



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



Διπλωματική εργασία

ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΩΝ
ΜΕΛΕΤΩΝ ΣΕ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΝΟΣΟ
ΤΟΥ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΑ

Diploma Thesis

COMBINATION OF IMMUNOLOGICAL AND BIOINFORMATICS
STUDIES ON PATHWAYS ASSOCIATED WITH PARKINSON'S
DISEASE IN HUMAN MONOCYTES

Μαρία Γεωργούλα του Αθανασίου
Λάρισα, Σεπτέμβριος, 2023

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Παπουτσοπούλου Σταματία

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αμούτζιας Γρηγόριος

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στη Μικροβιολογία
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ξηρομερήσιου Γεωργία

Αναπληρώτρια καθηγήτρια Νευρολογίας
Τμήμα Ιατρικής,
Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη	6
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή	8
1.1 Η νόσος του Parkinson.....	8
1.2 Στάδια εξέλιξης της νόσου.....	8
1.3 Παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου	10
1.3.1 Εκφυλισμός νευρώνων	10
1.3.2 α-συνουκλεΐνη: Φυσιολογικός ρόλος και Λανθασμένη αναδίπλωση....	11
1.4 Μηχανισμοί παθογένεσης της νόσου του Πάρκινσον	12
1.4.1 Μιτοφαγία και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία.....	12
1.4.2 Οξειδωτικό στρες	13
1.4.3 Νευροφλεγμονή	14
1.4.4 Δυσλειτουργία συστημάτων κάθαρσης	15
1.5 Αιτιολογικοί παράγοντες εκδήλωσης της νόσου	16
1.5.1 Ηλικία	17
1.5.2 Φύλο.....	17
1.5.3 Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	17
1.5.4 Γενετικό υπόβαθρο της νόσου	18
1.6 Θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	19
1.7 Σορτιλίνη : Μέλος της οικογένειας υποδοχέων με VPS10P επικράτεια	20
1.8 Λειτουργία της σορτιλίνης	21
1.9 Συσχέτιση σορτιλίνης και ανοσοποιητικού συστήματος.....	22
1.10 Σορτιλίνη και ασθένειες.....	23
2. Σκοπός της εργασίας.....	24
3. Υλικά και μέθοδοι.....	25

3.1 Κυτταρομετρία ροής	25
3.1.1 Πειραματική διαδικασία.....	25
3.2 Elisa	28
3.3 Ανοσοκυτταροχημεία–Ανοσοφθορισμός	30
4. Αποτελέσματα	31
4.1 Κυτταρομετρία ροής	31
4.1.1 Επίπεδα έκφρασης της σορτιλίνης σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος υγείων και ασθενών με νόσο του Parkinson	31
4.2 Προσδιορισμός διαλυτής σορτιλίνης.....	34
4.3 Ανάπτυξη πρωτόκολλου ανοσοφθορισμού.....	36
4.4 Βιοπληροφορική ανάλυση	39
4.4.1 Υποκυτταρικός και ιστοειδικός εντοπισμός της σορτιλίνης	39
4.4.2 Εντοπισμός πολυμορφισμών στο γονίδιο <i>SORT1</i> και ο συσχετισμός τους με τη νόσο του Parkinson	40
5. Συζήτηση	42
6. Βιβλιογραφία	46

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με το εργαστήριο Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας στο τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα κυρία Παπουτσοπούλου Σταματία, Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για τη σημαντική συμβολή της στην περάτωση της διπλωματικής μου εργασίας καθώς και για τη στήριξη και εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Αμούτζια Γρηγόριο, Αναπληρωτή καθηγητή Βιοπληροφορικής με έμφαση στη Μικροβιολογία στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την καθοδήγηση και τις καίριες επισημάνσεις του όσον αφορά το βιοπληροφορικό κομμάτι της εργασίας.

Ακόμη, ιδιαίτερη μνεία και ευχαριστίες οφείλω στην κυρία Ξηρομερήσιου Γεωργία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Νευρολογίας στο τμήμα Ιατρικής, για τη πολύτιμη συμβολή της μέσω της παροχής των δειγμάτων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στα μέλη του εργαστηρίου Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του τμήματος Ιατρικής και ιδιαίτερα στην τεχνολόγο του εργαστηρίου, κυρία Φουσίκα Αθανασία, για την άριστη συνεργασία.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου και στους φίλους μου που με ενθαρρύνουν και με στηρίζουν σε κάθε βήμα.

Περίληψη

Η νόσος Parkinson (Parkinson's Disease, PD) αποτελεί ένα από τα πιο συχνά νευροεκφυλιστικά νοσήματα που πλήττει κυρίως τις μεγαλύτερες ηλικίες, δηλαδή άτομα άνω των 65 ετών και πρόκειται για μία ασθένεια που χαρακτηρίζεται τόσο από κινητικά όσο και από μη κινητικά συμπτώματα. Ωστόσο υπάρχουν και νεανικές μορφές όπου η εκδήλωσή τους στην πλειοψηφία οφείλεται σε μεταλλάξεις σε γονίδια. Πρόκειται για μία πολυπαραγοντική νόσο ως προς την παθογένεση της η οποία μπορεί να συνδυάζει διάφορους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως επίσης την ηλικία και το φύλο. Τα μοριακά μονοπάτια και οι διεργασίες που επηρεάζονται και εμπλέκονται στην έναρξη και προώθηση αυτής της νόσου είναι αρκετά όπως η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και η μιτοφαγία, το οξειδωτικό στρες και η λανθασμένη αναδίπλωση και συσσώρευση α συνουκλεΐνης. Αυτά τα χαρακτηριστικά ωθούν στην εμφάνιση των κύριων γνωρισμάτων της νόσου του Parkinson που είναι ο διαδοχικός εκφυλισμός ντοπαμινεργικών νευρώνων που προεκβάλλουν από την συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας στο ραβδωτό σώμα και από συσσωματώματα πλούσια σε α-συνουκλεΐνη.

Η σορτιλίνη μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I, μέλος της οικογένειας υποδοχέων με VPS10P (Vacuolar Protein Sorting 10 Protein) επικράτεια, ερευνάται τα τελευταία χρόνια με στόχο τη συσχέτιση της με τη νόσο του Parkinson. Η οικογένεια αυτή των υποδοχέων περιέχει 5 μέλη όπου κοινό γνώρισμα τους είναι η VPS10P επικράτεια που βρίσκεται στην N τελική περιοχή. Η συγκεκριμένη επικράτεια δίνει τη δυνατότητα μεταγωγής σήματος και ενδοκυτταρικής μετακίνησης και ταξινόμησης των πρωτεϊνών.

Στη παρούσα πτυχιακή εργασία μελετώνται τα επίπεδα έκφρασης της σορτιλίνης σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και σε ορό από ασθενείς με νόσο Parkinson και υγιείς. Επίσης γίνονται προσπάθειες οπτικοποίησης της πρωτεΐνης σε κύτταρα. Ακόμη, με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής διερευνώνται τα επίπεδα έκφρασης της σορτιλίνης σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο όπως και η πιθανότητα εντοπισμού πολυμορφισμών στο γονίδιο *SORT1* που την κωδικοποιεί οι οποίες μπορούν να συσχετίσουν τη σορτιλίνη με τη νόσο.

Abstract

Parkinson's Disease is one of the most common neurodegenerative diseases that mainly affects older people, for example, people over 65 years of age and is a disease characterized by both motor and non-motor symptoms. However, there are also juvenile forms where the majority of their manifestation is due to mutations in genes. It is a multifactorial disease in its pathogenesis that can combine various genetic and environmental factors as well as age and gender. The molecular pathways and processes that are affected and involved in the initiation and promotion of this disease are several such as mitochondrial dysfunction and mitophagy, oxidative stress and misfolding and accumulation of α -synuclein. These features give rise to the main characteristics of Parkinson's Disease, which are the sequential degeneration of dopaminergic neurons projecting from the substantia nigra pars compacta to the striatum and from alpha-synuclein rich aggregates.

Sortilin, a type I transmembrane glycoprotein, a member of the VPS10P (Vacuolar Protein Sorting 10 Protein) family of receptors, has been investigated in recent years with the aim of linking it to Parkinson's disease. The family of these receptors consists of 5 members that their common feature is the VPS10P domain located in the N-terminal region. This domain enables signal transduction, intracellular trafficking and sorting of proteins.

In the present thesis the expression levels of sortilin in immune cells and serum from patients suffering from Parkinson's disease and healthy individuals are studied. Efforts are also being made to visualize the protein in cells. Furthermore, bioinformatics is being used to investigate the expression levels of sortilin at the transcriptional and protein level, as well as investigate the possibility of identifying polymorphisms in the SORT1 gene that encodes this protein, which may correlate sortilin with the disease.

1. Εισαγωγή

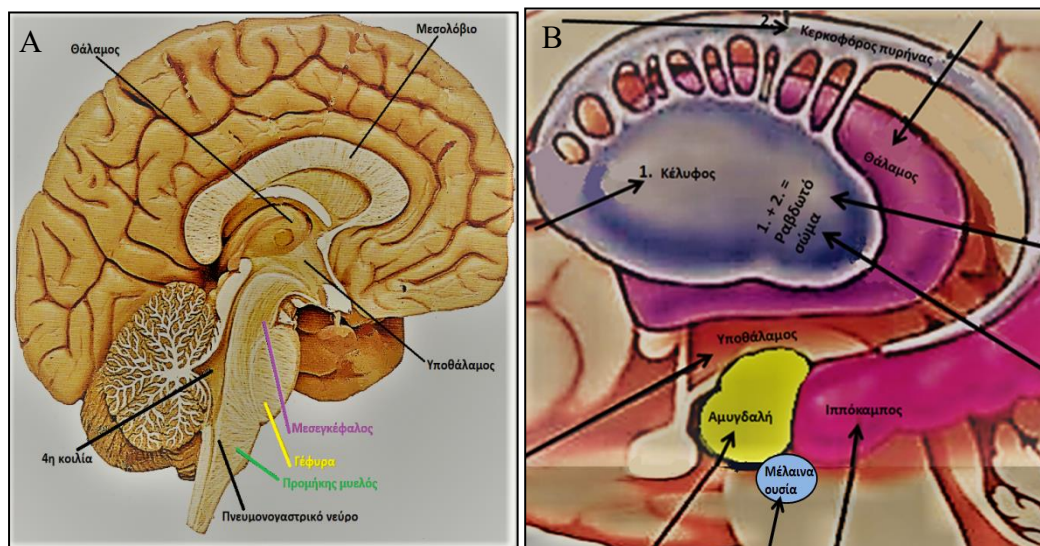
1.1 Η νόσος του Parkinson

Η νόσος του Parkinson (Parkinson's disease – PD) είναι μια προοδευτική νευρολογική διαταραχή που περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1817 από τον Άγγλο γιατρό James Parkinson [1]. Χαρακτηρίζεται από διαδοχικό εκφυλισμό ντοπαμινεργικών νευρώνων που προεκβάλλουν από την συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (Substantia Nigra, SNc) στο ραβδωτό σώμα, από εγκλείσματα πλούσια σε α-συνουκλεΐνη (alpha synuclein, a-syn) τα λεγόμενα σωμάτια Lewy (Lewy bodies) και από νευροφλεγμονή [2]. Η νόσος είναι μία από τις πιο συχνές νευροεκφυλιστικές ασθένειες που εμφανίζονται στον ανθρώπινο πληθυσμό μετά τη νόσο Alzheimer, με επικρατέστερες τις ηλικίες άνω των 65 ετών [1]. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της νόσου του Parkinson είναι η τεράστια ετερογένεια των συμπτωμάτων καθώς εμφανίζει τόσο κινητικά όσο και μη κινητικά συμπτώματα. Πιο συγκεκριμένα, ο κυτταρικός θάνατος των ντοπαμινεργικών νευρώνων έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη απελευθέρωση ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα επηρεάζοντας έτσι την ομαλή σηματοδότηση, οδηγώντας στην απώλεια ελέγχου των κινήσεων των μυών και με πιο χαρακτηριστικά κινητικά συμπτώματα τον τρόμο, τη βραδυκίνησια δηλαδή τη βραδύτητα στην έναρξη και την εκτέλεση εκούσιων κινήσεων, τις διαταραχές της στάσης και βάδισης και τη μυϊκή δυσκαμψία. Ωστόσο, ακόμη και αρκετό καιρό πριν την εκδήλωση των πρώτων κινητικών συμπτωμάτων αλλά και μετέπειτα, εμφανίζονται ορισμένα μη κινητικά συμπτώματα όπως οι διαταραχές ύπνου, η δυσκοιλιότητα, η ψύχωση, η δυσλειτουργία του ουροποιητικού συστήματος και η κατάθλιψη [3].

1.2 Στάδια εξέλιξης της νόσου

Οι επιστήμονες κατατάσσουν την εξέλιξη της νόσου σε έξι στάδια με βάση την περιοχή του εγκεφάλου που προσβάλλεται [4]. Έτσι, στα πρώιμα ή προ συμπτωματικά στάδια και συγκεκριμένα στο πρώτο και στο δεύτερο τα νευροπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά της νόσου περιορίζονται κυρίως στον προμήκη μυελό και επίσης εντοπίζονται στην πρόσθια οσφρητική περιοχή, στον οσφρητικό βολβό και στον ραχιαίο πυρήνα του πνευμονογαστρικού νεύρου (**Εικόνα 1**). Καθώς εξελίσσεται η νόσος, επηρεάζεται ο υπομέλας τόπος της γέφυρας και στο τρίτο και τέταρτο στάδιο ουσιαστικά η νόσος δεν επεκτείνεται μόνο στην γέφυρα αλλά και στον μεσεγκέφαλο όπου περιλαμβάνεται και η μέλαινα ουσία. Στο τελικό στάδιο, οι αλλοιώσεις από τη

νόσο αφορούν πλέον τον τελεγκέφαλο και δομές του κροταφικού λοβού όπως και τον νεοφλοιό [5,6].



Εικόνα 1: Αναπαράσταση περιοχών εγκεφάλου. Α Γενικότερη εικόνα ορισμένων περιοχών του εγκεφάλου. Β. Εστίαση στα βασικά γάγγλια.

Η σταδιοποίηση της ασθένειας είναι δύσκολη και παρουσιάζει αρκετά προβλήματα αφού δεν εμφανίζουν όλοι οι ασθενείς τα ίδια συμπτώματα και την ίδια πρόοδο στην ασθένεια. Πολλοί βέβαια χρησιμοποιούν την κλίμακα Hoehn και Yahr για να περιγράψουν την πρόοδο της νόσου, η οποία κυρίως εστιάζει στα κινητικά συμπτώματα και τα κατηγοριοποιεί σε πέντε στάδια [7]:

Πίνακας 1: Παρατίθενται τα πέντε στάδια της νόσου του Parkinson με βάση την κλίμακα Hoehn και Yahr και τα βασικά χαρακτηριστικά κάθε σταδίου [8].

Αριθμός σταδίου	Βασικά χαρακτηριστικά σταδίου
Πρώτο στάδιο	<ul style="list-style-type: none"> Αποτελεί την πιο ήπια μορφή της νόσου Τα κινητικά συμπτώματα περιορίζονται στην μία πλευρά του σώματος
Δεύτερο στάδιο	<ul style="list-style-type: none"> Εκδήλωση τρόμου και αλλαγές στις εκφράσεις του προσώπου Τα συμπτώματα παρατηρούνται και στις δύο πλευρές του σώματος
Τρίτο στάδιο	<ul style="list-style-type: none"> Συχνές πτώσεις, πολύ αργές κινήσεις, έντονα προβλήματα ισορροπίας

Τέταρτο στάδιο	<ul style="list-style-type: none"> • Απαραίτητη η χρήση βοηθητικών μέσων αφού οι κινήσεις και οι αντιδράσεις των μυών ελαττώνονται σημαντικά
Πέμπτο στάδιο	<ul style="list-style-type: none"> • Αναγκαία η βοήθεια επί εικοσιτετραώρου βάσης • Αδυναμία πραγματοποίησης βασικών κινήσεων • Πιθανή εμφάνιση σύγχυσης και ψευδαισθήσεων

Ωστόσο πριν την εμφάνιση των κινητικών συμπτωμάτων, οι ασθενείς με νόσο Parkinson μπορεί να εμφανίζουν ένα εύρος μη κινητικών συμπτωμάτων. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν οδήγησαν στο συμπέρασμα πως ορισμένοι ασθενείς με Parkinson πριν διαγνωσθούν με την νόσο μπορεί να εμφανίζουν τόσο συναισθηματικές διαταραχές όσο και διαταραχές στην όσφρηση γεγονός που επιβεβαιώνεται από το ότι η συγκεκριμένη περιοχή είναι από τις πρώτες που προσβάλλονται, όπως επίσης προβλήματα δυσκοιλιότητας και ύπνου [9].

