

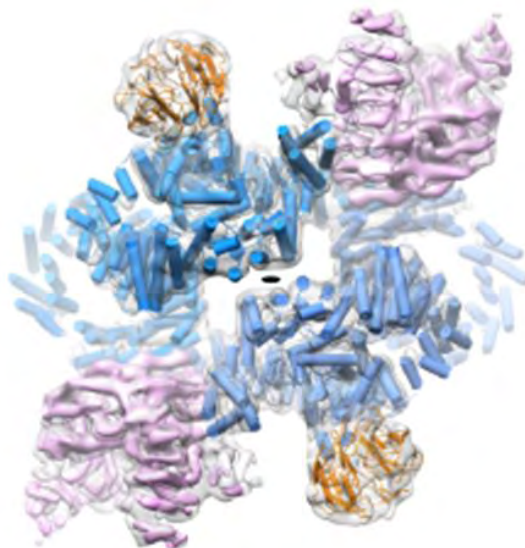
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Ρύθμιση της έκφρασης της α-συνουκλεΐνης από πρωτεΐνες πρόσδεσης RNA”

“Regulation of α -synuclein expression by RNA binding proteins”



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Καλλωνιάτη Κλεοπάτρα του Κωνσταντίνου

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Επαμεινώνδας Δοξάκης

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: Μοριακής και Κυτταρικής Νευροβιολογίας

Λάρισα, 2020

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

Υπεύθυνος Ερευνητής

Επαμεινώνδας Δοξάκης, Ερευνητής Γ', ΙΙΒΕΑΑ

Τριμελής Επιτροπή

Επαμεινώνδας Δοξάκης, Ερευνητής Γ', ΙΙΒΕΑΑ

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής ΤΒΒ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γκάγκος Σαράντης, Ερευνητής Β', ΙΙΒΕΑΑ

Περίληψη

Η α-συνουκλεΐνη (SNCA) αποτελεί μια πρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται κυρίως στα προσυναπτικά άκρα των νευρώνων. Η λειτουργία αυτής δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, αλλά είναι πιθανόν να εμπλέκεται στην συναπτική νευροδιαβίβαση. Η ταυτοποίησή της ως το κύριο συστατικό των σωματίων Lewy (Lewy bodies), καθώς και άλλων νευρογλοιακών κυτταροπλασματικών εγκλείστων την έχει συνδέσει με την παθολογία της νόσου του Πάρκινσον και άλλων νευροεκφυλιστικών νόσων, οι οποίες ονομάζονται α-συνουκλεϊνοπάθειες. Οι μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί που ελέγχουν την έκφραση της α-συνουκλεΐνης δεν έχουν προσδιοριστεί μέχρι στιγμής. Ωστόσο, εναλλακτικά μετάγραφα του mRNA της α-συνουκλεΐνης με διαφορετικό μήκος 3'UTR έχουν εντοπιστεί σε δείγματα από εγκεφαλικό φλοιό μετά θάνατον ασθενών με νόσο του Πάρκινσον, δημιουργώντας το ερώτημα για το αν η ρύθμιση της 3' αμετάφραστης περιοχής μπορεί να παίζει ένα ρόλο-κλειδί στην έκφραση της α-συνουκλεΐνης υπό φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες.

Οι πρωτεΐνες πρόσδεσης RNA (RBPs) εμπλέκονται στο πλήρες φάσμα των γεγονότων επεξεργασίας RNA που αφορά σε εκατοντάδες RNA στόχους στα κύτταρα όπου εκφράζονται, συμπεριλαμβάνοντας την εναλλακτική συρραφή, τη βιογένεση microRNA, τη μεταφορά απ' τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, την αξονική μεταφορά και τοπική τους μετάφραση, διαδικασίες που είναι απαραίτητες για τη νευρωνική ομοίωση και τη συναπτική λειτουργία.

Στην παρούσα εργασία, διερευνήθηκε ο ρόλος του 3'UTR στη ρύθμιση της έκφρασης της α-συνουκλεΐνης καθώς και το πως επηρεάζουν τη σχετική έκφραση του mRNA της οι RBPs TIA-1, HuB, HuD, TDP-43, FUS και RBFOX3, υπό φυσιολογικές και στρες συνθήκες, με την πραγματοποίηση PCR πραγματικού χρόνου. Η ρύθμιση της έκφρασης της α-συνουκλεΐνης μελετήθηκε και με ανάλυση συνεστιακής μικροσκοπίας, αποφέροντας πληροφορίες για την έκφραση και τον εντοπισμό τόσο του mRNA όσο και της ίδιας της πρωτεΐνης, υπό συνθήκες υπερέκφρασης των εναλλακτικών ισομορφών του mRNA της, καθώς και υπό συν-υπερέκφρασή τους με την HuD. Τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου έδειξαν ότι το εναλλακτικό ενδογενές mRNA μετάγραφο της α-συνουκλεΐνης με το μακρύ 3'UTR (2550nt) έχει την τάση να συγκεντρώνεται περισσότερο στο εσωτερικό του πυρήνα απ' ότι στο κυτταρόπλασμα. Οι RBPs HuB, HuD, TDP-43 και FUS εμφάνισαν μια τάση αντιστάθμισης της επίδρασης του κυτταρικού στρες στην σχετική έκφραση των total και full (2550nt 3'UTR) mRNA μεταγράφων της α-συνουκλεΐνης, ενδοπυρηνικά. Η υπερέκφραση της TIA-1, υπό φυσιολογικές συνθήκες, οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα έκφρασης του κυτταροπλασματικού full SNCA mRNA, ενώ υπό συνθήκες στρες, αυξήθηκε η μεταφορά του προς το κυτταρόπλασμα. Από την ανάλυση της μικροσκοπίας, παρατηρήθηκε ότι υπό υπερέκφραση της SNCA mRNA ισομορφής με το μεσαίο μήκος 3'UTR (1080nt), η α-συνουκλεΐνη εντοπιζόταν περισσότερο στους άξονες απ' ότι στο σώμα των νευρώνων. Η HuD δεν αύξησε τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης γενικά, ωστόσο, φάνηκε ότι προωθεί τη μεταφορά του mRNA της προς τους άξονες, κυρίως υπό υπερέκφραση του μεταγράφου με το μακρύ 3'UTR. Κατά την υπερέκφραση του μεταγράφου αυτού, εντοπίστηκαν κοκκία με mRNA α-συνουκλεΐνης στο εσωτερικό των πυρήνων της πλειοψηφίας των κυττάρων, γεγονός που δεν παρατηρούνταν υπό την υπερέκφραση της SNCA mRNA ισομορφής με το βραχύ 3'UTR (570nt).

Abstract

α -synuclein (SNCA) is a protein, which localizes mainly in the presynaptic terminals of neurons. Its function is not fully understood, although it is considered to be implicated in synaptic neurotransmission. The identification of α -synuclein as the main component of Lewy bodies and other cytoplasmic inclusions has connected it with the pathology of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases, termed α -synucleinopathies. The post-transcriptional mechanisms controlling α -synuclein expression are at present unknown. However, specific α -synuclein transcript isoforms with different 3'UTR lengths have been found enriched in cerebral cortex samples of post-mortem PD patients, thus, raising the question of whether the 3'UTR-mediated regulation could play a key role in α -synuclein expression under physiological and pathological conditions.

RNA binding proteins (RBPs) are implicated in the full spectrum of RNA processing events for hundreds of RNA targets in the cells in which they are expressed, including alternative splicing, miRNA biogenesis, nucleo-cytoplasmic trafficking, axodendritic transport and local translation, all of which are indispensable for neuronal homeostasis and synaptic function.

In the present study, the role of the 3'UTR in the regulation of α -synuclein expression was addressed and how the RBPs TIA-1, HuB, HuD, TDP-43, FUS and RBFOX3 alter its relative mRNA expression, under normal and stress-induced conditions, by the performance of Real-Time PCR. The regulation of α -synuclein expression was also evaluated with a confocal microscopy analysis, giving information for both α -synuclein and its mRNA expression and localization, under conditions of overexpression of α -synuclein mRNA isoforms and co-overexpression of the RBP HuD. Results showed that the endogenous α -synuclein mRNA isoform with the long 3'UTR (2550nt) has a tendency to have a higher concentration inside the nucleus rather than in the cytoplasm. The RBPs HuB, HuD, TDP-43 and FUS showed a tendency to counterbalance the effect of the cellular stress in the relative expression of total and full (2550nt) SNCA mRNA transcripts, inside the nucleus. TIA-1 overexpression, under normal conditions, led to a lower cytoplasmic relative expression of the SNCA mRNA transcript with the long 3'UTR, whereas under stress, its transport towards the cytoplasm was elevated. The microscopy analysis showed that overexpression of the SNCA mRNA with the medium 3'UTR length (1080nt) led to a more intense localization of α -synuclein in the axons rather than in the soma of neurons. HuD did not rise the levels of α -synuclein in general, however, it was shown to promote α -synuclein mRNA transport towards the axons, especially when the SNCA mRNA isoform with the long 3'UTR was overexpressed. Under the overexpression of this specific isoform, SNCA mRNA granules were observed inside the nuclei of the majority of neuronal cells, a phenomenon which was absent from cells under the overexpression of the short (570nt) SNCA mRNA isoform.

Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή/ Θεωρητικό Μέρος.....	6
1.1 Η α-συνουκλεΐνη.....	6
1.1.1 Το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης.....	6
1.1.2 Η δομή της α-συνουκλεΐνης.....	7
1.1.3 Φυσιολογικός ρόλος και έκφραση της α-συνουκλεΐνης.....	8
1.2 Παθολογικός ρόλος και έκφραση της α-συνουκλεΐνης.....	9
1.2.1 Α-συνουκλεΐνη και νόσος του Πάρκινσον.....	9
1.2.2 Αιτιολογία της νόσου του Πάρκινσον.....	10
1.2.3 Τοξικότητα α-συνουκλεΐνης και αλληλεπιδράσεις.....	11
1.3 Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης.....	13
1.3.1 Ρύθμιση της έκφρασης της α-συνουκλεΐνης.....	13
1.4 Πρωτεΐνες δέσμησης RNA.....	15
1.4.1 Λειτουργίες των πρωτεϊνών δέσμησης RNA.....	15
1.5 Οι RBPs στο ΚΝΣ.....	18
1.5.1 Η πρωτεΐνη TIA1.....	18
1.5.2 Η οικογένεια των πρωτεϊνών Hu.....	21
1.5.3 Η πρωτεΐνη TDP-43.....	23
1.5.4 Η πρωτεΐνη FUS.....	24
1.5.5 Η πρωτεΐνη RBFOX3/NeuN	26
1.6 Σκοπός της εργασίας.....	27
2. Πειραματικό Μέρος.....	27
2.1 Πειραματικά Υλικά.....	27
2.1.1 Κυτταρικά Συστήματα.....	27
2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς.....	28
2.1.3 Διαλύματα.....	29
2.1.4 Χημικά Αντιδραστήρια.....	31
2.1.5 Αντισώματα.....	31
2.2 Πειραματικές Μέθοδοι.....	31
2.2.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών.....	31
2.2.2 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών.....	32

2.2.3	Κυτταρική Κλασμάτωση.....	32
2.2.4	Απομόνωση RNA.....	33
2.2.5	PCR Αντίστροφης Μεταγραφάσης/ Σύνθεση cDNA.....	34
2.2.6	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.....	35
2.2.7	Ανοσοφθορισμός και Φθορίζων In situ Υβριδισμός.....	37
2.2.8	Συνεστιακή Μικροσκοπία Φθορισμού.....	40
2.2.9	Χρήση λογισμικών προγραμμάτων.....	40
2.2.10	Στατιστική επεξεργασία.....	41
3.	Αποτελέσματα.....	41
3.1	Διευκρίνιση του ρόλου της 3' αμετάφραστης περιοχής στην έξοδο του mRNA της α-συνουκλεΐνης από τον πυρήνα.....	41
3.2	Η επίδραση των πρωτεϊνών δέσμευσης RNA (RBPs) στην έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων του ενδογενούς mRNA της α-συνουκλεΐνης.....	43
3.3	Ανάλυση Συνεστιακής Μικροσκοπίας Φθορισμού.....	52
4.	Συμπεράσματα – Συζήτηση.....	59
5.	Βιβλιογραφία.....	61
6.	Ευχαριστίες.....	80

1. Εισαγωγή / Θεωρητικό Μέρος

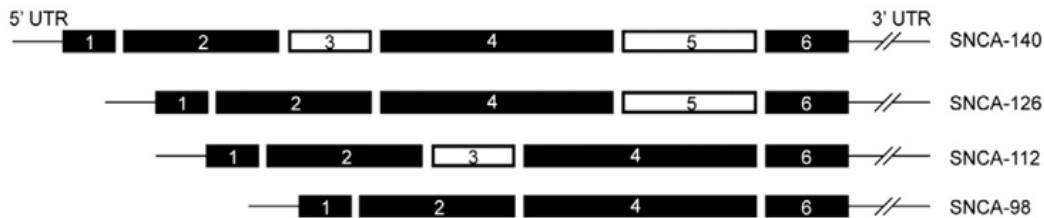
1.1 Η α-συνουκλεΐνη

Η α-συνουκλεΐνη (SNCA) ανήκει μαζί με τη β-συνουκλεΐνη και γ-συνουκλεΐνη στην οικογένεια των συνουκλεΐνών. Αποτελεί μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 14kD, που εκφράζεται σε περίσσεια στο νευρικό σύστημα, καταλαμβάνοντας περίπου το 1% του συνόλου των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, ενώ βρίσκεται εντοπισμένη κυρίως στα προσυναπτικά άκρα των νευρώνων (Stefanis, 2012). Παρότι η φυσιολογική της λειτουργία δεν έχει διευκρινιστεί, υπάρχουν ενδείξεις ότι έχει ρυθμιστικό ρόλο στη συναπτική νευροδιαβίβαση (George *et al.*, 1995; Kholodilov *et al.*, 1999; Abeliovich *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2000; Cabin *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2006). Η α-συνουκλεΐνη εμπλέκεται στη νευροπαθολογική εικόνα διαφόρων νευροεκφυλιστικών ασθενειών αποτελώντας το κυρίαρχο συστατικό σε πρωτεϊνικά ενδοκυτταρικά έγκλειστα, όπως τα σωματίδια Lewy (Lewy bodies), το βασικό παθολογικό γνώρισμα της νόσου του Πάρκινσον (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Singleton *et al.*, 2003; Chartier-Harlin *et al.*, 2004).

1.1.1 Το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την α-συνουκλεΐνη, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4 του ανθρώπινου γονιδιώματος, στην περιοχή 4q21.3-q22 του μεγάλου βραχίονα. Το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης περιλαμβάνει 6 εξώνια από τη μεταγραφή των οποίων

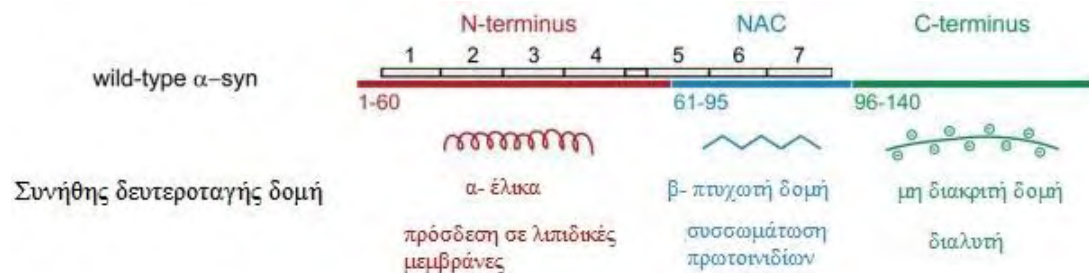
προκύπτει η πλήρους μήκους πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη με 140 αμινοξέα. Ωστόσο, μέσω εναλλακτικής συρραφής προκύπτουν ακόμη 3 μετάγραφα με 126 (παράλειψη του εξωνίου 3), 112 (παράλειψη του εξωνίου 5) και 98 (παράλειψη των εξωνίων 3 και 5) αμινοξέα, αντίστοιχα (McLean *et al.*, 2012).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων πιθανών μεταγράφων από το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης (Προσαρμογή από McLean *et al.* 2012).

1.1.2 Η δομή της α-συνουκλεΐνης

Η α-συνουκλεΐνη αποτελείται από 140 αμινοξέα. Η αμινοτελική της περιοχή είναι υψηλά διατηρημένη, με μεταβλητό αριθμό επαναλήψεων 11 βάσεων ενώ στη λιγότερο συντηρημένη καρβοξυ-τελική της περιοχή παρατηρείται υπερίσχυση των όξινων κατάλοιπων (George, 2002). Η α-συνουκλεΐνη έχει ασταθή δευτεροταγή δομή, επομένως η λειτουργικότητα αυτής βασίζεται σε μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση, η ουβικιτινίωση, η νίτρωση και η διάσπαση. Περιλαμβάνει τρεις κύριες περιοχές: (i) το αμινοτελικό άκρο (1-60 αμινοξέα), που περιέχει μια πολλαπλά επαναλαμβανόμενη αμφίφιλη αλληλουχία (KTKEGV), είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση αυτής σε αρνητικά φορτισμένες λιπιδικές μεμβράνες προκαλώντας διαμόρφωση δομής α- έλικας, (ii) την κεντρική περιοχή (61-95 αμινοξέα), γνωστή ως NAC (non-amyloid beta component), η οποία είναι εξαιρετικά υδρόφοβη και εμπλέκεται στη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης με την τάση διαμόρφωσης β- πτυχωτής δομής και είναι γνωστή ως το μη-αβ αμυλοειδές συστατικό των πλακών της νόσου Alzheimer και, (iii) το καρβοξυ-τελικό άκρο (αμινοξέα 96-140), αρνητικά φορτισμένο και εμπλουτισμένο σε κατάλοιπα προλίνης, το οποίο παρέχει ευελιξία στο πολυπεπτιδίο της α-συνουκλεΐνης προσδίδοντας της μια ακαθόριστη δομή (Vamvaca, Volles and Lansbury, 2009; Villar-Piqué, Lopes da Fonseca and Outeiro, 2016).



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής της α-συνουκλείνης. Παρουσιάζονται οι διακριτές περιοχές της με τη δομή και λειτουργία που προσδίδουν στην πρωτεΐνη (Προσαρμογή από Vamvaca, Volles, and Lansbury 2009).

1.1.3 Φυσιολογικός ρόλος και έκφραση της α-συνουκλείνης

Η α-συνουκλείνη εκφράζεται ευρέως στο νευρικό σύστημα, με μεγαλύτερη συγκέντρωση στον οσφρητικό βολβό (olfactory bulb), στον ιππόκαμπο, στο νεοφλοιό (neocortex), στα γάγγλια των εγκεφαλικών ημισφαιρίων (cerebral ganglia) και στο ραβδωτό σώμα (corpus striatum), ενώ σε μικρότερα ποσοστά στο εγκεφαλικό στέλεχος (brainstem) (Chartier-Harlin *et al.*, 2004; Vance *et al.*, 2010). Εκτός του ΚΝΣ, η α-συνουκλείνη εκφράζεται φυσιολογικά σε αφθονία στα ερυθροκύτταρα και στα αιμοπετάλια, με τη λειτουργία αυτής να παραμένει άγνωστη (Barbour *et al.*, 2008).

Κατά τα τελευταία 20 χρόνια, πολλές υποθετικές λειτουργίες έχουν αποδοθεί στην α-συνουκλείνη, αλλά μέχρι στιγμής ο φυσιολογικός της ρόλος δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Σε πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε υγιείς εγκεφάλους με αντισώματα ειδικά για την α-συνουκλείνη, εντοπίστηκε η έκφραση της πρωτεΐνης κυρίως στα προσυναπτικά άκρα και λιγότερο στο σώμα (Kahle, 2008). Μάλιστα, στα προσυναπτικά άκρα η α-συνουκλείνη φάνηκε να βρίσκεται πολύ κοντά στα συναπτικά κυστίδια αλλά όχι εντός αυτών. Η έκφραση της α-συνουκλείνης επάγεται κατά τη νευρωνική ανάπτυξη ενώ τα επίπεδά της μεταβάλλονται σε καταστάσεις αλλαγής της πλαστικότητας ή φλεγμονής (George *et al.*, 1995; Withers *et al.*, 1997; Kholodilov *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 2000; Vila *et al.*, 2000; Rideout *et al.*, 2003). Σύμφωνα με τα παραπάνω, πειράματα *in vivo* και *in vitro* όπου η απουσία ή η υπερέκφραση της α-συνουκλείνης φανέρωσαν αλλαγές στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών, οδήγησαν στη θεωρία ότι η α-συνουκλείνη μπορεί να ρυθμίζει τη συναπτική διαβίβαση (Abeliovich *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2000; Cabin *et al.*, 2002; Larsen *et al.*, 2006). Ακόμη, έχει προταθεί η δράση της α-συνουκλείνης ως αρνητικός ρυθμιστής της συναπτικής διαβίβασης καθώς η πρωτεΐνη απομακρύνεται από τα συναπτικά κυστίδια σε καταστάσεις επαναλαμβανόμενης νευρωνικής διέγερσης και επανέρχεται σταδιακά (Fortin *et al.*, 2005), ενώ σε μύες όπου δεν εκφράζεται η α-συνουκλείνη, παρατηρήθηκε αυξημένη απελευθέρωση της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα (Abeliovich *et al.*, 2000). Επίσης, είναι πιθανόν η α-συνουκλείνη να συμμετέχει στη βιογένεσή των συναπτικών κυστιδίων μέσω επίδρασης στον μεταβολισμό του φωσφατιδικού οξέος (PA) παρουσιάζοντας την ικανότητα ρύθμισης της δυναμικής των συναπτικών κυστιδίων κατά τη μεταβίβαση του σήματος (D. D. Murphy *et al.*, 2000), και τη δυνατότητα πρόσδεσης σε φωσφολιπίδια όπως το φωσφατιδικό οξύ (Perrin *et al.*, 2000). Επιπλέον, υπάρχει η υπόθεση πως η α-συνουκλείνη δρα ως συνοδός πρωτεΐνη μαζί με την CSP-a (Cysteine-string protein), συμβάλλοντας στη συγκρότηση του συμπλόκου SNARE μέσω δέσμευσης του καρβοξυτελικού άκρου της με το αμινοτελικό άκρο της synaptobrevin-2 (VAMP-2), ελέγχοντας έμμεσα στην απελευθέρωση των συναπτικών κυστιδίων (Chandra *et al.*, 2005; Burré *et al.*, 2010). Πέραν των λειτουργιών της στη συναπτική διαβίβαση, μια πληθώρα από άλλες βιολογικές λειτουργίες έχουν αποδοθεί στην α-συνουκλείνη, όπως η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Surguchev and Surguchov, 2017), η ρύθμιση της απόπτωσης, η ρύθμιση της γλυκόζης και των επιπέδων καλμοδουλίνης και η νευρωνική διαφοροποίηση (Emamzadeh, 2016). Παρόλο που αυτές οι τελευταίες λειτουργίες δεν έχουν διερευνηθεί σε βάθος, παρέχουν ενδείξεις για τη λειτουργία της α-συνουκλείνης ως πλειοτροπικό μόριο.

1.2 Παθολογικός ρόλος και έκφραση της α-συνουκλείνης

Η α-συνουκλείνη ταυτοποιήθηκε το 1997, ως το κύριο συστατικό των σωματίων Lewy (LBs) καθώς και των νευριτών Lewy (LNs), πρωτεϊνικά ενδοκυτταρικά έγκλειστα που είναι χαρακτηριστικά γνωρίσματα της ασθένειας του Πάρκινσον, καθώς και της άνοιας με σωματία Lewy (DLB) (Spillantini *et al.*, 1998a). Παρότι οι δυο αυτές ασθένειες μοιράζονται κοινά παθολογικά χαρακτηριστικά, διαφέρουν ωστόσο στα κλινικά τους συμπτώματα καθώς επηρεάζονται διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου. Στη νόσο του Πάρκινσον η παθολογία παρατηρείται κυρίως στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας και του μεσεγκεφάλου, ενώ στην άνοια με σωματία Lewy επηρεάζεται κυρίως η περιοχή του εγκεφαλικού φλοιού (Jankovic, 2008; Donaghy and McKeith, 2014).

Εκτός των παραπάνω, η α-συνουκλείνη έχει συσχετιστεί και με άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως η ατροφία πολλαπλών συστημάτων (MSA), όπου η α-συνουκλείνη συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα ολιγοδενδροκυττάρων σε δομές γνωστές ως γλοιακά κυτταροπλασματικά έγκλειστα (Spillantini *et al.*, 1998b), ο εκφυλισμός παρουσία σιδήρου στον εγκέφαλο (τύπου I) αλλά και με άλλες νόσους, που είναι γνωστές ως α-συνουκλείνοπάθειες (Kahle, 2008).

1.2.1 Α-συνουκλείνη και νόσος του Πάρκινσον

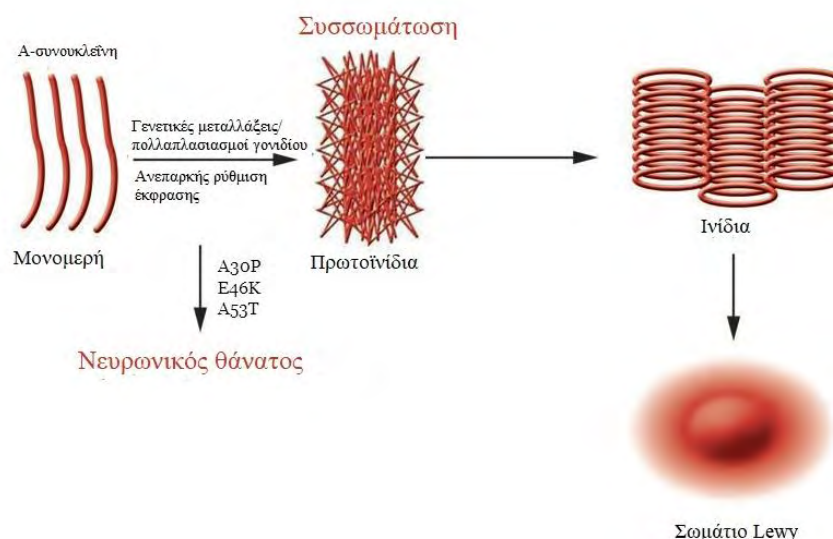
Η νόσος του Πάρκινσον (Parkinson's disease, νΠ) είναι μία χρόνια νευροεκφυλιστική νόσος, η οποία προσβάλλει συνήθως άτομα ηλικίας άνω των 60 ετών. Η κλινική εικόνα της νόσου αποτελείται από κινητικά προβλήματα όπως τρόμο ηρεμίας, δυσκαμψία και βραδυκινησία. Πέραν των κινητικών συμπτωμάτων, οι ασθενείς εμφανίζουν διαταραχές στην όσφρηση και στον ύπνο, δυσκοιλιότητα καθώς και άλλες διαταραχές του αυτόνομου νευρικού συστήματος, ήπιας μορφής κατάθλιψη, και σε μεγάλη ηλικία, έκπτωση των νοητικών λειτουργιών (Jankovic, 2008).

Σε παθολογικό επίπεδο, εκτός των σωματίων Lewy, χαρακτηριστικό της νόσου αποτελεί και η απώλεια νευρικών κυττάρων, κυρίως στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου (Substantia nigra pars compacta, SNpc). Τα κύτταρα της παραπάνω περιοχής παράγουν τον νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη, ως εκ τούτου ο εκφυλισμός τους διαταράσσει τη νευροδιαβίβαση κατά μήκος της μελινοραβδωτής οδού (Jankovic, 2008). Τα LBs εντοπίζονται και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου, όπως στον υπομέλαινα τόπο (locus coeruleus), στο ραχιαίο κινητικό πυρήνα (dorsal motor nucleus), στον οσφρητικό βολβό (olfactory bulb), στους συμπαθητικούς και παρασυμπαθητικούς μεταγαγγλιακούς νευρώνες (parasympathetic και sympathetic post-ganglionic neurons), στην αμυγδαλή (amygdaloid nucleus) και στον εγκεφαλικό φλοιό (cerebral cortex) (Jellinger, 2012).

Σε γενετικό επίπεδο, έχουν ταυτοποιηθεί σημειακές μεταλλάξεις αλλά και διπλασιασμοί ή τριπλασιασμοί του γενετικού τόπου της α-συνουκλείνης σε ασθενείς με αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα της νόσου. Ορισμένες σημειακές μεταλλάξεις αντικατάστασης που έχουν καταγραφεί είναι οι A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E και A53T (Polymeropoulos *et al.*, 1997; Krüger *et al.*, 1998; Zarranz *et al.*, 2004; Lesage *et al.*, 2013; Proukakis *et al.*, 2013; Pasanen *et al.*, 2014). Οι διπλασιασμοί ή τριπλασιασμοί του γενετικού τόπου της α-συνουκλείνης μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση των επιπέδων του mRNA και της πρωτεΐνης και τελικά στη δημιουργία αδιάλυτων συσσωματωμάτων, όπως έχει βρεθεί σε δείγματα εγκεφάλου ασθενών

(Singleton *et al.*, 2003). Παρ' όλα αυτά, τόσο η αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνη όσο και οι μορφές που έχουν προκύψει από τα μεταλλαγμένα μετάγραφα, εμφανίζουν εξ ίσου μειωμένη διαλυτότητα σε υδατικό διάλυμα, με αποτέλεσμα να έχουν ίσως παρόμοια συνεισφορά στο σχηματισμό τοξικών ινιδίων (Giasson *et al.*, 1999a) και ο παθολογικός της ρόλος έχει συσχετιστεί τόσο με τη κληρονομήσιμη όσο και με τη ιδιοπαθή μορφή της νόσου του Πάρκινσον (Stefanis, 2012).

Αρχικά, η λανθασμένα αναδιπλωμένη α-συνουκλεΐνη σχηματίζει διαλυτά ολιγομερή τα οποία συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα. Με την αύξηση της συγκέντρωσής της, τα ολιγομερή συνουκλεΐνης μπορούν να ενωθούν και να σχηματίσουν τοξικά πρωτοϊνίδια και στη συνέχεια αδιάλυτα ινίδια, που αποτελούν συστατικό των σωματίων Lewy, τα οποία σχετίζονται με νευρικό εκφυλισμό και νευρωνικό θάνατο (Spillantini *et al.*, 1998b; Giasson *et al.*, 1999b). Η αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της α-συνουκλεΐνης στον εγκέφαλο ασθενών εντοπίζεται κυρίως στη μέλαινα ουσία με αύξηση των αδιάλυτων συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των μονομερών και ολιγομερών μορφών (Tong *et al.*, 2010).



Εικόνα 3: Τα στάδια ολιγομερισμού της α-συνουκλεΐνης έως τον σχηματισμό σωματίων Lewy. Η τάση της πρωτεΐνης για συσσωμάτωση επηρεάζεται και από γενετικές μεταλλάξεις όπως οι A30P, E46K, A53T (Προσαρμογή από Savitt, Dawson, and Dawson 2006).

1.2.2 Αιτιολογία της νόσου του Πάρκινσον

Δεν υπάρχει σαφής αιτιολογία της παθογένειας της ν.Π. Σε ασθενείς με ν.Π εντοπίζονται μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες και κάποια γονίδια που σχετίζονται με συγγενείς μορφές της νόσου αφορούν στη μιτοχονδριακή λειτουργία. Επιπλέον, λόγω μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, έχει παρατηρηθεί σε εγκεφάλους ασθενών συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), αποτελώντας ένδειξη οξειδωτικού στρες. Έχει αποδειχθεί πως υπό συνθήκες έντονου οξειδωτικού στρες στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, γίνεται λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών οδηγώντας σε συσσωμάτωση των πρωτεϊνών και νευρωνικό εκφυλισμό (Gautier, Kitada and Shen, 2008; Dexter and Jenner, 2013). Ακόμη, κατά τον νευροεκφυλισμό επηρεάζεται η λειτουργία των μηχανισμών αποικοδόμησης των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα την εκτεταμένη συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης (Vekrellis and Stefanis, 2012).

1.2.3 Τοξικότητα α-συνουκλείνης και αλληλεπιδράσεις

Αμυλοειδογενείς πρωτεΐνες όπως η α-συνουκλείνη, προκαλούν διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Ως συνέπεια αυτής της διαπερατότητας, έχουν καταγραφεί δομικές μεταβολές των πλασματικών και ενδοκυττάρων μεμβρανών, αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου και ενεργοποίηση ασβεστοεξαρτώμενων πρωτεασών καθώς και δυσλειτουργία της συναπτικής μετάδοσης. Με τη σειρά της, αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης ασβεστίου οδηγεί σε περαιτέρω έκκριση της α-συνουκλείνης μέσω εξωσωμάτων (Emmanouilidou *et al.*, 2010a). Μέσω της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης μπορεί να επηρεαστεί η ομοιόσταση των νευρικών κυττάρων ακόμα και η επαγωγή φλεγμονωδών αντιδράσεων σε κύτταρα γλοίας, ενισχύοντας έτσι τον νευροεκφυλισμό, μέσω φαγοκύτωσης (Zhang *et al.*, 2005). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες ποντικού (MES κυτταρική σειρά) πως τα ολιγομερή α-συνουκλείνης επηρεάζουν τα κύτταρα αναστέλλοντας τον πολυμερισμό τουμπουλίνης, ενώ μειώνουν την μορφολογία του δικτύου νευριτών στην ανθρώπινη νευρωνική σειρά LUHMES (Chen *et al.*, 2007; Prots *et al.*, 2013). Με υπερέκφραση της α-συνουκλείνης σε κυτταροκαλλιέργειες προκαλείται αποσταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων και, κατά συνέπεια, νευρωνικός εκφυλισμός, που μπορεί να διαμεσολαβείται μέσω υπερφωσφορύλιωσης της πρωτεΐνης Tau (Microtubule-associated protein tau). Τα γεγονότα αυτά, θεωρείται ότι σχετίζονται με την αλληλεπίδραση της α-συνουκλείνης με πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αξονική μεταφορά όπως είναι η τουμπουλίνη, η MAP2 (microtubule-associated protein 2) και η Tau, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται κι η ίδια η αξονική μεταφορά (Lee *et al.*, 2006a; Prots *et al.*, 2013; Gassowska *et al.*, 2014). Εγκέφαλοι ασθενών με ν.Π εμφανίζουν όντως μειωμένα επίπεδα πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αξονική μεταφορά, ιδιαίτερα στους νευρώνες που περιέχουν συσσωματώματα α-συνουκλείνης (Chu *et al.*, 2012).

Η εφαρμογή α-συνουκλείνης, σε μορφή πρωτοϊνιδίων, σε κύτταρα προάγει ισχυρή ενεργοποίηση του παράγοντα απόκρισης στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ), X-box binding protein 1 (Castillo-Carranza *et al.*, 2012). Σε μν μοντέλο ν.Π έχει διαπιστωθεί πως οι νευρώνες που επηρεάζονται από τον παθολογικό ρόλο της α-συνουκλείνης παρουσιάζουν θετική ανατροφοδότηση της έκφρασης των συνοδών πρωτεϊνών του ΕΔ, καθώς και μορφολογικές ανωμαλίες του ΕΔ, ενδεικτικές της δυσλειτουργίας του, καθώς και επαγωγή έκφρασης του παράγοντα ATF4, ο οποίος δρα σε απόκριση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η φαρμακολογική αναστολή του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου καθυστερεί την εμφάνιση συμπτωμάτων της ασθένειας και μειώνει τη συσσώρευση ολιγομερών α-συνουκλείνης. Η παραπάνω διαπίστωση πραγματοποιήθηκε σε μυικά μοντέλα της ν.Π τα οποία, πριν την φαρμακολογική αναστολή του στρες του ΕΔ, παρουσίαζαν συσσώρευση ολιγομερών α-συνουκλείνης στο ΕΔ, καθώς και μορφολογικές ανωμαλίες του ΕΔ, ενδεικτικές της δυσλειτουργίας του (Bellucci *et al.*, 2011; Colla, Coune, *et al.*, 2012; Colla, Jensen, *et al.*, 2012). Ακόμη, έχει παρατηρηθεί πως η υπερέκφραση της α-συνουκλείνης σε κυτταρικές σειρές, σχετίζεται με κατακερματισμό του δικτύου Golgi και καθυστερημένη απόκριση στην αλληλεπίδραση ΕΔ – Golgi (Lee *et al.*, 2006b; Thayanidhi *et al.*, 2010).

