά του συστήματος ουβικουτίνης-πρωτεοσώματος. Η **pink1** είναι μια μιτοχονδριακή πρωτεΐνη που μπορεί να προστατεύει το κύτταρο έναντι μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας μέσω φωσφορύλιωσης πρωτεϊνών σε απάντηση στο στρες. Ως απάντηση στο οξειδωτικό στρες λειτουργεί επίσης και η **DJ1** πρωτεΐνη²⁵. Ο προτεινόμενος μηχανισμός με τον οποίο οι μεταλλάξεις ή οι αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να οδηγεί στη νόσο του Πάρκινσον περιλαμβάνει οξειδωτικό στρες, μιτοχονδριακό έλλειμμα και ανεπαρκή πρωτεϊνικό χειρισμό.

Πίνακας 1. Γονίδια και πρωτεΐνες στην νόσο του Πάρκινσον. (από *Genetic research branch*)

Γενετικός τύπος	Πρωτεΐνη	Χρωμοσωμική Θέση	Τρόπος κληρονομιάς	Λειτουργία
PARK1	a-Synuclein	4q21	AE	Άγνωστη
PARK2	Parkin	6q25-27	AY	E3 ubiquitin ligase
PARK3	Άγνωστο	2q13	AE	
PARK4	a-Synuclein	4q15	AE	Άγνωστη
PARK5	UCHL1	4q14	AE	ubiquitin C-terminal hydrolase
PARK6	PINK1	1p35	AY	Mitochondrial protein kinase
PARK7	DJ-1	1p36	AY	Oxidative stress response
PARK8	LRRK2 (dardarin)	12p11q13.1	AE	
	NR4A2	2q22-23	AE	Transcriptionfactor

AE= Αυτοσωμικό Επικρατές, AY= Αυτοσωμικό Υπολειπόμενο



Εικόνα 8. Πιθανό μοντέλο της νόσου. *Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease*
Miquel Vila & Serge Przedborski

1.5.3 Οξειδωτικό στρες και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Η εκλεκτική αύξηση της υπεροξειδωσής των λιπαρών οξέων στη μέλαινα ουσία παρκινσονικών ασθενών υποδηλώνει ότι στην περιοχή αυτή παράγονται σε περίσσεια ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη οξειδωτικού στρες. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνονται από διάφορα προστατευτικά αντιοξειδωτικά συστήματα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση και η καταλάση. Διαταραχή των συστημάτων αυτών μπορεί να ενισχύσει τα προβλήματα στην νόσο Πάρκινσον⁴.

Σε αρκετές μελέτες βρέθηκε ότι στην νόσο του Πάρκινσον υπάρχει μείωση του **συμπλέγματος I των μιτοχονδρίων** της μέλαινα ουσίας (περίπου 37%). Προς το παρόν δεν είναι γνωστό αν προηγείται η μιτοχονδριακή διαταραχή ή το οξειδωτικό στρες. Σημαντικό είναι ότι και τα δυο παίζουν ρόλο στην νόσο Πάρκινσον και ότι πρόσφατα γενετικά ευρήματα υποστηρίζουν αυτή την άποψη (εικόνα 8)²⁵.

1.6 Η α -συνουκλεΐνη στην ασθένεια του Πάρκινσον

1.6.1 Εισαγωγή

Υπάρχουν αρκετά ευρήματα που υποστηρίζουν τον ρόλο της α -συνουκλεΐνης στην νόσο του Πάρκινσον και σε άλλες βέβαια νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Πρώτον, η ινώδης μορφή της α -συνουκλεΐνη είναι το βασικό συστατικό των σωματίων Lewy (κυτταρικά έγκλειστα στις περιοχές του εγκεφάλου που είναι λειτουργικά κατεστραμμένα στην

ασθένεια του Πάρκινσον)³⁷. Δεύτερον, τρεις σημειακές μεταλλάξεις έχουν συνδεθεί με την εκκίνηση της νόσου σε νεότερη ηλικία. Τρίτον, η α -συνουκλεΐνη μπορεί να σχηματίσει τοξικά ολιγομερή ή ίνες. Η αυξανόμενη επίσης έκφρασή της στα κύτταρα μπορεί να προκαλέσει μιτοχονδριακό έλλειμμα, να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο, να προάγει το οξειδωτικό στρες, να καταστρέψει τα λυσοσώματα και την συσκευή του Golgi⁴⁴. Τέλος, αυξανόμενη έκφραση της ανθρώπινης α -συνουκλεΐνης σε διαγονιδιακές μύγες και ποντίκια συνοδεύεται από νευρωνική δυσλειτουργία, απώλεια των συναπτικών άκρων ή ολόκληρων των νευρώνων και ανάπτυξη κινητικών ανωμαλιών, βλάβες δηλαδή όμοιες με αυτές που βρέθηκαν σε ασθενείς με νόσο Πάρκινσον³⁷. Όλα αυτά τα στοιχεία υποστηρίζουν έναν κεντρικό ρόλο της α -συνουκλεΐνης στην παθογένεια της νόσου.

1.6.2 Η δομή της α -συνουκλεΐνης και ο πιθανός ρόλος της

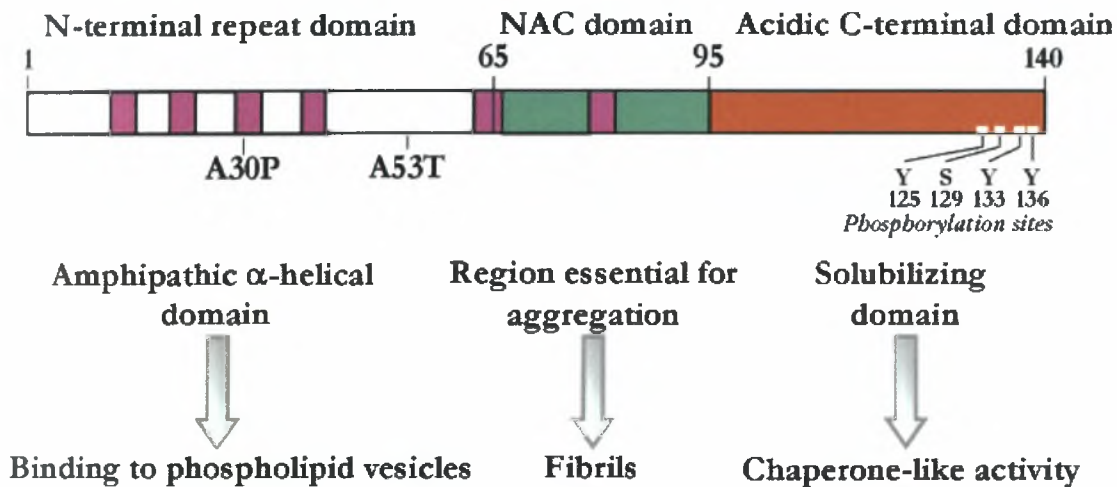
Η α -συνουκλεΐνη (α -syn) είναι μια μικρή πρωτεΐνη, 140 αμινοξέων (140aa), που εκφράζεται βασικά στους νευρώνες του εγκεφάλου, αν και έχει βρεθεί και στα κύτταρα γλοίας, και συγκεντρώνεται στα συναπτικά άκρα²⁸. Αποτελεί πρωτεΐνη αποκλειστικά των σπονδυλωτών και βρέθηκε πρώτη φορά στο ηλεκτροφότο χέλι *Torpedo californica*³⁷. Είναι γνωστή επίσης με την ονομασία **non-Amyloid β -peptide (μη αμυλοειδές β -πεπτίδιο)**³⁶. Η ανθρώπινη α -συνουκλεΐνη κωδικοποιείται από ένα γονίδιο (SNCA) που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4⁽³¹⁾ και έχει βρεθεί ομολογία με την αντίστοιχη πρωτεΐνη των αρουραίων και την πρωτεΐνη συνελφίνη των πουλιών (songbird)³⁰. Είναι μέλος μιας οικογένειας τριών συναπτικών πρωτεϊνών που περιλαμβάνει την α -συνουκλεΐνη, την β και την γ ^{29,32}. Παρότι τα μέλη της οικογένειας αυτής φέρουν κάποια αμινοξική ομολογία, η α -συνουκλεΐνη φαίνεται να είναι μοναδική διότι είναι η μόνη που έχει την ικανότητα να δημιουργεί ινίδια και να συναθροίζεται σε σωματίδια Lewy³³.

Η πρωτογενής δομή της α -συνουκλεΐνης χαρακτηρίζεται από τρεις απομακρυσμένες περιοχές, την N-τελική (1-60 κατάλοιπα), την κεντρική NAC περιοχή (61-95) και την C-τελική περιοχή (96-140)³⁷ (εικόνα 9).

Η υψηλά συντηρημένη **N-περιοχή** (1-65 κατάλοιπα) περιλαμβάνει έξι αντίγραφα μιας ασυνήθιστης επανάληψης 11 αμινοξέων (KTKEGV)⁴³. Πιστεύεται ότι η επικράτεια αυτή είναι υπεύθυνη για την αλλαγή της α -συνουκλεΐνης από τυχαία έλικα σε σχηματισμό α -έλικας όταν προσδένεται σε φωσφολιπιδιακές μεμβράνες. Στην περιοχή αυτή εντοπίζονται δυο σημαντικές μεταλλάξεις, οι A53T και A30P, οι οποίες διευκολύνουν την α -συνουκλεΐνη να παραμείνει στην μορφή των τυχαίων ελικών ώστε να είναι ευκολότερο να συμβεί η συνάθροιση της³⁶ (εικόνα 12).

Η **κεντρική υδρόφοβη** περιοχή είναι γνωστή με την ονομασία non-Amyloid β -peptide (μη αμυλοειδές β -πεπτίδιο). Περιλαμβάνει την υψηλή αμυλοειδογένεση του μορίου που είναι υπεύθυνη για την ικανότητα της α -συνουκλεΐνης να υφίσταται αλλαγή από τυχαία έλικα (random coil) σε δομή β -ελάσματος (β -sheet), αλλά και να σχηματίζει πρωτοινίδια και ινίδια⁴⁰. Τα καταλοιπα 71-81 είναι ζωτικής σημασίας για την δημιουργία των ινιδίων³⁴.

Η **C-τελική περιοχή** (96-140) σε αντίθεση με τις δυο προηγούμενες που μοιράζονται υψηλή ομολογία ανάμεσα στα διάφορα είδη, έχει ποικίλες μέγεθος και αλληλουχία⁴². Παρουσιάζει υδρόφιλη συμπεριφορά και είναι πλούσια σε προλίνη, γλουταμινικό οξύ και ασπαραγινικό. Τα κατάλοιπα 125-140 φαίνεται να έχουν κρίσιμο ρόλο καθώς προσδίδουν στην α -συνουκλεΐνη ιδιότητες όμοιες με αυτές των **chaperone πρωτεϊνών** (αλλιώς αναφέρονται ως *συνοδά μόρια* και είναι υπεύθυνες για την πρόληψη μη αναστρέψιμης πρωτεϊνικής συνάθροισης και για την σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών)⁴¹.



Εικόνα 9. Το γονίδιο της ανθρώπινης α -συνουκλεΐνης. Διακρίνονται οι τρεις βασικές περιοχές, ο ρόλος τους και οι μεταλλάξεις A53T και A30P. (Recchia et. al.)

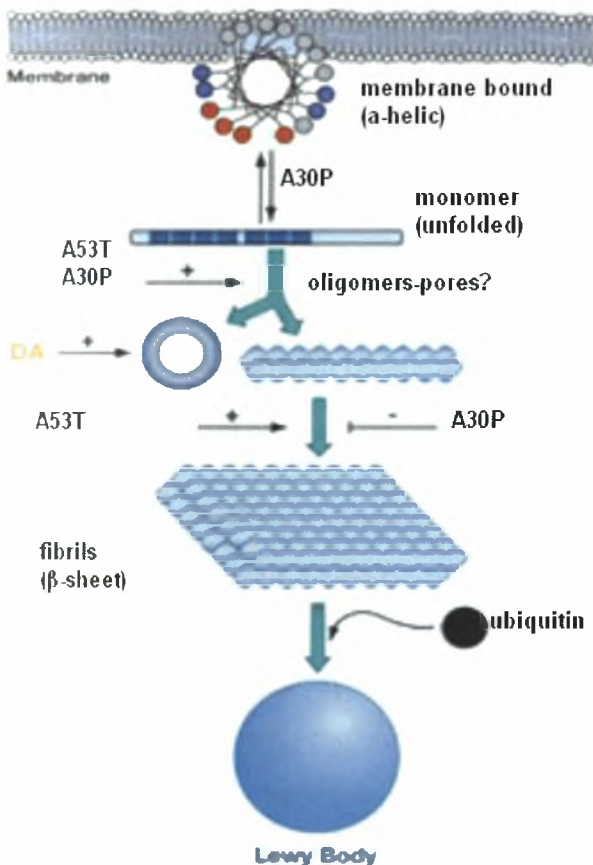
Αν και η κύρια λειτουργία της δεν έχει καθοριστεί μελέτες σε πούλια υποστηρίζουν ότι ίσως να παίζει ρόλο στη πλαστικότητα των νευρώνων, ενώ έρευνες σε α -syn knockout ποντίκια δείχνουν ότι ίσως να ενέχεται στη ρύθμιση της ντοπαμινεργικής νευροδιαβίβασης²⁹. Τέλος έχει υποτεθεί ότι η α -συνουκλεΐνη λειτουργεί *in vivo* ως chaperone πρωτεΐνη όχι μόνο επειδή συνδέεται με λιπίδια της μεμβράνης και αλληλεπιδρά με ποικιλία προσδετών και κυτταρικών πρωτεϊνών τροποποιώντας την δραστηριότητα τους αλλά επειδή μοιράζεται 40% αμινοξική ομολογία με την **14-3-3 chaperone πρωτεΐνη**³⁶. Η πρωτεΐνη αυτή συσσωρεύεται στα σωμάτια Lewy, συμμετέχει στην ανάπτυξη των νευρώνων και εμποδίζει την απόπτωση μέσω ανταγωνισμού με την BAD πρωτεΐνη (προαποπτωτική

πρωτεΐνη). Η α -συνουκλείνη και η 14-3-3 πρωτεΐνη αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν ένα σύμπλοκο περίπου 83kDa όπως βρέθηκε σε εγκεφάλους ασθενών με νόσο Πάρκινσον³⁸. Το σύμπλοκο αυτό επιλεκτικά αυξάνεται στην μέλαινα ουσία. Έτσι, η α -συνουκλείνη απομονώνει την 14-3-3 προκαλώντας μείωση στην ποσότητα της πρωτεΐνης που είναι απαραίτητη για να αναστείλει την απόπτωση κάνοντας τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στο κυτταρικό στρες³⁹.

Τελικά η φυσική και λειτουργική ομολογία μεταξύ της α -συνουκλείνης και της 14-3-3 chaperone πρωτεΐνης δείχνει ότι η α -συνουκλείνη δρα αρχικά σαν chaperone πρωτεΐνη για να βοηθήσει το κύτταρο να διαχειριστεί αυξανόμενα επίπεδα στρες και να προστατευτεί έναντι της συνάθροισης κατεστραμμένων πρωτεϊνών^{36,38}. Παρόλα αυτά η υπερέκφραση της είναι **τοξική** για τα κύτταρα καθώς και η υπερέκφραση των μεταλλαγμένων μορφών της A53T, A30P που επιτυγχάνουν ακόμη μεγαλύτερη τοξικότητα.

1.6.3 Οι μεταλλάξεις του γονιδίου

Η ανακάλυψη δυο σημαντικών γεγονότων συνέδεσε την α -συνουκλείνη με την νόσο του Πάρκινσον : 1) η εύρεση σημειακών μεταλλάξεων σε ασθενείς με οικογενή μορφή της



Εικόνα 10. Αναπαράσταση μορφών α -συνουκλείνης κάτω από την επίδραση μεταλλάξεων.

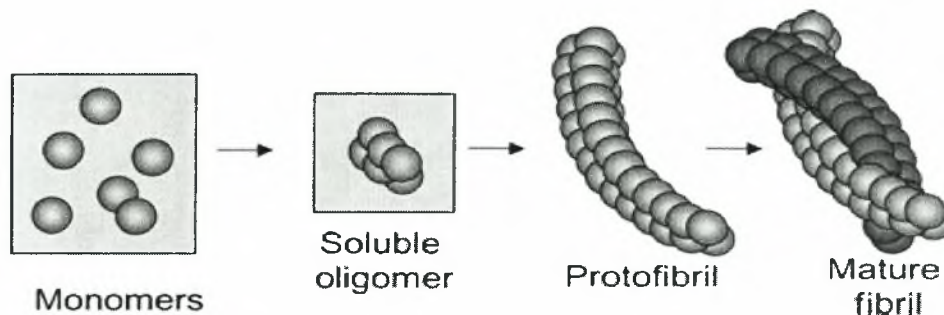
νόσου (Polymeropoulos et. al. 1997) και 2) η ένδειξη ότι η α -συνουκλείνη είναι το βασικό συστατικό των σωματίων Lewy σε ιδιοπαθής και σποραδικές περιπτώσεις της νόσου (Spillantini et. al., 1997)²⁹.

Δυο μη νοσηματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την α -συνουκλείνη, καθώς και διπλασιασμοί-τριπλασιασμοί του γενετικού τόπου που εμπεριέχει το γονίδιο έχουν αναγνωριστεί. Η **A53T** μετάλλαξη αφορά την αλλαγή μιας γουανίνης σε αδενίνη (G→A) στην θέση 206 με αποτέλεσμα να παράγεται το αμινοξύ θρεονίνη αντί για αλανίνη (Ala→ Thr)²⁴. Η μετάλλαξη **A30P** πρόκειται για αντικατάσταση της γουανίνης σε κυτοσίνη (G→C) με συνέπεια την

αλλαγή του αμινοξέους αλανίνη σε προλίνη (Ala→ Pro). Τριπλασιασμοί του γονιδίου οδηγούν σε υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης (wild-type a-syn). Οι μεταλλάξεις αν και σπάνιες, είναι υπεύθυνες για τη μη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών και την **συνάθροιση της α-συνουκλεΐνης στα σωματία Lewy**. Έχει επίσης δειχθεί ότι οι μεταλλάξεις A53T και A30P αυξάνουν το ποσοστό ολιγομερισμού της α-συνουκλεΐνης, ενώ το ποσοστό των ωρίμων σχηματισμένων ινιδίων αυξάνεται και μειώνεται από τις A53T και A30P αντίστοιχα (εικόνα 10). Τελικά ο σχηματισμός των σωματιών Lewy στα νευρικά κύτταρα ασθενών με νόσο του Πάρκινσον έχει οδηγήσει σε **δυο θεωρίες** σχετικά με την **τοξικότητα** της α-συνουκλεΐνης: ή ότι η συνάθροιση της είναι προμήνυμα τοξικότητας για τους νευρώνες αυτούς⁵³ ή ότι η συνουκλεΐνη συναθροίζεται για να προστατεύσει το κύτταρο έναντι των τοξικότερων ολιγομερών της⁵⁵.

1.6.4 Η συνάθροιση της α-συνουκλεΐνης

In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η φυσιολογική α-συνουκλεΐνη αλλά και οι μεταλλαγμένες μορφές της (A53T, A30P) έχουν δομή τυχαίας έλικας και δεν φαίνεται να σχηματίζουν μια συγκεκριμένη δευτερογενή δομή σε υδατικά διαλύματα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις⁴⁰. Παρόλα αυτά σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι επιρρεπής στην αυτό-

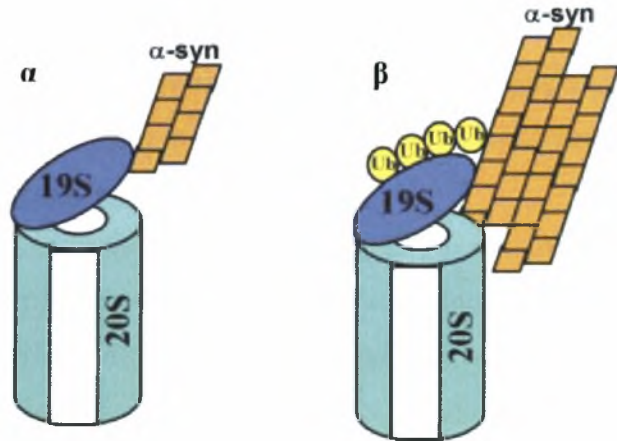


Εικόνα 11. Μορφές της α-συνουκλεΐνης. (Paleologou et.al)

συνάθροιση προκαλώντας την παραγωγή αμυλοειδών ινών όμοιων με αυτών που εμφανίζονται στα σωματία Lewy. Έχει προταθεί ότι η διαδικασία δημιουργίας ινιδίων της α-συνουκλεΐνης (**μονομερής**) διαμεσολαβείτε από τον σχηματισμό **πρωτοινιδίων (ολιγομερή)** που με την σειρά τους σχηματίζουν **ινίδια** (εικόνα 11). Το ποσοστό πρωτοινιδίων είναι υψηλότερο για της μεταλλαγμένες πρωτεΐνες ενώ το ποσοστό ινιδίων είναι υψηλότερο για την A53T μεταλλαγμένη μορφή³⁷ (εικόνα 10).

Διάφοροι μηχανισμοί συμβάλλουν στην συνάθροιση της α-συνουκλεΐνης με πιθανότερους, την καταστροφή του σύστημα ουβικουΐτινης-πρωτεοσώματος και την πρόκληση οξειδωτικού στρες.