1.3 Παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου

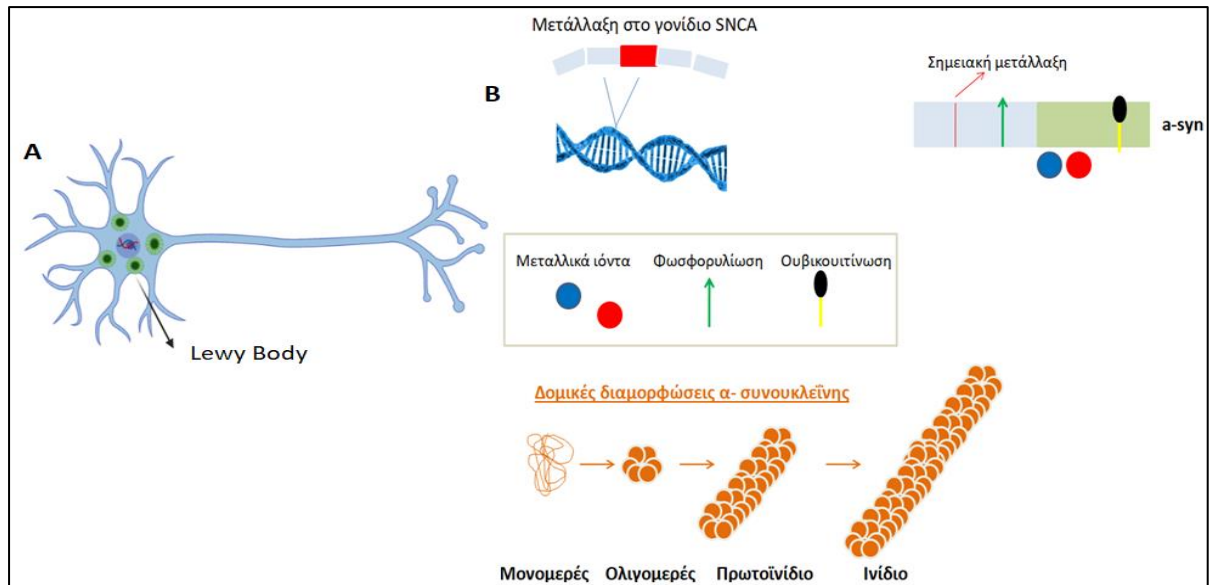
1.3.1 Εκφυλισμός νευρώνων

Η νόσος Parkinson αποτελεί την πιο κοινή διαταραχή που προσβάλλει τα βασικά γάγγλια. Τα βασικά γάγγλια περιέχουν πέντε πυρήνες με εκτεταμένες διασυνδέσεις : τον κερκοφόρο πυρήνα και το κέλυφος που ονομάζονται νεοραβδωτό ή ραβδωτό σώμα, τον υποθαλάμιο πυρήνα, την ωχρή σφαίρα και τη μέλαινα ουσία. Όπως είναι ήδη γνωστό τα βασικά γάγγλια συμβάλλουν στη ρύθμιση της κινητικής λειτουργίας [10]. Επομένως νόσοι των βασικών γαγγλίων όπως είναι και το Parkinson προκαλούν μια σειρά κινητικών ανωμαλιών όπως είναι οι μη φυσιολογικές ακούσιες κινήσεις, η απώλεια των αυτόνομων κινήσεων και οι διαταραχές της στάσης. Ένα από τα κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά αυτής της νόσου είναι ο σταδιακός θάνατος των ντοπαμινεργικών κυττάρων της μέλαινας ουσίας που έχει ως αποτέλεσμα τον εκφυλισμό των απολήξεων που εκκρίνουν την ντοπαμίνη. Η ντοπαμίνη βέβαια με τη μείωση της αυτή μπορεί να επηρεάσει και άλλες λειτουργίες του εγκεφάλου όπως είναι το αίσθημα της ευχαρίστησης και της ανταμοιβής, η μνήμη, οι γνωστικές λειτουργίες αποδεικνύοντας έτσι ότι η νόσος του Parkinson χαρακτηρίζεται και από μη κινητικά συμπτώματα.

1.3.2 α-συνουκλεΐνη: Φυσιολογικός ρόλος και Λανθασμένη αναδίπλωση

Ο φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης (α-syn) δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη. Παρόλα αυτά φαίνεται πως εμπλέκεται σε ορισμένες λειτουργίες όπως για παράδειγμα στην καταστολή της απόπτωσης ντοπαμινεργικών νευρώνων, στην ρύθμιση της βιοσύνθεσης ντοπαμίνης και στη ρύθμιση μετακίνησης κυστιδίων [11,12].

Στην παθογένεση της νόσου του Parkinson διαδραματίζει σημαντικό ρόλο η συσσώρευση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνικών εγκλείστων που αποτελούνται κυρίως από α-συνουκλεΐνη αλλά και από διάφορες άλλες πρωτεΐνες όπως συνφιλίνη, ουβικουιτίνη και παρκίνη, που είναι γνωστά ως σωματίδια Lewy (Lewy bodies). Τα συσσωματώματα αυτά παρατηρούνται στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων που έχουν απομείνει, ενώ εμφανίζονται κυρίως αξονικά ή στους δενδρίτες στην περίπτωση των δυστροφικών νευρώνων (Lewy neuritis), (**Εικόνα 2A**) [13]. Η α-συνουκλεΐνη είναι μία ξεδιπλωμένη και διαλυτή πρωτεΐνη 140 αμινοξέων που εντοπίζεται στα σπονδυλωτά και συγκεκριμένα σε αυξημένες ποσότητες στο κεντρικό νευρικό σύστημα, η οποία μπορεί να αποκτήσει διάφορες δομικές διαμορφώσεις όπως ολιγομερές, μονομερές, ώριμο ινίδιο ή πρωτοϊνίδιο [14]. Αυτό που χαρακτηρίζει τη νόσο και καθιστά την α-συνουκλεΐνη βιοδείκτη της είναι η συσσώρευση μη σωστά αναδιπλωμένης α-συνουκλεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη αποκτά τη δομή β πτυχωτού φύλλου οδηγώντας στον σχηματισμό αδιάλυτων συσσωματωμάτων. Αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαφόρων παραγόντων όπως α) η μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί την α συνουκλεΐνη (SNCA), β) κάποια ένωση που εντοπίζεται σε ορισμένα ζιζανιοκτόνα και φυτοφάρμακα ή μεταλλικά ιόντα που συνιστούν περιβαλλοντικούς παράγοντες (**Εικόνα 2B**) [15].



Εικόνα2:(Α) α-συνουκλεΐνη, σωματία Lewy και **(Β)** Πιθανές δομικές διαμορφώσεις της α συνουκλεΐνης, καθώς και ορισμένοι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες που οφείλονται για την λανθασμένη αναδίπλωσή της.

1.4 Μηχανισμοί παθογένεσης της νόσου του Πάρκινσον

Το γεγονός πως η νόσος του Parkinson αποτελεί την ταχύτερα αναπτυσσόμενη ασθένεια στο σύνολο των νευρολογικών ασθενειών οδήγησε στην ανάγκη ανεύρεσης των μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου. Πολλά μοριακά μονοπάτια και διεργασίες επηρεάζονται και εμπλέκονται στην έναρξη και προώθηση της ασθένειας όπως είναι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και μιτοφαγία, το οξειδωτικό στρες, η νευροφλεγμονή, η λανθασμένη αναδίπλωση και συσσώρευση α συνουκλεΐνης η οποία τελικά αποδείχθηκε ορόσημο της νόσου και η δυσλειτουργία του λυσοσωμικού και πρωτεασωμικού συστήματος.

1.4.1 Μιτοφαγία και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία

Είναι γνωστό πως ένα από τα σημαντικότερα οργανίδια του κυττάρου είναι τα μιτοχόνδρια αφού λειτουργούν ως εργοστάσια παραγωγής ενέργειας [16]. Επίσης, έχει βρεθεί πως σχετίζονται με το γήρας και κατά συνέπεια με την εμφάνιση συνοδών νοσημάτων. Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών διερευνήθηκε η πιθανότητα να εμπλέκονται στην νόσο του Parkinson. Αυτό που διαπιστώθηκε ήταν πως μειωμένα επίπεδα μιτοφαγίας σχετίζονται με την εμφάνιση της ασθένειας. Ειδικότερα, η μιτοφαγία αποτελεί μια μορφή εξειδικευμένης κυτταρικής αυτοφαγίας, συνιστά

δηλαδή έναν συγκεκριμένο τρόπο απομάκρυνσης και εξάλειψης των μη λειτουργικών μιτοχονδρίων, τα οποία όμως την ίδια στιγμή υποκαθίστανται μέσω της μιτοχονδριακής βιογένεσης [17]. Ελάττωση των επιπέδων της λοιπόν σε κύτταρα ασθενών με Parkinson ώθησε σε σταδιακή συσσώρευση κατεστραμμένων μιτοχονδρίων που είναι αποτέλεσμα της εξασθενημένης δράσης της μιτοχονδριακής βιογένεσης και της αδυναμίας απομάκρυνσης των συγκεκριμένων μη λειτουργικών οργανιδίων [18]. Αυτό είναι που ουσιαστικά έχει ως αποτέλεσμα τον θάνατο των νευρικών κυττάρων και συγκεκριμένα των ντοπαμινεργικών και κατ'επέκταση την εμφάνιση του Parkinson.

Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας για την παθογένεση τόσο της κληρονομικής όσο και της σποραδικής μορφής της νόσου είναι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της διαδικασίας της αερόβιας οξειδωτικής φωσφορυλίωσης τα μιτοχόνδρια παράγουν το κύριο ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου, το ATP [19]. Ωστόσο κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, το σύμπλοκο I μαζί με το σύμπλοκο III της αναπνευστικής αλυσίδας συνιστούν τους κύριους παράγοντες σχηματισμού ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) στα μιτοχόνδρια [20]. Οι ενεργές ρίζες οξυγόνου συμβάλλουν σημαντικά στο ενδοκυτταρικό οξειδωτικό στρες δηλαδή στην διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των ROS και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού [21]. Επομένως, είναι φανερό πως η υπερέκφραση των ενεργών ριζών, η οποία μπορεί να προκληθεί από κάποια βλάβη σε ένα εξειδικευμένο μιτοχονδριακό ένζυμο για αυτή την διαδικασία, μπορεί να οδηγήσει σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και κατ'επέκταση σε απόπτωση ή νέκρωση και θάνατο των νευρώνων ντοπαμίνης στη νόσο του Parkinson [22].

1.4.2 Οξειδωτικό στρες

Τα τελευταία χρόνια το γεγονός πως το οξειδωτικό στρες, ως συνέπεια της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, αυξάνεται σε ασθενείς με Parkinson θεωρείται αναμφισβήτητο. Σε φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει ισορροπία μεταξύ των ενεργών ριζών και των αντιοξειδωτικών συστημάτων του οργανισμού. Ωστόσο, ανισορροπία επέρχεται μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Επομένως, είναι φανερό πως μπορεί να προκληθούν οξειδωτικές βλάβες που μπορούν να επηρεάσουν τόσο τα βιομόρια, όσο και τα οργανίδια του κυττάρου και συνολικά το κύτταρο και κατ'

επέκταση τον ίδιο τον οργανισμό αν η παραγωγή των ενεργών ριζών υπερβεί την δυνατότητα λειτουργίας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Οι δραστικές ρίζες οξυγόνου μπορούν να βλάψουν όλα τα κυτταρικά συστατικά όπως DNA, RNA, πρωτεΐνες και λιπίδια, αλλά και να προκαλέσουν ενζυμική αδρανοποίηση [23]. Οι βλάβες που υφίστανται τα βιομόρια των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες είναι υπεύθυνες για τον νευροεκφυλισμό των νευρώνων της μέλαινας ουσίας [24]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα πως το οξειδωτικό στρες παίζει βασικό ρόλο στην παθογένεση του Parkinson αποτελούν τα μειωμένα επίπεδα γλουταθειόνης που αποτελεί ενδογενή αντιοξειδωτικό αμυντικό μηχανισμό, η υπεροξειδωση λιπιδίων και οι οξειδώσεις άλλων βιομορίων στη μέλαινα ουσία παρκινσονικών ατόμων [25].

1.4.3 Νευροφλεγμονή

Είναι κοινά αποδεκτό πως η φλεγμονή του νευρικού συστήματος και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες συμπεριλαμβανομένου και του Parkinson είναι άρρηκτα συνδεδεμένες μεταξύ τους. Επίσης είναι γνωστό πως το νευρικό σύστημα ως πολύπλοκο δίκτυο και συγκεκριμένα το κεντρικό νευρικό σύστημα επιτρέπει στους οργανισμούς να αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον τους με την αδιάκοπη διάδοση σημάτων μεταξύ των νευρώνων. Ο όρος νευροφλεγμονή αναφέρεται σε έναν φυσιολογικό μηχανισμό άμυνας του οργανισμού και ουσιαστικά αποτελεί την διαδικασία κατά την οποία το ανοσοποιητικό σύστημα ενεργοποιείται μετά από ένα φλεγμονώδη προκλητικό παράγοντα, όπως για παράδειγμα μία λοίμωξη με στόχο την προστασία του οργανισμού. Ωστόσο το πρόβλημα επέρχεται όταν παρατηρείται μια παρατεταμένη διαδικασία φλεγμονής στο νευρικό σύστημα, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές βλάβες των νευρώνων και σταδιακό εκφυλισμό του νευρικού συστήματος με αποτέλεσμα την εκδήλωση της νόσου του Parkinson [26].

Ορόσημο της παθογένεσης των νευροεκφυλιστικών ασθενειών αποτελεί και η ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων. Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι τα μακροφάγα του εγκεφάλου και αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού [27]. Τα συγκεκριμένα κύτταρα ενεργοποιούνται μέσα από μία διαδικασία αναγνώρισης παραγόντων όπως είναι η συσσώρευση α συνουκλεΐνης και τα φυτοφάρμακα από ειδικούς υποδοχείς τους Toll-like υποδοχείς (Toll-like receptors, TLRs) [28]. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NFκB, η επαγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η

ιντερλευκίνη 1β (IL-1β), ο παράγοντας νέκρωσης όγκου α (TNF-α) και διάφορες ελεύθερες ρίζες όπως το υπεροξειδίο και το μονοξειδίο του αζώτου [29]. Ωστόσο όπως αναφέρθηκε, η χρόνια φλεγμονή και γενικότερα η αυξημένη συσσώρευση όλων αυτών των παραγόντων επιδρά αρνητικά στους νευρώνες οδηγώντας σε νευροεκφυλισμό [30]. Ουσιαστικά τα ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα παράγουν ένα ευρύ φάσμα φλεγμονωδών και κυτταροτοξικών παραγόντων προκειμένου να προκαλέσουν τον θάνατο των νευρώνων.

1.4.4 Δυσλειτουργία συστημάτων κάθαρσης

Η συσσώρευση μη φυσιολογικών πρωτεϊνών και οργανιδίων στον οργανισμό προκαλεί δυσλειτουργίες τόσο οργανιδίων όσο και κυττάρων και ιστών. Προκειμένου λοιπόν να διατηρείται η ομοιόσταση των κυττάρων και να απομακρύνονται τα δυσλειτουργικά συστατικά, υπάρχουν δύο συστήματα κάθαρσης στον οργανισμό, το σύστημα ουβικιτίνης – πρωτεασώματος (ubiquitin – proteasome system, UPS) και το μονοπάτι αυτοφαγίας – λυσοσώματος (autophagy – lysosome pathway, ALP). Τα τελευταία χρόνια οι επιστήμονες έχουν εστιάσει στο γεγονός πως η ανισορροπία της ομοιόστασης της αυτοφαγίας δρα ως έναυσμα για την εξέλιξη της νόσου του Parkinson. Πράγματι, μεταλλάξεις σε ορισμένα γονίδια που σχετίζονται ή αποτελούν παράγοντες κινδύνου για το Parkinson εμπλέκονται στο μονοπάτι ALP με αποτέλεσμα η διαταραχή αυτή στο μονοπάτι να οδηγεί στη συσσώρευση μη σωστά αναδιπλωμένης α συνουκλεΐνης και γενικότερα ελαττωματικών πρωτεϊνών έχοντας ως επακόλουθο μία σειρά γεγονότων που αποτελούν ενάυσματα του Parkinson [31]. Ορισμένα γονίδια που σχετίζονται τόσο με την αυτοφαγία όσο και με το Parkinson είναι το *GBA*, το *LRRK2* [32] και το *VPS35* [33].

Αξίζει να σημειωθεί πως έχει αποδειχθεί πέρα από την συσχέτιση του μονοπατιού αυτοφαγίας - λυσοσώματος με τη νόσο του Parkinson και η στενή σχέση μεταξύ των δυσλειτουργιών του συστήματος ουβικιτίνης - πρωτεασώματος και της αιτιολογίας του Parkinson. Ειδικότερα, παρόμοια με τα ευρήματα στο μονοπάτι ALP, πολλά γονίδια που σχετίζονται με το σύστημα UPS προκαλούν την κληρονομική μορφή της νόσου και γενικότερα το συγκεκριμένο σύστημα παίζει κρίσιμο ρόλο στον νευροεκφυλισμό [34]. Ουσιαστικά αδυναμία του συστήματος να απομακρύνει τις ανεπιθύμητες πρωτεΐνες έχει ως αποτέλεσμα την διαταραχή της ομοιόστασης των πρωτεϊνών και την συσσώρευση τους, όπως για παράδειγμα της α συνουκλεΐνης, καθιστώντας την βασικό

παράγοντα παθογένεσης της νόσου. Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα βλάβης του συστήματος UPS είναι οι περιπτώσεις απώλειας λειτουργίας της πρωτεΐνης Parkin που αποτελεί μία E3 λιγάση ουβικιτίνης και κωδικοποιείται από το γονίδιο *PARK2* που συνδέεται με τη νόσο του Parkinson όπως επίσης και της καρβοξυτελικής υδρολάσης L1 ουβικιτίνης που είναι ένα ένζυμο το οποίο αφαιρεί μόρια ουβικιτίνης και κωδικοποιείται από το σχετιζόμενο με τη νευροεκφυλιστική νόσο γονίδιο *PARK5* [35].

