



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΘΕΜΑ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ Dyrk1a, FUS ΚΑΙ TDP43
ΣΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ**

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ: ΠΗΝΕΛΟΠΗ
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΧΡΗΣΤΙΑΔΗ**

ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ: 19678341

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑΣ: ΕΥΣΤΑΘΙΟΥ
ΑΝΤΩΝΙΑ, PhD, MBA – ΜΕΤΑΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ ΣΤΟ
ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΠΑΣΤΕΡ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΣΥΝ-ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΑ: ΔΟΞΑΚΗΣ
ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ, PhD, MBA - Γ' ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ ΣΤΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ (IIBEAA)

ΑΘΗΝΑ, 2024

UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE
SCIENCES DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
DIVISION OF MEDICAL LABORATORIES

DISSERTATION

**SUBJECT: ROLE OF DYRK1A, FUS AND TDP43 IN
PARKINSON DISEASE**

STUDENT NAME: PINELOPI KONSTANTINA CHRISTIDI

CN: 19678341


NAME OF SUPERVISOR: EFSTATHIOU ANTONIA, PhD, MBA –
POSTDOCTORAL RESEARCHER AT PASTEUR HELLENIC
INSTITUTE

NAME OF CO-SUPERVISOR: DOXAKIS EPAMINONDAS, PhD,
MBA – RESEARCHER C' AT THE BIOMEDICAL RESEARCH
FOUNDATION ACADEMY OF ATHENS (BRFAA)

ATHENS, 2024

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής:

Η διπλωματική εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

A/A	ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1 ^{ος} ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ	ΕΥΣΤΑΘΙΟΥ ΑΝΤΩΝΙΑ	
2 ^{ος} ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ	ΔΟΞΑΚΗΣ ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ	
3 ^{ος} ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ	ΤΡΑΠΑΛΗ ΜΑΡΙΑ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Χρηστίδη Πηνελόπη Κωνσταντίνα του Πέτρου, με αριθμό μητρώου 19678341 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα
Πηνελόπη Κωνσταντίνα Χρηστίδη

Περιεχόμενα

<i>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</i>	9
<i>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</i>	10
<i>ABSTRACT</i>	12
<i>Κεφάλαιο 1: Η νόσος του Πάρκινσον</i>	13
1.1 Παθολογικό προφίλ.....	13
1.2 Γενετικό υπόβαθρο.....	14
1.3 Αιτιολογία παθογένειας.....	14
<i>Κεφάλαιο 2: Η α-συνουκλεΐνη</i>	15
2.1 Το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης.....	16
2.2 Η δομή της α-συνουκλεΐνης.....	16
2.3 Έκφραση της α-συνουκλεΐνης και ο φυσιολογικός της ρόλος.....	17
2.4 Παθολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης.....	18
<i>Κεφάλαιο 3: Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης</i>	21
3.1 Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης.....	21
3.2 Ρύθμιση έκφρασης της α-συνουκλεΐνης.....	22
3.3 Πρωτεΐνες δέσμευσης RNA.....	23
3.4 Λειτουργίες των RBPs.....	24
<i>Κεφάλαιο 4: Οι RBPs στο ΚΝΣ</i>	28
4.1 Η πρωτεΐνη DYRK1A.....	28
4.2 Η πρωτεΐνη TDP43 (transactive response DNA-binding protein 43 kDa or TARDBP).....	29
4.3 Η πρωτεΐνη FUS/TLS (Fused in Sarcoma/Translocated in Liposarcoma).....	31
<i>Κεφάλαιο 5: Μηχανισμοί αποικοδόμησης των πρωτεϊνών</i>	32
5.1 Μονοπάτι Αυτοφαγίας-Λυσοσωμάτων (Autophagy Lysosome Pathway, ALP).....	33
5.1.1 Αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από πρωτεΐνες συνοδούς (Chaperone-Mediated Autophagy, CMA).....	34
35	
5.1.2 Μικροαυτοφαγία.....	35
5.1.3 Μακροαυτοφαγία.....	36
<i>ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</i>	40
<i>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</i>	41
1. Πειραματικά Υλικά.....	41
1.1 Κυτταρικά συστήματα.....	41
1.2 Πλασμίδια.....	41
1.3 Διαλύματα – Αντιδραστήρια.....	42
1.4 Φαρμακολογικοί παράγοντες.....	45
1.4 Αντισώματα.....	45
2. Μέθοδοι.....	47
2.1 Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών.....	47
2.2 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών.....	47
2.3 Επιμόλυνση κυττάρων με αδενοϊούς.....	48

2.4	Απομόνωση RNA	48
2.5	Αντίστροφη μεταγραφή (RT) / Σύνθεση cDNA	49
2.6	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR).....	50
2.7	Πουρομικίνη.....	51
2.8	Ανοσοστόψωμα κατά Western.....	52
2.9	TECAN SPARK® MULTIMODE MICROPLATE READER.....	54
2.10	Λογισμικά προγράμματα	54
2.11	Στατιστική επεξεργασία	55
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		56
1.	Η υπερέκφραση των DYRK1A, FUS, TDP43, και TDP43-ΔNLS δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα των SK-N-SH κύτταρα.....	56
2.	Συσχέτιση ανάμεσα στο μονοπάτι του ERK και στον ρόλο των DYRK1A, FUS, TDP-43 και TDP-43 ΔNLS.....	57
3.	Συσχέτιση ανάμεσα στο μονοπάτι mTOR και στον ρόλο των DYRK1A, FUS, TDP-43 και TDP-43 ΔNLS.....	57
4.	Ο ρόλος των DYRK1A, FUS, TDP-43 και TDP43-ΔNLS στην πρωτεϊνοσύνθεση.....	59
5.	Διερεύνηση του ρόλου των DYRK1A, FUS, TDP-43, TDP-43 ΔNLS στην αυτοφαγία. 60	
6.	Το οξειδωτικό στρες επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης DYRK1A ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση των FUS και TDP-43 στα SK-N-SH κύτταρα.....	61
7.	Η υπερέκφραση της DYRK1A και FUS αυξάνουν την συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης.....	63
8.	Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης α-συνουκλεΐνης στις σερίνες 87 και 129 δεν αλλάζουν μετά από υπερέκφραση των DYRK1A, FUS, TDP-43, και TDP-43 ΔNLS.....	64
9.	Μειωμένα επίπεδα mRNA της α-συνουκλεΐνης σε κύτταρα όπου έχουν υπερέκφραστεί η DYRK1A, FUS, TSP-43, και TDP43 ΔNLS.....	65
10.	Αυξημένα επίπεδα μονομερούς α-συνουκλεΐνης σε κύτταρα SK-N-SH όπου έχει υπερέκφραστεί η DYRK1A. Μικρότερη αύξηση παρατηρείται με τις FUS και TDP-43.....	66
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....		68
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....		74
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		75

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Βασικών Νευροεπιστημών του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.). Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέπων της διπλωματικής μου εργασίας, κ. Επαμεινώνδα Δοξάκη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στην ερευνητική του ομάδα, για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπων Καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας, κ. Αντωνία Ευσταθίου, καθηγήτρια του Τομέα Ιατρικών Εργαστηρίων, του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, για την πολύτιμη βοήθεια της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαρία Τράπαλη, καθηγήτρια του Τομέα Ιατρικών Εργαστηρίων, του τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, που δέχτηκε να είναι στην τριμελή επιτροπή μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Δοξάκη και ιδιαίτερα την Μαριάννα Νάκη και τον Φαίδων Καττάν για την άψογη συνεργασία και την συνεχή στήριξη που μου προσέφεραν όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου, για την αγάπη που μου παρέχουν να εκπληρώσω τους στόχους μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι α-συνουκλεϊνοπάθειες είναι παθήσεις του νευρικού συστήματος που ανήκουν στα νευροεκφυλιστικά νοσήματα όπου εντοπίζεται μη-φυσιολογική συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης, όπως η νόσος του Πάρκινσον. Η α-συνουκλεΐνη είναι μια πρωτεΐνη η οποία βρίσκεται κυρίως στα προσυναπτικά άκρα των νευρώνων και είναι το βασικό συστατικό των σωματίων Lewy (Lewy Bodies) που αποτελούνται, μεταξύ άλλων, από αδιάλυτες μορφές της πρωτεΐνης. Ενώ οι αιτίες αυτών των παθήσεων είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστες, βασικό ρόλο παίζουν και οι γενετικοί αλλά και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπου παράλληλα με την φυσική γήρανση του ανθρώπου, φαίνεται να εμπλέκονται στην παθογένεια των α-συνουκλεϊνοπαθειών.

Στόχος της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης των πρωτεϊνών δέσμευσης σε RNA (RBPs) και της κινάσης DYRK1A στην ρύθμιση της α-συνουκλεΐνης μέσω της επίδρασης τους στους μηχανισμούς της αυτοφαγίας, του οξειδωτικού στρες, του μονοπατιού mTOR, και ERK. Επιπλέον, μελέτη έγινε και στην επίδραση της DYRK1A και των RBPs στα επίπεδα συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης, της μονομερούς μορφή της αλλά και της αντίστοιχης ποσότητας mRNA καθώς και στην βιωσιμότητα των κυττάρων όταν πραγματοποιείται υπερ-έκφρασή τους.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε σειρά SK-N-SH κυττάρων όπου έγινε υπερέκφραση των πρωτεϊνών DYRK1A, FUS, TDP-43 και TDP-43 ΔNLS, και SNCA. Από τα πειράματα που έγιναν διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση των παραπάνω πρωτεϊνών αυξάνει σημαντικά την συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης αλλά και της μονομερούς μορφή της, ενώ σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στα επίπεδα mRNA.

Επιπλέον σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, φάνηκε η συσχέτιση του μονοπατιού ERK, mTOR και της αυτοφαγίας με την μεσολάβηση συνοδών πρωτεϊνών, με τις RBPs και την κινάση DYRK1A, ενώ μελετήθηκε και η επίδραση του οξειδωτικού στρες στα επίπεδα τους.

ABSTRACT

Alpha-synucleinopathies are disorders of the nervous system that belong to neurodegenerative diseases where abnormal accumulation of alpha-synuclein is observed, such as Parkinson's disease (PD). Alpha-synuclein is a protein primarily located at the presynaptic terminals of neurons and is the main component of Lewy bodies, which consist, among other things, of insoluble forms of aggregated protein. While the causes of these disorders are largely unknown, both genetic and environmental factors, along with the natural aging process, seem to play a significant role in the pathogenesis of alpha-synucleinopathies.

This thesis aims to study the effects of RNA-binding proteins (RBPs) and the kinase DYRK1A on the regulation of alpha-synuclein via mechanisms known to be impaired in Parkinson's disease (PD), such as autophagy, oxidative stress, and the mTOR and ERK pathways. Additionally, the study investigates the impact of DYRK1A and RBPs on alpha-synuclein aggregation levels, its monomeric form, the corresponding amount of mRNA, and cell viability under overexpression conditions.

This study used the SK-N-SH cell line to induce overexpression of DYRK1A, FUS, TDP-43, TDP-43 Δ NLS, and SNCA proteins. The experiments demonstrated that overexpression of these proteins significantly increased both alpha-synuclein aggregation and its monomeric form, while a significant decrease was observed in mRNA levels.

Additionally, further experiments revealed correlations between the ERK and mTOR pathways, as well as chaperone-mediated autophagy, with RBPs and DYRK1A kinase levels. The effect of oxidative stress on DYRK1A and RBPs expression was also investigated.

Κεφάλαιο 1: Η νόσος του Πάρκινσον

Η νόσος του Πάρκινσον (Parkinson's disease, νΠ) ορίζεται ως μια χρόνια νευροεκφυλιστική νόσος και απαντάται κυρίως σε άτομα άνω της ηλικίας των 60 ετών. Τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου επηρεάζουν κυρίως την κίνηση, με συμπτώματα όπως δυσκαμψία, τρόμο ηρεμίας και βραδυκίνησια. Εκτός των κινητικών συμπτωμάτων, προβλήματα εμφανίζονται επίσης στον ύπνο και στην όσφρηση ενώ οι ασθενείς εμφανίζουν και δυσκοιλιότητα αλλά και άλλες δυσλειτουργίες του αυτόνομου νευρικού συστήματος, κατάθλιψη και σε ηλικιακά μεγαλύτερους ασθενείς, επιβράδυνση των γνωστικών λειτουργιών (Jankovic, 2008).

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί θεραπεία για τη νόσο. Παρόλα αυτά, η χρήση φαρμακευτικών σκευασμάτων μπορεί να βοηθήσει στη διαχείριση των συμπτωμάτων της νΠ. Η πλειονότητα των θεραπευτικών προσεγγίσεων επικεντρώνονται στην αύξηση της ντοπαμίνης στον εγκέφαλο, όπως η αντικατάστασή της με λεβοντόπα (L-DOPA) (Lim και Zhang 2013). Η L-DOPA επιλέγεται λόγω της ικανότητάς της να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, να εισέρχεται στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα, και να μετατρέπεται σε ντοπαμίνη μέσω του ενζύμου L-αμινοξική αποκαρβοξυλάση (Barbeau 1969).

1.1 Παθολογικό προφίλ

Το κυριότερο χαρακτηριστικό της νΠ είναι τα σωμάτια Lewy (LB, Lewy bodies), δηλαδή κυτταροπλασματικά έγκλειστα τα οποία εντοπίζονται στους νευρώνες που έχουν απομείνει στην μέλαινα ουσία και σχηματίζονται από αδιάλυτες μορφές της α-συνουκλεΐνης («συσσωματώματα»). Ακόμη, τα LBs καταγράφονται και σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου, παραδείγματος χάρη στον ραχιαίο κινητικό πυρήνα (dorsal motor nucleus), στον υπομέλαινα (locus coeruleus) και οσφρητικό λοβό (olfactory bulb), αλλά και στην αμυγδαλή (amygdaloid nucleus), στους συμπαθητικούς και παρασυμπαθητικούς μεταγαγγλιακούς νευρώνες (parasympathetic and sympathetic post-ganglionic neurons) και στον εγκεφαλικό φλοιό (cerebral cortex) (Jellinger 2012). Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της νόσου είναι η απώλεια των νευρικών κυττάρων και ειδικότερα στην συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου (Substantia nigra pars compacta, SNpc). Εκεί, τα κύτταρα παράγουν τον νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη, με αποτέλεσμα ο εκφυλισμός τους να επηρεάζει αρνητικά τη νευροδιαβίβαση σε όλο το μήκος της μελαιοραβδωτής οδού (Jankovic 2008).

1.2 Γενετικό υπόβαθρο

Όσον αφορά το γενετικό επίπεδο, έχουν εντοπιστεί διάφοροι διπλασιασμοί ή τριπλασιασμοί αλλά και σημειακές μεταλλάξεις σε άτομα με αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα για την νΠ, για την κύρια πρωτεΐνη της νόσου, την α-συνουκλεΐνη. Οι διπλασιασμοί ή οι τριπλασιασμοί του γενετικού τόπου της πρωτεΐνης δύναται να προκαλέσουν αύξηση του mRNA αλλά και τελικά της α-συνουκλεΐνης, με αποτέλεσμα την δημιουργία μη διαλυτών συσσωματωμάτων, όπως έχει ανακαλυφθεί σε δείγματα εγκεφάλου ασθενών με τη νόσο (Singleton et al. 2003). Σχετικά με τις σημειακές μεταλλάξεις αντικατάστασης που έχουν βρεθεί, ονομαστικά είναι οι A53E, A30P, A53T, E46K, G51D, H50Q (Polymeropoulos et al. 1997; Krüger et al. 1998; Zarranz et al. 2004; Proukakis et al. 2013; Lesage et al. 2013; Pasanen et al. 2014). Ενδιαφέρον έχει ότι, και η αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνη αλλά και οι υπόλοιπες μορφές της που έχουν προέλθει από τις παραπάνω μεταλλάξεις, παρουσιάζουν εξ ίσου περιορισμένη διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα, το οποίο πιθανώς να επιδεικνύει μια παρόμοια συμμετοχή όσον αφορά την ανάπτυξη τοξικών ινιδίων (Giasson et al. 1999). Εκτός από την α-συνουκλεΐνη, κι άλλα γονίδια έχουν συσχετιστεί με τον αυτοσωμικό επικρατή τύπο κληρονομικότητας της νΠ, με μερικά να είναι τα LRRK2 και UCHL1. Τα γονίδια αυτά παράγουν πρωτεΐνες που συμμετέχουν, μεταξύ άλλων σηματοδοτικών οδών, σε οδούς αποικοδόμησης πρωτεϊνών και ειδικότερα στο μονοπάτι της αυτοφαγίας και της ουβικουιτίνης πρωτεασώματος (Lecker, Goldberg, and Mitch 2006; J.-Q. Li, Tan, and Yu 2014). Επιπλέον, εμφανίζεται και υπολειπόμενος τρόπος κληρονόμησης της νΠ, ο οποίος συσχετίζεται με τα γονίδια PRKN, DJ-1/PARK7, FBXO7 και PINK1. Οι πρωτεΐνες που παράγονται από αυτά τα γονίδια, συμμετέχουν στο οξειδωτικό στρες, στην λειτουργία των μιτοχονδρίων, στον μεταβολισμό των λιπιδίων, στην ουβικιτινίωση, και στην βιογένεση και ανακύκλωση των συναπτικών κυστιδίων (Gasser 2009).

1.3 Αιτιολογία παθογένειας

Μέχρι και σήμερα, δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί οι αιτιολογικοί παράγοντες της νΠ, παρ' όλα αυτά θεωρείται ότι και γενετικοί αλλά και περιβαντολλογικοί παράγοντες, σε συνδυασμό με την γήρανση του ανθρώπου, επηρεάζουν την νΠ (Chu and Kordower 2007). Βέβαια, σε ασθενείς με τη νΠ παρατηρούνται συχνά μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες αλλά και διαταραχές που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί μείωση της κυτταρικής αναπνοής λόγω της αποσιώπησης των γονιδίων PRKN και PINK1.

Επιπλέον, η αποσιώπηση του γονιδίου PRKN είναι πιθανόν να προκαλέσει τον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Επιπλέον, εξαιτίας της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων σε ασθενείς με την νόσο, παρατηρείται στους εγκεφάλους αυτών, σχηματισμός δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), το οποίο δείχνει την παρουσία οξειδωτικού στρες. Σε αυτές τις συνθήκες, έχει παρατηρηθεί λανθασμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών το οποίο δημιουργεί συσσωματώματα και τελικά νευροεκφυλισμό (Dexter and Jenner 2013; Gautier, Kitada, and Shen 2008).

Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι και η λειτουργία μηχανισμών αποικοδόμησης επηρεάζεται σε περιπτώσεις νευροεκφυλισμού, το οποίο οδηγεί σε συσσώρευση της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης (Vekrellis and Stefanis 2012). Όπως αναφέρθηκε, το γονίδιο LRRK2 φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην νΠ, συγκεκριμένα σε παθολογικές καταστάσεις δεσμεύει την πρωτεΐνη LAMP2A, το οποίο θεωρείται ότι μειώνει τον ρυθμό αυτοφαγίας (Ana Maria Cuervo et al. 2004). Αντίστοιχες μεταβολές έχουν την ικανότητα να δημιουργούν μια κυτταρική ευαισθησία στα ινίδια α-συνουκλεΐνης (Hunn, Cragg et. al. 2015) και οδηγούν στην περαιτέρω συσσώρευση και διακυτταρική μετάδοση τους (Bae, EJ., Kim, DK., Kim, C. et al. 2018). Τέλος, εκτός από τους μηχανισμούς κυτταρικής βλάβης, συνεισφορά στην νόσο έχει και η φλεγμονή του νευρικού συστήματος, καθώς αύξηση σηματοδότησης από αστροκύτταρα σε 'A1' μοίρα, υπερ-ενεργοποιημένη μικρογλοία (Milner, Campbell 2003), και κυτταροτοξικά κύτταρα (Sulzer, Alcalay, Garretti et al. 2017) έχουν την δυνατότητα να δράσουν είτε μεμονωμένα είτε από κοινού για να οδηγήσουν τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες σε θάνατο.

Κεφάλαιο 2: Η α-συνουκλεΐνη

Η α-συνουκλεΐνη (SNCA) είναι μια νευρωνική πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των συνουκλεϊνών, όπως και η β-συνουκλεΐνη και η γ-συνουκλεΐνη. Στον άνθρωπο, εντοπίζεται συχνότερα στα προσυναπτικά άκρα των νευρώνων ενώ έχει αποδειχθεί ότι καταλαμβάνει έως και το 1% όλων των πρωτεϊνών στο νευρωνικό κυττόςόλιο (Leonidas Stefanis 2012; Maroteaux, Campanelli, and Scheller 1988). Η α-συνουκλεΐνη εμπλέκεται στην νευροδιαβίβαση και φαίνεται να έχει βασικό ρόλο σε νευροεκφυλιστικές νόσους, καθώς αποτελεί βασικό συστατικό των σωματίων Lewy (Lewy bodies), ένα κύριο παθολογικό

χαρακτηριστικό της νΠ αλλά και άλλων νευρογλοιακών κυτταροπλασματικών εγκλειστών (Polymeropoulos et al. 1997; Chartier-Harlin et al. 2004; Singleton et al. 2003).

2.1 Το γονίδιο της α -συνουκλεΐνης

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την α -συνουκλεΐνη βρίσκεται στο μεγάλο βραχίονα στο χρωμόσωμα 4 (4q22.1) του ανθρώπινου γονιδιώματος και αποτελείται από 6 εξώνια (Εικόνα 1). Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 4 διαφορετικά μετάγραφα (mRNA) με 140, 126, 112 και 98 αμινοξέα, με εναλλακτική συρραφή, τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης. Η μετάφραση και των έξι εξωνίων κωδικοποιεί την ολική πρωτεΐνη με μήκος 140 αμινοξέα. Τα μετάγραφα με 126, 112 και 98 αμινοξέα δημιουργούνται με παράλειψη του εξωνίου 3, 5 και των 2 μαζί αντίστοιχα.

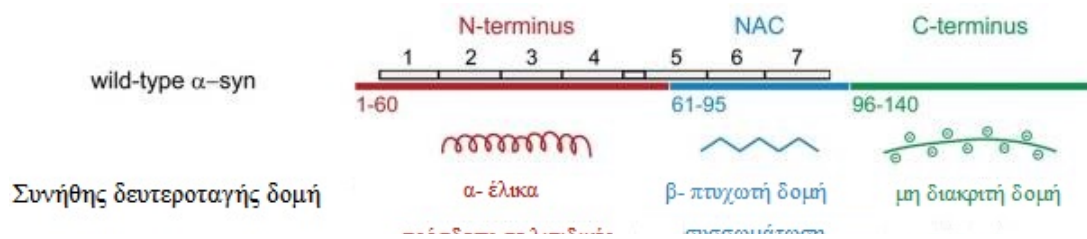


Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων πιθανών μεταγραφών του γονιδίου της α -συνουκλεΐνης (Προσαρμογή από McLean et al. 2012).

2.2 Η δομή της α -συνουκλεΐνης

Η α -συνουκλεΐνη αποτελείται από 140 αμινοξέα. Έχει μια άκρως διατηρημένη αμινοτελική περιοχή, με μεταβλητό αριθμό επαναλήψεων 11 βάσεων και μια καρβοξυτελική περιοχή λιγότερο συντηρημένη, όπου υπερισχύουν όξινα κατάλοιπα (George 2002). Εφόσον η δευτεροταγούς δομή της α -συνουκλεΐνης δεν είναι σταθερή, η λειτουργικότητά της εξαρτάται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η νίτρωση, η φωσφορυλίωση, η ουβικιτινίωση ή η διάσπαση. Συγκεκριμένα, η α -συνουκλεΐνη αποτελείται από 3 κύριες περιοχές όπου κατά σειρά είναι: (i) το αμινοτελικό άκρο (1-60 αμινοξέα) που επαναλαμβάνεται η αμφίφιλη αλληλουχία (KTKEGV) και θεωρείται υπεύθυνο για την πρόσδεση αυτής σε λιπιδικές μεμβράνες, δυνητικά δημιουργώντας μια δομή α -έλικας, (ii) η κεντρική περιοχή (61-95 αμινοξέα) ή NAC (non-amyloid beta component), μια εξαιρετικά υδρόφοβη περιοχή που σχετίζεται με τα συσσωματώματα που δημιουργούνται της α -συνουκλεΐνης και με την τάση αυτής να διαμορφώνει μια β -πτυχωτή δομή, γνωστή ως το

το μη-αβ αμυλοειδές συστατικό των πλακών της νόσου Αλτσχάιμερ και (iii) η καρβοξυτελική περιοχή (96-140 αμινοξέα), αρνητικά φορτισμένη και πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης, παρέχοντας ευελιξία στο πολυπεπίδιο της α-συνουκλεΐνης, δίνοντάς της μια ακαθόριστη δομή (Villar-Piqué, Fonseca, and Outeiro 2016; Vamvaca, Volles, and Lansbury 2009).



Εικόνα 2: Απεικόνιση της δευτεροταγούς δομής της α-συνουκλεΐνης. Διακρίνονται οι περιοχές με την δομή τους και την λειτουργία που δίνουν στην πρωτεΐνη (Προσαρμογή από Vamvaca et al., 2009).

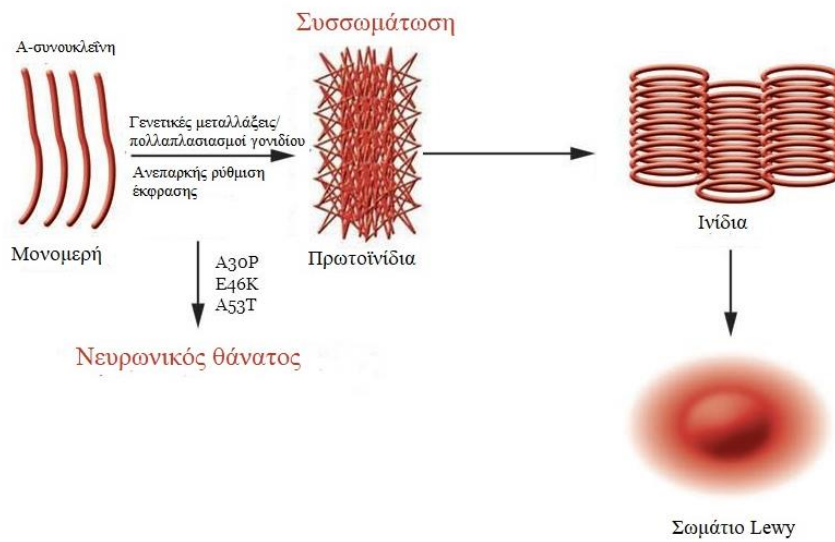
2.3 Έκφραση της α-συνουκλεΐνης και ο φυσιολογικός της ρόλος

Αναφορικά με τον εντοπισμό της α-συνουκλεΐνης, σε πειράματα που έγιναν σε υγιείς εγκεφάλους, με αντισώματα που αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη, βρέθηκε έκφραση της στα προσυναπτικά άκρα και λιγότερο στο σώμα (Kahle 2008). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι λόγω της γήρανσης, υπάρχει αύξηση της α-συνουκλεΐνης στους νευρώνες της μέλαινας ουσίας (Chu and Kordower 2007). Η παραγωγή της α-συνουκλεΐνης ξεκινά κατά τη νευρωνική ανάπτυξη ενώ αλλάζει σε καταστάσεις φλεγμονής. Έτσι, σε πειράματα *in vitro* και *in vivo*, όπου επάγεται είτε υπερέκφραση είτε μείωση της α-συνουκλεΐνης, παρατηρούνται αλλαγές στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών, το οποίο και επιβεβαιώνει τον βασικό ρόλο της α-συνουκλεΐνης στην διαμόρφωση της συναπτικής διαβίβασης (Kholodilov et al. 1999; Murphy et al. 2000; Abeliovich et al. 2000). Βέβαια ο ρόλος αυτός πιθανόν να είναι αρνητικά ρυθμιστικός καθώς σε μυς που δεν υπάρχει έκφραση της α-συνουκλεΐνης, βρέθηκαν αυξημένα τα επίπεδα της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα (Abeliovich et al. 2000). Επιπλέον, ένας ακόμη φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης φαίνεται να είναι η συμμετοχή της στην βιογένεση των συναπτικών κυστιδίων μέσω την επίδρασης της στον μεταβολισμό του φωσφατιδικού οξέος, αφού έχει την δυνατότητα να ρυθμίζει την δυναμική αυτών των κυστιδίων όταν γίνεται η μεταβίβαση του σήματος (Murphy et al. 2000). Επίσης, θεωρείται ότι η α-συνουκλεΐνη έχει την ικανότητα να δρα ως συνοδός πρωτεΐνη, παράλληλα με την CSP-a (Cystein-string protein) κατά την δημιουργία

του SNARE συμπλόκου. Τότε, μπορεί να δεσμεύεται το καρβοξυ- τελικό άκρο της α-συνουκλεΐνης με την synaptobrevin-2 (VAMP-2) όπου έπειτα να ακολουθείται απελευθέρωση των συναπτικών κυστιδίων. Συμπερασματικά, η βασική λειτουργία της α-συνουκλεΐνης στο ΚΝΣ θεωρείται ότι είναι ο έλεγχος απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών μέσω της δράσης της στο SNARE σύμπλοκο (Burré et al. 2010; Chandra et al. 2005). Πέρα από το ΚΝΣ, φυσιολογικά η α-συνουκλεΐνη εκφράζεται σε ερυθροκύτταρα και αιμοπετάλια με την λειτουργία της να είναι ακόμη άγνωστη (Barbour et al. 2008).

2.4 Παθολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης

Η α-συνουκλεΐνη ορίστηκε το 1997 ως το βασικό συστατικό των σωματίων Lewy (LBs) και των νευριτών Lewy (LNs), πρωτεϊνικά ενδοκυτταρικά έγκλειστα που αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα της νΠ αλλά και της άνοιας με σωματία Lewy (DLB) (Spillantini et al. 1998). Επιπρόσθετα, η α-συνουκλεΐνη έχει συσχετιστεί και με άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους όπως ο εκφυλισμός παρουσία σιδήρου στον εγκέφαλο (τύπου I), η ατροφία πολλαπλών συστημάτων (MSA) και η άνοια με σωματία του Lewy, νόσοι που ορίζονται ως α-συνουκλεΐνοπάθειες (Kahle 2008). Σε νευροεκφυλιστικές νόσους, η μη-αναδιπλωμένη α-συνουκλεΐνη παίρνει μια σφαιρική μορφή (Stefanis 2012) που της δίνει την ικανότητα να συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της α-συνουκλεΐνης, οι «σφαιρικές διαμορφώσεις» ενώνονται και μπορούν να σχηματίσουν τοξικά πρωτοϊνίδια και έπειτα ινίδια τα οποία είναι αδιάλυτα, τα οποία και αποτελούν βασικό συστατικό των σωματίων Lewy, τα οποία όπως έχει προαναφερθεί έχουν συσχετιστεί με νευροεκφυλισμό και νευρωνικό θάνατο (Giasson et al. 1999; Spillantini et al. 1998). Μάλιστα, η αύξηση των επιπέδων της α-συνουκλεΐνης στον εγκέφαλο ασθενών φαίνεται κυρίως στην μέλαινα ουσία όπου υπάρχει μεγάλη παρουσία αδιάλυτων συστατικών, μονομερών και ολιγομερών μορφών (Tong et al. 2010).



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

2.5 Η τοξική δράση της α-συνουκλεΐνης σε κυτταρικά οργανίδια και μονοπάτια

Η α-συνουκλεΐνη, όπως και οι υπόλοιπες αμυλοειδογενείς πρωτεΐνες, έχουν την ικανότητα να προκαλούν διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Με αποτέλεσμα να έχουν καταγραφεί αλλαγές στην δομή των ενδοκυττάρων και πλασματικών μεμβρανών, αύξηση του ασβεστίου στα κύτταρα και ενεργοποίηση ασβεστοεξαρτώμενων πρωτεασών αλλά και δυσλειτουργία της συναπτικής μετάδοσης. Επιπλέον, η αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου οδηγεί σε μεγαλύτερη έκκριση της α-συνουκλεΐνης μέσω εξωσωμάτων (Emmanouilidou et al. 2010). Εξαιτίας της α-συνουκλεΐνης που παράγεται, δύναται να επηρεαστεί η ομοιότητα των νευρικών κυττάρων αλλά και η επαγωγή φλεγμονής σε κύτταρα γλοίας, ενισχύοντας των νευρικό εκφυλισμό μέσω φαγοκύτωσης (W. Zhang et al. 2005). Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι τα ολιγομερή α-συνουκλεΐνης, σε ανθρώπινες ντοπαμινεργικές κυτταρικές σειρές, έχουν επιρροή στα κύτταρα, καθώς αναστέλλουν τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης και ταυτόχρονα μειώνουν την μορφή του δικτύου νευριτών (Prots et al. 2013; Chen et al. 2007). Όταν γίνεται υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων και έτσι οδηγεί σε νευροεκφυλισμό που διαμεσολαβείται μέσω υπερφωσφορύλιωσης της πρωτεΐνης Tau. Έτσι, θεωρείται ότι τα προηγούμενα γεγονότα εμπλέκονται με την σχέση της α-συνουκλεΐνης με πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αξονική μεταφορά όπως είναι η τουμπουλίνη, η MAP2 (microtubule-associated protein 2) και η MAPT/Tau, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται και η ίδια αξονική μεταφορά (Prots et al. 2013; H.-J. Lee et al. 2006; Gassowska et al. 2014). Έτσι, έχει δειχθεί ότι δείγματα από εγκεφάλους ασθενών με την νΠ

έχουν πράγματι μειωμένα επίπεδα πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αξονική μεταφορά, ειδικά στα νευρικά κύτταρα που έχουν συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης (Chu et al. 2012).