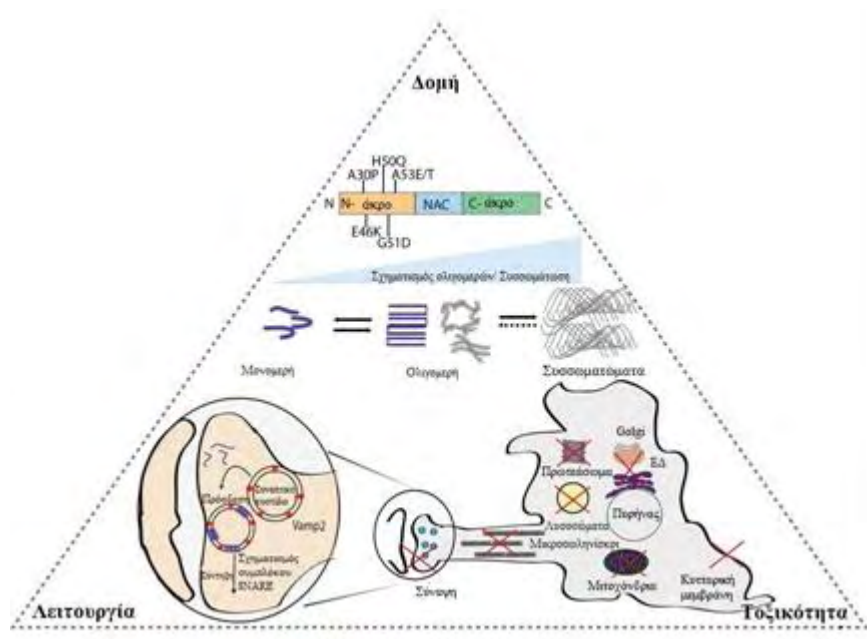
Όσον αφορά τα μιτοχόνδρια, δεν είναι σαφές πως η α-συνουκλείνη επηρεάζει τη λειτουργία τους. Έχει προταθεί πως η επίδραση της α-συνουκλείνης στη λειτουργία των μιτοχονδρίων επιτελείται μέσω του αμινοτελικού της άκρου και είναι πιθανόν να

οδηγεί σε μορφολογική, λειτουργική και δυναμική αλλοίωση τους καθώς και δυσλειτουργία της μιτοχondριακής μακροαυτοφάγias (Xie and Chung, 2012; Nakamura, 2013; Sarafian *et al.*, 2013; Plotegher, Gratton and Bubacco, 2014; Shen *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015).

Καθώς η ίδια η υπερέκφραση α-συνουκλείνης επάγει την έκκριση αυτής από τα νευρικά κύτταρα (Lee, 2008), ένα μεγάλο ποσοστό μελετών αφορά στους μηχανισμούς αποικοδόμησης της α-συνουκλείνης. Είναι πιθανόν η μονομερής α-συνουκλείνη να αποικοδομείται τόσο μέσω πρωτεασώματος όσο και μέσω αυτοφάγias στα λυσοσώματα (Cuervo *et al.*, 2004; Vogiatzi *et al.*, 2008; Ebrahimi-Fakhari *et al.*, 2011). Οι δύο παραπάνω κυτταρικοί μηχανισμοί αποικοδόμησης φαίνεται να επηρεάζονται στις α-συνουκλείνοπάθειες. Σε εγκεφάλους ασθενών με ν.Π παρατηρήθηκε μείωση σε διάφορους λυσοσωμικούς δείκτες (LAMP1, καθεψίνη D και HSP73), ιδιαίτερα σε νευρώνες της μέλαινας ουσίας που περιέχουν α-συνουκλείνη (Chu *et al.*, 2009). Επιπλέον, η αυτοφάγία με τη μεσολάβηση συνοδών πρωτεϊνών βρέθηκε επίσης ότι αναστέλλεται από την παθολογική α-συνουκλείνη σε καλλιιεργημένα κύτταρα. Αυτή η αναστολή, προκαλείται από τη σύνδεση της α-συνουκλείνης με τον LAMP2, έναν ειδικό υποδοχέα του λυσοσώματος, με πιθανό αποτέλεσμα την περαιτέρω συσσώρευση της α-συνουκλείνης και τη διαταραχή ολόκληρης της κυτταρικής ομοιόστασης (Cuervo *et al.*, 2004; Xilouri *et al.*, 2009).

Έχουν ακόμη παρατηρηθεί αλλαγές στο πρωτεάσωμα στη ν.Π, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης της ενζυματικής λειτουργίας του πρωτεασώματος και δομικών αλλοιώσεων αυτού (McNaught and Jenner, 2001; McNaught *et al.*, 2002). Δεν είναι ακόμη σαφές αν η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος είναι αιτία ή συνέπεια του νευροεκφυλισμού (Furukawa *et al.*, 2002).

Συμπερασματικά, καθώς οι «μη φυσιολογικές» μορφές της α-συνουκλείνης ενδέχεται να επηρεάζουν τα συγκεκριμένα συστήματα αποικοδόμησης των πρωτεϊνών (Stefanis *et al.*, 2001; Emmanouilidou *et al.*, 2010b), δημιουργείται έτσι ένας φαύλος κύκλος συσσώρευσης α-συνουκλείνης και αδυναμίας απόκρισης των συστημάτων αποικοδόμησης των πρωτεϊνών για την εξάλειψη της.



Εικόνα 4: Η σχέση μεταξύ δομής, λειτουργίας και τοξικότητας της α-συνουκλείνης. Η πρωτεΐνη μπορεί να υποστεί διεργασίες ολιγομερισμού / πολυμερισμού που σε παθολογικές καταστάσεις μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό αδιάλυτων συσσωματωμάτων, επιβλαβών για αρκετά ενδοκυτταρικά οργανίδια και μονοπάτια (Προσαρμογή από Villar-Piqué et al. 2016).

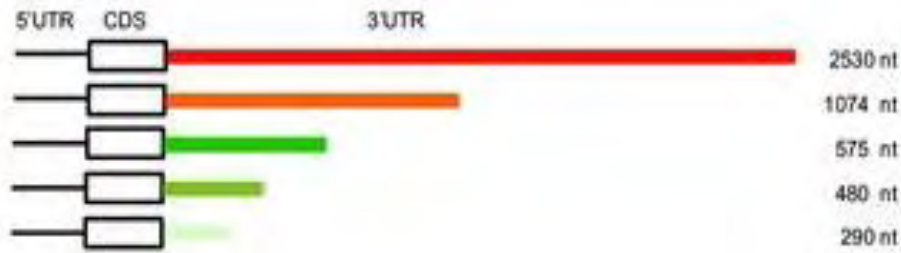
1.3 Ρύθμισης γονιδιακής έκφρασης

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, πραγματοποιείται ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων σε διάφορα στάδια της γονιδιακής έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, η ρύθμιση αυτή γίνεται κατά τη μεταγραφή, μετά τη μεταγραφή, με ωρίμανση και πολυαδενυλίωση του πρόδρομου mRNA, εξαγωγή του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και η ρύθμιση της σταθερότητας ή της αποικοδόμησής του, κατά τη μετάφραση και μετά τη μετάφραση. Οι ρυθμιστικές αυτές διαδικασίες διαμεσολαβούνται κυρίως από ειδικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα πρόσδεσης σε δομές ή αλληλουχίες RNA (RNA-Binding proteins, RBPs), αλλά και από miRs ή μη-κωδικά μεγάλου μήκους RNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs). Αν και όλες οι RBPs συνδέονται με RNAs, η αναγνώριση διαφορετικών αλληλουχιών και τα εξωγενή ερεθίσματα ή ενδοκυττάρια σήματα, επηρεάζουν σημαντικά το χρόνο ή την θέση πρόσδεσής τους σε αυτά (Dreyfuss, Kim and Kataoka, 2002). Παρά το γεγονός ότι οι RBPs μπορούν να επηρεάσουν τα μεταγραφικά/μεταφραστικά επίπεδα μιας πρωτεΐνης, η μελέτη για την επίδραση τους στη ρύθμιση της α-συνουκλείνης αποτελεί ένα σχεδόν ανεξερεύνητο πεδίο έρευνας, μέχρι στιγμής.

1.3.1 Ρύθμιση της έκφρασης της α-συνουκλείνης

Σε μεταγραφικό επίπεδο, θετική ρύθμιση φαίνεται να έχουν οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA1 (Scherzer *et al.*, 2008) και ZSCAN21 (Clough and Stefanis, 2007). Σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, η α-συνουκλείνη ρυθμίζεται από τη σύνδεση των microRNAs (miRs) -7 και -153 στο 3'αμετάφραστο άκρο του RNA με αποτέλεσμα τη μείωση των mRNA και πρωτεϊνικών επιπέδων (Junn *et al.*, 2009; Doxakis, 2010).

Οι 3' αμετάφραστες περιοχές (3'UTRs) των mRNA νευρωνικών γονιδίων εμφανίζουν συχνά μια πολυπλοκότητα στη ρύθμισή τους καθώς διαθέτουν πολλαπλές θέσεις πολυαδενυλίωσης. Οι ισομορφές mRNA με 3' αμετάφραστες περιοχές διαφορετικού μήκους που προκύπτουν μέσω εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης ποικίλουν ανάμεσα στα διαφορετικά είδη κυττάρων και μπορεί να παρέχουν θέσεις πρόσδεσης για διαφορετικές RBPs και microRNAs. Κατ' αυτόν τον τρόπο τα 3'UTRs μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάφραση, τον εντοπισμό και τη σταθερότητα των mRNAs. Το mRNA της ανθρώπινης α-συνουκλείνης, όπως ήταν γνωστό μέχρι και πριν δυο χρόνια, εκφράζεται σε 5 ισομορφές με διαφορετικά μήκη 3' αμετάφραστης περιοχής, από 290 έως 2530 νουκλεοτίδια, ανάλογα με την επιλογή της θέσης πολυαδενυλίωσης (Marchese *et al.*, 2017).



Εικόνα 5: Απεικόνιση των 5 ισομορφών των μεταγράφων της α-συνουκλείνης με διαφορετικό μήκος 3' αμετάφραστης περιοχής. Από κάτω προς τα πάνω, δηλαδή από το βραχύ προς το μακρύ 3'UTR, το μήκος εκτείνεται στα 290, 480, 575, 1074 ή 2530 νουκλεοτίδια (Προσαρμογή από Marchese et al. 2017).

Ωστόσο, σε μια πρόσφατη μελέτη, εντοπίστηκε και μια ακόμη νέα εκτεταμένη ισομορφή του mRNA της α-συνουκλείνης με 3'UTR έως 3775 νουκλεοτίδια σε δείγματα από μέλαινα ουσία μετά θάνατον ανθρώπινων εγκεφάλων, σε επαγόμενους από πολυδύναμα βλαστοκύτταρα ντοπαμινεργικούς νευρώνες, καθώς και σε άλλες ανθρώπινες νευρωνικές κυτταρικές σειρές (Je et al., 2018).

Όσον αφορά την έκφραση των ισομορφών του mRNA της α-συνουκλείνης με διαφορετικό μήκος 3'UTR και τη συσχέτισή τους με τη ν.Π, υπάρχουν διφορούμενα δεδομένα από την επιστημονική κοινότητα. Οι 3' αμετάφραστες περιοχές των mRNAs είναι κρίσιμες για τη στόχευση των μεταγράφων σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα και για τον έλεγχο της μετάφρασης (Andreassi and Riccio, 2009). Σύμφωνα με τη μελέτη των Rhinn et. al (2012), η παρουσία της ισομορφής με το μακρύ 3'UTR (~2500nt) του mRNA της α-συνουκλείνης βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα αυξημένη συγκριτικά με τις υπόλοιπες ισομορφές, σε ιστούς από φλοιό εγκεφάλων ασθενών με ν.Π και να επηρεάζει τη συσσώρευση της α-συνουκλείνης μακριά από τα συναπτικά άκρα, προς τα μιτοχόνδρια. Καθώς η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η ανακατανομή της α-συνουκλείνης από τα συναπτικά άκρα προς το σώμα και τα μιτοχόνδρια είναι χαρακτηριστικά της νευροπαθολογίας της ν.Π, η ισομορφή με το μακρύ 3'UTR του mRNA της α-συνουκλείνης πιθανόν να σχετίζεται με τη παθολογία της νόσου (Rhinn et al., 2012). Αντίθετα, από πειράματα που έγιναν σε κύτταρα του αίματος, τα επίπεδα του mRNA της α-συνουκλείνης με το μακρύ 3'UTR ήταν σημαντικά μειωμένα (27%) στο αίμα των ασθενών με ν.Π. σε σύγκριση με τα controls (Locascio et al., 2015).

Ρυθμιστικοί μηχανισμοί μπορεί να δρουν και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Για παράδειγμα, αρνητική ρύθμιση των επιπέδων της α-συνουκλείνης γίνεται μέσω των συστημάτων αποικοδόμησης του κυττάρου, ενώ δυσλειτουργία αυτών οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της και πιθανόν σε παθολογικό φαινότυπο (Xilouri et al., 2008). Η α-συνουκλείνη μπορεί να υποστεί μετα-μεταφραστικά φωσφορυλίωση, οξειδωση, ουβικουιλίνωση, νιτροσουλίωση ή γλυκοσουλίωση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η φωσφορυλίωση στη σερίνη 129 (Ser 129) και στην τυροσίνη 125 (Tyr 125) του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης, καθώς μπορεί να επηρεάσει την τάση της πρωτεΐνης για δημιουργία συσσωματωμάτων (Venda et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με την ανασκόπηση των Venda et al. 2010, η φωσφορυλίωση στη σερίνη 129 (Ser 129) ενισχύει την πιθανότητα δημιουργίας πρωτοϊνιδίων, ενώ η φωσφορυλίωση στην τυροσίνη 125 (Tyr 125) φαίνεται να την καταστέλλει. Ακόμη, σε

μελέτη των Kim et al. 2006, ταυτοποιήθηκε μια νέα θέση φωσφορυλίωσης της α-συνουκλεΐνης στη σερίνη 87 (Ser 87) από την κινάση Dyrk1A (Kim et al., 2006).

Η α-συνουκλεΐνη έχει 4 κατάλοιπα τυροσίνης, ένα στην αμινο-τελική περιοχή στη θέση Y39 και 3 στην καρβοξυ-τελική στις θέσεις Y125, Y133 και Y136 που μπορούν να νιτροσυλιωθούν. Τόσο οι φωσφορυλιωμένες όσο και οι νιτροσυλιωμένες ή ουβικουιτινωμένες μορφές της πρωτεΐνης έχουν εντοπιστεί στα σωμάτια Lewy, ενώ η νίτρωση της α-συνουκλεΐνης μπορεί να προωθεί το διμερισμό της και την ενσωμάτωση σε αδιάλυτα ινίδια (He, Yu and Chen, 2019).

Τέλος, το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης, μπορεί να υποστεί και επιγενετική ρύθμιση όπως είναι η μεθυλίωση εντός του εσωνίου 1 που οδηγεί σε μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας, όπως επιβεβαιώνεται και από μελέτες σε εγκεφάλους ασθενών με σποραδική μορφή της ν.Π (Jowaed et al., 2010).

1.4 Πρωτεΐνες δέσμησης RNA

Σε δομικό επίπεδο, οι RBPs εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια και ποικιλομορφία. Οι κλασσικές RBPs, δρώντας ως trans-δραστικοί παράγοντες, δεσμεύουν αντιστρεπτά στόχους mRNA μέσω διατηρημένων περιοχών δέσμησης RNA (RBDs) που συνήθως βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα (συνήθως δύο ή τρία) και / ή σε διαφορετικούς συνδυασμούς εντός της ίδιας πρωτεΐνης. Μια περιοχή δέσμησης συνήθως αναγνωρίζει 2-6 νουκλεοτίδια σε μια αλληλουχία RNA και επομένως όσο περισσότερες περιοχές δέσμησης έχει μια πρωτεΐνη τόσο πιο ισχυρή είναι η σύνδεσή της με το RNA-στόχο (Maris, Dominguez and Allain, 2005). Διακρίνονται σε τέσσερις ευρείες κατηγορίες:

- i. Αυτές με τους τρεις μονόκλωνους τομείς αναγνώρισης RNA που περιλαμβάνουν το μοτίβο αναγνώρισης RNA (RRM) (Daubner, Cléry and Allain, 2013)
- ii. Τις ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (HNRNP) με περιοχή πρόσδεσης KH (Nicastro, Taylor and Ramos, 2015)
- iii. Αυτές με περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου (Znf) (Nguyen et al., 2011) και
- iv. Εκείνες που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν διπλές ελικοειδείς δομές RNA(dsRBD) (Gleghorn and Maquat, 2014)

Γενικά, κάθε RBD έχει ενδιάμεση συγγένεια και εξειδίκευση για τους στόχους RNA ωστόσο, η ισχυρή και επιλεκτική δέσμευση επιτυγχάνεται με τη συνδυαστική χρήση παρακείμενων RBD. Επιπλέον, οι περισσότερες RBPs έχουν εγγενώς περιοχές χωρίς σαφή δομή, που χαρακτηρίζονται από μονότονες επαναλήψεις διακριτών αμινοξέων όπως οι επαναλήψεις R / G, S / R και K / R που εμποδίζουν την αναδίπλωση σε σταθερή δευτεροταγή ή τριτοταγή δομή (Järvelin et al., 2016).

1.4.1 Λειτουργίες των πρωτεϊνών δέσμησης RNA

Οι RBPs λειτουργούν σε διάφορα στάδια του κύκλου ζωής του RNA, από τη μεταγραφή, την εναλλακτική συρραφή, την πολυαδενυλίωση, έως και τη μεταφορά και τη μετάφραση του. Διατάραξη της λειτουργίας των RBPs μπορεί να οδηγήσει σε

απορρύθμιση της πρωτεϊνικής ομοιόστασης και της κυτταρικής λειτουργίας (Doxakis, 2014a; Ravanidis, Kattan and Doxakis, 2018a).

Εναλλακτική Συρραφή

Τουλάχιστον το 74% των ανθρώπινων γονιδίων εκφράζουν mRNAs τα οποία πρόκειται να υποστούν εναλλακτική συρραφή (Johnson *et al.*, 2003). Τη διαδικασία αυτή ρυθμίζουν, μεταξύ άλλων μορίων, και οι RBPs. Για παράδειγμα, οι νευρωνικές πρωτεΐνες της οικογένειας Nova ελέγχουν την εναλλακτική συρραφή πολλών πρόδρομων μορίων mRNA αναγνωρίζοντας την αλληλουχία YCAY στα εσώνια (όπου Y πυριμιδίνη, U ή C). Η πλειοψηφία των στόχων των πρωτεϊνών Nova είναι mRNAs που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με λειτουργικό ρόλο στη συναπτική δραστηριότητα και πλαστικότητα. Η μη φυσιολογική έκφραση των πρωτεϊνών Nova σε ορισμένους καρκίνους εκτός του ΝΣ, εκδηλώνεται σαν αυτοάνοση παρανεοπλασματική νευρολογική διαταραχή (Buckanovich, Posner and Darnell, 1993).

Πολυαδενυλίωση

Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό διαφορετικών πρωτεϊνικών μορίων από το ίδιο πρώιμο mRNA, στην περίπτωση που λαμβάνει χώρα σε αλληλουχία εσωτερικού εξωνίου, είτε στην παραγωγή μεταγράφων με διαφορετικό μήκος 3'UTR (Doxakis, 2014b). Όπως προαναφέρθηκε, από το ίδιο γονίδιο μπορεί να παραχθούν μόρια mRNA με διαφορετικό μήκος 3'UTR ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο ή τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται το κύτταρο. Έτσι, 3'UTR μικρού μήκους, συναντώνται στη φάση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ενώ μεγαλύτερου μήκους 3'UTR σχετίζονται με τη διαφοροποίηση των κυττάρων και την ανάπτυξη του οργανισμού εν γένει, αλλά και συγκεκριμένα του ΚΝΣ (Ji *et al.*, 2009; Paschou *et al.*, 2012). Η πολυαδενυλίωση ενός mRNA, η οποία εξαρτάται από RBPs, έχει ισχυρή επίδραση στη μεταφορά του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, τη μετάφραση καθώς και στη σταθερότητά του. Όλα τα ευκαρυωτικά mRNAs, με εξαίρεση τα mRNA των ιστονών, υφίστανται επεξεργασία για να λάβουν 3' πολυ (A) άκρα μήκους περίπου 200 νουκλεοτιδίων (Minvielle-Sebastia and Keller, 1999a).

Κατά την πολυαδενυλίωση το μετάγραφο διασπάται μεταξύ της εξαιρετικά συντηρημένης περιοχής AAUAAA και μιας ακολουθίας πλούσιας σε U/GU και μετά την περιοχή διάσπασης, η πολυ (A) πολυμεράση προσθέτει το πολυ (A) άκρο (Minvielle-Sebastia and Keller, 1999b). Ανάλογα με το μήκος της 3' αμετάφραστης περιοχής του, το κάθε mRNA μπορεί να συνδέεται με διαφορετική συγγένεια και σε διαφορετικές θέσεις με μια πληθώρα RBPs και miRs, στην περιοχή του 3'UTR, που με τη σειρά τους ρυθμίζουν τη σταθερότητα του mRNA μορίου με θετικό ή με αρνητικό αντίκτυπο.

Έχει δειχθεί ότι η οικογένεια των πρωτεϊνών ELAVL / HU καταστέλλει την προσθήκη του πολυ(A) άκρου μέσω της πρόσδεσής της στην ακολουθία πλούσια σε U/GU. Επίσης, η εναλλακτική πολυαδενυλίωση φαίνεται να επηρεάζει τον εντοπισμό των mRNAs. Για παράδειγμα, το mRNA του νευροτροφικού παράγοντα BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) επεξεργάζεται σε δύο μετάγραφα με ένα μακρύ 3'UTR ή ένα βραχύ 3'UTR, που κωδικοποιούν την ίδια πρωτεΐνη. Το mRNA με το βραχύ 3'UTR απαντάται στο σώμα των νευρώνων, ενώ το mRNA με το μακρύ 3'UTR στους δένδριτες. Η RBP CPEB1 μεσολαβεί στη στόχευση του BDNF στους δένδριτες και η RBP HuD στη σταθερότητα του mRNA με το μακρύ 3'UTR, μέσω της πρόσδεσής τη στην ακολουθία πλούσια σε AU (Doxakis 2014).

Μεταφορά του mRNA

Για την εξαγωγή του mRNA από τον πυρήνα, δημιουργείται ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών με το μόριο mRNA, στη συνέχεια το σύμπλοκο μεταφέρεται μέσω των πυρηνικών πόρων και τελικά απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχουν και RBPs (Grüter *et al.*, 1998). Οι RBPs ελέγχουν τη μεταφορά mRNA κατά μήκος των νευρώνων και των δενδριτών, τον υποκυτταρικό εντοπισμό ή την τοπική μετάφραση που εξαρτάται από την κυτταρική δραστηριότητα (Doxakis 2014). Επιπλέον, διαφορετικές RBPs μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με το ίδιο RNA σε διαφορετικές θέσεις δέσμησης ή να ανταγωνίζονται για την ίδια θέση σύνδεσης αυξάνοντας την πολυπλοκότητα της ρύθμισης (Lal *et al.*, 2004).

Μετάφραση του mRNA

Οι RBPs μπορούν να έχουν ρυθμιστικό ρόλο και στο επίπεδο της μετάφρασης συμμετέχοντας στο σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης. Μάλιστα, κατά τη διαφοροποίηση ή τον σχηματισμό των συνάψεων, πολλές RBPs συμβάλλουν στη μεταφορά των mRNAs στους δενδρίτες και στα προσυναπτικά άκρα, για να ακολουθήσει η μετάφρασή τους. Παράδειγμα τέτοιας πρωτεΐνης αποτελεί η FMRP η οποία, συμβάλλει στη μεταφορά και μετάφραση πολλών mRNAs στις συνάψεις. Δυσλειτουργία της FMRP, σχετίζεται άμεσα με το σύνδρομο του Εύθραυστου X (Fragile-X Syndrome)(Christie *et al.*, 2009).

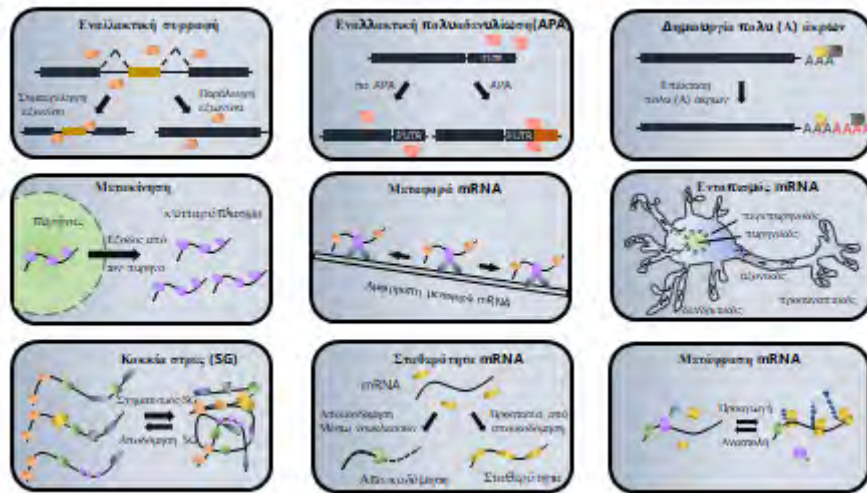
Ρύθμιση της σταθερότητας ή αποικοδόμησης των mRNAs

Ο κύκλος ζωής και η σταθερότητά του mRNA επηρεάζονται μεταξύ άλλων από στοιχεία ARE (περιοχές πλούσιες σε αδενίνη και ουρακίλη), που αποτελούνται από πέντε (AUUUA) ή και παραπάνω νουκλεοτίδια. Ένα μετάγραφο μπορεί να περιέχει παραπάνω του ενός ARE ενώ ο αριθμός αυτός μπορεί να καθορίσει την εξέλιξη του μορίου. Υπάρχουν πρωτεΐνες πρόσδεσης σε AREs (ARE-BPs), που συμβάλουν στην αποικοδόμηση του mRNA με στρατολόγηση διαφόρων παραγόντων (Barreau, Paillard and Osborne, 2005; Łabno, Tomecki and Dziembowski, 2016). Οι RBPs συμμετέχουν στη ρύθμιση της αποικοδόμησης των mRNAs μέσω ανταγωνισμού πρόσδεσης με αποσταθεροποιητικές πρωτεΐνες επηρεάζοντας θετικά τη σταθερότητα και μετάφραση των μορίων mRNA που είναι πλούσια σε AU σε διάφορους ιστούς, όπως είναι ο εγκέφαλος. Παράδειγμα τέτοιων πρωτεϊνών είναι οι ELAVL / HU που συμμετέχουν σε διεργασίες πρόληψης της αποικοδόμησης καθώς περιέχουν περιοχές πρόσδεσης σε αδενίνη και ουρακίλη και σταθεροποιούν πληθώρα μορίων όπως τα c-fos, GM-CSF, και EGF (Keene, 1999).

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

Τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά την μεταγραφή, οι RBPs συνδέονται με τους στόχους mRNA για τη διευκόλυνση της επεξεργασίας των προ-mRNAs. Προσελκύοντας κι άλλες ίδιες ή διαφορετικές RBPs, κατασκευάζουν μεγαλύτερα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά κοκκία (RNP) γύρω από το σκελετό του mRNA στόχου. Η αλληλεπίδραση μεταξύ δεσμευμένων RBP και του mRNA καθορίζει τελικά τον εντοπισμό του μεταγραφήματος και την επακόλουθη μετάφραση ή αποικοδόμηση. Τα RNP κοκκία είναι εξαιρετικά δυναμικά στη φύση, συναρμολογούνται και διαχωρίζονται ανάλογα με το τοπικό περιβάλλον. Σε ακραίες συνθήκες κυτταρικού στρες, όπως υποξία, θερμικό σοκ ή οξειδωτικό στρες, συναθροίζονται και συσκευάζονται σε αναστρέψιμα κοκκία στρες χωρίς μεμβράνη (SGs) τα οποία αναστέλλουν τη μετάφραση, προκειμένου να διατηρηθεί η ενέργεια και να ελαχιστοποιηθεί η βλάβη που σχετίζεται με την καταπόνηση. Αυτή η επίδραση προκαλείται κυρίως από τη μεταφορά στον πυρήνα RBPs όπως οι TIA1 / TIAR, η G3BP, το σύμπλεγμα eIF3 και

η πρωτεΐνη σύνδεσης πολυ (A) άκρων (PABP). Αξίζει να αναφερθεί ότι πολλές μεταλλάξεις που αφορούν RBPs (π.χ., TDP43, FUS, TIA1) σχετίζονται με την αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση και την μετωποκροταφική άνοια (ALS / FTD). Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν στον σχηματισμό παράτυπων SGs τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* υποδηλώνοντας ότι η εσφαλμένη θέση mRNA ή και η απώλεια της λειτουργίας RBPs μπορεί να είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό των παθογενών νευροεκφυλιστικών μηχανισμών (Doxakis, 2014a; Protter and Parker, 2016).



Εικόνα 6: Απεικόνιση των ρόλων των RBPs (Προσαρμογή από Ravanidis, Kattan, and Doxakis 2018b).

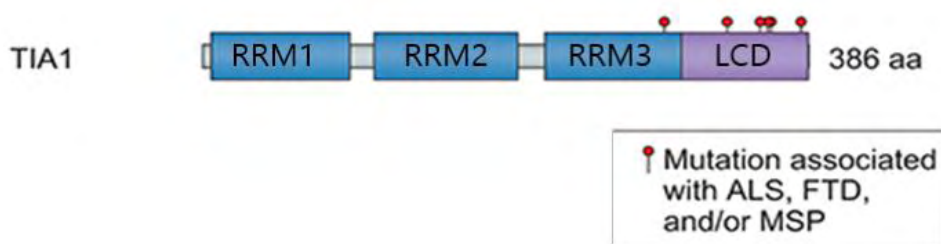
1.5 Οι RBPs στο ΚΝΣ

1.5.1 Η πρωτεΐνη TIA-1 (T-Cell Intracellular Antigen)

Η TIA-1 είναι μια υψηλά συντηρημένη πρωτεΐνη πρόσδεσης DNA/RNA 46 kDa. Αρχικά, οι TIA-1 και TIAR (TIA-1 Related/Like Protein), που παρουσιάζουν κατά 80% ομολογία σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ανακαλύφθηκαν ως συστατικά κυτταροτοξικών T-λεμφοκυτταρικών κοκκίων. Παρότι κατανέμονται ευρέως στους ιστούς, εκφράζονται κατά κύριο λόγο στον εγκέφαλο, στους όρχεις και στον σπλήνα (Kawakami *et al.*, 1992; Beck *et al.*, 1996). Η TIA-1 αποτελείται από 386 αμινοξέα και απαρτίζεται από τρεις περιοχές αναγνώρισης RNA (RRMs), την RRM1 (εξώνια 1-4), την RRM2 (εξώνια 5-8), την RRM3 (εξώνια 9-11) και μια καρβοξυτελική περιοχή (εξώνια 12-13) χαμηλής πολυπλοκότητας (low complexity domain, LCD) πλούσια σε κατάλοιπα γλουταμίνης (Förch *et al.*, 2002; Gilks *et al.*, 2004; Mackenzie *et al.*, 2017). Στον άνθρωπο, η TIA-1 εκφράζεται σε δυο ισομορφές, που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα, την TIA-1a και TIA-1b, οι οποίες παρουσιάζουν παρόμοιο υποκυτταρικό εντοπισμό και ικανότητα πρόσδεσης RNA. Στην ισομορφή TIA-1b έχει συμβεί παράλειψη του εξωνίου 5, μιας αλληλουχίας 11 αμινοξέων ανοδικά της RRM2 περιοχής, με αποτέλεσμα να παράγεται η πρωτεΐνη με 375 αμινοξέα. Χάρη στην παράλειψη αυτή, η ισομορφή TIA-1b έχει χαρακτηριστεί ότι διαθέτει ενισχυμένη ενεργότητα συρραφής σε σύγκριση με την TIA-1a, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Izquierdo and Valcárcel, 2007).

Τόσο η καρβοξυτελική περιοχή χαμηλής πολυπλοκότητας όσο και η αμινοτελική RRM1 περιοχή εμπλέκονται στη στρατολόγηση της U1 μικρής πυρηνικής ριβονουκλεοπρωτεΐνης στις ρυθμιζόμενες θέσεις μάτισματος. Η απομονωμένη RRM1

έχει βρεθεί ότι προσδένει μονόκλινα DNA μόρια αλλά όχι RNA, ωστόσο η παρουσία της μπορεί να αυξάνει τη συγγένεια πρόσδεσης για κάποιες αλληλουχίες RNA (Förch *et al.*, 2002; Suswam *et al.*, 2005). Η RRM2 περιοχή είναι απαραίτητη για την πρόσδεση της TIA-1 σε στοιχεία ARE, περιοχές πλούσιες σε κατάλοιπα αδενίνης και ουρακίλης (πενταμερή UUUUA ή AUUUU), ενώ η RMM3 συμβάλλει σε αυτού του είδους την πρόσδεση με χαμηλότερη συγγένεια και εξειδίκευση (Dember *et al.*, 1996; Bauer *et al.*, 2012).



Εικόνα 7: Απεικόνιση των τριών περιοχών αναγνώρισης RNA (RRMs) και της περιοχής χαμηλής πολυπλοκότητας, πλούσιας σε κατάλοιπα γλουταμίνης στην πρωτεΐνη TIA-1, καθώς επίσης και των θέσεων που εμφανίζονται μεταλλάξεις σχετικές με την αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση, τη μετωπιοκρατική άνοια ή την πρωτεϊνοπάθεια πολλαπλών συστημάτων (προσαρμογή από (Purice and Taylor, 2018)).

Γενικά, η TIA-1 εμπλέκεται στην επεξεργασία RNA-στόχων και στη ρύθμιση της μετάφρασης, ρυθμίζοντας κυρίως την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση, τη φλεγμονή και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Förch *et al.*, 2002; Dixon *et al.*, 2003; Reyes, Alcalde and Izquierdo, 2009; Sánchez-Jiménez and Izquierdo, 2013; Heck *et al.*, 2014). Η TIA-1 έχει δειχθεί ότι δεσμεύει τόσο την RNA πολυμεράση II όσο και τμήματα μονόκλωνου DNA πλούσια σε θυμίνη για την ρύθμιση της μεταγραφής και της εναλλακτικής συρραφής του πρώιμου mRNA. Για την εναλλακτική συρραφή mRNA, η TIA-1 δεσμεύεται σε πενταμερή πλούσια σε U κοντά στο 5' άκρο σε στοχευμένα ιντρόνια, για να καταστεί δυνατή η πρόσδεση U1 snRNP και η επακόλουθη ένταξη του παρακείμενου εξωνίου. Εκτιμάται ότι περίπου το 15% των εξωνίων στην εναλλακτική συρραφή ρυθμίζονται από την πρόσδεση TIA-1 σε αυτές τις θέσεις (Zhu *et al.*, 2003; Suswam *et al.*, 2005; Aznarez *et al.*, 2008; H. S. Kim *et al.*, 2013; Meyer *et al.*, 2018). Σε συνθήκες κυτταρικού στρες, η TIA-1 μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα για να καταστείλει την μετάφραση του mRNA στόχου μέσω δέσμευσης του και σχηματισμού κοκκίων στρες (SG). Παρά το γεγονός ότι, άλλες RBPs (π.χ. IGF2BP1 ή HUR), που έχουν τη δυνατότητα συναρμολόγησης SG, συνδέονται σταθερά με αυτά, η TIA-1 συνδέεται μόνο παροδικά με SGs, προωθώντας συνεχώς τη δημιουργία SGs με αναδιαμόρφωση των mRNP κοκκίων. Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, η TIA-1 οξειδώνεται από δραστικές ρίζες οξυγόνου, αναστέλλει το σχηματισμό SGs και οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση. Επομένως, η παρεμπόδιση σχηματισμού SGs μπορεί να συσχετίζεται με την επαγωγή κυτταρικού θανάτου (Bley *et al.*, 2015).

Εκτός από το ρόλο της στο μάτισμα, η TIA-1 είναι ικανή να προωθήσει ή να αναστείλει τη μετάφραση του mRNA μέσω της πρόσδεσής της στην 3' αμετάφραστη περιοχή και στα στοιχεία ARE στο κυτταρόπλασμα κατά τη διάρκεια του περιβαλλοντικού στρες. Επίσης, η TIA-1 έχει αναγνωριστεί ως ένας αποπτωτικός παράγοντας που μεσολαβεί στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω του ματίσματος του πρόδρομου

mRNA της κινάσης Fas, από το οποίο κωδικοποιείται μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που στοχεύει στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Wang *et al.*, 2014).