1.5 Αιτιολογικοί παράγοντες εκδήλωσης της νόσου

Παρόλο που πραγματοποιούνται ολοένα και περισσότερες μελέτες τα τελευταία χρόνια με στόχο τον εντοπισμό των αιτιών εκδήλωσης της νόσου του Parkinson, τα αποτελέσματα δεν είναι τα αναμενόμενα αφού η αιτιολογία είναι άγνωστη για τους περισσότερους ασθενείς. Αυτό που προέκυψε όμως ήταν ότι πρόκειται για μία πολυπαραγοντική ως προς την παθογένεση της νόσο η οποία μπορεί να συνδυάζει διάφορους γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες (Εικόνα 3) και ως επί το πλείστον τη γήρανση [1]. Στην συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, περίπου 85-90%, η νόσος είναι σποραδική και οφείλεται στον συνδυασμό αυτών των παραγόντων. Στον αντίποδα, στην μειοψηφία της, δηλαδή στο 5-10% των περιπτώσεων η νόσος είναι κληρονομική.



Εικόνα 3: Αιτιολογικοί παράγοντες εκδήλωσης της νόσου του Parkinson.

1.5.1 Ηλικία

Ένας από τους κυριότερους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση του Parkinson είναι η ηλικία. Ειδικότερα, η συχνότητα της νόσου αυξάνει με την πάροδο των ετών και σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν τα περισσότερα περιστατικά νόσησης παρατηρούνται σε άτομα που υπερβαίνουν την έκτη δεκαετία της ζωής τους με την πλειονότητα αυτών να εμφανίζονται κυρίως την όγδοη δεκαετία [36]. Ωστόσο η νόσος Parkinson μπορεί να εκδηλωθεί και σε μικρότερες ηλικίες. Αυτή η κατάσταση αντιπροσωπεύει περίπου το 5-10% όλων των περιπτώσεων και εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 60 ετών. Στους νεαρούς πάσχοντες από νόσο Parkinson, νευροανατομικές μελέτες αποδεικνύουν πως η εκδήλωσή της στην πλειοψηφία οφείλεται σε μεταλλάξεις σε γονίδια [37].

1.5.2 Φύλο

Εκτός της ηλικίας και το φύλο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη νόσο του Parkinson. Είναι μια ασθένεια που προσβάλλει συχνότερα τους άνδρες, οι οποίοι επί της ουσίας έχουν περίπου μιάμιση φορά περισσότερες πιθανότητες από τις γυναίκες να εμφανίσουν τη νόσο, αλλά δεν αντιμετωπίζουν την ταχεία εξέλιξη της νόσου και το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας των γυναικών [38]. Επίσης διαφορές παρατηρούνται στην επιδημιολογική και στην κλινική εικόνα των δύο φύλων καθώς εκδηλώνονται χαρακτηριστικά συμπτώματα στις γυναίκες αλλά και διαφορές στις φαρμακολογικές θεραπείες [39]. Πιθανολογείται πως οι διαφορές αυτές οφείλονται στην ευεργετική δράση των γυναικείων ορμονών και συγκεκριμένα των οιστρογόνων καθώς δρουν νευροπροστατευτικά ως προς το ντοπαμινεργικό σύστημα [39].

1.5.3 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Όπως έχει αναφερθεί, το Parkinson είναι μία πολυπαραγοντική νόσος, η εμφάνιση της οποίας μπορεί να βασίζεται και σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και στον τρόπο ζωής του κάθε ατόμου. Στις αρχές της δεκαετίας του '80, μια συνθετική ηρωίνη αποτέλεσε το εναρκτήριο λάκτισμα ώστε να θεωρηθούν ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες υπεύθυνοι για τη νόσο του Parkinson. Η τοξίνη 1-μεθυλ-4-φαινυλ-1,2,3,6-τετραϋδροπυριδίνη ή αλλιώς MPTP ήταν υπεύθυνη για την εκδήλωση της ασθένειας στους εξαρτημένους και αποτελεί μια ένωση που εντοπίζεται σε μερικά ζιζανιοκτόνα και φυτοφάρμακα [1]. Επίσης, άλλοι παράγοντες κινδύνου είναι η έκθεση σε φυτοφάρμακα όπως είναι η ρετινόνη, σε διαλύτες και σε βαρέα μέταλλα όπως για

παράδειγμα στον χαλκό ή στον ψευδάργυρο. Εκτός αυτών άλλοι παράγοντες που έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση της νόσου είναι ο τραυματισμός στο κεφάλι, η κατανάλωση νερού από πηγάδι και γαλακτοκομικών προϊόντων. Ωστόσο, μία σειρά περιβαλλοντικών παραγόντων μπορεί να δράσει προστατευτικά έναντι του Parkinson και σε αυτή περιλαμβάνονται η κατανάλωση καφέ και τσαγιού, το κάπνισμα και η σωματική άσκηση των οποίων όμως οι μηχανισμοί δράσης παραμένουν ακόμη ασαφείς [40].

1.5.4 Γενετικό υπόβαθρο της νόσου

Κατά κύριο λόγο η νόσος του Parkinson είναι μία ιδιοπαθής διαταραχή. Παρόλα αυτά ένα μικρό ποσοστό αντικατοπτρίζει τις μονογονιδιακές μορφές της νόσου. Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες εστιάζουν στο γενετικό υπόβαθρο της νόσου, με αποτέλεσμα να έχει σημειωθεί πρόοδος όσον αφορά τις γνώσεις μας σχετικά με την αναγνώριση των υπεύθυνων γενετικών παραγόντων. Πράγματι, έχουν εντοπιστεί γενετικές μεταλλάξεις που μπορούν να επάγουν μεμονωμένα την νόσο δηλαδή μεταλλάξεις σε ένα μόνο γονίδιο είναι ικανές να προκαλέσουν τον παθολογικό φαινότυπο αλλά και άλλες που αποτελούν απλώς παράγοντες κινδύνου [41]. Μεταλλάξεις στα γονίδια για τα οποία έχει εξακριβωθεί ότι έχουν σαφή σχέση με τη νόσο του Parkinson είναι υπεύθυνες είτε για αυτοσωμικά επικρατή μορφή της νόσου είτε για την πρόκληση της με αυτοσωμικά υπολειπόμενο τρόπο κληρονόμησης [41]. Στον παρακάτω πίνακα καταγράφονται ορισμένα από τα γονίδια που έχει διαπιστωθεί πως σχετίζονται με τη νόσο Parkinson των οποίων οι μεταλλάξεις είτε προσδίδουν μία προδιάθεση για εμφάνιση της νόσου δηλαδή αποτελούν παράγοντες κινδύνου είτε επάγουν τη νόσο χωρίς την αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες [41].

Πίνακας 2: Παρατίθενται οι πιο σημαντικές γενετικές παραλλαγές που σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου του Parkinson και η συχνότητα εμφάνισης τους [41].

Υψηλή διεισδυτικότητα Σπάνιες	Μέτρια διεισδυτικότητα Ασυνήθιστες	Χαμηλή διεισδυτικότητα Συνηθισμένες
<i>SNCA</i>	<i>LRRK2</i>	<i>LRP10</i>
<i>PARK7</i>	<i>GBA</i>	<i>MAPT</i>
<i>PRKN</i>		<i>GIGYF2</i>
<i>VPS35</i>		<i>BST1</i>
<i>ATP13A2</i>		<i>HTRA2</i>
<i>FBXO7</i>		<i>SYT11</i>
<i>PLA2G6</i>		<i>GAK</i>

Επίσης, με τη βοήθεια μελετών συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα (GWAS) εντοπίστηκαν μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο *SORL1*, το οποίο κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη SorLA που είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων με VPS10P επικράτεια, οι οποίοι σχετίζονται με τη νόσο του Parkinson, προσθέτοντας με αυτό τον τρόπο επιπλέον παράγοντες κινδύνου στην ήδη τεράστια λίστα για την νόσο [42]. Ακόμη, γίνονται προσπάθειες για να εντοπιστούν περαιτέρω γονίδια και πολυμορφισμοί τους οι οποίοι θα σχετίζονται με τη νόσο, όπως για παράδειγμα το γονίδιο *SORT1*.

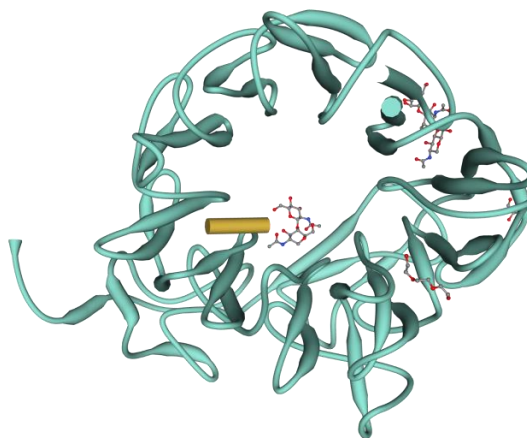
1.6 Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί φαρμακευτική αγωγή που να προλαμβάνει, να διακόπτει ή να αναστρέφει πλήρως αυτή τη νόσο. Οι θεραπευτικές στρατηγικές μπορούν να διαχωριστούν στις εξής κατηγορίες : στην φαρμακευτική αγωγή, στις μη φαρμακευτικές μεθόδους και στην χειρουργική επέμβαση [43]. Η κύρια φαρμακευτική στρατηγική στοχεύει στην αναπλήρωση των επιπέδων ντοπαμίνης και χρησιμοποιείται για την θεραπεία των κινητικών συμπτωμάτων [44]. Τέτοια φάρμακα αποτελούν η λεβοντόπα και η καρβιντόπα, οι αγωνιστές υποδοχέων ντοπαμίνης, οι αναστολείς της κατεχολ-Ο-μεθυλοτρανσφεράσης (COMT) και η αμανταδίνη [45]. Η δυνατότητα χειρουργικής επέμβασης δίνεται στους ασθενείς όταν πλέον καμία φαρμακευτική αγωγή δεν προσφέρει ανακούφιση από τα συμπτώματα. Ειδικότερα, υπάρχει η δυνατότητα χειρουργικής διέγερσης συγκεκριμένων κινητικών περιοχών του εγκεφάλου με τη χρήση ειδικού βηματοδότη (εν τω βάθει εγκεφαλική διέγερση, Deep Brain Stimulation, DBS) ή η πιθανότητα χειρουργικής επέμβασης που εκτελείται για να εισαχθεί ένας σωλήνας στο λεπτό έντερο, ο οποίος ελευθερώνει ένα ειδικό σκεύασμα για τα άτομα με Parkinson που περιέχει καρβιντόπα/λεβοντόπα [46]. Τέλος, όσον αφορά τις μη φαρμακευτικές μεθόδους περιλαμβάνουν τις στρατηγικές αποκατάστασης που βοηθούν στη διατήρηση και βελτίωση του ηθικού καθώς και την υποστήριξη της κινητικότητας με φυσιοθεραπείες, την σωστή διατροφή και την άσκηση [47].

1.7 Σορτιλίνη : Μέλος της οικογένειας υποδοχέων με VPS10P

επικράτεια

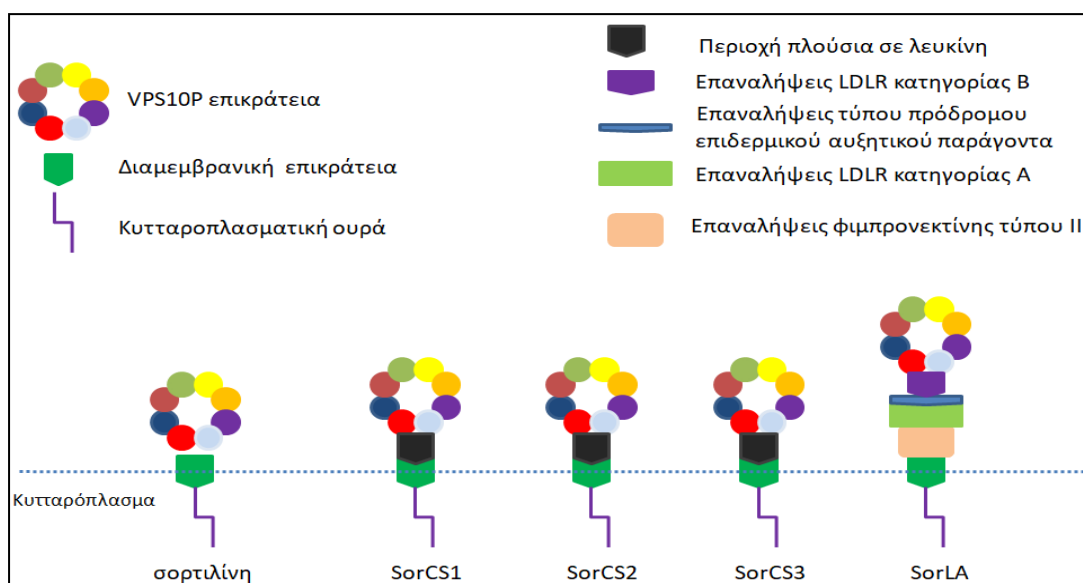
Η σορτιλίνη ή αλλιώς gp95 (glycoprotein of 95 kDa) ή υποδοχέας νευροτενσίνης 3 (Neurotensin Receptor-3, NTR3), είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I [48] όπου η κρυσταλλική της διαμόρφωση παρουσιάζεται στην **Εικόνα 4**. Κωδικοποιείται από το γονίδιο *SORT1* που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1p13.3 και αποτελεί μέλος της οικογένειας υποδοχέων με VPS10P (Vacuolar Protein Sorting 10 Protein) επικράτεια [49]. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη που αποτελείται από 833 αμινοξέα και όπως προκύπτει από το όνομά της έχει μάζα περίπου 95 kDa [50]. Επίσης εντοπίζεται σε 2 μορφές στην μεμβρανοσύνδετη και στην διαλυτή [51]. Στην **Εικόνα 4** παρατηρείται η κρυσταλλική δομή της VPS10P επικράτειας της σορτιλίνης σε σύμπλοκο με την νευροτενσίνη, μία δομή που κατατέθηκε στη βάση δεδομένων PDB το 2008.



Εικόνα 4:Κρυσταλλική δομή VPS10P επικράτειας της σορτιλίνης σε σύμπλοκο με την νευροτενσίνη. Άρα, πρόκειται για μοντέλο σορτιλίνης σε αλληλεπίδραση με την νευροτενσίνη.

Η οικογένεια των υποδοχέων με VPS10P επικράτεια περιέχει τα εξής μέλη: την σορτιλίνη, τη SorLA, τη SorCS1, τη SorCS2 και την SorCS3 (**Εικόνα 5**) [52]. Ο υποδοχέας νευροτενσίνης 3 δηλαδή η σορτιλίνη, αποτελείται από μία N-τελική εξωκυττάρια περιοχή, μια διαμεμβρανική και μία μικρή κυτταροπλασματική ουρά η οποία συνίσταται από περίπου 40-80 αμινοξέα. Όπως είναι γνωστό το κοινό γνώρισμα και των πέντε υποδοχέων αυτής της οικογένειας είναι η VPS10P επικράτεια που βρίσκεται στην N τελική περιοχή [53]. Έτσι, η εξωκυττάρια επικράτεια της σορτιλίνης αποτελείται από το κοινό αυτό χαρακτηριστικό όλων των υποδοχέων της οικογένειας που το ίδιο χαρακτηρίζεται από δύο δομικές επικράτειες, από την β προπέλα και από

τις 10 συντηρημένες κυστεΐνες που την ακολουθούν [54]. Όμως αξίζει να σημειωθεί, πως η VPS10P επικράτεια αποτελεί όλο το εξωκυτταρικό τμήμα στη σορτιλίνη σε αντίθεση με τα άλλα 4 μέλη της οικογένειας που η συγκεκριμένη επικράτεια αλληλεπιδρά με άλλες όπως για παράδειγμα με επαναλήψεις φιβρονεκτίνης τύπου III, με επαναλήψεις τύπου πρόδρομου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, με επαναλήψεις LDLR κατηγορίας A και B δηλαδή επαναλήψεις υποδοχέα λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoprotein Receptor, LDLR) και με περιοχή πλούσια σε λευκίνη. Επιπλέον, όλοι οι υποδοχείς αυτής της οικογένειας έχουν στο Ντελικό τους άκρο μία αλληλουχία διάσπασης που καθορίζει το Ν' τελικό προπεπτίδιο. Είναι γνωστό ότι η σορτιλίνη, η SorLA, η SorCS1, και η SorCS3 συντίθενται ως πρόδρομες ανώριμες ουσίες και μετατρέπονται στο δίκτυο trans Golgi σε ώριμους υποδοχείς, με τη διάσπαση του προπεπτιδίου τους που αποτελείται από 44 αμινοξέα, από τη φουρίνη [55]. Ουσιαστικά, ρόλος του προπεπτιδίου είναι να αναστείλει τη σύνδεση της σορτιλίνης με προσδέτες και να δράσει ως μοριακός συνοδός [56].



Εικόνα 5: Τα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων με VPS10P επικράτεια.

