



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας
Αθηνών

Πτυχιακή εργασία με θέμα

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ
Α- ΣΥΝΟΥΚΛΕΙΝΗΣ ΣΕ
ΟΛΙΓΟΔΕΝΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

Κιρμπάκη Μαρία-Άννα
Επιβλέπων καθηγητής : Κος Κωνσταντίνος Βεκρέλλης ,
Ερευνητής Β'
Συνεπιβλέποντες : Άννα- Μαρία Ψαρρά
Στάγκος Δημήτριος

Αθήνα 20/03/2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο ίδρυμα ιατροβιολογικών ερευνών της ακαδημίας Αθηνών , στο εργαστήριο του κ.Κωνσταντίνου Βεκρέλλη , Ερευνητής Β΄.Το διάστημα πραγματοποίησής της ήταν : Σεπτέμβριος 2015 – Σεπτέμβριος 2016.

Κατά τη διάρκεια της εργασίας , πραγματοποιήθηκε η μελέτη και η παρατήρηση της α-συνουκλείνης.Η α-συνουκλείνη είναι μια εγγενής πρωτεΐνη του εγκεφάλου , που σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται στη μη υδατοδιαλυτή και ξετυλιγμένη της μορφή.Στην ασθένεια του Πάρκινσον και στην πολλαπλή ατροφία συστημάτων , η α-συνουκλείνη σχηματίζει ινίδια που μετατρέπονται σε συσσωματώματα , σχηματίζοντας έτσι τα χαρακτηριστικά σωμάτια Lewy.

Τα OLN κύτταρα φυσιολογικά δεν εκφράζουν την α συνουκλείνη , αλλά στη σκλήρυνση κατά πλάκας η α συνουκλείνη εντοπίζεται αυθόρμητα σε παθολογικές μορφές στο CL των OLN.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν OLN κύτταρα από αρουραιους για τη μέτρηση της υπάρχουσας α-συνουκλείνης.Στα κύτταρα αυτά καθώς μελετήθηκε η έκφραση της α-συνουκλείνης τόσο στους άγριους τύπους (WT) , όσο και σε σειρές όπου υπερεκφραζόταν η α-συνουκλείνη (AS).

Η α-συνουκλείνη μετρήθηκε στην εγγενή της μορφή , όσο και στην εκλυόμενη από τα κύτταρα μορφή της (εξωσώματα).Η μελέτη της έκφρασης της α-συνουκλείνης έγινε σε 3 επίπεδα :

1. Στα medium (θρεπτικό υλικό όπου αναπτύχθηκαν τα κύτταρα)
2. Στο CL των κυττάρων
3. Στην πελλέτα των εξωσωμάτων , που απομονώθηκε από τα medium

ABSTRACT

The current thesis was conducted at the Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens , at mr.Konstantinos Vekrelli's laboratory during the period of September 2015- September 2016

During the thesis conduction , there was a deep investigation and observation of protein a-synuclein.A-synuclein is a neuronal protein , which under natural circumstances is natively unfolded.In Parkinson's disease and MSA (Multiple system Atrpophy) a-synuclein creates fibrils which are insoluble and create the charachteristic pathological inclusion Lewy Bodies.

OLN (oligodendroglial) cells normally do not express a-synuclein , but in MSA a-synuclein is located in the Cell Lysate of OLN cells.

For the experiments 2 types of OLN rat cells were used : Wild Type & Genetically modified , which were overexpressing a-synuclein.

The amount of a-synuclein was counted in the samples of :

1. Medium in which the cells were grown
2. Cell Lysate of the cells
3. Exosomes pellet

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Ιδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών , στο εργαστήριο νευροεκφυλιστικών ασθενειών , υπεύθυνος του οποίου είναι ο Δρ.Βεκρέλλης , ερευνητής Β΄.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον ίδιο , καθώς μέσω της διατριβής μου στο εργαστήριό του , μου δόθηκε η ευκαιρία να ασχοληθώ με έναν πολύ ενδιαφέρον ερευνητικό τομέα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου : Γιοβάννα Αριανόγλου (PhD) , Βασιλική Σηκιώτη (PhD) , Βασίλη Παπαδόπουλο (PhD) , Ευαγγελία Μανουηλίδου (PD-Researcher) και Μαρία Κεραμιώτη (PhD) , Μαρία Τσιόκα (Msc) για την υπομονή , την επιμονή τους και τις αμέτρητες συμβουλές & επιστημονικές καθοδηγήσεις μου παρείχαν , ώστε να ολοκληρωθεί η πτυχιακή εργασία μου.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ASYN: α-συνουκλεΐνη (α-synuclein)

DMSO: διμέθυλο-σουλφοξειδίο (Dimethyl sulfoxide)

DNA: δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ

ECL: ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (Enhanced Chemiluminescence)

KDa: 1000 Da

L-DOPA: L-3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνη – λεβοντόπα (L-3,4-dihydroxyphenylalanine – levodopa)

mRNA: αγγελιαφόρο RNA (messenger RNA)

MSA : Πολλαπλή ατροφία συστημάτων (multiple system atrophy)

OLN : Ολιγοδενδροκύτταρα (oligodendrocytes)

RNA: ριβονουκλεϊκό οξύ

RPMI: θρεπτικό μέσο του Roswell Park Memorial Institute

SNpc: συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας (Substantia Nigra pars compacta)

STET: διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων (STET sample buffer)

TEMED: N,N,N',N'-τετραμεθύλεν-διαμίνη (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)

Tween: πολυοxyethylene-sorbitan-monolaurate

Triton-100: αιθέρας της πολυαιθυλενογλυκόλης (polyethylene glycol ether)

WT: φυσικού τύπου (wild type)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η ασθένεια του Parkinson.....	7
2. Παθοφυσιολογία της νόσου του Παρκινσον.....	8
3.Θεραπεία της νόσου του Πάρκινσον.....	9
4.Η πολλαπλή ατροφία συστημάτων (MSA)	10
5. Παθοφυσιολογία της MSA.....	10
6.Θεραπεία της MSA.....	11
7.Η πρωτεΐνη α-συνουκλείνη.....	12
8.Μεταλλάξεις της α-συνουκλείνης.....	13
9.Γενετικά Μοντέλα συνουκλεοπαθειών.....	14
10.Παθολογικές μορφές της α-συνουκλείνης.....	15
11.Έκκριση της α-συνουκλείνης.....	15
12.Τα εξωσώματα.....	16
13.Οι πρωτεΐνες prion.....	18
14. Η υπόθεση της prion παθολογίας της α-συνουκλείνης.....	18

II. ΥΛΙΚΑ

1.Η κυτταρική σειρά OLN 93.....	20
2.Υλικά για τις μεθόδους.....	21

III. ΜΕΘΟΔΟΙ

1.Διατήρηση OLN κυτταροκαλλιιεργειών / Συλλογή δειγμάτων	24-27
2.1Bradford.....	28
3.1Western Blot.....	29-39
4.1Microbradford.....	40
5.1AChE.....	41-43
6.1Sandwich Elisa.....	44-48

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

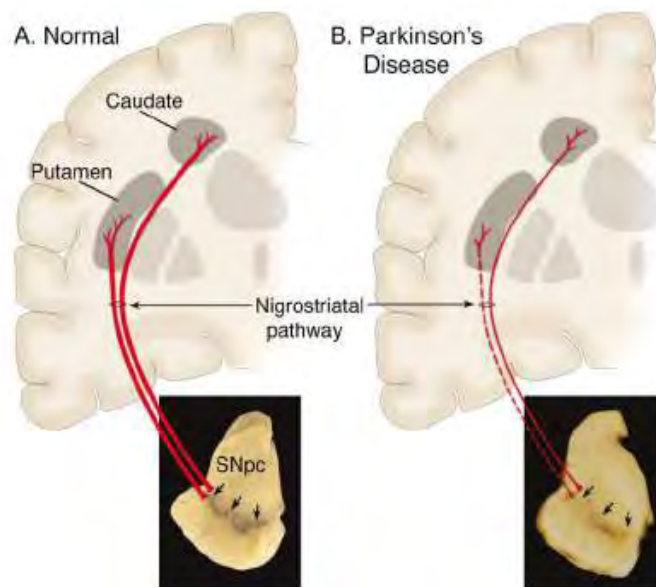
2.1 Αποτελέσματα Bradford.....	49
3.1 Αποτελέσματα Western Blot.....	50
4.1 Αποτελέσματα Microbradford.....	51
5.1 Αποτελέσματα AchE.....	52
6.1 Αποτελέσματα Sandwich Elisa.....	54
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	56
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58

Ι.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η ασθένεια του Parkinson

Η νόσος του Πάρκινσον (παρκινσονισμός) είναι μια εκφυλιστική διαταραχή του ΚΝΣ. Τα κινητικά συμπτώματα της νόσου του Πάρκινσον είναι αποτέλεσμα του θανάτου των ντοπαμινεργικών κυττάρων της μέλαινας ουσίας (Εικ. 1).

Η μέλαινα ουσία είναι το στρώμα φαιάς ουσίας που διαχωρίζει την καλύπτρα του μεσεγκεφάλου από το εγκεφαλικό στέλεχος.



Dauer & Przedborski, Neuron 39, 2003

Τα αίτια δημιουργίας της νόσου του Πάρκινσον δεν είναι ακόμη γνωστά. Τα αρχικά συμπτώματα της ασθένειας είναι κινητικά και περιλαμβάνουν τρόμο, ακαμψία, βραδυκινησία και δυσχέρεια στην βάρδιση. Αργότερα, μπορεί να εμφανιστούν ψυχιατρικές εκδηλώσεις (κατάθλιψη) και άνοια, που εμφανίζονται στα αργότερα στάδια της νόσου. Η νόσος περιλαμβάνει και διαταραχές ύπνου. Είναι συχνότερη στη τρίτη ηλικία και συχνότερα στις ηλικίες άνω των 50 ετών.

Η νόσος πήρε το όνομα της από τον Άγγλο γιατρό James Parkinson που δημοσίευσε την πρώτη περιγραφή της νόσου το 1817. (Goetz 2002; Weintraub, Comella et al. 2008)

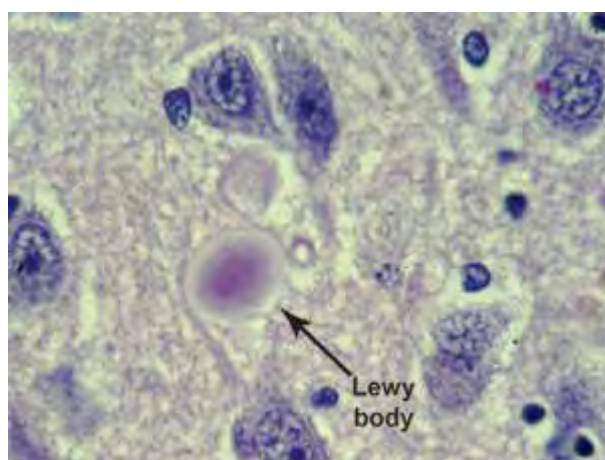
Πολλοί διεθνείς οργανισμοί προωθούν την ενημέρωση για την νόσο και την έρευνα καθώς και τις προσπάθειες για την βελτίωση του επιπέδου ζωής των ασθενών. Η διεθνής ημέρα για την νόσο είναι στις 11 Απριλίου με σύμβολο την κόκκινη τουλίπα.

2. Παθοφυσιολογία της νόσου του Παρκινσον

Η παθοφυσιολογία της νόσου χαρακτηρίζεται από :

1. Την συσσώρευση της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνη σε σωματία Lewy.
2. Την ανεπαρκή παραγωγή και λειτουργία της ντοπαμίνης που παράγεται στους κεντρικούς νευρώνες του μεσεγκεφάλου.

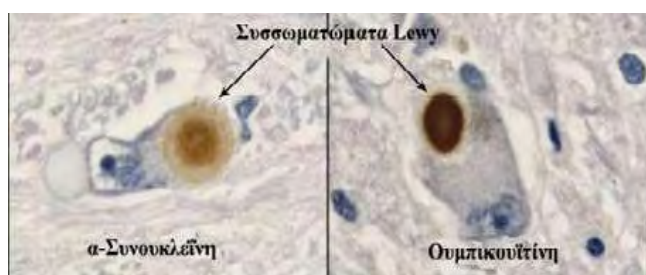
Τα σωματία του Lewy (Εικ.2) , περιγράφηκαν από τον Lewy το 1912 και είναι χαρακτηριστικά της νόσου. Η κατανομή των σωματίων συνδέεται με την βαρύτητα της νόσου. Η διάγνωση γίνεται κλινικά με βάση τα συμπτώματα, ενώ εξετάσεις όπως η νευροαπεικόνιση γίνονται για επιβεβαίωση.



Εικόνα 2 : Σωματίο Lewy
<http://lewybody.org/science>

Τα σωματία αυτά αποτελούν γνώρισμα της νόσου, ανευρίσκονται επίσης και σε άλλες ασθένειες (π.χ. MSA , Alzheimer κ.α.) . Τα σωματία Lewy αποτελούνται από ινίδια α-συνουκλεΐνης .Τα ινίδια αυτά αποτελούνται από μη διαλυτές μορφές της α-συνουκλεΐνης, που μοιάζουν δομικά με το β-αμυλοειδές.

Ένα βασικό συστατικό των σωματίων Lewy είναι πολλαπλές πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με την ουμπικουΐτινη(Engelender S et al 2008). Οι πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες με ουμπικουΐτινη αποικοδομούνται φυσιολογικά στο πρωτεάσωμα.(Εικ.3)



Εικόνα 3 : Ανοσοϊστοχημεία συσσωμάτων Lewy σε ντοπαμινεργικό νευρώνα της SNpc.Ανοσοϊστοχημεία με χρήση αντισώματος έναντι της ASYN δίνει έντονα χρωματισμένο κέντρο (αριστερά).Ανοσοϊστοχημεία έναντι της ουμπικουΐτινης (δεξιά)

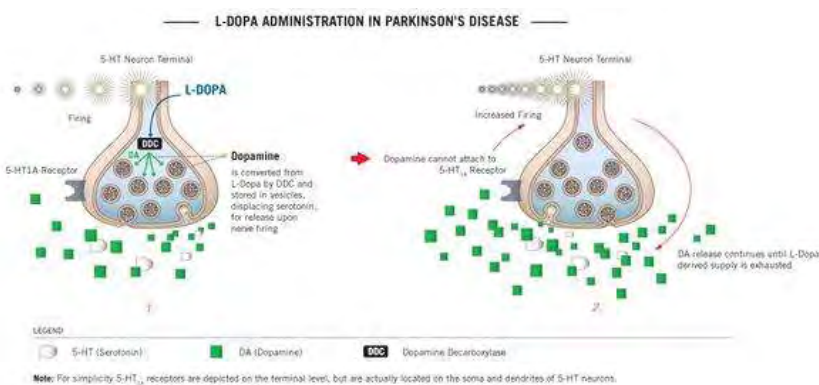
(Dauer and Pzederovski 2003)

3.Θεραπεία της νόσου του Πάρκινσον

Η νόσος χαρακτηρίζεται από έλλειψη ντοπαμίνης και η θεραπευτική αντιμετώπιση είναι η υποκατάσταση της ντοπαμίνης (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology et al 2016*). Αυτό επιτυγχάνεται :

- i. Μέσω χορήγησης της πρόδρομης ουσίας της ντοπαμίνης, την L-dopa (**Εικ.4**)
- ii. Ενεργοποιώντας τους υποδοχείς ντοπαμίνης με ουσίες που μιμούνται την δράση της (ντοπαμινεργικοί αγωνιστές).
- iii. Εμποδίζοντας τον μεταβολισμό της ντοπαμίνης από τα ένζυμα MAO και COMT.

Οι θεραπείες είναι αποτελεσματικές μόνο έναντι των κινητικών εκδηλώσεων των άκρων και δεν εμποδίζουν τον νευροεκφυλισμό.



