



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑΣ ΔΙΑΜΕΣΟΛΑΒΟΥΜΕΝΗΣ
ΑΠΟ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ-ΣΥΝΟΔΟΥΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ α -
ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΟΠΑΘΕΙΩΝ**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΔΡ. ΖΙΦΑ ΑΙΜΙΛΙΑ

**ΔΑΝΕΖΗ ΚΑΤΕΡΙΝΑ
Α.Μ. 00054
ΑΘΗΝΑ, 2020**

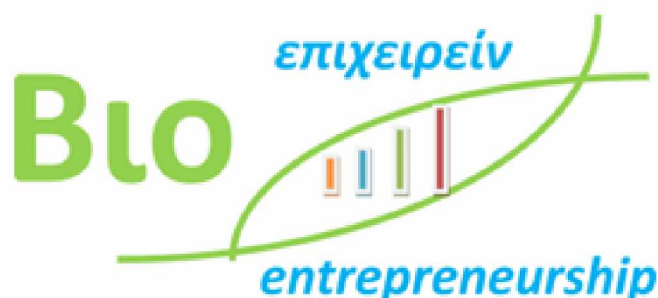


UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF BIOLOGY, MEDICINAL CHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY

**INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES
IN
BIOENTREPRENEURSHIP**



MASTER THESIS

**DYNAMIC MONITORING OF CHAPERONE-MEDIATED AUTOPHAGY IN
CELLULAR MODELS OF α -SYNUCLEINOPATHIES**

SUPERVISOR: ASSISTANT PROFESSOR, DR. ZIFA AIMILIA

**DANEZI KATERINA
00054
ATHENS, 2020**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο

ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με το εργαστήριο Νευροβιολογίας (Ερευνητική ομάδα Δρ. Ξυλούρη Μαρίας) του Κέντρου Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Εγκρίθηκε την από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
Δρ. Ζίφα Αιμιλία	Επίκουρος Καθηγήτρια	
Δρ. Πίντζας Αλέξανδρος	Ερευνητής Α΄	
Δρ. Νίκη Χονδρογιάννη	Ερευνήτρια Β΄	

Ευχαριστίες

Πολλοί είναι οι άνθρωποι που συνέβαλαν στην εκπόνηση αυτής της εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Ζίφα Αιμιλία, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας-Νευροβιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τις συμβουλές της στην πορεία της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και τη Δρ. Μαρία Ξυλούρη, Ερευνήτρια Δ' στο Εργαστήριο Νευροβιολογίας του ΙΙΒΕΑΑ, η οποία με δέχτηκε στην ομάδα της και μου έμαθε τόσα πολλά για την επιστημονική σκέψη και τον ορθό πειραματικό σχεδιασμό. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. Θανάση Σταυρόπουλο, Ειδικό Τεχνικό Επιστήμονα στο Κέντρο Ανοσολογίας και Μεταμοσχεύσεων, για την πολύτιμη βοήθειά του στο κομμάτι των μοριακών τεχνικών αλλά και συνολικότερα, για την καθοδήγησή του και το χρόνο που αφιέρωσε. Η εμπειρία μου στο εργαστήριο αυτό ήταν ο καλύτερος προθάλαμος για την αρχή της διδακτορικής μου έρευνας.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τις Αναστασία Βαμβακά-Ιακώβου και Μαρία Φούκα, που με βοήθησαν σε πολλά τεχνικά κομμάτια της εργασίας όταν αυτό χρειάστηκε και που ήταν δίπλα μου κάθε μία ημέρα αυτού του επιστημονικού ταξιδιού σαν συνεργάτιδες αλλά και σαν φίλες.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω, περισσότερο από όλους, την οικογένειά μου για τη συνεχή τους στήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές τους. Χωρίς αυτούς τίποτα δε θα ήταν δυνατό.

Αφιερωμένη στο Θεωρή

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ	7
ΣΚΟΠΟΣ.....	8
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Νευροεκφυλισμός.....	9
1.2 α-Συνουκλείνη	10
1.2.1 Φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλείνης	11
1.2.2 Διαμορφώσεις της α-συνουκλείνης	12
1.2.3 α-Συνουκλείνοπάθειες.....	13
1.3 Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων (ΑΠΣ).....	13
1.3.1 Γενικά.....	13
1.3.2 Οι υπότυποι της ΑΠΣ και τα ιστοπαθολογικά τους χαρακτηριστικά	14
1.3.3 Αιτιολογία της νόσου	15
1.3.4 Κλινική Διάγνωση.....	16
1.3.5 Επιπολασμός – Επιδημιολογία.....	17
1.3.6 Θεραπευτικές προσεγγίσεις στο σήμερα.....	18
1.3.7 Προτεινόμενος Παθογενετικός Μηχανισμός.....	18
1.4 Αυτοφαγία.....	20
1.4.1 Γενικά.....	20
1.4.2 Τύποι αυτοφαγίας.....	21
1.4.3 Αποικοδόμηση της α-συνουκλείνης	26
2. ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	28
2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
2.1.1 Σχεδιασμός πλασμιδιακού φορέα pPAmCherry (plasmid Photoactivatable monomeric Cherry) -KFERQ.....	28
2.1.2 Ανακαλλιέργεια βακτηρίων.....	29
2.1.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini prep).....	29
2.1.4 Πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	30
2.1.5 Υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδικών τμημάτων που κωδικοποιούν το μοτίβο KFERQ.....	32
2.1.6 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αгарόζης (Gel extraction).....	32
2.1.7 Αποφωσφορυλίωση τμήματος πλασμιδιακού DNA	33
2.1.8 Σύνδεση του αποφωσφορυλιωμένου, γραμμικού pPAmCherry1-N1 με το εισάγον τμήμα που κωδικοποιεί το μοτίβο στόχευσης KFERQ (ligation) ..	33

2.1.9	Μετασχηματισμός χημειοεπιλεκτικών βακτηρίων	34
2.1.10	Αλληλούχιση (Sequencing)	34
2.1.11	Βακτηριακή καλλιέργεια Midi/Maxi prep	35
2.1.12	Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση	35
2.1.13	Κυτταρικές καλλιέργειες	36
2.1.14	Διατήρηση και ανακαλλιέργεια κυτταρικών σειρών	36
2.1.15	Κατάψυξη και απόψυξη των κυττάρων	37
2.1.16	Διαμόλυνση κυττάρων με τον φορέα pPAmCherryN1-KFERQ	38
2.1.17	Αναστολή/ Επαγωγή λυσοσωμικής λειτουργίας	39
2.1.18	Επώαση κυττάρων με ινιδιακές μορφές της πρωτεΐνης α- συνουκλείνης	39
2.1.19	Φωτοενεργοποίηση	39
2.1.20	Ανοσοκυτταροχημεία	40
2.1.21	Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία φωτογραφιών	40
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
2.2.1	Κατασκευή του μοριακού εργαλείου pPAmCherry KFERQ	42
2.2.2	Διερεύνηση της επίδρασης της επαγωγής ή αναστολής της λυσοσωμικής λειτουργίας στην αποικοδόμηση KFERQ-mCherry πρωτεΐνης στα ολιγοδενδροκύτταρα αγρίου τύπου (OLN WT)	45
2.2.3	Διερεύνηση της επίδρασης της επαγωγής ή αναστολής της λυσοσωμικής λειτουργίας στην αποικοδόμηση της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης στα OLN p25α και τα OLN AS	50
3	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	52
4	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι α-συνουκλείνοπάθειες, όπως η νόσος του Πάρκινσον (ΝΠ) και η Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων (ΑΠΣ), είναι προοδευτικές νευροεκφυλιστικές ασθένειες που χαρακτηρίζονται από την παθολογική συσσώρευση της πρωτεΐνης α-συνουκλείνης, σε νευρώνες ή ολιγοδενδροκύτταρα, αντίστοιχα. Τα επίπεδα αλλά και οι διαμορφώσεις της α-συνουκλείνης είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με την εμφάνιση και εξέλιξη τέτοιων ασθενειών. Προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου στο οποίο πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, σε κυτταρικά και ζωικά μοντέλα α-συνουκλείνοπαθειών έχουν δείξει ότι η α-συνουκλείνη στα νευρικά κύτταρα αποικοδομείται κυρίως μέσω της Αυτοφαγίας Διαμεσολαβούμενης από Πρωτεΐνες-συνόδους (CMA). Ωστόσο, ο ρόλος της CMA στην απομάκρυνση της α-συνουκλείνης από τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα οποία φυσιολογικά εκφράζουν ελάχιστα επίπεδα ενδογενούς πρωτεΐνης αλλά συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες αυτής στην ΑΠΣ, παραμένει αδιευκρίνιστος. Για την παρακολούθηση της ενεργότητας του CMA μονοπατιού, κατασκευάστηκε πλασμιδιακός φορέας που εκφράζει μια πρωτεϊνική αλληλουχία στόχευσης (KFERQ-like μοτίβο) στο CMA, συζευγμένη με την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry. Το διαγονίδιο αναφοράς είναι φωτοενεργοποιούμενο και αυτό επέτρεψε την παρατήρηση των μεταβολών της ενεργότητας της CMA σε πραγματικό χρόνο. Κυτταρικές σειρές ολιγοδενδροκυττάρων που έχουν επωαστεί με επαγωγείς ή αναστολείς της λυσοσωμικής λειτουργίας, είτε με παθολογικές μορφές α-συνουκλείνης, διαμολύνθηκαν με αυτό το πλασμίδιο και παρατηρήθηκαν σε συνεσιακό μικροσκόπιο φθορισμού. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η προσθήκη επαγωγέων ή αναστολέων της λυσοσωμικής αποικοδόμησης οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές στην ενεργότητα της CMA ενώ η προσθήκη ινιδιακών μορφών της α-συνουκλείνης οδηγεί σε σημαντική αύξηση του φθορισμού υποδηλώνοντας, για πρώτη φορά, ότι η συσσώρευση α-συνουκλείνης στα ολιγοδενδροκύτταρα οδηγεί σε δυσλειτουργία του CMA μονοπατιού. Συνεπώς, το μοριακό εργαλείο που κατασκευάσαμε επιτρέπει τη δυναμική παρακολούθηση του CMA μονοπατιού σε κυτταρικά μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων και θα μπορούσε μελλοντικά να χρησιμοποιηθεί και σε ζωικά μοντέλα, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο αυτού του μονοπατιού στην εμφάνιση και εξέλιξη αυτών των νόσων.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ

Αυτοφαγία

Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων (ΑΠΣ)

α-συνουκλείνη

Αυτοφαγία Διαμεσολαβούμενη από Πρωτεΐνες-συναδούς (CMA)

Νευροεκφύλιση

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η δημιουργία ενός μοριακού εργαλείου που μας επιτρέπει να παρακολουθήσουμε σε πραγματικό χρόνο, μεταβολές της ενεργότητας του μονοπατιού της Αυτοφαγίας Διαμεσολαβούμενης από Πρωτεΐνες-συνοδούς, σε διαφορετικά κυτταρικά μοντέλα α-συνουκλεινοπαθειών. Πιο συγκεκριμένα, σε ολιγοδενδροκύτταρα αγρίου τύπου, αλλά και ολιγοδενδροκύτταρα που υπερεκφράζουν σταθερά τις πρωτεΐνες α-συνουκλείνη και p25α, πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί ότι παίζουν χαρακτηριστικό ρόλο στην παθολογία της Ατροφίας Πολλαπλών Συστημάτων αλλά και άλλων α-συνουκλεινοπαθειών.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Νευροεκφυλισμός

Ο όρος “νευροεκφυλισμός” ετυμολογικά βρίσκει τις ρίζες του στην ένωση των ελληνικών λέξεων “νεύρο” και “εκφύλιση”. Η πρώτη εκ των δύο λέξεων αναφέρεται στο νευρικό σύστημα προσδιορίζοντας τα νευρικά κύτταρα, ενώ η δεύτερη στην απώλεια δομής/ λειτουργίας ενός ιστού. Η “νευροεκφύλιση” αποτελεί έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο όρο, ο οποίος όμως, συχνά περιγράφεται ατελώς και χρησιμοποιείται για να περιγράψει διαταραχές του νευρικού συστήματος που χαρακτηρίζονται από την προοδευτική απώλεια της δομής ή/ και της λειτουργίας των νευρικών κυττάρων. Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες αποτελούν μεγάλο μέρος των νευρολογικών παθήσεων και πρακτικά εμφανίζουν έντονη ετερογένεια κλινικών και παθολογικών εκδηλώσεων, αλλά και αρκετή ομοιότητα στους παθογενετικούς μηχανισμούς. Τέτοιες ασθένειες περιλαμβάνουν τη νόσο του Alzheimer, τη νόσο του Πάρκινσον, την Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων (ΑΠΣ), τη νόσο του Huntington και άλλες. Ένας από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών παθήσεων είναι η ηλικία, καθώς η συχνότητα εμφάνισής τους αυξάνεται με την πρόοδο της ηλικίας. Οι εν λόγω ασθένειες παρουσιάζουν δυσκολία στην κατανόηση και την κατάταξή τους. Ο αριθμός τους υπολογίζεται σε κάποιες εκατοντάδες, ενώ πολλές από αυτές παρουσιάζουν αλληλοεπικαλύψεις στην κλινική και ιστοπαθολογική τους εικόνα, γεγονός που δυσχεραίνει την αξιολόγηση και την ορθή αντιμετώπισή τους. Έτσι, η κατάταξή τους συνηθίζεται να γίνεται βάσει της κύριας (ή και των δύο κύριων) περιοχών που επηρεάζονται από την εκάστοτε νόσο (Bertram and Tanzi, 2005).

Κυρίαρχο χαρακτηριστικό των νευροεκφυλιστικών νόσων είναι η μη φυσιολογική συσσώρευση τοξικών μορφών πρωτεϊνών, οι οποίες δεν μπορούν να απομακρυνθούν από τα νευρικά κύτταρα και γι’ αυτό οι ασθένειες αυτές ονομάζονται και πρωτεϊνοπάθειες. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η συσσώρευση α-συνουκλεΐνης στη νόσο Πάρκινσον και την ΑΠΣ, β-αμυλοειδούς στη νόσο Alzheimer, χαντιγκτίνης στη νόσο του Huntington, και άλλα. Η ανώμαλη αναδίπλωση και συσσώρευση πρωτεϊνών, μπορεί να οφείλεται σε κάποια δυσλειτουργία των συστημάτων πρωτεϊνικής αποικοδόμησης, ενώ από την άλλη μεριά, τέτοιες παθολογικές διαμορφώσεις μπορεί να παρεμποδίσουν τη λειτουργία των πρωτεολυτικών συστημάτων. Επίσης, η μετάδοση της παθολογίας των μη φυσιολογικά αναδιπλωμένων μορφών αυτών των πρωτεϊνών από το ένα κύτταρο στο άλλο φαίνεται να συμβάλλει σημαντικά στην εξέλιξη της νόσου, κάνοντας τη διευρέυνση των μηχανισμών που διέπουν αυτή τη διεργασία ένα πολύ θελκτικό πεδίο για πληθώρα μελετών.

Καθώς το προσδόκιμο ζωής και ο γηράσκων πληθυσμός ολοένα και μεγαλώνει, ο επιπολασμός των νευροεκφυλιστικών νόσων συνεχώς αυξάνεται (Heemels, 2016). Σήμερα, δεν υπάρχουν αποτελεσματικές θεραπείες που να προσφέρουν πλήρη ίαση, παρά μόνο μερική αντιμετώπιση των συμπτωμάτων προσφέροντας επιβράδυνση της εξέλιξης ορισμένων νόσων. Η ανάπτυξη θεραπευτικών τεχνικών είναι υψίστης σημασίας, προκειμένου να καταφέρουμε να αντιμετωπίσουμε τις γνωσιακές και κινητικές δυσλειτουργίες που παρουσιάζονται στους ασθενείς, ειδικά αν ληφθεί υπόψιν ότι για τις κινητικές διαταραχές της νόσου Πάρκινσον, η επίσκεψη στο γιατρό γίνεται όταν το μεγαλύτερο μέρος των ντοπαμινεργικών νευρώνων έχει ήδη καταστραφεί. Καθώς λοιπόν, οι νευροεκφυλιστικές νόσοι αποτελούν ένα εκ των φλεγόντων ζητημάτων για την επιστημονική κοινότητα, πολυάριθμες μελέτες πραγματοποιούνται για το σχεδιασμό νέων θεραπευτικών στρατηγικών και την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων που θα οδηγήσουν στην πρόληψη και την αντιμετώπιση των δυσάρεστων συμπτωμάτων. Στον αγώνα αυτό, εξαιρετικά σημαντικό ρόλο κατέχει η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που ευθύνονται για τη συσσώρευση των εκάστοτε πρωτεϊνών και τον επακόλουθο εκφυλισμό των νευρώνων.

1.2 α-Συνουκλείνη

Η πρωτεΐνη α-συνουκλείνη είναι μια μικρή νευρωνική πρωτεΐνη, διαλυτή και πολύ συντηρημένη, με την κυρίαρχη ισομορφή της να αποτελείται από 140 αμινοξέα, η οποία απαντάται στο κυτοσόλιο. Έχει την ικανότητα να υιοθετεί διαφορετικές διαμορφώσεις ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο εντοπίζεται και να αλληλεπιδρά εύκολα με άλλα μακρομόρια και προσδέτες όπως, για παράδειγμα, με τα λιπίδια. Η α-συνουκλείνη εντοπίζεται συνήθως στο κεντρικό νευρικό σύστημα, κυρίως στα προσυναπτικά άκρα των νευρικών κυττάρων, φαίνεται να εμπλέκεται σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών και έχει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο.

Η πρωτεΐνη αυτή αρχικά απομονώθηκε από εγκεφάλους ασθενών με τη νόσο του Alzheimer. Το έντονο ενδιαφέρον που προκλήθηκε γύρω από την α-συνουκλείνη οφειλόταν στην ομολογία της με την πρόδρομη μορφή του β-αμυλοειδούς, που συσσωρεύεται στην ασθένεια του Alzheimer (McCann *et al.*, 2014). Εκτός από την α-συνουκλείνη, στην ίδια οικογένεια πρωτεϊνών απαντώνται και η β- και γ-συνουκλείνη. Ο ρόλος αυτών δεν είναι πλήρως ξεκάθαρος έως σήμερα, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να εμπλέκονται στη νευροεκφύλιση (Burré, 2015). Οι συνουκλείνες είναι φυσιολογικά μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, δηλαδή, στη διαλυτή τους μορφή δεν εμφανίζουν τριτοταγή δομή και ως εκ τούτου είναι θερμοάντοχες. Αν και η α-συνουκλείνη απαντάται κυρίως στο νευρικό σύστημα, η έκφρασή της δεν περιορίζεται εκεί. Σημαντικές ποσότητες α-συνουκλείνης έχουν ανιχνευθεί

στα ερυθρά αιμοσφαίρια (Barbour *et al.*, 2008), ενώ έχουν βρεθεί και χαμηλά επίπεδα mRNA ή και της ίδιας της πρωτεΐνης και σε άλλους ιστούς, γεγονός που υποδηλώνει τη γενικότερη συμμετοχή της σε κυτταρικές λειτουργίες επιπλέον αυτών στον εγκέφαλο (Gardai *et al.*, 2013; Badawy *et al.*, 2018).

1.2.1 Φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης

Ο φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης παραμένει ένα άλυτο μυστήριο παρότι μελετάται εδώ και παραπάνω από 25 χρόνια. Η μελέτη της φυσιολογικής λειτουργίας της α-συνουκλεΐνης αποτελούσε και αποτελεί μια πρόκληση για τους εξής λόγους (Burré, 2015):

- (i) η α-συνουκλεΐνη είναι μια πρωτεΐνη που ήταν γνωστό ότι φυσιολογικά εντοπίζεται στη μη αναδιπλωμένη μορφή της στο κυτοσόλιο, ενώ μία άλλη έρευνα υποστήριξε ότι, φυσιολογικά απαντάται στα κύτταρα ως τετραμερές (Εικ.2) και έτσι ανθίσταται στην παθολογική συσσώρευση (Bartels *et al.*, 2011).
- (ii) Η υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης έχει τοξικές επιδράσεις, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζωικά μοντέλα. Οι τοξικές επιδράσεις φαίνεται να είναι πολύ πιο επιζήμιες σε σχέση με τις επιπτώσεις που προκύπτουν από την απώλεια της α-συνουκλεΐνης. Συγκεκριμένα, πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια που στερούνται α-συνουκλεΐνης (*a-syn knockout mice*) έδειξαν ότι η απώλειά της δεν έχει καταστρεπτικές επιπτώσεις στη συναπτική λειτουργία. Μελέτες με στέρηση όλων των ισομορφών των συνουκλεϊνών σε ποντίκια (τριπλό *knock-out*), έδειξαν νευρωνική δυσλειτουργία εξαρτώμενη από τη γήρανση, γεγονός που υποδηλώνει τη σημαντικότητα των συνουκλεϊνών στη μακροχρόνια ομαλή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Τέτοια ευρήματα περιπλέκουν τη χρήση μοντέλων υπερέκφρασης (Ugalde *et al.*, 2019).
- (iii) Η μελέτη πιθανής αντισταθμιστικής λειτουργίας της β- και γ-συνουκλεΐνης ως απάντηση στην απώλεια της α-συνουκλεΐνης είναι περίπλοκη καθώς απαιτεί ταυτόχρονη στέρηση (*knock-out*) όλων των ισομορφών.

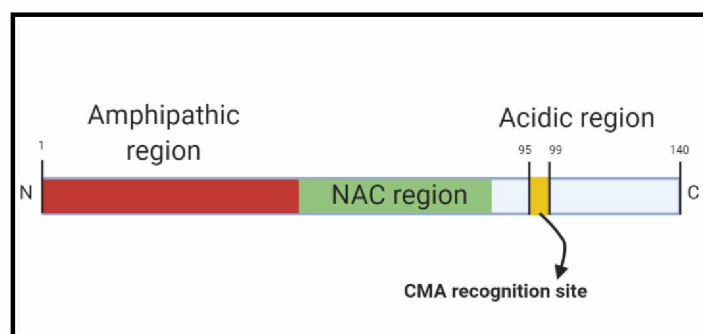
Εντούτοις, ο εντοπισμός της α-συνουκλεΐνης στα προσυναπτικά άκρα και η αλληλεπίδρασή της με μεμβρανικές και συναπτικές πρωτεΐνες υποδηλώνουν μια φυσιολογική ρυθμιστική λειτουργία που σχετίζεται με τη σύναψη, όπως είναι η απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών, η συναπτική πλαστικότητα και ο μεταβολισμός της ντοπαμίνης (Burré, 2015). Επιπροσθέτως, η α-συνουκλεΐνη μπορεί να δράσει ως πρωτεΐνη-συνοδός για το σχηματισμό και την επαγωγή σταθερότητας του συμπλόκου SNARE, μιας πολυμερούς πρωτεϊνικής μονάδας που εμπλέκεται στην πρόσδεση και σύντηξη των συναπτικών κυστιδίων με την προσυναπτική μεμβράνη στους νευρώνες. Ωστόσο, η αλληλεπίδρασή της με τις πρωτεΐνες του συμπλόκου SNARE παραμένει αμφιλεγόμενη. Καθώς η α-συνουκλεΐνη

έχει ανευρεθεί και σε άλλους ιστούς εκτός του εγκεφάλου, έρευνες προτείνουν τον αντιοξειδωτικό ρόλο της, αλλά και τη συμμετοχή της στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης, στην ενδοκυτταρική διακίνηση πρωτεϊνών και στην καταστολή της απόπτωσης (Ugalde *et al.*, 2019).