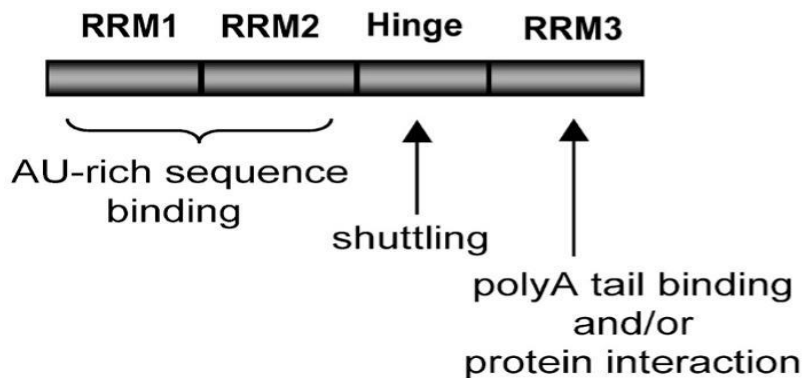
Από πειράματα *in vitro*, αλλά και *in vivo*, καταστολής της έκφρασης και υπερέκφρασης των πρωτεϊνών TIAR και ELAVL1 (HUR), βρέθηκε ότι οι δυο αυτές RBPs αλληλοεπιδρούν άμεσα με το mRNA της α -συνουκλεΐνης, μέσω της πρόσδεσής τους σε διάφορες θέσεις πάνω στο 3'UTR του mRNA της. Διαπιστώθηκε ότι η πρόσδεση με υψηλότερη συγγένεια αφορά στην ισομορφία με το βραχύ 3'UTR (στην περιοχή μεταξύ 190-575 nt), η οποία χαρακτηρίστηκε ως η μεταφραστικά ενεργότερη και σε μεγαλύτερη αφθονία ισομορφία, στις κυτταρικές σειρές SH-SY5Y και HeLa (~50% του συνολικού SNCA mRNA). Η αλληλεπίδραση των TIAR και ELAVL1 με την 3' αμετάφραστη περιοχή του SNCA mRNA οδηγεί στη θετική ρύθμιση της ενδογενούς α -συνουκλεΐνης, καθώς φάνηκε ότι σταθεροποιούν το mRNA της, ενώ όσον αφορά τη μετάφραση, η TIAR προωθεί τη πρωτεϊνοσύνθεση, στρατολογώντας το SNCA mRNA προς τις ριβοσωμικές υπομονάδες υψηλού μοριακού βάρους. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε μετά θάνατον ιστούς εγκεφάλων από ασθενείς με ν.Π. και Ατροφία Πολλαπλών Συστημάτων (MSA), τα επίπεδα των πρωτεϊνών TIAR και ELAVL1 είχαν επηρεαστεί. Σε αντιστοιχία με τα επίπεδα της α -συνουκλεΐνης, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της TIAR στα κύτταρα με ν.Π., ενώ τα επίπεδα της ELAVL1 ήταν αυξημένα στα κύτταρα με MSA (Marchese *et al.*, 2017).

Το TIA1 είναι ένα από τα πιο πρόσφατα γονίδια που αναγνωρίζονται για το ρόλο τους στο ALS / FTD. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της TIA-1 που έχουν συσχετιστεί με το φαινότυπο των ασθενειών, προκαλούν αλλαγές στις βιοφυσικές ιδιότητες της πρωτεΐνης TIA-1 με αποτέλεσμα την καθυστερημένη αποσυναρμολόγηση SGs και τη συσσώρευση στάσιμων SGs που περιλαμβάνουν TDP43 (Mackenzie *et al.*, 2017). Μελέτες που έγιναν σε κύτταρα HEK293, με διπλή αποσιώπηση των γονιδίων TIA1 και TIAR, παρουσίαζαν αύξηση των επιπέδων mRNA στόχων και συσσώρευση mRNAs που είχαν προέλθει από ανώμαλο μάτισμα, με αποτέλεσμα να οδηγούνται στην επακόλουθη αποικοδόμησή τους (Meyer *et al.*, 2018). Επιπλέον, η απενεργοποίηση της TIA-1 σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού συσχετίστηκε με μειωμένο πολλαπλασιασμό, μεγαλύτερο κυτταρικό κύκλο, αυξημένο μέγεθος κυττάρων καθώς και μεταβολική απορρύθμιση, αυξημένα επίπεδα ROS και βλάβες του DNA, προωθώντας εν τέλει μία μέτρια αύξηση στον κυτταρικό θάνατο (Sánchez-Jiménez and Izquierdo, 2013).

Πέραν των νόσων ALS και FTD, μελέτες έχουν δείξει ισχυρή συσχέτιση της TIA-1 με την παθοφυσιολογία Tau. Η πρωτεΐνη Tau έχει ομοιοστατικό ρόλο στο νευρικό σύστημα, καθώς δεσμεύει και σταθεροποιεί το δίκτυο των μικροϊνιδίων στους άξονες, προωθεί την επιμήκυνσή τους και την ταχεία αξονική μεταφορά. Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στη νόσο Alzheimer, η Tau σχηματίζει τοξικά ολιγομερή και ινίδια στο σώμα και στους δενδρίτες, ενώ αυξάνει τον εντοπισμό της TIA-1 σε αυτά τα κυτταρικά διαμερίσματα, επιταχύνοντας το σχηματισμό SGs με μειωμένη κινητικότητα (Kolařova *et al.*, 2012). Αντίστοιχα, μελέτες έδειξαν πως η έκφραση της TIA-1 σχετίζεται με τη δημιουργία SGs και των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους καθώς και με τη συσσώρευση ολιγομερών της πρωτεΐνης Tau. Πιο συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της TIA-1 σε καλλιεργημένους νευρώνες του ιππόκαμπτου, προκάλεσε λανθασμένη αναδίπλωση της Tau και οδήγησε σε απώλεια αξονικών άκρων και αυξημένη έκφραση αποπτωτικών δεικτών και τοξικότητα. Αντίστοιχα, με μείωση της έκφρασης της TIA1 παρατηρήθηκε αναστολή της συσσώρευσης των ολιγομερών Tau και αυξημένη νευρωνική επιβίωση, καθώς και βελτιωμένη κλινική εικόνα και διάρκεια ζωής (Vanderweyde *et al.*, 2016).

1.5.2 Η οικογένεια των πρωτεϊνών Hu

Οι Hu πρωτεΐνες είναι ομόλογες της νευρωνικής ELAV (embryonic lethal abnormal vision) πρωτεΐνης της *Drosophila melanogaster* και περιλαμβάνουν 4 μέλη στα σπονδυλωτά: τη HuR (HuA), τη HuB (Hel-N1), τη HuC (PLE21) και την HuD, με την HuR να εκφράζεται ευρέως σε όλους τους ιστούς και τις υπόλοιπες να εκφράζονται κυρίως στους νευρώνες. Η HuB εκφράζεται επίσης και στις γονάδες (Dalmau *et al.*, 1992). Όλα τα μέλη της οικογένειας παρουσιάζουν κατά 70% ομολογία σε πρωτεϊνικό επίπεδο και περιλαμβάνουν 3 περιοχές αναγνώρισης RNA (RRMs) (Okano and Darnell, 1997a), μέσω των οποίων αναγνωρίζουν και δεσμεύουν αλληλουχίες RNA πλούσιες σε ουρακίλη με διασκορπισμένες γουανίνες ή αδενίνες (Lebedeva *et al.*, 2011; Ince-Dunn *et al.*, 2012). Η κρυσταλλική δομή των περιοχών RRM1 και RRM2 της HuD φανερώνει πως δημιουργείται μια σχισμή ανάμεσά τους όπου δεσμεύεται το RNA, ενώ από μελέτες NMR της HuC φαίνεται ότι οι δυο αυτές περιοχές συνεργάζονται για τη δέσμευση ενός στοιχείου ARE (Inoue *et al.*, 2000; Wang and Tanaka Hall, 2001). Η RRM3 περιοχή συμβάλλει στη διατήρηση της σταθερότητας του συμπλόκου RNA-πρωτεΐνης και ίσως να δεσμεύει πολύ-A ουρές ή να εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (Abe, Yamamoto and Sakamoto, 1996; Ma, Chung and Furneaux, 1997; Anderson *et al.*, 2000). Ανάμεσα στις υψηλά συντηρημένες RRM1 και RRM2 περιοχές των Hu πρωτεϊνών βρίσκεται και μια λιγότερο συντηρημένη περιοχή άρθρωσης, η οποία πιστεύεται ότι περιλαμβάνει αλληλουχίες χάρη στις οποίες οι Hu μπορούν να μετακινούνται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και αντίστροφα.



Εικόνα 8: Οι περιοχές των Hu πρωτεϊνών και οι λειτουργίες τους. (Προσαρμογή από Hinman and Lou 2008a).

Ο υποκυτταρικός τους εντοπισμός διαφέρει για την καθεμία, καθώς η HuR είναι κατά βάση πυρηνική και μετατοπίζεται στο κυττασόλιο (Fan and Steitz, 1998; Peng *et al.*, 1998), η HuC είναι παρούσα και στο πυρηνικό και στο κυτταροπλασματικό κλάσμα, ενώ οι HuB και HuD είναι κυρίως κυτταροπλασματικές (Kasashima *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2001; Bolognani *et al.*, 2006; Hinman *et al.*, 2013).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, η καθεμία από τις Hu πρωτεΐνες εμφανίζει διαφορετικό πρότυπο έκφρασης. Σύμφωνα με μελέτες σε εγκεφάλους ποντικών, η HuB εκφράζεται αρχικά σε πρώιμους μετα-μιτωτικούς νευρώνες στο εξωτερικό στρώμα της κοιλιακής ζώνης, και λιγότερο στην ενδιάμεση ζώνη και στο φλοιό. Η HuD εκφράζεται κυρίως στην ενδιάμεση και λιγότερο στην κοιλιακή ζώνη και στο φλοιό, ενώ η HuC εκφράζεται στο φλοιό, απουσιάζοντας από τις άλλες δυο ζώνες (Okano and Darnell, 1997b). Σε ενήλικο στάδιο, όλοι οι νευρώνες εκφράζουν από μία έως όλες τις Hu πρωτεΐνες ανάλογα με το είδος του νευρώνα.

Οι πρωτεΐνες Hu έχουν ρυθμιστικό ρόλο σε όλα τα στάδια μεταβολισμού του mRNA, από την ωρίμανση του πρόδρομου mRNA μέχρι τη μετάφρασή του (Deschênes-Furry, Perrone-Bizzozero and Jasmin, 2006; Pascale, Amadio and Quattrone, 2008; Bronicki and Jasmin, 2013). Εντός του πυρήνα, οι Hu συμβάλλουν στην εναλλακτική συρραφή, σταθερότητα και πολυαδενυλίωση των mRNA. Περίπου το 30% των θέσεων πρόσδεσής τους έχουν εντοπιστεί στο εσωτερικό ιντρονίων (Lebedeva *et al.*, 2011; Mukherjee *et al.*, 2011; Ince-Dunn *et al.*, 2012). Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως, οι Hu δεσμεύουν τα ARE στοιχεία (επαναλήψεις AUUUA εντός αλληλουχιών πλούσιων σε ουρακίλες) που βρίσκονται εντός των 3'UTR των mRNA στόχων, ρυθμίζοντας τη σταθερότητά τους. Για παράδειγμα, η πρόσδεση της HuD στο mRNA του GAP-43 οδηγεί στη μείωση του ρυθμού της αποαδενυλίωσής του (Beckel-Mitchener *et al.*, 2002). Από την άλλη, η πρόσδεση της HuR στο mRNA του c-fos παρότι δεν εμποδίζει σημαντικά την αποαδενυλίωση, αναστέλλει την αποικοδόμηση του mRNA (Peng *et al.*, 1998). Η σταθεροποιητική επίδραση των Hu στους mRNA-στόχους τους μπορεί να ανταγωνίζεται τον αποσταθεροποιητικό ρόλο των ARE-BPs, που ενισχύει την αποικοδόμησή τους (Lai and Blackshear, 2001). Ένας μηχανισμός με τον οποίο οι Hu θα μπορούσαν να μπλοκάρουν την πρόσδεση των αποσταθεροποιητικών αυτών πρωτεϊνών είναι ο σχηματισμός ολιγομερών κατά την πρόσδεση στους στόχους τους. Μια τέτοια περίπτωση είναι αυτή της HuR που σχηματίζει ολιγομερή πρωτεϊνικά σύμπλοκα επάνω στο mRNA του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF α) (Fialcowitz-White *et al.*, 2007). Στο κυτταρόπλασμα, οι Hu προωθούν τη μετάφραση των mRNA-στόχων τους αλληλοεπιδρώνοντας ταυτόχρονα τόσο με την πολύ-A ουρά όσο και με την cap-binding πρωτεΐνη eIF4A (Fukao *et al.*, 2009, 2014). Επιπλέον, έχουν συσχετιστεί με τη μεταφορά και τον εντοπισμό mRNAs όπως αυτά των Bdnf, Gap43, Tau, Neuritin/cpg15 (Nrn1), Kv.1.1 (Kcna1) και Camk2a κοντά στους άξονες και δένδριτες. Τα mRNAs αυτά κατανέμονται σε κοκκία, με προσδεμένα ολιγομερή Hu, καθώς και άλλες RBPs (Kasashima *et al.*, 2002; Atlas *et al.*, 2004; Akten *et al.*, 2011; Sosanya *et al.*, 2013, 2015; Yoo *et al.*, 2013; Vanevski and Xu, 2015; Hao *et al.*, 2017).

Γενικά, οι Hu πρωτεΐνες έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη νευρωνική ανάπτυξη και πλαστικότητα, γεγονός που έχει κυρίως διερευνηθεί μέσα από μελέτες απώλειας λειτουργίας των Hu σε ποντικούς. Συγκεκριμένα, ποντίκια στα οποία έγινε ιστοειδική αποσιώπηση της HuR στο ΚΝΣ παρουσίαζαν ανωμαλίες στους κινητήριους νευρώνες, με συμπτώματα όπως απώλεια ισορροπίας, μειωμένη κινητικότητα και αδυναμία, ενώ η μελέτη από ιστούς του εγκεφάλου τους έδειχνε εικόνα παρόμοια με αυτή που συναντάται στην αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) (250). Από μελέτες σε HuC-KO και HuD-KO ποντικούς, έχουν διαπιστωθεί τόσο κινητικά όσο και συμπεριφορικά ελλείματα όπως ανωμαλίες στην χωρική αντίληψη και μάθηση, καθώς επίσης και αυξημένη τάση για επιληπτικές κρίσεις (Quattrone *et al.*, 2001; Akamatsu *et al.*, 2005; Ince-Dunn *et al.*, 2012; DeBoer *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2018). Αντίθετα, HuB-KO ποντίκια δεν έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής.

Σχετικά με την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, μελέτες *in vitro* έχουν αποδείξει πως η HuB ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των νευρικών βλαστοκυττάρων ενώ η HuD φαίνεται να απαιτείται για την έξοδο των νευρικών βλαστοκυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο (Akamatsu *et al.*, 1999, 2005; Okano *et al.*, 2005).

Παθολογικά στον άνθρωπο, οι πρωτεΐνες Hu έχουν συσχετιστεί με το σύνδρομο αντι-Hu ή αλλιώς παρανεοπλασματική νευροπάθεια που χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργίες του εγκεφαλικού στελέχους και της παρεγκεφαλίδας, απώλεια βραχυπρόθεσμης μνήμης και επιληπτικές κρίσεις. Το συγκεκριμένο σύνδρομο είναι αποτέλεσμα μιας αυτοάνοσης ανοσολογικής απόκρισης στις νευρωνικές Hu που

εκφράζονται μη φυσιολογικά σε ορισμένους όγκους όπως είναι κάποια καρκινώματα στον πνεύμονα και το νευροβλάστωμα (Senties-Madrid and Vega-Boada, 2001).

1.5.3 Η πρωτεΐνη TDP-43 (transactive response DNA-binding protein 43 kDa or TARDBP)

Η TDP-43, μια πρωτεΐνη των 43kDa και μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών hnRNP, ταυτοποιήθηκε αρχικά ως πρωτεΐνη που προσδένεται σε μονόκλωνο DNA από τον εκκινητή του HIV και αναστέλλει τη μεταγραφή του (Ou *et al.*, 1995). Αποτελεί μια RBP που περιέχει δύο περιοχές αναγνώρισης RNA (RRMs), μια περιοχή-σήμα εντοπισμού στον πυρήνα (nuclear localization signal, NLS), μια περιοχή-σήμα εξόδου από τον πυρήνα (nuclear export signal, NES) και μια περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα γλυκίνης, χαμηλής πολυπλοκότητας, στο καρβοξυ-τελικό άκρο (Buratti and Baralle, 2001; Winton *et al.*, 2008) (εικόνα 7). Η TDP-43 παίζει ρόλο στη μεταγραφή, την εναλλακτική συρραφή και τη σταθερότητα των mRNA, ενώ εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες όπως η απόπτωση, η κυτταρική διαίρεση και η αξονική μεταφορά (Buratti and Baralle, 2008). Εκφράζεται σε όλους τους τύπους κυττάρων και εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα, σε θέσεις μεταγραφής και συρραφής, θεωρείται μέρος του συμπλόκου εναλλακτικής συρραφής (σπλισόσωμα) (Tsuiji *et al.*, 2013) ενώ απουσιάζει από περιοχές σιωπηρής ετεροχρωματίνης (Casafont *et al.*, 2009). Ωστόσο, παρουσία κυτταρικού στρες, η TDP-43 εντοπίζεται σε κοκκία στρες (Buratti and Baralle, 2008; Colombrita *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013). Μέσω των περιοχών RRM συνδέεται κυρίως σε περιοχές με τουλάχιστον πέντε επαναλήψεις UG (Casafont *et al.*, 2009; Colombrita *et al.*, 2012a; Ravanidis, Kattan and Doxakis, 2018b), δεσμεύοντας περισσότερους από 6000 mRNA-στόχους στον εγκέφαλο, δηλαδή περίπου το 30% του συνόλου των μεταγράφων. Η δέσμευση της TDP-43 λαμβάνει χώρα κυρίως σε μεγάλο μήκος ιντρόνια πρώιμων mRNA (~70%) και λιγότερο σε περιοχές 3'UTR και μη-κωδικοποιητικά RNAs (~10%) (Polymenidou *et al.*, 2011; Sephton *et al.*, 2011; Tollervey *et al.*, 2011a; Xiao *et al.*, 2011). Η πρωτεΐνη TDP-43 επηρεάζει κατά κύριο λόγο την εναλλακτική συρραφή αναλόγως τη θέση στην οποία προσδένεται, όπως συμβαίνει και με άλλες RBPs όπως η NOVA και οι ELAVL, οδηγώντας είτε σε αποκλεισμό είτε σε συμπερίληψη εξωνίων. Όσον αφορά την κυτταροπλασματική TDP-43, συνδέεται περισσότερο στις αλληλουχίες 3' UTR, υποδεικνύοντας ότι ρυθμίζει τη σταθερότητα, τη μεταφορά ή/και τη μετάφραση του mRNA (Tollervey *et al.*, 2011b; Colombrita *et al.*, 2012b; Ravanidis, Kattan and Doxakis, 2018a).

Παθολογικά, η TDP-43 κατέχει πρωταγωνιστικό ρόλο στην παθογένεση της αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης (ALS) (Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006; Mackenzie *et al.*, 2007) καθώς και της μετωποκροταφικής άνοιας (FTD). Και στις δύο περιπτώσεις, τόσο στους νευρώνες όσο και στη γλοία των εγκεφάλων των ασθενών, η TDP-43 απομακρύνεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου συσσωρεύεται σε μη φυσιολογικά επίπεδα σε φωσφορυλιωμένα, πρωτεολυτικά διασπασμένα και με κατάλοιπα ουβικιτίνης πρωτεϊνικά συσσωματώματα σε ποσοστά των 97% ALS και 45% FTD ασθενών αντίστοιχα (Chen-Plotkin, Lee and Trojanowski, 2010a). Καθώς αυτή η υποκυτταρική ανακατανομή οδηγεί σε πυρηνική εξάντληση της TDP-43 (Neumann *et al.*, 2006; Van Deerlin *et al.*, 2008), ο παθογόνος μηχανισμός μπορεί να συνεπάγεται απώλεια πυρηνικής λειτουργίας, κέρδος κυτταροπλασματικής λειτουργίας ή και τα δύο. Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπιστεί περισσότερες από 50

παρानοηματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της TDP-43 που αντιπροσωπεύουν περίπου το 5% των οικογενών περιπτώσεων ALS και <1% των σποραδικών περιπτώσεων (Taylor, Brown and Cleveland, 2016). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σχεδόν όλες οι μεταλλάξεις που προκαλούν νόσο συγκεντρώνονται στην περιοχή που είναι πλούσια σε γλυκίνη (Gly-rich domain), η οποία μεσολαβεί σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης κυρίως με άλλες RBPs με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η διαλυτότητα, η μεταφορά RNP, ο υποκυτταρικός εντοπισμός αλλά και η στρατολόγηση σε SGs της TDP-43 (Anderson and Kedersha, 2009; Brangwynne *et al.*, 2009; Chong and Forman-Kay, 2016; Conicella *et al.*, 2016; Aguilera-Gomez and Rabouille, 2017; Kapeli, Martinez and Yeo, 2017) (εικόνα 7).

Συσσωματώματα TDP-43 απαντώνται επίσης σε άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος Αλτσχάιμερ (AD), η άνοια με σωμάτια Lewy (DLB) και η νόσος Χάντιγκτον (HD) (Chen-Plotkin, Lee and Trojanowski, 2010b).

Η TDP-43, όπως και οι περισσότερες RBP, σε απόκριση έναντι στρες, απομονώνεται σε SGs όπου συν-εντοπίζεται με τα mRNA στόχους. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει διαφορετικά την δημιουργία SGs από βασικές RBPs, όπως είναι η TIA1 και η G3BP. Σε κύτταρα με TDP43 siRNA, η TIA1 φαίνεται να δέχτηκε θετική ρύθμιση, ενώ η G3BP αρνητική. Επιπλέον, τα κοκκία SG ήταν λιγότερα, μικρότερα, με ακανόνιστη μορφολογία. Επιπλέον, μετά από στρες, οι παθογόνες μεταλλάξεις TDP43 ενσωματώθηκαν νωρίτερα σε SGs, αύξησαν το μέγεθος των SGs και μείωσαν την κινητικότητά τους (McDonald *et al.*, 2011).

Αν και ο εντοπισμός της πρωτεΐνης είναι κυρίως πυρηνικός, η χρώση για TDP43 ανίχνευσε την πρωτεΐνη μέσα στα συναπτικά άκρα, κατά μήκος των αξόνων των κινητικών νευρώνων και στους δενδρίτες των νευρώνων, γεγονός που δείχνει ότι μπορεί να εμπλέκεται στη μεταφορά και μετάφραση του mRNA (Wang *et al.*, 2008; Narayanan *et al.*, 2013; Alami *et al.*, 2014).

Συμπερασματικά, η TDP43 έχει πλειοτροπικές δράσεις που κυμαίνονται από την εναλλακτική συρραφή στον πυρήνα έως την μεταφορά του mRNA στα συναπτικά άκρα και την τοπική μετάφραση. Με παρεμπόδιση της έκφρασης ή μέσω μεταλλάξεων προκύπτει νευρωνική απώλεια και ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως ALS και FTD.

1.5.4 Η πρωτεΐνη FUS/TLS (Fused in Sarcoma/Translocated in Liposarcoma)

Η FUS/TLS είναι μια πρωτεΐνη 526 αμινοξέων που κωδικοποιείται από 15 εξώνια, ανήκει στην οικογένεια FET/TET των πολυλειτουργικών πρωτεϊνών δέσμησης DNA/RNA και εκφράζεται σε όλους τους τύπους κυττάρων (Bertolotti *et al.*, 1996). Περιλαμβάνει μια αμινοτελική περιοχή πλούσια σε Gln-Gly-Ser-Tyr, μια περιοχή πλούσια σε Gly, μια περιοχή-σήμα εξόδου από τον πυρήνα, μια περιοχή αναγνώρισης RNA, πολλαπλές επαναλήψεις Arg-Gly-Gly, μια περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου και ένα υψηλά συντηρημένο καρβοξυτελικό άκρο που κωδικοποιεί για ένα σήμα εντοπισμού στον πυρήνα που αναγνωρίζεται από την τρανσπορτίνη (Zakaryan and Gehring, 2006; Dormann *et al.*, 2010) (εικόνα 7).

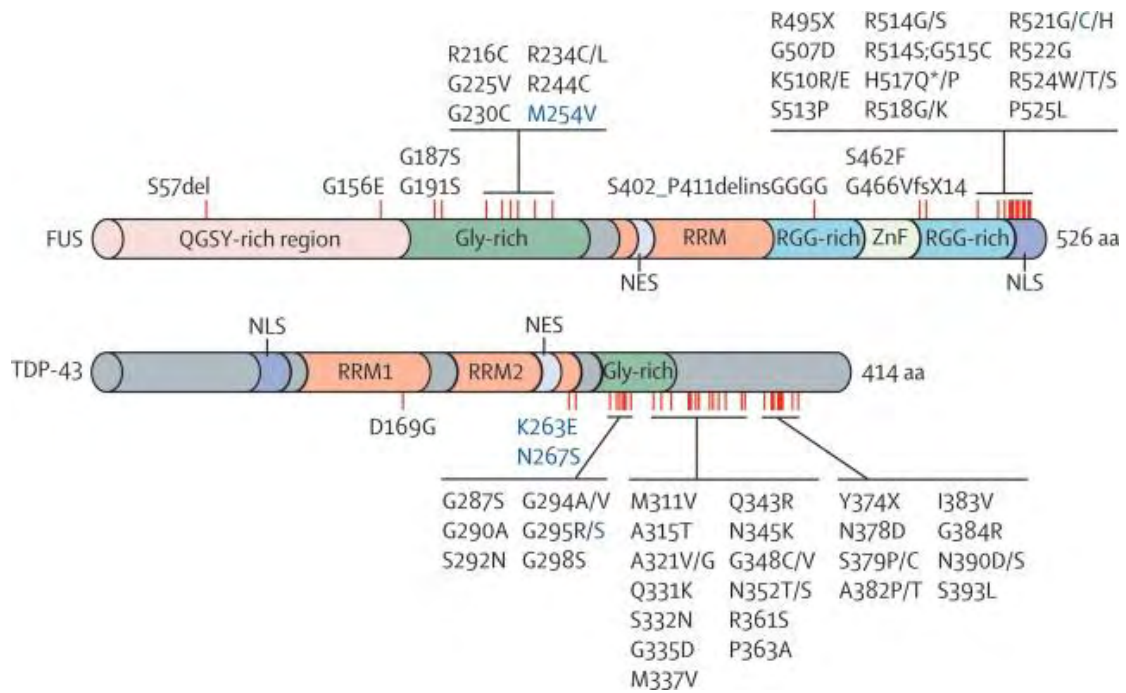
Εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, καθώς συνεχώς μετατοπίζεται από το ένα κυτταρικό διαμέρισμα στο άλλο (Zinszner *et al.*, 1997).

Η πρωτεΐνη FUS μπορεί να δεσμευτεί σε μονόκλινα και δίκλινα DNA καθώς και RNA που φέρουν επαναλήψεις των αλληλουχιών GUGGU ή GUU, ωστόσο με περιορισμένη ειδικότητα. Οι θέσεις πρόσδεσης της FUS βρίσκονται συνήθως στο εσωτερικό μεγάλο μήκους ιντρονίων και η απώλεια λειτουργίας της οδηγεί σε αρνητική ρύθμιση των πρώιμων mRNA στόχων της (Lerga *et al.*, 2001; Lagier-Tourenne *et al.*, 2012; Rogelj *et al.*, 2012). Ακόμη, η FUS μπορεί να συνδεθεί άμεσα με την RNA πολυμεράση II (RNAP2) και την III (RNAP3) για τη ρύθμιση της μεταγραφής και την επιλογή της θέσης πολυαδενυλίωσης του mRNA (Ishigaki *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2012; Masuda *et al.*, 2015). Επιπλέον, η αλληλεπίδραση του συμπλόκου FUS-RNAP2 με το U1-snRNP εξασφαλίζει την εναλλακτική συρραφή στο στάδιο της μεταγραφής (Yu and Reed, 2015). Η FUS συνδέεται επίσης και στα 5' και 3' αμετάφραστα άκρα των mRNAs και εμπλέκεται στην μεταφορά τους από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Ravanidis, Kattan and Doxakis, 2018b). Η FUS διεγείρει επίσης, τη βιογένεση microRNA προσελκύοντας το σύμπλοκο DROSHA (Morlando *et al.*, 2012). Σε περιοχές βλάβης του DNA, η FUS παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάκτηση, μέσω των αλληλεπιδράσεών της με τις CBP / p300 και HDAC1 (Wang *et al.*, 2013).

Συμπερασματικά, η FUS φαίνεται ότι έχει καθοριστική σημασία για τη διατήρηση των πυρηνικών λειτουργιών αλλά και της δυναμικής μεταξύ νευρικών αξόνων και δενδριτών καθώς εμπλέκεται και στη μετακίνηση και μετάφραση κάποιων mRNA στόχων (Yoshimura *et al.*, 2006).

Οι μεταλλάξεις στο FUS έχουν συνδεθεί με την οικογενή αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS), με παρουσία εγκλείστων θετικών για FUS στο κυτταρόπλασμα των εκφυλισμένων νευρώνων και της γλοίας καθώς και μειωμένα επίπεδα πυρηνικού FUS σε εγκεφάλους ασθενών (Mackenzie, Rademakers and Neumann, 2010).

Οι περισσότερες μεταλλάξεις FUS συγκεντρώνονται στην περιοχή πυρηνικού εντοπισμού (NLS) στο καρβοξυτελικό άκρο και σε μια περιοχή της οποίας η δομή μοιάζει με πρίον στο αμινοτελικό άκρο. Ως αποτέλεσμα, εκτρέπεται ο εντοπισμός FUS προς το κυτταρόπλασμα όπου και καθίσταται περισσότερο επιρρεπής σε λανθασμένη αναδίπλωση και συσσωμάτωση (Neumann *et al.*, 2009; Van Langenhove *et al.*, 2010). Παρόμοιος παθολογικός φαινότυπος FUS όπως στην ALS, έχει επίσης παρατηρηθεί στην FTD, αν και δεν ήταν υπεύθυνες μεταλλάξεις στο γονίδιο FUS για το νευροεκφυλιστικό φαινόμενο FTD.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνικών περιοχών των RBPs FUS και TDP-43, καθώς και των προσδιορισμένων γονιδιακών μεταλλάξεών τους που σχετίζονται με την ALS (με μαύρο χρώμα) και FTD (μπλε χρώμα) (Προσαρμογή από (Mackenzie, Rademakers and Neumann, 2010)).

1.5.5 Η πρωτεΐνη Rbfox3/NeuN

Η πρωτεΐνη RbFox3 ανήκει μαζί με τις Rbfox1 και Rbfox2 στην οικογένεια των πρωτεϊνών Rbfox. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν ως κύριο ρόλο την ιστοειδική ρύθμιση της εναλλακτικής συρραφής (Duan *et al.*, 2016). Κάθε μέλος της οικογένειας Rbfox περιλαμβάνει ένα υψηλά συντηρημένο μοτίβο αναγνώρισης RNA στη μέση της πρωτεΐνης με το οποίο αναγνωρίζει και προσδένει με υψηλή συγγένεια την αλληλουχία RNA (U)GCAUG είτε στα ρυθμιζόμενα εξώνια είτε σε πλευρικά ιντρόνια πρόδρομων mRNA, προωθώντας ή καταστέλλοντας την εναλλακτική συρραφή ενός αριθμού εξωνίων στόχων (Jin *et al.*, 2003). Ακόμη, από *in vitro* μελέτες αποκαλύφθηκε ότι η Rbfox3 μπορεί να προσδένει και μη-(U)GCAUG RNAs συμπεριλαμβανομένων και pre-microRNAs, παίζοντας ρυθμιστικό ρόλο στη βιογένεση microRNAs (Kim *et al.*, 2014).

Η Rbfox3 εκφράζεται αποκλειστικά στους νευρώνες (McKee *et al.*, 2005; Kim, Adelstein and Kawamoto, 2009) ενώ η δυσλειτουργία της έχει παρατηρηθεί και συσχετιστεί με εγκεφαλικές ανωμαλίες στον άνθρωπο όπως επιληψία, αυτιστικό σύνδρομο, νευροαναπτυξιακά και γνωστικά προβλήματα (Cooper *et al.*, 2011; Lal *et al.*, 2013; Lucas *et al.*, 2014; Utami *et al.*, 2014). Μέσα από πρόσφατες μελέτες, έχει δειχθεί ότι η Rbfox3 ρυθμίζει τη νευρωνική διαφοροποίηση μέσω εναλλακτικής συρραφής του πρώιμου mRNA Numb, ενώ είναι απαραίτητη για τη λειτουργία και την ισορροπία του κυκλώματος στον ιππόκαμπο, υποδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο που παίζει στην ανάπτυξη του εγκεφάλου (K. K. Kim *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Σε συμφωνία με τα παραπάνω δεδομένα, με μελέτες σε εγκεφάλους ποντικών, διαπιστώθηκε πως η έκφραση της Rbfox3 διαφέρει κατά την ανάπτυξη σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου, ενώ η απώλεια της λειτουργίας της οδηγεί σε μείωση της νευρογένεσης και της συναπτικής πλαστικότητας (Lin *et al.*, 2016).

1.6 Σκοπός της εργασίας

Η α-συνουκλεΐνη είναι μια πρωτεΐνη με ελλιπώς διευκρινισμένη φυσιολογική λειτουργία που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Πάρκινσον. Ωστόσο, η έρευνα πάνω στους μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασής της βρίσκεται ακόμη σε πολύ πρώιμο στάδιο. Όπως είναι γνωστό, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και η σταθερότητα των mRNA μεταγράφων καθορίζεται τόσο από την ύπαρξη αλληλουχιών εντός του mRNA, γνωστών ως cis-στοιχεία (π.χ. 3'UTRs), όσο και από προσδεμένους trans-ενεργούς παράγοντες (π.χ. RNA Binding Proteins) για την αναστολή ή την ενίσχυση της αποσύνθεσης του mRNA. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της ρύθμισης της έκφρασης της α-συνουκλεΐνης σε συνθήκες υπερέκφρασης των πρωτεϊνών που προσδένονται σε RNA (RBPs) και η διερεύνηση της επίδρασης τους στις ισομορφές του mRNA της α-συνουκλεΐνης με διαφορετικά μήκη 3'UTR.

Για το σκοπό αυτό, σε πρώτο σκέλος, μελετήθηκαν τα επίπεδα σχετικής έκφρασης των mRNA μεταγράφων της α-συνουκλεΐνης με διαφορετικό μήκος 3'UTR, με τη διεξαγωγή PCR πραγματικού χρόνου, τόσο για τα πυρηνικά όσο και για τα κυτταροπλασματικά κλάσματα της κυτταρικής σειράς SKNSH, υπό την υπερέκφραση των RBPs: TIA1, HuB, HuD, TDP-43, FUS και Rbfox3, σε φυσιολογικές και σε συνθήκες στρες. Σε δεύτερο σκέλος, πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης με 4 διαφορετικά μήκη 3'UTR, στην κυτταρική σειρά CAD και στη συνέχεια διπλή υπερέκφραση αυτής και της RBP HuD με στόχο τη σήμανση τόσο του mRNA όσο και της ίδιας της πρωτεΐνης με φθορίζουσες χρωστικές, προκειμένου να αναλυθεί ποιοτικά και ποσοτικά η έκφρασή της, με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού.

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Πειραματικά Υλικά

2.1.1 Κυτταρικά Συστήματα

SK-N-SH Κύτταρα Νευροβλαστώματος Ανθρώπου

Πρόκειται για κύτταρα νευροβλαστώματος ανθρώπου που χρησιμοποιούνται ευρέως σαν πρότυπο σύστημα μελέτης. Τα SK-N-SH απομονώθηκαν από μεταστατικό καρκίνο μυελού των οστών από ένα κορίτσι ηλικίας 4 χρονών και εκφράζουν την α-συνουκλεΐνη. Μπορούν να διαφοροποιηθούν μετά την προσθήκη ρετινοϊκού οξέος (Retinoic Acid, RA).

HEK293A

Η κυτταρική σειρά HEK293A αποτελεί έναν υποκλώνο της κυτταρικής σειράς 293 και διαθέτει μια σχετικά επίπεδη μορφολογία. Προέρχεται από εμβρυικά κύτταρα ανθρώπινου νεφρού και περιλαμβάνει ένα ενσωματωμένο αντίγραφο του γονιδίου E1 που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες E1a και E1b, οι οποίες είναι απαραίτητες για την παραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοϊών.