Εικόνα 1 : Η δράση της L-DOPA στη θεραπεία του Πάρκινσον

<http://neurosciencefundamentals.unsw.wikispaces.net/Deep+Brain+Stimulation+Neurostimulators+for+Treatment+Parkinson%27s+Disease>

4.Η πολλαπλή ατροφία συστημάτων (MSA)

Στη νόσο του Πάρκινσον μόνο μια ομάδα εγκεφαλικών κυττάρων καταστρέφονται με γοργούς ρυθμούς. Αυτά τα κύτταρα παράγουν την ντοπαμίνη, μια νευρο-χημική ουσία που διεγείρει μέρη του εγκεφάλου που είναι υπεύθυνα για την κίνηση. Χωρίς την ντοπαμίνη, το σώμα γίνεται πιο άκαμπτο, πιο αργό και μπορεί να αρχίσει να τρέμει. Στη νόσο του Πάρκινσον η φαρμακευτική αντικατάσταση της ντοπαμίνης που χάνεται μπορεί να βελτιώσει την κινητική κατάσταση του ασθενούς. (Flabeau, G. Meissner, Tison et al 2010).

Τα Παρκινσονικά Σύνδρομα όμως δεν καταστρέφουν μόνο τα εγκεφαλικά κύτταρα που παράγουν ντοπαμίνη αλλά περιλαμβάνουν και άλλα μέρη του νευρικού συστήματος, έχοντας ως αποτέλεσμα ταχεία εξέλιξη της αρρώστιας. Ένα από αυτά τα σύνδρομα είναι η πολλαπλή ατροφία συστημάτων.

Στην Πολλαπλή Ατροφία Συστημάτων πάνω από ένα γκρουπ νευρικών κυττάρων εκφυλίζεται. Στη νόσο του Πάρκινσον επηρεάζονται τα κύτταρα που δημιουργούν την ντοπαμίνη αλλά στην Πολλαπλή Ατροφία Συστημάτων και άλλα κύτταρα επηρεάζονται ή καταστρέφονται πχ ολιγοδενδροκύτταρα. Η MSA χαρακτηρίζεται ως συνουκλεοπάθεια (Ubhi K, Low P, Masliah E. et al 2011).

5.Παθοφυσιολογία της νόσου MSA

Η παθοφυσιολογία της νόσου χαρακτηρίζεται από :

1. Η α-συνουκλεΐνη βρίσκεται εντός των συναπτοσωμάτων και στο πυρήνα των νευρώνων και επί παρουσίας Fe ασκεί καταλυτικό ρόλο στο σχηματισμό του Υπεροξειδίου του υδρογόνου δρα ανασταλτικά, δηλαδή, σε μηχανισμούς απόπτωσης. Πιθανό να συμμετέχει στον μεταβολισμό των λιπιδίων, στον μεταβολισμό της ντοπαμίνης και στην νευροευπλαστικότητα.
2. Η α-συνουκλεΐνη βρίσκεται εντός των σφαιρικών, ομοιογενών, αργυρόφιλων, εωσινοφιλικών κυτταροπλασματικών εγκλείστων, των λεγόμενων σωματίων Lewy μαζί με ουμπικιτίνη και τορσίνη Α.
3. Εντοπισμός της α-συνουκλεΐνης στο κυτταρόπλασμα των ολιγοδενδροκυττάρων. Ο τρόπος με τον οποίο η α-συνουκλεΐνη εντοπίζεται στο κυτταροπλασματικό χώρο των OLN παραμένει άγνωστος (Yoshida M. et al 2007)

6.Θεραπεία της MSA

Υπάρχει φτωχή ανταπόκριση στη θεραπεία της ασθένειας. Το 30% των ασθενών αρχικά ανταποκρίνεται στη θεραπεία με L-Dopa (*Bensimon G, Ludolph A, Agid Y, Vidailhet M, Rayan C, Leigh PN et al 2008*). αλλά μετά από 1-2 χρόνια μόνο το 10% επωφελείται.

Ενδέχεται Πιθανή βελτίωση με ντοπαμινεργικούς αγωνιστές πχ αμανταδίνη μέχρι 300 mg/day (*Rajrut AH, Uitti RJ, Fenton ME, George D. et al 1997*)

7. Η πρωτεΐνη α-συνουκλείνη

Η α-συνουκλείνη (Εικ.5) είναι μια καλά συντηρημένη, όξινη κυτταροπλασματική πρωτεΐνη μάζας ~16 kDa στα σπονδυλωτά, που αποτελείται από 140 αμινοξέα. Στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το γονίδιο SNCA, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4.



Εικόνα 5 : Η α-συνουκλείνη
Human micelle-bound alpha-synuclein Ulmer, T.S.,
Bax, A., Cole, N.B., Nussbaum, R.L.

Είναι άφθονη στον εγκέφαλο και εκφράζεται κυρίως στις προσυναπτικές μεμβράνες και τις υπομεμβρανώδεις κύστες. Πρόκειται για εγγενώς ξετυλιγμένη πρωτεΐνη που συνδέεται αντιστρεπτά στα όξινα φωσφολιπίδια των μεμβρανών και αναδιπλώνεται λαμβάνοντας α-ελικοειδή διαμόρφωση. Η αναδίπλωση αυτή αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση προκειμένου να ασκήσει το φυσιολογικό βιολογικό της ρόλο. Σε κάθε περίπτωση αδυναμίας αναδίπλωσης, η α-συνουκλείνη παρουσιάζει αυξημένη τάση πολυμερισμού και ινιδισμού που τελικά οδηγούν σε κυτταρική βλάβη (Βογιατζή, Τερέζα-Ανδριανή et al 2009)

Οι λειτουργίες της α-συνουκλείνης είναι :

1. Πιθανόν να συμμετέχει στον σχηματισμό και τη διακίνηση συναπτικών κυστιδίων, καθώς μπορεί να προσδένεται σε λιπίδια και βρίσκεται εμπλουτισμένη στις προσυναπτικές μεμβράνες. Ειδικότερα στον έλεγχο και διακίνηση των έτοιμων αποθεμάτων ντοπαμίνης μέσω κυστιδίων.
2. Η προστασία των νευρικών απολήξεων κατά τον σχηματισμό του συμπλέγματος SNARE στην προσυναπτική μεμβράνη, δρώντας ως τσαπερόνη (Bendor, Logan, H. Edwards et al 2009)

8.Μεταλλάξεις στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης

Το γονίδιο της α- συνουκλεΐνης βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωματοσώματος 4 (4q21). Οι σημειακές μεταλλάξεις είναι σπάνιες. Έχουν περιγραφεί τρεις: Ala53Thr , Ala30Pro και E46K.

Η μεταλλαγμένη α- συνουκλεΐνη εμφανίζει αυξημένη τάση πολυμερισμού προς σχηματισμός αδιάλυτων ινιδίων.

Η μη-σωστή αναδίπλωση του μορίου της α- συνουκλεΐνης , οδηγεί σε παρεκκλίνουσες αλληλεπιδράσεις με άλλα βιολογικά μόρια που οδηγούν σε κυτταρική βλάβη.

- Έτσι η A30P μετάλλαξη οδηγεί σε σχηματισμό β-πτυχωτού χωρίς να δημιουργεί fibrils (Lemkau LR, Comellas G, Kloepper KD, Woods WS, George JM, Rienstra CM. et al 2012)
- Η E46K όπως και η A53T μετάλλαξη οδηγούν σε αύξηση της συνάθροισης των ινών (δημιουργία fibrils) λόγω μετατροπής της πρωτεΐνης σε β-πτυχωτό φύλλο. (Kang L, Wu KP, Vendruscolo M, Baum J. et al 2011 & Wise-Scira O, Dunn A, Aloglu AK, Sakallioğlu IT, Coskuner O. et al 2013)
- Η H50Q επιταχύνει τον ολιγομερισμό της σε fibrils και την μετανάστευση της α-συνουκλεΐνης σε γειτονικά κύτταρα (Khalaf , Fauvet B, Oueslati A, Dikiy I, Mahul-Mellier AL, Ruggeri FS, Mbefo MK, Vercruyse F, Dietler G, Lee SJ, Eliezer D, Lashuel H et al 2014).

Τόσο οι σημειακές μεταλλάξεις όσο και οι πολλαπλασιασμοί του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης, οδηγούν σε αυτοσωματικό επικρατή τύπο κληρονομικότητας της νόσου. Η αυξημένη τάση πολυμερισμού είναι κεντρικό γεγονός στη νευροεκφυλιστική διαδικασία.

Κυρίαρχο παραμένει το θέμα της κατανόησης των μηχανισμών που οδηγούν το φυσιολογικό μόριο της α- συνουκλεΐνης στο σχηματισμό τοξικών ολιγομερών. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών και οι σχετικές κυτταρικές διαβάσεις έχουν μελετηθεί στο πλαίσιο της προσπάθειας κατανόησης του νευροεκφυλισμού στην PD.

9.Ζωικά μοντέλα συνουκλεινοπαθειών

Η α-συνουκλείνη καθώς αποτελεί κύριο συστατικό των σωματίων Lewy έχει ταυτοποιηθεί ως μοριακός δείκτης μιας σειράς νευροεκφυλιστικών ασθενειών που χαρακτηρίζονται ως συνουκλεινοπάθειες .

Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα για την επείδειξη της φυσιολογίας και της παθολογίας της α συνουκλείνης.Στα γενετικά τροποποιημένα μοντέλα υπάρχει μια ποικιλία συμπτωμάτων των συνουκλεινοπαθειών αλλά δεν υπάρχει θάνατος των ντοπαμινεργικών νευρώνων των ποντικών (Linan Chen (Zhiguo Xie, Susie Turkson, and Xiaoxi Zhuang et al 2015)

Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια -- A53T

Δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν την τριπλέτα A53T σε ντοπαμινεργικά κύτταρα.Επάγεται έτσι η αύξηση την τάσης α-συνουκλείνης να δημιουργεί fibrils .Ο διπλασιασμός και ο τριπλασιασμός της τριπλέτας A53T δημιουργεί το φαινότυπο του παρκινσονισμού. (Linan Chen , Zhiguo Xie, Susie Turkson, and Xiaoxi Zhuang et al 2015)

Knock out ποντίκια

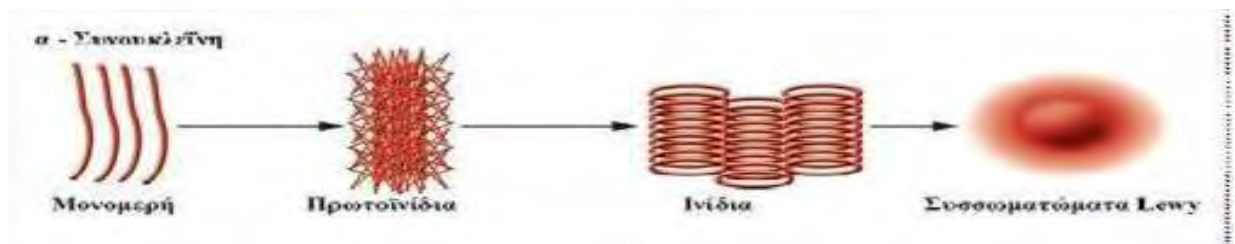
Ο ανασυνδυασμός με σύστημα Cre-Lox χρησιμοποιείται για τη δημιουργία knock out ποντικών.

Το σύστημα αποτελείται από την Cre ρεκομπινάση που ανασυνδυάζει τις αλληλουχίες στόχους LoxP.Η LoxP αλληλουχία έχει απομονωθεί από βακτηριοφάγο P1.

Τοποθετούνται έτσι οι αλληλουχίες LoxP στα γονίδια στόχους σε ένα ποντίκι και γίνεται ένθεση της ρεκομπινάσης στα εγκεφαλικά κύτταρα σε ένα άλλο ποντίκι. Ο απόγονός τους θα είναι CreLoxP και δεν θα εκφράζει το γονίδιο της α-συνουκλείνης

10. Παθολογικές μορφές της α-συνουκλεΐνης

Στο Parkinson παρατηρείται δημιουργία τοξικών ολιγομερών μορφών και συσσώρευση αδιάλυτων ινιδίων μιας εγγενούς της α-συνουκλεΐνης. Υπάρχουν σημαντικά στοιχεία ότι η μετατροπή της α-συνουκλεΐνης από την υδατοδιαλυτή μονομερή της μορφή σε διαλυτά ή αδιάλυτα ολιγομερή (πρωτοϊνίδια) και στη συνέχεια σε αδιάλυτα συσσωματώματα (ινίδια), με τελική κατάληξη το σχηματισμό συσσωματωμάτων Lewy, μέσω της περιοχής ολιγομερισμού της, οδηγεί στο νευροεκφυλισμό. (Εικ.6) (Conway, Harper et al. 1998; El-Agnaf, Jakes et al. 1998; Giasson, Uryu et al. 1999)



Εικόνα 6 : Πολυμερισμός της α-συνουκλεΐνης (Savitt ,Dawson et.2006)

11. Έκκριση της α-συνουκλεΐνης

Η α συνουκλεΐνη εκτός από τον ενδοκυττάριο χώρο μπορεί να ανιχνευθεί στο πλάσμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό.

Για να ανιχνευθεί ο τρόπος έκκρισής της από τον ενδοκυττάριο χώρο καλλιεργήθηκαν κύτταρα SH-SY5Y, που περιέχουν α συνουκλεΐνη και β-γαλακτοσιδάση. Στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων αυτών εμφανίζονται μόρια α συνουκλεΐνης. Τα μόρια της α συνουκλεΐνης εκκρίνονται με τη βοήθεια φορέων (εξωσωμάτων) με ασβεστιο-εξαρτόμενο τρόπο. Η ύπαρξη των εξωσωμάτων επιβεβαιώθηκε μέσω του φθορισμού τους και των μεθόδων χρωματογραφίας (Evangelia Emmanouilidou, Katerina Melachroinou, Theodoros Roumeliotis, Spiros D. Garbis, Maria Ntzouni, Lukas H. Margaritis, Leonidas Stefanis and Kostas Vekrellis et al 2010).

12.Τα εξωσώματα

Τα εξωσώματα αποτελούν μόρια- αγγελιοφόρους που μεταδίδουν μηνύματα στη διακυτταρική επικοινωνία. Απελευθερώνονται από το κύτταρο απευθείας από τη μεμβράνη του πλάσματος. Έχουν εξειδικευμένες λειτουργίες και διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη διακυτταρική σηματοδότηση και τη διαχείριση των αποβλήτων του κυττάρου.

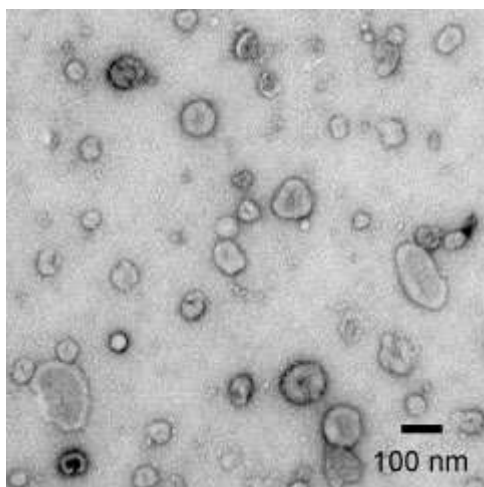
Κατά συνέπεια, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις κλινικές εφαρμογές εξωσωμάτων. Εξωσώματα μπορεί δυνητικά να χρησιμοποιηθούν για την πρόγνωση, τη θεραπεία, καθώς και ως βιοδείκτες .

Τα εξωσώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των νευροεκφυλιστικών νόσων , που σχετίζονται με κακώς αναδιπλωμένες πρωτεΐνες.

Είναι μικρά κυστίδια με μέγεθος που κυμαίνεται από 30 έως 120 nm και έχουν χαρακτηριστικό στρογγυλό σχήμα. Αυτά τα κυστίδια μπορούν να απελευθερωθούν από μία πληθώρα κυττάρων, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, όπως νευρωνικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων , μικρογλοίας , αστροκύτταρων και μη νευρωνικών κυττάρων όπως τα λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα. (Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P et al 2006) Πρόσφατα, έχει δειχθεί ότι εξωσώματα μπορούν να μεταφέρουν αγγελιαφόρο RNA, microRNA, πρωτεΐνες και σύμπλοκα σηματοδότησης, οι οποίες είναι σημαντικές στη διαμόρφωση της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων αποδεκτών (**Εικ.7**).

Άγνωστος παραμένει ακόμη ο μηχανισμός με τον οποίο μεταδίδονται τα μηνύματα μέσω των εξωσωμάτων.

Οι προς το παρόν μελέτες δείχνουν ότι τα εξωσώματα πιθανόν να λαμβάνονται από τα κύτταρα στόχο μέσω ενδοκυττάρωσης ή με τη συμμετοχή των πρωτεϊνών SNARE.