Για λόγους που δεν είναι πλήρως κατανοητοί το **σύστημα ουβικουΐτινης-πρωτεοσώματος** μπορεί να αποτυγχάνει σε άτομα που εκδηλώνουν την νόσο του Πάρκινσον (εικόνα 8). **Σωματία Lewy** σχηματίζονται μέσα στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας⁵⁴. Η εύρεση **πολυουβικουΐτινωμένων πρωτεϊνών** αντί για μονομερή ουβικουΐτινης, όπως υποδεικνύεται από βιοχημικές αναλύσεις, δείχνει ότι η συνάθροιση πρωτεϊνών σε έγκλειστα είναι αποτέλεσμα δυσλειτουργίας του πρωτεοσώματος, που μπορεί να οφείλεται σε γενετικές μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε οποιαδήποτε ένζυμο ή πρωτεΐνες συμμετέχουν στο σύστημα αυτό (εικόνα 8). Τα σωματία Lewy περικλείουν εκτός από αλυσίδες ουβικουΐτινης, ινίδια α-συνουκλεΐνης, 14-3-3 πρωτεΐνη καθώς και υπομονάδες του 26S πρωτεοσώματος υποδεικνύοντας ότι



Εικόνα 12 α) Πρόσδεση α-συνουκλεΐνης σε υπομονάδες του πρωτεοσώματος και απενεργοποίησή του, β) αναστολή πρωτεοσώματος από πολυουβικουΐτινωμένη α-συνουκλεΐνη. *Benoit I Giasson, 2003*

πολυουβικουΐτινωμένα έγκλειστα α-συνουκλεΐνης αναγνωρίζονται από το πρωτεοσώμα αλλά επειδή είναι αδιάσπαστα απενεργοποιούν το πρωτεοσώμα³⁶ (εικόνα 12,β). Η **πολυουβικουΐτινώση της α-συνουκλεΐνης δεν είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό εγκλείστων** (εικόνα 12,α)⁴⁵. Οι μεταλλάξεις της α-συνουκλεΐνης που προωθούν τον πολυμερισμό της και την δημιουργία πρωτοϊνιδίων μπορεί να αντιστέκονται στην ουβικουΐτινώση από την πρωτεΐνη **parkin**, που είναι υπεύθυνη για την μεταφορά μορίων ουβικουΐτινης στην υποψία για καταστροφή πρωτεΐνη. Δηλαδή τα **ολιγομερή α-συνουκλεΐνης ξεφεύγουν από το σύστημα του πρωτεοσώματος και επιβιώνουν είτε στο κυτταρόπλασμα προκαλώντας τοξικότητα και θάνατο των νευρώνων είτε συναθροίζονται σε σωματία Lewy**⁴⁶.

1.6.5 Ντοπαμίνη, οξειδωτικό στρες και α-συνουκλεΐνη

Σε φυσιολογικές καταστάσεις, η παρουσία της α-συνουκλεΐνης σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες έχει σαν σκοπό να μετριάσει την ποσότητα της κυτταροπλασματικής ντοπαμίνης στα νευρικά άκρα, με σκοπό τον περιορισμό της μετατροπής της σε μόρια υψηλής οξειδωτικής δραστηριότητας⁴⁶. Η ντοπαμίνη των νευρώνων της μέλαινα ουσίας είναι ικανή να μετατραπεί και να παράγει ενεργά στοιχεία οξυγόνου, **Reactive Oxygen Species, ROS**,

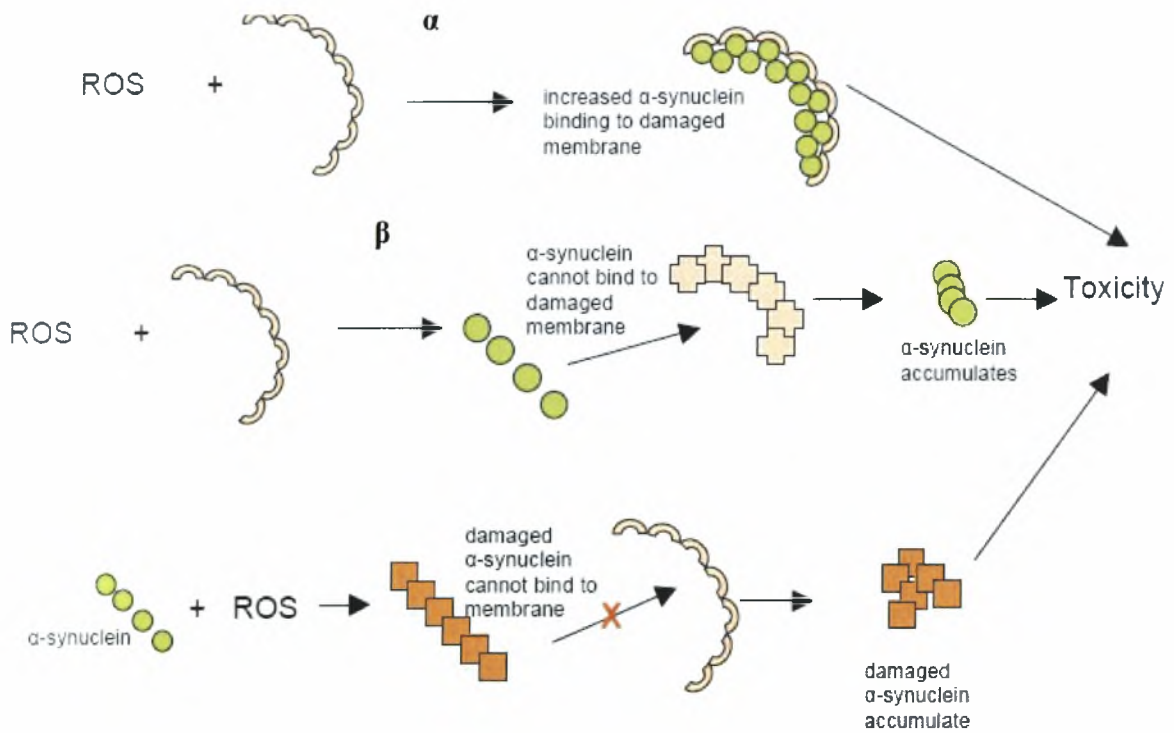
(υπεροξειδία υδρογόνου, ρίζες υδροξυλίου) καθώς και άλλα δραστικά χημικά μόρια που μπορεί να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες, όπως η κινίνη της ντοπαμίνης και υπεροξυνιτρίτες, είτε μέσω αυτοοξειδωσης είτε μέσω δραστηριότητας των MAO-B^{36,49}. Τα φυσιολογικά μονομερή α-συνουκλεΐνης είναι ικανά να μειώσουν την δράση της Tyrosine Hydroxylase (μέσω παρεμπόδισης πρόσδεσης της 14-3-3 πρωτεΐνης που αυξάνει την δραστηριότητα του ενζύμου), να αυξήσουν την επαναπρόσληψη της ντοπαμίνης από την σύναψη μέσω του μεταφορέα ντοπαμίνης (DAT) αλλά και να ρυθμίσουν την διαθεσιμότητα των συναπτικών κυστιδίων (VMAT-2) που βοηθούν στην επαναπρόσληψη της ντοπαμίνης σε αυτά. Φαίνεται λοιπόν ότι η α-συνουκλεΐνη αρχικά έχει ως σκοπό να προστατεύσει τους νευρώνες από γεγονότα τοξικότητας και κυτταρικό θάνατο^{46,47,48}.

Παρόλα αυτά όταν η α-συνουκλεΐνη αρχίσει να σχηματίζει ολιγομερή, η τοξικότητα που μπορεί να προκαλέσουν τα παράγωγα της ντοπαμίνης αυξάνει και η πρωτεΐνη δεν μπορεί πλέον να διαχειριστεί την καλή λειτουργία των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Ο σχηματισμός των πρωτοϊνιδίων μπορεί να παρακινηθεί, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη, ενότητα από την μετάλλαξη A53T ή από την υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης. Αρχίζοντας με την δημιουργία πρωτοϊνιδίων γίνεται κατανοητό ότι τα μόρια που συμβάλουν στην γένεση οξειδωτικού στρες αναστέλλουν την μετατροπή των τοξικών ολιγομερών α-συνουκλεΐνης σε αδιάλυτα ινίδια⁵⁰.

Η παραγωγή των ROS αλλά και των οξειδωμένων μορφών ντοπαμίνης ή οι ελεύθερες ρίζες σιδήρου είναι ικανές να προκαλέσουν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μέσω αναστολής της αναπνευστικής αλυσίδας, καταστροφή του DNA αλλά και υπεροξειδωση των λιπιδίων της μεμβράνης και τελικά να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο^{36,52}. Η καταστροφή των λιπιδίων της μεμβράνης των ντοπαμινεργικών νευρώνων μπορεί να εμποδίσει την πρόσδεση τη α-συνουκλεΐνης προκαλώντας την συνάθροιση της στο κυτταρόπλασμα αλλά και την συγκέντρωσή της στα σωματία Lewy⁵⁵(εικόνα 13,β). Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η οξειδωτική καταστροφή των κυττάρων μπορεί να αυξήσει την πρόσδεση της α-συνουκλεΐνης στις λιπιδιακές μεμβράνες και να οδηγήσει σε προβλήματα τοξικότητας⁵⁶(εικόνα 13,α).

Συμπερασματικά λοιπόν υπάρχει μια κυκλική σχέση μεταξύ ROS και α-συνουκλεΐνης. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης μπορεί να οδηγήσουν στην παραγωγή βλαβερών ολιγομερών ή και συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης. Αυτά με την σειρά τους προκαλούν αλλαγές στην δραστηριότητα του ενζύμου TH, του μεταφορέα DAT και των συναπτικών κυστιδίων VMAT-2 με αποτέλεσμα την αύξηση της ντοπαμίνης στο κυτταρόπλασμα του νευρώνα και την παραγωγή βλαβερών μορίων. Με την σειρά τους τα

βλαβερά παράγωγα μπορεί να οδηγήσουν σε μεγαλύτερη καταστροφή της α-συνουκλείνης και περαιτέρω συνάθροιση (εικόνες 8, 13).



Εικόνα 13. Η ανάμειξη των ROS και η σχέση της με την α-συνουκλείνη στην ασθένεια του Πάρκινσον.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας είναι η κλωνοποίηση και έκφραση του γονιδίου *asyn120aaA53T*, που κωδικοποιεί για την μεταλλαγμένη και με έλλειψη του C-τελικού άκρου α -συνουκλεΐνη, στα ανθρώπινα νευροβλαστικά κύτταρα SH-SY5Y. Απώτερος στόχος είναι ανίχνευση της συμπεριφοράς της συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε μια κυτταρική σειρά που αν και δεν αποτελεί το ιδανικότερο μοντέλο, τον ίδιο τον άνθρωπο, είναι ικανή να προσεγγίσει την πραγματικότητα.

Πολλά παρόμοια πειράματα ή ακόμη και πειράματα σε ζωϊκά μοντέλα (ποντίκια, μύγες, αραουραίους) έχουν πραγματοποιηθεί τόσο με την α -συνουκλεΐνη να φέρει την συγκεκριμένη μετάλλαξη A53T όσο και με την έλλειψη των συγκεκριμένων 20 αμινοξέων⁵⁹. Σε αυτά έχει παρατηρηθεί μια αυξανόμενη τάση της πρωτεΐνης να συναθροίζεται σε συσσωματώματα ή να δημιουργεί τοξικά ολιγομερή όπως συμβαίνει σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο. Στη συγκεκριμένη εργασία επιθυμούμε να παρατηρήσουμε αν το ίδιο συμβαίνει όταν η α -συνουκλεΐνη φέρει και τις δυο τροποποιήσεις ταυτόχρονα ή αν τα κύτταρα γίνονται ακόμη πιο ευαίσθητα ή ακόμη αν τελικά η πρωτεΐνη είναι ικανή να εκφραστεί και δε συμβαίνει αποσταθεροποίηση και αποικοδόμηση της.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Αντιδραστήρια

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της εργασίας αυτής ανά κατηγορία και σύμφωνα με την εταιρία που προμηθεύτηκαν.

Πίνακας 2

KIT	Εταιρία
NucleoSpim® Plasmid (Plasmid Purification)	Machery-Nagel
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Library efficiency DH5a – Chemical competent cells	Invitrogen
Lipofectamine 2000 Reagent	-//-
Αντιβιοτικά	
Ampicillin sodium salt	Sigma
G 418	
Ένζυμα	
HindIII, NdeI, SacII, XbaI, NsiI	New England Biolads
Klenow	-//-
Antarctic Phosphatase	-//-
T4 DNA ligase	-//-
Taq DNA polymerase	-//-
primers	
a-syn Reverse	MWG Biotech AG
a-syn Forward	-//-
T7, Sp6	New England Biolads
medium	
Tryptone	Fulca
Yeast extract	-//-
NaCl	AppliChem
agar	-//-
RPMI 1640	Sigma

gels	
agarose	BioRad
SDS	Sigma
APS, TEMED	Promega
Άλλα αντιδραστήρια	
Thermopol buffer, buffers 2,4, T4 ligation buffer	New England Biolads

* Οποιοδήποτε υλικό-αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε και δεν αναγράφεται στον πίνακα είναι της εταιρίας New England Biolads.

3.1.2 Χρησιμοποιούμενα Μηχανήματα

Πίνακας 3

<i>PCR μηχανήμα στεγνωτήρας υλικών μηχάνημα ανάδευσης-επώαση φυγόκεντροι</i>	<i>PTC-200 Peltier Thermal Cycler Medecenter Einrichtungen GmbH-MMM Thermo Forma-orbital Shaker-Hepafilters Biofuge stratos- Heraeus Biofuge fresco-Heraeus</i>
--	---

3.1.3 Κύτταρα

DH5a: Τα κύτταρα DH5a είναι στέλεχος του *E. coli* που δεν έχουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Είναι ιδανικά για μετασχηματισμό με πλασμιδιακούς και κοσμιδιακούς φορείς.

SH-SY5Y: Πρόκειται για ανθρώπινα νευροβλαστικά κύτταρα που έχουν την ικανότητα προσκόλλησης στις επιφάνειες τριβλίων μέσω extra cellular matrix.

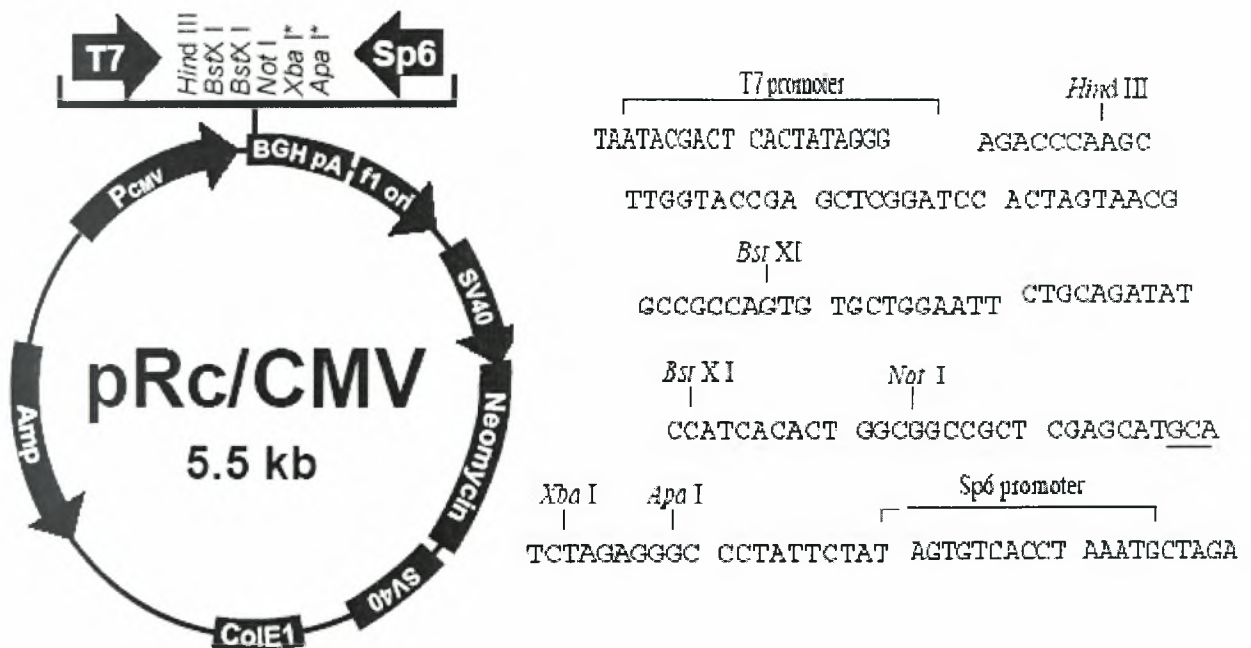
3.1.4 Ο Φορέας

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή είναι ο **pRc/CMV** (5.5 kb) της εταιρίας **Invitrogen**. Ο προαγωγέας του **P_{CMV}** (*immediate Cytomegalovirus virus promoter*) του δίνει την δυνατότητα υψηλών επιπέδων έκφρασης σε ευρεία κλίμακα ευκαρυωτικών κυττάρων. Είναι επομένως ένα σημαντικό εργαλείο για την μελέτη πρωτεϊνικής έκφρασης. Φέρει γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (*αμπικιλίνη, νεομικίνη*) για την επιλογή του τόσο σε προκαρυωτικά όσο και σε ευκαρυωτικά κύτταρα, καθώς και

αρχή έναρξης της αντιγραφής και για τους δυο τύπους κυττάρων (*f1 ori*, *colE1*). Περιλαμβάνει μια περιοχή που καλείται **BGH pA** (*Bovine Growth Hormone polyAAA*) και χρησιμεύει ως σήμα πολυαδενυλίωσης, αναγκαίο για την ωρίμανση του mRNA των ευκαρυωτικών κυττάρων. Τέλος περιλαμβάνει την αλληλουχία του **πολυσυνδέτη** (*polylinker site*) που φέρει θέσεις κοπής για περιοριστικά ένζυμα και περιβάλλεται τους προαγωγείς T7 και Sp6, οι οποίοι χρησιμεύουν τόσο σε PCR (*Polymerase Chain Reaction*) αντιδράσεις όσο και σε διαδικασίες μετασχηματισμού. Τα βασικότερα χαρακτηριστικά του παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4

Χαρακτηριστικό στοιχείο	Αριθμός Βάσεων	Χαρακτηριστικό στοιχείο	Αριθμός Βάσεων
CMV promoter	206-864	F1 ori	1306-1828
T7 promoter	865-883	SV40 promoter	1890-2215
polylinker	890-995	SV40 ori	2084-2169
Sp6	1008-1017	Neo	2251-3045
BGH pA	1019-1250	SV40 polyA	3219-3348
COLE1	3728-4400	Amp Resistance	5406-4546



Εικόνα 14. Απεικόνιση του pRc/cmv της Initrogen (αριστερά) και της περιοχής του πολυσυνδέτη (δεξιά).

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Παρασκευή απαραίτητων υλικών

Αμπικιλίνη*(ampicillin): Για την παρασκευή 100mg/ml αμπικιλίνης μετρήθηκαν 15ml H₂O (πολύ υψηλής καθαρότητας) και προστέθηκαν 15gr **Ampicillin sodium salt** (sigma). Ακολούθησε ανάδευση, vortex, με προσοχή ώστε να αποφευχθεί ο αφρισμός έως ότου διαλυθεί. Με την βοήθεια σύριγγας και απορροφητικού εμβόλου έγινε η διήθηση της σε αποστειρωμένο falcon. Αποθήκευση στους -4°C .

LB Broth**: Για την παρασκευή 1lt υγρού θρεπτικού μέσου για τις ανάγκες του εργαστηρίου χρησιμοποιήθηκαν: **10gr tryptone, 5gr yeast extract, 5gr NaCl, 1ml NaOH (1N)**, προσθήκη H₂O μέχρι τελικό όγκο και ρύθμιση pH =7.0-7.2. Ακολούθησε αποστείρωση σε κλίβανο και έπειτα αποθήκευση του στους -4°C. Για την δημιουργία στερεού υποστρώματος χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια συστατικά και προστέθηκαν επιπλέον **15gr άγαρ (agar)**. Αποστειρώθηκε και χρησιμοποιήθηκε για το στρώσιμο τριβλίων. **Κάθε τριβλίο περιέχει 25ml LB και 25μl amp.**

Δεκτικά κύτταρα (competent cells)***: Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CaCl₂ για την δημιουργία των **DH5a E.coli** σε παροδικά διαπερατά για τις ανάγκες του μετασχηματισμού. Αρχικά, ενοφθαλμίζονται κύτταρα DH5a σε 5ml υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth**. Έγινε έπειτα επώαση των κυττάρων για την ανάπτυξη της καλλιέργειας, με συνεχόμενη ανάδευση, για 12-14h στους 37°C. Στην συνέχεια, γίνεται ανανέωση του θρεπτικού μέσου (1ml αρχικής καλλιέργειας σε 100ml LB) και ακολουθεί επώαση στις ίδιες συνθήκες μέχρι να φτάσουν τα κύτταρα στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Για το λόγο αυτό ελέγχεται ανά διαστήματα, με φωτομέτρηση στα 600nm η απορρόφηση που πρέπει να κυμαίνεται σε OD₆₀₀=0,4-0,6. Όταν η απορρόφηση φτάσει στα επιθυμητά επίπεδα γίνεται ανάρρωση της καλλιέργειας για 10min στον πάγο και ακολουθεί φυγόκεντρωση 4000rpm για 6min στους -4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα 100ml MgCl₂ (0,1M). Έπειτα γίνεται επώαση για 20min στον πάγο και φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες με τις προηγούμενες. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100ml CaCl₂ (0,1M). Επιάζουμε για 1h στον πάγο. Αν τα κύτταρα δεν χρησιμοποιηθούν κατευθείαν για μετασχηματισμό προσθέτουμε γρήγορα αποστειρωμένη γλυκερόλη 80% σε τελική

συγκέντρωση 15%. Ψύχουμε τα κύτταρα σε άζωτο, και τελικά τα αποθηκεύουμε στους -80°C.

3.2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα (*mini preperation*)

Ο φορέας pCMV υπήρχε ήδη αποθηκευμένος στους -80 σε glycerol stock, δηλαδή μέσα σε DH5a κύτταρα. Έτσι μια μικρή ποσότητα αυτού επιστρώθηκε κατευθείαν σε τριλβία LB,amp και επώαστηκε για 16h. Την επόμενη μέρα, μερικές από τις αποικίες των μετασηματισμένων κυττάρων ενοφθαλμίζονται ξεχωριστά σε υγρό LB** που περιέχει αμπικιλίνη*(100mg/ml), για κάθε αποικία 10ml LB+10μl amp. Η ανάπτυξη των καλλιιεργειών γίνεται στους 37°C για 12-16h υπό ανάδευση (210rpm).

Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin® Plasmid kit της εταιρίας Macherey-Nagel. Το kit περιλαμβάνει: buffers A1, A2, A3, A4, AW, AE, RNaseA (lyophilized), NucleoSpin columns, NucleoSpin tubes (2ml), protocol. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Συγκέντρωση βακτηριακών κυττάρων

Φυγοκεντρούμε στις 4000rpm 5ml της καλλιέργειας των κυττάρων για 10min και αποχύνουμε το υπερκείμενο.

2. Λύση Κυττάρων

Προσθέτουμε 250μl buffer A1(+RNaseA) για την επαναδιάλυση του ιζήματος και αναδεύουμε ήπια 6-8 φορές. Ακολουθεί η προσθήκη 250μl buffer A2 (SDS/alkaline), για την θραύση του κυτταρικού τοιχώματος των κυττάρων και την απελευθέρωση του πλασμιδιακού DNA, 6-8 φορές ήπια ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για όχι περισσότερο από 5min. Προστίθενται 300μl buffer A3(neutralization) για την ουδετεροποίηση του διαλύματος και την καλύτερη πρόσδεση του DNA στην μεμβράνη.

3. Κλασματοποίηση

Γίνεται φυγοκέντρωση του δείγματος για 10min στις 11,000xg. Εδώ επιτυγχάνεται διαχωρισμός συστατικών όπου τα κυτταρικά υπολείμματα δημιουργούν ίζημα το οποίο απορρίπτεται.

4. Δέσμευση DNA

Το υπερκείμενο φορτώνεται σε μία στήλη, NucleoSpin columns, τοποθετημένη μέσα σε ένα σωλήνα, NucleoSpin tubes, και φυγοκεντρείται για 1-2min στις 11,000xg. Το έκλουσμα (υπολείμματα από buffer) απομακρύνεται.

5. Πλύσιμο μεμβράνης

Προστίθενται 500μl buffer AW, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 50°C, για την απομάκρυνση νουκλεασών. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 1-2min στις 11,000xg, το έκλουσμα απομακρύνεται. Τέλος προσθέτουμε 600μl A4 (ethanol buffer), για την απομάκρυνση υπολειμμάτων άλατος, μεταβολιτών, διαλυμένων μακρομοριακών στοιχείων. Φυγοκεντρώμε και πάλι για 1-2min στις 11,000xg.

6. Ξήρανση μεμβράνης

Φυγοκέντριση για 1-2min στις 11,000xg.

7. Έκλουση DNA

Τοποθετώ τη μεμβράνη σε καινούργιο σωλήνα. Προσθέτω από το AE (5mM Tris-Cl, pH8.5) 25μl και επωάζω σε θερμοκρασία δωματίου για 5min, έπειτα φυγοκεντρώ για 1min στις 11,000xg. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται για ακόμη μια φορά ώστε το DNA να βρίσκεται σε τελικό όγκο 50μl.

3.2.3 Πέψη *Pcmv* με το ένζυμο περιορισμού *HindIII*

Η πέψη του πλασμιδίου μας με το ένζυμο *HindIII* (New England Biolabs) μας επιτρέπει να προετοιμάσουμε τον φορέα για σύνδεση με επιθυμητό γονίδιο. Τα ένζυμα περιορισμού υδρολύουν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς σε ένα συγκεκριμένο σημείο της αλληλουχίας που αναγνωρίζουν. Το συγκεκριμένο ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε αναγνωρίζει στο *pCMV* ως θέση κοπής την 891 και αφήνει κολλώδη άκρα (*sticky ends*). Τα χαρακτηριστικά του παρατίθενται στον πίνακα αριστερά ενώ η αντίδραση που πραγματοποιήθηκε στον πίνακα δεξιά. Η πέψη έγινε στους 37°C για 3h.

Πίνακας 5

Χαρακτηριστικά	
Θέσεις κοπής	1 (891)
Τόπος εύρεσης	πολυσυνδέτης
Αλληλουχία αναγνώρισης	5'...A AGCTT ...3' 3'...TTCGA A ...5'
Θ ^ο ενεργοπ./ απενεργοπ.	37°C / 65°C
Buffer 2	100%

Αντιδραστήριο	Όγκος σε μl
Πλασμδιακό DNA	10
Buffer 2 (10x)	2
BSA	-
<i>HindIII</i>	1
H ₂ O	7
Τελικός όγκος	20

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ I (*PCMV CLEAN*)

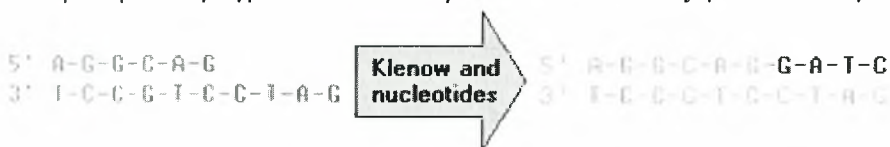
Για τον καθαρισμό του πλασμιδίου από τα διάφορα αντιδραστήρια αλλά και το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε το kit *QIAquick PCR Purification* της Qiagen, το οποίο

περιλαμβάνει QIAquick Spin Columns, Buffer PB, Buffer PE, Buffer EB, Collection Tubes (2 ml). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Αρχικά, σε ένα καθαρό σωλήνα προσθέσαμε τα 20μl της αντίδρασης πέψης και 100μl από το buffer PB (*guanidine hydrochloride and isopropanol*) ώστε να βρίσκονται σε αναλογία 1:5.
2. Το διάλυμα φορτώθηκε σε μισή στήλη QIAquick Spin Columns, πλαισιωμένη σε ένα σωλήνα Collection Tubes. Ακολούθησε φυγοκέντριση για 1min στις 13,000xg.
3. Απορρίψαμε το έκλουσμα και περάσαμε από την στήλη 750μl buffer PE. Φυγοκέντρισαμε για 1min στις 13,000xg.
4. Το έκλουσμα απορρίφθηκε και πάλι. Στη συνέχεια έγινε η ξήρανση της μεμβράνης με φυγοκέντριση για 1min στις 13,000xg.
5. Τέλος αφού τοποθετήσαμε την στήλη σε ένα καινούργιο σωλήνα προσθέσαμε 50μl buffer EB για να γίνει η έκλυση του καθαρού DNA. Επώασαμε για 2min και φυγοκέντρισαμε για 1min στις 13,000xg

3.2.4 Αντίδραση Klenow

Η προηγούμενη αντίδραση με το περιοριστικό ένζυμο HindIII άφησε στον Pcmv κολλώδη άκρα (5'overhands). Το ένζυμο **Klenow** ή Large fragment of DNA E.coli DNA polymerase I έχει την ικανότητα να δημιουργεί τυφλά άκρα συμπληρώνοντας τα κενά που έχει αφήσει το ένζυμο (*filling in recessed 3' ends of DNA fragments*). Παρακάτω φαίνεται η αντίδραση που πραγματοποιείται παρουσία Klenow ενζύμου και ολιγονουκλεοτιδίων.



Εικόνα 15. Διαδικασία επέκτασης αλληλουχίας DNA με την βοήθεια της Klenow polymerase.

Εδώ είναι σημαντικό να αναφέρουμε γιατί επιθυμούμε να πραγματοποιήσουμε αντίδραση Klenow. Το γονίδιο που επιθυμούμε να ανασυνδιάσουμε με το πλασμιδιακό φορέα Pcmv έχει δοθεί ως PCR product από αντίδραση που αφήνει τυφλά άκρα. Το γονίδιο αυτό καλείται **a-syn120A53T** και πρόκειται για το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης που φέρει ένα έλλειμμα 20 αμινοξέων στο καρβοξυλικό του άκρο και μια μετάλλαξη στην θέση 53 με αποτέλεσμα το αμινοξύ αλανίνη (Ala) να μετατρέπεται σε θρεονίνη (Thr). Το γονίδιο αυτό βρισκόταν αρχικά με ολόκληρη την αλληλουχία του, 140 αμινοξέα αλλά φέροντας την

μετάλλαξη A53T, στον πλασμιδιακό φορέα **ptre asyn140aaA53T**. Η a-syn120A53T προήλθε από PCR αντίδραση που πραγματοποιήθηκε από την Ιωάννα Παπαπαναγιώτου, μεταδιδακτορική φοιτήτρια του εργαστηρίου.

Επιστρέφοντας, η αντίδραση Klenow που πραγματοποιήθηκε περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήριο	Όγκος σε μl
πλασμίδιο	15
dNTPs	2
Buffer 2	2
klenow	1

Έπεται επώαση για 20min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια για να σταματήσουμε την αντίδραση προσθέτουμε 5 μl EDTA (10mM) και επωάζουμε για 20 min στους 65o C. Τελική αντίδραση 25 μl .

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ 2 (PCMV-KLENOW CLEAN)

Για τον καθαρισμό του πλασμιδίου από τα διάφορα αντιδραστήρια αλλά και το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε το kit QIAquick PCR Purification της Qiagen. Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε πιο πάνω για τον καθαρισμό του πλασμιδίου 1, με την μόνη διαφορά ότι προσθέσαμε 125 μl buffer PB σε 25 μl αντίδρασης.

3.2.5 Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης του Pcmv

Η αποφωσφορυλίωση (dephosphorylation) του πλασμιδίου έγινε με σκοπό να εμποδίσει την επανακυκλοποίηση του στην αντίδραση σύνδεσης με το επιθυμητό γονίδιο που θα ακολουθήσει. Αποτελεί λοιπόν μια διαδικασία ελαχιστοποίησης των περιπτώσεων να μην εισέλθει το γονίδιο φορέα επειδή έκλεισε μόνος του. Το ένζυμο που χρησιμοποιήσαμε για την αντίδραση αυτή είναι η **Antarctic Phosphatase** της εταιρίας New England Biolabs, που έχει την ικανότητα να καταλύει την απομάκρυνση 5'φωσφατασών τόσο του DNA όσο και του RNA. Για το ένζυμο αυτό χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα **Antarctic Phosphatase Buffer 10X** (1X: 50mM Bis-Tris-Propane-HCl, 1mM MgCl₂, 0,1mM ZnCl₂).

Η αντίδραση αποφωσφορυλίωσης που πραγματοποιήθηκε περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήριο	Όγκος σε μl
πλασμίδιο	30
Buffer	4
Antarctic Phosphatase	2
Τελικός όγκος	36

Έπεται επώαση για 20min σε θερμοκρασία 37°C. Στην συνέχεια για να σταματήσουμε την αντίδραση επωάζουμε για 5 min στους 65o C. Τελική αντίδραση 36μl.

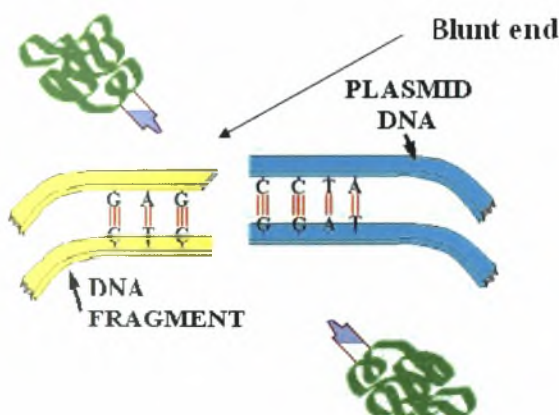
ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ 3

(PCMV-KLENOW-DEPHOSPHORELATED CLEAN)

Για τον καθαρισμό του πλασμιδίου από τα διάφορα αντιδραστήρια αλλά και το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε το kit QIAquick PCR Purification της Qiagen. Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε πιο πάνω για τον καθαρισμό του πλασμιδίου 1, με την μόνη διαφορά ότι προσθέσαμε 180μl buffer PB σε 36μl αντίδρασης.

3.2.6 Σύνδεση *asyn120aaA53T* γονιδίου με *Pcmv* (ligation)

Η διαδικασία περιλαμβάνει την ένωση των τμημάτων του πλασμιδιακού φορέα pCMV και του PCR προϊόντος a-syn. Η ύπαρξη τυφλών άκρων δυσκολεύει την διαδικασία τόσο στην είσοδο του γονιδίου όσο και στην τοποθέτηση του με την σωστή κατεύθυνση. Η αποφωσφοριλίωση βέβαια που προηγήθηκε αποτρέπει την επανακυκλοποίησή του. Η είσοδος του γονιδίου είναι τυχαία. Η χρησιμοποίηση του ενζύμου **T4 DNA ligase** της (New Engkand Biolabs) είναι κατάλληλη για αυτήν την αντίδραση και δουλεύει καλύτερα στο ρυθμιστικό διάλυμα **T4 DNA ligase buffer** (1X: 50mM Tris -HCl, 10mM MgCl₂, 1mM ATP, 10 m Dithiothreitol 25μg /ml BSA) .



Εικόνα 16. Διαδικασία σύνδεσης τυφλών άκρων με την βοήθεια της λιγάσης.

Είναι πολύ σημαντικό σε αυτού του είδους τις αντιδράσεις να χρησιμοποιηθούν τα κατάλληλα controls. Στην συγκεκριμένη εργασία ως controls χρησιμοποιήθηκαν: ο Pcmv (from stock), ο Pcmv κομμένος χωρίς προσθήκη λιγάσης και με προσθήκη και τέλος ο Pcmv κομμένος και αποφωσφοριλιωμένος με προσθήκη λιγάσης.

Για μια αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA με τελικό όγκο 20μl χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά στις εξής ποσότητες:

CONTROLS Κομμένος <i>pcmv</i> , κομμένος αποφωσφοριλιωμένος <i>pcmv</i>	Όγκος σε μl
Πλασμίδιο	5
T4 DNA ligase	2
T4 DNA ligase buffer	2
H ₂ O	11
Τελικός όγκος	20

Αντιδραστήριο	Όγκος σε μl
Πλασμίδιο / Γονίδιο	
1:1	5:5
1:3	2:6
3:1	6:2
T4 DNA ligase	2
T4 DNA ligase buffer	2
H ₂ O	
1:1	6
1:3	8
3:1	8
Τελικός όγκος	20

Pcmv (40ng/μl), *asyn120* (40ng/μl)

Όλα τα υλικά διατηρούνται στον πάγο κατά την διάρκεια της χρήσης τους. Το ένζυμο προστίθεται τελευταίο στο μίγμα. Η αντίδραση επωάζεται για 12-16h (overnight) στους 40C για την επίτευξη του μέγιστου αριθμού ανασυνδιασμένων πλασμιδίων. Η επ'ωαση 'εγινε στο PCR machine.

3.2.7 Μετασχηματισμός κυττάρων (*transformation*)

Για την είσοδο των ανασυνδιασμένων πλέον πλασμιδίων σε επιδεκτικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το kit της invitrogen Library efficiency DH5a (EcoRI)-Chemical competent cells.

Προσθέτονται 1μl από το DNA (ανασυνδιασμένο πλασμίδιο) σε 20μl κύτταρα για τα controls ενώ σε 60μl κυττάρων για τα δείγματα και τα επωάζονται στον πάγο για 30min. Ακολουθεί heatshock στους 42°C για 45sec και επώαση στον πάγο για 2 λεπτά. . Κατόπιν, προστίθενται σε κάθε καλλιέργεια 200μl **SOC medium** (20gr Tryptone, 5gr Εκχύλισμα ζύμης, 0.5gr NaCl 1M, 10ml KCl 250ml, 10ml MgCl₂ 1M, 20ml γλυκόζη 1M) και επωάζονται για 60min στους 37oC υπό ανάδευση (190rpm) για να αρχίσουν να αναρρώνουν και να εκφράσουν τον δείκτη αντίστασης στο αντιβιοτικό που κωδικοποιείται από το πλασμίδιο. Στην συνέχεια ολόκληρη η ποσότητα επιστρώνεται σε τριβλία Petri που περιέχουν 25μl LB και 25μl amp (100 mg/ml).

Την επόμενη μέρα, μερικές από τις αποικίες των μετασχηματισμένων κυττάρων ενοφθαλμίζονται ξεχωριστά σε υγρό LB** που περιέχει αμπικιλίνη*(100mg/ml), για κάθε αποικία 10ml LB+10μl amp. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών γίνεται στους 37°C για 12-16h

υπό ανάδευση (210rpm). Για την απομόνωση του ανασυνδιασμένου πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα χρησιμοποιήθηκε το **NucleoSpin® Plasmid kit** της εταιρίας Macherey-Nagel με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω.

3.2.8 Πέψεις με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *XbaI* και *NdeI*

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε με σκοπό την εύρεση του γονιδίου στο ανασυνδιασμένο πλασμιδιακό φορέα. Τα ένζυμα που επιλεχθήκαν φέρουν μοναδικές θέσεις κοπής σε σημεία που μας επιτρέπουν να διακρίνουμε αν υπάρχει το επιθυμητό γονίδιο ή όχι. Το *NdeI* βρίσκεται στην μέση περίπου που προαγωγέα *rpmV* και το *XbaI* στο τέλος του πολυσυνδέτη. Περισσότερες πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά τους παρατείνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6

Χαρακτηριστικά	<i>NdeI</i>	<i>XbaI</i>
Θέσεις κοπής	1 (485)	1 (985)
Τόπος εύρεσης	Μέση Προαγωγέα	Τέλος πολυσυνδέτη
Αλληλουχία αναγνώρισης	5'...CA TATG...3' 3'...GTAT AC...5'	5'...T CTAGA...3' 3'...AGATC T...5'
Θ ⁰ ενεργοπ./ απενεργοπ.	37°C / 65°C	37°C / 65°C
Buffer 2	100%	100%
Απαιτήσεις	-	BSA

Η αντίδραση που τελέστηκε:

Αντιδραστήριο	Όγκος σε μl
Πλασμιδιακό DNA	5
Buffer 2 (10x)	1
BSA	1
<i>XbaI</i> και <i>NdeI</i>	1+1
H ₂ O	1
Τελικός όγκος	10

Ακολούθησε ένας επιπλέον μετασχηματισμός με κύτταρα DH5a και ανασυνδιασμένο πλασμίδιο μόνο από το δείγμα 3:1 του ligation γιατί αυτό έδωσε μόνο θετικό σήμα για την ύπαρξη του γονιδίου. Η διαδικασία μετασχηματισμού που ακολουθήθηκε ήταν παρόμοια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω μόνο που χρησιμοποιήθηκαν 150μl κυττάρων, 10μl πλασμιδίου και 100μl LB medium. Η απόδοση αναμένεται να είναι μικρότερη αλλά η διαδικασία ήταν απαραίτητη ώστε να πραγματοποιηθεί το επόμενο στάδιο (*PCR αντίδραση*).

3.2.9 Ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης

Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να διαχωριστούν μόρια DNA με κριτήριο το μοριακό τους βάρος. Τα δείγματα DNA τοποθετούνται σε μια χαραγή που έχει δημιουργηθεί στο ένα άκρο μιας πλάκας από πήκτωμα αγαρόζης(gel) και καλύπτονται από ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Με την τοποθέτηση ηλεκτροδίων στα άκρα της πλάκας εξασφαλίζεται η εφαρμογή τάσης μεταξύ τους. Η τάση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση των διαφόρων θραυσμάτων DNA προς το θετικό πόλο. Επειδή όμως η ταχύτητα μετακίνησης ενός θραύσματος εξαρτάται από το μέγεθός του (τα μεγάλα θραύσματα κινούνται αργότερα από τα μικρά) σε μια δεδομένη χρονική στιγμή τα μικρότερα θραύσματα «προπορεύονται» έναντι των μεγαλύτερων κατά την κίνησή τους προς το θετικό πόλο, με αποτέλεσμα να μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν **gel αγαρόζης 1% αλλά και 1,5%** (1gr αγαρόζης ή 1,5gr, 100ml TAE(1x), 10μl βρωμιούχο αιθίδιο-*EtBr*) και το ρυθμιστικό διάλυμα **TAE(1x)**. Το ρυθμιστικό διάλυμα TAE(1x) προκύπτει από την αραιώση του ρυθμιστικού διαλύματος TAE (50x) με απεσταγμένο νερό. Στα δείγματα προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα **loading buffer 6X** (0,09% *Bromophenol Blue*, 0,09% *Xylene Cyanol*, 60% *Γλυκερόλη*, 60mM *EDTA*) πριν ηλεκτροφορηθούν.

Η τάση που εφαρμόζεται είναι 120V και μετά από κάποιο χρονικό διάστημα είναι δυνατή η ανίχνευση του DNA με τη μορφή ζωνών κάτω από το υπεριώδες φως εξαιτίας της ενσωμάτωσης των μορίων του βρωμιούχου αιθιδίου στις διπλές έλικες του DNA. Η σύγκριση μάλιστα της απόστασης που διένυσαν τα νουκλεϊκά οξέα του δείγματος μας, με την απόσταση που διανύουν μάρτυρες (*1kb Gene Ruler DNA ladder, New England Biolabs*) γνωστού μοριακού βάρους, πληροφορεί για το μέγεθος των πρώτων (παράρτημα 2).

3.2.10 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μέθοδος αυτή έγινε με σκοπό να ανιχνεύσουμε όχι μόνο την ύπαρξη του γονιδίου μας αλλά και την κατεύθυνση στην οποία βρίσκεται. Το δείγμα (Pcmv -asyn) οι αποικίες που είχε δώσει ο προηγούμενος μετασχηματισμός (*colonies PCR*) οι οποίες αριθμηθήκαν και λήφθηκε η μίση αποικία για την αντίδραση. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση χρειάζονται τα εξής συστατικά: DNA πολυμεράση, εκκινήτες (sense, antisense), γενωμικό DNA, dNTPs, MgCl₂ και ρυθμιστικό διάλυμα για την πολυμεράση. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν οι **T7, Sp6, a-synReverse primers** και η **Taq πολυμεράση** μαζί με το

ThermoPol buffer. Οι T7, Sp6 primers καλούνται universal primers και ανήκουν στους transcription promoter primers γιατί προσδένονται στον αντίστοιχο προαγωγέα οποιουδήποτε φορέα. Ο a-syn120R είναι ειδικός και προσδένεται στο αντίστοιχο γονίδιο.

Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν και τρία controls: pcmv με T7 + Sp6, pcmv με T7 + a-syn120R και pcmv + insert με T7 + Sp6.

