



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου

**Επίδραση της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης στην
ομοιόσταση των νευρικών κυττάρων -
Συσχέτιση με τη νόσο του Parkinson**

Διδακτορική Διατριβή
Αικατερίνης Χ. Μελαχροινού
Βιολόγου

Αθήνα 2013



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



NATIONAL & KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY
Department of Animal & Human Physiology

*Effects of secreted α -synuclein on neuronal
homeostasis –
Correlation with Parkinson's Disease*

Doctorate (*Ph.D.*) Thesis

Aikaterini C. Melachroinou

Biologist

Athens 2013



European Union
European Social Fund



OPERATIONAL PROGRAMME
EDUCATION AND LIFELONG LEARNING
investing in knowledge society
MINISTRY OF EDUCATION & RELIGIOUS AFFAIRS, CULTURE & SPORTS
MANAGING AUTHORITY



NSRF
2007-2013
programme for development
EUROPEAN SOCIAL FUND

Co- financed by Greece and the European Union

Επιβλέπων Καθηγητής

Ευθυμίουπουλος Σπυρίδων

Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ευθυμίουπουλος Σπυρίδων

Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Παπαζαφείρη Παναγιώτα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Στεφανής Λεωνίδα

Καθηγητής, Τομέας Κοινωνικής Ιατρικής, Ψυχιατρικής - Νευρολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Βασιλακοπούλου Διδώ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Βιοχημείας Ευκαρυωτικών Οργανισμών, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Βεκρέλλης Κωνσταντίνος
(Επιστημονικός Επιβλέπων)

Ερευνητής Γ', Τομέας Βασικών Νευροεπιστημών, Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.

Ευθυμίουπουλος Σπυρίδων

Καθηγητής, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Μάτσα Ρεβέκκα

Διευθύντρια ερευνών, Υπεύθυνη του Εργαστηρίου Κυτταρικής & Μοριακής Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Παπαζαφείρη Παναγιώτα

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Στεφανής Λεωνίδα

Καθηγητής, Τομέας Κοινωνικής Ιατρικής, Ψυχιατρικής - Νευρολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Στραβοπόδης Δημήτριος

Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Ανάπτυξης, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής, από το Τμήμα Βιολογίας, της Σχολής Θετικών Επιστημών (ΣΘΕ), του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα. (N. 5343/1932 άρθρο 202)

Στην οικογένειά μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Βασικών Νευροεπιστημών του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.), κατά το διάστημα 2008-2013. Ο κ. **Κωνσταντίνος Βεκρέλλης**, Ερευνητής Γ' του Τομέα Βασικών Νευροεπιστημών του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. είχε αναλάβει την επιστημονική επίβλεψη της διατριβής. Τον ευχαριστώ θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος της επιστημονικής του ομάδας, για την καθοδήγηση, τις πολύτιμες συμβουλές του, αλλά και την εμπιστοσύνη, την οποία μου έδειξε. Τον ευχαριστώ για την άψογη συνεργασία, την ηθική και ψυχολογική ενθάρρυνση σε δύσκολες «επιστημονικά» στιγμές. Κυρίως, όμως, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω σε προσωπικό επίπεδο για τη συμπαράστασή του, στις δυσκολίες, που αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της ζωής κάθε ανθρώπου, κατά τις οποίες με υπομονή και κατανόηση μου άφησε χρόνο προσαρμογής.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή της Διδακτορικής Διατριβής, τον κ. **Σπυρίδωνα Ευθυμιόπουλο**, Καθηγητή του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Αθηνών, για τις πολύτιμες παρατηρήσεις και συμβουλές του. Στο εργαστήριο του κ. **Ευθυμιόπουλου** είχα την πρώτη επαφή με τη **Βασική Έρευνα**, στα πλαίσια της προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας. Τέλος, τον ευχαριστώ για την ευκαιρία που μου έδωσε το έτος 2006, να συνεργαστώ με τον κ. **Ευθύμιο Σκουλάκη**, Ερευνητή του Ινστιτούτου Κυτταρικής & Αναπτυξιακής βιολογίας, στο ερευνητικό κέντρο «Αλέξανδρος Φλέμιγκ». Οι γνώσεις που απέκτησα εκεί αποτέλεσαν σημαντική βάση για τη μετέπειτα επιστημονική μου πορεία.

Ευχαριστώ, θερμά την κ. **Παναγιώτα Παπαζαφείρη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια στον Τομέα Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Αθηνών, για την πολύτιμη βοήθεια, τη συμπαράσταση, καθώς και την επιστημονική της καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια της Διδακτορικής Διατριβής. Θα ήθελα, όμως, να την ευχαριστήσω ιδιαίτερα, γιατί γνώρισα έναν υπέροχο άνθρωπο, ο οποίος στάθηκε δίπλα μου, με υπομονή και κατανόηση, σε εξαιρετικά κριτικές στιγμές για την πορεία της παρούσας έρευνας. Η παρουσία της συνέβαλε καθοριστικά σε κάθε επίπεδο.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. **Λεωνίδα Στεφανή**, Καθηγητή του Τομέα Κοινωνικής Ιατρικής, Ψυχιατρικής – Νευρολογίας της

Ιατρικής Σχολής Αθηνών, για την ουσιαστική συμμετοχή του, ως μέλος της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής. Οι εποικοδομητικές συμβουλές, οι παρατηρήσεις και οι προτάσεις του συνέβαλαν καθοριστικά στη διαμόρφωση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή, του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. **Δημήτριο Στραβοπόδη**, τόσο για τη συμμετοχή του στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή, όσο και για το ενδιαφέρον που έδειξε από τα πρώτα χρόνια της φοίτησης μου στο Τμήμα της Βιολογίας. Συνέβαλε σημαντικά στη διεύρυνση των γνώσεών μου και ενίσχυσε την απόφασή μου να συνεχίσω στον τομέα της έρευνας, ιδιαίτερα, επιτρέποντάς μου, το έτος 2007, να παρακολουθήσω εθελοντικά μοριακές τεχνικές, στο εργαστήριό του, σε συνεργασία με τον Δρ. **Γ. Βουτσινά**, στο Ερευνητικό Κέντρο Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος».

Επιπλέον, ευχαριστώ ιδιαίτερα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τομέα Βιοχημείας Ευκαρυωτικών Οργανισμών του Τμήματος Βιολογίας, κ. **Διδώ Βασιλακοπούλου**, καθώς και τη Διευθύντρια ερευνών, Υπεύθυνη του Εργαστηρίου Κυτταρικής & Μοριακής Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, κ. **Ρεβέκκα Μάτσα**, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή της Διδακτορικής Διατριβής και την κατανόηση που έδειξαν σε μια ιδιαίτερα ταραχώδη περίοδο που επικρατεί στο Πανεπιστήμιο.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Υπεύθυνο της Μονάδας Μικροσκοπίας του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α. κ. **Παγκάκη Σταμάτη** για την πολύτιμη βοήθειά του, καθώς τους συνεργάτες μας κ. **Λουκά Μαργαρίτη**, Καθηγητή Κυτταρικής Βιολογίας, Κυτταρικής Διαφοροποίησης, Ραδιοβιολογίας και Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, την κ. **Χρόνη Αγγελική**, Ερευνήτρια Β' του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών & Εφαρμογών του Ερευνητικού Κέντρου «Δημόκριτος», και την κ. **Roser Masgrau**, Ερευνήτρια Α' του Ινστιτούτου Νευροεπιστημών του Πανεπιστημίου της Βαρκελώνης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. **Μαρία Τσαχάκη**, στην οποία οφείλω μεγάλο μέρος των όσων έχω καταφέρει, από την πρώτη μου επαφή με τον εργαστηριακό πάγκο, μέχρι σήμερα. Η Μαρία ήταν εκείνη που με υπομονή, επιμονή, αγάπη για την έρευνα και πάντα θετική διάθεση, με καθοδήγησε, με συμβούλεψε και με ενθάρρυνε, στα πρώτα μου ερευνητικά βήματα, κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου

εργασίας. Κυρίως, την ευχαριστώ για τη φιλία της, που διατηρείται ύστερα από τόσα χρόνια, παρά τη χιλιομετρική απόσταση που μας χωρίζει, καθώς συνεχίζει την επιστημονική της καριέρα στο εξωτερικό.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη φίλη μου και συνάδελφο Δρ. **Μαρία Ξυλούρη**, η οποία υπήρξε ο «φύλακας άγγελος» σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής και ισχυρός κυματοθραύστης στις πιο κρίσιμες στιγμές της παρουσίας μου στο εργαστήριο. Η επιστημονική της βοήθεια υπήρξε εξαιρετικά σημαντική. Ευχαριστώ, τον Δρ. **Lee Clough**, πάνω από όλα για τη φιλία του και τις πολύτιμες συμβουλές του σε όλα τα επίπεδα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. **Ευαγγελία Εμμανουηλίδου**, για την άψογη συνεργασία την οποία είχαμε και για την άμεση βοήθειά της, σε επαγγελματικό και φιλικό επίπεδο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. **Ματίνα Μανιάτη**, για τη σημαντική υποστήριξή της, όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. **Hardy Rideout**, για την επιστημονική του βοήθεια, την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω ανθρώπους με τους οποίους μοιράζομαι τις ίδιες ανησυχίες, του ίδιους φόβους, αλλά και την ίδια αγάπη για την έρευνα, την Δρ. **Όλγα Μαυροφρύδη** και την Υποψήφια Διδάκτορα κ. **Γεωργία Ντερμεντζάκη**, η στήριξη και η ενθάρρυνση των οποίων υπήρξε εξαιρετικά σημαντική. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά τους Υποψήφιους Διδάκτορες, κ. **Αδαμαντία Καραμπέτσου**, κ. **Μεθόδιο Ξημεράκη**, κ. **Γιοβάννα Αριάνογλου**, κ. **Κεραμιώτη Μαρία** και κ. **Βάσια Συκιώτη**, από το εργαστήριο του κ. **Κωνσταντίνου Βεκρέλλη**, καθώς και την κ. **Αλεξία Πολυσίδη**, τον κ. **Νίκο Παπαγιαννάκη** και κ. **Oystein Brekk** του εργαστηρίου του κ. **Λεωνίδα Στεφανή**, με τους οποίους συνεργαστήκαμε άψογα και οι οποίοι έκαναν ευχάριστη την καθημερινότητα στο εργαστήριο.

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ), **Ηράκλειτος II**, Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου. Η προσωπική μου οικονομική ενίσχυση, μέσω του παραπάνω προγράμματος, κατά το χρονικό διάστημα 2010-2013, υπήρξε καθοριστική, για την περάτωση της Διδακτορικής Διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ, στους φίλους μου, που βρίσκονται πάντα δίπλα μου και στηρίζουν την κάθε προσπάθειά μου. Τους ευχαριστώ για την κατανόηση που έδειξαν τα τελευταία χρόνια, τόσο στις διαρκείς απουσίες μου, όσο και στη μόνιμα

αγχωμένη συμπεριφορά μου. Η παρουσία τους στη ζωή μου συνέβαλε στην αποφόρτιση της πίεσης και της έντασης της καθημερινότητας.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την κινητήριο δύναμη σε ό,τι έχω κάνει μέχρι τώρα, την οικογένειά μου, που υπέμεινε το άγχος, τη νευρικότητα και την ένταση όλων αυτών των χρόνων. Ευχαριστώ τη μητέρα μου, που στέκεται πάντα βράχος δίπλα μου, στηρίζοντας τις επιλογές μου, με κάθε τρόπο και τον πατέρα μου, την παρουσία του οποίου νιώθω σε ό,τι και αν κάνω. Τους ευχαριστώ που με βοήθησαν να πραγματοποιήσω το πρώτο μου μεγάλο όνειρο.

Μελαχροινού Αικατερίνη
Οκτώβριος 2013

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ABC: ATP-binding cassette

AD: νόσος του Alzheimer, (Alzheimer's disease)

ALS: αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση, (amyotrophic lateral sclerosis)

AMPA: υποδοχέας του AMPA, (AMPA receptor)

ANT: μεταφορέας νουκλεοτιδίων αδενίνης, (adenine nucleotide translocator)

APCs: αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, (antigen-presenting cells)

APS: υπερθειικό αμμώνιο, (ammonium persulfate)

ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη, (Adenosine-5'-triphosphate)

ΑΣΥΝ: α-συνουκλεΐνη

BDNF: προερχόμενος από τον εγκέφαλο νευροτροφικός παράγοντας, (Brain-derived neurotrophic factor)

bGAL+dox: κύτταρα μάρτυρες, που εκφράζουν ενδογενή επίπεδα της φυσικού τύπου α-συνουκλεΐνης και στα οποία το διαγονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης είναι απενεργοποιημένο, παρουσία δοξυκυκλίνης

bGAL-dox: κύτταρα μάρτυρες, που εκφράζουν ενδογενή επίπεδα της φυσικού τύπου α-συνουκλεΐνης και υπερεκφράζουν τη β-γαλακτοσιδάσης, απουσία δοξυκυκλίνης

BSA: αλβουμίνη ορού βοός, (Serum albumin, bovine)

Ca²⁺: ιόντα ασβεστίου

[Ca²⁺]_i: συγκέντρωση ελεύθερων ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα

CaBPs: πρωτεΐνες που δεσμεύουν ιόντα Ca²⁺, (Ca²⁺-binding proteins)

Cch: Καρβαχόλη, (Carbachol)

CCE: εισροή Ca²⁺ λόγω χωρητικότητας, (Capacitative Ca²⁺ entry)

CMA: αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από πρωτεΐνες συνοδούς, (Chaperone-mediated autophagy)

CI: Αναστολέας καλπαϊνών, (Calpain inhibitor)

CM: κυτταρικό μέσο καλλιέργειας, (conditioned medium)

CM, WT+: θρεπτικό μέσο από κύτταρα WT+dox

CM, WT-: θρεπτικό μέσο από κύτταρα WT-dox

CM, bGAL+: θρεπτικό μέσο από κύτταρα bGAL+dox

CM, bGAL-: θρεπτικό μέσο από κύτταρα bGAL-dox

CM, WT- / Syn-1 IP: θρεπτικό μέσο από κύτταρα WT-dox, κατόπιν επεξεργασίας με το αντίσωμα Syn-1

CM,WT-/ c-myc IP: θρεπτικό μέσο από κύτταρα WT-dox, κατόπιν επεξεργασίας με το αντίσωμα το c-myc

CM, UCHL-1: θρεπτικό μέσο από διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα, επιμολυσμένα με αδενοϊό που επάγει την υπερέκφραση της UCHL-1 πρωτεΐνης

CM, EGFP: θρεπτικό μέσο από διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα, επιμολυσμένα με αδενοϊό που επάγει την υπερέκφραση της EGFP πρωτεΐνης

cyt c: το κυτόχρωμα c, (cytochrome c)

DMSO: διμεθυλο-σουλφοξείδιο, (dimethyl sulfoxide)

dox: Δοξυκυκλίνη, (Doxycycline)

DTPA: διαιθυλενο-τριαμινο-πεντοξικό οξύ, (diethylene-triamino-pentaacetic acid)

DTT: διθειοθρεϊτόλη, (dithiothreitol)

E.Δ.: Eνδοπlασmαtικό Δίκtυo

ECL: ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, (Enhanced Chemilluminescence)

EN.Y: εγκεφαλονωτιαίο υγρό

EthD-1: Διμερές του αιθιδίου, (Ethidium Homodimer)

EtBr: βρωμιούχο αιθίδιο, (Ethidium bromide)

FBS: Ορός εμβρύου μόσχου, (Fetal Bovine Serum)

FCCP: Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxy-phenylhydrazone

GBA: β-γλυκοσερεβροσιδάση, (β-glucocerebrosidase)

GDNF: νευροτροφικός παράγοντας που προέρχεται από γλοιακά κύτταρα, (glial-cell-line-derived neurotrophic factor)

GPCR: υποδοχέας συζευγμένος με G πρωτεΐνες, (G-protein-coupled receptor)

GWAS: μελέτες συσχέτισης ολικού γονιδιώματος, (Genome Wide Association Studies)

HBSS: ισορροπημένο Hank's διάλυμα αλάτων, (Hank's balanced salt solution)

Hepes: 4-(2-υδροξυ-αιθυλο)-1-πιπεραζινο-αιθανο-θειϊκό οξύ, (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

HD: νόσος του Huntington, (Huntington's disease)

HLA: αντιγόνο λευκοκυττάρων ανθρώπου, (human leukocyte antigen)

HMW: υψηλό μοριακό βάρος, (High Molecular Weight)

HRP: υπεροξειδάση της αγριοραφανίδας, (Horseradish Peroxidase)

IL1β: ιντερλευκίνη-1β, (interleukin-1β)

IL6: ιντερλευκίνη-6, (interleukin-6)

iNOS: συνθετάση του νιτρικού οξέος, (inducible nitric oxide synthase)

- ILVs:** κυστίδια του αυλού των MVBs, (intraluminal vesicles)
- Iono:** Ιονομυκίνη, (Ionomycin)
- IP₃:** 1,4,5-τριφωφορική ινοσιτόλη, (inositol 1,4,5-triphosphate)
- IP₃R:** υποδοχέας της IP₃ (IP3 receptor)
- ΚΝΣ:** Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
- KRH:** Krebs-Ringer-Hepes
- LB:** σωματίδια Lewy, (Lewy bodies)
- LMW:** χαμηλό μοριακό βάρος, (Low Molecular Weight)
- LN:** νευρίτες Lewy, (Lewy neurites)
- LRRK2:** leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2
- MAPK:** επαγόμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση, (mitogen-activated protein kinase)
- Mon:** Μονενσίνη, (Monensin)
- MPTP:** 1-μεθυλο-4-φαινυλο-1,2,3,6,-τετραϋδροπυριδίνη, (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)
- MSA:** ατροφία πολλαπλών συστημάτων, (Multiple System Atrophy)
- MVBs:** πολυκυστιδιακά σωματίδια, (multivesicular bodies)
- NACP:** μη-Αβ αμυλοειδές συστατικό των πλακών της νόσου του Alzheimer, (non Aβ-component of plaque of Alzheimer's disease)
- NGS:** ορός αίγας, (normal goat serum)
- Nif:** Νιφεδιπίνη, (Nifedipine)
- NMDAR:** υποδοχέας του NMDA, (NMDA receptor)
- NMS:** μη κινητικές διαταραχές, (non-motor symptoms)
- Oligo:** ολιγομυκίνη, (Oligomycin)
- PARK2:** parkin
- PBS:** διάλυμα φωσφορικών αλάτων, (phosphate buffered saline)
- PD:** νόσος του Parkinson, (Parkinson's disease)
- PDGF:** νευροτροφικός παράγοντας αιμοπεταλιών, (Platelet-Derived Growth Factor)
- PFA:** παραφορμαλδεϋδη, (paraformaldehyde)
- PI₃K:** κινάση της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης, (phosphatidylinositol-3 kinase)
- PINK1:** PTEN-induced kinase protein 1
- PIP₂:** 4,5-διφωφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη, (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate)

- PIP₃**: 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη, (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate)
- IP₂**: 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη, (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate)
- PKB/Akt**: πρωτεϊνική κινάση B/Akt, (protein kinase B/Akt)
- PKC**: πρωτεϊνική κινάση, C (protein kinase C)
- PLC**: φωσφολιπάση C, (phospholipase C)
- PMCA**: ATPάση Ca²⁺ της πλασματικής μεμβράνης, (plasma membrane Ca²⁺ATPase)
- PrP**: πρωτεΐνη prion, (Prion protein)
- R.A.**: all-trans ρετινοϊκό οξύ, (all-trans retinoic acid)
- RIPA Buffer**: διάλυμα ραδιοανοσοκατακρήμνισης, (Radioimmunoprecipitation Buffer)
- ROI**: περιοχής ενδιαφέροντος (region of interest)
- ROS**: ενεργές μορφές οξυγόνου, (reactive oxygen species)
- RT**: θερμοκρασία δωματίου, (room temperature)
- RTK**: υποδοχέας με δράση κινάσης τυροσίνης, (receptor tyrosine kinase)
- RyR**: υποδοχέας ρυανοδίνης (ryanodine receptor)
- SDS**: δωδεκυλο-θειικό νάτριο, (sodium-dodecyl-sulphate)
- SD**: τυπική απόκλιση, (standard deviation)
- SEC**: χρωματογραφία διήθησης πηκτής, (size exclusion chromatography)
- SERCA**: σαρκο-/ενδο-πλασματική ATPάση Ca²⁺, (sarco-/endo-plasmatic ATPase Ca²⁺, (sarco-/endo-plasmatic reticulum Ca²⁺ ATPase)
- SKF**: SKF 96365 hydrochloride
- SNCA**: γονίδιο α-συνουκλεΐνης, (α-synuclein gene)
- SNpc**: συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας, (Substantia nigra pars compacta)
- SNPs**: γονιδιακοί πολυμορφισμοί, (Single-nucleotide polymorphism)
- SOC**: κανάλι που ελέγχεται από την πληρότητα των αποθηκών, (store-operated channel)
- TEMED**: τετραμεθυλ-μεθυλ-αιθυλενο-διαμίνη, (tetramethyl-ethylene-diamine)
- Tg**: Θαψιγκαργκίνη, (Thapsigargin)
- TH**: υδροξυλάσης της τυροσίνης, (Tyrosine Hydroxylase)
- TLR2**: υποδοχέας 2 που προσομοιάζει τον υποδοχέα Toll, (Toll-like receptor 2)
- TNF-a**: παράγοντας νέκρωσης α, (tumor necrosis factor-a)

UCHL1: ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1

UPS: σύστημα αποδόμησης ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος, (Ubiquitin-proteasome system)

UV: υπεριώδης, (ultra violet)

VOC: τασεο-ελεγχόμενος διάυλος, (voltage-operated channel)

v/v: συγκέντρωση κατ' όγκον, (ml διαλυμένης ουσίας ανά 100 ml διαλύτη)

WT+dox: κύτταρα μάρτυρες, που εκφράζουν ενδογενή επίπεδα της φυσικού τύπου α-συνουκλείνης, παρουσία δοξυκυκλίνης

WT-dox: κύτταρα που υπερεκφράζουν τη φυσικού τύπου α-συνουκλείνης, απουσία δοξυκυκλίνης

w/v: συγκέντρωση κατά βάρος, (g διαλυμένης ουσίας ανά 100 ml διαλύτη)

ω-cntx: ω-κονοτοξίνη GVIA, (ω-conotoxin GVIA)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1. Η Νόσος του Parkinson	9
1.1. Κλινικά συμπτώματα	9
1.2. Παθολογοανατομικές αλλοιώσεις	11
1.3. Αίτια και παράγοντες κινδύνου	14
1.3.1. Γενετικές μορφές της νόσου του Parkinson	14
1.3.2. Περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου	17
1.4. Μηχανισμοί νευροεκφύλισης στη νόσο του Parkinson	19
2. Κυτταρική Βιολογία και Βιοχημεία της α-Συνουκλεΐνης	23
2.1. Δομή και εντοπισμός της α-συνουκλεΐνης	23
2.2. Ο φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης	30
2.3. Ο παθολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης	32
2.3.1. Συσχέτιση με τη νόσο του Parkinson	32
2.3.2. Ο ρόλος της α-συνουκλεΐνης στην παθογένεια της νόσου του Parkinson ...	37
2.3.3. Τοξικές μορφές της α-συνουκλεΐνης	39
3. Η Έκκριση της α-Συνουκλεΐνης	44
3.1. Κλασσικά και μη κλασσικά μονοπάτια έκκρισης πρωτεϊνών	44
3.2. Εξωσώματα: Βιογένεση και φυσιολογικός ρόλος	47
3.3. Η έκκριση της α-συνουκλεΐνης	50
3.4. Παρακρινείς δράσεις της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης .	53
3.5. Η εξάπλωση της α-συνουκλεΐνης	56
4. Επίδραση της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης και την ομοιόσταση των ιόντων ...	60

Ca²⁺	
4.1. Επίδραση της α-συνουκλεΐνης στην ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων 60
4.1.1. Αλληλεπίδραση της α-συνουκλεΐνης με λιπιδικές μεμβράνες 60
4.1.2. Μοντέλα σχηματισμού μεμβρανικών πόρων α-συνουκλεΐνης 61
4.2. Επίδραση της α-συνουκλεΐνης την ομοιόσταση των ιόντων Ca²⁺ 63
4.2.1. Ο φυσιολογικός ρόλος και η δυναμική των ιόντων Ca ²⁺	... 63
4.2.2. Μηχανισμοί ομοιόστασης των ιόντων Ca ²⁺ 64
4.2.3. Συμμετοχή των ιόντων Ca ²⁺ σε μονοπάτια σηματοδότησης και κυτταρικού θανάτου	... 68
4.2.4. Διαταραχές της ομοιόστασης των ιόντων Ca ²⁺ στις νευροεκφυλιστικές νόσους και ιδιαίτερα στη νόσο του Parkinson 70
4.2.5. Συσχέτιση της α-συνουκλεΐνης με διαταραχές της ομοιόστασης των ιόντων Ca ²⁺ 72
4.2.6. Ο ιδιαίτερος φαινότυπος των ντοπαμινεργικών νευρώνων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου ως αιτία της ευπάθειας που επιδεικνύουν στη νόσο του Parkinson	... 74
II. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	79
III. ΥΛΙΚΑ	83
1. Πειραματικό Πρότυπο 83
2. Κυτταρικά συστήματα 83
2.1. SH-SY5Y Κύτταρα Νευροβλαστώματος Ανθρώπου 84
2.2. Πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων από έμβρυα επίμυος 85
3. Χημικά Αντιδραστήρια 85
3.1. Κυτταρικές καλλιέργειες 85
3.2. Πειράματα σήμανσης των εκκρινόμενων πρωτεϊνών με ραδιενεργό θείο (³⁵ S) 87
3.3. Μέτρηση της τοξικότητας 87

3.4. Μέτρηση της κυτταρικής επιβίωσης	87
3.5. Επεξεργασία πρωτεϊνών	88
3.6. Ανοσοδοκιμασία κατά Western	89
3.7. Μετρήσεις Ca^{2+} με φθορισμομετρία	92
3.8. ELISA για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της α-συνουκλεΐνης	94
IV. ΜΕΘΟΔΟΙ	97
1. Κυτταροκαλλιέργειες	97
1.1. Διατήρηση στείρων συνθηκών	97
1.2. Διατήρηση και ανακαλλιέργεια κυτταρικών σειρών	98
1.3. Κατάψυξη και ανάκτηση των κυττάρων	99
1.4. Διαφοροποίηση των SH-SY5Y κυττάρων	100
2. Παροδική / μόνιμη διαμόλυνση	100
3. Κατασκευή μόνιμα διαμολυσμένων επαγόμενων κυτταρικών σειρών TET-OFF	101
4. Επιμόλυνση κυττάρων με αδενοϊούς	103
5. Συλλογή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας	104
6. Συμπύκνωση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας μέσω υπερδιήθησης	104
7. Προετοιμασία ορού απαλλαγμένου από εξωσώματα	105
8. Απομόνωση εξωσωμάτων από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων	105
9. Χρωματογραφία διήθησης πηκτής (Size Exclusion Chromatography, SEC)	106
10. Ανοσοκυτταροχημεία	107
11. Μέτρηση κυτταρικού θανάτου	109
12. Μέτρηση κυτταρικής βιωσιμότητας	110
13. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός του ελεύθερου κυτταροπλασματικού Ca^{2+}	112

13.1. Με τη χρήση φθορισμόμετρου	112
13.2. Με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού (Live Ca ²⁺ Imaging)	113
14. Εκχύλιση πρωτεϊνών	115
14.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών	115
14.2. Διαφορική απομόνωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών	116
14.3. Αναλυτικό πρωτόκολλο κυτταρικής κλασμάτωσης	116
15. Ποσοτικός προσδιορισμός	117
15.1. Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων με φωτομέτρηση	117
15.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	118
16. Ηλεκτροφόρηση	119
16.1. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	119
16.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	120
16.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα βορικού οξέος- πολυακρυλαμιδίου (Boric acid-PAGE)	122
17. Υγρή ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών	123
18. Ανοσοδοκιμασία κατά Western (Western Blot, WB)	124
19. Αφαίρεση αντισώματος από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	125
20. Χρώση πρωτεϊνών με Ponceau S	126
21. Σήμανση ενδογενών και εκκρινόμενων πρωτεϊνών με ραδιενεργό θείο 35 (³⁵ S)	127
22. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών	129
22.1. Ανοσοκατακρήμνιση από κυτταρικά εκχυλίσματα	129
22.2. Ανοσοκατακρήμνιση από θρεπτικό μέσο καλλιέργειας	130
23. Ξήρανση πηκτώματος πολυ-ακρυλαμιδίου	131
24. Δοκιμασίες πρόσληψης ραδιοσημασμένων εκκρινόμενων πρωτεϊνών	131

25. Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης με ELISA τύπου Sandwich	132
26. Μέτρηση της ρευστότητας της πλασματικής μεμβράνης	133
27. Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των καλπαϊνών	135
28. Χρήση λογισμικών προγραμμάτων	136
29. Στατιστική επεξεργασία	137
30. Οργανολογία	137
V. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	140
1. Μελέτη της έκκρισης της α-συνουκλεΐνης	140
1.1. Η α-συνουκλεΐνη εκκρίνεται φυσιολογικά και κατά τρόπο συνεχόμενο	140
1.2. Ταυτοποίηση των εκκρινόμενων μορφών της α-συνουκλεΐνης	143
1.3. Μελέτη του μηχανισμού έκκρισης της α-συνουκλεΐνης	146
2. Διερεύνηση του νευροτοξικού δυναμικού της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης	150
2.1. Επίδραση της εξωκυττάριας α-συνουκλεΐνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων-δεκτών	151
2.2. Διερεύνηση των τοξικών μορφών της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης	155
3. Μελέτη του μηχανισμού νευροτοξικής δράσης της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης	157
3.1. Μελέτη της πρόσληψης της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης ως πιθανού νευροτοξικού μηχανισμού δράσης	157
3.1.1. Μελέτη της πρόσληψης της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης από διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα-δέκτες	158
3.1.2. Μελέτη της πρόσληψης της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης από διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα και πρωτογενείς νευρώνες	163
3.2. Διαταραχές στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης και της ομοιόστασης των ιόντων Ca^{2+} ως πιθανού	169

μηχανισμού τοξικής δράσης	
3.2.1. Επίδραση της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης στην εισροή Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας στα διαιρούμενα και διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα-δέκτες	... 169
3.2.2. Συμμετοχή των καναλιών Ca^{2+} της πλασματικής μεμβράνης, στην επαγόμενη από την εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη αύξηση της εισροής Ca^{2+} , στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα-δέκτες	... 173
3.2.3 Υποκυτταρική διαμερισματοποίηση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} , στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα-δέκτες, παρουσία της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης	... 177
3.2.4 Επίδραση της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης στην εισροή Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας στους πρωτογενείς νευρώνες	... 182
3.2.5 Επίδραση της μείωσης των επιπέδων του ελεύθερου κυτταροπλασματικού Ca^{2+} στην προκαλούμενη από την εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη νευροτοξικότητα	... 183
3.2.6 Επίδραση εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης στα σηματοδοτικά μονοπάτια PI3K/Akt και MAPK/ERK	... 185
3.2.7 Συμμετοχή των καλπαϊνών στο μονοπάτι νευροεκφυλισμού, που πυροδοτείται από την εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη	... 188
3.2.8 Αλληλεπίδραση της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων-δεκτών	... 192
3.2.9 Ο ρόλος της ελεύθερης και της συνδεδεμένης με τα εξωσώματα α-συνουκλεΐνης στην αύξηση της εισροής Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας	... 194
VI. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	197
1. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων	197
1.1. Μελέτη της έκκρισης της α-συνουκλεΐνης	197
1.2. Διερεύνηση του νευροτοξικού δυναμικού της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης	... 200
1.3. Μελέτη του μηχανισμού νευροτοξικής δράσης της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης	... 202
2. Γενικά συμπεράσματα	... 213
VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	219
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	250
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	257

<i>ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ</i>	<i>257</i>
<i>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ</i>	<i>298</i>

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η Νόσος του Parkinson

1.1. Κλινικά συμπτώματα

Η νόσος του Parkinson περιγράφηκε με πληρότητα, για πρώτη φορά, από το Βρετανό ιατρό James Parkinson το 1817 στη μονογραφία του με τίτλο «Ένα δοκίμιο για την Τρομώδη Παράλυση» (“*An assay of the Shaking Palsy*”). Πρόκειται για μια προοδευτικά εξελισσόμενη νευροεκφυλιστική νόσο του εγκεφάλου, η οποία επηρεάζει την κινητικότητα και μέχρι σήμερα δεν έχει αιτιολογική θεραπεία. Είναι δεύτερη σε συχνότητα εμφάνισης, μετά τη νόσο Alzheimer, με ποσοστό εκδήλωσης 1-2% για άτομα άνω των 65 ετών, το οποίο ανέρχεται στο 3-5% για άτομα άνω των 85 (Alves et al., 2008; Gasser, 2009a).

Η κλινική διάγνωση της νόσου βασίζεται, κατά κύριο λόγο, στην αξιολόγηση διαταραχών στις κινητικές λειτουργίες που εκδηλώνουν οι ασθενείς. Τα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά είναι η βραδυκίνησια, η δυσκαμψία, ο τρόμος ηρεμίας και η διαταραχή της στάσης και της βάδισης. Επίσης, παρατηρούνται δυσκολία στο λόγο και την κατάποση, ανέκφραστο πρόσωπο, καθώς και δυσκολίες στη γραφή (Jankovic, 2008). Η διάγνωση της νόσου επιβεβαιώνεται περαιτέρω από την ικανοποιητική απόκριση στη χορήγηση ντοπαμινεργικών φαρμάκων. Ωστόσο, βιβλιογραφικά δεδομένα παγιώνουν την άποψη ότι η νόσος του Parkinson είναι μια πιο σύνθετη ασθένεια που περιλαμβάνει, εκτός από τα κλασικά κινητικά συμπτώματα, ένα σύνολο μη κινητικών διαταραχών, όπως κατάθλιψη, διαταραχές του ύπνου και των αισθήσεων, δυσλειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος, και έκπτωση των γνωστικών λειτουργιών (Langston, 2006). Τα μη κινητικά συμπτώματα επηρεάζουν όλους τους ασθενείς, ενώ η συχνότητά τους αυξάνεται ανάλογα με τη βαρύτητα της νόσου (Dexter and Jenner, 2013). Σε αντίθεση με τις παρατηρούμενες κινητικές εκδηλώσεις της νόσου του Parkinson, οι αιτίες των μη κινητικών διαταραχών έχουν ερευνηθεί ελάχιστα.

Μέχρι και σήμερα δεν έχει βρεθεί η θεραπεία για τη νόσο του Parkinson. Εντούτοις, υπάρχουν θεραπευτικές προσεγγίσεις οι οποίες στοχεύουν στην επιβράδυνση της εκδήλωσης και της καλυτέρευσης των κινητικών συμπτωμάτων. Οι περισσότερες από αυτές είναι σχεδιασμένες έτσι ώστε να αυξάνουν την ποσότητα της ντοπαμίνης στον εγκέφαλο, είτε αντικαθιστώντας τη ντοπαμίνη είτε δίνοντας

αγωνιστές αυτής είτε παρατείνουντας την επίδρασή της αναστέλλοντας το μεταβολισμό της (Lim and Zhang, 2013). Η κύρια θεραπευτική οδός που ακολουθείται είναι η θεραπεία υποκατάστασης με τη χορήγηση λεβοντόπα (Levodopa or L-DOPA), η οποία αποτελεί πρόδρομο μόριο στη σύνθεση της ντοπαμίνης. Η λεβοντόπα, χορηγείται μαζί με τον αναστολέα της αποκαρβοξυλάσης της ντοπαμίνης, με στόχο τη μείωση των περιφερειακών παρενεργειών και την αποτελεσματικότερη απορρόφηση της λεβοντόπα. Ωστόσο, χρόνια χρήση της λεβοντόπα, είναι δυνατόν να προκαλέσει ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως λ.χ. μειωμένη απόκριση σε κάθε δόση, επίπονες κράμπες, καθώς και το φαινόμενο της χορείας, δηλ. των ακούσιων κινήσεων. Για αυτόν το λόγο η χρήση της καθυστερείται μέχρι να εμφανιστούν τα έντονα κινητικά προβλήματα.

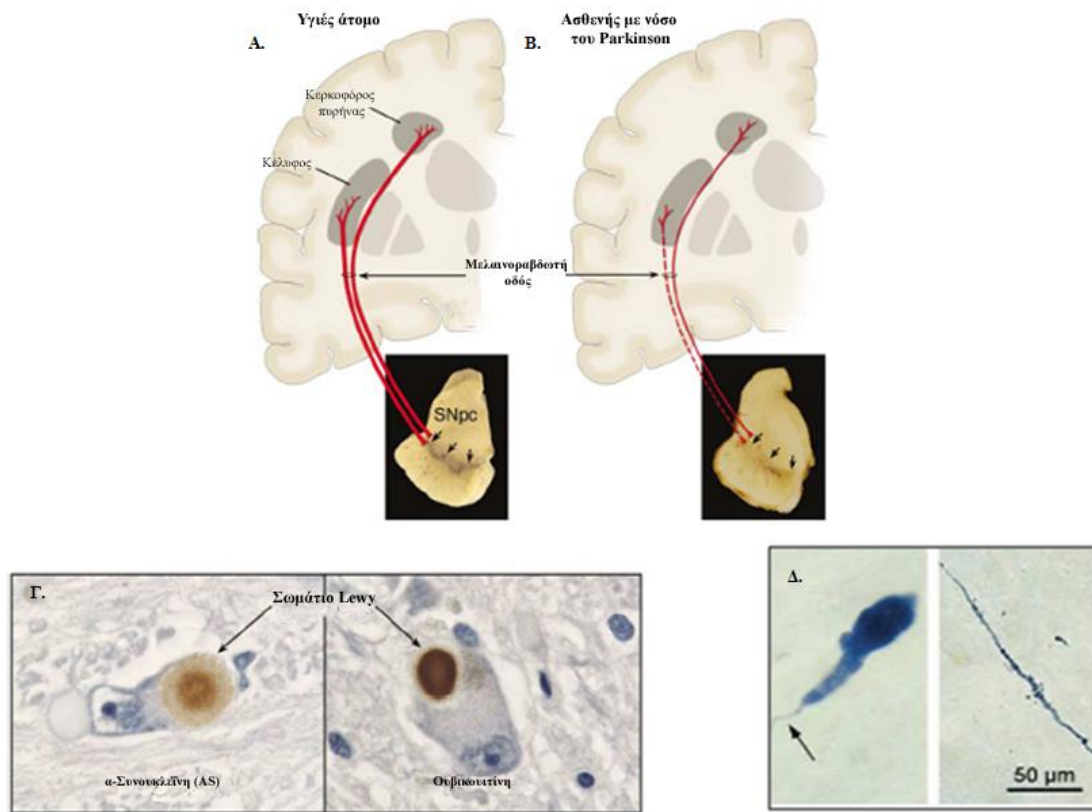
Δεδομένων των ανεπιθύμητων παρενεργειών που προκύπτουν από τη φαρμακευτική αντιμετώπιση της νόσου του Parkinson, η ανάγκη διατήρησης ενός αποδεκτού επιπέδου λειτουργικότητας με τις ελάχιστες δυνατές δόσεις είναι επιτακτική (Fernandez, 2012). Προς αυτήν την κατεύθυνση, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η βελτίωση του τρόπου ζωής. Αλλαγές στην ποιότητα ζωής, όπως η ξεκούραση και η άσκηση, η φυσιοθεραπεία, η εργοθεραπεία, καθώς και η λογοθεραπεία είναι δυνατόν να αποδειχθούν εξαιρετικά ευεργετικές.

Σε ορισμένες μεμονωμένες περιπτώσεις με προχωρημένα, σχεδόν ανεξέλεγκτα κινητικά φαινόμενα, η χειρουργική παρέμβαση είναι δυνατόν να ακολουθηθεί ως μια μορφή συμπτωματικής θεραπείας. Μια τέτοια προσέγγιση αποτελεί η εν τω βάθην διέγερση του εγκεφάλου, κατά την οποία ειδικά ηλεκτρόδια εμφυτεύονται σε περιοχές του εγκεφάλου που εμπλέκονται στη ρύθμιση της κίνησης, προκειμένου να τις διεγείρουν. Μια εναλλακτική προσέγγιση, αποτελεί η θεραπεία των εμβρυϊκών εμφυτευμάτων μέλαινας ουσίας, η οποία βελτιώνει σημαντικά τα συμπτώματα της ασθένειας. Μάλιστα, μελέτες σε νεκροτομικό υλικό ασθενών που είχαν υποβληθεί σε τέτοιου είδους εγχείριση έδειξαν τη δημιουργία νέων συνάψεων από το μεταμοσχευμένο ιστό. Εντούτοις, υπάρχουν και μελέτες οι οποίες θέτουν υπό αμφισβήτηση αυτόν τον τύπο θεραπείας. Έτσι, παρόλο που η χρήση των βλαστικών κυττάρων έχει μεγάλες προοπτικές, είναι επιτακτική η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα προς την κατεύθυνση αυτή, προτού αποκτήσει τη δέουσα θεραπευτική αξία. Γενικότερα, όσον αφορά στις παραπάνω χειρουργικές μεθόδους, παρά τα πλεονεκτήματά τους, να σημειωθεί ότι εφαρμόζονται σε περιορισμένο αριθμό, διότι

υπάρχει ο κίνδυνος πρόκλησης βλαβών, ακόμη και θανάτου του ασθενούς, ενώ οι μακροπρόθεσμες παρενέργειες δεν μπορούν να προβλεφθούν.

1.2. Παθολογοανατομικές αλλοιώσεις

Παθολογοανατομικά, η νόσος του Parkinson, χαρακτηρίζεται από την απώλεια ενός μεγάλου ποσοστού (50–80%) νευρικών κυττάρων, τα οποία εδράζονται στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου (substantia nigra pars compacta, SNpc), ενώ οι νευρικές απολήξεις τους καταλήγουν στο ραβδωτό σώμα (striatum) (Jankovic, 2008; Lesage and Brice, 2009). Καθώς, οι εν λόγω νευρώνες παράγουν το νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη, ο εκφυλισμός τους διαταράσσει τη νευροδιαβίβαση κατά μήκος της μελαινοραβδωτής οδού (**εικόνα 1Α, Β**) και του κυκλώματος των βασικών κινητικών γαγγλίων, οδηγώντας στον κλασικό κινητικό φαινότυπο της νόσου (Jankovic, 2008; Johnson et al., 2009). Στους εναπομείναντες ντοπαμινεργικούς νευρώνες της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου, εντοπίζονται ενδοκυττάρια πρωτεϊνικά έγκλειστα, είτε στα σώματα είτε στους νευράξονες, τα σωμάτια Lewy (Lewy bodies, LB) (**εικόνα 1Γ**) ή νευρίτες Lewy (Lewy neuritis, LN) (**εικόνα 1Δ**), αντίστοιχα, τα οποία αποτελούν το κυρίαρχο παθολογικό χαρακτηριστικό στην πλειοψηφία των περιπτώσεων της νόσου του Parkinson (Conway et al., 2000b). Πρόκειται για ηωσινόφιλα πρωτεϊνικά συσσωματώματα τα οποία, σε ανοσοϊστοχημική χρώση, φαίνεται να αποτελούνται από έναν πυκνό πυρήνα περιβαλλόμενο από ένα αχνό φωτοστέφανο ακτινωτών ινιδίων (**εικόνα 1Γ, Δ**). Κύριο συστατικό των περιγραφόμενων ενδοκυττάρων συσσωματωμάτων είναι η λανθασμένα αναδιπλωμένη πρωτεΐνη α-συνουκλείνη, για την οποία θα γίνει εκτενής λόγος παρακάτω (**βλπ. ενότητα 2**). Ο ρόλος που διαδραματίζουν τα σωμάτια και οι νευρίτες Lewy στην παθογένεια της νόσου, δεν έχει αποσαφηνιστεί μέχρι και σήμερα (Dexter and Jenner, 2013).