1.8 Λειτουργία της σορτιλίνης

Γενικότερα, η λειτουργία των υποδοχέων με επικράτεια VPS10P είναι η ενδοκυτταρική μετακίνηση και ταξινόμηση των πρωτεϊνών και άλλων μορίων καθώς και η μεταγωγή σήματος [57]. Έτσι, αφού η σορτιλίνη αποτελεί μέλος αυτής της οικογένειας διαθέτει τις ικανότητες διακίνησης και ταξινόμησης όπως επίσης δρα και ως υποδοχέας και συν-υποδοχέας [58]. Πιο συγκεκριμένα, όπως έχει ήδη αναφερθεί η σορτιλίνη ωριμάζει

μετά τη διάσπαση του προπεπτιδίου της στο trans Golgi δίκτυο. Από εκεί και πέρα μπορεί να μεταφερθεί στην πλασματική μεμβράνη όπου και υφίσταται στην μεμβρανοσύνδετη της μορφή και δρα σαν υποδοχέας ή μπορεί να διασπαστεί πρωτεολυτικά από μεταλλοπρωτεάσες [59] και στη συνέχεια με τη βοήθεια άλλων ενζύμων να απελευθερωθεί στην διαλυτή της μορφή. Στην συνέχεια, μπορούν μετά την σύνδεση με κάποιο πρόσδεμα, η σορτιλίνη με τον συνδέτη σαν σύμπλοκο να ενδοκυτταρωθούν και να κατευθυνθούν με τη βοήθεια ενδοσωμάτων πάλι στο trans Golgi δίκτυο [60,61] ή στο λυσόσωμα με στόχο την αποικοδόμηση [62]. Τέλος, η σορτιλίνη μπορεί να εξαχθεί στο εξωκυτταρικό περιβάλλον με τη μορφή εξωσωμάτων [63]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα δράσης της σορτιλίνης ως υποδοχέα και ως υπεύθυνη για ενδοκυτταρική διακίνηση είναι η σύνδεση της με νευροτενσίνη, με τον πρόδρομο εγκεφαλικό νευροτροφικό παράγοντα (precursor of Brain Derived Neurotrophic Factor, proBDNF), με την λιποπρωτεϊνική λιπάση (lipoprotein lipase, LpL) και με την πρωτεΐνη ενεργοποίησης σφιγγολιπιδίων (SAP) [64]. Μία επιπλέον λειτουργία της σορτιλίνης είναι η συμβολή της στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων και της γλυκόζης [65].

1.9 Συσχέτιση σορτιλίνης και ανοσοποιητικού συστήματος

Τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερες μελέτες εστιάζουν την προσοχή τους στον ρόλο της σορτιλίνης στην έκκριση κυτταροκινών και γενικότερα στην λειτουργία της στο ανοσοποιητικό σύστημα και στις φλεγμονώδεις ασθένειες. Η σορτιλίνη εκφράζεται σε αρκετά κύτταρα του ανοσοποιητικού, λόγω χάριν σε μακροφάγα, σε δενδριτικά κύτταρα, σε CD4⁺ T κύτταρα ή αλλιώς Th βοηθητικά λεμφοκύτταρα, σε CD8⁺ T κύτταρα ή T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα και σε B λεμφοκύτταρα [66]. Επίσης όπως έχει ήδη αναφερθεί μία από τις λειτουργίες της σορτιλίνης είναι η μεταγωγή σήματος. Έτσι, λοιπόν οι επιστήμονες απέδειξαν πως η σορτιλίνη ρυθμίζει την εξωκυττάρωση και τη σηματοδότηση προφλεγμονωδών κυτταροκινών [67]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα κυτταροκινών με τις οποίες συνδέεται η σορτιλίνη και επηρεάζει την έκκρισή τους αποτελούν η ιντερφερόνη γ (IFN-γ), η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), η ιντερλευκίνη 10 (IL-10), η ιντερλευκίνη 12 (IL-12), η ιντερλευκίνη 17A (IL-17A) και η ιντερφερόνη-α (IFN-α) [68]. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως η σορτιλίνη συμβάλει στην ωρίμανση του φαγοσώματος [69].

1.10 Σορτιλίνη και ασθένειες

Ολοένα και περισσότερες μελέτες τα τελευταία χρόνια εστιάζουν στο γεγονός πως η απορρύθμιση της σορτιλίνης συμβάλλει στην ανάπτυξη πολλών ασθενειών συμπεριλαμβανομένων των νευρολογικών παθήσεων όπως για παράδειγμα του Parkinson και του Alzheimer [70], του καρκίνου [71], του σακχαρώδη διαβήτη τύπου II [72], των καρδιαγγειακών νόσων και του μεταβολικού συνδρόμου [73]. Πράγματι, εστιάζοντας κυρίως στην περίπτωση του Parkinson, οι επιστήμονες υποστηρίζουν πως παρατηρείται υπερέκφραση της σορτιλίνης. Πιο συγκεκριμένα, αυτή η παρατήρηση έγινε σε πειράματα όπου στο γονίδιο *SNCA*, το οποίο κωδικοποιεί την α-συνουκλεΐνη, υπήρχε η μετάλλαξη A30P [74]. Παρόλα αυτά λόγω των περιορισμένων γνώσεων σχετικά με την σχέση της σορτιλίνης και της νόσου του Parkinson, είναι επιτακτική η ανάγκη περαιτέρω μελετών.

2. Σκοπός της εργασίας

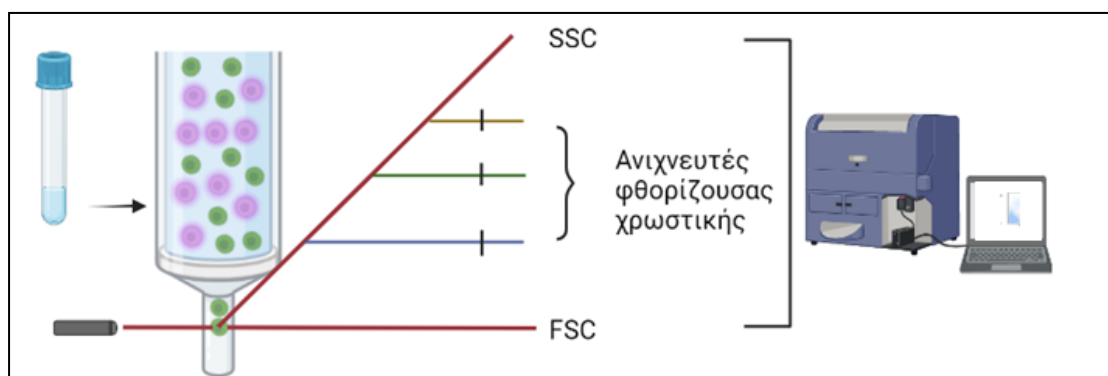
Η νόσος του Parkinson είναι μία από τις πιο κοινές νευροεκφυλιστικές διαταραχές που πλήττουν τον ανθρώπινο πληθυσμό και επηρεάζουν σημαντικά την καθημερινότητα του μέσω του μεγάλου εύρους συμπτωμάτων της. Συνεχείς έρευνες έχουν καταδείξει τόσο τους κυριότερους μηχανισμούς παθογένεσης της νόσου όσο και τους αιτιολογικούς, είτε γενετικούς είτε περιβαλλοντικούς, παράγοντες εκδήλωσης της νόσου του Parkinson. Αρκετά πειραματικά στοιχεία έχουν εστιάσει στην νευροφλεγμονή και συγκεκριμένα στο ανοσοποιητικό σύστημα και την καίρια θέση του στην νόσο. Επίσης, αναφορές έχουν γίνει και για την συμμετοχή μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης της SorLA που αποτελεί μέλος της οικογένειας των υποδοχέων με VPS10P επικράτεια στην εμφάνιση του Parkinson.

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι διττός και συνδυάζει τόσο ανοσολογικές όσο και βιοπληροφορικές μελέτες. Έγινε διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης της σορτιλίνης, σε ανθρώπινα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος με χρήση ποικίλων προσεγγίσεων. Σε επίπεδο βιοπληροφορικής ανάλυσης διερευνήθηκε η έκφραση της σορτιλίνης σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο καθώς και η πιθανότητα εντοπισμού πολυμορφισμών στο γονίδιο *SORT1* και ο συσχετισμός αυτών με την νόσο του Parkinson.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μία τεχνική μέτρησης και πολυπαραμετρικής ανάλυσης μικρών σωματιδίων όπως είναι τα κύτταρα καθώς αυτά αιωρούνται σε ένα υγρό το οποίο διέρχεται από ένα μηχάνημα ηλεκτρονικής ανίχνευσης [75]. Πρόκειται για μία ποσοτική και ποιοτική μέθοδο προσδιορισμού η οποία συνδυάζει την σκέδαση και τον φθορισμό. Ο κυτταρομετρητής ροής που είναι υπεύθυνος για τις αναλύσεις αποτελείται από 3 στοιχεία: από το υδροδυναμικό σύστημα ροής, το οπτικό σύστημα και το ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης δεδομένων. Το υδροδυναμικό σύστημα είναι υπεύθυνο ώστε να επιτευχθεί ροή των κυττάρων σε μονήρη διάταξη, δηλαδή να κινείται το ένα μετά το άλλο. Μία δέσμη φωτός συνήθως από laser κατευθύνεται προς αυτή την υδροδυναμική ροή υγρού. Υπάρχουν και ειδικοί ανιχνευτές που τοποθετούνται σε ειδικές θέσεις όπως για παράδειγμα ανιχνευτές για τις φθορίζουσες χρωστικές, ένας στην ίδια ευθεία με τη δέσμη φωτός (Forward Scatter Channel, FSC- πρόσθια σκέδαση) και άλλοι 90° ως προς αυτόν (Side Scatter Channel, SSC- πλάγια σκέδαση). Καθώς τα κύτταρα διέρχονται από το laser σκεδάζουν την ακτινοβολία και εκπέμπουν φθορισμό που φιλτράρεται και συλλέγεται από το δίκτυο του οπτικού συστήματος. Το ηλεκτρονικό σύστημα είναι υπεύθυνο για την μετατροπή αυτών των φωτεινών σημάτων σε ηλεκτρονικά.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των γεγονότων που πραγματοποιούνται κατά την διεξαγωγή της κυτταρομετρίας ροής.

3.1.1 Πειραματική διαδικασία

Για την διεξαγωγή της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας τα δείγματα περιφερικού αίματος προήλθαν από τη Νευρολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Το κυτταρόμετρο ροής που χρησιμοποιήθηκε ήταν το

Cytomics FC 500 της Beckman Coulter Life Sciences και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν το CXP 2.3 της Beckman Coulter.

Πίνακας 3 :Καταγραφή των αντισωμάτων και ορισμένων χαρακτηριστικών τους που χρησιμοποιούνται στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία

Αντισώματα	Πληθυσμός	Σήμανση	Nm	Εταιρία
anti-CD14 PC5	Μονοκύτταρα	φυκοερυθρίνη- κυανίνη 5 (Phycoerythrin- Cyanin 5, PC5)	670 nm	Beckman Coulter
anti- CD3 PE	T λεμφοκύτταρα	Φυκοερυθρίνη (phycoerythrin, PE)	576 nm	Beckman Coulter
anti- CD19 PC7	B λεμφοκύτταρα	φυκοερυθρίνη- κυανίνη 7 (Phycoerythrin- Cyanin 7, PC7)	767 nm	Beckman Coulter
anti- CD14- PE	Μονοκύτταρα	Φυκοερυθρίνη (phycoerythrin, PE)	576 nm	Beckman Coulter
mouseanti- hsortilin	Όπου υπάρχει σορτιλίνη	-	-	R&D
Goat anti- mouse- FITC	Δεσμεύεται στο παραπάνω αντίσωμα	ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (fluorescein isothiocyanate, FITC)	520 nm	R&D
FcR blocking antibody	B λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, κύτταρα φυσικοί φονείς	-	-	Immunostep

Για κάθε ένα από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν 2 σωληνάκια (το ένα αποτελούσε το control και το άλλο το δείγμα προς εξέταση). Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος ήταν τα εξής:

- Αφού ανακινήθηκαν τα δείγματα, 100 μl περιφερικού αίματος μεταφέρθηκαν σε κάθε σωληνάκι.
- Προσθήκη 1 ml λυτικού διαλύματος (lysis buffer → NH₄Cl: 19,16M, KHCO₃: 1,25M, 25μl EDTA, απεσταγμένο νερό σε κάθε σωληνάκι με στόχο την λύση των ερυθρών κυττάρων και αναμονή μέχρι να διαυγάσει το διάλυμα, δηλαδή μέχρι να παρατηρηθεί η λύση.
- Προσθήκη 4 ml PBS (Phosphate-Buffered Saline) προκειμένου να σταματήσει η διαδικασία λύσης των ερυθροκυττάρων.

- Φυγοκέντρηση για 5 min στα 1200-1500 rpm για να κατακρημνιστούν τα κύτταρα.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης αφαίρεση του υπερκείμενου.
- Επανάληψη του σταδίου πλύσης με PBS
- Επαναιώρηση των κυττάρων σε 50 μl PBS που περιείχε 4 μl FcR blocking antibody (Immunostep) και επώαση διαλύματος για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στα σωληνάκια στη συνέχεια προστέθηκαν οι συνδυασμοί αντισωμάτων που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Πραγματοποιήθηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί αντισωμάτων.

Πίνακας 4 : Περιγραφή του 1^{ου} κοκτέιλ αντισωμάτων που δοκιμάστηκε για την διεξαγωγή της κυτταρομετρίας ροής.

Αντισώματα	Δείγμα προς εξέταση	Control
anti-CD14 PC5	1:200	1:200
anti- CD3 PE	1:400	1:400
anti- CD19 PC7	1:400	1:400
anti-human sortilin unconjugated	1:100	-

Πίνακας 5: Περιγραφή του 2^{ου} κοκτέιλ αντισωμάτων που δοκιμάστηκε για την διεξαγωγή της κυτταρομετρίας ροής.

Αντισώματα	Δείγμα προς εξέταση	Control
anti- CD14-PE	1:100	1:100
Mouse anti-h sortilin	1:100	-

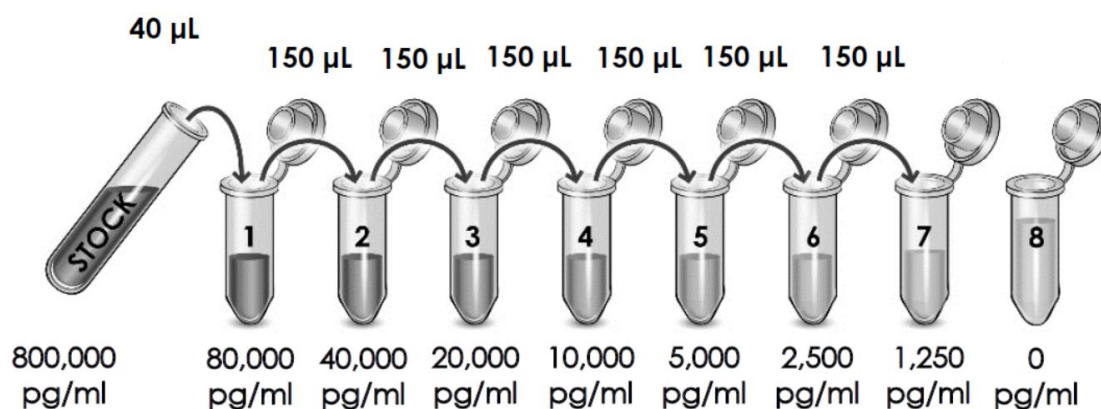
- Ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι για 20 min και πλύσιμο με PBS.
- Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 100 μl PBS που περιείχε Goat anti-mouse- FITC, το οποίο θα αναγνωρίσει το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για τη σορτιλίνη σε αναλογία 1:200 σε όλα τα σωληνάκια.
- Πραγματοποιήθηκε επώαση για 20 min στο σκοτάδι και ακολούθησε πλύση με PBS και φυγοκέντρηση.
- Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 400 μl PBS προκειμένου να ακολουθήσει η κυτταρομετρία και η ανάλυση.

3.2 Elisa

Η Elisa (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) αποτελεί μία ανοσοενζυμική μέθοδο υπεύθυνη για την ανίχνευση βιομορίων κυρίως πρωτεϊνών με τη βοήθεια αντισωμάτων [76]. Είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για ποσοτική ανάλυση αλλά και για διάγνωση. Επίσης αυτή η ενζυμοσύνδετη ανοσοδοκιμασία διακρίνεται σε 4 κατηγορίες: στην άμεση Elisa, στην έμμεση Elisa, στην Elisατύπου sandwich και στην ανταγωνιστική Elisa.