Πίνακας 7. Αλληλουχία εκκινήτων. Με κόκκινο φαίνεται η θέση περιορισμού του ενζύμου NsiI.

T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
SP6	5' ATTTAGGTGACACTATAGAA 3'
a-syn120Reverse	5' AACTGCAGAACCAATGCATTGAAGGATCCACAGGCA 3'

Οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Δείγματα δεξιά, controls αριστερά.

Αντιδραστήριο	Όγκος σε μl
Thermol buffer 10X	2
T7 primer (0,1g/μl)	0.5
Sp6 primer (100ng/μl)	0.5
dNTPs (20Mm)	1.5
H ₂ O	14.5
Προσθήκη αποικίας	
Taq polymerase	1
Τελικός όγκος	20

Αντιδραστήριο	Όγκος σε μl
plasmid	2
Thermol buffer 10X	2
T7 primer (0,1g/μl)	1
Sp6 primer or a-synR	1
dNTPs (20Mm)	1
H ₂ O	12
Taq polymerase	1
Τελικός όγκος	20

Η συσκευή της PCR, PTC-200 Peltier Thermal Cycler, ρυθμίστηκε στις εξής συνθήκες: Ο πρώτος κύκλος της αντίδρασης ξεκινάει με ένα στάδιο μετουσίωσης στους 94°C για 2min που δεν επαναλαμβάνεται στους επόμενους κύκλους. Ακολούθησε η αποδιάταξη του DNA στους 94°C για 15min. Στην συνέχεια έχουμε επαναδιάταξη του DNA στους 55°C για 30sec και έπειτα την επέκταση του μορίου στους 68°C για 1min. Τα βήματα 2-4 επαναλαμβάνονται για 26 κύκλους. Στον τελευταίο κύκλο της αντίδρασης υπάρχει ένα επιπλέον βήμα όπου η Taq πολυμεράση τοποθετεί πολύ-A ουρές στο 3' άκρο από τα μόρια DNA στους 72 °C για 10 min

3.2.11 Επιβεβαίωση έρευνας γονιδίου

α) επιβεβαίωση με PCR

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι primers T7, Sp6, a-synR και a-synForward. Ο primer αυτός είναι ειδικός για το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης και προσδένεται στην αρχή του. Ο παρακάτω πίνακας δείχνει την αλληλουχία όλων των εκκινητών.

Πίνακας 8. . Αλληλουχία εκκινητών. Με κόκκινο φαίνεται η θέση περιορισμού του ενζύμου NsiI για τον a-synR (Tm 67.5° C) και του SacII για τον a-synF (Tm 64,6° C).

T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
SP6	5' ATTTAGGTGACACTATAGAA 3'
a-syn120Reverse	5' AACTGCAGAACCAATGCATTGAAGGATCCACAGGCA 3'
a-syn120Forward	5' CCCCCGCGGATGGATGTATTTCATGAAAGGACTTTC 3'

Οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν:

Αντιδραστήριο	Όγκος σε μl	Αντιδραστήριο	Όγκος σε μl
plasmid	2	plasmid	2
Thermol buffer 10X	2	Thermol buffer 10X	2
T7 primer (0,1g/μl)	1	Sp6 primer (100ng/μl)	1
a-synR	1	a-synF	1
dNTPs (20Mm)	1	dNTPs (20Mm)	1
H ₂ O	12	H ₂ O	12
Taq polymerase	1	Taq polymerase	1
Τελικός όγκος	20	Τελικός όγκος	20

Οι συνθήκες επώασης είναι οι ίδιες με την προηγούμενη PCR.

β) επιβεβαίωση με πέψεις

Η πέψη με ένζυμα περιορισμού του πλασμιδιακού DNA μας επιτρέπει να ελέγξουμε αν το υπάρχει το επιθυμητό ένθεμα στο φορέα μας και στην συνέχεια να το χρησιμοποιήσουμε. Τα ένζυμα περιορισμού υδρολύουν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς σε ένα συγκεκριμένο σημείο της αλληλουχίας που αναγνωρίζουν. Για την πέψη του ανασυνδιασμένου φορέα χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού NdeI (πίνακας 6), SacII (New England Biolabs) και XbaI (πίνακας 6) καθώς αναγνωρίζουν τις αλληλουχίες στο 5' και στο 3' άκρο του ενθέματος που οφείλονται στους εκκινητές. Οι ακολουθίες που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα φαίνονται παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9

Χαρακτηριστικά	SacII
Θέσεις κοπής	Αρχή γονιδίου
Τόπος εύρεσης	5'...CCGC GG ...3'
Αλληλουχία αναγνώρισης	3'... GG CGCC...5'
Θ° ενεργοπ./ απενεργοπ.	37°C / 65°C
Buffer 2	75%
Απαιτήσεις	-

Αντιδραστήριο	Όγκος σε µl
Πλασμιδιακό DNA	5
Buffer 2 (10x)	1
BSA	1
I) XbaI + NdeI	1+1
II) XbaI + SacII	1+1
H ₂ O	1
Τελικός όγκος	10

Το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer 2 παρέχει τις συνθήκες στις οποίες και τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν όσο το δυνατόν μεγαλύτερη δραστηριότητα. Η αντίδραση επωάζεται στους 37°C για 3h.

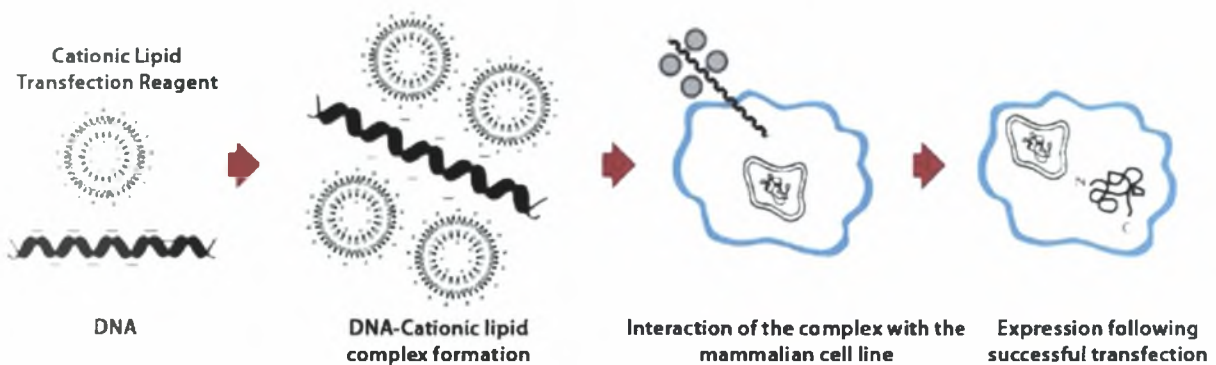
3.2.12 Καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων

Η καλλιέργεια των **SH5Y5Y κυττάρων** γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή μιας και η ευαισθησία τους είναι μεγάλη. Αρχικά γίνεται η προετοιμασία του θρεπτικού υλικού που θα χρησιμοποιηθεί. Όλες οι διαδικασίες γίνονται μέσα σε θάλαμο (*Biological safety cabinets, Helanco class II*) ώστε να τηρούνται συνθήκες αποστείρωσης. Για την δημιουργία 200ml θρεπτικού **RPMI⁺** χρησιμοποιώ 20ml *FBS (Gibso)*, 2ml *L-glutamin (200mM)*, 2ml *PEN-STREP (1%)*, 2ml *G418 (stock 50mg/ml)* αντιβιοτικό και τέλος συμπληρώνω μέχρι τελικό όγκο 200ml *RPMI 1640 (Sigma)* αφού έχει επωασθεί για 20min στους 37° C. Η διαδικασία ξεκινά με την συλλογή του παλιού θρεπτικού συστατικού, με την χρήση αναρροφητικής πιπέτας, από τριβλίου με ήδη επιστρωμένα κύτταρα. Ακολουθεί η προσθήκη 1ml **θρυψίνης** (*trypsin, EDTA, Sigma*) και έπειτα απομάκρυνση της, ώστε να προετοιμαστούν τα κύτταρα για τις συνθήκες που θα ακολουθήσουν, χωρίς όμως να ξεκολλήσουν τα κύτταρα που είναι προσκολλημένα στον πυθμένα του τριβλίου. Έπειτα προσθέτουμε 2ml θρυψίνης και κουνάμε το τριβλίο ώστε να βοηθήσουμε την πρωτεάση μας να ξεκολλήσει τα κύτταρα. Ελέγχουμε στο μικροσκόπιο αν έχουμε το επιθυμητό αποτέλεσμα και εν συνεχεία προσθέτουμε 4ml **RPMI⁺** για να απενεργοποιήσουμε την θρυψίνη. Ακολουθεί έντονη ανάδευση με την χρήση της πιπέτας ώστε να διαλυθούν τα συσσωματώματα κυττάρων που μπορεί να έχουν δημιουργηθεί. Συλλέγω το δείγμα μου σε σωλήνα και το φυγοκεντρώ για 5 min στις 600rpm (*στροφές ανα λεπτό*). Κατά την διάρκεια της φυγοκέντρισης παίρνω δυο καθαρά τριβλία και τα προσθέτω σε αυτά 5ml **RPMI⁺**. Με το τέλος της φυγοκέντρισης

αφαιρώ το εναιώρημα και προσθέτω στον σωλήνα 10ml RPMI⁺ και αναδεύω με σκοπό να διαλυθεί το ίζημα. Τέλος ρίχνω 5ml από το διάλυμα σε κάθε τριβλίο ανα σταγόνα κάνοντας κυκλικές κινήσεις ώστε να αυξήσω τις πιθανότητες να μην έχουν συσσωρευτεί τα κύτταρα σε ένα σημείο. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε ειδικό επωαστικό θάλαμο, *Thermo steril CO₂ cycle 5%*. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται κάθε δυο μέρες με σκοπό να ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό των κυττάρων για την καλύτερη ανάπτυξη τους και να αποφεύγονται συνθήκες τοξικότητας. Υστέρα από περίπου μία βδομάδα έγινε η επιστροφή τους σε πηγαδάκια μικρότερης διαμέτρου των 2cm² όπου τελικά επιστρώθηκαν 0,250μl **SH5Y5Y** κυττάρων σε 0,250μl καθαρού RPMI που δεν περιέχει αντιβιοτικό και επώαστηκαν για δυο ημέρες.

3.2.13 Διαμόλυνση κυττάρων (transfection)

Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο **Lipofectamine™ 2000 reagent** της **Invitrogen**. Πρόκειται για ένα αντιδραστήριο με την δομή θετικά φορτισμένου λιποσώματος που έχει την δυνατότητα να αλληλεπιδρά με τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊκά οξέα για την δημιουργία συμπλέγματος (**transfection complex**) που εισέρχεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω ενδοκυττάρωσης. Από την στιγμή που το λιποσωμικό/DNA σύμπλεγμα εισέλθει θα πρέπει να εισχωρήσει στον πυρήνα για να επιτευχθεί η έκφραση των γονιδίων.



Εικόνα 17. Μηχανισμός διαμόλυνσης κυττάρων με την χρήση θετικά φορτισμένων λιπιδιακών μεμβρανών. *Invitrogen*

Στην συγκεκριμένη περίπτωση το ρόλο του λιποσώματος επιτελεί το αντιδραστήριο **Lipofectamine™ 2000** ενώ του DNA: τα πλασμίδια **pcm_v**, **pcm_{vasyn}**, **ptreasyn full length** και το **pAdAptGFP** (παράρτημα 1) που προστέθηκε σε καθένα από τα προηγούμενα τρία δείγματα. Το γονίδιο του GFP χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς σε τέτοιες τεχνικές,

βρισκόμενο κάτω από δικό του προαγωγέα, το οποίο κωδικοποιεί για την *green fluorescent protein* που προκαλεί τα κύτταρα που την εκφράζουν να εκπέμπουν πράσινο χρώμα κάτω από την έκθεση τους σε UV φως.

Ο σχεδιασμός του πειράματος γίνεται ανά well. Αρχικά προετοιμάζω το DNA αναμειγνύοντας 1μg DNA (δείγμα) + 0,1 μg GFP σε 50μl θρεπτικού μέσου χωρίς ορό, *Opti-MEM[®] 1 Reduced Serum Medium without serum*. Στην συνέχεια προετοιμάζουμε το αντιδραστήριο *LF2000* προσθέτοντας 1-3μl αυτού σε 50μl *optimem* και επωάζουμε για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Αναμειγνύουμε τα δυο αντιδραστήρια (*DNA mix*) που προετοιμάσαμε σε ίσες αναλογίες και επωάζουμε για 20min σε θερμοκρασία δωματίου. Στο μεταξύ ελέγχουμε τα κύτταρα που καλλιιεργήσαμε ώστε να είναι στο 90-95% σε περιεκτικότητα την μέρα της διαμόλυνσης. Αφαιρώ το θρεπτικό RPMI από τα τριβλία και προσθέτω σε κάθε ένα από τα **24well plates** (2cm²) 500μl RPMI + L-glutamine. Μετά τα 20 λεπτά επώασης του DNA mix προσθέτω σε κάθε well 100μl από αυτό και αναδεύω προσεκτικά. Τοποθετώ τα κύτταρα για επώαση στους 37°C και τα ελέγχω κάθε 24h και 48h με την βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού.

3.2.14 Λύση κυττάρων

Η λύση των κυττάρων γίνεται με σκοπό της απομόνωση των πρωτεϊνών. Η διαδικασία τελείται και αυτή μέσα σε θάλαμο όπως και η καλλιέργεια των κυττάρων. Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό RPMI με την χρήση πιπέττας Pasteur και αναρροφητικής αντλίας. Προσθέτουμε σε κάθε δείγμα 500μl PBS (1X) και έπειτα το αφαιρούμε. Ακολουθεί η προσθήκη 100μl lysis byffer (50mM Tris, 150mM NaCl, 2mM MgCl, 1% Triton X, pH 7,4). Με την βοήθεια ξύστρας (*cell scrapper*) επιτυγχάνεται η αποκόλληση των κυττάρων από τα πηγαδάκια. Γίνεται συλλογή του κάθε δείγματος σε καθαρά σωληνάκια και επώαση τους για 30min στον πάγο. Τέλος φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13,000rpm στους 4° C για 10min. Συλλέγουμε το εναιώρημα.

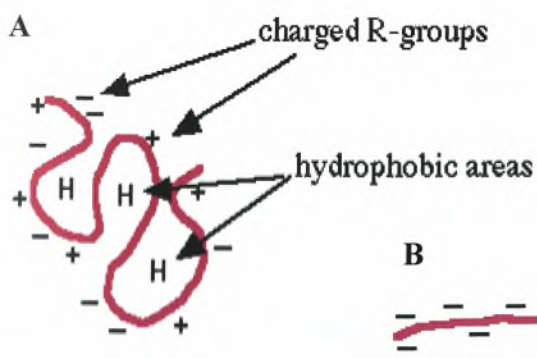
Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την μέτρηση της ποσότητας των πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωματίνης- πρωτεΐνης παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 595nm. Τα δείγματά μας **pcmv**, **asynpcmv** και **ptreasyn full length** για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης που περιέχουν προετοιμάστηκαν ως εξής: σε κάθε ένα αντίστοιχα καθαρό σωλήνα προστέθηκαν 1000μl Bradford (*Sigma-Aldrich*) και 5μl πρωτεΐνης. Επίσης

χρησιμοποιήθηκε ένα τυφλό δείγμα που περιείχε 200μl H₂O και 800μl Bradford για τον μηδενισμό του φωτόμετρου. Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5min πριν την φωτομετρήσή τους.

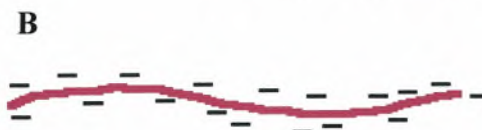
3.2.15 Διαχωρισμός των πρωτεϊνών – Western Blot

Ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες παρουσία SDS (*Sodium dodecyl sulfate*).

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου σχηματίζονται από το συμπολυμερισμό **ακρυλαμιδίου και bis ακρυλαμιδίου** (*Acrylamide mix = 29,2% acrylamide and N,N methylene bis- acrylamide*) Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται μέσω του μηχανισμού των ελευθέρων ριζών που παράγονται από το σύστημα **υπερθειϊκού αμμωνίου** (*APS=ammonium persulfate*) και **N,N,N',N' τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνης** (*TEMED=tetramethylethylenediamine*). Διακρίνονται δύο πηκτές, η **πηκτή επιστοιβάξης** (*stacking gel*) και η **πηκτή διαχωρισμού** (*separating gel*) που χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα σαν ένα ασυνεχές πήκτωμα. Η σύσταση, το pH και το μέγεθος των πόρων των δύο πηκτών είναι τέτοια, ώστε στην πηκτή επιστοιβάξης τα δείγματα να συμπυκνώνονται και στο τέλος οι πρωτεΐνες να συσσωρεύονται σε στενές ζώνες μεγάλης συγκέντρωσης. Στην πηκτή διαχωρισμού επιτελείται ο διαχωρισμός τους, λόγω διαφορετικής κινητικότητας κάθε πρωτεΐνης. Παρουσία SDS ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος. Το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό το οποίο δεσμεύεται πάνω στη ραχοκοκαλιά της πολυπεπτιδικής αλυσίδας με υδρόφοβους δεσμούς και έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση όλων των μη ομοιοπολικών δεσμών στο μόριο της πρωτεΐνης, την αποδιάταξή της και τη δημιουργία ενός επιμήκους συμπλόκου SDS πολυπεπτιδικής αλυσίδας με καθαρό αρνητικό φορτίο και περίπου σταθερό λόγο φορτίου ανά μονάδα μάζας πολυπεπτιδίου. Συνεπώς, το ολικό φορτίο του συμπλόκου εξαρτάται μόνο από το μέγεθος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και η ηλεκτροφορητική κινητικότητά του στην πηκτή αποκλειστικά από το μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου.



Εικόνα 18. α) Δομή πρωτεΐνης απουσία SDS, β) παρουσία SDS. Wikipedia common

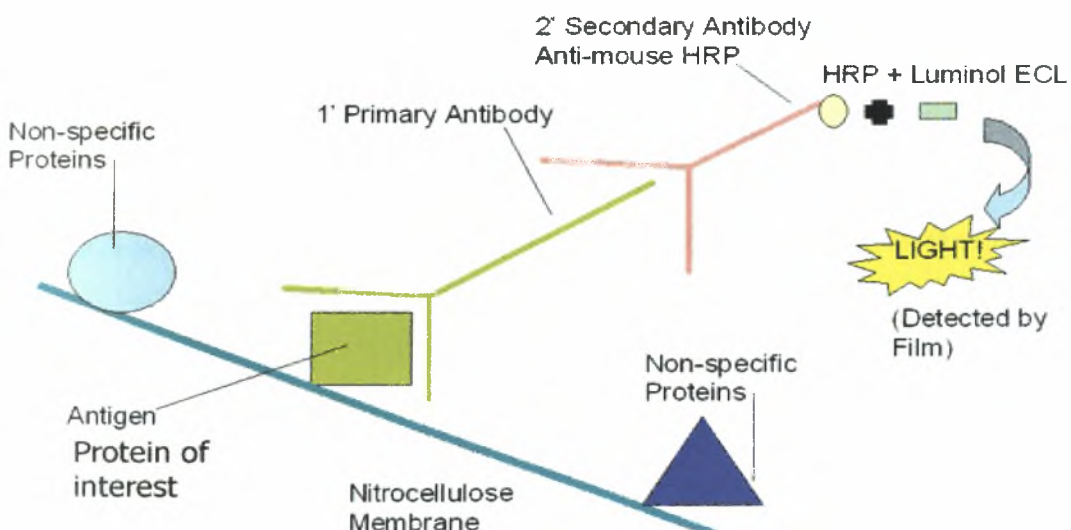


Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα: α) 250ml 1,5M Tris (MP. Biomedical Inc.) και 100ml 1M Tris, β) 100ml SDS 10X (Sigma) και γ) 1ml APS 10X (Promega). Έπειτα προστέθηκαν τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Όγκος σε ml 12% seperating gel	Αντιδραστήριο	Όγκος σε ml 5% Stacking gel
8.6	H ₂ O	4.35
6.0	30% Acrylamide mix	1.0
5.0	Tris	0.75
2.0	10% SDS	0.06
2.0	10% APS	0.06
0.008	TEMED	0.006
20	Τελικός όγκος	6

Και στις δυο πηκτές το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος, καθώς είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου. Στην συνέχεια τοποθετείται η πηκτή διαχωρισμού στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται από πάνω της μια μικρή ποσότητα H₂O για την ευθυγράμμιση της επιφάνειας του gel. Αφού πήξει, αφαιρείται το H₂O και τοποθετείται στη συσκευή η πηκτή επιστοιβαξης, ακριβώς πάνω από την πηκτή διαχωρισμού. Τα δείγματα προετοιμάζονται πριν την εισαγωγή τους στο gel, προσθέτοντας ρυθμιστικό διάλυμα **loading buffer 2x** (100ml: 1,52gr Tris-HCl, 20ml glycerol, 2gr SDS, 2ml b-mercaptoethanol, 1mg Bromphenol Blue, pH 6,8) και θερμαίνοντάς τα στους 100ο C για 5min. Αφού εισαχθούν τα δείγματα και ο μάρτυρας μοριακού βάρους (rainbow marker), προστίθεται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, 5x **running buffer** (1L: 25mM Tris-HCl, 190mM glycine, 5gr SDS) ώστε να άγει το ηλεκτρικό ρεύμα. Τοποθετώ την συσκευή σε 100 volt μέχρι να περάσει το stacking gel και στην συνέχεια στα 150 volt για όσο χρόνο χρειαστεί μέχρι τα δείγματα να κατέβουν. Στην συνέχεια ετοιμάζω το **transfer buffer 5x** (1L: 25mM Tris-HCl, 190mM glycine) με την βοήθεια του οποίου γίνεται η αποτύπωση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη **Νιτροκυτταρίνης** (Schleicher & Schuell, size: 30cm x 3M, pore: 0,45μm). Όλα τα διαλύματα χρησιμοποιούνται ως 1x, επίσης στο transfer buffer 1x γίνεται προσθήκη 20% μεθανόλης. Γίνεται η προετοιμασία της μεμβράνης τοποθετώντας την αρχικά σε H₂O και μετά σε transfer buffer. Προετοιμασία απαιτούν και τα διηθητικά χαρτιά Whatman που χρησιμοποιούνται καθώς επίσης και τα **Fiber Pads** (Biorad) με εμβαπτίση τους σε transfer buffer. Τοποθετώ ανάμεσα σε δύο ειδικές πλάκες: ένα Fiber Pad τρία χαρτιά Whatman, τρία χαρτιά Whatman, το SDS gel, την μεμβράνη, τρία χαρτιά Whatman και τέλος ένα ακόμη τρία χαρτιά Whatman. Σκοπός είναι

να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες από το gel στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης το οποίο επιτυγχάνεται μέσω **υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων**. Βυθίζω στην συνέχεια της πλάκας μέσα σε μια συσκευή γεμάτη με transfer buffer και ρυθμίζω το μηχάνημα *Thetmo electron Corporation 3000P, Power Supply*, στα 200mA/ 77 Volt/15W για 3,5h. Για να εμποδίσουμε την αλληλεπίδραση των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιήσουμε για την ανίχνευση της πρωτεΐνης μας με την μεμβράνη χρησιμοποιούμε **5% non fat milk** σε **buffer TBS-Tween** (*Tris-HCl 500mM, Sodium Chlorid 1,5M*). Η επώαση της μεμβράνης στο διάλυμα αυτό γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Οι πρωτεΐνες του γάλατος προσκολλούνται στην μεμβράνη σε οποιαδήποτε θέση εκτός από τα σημεία που βρίσκονται οι πρωτεΐνες του δείγματος (**blocking**). Η ακολουθούμενη προσθήκη του **πρώτου αντισώματος a-syn 211** (*Santa Cruz Biotechnology*) επιτρέπει στο αντίσωμα να προσδεθεί μόνο στην ειδική πρωτεΐνη και σε καμία άλλη θέση πάνω στην μεμβράνη. Αυτή η διαδικασία μειώνει ουσιαστικά τον «θόρυβο» στο τελικό αποτέλεσμα του Western Blot. Η επώαση του αντισώματος (3ml anti 5% non fat TBS milk) με την μεμβράνη γίνεται overnight με ήπια ανάδευση. Ακολουθούν πλύσεις της μεμβράνης με TBS-Tween για 30min με σκοπό την απομάκρυνση του αντισώματος που δεν προσδέθηκε στην πρωτεΐνη του ενδιαφέροντός μας. Έπεται η προσθήκη δεύτερου αντισώματος σε 1% TBS milk, για 1h. Στο πείραμα αυτό δεύτερο αντίσωμα είναι το **anti-mouse** (*Pierce*) που προσδέεται στο αντίσωμα a-syn αλλά και προσδένει την υπεύθυνη ουσία (*ECL Western blot Reagent, Ambershom*) για την εμφάνιση του Western, από την οποία προσθέτουμε 1ml πάνω στην μεμβράνη. Εμείς χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο **Chemiluminescence** που αφορά την επώαση του blot με φωτοβόλα ουσία. Το φως στην συνέχεια ανιχνεύεται με φωτογραφικό φιλμ.