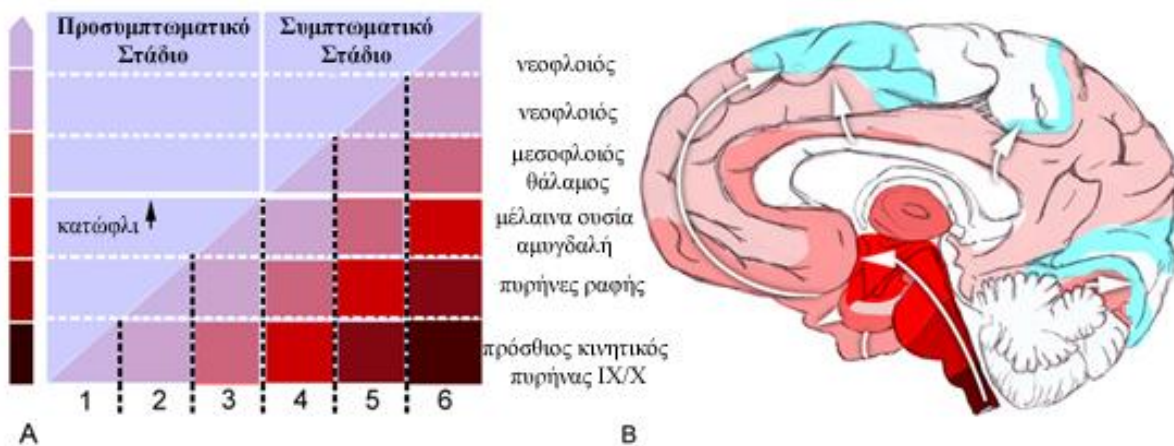


Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της φυσιολογικής (A) και της παθολογικής (B) στη νόσο Parkinson μελαινοραβδωτής οδού. Υπάρχει εκτεταμένη απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων που προβάλλουν στο κέλυφος και μικρότερη εκείνων που προβάλλουν στον κερκοφόρο πυρήνα του ραβδωτού σώματος. (Γ) Εικόνες ανοσοϊστοχημείας, όπου επισημαίνονται τα σωματίδια Lewy με αντίσωμα έναντι της α -συνουκλεΐνης (αριστερά) και έναντι της ουβικουιτίνης (δεξιά). (Δ) Ανοσοϊστοχημική χρώση των νευριτών Lewy με αντίσωμα έναντι της α -συνουκλεΐνης.

Η απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων (**εικόνα 1B**) και η ύπαρξη των σωματιών Lewy (**εικόνα 1Γ, Δ**), βέβαια, δεν περιορίζεται μόνο στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (substantia nigra pars compacta), αλλά και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου όπως στον υπομέλαινα τόπο (locus coeruleus), το ραχιαίο κινητικό πυρήνα (dorsal motor nucleus), τους πυρήνες της ραφής (raphe nucleus), τον οσφρητικό βολβό (olfactory bulb), τους συμπαθητικούς και παρασυμπαθητικούς μεταγαγγλιονικούς νευρώνες (parasympathetic and sympathetic post-ganglionic neurons), τον πυρήνα του Meynert (Meynert nucleus), την αμυγδαλή (amygdaloid nucleus) και τον εγκεφαλικό φλοιό (cerebral cortex) (Jellinger, 2012). Σημειωτέον, στην παθολογία των παραπάνω, μη ντοπαμινεργικών περιοχών του εγκεφάλου, οφείλονται πολλά από τα βασικά μη κινητικά συμπτώματα που συνδέονται με την εκδήλωση της νόσου. Για παράδειγμα, η απώλεια της όσφρησης συνδέεται με την παρουσία των σωματιών και νευριτών Lewy στον οσφρητικό βολβό και σε κέντρα

του εγκεφάλου, όπως η αμυγδαλή και ο περιρινικός πυρήνας (perirhinal nucleus) (Witt et al., 2009). Ο εντοπισμός των σωματίων Lewy στο μεσεντέριο πλέγμα (myenteric plexus), αντανακλά τις διαταραχές στην κινητικότητα του γαστρεντερικού συστήματος, που απαντούν στη νόσο του Parkinson. Η δυσκοιλιότητα, λ.χ., ένα από τα κύρια μη κινητικά συμπτώματα της νόσου, πιθανόν σχετίζεται με την απώλεια νευρώνων και την παρουσία σωματίων Lewy στο ραχιαίο κινητικό πυρήνα του πνευμονογαστρικού (dorsal motor nucleus of the vagus), ο οποίος παρέχει παρασυμπαθητική νεύρωση του στομάχου και του εντέρου (Braak et al., 2006).

Οι παθολογικές διεργασίες της νόσου του Parkinson εξελίσσονται σε βάθος χρόνου και προοδεύουν ανοδικά, σε ανατομικά επικοινωνούσες δομές του εγκεφάλου, με προσθιοδρομική (anterograde) κατεύθυνση (Braak et al., 2003). Έχουν ως αποτέλεσμα την εξάπλωση της μοριακής παθολογίας στο ανθρώπινο νευρικό σύστημα και τη συνεπακόλουθη επιβάρυνση της κλινικής εικόνας των ασθενών. Μεταθανάτια εξέταση εγκεφάλων ασθενών αποκάλυψε ότι η ανοδική πορεία εξάπλωσης μπορεί να διακριθεί σε έξι στάδια της κλίμακας Braak (**εικόνα 2**). Κατά τα πρώιμα στάδια της ασθένειας (στάδιο 1-2), σωματίδια και νευρίτες Lewy εμφανίζονται στο κατώτερο τμήμα του στελέχους, μέχρι και τα στάδια 3 ή 4 στα οποία η παθολογία έχει φτάσει στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας και συνοδεύεται από απώλεια νευρώνων, λόγω της οποίας εμφανίζονται τα πρώτα κινητικά κλινικά συμπτώματα (**εικόνα 2**). Κατά τα όψιμα στάδια της νόσου η παθολογία εντοπίζεται και σε περιοχές του νεοφλοιού, και συνοδεύεται και από μη-κινητικά συμπτώματα. Βάσει της παθολογοανατομικής κλίμακας Braak, η παθολογία Lewy σε μια περιοχή είναι συνθήκη απαραίτητη και ικανή ώστε η παθολογία να εξαπλωθεί στην επόμενη, ωστόσο αυτό δεν ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις (Burke et al., 2008).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της προοδευτικής εξάπλωσης της παθολογίας της νόσου του Parkinson, σύμφωνα με την κλίμακα Braak.

(A) Το στάδιο 1 αντιπροσωπεύει πρώιμα στάδια της νόσου απουσία κινητικών κλινικών συμπτωμάτων, ενώ κατά τα στάδια 3-4 γίνεται εφικτή η διάγνωση της νόσου. (B) Ανοδική πορεία εξάπλωσης της παθολογίας Lewy σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, ανάλογα με το στάδιο της νόσου. Προσαρμογή από (Braak et al., 2004).

1.3. Αίτια και παράγοντες κινδύνου

Για περισσότερο από 100 χρόνια υπάρχουν ενδείξεις για την κληρονομική φύση της νόσου του Parkinson, ωστόσο, η έρευνα των γενετικών μορφών της νόσου, μέχρι πρόσφατα τουλάχιστον, είχε τεθεί στο περιθώριο. Αυτό οφείλεται, αφενός στην επί μακράν αμφιβολία για το αν οι σπάνιες οικογενείς μορφές της νόσου αποτελούν ή όχι τη «γνήσια» νόσο του Parkinson και αφετέρου στα αποτελέσματα επιδημιολογικών μελετών, που συσχετίζουν περιβαλλοντικούς παράγοντες με την παθογένεια της νόσου, όπως διάφορους ιούς και νευροτοξίνες. Σύμφωνα με μεγάλο όγκο βιβλιογραφικών αναφορών η συχνότητα εκδήλωσης της ασθένειας αυξάνεται με την ηλικία (Tanner et al., 1999), ωστόσο σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τόσο περιβαλλοντικοί όσο και γενετικοί παράγοντες προδιάθεσης (Gasser, 2009b).

1.3.1. Γενετικές μορφές της νόσου του Parkinson

Καθώς το «κυνήγι» των γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεια της νόσου του Parkinson συνεχίζεται, αποκαλύπτονται ολοένα και περισσότερες γενετικές αιτίες (Hardy, 2010). Μέχρι στιγμής, η μελέτη κληρονομικών περιπτώσεων έχει αποκαλύψει περισσότερους από 13 γενετικούς τόπους και 9 γονίδια που φαίνεται να σχετίζονται με μορφές της νόσου που ακολουθούν το μεντέλαιο τύπο κληρονομικότητας (Lesage and Brice, 2009). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν γονίδια

που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες α-συνουκλεΐνη (α-synuclein, SNCA), parkin (PARK2), LRRK2 (leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2, LRRK2), UCH-L1 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1, UCH-L1), DJ-1 (DJ-1), και PINK1 (PTEN-induced kinase protein 1, PINK1) (Πίνακας 1). Μεταλλάξεις στα γονίδια SNCA και LRRK2 ακολουθούν τον επικρατή τρόπο κληρονομικότητας, οδηγώντας στο σχηματισμό σωματίων Lewy (Greggio et al., 2011). Δεδομένου ότι και οι δύο πρωτεΐνες σχετίζονται τόσο με τις σποραδικές όσο και με τις οικογενείς μορφές της νόσου, αποτελούν εξαιρετικούς στόχους για θεραπευτικές προσεγγίσεις. Σημειωτέον, το γεγονός ότι η α-συνουκλεΐνη εντοπίζεται υπερφωσφορυλιωμένη στα σωματίνα Lewy, σε συνδυασμό με την ενεργότητα κινάσης της πρωτεΐνης LRRK2, υποδηλώνουν μια πιθανή συσχέτιση των δύο πρωτεϊνών, όχι απαραίτητα άμεση (Greggio et al., 2011). Από την άλλη πλευρά, μεταλλάξεις στα γονίδια PARK2, DJ-1, και PINK1 έχουν υπολειπόμενη δράση, οδηγώντας σε απώλεια της λειτουργικότητας (a recessive, loss-of function mechanism) (Gasser, 2009b).

Επίσης, τις τελευταίες δύο δεκαετίες, στοιχεία που έχουν προκύψει από επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί για το λυσοσωμικό ένζυμο β-γλυκοσερεβροσιδάση (β-glucocerebrosidase, GBA) ως έναν από τους πιο κοινούς παράγοντες προδιάθεσης για την εκδήλωση της νόσου (Sidransky, 2005; Sidransky and Lopez, 2012). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου GBA παραδοσιακά έχουν ενοχοποιηθεί για τη νόσο Gaucher, μια αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή λυσοσωμικής αποθήκευσης (Goldin, 2010). Η συμβολή των μεταλλάξεων της GBA στην παθογένεση του παρκινσονισμού παραμένει άγνωστη, αλλά έχει προταθεί ότι υπάρχει μια αμφίδρομη συσχέτιση μεταξύ ελλειμματικής λυσοσωμικής δράσης της GBA και παθολογικής α-συνουκλεΐνης (Mazzulli et al., 2011).

Πίνακας 1: Γενετικοί τόποι που σχετίζονται με τη νόσο του Parkinson.

Γενετικοί τόποι που εμπλέκονται στη νόσο του Parkinson και πιθανοί ρόλοι αυτών				
Γενετικός Τόπος	Γονίδιο	Χρωμοσωμική Εντόπιση	Τρόπος Κληρονομικότητας	Πιθανός ρόλος
PARK1/4	a-synuclein	4q21	Επικρατής	Προσυναπτική πρωτεΐνη, κύριο συστατικό των σωματίων Lewy, μεταβολισμός λιπιδίων, ανακύκλωση κυστιδίων
PARK2	Parkin	6q25.2-27	Υπολειπόμενος	Λιγάση E3 της ουβικουιτίνης, μιτοφαγία
PARK3	Άγνωστο	2p13	Επικρατής	Άγνωστος
PARK5	UCH-L1	4p14	Επικρατής	Άγνωστος
PARK6	PINK1	1p35-36	Υπολειπόμενος	Μιτοχονδριακή κινάση
PARK7	DJ-1	1p36	Υπολειπόμενος	Οξειδωτικό στρες
PARK8	LRRK2	12p11.2	Επικρατής	Σηματοδοτική κινάση, δυναμική του κυτταροσκελετού, μετάφραση των πρωτεϊνών
PARK9	ATP13A2	1p36	Υπολειπόμενος	Άγνωστος
PARK10	Άγνωστο	1p32	Επικρατής	Άγνωστος
PARK11	GIGYF2	2p37	Επικρατής	Σηματοδότηση του IGF-1
PARK12	Άγνωστο	Xq21-q25	Συσχετιζόμενος με το χρωμόσωμα X (X-linked, φυλοκαθοριζόμενος)	Άγνωστος
PARK13	Omi/Htra2	2p13	Άγνωστος	Μιτοχονδριακή πρωτεΐνη της σερίνης
PARK14	PLA2G6	22q13	Υπολειπόμενος	Φωσφολιπάση
PARK15	FBXO7	22q11	Υπολειπόμενος	Λιγάση E3 της ουβικουιτίνης
PARK16	Άγνωστο	1q32	Άγνωστος	Άγνωστος
GBA	GBA	1q21	Ευεπιφορότητα	Υδρολάση

Προσαρμογή από (Gasser, 2009b).

Παράλληλα, ο συνδυασμός των εξελιγμένων γενετικών τεχνικών ανάλυσης, που προσφέρουν τη δυνατότητα ταυτοποίησης γονοτύπων χωρίς ιδιαίτερο οικονομικό κόστος, με τον ολοένα αυξανόμενο αριθμό ασθενών που λαμβάνουν μέρος στις έρευνες, όπως λ.χ., η Διεθνής Γενετική Κοινοπραξία για τη νόσο του Parkinson,

τροφοδοτεί μελέτες συσχέτισης ολικού γονιδιώματος (Genome Wide Association Studies, GWAS), που αφορούν περιπτώσεις της ιδιοπαθούς νόσου. Τέτοιου τύπου μελέτες έχουν αποκαλύψει 14 γενετικούς τόπους που αποτελούν παράγοντες προδιάθεσης για την εκδήλωση της νόσου, μεταξύ των οποίων η α-συνουκλείνη, η LRRK2, το αντιγόνο λευκοκυττάρων ανθρώπου (human leukocyte antigen, HLA), και η πρωτεΐνη tau (2011; Nalls et al., 2011). Η ύπαρξη τέτοιων γενετικών τόπων δεν έπεται απαραίτητα την εκδήλωση της ασθένειας, ωστόσο τονίζει την πολυπλοκότητα της ασθένειας και τον αλληλεπικαλυπτόμενο ρόλο των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην αιτιολογία της νόσου του Parkinson.

Παρότι υπάρχει ένας αυξανόμενος αριθμός γενετικών τόπων που σχετίζονται με την εκδήλωση της ασθένειας του Parkinson (βλπ. Πίνακας I), το μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων αφορά σποραδικές μορφές της νόσου. Εντούτοις, ο κλινικός και παθολογοανατομικός φαινότυπος τόσο της σποραδικής όσο και της κληρονομικής μορφής της νόσου παρουσιάζουν εξαιρετική ομοιότητα. Προκειμένου να εξηγηθεί το παράδοξο αυτό, προτάθηκε πρόσφατα μια υπόθεση η οποία στηρίζεται στην έννοια των σωματικών μεταλλάξεων (somatic mutations) και του μωσαϊκισμού (Proukakis et al., 2013b). Σε αντίθεση με τις κληρονομήσιμες μεταλλάξεις, οι οποίες είναι παρούσες διαρκώς σε όλα τα κύτταρα ενός ατόμου, οι σωματικές μεταλλάξεις προκύπτουν κατά τη μεταζυγωτική ανάπτυξη αποκλειστικά σε σωματικά κύτταρα (Engelholm and Gasser, 2013; Erickson, 2010). Λόγω της μικρής συχνότητας εμφάνισής τους, δεν ανιχνεύονται εύκολα με τις παρούσες τεχνικές. Ο δε ρόλος και η επίδρασή τους στον οργανισμό, εξαρτώνται από την τοπολογία και τη χρονική εμφάνισή τους (Proukakis et al., 2013b). Το κατά πόσον τέτοιου τύπου μεταλλάξεις θα μπορούσαν να αποτελούν τη βάση για την εκτεταμένη παθολογία της νόσου του Parkinson, είναι ακόμη υπό διερεύνηση, καθώς μέχρι και σήμερα δεν υπάρχουν δεδομένα που να επιβεβαιώνουν την παραπάνω υπόθεση (Proukakis et al., 2013b).

1.3.2. Περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου

Πέραν των γενετικών παραγόντων που συντελούν στην εκδήλωση της νόσου του Parkinson, υπάρχουν συγκεκριμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, οι οποίοι έχουν ενοχοποιηθεί για την εμπλοκή τους στην εκδήλωση και εξέλιξη διαφόρων νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα μη γενετικού παράγοντα αποτελεί η οξεία ή ήπια (υποξεία) έκθεση στη μιτοχονδριακή τοξίνη MPTP (1-μεθυλο-4-φαινυλο-1,2,3,6,-τετραϋδροπυριδίνη) (Hubble et al., 1993; Ikeda

et al., 1992). Κατά τη διάρκεια του 1970-80 χρήστες ναρκωτικών ουσιών ανέπτυξαν συμπτώματα παρκινσονισμού, γεγονός που αποδόθηκε στην πρόσμιξη με την ουσία MPTP (Langston et al., 1983; Ramsay et al., 1986). Η ουσία αυτή, αν και εν γένει αβλαβής, είναι λιποδιαλυτή και διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό όπου και οξειδώνεται από την οξειδάση Β των μονοαμινών, ένζυμο που διαθέτουν τα αστροκύτταρα, στο τοξικό 1 μέθυλ-4 φαινυλ-pyridinium (MPP+) ιόν. Η επιλεκτική ευαισθησία των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην τοξίνη αυτή οφείλεται στην πρόσληψή της από το μεταφορέα της ντοπαμίνης. Μέσα στο νευρώνα, συγκεντρώνεται στα μιτοχόνδρια όπου προσδένεται στη NADH δεϋδρογονάση αναστέλλοντας το σύμπλοκο I της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και οδηγώντας τελικά σε δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Το εύρημα ότι άτομα που έχουν εκτεθεί σε MPTP αναπτύσσουν συμπτώματα σχεδόν πανομοιότυπα με αυτά της νόσου του Parkinson, αποτελεί ένα αρχέτυπο παράδειγμα για το πώς μια περιβαλλοντική τοξίνη μπορεί να μιμηθεί τα κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου, αν και η παθολογία τύπου Lewy δεν απαντά στους χρήστες MPTP.

Εκτός από το MPTP, υπάρχουν και άλλες τοξίνες που προκαλούν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και έχουν συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου του Parkinson, παρότι ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους παραμένει αμφιλεγόμενος (Franco et al., 2010). Τόσο το ζιζανιοκτόνο paraquat (McCormack et al., 2002), όσο και η ροτενόνη (Tanner et al., 2011), που έχουν χρησιμοποιηθεί ως γεωργικά εντομοκτόνα, προσομοιάζουν δομικά το MPP+. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συνδέσει την έκθεση στα παραπάνω εντομοκτόνα με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου του Parkinson. Φαίνεται ότι οι εν λόγω νευροτοξίνες προκαλούν οξειδωτική βλάβη στους νευρώνες της μέλαινας ουσίας και παρκινσονισμό, τόσο σε πειραματόζωα, όσο και στον άνθρωπο.

Αιτιολογικά έχουν συζητηθεί επίσης και άλλες τοξίνες, τροφικοί παράγοντες, τραυματισμοί του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), ιογενείς φλεγμονές (εγκεφαλίτιδα) και πρόωρη γήρανση των νευρώνων της μέλαινας ουσίας. Επίσης, η ηλικία αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες προδιάθεσης στην πλειοψηφία των περιπτώσεων (Dexter and Jenner, 2013). Ωστόσο, παραμένει ακόμα ασαφές το κατά πόσον η χρονολογική ηλικία ή η διαδικασία της γήρανσης ευθύνονται για αυτό (Kempster et al., 2010). Τέλος, πρέπει να αναφερθεί και το εγκεφαλικό τραύμα, ως ένας σημαντικός παράγοντας προδιάθεσης, που

επανελημμένα έχει αναδειχθεί μέσα από επιδημιολογικές μελέτες (Lehman et al., 2012; Savica et al., 2012).

1.4. Μηχανισμοί νευροεκφύλισης στη νόσο του Parkinson

Με βάση τα παραπάνω, είναι πλέον σαφές ότι η αιτιολογία της παθογένειας της νόσου του Parkinson είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και για αυτό μέχρι και σήμερα δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Ωστόσο, η πληθώρα των επιδημιολογικών, γενετικών και μεταθανάτιων επιστημονικών μελετών σε αυτό το πεδίο, έχουν συνδράμει σημαντικά στην καλύτερη κατανόηση του μοριακού υποβάθρου της ασθένειας. Οι μελέτες αυτές καταδεικνύουν τις διαταραχές στη μιτοχονδριακή λειτουργία και το σύστημα της πρωτεόστασης ως τις κύριες συνισταμένες για την εκδήλωση της νόσου του Parkinson, με το οξειδωτικό στρες να διαδραματίζει το ρόλο του βασικού συνδέτη μεταξύ των δύο παραπάνω παθολογικών γεγονότων (**εικόνα 3**) (Lim and Zhang, 2013). Πιο αναλυτικά:

Δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων: Η βλάβη στη λειτουργία των μιτοχονδρίων αποτελεί ένα ευρύ πεδίο έρευνας στις περιπτώσεις των νευροεκφυλιστικών νόσων. Οι νευρώνες παρουσιάζουν έντονη μεταβολική ενεργότητα και οι ενεργειακές τους απαιτήσεις εξαρτώνται από τον αερόβιο μεταβολισμό. Τα μιτοχόνδρια συσσωρεύουν πλήθος μεταλλάξεων κατά τη φυσιολογική διαδικασία της γήρανσης, με αποτέλεσμα την ανεπαρκή παραγωγή ATP και τη δημιουργία ενεργών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS). Στη νόσο του Parkinson αρκετές ενδείξεις υποστηρίζουν την ανεπάρκεια του συμπλέγματος I της αναπνευστικής αλυσίδας, ενώ μειωμένη δραστηριότητά του έχει βρεθεί στη μέλαινα ουσία ασθενών (Mann et al., 1994; Schapira et al., 1992). Ορισμένα γονίδια που έχουν σχετιστεί με τη νόσο του Parkinson μπορούν επίσης να συνδεθούν και με τη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Έτσι, η PINK1 και η Parkin φαίνεται να δρουν στο ίδιο μονοπάτι, ρυθμίζοντας τη λειτουργία των μιτοχονδρίων (Silvestri et al., 2005). Διαγονιδιακοί μύες στους οποίους έχει αφαιρεθεί είτε το γονίδιο της PINK1 είτε της Parkin, παρουσιάζουν μειωμένη αναπνευστική λειτουργία, ενώ η μορφολογία των μιτοχονδρίων είναι φυσιολογική (Gautier et al., 2008; Goldberg et al., 2003; Itier et al., 2003; Kitada et al., 2007). Επιπλέον, μοντέλο *Drosophila*, στο οποίο έχει αποσιωπηθεί το γονίδιο της Parkin, χαρακτηρίζεται από εκφυλισμό ενός υποπληθυσμού ντοπαμινεργικών νευρώνων. Ο εν λόγω φαινότυπος εντείνεται παρουσία μεταλλάξεων που προκαλούν απώλεια τη

λειτουργίας της S1-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (Whitworth et al., 2005). Τέλος, σε κυτταρικά συστήματα έχει δειχθεί ότι η Parkin επάγει την εκλεκτική απομάκρυνση των δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων, διαμεσολαβώντας την ενδοκυττάρωσή τους από τα αυτοφαγосώματα (Narendra et al., 2008).

Δυσλειτουργία των συστημάτων αποικοδόμησης των πρωτεϊνών: Ο ρόλος της πρωτεασωμικής αποικοδόμησης έχει μελετηθεί, εκτενώς, σε περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών νόσων. Η δυσλειτουργία τους συστήματος αποδόμησης ουβικουΐτινης-πρωτεασώματος (Ubiquitin-proteasome system UPS) έχει προταθεί ότι εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου του Parkinson. Τα συσσωματώματα Lewy έχει βρεθεί ότι περιέχουν συστατικά του UPS, όπως ουβικουΐτινη και υποστρώματα του πρωτεασώματος, ενώ σε υλικό από βιοψίες έχει βρεθεί 40% μειωμένη ενεργότητα του συστήματος, που εντοπίζεται επιλεκτικά στη μέλαινα ουσία (McNaught and Jenner, 2001). Η φυσιολογική διαδικασία της γήρανσης οδηγεί σε μειωμένη δραστηριότητα του πρωτεασώματος ιδιαίτερα στη μέλαινα ουσία, γεγονός που πιθανά να συμβάλει στην επιλεκτική ευαισθησία των νευρώνων της μέλαινας ουσίας (Zeng et al., 2005).

Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μέσω του συστήματος αυτοφαγίας / λυσοσώματος φαίνεται να διαδραματίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο στη νευροεκφυλιστική διαδικασία, που χαρακτηρίζει τη νόσο του Parkinson. Όπως και στην περίπτωση του πρωτεασώματος, η αυτοφαγία μειώνεται σταδιακά με την διαδικασία της (Nixon, 2013). Επίσης, είναι γνωστό ότι συμβάλλει στη ρύθμιση των επιπέδων και την αποικοδόμηση των διαφορετικών μορφών της α-συνουκλεΐνης (Vekrellis and Stefanis, 2012).

Σε *in vivo* μελέτη, στην οποία μύες υπέστησαν χρόνια έκθεση στην τοξική ουσία MPTP, παρατηρήθηκε συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης σε νευρώνες και παρουσία δυσλειτουργικών λυσοσωμάτων, υποδηλώνοντας ότι τα λυσοσώματα μπορεί να συμμετέχουν στην αποδόμηση παθολογικής α-συνουκλεΐνης (Meredith et al., 2002). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι οι, σχετιζόμενες με τη νόσο του Parkinson μεταλλαγμένες μορφές της α-συνουκλεΐνης A53T και A30P, (βλπ. ενότητα 1.3.1.), καθώς και η τροποποιημένη από τη ντοπαμίνη φυσικού τύπου πρωτεΐνη, παρεμποδίζουν ένα πιο εξειδικευμένο μονοπάτι αυτοφαγίας, τη διαμεσολαβούμενη από πρωτεΐνες συνοδούς αυτοφαγία (Chaperone-mediated autophagy, CMA) (Cuervo et al., 2004; Martinez-Vicente et al., 2008; Xilouri et al., 2009). Κατά συνέπεια,

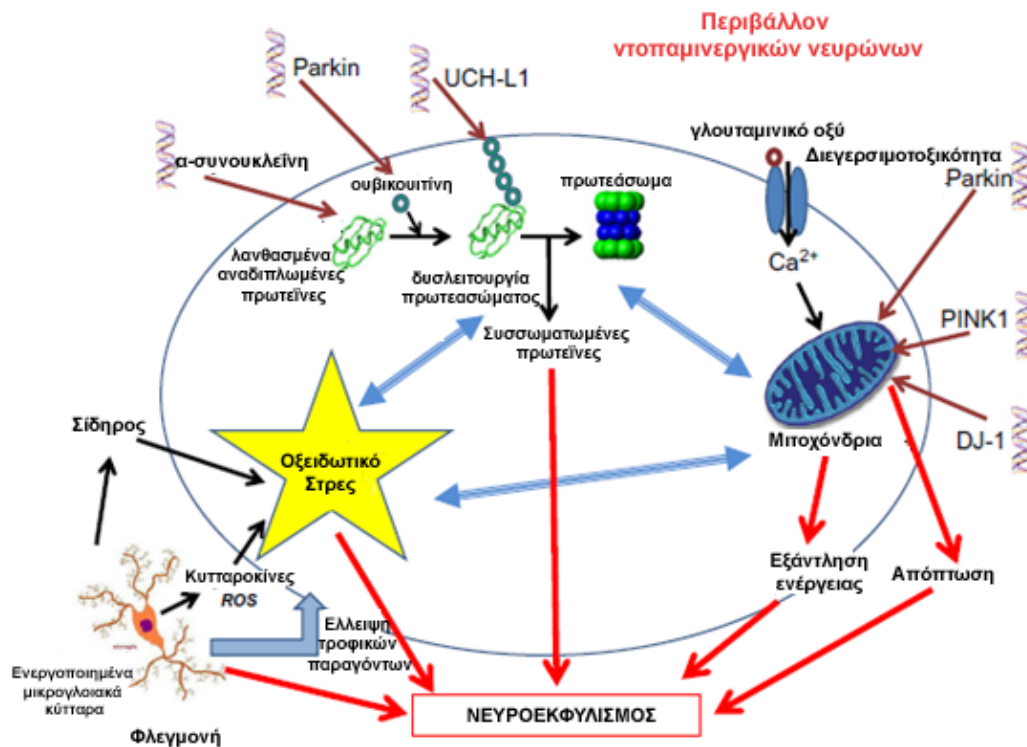
προκαλείται συσσώρευση των υποστρωμάτων της CMA και περαιτέρω αύξηση του πρωτεϊνικού φορτίου.

Οξειδωτικό στρες: Η αυξημένη ευπάθεια που παρουσιάζουν οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες, οι οποίοι προσβάλλονται στη νόσο του Parkinson, οφείλεται, ως επί το πλείστον, στον υψηλό ρυθμό μεταβολισμού τους, καθώς και τον οξειδωτικό χαρακτήρα των παραπροϊόντων του καταβολισμού της ντοπαμίνης (Lotharius and Brundin, 2002). Υπό συνθήκες έντονου οξειδωτικού στρες, τροποποιημένες μορφές των πρωτεϊνών, λ.χ. νιτροζυλιωμένες πρωτεΐνες, καθίστανται ευάλωτες στη διαδικασία της λανθασμένης αναδίπλωσης, με άμεσο επακόλουθο την πρωτεϊνική συσσώματωση (Uversky, 2007) και τελικά την κυτταρική εκφύλιση. Η όλη κατάσταση επιβαρύνεται από μια διαφαινόμενη ανεπάρκεια των ενδογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων (Jenner, 2003). Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικού στρες αποτελεί η διεγερσιμοτοξικότητα (excitotoxicity), η οποία πιθανόν να συμβάλλει στον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη νόσο του Parkinson (Beal, 1998; Bonifati et al., 2003; Sonsalla et al., 1998).

Φλεγμονή: Η φλεγμονή είναι μια διαδικασία που βρίσκεται σε συνεχή εξέλιξη στους εγκεφάλους των ασθενών με Parkinson. Σύμφωνα με μελέτες, παρατηρείται ενεργοποίηση των κυττάρων μικρογλοίας (McGeer et al., 1988), καθώς και αύξηση των επιπέδων προφλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης α (TNF-α), η ιντερλευκίνη-1β (IL1β), η ιντερλευκίνη-6 (IL6), συνθετάση του νιτρικού οξέος (iNOS) και η κυκλοοξυγενάση στο νέο-ραβδωτό και τη μέλαινα ουσία (Whitton, 2007). Υπό φυσιολογικές συνθήκες η διαδικασία της φλεγμονής είναι ζωτικής σημασίας για τη φυσιολογική λειτουργία και την προστασία τόσο του ΚΝΣ, όσο και του περιφερικού ευρικού συστήματος. Εντούτοις, σε παθολογικές καταστάσεις, και πιο συγκεκριμένα στη νόσο του Parkinson, η διαδικασία αυτή μπορεί να είναι ανεξέλεγκτη, με την υπερβολική ενεργοποίηση των κυττάρων της μικρογλοίας, περαιτέρω παραγωγή των κυτταροκινών, καθώς και άλλων φλεγμονωδών μεσολαβητών, και απελευθέρωση καταστρεπτικών μορίων, όπως π.χ. ROS.

Έλλειψη νευροτροφικών παραγόντων: Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες εξαρτώνται από κυτταροτροφικούς παράγοντες προκειμένου να διατηρήσουν ένα φυσιολογικό εσωτερικό περιβάλλον (Brundin et al., 2008). Σύμφωνα με αρκετές αναφορές τα βασικά γάγγλια των ασθενών με νόσο του Parkinson εκφράζουν μειωμένα επίπεδα νευροτροφικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων ο νευροτροφικός παράγοντας που

προέρχεται από γλοιακά κύτταρα (GDNF) και ο προερχόμενος από τον εγκέφαλο νευροτροφικός παράγοντας (BDNF) (Siegel and Chauhan, 2000).



Εικόνα 3: Κύριοι μοριακοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στη διαδικασία νευροεκφυλισμού των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου στη νόσο του Parkinson.

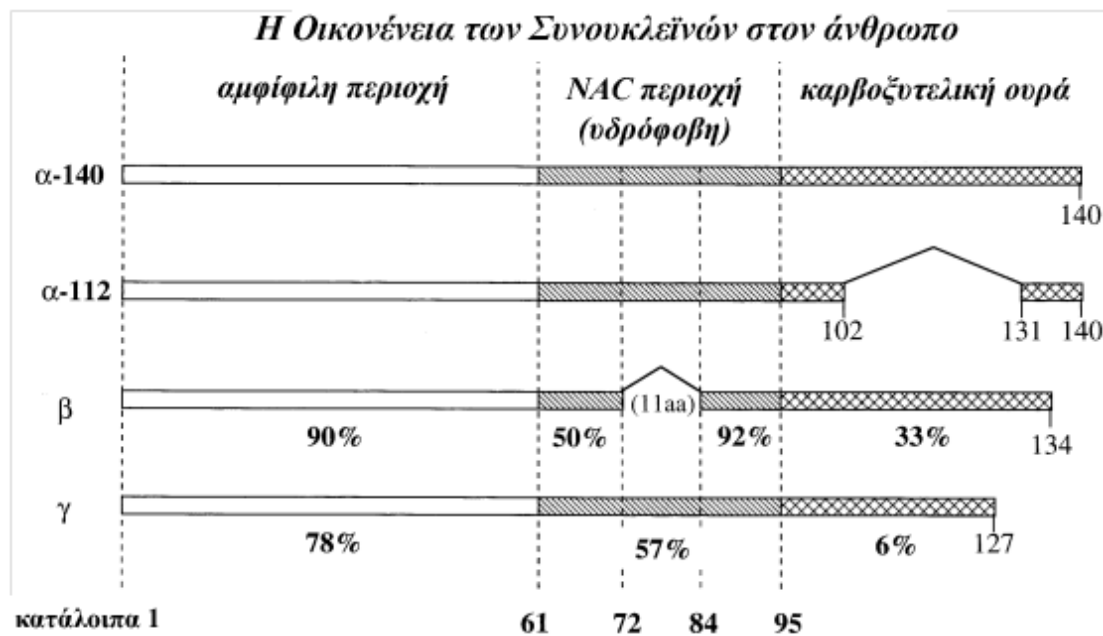
Τα διπλά γαλάζια βέλη αντιπροσωπεύουν μοριακούς μηχανισμούς, οι οποίοι αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν μοριακές διαδικασίες, που λαμβάνουν χώρα στη νόσο του Parkinson. Οι διπλές έλικες απεικονίζουν τις κύριες γενετικές μεταλλάξεις που απαντούν στις οικογενείς μορφές της νόσου. Τα καφέ βέλη απεικονίζουν περιπτώσεις, όπου οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες είναι δυνατόν να επιδράσουν στις κυτταρικές λειτουργίες και να επάγουν μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου που χαρακτηρίζουν πιθανόν και τις σποραδικές μορφές της νόσου (Dexter and Jenner, 2013).

Δεδομένου του μεγάλου αριθμού των «μοριακών» ενόχων, καθίσταται σαφές ότι η παθογένεια της νόσου περιλαμβάνει ένα εξαιρετικά περίπλοκο δίκτυο αλληλοεπηρεαζόμενων μονοπατιών, παρά μια γραμμική σειρά γεγονότων. Κατά συνέπεια, η καλύτερη και πιο ουσιαστική κατανόηση των διαφόρων μονοπατιών που σχετίζονται με νόσο, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο επιδρά το ένα στο άλλο, δυνητικά θα μπορούσαν να φωτίζουν νέες οδούς για θεραπευτικές προσεγγίσεις.

2. Κυτταρική Βιολογία και Βιοχημεία της α -Συνουκλεΐνης

2.1. Δομή και εντοπισμός της α -συνουκλεΐνης

Η α -συνουκλεΐνη αποτελεί το πρώτο μέλος της οικογένειας των συνουκλεϊνών (α -, β - και γ -συνουκλεΐνη και συνορεΐνη) (εικόνα 4). Οι συνουκλεΐνες αποτελούν μικρές, ιδιαίτερα συντηρημένες πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται στη ρύθμιση της συναπτικής λειτουργίας και σχετίζονται με την παθογένεια νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, των αποκαλούμενων «συνουκλεϊνοπαθειών». Παραδείγματα τέτοιων νόσων αποτελούν η νόσος των σωματίων Lewy, η ατροφία πολλαπλών συστημάτων (Multiple System Atrophy, MSA), η παραλλαγή της νόσου Alzheimer με σωματία Lewy, η νευροεκφύλιση με συγκέντρωση σιδήρου στον εγκέφαλο Τύπου 1 (νόσος Hallervorden- Spatz) και, φυσικά η νόσος του Parkinson (Dauer and Przedborski, 2003; Galvin et al., 2001; Vekrellis et al., 2004).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της οικογένειας των συνουκλεϊνών (α -, β -, γ -) στον άνθρωπο.

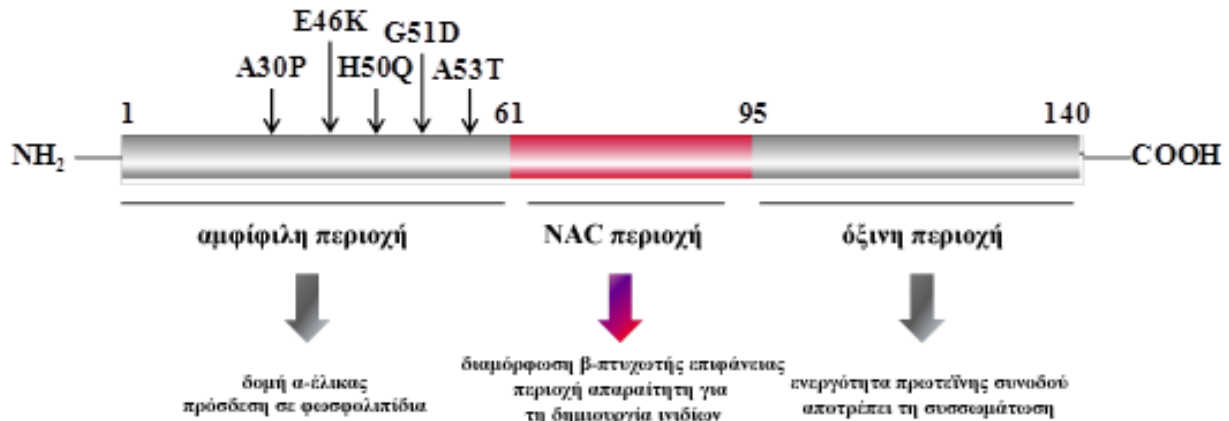
Οι διαφορετικές συνουκλεΐνες απεικονίζονται ως ράβδοι. Ο αριθμός των αμινοξικών καταλοίπων απεικονίζεται στο τέλος της κάθε πρωτεΐνης. Η αμφίφιλη αμινοτελική περιοχή, το υδροφοβικό NAC πεπτίδιο και η καρβοξυτελική ουρά διαχωρίζονται μεταξύ τους με κατακόρυφες διακεκομμένες γραμμές και απεικονίζονται με διαφορεική διαγράμμιση. Η πλήρους μήκους α -συνουκλεΐνη (α -140), το προϊόν εναλλακτικής ωρίμανσης της α -συνουκλεΐνης (α -122) από το οποίο λείπουν 28 αμινοξέα από το καρβοξυτελικό της άκρο, η β - και η γ -συνουκλεΐνη απεικονίζονται η μια κάτω από την άλλη. Από τη β -συνουκλεΐνη λείπουν 11 αμινοξέα από την κεντρική περιοχή του υδροφοβικού NAC πεπτιδίου (αμινοξικά κατάλοιπα 73-83). Ο βαθμός της αμινοξικής ομολογίας μεταξύ των συνουκλεϊνών, (βάσει ανάλυσης μεταξύ διαφορετικών ειδών), δίνεται ως ποσοστό κάτω από κάθε επικράτεια (Ανατύπωση από Lucking and Brice, 2000).

Το όνομα «συνουκλείνη», οφείλεται σε μια ειδική νευρική πρωτεΐνη 143 αμινοξικών καταλοίπων, η οποία απομονώθηκε από το ηλεκτρικό όργανο του ηλεκτρικού χελιού *Torpedo californica*. Η εν λόγω πρωτεΐνη είχε εντοπιστεί τόσο στις συνάψεις, όσο και στον πυρηνικό φάκελο, εξ'ού και η ονομασία της. Στον άνθρωπο η α-συνουκλείνη, που εκφράζεται πρωταρχικά στον εγκέφαλο, αποτελείται από 140 αμινοξικά κατάλοιπα (George, 2002). Ο ακριβής εντοπισμός της μέσα στα νευρικά κύτταρα παραμένει ασαφής.

Στο ώριμο ΚΝΣ η α-συνουκλείνη φαίνεται να εντοπίζεται κυρίως στις νευρωνικές απολήξεις, σε προσυναπτικές περιοχές σε παρασκευάσματα προσυναπτικών κυστιδίων, χωρίς όμως να ανευρίσκεται μέσα σε αυτά. Παρά την κυρίαρχη έκφρασή της στους νευρώνες έχει εντοπιστεί και σε ποικίλους άλλους κυτταρικούς τύπους, όπως, κύτταρα γλοίας, αιμοπετάλια και ερυθροκύτταρα (Clayton and George, 1998; Clayton and George, 1999; Mori et al., 2002; Park et al., 2002a).