Για την περάτωση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν οροί αίματος οι οποίοι είχαν αποθηκευτεί στους -80°C στην κατάψυξη μέχρι την διεξαγωγή του πειράματος. Πραγματοποιήθηκε Elisa τύπου Sandwich. Το kit που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό της σορτιλίνης σε ορό αίματος ήταν το ab277074 Human Sortilin 1 SimpleStep ELISA® Kit (Abcam). Τα βήματα της διαδικασίας που πραγματοποιήθηκαν ήταν τα ακόλουθα:

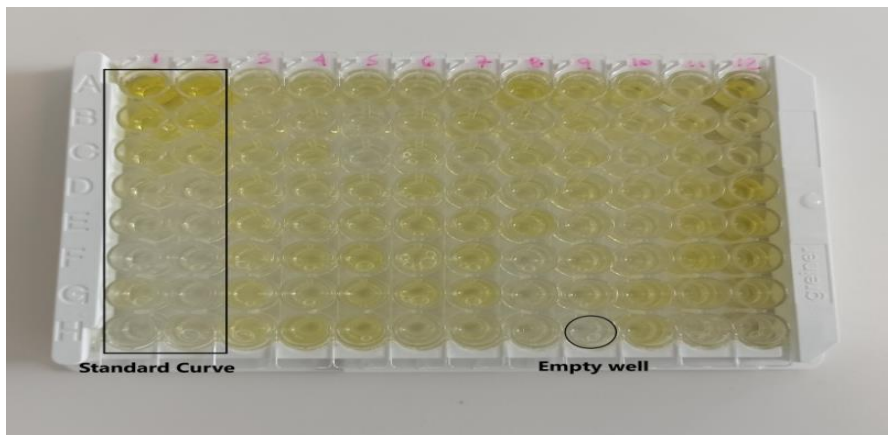
- Πρώτα, ετοιμάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα. Ουσιαστικά, χρησιμοποιήθηκαν 8 δοκιμαστικοί σωλήνες όπου στον 1^ο και στον 8^ο δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 360 μl PBS ενώ στον 2^ο έως τον 7^ο προστέθηκαν 150 μl PBS. Στη συνέχεια, εισήχθησαν στον 1^ο σωλήνα 40 μl από το Stock Standard Solution συγκέντρωσης 800 pg/ml ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 80 pg/ml . Αμέσως μετά μεταφέρθηκαν 150 μl από το συγκεκριμένο διάλυμα στον 2^ο δοκιμαστικό σωλήνα, μία διαδικασία η οποία συνεχίστηκε μέχρι να μεταφερθούν 150 μl διαλύματος από τον 6^ο δοκιμαστικό σωλήνα στον 7^ο. Προκειμένου να φτιαχτεί το Stock Standard Solution προστέθηκαν 540 μl PBS στο sortilin 1 standard. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η σειρά με την οποία πραγματοποιήθηκαν τα παραπάνω βήματα.



- Ακολούθως τοποθετήθηκαν 50 μl από τα πρότυπα διαλύματα στις κατάλληλες θέσεις στην μικροπλάκα και συγκεκριμένα στις δύο πρώτες στήλες. Σε όλα τα

υπόλοιπα πηγαδάκια της μικροπλάκας προστέθηκαν 50 μl από κάθε δείγμα ορού αίματος.

- Έπειτα έγινε η προετοιμασία του cocktail των αντισωμάτων. Ειδικότερα, για την κατασκευή 6 ml του cocktail προστέθηκαν 600 μl 10X Capture Antibody, 600 μl 10X Detector Antibody και 4.8 ml Antibody Diluent 5BR. Στη συνέχεια, από όλο αυτό το cocktail αντισωμάτων προστέθηκαν 50μl σε όλα τα πηγαδάκια της μικροπλάκας.
- Σε αυτό το χρονικό στάδιο η μικροπλάκα καλύφθηκε με την κατάλληλη διάφανη μεμβράνη και αφέθηκε για όλο το βράδυ στο ψυγείο της 4°C προκειμένου να επωαστεί.
- Την επόμενη μέρα προετοιμάστηκε το Wash Buffer (ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης). Ουσιαστικά, προστέθηκαν 5 ml Wash Buffer PT(1X) σε 45 ml νερού βρύσης ώστε να προκύψει Wash Buffer με τελικό όγκο 50ml. Το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να πλυθεί η μικροπλάκα.
- Αφού ολοκληρώθηκαν οι 3 πλύσεις της μικροπλάκας τοποθετήθηκαν 100 μl από το TMB Development Solution (διάλυμα υποστρώματος) σε κάθε πηγαδάκι με τη βοήθεια της οκτακάναλης πιπέτας. Με την προσθήκη αυτού του διαλύματος παρατηρήθηκε αλλαγή στο χρώμα το οποίο γινόταν μπλε.
- Απευθείας μετά την παρατήρηση της αλλαγής χρώματος του διαλύματος προστέθηκαν 100μl διαλύματος Stop Solution σε κάθε ένα πηγαδάκι. Το αποτέλεσμα ήταν το μπλε χρώμα του διαλύματος στα πηγαδάκια να μετατραπεί σε κίτρινο.
- Στο τέλος μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD) από κάθε πηγαδάκι της μικροπλάκας σε ειδικό φωτόμετρο στα 450nm.



Εικόνα 7: Απεικόνιση της μικροπλάκας μετά την μετατροπή του μπλε χρώματος σε κίτρινο.

3.3 Ανοσοκυτταροχημεία–Ανοσοφθορισμός

Η ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry) ασχολείται με την ανίχνευση αντιγόνων σε κυτταρικό επίπεδο με τη χρήση αντισωμάτων. Είναι μία μέθοδος υπεύθυνη για τον εντοπισμό βιολογικών μορίων σε κύτταρα η οποία βασίζεται στην σύνδεση και χημική συγγένεια αντιγόνου – αντισώματος [77]. Τα δείγματα που υποβάλλονται σε ανοσοκυτταροχημεία προκειμένου να ανιχνευτεί το σήμα και να εξαχθούν τα αποτελέσματα υπόκεινται για παρακολούθηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κάτι που συνέβη και κατά την διεξαγωγή των συγκεκριμένων πειραμάτων. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την περάτωση των πειραματικών διαδικασιών ήταν δείγματα περιφερικού αίματος. Τα αντισώματα που χρειάστηκαν για τα διάφορα πρωτόκολλα που αφορούσαν το συγκεκριμένο πείραμα ήταν τα εξής: anti-CD14-PE, Mouse anti-h sortilin, Goat anti-mouse- FITC, a- sortilin Goat και a-Goat Alexa. Επίσης, το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στο οποίο εξετάστηκαν τα δείγματα ήταν της εταιρείας Leica και προερχόταν από το Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας της Ιατρικής Σχολής.

Προκειμένου να βρεθεί το καταλληλότερο πρωτόκολλο έγιναν αρκετές πειραματικές δοκιμές όπως για παράδειγμα προσθήκη του αντισώματος πριν ή μετά την μονιμοποίηση των κυττάρων. Παρόλα αυτά τα βασικά βήματα της μεθόδου είναι η μονιμοποίηση των κυττάρων πάνω στα coverslip και η προσθήκη 2 αντισωμάτων.

4. Αποτελέσματα

4.1 Κυτταρομετρία ροής

Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί το πρωτόκολλο ανίχνευσης των μεμβρανικών πρωτεϊνών σε κύτταρα του περιφερικού αίματος έγιναν αρκετές πειραματικές δοκιμές όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των αντισωμάτων. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δοκιμές που αφορούσαν κυρίως το anti-CD3 PE αντίσωμα που αναγνωρίζει τα T λεμφοκύτταρα, διότι παρουσιάζει προβλήματα ανίχνευσης των συγκεκριμένων κυττάρων.

Πίνακας 6: Οι διάφορες αναλογίες του αντισώματος anti-CD3 PE.

Αντίσωμα	1 ^η δοκιμή	2 ^η δοκιμή	3 ^η δοκιμή
anti-CD3 PE	1:400	1:10	1:10
			1:20
			1:50
			1:100

Από όλες τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, διαπιστώθηκε πως όταν το αντίσωμα anti-CD3 PE είναι σε αναλογία 1:10 τότε ανιχνεύεται μεγαλύτερος αριθμός T λεμφοκυττάρων σε σύγκριση με τις αναλογίες 1:20 και 1:50. Όταν το αντίσωμα ήταν σε αναλογίες είτε 1:400 είτε 1:100 τότε δεν παρατηρούνταν T λεμφοκύτταρα. Επομένως, καταλήξαμε στη χρήση του αντισώματος anti-CD3 PE σε αναλογία 1:10 για καλύτερα αποτελέσματα.

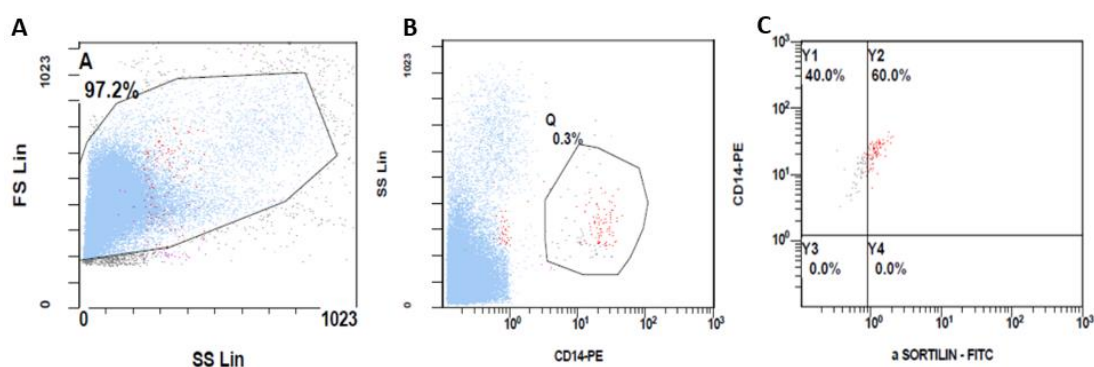
Ακολούθησαν χρώσεις με αντισώματα έναντι επιφανειακών επιτόπων CD14, CD3, CD19 με τα οποία γινόταν ο εντοπισμός των μονοκυττάρων, των T και B λεμφοκυττάρων αντίστοιχα., αλλά τελικά εστίασαμε κυρίως στην σήμανση των μονοκυττάρων με χρήση CD14.

4.1.1 Επίπεδα έκφρασης της σορτιλίνης σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος υγιών και ασθενών με νόσο του Parkinson

Κάθε δείγμα περιφερικού αίματος επεξεργάστηκε με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να προσδιοριστούν τα επίπεδα της σορτιλίνης. Η χρήση αντισωμάτων σημασμένων με

φθοριοχρώματα βοήθησε στον φαινοτυπικό προσδιορισμό συγκεκριμένων κυττάρων του ανοσοποιητικού. Ειδικότερα, τα μονοκύτταρα προσδιορίστηκαν με βάση τη χρώση τους με αντίσωμα έναντι ενός συγκεκριμένου επιφανειακού επιτόπου τους, του CD14. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε και ο προσδιορισμός της σορτιλίνης τόσο στον συνολικό κυτταρικό πληθυσμό όσο και στα μονοκύτταρα μεμονωμένα με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων έναντι αυτής της πρωτεΐνης όπως έχει ήδη αναφερθεί.

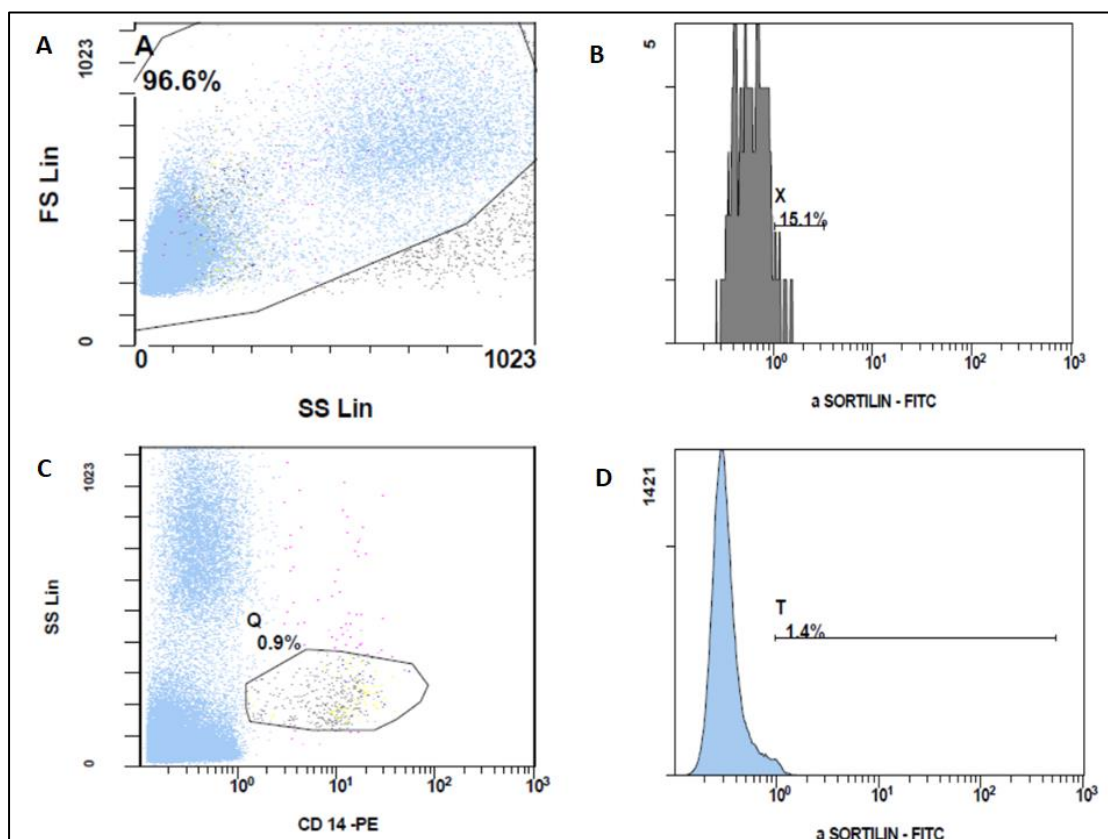
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα της κυτταρομετρίας ροής παριστάνονται στα παρακάτω δισδιάστατα γραφήματα (dotplots) (Εικόνα 8). Πιο συγκεκριμένα, πρώτα κατασκευάστηκε ένα γράφημα που περιλάμβανε όλα τα βιώσιμα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος με τον άξονα x να αντιστοιχεί στην πλάγια σκέδαση (side scatter linearscale, SSLin) και αντίστοιχα τον άξονα y στην πρόσθια σκέδαση (forward scatter linearscale, FSLin). Ουσιαστικά πραγματοποιήθηκε σήμανση (gating) στα συνολικά κύτταρα. Αμέσως μετά, προσδιορίστηκε ο πληθυσμός των μονοκυττάρων από το σύνολο των κυττάρων. Στην συνέχεια, προσδιορίστηκε η παρουσία της πρωτεΐνης σορτιλίνης τόσο στο σύνολο των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όσο και κυρίως στα μονοκύτταρα. Σε αυτά τα ιστογράμματα ο άξονας x αντικατοπτρίζει την ένταση του σήματος ενώ ο άξονας y αντιστοιχεί στον αριθμό των κυττάρων (Εικόνα 8).



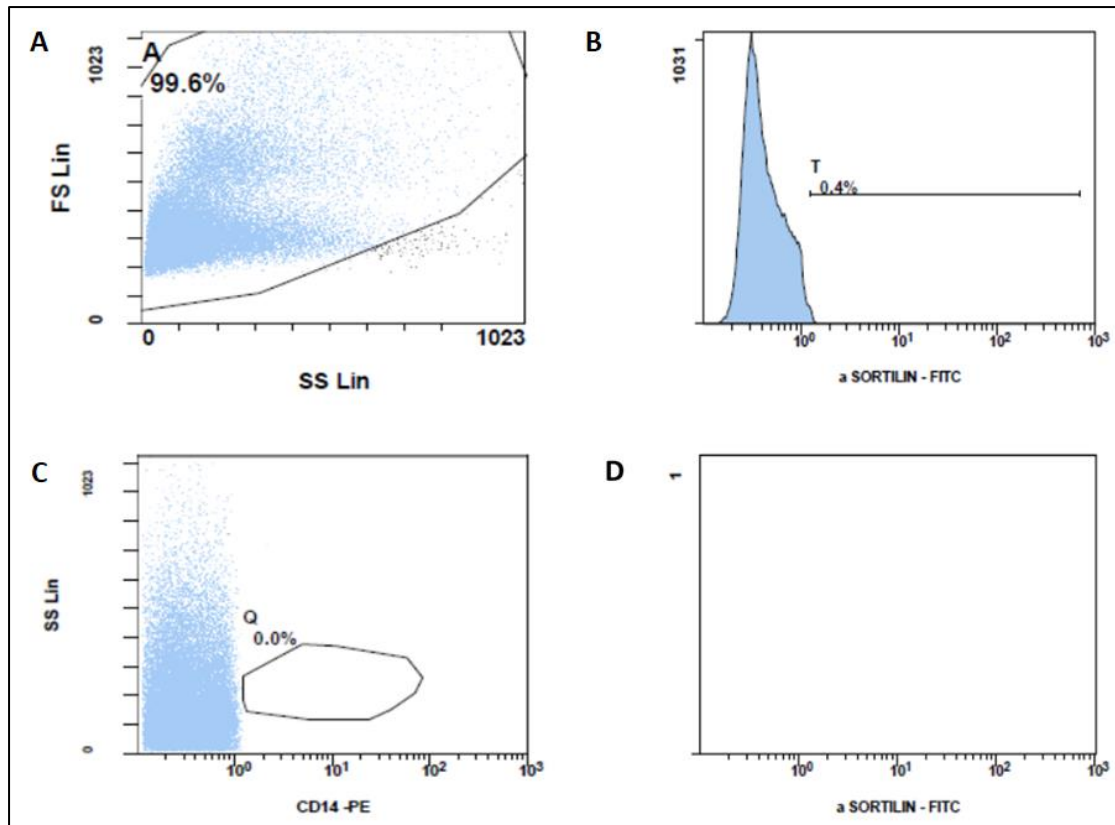
Εικόνα 8: **A.** Επιλογή των βιώσιμων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος με βάση την πλάγια και πρόσθια σκέδαση. **B.** Προσδιορισμός των μονοκυττάρων μέσω σήμανσης των CD14+ κυττάρων. **C.** Παρουσίαση του ποσοστού των μονοκυττάρων στα οποία παρατηρείται σήμα για τα επίπεδα της σορτιλίνης.