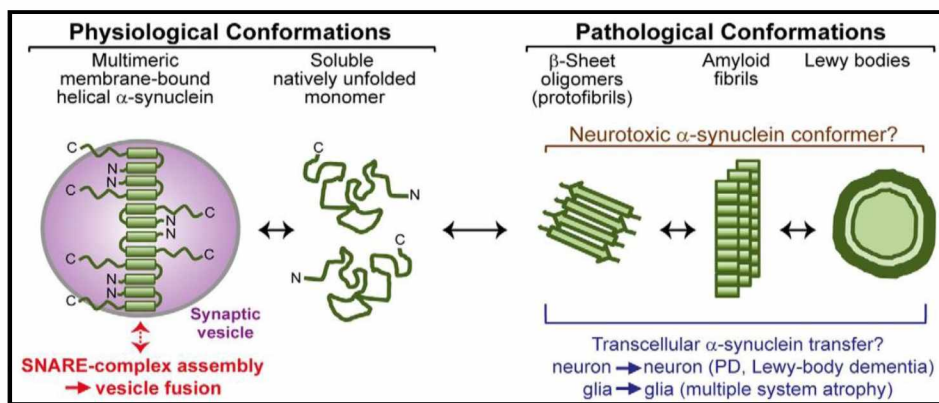
1.2.2 Διαμορφώσεις της α-συνουκλεΐνης

Από την ανακάλυψη και απομόνωση της α-συνουκλεΐνης είναι γνωστό και κοινώς αποδεκτό ότι, στο κυτοσόλιο φυσιολογικά εντοπίζεται με τη μορφή μη αναδιπλωμένου μονομερούς (Εικ. 1, Εικ. 2). Εκτός της μονομερούς μορφής, η α-συνουκλεΐνη αποκτά κατά περίπτωση και άλλες διαμορφώσεις. Αυτές μπορεί να είναι η ολιγομερής μορφή (ή αλλιώς πρωτοϊνίδια), η αμυλοειδής ινιδιακή μορφή και άλλες άμορφες ινιδιακές μορφές (Εικ. 2). Επίσης, η μεμβρανική α-συνουκλεΐνη σχηματίζεται σε δομή α-έλικας, η οποία έχει συσχετιστεί με τη δραστηριότητά της ως πρωτεΐνη-συνοδός στο σύμπλοκο SNARE, το οποίο αναφέρεται παραπάνω (Εικ. 2). Το κατά πόσον η συσσώματωση της α-συνουκλεΐνης ξεκινά από την α-ελικοειδή ή τη μονομερή κατάστασή της παραμένει άγνωστο.

Οι ινιδιακές μορφές έχουν συνδεθεί άμεσα με την παθολογία καθώς αποτελούν το κύριο συστατικό των πρωτεϊνικών κυτταροπλασματικών εγκλείστων που συσσωρεύονται σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως τα σωμάτια Lewy στη νόσο Πάρκινσον και τα γλοιακά (GCIs) και νευρωνικά (NCIs) κυτταροπλασματικά έγκλειστα στην Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων (Wakabayashi *et al.*, 1998).



Εικ. 1 Δομή της μονομερούς α-συνουκλεΐνης. Έχει μέγεθος 140 αμινοξέα και αποτελείται από 3 βασικές περιοχές. Στην αμφιπαθική (κόκκινο), που αφορά κυρίως τη σύνδεσή της με λιπίδια και κάποιες πρωτεΐνες, απαντώνται και οι περισσότερες σημειακές μεταλλάξεις που έχουν συνδεθεί με την παθολογία της νόσου του Πάρκινσον. Η NAC περιοχή (πράσινο), ή περιοχή μη-αμυλοειδούς-β συστατικού (non-amyloid-β component) έχει συνδεθεί με τη συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης, ενώ λίγο πριν το καρβοξυτελικό άκρο απαντάται η περιοχή στόχευσης στο μονοπάτι της Αυτοφαγίας Διαμεσολαβούμενης από πρωτεΐνες-συνοδούς (CMA) (κίτρινο).



Εικ. 2 Σχηματική απεικόνιση των διαμορφώσεων της α-συνουκλεΐνης. Σε φυσιολογικές καταστάσεις, απαντάται ως μονομερές ή και μεμβρανικό πολυμερές, ενώ σε παθολογικές καταστάσεις εντοπίζεται ως ολιγομερή β-φύλλων ή πρωτοϊνίδια, ινιδιακές μορφές και τέλος ως χαρακτηριστικό των σωμάτων Lewy. (Πηγή: Burré *et al.*, 2015)

1.2.3 α-Συνουκλείνοπάθειες

Ο όρος “α-συνουκλείνοπάθεια” χρησιμοποιείται για να περιγράψει έναν αριθμό νευροεκφυλιστικών ασθενειών που χαρακτηρίζονται από την ανώμαλη συσσώρευση αδιάλυτων συσσωματωμάτων α-συνουκλεΐνης σε νευρικά ή γλοιακά κύτταρα. Διαταραχές οι οποίες συνολικά αναφέρονται ως α-συνουκλείνοπάθειες περιλαμβάνουν τη νόσο του Πάρκινσον, την άνοια με σωμάτια Lewy καθώς και την Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων (Spillantini *et al.*, 1999), στην οποία θα εστιάσουμε στην παρούσα εργασία. Η ΑΠΣ διαφέρει από τις δυο άλλες συνουκλείνοπάθειες στο γεγονός ότι η κυρίαρχη συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης δεν παρατηρείται στους νευρώνες, που φυσιολογικά εκφράζουν την πρωτεΐνη, αλλά στα ολιγοδενδροκύτταρα.

1.3 Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων (ΑΠΣ)

1.3.1 Γενικά

Η ατροφία πολλαπλών συστημάτων (ΑΠΣ) αποτελεί μια σπάνια, ταχέως εξελισσόμενη, θανατηφόρα νευροεκφυλιστική διαταραχή, αβέβαιης αιτιολογίας, που χαρακτηρίζεται κλινικά από ένα μεταβλητό συνδυασμό παρκινσονισμού, παρεγκεφαλιδικής βλάβης, αυτόνομων και κινητικών δυσλειτουργιών.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κύριο χαρακτηριστικό της νόσου είναι η παθολογική συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης κυρίως στα ολιγοδενδροκύτταρα, τα οποία ευθύνονται για

την παραγωγή της μελίνης που περιβάλλει τους άξονες των νευρώνων. Φυσιολογικά, στα ολιγοδενδροκύτταρα η ποσότητα της α-συνουκλεΐνης ανευρίσκεται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, ενώ σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ΑΠΣ, παρατηρείται υπερβολική συσσώρευση της πρωτεΐνης στα γλοιακά κυτταροπλασματικά έγκλειστα (GCIs, glial cytoplasmic inclusions). Εκτός της α-συνουκλεΐνης, στα έγκλειστα αυτά ανευρίσκονται και άλλες πρωτεΐνες, όπως η ουβικουΐνη, η αβ-κρυσταλλίνη, οι α- και β-τουμπουλίνη και άλλες. Η α-συνουκλεΐνη στα κυτταρικά αυτά έγκλειστα, βρίσκεται σε μεγάλο βαθμό φωσφορυλιωμένη, καθώς και ουβικουτυλιωμένη, όπως συμβάνει στην άνοια με σωματία Lewy και τη νόσο του Πάρκινσον στα αντίστοιχα νευρωνικά έγκλειστα (Fujiwara *et al.*,2002 ; Hasegawa *et al.*,2002).

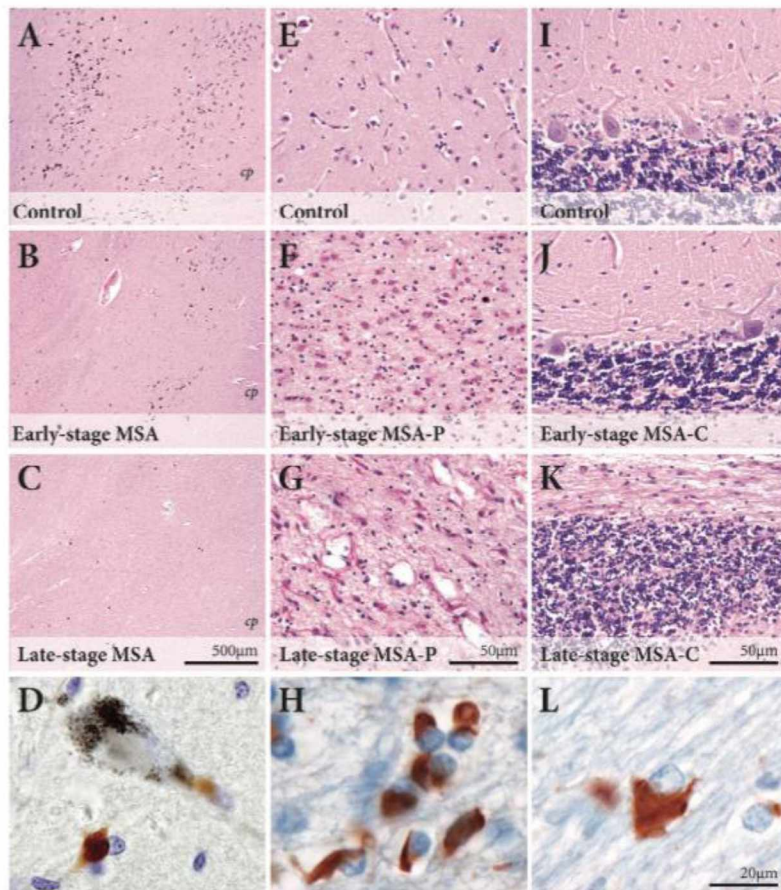
Ο όρος ΑΠΣ ή σύνδρομο Shy-Drager χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1969 από τους Graham και Oppenheimer για να περιγράψει συγκεντρωτικά την εξής νευρολογική συμπτωματολογία: έλαιο-γέφυρο παρεγκεφαλιδική αταξία, παρκινσονικά συμπτώματα και δυσλειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος και εκφυλισμός της μελαινοραβδωτής οδού (Graham and Oppenheimer, 1969). Οι Papp και Lantos, εν συνεχεία, ανακάλυψαν τα ολιγοδενδρογλοιακά κυτταροπλασματικά έγκλειστα στις περιοχές του εγκεφάλου που πλήττονταν στην ΑΠΣ (Papp *et al.*,1989). Αργότερα, βρέθηκε ότι το χαρακτηριστικό περιεχόμενο των εν λόγω εγκλείστων είναι η συσσωματωμένη φωσφορυλιωμένη α-συνουκλεΐνη, οδηγώντας στην αντίληψη ότι η ΑΠΣ χαρακτηρίζεται από έναν παθογενετικό μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν της νόσου του Πάρκινσον ή της άνοιας με σωματία Lewy. Δεδομένου ότι η εμφάνιση αυτών των εγκλείστων συμβαίνει πριν από την απώλεια των νευρώνων, πιθανολογείται ότι η ρίζα της παθογένεσης της ασθένειας μπορεί να βρίσκεται σε πρώιμα γεγονότα που αφορούν τα ολιγοδενδροκύτταρα (Wenning *et al.*, 2008).

1.3.2 Οι υπότυποι της ΑΠΣ και τα ιστοπαθολογικά τους χαρακτηριστικά

Σήμερα, τα κριτήρια για την κλινική διάγνωση της ΑΠΣ, οδηγούν στην ταξινόμησή της σε δύο υποτύπους:

- MSA-C, που χαρακτηρίζεται από παρεγκεφαλιδική αταξία (με κυρίαρχα συμπτώματα την αταξία του λόγου και της βάρδισης) και,
- MSA-P, που χαρακτηρίζεται από παρκινσονισμό (με συμπτώματα όπως η βραδυκινησία, η δυσκαμψία, ο τρόμος και η αστάθεια).
- Μικτός υπότυπος, με χαρακτηριστικά και των δύο τύπων.

Το χαρακτηριστικό ιστοπαθολογικό χαρακτηριστικό των δύο υποτύπων είναι η ύπαρξη ολιγοδενδρογλιακών κυτταροπλασματικών εγκλείστων. Οι κλινικοί υποτύποι MSA-P και MSA-C, γενικά αντανakλούν τις περιοχές του εγκεφάλου που επηρεάζονται (Εικ. 3). Στην MSA-P, επηρεάζεται κυρίως η μελαινораβδωτή οδός, ενώ στην MSA-C οι έλαιο-γέφυρο παρεγκεφαλιδικές περιοχές, ωστόσο μπορεί να υπάρξει σημαντική επικάλυψη (McCann *et al.*, 2014).



Εικ. 3 Φωτομικρογραφίες της μέλαινας ουσίας (A-D), του κελύφους (E-H) και της παρεγκεφαλίδας (I-L) των δειγμάτων μάρτυρες (A, E, I) δειγμάτων ΑΠΣ σε πρώιμο στάδιο (B, F, I) και σε εξελιγμένο στάδιο (C, G, K). Οι περιπτώσεις με MSA-P παρουσιάζουν σημαντική εκφύλιση στο κέλυφος του φακοειδούς πυρήνα (F, G) και όχι ιδιαίτερα στη μέλαινα ουσία (B, C), ενώ οι περιπτώσεις με MSA-C έχουν σημαντική εκφύλιση στην παρεγκεφαλίδα (J, K), όπως παρουσιάζεται στις τομές με χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης. Κυτταροπλασματικά έγκλειστα α-συνουκλείνης παρατηρούνται με ανοσοεντόπιση σε όλες τις περιοχές (D, H, L). (Πηγή: McCann *et al.*, 2014)

1.3.3 Αιτιολογία της νόσου

Η ακριβής αιτιολογία της νόσου παραμένει άγνωστη μέχρι και σήμερα. Ωστόσο, όπως και για άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους, φαίνεται πως οφείλεται σε μια σύνθετη αλληλεπίδραση τόσο γενετικών όσο και περιβαλλοντικών μηχανισμών. Η ΑΠΣ είναι μια κυρίως σποραδική ασθένεια και το οικογενειακό ιστορικό παρκινσονισμού ή αταξίας δεν ορίζεται ως σημαντικό υποστηρικτικό στοιχείο βάσει των τρεχόντων διαγνωστικών κριτηρίων (Gilman *et al.*, 2008). Μία μετάλλαξη στο *COQ2* γονίδιο που κωδικοποιεί το συνένζυμο Q10 αναφέρθηκε να συσχετίζεται με την εκδήλωση του MSA-C υπότυπου, η οποία οδηγεί σε μειωμένη μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια και αυξημένη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες (Wen *et al.*,

2015). Η έκθεση σε φυτοφάρμακα έχει προταθεί ως αιτιολογικός παράγοντας αλλά δεν έχει επιβεβαιωθεί στατιστικά (Nee *et al.*, 1991). Όσον αφορά άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες, υπάρχουν μελέτες που ενοχοποιούν την έκθεση σε σκόνες μετάλλων, μονομερή πλαστικών, άλλους οργανικούς διαλύτες κ.α (Fanciulli *et al.*, 2015).

Οι πολυμορφισμοί αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται σε φλεγμονώδεις διεργασίες έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΑΠΣ, π.χ., υπήρχε πενταπλός κίνδυνος ανάπτυξης ΑΠΣ σε άτομα ομόζυγα για το αλληλόμορφο ιντερλευκίνης-1A, ενώ το γονίδιο της α-1-αντιχυμοτρουπίνης AA (ACT-AA) έχει συσχετιστεί με πρόωρη εμφάνιση και ταχύτερη εξέλιξη της νόσου (Furuya *et al.*, 2005). Μια άλλη μελέτη έδειξε τη συσχέτιση της ΑΠΣ με πολυμορφισμούς γονιδίων που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες (Soma *et al.*, 2008).

Όλες οι μελέτες σχετικά με την αιτιολογία της ΑΠΣ περιορίζονται λόγω του αριθμού των περιπτώσεων, καθώς η νόσος είναι σπάνια και η διαφοροποίηση από άλλα παρκινσονικά σύνδρομα είναι δύσκολη, ιδιαίτερα σε πρώιμα στάδια της ασθένειας. Η οριστική διάγνωση της ΑΠΣ μπορεί να γίνει μόνο μεταθανάτια, η οποία, ωστόσο, εκλείπει στην πλειοψηφία των περιπτώσεων που εμπλέκονται σε γενετικές ή επιδημιολογικές μελέτες, συμβάλλοντας περαιτέρω στην αβεβαιότητα των αποτελεσμάτων.

1.3.4 Κλινική Διάγνωση

Βιοδείκτες για την ΑΠΣ

Σήμερα δεν υπάρχουν διαθέσιμοι αξιόπιστοι βιοδείκτες τόσο για προγνωστικούς όσο και για διαγνωστικούς σκοπούς. Στο παρελθόν, κάποιες μελέτες υποστήριξαν ότι ένας συνδυασμός βιολογικών δεικτών του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, όπως είναι η σχετιζόμενη με τη νόσο Πάρκινσον πρωτεΐνη DJ-1, η φωσφορυλιωμένη tau πρωτεΐνη, η A₄₂ κ.α. μπορεί να είναι χρήσιμος στη διαφορική διάγνωση μεταξύ της ΑΠΣ και άλλων παρκινσονικών διαταραχών (Laurens *et al.*, 2015 ; Herbert *et al.*, 2014). Ακόμη, έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα της οξειδωμένης πρωτεΐνης DJ-1 στα ερυθροκύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης για τη διαφορική διάγνωση μεταξύ της ασθένειας του Πάρκινσον και της ΑΠΣ (Yamagishi *et al.*, 2018). Άλλη πολύ πρόσφατη έρευνα εντόπισε 15 μεταβολίτες που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως βιοδείκτες για τη διαφορική διάγνωση της ΑΠΣ από το Πάρκινσον (Mori *et al.*, 2019). Γίνονται διαρκείς προσπάθειες στον ερευνητικό στίβο για την ανακάλυψη βιοδεικτών της ΑΠΣ, όμως οι μεταβολομικές και πρωτεομικές προσεγγίσεις χρειάζονται περαιτέρω αξιολόγηση και κλινικές δοκιμές προκειμένου να διασφαλιστεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Σήμερα, η σάρωση ¹²³I-MIBG (σπινθηρογράφημα κατά το οποίο χορηγείται το τεχνητό ραδιοϊσότοπο μετα-ιωδο-βενζυλγουανιδίνη) μπορεί να βοηθήσει στη διαφοροποίηση των δύο διαταραχών με εξειδίκευση 77%. Παρά την κάποια

αλληλοεπικάλυψη που υπάρχει μεταξύ της νόσου του Πάρκινσον και της ΑΠΣ, η μέθοδος αυτή μπορεί να φανεί χρήσιμη στη διάγνωση, κυρίως του MSA-P υπότυπου. Σε ασθενείς που παρουσιάζουν δυσλειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος, το σπινθηρογράφημα του μυοκαρδίου μπορεί να είναι πολύτιμος προγνωστικός δείκτης για την εξέλιξη σε ΑΠΣ. Ωστόσο, και αυτή η μέθοδος εγκυμονεί πολλούς περιορισμούς που επηρεάζουν την αξιοπιστία της. Καθώς η ανοσμία αποτελεί πρώιμο χαρακτηριστικό της νόσου Πάρκινσον, δοκιμές αναγνώρισης οσμής μπορούν να χρησιμοποιηθούν προς διαχωρισμό της ΑΠΣ από το Πάρκινσον, με ευαισθησία 76,7% και ειδικότητα 95,7% (Jellinger, 2018).

1.3.5 Επιπολασμός – Επιδημιολογία

Η ΑΠΣ είναι μια σπάνια νόσος με εκτιμώμενη συχνότητα εμφάνισης 3.6-4.9 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα στην Αμερική (Fanciulli *et al.*, 2015, Stefanova *et al.*, 2009) και 4-5 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα στην Ευρώπη (Vanacore *et al.*, 2001). Η συχνότητα εμφάνισης αυξάνεται με την ηλικία έως 12 / 100.000 άνω των 70 ετών. Ο μέσος όρος ηλικίας εμφάνισης κινητικών συμπτωμάτων είναι τα 56 έτη. Πολλοί ασθενείς δεν λαμβάνουν τη σωστή διάγνωση κατά τη διάρκεια της ζωής τους λόγω της δυσκολίας διαφοροποίησης της ΑΠΣ από άλλες διαταραχές (π.χ. νόσος του Πάρκινσον, άλλες σπάνιες κινητικές διαταραχές). Περίπου το 29-33% των ασθενών με παρεγκεφαλιδική αταξία και το 8-10% των ασθενών με παρκινσονισμό θα αναπτύξουν ΑΠΣ στη συνέχεια. Συνεπώς, μπορεί να θεωρηθεί ότι στην πραγματικότητα υπάρχει ελαφρώς υψηλότερος επιπολασμός από αυτόν που εκτιμάται στις έρευνες.

Εντούτοις, όπως στο Πάρκινσον, 20 έως 75% των περιπτώσεων ΑΠΣ έχουν προδρομική/προκλινική φάση με μη κινητικά συμπτώματα συμπεριλαμβανομένης καρδιαγγειακής ανεπάρκειας, ουρογεννητικής και σεξουαλικής δυσλειτουργίας, ορθοστατικής υπότασης, διαταραχή συμπεριφοράς ύπνου REM και αναπνευστικές διαταραχές που μπορεί να προηγούνται μήνες έως έτη από την εμφάνιση των κινητικών δυσλειτουργιών. Στις δυτικές χώρες ο MSA-P υπότυπος κυριαρχεί σε ποσοστό 70-80% των ασθενών με ΑΠΣ. Ωστόσο, ο υπότυπος MSA-C είναι πιο συνηθισμένος στις ανατολικές χώρες, που παρατηρείται στο 67-84% των ασθενών με ΑΠΣ (Jellinger, 2018). Η διάρκεια νόσησης μετά την κλινική διάγνωση είναι συνήθως 6 έως 10 (μέσος όρος 9,5) χρόνια, με ελάχιστους ασθενείς να επιβιώνουν περισσότερο από 15 χρόνια μετά τη διάγνωση. Η μέση επιβίωση είναι συνήθως παρόμοια και για τους δύο φαινότυπους. Σύμφωνα με έρευνες, οι ασθενείς με MSA-P έχουν 10 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου σε σύγκριση με τους ασθενείς αναφοράς (ασθενείς γενικού πληθυσμού που δεν παρουσίαζαν παρκινσονισμό ή τρέμουλο κατά το έτος εμφάνισης της

εκάστοτε α-συνουκλείνοπάθειας) και τα μικρότερα ποσοστά επιβίωσης μετά την εμφάνιση συμπτωμάτων σε σύγκριση με όλους τους άλλους τύπους συνουκλείνοπαθειών που εξετάστηκαν (Πάρκινσον, Άνοια με σωματία Lewy, Άνοια της νόσου Πάρκινσον) (Savica *et al.*, 2017). Τέλος, έχει φανεί ότι η νόσος είναι συχνότερη στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες, σε μία αναλογία περίπου 2 άνδρες:1 γυναίκα (Eschlböck *et al.*, 2017).

1.3.6 Θεραπευτικές προσεγγίσεις στο σήμερα

Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν διαθέσιμες θεραπείες τροποποίησης της πορείας της νόσου και οι θεραπείες που αφορούν τη συμπτωματολογία της ΑΠΣ είναι περιορισμένες. Η ανταπόκριση των ασθενών που πάσχουν από ΑΠΣ στη λεβοντόπα φαίνεται να είναι καλή περίπου στο 80% των ασθενών με MSA-P υπότυπο, αλλά το αποτέλεσμα είναι συνήθως παροδικό και μόνο το 30% δείχνει απόκριση για μια περίοδο 3,5 ετών (Wenning *et al.*, 2013). Σε μερικούς ασθενείς παρατηρούνται διακυμάνσεις στην εκδήλωση των κινητικών συμπτωμάτων. Η εν τω βάθει εγκεφαλική διέγερση (DBS) δε συνιστάται για την αντιμετώπιση της ΑΠΣ, ενώ η ενεργός ανοσοποίηση έναντι της α-συνουκλείνης και ο συνδυασμός με αντιφλεγμονώδη θεραπεία αναδεικνύονται ως περισσότερο ελπιδοφόρες θεραπευτικές στρατηγικές. Νέες στρατηγικές που στοχεύουν τη συσσωρευμένη α-συνουκλείνη στα ολιγοδενδροκύτταρα βρίσκονται σε εξέλιξη. Παρότι πρόκειται για μια “ορφανή” ασθένεια, δηλαδή μια ασθένεια που δεν προκαλεί το ενδιαφέρον των φαρμακευτικών βιομηχανιών επειδή αφορά λιγότερα από 200.000 άτομα ανά τον κόσμο, η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων είναι αναγκαία και απαιτεί τη βαθύτερη κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών που ευθύνονται για την εκδήλωση της νόσου ΑΠΣ (Jellinger, 2018).