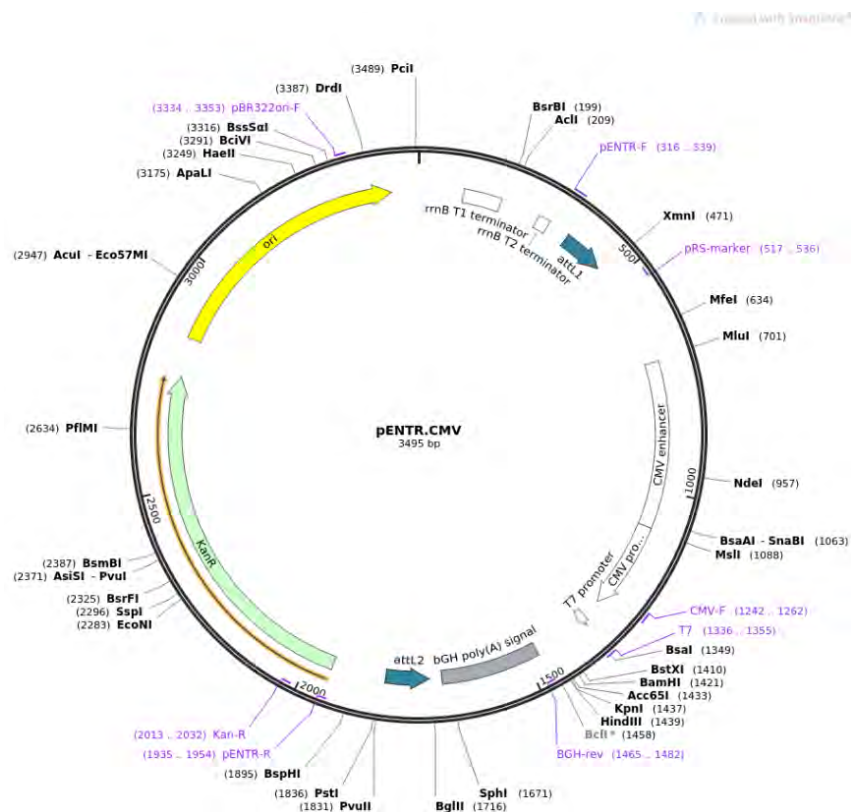
CAD - Κύτταρα από όγκο εγκεφάλου ποντικού

Η κυτταρική σειρά CAD (Cath.-α-διαφοροποιημένα κύτταρα) είναι ένας υποκλώνος μιας κατεχολαμινεργικής κυτταρικής σειράς του ΚΝΣ που προέρχεται από εγκεφαλικό όγκο ενός διαγονιδιακού ποντικού που περιέχει το SV-40 T αντιγόνο, υπό το μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή της τυροσινικής υδροξυλάσης αρουραίου. Τα CAD έχουν απωλέσει τα ογκογονίδια και εκφράζουν νευρωνικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες των συναπτικών κυστιδίων, συμπεριλαμβανόμενης και της α-συνουκλείνης. Μπορούν να διαφοροποιηθούν για τη διεξαγωγή και μελέτη νευρωνικών διαδικασιών σε συνθήκες απουσίας ορού.

2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς

Πλασμιδιακός φορέας pENTR.GD

Ο πλασμιδιακός φορέας pENTR.GD (ThermoFisher) χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις TIA1, HuB, HuD, TDP43, FUS, Fox3. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε για την υπερέκφραση της GFP (Green Fluorescent Protein) πρωτεΐνης, υπό το μεταγραφικό έλεγχο της ακολουθίας IRES (Internal Ribosome Entry Site). Ο φορέας pENTR.GD διαθέτει: α) γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμικίνη, απαραίτητο για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών E. Coli που φέρουν τον σωστό φορέα, β) τον υποκινητή CMV ανοδικά των πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης, γ) πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης για την ενσωμάτωση των αλληλουχιών προς μελέτη.

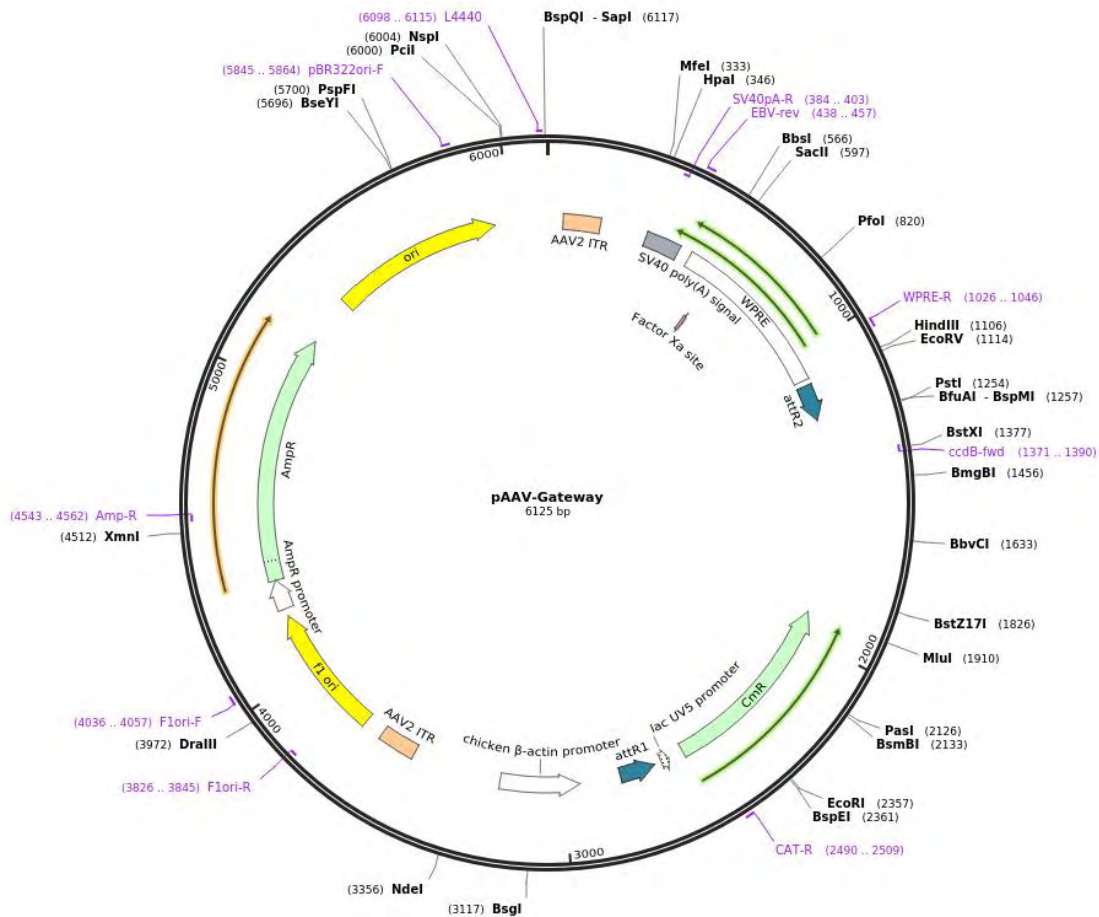


Εικόνα 10: Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pENTR.GD.

Πλασμιδιακός φορέας pAAV-Gateway

Ο πλασμιδιακός φορέας pAAV-Gateway χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του γονιδίου της ανθρώπινης α-συνουκλείνης με διαφορετικά μήκη 3' UTR. Ο φορέας αυτός διαθέτει δυο γονίδια ανθεκτικότητας στην χλωραμφενικόλη και στην αμπικιλίνη, απαραίτητα για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών ccdB Survival με το σωστό φορέα και πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης για την ενσωμάτωση των αλληλουχιών προς μελέτη.

Created with SnapGene®



Εικόνα 12: Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pAAV-Gateway. (Addgene)

2.1.3 Διαλύματα

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την καλλιέργεια των κυττάρων και τη διαμόλυνση:

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - high glucose: Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA.
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-HAM's F-12: Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA.
- Ορός εμβρύου βοός (FBS): ThermoFisher Scientific, Reinach, Switzerland.
- Τρυψίνη: Sigma-Aldrich.

- Μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης: Penicillin-Streptomycin, Sigma-Aldrich.
- Η διαμόλυνση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό αντιδραστήριο Jetprime, Polyplus, Illkirch, France.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την κυτταρική κλασμάτωση:

- Ορός εμβρύου βοός (FBS): ThermoFisher Scientific, Reinach, Switzerland.
- Τρυψίνη: Sigma-Aldrich.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)
- HLB (Hypotonic Lysis Buffer): Για την παρασκευή του HLB χρησιμοποιήθηκαν 7,5 μ L Tris-Base 10mM, 10 nM NaCl, 3mM MgCl₂, 1 mM EDTA και 0,1% NP-40.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την απομόνωση RNA:

- RNAzol® RT (MRCgene).
- precipitation carrier (PC 173) σε διάλυμα ddH₂O (1:100) (MRCgene)
- 4-bromoanisole, BAN (MRCgene)
- Διάλυμα αιθανόλης 75%

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίστροφη μεταγραφή:

- Διάλυμα dNTPs (ThermoFisher Scientific)
- Διάλυμα τυχαίων εξαμερών εκκινητών (Random Hexamers) (Invitrogen)
- Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol, DTT) (Invitrogen)
- M-MLV RT/ ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (Invitrogen)
- 5x PCR Buffer (Invitrogen)

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ποσοτική Real Time PCR:

- Διάλυμα dNTPs (ThermoFisher Scientific)
- DreamTaq DNA πολυμεράση Taq (ThermoFisher Scientific)
- SybrGreen (Invitrogen)
- PCR Buffer (10x) (ThermoFisher Scientific)

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοφθορισμό / FISH:

- Fixation Buffer: 4% PFA σε ρυθμιστικό διάλυμα DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline). Για την παρασκευή 10mL διαλύματος αναμίχθηκαν 0.4g PFA, 100 μ L 1N NaOH και 1mL ddH₂O και διαλύθηκαν με θέρμανση στους 61°C σε 9mL DPBS.

- DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) (1x): χρωστική προκειμένου να σημανθεί το πυρηνικό DNA, προϊόν της εταιρείας ThermoFisher Scientific.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)
- Διάλυμα αιθανόλης 70%
- Wash Buffer A: για τελικό όγκο 10 mL χρησιμοποιήθηκαν 7mL ddH₂O, 2mL Stellaris RNA FISH 5X Wash Buffer A (Biosearch Technologies) και 1mL φορμαμίδη.
- Stellaris RNA FISH Wash Buffer B (Biosearch Technologies)
- Διάλυμα υβριδισμού/ Hybridization Buffer (HB): περιέχει 90% Stellaris RNA FISH Hybridization Buffer (Biosearch Technologies), 10% φορμαμίδη, 1:100 RNA probe (Stellaris) και 1:200 αντίσωμα για α-συνουκλεΐνη (C-20, Santa Cruz Biotech.).
- SlowFade™ Gold Antifade Mountant, προϊόν της εταιρείας ThermoFisher Scientific.

2.1.4 Χημικά Αντιδραστήρια

- Sodium Arsenite προϊόν της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- FeCl₂
- H₂O₂

2.1.5 Αντισώματα

Αντισώματα για τον ανοσοφθορισμό:

Πρωτογενές: α-synuclein (C-20, sc-7011): πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την α-συνουκλεΐνη. Προμηθεύτηκε από την εταιρεία Santa Cruz Biotechnology, USA.

Δευτερογενές: Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488): αντίσωμα που αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G που προέρχονται από το κουνέλι και φέρει μία πράσινη φθορίζουσα ετικέτα, η οποία εκπέμπει φως στα 488 nm.

2.2 Πειραματικές Μέθοδοι

2.2.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε στείρες συνθήκες, σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας στους 37°C, ατμόσφαιρας 5% CO₂ και σχετικής υγρασίας 95%.

Η κυτταρικές σειρές SK-N-SH και HEK293A αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό DMEM υψηλής συγκέντρωσης σε γλυκόζη, στο οποίο είχε προστεθεί 10% (v/v) ορός εμβρύου βοός και μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη σε ποσοστό 1% (v/v).

Η κυτταρική σειρά CAD αναπτυσσόταν σε θρεπτικό υλικό DMEM–F12, στο οποίο είχε προστεθεί 7% (v/v) ορός εμβρύου βοός και μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη σε ποσοστό 1% (v/v).

2.2.2 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών

Ο όρος διαμόλυνση αναφέρεται στην εισαγωγή ξένων νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) σε κύτταρα θηλαστικών. Στην παρούσα εργασία, η διαμόλυνση των κυττάρων με τα αντίστοιχα πλασμίδια πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο lipofection. Το αντιδραστήριο jetPRIME® (Polyplus) αποτελείται από κατιοντικά λιπίδια, τα οποία δημιουργούν σύμπλοκο με τα αρνητικά φορτισμένα πλασμίδια προκειμένου αυτά να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη. Έτσι, εξασφαλίζει υψηλά επίπεδα διαμόλυνσης. Η μέθοδος της διαμόλυνσης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Τα πειράματα της υπερέκφρασης των RBPs διήρκησαν 48 ώρες, ενώ τα πειράματα υπερέκφρασης της α -συνουκλείνης που προορίζονταν για ανάλυση μικροσκοπίας διήρκησαν 24 ώρες.

Πριν από κάθε πείραμα πραγματοποιούταν έλεγχος του ποσοστού των κυττάρων που είχαν διαμολυνθεί σε οπτικό ή ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού LEICA με φίλτρο για το πράσινο χρώμα (για τα βαμμένα GFP-θετικά κύτταρα, στην περίπτωση που ο φορέας διαμόλυνσης περιέχει το γονίδιο *gfp*). Όταν το ποσοστό βιωσιμότητας και διαμόλυνσης των κυττάρων ήταν ικανοποιητικό (τουλάχιστον 70%), τότε ακολουθούσε η συλλογή των κυττάρων για περαιτέρω ανάλυση.

2.2.3 Κυτταρική Κλασμάτωση

Με τον όρο «κλασμάτωση του κυττάρου» εννοείται ο διαχωρισμός των δομικών συστατικών του κυττάρου με βάση το μέγεθος και την πυκνότητά τους. Η κυτταρική κλασμάτωση χρησιμεύει για την απομόνωση δομικών συστατικών του κυττάρου, όπως του πυρήνα, των μιτοχονδρίων, των ριβοσωμάτων κ.λπ., με σκοπό τη μελέτη της μορφολογίας τους και λειτουργίας των επιμέρους συστατικών τους. Πραγματοποιείται σχετικά εύκολα γιατί τα υποκυτταρικά οργανίδια διαφέρουν σε μέγεθος και πυκνότητα, γεγονός που επιτρέπει τον διαχωρισμό τους με τη φυγοκέντρηση. Ο πυρήνας, για παράδειγμα, είναι το μεγαλύτερο και βαρύτερο οργανίδιο.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση στις κυτταρικές σειρές SKNSH και HEKA προκειμένου να μελετηθούν ξεχωριστά το πυρηνικό και το κυτταροπλασματικό κλάσμα. Πριν την κλασμάτωση του κυττάρου θα πρέπει προηγουμένως να διαρρηχθεί η κυτταρική μεμβράνη προκειμένου να απελευθερωθούν τα υποκυτταρικά οργανίδια. Αρχικά, μετά το πέρας της 48ωρης καλλιέργειας των κυττάρων με τις εκάστοτε συνθήκες, το θρεπτικό μέσο αφαιρείται και προστίθενται 800 μ l τρυψίνης (οι όγκοι αντιστοιχούν σε κύτταρα που καλλιεργούνται σε πιάτο με 12 πηγάδια), με τα οποία τα κύτταρα επωάζονται για 5 λεπτά στους 37°C. Κατόπιν, τα ξεκολλημένα από τον πάτο του πιάτου κύτταρα προστίθενται σε σωλήνες που περιέχουν 20-30 μ l ορού εμβρύου βοός (FBS), για την απενεργοποίηση της τρυψίνης. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση για 30 sec, αφαίρεση του υπερκείμενου και προστίθενται 500 μ l κρούου PBS. Τα κύτταρα, στη συνέχεια φυγοκεντρούνται στις

2.000 rpm, για 5 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται 200 μl υποτονικού διαλύματος λύσης των κυττάρων (HLB). Ακολουθεί πιπετάρισμα έως ότου να εξαφανιστούν τυχόν συσσωματώματα κυττάρων για πλήρη ομογενοποίηση του διαλύματος και επώαση για 10 λεπτά στον πάγο. Μετά το πέρας των 10 λεπτών, πραγματοποιείται ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 3.000 rpm, για 3 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο που αντιστοιχεί στο κυτταροπλασματικό κλάσμα συλλέγεται σε νέο σωλήνα και τοποθετείται στον πάγο. Για το ίζημα που περιέχει το πυρηνικό κλάσμα, ακολουθεί επαναιώρηση και επανομογενοποίηση σε 200 μl HLB, φυγοκέντρηση στις 2.000 rpm, για 3 λεπτά στους 4° C και απόρριψη του υπερκειμένου και το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται 3 φορές.

Επειδή η μέθοδος της κυτταρικής κλασμάτωσης πραγματοποιήθηκε με σκοπό την επακόλουθη απομόνωση RNA από τα παραγόμενα κυτταρικά κλάσματα, σε όλα τα δείγματα, στο τέλος της διαδικασίας προστίθεντο 400 μl RNAzol® RT (MRC) και αποθηκεύονταν στην κατάψυξη, μέχρι να υποστούν περαιτέρω ανάλυση.

2.2.4 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε για τις κυτταρικές σειρές SKNSH και HEK293A μετά από το διαχωρισμό των δειγμάτων σε πυρηνικά και κυτταροπλασματικά κλάσματα με τη χρήση του αντιδραστηρίου RNAzol® RT (MRC). Αρχικά, αφού ξεπαγώθηκαν τα δείγματα με το RNAzol® RT, προστέθηκε σε αυτά 1 μL του φορέα κατακρήμνισης PC 173 (precipitation carrier) σε διάλυμα 100 μL γH₂O, με σκοπό τη δέσμευση του DNA και τον καθαρισμό του και τα δείγματα αναδεύτηκαν. Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν για 5 λεπτά στους 65°C και ακολούθησε ανάδευση των δειγμάτων με το πυρηνικό κλάσμα. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm, για 15 λεπτά στους 18°C και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέους σωλήνες errendorf που περιείχαν 1,5 μL BAN, για περαιτέρω καθαρισμό των δειγμάτων. Ακολούθησε ανάδευση για 15 sec, επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και δεύτερη φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm, για 10 λεπτά στους 18°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε και πάλι σε νέα tubes και προστέθηκε σε αυτά ίσος όγκος ισοπροπανόλης, η οποία βοηθάει στην κατακρήμνιση του RNA. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο ψυγείο (4°C) για 1 ώρα, αφού αναδεύτηκαν στιγμιαία. Μετά το πέρας της μιας ώρας, έγινε φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm, για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε από τα δείγματα και ακολούθησαν 2 πλύσεις με 350 μL 75% αιθανόλη και διαδοχικές φυγοκεντρήσεις των 5 λεπτών, στις 13.000 rpm, στους 4°C, με επακόλουθη απόρριψη του υπερκειμένου. Τέλος, μετά από μια τελευταία φυγοκέντρηση του ενός λεπτού (13.000 rpm/ 4°C) αφαιρέθηκε και η τελευταία σταγόνα υπερκειμένου και οι σωλήνες αφέθηκαν με ανοιχτά τα καπάκια για 2-3 λεπτά προκειμένου να εξατμιστεί οποιοδήποτε ίχνος αιθανόλης έχει παραμείνει. Οι πελέτες με το RNA επαναιωρήθηκαν σε 20-100 μL RNase free ddH₂O, ανάλογα με την ποσότητα που απομονώθηκε. Με τη χρήση φωτόμετρου, έγινε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης RNA για το εκάστοτε δείγμα από τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

2.2.5 PCR Αντίστροφης Μεταγραφάσης/ Σύνθεση cDNA

Η PCR αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR) είναι μια ιδιαίτερα ευαίσθητη τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του RNA. Αντίστροφη μεταγραφή ονομάζεται η σύνθεση μιας συμπληρωματικής (complementary) αλυσίδας DNA (cDNA) έχοντας ως εκμαγείο ένα μόριο RNA. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (ή αντίστροφη τρανσκριπτάση), το οποίο στη φύση βρίσκεται σε RNA-ιούς (ρετροϊούς) όπως ο ιός HIV. Το ένζυμο μετατρέπει το γενετικό υλικό του ιού από τη μορφή του μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA, έτσι ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό των κυττάρων ξενιστών.

Η αντίδραση σύνθεσης της πρώτης αλυσίδας του cDNA πραγματοποιείται στον θερμικό κυκλοποιητή και τα απαραίτητα αντιδραστήρια είναι η αντίστροφη μεταγραφάση, το αρχικό υλικό RNA, τα dNTPs και οι κατάλληλοι εκκινητές. Υπάρχουν τρία είδη εκκινητών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν: οι oligo-dT εκκινητές, οι εκκινητές που είναι ειδικοί για το γονίδιο-στόχο και οι τυχαίοι εξανουκλεοτιδικοί εκκινητές. Οι τελευταίοι είναι το είδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Οι εκκινητές αυτοί απαρτίζονται από ένα μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων μήκους 6 βάσεων που έχουν τυχαία νουκλεοτιδική σύσταση. Θεωρείται ότι με τη χρήση του μίγματος των τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών επιτυγχάνεται πληρέστερη κάλυψη όλων των μορίων RNA (ανεξαρτήτως πολυ-A ουράς και σε όλο το μήκος τους).

Αρχικά, ξεπαγώθηκαν τα δείγματα με το απομονωμένο RNA, αναδεύτηκαν και φυγοκεντρήθηκαν μέχρι τις 2.500 rpm. Για κάθε πειραματική συνθήκη, προστέθηκαν 6 μL δείγματος σε σωλήνες των 250 μL και αναμείχθηκαν με 2 μL RNase free ddH₂O, 1 μL dNTPs και 1 μL Random Hexamers. Στη συνέχεια, επωάστηκαν στο θερμικό κυκλοποιητή MJ Research PTC-200 για 5 λεπτά στους 65°C (primer incubation step) και αμέσως μετά τοποθετήθηκαν στον πάγο. Το βήμα αυτό είναι σημαντικό για τη γραμμικοποίηση της δευτεροταγούς δομής των μορίων RNA, ώστε να καταστεί ευκολότερη η πρόσδεση των εκκινητών. Ακολούθησε η προσθήκη 4 μL 5X First Strand Buffer, 2 μL DTT (διθειοθρεϊτόλη), 0,5 μL του ενζύμου M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus transcriptase) και συμπληρώθηκαν 3,5 μL ddH₂O, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20 μL . Παράλληλα, δημιουργήθηκε και ένας μάρτυρας ελέγχου που περιείχε μίγμα δειγμάτων και όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια εκτός από το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης.

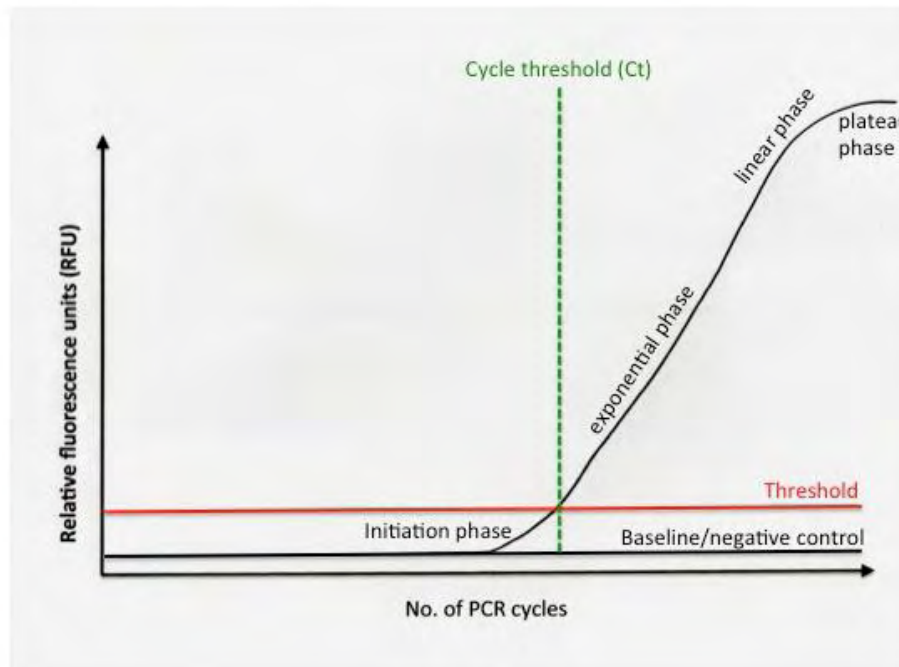
Όλα τα δείγματα φορτώθηκαν στο μηχάνημα του κυκλοποιητή για την έναρξη της RT-PCR. Η σύνθεση cDNA εκτελέστηκε στους 37°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια, ακολούθησε ένα βήμα θέρμανσης στους 75°C για 15 λεπτά, κατά το οποίο καταστρέφεται η αντίστροφη μεταγραφάση, και ένα τελευταίο βήμα στους 4°C για 5 λεπτά. Τα δείγματα αφαιρέθηκαν από τον κυκλοποιητή και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Το νεοσυντεθέν cDNA είναι συμπληρωματικό του αρχικού RNA και η ουρακίλη έχει αντικατασταθεί από τη θυμίνη. Το cDNA αυτό χρησιμοποιήθηκε, στη συνέχεια, ως αρχικό υλικό στην Real Time PCR.

2.2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια τεχνική υψηλής ακρίβειας και ευαισθησίας που επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης, προσφέροντας πληροφορίες ταυτόχρονα με τη διαδικασία πολλαπλασιασμού, χωρίς να απαιτεί περαιτέρω χειρισμούς μετά την PCR. Κατά τη Real-Time PCR, η μεγέθυνση του DNA - στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο, διότι το προϊόν που παράγεται συνδέεται με φθορίζουσα χρωστική που ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού θερμοκυκλοποιητή. Με το όργανο αυτό καταγράφεται η κινητική της μεγέθυνσης του DNA από την ένταση του σήματος του φθορισμού που αντανακλά το ποσό του συντηθέμενου νέου DNA. Έτσι μπορεί να μετρηθεί επακριβώς το ποσό του DNA.

Σημαντικός παράμετρος για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος.



Εικόνα 13: Η γραφική αναπαράσταση της καμπύλης ενίσχυσης σε μια Real-Time PCR.

Για την ανίχνευση των προϊόντων της Real-Time PCR, χρησιμοποιήθηκε η χρωστική φθορισμού SYBR Green I, η οποία είναι λιγότερο τοξική από το βρωμιούχο αιθίδιο και

ενσωματώνεται στο δίκλωνο DNA. Αναλυτικότερα, η SYBR Green I ενσωματώνεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, αυξάνοντας σε μεγάλο βαθμό το φθορισμό του. Κατά την πορεία της αντίδρασης, η ποσότητα του δίκλωνου DNA-στόχου αυξάνεται εκθετικά, με παράλληλη αύξηση της ποσότητας της χρωστικής SYBR Green I που ενσωματώνεται, και άρα αύξηση του φθορισμού που εκπέμπεται. Σε κάθε κύκλο, ο εκπεμπόμενος φθορισμός αυξάνεται σταδιακά κατά τη φάση της επιμήκυνσης της αντίδρασης, ενώ απουσιάζει εντελώς κατά τη φάση αποδιάταξης.

Η μέθοδος της Real-Time PCR εφαρμόστηκε για την ανάλυση της έκφρασης των ισομορφών mRNA της α -συνουκλεΐνης με το βραχύ (~575 nt) και το μακρύ 3'UTR (~2550 nt) τόσο στα πυρηνικά όσο και στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των SKNSH και HEK293A κυτταρικών σειρών, για τη μελέτη του ρόλου του μήκους του 3'UTR στην έκφραση του ενδογενούς mRNA της α -συνουκλεΐνης σε φυσιολογικές και στρες συνθήκες. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε στην κυτταρική σειρά SKNSH η οποία είχε διαμολυνθεί με τον φορέα pENTR.GD για την υπερέκφραση των RBPs TIA1, HuB, HuD, TDP43, FUS και Fox3, για τη μελέτη της επίδρασης των RBPs στην έκφραση του mRNA της α -συνουκλεΐνης, τόσο υπό φυσιολογικές όσο και υπό συνθήκες στρες. Μετά την κυτταρική κλασμάτωση, ακολούθησε απομόνωση RNA και μετατροπή σε cDNA μέσω RT-PCR για όλα τα δείγματα, ώστε να καταστούν έτοιμα την διεξαγωγή της Real-Time PCR.

Χρησιμοποιηθήκαν εκκινητές ειδικοί για α) το mRNA μετάγραφο με κοντό 3' UTR της α -συνουκλεΐνης (~575 nt) β) το mRNA μετάγραφο με το μακρύ 3'UTR (~2550 nt) της α -συνουκλεΐνης, γ) το ιντρονικό pre-mRNA της α -συνουκλεΐνης και δ) το mRNA του σταθερά εκφραζόμενου γονιδίου *gapdh*. Για χάρη συντόμευσης τα παραπάνω mRNA μετάγραφα θα αναφέρονται ως α) total SNCA mRNA, β) full SNCA mRNA, γ) intronic SNCA mRNA και δ) GAPDH mRNA, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ζεύγη εκκινητών:

A) για total snca

Forward: 5' – GAA ATA TCT TTG CTC CCA GT – 3'

Reverse: 5' – ACA TTG GAA CTG AGC ACT TG – 3'

B) για full snca

Forward: 5' – TGA CGG TAA TTT TTG AGC AGT GAA – 3'

Reverse: 5' – GCT TCC TGA AAA GGC TTA TAT GAC TTA A – 3'

Γ) για intronic snca

Forward: 5' – TGG CTT GAG GGT CAT AGC TT – 3'

Reverse: 5' – GAG GCA GAA TAG GTG GGA CA – 3'

Δ) για *gapdh*

Forward: 5' – GCA CCA CCA ACT GCT TAG – 3'

Reverse: 5' – GCC ATC CAC AGT CTT CTG – 3'

Για την προετοιμασία της αντίδρασης, αρχικά, όλα τα δείγματα αραιώθηκαν με ddH₂O έως 20 φορές και αναδεύτηκαν. Προετοιμάστηκαν primer mix για κάθε ζεύγος εκκινητών. Κάθε αντίδραση περιείχε 10 μ L αραιωμένου δείγματος cDNA, 0,4 μ L dNTPs (2mM), 1 μ L εκκινητών (1pmol/ μ L), 2 μ L Dream Taq Buffer (10x), 0,9 μ L χρωστικής

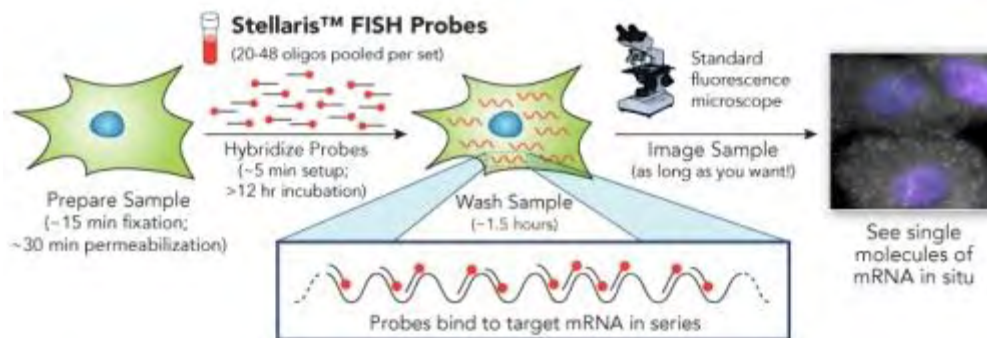
Sybr Green I, 0,09 μ L Dream Taq DNA πολυμεράσης και 5,6 μ L ddH₂O, με τελικό όγκο αντίδρασης τα 20 μ L. Κάθε ξεχωριστή αντίδραση πραγματοποιήθηκε τρεις φορές, ενώ για τον έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων από μη ειδικά προϊόντα πραγματοποιήθηκαν και αντιδράσεις απουσία υποστρώματος (Non Template Controls) και αντιδράσεις παρουσία δειγμάτων στα οποία δεν προστέθηκε το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση κατά την RT-PCR (Non RT Controls). Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν ειδικές μικροπλακέτες 96 θέσεων (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, Roche). Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία προετοιμασίας ενός «πιάτου» PCR, προσκολλάται αεροστεγώς στην επιφάνειά του μια ειδική μεμβράνη, ακολουθεί μια φυγοκέντρωση των 30 δευτερολέπτων και το πιάτο είναι έτοιμο για την έναρξη της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου. Για την πραγματοποίησή της χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής LightCycler 96 της Roche. Συνολικά, πραγματοποιούνταν, κάθε φορά, 35 κύκλοι ενίσχυσης, με τον κάθε κύκλο να περιλαμβάνει ένα βήμα αποδιάταξης στους 95°C για 10 sec και ένα βήμα στους 60°C για 30 sec, κατά το οποίο γίνεται η υβριδοποίηση των εκκινητών στα μονόκλινα μόρια DNA καθώς και η επιμήκυνσή τους.

Για την ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων, έγινε κανονικοποίηση των τιμών Ct των γονιδίων-στόχων ως προς τις τιμές Ct του ενδογενούς γονιδίου σταθερής έκφρασης *gapdh*, με τη μέθοδο $\Delta\Delta$ Ct (Livak and Schmittgen, 2001).

2.2.7 Ανοσοφθορισμός και Φθορίζων *in situ* Υβριδισμός (Immunofluorescence and Fluorescent *in situ* Hybridization, FISH)

Φθορίζων *in situ* υβριδισμός – FISH

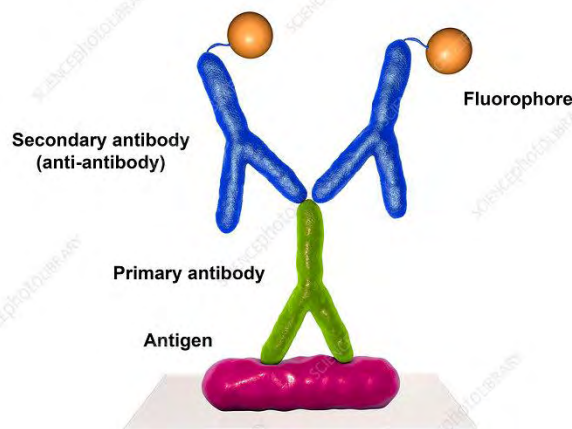
Ο φθορίζων *in situ* υβριδισμός (FISH) είναι μια μοριακή τεχνική, που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον εντοπισμό συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA ή RNA. Η τεχνική βασίζεται στις αρχές του *in situ* υβριδισμού, όπου προκύπτει ένα σταθερό διμερές, το υβρίδιο, που αποτελείται είτε από δυο αλυσίδες DNA, είτε από συνδυασμό αλυσίδων DNA-RNA, ή από συνδυασμό RNA-RNA. Η εξεταζόμενη νουκλεοτιδική αλληλουχία εντοπίζεται στο υποκυτταρικό μικροπεριβάλλον της (*in situ*) και καθίστανται δυνατά η οπτικοποίηση και ο ποσοτικός της προσδιορισμός με τη χρήση της μικροσκοπίας φθορισμού. Χρησιμοποιούνται κατάλληλα σημασμένες δίκλωνες (DNA probes) ή μονόκλωνες (RNA probes) αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Σύμφωνα με την αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων τα probes συνδέονται και κατά συνέπεια ανιχνεύουν την αναζητούμενη αλληλουχία. Στον υβριδισμό FISH γίνεται χρήση φθορίζουσών χρωστικών για την σήμανση των ανωτέρω δεικτών και η σύνδεσή τους με την υπό εξέταση αλληλουχία πραγματοποιείται σε υπόστρωμα φθορίζουσας ουσίας. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε τομές ιστού εμπεδωμένες σε παραφίνη, τομές κρυστάτη, κυτταρολογικά επιχρίσματα ή μονιμοποιημένα κύτταρα.



Εικόνα 14: Σχηματική περιγραφή της μεθόδου Stellaris φθορίζοντα *in situ* υβριδισμού με mRNA μόρια.

Ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός είναι η μέθοδος, κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη σήμανση των αντισωμάτων με ειδικές χημικές ουσίες που ονομάζονται φθοριοχρώματα ή φθορίζουσες χρωστικές. Κάθε φθορίζουσα χρωστική απελευθερώνει φθορίζον φως συγκεκριμένου μήκους κύματος, το οποίο καθορίζεται από το ποσό της ενέργειας που καταναλώνεται κατά την διέγερση των ηλεκτρονίων του. Στην προκειμένη περίπτωση, ο ανοσοφθορισμός είναι έμμεσος καθώς το αντίσωμα που φέρει τη φθορίζουσα χρωστική είναι το δευτερογενές.



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Το πρωτογενές αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με το αντιγόνο. Στη συνέχεια το δευτερογενές αντίσωμα που φέρει τη φθορίζουσα χρωστική συνδέεται με το πρωτογενές.

Στόχος του συγκεκριμένου πειράματος ήταν ο ταυτόχρονος ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης της α -συνουκλείνης. Για να καταστεί εφικτή η μελέτη του εντοπισμού τόσο του mRNA όσο και της ίδιας της πρωτεΐνης, καθώς και η επίδραση που έχουν σε αυτόν οι διαφορετικού μήκους 3'UTR ισομορφές του mRNA της αλλά και οι RBPs (HuD), εκτελέστηκε κυτταρική διαμόλυνση στην κυτταρική σειρά CAD με τον φορέα pAAV-Gateway για υπερέκφραση της α -συνουκλείνης και παράλληλα συν-διαμόλυνση του φορέα pAAV-Gateway με το φορέα pENTR.GD για υπερέκφραση της HuD.

Κατόπιν, διεξάχθηκε ταυτόχρονος ανοσοφθορισμός και φθορίζων *in situ* υβριδισμός. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των αντιδραστηρίων Stellaris RNA FISH, σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας.

Προετοιμασία του πειράματος

Μια μέρα πριν τη διαμόλυνση των κυττάρων, αποστειρώνονται καλυπτρίδες (coverglass) διαμέτρου 13mm σε υψηλή θερμοκρασία για ένα λεπτό, αφήνονται για 30 λεπτά υπό UV ακτινοβολία σε συσκευή κάθετης νηματικής ροής και τοποθετούνται στα πηγάδια ενός 24-well plate. Κατόπιν, προστίθενται 500 μ L poly-D-lysine και το πιάτο αφήνεται overnight σε θερμοκρασία δωματίου. Η poly-D-lysine περιέχει ένα συνθετικό πολυμερές που αυξάνει τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ των αρνητικά φορισμένων ιόντων των κυτταρικών μεμβρανών και των θετικά φορισμένων ιόντων των παραγόντων προσκόλλησης της καλυπτρίδας, ώστε να προσκολλώνται τα κύτταρα στην επιφάνειά της. Την ημέρα της διαμόλυνσης, η poly-D-lysine αφαιρείται και ακολουθούν 2 εκπλύσεις με ddH₂O και καλό στέγνωμα πριν την προσθήκη των διαμολυσμένων κυττάρων.

Μονιμοποίηση των κυττάρων

Μια μέρα μετά τη διαμόλυνση, πραγματοποιείται μονιμοποίηση των κυττάρων για την αποτροπή της λύσης και τη διαφύλαξη της δομικής τους σταθερότητας. Για τη μονιμοποίηση των κυττάρων, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και γίνεται μία πλύση με 400 μ L PBS. Το PBS απορρίπτεται, προστίθενται 400 μ L διαλύματος παραφορμαλδεΐδης (PFA) 4% (fixation buffer) και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά. Έπειτα το διάλυμα αφαιρείται και ακολουθούν 2 πλύσεις με 400 μ L PBS των 2-4 λεπτών. Για να καταστούν τα κύτταρα διαπερατά στη συνέχεια, προστίθενται 400 μ L αιθανόλης 70% και τα κύτταρα παραμένουν στο ψυγείο, overnight.

Φθορίζων υβριδισμός *in situ* με ανοσοφθορισμό

Αρχικά, προετοιμάστηκε μια συσκευή (apparatus), χρησιμοποιώντας ένα τρυβλίο petri διαμέτρου 150 mm, στον πάτο του οποίου τοποθετείται ένα κομμάτι απορροφητικό χαρτί Whatmann. Κατόπιν, αυτό περιβρέχεται με 3-4 mL ddH₂O και από πάνω τοποθετείται ένα ορθογώνιο πλαστικό με οπές. Πάνω στο πλαστικό αυτό εφάπτεται σταθερά ένα κομμάτι παραφίλμ. Η κατασκευή αυτή χρησιμεύει στο να αποτρέψει το διάλυμα με τον ανιχνευτή (probe) από το να εξατμιστεί. Το τρυβλίο, κατά τη διάρκεια των επωάσεων, καπακώνεται και τυλίγεται με παραφίλμ για να διατηρείται η υγρασία. Την επόμενη μέρα, η αιθανόλη αφαιρείται, και προστίθενται 400 μ L Wash Buffer A (επώαση 5-10 λεπτά). Οι καλυπτρίδες επωάζονται για 5-10 λεπτά και μετά το Wash Buffer A απομακρύνεται. Μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα, τοποθετούνται πάνω στο παραφίλμ, σε μορφή σταγόνας, 80 μ L Hybridization Buffer (διάλυμα υβριδισμού), για κάθε πειραματική συνθήκη, το οποίο περιέχει ανιχνευτή RNA (Stellaris RNA probe) ειδικό για το mRNA της α -συνουκλεΐνης (σε αναλογία 1:100) και το πρωτογενές αντίσωμα (C-20, SCBT) για την α -συνουκλεΐνη (αναλογία 1:200). Ο RNA probe (mix ~20 διαφορετικών probes, ειδικών για διάφορες θέσεις κατά μήκος του SNCA mRNA) είναι σεσημασμένος με Quasar 570, η οποία φθορίζει κόκκινο χρώμα και εκπέμπει

φως στα 566 nm. Στη συνέχεια, μεταφέρονται με προσοχή οι καλυπτρίδες και τοποθετούνται η καθεμία πάνω σε κάθε σταγόνα HB με την επιφάνεια με τα κύτταρα προς τα κάτω. Ακολουθεί επώαση από 4 έως 16 ώρες (συνήθως 8 ώρες ή overnight) σε επωαστικό κλίβανο (σκοτάδι), στους 37°C.

Μετά το πέρας της επώασης, αναποδογυρίζονται οι καλυπτρίδες, συλλέγεται το HB και ακολουθεί πλύση με 200 µL Wash Buffer A. Έπειτα, προστίθενται 100 µL Wash Buffer A που περιέχουν το δευτερογενές αντίσωμα Donkey anti-rabbit 488 (1:500) (Alexa Fluor) και τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι σημασμένο με μια πράσινη φθορίζουσα χρωστική η οποία φθορίζει ιδανικά στα 488 nm. Μετά την αναμονή, το δευτερογενές αντίσωμα συλλέγεται και για 2 λεπτά, τα κύτταρα επωάζονται με Wash Buffer A, το οποίο στη συνέχεια αφαιρείται. Στη συνέχεια, προστίθενται για 2 λεπτά, 100 µL 1X DAPI, η οποία σημαίνει τους πυρήνες με μπλε χρώση. Αφού αφαιρεθεί, προστίθεται 200 µL διαλύματος Wash Buffer B, για 2-5 λεπτά. Τέλος, οι καλυπτρίδες μεταφέρονται σε ένα στεγνό χαρτί και αφήνονται να στεγνώσουν πλήρως. Παράλληλα, ετοιμάζονται αντικειμενοφόροι πλάκες στις οποίες προστίθενται 8 µL Slowfade Gold Mounting Media το οποίο προστατεύει τις φθορίζουσες χρωστικές από τον αποχρωματισμό και την αποδυνάμωση του σήματος φθορισμού. Οι στεγνές καλυπτρίδες τοποθετούνται πάνω στις σταγόνες με το mounting media και περικαλύπτονται, στη συνέχεια, με βερνίκι νυχιών περιμετρικά, για να παραμείνουν σταθεροποιημένες. Αφού στεγνώσει και το βερνίκι, αποθηκεύονται στο σκοτάδι, στους 4°C.

2.2.8 Συνεστιακή Μικροσκοπία Φθορισμού

Η παρατήρηση των δειγμάτων και η φωτογράφιση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με το συνεστιακό μικροσκόπιο LEICA TCS SP5 (Leica Microsystems), με τη χρήση των ξηρών αντικειμενικών φακών 20X και 40X (HCX PL APO CS). Με τη βοήθεια του συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού, αναλύθηκε στην κυτταρική σειρά CAD μετά από τα πειράματα ανοσοφθορισμού και FISH, ποιοτικά και ποσοτικά η έκφραση της α-συνουκλεΐνης τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο. Ο RNA probe ανιχνεύει και βάφει με κόκκινο χρώμα το mRNA της α-συνουκλεΐνης, ενώ η πρωτεΐνη ανιχνεύεται με το πράσινο χρώμα της φθορίζουσας χρωστικής που είναι συνδεδεμένη στο δευτερογενές αντίσωμα που αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G από κουνέλι του πρώτου αντισώματος που είναι ειδικό για την α-συνουκλεΐνη.

Τέλος, με μπλε χρώμα έγινε η βαφή των πυρήνων των κυττάρων, χάρη στην προσθήκη της χρωστικής DAPI.

2.2.9 Χρήση λογισμικών προγραμμάτων

Για την παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω λογισμικά προγράμματα:

- Microsoft Office Word 2010, για τη συγγραφή της διατριβής,
- Zotero, για την εισαγωγή των βιβλιογραφικών αναφορών,
- Microsoft Office Excel 2010 για την μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων,

- ImageJ/ Fiji για την ανάλυση του φθορισμού από τη συνεστιακή μικροσκοπία,
- Το λογισμικό πρόγραμμα LightCycler® 96 της Roche Life Science, για την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων από τη Real Time PCR,
- GraphPad Prism 8 (Windows Version 8.01).

2.2.10 Στατιστική επεξεργασία

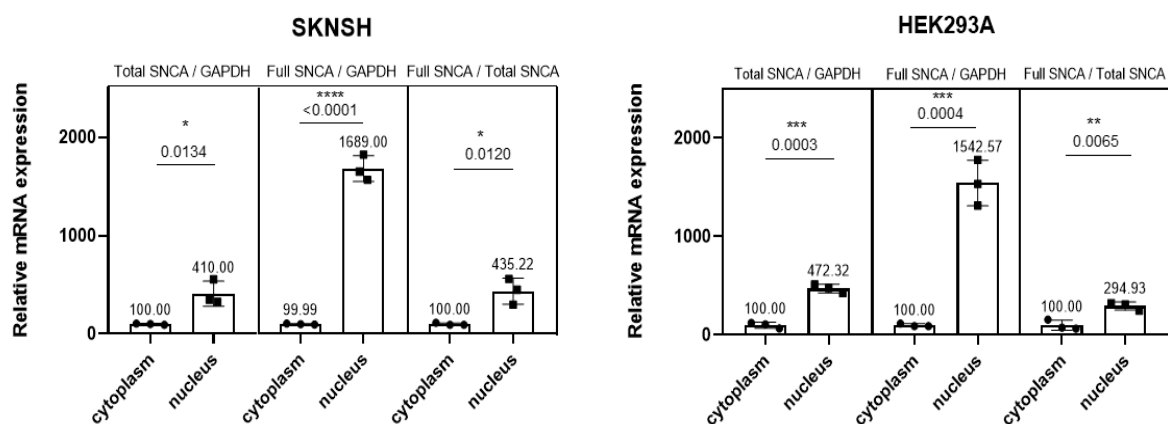
Όλες οι τιμές των αποτελεσμάτων συνιστούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD). Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism 8.

Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο εκάστοτε δείγμα και το δείγμα-μάρτυρα προσδιορίστηκαν με εφαρμογή του Student's t-test (για τη σύγκριση 2 ομάδων αποτελεσμάτων) ενώ για τη σύγκριση άνω των δυο ομάδων αποτελεσμάτων εφαρμόστηκε one-way ANOVA. Σε κάθε περίπτωση, ως στατιστικά σημαντικές κρίθηκαν οι τιμές για τις οποίες ισχύει: $p < 0.05$.

3 Αποτελέσματα

3.1 Διευκρίνιση του ρόλου της 3' αμετάφραστης περιοχής στην έξοδο του mRNA της α -συνουκλείνης από τον πυρήνα

Το mRNA της α -συνουκλείνης με το μακρύ 3'UTR παραμένει εντός του πυρήνα
Για την αξιολόγηση του ρόλου της 3' αμετάφραστης περιοχής στην έξοδο του ενδογενούς mRNA της α -συνουκλείνης από τον πυρήνα, πραγματοποιήθηκε, αρχικά, κλασμάτωση στις κυτταρικές σειρές SKNSH και HEK293A και μετρήθηκαν στο κάθε κυτταρικό κλάσμα (πυρηνικό και κυτταροπλασματικό) τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των mRNA μεταγράφων της α -συνουκλείνης με βραχύ (~575 nt) και μακρύ (~2550 nt) 3'UTR.



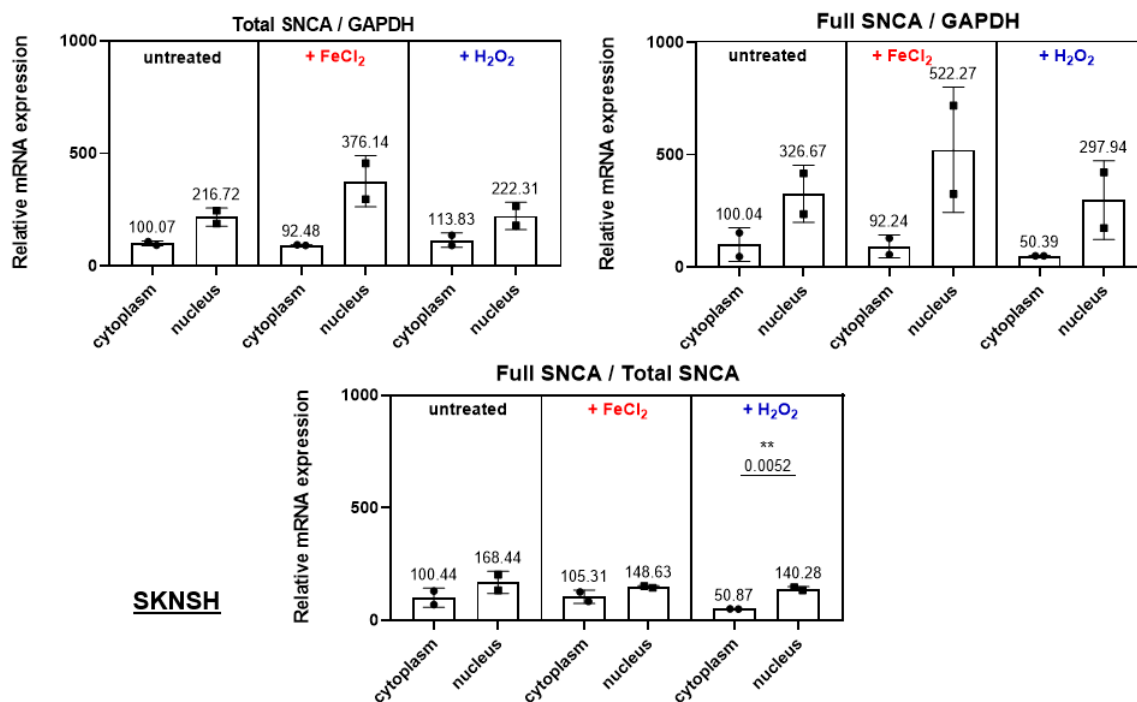
Εικόνα 16: Γραφικές παραστάσεις της σχετικής έκφρασης των mRNA μεταγράφων της α -συνουκλείνης (total & full SNCA) ως προς τα επίπεδα έκφρασης του σταθερά εκφραζόμενου

γονιδίου *gaphd* (1^η και 2^η στήλη, αντίστοιχα), καθώς και του λόγου της μέσης έκφρασης του mRNA με το μακρύ 3'UTR ως προς τη μέση έκφραση του mRNA με το κοντό 3'UTR της α -συνουκλείνης (Full/Total SNCA, 3^η στήλη), σε κάθε κυτταρικό κλάσμα (nuclear, cytoplasmic). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 3 πειραματικές επαναλήψεις (n=3).

Παρατηρήθηκε ότι και στις δύο κυτταρικές σειρές τα πυρηνικά κλάσματα περιέχουν περισσότερο mRNA απ' ό,τι τα κυτταροπλασματικά. Ωστόσο, το mRNA με το μακρύ 3'UTR (full SNCA mRNA) παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα σχετικής έκφρασης στο πυρηνικό κλάσμα (nuclear) σε σύγκριση με το mRNA μετάγραφο με το βραχύ 3' UTR (total SNCA mRNA), αυξάνοντας έτσι και το λόγο full/total SNCA στον πυρήνα. Όσον αφορά στο κυτταρόπλασμα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές. Συγκρίνοντας τον λόγο full/total SNCA mRNA στον πυρήνα με το λόγο full/total SNCA mRNA στο κυτταρόπλασμα, παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση του λόγου στον πυρήνα, με $p=0.012$ για την σειρά SKNSH και $p=0.0065$ για την σειρά HEK293A, αντίστοιχα. Επομένως, μπορεί να υποστηριχθεί ότι το mRNA μετάγραφο της α -συνουκλείνης με το μακρύ 3'UTR παραμένει περισσότερο εντός του πυρήνα.

Επαγωγή οξειδωτικού στρες με προσθήκη FeCl_2 και H_2O_2

Κατόπιν, ακολούθησε επαγωγή οξειδωτικού στρες με την προσθήκη 1mM χλωριούχου σιδήρου (FeCl_2) και 250 μM υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), για 24 ώρες, στην κυτταρική σειρά SKNSH και αναλύθηκαν ποσοτικά τα επίπεδα σχετικής έκφρασης των mRNA μεταγράφων της α -συνουκλείνης, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.



Εικόνα 17: Γραφικές παραστάσεις της σχετικής έκφρασης του mRNA της α -συνουκλείνης, για κάθε κυτταρικό κλάσμα (κυτταροπλασματικό, πυρηνικό) σε φυσιολογικές συνθήκες και

συνθήκες στρες λόγω προσθήκης FeCl_2 και H_2O_2 (1^η, 2^η και 3^η στήλη, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα προέρχονται από 2 πειραματικές επαναλήψεις (n=2).

Σε αντίθεση με την προηγούμενη εικόνα, από την 1^η στήλη (φυσιολογικές συνθήκες) των γραφημάτων, εδώ παρατηρείται μια μικρότερη τάση του μεταγράφου με το μακρύ 3'UTR να βρίσκεται περισσότερο στον πυρήνα, απ' ό,τι στο κυτταρόπλασμα σε σύγκριση με τα επίπεδα σχετικής έκφρασης του total mRNA της α -συνουκλεΐνης ($p > 0.05$).

Με την προσθήκη χλωριούχου σιδήρου (FeCl_2), παρατηρείται μια αύξηση της σχετικής έκφρασης και των δυο μεταγράφων στο πυρηνικό κλάσμα, ενώ στο κυτταρόπλασμα δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή, σε σύγκριση με τις φυσιολογικές συνθήκες.

Στις συνθήκες επαγωγής οξειδωτικού στρες με την προσθήκη H_2O_2 , μειώνονται τα επίπεδα σχετικής έκφρασης του mRNA μεταγράφου της α -συνουκλεΐνης με το μακρύ 3'UTR (full SNCA mRNA), λιγότερο στο πυρηνικό και περισσότερο στο κυτταροπλασματικό κλάσμα. Αυτό αντανακλάται και από τη μείωση των λόγων full/total SNCA mRNA και στα δυο κυτταρικά κλάσματα, όπου ο λόγος full/total SNCA mRNA είναι πολύ μικρότερος στο κυτταρόπλασμα, απ' ό,τι στον πυρήνα ($p = 0.0052$). Τέλος, τα επίπεδα σχετικής έκφρασης του total SNCA mRNA δεν φαίνεται να επηρεάζονται.

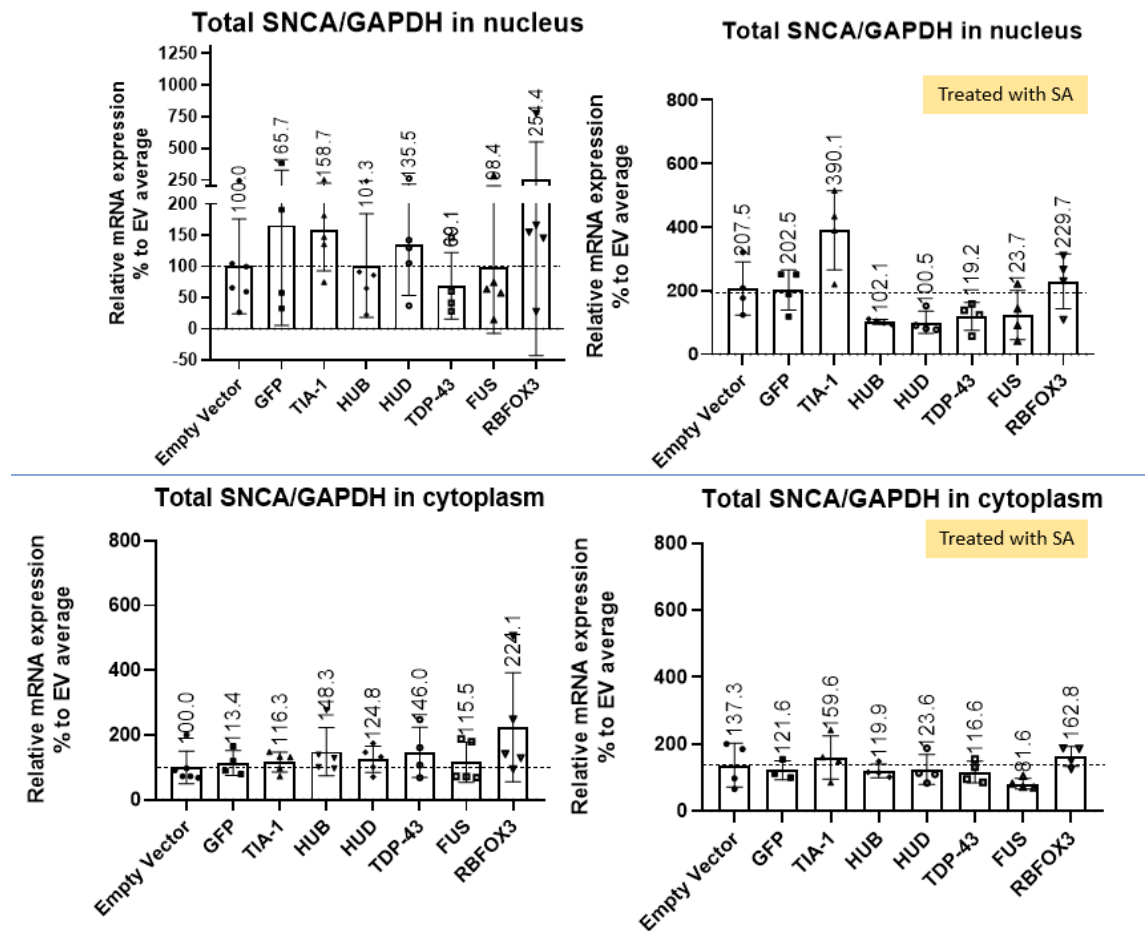
Με τον έναν ή τον άλλο τρόπο, η επαγωγή οξειδωτικού στρες φάνηκε να επηρεάζει περισσότερο το mRNA μετάγραφο με το μακρύ 3'UTR της α -συνουκλεΐνης, είτε αυξάνοντας τα επίπεδα της σχετικής του έκφρασης στον πυρήνα (FeCl_2), ή μειώνοντάς τα στο κυτταρόπλασμα (H_2O_2). Ωστόσο, δεν μπορούν να εξαχθούν αξιόπιστα συμπεράσματα λόγω της μικρής επαναληψιμότητας αυτού του πειράματος.

3.2 Η επίδραση των πρωτεϊνών δέσμευσης RNA (RBPs) στην έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων του ενδογενούς mRNA της α -συνουκλεΐνης

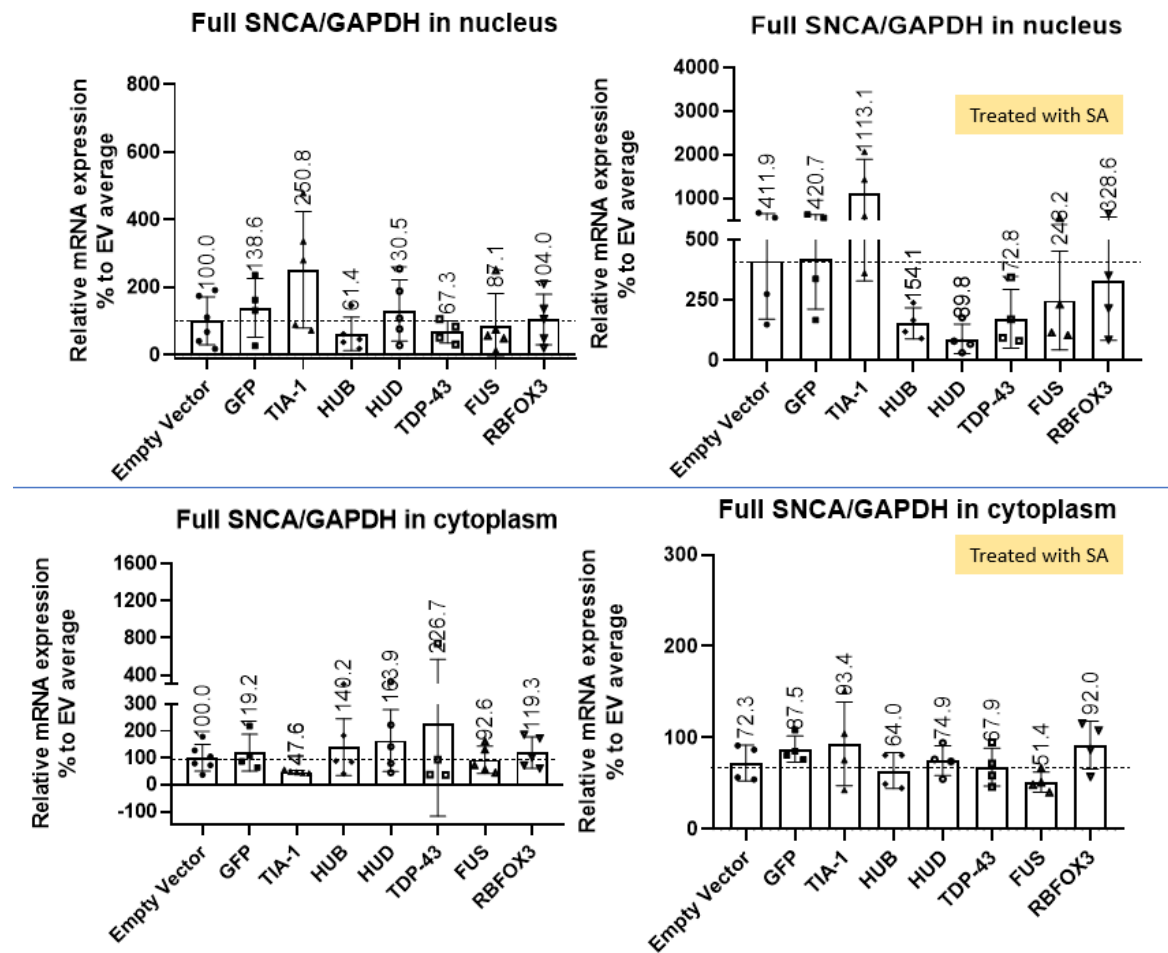
Στη συνέχεια, μετρήθηκαν τα επίπεδα σχετικής έκφρασης των mRNA μεταγράφων της α -συνουκλεΐνης με διαφορετικό μήκος 3'UTR, με τη διεξαγωγή PCR πραγματικού χρόνου, τόσο για τα πυρηνικά όσο και για τα κυτταροπλασματικά κλάσματα της κυτταρικής σειράς SKNSH, υπό την υπερέκφραση των RBPs TIA-1, HuB, HuD, TDP-43, FUS και RBFOX3, σε φυσιολογικές και σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Για την εφαρμογή έντονου οξειδωτικού στρες, προστίθεντο 24 ώρες μετά την κυτταρική διαμόλυνση 150 μM Sodium Arsenite (SA) και ακολουθούσε επώαση των κυτάρων για 1 ώρα.

Για την ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων, παράχθηκαν τα ραβδογράμματα που απεικονίζουν τη σχετική έκφραση των total και full mRNA της α -συνουκλεΐνης (βλ. ενότητα 2.2.6) ως προς το mRNA του γονιδίου αναφοράς GAPDH (εικόνες 18 και 19, αντίστοιχα), τη σχετική έκφραση του full SNCA mRNA ως προς το total SNCA mRNA (εικόνα 20), καθώς και το λόγο της σχετικής έκφρασης των total και full SNCA mRNA του πυρηνικού ως προς το κυτταροπλασματικό κλάσμα (εικόνα 21). Όλα τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς τη μέση τιμή που προκύπτει από τις τιμές κάθε ξεχωριστού πειράματος στο δείγμα του μάρτυρα ελέγχου (empty vector), σε φυσιολογικές συνθήκες. Τα διαγράμματα αυτά απεικονίζουν συγκεντρωτικά όλα τα

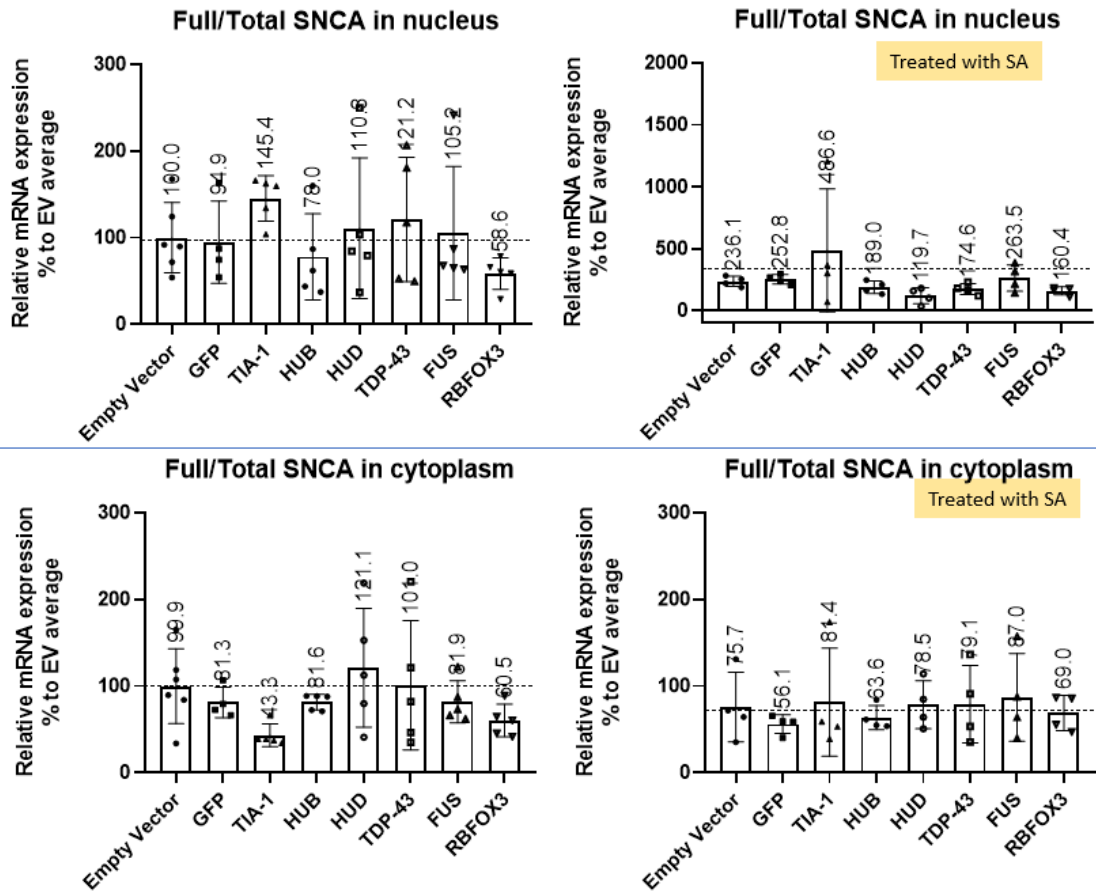
αποτελέσματα για κάθε πειραματική συνθήκη. Τα αποτελέσματα που αφορούν στις φυσιολογικές (untreated) συνθήκες προέρχονται από 5 πειραματικές επαναλήψεις (n=5), ενώ εκείνα που αφορούν στις συνθήκες επαγωγής οξειδωτικού στρες (treated with SA) προέρχονται από 4 επαναλήψεις (n=4). Εκτός από τον χωρίς ένθεμα φορέα (pENTR-GD), χρησιμοποιήθηκε ως control και ο ίδιος φορέας για την υπερέκφραση GFP υπό τον έλεγχο της αλληλουχίας IRES (Internal Ribosome Entry Site), για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της κυτταρικής διαμόλυνσης με τη χρήση μικροσκοπίου.



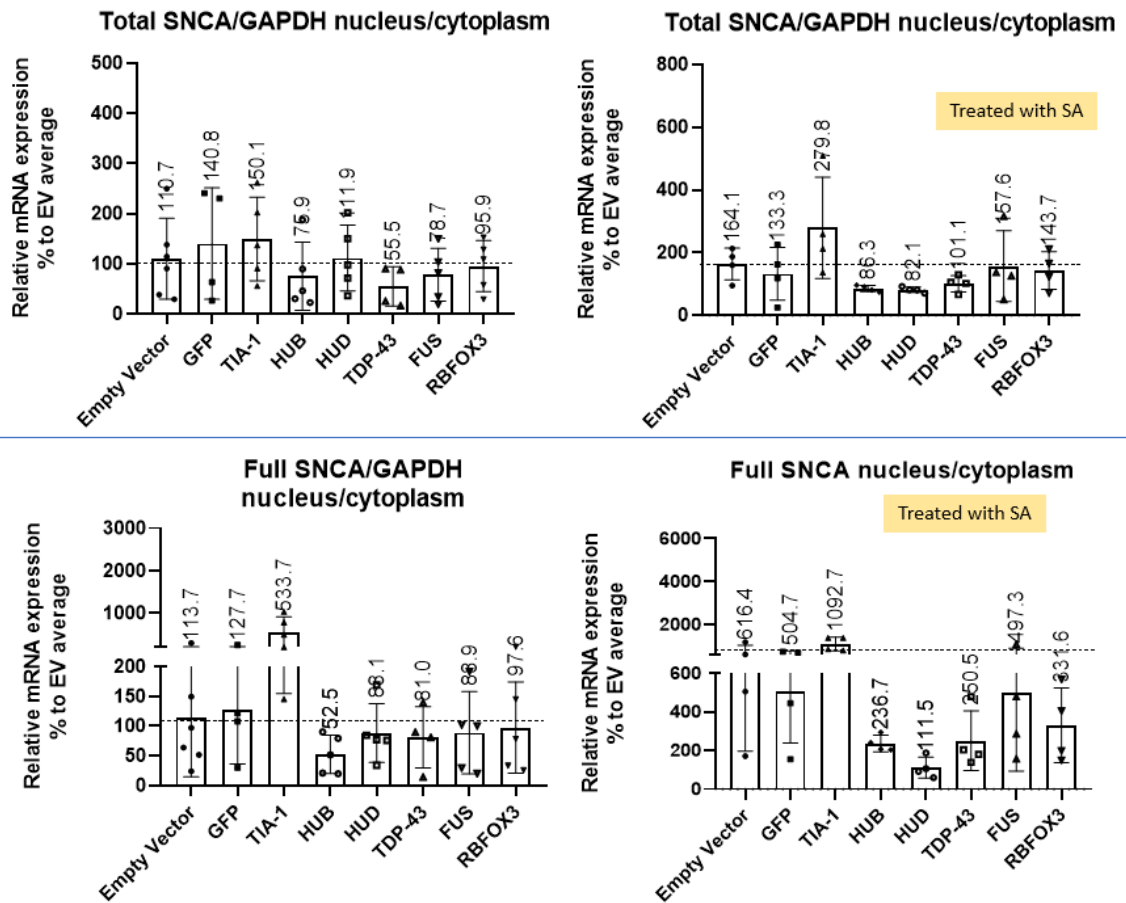
Εικόνα 18: Ραβδογράμματα σχετικής έκφρασης του total mRNA της α-συνουκλείνης ως προς το GAPDH mRNA, στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, σε φυσιολογικές (αριστερά) και συνθήκες στρες (δεξιά). Στο κάθε γράφημα αναγράφονται οι μέσοι όροι της σχετικής έκφρασης mRNA από κάθε πείραμα.



