



INEB

ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ
ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ A53T A-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΒΛΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ

Νοτοπούλου Α. Σοφία

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΑΚΡΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ, ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Α΄

ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΠΕΤΡΑΚΗΣ ΣΠΥΡΟΣ, ΜΕΤΑΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2020



INEB

CENTER OF RESEARCH AND
TECHNOLOGY OF HELLAS
INSTITUTE OF APPLIED
BIOSCIENCES



UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY
& BIOTECHNOLOGY

DIPLOMA PROJECT

**OVEREXPRESSION OF THE PATHOLOGICAL
 α -SYNUCLEIN A53T IN HUMAN STEM CELLS**

Notopoulou A. Sofia

ADVISORY COMMITTEE

MAKRIS ANTONIOS, RESEARCHER

MATHIOPOULOS KONSTANTINOS, PROFESSOR

PETRAKIS SPYROS, POSTDOCTORAL RESEARCHER

LARISSA, JUNE 2020

Περιεχόμενα

.....	1
Πρόλογος	5
Περίληψη	6
Abstract.....	7
.....	8
1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Η ασθένεια του Πάρκινσον.....	9
1.2 Συμπτώματα	9
1.3 Το σύστημα ντοπαμίνης	10
1.4 Αίτια της ασθένειας.....	11
1.5 Ο φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης.....	11
1.6 Ο παθολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης	13
.....	16
1.7 Η κληρονομική μορφή της ασθένειας του Πάρκινσον.....	16
1.8 Η α-συνουκλεΐνη A53T.....	17
1.9 Θεραπεία	19
1.10 Ζωικά πειραματικά μοντέλα	23
1.11 Κυτταρικά πειραματικά μοντέλα	24
1.12 Σκοπός της εργασίας.....	28
2. Μέθοδοι και Υλικά.....	30
2.1 Παρασκευή LB Broth	30
2.2 Παρασκευή LB Agar	30
2.3 Κατασκευή πλασμιδίου έκφρασης.....	30
2.4 Μετασχηματισμός βακτηρίων	31
2.5 Απομόνωση πλασμιδίων	31
2.6 Υπολογισμός συγκέντρωσης πλασμιδιακού DNA	32
2.7 Πέψη πλασμιδίων	32
2.8 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης.....	32
2.9 Καλλιέργεια κυττάρων HEK293T	32
2.10 Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Βλαστικών κυττάρων (MSCs).....	33
2.11 Καλλιέργεια Πρόδρομων Νευρικών Κυττάρων (smNPCs).....	33
2.12 Αποθήκευση και διατήρηση των κυττάρων	34
2.13 Παροδική έκφραση πρωτεΐνης	35
2.14 Παραγωγή σταθερής κυτταρικής σειράς σε MSCs.....	36
2.15 Παραγωγή σταθερής κυτταρικής σειράς σε smNPCs.....	36

2.16 Φθορίζουσα μικροσκοπία	36
2.17 Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών κατά Western.....	37
2.18 Ανάλυση ενδοκυττάρωσης της πρωτεΐνης.....	38
2.19 Υπολογισμός κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο MTT	39
2.20 Κυτταρομετρία ροής.....	39
2.21 Ανοσοφθορισμός.....	40
3. Αποτελέσματα.....	43
3.1 Επιτυχής κατασκευή πλασμιδίου για παραγωγή της πρωτεΐνης YFP-SNCA A53T	43
3.2 Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς YFP-SNCA A53T MSCs	44
3.3 Μελέτη της υπερέκφρασης του γονιδίου YFP-SNCA A53T σε Tet-On YFP-SNCA MSCs.....	47
3.4 Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς YFP-SNCA A53T smNPCs	49
3.5 Μελέτη της υπερέκφρασης του γονιδίου YFP-SNCA A53T σε Tet-On YFP-SNCA smNPCs.....	50
3.6 Μελέτη της μεταβολικής δραστηριότητας των Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs	52
3.7 Μελέτη μονοπατιού του θανάτου των Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs μέσω απόπτωσης .	53
3.8 Μελέτη εξοκυττάρωσης της πρωτεΐνης YFP – SNCA A53T.....	54
3.9 Μελέτη ενδοκυττάρωσης της πρωτεΐνης YFP – SNCA A53T	56
3.10 Δημιουργία διαφοροποιημένων κυττάρων YFP-SNCA A53T smNPCs.....	57
3.11 Μελέτη της υπερέκφρασης του γονιδίου YFP-SNCA A53T σε διαφοροποιημένα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs	58
3.12 Μελέτη μονοπατιού του θανάτου των διαφοροποιημένων Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs μέσω απόπτωσης.....	60
4. Συζήτηση.....	64
4.1 Τα βλαστικά κύτταρα στη μελέτη της ασθένειας του Πάρκινσον	64
4.2 Υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης A53T σε μεσεγχυματικά και πρόδρομα νευρικά βλαστοκύτταρα.....	66
4.3 Κυτταρικές αποκρίσεις στην υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης A53T	70
4.4 Υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης A53T και αποκρίσεις των διαφοροποιημένων νευρικών κυττάρων.....	71
4.5 Μελλοντική έρευνα.....	72
5. Βιβλιογραφία	74

Πρόλογος

Η παρούσα πτυχιακή εργασία διεξήχθη στο Ινστιτούτο Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης (INEB – ΕΚΕΤΑ), σε συνεργασία με το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα, Καθηγητή και Πρόεδρο του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο και τον Πρόεδρο του Ινστιτούτου Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών Δρ. Κωνσταντίνο Σταματόπουλο, που μου έδωσαν την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον επιβλέποντα Δρ. Σπύρο Πετράκη, που μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω μαζί του. Είμαι ευγνώμων που πραγματοποίησα τα πρώτα ερευνητικά μου βήματα δίπλα μου και κατάφερε να μου μεταδώσει την αγάπη του για την Έρευνα και τις Νευροεπιστήμες. Τον ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη, την υπομονή και τις συμβουλές του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αντώνιο Μακρή, Ερευνητή Α΄ του Ινστιτούτου Εφαρμοσμένων Βιοεπιστημών, για τη συμμετοχή του στην Τριμελή Επιτροπή.

Σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίηση της πτυχιακής μου εργασίας κατέχει και ο Ιωάννης Γκέκας, υποψήφιος Διδάκτωρ, ο οποίος ήταν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο Ινστιτούτο, τόσο ως μέντορας όσο και ως φίλος. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερω που μου μετέδωσε τις γνώσεις του, την εργατικότητα του και την αγάπη του για την Έρευνα.

Αντίστοιχα, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την ευχάριστη συνεργασία και το θετικό εργασιακό περιβάλλον. Περισσότερο θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Μαρία Χατζηνικολάου, η οποία ήταν συνοδοιπόρος σε αυτό το ταξίδι και κατάφερνε να γεμίζει πάντα με χαρά τη μέρα μου. Της εύχομαι από καρδιάς καλή σταδιοδρομία.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά του γονείς μου Αντώνη και Βενετία και τον αδερφό μου Στέφανο που μου έδωσαν τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω την πτυχιακή εργασία, για τη διαρκή υποστήριξη και την ενθάρρυνσή τους. Αντίστοιχα, ευχαριστώ τους φίλους μου και τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου σε όλη αυτήν τη διαδρομή.

Σοφία Νοτοπούλου
Θεσσαλονίκη, Ιούνιος 2020

Περίληψη

Η ασθένεια του Πάρκινσον είναι η δεύτερη πιο κοινή νευροεκφυλιστική νόσος, με επώδυνα συμπτώματα για τους ασθενείς. Τα αίτια δεν έχουν διευκρινιστεί, καθώς πολλοί παράγοντες συμμετέχουν στην πρόκλησή της, όπως περιβαλλοντικοί, ψυχολογικοί, γενετικοί. Παρ' όλ' αυτά έχει παρατηρηθεί ένα κοινό μοτίβο, που είναι η συσσώρευση της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης (SNCA) στα σώματα των νευρώνων και η παραγωγή συσσωματωμάτων. Επιπλέον, μεταλλάξεις στο γονίδιο *snca* προκαλούν πιο έντονα τον παθολογικό φαινότυπο. Ιδιαίτερα στους Μεσογειακούς πληθυσμούς έχει ταυτοποιηθεί η μεταλλαγμένη παθολογική πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη A53T σε σημαντικό ποσοστό των ασθενών. Έως και σήμερα, δεν έχει βρεθεί κάποια θεραπεία και αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός πως η γνώση μας για το μηχανισμό της νόσου του Πάρκινσον είναι περιορισμένη, αφού δεν υπάρχουν αξιόπιστα πειραματικά μοντέλα. Έτσι προκύπτει η ανάγκη δημιουργίας νέων, εξειδικευμένων μοντέλων, που θα επιτρέπουν τη μελέτη των σταδίων της νόσου και την ανάλυση των κυτταρικών αποκρίσεων. Τα ανθρώπινα βλαστοκύτταρα αποτελούν ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για αυτόν τον σκοπό.

Στην παρούσα μελέτη, η παθολογική πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη A53T υπερεκφράστηκε επαγόμενα σε σύντηξη με την YFP σε μεσεγγυματικά και πρόδρομα νευρικά κύτταρα χρησιμοποιώντας το τρανσποζόνιο Sleeping Beauty. Επιπλέον, τα πρόδρομα νευρικά κύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε νευρικά κύτταρα. Η πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε σε όλα τα βλαστοκύτταρα με τη μορφή κυτταροπλασματικών κυστιδίων και σε υψηλά επίπεδα στα διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα. Κατά τη μελέτη των κυτταρικών αποκρίσεων των βλαστοκυττάρων φάνηκε πως η μεταβολική δραστηριότητα μειώθηκε σημαντικά, ενώ παράλληλα ενεργοποιήθηκε ο κυτταρικός θάνατος μέσω απόπτωσης. Στα διαφοροποιημένα κύτταρα δεν παρατηρήθηκε η ίδια επαγωγή, υποδεικνύοντας πως διαφορετικοί προστατευτικοί μηχανισμοί ενεργοποιούνται σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Επιπλέον, η παθολογική πρωτεΐνη εκκρίνεται από κύτταρα που την υπερπαραγωγή και ενδοκυτταρώνεται σε γειτονικά υγιή, «μολύνοντάς» τα.

Οι κυτταρικές σειρές που κατασκευάσαμε εκδηλώνουν έναν πιθανό παθολογικό φαινότυπο που σχετίζεται με την ασθένεια του Πάρκινσον. Επομένως αποτελούν ικανοποιητικά κυτταρικά μοντέλα για τη μελέτη της νόσου, συγκεντρώνοντας ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που τα ξεχωρίζουν από τα προϋπάρχοντα μοντέλα. Μελλοντικές προσεγγίσεις μπορεί να περιλαμβάνουν την ανάλυση του νευρωνικού φαινοτύπου μετά από υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης A53T σε διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα, τη μελέτη διαφορετικών προστατευτικών μηχανισμών, καθώς και την διερεύνηση έναρξης μιας ανοσολογικής απόκρισης.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most frequent neurodegenerative disease, with painful symptoms for the patients. The reasons behind this disease's onset are not clearly defined, since several factors, like environmental, psychological and genetic, are involved in its pathogenesis. However, there is a common motif, which is the accumulation of α -synuclein protein (SNCA) in the neurons' bodies, leading to the generation of aggregates. Furthermore, mutations in *snca* gene are responsible for a more pathological phenotype. Specifically, the mutated pathological protein SNCA A53T has been identified in a considerable percentage of PD patients within the Mediterranean populations. Until now, no cure has been found because the lack of reliable experimental models has led to a limited understanding of PD mechanism. Hence, new specific models should be developed, that allow the study of Parkinson's stages and the analysis of cellular responses. For these reasons human stem cells represent a very useful tool.

In this project, the pathological protein SNCA A53T was inducibly overexpressed in fusion with YFP, in mesenchymal stem cells (MSCs) and neural precursor cells (NPCs), using Sleeping Beauty transposon. Furthermore, the NPCs were differentiated to neural cells. The protein was detected in all types of stem cells in the form of cytoplasmic inclusion bodies, but was particularly overexpressed in the differentiated neural cells. During the study of stem cells' responses, the metabolic activity was found significantly reduced, while death through apoptosis was activated. In contrast, no such activation was seen in the differentiated NPCs, indicating that different protective mechanisms are involved in different developmental stages. Additionally, the pathological protein was secreted by the overproducing cells and was endocytosed from healthy neighboring cells.

The cell lines we created exhibit a potential pathological phenotype that correlates with PD. So, they are sufficient cell models for the disease's studies, due to the advantages they have over other pre-existing models. Future approaches may include the analysis of neuronal phenotype after the overexpression of SNCA A53T in differentiated NPCs, the study of distinct protective mechanisms, as well as the investigation of a potential immune response.

Εισαγωγή

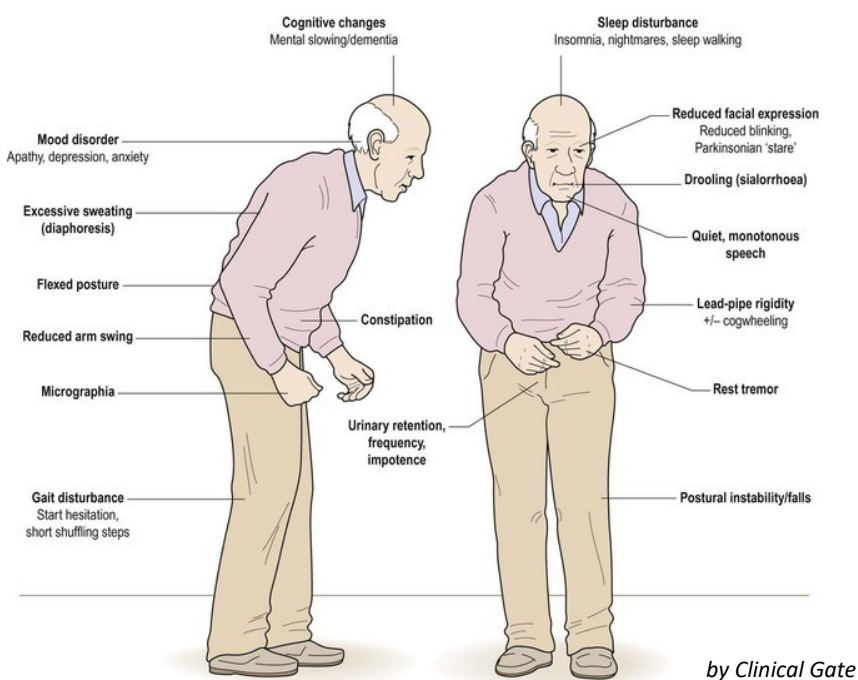
1. Εισαγωγή

1.1 Η ασθένεια του Πάρκινσον

Το Πάρκινσον είναι η δεύτερη πιο κοινή νευροεκφυλιστική νόσος μετά το Αλτσχάιμερ, με περίπου 7 έως 10 εκατομμύρια ασθενείς παγκοσμίως. Η συχνότητα εμφάνισής της κυμαίνεται από 41 άτομα ανά 100.000 στη ηλικιακή δεκαετία των 40, έως και περίπου 2.000 άτομα με ηλικία άνω των 80 (*Parkinson's disease statistics, 2018*), αριθμοί που προβλέπεται να αυξηθούν καθώς αυξάνεται και το προσδόκιμο ζωής.

1.2 Συμπτώματα

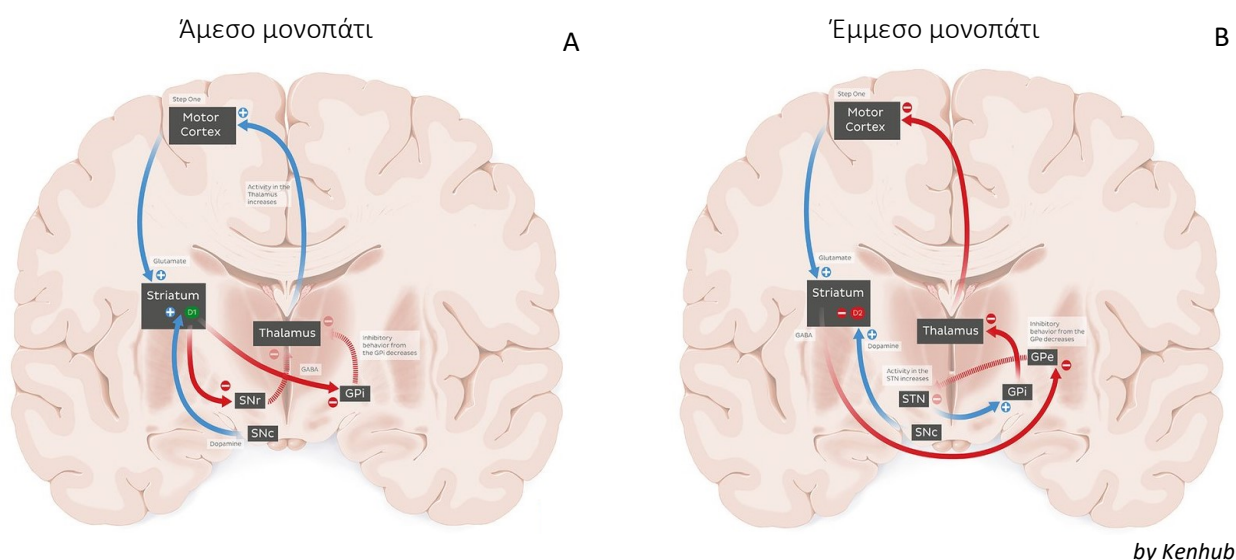
Η κλινική απεικόνιση της ασθένειας διακρίνεται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες: επιπλοκές στην κίνηση, μεταβολές στην νοημοσύνη, συμπεριφορικά/νευροψυχιατρικά προβλήματα και ανεπαρκής δράση του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Χαρακτηριστικά συμπτώματα αποτελούν το τρέμουλο, η δυσκαμψία, η βραδυκινησία και η σκυφτή στάση σώματος. Αρκετά χρόνια όμως πριν την εκδήλωση αυτών, παρουσιάζονται τα μη κινητικά χαρακτηριστικά, όπως διαταραχές ύπνου, κατάθλιψη, υποσμμία, δυσκοιλιότητα, στυτική δυσλειτουργία και έντονη ακράτεια ούρων, που συνοδεύουν τον ασθενή μέχρι το τέλος. Στο τελικό στάδιο εμφανίζεται ανεξήγητος πόνος, άνοια, απάθεια, μείωση αντίληψης του χώρου και μυϊκή παράλυση (Beitz, 2014) (Εικόνα 1). Οι τέσσερις αυτές κατηγορίες βρίσκονται υπό τον έλεγχο του συστήματος ντοπαμίνης, το οποίο μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές στον οργανισμό, ακόμη και όταν μεταβάλλονται λίγο τα επίπεδά της.



Εικόνα 1. Συμπτώματα ασθενή με νόσο Πάρκινσον.

1.3 Το σύστημα ντοπαμίνης

Ο νευροδιαβιβαστής ντοπαμίνη παράγεται κυρίως στη μέλαινα ουσία, μια μεσεγκεφαλική περιοχή πυκνών βασικών γαγγλίων ή βασικών πυρήνων, σωμάτων δηλαδή των νευρικών κυττάρων. Σε κάθε ημισφαίριο υπάρχει μία δομή βασικών γαγγλίων, που αποτελείται από το ραβδωτό σώμα (κέλυφος και κερκοφόρος πυρήνας), την ωχρά σφαίρα (έξω και έσω) και τη μέλαινα ουσία. Οι δομές αυτές λαμβάνουν και στέλνουν σήματα σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου, ρυθμίζοντας την έναρξη επιθυμητών ή τη λήξη ανεπιθύμητων κινήσεων και ενεργειών, μέσω του Άμεσου και Έμμεσου Μονοπατιού (Pollack, 2001). Συνοπτικά, κατά το άμεσο μονοπάτι, ο εγκεφαλικός φλοιός λαμβάνει ερεθίσματα και διεγείρει το ραβδωτό σώμα, το οποίο αναστέλλει την έσω ωχρά σφαίρα, που μέχρι πριν δρούσε ανασταλτικά στον θάλαμο. Πλέον ο θάλαμος μπορεί να στείλει διεγερτικές αποκρίσεις στον κινητικό φλοιό, με αποτέλεσμα την εκδήλωση εκούσιων κινήσεων (Εικόνα 2Α). Κατά το έμμεσο μονοπάτι, ο εγκεφαλικός φλοιός λαμβάνει ερεθίσματα και διεγείρει το ραβδωτό σώμα, αυτή τη φορά όμως αναστέλλεται η έξω ωχρά σφαίρα. Ο υποθαλαμικός πυρήνας, που θα αναστελλόταν από την τελευταία, διεγείρει πλέον την έσω ωχρά σφαίρα και, αντίθετα από την προηγούμενη περίπτωση, ο θάλαμος αναστέλλεται, το ίδιο και ο κινητικός φλοιός. Η ντοπαμίνη δρα τόσο στο άμεσο, όσο και στο έμμεσο μονοπάτι, αφού προσδεθεί στους D1 ή D2 υποδοχείς της, αντίστοιχα (Εικόνα 2). Οι D1 βρίσκονται στην έσω ωχρά σφαίρα και συμμετέχουν στο άμεσο μονοπάτι, ελέγχοντας του μύες εκούσιας κίνησης. Αντιθέτως, οι D2 βρίσκονται στην έξω ωχρά σφαίρα και η ενεργοποίησή τους αναστέλλει τους ίδιους μύες, μέσω του έμμεσου μονοπατιού (Wolfgang, 1998).



Εικόνα 2. Το άμεσο (A) και το έμμεσο (B) μονοπάτι για σηματοδότηση της κίνησης.

Φυσικά η δράση της ντοπαμίνης δεν περιορίζεται μόνο στην κίνηση, καθώς όπως

προαναφέρθηκε επηρεάζει και νοητικές λειτουργίες, συμμετέχει στη ρύθμιση του ύπνου, των ορμονών και κάποιων εντολών του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Οποιαδήποτε διατάραξη της ισορροπίας της συγκέντρωσης ή απελευθέρωσής της μπορεί να προκαλέσει εμφανείς επιπλοκές. Σε συνθήκες φυσιολογικού γήρατος, το 4% του αριθμού των ντοπαμινεργικών νευρώνων εκφυλίζεται ανά δεκαετία, όμως σε ασθενείς του Πάρκινσον η απώλεια είναι πολύ πιο εκτεταμένη και γρήγορη και η ντοπαμίνη που παράγεται δεν αρκεί για την ομαλή σηματοδότηση, με αποτέλεσμα την εκδήλωση των χαρακτηριστικών συμπτωμάτων (Klein et al., 2019).

1.4 Αίτια της ασθένειας

Τα ακριβή αίτια ή ο μηχανισμός εκφυλισμού δεν είναι ακόμη γνωστά, παρά τις εντατικές έρευνες. Μέχρι και δύο δεκαετίες πριν, επικρατούσε η άποψη πως η ασθένεια εμφανίζεται τυχαία στον πληθυσμό και εξαρτάται αποκλειστικά από ηλικιακούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Από τις πρώτες μελέτες όμως εγκεφάλων ασθενών με Πάρκινσον το 1912, έως και όλα τα σημερινά *in vivo* και *in vitro* πειραματικά μοντέλα, έχει βρεθεί ένα κοινό χαρακτηριστικό, που πλέον θεωρείται ως το ορόσημο της παθολογίας της ασθένειας Πάρκινσον. Αυτό είναι τα σωμάτια Lewy (Lewy bodies, LB), δηλαδή σώματα νευρώνων που φέρουν χαρακτηριστικά συσσωματώματα πρωτεϊνών (Engelhardt & Gomes, 2017). Το 1997, ταυτοποιήθηκε η πρώτη σημειακή μετάλλαξη A53T στο γονίδιο *snca*, που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη και ευθύνεται για μια κληρονομική μορφή της ασθένειας Πάρκινσον με αυτοσωμικό κι επικρατή χαρακτήρα (Polymeropoulos et al., 1997), ενώ λίγο αργότερα ανακαλύφθηκε πως η α-συνουκλεΐνη αποτελεί το κύριο συστατικό των σωμάτων Lewy (Spillantini et al., 1997). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί αρκετές αυτοσωμικές επικρατείς μεταλλάξεις στο γονίδιο *snca* αλλά και σε άλλους γενετικούς τόπους, που ευθύνονται για την εκδήλωση πρόωρου και επιθετικού φαινοτύπου τουλάχιστον στο 10% των ασθενών του Πάρκινσον (Bendor et al., 2013). Τα γεγονότα αυτά επισημαίνουν τη σπουδαιότητα της α-συνουκλεΐνης τόσο για τη σποραδική όσο και της κληρονομική μορφή της νόσου.

1.5 Ο φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης

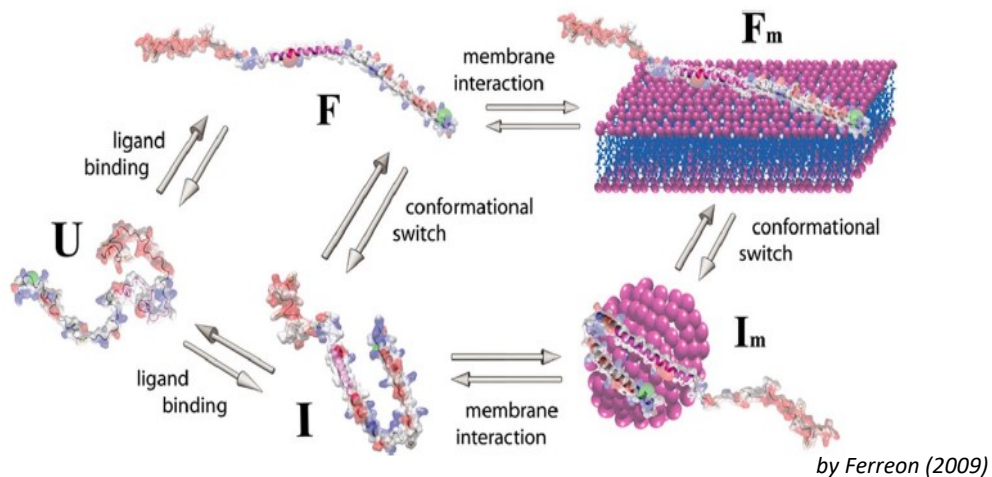
Σε φυσιολογικά άτομα, η α-συνουκλεΐνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη (14kDa), με 140 αμινοξέα, αποτελούμενη από την N-τελική περιοχή (1-60 αμινοξέα) με ιδιότητα απολιποπρωτεΐνης, η οποία επιτρέπει την αλληλεπίδραση με λιπίδια και αποτρέπει το σχηματισμό β-ελάσματος, την κεντρική επικράτεια (NAC) (61-95) που μπορεί να προσδεθεί σε αμυλοειδή και την C-τελική περιοχή (95-140) χαμηλής υδροφοβικότητας, υπεύθυνη για την διαλυτότητά του μορίου (Emamzadeh, 2016). Δομικά, διατηρείται ένα ισοζύγιο μεταξύ

της διαλυτής, χωρίς διάταξη μορφής στο κυτταρόπλασμα και της προσδεμένης σε μεμβράνες με δομή α-έλικας (Mehra et al., 2019).

Αν και έχει ανιχνευθεί σε διαφόρους κυτταρικούς τύπους, η α-συνουκλείνη βρίσκεται κυρίως νευρικό σύστημα, όπου αποτελεί το 1% του συνόλου των πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα (Stefanis, 2012). Συγκεκριμένα, εντοπίζεται στις προσυναπτικές απολήξεις και στους άξονες, ενώ σε πολύ μικρότερο βαθμό στα σώματα των νευρώνων. Ο ακριβής ρόλος της πρωτεΐνης δεν έχει καθοριστεί, όμως φαίνεται πως συμμετέχει σε αρκετές κυτταρικές λειτουργίες. Ενδεικτικά περιλαμβάνουν την καταστολή απόπτωσης των ντοπαμινεργικών νευρώνων μέσω αναστολής της δράσης της πρωτεϊνικής κινάσης C, την ενεργοποίηση της καλμοδουλίνης για ρύθμιση κινασών, τη δράση ως πρωτεΐνη- συνοδός για τη συγκρότηση του συμπλόκου SNARE κατά την απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών, τη συμμετοχή στη φυσιολογική σύνθεση ζωτικών λιπαρών οξέων στον εγκέφαλο, την αναστολή ενεργοποίησης κασπασών και μονοπατιού JNK για νευροπροστασία, τη νευρωνική διαφοροποίηση μέσω μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων και τη ρύθμιση των επιπέδων ντοπαμίνης με αναστολή της υδροξυλάσης τυροσίνης (Emamzadeh, 2016). Ο πιο σημαντικός ρόλος της όμως, φαίνεται να είναι η ρύθμιση της απελευθέρωσης και επαναπρόσληψης του νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνης. Αυτό επιτυγχάνεται μετά από πρόσδεση της πρωτεΐνης στα συναπτικά κυστίδια που περιλαμβάνουν τον νευροδιαβιβαστή, τα οποία βρίσκονται στις απολήξεις των προσυναπτικών νευρώνων. Πιο συγκεκριμένα, πιστεύεται ότι αφενός ελέγχει το ρυθμό βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων που απαρτίζουν τα συναπτικά κυστίδια, οπότε και τη διαθεσιμότητά τους στις απολήξεις και αφετέρου προσδένεται σ' αυτά έπειτα από επανειλημμένες διεγέρσεις του νευρώνα, που θα οδηγούσαν σε αυξημένη απελευθέρωση της ντοπαμίνης. Παρεμποδίζοντας όμως τη σύζευξή τους με τη πλασματική μεμβράνη, επάγουν την ενδοκυττάρωσή τους και έτσι περιορίζουν την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή (Murphy et al., 2000).

Αυτές οι ιδιότητες οφείλονται στη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα στη δομή α-έλικας που δημιουργείται στη N-τελική περιοχή, με τα υδρόφοβα κατάλοιπα να διεισδύουν στο εξωτερικό στρώμα των λιπιδικών μεμβρανών. Αντίθετα, η C-τελική περιοχή παραμένει αδιάλυτη στο κυτταρόπλασμα (Jao et al., 2004), (Ulmer et al., 2005). Η δομή αυτή διακρίνεται σε μία μεμονωμένη α-έλικα ή σε δύο επιμέρους αντι-παράλληλες και εξαρτάται από την καμπυλότητα της μεμβράνης-στόχου (Westphal & Chandra, 2013). Σύμφωνα με μοριακές προσομοιώσεις, η α-συνουκλείνη ανιχνεύει την υψηλή καμπυλότητα της μεμβράνης-στόχου, αποκτά τη διαμόρφωση δύο α-ελίκων και προσδένεται ισχυρά στο εξωτερικό της στρώμα. Όταν απαιτείται η απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή, αλλάζει διαμόρφωση προς μία ενιαία έλικα, μειώνοντας το βαθμό καμπυλότητας της μεμβράνης και πιέζοντας την να συντηχθεί με την πλασματική μεμβράνη, απελευθερώνοντας το περιεχόμενό της. Η α-συνουκλείνη αναδιπλώνεται και πάλι στην

αρχική διαμόρφωση, αυξάνοντας την καμπυλότητα της μεμβράνης. Το κυστίδιο ενδοκυτταρώνεται και η απελευθέρωση της ντοπαμίνης σταματά (Εικόνα 3) (Ferreon et al., 2009). Σημαντικό ρόλο παίζει και ο αριθμός των μορίων πρωτεΐνης που προσδέεται σε κάθε κυστίδιο και υπολογίζεται περίπου σε 70, ποσό αρκετά μεγαλύτερο από οποιασδήποτε άλλης πρωτεΐνης. Σε αναλογία πρωτεΐνης προς λιπίδια από 1:10 ως 1:40, η α -συνουκλεΐνη επάγει την καμπύλωση και την κυστιδίωση, ενώ όταν μειώνεται σε 1:200 προωθείται η εξομάλυνση της καμπύλης της μεμβράνης (Fakhree et al., 2016).



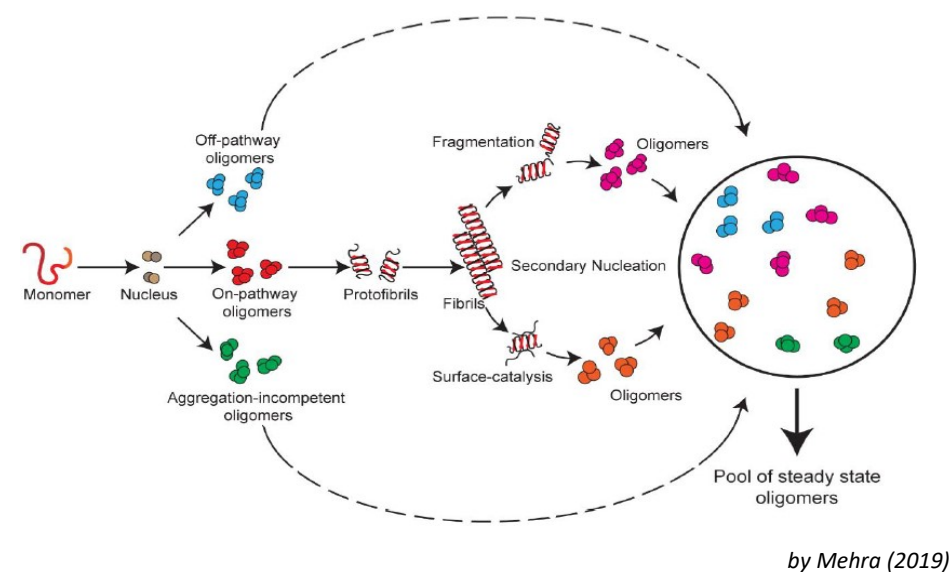
Εικόνα 3. Μεταβολές στη διαμόρφωση δευτεροταγούς δομής της α -συνουκλεΐνης, ανάλογα με την καμπυλότητα της πρωτεΐνης-στόχου. **U**: μη αναδιπλωμένη πρωτεΐνη, **F** και **I**: διαμόρφωση μεμονωμένης και διμερούς α -έλικας, αντίστοιχα, έπειτα από πρόσδεση με μη μεμβρανικά συστατικά, **F_m**: μεμονωμένη α -έλικα, προσδεμένη σε μεμβράνη χαμηλής καμπυλότητας, **I_m**: διμερής α -έλικα, προσδεμένη σε μεμβράνη υψηλής καμπυλότητας.