1.3.7 Προτεινόμενος Παθογενετικός Μηχανισμός

Παρόλο που οι μηχανισμοί παθογένεσης της Ατροφίας Πολλαπλών Συστημάτων παραμένουν σχετικά ασαφείς, δεδομένα μελετών που χρησιμοποιούν προκλινικά μοντέλα καθώς και μεταθανάτιες μελέτες υποδηλώνουν ότι πρόκειται για μια πρωτογενή ολιγοδενδρογλοιοπάθεια.

Μια πρόσφατη μελέτη έθεσε σε αμφισβήτηση μια προηγούμενη θεωρία που υποστήριζε ότι τα ολιγοδενδροκύτταρα ασθενών με ΑΠΣ δεν εκφράζουν την α-συνουκλείνη (Djelloul *et al.*, 2015). Η έκφραση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε σε ένα μικρό κλάσμα προγονικών ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων της μέλαινας ουσίας σε ασθενείς με τον MSA-P υπότυπο. Επιπλέον, η α-συνουκλείνη αλλά και μετάγραφά της ανευρέθησαν σε ολιγοδενδροκύτταρα

που προέκυψαν από εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα μύς και ανθρώπου, σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα προερχόμενα από ινοβλάστες ασθενών με ΑΠΣ και σε ολιγοδενδροκύτταρα απομονωμένα από εγκεφάλους ενήλικων ασθενών με ΑΠΣ. Η έκφραση της πρωτεΐνης και των μεταγράφων της φάνηκε να μειώνεται με την πάροδο του χρόνου και τα επίπεδά της ήταν χαμηλότερα στα ώριμα ολιγοδενδροκύτταρα σε σύγκριση με τα προγονικά ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα της μέλαινας ουσίας. Σε άλλη έρευνα, φάνηκε ότι υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης σε προγονικά ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα αναστέλλει την ωρίμανσή τους (Ettle *et al.*, 2014). Αυτά τα ευρήματα συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι η συσσωματωμένη α-συνουκλεΐνη που απαρτίζει τα χαρακτηριστικά γλοιακά κυτταρικά έγκλειστα στην ΑΠΣ, είναι ολιγοδενδρογλοιακής προέλευσης. Είναι γνωστό ότι τα ολιγοδενδροκύτταρα μπορούν να προσλάβουν και εξωγενούς προέλευσης α-συνουκλεΐνη. Έτσι, η διασπορά της πρωτεΐνης από κύτταρο σε κύτταρο μπορεί να συμβάλλει στην παθογένεση της ΑΠΣ (Reyes *et al.*, 2013).

Έχει προταθεί ότι ένα πρώιμο γεγονός κατά την εκδήλωση της ΑΠΣ αποτελεί η μεταφορά της ολιγοδενδρογλοιακής πρωτεΐνης TRPP/p25α (πρωτεΐνη επαγωγής πολυμερισμού τουμπουλίνης), η οποία παίζει κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία της μυελινοποίησης, από το έλυτρο της μυελίνης στο σώμα των ολιγοδενδροκυττάρων. Μια πρόσφατη μελέτη επέκτεινε αυτά τα ευρήματα, δείχνοντας ότι η p25α, εκτός από τα έλυτρα μυελίνης, μετατοπίζεται και από τον πυρήνα στο περιπυρηνικό κυτταρόπλασμα σε ασθενείς με ΑΠΣ (Laurens *et al.*, 2017). Αυτή η μεταφορά της p25α στο σώμα των ολιγοδενδροκυττάρων, έχειδειχθεί ότι προωθεί τη συσώρευση της α-συνουκλεΐνης στα ολιγοδενδροκύτταρα. Αυτό ακολουθείται από διόγκωση των ολιγοδενδροκυττάρων και από μη φυσιολογική πρόσληψη εξωγενούς α-συνουκλεΐνης από τους νευρώνες ή υπερέκφραση της ενδογενούς πρωτεΐνης. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της p25α και της α-συνουκλεΐνης προωθεί τη φωσφορυλίωση και τη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης πρώτα σε αδιάλυτα ολιγομερή και, εν συνεχεία, σε ολιγοδενδρογλοιακά κυτταροπλασματικά έγκλειστα. Ο σχηματισμός των κυτταροπλασματικών εγκλείστων, με τη σειρά του, ενεργοποιεί τη μικρογλοία και την αστρογλοία, κατηγορίες γλοιακών κυττάρων που έχουν προστατευτικό ρόλο. Ως αποτέλεσμα, σταδιακά, δυσλειτουργικά ολιγοδενδροκύτταρα απελευθερώνουν τη μη φυσιολογικά αναδιπλωμένη α-συνουκλεΐνη στον εξωκυττάριο χώρο. Αυτή η α-συνουκλεΐνη μπορεί στη συνέχεια να προσληφθεί από γειτονικούς νευρώνες για να σχηματιστούν, μετέπειτα, νευρωνικά κυτταροπλασματικά έγκλειστα (Fanciulli *et al.*, 2015).

Πιστεύεται, ακόμα, ότι η νευροφλεγμονή, όπως αυτή υποδεικνύεται από την ενεργοποίηση μεγάλου αριθμού αστροκυττάρων και μικρογλοίας, συμβάλλει στην παθογένεση της ΑΠΣ (Stefanova *et al.*, 2007). Επίσης, πρόσφατη μελέτη συνέδεσε τη μιτοχονδριακή

δυσλειτουργία και το οξειδωτικό στρες με το σχηματισμό ολιγοδενδρογλοιακών κυτταροπλασματικών εγκλείστων που προκύπτει από δυσλειτουργία της αυτοφαγίας (Monzio Compagnoni *et al.*, 2018)

1.4 Αυτοφαγία

1.4.1 Γενικά

Όλα τα κυτταρικά συστατικά υπόκεινται σε συνεχή παρακολούθηση από ενδοκυτταρικά συστήματα “ελέγχου ποιότητας” για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης. Οι κύριοι παράγοντες που εμπλέκονται σε αυτόν τον “ποιοτικό έλεγχο” είναι οι μοριακές πρωτεΐνες-συνοδοί, οι οποίες ανιχνεύουν τα μη φυσιολογικά συστατικά, καθώς και οι πρωτεάσες, οι οποίες ευθύνονται για τη διάσπαση των πρωτεϊνών του κυττάρου. Η δυσλειτουργία των συστημάτων κυτταρικής παρακολούθησης οδηγεί αναπόφευκτα σε κυτταροτοξικότητα και συχνά σε κυτταρικό θάνατο, λόγω της συσσώρευσης ανεπιθύμητων, μη λειτουργικών συστατικών εντός των κυττάρων. Έτσι, ο όρος “αυτοφαγία” παραπέμπει σε αυτό το σύστημα αυτοαποικοδόμησης και ανακύκλωσης των ενδοκυτταρικών μακρομοριακών στοιχείων και οργανιδίων κατά περίπτωση, το οποίο αναδύεται ως ένας από τους βασικούς “ενορχηστρωτές” της υγιούς γήρανσης.

Αυτή η διαδικασία αυτοαποικοδόμησης λαμβάνει χώρα σε όλα τα κύτταρα των ιστών των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Μέσω της αυτοφαγίας το κατεστραμμένο ή δυσλειτουργικό ενδοκυτταρικό υλικό κατευθύνεται στα λυσοσώματα, το βασικό ενδοκυτταρικό οργανίδιο πέψης και αποικοδόμησης των μακρομοριακών στοιχείων. Σε καταστάσεις κυτταρικού stress οι αυτοφαγικές διαδικασίες λειτουργούν προσαρμοστικά για την αποκατάσταση της κυτταρικής ομοιόστασης. Έτσι, η προσαρμοστική αυτοφαγία στόχο έχει την παροχή των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και ενέργειας, καθώς και την εξυγίανση από τα τοξικά συστατικά που τυχόν συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια μιας κυτταρικής λειτουργικής βλάβης. Η αυτοφαγία μπορεί να αποβεί ευεργετική ή επιβλαβής, ανάλογα με τον τρόπο αλλά και τη διάρκεια της επαγωγής αυτής. Φυσιολογικά, η διάρκεια της αυτοφαγικής απόκρισης υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση για να αποφευχθεί η ανεξέλεγκτη αποδόμηση (Antonoli *et al.*, 2017).

Μεταβολές τόσο στην έναρξη αυτοφαγικών διεργασιών όσο και στον τερματισμό τους, συχνά, προδιαθέτουν κυτταρικό θάνατο και επηρεάζουν την εκτέλεση άλλων διεγερσιμων διεργασιών, όπως είναι η απόκριση στη φλεγμονή. Συνεπώς, η επιτυχώς ολοκληρωμένη αυτοφαγική απόκριση είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της φυσιολογίας του ΚΝΣ και την επιβίωση των νευρώνων. Αυτό περίτρανα αποδεικνύεται από τον αυξημένο αριθμό

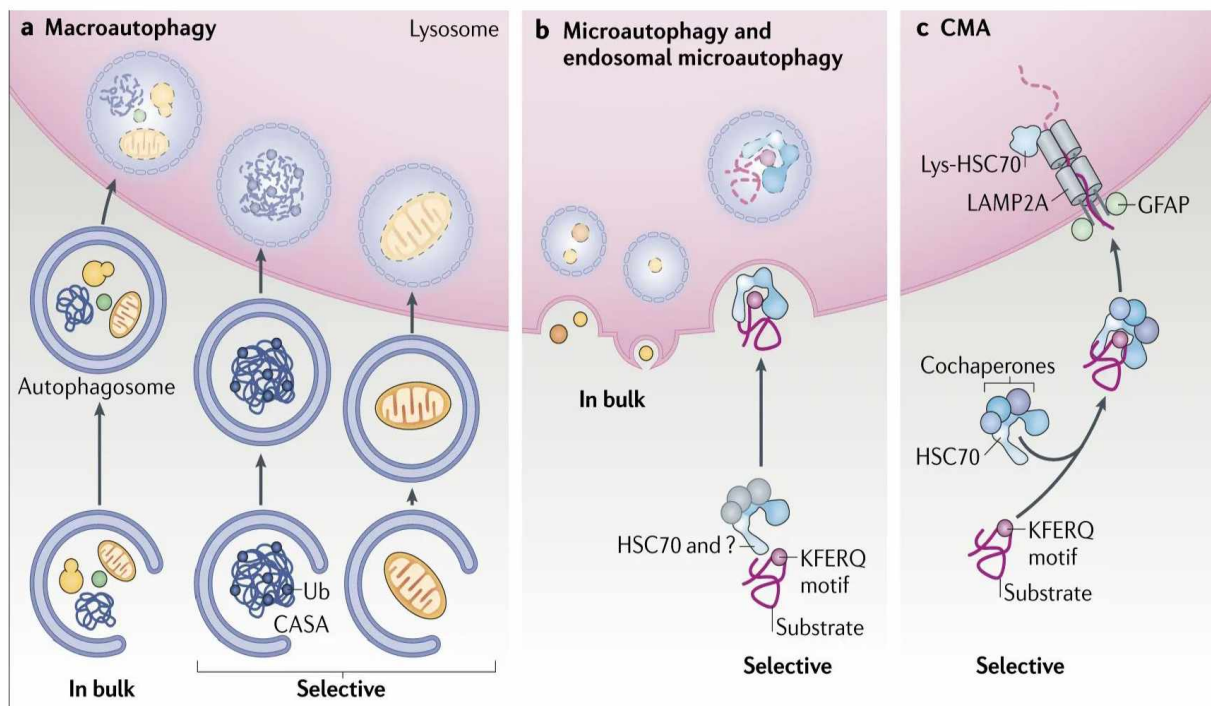
συνδέσεων που έγιναν μεταξύ της δυσλειτουργίας της αυτοφαγίας, της γήρανσης και του νευροεκφυλισμού. Στον εγκέφαλο έχει μελετηθεί ως επί το πλείστον σε νευρώνες, όπου η παράδοση τοξικών μορίων και οργανιδίων στα λυσοσώματα διαμέσου αυτοφαγικών διεργασιών είναι μεγίστης σημασίας για την υγεία και την επιβίωση των νευρώνων. Η αυτοφαγία ρυθμίζεται στο μεταμεταφραστικό επίπεδο. Η φωσφορυλίωση και η ουβικουιπινυλίωση είναι οι καλύτερα χαρακτηρισμένες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που συμμετέχουν ρυθμιστικά στην αυτοφαγία.

1.4.2 Τύποι αυτοφαγίας

Έχουν περιγραφεί τρεις τύποι αυτοφαγίας ανάλογα με την εκλεκτικότητα υποστρώματος και την οδό που χρησιμοποιείται για τη μεταφορά του “φορτίου” στα λυσοσώματα: α) η μακροαυτοφαγία, β) η μικροαυτοφαγία και γ) η αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από πρωτεΐνες-συνοδούς (CMA) (Εικ.4) (Xilouri and Stefanis, 2016; Nassif *et al.*, 2017). Πιο αναλυτικά,

α) Μακροαυτοφαγία

Η μακροαυτοφαγία είναι μια εξελικτικά συντηρημένη αυτοφαγική οδός. Είναι η πιο διαδεδομένη και μελετημένη οδός και η μοναδική διαμέσου της οποίας μπορούν να αποικοδομηθούν και οργανίδια. Η μελέτη της μακροαυτοφαγίας σε μοντέλα ζύμης βοήθησε ιδιαίτερα στην κατανόησή της. Περιληπτικά, κατά τη μακροαυτοφαγία δημιουργούνται διπλά μεμβρανικά κυστίδια, γνωστά ως αυτοφαγοσώματα, τα οποία εγκολπώνουν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και οργανίδια και στη συνέχεια τα οδηγούν στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Τα αυτοφαγοσώματα ταξιδεύουν κατά μήκος των μικροσωληνίσκων και έπειτα συντήκονται με λυσοσώματα, σχηματίζοντας τελικά τα αυτοφαγολυσοσώματα. Η μακροαυτοφαγία μπορεί να είναι πιο μαζική (in bulk) ή επιλεκτική ανάλογα με το φορτίο που έχει απομονωθεί (Kaushik and Cuervo, 2018). Εώς σήμερα, περισσότερα από 30 γονίδια σχετιζόμενα με την αυτοφαγία (ATG genes) είναι γνωστά στα μοντέλα ζύμης για τη συμμετοχή τους στα διαφορετικά στάδια της μακροαυτοφαγίας. Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, έχουν βρεθεί πολλά ορθόλογα γονίδια (Levine and Klionsky, 2004). Πρωτεϊνικά σύμπλοκα των Atg πρωτεϊνών συμμετέχουν στα στάδια σχηματισμού του αυτοφαγοσώματος. Έτσι, οι Atg και οι ορθόλογες μορφές σε ανώτερους οργανισμούς παίζουν ενορχηστρωτικό ρόλο τόσο στην έναρξη όσο και στην ομαλή διεκπεραίωση της μακροαυτοφαγίας. Πρόσφατα, προτάθηκε ένας ακόμη ρόλος για τις Atg πρωτεΐνες, αυτός της ρύθμισης πρωτεϊνικής έκκρισης ή, όπως ονομάστηκε, ATG εξαρτούμενη έκκριση (Cavalli



Εικ. 4. Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών αυτοφαγικών μονοπατιών, **a)** Μακροαυτοφαγία. Μέσω της μακροαυτοφαγίας το κυτταρικό φορτίο απομονώνεται από μια οριοθετημένη μεμβράνη που σχηματίζεται μέσω της σύζευξης συγκεκριμένων πρωτεϊνών μεταξύ τους και με λιπίδια σε μια σύνθετη διαδικασία πολλαπλών σταδίων. Η μεμβράνη αυτή, στη συνέχεια, σφραγίζεται δημιουργώντας ένα αυτοφαγόσωμα που διακινείται διαμέσου μικροσωληνίσκων. Η σύντηξη των αυτοφαγοσωμάτων με λυσοσώματα οδηγεί στη δημιουργία αυτοφαγολυσοσώματος και έπειτα στην αποικοδόμηση του παγιδευμένου φορτίου. Η μακροαυτοφαγία μπορεί να είναι μαζική (in bulk) ή επιλεκτική ανάλογα με το φορτίο που έχει απομονωθεί. **b)** Μικροαυτοφαγία. Κατά τη μικροαυτοφαγία το κυτταρικό φορτίο παγιδεύεται σε μικρά κυστίδια που σχηματίζονται με την διάσπαση της λυσοσωμικής μεμβράνης είτε μαζικά (in bulk) είτε επιλεκτικά μέσω αναγνώρισης και στόχευσης από την πρωτεΐνη HSC70 και άλλες πρωτεΐνες-συνοδούς που δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί. **c)** Η αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από πρωτεΐνες-συνοδούς (CMA) περιλαμβάνει την επιλεκτική αποικοδόμηση πρωτεϊνών που φέρουν μοτίβο KFERQ ή βιοχημικά παρόμοιο. Το πρωτεϊνικό φορτίο οδηγείται στα λυσοσώματα με τη βοήθεια της HSC70 και άλλων πρωτεϊνών-συνοδών και αποικοδομείται στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων έπειτα από σύνδεση στον ειδικό λυσοσωμικό υποδοχέα LAMP2A (Πηγή: Kaushik and Cuervo, 2018)

and Cenci, 2020). Καθώς η μακροαυτοφαγία λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα, οι επλεκόμενες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με πληθώρα εκκριτικών άλλων πρωτεϊνών, γεγονός που έχει ρυθμιστική επίδραση στην έκφρασή τους διαμέσω διαφορετικών μηχανισμών που δεν είναι πλήρως κατανοητοί (Cavalli and Cenci, 2020).

β) Μικροαυτοφαγία

Η μικροαυτοφαγία παγιδεύει το κυτοσολικό φορτίο σε μικρά κυστίδια που σχηματίζονται με την εγκόλπωση από τη λυσοσωμική μεμβράνη είτε μαζικά είτε επιλεκτικά μέσω αναγνώρισης του υποστρώματος από την πρωτεΐνη HSC70/HSPA8 και από άλλες πρωτεΐνες-συνοδούς που δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί (Kaushik and Cuervo, 2018).

γ) Αυτοφαγία Διαμεσολαβούμενη από Πρωτεΐνες-συνοδούς (CMA)

Η αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από πρωτεΐνες-συνοδούς (CMA) ήταν η πρώτη διαδικασία της οποίας η μελέτη έδειξε ότι η αποικοδόμηση των ενδοκυτταρικών συστατικών από τα λυσοσώματα μπορεί να είναι επιλεκτική - ένα σενάριο που είναι τώρα αποδεκτό και για άλλες μορφές αυτοφαγίας.

Η επιλεκτικότητα έχει συσχετιστεί με την CMA λόγω του μοναδικού μηχανισμού που βασίζεται στη μεταφορά του φορτίου στα λυσοσώματα. Οι πρωτεΐνες, ως το μόνο φορτίο που μπορεί να μεταβληθεί από αυτό το μονοπάτι, διασχίζουν τη λυσοσωμική μεμβράνη μια προς μια. Δεν είναι δυνατόν όλες οι κυτοσολικές πρωτεΐνες να υποστούν λυσοσωμική αποικοδόμηση. Μελετώντας την ριβονουκλεάση A, η οποία είναι μια από τις πρωτεΐνες που μπορούν να αποικοδομηθούν μέσω των λυσοσωμάτων, ο Αμερικανός βιοχημικός και κυτταρολόγος Fred Dice και η ομάδα του αναγνώρισαν μια περιοχή 11 αμινοξέων στην πρωτεΐνη, που αργότερα περιορίστηκε στο πενταπεπτίδιο KFERQ (ή κάποιο βιοχημικά παρόμοιο), η οποία είναι επαρκής προκειμένου να στοχευθούν οι πρωτεΐνες που την περιέχουν προς λυσοσωμική αποικοδόμηση μέσω CMA. Σήμερα γνωρίζουμε ότι περίπου το 40% των κυτοσολικών πρωτεϊνών του πρωτεώματος των θηλαστικών περιέχουν ένα μοτίβο τύπου KFERQ. Επιπροσθέτως, σε μερικές πρωτεΐνες-υποστρώματα, το ίδιο μοτίβο στόχευσης μπορεί να έχει δημιουργηθεί μέσω μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων, διευρύνοντας έτσι τον αριθμό των πιθανών υποστρωμάτων της CMA.

Η εκλεκτική διαδικασία της αυτοφαγίας διαμεσολαβούμενης από πρωτεΐνες-συνοδούς μπορεί να χωριστεί στα εξής διακριτά στάδια (Xilouri and Stefanis, 2015) (Εικ.5): (1) αναγνώριση υποστρώματος και στόχευσή του στα λυσοσώματα, (2) δέσμευση υποστρώματος στον ειδικό υποδοχέα της λυσοσωμικής μεμβράνης (LAMP2A) και

ξεδίπλωση του υποστρώματος, (3) μεταφορά του υποστρώματος στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων διαμέσου της λυσοσωμικής μεμβράνης και (4) αποικοδόμηση υποστρώματος.