Εικόνα 7 : Εξωσώματα όπως φαίνονται από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο
Edvin Van der Pol

Εξωσώματα και νευροεκφυλιστικές ασθένειες

Η διακυτταρική επικοινωνία στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες ήταν ανέκαθεν ένα κομμάτι μεγάλου ενδιαφέροντος. Συγκεκριμένα στην ασθένεια του Παρκινσον οι κακώς αναδιπλωμένες μορφές της α-συνουκλείνης είναι δυνατόν να μεταδωθούν από κύτταρο σε κύτταρο, προκαλώντας έτσι την διασπορά των ινιδίων της, που πιθανόν να έχουν ρόλο τοξικό. Η διασπορά της α-συνουκλείνης από κύτταρο σε κύτταρο προκαλεί επίσης τη διαμόρφωση συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης στο κύτταρο αποδέκτη. Τα εξωσώματα λειτουργούν ως μόρια φορείς της παθολογικής α-συνουκλείνης (Isabella Russo, Luigi Bubacco, and Elisa Greggio et al 2012)

13. Οι πρωτεΐνες prion

Οι πρωτεΐνες Prion εμπλέκονται σε μια σειρά ασθενειών συμπεριλαμβανομένης της σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας των βοοειδών (γνωστή και ως «νόσος των τρελών αγελάδων») στα βοοειδή και της νόσου Creutzfeldt-Jakob σε ανθρώπους.

Σε μία πρωτεΐνη υπάρχουν δύο ισομορφές : η φυσιολογική PrPC και η παθολογική το PrPSc (prion). Η παθολογική ορφή είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των πλακών αμυλοειδούς και του εκφυλισμού των νευρώνων. Συσσωρεύεται σε μολυσμένους ιστούς, προκαλώντας βλάβη στους ιστούς και θάνατο των κυττάρων. Τα prions είναι ανθεκτικά σε μετουσίωση από χημικούς και φυσικούς παράγοντες.

Τα Prions μπορεί να προκαλέσουν νευροεκφυλιστική νόσο με την άθροιση σε μορφή πλακών γνωστή ως αμυλοειδές, που διαταράσσει τη φυσιολογική δομή των ιστών. Η διαταραχή αυτή χαρακτηρίζεται από "τρύπες" στον ιστό με συνακόλουθη σπογγώδη αρχιτεκτονική λόγω του σχηματισμού χυμοτοπίων στους νευρώνες. (Πατσούρης et al 2006)

14. Η υπόθεση της prion παθολογίας της α-συνουκλείνης

Υπάρχει πιθανότητα οι συνουκλεοπάθειες να οφείλονται στην συμπεριφορά της α-συνουκλείνης ως πρωτεΐνη prion.

Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή η παθολογική μορφή της α-συνουκλείνης εμφανίζεται ως η ισομορφή PrP Sc . Η PrP Sc της α-συνουκλείνης έχει ανώμαλη δευτεροταγή δομή β-πτυχωτού φύλλου , ενώ η φυσιολογική είναι η α-έλικα. Φυσιολογικά τα λυσοσώματα και τα πρωτεασώματα αποικοδομούν την PrP Sc. Όταν συσσωρεύονται τα PrP Sc τείνουν να συσσωματώνονται και να δημιουργούν fibrils. Η PrP Sc μπορεί να επικρατήσει της PrP C.

Τα ολιγομερή PrP Sc προκαλούν τον νευροεκφυλισμό. Η σημασία των σωματιδίων Lewy δεν έχει αποσαφινιστεί αλλά υποτίθεται ότι μπορεί να έχουν προστατευτικό ρόλο , ώστε να αποτραπεί ο σχηματισμός fibrils από την PrP Sc. Τα fibrils μπορούν να μεταφερθούν σε υγιή κύτταρα μέσω των εξωσωμάτων. (Olanow CW, Brundin P. Et al 2013 & Chu Y, Kordower JH. Et al 2015)

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΚΟΜΜΑΤΙ

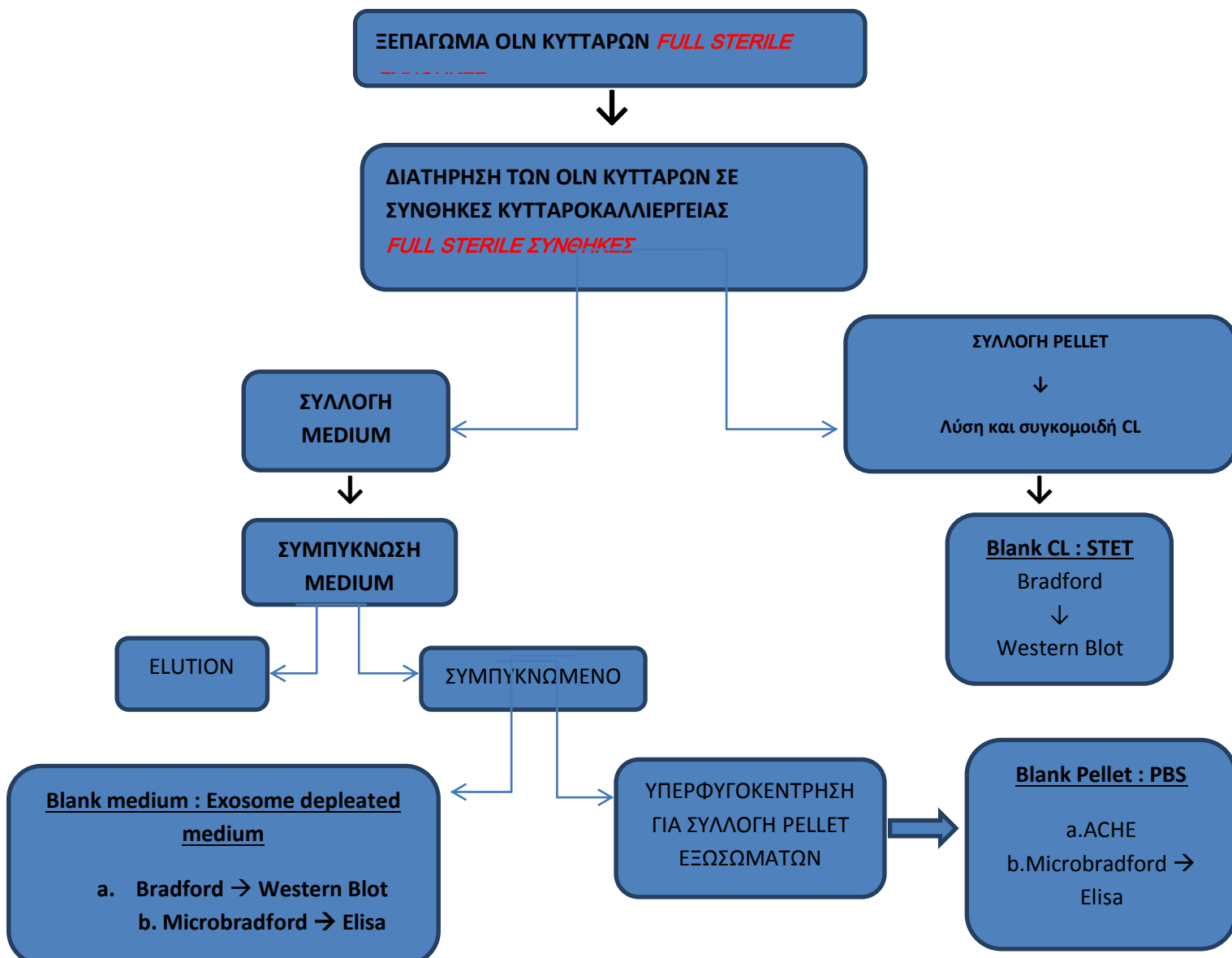
Τα βασικά κύτταρα του εγκεφάλου είναι οι νευρώνες. Γύρω από τους νευρώνες υπάρχουν άλλα κύτταρα που τους προστατεύουν και ταυτόχρονα τους τρέφουν: τα κύτταρα αυτά λέγονται νευρογλοιακά ή γλοιακά (glial cells). Υπάρχουν διάφορα είδη νευρογλοιακών κυττάρων, όπως τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα.

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων είναι η OLN-93. Τα OLN-93 είναι ολιγοδενδροκύτταρα, τα οποία απομονώθηκαν από εγκεφάλους αρουραίων.

Στην πειραματική διεργασία υπήρξαν 2 κυτταρικές σειρές :

- WT (άγριου τύπου)
- Asyn (Υπερεκφράζουν την α-συνουκλείνη)

ΠΛΑΝΟ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΚΟΜΜΑΤΙΚΟΥ



1. Η κυτταρική σειρά OLN-93

Για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές ολιγοδενδροκυττάρων, οι οποίες απομονώθηκαν από εγκεφάλους αρουραίων. Η κυτταρική σειρά OLN-93 είναι τυχαίως διαφοροποιημένα γλοιακά κύτταρα αρουραίων.

Η καλλιέργειά τους έγινε σε medium με 10% ορό και ο χρόνος αναδιπλασιασμού τους είναι 16-18 ώρες. Η συμπεριφορά των OLN-93 είναι ταυτόσημη με εκείνη των ολιγοδενδροκυττάρων (Richter-Landsberg C1, Heinrich M. Et al 1996).

Μέσω ανοσοφθορισμού ανιχνεύτηκε ότι :

- i. Ο A2B5 marker είναι απών, και εκφράζουν γαλακτοσυμπεροσιδάσες (σφιγκολιπίδια), βασικές μυελινικές πρωτείνες (BMP), γλυκοπρωτεΐνη συσχετιζόμενη με τη δράση της μυελίνης (MAG), και την πρωτεΐνη Wolfgram (WP)
- ii. Δέν έχουν παρόμοια συμπεριφορά με αστροκύτταρα όπως η έκφραση βιμεντίνης ή της πρωτεΐνης GFAP.

Στη μονοκλωνική τους φάση είναι παρόμοια με τα διπολικά και αναπτύσσονται σε πιάτα με στρώμα πολυ-λυσίνης και σε χαμηλή περιεκτικότητα ορού.

Η συμπεριφορά των OLN είναι ταυτόσημη με τη συμπεριφορά ολιγοδενδροκυττάρων ηλικίας 5 με 10 ημερών. Είναι χρήσιμο μοντέλο για τη διερεύνηση των μηχανισμών που επάγει την διαφοροποίηση των ολιγοδενδροκυττάρων in vitro και τους μοριακούς μηχανισμούς της αλληλεπίδρασής τους με άλλα κύτταρα του νευρικού συστήματος.

Τα δύο μοντέλα OLN-93 που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

- WT : Άγριου τύπου
- AS : Υπερεκφράζουν την α-συνουκλείνη.

2. Χημικά αντιδραστήρια

Για τις κυτταρικές καλλιέργειες των κυττάρων

Χρησιμοποιήθηκαν:

- Θρεπτικό υλικό: RPMI 1640 Medium Sigma Aldrich (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
- Ορός εμβρύου μόσχου: Fetal Bovine Serum-FBS (#S1500, Biowest, Nuaille, France).

Για την διατήρηση των μόνιμα διαμολυσμένων σειρών χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά:

- Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) Thermo Fischer
- Zeocin™ Selection Reagent Thermo Fisher Scientific

Επεξεργασία πρωτεϊνών

Για την εκχύλιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το μείγμα πρωτεασών σε σκεύασμα:

Complete, Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets (#11836153001, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN).

Το μείγμα δεικτών γνωστού μοριακού βάρους για τις πρωτεΐνες: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#SM0671) και διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων (sample buffer): DualColor™ Protein Loading Buffer Pack (#R1011) ήταν της εταιρείας Fermentas (Vilnius, Lithuania).

Το αντιδραστήριο Bradford (Bio-Rad Protein Assay, #500-0006) για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, το μείγμα ακρυλαμίδιου/bis-ακρυλαμίδιου: 30% Acrylamide/Bis Solution (#161-0157) καθώς και οι συσκευές ηλεκτροφόρησης και μεταφοράς αγοράστηκαν από την εταιρεία Bio-Rad (Munich, Germany).

Τα προκατασκευασμένα πηκτώματα ακρυλαμίδιου κλίσης 4-12%: NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm (# P0323) και το ρυθμιστικό διάλυμα MES: NuPAGE® MES SDS Running Buffer (for Bis-Tris Gels only) (20X) (#NP0002) αγοράστηκαν από την εταιρεία Invitrogen Ltd (Carlsbad, USA). Η νιτροκυτταρίνη [Protran BA Nitrocellulose (0.45 μM)] που χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφορά των πρωτεϊνών αγοράστηκε από την Schleicher & Schuell (Keene NH, USA).

Ανοσοδοκιμασία κατά Western

Η ομάδα αντιδραστηρίων ECL (Western Lightning, # NEL100001EA) που χρησιμοποιήθηκε για την ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, αγοράστηκε από την εταιρεία Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) και το X RAY φιλμ (Super RX Film) από την εταιρεία Fuji Medical (Tokyo, Japan)

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνονται στον παρακάτω κατάλογο:

- α-synuclein (C-20)-R: πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι έναντι συνθετικού πεπτιδίου και αναγνωρίζει στο καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης ASYN (#sc-7011-R, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA).
- Anti-β-Actin: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μύες έναντι συνθετικού πεπτιδίου και αναγνωρίζει το αμινοτελικό άκρο της ισομορφής β της πρωτεΐνης ακτίνης προέλευσης μύος (#A5316, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Anti-rabbit IgG-HRP conjugated: αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση που παρασκευάζεται σε αίγα και αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G του κουνελιού (Fc περιοχή) (#111-035-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA).
- Anti-mouse IgG-HRP conjugated: αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση που παρασκευάζεται σε αίγα και αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G του κουνελιού (Fc περιοχή) (#PAB0096, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA).

III. ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Συντήρηση κυτταροκαλλιεργείων OLN-93

Τα ολιγοδενδροκύτταρα είναι τα κύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της μυελίνης στο Κ.Ν.Σ. και αποτελούν τον πιο πολυάριθμο τύπο γλοιακού κυττάρου της λευκής ουσίας. Στη φαιά ουσία, αναγνωρίζονται πολύ κοντά στα σώματα των νευρώνων, όπου θεωρείται ότι έχουν κυρίως στηρικτικό ρόλο. Ένα ολιγοδενδροκύτταρο μπορεί να παράγει μυελίνη για μέχρι 50 νευράξονες και οι διακλαδώσεις των αποφυάδων του, ουσιαστικά αποτελούν λεπτές γέφυρες που ενώνουν το κυτταρικό σώμα με τα έλυτρα μυελίνης.

Η μυελίνη βρίσκεται σε μειωμένη ποσότητα στους ασθενείς με παρκινσον και η έλλειψη της προκαλεί σκληρυνση κατά πλάκας.

Στους ασθενείς με MSA η α-συνουκλείνη εντοπίζεται αυθόρμητα στο κυτταρόπλασμα των OLN και σχηματίζει πρόδρομα fibrills όπως και η παθολογική της μορφή στην ασθένεια του παρκινσον.

Επίσης έρευνες έχουν δείξει ότι φάρμακα που αναστέλλουν τα συμπτώματα του παρκινσονισμού πχ βενζοτροπίνη διεγείρουν την σύνθεση μυελίνης από τα OLN.

Τα β-αμυλοειδή επίσης αναστέλλουν τη σφυγγομυελίνη.

Στην MSA η α-συνουκλείνη των oln είναι παθολογική

(επειδή είναι σε fibrills και προκαλείται ο θάνατος των oln) η δρα ως βοηθητική απόκριση του οργανισμού στην αποκατάσταση της μυελίνης (ως β-αμυλλοειδές);

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μέτρηση της ποσότητας A α syn σε δείγματα OLN κυττάρων.