Συνδυάζοντας τα δεδομένα αυτά επισημαίνεται ο καθοριστικός ρόλος της α -συνουκλεΐνης στον έλεγχο της ντοπαμινικής σηματοδότησης. Πρόσφατα, η πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε και σε μορφή ελικοειδών τετραμερών, αυξάνοντας την ικανότητα πρόσδεσης με λιπίδια και τη σταθερότητά της στο κυτταρόπλασμα (Olanow & Brundin, 2013)(Bartels et al., 2011).

1.6 Ο παθολογικός ρόλος της α -συνουκλεΐνης

Ο παθολογικός φαινότυπος της α -συνουκλεΐνης εκδηλώνεται κατά το σχηματισμό των LB, όπου η πρωτεΐνη πλέον αναδιπλώνεται σε δομή β -ελάσματος και δημιουργεί αδιάλυτα συσσωματώματα. Συγκεκριμένα, σχηματίζεται αρχικά ένας μικρός πυρήνας από λίγα μόρια της πρωτεΐνης, που έχουν χάσει τη φυσιολογική διαμόρφωση α -έλικας. Η διαδικασία αυτή αποτελεί τη λανθάνουσα φάση της συσσώρευσης και καθορίζει το ρυθμό εξέλιξής της, καθώς είναι το πιο χρονοβόρο στάδιο. Ακολουθεί η φάση επιμήκυνσης, όπου

όλο και περισσότερα μόρια συσσωρεύονται γύρω από τον πυρήνα, σχηματίζοντας τα πρωτοϊνίδια, ενώ τέλος, στη στατική φάση η πλειοψηφία της διαλυτής πρωτεΐνης μετατρέπεται σε αδιάλυτα, ινίδια αμυλοειδούς. Λιγότερο σταθερά συσσωματώματα, μπορεί να θρυμματιστούν στα επιμέρους ολιγομερή, τα οποία θα εισέλθουν εκ νέου στη φάση επιμήκυνσης, τροφοδοτώντας το μονοπάτι για την ενίσχυση των ινιδίων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4, το σύνολο το πρωτογενών και δευτερογενών ολιγομερών αποτελεί μία δεξαμενή μορίων, διαθέσιμων παραγωγή ινιδίων, τα οποία εμφανίζουν επιπλέον ανθεκτικότητα στην πρωτεΐνάση K, παρεμποδίζοντας την αποικοδόμησή τους (Mehra et al., 2019), (Roberts & Brown, 2015).

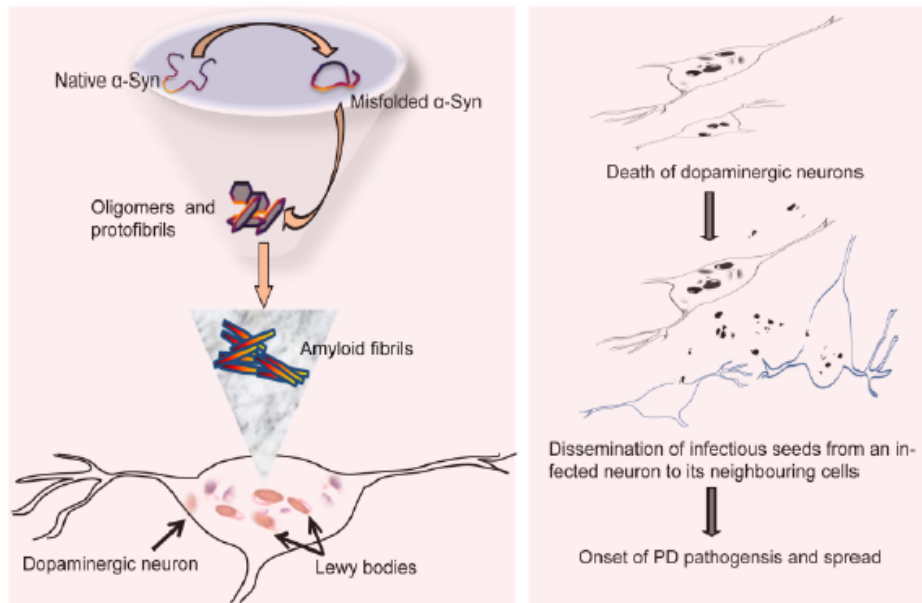


Εικόνα 4. Αίτια και στάδια σχηματισμού των LB.

Τα συσσωματώματα εντοπίζονται κυρίως στο σώμα του νευρώνα (απ' όπου προκύπτει και η ονομασία τους) και η έναρξη σχηματισμού τους αρχίζει μετά την παραγωγή της πρωτεΐνης, αποτρέποντας την να μεταβεί στις απολήξεις. Λιγότερο συχνά παρατηρούνται συσσωματώματα και στους άξονες, οι οποίοι με τη σειρά της ονομάζονται νευρίτες Lewy (Lewy neurites, LN).

Η συγκέντρωση των συσσωματωμάτων στο κυτταρόπλασμα φαίνεται να προκαλεί την παθολογία της ασθένειας, έχοντας μεγαλύτερο αντίκτυπο στη σύναψη. Όπως έχει αποδειχθεί (Chung et al., 2009), η απουσία της α-συνουκλεΐνης δεν επιτρέπει τη φυσιολογική αλληλεπίδραση των συναπτικών κυστιδίων με την πλασματική μεμβράνη κι άρα την ομαλή σηματοδότηση, καθώς μεταβάλλεται η άμεση αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τα κυστίδια, αλλά και με άλλες καθοριστικές πρωτεΐνες. Μία από αυτές είναι και η συνταξίνη, που απαρτίζει το σύμπλεγμα SNARE, με αποτέλεσμα την αδυναμία εκκίνησης και συγχρονισμού της σύντηξης κυστιδίων-πλασματικής μεμβράνης για εξωκυττάρωση του περιεχομένου τους.

Καθώς ο αριθμός των φυσιολογικών μορίων α-συνουκλεΐνης δεν επαρκεί για την ορθή μεταβολή καμυλότητας που περιγράφηκε παραπάνω, τα κυστίδια παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα προσδεμένα στις λιπιδικές μεμβράνες. Σταδιακά δημιουργούνται πόροι, με αποτέλεσμα ο νευροδιαβιβαστής να διαχέεται στο κυτταρόπλασμα. Πολύ σύντομα μεταβολίζεται σε DOPAC και αποικοδομείται. Έτσι, η ανεπαρκής σηματοδότηση παρατηρείται ακόμη και πριν τον εκφυλισμό του νευρώνα. Μακροσκοπικά, παρατηρούνται αλλαγές στη φυσιολογική δομή του κυτταροσκελετού, λόγω μείωσης των επιπέδων της β-τουμπουλίνης και περιορισμού της μετακίνησης των πρωτεϊνών προς τους άξονες ή το σώμα του νευρώνα. Αυτές οι αλλαγές σταδιακά συσσωρεύονται, αυξάνοντας τη συγκέντρωση πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα και το οξειδωτικό στρες. Το τελευταίο ειδικά φαίνεται πως έχει καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη της παθολογίας, καθώς όλο και περισσότερες μελέτες επισημαίνουν σοβαρές βλάβες στα μιτοχόνδρια. Συγκεκριμένα, σε εγκεφάλους ασθενών με Πάρκινσον, αλλά και σε πειραματικά μοντέλα, έχει παρατηρηθεί αυξημένη συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης στην εσωτερική πλευρά των μιτοχονδριακών μεμβρανών ντοπαμινεργικών νευρώνων και απορρύθμιση του συμπλόκου I (αναγωγή NADH-ουβικινόνης) της αναπνευστικής αλυσίδας, με συνέπεια την αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) (Devi et al., 2008). Επιπλέον, η εκτενής συσσώρευση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα ενεργοποιεί την αυτοφαγία, ως απόπειρα αποικοδόμησής της. Αντιθέτως όμως, το αυτοφαγόσωμα αδυνατεί να συνδεθεί με τα συσσωματώματα και, με κάποιον άγνωστο μηχανισμό, στοχεύει λειτουργικά μιτοχόνδρια, καταστρέφοντάς τα (Choubey et al., 2011). Αυτή αποτελεί άλλη μία αιτία αύξησης των ROS στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες και πολύ πιθανό παράγοντα νευροεκφυλισμού. Τέλος, μέχρι προσφάτως η α-συνουκλεΐνη θεωρούνταν καθαρά ενδοκυτταρική πρωτεΐνη, καθώς δεν περιέχει κάποια σηματοδοτική αλληλουχία εξωκυττάρωσης. Η πεποίθηση αυτή διαψεύστηκε και αποδείχθηκε πως τα ολιγομερή της όχι μόνο μπορούν να απεκκριθούν, «μολύνοντας» γειτονικά κύτταρα, αλλά ευθύνονται και για την πρόκληση νευροφλεγμονής. Τα κύτταρα γλοίας, και συγκεκριμένα τα αστροκύτταρα που διατηρούν την ομοιόσταση του εγκεφάλου, απορροφούν πιθανώς τοξικές πρωτεΐνες του μικροπεριβάλλοντος, μεταξύ των οποίων και η α-συνουκλεΐνη, οδηγώντας τις στα λυσοσώματα για διάσπαση. Όταν εκτίθενται συνεχώς σε συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης, τα λυσοσώματα φτάνουν σε κορεσμό, με αποτέλεσμα η παθολογική πρωτεΐνη να συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα. Αδυνατώντας να ανταποκριθούν στο ρόλο τους, τα αστροκύτταρα στρατολογούν κυτοκίνες και ξεκινούν μια ανοσολογική απόκριση. (H. J. Lee et al., 2010). Η έναρξη της φλεγμονής φαίνεται αρχικά στις νευρικές απολήξεις και σταδιακά προχωράει προς τα σώματα των νευρώνων, υποδηλώνοντας την εξάπλωσή της προς τον μεσεγκέφαλο, προκαλώντας παράλληλα εκτεταμένο νευροεκφυλισμό (Εικόνα 5).



by Ghosh (2017)

Εικόνα 5. Παθολογική δράση της α-συνουκλεΐνης.

1.7 Η κληρονομική μορφή της ασθένειας του Πάρκινσον

Στις κληρονομήσιμες μορφές της ασθένειας, η α-συνουκλεΐνη γίνεται παθολογική, λόγω γενετικών μεταλλάξεων. Αυτές περιλαμβάνουν είτε την ύπαρξη πολλαπλών αντιγράφων του γονιδίου, που οδηγούν σε υπερέκφραση του και συσσώρευση της πρωτεΐνης ή κάποια σημειακή μετάλλαξη, που πιθανώς επηρεάζει τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης. Μελέτες που υποστηρίζουν τον πρώτο ισχυρισμό, δείχνουν τη δόσο-εξαρτώμενη σχέση α-συνουκλεΐνης και των συμπτωμάτων της ασθένειας του Πάρκινσον, εκτενή συσσώρευση της πρωτεΐνης στους εγκεφάλους ασθενών σε σύγκριση με τους υγιείς, καθώς και εκδήλωση του παθολογικού φαινοτύπου σε ζωικά πειραματικά μοντέλα, έπειτα από επαγωγή της υπερέκφρασης του γονιδίου (Stefanis, 2012). Σχετικά με το ρόλο των σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο *snca*, οι έρευνες δείχνουν πως αυτές ανιχνεύονται στα κατάλοιπα του N-τελικού άκρου, που όπως προαναφέρθηκε ευθύνεται για τη διαμόρφωση α-έλικας και την παρεμπόδιση σχηματισμού β-ελάσματος (A30P, A53T, E46K, G51D, H50Q). Συγκρίσεις μεταξύ της φυσιολογικής και των μεταλλαγμένων μορφών α-συνουκλεΐνης δείχνουν σημαντική αδυναμία πρόσδεσης των δεύτερων στις μεμβράνες λιπιδίων, που οδηγεί σε παθολογική σηματοδότηση (Westphal & Chandra, 2013). Επίσης όλες οι μεταλλάξεις ακολουθούν αυτοσωμικό κι επικρατή τρόπο κληρονόμησης, προκαλώντας την πρόωρη εκδήλωση των συμπτωμάτων της νόσου. Τέλος, και σ' αυτή την περίπτωση, πειραματικά μοντέλα στα οποία έχει εισαχθεί το μεταλλαγμένο γονίδιο εμφανίζουν τον παθολογικό φαινότυπο (Bendor et al., 2013).

1.8 Η α-συνουκλεΐνη A53T

Η πιο καλά μελετημένη γενετική μετάλλαξη είναι η αντικατάσταση της γουανίνης από αδενίνη στη θέση 209 του γονιδίου, που έχει ως συνέπεια την αλλαγή του καταλοίπου 53 από αλανίνη σε θρεονίνη. Άτομα που πάσχουν από τη νόσο και φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά σε μία ιταλική οικογένεια, με φορείς 60 μέλη της σε βάθος 5 γενεών (Golbe et al., 1996), ενώ σχεδόν ταυτόχρονα ανιχνεύθηκε και σε ασθενείς τριών μη συγγενικών ελληνικών οικογενειών (Polymeropoulos et al., 1997). Τα ευρήματα αυτά αποτέλεσαν αφορμή να ταυτοποιηθεί η ύπαρξη της α-συνουκλεΐνης A53T σε επιπλέον 16 άτομα μιας ελληνο-αμερικάνικης οικογένειας σε βάθος τριών γενεών, που είχαν μελετηθεί προηγουμένως (Markopoulou et al., 1995). Αργότερα, ανιχνεύθηκε σε μια αυστραλιανή οικογένεια ελληνικής καταγωγής, με 9 άτομα να φέρουν τη μετάλλαξη (Spira et al., 2001). Πρόσφατες αναλύσεις έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα και για άτομα πολωνικής (Michell et al., 2005) και σουηδικής καταγωγής, χωρίς ελληνικές ή ιταλικές ρίζες.

Η διεισδυτικότητα της μετάλλαξης φτάνει στο 85% και η παθολογική του δράση οφείλεται είτε στην υπέρμετρη έκφρασή του ή στην ολοκληρωτική επικράτησή του υπέρ του φυσιολογικού αλληλομόρφου. Η μέση ηλικία των ασθενών που εμφανίζουν την οικογενή μορφή της νόσου λόγω της μετάλλαξης A53T είναι τα 50 χρόνια, πολύ μικρότερη σε σύγκριση με τους ασθενείς της σποραδικής μορφής της νόσου του Πάρκινσον, που είναι περίπου τα 63 χρόνια. Το χρονικό περιθώριο επιβίωσης φτάνει τα 7 χρόνια με θεραπεία, περίπου μειωμένο κατά το μισό, σε σχέση με τα 13 χρόνια επιβίωσης των δεύτερων. Τα πρώτα ήπια συμπτώματα εμφανίζονται περίπου 6 μήνες πριν τη διάγνωση και μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα η επιδείνωση είναι ραγδαία. Τα πρώτα συμπτώματα είναι αρκετά διαφορετικά από αυτά των ασθενών της σποραδικής νόσου, περιλαμβάνοντας ασύμμετρη παράλυση και στα δύο άκρα, βραδυκινησία, δυσκαμψία και όχι απομόνωση ενός μόνο άκρου ή τρέμουλο, όπως συνηθίζεται. Οι περισσότεροι ασθενείς σταματούν να ανταποκρίνονται στη συμβατική θεραπεία και εμφανίζουν γρήγορα σοβαρές επιπλοκές στις νοητικές και αισθητήριες ικανότητες. Συνηθέστερος λόγος θανάτου αποτελεί η διακοπή λειτουργίας κάποιου ζωτικού οργάνου, κυρίως των πνευμόνων, αφού οι περισσότεροι καταλήγουν από αναπνευστική ανεπάρκεια (Markopoulou et al., 1995), (Golbe et al., 1996), (Spira et al., 2001), (Puschmann et al., 2009), (Markopoulou et al., 2008), (Hughes et al., 2016). Στις ψυχολογικές διαταραχές κατατάσσονται η μειωμένη διάθεση για πρόσληψη τροφής, που οδηγεί σε σημαντική απώλεια βάρους, η έλλειψη άγχους και γενικότερου ενδιαφέροντος, η απροθυμία για προσωπική φροντίδα και τις συνθήκες ζωής και η κατάθλιψη, συμπεριφορές πολύ πιο έντονες σε σχέση με αυτές των ασθενών με τη σποραδική μορφή Πάρκινσον. Το αισθητήριο σύστημα πλήττεται εξίσου, με τα άτομα να μην ανταποκρίνονται σε ήχους παρ' όλη τη φυσιολογική ακουστική ικανότητα, καθώς αναπτύσσουν διακοπτόμενη ή και καθόλου ομιλία (Markopoulou et al., 2008), (Puschmann et al., 2009), (Paumier et al., 2013).

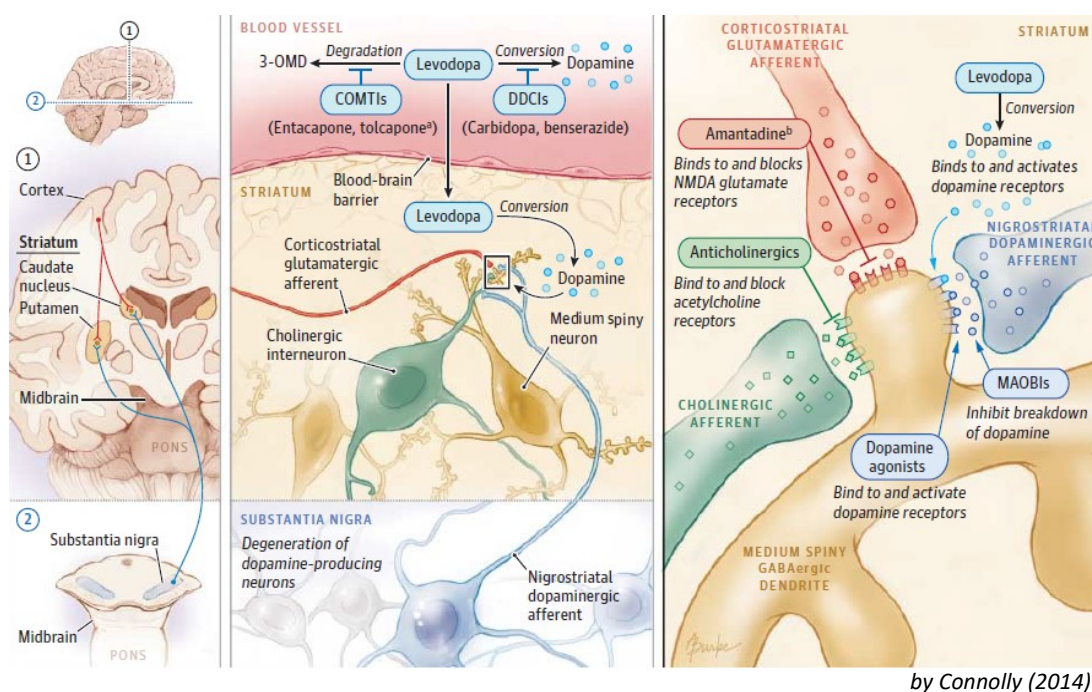
Συνοψίζοντας, μια μετάλλαξη στη N-τελική περιοχή, όπως η A53T, επισπεύδει την δημιουργία αδιάλυτων συσσωματωμάτων. Επιπλέον, ακόμη κι αν κάποια μόρια πρωτεΐνης ξεφύγουν από τη συμμετοχή στο β-έλασμα και καταφέρουν να φτάσουν στις απολήξεις, δε θα έχουν φυσιολογική δράση, λόγω αδυναμίας πρόσδεσης στα συναπτικά κυστίδια. Τα δεδομένα αυτά εξηγούν γιατί η κληρονομήσιμη μορφή της νόσου εξελίσσεται τόσο γρήγορα και επιθετικά.

Πειραματικά μοντέλα μελέτης της μετάλλαξης επιβεβαιώνουν τη σημαντική αύξηση του παθολογικού φαινοτύπου. Ο αριθμός των εκκριτικών κυστιδίων στις νευρικές απολήξεις μειώνεται κατά 54% και ακολούθως η υδροξυλάση της τυροσίνης κατά 39%, υποδηλώνοντας σοβαρή ανεπάρκεια σηματοδότησης ανεξάρτητη από νευροεκφυλισμό. Ο μεταφορέας ντοπαμίνης αντίθετα αυξάνεται κατά 29% στην προσπάθεια επαναπρόσληψης όσο το δυνατόν περισσότερου νευροδιαβιβαστή, γεγονός το οποίο οδηγεί σε μειωμένη δράση του στη σχισμή (Chen et al., 2015). Βιοχημικές μελέτες δείχνουν ότι η α-συνουκλεΐνη A53T στρατολογεί και τη φυσιολογική πρωτεΐνη που παράγεται από το φυσιολογικό αλληλόμορφο, για το σχηματισμό ολιγομερών και ινιδίων, επάγοντας προηγουμένως τη φωσφορυλίωσή της στο κατάλοιπο σερίνης 129, μία χαρακτηριστική τροποποίηση των συσσωματωμάτων στα LB (Henrich et al., 2018). Οι δομές αυτές είναι εξαιρετικά ανθεκτικές σε πρωτεάσες, με αποτέλεσμα να επάγεται η δράση ουβικουΐτινης, η οποία όμως αποτυγχάνει στη στόχευσή της και στρέφεται προς άλλα κυτταρικά μόρια, μη ειδικά (Stefanis et al., 2001). Τα οργανίδια που πλήττονται περισσότερο είναι τα μιτοχόνδρια, με τη ταχύτητα δράσης τους να μειώνεται κατά 15%, ενώ ο αριθμός των λειτουργικών μιτοχονδρίων εξαντλείται σχεδόν κατά 70%. Η μέγιστη αναπνευστική ικανότητα είναι σημαντικά μειωμένη και η παραγωγή ATP δεν επαρκεί, με αποτέλεσμα να σημειώνονται υψηλά επίπεδα γλυκόλυσης (L. Li et al., 2013). Προοδευτικά, επάγεται μιτοφαγία, με σχηματισμό κυστιδίων περιμετρικά του πυρήνα, που αποτελούνται από θραύσματα μιτοχονδρίων και ολιγομερή α-συνουκλεΐνης A53T (Stefanis et al., 2001), (Chen et al., 2015). Στο τελικό στάδιο, όπου οι διακλαδώσεις δενδριτών καταστρέφονται και οι νευρώνες εκφυλίζονται, έχει παρατηρηθεί 35% αύξηση της απώλειας κυττάρων με την μετάλλαξη A53T σε σύγκριση με τη φυσιολογική α-συνουκλεΐνη. Τέλος, αξιοσημείωτη είναι αύξηση του αριθμού των γειτονικών κυττάρων μικρογλοίας και αστρογλοίας 5 και 6 φορές αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την υπερπαραγωγή των πρωτεϊνών p62 και Ubi-6 για τον σχηματισμό συσσωματωμάτων με την α-συνουκλεΐνη A53T, καθώς και η έκκριση κιτοκινών, υποδηλώνουν έντονη ανοσολογική απόκριση και πρόκληση φλεγμονής, που εν τέλη συνεισφέρει θετικά στην επιδείνωση της παθολογίας, αφού επιταχύνει τον νευροεκφυλισμό στην περιοχή (Henrich et al., 2018).

1.9 Θεραπεία

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί θεραπεία για τη νόσο του Πάρκινσον. Η αντιμετώπιση του ισοδυναμεί με αντιμετώπιση των συμπτωμάτων - και κυρίως των κινητικών - κατά την οποία ακολουθείται φαρμακευτική αγωγή για αναπλήρωση της δράσης της ντοπαμίνης. Από τις πιο σημαντικές αποφάσεις για την εξέλιξη της νόσου είναι το πότε θα ξεκινήσει η θεραπεία και τί φαρμακευτική ουσία θα περιλαμβάνει. Η πιο αποδοτική αγωγή ανακαλύφθηκε το 1969 (Cotzias et al., 1969) και περιλαμβάνει τη χορήγηση λεβοντόπας, ενός μεταβολικού πρόδρομου της ντοπαμίνης. Με την ικανότητά της να διέρχεται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, απορροφάται γρήγορα από τους νευρώνες και μετατρέπεται στον επιθυμητό νευροδιαβιβαστή, αναπληρώνοντας τη δράση του κι έτσι τα συμπτώματα υποχωρούν παροδικά. Μειονεκτήματά αποτελούν η συστημική κατανομή της στον οργανισμό και ιδιαίτερα η απορρόφησή της από τους σκελετικούς μύες, το ήπαρ και τους νεφρούς. Οι τελευταίοι οφείλονται και για τον σημαντικά μικρό χρόνο ημιζωής της λεβοντόπας, γεγονός που καθιστά απαραίτητη τη συχνή χορήγησή της μέσα στη μέρα. Αυξημένες δόσεις απαιτούνται επίσης λόγω της σύντομης διάρκειας δράσης της στη συναπτική σχισμή, μόλις απελευθερωθεί από τους προσυναπτικούς νευρώνες. Καθώς όμως η λεβοντόπα είναι από τις ουσίες που ο οργανισμός αποκτά σταδιακά ανοχή, παρατηρείται μείωση ανταπόκρισης περίπου 5 χρόνια μετά την έναρξη συστηματικής χρήσης της (Lewitt, 2009). Για την καθυστέρηση αυτής, χορηγείται συνδυαστικά κάποιος περιφερικός αναστολέας αποδόμησής της, όπως η καρβιντόπα, που αποτρέπει το μεταβολισμό της στο υπόλοιπο σώμα, αυξάνοντας το χρόνο ημιζωής της και τη διαθεσιμότητα στον εγκέφαλο. Αναστολείς της μονοαμινικής οξειδάσης Β (MAO-B) μπορεί να χορηγηθούν επίσης συμπληρωματικά κι έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν πιο ελεγχόμενο βάδισμα και ηπιότερη επιδείνωση των συμπτωμάτων. Η χειρότερη παρενέργεια της λεβοντόπας όμως είναι η δυσκινησία. Μετά την διαρκή θεραπεία με λεβοντόπα, οι ασθενείς αποκτούν ανεξέλεγκτη κίνηση του κεφαλιού και των άκρων, ενώ πλήττονται και οι αναπνευστικοί και κοιλιακοί μύες. Το σύμπτωμα αυτό είναι μη αντιστρεπτό και απαιτείται η διακοπή λήψης της ουσίας για ορισμένο χρονικό διάστημα, με αποτέλεσμα ο ασθενής να εισέρχεται συνεχώς σε κύκλους θεραπείας-επιδείνωσης (Thanvi et al., 2007). Άλλες φαρμακευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι οι αγωνιστές ντοπαμίνης, όπως η απομορφίνη, που δεν προκαλούν δυσκινησία ή ανοχή κατά τη χρήση, όμως η αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της νόσου δεν είναι εξίσου αποδοτική και μπορεί με τη σειρά τους να προκαλέσουν οίδημα. Η αμανταδίνη έχει ευρεία δράση, συμπεριλαμβανομένου αντιμυοσκαινικές ιδιότητες, επαγωγή απελευθέρωσης ντοπαμίνης στη συναπτική σχισμή, αποτροπή της επαναπρόσληψής της και παρεμπόδιση των γλουταμινικών υποδοχέων. Παρ' όλ' αυτά προκαλεί δικτυωτή πελίωση, οίδημα και σύγχυση, συμπτώματα που αποτρέπουν τη χορήγηση σε ασθενείς μεγάλης ηλικίας (Εικόνα 6). Η χειρουργική επέμβαση αποτελεί την θεραπεία τελευταίας γραμμής, όταν οι ασθενείς δεν ανταποκρίνονται στις συμβατικές αγωγές. Με την εν τω βάθει

εγκεφαλική διέγερση (deep brain stimulation) εφαρμόζεται η εμφύτευση ηλεκτροδίων σε περιοχές του εγκεφάλου για τροποποίηση της νευρικής λειτουργίας με την πρόκληση διεγέρσεων που αδυνατεί να πυροδοτήσει από μόνος του ο εγκέφαλος. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ δαπανηρή, απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και η εγχείρηση είναι αρκετά ριψοκίνδυνη για την επιβίωση του ηλικιωμένου ασθενούς (Fahn, 2003).



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών δράσης των φαρμακολογικών ουσιών, που χορηγούνται για την αντιμετώπιση κινητικών συμπτωμάτων της νόσου του Πάρκινσον.

Οι θεραπείες νέας γενιάς σχεδιάζονται έτσι ώστε να επιτευχθεί πιο ευρεία δράση των παραγόντων κι όχι αποκλειστικά στη συναπτική σχισμή με μίμηση της ντοπαμίνης. Συγκεκριμένα, οι γονιδιακές θεραπείες στοχεύουν είτε στην παραγωγή αυξητικών παραγόντων για την επιβράδυνση του νευροεκφυλισμού, είτε στην παραγωγή ενζύμων που συμμετέχουν στο μονοπάτι βιοσύνθεσης ντοπαμίνης ή στη μετατροπή του προφίλ σηματοδότησης των κυττάρων (Benabid, 2010). Συνοπτικά, αναφέρονται κάποιες προσεγγίσεις με τα αντίστοιχα ενθαρρυντικά και αποτρεπτικά συμπεράσματα.

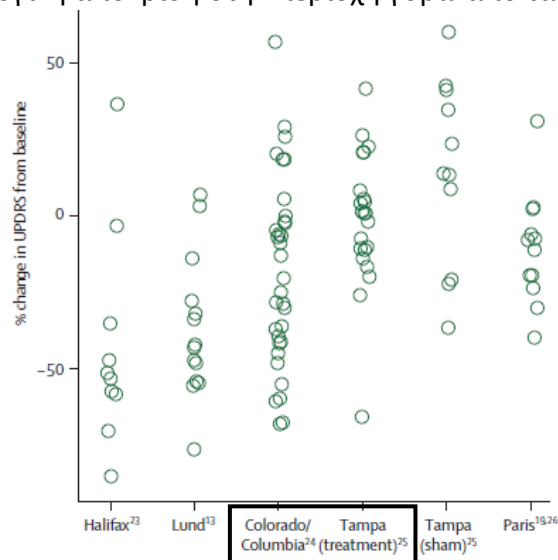
Σε δύο ξεχωριστές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν γονίδια νευρικών αυξητικών παραγόντων για την αποτροπή του θανάτου των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μέλαινα ουσία. Στην πρώτη εντέθηκε το γονίδιο του GDNF (νευρικός παράγοντας προερχόμενος από κύτταρα της γλοίας) σε λεντοϊό και χορηγήθηκε μέσω ένεσης σε εγκεφαλικές περιοχές ηλικιωμένων μαϊμούδων, που εμφάνιζαν εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Kordower et al., 2000). Παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του παράγοντα που οδήγησε σε

διατήρηση δεικτών ντοπαμινεργικής δράσης, αυξημένη παρουσία της υδροξυλάσης της τυροσίνης και σημαντική αύξηση του νευρωνικού όγκου. Όμως, ο αριθμός των πειραματόζων ήταν πολύ μικρός (n=8) για να είναι ενδεικτικός, ο χρόνος μελέτης της δράσης του παράγοντα πολύ σύντομος (3 μήνες μετά την εγχείρηση) και ο φαινότυπος του μοντέλου πολύ ήπιος, καθώς οι νευρώνες καταστρέφονται λόγω φυσιολογικού γήρατος κι όχι εντατικά από εκτεταμένη παθολογία. Στη δεύτερη εντέθηκε αντίστοιχα το γονίδιο της νευρτουρίνης (neurturin) σε αδενο-σχετιζόμενο ιικό φορέα (AAV) και χορηγήθηκε μέσω ένεσης σε εγκεφάλους ασθενών του Πάρκινσον (Marks et al., 2010). Σ' αυτήν την περίπτωση αρκετοί ασθενείς εκδήλωσαν σημαντική πρόοδο και μείωση του παθολογικού φαινοτύπου, αν και με μεγάλη χρονική καθυστέρηση (18 μήνες μετά την εγχείρηση). Επιπλέον, η έκφραση του παράγοντα ήταν ευρεία στον εγκέφαλο, γεγονός ανησυχητικό για μελλοντική ανάπτυξη όγκου. Βασικό μειονέκτημα των δύο αυτών αποπειρών είναι πως το μέγιστο θετικό αποτέλεσμα θα είναι η μερική αναπλήρωση των εκφυλισμένων νευρώνων κι όχι η μόνιμη θεραπεία της νόσου.

Μία άλλη ενδιαφέρουσα προσέγγιση είναι η μεταμόσχευση ντοπαμινεργικών νευρώνων σε εγκεφάλους ασθενών, για άμεση και εκτενή αναπλήρωση των εκφυλισμένων. Αν και η πρώτη απόπειρα ξεκίνησε 30 χρόνια πριν, ακόμη γίνονται προσπάθειες βελτιστοποίησης της μεθόδου και οι απόψεις είναι αμφιλεγόμενες. Ως σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί 6 κλινικές μελέτες, με δύο απ' αυτές να έχουν τον μεγαλύτερο αντίκτυπο στην επιστημονική κοινότητα (Εικόνα 6). Η πρώτη διεξήχθη από τον Freed και την ομάδα του (Colorado/Columbia), όπου συμμετείχαν 40 ασθενείς με προχωρημένη ασθένεια του Πάρκινσον και τους χορηγήθηκε μεσεγκεφαλικός ιστός από τέσσερα έμβρυα ηλικίας 7-8 εβδομάδων, στο ραβδωτό σώμα και των δύο ημισφαιρίων του καθενός (Freed et al., 2001). Τα αποτελέσματα μετρήθηκαν 1, 2 και 4 χρόνια μετά την επέμβαση, από τους ίδιους τους ασθενείς και από τους κλινικούς ερευνητές. Οι υποκειμενικές μετρήσεις δεν έδειξαν κάποια ιδιαίτερη βελτίωση, με τους ασθενείς να μην αισθάνονται καμία διαφορά. Αντίστοιχα οι ερευνητές δεν παρατήρησαν καμία αξιολογη πρόοδο, παρά μόνο όταν διαχώρισαν τους ασθενείς με βάση την ηλικία τους. Σ' αυτήν την περίπτωση τα άτομα κάτω των 60 ετών εκδήλωσαν κάποια βελτίωση στα παρκινσονικά συμπτώματα (Unified Parkinson's Disease Rating Scale - UPDRS) (Εικόνα 7), με 34% μείωση των κινητικών δυσλειτουργιών μετά από 1 χρόνο, σημαντική αύξηση ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα και μείωση της μη ειδικής έκκρισης ντοπαμίνης από άλλες εγκεφαλικές περιοχές 4 χρόνια μετεγχειρητικά, ενώ στα αρνητικά κατατάσσεται η πρόκληση δυσκινησίας στο 15% των ασθενών, που οφείλεται αποδεδειγμένα στο μόσχευμα (Freed et al., 1990), (Freed et al., 1992).