Στον άνθρωπο, το γονίδιο της α-συνουκλείνης, SNCA, εδράζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 4 (4q21.3-q22). Η πρωτεΐνη αποτελείται από 140 αμινοξικά κατάλοιπα και απαρτίζεται από τρεις διακριτές περιοχές (**εικόνα 5**). Φέρει ένα εξαιρετικά συντηρημένο αμφίφιλο αμινοτελικό άκρο (αμινοξικά κατάλοιπα 1-60), το οποίο παρότι σε διάλυμα παρουσιάζεται χωρίς συγκεκριμένη οργάνωση είναι σε θέση να μεταβεί σε διαμόρφωση α-έλικας κάτω από προϋποθέσεις (George, 2002). Στο αμινοτελικό άκρο της α-συνουκλείνης εντοπίζονται οι χαρακτηριστικές επτά επαναλήψεις του συντηρημένου μοτίβου KTKEGV. Αυτές οι επαναλήψεις έχει δείχθει από μελέτες ότι συμβάλλουν στη δημιουργία της δομής α-έλικας στο αμινοτελικό άκρο της α-συνουκλείνης και ότι είναι απαραίτητες για την πρόσδεση της πρωτεΐνης σε λιπίδια (Perrin et al., 2000). Επίσης, το αμινοτελικό άκρο της α-συνουκλείνης φαίνεται να ευθύνεται για την ασθενή σύνδεσή της με τα συναπτικά κυστίδια (Jensen et al. 1998, Geo,p.19). Το κεντρικό τμήμα της εν λόγω πρωτεΐνης είναι υδροφοβικό (αμινοξικά κατάλοιπα 61-95) και είναι κυρίως γνωστό ως το μη-Αβ αμυλοειδές συστατικό των πλακών της νόσου του Alzheimer (NACP) (Vekrellis et al., 2004). Στο τμήμα αυτό, οφείλεται και η ικανότητα του μορίου της α-συνουκλείνης να μεταβαίνει από μια διαμόρφωση τυχαίας περιέλιξης σε μια διαμόρφωση β-πτυχωτής επιφάνειας (el-Agnaf and Irvine, 2002; Serpell et al., 2000; Walsh et al., 1997) και να δημιουργεί πρωτοϊνίδια και ινίδια που ομοιάζουν με αυτά του αμυλοειδούς (Conway et al., 1998; Ding et al., 2002; El-Agnaf and Irvine, 2000; el-Agnaf and Irvine, 2002; El-Agnaf et al., 1998; Giasson et al., 2001; Giasson et al.,

1999; Harper et al., 1997; Hashimoto et al., 1998; Narhi et al., 1999; Walsh et al., 1997). Το καρβοξυτελικό άκρο της α-συνουκλεΐνης (αμινοξικά κατάλοιπα 96-140), έχει ιδιαίτερα μεταβλητή διαμόρφωση και είναι πλούσιο σε αμινοξέα προλίνης, γλουταμινικού και ασπαρτικού οξέος (Cookson, 2005) (εικόνα 5). Επιπλέον, είναι υπεύθυνο για την ενεργότητά της ως πρωτεΐνη-συνοδός. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η ισομορφή της α-συνουκλεΐνης, που εκφράζεται κυρίως στην καρδιά, το σκελετικό μυ και το πάγκρεας, αποτελείται από 112 αμινοξικά κατάλοιπα.

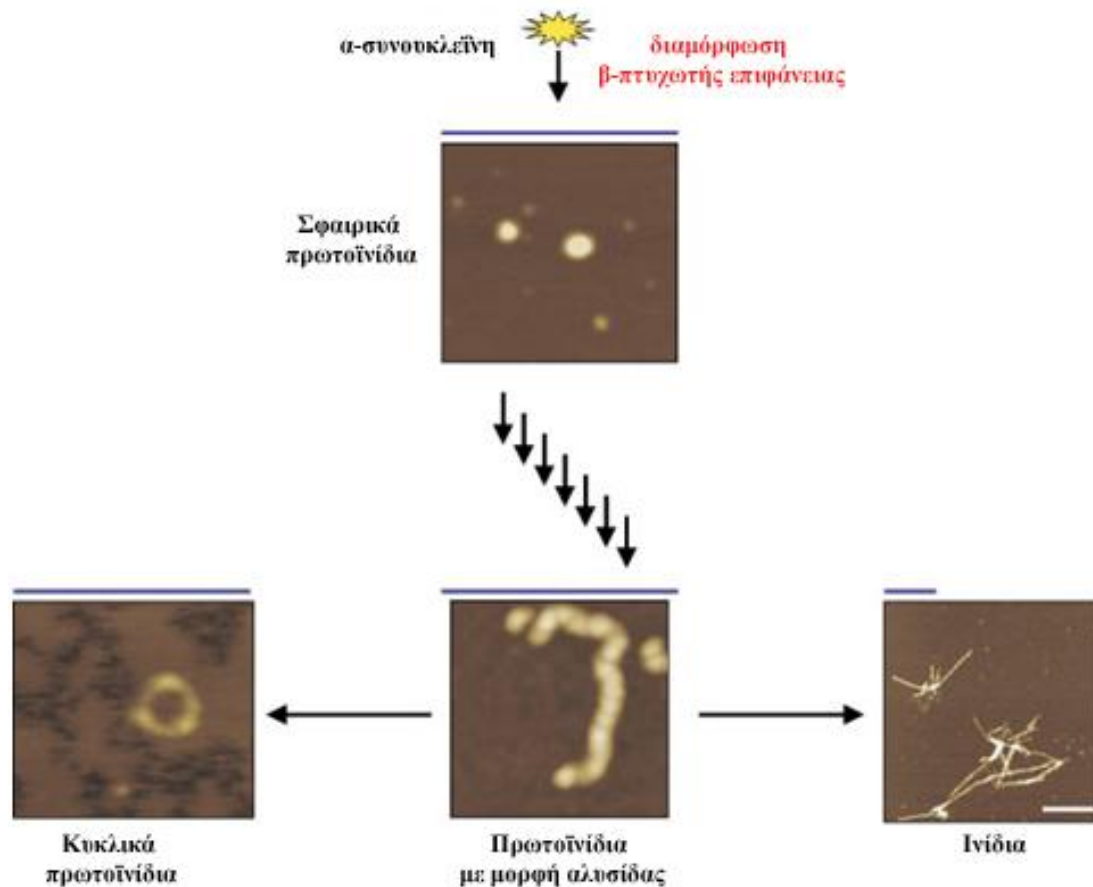


Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της πρωτοταγούς δομής της α-συνουκλεΐνης.

Το αμινοτελικό άκρο περιλαμβάνει μια συντηρημένη αλληλουχία. Το κεντρικό, υδρόφοβο τμήμα περιλαμβάνει την περιοχή NAC και το όξινο καρβοξυτελικό άκρο διαθέτει ρόλο πρωτεΐνης συνοδού. Σημειώνονται οι θέσεις των 5 σημειακών μεταλλάξεων A30P, E46K, H50Q, G51D και A53T. Αναπροσαρμογή από (Greggio et al., 2011; Recchia et al., 2004) και Vekrellis, Minakaki and Emmanouilidou, 2010 (Book Chapter, Effects of Alpha-Synuclein on Cellular Homeostasis).

Ανασυνδυασμένα μόρια α-συνουκλεΐνης σε υδατικό διάλυμα δεν αποκτούν ενιαία και σταθερή δευτεροταγή δομή και ως εκ τούτου η πρωτεΐνη θεωρείται ότι βρίσκεται φυσικά σε αναδιαταγμένη μορφή (Weinreb et al., 1996). Παρόλα αυτά, μέσω του αμινοτελικού της άκρου έχει την ικανότητα να προσδένεται αναστρέψιμα σε λιπιδικές μεμβράνες και να αποκτά δευτεροταγή δομή σχηματίζοντας αμφιπαθείς α-έλικες προσομοιάζοντας τις απολιποπρωτεΐνες (Eliezer et al., 2001). Πολλαπλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοτελικού και καρβοξυτελικού άκρου οδηγούν στο σχηματισμό πληθώρας παροδικών διαμορφώσεων, αποδίδοντας στο μόριο μια μορφή δομικής πλαστικότητας εξαρτώμενης τόσο από τον εντοπισμό της όσο και από τις πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά, γεγονός που δικαιολογεί το χαρακτηρισμό της ως πρωτεΐνη «χαμαιλέοντα» (Bertoncini et al., 2005; Dedmon et al., 2005; Lee et al., 2005b; Sandal et al., 2008; Uversky, 2003). Οι δομικές αυτές ιδιότητες και η ενδογενής φυσική της τάση για συσσωμάτωση, είναι πιθανόν να εμπλέκονται στην

παθολογική μετατροπή της πρωτεΐνης από τη μονομερή μορφή σε αυτή των, αρχικά διαλυτών, ολιγομερών και εν συνεχεία των αδιάλυτων νηματοειδών μορφών. Οι τελευταίες ανευρίσκονται στα συσσωματώματα Lewy και σχετίζονται με εκφύλιση και νευρωνικό θάνατο (εικόνα 6).

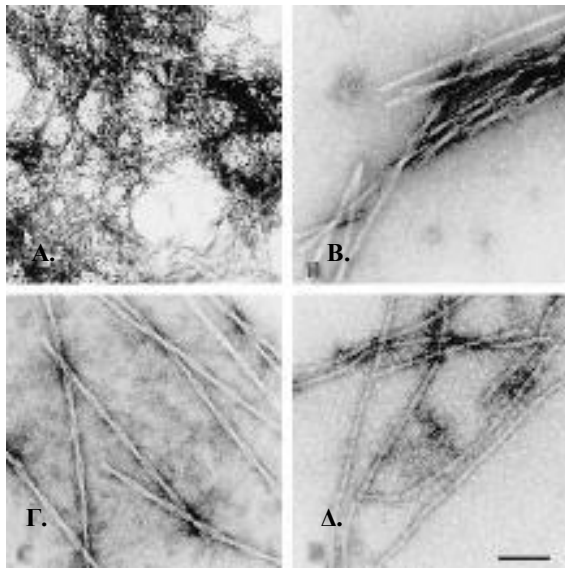


Εικόνα 6: Διαδικασία πυρήνωσης.

Η μη αναδιπλωμένη α-συνουκλεΐνη (επάνω) αποκτά μια προφανή σφαιρική διαμόρφωση, η οποία είναι δυνατόν να συσσωρευθεί στο κυτταρόπλασμα. Καθώς η συγκέντρωσή της αυξάνει, οι σφαιρικές μορφές είναι δυνατό να ενωθούν μεταξύ τους για να σχηματίσουν εν δυνάμει τοξικά πρωτοϊνίδια σε σχήμα αλυσίδας. Αυτά τα διαλυτά ολιγομερή, εν συνεχεία, μπορούν είτε να δώσουν γένεση σε κυκλικά πρωτοϊνίδια, μέσω αλληλεπίδρασης της κεφαλής του ενός με ουρά του άλλου είτε αλληλεπιδρώντας πλευρικά το ένα με το άλλο, να δημιουργήσουν αδιάλυτα ινίδια, τα οποία αποτελούν το κύριο συστατικό των σωματίων Lewy (Giasson et al., 1999).

In vitro μελέτες που στοχεύουν στην κατανόηση του μηχανισμού, μέσω του οποίου μια τόσο διαλυτή πρωτεΐνη καταλήγει να αποτελεί το βασικό συστατικό των πρωτεϊνικών εγκλείστων, έχουν δείξει ότι τόσο η φυσικού τύπου α-συνουκλεΐνη όσο και οι μεταλλαγμένες της μορφές A53T και A30P, παρουσιάζουν μειωμένη διαλυτότητα, ύστερα από επώαση σε υδατικό διάλυμα, σε φυσιολογική θερμοκρασία. Αυτή η αλλαγή στις φυσικές της ιδιότητες οδηγεί, τελικά, στο σχηματισμό

επιμηκυμένων ινιδίων (εικόνα 7). Παρόλο που η δομή της α -συνουκλεΐνης έχει χαρακτηριστεί *in vitro*, λίγα είναι γνωστά για τη φυσική δομή της στα κύτταρα.

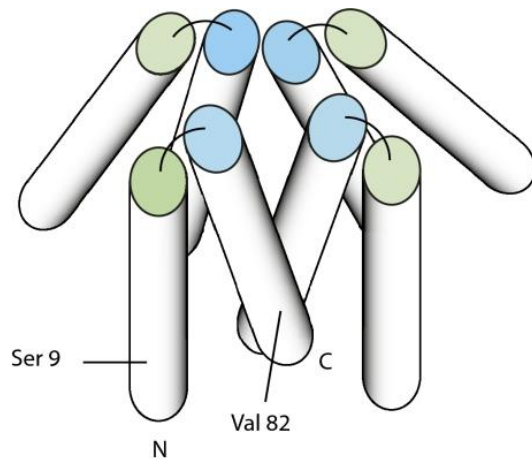


Εικόνα 7: Ηλεκτρονικές φωτογραφίες ινιδίων α -συνουκλεΐνης που δημιουργήθηκαν *in vitro*. (Α), (Β): Φυσικού τύπου α -συνουκλεΐνη. (Γ), (Δ) Μεταλλαγμένες μορφές της α -συνουκλεΐνης, A53T (Γ) και A30P (Δ) (Giasson et al., 1999).

Η αμινοξική αλληλουχία και η δομή μιας πρωτεΐνης είναι συνυφασμένες με τη λειτουργία της. Τα τελευταία χρόνια, γίνονται συνεχείς και συντονισμένες προσπάθειες, προκειμένου να διαλευκανθεί η δομή της α -συνουκλεΐνης, *in vivo*, με σκοπό να χαρακτηριστούν οι διαμορφώσεις εκείνες που καθορίζουν τις ιδιότητες της πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο, και εκείνες που παρεκκλίνουν και οδηγούν σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η νόσος του Parkinson, και άλλες συνουκλεϊνοπάθειες. Σε αυτά τα πλαίσια, ο ολιγομερισμός της α -συνουκλεΐνης ή η αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες έχει προταθεί ως πιθανός μηχανισμός, μέσω του οποίου η α -συνουκλεΐνη είναι σε θέση να λαμβάνει διαφορετικές διαμορφώσεις και λειτουργίες *in vivo* (Lashuel et al., 2013).

Σύμφωνα με δύο πρόσφατες μελέτες, *in vivo*, υπό φυσιολογικές συνθήκες, η α -συνουκλεΐνη, βρίσκεται υπό τη μορφή ενός αναδιπλωμένου τετραμερούς (Bartels et al., 2011; Wang et al., 2011). Ο Bartels και οι συνεργάτες του, με τη χρήση χρωματογραφίας διήθησης πηκτής (SEC), native PAGE (clear και blue-native PAGE), καθώς και μέτρησης της ισορροπίας καθίζησης, έδειξαν ότι η απομονωμένη α -συνουκλεΐνη από κυτταρικές σειρές θηλαστικών ή από ερυθροκύτταρα, υπάρχει ως σταθερό τετραμερές από α -έλικες, μοριακού βάρους 58–60 kDa (Bartels et al., 2011). Στη δεύτερη μελέτη, η ομάδα του Wang, βασιζόμενη στην πυρηνική μαγνητική τομογραφία (NMR), τη μέθοδο της χημικής σύζευξης και τη SEC, έδειξαν ότι η παραγόμενη από το βακτήριο *Escherichia coli* α -συνουκλεΐνη απαντά ως ένα

«δυναμικό τετραμερές» πλούσιο σε δομές α-έλικες (**εικόνα 8**) (Wang et al., 2011). Και οι δύο μελέτες υποστηρίζουν ότι η τετραμερής ελικοειδής διαμόρφωση, ανθίσταται στη συσσωμάτωση και τη δημιουργία ινιδίων.



Εικόνα 8: Προτεινόμενο μοντέλο της τετραμερούς δομής της α-συνουκλείνης.

Οι έλικες αναπαριστώνται ως κύλινδροι. Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης (N-) αντιπροσωπεύει το άκρο με την πρώτη έλικα α1 (κύλινδρος σημασμένος με πράσινο χρώμα) να τελειώνει στο αμινοξικό κατάλοιπο 43. Η δεύτερη έλικα α2, (κύλινδρος σημασμένος με μπλε χρώμα) ξεκινά στο κατάλοιπο 50 και καταλήγει στο 103 (με την ένδειξη C). Το τμήμα του πολυπεπτιδίου το οποίο αναμένεται να στερείται σταθερής δομής δεν απεικονίζεται. Προσαρμογή από (Wang et al., 2011).

Ωστόσο, τα παραπάνω ευρήματα δεν έχουν επιβεβαιωθεί από άλλες ερευνητικές ομάδες. Ο Lashuel και οι συνεργάτες του, απομόνωσαν την α-συνουκλείνη από κυτταρικές σειρές θηλαστικών, από ερυθροκύτταρα, από εγκέφαλο μύος, επίμυος ή ανθρώπου και από διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι η κινητικότητα που παρουσίασε η απομονωμένη α-συνουκλείνη σε αποδιατακτικές ή μη (native gels) συνθήκες ήταν πανομοιότυπη με την αντίστοιχη της μη αναδιπλωμένης μονομερούς α-συνουκλείνης που είχε παραχθεί σε βακτήρια *E. coli* (Fauvet et al., 2012b). Επιπλέον, με βάση τα αποτελέσματα της NMR, που αφορούν στην α-συνουκλείνη σε άθικτα κύτταρα, αποκλείεται η παρουσία σταθερών ή μεγαλομοριακών ολιγομερών δομών, ενώ επιβεβαιώνεται η εγγενής τάση της πρωτεΐνης για έλλειψη καθορισμένης διαμόρφωσης (Fauvet et al., 2012a). Τέλος, ο Burre και οι συνεργάτες του, με τη χρήση συνδυασμένων βιοχημικών τεχνικών, απορρίπτουν τη δομή του τετραμερούς ως βασική διαμόρφωση της πρωτεΐνης και ενισχύουν την άποψη του μη αναδιπλωμένου μονομερούς (Burre et al., 2013).

Συνοψίζοντας, είναι επιτακτική η ανάγκη για την ανάπτυξη νέων εργαλείων και μεθοδολογιών, με σκοπό τον άμεσο εντοπισμό και την παρακολούθηση αλλαγών στη δομή της α-συνουκλείνης και των διαφορετικών ολιγομερών διαμορφώσεών της σε ζωντανά κύτταρα και *in vivo*. Μόνο με αυτήν την προσέγγιση είναι δυνατή η κατανόηση της φυσιολογικής λειτουργίας της α-συνουκλείνης και του μηχανισμού μέσω του οποίου αυτή μεταβάλλεται στις παθολογικές καταστάσεις.

Η α-συνουκλεΐνη μπορεί να υποστεί διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση, οξειδωση-νιτροζυλίωση και κατάτμηση προς τις καρβοξυτελικές περιοχές (κολόβωση). Θεωρείται δε ότι αυτές οι τροποποιήσεις μεταβάλλουν την τάση της α-συνουκλεΐνης να δημιουργεί ολιγομερή και πρωτεϊνικά συσσωματώματα. Πιο συγκεκριμένα, διαρκής φωσφορυλίωση της α-συνουκλεΐνης στη σερίνη 129 (Ser-129) παρατηρήθηκε αρχικά σε κυτταρικές καλλιέργειες ανθρώπινων HEK-293 και PC-12 κυττάρων επίμυος (Okochi et al., 2000). Επιπλέον, η φωσφορυλίωση στο συγκεκριμένο κατάλοιπο έδειξε ότι αυξάνει την τάση της α-συνουκλεΐνης για σχηματισμό ινιδίων. Το γεγονός αυτό πιστοποιήθηκε με τη χρήση αντισωμάτων έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης, σε τομές εγκεφάλου, συναινώντας υπέρ του ρόλου της φωσφορυλίωσης στο σχηματισμό συσσωματωμάτων και πρωτεϊνικών εγκλείστων (Fujiwara et al., 2002). Παραμένει, παρόλα αυτά, άγνωστο το κατά πόσον η παρουσία φωσφορυλιωμένων μορφών έχει κάποιο αιτιολογικό ρόλο στη δημιουργία των εγκλείστων ή πρόκειται για μια δευτερεύουσα επακόλουθη τροποποίηση. Μια δεύτερη θέση φωσφορυλίωσης στο αμινοξικό κατάλοιπο τυροσίνη 125 (Tyr-125) από την Src οικογένεια κινασών τυροσίνης έχειδειχθεί ότι δρα κατασταλτικά στην ικανότητα της α-συνουκλεΐνης για συσσωμάτωση (Negro et al., 2002). Φαίνεται, λοιπόν, ότι η φωσφορυλίωση μπορεί να διευκολύνει ή να καταστείλει την ικανότητα της α-συνουκλεΐνης να ολιγομερίζεται, γεγονός που σχετίζεται με τη θέση και το αμινοξικό κατάλοιπο κάθε φορά.

Οι πιο κοινές από τις υπόλοιπες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η νιτροζυλίωση και η κολόβωση, φαίνεται να εμφανίζονται πιο συχνά σε παθολογικές παρά σε φυσιολογικές καταστάσεις. Έκθεση σε οξειδωτικούς παράγοντες ή σε παράγοντες νιτροζυλίωσης προκαλεί διμερισμό και σταθεροποίηση ινιδίων α-συνουκλεΐνης *in vitro* (Hashimoto and Masliah, 1999; Souza et al., 2000; Takahashi et al., 2002). Σημειωτέον δε ότι η νιτροζυλιωμένη α-συνουκλεΐνη αποτελεί συστατικό στοιχείο των συσσωματωμάτων Lewy (Giasson et al., 2000a). Τέλος, η κολόβωση έχει συσχετιστεί με αυξημένη τάση για ολιγομερισμό (Hoyer et al., 2004; Li et al., 2005; Liu et al., 2005).

2.2. Ο φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης

Ο φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί μέχρι και σήμερα, καθώς τα μοντέλα μυών στους οποίους έχει αποσιωπηθεί η έκφραση της εν λόγω πρωτεΐνης δεν παρουσιάζουν κάποιον ιδιαίτερο φαινότυπο (Chandra et al., 2004). Επίσης, είναι γνωστό ότι κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ η έκφραση της α-συνουκλεΐνης έπεται της δημιουργίας των συνάψεων. Κατά συνέπεια, η συμβολή των συνουκλεϊνών στο σχηματισμό των συνάψεων δε φαίνεται να είναι σημαντική (Murphy et al., 2000). Ωστόσο, ο εντοπισμός της α-συνουκλεΐνης σε στενή συσχέτιση με τα συναπτικά κυστίδια των τελικών απολήξεων του νευράξονα, καθώς και η παρουσία του επαναλαμβανόμενου μοτίβου που προσομοιάζει το αντίστοιχο των απολιποπρωτεϊνών, στο αμινοτελικό της άκρο, έχουν πλαισιώσει την επικρατέστερη θεωρία, σχετικά με το φυσιολογικό της ρόλο στο κύτταρο, που αφορά στην αλληλεπίδρασή της με λιπίδια και τη διακίνηση των συναπτικών κυστιδίων. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η α-συνουκλεΐνη μπορεί να προσδεθεί σε όξινα φωσφολιπιδικά κυστίδια, κατά τρόπο που επηρεάζει δραματικά τη δευτεροταγή δομή της, μεταβάλλοντας από 3% σε 80% το ποσοστό των α-ελίκων που αυτή σχηματίζει (Davidson et al., 1998). Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι τόσο η α- όσο και η β-συνουκλεΐνη δρουν ως ισχυροί αναστολείς της φωσφολιπάσης D2, η οποία εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη, καθώς και σε υπομεμβρανικά κυστίδια και παράγει φωσφατιδικό οξύ μετά από υδρόλυση της φωσφατιδυλοχολίνης (Jenco et al., 1998). Μέσω της αλληλεπίδρασής της με τη φωσφολιπάση D2, έχει προταθεί ότι η α-συνουκλεΐνη θα μπορούσε να συμμετέχει στη βιογένεση και τον έλεγχο του κύκλου των συναπτικών κυστιδίων, καθώς ο μεταβολισμός του φωσφατιδικού οξέος εμπλέκεται ειδικά σε αυτήν τη διαδικασία.

Πίνακας 2: Πιθανές φυσιολογικές λειτουργίες της α -συνουκλείνης.

Συναπτική πλαστικότητα: Αλληλεπίδραση της α -συνουκλείνης με εγκεφαλικά κυστίδια και φωσφολιπιδικές μεμβράνες.
Ανάπτυξη και διατήρηση των συνάψεων: Εντοπισμός σε αναπτυσσόμενες προ-συναπτικές απολήξεις.
Νευρωνική διαφοροποίηση: Επεξεργασία κυττάρων PC12 με τον αυξητικό νευρικό παράγοντα (NGF) αυξάνει τα επίπεδα της α -συνουκλείνης.
Μεταβολισμός λιπιδίων: Αυξημένη τάση πρόσδεσης της α -συνουκλείνης με μόρια ισχυρού υδρόφοβου περιεχομένου ή με εκτεθειμένες υδρόφοβες περιοχές.
Δυναμική των κυστιδίων: Η μείωση των επιπέδων έκφρασης της α -συνουκλείνης συνοδεύεται από μείωση του αριθμού των κυστιδίων στις προσυναπτικές απολήξεις.
Φλεγμονώδεις διαδικασίες και ανοσο-απόκριση: Χορήγηση ιντερλευκίνης-1 β σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά αστροκυττάρων ακολουθείται από αύξηση των επιπέδων της α -συνουκλείνης.
Τροποποίηση της λειτουργίας της πρωτεΐνης tau: φωσφορυλίωση της tau στη σερίνη-262 από την α -συνουκλείνη αναστέλλει την πρόσδεση της tau στους μικροσωληνίσκους.
Συμμετοχή στη συγκρότηση του συμπλόκου SNARE: Σε μοντέλο μύος στο οποίο έχει αποσιωπηθεί η έκφραση της πρωτεΐνης CSPa παρατηρείται προοδευτικός εκφυλισμός των συνάψεων, μέσα στους δύο πρώτους μήνες και τελικά θάνατος. Η υπερέκφραση της φυσικού τύπου α -συνουκλείνης στο παραπάνω ζωικό μοντέλο, καθυστερεί την εκδήλωση του περιγραφόμενου φαινότυπου.

Προσαρμογή από (Chandra et al., 2005; Hegde and Jagannatha Rao, 2003)

Μύες που δεν εκφράζουν την α -συνουκλείνη (KO), παρουσιάζουν αυξημένη απελευθέρωση της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα, γεγονός που υποδεικνύει τον πιθανό ρόλο της πρωτεΐνης ως αρνητικού ρυθμιστή της νευροδιαβίβασης (Abeliovich et al., 2000). Υπάρχουν επίσης ισχυρά δεδομένα που καθιστούν την α -συνουκλείνη κριτικής σημασίας ρυθμιστή της δυναμικής των συναπτικών κυστιδίων (Burre et al., 2010; Chandra et al., 2004; Murphy et al., 2000). Έχει δειχθεί ότι η α -συνουκλείνη δρα ως μια μη κλασσική πρωτεΐνη-συνοδός (nonclassical chaperone), συμπληρώνοντας τη δράση της Cystein-string protein (CSPa) (Chandra et al., 2005). Η CSPa διευκολύνει τη σωστή συγκρότηση του συμπλόκου SNARE, το οποίο με τη σειρά του συμμετέχει στην απελευθέρωση των συναπτικών κυστιδίων. Επίσης, ταυτόχρονη αποσιώπηση των γονιδίων της α -, β - και γ - συνουκλείνης προκαλεί ηλικιοεξαρτώμενη νευρωνική διαταραχή σε μύες (Gretten-Harrison et al., 2010). Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με ευρήματα ανεξάρτητων μελετών, διαταραχές των προσυναπτικών άκρων πιθανότατα να αποτελούν πρώιμο γεγονός νευροεκφυλισμού (Gray et al., 2009; Nemani et al., 2010). Επομένως, η αδυναμία διατήρησης της ορθής λειτουργίας των πρωτεϊνών του συμπλόκου SNARE, όσον αφορά στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών, δυνητικά θα μπορούσε να

προκαλέσει τη νόσο του Parkinson (Sharma et al., 2012). Η αφετηρία δε, της αλληλουχίας των παραπάνω παθολογικών γεγονότων θα μπορούσε να εντοπιστεί στη λειτουργική παρέκκλιση της α-συνουκλεΐνης (Burre et al., 2010; Greten-Harrison et al., 2010; Nemani et al., 2010).

2.3. Ο παθολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης

2.3.1. Συσχέτιση με τη νόσο του Parkinson

Η συσχέτιση της α-συνουκλεΐνης με το νευροεκφυλισμό προέκυψε από δύο ουσιώδεις παρατηρήσεις: 1) την ταυτοποίηση σημειακών μεταλλάξεων, αλλά και διπλασιασμών και τριπλασιασμών του γενετικού της τόπου, SNCA, σε ένα μικρό αριθμό οικογενειών με αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα για τη νόσο του Parkinson πρώιμης έναρξης και 2) την ανακάλυψη ότι η α-συνουκλεΐνη αποτελεί βασικό συστατικό των σωματίων Lewy, που ανευρίσκονται τόσο στην οικογενή όσο και στη σποραδική μορφή της νόσου.

Η πρώτη σημειακή μετάλλαξη αντικατάστασης Ala53Thr (A53T) ανακαλύφθηκε σε μια μεγάλη ιταλική οικογένεια από το Contursi της νότιας Ιταλίας και τρεις ελληνικές οικογένειες της ορεινής Κορινθίας (Polymeropoulos et al., 1997) (**εικόνα 9**). Εν συνεχεία, δύο ακόμα σημειακές μεταλλάξεις, Ala30Pro (A30P) και E46K (**εικόνα 9**), περιγράφηκαν σε μια γερμανική και μια ισπανική οικογένεια αντίστοιχα, με συγγενείς πάσχοντες από τη νόσο πρώιμης έναρξης και αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονομικότητας (Kruger et al., 1998; Zarranz et al., 2004). Πολύ πρόσφατα, ανιχνεύθηκε και μια νέα σημειακή μετάλλαξη, η G51D από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες. Η Lesage και οι συνεργάτες της ανακάλυψαν την εν λόγω σημειακή μετάλλαξη, σε μια γαλλική οικογένεια με σύνδρομο πυραμιδικού παρκινσονισμού (Lesage et al., 2013). Μάλιστα, έκαναν λόγο για έναν ασυνήθιστο φαινότυπο, που χαρακτηρίζεται από πρώιμη εκδήλωση της νόσου, μέτρια απόκριση στη θεραπεία με λεβοντόπα, ραγδαία εξέλιξη των συμπτωμάτων και θάνατο μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ο Kiely και οι συνεργάτες του εντόπισαν τη G51D μετάλλαξη σε μια σε μια βρετανική οικογένεια, με επίσης πρώιμη εκδήλωση της νόσου. Ο τύπος κληρονομικότητας είναι αυτοσωμικός επικρατής, ενώ τα κλινικά χαρακτηριστικά προσομοιάζουν με εκείνα που παρατηρούνται στην περίπτωση τριπλασιασμού του γονιδίου της SNCA ή της σημειακής μετάλλαξης A53T (Kiely et al., 2013). Ο Proukakis και οι συνεργάτες του, ταυτοποίησαν και κατέγραψαν μια νέα

σημειακή μετάλλαξη στο εξόνιο 4 του γονιδίου της SNCA, που κωδικοποιεί για την αντικατάσταση H50Q (**εικόνα 10**), σε μια καυκάσια αγγλίδα ασθενή, χωρίς προηγούμενο οικογενειακό ιστορικό (Proukakis et al., 2013a). Την ίδια μετάλλαξη (H50Q) εντόπισε μια ανεξάρτητη ερευνητική ομάδα, επίσης, στο εξόνιο 4 του γονιδίου της SNCA, ασθενούς με προηγούμενο οικογενειακό ιστορικό παρκινσονισμού, από την πλευρά της μητέρας, αγγλικής / ουαλικής καταγωγής, που είχε θετική απόκριση στη θεραπεία με λεβοντόπα (Appel-Cresswell et al., 2013).

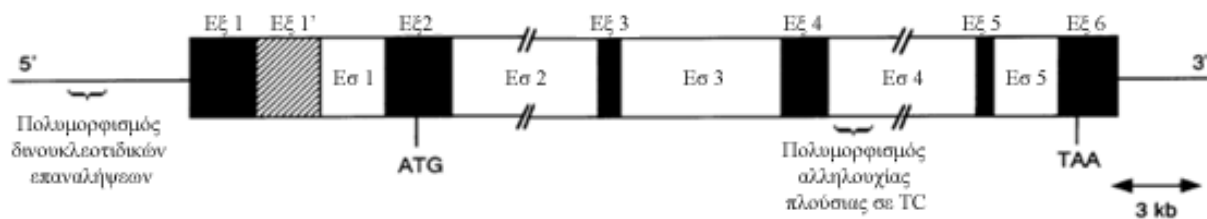


Εικόνα 9: Μοντέλο δομής της α -συνουκλεΐνης.

Σημειώνονται οι μεταλλάξεις E46K, H50Q και A53T, οι οποίες βρίσκονται στην ίδια πλευρά της αμφιφιλικής έλικας. Προσαρμογή από (Appel-Cresswell et al., 2013).

Το γεγονός ότι η α -συνουκλεΐνη αποτελεί το βασικό συστατικό των σωματίων Lewy και στις σποραδικές περιπτώσεις εμφάνισης της νόσου, οδήγησε στη σκέψη ότι και η φυσικού τύπου α -συνουκλεΐνη είναι δυνατόν να αποκτήσει κάποια μη φυσιολογική λειτουργία, η οποία εντείνεται στις περιπτώσεις των μεταλλάξεων. Η συγκεκριμένη υπόθεση ενισχύθηκε μετά την περιγραφή του τριπλασιασμού του γενετικού τόπου της α -συνουκλεΐνης, σε μια πολυμελή οικογένεια από την Iowa. Τριπλασιασμός του αλληλομόρφου είχε ως αποτέλεσμα το διπλασιασμό των επιπέδων τόσο του mRNA, όσο και της πρωτεΐνης, και την παρουσία SDS-αδιάλυτων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων σε νεκροτομικό υλικό από δείγματα εγκεφάλου των ασθενών. Κλινικά, τα μέλη των οικογενειών εμφάνιζαν τυπικά συμπτώματα της νόσου με πιο πρόωμη έναρξη και πιο γρήγορη επιδείνωση σε σχέση με τις υπόλοιπες σποραδικές περιπτώσεις (Miller et al., 2004; Singleton et al., 2003). Διπλασιασμός του γενετικού τόπου της α -συνουκλεΐνης παρατηρήθηκε αργότερα σε οικογένειες από τη Γαλλία και την Ιταλία, στις οποίες οι ασθενείς είχαν τρία αντίγραφα του γονιδίου (Chartier-Harlin et al., 2004; Ibanez et al., 2004). Η ηλικία έναρξης της νόσου σε αυτές τις περιπτώσεις πολλαπλασιασμού του γενετικού τόπου, δείχνει μια συσχέτιση με τον αριθμό των αντιγράφων, ενώ οι ασθενείς παρουσιάζουν πιο σοβαρή παθολογία Lewy (Ikeuchi et al., 2008).

Πολυμορφισμοί στον υποκινητή του γονιδίου της α -συνουκλεΐνης (Rep1) αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 1996 (Xia et al., 1996) (**εικόνα 10**) και συνδέθηκαν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου του Parkinson (Farrer et al., 2001; Hadjigeorgiou et al., 2006; Kruger et al., 1999; Mellick et al., 2005; Pals et al., 2004; Tan et al., 2000). Πρόκειται για δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις (TC)X(TT)(TC)Y(TA)Z(CA)W, όπου X,Y,Z και W δηλώνουν τον αριθμό των επαναλήψεων και τοποθετούνται ~ 10Kb στον ανάρρου του γονιδίου. Μελέτες συσχέτισης έδειξαν ότι το αυξημένο μέγεθος του Rep1 σχετίζεται με επιτάχυνση του χρόνου έναρξης της νόσου (Kay et al., 2008) και αυξημένα επίπεδα mRNA α -συνουκλεΐνης (Chiba-Falek et al., 2003).



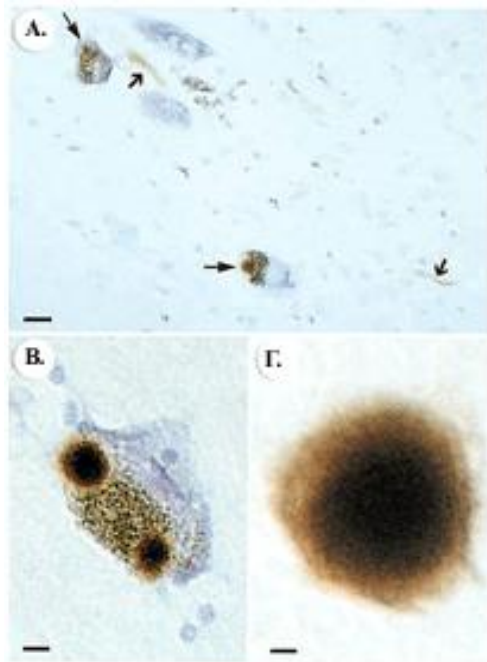
Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση του γονιδίου της α -συνουκλεΐνης.

Τα μαύρα κουτιά συμβολίζουν τα εξόνια (EΞ), ενώ τα λευκά τα εσόνια (Eσ). Τα κενά εσόνια 2 και 4 επισημαίνουν το μεγάλο μέγεθος των περιοχών αυτών, που δεν έχουν πλήρως κλωνοποιηθεί. Το μικρό μαύρο κουτί συμβολίζει τη δινουκλεοτιδική επαναληπτική ακολουθία NACP-Rep 1, πολυμορφισμοί της οποίας έχουν προταθεί ως παράγοντας κινδύνου για εκδήλωση της νόσου του Parkinson (Xia et al., 2001).

Μελέτες γενετικής σύνδεσης και γενετικής συσχέτισης, έχουν δείξει ότι γονιδιακοί πολυμορφισμοί (Single-nucleotide polymorphism, SNP), που εντοπίζονται τόσο κοντά στο 3' όσο και στο 5' άκρο του γονιδίου, σχετίζονται με προδιάθεση για τη νόσο, αυξάνοντας τα επίπεδα του mRNA της α -συνουκλεΐνης (Holzmann et al., 2003; Mizuta et al., 2006; Mueller et al., 2005; Myhre et al., 2008; Wang et al., 2006; Winkler et al., 2007). Συνολικά τα δεδομένα από τις γενετικές μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη αιτιολογικής σχέσης της α -συνουκλεΐνης με τη νόσο του Parkinson. Η εν λόγω συσχέτιση αποκτά ολοένα και πιο γερά θεμέλια, ύστερα από τις νεότερες GWAS, οι οποίες καθιστούν το γονίδιο της SNCA, ως έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες προδιάθεσης για την εκδήλωση της νόσου του Parkinson (Simon-Sanchez et al., 2009).

Η α -συνουκλεΐνη, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αποτελεί το βασικό συστατικό των σωματίων Lewy, τα οποία, με τη σειρά τους, συνιστούν το χαρακτηριστικό μικροσκοπικό εύρημα στη σποραδική μορφή της νόσου του

Parkinson. Οι ερευνητές της ομάδας της Spillantini, το 1997, έδειξαν ότι τα σωμάτια Lewy χρωματίζονται ανοσοϊστοχημικά με τα αντισώματα έναντι της α-συνουκλείνης (Spillantini et al., 1997) (εικόνα 11). Βεβαίως, πρέπει να αναφερθεί ότι η εν λόγω πρωτεΐνη σχηματίζει ινίδια τα οποία σε συνδυασμό με άλλες πρωτεΐνες, όπως η ουβικουτίνη, η UCH-L1, η synphilin και η parkin, δημιουργούν τα κυτταρικά έγκλειστα στο κυτταρικό σώμα. Παράλληλα, βρέθηκε ότι τα σωμάτια Lewy είναι πλούσια σε α-συνουκλείνη, η οποία έχει χάσει τα τελευταία 20 αμινοξέα (Tofaris et al., 2003). Η δημιουργία ινιδίων της α-συνουκλείνης επηρεάζεται από τις μεταλλάξεις A53T και A30P, οι οποίες αυξάνουν την ταχύτητα πολυμερισμού. Η παρουσία της α-συνουκλείνης στα σωμάτια Lewy αντικατοπτρίζει μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ σποραδικής και οικογενούς μορφής της νόσου.



Εικόνα 11: Ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι της α-συνουκλείνης της μέλαινας ουσίας εγκεφάλου ασθενών με νόσο του Parkinson.

(A) Δύο διάστικτα νευρικά κύτταρα, καθένα από τα οποία περιέχει σωμάτια Lewy θετικά στη χρώση για α-συνουκλείνη (λεπτά βέλη). Θετικοί στη χρώση για α-συνουκλείνη παρουσιάζονται και οι νευρίτες Lewy (παχιά βέλη). Κλίμακα: 20μm. (B) Ένα διάστικτο νευρικό κύτταρο με δύο σωμάτια Lewy θετικά στη χρώση για α-συνουκλείνη. Κλίμακα: 8μm. (C) Εξωκυττάριο σωμάτιο Lewy θετικό στη χρώση για α-συνουκλείνη. Κλίμακα: 4μm. (Spillantini et al., 1997).

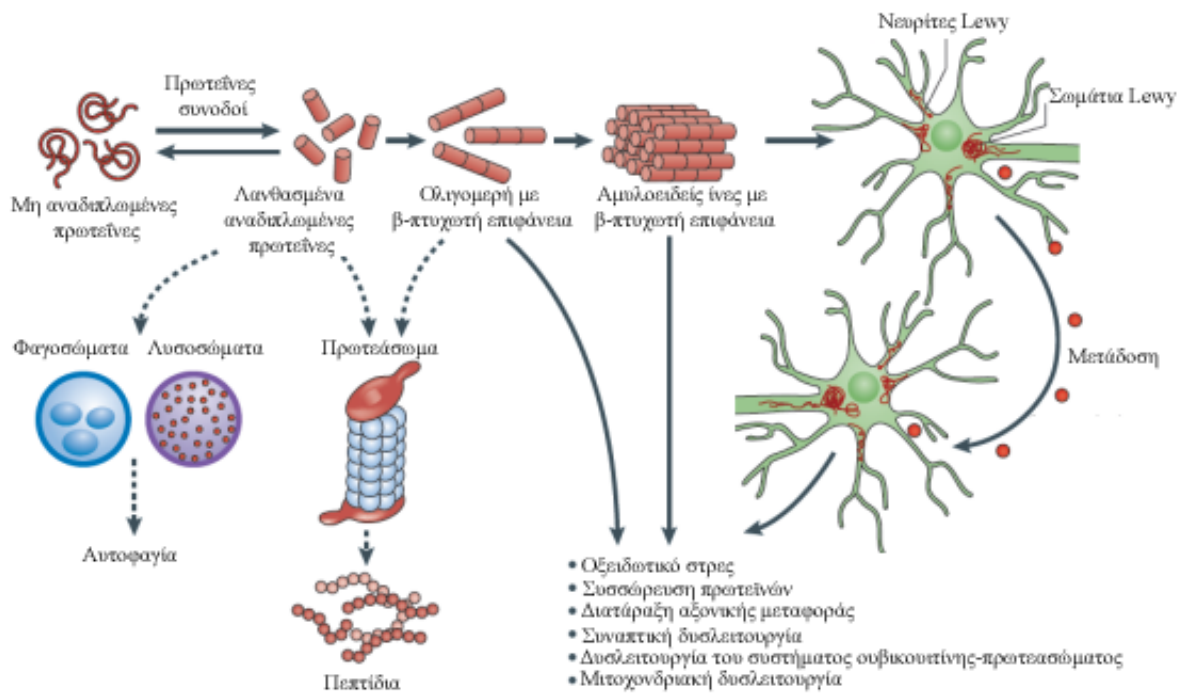
Μελέτες σε διαφορετικά κυτταρικά συστήματα, έδειξαν ότι η έκφραση της φυσικού τύπου ή της μεταλλαγμένης α-συνουκλείνης, οδηγεί στο σχηματισμό τέτοιων ολιγομερών μορφών, η παρουσία των οποίων συνοδεύεται από κυτταρικό θάνατο. Η χορήγηση χημικών αναστολέων του σχηματισμού ινιδίων ή η παρουσία πρωτεϊνών-συνοδών, ανατρέπουν το φαινόμενο της κυτταροτοξικότητας (Emmanouilidou et al.; Lee and Lee, 2002; Outeiro et al., 2008). Πάντως, η κυτταροτοξικότητα και η δημιουργία ολιγομερών δεν είναι εμφανής σε όλες τις περιπτώσεις (Hsu et al., 2000; Petrucelli et al., 2002; Saha et al., 2000; Zhou et al., 2000; Zhou et al., 2002). Μια πιθανή εξήγηση για την ασυμφωνία των

αποτελεσμάτων είναι τα επίπεδα υπερέκφρασης της πρωτεΐνης. Έτσι ο Seo και οι συνεργάτες του (Seo et al., 2002) πρότειναν ότι μόνο όταν τα ενδογενή επίπεδα της α-συνουκλεΐνης βρίσκονται πάνω από ένα κατώφλι, εμφανίζονται οι μη-φυσιολογικές επιδράσεις της πρωτεΐνης (Lee and Lee, 2002).