❖ Ξεπάγωμα OLN κυττάρων

Υλικά
❖ RPMI-1640 Medium Sigma Aldrich ❖ Gibco Exosome-Depleted FBS ❖ Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) Thermo Fischer

Τα κύτταρα αρχικά βρίσκονταν σε cryovial και συντηρούνταν σε υγρό άζωτο στους -135. °C Για το ξεπάγωμα και την αξιοποίηση των κυττάρων αυτών ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα :

1. Ζέσταμα θρεπτικού υλικού (10% FBS , 1%Pen-Strep & 89% RPMI) και cryovial σε υδατόλουτρο
2. Προσθήκη 10ml θρεπτικού στο cryovial και αναδιάλυση κυττάρων
3. Προσθήκη 1ml διαλύματος κυττάρων/θρεπτικού σε πιάτο (split 1/10)
4. Διατήρηση κυττάρων στους 37 βαθμούς
5. Splitting κυττάρων 24 ώρες μετά

❖ Πάγωμα OLN κυττάρων

Υλικά
❖ Trypsin-EDTA solution, 0.25%, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture, 2.5 g porcine trypsin and 0.2 g EDTA • 4Na per liter of Hanks' Balanced Salt Solution with phenol red ❖ RPMI-1640 Medium Sigma Aldrich ❖ Gibco Exosome-Depleted FBS ❖ Dimethyl sulfoxide ACS reagent, ≥99.9%

Τα κύτταρα τοποθετούνται στην ψύξη σε περίπτωση διακοπής πειραμάτων. Η διαδικασία ψύξης των κυττάρων είναι η εξής :

1. Αναρρόφηση παλιού θρεπτικού υλικού από το πιάτο καλλιέργειας
2. Στο πιάτο τοποθετείται 1 ml τρυψίνης (Η τρυψίνη χρησιμοποιείται για την ανύψωση των κυττάρων , καθώς είναι υδρολυτικό ένζυμο)
3. Στο πιάτο προστίθενται 2ml full medium
4. Το διάλυμα κυττάρων / medium & τρυψίνης μεταφέρεται σε falcon 15ml και φυγοκεντρείται για 5' στα 1.500 rpm

5. Γίνεται αναρρόφηση του medium (υπερκείμενο)
6. Στο falcon προστίθεται 0.5 ml ορού FBS
7. Το Falcon τοποθετείται για 30' στον πάγο
8. Σε 500μl FBS προσθέτουμε 100μl DMSO (κρυοπροστατευτικό)
9. Στο falcon που βρίσκεται στον πάγο προστείνεται 0,5 ml DMSO/FBS ώστε ν τελικό του falcon να είναι 1ml
10. Το 1ml διαλύματος του falcon μεταφέρεται σε cryovial και συντηρείται στους -80 βαθμούς

ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΟΛΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Υλικά
<ul style="list-style-type: none"> ❖ RPMI-1640 Medium Sigma Aldrich ❖ Gibco Exosome-Depleted FBS ❖ Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) Thermo Fischer ❖ Zeocin™ Selection Reagent Thermo Fisher Scientific ❖ Trypsin-EDTA solution, 0.25%, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture, 2.5 g porcine trypsin and 0.2 g EDTA • 4Na per liter of Hanks' Balanced Salt Solution with phenol red ❖

❖ Αλλαγή θρεπτικού υλικού των OLN (Ανα 3 μέρες)

1. Αναρρόφηση παλιού θρεπτικού υλικού
2. Προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού , η σύσταση του οποίου εξαρτάται από την μελλοντική χρήση της καλλιέργειας. Για παράδειγμα , στα WT κύτταρα το θρεπτικό υλικό είχε σύσταση (10% FBS , 1% Pen-Strep & 89% RPMI) , ενώ στα κύτταρα από τα οποία απομονώσαμε εξωσώματα (Asyn) το θρεπτικό υλικό είχε σύσταση (2% FBS , 1% Pen-Strep & 97% RPMI ex/dp).
3. Προσθήκη αντιβιοτικού ziocin στα Asyn κύτταρα

❖ Splitting OLN κυττάρων (80-90% confluent) (Ανα 4-5 μέρες)

1. Αναρρόφηση παλιού θρεπτικού υλικού
2. Πλύση με 2 x 5ml ζεστού PBS
3. Αναρρόφηση PBS
4. Προσθήκη 1,5 ml τρυψίνης & Αναμονή για 5'
5. Προσθήκη 3 x 1,5 ml full medium
6. Συλλογή μείγματος σε falcon
7. Φυγοκέντρηση για 5' στα 1500 rpm
8. Αφαίρεση υπερκειμένου

9. Αναδιάλυση pellet σε full medium ανάλογα με το ποσοστό αραιώσης που θέλουμε
10. Στρώσιμο κυττάρων σε νέο πιάτο
11. Προσθήκη medium και αντιβιοτικού

B. ΣΥΛΛΟΓΗ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ

Γίνεται σε κύτταρα που είναι 80%-90% confluent και έχουν αναπτυχθεί για 33 ώρες σε exosome depleted medium (2% FBS & 1% Pen-Strep). Τα εξωσώματα απομονώνονται από το medium, το CL

ΣΥΛΛΟΓΗ MEDIUM ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ

❖ Συλλογή medium με εξωσώματα

1. Συλλογή και μεταφορά medium σε falcon
2. Φυγοκέντρηση για 5' στα 400xg
3. Συλλογή υπερκειμένου και μεταφορά του σε νέο falcon
4. Φυγοκέντρηση για 10' στα 400xg
5. Συλλογή υπερκειμένου και μεταφορά σε falcon
6. Ψύξη στους -20°C

❖ Συμπύκνωση medium

1. Ξεπλένονται με νερό 2 x falcons με φίλτρα, 2 φορές για 30' στα 100.000 x g στους 4°C
2. Το νερό αδειάζεται από τα falcons με φίλτρα. Στο 1^ο falcon μπαίνει το medium από τα WT, ενώ στο 2^ο falcon το medium των Asyn.
3. Τα medium φυγοκεντρούνται για 30' στους 4°C για 30' στα 100.000 x g
4. Προκύπτουν 2 είδη διαλυμάτων: Το συμπυκνωμένο (κάτω από το φίλτρο) & το elution (πάνω από το φίλτρο). Συλλέγονται και μεταφέρονται σε falcon
5. Τα falcon με φίλτρα ξεπλένονται με H₂O, για 30' στους 4°C για 30' στα 100.000 x g.
6. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι n → 3 και θα έχουμε τελικά 3 falcon με elution & 3 falcon με συμπυκνωμένο medium.

❖ Απομόνωση εξωσωμάτων από φυγοκεντρημένα medium

1. Σε 6 tube υπερφυγόκεντρο με ρότορα T8100 τοποθετούνται τα δείγματα των medium.
2. Τα δείγματα ισοζυγίζονται μέχρι τον 3^ο δεκαδικό ανά 2.
3. Πραγματοποιείται υπερφυγοκέντρωση δειγμάτων για 2 hrs στους 4°C και στα 100.000 x g
4. Τα tubes αφαιρούνται από την υπερφυγόκεντρο και παρατηρείται εάν υπάρχει pellet.
5. Αφαιρείται το υπερκείμενο με τη βοήθεια πιπέτας.
6. Το pellet επαναδιαλύεται σε 100μl PBS
7. Το PBS/ pellet μεταφέρεται σε erpendorf
8. 15 μl από το δείγμα μεταφέρονται σε ένα 2^ο erpendorf
9. Τα 12 erpendorfs μεταφέρονται στους -20°C

ΣΥΛΛΟΓΗ CL ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΕΙ ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ

➤ Συλλογή pellet → Λύση κυττάρων και συγκομιδή CL από τα κύτταρα

1. Στο πιάτο από όπου αφαιρέθηκε το παραπάνω medium γίνεται πλύση με 5ml ζεστού PBS
2. Απορρόφηση PBS
3. Πλύση με 5ml κρύου PBS , ώστε να σηκωθούν τα κύτταρα
4. Συλλογή μείγματος σε 2 falcon
5. Φυγοκέντρωση των Falcon για 10' σε 1500 rpm
6. Στο 1^ο Falcon αφαιρείται το υπερκείμενο και το pellet φυλάσσεται στους -20°C
7. Στο 2^ο falcon προσθέτω 50μl STET. Το STET είναι λυτικό buffer.
8. Το STET-pellet τοποθετείται για 30' στον πάγο
9. Vortex falcon
10. Φυγοκέντρωση για 10' στους -4°C και 13000 rpm
11. Συλλογή υπερκειμένου (CL)
12. Μεταφορά σε erpendorf
13. Ψύξη στους -20°C.

ΣΥΝΤΑΓΗ STET

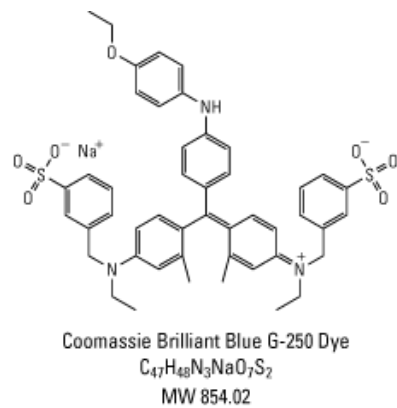
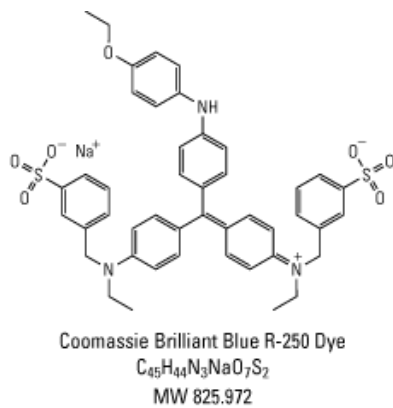
- 500 μl TNE 2x
- 360 μl H₂O
- 100 μl Triton-X 10%
- 40 μl PI 1 x

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ Asyn ΣΤΑ ΣΥΛΛΕΓΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Μέτρηση Asyn στα δείγματα CL και medium

2.1 Μέτρηση ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων μέσω Bradford

Οι πρωτεΐνες των δειγμάτων μπορούν να αντιδράσουν με μια χρωστική ουσία που ονομάζεται κυανούν του Coomassie (Coomassie Brilliant Blue) και ανήκει στην κατηγορία των όξινων χρωμάτων. Η χρωστική αυτή περιέχει σουλφοομάδα που στην ανιοντική μορφή δεσμεύει τα αμινοξέα. Ουσιαστικά όλες οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες αντιδρούν με τη χρωστική κυανούν του Coomassie και σχηματίζουν ένα γαλάζιο σύμπλοκο.



1. Το Bradford mix (φωτοευαίσθητο) (stock : 5 x) που διατηρείται στο ψυγείο , αραιώνεται σε 1 x.
2. Σε 7 κυψελίδες τοποθετούνται 1 ml Bradford mix στην καθεμία
3. Στις 6 από αυτές τοποθετείται 1 μl του δείγματός μας
4. Στην 7^η κυψελίδα 1μl του background του δείγματος.(ΤΥΦΛΟ).
Στα δείγματα CL το τυφλό είναι το STET , ενώ στα δείγματα medium το τυφλό είναι το Exosome depleted medium.
5. Αναδεμα τις κυψελίδων με βοήθεια parafilm.
6. Τοποθέτηση κυψελίδων στο σκοτάδι και αναμονή για 5'.
7. Το φωτόμετρο ρυθμίζεται : Protein test → Bradford standard → Stored → STKV1 → Run Test
8. Τοποθετείται για φωτομέτρηση η κυψελίδα με το τυφλό
9. Ρύθμιση σε : Measure Blank μέχρι η ένδειξη να δείξει A → 0 . 0
10. Τοποθετούνται για φωτομέτρηση οι κυψελίδες με τα δείγματα
11. Ρύθμιση σε : Measure Sample

3.1 Τεχνική ανοσοσήμανσης – Western Blot

Η western blot είναι τεχνική ανοσοσήμανσης, που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών (που είναι συνδεδεμένες με αντισώματα) σε ένα συγκεκριμένο δείγμα. Έχει μεγάλο βαθμό ευαισθησίας και εξειδίκευσης.

Χρησιμοποιείται gel ηλεκτροφόρησης, ώστε να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες με βάση το MW τους ή την 3D δομή τους. Οι ηλεκτροφορημένες πρωτεΐνες έπειτα μεταφέρονται σε μια μεμβράνη (νιτροκυτταρίνης), ώστε να πραγματοποιηθεί η ειδική τους σύνδεση με αντισώματα. Η western blot χρησιμοποιείται κατά κόρον σε τομείς της μοριακής βιολογίας & της ανοσοβιολογίας.

Αναπτύχθηκε στο εργαστήριο του Harry Towbin στο Friedrich Miescher Institute. Το όνομα *western blot* δόθηκε από τον W. Neal Burnette επηρεασμένος από τη Southern blot (τεχνική εύρεσης DNA), που είχε αναπτυχθεί νωρίτερα από τον Edwin Southern. Το RNA ανιχνεύεται με Northern blot.

Για τη μέτρηση της ποσότητας AS των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν western blot : $n \rightarrow 3$ στα δείγματα CL
 $n \rightarrow 2$ στα δείγματα συμπυκνωμένου medium

Η western blot είναι μια πολύωρη τεχνική και χωρίζεται από επιμέρους κομμάτια. Αυτά είναι :

- A. Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση
- B. Προετοιμασία gel & Ηλεκτροφόρηση
- C. Μεταφορά πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- D. Blocking
- E. Ανοσοσήμανση πρωτεϊνών

A. Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

1. Ο τελικός όγκος του κάθε δείγματος που θα φορτωθεί θα είναι 36 μl ή 40μl.
Εφόσον έχει μετρηθεί η ολική πρωτεΐνη μέσω Bradford , αραιώνονται τα δείγματα CL ώστε η $c_{\text{τελ}}$ της πρωτεΐνης να είναι 30 μg/μl.
Σε κάθε erpendorf του αραιωμένου δείγματος CL προσθέτω 9μl sample buffer , καθώς το stock S.B είναι 4 x και $c_{\text{τελ}}$ S.B είναι 1 x.
Συμπλήρωση με ddH2O , ώστε $V_{\text{τελ}}$ 36μl (n 1,2) και $V_{\text{τελ}}$ 40μl (n3).Στα δείγματα medium δεν προστίθεται νερό .Δεν πήραμε κάποια μέτρηση από τη Bradford και δεν χρειάζονται αραιώση

ΣΥΝΤΑΓΗ SAMPLE BUFFER

- 4% SDS
(αποδιατακτικό)
- 10% 2-μερκαπτοαιθανόλη
(διαχωρισμός πρωτεϊνών)
- 20% Γλυκερόλη
(συντελεστής βαρύτητας)
- 0.004% Βρωμοφαινόλη μπλέ
(χρωστική)
- 0.125 M Tris HCL

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ CL

Για $n \rightarrow 1$ ($V_{\text{τελ}}$ 36μl)

	WT 1	WT 2	WT 3	AS 1	AS 2	AS 3
V δείγματος σε μl	3,30	5,45	2.24	28,7	3.40	4.863
V ddH2O	23,7	21.55	24.76	-	23.6	22.14
V Sample Buffer	9	9	9	9	9	9

Για $n \rightarrow 2$ ($V_{\text{τελ}}$ 36μl)

	WT 1	WT 2	WT 3	AS 1	AS 2	AS 3
V δείγματος σε μl	2.1	2.7	3.4	25.1	2.4	2.8
V ddH2O	24.9	24.3	23.6	-	24.6	24.2
V Sample Buffer	9	9	9	9	9	9

Για $n \rightarrow 3$ ($V_{\text{τελ}}$ 40μl)

	WT 1	WT 2	WT 3	AS 1	AS 2	AS 3
V δείγματος σε μl	1.6	2.3	3.4	31.3	4.3	2.0
V ddH2O	29.4	28.7	25.6	-	26.7	29
V Sample B.	9	9	9	9	9	9

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΩΝ MEDIUM

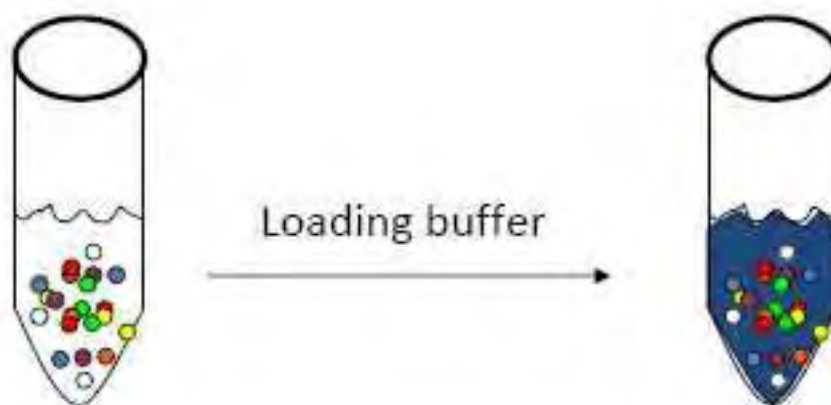
Για $n \rightarrow 1$ (Vτελ 36μl)

	WT 1	WT 2	WT 3	AS 1	AS 2	AS 3
V δείγματος σε μl	25	25	25	25	25	25
V ddH ₂ O	-	-	-	-	-	-
V Sample B.	9	9	9	9	9	9

Για $n \rightarrow 2$ (Vτελ 36μl)

	WT 1	WT 2	WT 3	AS 1	AS 2	AS 3
V δείγματος σε μl	25	25	25	25	25	25
V ddH ₂ O	-	-	-	-	-	-
V Sample B.	9	9	9	9	9	9

2. Τα erpendorfs έπειτα αναδεύονται με vortex
3. Γίνεται spin down
4. Ξηρό βράσιμο για 5' της 95°C , ώστε να αποδιαταχθούν οι πρωτείνες.
5. Vortex
6. Spin down



B. Προετοιμασία gel και ηλεκτροφόρηση



Εικ : Όργανα που χρησιμοποιούνται στην ηλεκτροφόρηση και στην προετοιμασία gel

Η ηλεκτροφόρηση είναι το φαινόμενο της κίνησης χημικών ενώσεων (κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων) μέσα σε ένα πήκτωμα (gel) με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η κίνηση των ουσιών μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από το ηλεκτρικό φορτίο και το μοριακό βάρος των ουσιών. Τηs οι πρωτεΐνες κινούνται της την άνοδο δηλαδή τον θετικό πόλο.