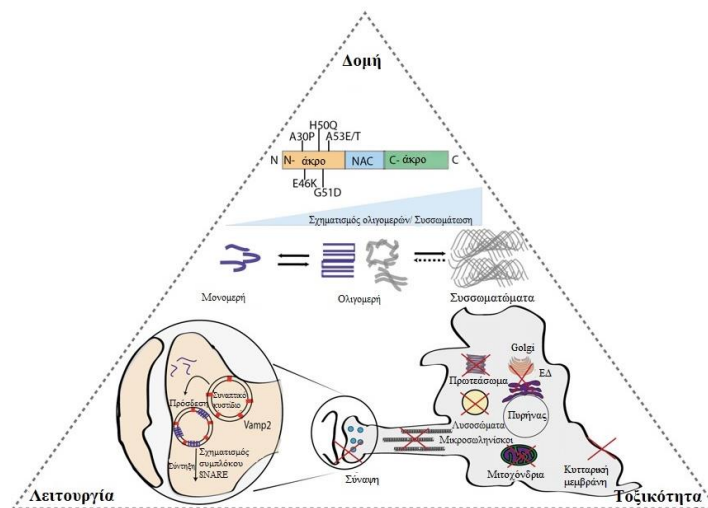
Η εφαρμογή α-συνουκλεΐνης, σε μορφή πρωτοϊνιδίων, σε κύτταρα επάγει ισχυρή ενεργοποίηση του παράγοντα απόκρισης στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ), X-boxbinding protein 1 (Castillo-Carranza et al. 2012). Μάλιστα, έχει αποδειχθεί, σε μυ μοντέλο νΠ, ότι τα νευρικά κύτταρα που επηρεάζονται από τη μη- φυσιολογική μορφή της α-συνουκλεΐνης, παρουσιάζουν θετική ανατροφοδότηση όσον αφορά την έκφραση των συνοδών πρωτεϊνών του ΕΔ, αλλά και μορφολογικές ανωμαλίες του ΕΔ, ενδεικτικές της δυσλειτουργίας του, αλλά και την επαγωγή έκφρασης του παράγοντα ATF4, ο οποίος δρα σε απόκριση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Επιπλέον αξίζει να αναφερθεί ότι η φαρμακολογική αναστολή του στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο επιβραδύνει τα συμπτώματα της νόσου και μειώνει τα συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης. Αυτή η διαπίστωση έγινε σε μυϊκά μοντέλα της νΠ, τα οποία πριν από την αναστολή του στρες, εμφάνιζαν συσσωματώματα α-συνουκλεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο καθώς και ανωμαλίες στην μορφολογία του, σημάδι ενδεικτικό της δυσλειτουργίας του (Colla, Jensen, et al. 2012; Colla, Coune, et al. 2012; Bellucci et al. 2011). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι όταν υπερ-εκφράζεται η α-συνουκλεΐνη, σχετίζεται με κατακερματισμό του δικτύου Golgi σε αυτές τις κυτταρικές σειρές καθώς και με επιβραδυμένη αντίδραση στην αλληλεπίδραση ΕΔ-Golgi (H.-J. Lee et al. 2006; Thayanidhi et al. 2010).

Εφόσον η ίδια η υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης οδηγεί σε έκκριση αυτής από τα νευρικά κύτταρα (S.-J. Lee 2008), πληθώρα μελετών έχουν γίνει αναφορικά με τους μηχανισμούς αποικοδόμησής της. Το μονομερές της α-συνουκλεΐνης, αποικοδομείται και μέσω αυτοφαγίας στα λυσοσώματα αλλά και μέσω του πρωτεασώματος (Ebrahimi-Fakhari et al. 2011; Ana Maria Cuervo et al. 2004; Vogiatzi et al. 2008). Και οι δύο αυτοί κυτταρικοί μηχανισμοί αποικοδόμησης φαίνεται να διαταράσσονται στις συνουκλεΐνοπάθειες. Σε δείγματα εγκεφάλων ασθενών με νΠ, εντοπίστηκε μείωση σε διάφορους λυσοσωμικούς δείκτες (LAMP1, καθεψίνη D και hsp 73), ειδικά σε νευρώνες της μέλαινας ουσίας (Chu et al. 2009). Επίσης, όσον αφορά την αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από σαπερονίνες (CMA), βρέθηκε ότι αναστέλλεται από την παθολογική μορφή της α-συνουκλεΐνης με τον LAMP2, έναν ειδικό υποδοχέα στο λυσόσωμα, με πιθανό αποτέλεσμα την επιπλέον συσώρευση της

α-συνουκλεΐνης και τη διαταραχή της ομοιόστασης του κυττάρου (Xilouri et al. 2009; Ana Maria Cuervo et al. 2004).

Επιπλέον, έχουν βρεθεί αλλαγές και στο πρωτεάσωμα στην νΠ, συμπεριλαμβανομένου της μείωσης της ενζυμικής λειτουργίας του πρωτεασώματος καθώς και δομικών αλλοιώσεων αυτού (K. S. McNaught and Jenner 2001; K. S. P. McNaught et al. 2002). Όμως, δεν είναι ακόμη σαφές αν η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος είναι η αιτία ή η συνέπεια του νευρικού εκφυλισμού (Furukawa et al. 2002).

Ως εκ τούτου, ενώ οι παθολογικές μορφές της α-συνουκλεΐνης, μπορούν να επηρεάσουν τα παραπάνω συστήματα αποικοδόμησης πρωτεϊνών (Emmanouilidou et al. 2010; L. Stefanis et al. 2001), δημιουργείται ένας συνεχής κύκλος συσσώρευσης α-συνουκλεΐνης και αδυναμίας απόκρισης των συστημάτων αποικοδόμησης των πρωτεϊνών για την εξάλειψή της.



Εικόνα 4: Σχηματικά η σχέση της λειτουργίας, της δομής και της τοξικότητας για την α-συνουκλεΐνη. Η α-συνουκλεΐνη μπορεί να υποστεί διεργασίες ολιγομερισμού ή πολυμερισμού, οι οποίες σε παθολογικές συνθήκες είναι ικανές να σχηματίσουν αδιάλυτα συσσωματώματα, τα οποία και είναι επιβλαβή για πολλά ενδοκυτταρικά οργανίδια και μονοπάτια (Προσαρμογή από Villar-Piqué et al., 2016).

Κεφάλαιο 3: Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης

3.1 Ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης

Η ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών στα ευκαρυωτικά κύτταρα γίνεται σε διάφορα στάδια κατά την γονιδιακή έκφραση. Συγκεκριμένα, η ρύθμιση μπορεί να συμβεί είτε κατά την μεταγραφή, μετά την μεταγραφή, με ωρίμανση και πολυαδενυλίωση του πρόδρομου mRNA, κατά την έξοδο του mRNA από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα ενώ η ρύθμιση είτε της σταθερότητας είτε της αποικοδόμησης του, μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε κατά την μετάφραση είτε μετά την μετάφραση. Για την ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων, ειδικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες προσδένονται σε δομές ή σε RNA αλληλουχίες (RNA-Binding proteins, RBPs), διαφορετικά οι ρυθμιστικές διαδικασίες μπορούν να ρυθμιστούν και από microRNAs (miRs). Ενώ όλες οι RBPs έχουν την ικανότητα σύνδεσης με RNAs και πρωτεΐνες, διαφορετικές RBPs αναγνωρίζουν διαφορετικές αλληλουχίες και σε συνδυασμό με ενδοκυττάρια σήματα ή εξωγενή ερεθίσματα, ο χρόνος ή η θέση πρόσδεσης των πρωτεϊνών στις αλληλουχίες επηρεάζεται σημαντικά (Dreyfuss, Kim, and Kataoka 2002). Μολονότι οι RBPs έχουν την δυνατότητα να επηρεάσουν τα επίπεδα μιας πρωτεΐνης, δεν υπάρχουν ακόμη μελέτες αναφορικά με την ρύθμιση των επιπέδων της α -συνουκλεΐνης.

3.2 Ρύθμιση έκφρασης της α -συνουκλεΐνης

Όπως προαναφέρθηκε, δεν υπάρχουν επί του παρόντος πληθώρα δεδομένων σχετικά με την ρύθμιση έκφρασης της α -συνουκλεΐνης, παρόλο που οι «μη φυσιολογικές» της μορφές έχουν ως απόρροια πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Ειδικότερα, κατά την μεταγραφή, θετικό ρόλο στην ρύθμιση της α -συνουκλεΐνης θεωρείται ότι έχουν οι μεταγραφικοί παράγοντες GATA1 (Scherzer et al. 2008) και ZSCAN21 (Clough and Stefanis 2007). Μετά την μεταγραφή, η ρύθμιση της πρωτεΐνης γίνεται από την σύνδεση των miR-7 και -153 στο 3' αμετάφραστο άκρο του RNA, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη ποσότητα mRNA και πρωτεϊνικών επιπέδων της (Doxakis 2010; Junn et al. 2009). Όμως, μηχανισμοί ρύθμισης μπορούν να δράσουν και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, αρνητικό ρόλο στην ρύθμιση των επιπέδων της α -συνουκλεΐνης έχουν διάφορα συστήματα που σχετίζονται με την αποικοδόμηση του κυττάρου, όπου η δυσλειτουργία τους μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα της α -συνουκλεΐνης και να πιθανόν οδηγήσει σε παθολογικό φαινότυπο (Xilouri et al. 2008). Ως μετα-μεταφραστική ρύθμιση θεωρείται και μια τροποποίηση όπως η φωσφορυλίωση στη σερίνη 129 (Ser129) και στη τυροσίνη 125 (Tyr125) του καρβοξυτελικού άκρου της α -συνουκλεΐνης, εφόσον αυτή η τροποποίηση μπορεί να επηρεάσει την δημιουργία συσσωματωμάτων της (Venda et al. 2010). Με βάση την μελέτη

των Venda et al. 2010, όταν η φωσφορυλίωση γίνεται στην σερίνη 129, αυξάνεται η πιθανότητα εμφάνισης πρωτοϊνιδίων, ενώ όταν η φωσφορυλίωση γίνει στην τυροσίνη 125, επάγεται το αντίθετο, δηλαδή απουσία πρωτοϊνιδίων. Ένα σημαντικό εύρημα που αφορά άμεσα και την συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, είναι το εύρημα της μελέτης των Kim et al. 2006, όπου βρέθηκε μια νέα θέση όπου φωσφορυλιώνεται η α-συνουκλεΐνη, στην σερίνη 87 (Ser87) από την κινάση Dyrk1A. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την Dyrk1A, έχει βρεθεί στο χρωμόσωμα 21 και η υπερ-έκφραση της πρωτεΐνης, έχει συσχετιστεί με το σύνδρομο Down, που η κλινική του εικόνα είναι χαρακτηριστική αναφορικά με την νευροϊνιδιακή εκφύλιση του εγκεφάλου των ανθρώπων που πάσχουν από το σύνδρομο Down (F. Liu and et al. 2008). Επιπλέον, υπάρχουν έρευνες που συνδέουν την Dyrk1A και με την νόσο του Αλτσχάιμερ αλλά και του Πάρκινσον (Kimura 2007; Wiseman and et al. 2015) (Yong et. al. 2023).

Τέλος, το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης, μπορεί να υποβληθεί και σε επιγενετική ρύθμιση, όπως μεθυλίωση εντός του εσωνίου 1 το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα, το οποίο και επιβεβαιώνεται από μελέτες σε εγκεφάλους ασθενών με σποραδική μορφή της νΠ (Jowaed et al. 2010).

3.3 Πρωτεΐνες δέσμησης RNA

Οι RBPs, αναφορικά με την δομή τους, εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία και ετερογένεια. Η λειτουργία τους είναι να δεσμεύονται σε mRNA-στόχους και μέσω συγκεκριμένων περιοχών δέσμησης RNA (RBDs) τα οποία βρίσκονται συνήθως σε πολλαπλά αντίγραφα (δύο ή τρία) και / ή σε διαφορετικούς συνδυασμούς στην ίδια πρωτεΐνη. Μία μόνο περιοχή δέσμησης μπορεί να αναγνωρίσει από 2 έως και 6 νουκλεοτίδια μιας αλληλουχίας RNA, έτσι όσο περισσότερες θέσεις δέσμησης υπάρχουν σε μια πρωτεΐνη, τόσο πιο δυνατή η σύνδεσή της με τον RNA – στόχο (Maris, Dominguez, and Allain 2005).

Οι RBPs διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες:

- i. Αυτές με τρεις μονόκλωνους τομείς αναγνώρισης RNA, περιλαμβανομένου και το μοτίβο αναγνώρισης RNA (RRM) (Daubner, Cléry, and Allain 2013)
- ii. Αυτές με περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου (Znf) (Nguyen et al. 2011)

- iii. Στις ετερογενείς πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (HNRNP) με περιοχή πρόσδεσης KH (Nicastro, Taylor, and Ramos 2015) και
- iv. Σε αυτές που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν διπλές ελικοειδείς δομές RNA (dsRBD) (Gleghorn and Maquat 2014)

Κάθε RBD έχει ενδιάμεση συγγένεια και είναι ειδική για συγκεκριμένο RNA – στόχο, ωστόσο, μια ισχυρή δέσμευση μπορεί να επιτευχθεί με συνδυαστική χρήση παρακείμενων RBD. Επιπρόσθετα, η πλειονότητα των RBPs έχουν περιοχές χωρίς σαφή δομή, με συνεχής επαναλήψεις διακριτών αμινοξέων όπως οι R / G, S / R και K / R, επαναλήψεις που παρεμποδίζουν την πρωτεΐνη να αναδιπλωθεί σε μια σταθερή δευτερογενή ή τριτογενή δομή (Järvelin et al. 2016).

3.4 Λειτουργίες των RBPs

Οι RBPs παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα στάδια ζωής του RNA, από την μεταγραφή στην εναλλακτική συρραφή, την πολυαδενυλίωση, την μεταφορά του στο κυτταρόπλασμα και την μετάφρασή του. Έχει διαπιστωθεί ότι μεταβολή της λειτουργίας των RBPs, μπορεί να οδηγήσει σε διατάραξη της πρωτεϊνικής ομοιόστασης και της κυτταρικής λειτουργίας (Doxakis 2014; Ravanidis et al., 2018).

Εναλλακτική Συρραφή

Τουλάχιστον το 74% των γονιδίων του ανθρώπου εκφράζουν mRNAs τα οποία μπορούν να υποστούν εναλλακτική συρραφή (Johnson et al. 2003). Αυτή η διαδικασία ρυθμίζεται από τις RBPs. Παραδείγματος χάρη, η εναλλακτική συρραφή πολλών mRNA ελέγχεται από την οικογένεια νευρωνικών πρωτεϊνών Nova, οι οποίες αναγνωρίζουν την αλληλουχία YCAY στα εσώνια (όπου Y πυριμιδίνη, U ή C). Η πλειονότητα των στόχων των Nova είναι mRNAs που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αφορούν την συναπτική δραστηριότητα και πλαστικότητα. Σε περιπτώσεις καρκίνου, εκτός του ΝΣ, η παθολογική έκφραση των Nova εκδηλώνεται ως αυτοάνοση παρανεοπλασματική νευρολογική διαταραχή (Buckanovich, Posner, and Darnell 1993).

Πολυαδενυλίωση

Έρευνες έχουν δείξει ότι από ένα γονίδιο μπορούν να παραχθούν mRNA με διαφορετικό μήκος 3' UTR αναλόγως με το αναπτυξιακό στάδιο ή τα φάση του κυτταρικού κύκλου του κυττάρου. Έτσι, 3'UTR με μικρό μήκος, σχετίζονται με την φάση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ενώ με μεγαλύτερο μήκος 3' UTR συναντώνται κατά την διαφοροποίηση των κυττάρων και γενικά την ανάπτυξη του οργανισμού και ειδικότερα του ΚΝΣ (Ji et al. 2009; Paschou et al. 2012). Η πολυαδενυλίωση έχει ισχυρή επιρροή στην μεταφορά του mRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, στην μετάφραση που ακολουθεί αλλά και στην σταθερότητα του μορίου mRNA. Αν εξαιρεθούν τα mRNA των ιστονών, τα υπόλοιπα ευκαρυωτικά mRNAs, υφίστανται επεξεργασία για να λάβουν 3' πολύ (A) άκρα με μήκος περίπου 200 νουκλεοτίδια (Minvielle-Sebastia and Keller 1999).

Στην πολυαδενυλίωση το μετάγραφο διασπάται σε μια περιοχή που ονομάζεται περιοχή διάσπασης, μεταξύ της συντηρημένης περιοχής AAUAAA και μιας ακολουθίας πλούσια σε U/UH. Έπειτα, η πολύ (A) πολυμεράση προσθέτει το πολύ (A) άκρο μετά την περιοχή διάσπασης (Minvielle-Sebastia and Keller 1999). Έχει βρεθεί ότι η οικογένεια ELAVL/HU, καταστέλλει την προσθήκη του πολύ (A) άκρου με την πρόσδεσή της στην ακολουθία πλούσια με U/GU (Zhu et al., 2007).. Η εναλλακτική πολυαδενυλίωση ίσως να επηρεάζει τον εντοπισμό των mRNAs. Μάλιστα, το mRNA του νευροτροφικού παράγοντα BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) επεξεργάζεται σε δύο μετάγραφα, ένα με μακρύ 3' UTR ή με βραχύ 3' UTR, τα οποία όμως κωδικοποιούν την ίδια πρωτεΐνη. Στους δενδρίτες απαντάται το mRNA με το μακρύ 3' UTR, ενώ το mRNA με το βραχύ 3' UTR βρίσκεται στο σώμα των νευρώνων. Επιπλέον, η RBP, CPEB1, μεσολαβεί στην στόχευση του BDNF στους δενδρίτες ενώ η HuD βοηθά στην σταθερότητα του mRNA με το μακρύ 3' UTR άκρο, μέσω της πρόσδεσής της στην ακολουθία πλούσια σε AU (reviewed in Doxakis 2014).

Μεταφορά του mRNA

Το mRNA μεταγράφεται στον πυρήνα, και με το πέρας της διαδικασίας, μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα. Για να επιτευχθεί αυτή η διαδικασία, ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών δημιουργείται με το mRNA, και έπειτα το πρώτο, μετατοπίζεται μέσω των πυρηνικών πόρων και εν τέλει απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Για την εξαγωγή του mRNA από τον πυρήνα, απαιτείται και η συμμετοχή των RBPs (Grüter et al. 1998). Οι RBPs ελέγχουν την μεταφορά mRNA στους νευρώνες και τους δενδρίτες, αλλά και τον υποκυτταρικό εντοπισμό ή την τοπική μετάφραση που είναι εξαρτώμενη από την δραστηριότητα του

κυττάρου (U. Narayanan et al. 2008; Doxakis 2014). Αξιοσημείωτο είναι ότι διαφορετικές RBPs έχουν την δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με το ίδιο μόριο RNA σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης ή να ανταγωνίζονται για την ίδια θέση σύνδεσης αυξάνοντας έτσι, την πολυπλοκότητα της ρύθμισης (Lal et al. 2004).

Μετάφραση του mRNA

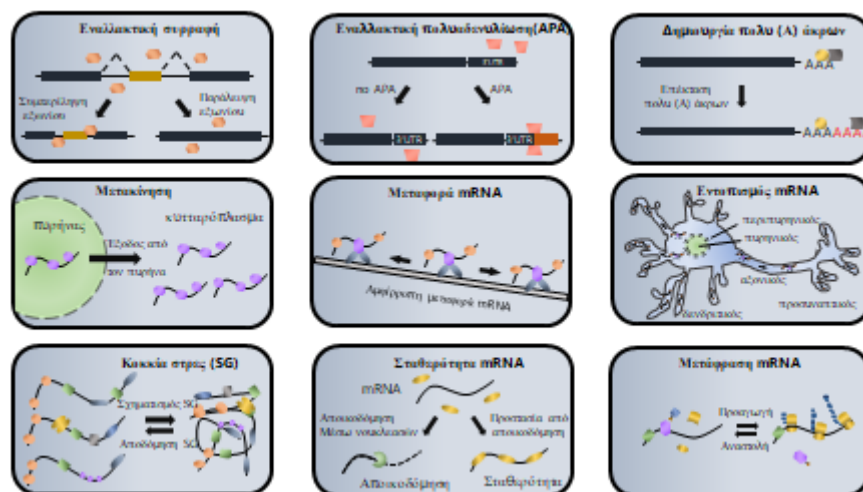
Οι RBPs έχουν σημαντικό ρόλο κατά την μετάφραση καθώς εμπλέκονται στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αλλά και στον σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης. Συγκεκριμένα, κατά την διαφοροποίηση ή τον σχηματισμό των συνάψεων, πολλές RBPs συμβάλλουν στην μεταφορά των mRNAs στους δενδρίτες και στα προσυναπτικά άκρα, όπου ακολουθεί η μετάφραση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντίστοιχης πρωτεΐνης είναι η FMRP, η οποία συμβάλλει στην μεταφορά και μετάφραση πολλών mRNA. Επιπλέον, έχει συσχετιστεί η δυσλειτουργία της FMRP με το σύνδρομο του Εύθραυστου X (Fragile-X Syndrome)(Christie et al. 2009).

Ρύθμιση της σταθερότητας ή αποικοδόμησης των mRNAs

Η σταθερότητα και ο κύκλος ζωής ενός mRNA επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου των στοιχείων ARE (περιοχές πλούσιες σε A/U), που αποτελούνται από πέντε (AUUUA) ή περισσότερα νουκλεοτίδια. Ένα μετάγραφο μπορεί να έχει περισσότερο από ένα ARE ενώ ο αριθμός τους είναι καθοριστικός για την εξέλιξη του μορίου. Επιπλέον, υπάρχουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες που προσδένονται σε AREs (ARE-BPs), όπως η AUF1 και συμβάλλουν στην αποικοδόμηση του mRNA με στρατολόγηση διάφορων παραγόντων (Barreau, Paillard, and Osborne 2005; Labno, Tomecki, and Dziembowski 2016). Ο τρόπος που οι RBPs συμμετέχουν στην αποικοδόμηση των mRNAs είναι λειτουργώντας ανταγωνιστικά έναντι αποσταθεροποιητικών RBPs, για τις θέσεις πρόσδεσης. Αυτό έχει θετική επιρροή και στην σταθερότητα και στην μετάφραση των μορίων mRNA που είναι πλούσια σε AU, σε αρκετούς ιστούς, όπως είναι ο εγκέφαλος. Χαρακτηριστικά τέτοια παραδείγματα είναι οι πρωτεΐνες ELAV / Hu καθώς συμμετέχουν σε διαδικασίες πρόληψης της αποικοδόμησης αφού εμπεριέχουν περιοχές σύνδεσης σε αδενίνη και ουρακίλη και σταθεροποιούν πολλά μόρια όπως τα GM-CSF, EFG, και c-fos (Keene 1999).

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

Κατά την διάρκεια της διαδικασίας της μεταγραφής αλλά και με το πέρας της, οι RBPs συνδέονται με τα mRNA- στόχους ώστε να διευκολυνθεί η επεξεργασία των πρώιμων mRNA. Έτσι προσελκύονται και άλλες ίδιες ή και διαφορετικές RBPs, κατασκευάζοντας μεγαλύτερα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά κοκκία (RNP) γύρω από τον σκελετό του mRNA στόχου. Έτσι, η σχέση αυτή μεταξύ του mRNA και των δεσμευμένων RBP είναι καθοριστική για τον εντοπισμό του μεταγραφήματος και την διαδικασία της μετάφρασης ή αποικοδόμησης που θα ακολουθήσει. Γενικά, τα RNP κοκκία είναι πολύ δυναμικά στην φύση καθώς συναρμολογούνται και διαχωρίζονται ανάλογα με το περιβάλλον γύρω τους. Όταν το κύτταρο βρίσκεται σε συνθήκη στρες, όπως θερμικό σοκ, υποξία ή οξειδωτικό στρες, συναθροίζονται και δημιουργούν αναστρέψιμα κοκκία στρες χωρίς μεμβράνη (SGs), τα οποία αναστέλλουν την μετάφραση ώστε να διατηρηθεί η ενέργεια και να υπάρξει η ελάχιστη δυνατή βλάβη σχετική με την καταπόνηση. Αυτή η επίδραση είναι αποτέλεσμα συγκεκριμένων RBPs, όπως οι TIA1 / TIAR, το σύμπλεγμα eIF3, G3BP και η πρωτεΐνη σύνδεσης πολυ (A) άκρων (PABP). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μη φυσιολογικές ποσότητες ή μεταλλάξεις στις RBPs (π.χ FUS, TDP43, TIA1) έχουν συνδεθεί με την αύξηση των κοκκίων στρες και την εμφάνιση αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνσης και την μετωποκροταφική άνοια (ALS / FTD). Αυτές οι μεταλλάξεις των RBPs μπορούν να οδηγήσουν σε περαιτέρω σχηματισμό παράτυπων SGs τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, επιβεβαιώνοντας ότι η εσφαλμένη θέση mRNA ή και η μη φυσιολογική λειτουργία των RBPs, μπορεί να είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό των παθογενών νευροεκφυλιστικών μηχανισμών (Protter and Parker 2016; Doxakis 2014).



Εικόνα 5: Απεικόνιση των ρόλων των RBPs (Προσαρμογή από Ravanidis et al., 2018).

Κεφάλαιο 4: Οι RBPs στο ΚΝΣ

4.1 Η πρωτεΐνη DYRK1A

Η DYRK1A (Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A) αναγνωρίζεται ως μια κινάση της οικογένειας των CMGC, η οποία έχει την ιδιότητα να καταλύει την φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης καθώς και την αυτοφωσφορυλίωσή της σε ένα κατάλοιπα σερίνης, τυροσίνης και θρεονίνης. Επιπλέον, στο N- τελικό άκρο της έχει μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού. Η DYRK1A φυσιολογικά υπάρχει σε όλους τους ιστούς του ανθρώπου και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα, καθώς ελέγχει την μεταφορά των μεταγραφικών παραγόντων από και προς τον πυρήνα (Becker and Sippl 2011). Έτσι, το γεγονός ότι η DYRK1A μπορεί και συνεργάζεται με μεγάλο εύρος μορίων, υποδεικνύει την ικανότητά της να ελέγχει πληθώρα μοριακών διεργασιών.

Η DYRK1A φαίνεται να έχει βασικό ρόλο στην φυσιολογία του εγκεφάλου καθώς συμμετέχει στην νευρολογική ανάπτυξη στα έμβρυα αλλά και στην διαφοροποίηση των νευρώνων. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την κινάση βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21q22.2, περιοχή που έχει χαρακτηριστεί κρίση περιοχή όσον αφορά το σύνδρομο Down (AlNajjar, Gabr, ELHady et. al. 2022). Η αναγνώριση 239 γονιδίων που απορρυθμίζονται από την υπερεκφρασμένη DYRK1A μέσω του συμπλέγματος αναδιαμόρφωσης χρωματίνης REST/NRSF δείχνει τον κεντρικό ρόλο της στην παθολογία του εγκεφάλου (Lepagnol-Bestel et. al. 2009). Τελευταίες έρευνες δείχνουν ότι υπερέκφραση της DYRK1A έχει συσχετιστεί με νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Πιθανολογείται ότι συμβάλλει και στην παθολογία της νόσου Αλτσχάιμερ (Kimura 2007; Wiseman et al. 2015). Μάλιστα, εκτός από την νόσο Αλτσχάιμερ, η αύξηση των επιπέδων Dyrk1A παρατηρείται και σε άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Πάρκινσον (Kargbo R. B. 2020).

Σύμφωνα με έρευνες, φαίνεται η φωσφορυλίωση του γονιδίου DYRK1A να τροποποιεί την α-συνουκλεΐνη και να μειώνει την έκφραση της P-α-συνουκλεΐνης (Ser129), ενώ η υπερέκφραση του γονιδίου DYRK1A, αναστέλλει το μονοπάτι PI3K/AKT και ενισχύει την απόπτωση των νευρώνων (Yong, Wu et. al. 2023). Τέλος, η DYRK1A μαζί με τις CKs (Cyclin-dependent kinase) είναι οι μοναδικές πρωτεΐνες που φωσφορυλιώνουν την α-συνουκλεΐνη στην θέση 87 (Ser87) και πιθανόν να επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των

νευρικών κυττάρων, επάγωντας έτσι την εμφάνιση α-συνουκλεινοπαθειών (Okochi 2000) (Kim 2006).

4.2 Η πρωτεΐνη TDP43 (transactive response DNA-binding protein 43 kDa or TARDBP)

Η TDP43 εξ αρχής είχε αναγνωριστεί ως πρωτεΐνη δέσμησης DNA με βασική ιδιότητα την αναστολή της μεταγραφής. Επιπλέον, ανήκει στην οικογένεια hnRNP, η οποία έχει βασικό ρόλο στην ρύθμιση του RNA, καθώς βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα και εκφράζεται από όλους τους τύπους κυττάρων. Επίσης, θεωρείται ότι η TDP43 αποτελεί μέρος του συμπλόκου εναλλακτικής συρραφής (spliceosome), εμφανίζεται και σε θέσεις μεταγραφής και συρραφής ενώ απουσιάζει από περιοχές σιωπηρής ετεροχρωματίνης. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το TDP43 έχει δυο μοτίβα αναγνώρισης RNA (RRM) και συνδέεται συνήθως σε περιοχές με τουλάχιστον πέντε επαναλήψεις UG (Casafont et al. 2009; Colombrita et al. 2012; Ou et al. 1995; Ravanidis et al., 2018).

Η TDP43 δεσμεύεται σε περισσότερα από 6,000 RNA στόχους στον εγκέφαλο, δηλαδή με το 30% του συνολικού μεταγραφικού σημείου, δείχνοντας έτσι την ισχυρή επιρροή της στην ρύθμιση του RNA. Η δέσμηση της TDP43 γίνεται κυρίως σε εσόνια (περίπου 70%), αλλά και στο 3'UTR άκρο και σε μη κωδικοποιητικό RNA (περίπου 10%). Η θέση πρόσδεσης της TDP43, όπως και σε άλλες RBPs, εξαρτάται κυρίως από την εναλλακτική συρραφή, οδηγώντας είτε σε αποκλεισμό είτε σε συμπερίληψη εξωνίων. Ειδικότερα, για την κυτταροπλασματική TDP43, φαίνεται να συνδέεται περισσότερο στις 3'UTR αλληλουχίες, δείχνοντας ότι είναι βασικός ρυθμιστής της σταθερότητας, της μεταφοράς ή/και μετάφρασης του mRNA (Colombrita et al. 2012; Tollervy et al. 2011; Ravanidis, Kattan, and Doxakis 2018).

Στην παθολογική μορφή της, η TDP43 έχει κύριο ρόλο στην αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) καθώς και της μετωποκροταφικής άνοιας (FTD). Και στις δύο ασθένειες, η TDP43 τόσο στους νευρώνες όσο και στην γλοία των εγκεφάλων ασθενών, απομακρύνεται από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα και συσσωρεύεται σε μη φυσιολογικό βαθμό σε φωσφορυλιωμένα, πρωτεολυτικά διασπασμένα και με κατάλοιπα ουβικιτίνης συσσωματώματα σε ποσοστά των 97% ALS και 45% FTD ασθενών, αντίστοιχα (Chen-Plotkin, Lee, and Trojanowski 2010).

Εξαιτίας της παθογενούς απομάκρυνσης της TDP43 από τον πυρήνα των κυττάρων, έγιναν έρευνες σε μύες και σε κυτταρικές σειρές, με στόχο την υπερέκφραση μιας συγκεκριμένης κυτταροπλασματικής μορφής TDP43 (η οποία μελετήθηκε και στην παρούσα διπλωματική εργασία) της TDP43-ΔNLS. Επίσης, εξαιτίας της μετάλλαξης της TDP43-ΔNLS στην θέση που σχετίζεται με τον εντοπισμό της στο πυρήνα, εμφανίζεται συσσώρευση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα και δημιουργεί συσσωματώματα όπου, προσδένεται και εγκλωβίζει και τις ενδογενείς φυσιολογικές TDP43 (Winton et al. 2008). Μελέτες έχουν δείξει ότι όταν υπερεκφράζεται η TDP43-ΔNLS, εμφανίζονται και συμπτώματα χαρακτηριστικά της FTD, τα οποία με την απομάκρυνση της εξωγενούς πρωτεΐνης, βελτιώνονται (Alfieri, Pino, and Igaz 2014). Επιπλέον, φαίνεται ότι όταν υπερεκφράζεται η TDP43-ΔNLS, ακολουθεί μια απορρύθμιση της γενετικής έκφρασης και ένας γρηγορότερος νευρωνικός θάνατος στο φλοιό και στον ιππόκαμπο του εγκεφάλου (Igaz et al. 2011).