Κατά τη δεύτερη δοκιμή που έγινε από τον Olanow και τους συνεργάτες (Tampa), χορηγήθηκε στο ραβδωτό σώμα 34 ασθενών μεσεγκεφαλικός ιστός από έμβρυα ηλικίας 6-9 εβδομάδων, ακολουθώντας εξάμηνη χορήγηση αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (Olanow et al.,

2003). Κάθε ασθενής έλαβε μόσχευμα από 1 ή 4 έμβρυα-δωρητές, στο ένα ή και στα δύο ημισφαίρια του εγκεφάλου και εξετάστηκε η απάντηση σε κάθε συνθήκη 2 χρόνια μετά την εγχείρηση. Όπως ήταν αναμενόμενο, μόνο οι ασθενείς που έλαβαν το περισσότερο μόσχευμα εμφάνισαν βελτίωση, ενώ οι υπόλοιποι παρέμειναν σχετικά σταθεροί (Εικόνα 7). Όσον αφορά τη δεύτερη συνθήκη, το 57% των ασθενών που έλαβε μόσχευμα και στα δύο ημισφαίρια εκδήλωσε σοβαρή δυσκινησία σε σύντομο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, μετά τη λήξη της αντιφλεγμονώδους θεραπείας η κατάσταση των ασθενών επιδεινώθηκε και σημειώθηκε ανοσολογική απόκριση στην περιοχή γύρω από τα μοσχεύματα.

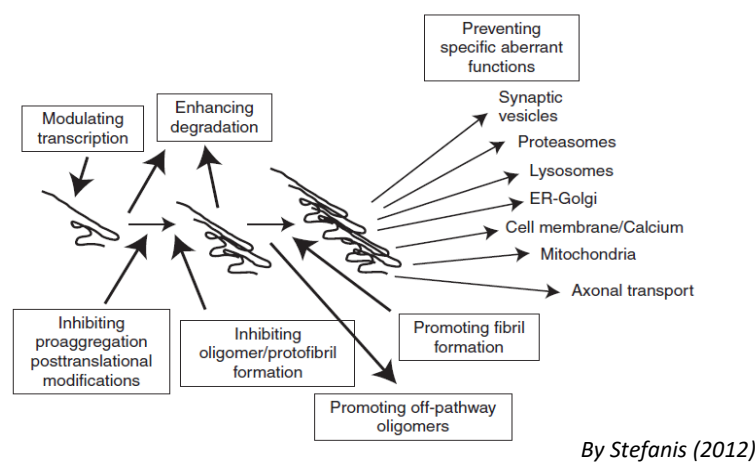


By Barker (2013)

Εικόνα 7. Γραφική απεικόνιση της βελτίωσης των συμπτωμάτων (URDRS) ασθενών που συμμετείχαν σε κλινικές δοκιμές μεταμόσχευσης εμβρυακών μεσεγκεφαλικών ιστών.

Αν και προκύπτουν κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα και από τις δύο κλινικές δοκιμές, τα μειονεκτήματα είναι σημαντικά περισσότερα. Όπως προκύπτει από τις παρατηρήσεις, οι φαινότυποι των ασθενών μπορούν να διαφέρουν αρκετά ακόμη κι αν ακολουθούνται τα ίδια πρωτόκολλα. Κάτι τέτοιο ορίζει την ανάγκη ανάπτυξης εξατομικευμένου πρωτοκόλλου που θα ανταποκρίνεται στην ηλικία του ασθενή και στο στάδιο της νόσου, αυξάνοντας κι άλλο την πολυπλοκότητα της μεθόδου. Υπάρχουν όμως ζητήματα βιοηθικής λόγω της χρήσης εμβρύων από εκτρώσεις, (απαιτούνται τουλάχιστον τέσσερα έμβρυα ανά ασθενή) και τεχνικά ζητήματα, αφού οι νευροβλάστες αναπτύσσονται πολύ αργά στη νέα τους θέση, χρειάζονται μήνες μέχρι την πλήρη διαφοροποίησή τους χρόνια μέχρι την επιθυμητή επιμήκυνση των αξόνων τους και το σχηματισμό λειτουργικών συνάψεων (Barker et al., 2013). Πιο ανησυχητικά όμως κρίνονται τα αποτελέσματα επανεξετάσεων των εγκεφάλων των ασθενών 10 ως 16 χρόνια μετά την επέμβαση, που δηλώνουν την ύπαρξη σωμάτων Lewy μέσα στα μοσχεύματα (Kordower et al., 2008), (J. Y. Li et al., 2008), (Chu & Kordower, 2010). Τα κύτταρα αυτά, που προέρχονται από φυσιολογικά έμβρυα και έχουν αναπτυχθεί για λίγα χρόνια μετά από μεταμόσχευση, εμφανίζουν

εκτεταμένη συσσώρευση α-συνουκλεΐνης στο κυτταρόπλασμα, ενώ ταυτόχρονα καταγράφεται αδικαιολόγητη καταστροφή των ντοπαμινεργικών νευρώνων, εκδηλώνοντας τον χαρακτηριστικό μοριακό φαινότυπο της νόσου. Ειδικότερα, υπήρξε μία περίπτωση ενός ασθενούς με πρόωρη εκδήλωση της ασθένειας (38 χρονών), όπως συμβαίνει τις περιπτώσεις ύπαρξης κάποιας γονιδιακής μετάλλαξης (δεν αναφέρεται), που δέχθηκε μόσχευμα. Αρχικά παρουσίασε βελτίωση για τα επόμενα 12 χρόνια, όμως για κάποιον ανεξήγητο λόγο η υγεία του επιδεινώθηκε ραγδαία και πέθανε 2 χρόνια αργότερα. Η εξέταση του εγκεφάλου μετά το θάνατό του έδειξε αυξημένη συγκέντρωση συσσωματωμάτων α-συνουκλεΐνης και ουβικουΐτινης στη μέλαινα ουσία, καθώς και αποχρωματισμό της περιοχής, ενδεικτικό στοιχείο νευροεκφυλισμού (Kordower et al., 2008). Συνοψίζοντας λοιπόν, από τη μία πλευρά η α-συνουκλεΐνη μπορεί κάτω από ανεξακρίβωτες συνθήκες να επάγει τη νόσου του Πάρκινσον. Από την άλλη, η μεταλλαγμένη α-συνουκλεΐνη σχετίζεται με μια ιδιαίτερα επιθετική μορφή της νόσου. Τέλος, σύμφωνα με τα νέα δεδομένα, οποιαδήποτε μορφή της πρωτεΐνης μπορεί επανειλημμένα να εξαπλωθεί στον εγκέφαλο, μολύνοντας όλο και περισσότερους νευρώνες. Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν την ανάγκη να διαλευκανθεί ο μηχανισμός δράσης της α-συνουκλεΐνης και να ταυτοποιηθούν τα ακριβή μοριακά αίτια της ασθένειας του Πάρκινσον, ώστε να σχεδιαστούν νέες αποτελεσματικές θεραπείες (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Πιθανοί στόχοι για αντιμετώπιση της παθολογίας της α-συνουκλεΐνης.

1.10 Ζωικά πειραματικά μοντέλα

Τόσο η μελέτη του μηχανισμού δράσης της α-συνουκλεΐνης στην ασθένεια του Πάρκινσον όσο και η δοκιμή θεραπευτικών προσεγγίσεων, απαιτούν την ανάπτυξη πειραματικών μοντέλων. Στα μοντέλα αυτά είτε υπερεκφράζεται η α-συνουκλεΐνη αγγ τύπου ή κάποιο μεταλλαγμένο αλληλόμορφό της, αν και στην τελευταία περίπτωση παρατηρείται πιο έντονος και γρήγορος φαινότυπος. Τα πειραματόζωα, όπως ποντίκια,

αρουραίοι και μη-ανθρώπινα πρωτεύοντα, χρησιμοποιούνται ευρέως στο εργαστήριο για τη μελέτη της ασθένειας. Παρόλο που τα τρία είδη εκδηλώνουν αποκρίσεις παρόμοιες με του ανθρώπου, εμφανίζουν και σημαντικά μειονεκτήματα που αμφισβητούν τη χρήση τους. Τα τρωκτικά είναι απλοϊκά μοντέλα, με μικρό μέγεθος εγκεφάλου, μειωμένη ικανότητα αναπροσαρμογής των νευρώνων σε νέες συνθήκες (νευρωνική πλαστικότητα) και χαμηλό ρυθμό παραγωγής νευρώνων (νευρογένεση) (Snyder et al., 2009). Επιπλέον, τοξικές για τον άνθρωπο ουσίες δεν προκαλούν αντίστοιχο φαινότυπο σ' αυτά. Για παράδειγμα, η έκθεση σε MPTP έχει συνδεθεί με την εκδήλωση σποραδικού Πάρκινσον στον άνθρωπο, ενώ οι αρουραίοι εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα (Boné & Perier, 2012). Επιπλέον, η υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης προκαλεί τόσο σποραδικές όσο και κληρονομικές μορφές της ανθρώπινης νόσου, όμως δεν προκαλεί κανένα σύμπτωμα σε ποντίκια (Nuber et al., 2013). Τέλος, τα τρωκτικά έχουν φυσιολογικά μια θρεονίνη στη αμινοξική θέση 53 της πρωτεΐνης (A53T), δηλαδή την μετάλλαξη που προκαλεί την κληρονομήσιμη ασθένεια του Πάρκινσον στον άνθρωπο, υποδηλώνοντας μια ειδο-ειδίκευση της παθολογίας (Bendor et al., 2013). Τα μη-ανθρώπινα πρωτεύοντα από την άλλη έχουν αυξημένη διάρκεια ζωής, δίνουν λίγους απογόνους και απαιτούν αρκετό χρόνο εκπαίδευσης για διάφορα πειράματα. Πολλές φορές επίσης, η κλινική αξία των παρατηρούμενων αποκρίσεών τους είναι αμφιλεγόμενες, όπως για παράδειγμα η έντονη περιστροφή τους ή η σπασμωδική κίνηση των ματιών τους (Emborg, 2007). Άλλοι οργανισμοί, όπως σκώληκες και μύγες δε διαθέτουν ομόλογα γονίδια με τη συνουκλεΐνη, υποδηλώνοντας πως δεν απαιτείται στα σηματοδοτικά μονοπάτια τους.

1.11 Κυτταρικά πειραματικά μοντέλα

Τα κυτταρικά μοντέλα αποτελούν μια πιο εύχρηστη και αποδοτική λύση. Χειρίζονται σχετικά εύκολα, έχουν χαμηλό κόστος και η χρήση τους δεν εγείρει ζητήματα βιοηθικής. Σε αντίθεση με τα ζώα, στα κύτταρα ο φαινότυπος εκδηλώνεται πολύ πιο γρήγορα ενώ διαφορετικές πειραματικές δοκιμές μπορεί να πραγματοποιηθούν ταυτόχρονα στον ίδιο πληθυσμό κυττάρων. Επιπλέον, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται γρήγορα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δοκιμή φαρμακευτικών ουσιών σε μεγάλη κλίμακα, δίνοντας γρήγορα αποτελέσματα. Τέλος, συγκεκριμένοι τύποι κυττάρων μπορεί να απομονωθούν και να καλλιεργηθούν, ώστε να μελετηθεί η συνεισφορά κάθε είδους νευρικού κυττάρου στην πρόοδο της νόσου (Falkenburger et al., 2016). Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί αρκετές κυτταρικές σειρές, με την κάθε μία να έχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, αλλά και σημαντικά μειονεκτήματα, γεγονός που καθιστά πολύπλοκη την επιλογή του κατάλληλου κυτταρικού μοντέλου (D. F. Lázaro et al., 2017). Παρακάτω αναφέρονται τα είδη κυττάρων που χρησιμοποιούνται περισσότερο για τη μελέτη της ασθένειας του Πάρκινσον, με μία συνοπτική περιγραφή των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων τους.

Η ζύμη είναι το πιο απλοϊκό κυτταρικό μοντέλο και έχει χρησιμοποιηθεί για την υπερέκφραση της α -συνουκλεΐνης (Outeiro & Lindquist, 2003), (Zabrocki et al., 2005), (Zabrocki et al., 2008) και των μεταλλαγμένων μορφών της (D. F. Lázaro et al., 2014), (D. F. Lázaro et al., 2016), (Mbefo et al., 2015), την αλλαγή των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της (Kleinknecht et al., 2016), (Brás et al., 2018), (Tenreiro et al., 2014), (Tenreiro et al., 2017), (Shahrasandzadeh et al., 2014), (Vicente Miranda et al., 2017), καθώς και τη δοκιμή διαφόρων φαρμακευτικών μορίων (Su et al., 2010), (Fleming et al., 2008). Αν και η μεγάλη παραγωγή κυττάρων σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα είναι ιδανική για τη μελέτη των αποκρίσεων τους σε διάφορες συνθήκες, το μοντέλο είναι τόσο βασικό που δεν προσφέρει αξιόπιστες πληροφορίες για το μηχανισμό δράσης της πρωτεΐνης και την εξέλιξη της νόσου. Επομένως, οποιαδήποτε απόκριση παρατηρείται σε κύτταρα της ζύμης χρειάζεται επαλήθευση από πιο πολύπλοκα κυτταρικά μοντέλα (Tenreiro & Outeiro, 2010), (Menezes et al., 2015).

Τα πιο κοινά μοντέλα είναι τα κύτταρα ανθρώπινου εμβρυονικού νεφρού 293 (HEK2936) και τα κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος (H4). Οι κυτταρικές αυτές σειρές είναι αθανατοποιημένες, με αποτέλεσμα να διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε καλλιέργεια, να πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα και να δίνουν ομογενείς πληθυσμούς (Falkenburger & Schulz, 2006). Είναι ιδανικές για το σχεδιασμό πειραμάτων μεγάλης κλίμακας και τη δοκιμή φαρμάκων (Moree et al., 2015). Η διαμόλυνσή τους επιτυγχάνεται εύκολα και ήδη υπάρχουν σταθερές κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν την α -συνουκλεΐνη και τις μεταλλάξεις A30P και A53T (D. F. Lázaro et al., 2014). Παρ' όλ' αυτά η συσσώρευση της πρωτεΐνης προκαλεί σχετικά χαμηλή τοξικότητα, ενώ δε σχηματίζονται εύκολα συσσωματώματα ή ινίδια, λόγω της υψηλής ενεργότητας των πρωτεϊνών-συνοδών. Επίσης τα συγκεκριμένα κύτταρα είναι μη νευρωνικά, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να δώσουν ντοπαμινεργικό φαινότυπο, που είναι ειδικός για την ασθένεια του Πάρκινσον (D. F. Lázaro et al., 2017).

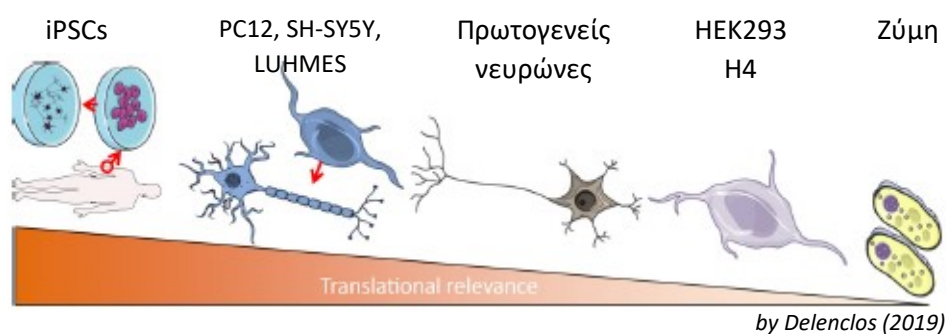
Μια εναλλακτική αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά είναι οι πρωτογενείς νευρώνες, που προέρχονται από έμβρυα ή από μωρά τρωκτικών (Gaven et al., 2014). Η υπερέκφραση της α -συνουκλεΐνης μπορεί να γίνει έπειτα από διαμόλυνση με το επιθυμητό γονίδιο (Hassink et al., 2018), (Tonges et al., 2014) ή με απομόνωση πρωτογενών νευρώνων από διαγονιδιακά ζώα που έχουν τροποποιηθεί με την α -συνουκλεΐνη (L. Li et al., 2013). Επιτρέπουν τη μελέτη όλων των βημάτων εξέλιξης της νόσου και την απομόνωση συγκεκριμένων νευρικών κυτταρικών τύπων (Schlachetzki et al., 2013). Αυτή όμως είναι εφικτή μόνο μετά από επαγόμενη διαφοροποίηση των κυττάρων, καθώς η αρχική καλλιέργεια είναι εξαιρετικά ετερογενής. Το γεγονός αυτό αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα, αφού διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι απαιτούν και διαφορετικούς χειρισμούς, μειώνοντας το χρόνο διατήρησης της καλλιέργειας και την απόδοση των τεχνικών διαμόλυνσης

(Schlachetzki et al., 2013), ενώ παράλληλα διαφορετικοί πληθυσμοί αποκρίνονται διαφορετικά στην α -συνουκλεΐνη (Al-Ali et al., 2004), δυσκολεύοντας την παρατήρηση των φαινοτύπων. Τέλος, η γέννηση και η θανάτωση ζώων αποκλειστικά για τη μελέτη ανθρώπινης ασθένειας προκαλεί προβλήματα βιοηθικής, αυξάνοντας το χρόνο έγκρισης των πειραμάτων (D. F. Lázaro et al., 2017).

Για τη μελέτη των ντοπαμινεργικών νευρώνων επιλέγονται τα διαφοροποιημένα αθανатоποιημένα κύτταρα PC12, SH-SY5Y και LUHMES. Τα πρώτα απομονώνονται από φαιοχρωμοκύττωμα αρουραίου και στα πλεονεκτήματά τους περιλαμβάνεται η ιδιότητά τους να αποκτούν νευρωνικό φαινότυπο ύστερα από κατάλληλους χειρισμούς (Martin & Grishanin, 2003) και η χρήση τους για τη μελέτη εκκριτικών μονοπατιών (Westerink & Ewing, 2008). Από την άλλη όμως δε διαθέτουν ανθρώπινη καταγωγή, ενώ η καρκινική τους ταυτότητα επηρεάζει πολλά κυτταρικά και σηματοδοτικά μονοπάτια. Η καλλιέργειά τους, όπως και προηγουμένως, είναι απαιτητική και χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στα θρεπτικά μέσα (D. F. Lázaro et al., 2017). Από την άλλη τα SH-SY5Y έχουν απομονωθεί από ανθρώπινο νευροβλάστωμα μυελού των οστών και διαφοροποιούνται προς ντοπαμινεργικούς νευρώνες έπειτα από συγκαλλιέργεια με κατάλληλους παράγοντες, όπως το ρετινοϊκό οξύ (Xie et al., 2010). Οι αλλαγές στη μορφολογία και στις λειτουργίες παρατηρούνται μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, επιτρέποντας το χαρακτηρισμό τους. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα, τα κύτταρα αυτά διατηρούνται για αρκετό καιρό και δεν απαιτούν ακριβά θρεπτικά μέσα ή ιδιαίτερες συνθήκες καλλιέργειας. Το βασικό τους μειονέκτημα και σ' αυτήν την περίπτωση είναι η καρκινική ταυτότητα, που μεταβάλλει την επιβίωση, την ανάπτυξη, το μεταβολισμό και την απόπτωση (Xicoy et al., 2017). Επίσης το ρετινοϊκό οξύ επηρεάζει τη λειτουργία του πρωτεασώματος, αποτρέποντας την παρατήρηση της σημαντικής συνεισφοράς του στην πρόοδο της νόσου του Πάρκινσον (Cheng et al., 2013). Τέλος, τα LUHMES είναι ανθρώπινα μεσεγκεφαλικά κύτταρα, πρόδρομα των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Edwards & Bloom, 2019). Σε σύντομο χρονικό διάστημα, μπορούν να διαφοροποιηθούν πλήρως προς ντοπαμινεργικούς νευρώνες μετά από έκθεση στους κατάλληλους παράγοντες (όπως ο νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από κύτταρα γλοίας), να αποκτήσουν εξειδικευμένες ηλεκτρικές ιδιότητες και να παράγουν ενδογενώς ντοπαμίνη και α -συνουκλεΐνη (Lotharius et al., 2005), (X. M. Zhang et al., 2014). Και αυτή η κυτταρική σειρά απαιτεί έμπειρους χειρισμούς, καθώς η καλλιέργεια μπορεί να καταστραφεί εύκολα, ενώ η απόδοση διαμόλυνσης πολύ χαμηλή. Επιπλέον, η υδροξυλάση της τυροσίνης εμφανίζει ετερογενή έκφραση μετά τη διαφοροποίηση των κυττάρων, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει διαφορετικό παθολογικό φαινότυπο, ανεξάρτητο της α -συνουκλεΐνης (X. M. Zhang et al., 2014).

Ανακάλυψη-σταθμός αποτέλεσε η δημιουργία επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs), 15 περίπου χρόνια πριν. Πρόκειται

για κύτταρα ινοβλαστών που απομονώνονται από ενήλικες και τροποποιούνται γενετικά, ώστε να εκφράζουν συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες. Με αυτόν τον τρόπο αποκτούν και πάλι τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των βλαστοκυττάρων (I. De Lázaro et al., 2014). Έτσι, με την έκφραση κατάλληλων παραγόντων μπορούν να διαφοροποιηθούν περαιτέρω σε μικτούς νευρικούς πληθυσμούς, αλλά και στοχευμένα σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Soldner et al., 2009). Καθώς όμως τα iPSCs προέρχονται απευθείας από τον ασθενή, διαθέτουν όλο το γενετικό του προφίλ, επιτρέποντας την ανίχνευση των παραγόντων κινδύνου της νόσου (για παράδειγμα την ύπαρξη της μετάλλαξης A53T ή του διπλασιασμού του γονιδίου) και τη μελέτη όλων των σταδίων εξέλιξής της (Hu et al., 2020). Επίσης είναι ιδανικά για τη δοκιμή μεγάλης κλίμακας φαρμακευτικών μορίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εξατομικευμένη θεραπεία (Chun et al., 2011). Η απομόνωση των κυττάρων στηρίζεται σε ένα εύκολο πρωτόκολλο και η χρήση τους δεν εγείρει ζητήματα βιοηθικής (Q. Zhang et al., 2017). Από την άλλη όμως η καλλιέργειά του είναι απαιτητική και η διαμόλυνσή τους επιτυγχάνεται κυρίως με τη χρήση ιών (Singh et al., 2015). Επιπλέον, κατά τη δημιουργία των iPSCs μεταβάλλεται η επιγενετική τροποποίηση των αρχικών κυττάρων και πλέον διαμορφώνεται ένα διαφορετικό επιγενετικό προφίλ σε σχέση με των ώριμων νευρώνων του ασθενούς. Ένα από τα γονίδια που επηρεάζονται είναι και αυτό της α-συνουκλείνης, η οποία παράγεται πλέον με χαμηλό ρυθμό και απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα για τη συσσώρευση και τη δημιουργία συσσωματωμάτων, αντιμετωπίζοντας τον κίνδυνο γήρατος (Delenclos et al., 2019). Ανεξάρτητα όμως από αυτό, τα κύτταρα δεν εμφανίζουν έντονο παθολογικό φαινότυπο. Τέλος, η νόσος μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες, περιβαλλοντικούς ή γενετικούς. Λόγω της ποικιλομορφίας των παραγόντων κινδύνου, η μελέτη των κυτταρικών σειρών από διαφορετικούς ασθενείς μπορεί να οδηγήσει σε παρατήρηση διαφορετικών παθολογικών φαινοτύπων. Για παράδειγμα διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου μπορεί να στοχεύουν διαφορετικά κυτταρικά συστατικά ή μπορεί να ακολουθείται διαφορετική αλληλουχία γεγονότων έπειτα από ύπαρξη τριπλού αντιγράφου του γονιδίου της α-συνουκλείνης. Κάτι τέτοιο κάνει ακόμη πιο περίπλοκη τη μελέτη της δράσης της α-συνουκλείνης και παρεμποδίζει την ανακάλυψη ενός κοινού μοτίβου εξέλιξης της νόσου (Delenclos et al., 2019), (D. F. Lázaro et al., 2017).



Εικόνα 9. Φθίνουσα καταλληλότητα των διαθέσιμων κυτταρικών σειρών για χρήση ως μοντέλα στην ασθένεια του Πάρκινσον.

1.12 Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η δημιουργία νέων κυτταρικών μοντέλων για την ασθένεια του Πάρκινσον, που πιθανόν να εμφανίζουν πιο έντονους παθολογικούς φαινοτύπους. Για το σκοπό αυτό, κατασκευάστηκαν σταθερές κυτταρικές σειρές μεσεγχυματικών (Tet-On YFP SNCA A53T MSCs) και πρόδρομων νευρικών κυττάρων (Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs) που υπερεκφράζουν την α-συνουκλεΐνη A53T. Τα νέα κυτταρικά μοντέλα μελετήθηκαν ως προς τις αποκρίσεις και τον παθολογικό φαινότυπό τους, επιβεβαιώνοντας και διευρύνοντας το φάσμα των έως τώρα γνωστών χαρακτηριστικών της ασθένειας του Πάρκινσον.

Μέθοδοι και Υλικά

2. Μέθοδοι και Υλικά

2.1 Παρασκευή LB Broth

Χρησιμοποιήθηκαν 20gr σκόνης LB Broth Base (Invitrogen) εναιωρημένα σε 1000ml απιονισμένου H₂O. Το διάλυμα αποστειρώθηκε στους 121°C για 20 λεπτά. Δε χρειάστηκε ρύθμιση pH.

2.2 Παρασκευή LB Agar

Χρησιμοποιήθηκαν 35gr σκόνης LB Agar (Scharlau) εναιωρημένα σε 1000ml αποστειρωμένου H₂O. Το διάλυμα αποστειρώθηκε στους 121°C για 20 λεπτά. Σε θερμοκρασία διαλύματος περίπου 50°C, προστέθηκαν 1000μL αμπικιλίνης (τελική συγκέντρωση 100μg/ml). Έπειτα από καλή ανάδευση, 30 ml διαλύματος αποχύθηκαν ανά τρυβλίο. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου να στερεοποιηθεί το άγαρ.

2.3 Κατασκευή πλασμιδίου έκφρασης

Το πλασμίδιο που κωδικοποιεί το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης (α-synuclein, SNCA) σε σύντηξη με την κίτρινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Yellow Fluorescent Protein, YFP) και τις κατάλληλες ρυθμιστικές αλληλουχίες κατασκευάστηκε με την τεχνολογία κλωνοποίησης Gateway. Χρησιμοποιήθηκαν δύο πλασμίδια, το pDONR223 SNCA A53T ως entry clone και το pT2 Tet On YFP GW ως destination vector, σε αναλογία 1:3. Το καταλυτικό ένζυμο της αντίδρασης είναι η LR Clonase (ThermoFisher Scientific), που δρα βέλτιστα παρουσία του διαλύματος TE. Μετά από την ανάμειξη των αντιδραστηρίων, ακολούθησε επώαση για 1 ώρα. Οι ποσότητες της αντίδρασης αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση	Ποσότητα (μL)
pDONR223 SNCA A53T	25ng/μL	1
pT2 Tet On YFP GW	40ng/μL	2
LR Clonase		1
TE Buffer	1X	1

Πίνακας 2.1: Ποσότητες αντίδρασης κλωνοποίησης LR.

2.4 Μετασηματισμός βακτηρίων

Ως φορείς του πλασμιδίου έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια του στελέχους TOP10 της *E.coli*. Σε 50μL βακτηρίων προστέθηκαν 5μL της αντίδρασης LR και επώαστηκαν στον πάγο για 1 ώρα. Στη συνέχεια υπέστησαν θερμικό σοκ με μεταφορά στους 42°C για 1 λεπτό και μεταφορά στον πάγο για άλλα 5 λεπτά. Προστέθηκαν 100μL LB Broth και τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν στους 37°C και σε 300rpm για 1 ώρα, ώστε να πολλαπλασιαστούν. Τέλος, στρώθηκαν σε τρυβλίο LB Agar παρουσία αμικικιλίνης και επώαστηκαν στους 37°C. Την επόμενη μέρα, απομονώθηκαν τέσσερις αποικίες, οι οποίες μεταφέρθηκαν σε σωλήνα καλλιέργειας (Greiner Bio-One) με 7ml LB Broth παρουσία αμικικιλίνης (100μg/ml) και επώαστηκαν στους 37°C και στις 250rpm για 24 ώρες.

2.5 Απομόνωση πλασμιδίων

Τα βακτήρια της υγρής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του πλασμιδίου έκφρασης της YFP-SNCA A53T, μέσω του NucleoSpin Plasmid NoLid kit (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες που υποδεικνύει το συνοδευτικό εγχειρίδιο. Η διαδικασία περιλαμβάνει:

1. Φυγοκέντρηση καλλιιεργειών για απομόνωση των βακτηρίων.
2. Απόρριψη υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε διάλυμα A1.
3. Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος A2 (SDS) για 3 λεπτά και λύση των μεμβρανών.
4. Προσθήκη διαλύματος A3 για εξουδετέρωση του pH.
5. Φυγοκέντρηση για 8 λεπτά στις 11.000 rpm, ώστε να διαχωριστούν οι φάσεις του μείγματος.
6. Μεταφορά του υπερκειμένου σε στήλη NucleoPlasmid, στην οποία θα δεσμευτεί το πλασμίδιο.
7. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 rpm, ώστε να δεσμευτεί το πλασμίδιο στη στήλη.
8. Απόρριψη διηθήματος και προσθήκη διαλύματος A4 για πλύση της στήλης από οποιοδήποτε άλλο συστατικό πέραν των πλασμιδίων.
9. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 rpm.
10. Απόρριψη διηθήματος και εκ νέου φυγοκέντρηση χωρίς διαλύτη, για ξήρανση της στήλης.
11. Μεταφορά της στήλης σε σωληνάριο Eppendorf.
12. Προσθήκη διαλύματος έκλουσης για αποδέσμευση του πλασμιδίου από τη στήλη.
13. Φυγοκέντρηση και αποθήκευση του πλασμιδιακού DNA.

2.6 Υπολογισμός συγκέντρωσης πλασμιδιακού DNA

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των πλασμιδίων έγινε με τη χρήση της συσκευής Nanodrop. Αρχικά καθαρίστηκε με 2μL αποστειρωμένου νερού. Ως τυφλός δείκτης χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα έκλουσης (2μL), με τον οποίο έγινε μηδενισμός μέτρησης. Στη συνέχεια μετρήθηκαν 2μL από το προϊόν κάθε απομόνωσης.

2.7 Πέψη πλασμιδίων

Τα απομονωμένα πλασμίδια υποβλήθηκαν σε διαδικασία πέψης για έλεγχο των παραγόμενων ζωνών κι επαλήθευσή τους. Η αντίδραση πέψης περιείχε 0,1-0,5μg πλασμιδίου, 0,2μL ενζύμου/ενδονουκλεάση περιορισμού, 1μL κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (NEB) και αποστειρωμένο H₂O για τελικό όγκο 10μL. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 37°C για δύο ώρες.

Για το πλασμίδιο pT2 Tet-On YFP SNCA A53T χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο BsrGI, ενώ για τα pT2 TetR-neo και pCMV(CAT)T7-SB100 το HindIII. Και τα δύο ένζυμα δρουν βέλτιστα σε Buffer 2.1.

2.8 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων πέψης

Παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης 1%, με 3gr UltraPure Agarose (Invitrogen) και 5% EtBr διαλυμένα σε 300ml 1X TAE buffer. Σε 10μL της αντίδρασης πέψης προστέθηκαν 2μL χρωστικής (Gel loading dye purple 6X, NEB). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε 1kb DNA ladder. Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 120V για ενενήντα λεπτά.

2.9 Καλλιέργεια κυττάρων HEK293T

Αρχικά, λήφθηκε κρουοφιαλίδιο 1ml από το υγρό άζωτο που περιείχε κρουοσυντηρημένα κύτταρα σε 90% FBS και 10% DMSO. Όταν η θερμοκρασία των κυττάρων έφτασε σε θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο Falcon 15ml με προσθήκη complete DMEM και φυγοκεντρήθηκαν στις 2.000 rpm για έξι λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 8ml complete DMEM και μεταφέρθηκε σε πιάτο καλλιέργειας κυττάρων (10ml). Μετά από ήπια ανάδευση το πιάτο τοποθετήθηκε σε κλίβανο, όπου τα κύτταρα καλλιεργούνται υπό στείρες συνθήκες στους 37°C με 5% περιεκτικότητα σε CO₂ και 90% υγρασία. Το θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν ανά 2 ημέρες, ώστε τα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν. Η σύσταση του complete DMEM αναγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Complete DMEM
D-MEM high glucose (ThermoFisher)
10% ορός εμβρυϊκού βοοειδούς (Biowest)
1% Pen-Strep (ThermoFisher)
15μg/ml gentamicin
0.2% Myco-3 (PanReac AppliChem)

Πίνακας 2.2: Σύσταση complete DMEM.

Όταν το 80% του πιάτου είχε καλυφθεί, τα κύτταρα επανακαλλιεργήθηκαν σε δύο νέα. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και ακολούθησε ήπια πλύση των κυττάρων με 1X PBS (Biowest). Προστέθηκε 1ml 0,05% Trypsin-EDTA (ThermoFisher) για αποκόλληση των κυττάρων από το πιάτο και επώαση στους 37°C για 3 λεπτά. Η τρυψίνη απενεργοποιήθηκε με προσθήκη 5ml complete DMEM. Ύστερα από την αποκόλληση των κυττάρων, το εναιώρημα ισομοιράστηκε σε δύο νέα πιάτα καλλιέργειας και προστέθηκαν στο καθένα επιπλέον 5ml complete DMEM.

2.10 Καλλιέργεια Μεσεγχυματικών Βλαστικών κυττάρων (MSCs)

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν όπως και τα HEK293T που περιεγράφηκαν παραπάνω.