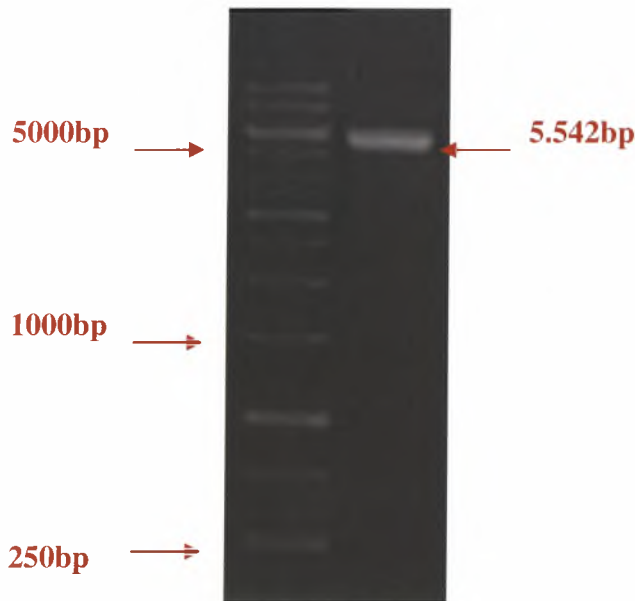


Εικόνα 19. Περίληψη της εμφάνισης του Western blot με την μέθοδο ECL Chemiluminescence. Copyright 2006 Molecular Station.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Κλωνοποίηση του φορέα pRc/cmv

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η πέψη του φορέα **pRc/cmv** με το ένζυμο **HindIII** με σκοπό την προετοιμασία του για την επακόλουθη σύνδεση με το γονίδιο **a-syn120aaA53T**. Το αποτέλεσμα της πέψης, ύστερα από τριώρη επώαση στους 37° C, είναι το γραμμικό μόριο του φορέα, **5.542bp**.

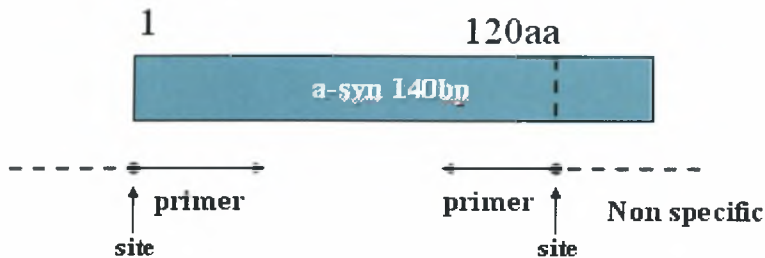


Εικόνα 20. Απεικόνιση Pcmv μετά από πέψη με **HindIII**. Το gel είναι 1% και ο marker είναι ο **GeneRuler™ 1kb DNA Ladder** της **New England Biolabs**.

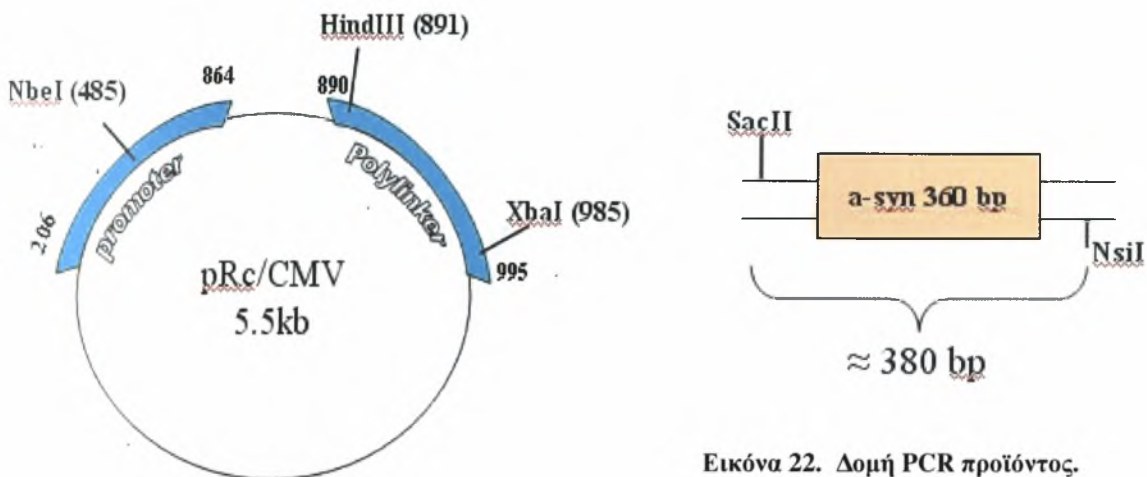
Ακολούθησε η αντίδραση Klenow και η αντίδραση αποφωσφορυλίωσης με σκοπό την δημιουργία τυφλών άκρων και την ελαχιστοποίηση επανακυκλοποίησης του φορέα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα *DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment* και *Antarctic Phosphatase* της **New England Biolabs**. Σε κάθε ενδιάμεσο βήμα των αντιδράσεων ακολουθούσε ο καθαρισμός του ενζύμου από τις διάφορες ανεπιθύμητες προσμείξεις που θα μπορούσαν να αναστείλουν ή να δυσχεραίνουν την αντίδραση σύνδεσης του φορέα με το επιθυμητό γονίδιο. Ο τελικός όγκος έκλουσης ήταν σε κάθε στάδιο 50μl καθαρού DNA.

Όπως προαναφέρθηκε το γονίδιο που επιθυμούμε να ανασυνδυάσουμε με το πλασμιδιακό φορέα Pcmv έχει δοθεί ως PCR product από αντίδραση που αφήνει τυφλά άκρα. Το γονίδιο αυτό καλείται **a-syn120A53T** και πρόκειται για το γονίδιο της ασνουκλείνης που φέρει ένα έλλειμμα 20 αμινοξέων στο καρβοξυλικό του άκρο και μια

μετάλλαξη στην θέση 53 με αποτέλεσμα το αμινοξύ αλανίνη (Ala) να μετατρέπεται σε θρεονίνη (Thr). Το γονίδιο αυτό βρισκόταν αρχικά με ολόκληρη την αλληλουχία του, 140 αμινοξέα αλλά φέροντας την μετάλλαξη A53T, στον πλασμιδιακό φορέα **ptre asyn140aaA53T**. Οι εκκινητές asyn120R, asyn120F του γονιδίου σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να δημιουργήσουν εκατέρωθεν του νέες θέσεις περιορισμού για τα ένζυμα NsiI και SacII.



Εικόνα 21. Επιθυμητό γονίδιο. Παρατηρούνται οι νέες θέσεις των ενζύμων NsiI (δεξιά) και SacII (αριστερά), οι primers asynR (δεξιά) και asynF (αριστερα).



Εικόνα 22. Δομή PCR προϊόντος.

Εικόνα 23. Απεικόνιση του pRCN με τις σημαντικότερες θέσεις κοπής.

ATGGATGTATTCATGAAAGGACTTTCAAAGGCCAAGGAGGGAGTTGTGGC
 TGCTGCTGAGAAAACCAAACAGGGTGTGGCAGAAGCAGCAGGAAAGACAAAAGAGGGTGT
 TCTCTATGTAGGCTCCAAAACCAAGGAGGGAGTGGTGCATGGTGTGGCAACAGTGGCTGA
 GAAGACCAAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGCAGGGTGTGACAGCAGT
 AGCCCAGAAGACAGTGGAGGGAGCAGGGAGCATTGCAGCAGCCACTGGCTTTGTCAAAAA
 GGACCAGTTGGGCAAGAATGAAGAAGGAGCCCCACAGGAAGGAATTCTGGAAGATATGCC
 TGTGGATCCT

GACAATGAGGCTTATGAAATGCCTTCTGAGGAAGGGTATCAAGACTACGA
 ACCTGAAGCC

Εικόνα 24. Αλληλουχία asyn. Με το γαλάζιο χρώμα παρουσιάζεται αλληλουχία της α-συνουκλεΐνης που αντιστοιχεί σε 120 αμινοξέα, ενώ με κόκκινο εμφανίζεται το τμήμα του γονιδίου που αντιστοιχεί στο C-τελικό άκρο και έχει αφαιρεθεί.

Ακολούθησε η αντίδραση σύνδεσης του pcmv με το asyn120aaA53T, με την βοήθεια του ενζύμου T4 DNA λιγάση. Χρησιμοποιήθηκαν τρία δείγματα (vector:insert) και τέσσερα controls για να βοηθήσουν στον έλεγχο των αποτελεσμάτων που ακολουθούν το μετασχηματισμό (πίνακας 10). Η ποσότητα του φορέα όπως και του γονιδίου υπολογίστηκαν ως 40ng/μl. Η αντίδραση επώαστηκε για 12h στους 4°C στο μηχάνημα της PCR για να εξασφαλιστεί ότι η θερμοκρασία θα παραμείνει σταθερή.

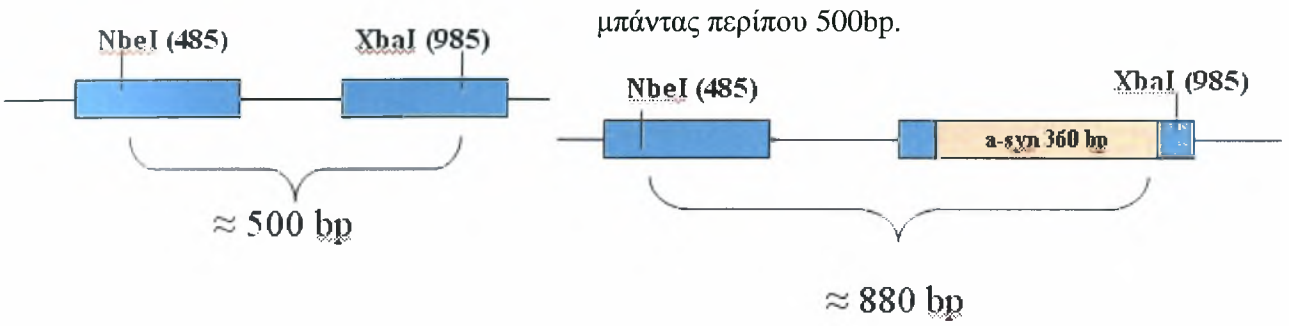
Πίνακας 10

	description	To Test:
C1	Pcmv stock, no ligase	Plasmid
C2a	Pcmv digested-klenow, + ligase	ligase
C2b	Pcmv digested, + ligase	
C3	Pcmv digested, no ligase	HindIII
C4	Pcmv digested-klenow-dephosphorelated, + ligase	phosphatase
S1,S2,S3	Pcmv digested-klenow-dephosphorelated, + ligase, + insert	

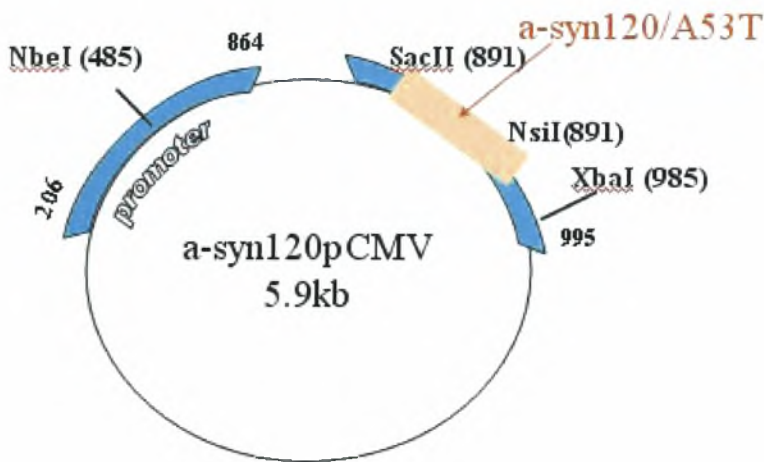
C= control, S= sample

Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει τον μετασχηματισμό επιλεκτικών βακτηριακών κυττάρων με το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο. Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DH5a του βακτηρίου *E.coli* με την βοήθεια του kit της invitrogen **Library efficiency DH5a – Chemical competent cells**. Τα θεωρητικά αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι το C1 πρέπει να εμφανίσει τις περισσότερες αποικίες καθώς το C2 πρέπει να έχει περίπου τις ίδιες αν το ligation έχει δουλέψει σωστά ή λίγο λιγότερες. Το C3 πρέπει να έχει το 1% του C1 ή καθόλου όπως και το C4 αν δεν έχει επιτευχθεί πλήρης αποφωσφορίωση. Τα αποτελέσματα του πειράματός μας έδειξαν ότι ο μετασχηματισμός δεν ήταν ιδανικός γιατί υπήρξε πολύ background (πλασμίδιο χωρίς το γονίδιο). Το γεγονός ότι το C4 έχει περισσότερες αποικίες από του S1 1:1 (C4> S1) δείχνει ότι ίσως να μην έχει δουλέψει πολύ καλά η φωσφατάση. Αν και γενικά ο μετασχηματισμός δεν ήταν ιδανικός τα αποτελέσματα του έδειξαν ότι έχει πραγματοποιηθεί σύνδεση του πλασμιδίου με το γονίδιο σε επιθυμητά πλαίσια. Ακολούθησε έτσι απομόνωση αποικιών, καλλιέργεια σε LB και αμπικιλίνη στην οποία εμφανίζει ανθεκτικότητα ο φορέας, και ανάπτυξη του πλασμιδίου σε μικρή κλίμακα. Έπειτα έγιναν πέψεις για την ανίχνευση του γονιδίου με τα ένζυμα XbaI και NdeI σε τελικό όγκο 10μl. Το NdeI έχει μία θέση κοπής στον προαγωγέα, ενώ το XbaI με στον πολυσυνδέτη. Αν το γονίδιο έχει μπει στον φορέα το αποτέλεσμα της διπλής πέψης θα είναι η εμφάνιση μιας

μπάντας περίπου 880bp στο πήκτωμα αγαρόζης κάτω από την έκθεση υπεριώδους ακτινοβολίας. Αν το γονίδιο δεν έχει τοποθετηθεί το αποτέλεσμα θα είναι η ύπαρξη μιας

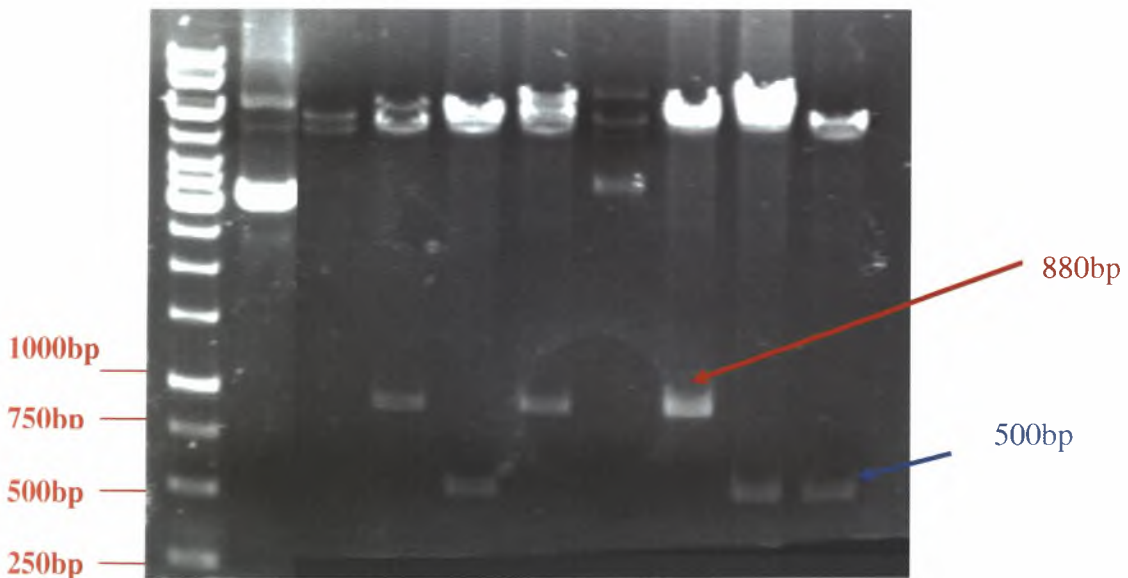


Εικόνα 25 Απόσταση σε ζεύγη βάσεων. Ύπαρξη γονιδίου (δεξιά), ελλείψη γονιδίου αριστερά.



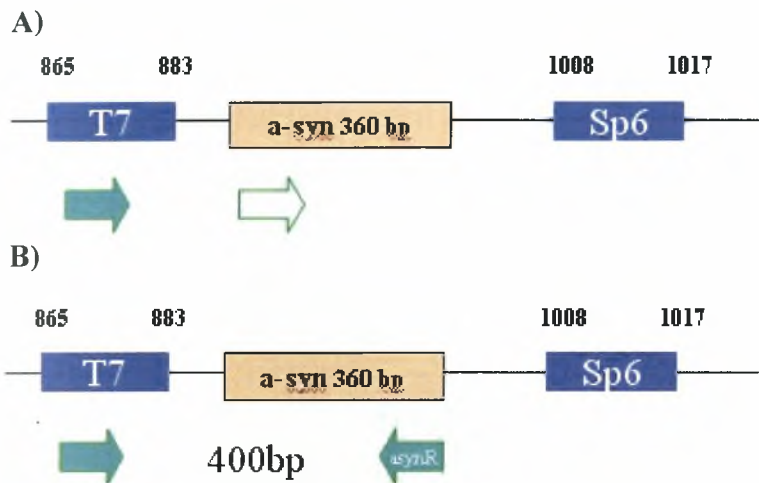
Εικόνα 26 Απεικόνιση του pcmvasyn120aa με τις σημαντικότερες θέσεις κοπής.

M pcvn S3..... S2 S1.....



Εικόνα 27. gel 1%, generulerDNA 1kb ladder, S= samples, 5μl DNA.