Λόγω αυτής της υποκυτταρικής ανακατανομής, εμφανίζεται πυρηνική εξάντληση της TDP43, που δείχνει ότι ο μη φυσιολογικός μηχανισμός μπορεί να συνεπάγεται απώλεια λειτουργίας του πυρήνα, κέρδος κυτταροπλασματικής λειτουργίας ή αμφότερα. Έως σήμερα, έχουν βρεθεί παραπάνω από 50 παρανοηματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο TDP43 που σχετίζονται περίπου με το 5% των οικογενών περιπτώσεων ALS και <1% των σποραδικών περιπτώσεων. Αξιοσημείωτο είναι ότι σχεδόν όλες οι μεταλλάξεις που συγκεντρώνονται σε περιοχές που είναι πλούσιες στην γλυκίνη (Gly-rich domains), προκαλούν νόσο, επηρεάζοντας τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και συγκεκριμένα με άλλες RBPs. Αποτέλεσμα αυτού είναι να μεταβάλλεται η μεταφορά RNP, η διαλυτότητα, ο υποκυτταρικός εντοπισμός αλλά και η στρατολόγηση σε SGs της TDP43. Επίσης, και σε άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες εμφανίζονται συσσωματώματα TDP43, όπως η νόσος Αλτσχάιμερ (AD), η νόσος Χάντιγκτον (HD), η νΠ και η άνοια με σωματίδια Lewy (DLB) (Chen-Plotkin, Lee, and Trojanowski 2010).

Όταν το κύτταρο βρίσκεται σε κατάσταση στρες, η TDP43, όπως και η πλειονότητα των RBPs, απομονώνεται σε SGs όπου συν-εντοπίζεται με τα mRNA στόχους. Επίσης, μετά από στρες, οι παθολογικές μορφές της TDP43, ενσωματώθηκαν νωρίτερα σε SGs ενώ αύξησαν το μέγεθός των SGs και ελάττωσαν την κινητικότητά τους (McDonald et al. 2011).

Ενώ η TDP43 εμφανίζεται κυρίως στον πυρήνα, η χρώση ανίχνευσε πρωτεΐνη και μέσα στα συναπτικά άκρα, κατά μήκος των αξόνων των κινητικών νευρώνων και στους δενδρίτες, το οποίο δείχνει ότι μπορεί να σχετίζεται με την μεταφορά αλλά και την μετάφραση του mRNA (R. K. Narayanan et al. 2013; Alami et al. 2014; I.-F. Wang et al. 2008).

Συνοψίζοντας, η TDP43 έχει πολλαπλές δράσεις, από την εναλλακτική συρραφή στον πυρήνα έως την μεταφορά του mRNA στα συνοπτικά άκρα και την τοπική μετάφραση. Μέσω μεταλλάξεων ή γενικότερης παρεμπόδισης της έκφρασης της, ακολουθεί νευρωνική απώλεια και εμφάνιση νευροεκφυλιστικών νόσων όπως FTD και ALS.

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

Η πρωτεΐνη FUS/TLS έχει την δυνατότητα να δεσμεύεται σε μονόκλιωνα και δίκλιωνα μόρια DNA και RNA που έχουν στο μόριο τους επαναλήψεις της αλληλουχίας GUGGU, αλλά με περιορισμένη ειδικότητα (Rogelj et al. 2012; Lagier-Tourenne et al. 2012; Lerga et al. 2001). Επιπλέον, η πρωτεΐνη μπορεί άμεσα να συνδεθεί με την RNA πολυμεράση II (RNAP2) και την III (RNAP3) ώστε να ρυθμίσει την μεταγραφή και την επιλογή της θέσης πολυαδενυλίωσης του mRNA (Masuda et al. 2015; Ishigaki et al. 2012; Tan et al. 2012). Ακόμη, κατά την μεταγραφή, η εναλλακτική συρραφή εξασφαλίζεται με την αλληλεπίδραση του U1-snRNP με το σύμπλοκο FUS-RNAP2 (Yu and Reed 2015). Η FUS συνδέεται στα 5' και 3' αμετάφραστα άκρα του mRNA και εμπλέκεται στην μεταφορά τους από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Ravanidis et al., 2018). Επιπλέον η FUS διεγείρει την βιογένεση των microRNAs, προσελκύνοντας το σύμπλοκο DRISHA (Morlando et al. 2012). Σε περιοχές βλάβης του DNA, η FUS έχει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διάσωση μέσω των αλληλεπιδράσεων με τις CBP / p300 και HDAC1 (W.-Y. Wang et al. 2013).

Έτσι, φαίνεται η FUS να έχει πρωταρχικό ρόλο στην ομαλή λειτουργία των πυρηνικών λειτουργιών αλλά και της δυναμικής μεταξύ δενδριτών και νευρικών αξόνων εφόσον εμπλέκεται και στην μετακίνηση αλλά και στην μετάφραση ορισμένων mRNA στόχων (Yoshimura et al. 2006).

Οι μη φυσιολογικές μορφές της FUS, έχουν συσχετιστεί με την οικογενή αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS), με παρουσία εγκλειστών θετικών για FUS στο κυτταρόπλασμα

των εκφυλισμένων νευρώνων και της γλοίας καθώς και με μειωμένα επίπεδα FUS στον πυρήνα σε εγκεφάλους ασθενών.

Η πλειονότητα των μεταλλάξεων FUS παρατηρούνται στην περιοχή πυρηνικού εντοπισμού (NLS) στο καρβοξυτελικό άκρο και σε μια ακόμη περιοχή που ομοιάζει με πρίον στο αμινοτελικό άκρο. Έτσι, εκτρέπεται ο εντοπισμός FUS προς το κυτταρόπλασμα όπου καθίσταται περισσότερο επιρρεπής σε λάθος αναδίπλωση και συσσωμάτωση (Neumann et al. 2009; Van Langenhove et al. 2010). Τέλος, η έκφραση μη-φυσιολογικών FUS έδειξε ότι σε νευρωνικά κύτταρα παρατηρείται εξασθένηση της αυτοφαγίας όπως αποδεικνύεται από την συσσώρευση ουβικινιωμένων πρωτεϊνών και αυτοφαγικών υποστρωμάτων NBR1 και p62 (Soo et al. 2015).

Κεφάλαιο 5: Μηχανισμοί αποικοδόμησης των πρωτεϊνών

Η ρύθμιση των επιπέδων των πρωτεϊνών του κυττάρου πραγματοποιείται από τον ρυθμό που αυτές συντίθενται αλλά και τον ρυθμό που αποικοδομούνται. Ο ρυθμός αποικοδόμησης των πρωτεϊνών εξαρτάται από τη λειτουργία τους, την ποσότητά τους και από το αν έχουν βλαβερά αποτελέσματα για το κύτταρο. Πρωτεΐνες με ρυθμιστικό ρόλο όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες, έχουν μειωμένο χρόνο ημιζωής και η αποικοδόμησή τους γίνεται ταχύτατα. Τα δύο βασικά μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών είναι το αυτό της ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και το μονοπάτι της αυτοφαγίας που καταλήγει στα λυσοσώματα (Cooper and Hausman 2004).

Εξαιτίας της γήρανσης ή και σε καταστάσεις στρες, η ενεργότητα αυτών των δύο μηχανισμών φθίνει, με συνέπεια την συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών, οι οποίες δεν μπορούν να αφομοιωθούν φυσιολογικά, αντιθέτως διασυνδέονται μεταξύ τους και δημιουργούν εκτεταμένους υδρόφοβους δεσμούς.

Επιπλέον, σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νΠ, έχει παρατηρηθεί συσσώρευση παθολογικών μορφών πρωτεϊνών. Βλάβες στους δύο μηχανισμούς που αναφέρθηκαν, του πρωτεασώματος και της αυτοφαγίας, προκαλεί την συσσωμάτωση και την δημιουργία εγκλείστων των πρωτεϊνών που φυσιολογικά καταστρέφονται. Έτσι, η ρύθμιση των δύο μηχανισμών της αυτοφαγίας και του πρωτεασώματος, είναι δυνατόν να αποτρέψει την

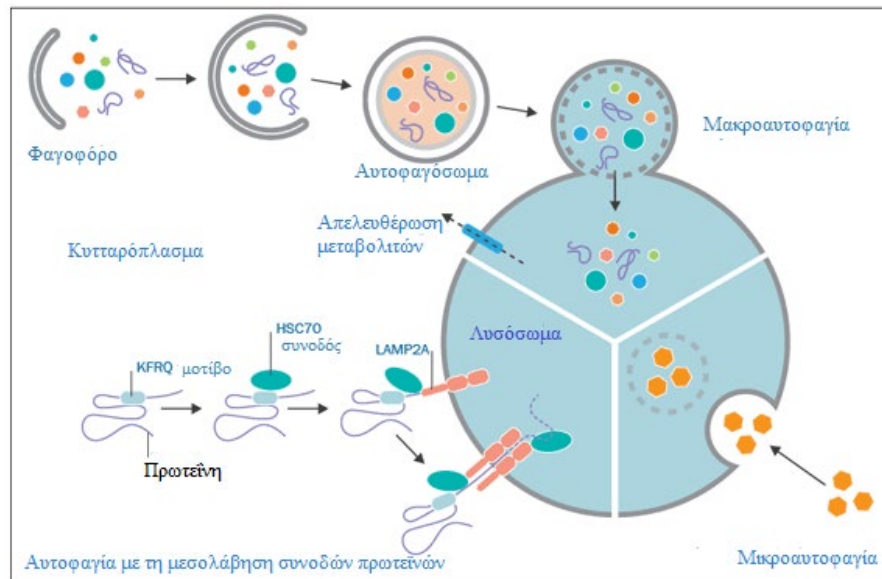
δημιουργία εγκλείστων και να προκαλέσει μείωση στην πρόοδο νευροεκφυλιστικών νόσων και γενικότερα ασθενειών που οφείλονται στην συσσώρευση μη-φυσιολογικών πρωτεϊνών (Tsuchiya et al. 2013; Nixon 2013).

5.1 Μονοπάτι Αυτοφαγίας-Λυσοσωμάτων (Autophagy Lysosome Pathway, ALP)

Η διαδικασία της αυτοφαγίας ορίζεται ως μια φυσιολογική διαδικασία όπου τα συστατικά του κυττάρου αποικοδομούνται από το λυσόσωμα τόσο σε φυσιολογικά αλλά και πάσχοντα κύτταρα. Ο έλεγχος της ποιότητας των πρωτεϊνών είναι εξαιρετικά σημαντικός καθώς προλαμβάνει την έγκαιρη απομάκρυνση των συσσωρευμένων παθογόνων πρωτεϊνών σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως της tau στην νόσο Αλτσχάιμερ και της α-συνουκλεΐνης στην νΠ (Yorimitsu et al. 2005). Στον ορισμό της αυτοφαγίας περιλαμβάνονται όλα τα μονοπάτια όπως η αυτοφαγία με την μεσολάβηση συνοδών πρωτεϊνών (chaperone-mediated autophagy, CMA), η μακροαυτοφαγία και η μικροαυτοφαγία όπου η ομοιότητά τους είναι ότι περιλαμβάνουν την μεταφορά ενδοκυττάρων συστατικών στα λυσοσώματα και ότι τα δομικά στοιχεία που προκύπτουν επαναχρησιμοποιούνται. Η διαφορά των τριών αυτών μονοπατιών αυτοφαγίας είναι ότι διαφέρουν σχετικά με ποιο μηχανισμό τα κυτταρικά φορτία παραδίδονται στο λυσόσωμα.

Επιπλέον, τα λυσοσώματα μπορούν και λαμβάνουν συστατικά πλασματικής μεμβράνης και να εσωτερικεύουν εξωκυττάριο υλικό με την διαδικασία της ενδοκύτωσης (Xilouri, Brekk, and Stefanis 2016; Grant and Donaldson 2009).

Συγκεκριμένα, η αποικοδόμηση της α-συνουκλεΐνης φαίνεται να πραγματοποιείται κυρίως από τα μονοπάτια της αυτοφαγίας με την μεσολάβηση συνοδών πρωτεϊνών και της μακροαυτοφαγίας (Ana Maria Cuervo et al. 2004; Vogiatzi et al. 2008; Alvarez-Erviti et al. 2010; Vekrellis and Stefanis 2012).

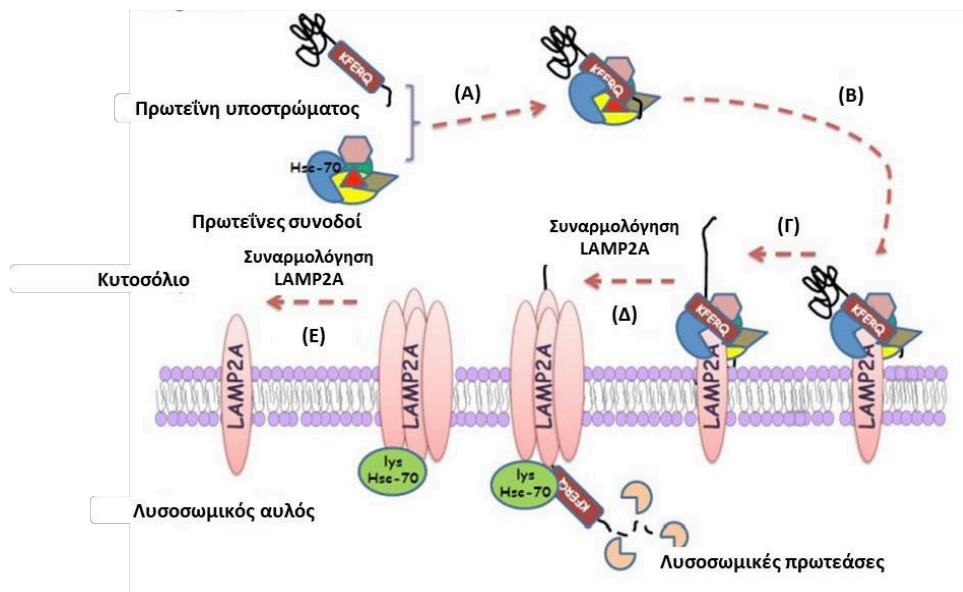


Εικόνα 6: Οι τύποι της αυτοφαγίας (Προσαρμογή από www.novusbio.com).

5.1.1 Αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από πρωτεΐνες συνοδούς (Chaperone-Mediated Autophagy, CMA)

Η αυτοφαγία με την μεσολάβηση συνοδών πρωτεϊνών είναι ένα ιδιαίτερα επιλεκτικό μονοπάτι που συχνά ρυθμίζεται ως απόκριση στο κυτταρικό στρες (Cuervo and Dice, 2000a; Cuervo and Dice, 2000b), ενώ δεν περιλαμβάνει τον σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων. Έτσι, οι πρωτεΐνες-στόχοι διασχίζουν τη λυσοσωμική μεμβράνη άμεσα για να φθάσουν στο λυσοσωμικό αυλό. Μόνο κυτοσολικές πρωτεΐνες, οι οποίες φέρουν την KFERQ αλληλουχία, που είναι μοτίβο στόχευσης CMA, ή παρόμοια αλληλουχία, αναγνωρίζονται από τη συνοδό Hsc70 και ένα γενικότερο σύμπλεγμα συνοδών πρωτεϊνών. Αυτό το μοτίβο εμφανίζεται σε ένα ποσοστό 30% όλων των κυτοσολικών πρωτεϊνών, αλλά ακόμη περισσότερες πρωτεΐνες θα μπορούσαν δυνητικά να γίνουν στόχοι αποικοδόμησης μετά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Dice 1990; Chiang and Dice 1988). Έπειτα από την αναγνώριση, η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται μια προς μια στην μεμβράνη του λυσοσώματος (Agarraberes and Dice 2001), όπου γίνεται αλληλεπίδραση με την Lamp2A (A. M. Cuervo and Dice 1996). Η πρωτεΐνη Lamp2A βρίσκεται ως μονομερές πάνω στην μεμβράνη του λυσοσώματος, και μαζί με άλλες πρωτεΐνες, σχηματίζει ένα πολυμερές σύμπλοκο, το οποίο βοηθά στην μετατόπιση του πρωτεϊνικού υποστρώματος. Συγκεκριμένα, ο ρυθμός της CMA αλληλεξαρτάται με την ποσότητα της Lamp2A αλλά και από την ταχύτητα της δυναμικής συναρμολότητας / αποσυναρμολότητας του συμπλόκου

μετατόπισης του πρωτεϊνικού υποστρώματος (Bandyopadhyay et al. 2008). Μάλιστα μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση της Lamp2A μειώνεται στην συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας σε εγκεφάλους ατόμων με νΠ (Alvarez-Erviti et al., 2010), ενώ αυτή η μείωση έχει ως συνέπεια την συσσωμάτωση της α -συνουκλεΐνης και τον νευρικό θάνατο (Vogiatzi et al., 2008- Xilouri et al., 2016). Αντίθετα, η υπερέκφραση της Lamp2A σε έρευνα από Xilouri et al. 2013, έδειξε προστασία των τρωκτικών από τον συνεπακόλουθο από α -συνουκλεΐνη, θάνατο των νευρώνων.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της αυτοφαγίας διαμεσολαβούμενης από πρωτεΐνες συνοδούς (CMA).

5.1.2 Μικροαυτοφαγία

Στην μικροαυτοφαγία γίνεται άμεση μεταφορά και πέψη των κυτταρικών συστατικών (όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, οργανίδια), η οποία επιτυγχάνεται μέσω εγκολπώσεων στο επίπεδο της λυσοσωμικής μεμβράνης που εν τέλει σφαιροποιούνται σε κυστίδια (Müller et al. 2000). Η μικροαυτοφαγία, λειτουργεί στα θηλαστικά ως μη ειδική οδός αυτοφαγίας. Επιπλέον, στέρηση αζώτου ή η δράση της ραπαμυκίνης μέσω των ρυθμιστικών συμπλόκων σηματοδότησης μπορεί να προκαλέσει μικροαυτοφαγία των διαλυτών υποστρωμάτων. Σε συνθήκες με μειωμένο άζωτο, οι βασικές λειτουργίες της μικροαυτοφαγίας είναι η διατήρηση της μεμβρανικής ομοιόστασης, του οργανικού μεγέθους και της κυτταρικής επιβίωσης. Τέλος, η μικροαυτοφαγία συνδέεται και συμπληρώνει την αυτοφαγία με τη

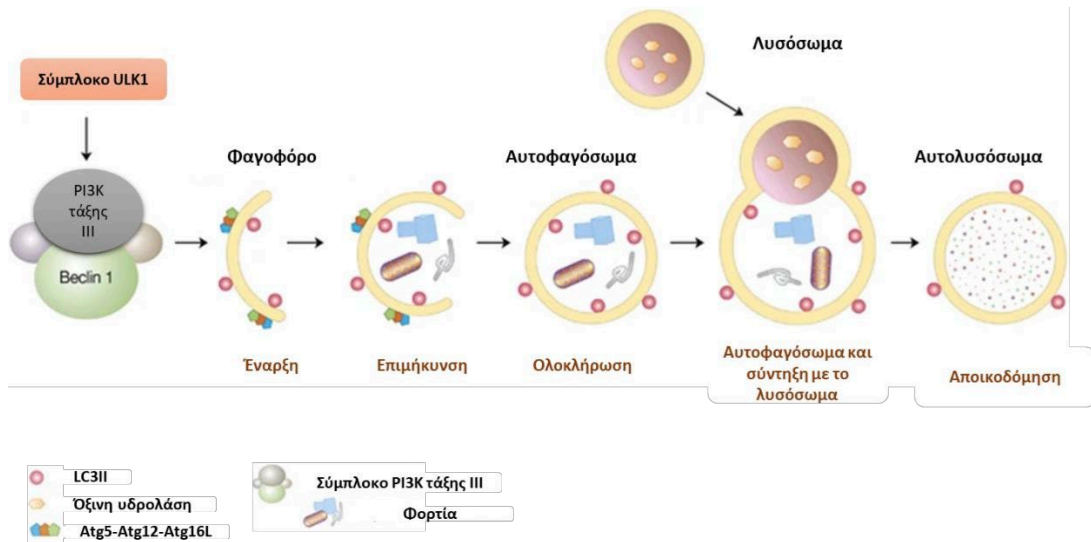
μεσολάβηση των συνοδών πρωτεϊνών, την μακροαυτοφαγία και άλλα μονοπάτια αποικοδόμησης κυτταρικών συστατικών (Li, Wen-wen et al. 2012).

5.1.3 Μακροαυτοφαγία

Η διαδικασία της μακροαυτοφαγίας αφορά την αποικοδόμηση μεγάλων τμημάτων του κυτταροπλάσματος, μέχρι και ολόκληρων οργανιδίων, μέσω της δημιουργίας αυτοφαγοσωμάτων. Συγκεκριμένα, τα αυτοφαγοσώματα είναι λιπιδικές δομές με διπλή μεμβράνη, όπου απομονώνονται κυτοσολικά συστατικά – στόχοι προς αποικοδόμηση. Έπειτα, πραγματοποιείται σύντηξη λυσόσωμα με αυτοφαγοσώματα, ώστε να δημιουργηθεί το **αυτολυσόσωμα**. Καθώς μειώνεται το pH μέσα στο αυτολυσόσωμα, λαμβάνουν δράση πολλές υδρολάσες, τα συστατικά που αποτελούν το αυτολυσόσωμα διασπώνται ταχύτατα σε ελεύθερα αμινοξέα όπου και είναι ξανά διαθέσιμα προς χρήση για το κύτταρο (Xilougi, Brekk, and Stefanis 2016). Συγκεκριμένα, ορισμένες πρωτεΐνες εκτίθενται στην επιφάνεια περιλαμβάνονται σε αυτές προς αποικοδόμηση, καθώς και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις- όπως η ουβικιτινίωση- που συνδέει τη μακροαυτοφαγία και το μονοπάτι ουβικιτίνης πρωτεασώματος (Park and Cuervo 2013).

Όταν το σύμπλοκο mTOR αναστέλλεται από διάφορους παράγοντες στρες όπως έλλειψη θρεπτικών συστατικών, ενεργοποιείται ο σχηματισμός αυτοφαγοσωμάτων. Η δημιουργία αυτοφαγοσωμάτων στους νευρώνες είναι μια δυναμική διαδικασία. Πραγματοποιείται ιδανικά στα αξονικά άκρα και υποβάλλονται σε οπισθοδρομική αξονική μεταφορά προς το σώμα του κυττάρου (S. Lee, Sato, and Nixon 2011; Maday and Holzbaaur 2014). Έτσι, οι νευρώνες μπορούν να ανακυκλώσουν τα απομακρυσμένα μιτοχόνδρια αλλά και τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα που εμφανίζονται σε περιφερικά αξονικά διαμερίσματα. Πλέον είναι γνωστό ότι η μακροαυτοφαγία περιλαμβάνει πληθώρα σηματοδοτικών μονοπατιών ειδικά για κάθε υπόστρωμα, που σχετίζονται από τον μεταβολισμό λιπιδίων έως και την άμυνα του οργανισμού σε ξένους παθογόνους οργανισμούς (Frake et al. 2015; Stolz, Ernst, and Dikic 2014).

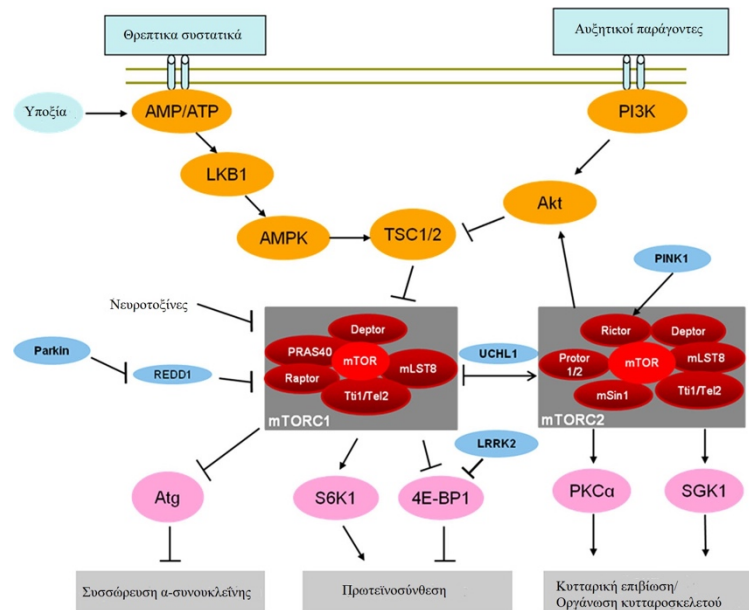
Αλλαγές στην ομοιόσταση της μακροαυτοφαγίας καθιστούν πιο δύσκολη την δημιουργία αυτοφαγοσωμάτων είτε επάγουν σε υπερβολικό βαθμό το μονοπάτι της μακροαυτοφαγίας, διαταράσσοντας έτσι την αυτοφαγική ροή. Αυτές οι αλλαγές πιο συχνά οφείλονται σε ανωμαλίες του λυσοσώματος, οι οποίες βλάπτουν την σύντηξη των αυτοφαγοσωμάτων με λυσοσώματα (Xilouri, Brekk, and Stefanis 2016).



Εικόνα 8: Σχηματισμός αυτοφαγοσωμάτων και λυσοσωμική αποικοδόμηση.

Αναφορικά με την ρύθμιση της μακροαυτοφαγίας, σε φυσιολογικά βιοχημικά επίπεδα, σταματά η αυτοφαγία από πληθώρα μοριακών διεργασιών. Κυρίως η πρωτεΐνη mTOR, στόχος του μορίου ραπαμυκίνης, και ειδικότερα το σύμπλοκο mTORC1 παίζει βασικό ρόλο αναστέλλοντας, μέσω φωσφορυλίωσης της σερίνης 757, το σύμπλεγμα ULK1. Η mTOR είναι μια συντηρημένη πρωτεϊνική κινάση σερίνης / θρεονίνης που λειτουργεί ως κεντρικός αισθητήρας αυξητικών παραγόντων, σημάτων θρεπτικών ουσιών και των επιπέδων ενέργειας και ελέγχει πληθώρα λειτουργιών σε κυτταρικό επίπεδο, περιλαμβανομένου την μεταγραφή, την σύνθεση πρωτεϊνών, την κυτταροσκελετική οργάνωση, τον μεταβολισμό, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του κυττάρου. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα βλαστικής σειράς, όπου απουσίαζε το mTOR, έδειξαν θνησιμότητα του εμβρύου κατά την εμφύτευση (Brown et al. 2004, Murakami et al. 2004). Αποτελείται από δύο πρωτεϊνικά σύμπλοκα, το mTORC1 και το mTORC2. Το mTORC1 λειτουργεί ως βασικός ρυθμιστής της αυτοφαγίας (Zhifeng and Klionsky 2009; Lan et al. 2017). Επιπλέον, το mTORC1 ρυθμίζει εν μέρει την αυτοφαγία με την φωσφορυλίωση και την αναστολή της πυρηνικής μετατόπισης του TFEB (Transcription factor EB), ο οποίος επάγει την έκφραση των γονιδίων της λυσοσωμικής βιογένεσης και της αυτοφαγίας (Martina et al. 2012).

Σε συνθήκες στρες ή έλλειψης απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για το κύτταρο, επάγεται διακοπή της δράσης του mTORC1, ώστε να σχηματιστεί και να επιμηκυνθεί η αυτοφαγοσωματική μεμβράνη μέσω της πρόσληψης ενός συστήματος πρόσδεσης σαν αυτό της ουβικιτίνης που αποτελείται από πρωτεΐνες, όπως η LC3 και Beclin1 (Xilouri, Brekk, and Stefanis 2016).

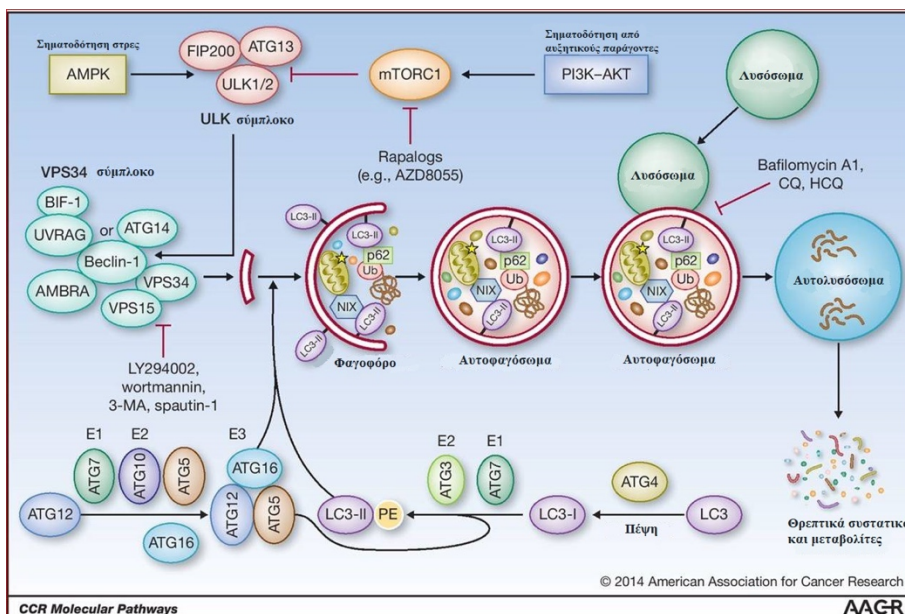


Εικόνα 9: Το μονοπάτι του mTOR στο κύτταρο και ο ρόλος του στην απόκριση της αυτοφαγίας (Atg, autophagy-related genes) στην συσσώρευση α-συνουκλεΐνης (Προσαρμογή από Lan et al. 2017).

Δημιουργία αυτολυσοσώματος

Για την έναρξη της μακροαυτοφαγίας, πραγματοποιείται φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της ULK1 από την AMPK αλλά και από άλλες διαδικασίες όπως συνθήκες στρες ή η εξάντληση γλυκόζης. Για την δημιουργία του συμπλόκου για την έναρξη της μακροαυτοφαγίας ULK1 / 2-ATG13-FIP200, είναι ανεξάρτητη της διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών, αφού πραγματοποιείται ακόμα και σε συνθήκες με πληθώρα θρεπτικών συστατικών. Έτσι, φυσιολογικά το σύμπλοκο mTORC1 φωσφορυλιώνει και μπλοκάρει τις ULK1 / 2 και ATG13 με αποτέλεσμα την διακοπή της αλληλεπίδρασης της ULK1 και AMPK. Αντίθετα, σε συνθήκες όπου επάγεται η αυτοφαγία, πραγματοποιείται απελευθέρωση του mTOR από τις παραπάνω πρωτεΐνες και έτσι ενεργοποιείται το ULK1 /

2, που φωσφορυλιώνει και πιθανόν ενεργοποιεί, τα ATG13 και FIP200. Με την ενεργοποίηση του εναρκτήριου ULK συμπλόκου, το ίδιο ενεργοποιεί το σύμπλοκο VPS34 μέσω φωσφορυλίωσης από των AMBRA1 και BECLIN1. Το σύμπλοκο VPS34 έχει ρυθμιστικό ρόλο στην αυτοφαγία καθώς προσελκύει και άλλες Atg πρωτεΐνες για την δημιουργία φαγοφόρου και φαγοσώματος (Zhifeng and Klionsky 2009). Επιπλέον, το VPS34 παράγει 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PI3P) στη μεμβράνη που θα γίνει φαγοφόρο και η PI3P αντίστοιχα, προσλαμβάνει πρωτεΐνες, απαραίτητες για την επιμήκυνση του φαγοφόρου. Απαραίτητο συστατικό για την επιμήκυνση είναι η ενσωμάτωση της LC3 (ATG8) με λιποειδή φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, δηλαδή της LC3 II, που ο σχηματισμός της και η ακριβής στόχευση μεμβράνης περιλαμβάνουν δύο συστήματα σύζευξης πρωτεΐνης. Η επιμήκυνση συνεχίζεται έως να γίνει συγχώνευση των μεμβρανών του φαγοφόρου ώστε να δημιουργηθεί το αυτοφαγόσωμα, το οποίο εν τέλει συνδέεται με το λυσόσωμα και σχηματίζεται το αυτολυσόσωμα, που οι μόνιμες λυσοσωμικές υδρολάσεις διασπών το πρωτεϊνικό φορτίο αλλά και την LC3 II. Σε αυτό το μονοπάτι και άλλες πρωτεΐνες υποδοχείς έχουν σημαντικό ρόλο, όπως το p62 / SQSTM1, που έχουν την ικανότητα να αναγνωρίσουν και να παραδώσουν μεταλλαγμένες ή συσσωματωμένες πρωτεΐνες και κατεστραμμένα οργανίδια στο αυτοφαγόσωμα για αποικοδόμηση, διατηρώντας έτσι την ομοιόσταση του κυττάρου. Για την επιτυχημένη επιλεκτική παράδοση πρωτεϊνικού φορτίου, βασικός παράγοντας είναι οι ειδικές αλληλεπιδράσεις της LC3-II, που λειτουργεί ως δέκτης του φορτίου και των πρωτεϊνικών υποδοχέων (Cicchini, Karantza, and Xia 2015). Ειδικότερα, αυτοί οι αυτοφαγικοί υποδοχείς αναγνωρίζουν την σήμανση των πρωτεϊνών που πρόκειται να αποικοδομηθούν. Αυτοφαγικοί παράγοντες είναι οι πρωτεΐνες p62, Ndp52,14-17, Nbr1 (Thurston et al. 2009; Kanki et al. 2009; Novak et al. 2010; Kirkin et al. 2009, 1).



Εικόνα 10: Το μονοπάτι της μακροαυτοφαγίας και χημικοί αναστολείς αυτού (Προσαρμογή από Cicchini, Karantza, and Xia 2015).