Η *in vivo* υπερέκφραση είτε της φυσικού τύπου είτε των μεταλλαγμένων μορφών της α-συνουκλεΐνης σε ζωικά μοντέλα, προκαλεί κλινικά και νευροπαθολογικά συμπτώματα, που προσομοιάζουν εκείνα της νόσου του Parkinson. Η χρήση τέτοιων προσεγγίσεων στοχεύει στην κατανόηση του μηχανισμού μέσω του οποίου δρα η α-συνουκλεΐνη, προάγοντας την παθογένεια της νόσου. Σε ένα από αυτά τα μοντέλα, η υπερέκφραση της A53T μετάλλαξης της α-συνουκλεΐνης σε διαγονιδιακούς μύες υπό τον έλεγχο του υποκινητή Thy-1, οδήγησε σε νευρικό εκφυλισμό, κυτταρική παθολογία με σωματία Lewy και κινητικές δυσλειτουργίες, χωρίς, ωστόσο, να υπάρχει έκφραση του γονιδίου στη μέλαινα ουσία (van der Putten et al., 2000). Οι διαγονιδιακοί μύες, οι οποίοι υπερέκφραζαν τη φυσιολογικού τύπου α-συνουκλεΐνη, υπό τον έλεγχο του υποκινητή PDGF, παρουσίαζαν προοδευτική συσσώρευση συσσωματωμάτων που περιείχαν α-συνουκλεΐνη και ουβικουιτίνη στις περιοχές του φλοιού, του ιππόκαμπου και της μέλαινας ουσίας. Επίσης, είχαν μείωση των ντοπαμινεργικών απολήξεων στα βασικά γάγγλια, ενώ ακόμη εμφάνιζαν και κινητικές δυσλειτουργίες (Masliah et al., 2000). Εντούτοις, η παθολογία εκδηλωνόταν από την ηλικία των δύο μηνών. Η υπερέκφραση της A53T μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης στον εγκέφαλο επίμυων, υπό τον έλεγχο του υποκινητή της πρωτεΐνης *prion*, οδήγησε σε αυξημένη παρουσία συσσωματωμάτων α-συνουκλεΐνης στις περιοχές του νωτιαίου μυελού, του εγκεφαλικού στελέχους, της παρεγκεφαλίδας και του θαλάμου από την ηλικία των επτά μηνών και σε σοβαρή παραπάρεση σε μεγάλη ηλικία (Giasson et al., 2002). Η δημιουργία διαγονιδιακών επίμυων, με στοχευμένη έκφραση της α-συνουκλεΐνης στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, έγινε με τη χρήση του υποκινητή της υδροξυλάσης της τυροσίνης (Tyrosine Hydroxylase, TH). Η υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης, η οποία στερείται τα τελευταία 20 αμινοξέα του καρβοξυτελικού της άκρου σε διαγονιδιακούς μύες, διευκολύνει τη δημιουργία ινιδίων και την παθολογική κατανομή της πρωτεΐνης. Στις περιοχές της μέλαινας ουσίας και του οσφρητικού βολβού παρατηρήθηκαν συσσωματώματα και στο ραβδωτό παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων ντοπαμίνης. Τέλος, οι μύες παρουσίασαν κινητικές δυσλειτουργίες σε ηλικία 18 μηνών (Tofaris et al., 2006).

2.3.2. Ο ρόλος της α-συνουκλεΐνης στην παθογένεια της νόσου του Parkinson

Δεδομένου του κυρίαρχου εντοπισμού της α-συνουκλεΐνης στο κυτταρόπλασμα, οι βασικές παθολογικές δράσεις της πρωτεΐνης, είναι εύλογο, να εντοπίζονται στο ενδοκυττάριο επίπεδο (Pacheco et al., 2012). Μεταξύ των μηχανισμών που μπορούν να περιγράψουν το ρόλο της ενδοκυττάριας α-συνουκλεΐνης στην παθογένεια της νόσου του Parkinson είναι οι εξής: 1) αναστολή του συστήματος πρωτεασώματος-ουβικουιτίνης (ubiquitin-proteasome system, UPS) (Emmanouilidou et al., 2010b), 2) διαταραχές της αυτοφαγίας που διαμεσολαβείται από πρωτεΐνες-συνοδούς (Chaperone-mediated autophagy, CMA) (Cuervo et al., 2004; Xilouri et al., 2009), 3) αλλαγές στην απελευθέρωση των συναπτικών κυστιδίων (Murphy et al., 2000), 4) διαταραχή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων (Elkon et al., 2002), 5) δημιουργία αμυλοειδούς πόρου (Quist et al., 2005; Volles et al., 2001), και 6) παραγωγή ROS (Junn and Mouradian, 2002) (**βλπ. ενότητα 1.4.**). Όλες οι παραπάνω διαταραχές (**εικόνα 12**) οδηγούν στη νευρωνική δυσλειτουργία και τελικά την κυτταρική έκπτωση (Cookson and van der Brug, 2008). Κατά την τελευταία δεκαετία, ωστόσο, ολοένα αυξανόμενος όγκος δεδομένων, πιστοποιεί την παρουσία της α-συνουκλεΐνης στον εξωκυττάριο χώρο (El-Agnaf et al., 2003; El-Agnaf et al., 2006). Το γεγονός αυτό, κατέρριψε την αρχική άποψη, σύμφωνα με την οποία η α-συνουκλεΐνη δρα, αυστηρά, μέσα στα όρια των κυττάρων που την εκφράζουν και αναδεικνύει την παρακρινή δράση, ως έναν επιπλέον πιθανό μηχανισμό εξάπλωσης της παθογένειας της νόσου του Parkinson (**βλπ. ενότητα 3.5.**) (Lee et al., 2008b; Lee, 2008; Luk et al., 2009).



Εικόνα 12: Υποθετικό μοντέλο της νευροτοξικής δράσης της α -συνουκλεΐνης στη νόσο του Parkinson.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η α -συνουκλεΐνη βρίσκεται σε μια διαλυτή τυχαία διαμόρφωση, ως μη αναδιπλωμένη πρωτεΐνη. Υπό παθολογικές συνθήκες, υφίσταται λανθασμένη αναδίπλωση, μεταπίπτοντας στις παθολογικές ολιγομερείς μορφές (διμερείς, τριμερείς, ολιγομερείς), οι οποίες πολυμερίζονται περαιτέρω, σχηματίζοντας υψηλότερων τάξεων συσσωματωμένες δομές (πρωτοϊνίδια, ενδιάμεσα ινίδια και αμυλοειδείς ίνες). Τέλος, τα συσσωματώματα αυτά αποτελούν τους ακρογωνιαίους λίθους για τη δημιουργία των παθολογικών εγκλείστων, που χαρακτηρίζουν τη νόσο του Parkinson, τα σωματίδια και τους νευρίτες Lewy. Γενετικές ανωμαλίες, καθώς και περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι δυνατόν να επιταχύνουν την παραπάνω διαδικασία. Τα συστήματα ελέγχου του κυττάρου (πρωτεΐνες-συνοδοί, σύστημα ουβικουτίνης-πρωτεασώματος, σύστημα αυτοφαγίας-λυσοσωμάτων), καθώς επιστρατεύονται προκειμένου να καταπολεμήσουν τις λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, υπερφορτώνονται από τα ολιγομερή της α -συνουκλεΐνης (διάστικτες γραμμές). Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η εξάπλωση της νόσου του Parkinson και των σχετιζόμενων ασθενειών, πιθανά να οφείλεται στη διακυτταρική μεταφορά των παθολογικών μορφών της α -συνουκλεΐνης. Προσαρμογή από (Irwin et al., 2013).

Είναι πιθανόν η α -συνουκλεΐνη να έχει διττό ρόλο: ένα φυσιολογικό, που σχετίζεται με τη ρύθμιση της συναπτικής νευροδιαβίβασης και έναν παθολογικό, που εμπλέκεται στις νευροεκφυλιστικές διεργασίες (εικόνα 12). Είναι δυνατόν αυτοί οι δύο ρόλοι με κάποιο τρόπο να συνδέονται; Προς το παρόν, δεν υπάρχει σαφής απάντηση, ωστόσο, είναι πολύ πιθανόν να υπάρχει ένας «συναπτικός διακόπτης», ο οποίος να ορίζει την εκδήλωση της ασθένειας (Pacheco et al., 2012). Επομένως, η κατανόηση των ομοιοτήτων και των διαφορών μεταξύ των φυσιολογικών και παθολογικών μηχανισμών δράσης της α -συνουκλεΐνης χρήζει ιδιαίτερης προσοχής. Η απάντηση, τουλάχιστον εν μέρει, είναι δυνατόν να βρίσκεται στην ευελιξία διαμόρφωσης που επιδεικνύει η α -συνουκλεΐνη και η οποία της επιτρέπει να

μεταβαίνει από τη φυσιολογική διαλυτή μορφή της, στη συσσωματωμένη αδιάλυτη και παθολογική δομή (Pacheco et al., 2012).

2.3.3. Τοξικές μορφές της α-συνουκλεΐνης

Η α-συνουκλεΐνη, υπό φυσιολογικές συνθήκες και σε υδατικό διάλυμα βρίσκεται σε αναδιαταγμένη μορφή (Weinreb et al., 1996), όπως ήδη ανφέρθηκε (βλπ. ενότητα 2.1.), ωστόσο χαρακτηρίζεται από έντονη ενδογενή τάση προς ολιγομερισμό (Vekrellis et al., 2004). Η επικρατούσα θεωρία για τη σύνδεση της α-συνουκλεΐνης με το νευροεκφυλισμό βασίζεται στη διαδικασία μετατροπής της από την υδατοδιαλυτή μονομερή της μορφή, σε διαλυτά ή αδιάλυτα ολιγομερή (πρωτοϊνίδια) και στη συνέχεια σε αδιάλυτα συσσωματώματα (ινίδια), με τελική κατάληξη το σχηματισμό συσσωματωμάτων Lewy (εικόνα 13). Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα μονομερή της α-συνουκλεΐνης μετατρέπονται σε τοξικά ολιγομερή και εν συνεχεία αμυλοειδή ινίδια παραμένει άγνωστος, ως επί το πλείστον (Tsigelny et al., 2007). Ωστόσο, θεωρείται ότι η παραπάνω διαδικασία ξεκινά στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης σε λιπιδικές μικροσχεδίες (Bar-On et al., 2008).

Σύμφωνα με *in vitro* μελέτες, η διαδικασία συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης, ακολουθεί ένα μηχανισμό πυρήνωσης (εικόνα 6, 13), ο οποίος χαρακτηρίζεται από μια αργή έναρξη (Cremades et al., 2012), μια ακόλουθη φάση επιμήκυνσης, ενώ κορυφώνεται όταν επέλθουν τα βασικά επίπεδα ισορροπίας μεταξύ των διαφορετικών μορφών (Wood et al., 1999). Η εξέλιξη των γεγονότων εξαρτάται από τη φύση της α-συνουκλεΐνης (φυσικός τύπος ή μεταλλαγμένη μορφή) (Li et al., 2001), καθώς και από συνθήκες όπως το pH, η θερμοκρασία (Uversky et al., 2001a) και η συγκέντρωση των μεταλλικών ιόντων (Uversky et al., 2001b). Η δομή των συσσωματωμάτων της α-συνουκλεΐνης, τα οποία δημιουργούνται *in vitro*, προσομοιάζουν αυτήν των αντίστοιχων που απομονώνονται από τον εγκέφαλο, εμφανίζοντας την τυπική μορφολογία των αμυλοειδών ινιδίων (Conway et al., 2000a). Μεταλλάξεις που σχετίζονται με τη νόσο, όπως η A53T και η A30P, προωθούν τη δημιουργία πρωτοϊνιδιακών ολιγομερών μορφών (εικόνα 7), ενώ η E46K, όπως και η πρόσφατα δημοσιευμένη G51D μετάλλαξη φαίνεται να μειώνουν το σχηματισμό τέτοιων συσσωματώσεων (Bisaglia et al., 2009; Lesage et al., 2013).

Αρχικά η παρουσία των σωματίων και νευριτών Lewy θεωρήθηκε απόρροια της εκφυλιστικής διαδικασίας που χαρακτηρίζει τη νόσο του Parkinson. Ο εντοπισμός των σημειακών μεταλλάξεων της α-συνουκλεΐνης, του κύριου συστατικού των

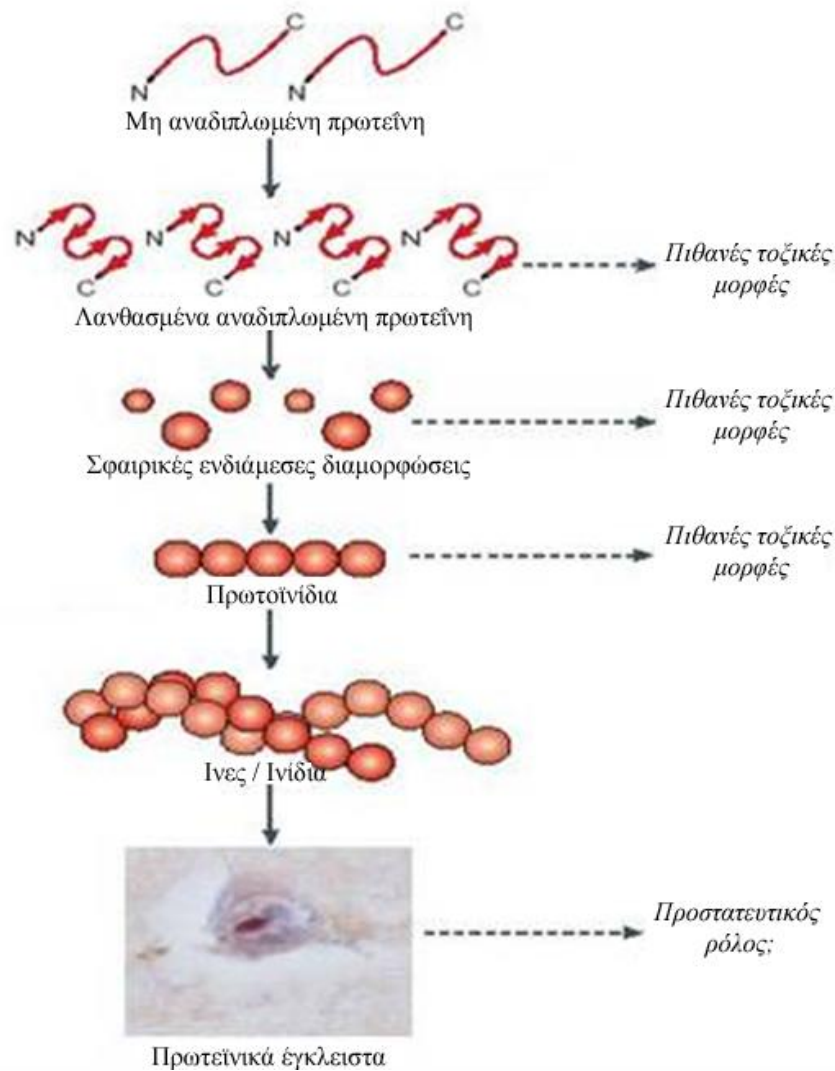
ενδοκυττάρων συσσωματωμάτων και η συσχέτισή τους με τις κληρονομήσιμες μορφές της νόσου, αποκάλυψε μια αιτιολογική σχέση της εν λόγω πρωτεΐνης με τη νόσο του Parkinson (Bendor et al., 2013). Ωστόσο, μέχρι και σήμερα ο ακριβής ρόλος των σωματίων και των νευριτών Lewy δεν είναι γνωστός, υπό την έννοια, του αν είναι προστατευτικός ή αν οξύνει τη νευροεκφυλιστική διαδικασία.

Πιο συγκεκριμένα, η απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου προηγείται της εκδήλωσης των κινητικών συμπτωμάτων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτεϊνική συσσώρευση δεν είναι σημαντική για τον κυτταρικό εκφυλισμό. Επιπλέον, ιστολογική εξέταση νεκροτομικού υλικού από ασυμπτωματικούς υπερήλικες, έχει αποκαλύψει την έντονη παρουσία σωματίων και νευριτών Lewy (Ding et al., 2006). Κατά συνέπεια, υπάρχει η πιθανότητα η συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης να αποτελεί μια ενδογενή νευροπροστατευτική απόκριση των κυττάρων, σε αντίθεση με άλλες διαμορφώσεις της πρωτεΐνης, λ.χ. τα διαλυτά ολιγομερή, οι οποίες πιθανόν να έχουν ένα νευροτοξικό δυναμικό. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ζωικά μοντέλα της νόσου του Parkinson, έδειξαν ότι η συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης δε συνοδεύεται πάντα από κυτταρική απώλεια.

Παράλληλα, η α-συνουκλεΐνη είναι δυνατόν να υποστεί έναν αριθμό μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων (βλπ. ενότητα 2.1.), οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να επηρεάσουν την τάση της πρωτεΐνης για ολιγομερισμό, καθώς και το τοξικό δυναμικό της. Πιο συγκεκριμένα, οι συνθήκες οξειδωτικού στρες μπορούν να προκαλέσουν τη νιτροζυλίωση ή και την οξείδωση σε κατάλοιπο μεθειονίνης της α-συνουκλεΐνης, αν και οι τροποποιήσεις αυτές δε φαίνεται να προωθούν τον ολιγομερισμό της (Breydo et al., 2012; Giasson et al., 2000b). Από την άλλη πλευρά η φωσφορυλίωση στη Ser 129 ενισχύει εξαιρετικά την τάση της α-συνουκλεΐνης για ολιγομερισμό (Smith et al., 2005). Ωστόσο, μέχρι και σήμερα η τοξικότητα της εν λόγω φωσφορυλιωμένης μορφής δεν έχει αποσαφηνιστεί, δεδομένου ότι τα αποτελέσματα ανεξάρτητων μελετών παραμένουν αντικρουόμενα (Azeredo da Silveira et al., 2009; Chen and Feany, 2005). Αντιθέτως, η φωσφορυλίωση στη Ser 87 ή την Tyr 125 αποτρέπουν το σχηματισμό ολιγομερών (Negro et al., 2002; Paleologou et al., 2010). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η ντοπαμίνη ενισχύει τον ολιγομερισμό της α-συνουκλεΐνης, όχι όμως το σχηματισμό αμυλοειδών ινιδίων, καθώς σταθεροποιεί τα ολιγομερή της στο στάδιο των τοξικών πρωτοϊνιδίων (Bisaglia et al., 2010; Herrera et al., 2008; Norris et al., 2005; Rekas et al., 2010).

Παράλληλα η κατάτμηση του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης επάγει τη συσσωμάτωσή της. Μάλιστα, έχειδειχθεί *in vivo* ότι τέτοιου τύπου τροποποίηση συνοδεύεται από το σχηματισμό συσσωματωμάτων και παθολογικές αλλοιώσεις (Li et al., 2005; Murray et al., 2003; Ulusoy et al., 2010). Τέλος, η ικανότητα ολιγομερισμού της α-συνουκλεΐνης είναι δυνατόν να επηρεαστεί και από συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι τα βαρέα μέταλλα επάγουν την πρωτεϊνική συσσωμάτωση (Breydo et al., 2012).

Πρόσφατα δεδομένα, κάνουν λόγο για την τάση της φυσικού τύπου πρωτεΐνης να δημιουργεί τετραμερή, τα οποία είναι ανθεκτικά στη διαδικασία της συσσωμάτωσης (**βλπ. ενότητα 2.1**) (Bartels et al., 2011). Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, έχει προταθεί η υπόθεση, σύμφωνα με την οποία η αποσταθεροποίηση των τετραμερών ελικοειδών δομών προηγείται της λανθασμένης αναδίπλωσης και της συσσωμάτωσης της α-συνουκλεΐνης κατά την παθογένεια της νόσου του Parkinson. Τέλος, έχειδειχθεί ότι διαλυτά ολιγομερή, όπως διμερή, τριμερή, τετραμερή, πενταμερή και εξαμερή, των οποίων τα μοριακά βάρη κυμαίνονται μεταξύ 20-100 kDa, εμφανίζουν τοξικό δυναμικό (Danzon et al., 2007).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ολιγομερισμού της α -συνουκλεΐνης.

Έχει προταθεί ότι τα πρωτοϊνίδια και όχι οι πιο ώριμες συσσωματωμένες μορφές αποτελούν την τοξική μορφή της α -συνουκλεΐνης. Στοιχεία από μελέτες συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι τα σωματία Lewy δεν προκαλούν, αλλά αντίθετα προστατεύουν από νευροεκφυλισμό (Goldberg and Lansbury, 2000).

Συμπερασματικά, είναι κοινώς αποδεκτό ότι οι διαλυτές ολιγομερείς μορφές της α -συνουκλεΐνης, παρά τα αδιάλυτα ινίδια, ευθύνονται για τη νευροτοξική της δράση, χωρίς να αποκλείεται το γεγονός και οι μονομερείς μορφές της πρωτεΐνης να συμβάλλουν προς αυτήν την κατεύθυνση. Να τονιστεί στο σημείο αυτό ότι οι μεταλλάξεις πολλαπλασιασμού εμφανίζουν πολύ πιο έντονο φαινότυπο συγκριτικά με τον αντίστοιχο των σημειακών μεταλλάξεων. Κατά συνέπεια, τα ενδογενή επίπεδα της μονομερούς α -συνουκλεΐνης είναι καθοριστικός παράγοντας για την ευαισθησία στις νευροεκφυλιστικές διαδικασίες.

Διάφοροι από τους παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία συσσωμάτωσης της α -συνουκλεΐνης αποδίδονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3: Παράγοντες που επηρεάζουν τη δημιουργία συσσωματώσεων α-συνουκλεΐνης.

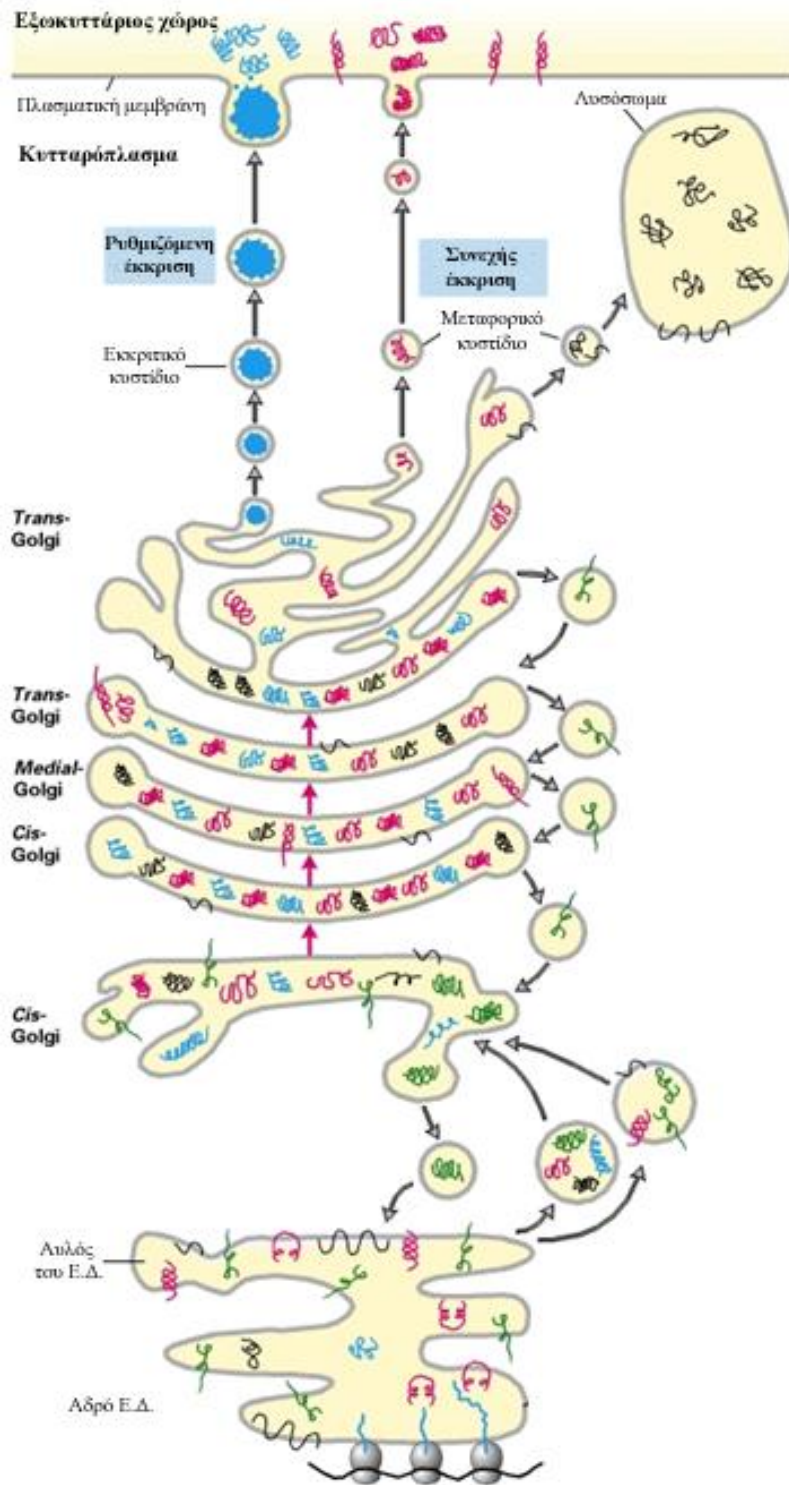
Παράγοντας	Αποτέλεσμα στη συσσωμάτωση	Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν	Βιβλιογραφικές αναφορές
Φωσφορυλίωση στη θέση σερίνη 129 (Ser129)	(+)	(in vitro, διαγονιδιακοί μύες, μοντέλα με μύγες, ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις και φασματομετρία μάζας	(Kahle et al. 2000, Keck et al. 2003, Kayed et al. 2003)
Σημειακές μεταλλάξεις (A30P, A53T)	(+)		(Chandra et al. 2003, Davidson et al. 1998, Heiser et al. 2000)
Μεταλλάξεις πολλαπλασιασμού (αύξηση της συγκέντρωσης)	(+)	(ο τριπλασιασμός του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης προκαλεί άνοια με σωματίδια Lewy και νόσο του Parkinson, μέσω επικρατούς αυτοσωμικού τύπου κληρονομικότητας.	(Baba et al. 1998)
Μείωση pH	(+)		(Lin et al. 2004, Lindersson 2004)
Αύξηση φορτίου ιόντων	(+)		(Lin et al. 2004)
Αύξηση θερμοκρασίας	(+)		(Lindersson 2004)
Καταμήσεις του C-άκρου	(+)	(ανασυνδουασμένη α-συνουκλεΐνη)	(Lindersson 2004, Hoyer et al. 2002)
Οξειδωτικές τροποποιήσεις	(+)	(έγκλειστα από συνουκλεϊνοπάθειες, νιτροζυλίωση)	(Murray et al. 2003, Narshi et al. 1999, Paik et al. 1997)
Ιόντα μετάλλων	(+/-)	(in vitro, ανάμεσα σε εκείνα που δρουν επαγωγικά: Al ⁺³ , Fe ⁺³ , Co ⁺³ , Mn ⁺² , Ca ⁺² και Cu ⁺²)	(Manning-Bog et al. 2002, McNaught et al. 2003, Cyr et al. 2002, Masliah 2000)
Ανθρώπινη β-/γ-συνουκλεΐνη	(-)	(in vitro)	(Paik et al. 1999, Papp et al. 1989)
Τουμπολίνη	(+/-)	(in vitro)	(Pountney 2004, Saito et al. 2003)
Ιστονες, p25a, Tau	(+)	(in vitro)	(Perrin et al. 2001)
Λιπίδια	(+)		(Serpell et al. 2000, Sharon et al. 2003, Shtilerman et al. 2002)
Εντομοκτόνα	(+)	(in vivo σε τρωκτικά)	(Sirover et al. 1999, Snyder et al. 2003)

Η επαγωγή σημειώνεται με (+), ενώ η αναστολή της συσσωμάτωσης με (-). Προσαρμογή από (Lundvig et al., 2005).

3. Η Έκκριση της α-Συνουκλεΐνης

3.1. Κλασσικά και μη κλασσικά μονοπάτια έκκρισης πρωτεϊνών

Η έκκριση των πρωτεϊνών αποτελεί θεμελιώδη διεργασία για τη διακυτταρική επικοινωνία και συμβαίνει φυσιολογικά, μέσω κλασικών και μη-κλασικών μονοπατιών (Hebert and Molinari, 2007). Οι πρωτεΐνες που πρόκειται να ακολουθήσουν τα ενδοκυτταρικά και εκκριτικά μονοπάτια, να καταλήξουν στην πλασματική μεμβράνη ή τέλος να εκκριθούν φυσιολογικά στον εξωκυττάριο χώρο, διαθέτουν στο αμινοτελικό τους άκρο (N-άκρο) μια αλληλουχία-οδηγό στόχευσης. Η σηματοδοτική αλληλουχία στοχεύει τα ριβοσώματα, τα οποία μεταφράζουν τις εν λόγω πρωτεΐνες, στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο (Ε.Δ.), και με αυτόν τον τρόπο επιτρέπει την είσοδό τους στον αυλό του Ε.Δ. Εν συνεχεία, ακολουθούν το κλασικό εκκριτικό μονοπάτι (**εικόνα 14**) (Lodish et al., 2008). Αρχικά, οι πρωτεΐνες διακινούνται στο σύμπλοκο trans-Golgi, όπου εισέρχονται σε εκκριτικά μεταφορικά κυστίδια. Η έκκριση μέσω κυστιδίων μπορεί να είναι συνεχής ή ρυθμιζόμενη. Κατά τη συνεχή έκκριση, τα μεταφορικά κυστίδια μεταναστεύουν αμέσως στην πλασματική μεμβράνη και ελευθερώνουν το περιεχόμενό τους με εξωκυττάρωση (πχ. συνεχής έκκριση κολλαγόνου). Στην περίπτωση της ρυθμιζόμενης έκκρισης (πχ. επαγόμενη έκκριση νευροδιαβιβαστή), τα εκκριτικά κυστίδια συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη, κατόπιν ερεθίσματος (πχ. αύξηση του ενδοκυτταρίου ασβεστίου (Calcium, Ca^{2+}) που προκαλείται, λόγω πρόσδεσης μορίου σε ειδικό υποδοχέα).

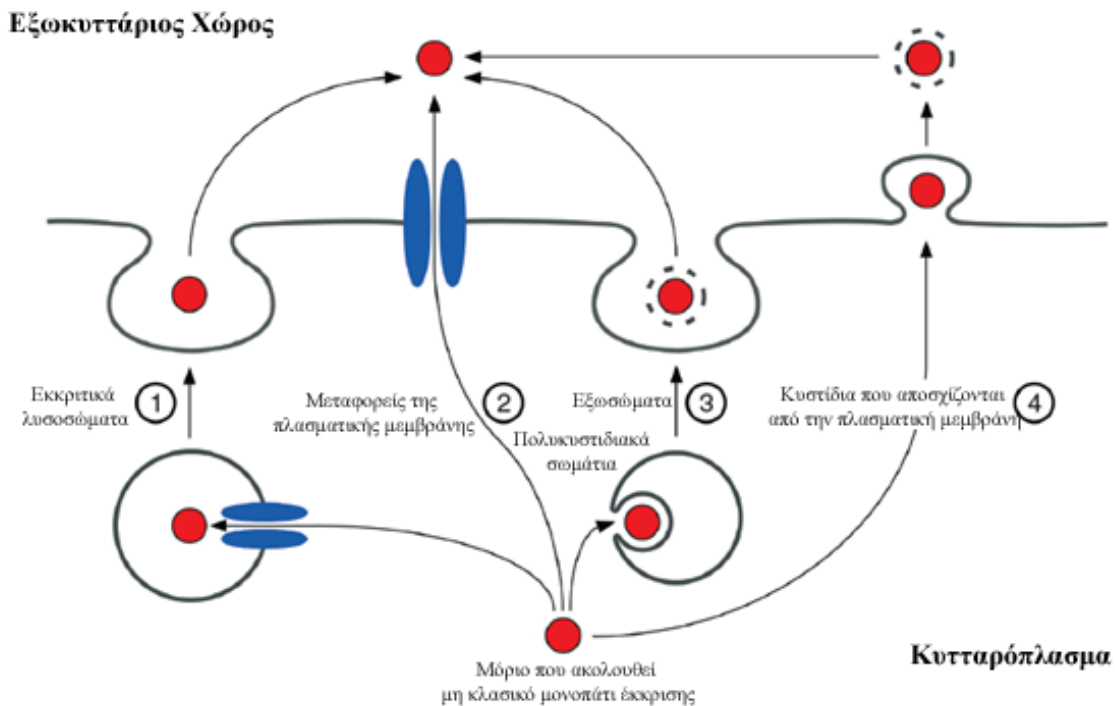


Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση του κλασικού μονοπατιού έκκρισης πρωτεϊνών.

Κατά τη μετάφρασή τους, οι πρωτεΐνες που θα ακολουθήσουν το εκκριτικό μονοπάτι, οδηγούνται μέσω της σηματοδοτικής τους αλληλουχία στα ριβοσώματα του αδρού Ε.Δ. Εκεί, με την ολοκλήρωση της μετάφρασης, οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες διαπερνούν τη μεμβράνη του Ε.Δ. και εισέρχονται στον αυλό. Κάποιες από αυτές, π.χ. ένζυμα του αδρού Ε.Δ. ή δομικές πρωτεΐνες, παραμένουν εκεί. Οι υπόλοιπες πακετάρονται σε μεταφορικά κυστίδια, τα οποία με τη σειρά τους συντήκονται προκειμένου να δημιουργήσουν νέα κυστίδια του *cis*-Golgi. Κάθε ένα από αυτά, μαζί με το πρωτεϊνικό του περιεχόμενο, μεταφέρεται από τη *cis* στην *trans* πλευρά της συσκευής Golgi (κόκκινα βέλη). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, πολλές μεμβρανικές πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες του αυλού υφίστανται τροποποιήσεις, κυρίως στις προσκολλημένες ολιγοσακχαριτικές αλυσίδες.

Κάποιες από αυτές παραμένουν στο *trans*-Golgi και κάποιες μετακινούνται, μέσω μικρών κυστιδίων, στην κυτταρική επιφάνεια ή στα λυσοσώματα. Σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, λ.χ. νευρικά κύτταρα ή κύτταρα παγκρέατος, διαλυτές πρωτεΐνες είναι δυνατόν να αποθηκευτούν σε εκκριτικά κυστίδια και να απελευθερωθούν κατόπιν λήψης του κατάλληλου σήματος, (ρυθμιζόμενη έκκριση). Σε όλα τα κύτταρα, συγκεκριμένες πρωτεΐνες μεταφέρονται στην κυτταρική επιφάνεια, μέσω μεταφορικών κυστιδίων και εκκρίνονται συνεχώς (συνεχής έκκριση). Προσαρμογή από (Lodish et al., 2008).

Οι πρωτεΐνες του κυττοσολίου στερούνται αλληλουχίας σηματοδότησης για τον αυλό του ΕΔ. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι αρκετές από αυτές εκκρίνονται συνεχώς ή κατόπιν ερεθίσματος, μέσω ΕΔ/Golgi-ανεξάρτητων μηχανισμών (Hebert and Molinari, 2007). Οι μηχανισμοί αυτοί συνολικά ονομάζονται μη-κλασικοί μηχανισμοί έκκρισης (**εικόνα 15**) και παραμένουν μέχρι και σήμερα μερικώς μόνο ταυτοποιημένοι. Κάποιοι από αυτούς περιλαμβάνουν την είσοδο πρωτεϊνών του κυττοσολίου σε μικροκυστίδια, τα οποία αποσχίζονται άμεσα από την πλασματική μεμβράνη. Για παράδειγμα, το πρόδρομο μόριο της IL-1β, εισέρχεται σε κυστίδια, μετατρέπεται μέσα σε αυτά στην ώριμη μορφή του και εξέρχεται του κυττάρου ως ενεργό μόριο (Rubartelli et al., 1990). Ομοίως, η πρωτεΐνη Acb1 στους μύκητες, εισέρχεται σε ένα είδος «εκκριτικών αυτοφαγοσωμάτων», και εκκρίνεται με τα



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση των μη κλασικών μηχανισμών έκκρισης πρωτεϊνών.

Οι κύριοι μηχανισμοί μη-κλασικής έκκρισης που έχουν προταθεί είναι οι εξής: 1) Η πρωτεΐνη εισέρχεται σε εκκριτικά λυσοσώματα, τα οποία με τη σειρά τους συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη, απελευθερώνοντας το περιεχόμενό τους στον εξωκυττάριο χώρο. 2) Ο δεύτερος μηχανισμός δεν περιλαμβάνει εγκλεισμό σε εκκριτικά κυστίδια. Η έξοδος της πρωτεΐνης από το κύτταρο διαμεσολαβείται από μεταφορείς της πλασματικής μεμβράνης. 3) Η πρωτεΐνη εγκλωβίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα, κατά τη διαδικασία των διαδοχικών προς τα έξω εγκλωπώσεών τους, προς σχηματισμό των πολυκυστιδιακών σωματίων. Ακολουθεί σύντηξη των πολυκυστιδιακών σωματίων με την πλασματική μεμβράνη και απελευθέρωση των μικρών κυστιδίων (εξωσώματα) στον εξωκυττάριο χώρο. 4) Τέλος, είναι δυνατόν η κυττοσολική πρωτεΐνη να εξέλθει του κυττάρου μέσω κυστιδίων που αποσχίζονται από την πλασματική μεμβράνη. Προσαρμογή από (Nickel, 2005; Nickel and Rabouille, 2009).

κυστίδια που αυτά ελευθερώνουν όταν συντηχθούν με την πλασματική μεμβράνη (Locher, 2009; Nickel and Rabouille, 2009). Επίσης, πρωτεΐνες του κυτοσολίου εξέρχονται και κατά την απόσχιση αποπτωτικών ασκών από παθολογικά κύτταρα. Ο τροφικός παράγοντας FGF2 είναι μια κυτοσολική πρωτεΐνη, η οποία εκκρίνεται σταθερά, χωρίς τη διαμεσολάβηση κυστιδίων. Αλληλεπιδρά άμεσα με τα PI(4,5)P₂, στο εσωτερικό της πλασματικής μεμβράνης, όπου φωσφορυλιώνεται και ολιγομερίζεται (Nickel and Rabouille, 2009).

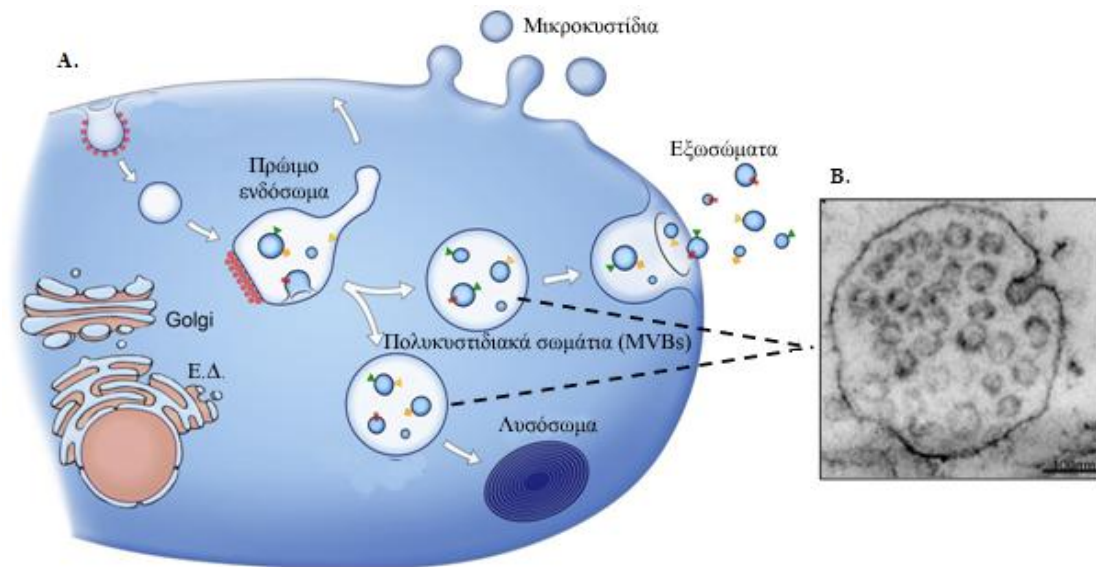
Η έκκριση πρωτεϊνών, επίσης, διευκολύνεται από ενδιάμεσα μόρια, όπως οι μεταφορείς ABC (ATP-binding cassette), οι οποίοι μετατρέπουν την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP, σε ενέργεια μετακίνησης υποστρωμάτων κατά μήκος της λιπιδικής διπλοστιβάδας προς το κυτταρόπλασμα (εισαγωγή) ή προς τον εξωκυττάριο χώρο (εξαγωγή) (Locher, 2009). *In vivo*, η αύξηση των επιπέδων των μεταφορέων ABC έχει συνδεθεί με τα επίπεδα των αμυλοειδών πεπτιδίων Αβ40 και Αβ42 (Wolf et al., 2012). Τέλος, πολυμορφισμοί στο γενετικό τόπο των γονιδίων που κωδικοποιούν για τους μεταφορείς ABC, ή μειωμένη λειτουργία των γονιδίων που οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα έκφρασης, συνδέονται με τη νόσο του Parkinson (ElAli and Hermann, 2011).

Μέχρι σήμερα, δεν είναι γνωστό αν οι κυτοσολικές πρωτεΐνες έχουν κάποια «προτίμηση» σε έναν από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς μη-κλασσικής έκκρισης. Αντιθέτως, φαίνεται να εξέρχονται από το κύτταρο με παραπάνω από έναν μηχανισμούς. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε η ύπαρξη λιπιδικών κυστιδίων ενδοκυτταρικής βιογένεσης, τα οποία μεταφέρουν όχι μόνο πρωτεΐνες αλλά και RNA και είναι ικανά να επηρεάσουν τη βιολογική ενεργότητα γειτονικών κυττάρων, χωρίς φυσική επαφή (Simons and Raposo, 2009). Η τρίτη αυτή κατηγορία μη-κλασσικού μηχανισμού έκκρισης αφορά τα εξωσώματα (βλπ. ενότητα 3.2). Δεδομένου του ότι η πλασματική μεμβράνη είναι αδιαπέραστη, η ανακάλυψη τέτοιου τύπου κυστιδίων είναι εξαιρετικά σημαντική για τη διακυτταρική επικοινωνία σε επίπεδο συστήματος.