- Προετοιμασία των gel ηλεκτροφόρησης

Το πήκτωμα (gel) της πολυακρυλαμίδης είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ της με μόρια N-N μεθυλενο- δις-ακρυλαμίδης (MBA) .Το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμίδης και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του ηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Το πήκτωμα που θα κατασκευαστεί αποτελείται από 2 φάσεις , που περιέχουν τα ίδια συστατικά σε διαφορετικές ποσότητες :

➤ Η 1^η φαση είναι η running , που διαχωρίζει της πρωτεΐνες με βάση το MB.

ΣΥΝΤΑΓΗ RUNNING GEL (13%) (15 ml)

- 4,5 ml ddH₂O
- 6,5 ml 30% ακρυλαμίδης
- 3.3 ml 1.5 Tris pH 8.8
- 0,15 ml 10% SDS
- 0,15 ml 10% APS (παράγοντας πολυμερισμού)
- 0.006 ml TEMED (παράγοντας πολυμερισμού)

- Η 2^η φάση είναι η stacking , που βοηθά στο πακετάρισμα των πρωτεϊνών ώστε να εξιγχνριστούν κατά την ηλεκτροφόρησή της.

ΣΥΝΤΑΓΗ STACKING GEL (9 ml)

- 5,5 ml ddH₂O
- 1,3 ml 30% ακρυλαμίδης
- 1.0 ml 1.5 Tris pH 6.8
- 0,08 ml 10% SDS
- 0,08 ml 10% APS (παράγοντας πολυμερισμού)
- 0.008 ml TEMED (παράγοντας πολυμερισμού)

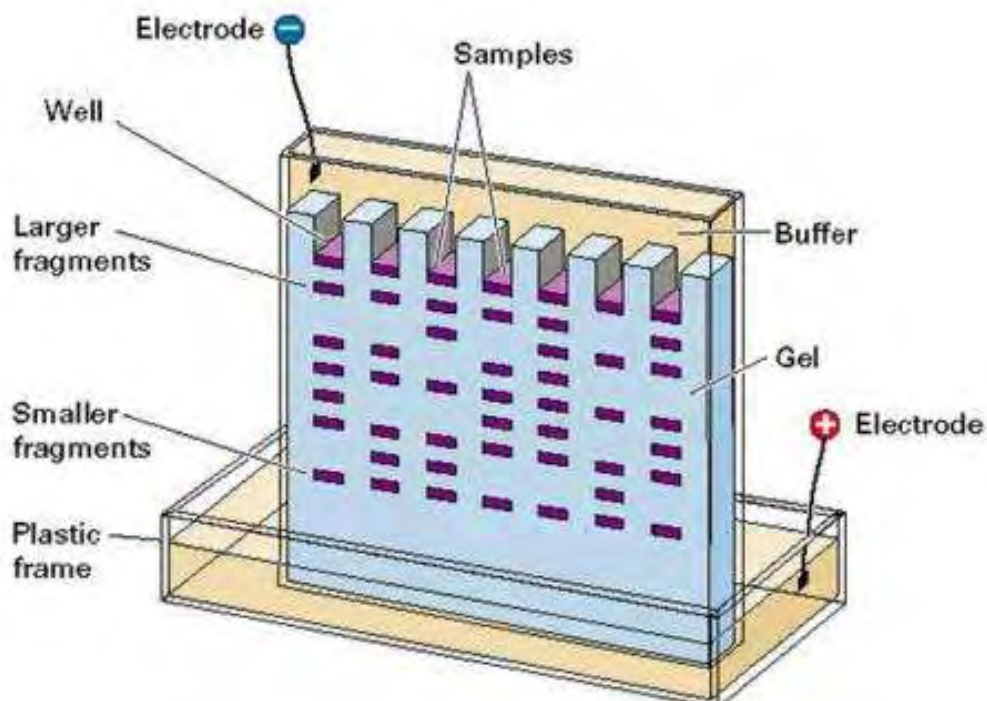
1. Σταθεροποιείται το διπλό τζάμι μεσα στο casting frame.
2. Στο κάτω μέρος του casting stand τοποθετείται σπόγγος , πάνω από το σπόγγο σταθεροποιείται το casting frame με τα τζάμια.
3. Ελέγχεται η συσκευή για τυχόν διαρροές μέσω προσθηκης νερού στο κενό μεταξύ των τζαμιών
4. Εφόσον δεν υπάρχει διαρροή το νερό αδειάζεται
5. Κατασκευάζεται το running gel και τοποθετείται στο κενό μεταξύ των τζαμιών.
6. Προσθήκη ισοβουτανόλης με πιπέτα raster
7. Αναμονή για 30'-45' μέχρι να πήξει το gel.
8. Αφού πήξει απομακρύνεται η ισοβουτανόλη, και πραγματοποιείται τριπλή πλύση με νερό.
9. Κατασκευάζεται το stacking gel και τοποθετείται στο κενό μεταξύ των τζαμιών.
10. Στην κορυφή των τζαμιών τοποθετούνται διαγώνια και αργά (ώστε να μην υπάρξουν φουσκάλες) τα χτενάκια που θα δημιουργήσουν τα πηγάδια της , όπου θα φορτωθούν τα δείγματα.
11. Αναμονή για 30'-45' μέχρι να πήξει το stacking.
12. Κάτω από νερό τα χτενάκια αφαιρούνται προσεκτικά και έχουμε έτσι το πηγμένο της gel , μεταξύ των τζαμιών.

- **Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών στο gel**

1. Τα τζαμάκια με το τζελ τοποθετούνται μέσα στη θήκη με το ηλεκτρόδιο.
2. Η θήκη με το ηλεκτρόδιο τοποθετείται μέσα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης.
3. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμίζεται με running buffer μέχρι το κάτω ηλεκτρόδιο εξωτερικά και εσωτερικά.
4. Στο 1^ο πηγαδάκι φορτώνονται 5μl marker, που αποτελεί το control. Στην προκειμένη περίπτωση ο marker είναι το Ladder.
5. Στη συνέχεια φορτώνονται τα υπόλοιπα πηγαδάκια με τα δείγματα.
6. Τα καλώδια τοποθετούνται στα αντίστοιχα χρώματα της συσκευής (κόκκινο στο κόκκινο / μαύρο στο μαύρο).
7. Η συσκευή ανοίγει και το gel τρέχει αρχικά στα 80 V μέχρι να ανοίξει ο marker.
8. Η τάση ανεβαίνει στα 100V μέχρι να φτάσουν οι πρωτεΐνες στο ηλεκτρόδιο.

ΣΥΝΤΑΓΗ RUNNING BUFFER (1l)

- 100 ml STOCK Running (10x)
- 10ml SDS 10%
- 890 ml ddH₂O



C. Μεταφορά πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης



Είναι η διαδικασία μεταφοράς πρωτεϊνών από το gel σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και πραγματοποιείται σε υγρό και κρύο περιβάλλον.

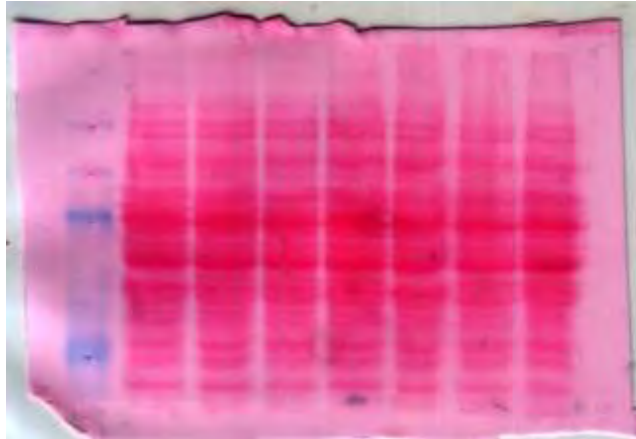
1. Κατασκευάζεται το transfer buffer.
2. Κόβονται χαρτιά whatman και βρέχονται με transfer buffer μαζί με τους σπόγγους.
3. Στην κασέτα μπαίνει ένας σπόγγος από κάτω, 2 χαρτιά whatman, το gel, η μεμβράνη και 2 ακόμη whatman και ένας σπόγγος από πάνω.
4. Η κασέτα μπαίνει μέσα στη θήκη με το ηλεκτρόδιο, με τη μαύρη πλευρά να είναι στραμμένη στη μαύρη πλευρά της θήκης και την άσπρη προς την κόκκινη.
5. Η θήκη με την κασέτα τοποθετείται μες στη συσκευή ηλεκτροφόρησης μαζί με μια παγοκύστη.
6. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμίζεται με transfer buffer και μεταφέρεται σε ψυχρό περιβάλλον.
7. Συνδέονται τα καλώδια και ρυθμίζεται στα 400V για 120'.

ΣΥΝΤΑΓΗ TRANSFER BUFFER (1l)

- 100 ml STOCK transfer Buffer (10 x)
- 200 ml MeOH
- 5 ml 10% SDS
- 695 ml H₂O

D. Blocking πρωτεϊνών της μεμβράνης

1. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αφαιρείται από την κασέτα.
2. Πλένεται με χρωστική Roncau , που επαναχρησιμοποιείται και ανιχνεύει πρωτεΐνες.



3. Η μεμβράνη ξεπλένεται από τη χρωστική με νερό.
4. Κατασκευάζεται το blocking solution , που περιέχει 2.5 gr σκόνη γάλακτος και 50 ml TBST 1 x. Το blocking solution εμποδίζει το αντίσωμα που θα προστεθεί να συνδεθεί μη ειδικά με μεμβρανικές πρωτεΐνες.
5. Η μεμβράνη ξεπλένεται με το blocking solution για 1 ώρα σε RT.
6. Απομακρύνεται το blocking solution.
7. Η μεμβράνη κόβεται στα 30kDa σε 2 κομμάτια , ώστε να προστεθούν τα αντισώματα.

ΣΥΝΤΑΓΗ TBST 1x (1l)

- 100 ml TBS 10 x
- 900 ml dd H₂O
- 1 ml Tween- 20

5.Ανοσοσήμανση πρωτεϊνών

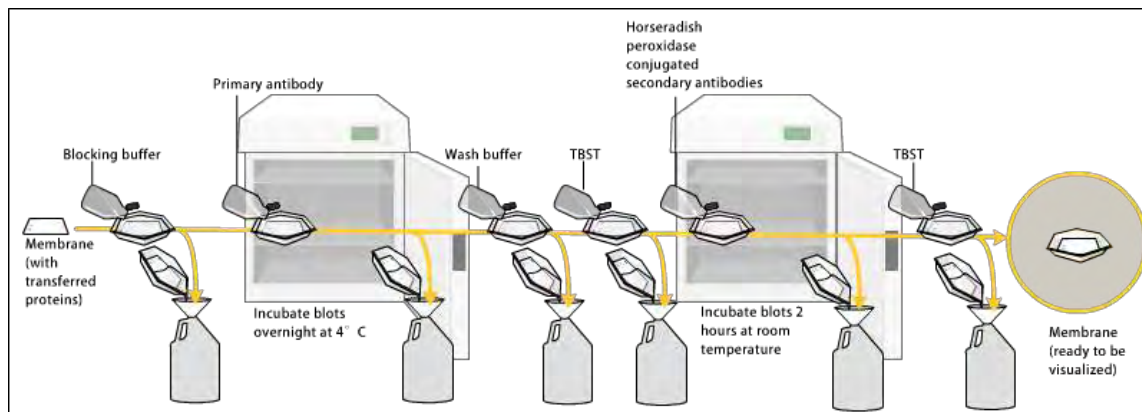
Κατά την διεργασία αυτή γίνεται εύρεση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης μέσω προσθήκης 2 αντισωμάτων.

Το 1^ο αντίσωμα αναγνωρίζει την πρωτεΐνη στόχο , ενώ το 2^ο αντίσωμα αναγνωρίζει το 1^ο αντίσωμα. Το 2^ο αντίσωμα φέρει επίσης και ετικέτα (tag HRP) , γεγονός που το καθιστά ανιχνεύσιμο.

Το 2ο αντίσωμα μπορεί να συνδεθεί με δυο αντισώματα πάνω στο 1ο ήδη συνδεδεμένο αντίσωμα επιτυγχάνοντας με αυτό τον τρόπο πολλαπλασιασμό του σήματος.

Τα δύο αντισώματα πρέπει να προέρχονται από τα ίδια είδη. Για παράδειγμα αν το 1^ο προέρχεται από ποντίκι , τότε το δεύτερο θα είναι anti-mouse.

Τα αντισώματα φυλάσσονται πάντα στους -20°C.



ΠΡΟΣΘΗΚΗ 1^{ου} ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

1. Σε 1ml γάλακτος προστίθενται 0,2μl β-ακτίνης.
Η β-ακτίνη (mouse) είναι το αντίσωμα control , που ανιχνεύει ακτίνες και επιβεβαιώνει με τον τρόπο αυτό ότι η διαδικασία διεξάγεται σωστά. Η β-ακτίνη έχει αραιώση 1/5000.
2. Σε 1ml γάλακτος προστίθεται 1 μl c-20 , το οποίο ανιχνεύει την asyn και έχει αραιώση 1/1000. Το c-20 είναι rabbit..
3. Στο πρώτο κομμάτι της μεμβράνης (30kDa- 75kDa) , προστίθεται το αντίσωμα της β-ακτίνης . Η β-ακτίνη έχει MB 45kDa.
4. Στο 2^ο κομμάτι της μεμβράνης (30-5kDa) , προστίθεται το c-20 , το οποίο έχει MB 15kDa
5. Οι 2 μεμβράνες τοποθετούνται overnight σε cold room.
6. Αφαιρούνται τα αντισώματα από τις μεμβράνες και τοποθετούνται ξανά μέσα στα falcons στα οποία παρασκευάστηκαν. Αναγράφονται πάνω στο falcon πάντα : Η ημερομηνία παρασκευής του διαλύματος & η φορά χρήσης του.
Τα αντισώματα έχουν χρόνο λήξης περίπου στις 20 φορές χρήσης και διατηρούνται στους -20°C.
7. Γίνονται 3 x 10' πλύσεις στις μεμβράνες με TBST 1x.

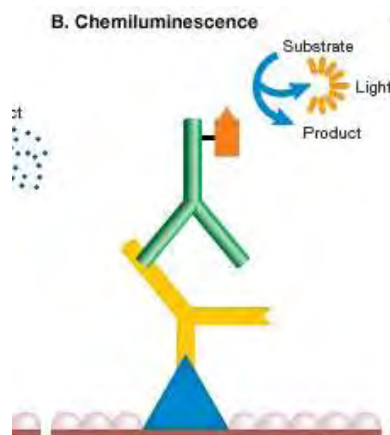
ΠΡΟΣΘΗΚΗ 2^{ου} ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

1. Σε 10ml γάλακτος προστείνεται 1μl anti-mouse , που αναγνωρίζει τη β-ακτίνη
2. Σε 10ml γάλακτος προστείνεται 1μl anti-rabbit , που αναγνωρίζει το c-20
3. Οι μεμβράνες επωάζονται με τα δεύτερα αντισώματα για 1 ώρα σε RT.
4. Γίνονται 3 x 10' πλύσεις στις μεμβράνες με TBST 1x.

ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ WESTERN BLOT

Η απεικόνιση των αποτεσμάτων της western blot γίνεται με τη χρήση φωτογραφικού φιλμ και του φωτοευαίσθητου αντιδραστήριου ECL.

1. Πάνω σε μια κασέτα εμφάνισης φιλμ, τοποθετείται πλαστική μεμβράνη που έχει προηγουμένως ψεκαστεί αιθανόλη.
2. Πάνω στην πλαστική μεμβράνη τοποθετούνται η μια κάτω από την άλλη οι πρωτεϊνικές μεμβράνες.
3. Οι μεμβράνες βρέχονται με ECL και τοποθετούνται για 3' σε σκοτεινό χώρο.
4. Λαμβάνει χώρα η αντίδραση μεταξύ ECL & HRP που απελευθερώνει φως.



5. Μια δεύτερη πλαστική μεμβράνη τοποθετείται πάνω από τις πρωτεϊνικές και απομακρύνονται οι φυσαλίδες.
6. Η κασέτα κλείνει και γίνεται μεταβίβαση στο dark room
7. Στο dark room τα φιλμ εμφανίζονται μέσω επαφής τους με τη μεμβράνη και τοποθέτησής τους στο μηχάνημα εμφάνισης. Η διάρκεια επαφής των φιλμ με τη μεμβράνη εξαρτάται από την ένταση του σήματος.
8. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν ήταν τα εξής :

STRIPPING

Σε περίπτωση κακής ποιότητας αποτελεσμάτων , επιτυγχάνεται stripping της μεμβράνης. Μέσω stripping ξεπλένονται τα δύο αντισώματα από την πρωτεϊνική μεμβράνη. Υπάρχουν δύο είδη stripping :

- Harsh stripping

Πραγματοποιείται σε περιπτώσεις όπου το καινούριο 1^ο αντίσωμα που θα μπει στη μεμβράνη πιάνει πολύ κοντά με το προηγούμενο 1^ο αντίσωμα.

1. Η μεμβράνη πλένεται με TBST 1 x για 10΄
2. Η μεμβράνη τοποθετείται σε stripping buffer και μένει στους 55°C για 30 λεπτά.
3. Γίνονται 3x 5΄ πλύσεις με TBST 1x
4. Επαναλαμβάνεται η προσθήκη 1^{ου} και 2^{ου} αντισώματος.

- Mild stripping

Είναι το ήπιο και το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο stripping.

1. Η μεμβράνη πλένεται σε TBST 1x για 5΄
2. Η μεμβράνη τοποθετείται σε stripping buffer και σε RT για 10΄.
3. Γίνονται 2x 10΄ πλύσεις με TBST 1x
4. Επαναλαμβάνεται η προσθήκη 1^{ου} και 2^{ου} αντισώματος.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ Asyn ΣΤΑ MEDIUM ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ

4.1 microBradford

Με απώτερο σκοπό την πραγματοποίηση της τεχνικής της αντίδρασης δοκιμασίας της ακετυλοχολινεστεράσης, πρέπει να μετρηθεί η συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης των δειγμάτων μας. Έτσι θα υπολογισθεί η αραιώση των δειγμάτων κατά την ισοφόρτωσή των πρωτεϊνών τους στα wells της ache.

Η microBradford όπως και η Bradford (σελ.19) είναι μέθοδος μέτρησης της ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων , έχει όμως μεγαλύτερη ευαισθησία.

ΒΗΜΑΤΑ micro-Bradford

1. Το Bradford mix (φωτοευαίσθητο) (stock : 5 x) που διατηρείται στο ψυγείο , αραιώνεται σε 1 x.
2. Σε 7 κυψελίδες τοποθετούνται 1 ml Bradford mix στην καθεμία
3. Στις 6 από αυτές τοποθετείται 1 μl του δείγματός μας
4. Στην 7^η κυψελίδα 1μl του background του δείγματος.(ΤΥΦΛΟ).
Στα δείγματα της πελέτας των εξωσωμάτων , το τυφλό είναι το 1xPBS
5. 5' αναμονή σε RT
6. Φωτομέτρηση στα 570 nm

5.1Η ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ακετυλοχολίνη είναι ένας νευροδιαβιβαστής με περιοχή δράσης τις νευρομυϊκές σύναψεις των σκελετικών μυών .Συμμετέχει τόσο στο αυτόνομο νευρικό σύστημα , καθώς εντοπίζεται στις παρασυμπαθητικές απολήξεις και στα γάγγλια όσο και στο ΚΝΣ .

Η σύνθεσή της πραγματοποιείται στο κυτοσόλιο από τη χολίνη και το ακετυλο-coA. Η αντίδραση καταλύεται από την ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης .

Αφού πραγματοποιηθεί η σύνθεσή της μεταφέρεται και αποθηκεύεται στα κυστίδια από το κυστιδικό μεταφορέα.Όταν το δυναμικό ηρεμίας της κυτταρικής μεμβράνης διαταραχτεί , τότε η ακετυλοχολίνη απελευθερώνεται από τα κυστίδια στη σύναψη , όπου συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς (μουσκαρινικοί και νικοτινικοί).

Αφού δρασει απομακρύνεται μέσω διάσπασης της από την ακετυλοχολινεστεράση (AChE) . Απελευθερώνεται έτσι χολίνη και ιον οξικού οξέος.

Στη συνέχεια , η χολίνη που απελευθερώνεται επαναπροσλαμβάνεται μέσω μέσω μεταφορέα Na+/χολίνης και χρησιμοποιείται για την επανασύνθεση ακετυλοχολίνης.

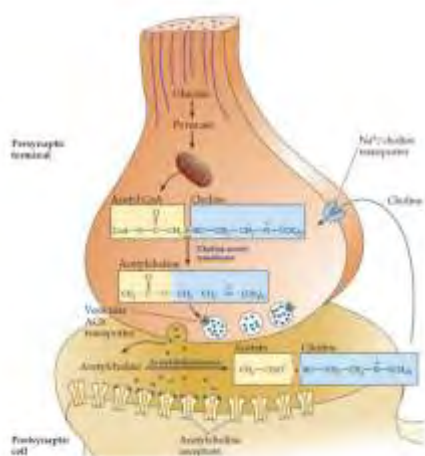


Figure 1 : Synthesis and recycling of acetylcholine

Μέσω της τεχνικής δοκιμασίας της ακετυλοχολινεστεράσης μετράμε έμμεσα το ποσοστό της ακετυλοχολίνης των κυτάρων , καθώς η απελευθερούμενη από την υδρόλυσή της θειοχολίνη που συνδέεται με το αντιδραστήριο Ellman (DTNB) . Το DTNB συνδέεται με θειολικές ομάδες και τις οξειδώνει δίνοντας έτσι TNB²⁻ (νιτροβενζοϊκό).Το νιτροβενζοϊκό απορροφά στα 405nm (Εικ.) .

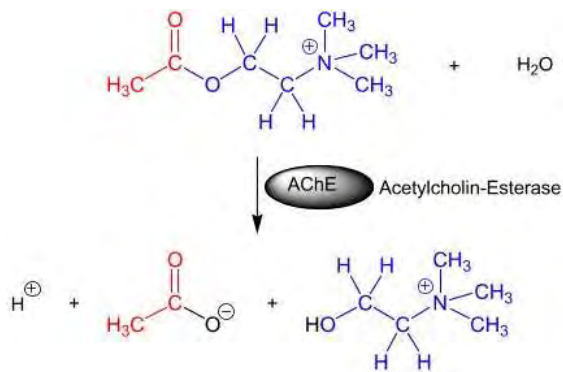


Figure 2: Η διάσπαση της ακετυλοχολίνης



Figure 3 : Αντίδραση θειοχολίνης με νιτροβενζοϊκό

Η ακετυλοχολίνη εντοπίζεται και στα εξωσώματα. Συνεπώς, μετράται έμμεσα και ο αριθμός των εξωσωμάτων των δειγμάτων μας.

ΒΗΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

1. Σε ένα erppendorf ζυγίζονται 1mg DTNB σε 1ml 1xPBS → Vortex
2. Σε ένα δεύτερο erppendorf ζυγίζονται 100 mg ακετυλοθειοχολίνης σε 100 μl 1x PBS → Vortex
3. Για την ορθή μέτρηση των αποτελεσμάτων, κατασκευάζουμε αρχικά μια καμπύλη αναφοράς με μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις AChE διαλυμένη σε 1x PBS.
4. Το stock Ache αραιώνεται 100 φορές (1μl AChE σε 99μl 1x PBS).
5. Σε 4 erppendorfs φτιάχνουμε τις εξής αραιώσεις

Αριθμός erppendorf	PBS	AChE
1 ^ο	24,2 μl	0,78 μl
2 ^ο	23,4 μl	1,56 μl
3 ^ο	21,9 μl	3,12 μl
4 ^ο	18,7 μl	6,25 μl

6. Φτιάχνουμε το master mix με τον εξής τρόπο :
 Υπολογίζουμε τον αριθμό των wells που θα φορτωθούν n = 4 x 2 (αναφορά) + 6 x 2 (δείγματα) + 2 (τυφλό) = 23.
 Σύμφωνα με τον τύπο n x 2 + 0,2 = α (α = 23 x 2 + 0.2 = , βρίσκουμε τον α.

7. Στη συνέχεια για κάθε αντιδραστήριο υπολογίζεται η ποσότητά του με τον εξής τύπο :

$$\text{DTNB} = x = \alpha \times 10 \mu\text{l} = 230 \mu\text{l}$$

$$\text{Ακετυλοθειοχολίνη} = y = \alpha \times 8,3 \mu\text{l} = 84,66$$

$$\text{PBS} = \omega = \alpha \times 222 \mu\text{l} = 2264$$

Ποσότητα master mix σε ml = $x+y+\omega \rightarrow$ Vortex

8. Σε ένα πιάτο με wells φορτώνουμε ως εξής

Τυφλό (240 μl master mix + 10 μl PBS)	Τυφλό (240 μl master mix + 10 μl PBS)	240 μl master mix + 10 μl AS1	240 μl master mix + 10 μl AS1
240 μl master mix + 10 μl eppendorf 1o	240 μl master mix + 10 μl eppendorf 1o	240 μl master mix + 10 μl AS2	240 μl master mix + 10 μl AS2
240 μl master mix + 10 μl eppendorf 2o	240 μl master mix + 10 μl eppendorf 2o	240 μl master mix + 10 μl AS 3	240 μl master mix + 10 μl AS3
240 μl master mix + 10 μl eppendorf 3o	240 μl master mix + 10 μl eppendorf 3o		
240 μl master mix + 10 μl eppendorf 4o	240 μl master mix + 10 μl eppendorf 4o		
240 μl master mix + 10 μl WT1	240 μl master mix + 10 μl WT1		
240 μl master mix + 10 μl WT2	240 μl master mix + 10 μl WT2		
240 μl master mix + 10 μl WT3	240 μl master mix + 10 μl WT3		

9. Τα wells τοποθετούνται για 30' σε RT σε σκοτάδι

10. Σε υπολογιστή μπαίνουμε σε πρόγραμμα ADAP \rightarrow R (Measurement) \rightarrow 405 nm \rightarrow start \rightarrow επιλογή των well που είναι φορτωμένα \rightarrow μετρηση

ΑΝΟΣΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ SANDWICH ELISA

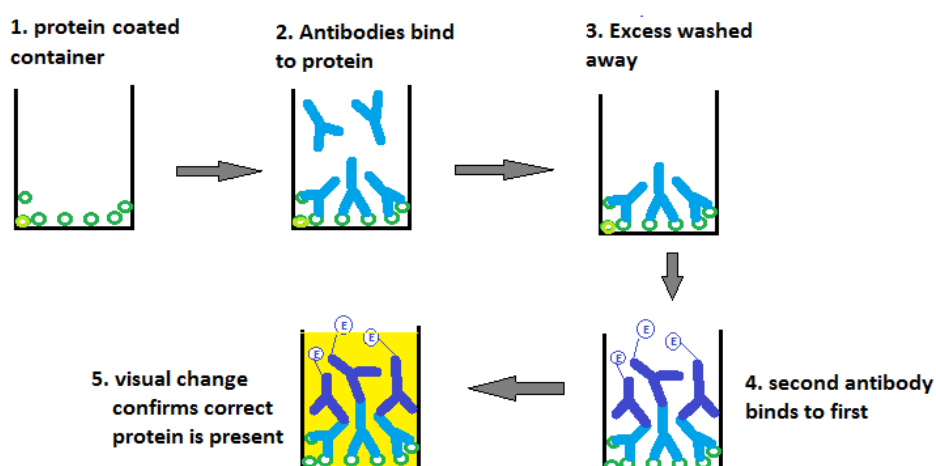
Η ανοσοχημική μέθοδος Elisa μετράει μέσω ειδικού ανιχνευτή το σήμα που παράγεται από κάποια χημική αντίδραση. Αυτή η χημική αντίδραση πυροδοτείται από την ένωση της πρωτεΐνης με το αντίσωμα και της δημιουργίας ενός ανοσοσυμπλέγματος.

Στην περίπτωση της παρούσας εργασίας το σήμα που παράγεται μετράται μέσω χημειοφωταύγειας.

Η αρχή της μεθόδου Elisa είναι ότι στο δείγμα κάθε πρωτεΐνη μπορεί να συνδεθεί εξειδικευμένα με δύο αντισώματα. Δημιουργείται έτσι ένα ανοσοσύμπλεγμα.

Στη συνέχεια προστίθεται 2^ο αντίσωμα που συνδέεται εξειδικευμένα με την πρωτεΐνη. Το 2^ο αντίσωμα φέρει επίσης και κατάλληλο ένζυμο το οποίο καταλύει την αντίδραση HRP και Ιλουμινόλη. Τέλος μετράται η χημειοφωταύγεια που παράγεται από την αντίδραση

Indirect ELISA



Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων απαραίτητη είναι η κατασκευή καμπύλης αναφοράς.

Η καμπύλη αναφοράς μετράται μέσω μέτρησης της χημειοφωταύγειας δειγμάτων που περιέχουν γνωστή ποσότητα της υπό μελέτης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Η elisa πραγματοποιήθηκε τόσο στα δείγματα medium (Blank medium : Exosome depleted medium) , όσο και στην πελλέτα των εξωσωμάτων (Blank Pellet : PBS)

ΒΗΜΑΤΑ ELISA Για medium

1. Παρασκευάζεται το coating
2. Σε 1ml coating αραιώνονται 2 μλ του 1^{ου} αντισώματος syn-1 (1/500)
3. Σε πιάτο με wells προστίθενται 50 μλ του αραιωμένου αντισώματος και μένει σε RT overnight
4. Πλύση του πιάτου
5. Κατασκευάζεται το διάλυμα TBST 10x
6. Το TBST 10x αραιώνεται σε 1x (σε 2,7 ml H₂O προστίθενται 300 μλ TBST)
7. Vortex

ΣΥΝΤΑΓΗ COATING

Σε 20 ml H₂O διαλύονται 0,168 gr NaHCO₃
Το pH ρυθμίζεται στο 9.3-9.6

ΣΥΝΤΑΓΗ TBST 10x

100mM Tris
1M NaCl
1% Tween-20
pH = 7.6

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

8. Σε ένα γυάλινο δοχείο αναμειγνύονται 300 μλ TBST με 300 μλ exosome depleted medium (**διάλυμα 1**)
Σε 4 erpendorfs προστίθενται διαδοχικά τις εξής συγκεντώσεις recombinant synuclein :

1 ^ο	(2 μλ rec.syn σε 100μλ Exosome depleted medium / TBST-BSA)
2 ^ο	0,9 c (2,92 μλ rec.syn σε 140 μλ Exosome depleted medium / TBST-BSA)
3 ^ο	0,3 c (70μλ rec.syn σε 140 μλ Exosome depleted medium / TBST-BSA)
4 ^ο	0,1 c (70μλ rec.syn σε 140 μλ Exosome depleted medium / TBST-BSA)

9. Φορτωμα των wells ως εξής :

Τυφλό (50 μλ) (TBST + exosome depleted medium)	WT1(50 μλ)	AS2 (50 μλ)
Τυφλό(50 μλ) (TBST + exosome depleted medium)	WT1(50 μλ)	AS2 (50 μλ)
0,1 c (50 μλ)	WT2 (50 μλ)	AS3 (50 μλ)
0,1 c (50 μλ)	WT2 (50 μλ)	AS3 (50 μλ)
0,3 c (50 μλ)	WT3 (50 μλ)	
0,3 c (50 μλ)	WT3 (50 μλ)	
0,9 c (50 μλ)	AS1 (50 μλ)	
0,9 c (50 μλ)	AS1(50 μλ)	

10. Κλείσιμο των wells με ταινία και μένουν σε 37 βαθμούς για 2,5 ώρες
11. Πλύση πιάτων
12. Τοποθέτηση του 2^{ου} αντισώματος (αραίωση 1/12.000).
Το 2^ο αντίσωμα είναι συζευγμένο με HRP και είναι το c-20. Το δεύτερο αντίσωμα αραιώνεται σε TBST/BSA.
(Σε 1050 μl TBST – BSA αραιώνονται 0,375 μl c-20)
13. 1 ώρα σε RT
14. Πλύση
15. Κατασκευή υποστρώματος σε erpendorf με αλουμινόχαρτο (φωτοευαίσθητο) σε ποσότητα $\chi = \alpha + 2\beta$
16. Προσθήκη 50 μl υποστρώματος σε κάθε well
17. Αναμονή 10 λεπτά
18. Μέτρηση της χημειοφωταύγειας.