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει η α-συνουκλεΐνη, ωστόσο ο αριθμός μελετών που έχει πραγματοποιηθεί για την επεξήγηση του μηχανισμού ρύθμισης των επιπέδων της, είναι περιορισμένος. Η ρύθμιση αυτών των επιπέδων πραγματοποιείται σε διάφορα στάδια της γονιδιακής έκφρασης από διαφορετικά μόρια, με κύριες τις RBPs. Εκτός από τις RBPs, η ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών πραγματοποιείται και από τους μηχανισμούς αποικοδόμησης αυτών όπως ο μηχανισμός της αυτοφαγίας.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας είναι η αποσαφήνιση της ρύθμισης της συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης από τον μηχανισμό της αυτοφαγίας όταν μεταβάλλεται η έκφραση των πρωτεϊνών DYRK1A, FUS, και TDP-43. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η σηματοδότηση πρωτεϊνών-κλειδιών στο μονοπάτι της αυτοφαγίας όταν επάγεται υπερέκφραση τους, ενώ εξετάστηκε επίσης και η πρωτεϊνοσύνθεση αλλά και η κυτταρική βιωσιμότητα. Επιπλέον, με γνώμονα την αισθητή παρουσία οξειδωτικού στρες στην νΠ, μελετήθηκε και η επίδραση χημικών οξειδωτικών παραγόντων στα επίπεδα των παραπάνω RBPs.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Πειραματικά Υλικά

1.1 Κυτταρικά συστήματα

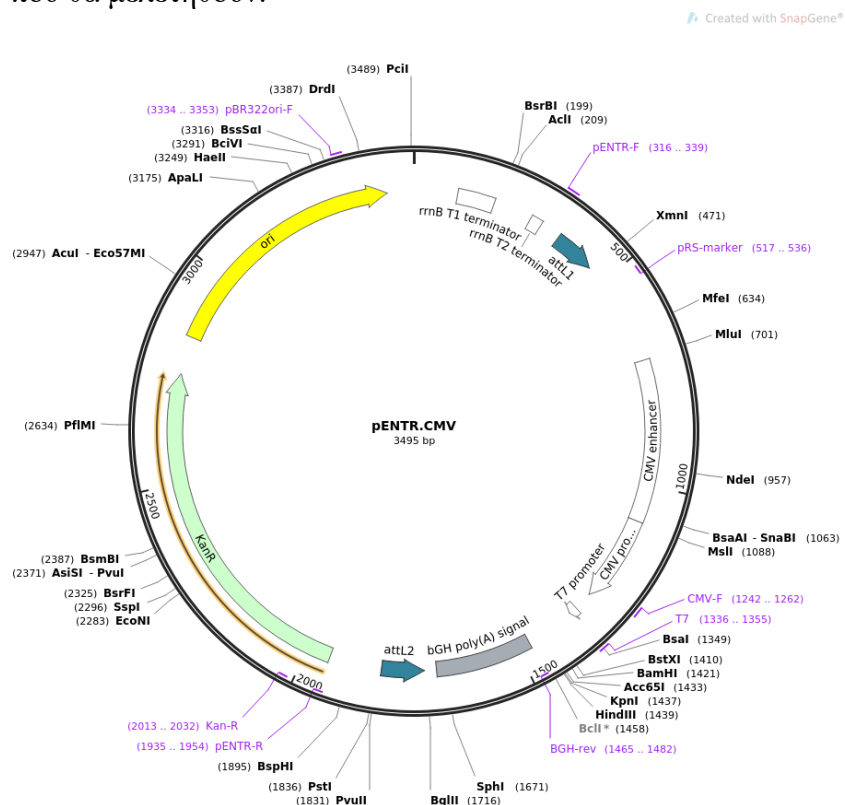
SK-N-SH Κύτταρα Νευροβλαστώματος Ανθρώπου

Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιούνται εκτενώς σε ερευνητικές διαδικασίες ως πρότυπο μοντέλο μελέτης. Η απομόνωση των SK-N-SH έγινε από ένα κορίτσι ηλικίας 4 χρονών από μεταστατικό καρκίνο μυελού των οστών και έχουν την ικανότητα να παράγουν την α-συνουκλεΐνη (Gautier et al. 2021).

1.2 Πλασμίδια

Πλασμιδιακός φορέας pENTR.GD

Με την χρήση του πλασμιδιακού φορέα pENTR.GD (ThermoFisher) έγινε η κλωνοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις Dyrk1A, FUS/TLS, TDP43, TDP43-ΔNLS και SNCA. Ο φορέας pENTR.GD περιλαμβάνει πρώτον, ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη, το οποίο και απαιτείται για την επιλογή των βακτηριακών στελεχών E. Coli που έχουν τον σωστό φορέα, δεύτερον, τον υποκινητή CMV που βρίσκεται πριν από τις πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης, και τρίτον, πολλές θέσεις κλωνοποίησης για την εισαγωγή των αλληλουχιών που θα μελετηθούν.



Εικόνα 11: Σχηματικός χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pENTR.GD.

1.3 Διαλύματα – Αντιδραστήρια

Χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την καλλιέργεια των κυττάρων, τη διαμόλυνση και την επιμόλυνση:

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - high glucose: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.
- Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) – PAN-Biotech
- Ορός εμβρύου βοός (FBS): ThermoFisher Scientific, Reinach, Switzerland.
- Τρυψίνη: Sigma-Aldrich.
- Μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνη: Penicillin-Streptomycin, Sigma-Aldrich.
- Η διαμόλυνση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό αντιδραστήριο JetOptimus, Polyplus, Illkirch, France.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την Δοκιμασία Κυτταροτοξικότητας - Ανίχνευση της βιωσιμότητας των κυττάρων.

Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo): στην κάθε συνθήκη προστέθηκαν 10 μ L και χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών της εταιρείας Tecan, μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 450 nm.

Το Cell Counting Kit-8 (CCK-8), επιτρέπει την μελέτη της επαγωγής και της αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε οποιοδήποτε *in vitro* μοντέλο. Παρέχει την δυνατότητα γρήγορων και μη επεμβατικών αναλύσεων χρησιμοποιώντας το υδατοδιαλυτό άλας τετραζολίου, WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt], το οποίο παράγει μέσω αναγωγής παρουσία ηλεκτρονίου, την φορμαζάνη, μια υδατοδιαλυτή χρωστική. Το CCK-8 είναι έτοιμο προς χρήση διάλυμα. Επιπλέον, όντας μη ραδιενεργό, επιτρέπει ευαίσθητες χρωματομετρικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων σε αναλύσεις κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξικότητας. Το WST-8 μειώνεται από τις αφυδρογονάσεις στα κύτταρα για να δώσουν ένα πορτοκαλί χρώματος προϊόν (φορμαζάνη), το οποίο είναι διαλυτό στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Η ποσότητα της χρωστικής φορμαζάνη που παράγεται από τις αφυδρογονάσεις στα κύτταρα είναι ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων.

Cytotoxicity Detection Kit (LDH) της εταιρείας Merck

Σε 96-well διάφανο plate, προστέθηκαν 50μl θρεπτικό χωρίς FBS και 50μl από «χρησιμοποιημένο» θρεπτικό από κάθε δείγμα, ενώ μια συνθήκη έχει σκέτο θρεπτικό υλικό. Προστίθεται στα διαμολυσμένα πηγάδια, 5μl διάλυμα κυτταρικής λύσης, γίνεται ανάδευση και αναμονή για 15 λεπτά. Μεταφέρονται 10μl από το κυτταρικό εκχύλισμα σε πηγαδάκια και προστίθεται 90μl θρεπτικό χωρίς FBS. Αναμειγνύονται 100μl αντιδραστήριο χρώσης και 2μl καταλύτη και δημιουργείται μίγμα, το οποίο μοιράζεται σε όλα τα πηγάδια. Γίνεται ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι για 5 λεπτά. Χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών της εταιρείας Tecan, μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 492 nm σε χρονικά διαστήματα από 5-10-15 λεπτά.

Διαλύματα- Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην απομόνωση του RNA (RNA Extraction), στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), στην αντίδραση *in vitro* μεταγραφής και στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR).

- TRI Reagent: Πρόκειται για αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για να απομονωθεί το συνολικό RNA από δείγματα ανθρώπινης και ζωικής προέλευσης (κυτταρικές σειρές) (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA).
- Ένζυμο MMLV: Χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής καθώς μπορεί να συνθέτει μόρια DNA με πρότυπο μόρια RNA. Προϊόν της ThermoFisher Scientific.
- Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol, DTT): Διευκολύνει την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής διαλύοντας τους δισουλφορικούς δεσμούς στα RNA, προϊόν της εταιρείας ThermoFisher Scientific.
- RNaseOUT™: Αναστολέας των ενζύμων που έχουν δραστικότητα ριβονουκλεάσης. Προϊόν της ThermoFisher Scientific.
- Νουκλεοτίδια-Deoxynucleoside Triphosphates (dNTPs): Τριφωσφορικά νουκλεοτίδια ως ισομοριακό μείγμα τεσσάρων νουκλεοτιδίων (dATP, dTTP, dCTP και dGTP), της ThermoFisher Scientific.
- Τυχαία εξαμερή (Random hexamers): Οι εκκινητές αυτοί απαρτίζονται από ένα μείγμα ολιγονουκλεοτιδίων μήκους 6 βάσεων που έχουν τυχαία νουκλεοτιδική

σύσταση. Θεωρείται ότι με τη χρήση του μίγματος των τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών επιτυγχάνεται πληρέστερη κάλυψη όλων των μορίων RNA (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

- Ρυθμιστικό διάλυμα της πολλαπλής αντίδρασης πολυμεράσης με Mg^{2+} : Χρησιμοποιείται προκειμένου να διατηρείται σταθερή η ενεργότητα του ενζύμου της αντίδρασης. Περιέχει επίσης ιόντα Mg^{2+} που είναι απαραίτητος παράγοντας της DNA πολυμεράσης. Προϊόν της ThermoFisher Scientific.
- Kapa Taq polymerase: DNA πολυμεράση που επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο από την εταιρεία Kapa Biosystems.
- SYBR Green: Μη ειδική φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση της ποσοτικής PCR (qPCR), από την εταιρεία Roche.

Διαλύματα-Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο ανοσοτύπωμα κατά Western:

- Διάλυμα λύσης κυττάρων: Παρασκευάστηκε διάλυμα 25mM, Tris pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.16% Sodium Deoxycholate, 0.16% SDS.
- Μείγμα δεικτών γνωστού μοριακού βάρους για τις πρωτεΐνες: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#SM0671), ThermoFisher Scientific.
- Laemmli Buffer 6X: 375mM Tris pH6.8, 10% SDS, 50% glycerol, 10% β-mercaptoethanol, 0.03% bromophenol blue. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους -20°C.
- Protran® μεμβράνες νιτροκυτταρίνης: Αξιοποιήθηκαν για τη μεταφορά των πρωτεϊνών, Whatman, Kent, UK.
- Αντιδραστήρια ECL: Αξιοποιήθηκαν για την ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, Clarity, BioRad, California, USA.
- SDS-PAGE 5X (Running Buffer): 15,1g/lit Tris-Base και 72g/lit γλυκίνης σε ddH₂O. Στο τελικό διάλυμα προστέθηκε SDS έτσι ώστε να έχει περιεκτικότητα 0.1%. Το διάλυμα χρησιμοποιήθηκε σε πυκνότητα 1X με κατάλληλη αραιώση με δις απιονισμένο νερό.
- Transfer Buffer 1X: 2lit διαλύματος διαθέτουν 6,08g Tris-Base, 28,8g γλυκίνης και 400mL μεθανόλης.
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBS 10X: Μετά την Παρασκευή έγινε ρύθμιση του pH στο 7.4 με την προσθήκη HCl οξέος.

•Ρυθμιστικό διάλυμα TBS-T 1X: Για την παρασκευή 500 ml διαλύματος αναμίχθηκαν 50 ml TBS 10X με 500 µl Tween-20 και διαλύθηκαν σε 450 ml ddH₂O.

1.4 Φαρμακολογικοί παράγοντες

- CCCP/FCCP: από την εταιρεία MedChemExpress, New Jersey, USA.
- DMSO: από την εταιρεία Applichem, Darmstadt, Germany.
- Dopamine: από την εταιρεία MedChemExpress, New Jersey, USA.
- H₂O₂: προϊόν της εταιρείας Merck.
- MPP, 6-OHDA: προϊόν της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- NaAsO₂: προϊόν της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- Rotenone: προϊόν της εταιρείας Sigma-Aldrich.

1.4 Αντισώματα

Πρωτογενή αντισώματα:

- SNCA: (syn-1, 610786): μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την α-συνουκλείνη. Προμηθεύτηκε από την εταιρεία BD Biosciences, USA.
- SNCA 129 (phosphor-129, ab-168381): μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την α-συνουκλείνη που είναι φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 129. Προμηθεύτηκε από την εταιρεία abcam
- SNCA 87 (phosphor-87, sc-19893): μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την α-συνουκλείνη που είναι φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 87. Προμηθεύτηκε από την εταιρεία Santa Cruz Biotechnology.
- GAPDH HRP (60004): αναγνωρίζει την GAPDH και είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase). Προμηθεύτηκε από την εταιρεία Proteintech Europe, Manchester, UK.
- DYRK1A (100376): Santa Cruz Biotechnology Dyrk1A Antibody sc-100376 Mouse, 1:1000
- FUS/TLS: PROTEINTECH 11579-I-AP, Polyclonal Rabbit antibody, 1:1000
- TDP-43: PROTEINTECH TDP-43 Antibody 10782-I-AP Rabbit, 1:2000
- P62: Santa Cruz Biotechnology (sc-28359 HRP), monoclonal mouse antibody, 1:1000

- LAMP2A: Santa Cruz Biotechnology (sc-18822), monoclonal mouse antibody, 1:1000
- AKT: Cell Signaling AKT Antibody #9272 Rabbit
- Phospho-AKT: Cell Signaling Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb #4060/
- eIF2 α : Cell Signaling eIF2 α (D7D3) XP® Rabbit mAb #5324, 1:1000.
- Phospho- eIF2 α : Cell Signaling Phospho-eIF2 α (Ser51) (119A11) Rabbit mAb #3597 /
- ERK1/2: Cell Signaling p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody #9102 Rabbit /
- pERK1/2: Cell Signaling Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody #9101 Rabbit, 1:1000.
- PP2A: Santa Cruz Biotechnology PP2A-A α / β (4G7) Antibody: sc-13600 Mouse /
- p-PP2A: Santa Cruz Biotechnology p-PP2A-C α / β (F-8) Antibody: sc-271903 Mouse 1:1000
- ULK: Cell Signaling ULK1 (D8H5) Rabbit mAb #8054 /
- Phospho-ULK: Cell Signaling Phospho-ULK1 (Ser757) Antibody #6888 Rabbit 1:1000
- Puromycin: Sigma-Aldrich MABE343 Anti-Puromycin Antibody, clone 12D10 Mouse, 1:25000.
- Vinculin: Santa Cruz Biotechnology Vinculin Antibody (7F9): sc-73614 Mouse, 1:3000.
- Δευτερογενή αντισώματα:
- Anti-rabbit IgG-HRP: αντίσωμα, από την εταιρεία Cell Signaling Technologies, το οποίο έχει συζευχθεί με υπεροξειδάση, και αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G του κουνελιού (CST#7074),
- Anti-mouse IgG-HRP: αντίσωμα, από την εταιρεία Cell Signaling Technologies, το οποίο έχει συζευχθεί με υπεροξειδάση, και αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G του ποντικιού (CST#7076)

2. Μέθοδοι

2.1 Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών

Οι κυτταρικές σειρές αναπτύσσονταν σε στείρες συνθήκες, σε επωαστικό κλίβανο που είχε σταθερή θερμοκρασία τους 37 °C, ατμόσφαιρας 5% CO₂ και σχετική υγρασία 95%. Ο χειρισμός των κυττάρων έγινε σε θάλαμο νηματικής ροής.

Το θρεπτικό που επιλέχτηκε για την ανάπτυξη των ανθρώπινων νευροβλαστικών κυττάρων SK-N-SH ήταν το θρεπτικό υλικό DMEM (old cell line) ή EMEM (new cell line), που περιείχε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης, ενώ είχε προστεθεί 10% (v/v) ορός εμβρύου βοός και μίγμα 1% (v/v) αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

2.2 Διαμόλυνση κυτταρικών σειρών

Η ορολογία «διαμόλυνση» περιγράφει την εισαγωγή εξωγενών νουκλεϊκών οξέων (π.χ πλασμίδια) σε κυτταρικές σειρές. Στην παρούσα εργασία η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε μέσω κατιονικών λιπιδίων και συγκεκριμένα του αντιδραστηρίου JetOptimus για την εισαγωγή πλασμιδίων. Η κατάλληλη ποσότητα νουκλεϊκού οξέος, με βάση τις οδηγίες της εταιρείας, αναμιγνύεται με το λιπίδιο σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και επωάζονται για 15 λεπτά ώστε να δημιουργηθούν μικκύλια. Έπειτα, προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα από εναιώρημα κυττάρων και ακολουθεί επιπλέον αναμονή 10 λεπτών ώστε να πραγματοποιηθεί η διαμόλυνση. Τέλος, προστίθεται θρεπτικό ανάπτυξης DMEM και η αντίδραση μεταφέρεται σε πηγάδι για επώαση.

Πριν την συλλογή των κυττάρων, γινόταν έλεγχος του ποσοστού αυτών που είχαν πράγματι διαμολυνθεί σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού LEICA με φίλτρο για το πράσινο χρώμα. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε συνθήκη μάρτυρας της διαμόλυνσης με κατάλληλο πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο GFP και πραγματοποιούνταν έλεγχος τα αντίστοιχα κύτταρα έχουν πράσινο φθορισμό, είναι δηλαδή GFP-θετικά, και κατά συνέπεια, έχουν όντως ενσωματώσει τον φορέα διαμόλυνσης.

Εφόσον το ποσοστό των κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί ήταν ικανοποιητικό (>50%), τότε ακολουθούσε η συλλογή αυτών των κυττάρων για περαιτέρω πειραματικές δοκιμασίες.

2.3 Επιμόλυνση κυττάρων με αδενοϊούς

Τα διαιρούμενα SK-N-SH κύτταρα καλλιεργούνται μέχρι η επιφάνεια της καλλιέργειας να είναι καλυμμένη σε ποσοστό τουλάχιστον 70%. Έπειτα, αφού γίνει αλλαγή του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας, προστίθεται σε ειδική συγκέντρωση (24 MOI) εναιώρημα αδενοϊού. Οι ιοί που χρησιμοποιήθηκαν, έχουν παραχθεί στο εργαστήριο όπου έγινε το πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής, με μεταφορά του υποκινητή και των γονιδίων-στόχων από τον φορέα pENTR, με σκοπό την υπερέκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων. Αφού γίνει η καλλιέργεια και υπάρχει ικανοποιητικό ποσοστό κάλυψης του τριβλίου, γίνεται επιμόλυνση με τον κάθε ιό για 6 ώρες στον κλίβανο, σε θερμοκρασία 37 °C. Μετά, απομακρύνεται το υλικό που περιείχε το ιϊκό φορτίο, προστίθεται νέο θρεπτικό υλικό και το κύτταρα αφήνονται για 48 ώρες στους 37 °C. Τέλος, μετά το πέρας των 48 ωρών γίνεται η συλλογή των κυττάρων.

2.4 Απομόνωση RNA

Η απομόνωση ολικού RNA έγινε, για την κυτταρική σειρά SK-N-SH, 48 ώρες μετά από την διαμόλυνση, πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του θρεπτικού ανάπτυξης και προστέθηκε το αντιδραστήριο TRI Reagent, ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και θειοκυανικής γουανιδίνης. Έπειτα, το μείγμα TRI Reagent και κυττάρων, αφού έχουν μεταφερθεί σε σωληνάρια, υπόκεινται έντονη ανάδευση σε vortex για 10'' και αφήνεται στον πάγκο. Μετά το πέρας 5 λεπτών, προστίθεται BCP (βρωμοχλωροπροπάνιο), γίνεται φυγοκέντρηση στις 13,000 στροφές ανά λεπτό (rpm) σε ψυχόμενη φυγόκεντρο, ρυθμισμένη στους 4°C, ώστε να γίνει σωστός διαχωρισμός των φάσεων. Σε κάθε σωληνάριο, το RNA είναι διαλυμένο στην υδατική διάφανη φάση ενώ το DNA βρίσκεται στην μεσόφαση και τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες στην οργανική φάση ως πιο βαριά συστατικά. Σε νέα σωληνάρια μεταφέρονται οι υδατικές φάσεις των δειγμάτων με την προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης. Μετά από σύντομη ανάδευση 1'', το νέο μείγμα αφήνεται για επώαση στον πάγκο για 30 λεπτά. Έπειτα, γίνεται φυγοκέντρηση στην ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 13,000 στροφές στους 4°C για 30 λεπτά. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης, το RNA, λόγω του βάρους του, αναμένεται να έχει κατακρημνισθεί ως ορατό ίζημα με ημιδιαφανές χρώμα. Τέλος, πραγματοποιούνται δύο εκπλύσεις του ιζήματος με διάλυμα αιθανόλης 75%, ξήρανσης του

RNA ώστε να μην υπάρχει υγρασία και τέλος επαναιώρηση του ιζήματος σε διπλά απιονισμένο νερό.

2.5 Αντίστροφη μεταγραφή (RT) / Σύνθεση cDNA

Η PCR αντίστροφής μεταγραφής (Reverse Transcription PCR, RT-PCR) είναι μια ευαίσθητη τεχνική που σκοπεύει στον ποσοτικό προσδιορισμό RNA. Αντίστροφη μεταγραφή ορίζεται ως η διαδικασία δημιουργίας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (complementary DNA- cDNA) σύμφωνα με ένα «πρότυπο» RNA. Το ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για αυτήν την αντίδραση, ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφάση (ή αντίστροφη τρανσκριπτάση), το οποίο βρίσκεται εκ φύσεως σε RNA-ιούς όπως ο ιός που προκαλεί το AIDS. Με την βοήθεια αυτού του ενζύμου, γίνεται μετατροπή του γενετικού υλικού του ρετροϊού από μονόκλωνο RNA σε δίκλωνο DNA, ώστε να μπορεί να γίνει ενσωμάτωση του υλικού σε κύτταρα ξενιστών. Στον θερμικό κυκλοποιητή όπου πραγματοποιείται η RT-PCR, τα αντιδραστήρια που είναι απαραίτητα για την παραγωγή αντίστοιχου cDNA είναι το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης, τα dNTPs, ένα αρχικό μόριο ριβονουκλεοτιδίων και οι ενδεδειγμένοι εκκινητές. Στον τομέα της έρευνας υπάρχουν τριών ειδών εκκινητές: οι εκκινητές που είναι ειδικοί για το γονίδιο ενδιαφέροντος, oligo-dT εκκινητές και τέλος οι εξανουκλεοτιδικοί τυχαίοι εκκινητές, οι οποίοι και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Αυτοί, έχουν μια τυχαία σύσταση από 6 νουκλεοτίδια και θεωρούνται ότι καλύπτουν με το μεγαλύτερο εύρος, όλα τα μόρια RNA (ανεξάρτητα όποιας πολύ-A ουράς). Καταρχάς, αφού ξεπαγώθηκαν τα δείγματα με το RNA, έγινε ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 2.500 στροφές ανά λεπτό. Σε κάθε πείραμα, δημιουργήθηκε ένα διάλυμα το οποίο περιείχε 5 μ L δείγματος RNA, 2 μ L Random Hexamers, 1 μ L dNTPs και 1 μ L RNase free ddH₂O. Έπειτα, έγινε επώαση σε θερμικό κυκλοποιητή εταιρείας Bio Rad T100 Thermal, ρυθμισμένο στους 65 °C για 5 λεπτά. Αμέσως μετά τοποθετήθηκαν σε ειδικό cryobox και ακολούθησε η δημιουργία του δεύτερου διαλύματος. Για αυτό, χρησιμοποιήθηκαν 2 μ L DTT (διθειοθρεϊτόλη), 4 μ L First Strand Buffer, 3,5 μ L ddH₂O και 0,5 μ L M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Transcriptase), με την τελική αντίδραση να έχει όγκο 20 μ L. Ως μάρτυρας ελέγχου λειτούργησε ένα επιπλέον διάλυμα το οποίο περιείχε όλα τα παραπάνω αναφερόμενα αντιδραστήρια, με εξαίρεση το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης. Ξαναέγινε η φόρτωση όλων των δειγμάτων στον θερμικό κυκλοποιητή για την εκτέλεση της RT-PCR στις κατάλληλες θερμοκρασίες. Για την υβριδοποίηση των τυχαίων εκκινητών (annealing) στο RNA να πραγματοποιείται για 10 λεπτά στους 25 °C

ενώ η σύνθεση του cDNA για 1 ώρα στους 37 °C. Αφού συντεθεί το cDNA, η τελευταία θερμοκρασία είναι στους 75 °C για 15 λεπτά, θερμοκρασία που το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης καθίσταται μη-λειτουργικό και ως εκ τούτου καταστρέφεται.

Αφού αφαιρεθούν τα δείγματα από τον κυκλοποιητή αποθηκεύονται στους -20 °C. Πλέον στα δείγματα υπάρχει cDNA το οποίο είναι συμπληρωματικό του αρχικού RNA των δειγμάτων και καθίσταται έτοιμο για να χρησιμοποιηθεί στην Real-Time PCR.

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

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time Polymerase Chain Reaction, PCR) ορίζεται ως μια ευαίσθητη και ακριβής τεχνική για τον προσδιορισμό των προϊόντων της αντίδρασης στην εκθετική φάση, ενώ ταυτόχρονα προσφέρει πληροφορίες για τον πολλαπλασιασμό του DNA, χωρίς να απαιτούνται επιπλέον χειρισμοί. Η διαφορά της Real-Time PCR είναι ότι επιτρέπει και τον πολλαπλασιασμό αλλά και την ανίχνευση του προϊόντος καθώς το παραχθέν προϊόν συνδέεται με ευαίσθητη φθορίζουσα ουσία που ανιχνεύεται από τον θερμοκυκλοποιητή και δίνει το κατάλληλο σήμα. Παράμετρος ύψιστης σημασίας για την ποσοτικοποίηση είναι η τιμή Ct (threshold cycle), που ερμηνεύει τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης που απαιτούνται ώστε ο φθορισμός κάθε δείγματος να προσεγγίσει το όριο αυτό (threshold). Η τιμή αυτού θα είναι πάνω από την τιμή του μη-ειδικού σήματος (background). Έτσι, η τιμή Ct καθίσταται αντιστρόφως ανάλογη με την συγκέντρωση υποστρώματος που υπήρχε εξ αρχής: έτσι όσο χαμηλότερη είναι η τιμή Ct, τόσο υψηλότερη θα είναι η ποσότητα του υποστρώματος.

Όπως αναφέρθηκε γίνεται χρήση μιας χρωστικής, η οποία και ονομάζεται SYBR Green I. Μια φωτοευαίσθητη αλλά λιγότερη τοξική ουσία από το βρωμιούχο αιθίδιο που συνήθως χρησιμοποιείται σε PCRs, που ενσωματώνεται στο DNA και επιτρέπει την ανίχνευση των προϊόντων. Συγκεκριμένα, όταν εντάσσεται η χρωστική στην μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, και έτσι αυξάνει τον φθορισμό. Όσο εξελίσσεται η αντίδραση, η ποσότητα του γενετικού υλικού αυξάνεται, όπως και ο φθορισμός που εκπέμπεται, καθώς περισσότερη ποσότητα της SYBR Green I εντάσσεται στο DNA. Σε κάθε κύκλο, ο φθορισμός αυξάνεται με σταδιακούς ρυθμούς κατά την επιμήκυνση, ενώ μειώνεται και εκμηδενίζεται κατά την αποδιάταξη. Η Real-Time PCR εφαρμόστηκε για την διερεύνηση των επιπέδων των γονιδίων ενδιαφέροντος σύμφωνα με ορισμένα γονίδια ελέγχου (controls).

Αρχικά, για την αντίδραση, έγινε αραίωση των δειγμάτων cDNA με ddH₂O καθώς το προϊόν της αντίστροφης μεταγραφής ήταν κατά 12 φορές συμπυκνωμένο ενώ ακολούθησε και ανάδευση. Έγινε προετοιμασία των dNTPs και το mix με τους κατάλληλους εκκινητές (primers mix). Κάθε αντίδραση είχε 10 μL αραιωμένο δείγμα cDNA και ακόμη 10 μL από το mix. Το mix αυτό 0,4 μL dNTPs, 2 μL Taq Buffer B (10x), 1 μL εκκινητές (SNCA, Gapdh, U6), 0,9 μL της χρωστικής Sybr Green I [37], 0,08 μL Kara Taq, προστέθηκαν 5,62 ddH₂O ώστε να έχει τελικό όγκο η αντίδραση 20μL. Κάθε αντίδραση για τα δείγματα ενδιαφέροντος έγινε τρεις φορές ενώ για τον έλεγχο για τυχόν επιμολύνσεις, χρησιμοποιήθηκαν αντιδράσεις όπου απουσίαζε το υπόστρωμα (Non Template Controls) ή που απουσίαζε το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση στην RT-PCR (Non RT Controls). Για την αντίδραση της Real Time PCR χρησιμοποιήθηκαν μικροπλακέτες με 96 θέσεις, ειδικές για την συγκεκριμένη διεργασία (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, Roche). Αφού προστέθηκαν τα δείγματα στην ειδική πλακέτα, αυτή σφραγίζεται αεροστεγώς με συγκεκριμένη μεμβράνη, όπου και ακολουθεί μια σύντομη φυγοκέντρηση των 30 δευτερολέπτων. Το μηχάνημα που χρησιμοποιεί το εργαστήριο ήταν ένας θερμικός κυκλοποιητής CFX Opus 96 από την εταιρεία Bio-Rad ενώ το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των τιμών ήταν το CFX Maestro. Το πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε, ρυθμίστηκε για 35 κύκλους, με κάθε κύκλο να έχει διαφορετικές θερμοκρασίες σε κάθε στάδιο της αντίδρασης. Η αποδιάταξη έγινε για 10 δευτερόλεπτα στους 95 °C, το στάδιο της υβριδοποίησης των εκκινητών στα μόρια DNA και η επιμήκυνση αυτών, στους 60 °C για 30 δευτερόλεπτα. Τέλος, παράγεται καμπύλη τήξης του προϊόντος σε θερμοκρασίες από 65 έως 95 °C με βήμα τα 0,5 °C. Για την ποσοτικοποίηση των τελικών τιμών, πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση των Ct των γονιδίων ενδιαφέροντος ως προς τις ίδιες τιμές των ενδογενών γονιδίων Gapdh και U6 τα οποία είναι γονίδια σταθερής έκφρασης μέσα στο κύτταρο, σύμφωνα με την μέθοδο ΔΔCt (Livak and Schmitthen, 2001).

2.7 Πουρομυκίνη

Μέτρηση της πρωτεϊνοσύνθεσης με τη μέθοδο SUnSET (Surface Sensing of Translation)

Για τη μέτρηση της πρωτεϊνοσύνθεσης in-vitro με τη δοκιμασία SUnSET, τα κύτταρα SK-N-SH, στα οποία είχε γίνει ήδη διαμόλυνση για την υπερέκφραση των υπό μελέτη πρωτεϊνών, επώαστηκαν με 1 μM πουρομυκίνη για 30 λεπτά πριν από τη συλλογή. Ακολούθησε ανοστύπωμα κατά Western και αντίσωμα έναντι της πουρομυκίνης.

2.8 Ανοσοστύπωμα κατά Western

Για την ανάλυση της έκφρασης της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνη και των υπόλοιπων πρωτεϊνών που μελετώνται στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το ανοσοστύπωμα κατά Western. Για την πραγματοποίηση αυτής, 48 ώρες μετά την διαμόλυνση των κυττάρων με στόχο την υπερέκφραση αυτών των πρωτεϊνών, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και απομονώθηκαν τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα τους ώστε να είναι έτοιμα προς πειραματική χρήση.

2.8.1 Λύση κυττάρων

Για την λύση των κυττάρων, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό των κυττάρων από το plate όπου είχε γίνει η διαμόλυνση και προστίθεται παγωμένο διάλυμα PBS. Με την απομάκρυνση όλης της ποσότητας PBS, ακολουθεί προσθήκη διαλύματος λύσης των κυττάρων, με όγκο ανάλογο της πυκνότητας των κυττάρων, συνηθέστερα από 80 έως 120 μL . Έπειτα γίνεται έντονη ανάδευση στις 200 στροφές για 30 λεπτά στον πάγο ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από τον πυθμένα του πηγαδιού στο plate. Τα κύτταρα, τοποθετούνται σε νέα σωληνάρια και φυγοκεντρώνονται για 20 λεπτά σε ψυχόμενη φυγόκεντρο, η οποία είναι ρυθμισμένη στους 4 °C και στις 13,000 στροφές ανά λεπτό. Στο υπερκείμενο, σε κάθε σωληνάριο, περιέχονται οι διαλυτές πρωτεΐνες, οι οποίες και μεταφέρονται σε νέα σωληνάρια. Σε αυτά, προστίθεται η χρώση Laemli 1x, γίνεται μια μικρή ανάδευση και τα δείγματα αφού θερμανθούν για 5 λεπτά στους 100 °C, είναι έτοιμα να χρησιμοποιηθούν, διαφορετικά φυλάσσονται στους -20 °C.