3.2. Εξωσώματα: Βιογένεση και φυσιολογικός ρόλος

Τα εξωσώματα είναι μικροκυστίδια, η βιογένεση των οποίων ξεκινά στα πολυκυστιδιακά σωμάτια (multivesicular bodies, MVBs) του συστήματος των ενδοσωμάτων (εικόνα 16). Πιο αναλυτικά, πρωτεΐνες και σύμπλοκα σηματοδότησης απομονώνονται στον πεπερασμένο χώρο που οριοθετείται από τη μεμβράνη των

MVBs. Εν συνεχεία, μπορούν να ενσωματωθούν στα μικρά ενδοκυτίδια, τα οποία βρίσκονται στον αυλό των MVBs (intraluminal vesicles, ILVs) και προκύπτουν από τις διαρκείς, προς τα έξω, εγκολλώσεις της μεμβράνης των MVBs. Στο σημείο αυτό, τα MVBs είναι δυνατόν να συντηχθούν με τη λυσοσωμική μεμβράνη, με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση των ILVs και του περιεχομένου τους. Εναλλακτικά, τα MVBs μπορεί να συντηχθούν με την πλασματική μεμβράνη και να απελευθερώσουν τα ενδοκυτίδιά τους στον εξωκυττάριο χώρο, με τη μορφή των εξωσωμάτων (exosomes) (Bellingham et al., 2012; Schneider and Simons, 2013).

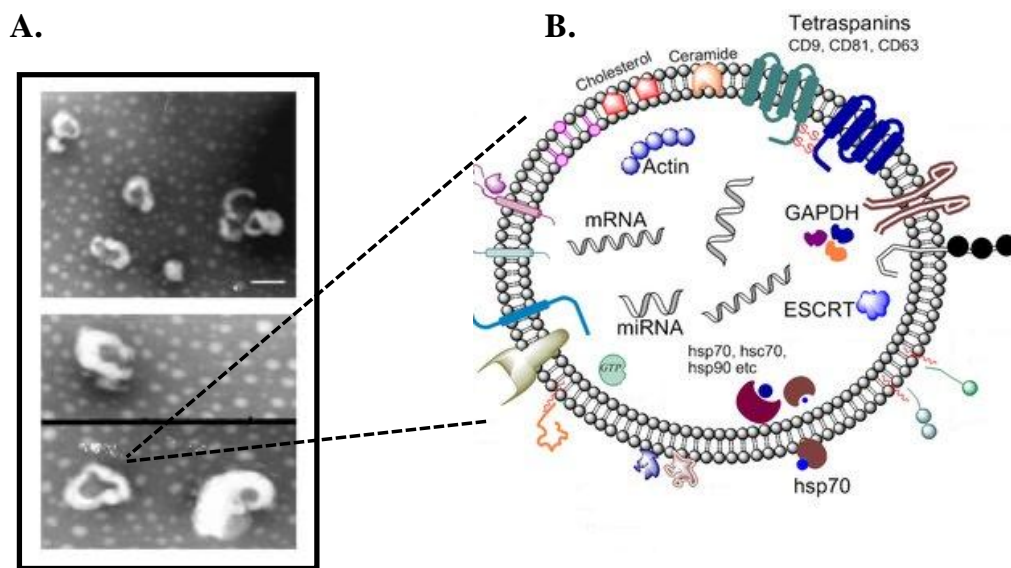


Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση της βιογένεσης των εξωσωμάτων.

A) Τα μικροκυτίδια αποκόπτονται απευθείας από τη μεμβράνη. Τα πρώιμα ενδοσώματα υφίστανται διαδοχικές, προς τα έξω αναδιπλώσεις, προς σχηματισμό των πολυκυστιδιακών σωματίων. Αυτά, είτε συντήκονται με τα λυσοσώματα, οπότε και το περιεχόμενό τους αποικοδομείται είτε συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου, απελευθερώνοντας τα μικρά ενδοκυτίδια και το περιεχόμενό τους στον εξωκυττάριο χώρο, υπό τη μορφή των εξωσωμάτων. Οι κόκκινες κουκκίδες απεικονίζουν την κλαθρίνη, που συνδέεται με κυτίδια στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης. Οι μεμβρανοσυνδεδεμένες και οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες πάνω στα κυτίδια συμβολίζονται ως τρίγωνα και ορθογώνια, αντίστοιχα. Τα βέλη απεικονίζουν τις προτεινόμενες κατευθύνσεις των πρωτεϊνών και των λιπιδίων μεταξύ των οργανιδίων και μεταξύ των πολυκυστιδιακών σωματίων και της πλασματικής μεμβράνης για την έκκριση των εξωσωμάτων. Προσαρμογή από (Raposo and Stoorvogel, 2013). B) Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που απεικονίζει ένα πολυκυστιδιακό σωματίο σε νευρόνα της περιοχής CA1 του ιππόκαμπου ενήλικου επίμους. Είναι εμφανής η προς τα έξω αναδίπλωση προς το σχηματισμό ενδοκυστιδίου (πάνω δεξιά), καθώς και οι μεμβράνες που περιβάλλουν τόσο τα ενδοκυτίδια, όσο και συνολικά το MVB. Κλίμακα: 100 nm. Προσαρμογή από (Chivet et al., 2012).

Το μέγεθος των εξωσωμάτων είναι μικρό και ποικίλει από 30 έως 120 nm. Παρουσιάζουν δε, χαρακτηριστική μορφολογία σφαιρικού ή κυπελλοειδούς σχήματος, όπως προκύπτει από τις εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (εικόνα 17)

(Emmanouilidou et al., 2010a; Russo et al., 2012). Πληθώρα διαφορετικών κυτταρικών τύπων εκκρίνουν εξωσώματα, τόσο *in vitro* and *in vivo*, όπως νευρώνες (Faure et al., 2006), κύτταρα μικρογλοίας (Poticchio et al., 2005), αστροκύτταρα (Taylor et al., 2007), καθώς και μη νευρικά κύτταρα, π.χ. λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα (Bobrie et al., 2011; Simons and Raposo, 2009). Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, τα εξωσώματα μεταφέρουν mRNAs (messenger RNA), microRNA, καθώς και πρωτεϊνικά και σηματοδοτικά σύμπλοκα, τα οποία στο σύνολό τους είναι δυνατόν να ρυθμίσουν τη γονιδιακή ενεργότητα και την πρωτεϊνική έκφραση των κυττάρων που τα προσλαμβάνουν (Bellingham et al., 2012; Simons and Raposo, 2009). Το



Εικόνα 17: Μορφολογική και βιοχημική ταυτότητα των εξωσωμάτων.

A) Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, στις οποίες παρουσιάζονται εξωσώματα με χαρακτηριστική σφαιρική ή κυπελλοειδή μορφολογία. Κλίμακα: 100 nm. Προσαρμογή από (Emmanouilidou et al., 2010a). B) Σχηματική απεικόνιση της δομής και του περιεχομένου των εξωσωμάτων. Τα εξωσώματα παρουσιάζουν παρόμοια τοπολογία με αυτήν της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων που τα εκκρίνουν. Περιέχουν mRNAs, microRNAs και μια τεράστια ποικιλία από διαφορετικές πρωτεΐνες, αναλόγως του κυτταρικού τύπου στον οποίο βιοσυντίθενται. Γενικά, όμως, είναι εμπλουτισμένα σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη δημιουργία των πολυκυστιδιακών σωματίων, λ.χ. tetraspanins, πρωτεΐνες απαραίτητες για τη μεταφορά και τη σύντηξη και τέλος κυτοσολικές πρωτεΐνες. Προσαρμογή από (Bellingham et al., 2012).

εξωσωμικό φορτίο περιλαμβάνει συγκεκριμένες πρωτεΐνες, μερικές από τις οποίες είναι κοινές για όλα τα εξωσώματα και χρησιμοποιούνται ευρέως ως πρωτεϊνικοί δείκτες, μεταξύ των οποίων η Alix, η tetraspanin (CD63, CD81) και οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ 70 και 90 (heat shock proteins 70,90, HSP70, 90) (Lee et al., 2011; Simons and Raposo, 2009). Άλλες είναι ειδικές και η παρουσία τους εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο στον οποίο δημιουργούνται και εκκρίνονται τα εξωσώματα

(Keller et al., 2006). Σε αυτά τα πλαίσια, έχει αναφερθεί ότι τα εξωσώματα που απελευθερώνονται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μεταφέρουν το μείζον σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας (Thery et al., 2001), ενώ αυτά που εκκρίνονται από ολιγοδεντροκύτταρα μεταφέρουν πρωτεΐνες μυελίνης (Kramer-Albers et al., 2007).

Τα εξωσώματα είναι βιολογικά ενεργές οντότητες και διαδραματίζουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο για πληθώρα φυσιολογικών διεργασιών. Πιο συγκεκριμένα, η σύντηξη των MVBs με τα λυσοσώματα, οδηγεί ανεπιθύμητα κυτταρικά συστατικά προς αποικοδόμηση. Επιτρέπεται, τρόπον τινά, η απομάκρυνση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, η οποία είναι απαραίτητη για τη μείωση του αριθμού των ενεργοποιημένων υποδοχέων στην επιφάνεια του κυττάρου, όπως π.χ. τροφικοί παράγοντες και μόρια προσκόλλησης (Dello Sbarba and Rovida, 2002). Παράλληλα, είναι, πλέον, αποδεδειγμένος ο λειτουργικός ρόλος των εξωσωμάτων στη νευρωνική ανάπτυξη και αναγέννηση (Marzesco et al., 2005), καθώς και τη συναπτική πλαστικότητα των νευρικών κυττάρων του φλοιού και του ιππόκαμπου, στον εγκέφαλο (Lachenal et al., 2011). Όταν, δε, απελευθερώνονται από ανοσοκύτταρα, προκαλούν ανοσολογικές αποκρίσεις, κριτικής σημασίας για την ενεργοποίηση και τη μετάδοση της φλεγμονής σε απόκριση κάποιου παθογόνου ερεθίσματος ή κάποιου τραύματος (Raposo et al., 1996; Thery et al., 2009). Τα τελευταία χρόνια, η διερεύνηση των πιθανών παθολογικών δραστηριοτήτων των εξωσωμάτων έχει τεθεί στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος, καθώς φαίνεται να συμμετέχουν στη μετάδοση τοξικών πρωτεϊνών σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου και στην εξάπλωση της παθολογίας πολυπαραγοντικών νευροεκφυλιστικών ασθενειών, μεταξύ των οποίων και η νόσος του Parkinson (**βλπ. ενότητα 3.4**) (Bellingham et al., 2012).

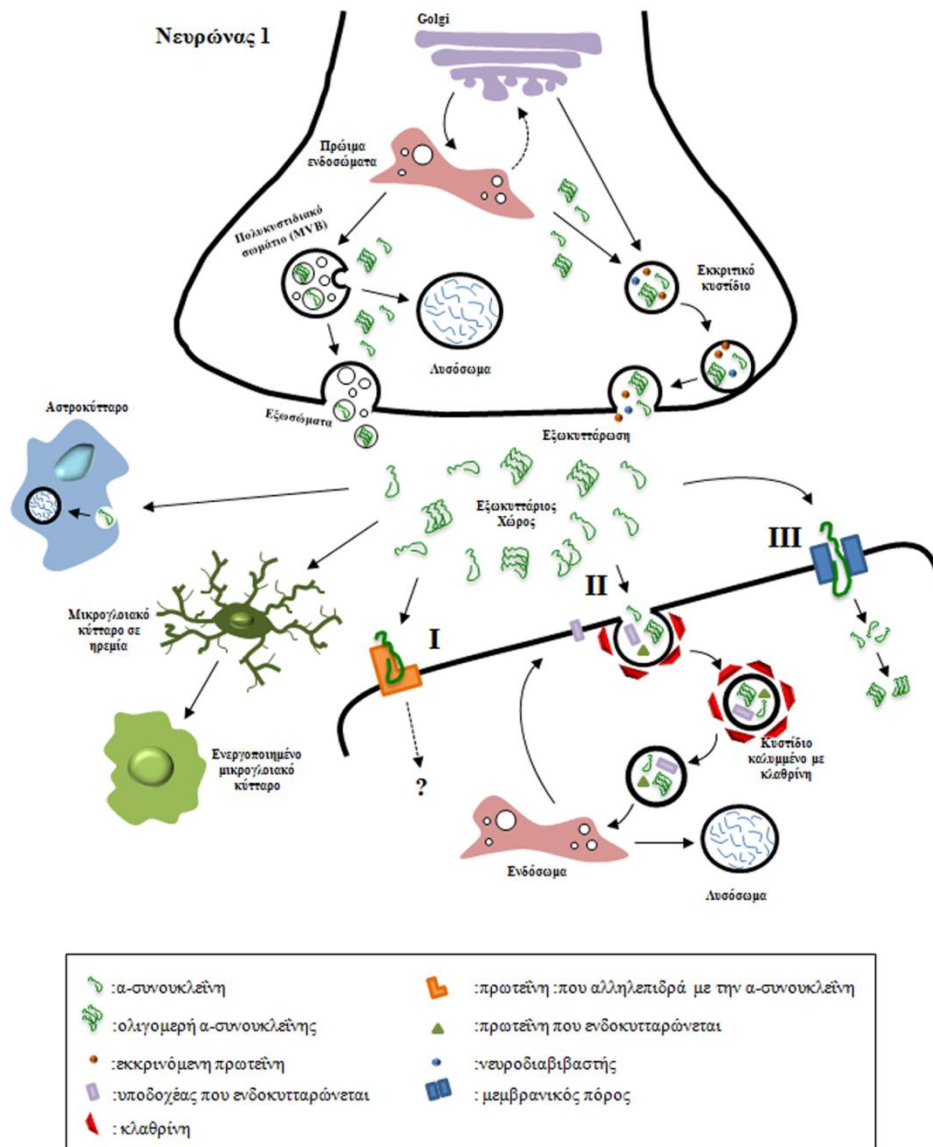
3.3. Η έκκριση της α-συνουκλεΐνης

Η α-συνουκλεΐνη, εξαιτίας του κυρίαρχου εντοπισμού της στο κυτταρόπλασμα και της έλλειψης σηματοδοτικής αλληλουχίας στόχευσης για το Ε.Δ., μέχρι και πρόσφατα, θεωρείτο μια τυπική περίπτωση κλασικής κυτοσολικής πρωτεΐνης (Vekrellis et al., 2011). Η ως άνω άποψη κλονίστηκε, με την ανίχνευσή της σε βιολογικά υγρά όπως π.χ. πλάσμα αίματος και εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), τόσο ασθενών με τη νόσο του Parkinson, όσο και υγιών ατόμων (Borghì et al., 2000; El-Agnaf et al., 2003). Στα ίδια πλαίσια, από *in vitro* μελέτες σε κυτταρικά συστήματα βρέθηκε ότι η α-συνουκλεΐνη είναι δυνατόν να εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο

νευρωνικών κυττάρων. Μάλιστα, η παρουσία της στο εξωκυττάριο μέσο είναι ανεξάρτητη από τον τρόπο υπερέκφρασης της, λ.χ. σταθερή (El-Agnaf et al., 2003) ή παροδική (Danzer et al., 2011; Sung et al., 2005) υπερέκφραση, υπερέκφραση κατόπιν επαγωγής (Emmanouilidou et al., 2010a), ή με τη χρήση ιϊκού φορέα (Lee et al., 2005a).

Με ποιον τρόπο εκκρίνεται άραγε η α-συνουκλείνη; Το ερώτημα αυτό, αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας και δεν έχει απαντηθεί με κατηγορηματικό τρόπο. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι ένα μικρό, τουλάχιστον, ποσοστό της α-συνουκλείνης εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο μέσω ενός μη κλασικού μονοπατιού εξωκυττάρωσης, ανεξάρτητου από τη μεταφορά μέσω Ε.Δ. και συσκευής Golgi, το οποίο περιλαμβάνει τη σύνδεση της α-συνουκλείνης με μικρά κυστίδια (Lee et al., 2005a). Πρόσφατη δημοσίευση, κάνει λόγο τόσο για μονομερείς όσο και για ολιγομερείς μορφές της α-συνουκλείνης, οι οποίες απελευθερώνονται στο καλλιεργητικό μέσο κυττάρων νευροβλαστώματος ανθρώπου, εν μέρει μέσω μικρών κυστιδίων (Emmanouilidou et al., 2010a). Τα δε κυστίδια φέρουν τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των εξωσωμάτων (Emmanouilidou et al., 2010a). Στην ίδια μελέτη, η έκκριση εξαρτάται από τα επίπεδα του ενδοκυττάρου Ca^{2+} και το ενδοκυτταρικό μονοπάτι, στοιχεία που συνάδουν με τη συμμετοχή των εξωσωμάτων στο μηχανισμό εξωκυττάρωσης της α-συνουκλείνης (Emmanouilidou et al., 2010a).

Παρά την ιδιαίτερη σημασία για την κατανόηση της παθογένειας της νόσου του Parkinson και πιθανότατα της εξάπλωσής της, ο μηχανισμός της μη συμβατικής έκκρισης που ακολουθεί η α-συνουκλείνη παραμένει αδιευκρίνιστος. Στην πραγματικότητα θα μπορούσαν να υπάρχουν περισσότεροι του ενός μηχανισμού (Nickel and Rabouille, 2009), ικανοί να περιγράψουν το φαινόμενο της έκκρισης των διαλυτών και συσσωματωμένων μορφών της α-συνουκλείνης (**εικόνα 18**). Η έκκριση θα μπορούσε να λαμβάνει χώρα υπό φυσιολογικές συνθήκες, ωστόσο θα ήταν δυνατόν να ενταθεί υπό παθολογικές καταστάσεις, όπως αυτές που σχετίζονται με τις μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες και τις διαταραχές του πρωτεασώματος και απαντούν στη νόσο του Parkinson (Lee et al., 2005a). Η α-συνουκλείνη που συνδέεται σε εκκριτικά κυστίδια παρουσιάζει αυξημένη τάση για συσσωμάτωση συγκριτικά με την ελεύθερη κυτοσολική πρωτεΐνη (Lee et al., 2005a). Δύο βασικές υποθέσεις είναι δυνατόν να περιγράψουν το φαινόμενο αυτό: 1) Με είσοδό της στα κυστίδια, εξαιτίας



Εικόνα 18: Προτεινόμενο μοντέλο μηχανισμών έκκρισης της α-συνουκλείνης και πιθανές παρακρινείς δράσεις της.

Η α-συνουκλείνη εκκρίνεται μέσω μη κλασικών ενδοκυτταρικών ή εξωκυτταρικών μονοπατιών. Στα πρώιμα ενδοσώματα (early endosomes), το πρωτεϊνικό φορτίο είτε ανακυκλώνεται, επιστρέφοντας πίσω στην πλασματική μεμβράνη, είτε ακολουθεί διαλογή του στα πολυκυστιδιακά σωμάτια (multivesicular bodies, MVBs). Σε αυτό το σημείο, οι ελεύθερες κυτταροπλασματικές μορφές της α-συνουκλείνης είναι δυνατόν να εισέλθουν στα MVBs, μέσω της προς τα έσω διαδικασίας αναδίπλωσης των πρώιμων ενδοσωμάτων. Στη συνέχεια, τα MVBs συντήκονται είτε με τα λυσοσώματα προς αποικοδόμηση, είτε με την πλασματική μεμβράνη, απελευθερώνοντας τα εξωσώματα στον εξωκυττάριο χώρο. Εναλλακτικά, η α-συνουκλείνη μπορεί να ενσωματωθεί σε εκκριτικά κυστίδια και να εξέλθει του κυττάρου μέσω εξωκυττάρωσης. Μόλις βρεθεί στον εξωκυττάριο χώρο, η α-συνουκλείνη είναι σε θέση να επηρεάσει την ομοίωσταση των γειτονικών κυττάρων. Αυτό απαιτεί την αλληλεπίδρασή της με άγνωστους, μέχρι στιγμής, υποδοχείς, την ενδοκυττάρωσή της μέσω clathrin-coated pits, ή τη δημιουργία πόρων στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων-δεκτών. Παράλληλα, η α-συνουκλείνη, προκαλώντας την ενεργοποίηση των κυττάρων μικρογλοίας, μπορεί να πυροδοτήσει νευρωνικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Τέλος, η εκκρινόμενη α-συνουκλείνη είναι δυνατόν να απομακρυνθεί από τον εξωκυττάριο χώρο, μέσω της ενδοκυττάρωσης από τα αστροκύτταρα. Προσαρμογή από (Vekrellis et al., 2011).

του όξινου pH, η τάση της α-συνουκλεΐνης για ολιγομερισμό γίνεται εντονότερη (Hoyer et al., 2004). 2) Οι ήδη σχηματισμένες ολιγομερείς μορφές της πρωτεΐνης μετακινούνται στα εκκριτικά κυστίδια, όπου και πραγματοποιείται περαιτέρω συσσωμάτωσή τους. Στη συνέχεια απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο, όπου δυνητικά μπορούν να πυροδοτήσουν πληθώρα παθολογικών γεγονότων σε γειτονικά κύτταρα (Feng et al., 2010; van Rooijen et al., 2010).

3.4. Παρακρινείς δράσεις της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης

Αυξανόμενος όγκος βιβλιογραφικών δεδομένων υποστηρίζει τη βιολογική σημαντικότητα των εκκρινόμενων μορφών της α-συνουκλεΐνης, κάνοντας λόγο για πιθανές παρακρινείς δράσεις, με άμεσο αντίκτυπο στην ομοίωση των γειτονικών κυττάρων (**εικόνα 18**) (Vekrellis et al., 2011). Σύμφωνα με αποτελέσματα που προέκυψαν από κυτταρικά μοντέλα, είναι, πλέον, αποδεδειγμένη η ικανότητα της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης να μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των νευρωνικών κυττάρων-δεκτών. Μάλιστα, το τοξικό δυναμικό της πρωτεΐνης είναι ανάλογο της συγκέντρωσής της στο εξωκυττάριο μέσο (Emmanouilidou et al., 2010a; Sung et al., 2005) και οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στις ολιγομερείς μορφές (Danzer et al., 2011; Emmanouilidou et al., 2011; Emmanouilidou et al., 2010a).

Ένας από τους επικρατέστερους μηχανισμούς τοξικής δράσης των εκκρινόμενων μορφών της α-συνουκλεΐνης είναι η πρόσληψή τους από τα κύτταρα με τα οποία έρχονται σε επαφή (Emmanouilidou et al., 2010a; Lee et al., 2008a; Luk et al., 2009). Το δε γεγονός, ότι ένα ποσοστό της α-συνουκλεΐνης εκκρίνεται μέσω εξωσωμάτων ενισχύει την υπόθεση της διακυτταρικής μετάδοσης της παθογένειας της νόσου του Parkinson (Vekrellis et al., 2011). Όπως ήδη αναφέρθηκε (**βλπ. ενότητα 3.2**), μια πιθανή λειτουργία των εξωσωμάτων είναι η απομάκρυνση του βλαβερού πρωτεϊνικού φορτίου ενός κυττάρου (Putz et al., 2008). Από τη στιγμή που το τοξικό «φορτίο» βρεθεί στον εξωκυττάριο χώρο και στα πλαίσια της διακυτταρικής επικοινωνίας, είναι δυνατόν να προσληφθεί από παρακείμενα κύτταρα, επιδρώντας στη φυσιολογία τους (Ghidoni et al., 2008). Η υπόθεση αυτή, που έχει επικρατήσει με τον όρο «Υπόθεση του Δούρειου Ίππου», αφορά γενικά τα αμυλοειδή του κυτοσολίου, τα οποία εισέρχονται στα εξωσώματα κατά τη διαδικασία βιογένεσής τους και απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο (Ghidoni et al., 2008; Smalheiser, 2007). Αυτός ο μηχανισμός ενδέχεται να λειτουργεί προοδευτικά και

συσσωρευτικά (Emmanouilidou et al., 2010a). Διάφορες πρωτεΐνες που σχετίζονται βιοχημικά με το νευροεκφυλισμό έχειδειχθεί ότι συνδέονται με τα εξωσώματα (Mathivanan et al., 2012). Ορισμένες εξ αυτών είναι το πεπτίδιο του αμυλοειδούς Αβ (Rajendran et al., 2006) και η πρωτεΐνη prion PrP (Fevrier et al., 2004), καθώς και τα πρόδρομα μόριά τους, η tau (Saman et al., 2012), αλλά και η α-συνουκλεΐνη (Emmanouilidou et al., 2010a). Εντούτοις, η συσχέτιση των πρωτεϊνών αυτών με τα εξωσώματα δεν είναι αρκετή για να επιβεβαιώσει ή να απορρίψει την υπόθεση ότι τα εξωσώματα λειτουργούν και ως «Δούρειοι Ίπποι» που συνεισφέρουν στην εξέλιξη του νευροεκφυλισμού.

Ωστόσο, το κατά πόσον οι νευρώνες είναι σε θέση να προσλαμβάνουν τη φυσιολογικά εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη είναι υπό συζήτηση (Vekrellis et al., 2011). Η Emmanouilidou και οι συνεργάτες της έδειξαν ότι η φυσιολογικά εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη, ενώ προσλαμβάνεται άμεσα από διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα νευροβλαστώματος ανθρώπου, δεν εισέρχεται σε νευρωνικά διαφοροποιημένα κύτταρα ή πρωτογενείς νευρώνες (Emmanouilidou et al., 2010a). Σε ανεξάρτητη μελέτη, προκειμένου να διευκολυνθεί η είσοδος της εξωγενώς χορηγούμενης ανασυνδυασμένης ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-δεκτών, επιστρατεύτηκε η χρήση των κατιονικών λιποσωμάτων (Luk et al., 2009). Τα παραπάνω δεδομένα στο σύνολό τους, συνηγορούν στην ύπαρξη και άλλων μηχανισμών, πέραν της ενδοκυττάρωσης, μέσω των οποίων η εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη επιδρά στην ομοίωση των κυττάρων-δεκτών, όπως π.χ., η επίδραση στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων-δεκτών, πιθανώς μέσω ελεγχόμενης διάχυσης ή ειδικής πρόσδεσης (Emmanouilidou et al., 2010a; Lee et al., 2008a). Τέλος, έχειδειχθεί ότι επιβλαβείς μορφές ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης (ολιγομερείς και συσσωματωμένες μορφές) είναι δυνατόν να δράσουν παρόμοια με άλλες επιρρεπείς, σε συσσωμάτωση, πρωτεΐνες, όπως το πεπτίδιο του αμυλοειδούς Αβ και η πρωτεΐνη prion, διαταράσσοντας την ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων, μέσω της δημιουργίας αμυλοειδικών πόρων (Danzner et al., 2007; Tsigelny et al., 2012) (βλπ. ενότητα 4.1.2.). Εναλλακτικά, τέτοιου τύπου πρωτεΐνες θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη λειτουργία καναλιών Ca^{2+} , διαταράσσοντας την ισορροπία των ιόντων Ca^{2+} μεταξύ του ενδοκυττάρου και του εξωκυττάρου χώρου (Demuro et al., 2010) (βλπ. ενότητα 4.2.4, 4.2.5).

Η φλεγμονή και ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων σε διάφορα ζωικά μοντέλα νευροεκφυλισμού, συμπίπτει με ευρήματα της νόσου του Parkinson

(Langston et al., 1999). Υπάρχουν δεδομένα ότι η εξωγενώς προστιθέμενη ανασυνδυασμένη α -συνουκλείνη πυροδοτεί την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων, επάγοντας την παραγωγή κυτταροκινών, όπως η IL-1 β και η IL-6, καθώς και ενζύμων που σχετίζονται με τη φλεγμονή (Su et al., 2008; Zhang et al., 2005). Μάλιστα, φάνηκε ότι η παρουσία μικρογλοιακών κυττάρων είναι απαραίτητη για την τοξική δράση της α -συνουκλείνης σε συγκαλλιέργειες, υποδεικνύοντας ότι το νευροτοξικό δυναμικό της οφείλεται, κυρίως, στην απόκριση των μικρογλοιακών κυττάρων (Zhang et al., 2005). Ωστόσο, βασικό μειονέκτημα όλων αυτών των μελετών αποτελεί η χρήση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και όχι φυσιολογικά εκκρινόμενης, της οποίας οι ιδιότητες μπορεί να διαφέρουν.

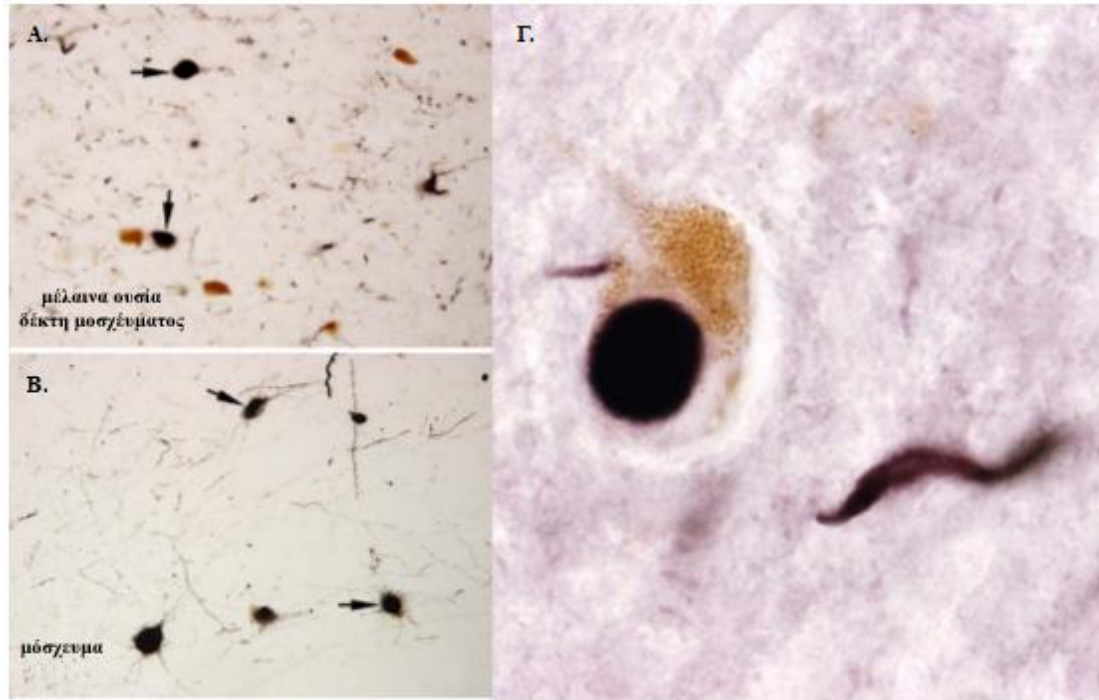
Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η α -συνουκλείνη διενεργεί τις τοξικές παρακρινείς δράσεις της ενδέχεται να περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση συγκεκριμένων υποδοχέων ή την πρόσληψη της πρωτεΐνης από κύτταρα, όπως έχει προταθεί για την πρόσληψη της πρωτεΐνης από μικρογλοιακά κύτταρα με φαγοκύτωση (Zhang et al., 2005). Έχει δειχθεί ότι η μονομερής α -συνουκλείνη μπορεί να εισέλθει σε κύτταρα απ' ευθείας, χωρίς ενδοκύτωση, ενώ η ολιγομερής μορφή με ενδοκύτωση (Lee et al., 2008a) ή διανοίγοντας πόρους στη μεμβράνη (Lashuel et al., 2002). Επιπλέον, η α -συνουκλείνη που εκκρίνεται από νευρικά κύτταρα θα μπορούσε να προσλαμβάνεται από αστροκύτταρα, με αποτέλεσμα την επαγωγή φλεγμονωδών αντιδράσεων ή την επακόλουθη αποικοδόμησή της (Lee et al., 2010). Τέλος, μια πολύ πρόσφατη μελέτη, με τη συνδυασμένη χρήση *in silico*, *in vitro* και *in vivo* προσεγγίσεων, έδειξε ότι η εξωκυττάρια α -συνουκλείνη, που εκκρίνεται από νευρωνικά κύτταρα, αποτελεί ενδογενή αγωνιστή του υποδοχέα TLR2 (Toll-like receptor 2, TLR2) (Kim et al., 2013). Ο TLR2 ενεργοποιεί τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις στα κύτταρα της μικρογλοίας. Η ικανότητα πρόσδεσης της α -συνουκλείνης στον TLR2 εξαρτάται από τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, καθώς μόνο συγκεκριμένες ολιγομερείς μορφές αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα και τον ενεργοποιούν (Kim et al., 2013).

3.5. Η εξάπλωση της παθολογίας της α-συνουκλεΐνης

Η παθολογοανατομική κλίμακα Braak (βλπ. ενότητα 1.1), αναδεικνύει την εξάπλωση της παθολογίας των σωματίων Lewy κατά μήκος του νευρικού άξονα, ως κεντρικό παθογενετικό γεγονός κατά την εξέλιξη της νόσου του Parkinson (Braak et al., 2003). Πρόσφατες μελέτες-κλειδιά, ενισχύουν το παραπάνω σχήμα και δίνουν μια νέα θεώρηση σχετικά με την εξάπλωση της παθολογίας της α-συνουκλεΐνης. Εξέταση του νεκροτομικού υλικού ασθενών, οι οποίοι πριν από 11-14 χρόνια είχαν δεχθεί εμφυτεύματα εμβρυικών ντοπαμινεργικών νευρώνων στο ραβδωτό σώμα, έδειξε ότι οι αρχικά υγιείς εμφυτευμένοι νευρώνες ανέπτυξαν σωματία Lewy, που περιείχαν α-συνουκλεΐνη και ήταν θετικά για τη χρώση της thioflavin-S (εικόνα 19) (Kordower et al., 2008; Li et al., 2008). Τα παραπάνω ευρήματα προτείνουν την υπόθεση της μετάδοσης της παθολογίας της α-συνουκλεΐνης από τα κύτταρα του δέκτη στο εμβρυικό μόσχευμα. Καθότι δε, η ηλικία των εμφυτευμάτων ήταν νεαρή (11-14 έτη), δεν είναι πιθανόν η παθολογία που αναπτύχθηκε να οφείλεται στην α-συνουκλεΐνη, την οποία ενδογενώς εκφράζουν τα εμφυτεύματα. Η παρουσία των σωματίων Lewy ήταν ανεξάρτητη από το πρωτόκολλο προετοιμασίας του ιστού που ακολουθήθηκε ή το πρωτόκολλο ανοσοκαταστολής ή τέλος το επίπεδο της ενεργοποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων (Kordower and Brundin, 2009).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω ευρήματα, ο Mendez και οι συνεργάτες του, μελετώντας τις περιπτώσεις 5 ασθενών που υπέστησαν εμφύτευση εμβρυικών κυττάρων μεσεγκεφάλου 9-14 χρονιά πριν το θάνατό τους, δε βρήκαν στον εμφυτευμένο ιστό σωματία Lewy και γενικότερα το οποιοδήποτε σημάδι νευροεκφυλισμού (Mendez et al., 2008). Η παρουσία, καθώς και ο βαθμός εκδήλωσης της φλεγμονής, όπως επίσης και η μέθοδος μεταμόσχευσης που ακολουθήθηκε, θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανές εξηγήσεις για τις αναφερθείσες διαφορές, μεταξύ των ξεχωριστών μελετών. Προς αυτήν την κατεύθυνση, κλίνει και μια ανεξάρτητη μελέτη σε νεκροτομικό υλικό από εγκέφαλο ασθενούς, ο οποίος είχε δεχθεί εμφυτεύματα πριν από 14 χρόνια (Ahn et al., 2012). Σε αυτήν την περίπτωση η παρουσία σωματίων Lewy στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες του εμφυτεύματος ήταν σπάνια και κυρίως στην κεντρική περιοχή του μοσχεύματος και όχι στην περιφέρεια. Αντίθετα, έντονη ήταν η παρουσία των πρωτεϊνικών εγκλείστων της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα γλοίας που περιέβαλαν την εν λόγω περιοχή. Το συγκεκριμένο εύρημα αντικρούει τη μέχρι πρότινος κρατούσα

θεωρία της διακυτταρικής μετάδοσης της παθολογίας της α -συνουκλεΐνης από τους πάσχοντες νευρώνες στους υγιείς του εμφυτεύματος στην περιοχή της περιφέρειας. Από την άλλη πλευρά, αναδεικνύει το ρόλο των κυττάρων της γλοίας στην παθογενετική διαδικασία.

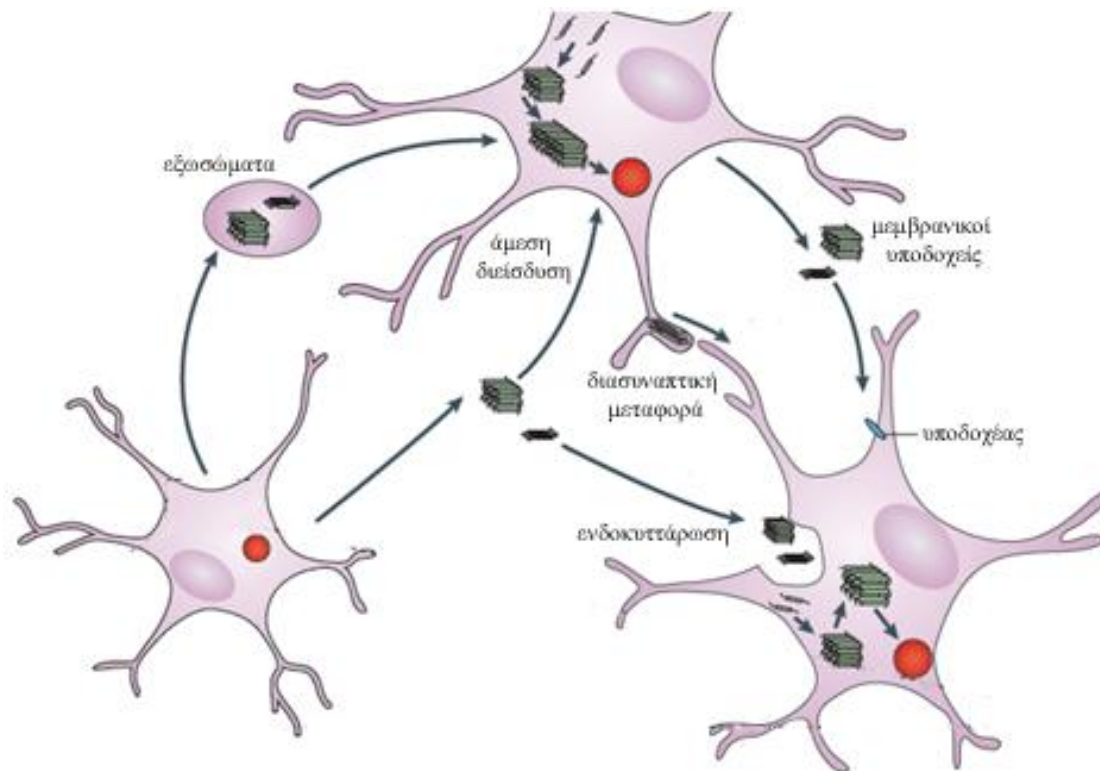


Εικόνα 19: Εξάπλωση της παθολογίας των σωματίων Lewy σε εμφυτεύματα υγιών εμβρυικών νευρώνων.

A,B) Σώματα και νευρίτες Lewy, με χρώση έναντι της α -συνουκλεΐνης, παρόντα (A) στους νευρώνες της μέλαινας ουσίας του δέκτη και (B) στους εμβρυικούς ντοπαμινεργικούς νευρώνες που εμφυτεύτηκαν στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου ασθενούς με νόσο του Parkinson. Γ.) Μεγάλη μεγέθυνση σωματίου και νευτίτη Lewy, με χρώση έναντι της α -συνουκλεΐνης, σε εμφυτευμένους ντοπαμινεργικούς νευρώνες μεσεγκεφάλου. Προσαρμογή από (Kordower et al., 2008; Olanow and Brundin, 2013).

Από την άλλη πλευρά, η παρουσία των πρωτεϊνικών εγκλείστων στα εμφυτεύματα θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα του «παθογενούς περιβάλλοντος», το οποίο κυριαρχεί στον εγκέφαλο του δέκτη. Σε αυτά τα πλαίσια, η Desplats και οι συνεργάτες της (Desplats et al., 2009) κατόρθωσαν να δείξουν διανευρωνική εξάπλωση συσσωματωμάτων της α -συνουκλεΐνης. Παρατήρησαν την άμεση μεταφορά της α -συνουκλεΐνης στα εμβρυικά βλαστοκύτταρα που εμφυτεύτηκαν στον ιππόκαμπο διαγονιδιακών, για την α -συνουκλεΐνη, μυών. Παράλληλα, η ερευνητική ομάδα του Brundin (Hansen et al., 2011), σε μια προσπάθεια να προσεγγίσει περισσότερο την κατάσταση της μεταμόσχευσης στον άνθρωπο, εξέτασε, για την

παρουσία α-συνουκλείνης, εμβρυικούς νευρώνες του κοιλιακού μεσεγκεφάλου ύστερα από την εμφύτευσή τους στο ραβδωτό σώμα διαγονιδιακών μυών. Διαπίστωσαν ότι σε ένα μικρό ποσοστό των εμφυτευμένων ήταν διακριτή η παρουσία κοκκίων α-συνουκλείνης, υπονοώντας την περίπτωση της μετάδοσης από το δέκτη στο μόσχευμα. Μάλιστα, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, ολιγομερή της ανασυνδυασμένης α-συνουκλείνης προσλαμβάνονται από τους άξονες νευρώνων



Εικόνα 20: Μηχανισμοί εξάπλωσης της παθολογίας της α-συνουκλείνης.

Υπάρχουν ποικίλοι μηχανισμοί εξάπλωσης της παθολογίας της α-συνουκλείνης, μεταξύ των οποίων η ενδοκυττάρωση, η άμεση διείσδυση, η διασυναπτική μεταφορά ή η μεταφορά μέσω της μεσολάβησης μεμβρανικού υποδοχέα. Η α-συνουκλείνη κατόπιν της εισόδου της στα στα κύτταρα-δέκτες, είναι δυνατόν να πυροδοτήσει τη διαδικασία πυρήνωσης, προάγοντας την εξάπλωση της παθογένειας. Προσαρμογή από (Lashuel et al., 2013).

φλοιού και μεταφέρονται ανάδρομα προς τα σώματα των αντίστοιχων νευρώνων, επάγοντας νευροτοξικότητα (Danzer et al., 2011). Εντούτοις, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως (βλπ. ενότητα 3.3), η ικανότητα των νευρώνων να προσλαμβάνουν τη φυσιολογικά εκκρινόμενη α-συνουκλείνη παραμένει υπό διερεύνηση (Vekrellis and Stefanis, 2012).

Πέραν της υπόθεσης της πρόσληψης, ένα δόγμα σχετικά με την εξάπλωση της νόσου του Parkinson, το οποίο κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος, αφορά στην προϋπόθεση της συσσωμάτωσης της ενδογενούς α-συνουκλείνης (εικόνα 20)

(Vekrellis and Stefanis, 2012). Τα πρόσφατα πειραματικά δεδομένα του Volpicelli-Daley και των συνεργατών του κατέδειξαν ότι η χορήγηση προσχηματισμένων ινιδίων ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης ήταν σε θέση να προκαλέσουν τη συσσωμάτωση της ενδοκυττάριας πρωτεΐνης και τελικά να επιφέρουν το θάνατο, μόνο στην περίπτωση που τα κύτταρα-δέκτες εξέφραζαν την α-συνουκλεΐνη (Volpicelli-Daley et al., 2011). Ωστόσο, δεδομένου ότι στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τεχνητά κατασκευασμένα ινίδια και όχι φυσιολογικά εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη, τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν να αξιολογηθούν πλήρως, καθώς δεν είναι γνωστό αν τέτοιου τύπου μορφές σχηματίζονται και εν συνεχεία εκκρίνονται, *in vivo*.