Πιο αναλυτικά,

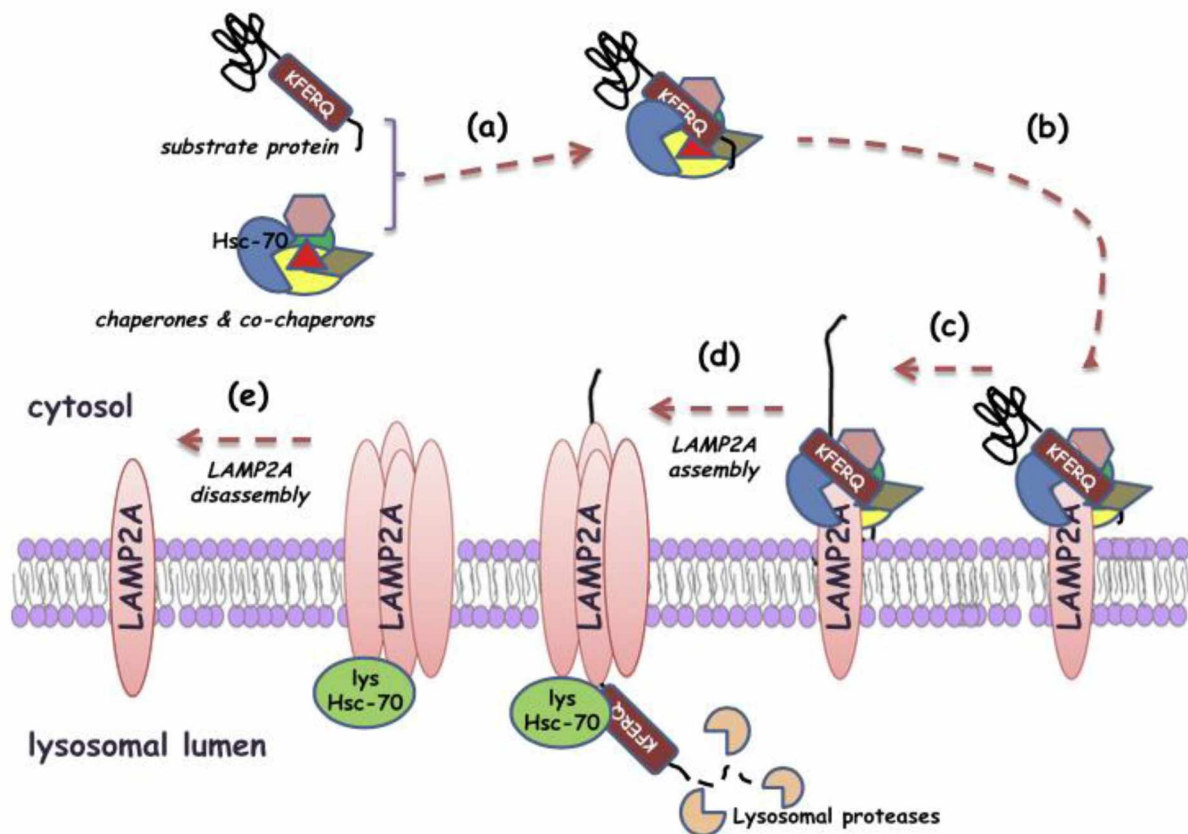
- 1) Κυτοσολικές πρωτεΐνες-υποστρώματα που φέρουν πενταπεπτιδίο βιοχημικά παρόμοιο με το μοτίβο KFERQ αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη HSC70/HSPA8, η οποία ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια πρωτεϊνών- συνοδών HSP70. Αυτή η διαδικασία αναγνώρισης υποβοηθάται από μια ομάδα άλλων πρωτεϊνών- συνοδών, όπως είναι οι HSP40, HSP90, Hip, Hop και Bag-1.
- 2) Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει τη μετατόπιση του συμπλόκου των πρωτεϊνών- συνοδών και του υποστρώματος στην επιφάνεια της λυσοσωμικής μεμβράνης όπου λαμβάνει χώρα η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με την κυτοσολική “ουρά” της μεμβρανικής πρωτεΐνης-ειδικού λυσοσωμικού υποδοχέα, LAMP2A. Η LAMP2A πρωτεΐνη είναι μία από τις τρεις ισομορφές του γονιδίου *LAMP2*, που κωδικοποιείται μέσω εναλλακτικού ματίσματος και αποτελεί τη μοναδική ισομορφή που εμπλέκεται στη CMA. Όλες οι ισομορφές της *LAMP2* είναι λυσοσωμικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και αυτό που διαφοροποιεί τη LAMP2A από τις LAMP2B και LAMP2C είναι περιοχές διαμέσου της διαμεμβρανικής δομής και της κυτταροπλασματικής ουράς τους. Κατά το παρόν βήμα είναι κρίσιμη τόσο η διαμόρφωση της πρωτεΐνης-υποδοχέα όσο και τα επίπεδά της. Η LAMP2A υπάρχει με τη μορφή μονομερούς στη λυσοσωμική μεμβράνη και σε συνδυασμό με άλλες πρωτεΐνες σχηματίζει ένα πολυμερές σύμπλοκο που απαιτείται για τη μετέπειτα μετατόπιση του υποστρώματος στα λυσοσώματα. Η “συναρμολόγηση” της LAMP2A σε αυτό το σύμπλεγμα που σχηματίζεται στη λυσοσωμική μεμβράνη είναι δυναμική και εξαρτάται άμεσα από τη δέσμευση του υποστρώματος σε αυτήν την πρωτεΐνη-υποδοχέα.
- 3) Κατά τη διάρκεια της μετάβασης από μονομερές σε πολυμερές, η σταθερότητα του LAMP2A υποδοχέα διατηρείται μέσω της αλληλεπίδρασής του με μια λυσοσωμική μορφή της HSC70 πρωτεΐνης-συνοδού που καλείται Iys-HSC70. Η μονομερής διαμόρφωση του LAMP2A απαιτείται για τη δέσμευση του υποστρώματος, η οποία στη συνέχεια οδηγεί στον πολυμερισμό του LAMP2A σε ένα σύμπλεγμα, πράγμα που καθιστά δυνατή τη μετατόπιση της πρωτεΐνης-υποστρώματος στη λυσοσωμική κοιλότητα. Το υπόστρωμα μπορεί να δεσμευθεί στον υποδοχέα LAMP2A ακόμη και στην αναδιπλωμένη διαμόρφωσή του, αλλά για να καταστεί δυνατή η μετακίνησή του στο εσωτερικό της λυσοσωμικής κοιλότητας έχει βρεθεί ότι απαιτείται το ξετύλιγμά του, μια διαδικασία που πιθανώς διευκολύνεται από τη Iys-HSC70 και άλλες πρωτεΐνες-συνοδούς. Αν και ο ακριβής τρόπος με τον οποίο λαμβάνει χώρα αυτή η μετατόπιση δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, έχει προταθεί ότι το σύμπλοκο που δημιουργείται λειτουργεί ενεργητικά, πιθανώς τραβώντας τις πρωτεΐνες του υποστρώματος ή, εναλλακτικά, μπορεί να

συγκρατεί παθητικά το υπόστρωμα αποτρέποντας την επιστροφή του στο κυτοσόλιο. Ο τρόπος με τον οποίο η lys-HSC70 φτάνει στη λυσοσωμική κοιλότητα δεν είναι ακόμη σαφής, αλλά επικρατέστερη παραμένει η ιδέα της εσωτερίκευσής της με τη μορφή πολυκυκλικών σωμάτων από την επιφάνεια των ενδοσωμάτων και την επακόλουθη σύντηξη λυσοσώματος-ενδοσωμάτων. Η σταθερότητα της lys-HSC70 στα λυσοσώματα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH τους και είναι γνωστό ότι η αλκαλοποίηση των λυσοσωμάτων οδηγεί στην αποικοδόμησή της.

- 4) Μετά τη μετατόπιση του υποστρώματος, η lys-HSC70 καθιστά δυνατή την αποσυναρμολόγηση του συμπλόκου LAMP2A το οποίο, αφού “απελευθερωθεί”, είναι διαθέσιμο για τη σύνδεση άλλων υποστρωμάτων. Ένα άλλο ενδεχόμενο είναι το LAMP2A σύμπλοκο να μετατοπιστεί εντός της λυσοσωμικής κοιλότητας, όπου δε θα συμμετάσχει στη CMA και μπορεί να αποικοδομηθεί από την πρωτεΐνη καθεψίνη A. Αλλαγές στη ρευστότητα της λυσοσωμικής μεμβράνης ή στη σύνθεσή της από πρωτεΐνες και λιπίδια αποτελούν παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τη συναρμολόγηση και αποσυναρμολόγηση του εν λόγω συμπλόκου.

Στην πραγματικότητα, παρότι όλα τα κύτταρα περιέχουν τον μεμβρανικό υποδοχέα LAMP2A, η lys-HSC70 περιέχεται στις λυσοσωμικές κοιλότητες μιας μειοψηφίας αυτών. Ο ρυθμός και η ενεργότητα της αυτοφαγίας διαμεσολαβούμενης από πρωτεΐνες-συνοδούς εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα επίπεδα του LAMP2A υποδοχέα, το ρυθμό συναρμολόγησης/αποσυναρμολόγησης του δημιουργούμενου συμπλόκου και από την lys-HSC70 που βρίσκεται στη λυσοσωμική κοιλότητα.

Ο ρόλος της CMA στην αποικοδόμηση ανεπιθύμητων ή δυσλειτουργικών πρωτεϊνών στο ΚΝΣ είχε τεθεί υπό αμφισβήτηση, καθώς τα μεταγραφικά επίπεδα της ισομορφής LAMP2A στον εγκέφαλο είχαν βρεθεί στο παρελθόν πολύ χαμηλά (Furuta *et al.*, 1999) και οι πρωτεΐνες που έφεραν το μοτίβο KFERQ δεν φαίνονταν να αλλάζουν έπειτα από αστία των κυττάρων (Dice *et al.*, 1990), παράγοντας που είναι γνωστό ότι επάγει την CMA. Παρόλα αυτά, μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης LAMP2A είναι αρκετά υψηλά στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες των τρωκτικών (Xilouri *et al.*, 2013) και επίσης βρέθηκε ότι τα επίπεδα αυτά ρυθμίζονται κατά την ανάπτυξη, τόσο στις πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων όσο και στον εγκέφαλο επίμυων (Vogiatzi *et al.*, 2008). Σχετικά με τις νόσους του εγκεφάλου, έχει προταθεί ότι η CMA δεν είναι μόνο υπεύθυνη για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών που είναι επιρρεπείς στη συσσώρευση αλλά, ταυτόχρονα, μπορεί να αποτελεί και άμεσο στόχο των τοξικών επιπτώσεων αυτής της παθολογικής συσσώρευσης, γεγονός που οδηγεί σε νευροεκφύλιση (Xilouri and Stefanis, 2015).



Εικ. 5. Εικονογραφημένη αναπαράσταση των διακριτών σταδίων της αυτοφαγίας διαμεσολαβούμενης από πρωτεΐνες-συνοδούς (CMA). a) Αναγνώριση και δέσμευση της αναδιπλωμένης μορφής της πρωτεΐνης-υποστρώματος που φέρει το μοτίβο KFERQ από την πρωτεΐνη-συνοδό Hsc70 και άλλες βοηθητικές πρωτεΐνες-συνοδούς στο κυττόςόλιο, **b)** Μετατόπιση του υποστρώματος στη λυσοσωμική μεμβράνη και σύνδεση με την κυττοσολική ουρά του μονομερούς ειδικού λυσοσωμικού υποδοχέα LAMP2A, **c)** ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης-υποστρώματος και επαγωγή του πολυμερισμού του LAMP2A με τη βοήθεια της lys-Hsc70, **d)** συναρμολόγηση του συμπλόκου LAMP2A, μεταφορά του υποστρώματος στη λυσοσωμική κοιλότητα και πέψη του υποστρώματος με λυσοσωμικές πρωτεάσες, **e)** Απελευθέρωση και αποσυναρμολόγηση του συμπλόκου προς τη μονομερή μορφή του (Πηγή: Xilouri and Stefanis, 2015).

1.4.3 Αποικοδόμηση της α-συνουκλεΐνης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, γνωρίζουμε ότι ένα από τα κύρια μονοπάτια αποικοδόμησης της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης, η συσσώρευση τοξικών μορφών της οποίας είναι άμεσα συνδεδεμένη με την παθογένεση νευροεκφυλιστικών νόσων όπως η Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων, είναι η CMA.

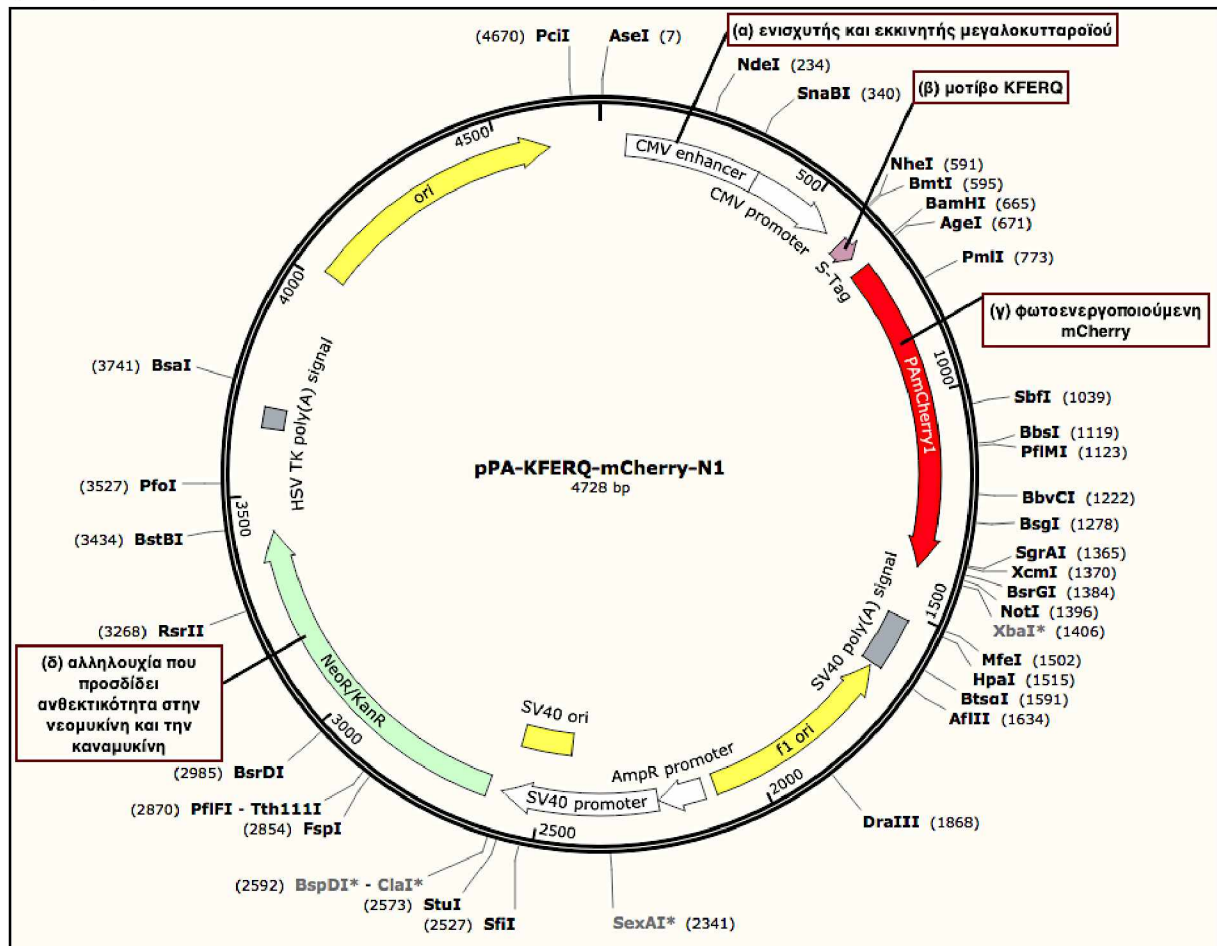
Στο παρελθόν, έχουν προταθεί διαφορετικές θεωρίες σχετικά με τον τρόπο αποικοδόμησης της α-συνουκλεΐνης. Αρχικά, το σύστημα ουβικουΐνης-πρωτεασώματος (UPS) είχε προταθεί ως το υπεύθυνο μονοπάτι αποικοδόμησης, έπειτα από έρευνες σε νευρωνικά κύτταρα όπου φάνηκε συσσώρευση πολυουβικουΐτυλιωμένων μορφών της α-συνουκλεΐνης μετά από αναστολή του πρωτεασώματος (Bennett *et al.*, 1999; Imai *et al.*, 2000). Στη συνέχεια, δείχθηκε πως η φωσφορυλιωμένη α-συνουκλεΐνη στο αμινοξύ σερίνη 129, μπορεί μεν να αποικοδομηθεί μέσω του πρωτεασώματος, αλλά με τρόπο μη εξαρτώμενο από την ουβικουΐνη (Machiya *et al.*, 2010), κάτι που συμπλήρωσε αποτελέσματα άλλων ερευνών που έδειξαν ότι η ουβικουΐτυλίωση δεν είναι απαραίτητη για τη στόχευση της α-συνουκλεΐνης στο πρωτεάσωμα (Tofaris *et al.* 2001 ; Nakajima *et al.*,2005). Ωστόσο, σε άλλες έρευνες δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση της ενδογενούς ή υπερεκφραζόμενης α-συνουκλεΐνης με αναστολή του πρωτεασώματος (Rideout *et al.*, 2002 ; Emmanouilidou *et al.*, 2010). Μια πιθανή εξήγηση ως προς αυτό είναι ότι στις αντίστοιχες έρευνες χρησιμοποιήθηκαν είδη της α-συνουκλεΐνης που μπορούν να αποικοδομηθούν μέσω λυσοσωμικών οδών αλλά όχι μέσω του UPS. Βασισμένοι σε αυτό, έρευνες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι μικρές, διαλυτές ολιγομερείς μορφές της α-συνουκλεΐνης μπορούν να αποικοδομηθούν μέσω του UPS (Emmanouilidou *et al.*, 2010). Σε άλλη έρευνα, προτάθηκε ότι ο τρόπος αποικοδόμησης της α-συνουκλεΐνης καθορίζεται άμεσα από τον τύπο και το μέγεθος του πρωτεϊνικού φορτίου εντός του κυττάρου (Ebrahimi-Fakhari *et al.*, 2011). Έτσι, πρότειναν πως το σύστημα UPS «αναλαμβάνει» σε περιπτώσεις αποικοδόμησης ενδογενούς α-συνουκλεΐνης, ενώ η λυσοσωμική αποικοδόμηση αφορά την παθολογική συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης. Σε παρελθοντικές έρευνες του εργαστηρίου μας, όπως αναφέρεται παραπάνω, έχει προταθεί πως η αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από πρωτεΐνες-συνοδούς και η μακροαυτοφαγία αποτελούν τα βασικά μονοπάτια αποικοδόμησης της α-συνουκλεΐνης, και συνεπώς η αναστολή τους μπορεί να συμβάλλει στην παθογένεση (Vogiatzi *et al.*, 2008). Τελευταία, έρευνα ανέδειξε την canthin-6-one, ένα αλκαλοειδές παράγωγο της ινδόλης ως φυσικό συστατικό που μειώνει τη συσσώρευση της αγρίου τύπου αλλά και μεταλλαγμένης α-συνουκλεΐνης, αυξάνοντας την αποικοδόμησή της μέσω του UPS (Yuan *et al.*, 2019). Η πληθώρα ερευνών που επικεντρώνεται σε αυτό το θέμα, έχει πραγματοποιηθεί ως επί το πλείστον σε νευρικά κύτταρα. Επομένως, η μελέτη του ρόλου της αυτοφαγίας διαμεσολαβούμενης από πρωτεΐνες-συνοδούς, αλλά και άλλων οδών αποικοδόμησης, σε κυτταρικές σειρές ολιγοδενδροκυττάρων κρίνεται απαραίτητη, καθώς δεν υπάρχουν πολλά στοιχεία έως σήμερα.

2. ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1 Σχεδιασμός πλασμιδιακού φορέα pPAMCherry (plasmid Photoactivatable monomeric Cherry) -KFERQ

Προκειμένου να καταστεί δυνατή η παρακολούθηση της αυτοφαγίας διαμεσολαβούμενης από πρωτεΐνες-συνοδούς, σχεδιάστηκε ένας πλασμιδιακός φορέας που φέρει μεταξύ άλλων: 1) αλληλουχία ενισχυτή και αλληλουχία υποκινητή μεγαλοκυτταροϊού (CMV enhancer και CMV promoter), 2) αλληλουχία που κωδικοποιεί το μοτίβο KFERQ συζευγμένη με την αλληλουχία που κωδικοποιεί το φωτοενεργοποιούμενο μονομερές της φθορίζουσας πρωτεΐνης Cherry (PAMCherry) και 3) αλληλουχία που κωδικοποιεί την αμινογλυκοσιδική φωσφοτρανσφεράση και προσδίδει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά καναμυκίνη και νεομυκίνη (Εικ. 6).



Εικ.6 Απεικόνιση της δομής του τελικού πλασμιδιακού φορέα pPAMCherry-KFERQ που κατασκευάστηκε.

Ο τελικός πλασμιδιακός φορέας pPAmCherry-KFERQ, που στην πορεία χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα που σχεδιάστηκαν, κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ως βάση τον εμπορικά διαθέσιμο φορέα pPAmCherry1-N1 (#31928, addgene), που φέρει πολλαπλή θέση κλωνοποίησης (Multiple Cloning Site -MCS) (Εικ. 6) και ένα εισάγον τμήμα που κωδικοποιεί το μοτίβο KFERQ το οποίο κατασκευάστηκε σύμφωνα με προηγούμενα βιβλιογραφικά δεδομένα (Koga *et al.*, 2011).

Η φωτοενεργοποιούμενη πρωτεΐνη mCherry είναι μέλος της οικογένειας των mFruits, των μονομερών κόκκινων φθορίζουσων πρωτεϊνών mRFP. Ο πλασμιδιακός φορέας pPAmCherry1-N1, φέρει νουκλεοτιδική ακολουθία που κωδικοποιεί την PAmCherry, μια φωτοενεργοποιούμενη μεταλλαγή της φθορίζουσας πρωτεΐνης mCherry. Η PAmCherry είναι μη φθορίζουσα μέχρι να ενεργοποιηθεί με πρόσπτωση υπεριώδους φωτός, μήκους κύματος εύρους 350 nm - 400 nm. Τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής αντίστοιχα, είναι 564 nm και 595 nm. Τα γονίδια που εισάγονται στην πολλαπλή θέση κλωνοποίησης εκφράζονται ως συντήξεις στο αμινοτελικό άκρο της PAmCherry αν βρίσκονται στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης και δεν παρεμβάλλονται κωδικόνια λήξης μεταξύ των δύο αλληλουχιών. Λεπτομερώς, τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την κατασκευή του τελικού πλασμιδιακού φορέα pPAmCherry-KFERQ περιγράφονται παρακάτω:

2.1.2 Ανακαλλιέργεια βακτηρίων

Για την κατασκευή του τελικού πλασμιδιακού φορέα pPAmCherry-KFERQ, χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμη καλλιέργεια βακτηρίων που φέρουν το φορέα-μήτρα pPAmCherry1-N1. Έγινε ενοφθαλμισμός στερεών θρεπτικών υλικών εμπλουτισμένων με το αντιβιοτικό καναμυκίνη, με κρικοφόρο στυλεό σε τρυβλία petri, τα οποία επωάσθηκαν στους 37°C για 16 ώρες.

2.1.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (mini prep)

Στη συνέχεια, αποικίες που αναπτύχθηκαν απομονώθηκαν από τη στερεή καλλιέργεια με πλαστικά ρύγχη πιπετών (tips) και επανακαλλιεργήθηκαν σε 5 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB με καναμυκίνη και 1,8 ml εξ'αυτών χρησιμοποιήθηκαν σε κλασσικά σωληνάρια erpendorf των 2 ml για απομόνωση των πλασμιδίων pPAmCherry1-N1 ακολουθώντας πρωτόκολλο που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο:

- (i) Τα καλλιεργημένα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν στις 13.000 στροφές για 10', σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 250 µl διαλύματος επαναιώρησης (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0).

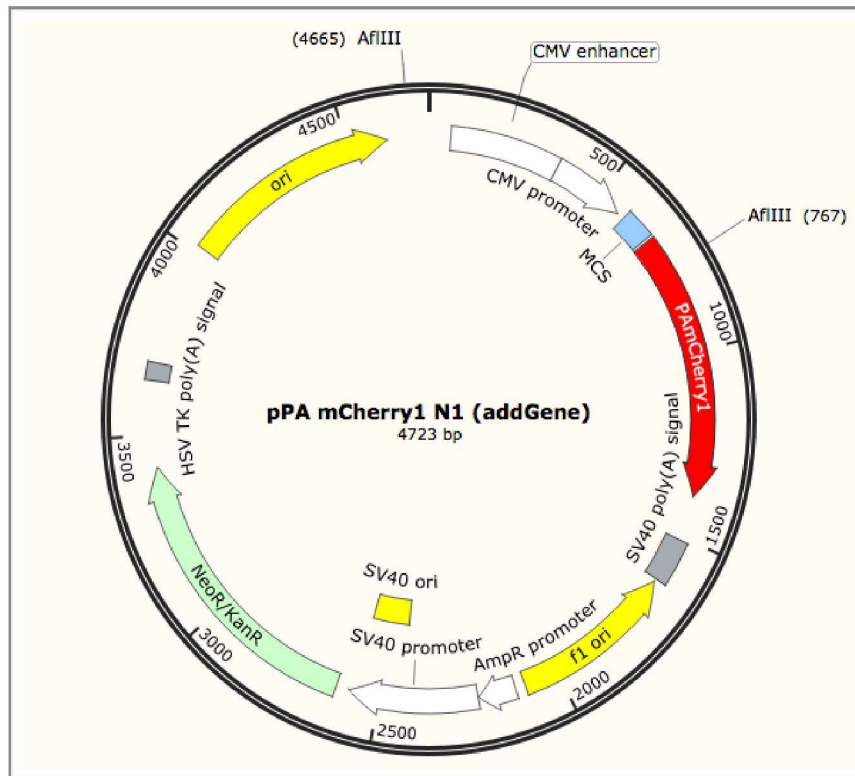
- (ii) Στο επαναιωρημένο ίζημα προστέθηκαν 250 μl διαλύματος λύσης (0.1 M NaOH, 1% SDS) των βακτηρίων και έγινε ήπια ανακίνηση του σωληναρίου προκειμένου να αναδευτούν τα δύο διαλύματα.
- (iii) Εν συνεχεία, προστέθηκαν 350 μl διαλύματος εξουδετέρωσης (1.5 M οξικό κάλιο, pH 5.5) και ακολούθησε φυγοκέντρηση (13.000 rpm/ 10' θερμοκρασία δωματίου) προκειμένου να διαχωριστεί το DNA από τα κυτταρικά θραύσματα.
- (iv) Το υπερκείμενο, στο οποίο περιέχεται το DNA, μεταφέρθηκε σε δεύτερο σωληνάριο των 2 ml και σε αυτό προστέθηκαν 700 μl απόλυτης ισοπροπανόλης (100%) για την κατακρήμνιση του DNA.
- (v) Τα δύο διαλύματα αναδύτηκαν με έντονη ανακίνηση (vortex) του σωληναρίου και ακολούθησε φυγοκέντρηση (13.000 rpm/ 5' θερμοκρασία δωματίου).
- (vi) Τέλος, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα DNA στο σωληνάριο στέγνωσε σε απαγωγό προκειμένου να εξατμιστούν οποιαδήποτε υπολείμματα ισοπροπανόλης. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 50 μl διπλά απεσταγμένου H₂O και μετρήθηκε η συγκέντρωση των πλασμιδίων με χρήση φασματοφωτόμετρου.