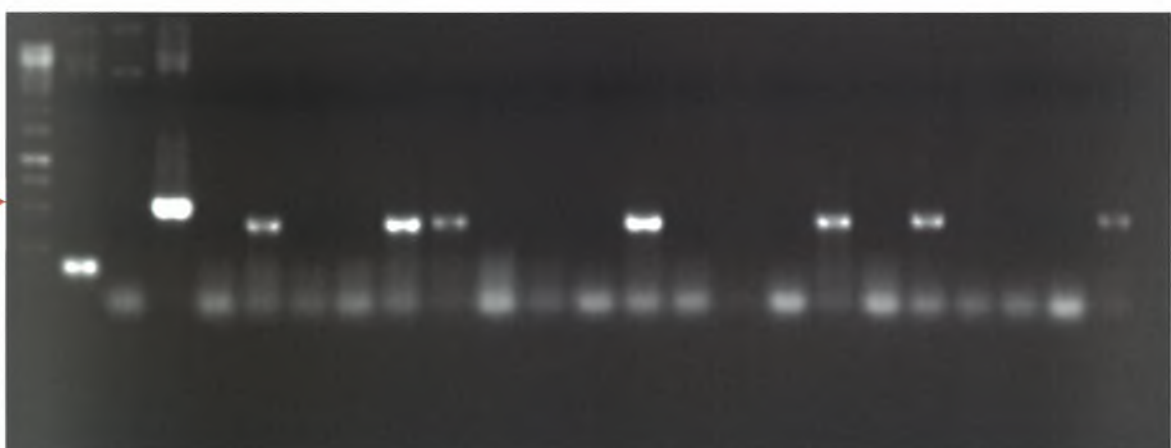
Ακολούθησε απομόνωση αποικιών από το τριβλίο με το **δείγμα S3** που έδωσε τα περισσότερα θετικά αποτελέσματα και καλλιέργεια τους σε 5mlLB + 5μL amp για περίπου 16h. Έπειτα έγινε ανάπτυξη του πλασμιδίου σε μικρή κλίμακα με την βοήθεια του kit **NucleoSpin® Plasmid (Plasmid Purification)**. Για να ανιχνευθεί η ύπαρξη ή μη του γονιδίου αλλά και για να γίνει η εύρεση της σωστής κατεύθυνσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της PCR με χρήση των **T7, Sp6, a-synReverse** primers σε τελικό όγκο αντίδρασης 20μl. Η χρήση των T7 και a-synReverse ταυτόχρονα στα δείγματα μας αναμένεται να δώσει προϊόν 400bp αν το γονίδιο έχει εισέλθει με την σωστή φορά στον rcmn ή τίποτα αν το γονίδιο έχει εισέλθει αντίθετα ή καθόλου.



Εικόνα 28. Πιθανά αποτελέσματα αν το γονίδιο της asyn έχει εισέλθει με β) σωστή ή α) αντίστροφη κατεύθυνση.

Το αποτέλεσμα ήταν ικανοποιητικό όπως φαίνεται στο πήκτωμα αγαρόζης που ακολούθησε. Από τα 20 δείγματα τα 7 έδωσαν θετικό αποτέλεσμα.

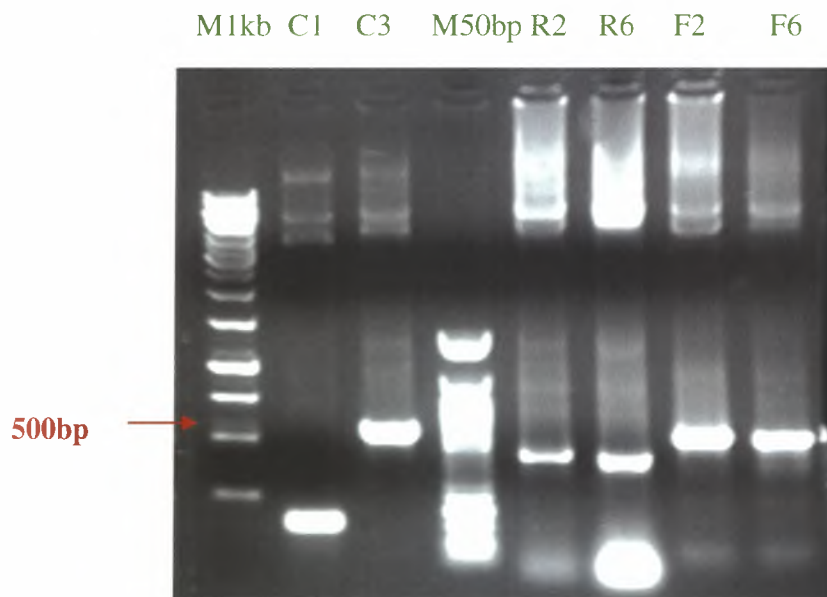
m C1 C2 C3 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



Εικόνα 29. Αποτελέσματα PCR. gel 1,5%. Υπογραμμισμένες μπάντες αντιστοιχούν σε 400bp, generulerDNA 1kb ladder

Τα controls C1: pcmv με T7 + Sp6, C2: pcmv με T7 + a-syn120R και C3: pcmv + insert με T7 + Sp6 επιβεβαιώνουν τόσο την ύπαρξη ή μη του γονιδίου όσο και την σωστή δράση των εκκινητών. Για τα δείγματα αυτά έγιναν υγρές καλλιέργειες 5mlLB + 5μL amp με επώαση περίπου 16h. Δυστυχώς κάποια από τα δείγματα δεν αναπτύχθηκαν καθόλου, 5, 16. Σε αυτά όμως όπου οι καλλιέργειες απέκτησαν θολή εικόνα πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη τους σε μικρή κλίμακα, τελικό όγκο 50μl (1γ/μl) και ακολούθησε ανάλυση του με περιοριστικά ένζυμα αλλά και με PCR για επιβεβαίωση.

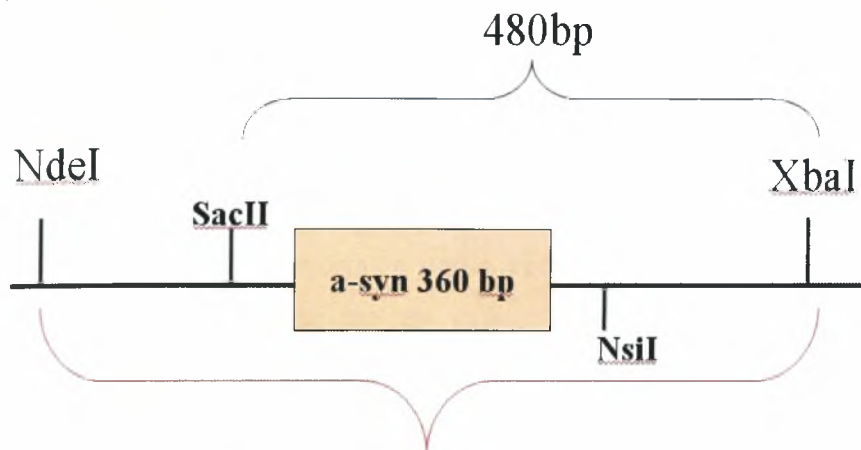
Η επιβεβαιωτική PCR έγινε στα δείγματα 2, 6. Χρησιμοποιήθηκαν δυο controls (C1: pcmv με T7 + Sp6, C3: pcmv + insert με T7 + Sp6) και δυο ζευγάρια δειγμάτων $S_{reverse}$ (T7+ asynR) και $S_{forward}$ (F-asyn + Sp6). Τα επιθυμούμενα αποτελέσματα είναι μια μπάντα 400 bp για τα $S_{reverse}$ και μια των 500bp για τα $S_{forward}$. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων αυτών (5μl DNA + 2μl loading dye) φαίνονται στην παρακάτω εικόνα και είναι τα επιθυμούμενα.



Εικόνα 30. Επιβεβαιωτική PCR.

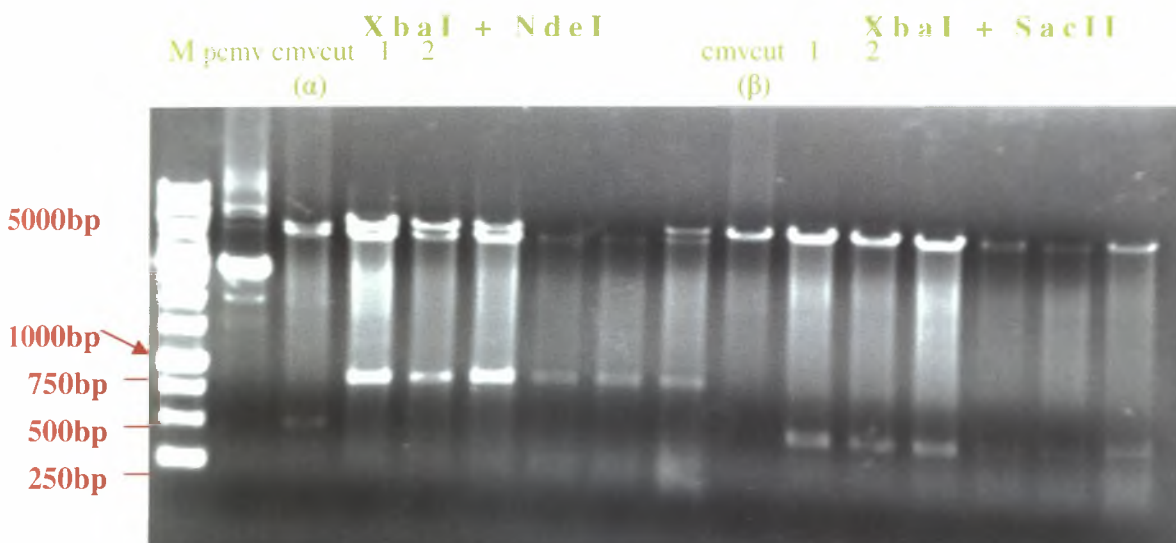
Έτσι ακολούθησε μετασχηματισμός σε DH5a κύτταρα για τα δείγματα 2, 6, τα οποία ονομάστηκαν asyn1200aa CMV1 και asyn120aa CMV2 αντίστοιχα. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα αναπτύχθηκαν στους 37°C σε τριβλία με άγαρ και το αντιβιοτικό αμικικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 1μl/ml. Ο φορέας pCMV παρέχει ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη και έτσι αναπτύσσονται μόνο τα κύτταρα που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο. Ακολούθησε ο εμβολιασμός τους σε υγρό θρεπτικό και η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα. Από αυτό το βήμα συλλέχθηκαν 50μl (1γ/μl). Ακολούθησαν διπλές πέψεις με τα

ένζυμα NdeI + XbaI και XbaI + SacII. Η αντίδραση επωάστηκε για 2 ώρες στους 37°C. Τα αναμενόμενα αποτελέσματα φαίνονται παρακάτω:



Εικόνα 31. Αναπαράσταση αποτελεσμάτων.

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης σε gel αγαρόζης, χρησιμοποιώντας 10μl DNA + 2μl loading dye επιβεβαίωσε το επιθυμητό αποτέλεσμα.



Εικόνα 32. Αποτελέσματα πέψεων.

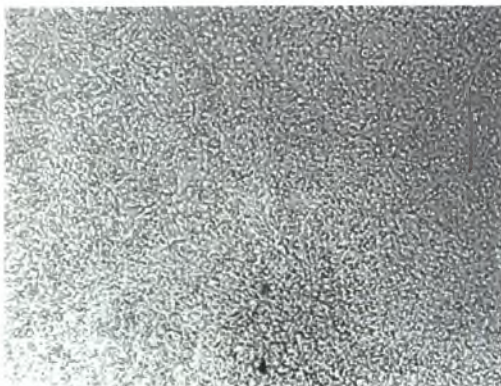
Ο pcmv cut (α) δεν περιέχει το γονίδιο και δίνει μετά από πέψη με τα NdeI + XbaI μια πάντα 500bp και μια 5000bp, όπως αναμενόταν. Ο pcmv cut (β) δίνει ένα γραμμικό κομμάτι γιατί δεν περιέχει θέση κοπής για το ένζυμο SacII. Τα υπόλοιπα δείγματα δίνουν τα επιθυμούμενα αποτελέσματα της εικόνας 24.

Τελικά από τα δείγματα asyn1200aa CMV1 και asyn120aa CMV2 στάλθηκαν 20μl από το καθένα για αλληλούχηση (sequencing) στην εταιρία Macrogen. Τα αποτελέσματα παρατίθενται σε παράρτημα στο τέλος της εργασίας.

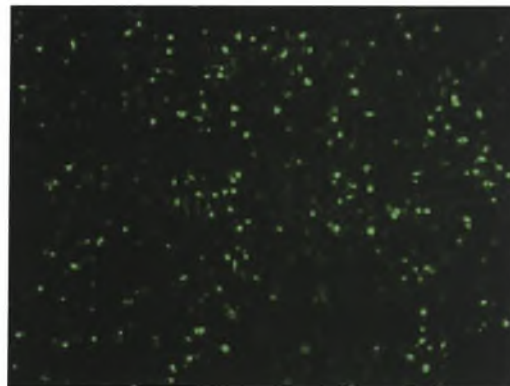
4.2 Έκφραση της *asyn120aaA53T*

Μετά την διαμόλυνση των κυττάρων με την βοήθεια της lipofectamine, ακολούθησε ο υπολογισμός της αποτελεσματικότητας της μεθόδου (*transfection efficiency*). Για να αναγνωριστεί η επιτυχία της μεθόδου, δηλαδή το ποσοστό των πλασμιδίων που εισήχθησαν και των γονιδίων που εκφράστηκαν, χρησιμοποιήθηκε ως αναφορέας η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein) η οποία προκαλεί στα κύτταρα που την εκφράζουν ένα έντονο πράσινο χρώμα κάτω από την έκθεση τους σε UV φως. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο Leica DM IRE2, ενώ η μεγέθυνση του φακού ήταν 10X. Το πρόγραμμα με το οποίο αναλύθηκαν οι φωτογραφίες είναι το Leica Microsystem LAS. Έγιναν δυο απεικονίσεις για κάθε δείγμα, *pcmv*, *ptre*, *pcmv_{asyn}*, μια οπτική που δείχνει το σύνολο των κυττάρων που αναπτύχθηκαν και μια φθορισμού η οποία δίνει το ποσοστό πρωτεϊνών που εκφράστηκαν μέσα σε 24h και 48h. Το δείγμα του *ptre* χρησιμοποιήθηκε σαν control.

24h



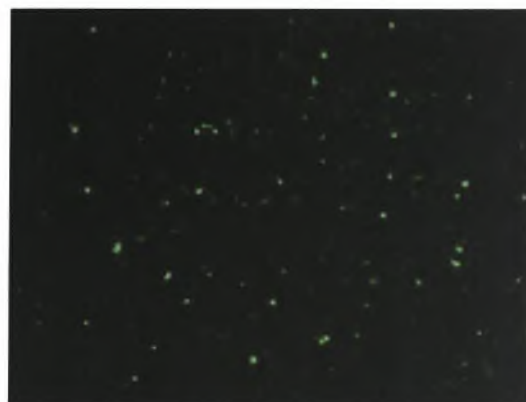
Ptre asyn140aa



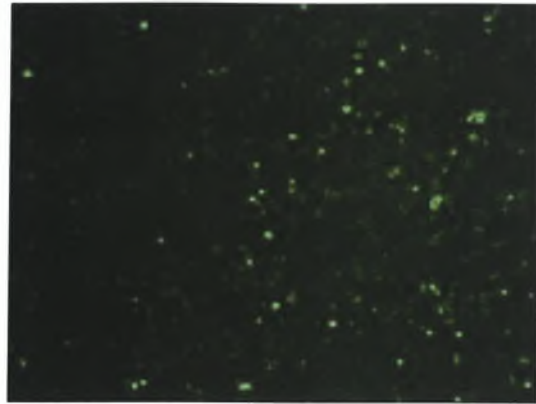
Ptre asyn140aa GFP



Pcmv



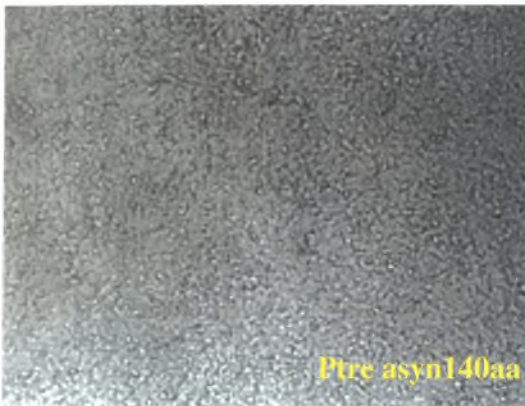
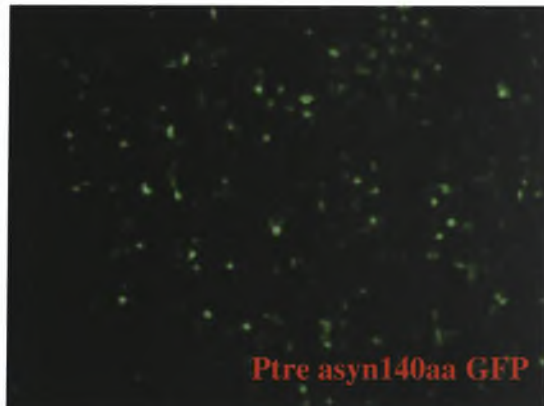
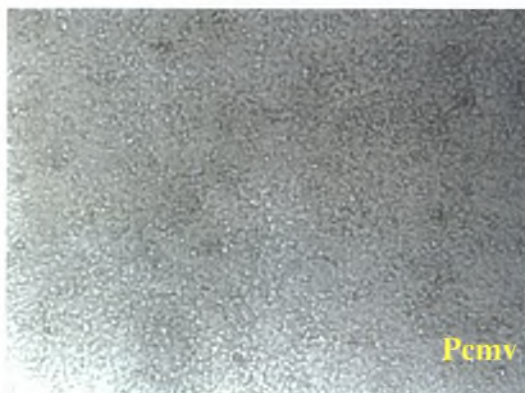
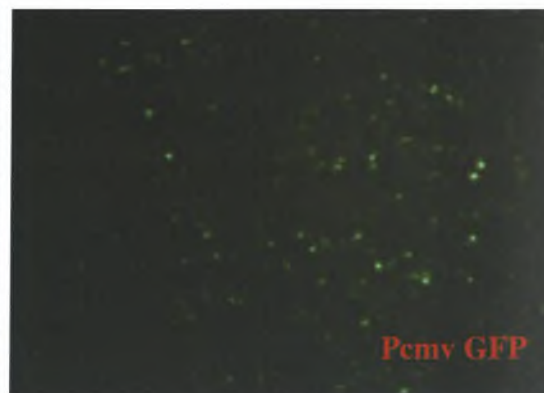
Pcmv GFP

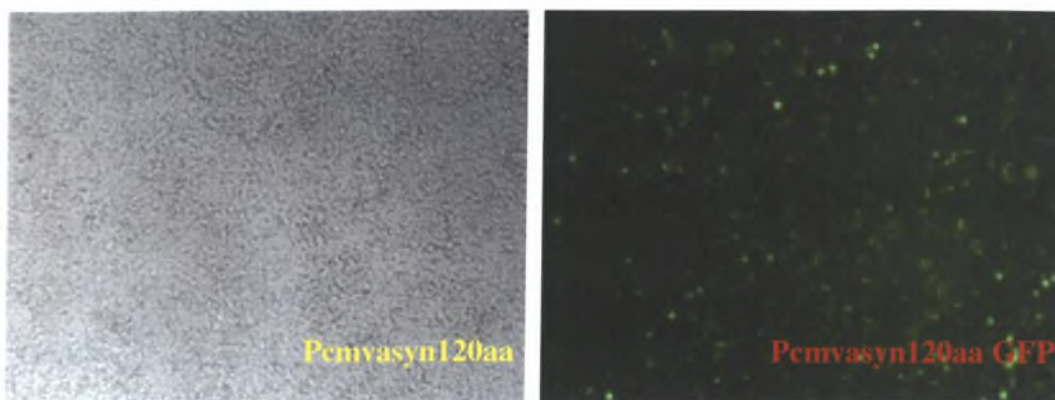
**Pcmvasyn120aa****Pcmvasyn120aa GFP**

Εικόνα 33. Αποτελέσματα από την μικροσκοπική ανάλυση του transfection. Δεξιά απεικονίζονται τα δείγματα κάτω από την έκθεση τους σε UV ενώ αριστερά φαίνεται η οπτική ανάλυση.

Η οπτική απεικόνιση μαρτυρεί μια υπερβολική ανάπτυξη κυττάρων, αλλά δείχνει την έλλειψη συσσωματωμάτων (κύτταρων που επιπλέον ή έντονων σκούρων περιοχών) και την απουσία θανάτου (επιπλέοντα κύτταρα). Ακριβώς δίπλα η αντίστοιχη περιοχή σε κάθε δείγμα κάτω από φθορισμό δίνει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου σε ένα ποσοστό λιγότερο του 20%. 48h μετά πραγματοποιήθηκε και δεύτερη μικροσκοπική ανάλυση.

48h

**Ptre asyn140aa****Ptre asyn140aa GFP****Pcmv****Pcmv GFP**



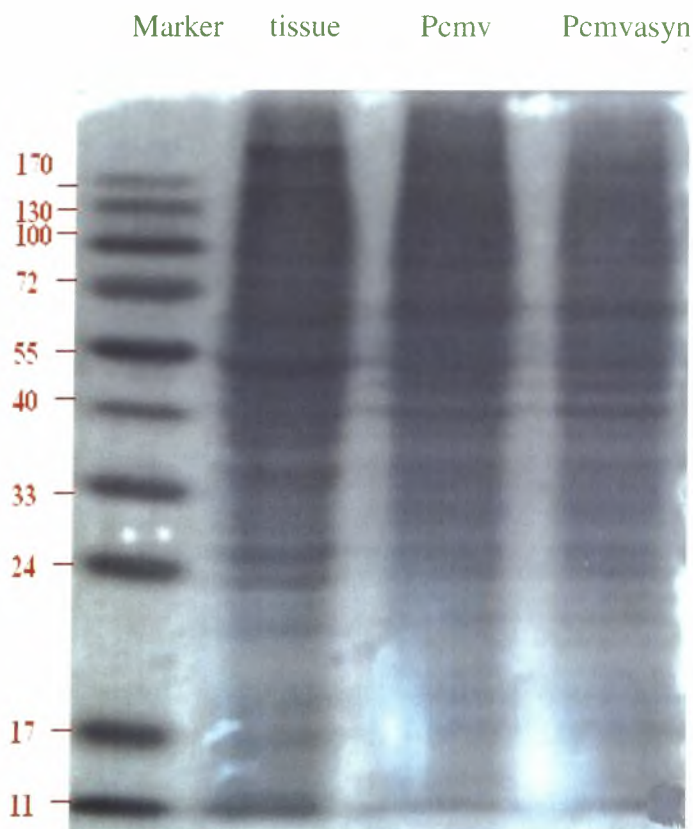
Εικόνα 34. Αποτελέσματα από την μικροσκοπική ανάλυση του transfection ύστερα από 48h. Δεξιά απεικονίζονται τα δείγματα κάτω από την έκθεση τους σε UV ενώ αριστερά φαίνεται η οπτική ανάλυση.