Τέλος, τα ευρήματα της Emmanouilidou και των συνεργατών της πιστοποιούν τη δυνατότητα μέτρησης της διαλυτής α-συνουκλεΐνης, *in vivo* στο εγκεφαλικό παρέγχυμα τόσο μυών, όσο και του ανθρώπου (Emmanouilidou et al., 2011). Το γεγονός αυτό ενισχύει την κρατούσα αντίληψη, σύμφωνα με την οποία η α-συνουκλεΐνη, μέσω της παρακρινούς της δράσης, δύναται να επιδεινώνει την παθολογία της νόσου του Parkinson. Κατά συνέπεια, η διατήρηση της συγκέντρωσης της εξωκυττάριας α-συνουκλεΐνης σε φυσιολογικά επίπεδα, είναι δυνατόν να αποδειχθεί κριτικής σημασίας για την ομοιόσταση των κυττάρων. Επομένως, οι μηχανισμοί που διέπουν είτε την απελευθέρωση της α-συνουκλεΐνης προς το εξωκυττάριο περιβάλλον είτε την απομάκρυνσή της από αυτό, θα πρέπει να βρίσκονται υπό αυστηρή ρύθμιση. Είναι πιθανόν, οι παράγοντες που διαταράσσουν τους παραπάνω μηχανισμούς να πυροδοτούν ή να συνεισφέρουν, τελικά, στην εξάπλωση του νευροεκφυλισμού. Κατ'επέκταση, προσεγγίσεις που κατορθώνουν να περιορίσουν τη μετάδοση της α-συνουκλεΐνης, δυνητικά θα μπορούσαν να αποκτήσουν προληπτική και θεραπευτική σημασία (Vekrellis and Stefanis, 2012).

4. Επίδραση της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης και την ομοιόσταση των ιόντων Ca^{2+}

4.1. Επίδραση της α-συνουκλεΐνης στην ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων

4.1.1. Αλληλεπίδραση της α-συνουκλεΐνης με λιπιδικές μεμβράνες

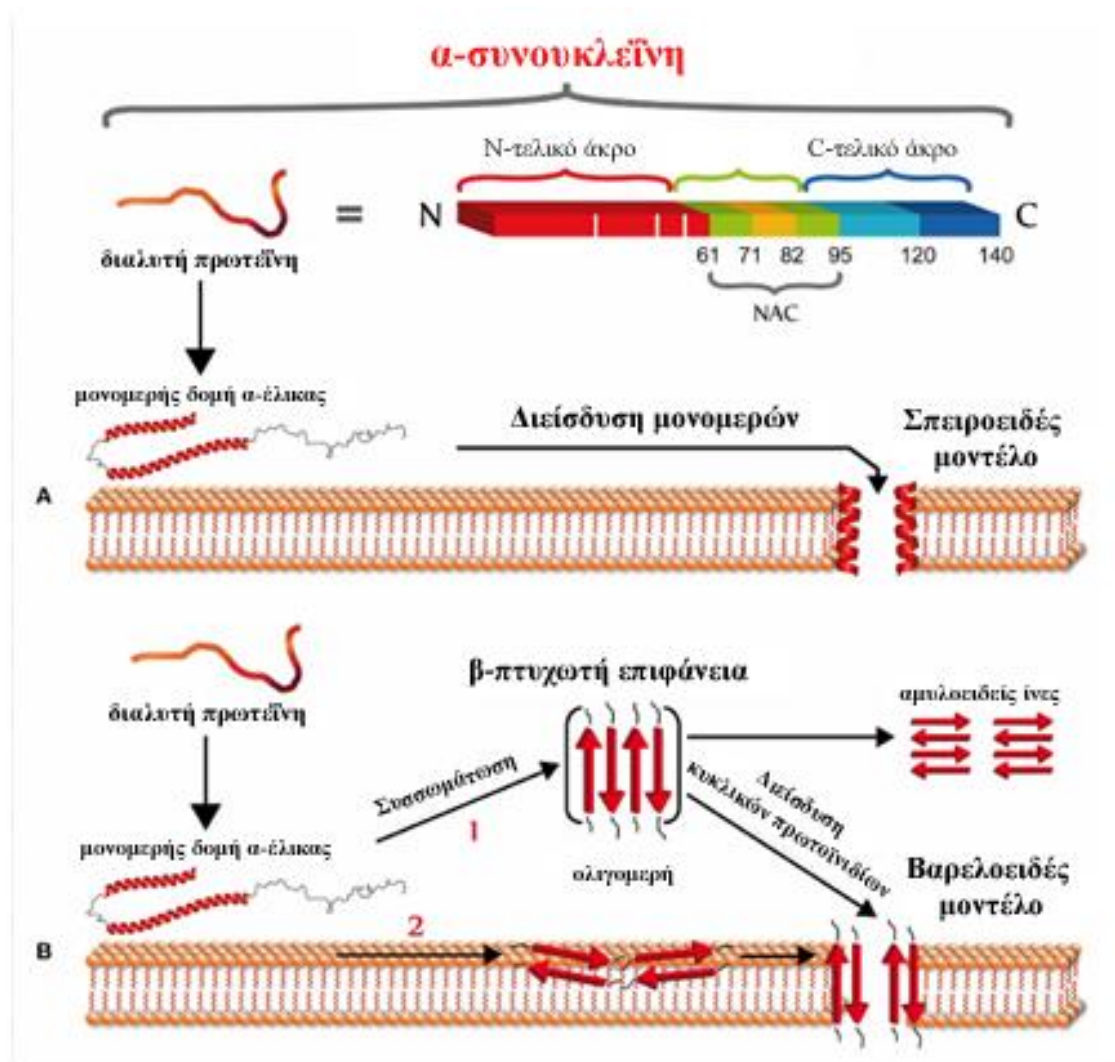
Η α-συνουκλεΐνη, αποδεδειγμένα, αλληλεπιδρά με λιπιδικές μεμβράνες, κυρίως εξαιτίας του αμινοτελικού της άκρου (βλπ. ενότητα 2.1). Μάλιστα, η ικανότητά της αυτή έχει θεωρηθεί πιθανός μηχανισμός, πέραν της ενδοκυττάρωσης, μέσω του οποίου διενεργεί τις τοξικές της δράσεις στα κύτταρα-δέκτες (βλπ. ενότητα 3.3). Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η εν λόγω πρωτεΐνη σχετίζεται με φωσφολιπιδικές διπλοστιβάδες, ιδιαίτερα αυτές, που περιέχουν όξινα φωσφολιπίδια (Davidson et al., 1998), καθώς η λιπόφιλη αμινοτελική περιοχή της είναι θετικά φορτισμένη σε συνθήκες φυσιολογικού pH (Rhoades et al., 2006). Επιπλέον, σταθεροποίηση στην αλληλεπίδραση προσδίδει η αύξηση του σχηματισμού δευτεροταγούς δομής α-έλικας της α-συνουκλεΐνης (Chandra et al., 2003; Davidson et al., 1998; Eliezer et al., 2001; Jo et al., 2000). Ενώ η α-συνουκλεΐνη προσδένεται σε κυστίδια μικρής διαμέτρου (20-25 nm) (Davidson et al., 1998), σύμφωνα με πρόσφατες δημοσιεύσεις, η πρόσδεση αυτή είναι γρήγορη και αντιστρεπτή και είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί με διαφορετικούς μηχανισμούς (Shvadchak et al., 2011).

Σε ουδέτερες μεμβράνες, η α-συνουκλεΐνη έχει δειχθεί ότι προσδένεται ως περιφερειακή πρωτεΐνη, με συναπτικά κυστίδια (Maroteaux et al., 1988), κυστίδια αξονικής μεταφοράς (Jensen et al., 1998), σταγονίδια λιπιδίων (Cole et al., 2002) και κυστίδια ζύμης (Outeiro and Lindquist, 2003). Η πρόσδεση πραγματοποιείται στο εξωτερικό φύλλο της πλασματικής μεμβράνης, κυρίως στις λιπιδικές σχεδίες, περιοχές πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια (Bar-On et al., 2008; Fortin et al., 2004). Οι λιπιδικές σχεδίες εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των λιπιδίων και των υδροφοβικών καταλοίπων της αμφίφιλης α-έλικας που είναι παρούσα στο αμινοτελικό άκρο της α-συνουκλεΐνης (Tsigelny et al., 2007). Η εξάλειψη των αμινοτελικών καταλοίπων της πρωτεΐνης μειώνει την τοξική της δράση στα κύτταρα της ζύμης, υποδεικνύοντας ότι το τοξικό δυναμικό της α-συνουκλεΐνης εξαρτάται από τη λειτουργική περιοχή πρόσδεσης σε μεμβράνες του αμινοτελικού της άκρου (Vamvaca et al., 2009). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε από τις σημειακές

μεταλλάξεις στο γονίδιο της α -συνουκλεΐνης (A30P, E46K και A53T,), οι οποίες μεταφράζονται στην περιοχή του αμινοτελικού της άκρου (**βλπ. ενότητα 2.3.1., εικόνα 10**) και σχετίζονται με τις οικογενείς μορφές της νόσου του Parkinson (Kruger et al., 1998; Polymeropoulos et al., 1997; Zarranz et al., 2004).

4.1.2. Μοντέλα σχηματισμού μεμβρανικών πόρων α -συνουκλεΐνης

Η έλλειψη κρυσταλλογραφικών δεδομένων για την α -συνουκλεΐνη, πιθανότατα εξαιτίας της πολυπλοκότητας που διέπει την κρυσταλλογράφιση αμυλοειδών μορφών, αποτελεί τροχοπέδη στην κατανόηση της δομής των πόρων που αυτή σχηματίζει (Pacheco et al., 2012). Ωστόσο, μέχρι και σήμερα, υπάρχουν κυρίως 2 τύποι μοντέλων μεμβρανικού πόρου, ο σπειροειδής και ο βαρελοειδής (Yang et al., 2001) (**εικόνα 21**). Το μοντέλο του σπειροειδούς πόρου, περιλαμβάνει την πρόσδεση των μονομερών της α -συνουκλεΐνης σε λιπιδικές μεμβράνες, με αποτέλεσμα το σχηματισμό πόρων ή καναλιών με δομή α -έλικας (Zakharov et al., 2007). Μάλιστα, επικρατεί η άποψη ότι οι βασικές επαναλήψεις του μοτίβου KXKE του αμινοτελικού άκρου της α -συνουκλεΐνης δρουν ως αισθητήρας της μεμβρανικής τάσης (Zakharov et al., 2007). Σε αντίθεση με το παραπάνω μοντέλο, έρχεται αυτό του βαρελοειδούς πόρου, σύμφωνα με το οποίο ολιγομερή της α -συνουκλεΐνης, πλούσια σε δομές β -πτυχωτής επιφάνειας σχηματίζουν δακτυλιοειδείς δομές με κεντρικό πόρο (Volles and Lansbury, 2003). Αυτά τα συσσωματώματα προσδένονται στη μεμβράνη (Volles et al., 2001), καθιστώντάς τη διαπερατή, με τρόπο που εξαρτάται από την πρωτεϊνική συγκέντρωση, όπως έχει δείχθει σε λιποσώματα (Volles et al., 2001) και τεχνητές μεμβρανικές διπλοστιβάδες (Kayed et al., 2004). Επίσης, με τη χρήση ατομικής μικροσκοπίας έχει δείχθει ότι η α -συνουκλεΐνη, σε τεχνητές μεμβράνες, σχηματίζει πόρους εξωτερικής διαμέτρου 8-10 nm και εσωτερικής 1-2 nm (Quist et al., 2005). Σημειωτέον, δε, αυτός ο τύπος διαμόρφωσης είναι πολύ παρόμοιος με αυτούς που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες πόρων, όπως π.χ. η amylin (Quist et al., 2005) και η gramicin (Diociaiuti et al., 2002).



Εικόνα 21: Μοντέλα σχηματισμών πόρων από την α-συνουκλεΐνη.

(Επάνω) Πρωτοταγής δομή της α-συνουκλεΐνης. (Α) Το σπειροειδές μοντέλο περιλαμβάνει τη διαδοχική πρόσδεση των μονομερών της α-συνουκλεΐνης στην πλασματική μεμβράνη, με αποτέλεσμα το σχηματισμό πόρων ή καναλιών, με διαμόρφωση α-έλικας (Zakharov et al., 2007). (Β) Σύμφωνα με το βαρελοειδές μοντέλο, τα ολιγομερή της α-συνουκλεΐνης (πλούσια σε β-πτυχωτές επιφάνειες), σχηματίζουν δακτυλιοειδείς διαμορφώσεις, με κεντρικό πόρο (Volles and Lansbury, 2003). Η δημιουργία των εμπλουτισμένων, σε β-πτυχωτές επιφάνειες, ολιγομερών της α-συνουκλεΐνης είναι δυνατόν να λαμβάνει χώρα είτε στον εξωκυττάριο χώρο (1) είτε στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης (2).

Από την ανάλυση μεμονωμένων ρευμάτων καναλιών σε τεχνητές μεμβράνες, προέκυψε ότι τα συσσωματώματα της α-συνουκλεΐνης δημιουργούν πόρους ποικίλης αγωγιμότητας. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει τη συμβολή διαφορετικών ολιγομερών μορφών της πρωτεΐνης στο σχηματισμό των περιγραφόμενων μεμβρανικών δομών (Quist et al., 2005). Παράλληλα, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με τις μεταλλαγμένες μορφές της α-συνουκλεΐνης, A53T και A30P, τονίζουν ότι είναι δυνατόν να μεταβάλλουν την αρχιτεκτονική των πόρων / διατρήσεων (pore / perforations) της πλασματικής μεμβράνης που φυσιολογικά δημιουργεί η φυσικού

τύπου πρωτεΐνη (Furukawa et al., 2006). Αυτές οι δομές πόρου, που διαπερνούν τη μεμβράνη, κανονικά θα έπρεπε να επιτρέπουν την επιλεκτική διέλευση μορίων, με βάση τη μοριακή τους διάμετρο (Pacheco et al., 2012). Για παράδειγμα, τόσο τα ιόντα Ca^{2+} όσο και ο νευροδιαβιβαστής ντοπαμίνη είναι δυνατόν να διαπεράσουν τη μεμβράνη, παρουσία πρωτοϊνιδίων α -συνουκλεΐνης, σε αντίθεση με τα μόρια του κυτοχρώματος c (Volles et al., 2001).

Συνοψίζοντας, η α -συνουκλεΐνη, όπως και άλλες πρωτεΐνες με τάση για ολιγομερισμό (prone-aggregating proteins), είναι σε θέση να αλληλεπιδρά με τα λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου, αυξάνοντας τη μεμβρανική διαπερατότητα μέσω της δημιουργίας δομών, οι οποίες μέχρι και σήμερα δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως. Οι εν λόγω δομές είναι δυνατόν να προκαλέσουν διαταραχές στην ομοιόσταση του Ca^{2+} , αλλά και στη μετακίνηση μετάλλων, με τελικό επακόλουθο την τοξικότητα στο επίπεδο της σύναψης και την κυτταρική έκπτωση. Κατά συνέπεια, η κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τη διαδικασία σχηματισμού των πόρων, θα μπορούσε να προσφέρει νέα γνώση για τη δημιουργία μιας νέας γενιάς καινοτόμων θεραπευτικών προσεγγίσεων, οι οποίες θα παρεμβαίνουν στο επίπεδο της μεμβράνης, εκεί όπου και ξεκινούν οι νευροτοξικές διεργασίες, προκειμένου να αντιμετωπίσουν τη νόσο του Parkinson, καθώς και άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Pacheco et al., 2012).

4.2. Επίδραση της α -συνουκλεΐνης στην ομοιόσταση των ιόντων Ca^{2+}

4.2.1. Ο φυσιολογικός ρόλος και η δυναμική των ιόντων Ca^{2+}

Τα ιόντα Ca^{2+} αποτελούν ένα δεύτερο μήνυμα, που συμμετέχει σχεδόν στο σύνολο των κυτταρικών λειτουργιών (π.χ. γονιδιακή έκφραση, μεταβολισμός, κυτταρικός πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση, οργάνωση του κυτταροσκελετού, έκκριση και κυτταρικός θάνατος). Η ανταπόκριση ενός απλού δισθενούς κατιόντος σε ένα τόσο μεγάλο εύρος διαφορετικών λειτουργιών, πολλές από τις οποίες διενεργούνται ταυτόχρονα στο κύτταρο, επιτυγχάνεται μέσω ενός πολύπλοκου και αυστηρά ελεγχόμενου δικτύου ομοιοστατικών μηχανισμών. Σε συνθήκες ηρεμίας, η συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα είναι 55-100 nM, ενώ κατά τη διέγερση του κυττάρου αυξάνεται, κατά προσέγγιση, στο 1 μ M. Αντίθετα, στον εξωκυττάριο χώρο, τα επίπεδά του ξεπερνούν περίπου κατά 20000 φορές τα βασικά κυτταροπλασματικά, αγγίζοντας τα 2 mM. Η διατήρηση αυτής της διαβάθμισης

αντανακλά την αποτελεσματικότητα των μηχανισμών, που ρυθμίζουν την ομοιόσταση των ιόντων, για τους οποίους το κύτταρο διαθέτει ένα μεγάλο μέρος της ενέργειάς του (Clapham, 2007; Rhodes and Sanderson, 2009).

4.2.2. Μηχανισμοί ομοιόστασης των ιόντων Ca^{2+}

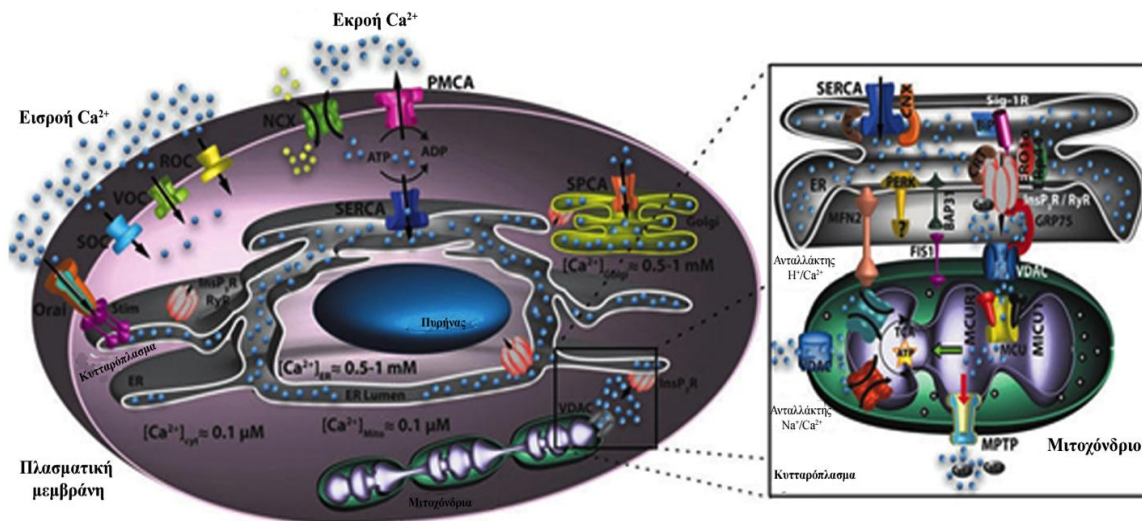
Πρωταγωνιστές στη ρύθμιση της διακίνησης των ιόντων Ca^{2+} , προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση και να εξασφαλιστεί η σωστή κυτταρική σηματοδότηση, είναι ένα πολύπλοκο σύστημα καναλιών, αντλιών και ιοντοανταλλακτών, στην πλασματική μεμβράνη και το Ε.Δ. (εικόνα 22).

Η απομάκρυνση του Ca^{2+} από το κυτταρόπλασμα είναι μια ενεργητική διαδικασία, που πραγματοποιείται αφενός μέσω της αντλίας PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase) και των ιοντοανταλλακτών Na^+/Ca^{2+} (NCX) και $Na^+/Ca^{2+}-K^+$ (NCKX), στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης, και αφετέρου μέσω της αντλίας SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase) στη μεμβράνη του Ε.Δ. Οι αντλίες PMCA και SERCA, μεταφέρουν συνεχώς Ca^{2+} στον εξωκυττάριο χώρο και τον αυλό του Ε.Δ., αντίστοιχα, αντίθετα προς τη διαβάθμιση συγκέντρωσης, με παράλληλη υδρόλυση ATP (Clapham, 2007). Οι ιοντικοί ανταλλάκτες κατέχουν εξίσου θεμελιώδη ρόλο στην ομοιόσταση του Ca^{2+} . Ο NCX ανταλλάσσει 3 ιόντα Na^+ προς 1 ιόν Ca^{2+} , ενώ ο NCKX ανταλλάσσει 1 ιόν K^+ και 1 ιόν Ca^{2+} προς 4 ιόντα Na^+ (Belkacemi et al., 2005). Η διαφορά στους ρόλους των δύο συστημάτων μεταφοράς, έγκειται στο γεγονός ότι η PMCA είναι υπεύθυνη για τη μακροχρόνια διατήρηση των χαμηλών επιπέδων κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , ενώ οι ανταλλάκτες αποκαθιστούν πολύ γρήγορα την ισορροπία, ύστερα από στιγμιαίες διαταραχές, όπως η εκπόλωση των νευρώνων (Hilgemann et al., 2006).

Η αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} πραγματοποιείται με εισροή ιόντων από τον εξωκυττάριο χώρο ή / και με απελευθέρωσή τους από το Ε.Δ. Η έξοδος των ιόντων Ca^{2+} από το ΕΔ, το οποίο αποτελεί τη βασική αποθήκη Ca^{2+} στο κύτταρο, επιτυγχάνεται μέσω δύο διαμεμβρανικών υποδοχέων: του υποδοχέα της 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3R ή $InsP_3R$) και του υποδοχέα της ρυανοδίνης (RyR). Οι IP_3Rs ενεργοποιούνται με πρόσδεση του δεύτερου μηνύματος, IP_3 , το οποίο παράγεται από καταρροϊκά σήματα υποδοχέων, που είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες (GPCRs). Οι RyRs, που εντοπίζονται, τόσο στο ενδοπλασματικό, όσο και στο σαρκοπλασματικό δίκτυο, ενεργοποιούνται από χαμηλά επίπεδα κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις τους καταστέλλουν. Και οι

δύο τύποι υποδοχέων διαθέτουν ογκώδη κυτταροπλασματικά τμήματα, με μεγάλο αριθμό ρυθμιστικών περιοχών και θέσεων πρόσδεσης πρωτεϊνών, όπως η καλμοδουλίνη (Clapham, 2007). Επίσης, παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία, στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, τις ROS και τις κινόνες (Waring, 2005).

Τα κανάλια εισόδου Ca^{2+} της πλασματικής μεμβράνης ενεργοποιούνται μετά από κατάλληλο ερέθισμα και περιλαμβάνουν τα τασεο-ελεγχόμενα κανάλια (voltage-gated Ca^{2+} channels, VOCs), την υπεροικογένεια των TRPs (transient receptor potential) και τα κανάλια που ελέγχονται από την πληρότητα των αποθηκών (store-operated Ca^{2+} channels, SOCs). Οι VOCs αποκρίνονται ταχύτατα στις αλλαγές του διαμεμβρανικού δυναμικού και, λόγω της μεγάλης διαβάθμισης στη συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} , είναι ικανοί να δεκαπλασιάσουν τα κυτταροπλασματικά επίπεδα των ιόντων, σε λίγα μόλις χιλιοστά του δευτερολέπτου (Catterall, 2011). Τα μέλη της υπεροικογένειας των TRPs επάγονται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως οι μεταβολές της θερμοκρασίας ή του pH, οι πτητικές οργανικές ενώσεις και ποικίλα φυτικά συστατικά. Πρόκειται για μη ειδικά κατιονικά κανάλια, τα οποία εκπολώνουν την πλασματική μεμβράνη και αυξάνουν τη συγκέντρωση Ca^{2+} και Na^+ στο κυτταρόπλασμα. Η δραστηριότητά τους επάγεται από GPCRs ή υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης (RTKs), μέσω ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης C (PLC) (Ramsey et al., 2006). Τέλος, τα κανάλια SOCs ενεργοποιούνται από την εκκένωση του Ε.Δ. από ιόντα Ca^{2+} , προκειμένου να αναπληρωθούν οι ενδοκυττάρια αποθήκες. Η διαδικασία αυτή, γνωστή ως «είσοδος Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας» ή CCE (Capacitative Calcium Entry), είναι ζωτικής σημασίας για τη διασφάλιση της ομαλής κυτταρικής σηματοδότησης. Ο μηχανισμός που συνδέει την εκκένωση των αποθηκών με την εισροή εξωκυττάρια Ca^{2+} δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Ωστόσο, κρίσιμο ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει η διαμεμβρανική πρωτεΐνη STIM1 του Ε.Δ., η οποία λειτουργεί ως «αισθητήρας» των επιπέδων Ca^{2+} , στο εσωτερικό του Ε.Δ. και, κατά την εκκένωσή του, σχηματίζει συσσωματώματα, ακριβώς κάτω από τα κανάλια SOCs (Putney, 2009; Putney, 2007).



Εικόνα 22: Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών ομοιόστασης του κυτταρικού Ca^{2+} .

Παρουσία κυτταρικού ερεθίσματος, τα ιόντα Ca^{2+} ρέουν προς το κυτταρόπλασμα μέσω της διάνοιξης των υποδοχέων InsP_3Rs και RyRs , του Ε.Δ. (ER), και/ή των υποδοχέων VOCs , ROCs και SOCs , και των καναλιών Ca^{2+} της πλασματικής μεμβράνης, ενώ μετακινούνται απευθείας στον αυλό του Ε.Δ. μέσω του συμπλόκου Stim-Orai . Η εκκαθάριση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} στηρίζεται στην ATP άση Ca^{2+} της πλασματικής μεμβράνης (PMCA), τον ιοντοανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), την ATP άση Ca^{2+} του σαρκοενοδοπλασματικού δικτύου (SERCA), καθώς και την ATP άση Ca^{2+} του εκκριτικού μονοπατιού της συσκευής Golgi (SPCA). Οι μεμβράνες που συνδέονται με τα μιτοχόνδρια, περιέχουν υψηλά επίπεδα calnexin (CNX), calreticulin (CRT), και BiP, πρωτεϊνών που δεσμεύουν το ελεύθερο Ca^{2+} . Τα ιόντα Ca^{2+} που απελευθερώνονται από τους InsP_3Rs , δημιουργούν, τοπικά, μικρές λειτουργικές περιοχές υψηλών συγκεντρώσεων Ca^{2+} , οι οποίες γίνονται αντιληπτές από το μιτοχονδριακό ανταλλάκτη Ca^{2+} (MCU). Η σύνδεση των InsP_3Rs με το τασεοελεγχόμενο κανάλι ανιόντων (VDAC), μέσω της Grp75 , καθώς και η πρόσδεση της Mitofusin-2 (MFN2), διατηρούν τα σημεία επαφής μεταξύ του Ε.Δ. και των μιτοχονδρίων και τη δημιουργία εξειδικευμένων μικροδιαμερισμάτων. Η απελευθέρωση του Ca^{2+} που επάγεται από την InsP_3 , ρυθμίζεται από πρωτεΐνες συνοδούς του Ε.Δ., μεταξύ των οποίων η Ero1a , η ERp44 , και η Sig-1R , καθώς και από το κυτόχρωμα c (cyt c). Η ενισχυμένη συσσώρευση ιόντων Ca^{2+} στα μιτοχόνδρια υποστηρίζει τη σύνθεση του ATP . Ωστόσο, υπερβολική αύξηση του μιτοχονδριακού περιεχομένου ενεργοποιεί τη διάνοιξη του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας (MPTP), με επακόλουθο την απελευθέρωση του cyt c και την επαγωγή της απόπτωσης. Ο μηχανισμός εκροής Ca^{2+} από τα μιτοχόνδρια εξαρτάται, ως επί το πλείστον, από τη δραστηριότητα του ιοντοανταλλάκτη $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, ενώ σε μερικούς κυτταρικούς τύπους είναι ενεργός και αυτός του $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$. Προσαρμογή από (Cali et al., 2013).

Για μεγάλο χρονικό διάστημα η εισροή ιόντων Ca^{2+} θεωρείτο ως η κύρια πηγή σημάτων Ca^{2+} , ιδιαίτερος για τους νευρώνες. Εντούτοις, αυξανόμενος όγκος δεδομένων παγιώνει τη σπουδαιότητα της απελευθέρωσης ιόντων Ca^{2+} από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες, με το Ε.Δ., να επιτελεί το ρόλο της κυρίαρχης υποκυτταρικής δεξαμενής (Patel and Docampo, 2010). Η ελεγχόμενη εκροή Ca^{2+} από το Ε.Δ. προς το κυτταρόπλασμα ρυθμίζει σημαντικές νευρωνικές λειτουργίες, μεταξύ των οποίων και η νευρωνική πλαστικότητα (Bardo et al., 2006; Zundorf and Reiser,

2011). Σημαντικός αρωγός στο ρυθμιστικό ρόλο του Ε.Δ. είναι τα μιτοχόνδρια, τα οποία βρίσκονται σε φυσική και λειτουργική επαφή με το Ε.Δ. (**εικόνα 22**) (de Brito and Scorrano, 2008; Lamarca and Scorrano, 2009). Τα σημεία επαφής μεταξύ του Ε.Δ. και των μιτοχονδρίων αποτελούν εξειδικευμένες περιοχές, στις οποίες οι μεμβράνες των δύο οργανιδίων, που βρίσκονται απέναντι, συνδέονται με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών, οι οποίες διατηρούν τη μεταξύ τους απόσταση σε εύρος 10–30 nm (**εικόνα 22**) (Csordas et al., 2006; Friedman et al., 2011; Rizzuto et al., 1998). Πλέον, είναι γνωστό ότι οι περιοχές σύνδεσης διαθέτουν χαρακτηριστικές βιοχημικές ιδιότητες και εμπλέκονται σε ποικίλες σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η βιοσύνθεση λιπιδίων, η διαίρεση των μιτοχονδρίων, η ρύθμιση της δυναμικής μεταξύ των δύο οργανιδίων και τέλος τα σηματοδοτικά μονοπάτια του Ca^{2+} (Rowland and Voeltz, 2012). Κατά συνέπεια, η διατήρηση της φυσικής σύνδεσης μεταξύ του Ε.Δ. και των μιτοχονδρίων είναι κομβικής σημασίας για τη συσσώρευση των ιόντων Ca^{2+} από τα τελευταία (Cali et al., 2011).

Πέραν του Ε.Δ. και των μιτοχονδρίων, ως πηγές ιόντων Ca^{2+} , μπορούν, επίσης, να λειτουργήσουν τα ενδοσώματα, τα εκκριτικά κυστίδια, τα λυσοσώματα, κυστίδια του συστήματος Golgi και τα μελανοσώματα (Rizzuto and Pozzan, 2006). Πιο συγκεκριμένα, τα λυσοσώματα, πλέον, τοποθετούνται στο κέντρο του ενδιαφέροντος, καθώς φαίνεται να διαδραματίζουν έναν πιο περίπλοκο ρυθμιστικό ρόλο από αυτόν των απλών οργανιδίων καταβολισμού. Παρότι η έρευνα προς αυτήν την κατεύθυνση βρίσκεται σε νηπιακό στάδιο, πρόσφατα δεδομένα υπογραμμίζουν τη σπουδαιότητα του ρόλου των όξινων οργανιδίων στη σηματοδότηση του Ca^{2+} (Patel and Docampo, 2010). Η σωστή λειτουργία του ενδολυσοσωμικού και εκκριτικού μονοπατιού, φαίνεται να βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην κατάλληλη διαχείριση του Ca^{2+} που βρίσκεται στο εσωτερικό των όξινων οργανιδίων (Holroyd et al., 1999; Patel and Docampo, 2010; Peters and Mayer, 1998; Pryor et al., 2000). Τέλος, παρουσία κάποιου αποπτωτικού ερεθίσματος, τα λυσοσώματα αποκρίνονται με απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} , οδηγώντας σε περαιτέρω αύξηση των επιπέδων του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} και επακόλουθο κυτταρικό θάνατο (Mirnikjoo et al., 2009).

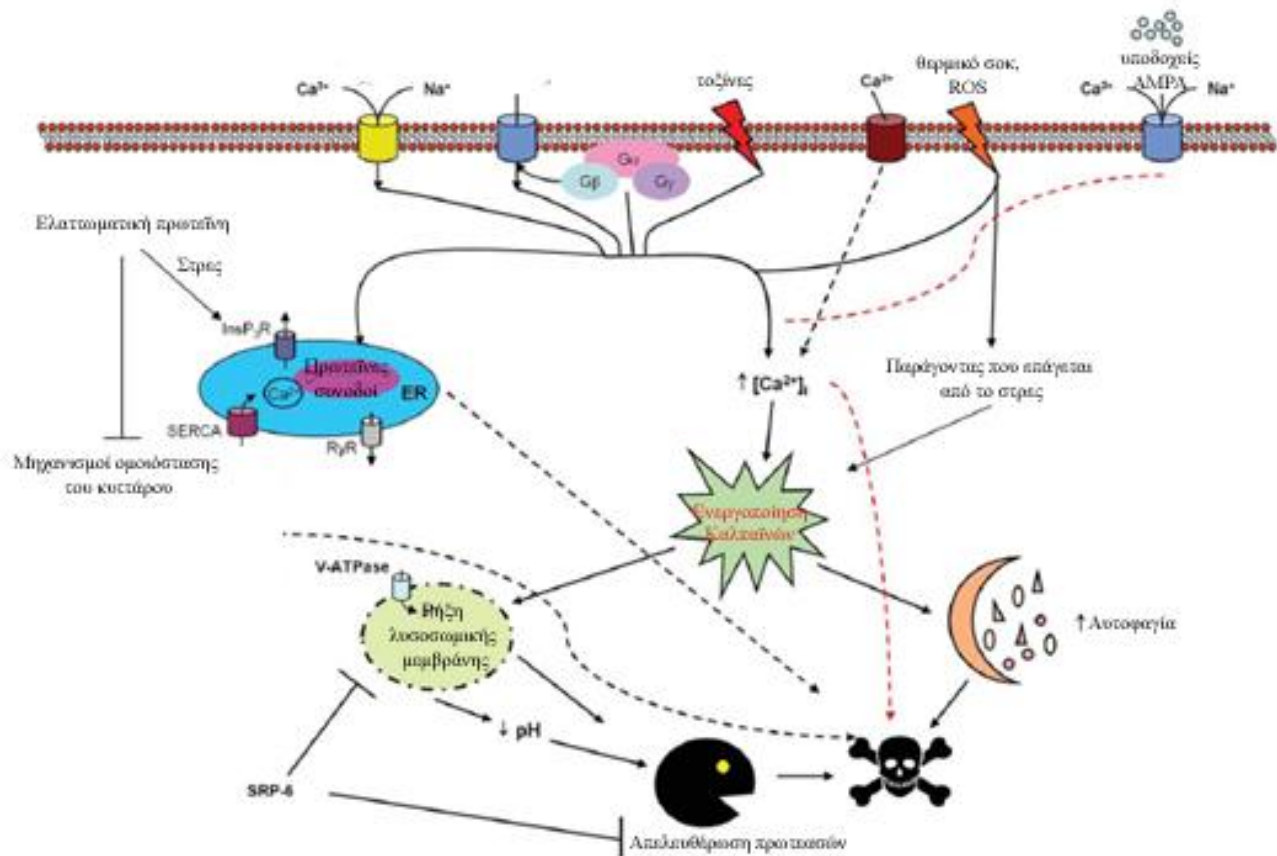
4.2.3. Συμμετοχή των ιόντων Ca^{2+} σε μονοπάτια σηματοδότησης και κυτταρικού θανάτου

Η κυτταρική σηματοδότηση μέσω ιόντων Ca^{2+} , όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως (βλπ. ενότητα 4.2.2.), βασίζεται στην απελευθέρωσή τους από τις ενδοκυττάρια αποθήκες. Η ενεργοποίηση της PLC_{β} και της PLC_{γ} από τους μεμβρανικούς υποδοχείς GPCRs και RTKs, αντίστοιχα, οδηγεί στην υδρόλυση του PIP_2 και την παραγωγή των δεύτερων μηνυμάτων, IP_3 και διακυλογλυκερόλη (DAG). Η πρόσδεση της IP_3 στον υποδοχέα IP_3R του Ε.Δ., επιτρέπει την απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, αυξάνοντας τη συγκέντρωσή τους περίπου στο 1 μM . Τα ελεύθερα ιόντα Ca^{2+} αλληλεπιδρούν με την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και επάγουν τη μεταφορά της στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης, όπου ενεργοποιεί τη DAG, μέσω φωσφορυλίωσης. Κατά την επεξεργασία της DAG από ειδικές κινάσες και φωσφατάσες, προκύπτουν δύο βιοενεργά μόρια: το φωσφατιδικό και το αραχιδονικό οξύ, αντίστοιχα. Αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι κινητοποιείται καταρροϊκά της ενεργοποίησης των περισσότερων υποδοχέων της πλασματικής μεμβράνης (Clapham, 2007).

Η επίδραση του Ca^{2+} στην επιβίωση του κυττάρου έχει διττό χαρακτήρα. Μικρές, ελεγχόμενες αυξήσεις στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων, μπορούν να επάγουν την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό αλληλεπιδρώντας με αντίστοιχα σηματοδοτικά μονοπάτια (π.χ. PI_3K/Akt) και μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. $NF-\kappa B$, $HIF-1$). Για παράδειγμα, το Ca^{2+} συμμετέχει στην ενεργοποίηση της κινάσης Akt, μέσω του ένζυμου καλμοδουλίνη (Deb et al., 2004; Perez-Garcia et al., 2004). Η καλμοδουλίνη ενεργοποιείται από τα ιόντα Ca^{2+} και προσδένεται στην ανενεργή Akt μεταφέροντάς την στην πλασματική μεμβράνη, όπου φωσφορυλιώνεται από τις αντίστοιχες κινάσες. Εναλλακτικά, έχει προταθεί ότι η καλμοδουλίνη επάγει απευθείας την ενεργοποίηση της PI_3K , η οποία ακολούθως μεσολαβεί τη φωσφορυλίωση της Akt (Perez-Garcia et al., 2004).

Ωστόσο, η μαζική και παρατεταμένη εισροή Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, πυροδοτεί μια σειρά γεγονότων, που ενδέχεται να έχουν καταστροφικές συνέπειες για το κύτταρο (εικόνα 23). Στις περιπτώσεις αυτές, παρατηρείται εκτεταμένη πρωτεόλυση, μέσω ενεργοποίησης Ca^{2+} -εξαρτώμενων πρωτεασών (π.χ. καλπαΐνες), καθώς και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Ένα από τα υποστρώματα των καλπαϊνών είναι η προκασπάση-12, η οποία εντοπίζεται στη μεμβράνη του Ε.Δ. Η

κασπάση-12, με τη σειρά της, ενεργοποιεί πρωτεολυτικά τις κασπάσες τελεστές, επάγοντας την αποπτωτική διαδικασία, ανεξάρτητα από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Moserova and Kralova, 2012). Παράλληλα, τα μιτοχόνδρια ανταποκρίνονται άμεσα στην υψηλή συγκέντρωση Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα. Η διέλευση των ιόντων Ca^{2+} από την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη πραγματοποιείται μέσω των τασεοελεγχόμενων καναλιών, VDAC. Αφού τα ιόντα διαπεράσουν την εξωτερική μεμβράνη, μπορούν να εισέλθουν στη μήτρα, είτε μέσω των ιοντοανταλλακτών Na^+/Ca^{2+} και H^+/Ca^{2+} , είτε μέσω ενός ειδικού μεταφορέα που επιτρέπει την είσοδο ιόντων, λόγω της διαφοράς δυναμικού εκατέρωθεν της μεμβράνης. Στη μιτοχονδριακή μήτρα, το Ca^{2+} αλληλεπιδρά με τη κυκλοφιλίνη D επάγοντας την ευθυγράμμιση του μεταφορέα αδενίνης (ANT) της εσωτερικής μεμβράνης, με το κανάλι VDAC της εξωτερικής μεμβράνης και τη δημιουργία του πόρου PTP (Permeability Transition Pore). Το γεγονός αυτό, προκαλεί διόγκωση και ρήξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης, απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων προ-αποπτωτικών παραγόντων (AIF, ενδονουκλεάση G) στο κυτταρόπλασμα και επαγωγή του αποπτωτικού θανάτου (Jeong and Seol, 2008). Επιπλέον, το άνοιγμα του πόρου PTP, έχει συνδεθεί και με μια έκρηξη παραγωγής ROS από το μιτοχόνδριο, λόγω της διατάραξης της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα την επαγωγή έντονου οξειδωτικού στρες και τη γενίκευση της βλάβης (Adam-Vizi and Starkov, 2010).



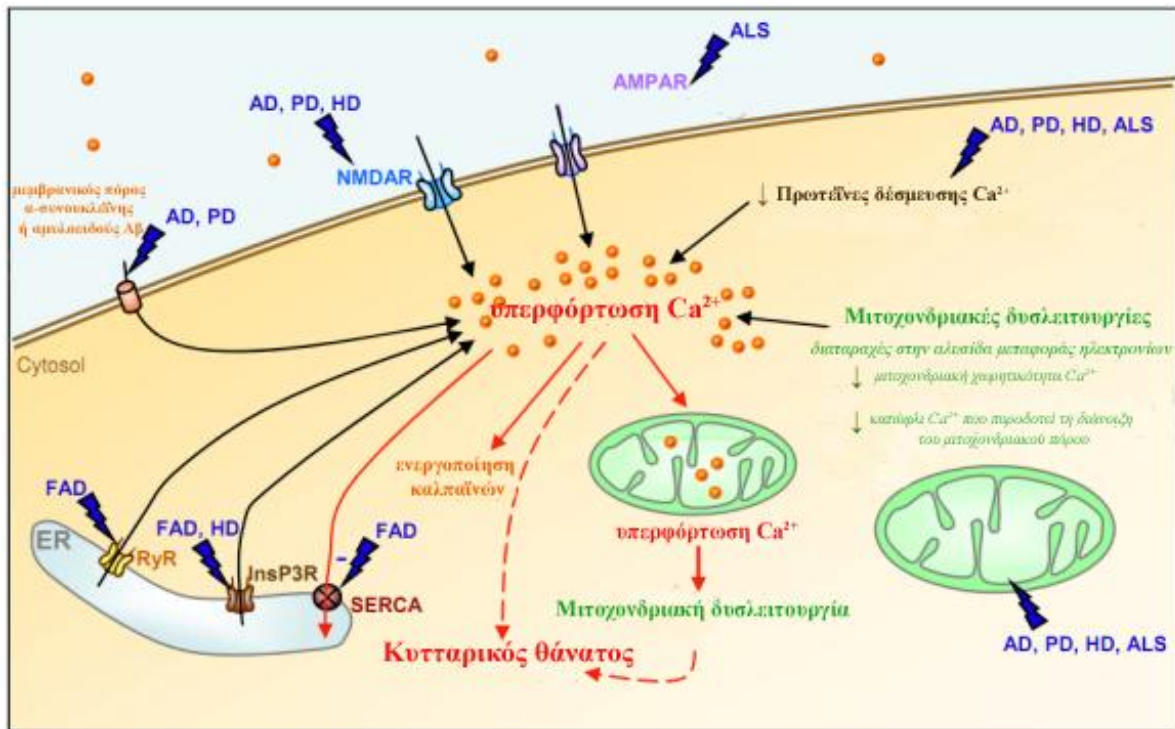
Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών θανάτου που ενεργοποιούνται από την παρατεταμένη αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} .