2.1.4 Πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

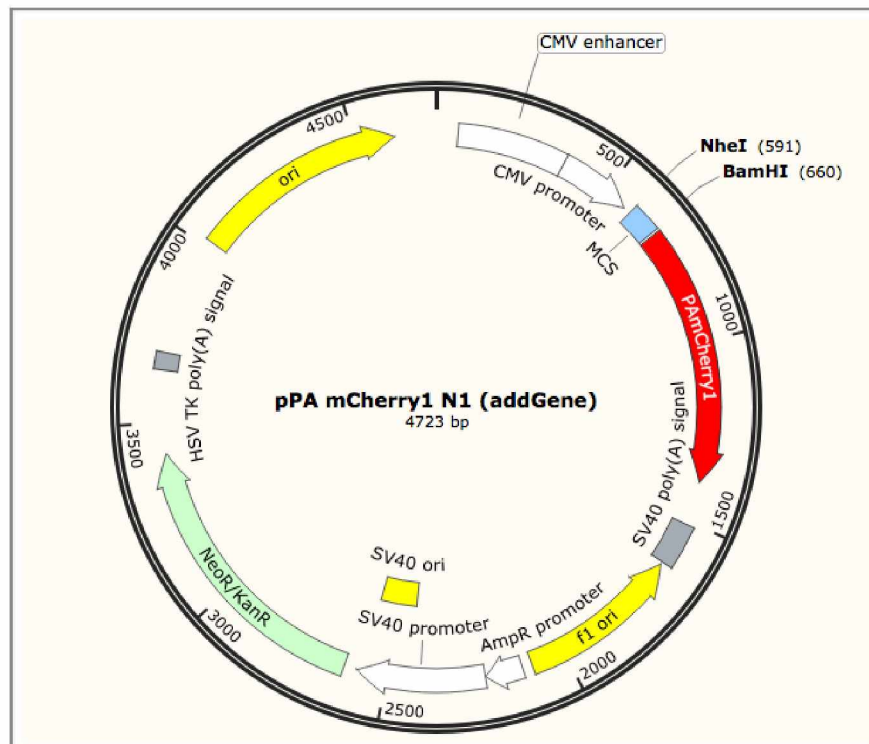
Κατά την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα pPAmCherry KFERQ, έγιναν οι εξής διαγνωστικές πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες:

- Διαγνωστική πέψη 1 μg πλασμιδίων pPAmCherry1-N1, με το ένζυμο περιορισμού AfIII (R0541S, New England BioLabs) σε υδατόλουτρο, στους 37°C, για 1 ώρα (Εικ. 7)
- Πέψη των πλασμιδιακών φορέων pPAmCherry1-N1 με τα ένζυμα περιορισμού NheI (R0131S, New England BioLabs) και BamHI (R0136S, New England BioLabs), προκειμένου να απομακρυνθεί η πολλαπλή θέση κλωνοποίησης, σε υδατόλουτρο, στους 37°C, για 3 ώρες (Εικ. 8)
- Διαγνωστική πέψη του τελικού πλασμιδιακού φορέα pPAmCherry KFERQ με τα ένζυμα HindIII (R0104S, New England BioLabs) και BglIII (R0144S, New England BioLabs)

Μετά το πέρας των επωάσεων, οι αντιδράσεις ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% w/v, για 20-40 λεπτά ανάλογα με το μέγεθος των εκάστοτε θραυσμάτων, σε τάση 100V, προκειμένου να διαχωριστούν.



Εικ. 7 Απεικόνιση των θέσεων αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου AflIII στον πλασμιδιακό φορέα pPA mCherry1 N1.



Εικ. 8 Απεικόνιση των θέσεων αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων BamHI και NheI στον πλασμιδιακό φορέα pPA mCherry1-N1.

2.1.5 Υβριδοποίηση των ολιγονουκλεοτιδικών τμημάτων που κωδικοποιούν το μοτίβο KFERQ

Το μοτίβο KFERQ προέκυψε από την υβριδοποίηση των εξής ολιγονουκλεοτιδικών τμημάτων:

ctagcgcaccatgaaggaaactgcagcagccaagtttgagcggcagcacatggactccagcacttccgctgcg-3'

(τμήμα α) και 5'

gatccgcagcggaaagtgctggagtcctatgtgctgccgctcaaactggctgctgcagtttcctcatggtggcg-3' (τμήμα β),

τα οποία προμηθευτήκαμε μετά από παραγγελία σε εξωτερικό φορέα. Η αντίδραση υβριδοποίησης έγινε σε συνολικό όγκο 100 μl προσθέτοντας τα ακόλουθα: 1) 10 μg του τμήματος α, 2) 10 μg του τμήματος β, 3) 150 mM NaCl, 4) διπλά απεσταγμένο H₂O έως τα 100 μl. Στη συνέχεια, έγινε ολονύκτια επώαση στο υδατόλουτρο ξεκινώντας από τους 95°C και με σταδιακή πτώση θερμοκρασίας έως τη θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, το εισάγον τμήμα που προέκυψε μετά την αντίδραση υβριδοποίησης καθαρίστηκε ακολουθώντας το πρωτόκολλο που ακολουθεί:

Αρχικά προστέθηκαν 3 μl 5M NaCl στην αντίδραση υβριδοποίησης των 100 μl. Στη συνέχεια, ακολούθησε ήπια ανάδευση και προσθήκη 250 μl παγωμένης αιθανόλης 95% v/v. Το διάλυμα επώασθη στους -80°C, για 30 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε στις 13.000 στροφές, στους 4°C, για 30 λεπτά. Μετά από απόρριψη του υπερκείμενου και πλύση του ίζηματος με αιθανόλη 70% v/v ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές, στους 4°C, για 25 λεπτά. Έπειτα, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 40 μl διπλά απεσταγμένου H₂O. Τέλος, έγινε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του εισάγοντος τμήματος KFERQ με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm με τη χρήση φασματοφωτόμετρου.

2.1.6 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (Gel extraction)

Η αντίδραση πέψης του πλασμιδιακού φορέα pPAmCherry1-N1 με τα ένζυμα περιορισμού NheI και BamHI που πέπτουν εκατέρωθεν του νουκλεοτιδικού τμήματος που κωδικοποιεί την πολλαπλή θέση κλωνοποίησης, ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης προκειμένου να διαχωριστούν τα δύο τμήματα. Από το πήκτωμα αγαρόζης, απομονώθηκε με χειρουργικό νυστέρι η μπάντα που αντιστοιχεί στο τμήμα του πλασμιδιακού φορέα χωρίς την πολλαπλή θέση κλωνοποίησης. Το “παγιδευμένο” στη μπάντα πλασμιδιακό DNA, απομονώθηκε με εμπορικά διαθέσιμο kit (QIAquick Gel Extraction Kit, Cat.No 28115, Qiagen) και επαναιωρήθηκε σε 50 μl διαλύματος επαναιώρησης TB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) που εμπεριέχεται στο kit. Ακολούθησε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου τμήματος. Η απομάκρυνση του ολιγονουκλεοτιδικού τμήματος που κωδικοποιεί την πολλαπλή θέση κλωνοποίησης έγινε προκειμένου να γίνει στη συνέχεια η σύνδεση (ligation)

του εισάγοντος τμήματος που κωδικοποιεί το μοτίβο KFERQ με το γραμμικό πλασμιδιακό μέρος του φορέα pPAmCherry1-N1 που απομονώθηκε από το πηκτωμα αγαρόζης.

2.1.7 Αποφωσφορυλίωση τμήματος πλασμιδιακού DNA

Η αποφωσφορυλίωση είναι ένα κοινό βήμα κατά την κλωνοποίηση, σημαντικό ώστε να διασφαλιστεί ότι ο πλασμιδιακός φορέας δε θα επανακυκλοποιηθεί κατά τη διαδικασία σύνδεσης (ligation) του φορέα με το τμήμα KFERQ. Εάν ένας κυκλικός πλασμιδιακός φορέας έχει καταστεί γραμμικός με χρήση ενός απλού ενζύμου περιορισμού ή έχει κοπεί με δύο ένζυμα με συμβατά άκρα, η χρήση μιας φωσφατάσης για την απομάκρυνση της 5'-φωσφορικής ομάδας στα άκρα μειώνει την πιθανότητα επανακυκλοποίησης των φορέων λόγω ενδομοριακών αντιδράσεων. Η αποφωσφορυλίωση έγινε χρησιμοποιώντας: 1) 1 μg του πλασμιδιακού φορέα-μήτρα pPAmCherry1-N1, που απομονώθηκε από το πηκτωμα αγαρόζης κατά το προηγούμενο βήμα, 2) το ένζυμο SAP (M0371S, New England BioLabs), το οποίο είναι μια αλκαλική φωσφατάση, 3) το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), 4) διπλά απεσταγμένο H₂O έως τα 30 μl. Η αντίδραση επωάστηκε στους 30°C στο υδατόλουτρο, για 30 λεπτά και στη συνέχεια η αντίδραση απενεργοποιήθηκε με επώαση στους 65°C σε θερμαινόμενη πλάκα για 15 λεπτά.

2.1.8 Σύνδεση του αποφωσφορυλιωμένου, γραμμικού pPAmCherry1-N1 με το εισάγον τμήμα που κωδικοποιεί το μοτίβο στόχευσης KFERQ (ligation)

Στα προηγούμενα βήματα περιγράφηκε αναλυτικά η κατασκευή και απομόνωση των δύο τμημάτων. Σε αυτό το βήμα περιγράφεται η ενζυμική σύνδεση των δύο αυτών τμημάτων προς έναν τελικό πλασμιδιακό φορέα που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια, ο οποίος στην παρούσα εργασία θα αναφέρεται ως pPAmCherry KFERQ. Σε αυτό το στάδιο, σχεδιάστηκαν δύο αντιδράσεις (A & B), μία (A) που περιείχε τόσο το τμήμα του γραμμικού φορέα pPAmCherry1-N1 όσο και το εισάγον τμήμα KFERQ σε αναλογία 5 (εισάγον τμήμα): 1 (γραμμικός πλασμιδιακός φορέας) και μία δεύτερη (B) η οποία περιείχε μόνο τον γραμμικό πλασμιδιακό φορέα και λειτούργησε ως αντίδραση - μάρτυρας.

Σε κάθε μία από τις δύο αντιδράσεις A & B, τελικού όγκου 20 μl, χρησιμοποιήθηκαν 1) 100 ng του αποφωσφορυλιωμένου, γραμμικού φορέα pPAmCherry1-N1, 2) 1 μl του ενζύμου T4 λιγάση (M0202S, New England BioLabs), 3) 1X ρυθμιστικού διαλύματος κατάλληλου για το ένζυμο T4 λιγάση, 4) διπλά απεσταγμένο H₂O έως τα 20 μl και μόνο στην αντίδραση A, 5) 8 ng από το εισάγον τμήμα KFERQ. Στη συνέχεια, οι δύο αντιδράσεις επωάστηκαν στους 16°C, σε θερμοκυκλοποιητή που χρησιμοποιείται για την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για τουλάχιστον 1 ώρα.

2.1.9 Μετασχηματισμός χημειοεπιδεκτικών βακτηρίων

Χημειοεπιδεκτικά βακτήρια Dh5a, στελέχη του *Escherichia coli*, όπου είχαν κατασκευαστεί στο εργαστήριό μας στο παρελθόν, μετασχηματίστηκαν με τις δύο αντιδράσεις του προηγούμενου βήματος, δηλαδή με τον πλασμιδιακό φορέα pPAmCherry KFERQ και με την αντίδραση-μάρτυρα. Ο μετασχηματισμός τους έγινε ως εξής: 50 μl χημειοεπιδεκτικών βακτηρίων για κάθε αντίδραση τοποθετήθηκαν σε πάγο για 5-10 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκε σε κάθε σωληνάριο 1 μl πλασμιδιακού DNA των αντιδράσεων A & B στα βακτήρια και επώασθησαν στον πάγο για 30 λεπτά. Έπειτα, οι δύο αντιδράσεις επώασθησαν σε υδατόλουτρο στους 42°C για 90" και απευθείας τοποθετήθηκαν σε πάγο για 2-3 λεπτά. Κατόπιν, προστέθηκαν 500 μl υγρού θρεπτικού υλικού LB στην κάθε αντίδραση και τα σωληνάρια επώασθησαν για 45 λεπτά στους 37°C σε επωαστικό κλίβανο με ανακίνηση. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό στερεών θρεπτικών υλικών εμπλουτισμένων με το αντιβιοτικό καναμυκίνη σε τρυβλία petri, καθιστώντας δυνατή την ανάπτυξη μόνο των αποικιών που έφεραν το πλασμίδιο και είχαν αποκτήσει ανθεκτικότητα στο εν λόγω αντιβιοτικό. Η επώαση των τρυβλίων έγινε ολονύκτια στους 37°C. Ακολούθησε η απομόνωση του τελικού πλασμιδιακού φορέα pPAmCherry KFERQ και διαγνωστικές πέψεις. Αποικίες βακτηρίων που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία απομονώθηκαν με πλαστικά ρύγγη πιπέτας και επανακαλλιεργήθηκαν σε 5 ml υγρού θρεπτικού υλικού LB με καναμυκίνη. Ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA όπως φαίνεται στη σελίδα 16 (mini prep). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα HindIII και BglII των οποίων οι θέσεις αναγνώρισης καταργούνται εάν η αντίδραση σύνδεσης των δύο τμημάτων έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία, ενώ στις αντιδράσεις μάρτυρες οι θέσεις αναγνώρισης των δύο ενζύμων υπάρχουν ακόμα. Οι πέψεις έγιναν τόσο σε πλασμιδιακό DNA αποικιών από τις καλλιέργειες με το φορέα pPAmCherry KFERQ όσο και σε DNA από τις καλλιέργειες με την αντίδραση-μάρτυρα (δείγματα μάρτυρες). Τα προϊόντα των πέψεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αгарόζης 1%.

2.1.10 Αλληλούχιση (Sequencing)

Η αλληλούχιση του DNA παρέχει τον πληρέστερο χαρακτηρισμό των ανασυνδυασμένων DNA πλασμιδίων. Χρησιμοποιώντας εκκινητές που στοχεύουν τον σκελετό του πλασμιδίου και / ή την αλληλουχία εισαγωγής, μπορεί να προσδιοριστεί η ταυτότητα και η σειρά των νουκλεοτιδικών βάσεων για οποιοδήποτε DNA. Στο πλαίσιο της κλωνοποίησης, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας επιτρέπει την επιβεβαίωση της αλληλουχίας του εισάγοντος τμήματος, τον προσανατολισμό του προστιθέμενου τμήματος, καθώς και των συνδέσεων μεταξύ του πλασμιδίου και του ένθετου DNA. Προκειμένου να βεβαιωθούμε για την ορθότητα της αλληλουχίας του φορέα pPAmCherry KFERQ μετά τη σύνδεση του πλασμιδίου pPAmCherry1-N1 και της αλληλουχίας που κωδικοποιεί το μοτίβο KFERQ, τα πλασμίδια που

απομονώθηκαν απεστάλησαν σε εξωτερικό φορέα για αλληλούχιση και τα αποτελέσματα αυτής αξιολογήθηκαν στη συνέχεια στο εργαστήριο. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι η φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry θα εκφραστεί μαζί με το μοτίβο KFERQ και ότι δεν υπάρχουν παρεμβάλλοντα τμήματα μεταξύ των δύο τμημάτων.

2.1.11 Βακτηριακή καλλιέργεια Midi/Maxi prep

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση μεγάλης ποσότητας υψηλής καθαρότητας πλασμιδιακού DNA (της τάξεως των mg), που απαιτείται για κλωνοποίηση τμημάτων DNA και μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων. Η πορεία αυτής της διαδικασίας είναι η εξής: αρχικά, 5 ml θρεπτικού υλικού LB με αντιβιοτικό εμβολιάζονται με μία αποικία μετασχηματισμένων με πλασμίδιο και επωάζονται υπό ανάδευση στους 37°C για 16 ώρες. Με το πέρας αυτού του χρόνου, από την παραπάνω καλλιέργεια, χρησιμοποιείται ποσότητα για τον εμβολιασμό 150-500 ml (αναλόγως με την ποσότητα πλασμιδίων που θέλουμε να απομονώσουμε) αντίστοιχου θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένου με αντιβιοτικό και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 16 h. Στη συνέχεια, ακολουθώντας το πρωτόκολλο του εμπορικά διαθέσιμου kit NucleoBond® Xtra Midi / Maxi (740414.10, Macherey-Nagel) απομονώθηκαν τα πλασμίδια pPAmCherry KFERQ για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας.

2.1.12 Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση

Οι ηλεκτροφορήσεις που πραγματοποιήθηκαν για την ανάλυση τμημάτων DNA έγιναν σε πήκτωμα αγαρόζης (low melting agarose). Τα συστατικά του πηκτώματος αγαρόζης ήταν τα εξής:

- 1% w/v σκόνη αγαρόζης
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris Acetate Acid/EDTA 1X
- Βρωμιούχο αιθίδιο (1:10000)

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Βασίζεται στο διαχωρισμό φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Αφού προετοιμαστεί το πήκτωμα της αγαρόζης και στερεοποιηθεί, εμβαπτίζεται στο οριζόντιο λουτρό ηλεκτροφόρησης στο ρυθμιστικό διάλυμα και στη συνέχεια τα δείγματα προς διαχωρισμό εγχύονται στα πηγαδάκια που έχουν δημιουργηθεί κατά την προετοιμασία του πηκτώματος. Στο πρώτο πηγαδάκι συνήθως εγχύεται μείγμα θραυσμάτων DNA γνωστού μεγέθους, έτσι ώστε να μπορούμε στη συνέχεια να εντοπίσουμε τα τμήματα DNA τα οποία

μας ενδιαφέρουν. Στην παρούσα εργασία, εγχύονταν 3 μl του MassRuler DNA Ladder Mix (Cat.No. SM0403, ThermoFisher Scientific) ως μείγμα θραυσμάτων γνωστού μεγέθους. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, τα πηκτώματα αгарόζης παρατηρήθηκαν σε κλειστή τράπεζα υπεριώδους με ενσωματωμένη κάμερα, με την οποία στη συνέχεια έγινε λήψη φωτογραφιών.

2.1.13 Κυτταρικές καλλιέργειες

Τα πειράματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκαν στις παρακάτω αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές ολιγοδενδροκυττάρων, την OLN WT, την OLN AS και την OLN p25a. Οι τρεις αυτές σειρές έχουν προέλθει από την OLN 93 σειρά, μια ολιγοδενδρογλοιακή καρκινική σειρά που προέρχεται από πρωτογενείς καλλιέργειες γλοίας εγκεφάλου επίμους στελέχους Wistar (Robitzki, Doll *et al.*, 2000). Συγκεκριμένα:

- **OLN WT:** Ολιγοδενδροκύτταρα αγρίου τύπου τα οποία εκφράζουν χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα επίπεδα ενδογενούς α-συνουκλείνης και πρωτεΐνης p25a επίμους (ή αλλιώς κύτταρα OLN-93).
- **OLN AS:** Ολιγοδενδροκύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν σταθερά την ανθρώπινη α-συνουκλείνη. Ταυτόχρονα τα κύτταρα αυτά εκφράζουν χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα επίπεδα ενδογενούς α-συνουκλείνης και πρωτεΐνης p25a επίμους.
- **OLN p25a:** Ολιγοδενδροκύτταρα τα οποία υπερεκφράζουν σταθερά την ανθρώπινη TRPP/p25a ενώ παράλληλα εκφράζουν χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα επίπεδα ενδογενούς α-συνουκλείνης και πρωτεΐνης p25a επίμους.

2.1.14 Διατήρηση και ανακαλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Η διατήρηση των κυτταρικών σειρών που αναφέρθηκαν παραπάνω έγινε σε στείρες συνθήκες, σε επωαστικό κλίβανο με θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO₂ και σχετική υγρασία 95%.

Για τη διατήρηση, ανακαλλιέργεια, ψύξη-απόψυξη των κυττάρων αλλά και την εκτέλεση των πειραματικών διαδικασιών χρησιμοποιήθηκαν:

- Θρεπτικό υλικό: DMEM-D6429 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) με 10% ορό εμβρύου μόσχου (10% FBS), 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομικίνης (1% P/S, Invitrogen)
- Ορός εμβρύου μόσχου: Fetal Bovine Serum- FBS (#S1500, Biowest, Nuaille, France).
- DMSO: Dimethyl Sulfoxide (#100950636, Sigma)
- Θρυψίνη (Trypsin, #T4674, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- 25% TRYPsin-EDTA (#25200-072 Gibco Life Technologies, Invitrogen)
- Trypan blue solution (#T8154, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Μείγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης: Penicillin-Streptomycin (#P4458, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Opti-MEM (#31985070, Gibco Life Technologies)

Τα ολιγοδενδροκύτταρα καλλιεργούνταν σε πλαστικά τρυβλία καλλιέργειας διαμέτρου 10cm και οι πειραματικές διαδικασίες γίνονταν σε πιάτα των 12 ή 24 θέσεων. Το θρεπτικό υλικό των κυττάρων σε καλλιέργεια άλλαζε περίπου κάθε 3 ημέρες και αντικαθιστούταν με νέο. Με την αύξηση της πυκνότητας των κυττάρων μέσα στο τρυβλίο γινόταν ανακαλλιέργειά τους σε νέα τρυβλία. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας των κυττάρων είναι η εξής: αρχικά γινόταν έκπλυση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) για να απομακρυνθεί πλήρως το παλιό θρεπτικό και ακολουθούσε η προσθήκη διαλύματος θρυψίνης-EDTA. Η επώαση των κυττάρων με το διάλυμα θρυψίνης- EDTA σε θερμοκρασία δωματίου, για περίπου 3-5 λεπτά, σε συνδυασμό με την ελαφρά ανακίνηση του τρυβλίου, βοηθούσε στην αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια του τρυβλίου. Η ενζυμική αντίδραση της θρυψίνης τερματιζόταν με την προσθήκη θρεπτικού μέσου και ακολουθούσε μηχανική αποκόλληση όσων κυττάρων παρέμεναν προσκολλημένα στο τρυβλίο με την βοήθεια πιπέτας. Τέλος, γινόταν φυγοκέντρηση του εναιωρήματος για πέντε λεπτά σε 400xg, απομάκρυνση του υπερκείμενου, επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος που περιέχει τα κύτταρα σε νέο θρεπτικό μέσο και καταμερισμός του εναιωρήματος σε νέα αποστειρωμένα τρυβλία.

2.1.15 Κατάψυξη και απόψυξη των κυττάρων

Οι OLN-93 κυτταρικές σειρές είναι αθανатоποιημένες καρκινικές σειρές και έτσι, στη θεωρία, τα κύτταρα μπορούν να διαιρούνται επ'άόριστον. Παρόλα αυτά, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούμε κύτταρα μικρής γενεάς, δηλαδή κύτταρα που δεν έχουν πολλαπλασιαστεί πολλές φορές για να αποφευχθούν μεταλλάξεις κ.α. Για το λόγο αυτό αλλά και για τη διατήρηση της καρκινικής σειράς χρειάζεται να καταψύχονται κύτταρα μικρής γενιάς σε υγρό άζωτο (-196°C) ώστε να διατηρούνται όπως ήταν κατά την στιγμή της κατάψυξης και με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον.

Αρχικά τα κύτταρα συλλέγονταν, κατακρημνίζονταν και επαναδιαλύονταν σε 90% ορό εμβρύου μόσχου (FBS). Παρέμεναν για τριάντα λεπτά στον πάγο, έτσι ώστε να παγώσουν σταδιακά και με το πέρασ αυτού του χρόνου γινόταν προσθήκη διαλύματος ψύξης που περιείχε την κρυοπροστατευτική ουσία διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), διαλυμένη σε FBS σε ποσοστό 10%. Έπειτα τα κύτταρα μεταφέρονταν σε αποστειρωμένα φιαλίδια (cryovials) του

1 ml. Η κατάψυξη γίνεται σταδιακά, αρχικά στους -80°C για 16 ώρες και έπειτα στους -196°C , έτσι ώστε να αποφευχθεί ο θάνατος μεγάλου αριθμού κυττάρων που μπορεί να προκληθεί από τη δημιουργία κρυστάλλων και την επακόλουθη καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών.