2.8.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12 ή 15% (SDS-PAGE) και ακολούθησε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης, όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος, λόγω του SDS, με το να μετακινούνται από τον θετικό στον αρνητικό πόλο (υπό σταθερό ηλεκτρικό πεδίο). Αυτό συμβαίνει διότι το SDS ως ανιονικό απορρυπαντικό, είναι ικανό να φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες, και για αυτόν τον λόγο τα αποτελέσματα του διαχωρισμού των πρωτεϊνών δεν είναι με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο αλλά καθαρά το βάρος τους.

Κατά την Western το τελικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιείται έχει δύο ξεχωριστά πηκτώματα, το πήκτωμα επιστοιβαξης στην βάση αυτού (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (running ή separating gel). Ειδικότερα το πήκτωμα επιστοιβαξης βρίσκεται σε μικρότερη ποσότητα και μικρότερη πυκνότητα αφού και περιέχει την χαμηλότερη συγκέντρωση ακρυλαμίδης και το χαμηλότερο pH στα 6,8. Με τα χαρακτηριστικά αυτά, όλα τα δείγματα «τρέχουν» κάθετα στο πήκτωμα επιστοιβαξης μαζί, μέχρι το πήκτωμα διαχωρισμού. Κατά το δεύτερο πήκτωμα που «συναντούν» τα δείγματα, η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης είναι μεγαλύτερη όπως και το pH στα 8,8, στοιχεία που βοηθούν στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος.

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε αρχικά στα 130 Volt, μέχρι οι πρωτεΐνες να «περάσουν» το πήκτωμα επιστοιβαξης για περίπου 20 λεπτά ενώ έπειτα αυξήθηκε η τάση στα 150 Volt για περίπου 60 λεπτά. Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε ειδική συσκευή ηλεκτρομεταφοράς. Για αυτό, απαιτούνταν μια κασετίνα όπου τοποθετήθηκαν σε σειρά από την μύρη πλευρά προς την λευκή: ένα σφουγγάρι, ένα απορροφητικό χαρτί Whatmann, μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μετά την ηλεκτροφόρηση και μετά πάλι ένα απορροφητικό χαρτί ίδιου τύπου και ένα αντίστοιχο σφουγγάρι. Για να διατηρηθούν η μεμβράνη και το πήκτωμα, είχαν επωαστεί σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer). Αφού σφραγιστεί η κασετίνα στεγανά στην μεμβράνη ή στο πήκτωμα, τοποθετείται σε συσκευή ηλεκτρομεταφοράς με το ειδικό διάλυμα μεταφοράς. Η διαδικασία της ηλεκτρομεταφοράς πραγματοποιείται στο δωμάτιο ψύξης για να διατηρηθούν οι πρωτεΐνες, το τροφοδοτικό έντασης ρυθμίζεται στα 390 mA για τουλάχιστον 90 λεπτά. Με το πέρας της διαδικασίας, γίνεται ξέπλυμα και χρώση της μεμβράνης με την χρώση Ponceau. Η χρώση Ponceau χρησιμοποιείται για έλεγχο της επιτυχούς μεταφοράς των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Τέλος, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης ξεπλένεται και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου σε 1 ώρα σε παρασκευασμένο διάλυμα TBS-T με 5% w/v άπαχο γάλα, με στόχο να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις.

2.8.3 Επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το πρωτογενές αντίσωμα

Αφού έχουν πλέον καλυφθεί οι μη ειδικές θέσεις, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ειδικό αντίσωμα ενδιαφέροντος. Έπειτα, το δοχείο με την μεμβράνη επώαστηκε για τουλάχιστον 16 ώρες στους 4 °C στο δωμάτιο ψύξης. Όλα τα αντισώματα διαλύθηκαν σε διάλυμα TBS-T περιεκτικότητας 3% άπαχο γάλα.

2.8.4 Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα και εμφάνιση

Αφού απορριφθεί το πρωτογενές αντίσωμα, ακολούθησαν 3 εκπλύσεις από 5 λεπτά η καθεμία με διάλυμα TBS-T, πάνω σε ειδικό αναδευτήρα (μπαλαρίνα). Έπειτα, ακολούθησε η επώαση της μεμβράνης σε δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα τουλάχιστον και σε θερμοκρασία δωματίου στον αναδευτήρα. Όλα τα δευτερογενή αντισώματα έχουν διαλυθεί σε διάλυμα TBS-T περιεκτικότητας 3% άπαχο γάλα. Με το τέλος της επώασης και του δεύτερου αντισώματος, πραγματοποιήθηκαν παρόμοιες πλύσεις των 5 λεπτών με το διάλυμα TBS-T. Στην συνέχεια, για την εμφάνιση, αναμίχτηκαν ίσοι όγκοι αντιδραστηρίων του εμπορικού αντιδραστηρίου ECL και επικάλυψαν την μεμβράνη. Το ECL (Enhanced Chemiluminescence) είναι ένα μίγμα λουμινόλης και H_2O_2 , το οποίο μίγμα αντιδρά με την υπεροξειδάση του δεύτερου αντισώματος. Συγκεκριμένα, το H_2O_2 διασπάται από την υπεροξειδάση, με αποτέλεσμα να παράγονται ρίζες οξυγόνου, οι οποίες αντιδρούν με την λουμινόλη, προκαλώντας απελευθέρωση φωτονίων. Τοποθετείται η μεμβράνη στο μηχάνημα Vilber το οποίο και δίνει την δυνατότητα εμφάνισης με κατάλληλη έκθεση φωτός, έπειτα επιλέγεται ο χρόνος έκθεσης και γίνεται λήψη της εικόνας. Οι εικόνες που προκύπτουν από την παραπάνω εμφάνιση αναλύονται με χρήση του προγράμματος ImageJ και ποσοτικοποιείται η ένταση σήματος κάθε πρωτεΐνης για κάθε δείγμα ξεχωριστά.

2.9 TECAN SPARK® MULTIMODE MICROPLATE READER

Το μηχάνημα έχει την δυνατότητα μέτρησης φθορισμού και στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων SK-N-SH έπειτα από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών και εφαρμογή του εμπορικού kit CCK-8.

2.10 Λογισμικά προγράμματα

Στη παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά προγράμματα:

- Microsoft Office Word 2010, για τη συγγραφή της διατριβής,
- EndNote X5, για την εισαγωγή των βιβλιογραφικών αναφορών,
- Adobe Photoshop CC, για την επεξεργασία των εικόνων,

- Microsoft Office Excel 2010 για την μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων,
- ImageJ για την ανάλυση των ζωνών από το ανασοστύπωμα κατά Western και του φθορισμού από τη μικροσκοπία φθορισμού και τη συνεστιακή μικροσκοπία.
- GraphPad Prism 8 (Windows Version 8.01).

2.11 Στατιστική επεξεργασία

Όλες οι τιμές των αποτελεσμάτων αποτελούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ή και παραπάνω ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD). Επιπλέον, για την στατιστική επεξεργασία το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GraphPad Prism 8.

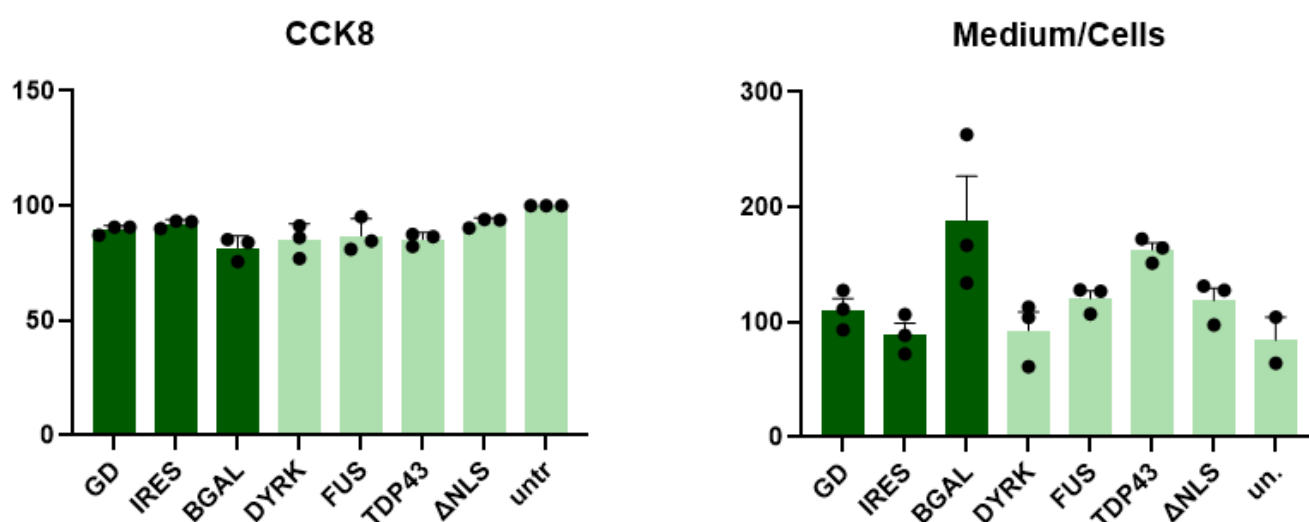
Με την εφαρμογή του Student's t-test υπολογίστηκαν οι στατιστικά σημαντικές διαφορές, ανάμεσα στο κάθε δείγμα και τον μάρτυρα του αντίστοιχου δείγματος (σύγκριση 2 ομάδων αποτελεσμάτων). Στην περίπτωση σύγκρισης περισσότερων μεταβλητών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ελέγχου διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA), ακολουθούμενη από Tukey's test ανάλυση. Σε όλες τις περιπτώσεις, ως στατιστικά σημαντικές κρίθηκαν οι τιμές όπου ίσχυε: $p < 0.05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Η υπερέκφραση των DYRK1A, FUS, TDP43, και TDP43-ΔNLS δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα των SK-N-SH κύτταρα.

Για να διαπιστώσουμε εάν τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται κατά την μέθοδο της διαμόλυνσης, επηρεάζουν την βιωσιμότητα των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε το cell viability assay test, ώστε να γίνει η ποσοτικοποίηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων, με την μέθοδο CCK-8 και η μέτρηση των νεκρών κυττάρων προς το θρεπτικό υλικό με τη μέθοδο LDH. Η διαμόλυνση των SK-N-SH κυττάρων έγινε με πλασμίδια pENTR. Έπειτα, για κάθε τεχνική, ακολουθήθηκαν οι διαδικασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω και μετά μετρήθηκε η ζωτικότητα των κυττάρων.

Για την μέτρηση της ζωτικότητας, μετράτε η απορρόφηση στα 450 nm για την μέθοδο CCK-8 και 492nm για την LDH, με την χρήση συσκευής ανάγνωσης μικροπλακών της εταιρείας Tecan. Τα αποτελέσματα έδειξαν ελάχιστη τοξικότητα των πλασμιδίων στα κύτταρα, ενώ με την μέθοδο LDH, φάνηκε να έχει τοξικότητα το πλασμίδιο βgal, όπου και αφαιρέθηκε ως control από τα επόμενα πειράματα.

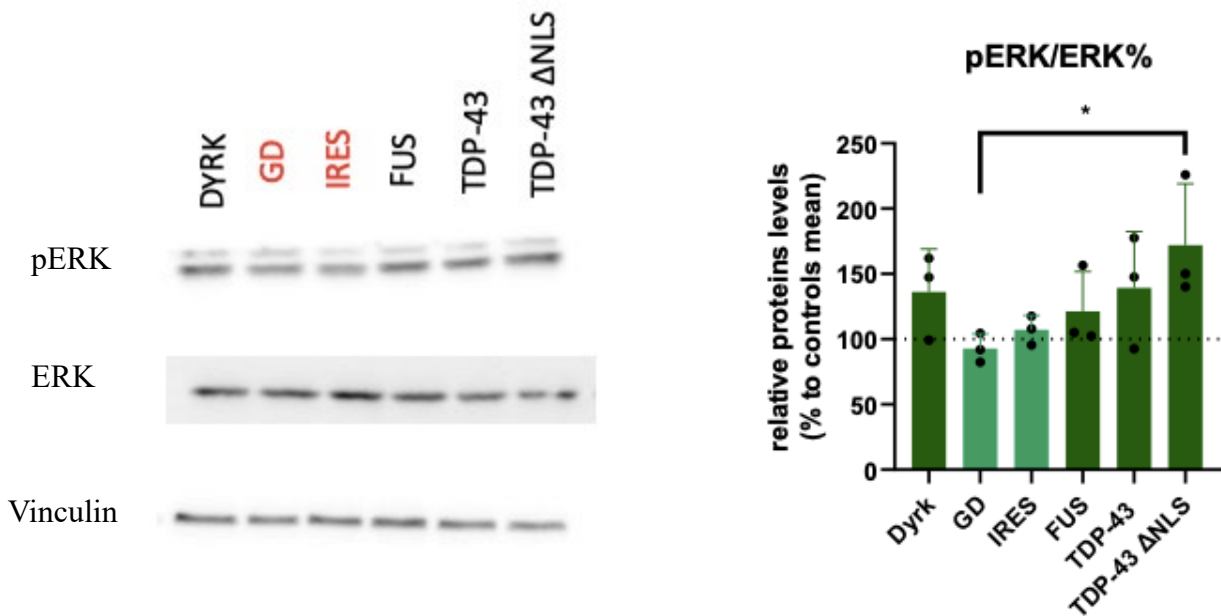


Εικόνα 12: Ποσοτικοποίηση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων με την δοκιμασία καταμέτρησης της βιωσιμότητας τους συγκριτικά με το untreated. Αριθμός επαναλήψεων n=3

2. Συσχέτιση ανάμεσα στο μονοπάτι του ERK και στον ρόλο των DYRK1A, FUS, TDP-43 και TDP-43 ΔNLS.

Προκειμένου να μελετηθεί το μονοπάτι του ERK όταν πραγματοποιείται υπερέκφραση των DYRK1A, FUS, TDP-43, TDP-43 ΔNLS, έγινε ανοσοστύπωμα κατά Western, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του ERK1/2 και της φωσφορυλιωμένης μορφής του. Ως πρωτεΐνη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η Vinculin (VCL).

Αρχικά το αποτέλεσμα της ανάλυσης έδειξε ότι οι πρωτεΐνες δεν επηρεάζουν στατιστικώς σημαντικά το μονοπάτι ERK εκτός από την πρωτεΐνη TDP-43 ΔNLS που παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση. Συγκεκριμένα, με υπερέκφραση της DYRK1A, TDP-43 και TDP-43 ΔNLS, παρουσιάζεται μικρή αύξηση της φωσφορυλίωσης του ERK1/2, συγκριτικά με τις συνθήκες αναφοράς με υπερέκφραση της αλληλουχίας GD (πλασμίδιο χωρίς ένθεμα) και IRES-GFP και άρα αύξηση της αναλογίας φωσφορυλιωμένης/μη-φωσφορυλιωμένης μορφής. Ενώ καμία επίδραση δεν παρατηρείται με υπερέκφραση της FUS.



Εικόνα 13: Ανοσοστύπωμα κατά Western των SK-N-SH κυττάρων στα οποία έχει πραγματοποιηθεί υπερέκφραση των DYRK1A, FUS, TDP-43, TDP-43 ΔNLS. Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του ERK1/2, της φωσφορυλιωμένης μορφής και της πρωτεΐνης αναφοράς Vinculin. Αριθμός επαναλήψεων N=3

3. Συσχέτιση ανάμεσα στο μονοπάτι mTOR και στον ρόλο των DYRK1A, FUS, TDP-43 και TDP-43 ΔNLS.

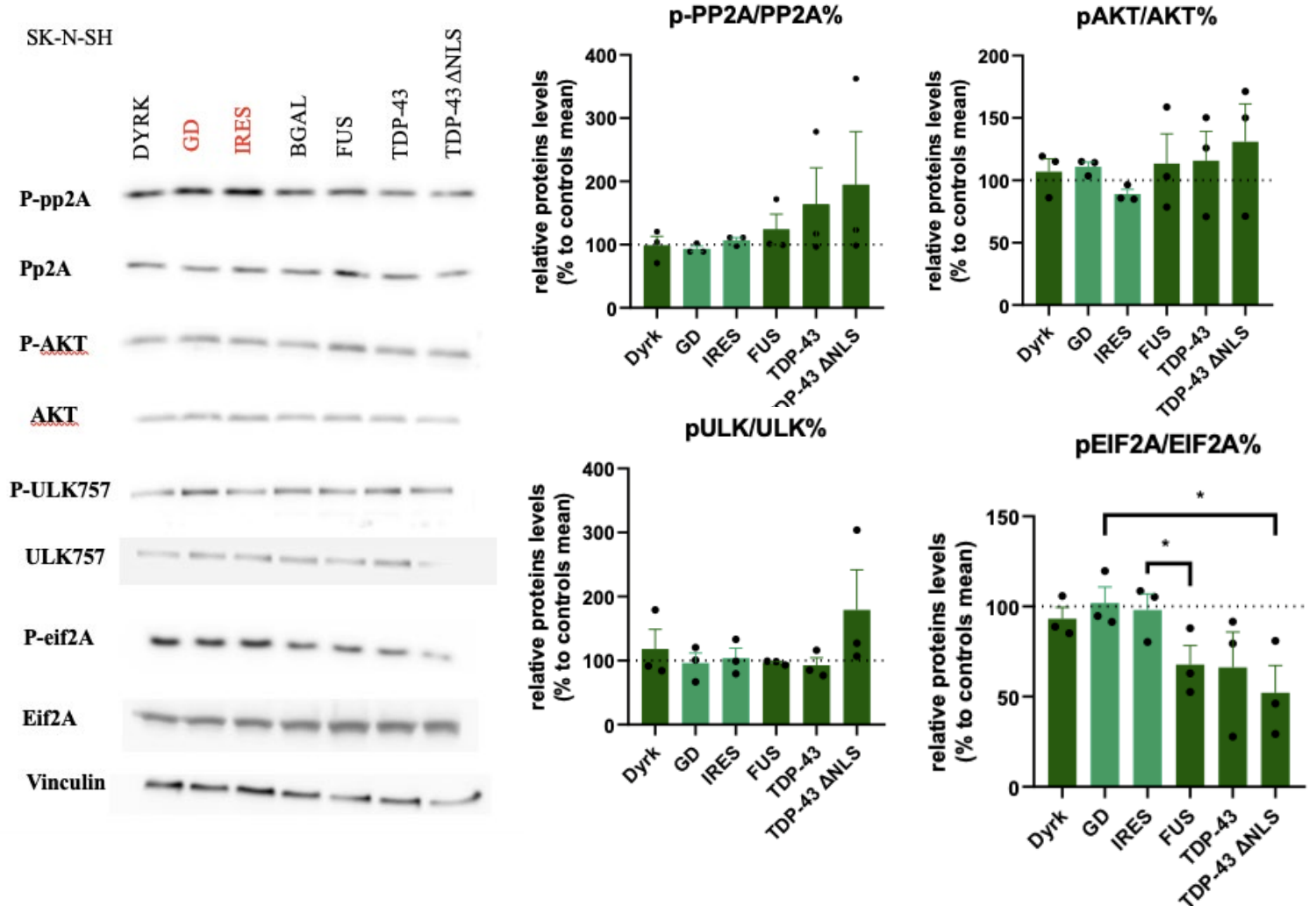
Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των DYRK1A, FUS, TDP-43 και TDP-43 ΔNLS στο μονοπάτι του mTOR έγινε υπερέκφραση αυτών, σε κύτταρα SK-N-SH. Τα πειράματα υπερέκφρασης στην κυτταρική σειρά SK-N-SH έγιναν με την χρήση πλασμιδίων. Δηλαδή, στα κύτταρα εισάχθηκαν τα αντίστοιχα πλασμίδια για κάθε πρωτεΐνη και για τα controls. Μετά το πέρας των πειραματικών συνθηκών, έγινε συλλογή των κυττάρων για μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων, χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι PP2A, AKT (Ser473), EIF2A, ULK757 και τις φωσφορυλιωμένες μορφές τους. Η πρωτεΐνη αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Vinculin. Για τις πρωτεΐνες που έχουν και φωσφορυλιωμένες μορφές, τα αποτελέσματα της ανάλυσης προκύπτουν από την αναλογία φωσφορυλιωμένης/μη-φωσφορυλιωμένης μορφής.

Αρχικά το αποτέλεσμα της ανάλυσης έδειξε ότι μέσω συγκεκριμένων πρωτεϊνών, μπορεί να επηρεαστεί το μονοπάτι του mTOR.

Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε με υπερέκφραση των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν, μείωση της αναλογίας φωσφορυλιωμένη (pEIF2A) προς την ολικής EIF2A και συγκεκριμένα στατιστικά σημαντική μείωση με υπερέκφραση FUS και TDP-43 ΔNLS, μη στατιστικά σημαντική μείωση στην TDP-43 και καμία αλλαγή στην DYRK1A.

Με υπερέκφραση της DYRK1A δεν παρατηρείται αλλαγή στην PP2A ενώ με την υπερέκφραση των FUS, TDP-43, TDP-43 ΔNLS παρατηρείται μικρή, αλλά όχι στατιστική, αύξηση της PP2A.

Με υπερέκφραση όλων των RBPs και της πρωτεΐνης DYRK1A, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή στην φωσφορυλίωση της AKT (Ser473). Το ίδιο ισχύει και για την ULK, με πιθανόν μια μικρή τάση για αύξηση της DYRK1A και TDP-43 ΔNLS.



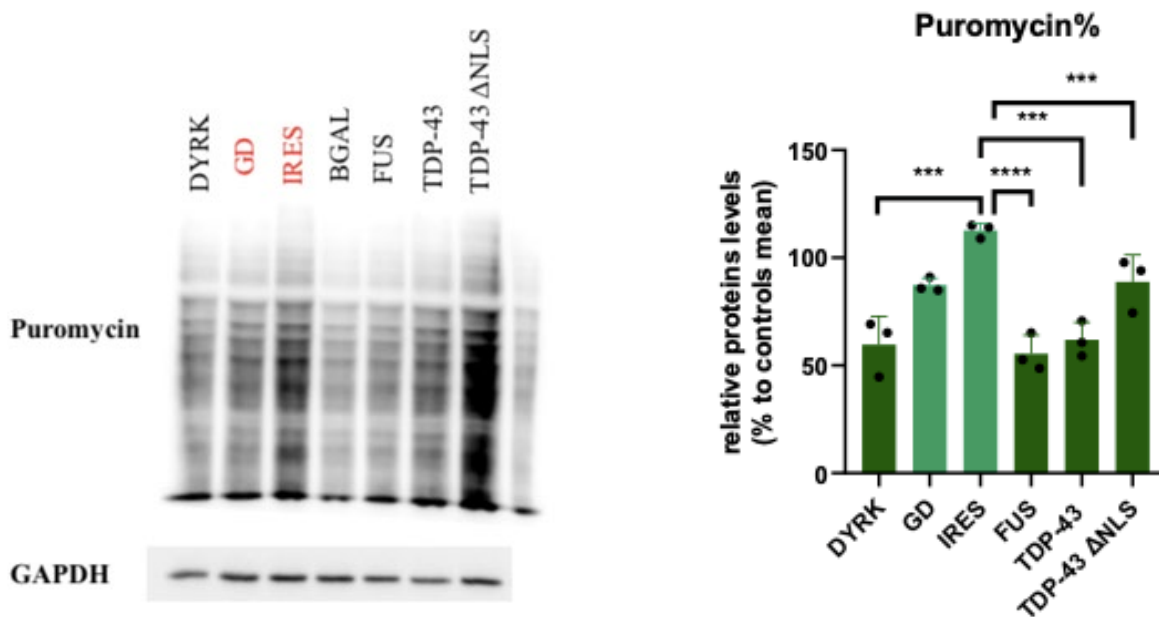
Εικόνα 14: Ανοσοστύπωμα κατά Western των SK-N-SH κυττάρων στα οποία έχει πραγματοποιηθεί υπερέκφραση των DYRK1A, FUS, TDP-43, TDP-43 ΔNLS. Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του AKT, ULK, EIF2A, PP2A και των φωσφορυλιωμένων μορφών και της πρωτεΐνης αναφοράς Vinculin. Αριθμός επαναλήψεων N=3.

4. Ο ρόλος των DYRK1A, FUS, TDP-43 και TDP43-ΔNLS στην πρωτεϊνοσύνθεση

Για να αξιολογηθεί ο ρόλος DYRK1A, FUS, TDP-43 και TDP43-ΔNLS στην πρωτεϊνοσύνθεση, πραγματοποιήθηκαν πειράματα υπερέκφρασης στην κυτταρική σειρά SK-NS-SH που διήρκησαν 48 ώρες. Την ημέρα συλλογής κυττάρων, πριν από αυτή,

προστέθηκε πουρομυκίνη συγκέντρωσης 1,5 μ M και έγινε επώαση για 2 ώρες, πριν την συλλογή των κυττάρων. Έπειτα, με ανοσοσύτρωμα κατά Western, βρέθηκε ο βαθμός της πρωτεϊνοσύνθεσης για κάθε συνθήκη. Πρωτεΐνη αναφοράς ήταν το GAPDH.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση έδειξαν ότι όλες οι πρωτεΐνες μειώνουν την πρωτεϊνοσύνθεση. Μεγαλύτερη μείωση έδειξαν η Dyrk, FUS, TDP43 ενώ και το TDP-43 Δ NLS παρουσίασε μια μικρότερη -συγκριτικά- μείωση αλλά και αυτή στατιστικά σημαντική.

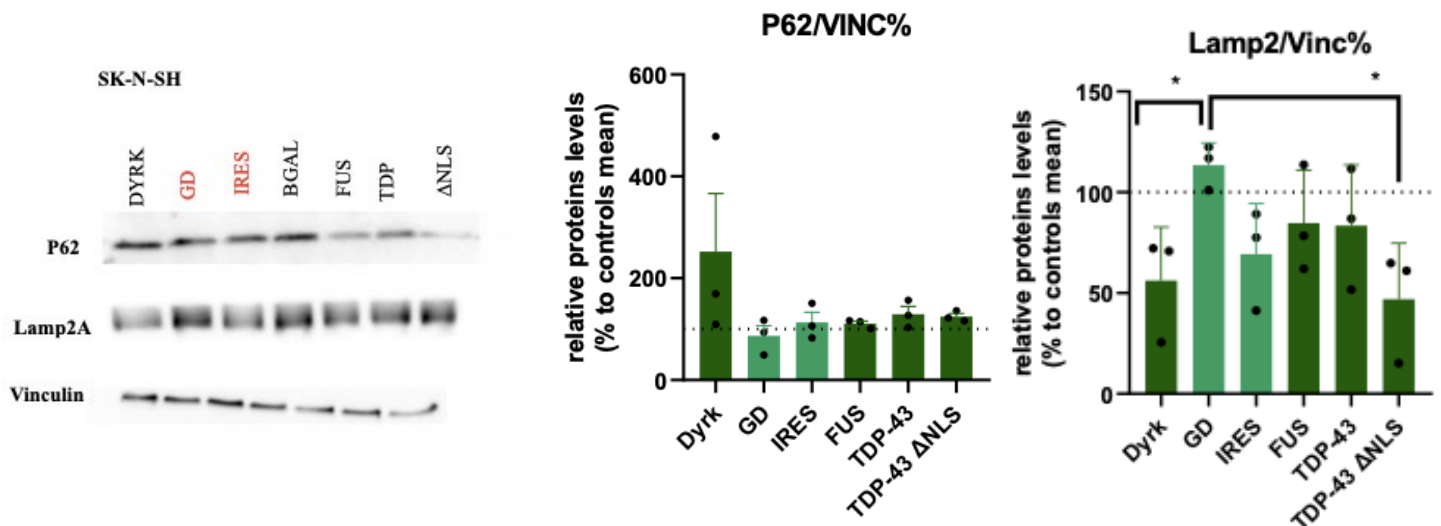


Εικόνα 15: Ανοσοσύτρωμα κατά Western των SK-N-SH κυττάρων στα οποία έχει πραγματοποιηθεί υπερέκφραση των Dyrk, FUS, TDP-43, TDP-43 Δ NLS. Η ανάλυση των επιπέδων πρωτεϊνοσύνθεσης έγινε μετά την αναστολή με πουρομυκίνη.

5. Διερεύνηση του ρόλου των DYRK1A, FUS, TDP-43, TDP-43 Δ NLS στην αυτοφαγία.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των DYRK1A, FUS, TDP-43 και TDP-43 Δ NLS στην αυτοφαγία και συγκεκριμένα στην μακροαυτοφαγία και στην chaperone-mediated αυτοφαγία. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης έδειξε πως ειδικότερα η DYRK1A και λιγότεροι η FUS, TDP-43 και TDP-43 Δ NLS μπορούν πιθανόν να επηρεάσουν το μονοπάτι της αυτοφαγίας. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε με υπερέκφραση της DYRK1A μη σημαντική αύξηση της p62 συγκριτικά με τα controls ενώ δεν παρατηρήθηκε κάτι αντίστοιχα με την υπερέκφραση των RBPs.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της LAMP2A όταν υπήρχε υπερέκφραση της DYRK1A αλλά και του TDP-43 ΔNLS συγκριτικά με τα controls. Ενώ με υπερέκφραση της FUS και TDP-43 δεν βγήκαν ξεκάθαρα αποτελέσματα συγκριτικά με το empty και GFP.



Εικόνα 16: Ανοσοστύπωμα κατά Western των SK-N-SH κυττάρων όπου έχει πραγματοποιηθεί υπερέκφραση των DYRK1A, FUS, TDP43, TDP43 ΔNLS: Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών p62, LAMP2A και της πρωτεΐνης Vinculin. N=3.

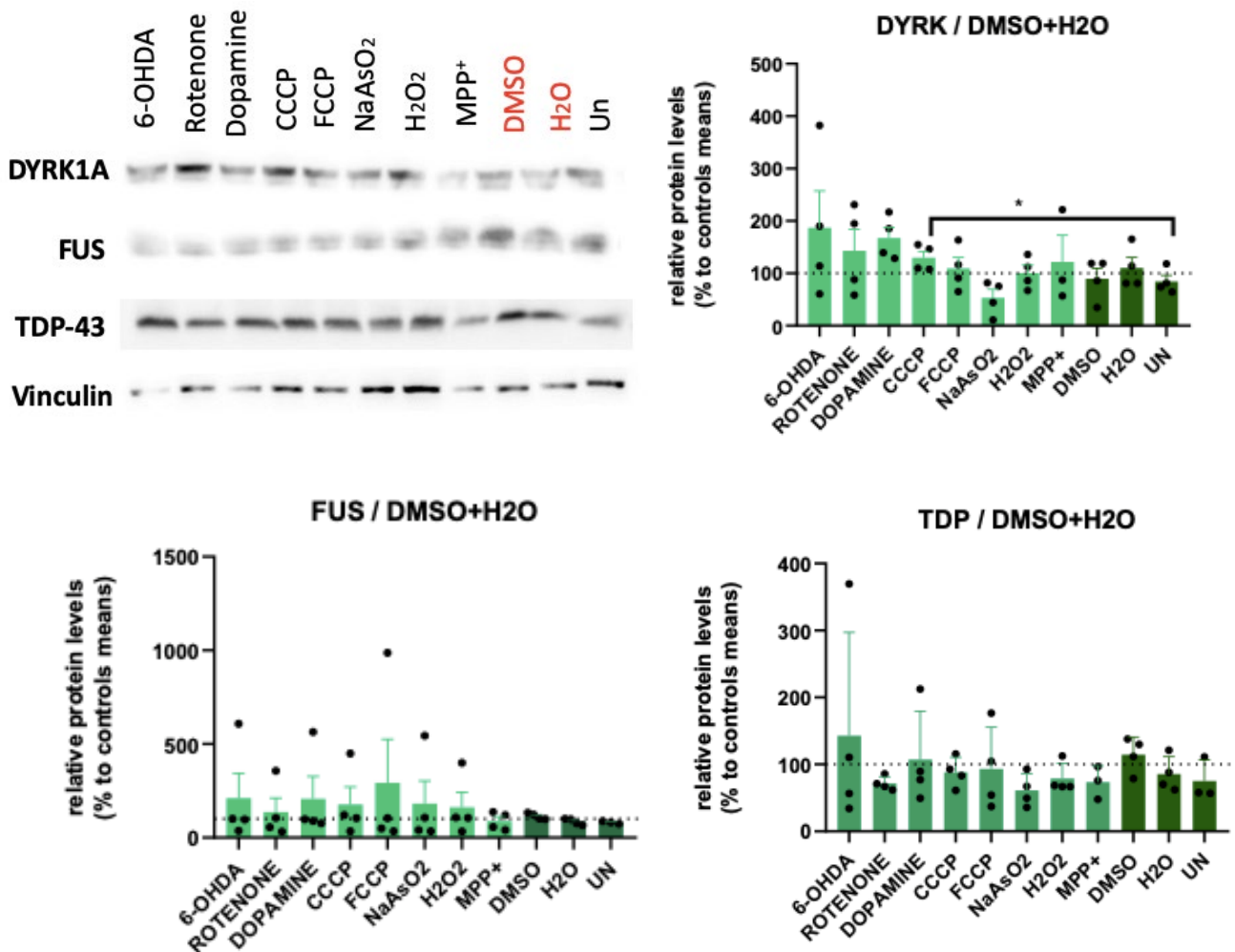
6. Το οξειδωτικό στρες επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης DYRK1A ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση των FUS και TDP-43 στα SK-N-SH κύτταρα.

Το οξειδωτικό στρες είναι μια κατάσταση όπου υπάρχει ανισορροπία των αντιοξειδωτικών και άλλων ελεύθερων ριζών στα κύτταρα προκαλώντας το θάνατο τους. Έχει σημαντικό ρόλο σε πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος Αλτσχάιμερ, η νόσος του Πάρκινσον, νόσος Χάντιγκτον και η αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση.