Εικόνα 19: Ραβδογράμματα σχετικής έκφρασης του full mRNA της α-συνουκλείνης ως προς το GAPDH mRNA, στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, σε φυσιολογικές (αριστερά) και συνθήκες στρες (δεξιά). Στο κάθε γράφημα αναγράφονται οι μέσοι όροι της σχετικής έκφρασης mRNA από κάθε πείραμα.



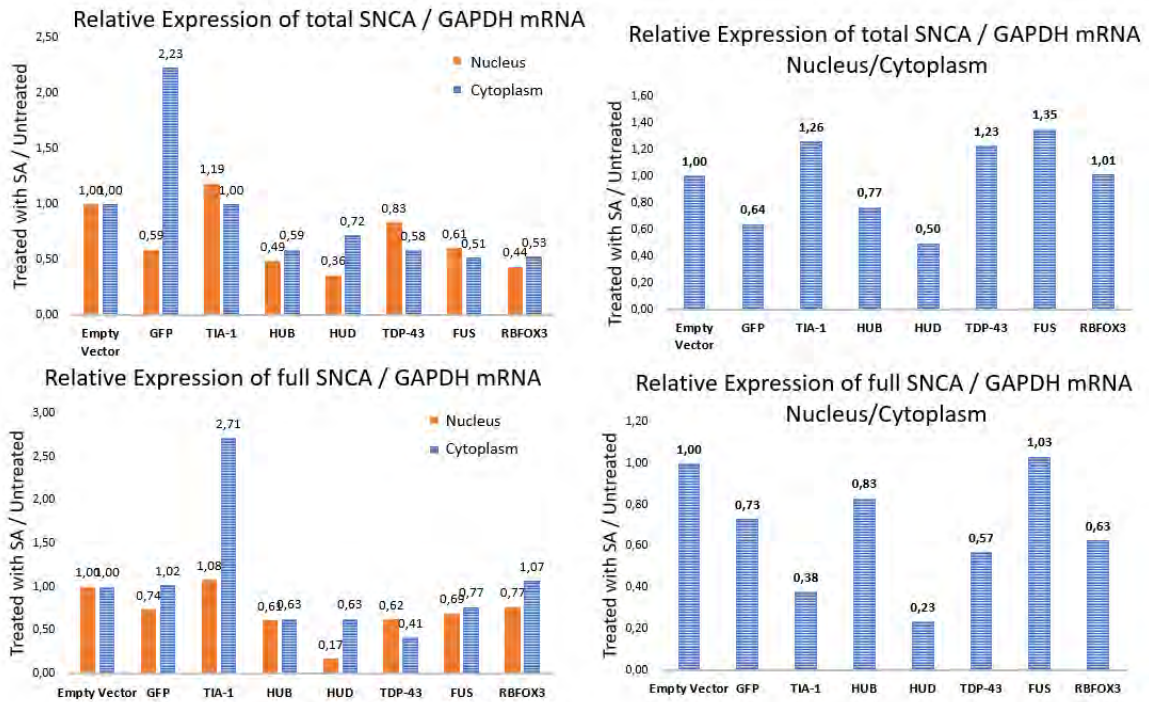
Εικόνα 20: Ραβδογράμματα σχετικής έκφρασης του full mRNA ως προς το total mRNA της α-συνουκλείνης, στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, σε φυσιολογικές (αριστερά) και συνθήκες στρες (δεξιά). Στο κάθε γράφημα αναγράφονται οι μέσοι όροι της σχετικής έκφρασης mRNA από κάθε πείραμα.



Εικόνα 21: Ραβδογράμματα του λόγου της σχετικής έκφρασης των total mRNA και του full mRNA της α-συνουκλείνης, στο πυρηνικό προς το κυτταροπλασματικό κλάσμα, σε φυσιολογικές (αριστερά) και συνθήκες στρες (δεξιά). Στο κάθε γράφημα αναγράφονται οι μέσοι όροι της σχετικής έκφρασης mRNA από κάθε πείραμα.

Επίδραση Sodium Arsenite

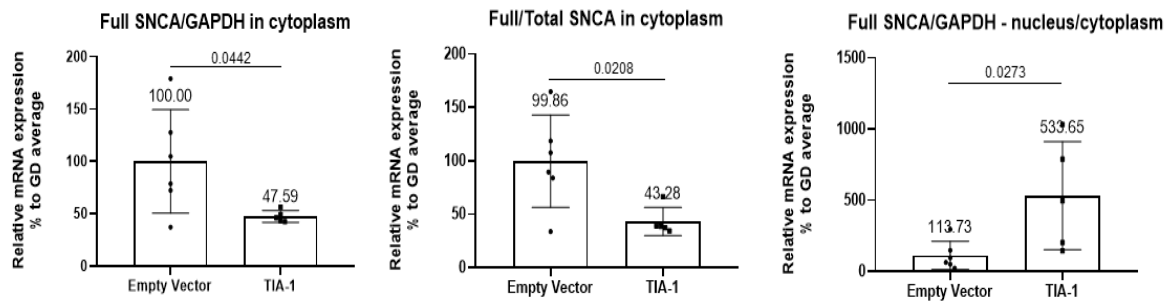
Ακόμη, για την εκτίμηση της επίδρασης του Sodium Arsenite στη σχετική έκφραση των mRNA μεταγράφων της α-συνουκλείνης, υπό την υπερέκφραση των 6 διαφορετικών RBPs, παράχθηκαν τα ραβδογράμματα που εκφράζουν το λόγο treated with Sodium Arsenite / Untreated, για τη σχετική έκφραση των total και full SNCA mRNA ως προς το GAPDH mRNA, σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα, καθώς και της διαφοράς τους στα δυο κυτταρικά κλάσματα.



Εικόνα 22: Ενδεικτικά ραβδογράμματα απεικόνισης της επίδρασης του Sodium Arsenite στη σχετική έκφραση του mRNA της α-συνουκλείνης, στον πυρήνα και στο κυταρόπλασμα. Για κάθε συνθήκη υπερέκφρασης, έχει υπολογιστεί η μέση τιμή από κάθε ξεχωριστό πείραμα και ο λόγος treated/untreated είναι κανονικοποιημένος ως προς το empty vector.

Υπερέκφραση TIA-1

Υπό την υπερέκφραση της TIA-1 σε φυσιολογικές συνθήκες, παρατηρήθηκε σημαντικά μειωμένη σχετική έκφραση του mRNA της α-συνουκλείνης με το μακρύ 3' UTR στο κυταρόπλασμα τόσο ως προς το GAPDH mRNA ($p=0.0442$) όσο και ως προς το total mRNA της α-συνουκλείνης ($p=0.0208$), σε σύγκριση με το control. Αντίθετα, παρουσία TIA-1, στον πυρήνα παρατηρήθηκε μια τάση για αύξηση λιγότερο της σχετικής έκφρασης του total (158,67) και περισσότερο αυτής του full (250,83) mRNA της α-συνουκλείνης, σε σύγκριση με το control (βλ. εικόνες 18, 19 & 20). Η αύξηση της σχετικής έκφρασης του mRNA της α-συνουκλείνης με το μακρύ 3' UTR στον πυρήνα και αντίστοιχη μείωσή της στο κυταρόπλασμα, αντανακλάται από ραβδόγραμμα του λόγου τους ($p=0.0273$). Κατά τα άλλα, η υπερέκφραση της TIA-1 δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη σχετική έκφραση του total SNCA mRNA, στο κυταρόπλασμα (εικ. 18) συγκριτικά με το μάρτυρα ελέγχου.



Εικόνα 23: Ποσοτική και στατιστική ανάλυση της σχετικής έκφρασης του full (2550nt 3'UTR) mRNA της α-συνουκλεΐνης, ως προς το GAPDH mRNA και το total mRNA της α-συνουκλεΐνης, στο κυτταρόπλασμα και του λόγου της στο πυρηνικό / κυτταροπλασματικό κλάσμα. Στο κάθε γράφημα αναγράφονται οι μέσοι όροι της σχετικής έκφρασης mRNA από κάθε πείραμα και η p value που προέκυψε από δοκιμασία Student's t-test μεταξύ του empty vector και της υπερέκφρασης της TIA-1.

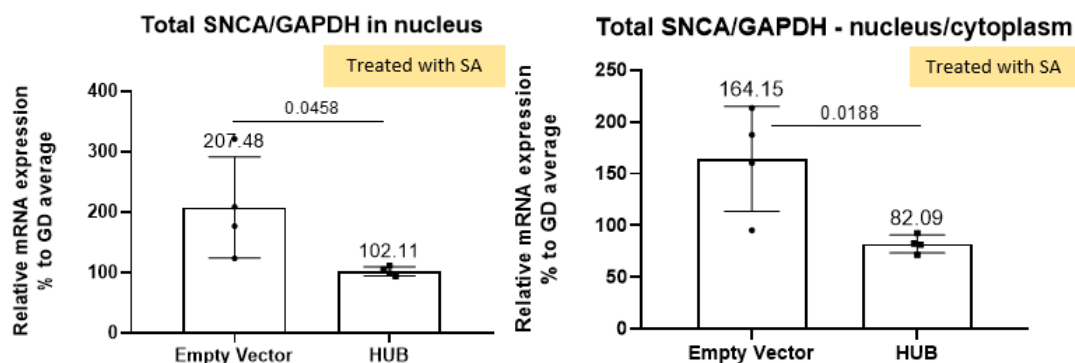
Κατά την επαγωγή οξειδωτικού στρες με Sodium Arsenite, υπό υπερέκφραση της TIA-1, παρατηρήθηκε μια γενικευμένη τάση για αύξηση της σχετικής έκφρασης και του total και του full mRNA της α-συνουκλεΐνης και στα δυο κυτταρικά κλάσματα (εικ. 18 & 19) παρότι δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με το μάρτυρα ελέγχου. Ωστόσο, από τα γραφήματα ποσοτικοποίησης της επίδρασης του κυτταρικού στρες (εικ. 22), είναι αξιοσημείωτο ότι υπό συνθήκες στρες και υπερέκφρασης TIA-1 αυξάνεται η σχετική έκφραση του full mRNA της α-συνουκλεΐνης στο κυτταρόπλασμα. Από τα παραπάνω, φαίνεται ότι η TIA-1 κρατάει το full SNCA mRNA εντός του πυρήνα υπό φυσιολογικές συνθήκες, ενώ όταν το κύτταρο στρεσάρεται, προωθεί την έξοδό του στο κυτταρόπλασμα.

Υπερέκφραση HuB

Υπό υπερέκφραση της HuB, όσον αφορά στο πυρηνικό κλάσμα, τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης του total SNCA mRNA δεν φάνηκαν να επηρεάζονται συγκριτικά με το μάρτυρα ελέγχου, ενώ όσον αφορά στο κυτταροπλασματικό κλάσμα, παρατηρήθηκε μια τάση για μικρή αύξησή τους ($p > 0,05$), σε φυσιολογικές συνθήκες. Σε συνθήκες στρες, ωστόσο, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επίπεδων σχετικής έκφρασης του total SNCA mRNA στον πυρήνα ($p = 0.0458$) σε σύγκριση με το control, ενώ στο κυτταρόπλασμα δεν σημειώθηκε κάποια στατιστικά σημαντική αλλαγή, παρότι η σχετική έκφραση του total SNCA mRNA παρουσίασε και πάλι φθίνουσα τάση. Συγκριτικά με το κυτταροπλασματικό κλάσμα, η σχετική έκφραση του total SNCA mRNA στον πυρήνα ήταν σημαντικά χαμηλότερη ($p = 0.018$) (εικ. 24).

Όσον αφορά τη σχετική έκφραση του mRNA της α-συνουκλεΐνης με το μακρύ 3'UTR, τα επίπεδά της, υπό υπερέκφραση HuB, βρέθηκαν χαμηλότερα σε σύγκριση με τον empty vector στον πυρήνα, λιγότερο στις φυσιολογικές και περισσότερο στις συνθήκες στρες. Στο κυτταρόπλασμα, επίσης παρατηρήθηκε μια τάση για μείωση της σχετικής έκφρασης του full SNCA mRNA υπό συνθήκες στρες και υπερέκφρασης HuB, σε σύγκριση με τις φυσιολογικές συνθήκες. Γενικά, όπως φαίνεται και από την εικόνα 22,

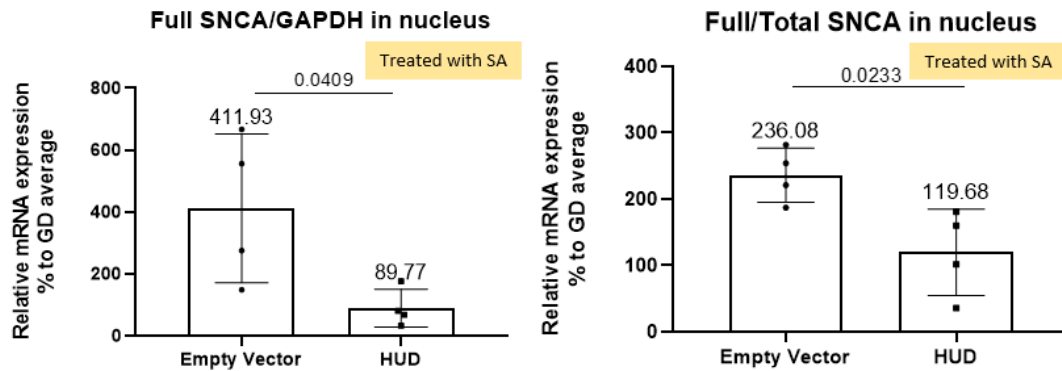
η επίδραση του Sodium Arsenite, υπό υπερέκφραση HuB, στην έκφραση του mRNA της α -συνουκλεΐνης (total & full) ήταν ασθενέστερη.



Εικόνα 24: Ποσοτική και στατιστική ανάλυση της σχετικής έκφρασης του total mRNA της α -συνουκλεΐνης ως προς το GAPDH mRNA στον πυρήνα και του λόγου της σχετικής έκφρασης του πυρηνικού προς το κυτταροπλασματικό total SNCA mRNA, υπό συνθήκες στρες. Στο κάθε γράφημα αναγράφονται οι μέσοι όροι της σχετικής έκφρασης mRNA από κάθε πείραμα και η p value που προέκυψε από δοκιμασία Student's t-test μεταξύ του empty vector και της υπερέκφρασης της HuB.

Υπερέκφραση HuD

Υπό την υπερέκφραση της HuD σε φυσιολογικές συνθήκες δεν σημειώθηκε κάποια σημαντική αλλαγή στη σχετική έκφραση των total και full SNCA mRNA μεταγράφων στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, συγκριτικά με το empty vector (μικρή τάση προς αύξηση, $p > 0,05$) (εικ. 18, 19). Η επαγωγή του οξειδωτικού στρες είχε χαμηλή επίδραση στη σχετική έκφραση του total στον πυρήνα (0,36) και ακόμα χαμηλότερη στην έκφραση του full SNCA mRNA μεταγράφου, η οποία μειώθηκε σημαντικά στον πυρήνα ($p = 0,0409$), σε σχέση με τα controls, στα οποία σημειώθηκε αύξηση στη σχετική έκφραση του. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει έναν προστατευτικό ρόλο της HuD προς το full SNCA mRNA (και λιγότερο του total), μέσα στον πυρήνα, υπό συνθήκες στρες. Παρότι, υπό συνθήκες στρες παρατηρήθηκε κάποια μείωση της σχετικής έκφρασης του total SNCA mRNA στον πυρήνα, η μείωση που σημειώθηκε για το full SNCA mRNA μεταγραφο ήταν σημαντικά μεγαλύτερη, κρίνοντας από το γράφημα του λόγου τους ($p = 0,0233$) (εικ. 25). Στο κυτταρόπλασμα, η σχετική έκφραση του full SNCA mRNA δεν φάνηκε να διαφέρει σε σύγκριση με το empty vector, ωστόσο σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες φάνηκε πως μειώθηκε ελαφρώς. Όσον αφορά στο total mRNA της α -συνουκλεΐνης, η σχετική του έκφραση στο κυτταρόπλασμα δεν φάνηκε να επηρεάστηκε παρουσία στρες.



Εικόνα 25: Ποσοτική και στατιστική ανάλυση της σχετικής έκφρασης του full mRNA της α-συνουκλεΐνης ως προς το GAPDH mRNA και ως προς το total SNCA mRNA, στον πυρήνα, υπό συνθήκες στρες. Στο κάθε γράφημα αναγράφονται οι μέσοι όροι της σχετικής έκφρασης mRNA από κάθε πείραμα και η p value που προέκυψε από δοκιμασία Student's t-test μεταξύ του empty vector και της υπερέκφρασης της HuD.

Υπερέκφραση TDP-43 και FUS

Η υπερέκφραση των RBPs TDP-43 και FUS, σε φυσιολογικές αλλά και σε συνθήκες στρες, δεν επηρέασε σημαντικά τη σχετική έκφραση των total και full mRNA μεταγράφων της α-συνουκλεΐνης, σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα, σε σύγκριση με τα controls τους ($p > 0.05$) (εικόνες 18 & 19). Ωστόσο, σε σύγκριση με τις φυσιολογικές συνθήκες, κατά την επαγωγή στρες, παρατηρήθηκε μεν μια τάση προς αύξηση των επιπέδων της σχετικής έκφρασης των full και total SNCA mRNA στον πυρήνα, μικρότερη δε από αυτή που σημειώθηκε στα controls. Στο κυτταρόπλασμα, σημειώθηκε μια τάση για μείωση της σχετικής έκφρασης των total και full SNCA mRNA, κατά την επαγωγή στρες, υπό υπερέκφραση FUS και TDP-43, σε σύγκριση με τις φυσιολογικές συνθήκες, ωστόσο δεν υπήρχε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

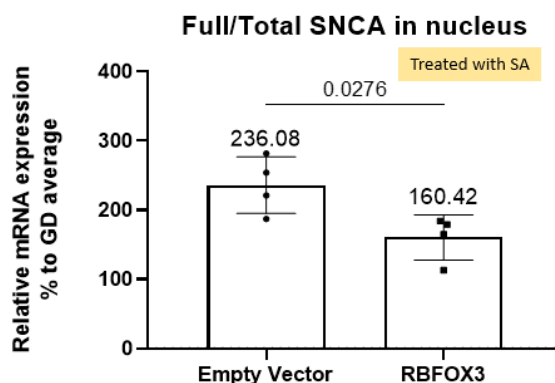
Υπερέκφραση Rbfox3

Υπό την υπερέκφραση της Rbfox3, σε φυσιολογικές συνθήκες, η σχετική έκφραση του total mRNA της α-συνουκλεΐνης παρουσίασε μια τάση για αύξηση ($p > 0,05$), τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, σε σύγκριση με το μάρτυρα ελέγχου, ενώ όσον αφορά στο full SNCA mRNA μετάγραφο, δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή σε σχέση με το μάρτυρα.

Σε συνθήκες στρες, τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης του total mRNA της α-συνουκλεΐνης δεν σημείωσαν αυτή την τάση προς αύξηση που παρατηρήθηκε στις φυσιολογικές συνθήκες και η επίδραση του sodium arsenite ήταν χαμηλή, μειώνοντας τα επίπεδα της σχετικής έκφρασης του total SNCA mRNA σε σύγκριση με τις φυσιολογικές συνθήκες (0,44 ο λόγος στον πυρήνα και 0,53 στο κυτταρόπλασμα – εικ. 22).

Με την επαγωγή του οξειδωτικού στρες, ο λόγος της σχετικής έκφρασης του full SNCA προς τη σχετική έκφραση του total SNCA mRNA ήταν μειωμένος σε σύγκριση με τον empty vector, στον πυρήνα ($p = 0,0276$, εικ. 26). Σε σύγκριση με τις φυσιολογικές

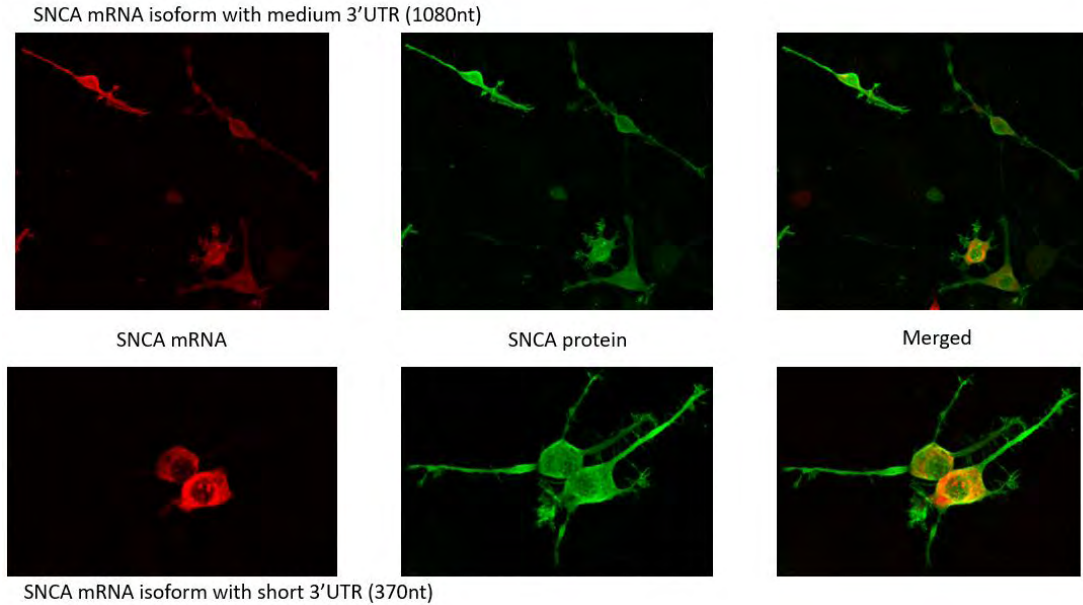
συνθήκες, η επίδραση του sodium arsenite αύξησε τη σχετική έκφραση του πυρηνικού full SNCA mRNA, όχι όμως όσο αυξήθηκε στο control. Όσον αφορά στο κυτταρόπλασμα, τα επίπεδα σχετικής έκφρασης του full SNCA mRNA δεν παρουσίασαν κάποια διαφορά σε σύγκριση με το control, αλλά ούτε και σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες (εικ. 19 & 22).



Εικόνα 26: Ποσοτική και στατιστική ανάλυση της σχετικής έκφρασης του full mRNA της α-συνουκλείνης ως προς το total SNCA mRNA, στον πυρήνα, υπό συνθήκες στρες. Στο γράφημα αναγράφονται οι μέσοι όροι της σχετικής έκφρασης mRNA από κάθε πείραμα και η p value που προέκυψε από δοκιμασία Student's t-test μεταξύ του empty vector και της υπερέκφρασης της Rbfox3.

3.3 Ανάλυση Συνεστιακής Μικροσκοπίας Φθορισμού

Παράλληλα με τα παραπάνω πειράματα, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με το φορέα pAAV-Gateway στην κυτταρική σειρά CAD, για υπερέκφραση τεσσάρων ισομορφών της α-συνουκλείνης με διαφορετικά μήκη 3'UTR (370nt & 570nt – βραχεία, 1080nt – μεσαία και 2550nt – μακρύ), και συν-διαμόλυνση με το φορέα pENTR-GD διπλή υπερέκφραση της α-συνουκλείνης και της RBP HuD. Κατόπιν, εκτελέστηκε φθορίζον *in situ* υβριδισμός με ανοσοφθορισμό, με στόχο τη σήμανση τόσο του mRNA όσο και της ίδιας της πρωτεΐνης με φθορίζουσες χρωστικές. Τέλος, με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας (40X αντικειμενικός φακός), φωτογραφήθηκαν κύτταρα από κάθε πειραματική συνθήκη και με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος ImageJ/Fiji αναλύθηκε ποιοτικά και ποσοτικά η έκφρασή της α-συνουκλείνης, μέσω της μέτρησης της μέσης έντασης του φθορισμού ανά περιοχή (εμβადόν), τόσο της α-συνουκλείνης (πράσινο χρώμα φθορισμού), όσο και του mRNA της (κόκκινο) (εικόνα 27). Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν ξεχωριστά οι περιοχές του πυρήνα, του κυτταροπλάσματος, του σώματος (πυρήνας + κυτταρόπλασμα) και του άξονα (ή αξόνων) του κάθε νευρικού κυττάρου. Τα αποτελέσματα προέρχονται από 4 πειραματικές επαναλήψεις, ενώ συνολικά μετρήθηκαν ~50 κύτταρα από κάθε πειραματική συνθήκη.

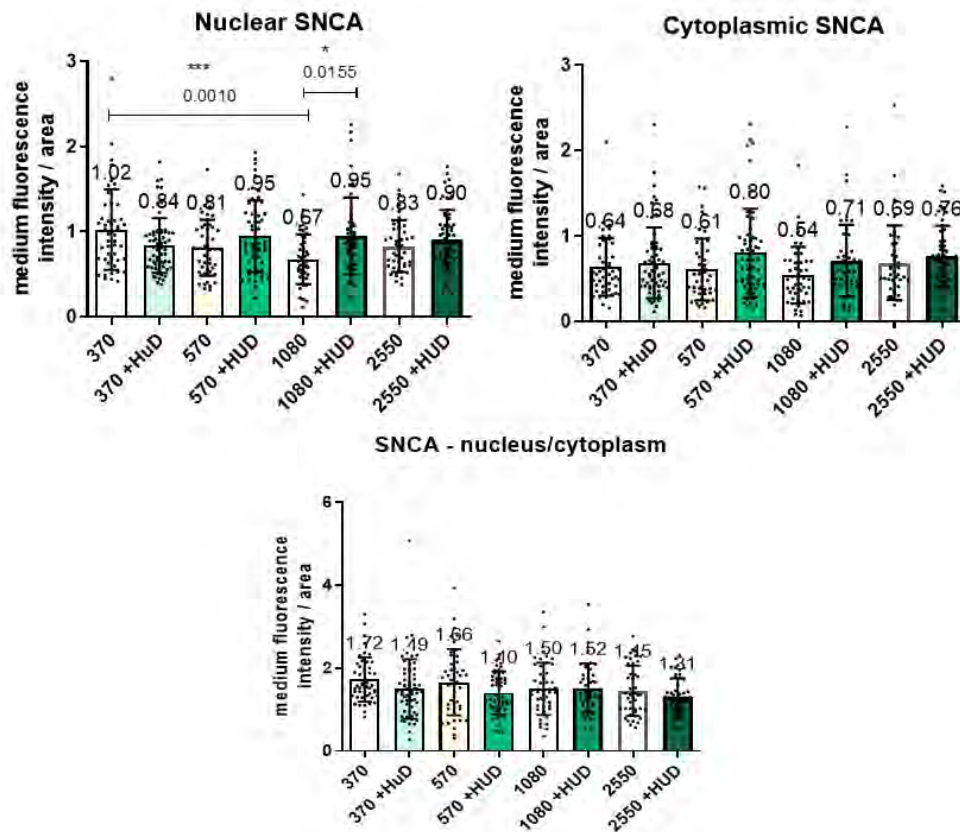


Εικόνα 27: Ενδεικτικές εικόνες των φωνογραφημένων κυττάρων CAD που παράχθηκαν κατά την ποσοτικοποίηση και ανάλυση της συνεστιακής μικροσκοπίας. Στην εικόνα αναγράφεται η πειραματική συνθήκη υπερέκφρασης για την κάθε τριπλέτα εικόνων.

Με συν-υπερέκφραση HuD, η α-συνουκλείνη συγκεντρώνεται περισσότερο στο σώμα των νευρώνων

Γενικά, σε κάθε πειραματική συνθήκη παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση στις τιμές της μέσης έντασης φθορισμού της α-συνουκλείνης προς το εμβαδόν της κάθε κυτταρικής περιοχής. Στον πυρήνα, σημειώθηκε σημαντική αύξηση της μέσης έντασης φθορισμού υπό συν-υπερέκφραση με HuD της ισομορφής της α-συνουκλείνης με το μεσαίο 3'UTR (1080nt), σε σύγκριση με τις συνθήκες απλής υπερέκφρασής της ($p=0,0155$). Επίσης, υπό υπερέκφραση της ισομορφής με το 1080nt 3'UTR παρατηρήθηκε η χαμηλότερη ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης εντός πυρήνα και σε σύγκριση με τις συνθήκες υπερέκφρασης της ισομορφής με 370nt 3'UTR η διαφορά τους ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,001$). Με εξαίρεση τις συνθήκες υπερέκφρασης της ισομορφής με το 370nt 3'UTR, υπό συν-υπερέκφραση της HuD, η α-συνουκλείνη παρουσίασε μια γενική τάση προς αύξηση των επιπέδων της μέσης έντασης φθορισμού εντός του πυρήνα, απ' ότι απουσία της HuD.

Στο κυτταρόπλασμα, η μέση ένταση του φθορισμού της α-συνουκλείνης φάνηκε να αυξάνεται γενικά υπό συν-υπερέκφραση HuD και κυρίως στις ισομορφές με τα 570nt 3'UTR και με τα 1080nt 3'UTR (ns) αλλά οι διαφορές ανάμεσα στις τιμές δεν παρουσιάζουν κάποια στατιστική σημαντικότητα.

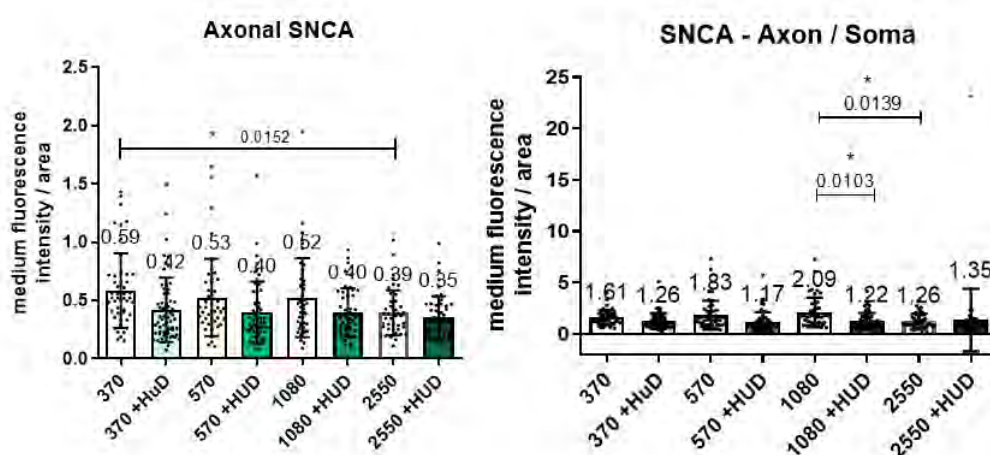


Εικόνα 28: Ραβδογράμματα απεικόνισης της μέσης έντασης του φθορισμού της α-συνουκλεΐνης προς το εμβადόν του πυρήνα, του κυτταροπλάσματος και του λόγου τους, υπό την υπερέκφραση της κάθε ισομορφής με διαφορετικό μήκος 3' UTR (άξονας χ) με ή χωρίς συν-υπερέκφραση της HuD. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ πολλαπλών μεταβλητών (Brown-Forsythe and Welch one-way ANOVA) και post hoc ανάλυση. Στα γραφήματα αναγράφονται η μέση τιμή που προκύπτει από τις τιμές μέσης έντασης φθορισμού/εμβαδόν που μετρήθηκαν σε κάθε ξεχωριστό κύτταρο, καθώς και οι στατιστικά σημαντικές p values.

Ο εντοπισμός της α-συνουκλεΐνης στους άξονες των νευρώνων δεν προωθείται από τη HuD αλλά υπό υπερέκφραση της ισομορφής με 3'UTR 1080nt

Όσον αφορά στους άξονες, η α-συνουκλεΐνη εμφάνισε χαμηλότερη ένταση φθορισμού σε συνθήκες υπερέκφρασης της full 3'UTR ισομορφής (2550nt) σε σύγκριση με τις short 3'UTR ισομορφές (370 – $p=0,0152$ και 570 – not significant), ενώ με συν-υπερέκφραση της HuD η αντίστοιχη διαφορά είναι μικρότερη (ns). Σε γενικές γραμμές, η υπερέκφραση της HuD μείωσε το φθορισμό και κατ' επέκταση τη συγκέντρωση της α-συνουκλεΐνης στους άξονες καθώς σε όλες τις ισομορφές παρατηρείται μια μικρή μείωση του φθορισμού υπό υπερέκφραση της HuD, ωστόσο, όχι στατιστικά σημαντική. Πάντως, η HuD δεν φαίνεται να συμβάλλει άμεσα στη στρατολόγηση της α-συνουκλεΐνης στους άξονες. Από τον λόγο της μέσης έντασης φθορισμού στους άξονες προς τη μέση ένταση φθορισμού στο σώμα των κυττάρων, βρέθηκε ότι σε συνθήκες υπερέκφρασης της ισομορφής με 3'UTR 1080nt, η α-συνουκλεΐνη φθόριζε εντονότερα στους άξονες απ' ότι στο σώμα των νευρώνων συγκριτικά με τις συνθήκες συν-υπερέκφρασής της με την HuD ($p=0,0103$) αλλά και με τις συνθήκες υπερέκφρασης της ισομορφής με 2550nt 3'UTR ($p=0,0139$). Σε συνδυασμό με το

γεγονός ότι υπό υπερέκφραση της μεσαίου μήκους 3'UTR ισομορφής της, η α-συνουκλεΐνη εμφάνιζε χαμηλότερη συγκέντρωση στον πυρήνα αλλά και στο κυτταρόπλασμα, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι το 3'UTR με μήκος 1080 νουκλεοτίδια έχει την τάση να κατευθύνει την α-συνουκλεΐνη περισσότερο προς τους άξονες των νευρώνων. Ίσως σε αυτή τη λειτουργία να συμμετέχουν και άλλα μόρια-συνοδοί, ωστόσο, η HuD δεν φαίνεται να είναι ένα από αυτά.

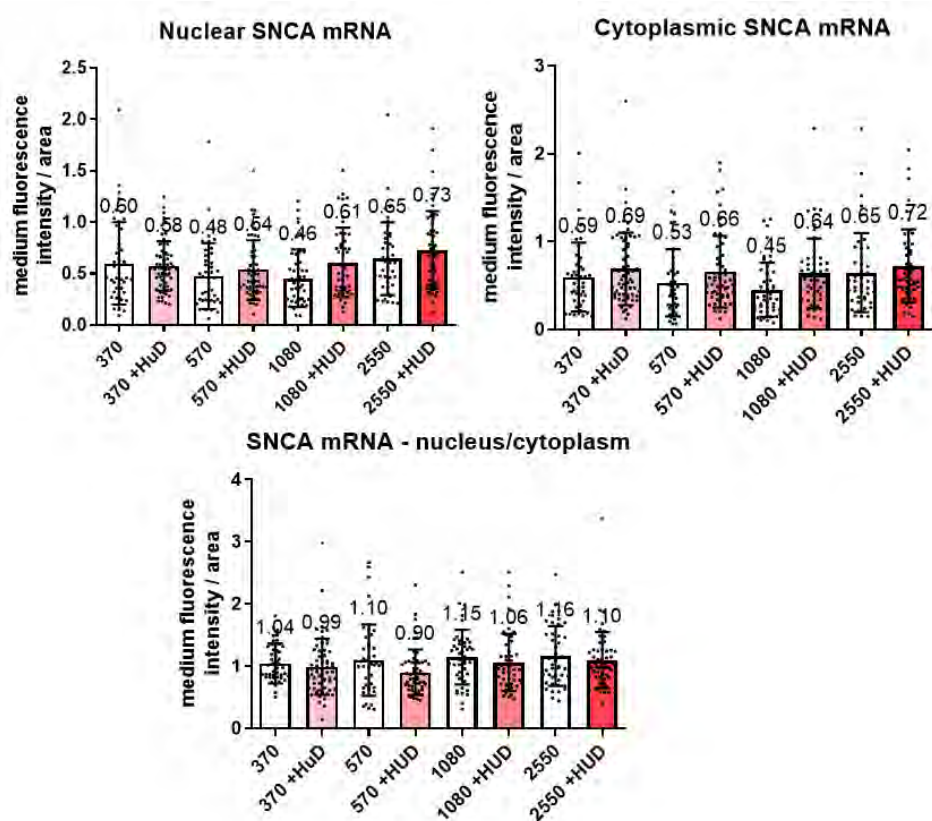


Εικόνα 29: Ραβδογράμματα απεικόνισης της μέσης έντασης του φθορισμού της α-συνουκλεΐνης προς το εμβασόν του νευρικού άξονα και του λόγου της αξονικής μέσης έντασης φθορισμού προς αυτή στο σώμα του νευρώνα, υπό την υπερέκφραση της κάθε ισομορφής με διαφορετικό μήκος 3' UTR (άξονας χ) με ή χωρίς συν-υπερέκφραση της HuD. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ πολλαπλών μεταβλητών (Brown-Forsythe and Welch one-way ANOVA) και post hoc ανάλυση. Στα γραφήματα αναγράφονται η μέση τιμή που προκύπτει από τις τιμές μέσης έντασης φθορισμού/εμβασόν που μετρήθηκαν σε κάθε ξεχωριστό κύτταρο, καθώς και οι στατιστικά σημαντικές p values.