Αντίθετα από την κατάψυξη, η επαναφορά των κυττάρων σε κανονική θερμοκρασία γινόταν με ταχεία μετάβαση από τη χαμηλή θερμοκρασία των -196°C στους 37°C για να αποφευχθεί ο θάνατος από την απόψυξη των κρυστάλλων που πιθανώς να δημιουργήθηκαν από το πάγωμα. Αρχικά το φιαλίδιο με τα κύτταρα τοποθετούνταν κατευθείαν στο υδατόλουτρο στους 37°C , ακολουθούσε προσθήκη φρέσκου θρεπτικού μέσου και γινόταν κατακρήμνιση με φυγοκέντρηση. Ακολουθούσε αφαίρεση του υπερκειμένου, επαναιώρηση των κυττάρων και διανομή τους σε αποστειρωμένα τρυβλία. Το θρεπτικό μέσο ήταν απαραίτητο να αλλάξει μετά από 24 ώρες καθώς το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα και ενδέχεται να έχει μείνει μικρή ποσότητα αυτού στην καλλιέργεια, αλλά και για να βοηθηθούν τα κύτταρα και να επανέλθουν πιο σύντομα.

2.1.16 Διαμόλυνση κυττάρων με τον φορέα pPAmCherryN1-KFERQ

Για τη διαδικασία διαμόλυνσης των κυττάρων με τον πλασμιδιακό φορέα pPAmCherryN1-KFERQ, αρχικά τοποθετήθηκαν καλυπτρίδες σε πιάτα καλλιέργειας με 24 πηγαδάκια (24-well plate) και στη συνέχεια επιστρώθηκαν με διάλυμα 1X πολυ-D-λυσίνης (PDL) και επώασθηκαν στους 37°C για 1 ώρα (ή από 2 ώρες και άνω σε θερμοκρασία δωματίου). Στη συνέχεια, το διάλυμα πολυ-D-λυσίνης απορρίφθηκε και οι καλυπτρίδες εκπλήθηκαν δις με διπλά απεσταγμένο H_2O και αφέθηκαν να στεγνώσουν στον απαγωγό. Έπειτα, κύτταρα των κυτταρικών σειρών OLN WT, AS και p25a επιστρώθηκαν στις στεγνές καλυπτρίδες (10.000-20.000 ανά πηγαδάκι) και επώασθηκαν με θρεπτικό υλικό DMEM για 24 ώρες στους $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Με το πέρας των 24 ωρών, το DMEM απομακρύνθηκε και προστέθηκαν σε κάθε πηγαδάκι του πιάτου 50 μl Opti-MEM με 1 μg του επιθυμητού εισαχθέντος DNA και 50 μl Opti-MEM με 3 μg πολυαιθυλενιμίνης (PEI). Το DNA μπορεί να εισαχθεί σε ένα κύτταρο ξενιστή με διαμόλυνση, με τη βοήθεια της πολυαιθυλενιμίνης, η οποία είναι ένα σταθερό κατιονικό πολυμερές. Η PEI συμπυκνώνει το DNA σε θετικά φορτισμένα σωματίδια που δεσμεύονται στις επιφάνειες ανιονικών κυττάρων. Κατά συνέπεια, το σύμπλοκο DNA:PEI ενδοκυτταρώνεται από τα κύτταρα που θέλουμε να διαμολύνουμε και το DNA απελευθερώνεται, εν συνεχεία, στο κυτταρόπλασμα (Longo *et al.*, 2013). Έπειτα από επώαση των κυττάρων με το διάλυμα Opti-MEM/DNA/PEI για 4 έως 6 ώρες στους $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$, το διάλυμα απορρίφθηκε και προστέθηκε DMEM.

2.1.17 Αναστολή/ Επαγωγή λυσοσωμικής λειτουργίας

Ένας εκ των στόχων της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθούν οι μεταβολές στην ενεργότητα της αυτοφαγίας διαμεσολαβούμενης από πρωτεΐνες-συνοδούς σε συνθήκες αναστολής ή επαγωγής της λυσοσωμικής λειτουργίας στα ολιγοδενδροκύτταρα.

Για την αναστολή της λυσοσωμικής λειτουργίας έγινε προσθήκη χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl), το οποίο δρα ως γενικός αναστολέας των λυσοσωμάτων. Το NH_4Cl είναι μια ασθενής βάση η οποία, λόγω της ικανότητας αλκαλοποίησης, επηρεάζει το όξινο pH του εσωτερικού των λυσοσωμάτων και κατ'επέκταση την εξαρτώμενη από το pH ωρίμανση των ενδοσωμάτων και τη σύντηξη αυτοφαγοσώματος - λυσοσώματος.

Είναι γνωστό ότι ένας από τους κυριότερους παράγοντες επαγωγής της αυτοφαγίας είναι ο θρεπτικός περιορισμός (Klionsky and Emr, 2000). Έτσι, για την επαγωγή της αυτοφαγίας, το πλήρες DMEM αντικαταστάθηκε με DMEM που στερούταν τον ορό εμβρύου μόσχου.

2.1.18 Επώαση κυττάρων με ινιδιακές μορφές της πρωτεΐνης α-συνουκλειΐνης

Προκειμένου να μοντελοποιήσουμε και να μελετήσουμε μια παθολογική κατάσταση παρόμοια με αυτή που συμβαίνει στην Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων, τα ολιγοδενδροκύτταρα αγρίου τύπου επώασθηκαν με ινιδιακές μορφές της α-συνουκλειΐνης. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, αυτές οι μορφές της πρωτεΐνης έχουν συνδεθεί χαρακτηριστικά με την παθολογία της νόσου και τη δυσλειτουργία των αυτοφαγικών διαδικασιών στα ολιγοδενδροκύτταρα. Έτσι, μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων με τον πλασμιδιακό φορέα pPAmCherry KFERQ, έγινε επώαση των κυττάρων με 0,5 μg ινιδιακών μορφών της α-συνουκλειΐνης, διαλυμένες σε θρεπτικό υλικό DMEM.

2.1.19 Φωτοενεργοποίηση

Τα κύτταρα που επιστρώθηκαν στις καλυπτρίδες και στη συνέχεια διαμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pPAmCherry KFERQ υπέστησαν φωτοενεργοποίηση προκειμένου να οπτικοποιηθούν οι μεταβολές της ενεργότητας του CMA μονοπατιού. Η φωτοενεργοποίηση έγινε με πρόσπτωση μπλέ φωτός (UV) σε LED ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού Leica DMIRB, σε φάσμα φωτός UV 380-405 nm, με φακό εστίασης 10X, για 5 λεπτά ανά οπτικό πεδίο. Έτσι, διεγείροντας το φωτοενεργοποιούμενο μονομερές Cherry, μετά την πρόσπτωση UV φωτός μπορεί να οπτικοποιηθεί η πρωτεΐνη mCherry και άρα και η αλληλουχία KFERQ που είναι συζευγμένη με την πρώτη. Σε κάθε καλυπτρίδα έγινε φωτοενεργοποίηση των πρωτεϊνών κυττάρων πέντε οπτικών πεδίων. Η φωτοενεργοποίηση δε φάνηκε να επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

2.1.20 Ανοσοκυτταροχημεία

Για να μελετηθούν οι μεταβολές της ενεργότητας του CMA μονοπατιού σε μονιμοποιημένα ολιγοδενδροκύτταρα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοκυτταροχημείας. Οι κυτταρικές σειρές επωάστηκαν για περίπου 26 ώρες σε διαφορετικές συνθήκες (προσθήκη χλωριούχου αμμωνίου, στέρηση ορού, προσθήκη παθολογικών (ινιδιακών) μορφών α-συνουκλεΐνης) και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν δύο φορές με διάλυμα PBS για να απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό. Έπειτα, έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων με χρήση απόλυτης μεθανόλης 100% που προηγουμένως είχε ψυχθεί (-20°C). Τα κύτταρα επωάστηκαν με αυτό την απόλυτη μεθανόλη για 5 λεπτά και ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS. Στη συνέχεια, προκειμένου να γίνει παρεμπόδιση των μη-ειδικών αλληλεπιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος ή αλλιώς blocking, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα PBS 1X με 10% ορό αίγας (NGS) και 0,4% Triton-X 100 για μία ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, τα μονιμοποιημένα κύτταρα επωάστηκαν με τα πρωτογενή αντισώματα για 16 ώρες στους 4°C και ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS 1X. Τέλος, τα κύτταρα επωάστηκαν για 40 λεπτά με τα δευτερογενή αντισώματα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φθορίζοντα δευτερογενή αντισώματα είναι φωτοευαίσθητα και για αυτό η επώαση με τα παραπάνω έγινε στο σκοτάδι. Τα πρωτογενή και τα δευτερογενή αντισώματα διαλύθηκαν σε μείγμα PBS 1X με 2% NGS και 0,1% Triton-X 100. Στο μείγμα του δευτερογενούς αντισώματος προστέθηκε και η χρωστική Hoechst 33342 (1/1000) (Sigma, St Louis, MO, USA 1 mg/mL) στην οποία οφείλεται η χρώση των πυρήνων των κυττάρων. Τέλος, οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν ανάστροφα σε αντικειμενοφόρες πλάκες, με 1 σταγόνα εμπορικά διαθέσιμου διαλύματος έγκλεισης VECTASHIELD (Marvai Life Sciences, #H-1000) ανά καλυπτρίδα. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού Leica DMIRB και η λήψη ψηφιακών φωτογραφιών έγινε σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser.

Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε είναι έναντι του:

- LAMP2A anti-rabbit, Zymed (1:800)

Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το:

- CF488A, goat anti-rabbit (Biotium, 2012) 1:2000

2.1.21 Στατιστική ανάλυση και επεξεργασία φωτογραφιών

Η επεξεργασία των φωτογραφιών που λήφθηκαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο έγινε με το πρόγραμμα ImageJ (Fiji), όπου μετρήθηκε η συνολική ένταση φθορισμού και ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε φωτογραφία. Η ένταση του φθορισμού θεωρήθηκε ότι αντανακλά τη συσσώρευση της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης-υπόστρωμα και κατ'επέκταση τη δυνατότητα

αποικοδόμησης αυτής μέσω του CMA μονοπατιού. Προκειμένου να υπολογιστεί η μέση ένταση φθορισμού, η συνολική ένταση φθορισμού κάθε φωτογραφίας διαιρέθηκε με τον αριθμό των κυττάρων που απεικονίζονταν στην εκάστοτε φωτογραφία. Στη συνέχεια, έγινε κανονικοποίηση (normalising) βάσει του θορύβου που υπήρχε σε κάθε φωτογραφία.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του προγράμματος GraphPad Prism 6.0. Ως στατιστικά σημαντικές κρίθηκαν οι τιμές για τις οποίες ισχύει $P < 0.05$, ενώ για τη σύγκριση δύο μεταβλητών εφαρμόστηκε το t-test.

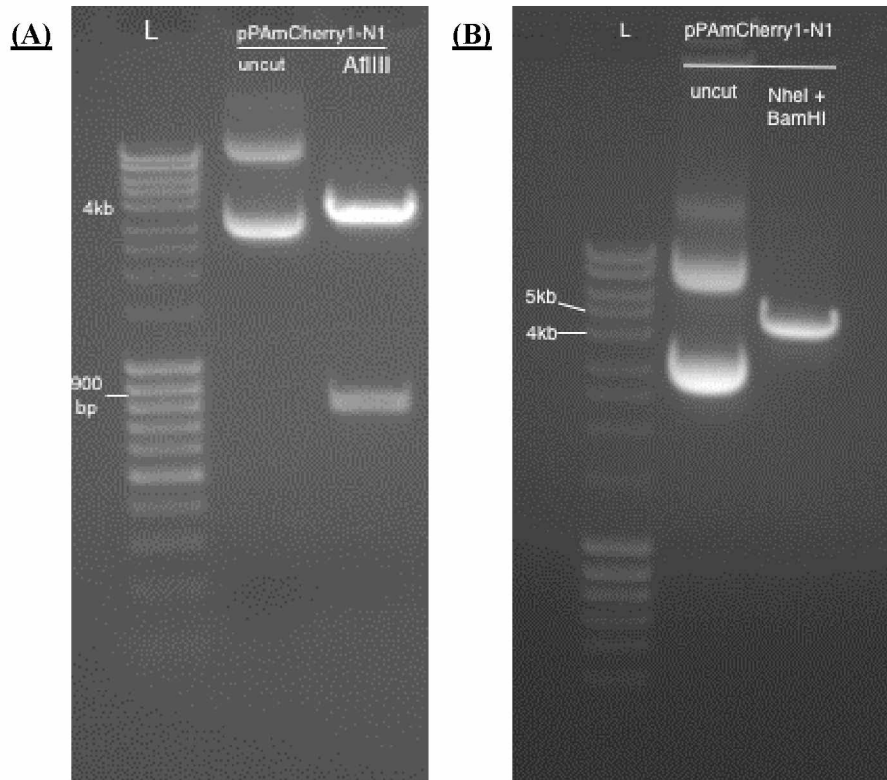
2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.2.1 Κατασκευή του μοριακού εργαλείου pPAmCherry KFERQ

Όπως αναφέρεται παραπάνω, αρχικά σχεδιάστηκε ο τελικός πλασμιδιακός φορέας pPAmCherry KFERQ, με τον οποίο στη συνέχεια διαμολύνθηκαν οι διαφορετικές κυτταρικές σειρές ολιγοδενδροκυττάρων. Η κατασκευή του τελικού pPAmCherry KFERQ απαιτεί την εκτέλεση μιας σειράς αρκετών βημάτων, καθώς μετέπειτα αυτό αποτέλεσε το βασικό μοριακό εργαλείο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία και κατέστησε δυνατή την παρακολούθηση των μεταβολών της ενεργότητας του CMA μονοπατιού. Μετά το μετασχηματισμό και την καλλιέργεια χημειοεπιλεκτικών βακτηρίων με τον εμπορικά διαθέσιμο φορέα-μήτρα pPAmCherry1-N1, έγινε απομόνωση των αρχικών πλασμιδιακών φορέων. Προκειμένου να ελέγξουμε τα παραχθέντα πλασμίδια pPAmCherry1-N1 αναμενόμενου συνολικού μεγέθους 4723bp, πραγματοποιήθηκε πέψη 1 μg πλασμιδίων pPAmCherry1-N1, με το ένζυμο περιορισμού AflIII. Το ένζυμο AflIII έχει 2 θέσεις αναγνώρισης στο πλασμίδιο. Η μια θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου βρίσκεται εντός της αλληλουχίας που κωδικοποιεί τη φωτοενεργοποιούμενη πρωτεΐνη mCherry και η δεύτερη βρίσκεται εκτός. Μετά την πέψη, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και αναμένονταν 2 θραύσματα μεγέθους 825bp + 3898bp (Εικ. 9(α)).

Αφού έγινε μια πρώτη διαγνωστική πέψη με το ένζυμο AflIII, ακολούθησε μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια μετασχηματισμένων με το pPAmCherry1-N1 βακτηρίων (maxi prep) και απομόνωση μεγάλης ποσότητας πλασμιδίων. Από αυτά τα πλασμίδια αφαιρέθηκε ενζυματικά η πολλαπλή θέση κλωνοποίησης, συνολικού μεγέθους 73 ζευγών βάσεων, χρησιμοποιώντας τα ένζυμα NheI και BamHI, τα οποία αναγνωρίζουν μοναδικές θέσεις περιορισμού στο πλασμίδιο. Οι θέσεις αυτές βρίσκονται αντίστοιχα στην αρχή και στο τέλος του τμήματος που αντιστοιχεί στην πολλαπλή θέση κλωνοποίησης και μετά την πέψη αφήνουν προεξέχοντα κολλώδη άκρα εκατέρωθεν. Η γραμμικοποίηση του pPAmCherry1-N1 φαίνεται στην Εικ. 9(β). Παρόλα αυτά, λόγω του μικρού μεγέθους, δεν είναι δυνατό να εντοπίσουμε την μπάντα που αντιστοιχεί στο τμήμα που απομακρύνθηκε (Εικ.9(β)).

Η μπάντα που αντιστοιχεί στον γραμμικοποιημένο πλασμιδιακό φορέα αποκόπηκε από την πηκτή αгарόζης με χειρουργικό νυστέρι και το εγκλωβισμένο DNA απομονώθηκε όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Έπειτα, το γραμμικό pPAmCherry1-N1 υπέστη αποφωσφορυλίωση έτσι ώστε να διαβεβαιώσουμε ότι το πλασμίδιο δε θα επανακυκλοποιηθεί. Δύο ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα υβριδοποιήθηκαν, έτσι ώστε να σχηματίσουν την ένθετη αλληλουχία που κωδικοποιεί το μοτίβο KFERQ και στη συνέχεια, το γραμμικό πλασμίδιο και η ένθετη αλληλουχία ενώθηκαν με χρήση του ενζύμου T4 λιγάση.



Εικ. 9. Πέψεις του πλασμιδίου *pPAmCherry1-N1* με ένζυμα περιορισμού. Στο πρώτο πηγαδάκι τοποθετήθηκε το μείγμα θραυσμάτων γνωστού μοριακού βάρους ή αλλιώς ladder (L), στο δεύτερο προστέθηκε άκοπτο δείγμα του πλασμιδιακού φορέα (uncut) και στο τρίτο προστέθηκε ίση ποσότητα πλασμιδιακού φορέα έπειτα από πέψη με το εκάστοτε ένζυμο **(A)** Διαγνωστική πέψη του πλασμιδιακού φορέα *pPAmCherry1-N1* με το ένζυμο περιορισμού *AflIII*. Όπως φαίνεται στη φωτογραφία, μετά την πέψη, υπάρχουν τα δύο αναμενόμενα θραύσματα μεγέθους 3898 και 825 ζευγών βάσεων. **(B)** Διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *NheI* και *BamHI* προκειμένου να απομακρυνθεί η πολλαπλή θέση κλωνοποίησης και να γίνει γραμμικός ο φορέας *pPAmCherry1-N1*. Η μπάντα που αντιστοιχεί στο τμήμα που απομακρύνθηκε δεν είναι ορατή στη φωτογραφία λόγω του μικρού της μεγέθους.

Τέλος, έγινε μετασχηματισμός χημειοεπιλεκτικών βακτηρίων τόσο με το νέο πλασμίδιο όσο και με το γραμμικό πλασμίδιο ως καλλιέργεια-μάρτυρα. Έτσι προέκυψαν 2 καλλιέργειες βακτηρίων σε στερεό θρεπτικό υλικό LB εμβολιασμένο με το αντιβιοτικό καναμυκίνη: μια καλλιέργεια στην οποία αναπτύχθηκαν αποικίες βακτηρίων που προσέλαβαν το πλασμίδιο *pPAmCherry KFERQ* και μια καλλιέργεια βακτηρίων που μετασχηματίστηκαν με το γραμμικό πλασμίδιο *pPAmCherry1-N1*, ως καλλιέργεια-μάρτυρας. Στη συνέχεια, 20 αποικίες βακτηρίων που αναπτύχθηκαν στις 2 στερεές καλλιέργειες επανακαλλιιεργήθηκαν σε 5 ml υγρού θρεπτικού LB/ αποικία και ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής

κλίμακας (mini prep) και η μέτρηση της συγκέντρωσης των δειγμάτων σε φασματοφωτόμετρο. Προκειμένου να γίνει ένας πρώτος έλεγχος της ορθότητας και της ποιότητας των πλασμιδίων που απομονώθηκαν πραγματοποιήθηκε νέα διαγνωστική πέψη με τα ένζυμα HindIII και BglII. Εάν η κατασκευή του τελικού πλασμιδιακού φορέα είχε γίνει επιτυχώς, οι θέσεις αναγνώρισης των δύο αυτών ενζύμων θα καταργούνταν, ενώ στην περίπτωση των πλασμιδίων-μάρτυρες (pPAmCherry control) οι θέσεις αναγνώρισης εξακολουθούσαν να υπάρχουν. Με το πέρας της αντίδρασης πέψης, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν. Κατόπιν, επιλέχθηκαν 3 δείγματα όπου φάνηκαν να μην περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού HindIII και BglII, καθώς και ένα δείγμα από την καλλιέργεια-μάρτυρα που φάνηκε να έχει τις θέσεις αναγνώρισης (Εικ.10) και



Εικ. 10 Διαγνωστικές πέψεις του πλασμιδίου pPAmCherry KFERQ και των pPAm-Cherry controls με τα ένζυμα περιορισμού HindIII και BglII. Τα δείγματα υπ' αριθμόν 1,5 και 8 φαίνεται να μην περιέχουν τις θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων, καθώς δεν έχουν κοπεί από τα ένζυμα περιορισμού και κατά συνέπεια, συμπεραίνουμε ότι η μοριακή κατασκευή είναι σωστή. Τα δύο controls φαίνεται να έχουν κοπεί, και κατ'επέκταση συμπεραίνουμε ότι το ένθετο τμήμα που κωδικοποιεί το μοτίβο KFERQ δεν υπάρχει. Με a έχει σημειωθεί το άκοπτο δείγμα, με b η πέψη δείγματος με HindIII και με c η πέψη δείγματος με BglII.

απεστάλησαν σε εξωτερικό φορέα για αλληλούχιση.

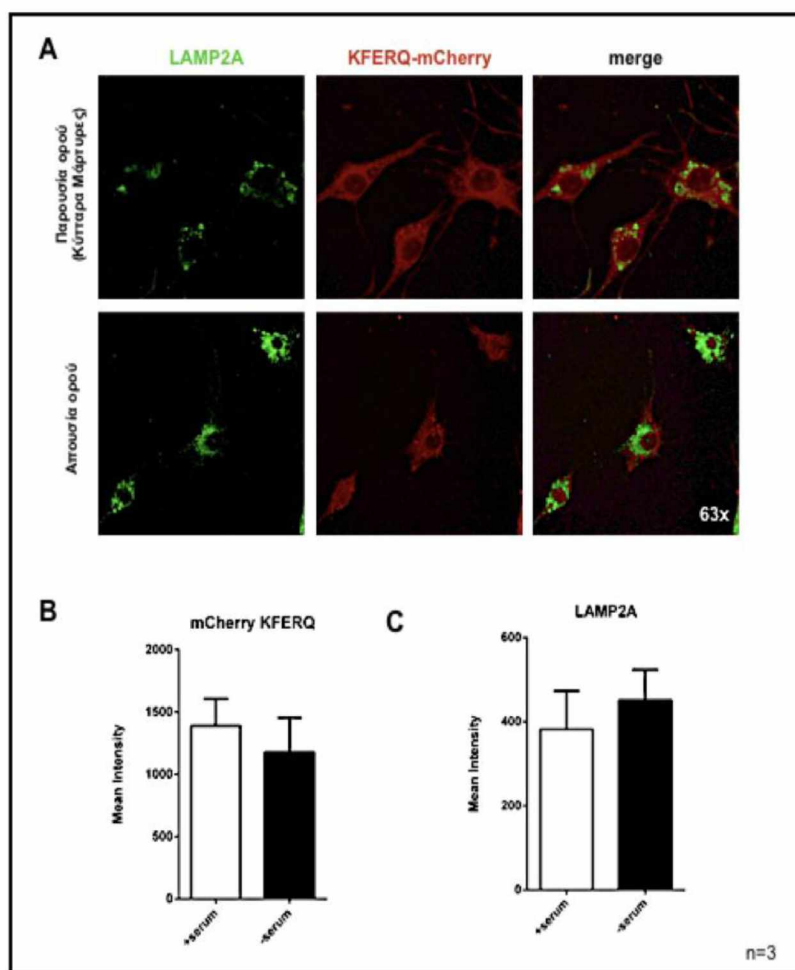
Με την αλληλούχιση των δειγμάτων 1,5,8 και του control 2 που απεικονίζονται άνωθεν στην Εικόνα 10, επιβεβαιώθηκε η ορθότητα της εκάστοτε αλληλουχίας. Τέλος, μετασχηματισμένα βακτήρια με ένα από τα πλασμίδια pPAmCherry KFERQ που αλληλουχήθηκαν,

αναπτύχθηκε σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας (maxi prep) και απομονώθηκε μεγάλη ποσότητα του πλασμιδίου για να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για τη διαμόλυνση διαφορετικών κυτταρικών σειρών.