Παρατηρούμε στην οπτική απεικόνιση ότι ο αριθμός των κυττάρων αυξήθηκε και στα τρία δείγματα. Η αποτελεσματικότητα του transfection υπολογίστηκε εμπειρικά με βάση την εικόνα των GFP κυττάρων να είναι χαμηλότερη του 20%, δεν υπολογίστηκε δηλαδή με συστηματική μέτρηση. Θα επιθυμούσαμε ένα ποσοστό μεγαλύτερο του 35% καθώς και οι απεικονίσεις δεν μας επιτρέπουν την παρατήρηση του GFP σε όλες τις διαστάσεις. Παρόλα αυτά συνεχίστηκαν οι διαδικασίες για την εύρεση της πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα της ποσοτικής μέτρησης πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford μετά την λήψη εκχυλίσματος (παρακείμενος πίνακας) επιβεβαιώνει την έκφραση πρωτεϊνών στα κύτταρά μας αλλά όχι απαραίτητος και την υπερέκφραση της επιθυμούμενης πρωτεΐνης.

Δείγματα	Πρωτεΐνη σε $\mu\text{g/ml}$ (594nm)
Ptre asyn full length	7,667
Pcmv	9,036
Pcmv asyn120aa	9,883

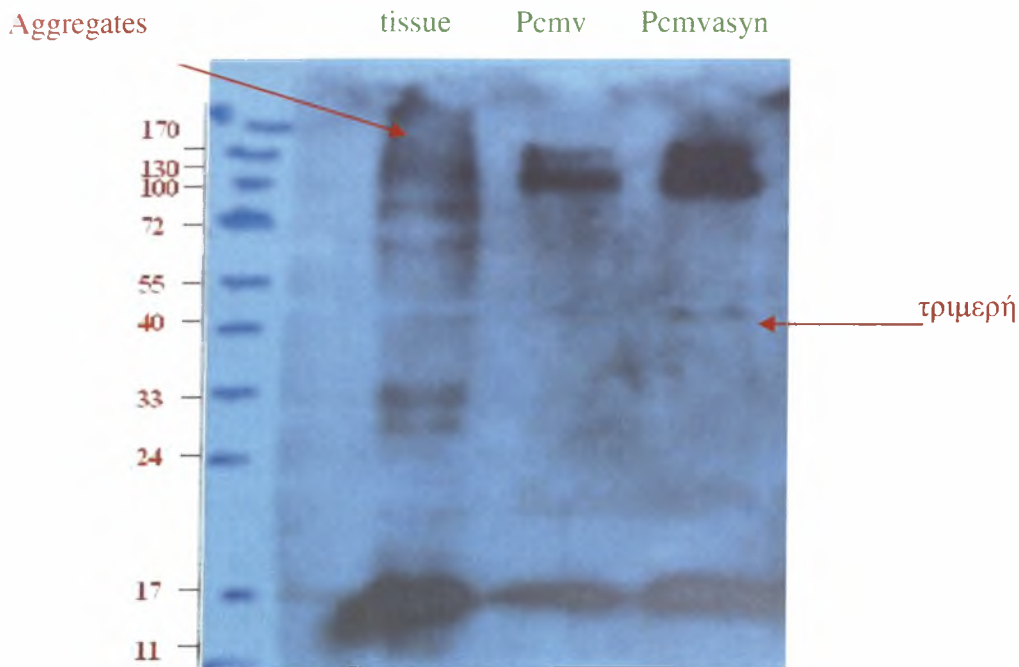
Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε η μέθοδος του Western blot που μας επιτρέπει με την χρήση ειδικών αντισωμάτων anti-asyn να εντοπίσουμε την α -συνουκλείνη. Φυσικά πριν την λήψη αποτελεσμάτων του Western blot προηγήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με SDS των δειγμάτων Pcmv και pcmvasyn120aaA53T καθώς και δείγματος ιστού από εγκέφαλο ποντικού ως control, το οποίο χρησιμοποιήσαμε και την συνέχεια. Στην ηλεκτροφόρηση αυτή δεν περιμένουμε να δούμε ειδικά την α -συνουκλείνη αλλά ένα σύνολο διάφορων πρωτεϊνών που εκφράστηκαν στο κύτταρο. Ως marker πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ο *Pageruler Prestained ladder* (παράρτημα 2), ο οποίος μας

επιτρέπει, με βάση γνωστά μοριακά βάρη που υποδεικνύει, να αντιστοιχήσουμε ή να προβλέψουμε τις πρωτεΐνες του δείγματός μας. Επίσης μπορούμε να δούμε αν τα δείγματα μας και ο marker έχουν 'τρέξει' σωστά πριν προχωρήσουμε στις αποτύπωσή τους στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Για να γίνουν τα δείγματα ορατά εμβαπτίσαμε το πήκτωμα στην χρωστική **Coomassie Brilliant Blue** που έχει την ικανότητα να προσδένεται στις πρωτεΐνες. Αρκεί να αναφέρουμε πως η α -συνουκλεΐνη full-length αναμένεται στα 14kDa ενώ η truncated α -συνουκλεΐνη 120aa πρέπει να αντιστοιχεί σε περίπου 12kDa.



Εικόνα 35. Δείγματα πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

Ακολούθησε η ανίχνευση της α -συνουκλεΐνης με την μέθοδο του Western blot, μια διαδικασία που στηρίζεται στην χρήση ειδικών αντισωμάτων. Στην δική μας περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα anti-*asyn* της εταιρίας Santa Cruz που ανιχνεύει οποιαδήποτε πηγή α -συνουκλεΐνης (ανθρώπινη ή ζωϊκή). Φορτώσαμε 40μl DNA από κάθε δείγμα. Η παρακάτω εικόνα λήφθηκε με την βοήθεια της μεθόδου **Chemiluminescence** και την χρήση φωτογραφικού φιλμ.



Εικόνα 36. Αποτελέσματα Western blot.

Στο υπερκείμενο αποτύπωμα του Western θα μπορούσαμε ένα πούμε ότι η truncated α -συνουκλεΐνη 120aa δεν εκφράστηκε και ότι η μπάντες που παρατηρούμε αντιστοιχούν σε μια έκφραση ενδογενούς α -συνουκλεΐνης (γιατί δεν υπάρχει διαφορά στην θέση ή την ένταση της μπάντας μεταξύ pcmv και pcmvasyn). Παρατηρώντας τον ιστό εντοπίζουμε περίπου στα 14kDa μονομερή α -συνουκλεΐνης, ενώ στις πιο πάνω θέσεις τριμερή (~44kDa), πολυμερή ή ακόμη και συσσωματώματα πρωτεΐνης. Ενδογενής είναι και η συνουκλεΐνη που απεικονίζεται σε δείγματα pcmv και pcmvasyn120aaA53T, συγκρίνοντας τα μεταξύ τους αλλά και με τον ιστό. Βλέπουμε επίσης τριμερή στις ίδιες θέσεις με αυτές του ιστού. Μας προβληματίζουν οι έντονες μπάντες στις θέσεις 100-150kDa και η διαφορά μεγέθους τους. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι πρόκειται είτε για διαφορά στην ποσότητα που φορτώσαμε είτε ότι η α -syn120aa εκφράζεται μόνο με την μορφή ολιγομερών. Και τα δυο συμπεράσματα είναι υποθετικά και θα πρέπει να λυθούν, ο πειραματικό όμως χρόνος δεν επανάληψη των πειραμάτων. Πιθανώς τον χαμηλό transfection efficiency να αποτέλεσε τον κύριο περιοριστικό παράγοντα στην επιτυχία του πειράματος.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως προαναφέρθηκε η **α-συνουκλεΐνη** είναι μία πρωτεΐνη 140 αμινοξέων που ενέχεται στην ρύθμιση της ντοπαμινεργικής νευροδιαβίβασης. Βρέθηκε μεταλλαγμένη ή τροποποιημένη σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, αλλά κυρίως στην νόσο του Πάρκινσον, είτε με την μορφή ολιγομερών είτε ως συσσωματώματα στα σωματία Lewy. Έτσι το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε στην διευκρίνιση του ρόλου της α-συνουκλεΐνης στην ανάπτυξη της ασθένειας του Παρκινσον.

Το **C-τελικό άκρο** της α-συνουκλεΐνης φιλοξενεί μια περιοχή (*κατάλοιπα 125-140*) που θεωρείται κρίσιμη για την δραστηριότητα της ως chaperone-like πρωτεΐνη, όπως δείχθηκε από πειράματα διαγραφής του καρβόξυ-τελικού άκρου⁵⁷. Επίσης έλλειψη του καρβοξυ-τελικού άκρου πιθανώς μέσω **πρωτεόλυσης** έχει αναφερθεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία ινιδίων α-συνουκλεΐνης σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες⁶⁶. Πολλοί μελετητές στρέφουν την προσοχή τους στην συμπεριφορά της α-συνουκλεΐνης με ελλείψεις στο καρβοξυ-τελικό άκρο και κυρίως στην έλλειψη των 15-20 τελευταίων καταλοίπων της ύστερα από την ανακάλυψη των σημαντικών θέσεων φωσφορυλίωση και του πιθανού ρόλου στην ασθένεια. Γίνεται υπόθεση ότι η α-συνουκλεΐνη με την μορφή **1-120aa** (έλλειψη 20 αμινοξέων C-τελικού άκρου) διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεση των σωματιδίων Lewy και στον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων⁶⁰. Η ελλιπής α-syn120 σχηματίζει ινίδια με γρηγορότερο ρυθμό από ότι φυσιολογική ή η μεταλλαγμένη μορφή της⁶¹. Η α-syn120 ανιχνεύθηκε σε σωματία Lewy σε ανθρώπινες ασθένειες αλλά και σε διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν μεταλλάξεις τις ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης^{60,62,63}. Με ποιον τρόπο μπορεί να παράγονται διάφορες μορφές της α-συνουκλεΐνης με διαφορετικές ελλείψεις στο καρβοξυ-τελικό άκρο παραμένει άγνωστο, το σύστημα πρωτεοσώματος είναι πιθανό να εμπλέκεται⁶⁴. Απομονωμένα ινίδια α-συνουκλεΐνης από ανθρώπινους εγκεφάλους υποδεικνύουν ότι η έλλειψη μπορεί να έπεται της συνάθροισης^{65,66}. Γίνεται ξεκάθαρο ότι η C-τελική περιοχή της α-συνουκλεΐνης είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της αυτό-συνάθροισης⁶⁷. Παρόλα αυτά τροποποιήσεις σε αυτή την περιοχή που περιλαμβάνει οξειδωση, νίτρωση, γλυκοσυλίωση ή φωσφορυλίωση⁶⁸ μπορεί να επηρεάζουν την ικανότητα της α-συνουκλεΐνης να συναθροίζεται in vivo με ένα τρόπο παρόμοιο με την έλλειψη του άκρου αυτού. Έκφραση της ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης 120aa σε διαγονιδιακά ποντίκια κάτω από τον προαγωγέα TH οδηγεί στον σχηματισμό παθολογικών εγκλείστων όπως αποκαλύφθηκε από μορφολογικές και βιοχημικές μελέτες⁵⁹. Έκφραση της φυσιολογικής ή της μεταλλαγμένης α-συνουκλεΐνης κάτω από τον ίδιο TH προαγωγέα (υδροξυλάση της τυροσίνης) δεν οδήγησε στον

σχηματισμό παθολογικών εγκλειστών⁶⁹. Τα παραπάνω τελευταία ευρήματα υποστηρίζουν την ανάμειξη του C-τελικού άκρου στην συνάθροιση της α-συνουκλεΐνης.

Το εργαστηριακό λοιπόν πείραμα που ακολουθήσαμε πραγματοποιήθηκε με σκοπό την λήψη μιας εκτίμησης της συμπεριφοράς της **asyn120aaA53T** πρωτεΐνης, σε κυτταρικό επίπεδο, με σκοπό να οδηγήσει αργότερα στην δημιουργία ανώτερων πειραματικών μοντέλων όπως αυτών των διαγονιδιακών ζώων ή και κατάλληλων φαρμακευτικών στόχων. Οι προβληματισμοί μας ήταν αν τα κύτταρα καταφέρνουν να επιβιώσουν κάτω από την έκφραση της πρωτεΐνης αυτής, αν σχηματίζονται περισσότερα ολιγομερή, αν η πρωτεΐνη είναι σταθερή ή αποικοδομείται. Ουσιαστικά δηλαδή τι σημαίνει για το κύτταρο η επιπλέον έλλειψη 20 αμινοξέων, η επακόλουθη έλλειψη των θέσεων φωσφορυλίωσης, και η ταυτόχρονη ύπαρξη της μετάλλαξης A53T.

Το βασικότερο πρόβλημα για το αποτέλεσμα της μεθόδου είναι ότι τα *in vitro* πειράματα δεν μαρτυρούν ποια είναι η πραγματική *in vivo* εικόνα. Αν και διάφορες κυτταρικές σειρές χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες από τους ερευνητές ως μοντέλα μίμησης για την προσέγγιση διάφορων ασθενειών με ικανοποιητικά αποτελέσματα, δεν παύουν να είναι απλές προσομοιώσεις. Ακόμη και η χρήση πειραματόζωων όπως των ποντικών που χρησιμοποιούνται ευρέως μπορεί να μην είναι ικανά να αποδώσουν το τι πραγματικά μπορεί να συμβαίνει σε έναν τόσο πολύπλοκο οργανισμό όπως ο άνθρωπος. Τα αποτελέσματα μέσω πειραμάτων με την χρήση κυτταρικών σειρών ή ζώων ως μοντέλων μίμησης είναι αρκετά αξιόπιστα και έχουν βοηθήσει την επιστήμη να αναπτυχθεί για την καλύτερευση της ανθρώπινης ζωής. Το βασικότερο μειονέκτημα τους είναι ότι δεν εκφράζουν την ψυχική και πνευματική επιρροή που ασκεί ο άνθρωπος, καθώς επίσης οι κυτταρικές σειρές δεν αποτελούν ένα ενιαίο οργανικό σύνολο.

Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία παρατηρήσαμε αρχικά στις απεικονίσεις της GFP, με την χρήση του μικροσκοπίου Leica DM IRE2, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης για το ποσοστό πρωτεϊνικής έκφρασης ανά κύτταρο. Μια εμπειρική εκτίμηση του **transfection** (διαδικασία εισαγωγής DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα) που πραγματοποιήθηκε υπέθεσε μειωμένη αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην μεγάλη περιεκτικότητα των κυττάρων (90-95% confluency) την ημέρα του transfection. Δεν πρέπει να αγνοούμε ότι οι διάφορες κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούμε μπορεί σε συνθήκες καλλιέργειας *in vitro* να οδηγούνται σε λειτουργικές αλλαγές τις οποίες δεν μπορούμε να γνωρίζουμε ή να προβλέψουμε. Από την άλλη πλευρά η μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων 24 και 48 ώρες μετά το transfection έδειξε αύξηση αυτών την δεύτερη μέρα της επώασης και απουσία κυτταρικού θανάτου. Μια πιθανή εξήγηση του

φαινομένου αυτού είναι ότι η μεταλλαγμένη και ταυτόχρονα τροποποιημένη α-συνουκλεΐνη (*α-syn120aaA53T*) δεν προκάλεσε προβλήματα τοξικότητας, τουλάχιστον στην αδιαφοροποίητη κυτταρική σειρά SH-SY5Y. Φυσικά στηριζόμενοι σε αυτό δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την εμφάνιση **τοξικότητας** σε διαφοροποιημένα πλέον νευρικά κύτταρα. Άλλη πιθανή ερμηνεία είναι να μην λειτούργησε ικανοποιητικά ο προαγωγέας pcmv που χρησιμοποιήθηκε και επομένως το γονίδιο μας να μην εκφράστηκε ή να μην εκφράστηκε σε επιθυμητά επίπεδα. Στην συνέχεια στρέψαμε την προσοχή μας στο αποτέλεσμα της Western όπου το αποτύπωμα αποκάλυψε την έκφραση μόνο ενδογενούς α-συνουκλεΐνης (η σύγκριση μεταξύ του δείγματος pcmv (control) και pcmv α syn120aaA53T δεν παρουσίασε διαφορές). Το γεγονός αυτό καθώς και η έλλειψη ουσιαστικών διαφορών μεταξύ των non-transfected και transfected δειγμάτων οδηγεί στην εντύπωση ενός χαμηλού transfection efficiency. **Transfection efficiency** σημαίνει ότι ένα **ποσοστό** των ευκαρυωτικών κυττάρων γίνονται ικανά να δεκτούν και να εκφράσουν εξωγενές DNA. Ενδεχομένως το ποσοστό των κυττάρων που έγιναν transfected με την α-syn120aaA53T να μην ήταν αρκετό ώστε τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης να είναι επαρκή για να ανιχνευτούν με την μέθοδο Western blot. Αρκεί να λάβουμε υπόψιν μας την μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου.

Θα μπορούσε να σχεδιαστεί μια δεύτερη ερευνητική προσπάθεια, με τον ίδιο στόχο, και τις παρακάτω προϋποθέσεις: βελτιστοποίηση της μεθόδου του transfection (*optimized transfection*) που αποσκοπεί στην δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών που παράγουν την α-syn120aaA53T (*stable transfected a-syn cell lines*) αλλά και αναζήτηση πιο ευαίσθητων ανιχνευτικών μεθόδων έναντι της Western που χρησιμοποιήθηκε.

Οι ερευνητές που έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στην διευκρίνιση του ρόλου της α-συνουκλεΐνης και άλλων νευροτοξικών ή νευροπροστατευτικών μορίων που ενέχονται στην Νόσο του Πάρκινσον αναζητούν όλες εκείνες τις λύσεις του τελικά θα καλυτερέψουν την ζωή του ασθενή ή ακόμη καλύτερα θα προλαμβάνουν τα συμπτώματα.

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Παρκινσονικό τμήμα Β' Νευρολογικής κλινικής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης: Νόσος του Πάρκινσον (Παθολογικές απόψεις και θεραπευτικές εφαρμογές), Χαλκιδική, 1992
- 2) Παρκινσονικό τμήμα Β' Νευρολογικής κλινικής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης: Νόσος του Πάρκινσον Νεώτερες εξελίξεις, Χαλκιδική, 1991
- 3) Maurice Victor, Allan H.Ropper: Principles of Neurology, 7th edition, New York. The McGraw-Hill Companies, Inc.1976
- 4) Κ.Θ.Παπαγεωργίου, 23^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Συνέδριο Αθηνών: Νόσος του Πάρκινσον, Αθήνα, Ιατρική Εταιρία Αθηνών, 1997
- 5) Ted M. Dawson and Valina L. Dawson (2003 Oct). Molecular Pathways of neurodegeneration in Parkinson's Disease. Science, vol 302:819-822
- 6) A.E. Lang and A.M. Lozano (1998 Oct). Parkinson's Disease. New England Journal of Medicine, 339: 1.044-1.053 and 1.130-1.143
- 7) Andres M. Lozano and Suneil K Kalia (2005 Oct). New therapeutic strategies for PD. Scientific American, Katoptro, 26-34
- 8) Mark S. Forman, John Q Trajanowski and Virginia M-Y Lee (2004 Oct). Neurodegenerative Diseases: A Decade of Discoveries Pave the Way for Therapeutic Breakthroughs. Nature Medicine, 10: 1.055-1.063
- 9) Kessler I. (1978). Parkinson's disease in epidemiological perspectives. Advances in Neurology, 25:355-383
- 10) Gibbs WRG, Lees AJ. (1994) Pathological clues to the cause of Parkinson's disease. In: Marsden D, Fahn S, eds. Movement Disorders 3. Oxford, UK. Butterworth – Heinemann
- 11) National Institute of Neurological Disorders and Stroke (January 2006). Parkinson's Disease: Hope Through Research. National Institutes of Health
- 12) Λογοθέτης Ι. Νευρολογία. Θεσσαλονίκη: University Studio Press, 1988
- 13) Cotzias G (1968). "L-Dopa for Parkinsonism.". N Engl J Med 278 (11): 630.
- 14) Steller H.(1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 267:1.445-1462
- 15) Vermeulen, R.J. (1994) Effects of Dopamine D1 and D2 receptor agonists on motor behavior of MPTP-lesioned monkeys. PhD-thesis, Vrije Universiteit Amsterdam