2.11 Καλλιέργεια Πρόδρομων Νευρικών Κυττάρων (smNPCs)

Η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται σε πιάτο επιστρωμένο με Matrigel (Corning). Το συστατικό αυτό αποτελείται από ένα μείγμα πρωτεϊνών, που όταν επωαστούν στους 37°C σχηματίζουν πολυμερή πλέγματα, μέσα στα οποία επικάθονται τα smNPCs και σχηματίζουν δίκτυα. Για την παραγωγή του απαιτούνται 500μL Matrigel αραιωμένα σε 14,5ml KnockOut DMEM (ThermoFisher). Για χρήση την ίδια ημέρα, τα πιάτα επωάζονται στους 37°C για 4 ώρες, ειδάλλως αποθηκεύονται στους 4°C κλεισμένα με Parafilm έως και μία βδομάδα. Λίγο πριν χρησιμοποιηθούν, επωάζονται στους 37°C για 30 λεπτά, απομακρύνεται το Matrigel και στρώνονται τα κύτταρα διαλυμένα στο θρεπτικό.

Αρχικά, λήφθηκε κρυσταλλίδιο 1ml από το υγρό άζωτο που περιείχε κρυσσοσυντηρημένα κύτταρα σε 90% FBS και 10% DMSO. Όταν η θερμοκρασία τους έφτασε σε θερμοκρασία δωματίου, μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο Falcon 15ml με προσθήκη Sm^+ medium και φυγοκεντρήθηκαν στις 0.3 rcf για 7 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 8ml Sm^+ medium και μεταφέρθηκε σε πιάτο καλλιέργειας κυττάρων (10ml) επιστρωμένο με Matrigel. Μετά από ήπια ανάδευση το πιάτο τοποθετήθηκε σε

κλίβανο, όπου τα κύτταρα καλλιεργούνται υπό στείρες συνθήκες στους 37°C, με 5% περιεκτικότητα σε CO₂ και 90% υγρασία. Το θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν ανά 2 ημέρες, έως ότου τα κύτταρα να καλύψουν την επιφάνεια καλλιέργειας κατά περίπου 80%. Η σύσταση του θρεπτικού φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Συστατικό	Συγκέντρωση	Ποσότητα
NeuroCult NS-A Basal Medium (Human) (StemCell Technologies)	50%	24mL
DMEM F12 (Biowest)	50%	24mL
L-Glutamine 100X	1%	500μL
B27	1%	500μL
N2	0.5%	250μL
Mycο3	0.1%	50μL
Purmorphamine	0.5μM	38.5μL
Ascorbic acid	150μM	37.5μL
Chir99021	3μM	25μL

Πίνακας 2.3: Σύσταση θρεπτικού Sm⁺.

Για την επανακαλλιέργεια σε δύο νέα πιάτα, το θρεπτικό απομακρύνθηκε και προστέθηκε 1ml ακιουτάσης, για αποκόλληση των κυττάρων. Ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη 5ml Sm⁺ medium για σπάσιμο των συσσωματωμάτων και φυγοκέντρηση για 6 λεπτά σε 0,3rcf για απομάκρυνση του ενζύμου. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 8ml θρεπτικού, το οποίο ισομοιράστηκε σε πιάτα που είχαν προετοιμαστεί με Matrigel. Τέλος, προστέθηκαν επιπλέον 4ml θρεπτικού Sm⁺ στο καθένα.

2.12 Αποθήκευση και διατήρηση των κυττάρων

Σε περίπτωση που τα κύτταρα πρέπει να αποθηκευτούν για μελλοντική χρήση, φυγοκεντρώνται, το υπερκείμενο απορρίπτεται, ενώ το ίζημα επαναιωρείται σε 1ml Freezing Medium. Το διάλυμα μεταφέρεται σε CryoVial, τοποθετείται σε Mr. Frosty (ThermoFisher) που επιτρέπει την κάθοδο της θερμοκρασίας κατά ένα βαθμό Κελσίου ανά λεπτό και αποθηκεύεται στους -80°C. Την επόμενη εβδομάδα το stock μεταφέρεται σε δεξαμενή με υγρό άζωτο. Οι συνθήκες για κάθε κυτταρική σειρά αναγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Κυτταρική σειρά	Στροφές φυγοκέντρησης	Χρόνος φυγοκέντρησης (min)	Freezing medium
HEK293T	2.000 rpm	7	90% FBS + 10% DMSO
MSCs	2.000 rpm	7	Embryo Max Mesenchymal Stem Cell Freezing Medium (Specialty Media)
smNPCs	0,3 rcf	6	Neural Stem Cell Freezing Medium (Specialty Media)

Πίνακας 2.4: Συνθήκες διατήρησης κυτταρικών σειρών.

2.13 Παροδική έκφραση πρωτεΐνης

Τα κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pT2 Tet-On YFP SNCA A53T με τη χρήση πολυαιθυλενιμίνης (PEI), ενός σταθερού κατιονικού πολυμερούς. Το PEI αποθηκεύεται στους -2°C. Πριν τη χρήση επωάζεται στους 65 °C για 5 λεπτά. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε ένα πιάτο 6-well και πυκνότητα 70%. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε την επόμενη ημέρα. Η ποσότητα DNA που απαιτεί η μέθοδος είναι 2μg/well και 3μL PEI ανά μg DNA. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Eppendorf 1		Eppendorf 2		Well
<u>DNA</u>	<u>OPTIMEM</u>	<u>PEI</u>	<u>OPTIMEM</u>	<u>Κύτταρα + DMEM</u>
16μL	359μL	6μL	369μL	750μL
Vτελικός = 375μL		Vτελικός = 375μL		
Vτελικός = 750μL				

Πίνακας 2.5: Ποσότητες αντιδραστηρίων για επιμόλυνση κυττάρων HEK293T μέσω PEI.

Τα διαλύματα των Eppendorf 1 και 2 παρασκευάστηκαν ξεχωριστά και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, αναμείχθηκαν και προστέθηκαν στο well με τα κύτταρα. Μετά από είκοσι 24 ώρες καλλιέργειας στους 37°C έγινε αλλαγή θρεπτικού.

2.14 Παραγωγή σταθερής κυτταρικής σειράς σε MSCs

Τα κύτταρα MSCs καλλιεργήθηκαν σε πιάτο 6-well με 2ml complete DMEM medium. Όταν η περιεκτικότητα έφτασε το 70%, έγινε επιμόλυνση με τρία πλασμίδια, που κωδικοποιούν το γονίδιο της YFP-SNCA A53T, του TetR και της SB100X, σε αναλογία 7:2:1, αντίστοιχα, με τελική ποσότητα συνολικού DNA 5μg. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν καταγράφονται παρακάτω:

Γονίδιο πλασμιδίου	Αρχική Συγκέντρωση	Όγκος
SNCA A53T	420,25ng/μL	8,33μL
TetR	145,2ng/μL	6,9μL
SB100X	163,5ng/μL	3,05μL

Πίνακας 2.6: Ποσότητες πλασμιδίων για επιμόλυνση κυττάρων MSCs με νανοσωματίδια.

Τα πλασμίδια αναμείχθηκαν σε erpendorf και ακολούθησε ήπια ανάδευση σε Vortex. Στη συνέχεια, αναμείχθηκαν με διάλυμα που περιείχε νανοσωματίδια, μέσω των οποίων έγινε η επιμόλυνση. Ακολούθησε εκ νέου ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 100μL νανοσωματιδίων σε 1ml complete DMEM. Μετά από επώαση 4 ωρών στους 37°C, το θρεπτικό υλικό αλλάχθηκε και τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Έπειτα από μία βδομάδα, τα μετασηματισμένα κύτταρα επιλέχθηκαν με προσθήκη αντιβιοτικού G418 (100 mg/ml) (InvivoGen). Όταν η περιεκτικότητα των κυττάρων έφτασε στο 90%, μεταφέρθηκαν σε πιάτο καλλιέργειας των 10ml. Η επαγόμενη παραγωγή της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 2μg/ml δοξυκυκλίνης στο θρεπτικό υλικό.

2.15 Παραγωγή σταθερής κυτταρικής σειράς σε smNPCs

Η διαδικασία είναι ίδια με αυτή της παραγωγής σταθερής κυτταρικής σειράς στα MSCs, με τη διαφορά ότι αφενός χρησιμοποιήθηκαν πιάτα 6well επιστρωμένα με Matrigel και αφετέρου θρεπτικό Sm⁺ αντί για complete DMEM.

2.16 Φθορίζουσα μικροσκοπία

Τα κύτταρα της κάθε κυτταρικής σειράς επιστρώθηκαν σε πυκνότητα έως και 60% σε πιάτο 6well που περιείχε αποστειρωμένη καλυπτρίδα, με 2 ml από το εκάστοτε θρεπτικό. Όταν η περιεκτικότητα έφτασε το 80%, το θρεπτικό απομακρύνθηκε, έγινε πλύση με 1X PBS και προστέθηκαν 2ml 3,7% φορμαλδεΰδης σε 1X PBS. Έπειτα από δέκα λεπτά επώασης σε

Θερμοκρασία δωματίου, έγινε και πάλι πλύση με 1X PBS και προστέθηκαν 2ml 0,1% Triton-X σε 1X PBS. Ακολούθησε και πάλι επώαση δέκα λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, δύο πλύσεις με 1X PBS και κάλυψη της καλυπτρίδας με 25μL DAPI για χρωματισμό των πυρήνων.

2.17 Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών κατά Western

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πιάτο 6-well μέχρι κάλυψης του κατά 70%. Το θρεπτικό των κυττάρων αφαιρέθηκε, ενώ τα κύτταρα πλύθηκαν με 1X PBS. Προστέθηκαν 150-200μL από το διάλυμα λύσης των κυττάρων, του οποίου η σύσταση φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (μL)
PBS 1X	800
10% SDS	100
Αναστολείς πρωτεασών	100
Βενζονάση	1

Πίνακας 2.7: Σύσταση διαλύματος για λύση των κυττάρων.

Ακολούθησε επώαση στους 4°C για 10 λεπτά, ομογενοποίηση του εκχυλίσματος και αποθήκευση στους -20°C. Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών παρασκευάστηκε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 15%, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Πήκτωμα διαχωρισμού	
Συστατικό	Ποσότητα (ml)
H ₂ O	1,1
30% Ακρυλαμίδη	2,5
1,5M Tris (pH 8.8)	1,3
10% SDS	0,05
10% APS	0,05
TEMED	0,002

Πήκτωμα επιστοίβαξης	
Συστατικό	Ποσότητα (ml)
H ₂ O	1,4
30% Ακρυλαμίδη	0,33
1,5M Tris (pH 6.8)	0,25
10% SDS	0,02
10% APS	0,02
TEMED	0,002

Πίνακας 2.8: Σύσταση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 15%.

Την ημέρα της ηλεκτροφόρησης, τα δείγματα έφτασαν σε θερμοκρασία δωματίου και αναμείχθηκαν με διάλυμα 3X DDT (Cell Signaling Technology) και 3X Blue Loading Dye Buffer. Ακολούθησε επώαση 10 λεπτών στους 99°C για αποδιάταξη των δευτεροταγών πρωτεϊνικών

δομών. Στις κενές θέσεις φορτώθηκαν 5μL χρωστικής. Η ηλεκτροφόρηση διεξήχθη στα 120V για 90 λεπτά.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη PVDF, στα 125mA για 90 λεπτά.

Η επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη επιβεβαιώθηκε μέσω χρωματισμού της με διάλυμα Ponceau. Ακολούθησαν πλύσεις με PBS-T μέχρι αποχρωματισμού κι έπειτα οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης καλύφθηκαν με επώαση σε 5% γάλα διαλυμένο σε PBS-T για 60 λεπτά. Τα υπολείμματα γάλακτος απομακρύνθηκαν με πλύση PBS-T και προστέθηκε το πρωτογενές αντίσωμα για την επιθυμητή πρωτεΐνη, με ολονύκτια επώαση στους 4°C. Την επόμενη ημέρα η επώαση συνεχίστηκε για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση και ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις με PBS-T. Το δευτερογενές αντίσωμα προστέθηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση κι επαναλήφθηκαν τρεις πλύσεις. Το ρυθμιστικό διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης παρασκευάστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Συστατικό	Ποσότητα (ml)
1M Tris HCl (pH 9,5)	5
5M NaCl	1
1M MgCl ₂	250μL
H ₂ O	43,75ml

Πίνακας 2.9: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος της αλκαλικής φωσφατάσης.

Προηγήθηκε μια επώαση 3 λεπτών της μεμβράνης στο ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να αποκτήσει το κατάλληλο pH, ενώ στη συνέχεια προστέθηκαν 10ml του ίδιου διαλύματος με 66μL NBT και 33μL BCIP, που αποτελούν τα υποστρώματα του ενζύμου. Η μεμβράνη αναδεύτηκε στο διάλυμα NBT/BCIP έως εμφάνισης των επιθυμητών ζωνών. Ο τερματισμός της εμφάνισης έγινε με απόρριψη του διαλύματος και πλύση αρχικά με H₂O κι έπειτα με PBS-T.

2.18 Ανάλυση ενδοκυττάρωσης της πρωτεΐνης

Κύτταρα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs και Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs καλλιεργήθηκαν σε θέσεις ενός 6-well, μέχρι 80% κάλυψής του. Ακολούθησε επαγωγή παραγωγής της πρωτεΐνης με προσθήκη 2μg/ml δοξκυκλίνης στο θρεπτικό μέσο για πέντε ημέρες. Κάθε θρεπτικό απομακρύνθηκε και χρησιμοποιήθηκε κατά 75% στις καλλιέργειες μη

τροποποιημένων βλαστοκυττάρων MSCs και smNPCs, με 15% προσθήκη νέου αντίστοιχου θρεπτικού (Πίνακας 10).

	Θρεπτικό sm+		Θρεπτικό DMEM	
	Από καλλιέργεια υπερέκφρασης SNCA A53T - YFP	Νέο	Από καλλιέργεια υπερέκφρασης SNCA A53T - YFP	Νέο
MSCs	1,5ml	0,5ml	1,5ml	0,5ml
smNPCs	1,5ml	0,5ml	1,5ml	0,5ml

Πίνακας 2.10. Καλλιέργειες και αναλογίες θρεπτικών για ανάλυση ενδοκυττάρωσης πρωτεΐνης.

Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν για τρεις ημέρες και στη συνέχεια τα υπερκείμενα απομακρύνθηκαν κι αποθηκεύτηκαν στους -20°C , ενώ τα κύτταρα διασπάστηκαν σε διάλυμα λύσης. Ακολούθησε ανοσοανίχνευση κατά Western της α -συνουκλεΐνης A53T, τόσο στα θρεπτικά όσο και σε κάθε κυτταρικό τύπο, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.19 Υπολογισμός κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο MTT

Τα smNPCs ($15 \cdot 10^3$) επιστρώθηκαν σε 4 θέσεις ενός πιάτου καλλιέργειας 96-well. Στα επιθυμητά χρονικά σημεία, το θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 150 μL Sm⁺ που περιείχε 50 μL διαλύματος MTT. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 4 ώρες. Ύστερα, το διάλυμα απορρίφθηκε και προστέθηκαν 40 μL DMSO. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε σε συσκευή ανάγνωσης ELx800 (Bio Tek).

2.20 Κυτταρομετρία ροής

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θέσεις από ένα πιάτο 6-well μέχρι 90% κάλυψης του. Στη συνέχεια, αποκολλήθηκαν με τη χρήση του κατάλληλου ενζύμου και φυγοκεντρήθηκαν. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα πλύθηκε με PBS 1X και εκ νέου φυγοκέντρωση. Τελικά, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 500 μL PBS 1X. Πρώτα μετρήθηκαν τα κύτταρα που δεν είχαν σημανθεί με κάποια χρώση. Για τη μέτρηση βιωσιμότητας, τα κύτταρα επώαστηκαν στο σκοτάδι για 10 λεπτά με 1% από το αντιδραστήριο 7-AAD (7-amino actinomycin viability dye, BD Bioscience). Για τη μέτρηση ζωντανών, προαποπτωτικών και αποπτωτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε χρώση με 0,5% FVS (Fixable viability stain), επώαση για 20 λεπτά στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρωση 5 λεπτών στις 2.000rpm, απόρριψη υπερκειμένου, εκ νέου φυγοκέντρωση με 500 μL PBS 1X για πλύση

των κυττάρων και επαναιώρηση σε 500μL PBS 1X. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε πρωτόκολλα που ταιριάζουν στο μέγεθος των κυττάρων και το μήκος απορρόφησης της χρωστικής.

2.21 Ανοσοφθορισμός

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πιάτο 6-well με καλυπτρίδα και σε τελική πυκνότητα 70%. Για τη μονιμοποίηση τους, το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και προστέθηκε διάλυμα 3,7% φορμαδεΐδης για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε πλύση με PBS 1X και επώαση 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα 0,1% Triton-X, για διάνοιξη πόρων στις μεμβράνες των κυττάρων. Η καλυπτρίδα πλύθηκε δύο φορές με PBS 1X και επώαστηκε για 2 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα παρεμπόδισης, του οποίου η σύσταση αναγράφεται παρακάτω:

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
5% FBS	250μL
2,5% BSA	0,125gr
PBS-T	4,750μL

Πίνακας 2.11: Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος παρεμπόδισης μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης καλυπτρίδας.

Έπειτα από πλύση με PBS-T, η καλυπτρίδα με τα μονιμοποιημένα κύτταρα επώαστηκε με το πρωτογενές ειδικό αντίσωμα για την ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Οι συγκεντρώσεις κάθε αντισώματος φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πρωτογενές αντίσωμα	Συγκέντρωση
Nestin	1:200
TUJ1	1:1000
PAX6	1:50
MAP2	1:200
GFAP	1:500
O4	1:400
αSyn	1:500

Πίνακας 2.12: Τύποι και συγκεντρώσεις πρωτογενών αντισωμάτων για ανοσοφθορισμό.

Την επόμενη μέρα έγιναν 3 πλύσεις με PBS-T και προστέθηκε το κατάλληλο δευτερογενές (anti-mouse ή anti-rabbit) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Τέλος, έγιναν πλύσεις με PBS-T και προστέθηκαν 25μL DAPI για το χρωματισμό των πυρήνων.

Αποτελέσματα

3. Αποτελέσματα

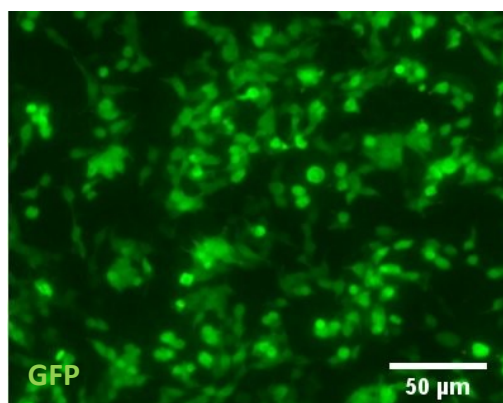
3.1 Επιτυχής κατασκευή πλασμιδίου για παραγωγή της πρωτεΐνης YFP-SNCA A53T

Το πρώτο βήμα της εργασίας ήταν η κατασκευή ενός πλασμιδίου που φέρει το επιθυμητό γονίδιο, προσδεμένο με το γονίδιο μιας πρωτεΐνης-δείκτη, υπό τον έλεγχο του κατάλληλου υποκινητή. Έτσι δημιουργήθηκε το pT2 Tet-On YFP-SNCA A53T με την τεχνολογία Gateway Cloning. Στη συνέχεια έγινε μετασχηματισμός βακτηρίων TOP10, με σκοπό την αύξηση της ποσότητάς του DNA. Όταν οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε ικανοποιητικό βαθμό, ακολούθησε απομόνωση και πέψη των πλασμιδίων με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού, ώστε να επαληθευτεί η ταυτότητά τους. Στο πήκτωμα αγαρόζης φάνηκαν οι αναμενόμενες ζώνες στις 200 βάσεις (*tet-on yfp-snca a53t*) και 3000 βάσεις (υπόλοιπο πλασμίδιο pT2) (Εικόνα 3.1).

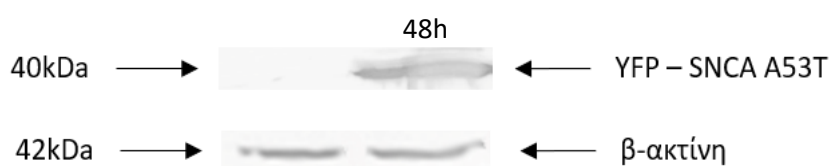


Εικόνα 3.1. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από πέψη του πλασμιδίου pT2 Tet-On YFP-SNCA A53T με ένζυμο περιορισμού.

Η ικανότητα παραγωγής της πρωτεΐνης α -συνουκλεΐνης A53T σε σύντηξη με την YFP (Yellow Fluorescent Protein) στο N-τελικό άκρο δοκιμάστηκε αρχικά σε εργαστηριακά κύτταρα HEK293T λόγω ευκολίας στην διαμόλυνση τους. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα δέχτηκαν το πλασμίδιο και 48 ώρες μετά, η παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης επαληθεύτηκε με φθορίζουσα μικροσκοπία (Εικόνα 3.2A) και ανοσοανίχνευση κατά Western (Εικόνα 3.2B). Για τη δεύτερη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε ένα πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την α -συνουκλεΐνη, ενώ η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με βάση τη β -ακτίνη. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2A, η παραγωγή της πρωτεΐνης είναι άμεση και ανιχνεύεται έντονος φθορισμός σχεδόν σε όλα τα κύτταρα. Το ανοσοαποτύπωμα του εκχύλισματος των παροδικά μετασχηματισμένων κυττάρων HEK293T έδειξε μια ζώνη στα 40kDa, το σωστό μοριακό βάρος της YFP-SNCA A53T, η οποία απουσίαζε από το εκχύλισμα των αντίστοιχων μη μετασχηματισμένων κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το πλασμίδιο pT2 Tet-On YFP-SNCA A53T κωδικοποιεί το σωστό γονίδιο και είναι κατάλληλο για τη δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς που θα παράγει την πρωτεΐνη YFP-SNCA A53T.



A



B

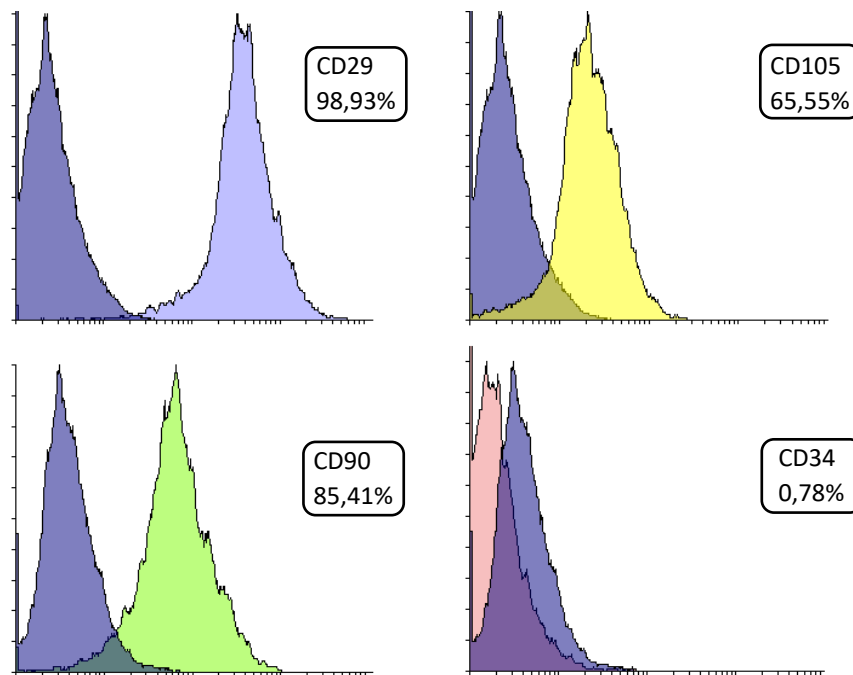
Εικόνα 3.2. Ανίχνευση της παραγωγής της α-συνουκλείνης A53T σε σύντηξη με την YFP σε κύτταρα HEK293T 48 ώρες μετά από παροδική διαμόλυνση με **(A)** Μικροσκοπία φθορισμού και **(B)** Ανοσοανίχνευση κατά Western. Κανονικοποίηση με β-ακτίνη.

3.2 Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς YFP-SNCA A53T MSCs

Στη συνέχεια, το πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία μιας σταθερής κυτταρικής σειράς μεσεγχυματικών κυττάρων προερχόμενα από τη γέλη του Wharton (MSCs). Σκοπός είναι η κατασκευή ενός νέου κυτταρικού μοντέλου που θα παράγει επαγόμενα την πρωτεΐνη YFP-SNCA A53T. Για το σκοπό αυτό, τα MSCs τροποποιήθηκαν γενετικά με τα πλασμίδια pT2 Tet-On YFP-SNCA A53T και pT2 TetR-neo^R παρουσία της τρανσποζάσης Sleeping Beauty 100x.

Τα φυσιολογικά MSCs χαρακτηρίζονται από ιδιότητες αναγέννησης και πολλαπλασιασμού για πολλές γενιές. Επιπλέον, μετά από κατάλληλη επαγωγή μπορούν να διαφοροποιηθούν προς κυτταρικούς τύπους του ενδοδέρματος, μεσοδέρματος κι εξωδέρματος. Παρ' όλ' αυτά η γενετική τροποποίηση θα μπορούσε να επηρεάσει αυτά τα χαρακτηριστικά, μεταβάλλοντας την ταυτότητα των βλαστοκυττάρων. Τα αδιαφοροποίητα κύτταρα φέρουν τους ειδικούς επιφανειακούς δείκτες CD29, CD73, CD90, CD105, ενώ δεν εκφράζουν τους αιμοποιητικούς δείκτες CD14, CD34 και CD45 (Ullah et al., 2015). Με βάση αυτούς, έγινε κυτταρομετρία ροής, για να επιβεβαιωθεί η διατήρηση της βλαστικής ταυτότητας των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων, ακόμη και μετά την γενετική τροποποίησή τους. Η συντριπτική πλειοψηφία των κυττάρων ήταν θετική για τους βλαστικούς δείκτες CD29,

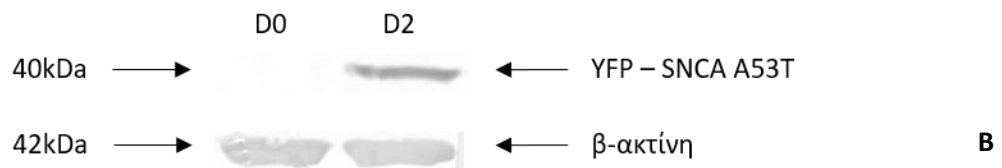
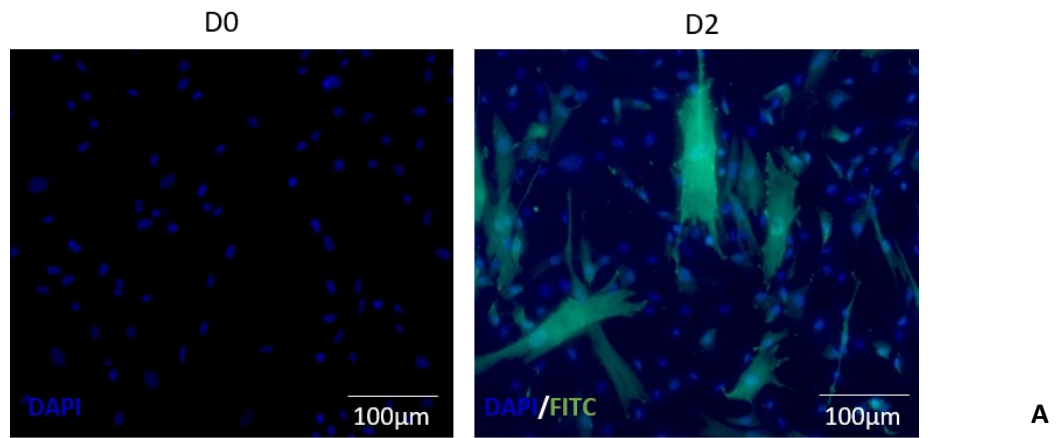
CD90, CD105 πριν και μετά την τροποποίηση, ενώ ήταν αρνητικά για τον δείκτη διαφοροποίησης CD34 (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3. Κυτταρομετρία ροής των Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs για τους επιφανειακούς δείκτες CD29, CD34, CD90 και CD105.

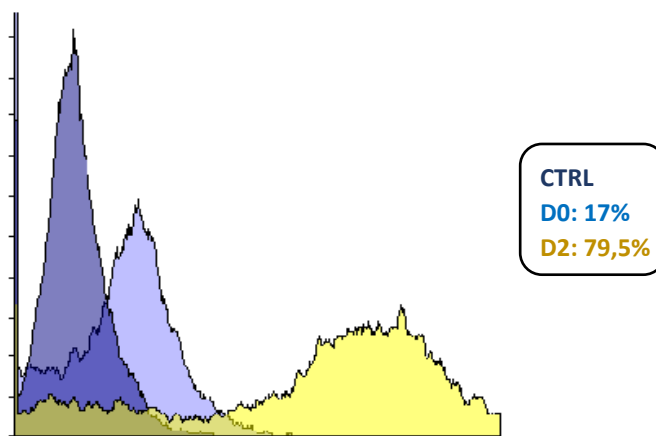
Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως η γενετική τροποποίηση των MSCs δεν επηρέασε τη βλαστική τους ταυτότητα, καθώς αυτά διατήρησαν την έκφραση των αρχικών δεικτών. Έτσι, τα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο στη μελέτη της δράσης της παθολογικής πρωτεΐνης σε βλαστοκύτταρα, αλλά επίσης μπορούν να διαφοροποιηθούν για να μελετηθεί η δράση της και σε εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους.

Έπειτα, εξετάστηκε η ικανότητα επαγόμενης έκφρασης του γονιδίου για την παραγωγή της πρωτεΐνης σε επιθυμητό χρόνο. Για το σκοπό αυτό παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού κύτταρα χωρίς ή με προσθήκη δοξυκυκλίνης για 2 ημέρες. Όπως ήταν αναμενόμενο, ο φθορισμός παρατηρήθηκε μόνο παρουσία δοξυκυκλίνης (Εικόνα 3.4A). Επιπλέον, ακολούθησε και ανοσοανίχνευση Western, όπως και στα HEK293T, για την επιβεβαίωση της παραγωγής της σωστής πρωτεΐνης. Η ανίχνευση μιας ζώνης στο σωστό μοριακό βάρος μόνο στο δείγμα που είχε προστεθεί δοξυκυκλίνη επιβεβαιώνει την επαγόμενη παραγωγή της σωστής πρωτεΐνης (Εικόνα 3.4B). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με βάση την β-ακτίνη.



Εικόνα 3.4. Ανίχνευση της παραγωγής της α -συνουκλείνης A53T σε σύντηξη με την YFP σε Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs χωρίς (D0) ή παρουσία δοξυκυκλίνης για 2 ημέρες (D2) με **(A)** μικροσκοπία φθορισμού και **(B)** ανοσοανίχνευση κατά Western. Κανονικοποίηση με β -ακτίνη.

Το ποσοστό των κυττάρων που παράγουν την επιθυμητή πρωτεΐνη μετρήθηκε επιπλέον με κυτταρομετρία ροής, ανιχνεύοντας την πρωτεΐνη YFP. Οι μετρήσεις έγιναν σε MSCs που δεν είχαν τροποποιηθεί γενετικά (CTRL) και σε Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs που είχαν καλλιεργηθεί απουσία (D0) ή παρουσία δοξυκυκλίνης για 2 ημέρες (D2). Όπως φαίνεται στο ιστόγραμμα, σχεδόν το 80% των κυττάρων παράγουν την ανασυνδυασμένη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Εικόνα 3.5).

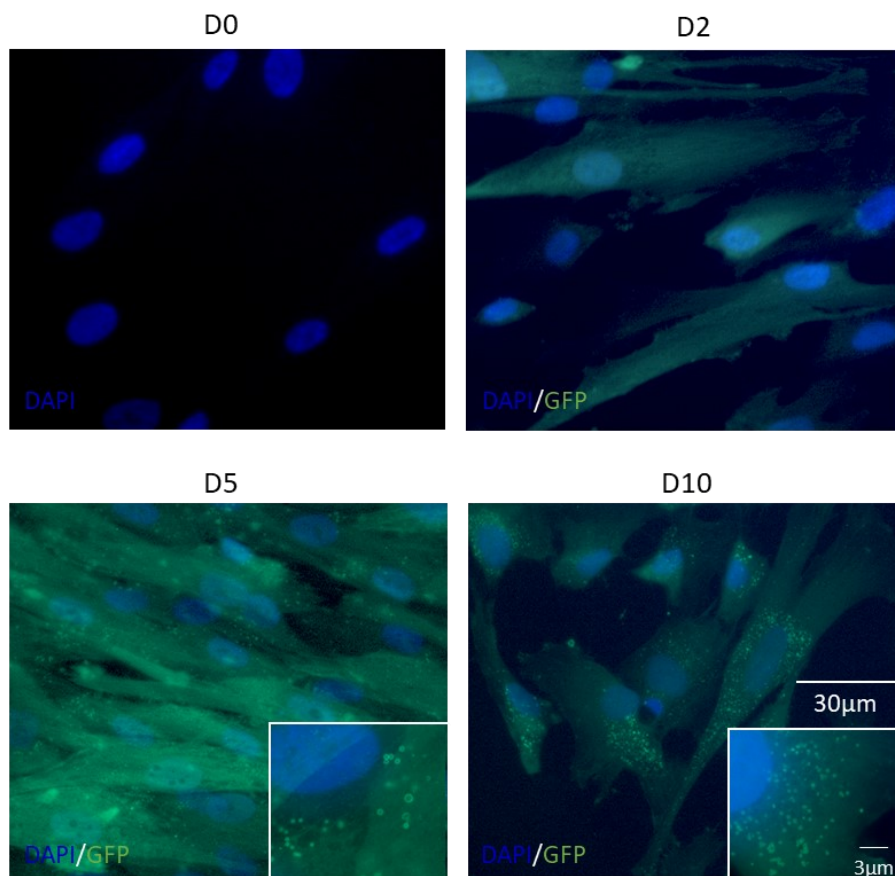


Εικόνα 3.5. Κυτταρομετρία ροής σε CTRL MSCs και Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs (D0 ή D2) για μέτρηση ποσοστού θετικών κυττάρων για YFP.