Στα παρακάτω γραφήματα και ιστογράμματα κατανομής συχνοτήτων (Εικόνες 9,10) παρατηρούνται τα βιώσιμα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ο προσδιορισμός του πληθυσμού των μονοκυττάρων, η παρουσία της σορτιλίνης στο

σύνολο των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όσο και κυρίως στα μονοκύτταρα, ενδεικτικά σε υγιές άτομο και ασθενή με νόσο του Parkinson.



Εικόνα 9:ΥΓΙΕΣ ΑΤΟΜΟ. **A.** Επιλογή των βιώσιμων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος με βάση την πλάγια και πρόσθια σκέδαση. **B.** Απεικόνιση έντασης έκφρασης της σορτιλίνης στο σύνολο των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος σε υγιές άτομο. **C.** Προσδιορισμός των μονοκυττάρων μέσω σήμανσης των CD14+ κυττάρων σε υγιές άτομο. **D.** Απεικόνιση έντασης έκφρασης της σορτιλίνης στον πληθυσμό των μονοκυττάρων σε υγιές άτομο.



Εικόνα 10: ΑΣΘΕΝΗΣ ΜΕ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ. **A.** Επιλογή των βιώσιμων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος με βάση την πλάγια και πρόσθια σκέδαση. **B.** Απεικόνιση έντασης έκφρασης της σορτιλίνης στο σύνολο των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος σε ασθενή. **C.** Προσδιορισμός των μονοκυττάρων μέσω σήμανσης των CD14+ κυττάρων σε ασθενή. **D.** Απεικόνιση έντασης έκφρασης της σορτιλίνης στο πληθυσμό των μονοκυττάρων σε ασθενή με Parkinson.

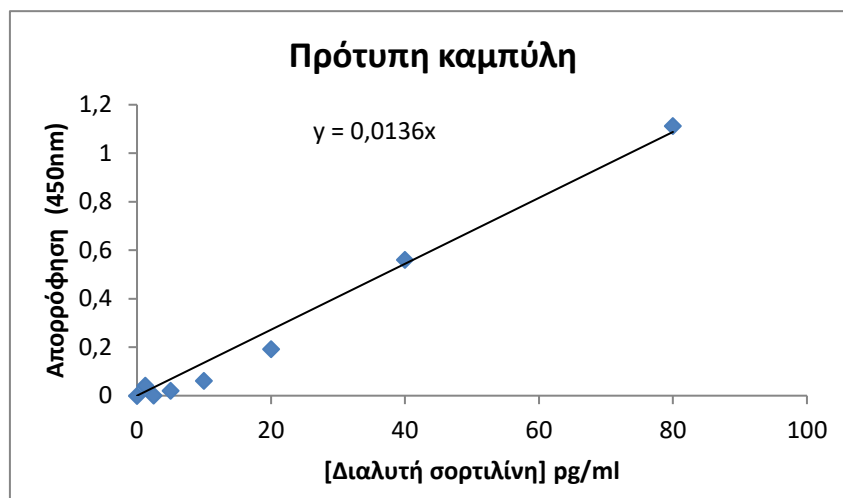
Αυτό που παρατηρήθηκε από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ υγιών και ασθενών ήταν πως στους ασθενείς με νόσο Parkinson ο πληθυσμός των μονοκυττάρων ήταν πολύ μικρός έως και ανύπαρκτος (**Εικόνα 10C**). Αυτό ωθεί στο συμπέρασμα πως δεν θα εκφράζεται σορτιλίνη στο πληθυσμό των μονοκυττάρων κάτι που επιβεβαιώθηκε (**Εικόνα 10D**).

4.2 Προσδιορισμός διαλυτής σορτιλίνης

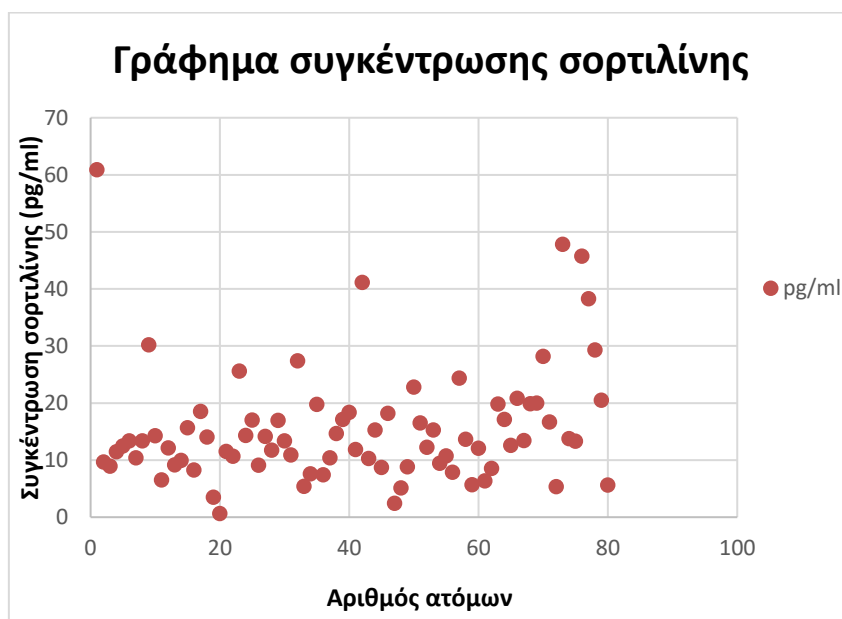
Έχοντας ως στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων της διαλυτής μορφής της πρωτεΐνης σορτιλίνης στον ορό αίματος ασθενών πραγματοποιήθηκε Elisa. Αφού μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη (**Εικόνα 11A**) με απώτερο σκοπό τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της σορτιλίνης. Οι απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων που αποτελούσαν τις 2 πρώτες στήλες

της μικροπλάκας λήφθηκαν υπόψη. Υπολογίστηκε η μέση τιμή αυτών των απορροφήσεων και προέκυψαν ορισμένες τιμές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Η εξίσωση που προέκυψε στην συγκεκριμένη περίπτωση από την πρότυπη καμπύλη ήταν η $y=0,0136x$.

A



B

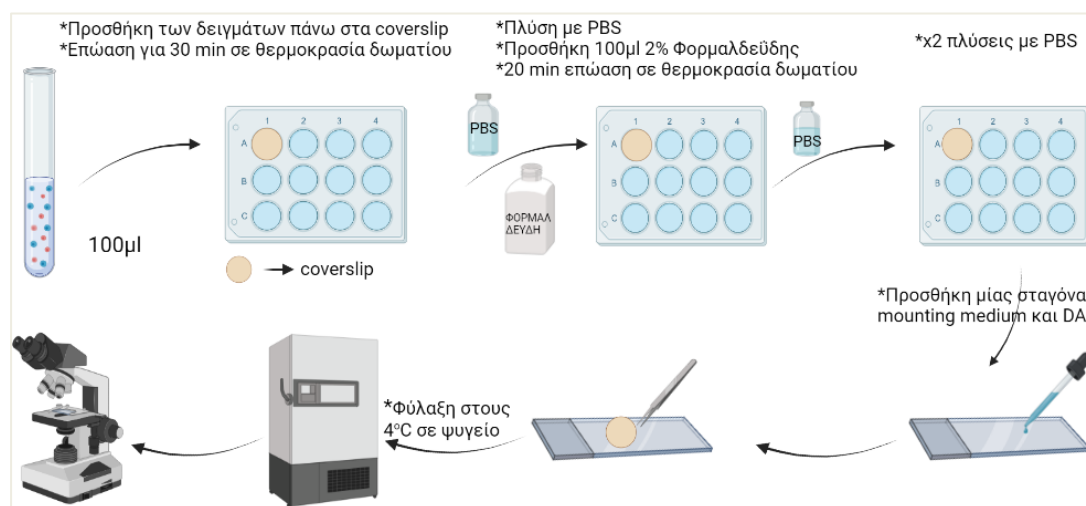


Εικόνα 11. Υπολογισμός διαλυτής σορτιλίνης σε ορούς ασθενών με PD. Α. Πρότυπη καμπύλη και εξίσωση για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της σορτιλίνης. **Β.** Γράφημα σύγκρισης συγκεντρώσεων σορτιλίνης μεταξύ ενός υγιούς ατόμου (Το 1^ο άτομο είναι το υγιές με συγκέντρωση 60.87 pg/ml) και ασθενών.

Υπολογίζοντας τον άγνωστο x της εξίσωσης τοποθετώντας όπου y την κάθε τιμή απορρόφησης, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση σορτιλίνης που περιείχε κάθε δείγμα ορού (**Εικόνα 11B**). Παρατηρήθηκε ότι οι τιμές της σορτιλίνης στον ορό ασθενών με Parkinson είναι $14,95 \pm 9,002$ pg/ml.

4.3 Ανάπτυξη πρωτοκόλλου ανοσοφθορισμού

Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού επιλέχθηκε προκειμένου να εντοπιστεί η ακριβής θέση της σορτιλίνης στα κύτταρα, δηλαδή η οπτικοποίησή της. Προκειμένου να βρεθεί το καταλληλότερο πρωτόκολλο έγιναν αρκετές πειραματικές δοκιμές με κύρια δοκιμή τη χρώση των κυττάρων πριν (PRE-FIX) και μετά την μονιμοποίηση τους (POST-FIX). Κατά τη διαδικασία του PRE-FIX έγινε λύση των ερυθρών, επώαση με FcR blocking αντίσωμα για απενεργοποίηση των FcR υποδοχέων και αμέσως μετά τα κύτταρα επωάστηκαν με ένα μίγμα αντισωμάτων που περιείχε το anti- CD14-PE και Mouse anti-human sortilin. Ακολούθησε προσθήκη του Goat anti-mouse- FITC αντισώματος για την ανίχνευση της σορτιλίνης. Μετά τη χρώση ακολούθησε η διαδικασία βασισμένη στα πειραματικά δεδομένα της πτυχιακής εργασίας της Ι. Φραγκουλίδου (2023), η οποία περιγράφεται περιληπτικά στην Εικόνα 12.

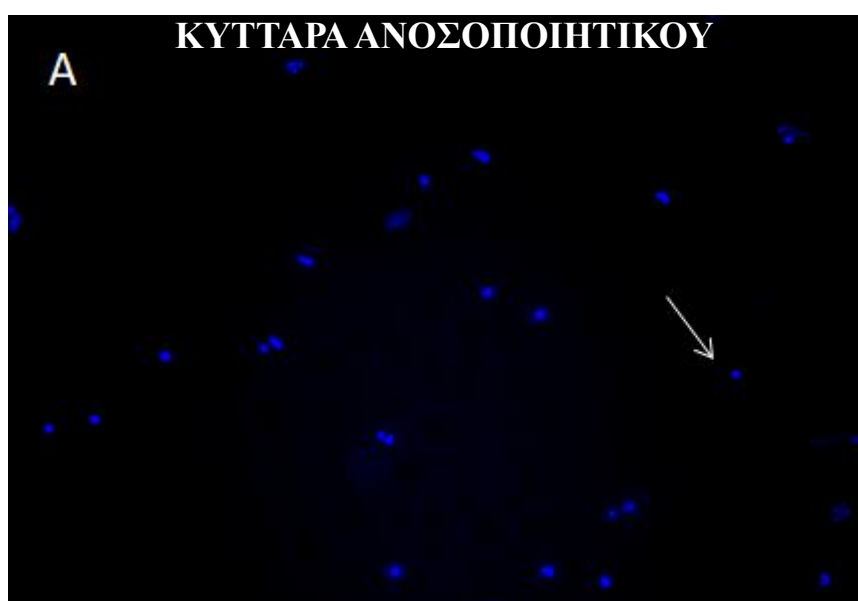


Εικόνα 12: Διαδικασία κατακρήμνισης κυττάρων μετά τη χρώση. 100 µl δείγματος τοποθετήθηκαν πάνω σε ειδικά coverslip και παρέμειναν εκεί για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να καθιζάνουν τα κύτταρα. Ακολούθησε πλύση με PBS και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με προσθήκη 100 µl 2% (v/v) φορμαλδεύδης για 20 λεπτά. Μετά από πλύσεις με PBS και πλέον με τη βοήθεια λαβίδας μεταφέρθηκαν τα coverslip σε αντικειμενοφόρους πλάκες και όπου σταθεροποιήθηκαν

με χρήση mounting medium και DAPI για χρώση των πυρήνων. Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους 4°C σε ψυγείο στο σκοτάδι.

Κατά τη διαδικασία του POST-FIX τα αρχικά βήματα ήταν ίδια με αυτά του PRE-FIX, αλλά η χρώση για μεμβρανική σορτιλίνη έγινε μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων. Αρχικά έγινε χρώση μόνο με anti-CD14 PE για τα μονοκύτταρα, ακολούθησε πλύση με PBS και η διαδικασία όπως περιγράφεται στην **Εικόνα 12** μέχρι και τη χρήση φορμαλδεύδης. Ακολούθησαν πλύσεις με PBS και επώαση σε διάλυμα PBS που περιείχε 0.3% (v/v) Triton X-100 και 0,1% (w/v) BSA προκειμένου να ανοίξουν τρύπες στην πλασματική μεμβράνη. Ακολούθησε επώαση με πρώτο αντίσωμα Mouse anti-h Sortilin (1:100), σε PBS/TritonX-100/BSA στους 4°C για όλη νύχτα. Την επόμενη μέρα χρησιμοποιήθηκε ως δεύτερο αντίσωμα Goat anti-mouse/FITC (1:200) σε PBS/TritonX-100/BSA και ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι για 1 ώρα. Πριν από την τοποθέτησή τους στις πλάκες προστέθηκε και μία σταγόνα mounting medium και DAPI πάνω στις πλάκες. Αυτές οι αντικειμενοφόρες πλάκες φυλάχθηκαν στους 4°C σε ψυγείο στο σκοτάδι και αργότερα παρατηρήθηκαν σε ειδικό μικροσκόπιο φθορισμού (**Εικόνα 13**).

Αρχικά παρατηρήθηκαν διάφορα κύτταρα το οποίο συνεπάγεται πως στην καλυπτρίδα παρατηρούνται κύτταρα. Επίσης, παρατηρήθηκαν ορισμένα μονοκύτταρα με τη βοήθεια του αντισώματος anti CD14- PE. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε σορτιλίνη στον πληθυσμό των μονοκυττάρων.



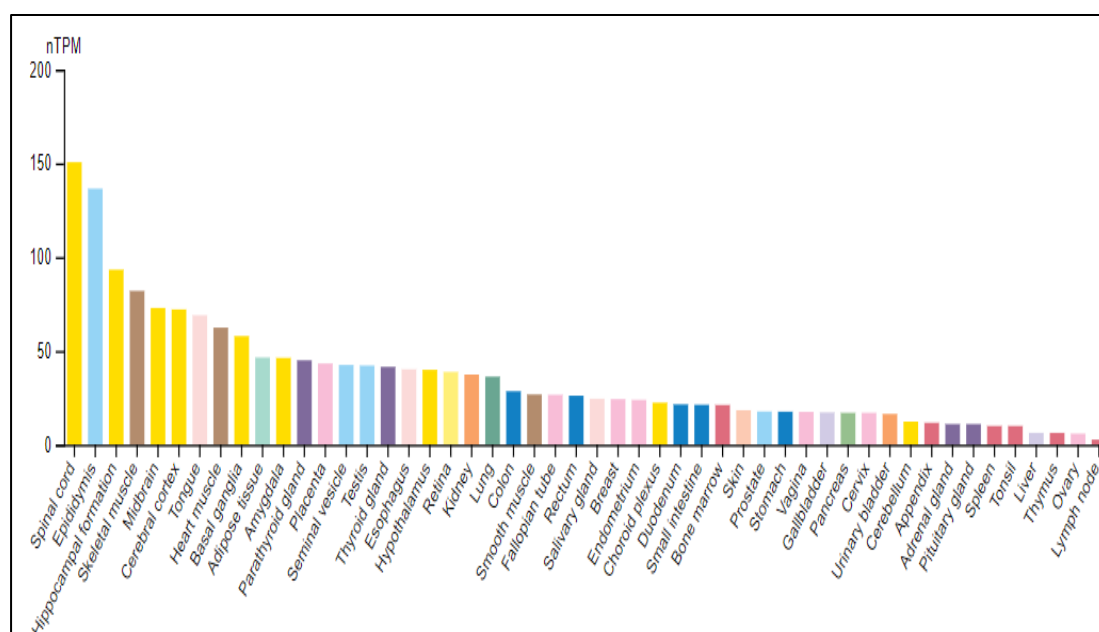


Εικόνα 13:Α. Κύτταρα ανοσοποιητικού συστήματος που βρίσκονται πάνω στη καλυπτρίδα και παρατηρούνται με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού. **Β.** Εντοπισμός μονοκυττάρου με τη βοήθεια χρώσης με αντίσωμα anti CD14-PE. **Γ.** Εντοπισμός του ίδιου μονοκυττάρου μετά τη χρωστική DAPI που βάφει τον πυρήνα.