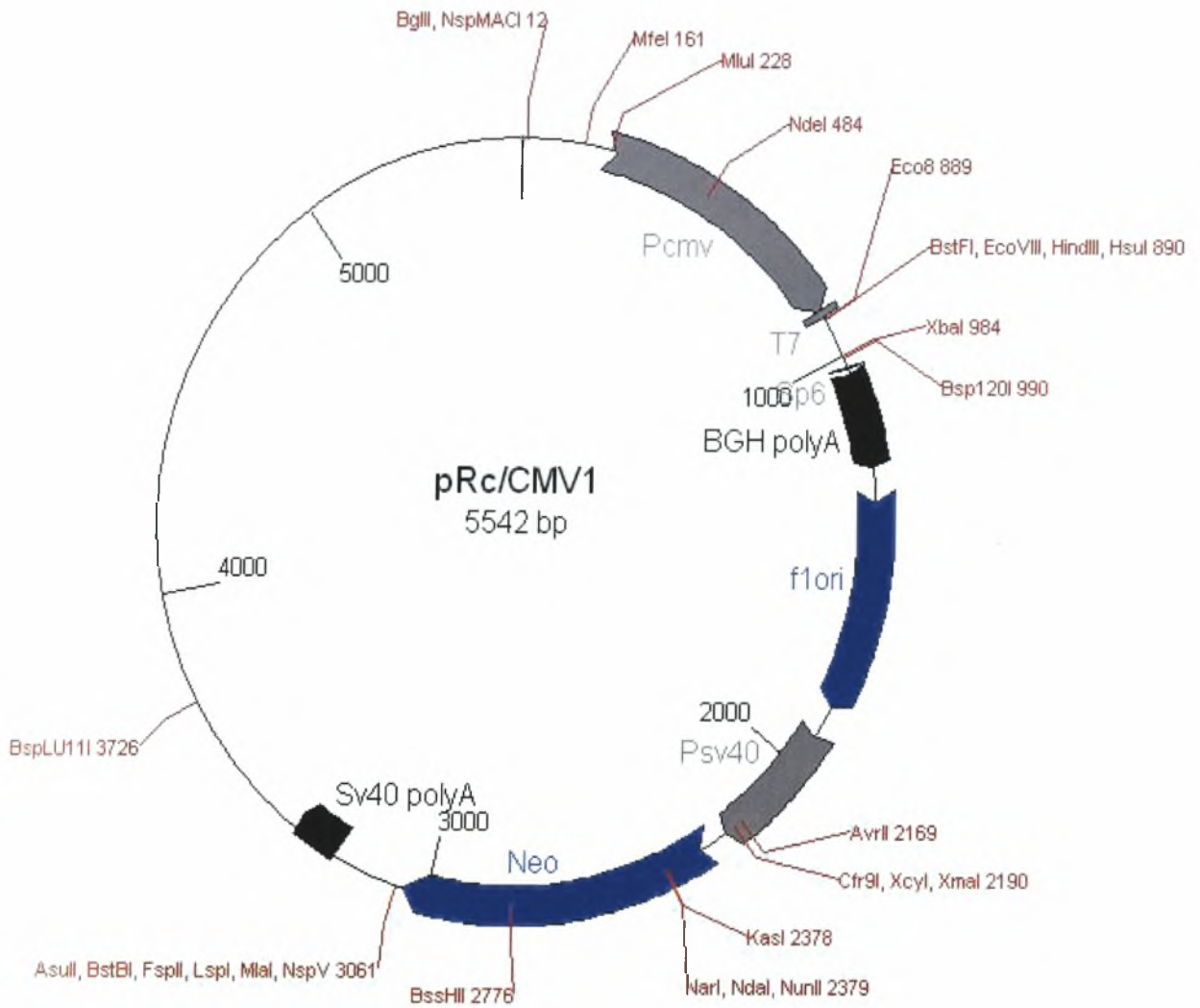
- 16) Rieley DE, Lang AE. Movement Disorders, IN: Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Marsden CD. Neurology in Clinical Practice: The Neurological Disorders. Boston: Butterworth-Heinemann, 1996:1733-1772
- 17) Christopher A. Ross and Michelle A. Poirier (2004). Protein aggregation and neurodegenerative diseases. Nature Medicine, 510-517
- 18) Evo Lindersson, Rasmus Beedholme (2004). Proteosomal Inhibition by a-synuclein filaments and oligomers. Journal of Biological chemistry, vol 279, 13: 12924-12934
- 19) Moussa B. H. Youdim and Peter Riederer, (1997). Understanding Parkinson's Disease, Scientific American, Katopro.
- 20) Eizirik DL, Spencer P, Kisby GE. (1996). Potential role of environmental genotoxic agents in neurodegenerative diseases. Biochem Pharmacol 51: 1585-1591
- 21) Tanner CM. (2003). "Is the cause of Parkinson's disease environmental or hereditary? Evidence from twin studies.". Adv Neurol 91: 133-42.
- 22) Gerlach M, Riederer P, Przuntek H, Youdim (1999). MPTP mechanism of neurotoxicity and their implication for Parkinson's disease. Eur J Pharmacol, 208: 273-286
- 23) Edwards RH. (1993). Neuronal degeneration and the transport of the neurotransmitters. Neurology 42: 2241-2250
- 24) Polymeropoulos MH., Lavedan C., Leory E, et al. (1997). Mutation in the a-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science 276: 2045-2047
- 25) Mel B Feany (2004). New genetics insights into Parkinson's Disease. New England Journal of Medicine 1937-1940.
- 26) L.s. Formo (1996). J. neuropathol. Exp. Neurol. 55, 259
- 27) M. Goedert (2001). Nature Rev. Neurosci. 2, 492
- 28) Benoit I. Giasson, John E. Duda, Shawn M. Quinn (2002). Neuronal a-Synucleinopathy with General Movement Disorder in Mice Expressing A53T human a-Synuclein. Neuron, 34:521-533
- 29) Virginia M.-Y. Lee and John Trojanowski (2006). Mechanism of Parkinson's Disease linked to pathological a-Synuclein: New target for Drugs Discovery
- 30) Eliezer Masliah, Edward Rockenstein, Isaac Veinbergs (2000). Dopaminergic loss and Inclusion Body formation in a-Synuclein mice: Implications for neurodegenerative disorders. Science, 287
- 31) X. Chen et al., (1995), Genomics 26: 425

- 32) Giasson, B.I., Lee and Trojanowsky (2004). Animal models of neurodegenerative dementing disorders other than Alzheimers disease. *Clin. Neurosci. Res.* 3, 427-436
- 33) J. M. George, (2002), *Genome Biol.* 3, Reviews3002
- 34) B.I.Giasson, I. V. Murray (2001), *J. Biol. Chem.* 276, 41952
- 35) R. J. Perrin, W.S. Woods, D. F. Claysoton, J.M. George (2001). *J. Biol. Chem* 276, 41958
- 36) Alessandra Recchia, Patricia Debertto, Alessandro Negro (2004). A-Synuclein and Parkinson's Disease. *The FASEB Journal*, 617-629
- 37) K.E. Paleologoy, G.B. Irvine and O.M.A. El Agnaf. (2005). A-synuclein aggregation in neurodegenerative disease and its inhibition as a potential therapeutic strategy. *Biochemical Society Transaction*, 33, part 5, 1106-1110
- 38) Osterona N., Petrucelli, L. Farre, (1999). Alpha synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J. Neuroscience*, 19, 5782-5791
- 39) Xu, J., Kao, S. Y. Lee and Yankner B. (2002). Dopamine dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nature Medicine*, 8, 600-606
- 40) El-Agnaf, O. M., and Irvine, G. B. (2002) Aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein and related peptides. *Biochem.Soc. Trans.* 30, 559-565
- 41) Kim, T. D., Paik, S. R., and Yang, C. H. (2002) Structural and functional implications of C-terminal regions of alphasynuclein. *Biochemistry* 41, 13782-13790
- 42) 22 Park, S.M., Jung, H.Y., Kim, T.D., Park, J.H., Yang, C.-H. and Kim, J. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 28512-28520
- 43) Kahle, P. J., Haass, C., Kretschmar, H. A., and Neumann, M. (2002) Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases. *J. Neurochem.* 82, 449-457
- 44) Hsu, L.J., Sagara, Y., Arroyo, A., Rockenstein, E., Sisk, A., Mallory, M., Wong, J., Takenouchi, T., Hashimoto, M. and Masliah, E. (2000) *Am. J. Path.* 157, 401-410
- 45) Benoit I Giasson and Virginia M.Y. Lee (2003). Are ubiquitination pathways central to Parkinson's Disease?, *Cell* 114, 1-8
- 46) Anita Sidhu, Christopher Wersinger and Philippe Vernier (2004). Does a-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse? *FASEB J.* 18, 637-647
- 47) Perez, R. G., Waymire, J. C., Lin, E., Liu, J. J., Guo, F., and Zigmond, M. J. (2002) A role for α -synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J. Neurosci.* 22, 3090-3099

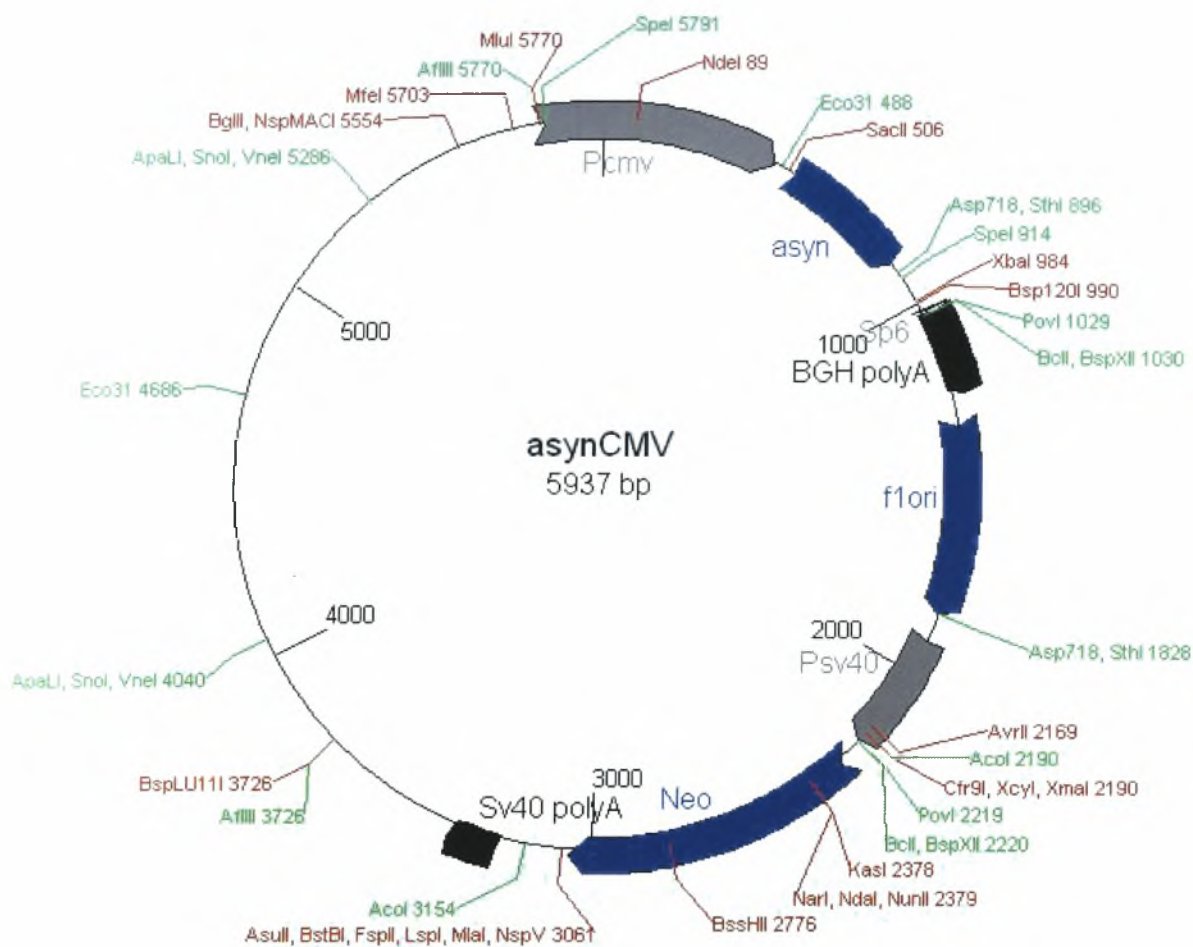
- 48) Lotharius, J., and Brundin, P. (2002) Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2395–2407
- 49) Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1620–1624
- 50) Conway, K. A., Rochet, J. C., Bieganski, R. M., and Lansbury, P. T., Jr. (2001) Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 294, 1346–1349
- 51) Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F., and George, J.M. 1998. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* 273(16): 9443-9.
- 52) Jones, D. C., Gunasekar, P. G., Borowitz, J. L., and Isom, G. E.(2000) Dopamine-induced apoptosis is mediated by oxidative stress and is enhanced by cyanide in differentiated PC12 cells. *J. Neurochem.* 74, 2296–2304
- 53) Goedert, M. 1999. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 354(1386): 1101-18.
- 54) Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388(6645): 839 40.
- 55) McNaught, K.S., Shashidharan, P., Perl, D.P., Jenner, P., and Olanow, C.W. 2002. Aggresome-related biogenesis of Lewy bodies. *Eur J Neurosci* 16(11): 2136-48.
- 56) Volles, M.J., Lee, S.J., Rochet, J.C., Shtilerman, M.D., Ding, T.T., Kessler, J.C., and Lansbury, P.T. Jr. 2001. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry* 40(26): 7812-78129.
- 57) Park, S. M., Jung, H. Y., Kim, T. D., Park, J. H., Yang, C. H., and Kim, J. (2002) Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of α -synuclein, a molecular chaperone. *J. Biol. Chem.* 277, 28512–28520
- 58) Rochet, J. C., Conway, K. A., and Lansbury, P. T. (2000) Inhibition of fibrillization and accumulation of prefibrillar oligomers in mixtures of human and mouse α -synuclein. *Biochemistry* 39, 10619–10626
- 59) George K. Tofaris, Maria Garcia Spillantini et. al. (2006). Pathological changes in dopaminergic nerve cells of the substantia nigra and olfactory bulb in mice transgenic for truncated human (1-120): Implication for Lewy body disorder. *The journal of neuroscience*, 26, 3942-3950

- 60) Tofaris GK, Razaq A, Ghetti B, Lilley KS, Spillantini MG (2003) Ubiquitination of α -synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function. *J Biol Chem* 278:44405–44411.
- 61) Murray IV, Giasson BI, Quinn SM, Koppaka V, Axelsen PH, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VMY (2003) Role of α -synuclein carboxyterminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry* 42:8530–8540.
- 62) Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VMY (2002) Neuronal α -synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human α -synuclein. *Neuron* 34:521–533.
- 63) Lee MK, Stirling W, Xu Y, Xu X, Qui D, Mandir AS, Dawson TM, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL (2002) Human α -synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53-Thr mutation causes neurodegenerative disease with α -synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8968–8973.
- 64) Liu C-W, Corboy MJ, DeMartino GN, Thomas PJ (2003) Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* 299:408–411.
- 65) Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998a) α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6469–6473.
- 66) Crowther RA, Daniel SE, Goedert M (2000) Characterisation of isolated α -synuclein filaments from substantia nigra of Parkinson's disease brain. *Neurosci Lett* 292:128–130.
- 67) Norris EH, Giasson BI, Hodara R, Xu S, Trojanowski JQ, Ischiropoulos H, Lee VMY (2005) Reversible inhibition of α -synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. *J Biol Chem* 280:2
- 68) Hashimoto M, Takeda A, Hsu LJ, Takenouchi T, Masliah E (1999) Role of cytochrome c as a stimulator of α -synuclein aggregation in Lewy body disease. *J Biol Chem* 274:28849–28852. 1212–21219
- 69) Matsuoka Y, Vila M, Lincoln S, McCormack A, Picciano M, LaFrancois J, Yu X, Dickson D, Langston WJ, McGowan E, Farrer M, Hardy J, Duff K, Przedborski S, Di Monte DA (2001) Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human α -synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiol Dis* 8:535–539.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.

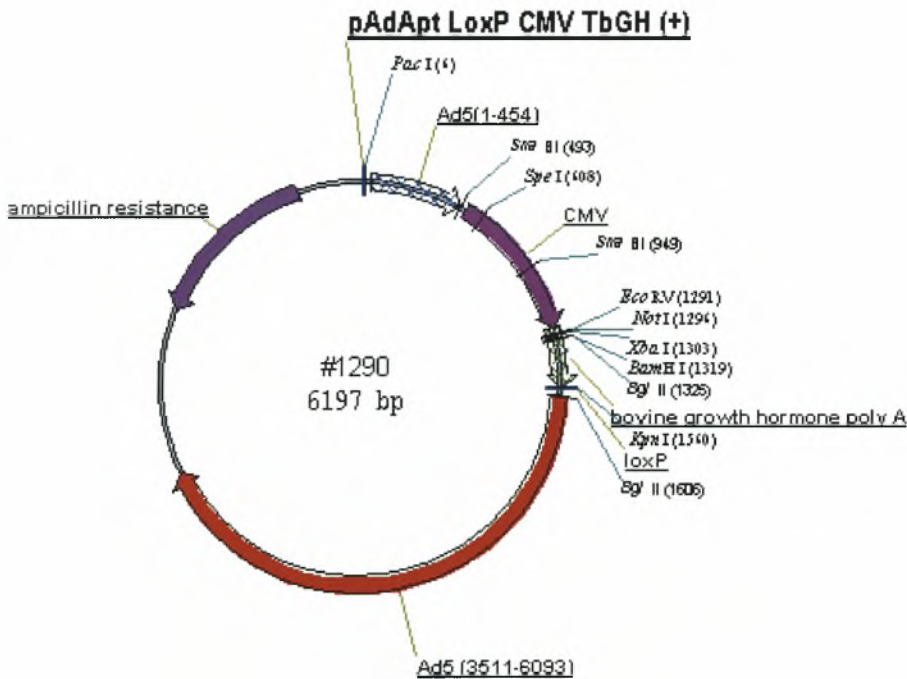
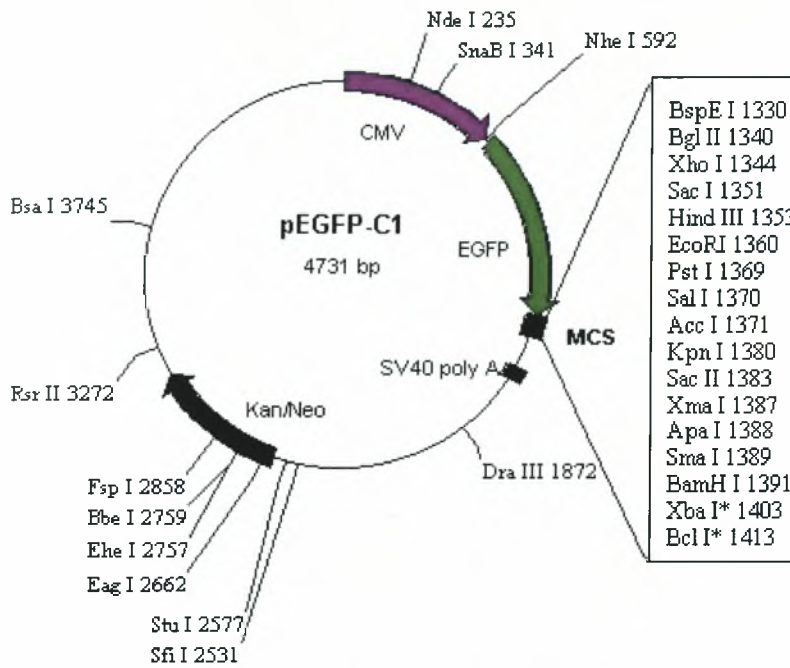


Εικόνα 37. Ο φορέας *pcmv* και οι θέσεις περιορισμού για ένζυμα που κόβουν σε μια θέση.



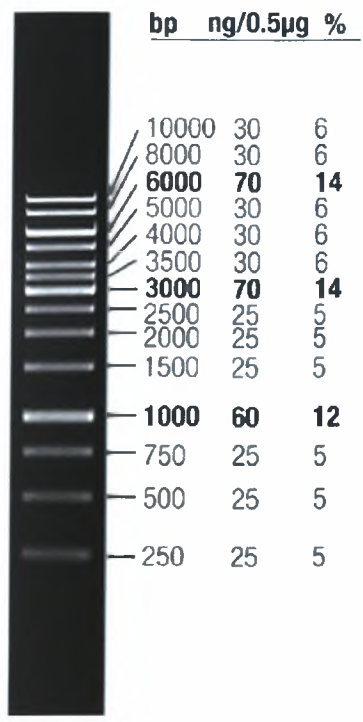
Εικόνα 38 Ο φορέας *pcmv* το γονίδιο της *asyn120aaA53T*. Με κόκκινο φαίνονται οι μονές θέσεις κοπής ενώ με πράσινο οι διπλές θέσεις κοπής.

pEGFP-C1

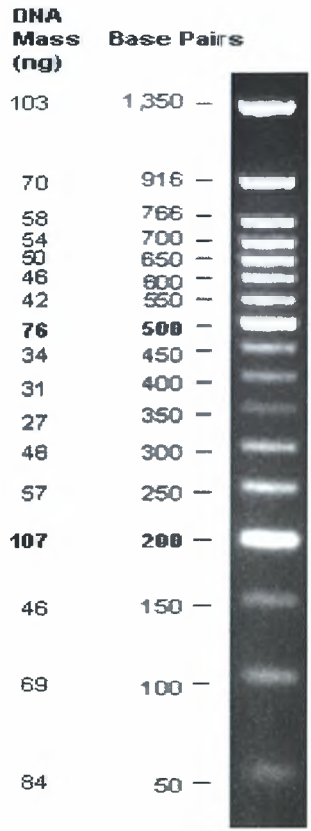


Εικόνα 39. Το γονίδιο GFP απομονώθηκε από τον 1^ο φορέα με πέψη blunt end στο 5' άκρο (NheI 592) και στην θέση BamHI 1391 στο 3' άκρο. Εισήχθη στον φορέα pAdApt LoxP CMV TbGH με ligation blunt end στο 5' άκρο (NotI 1296) ενώ στο 3' άκρο η πέψη είχε πραγματοποιηθεί με το ίδιο ένζυμο BamHI (1391). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε από την διδακτορική φοιτήτρια Γιώτα Παναγιωτοπούλου του εργαστηρίου κυτταρικής βιολογίας.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.

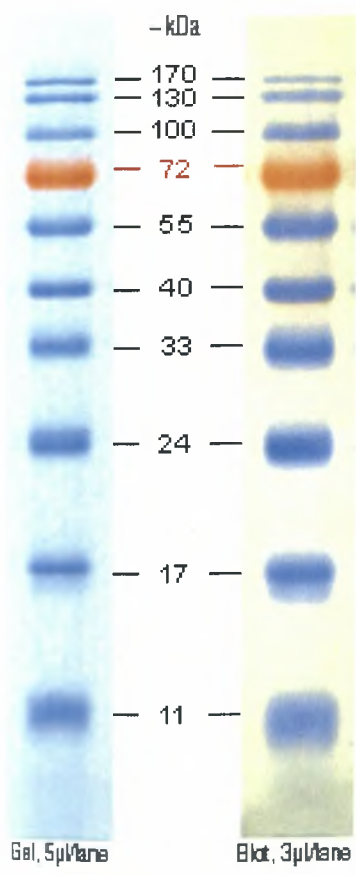


0.5µg/lane, 8cm length gel,
1X TAE, 7V/cm, 45min



Εικόνα 41. GeneRuler 1kb DNA Ladder.
New England Biolabs

Εικόνα 40. 50bp DNA Ladder. New England



Εικόνα 42 PageRuler
Prestained protein Ladder
(SM0671), Fementas

12% SDS-PAAG

File: 061212-21_B16_asynCMV1-T7promoter.ab1 Run Ended: 2006/12/14 0:25:4 Signal G:55 A:94 C:117 T:104
 Sample: asynCMV1_T7promoter Lane: 64 Base spacing: 13.65 86S bases in 9710 scans Page 1 of 2