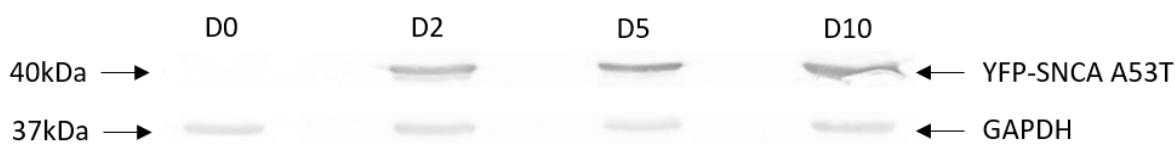
Τα αποτελέσματα δηλώνουν πως η παραγωγή της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται σε αυξημένα επίπεδα και στα MSCs. Επιπλέον όμως η έκφραση του γονιδίου μπορεί να ξεκινήσει ή να σταματήσει οποιαδήποτε χρονική στιγμή, με την προσθήκη ή αφαίρεση, αντίστοιχα, της δοξυκυκλίνης από το θρεπτικό. Τέλος, η επαγωγή της έκφρασης ξεκίνησε αρκετές ημέρες μετά την διαμόλυνση των κυττάρων και το θετικά σήματα επιβεβαιώνουν την εισαγωγή των γονιδίων του πλασμιδίου στο γονιδίωμα και άρα τη δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς.

3.3 Μελέτη της υπερέκφρασης του γονιδίου YFP-SNCA A53T σε Tet-On YFP SNCA MSCs

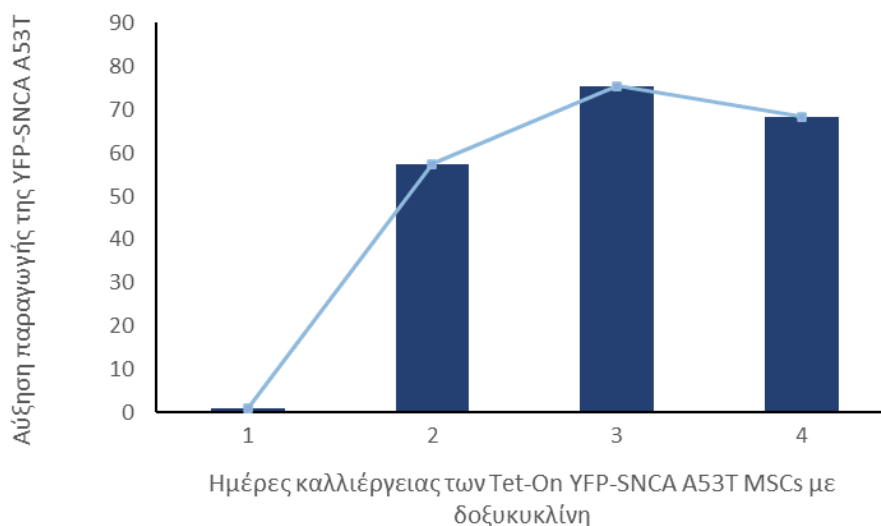
Στη συνέχεια, μελετήθηκε η παραγωγή της YFP-SNCA A53T για διάφορα χρονικά διαστήματα. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ή παρουσία δοξυκυκλίνης για 2, 5 και 10 ημέρες και παρατηρήθηκαν με μικροσκοπία φθορισμού (Εικόνα 3.6A), ενώ εκχυλίσματά τους αναλύθηκαν με ανοσοανίχνευση κατά Western (Εικόνα 3.6B). Όπως και προηγουμένως, χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα για την α -συνουκλεΐνη A53T και την GAPDH, με βάση την οποία κανονικοποιήθηκαν τα δείγματα. Οι ζώνες του ανοσοαποτυπώματος επεξεργάστηκαν περαιτέρω με τη μέθοδο της πυκνομετρίας, κατά την οποία μετράται η ένταση του σήματος των ζωνών και εκφράζεται ως η ποσότητα της πρωτεΐνης σε σύγκριση σε τον αριθμό των κυττάρων που υπάρχουν στο δείγμα. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στη γραφική παράσταση (Εικόνα 3.6Γ).



A



B



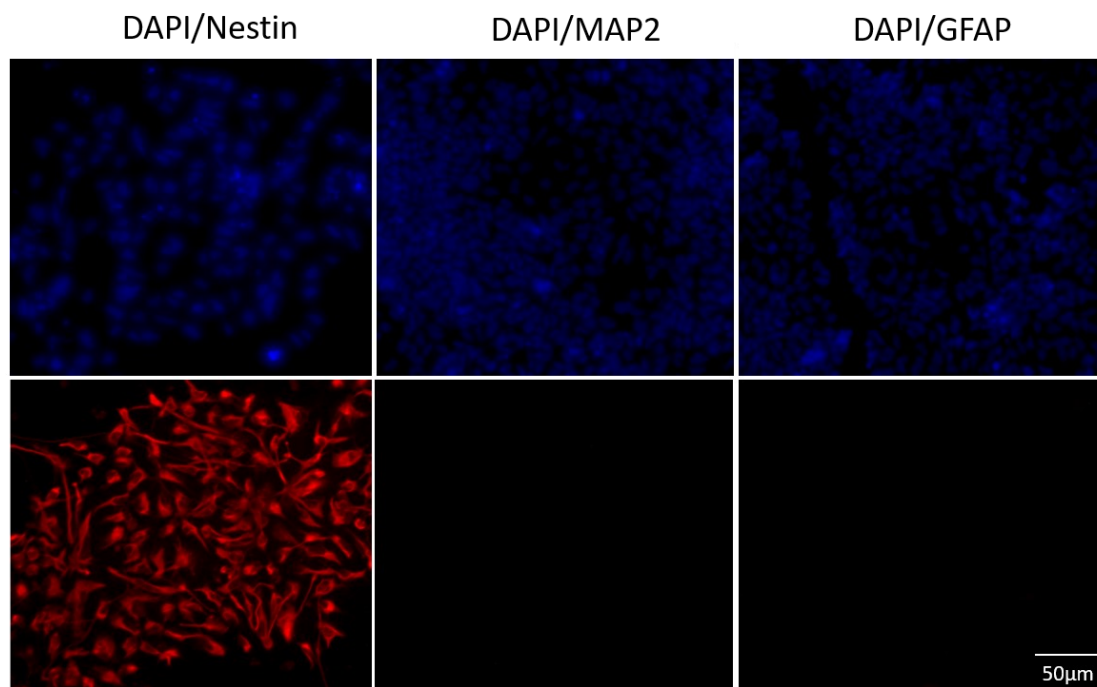
Γ

Εικόνα 3.6. Ανίχνευση της παραγωγής της α -συνουκλεΐνης A53T σε σύντηξη με την YFP σε Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs χωρίς (D0) ή παρουσία δοξυκυκλίνης για 2 (D2), 5 (D5) και 10 (D10) ημέρες με **(Α)** μικροσκοπία φθορισμού και **(Β)** ανοσοανίχνευση κατά Western. Κανονικοποίηση με GAPDH. **(Γ)** Γραφική παράσταση της ποσότητας της πρωτεΐνης σε σύγκριση με τον χρόνο έκθεσης των κυττάρων σε δοξυκυκλίνη. Κανονικοποίηση με GAPDH.

Στην Εικόνα 3.6Α φαίνεται από τη δεύτερη ημέρα έκθεσης σε δοξυκυκλίνη η έντονη παρουσία της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα, ενώ από την πέμπτη ημέρα η YFP-SNCA A53T σχηματίζει ενδοκυτταρικά κυστίδια. Ως τη δέκατη μέρα τα κυστίδια έχουν αυξηθεί σε αριθμό, όμως φαίνεται πως έχουν μικρότερο μέγεθος. Επιπλέον, η YFP-SNCA A53T ανιχνεύθηκε στα όλα τα εκχυλίσματα των κυττάρων που είχαν καλλιεργηθεί με δοξυκυκλίνη. Το γράφημα φανερώνει πως η μέγιστη παραγωγή της πρωτεΐνης σημειώνεται ως την πέμπτη ημέρα παρουσίας της δοξυκυκλίνης, ενώ σταδιακά αρχίζει να μειώνεται. Πρέπει επίσης να σημειωθεί η ανίχνευση μιας αχνής ζώνης στα 40kDa για την α -συνουκλεΐνη A53T στο δείγμα που δεν είχε προστεθεί δοξυκυκλίνη (D0). Αυτό συμβαίνει επειδή ορισμένοι υποκινητές δεν έχουν ανασταλεί πλήρως, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η μεταγραφή του γονιδίου της YFP-SNCA A53T σε μικρό βαθμό.

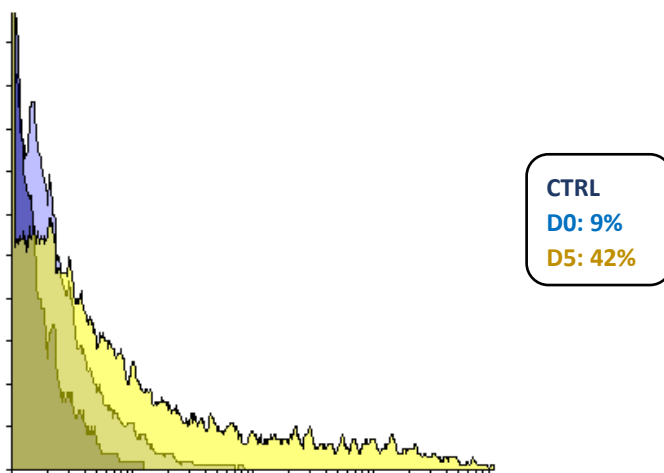
3.4 Δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς YFP-SNCA A53T smNPCs

Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και για τη δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς smNPCs που εκφράζουν επαγόμενα την YFP-SNCA A53T. Πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με πλασμίδια που κωδικοποιούν τα γονίδια YFP-SNCA A53T, TetR και την τρανσποζάση Sleeping Beauty 100x. Η διατήρηση των βλαστικών ιδιοτήτων των κυττάρων μετά τη διαμόλυνση με το πλασμίδιο εξετάστηκε με χρώση για το βλαστικό μάρτυρα νεστίνη, τον δείκτη νευρώνων MAP2 και τον δείκτη αστροκυττάρων GFAP. Στην εικόνα της φθορίζουσας μικροσκοπίας φαίνεται έντονη χρώση για τη νεστίνη και παράλληλα παρατηρείται η χαρακτηριστική μορφολογία των νευρικών βλαστοκυττάρων. Αντιθέτως οι χρώσεις για τους δείκτες MAP2 και GFAP είναι αρνητικές, επιβεβαιώνοντας τη διατήρηση του βλαστικού φαινοτύπου των κυττάρων (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7. Φθορίζουσα μικροσκοπία για τους δείκτες νεστίνη, MAP2 και GFAP σε Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs. Κλίμακα: 50µm.

Για να επαληθευτεί η εισαγωγή των γονιδίων στο γονιδίωμα των κυττάρων και η ικανότητα παραγωγής της πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα κυττάρων χωρίς (D0) και με προσθήκη δοξκυκλίνης για 5 μέρες (D5) για ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 3.8).

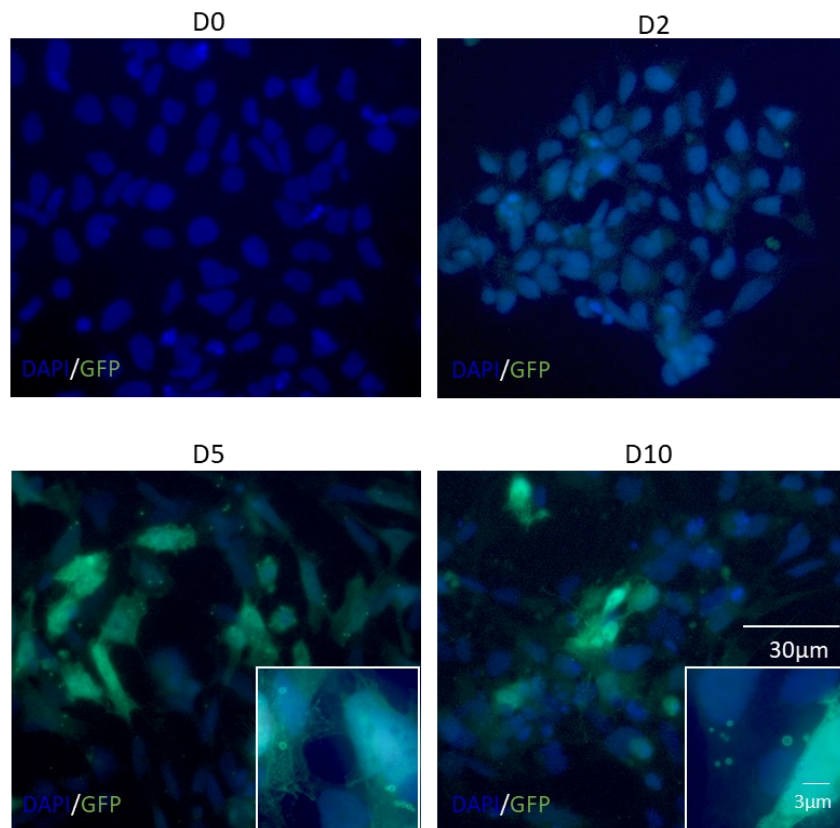


Εικόνα 3.8. Κυτταρομετρία ροής σε CTRL smNPCs και Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs (D0 ή 52) για μέτρηση ποσοστού θετικών κυττάρων για YFP.

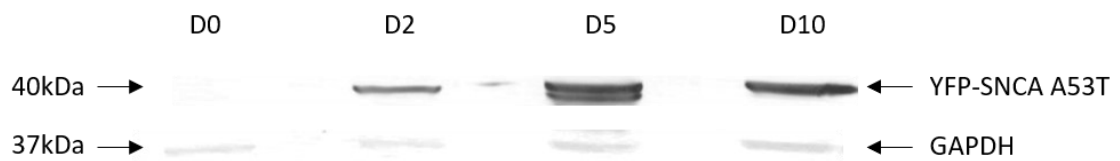
Στο ιστόγραμμα φαίνεται η σταδιακή αύξηση της παραγωγής της YFP-SNCA A53T και ταυτόχρονα επιβεβαιώνεται η εισαγωγή των αντίστοιχων γονιδίων στο γονιδίωμα των κυττάρων. Στο συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο παρατηρείται μικρότερη παραγωγή της πρωτεΐνης σε σχέση με των Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs.

3.5 Μελέτη της υπερέκφρασης του γονιδίου YFP-SNCA A53T σε Tet-On YFP-SNCA smNPCs

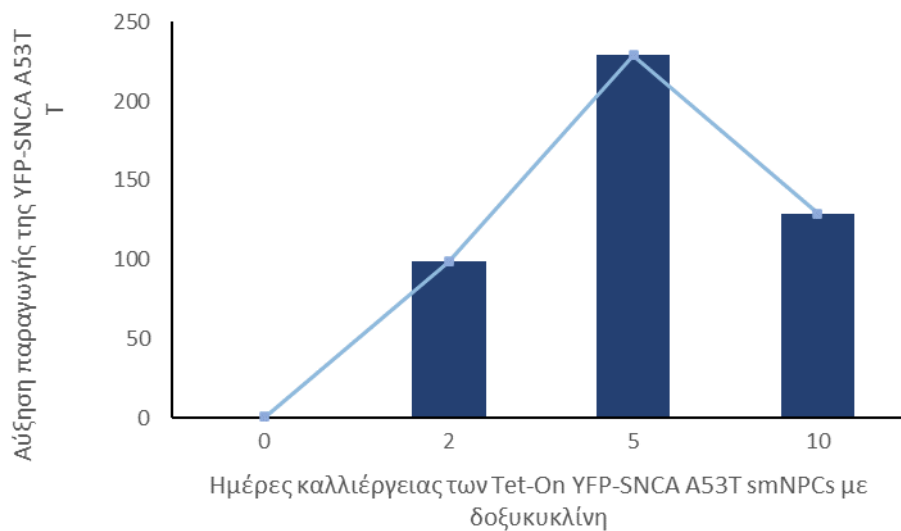
Όταν αναπτύχθηκε αρκετός αριθμός κυττάρων, προστέθηκε στην καλλιέργεια δοξυκυκλίνη για 2, 5 και 10 ημέρες, ενώ υπήρχε και δείγμα χωρίς προσθήκη της ουσίας. Η παραγωγή της πρωτεΐνης μελετήθηκε και πάλι στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα μέσω φθορίζουσας μικροσκοπίας (Εικόνα 3.9Α) και ανοσοανίχνευσης κατά Western Blot (Εικόνα 3.9Β). Στην τελευταία χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα για την ασυνουκλεΐνη A53T και την GAPDH. Οι ζώνες του ανοσοαποτυπώματος επεξεργάστηκαν με πυκνομετρία, για να βρεθεί η αναλογία της ποσότητας πρωτεΐνης και ποσότητας κυττάρων (Εικόνα 3.9Γ). Στις εικόνες του μικροσκοπίου φαίνεται μικρή παραγωγή μέχρι την δεύτερη ημέρα, η οποία αντιθέτως μέχρι την πέμπτη ημέρα γίνεται πολύ έντονη. Ξεκάθαρη είναι η παρατήρηση κυστιδίων στο κυτταρόπλασμα και ίσως σε κάποιους πυρήνες. Αντιθέτως, μέχρι τη δέκατη ημέρα έκθεσης σε δοξυκυκλίνη η ποσότητα της ασυνουκλεΐνης A53T μειώνεται, ενώ πλέον παρατηρούνται μικρότερα αλλά πιο πολλά κυστίδια. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και στις δύο επόμενες εικόνες, δηλαδή η έντονη αύξηση της ποσότητας της πρωτεΐνης μέχρι την πέμπτη ημέρα και η σταδιακή μείωση της ως το τελικό χρονικό σημείο.



A



B

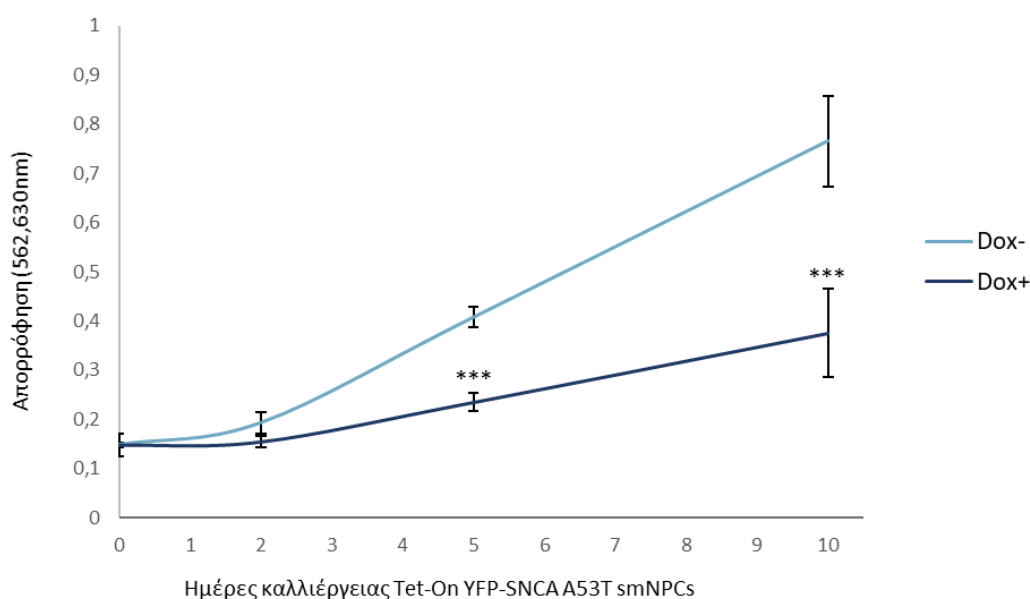


Γ

Εικόνα 3.9. Ανίχνευση της παραγωγής της YFP – SNCA A53T σε κύτταρα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs, μετά από 0, 2, 5 και 10 ημέρες καλλιέργειας με δοξυκυκλίνη με **A.** Μικροσκοπία φθορισμού, **B.** Ανοσοανίχνευση κατά Western και **Γ.** Ποσοτικοποίηση με πυκνομετρία. Κανονικοποίηση με GAPDH.

3.6 Μελέτη της μεταβολικής δραστηριότητας των Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs

Η μεταβολική δραστηριότητα και κατ' επέκταση ο αριθμός των κυττάρων σε καλλιέργεια μετρήθηκε με την μέθοδο MTT. Η μέθοδος βασίζεται στην διάσπαση της χρωστικής MTT από ένζυμα που εντοπίζονται στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων. Το προϊόν της διάσπασης έχει μωβ χρώμα και με φωτομετρία ενός δείγματος μπορεί να ποσοτικοποιηθεί η μιτοχονδριακή λειτουργία. Για το πείραμα καλλιεργήθηκε ίσος αριθμός κυττάρων Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs για 0, 2, 5 και 10 ημέρες χωρίς (Dox⁻) και με προσθήκη δοξουκυκλίνης (Dox⁺). Τα αποτελέσματα της φωτομετρίας απεικονίζονται στο γράφημα της Εικόνας 3.10.

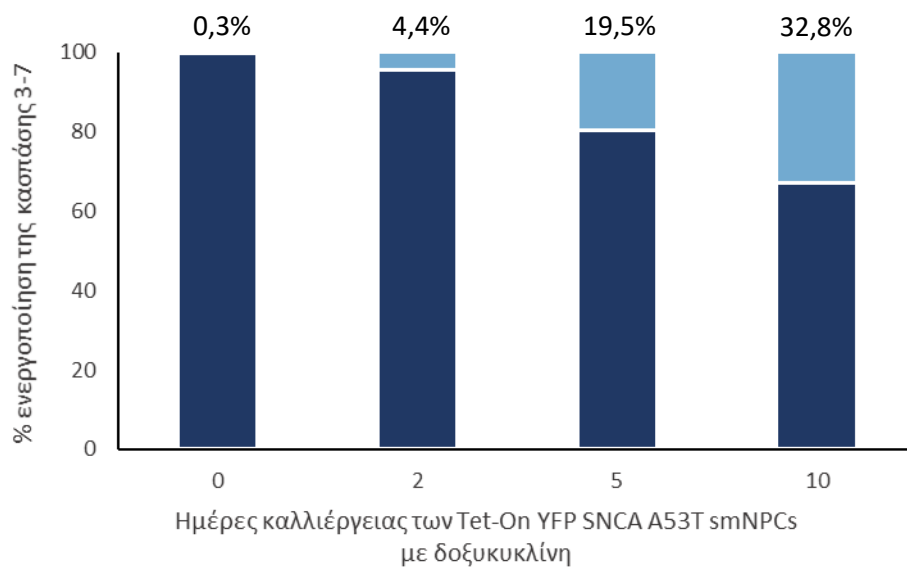
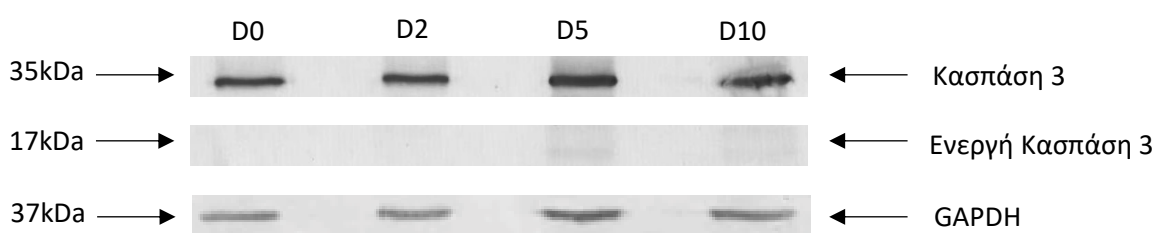


Εικόνα 3.10. Μέτρηση μεταβολικής δραστηριότητας μετά από 0, 2, 5 και 10 ημέρες καλλιέργειας κυττάρων χωρίς (Dox⁻) και με προσθήκη δοξουκυκλίνης (Dox⁺).

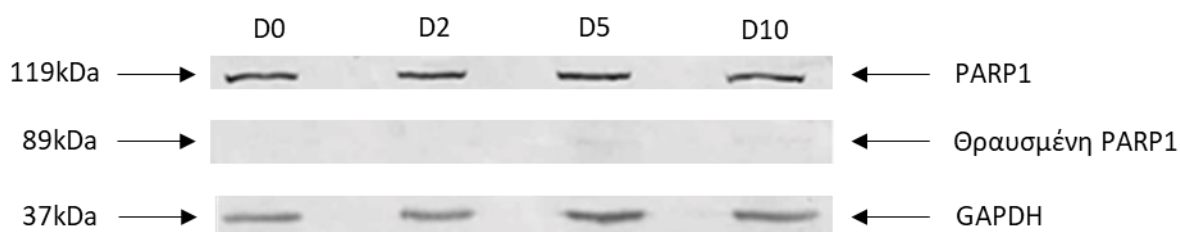
Μέχρι την δεύτερη ημέρα δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στη μεταβολική δραστηριότητα μεταξύ των καλλιεργειών χωρίς και με προσθήκη δοξουκυκλίνης. Στην πέμπτη ημέρα όμως φαίνεται στατιστικά σημαντική μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε δοξουκυκλίνη. Η διαφορά των Dox⁺ και Dox⁻ καλλιεργειών κλιμακώνεται σημαντικά μέχρι και το τελικό σημείο μέτρησης. Η μείωση αυτή δείχνει ότι η παραγωγή της YFP-SNCA A53T μειώνει σημαντικά τη μεταβολική δραστηριότητα και πιθανόν τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων στην καλλιέργεια.

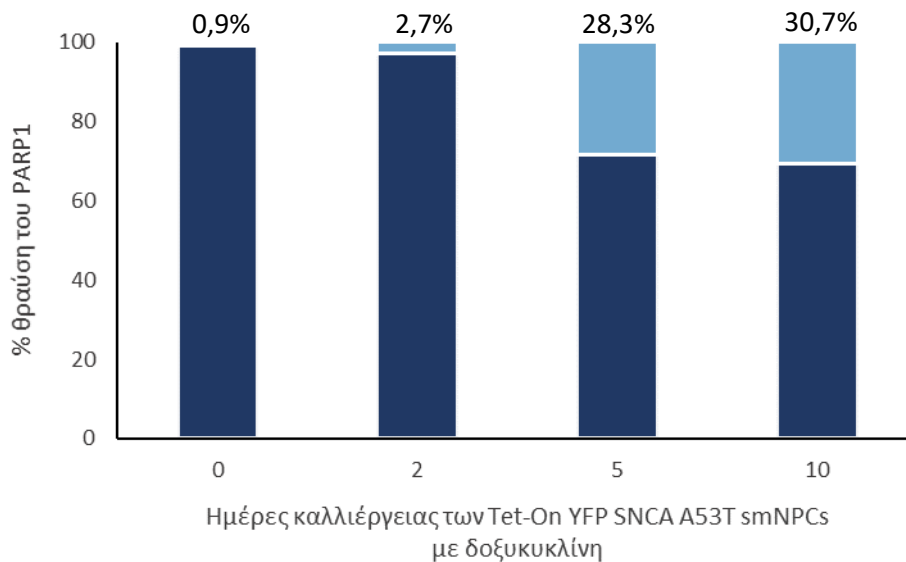
3.7 Μελέτη μονοπατιού του θανάτου των Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs μέσω απόπτωσης

Για να μελετηθεί αν η παραγωγή της α -συνουκλεΐνης επάγει τον κυτταρικό θάνατο, εξετάστηκε η παρουσία ανενεργής (35kDa) και ενεργής κασπάσης 3 (12kDa) και θραυσμένου PARP1 (89kDa). Κύτταρα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs καλλιεργήθηκαν παρουσία/απουσία δοξυκυκλίνης για 2, 5 και 10 ημέρες. Οι πρωτεΐνες κασπάση 3 (Εικόνα 3.11A) και PARP1 (Εικόνα 3.11B) ανοσοανιχνεύθηκαν με Western στα εκχυλίσματα των κυττάρων με ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα, ενώ η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με την GAPDH. Οι ζώνες αναλύθηκαν με πυκνομετρία για την αναλογία ανενεργής-ενεργής πρωτεΐνης.



A





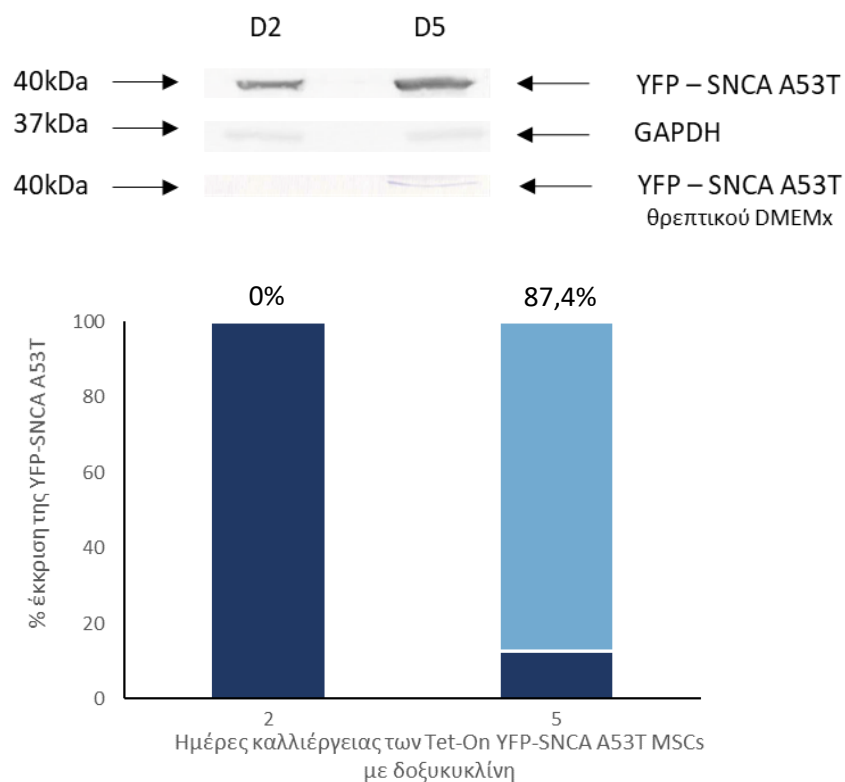
B

Εικόνα 3.11. Ανοσοανίχνευση κατά Western και πυκνομετρία σε εκχυλίσματα κυττάρων Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs που υπερπαράγουν την α-συνουκλεΐνη για 0, 2, 5 και 10 ημέρες για **A.** κασπάση 3 και **B.** PARP1. Κανονικοποίηση με GAPDH.

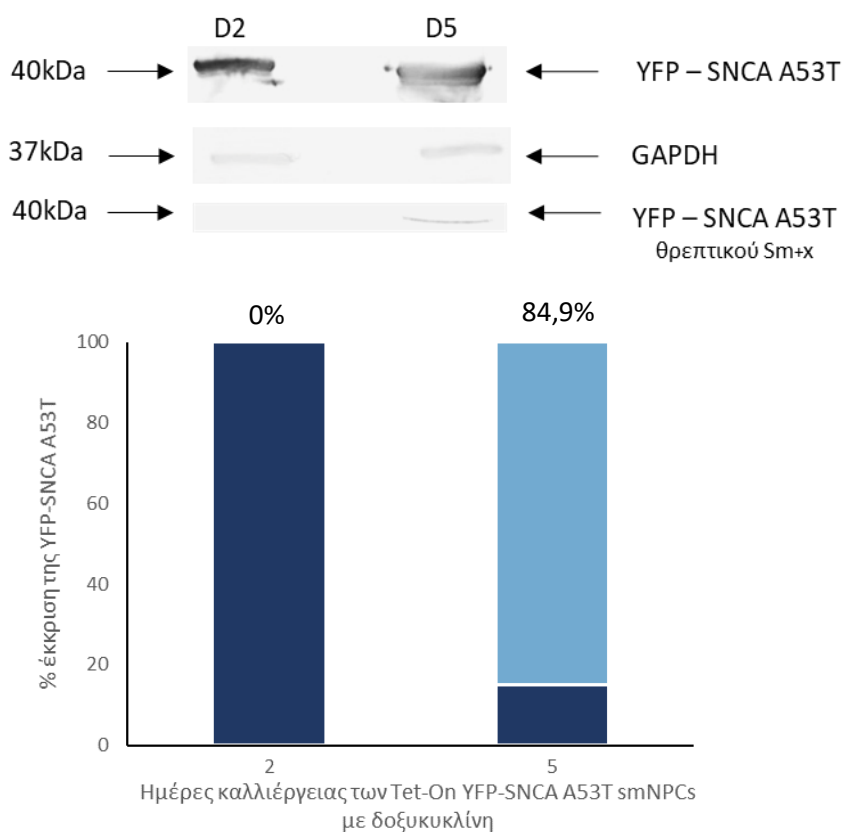
Στα ανοσοαποτυπώματα δεν ανιχνεύονται ζώνες θραυσμάτων στα δείγματα D0 και D2, σε αντίθεση με τις έντονες ζώνες των πρωτεϊνών στο συνολικό μοριακό τους βάρος. Την πέμπτη ημέρα όμως παρατηρείται μια αχνή ζώνη τόσο στο ανοσοαποτύπωμα της κασπάσης 3 (17kDa), όσο και στις PARP1 (89kDa). Οι δύο ζώνες γίνονται πιο έντονες μέχρι την δέκατη ημέρα έκθεσης σε δοξυκυκλίνη. Η επεξεργασία των ζωνών με υπολογιστικά προγράμματα έδειξαν με μεγαλύτερη ακρίβεια την μετατροπή των αρχικών ενζύμων στα επιμέρους θραύσματά τους. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα της Εικόνας 9A, η ποσότητα της ενεργής κασπάσης 3 αυξάνεται σχεδόν γραμμικά, αποτελώντας το 32,8% της συνολικής ποσότητας κασπάσης 3 τη δέκατη μέρα. Η διάσπαση της PARP1 αυξάνει αρκετά μέχρι την πέμπτη ημέρα (28,3%), αν και στη συνέχεια παραμένει σχεδόν σε σταθερό επίπεδο.