Όσον αφορά στη μέση ένταση του φθορισμού του mRNA της α-συνουκλεΐνης, και πάλι παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση από κύτταρο σε κύτταρο, για την κάθε συνθήκη. Η παρατήρηση (από τις Real-Time PCR) ότι η ισομορφή με το μακρύ 3'UTR (2550nt) συγκεντρώνεται περισσότερο εντός του πυρήνα απ' ότι στο κυτταρόπλασμα, έναντι της ισομορφής με το κοντό 3'UTR, δεν επιβεβαιώθηκε από αυτή την ανάλυση, καθώς ο λόγος της μέσης έντασης φθορισμού του mRNA της α-συνουκλεΐνης στον πυρήνα προς αυτήν του κυτταροπλάσματος είναι περίπου ο ίδιος τόσο σε συνθήκες υπερέκφρασης του βραχέος μήκους 3'UTR (370 & 570nt) όσο και σε συνθήκες υπερέκφρασης του μεγάλου μήκους 3'UTR μεταγράφου (οι λόγοι κυμαίνονται από 1,04 έως 1,16 και από 0,9 έως 1,1 με συν-υπερέκφραση HuD). Αυτή η αντίφαση μπορεί να οφείλεται στις συνθήκες υπερέκφρασης, ενώ η παρατήρηση από τις PCR αφορά στο ενδογενές mRNA της α-συνουκλεΐνης.

Με εξαίρεση την ισομορφή mRNA με το πολύ κοντό 3'UTR (370nt), η υπερέκφραση της HuD αυξάνει ελαφρώς τα επίπεδα φθορισμού των υπόλοιπων ισομορφών mRNA της α-συνουκλεΐνης εντός του πυρήνα, χωρίς να παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Στο κυτταρόπλασμα, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ισομορφές του mRNA. Γενικά, όπως φάνηκε και στην πρωτεΐνη, με συν-υπερέκφραση της HuD, αυξάνεται ελαφρώς ο φθορισμός του SNCA mRNA στο κυτταρόπλασμα, σε όλες τις συνθήκες. Συμπερασματικά, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η HuD έχει έναν θετικό ρόλο στη σταθερότητα του mRNA της α-συνουκλείνης.

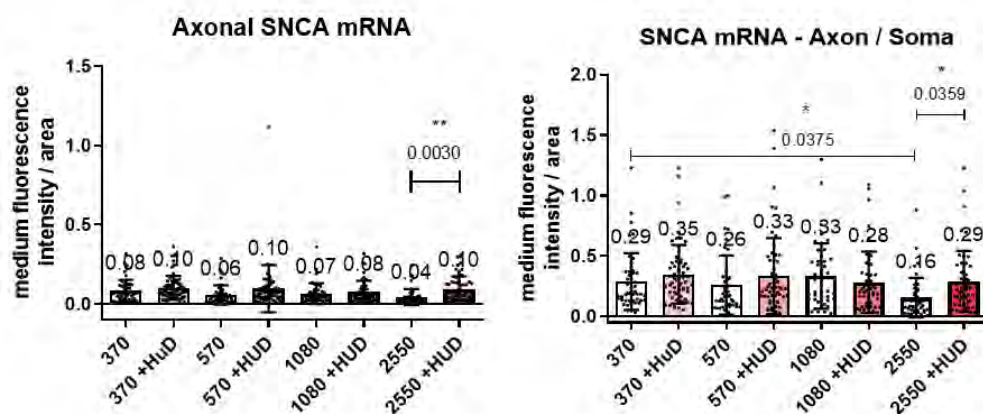


Εικόνα 30: Ραβδογράμματα απεικόνισης της μέσης έντασης του φθορισμού του mRNA της α-συνουκλείνης προς το εμβαδόν του πυρήνα, του κυτταροπλάσματος και του λόγου τους, υπό την υπερέκφραση της κάθε ισομορφής με διαφορετικό μήκος 3' UTR (άξονας χ) με ή χωρίς συν-υπερέκφραση της HuD. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ πολλαπλών μεταβλητών (Brown-Forsythe and Welch one-way ANOVA) και post hoc ανάλυση. Στα γραφήματα αναγράφονται η μέση τιμή που προκύπτει από τις τιμές μέσης έντασης φθορισμού/εμβαδόν που μετρήθηκαν σε κάθε ξεχωριστό κύτταρο, καθώς και οι στατιστικά σημαντικές p values (εδώ δεν υπήρχαν, $p > 0,05$).

Τέλος, παρατηρείται, γενικώς, ότι οι τιμές της μέσης έντασης φθορισμού του mRNA στους άξονες είναι αρκετά χαμηλές. Υπό υπερέκφραση του mRNA μεταγράφου με το μακρύ 3'UTR (2550nt), σημειώθηκε η χαμηλότερη μέση ένταση φθορισμού (0,04) που αντιστοιχεί στην ελάχιστη συγκέντρωση mRNA, στους άξονες των νευρώνων. Ωστόσο, υπό συν-υπερέκφραση της HuD, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στη μέση ένταση του φθορισμού (0,1) ($p=0,003$), γεγονός που καταδεικνύει ότι η HuD προωθεί τη στρατολόγηση του μεταγράφου με το μακρύ 3'UTR (2550nt) προς τους άξονες. Τα παραπάνω δεδομένα αντανακλώνονται και από τον λόγο της μέσης έντασης φθορισμού στους άξονες προς τη μέση ένταση φθορισμού στο σώμα των νευρώνων, όπου η

διαφορά στη μέση ένταση φθορισμού μεταξύ των συνθηκών υπερέκφρασης των ισομορφών με 370nt 3'UTR και 2550nt 3'UTR ($p=0,0375$), καθώς και η διαφορά μεταξύ των συνθηκών υπερέκφρασης του μεταγράφου με 2550nt 3'UTR $-/+$ HUD ($p=0,359$) παρουσίασαν στατιστική σημαντικότητα.

Γενικότερα, μικρότερης τάξης αυξήσεις παρατηρήθηκαν στη μέση ένταση του φθορισμού και για τις υπόλοιπες ισομορφές, συνιστώντας το θετικό ρόλο της HuD στη μεταφορά του mRNA της α-συνουκλείνης προς τους άξονες.

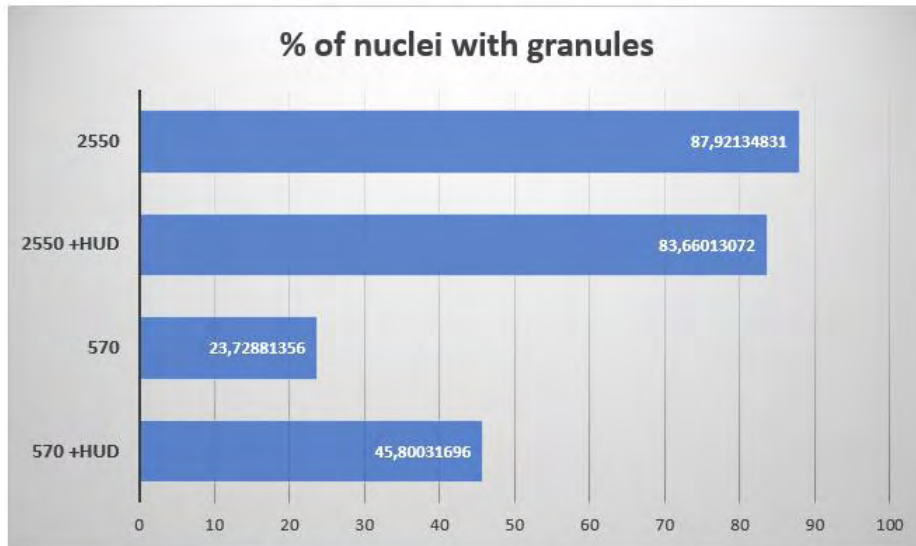


Εικόνα 31: Ραβδογράμματα απεικόνισης της μέσης έντασης του φθορισμού του mRNA της α-συνουκλείνης προς το εμβαδόν του νευρικού άξονα και του λόγου της αξονικής μέσης έντασης φθορισμού προς αυτή στο σώμα του νευρώνα, υπό την υπερέκφραση της κάθε ισομορφής με διαφορετικό μήκος 3' UTR (άξονας χ) με ή χωρίς συν-υπερέκφραση της HuD. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ πολλαπλών μεταβλητών (Brown-Forsythe and Welch one-way ANOVA) και post hoc ανάλυση. Στα γραφήματα αναγράφονται η μέση τιμή που προκύπτει από τις τιμές μέσης έντασης φθορισμού/εμβαδόν που μετρήθηκαν σε κάθε ξεχωριστό κύτταρο, καθώς και οι στατιστικά σημαντικές p values.

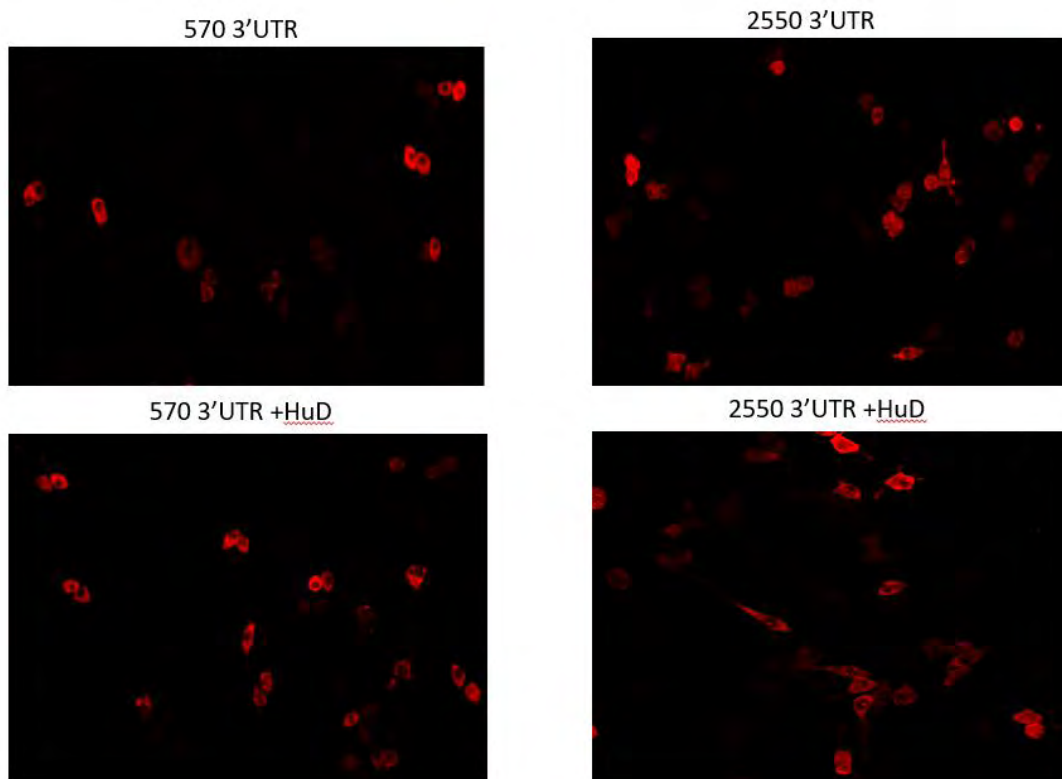
Ποσοτικοποίηση του ποσοστού των πυρήνων με mRNA κοκκία

Κατά την παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο, εντοπίστηκαν κάποιες ποιοτικές διαφορές ανάμεσα στις συνθήκες υπερέκφρασης της ισομορφής με το μακρύ 3'UTR (2550nt) και της ισομορφής με το βραχύ 3'UTR (570nt). Συγκεκριμένα, στα κύτταρα όπου είχε υπερεκφραστεί το μακρύ 3'UTR μετάγραφο, το mRNA σχημάτιζε κοκκία εντός των πυρήνων (granules), κάτι που δεν συνέβαινε κατά κύριο λόγο, υπό υπερέκφραση του κοντού 3'UTR μεταγράφου. Με τη χρήση του αντικειμενικού φακού 20X, φωτογραφήθηκαν κύτταρα από τις δυο αυτές συνθήκες και μετρήθηκε ο αριθμός των κυττάρων με mRNA κοκκία εντός του πυρήνα, καθώς και ο συνολικός αριθμός των κυττάρων ανά φωτογραφία, σε κάθε πειραματική συνθήκη, με και χωρίς συν-υπερέκφραση της HuD, για την ποσοτικοποίηση αυτού του φαινομένου. Στο παρακάτω γράφημα, εκφράζεται το ποσοστό % των κυττάρων με mRNA κοκκία εντός του πυρήνα προς τον συνολικό αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν. Όντως, από την ποσοτικοποίηση αυτή, φαίνεται ότι υπό υπερέκφραση του mRNA με 3'UTR 2550nt, το 87,9% των κυττάρων περιλάμβανε πυρήνες με mRNA κοκκία, ενώ υπό υπερέκφραση του μεταγράφου με το βραχύ 3'UTR (570nt), αυτό συνέβαινε σε

ποσοστό μόλις 23,7%. Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και με συν-υπερέκφραση HuD, ωστόσο εδώ η διαφορά ήταν μικρότερη. Οι πυρήνες με κοκκία mRNA αυξήθηκαν σε συνθήκες συν-υπερέκφρασης της HuD με το βραχύ μετάγραφο (3'UTR 570nt) από 23,7% (-HuD), στο 45,8%. Μια πιθανή εξήγηση είναι η HuD να δεσμεύει έως ένα βαθμό mRNA μόρια της α-συνουκλεΐνης εντός του πυρήνα σχηματίζοντας RNP κοκκία.



Εικόνα 32: Ραβδόγραμμα έκφρασης του % ποσοστού των κυτάρων με mRNA κοκκία εντός του πυρήνα ως προς τον συνολικό αριθμό των κυτάρων. Συνολικά μετρήθηκαν 631, 120, 612 & 351 κύτταρα για τις συνθήκες που αναγράφονται στο γράφημα, με σειρά από κάτω προς τα πάνω, αντίστοιχα (n=4 για τα 570 και 2550, ενώ n=5 για τα 570 και 2550 +HuD).



Εικόνα 33: Απεικόνιση των κυττάρων CAD υπό συνθήκες υπερέκφρασης των ισομορφών του mRNA της α-συνουκλεΐνης με μήκος 3'UTR 570 και 2550 νουκλεοτιδίων, χωρίς (πάνω) και με συν-υπερέκφραση της RBP HuD (κάτω). Η πλειοψηφία των κυττάρων στις εικόνες της δεξιάς πλευράς (2550 & 2550 +HuD) περιέχει κοκκία mRNA (κόκκινο χρώμα που φθορίζει ο ειδικός RNA probe για το SNCA mRNA), εντός των πυρήνων τους, σε αντίθεση με τα κύτταρα των εικόνων στα αριστερά (570 +/- HuD).

4 Συμπεράσματα – Συζήτηση

Από τα πειραματικά δεδομένα προέκυψε ότι το εναλλακτικό ενδογενές mRNA μετάγραφο της α-συνουκλεΐνης με το μακρύ 3'UTR (2550nt) έχει την τάση να συγκεντρώνεται περισσότερο στο εσωτερικό του πυρήνα απ' ό,τι στο κυτταρόπλασμα. Η επαγωγή οξέος οξειδωτικού στρες με προσθήκη sodium arsenite είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων σχετικής έκφρασης του total και ακόμα περισσότερο του full (περίπου 3 φορές) SNCA mRNA στο πυρηνικό κλάσμα, στους μάρτυρες ελέγχου (empty vector και GFP). Στο κυτταρόπλασμα, η επίδραση του sodium arsenite δεν οδήγησε σε ιδιαίτερες αλλαγές, με τα επίπεδα σχετικής έκφρασης του total SNCA mRNA να είναι ελαφρώς αυξημένα και του full SNCA mRNA ελαφρώς ελαττωμένα.

Από τη βιβλιογραφία, έχει βρεθεί ότι η TIAR αλληλοεπιδρά με την 3' αμετάφραστη περιοχή του SNCA mRNA, οδηγώντας στη θετική ρύθμιση της ενδογενούς α-συνουκλεΐνης, καθώς σταθεροποιεί το mRNA της και προωθεί τη μετάφρασή του. Όσον αφορά στην TIA-1, που εμφανίζει 80% ομολογία σε πρωτεϊνικό επίπεδο με την TIAR, υπό υπερέκφρασή της σε φυσιολογικές συνθήκες, παρατηρείται μια τάση για αύξηση των επιπέδων του εναλλακτικού SNCA mRNA με 3'UTR 2550nt εντός του πυρήνα και για μείωσή τους στο κυτταρόπλασμα. Η έκφραση του total mRNA της α-συνουκλεΐνης παραμένει σχετικά σταθερή σε σχέση με το μάρτυρα ελέγχου. Η επίδραση του sodium arsenite, κατά την υπερέκφραση της TIA-1, στο total SNCA mRNA είναι ανάλογη με την επίδραση που παρατηρήθηκε στα controls. Ωστόσο, σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες, όπου υπό υπερέκφραση TIA-1 μειωνόταν το full SNCA mRNA στο κυτταρόπλασμα, παρουσία sodium arsenite, η σχετική του έκφραση αυξήθηκε στο επίπεδο των control. Με άλλα λόγια, η TIA-1 υπό φυσιολογικές συνθήκες φαίνεται να κρατάει το full SNCA mRNA μέσα στον πυρήνα, αναστέλλοντας την έξοδό του στο κυτταρόπλασμα, ενώ αυτή η αναστολή αίρεται υπό συνθήκες στρες.

Η υπερέκφραση των HuB, HuD, TDP-43, FUS και λιγότερο της RBFOX3 αντισταθμίζει την τάση για αύξηση των επιπέδων σχετικής έκφρασης των total και full SNCA mRNA που προκαλεί το sodium arsenite στον πυρήνα των κυττάρων SKNSH, κρατώντας περίπου σταθερές τις τιμές τους και χαμηλότερες απ' τις τιμές των controls τους, ενώ στην περίπτωση της HuD, αυτή η αντιστάθμιση είναι ακόμα μεγαλύτερη καθώς το πυρηνικό full SNCA mRNA όχι απλά δεν αυξάνεται αλλά μειώνεται υπό συνθήκες στρες. Αν η τάση για αύξηση του SNCA mRNA στον πυρήνα που προκαλεί η επίδραση του sodium arsenite αντανάκλα μια γενικότερη παθολογική έκφραση του mRNA της α-συνουκλεΐνης, τότε μπορεί να υποστηριχθεί ότι οι RBPs HuB, HuD, TDP-43 και FUS (και λιγότερο η RBFOX3) έχουν έναν θετικό ρόλο στη σταθερότητα του, προστατεύοντας το από την αύξηση της έκφρασής του, που ίσως τελικά να οδηγούσε σε αυξημένα επίπεδα α-συνουκλεΐνης ή ακόμα και στη συσσωμάτωσή της.

Στο κυτταρόπλασμα, αυτή η αντιστάθμιση της επίδρασης του στρες παρατηρείται σε μικρότερο ποσοστό στο total SNCA mRNA υπό υπερέκφραση των HuB, TDP-43, FUS και RBFOX3, ενώ στο full SNCA mRNA αυτό το καταφέρει μόνο η TIA-1, όπως προαναφέρθηκε.

Από την ανάλυση της συνεστιακής μικροσκοπίας, η συγκέντρωση της α-συνουκλεΐνης υπό υπερέκφραση της ισομορφής του mRNA της με μεσαίο μήκος 3'UTR ήταν μεγαλύτερη στους άξονες απ' ό,τι στο σώμα των νευρώνων. Αυτή η διαφορά έσβηνε με συν-υπερέκφραση HuD, η οποία έτεινε να αυξάνει τη συγκέντρωση της α-συνουκλεΐνης μέσα στον πυρήνα. Γενικότερα, η HuD δεν αύξησε τη συγκέντρωση της α-συνουκλεΐνης στους άξονες.

Ακόμη, η α-συνουκλεΐνη εμφάνισε χαμηλότερη ένταση φθορισμού σε συνθήκες υπερέκφρασης της full 3'UTR ισομορφής (2550nt) σε σύγκριση με τις short 3'UTR ισομορφές, στους νευρικούς άξονες, γεγονός που συνιστά ότι το μεγάλο 3'UTR δεν οδηγεί σε αυξημένη αξονική παρουσία της α-συνουκλεΐνης.

Όσον αφορά στο φθορισμό του mRNA της α-συνουκλεΐνης στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων CAD, τα επίπεδα του αυξάνονταν ελαφρώς με συν-υπερέκφραση της HuD, χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές απ' ό,τι απουσία συν-υπερέκφρασής της. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η HuD μπορεί να έχει έναν σταθεροποιητικό ρόλο στο SNCA mRNA σε αυτά τα κυτταρικά διαμερίσματα, αλλά δεν μπορεί να διευκρινιστεί κατά πόσο αυτός ο ρόλος είναι απαραίτητος.

Οι τιμές της μέσης έντασης φθορισμού του SNCA mRNA στους άξονες ήταν αρκετά χαμηλές, κάτι που αντανάκλα το γεγονός ότι τα mRNA εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα όπου συντίθενται και στο κυτταρόπλασμα όπου στρατολογούνται προς τα ριβοσώματα για την διεξαγωγή της πρωτεϊνσύνθεσης, ενώ σε μικρότερο ποσοστό μεταφέρονται με τη βοήθεια άλλων μορίων (πχ. RBPs) προς πιο απομακρυσμένα μέρη του κυττάρου (όπως άξονες, δένδριτες), για να λάβει χώρα η τοπική τους μετάφραση. Παρατηρήθηκε ότι η HuD τείνει να προωθεί τη μεταφορά του mRNA της α-συνουκλεΐνης προς τους άξονες των νευρώνων και αυτό το φαινόμενο ήταν εντονότερο υπό συνθήκες υπερέκφρασης της ισομορφής με το μακρύ 3'UTR (2550nt).

Πως εξηγείται ότι η HuD προωθεί τον εντοπισμό του mRNA της α-συνουκλεΐνης αλλά όχι της ίδιας της πρωτεΐνης στους άξονες; Μια πιθανή απάντηση θα μπορούσε να είναι το ότι προσδένει το mRNA της και το μεταφέρει προς τους άξονες, διατηρώντας το σε μια διαμόρφωση που αναστέλλει την μετάφρασή του, μέχρις ότου ένα δεύτερο σήμα να πυροδοτήσει την αλλαγή διαμόρφωσής του ή την αποδέσμευσή του (π.χ. φωσφορυλίωση της HuD).

Τέλος, από την παρατήρηση στο μικροσκόπιο, εντοπίστηκε μια τάση, υπό συνθήκες υπερέκφρασης της ισομορφής του SNCA mRNA με το μακρύ 3'UTR, να εμφανίζονται κοκκία SNCA mRNA εντός των πυρήνων των κυττάρων. Ίσως, αυτό το φαινόμενο να αποτελεί έναν μηχανισμό του κυττάρου να αποθηκεύει το mRNA της α-συνουκλεΐνης ενδοπυρηνικά και το γεγονός ότι παρατηρείται κυρίως υπό συνθήκες υπερέκφρασης του full SNCA mRNA μεταγράφου να σχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα έκφρασής του, στον πυρήνα, ενδογενώς, ωστόσο τα αποτελέσματα προέρχονται από πειράματα σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Θα είχε ενδιαφέρον να διερευνηθεί περαιτέρω η ριβονουκλεοπρωτεϊνική σύσταση αυτών των κοκκίων, καθώς θα έριχνε φως στη

μεταγραφική και μετα-μεταγραφική ρύθμιση του full SNCA mRNA μεταγράφου, και κατ' επέκταση στη διασαφήνιση του ρόλου του.

5 Βιβλιογραφία

Abe, R., Yamamoto, K. and Sakamoto, H. (1996) 'Target specificity of neuronal RNA-binding protein, Mel-N1: direct binding to the 3' untranslated region of its own mRNA', *Nucleic Acids Research*, 24(11), pp. 2011–2016. doi: 10.1093/nar/24.11.2011.

Abeliovich, A. *et al.* (2000) 'Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system', *Neuron*, 25(1), pp. 239–252. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80886-7.

Aguilera-Gomez, A. and Rabouille, C. (2017) 'Membrane-bound organelles versus membrane-less compartments and their control of anabolic pathways in *Drosophila*', *Developmental Biology*, 428(2), pp. 310–317. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.03.029.

Akamatsu, W. *et al.* (1999) 'Mammalian ELAV-like neuronal RNA-binding proteins HuB and HuC promote neuronal development in both the central and the peripheral nervous systems', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17), pp. 9885–9890. doi: 10.1073/pnas.96.17.9885.

Akamatsu, W. *et al.* (2005) 'The RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(12), pp. 4625–4630. doi: 10.1073/pnas.0407523102.

Akten, B. *et al.* (2011) 'Interaction of survival of motor neuron (SMN) and HuD proteins with mRNA cpg15 rescues motor neuron axonal deficits', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25), pp. 10337–10342. doi: 10.1073/pnas.1104928108.

Alami, N. H. *et al.* (2014) 'Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations', *Neuron*, 81(3), pp. 536–543. doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.018.

Anderson, K. D. *et al.* (2000) 'Overexpression of HuD, but not of its truncated form HuD I+II, promotes GAP-43 gene expression and neurite outgrowth in PC12 cells in the absence of nerve growth factor', *Journal of Neurochemistry*, 75(3), pp. 1103–1114. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0751103.x.

Anderson, K. D. *et al.* (2001) 'Overexpression of HuD accelerates neurite outgrowth and increases GAP-43 mRNA expression in cortical neurons and retinoic acid-induced embryonic stem cells in vitro', *Experimental Neurology*, 168(2), pp. 250–258. doi: 10.1006/exnr.2000.7599.

Anderson, P. and Kedersha, N. (2009) 'RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(6), pp. 430–436. doi: 10.1038/nrm2694.

- Andreassi, C. and Riccio, A. (2009) 'To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends', *Trends in Cell Biology*, 19(9), pp. 465–474. doi: 10.1016/j.tcb.2009.06.001.
- Arai, T. *et al.* (2006) 'TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(3), pp. 602–611. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.10.093.
- Atlas, R. *et al.* (2004) 'The insulin-like growth factor mRNA binding-protein IMP-1 and the Ras-regulatory protein G3BP associate with tau mRNA and HuD protein in differentiated P19 neuronal cells', *Journal of Neurochemistry*, 89(3), pp. 613–626. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02371.x.
- Aznarez, I. *et al.* (2008) 'A systematic analysis of intronic sequences downstream of 5' splice sites reveals a widespread role for U-rich motifs and TIA1/TIAL1 proteins in alternative splicing regulation', *Genome Research*, 18(8), pp. 1247–1258. doi: 10.1101/gr.073155.107.
- Barbour, R. *et al.* (2008) 'Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood', *Neuro-Degenerative Diseases*, 5(2), pp. 55–59. doi: 10.1159/000112832.
- Barreau, C., Paillard, L. and Osborne, H. B. (2005) 'AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles?', *Nucleic Acids Research*, 33(22), pp. 7138–7150. doi: 10.1093/nar/gki1012.
- Bauer, W. J. *et al.* (2012) 'Three RNA recognition motifs participate in RNA recognition and structural organization by the pro-apoptotic factor TIA-1', *Journal of Molecular Biology*, 415(4), pp. 727–740. doi: 10.1016/j.jmb.2011.11.040.
- Beck, A. R. *et al.* (1996) 'Structure, tissue distribution and genomic organization of the murine RRM-type RNA binding proteins TIA-1 and TIAR', *Nucleic Acids Research*, 24(19), pp. 3829–3835. doi: 10.1093/nar/24.19.3829.
- Beckel-Mitchener, A. C. *et al.* (2002) 'Poly(A) tail length-dependent stabilization of GAP-43 mRNA by the RNA-binding protein HuD', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(31), pp. 27996–28002. doi: 10.1074/jbc.M201982200.
- Bellucci, A. *et al.* (2011) 'Induction of the unfolded protein response by α -synuclein in experimental models of Parkinson's disease', *Journal of Neurochemistry*, 116(4), pp. 588–605. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07143.x.
- Bertolotti, A. *et al.* (1996) 'hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II', *The EMBO journal*, 15(18), pp. 5022–5031.
- Bley, N. *et al.* (2015) 'Stress granules are dispensable for mRNA stabilization during cellular stress', *Nucleic Acids Research*, 43(4), p. e26. doi: 10.1093/nar/gku1275.
- Bolognani, F. *et al.* (2006) 'In vivo post-transcriptional regulation of GAP-43 mRNA by overexpression of the RNA-binding protein HuD', *Journal of Neurochemistry*, 96(3), pp. 790–801. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03607.x.

Brangwynne, C. P. *et al.* (2009) ‘Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation’, *Science (New York, N.Y.)*, 324(5935), pp. 1729–1732. doi: 10.1126/science.1172046.

Bronicki, L. M. and Jasmin, B. J. (2013) ‘Emerging complexity of the HuD/ELAV14 gene; implications for neuronal development, function, and dysfunction’, *RNA (New York, N.Y.)*, 19(8), pp. 1019–1037. doi: 10.1261/rna.039164.113.

Buckanovich, R. J., Posner, J. B. and Darnell, R. B. (1993) ‘Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system’, *Neuron*, 11(4), pp. 657–672. doi: 10.1016/0896-6273(93)90077-5.

Buratti, E. and Baralle, F. E. (2001) ‘Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9’, *The Journal of Biological Chemistry*, 276(39), pp. 36337–36343. doi: 10.1074/jbc.M104236200.

Buratti, E. and Baralle, F. E. (2008) ‘Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease’, *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 13, pp. 867–878. doi: 10.2741/2727.

Burré, J. *et al.* (2010) ‘ α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in vivo and in vitro’, *Science (New York, N.Y.)*, 329(5999), pp. 1663–1667. doi: 10.1126/science.1195227.

Cabin, D. E. *et al.* (2002) ‘Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein’, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(20), pp. 8797–8807.

Casafont, I. *et al.* (2009) ‘TDP-43 localizes in mRNA transcription and processing sites in mammalian neurons’, *Journal of Structural Biology*, 167(3), pp. 235–241. doi: 10.1016/j.jsb.2009.06.006.

Castillo-Carranza, D. L. *et al.* (2012) ‘Differential activation of the ER stress factor XBP1 by oligomeric assemblies’, *Neurochemical Research*, 37(8), pp. 1707–1717. doi: 10.1007/s11064-012-0780-7.

Chandra, S. *et al.* (2005) ‘Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration’, *Cell*, 123(3), pp. 383–396. doi: 10.1016/j.cell.2005.09.028.

Chartier-Harlin, M.-C. *et al.* (2004) ‘Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson’s disease’, *Lancet (London, England)*, 364(9440), pp. 1167–1169. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17103-1.

Chen, L. *et al.* (2007) ‘Oligomeric alpha-synuclein inhibits tubulin polymerization’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(3), pp. 548–553. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.02.163.

Chen, L. *et al.* (2015) ‘A53T human α -synuclein overexpression in transgenic mice induces pervasive mitochondria macroautophagy defects preceding dopamine neuron

degeneration', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(3), pp. 890–905. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0089-14.2015.

Chen-Plotkin, A. S., Lee, V. M.-Y. and Trojanowski, J. Q. (2010a) 'TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease', *Nature Reviews. Neurology*, 6(4), pp. 211–220. doi: 10.1038/nrneurol.2010.18.

Chen-Plotkin, A. S., Lee, V. M.-Y. and Trojanowski, J. Q. (2010b) 'TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease', *Nature Reviews. Neurology*, 6(4), pp. 211–220. doi: 10.1038/nrneurol.2010.18.

Chong, P. A. and Forman-Kay, J. D. (2016) 'A New Phase in ALS Research', *Structure (London, England: 1993)*, 24(9), pp. 1435–1436. doi: 10.1016/j.str.2016.08.003.

Christie, S. B. *et al.* (2009) 'The FXG: A presynaptic Fragile X granule expressed in a subset of developing brain circuits', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(5), pp. 1514–1524. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3937-08.2009.

Chu, Y. *et al.* (2009) 'Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions', *Neurobiology of Disease*, 35(3), pp. 385–398. doi: 10.1016/j.nbd.2009.05.023.

Chu, Y. *et al.* (2012) 'Alterations in axonal transport motor proteins in sporadic and experimental Parkinson's disease', *Brain: A Journal of Neurology*, 135(Pt 7), pp. 2058–2073. doi: 10.1093/brain/aws133.

Clough, R. L. and Stefanis, L. (2007) 'A novel pathway for transcriptional regulation of alpha-synuclein', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(2), pp. 596–607. doi: 10.1096/fj.06-7111com.

Colla, E., Jensen, P. H., *et al.* (2012) 'Accumulation of toxic α -synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in α -synucleinopathy in vivo', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(10), pp. 3301–3305. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5368-11.2012.

Colla, E., Coune, P., *et al.* (2012) 'Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of α -synucleinopathy in vivo', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(10), pp. 3306–3320. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5367-11.2012.

Colombrita, C. *et al.* (2009) 'TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult', *Journal of Neurochemistry*, 111(4), pp. 1051–1061. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06383.x.

Colombrita, C. *et al.* (2012a) 'TDP-43 and FUS RNA-binding Proteins Bind Distinct Sets of Cytoplasmic Messenger RNAs and Differently Regulate Their Post-transcriptional Fate in Motoneuron-like Cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(19), pp. 15635–15647. doi: 10.1074/jbc.M111.333450.

Colombrita, C. *et al.* (2012b) ‘TDP-43 and FUS RNA-binding proteins bind distinct sets of cytoplasmic messenger RNAs and differently regulate their post-transcriptional fate in motoneuron-like cells’, *The Journal of Biological Chemistry*, 287(19), pp. 15635–15647. doi: 10.1074/jbc.M111.333450.

Conicella, A. E. *et al.* (2016) ‘ALS Mutations Disrupt Phase Separation Mediated by α -Helical Structure in the TDP-43 Low-Complexity C-Terminal Domain’, *Structure (London, England: 1993)*, 24(9), pp. 1537–1549. doi: 10.1016/j.str.2016.07.007.

Cooper, G. M. *et al.* (2011) ‘A copy number variation morbidity map of developmental delay’, *Nature Genetics*, 43(9), pp. 838–846. doi: 10.1038/ng.909.

Cuervo, A. M. *et al.* (2004) ‘Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy’, *Science (New York, N.Y.)*, 305(5688), pp. 1292–1295. doi: 10.1126/science.1101738.

Dalmau, J. *et al.* (1992) ‘The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissues.’, *The American Journal of Pathology*, 141(4), pp. 881–886.

Daubner, G. M., Cléry, A. and Allain, F. H.-T. (2013) ‘RRM-RNA recognition: NMR or crystallography...and new findings’, *Current Opinion in Structural Biology*, 23(1), pp. 100–108. doi: 10.1016/j.sbi.2012.11.006.

DeBoer, E. M. *et al.* (2014) ‘Prenatal deletion of the RNA-binding protein HuD disrupts postnatal cortical circuit maturation and behavior’, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(10), pp. 3674–3686. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3703-13.2014.

Dember, L. M. *et al.* (1996) ‘Individual RNA recognition motifs of TIA-1 and TIAR have different RNA binding specificities’, *The Journal of Biological Chemistry*, 271(5), pp. 2783–2788. doi: 10.1074/jbc.271.5.2783.

Deschênes-Furry, J., Perrone-Bizzozero, N. and Jasmin, B. J. (2006) ‘The RNA-binding protein HuD: a regulator of neuronal differentiation, maintenance and plasticity’, *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 28(8), pp. 822–833. doi: 10.1002/bies.20449.

Dexter, D. T. and Jenner, P. (2013) ‘Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms’, *Free Radical Biology & Medicine*, 62, pp. 132–144. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018.

Dixon, D. A. *et al.* (2003) ‘Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the translational silencer TIA-1’, *The Journal of Experimental Medicine*, 198(3), pp. 475–481. doi: 10.1084/jem.20030616.

Donaghy, P. C. and McKeith, I. G. (2014) ‘The clinical characteristics of dementia with Lewy bodies and a consideration of prodromal diagnosis’, *Alzheimer’s Research & Therapy*, 6(4), p. 46. doi: 10.1186/alzrt274.