2.2.2 Διερεύνηση της επίδρασης της επαγωγής ή αναστολής της λυσοσωμικής λειτουργίας στην αποικοδόμηση KFERQ-mCherry πρωτεΐνης στα ολιγοδενδροκύτταρα αγρίου τύπου (OLN WT)

Η στέρηση ορού στα OLN WT φαίνεται να συνοδεύεται από αλλαγή του προτύπου της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης από διάχυτο σε στικτό.

Σε αυτήν την ενότητα εξετάστηκε το κατά πόσον η επώαση των κυττάρων με θρεπτικό υλικό που στερείται ορού (-serum) έχει επίδραση στην αποικοδόμηση της πρωτεΐνης KFERQ-mCherry στα ολιγοδενδροκύτταρα αγρίου τύπου. Αρχικά, τα κύτταρα επιστρώθηκαν στις καλυπτρίδες και μετά από 24 ώρες διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pAmCherry KFERQ. Έπειτα επώασθηκαν με θρεπτικό υλικό DMEM που στερείται ορού για 26 ώρες. Με το πέρασ αυτού του χρόνου, τα κύτταρα υπέστησαν φωτοενεργοποίηση όπως περιγράφεται παραπάνω (Υλικά και Μέθοδοι) και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν. Ακολούθησε το blocking των μη-ειδικών αλληλεπιδράσεων αντιγόνου αντισώματος και η επώαση των κυττάρων με, αρχικά πρωτογενή αντισώματα έναντι του ειδικού λυσοσωμικού υποδοχέα LAMP2A, και εν συνεχεία με τα αντίστοιχα δευτερογενή. Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες για να παρατηρηθούν στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού.



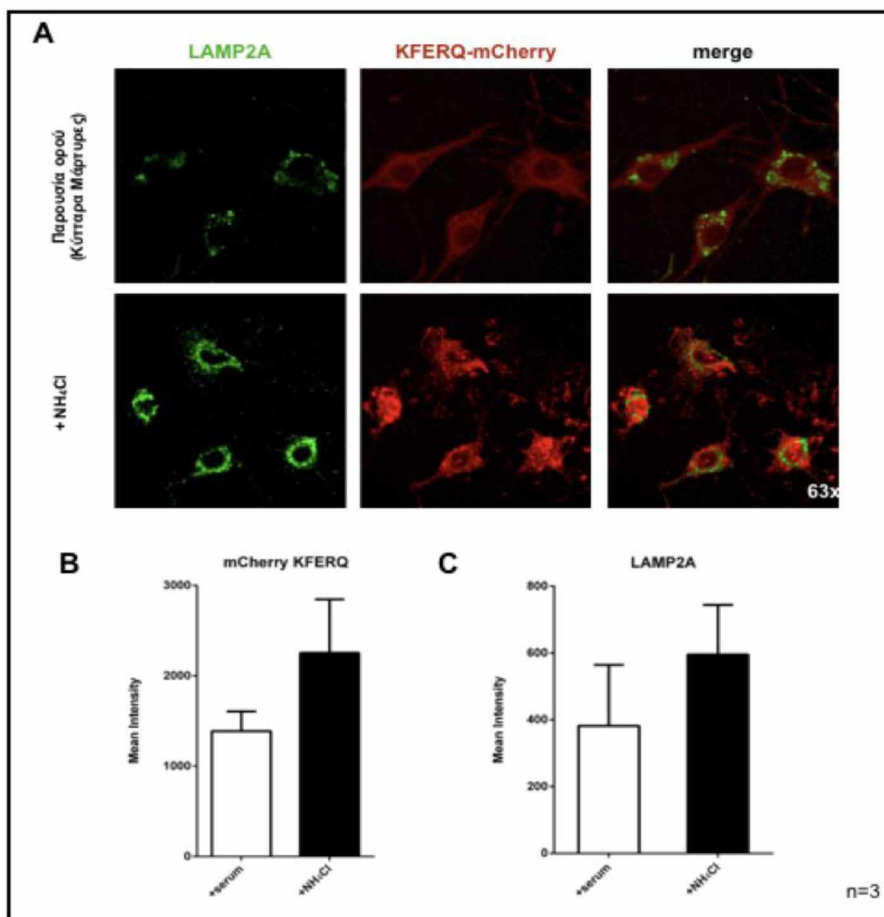
Εικ. 11 Η στέρηση ορού στα OLN WT φαίνεται να συνοδεύεται από αλλαγή του προτύπου της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης από διάχυτο σε σικτό και από περιπυρηνική συσσώρευση των λυσοσωμάτων. (A) Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας όπου με κόκκινο απεικονίζεται η KFERQ-mCherry πρωτεΐνη και με πράσινο ο ειδικός λυσοσωμικός υποδοχέας LAMP2A. (B) Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα ολικά επίπεδα της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης παρουσία και απουσία ορού, ενώ (C) παρατηρήθηκε μικρή αύξηση του φθορισμού του πράσινου που αντανακλά τα επίπεδα του LAMP2A με την επαγωγή της αυτοφαγίας διαμεσολαβούμενης από πρωτεΐνες-συνοδούς.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 11, παρουσία ορού, η KFERQ-mCherry πρωτεΐνη είναι διάχυτη στο κυτταρόπλασμα των ολιγοδενδροκυττάρων αγίου τύπου. Τα λυσοσώματα, που αντιπροσωπεύονται στις εικόνες από τον ειδικό λυσοσωμικό υποδοχέα LAMP2A με πράσινο, φαίνεται να είναι διάσπαρτα στο κυτταρόπλασμα. Η επαγωγή της αυτοφαγίας διαμεσολαβούμενης από πρωτεΐνες-συνοδούς (μέσω στέρησης ορού) στα ίδια κύτταρα φάνηκε να συνοδεύεται από αλλαγή του προτύπου της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης από διάχυτο σε σικτό. Επίσης, με την επαγωγή της CMA παρατηρήθηκε περιπυρηνική συσσώρευση των λυσοσωμάτων και μικρή αύξηση της έντασης φθορισμού του ειδικού

λυσosomal υποδοχέα LAMP2A, γεγονός που συμφωνεί με όσα είναι ήδη γνωστά από βιβλιογραφικές πηγές (Koga *et al.*, 2011). Η συνολική ένταση φθορισμού της KFERQ-mCherry δε φάνηκε να διαφέρει σημαντικά στις δύο συνθήκες.

Η αναστολή της λυσοσωμικής λειτουργίας στα OLN WT προκαλεί συσσώρευση της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης και αύξηση των επιπέδων του LAMP2A υποδοχέα.

Προκειμένου να εξετάσουμε την επίδραση της αναστολής της λυσοσωμικής λειτουργίας στην αποικοδόμηση της pAmCherry KFERQ πρωτεΐνης, ολιγοδενδροκύτταρα αγρίου τύπου επώασθηκαν με DMEM θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με χλωριούχο αμμώνιο που, όπως προαναφέρθηκε είναι αναστολέας της συνολικής λυσοσωμικής λειτουργίας. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν στις καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pAmCherry KFERQ και έπειτα στο θρεπτικό υλικό DMEM προστέθηκε το χλωριούχο αμμώνιο και έγινε επώαση με αυτό για διάστημα 16-24 ωρών. Με το πέρας αυτού του χρόνου, τα κύτταρα υπέστησαν φωτοενεργοποίηση όπως περιγράφεται παραπάνω (Υλικά και Μέθοδοι) και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν. Ακολούθησε το blocking των μη-ειδικών αλληλεπιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος και η επώαση των κυττάρων με, αρχικά πρωτογενή αντισώματα έναντι του ειδικού λυσοσωμικού υποδοχέα LAMP2A, και εν συνεχεία με τα αντίστοιχα δευτερογενή. Στη συνέχεια, οι καλυπτρίδες μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες για να παρατηρηθούν στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού. Στην περίπτωση αυτή, παρατηρήθηκε έντονη συσσώρευση της πρωτεΐνης KFERQ-mCherry στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων (Εικ. 12), γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η συγκεκριμένη παραχθείσα πρωτεΐνη αποικοδομείται μέσω λυσοσωμικών μονοπατιών και όχι μέσω του συστήματος ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος. Η παρατήρηση αυτή ήταν λογική και αναμενόμενη, καθώς η πρωτεΐνη που παράγεται φέρει το μοτίβο KFERQ που όπως προαναφέρθηκε αποτελεί υπόστρωμα της CMA, που αποτελεί έναν από τα ειδικά μονοπάτια λυσοσωμικής πρωτεϊνικής αποικοδόμησης. Έτσι, όταν η συνολική λυσοσωμική λειτουργία αναστέλλεται (άρα και η CMA), η πρωτεΐνη αδυνατώντας να αποικοδομηθεί επιτυχώς συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα. Επομένως, αυτή η συσσώρευση πιθανά υποδηλώνει δυσλειτουργία της CMA. Στο ίδιο πείραμα ταυτόχρονα παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του LAMP2A υποδοχέα, γεγονός που μπορεί να λειτουργεί αντισταθμιστικά στην αναστολή της λυσοσωμικής λειτουργίας. Αυτό σημαίνει ότι, καθώς το κύτταρο αντιλαμβάνεται τη δυσλειτουργία αυτή, επάγεται η παραγωγή του LAMP2A και τα λυσοσώματα πιθανώς αυξάνονται προκειμένου να την αντιμετωπίσουν ενισχύοντας την αποικοδόμηση της συσσωρευμένης πλέον πρωτεΐνης.

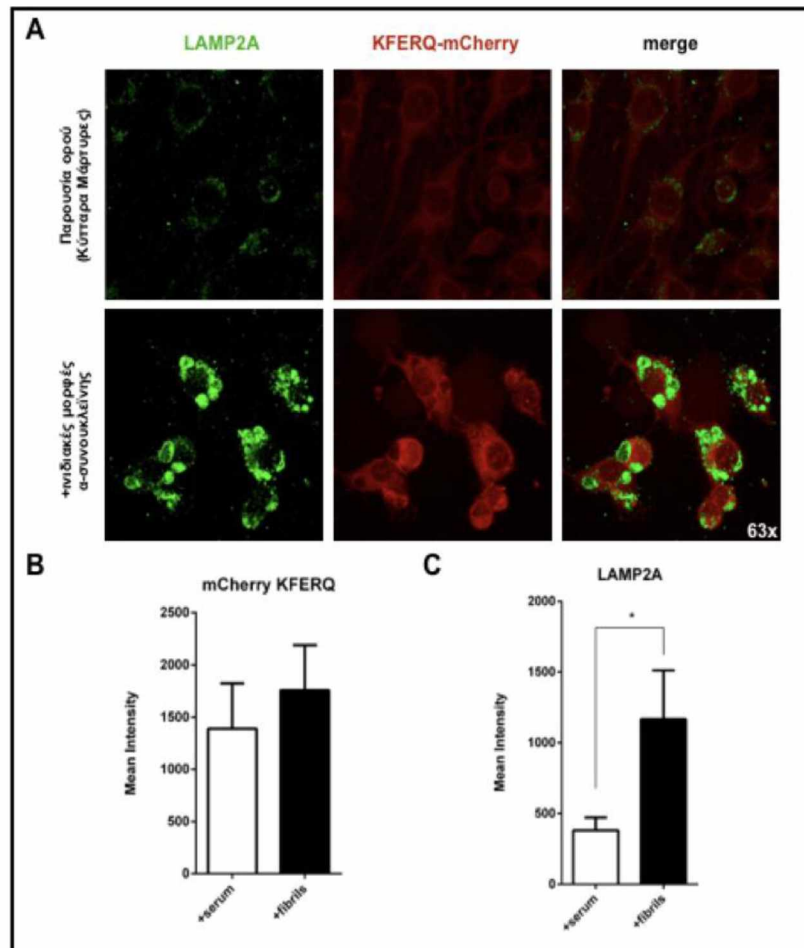


Εικ. 12 Η αναστολή της λυσοσωμικής λειτουργίας συνοδεύεται από συσσώρευση της KFERQ-mCherry και έντονη αύξηση των επιπέδων του LAMP2A υποδοχέα. (A) Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας όπου φαίνεται η έντονη αύξηση των επιπέδων τόσο του LAMP2A (πράσινο) όσο και της πρωτεΐνης KFERQ-mCherry (κόκκινο) που συσσωρεύθηκε λόγω της προσθήκης 20 mM χλωριούχου αμμωνίου. (B) Με την προσθήκη χλωριούχου αμμωνίου τα επίπεδα της KFERQ-mCherry σχεδόν διπλασιάζονται. (C) Αύξηση παρατηρείται και στα επίπεδα του LAMP2A, γεγονός που μπορεί να λειτουργεί αντισταθμιστικά.

Η προσθήκη τοξικών μορφών της α-συνουκλεΐνης στα ολιγοδενδροκύτταρα αγρίου τύπου φαίνεται να λειτουργεί ανασταλτικά στη λυσοσωμική λειτουργία.

Προκειμένου να μοντελοποιηθεί η Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων σε κυτταρικό επίπεδο, προστέθηκαν στα ολιγοδενδροκύτταρα αγρίου τύπου τοξικές μορφές α-συνουκλεΐνης. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε καλυπτρίδες, διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο που φέρει την KFERQ-mCherry πρωτεΐνη και στη συνέχεια επώασθησαν με 0,5 μg/ml ανασυνδυασμένων ινιδιακών μορφών της α-συνουκλεΐνης για 16-30 ώρες. Με το πέρας του χρόνου αυτού τα

κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με μεθανόλη, πραγματοποιήθηκε το blocking των μη ειδικών θέσεων σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος και τέλος επώασθησαν με πρωτογενή αντισώματα έναντι του ειδικού λυσοσωμικού υποδοχέα LAMP2A και με τα αντίστοιχα δευτερογενή αντισώματα.



Εικ. 13 Η προσθήκη ανασυνδυασμένων ινιδιακών μορφών α-συνουκλείνης συνοδεύεται από συσσώρευση της KFERQ-mCherry και δραματική αύξηση των επιπέδων του LAMP2A υποδοχέα. (A) Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας. Τα OLN WT κύτταρα επώασθησαν για 16-30 ώρες με 0,5 μg/ml ινιδιακών μορφών α-συνουκλείνης. Αυτό οδήγησε σε έντονη συσσώρευση της KFERQ-mCherry (B) αλλά και σε δραματική αύξηση των επιπέδων του λυσοσωμικού υποδοχέα LAMP2A (C).

Και στην περίπτωση αυτή, παρατηρήθηκε έντονη συσσώρευση της πρωτεΐνης KFERQ-mCherry καθώς και έντονη αύξηση των επιπέδων του ειδικού λυσοσωμικού υποδοχέα LAMP2A (Εικ. 13). Όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο της Εισαγωγής, η α-συνουκλείνη έχει βρεθεί ότι αποικοδομείται κυρίως μέσω του CMA μονοπατιού, επομένως η συσσώρευσή της

υποδηλώνει πιθανή δυσλειτουργία του CMA μονοπατιού έπειτα από την προσθήκη των ανασυνδυασμένων ινιδιακών μορφών.

2.2.3 Διερεύνηση της επίδρασης της επαγωγής ή αναστολής της λυσοσωμικής λειτουργίας στην αποικοδόμηση της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης στα OLN p25α και τα OLN AS.

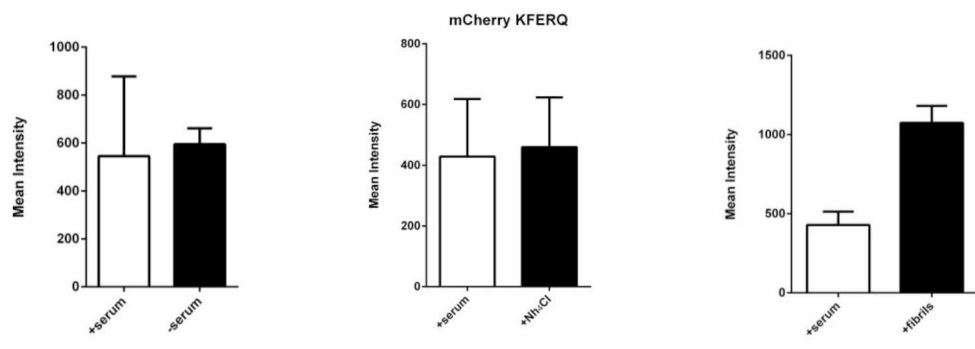
Κατά τη διάρκεια της πειραματικής αυτής εργασίας μελετήθηκε και η επίδραση της επαγωγής ή της αναστολής της λυσοσωμικής λειτουργίας στην αποικοδόμηση της KFERQ-mCherry σε δύο ακόμη κυτταρικές σειρές, την OLN AS και την OLN p25α.

Όπως αναφέρεται παραπάνω, η OLN AS είναι μια κυτταρική σειρά που υπερεκφράζει σταθερά την ανθρώπινη α-συνουκλεΐνη και η OLN p25α αντίστοιχα, υπερεκφράζει την πρωτεΐνη p25α. Και οι δύο κυτταρικές σειρές εκφράζουν πολύ χαμηλά έως μη ανιχνεύσιμα επίπεδα ενδογενούς α-συνουκλεΐνης και πρωτεΐνης p25α επίμους. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: τα κύτταρα επιστρώθηκαν στις καλυπτρίδες και μετά από 24 ώρες διαμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pPAmCherry-KFERQ. Αμέσως μετά τη διαμόλυνσή τους, το θρεπτικό τους υλικό αντικαταστάθηκε με α) πλήρες DMEM, β) με DMEM που στερείται ορού, γ) με πλήρες DMEM στο οποίο προστέθηκαν 20 mM NH₄Cl, και γ) με πλήρες DMEM στο οποίο είχαν προστεθεί 0,5 μg/ml ανασυνδυασμένων ινιδιακών μορφών α-συνουκλεΐνης.

Από τη βιβλιογραφία, είναι γνωστό ότι η υπερέκφραση της p25α προκαλεί τη συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης και συνεντοπίζεται με ανοσοκυτταροχημικές μεθόδους μαζί με την συσσωρευμένη α-συνουκλεΐνη (Lindersson *et al.*, 2005). Στην παρούσα μελέτη, έπειτα από προσθήκη ινιδιακών μορφών της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα που υπερεκφράζουν σταθερά την p25α, παρατηρήθηκε δραματική αύξηση των επιπέδων της KFERQ-mCherry σε σχέση με τα κύτταρα που επωάσθηκαν μόνο με πλήρες DMEM. Ωστόσο, στα ίδια κύτταρα, όταν έγινε αναστολή της λυσοσωμικής λειτουργίας με προσθήκη χλωριούχου αμμωνίου δεν παρατηρήθηκε το ίδιο φαινόμενο, παρά μόνο μια αμελητέα αύξηση των επιπέδων της KFERQ-mCherry (Εικ. 14). Αυτό πιθανώς υποδεικνύει ότι σε στην περίπτωση των OLN p25α κυττάρων η προσθήκη των τοξικών μορφών α-συνουκλεΐνης είναι εκείνη που επάγει σημαντική αναστολή του CMA μονοπατιού με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης.

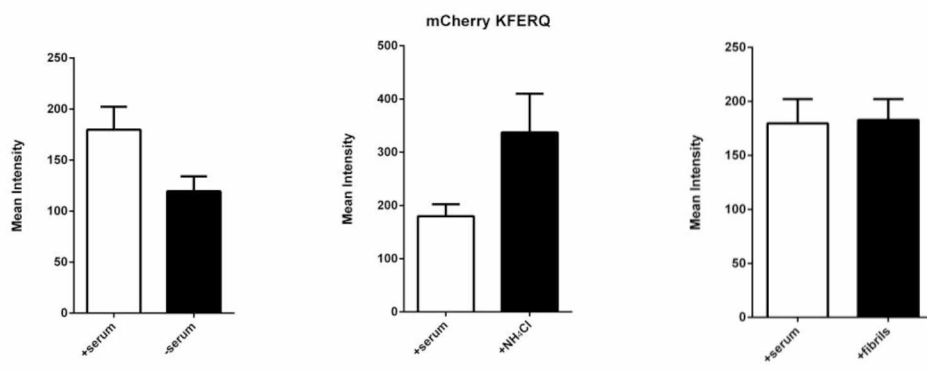
Αντιθέτως, στα OLN AS κύτταρα, δεν παρατηρήθηκαν έντονες διαφορές στα επίπεδα της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης μεταξύ των κυττάρων που επωάσθηκαν με τις τοξικές μορφές α-συνουκλεΐνης και εκείνων που επωάσθηκαν με το πλήρες θρεπτικό υλικό. Παράλληλα, στα OLN AS η αναστολή της λυσοσωμικής λειτουργίας με χλωριούχο αμμώνιο φάνηκε να

συνοδεύεται από έντονη συσσώρευση της KFERQ-mCherry (Εικ. 15). Στην περίπτωση των OLN AS και OLN p25a κυττάρων οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν από φωτογραφίες ζωντανών κυττάρων και όχι μονιμοποιημένων και έτσι, δεν προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του LAMP2A υποδοχέα.



Εικ. 14 Διερεύνηση των επιπέδων της KFERQ-mCherry στα OLN p25a κύτταρα.

Η στέρηση ορού στα OLN p25a δε φάνηκε να συνοδεύεται από σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης. Το ίδιο παρατηρείται και έπειτα από προσθήκη 20 mM χλωριούχου αμμωνίου. Στα OLN p25a κύτταρα που επώασθηκαν με ανασυνδυασμένες ινδιακές μορφές της α-συνουκλείνης παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στα επίπεδα της πρωτεΐνης KFERQ-mCherry.



Εικ. 15 Διερεύνηση των επιπέδων της KFERQ-mCherry στα OLN AS κύτταρα.

Η στέρηση ορού στα OLN AS φάνηκε να συνοδεύεται από μειωμένα επίπεδα της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης, ενώ η προσθήκη 20 mM χλωριούχου αμμωνίου φάνηκε να προκαλεί την συσσώρευσή της. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα της πρωτεΐνης KFERQ-mCherry μεταξύ των κυττάρων που είχαν επωασθεί με ανασυνδυασμένες ινδιακές μορφές της α-συνουκλείνης και των κυττάρων που είχαν επωασθεί με πλήρες DMEM.

3.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων (ΑΠΣ) είναι μια σπάνια νευροεκφυλιστική διαταραχή που πλήττει περίπου 4-5 στα 100.000 άτομα στην Ευρώπη. Η ασθένεια αυτή παραμένει αβέβαιης αιτιολογίας και τα κλινικά της χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν έναν μεταβλητό συνδυασμό παρκινσονισμού, παρεγκεφαλιδικής βλάβης, αυτόνομων και κινητικών δυσλειτουργιών. Η ΑΠΣ κατατάσσεται στις α-συνουκλείνοπάθειες, δηλαδή νευρολογικές παθήσεις που χαρακτηρίζονται από την ανώμαλη, παθολογική συσσώρευση αδιάλυτων συσσωματωμάτων α-συνουκλείνης σε ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα κυρίως, και σε μικρό ποσοστό σε νευρώνες. Για το κυτταρικό περιβάλλον είναι υψίστης σημασίας να διατηρείται ισορροπία μεταξύ τόσο της σύνθεσης όσο και της αποικοδόμησης των μακρομορίων. Συνεπώς, αυτή η παθολογική συσσώρευση της πρωτεΐνης α-συνουκλείνης έχει συνδεθεί χαρακτηριστικά με την παθοφυσιολογία της ΑΠΣ, κάτι που υπογραμμίζεται και από έρευνες που μελέτησαν μεταθανάτιους ιστούς ασθενών με ΑΠΣ.