ΒΗΜΑΤΑ ELISA Για εξωσώματα

1. Παρασκευάζεται το coating
2. Σε 1ml coating αραιώνονται 2 µl του 1^{ου} αντισώματος syn-1 (1/500)
3. Σε πιάτο με wells προστίθενται 50 µl του αραιωμένου αντισώματος και μενουν σε RT overnight
4. Πλύση του πιάτου
5. Το TBST 10x αραιώνεται σε 1x (σε 2,7 ml H₂O προστίθενται 300 µl TBST)
6. Στο αραιωμένο TBST προστίθεται 1% BSA.
Το BSA είναι ορός που αποτρέπει τις μη ειδικές συνδέσεις.
(σε 3ml TBST 1x προστίθενται 0,03 gr BSA).
7. Το TBST-BSA κατασκευάζεται σε γυάλινο δοχείο ώστε να μειωθεί η προσρόφηση της πρωτεΐνης στην επιφάνεια .
8. Vortex

Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

9. Σε 4 erpendorfs προστίθενται διαδοχικά οι εξής συγκεντώσεις recombinant synuclein :

1 ^ο	(1 µl rec.syn σε 50µl TBST-BSA)
2 ^ο	0,9 c (2,92 µl rec.syn σε 210 µl TBST-BSA)
3 ^ο	0,3 c (70µl rec.syn σε 140 µl TBST-BSA)
4 ^ο	0,1 c (70µl rec.syn σε 140 µl TBST-BSA)

10. Φορτωμα των wells ως εξής :

Τυφλό (50 µl) (TBST/BSA)	WT1 (40 µl TBST/BSA+10µl WT1 exosomes)	AS2 (40 µl TBST/BSA+10µl AS1 exosomes)
Τυφλό(50 µl) (TBST/BSA)	WT1 (40 µl TBST/BSA+10µl WT1 exosomes)	AS2 (40 µl TBST/BSA+10µl AS2 exosomes)
0,1 c (50 µl)	WT2 (40 µl TBST/BSA+10µl WT2 exosomes)	AS3 (40 µl TBST/BSA+10µl AS3 exosomes)
0,1 c (50 µl)	WT2 (40 µl TBST/BSA+10µl WT2 exosomes)	AS3 (40 µl TBST/BSA+10µl AS3 exosomes)
0,3 c (50 µl)	WT3 (40 µl TBST/BSA+10µl WT3 exosomes)	
0,3 c (50 µl)	WT3 (40 µl TBST/BSA+10µl WT3 exosomes)	
0,9 c (50 µl)	AS1 (40 µl TBST/BSA+10µl AS1 exosomes)	
0,9 c (50 µl)	AS1 (40 µl TBST/BSA+10µl AS1 exosomes)	

11. Κλείσιμο wells με ταινία και μένουν σε 37 βαθμούς για 2,5 ώρες
12. Πλύση πιάτων
13. Τοποθέτηση του 2^{ου} αντισώματος (αραίωση 1/12.000).
Το 2^ο αντίσωμα είναι συζευγμένο με HRP και είναι το c-20. Το δεύτερο αντίσωμα αραιώνεται σε TBST/BSA.
(Σε 1050 μl TBST – BSA αραιώνονται 0,375 μl c-20)
14. 1 ώρα σε RT
15. Πλύση
16. Κατασκευή υποστρώματος σε erpendorf με αλουμινόχαρτο
(φωτοευαίσθητο) σε ποσότητα $\chi = \alpha + 2\beta$
17. Προσθήκη 50 μl υποστώματος σε κάθε well
18. Αναμονή 10 λεπτά
19. Μέτρηση της χημειοφωταύγειας

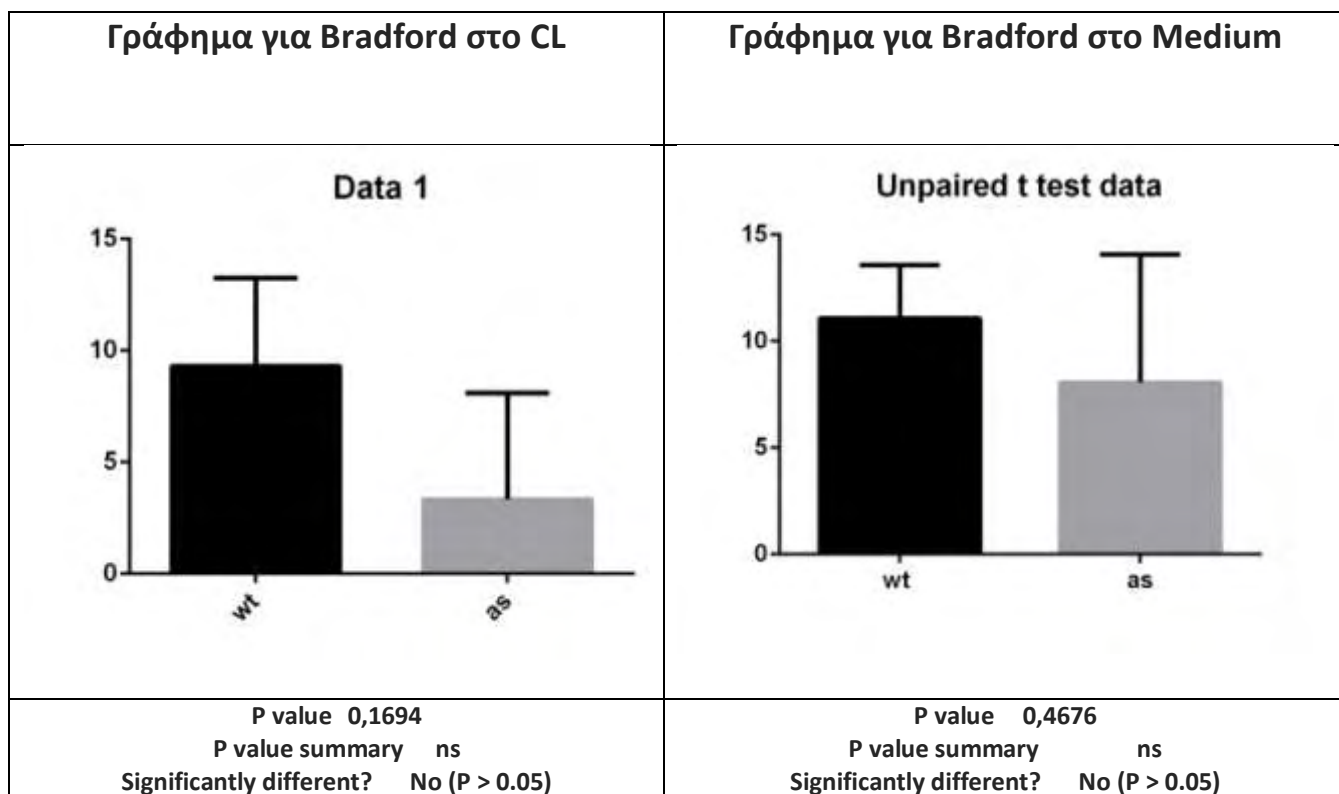
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 Αποτελέσματα Bradford στα medium των OLN κυττάρων

Στην παρακάτω εικόνα βλέπουμε τις μετρήσεις ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων cell lysate και στα medium μέσω μεθόδου Bradford.

Οι μετρήσεις της ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων είναι απαραίτητη για τη σωστή φόρτωση των δειγμάτων μας με τη μέθοδο Western blot.

CL ΑΠΟ WT		MEDIUM ΑΠΟ WT	
WT 1	9,079 $\mu\text{gολ.pr}/\mu\text{l}$	WT 1	13,64
WT2	5,495	WT 2	10,93
WT3	13,36	WT 3	8.645
CL ΑΠΟ Asyn		MEDIUM ΑΠΟ Asyn	
AS 1	1,013	AS 1	1.195
AS 2	8,818	AS 2	12.38
AS 3	6,168	AS 3	10.60



3.1 Αποτελέσματα Western Blot

Figure 1

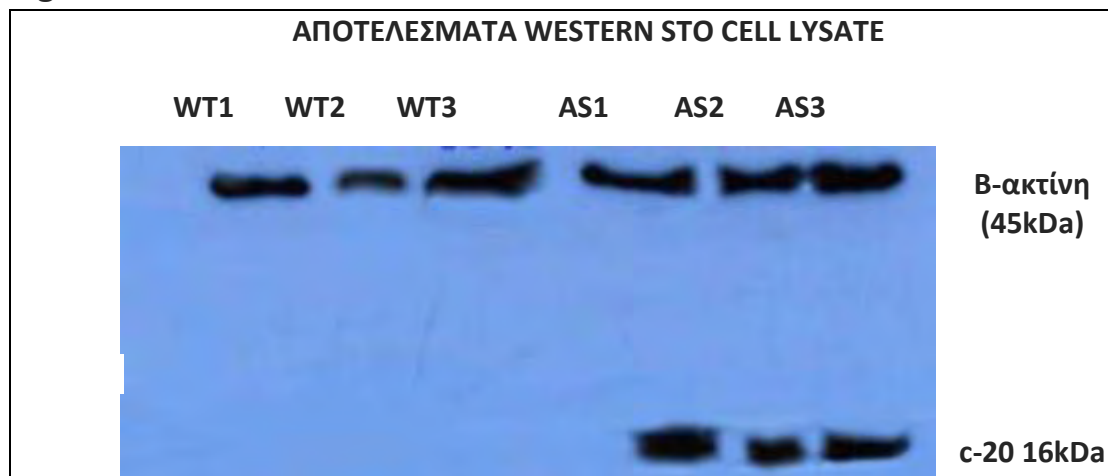
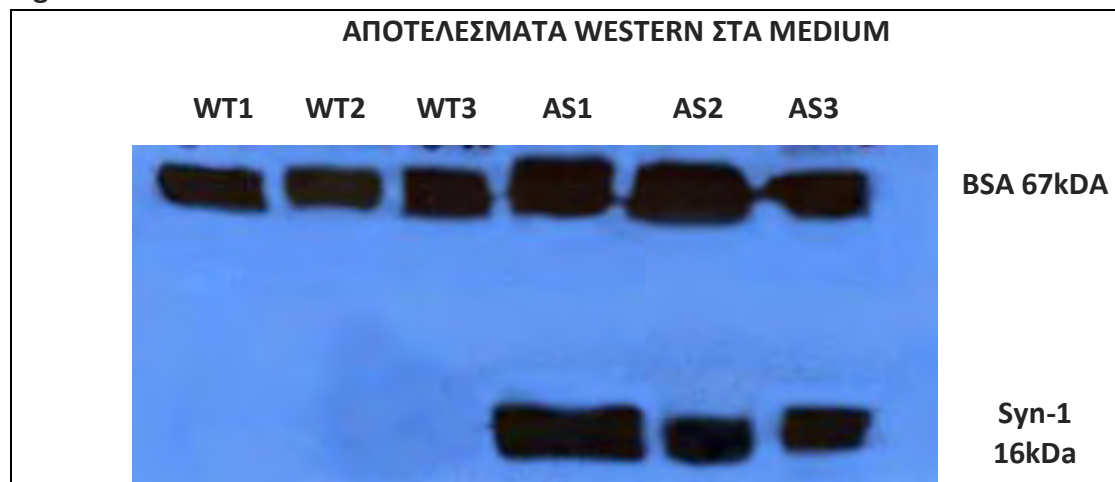


Figure 2



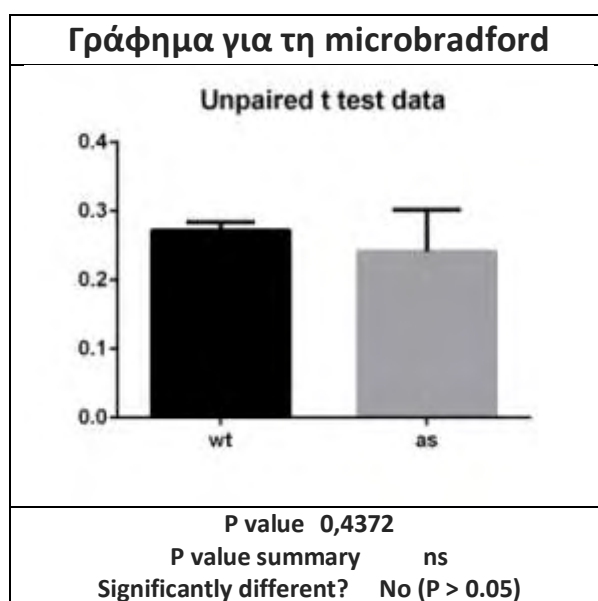
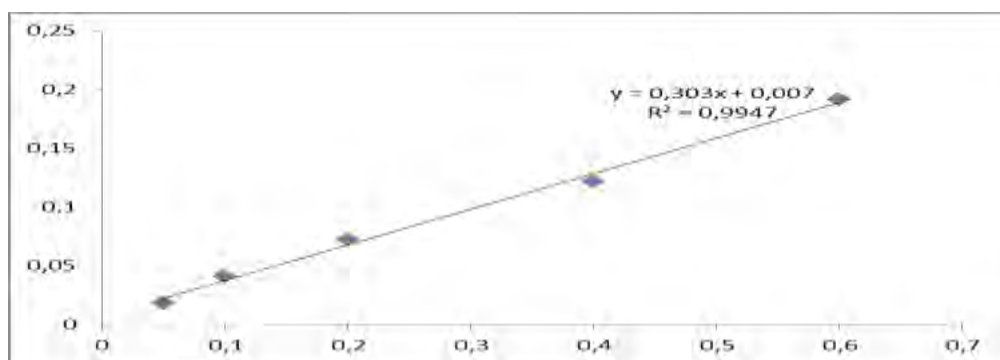
- **Figure 1** : Στην εικόνα 1 μελετήθηκε η έκφραση της α-συνουκλείνης στο κυτταρόπλασμα των OLN κυττάρων (WT & AS). Το αντίσωμα ακτίνη-β χρησιμοποιείται ως δείκτης , ενώ το αντίσωμα c-20 συνδέεται εξειδικευμένα με την α-συνουκλείνη. Σύμφωνα με την εικόνα βλέπουμε ότι η α-συνουκλείνη εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα μόνο των AS κυττάρων που υπερεκφράζουν την α-συνουκλείνη
- **Figure 2** : Στην εικόνα 2 μελετήθηκε η έκφραση της α-συνουκλείνης στο medium των OLN κυττάρων (WT & AS). Το αντίσωμα BSA χρησιμοποιείται ως δείκτης , ενώ το αντίσωμα syn-1 συνδέεται εξειδικευμένα με την α-συνουκλείνη. Σύμφωνα με την εικόνα βλέπουμε ότι η α-συνουκλείνη εντοπίζεται στο medium μόνο των AS κυττάρων που υπερεκφράζουν την α-συνουκλείνη.