3.8 Μελέτη εξωκυττάρωσης της πρωτεΐνης YFP – SNCA A53T

Ένα άλλο ερώτημα που μελετήθηκε είναι αφενός αν η πρωτεΐνη εκκρίνεται από τα κύτταρα. Για την απάντηση, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες Tet-On YFP SNCA A53T smNPCs και Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs στις οποίες έγινε προσθήκη δοξυκυκλίνης για 5 ημέρες. Τα θρεπτικά μέσα (DMEMx και Sm⁺x) συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν με ανοσοανίχνευση κατά Western για την περιεκτικότητά τους σε YFP-SNCA A53T, με αντίσωμα ειδικό για την α-συνουκλεΐνη (Εικόνα 3.12A και 3.12B). Η κανονικοποίηση έγινε με ανοσοανίχνευση κατά Western για το GAPDH στα εκχυλίσματα των αντίστοιχων κυττάρων.



A



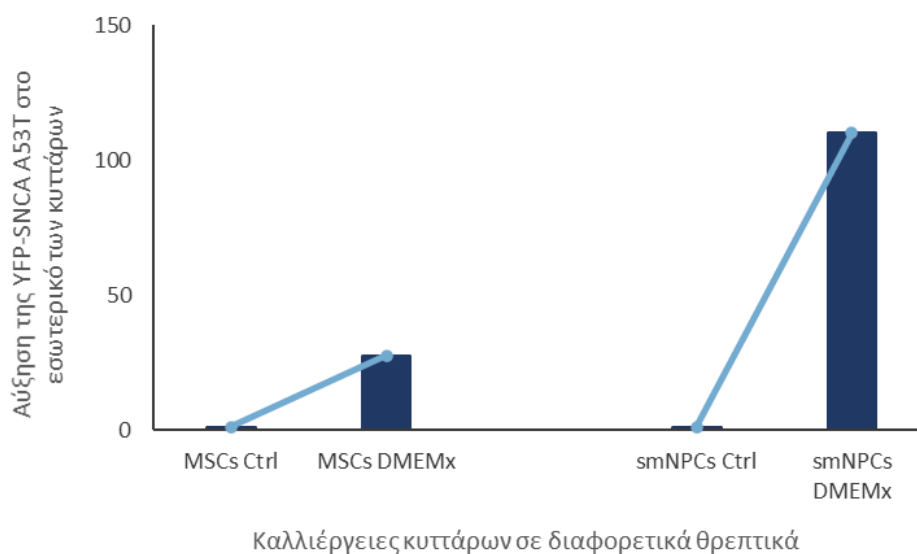
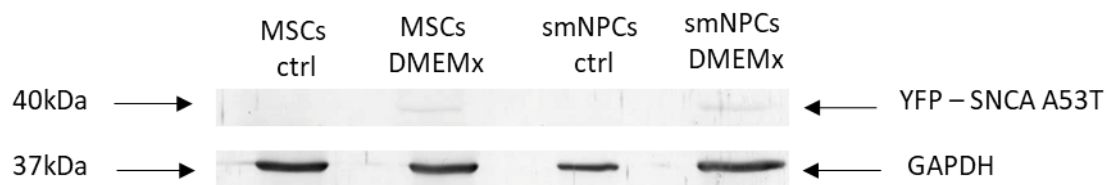
B

Εικόνα 3.12. Ανίχνευση της έκκρισης της πρωτεΐνης YFP – SNCA A53T με ανοσοανίχνευση κατά Western Blot και πυκνομετρία σε εκχυλίσματα και σε θρεπτικά των κυττάρων **A.** Tet-On YFP SNCA A53T MSCs και **B.** Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs. Κανονικοποίηση με GAPDH.

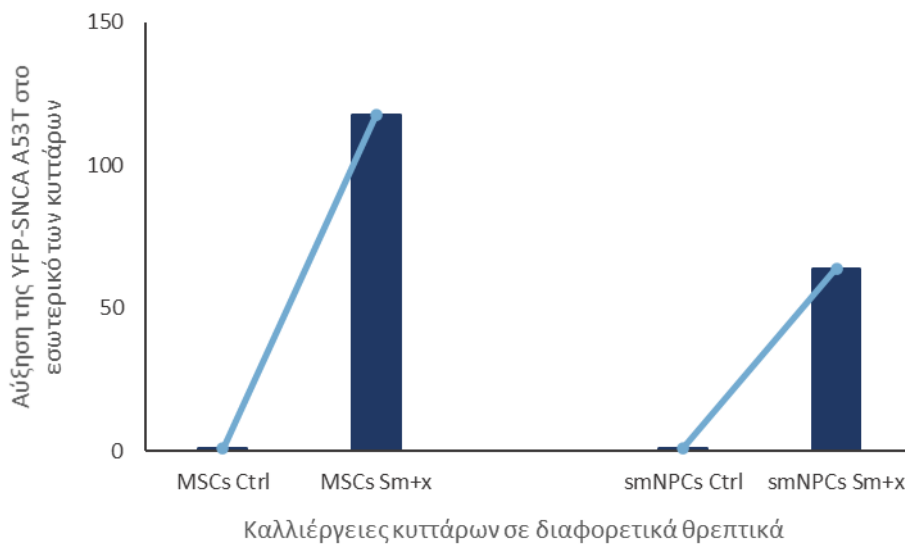
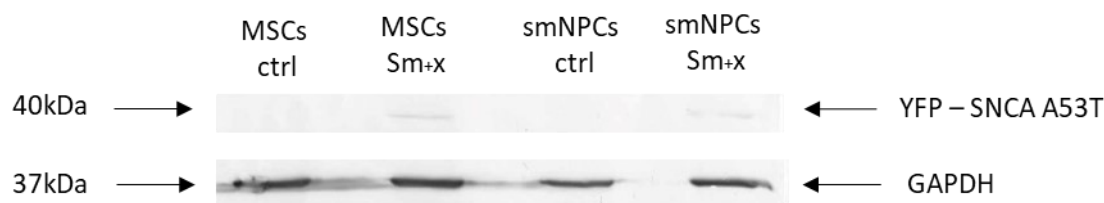
Όσον αφορά τα Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs, φαίνεται ανιχνεύεται μία καθαρή ζώνη για την YFP-SNCA A53T στο θρεπτικό τους και επιβεβαιώνεται με την ανάλυση της πυκνομετρίας, ότι περισσότερο από το 80% της πρωτεΐνης απεκκρίνεται. Αντίστοιχα συμβαίνει και στο θρεπτικό των Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs, αν και το ποσοστό έκκρισης είναι ελαφρώς μικρότερο.

3.9 Μελέτη ενδοκυττάρωσης της πρωτεΐνης YFP – SNCA A53T

Στη συνέχεια εξετάστηκε αν κύτταρα MSCs και smNPCs μπορούν να ενδοκυτταρώσουν την YFP-SNCA A53T, όταν αυτή βρεθεί στο περιβάλλον τους. Τα θρεπτικά DMEMx και Sm⁺x συλλέχθηκαν και προστέθηκαν σε καλλιέργειες γενετικά μη τροποποιημένων κυττάρων MSCs και smNPCs. Επιπλέον καλλιεργήθηκαν και γενετικά μη τροποποιημένα κύτταρα MSCs και smNPCs σε απλό θρεπτικό DMEM και Sm⁺, αντίστοιχα. Τα εκχυλίσματα των κυττάρων από κάθε καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοανίχνευση κατά Western, με αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη YFP (Εικόνα 3.13), ώστε να ανιχνευθεί μόνο η εξωγενής πρωτεΐνη που πιθανόν ενδοκυτταρώθηκε. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων έγινε με βάση το GAPDH, ενώ οι ζώνες του ανοσοαποτυπώματος αναλύθηκαν με πυκνομετρία.



A



B

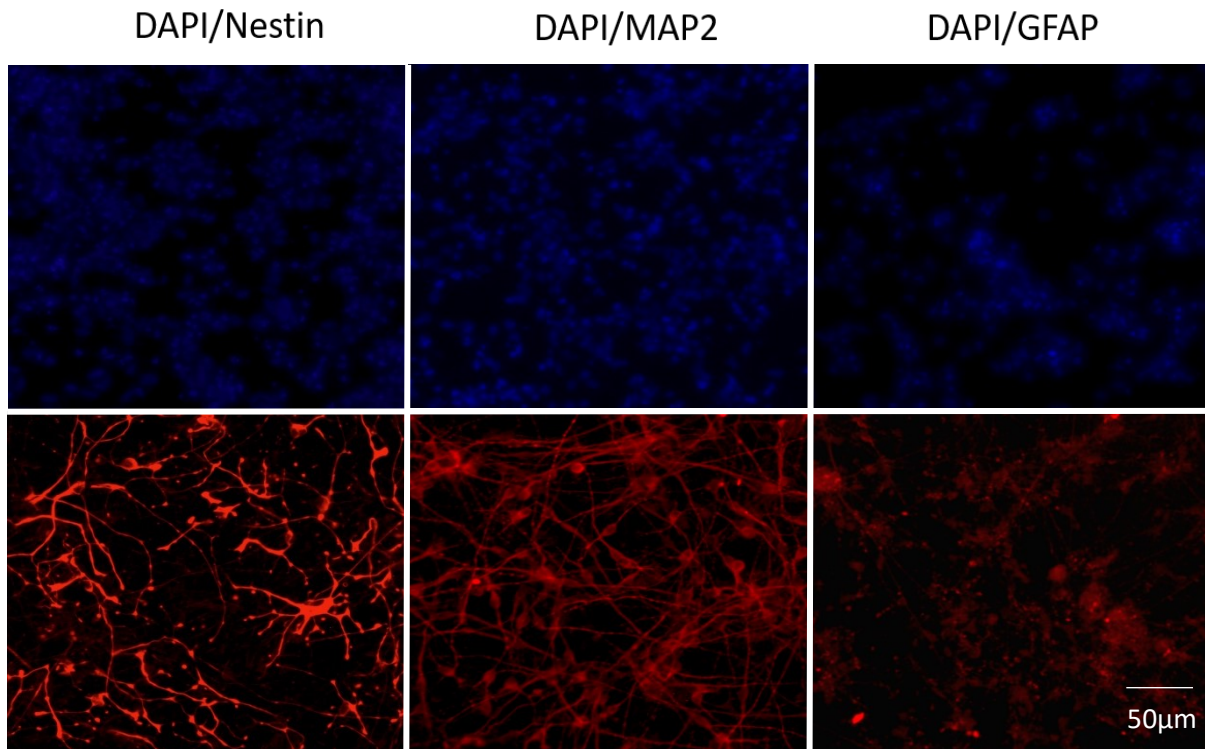
Εικόνα 3.13. Ανίχνευση της ενδοκυττάρωσης της πρωτεΐνης YFP – SNCA A53T με ανοσοανίχνευση κατά Western Blot και πυκνομετρία σε **A.** Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs και Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs με DMEMx και **B.** Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs και Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs με Sm⁺x. Κανονικοποίηση με GAPDH.

Η πρωτεΐνη ενδοκυτταρώνεται και στις τέσσερις συνθήκες. Στις περιπτώσεις όμως που τα κύτταρα καλλιεργούνται στο ετερόλογο θρεπτικό μέσο η ενδοκυττάρωση της YFP-SNCA A53T είναι μεγαλύτερη σε σχέση με το ομόλογο.

3.10 Δημιουργία διαφοροποιημένων κυττάρων YFP-SNCA A53T smNPCs

Καθώς η νόσος Πάρκινσον εμφανίζεται σε ώριμα νευρικά κύτταρα, πραγματοποιήθηκαν τα ίδια πειράματα σε διαφοροποιημένα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs. Τα συγκεκριμένα βλαστοκύτταρα διατηρούν την ταυτότητά τους παρουσία θρεπτικού Sm⁺, όμως μπορούν να διαφοροποιηθούν σε νευρώνες, αστροκύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα και κύτταρα γλοίας έπειτα από προσθήκη κατάλληλου θρεπτικού υλικού Sm⁻ (Reinhardt et al., 2013). Καλλιεργήθηκε ίσος αριθμός κυττάρων σε Sm⁺ και Sm⁻ για καθορισμένο χρονικό διάστημα και η διαφοροποίηση των δεύτερων επαληθεύτηκε με ανοσοφθορισμό. Συγκεκριμένα, κάθε καλλιέργεια σημάνθηκε με αντισώματα για τη

νεστίνη (δείκτης βλαστοκυττάρων), τη MAP2 (δείκτης νευρώνων) και την GFAP (δείκτης αστροκυττάρων). Στη συνέχεια, τα πρωτογενή αντισώματα ανιχνεύθηκαν με ένα δευτερογενές που ήταν προσδεμένο με κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, επιτρέποντας την ανίχνευση με φθορίζουσα μικροσκοπία (Εικόνα 3.14).



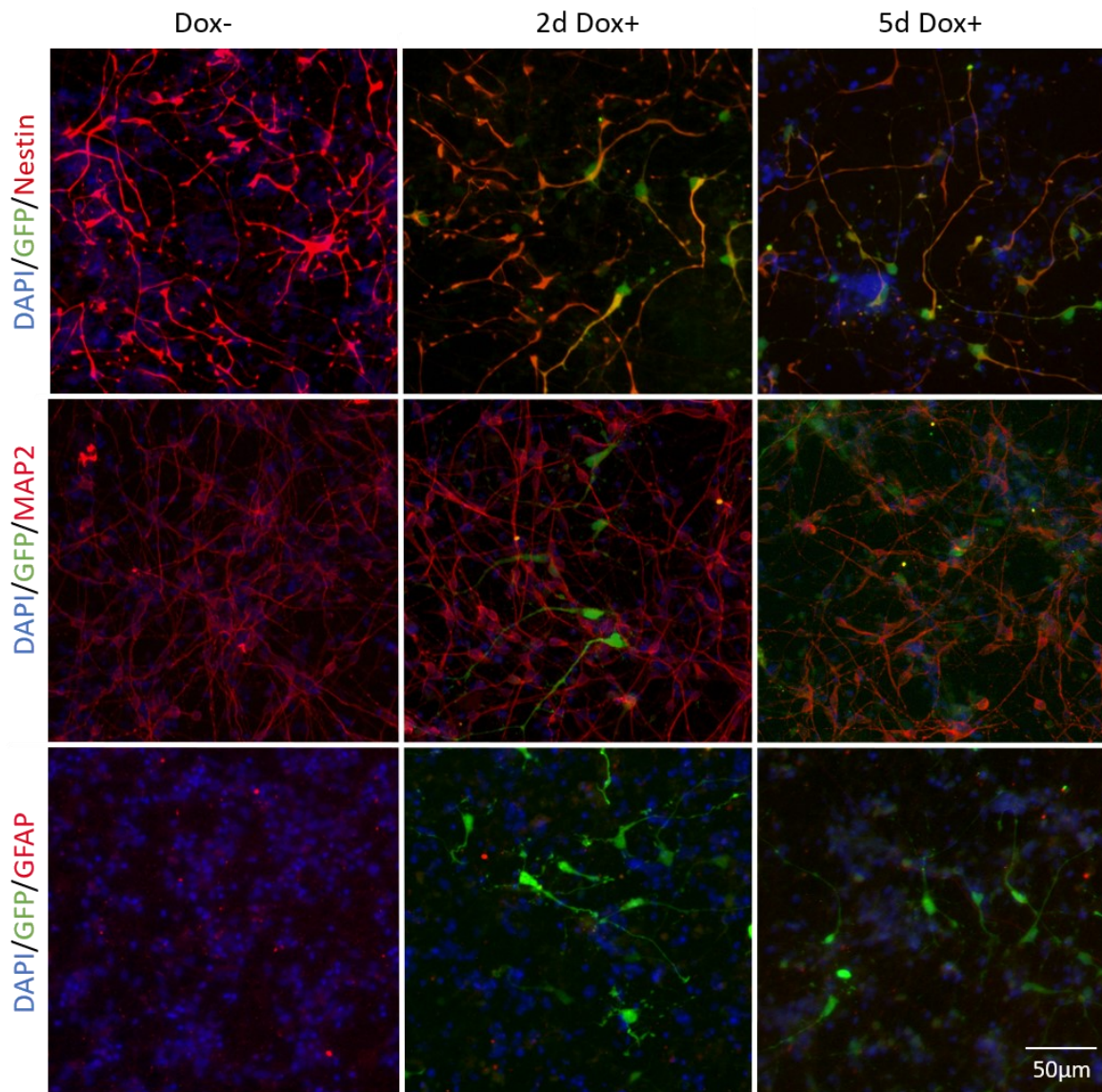
Εικόνα 3.14. Φθορίζουσα μικροσκοπία για τους δείκτες νεστίνη, MAP2 και GFAP σε διαφοροποιημένα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs.

Σε αντίθεση με τα βλαστικά Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs, εδώ παρατηρείται έντονη χρώση MAP2 και GFAP. Επιπλέον, ανιχνεύεται σήμα και για την νεστίνη, όμως τα κύτταρα έχουν σημαντικά διαφορετικό φαινότυπο.

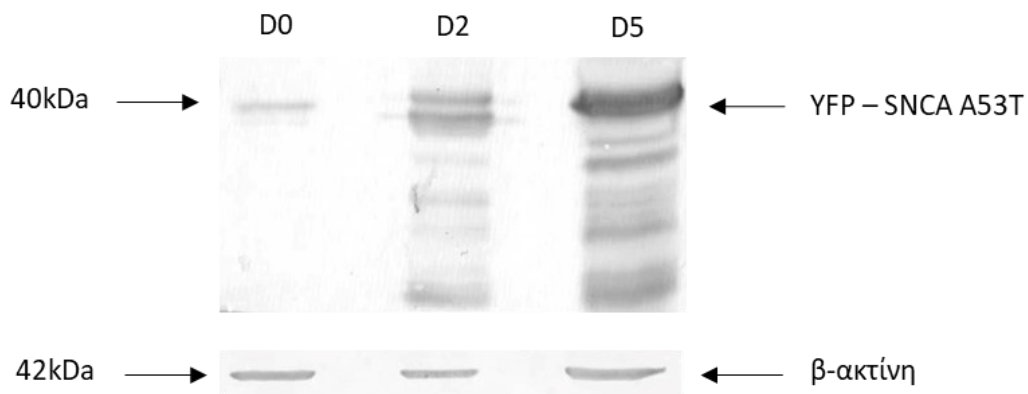
3.11 Μελέτη της υπερέκφρασης του γονιδίου YFP-SNCA A53T σε διαφοροποιημένα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs

Κύτταρα διαφοροποιήθηκαν για 15 ημέρες με καλλιέργεια στο κατάλληλο θρεπτικό και παράλληλα έγινε επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου YFP-SNCA A53T για 2 και 5 ημέρες, με προσθήκη δοξυκυκλίνης (13^η και 10^η ημέρα διαφοροποίησης, αντίστοιχα). Ως δείγμα ελέγχου, καλλιεργήθηκαν κύτταρα χωρίς επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου. Η παραγωγή της πρωτεΐνης ανιχνεύτηκε με μικροσκοπία φθορισμού (Εικόνα 3.15A) και ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 3.15B), με αντισώματα ειδικά για την α-

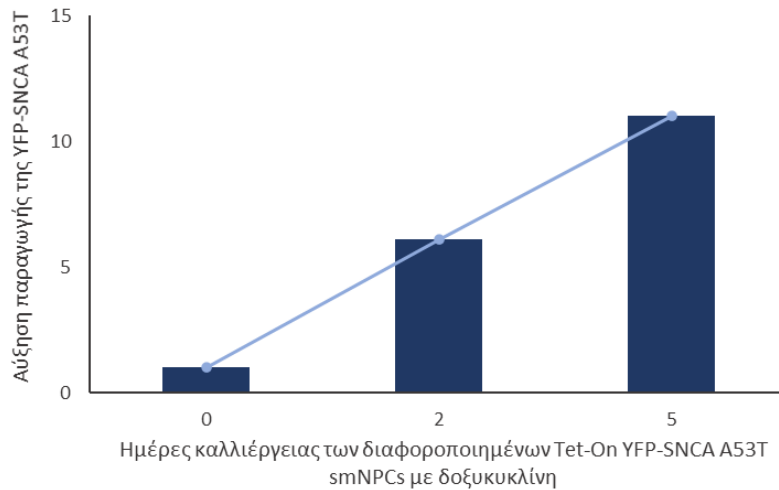
συνουκλεΐνη A53T και το GAPDH. Όπως και προηγουμένως, οι ζώνες αναλύθηκαν με πικνομετρία (Εικόνα 3.15Γ).



A



B

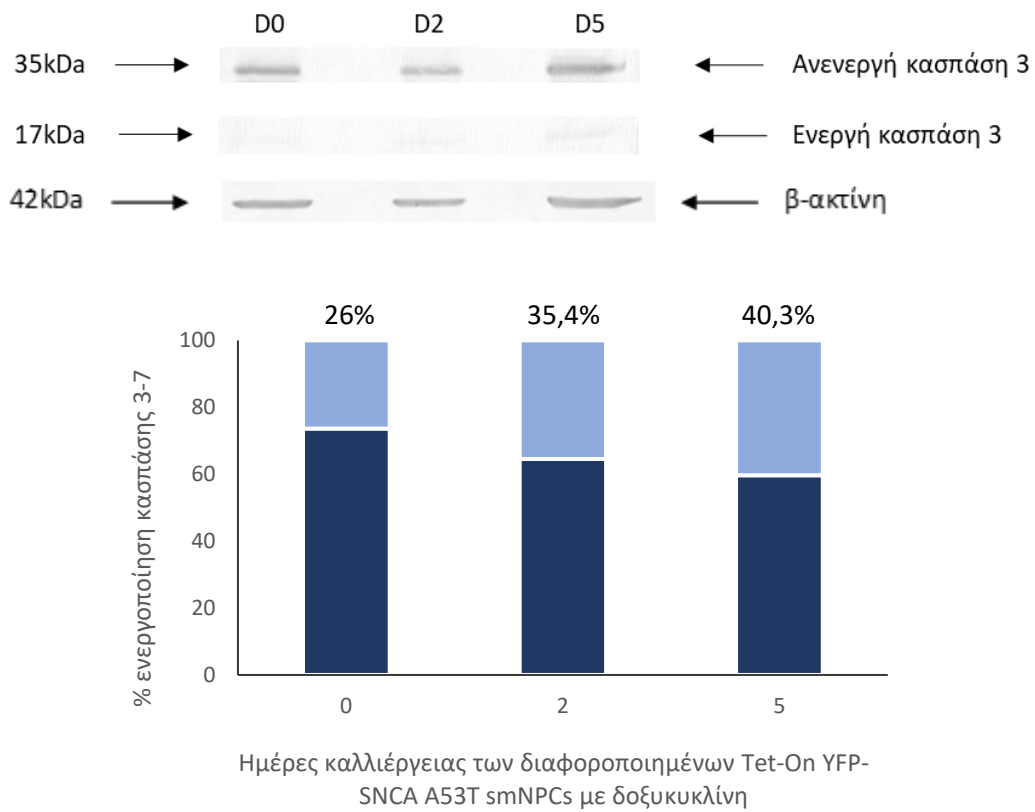


Εικόνα 3.15. Ανίχνευση της παραγωγής της YFP – SNCA A53T σε διαφοροποιημένα κύτταρα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs μετά από 0, 2 και 5 ημέρες καλλιέργειας με δοξουκυκλίνη με **A.** Μικροσκοπία φθορισμού, **B.** Ανοσοανίχνευση κατά Western και **Γ.** Ποσοτικοποίηση με πυκνομετρία.

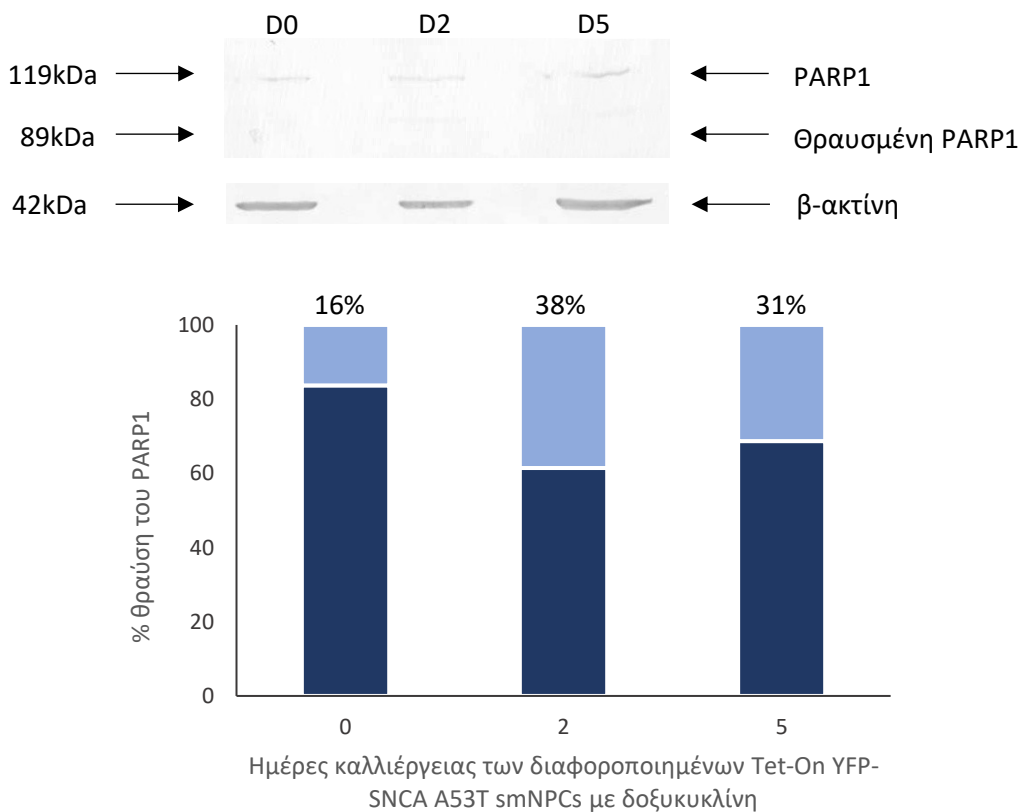
Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η YFP-SNCA A53T υπερεκφράζεται και στα διαφοροποιημένα κύτταρα Tet-On YFP-SNCA A53T, αν και σε μικρότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με τα αντίστοιχα βλαστικά. Επιπλέον, από τις εικόνες μικροσκοπίας φαίνεται έντονη αλληλοεπικάλυψη των χρώσεων YFP-SNCA A53T και νεστίνης, μικρότερη για MAP2 και YFP-SNCA A53T, ενώ δεν ανιχνεύεται για GFAP και YFP-SNCA A53T. Στο ανοσοαποτύπωμα φαίνονται πολλές και έντονες ζώνες για το YFP-SNCA A53T σε μικρότερα μοριακά βάρη στις 2 και 5 ημέρες καλλιέργειας με δοξουκυκλίνη (D2 και D5), καθώς και μικρή μη ειδική έκφραση σε κύτταρα καλλιέργειας χωρίς παρουσία δοξουκυκλίνης (D0).

3.12 Μελέτη μονοπατιού του θανάτου των διαφοροποιημένων Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs μέσω απόπτωσης

Για τη μελέτη της συμβολής της YFP-SNCA A53T στον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης εξειδικευμένων νευρικών πληθυσμών, εξετάστηκε και πάλι η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών κασπάσης 3 και PARP1 σε διαφοροποιημένα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs χωρίς ή με καλλιέργεια σε δοξουκυκλίνη για 2 ή 5 ημέρες. Η ανοσοανίχνευση κατά Western πραγματοποιήθηκε με αντισώματα ειδικά για τις δύο πρωτεΐνες, ενώ οι ζώνες αναλύθηκαν περαιτέρω με πυκνομετρία.



A



B

Εικόνα 3.16. Ανοσοανίχνευση κατά Western και πυκνομετρία σε εκχυλίσματα διαφοροποιημένων κυττάρων Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs που υπερπαράγουν την α-συνουκλεΐνη για 0, 2, 5 και 10 ημέρες για **A.** κασπάση 3-7 και **B.** PARP1. Ποσοτικοποίηση με β-ακτίνη.

Τα θραύσματα των πρωτεϊνών παράγονται και σε διαφοροποιημένα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs. Συγκεκριμένα, η κασπάση 3 ενεργοποιείται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα αντίστοιχα βλαστοκύτταρα (40,3% έναντι 32,8%), όμως ανιχνεύεται και κύτταρα που δεν έχουν καλλιεργηθεί με δοξουκυκλίνη (25% έναντι 0,3%, βλ. Εικόνα 3.11A). Στην περίπτωση του PARP1 φαίνεται αντίστοιχα υψηλότερη συγκέντρωση σε κύτταρα που δεν έχει γίνει επαγωγή της έκφρασης του παθολογικού γονιδίου. Επιπλέον όμως παρατηρείται σημαντική αύξηση της θραύσης της πρωτεΐνης μέχρι την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας με δοξουκυκλίνη (38% έναντι 2,7%, βλ. Εικόνα 3.11B), η οποία μειώνεται μέχρι το τελικό χρονικό σημείο (31%).

Συζήτηση

4. Συζήτηση

4.1 Τα βλαστικά κύτταρα στη μελέτη της ασθένειας του Πάρκινσον

Η ασθένεια του Πάρκινσον είναι η 2^η πιο κοινή νευροεκφυλιστική νόσος και η 14^η αιτία θανάτου παγκοσμίως (Kochanek et al., 2019). Κατά 70% εμφανίζεται σποραδικά στον πληθυσμό, με παράγοντες κινδύνου να αποτελούν η δυσκοιλιότητα, η μειωμένη φυσική δραστηριότητα, το άγχος, η κατάθλιψη και τα παρασιτοκτόνα (Bellou et al., 2016). Το υπόλοιπο 30% των περιπτώσεων οφείλεται σε γενετικά αίτια, με συγκεκριμένους γενετικούς τόπους να ευθύνονται για αυτοσωμική επικρατή ή υπολειπόμενη κληρονομικότητα της νόσου (Hernandez et al., 2016). Όλοι όμως οι ασθενείς εμφανίζουν ένα κοινό γνώρισμα, τα σωματία Lewy, που αποτελούνται από ολιγομερή της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης (Spillantini et al., 1997). Επίσης, μελέτες των γενεαλογικών δένδρων ασθενών με Πάρκινσον (είτε σποραδικού ή κληρονομικού) έδειξαν 2 ως 3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης σε άτομα πρώτου βαθμού συγγένειας και 1,5 ως 2,5 φορές σε άτομα δεύτερου βαθμού συγγένειας (Sveinbjornsdottir et al., 2000), (Savica et al., 2016). Οι μετα-αναλύσεις δεδομένων των ασθενών έδειξαν το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης ως τον πιο υψηλό γενετικό κίνδυνο (Satake et al., 2009), (Simón-Sánchez et al., 2009), (Nalls et al., 2014), (Chang et al., 2017). Τα δεδομένα αυτά επισημαίνουν τη σπουδαιότητα της πρωτεΐνης στην πρόκληση της νόσου. Τόσο όμως ο φυσιολογικός όσο και ο παθολογικός της ρόλος δεν έχει διευκρινιστεί. Παρομοίως, τα στάδια εξέλιξης της νόσου του Πάρκινσον παραμένουν άγνωστα. Η μελέτη της δράσης της α-συνουκλεΐνης ίσως δώσει την απάντηση σε αυτά τα ερωτήματα. Γι' αυτό απαιτείται η δημιουργία πειραματικών μοντέλων, που θα προσομοιάζουν την ασθένεια μετά από υπερέκφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα της μετάλλαξης A53T που προκαλεί πιο έντονα και γρήγορα τον παθολογικό φαινότυπο (Polymeropoulos et al., 1997). Τα υπάρχοντα μοντέλα, αν και φέρουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, εμφανίζουν ταυτόχρονα σημαντικά μειονεκτήματα. Έτσι, υπάρχει ανάγκη δημιουργίας νέων μοντέλων που θα εμφανίζουν πιο έντονα τα χαρακτηριστικά της νόσου. Οι βασικές τους ιδιότητες πρέπει να περιλαμβάνουν την ύπαρξη βλαστικής ταυτότητας, την ικανότητα διαφοροποίησης προς νευρικούς κυτταρικούς τύπους και την εκδήλωση έντονου φαινοτύπου.

Τα βλαστοκύτταρα χαρακτηρίζονται από τρεις βασικές ιδιότητες: την ικανότητα να αναγεννούνται, να διαφοροποιούνται προς έναν ή περισσότερους κυτταρικούς τύπους και να ανακατασκευάζουν έναν ιστό ή ένα όργανο *in vivo* (Weissman et al., 2001). Διακρίνονται σε ολοδύναμα (totipotent - διαφοροποίηση προς οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο), πολυδύναμα (pluripotent - διαφοροποίηση προς όλους τους κυτταρικούς τύπους εκτός του πλακούντα) και πλειοδύναμα (multipotent - διαφοροποίηση προς περιορισμένο αριθμό κυτταρικών τύπων) (Hima Bindu & Srilatha, 2011).

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα αποτελούν το μεγαλύτερο αριθμό πλειοδύναμων κυττάρων και μπορούν να απομονωθούν σχεδόν από κάθε ιστό του σώματος (Giai Via et al., 2012). Η πλέον βέλτιστη πηγή θεωρείται ο ομφάλιος λώρος και συγκεκριμένα η γέλη του Wharton (UC-MSCs). Τα UC-MSCs είναι εξελικτικά πιο πρωτόγονα από τα αντίστοιχα που απομονώνονται από ενήλικες και συγκλίνουν περισσότερο με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα (K. Batsali et al., 2013). Διατηρούν τη βλαστική τους ταυτότητα για περισσότερο χρονικό διάστημα και πολλαπλασιάζονται γρηγορότερα, δίνοντας μεγαλύτερο αριθμό θυγατρικών κυττάρων (Karahuseyinoglu et al., 2007). Στα σημαντικά τους πλεονεκτήματα περιλαμβάνονται επίσης η απουσία καρκινικής ταυτότητας καθώς και ότι η χρήση τους δεν εγείρει βιοηθικά ζητήματα. Η απομόνωσή τους γίνεται από ανθρώπινο ιστό που φυσιολογικά απορρίπτεται. Ακολουθείται ένα εύκολο πρωτόκολλο που δεν απαιτεί επέμβαση (Joerger-Messerli et al., 2016). Ο αριθμός κυττάρων που λαμβάνεται είναι αρκετά μεγάλος και μπορεί να διατηρηθεί σε ψύξη για μεγάλο χρονικό διάστημα, χωρίς σημαντική μείωση βιωσιμότητας (Karahuseyinoglu et al., 2007). Μπορούν να διαφοροποιηθούν πλήρως προς οστεοβλάστες, χονδροβλάστες και λιποκύτταρα, (Mitchell et al., 2003), (Peng et al., 2011). Σημαντική εξέλιξη για την αξιοποίηση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων στη νόσο του Πάρκινσον αποτέλεσε η διαφοροποίησή τους προς ντοπαμινεργικούς νευρώνες (Fu et al., 2006). Επιπλέον, στα χαρακτηριστικά των UC-MSCs συμπεριλαμβάνεται η καταστολή του μονοπατιού της απόπτωσης, με αποτέλεσμα να διατηρούνται σε καλλιέργεια ακόμη και υπό συνθήκες στρες, δίνοντας τη δυνατότητα μελέτης ενός παθολογικού φαινοτύπου (Robert et al., 2019). Τέλος, η συγκέντρωση των κασπασών στο κυτταρόπλασμα δεν είναι πολύ υψηλή, ευνοώντας τη συσσώρευση πρωτεϊνών και την πιθανή δημιουργία συσσωματωμάτων (Egger et al., 2018).

Τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (induced pluripotent stem cells -iPSCs) παράγονται από ενήλικα κύτταρα ινοβλαστών του δέρματος (Takahashi et al., 2007), (Yu et al., 2007) ή μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (Haase et al., 2009), στα οποία έχει γίνει επαγωγή έκφρασης τεσσάρων συγκεκριμένων γονιδίων. Τα προϊόντα τους είναι μεταγραφικοί παράγοντες, που επαναπρογραμματίζουν την ταυτότητα των κυττάρων και τα μετατρέπουν από διαφοροποιημένα σε πολυδύναμα βλαστικά. Τα iPSCs εμφανίζουν αρκετές ομοιότητες με τα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα, όπως τη μορφολογία, το γονιδιακό προφίλ, τους βλαστικούς μάρτυρες και τη δυνατότητα διαφοροποίησης προς περισσότερους από 200 κυτταρικούς τύπους (Chin et al., 2009), (Bilic & Izpisua Belmonte, 2012). Η χρήση τους δεν εγείρει ζητήματα βιοηθικής, αφθονούν σε αριθμό, και απομονώνονται ανώδυνα από τους δότες. Στο εργαστήριο καλλιεργούνται εύκολα και πολλαπλασιάζονται γρήγορα, δίνοντας μεγάλο αριθμό απογόνων (Glicksman, 2018). Καθώς μπορεί να απομονωθούν από ασθενείς διάφορων νόσων, διαμορφώνουν πολύ χρήσιμα κυτταρικά μοντέλα για τη μελέτη της εκάστοτε ασθένειας, εκδηλώνοντας τους μοριακούς και κυτταρικούς παθολογικούς

φαινοτύπους της (Robinton & Daley, 2012). Για αυτό και έχουν ιδιαίτερη αξία για τη μελέτη των νευροεκφυλιστικών νόσων (Brennand et al., 2011), (Dimos et al., 2008), (Ebert et al., 2009), (Israel et al., 2012), (G. Lee et al., 2009), (Song et al., 2012), (Yichen Shi et al., 2014), (Mertens & Gage, 2018), (Tang, 2018),. Μετά από διαφοροποίησή τους προς νευρικά βλαστοκύτταρα (neural stem cells – NSCs) και εξειδικευμένους νευρικούς κυτταρικούς τύπους, αποκτούν την πολύπλοκη μορφολογία και λειτουργία των νευρικών κυττάρων πιο αξιόπιστα από οποιοδήποτε άλλο κυτταρικό μοντέλο. Επίσης, οι φαινότυποι που εκδηλώνουν είναι πιο ακριβείς, αφού έχουν ανθρώπινη προέλευση και άρα ίδιους κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς. Τέλος, η καλλιέργεια iPSCs που θα διαφοροποιηθούν σε εξειδικευμένους νευρικούς τύπους, δίνει τη δυνατότητα μελέτης της νόσου σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια (Shen et al., 2015). Οι προκλήσεις στη χρήση τους όμως περιλαμβάνουν τη διατήρηση της βλαστικής ταυτότητας και τον έλεγχο της ανεξέλεγκτης διαφοροποίησης, την ανάπτυξη αποτελεσματικών πρωτοκόλλων διαφοροποίησης και τη μείωση του κόστους καλλιέργειας. Τις λύσεις σε αυτά τα προβλήματα φαίνεται πως έδωσε η ανάπτυξη των πρόδρομων νευρικών βλαστοκυττάρων μικρών μορίων (small molecules neural precursor cells - smNPCs). Πρόσφατα αποδείχθηκε πως με την προσθήκη μικρών μορίων στο θρεπτικό τους διατηρούν τις βλαστικές ιδιότητες της αυτό-αναγέννησης και του πολλαπλασιασμού για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από οποιαδήποτε άλλη κυτταρική σειρά (Reinhardt et al., 2013). Με την αφαίρεση των μορίων από το θρεπτικό καλλιέργειας, τα NPCs διαφοροποιούνται προς όλους τους νευρικούς κυτταρικούς τύπους και ιδιαίτερα προς ντοπαμινεργικούς νευρώνες, μετά από λίγες μόνο ημέρες.

4.2 Υπερέκφραση της α -συνουκλεΐνης A53T σε μεσεγχευματικά και πρόδρομα νευρικά βλαστοκύτταρα

Στην παρούσα μελέτη, κατασκευάστηκαν οι σταθερές κυτταρικές σειρές Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs και Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs για να χρησιμοποιηθούν ως κυτταρικά μοντέλα της ασθένειας του Πάρκινσον. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου της παθολογικής πρωτεΐνης α -συνουκλεΐνης A53T, που ευθύνεται για μια κληρονομήσιμη μορφή της νόσου, με πιο έντονο και γρήγορο φαινότυπο (Polymeropoulos et al., 1997), (Tambasco et al., 2016). Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης και την ανίχνευση δομών που ίσως σχηματίζει, έγινε σύντηξη του γονιδίου της με το γονίδιο της κίτρινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (yellow fluorescent protein – YFP). Η έκφραση του γονιδίου επιλέχθηκε να γίνεται με επαγωγή έπειτα από προσθήκη δοξυκυκλίνης στην καλλιέργεια (σύστημα Tet-On), ώστε να ελέγχεται άμεσα η παραγωγή της. Σε αντίθεση με το σύστημα σταθερής έκφρασης ενός γονιδίου, εδώ ελέγχεται πότε θα ξεκινήσει και θα διακοπεί η παραγωγή της πρωτεΐνης. Επιπλέον, η συνεχής υπερέκφραση μιας τοξικής πρωτεΐνης θα οδηγούσε σε αύξηση του κυτταρικού στρες και άμεσο θάνατο,

κάνοντας αδύνατη τη μακροπρόθεσμη μελέτη των κυττάρων (T. Das et al., 2016). Η διαμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια που φέρουν τα επιθυμητά γονίδια για τη δημιουργία των σταθερών κυτταρικών σειρών έγινε με τη χρήση του τρανσποζονίου Sleeping Beauty 100X ενός μη ιικού πλασμιδιακού φορέα (Hudecek & Ivics, 2018).

Η διαμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στις βλαστικές ιδιότητες τους και απώλεια των χαρακτηριστικών τους. Η βλαστική ταυτότητα των κυττάρων Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs επιβεβαιώθηκε με κυτταρομετρία ροής για τους δείκτες μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων CD29, CD90 και CD105 και με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου, διαθέτοντας τη χαρακτηριστική μορφολογία ινοβλαστών (Dominici et al., 2006). Η βλαστική ταυτότητα των Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs εξετάστηκε με ανοσοφθορισμό για τον δείκτη πρόδρομων νευρικών βλαστοκυττάρων νεστίνη (Hendrickson et al., 2011), τον δείκτη νευρώνων MAP2 (Caceres et al., 1992) και τον δείκτη αστροκυττάρων GFAP (Middelдорp & Hol, 2011) (Εικόνα 3.7). Όπως ήταν αναμενόμενο, υπάρχει έντονη παρουσία της νεστίνης στις μεμβράνες των κυττάρων, ενώ δεν ανιχνεύονται οι άλλοι δύο μάρτυρες. Παρομοίως, εξετάστηκε η μορφολογία τους σε οπτικό μικροσκόπιο, εκδηλώνοντας τον χαρακτηριστικό φαινότυπο νευρικών βλαστοκυττάρων.

Η εισαγωγή των διαγονιδίων στο γονιδίωμα των κυττάρων και η παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης YFP-SNCA A53T (40 kDa) επιβεβαιώθηκε στα Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs με μικροσκοπία φθορισμού (Εικόνα 3.4A), ανοσοχρώση κατά Western (Εικόνα 3.4B) και κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 3.5). Από την τελευταία ανάλυση, ανιχνεύεται και ένα μικρό ποσοστό κυττάρων (17%) που εκφράζει την πρωτεΐνη χωρίς να έχει προστεθεί δοξυκυκλίνη στην καλλιέργεια (D0). Το φαινόμενο αυτό είναι αναμενόμενο και παρατηρείται συχνά σε επαγόμενα συστήματα. Κυτταρομετρία ροής έγινε και για την ανίχνευση της YFP σε Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs χωρίς και με παρουσία δοξυκυκλίνης για 5 ημέρες. Σε αυτήν την περίπτωση το 42% των κυττάρων είναι θετικό για τον δείκτη (Εικόνα 3.8). Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω εισαγωγής των διαγονιδίων σε λιγότερο ενεργές περιοχές του γονιδιώματος των Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs, διαφορετικής ρύθμισης της μεταγραφής και μετάφρασης μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων, αλλά και διαφορετικού βαθμού διαμόλυνσης τους.

Σε καλλιέργειες κυττάρων Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs και Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs προστέθηκε δοξυκυκλίνη για 0, 2, 5 και 10 ημέρες, ώστε να μελετηθεί η παραγωγή της πρωτεΐνης σε βάθος χρόνου. Στις Εικόνες 3.6 και 3.9 φαίνεται πως μετά από πέντε ημέρες καλλιέργειας με δοξυκυκλίνη (D5), ο φθορισμός των κυττάρων είναι διάχυτος και πολύ έντονος και στους δύο κυτταρικούς τύπους, με ευδιάκριτη παρουσία κυκλικών φθοριζόντων κυστιδίων. Οι δομές αυτές ίσως είναι κυστίδια ή πρώιμα ολιγομερή που σχηματίζονται αυθόρμητα λόγω της συσσώρευσης της παθολογικής πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα. Δεδομένου όμως πως τα σωματίδια Lewy αποτελούνται

από α-συνουκλεΐνη, έχουν διάμετρο 5-25μm, εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και διαθέτουν μορφή στεφανιού (Duffy & Tennyson, 1965), (Spillantini et al., 1998), θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως ίσως να είναι αυτά που ανιχνεύονται. Λαμβάνοντας επίσης υπόψιν ότι στα νευρικά βλαστοκύτταρα παράγεται ενδογενώς η φυσιολογική α-συνουκλεΐνη, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο λόγος αύξησης της διαμέτρου είναι η στρατολόγηση και η πρόσδεση και των δύο μορφών της πρωτεΐνης στα κυστίδια (Henrich et al., 2018). Όπως φαίνεται στα γραφήματα, σε αυτό το χρονικό σημείο καταγράφεται η μέγιστη συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Μέχρι τις 10 ημέρες καλλιέργειας με δοξουκυκλίνη (D10) η συγκέντρωση της έχει μειωθεί και στους δύο κυτταρικούς τύπους, αλλά πιο έντονα στα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs. Όντως στις εικόνες μικροσκοπίου ο φθορισμός έχει μειωθεί, ενώ διαφορές παρατηρούνται και στις δομές της YFP-SNCA A53T. Στα Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs η διάμετρός τους έχει μειωθεί και ο αριθμός ανά κύτταρο είναι πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με του D5. Αντίστοιχα, στα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs η διάμετρος των κυστιδίων μειώνεται, ενώ ο αριθμός τους ανά κύτταρο αυξάνεται. Το κοινό μοτίβο που παρατηρείται στις δύο κυτταρικές σειρές ίσως οφείλεται στην ανάπτυξη δυνάμεων μεταξύ των πρώιμων δομών της YFP-SNCA A53T, που σταδιακά τις ωθούν να σχηματίσουν μικρότερα, πυκνότερα και πιο σταθερά κυστίδια. Από την άλλη, τα κύτταρα αυτά διαθέτουν βλαστικές ιδιότητες, οι οποίες τους προσδίδουν αυξημένη ανθεκτικότητα σε στρες, άμεση επιδιόρθωση των κυτταρικών επιπλοκών και υψηλά επίπεδα επιβίωσης σε δυσμενείς συνθήκες. Έτσι, ίσως η συσσώρευση της παθολογικής πρωτεΐνης και ο σχηματισμός αφύσικων δομών επάγει την ενεργοποίηση προστατευτικών μηχανισμών για την αποικοδόμηση και τη διάλυσή τους. Ο λόγος που η μείωση στα νευρικά βλαστοκύτταρα είναι μεγαλύτερη από αυτή των μεσεγχυματικών μπορεί να είναι η ύπαρξη κάποιου πιο εξειδικευμένου μηχανισμού στα πρώτα ή υψηλότερης ευαισθησίας στην α-συνουκλεΐνη, μιας και είναι ο κυτταρικός τύπος που παράγει φυσιολογικά την πρωτεΐνη. Παρ' όλ' αυτά, η απομάκρυνση των κυστιδίων και γενικότερα της YFP-SNCA A53T δεν είναι πλήρης. Κάτι τέτοιο ίσως συμβαίνει επειδή οι προστατευτικές πρωτεΐνες δεν μπορούν να προσδεθούν εύκολα στην παθολογική πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα να ξεφεύγει από αποικοδόμηση (Choubey et al., 2011), (Roberts & Brown, 2015), (Mehra et al., 2019). Θα μπορούσε όμως να υπάρχει κάποιος μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης που να ενεργοποιείται μόλις η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ξεπεράσει ένα κατώφλι, παρεμποδίζοντας την περαιτέρω παραγωγή της. Μέχρι όμως να γίνει κάτι τέτοιο τα κυστίδια έχουν ήδη σχηματιστεί και προκαλέσει τοξικότητα (Gallastegui et al., 2018). Μία άλλη εξήγηση είναι η απέκκρισή της πρωτεΐνης, καθώς σύμφωνα με πρόσφατα ευρήματα η α-συνουκλεΐνη μπορεί να εξωκυτταρωθεί και να μολύνει γειτονικά κύτταρα (Recasens & Dehay, 2014), (Ghosh et al., 2017).

Μετά από επαγωγή της παραγωγής της YFP-SNCA A53T στα Tet-On YFP-SNCA A53T MSCs και Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs, τα θρεπτικά μέσα των κυττάρων (DMEMx και

Sm⁺x αντίστοιχα) αναλύθηκαν και φάνηκε πως περιέχουν την πρωτεΐνη. Ειδικότερα, υπολογίστηκε η συγκέντρωση της YFP-SNCA A53T εντός κι εκτός των κυττάρων και το αποτέλεσμα έδειξε πως εκκρίνεται περισσότερο από το 80% της παραγόμενης πρωτεΐνης και από τους δύο κυτταρικούς τύπους (87,4% και 84,9% αντίστοιχα) (Εικόνα 3.12). Οι ενδείξεις αυτές επιβεβαιώνουν την άποψη πως η α-συνουκλειΐνη μπορεί να εξωκυτταρωθεί και μάλιστα σε πολύ μεγάλο βαθμό. Το γεγονός πως παρατηρείται παρόμοιο ποσοστό απέκκρισης σε δύο αρκετά διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους ίσως δηλώνει πως δεν υπάρχει κάποιος εξειδικευμένος μηχανισμός εξωκυττάρωσής της, όπως για παράδειγμα κάποιος ειδικός μεταφορέας. Καθώς η α-συνουκλειΐνη φυσιολογικά προσδένεται σε λιπιδικές μεμβράνες, ίσως χρησιμοποιεί την λιπόφιλη ιδιότητά της για να εξέλθει εύκολα και γρήγορα από το κύτταρο.

Τα θρεπτικά αυτά μέσα χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί η «μόλυνση» γενετικά μη τροποποιημένων κυττάρων MSCs και smNPCs από την παθολογική πρωτεΐνη. Κάθε θρεπτικό χορηγήθηκε και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Η ανάλυση των κυττάρων έδειξε πως όντως περιέχουν την YFP-SNCA A53T, είτε καλλιεργούνται με το δικό τους θρεπτικό είτε με ετερόλογο (Εικόνα 3.13). Έτσι, οι κυτταρικοί μας τύποι επιβεβαιώνουν τα ευρήματα πως η α-συνουκλειΐνη μπορεί να ενδοκυτταρωθεί σε κύτταρα που δεν την παράγουν και να διασπείρει τον παθολογικό φαινότυπο (Desplats et al., 2009), (Volpicelli-daley et al., 2011). Η πρωτεΐνη όμως μπορεί να εισέλθει το ίδιο αποδοτικά και στους δύο κυτταρικούς τύπους, που είναι αρκετά διαφορετικοί μεταξύ τους. Κάτι τέτοιο δηλώνει πως δεν υπάρχει κάποιος εξειδικευμένος μηχανισμός ενδοκυττάρωσης, όπως ένας μεμβρανικός υποδοχέας ή πρωτεϊνικός μεταφορέας. Επιπλέον σημαίνει πως η διασπορά του παθολογικού φαινοτύπου μπορεί να γίνει προς διάφορους κυτταρικούς τύπους και όχι μόνο προς ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Συγκεκριμένα, μπορεί να γίνει μεταξύ νευρικών κυττάρων (χορήγηση Sm⁺x σε smNPCs) επιβεβαιώνοντας τη θεωρία εξάπλωσης των σωματίων Lewy στους νευρικούς πληθυσμούς του εγκεφάλου (Braak et al., 2004). Σύμφωνα με αυτή, η πρωτεΐνη μολύνει διάφορους τύπους νευρώνων και αστροκυττάρων, οδηγώντας σε πρόκληση νευροφλεγμονής και επιδείνωση του παθολογικού φαινοτύπου. Επιπλέον μπορεί να εισέλθει σε μη νευρικά κύτταρα (χορήγηση DMEMx σε MSCs), όπως είναι τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα. Τελευταία αναπτύσσεται η άποψη πως η νόσος του Πάρκινσον ξεκινά από το έντερο και εξαπλώνεται προς τον εγκέφαλο μέσω του πνευμονογαστρεντερικού νεύρου (Gershanik, 2018). Δεδομένου πως τα εντερικά κύτταρα προέρχονται από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (Pinchuk et al., 2010) η παρατήρησή μας αυξάνει το ενδιαφέρον για αυτό το ενδεχόμενο. Επιπλέον, και οι δύο κυτταρικοί τύποι μπορούν να ενδοκυτταρώσουν την YFP-SNCA A53T ακόμη και αν εκτεθούν σε διαφορετικά περιβάλλοντα (χορήγηση DMEMx σε smNPCs και Sm⁺x σε MSCs). Η ένδειξη αυτή υποστηρίζει την υπόθεση πως η παθολογική πρωτεΐνη μπορεί να μεταδίδεται από έναν κυτταρικό τύπο σε άλλον. Ιδιαίτερα,

αποδεικνύεται πως οι νευρώνες εισάγουν την πρωτεΐνη ακόμη και όταν εκτεθούν σε διαφορετικό περιβάλλον, αφήνοντας πιθανό το ενδεχόμενο «μόλυνσης» των νευρώνων από την παθολογική πρωτεΐνη στο εντερικό περιβάλλον και εξάπλωσής της προς του υπόλοιπους νευρικούς πληθυσμούς του εγκεφάλου.

4.3 Κυτταρικές αποκρίσεις στην υπερέκφραση της α -συνουκλεΐνης A53T

Τα Tet-On YFP-SNCA A53T χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των κυτταρικών αποκρίσεων τους μετά από υπερέκφραση του παθολογικού γονιδίου. Αρχικά εξετάστηκε η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα της Εικόνας 3.10, από την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας με δοξουκυκλίνη αρχίζει η μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας. Σταδιακά η μείωση κλιμακώνεται και ήδη από την πέμπτη ημέρα σημειώνεται σημαντική διαφορά σε σχέση με αντίστοιχα κύτταρα που δεν υπερπαραγάγουν την πρωτεΐνη. Μέχρι τη δέκατη μέρα η μεταβολική δραστηριότητα έχει εξασθενήσει κατά 51%. Η μείωση αυτή ίσως οφείλεται στη συσσώρευση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που αυξάνει το κυτταρικό στρες και μειώνει την απόδοση των κυττάρων. Είναι γνωστό όμως πως η α -συνουκλεΐνη προσδένεται στο εσωτερικό των μιτοχονδριακών μεμβρανών απορρυθμίζοντας τη δράση των ενζύμων κι έτσι μειώνεται η απόδοση των οργανιδίων (Devil et al., 2008). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί πως η υπερέκφραση της α -συνουκλεΐνης A53T σε ζωικά μοντέλα προκαλεί μείωση του αριθμού μιτοχονδρίων κατά 70% και μείωση της ταχύτητας λειτουργίας τους κατά 15% (L. Li et al., 2013). Η κυτταρική μας σειρά επιβεβαιώνει αυτά τα αποτελέσματα και εκδηλώνει όμοιο παθολογικό φαινότυπο.

Επιπλέον, μελετήθηκε η δράση της YFP-SNCA A53T στην επαγωγή κυτταρικού θανάτου στα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs που έχουν καλλιιεργηθεί χωρίς και με δοξουκυκλίνη έως 10 ημέρες. Οι κασπάσες είναι ένζυμα, τα οποία προϋπάρχουν σε ανενεργή μορφή μέσα στο κύτταρο. Κατά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ενεργοποιούνται και διμερίζονται σε δύο υπομονάδες, τη μεγάλη (17kDa) και τη μικρή (~12kDa). Αυτές διαμορφώνουν το ενεργό ένζυμο, που καταλύει την πρωτεόλυση διάφορων πρωτεϊνών-στόχων (Yigong Shi, 2004). Ένας τέτοιος στόχος είναι και η πρωτεΐνη PARP1, που σε περίπτωση αποπτωτικού θανάτου διασπάται στην καταλυτική υπομονάδα 89kDa και σε ένα θραύσμα 24kDa. Σε νευρολογικές ασθένειες όπως το Αλτσχάιμερ και το Πάρκινσον, η παρουσία θραυσμένης PARP1 είναι πολύ έντονη (Chaitanya et al., 2010). Τα κύτταρα όντως περιέχουν τα θραύσματα και των δύο πρωτεϊνών, επαληθεύοντας την έντονη παθολογία που προκαλεί η πρωτεΐνη. Οι αναλύσεις που απεικονίζονται στα γραφήματα της Εικόνας 3.11 δείχνουν σημαντική αύξηση των θραυσμάτων από την πέμπτη ημέρα παρουσίας της δοξουκυκλίνης στην καλλιέργεια, όταν δηλαδή είχε σημειωθεί και η μέγιστη συγκέντρωση της YFP-SNCA A53T στα κύτταρα. Η αύξηση κλιμακώνεται μέχρι την δέκατη ημέρα παρόλο που

η ποσότητα της πρωτεΐνης μειώνεται. Η θραύση του PARP1 είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς μέχρι το τελικό χρονικό σημείο σχεδόν το 60% της συνολικής πρωτεΐνης έχει διασπαστεί. Κάτι τέτοιο μπορεί να συμβαίνει επειδή ο προστατευτικός μηχανισμός δεν έχει προλάβει να σταματήσει. Από την άλλη μπορεί τα κύτταρα να έχουν υποστεί ανεπανόρθωτες βλάβες, αδυνατώντας να τερματίσουν την πρόοδο του κυτταρικού θανάτου και την γειτονική σηματοδότηση για απόπτωση. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με παρατηρήσεις προηγούμενων ερευνών και επισημαίνουν την τοξικότητα που μπορεί να υποστούν τα νευρικά κύτταρα μετά από συσσώρευση της α -συνουκλεΐνης.

4.4 Υπερέκφραση της α -συνουκλεΐνης A53T και αποκρίσεις των διαφοροποιημένων νευρικών κυττάρων

Η δράση της YFP-SNCA A53T μελετήθηκε και σε διαφοροποιημένα κύτταρα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs (Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs diff) . Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 15 ημέρες σε θρεπτικό υλικό απουσία των μικρών μορίων (small molecules) που ευθύνονται για τη διατήρηση του βλαστικού φαινοτύπου (Reinhardt et al., 2013). Σε αντίθεση με των Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs, τα διαφοροποιημένα κύτταρα παράγουν τους μάρτυρες νευρώνων MAP2 και αστροκυττάρων GFAP (Εικόνα 3.14). Παράλληλα όμως είναι θετική και η χρώση για τη νεστίνη. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην πολύ αργή αρνητική ρύθμιση (down regulation) του γονιδίου του μάρτυρα κατά τη διαφοροποίηση, που οδηγεί σε παραγωγή της πρωτεΐνης σε πολλά στάδια της ανάπτυξης της εγκεφάλου (Lothian et al., 1999), (Messam et al., 2000). Παρ' όλ' αυτά, οι μορφολογικές διαφορές μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων είναι πολύ έντονες, με τα διαφοροποιημένα να εμφανίζουν το χαρακτηριστικό φαινότυπο νευρώνων και κυττάρων γλοίας. Οι αλλαγές αυτές εκδηλώθηκαν μόλις 15 ημέρες μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης, χρονικό διάστημα σημαντικά μειωμένο σε σχέση με άλλων κυτταρικών μοντέλων (Sundberg et al., 2011), (Hoveizi et al., 2017), (Lin, 2015).

Για την έκφραση της YFP-SNCA A53T σε διαφοροποιημένα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs προστέθηκε δοξυκυκλίνη 2 και 5 ημέρες πριν το τελικό χρονικό σημείο διαφοροποίησης (13^η και 15^η ημέρα διαφοροποίησης, αντίστοιχα). Η πρωτεΐνη παράγεται επιτυχώς και σε αυτόν τον κυτταρικό τύπο, με περισσότερη από δεκαπλάσια αύξηση της συγκέντρωσής της (Εικόνα 3.15). Στα δείγματα που έχει προστεθεί φαίνεται πως η YFP-SNCA A53T και σε μικρότερα μοριακά βάρη. Οι ζώνες αυτές φαίνονται μόνο στα δείγματα κυττάρων που υπερεκφράζουν την YFP-SNCA A53T, ενώ όχι σε εκείνο που εκφράζουν ασθενώς την πρωτεΐνη χωρίς προσθήκη δοξυκυκλίνης (Εικόνα 3.15B). Ίσως η συσσώρευση της παθολογικής πρωτεΐνης στο κύτταρο να επάγει την έναρξη κάποιου προστατευτικού μηχανισμού, που οδηγεί σε αποικοδόμησή της και σχηματισμό των επιμέρους θραυσμάτων.

Όντως, στις εικόνες φθορίζουσας μικροσκοπίας, που χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για την α -συνουκλεΐνη, το σήμα δεν είναι τόσο έντονο όσο θα περιμέναμε με βάση το ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Πιθανώς μια ποσότητα της YFP-SNCA A53T κόβεται σε επιμέρους τμήματα που δεν αναγνωρίζονται από το αντίσωμα, με αποτέλεσμα να μη λαμβάνεται το αναμενόμενο σήμα. Εάν ληφθούν υπόψιν και οι ζώνες που ανιχνεύονται σε μικρότερα μοριακά βάρη, τότε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι 20 φορές υψηλότερη από το αρνητικό δείγμα (0d), όμως μόνο η μισή ποσότητα από αυτή είναι λειτουργική YFP-SNCA A53T. Το ενδεχόμενο αυτό θα μπορούσε να εξακριβωθεί και με ανοσοανίχνευση με αντίσωμα ειδικό για την α -συνουκλεΐνη.

Η επαγωγή του μονοπατιού απόπτωσης μελετήθηκε και σε διαφοροποιημένα Tet-On YFP-SNCA A53T smNPCs που έχουν καλλιεργηθεί χωρίς και με δοξουκυκλίνη για 2 ή 5 ημέρες. Όπως και προηγουμένως, εξετάστηκε η κασπάση 3 και η PARP1. Η θραυσμένη κασπάση 3-7 ανιχνεύτηκε και πάλι στα κύτταρα, όμως προϋπάρχει σε ήδη υψηλή συγκέντρωση στα κύτταρα που δεν έχει γίνει επαγωγή της έκφρασης του παθολογικού γονιδίου. Αντίστοιχα για την PARP1, παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση σε κύτταρα καλλιέργειας χωρίς δοξουκυκλίνη (Εικόνα 3.16B). Η συγκέντρωση υπερδιπλασιάζεται μέχρι την δεύτερη ημέρα καλλιέργειας με την ουσία, ενώ μετά αρχίζει να φθίνει. Ίσως η ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και η θραύση του PARP1 να μην είναι ειδικό αποτέλεσμα της υπερέκφρασης της YFP-SNCA A53T στα διαφοροποιημένα κύτταρα, αλλά να οφείλεται στη διαδικασία διαφοροποίησης. Είναι πιθανό το ενδεχόμενο ενεργοποίησης ενός διαφορετικού προστατευτικού μηχανισμού στα διαφοροποιημένα απ' ό,τι στα βλαστικά κύτταρα (Vekrellis et al., 2009).

4.5 Μελλοντική έρευνα

Η διαφοροποίηση των πρόδρομων νευρικών βλαστοκυττάρων προσδίδει τη δυνατότητα μελέτης της ασθένειας του Πάρκινσον σε ένα πιο εξειδικευμένο κυτταρικό μοντέλο. Συγκεκριμένα, προβλέπεται η ανάλυση του νευρωνικού φαινοτύπου μετά από υπερέκφραση της παθολογικής πρωτεΐνης, δηλαδή η μέτρηση του μήκους και πάχους του νευράξονα, του μεγέθους του σώματος και του αριθμού των νευρικών απολήξεων κάθε νευρώνα. Επιπλέον, σημαντικό δεδομένο για το ενδεχόμενο επαγωγής νευροφλεγμονής θα ήταν η μέτρηση του αριθμού των αστροκυττάρων χωρίς και με επαγωγή της παραγωγής της α -συνουκλεΐνης A53T. Όσον αφορά τις κυτταρικές αποκρίσεις, θα μπορούσε να μελετηθεί η ενεργοποίηση κάποιου άλλου προστατευτικού μηχανισμού, όπως για παράδειγμα της κασπάσης 9, καθώς και κάποιου δείκτη ανοσολογικής απόκρισης.