Τα τελευταία χρόνια, ολοένα και περισσότερες έρευνες εστιάζουν στο ρόλο της αυτοφαγίας στην αποικοδόμηση της α-συνουκλείνης. Πιο συγκεκριμένα, πειράματα του εργαστηρίου στο οποίο πραγματοποιήθηκε η παρούσα ερευνητική εργασία, έδειξαν ότι η α-συνουκλείνη αποικοδομείται κυρίως μέσω ενός επιλεκτικού τύπου αυτοφαγίας, της αυτοφαγίας διαμεσολαβούμενης από πρωτεΐνες-συναδοούς (CMA). Στην CMA, κυτοσολικές πρωτεΐνες που φέρουν το μοτίβο KFERQ ή βιοχημικά παρόμοιο με αυτό, αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη Hsc70 και άλλες πρωτεΐνες-συναδοούς και οδηγούνται στα λυσοσώματα. Στη λυσοσωμική μεμβράνη αναγνωρίζονται από τον ειδικό υποδοχέα LAMP2A και στη συνέχεια προσλαμβάνονται και αποικοδομούνται στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων. Στο παρελθόν, ο ρόλος της CMA στην απομάκρυνση πρωτεϊνών που συσσωρεύονται παθολογικά στο ΚΝΣ είχε τεθεί υπό αμφισβήτηση. Έπειτα όμως, ευρήματα έδειξαν ότι ο ειδικός υποδοχέας LAMP2A ανευρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες τρωκτικών και πιθανώς η CMA να αποτελεί άμεσο στόχο των τοξικών επιπτώσεων αυτής της παθολογικής συσσώρευσης, οδηγώντας σε νευροεκφύλιση (Xilouri and Stefanis, 2015). Έτσι, η μελέτη της ενεργότητας του CMA μονοπατιού κρίνεται άκρως σημαντική για τη βαθύτερη κατανόηση του παθογενετικού μηχανισμού της ΑΠΣ.

Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, ένας από τους κυρίαρχους λόγους που το CMA μονοπάτι ήταν δύσκολο να μελετηθεί ήταν η έλλειψη μοριακών εργαλείων που να επιτρέπουν την παρακολούθηση των μεταβολών της ενεργότητάς του με μεθόδους ρουτίνας που θα μπορούσαν να εφαρμοστούν σε κάθε εργαστήριο. Μέχρι πρότινος, οι μεταβολές της ενεργότητας της CMA προσδιορίζονταν με μέτρηση της ικανότητας των απομονωμένων

λυσσοσωμάτων να αναγνωρίσουν και να προσλάβουν γνωστά υποστρώματα, με μεθόδους ραδιοεπισήμανσης, μέτρησης της δυνατότητας πρωτεϊνικής αποικοδόμησης παρουσία αναστολέων πρωτεασών κ.α. (Koga *et al.*, 2011).

Στην παρούσα εργασία, σχεδιάστηκε και δημιουργήθηκε ένα μοριακό εργαλείο παρακολούθησης των μεταβολών της ενεργότητας του CMA μονοπατιού σε πραγματικό χρόνο, βασισμένο σε αντίστοιχη προηγούμενη μελέτη (Koga *et al.*, 2011). Πιο συγκεκριμένα, όπως αναλύθηκε παραπάνω, πρόκειται για έναν πλασμιδιακό φορέα που φέρει μεταξύ άλλων αλληλουχία που κωδικοποιεί το μονομερές της φωτοενεργοποιούμενης φθορίζουσας πρωτεΐνης PAmCherry (photoactivatable monomeric Cherry) συζευγμένη με αλληλουχία που κωδικοποιεί το μοτίβο KFERQ, δηλαδή το μοτίβο στόχευσης στη CMA. Δημιουργώντας αυτόν τον πλασμιδιακό φορέα σκοπός ήταν, μετά τη διαμόλυνση διαφορετικών κυτταρικών σειρών ολιγοδενδροκυττάρων, να μπορέσουμε να οπτικοποιήσουμε πιθανές αλλαγές στην ενεργότητα του CMA μονοπατιού. Η πρωτεΐνη PAmCherry λειτούργησε ως πρωτεΐνη-αναφορά για το μοτίβο KFERQ με το οποίο ήταν συζευγμένη, έτσι ώστε να καταστεί δυνατή αυτή η οπτικοποίηση. Η PAmCherry έπειτα από φωτοενεργοποίησή της σε ζωντανά κύτταρα με πρόσπτωση μπλε φωτός εξέπεμπε φθορισμό και έτσι γινόταν ορατή. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης μιας φωτοενεργοποιούμενης φθορίζουσας πρωτεΐνης έναντι μιας συμβατικής φθορίζουσας πρωτεΐνης είναι αρκετά. Αρχικά, η μελέτη των αλλαγών της ενεργότητας της CMA μπορούν να μελετηθούν χωρίς να απαιτείται αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης ή όλων των μονοπατιών πρωτεϊνικής αποικοδόμησης. Επίσης, οι μετρήσεις που γίνονται προς στατιστική ανάλυση έπειτα από λήψη φωτογραφιών στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, δεν “επηρεάζονται” από νεοσυντιθέμενα φθορίζοντα μόρια καθώς, στη δική μας περίπτωση, ο φθορισμός προσομοιάζεται με τη λειτουργία ενός διακόπτη. Παράλληλα, με τη χρήση της PAmCherry διασφαλίζουμε ότι η πρωτεΐνη θα διατηρήσει τα μονομερή της χαρακτηριστικά και στο εσωτερικό του κυττάρου και δεν θα ολιγομεριστεί.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν διαφορετικές σειρές ολιγοδενδροκυττάρων (OLN WT, OLN AS, OLN p25a) και σκοπός ήταν να μελετήσουμε τις μεταβολές της ενεργότητας της CMA σε συνθήκες επαγωγής και αναστολής της λυσοσωμικής λειτουργίας αλλά και στη συνθήκη επώασης των κυττάρων με ανασυνδυασμένες ινιδιακές μορφές της ασυνουκλείνης, ήτοι τις θεωρούμενες τοξικές, παθολογικές της διαμορφώσεις. Η αξιολόγηση των μεταβολών έγινε με άξονα τις μεταβολές που παρατηρήθηκαν τόσο στα επίπεδα της KFERQ-mCherry όσο και του LAMP2A υποδοχέα. Τα αποτελέσματά μας στα ολιγοδενδροκύτταρα αγρίου τύπου έδειξαν ότι η στέρση ορού, που αποτελεί γνωστό επαγωγέα του CMA μονοπατιού, συνοδεύεται από αλλαγή του προτύπου της KFERQ-mCherry από διάχυτο σε σικτό καθώς και από περιπυρηνική συσσώρευση των

λυσσωμάτων. Στα ίδια κύτταρα, η αναστολή της συνολικής λυσοσωμικής λειτουργίας με προσθήκη NH₄Cl, έδειξε έντονη συσσώρευση της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης, καθώς δεν μπορούσε να αποικοδομηθεί επαρκώς μέσω του CMA μονοπατιού ενώ τα επίπεδα του LAMP2A υποδοχέα ήταν πολύ υψηλά σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες που επωάσθηκαν με πλήρες DMEM. Αυτό πιθανώς να αποτελεί έναν αντισταθμιστικό μηχανισμό του κυττάρου στην αναστολή της λυσοσωμικής λειτουργίας. Ενδιαφέρον όμως φέρει η παρατήρηση που προήλθε από τα πειράματα σε ολιγοδενδροκύτταρα αγρίου τύπου που επωάσθηκαν με ανασυνδυασμένες ινιδιακές μορφές της α-συνουκλεΐνης. Και στην περίπτωση αυτή, η πρωτεΐνη KFERQ-mCherry παρουσίασε έντονη συσσώρευση και τα επίπεδα του LAMP2A υποδοχέα αυξήθηκαν σημαντικά, παρόμοια δηλαδή με την εικόνα που παίρνουμε έπειτα από αναστολή της λυσοσωμικής λειτουργίας. Συνεπώς, η έντονη αύξηση του φθορισμού υποδεικνύει, για πρώτη φορά, ότι η συσσώρευση α-συνουκλεΐνης σε ολιγοδενδροκύτταρα αγρίου τύπου οδηγεί σε δυσλειτουργία του CMA μονοπατιού, καθώς και ότι πιθανή στόχευσή του θα μπορούσε στο μέλλον να έχει θεραπευτικές προεκτάσεις. Παρομοίως, έγιναν επώσεις σε OLN AS και OLN p25a κύτταρα έτσι ώστε να επαχθεί ή να ανασταλεί η λυσοσωμική λειτουργία. Στα OLN p25a κύτταρα, δεν παρατηρήθηκαν έντονες διαφορές στα επίπεδα της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης στις συνθήκες στέρησης ορού και προσθήκης χλωριούχου αμμωνίου, ενώ η προσθήκη ινιδιακών μορφών αύξησε σημαντικά τα επίπεδα φθορισμού της πρωτεΐνης. Μετά την προσθήκη χλωριούχου αμμωνίου θα ήταν αναμενόμενο να προκληθεί συσσώρευση της πρωτεΐνης στα OLN p25a, καθώς δεν θα μπορούσε να αποικοδομηθεί από τα λυσοσώματα. Ωστόσο, στα δικά μας αποτελέσματα αυτό δεν συνέβη και μια πιθανή εξήγηση είναι η αντισταθμιστική αύξηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος, κάτι που έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία για διαφορετικούς τύπους κυττάρων (Koga *et al.*, 2011). Όσον αφορά στα OLN AS, παρόμοια με τα OLN WT, παρατηρήθηκε μικρή μείωση των επιπέδων της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης έπειτα από επαγωγή του CMA μονοπατιού με στέρηση ορού και αύξησή τους έπειτα από αναστολή της λυσοσωμικής λειτουργίας. Επωάζοντας τα OLN AS με τις ινιδιακές μορφές της α-συνουκλεΐνης δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της πρωτεΐνης KFERQ-mCherry.

Κατά τη διάρκεια της εν λόγω πειραματικής εργασίας, έγιναν ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις οι οποίες θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σε μελλοντικές μελέτες. Καθώς είναι γνωστό ότι η μακροαυτοφαγία ενεργοποιείται ορισμένες φορές αντισταθμιστικά, ως απάντηση του κυττάρου στη δυσλειτουργία του CMA μονοπατιού (Vogiatzi *et al.*, 2008), μεγάλο ενδιαφέρον θα είχε να μελετηθούν, στις προαναφερθέντες κυτταρικές σειρές, οι μεταβολές της KFERQ-mCherry πρωτεΐνης έπειτα από επαγωγή ή αναστολή της μακροαυτοφαγίας όπως επίσης και μετά από υπερέκφραση ή σίγαση του LAMP2A υποδοχέα.

Καθώς το παρόν μοριακό εργαλείο που κατασκευάστηκε φάνηκε να ανταποκρίνεται επιτυχώς σε συνθήκες μεταβολής της λυσοσωμικής ενεργότητας, θα μπορούσε στο μέλλον να αξιοποιηθεί για την παρακολούθηση του CMA μονοπατιού σε άλλα κυτταρικά μοντέλα, όπως, για παράδειγμα, σε νευρωνικά μοντέλα α-συνουκλείνοπαθειών. Τέλος, το εργαλείο αυτό θα μπορούσε δυνητικά να εφαρμοσθεί αργότερα και σε ζωικά μοντέλα νευροεκφυλιστικών παθήσεων, από όπου και θα αντλούνταν πολύ σημαντικές πληροφορίες για το ρόλο της CMA στην εμφάνιση και εξέλιξη αυτών.

4.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Antonoli M, Di Rienzo M, Piacentini M, & Fimia GM. (2017). Emerging Mechanisms in Initiating and Terminating Autophagy. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(1), 28–41.

Badawy SMM, Okada T, Kajimoto T, Hirase M, Matovelo SA, Nakamura S, Yoshida D, Ijuin T, Nakamura SI (2018). Extracellular α -synuclein drives sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1 out of lipid rafts, leading to impaired inhibitory G-protein signaling. *J Biol Chem*. 293(21):8208-8216.

Barbour R, Kling K, Anderson JP, Banducci K, Cole T, Diep L, Fox M, Goldstein JM, Soriano F, Seubert P, Chilcote TJ. (2008). Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood *Neurodegener Dis*. 5(2):55-9.

Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ. (2011). α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*. 477(7362):107-10.

Bennett MC, Bishop JF, Leng Y, Chock PB, Chase TN, Mouradian MM (1999). Degradation of alpha-synuclein by proteasome. *J Biol Chem* 274:33855–33858.

Bertram L, Tanzi R (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *The journal of clinical investigation*, 115(6):1449- 1457.

Burré J, Sharma M, Südhof T (2015). Definition of a Molecular Pathway Mediating α -Synuclein Neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 35 (13): 5221-5232.

Burré J. (2015). The Synaptic Function of α -Synuclein. *Journal of Parkinson's disease*, 5(4), 699–713.

Cavalli G, Cenci S, (2020) Autophagy and protein secretion, *Journal of Molecular Biology*, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.01.015>.

Dice JF (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* 15(8): 305-309.

Djelloul M, Holmqvist S, Boza-Serrano A, Azevedo C, Yeung MS, Goldwurm S, Frisén J, Deierborg T, Roybon L. (2015). Alpha-Synuclein Expression in the Oligodendrocyte Line-

age: an In Vitro and In Vivo Study Using Rodent and Human Models. *Stem Cell Reports*. 5(2):174-84.

Ebrahimi-Fakhari D, Cantuti-Castelvetri I, Fan Z, Rockenstein E, Masliah E, Hyman BT, McLean PJ, Unni VK (2011). Distinct roles in vivo for the ubiquitin–proteasome system and the autophagy–lysosomal pathway in the degradation of alpha-synuclein. *J Neurosci* 31:14508–14520.

Emmanouilidou E, Stefanis L, Vekrellis K (2010). Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiol Aging* 31:953–968.

Eschlböck S, Benke T, Boesch S, Delazer M, Djamshidian-Tehrani A, Fanciulli A, Granata R, Högl B, Kaindlstorfer C, Kiss G, Krismer F, Mair K, Nocker M, Raccagni C, Scherzer C, Seppi K, Stefani A, Poewe W, Wenning GK (2017). Non-motor symptoms and gender differences in multiple system atrophy (abstr.). *NeuroLogisch Supp* 1, 8.

Ettle B, Reiprich S, Deusser J., Schlachetzki JC, Xiang W, Prots I, Masliah E, Winner B, Wegner M., Winkler J. (2014). Intracellular alpha-synuclein affects early maturation of primary oligodendrocyte progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 62: 68-78.

Fanciulli A, & Wenning GK (2015). Multiple-System Atrophy. *New England Journal of Medicine*, 372(3), 249–263.

Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N (2002). α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4, 160–164.

Furiya Y, Hirano M, Kurumatani N, Nakamuro T, Matsumura R, Futamura N, Ueno S (2005) Alpha-1-antichymotrypsin gene polymorphism and susceptibility to multiple system atrophy (MSA). *Brain Res Mol Brain Res* 138, 178–181.

Furuta K. (1999). Differential expression of the lysosome-associated membrane proteins in normal human tissues. *Arch Biochem Biophys* 365(1): 75-82.

Gardai SJ, Mao W, Schüle B, Babcock M, Schoebel S, Lorenzana C, Alexander J, Kim S, Glick H, Hilton K, Fitzgerald JK, Buttini M, Chiou SS, McConlogue L, Anderson JP, Schenk DB, Bard F, Langston JW, Yednock T, Johnston JA (2013). Elevated alpha-synuclein impairs innate immune cell function and provides a potential peripheral biomarker

for Parkinson's disease. PLoS One. 8(8):e71634.

Gilman S, Wenning GK, Low PA, Brooks DJ, Mathias CJ, Trojanowski JQ, Wood NW, Colosimo C, Dürr A, Fowler CJ, Kaufmann H, Klockgether T, Lees A, Poewe W, Quinn N, Revesz T, Robertson D, Sandroni P, Seppi K, Vidailhet M (2008). Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology*. 71(9):670-6.

Graham JG, Oppenheimer DR (1969). Orthostatic hypotension and nicotine sensitivity in a case of multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 32(1):28-34.

Hasegawa M, Fujiwara H, Nonaka T, Wakabayashi K, Takahashi H, Lee VM, Trojanowski JQ, Mann D, Iwatsubo T (2002) Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J Biol Chem*. 277(50):49071-6.

Heemels, MT (2016). Neurodegenerative diseases. *Nature*, 539(7628), 179–179.

Herbert MK, Eeftens JM, Aerts MB, Esselink RAJ, Bloem BR, Kuiperij HB, Verbeek MM (2014). CSF levels of DJ-1 and tau distinguish MSA patients from PD patients and controls *Parkinsonism and Related Disorders*, 20 (1) 112-115.

Imai Y, Soda M, Takahashi R (2000) Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem* 275:35661–35664.

Jellinger, K. A. (2018). Multiple System Atrophy: An Oligodendroglioneural Synucleinopathy. *Journal of Alzheimer 's disease*, 62(3), 1141–1179.

Kaushik S, Cuervo AM (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 365–381.

Klionsky DJ, Emr S.D. (2000). Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. *Science* 290: 1717–1721.

Koga H, Martinez-Vicente M, Macian F, Verkhusha VV, & Cuervo AM (2011). A photoconvertible fluorescent reporter to track chaperone-mediated autophagy. *Nature Communications*, 2(1).

Laurens B, Constantinescu R, Freeman R, Gerhard A, Jellinger K, Jeromin A, Krismer F, Mollenhauer B, Schlossmacher MG, Shaw LM, Verbeek MM, Wenning GK, Winge

K, Zhang J, Meissner WG (2015). Fluid biomarkers in multiple system atrophy: A review of the MSA Biomarker Initiative. *Neurobiol Dis.* 80:29-41.

Laurens B, Vergnet S, Lopez MC, Foubert-Samier A, Tison F, Fernagut PO, & Meissner WG (2017). Multiple System Atrophy - State of the Art. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 17(5).

Levine B and Klionsky DJ, (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy, *Developmental Cell*, 6(4), 463–477.

Lindersson E, Lundvig D, Petersen C, Madsen P, Nyengaard JR, Højrup P, Moos T, Otzen D, Gai WP, Blumbergs PC, Jensen PH (2005). p25alpha Stimulates alpha-synuclein aggregation and is co-localized with aggregated alpha-synuclein in alpha-synucleinopathies. *J Biol Chem.* 280(7):5703-15.

Longo P, Kavran J, Kim MS, Leahy D (2013). Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI) *Methods Enzymol.* 529: 227–240.

Machiya Y, Hara S, Arawaka S, Fukushima S, Sato H, Sakamoto M, Koyama S, Kato T (2010). Phosphorylated alpha-synuclein at Ser-129 is targeted to the proteasome pathway in a ubiquitin-independent manner. *J Biol Chem* 285:40732–40744.

McCann H, Stevens, CH, Cartwright H, & Halliday GM (2014). α -Synucleinopathy phenotypes. *Parkinsonism & Related Disorders*, 20, S62–S6.

Monzio Compagnoni G, Kleiner G, Samarani M, Aureli M, Faustini G, Bellucci A, Di Fonzo A (2018). Mitochondrial Dysregulation and Impaired Autophagy in iPSC-Derived Dopaminergic Neurons of Multiple System Atrophy. *Stem cell reports*, 11(5), 1185–1198.

Mori A, Ishikawa K-I, Saiki S, Hatano T, Oji Y, Okuzumi A, et al. (2019). Plasma metabolite biomarkers for multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. *PLoS One* 14(9): e0223113.

Nakajima T, Takauchi S, Ohara K, Kokai M, Nishii R, Maeda S, Takanaga A, Tanaka T, Takeda M, Seki M, Morita Y (2005). Alpha-synuclein-positive structures induced in leupeptin-infused rats. *Brain Res* 1040:73–80.

Nassif M, Woehlbier U, Patricio A (2017). Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging. *The Delicate Balance of Autophagy in Neurodegeneration* (12) 19:387-399.

Nee LE, Gomez M, Dambrosia J, Bale S, Eldridge R, Polinsky RJ (1991). Environmental-occupational risk factors in multiple system atrophy: a preliminary investigation. *Clin Auton Res* 1:9–13.

Papp MI, Kahn JE, Lantos PL (1989). Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome) *J Neurol Sci.* 94(1-3):79-100.

Reyes JF, Rey NL, Bousset L, Melki R, Brundin P, Angot E. (2014). Alpha-synuclein transfers from neurons to oligodendrocytes. *Glia.* 62(3):387-98.

Rideout HJ, Stefanis L (2002). Proteasomal inhibition-induced inclusion formation and death in cortical neurons require transcription and ubiquitination. *Mol Cell Neurosci* 21:223–238.

Savica R, Grossardt BR, Bower JH, Ahlskog JE, Boeve BF, Graff-Radford J, Mielke MM. (2017). Survival and Causes of Death Among People With Clinically Diagnosed Synucleinopathies With Parkinsonism: A Population-Based Study. *JAMA neurology*, 74(7), 839–846. doi:10.1001/jamaneurol.2017.0603.

Soma H, Yabe I, Takei A, Fujiki N, Yanagihara T, Sasaki H (2008). Associations between multiple system atrophy and polymorphisms of SLC1A4, SQSTM1, and EIF4EBP1 genes. *Mov Disord* 23, 1161–1167.

Spillantini MG (1999). Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy are alpha-synucleinopathies. *Parkinsonism Relat Disord.* 5(4):157-62.

Stefanova N, Reindl M, Neumann M, Kahle PJ, Poewe W, Wenning GK. (2007). Microglial activation mediates neurodegeneration related to oligodendroglial alpha-synucleinopathy: implications for multiple system atrophy. *Mov Disord.* 22:2196–203.

Stefanova N, Bücke P, Duerr S, & Wenning GK (2009). Multiple system atrophy: an update. *The Lancet Neurology*, 8(12), 1172–1178.

Tofaris GK, Layfield R, Spillantini MG (2001). Alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett* 509:22–26.

Ugalde CL, Lawson VA., Finkelstein DI, & Hill AF (2019). The role of lipids in α -synuclein misfolding and neurotoxicity. *J Biol Chem* 294(23):9016-9028.

Vanacore N, Bonifati V, Fabbrini G, Colosimo C, De Michele G, Marconi R, Nicholl D, Locuratolo N, Talarico G, Romano S, Stocchi F, Bonuccelli U, De Mari M, Vieregge P, Meo G; European Study Group on Atypical Parkinsonism (ESGAP) (2001). Epidemiology of multiple system atrophy. ESGAP Consortium. European Study Group on Atypical Parkinsonisms. *Neurol Sci.* 22(1):97-9.

Vogiatzi, T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L (2008). Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem* 283(35): 23542-23556.

Wakabayashi, K., Yoshimoto, M., Tsuji, S., & Takahashi, H. (1998). α -Synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neuroscience Letters*, 249(2-3), 180–182.

Wen XD, Li HF, Wang HX, Ni W, Dong Y, Wu ZY (2015). Mutation Analysis of COQ2 in Chinese Patients with Cerebellar Subtype of Multiple System Atrophy *CNS Neurosci Ther.* 21(8):626-30.

Wenning GK, Geser F, Krismer F, Seppi K, Duerr S, Boesch S, Köllensperger M, Goebel G, Pfeiffer KP, Barone P, Pellecchia MT, Quinn NP, Koukouni V, Fowler CJ, Schrag A, Mathias CJ, Giladi N, Gurevich T, Dupont E, Ostergaard K, Nilsson CF, Widner H, Oertel W, Eggert KM, Albanese A, del Sorbo F, Tolosa E, Cardozo A, Deuschl G, Hellriegel H, Klockgether T, Dodel R, Sampaio C, Coelho M, Djaldetti R, Melamed E, Gasser T, Kamm C, Meo G, Colosimo C, Rascol O, Meissner WG, Tison F, Poewe W, European Multiple System Atrophy Study Group (2013). The natural history of multiple system atrophy: a prospective European cohort study. *Lancet Neurol.* 12(3):264-74.

Xilouri M, Stefanis L (2016). Chaperone mediated autophagy in aging: Starve to prosper. *Ageing Res. Rev.* 32:13–21.

Xilouri M, & Stefanis L (2015). Chaperone mediated autophagy to the rescue: A new-fangled

target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 66, 29–36.

Xilouri M, Brekk OR, Landeck N, Pitychoutis PM, Papasilekas T, Papadopoulou-Daifoti Z, Kirik D, Stefanis L. (2013). Boosting chaperone-mediated autophagy in vivo mitigates alpha-synuclein-induced neurodegeneration. *Brain* 136 (7): 2130-2146.

Yamagishi Y, Saigoh K, Saito Y., Ogawa I., Mitsui Y., Hamada Y., Samukawa M., Suzuki H., Kuwahara M., Hiran, M., Noguchi N., Kusunoki S. (2018). Diagnosis of Parkinson's disease and the level of oxidized DJ-1 protein. *Neuroscience Research* (128) 58-62.

Yuan NN, Cai CZ, Wu MY, Zhu Q, Su H, Li M, Lu JH. (2019). Canthin-6-One Accelerates Alpha-Synuclein Degradation by Enhancing UPS Activity: Drug Target Identification by CRISPR-Cas9 Whole Genome-Wide Screening Technology. *Frontiers in Pharmacology*, 10.