4.1 Αποτελέσματα microBradford στα εξωσώματα

Σύμφωνα με τη microBradford μετριέται η ολική ποσότητα πρωτεΐνης με μεγαλύτερη ευαισθησία στα cell lysate των δειγμάτων μας. Μέσω microBradford υπολογίζεται η ποσότητα φόρτωσης στην AchE.

st.curve		samples	
blank	0,349	wt1	0,286
0,05	0,367	wt2	0,263
0,1	0,39	wt 3	0,26
0,2	0,421	as1	0,244
0,4	0,4705	as2	0,1785
0,6	0,5405	as3	0,3005

Η καμπύλη αναφοράς είναι εκθετική, επιβεβαιώνοντας την ορθή διεκπεραίωση των μετρήσεων



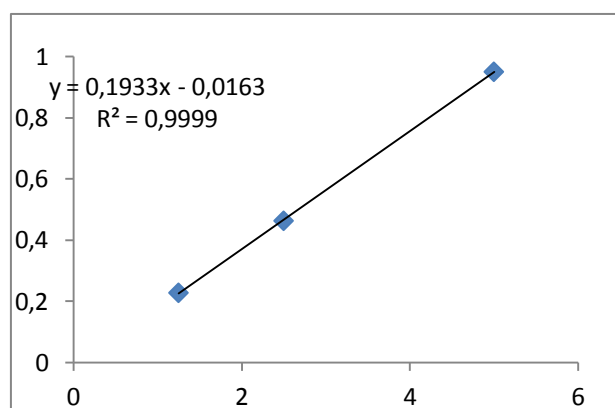
5.1 Αποτελέσματα AChE για την ανίχνευση α-συνουκλείνης στα εξωσώματα που απομονώθηκαν

<>	1	2	3
A	0,092 (blank)	0,9813 (4o eppendorf)	1,6943 (AS1)
B	0,1088 (blank)	1,1217 (4o eppendorf)	1,2233 (AS1)
C	0,285 (1o eppendorf)	1,4535 (WT1)	1,3471 (AS2)
D	0,2972 (1o eppendorf)	1,1452 (WT1)	1,4198 (AS2)
E	0,3292 (2o eppendorf)	1,4772 (WT2)	1,7383 (AS3)
F	0,3268 (2o eppendorf)	1,4335 (WT2)	1,8991 (AS3)
G	0,4854 (3o eppendorf)	1,5567 (WT3)	
H	0,6418 (3o eppendorf)	1,5578 (WT3)	

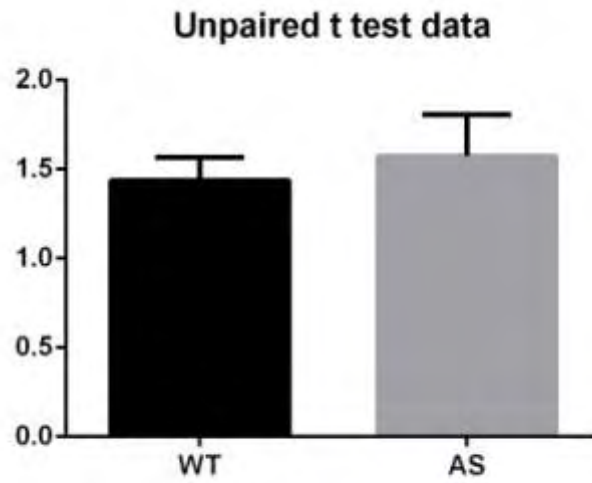
Σύμφωνα με τις παραπάνω μετρήσεις βλέπουμε την ποσότητα της ακετυλοχολινεστεράσης, που εντοπίζεται στα δείγματά μας. Μέσω ανίχνευσης της ακετυλοχολινεστεράσης μετράται έμμεσα το ποσοστό της ακετυλοχολίνης των κυττάρων, καθώς η απελευθερούμενη από την υδρόλυσή της θειοχολίνη που συνδέεται με το αντιδραστήριο Eliman (DTNB).

Το DTNB συνδέεται με θειολικές ομάδες και τις οξειδώνει δίνοντας έτσι TNB²⁻ (νιτροβενζοϊκό). Το νιτροβενζοϊκό απορροφά στα 405nm.

Η καμπύλη αναφοράς είναι εκθετική, επιβεβαιώνοντας την ορθή διεκπεραίωση των μετρήσεων



Γράφημα για AchE



P value 0,4240

P value summary

ns

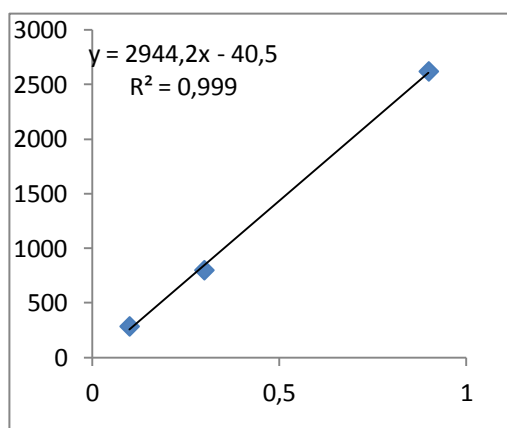
Significantly different?

No (P > 0.05)

6.1 Αποτελέσματα ELISA για την ανίχνευση α-συνουκλείνης στα εξωσώματα που απομονώθηκαν

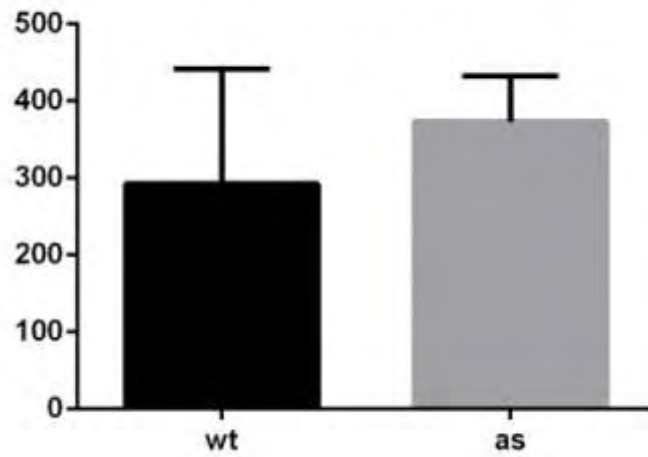
<>	1	2	3
A	187 (Blank)	251 (WT1)	251 (AS2)
B	228 (Blank)	282 (WT1)	444 (AS2)
C	489 (0,1)	1131 (WT2)	594 (AS3)
D	352 (0.1)	185 (WT2)	289 (AS3)
E	843 (0.3)	151 (WT3)	
F	591 (0.3)	495 (WT3)	
G	2803 (0.9)	412 (AS1)	
H	1799 (0.9)	329 (AS1)	

Μέσω sandwich elisa μετρήθηκαν οι ποσότητες της α-συνουκλείνης στα εξωσώματα. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε μέσω χημειοφωταύγειας σε διαλύματα με γνωστές συγκεντρώσεις α-συνουκλείνης. Η καμπύλη αναφοράς είναι εκθετική, και επιβεβαιώνει την ορθότητα των αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της α-συνουκλείνης στα εξωσώματα από τα δείγματα ολιγοδενδροκυττάρων WT και AS.



Γράφημα για Elisa

Unpaired t test data



P value 0,4335

P value summary ns

Significantly different? No ($P > 0.05$)

V.ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η πρωτεΐνη α-συνουκλείνη συνδέεται βιοχημικά και γενετικά με την παθογένεια της νόσου του Πάρκινσον (Vekrellis et al.2004).Αυξημένα επίπεδα της έκφρασής της θεωρούνται νευροεκφυλιστικά.Ο μηχανισμός νευροτοξικότητας , ωστόσο της α-συνουκλείνης δεν είναι πλήρως κατανοητός.Επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αναδίπλωση και η συσσωμάτωση της μονομερούς πρωτεΐνης παίζει κομβικό ρόλο στην εκδήλωση του νευροεκφυλισμού , καθώς μετατρέπουν την α-συνουκλείνη σε διαλυτές ολιγομερείς μορφές (πρωτοϊνίδια) , που θεωρούνται τοξικές (Conway et al.2000b , Conway et al.2001).

Εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα αλλά τα τελευταία χρόνια έρευνες προτίνουν ότι η α-συνουκλείνη εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο με τη βοήθεια ασβεστιοεξαρτόμενων κυστιδίων (εξωσώματα) (Evangelia Emmanouilidou, Katerina Melachroinou,Theodoros Roumeliotis,Spiros D. Garbis, Maria Ntzouni,Lukas H. Margaritis, Leonidas Stefanis and Kostas Vekrellis et al 2010) , επηρεάζοντας έτσι την ομοιόσταση των γειτονικών κυττάρων (Desplats et al.2009 , Lee et al 2008).

Μελέτη της έκκρισης της α-συνουκλείνης

Στην παρούσα πτυχιακή τα παραπάνω ερωτήματα προσεγγίστηκαν μέσω μελέτης της έκφρασης της α-συνουκλείνης στο κυτταρόπλασμα των ολιγοδενδροκυττάρων που υπερέκφραζαν το γονίδιο της και όχι στο εσωτερικό των εξωσωμάτων , καθώς τα εξωσώματα που απομονώθηκαν δεν υπέστησαν διατήρηση με υπέρηχους (sonication)

Η έκφρασή της μελετήθηκε και στα medium , ώστε να διαπιστωθεί η εξωκυτταρική μεταφορά της.

Η μεταφορά της διαπιστεύτηκε και μέσω μέτρησης της έκκρισης εξωσωμάτων στα δείγματα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν :

- Σύμφωνα με την τεχνική ανοσοσήμανσης western Blot βλέπουμε ότι η α-συνουκλείνη εντοπίζεται μόνο στα AS ολιγοδενδροκύτταρα και όχι στα WT, γεγονός που επιβεβαιώνει τα υπάρχοντα δεδομένα : Η α-συνουκλείνη δεν εντοπίζεται φυσιολογικά στα ολιγοδενδροκύτταρα και εκφράζεται παθογενώς πιθανόν στα AS.Ο εντοπισμός της τόσο στο κυτταρόπλασμα των AS είναι πιθανόν παθολογικός ενώ ο εντοπισμός της στα medium των AS υποδεικνύει ότι μεταφέρεται εκτός του κυττάρου σε γειτονικά κύτταρα με τη βοήθεια των εξωσωμάτων.

- Σύμφωνα με τη μέθοδο AChE : Η α-συνουκλείνη είναι ελαφρά πιο αυξημένη στα AS σε σχέση με τα WT , χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για τα δύο είδη εξωσωμάτων που απομονώθηκαν από τα κυττάρια. Το γεγονός αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι δεν πραγματοποιήθηκε λύση των εξωσωμάτων , ώστε να απελευθερωθεί η ενδογενής συνουκλείνη. Ως αποτέλεσμα , μέσω AChE μετράται μόνο η εξωτερική α-συνουκλείνη των εξωσωμάτων.
- Σύμφωνα με τη μέθοδο Sandwich Elisa : Η α-συνουκλείνη είναι ελαφρά πιο αυξημένη στα AS σε σχέση με τα WT , χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά για τα δύο είδη εξωσωμάτων που απομονώθηκαν από τα κυττάρια. Το γεγονός αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι δεν πραγματοποιήθηκε λύση των εξωσωμάτων , ώστε να απελευθερωθεί η ενδογενής συνουκλείνη. Ως αποτέλεσμα , μέσω Elisa μετράται μόνο η εξωτερική α-συνουκλείνη των εξωσωμάτων.

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Weintraub, D., C. L. Comella, et al. (2008). "Parkinson's disease--Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment." *Am J Manag Care* 14(2 Suppl): S40-8.
2. Engelender S (April 2008). "Ubiquitination of alpha-synuclein and autophagy in Parkinson's disease". *Autophagy*.
3. "Dopamine: Biological activity". *IUPHAR/BPS guide to pharmacology*. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. Retrieved 29 January 2016.
4. *Multiple system atrophy: current and future approaches to management* (Olivier Flabeau, MD, Department of Neurology, University Hospital of Bordeaux, Bordeaux, France .Wassilios G. Meissner, MD, PhD Department of Neurology and French Reference Centre for MSA, University Hospital of Bordeaux, Bordeaux, France , François Tison, MD, PhD Department of Neurology and French Reference Centre for MSA, University Hospital of Bordeaux, Bordeaux, France) *Ther Adv Neurol Disord*. 2010 Jul; 3(4): 249–263.
5. Ubhi K, Low P, Masliah E. 2011 Nov;34(11) Sep 29. *Multiple system atrophy: a clinical and neuropathological perspective*.
6. *Neuropathology*. 2007 Oct;27(5):484-93. *Multiple system atrophy: alpha-synuclein and neuronal degeneration*. Yoshida M1.
7. (Bensimon G, Ludolph A, Agid Y, Vidailhet M, Payan C, Leigh PN) (2008). "Riluzole treatment, survival and diagnostic criteria in Parkinson plus disorders: The NNIPPS Study"
8. *Parkinsonism Relat Disord*. 1997 Dec;3(4):211-4. *Amantadine effectiveness in multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy*. Rajrut AH1, Uitti RJ, Fenton ME, George D.
9. Διδακτορική διατριβή της Βογιατζή, Τερέζα-Ανδριανή (2009, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ)), *Νευροβιολογία της α-Συνουκλείνης*
10. *The Function of α-Synuclein* (Jacob Bendor, Todd Logan, and Robert H. Edwards)
11. Lemkau LR, Comellas G, Kloepper KD, Woods WS, George JM, Rienstra CM. *J Biol Chem*. 2012 Mar 30;287(14):11 *Mutant protein A30P α-synuclein adopts wild-type fibril structure, despite slower fibrillation kinetics*.
12. *ACS Chem Neurosci*. 2013 Mar 20;4(3):498-508. *Structures of the E46K mutant-type α-synuclein protein and impact of E46K mutation on the structures of the wild-type α-synuclein protein*. Wise-Scira O1, Dunn A, Aloglu AK, Sakallioglu IT, Coskuner O.
13. *J Am Chem Soc*. 2011 Aug 31;133(34):13465 *The A53T mutation is key in defining the differences in the aggregation kinetics of human and mouse α-synuclein*. Kang L1, Wu KP, Vendruscolo M, Baum J.
14. *J Biol Chem*. 2014 Aug 8;289(32):21856-76. *The H50Q mutation enhances α-synuclein aggregation, secretion, and toxicity*. Khalaf O1, Fauvet B1, Oueslati A1, Dikiy I2, Mahul-Mellier AL1, Ruggeri FS3, Mbefo MK1, Vercruysse F1, Dietler G3, Lee SJ4, Eliezer D2, Lashuel HA5.
15. *A53T Human α-Synuclein Overexpression in Transgenic Mice Induces Pervasive Mitochondria Macroautophagy Defects Preceding Dopamine Neuron Degeneration* Linan Chen (陈), Zhiguo Xie, Susie Turkson, and Xiaoxi Zhuang
16. Giasson, B. I., K. Uryu, et al. (1999). "Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro." *J Biol Chem* 274(12): 7619-22.

17. *Cell-Produced α -Synuclein Is Secreted in a Calcium-Dependent Manner by Exosomes and Impacts Neuronal Survival* Evangelia Emmanouilidou,¹ Katerina Melachroinou,¹ Theodoros Roumeliotis,² Spiros D. Garbis,² Maria Ntzouni,³ Lukas H. Margaritis,³ Leonidas Stefanis,^{1,4} and Kostas Vekrellis¹ *J Neurosci.* 2010 May 19; 30(20): 6838–6851
18. *Immunol Lett.* 2006 Nov 15;107(2):102-8. Epub 2006 Oct 17. *Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function.* Keller S¹, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P.
19. *Exosomes-associated neurodegeneration and progression of Parkinson's disease* Isabella Russo, Luigi Bubacco, and Elisa Greggio *Am J Neurodegener Dis.* 2012; 1(3): 217–225.
20. ΝΟΣΗΜΑΤΑ PRION ΣΠΟΓΓΩΔΕΙΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΠΑΘΕΙΕΣ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών Διευθυντής: Καθηγητής Ε.Σ.ΠΑΤΣΟΥΡΗΣ
21. *Mov Disord.* 2013 Jan;28(1):31-40. doi: 10.1002/mds.25373. *Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder* Olanow CW¹, Brundin P.
22. *The prion hypothesis of Parkinson's disease.* Chu Y¹, Kordower JH. *Mov Disord.* 2013 Jan;28(1):31-40. doi: 10.1002/mds.25373
23. *OLN-93: a new permanent oligodendroglia cell line derived from primary rat brain glial cultures.* Richter-Landsberg C¹, Heinrich M. *J Neurosci Res.* 1996 Jul 15;45(2):161-73.