Γενετικοί ή περιβαλλοντικοί παράγοντες, οδηγούν σε αυξημένη κυτταροπλασματική συγκέντρωση Ca^{2+} . Η επακόλουθη ενεργοποίηση των καλπαϊνών, προκαλεί αλλοίωση των λυσοσωμικών μεμβρανών και απελευθέρωση του λυσοσωμικού περιεχομένου στο κυτταρόπλασμα. Η ταυτόχρονη απελευθέρωση λυσοσωμικών πρωτεολυτικών ενζύμων, σε συνδυασμό με την όξυνση του κυτταροπλασματικού pH, διαμεσολαβεί στην κυτταρική καταστροφή. Η αύξηση της κυτταροφαγίας μπορεί να έχει συνεργατική δράση με τα λυσοσωμικά πρωτεολυτικά μονοπάτια, διευκολύνοντας στη διάλυση του κυτταρικού περιεχομένου. Προσαρμογή από (Vlachos and Tavernarakis, 2010).

4.2.4. Διαταραχές της ομοιόστασης των ιόντων Ca^{2+} στις νευροεκφυλιστικές νόσους και ιδιαίτερα στη νόσο του Parkinson

Διαταραχές στην ομοιόσταση του Ca^{2+} έχουν παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις νευροεκφυλιστικών ασθενειών, μεταξύ των οποίων η νόσος του Alzheimer (AD) (Bezprozvanny and Mattson, 2008; Green and LaFerla, 2008), η νόσος του Parkinson (PD) (Hallett and Standaert, 2004; Surmeier et al., 2010; Thomas and Beal, 2007), η νόσος του Huntington (HD) (Bezprozvanny, 2007; Fan and Raymond, 2007), καθώς και η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) (von Lewinski and Keller, 2005). Τέτοιου τύπου διαταραχές περιλαμβάνουν δυσλειτουργίες σε μία πληθώρα μηχανισμών, όπως αλλαγές στην

ικανότητα ρύθμισης του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , απορρύθμιση των καναλιών Ca^{2+} , ή διεγερσιμοτοξικότητα (Marambaud et al., 2009). Σπάνια είναι τα παραδείγματα των περιπτώσεων, οι οποίες προσδίδουν στη διαταραχή της ομοιόστασης του Ca^{2+} , έναν ακριβή αιτιολογικό ρόλο στη διαδικασία νευροεκφυλισμού. Εντούτοις, αυξανόμενος αριθμός δεδομένων παρέχει αδιαμφισβήτητες αποδείξεις για τη συμμετοχή του Ca^{2+} στην παθογένεια των νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Marambaud et al., 2009).



Εικόνα 24: Διαταραχές της ομοιόστασης του Ca^{2+} στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Στις νευροεκφυλιστικές νόσους επηρεάζονται τα κυτταροπλασματικά επίπεδα Ca^{2+} , καθώς απορρυθμίζονται οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί ελέγχου, όπως η δραστηριότητα των NMDAR και AMPAR, οι πρωτεΐνες δέσμησης Ca^{2+} , και η μιτοχονδριακή λειτουργία. Η α -συνουκλείνη και το β -αμυλοειδές στη νόσο του Parkinson και τη νόσο του Alzheimer αντίστοιχα, μπορούν να σχηματίσουν ιονικά κανάλια στην πλασματική μεμβράνη, διαπερατά στο Ca^{2+} . Επιπλέον, παρατηρήθηκε υπερβολική εκροή Ca^{2+} από το Ε.Δ., λόγω της υπερευαισθητοποίησης των InsP_3Rs και των RyRs , ή της απενεργοποίησης της αντλίας SERCA. Προσαρμογή από (Marambaud et al., 2009).

Πρόσφατα δεδομένα καθιστούν τις διαταραχές της ομοιόστασης του Ca^{2+} ως την κύρια ηλικιοεξαρτώμενη δύναμη που κινεί το νευροεκφυλισμό στη σποραδική νόσο του Parkinson (Zundorf and Reiser, 2011). Αυτή η άποψη υποστηρίζεται, περαιτέρω, από το εύρημα ότι οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες, που εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα πρωτεϊνών που δεσμεύουν ιόντα Ca^{2+} (Ca^{2+} -binding proteins, *CaBPs*), όπως, λ.χ. η calbindin D28K, η calretinin και η parvalbumin, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα απέναντι στον εκφυλισμό (Surmeier et al., 2010).

Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας και οι νοραδρενεργικοί του υπομέλανα τόπου, οι οποίοι πλήττονται στη νόσο του Parkinson, παρουσιάζουν μια αυτόνομη δραστηριότητα βηματοδότη που κατευθύνεται από τα CaV (1.3) L-τύπου τασεολελεγχόμενα κανάλια Ca²⁺ (L-type Ca²⁺ channels) (βλπ. ενότητα 4.2.6) (Chan et al., 2009; Mosharov et al., 2009). Κατά συνέπεια, οι ώριμοι νευρώνες της μέλαινας ουσίας πρέπει να ανταπεξέλθουν στα εξαιρετικά υψηλά κύματα κυτταροπλασματικού Ca²⁺, γεγονός που καθιστά το συγκεκριμένο πληθυσμό νευρώνων ευάλωτο (Chan et al., 2009; Mosharov et al., 2009). Τέλος, έχει προταθεί, ότι τα CaV(1.3) L-τύπου τασεολελεγχόμενα κανάλια συνδέονται με την παραγωγή μιτοχονδριακού οξειδωτικού στρες, υποστηρίζοντας τη θεωρία της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στην παθογένεια της νόσου του Parkinson (Chan et al., 2009; Kang et al., 2012; Mosharov et al., 2009; Surmeier et al., 2010).

4.2.5. Συσχέτιση της α-συνουκλεΐνης με διαταραχές της ομοιόστασης των ιόντων Ca²⁺

Διαταραχές της ομοιόστασης των ιόντων Ca²⁺, που παρατηρούνται στη νόσο του Parkinson (βλπ. ενότητα 4.2.4), έχουν συνδεθεί κατά καιρούς με την α-συνουκλεΐνη, τον κυριότερο «μοριακό πρωταγωνιστή» της νόσου. Σύμφωνα με επιστημονικές αναφορές, η α-συνουκλεΐνη επηρεάζει τη λειτουργία των τασεολελεγχόμενων καναλιών Ca²⁺ (voltage-dependent Ca²⁺ channels, VOCs) (εικόνα 25) (Adamczyk and Strosznajder, 2006; Hettiarachchi et al., 2009; Kang et al., 2012). Πιο συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι η α-συνουκλεΐνη επάγει την εισροή ιόντων Ca²⁺ σε συναπτοσώματα επίμυων, μέσω της μεσολάβησης των N-τύπου τασεολελεγχόμενων καναλιών (N-type VOCs) (Adamczyk and Strosznajder, 2006). Επιπλέον, *in vitro* παρασκευασμένα ολιγομερή της α-συνουκλεΐνης προκαλούν εισροή ιόντων Ca²⁺ και επακόλουθη ενεργοποίηση των κασπασών σε πρωτογενείς νευρώνες αλλά και σε καλλιέργειες κυττάρων νευροβλαστώματος ανθρώπου (Danzer et al., 2007; Furukawa et al., 2006; Martin et al., 2012).

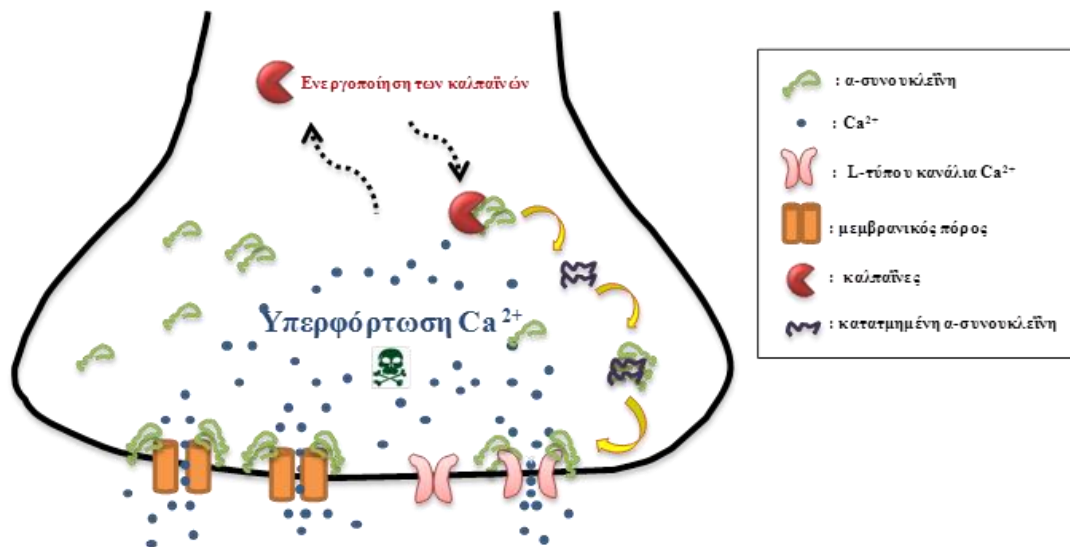
Η επιρροή της α-συνουκλεΐνης στη ρύθμιση των ιόντων Ca²⁺, πέραν από την επίδρασή της σε κανάλια Ca²⁺, τοποθετείται και στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης. *In vitro*, έχειδειχθεί ότι οι τοξικές μορφές της πρωτεΐνης, ολιγομερή και συσσωματώματα, έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με λιπιδικές μεμβράνες. Σε αυτά τα πλαίσια, έχει προταθεί η υπόθεση σύμφωνα με την οποία ολιγομερείς και ινδιακές μορφές της α-συνουκλεΐνης ενσωματώνονται στην κυτταρική μεμβράνη

σχηματίζοντας πόρους και αλλοιώνοντας τρόπον τινά την ακεραιότητά της (**βλπ. ενότητα 4.1.2**). Εναλλακτικά, αλληλεπιδρώντας με τα μεμβρανικά κανάλια Ca^{2+} και αλλάζοντας τη λειτουργία τους, διαταράσσουν την ισορροπία των ιόντων Ca^{2+} ανάμεσα στον εξωκυττάριο και τον ενδοκυττάριο χώρο (**εικόνα 24, 25**) (Danzer et al., 2007; Hettiarachchi et al., 2009; Huls et al., 2011; Kaye et al., 2004; Kostka et al., 2008; Tsigelny et al., 2007; Tsigelny et al., 2008; Tsigelny et al., 2012).

Η λειτουργική και φυσιολογική επικοινωνία μεταξύ του Ε.Δ. και των μιτοχονδρίων, κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca^{2+} . Μέσω της ομαλής μεταφοράς των ιόντων Ca^{2+} από το ένα οργανίδιο στο άλλο, ελέγχεται πληθώρα κυτταρικών διεργασιών (**βλπ. ενότητα 4.2.2**). Υπό φυσιολογικές συνθήκες έχει δειχθεί ότι η α -συνουκλείνη διευκολύνει τη σύνδεση μεταξύ των δύο οργανιδίων. Αντιθέτως, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης οδηγεί σε αναδιοργάνωσή της μέσα στο κύτταρο, αλλοίωση της επικοινωνίας μεταξύ των δύο οργανιδίων και επακόλουθη απορρύθμιση της ομοιόστασης του μιτοχονδριακού Ca^{2+} (Cali et al., 2012). Παρομοίως, η αποσιώπηση της α -συνουκλείνης με siRNA μειώνει την πρόσληψη Ca^{2+} από τα μιτοχόνδρια, ενώ παράλληλα προκαλεί σημαντικές τροποποιήσεις στη μορφολογία του οργανιδίου. Η κακή διαχείριση των καταστάσεων υπερφόρτωσης του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} έχει συνδεθεί με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και τον επακόλουθο κυτταρικό θάνατο, που απαντάται στη νόσο του Parkinson (Benner et al., 2004; Cali et al., 2012; Vekrellis and Stefanis, 2012; Zhou et al., 2004).

Η ανεξέλεγκτη εισροή των ιόντων Ca^{2+} είναι δυνατόν να ενεργοποιήσει μια κατηγορία Ca^{2+} -εξαρτώμενων πρωτεασών κυστεΐνης, των καλπαϊνών (Medeiros et al., 2012). Αυξανόμενος αριθμός αναφορών παγιώνει, σταδιακά, την άποψη σύμφωνα με την οποία η μη φυσιολογική ενεργοποίηση των καλπαϊνών αποτελεί έναν από τους κύριους «υπόπτους», σε ένα ευρύ φάσμα διαταραχών του εγκεφάλου, μεταξύ των οποίων η νόσος του Parkinson, του Alzheimer και του Huntington, αλλά και η ισχαιμία, η διεγερσιμοτοξικότητα και το εγκεφαλικό τραύμα (Camins et al., 2006). Προς αυτήν την κατεύθυνση συνάδουν δεδομένα σύμφωνα με τα οποία, αναστολείς των καλπαϊνών δρουν προστατευτικά σε ζωικά μοντέλα MPTP, τα οποία προσομοιάζουν χαρακτηριστικά της νόσου του Parkinson (Camins et al., 2006; Li et al., 1998; Nakamura et al., 2003). Τέλος, νέα επιστημονικά ευρήματα αναδεικνύουν μια αλληλένδετη σχέση μεταξύ της α -συνουκλείνης, της ενεργοποίησης των καλπαϊνών και της νευροτοξικότητας (**εικόνα 25**). Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός

μέσω του οποίου οι καλπαΐνες ρυθμίζουν τα μονοπάτια κυτταρικού θανάτου παραμένει μέχρι και σήμερα αδιευκρίνιστος (Camins et al., 2006).



Εικόνα 25: α-συνουκλείνη και διαταραχές της ομοιόστασης του Ca^{2+} στη νόσο του Parkinson.

Οι ολιγομερείς μορφές της α-συνουκλείνης θεωρείται ότι προωθούν το σχηματισμό πόρων στην πλασματική μεμβράνη, μέσω των οποίων τα ιόντα Ca^{2+} εισέρχονται στο κύτταρο. Αυξημένες συγκεντρώσεις κυτταροπλασματικού Ca^{2+} είναι δυνατόν να επηρεάσουν τη λειτουργία των L-τύπου VOCs (Cav1.3), προκαλώντας την περαιτέρω εισροή Ca^{2+} , με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια συσσώρευσή του και την ενεργοποίηση καταρροϊκών μονοπατιών θανάτου, στα οποία εμπλέκεται και η ενεργοποίηση των καλπαϊνών. Επιπλέον, η κατάτμηση της α-συνουκλείνης στο καρβοξυτελικό της άκρο από τις ενεργοποιημένες καλπαΐνες, μπορεί να δώσει γένεση σε μορφές με έντονη τάση για συσσωμάτωση, οι οποίες είναι σε θέση να ενισχύσουν την εισροή ιόντων Ca^{2+} , μέσω των L-τύπου VOCs. Προσαρμογή από (Vekrellis et al., 2011).

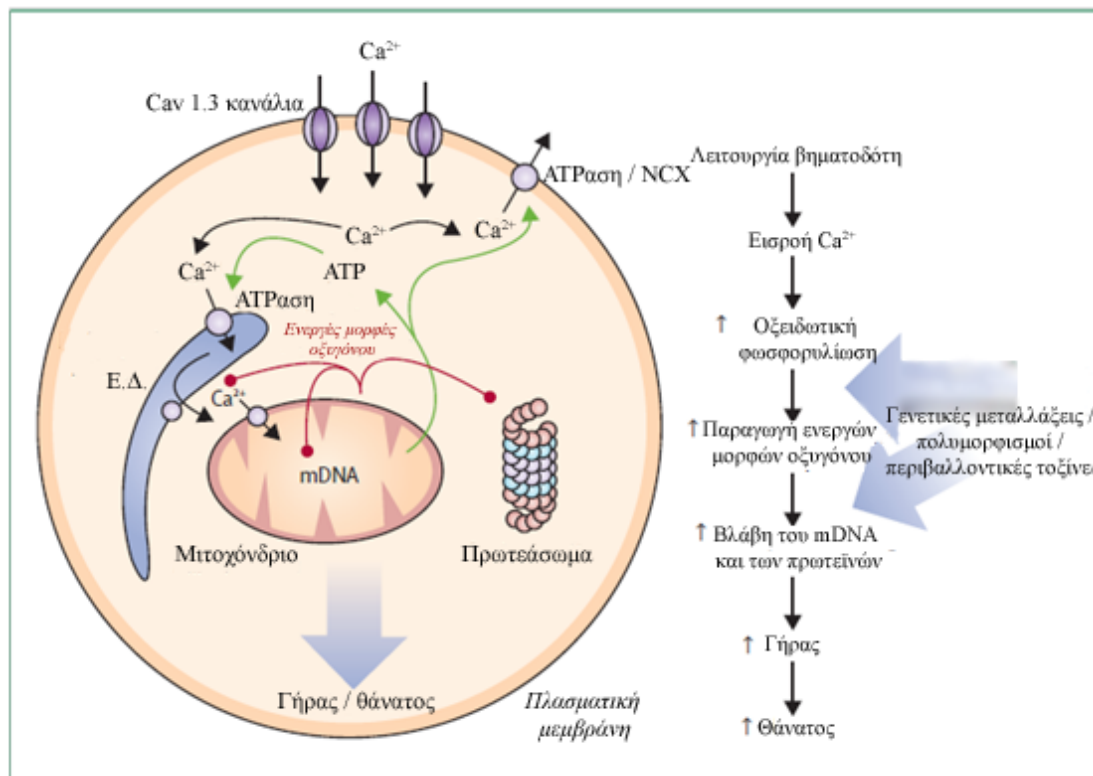
4.2.6. Ο ιδιαίτερος φαινότυπος των ντοπαμινεργικών νευρώνων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου ως αιτία της ευπάθειας που αυτοί επιδεικνύουν στη νόσο του Parkinson

Σε αντίθεση με την πλειοψηφία των νευρώνων του εγκεφάλου, οι ώριμοι νευρώνες της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου παρουσιάζουν έναν ασυνήθιστο φαινότυπο (Chan et al., 2009). Είναι αυτόνομα ενεργοί, παράγοντας δυναμικά δράσης, με προγραμματισμένο τρόπο (2–4 Hz), απουσία συναπτικής δράσης (Grace and Bunney, 1983). Η συγκεκριμένη ιδιότητα βηματοδότη θεωρείται σημαντική για τη διατήρηση των τοπικών επιπέδων ντοπαμίνης σε περιοχές οι οποίες νευρώνονται από τα συγκεκριμένα κύτταρα, όπως λ.χ. το ραβδωτό σώμα (Romo and Schultz, 1990). Παρότι η δραστηριότητα του βηματοδότη των περισσότερων νευρώνων στηρίζεται σε κανάλια μονοσθενών κατιόντων, οι εν λόγω νευρώνες επιστρατεύουν, επίσης, κανάλια που επιτρέπουν την είσοδο ιόντων Ca^{2+} στο

κυτταρόπλασμα (Bonci et al., 1998; Puopolo et al., 2007), αυξάνοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωσή τους (Chan et al., 2007). Τα L-τύπου τασεοελεγχόμενα κανάλια Ca^{2+} που χρησιμοποιούνται ως βηματοδότες από τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας, διαθέτουν μια χαρακτηριστική υπομονάδα, την Cav1.3, η οποία σχηματίζει τον πόρο του καναλιού και κωδικοποιείται από το Cacna1d γονίδιο (Chan et al., 2007; Striessnig et al., 2006). Η συγκεκριμένη υποκατηγορία L-τύπου τασεοελεγχόμενων καναλιών Ca^{2+} , διαφέρει από τις υπόλοιπες, καθώς ενεργοποιείται σε σχετικά υπερπολωμένα δυναμικά, ωθώντας τα κύτταρα να ξεπεράσουν το κατώφλι διέγερσης (Chan et al., 2007; Puopolo et al., 2007).

Η διαρκής δέσμευση των Cav1.3 VOCs στο ρόλο του βηματοδότη αποτελεί σημαντικό μεταβολικό κόστος (Surmeier et al., 2010). Στους περισσότερους νευρώνες η διάνοιξη των καναλιών Ca^{2+} είναι ένα γεγονός που συμβαίνει σπάνια, κυρίως κατά τη διάρκεια σύντομων δυναμικών δράσης (brief action potentials). Κατά συνέπεια, τα κύτταρα είναι σε θέση να διαχειριστούν εύκολα το μεταβολικό κόστος (Chan et al., 2009). Αντιθέτως, στην περίπτωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας, στους οποίους τα Cav1.3 VOCs βρίσκονται τον περισσότερο χρόνο σε ενεργοποιημένη κατάσταση, το μέγεθος και η χωρική έκταση της εισροής Ca^{2+} είναι εξαιρετικά μεγαλύτερα (Wilson and Callaway, 2000). Τα δύο κύρια οργανίδια που είναι επιφορτισμένα με τη διευθέτηση του πλεονάζοντος εισερχόμενου Ca^{2+} είναι το Ε.Δ. και τα μιτοχόνδρια, τα οποία μάλιστα είναι στενά συνδεδεμένα και με την παθογένεια της νόσου του Parkinson.

Πιο αναλυτικά, αμέσως μετά την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα των νευρώνων, το Ca^{2+} είτε προωθείται στον εξωκυττάριο χώρο, αντίθετα από την ισχυρή κλίση συγκέντρωσης, μέσω των αντλιών της πλασματικής μεμβράνης, είτε συσσωρεύεται στο Ε.Δ. και τα μιτοχόνδρια (**εικόνα 26, αριστερά**) (Chan et al., 2009). Και οι δύο διαδικασίες απαιτούν ενέργεια αποθηκευμένη υπό τη μορφή μορίων ATP. Το μεταβολικό κόστος που δημιουργείται από τα παραπάνω ATP-εξαρτώμενα μονοπάτια της ομοιόστασης του Ca^{2+} αυξάνουν τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια και την παραγωγή ROS. Οι ROS καταστρέφουν τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, όπως, π.χ. το σύμπλοκο I, καθώς και το μιτοχονδριακό DNA, μειώνοντας σημαντικά την αποτελεσματικότητα της



Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών μεταφοράς ιόντων Ca^{2+} στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου.

(Αριστερά) Ιόντα Ca^{2+} εισρέουν στο κυτταρόπλασμα των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας, μέσω των L-τύπου VOCs, ως μέρος της δραστηριότητας του βηματοδότη. Η αυξημένη μεταβολική ζήτηση εντείνει τους ρυθμούς της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και τελικά την κυτταρική φθορά που συνοδεύει το γήρας (οι βλάβες, απεικονίζονται ως κόκκινοι κύκλοι). (Δεξιά) Διαγραμματική απεικόνιση της ροής των γεγονότων. Γενετικοί πολυμορφισμοί ή μεταλλάξεις, καθώς και τοξίνες που υπάρχουν στο περιβάλλον μπορούν δράσουν καταλυτικά στο περιγραφόμενο σχήμα. Προσαρμογή από (Surmeier, 2007).

οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Σε ακραίες περιπτώσεις, το υπερβολικό στρες που υφίστανται τα μιτοχόνδρια, προκαλεί το άνοιγμα του μιτοχονδριακού πόρου διαπερατότητας και μεταφοράς, τη διόγκωση των μιτοχονδρίων και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c καθώς και άλλων προαποπτωτικών πρωτεϊνών. Παράλληλα, οι ROS καταστρέφουν και πρωτεΐνες του Ε.Δ., αυξάνοντας τρόπον τινά τη συγκέντρωση των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, οι οποίες πρέπει να αποικοδομηθούν από το πρωτεάσωμα ή τα αυτοφαγосώματα. Το γεγονός αυτό, πιθανότατα μειώνει την παραγωγή πρωτεϊνών στο Ε.Δ. και οδηγεί στην περαιτέρω απελευθέρωση προαποπτωτικών παραγόντων. Με βάση τα παραπάνω, είναι εύλογη η μείωση των κυτταροπλασματικών επιπέδων του ATP, με άμεση συνέπεια τη διατάραξη της λειτουργίας του Ε.Δ., του πρωτεασώματος και των αυτοφαγосωμάτων, προωθώντας τη συσσώματωση των πρωτεϊνών και τη δημιουργία των σωματίων

Lewy. Γενετικές μεταλλάξεις ή τοξίνες που υπάρχουν στο περιβάλλον, όπως π.χ. η ροτενόνη, (**εικόνα 26, δεξιά**), διαταράσσουν περαιτέρω τη σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων και του Ε.Δ., καθιστώντας τα πιο ευάλωτα στο επαγόμενο από το Ca^{2+} στρες (Chan et al., 2009).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

II. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Με βάση τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διαλεύκανση της επιρροής που ασκεί η εκκρινόμενη α-συνουκλείνη στην ομοιόσταση των νευρικών κυττάρων. Το παραπάνω ερώτημα αποτελεί συνισταμένη μικρότερων υποερωτημάτων, που αφορούν στη διερεύνηση του μηχανισμού έκκρισης της πρωτεΐνης, της επίδρασής της στη βιωσιμότητα των κυττάρων-δεκτών και τέλος του ακριβή μηχανισμού δράσης της.

Προκειμένου να απαντηθούν τα παραπάνω ερωτήματα, χρησιμοποιήθηκε ως σύστημα-μοντέλο μια κυτταρική σειρά, που έχει ως βάση τα SH-SY5Y κύτταρα από νευροβλάστωμα ανθρώπου. Τα κύτταρα αυτά είναι γενετικά τροποποιημένα, έτσι ώστε να υπερεκφράζουν, επαγόμενα, τη φυσικού τύπου ανθρώπινη α-συνουκλείνη. Να σημειωθεί ότι, ως εσωτερικός μάρτυρας της συγκεκριμένης προσέγγισης, χρησιμοποιήθηκε μία κυτταρική σειρά ελέγχου, τα κύτταρα της οποίας εκφράζουν με τον ίδιο επαγόμενο τρόπο την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, βακτηριακής προέλευσης, β-γαλακτοσιδάση. Στο συγκεκριμένο κυτταρικό μοντέλο, αρχικά διερευνήθηκε κατά πόσον η α-συνουκλείνη εκκρίνεται φυσιολογικά στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων και όχι εξαιτίας της υπερέκφρασής της ή ως αποτέλεσμα απελευθέρωσης ενδοκυττάρων πρωτεϊνών, λόγω κυτταρικής λύσης. Εν συνεχεία, διερευνήθηκε ο μηχανισμός έκκρισης της α-συνουκλείνης και πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε η συμμετοχή του ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού μονοπατιού απελευθέρωσης των πρωτεϊνών, με ιδιαίτερη έμφαση στα εξωσώματα. Επιπλέον, απομονώθηκαν και αναλύθηκαν οι ποικίλες εκκρινόμενες μορφές της πρωτεΐνης, μονομερείς και ολιγομερείς, ενώ προσδιορίστηκε και η ακριβής συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης στο εξωκυττάριο μέσο.

Ακολούθως, διερευνήθηκε η βιολογική σημασία των εκκρινόμενων μορφών της α-συνουκλείνης. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η επίδραση πλούσιου, σε εκκρινόμενη α-συνουκλείνη, θρεπτικού μέσου στη βιωσιμότητα διαιρούμενων, αλλά και διαφοροποιημένων κυττάρων SH-SY5Y, καθώς και πρωτογενών νευρώνων από φλοιό εγκεφάλου εμβρύων επίμουσ. Η επιλογή των κυττάρων-δεκτών έγινε με προσοχή, έτσι ώστε να επιτρέπεται η παρακολούθηση των διαφορετικών κυτταρικών αποκρίσεων, κατά τη διάρκεια της μετάβασης από τη φάση του διαιρούμενου κυττάρου, σε εκείνην του πλήρως διαφοροποιημένου νευρικού κυττάρου. Επίσης,

εξετάστηκε η πιθανότητα η εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη να επηρεάζει σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια κυτταρικής επιβίωσης, όπως αυτό της PI₃K/Akt και των MAPK/ERKs, ενώ παράλληλα αξιολογήθηκε, χωριστά, το τοξικό δυναμικό των χαμηλού και υψηλού μοριακού βάρους εκκρινόμενων μορφών της πρωτεΐνης. Ταυτόχρονα, έγινε προσπάθεια, αντιστροφής του κυτταρικού εκφυλισμού, μέσω απομάκρυνσης της α -συνουκλεΐνης από το θρεπτικό μέσο, κατόπιν ανοσοκαθίζησης με ειδικό για την πρωτεΐνη αντίσωμα.

Τέλος, μελετήθηκε ο μηχανισμός δράσης της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης, εστιάζοντας σε δύο κύριες κατευθύνσεις: στο μηχανισμό ενδοκυττάρωσης της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης και στη διαταραχή της ομοιόστασης των ιόντων Ca²⁺. Έτσι, σε πρώτη φάση διερευνήθηκε η πιθανότητα πρόσληψης της φυσιολογικά εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης, από διαιρούμενα και διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα και από πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων φλοιού από έμβρυα επίμυος. Επίσης, έγινε προσπάθεια να εντοπιστεί το υποκυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο εδράζεται η ενδοκυτταρωμένη πρωτεΐνη. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα προκειμένου να διαλευκανθεί ο ακριβής μηχανισμός πρόσληψης της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης. Σε δεύτερη φάση εξετάστηκε το ενδεχόμενο η αφετηρία του νευροτοξικού μονοπατιού της α -συνουκλεΐνης, να εντοπίζεται στην αλληλεπίδραση της εκκρινόμενης πρωτεΐνης με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων-δεκτών. Επομένως, δόθηκε βάση στα πρώιμα γεγονότα, αυτά, δηλ., που προηγούνται του κυτταρικού εκφυλισμού. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν οι επιδράσεις της παρουσίας της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης στη ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης και στην ομοιόσταση των ιόντων Ca²⁺. Πιο συγκεκριμένα, μετρήθηκε η εισροή ιόντων Ca²⁺ σε κύτταρα-δέκτες μετά από χορήγηση α -συνουκλεΐνης ενώ παράλληλα αποσαφηνίστηκε η συμμετοχή της ελεύθερης εξωκυττάριας και της, συνδεδεμένης με εξωσώματα, πρωτεΐνης, στο φαινόμενο αυτό. Ακόμα, με τη χρήση ειδικών φαρμακολογικών αναστολέων, διερευνήθηκε η συμμετοχή συγκεκριμένων μεμβρανικών καναλιών Ca²⁺ και εξετάστηκε η υποκυτταρική διαμερισματοποίηση του ενδοκυττάρου Ca²⁺. Στη συνέχεια, με τη χρήση κατάλληλων ενζυμικών μεθόδων μελετήθηκε η συμμετοχή των καλπαϊνών, μίας κατηγορίας Ca²⁺-εξαρτώμενων πρωτεασών κυστεΐνης, στο νευροτοξικό μονοπάτι που πυροδοτείται από την εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη. Τέλος, προκειμένου να συσχετισθεί, περαιτέρω, η τοξική δράση της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης με την απορρύθμιση του ομοιοστατικού μηχανισμού των ιόντων Ca²⁺ και την ενεργοποίηση των καλπαϊνών,

έγινε προσπάθειά αντιστροφής του κυτταρικού θανάτου, που προκαλείται παρουσία της εξωκυττάριας πρωτεΐνης, μέσω τροποποίησης της ενδοκυττάριας ή της εξωκυττάριας συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} , καθώς και αναστολής των καλπαϊνών, με τη χρήση κατάλληλων χηλικών παραγόντων και φαρμακολογικών αναστολέων.

Η καινοτομία της παρούσας μελέτης έγκειται στη διαθεσιμότητα ενός αυστηρά ρυθμιζόμενου συστήματος-μοντέλου έκκρισης της α-συνουκλεΐνης, το οποίο προσφέρει τη δυνατότητα διερεύνησης του ρόλου των φυσιολογικά εκκρινόμενων μορφών της α-συνουκλεΐνης στην ομοίωση των νευρικών κυττάρων. Συνοψίζοντας, ο απώτερος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η απόκτηση γνώσης, η οποία θα μπορούσε να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας της νόσου του Parkinson, και πιθανότατα να φωτίσει νέες οδούς για την ανάπτυξη διαγνωστικών ή και θεραπευτικών προσεγγίσεων.

ΥΛΙΚΑ

III. ΥΛΙΚΑ

1. Πειραματικό Πρότυπο

Η διερεύνηση των μηχανισμών δράσης της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης απαιτεί τη χρήση ενός πειραματικού μοντέλου, το οποίο να προσομοιάζει με τον καλύτερο δυνατό τρόπο τα διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές SH-SY5Y κυττάρων νευροβλαστώματος ανθρώπου, με μεγάλη ικανότητα αναδιπλασιασμού σε ευνοϊκές συνθήκες καλλιέργειας. Οι συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές με τη χρήση του ρετινοϊκού οξέος, ισχυρού μορφογόνου, είναι δυνατόν να διαφοροποιηθούν, αποκτώντας νευρωνικό φαινότυπο. Με αυτό το δεδομένο, στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα, ένα σύστημα που προσομοιάζει περισσότερο τα νευρικά κύτταρα. Οι καλύτερες απαντήσεις, ωστόσο, εξάγονται με μελέτη των αποκρίσεων σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρικών κυττάρων. Σύμφωνα με αυτήν τη συνθήκη, χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων φλοιού, από έμβρυα επίμυος, για περαιτέρω επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Τα πειραματόζωα ήταν της φυλής Wistar (βάρους 200-250 gr) από το Τμήμα Πειραματόζωων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (I.I.B.E.A.A.). Τα ζώα στεγάζονταν σε θαλάμους με θερμοκρασία δωματίου 22 ± 1 °C, σχετική υγρασία $55 \pm 10\%$ και δωδεκάωρη διάρκεια φωτοπεριόδου, μεταξύ 07:00 και 19:00. Τα ζώα βρίσκονταν μέσα σε κλωβούς, οι οποίοι καθαρίζονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.

2. Κυτταρικά Συστήματα

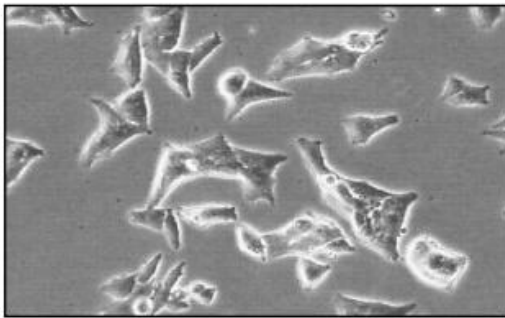
Για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά, των SH-SY5Y κυττάρων νευροβλαστώματος ανθρώπου, η οποία παρουσιάζει χαρακτηριστικά «προγραμματισμένων» νευρικών προδρόμων (πολυδύναμα εμβρυϊκά κύτταρα). Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y, μετά από κατάλληλη διαδικασία που αφορά στη διαφοροποίησή της, είναι δυνατόν να δώσει πλήρως λειτουργικούς μετα-μιτωτικούς νευρώνες. Τέλος, οι πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων φλοιού από έμβρυα επίμυος αποτέλεσαν ένα πολύτιμο εργαλείο, καθώς

πρόκειται για ένα σύστημα που προσομοιάζει καλύτερα την *in vivo* κατάσταση. Πιο αναλυτικά:

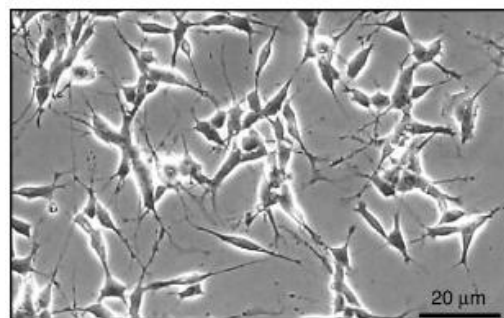
2.1 SH-SY5Y Κύτταρα Νευροβλαστώματος Ανθρώπου

Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y (American Type Culture Collection, Rockville, MD) είναι μια καρκινική σειρά ανθρώπινων νευροβλαστωμάτων που χρησιμοποιείται ευρέως ως νευρωνικό μοντέλο. Προέρχεται από την αρχική σειρά SK-N-SH, μεταστατικού καρκίνου του μυελού των οστών (Biedler et al., 1973) και διαθέτει ντοπαμινεργικό, ακετυλοχολινεργικό, γλουταμινεργικό και αδενোসινεργικό χαρακτήρα. Επίσης, εκφράζει την ενδογενή α-συνουκλεΐνη σε ανιχνεύσιμα επίπεδα. Τα κύτταρα SH-SY5Y πολλαπλασιάζονται μιτωτικά, ταχύτατα σε καλλιέργεια (εικόνα 27, αριστερά), ενώ μπορούν να διαφοροποιηθούν κατόπιν προσθήκης ρετινοϊκού οξέος (Retinoic Acid-RA). Στην περίπτωση αυτή, παύουν να διαιρούνται και εκτείνουν άξονες (εικόνα 27, δεξιά). Ταυτόχρονα, αυξάνεται η έκφραση της υδροξυλάσης της τυροσίνης με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της ντοπαμίνης (Jalava et al., 1990).

Διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα



Διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα (10 μM ρετινοϊκού οξέος)



Εικόνα 27: SH-SY5Y κύτταρα από νευροβλάστωμα ανθρώπου.

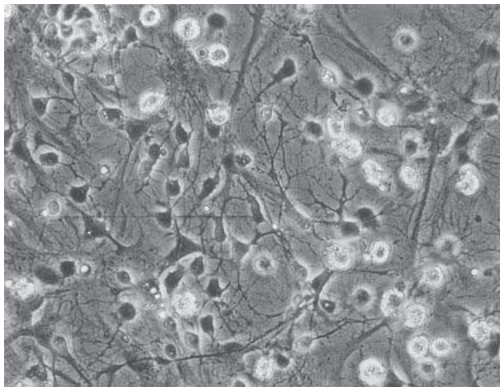
(Αριστερά) Διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα. (Δεξιά) SH-SY5Y κύτταρα, καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό παρουσία 10μM ρετινοϊκού οξέος. Τα κύτταρα μετά από 6 ημέρες, έχουν αποκτήσει νευρωνικό φαινότυπο. Κλίμακα: 20 μm.

Για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής, χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος 2.22, ο οποίος κατασκευάστηκε από τους Δρς. Κ. Βεκρέλλη και Λ. Στεφανή, με βάση την αρχική κυτταρική σειρά SH-SY5Y (προσφορά του Δρ. Darryl Yamashiro, Dept. of Pediatrics, Columbia University, USA) και ο οποίος είναι μόνιμα διαμολυσμένος με το ρυθμιστικό πλασμίδιο που εκφράζει τον υβριδικό μεταγραφικό παράγοντα tTa.

Σημαντικό πλεονέκτημα των κυττάρων είναι το γεγονός ότι το σύστημα Tet-Off μπορεί να λειτουργήσει και κατόπιν της διαφοροποίησης των κυττάρων (Pahman S. Et al., 1984).

2.2 Πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων από έμβρυα επίμυος

Καλλιέργειες νευρώνων εγκεφαλικού φλοιού προήλθαν από το φλοιό εμβρύων επίμυος 18 ημερών. Μετά την απομόνωση των κυττάρων του εγκεφαλικού φλοιού, ακολούθησε επώαση με 0,05% τρυψίνη (Sigma) και 100μg/ml DNase (Sigma) σε θρεπτικό μέσο Neurobasal (Invitrogen) για 15 λεπτά στους 37°C, χωρίς να προστεθεί ακόμη ο ιστός. Κατόπιν ακολούθησε η προσθήκη του ιστού και άλλα 15 λεπτά επώασης στους 37°C (ενζυματικός διαχωρισμός). Η αδρανοποίηση της τρυψίνης επιτεύχθηκε με προσθήκη πλήρους θρεπτικού καλλιεργητικού μέσου Neurobasal (Neurobasal, 0.5mM L-γλουταμίνη, 100μg/ml στρεπτομυκίνη, 100μg/ml πενικιλίνη, 2% (v/v) παράγοντας B27). Ο παράγοντας B27 είναι απαραίτητος για την καλύτερη επιβίωση των νευρικών κυττάρων για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια, ο ιστός διαχωρίστηκε μηχανικά με πιπετάρισμα, ενώ κατόπιν φυγοκέντρησης στα 2000g, για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, τα κύτταρα που είχαν καθιζάνει επαναδιαλύθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτα καλυμμένα με πολυλυσίνη (εικόνα 28).



Εικόνα 28: Φωτογραφία από οπτικό μικροσκόπιο πρωτογενών νευρώνων από φλοιό εγκεφάλου εμβρύων επίμυος σε καλλιέργεια.

3. Χημικά Αντιδραστήρια

3.1 Κυτταρικές Καλλιέργειες

Για την καλλιέργεια των κυττάρων SH-SY5Y και των πρωτογενών νευρώνων φλοιού εγκεφάλου από έμβρυα επίμυος χρησιμοποιήθηκαν:

- Θρεπτικό υλικό: RPMI 1640-Roswell Park Memorial Institute (#31870025, Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

- Θρεπτικό υλικό: Neurobasal (#21103-049, Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
- Θρεπτικό υλικό με μειωμένο ορό για τις κυτταρικές διαμολύνσεις: OPTIMEM (#31985, Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).
- Ορός εμβρύου μόσχου: Fetal Bovine Serum-FBS (#S1500, Biowest, Nuaille, France).
- Μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνη: Penicillin-Streptomycin (#P4458, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Συμπληρωματικό αμινοξύ: L-γλουταμίνη-L-glutamine (#21051024, Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).
- all-trans-Ρετινοϊκό Οξύ: all-trans-Retinoic acid-RA: (#R2625, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- DMSO: Dimethyl Sulfoxide (#100950636, Sigma)
- DNase: (DNase, #D 4527-20, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Τρυψίνη: (trypsin, #T4674, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 25% TRYPSIN-EDTA (#25200-072, Gibco Life Technologies, Invitrogen)
- Παράγοντας B27: (#17504-044, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
- Πολυ-λυσίνη: (Poly-D-Lysine, #P1024-500MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Trypan blue solution (#T8154, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Η διαμόλυνση των κυττάρων (παροδική ή μόνιμη) έγινε με Lipofectamine™ 2000 (#11668019, Invitrogen Ltd, Carlsbad, USA). Για τη διατήρηση των μόνιμα διαμολυσμένων σειρών χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά:

- Υγρομυκίνη Β: **Hygromycin B** (#10843555001, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)
- Νεομυκίνη: **G 418** disulfate salt (#A1720, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Δοξυκυκλίνη: **Doxycycline** (#631311, Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA, USA)

Όλα τα πλαστικά αγοράστηκαν από την εταιρία Greiner, Bio One GmbH (Germany).

3.2 Πειράματα σήμανσης των εκκρινόμενων πρωτεϊνών με ραδιενεργό θείο (³⁵S)

Για τα πειράματα ραδιοσήμανσης των εκκρινόμενων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένο θρεπτικό υλικό RPMI, χωρίς κυστεΐνη και μεθειονίνη (#R7513, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) και ισομοριακό μείγμα [³⁵S] κυστεΐνης/μεθειονίνης (EXPRE³⁵S³⁵S Protein Labeling Mix, [35S], #NEG07200, PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA). Το διάλυμα ενίσχυσης του ραδιενεργού σήματος ήταν της Amersham: Amplify™ Fluorographic Reagent (#NAMP100V, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden).