Βιβλιογραφία

5. Βιβλιογραφία

1. Al-Ali, H., Blackmore, M., Bixby, J. L., & Lemmon, V. P. (2004). High Content Screening with Primary Neurons. *Assay Guidance Manual*, *Md*, 1–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24260776>
2. Barker, R. A., Barrett, J., Mason, S. L., & Björklund, A. (2013). Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson's disease Early clinical trials. *The Lancet Neurology*, *12*(1), 84–91. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70295-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70295-8)
3. Bartels, T., Choi, J. G., & Selkoe, D. J. (2011). α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*, *477*(7362), 107–111. <https://doi.org/10.1038/nature10324>
4. Beitz, J. M. (2014). Parkinson's disease: a review. *Frontiers in Bioscience*, *6*(3), 65–74. <https://doi.org/10.2741/s415>
5. Bellou, V., Belbasis, L., Tzoulaki, I., Evangelou, E., & Ioannidis, J. P. A. (2016). Environmental risk factors and Parkinson's disease: An umbrella review of meta-analyses. *Parkinsonism and Related Disorders*, *23*(2015), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.12.008>
6. Benabid, A. L. (2010). Gene therapy for Parkinson's disease : do we have the cure ? *The Lancet Neurology*, *9*(12), 1142–1143. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70256-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70256-8)
7. Bendor, J. T., Logan, T. P., & Edwards, R. H. (2013). The function of α -synuclein. *Neuron*, *79*(6), 1044–1066. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.004>
8. Bilic, J., & Izpisua Belmonte, J. C. (2012). Concise review: Induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: Close enough or yet too far apart? *Stem Cells*, *30*(1), 33–41. <https://doi.org/10.1002/stem.700>
9. Bové, J., & Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, *211*, 51–76. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057>
10. Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research*, *318*(1), 121–134. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0956-9>
11. Brás, I. C., Tenreiro, S., Silva, A. M., & Outeiro, T. F. (2018). Identification of novel protein phosphatases as modifiers of alpha-synuclein aggregation in yeast. *FEMS Yeast Research*, *18*(8), 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy108>
12. Brennand, K. J., Simone, A., Jou, J., Burkhart, C. G., Tran, N., Sangar, S., Li, Y., Mu, Y., Chen, G., Yu, D., McCarthy, S., Sebat, J., & Gage, F. H. (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, *479*(7374), 556. <https://doi.org/10.1038/nature10603>
13. Caceres, A., Mautino, J., & Kosik, K. S. (1992). Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron*, *9*(4), 607–618. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90025-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90025-9)
14. Chaitanya, G. V., Alexander, J. S., & Babu, P. P. (2010). PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling*, *8*(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-31>
15. Chang, D., Nalls, M. A., Hallgrímsdóttir, I. B., Hunkapiller, J., Brug, M. van der, Cai, F., Kerchner, G. A., Ayalon, G., Bingol, B., Sheng, M., Hinds, D., Behrens, T. W., Singleton, A. B., Bhangale, T. R., & Graham, R. R. (2017). A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci. *Nature Genetics*, *49*(10), 1511–1516. <https://doi.org/10.1038/ng.3955>
16. Chen, L., Xie, Z., Turkson, S., & Zhuang, X. (2015). A53T human α -synuclein overexpression in transgenic mice induces pervasive mitochondria macroautophagy defects preceding dopamine neuron degeneration. *Journal of Neuroscience*, *35*(3), 890–905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0089-14.2015>
17. Cheng, B., Martinez, A. A., Morado, J., Scofield, V., Roberts, J. L., & Maffi, S. K. (2013). Retinoic acid protects against proteasome inhibition associated cell death in SH-SY5Y cells via the AKT pathway. *Neurochemistry International*, *62*(1), 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.10.014>
18. Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan,

- G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., Khvorostov, I., Ott, V., Grunstein, M., Lavon, N., Benvenisty, N., Croce, C. M., Clark, A. T., Baxter, T., Pyle, A. D., ... Lowry, W. E. (2009). Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. *Cell Stem Cell*, 5(1), 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.008>
19. Choubey, V., Safiulina, D., Vaarmann, A., Cagalinec, M., Wareski, P., Kuum, M., Zharkovsky, A., & Kaasik, A. (2011). Mutant A53T α -Synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10814–10824. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.132514>
 20. Chu, Y., & Kordower, J. H. (2010). Lewy body pathology in fetal grafts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1184, 55–67. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05229.x>
 21. Chun, Y. S., Byun, K., & Lee, B. (2011). Induced pluripotent stem cells and personalized medicine: current progress and future perspectives. *Anatomy & Cell Biology*, 44(4), 245. <https://doi.org/10.5115/acb.2011.44.4.245>
 22. Chung, C. Y., Koprach, J. B., Siddiqi, H., & Isacson, O. (2009). Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV α -synucleinopathy. *Journal of Neuroscience*, 29(11), 3365–3373. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5427-08.2009>
 23. Cotzias, G., Papavasiliou, P., & Gellene, R. (1969). Modification of parkinsonism - chronic treatment with L-DOPA. *Journal of Medicine*, 280, 337–345.
 24. De Lázaro, I., Yilmazer, A., & Kostarelos, K. (2014). Induced pluripotent stem (iPS) cells: A new source for cell-based therapeutics? *Journal of Controlled Release*, 185(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.011>
 25. Delenclos, M., Burgess, J. D., Lamprokostopoulou, A., Outeiro, T. F., Vekrellis, K., & McLean, P. J. (2019). Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation. *Journal of Neurochemistry*, 150(5), 566–576. <https://doi.org/10.1111/jnc.14806>
 26. Desplats, P., Lee, H. J., Bae, E. J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., & Lee, S. J. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 13010–13015. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903691106>
 27. Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9089–9100. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710012200>
 28. Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., Wichterle, H., Henderson, C. E., & Eggan, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321(5893), 1218–1221. <https://doi.org/10.1126/science.1158799>
 29. Dominici, M., Blanc, K. Le, Mueller, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells . The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
 30. Duffy, P., & Tennyson, V. (1965). Phase and electron microscopic observations of Lewy Bodies and melanin granules in the substantia nigra and locus caeruleus in Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 24(3), 398–414. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/00005072-196507000-00003>
 31. Ebert, A. D., Yu, J., Rose, F. F., Mattis, V. B., Lorson, C. L., Thomson, J. A., & Svendsen, C. N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 457(7227), 277–280. <https://doi.org/10.1038/nature07677>
 32. Edwards, T. G., & Bloom, D. C. (2019). Lund Human Mesencephalic (LUHMES) Neuronal Cell Line Supports Herpes Simplex Virus 1 Latency In Vitro . *Journal of Virology*, 93(6), 1–14. <https://doi.org/10.1128/jvi.02210-18>
 33. Egger, D., Tripisciano, C., Weber, V., Dominici, M., & Kasper, C. (2018). Dynamic Cultivation of Mesenchymal Stem Cell Aggregates. *Bioengineering*, 5(48), 1–15. <https://doi.org/10.3390/bioengineering5020048>

34. Emamzadeh, F. N. (2016). Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *Journal of Research in Medical Sciences*, 21(2). <https://doi.org/10.4103/1735-1995.181989>
35. Emborg, M. E. (2007). *Nonhuman Primate Models of Parkinson's Disease*. 48(4), 339–355. <https://doi.org/10.1093/ilar.48.4.339>
36. Engelhardt, E., & Gomes, M. da M. (2017). Lewy and his inclusion bodies: Discovery and rejection. *Dementia & Neuropsychologia*, 11(2), 198–201. <https://doi.org/10.1590/1980-57642016dn11-020012>
37. Fahn, S. (2003). Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 991, 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1749-66322003.tb07458.x>
38. Fakhree, M. A. A., Zijlstra, N., Raiss, C. C., Siero, C. J., Grabmayr, H., Bausch, A. R., Blum, C., & Claessens, M. M. A. E. (2016). The number of α -synuclein proteins per vesicle gives insights into its physiological function. *Scientific Reports*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep30658>
39. Falkenburger, B. H., Saridaki, T., & Dinter, E. (2016). Cellular models for Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 139, 121–130. <https://doi.org/10.1111/jnc.13618>
40. Falkenburger, B. H., & Schulz, J. B. (2006). Limitations of cellular models in Parkinson's disease research. *Journal of Neural Transmission, Supplement*, 70, 261–268. https://doi.org/10.1007/978-3-211-45295-0_40
41. Ferreon, A. C. M., Gambin, Y., Lemke, E. A., & Deniz, A. A. (2009). Interplay of α -synuclein binding and conformational switching probed by single-molecule fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5645–5650. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809232106>
42. Fleming, J., Outeiro, T. F., Slack, M., Lindquist, S. L., & Bulawa, C. E. (2008). Detection of Compounds That Rescue Rab1-Synuclein Toxicity. *Methods in Enzymology*, 439(07), 339–351. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)00425-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)00425-9)
43. Freed, C. R., Breeze, R. E., Rosenberg, N. L., & Ansary, A. (1992). Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine*, 327(19), 1360–1365.
44. Freed, C. R., Breeze, R. E., Rosenberg, N. L., Schneck, S. A., Wells, T. H., Barrett, J. N., Grafton, S. T., Huang, S. C., Eidelberg, D., & Rottenberg, D. A. (1990). Transplantation of Human Fetal Dopamine Cells for Parkinson's Disease: Results at 1 Year. *Archives of Neurology*, 47(5), 505–512. <https://doi.org/10.1001/archneur.1990.00530050021007>
45. Freed, C. R., Greene, P., Breeze, R., Tsai, W.-Y., DuMouchel, W., & Fahn, S. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 344(10), 710–719. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103083441002>
46. Fu, Y.-S., Cheng, Y.-C., & Sung, M.-S. (2006). Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly to Dopaminergic Neurons In Vitro: Potential Therapeutic Application for Parkinsonism. *Stem Cells*, 24, 115–124. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0053>
47. Gallastegui, E., Domuro, C., Serratos, J., Larrioux, A., Martinez, J., Besson, A., & Morante-redolat, J. M. (2018). p27kip1 regulates alpha-synuclein expression. *Oncotarget*, 9(23), 16368–16379. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24687>
48. Gaven, F., Marin, P., & Claeys, S. (2014). Primary culture of mouse dopaminergic neurons. *Journal of Visualized Experiments*, 91, 1–11. <https://doi.org/10.3791/51751>
49. Gershanik, O. S. (2018). Does Parkinson's disease start in the gut? *Acta Neuropathologica*, 76(2), 67–70. <https://doi.org/10.1590/0004-282x20170188>
50. Ghosh, D., Mehra, S., Sahay, S., Singh, P. K., & Maji, S. K. (2017). A-Synuclein Aggregation and Its Modulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 100, 37–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.021>
51. Gai Via, A., Frizziero, A., & Oliva, F. (2012). Biological properties of mesenchymal stem cells from different sources. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, 2(3), 154–162.
52. Glicksman, M. A. (2018). Induced Pluripotent Stem Cells: The Most Versatile Source for Stem Cell Therapy. *Clinical Therapeutics*, 40(7), 1060–1065. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2018.06.004>
53. Golbe, L. I., Di Iorio, G., Sanges, G., Lazzarini, A. M., La Sala, S., Bonavita, V., & Duvoisin, R. C. (1996). Clinical genetic analysis of Parkinson's disease in the Contursi kindred. *Annals of Neurology*, 40(5), 767–775. <https://doi.org/10.1002/ana.410400513>
54. Haase, A., Olmer, R., Schwanke, K., Wunderlich, S., Merkert, S., Hess, C., Zweigerdt, R.,

- Gruh, I., Meyer, J., Wagner, S., Maier, L. S., Han, D. W., Glage, S., Miller, K., Fischer, P., Schöler, H. R., & Martin, U. (2009). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Cord Blood. *Cell Stem Cell*, 5(4), 434–441. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.08.021>
55. Hassink, G. C., Raiss, C. C., Segers-Nolten, I. M. J., Van Wezel, R. J. A., Subramaniam, V., Le Feber, J., & Claessens, M. M. A. E. (2018). Exogenous α -synuclein hinders synaptic communication in cultured cortical primary rat neurons. *PLoS ONE*, 13(3), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193763>
 56. Hendrickson, M. L., Rao, A. J., Demerdash, O. N. A., & Kalil, R. E. (2011). Expression of nestin by neural cells in the adult rat and human brain. *PLoS ONE*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018535>
 57. Henrich, M. T., Geibl, F. F., Lee, B., Chiu, W. H., Koprach, J. B., Brotchie, J. M., Timmermann, L., Decher, N., Matschke, L. A., & Oertel, W. H. (2018). A53T- α -synuclein overexpression in murine locus coeruleus induces Parkinson's disease-like pathology in neurons and glia. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0541-1>
 58. Hernandez, D. G., Reed, X., & Singleton, A. B. (2016). Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance. *Journal of Neurochemistry*, 139(Suppl 1), 59–74. <https://doi.org/10.1111/jnc.13593>
 59. Hima Bindu, A., & Srilatha, B. (2011). Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, 01(03), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000115>
 60. Hoveizi, E., Ebrahimi-Barough, S., Tavakol, S., & Sanamiri, K. (2017). In Vitro Differentiation of Human iPS Cells into Neural like Cells on a Biomimetic Polyurea. *Molecular Neurobiology*, 54(1), 601–607. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9663-7>
 61. Hu, X., Mao, C., Fan, L., Luo, H., Hu, Z., Zhang, S., Yang, Z., Zheng, H., Sun, H., Fan, Y., Yang, J., Shi, C., & Xu, Y. (2020). Modeling Parkinson's Disease Using Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1061470>
 62. Hudecek, M., & Ivics, Z. (2018). Non-viral therapeutic cell engineering with the Sleeping Beauty transposon system. *Current Opinion in Genetics and Development*, 52, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2018.06.003>
 63. Hughes, J. A., Daniel, S., Blankson, S., & Lees, A. J. (2016). *Clinicopathologic Study of 100 Cases of Parkinson's Disease*. 2, 140–148. <https://doi.org/10.1001/archneur.1993.00540020018011>
 64. Israel, M. A., Yuan, S. H., Bardy, C., Reyna, S. M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M. P., Van Gorp, S., Nazor, K. L., Boscolo, F. S., Carson, C. T., Laurent, L. C., Marsala, M., Gage, F. H., Remes, A. M., Koo, E. H., & Goldstein, L. S. B. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482(7384), 216–220. <https://doi.org/10.1038/nature10821>
 65. Jao, C. C., Der-Sarkissian, A., Chent, J., & Langen, R. (2004). Structure of membrane-bound α -synuclein studied by site-directed spin labelling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(22), 8331–8336. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400553101>
 66. Joerger-Messerli, M. S., Marx, C., Oppliger, B., Mueller, M., Surbek, D. V., & Schoeberlein, A. (2016). Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly and Amniotic Fluid. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 31, 30–44. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.07.006>
 67. K. Batsali, A., Kastrinaki, M.-C., A. Papadaki, H., & Pontikoglou, C. (2013). Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly of the Umbilical Cord: Biological Properties and Emerging Clinical Applications. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 8(2), 144–155. <https://doi.org/10.2174/1574888x11308020005>
 68. Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G. G., Demiralp, D. Ö., Tukun, A., Uckan, D., & Can, A. (2007). Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells*, 25(2), 319–331. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0286>
 69. Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 39(1), 31–59.

- <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>
70. Kleinknecht, A., Popova, B., Lázaro, D. F., Pinho, R., Valerius, O., Outeiro, T. F., & Braus, G. H. (2016). C-Terminal Tyrosine Residue Modifications Modulate the Protective Phosphorylation of Serine 129 of α -Synuclein in a Yeast Model of Parkinson's Disease. *PLoS Genetics*, *12*(6), 1–39. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006098>
 71. Kochanek, K. D., Murphy, S. L., Xu, J., & Arias, E. (2019). *Deaths: Final Data for 2017*. *68*(9). <https://www.cdc.gov/nchs/products/index.htm>.
 72. Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Olanow, C. W., & Freeman, T. B. (2008). Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: A second case report. *Movement Disorders*, *23*(16), 2303–2306. <https://doi.org/10.1002/mds.22369>
 73. Kordower, J. H., Emborg, M. E., Bloch, J., Shuang, Y., Leventhal, L., McBride, J., Chen, E., Palfi, S., Roitberg, B. Z., Douglas, W., Taylor, M. D., Carvey, P., Ling, Z., Trono, D., Hantraye, P., & Deglon, N. (2000). *Neurodegeneration prevented by Lentiviral Vector Delivery of DGNF in Primate Models of Parkinson's Disease*. *290*(October).
 74. Lázaro, D. F., Dias, M. C., Carija, A., Navarro, S., Madaleno, C. S., Tenreiro, S., Ventura, S., & Outeiro, T. F. (2016). The effects of the novel A53E alpha-synuclein mutation on its oligomerization and aggregation. *Acta Neuropathologica Communications*, *4*(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0402-8>
 75. Lázaro, D. F., Pavlou, M. A. S., & Outeiro, T. F. (2017). Cellular models as tools for the study of the role of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, *298*, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.05.007>
 76. Lázaro, D. F., Rodrigues, E. F., Langohr, R., Shahpasandzadeh, H., Ribeiro, T., Guerreiro, P., Gerhardt, E., Kröhnert, K., Klucken, J., Pereira, M. D., Popova, B., Kruse, N., Mollenhauer, B., Rizzoli, S. O., Braus, G. H., Danzer, K. M., & Outeiro, T. F. (2014). Systematic Comparison of the Effects of Alpha-synuclein Mutations on Its Oligomerization and Aggregation. *PLoS Genetics*, *10*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004741>
 77. Lee, G., Papapetrou, E. P., Kim, H., Chambers, S. M., Tomishima, M. J., Fasano, C. A., Ganat, Y. M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., Tabar, V., Sadelain, M., & Studer, L. (2009). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*, *461*(7262), 402–406. <https://doi.org/10.1038/nature08320>
 78. Lee, H. J., Suk, J. E., Patrick, C., Bae, E. J., Cho, J. H., Rho, S., Hwang, D., Masliah, E., & Lee, S. J. (2010). Direct transfer of α -synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(12), 9262–9272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.081125>
 79. Lewitt, P. A. (2009). Levodopa therapeutics for Parkinson's disease: new developments. *Parkinsonism and Related Disorders*, *15*, S31–S34. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70009-4](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70009-4)
 80. Li, J. Y., Englund, E., Holton, J. L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A. J., Lashley, T., Quinn, N. P., Rehncrona, S., Björklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O., & Brundin, P. (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nature Medicine*, *14*(5), 501–503. <https://doi.org/10.1038/nm1746>
 81. Li, L., Nadanaciva, S., Berger, Z., Shen, W., Paumier, K., Schwartz, J., Mou, K., Loos, P., Milici, A. J., Dunlop, J., & Hirst, W. D. (2013). Human A53T α -synuclein causes reversible deficits in mitochondrial function and dynamics in primary mouse cortical neurons. *PLoS ONE*, *8*(12), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085815>
 82. Lin, L. (2015). In Vitro Differentiation of Human Neural Progenitor Cells Into Striatal GABAergic Neurons. *Stem Cells Translational Medicine*, *4*, 775–788.
 83. Lotharius, J., Falsig, J., Van Beek, J., Payne, S., Dringen, R., Brundin, P., & Leist, M. (2005). Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress is dependent on the mixed-lineage kinase pathway. *Journal of Neuroscience*, *25*(27), 6329–6342. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1746-05.2005>
 84. Lothian, C., Prakash, N., Lendahl, U., & Wahlstro, G. M. (1999). Identification of Both General and Region-Specific Embryonic CNS Enhancer Elements in the Nestin Promoter. *Experimental Cell Research*, *248*, 509–519. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4417>
 85. Markopoulou, K., Dickson, D. W., McComb, R. D., Wszolek, Z. K., Katechlidou, L., Avery, L., Stansbury, M. S., & Chase, B. A. (2008). Clinical, neuropathological and

- genotypic variability in SNCA A53T familial Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, 116(1), 25–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0372-4>
86. Markopoulou, K., Wszolek, Z. K., & Pfeiffer, R. F. (1995). A Greek-American kindred with autosomal dominant, levodopa-responsive parkinsonism and anticipation. *Annals of Neurology*, 38(3), 373–378. <https://doi.org/10.1002/ana.410380306>
 87. Marks, W., Bartus, R. T., Siff, J., Davis, C. S., Lozano, A., Boulis, N., Vitek, J., Stacy, M., & Turner, D. (2010). *Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson ' s disease : a double-blind , randomised , controlled trial*. 4422(March 2019). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70254-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70254-4)
 88. Martin, T. F. J., & Grishanin, R. N. (2003). PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells. *Methods in Cell Biology*, 2003(71), 267–286. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(03\)01012-4](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(03)01012-4)
 89. Mbefo, M. K., Fares, M. B., Paleologou, K., Oueslati, A., Yin, G., Tenreiro, S., Pinto, M., Outeiro, T., Zweckstetter, M., Masliah, E., & Lashuel, H. A. (2015). Parkinson disease mutant E46K enhances α -synuclein phosphorylation in mammalian cell lines, in yeast, and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 290(15), 9412–9427. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.610774>
 90. Mehra, S., Sahay, S., & Maji, S. K. (2019). α -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1867(10), 890–908. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.03.001>
 91. Menezes, R., Tenreiro, S., Macedo, D., Santos, C. N., & Outeiro, T. F. (2015). From the baker to the bedside: Yeast models of parkinson's disease. *Microbial Cell*, 2(8), 262–279. <https://doi.org/10.15698/mic2015.08.219>
 92. Mertens, J., & Gage, F. H. (2018). Aging in a dish. *Annu Rev Genet*, 52, 271–293. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
 93. Messam, C. A., Hou, J., & Major, E. O. (2000). Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CNS defined by a human-specific anti-nestin antibody. *Experimental Neurology*, 161(2), 585–596. <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7319>
 94. Michell, A. W., Barker, R. A., Raha-Chowdhury, R., & Raha, S. K. (2005). A case of late onset sporadic Parkinson's disease with an A53T mutation in α -synuclein [1]. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 76(4), 596–597. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.046425>
 95. Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93(3), 421–443. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>
 96. Mitchell, K., Weiss, M., & Troyer, D. (2003). *Matrix Cells from Wharton's Jelly Form Neurons and Glia*. 21, 50–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1634/stemcells.21-1-50>
 97. Moree, B., Yin, G., Lázaro, D. F., Munari, F., Strohäker, T., Giller, K., Becker, S., Outeiro, T. F., Zweckstetter, M., & Salafsky, J. (2015). Small molecules detected by second-harmonic generation modulate the conformation of monomeric α -synuclein and reduce its aggregation in cells. *Journal of Biological Chemistry*, 290(46), 27582–27593. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.636027>
 98. Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2000). Synucleins Are Developmentally Expressed, and alpha -Synuclein Regulates the Size of the Presynaptic Vesicular Pool in Primary Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience*, 20(9), 3214–3220. <http://www.jneurosci.org/cgi/content/abstract/20/9/3214>
 99. Nalls, M. A., Pankratz, N., Lill, C. M., Do, C. B., Hernandez, D. G., Saad, M., Destefano, A. L., Kara, E., Bras, J., Sharma, M., Schulte, C., Keller, M. F., Arepalli, S., Letson, C., Edsall, C., Stefansson, H., Liu, X., Pliner, H., Lee, J. H., ... Singleton, A. B. (2014). Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nature Genetics*, 46(9), 989–993. <https://doi.org/10.1038/ng.3043>
 100. Nuber, S., Harmuth, F., Kohl, Z., Adame, A., Trejo, M., Schönig, K., Zimmermann, F., Bauer, C., Casadei, N., Giel, C., Calaminus, C., Pichler, B. J., Jensen, P. H., Müller, C. P., Amato, D., Kornhuber, J., Teismann, P., Yamakado, H., Takahashi, R., ... Riess, O. (2013). A progressive dopaminergic phenotype associated with neurotoxic conversion of α -synuclein in BAC-transgenic rats. *Brain*, 136(2), 412–432. <https://doi.org/10.1093/brain/aws358>
 101. Olanow, C. W., & Brundin, P. (2013). Parkinson's Disease and Alpha Synuclein:

- Is Parkinson's Disease a Prion-Like Disorder? *Movement Disorders*, 28(1), 31–40. <https://doi.org/10.1002/mds.25373>
102. Olanow, C. W., Goetz, C. G., Kordower, J. H., Stoessl, A. J., Sossi, V., Brin, M. F., Shannon, K. M., Nauert, G. M., Perl, D. P., Godbold, J., & Freeman, T. B. (2003). *Double-blind Controlled Trial of Bilateral Fetal Nigral Transplantation in Parkinson's Disease*. 403–414.
 103. Outeiro, T. F., & Lindquist, S. G. (2003). Yeast Cells Provide Insight into Alpha-Synuclein Biology and Pathobiology. *Science*, 302(5651), 1772–1775. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>. Investigations
 104. Paumier, K. L., Sukoff Rizzo, S. J., Berger, Z., Chen, Y., Gonzales, C., Kaftan, E., Li, L., Lotarski, S., Monaghan, M., Shen, W., Stolyar, P., Vasilyev, D., Zaleska, M., D. Hirst, W., & Dunlop, J. (2013). Behavioral Characterization of A53T Mice Reveals Early and Late Stage Deficits Related to Parkinson's Disease. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070274>
 105. Peng, J., Wang, Y., Zhang, L., Zhao, B., Zhao, Z., Chen, J., Guo, Q., Liu, S., Sui, X., Xu, W., & Lu, S. (2011). Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells differentiate into a Schwann-cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Brain Research Bulletin*, 84(3), 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.12.013>
 106. Pinchuk, I. V., Mifflin, R. C., Saada, J. I., & Powell, D. W. (2010). Intestinal mesenchymal cells. *Current Gastroenterology Reports*, 12(5), 310–318. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0135-y>
 107. Pollack, A. E. (2001). Anatomy, physiology, and pharmacology of the basal ganglia. *Neurologic Clinics*, 19(3), 523–534. [https://doi.org/10.1016/S0733-8619\(05\)70032-3](https://doi.org/10.1016/S0733-8619(05)70032-3)
 108. Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321), 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>
 109. Puschmann, A., Ross, O. A., Vilariño-Güell, C., Lincoln, S. J., Kachergus, J. M., Cobb, S. A., Lindquist, S. G., Nielsen, J. E., Wszolek, Z. K., Farrer, M., Widner, H., van Westen, D., Hägerström, D., Markopoulou, K., Chase, B. A., Nilsson, K., Reimer, J., & Nilsson, C. (2009). A Swedish family with de novo α -synuclein A53T mutation: Evidence for early cortical dysfunction. *Parkinsonism and Related Disorders*, 15(9), 627–632. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2009.06.007>
 110. Recasens, A., & Dehay, B. (2014). Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(DEC), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00159>
 111. Reinhardt, P., Glatza, M., Hemmer, K., Tsytsyura, Y., Thiel, C. S., Höing, S., Moritz, S., Parga, J. A., Wagner, L., Bruder, J. M., Wu, G., Schmid, B., Röpke, A., Klingauf, J., Schwamborn, J. C., Gasser, T., Schöler, H. R., & Sternecker, J. (2013). Derivation and Expansion Using Only Small Molecules of Human Neural Progenitors for Neurodegenerative Disease Modeling. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059252>
 112. Robert, A., Weiss, R., Dahlke, M. H., Robert, A., & Weiss, R. (2019). *Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs*. 10(June), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01191>
 113. Roberts, H. L., & Brown, D. R. (2015). Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric α -synuclein. *Biomolecules*, 5(2), 282–305. <https://doi.org/10.3390/biom5020282>
 114. Robinton, D. A., & Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481(7381), 295–305. <https://doi.org/10.1038/nature10761>
 115. Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., Kawaguchi, T., Tsunoda, T., Watanabe, M., Takeda, A., Tomiyama, H., Nakashima, K., Hasegawa, K., Obata, F., Yoshikawa, T., Kawakami, H., Sakoda, S., Yamamoto, M., Hattori, N., ... Toda, T. (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four

- loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nature Genetics*, 41(12), 1303–1307. <https://doi.org/10.1038/ng.485>
116. Savica, R., Cannon-Albright, L. A., & Pulst, S. (2016). Familial aggregation of Parkinson disease in Utah. *Neurology: Genetics*, 2(2), 1–6. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000065>
 117. Schlachetzki, J. C. M., Saliba, S. W., & de Oliveira, A. C. P. (2013). Studying neurodegenerative diseases in culture models. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35(SUPPL.2), 92–100. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1159>
 118. Shahpasandzadeh, H., Popova, B., Kleinknecht, A., Fraser, P. E., Outeiro, T. F., & Braus, G. H. (2014). Interplay between sumoylation and phosphorylation for protection against α -synuclein inclusions. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 31224–31240. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.559237>
 119. Shen, T., Pu, J., Zheng, T., & Zhang, B. (2015). Induced neural stem/precursor cells for fundamental studies and potential application in neurodegenerative diseases. *Neuroscience Bulletin*, 31(5), 589–600. <https://doi.org/10.1007/s12264-015-1527-z>
 120. Shi, Yichen, Kirwan, P., Smith, J., Maclean, G., Orkin, S. H., & Livesey, F. J. (2014). A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in Down syndrome. 4(124). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003771.A>
 121. Shi, Yigong. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. *Protein Science*, 13(8), 1979–1987. <https://doi.org/10.1110/ps.04789804>
 122. Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Bras, J. M., Sharma, M., Gibbs, J. R., Berg, D., Paisan-Ruiz, C., Lichtner, P., Scholz, S. W., Hernandez, D. G., Krüger, R., Federoff, M., Klein, C., Goate, A., Perlmutter, J., Bonin, M., Nalls, M. A., Illig, T., Gieger, C., ... Gasser, T. (2009). Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nature Genetics*, 41(12), 1308–1312. <https://doi.org/10.1038/ng.487>
 123. Singh, V. K., Kalsan, M., Kumar, N., Saini, A., & Chandra, R. (2015). Induced pluripotent stem cells: Applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(FEB), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00002>
 124. Snyder, J. S., Choe, J. S., Clifford, M. A., Jeurling, S. I., Hurley, P., Brown, A., Kamhi, J. F., & Cameron, H. A. (2009). Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *Journal of Neuroscience*, 29(46), 14484–14495. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1768-09.2009>
 125. Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G. W., Cook, E. G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Isacson, O., & Jaenisch, R. (2009). *Parkinson's Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Free of Viral Reprogramming Factors*. 136(5), 964–977. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.013.Parkinson>
 126. Song, B., Sun, G., Herszfeld, D., Sylvain, A., Campanale, N. V., Hirst, C. E., Caine, S., Parkington, H. C., Tonta, M. A., Coleman, H. A., Short, M., Ricardo, S. D., Reubinoff, B., & Bernard, C. C. A. (2012). Neural differentiation of patient specific iPS cells as a novel approach to study the pathophysiology of multiple sclerosis. *Stem Cell Research*, 8(2), 259–273. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2011.12.001>
 127. Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998). α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6469–6473. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6469>
 128. Spillantini, Schmidt, Lee, Trojanowski, Jakes, & Goedert. (1997). α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388, 839–840. <https://www.nature.com/articles/42166.pdf>
 129. Spira, P. J., Sharpe, D. M., Halliday, G., Cavanagh, J., & Nicholson, G. A. (2001). Clinical and pathological features of a Parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr α -synuclein mutation. *Annals of Neurology*, 49(3), 313–319. <https://doi.org/10.1002/ana.67>
 130. Stefanis, L. (2012). α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2), 1–23. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>
 131. Stefanis, L., Larsen, K. E., Rideout, H. J., Sulzer, D., & Greene, L. A. (2001). Expression of A53T mutant but not wild-type α -synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release,

- and autophagic cell death. *Journal of Neuroscience*, 21(24), 9549–9560. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-24-09549.2001>
132. Su, L. J., Auluck, P. K., Outeiro, T. F., Yeger-Lotem, E., Kritzer, J. A., Tardiff, D. F., Strathearn, K. E., Liu, F., Cao, S., Hamamichi, S., Hill, K. J., Caldwell, K. A., Bell, G. W., Fraenkel, E., Cooper, A. A., Caldwell, G. A., Michael McCaffery, J., Rochet, J. C., & Lindquist, S. (2010). Compounds from an unbiased chemical screen reverse both ER-to-Golgi trafficking defects and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease models. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 3(3–4), 194–208. <https://doi.org/10.1242/dmm.004267>
 133. Sundberg, M., Andersson, P. H., Kesson, E. A., Odeberg, J., Holmberg, L., Inzunza, J., Falci, S., Öhman, J., Suuronen, R., Skottman, H., Lehtimäki, K., Hovatta, O., Narkilahti, S., & Sundström, E. (2011). Markers of Pluripotency and Differentiation in Human Neural Precursor Cells Derived From Embryonic Stem Cells and CNS Tissue. *Cell Transplantation*, 20(2), 177–191. <https://doi.org/10.3727/096368910X527266>
 134. Sveinbjornsdottir, S., Hicks, A., Jonsson, T., & Stefansson, K. (2000). FAMILIAL AGGREGATION OF PARKINSON'S DISEASE IN ICELAND. *The New England Journal of Medicine*, 343(24), 1765–1770. <https://doi.org/10.1056/NEJM200012143432404>
 135. T. Das, A., Tenenbaum, L., & Berkhout, B. (2016). Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Current Gene Therapy*, 16(3), 156–167. <https://doi.org/10.2174/1566523216666160524144041>
 136. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
 137. Tambasco, N., Nigro, P., Romoli, M., Prontera, P., Simoni, S., & Calabresi, P. (2016). A53T in a parkinsonian family: a clinical update of the SNCA phenotypes. *Journal of Neural Transmission*, 123(11), 1301–1307. <https://doi.org/10.1007/s00702-016-1578-6>
 138. Tang, B. (2018). Patient-Derived iPSCs and iNs—Shedding New Light on the Cellular Etiology of Neurodegenerative Diseases. *Cells*, 7(5), 38. <https://doi.org/10.3390/cells7050038>
 139. Tenreiro, S., Eckermann, K., & Outeiro, T. F. (2014). Protein phosphorylation in neurodegeneration: Friend or foe? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7(MAY), 1–30. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00042>
 140. Tenreiro, S., Franssens, V., Winderickx, J., & Outeiro, T. F. (2017). Yeast models of Parkinson's disease-associated molecular pathologies. *Current Opinion in Genetics and Development*, 44, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.01.013>
 141. Tenreiro, S., & Outeiro, T. F. (2010). Simple is good: Yeast models of neurodegeneration. *FEMS Yeast Research*, 10(8), 970–979. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00649.x>
 142. Thanvi, B., Lo, N., & Robinson, T. (2007). *Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: clinical features, pathogenesis, prevention and treatment*. 384–388. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.054759>
 143. Tonges, L., Szego, É. M., Hause, P., Saal, K. A., Tatenhorst, L., Koch, J. C., D'Hedouville, Z., Dambeck, V., Kügler, S., Dohm, C. P., Bañhr, M., & Lingor, P. (2014). Alpha-synuclein mutations impair axonal regeneration in models of Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(SEP), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00239>
 144. Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35. <https://doi.org/10.1042/BSR20150025>
 145. Ulmer, T. S., Bax, A., Cole, N. B., & Nussbaum, R. L. (2005). Structure and dynamics of micelle-bound human α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9595–9603. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411805200>
 146. Vekrellis, K., Xilouri, M., Emmanouilidou, E., & Stefanis, L. (2009). Inducible over-expression of wild type α -synuclein in human neuronal cells leads to caspase-dependent non-apoptotic death. *Journal of Neurochemistry*, 109(5), 1348–1362. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06054.x>
 147. Vicente Miranda, H., Szego, É. M., Oliveira, L. M. A., Breda, C., Darendelioglu, E., De Oliveira, R. M., Ferreira, D. G., Gomes, M. A., Rott, R., Oliveira, M., Munari, F.,

- Enguita, F. J., Simões, T., Rodrigues, E. F., Heinrich, M., Martins, I. C., Zamolo, I., Riess, O., Cordeiro, C., ... Outeiro, T. F. (2017). Glycation potentiates α -synuclein-associated neurodegeneration in synucleinopathies. *Brain*, *140*(5), 1399–1419. <https://doi.org/10.1093/brain/awx056>
148. Volpicelli-daley, L. a, Luk, K. C., Patel, T. P., Tanik, S. a, Dawn, M., Stieber, A., Meany, D. F., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2011). Exogenous α -Synuclein Fibrils Induce Lewy Body Pathology Leading to Synaptic Dysfunction and Neuron Death. *Neuron*, *72*(1), 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.033>. Exogenous
149. Weissman, I. L., Anderson, D. J., & Gage, F. (2001). STEM AND PROGENITOR CELLS: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Cell and Developmental Biology*, *17*, 387–403. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.54.101601.152334>
150. Westerink, R. H. S., & Ewing, A. G. (2008). The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiol (Oxf)*, *192*(2), 273–285. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
151. Westphal, C. H., & Chandra, S. S. (2013). Monomeric synucleins generate membrane curvature. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(3), 1829–1840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.418871>
152. Wolfgang, H. (1998). Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Progress in Neurobiology*, *56*(5), 507–540. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008298000410>
153. Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. M. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration*, *12*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>
154. Xie, H. R., Hu, L. Sen, & Li, G. Y. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: In vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, *123*(8), 1086–1092. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.08.021>
155. Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, *318*(5858), 1917–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>
156. Zabrocki, P., Bastiaens, I., Delay, C., Bammens, T., Ghillebert, R., Pellens, K., De Virgilio, C., Van Leuven, F., & Winderickx, J. (2008). Phosphorylation, lipid raft interaction and traffic of α -synuclein in a yeast model for Parkinson. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1783*(10), 1767–1780. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.06.010>
157. Zabrocki, P., Pellens, K., Vanhelmont, T., Vandebroek, T., Griffioen, G., Wera, S., Van Leuven, F., & Winderickx, J. (2005). Characterization of α -synuclein aggregation and synergistic toxicity with protein tau in yeast. *FEBS Journal*, *272*(6), 1386–1400. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04571.x>
158. Zhang, Q., Chen, W., Tan, S., & Lin, T. (2017). Stem cells for modeling and therapy of Parkinson's disease. *Human Gene Therapy*, *28*(1), 85–98. <https://doi.org/10.1089/hum.2016.116>
159. Zhang, X. M., Yin, M., & Zhang, M. H. (2014). Cell-based assays for Parkinson's disease using differentiated human LUHMES cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, *35*(7), 945–956. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.36>