Για να βρεθεί η επίδραση του οξειδωτικού στρες στις πρωτεΐνες DYRK1A, FUS και TDP-43, SK-N-SH κύτταρα επωάστηκαν με χημικά που επάγουν το οξειδωτικό στρες όπως το 6-

OHDA, Rotenone, Dopamine, CCCP, FCCCP, NaAsO₂, H₂O₂, MPP⁺. Ως κοντρόλ χρησιμοποιήθηκαν το H₂O και το DMSO, καθώς και μια συνθήκη στην οποία δεν προστέθηκε κάποιο υλικό (untreated, UN).

Με ανοσοσύτρωμα κατά Western, βρέθηκε ότι με τη χρήση των χημικών αυτών, αυξάνεται η ποσότητα της DYRK1A, χωρίς στατιστική σημαντικότητα, ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζονται ιδιαίτερα οι FUS ή TDP-43.

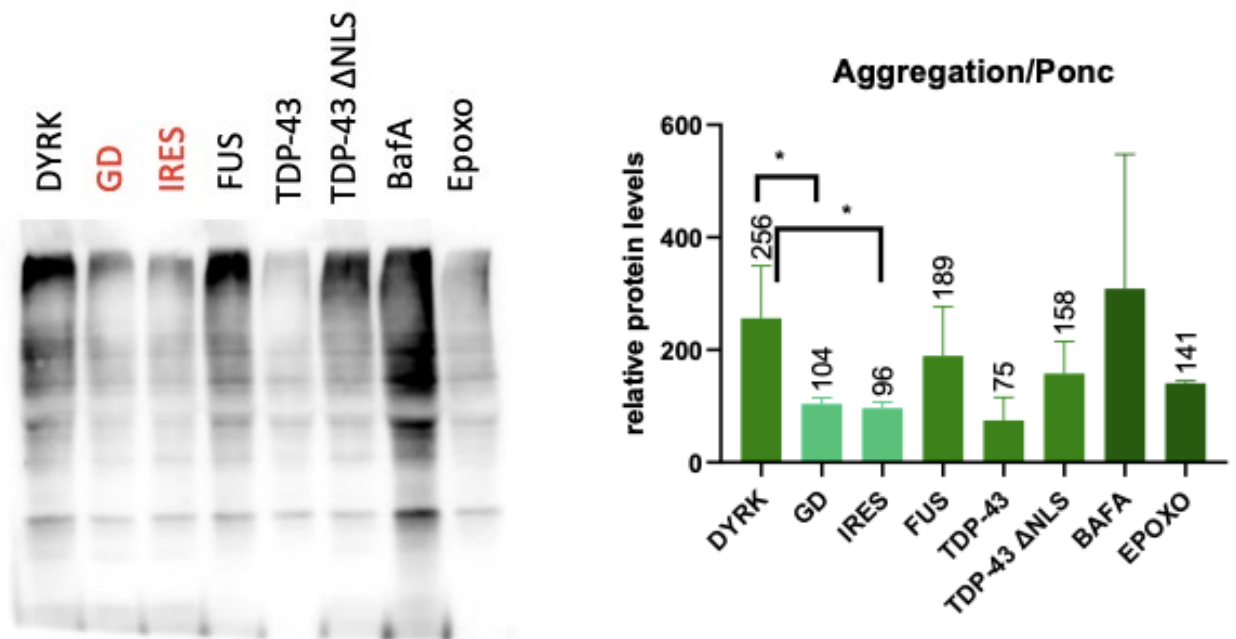


Εικόνα 17: Ανοσοσύτρωμα κατά Western για DYRK1A, FUS, και TDP σε SK-N-SH κύτταρα όπου έχουν προστεθεί παράγοντες (6-OADA, Rotenone, Dopamine, CCCP, FCCCP, NaAsO₂, H₂O₂, MPP) που προωθούν το οξειδωτικό στρες. Αριθμός επαναλήψεων N=4.

7. Η υπερέκφραση της DYRK1A και FUS αυξάνουν την συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης.

Προκειμένου να μελετηθεί η επιρροή των πρωτεϊνών στην συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης έγινε υπερέκφραση αυτών σε νέα SK-N-SH κύτταρα με αδενοϊούς. Μετά το πέρας 24 ωρών μετά το plating, προστέθηκε 12ul ιός α-συνουκλεΐνης και 12ul ιός από DYRK1A, FUS, TDP-43 και TDP-43 ΔNLS ξεχωριστά σε κάθε πηγάδι. Το ίδιο έγινε και για τα controls (GD, IRES), ενώ προστέθηκαν και άλλες 2 συνθήκες με ιούς SNCA και GD όπου μελλοντικά προστέθηκαν χημικά. Μετά από 24 ώρες έγινε αλλαγή του θρεπτικού των πηγαδιών (εκ νέου προσθήκη 380μL EMEM) για να προωθηθεί ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και να καθυστερήσει η απόπτωσή τους και επιπλέον σε 2 συνθήκες προστέθηκαν τα χημικά BafA 70nM (από πυκνό 0,1mM) και eroxomicin 0,3μM (από πυκνό 1mM) για να μπορεί να γίνει περαιτέρω σύγκριση της συσσωμάτωσης μετά από διακοπή της αυτοφαγίας ή του πρωτεασώματος, αντίστοιχα. Έπειτα από 24 ώρες, γίνεται η παρατήρηση και συλλογή των κυττάρων.

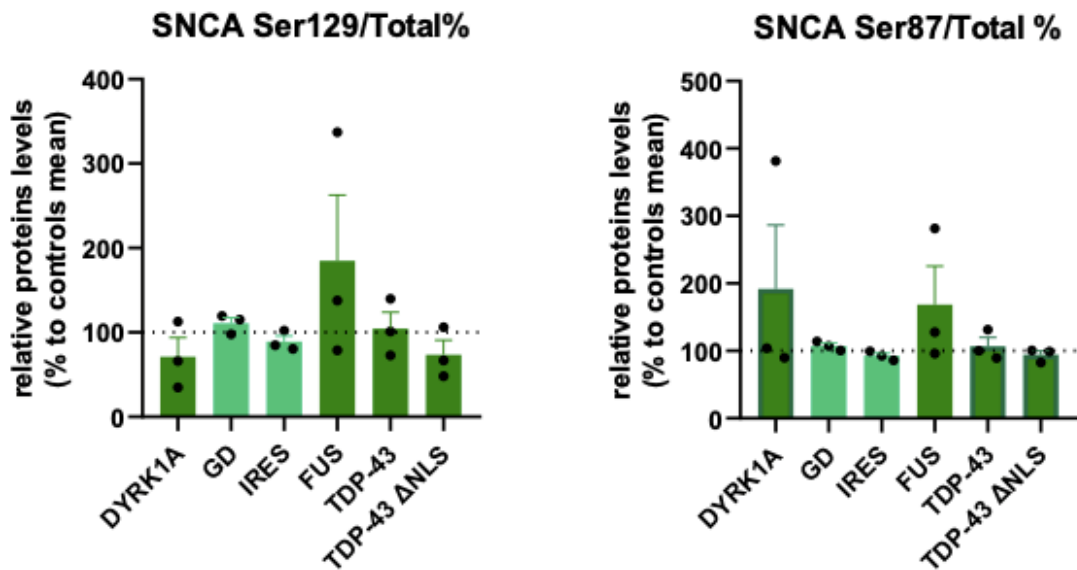
Με ανοσοστύπωμα κατά Western βρέθηκε ότι υπάρχει αύξηση της συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης όταν υπερεκφράζεται η DYRK1A, FUS και λιγότερο της TDP-43 ΔNLS ενώ μικρή μείωση παρατηρείται όταν υπερεκφράζεται η TDP-43. Η ανάλυση της συσσωμάτωσης έγινε με βάση της Ponceau, δηλαδή την συνολική ποσότητα των πρωτεϊνών για κάθε συνθήκη για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.



Εικόνα 18: Ανοσοστύπωμα κατά Western των SK-N-SH κυττάρων όπου έχει γίνει συν-υπερέκφραση των DYRK1A, FUS, TDP-43, TDP-43 ΔNLS και της α-συνουκλεΐνης με την χρήση αδενοϊών. Αριθμός επαναλήψεων N=4.

8. Τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης α-συνουκλεΐνης στις σερίνες 87 και 129 δεν αλλάζουν μετά από υπερ-έκφραση των DYRK1A, FUS, TDP-43, και TDP-43 ΔNLS.

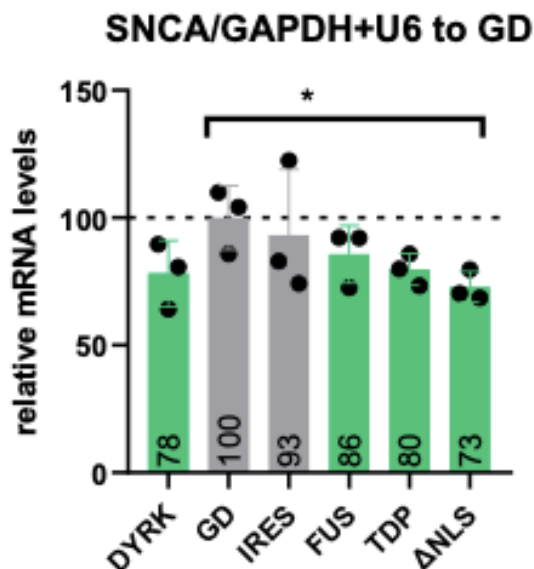
Επιπλέον της συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης, μελετήθηκε και η σερίνη 87 και η σερίνη 129 σύμφωνα με την βιβλιογραφία. Έτσι μελετήθηκε αν οι DYRK1A, FUS, TDP-43 και TDP-43 ΔNLS επηρεάζουν την φωσφορυλίωση της α-συνουκλεΐνης στις θέσεις 87 και 129. Έγινε διαμόλυνση με ιό, σε παλιά SK-N-SH, της SNCA και αντίστοιχα των DYRK1A, FUS, TDP-43 και TDP-43 ΔNLS, συλλογή των πρωτεϊνών και ανοσοστύπωμα κατά Western. Τα αποτελέσματα έδειξαν -μη-στατιστική- αύξηση της σερίνης 87 και 129 με υπερέκφραση των RBPs και της κινάσης DYRK1A συγκριτικά με τα controls. Με υπερέκφραση της κινάσης DYRK1A παρατηρείται αύξηση σερίνης 87 και όχι τόσο της σερίνης 129. Επιπλέον αυξημένα είναι τα επίπεδα της σερίνης 129 με υπερέκφραση της FUS.



Εικόνα 19: Ανοσοστόπωμα κατά Western των SK-N-SH κυττάρων όπου έχει γίνει συν-υπερέκφραση των DYRK1A, FUS, TDP-43, και TDP-43 ΔNLS με την SNCA για την απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης της φωσφορυλιωμένης SNCA στις θέσεις Ser 129 και Ser87. Αριθμός επαναλήψεων N=3.

9. Μειωμένα επίπεδα mRNA της α-συνουκλεΐνης σε κύτταρα όπου έχουν υπερ-εκφραστεί η DYRK1A, FUS, TSP-43, και TDP43 ΔNLS.

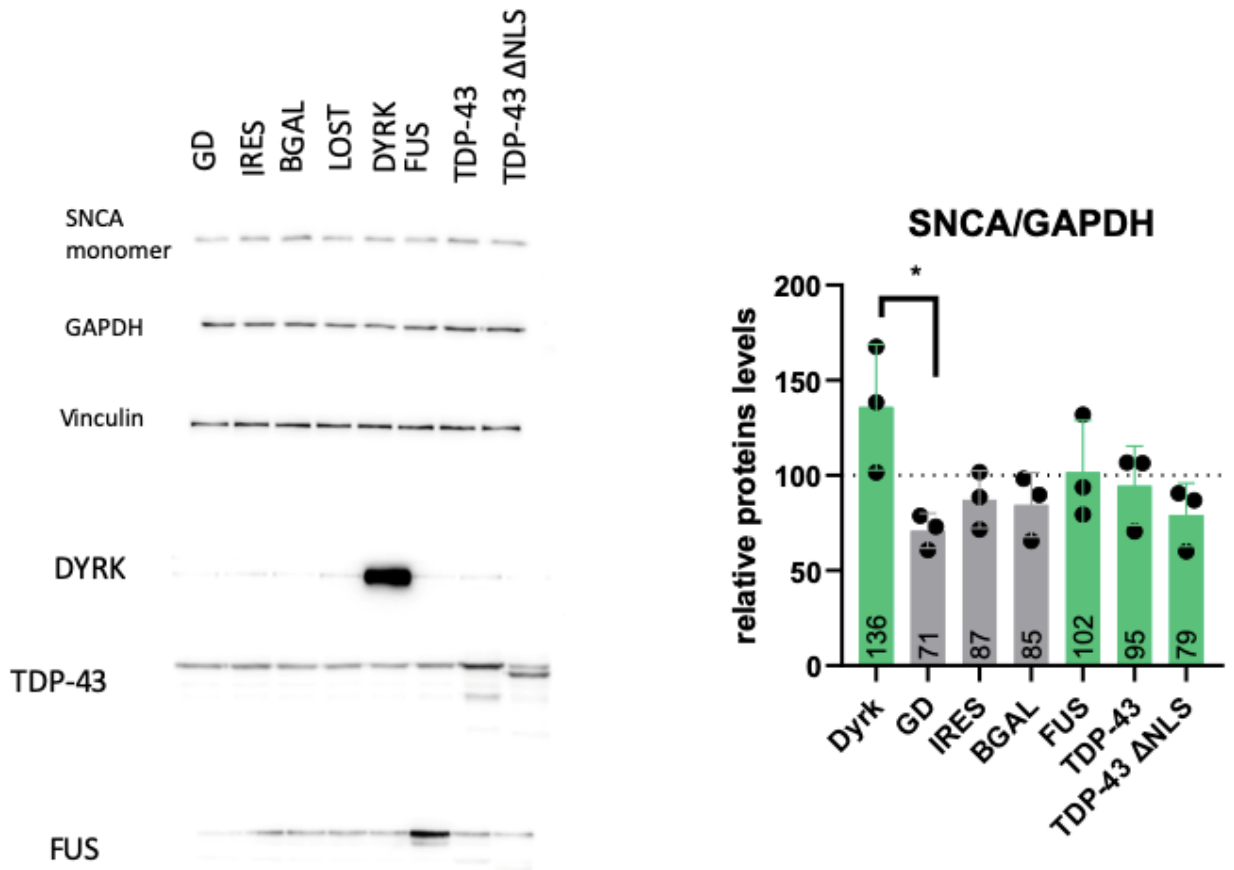
Έπειτα, μελετήθηκε η μονομερής μορφή της. Έτσι, μελετήθηκε αν οι DYRK1A, FUS, TDP-43, TDP-43 ΔNLS επιδρούν σε μετά-μεταγραφικό επίπεδο, δηλαδή αν υπάρχει αλλαγή των επιπέδων των mRNA της α-συνουκλεΐνης όταν υπερεκφράζονται οι αντίστοιχες πρωτεΐνες. Έτσι, έγινε συλλογή του ολικού RNA των κυττάρων, μετατροπή σε cDNA και έπειτα real time PCR με ειδικούς εκκινητές για να ενισχυθούν επιλεκτικά τα γονίδια στόχοι mRNA. Μέσω της ανάλυσης της qPCR και με την χρήση των γονιδίων αναφοράς U6 και GAPDH για την κανονικοποίηση των δειγμάτων, παρατηρήθηκε να είναι στατιστικά μειωμένη στο TDP-43 ΔNLS, συγκριτικά με τα controls.



Εικόνα 20: Γραφική παράσταση της έκφρασης των συνολικών mRNA μεταγράφων για το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης ως προς τα επίπεδα των σταθερά εκφραζόμενων γονιδίων U6+GAPDH για κάθε συνθήκη υπερέκφρασης DYRK1A, FUS, TDP-43, και TDP-43 ΔNLS. N=3

10. Αυξημένα επίπεδα μονομερούς α-συνουκλεΐνης σε κύτταρα SK-N-SH όπου έχει υπερ-εκφραστεί η DYRK1A. Μικρότερη αύξηση παρατηρείται με τις FUS και TDP-43.

Εκτός από τα επίπεδα mRNA, μελετήθηκε και η ποσότητα της μονομερούς α-συνουκλεΐνης στο κύτταρο όταν υπερεκφράζονται οι υπό μελέτη πρωτεΐνες. Έτσι, έγινε διαμόλυνση των SK-N-SH κυττάρων με τα κατάλληλα πλασμίδια για την DYRK1A, FUS, TDP-43, TDP-43 ΔNLS και για τα controls GD, IRES, BGAL. Με ανοσοστύπωμα κατά Western βρέθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της ποσότητας της μονομερούς α-συνουκλεΐνης όταν υπάρχει υπερέκφραση της DYRK1A, ενώ μικρότερη αύξηση παρατηρείται για τις FUS, TDP-43 και καμία αύξηση για την TDP-43 ΔNLS. Τέλος έγινε και επαλήθευση της διαμόλυνσης και υπερέκφρασης των RBPs, επίσης με ανοσοστύπωμα κατά Western χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι Dytk, FUS και TDP-43, όπου και παρατηρείται υπερέκφραση.



Εικόνα 21: Ανοσοστύπωμα κατά Western των SK-N-SH κυττάρων όπου έχει γίνει υπερέκφραση των RBPs με την χρήση πλασμιδίων. Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης της μονομερούς α-συνουκλείνης και των controls GAPDH και Vinculin. Το control που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν το GAPDH. Επιπλέον έγινε επαλήθευση της διαμόλυνσης και υπερέκφρασης των RBPs και της DYRK1A με την χρήση των αντίστοιχων αντισωμάτων. Αριθμός επαναλήψεων N=3.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Πάρκινσον (ν.Π) σχετίζονται άμεσα με τα επίπεδα της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνη, η οποία είναι υπεύθυνη για πολλές νευροεκφυλιστικές νόσους γνωστές ως α-συνουκλεΐνοπάθειες. Μάλιστα, τα επίπεδά της στο κύτταρο, φαίνονται να σχετίζονται με την παθολογία και την προδιάθεση για την ν.Π (Chiba-Falek, Touchman, and Nussbaum 2003; Sotiriou et al. 2009) ενώ η συσσωρευμένη α-συνουκλεΐνη, σχηματίζει τα σωμάτια Lewy, που έχουν σημαντικό ρόλο στον εκφυλισμό των κυττάρων (Vekrellis and Stefanis 2012). Επιπλέον, θεωρείται ότι η παθολογία της νόσου μεταδίδεται από τα πάσχοντα στα υγιή κύτταρα, μέσω της διακυτταρικής μεταφοράς των τοξικών μορφών της α-συνουκλεΐνης (Angot et al. 2012). Μάλιστα, η έκκριση της α-συνουκλεΐνης από τα κύτταρα, είναι ανάλογη με την έκφρασή της σε αυτά (S.-J. Lee 2008). Για αυτό τον λόγο, πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην διερεύνηση των ενδοκυτταρικών μηχανισμών αποικοδόμησης της περίσσειας α-συνουκλεΐνης ενώ ο αριθμός των ερευνών που στοχεύουν στην ρύθμιση της έκφρασης των ενδοκυτταρικών επιπέδων της είναι περιορισμένος.

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι γνωστό πως η ρύθμιση των πρωτεϊνών είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί σε πολλά στάδια. Κάποια από αυτά αφορούν τους μηχανισμούς ωρίμανσης και πολυαδενυλίωσης του πρόδρομου mRNA, εξαγωγής αυτού από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα, ρύθμιση της σταθερότητας ή της αποικοδόμησής του και τέλος έναρξης της μετάφρασης. Αυτές οι διεργασίες πραγματοποιούνται συνήθως από ειδικές πρωτεΐνες με ικανότητα πρόσδεσης σε δομές ή αλληλουχίες RNA (RBPs) αλλά και από miRs (Dreyfuss, Kim, and Kataoka 2002). Οι RBPs συμμετέχουν σε πολλές διαδικασίες της βιολογίας του RNA ενώ η λανθασμένη λειτουργία αυτών των πολύπλοκων σταδίων μπορεί να προκαλέσει ασθένειες (Doxakis 2014).

Ο καταβολισμός των πρωτεϊνών στο κύτταρο πραγματοποιείται μέσω διάφορων μηχανισμών αποικοδόμησης όπως το μονοπάτι της αυτοφαγίας ενώ σημαντικό ρόλο στα επίπεδα τους έχει και το οξειδωτικό στρες. Όταν παρατηρείται νευροεκφυλισμός, ειδικά σε περιπτώσεις συνουκλεΐνοπαθειών, φαίνεται να επηρεάζονται αυτοί οι κυτταρικοί μηχανισμοί αποικοδόμησης. Συγκεκριμένα, όταν υπάρχει βλάβη της αυτοφαγίας, επάγεται η συσσωμάτωση και ο σχηματισμός εγκλείστων των πρωτεϊνών που φυσιολογικά καταστρέφονται. Έρευνα από τους Chu et. al. 2009, έδειξε σε εγκεφάλους ασθενών με ν.Π,

χαρακτηριστική μείωση σε λυσοσωμικούς δείκτες και ειδικότερα σε νευρώνες της μέλαινας ουσίας που περιέχουν α -συνουκλεΐνη. Βέβαια, ακόμα γίνονται έρευνες για την κατανόηση των μηχανισμών αποικοδόμησης στις συνουκλεϊνοπάθειες καθώς ο βασικός μηχανισμός αποικοδόμησης της α -συνουκλεΐνης δεν έχει ακόμα καθοριστεί.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν πως η κινάση DYRK1A και οι FUS, TDP-43 και TDP-43 Δ NLS, επηρεάζουν τα μονοπάτια που εμπλέκονται στην συσσωμάτωση της α -συνουκλεΐνης. Τα μονοπάτια που μελετήθηκαν είναι το μονοπάτι του ERK, του mTOR, και της αυτοφαγίας. Επιπλέον μελετήθηκε πως χημικά που επάγουν το οξειδωτικό στρες επηρεάζουν την ποσότητα των DYRK1A, FUS, TDP-43 στο κύτταρο. Τέλος, μελετήθηκε η φωσφορυλίωση της α -συνουκλεΐνης στις σερίνες 87 και 129, η συσσωμάτωση αυτής και έπειτα αν επηρεάζονται τα επίπεδα της α -συνουκλεΐνης σε πρωτεϊνικό επίπεδο αλλά και σε επίπεδο RNA με υπερ-έκφραση των RBPs και της κινάσης DYRK1A.

Όσον αφορά το μονοπάτι του ERK, παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση στην φωσφορυλίωση του ERK1/2, όταν υπερεκφράζεται η TDP-43 Δ NLS ενώ μια μη στατιστικά σημαντική αύξηση με υπερ-έκφραση των πρωτεϊνών DYRK1A, FUS, TDP-43. Το μονοπάτι ERK μαζί με την AKT, ενεργοποιούν το mTORC1 που εμπλέκεται στη πρωτεϊνοσύνθεση και μείωση της μακροαυτοφαγία.

Γενικότερα, παρατηρείται σχετική μείωση των φωσφορυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών ανοδικά και καθοδικά του συμπλόκου mTOR, εκτός από την πρωτεΐνη ULK757 στην οποία παρατηρείται μια μικρή αύξηση και την PP2A όπου φαίνεται μια τάση για αύξηση. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης AKT που αναστέλλεται από την κινάση DYRK1A (Yong, Wu et al. 2023), δεν επαληθεύτηκε από τα αποτελέσματα αυτής της διπλωματικής. Επιπλέον, έρευνες δείχνουν αύξηση του pAKT με την αλληλεπίδραση της FUS και του RNA LINC00470 οδηγώντας στο GBM (Glioblastoma) (Liu, Changhong et al. 2018). Οι RBPs FUS, TDP-43 και TDP-43 Δ NLS προκαλούν μια τάση για αύξηση στον λόγο pAKT/AKT, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστική σημαντικότητα. Αναφορικά με την ULK757, σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε συστατικά, το mTOR φωσφορυλιώνει την σερίνη 757, η οποία μειώνει την δραστηριότητα της ULK1 (Choi, Insup et al. 2022). Στην συγκεκριμένη εργασία, βρέθηκε μια μη στατιστικώς σημαντική τάση για αύξηση της ULK757 με υπερ-έκφραση

της DYRK1A και TDP-43 ΔNLS ενώ καμία αλλαγή αυτής με υπερ-έκφραση των FUS και TDP-43.

Με υπερέκφραση της DYRK1A, FUS, TDP-43 και TDP-43 ΔNLS παρατηρείται μείωση του λόγου της φωσφορυλιωμένης pEIF2A προς την ολική EIF2A, το οποίο υποστηρίζεται και από έρευνες που έγιναν σε ασθενείς με LBD (Lewy Body Dementia), όπου παρατηρήθηκε μείωση του λόγου pEIF2A/EIF2A (Hrabos, Dominik et al. 2024). Η πρωτεΐνη αυτή είναι μια RNA ελικάση, μέλος στο σύμπλοκο EIF4F και έχει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της μετάφρασης. Η φωσφορυλίωση της EIF2A μετατρέπει το EIF2 σε έναν αναστολέα του EIF2B, μειώνοντας έτσι την πρωτεϊνοσύνθεση (Ito, Takuhiro et al. 2023). Έτσι, μείωση του pEIF2A υποδηλώνει αύξηση των ολικών πρωτεϊνών το οποίο και δεν υποστηρίζεται από το πείραμα της πουρομυκίνης που πραγματοποιήθηκε.

Η PP2A παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, καθώς ελέγχει τον κυτταρικό μεταβολισμό, ρυθμίζοντας τα ένζυμα που συμμετέχουν στην γλυκόλυση, στον μεταβολισμό των λιπιδίων και στην παραγωγή της κατεχολαμίνης. Επιπλέον, το PP2A «κλείνει» το mTORC1, ρυθμίζοντας το AKT με αποφωσφορυλίωση της θρεονίνης 308 (Wlodarchak, Xing 2016). Άρα, μπορεί να μειώσει την πρωτεϊνοσύνθεση και να επιφέρει κυτταρική απόπτωση (Allen-Petersen et al 2019). Στα αποτελέσματα, με υπερέκφραση των FUS, TDP-43, και TDP-43 ΔNLS φάνηκε τάση για αύξηση του λόγου pPP2A/PP2A και άρα πιθανόν αύξηση της αυτοφαγίας, ενώ με υπερέκφραση της DYRK1A, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στον λόγο pPP2A/PP2A. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, πιθανόν η επίδραση των DYRK1A, FUS, TDP-43 και TDP-43 ΔNLS, στοχεύει όχι τόσο το mTOR μονοπάτι άμεσα, όσο τα επίπεδα EIF2A που παράλληλα με το ERK1/2 μπορούν να ρυθμίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση (Cagnetta, Roberta et al. 2019).

Επιπλέον, μελετήθηκε και η συνολική ποσότητα πρωτεϊνών που παράγονται όταν υπερεκφράζονται οι DYRK1A, FUS, TDP-43, TDP-43 ΔNLS όπου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της δεσμευμένης πουρομυκίνης, δηλαδή μείωση της συνολικής πρωτεϊνοσύνθεσης. Αυτό αποδεικνύει ότι όντως η υπερέκφραση των RBPs και της DYRK1A επηρεάζει την συνολική ποσότητα των πρωτεϊνών στο κύτταρο και έτσι φαίνεται η αρνητική επίδραση αυτών στην πρωτεϊνοσύνθεση του κυττάρου.

Από την βιβλιογραφία φαίνεται σημαντικός ο ρόλος των RBPs και της κινάσης DYRK1A στην αυτοφαγία. Η FUS έχει βρεθεί να ελέγχει την έκφραση γονιδίων (σχηματισμός αυτοφαγοσώματος) που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια του μονοπατιού της αυτοφαγίας

(Arenas et al. 2021), ενώ και η TDP-43 αποτελεί πρωτεΐνη άμεσα συνδεδεμένη με την αυτοφαγία (Barmada, Serio, Arjun et al. 2014). Επιπλέον, αναφορικά με την DYRK1A έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με την PARKIN, ένα βασικό συστατικό της μιτοαυτοφαγίας (Atas-Ozcan, Helin et al. 2021) και κύριο χαρακτηριστικό του υπολειπόμενου τρόπου κληρονόμησης της νΠ. Έτσι, αναφορικά με το μονοπάτι της αυτοφαγίας, μελετήθηκε το p62, που λειτουργεί ως υπόστρωμα της μακροαυτοφαγίας, και συσσωρεύεται όταν η αυτοφαγία μπλοκάρεται. Για την αυτοφαγία με τη μεσολάβηση συνοδών πρωτεϊνών (Chaperone-mediated αυτοφαγία, CMA), μελετήθηκε ο υποδοχέας LAMP2A που βρίσκεται πάνω στο λυσόσωμα, όπου μείωση αυτού σημαίνει και μειωμένη CMA. Έτσι λοιπόν, παρατηρήθηκε τάση για αύξηση του p62 με την υπερέκφραση όλων των υπό μελέτη πρωτεϊνών δηλαδή πιθανόν μείωση της μακροαυτοφαγίας, ενώ η LAMP2A μειώνεται σημαντικά με την υπερέκφραση των DYRK1A και TDP-43 ΔNLS και άρα μείωση της CMA, ενώ με υπερέκφραση των FUS και TDP-43 δεν φαίνεται κάποια σημαντική αλλαγή.

Επιπλέον, έχει μελετηθεί η συσχέτιση του οξειδωτικού στρες στις νευροεκφυλιστικές νόσου και ιδιαίτερα στην νΠ, με τον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων (Dias et al. 2013). Η συσχέτιση των γονιδίων που παράγονται από τα PRKN και PINK1 -γονίδια που σχετίζονται με την νΠ- συμμετέχουν στο οξειδωτικό στρες με τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, που μπορεί και σχηματίζει δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και να φέρει το κύτταρο σε κατάσταση οξειδωτικού στρες (Gasser 2009). Έτσι, μελετήθηκε και η επίδραση χημικών που επάγουν το οξειδωτικό στρες, στην έκφραση των πρωτεϊνών DYRK1A, FUS και TDP-43. Παρατηρήθηκε αύξηση της πρωτεΐνης DYRK1A με το χημικό CCCP, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική αλλαγή στην FUS και TDP-43.

Σημαντικό αποτέλεσμα ήταν η στατιστικώς σημαντική αύξηση της συσσωμάτωσης της α -συνουκλεΐνης με υπερέκφραση της DYRK1A, αλλά και των FUS και TDP-43 ΔNLS, ενώ η TDP-43 δεν παρουσιάζει κάποια διαφορά. Αυτό δείχνει ξεκάθαρα την επιρροή της DYRK1A και των υπόλοιπων RBPs στην έκφραση της α -συνουκλεΐνης και την συμβολή τους στις α -συνουκλεϊνοπάθειες. Η συσσωμάτωση της α -συνουκλεΐνης είναι ο βασικός παράγοντας δημιουργίας των σωμάτων Lewy, το κύριο χαρακτηριστικό της νΠ αλλά και άλλων α -συνουκλεϊνοπαθειών. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει και την υπάρχουσα βιβλιογραφία, όπου έχει παρατηρηθεί αύξηση της συσσωμάτωσης της α -συνουκλεΐνης με υπερέκφραση της κινάσης DYRK1A (Kim 2006), ενώ αυξημένη συσσωμάτωση της α -συνουκλεΐνης έχει βρεθεί και σε νευρώνες και νευρογλοιακά κύτταρα σε ασθενείς με ALS

(σε ποσοστό 97%) και FTD (45%), όπου υπερ-εκφράζεται η TDP-43 (Kapele et al. 2017). Επιπλέον και η μεταφορά της FUS από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα έχει βρεθεί ότι καθιστά την α -συνουκλεΐνη, πιο επιρρεπή σε λανθασμένη αναδίπλωση και συσσωμάτωση (Ratti, Buratti 2016).

Με βάση την βιβλιογραφία, η α -συνουκλεΐνη φωσφορυλιώνεται στην θέση 129 από πολλές πρωτεΐνες που έχουν συσχετιστεί με ασθένειες των σωμάτων Lewy όπως η νΠ και η DLB. Συγκεκριμένα για την DYRK1A η βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι μαζί με τις CKs, είναι η μόνη πρωτεΐνη που φωσφορυλιώνει την α -συνουκλεΐνη στην θέση 87 (Okochi 2000) (Kim 2006). Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας δείχνουν μια όχι στατιστικώς σημαντική αλλά υποσχόμενη αύξηση της σερίνης 87 με υπερέκφραση της DYRK1A. Επιπλέον, μειωμένη είναι η φωσφορυλίωση της σερίνης 129 με υπερέκφραση της DYRK1A όπως φαίνεται επίσης στην βιβλιογραφία (Kim 2006), χωρίς όμως να υπάρχει στατιστική σημαντικότητα. Με υπερέκφραση των FUS, TDP-43, και TDP-43 Δ NLS φαίνεται μια τάση προς αύξηση της σερίνης 129 στα SK-N-SH κύτταρα.