4.4 Βιοπληροφορική ανάλυση

4.4.1 Υποκυτταρικός και ιστοειδικός εντοπισμός της σορτιλίνης

Αρχικά, μελετήθηκε το μεταγραφικό επίπεδο της έκφρασης του γονιδίου *SORT1*. (Εικόνα 14). Σε αυτό το επίπεδο τα μεγαλύτερα ποσοστά έκφρασης παρατηρούνται στο νωτιαίο μυελό, στην επιδιδυμίδα και στον εγκέφαλο. Μικρότερα ποσοστά παρατηρούνται στους σκελετικούς μύες και στην καρδιά, στον πλακούντα και στους όρχεις. Από την άλλη, σχεδόν μηδενικά είναι τα μεταγραφικά επίπεδα στους λεμφαδένες όπως και στο ήπαρ σύμφωνα με δεδομένα που εντοπίζονται στη βάση δεδομένων Protein Atlas. (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134243-SORT1/tissue#checkbox>)

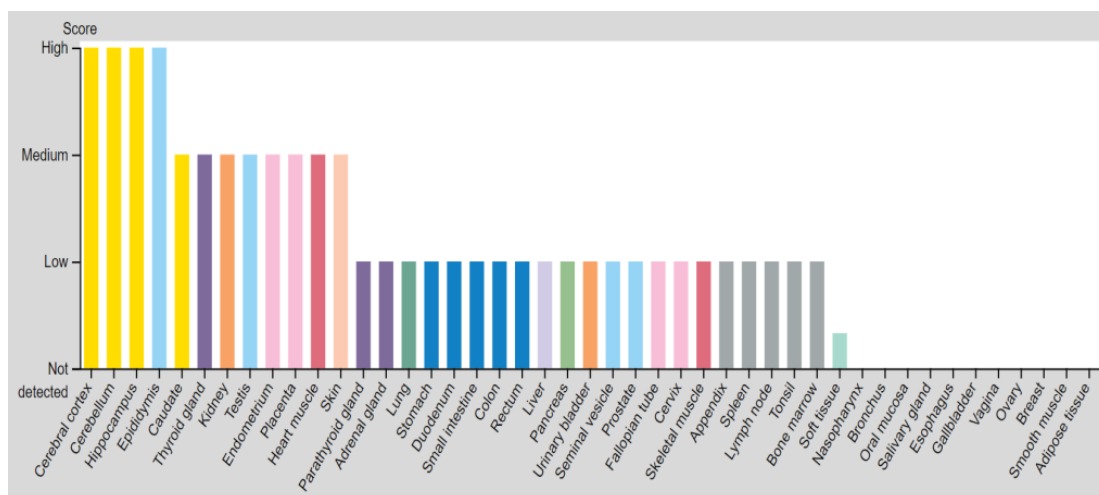


Εικόνα 14: Μεταγραφικά επίπεδα του γονιδίου *SORT1*.

Το γονίδιο *SORT1* όπως έχει ήδη αναφερθεί κωδικοποιεί την πρωτεΐνη σορτιλίνη. Η κατανομή της σορτιλίνης στα κύτταρα είναι ρυθμισμένη. Το 90% της πρωτεΐνης παραμένει ενδοκυτταρικό. Ειδικότερα, η σορτιλίνη κυριαρχεί σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα όπως είναι το λυσόσωμα, το ενδόσωμα και το σύμπλεγμα Golgi [48]. Στον αντίποδα, μόνο ένα μικρό ποσοστό, 10%, της σορτιλίνης εκφράζεται στην κυτταρική επιφάνεια, στην πλασματική μεμβράνη [78].

Η σορτιλίνη ανιχνεύτηκε και ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στον ανθρώπινο εγκέφαλο όπου και εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα [50] (Εικόνα 15). Συγκεκριμένα, όσον αφορά τον εγκέφαλο εκφράζεται κυρίως στον εγκεφαλικό φλοιό, στον ιππόκαμπο

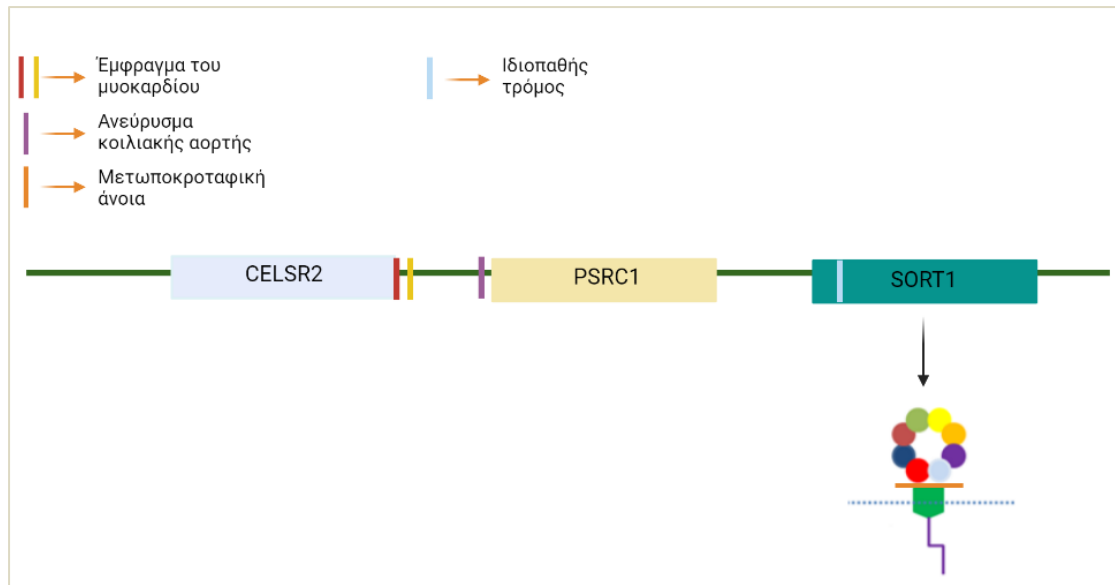
και στον οδοντωτό γύρο [79]. Πέραν τούτου, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφράζεται σε σχετικά υψηλά επίπεδα και σε άλλους ιστούς και όργανα εκτός του εγκεφάλου λόγω χάριν στον νωτιαίο μυελό, στην καρδιά, στους σκελετικούς μύες, στον θυρεοειδή, στον πλακούντα και στους όρχεις. Αντίθετα χαμηλότερα ποσοστά σορτιλίνης εντοπίζονται σε λεμφικά όργανα εστιάζοντας κυρίως στους λεμφαδένες, στο κόλον (παχύ έντερο) και στο ήπαρ.



Εικόνα 15: Επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης σορτιλίνης σε ιστούς.

4.4.2 Εντοπισμός πολυμορφισμών στο γονίδιο *SORT1* και ο συσχετισμός τους με τη νόσο του Parkinson

Το συγκεκριμένο γονίδιο όπως έχει ήδη αναφερθεί κωδικοποιεί την πρωτεΐνη σορτιλίνη. Βέβαια δεν εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί σε αυτό το γονίδιο που να σχετίζονται με τη συγκεκριμένη νόσο. Παρόλα αυτά, έχουν βρεθεί αρκετοί πολυμορφισμοί στο συγκεκριμένο γονίδιο ή κοντά σε αυτό, δηλαδή στη ευρύτερη περιοχή του 1p13.3 χρωμοσώματος [80,81] όπου εδράζεται (**Εικόνα 16**), οι οποίοι ίσως να σχετίζονται με την εμφάνιση άλλων ασθενειών και παθολογικών καταστάσεων όπως ο ιδιοπαθής τρόμος (Essential Tremor, ET), το έμφραγμα του μυοκαρδίου (Myocardial Infarction, MI) και το ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής (Abdominal Aortic Aneurysm, AAA).



Εικόνα 16: Ορισμένοι πολυμορφισμοί που εντοπίζονται στο γονίδιο *SORT1* και κοντά στην συγκεκριμένη γονιδιακή περιοχή και οι ασθένειες με τις οποίες έχουν συσχετιστεί.

5. Συζήτηση

Η νόσος του Parkinson είναι μια προοδευτική νευρολογική διαταραχή που εμφανίζεται δεύτερη στην ιεραρχία όσον αφορά τη συχνότητα εμφάνισης της μετά τη νόσο Alzheimer. Αποτελεί μία πολυπαραγοντική νόσο ως προς την παθογένεση της, η οποία χαρακτηρίζεται από απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μέλαινα ουσία και από εγκλείσματα πλούσια σε α-συνουκλεΐνη [82]. Μελέτες σε γενετικό επίπεδο έδειξαν συσχέτισμό διάφορων πρωτεϊνών με τη νόσο, μία εκ των οποίων είναι η σορτιλίνη [83], η οποία αποτελεί αντικείμενο μελέτης της συγκεκριμένης εργασίας.

Η σορτιλίνη είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I και μέλος της οικογένειας υποδοχέων με VPS10P επικράτεια [84]. Εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος και φαίνεται πως έχει συσχετιστεί με αρκετές ασθένειες και διαταραχές όπως για παράδειγμα με το Alzheimer, τον καρκίνο και τις καρδιαγγειακές νόσους [83]. Ολοένα και περισσότερες έρευνες λόγω των περιορισμένων γνώσεων σχετικά με την σχέση της σορτιλίνης και της νόσου του Parkinson στρέφουν το ενδιαφέρον τους πλέον στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Είναι επομένως αναγκαίο, προκειμένου να ξετυλιχθεί γενικότερα η λειτουργία της σορτιλίνης, να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της σορτιλίνης τόσο σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος υγιών ατόμων και ασθενών με νόσο Parkinson όσο και σε ορό. Ένα από τα κύρια ευρήματα της μελέτης αποτελεί το γεγονός πως ο πληθυσμός των μονοκυττάρων ήταν μειωμένος έως και ανύπαρκτος στους ασθενείς με νόσο Parkinson έναντι των υγείων. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με ευρήματα που προέκυψαν από προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι ο πληθυσμός των μονοκυττάρων παρουσίαζε μία τάση προς μείωση στους ασθενείς με νόσο (Π. Νταβαρούκας (2022) και Α. Ανδρουτσοπούλου (2022)). Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με την πρώτη βιβλιογραφική αναφορά το ποσοστό των μονοκυττάρων στο αίμα των υγιών ατόμων της συγκεκριμένης μελέτης ήταν $3,11\% \pm 0,29\%$ έναντι $1,17\% \pm 0,39\%$ των ασθενών, υποδεικνύοντας την στατιστικώς σημαντική διαφορά αφού $p\text{-value} = 0,0016 < 0,05$). Αξίζει να σημειωθεί πως ορισμένες έρευνες έδειξαν επίσης διαφορές ανάμεσα στα επίπεδα των τριών υποπληθυσμών μονοκυττάρων στις δύο ομάδες ατόμων [85]. Ειδικότερα, παρατηρήθηκαν χαμηλότερα επίπεδα μη κλασικών και ενδιάμεσων μονοκυττάρων στους ασθενείς σε σύγκριση με τους υγιείς αλλά

υψηλότερα ποσοστά κλασικών μονοκυττάρων. Επίσης, έχει δειχθεί ότι παρατηρείται αυξημένη κυτταρική διαίρεση των συγκεκριμένων κυττάρων στους ασθενείς αλλά μειωμένη βιωσιμότητα τους [86]. Ωστόσο κάποιες άλλες μελέτες υποδεικνύουν πως δεν υπάρχει μεταβολή στην ποσότητα των ολικών μονοκυττάρων μεταξύ ασθενών και υγιών [85]. Γενικότερα οι ερευνητές έχουν παρατηρήσει διαφορές όχι μόνο στα μονοκύτταρα αλλά και σε άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στο αίμα ασθενών με νόσο Parkinson [87,88,89].

Στη συνέχεια, αναλύθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης σορτιλίνης στο σύνολο των κυττάρων του αίματος αλλά και στην κυτταρική επιφάνεια των μονοκυττάρων τόσο στους υγιείς όσο και στους ασθενείς. Παρόλο που τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά, χρήζουν ανάλυσης και συζήτησης. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν πως τόσο στον συνολικό αριθμό των κυττάρων του αίματος όσο και μεμονωμένα στα μονοκύτταρα, τα επίπεδα έκφρασης της σορτιλίνης ήταν υψηλότερα στους υγιείς σε σύγκριση με τους ασθενείς. Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης της σορτιλίνης στα μονοκύτταρα των ασθενών, φαίνεται να είναι απόρροια της μείωσης των μονοκυττάρων στη συγκεκριμένη ομάδα ατόμων. Ειδικότερα, υποστηρίζεται από τους ερευνητές πως η σορτιλίνη κυριαρχεί σε T λεμφοκύτταρα, σε μακροφάγα και σε δενδριτικά κύτταρα [90]. Ωστόσο, το συγκεκριμένο αποτέλεσμα δεν συμβαδίζει με τις υπάρχουσες μελέτες που υποστηρίζουν μία μικρή τάση αύξησης των επιπέδων έκφρασης της σορτιλίνης τόσο στον συνολικό αριθμό κυττάρων του ανοσοποιητικού όσο και στα μονοκύτταρα των ασθενών έναντι των υγιών [68].

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε και ο ποσοτικός προσδιορισμός της διαλυτής σορτιλίνης στον ορό αίματος ασθενών με νόσο Parkinson καθώς και σύγκριση των μέσων όρων των συγκεντρώσεων αυτής της πρωτεΐνης μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων με δεδομένα που προέκυψαν από προηγούμενες μελέτες. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με τα ευρήματα στην περίπτωση της έκφρασης της πρωτεΐνης σορτιλίνης στην επιφάνεια των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης της διαλυτής σορτιλίνης ήταν υψηλότερα στα υγιή άτομα, δεδομένα που προήλθαν από την πτυχιακή της Α. Ανδρουτσοπούλου (2022), σε σύγκριση με τους ασθενείς με νόσο. Πράγματι, παρατηρώντας κανείς τους μέσους όρους των συγκεντρώσεων της σορτιλίνης και στις δύο ομάδες ατόμων αντιλαμβάνεται αυτή τη διαφορά, αφού ο μέσος όρος συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης σε ασθενείς με νόσο Parkinson ισούται με 14,95 pg/ml ενώ σε υγιείς ισούται με 60,87 pg/ml. Με βάση τις υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές [54,74] και όπως αναφέρθηκε προηγουμένως,

ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν αύξηση της σορτιλίνης στους ασθενείς συγκριτικά με υγιείς. Ένα τέτοιο γεγονός θα έθετε τη σορτιλίνη ως υπεύθυνο παράγοντα για την παθογένεση της νόσου. Ωστόσο μία τέτοια αύξηση δεν παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία. Κατ' επέκταση απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για διευκρίνιση των παραγόντων που επηρεάζουν τα επίπεδα της διαλυτής στον ορό του αίματος σορτιλίνης.

Επίσης πραγματοποιήθηκαν και προσπάθειες οπτικοποίησης της σορτιλίνης σε κύτταρα. Για το σκοπό αυτό δοκιμάστηκαν διαφορετικά πρωτόκολλα ανοσοφθορισμού. Τα αποτελέσματα, τόσο με τη χρώση των κυττάρων πριν (PRE-FIX) όσο και μετά την μονιμοποίηση τους (POST-FIX), ήταν παρόμοια. Όπως και στην περίπτωση της κυτταρομετρίας ροής έτσι και εδώ, παρατηρήθηκε μικρός αριθμός μονοκυττάρων στους ασθενείς ωστόσο τα μονοκύτταρα ήταν ορατά με τη βοήθεια των κατάλληλων αντισωμάτων. Παρόλα αυτά, ούτε με τη συγκεκριμένη τεχνική παρατηρήθηκε σορτιλίνη στον πληθυσμό των μονοκυττάρων των ασθενών με νόσο Parkinson. Αυτό το γεγονός καθιστά απαραίτητη την περαιτέρω μελέτη ώστε να εξαχθούν σαφή αποτελέσματα όσον αφορά τη σορτιλίνη και τη συσχέτιση της με τη νόσο του Parkinson. Το επόμενο βήμα θα ήταν να δοκιμαστούν διαφορετικά αντισώματα διαφορεικής προέλευσης και ευαισθησίας ώστε να ελεγχθεί η πιθανότητα τεχνικού σφάλματος και να βελτιστοποιηθεί το πρωτόκολλο.