Dormann, D. *et al.* (2010) 'ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import', *The EMBO journal*, 29(16), pp. 2841–2857. doi: 10.1038/emboj.2010.143.

Doxakis, E. (2010) 'Post-transcriptional regulation of alpha-synuclein expression by mir-7 and mir-153', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(17), pp. 12726–12734. doi: 10.1074/jbc.M109.086827.

Doxakis, E. (2014a) 'RNA binding proteins: a common denominator of neuronal function and dysfunction', *Neuroscience Bulletin*, 30(4), pp. 610–626. doi: 10.1007/s12264-014-1443-7.

Doxakis, E. (2014b) 'RNA binding proteins: a common denominator of neuronal function and dysfunction', *Neuroscience Bulletin*, 30(4), pp. 610–626. doi: 10.1007/s12264-014-1443-7.

Dreyfuss, G., Kim, V. N. and Kataoka, N. (2002) 'Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(3), pp. 195–205. doi: 10.1038/nrm760.

Duan, W. *et al.* (2016) 'Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator', *Molecular Neurobiology*, 53(3), pp. 1637–1647. doi: 10.1007/s12035-015-9122-5.

Ebrahimi-Fakhari, D. *et al.* (2011) 'Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of α -synuclein', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(41), pp. 14508–14520. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1560-11.2011.

Emamzadeh, F. N. (2016) 'Alpha-synuclein structure, functions, and interactions', *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 21, p. 29. doi: 10.4103/1735-1995.181989.

Emmanouilidou, E. *et al.* (2010a) 'Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(20), pp. 6838–6851. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010.

Emmanouilidou, E. *et al.* (2010b) 'Cell-Produced α -Synuclein Is Secreted in a Calcium-Dependent Manner by Exosomes and Impacts Neuronal Survival', *The Journal of Neuroscience*, 30(20), pp. 6838–6851. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010.

Fan, X. C. and Steitz, J. A. (1998) 'HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), pp. 15293–15298. doi: 10.1073/pnas.95.26.15293.

Fialcowitz-White, E. J. *et al.* (2007) 'Specific protein domains mediate cooperative assembly of HuR oligomers on AU-rich mRNA-destabilizing sequences', *The Journal of Biological Chemistry*, 282(29), pp. 20948–20959. doi: 10.1074/jbc.M701751200.

- Förch, P. *et al.* (2002) ‘The splicing regulator TIA-1 interacts with U1-C to promote U1 snRNP recruitment to 5’ splice sites’, *The EMBO journal*, 21(24), pp. 6882–6892. doi: 10.1093/emboj/cdf668.
- Fortin, D. L. *et al.* (2005) ‘Neural Activity Controls the Synaptic Accumulation of α -Synuclein’, *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, 25(47), pp. 10913–10921. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2922-05.2005.
- Fukao, A. *et al.* (2009) ‘The ELAV protein HuD stimulates cap-dependent translation in a Poly(A)- and eIF4A-dependent manner’, *Molecular Cell*, 36(6), pp. 1007–1017. doi: 10.1016/j.molcel.2009.11.013.
- Fukao, A. *et al.* (2014) ‘MicroRNAs trigger dissociation of eIF4AI and eIF4AII from target mRNAs in humans’, *Molecular Cell*, 56(1), pp. 79–89. doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.005.
- Furukawa, Y. *et al.* (2002) ‘Brain proteasomal function in sporadic Parkinson’s disease and related disorders’, *Annals of Neurology*, 51(6), pp. 779–782. doi: 10.1002/ana.10207.
- Gąssowska, M. *et al.* (2014) ‘Extracellular α -synuclein leads to microtubule destabilization via GSK-3 β -dependent Tau phosphorylation in PC12 cells’, *PloS One*, 9(4), p. e94259. doi: 10.1371/journal.pone.0094259.
- Gautier, C. A., Kitada, T. and Shen, J. (2008) ‘Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(32), pp. 11364–11369. doi: 10.1073/pnas.0802076105.
- George, J. M. *et al.* (1995) ‘Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch’, *Neuron*, 15(2), pp. 361–372. doi: 10.1016/0896-6273(95)90040-3.
- George, J. M. (2002) ‘The synucleins’, *Genome Biology*, 3(1), p. reviews3002.1-reviews3002.6.
- Giasson, B. I. *et al.* (1999a) ‘Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro’, *The Journal of Biological Chemistry*, 274(12), pp. 7619–7622.
- Giasson, B. I. *et al.* (1999b) ‘Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro’, *The Journal of Biological Chemistry*, 274(12), pp. 7619–7622. doi: 10.1074/jbc.274.12.7619.
- Gilks, N. *et al.* (2004) ‘Stress Granule Assembly Is Mediated by Prion-like Aggregation of TIA-1’, *Molecular Biology of the Cell*, 15(12), pp. 5383–5398. doi: 10.1091/mbc.E04-08-0715.
- Gleghorn, M. L. and Maquat, L. E. (2014) ‘“Black sheep” that don’t leave the double-stranded RNA-binding domain fold’, *Trends in Biochemical Sciences*, 39(7), pp. 328–340. doi: 10.1016/j.tibs.2014.05.003.

- Grüter, P. *et al.* (1998) ‘TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus’, *Molecular Cell*, 1(5), pp. 649–659. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80065-9.
- Hao le, T. *et al.* (2017) ‘HuD and the Survival Motor Neuron Protein Interact in Motoneurons and Are Essential for Motoneuron Development, Function, and mRNA Regulation’, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 37(48), pp. 11559–11571. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1528-17.2017.
- He, Y., Yu, Z. and Chen, S. (2019) ‘Alpha-Synuclein Nitration and Its Implications in Parkinson’s Disease’, *ACS chemical neuroscience*, 10(2), pp. 777–782. doi: 10.1021/acscchemneuro.8b00288.
- Heck, M. V. *et al.* (2014) ‘Dysregulated expression of lipid storage and membrane dynamics factors in Tia1 knockout mouse nervous tissue’, *Neurogenetics*, 15(2), pp. 135–144. doi: 10.1007/s10048-014-0397-x.
- Hinman, M. N. *et al.* (2013) ‘All three RNA recognition motifs and the hinge region of HuC play distinct roles in the regulation of alternative splicing’, *Nucleic Acids Research*, 41(9), pp. 5049–5061. doi: 10.1093/nar/gkt166.
- Hinman, M. N. and Lou, H. (2008) ‘Diverse molecular functions of Hu proteins’, *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 65(20), pp. 3168–3181. doi: 10.1007/s00018-008-8252-6.
- Ince-Dunn, G. *et al.* (2012) ‘Neuronal Elav-like (Hu) proteins regulate RNA splicing and abundance to control glutamate levels and neuronal excitability’, *Neuron*, 75(6), pp. 1067–1080. doi: 10.1016/j.neuron.2012.07.009.
- Inoue, M. *et al.* (2000) ‘NMR studies on functional structures of the AU-rich element-binding domains of Hu antigen C’, *Nucleic Acids Research*, 28(8), pp. 1743–1750. doi: 10.1093/nar/28.8.1743.
- Ishigaki, S. *et al.* (2012) ‘Position-dependent FUS-RNA interactions regulate alternative splicing events and transcriptions’, *Scientific Reports*, 2, p. 529. doi: 10.1038/srep00529.
- Izquierdo, J. M. and Valcárcel, J. (2007) ‘Two isoforms of the T-cell intracellular antigen 1 (TIA-1) splicing factor display distinct splicing regulation activities. Control of TIA-1 isoform ratio by TIA-1-related protein’, *The Journal of Biological Chemistry*, 282(27), pp. 19410–19417. doi: 10.1074/jbc.M700688200.
- Jankovic, J. (2008) ‘Parkinson’s disease: clinical features and diagnosis’, *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 79(4), pp. 368–376. doi: 10.1136/jnnp.2007.131045.
- Järvelin, A. I. *et al.* (2016) ‘The new (dis)order in RNA regulation’, *Cell communication and signaling: CCS*, 14, p. 9. doi: 10.1186/s12964-016-0132-3.
- Je, G. *et al.* (2018) ‘A novel extended form of alpha-synuclein 3’UTR in the human brain’, *Molecular Brain*, 11. doi: 10.1186/s13041-018-0371-x.

- Jellinger, K. A. (2012) 'Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts', *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 27(1), pp. 8–30. doi: 10.1002/mds.23795.
- Ji, Z. *et al.* (2009) 'Progressive lengthening of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation during mouse embryonic development', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(17), pp. 7028–7033. doi: 10.1073/pnas.0900028106.
- Jin, Y. *et al.* (2003) 'A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG', *The EMBO journal*, 22(4), pp. 905–912. doi: 10.1093/emboj/cdg089.
- Johnson, J. M. *et al.* (2003) 'Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays', *Science (New York, N.Y.)*, 302(5653), pp. 2141–2144. doi: 10.1126/science.1090100.
- Jowaed, A. *et al.* (2010) 'Methylation Regulates Alpha-Synuclein Expression and Is Decreased in Parkinson's Disease Patients' Brains', *The Journal of Neuroscience*, 30(18), pp. 6355–6359. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6119-09.2010.
- Junn, E. *et al.* (2009) 'Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), pp. 13052–13057. doi: 10.1073/pnas.0906277106.
- Kahle, P. J. (2008) 'alpha-Synucleinopathy models and human neuropathology: similarities and differences', *Acta Neuropathologica*, 115(1), pp. 87–95. doi: 10.1007/s00401-007-0302-x.
- Kapeli, K., Martinez, F. J. and Yeo, G. W. (2017) 'Genetic mutations in RNA-binding proteins and their roles in ALS', *Human Genetics*, 136(9), pp. 1193–1214. doi: 10.1007/s00439-017-1830-7.
- Kasashima, K. *et al.* (1999) 'Cytoplasmic localization is required for the mammalian ELAV-like protein HuD to induce neuronal differentiation', *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 4(11), pp. 667–683. doi: 10.1046/j.1365-2443.1999.00292.x.
- Kasashima, K. *et al.* (2002) 'Complex formation of the neuron-specific ELAV-like Hu RNA-binding proteins', *Nucleic Acids Research*, 30(20), pp. 4519–4526. doi: 10.1093/nar/gkf567.
- Kawakami, A. *et al.* (1992) 'Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(18), pp. 8681–8685. doi: 10.1073/pnas.89.18.8681.
- Keene, J. D. (1999) 'Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(1), pp. 5–7. doi: 10.1073/pnas.96.1.5.
- Kholodilov, N. G. *et al.* (1999) 'Increased expression of rat synuclein in the substantia nigra pars compacta identified by mRNA differential display in a model of

developmental target injury', *Journal of Neurochemistry*, 73(6), pp. 2586–2599. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0732586.x.

Kim, E. J. *et al.* (2006) 'Dyrk1A Phosphorylates α -Synuclein and Enhances Intracellular Inclusion Formation', *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), pp. 33250–33257. doi: 10.1074/jbc.M606147200.

Kim, H. S. *et al.* (2013) 'Distinct binding properties of TIAR RRMs and linker region', *RNA biology*, 10(4), pp. 579–589. doi: 10.4161/rna.24341.

Kim, K. K. *et al.* (2013) 'Rbfox3-regulated alternative splicing of Numb promotes neuronal differentiation during development', *The Journal of Cell Biology*, 200(4), pp. 443–458. doi: 10.1083/jcb.201206146.

Kim, K. K. *et al.* (2014) 'Rbfox3 controls the biogenesis of a subset of microRNAs', *Nature Structural & Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 21(10), pp. 901–910. doi: 10.1038/nsmb.2892.

Kim, K. K., Adelstein, R. S. and Kawamoto, S. (2009) 'Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors', *The Journal of Biological Chemistry*, 284(45), pp. 31052–31061. doi: 10.1074/jbc.M109.052969.

Kolarova, M. *et al.* (2012) 'Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease', *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, p. 731526. doi: 10.1155/2012/731526.

Krüger, R. *et al.* (1998) 'Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease', *Nature Genetics*, 18(2), pp. 106–108. doi: 10.1038/ng0298-106.

Łabno, A., Tomecki, R. and Dziembowski, A. (2016) 'Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1863(12), pp. 3125–3147. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.023.

Lagier-Tourenne, C. *et al.* (2012) 'Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs', *Nature Neuroscience*, 15(11), pp. 1488–1497. doi: 10.1038/nn.3230.

Lai, W. S. and Blackshear, P. J. (2001) 'Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: tristetraprolin-mediated AU-rich element-dependent mRNA degradation can occur in the absence of a poly(A) tail', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(25), pp. 23144–23154. doi: 10.1074/jbc.M100680200.

Lal, A. *et al.* (2004) 'Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs', *The EMBO journal*, 23(15), pp. 3092–3102. doi: 10.1038/sj.emboj.7600305.

Lal, D. *et al.* (2013) 'RBFOX1 and RBFOX3 mutations in rolandic epilepsy', *PloS One*, 8(9), p. e73323. doi: 10.1371/journal.pone.0073323.

Larsen, K. E. *et al.* (2006) 'Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis', *The*

- Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(46), pp. 11915–11922. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3821-06.2006.
- Lebedeva, S. *et al.* (2011) ‘Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR’, *Molecular Cell*, 43(3), pp. 340–352. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.008.
- Lee, H.-J. *et al.* (2006a) ‘Impairment of microtubule-dependent trafficking by overexpression of alpha-synuclein’, *The European Journal of Neuroscience*, 24(11), pp. 3153–3162. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05210.x.
- Lee, H.-J. *et al.* (2006b) ‘Impairment of microtubule-dependent trafficking by overexpression of alpha-synuclein’, *The European Journal of Neuroscience*, 24(11), pp. 3153–3162. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05210.x.
- Lee, S.-J. (2008) ‘Origins and effects of extracellular alpha-synuclein: implications in Parkinson’s disease’, *Journal of molecular neuroscience: MN*, 34(1), pp. 17–22. doi: 10.1007/s12031-007-0012-9.
- Lerga, A. *et al.* (2001) ‘Identification of an RNA binding specificity for the potential splicing factor TLS’, *The Journal of Biological Chemistry*, 276(9), pp. 6807–6816. doi: 10.1074/jbc.M008304200.
- Lesage, S. *et al.* (2013) ‘G51D α -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome’, *Annals of Neurology*, 73(4), pp. 459–471. doi: 10.1002/ana.23894.
- Li, Y. R. *et al.* (2013) ‘Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis’, *The Journal of Cell Biology*, 201(3), pp. 361–372. doi: 10.1083/jcb.201302044.
- Lin, Y.-S. *et al.* (2016) ‘Neuronal Splicing Regulator RBFOX3 (NeuN) Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis and Synaptogenesis’, *PloS One*, 11(10), p. e0164164. doi: 10.1371/journal.pone.0164164.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) ‘Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method’, *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Locascio, J. J. *et al.* (2015) ‘Association between α -synuclein blood transcripts and early, neuroimaging-supported Parkinson’s disease’, *Brain: A Journal of Neurology*, 138(Pt 9), pp. 2659–2671. doi: 10.1093/brain/awv202.
- Lucas, C.-H. *et al.* (2014) ‘Altered subcellular localization of the NeuN/Rbfox3 RNA splicing factor in HIV-associated neurocognitive disorders (HAND)’, *Neuroscience Letters*, 558, pp. 97–102. doi: 10.1016/j.neulet.2013.10.037.
- Ma, W. J., Chung, S. and Furneaux, H. (1997) ‘The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA’, *Nucleic Acids Research*, 25(18), pp. 3564–3569. doi: 10.1093/nar/25.18.3564.

- Mackenzie, I. R. *et al.* (2017) ‘TIA1 Mutations in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Promote Phase Separation and Alter Stress Granule Dynamics’, *Neuron*, 95(4), pp. 808–816.e9. doi: 10.1016/j.neuron.2017.07.025.
- Mackenzie, I. R. A. *et al.* (2007) ‘Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations’, *Annals of Neurology*, 61(5), pp. 427–434. doi: 10.1002/ana.21147.
- Mackenzie, I. R., Rademakers, R. and Neumann, M. (2010) ‘TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia’, *The Lancet Neurology*. Elsevier, 9(10), pp. 995–1007. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70195-2.
- Marchese, D. *et al.* (2017) ‘Discovering the 3’ UTR-mediated regulation of alpha-synuclein’, *Nucleic Acids Research*, 45(22), pp. 12888–12903. doi: 10.1093/nar/gkx1048.
- Maris, C., Dominguez, C. and Allain, F. H.-T. (2005) ‘The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression’, *The FEBS journal*, 272(9), pp. 2118–2131. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04653.x.
- Masuda, A. *et al.* (2015) ‘Position-specific binding of FUS to nascent RNA regulates mRNA length’, *Genes & Development*, 29(10), pp. 1045–1057. doi: 10.1101/gad.255737.114.
- McDonald, K. K. *et al.* (2011) ‘TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1’, *Human Molecular Genetics*, 20(7), pp. 1400–1410. doi: 10.1093/hmg/ddr021.
- McKee, A. E. *et al.* (2005) ‘A genome-wide in situ hybridization map of RNA-binding proteins reveals anatomically restricted expression in the developing mouse brain’, *BMC developmental biology*, 5, p. 14. doi: 10.1186/1471-213X-5-14.
- McLean, J. R. *et al.* (2012) ‘Transcript expression levels of full-length alpha-synuclein and its three alternatively spliced variants in Parkinson’s disease brain regions and in a transgenic mouse model of alpha-synuclein overexpression’, *Molecular and Cellular Neurosciences*, 49(2), pp. 230–239. doi: 10.1016/j.mcn.2011.11.006.
- McNaught, K. S. and Jenner, P. (2001) ‘Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson’s disease’, *Neuroscience Letters*, 297(3), pp. 191–194. doi: 10.1016/s0304-3940(00)01701-8.
- McNaught, K. S. P. *et al.* (2002) ‘Selective loss of 20S proteasome alpha-subunits in the substantia nigra pars compacta in Parkinson’s disease’, *Neuroscience Letters*, 326(3), pp. 155–158. doi: 10.1016/s0304-3940(02)00296-3.
- Meyer, C. *et al.* (2018) ‘The TIA1 RNA-Binding Protein Family Regulates EIF2AK2-Mediated Stress Response and Cell Cycle Progression’, *Molecular Cell*, 69(4), pp. 622–635.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2018.01.011.

- Minvielle-Sebastia, L. and Keller, W. (1999a) 'mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription', *Current Opinion in Cell Biology*, 11(3), pp. 352–357. doi: 10.1016/S0955-0674(99)80049-0.
- Minvielle-Sebastia, L. and Keller, W. (1999b) 'mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription', *Current Opinion in Cell Biology*, 11(3), pp. 352–357. doi: 10.1016/S0955-0674(99)80049-0.
- Morlando, M. *et al.* (2012) 'FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment', *The EMBO journal*, 31(24), pp. 4502–4510. doi: 10.1038/emboj.2012.319.
- Mukherjee, N. *et al.* (2011) 'Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability', *Molecular Cell*, 43(3), pp. 327–339. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.007.
- Murphy, D. D. *et al.* (2000) 'Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(9), pp. 3214–3220.
- Nakamura, K. (2013) 'α-Synuclein and mitochondria: partners in crime?', *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 10(3), pp. 391–399. doi: 10.1007/s13311-013-0182-9.
- Narayanan, R. K. *et al.* (2013) 'Identification of RNA bound to the TDP-43 ribonucleoprotein complex in the adult mouse brain', *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 14(4), pp. 252–260. doi: 10.3109/21678421.2012.734520.
- Neumann, M. *et al.* (2006) 'Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis', *Science (New York, N.Y.)*, 314(5796), pp. 130–133. doi: 10.1126/science.1134108.
- Neumann, M. *et al.* (2009) 'A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology', *Brain*, 132(11), pp. 2922–2931. doi: 10.1093/brain/awp214.
- Nguyen, C. D. *et al.* (2011) 'Characterization of a Family of RanBP2-Type Zinc Fingers that Can Recognize Single-Stranded RNA', *Journal of Molecular Biology*, 407(2), pp. 273–283. doi: 10.1016/j.jmb.2010.12.041.
- Nicastro, G., Taylor, I. A. and Ramos, A. (2015) 'KH-RNA interactions: back in the groove', *Current Opinion in Structural Biology*, 30, pp. 63–70. doi: 10.1016/j.sbi.2015.01.002.
- Okano, H. *et al.* (2005) 'Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells', *Experimental Cell Research*, 306(2), pp. 349–356. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.02.021.
- Okano, H. J. and Darnell, R. B. (1997a) 'A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(9), pp. 3024–3037.

- Okano, H. J. and Darnell, R. B. (1997b) 'A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(9), pp. 3024–3037.
- Ou, S. H. *et al.* (1995) 'Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs', *Journal of Virology*, 69(6), pp. 3584–3596.
- Pasanen, P. *et al.* (2014) 'Novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology', *Neurobiology of Aging*, 35(9), p. 2180.e1–5. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.024.
- Pascale, A., Amadio, M. and Quattrone, A. (2008) 'Defining a neuron: neuronal ELAV proteins', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 65(1), pp. 128–140. doi: 10.1007/s00018-007-7017-y.
- Paschou, M. *et al.* (2012) 'miRNA Regulons Associated with Synaptic Function', *PLoS ONE*, 7(10). doi: 10.1371/journal.pone.0046189.
- Peng, S. S. *et al.* (1998) 'RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein', *The EMBO journal*, 17(12), pp. 3461–3470. doi: 10.1093/emboj/17.12.3461.
- Perrin, R. J. *et al.* (2000) 'Interaction of human alpha-Synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis', *The Journal of Biological Chemistry*, 275(44), pp. 34393–34398. doi: 10.1074/jbc.M004851200.
- Plotegher, N., Gratton, E. and Bubacco, L. (2014) 'Number and Brightness analysis of alpha-synuclein oligomerization and the associated mitochondrial morphology alterations in live cells', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1840(6), pp. 2014–2024. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.013.
- Polymenidou, M. *et al.* (2011) 'Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43', *Nature Neuroscience*, 14(4), pp. 459–468. doi: 10.1038/nn.2779.
- Polymeropoulos, M. H. *et al.* (1997) 'Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease', *Science (New York, N.Y.)*, 276(5321), pp. 2045–2047.
- Prots, I. *et al.* (2013) ' α -Synuclein oligomers impair neuronal microtubule-kinesin interplay', *The Journal of Biological Chemistry*, 288(30), pp. 21742–21754. doi: 10.1074/jbc.M113.451815.
- Protter, D. S. W. and Parker, R. (2016) 'Principles and Properties of Stress Granules', *Trends in Cell Biology*, 26(9), pp. 668–679. doi: 10.1016/j.tcb.2016.05.004.
- Proukakis, C. *et al.* (2013) 'A novel α -synuclein missense mutation in Parkinson disease', *Neurology*, 80(11), pp. 1062–1064. doi: 10.1212/WNL.0b013e31828727ba.

- Purice, M. D. and Taylor, J. P. (2018) 'Linking hnRNP Function to ALS and FTD Pathology', *Frontiers in Neuroscience*, 12, p. 326. doi: 10.3389/fnins.2018.00326.
- Quattrone, A. *et al.* (2001) 'Posttranscriptional regulation of gene expression in learning by the neuronal ELAV-like mRNA-stabilizing proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), pp. 11668–11673. doi: 10.1073/pnas.191388398.
- Ravanidis, S., Kattan, F.-G. and Doxakis, E. (2018a) 'Unraveling the Pathways to Neuronal Homeostasis and Disease: Mechanistic Insights into the Role of RNA-Binding Proteins and Associated Factors', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). doi: 10.3390/ijms19082280.
- Ravanidis, S., Kattan, F.-G. and Doxakis, E. (2018b) 'Unraveling the Pathways to Neuronal Homeostasis and Disease: Mechanistic Insights into the Role of RNA-Binding Proteins and Associated Factors', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8). doi: 10.3390/ijms19082280.
- Reyes, R., Alcalde, J. and Izquierdo, J. M. (2009) 'Depletion of T-cell intracellular antigen proteins promotes cell proliferation', *Genome Biology*, 10(8), p. R87. doi: 10.1186/gb-2009-10-8-r87.
- Rhinn, H. *et al.* (2012) 'Alternative α -synuclein transcript usage as a convergent mechanism in Parkinson's disease pathology', *Nature Communications*, 3, p. 1084. doi: 10.1038/ncomms2032.
- Rideout, H. J. *et al.* (2003) 'Regulation of alpha-synuclein by bFGF in cultured ventral midbrain dopaminergic neurons', *Journal of Neurochemistry*, 84(4), pp. 803–813. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01574.x.
- Rogelj, B. *et al.* (2012) 'Widespread binding of FUS along nascent RNA regulates alternative splicing in the brain', *Scientific Reports*, 2, p. 603. doi: 10.1038/srep00603.
- Sánchez-Jiménez, C. and Izquierdo, J. M. (2013) 'T-cell intracellular antigen (TIA)-proteins deficiency in murine embryonic fibroblasts alters cell cycle progression and induces autophagy', *PloS One*, 8(9), p. e75127. doi: 10.1371/journal.pone.0075127.
- Sarafian, T. A. *et al.* (2013) 'Impairment of mitochondria in adult mouse brain overexpressing predominantly full-length, N-terminally acetylated human α -synuclein', *PloS One*, 8(5), p. e63557. doi: 10.1371/journal.pone.0063557.
- Savitt, J. M., Dawson, V. L. and Dawson, T. M. (2006) 'Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine', *The Journal of Clinical Investigation*, 116(7), pp. 1744–1754. doi: 10.1172/JCI29178.
- Scherzer, C. R. *et al.* (2008) 'GATA transcription factors directly regulate the Parkinson's disease-linked gene alpha-synuclein', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(31), pp. 10907–10912. doi: 10.1073/pnas.0802437105.

- Senties-Madrid, H. and Vega-Boada, F. (2001) 'Paraneoplastic syndromes associated with anti-Hu antibodies', *The Israel Medical Association journal: IMAJ*, 3(2), pp. 94–103.
- Sephton, C. F. *et al.* (2011) 'Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes', *The Journal of Biological Chemistry*, 286(2), pp. 1204–1215. doi: 10.1074/jbc.M110.190884.
- Shen, J. *et al.* (2014) ' α -Synuclein amino terminus regulates mitochondrial membrane permeability', *Brain Research*, 1591, pp. 14–26. doi: 10.1016/j.brainres.2014.09.046.
- Singleton, A. B. *et al.* (2003) 'alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease', *Science (New York, N.Y.)*, 302(5646), p. 841. doi: 10.1126/science.1090278.
- Sosanya, N. M. *et al.* (2013) 'Degradation of high affinity HuD targets releases Kv1.1 mRNA from miR-129 repression by mTORC1', *The Journal of Cell Biology*, 202(1), pp. 53–69. doi: 10.1083/jcb.201212089.
- Sosanya, N. M. *et al.* (2015) 'Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Tagging Promotes Dendritic Branch Variability through the Capture of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II α (CaMKII α) mRNAs by the RNA-binding Protein HuD', *The Journal of Biological Chemistry*, 290(26), pp. 16357–16371. doi: 10.1074/jbc.M114.599399.
- Spillantini, M. G. *et al.* (1998a) 'alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), pp. 6469–6473.
- Spillantini, M. G. *et al.* (1998b) 'alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), pp. 6469–6473. doi: 10.1073/pnas.95.11.6469.
- Stefanis, L. *et al.* (2001) 'Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(24), pp. 9549–9560.
- Stefanis, L. (2012) ' α -Synuclein in Parkinson's Disease', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2). doi: 10.1101/cshperspect.a009399.
- Sun, K. *et al.* (2018) 'Neuron-Specific HuR-Deficient Mice Spontaneously Develop Motor Neuron Disease', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 201(1), pp. 157–166. doi: 10.4049/jimmunol.1701501.
- Surguchev, A. A. and Surguchov, A. (2017) 'Synucleins and Gene Expression: Ramblers in a Crowd or Cops Regulating Traffic?', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, p. 224. doi: 10.3389/fnmol.2017.00224.

- Suswam, E. A. *et al.* (2005) 'Novel DNA-binding properties of the RNA-binding protein TIAR', *Nucleic Acids Research*, 33(14), pp. 4507–4518. doi: 10.1093/nar/gki763.
- Tan, A. Y. *et al.* (2012) 'TLS/FUS (translocated in liposarcoma/fused in sarcoma) regulates target gene transcription via single-stranded DNA response elements', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), pp. 6030–6035. doi: 10.1073/pnas.1203028109.
- Taylor, J. P., Brown, R. H. and Cleveland, D. W. (2016) 'Decoding ALS: from genes to mechanism', *Nature*, 539(7628), pp. 197–206. doi: 10.1038/nature20413.
- Thayanidhi, N. *et al.* (2010) 'Alpha-synuclein delays endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport in mammalian cells by antagonizing ER/Golgi SNAREs', *Molecular Biology of the Cell*, 21(11), pp. 1850–1863. doi: 10.1091/mbc.e09-09-0801.
- Tollervey, J. R. *et al.* (2011a) 'Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43', *Nature Neuroscience*, 14(4), pp. 452–458. doi: 10.1038/nn.2778.
- Tollervey, J. R. *et al.* (2011b) 'Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43', *Nature Neuroscience*, 14(4), pp. 452–458. doi: 10.1038/nn.2778.
- Tong, J. *et al.* (2010) 'Brain alpha-synuclein accumulation in multiple system atrophy, Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy: a comparative investigation', *Brain: A Journal of Neurology*, 133(Pt 1), pp. 172–188. doi: 10.1093/brain/awp282.
- Tsuiji, H. *et al.* (2013) 'Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA', *EMBO Molecular Medicine*, 5(2), pp. 221–234. doi: 10.1002/emmm.201202303.
- Utami, K. H. *et al.* (2014) 'Detection of chromosomal breakpoints in patients with developmental delay and speech disorders', *PloS One*, 9(6), p. e90852. doi: 10.1371/journal.pone.0090852.
- Vamvaca, K., Volles, M. J. and Lansbury, P. T. (2009) 'The First N-terminal Amino Acids of α -Synuclein Are Essential for α -Helical Structure Formation In Vitro and Membrane Binding in Yeast', *Journal of molecular biology*, 389(2), pp. 413–424. doi: 10.1016/j.jmb.2009.03.021.
- Van Deerlin, V. M. *et al.* (2008) 'TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis', *The Lancet. Neurology*, 7(5), pp. 409–416. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70071-1.
- Van Langenhove, T. *et al.* (2010) 'Genetic contribution of FUS to frontotemporal lobar degeneration', *Neurology*, 74(5), pp. 366–371. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181ccc732.

- Vance, J. M. *et al.* (2010) ‘Gene-environment interactions in Parkinson’s disease and other forms of parkinsonism’, *Neurotoxicology*, 31(5), pp. 598–602. doi: 10.1016/j.neuro.2010.04.007.
- Vanderweyde, T. *et al.* (2016) ‘Interaction of tau with the RNA-Binding Protein TIA1 Regulates tau Pathophysiology and Toxicity’, *Cell Reports*, 15(7), pp. 1455–1466. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.045.
- Vanevski, F. and Xu, B. (2015) ‘HuD interacts with Bdnf mRNA and is essential for activity-induced BDNF synthesis in dendrites’, *PloS One*, 10(2), p. e0117264. doi: 10.1371/journal.pone.0117264.
- Vekrellis, K. and Stefanis, L. (2012) ‘Targeting intracellular and extracellular alpha-synuclein as a therapeutic strategy in Parkinson’s disease and other synucleinopathies’, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(4), pp. 421–432. doi: 10.1517/14728222.2012.674111.
- Venda, L. L. *et al.* (2010) ‘ α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson’s disease’, *Trends in neurosciences*, 33(12), pp. 559–568. doi: 10.1016/j.tins.2010.09.004.
- Vila, M. *et al.* (2000) ‘Alpha-synuclein up-regulation in substantia nigra dopaminergic neurons following administration of the parkinsonian toxin MPTP’, *Journal of Neurochemistry*, 74(2), pp. 721–729. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.740721.x.
- Villar-Piqué, A., Lopes da Fonseca, T. and Outeiro, T. F. (2016) ‘Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies’, *Journal of Neurochemistry*, 139 Suppl 1, pp. 240–255. doi: 10.1111/jnc.13249.
- Vogiatzi, T. *et al.* (2008) ‘Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells’, *The Journal of Biological Chemistry*, 283(35), pp. 23542–23556. doi: 10.1074/jbc.M801992200.
- Wang, H.-Y. *et al.* (2015) ‘RBFOX3/NeuN is Required for Hippocampal Circuit Balance and Function’, *Scientific Reports*, 5, p. 17383. doi: 10.1038/srep17383.
- Wang, I. *et al.* (2014) ‘Structure, dynamics and RNA binding of the multi-domain splicing factor TIA-1’, *Nucleic Acids Research*, 42(9), pp. 5949–5966. doi: 10.1093/nar/gku193.
- Wang, I.-F. *et al.* (2008) ‘TDP-43, the signature protein of FTL-DU, is a neuronal activity-responsive factor’, *Journal of Neurochemistry*, 105(3), pp. 797–806. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05190.x.
- Wang, W.-Y. *et al.* (2013) ‘Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons’, *Nature Neuroscience*, 16(10), pp. 1383–1391. doi: 10.1038/nn.3514.
- Wang, X. and Tanaka Hall, T. M. (2001) ‘Structural basis for recognition of AU-rich element RNA by the HuD protein’, *Nature Structural Biology*, 8(2), pp. 141–145. doi: 10.1038/84131.

- Winton, M. J. *et al.* (2008) 'Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(19), pp. 13302–13309. doi: 10.1074/jbc.M800342200.
- Withers, G. S. *et al.* (1997) 'Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons', *Brain Research. Developmental Brain Research*, 99(1), pp. 87–94. doi: 10.1016/s0165-3806(96)00210-6.
- Xiao, S. *et al.* (2011) 'RNA targets of TDP-43 identified by UV-CLIP are deregulated in ALS', *Molecular and Cellular Neurosciences*, 47(3), pp. 167–180. doi: 10.1016/j.mcn.2011.02.013.
- Xie, W. and Chung, K. K. K. (2012) 'Alpha-synuclein impairs normal dynamics of mitochondria in cell and animal models of Parkinson's disease', *Journal of Neurochemistry*, 122(2), pp. 404–414. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07769.x.
- Xilouri, M. *et al.* (2008) 'alpha-synuclein degradation by autophagic pathways: a potential key to Parkinson's disease pathogenesis', *Autophagy*, 4(7), pp. 917–919. doi: 10.4161/auto.6685.
- Xilouri, M. *et al.* (2009) 'Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy', *PloS One*, 4(5), p. e5515. doi: 10.1371/journal.pone.0005515.
- Yoo, S. *et al.* (2013) 'A HuD-ZBP1 ribonucleoprotein complex localizes GAP-43 mRNA into axons through its 3' untranslated region AU-rich regulatory element', *Journal of Neurochemistry*, 126(6), pp. 792–804. doi: 10.1111/jnc.12266.
- Yoshimura, A. *et al.* (2006) 'Myosin-Va facilitates the accumulation of mRNA/protein complex in dendritic spines', *Current biology: CB*, 16(23), pp. 2345–2351. doi: 10.1016/j.cub.2006.10.024.
- Yu, Y. and Reed, R. (2015) 'FUS functions in coupling transcription to splicing by mediating an interaction between RNAP II and U1 snRNP', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(28), pp. 8608–8613. doi: 10.1073/pnas.1506282112.
- Zakaryan, R. P. and Gehring, H. (2006) 'Identification and characterization of the nuclear localization/retention signal in the EWS proto-oncoprotein', *Journal of Molecular Biology*, 363(1), pp. 27–38. doi: 10.1016/j.jmb.2006.08.018.
- Zarranz, J. J. *et al.* (2004) 'The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia', *Annals of Neurology*, 55(2), pp. 164–173. doi: 10.1002/ana.10795.
- Zhang, Wei *et al.* (2005) 'Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(6), pp. 533–542. doi: 10.1096/fj.04-2751com.

Zhu, H. *et al.* (2003) ‘U1 snRNP-dependent function of TIAR in the regulation of alternative RNA processing of the human calcitonin/CGRP pre-mRNA’, *Molecular and Cellular Biology*, 23(17), pp. 5959–5971. doi: 10.1128/mcb.23.17.5959-5971.2003.

Zinszner, H. *et al.* (1997) ‘TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleocytoplasmic shuttling’, *Journal of Cell Science*, 110 (Pt 15), pp. 1741–1750.

6 Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, κ. Επαμεινώνδα Δοξάκη, Ερευνητή Γ' στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ) για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στην ερευνητική του ομάδα, για τις γνώσεις που μου προσέφερε και την έμπρακτη υποστήριξη του καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα, επίσης, να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Δοξάκη για την βοήθεια που μου προσέφεραν, την υπομονή και την καθοδήγηση σε όλο αυτό το διάστημα.

Συγχρόνως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, κ. Νικόλαο Μπαλατσό, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, και τον κ. Γκάγκο Σαράντη, Ερευνητή Β' στο ΙΙΒΕΑΑ.