Τέλος, αναφορικά με τα επίπεδα mRNA της α -συνουκλεΐνης, βρέθηκε στατιστικά σημαντική μείωση με την υπερέκφραση της TDP-43 Δ NLS, ενώ μη σημαντική μείωση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που ελέγχονται. Αντίθετα, με την μελέτη των επιπέδων της μονομερούς πρωτεΐνης, βρέθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση αυτής με υπερέκφραση της DYRK1A, μικρή αύξηση με την υπερέκφραση των FUS και TDP-43 και καμία μεταβολή με υπερέκφραση του TDP-43 Δ NLS.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ύστερα από μια σειρά πειραμάτων που μας επέτρεψαν τη διερεύνηση του ρόλου της κινάσης DYRK1A και των FUS, TDP-43 και TDP-43 ΔNLS, καταλήξαμε στο ότι οι RBPs και η DYRK1A έχουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση της α-συνουκλεΐνης, καθώς αυξάνουν τα επίπεδα της συσσωματωμένης μορφής της. Ταυτόχρονα, βρέθηκε με το πείραμα της πουρομυκίνης, ότι μειώνουν και την πρωτεϊνοσύνθεση στα SK-N-SH κύτταρα. Επιπλέον, στόχος μας ήταν να αποδείξουμε μέσω ποιου μονοπατιού επηρεάζουν την έκφραση της α-συνουκλεΐνης, και βρέθηκε πως βασικό ρόλο έχει το μονοπάτι των ERK και mTOR ενώ σημαντικό ρόλο έχει και η αυτοφαγία με τη μεσολάβηση συνοδών πρωτεϊνών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abeliovich et al. 2000. “Mice Lacking α -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System: Neuron.” 2000. [https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273\(00\)80886-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627300808867%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273(00)80886-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627300808867%3Fshowall%3Dtrue).
- Agarraberes, F. A., and J. F. Dice. 2001. “A Molecular Chaperone Complex at the Lysosomal Membrane Is Required for Protein Translocation.” *Journal of Cell Science* 114 (Pt 13): 2491–99.
- Akamatsu, Wado, Hiroaki Fujihara, Takayuki Mitsuhashi, Masato Yano, Shinsuke Shibata, Yoshika Hayakawa, Hirotaka James Okano, et al. 2005. “The RNA-Binding Protein HuD Regulates Neuronal Cell Identity and Maturation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (12): 4625–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407523102>.
- Akamatsu, Wado, Hirotaka J. Okano, Noriko Osumi, Takayoshi Inoue, Shun Nakamura, Shin-Ichi Sakakibara, Masayuki Miura, Nobutake Matsuo, Robert B. Darnell, and Hideyuki Okano. 1999. “Mammalian ELAV-like Neuronal RNA-Binding Proteins HuB and HuC Promote Neuronal Development in Both the Central and the Peripheral Nervous Systems.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (17): 9885–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9885>.
- Alami, Nael H., Rebecca B. Smith, Monica A. Carrasco, Luis A. Williams, Christina S. Winborn, Steve S. W. Han, Evangelos Kiskinis, et al. 2014. “Axonal Transport of TDP43 mRNA Granules Is Impaired by ALS-Causing Mutations.” *Neuron* 81 (3): 536–43. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.018>.
- Alfieri, Julio A., Natalia S. Pino, and Lionel M. Igaz. 2014. “Reversible Behavioral Phenotypes in a Conditional Mouse Model of TDP43 Proteinopathies.” *The Journal of Neuroscience* 34 (46): 15244–59. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1918-14.2014>.
- Allen-Petersen, B. L., Risom, T., Feng, Z., Wang, Z., Jenny, Z. P., Thoma, M. C., Pelz, K. R., Morton, J. P., Sansom, O. J., Lopez, C. D., Sheppard, B., Christensen, D. J., Ohlmeyer, M., Narla, G., & Sears, R. C. 2019. “Activation of PP2A and Inhibition of mTOR Synergistically Reduce MYC Signaling and Decrease Tumor Growth in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.” *Cancer research*, 79(1), 209–219. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0717>

- AlNajjar, Y. T., Gabr, M., ElHady, A. K., Salah, M., Wilms, G., Abadi, A. H., Becker, W., Abdel-Halim, M., & Engel, M. 2022. “Discovery of novel 6-hydroxybenzothiazole urea derivatives as dual Dyrk1A/ α -synuclein aggregation inhibitors with neuroprotective effects.” *European journal of medicinal chemistry*, 227, 113911. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113911>
- Alvarez-Erviti, Lydia, Maria C. Rodriguez-Oroz, J. Mark Cooper, Cristina Caballero, Isidro Ferrer, Jose A. Obeso, and Anthony H. V. Schapira. 2010. “Chaperone-Mediated Autophagy Markers in Parkinson Disease Brains.” *Archives of Neurology* 67 (12): 1464–72. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.198>.
- Angot, Elodie, Jennifer A. Steiner, Carla M. Lema Tomé, Peter Ekström, Bengt Mattsson, Anders Björklund, and Patrik Brundin. 2012. “Alpha-Synuclein Cell-to-Cell Transfer and Seeding in Grafted Dopaminergic Neurons in Vivo.” *PloS One* 7 (6): e39465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039465>.
- Arenas, A., Kuang, L., Zhang, J., Kingren, M. S., & Zhu, H. 2021. “FUS regulates autophagy by mediating the transcription of genes critical to the autophagosome formation.” *Journal of neurochemistry*, 157(3), 752–763. <https://doi.org/10.1111/jnc.15281>
- Atas-Ozcan, H., Brault, V., Duchon, A., & Herault, Y. 2021. “Dyrk1a from Gene Function in Development and Physiology to Dosage Correction across Life Span in Down Syndrome.” *Genes*, 12(11), 1833. <https://doi.org/10.3390/genes12111833>
- Bandyopadhyay, Urmi, Susmita Kaushik, Lyuba Varticovski, and Ana Maria Cuervo. 2008. “The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane.” *Molecular and Cellular Biology* 28 (18): 5747–63. <https://doi.org/10.1128/MCB.02070-07>.
- Barbeau, André. 1969. “L-Dopa Therapy in Parkinson’s Disease.” *Canadian Medical Association Journal* 101 (13): 59–68.
- Barbour, Robin, Kristin Kling, John P. Anderson, Kelly Banducci, Tracy Cole, Linnea Diep, Michael Fox, et al. 2008. “Red Blood Cells Are the Major Source of Alpha-Synuclein in Blood.” *Neuro-Degenerative Diseases* 5 (2): 55–59. <https://doi.org/10.1159/000112832>.
- Barmada, S., Serio, A., Arjun, A. et al. 2014. “Autophagy induction enhances TDP43 turnover and survival in neuronal ALS models.” *Nat Chem Biol* 10, 677–685. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1563>
- Barreau, Carine, Luc Paillard, and H. Beverley Osborne. 2005. “AU-Rich Elements and Associated Factors: Are There Unifying Principles?” *Nucleic Acids Research* 33 (22): 7138–50. <https://doi.org/10.1093/nar/gki1012>.

- Baumeister, W., J. Walz, F. Zühl, and E. Seemüller. 1998. "The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease." *Cell* 92 (3): 367–80.
- Beck, A. R., Q. G. Medley, S. O'Brien, P. Anderson, and M. Streuli. 1996. "Structure, Tissue Distribution and Genomic Organization of the Murine RRM-Type RNA Binding Proteins TIA-1 and TIAR." *Nucleic Acids Research* 24 (19): 3829–35.
- Becker, W., & Sippl, W. 2011. "Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A." *The FEBS journal*, 278(2), 246–256. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07956.x>
- Bellucci, Arianna, Laura Navarria, Michela Zaltieri, Elisa Falarti, Serena Bodei, Sandra Sigala, Leontino Battistin, Mariagrazia Spillantini, Cristina Missale, and Pierfranco Spano. 2011. "Induction of the Unfolded Protein Response by α -Synuclein in Experimental Models of Parkinson's Disease." *Journal of Neurochemistry* 116 (4): 588–605. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07143.x>.
- Benaroudj, Nadia, Peter Zwickl, Erika Seemüller, Wolfgang Baumeister, and Alfred L. Goldberg. 2003. "ATP Hydrolysis by the Proteasome Regulatory Complex PAN Serves Multiple Functions in Protein Degradation." *Molecular Cell* 11 (1): 69–78.
- Bhalla, Kavita, Hilary A. Phillips, Joanna Crawford, Olivia L. D. McKenzie, John C. Mulley, Helen Eyre, Alison E. Gardner, Gabriel Kremmidiotis, and David F. Callen. 2004. "The de Novo Chromosome 16 Translocations of Two Patients with Abnormal Phenotypes (Mental Retardation and Epilepsy) Disrupt the A2BP1 Gene." *Journal of Human Genetics* 49 (6): 308–11. <https://doi.org/10.1007/s10038-004-0145-4>.
- Bley, Nadine, Marcell Lederer, Birgit Pfalz, Claudia Reinke, Tommy Fuchs, Markus Glaß, Birgit Möller, and Stefan Hüttelmaier. 2015. "Stress Granules Are Dispensable for mRNA Stabilization during Cellular Stress." *Nucleic Acids Research* 43 (4): e26. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1275>.
- Bronicki, Lucas M., and Bernard J. Jasmin. 2013. "Emerging Complexity of the HuD/ELAV14 Gene; Implications for Neuronal Development, Function, and Dysfunction." *RNA (New York, N.Y.)* 19 (8): 1019–37. <https://doi.org/10.1261/rna.039164.113>.
- Brown EJ, Cereghini S, Thomas G, Kozma SC. Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Mol. Cell Biol.* 2004 24:9508-9516.
- Buckanovich, R. J., J. B. Posner, and R. B. Darnell. 1993. "Nova, the Paraneoplastic Ri Antigen, Is Homologous to an RNA-Binding Protein and Is Specifically Expressed in the Developing Motor System." *Neuron* 11 (4): 657–72.

- Burré, Jacqueline, Manu Sharma, Theodoros Tsetsenis, Vladimir Buchman, Mark Etherton, and Thomas C. Südhof. 2010. “ α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro.” *Science* (New York, N.Y.) 329 (5999): 1663–67. <https://doi.org/10.1126/science.1195227>.
- Cagnetta, R., Wong, H. H., Frese, C. K., Mallucci, G. R., Krijgsveld, J., & Holt, C. E. 2019. “Noncanonical Modulation of the eIF2 Pathway Controls an Increase in Local Translation during Neural Wiring.” *Molecular cell*, 73(3), 474–489.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.013>
- Canal, Mercè, Joan Romani-Aumedes, Núria Martín-Flores, Víctor Pérez-Fernández, and Cristina Malagelada. 2014. “RTP801/REDD1: A Stress Coping Regulator That Turns into a Troublemaker in Neurodegenerative Disorders.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (October). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00313>.
- Casafont, Iñigo, Rocío Bengoechea, Olga Tapia, María T. Berciano, and Miguel Lafarga. 2009. “TDP43 Localizes in MRNA Transcription and Processing Sites in Mammalian Neurons.” *Journal of Structural Biology* 167 (3): 235–41. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.06.006>.
- Castillo-Carranza, Diana L., Yan Zhang, Marcos J. Guerrero-Muñoz, Rakez Kaye, Diego E. Rincon-Limas, and Pedro Fernandez-Funez. 2012. “Differential Activation of the ER Stress Factor XBP1 by Oligomeric Assemblies.” *Neurochemical Research* 37 (8): 1707–17. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0780-7>.
- Chandra, Sreeranga, Gilbert Gallardo, Rafael Fernández-Chacón, Oliver M. Schlüter, and Thomas C. Südhof. 2005. “Alpha-Synuclein Cooperates with CSPalpha in Preventing Neurodegeneration.” *Cell* 123 (3): 383–96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.028>.
- Chartier-Harlin, Marie-Christine, Jennifer Kachergus, Christophe Roumier, Vincent Mouroux, Xavier Douay, Sarah Lincoln, Clotilde Levecque, et al. 2004. “Alpha-Synuclein Locus Duplication as a Cause of Familial Parkinson’s Disease.” *Lancet* (London, England) 364 (9440): 1167–69. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17103-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17103-1).
- Chen et al. 2007. “Oligomeric Alpha-Synuclein Inhibits Tubulin Polymerization. - PubMed - NCBI.” 2007. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17374364>.
- Chen, Linan, Zhiguo Xie, Susie Turkson, and Xiaoxi Zhuang. 2015. “A53T Human α -Synuclein Overexpression in Transgenic Mice Induces Pervasive Mitochondria Macroautophagy Defects Preceding Dopamine Neuron Degeneration.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (3): 890–905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0089-14.2015>.

- Chen-Plotkin, Alice S., Virginia M.-Y. Lee, and John Q. Trojanowski. 2010. "TAR DNA-Binding Protein 43 in Neurodegenerative Disease." *Nature Reviews. Neurology* 6 (4): 211–20. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.18>.
- Chiang, H. L., and J. F. Dice. 1988. "Peptide Sequences That Target Proteins for Enhanced Degradation during Serum Withdrawal." *The Journal of Biological Chemistry* 263 (14): 6797–6805.
- Chiba-Falek, Ornit, Jeffrey W. Touchman, and Robert L. Nussbaum. 2003. "Functional Analysis of Intra-Allelic Variation at NACP-Rep1 in the Alpha-Synuclein Gene." *Human Genetics* 113 (5): 426–31. <https://doi.org/10.1007/s00439-003-1002-9>.
- Christie, Sean B., Michael R. Akins, James E. Schwob, and Justin R. Fallon. 2009. "The FXG: A Presynaptic Fragile X Granule Expressed in a Subset of Developing Brain Circuits." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (5): 1514–24. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3937-08.2009>.
- Choi, I., Heaton, G. R., Lee, Y. K., & Yue, Z. 2022. "Regulation of α -synuclein homeostasis and inflammasome activation by microglial autophagy." *Science advances*, 8(43), eabn1298. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn1298>
- Chu, Yaping, Hemraj Dodiya, Patrick Aebischer, C. Warren Olanow, and Jeffrey H. Kordower. 2009. "Alterations in Lysosomal and Proteasomal Markers in Parkinson's Disease: Relationship to Alpha-Synuclein Inclusions." *Neurobiology of Disease* 35 (3): 385–98. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.05.023>.
- Chu, Yaping, and Jeffrey H. Kordower. 2007. "Age-Associated Increases of Alpha-Synuclein in Monkeys and Humans Are Associated with Nigrostriatal Dopamine Depletion: Is This the Target for Parkinson's Disease?" *Neurobiology of Disease* 25 (1): 134–49. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.08.021>.
- Chu, Yaping, Gerardo A. Morfini, Lori B. Langhamer, Yinzhen He, Scott T. Brady, and Jeffrey H. Kordower. 2012. "Alterations in Axonal Transport Motor Proteins in Sporadic and Experimental Parkinson's Disease." *Brain: A Journal of Neurology* 135 (Pt 7): 2058–73. <https://doi.org/10.1093/brain/aws133>.
- Cicchini, M, V Karantza, and B Xia. 2015. "Molecular Pathways: Autophagy in Cancer--a Matter of Timing and Context. - PubMed - NCBI." 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25165101>.
- Clough, R. Lee, and Leonidas Stefanis. 2007. "A Novel Pathway for Transcriptional Regulation of Alpha-Synuclein." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of*

American Societies for Experimental Biology 21 (2): 596–607.
<https://doi.org/10.1096/fj.06-7111com>.

Colla, Emanuela, Philippe Coune, Ying Liu, Olga Pletnikova, Juan C. Troncoso, Takeshi Iwatsubo, Bernard L. Schneider, and Michael K. Lee. 2012. “Endoplasmic Reticulum Stress Is Important for the Manifestations of α -Synucleinopathy in Vivo.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32 (10): 3306–20.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5367-11.2012>.

Colla, Emanuela, Poul H. Jensen, Olga Pletnikova, Juan C. Troncoso, Charles Glabe, and Michael K. Lee. 2012. “Accumulation of Toxic α -Synuclein Oligomer within Endoplasmic Reticulum Occurs in α -Synucleinopathy in Vivo.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32 (10): 3301–5.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5368-11.2012>.

Colombrita, Claudia, Elisa Onesto, Francesca Megiorni, Antonio Pizzuti, Francisco E. Baralle, Emanuele Buratti, Vincenzo Silani, and Antonia Ratti. 2012. “TDP43 and FUS RNA-Binding Proteins Bind Distinct Sets of Cytoplasmic Messenger RNAs and Differently Regulate Their Post-Transcriptional Fate in Motoneuron-like Cells.” *The Journal of Biological Chemistry* 287 (19): 15635–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.333450>.

Cooper, G. M., and R. E. Hausman. 2004. *The Cell: A Molecular Approach*. 3rd ed. Washington D. C.: ASM Press.

Cuervo, A. M., and J. F. Dice. 1996. “A Receptor for the Selective Uptake and Degradation of Proteins by Lysosomes.” *Science (New York, N.Y.)* 273 (5274): 501–3.

Cuervo, Ana Maria, Leonidas Stefanis, Ross Fredenburg, Peter T. Lansbury, and David Sulzer. 2004. “Impaired Degradation of Mutant Alpha-Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy.” *Science (New York, N.Y.)* 305 (5688): 1292–95.
<https://doi.org/10.1126/science.1101738>.

Daubner, Gerrit M., Antoine Cléry, and Frédéric H.-T. Allain. 2013. “RRM-RNA Recognition: NMR or Crystallography...and New Findings.” *Current Opinion in Structural Biology* 23 (1): 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.11.006>.

Dehay, Benjamin, Alfredo Ramirez, Marta Martinez-Vicente, Celine Perier, Marie-Hélène Canron, Evelyne Doudnikoff, Anne Vital, Miquel Vila, Christine Klein, and Erwan Bezdard. 2012. “Loss of P-Type ATPase ATP13A2/PARK9 Function Induces General Lysosomal Deficiency and Leads to Parkinson Disease Neurodegeneration.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (24): 9611–16.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1112368109>.

- Deschênes-Furry, Julie, Nora Perrone-Bizzozero, and Bernard J. Jasmin. 2006. "The RNA-Binding Protein HuD: A Regulator of Neuronal Differentiation, Maintenance and Plasticity." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 28 (8): 822–33. <https://doi.org/10.1002/bies.20449>.
- Dexter, David T., and Peter Jenner. 2013. "Parkinson Disease: From Pathology to Molecular Disease Mechanisms." *Free Radical Biology & Medicine* 62 (September): 132–44. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018>.
- Dice, J. F. 1990. "Peptide Sequences That Target Cytosolic Proteins for Lysosomal Proteolysis." *Trends in Biochemical Sciences* 15 (8): 305–9.
- Doxakis, Epaminondas. 2010. "Post-Transcriptional Regulation of Alpha-Synuclein Expression by Mir-7 and Mir-153." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (17): 12726–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.086827>.
- . 2014. "RNA Binding Proteins: A Common Denominator of Neuronal Function and Dysfunction." *Neuroscience Bulletin* 30 (4): 610–26. <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1443-7>.
- Dreyfuss, Gideon, V. Narry Kim, and Naoyuki Kataoka. 2002. "Messenger-RNA-Binding Proteins and the Messages They Carry." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3 (3): 195–205. <https://doi.org/10.1038/nrm760>.
- Ebrahimi-Fakhari, Darius, Ippolita Cantuti-Castelvetri, Zhanyun Fan, Edward Rockenstein, Eliezer Masliah, Bradley T. Hyman, Pamela J. McLean, and Vivek K. Unni. 2011. "Distinct Roles in Vivo for the Ubiquitin-Proteasome System and the Autophagy-Lysosomal Pathway in the Degradation of α -Synuclein." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (41): 14508–20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1560-11.2011>.
- Emmanouilidou, Evangelia, Katerina Melachroinou, Theodoros Roumeliotis, Spiros D. Garbis, Maria Ntzouni, Lukas H. Margaritis, Leonidas Stefanis, and Kostas Vekrellis. 2010. "Cell-Produced Alpha-Synuclein Is Secreted in a Calcium-Dependent Manner by Exosomes and Impacts Neuronal Survival." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (20): 6838–51. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010>.
- Fialcowitz-White, Elizabeth J., Brandy Y. Brewer, Jeff D. Ballin, Chris D. Willis, Eric A. Toth, and Gerald M. Wilson. 2007. "Specific Protein Domains Mediate Cooperative Assembly of HuR Oligomers on AU-Rich MRNA-Destabilizing Sequences." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (29): 20948–59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701751200>.

- Furukawa, Yoshiaki, Sophie Vigouroux, Henry Wong, Mark Guttman, Ali H. Rajput, Lee Ang, Marièle Briand, Stephen J. Kish, and Yves Briand. 2002. "Brain Proteasomal Function in Sporadic Parkinson's Disease and Related Disorders." *Annals of Neurology* 51 (6): 779–82. <https://doi.org/10.1002/ana.10207>.
- Gasser, Thomas. 2009. "Molecular Pathogenesis of Parkinson Disease: Insights from Genetic Studies." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 11 (July): e22. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001148>.
- Gassowska et al. 2014. "Extracellular α -Synuclein Leads to Microtubule Destabilization via GSK-3 β -Dependent Tau Phosphorylation in PC12 Cells. - PubMed - NCBI." 2014. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24722055>.
- Gautier, M., Thirant, C., Delattre, O., & Janoueix-Lerosey, I. 2021. "Plasticity in Neuroblastoma Cell Identity Defines a Noradrenergic-to-Mesenchymal Transition (NMT)". *Cancers*, 13(12), 2904. <https://doi.org/10.3390/cancers13122904>
- Gautier, Clement A., Tohru Kitada, and Jie Shen. 2008. "Loss of PINK1 Causes Mitochondrial Functional Defects and Increased Sensitivity to Oxidative Stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (32): 11364–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802076105>.
- Gehman, Lauren T., Pratap Meera, Peter Stoilov, Lily Shiue, Janelle E. O'Brien, Miriam H. Meisler, Manuel Ares, Thomas S. Otis, and Douglas L. Black. 2012. "The Splicing Regulator Rbfox2 Is Required for Both Cerebellar Development and Mature Motor Function." *Genes & Development* 26 (5): 445–60. <https://doi.org/10.1101/gad.182477.111>.
- Gehman, Lauren T., Peter Stoilov, Jamie Maguire, Andrey Damianov, Chia-Ho Lin, Lily Shiue, Manuel Ares, Istvan Mody, and Douglas L. Black. 2011. "The Splicing Regulator Rbfox1 (A2BP1) Controls Neuronal Excitation in the Mammalian Brain." *Nature Genetics* 43 (7): 706–11. <https://doi.org/10.1038/ng.841>.
- George, Julia M. 2002. "The Synucleins." *Genome Biology* 3 (1): reviews3002.1-reviews3002.6.
- Giasson, B. I., K. Uryu, J. Q. Trojanowski, and V. M. Lee. 1999. "Mutant and Wild Type Human Alpha-Synucleins Assemble into Elongated Filaments with Distinct Morphologies in Vitro." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (12): 7619–22.
- Gleghorn, Michael L., and Lynne E. Maquat. 2014. "'Black Sheep' That Don't Leave the Double-Stranded RNA-Binding Domain Fold." *Trends in Biochemical Sciences* 39 (7): 328–40. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.05.003>.

- Glickman, Michael H., and Aaron Ciechanover. 2002. "The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction." *Physiological Reviews* 82 (2): 373–428. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2001>.
- Goldberg, Alfred L. 2005. "Nobel Committee Tags Ubiquitin for Distinction." *Neuron* 45 (3): 339–44. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.019>.
- Gómez-Suaga, Patricia, Berta Luzón-Toro, Dev Churamani, Ling Zhang, Duncan Bloor-Young, Sandip Patel, Philip G. Woodman, Grant C. Churchill, and Sabine Hilfiker. 2012. "Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Regulates Autophagy through a Calcium-Dependent Pathway Involving NAADP." *Human Molecular Genetics* 21 (3): 511–25. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr481>.
- Good, P J. 1995. "A Conserved Family of Elav-like Genes in Vertebrates." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (10): 4557–61.
- Grant, Barth D., and Julie G. Donaldson. 2009. "Pathways and Mechanisms of Endocytic Recycling." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (9): 597–608. <https://doi.org/10.1038/nrm2755>.
- Groll, M., M. Bajorek, A. Köhler, L. Moroder, D. M. Rubin, R. Huber, M. H. Glickman, and D. Finley. 2000. "A Gated Channel into the Proteasome Core Particle." *Nature Structural Biology* 7 (11): 1062–67. <https://doi.org/10.1038/80992>.
- Grüter, P., C. Taberner, C. von Kobbe, C. Schmitt, C. Saavedra, A. Bachi, M. Wilm, B. K. Felber, and E. Izaurralde. 1998. "TAP, the Human Homolog of Mex67p, Mediates CTE-Dependent RNA Export from the Nucleus." *Molecular Cell* 1 (5): 649–59.
- Haas, A. L., and I. A. Rose. 1982. "The Mechanism of Ubiquitin Activating Enzyme. A Kinetic and Equilibrium Analysis." *The Journal of Biological Chemistry* 257 (17): 10329–37.
- Handley, P. M., M. Mueckler, N. R. Siegel, A. Ciechanover, and A. L. Schwartz. 1991. "Molecular Cloning, Sequence, and Tissue Distribution of the Human Ubiquitin-Activating Enzyme E1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (1): 258–62.
- Hrabos, D., Poggiolini, I., Civitelli, L., Galli, E., Esapa, C., Saarna, M., Lindholm, P., & Parkkinen, L. 2024. "Unfolded protein response markers Grp78 and eIF2alpha are upregulated with increasing alpha-synuclein levels in Lewy body disease." *Neuropathology and applied neurobiology*, 50(4), e12999. <https://doi.org/10.1111/nan.12999>

- Hinman, M. N., and H. Lou. 2008. "Diverse Molecular Functions of Hu Proteins." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 65 (20): 3168–81. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8252-6>.
- Igaz, Lionel M., Linda K. Kwong, Edward B. Lee, Alice Chen-Plotkin, Eric Swanson, Travis Unger, Joe Malunda, et al. 2011. "Dysregulation of the ALS-Associated Gene TDP43 Leads to Neuronal Death and Degeneration in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (2): 726–38. <https://doi.org/10.1172/JCI44867>.
- Ishigaki, Shinsuke, Akio Masuda, Yusuke Fujioka, Yohei Iguchi, Masahisa Katsuno, Akihide Shibata, Fumihiko Urano, Gen Sobue, and Kinji Ohno. 2012. "Position-Dependent FUS-RNA Interactions Regulate Alternative Splicing Events and Transcriptions." *Scientific Reports* 2: 529. <https://doi.org/10.1038/srep00529>.
- Ito, T., Wuerth, J. D., & Weber, F. 2023. "Protection of eIF2B from inhibitory phosphorylated eIF2: A viral strategy to maintain mRNA translation during the PKR-triggered integrated stress response." *The Journal of biological chemistry*, 299(11), 105287. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105287>
- Jankovic, J. 2008. "Parkinson's Disease: Clinical Features and Diagnosis." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 79 (4): 368–76. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>.
- Järvelin, Aino I., Marko Noerenberg, Ilan Davis, and Alfredo Castello. 2016. "The New (Dis)Order in RNA Regulation." *Cell Communication and Signaling: CCS* 14 (April): 9. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0132-3>.
- Jellinger, Kurt A. 2012. "Neuropathology of Sporadic Parkinson's Disease: Evaluation and Changes of Concepts." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 27 (1): 8–30. <https://doi.org/10.1002/mds.23795>.
- Jentsch, S. 1992. "The Ubiquitin-Conjugation System." *Annual Review of Genetics* 26: 179–207. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.26.120192.001143>.
- Ji, Zhe, Ju Youn Lee, Zhenhua Pan, Bingjun Jiang, and Bin Tian. 2009. "Progressive Lengthening of 3' Untranslated Regions of MRNAs by Alternative Polyadenylation during Mouse Embryonic Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (17): 7028–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900028106>.
- Jin, Yui, Hitoshi Suzuki, Shingo Maegawa, Hitoshi Endo, Sumio Sugano, Katsuyuki Hashimoto, Kunio Yasuda, and Kunio Inoue. 2003. "A Vertebrate RNA-Binding Protein Fox-1 Regulates Tissue-Specific Splicing via the Pentanucleotide GCAUG." *The EMBO Journal* 22 (4): 905–12. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg089>.

- Johnson, Jason M., John Castle, Philip Garrett-Engele, Zhengyan Kan, Patrick M. Loerch, Christopher D. Armour, Ralph Santos, Eric E. Schadt, Roland Stoughton, and Daniel D. Shoemaker. 2003. "Genome-Wide Survey of Human Alternative Pre-mRNA Splicing with Exon Junction Microarrays." *Science (New York, N.Y.)* 302 (5653): 2141–44. <https://doi.org/10.1126/science.1090100>.
- Jowaed, Ahmad, Ina Schmitt, Oliver Kaut, and Ullrich Wüllner. 2010. "Methylation Regulates Alpha-Synuclein Expression and Is Decreased in Parkinson's Disease Patients' Brains." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (18): 6355–59. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6119-09.2010>.
- Junn, Eunsung, Kang-Woo Lee, Byeong Seon Jeong, Teresa W. Chan, Joo-Young Im, and M. Maral Mouradian. 2009. "Repression of Alpha-Synuclein Expression and Toxicity by MicroRNA-7." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (31): 13052–57. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906277106>.
- Kahle, Philipp J. 2008. "Alpha-Synucleinopathy Models and Human Neuropathology: Similarities and Differences." *Acta Neuropathologica* 115 (1): 87–95. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0302-x>.
- Kaizuka, Takeshi, Hideaki Morishita, Yutaro Hama, Satoshi Tsukamoto, Takahide Matsui, Yuichiro Toyota, Akihiko Kodama, Tomoaki Ishihara, Tohru Mizushima, and Noboru Mizushima. 2016. "An Autophagic Flux Probe That Releases an Internal Control." *Molecular Cell* 64 (4): 835–49. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.037>.
- Kanki, Tomotake, Ke Wang, Yang Cao, Misuzu Baba, and Daniel J. Klionsky. 2009. "Atg32 Is a Mitochondrial Protein That Confers Selectivity during Mitophagy." *Developmental Cell* 17 (1): 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.014>.
- Kapeli, K., Martinez, F.J. & Yeo, G.W. 2017. "Genetic mutations in RNA-binding proteins and their roles in ALS." *Hum Genet* 136, 1193–1214. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1830-7>
- Kargbo R.B. Selective DYRK1A inhibitor for the treatment of neurodegenerative diseases: Alzheimer, Parkinson, Huntington, and Down Syndrome. *ACS Med. Chem. Lett.* 2020;11:1795–1796. doi: 10.1021/acsmchemlett.0c00346.
- Kawakami, A., Q. Tian, X. Duan, M. Streuli, S. F. Schlossman, and P. Anderson. 1992. "Identification and Functional Characterization of a TIA-1-Related Nucleolysin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (18): 8681–85.

- Keene, J. D. 1999. "Why Is Hu Where? Shuttling of Early-Response-Gene Messenger RNA Subsets." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1): 5–7.
- Kholodilov, Nikolai G., Michael Neystat, F. Oo Tinmarla, E. Lo Steven, Kristin E. Larsen, David Sulzer, and Robert E. Burke. 1999. "Increased Expression of Rat Synuclein in the Substantia Nigra Pars Compacta Identified by mRNA Differential Display in a Model of Developmental Target Injury." *Journal of Neurochemistry* 73 (6): 2586–99. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0732586.x>.
- Kim, Eun Joo, Jee Young Sung, Hyun Jung Lee, Hyewhon Rhim, Masato Hasegawa, Takeshi Iwatsubo, Do Sik Min, Jongsun Kim, Seung R. Paik, and Kwang Chul Chung. 2006. "Dyrk1A Phosphorylates α -Synuclein and Enhances Intracellular Inclusion Formation." *Journal of Biological Chemistry* 281 (44): 33250–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606147200>.
- Kim, Henry S., Stephen J. Headey, Yano M. K. Yoga, Martin J. Scanlon, Myriam Gorospe, Matthew C. J. Wilce, and Jacqueline A. Wilce. 2013. "Distinct Binding Properties of TIAR RRM5 and Linker Region." *RNA Biology* 10 (4): 579–89. <https://doi.org/10.4161/rna.24341>.
- Kimura, R. 2007. "The DYRK1A Gene, Encoded in Chromosome 21 Down Syndrome Critical Region, Bridges between Beta-Amyloid Production and Tau Phosphorylation in Alzheimer... - PubMed - NCBI." 2007. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17135279>.
- Kirkin, Vladimir, Trond Lamark, Yu-Shin Sou, Geir Bjørkøy, Jennifer L. Nunn, Jack-Ansgar Bruun, Elena Shvets, et al. 2009. "A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates." *Molecular Cell* 33 (4): 505–16. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.020>.
- Kisselev, A. F., T. N. Akopian, K. M. Woo, and A. L. Goldberg. 1999. "The Sizes of Peptides Generated from Protein by Mammalian 26 and 20 S Proteasomes. Implications for Understanding the Degradative Mechanism and Antigen Presentation." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (6): 3363–71.
- Kisselev, A. F., and A. L. Goldberg. 2001. "Proteasome Inhibitors: From Research Tools to Drug Candidates." *Chemistry & Biology* 8 (8): 739–58.
- Krüger, R., W. Kuhn, T. Müller, D. Woitalla, M. Graeber, S. Kösel, H. Przuntek, J. T. Epplen, L. Schöls, and O. Riess. 1998. "Ala30Pro Mutation in the Gene Encoding Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease." *Nature Genetics* 18 (2): 106–8. <https://doi.org/10.1038/ng0298-106>.