Επιπρόσθετα, διερευνήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της σορτιλίνης σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο με τη βοήθεια βιοπληροφορικών αναλύσεων, όπως και η πιθανότητα εντοπισμού πολυμορφισμών στο γονίδιο *SORT1* που την κωδικοποιεί και οι οποίες θα σχετίζονται με τη νόσο του Parkinson. Οι πληροφορίες που παρουσιάζονται στις βάσεις δεδομένων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, και γενικότερα από τη διεθνή βιβλιογραφία, η σορτιλίνη εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον εγκέφαλο υγιών ατόμων [52]. Πέραν όμως του εγκεφάλου εκφράζεται και σε άλλους ιστούς με διάφορες όμως διακυμάνσεις όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης της. Στους ασθενείς με Parkinson σύμφωνα με πρόσφατες βιοπληροφορικές αναλύσεις φάνηκε πως η σορτιλίνη εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στην μέλαινα ουσία [90]. Αυτό το εύρημα ίσως υποδηλώνει πως η σορτιλίνη συμμετέχει μέσω ορισμένων μοριακών μονοπατιών στη παθογένεση της νόσου. Όσον αφορά την εύρεση πολυμορφισμών στο γονίδιο *SORT1* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη σορτιλίνη και τη συσχέτιση τους με τη νόσο του

Parkinson απαιτούνται επιπλέον έρευνες και μελέτες προκειμένου να επιτευχθεί αυτός ο στόχος. Μέχρι σήμερα οι μελέτες έχουν δείξει πως περίπου το 90% των μεταλλάξεων που σχετίζονται με ορισμένες ασθένειες εντοπίζονται κυρίως σε μη κωδικές περιοχές [91]. Ωστόσο, στο συγκεκριμένο γονίδιο δεν έχει βρεθεί κάποιος πολυμορφισμός που να σχετίζεται με τη νόσο. Παρόλα αυτά έχουν εντοπιστεί πολυμορφισμοί στο γονίδιο *SORT1* ή κοντά σε αυτή τη γονιδιακή περιοχή που πιθανώς να σχετίζονται με την εκδήλωση άλλων ασθενειών [80,81,92]. Ένα από τα μεγαλύτερα και σημαντικότερα προβλήματα είναι η κατανόηση της συνεισφοράς και της βιολογικής σημασίας των SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) στις ασθένειες και στον ανθρώπινο φαινότυπο. Επομένως, είναι επιτακτική η ανάγκη μελλοντικών ερευνών προκειμένου να βρεθούν πολυμορφισμοί στο συγκεκριμένο γονίδιο και να συσχετιστούν με την εκδήλωση της νόσου του Parkinson.

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από ασθενείς με Parkinson στους οποίους επιβεβαιωθήκαν προηγούμενα ευρήματα σχετικά με τα επίπεδα της μεμβρανικής και διαλυτής σορτιλίνης . Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκαν τα πρώτα στάδια για ανίχνευση της σορτιλίνης με χρήση ανοσοφθορισμού σε ανθρώπινα κύτταρα. Είναι απαραίτητο μελλοντικά να αυξηθεί ο αριθμός των δοτών/δειγμάτων προς μελέτη. Μια ενδιαφέρουσα πρόταση ίσως να είναι ο έλεγχος των επιπέδων σορτιλίνης σε ασθενείς με ίδια κλινικά χαρακτηριστικά όπως για παράδειγμα η διερεύνηση των επιπέδων της σε νοσούντες οι οποίοι βρίσκονται στο ίδιο στάδιο. Οι πληροφορίες αυτές θα συνεισφέρουν ώστε να γίνει περισσότερο κατανοητός ο ρόλος της σορτιλίνης στην παθογένεση της νόσου του Parkinson και εφόσον σχετίζεται ίσως και να γίνει θεραπευτικός στόχος για την αντιμετώπιση του.

6. Βιβλιογραφία

1. Kouli, A., et al., (2018), **Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis**, Brisbane: Stoker TB, Greenland JC
2. Pike, A. F., et al., (2022), **Dopamine signaling modulates microglial NLRP3 inflammasome activation: implications for Parkinson's disease**, *Journal of Neuroinflammation*
3. Church, F. C., (2021). **Treatment Options for Motor and Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease**. *Biomolecules* , 11(4): p. 612
4. Braak, H., et.al., (2004), **Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology**, *Cell and Tissue Research*, 318(1): p: 121–134
5. Braak, H., et.al., (2003), **Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease**, *Neurobiology of Aging*, 24(2): p. 197-211
6. Zafar, S., Yaddanapudi, S, S., (2022), **Parkinson Disease**, *StatPearls*
7. Guo, X., et.al., (2022), **Characterization of Early Stage Parkinson's Disease From Resting-State fMRI Data Using a Long Short-Term Memory Network**, *Front. Neuroimaging*
8. Templeton, J. M., Poellabauer, C., Schneider, S., (2022), **Classification of Parkinson's disease and its stages using machine learning**, *Scientific Reports*, 12(1):p. 14036
9. Sveinbjornsdottir, S., (2016), **The clinical symptoms of Parkinson's disease**, *Journal of Neurochemistry*, 139(S1): p. 318-324
10. Bostan A.C., Dum R.P., Strick P.L. (2018), **Functional Anatomy of Basal Ganglia Circuits with the Cerebral Cortex and the Cerebellum** *Prog Neurol Surg*. p 50-61
11. Emamzadeh, F.N., (2016), **Alpha-synuclein structure, functions, and interactions**. *J Res Med Sci*, 21: p. 29
12. Stefanis, L., (2012), **α -Synuclein in Parkinson's Disease**, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(2)
13. Mehra, S., S. Sahay, and S.K. Maji, (2019), **alpha-Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis**. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 1867(10): p. 890-908
14. Bobela, W., et. al., (2015), **Alpha-Synuclein as a Mediator in the Interplay between Aging and Parkinson's Disease**, *Biomolecules*, 5(4): p. 2675–2700

15. Chen, R., et. al., (2022), α -Synuclein in Parkinson's disease and advances in detection, *ClinicaChimica Acta*, p. 76-86
16. Annesley, S. J., Fisher, P. R., (2019), Mitochondria in Health and Disease, *Cells*, 8(7): p. 680
17. Bravo-San Pedro, J. M., et. al., (2017), Autophagy and Mitophagy in Cardiovascular Disease, *Circulation Research*, 120(11): p. 1812-1824
18. Dornie, F., (2020), Mitophagy in Parkinson's disease: From pathogenesis to treatment target, *Neurochemistry International*, p. 104756
19. Subramaniam, S. R., Chesselet, M.F., (2013), Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease, *Prog Neurobiol*, 106-107: p. 17-32
20. Kung, H.C., et.al., (2021), Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Neuroprotection of Polyphenols with Respect to Resveratrol in Parkinson's Disease, *Biomedicines*, 9(8): p. 918
21. Starkov, A.A., (2008), The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling, *Ann N Y Acad Sci.*, 1147:37-52
22. Moon, H.E., Paek, S.H., (2015), Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease, *Exp Neurobiol*, 24(2): p. 103-116
23. Yan, M. H., et.al., (2013), Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease, *Free Radic Biol Med*, 62: p. 90-101
24. Percário, S., et.al., (2020), Oxidative Stress in Parkinson's Disease: Potential Benefits of Antioxidant Supplementation, *Oxid Med Cell Longev*
25. Hartmann, A., (2004) Postmortem studies in Parkinson's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* 6(3): p. 281-293
26. McGeer, P. L., McGeer, E. G., (2004), Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease, *Parkinsonism and Related Disorders*, 10 : p. S3-S7
27. Kwon, H, S., Koh, S., (2020), Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes, *TranslNeurodegener.*, 9: p. 42
28. Daniele, S.G., et al., (2015), Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded alpha-synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders. *SciSignal*, 8(376): p. ra45

29. Béraud, B., A Maguire-Zeiss, K., (2012), Misfolded α -synuclein and Toll-like receptors: therapeutic targets for Parkinson's disease, *Parkinsonism RelatDisord*, p. S17-20
30. Liu, B., et.al., (2002), Role of Nitric Oxide in Inflammation-Mediated Neurodegeneration, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 962: p. 318-31
31. Zhang, K., et.al., (2021), Targeting autophagy using small-molecule compounds to improve potential therapy of Parkinson's disease, *Acta Pharm Sin B*, 11(10): p. 3015–3034
32. Yin-Yu Pang, S., et.al., (2022), LRRK2, GBA and their interaction in the regulation of autophagy: implications on therapeutics in Parkinson's disease, *Transl Neurodegener*, 11: p. 5
33. Zavodszky, E., Seaman, M.N., Rubinsztein, D.C., (2014), VPS35 Parkinson mutation impairs autophagy via WASH. *Cell Cycle*, 13(14): p. 2155-2156
34. Behl, T., et.al., (2022), Exploring the Role of Ubiquitin–Proteasome System in Parkinson's Disease, *Molecular Neurobiology*, 59(7): p. 4257–4273
35. Buneeva, O., Medvedev, A., (2022), Atypical Ubiquitination and Parkinson's Disease, *Int J Mol Sci.*, 23(7): p. 3705
36. Ou, Z., et al., Global Trends in the Incidence, Prevalence, and Years Lived With Disability of Parkinson's Disease in 204 Countries/Territories From 1990 to 2019. *Front Public Health*, 2021. 9: p. 776847
37. Reeve, A., et al., (2014). Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor? *AgeingResearchReviews* , 14(100): p. 19–30
38. Cerri, S., Mus, L., Blandini, F., (2019), Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *J Parkinsons Dis*, 9(3): p. 501-515
39. Georgiev, D.,et.al., (2017), Gender differences in Parkinson's disease: A clinical perspective. *Acta Neurologica Scandinavica* , 136(6): p. 570-584
40. Marras, C., et al., (2019). Environment, lifestyle, and Parkinson's disease: Implications for prevention in the next decade. *Movement Disorders* , 34(6): p. 801-811
41. Mullin, S., Day, J. O., (2021). The Genetics of Parkinson's Disease and Implications for Clinical Practice. *Genes* , 12(7): p. 1006

42. Wang, Y., et al., (2022), Evaluation of the relationship between SORL1 gene polymorphism and Parkinson's disease in the Chinese population. *NeurosciLett*, 778: p. 136602
43. Radhakrishnan. D.M, Goyal V. (2018). Parkinson's disease: A review. *Neurol India*, 66(7): p. 26-35
44. Armstrong, M.J, Okun M. S. (2020). Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease. *JAMA* , 323(6): p. 548-560
45. Halli-Tierney, A.D, et.al., (2020). Parkinson Disease. *American Family Physician*, 102(11):679-691
46. Armstrong, M.J, Okun M. S. (2020). Choosing a Parkinson Disease Treatment. *JAMA*, 323(14): p.1420
47. Witt, K., et al., (2017). Nonpharmacological treatment procedures for Parkinson's disease *Nervenarzt*, 88(4): p. 383-390
48. Ni, X., Morales, C. R., (2006), The Lysosomal Trafficking of Acid Sphingomyelinase is Mediated by Sortilin and Mannose 6-phosphate Receptor *Traffic*7(7): p. 889-902
49. Goettsch, C., Kjolby, M., Aikawa E., (2018), Sortilin and its Multiple Roles in Cardiovascular and Metabolic Diseases, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 38(1): p. 19–25
50. Petersen, C.M., et al., (1997), Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem*, 272(6): p. 3599-605
51. Mazella, J., (2022), Deciphering Mechanisms of Action of Sortilin/Neurotensin Receptor-3 in the Proliferation Regulation of Colorectal and Other Cancers, *Int J Mol Sci.*, 23(19): p. 11888
52. Mitok, K. A., et.al., (2022), Sorting through the extensive and confusing roles of sortilin in metabolic disease, *journal of lipid research*, 63(8): p. 100243
53. Hermey, G., (2009), The Vps10p-domain receptor family, *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(16): p. 2677–2689
54. Al-Yozbaki, M., et.al., (2020), Balancing neurotrophin pathway and sortilin function: Its role in human disease, *BiochimBiophys Acta Rev Cancer*, 1874(2): p. 188429

55. Hivelin, C., Mazella, J., Coppola, T., (2017), Sortilin derived propeptide regulation during adipocyte differentiation and inflammation, *BiochemBiophys Res Commun*, 482(1): p. 87-92
56. Trabjerg, E., et.al., (2019), Investigating the Conformational Response of the Sortilin Receptor upon Binding Endogenous Peptide- and Protein Ligands by HDX-MS, *Structure*, 27(7): p. 1103-1113.e3
57. Nielsen, M. S., et.al., (2008), Different Motifs Regulate Trafficking of SorCS1 Isoforms, *Traffic*, 9(6):p. 980-994
58. Talbot. H., et.al., (2019), Regulatory Roles of Sortilin and SorLA in Immune-Related Processes, *Front Pharmacol*. P. 1507
59. Evans, S. F., et.al., (2011), Neuronal Brain-derived Neurotrophic Factor Is Synthesized in Excess, with Levels Regulated by Sortilin-mediated Trafficking and Lysosomal Degradation, *Journal of Biological Chemistry*, 286(34): p. 29556–29567
60. Nielsen, M.S., et al., (2001), The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J*, 20(9): p. 2180-2190
61. Morinville, A., et al., (2004), Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(11): p. 2153-2168
62. Tanimoto, R., et al., (2017), The perlecan-interacting growth factor progranulin regulates ubiquitination, sorting, and lysosomal degradation of sortilin, *Matrix Biol*, 64: p. 27-39
63. Wilson, C.M., et al., (2016), A new role under sortilin's belt in cancer, *CommunIntegr Biol*, 9(1): p. e1130192
64. Chen, Z. Y., et.al., (2005), Sortilin Controls Intracellular Sorting of Brain-Derived Neurotrophic Factor to the Regulated Secretory Pathway, *J Neurosci.*, 25(26): p. 6156–6166
65. Su, X., et.al., (2022), Emerging roles of sortilin in affecting the metabolism of glucose and lipid profiles, *Bosn J Basic Med Sci.*, 22(3):p. 340–352
66. Reuter, E., et.al., (2015), Role of Sortilin in Models of Autoimmune Neuroinflammation, *J Immunol*, 195 (12): p. 5762–5769

67. Han, W., et.al., (2020), The Association Between Sortilin and Inflammation in Patients with Coronary Heart Disease, *J Inflamm Res*, 13: p. 71–79
68. Yabe-Wada, T., et.al., (2016), TLR signals post transcriptionally regulate the cytokine trafficking mediator sortilin, *Scientific Reports*, 6: p. 26566
69. Vázquez, C. L., et.al., (2016), The proneurotrophin receptor sortilin is required for *Mycobacterium tuberculosis* control by macrophages, *Scientific Reports*6: p. 29332
70. Saadipour, K., et.al., (2013), Amyloid beta1–42 (A β 42) up-regulates the expression of sortilin via the p75NTR/RhoA signaling pathway, *Journal of Neurochemistry*, 127(2): p. 152-162
71. Roselli, S., et.al., (2015), Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion, *Oncotarget*, 6(12): p. 10473–10486
72. Oh T.J., et.al., (2017), Circulating sortilin level as a potential biomarker for coronary atherosclerosis and diabetes mellitus. *CardiovascDiabetol*. 16(1): p. 92
73. Goettsch, C., Kjolby, M., Aikawa E., (2018), Sortilin and its Multiple Roles in Cardiovascular and Metabolic Diseases, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 38(1): p. 19–25
74. Szegő, É. M., et.al., (2013), Impairment of the septal cholinergic neurons in MPTP-treated A30P α -synuclein mice, *Neurobiology of Aging*, 34(2): p. 589-601
75. McKinnon, Katherine M., (2018), Flow Cytometry: An Overview, *CurrProtoc Immunol.*, 120: 5.1.1–5.1.11
76. Tabatabaei, M.S., Ahmed, M., (2022), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), *Methods Mol Biol*, 2508, p: 115-134
77. Im, K., et al., (2019), An introduction to Performing Immunofluorescence Staining, *Methods Mol Biol.*, 1897 p: 299–311
78. Ouyang, S., et.al., (2020), Mechanism underlying the regulation of sortilin expression and its trafficking function, *Journal of Cellular Physiology*, 235(12): p. 8865-10118

79. Mazella, J., (2001), Sortilin/neurotensin receptor-3: a new tool to investigate neurotensin signaling and cellular trafficking?, *Cellular Signalling*, 13(1): p. 1-6
80. Sánchez, E., et.al., (2015), SORT1 Mutation Resulting in Sortilin Deficiency and p75(NTR) Upregulation in a Family With Essential Tremor, *ASN Neuro*, 7(4)
81. Jones, G T., et.al., (2013), A sequence variant associated with sortilin-1 (SORT1) on 1p13.3 is independently associated with abdominal aortic aneurysm, *Hum Mol Genet*, 22(14): p. 2941–2947
82. Venda L L., et.al., (2010), α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease, *Trends Neurosci*, 33(12): p. 559–568
83. Talbot, H., et al., (2018), Regulatory Roles of Sortilin and SorLA in Immune-Related Processes. *Front Pharmacol*, 9: p. 1507
84. Hermey, G., (2009), The Vps10p-domain receptor family. *Cell Mol Life Sci*, 66(16): p. 2677-89
85. Su, Y., et al., (2022), Dysregulation of peripheral monocytes and pro-inflammation of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *J Neurol*,
86. Nissen, S.K., et al., (2019), Alterations in Blood Monocyte Functions in Parkinson's Disease. *Mov Disord*, 34(11): p. 1711-1721
87. Jiang, S., Gao, H., Luo, Q. et al. (2017) The correlation of lymphocyte subsets, natural killer cell, and Parkinson's disease: a meta-analysis. *Neurol Sci* 38: p. 1373–1380
88. Stevens C. H., Rowe D., Morel-Kopp M.-C. et al. (2012) Reduced T helper and B lymphocytes in Parkinson's disease. *Journal of Neuroimmunology*, 252(1-2): p. 95–99
89. Bas, J., et al., Lymphocyte populations in Parkinson's disease and in rat models of parkinsonism. *J Neuroimmunol*, 2001. 113(1): p. 146-52
90. Ishiyama S., et al., (2023), Sortilin acts as an endocytic receptor for α -synuclein fibril, *The FASEB Journal*, 37(7)
91. Farh, K.K.-H., Marson, A., Zhu, J., Kleinewietfeld, M., et al., (2015), Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*, 518, 337–343
92. Musunuru, K., et.al., (2010), From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus, *Nature*, 466(7307) : p. 714–719