- Łabno, Anna, Rafał Tomecki, and Andrzej Dziembowski. 2016. "Cytoplasmic RNA Decay Pathways - Enzymes and Mechanisms." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1863 (12): 3125–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.023>.
- Lagier-Tourenne, Clotilde, Magdalini Polymenidou, Kasey R. Hutt, Anthony Q. Vu, Michael Baughn, Stephanie C. Huelga, Kevin M. Clutario, et al. 2012. "Divergent Roles of ALS-Linked Proteins FUS/TLS and TDP43 Intersect in Processing Long Pre-mRNAs." *Nature Neuroscience* 15 (11): 1488–97. <https://doi.org/10.1038/nn.3230>.
- Lal, Ashish, Krystyna Mazan-Mamczarz, Tomoko Kawai, Xiaoling Yang, Jennifer L. Martindale, and Myriam Gorospe. 2004. "Concurrent versus Individual Binding of HuR and AUF1 to Common Labile Target mRNAs." *The EMBO Journal* 23 (15): 3092–3102. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600305>.
- Lan, Ai-Ping, Jun Chen, Yuliang Zhao, Zhifang Chai, and Yi Hu. 2017. "mTOR Signaling in Parkinson's Disease." *Neuromolecular Medicine* 19 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12017-016-8417-7>.
- Lecker, Stewart H., Alfred L. Goldberg, and William E. Mitch. 2006. "Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States." *Journal of the American Society of Nephrology* 17 (7): 1807–19. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006010083>.
- Lee, He-Jin, Farnaz Khoshaghideh, Stephen Lee, and Seung-Jae Lee. 2006. "Impairment of Microtubule-Dependent Trafficking by Overexpression of Alpha-Synuclein." *The European Journal of Neuroscience* 24 (11): 3153–62. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05210.x>.
- Lee, Seung-Jae. 2008. "Origins and Effects of Extracellular α -Synuclein: Implications in Parkinson's Disease." *Journal of Molecular Neuroscience* 34 (1): 17–22. <https://doi.org/10.1007/s12031-007-0012-9>.
- Lepagnol-Bestel, A. M., Zvara, A., Maussion, G., Quignon, F., Ngimbous, B., Ramoz, N., Imbeaud, S., Loe-Mie, Y., Benihoud, K., Agier, N., Salin, P. A., Cardona, A., Khung-Savatovsky, S., Kallunki, P., Delabar, J. M., Puskas, L. G., Delacroix, H., Aggerbeck, L., Delezoide, A. L., Delattre, O., ... Simonneau, M. 2009. "DYRK1A interacts with the REST/NRSF-SWI/SNF chromatin remodelling complex to deregulate gene clusters involved in the neuronal phenotypic traits of Down syndrome." *Human molecular genetics*, 18(8), 1405–1414. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp047>
- Lerga, A., M. Hallier, L. Delva, C. Orvain, I. Gallais, J. Marie, and F. Moreau-Gachelin. 2001. "Identification of an RNA Binding Specificity for the Potential Splicing Factor TLS." *Nature* 411 (6840): 467–71. <https://doi.org/10.1038/35081a>.

- The Journal of Biological Chemistry 276 (9): 6807–16.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M008304200>.
- Lesage, Suzanne, Mathieu Anheim, Franck Letournel, Luc Bousset, Aurélie Honoré, Nelly Rozas, Laura Pieri, et al. 2013. “G51D α -Synuclein Mutation Causes a Novel Parkinsonian-Pyramidal Syndrome.” *Annals of Neurology* 73 (4): 459–71.
<https://doi.org/10.1002/ana.23894>.
- Li, Jie-Qiong, Lan Tan, and Jin-Tai Yu. 2014. “The Role of the LRRK2 Gene in Parkinsonism.” *Molecular Neurodegeneration* 9 (November). <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-47>.
- Li, Wen-wen, Jian Li, and Jin-ku Bao. 2012. “Microautophagy: Lesser-Known Self-Eating.” *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69 (7): 1125–36.
<https://doi.org/10.1007/s00018-011-0865-5>.
- Lim, Kah-Leong, and Cheng-Wu Zhang. 2013. “Molecular Events Underlying Parkinson’s Disease - an Interwoven Tapestry.” *Frontiers in Neurology* 4: 33.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00033>.
- Lipford, J. Russell, Geoffrey T. Smith, Yong Chi, and Raymond J. Deshaies. 2005. “A Putative Stimulatory Role for Activator Turnover in Gene Expression.” *Nature* 438 (7064): 113–16. <https://doi.org/10.1038/nature04098>.
- Liu, Chang-Wei, and Andrew D. Jacobson. 2013. “Functions of the 19S Complex in Proteasomal Degradation.” *Trends in Biochemical Sciences* 38 (2): 103–10.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.11.009>.
- Liu, Fei, and et al. 2008. “Overexpression of Dyrk1A Contributes to Neurofibrillary Degeneration in Down Syndrome.” 2008.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2518253/>.
- Liu, C., Zhang, Y., She, X., Fan, L., Li, P., Feng, J., Fu, H., Liu, Q., Liu, Q., Zhao, C., Sun, Y., & Wu, M. (2018). A cytoplasmic long noncoding RNA LINC00470 as a new AKT activator to mediate glioblastoma cell autophagy. *Journal of hematology & oncology*, 11(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0619-z>
- Mackenzie, Ian R., Alexandra M. Nicholson, Mohona Sarkar, James Messing, Maria D. Purice, Cyril Pottier, Kavya Annu, et al. 2017. “TIA1 Mutations in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Promote Phase Separation and Alter Stress Granule Dynamics.” *Neuron* 95 (4): 808-816.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.025>.
- MacLeod, David A., Herve Rhinn, Tomoki Kuwahara, Ari Zolin, Gilbert Di Paolo, Brian D. McCabe, Brian D. MacCabe, et al. 2013. “RAB7L1 Interacts with LRRK2 to Modify

- Intraneuronal Protein Sorting and Parkinson's Disease Risk." *Neuron* 77 (3): 425–39. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.11.033>.
- Malagelada, Cristina, Zong Hao Jin, and Lloyd A. Greene. 2008. "RTP801 Is Induced in Parkinson's Disease and Mediates Neuron Death by Inhibiting Akt Phosphorylation/Activation." *The Journal of Neuroscience* 28 (53): 14363–71. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3928-08.2008>.
- Maris, Christophe, Cyril Dominguez, and Frédéric H.-T. Allain. 2005. "The RNA Recognition Motif, a Plastic RNA-Binding Platform to Regulate Post-Transcriptional Gene Expression." *The FEBS Journal* 272 (9): 2118–31. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04653.x>.
- Maroteaux, L., J. T. Campanelli, and R. H. Scheller. 1988. "Synuclein: A Neuron-Specific Protein Localized to the Nucleus and Presynaptic Nerve Terminal." *Journal of Neuroscience* 8 (8): 2804–15. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-08-02804.1988>.
- Martina, Jose A., Yong Chen, Marjan Gucek, and Rosa Puertollano. 2012. "MTORC1 Functions as a Transcriptional Regulator of Autophagy by Preventing Nuclear Transport of TFEB." *Autophagy* 8 (6): 903–14. <https://doi.org/10.4161/auto.19653>.
- Masuda, Akio, Jun-ichi Takeda, Tatsuya Okuno, Takaaki Okamoto, Bisei Ohkawara, Mikako Ito, Shinsuke Ishigaki, Gen Sobue, and Kinji Ohno. 2015. "Position-Specific Binding of FUS to Nascent RNA Regulates mRNA Length." *Genes & Development* 29 (10): 1045–57. <https://doi.org/10.1101/gad.255737.114>.
- McDonald, Karli K., Anaïs Aulas, Laurie Destroismaisons, Sarah Pickles, Evghenia Beleac, William Camu, Guy A. Rouleau, and Christine Vande Velde. 2011. "TAR DNA-Binding Protein 43 (TDP43) Regulates Stress Granule Dynamics via Differential Regulation of G3BP and TIA-1." *Human Molecular Genetics* 20 (7): 1400–1410. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr021>.
- McLean, Jesse R., Penelope J. Hallett, Oliver Cooper, Michael Stanley, and Ole Isacson. 2012. "Transcript Expression Levels of Full-Length Alpha-Synuclein and Its Three Alternatively Spliced Variants in Parkinson's Disease Brain Regions and in a Transgenic Mouse Model of Alpha-Synuclein Overexpression." *Molecular and Cellular Neurosciences* 49 (2): 230–39. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.11.006>.
- McNaught, K. S., and P. Jenner. 2001. "Proteasomal Function Is Impaired in Substantia Nigra in Parkinson's Disease." *Neuroscience Letters* 297 (3): 191–94.

McNaught, Kevin St P., Roger Belizaire, Peter Jenner, C. Warren Olanow, and Ole Isacson. 2002. "Selective Loss of 20S Proteasome Alpha-Subunits in the Substantia Nigra Pars Compacta in Parkinson's Disease." *Neuroscience Letters* 326 (3): 155–58.

Meyer, Cindy, Aitor Garzia, Michael Mazzola, Stefanie Gerstberger, Henrik Molina, and Thomas Tuschl. 2018. "The TIA1 RNA-Binding Protein Family Regulates EIF2AK2-Mediated Stress Response and Cell Cycle Progression." *Molecular Cell* 69 (4): 622-635.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.011>.

Minvielle-Sebastia, L., and W. Keller. 1999. "MRNA Polyadenylation and Its Coupling to Other RNA Processing Reactions and to Transcription." *Current Opinion in Cell Biology* 11 (3): 352–57. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80049-0](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80049-0).

Morlando, Mariangela, Stefano Dini Modigliani, Giulia Torrelli, Alessandro Rosa, Valerio Di Carlo, Elisa Caffarelli, and Irene Bozzoni. 2012. "FUS Stimulates MicroRNA Biogenesis by Facilitating Co-Transcriptional Drosha Recruitment." *The EMBO Journal* 31 (24): 4502–10. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.319>.

Müller, Oliver, Tanja Sattler, Matthias Flötenmeyer, Heinz Schwarz, Helmut Plattner, and Andreas Mayer. 2000. "Autophagic Tubes." *The Journal of Cell Biology* 151 (3): 519–28.

Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, Oshiro N, Hara K, Edenhofer F, Kiyama H, Yonezawa K, Yamanaka S. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* 2004 24:6710-6718.

Muratani, Masafumi, and William P. Tansey. 2003. "How the Ubiquitin-Proteasome System Controls Transcription." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (3): 192–201. <https://doi.org/10.1038/nrm1049>.

Murphy et al. 2000. "Synucleins Are Developmentally Expressed, and α -Synuclein Regulates the Size of the Presynaptic Vesicular Pool in Primary Hippocampal Neurons | *Journal of Neuroscience*." 2000. <http://www.jneurosci.org/content/20/9/3214.long>.

Nakamura, Ken. 2013. " α -Synuclein and Mitochondria: Partners in Crime?" *Neurotherapeutics* 10 (3): 391–99. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0182-9>.

Narayanan, Ramesh K., Marie Mangelsdorf, Ajay Panwar, Tim J. Butler, Peter G. Noakes, and Robyn H. Wallace. 2013. "Identification of RNA Bound to the TDP43 Ribonucleoprotein Complex in the Adult Mouse Brain." *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration* 14 (4): 252–60. <https://doi.org/10.3109/21678421.2012.734520>.

Narayanan, Usha, Vijayalaxmi Nalavadi, Mika Nakamoto, George Thomas, Stephanie Ceman, Gary J. Bassell, and Stephen T. Warren. 2008. "S6K1 Phosphorylates and Regulates

Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) with the Neuronal Protein Synthesis-Dependent Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) Signaling Cascade.” *The Journal of Biological Chemistry* 283 (27): 18478–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800055200>.

Neumann, Manuela, Rosa Rademakers, Sigrun Roeber, Matt Baker, Hans A. Kretzschmar, and Ian R. A. Mackenzie. 2009. “A New Subtype of Frontotemporal Lobar Degeneration with FUS Pathology.” *Brain: A Journal of Neurology* 132 (Pt 11): 2922–31. <https://doi.org/10.1093/brain/awp214>.

Nguyen, Cuong D., Robyn E. Mansfield, Wilfred Leung, Paula M. Vaz, Fionna E. Loughlin, Richard P. Grant, and Joel P. Mackay. 2011. “Characterization of a Family of RanBP2-Type Zinc Fingers That Can Recognize Single-Stranded RNA.” *Journal of Molecular Biology* 407 (2): 273–83. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.12.041>.

Nicastro, Giuseppe, Ian A. Taylor, and Andres Ramos. 2015. “KH-RNA Interactions: Back in the Groove.” *Current Opinion in Structural Biology* 30 (February): 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.01.002>.

Nixon, Ralph A. 2013. “The Role of Autophagy in Neurodegenerative Disease.” *Nature Medicine* 19 (8): 983–97. <https://doi.org/10.1038/nm.3232>.

Novak, Ivana, Vladimir Kirkin, David G. McEwan, Ji Zhang, Philipp Wild, Alexis Rozenknop, Vladimir Rogov, et al. 2010. “Nix Is a Selective Autophagy Receptor for Mitochondrial Clearance.” *EMBO Reports* 11 (1): 45–51. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.256>.

Okano, H. J., and R. B. Darnell. 1997. “A Hierarchy of Hu RNA Binding Proteins in Developing and Adult Neurons.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (9): 3024–37.

Okano, Hideyuki, Hironori Kawahara, Masako Toriya, Keio Nakao, Shinsuke Shibata, and Takao Imai. 2005. “Function of RNA-Binding Protein Musashi-1 in Stem Cells.” *Experimental Cell Research* 306 (2): 349–56. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.02.021>.

Orenstein, Samantha J., Sheng-Han Kuo, Inmaculada Tasset, Esperanza Arias, Hiroshi Koga, Irene Fernandez-Carasa, Ety Cortes, et al. 2013. “Interplay of LRRK2 with Chaperone-Mediated Autophagy.” *Nature Neuroscience* 16 (4): 394–406. <https://doi.org/10.1038/nn.3350>.

Ou, S. H., F. Wu, D. Harrich, L. F. García-Martínez, and R. B. Gaynor. 1995. “Cloning and Characterization of a Novel Cellular Protein, TDP43, That Binds to Human Immunodeficiency Virus Type 1 TAR DNA Sequence Motifs.” *Journal of Virology* 69 (6): 3584–96.

- Pasanen, Petra, Liisa Myllykangas, Maija Siitonen, Anna Raunio, Seppo Kaakkola, Jukka Lyytinen, Pentti J. Tienari, Minna Pöyhönen, and Anders Paetau. 2014. "Novel α -Synuclein Mutation A53E Associated with Atypical Multiple System Atrophy and Parkinson's Disease-Type Pathology." *Neurobiology of Aging* 35 (9): 2180.e1-5. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.024>.
- Pascale, A., M. Amadio, and A. Quattrone. 2008. "Defining a Neuron: Neuronal ELAV Proteins." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 65 (1): 128–40. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7017-y>.
- Paschou, Maria, Maria D. Paraskevopoulou, Ioannis S. Vlachos, Pelagia Koukouraki, Artemis G. Hatzigeorgiou, and Epaminondas Doxakis. 2012. "MiRNA Regulons Associated with Synaptic Function." *PloS One* 7 (10): e46189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046189>.
- Plotegher, N., E. Gratton, and L. Bubacco. 2014. "Number and Brightness Analysis of Alpha-Synuclein Oligomerization and the Associated Mitochondrial Morphology Alterations in Live Cells." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1840 (6): 2014–24. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.013>.
- Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, et al. 1997. "Mutation in the Alpha-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease." *Science (New York, N.Y.)* 276 (5321): 2045–47.
- Prots, Iryna, Vanesa Veber, Stefanie Brey, Silvia Campioni, Katrin Buder, Roland Riek, Konrad J. Böhm, and Beate Winner. 2013. " α -Synuclein Oligomers Impair Neuronal Microtubule-Kinesin Interplay." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (30): 21742–54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.451815>.
- Protter, David S. W., and Roy Parker. 2016. "Principles and Properties of Stress Granules." *Trends in Cell Biology* 26 (9): 668–79. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.004>.
- Proukakis, Christos, Christopher G. Dudzik, Timothy Brier, Donna S. MacKay, J. Mark Cooper, Glenn L. Millhauser, Henry Houlden, and Anthony H. Schapira. 2013. "A Novel α -Synuclein Missense Mutation in Parkinson Disease." *Neurology* 80 (11): 1062–64. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828727ba>.
- Ravanidis, Stylianos, Fedon-Giasin Kattan, and Epaminondas Doxakis. 2018. "Unraveling the Pathways to Neuronal Homeostasis and Disease: Mechanistic Insights into the Role of RNA-Binding Proteins and Associated Factors." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (8). <https://doi.org/10.3390/ijms19082280>.

- Ratti, A., & Buratti, E. 2016. "Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins." *Journal of neurochemistry*, 138 Suppl 1, 95–111. <https://doi.org/10.1111/jnc.13625>
- Reits, Eric, Joost Neijssen, Carla Herberts, Willemien Benckhuijsen, Lennert Janssen, Jan Wouter Drijfhout, and Jacques Neefjes. 2004. "A Major Role for TPPII in Trimming Proteasomal Degradation Products for MHC Class I Antigen Presentation." *Immunity* 20 (4): 495–506.
- Rogelj, Boris, Laura E. Easton, Gireesh K. Bogu, Lawrence W. Stanton, Gregor Rot, Tomaž Curk, Blaž Zupan, et al. 2012. "Widespread Binding of FUS along Nascent RNA Regulates Alternative Splicing in the Brain." *Scientific Reports* 2: 603. <https://doi.org/10.1038/srep00603>.
- Sánchez-Jiménez, Carmen, and José M. Izquierdo. 2013. "T-Cell Intracellular Antigen (TIA)-Proteins Deficiency in Murine Embryonic Fibroblasts Alters Cell Cycle Progression and Induces Autophagy." *PloS One* 8 (9): e75127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075127>.
- Sarafian, Theodore A., Christopher M. Ryan, Puneet Souda, Eliezer Masliah, Upendra K. Kar, Harry V. Vinters, Gary W. Mathern, Kym F. Faull, Julian P. Whitelegge, and Joseph B. Watson. 2013. "Impairment of Mitochondria in Adult Mouse Brain Overexpressing Predominantly Full-Length, N-Terminally Acetylated Human α -Synuclein." *PloS One* 8 (5): e63557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063557>.
- Saric, Tomo, Claudia I. Graef, and Alfred L. Goldberg. 2004. "Pathway for Degradation of Peptides Generated by Proteasomes: A Key Role for Thimet Oligopeptidase and Other Metallopeptidases." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (45): 46723–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406537200>.
- Savitt, J.M., Valina L. Dawson, and Ted M. Dawson. 2006. "Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: Molecules to Medicine." 2006. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1483178/>.
- Scherzer, Clemens R., Jeffrey A. Grass, Zhixiang Liao, Imelda Pepivani, Bin Zheng, Aron C. Eklund, Paul A. Ney, et al. 2008. "GATA Transcription Factors Directly Regulate the Parkinson's Disease-Linked Gene Alpha-Synuclein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (31): 10907–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802437105>.
- Senties-Madrid, H., and F. Vega-Boada. 2001. "Paraneoplastic Syndromes Associated with Anti-Hu Antibodies." *The Israel Medical Association Journal: IMAJ* 3 (2): 94–103.

- Shen, Jiamei, Tingting Du, Xue Wang, Chunli Duan, Ge Gao, Jianliang Zhang, Lingling Lu, and Hui Yang. 2014. “ α -Synuclein Amino Terminus Regulates Mitochondrial Membrane Permeability.” *Brain Research* 1591 (December): 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.046>.
- Singleton, A. B., M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hulihan, et al. 2003. “Alpha-Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson’s Disease.” *Science (New York, N.Y.)* 302 (5646): 841. <https://doi.org/10.1126/science.1090278>.
- Soo, K. Y., J. Sultana, A. E. King, Rak Atkinson, S. T. Warraich, V. Sundaramoorthy, I. Blair, M. A. Farg, and J. D. Atkin. 2015. “ALS-Associated Mutant FUS Inhibits Macroautophagy Which Is Restored by Overexpression of Rab1.” *Cell Death Discovery* 1: 15030. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2015.30>.
- Sotiriou, Sotiria, Gretchen Gibney, Andreas D. Baxevanis, and Robert L. Nussbaum. 2009. “A Single Nucleotide Polymorphism in the 3’UTR of the SNCA Gene Encoding Alpha-Synuclein Is a New Potential Susceptibility Locus for Parkinson Disease.” *Neuroscience Letters* 461 (2): 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.034>.
- Spillantini, M. G., R. A. Crowther, R. Jakes, M. Hasegawa, and M. Goedert. 1998. “Alpha-Synuclein in Filamentous Inclusions of Lewy Bodies from Parkinson’s Disease and Dementia with Lewy Bodies.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (11): 6469–73.
- Stefanis, L., K. E. Larsen, H. J. Rideout, D. Sulzer, and L. A. Greene. 2001. “Expression of A53T Mutant but Not Wild-Type Alpha-Synuclein in PC12 Cells Induces Alterations of the Ubiquitin-Dependent Degradation System, Loss of Dopamine Release, and Autophagic Cell Death.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (24): 9549–60.
- Stefanis, Leonidas. 2012. “ α -Synuclein in Parkinson’s Disease.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (2): a009399. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>.
- Tan, Adelene Y., Todd R. Riley, Tristan Coady, Harmen J. Bussemaker, and James L. Manley. 2012. “TLS/FUS (Translocated in Liposarcoma/Fused in Sarcoma) Regulates Target Gene Transcription via Single-Stranded DNA Response Elements.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (16): 6030–35. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203028109>.
- Thayanidhi, Nandhakumar, Jared R. Helm, Deborah C. Nycz, Marvin Bentley, Yingjian Liang, and Jesse C. Hay. 2010. “Alpha-Synuclein Delays Endoplasmic Reticulum (ER)-to-

Golgi Transport in Mammalian Cells by Antagonizing ER/Golgi SNAREs.” *Molecular Biology of the Cell* 21 (11): 1850–63. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-09-0801>.

Thurston, Teresa L. M., Grigory Ryzhakov, Stuart Bloor, Natalia von Muhlinen, and Felix Randow. 2009. “The TBK1 Adaptor and Autophagy Receptor NDP52 Restricts the Proliferation of Ubiquitin-Coated Bacteria.” *Nature Immunology* 10 (11): 1215–21. <https://doi.org/10.1038/ni.1800>.

Tollervey, James R., Tomaž Curk, Boris Rogelj, Michael Briese, Matteo Cereda, Melis Kayikci, Julian König, et al. 2011. “Characterizing the RNA Targets and Position-Dependent Splicing Regulation by TDP43.” *Nature Neuroscience* 14 (4): 452–58. <https://doi.org/10.1038/nn.2778>.

Tong, Junchao, Henry Wong, Mark Guttman, Lee C. Ang, Lysia S. Forno, Mitsunobu Shimadzu, Ali H. Rajput, et al. 2010. “Brain Alpha-Synuclein Accumulation in Multiple System Atrophy, Parkinson’s Disease and Progressive Supranuclear Palsy: A Comparative Investigation.” *Brain: A Journal of Neurology* 133 (Pt 1): 172–88. <https://doi.org/10.1093/brain/awp282>.

Tsuchiya, Yoshiki, Hiroaki Taniguchi, Yoshiyuki Ito, Tomoko Morita, M. Rezaul Karim, Norihito Ohtake, Kousuke Fukagai, et al. 2013. “The Casein Kinase 2-Nrf1 Axis Controls the Clearance of Ubiquitinated Proteins by Regulating Proteasome Gene Expression.” *Molecular and Cellular Biology* 33 (17): 3461–72. <https://doi.org/10.1128/MCB.01271-12>.

Tsunemi, T., T. D. Ashe, B. E. Morrison, K. R. Soriano, J. Au, R. A. V. Roque, E. R. Lazarowski, V. A. Damian, E. Masliah, and A. R. La Spada. 2012. “PGC-1 Rescues Huntington’s Disease Proteotoxicity by Preventing Oxidative Stress and Promoting TFEB Function.” *Science Translational Medicine* 4 (142): 142ra97-142ra97. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003799>.

Vamvaca, Katherina, Michael J. Volles, and Peter T. Lansbury. 2009. “The First N-Terminal Amino Acids of α -Synuclein Are Essential for α -Helical Structure Formation In Vitro and Membrane Binding in Yeast.” *Journal of Molecular Biology* 389 (2): 413–24. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.021>.

Van Langenhove, T., J. van der Zee, K. Sleegers, S. Engelborghs, R. Vandenberghe, I. Gijselincx, M. Van den Broeck, et al. 2010. “Genetic Contribution of FUS to Frontotemporal Lobar Degeneration.” *Neurology* 74 (5): 366–71. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ccc732>.

Vanderweyde, Tara, Daniel J. Apicco, Katherine Youmans-Kidder, Peter E. A. Ash, Casey Cook, Edroaldo Lummertz da Rocha, Karen Jansen-West, et al. 2016. “Interaction of Tau

- with the RNA-Binding Protein TIA1 Regulates Tau Pathophysiology and Toxicity.” *Cell Reports* 15 (7): 1455–66. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.045>.
- Vekrellis, Kostas, and Leonidas Stefanis. 2012. “Targeting Intracellular and Extracellular Alpha-Synuclein as a Therapeutic Strategy in Parkinson’s Disease and Other Synucleinopathies.” *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 16 (4): 421–32. <https://doi.org/10.1517/14728222.2012.674111>.
- Venda, Lara Lourenço, Stephanie J. Cragg, Vladimir L. Buchman, and Richard Wade-Martins. 2010. “ α -Synuclein and Dopamine at the Crossroads of Parkinson’s Disease.” *Trends in Neurosciences* 33 (12): 559–68. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.09.004>.
- Villar-Piqué, Anna, Tomás Lopes da Fonseca, and Tiago Fleming Outeiro. 2016. “Structure, Function and Toxicity of Alpha-Synuclein: The Bermuda Triangle in Synucleinopathies.” *Journal of Neurochemistry* 139 (S1): 240–55. <https://doi.org/10.1111/jnc.13249>.
- Voges, D., P. Zwickl, and W. Baumeister. 1999. “The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed for Controlled Proteolysis.” *Annual Review of Biochemistry* 68: 1015–68. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.1015>.
- Vogiatzi, Tereza, Maria Xilouri, Kostas Vekrellis, and Leonidas Stefanis. 2008. “Wild Type Alpha-Synuclein Is Degraded by Chaperone-Mediated Autophagy and Macroautophagy in Neuronal Cells. - PubMed - NCBI.” 2008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18566453>.
- Voineagu, Irina, Xinchun Wang, Patrick Johnston, Jennifer K. Lowe, Yuan Tian, Steve Horvath, Jonathan Mill, Rita M. Cantor, Benjamin J. Blencowe, and Daniel H. Geschwind. 2011. “Transcriptomic Analysis of Autistic Brain Reveals Convergent Molecular Pathology.” *Nature* 474 (7351): 380–84. <https://doi.org/10.1038/nature10110>.
- Wang, I.-Fan, Lien-Szn Wu, Hsiang-Yu Chang, and C.-K. James Shen. 2008. “TDP43, the Signature Protein of FTL-D-U, Is a Neuronal Activity-Responsive Factor.” *Journal of Neurochemistry* 105 (3): 797–806. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05190.x>.
- Wang, Iren, Janosch Hennig, Pravin Kumar Ankush Jagtap, Miriam Sonntag, Juan Valcárcel, and Michael Sattler. 2014. “Structure, Dynamics and RNA Binding of the Multi-Domain Splicing Factor TIA-1.” *Nucleic Acids Research* 42 (9): 5949–66. <https://doi.org/10.1093/nar/gku193>.
- Wang, Wen-Yuan, Ling Pan, Susan C. Su, Emma J. Quinn, Megumi Sasaki, Jessica C. Jimenez, Ian R. A. Mackenzie, Eric J. Huang, and Li-Huei Tsai. 2013. “Interaction of FUS and HDAC1 Regulates DNA Damage Response and Repair in Neurons.” *Nature Neuroscience* 16 (10): 1383–91. <https://doi.org/10.1038/nn.3514>.

- Winslow, Ashley R., Chien-Wen Chen, Silvia Corrochano, Abraham Acevedo-Arozena, David E. Gordon, Andrew A. Peden, Maïke Lichtenberg, et al. 2010. “ α -Synuclein Impairs Macroautophagy: Implications for Parkinson’s Disease.” *The Journal of Cell Biology* 190 (6): 1023–37. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003122>.
- Winton, Matthew J., Lionel M. Igaz, Margaret M. Wong, Linda K. Kwong, John Q. Trojanowski, and Virginia M.-Y. Lee. 2008. “Disturbance of Nuclear and Cytoplasmic TAR DNA-Binding Protein (TDP43) Induces Disease-like Redistribution, Sequestration, and Aggregate Formation.” *The Journal of Biological Chemistry* 283 (19): 13302–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800342200>.
- Wiseman, Frances K., and et al. 2015. “A Genetic Cause of Alzheimer Disease: Mechanistic Insights from Down Syndrome.” 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4678594/>.
- Wlodarchak, N., & Xing, Y. 2016. “PP2A as a master regulator of the cell cycle.” *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 51(3), 162–184. <https://doi.org/10.3109/10409238.2016.1143913>
- Xie, Weilin, and Kenny K. K. Chung. 2012. “Alpha-Synuclein Impairs Normal Dynamics of Mitochondria in Cell and Animal Models of Parkinson’s Disease: Alpha-Syn Impairs Mitochondrial Dynamics in PD.” *Journal of Neurochemistry* 122 (2): 404–14. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07769.x>.
- Xilouri, Maria, Oeystein Roed Brekk, and Leonidas Stefanis. 2016. “Autophagy and Alpha-Synuclein: Relevance to Parkinson’s Disease and Related Synucleopathies.” *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 31 (2): 178–92. <https://doi.org/10.1002/mds.26477>.
- Xilouri, Maria, Tereza Vogiatzi, Kostas Vekrellis, David Park, and Leonidas Stefanis. 2009. “Abberant Alpha-Synuclein Confers Toxicity to Neurons in Part through Inhibition of Chaperone-Mediated Autophagy.” *PloS One* 4 (5): e5515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005515>.
- Xilouri, Maria, Tereza Vogiatzi, Kostas Vekrellis, and Leonidas Stefanis. 2008. “Alpha-Synuclein Degradation by Autophagic Pathways: A Potential Key to Parkinson’s Disease Pathogenesis.” *Autophagy* 4 (7): 917–19.
- Yang, Qian, Hua She, Marla Gearing, Emanuela Colla, Michael Lee, John J. Shacka, and Zixu Mao. 2009. “Regulation of Neuronal Survival Factor MEF2D by Chaperone-Mediated Autophagy.” *Science (New York, N.Y.)* 323 (5910): 124–27. <https://doi.org/10.1126/science.1166088>.

- Yeo, Gene W., Nicole G. Coufal, Tiffany Y. Liang, Grace E. Peng, Xiang-Dong Fu, and Fred H. Gage. 2009. "An RNA Code for the FOX2 Splicing Regulator Revealed by Mapping RNA-Protein Interactions in Stem Cells." *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (2): 130–37. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1545>.
- Yong, Y., Wu, Q., Meng, X., Lu, R., Xia, H., Pei, F., & Yang, X. 2023. "Dyrk1a Phosphorylation of α -Synuclein Mediating Apoptosis of Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease." *Parkinson's disease*, 2023, 8848642. <https://doi.org/10.1155/2023/8848642>
- Yorimitsu, T., & Klionsky, D. J. 2005. "Autophagy: molecular machinery for self-eating." *Cell death and differentiation*, 12 Suppl 2(Suppl 2), 1542–1552. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401765>
- Yoshimura, Atsushi, Ritsuko Fujii, Yasuhito Watanabe, Shigeo Okabe, Kenji Fukui, and Toru Takumi. 2006. "Myosin-Va Facilitates the Accumulation of mRNA/Protein Complex in Dendritic Spines." *Current Biology: CB* 16 (23): 2345–51. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.024>.
- Yu, Yong, and Robin Reed. 2015. "FUS Functions in Coupling Transcription to Splicing by Mediating an Interaction between RNAP II and U1 SnRNP." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (28): 8608–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506282112>.
- Zarranz, Juan J., Javier Alegre, Juan C. Gómez-Esteban, Elena Lezcano, Raquel Ros, Israel Ampuero, Lídice Vidal, et al. 2004. "The New Mutation, E46K, of Alpha-Synuclein Causes Parkinson and Lewy Body Dementia." *Annals of Neurology* 55 (2): 164–73. <https://doi.org/10.1002/ana.10795>.
- Zhang, Chaolin, Zuo Zhang, John Castle, Shuying Sun, Jason Johnson, Adrian R. Krainer, and Michael Q. Zhang. 2008. "Defining the Regulatory Network of the Tissue-Specific Splicing Factors Fox-1 and Fox-2." *Genes & Development* 22 (18): 2550–63. <https://doi.org/10.1101/gad.1703108>.
- Zhang, Wei, Tongguang Wang, Zhong Pei, David S. Miller, Xuefei Wu, Michelle L. Block, Belinda Wilson, et al. 2005. "Aggregated Alpha-Synuclein Activates Microglia: A Process Leading to Disease Progression in Parkinson's Disease." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (6): 533–42. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2751com>.

Zhifen, Yang, and Daniel J. Klionsky. 2009. "Mammalian Autophagy: Core Molecular Machinery and Signaling Regulation." 2009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2854249/>.

Zhou, HuaLin, Marie Mangelsdorf, JiangHong Liu, Li Zhu, and Jane Y. Wu. 2014. "RNA-Binding Proteins in Neurological Diseases." *Science China. Life Sciences* 57 (4): 432–44. <https://doi.org/10.1007/s11427-014-4647-9>.