3.3 Μέτρηση της τοξικότητας

Για την μέτρηση της τοξικότητας χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω χρωστικές:

- Hoechst 33342: (bisBenzimide H 33342 trihydrochloride, # B2261, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Calcein-AM: (#C3099, 1mg/ml solution in dry DMSO, Molecular Probes, Invitrogen Ltd, Carlsbad, USA)
- Ethidium Homodimer: (#L3224: LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells*, Invitrogen Ltd, Carlsbad, USA)

3.4 Μέτρηση της κυτταρικής επιβίωσης

Για τη μέτρηση της κυτταρικής επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο διάλυμα που επιτρέπει τη συλλογή πυρήνων. Για την παρασκευή του χρειάστηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- Ethylhexadecylmethylammonium bromide, EHDA (C5335-25G Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Glacial acetic acid (#537020, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Sodium Chloride (NaCl, # S7653, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Phosphate-Buffered Saline (PBS, # 10010-015, Invitrogen Ltd, Carlsbad, USA)
- Triton-X (#X100, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Magnesium Chloride ($MgCl_2$, #M8266, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Επίσης, στα πειράματα κυτταρικής επιβίωσης χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω φαρμακολογικοί παράγοντες:

- Αναστολέας καλπαϊνών: Calpain inhibitor: (#A6185, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Bapta – AM (#A1076, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- EGTA (#E38889, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Νιφεδιπίνη: Nifedipine (#N7634, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ω-κονοτοξίνη GVIA: ω-conotoxin GVIA (#1085, Toris Bioscience, USA)

3.5 Επεξεργασία Πρωτεϊνών

Για την εκχύλιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το μείγμα αναστολέων πρωτεασών σε σκεύασμα: Complete, Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets (#11836153001, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN). Στις περιπτώσεις πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων που κρίθηκε απαραίτητο, χρησιμοποιήθηκε το μείγμα αναστολέων φωσφατασών: Phosphostop (#04906837001, Roche). Το μείγμα δεικτών γνωστού μοριακού βάρους για τις πρωτεΐνες: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#SM0671) και διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων (*sample buffer*): DualColor™ Protein Loading Buffer Pack (#R1011) ήταν της εταιρείας Fermentas (Vilnius, Lithuania). Το αντιδραστήριο Bradford (Bio-Rad Protein Assay, #500-0006) για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, το μείγμα ακρυλαμιδίου/bis-ακρυλαμιδίου: 30% Acrylamide/Bis Solution (#161-0157) καθώς και οι συσκευές ηλεκτροφόρησης και μεταφοράς αγοράστηκαν από την εταιρεία Bio-Rad (Munich, Germany). Τα προκατασκευασμένα πηκτώματα ακρυλαμιδίου κλίσης 4-12%: NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm (# P0323) και το ρυθμιστικό διάλυμα MES: NuPAGE® MES SDS Running Buffer (for Bis-Tris Gels only) (20X) (#NP0002) αγοράστηκαν από την εταιρεία Invitrogen Ltd (Carlsbad, USA). Η νιτροκυτταρίνη [Protran BA Nitrocellulose (0.45 μ M)] που χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφορά των πρωτεϊνών αγοράστηκε από την Schleicher & Schuell (Keene NH, USA).

3.6 Ανοσοδοκιμασία κατά Western

Η ομάδα αντιδραστηρίων ECL (Western Lightning, # NEL100001EA) που χρησιμοποιήθηκε για την ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, αγοράστηκε από την εταιρεία Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) και το X RAY φιλμ (Super RX Film) από την εταιρεία Fuji Medical (Tokyo, Japan). Τέλος, η ακρυλαμίδα που χρησιμοποιήθηκε αγοράστηκε από BIORAD (# 161-0158, Bio-Rad Laboratories, United Kingdom).

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνονται στον παρακάτω κατάλογο:

- **α -synuclein (syn-1)**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυς έναντι της α -συνουκλεΐνης επίμυος και αναγνωρίζει την ευρεία περιοχή της πρωτεΐνης μεταξύ των αμινοξέων 15 και 123 (#610786, BD Biosciences, San Jose, California, USA).
- **α -synuclein (C-20)-R**: πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι, έναντι συνθετικού πεπτιδίου και αναγνωρίζει στο καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης α -συνουκλεΐνης (#sc-7011-R, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA).
- **α -synuclein (LB509)**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυς και αναγνωρίζει την ανθρώπινη α -συνουκλεΐνη (#SIG-39725, Conance, Princeton, New Jersey, USA).
- **α -synuclein (211)**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυς, έναντι της ανθρώπινης α -συνουκλεΐνης και αναγνωρίζει την περιοχή της πρωτεΐνης μεταξύ των αμινοξέων 121 και 125 (#sc-12767, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA).
- **ERK 2 (C-14)**: πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι, έναντι συνθετικού πεπτιδίου και αναγνωρίζει το καρβοξυτελικό άκρο της ERK2 επίμυος (#sc-154, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA).
- **β -Actin (ACTBD11B7)**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυς, έναντι της ανθρώπινης β -ακτίνης και αναγνωρίζει μια περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (#sc-81178, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA).
- **GFP (B-2)**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυς, έναντι της περιοχής που περιλαμβάνει την αλληλουχία των αμινοξέων μεταξύ 1 και 238

της πλήρους μήκους GFP (#sc-9996, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA).

- **Anti-flag (M2)**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυς, έναντι της αμινοξικής αλληλουχίας του FLAG (#F3165, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- **Akt**: πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι, έναντι συνθετικού πεπτιδίου και αναγνωρίζει το καρβοξυτελικό άκρο της Akt. (#9272, Cell Signaling Technology, Inc.).
- **CREB (86B10)**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυ, έναντι πλήρους μήκους πρωτεΐνης CREB, σε σύντηξη με την πρωτεΐνη GST. (#9104, Cell Signaling Technology, Inc.).
- **Anti-GSK3 α/β , clone 4G-1E**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυ, έναντι συνθετικού πεπτιδίου το οποίο αντιστοιχεί στα αμινοξέα 203-219, που εντοπίζονται στην περιοχή του καταλυτικού κέντρου της GSK-3 της μύγας *Drosophila*. (#05-412SP, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).
- **RSK1/RSK2/RSK3 (32D7)**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι, έναντι συνθετικού πεπτιδίου, το οποίο αντιστοιχεί στα κατάλοιπα που περιβάλλουν την Asp659 της ανθρώπινης p90RSK. (#9355, Cell Signaling Technology, Inc.).
- **Phospho-Akt (Ser473)**: πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι έναντι, συνθετικού φωσφο-πεπτιδίου, το οποίο αντιστοιχεί στα κατάλοιπα που περιβάλλουν τη Ser473 της Akt προέλευσης μύος. (#9271, Cell Signaling Technology, Inc.).
- **Phospho-CREB (Ser133)**: πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι, έναντι συνθετικού φωσφο-πεπτιδίου, το οποίο αντιστοιχεί στα κατάλοιπα που περιβάλλουν τη Ser133 της CREB ανθρώπινης προέλευσης. (#9191, Cell Signaling Technology, Inc.).
- **p-ERK (E-4)**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυ, έναντι συνθετικού πεπτιδίου και αναγνωρίζει την αλληλουχία που περιέχει τη φωσφορυλιωμένη Tyr204 της ERK ανθρώπινης προέλευσης. (#sc-7383, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA).
- **Phospho-GSK-3 α/β (Ser21/9)**: πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι έναντι συνθετικού φωσφο-πεπτιδίου, το οποίο αντιστοιχεί σε

αλληλουχία της GSK-3α ανθρώπινης προέλευσης. (#9331, Cell Signaling Technology, Inc.).

- **Phospho-p90RSK (Ser380)**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι, έναντι συνθετικού φωσφο-πεπτιδίου, το οποίο αντιστοιχεί στα κατάλοιπα που περιβάλλουν τη Ser380 της p90RSK ανθρώπινης προέλευσης. (#9335, Cell Signaling Technology, Inc.).
- **BSA (Anti Serum albumin, bovin, BSA)**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυσ, έναντι της αλβουμίνης που προέρχεται από ορό μόσχου (#HYB 267-01, ANTIBODY SHOP, BioPorto, Gentofte Denmark).
- **anti-UBIQUITIN**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυσ, έναντι συνθετικού πεπτιδίου και αναγνωρίζει μια ευρεία ζώνη πολύ-ουβικοϋτιλωμένων πρωτεϊνών επίμυος και ανθρώπου (#Z0458, DAKO A/S, Glostrup, Denmark).
- **anti-Flotillin-1(C-7)**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυσ, έναντι πεπτιδίων που αντιστοιχούν στην περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 324 έως 427 της ανθρώπινης πρωτεΐνης Flotillin-1 (#sc-133153, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA).
- **anti-Alix (3A9)**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυ, έναντι της πλήρους μήκους ανασυνδυασμένης ανθρώπινης πρωτεΐνης Alix (#2171, Cell Signaling Technology, Inc.).
- **anti-Laminin**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυ, έναντι της ανθρώπινης πρωτεΐνης laminin (#33-5300, Invitrogen Ltd, Carlsbad, USA).
- **anti-Complex II**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυσ, έναντι του συμπλόκου II από καρδιά βοός (#459200, Invitrogen Ltd, Carlsbad, USA).
- **anti-Calnexin**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλια, έναντι συνθετικού πεπτιδίου που περιλαμβάνει την αλληλουχία μεταξύ των αμινοξέων 550 έως το καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης Calnexin (#ab22595, Abcam, Cambridge, UK).
- **anti-Golgin-97**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μυσ, έναντι της ανθρώπινης πρωτεΐνης golgin-97 (#A-21270, Molecular Probes, Invitrogen Ltd, Carlsbad, USA).
- **anti-Lamp-1 (CD107a)**: πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλια, έναντι συνθετικού πεπτιδίου που αντιστοιχεί σε ευρεία περιοχή της

ανθρώπινης πρωτεΐνης LAMP-1 (#AB2971, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

- **anti-caspase-3:** πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλια, έναντι συνθετικού πεπτιδίου που αντιστοιχεί στην αμινοτελική αλληλουχία της ανθρώπινης κασπάσης-3 (#9661, Cell Signaling Technology, Inc.).
- **Anti-rabbit IgG-HRP conjugated:** αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση, που παρασκευάζεται σε αίγα και αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G του κουνελιού (Fc περιοχή) (#111-035-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA).
- **Anti-mouse IgG-HRP conjugated:** αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση, που παρασκευάζεται σε αίγα και αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G του κουνελιού (Fc περιοχή) (#PAB0096, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA).

3.7 Μετρήσεις Ca^{2+} με φθορισμομετρία

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις του ελεύθερου κυτταροπλασματικού Ca^{2+} είναι τα ακόλουθα:

- **Χρωστική Fura-2 AM** (#344905, Calbiochem)
- **Καρβαχόλη - Carbachol – Cch** (#sc 202092, Santa Cruz): Η καρβαχόλη είναι ένας αγωνιστής των μουςκαρινικών, χοληνεργικών υποδοχέων (PubMed: 18440028). Η χορήγησή της οδηγεί στην παραγωγή τριφωσφορικής ινισιτόλης (IP_3), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τους υποδοχείς της IP_3 στο Ε.Δ. (IP_3R), με άμεσο επακόλουθο την εκροή του Ca^{2+} από το Ε.Δ. στο κυτταρόπλασμα (White and McGeown, 2002).
- **Θαψιγκαργκίνη - Thapsigargin - Tg** (#T9033, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): Η θαψιγκαργκίνη (Tg) είναι μεταβολικό προϊόν του φυτού *Thapsa garganica* με τοξική δράση. Συνιστά έναν ειδικό αναστολέα της ασβεστοεξαρτώμενης ΑΤΡάσης του (σαρκο)ενδοπλασματικού δικτύου (SERCA), στην οποία προσδέεται μη αντιστρεπτά. Η πρόσδεση αυτή οδηγεί σε απελευθέρωση ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) και συσσώρευση Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα και σε πολλές περιπτώσεις σε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Nguyen et al., 2002). Η δράση της θαψιγκαργκίνης σε νευρικά κύτταρα, προσομοιάζει οξείες και χρόνιες παθολογικές καταστάσεις του εγκεφάλου που

οφείλονται σε δυσλειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις η επώαση με θαψιγκαργκίνη οδηγεί σε αναστολή της έκφυσης δενδριτών και αξόνων (Mengesdorf et al., 2001; Simpson et al., 1995). Τέλος, έχειδειχθεί ότι η Tg μπορεί να επηρεάζει την ασβεστοεπαγόμενη απελευθέρωση ασβεστίου από το ΕΔ, η οποία είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία των ανασταλτικών μικροσκοπικών μετα-συναπτικών δυναμικών, IPSPs, τη βραχύχρονη πλαστικότητα και την αυθόρμητη απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή σε νευρώνες ιπποκάμπου (Verkhatsky, 2002).

- **Ιονομυκίνη - Ionomycin – Iono** (#I0634, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): Η ιονομυκίνη (Iono) είναι ένα ιονοφόρο ασβεστίου, το οποίο αυξάνει την κυτταροπλασματική συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} απελευθερώνοντας το ασβέστιο από τις ενδοκυττάρια αποθήκες (Zhu and Wang, 1999) και αυξάνοντας την εισροή του από το εξωκυττάριο περιβάλλον (Dowd, 1995).
- **Μονενσίνη - Monensin – Mon** (#M5273, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): Η μονενσίνη (Mon) είναι ένα ιονοφόρο νατρίου που συμμετέχει στην ανταλλαγή ιόντων Na^+ και H^+ (αντιμεταφορέας Na^+/H^+). Η έξοδος ιόντων H^+ οδηγεί σε αύξηση του ενδοκυττάρια pH και απώλεια του μιτοχondριακού διαμεμβρανικού δυναμικού ($\Delta\Psi_m$), ενώ το κύτταρο οδηγείται τελικά σε απόπτωση (Park et al., 2002b). Η μονενσίνη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του αποθηκευμένου ασβεστίου σε υποκυτταρικά σωματίδια με όξινο pH. Η επαγόμενη από τη μονενσίνη αυξημένη είσοδος νατρίου, μπορεί να οδηγήσει σε αναστροφή της λειτουργίας του ανταλλάκτη Na^+/Ca^{2+} , με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται αυξημένη είσοδος ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα. Η είσοδος ασβεστίου μέσω αυτού του ανταλλάκτη φαίνεται πως σχετίζεται με καταστάσεις βλάβης στους νευρώνες (Arundine and Tymianski, 2003; LoPachin and Lehning, 1997).
- **Νιφεδιπίνη – Nifedipine** (#N7634, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): Η νιφεδιπίνη είναι μια διϋδροπυριδίνη και ανήκει στην κατηγορία των ανταγωνιστών Ca^{2+} , καθώς παρεμποδίζει την είσοδο ιόντων Ca^{2+} από τα L-τύπου τασεοελεγχόμενα κανάλια των κυττάρων (Pinterova et al., 2010).
- **ω-κονοτοξίνη - ω-conotoxin** (#1085, Toris Bioscience, USA): Η ω-κονοτοξίνη είναι ειδικός αναστολέας των N-τύπου τασεοελεγχόμενων καναλιών Ca^{2+} των κυτταρικών μεμβρανών των νευρώνων, αλλά όχι των μυϊκών κυττάρων (Herrero

et al., 1999; Rivier et al., 1987). Το πρόκειται για μια τοξίνη το πεπτίδιο της οποίας απομονώθηκε από το σαλιγκάρι *Conus geographus L.*

- **SKF 96365 hydrochloride** (#1085, Toris Bioscience, USA): Ο SKF 96365, 51-(beta-[3-(p-methoxyphenyl)-propyloxy]-p-methoxyphenethyl)-1H-imidazole hydrochloride, είναι αναστολέας των καναλιών Ca^{2+} , τα οποία εδράζονται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και ενεργοποιούνται κατόπιν εκκένωσης των ενδοκυττάρων αποθηκών Ca^{2+} , (Storage-Operated Ca^{2+} Channels, SOCs) (Ye et al., 2011). Η διάνοιξη των καναλιών έχει ως αποτέλεσμα την εισροή Ca^{2+} από τον εξωκυττάριο χώρο στο κυτταρόπλασμα.
- **Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxy-phenylhydrazone, FCCP** (#0453, Toris Bioscience, USA): Ο FCCP είναι μιτοχονδριακός αποσυζεύκτης (mitochondrial uncoupler) (Hettiarachchi et al., 2009).
- **Oligomycin, (Oligo)** (#75351, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): Η ολιγομυκίνη αναστέλλει την κατανάλωση του ATP, μέσω της αντεστραμμένης λειτουργίας της συνθάσης του F1/F0 (Hettiarachchi et al., 2009).
- **Ορός εμβρύου μόσχου - Fetal Bovine Serum-FBS** (#S1500, Biowest, Nuaille, France)

3.8 ELISA για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της α-συνουκλεΐνης

Για την ELISA τύπου Sandwich χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- **Αντίσωμα πρόσδεσης → α-synuclein (syn-1)**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε επίμυς έναντι της α-συνουκλεΐνης επίμυος και αναγνωρίζει την ευρεία πειοχή της πρωτεΐνης μεταξύ των αμινοξέων 15 και 123 (#610786, BD Biosciences, San Jose, California, USA).
- **Αντίσωμα ανίχνευσης → α-synuclein (C-20)-R** (πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι έναντι συνθετικού πεπτιδίου και αναγνωρίζει στο καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης, #sc-7011-R, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), ομοιοπολικά συζευγμένο με την πρωτεΐνη υπεροξειδάση της αγριοραφανίδας (horseradish peroxidase, HRP, #31490, Thermo Scientific, CA, US).
- **Πλακίδια μικροτιτλοδότησης**: (Corning 96 well Stripwell plates, 1 x 8, #CLS3923, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- **Sodium bicarbonate:** (NaHCO_3 , #S5761, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- **Bovine Serum Albumin:** (BSA, #K41-012, PAA Laboratories GmbH, Piscataway, NJ, USA)
- **Χημειοφωταυγές υπόστρωμα λουμινόλης (ultrasensitive luminol reagent):** BioFX Laboratories

ΜΕΘΟΔΟΙ

IV. ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Κυτταροκαλλιέργειες

1.1. Διατήρηση στείρων συνθηκών

Για τη διατήρηση κυτταρικών σειρών σε καλλιέργεια απαιτούνται στείρες συνθήκες (Freshney, 1993). Αυτό επιτυγχάνεται με την αποστείρωση των υλικών αλλά και του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών, η οποία πραγματοποιείται με: α) υγρή θερμότητα-αυτόκαυστο (για διαλύματα αλάτων, ανθεκτικά πλαστικά αναλώσιμα, γυάλινα αναλώσιμα και νερό), β) φιλτράρισμα με τη χρήση φίλτρου με πόρους 0.2 μM (για τα υπόλοιπα διαλύματα) και γ) αποστείρωση με υπεριώδη ακτινοβολία-UV (για πλαστικά αναλώσιμα και χώρους). Η υγρή αποστείρωση με τη χρήση του αυτόκαυστου, πραγματοποιείται στους 121°C για 20 λεπτά υπό πίεση 1.1 kp/cm^2 . Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η νέκρωση των περισσότερων μικροοργανισμών και των σπορίων τους, κυρίως λόγω αποδιάταξης των πρωτεϊνών τους. Για την αποστείρωση διαλυμάτων που είναι ευαίσθητα στην υψηλή θερμότητα, γίνεται φιλτράρισμα μέσα από πόρους 0.2 μM (συχνά με τη βοήθεια αντλίας κενού), κάτι που αποτρέπει τη διέλευση βακτηρίων και των περισσότερων σπορίων τους. Με τη χρήση της υπεριώδους ακτινοβολίας, επιτυγχάνεται νέκρωση των κυττάρων λόγω καταστροφής του DNA τους, αφού παρουσία της υπεριώδους ακτινοβολίας, δημιουργούνται δεσμοί μεταξύ γειτονικών μορίων πυριμιδινών (συχνότερα μεταξύ δυο μορίων θυμίνης) στις αλυσίδες του DNA, που εμποδίζουν το σωστό διπλασιασμό του DNA κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Το δραστικότερο μήκος κύματος είναι τα 260 nm, δηλαδή το μήκος κύματος που απορροφά μέγιστα το DNA. Με αυτόν τον τρόπο αποστειρώνονται αντικείμενα και επιφάνειες που μπορούν να εκτεθούν άμεσα στο υπεριώδες φως, δηλαδή όταν δεν καλύπτονται από στερεά υλικά (όπως γυαλί ή πλαστικό).

Τα περισσότερα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στις κυτταροκαλλιέργειες (όπως τα θρεπτικά υλικά) αγοράζονται αποστειρωμένα, και αυτά που ενώ αγοράζονται αποστειρωμένα, χωρίζονται σε κλάσματα-ίσα μέρη (όπως η θρυψίνη, τα αντιβιοτικά, η γλουταμίνη, τα μη απαραίτητα αμινοξέα) και φιλτράρονται πριν τη χρήση προς αποφυγήν μόλυνσεων. Τα διαλύματα που παρασκευάζονται στο εργαστήριο και είναι ανθεκτικά στην υψηλή θερμότητα (όπως το ρυθμιστικό διάλυμα PBS) αποστειρώνονται με τη χρήση αυτόκαυστου. Ο ορός που χρησιμοποιείται (FBS,

FCS) θερμαίνεται στους 56°C για 30 λεπτά, προκειμένου να γίνει απενεργοποίηση του συμπληρώματος, και στη συνέχεια μοιράζεται σε κλάσματα-ίσα μέρη και φιλτράρεται κάθε φορά πριν τη χρήση. Όλες οι διαδικασίες εκτελούνται σε θάλαμο νηματικής ροής (hood), που εξασφαλίζει περιβάλλον απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς, αφού αποστειρώνει τον αέρα με τη μέθοδο της διήθησης, διαθέτοντας φίλτρα υψηλής απόδοσης. Πριν την έναρξη της χρήσης του θαλάμου κάθε πρωί, ο χώρος του θαλάμου καθώς και όλη η αίθουσα των κυτταροκαλλιεργειών, εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία για 15 λεπτά. Για τοπική αποστείρωση περιορισμένου χώρου χρησιμοποιείται διάλυμα αιθανόλης 70%.

1.2. Διατήρηση και ανακαλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y διατηρείται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και σχετική υγρασία 95%. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για τα SH-SY5Y κύτταρα είναι το RPMI 1640 (Gibco). Για την παρασκευή 500 ml πλήρους θρεπτικού διαλύματος RPMI 1640 προστίθεται επίσης ορός εμβρύου βοός 10% (v/v) (Biowest), μίγμα αντιβιοτικών 100 U/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη και L-γλουταμίνη (2 mM) (Biedler et al., 1973). Οι μόνιμα διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές διατηρούνται με την προσθήκη αντιβιοτικού G418 (Clontech) σε συγκέντρωση 200µg/ml, για την διατήρηση του πλασμιδίου Tet-Off και του αντιβιοτικού Hygromycin B (Roche Diagnostics) σε συγκέντρωση 50µg/ml για τα κύτταρα SH-SY5Y, για την διατήρηση του πλασμιδίου απόκρισης.

Τα SH-SY5Y κύτταρα καλλιεργούνται σε πλαστικά τρυβλία καλλιέργειας διαμέτρου 10, 1, 0,5 και 0,2 cm (Greiner, Bio One), ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος, με ανανέωση του θρεπτικού υλικού τρεις φορές την εβδομάδα. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων, γίνεται μηχανικά ή μετά από έκπλυση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄, pH 7.4) και προσθήκη διαλύματος θρυψίνης-EDTA [0.05%-0.02% (w/v), σε PBS]. Συνοπτικά, μετά από επώαση των κυττάρων για περίπου ένα λεπτό στους 37°C με το παραπάνω διάλυμα, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί αποκόλληση των κυττάρων από το στερεό τους υπόστρωμα, η ενζυμική αντίδραση της θρυψίνης τερματίζεται με την προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα σε εναιώρημα, διαμοιράζονται σε νέα τρυβλία καλλιέργειας.

Η καλλιέργεια πρωτογενών φλοιϊκών νευρώνων από έμβρυα επίμυος αναπτύχθηκε λεπτομερώς στο κεφάλαιο «Υλικά» (βλ. **Υλικά, ενότητα 2.2.**). Πρέπει ωστόσο να προσθέσουμε ότι διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και σχετική υγρασία 95%. Σε αντίθεση με τις παραπάνω καρκινικές σειρές, το καλλιεργητικό μέσο δεν ανανεώνεται εξολοκλήρου, καθότι οι νευρώνες εκκρίνουν νευροτροφικούς παράγοντες, απαραίτητους για την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους. Απλά, κάθε δύο-τρεις ημέρες, αναπληρώνεται ο χαμένος λόγω εξάτμισης όγκος, με την προσθήκη φρέσκου θρεπτικού.

1.3. Κατάψυξη και ανάκτηση των κύτταρων

Τα SH-SY5Y κύτταρα που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη, είναι καρκινικά κύτταρα, οπότε θεωρητικά μπορούν να πολλαπλασιάζονται έπ' αόριστον σε καλλιέργεια, ωστόσο για τη διαφοροποίηση είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται κύτταρα που να έχουν διαιρεθεί λίγες φορές στην καλλιέργεια (Bain et al., 1994; Jones-Villeneuve et al., 1982). Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητο να υπάρχουν διαθέσιμα κύτταρα μικρής γενιάς σε ψύξη. Τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν στο υγρό άζωτο (-196°C) για μεγάλο χρονικό διάστημα, μειώνοντας σημαντικά το μεταβολισμό τους. Έτσι, διατηρούνται στην κατάσταση που βρίσκονταν κατά τη στιγμή της κατάψυξης. Η κατάψυξη γίνεται σταδιακά [-80°C, -196°C] για την αποφυγή θανάτου μεγάλου αριθμού κυττάρων, που μπορεί να προκληθεί από τη δημιουργία κρυστάλλων και επακόλουθη καταστροφή κυτταρικών μεμβρανών και οργανιδίων και από την αλλαγή του pH και της συγκέντρωσης ηλεκτρολυτών κατά την κατάψυξη. Επίσης, χρησιμοποιείται ειδικό διάλυμα κατάψυξης κυττάρων, το οποίο περιέχει την κρυοπροστατευτική ουσία διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) που μειώνει το σημείο τήξης του διαλύματος, σύμφωνα με όσα αναφέρονται σε πρωτόκολλα σχετικά με το χειρισμό κυτταροκαλλιιεργειών (Ausubel, 1991; Freshney, 1993; Spector et al., 1998). Τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια του πλαστικού τρυβλίου καλλιέργειας φλάσκας, με τη διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί (βλ. **ενότητα 1.2.**), επαναιωρούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και φυγοκεντρώνται (400 × g, 5 λεπτά). Αφού αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1-2 ml κατάλληλου υγρού κατάψυξης [freezing buffer, FBS 90% (v/v) και DMSO 10% (v/v)] και τοποθετείται σε ειδικά πλαστικά αποστειρωμένα φιαλίδια (cryovials), στα οποία αναγράφεται ο τύπος των κυττάρων και η ημερομηνία

κατάψυξής τους. Τα φιαλίδια τοποθετούνται αρχικά για 16 ώρες στους -80°C και στη συνέχεια μεταφέρονται σε ειδικό δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο (-196°C).

Σε αντίθεση με την κατάψυξη που επιβάλλεται σταδιακή και αργή μείωση της θερμοκρασίας, για την απόψυξη των κυττάρων απαιτείται ταχεία μετάβαση από την εξαιρετικά χαμηλή θερμοκρασία του υγρού αζώτου στη θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων, δηλαδή τους 37°C . Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται κατά το δυνατό ο τραυματισμός των κυττάρων από την απόψυξη των κρυστάλλων που σχηματίζονται όταν τα κύτταρα παγώνουν. Έτσι, το φιαλίδιο με τα παγωμένα κύτταρα τοποθετείται απευθείας στους 37°C (σε υδατόλουτρο ή στον κλίβανο), στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται στο τρυβλίο καλλιέργειας που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό θερμοκρασίας 37°C και τοποθετούνται στον κλίβανο. Καθώς το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα, κρίνεται απαραίτητη η αλλαγή του θρεπτικού υλικού μετά από 12-18 ώρες, για την απομάκρυνσή του.

1.4. Διαφοροποίηση των SH-SY5Y κυττάρων

Η διαφοροποίηση των κυττάρων SH-SY5Y έγινε με προσθήκη $10\ \mu\text{M}$ all-trans ρετινοϊκού οξέος (Sigma-Aldrich) (Pahlman et al., 1984). Τα κύτταρα τοποθετούνται στα κατάλληλα τρυβλία σε πυκνότητα 60% και (εφόσον προσκολληθούν) ακολουθεί προσθήκη του ρετινοϊκού οξέος. Η ανανέωση του θρεπτικού γίνεται κάθε δύο ημέρες. Η παύση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και η εμφάνιση νευρικών αποφυάδων παρατηρείται την 5η-6^η ημέρα της διαφοροποίησης.

2. Παροδική / μόνιμη διαμόλυνση

Για την διαμόλυνση των κυττάρων με νουκλεϊκά οξέα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διαμόλυνσης με σφαιρικά λιποσώματα (Felgner et al., 1987). Τα λιποσώματα είναι κυστίδια που αποτελούνται από φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα και με τον τρόπο αυτό μπορούν εύκολα να συντηχθούν με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και να απελευθερώσουν το περιεχόμενό τους (DNA ή RNA) στο κυτταρόπλασμα. Το πλεονέκτημα της μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι, επιτυγχάνονται εύκολα υψηλά ποσοστά διαμόλυνσης και μικρή τοξικότητα για τα κύτταρα. Επιπλέον, μπορεί να διαμολυνθεί ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών κυτταρικών τύπων, τόσο με DNA

όσο και με RNA. Η διαμόλυνση των κυττάρων μπορεί γίνει και με τη χρήση διαφόρων πολυμερών, δεξτράνης και φωσφορικού ασβεστίου. Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen).

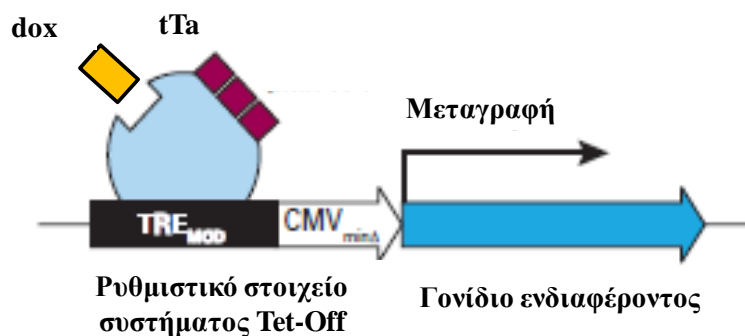
Αρχικά, 0,2 μl Lipofectamine αναμιγνύονται σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erppendorf με 25 μl θρεπτικού μέσου OPTIMEM (απουσία αντιβιοτικών και ορού) και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, χρόνος που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί ο σχηματισμός των λιποσωμάτων. Ταυτόχρονα, αναμιγνύονται ισομοριακές ποσότητες (0,2 μg) DNA ή RNA (κατά την αναγραφόμενη συγκέντρωση) με 25 μl θρεπτικού μέσου OPTIMEM. Στη συνέχεια, τα δυο μείγματα ενώνονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα, κατά τη διάρκεια της οποίας συντελείται η είσοδος των νουκλεϊκών οξέων στα λιποσώματα. Τέλος, προστίθεται επιπλέον θρεπτικό OPTIMEM, ανάλογα με την επιφάνεια του τρυβλίου στο οποίο θα γίνει το πείραμα, και το μείγμα προστίθεται στα κύτταρα, τα οποία τοποθετούνται για 16 ώρες μέσα στον κλίβανο επώασης. Μετά το πέρας των 16 ωρών το μείγμα αντικαθίσταται από πλήρες θρεπτικό μέσο.

3. Κατασκευή μόνιμα διαμολυσμένων επαγόμενων κυτταρικών σειρών TET-OFF

Το σύστημα Tet-off αναπτύχθηκε από τον Gossen, M. και τους συνεργάτες του, για την ρύθμιση της έκφρασης διαγονιδιακών πρωτεϊνών σε κύτταρα θηλαστικών (Gossen and Bujard, 1992; Triezenberg et al., 1988). Το βασικό πλεονέκτημα του συστήματος αυτού, είναι η πολύ υψηλή και σε σύντομο χρονικό διάστημα έκφραση του γονιδίου ενδιαφέροντος κατόπιν αφαίρεσης του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (doxycycline, dox) από το θρεπτικό (**εικόνα 30**). Αντιθέτως, παρουσία του αντιβιοτικού παρατηρείται έκφραση μόνο των ενδογενών επιπέδων της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος (αμελητέα διαρροή διαγονιδίου). Για το σύστημα Tet-Off χρησιμοποιήθηκαν δυο πλασμίδια: α) το ρυθμιστικό πλασμίδιο και β) το πλασμίδιο απόκρισης, στο οποίο έχει εισαχθεί το cDNA του γονιδίου ενδιαφέροντος (response plasmid) (**εικόνα 29**). Το ρυθμιστικό πλασμίδιο εκφράζει τον υβριδικό μεταγραφικό παράγοντα tTa (Tetracycline Transactivator), υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού ανθρώπου (Cytomegalovirus-CMV). Ο μεταγραφικός παράγοντας tTa είναι μια τεχνητή πρωτεΐνη, που έχει προέλθει από την σύντηξη του καταστολέα της έκφρασης του γονιδίου αντίστασης στην τετρακυκλίνη (tetracycline

repressor-tetR) του βακτηρίου *E.coli*, μαζί με το καρβοξυτελικό άκρο του μεταγραφικού παράγοντα Virion Protein 16-VP16 του ιού του έρπη που προσβάλλει τον άνθρωπο (Herpes Simplex Virus). Μέσω της περιοχής που έχει προέλθει από τον tetR, μπορεί να προσδένεται στα ρυθμιστικά στοιχεία TRE του χειριστή του γονιδίου της τετρακυκλίνης (tetracycline operator-tetO), ενώ η περιοχή VP16 αποτελεί ισχυρό μεταγραφικό ενεργοποιητή. Στο σύστημα Tet-Off, η πρόσδεση αυτή επιτυγχάνεται μόνο απουσία τετρακυκλίνης (ή εκδόχων της, όπως π.χ. δοξυκυκλίνη), ενώ αντιθέτως η πρόσδεση παρεμποδίζεται από την παρουσία του αντιβιοτικού. Εφόσον αφαιρεθεί το αντιβιοτικό από το θεραπευτικό μέσο, ο tTa προσδένεται στον χειριστή του πλασμιδίου απόκρισης που αποτελείται από ένα αριθμό επαναλήψεων της αλληλουχίας TRE, σε σύντηξη με τον υποκινητή CMV, και ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου ενδιαφέροντος.

Πλασμίδιο απόκρισης pTRE



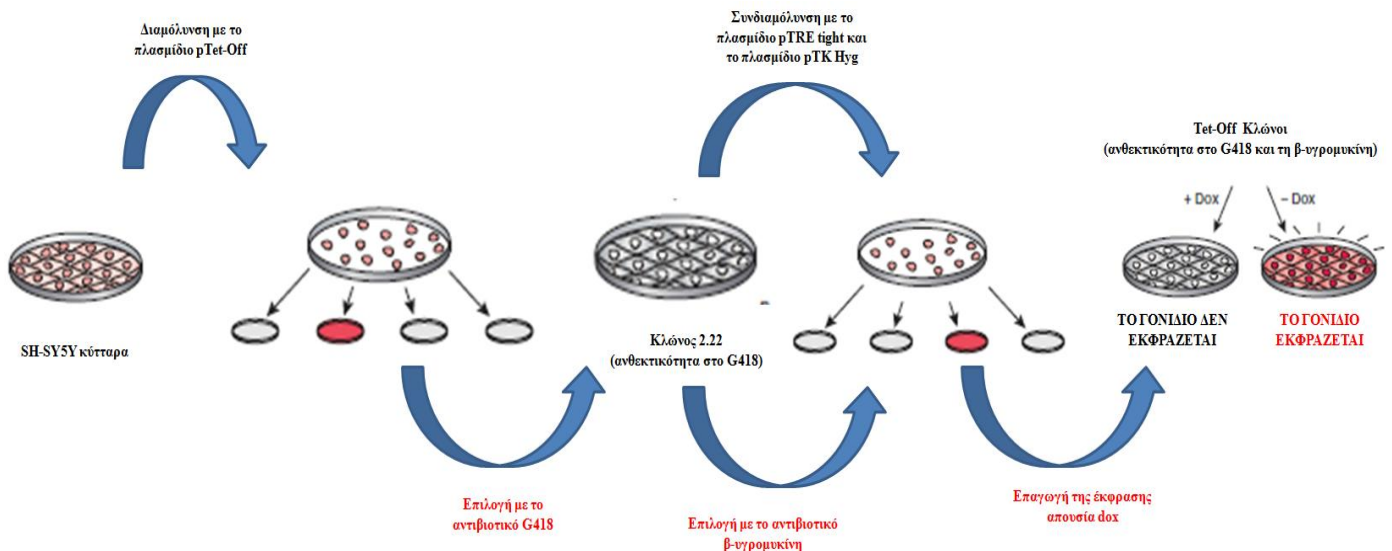
Εικόνα 29: Το σύστημα έκφρασης Tet-Off.

Απουσία δοξυκυκλίνης (dox), ο tTa ενεργοποιητής προσδένεται στα ρυθμιστικά στοιχεία TRE του χειριστή του γονιδίου της τετρακυκλίνης (tetracycline response element, TREMod) και ενεργοποιεί τη διαδικασία μεταγραφής του γονιδίου ενδιαφέροντος. Η dox προσδένεται στον ενεργοποιητή tTa, παρεμποδίζοντας την πρόσδεση του στα ρυθμιστικά στοιχεία και κατ' επέκταση την έκφραση του γονιδίου.

Για την δημιουργία μόνιμα διαμολυσμένων επαγόμενων κυτταρικών σειρών Tet-Off, οι αρχικοί κλώνοι SH-SY5Y 2,22 συνδιαμολύνονται με 10μg του πλασμιδίου απόκρισης pTRE tight (Clontech) στο οποίο είχε κλωνοποιηθεί: α) η φυσικού τύπου α-συνουκλεΐνη, ή β) η βακτηριακή πρωτεΐνη b-Gal και 3,3μg του πλασμιδίου pTK-Hyg (Clontech) (αναλογία 3:1), με τη χρήση του συστήματος Lipofectamine 2000 (βλ. ενότητα 2). Το πλασμίδιο pTK-Hyg διαθέτει γονίδιο αντίστασης στην υδρομυκίνη και χρησιμοποιείται για την επιλογή των διπλά διαμολυσμένων κλώνων, εφόσον στην αναλογία που γίνεται η διαμόλυνση (3:1)

εισέρχεται στο γονιδίωμα του κυττάρου στόχου με την ίδια συχνότητα με τον φορέα απόκρισης.

Δυο μέρες μετά την διαμόλυνση ξεκινά η επιλογή των επιτυχώς διαμολυσμένων κλώνων με την προσθήκη υγρομυκίνης στο θρεπτικό (50μg/ml). Η συντήρηση του ρυθμιστικού πλασμιδίου, το οποίο διαθέτει αντίσταση στην νεομυκίνη, γίνεται με ταυτόχρονη προσθήκη στο θρεπτικό G418 (200μg/ml). Ακολουθεί ανανέωση του θρεπτικού μέσου ανά δυο ημέρες. Μετά το πέρας τριών εβδομάδων αρχίζουν να σχηματίζονται μεμονωμένες αποικίες ανθεκτικές στα αντιβιοτικά, οι οποίες μεταφέρονται σε νέο τρυβλίο και καλλιεργούνται παρουσία ή απουσία dox για 4 ημέρες. Η επαγωγή της α-συνουκλεΐνης ελέγχεται με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τέλος, γίνεται η επιλογή και κατάψυξη των κλώνων με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της α-συνουκλεΐνης.



Εικόνα 30: Δημιουργία κυτταρικών σειρών Tet-Off.

Τα SH-SY5Y κύτταρα διαμολύνονται με το πλασμίδιο pTet-Off, που περιέχει το γονίδιο του ενεργοποιητή τ Ta και επιλέγονται με το αντιβιοτικό G418, προκειμένου να δημιουργηθεί η μόνιμα διαμολυσμένη κυτταρική σειρά (κλώνος 2.22). Τα κύτταρα του κλώνου 2.22 συνδιαμολύνονται με το πλασμίδιο pTRE tight, που φέρει το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης, και το πλασμίδιο pTKHyg, που φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας στη β-υγρομυκίνη (Hyg). Ύστερα από έναν δεύτερο γύρο επιλογής με β-υγρομυκίνη, παράγεται η μόνιμα διαμολυσμένη κυτταρική σειρά Tet-Off, στη οποία απουσία της δοξκυκλίνης (dox), το γονίδιο ενδιαφέροντος (Gene Of Interest, GOI), υπερεκφράζεται.

4. Επιμόλυνση κυττάρων με αδενοϊούς

Τα διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα καλλιεργούνται σε κατάλληλα πλαστικά τρυβλία, μέχρι η πυκνότητά τους να αγγίξει το 70%. Κατόπιν, χορηγείται φρέσκο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, στο οποίο διαλύεται ο αδενοϊός, στην κατάλληλη

συγκέντρωση (100 M.O.I.). Η επιμόλυνση πραγματοποιείται για 16 ώρες στους 37 °C. Οι αδενοϊοί που χρησιμοποιήθηκαν είναι κατασκευασμένοι έτσι, ώστε να προκαλούν την υπερέκφραση είτε της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης UCHL-1 είτε της β-γαλακτοσιδάσης, πρωτεΐνης βακτηριακής προέλευσης. Στη συνέχεια, ακολουθούν εκτεταμένες πλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS, προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως το ιϊκό φορτίο και τέλος χορηγείται φρέσκο θρεπτικό, για 16 επιπλέον ώρες. Μετά το πέρας των 16 ωρών, το θρεπτικό συλλέγεται όπως περιγράφεται στην παρακάτω ενότητα (**βλπ ενότητα 5**).

5. Συλλογή θρεπτικού μέσου καλλιέργειας

Προκειμένου να γίνει συλλογή του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας (conditioned medium, CM), το οποίο περιέχει την εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη, τα SH-SY5Y κύτταρα, που εκφράζουν τη φυσικού τύπου α-συνουκλεΐνη, με επαγόμενο τρόπο, καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 150 mm, παρουσία ή απουσία δοξυκυκλίνης για τουλάχιστον επτά ημέρες. Όταν η περιεκτικότητα του τρυβλίου σε κύτταρα αγγίζει το 70-80%, το πλήρες θρεπτικό μέσο αντικαθίσταται από νέο μειωμένης περιεκτικότητας σε ορό (2% FBS). Μετά από επώαση 48 ωρών στους 37°C, το θρεπτικό μέσο (CM) και τα κύτταρα συλλέγονται. Αρχικά, απομακρύνονται από το CM τα κύτταρα που έχουν αποκολληθεί ή έχουν πεθάνει, με φυγοκέντρηση στα 400 × g, για 5 λεπτά, στους 4°C. Εν συνεχεία, το υπερκείμενο επαναφυγοκεντρείται στα 4000 × g, για 10 λεπτά, στους 4°C, για την απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων. Το απαλλαγμένο από τα κύτταρα και κυτταρικά υπολείμματα υπερκείμενο φυλάσσεται στους 4°C, εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί τις επόμενες μια-δύο ημέρες. Για μεγαλύτερα διαστήματα συντήρησης, το CM, ισομοιράζεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου falcon και καταψύχεται σε θερμοκρασία -80°C.

6. Συμπύκνωση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας μέσω υπερδιήθησης

Η συμπύκνωση του θρεπτικού μέσου (CM) γίνεται με τη μέθοδο της υπερδιήθησης. Γενικά κατά την υπερδιήθηση, τα μόρια του διαλύματος αναγκάζονται να διαπεράσουν μια πορώδη μεμβράνη λόγω της πίεσης που ασκείται στο διάλυμα μέσω της φυγοκέντρησης. Μόρια με μέγεθος μεγαλύτερο από εκείνο των πόρων

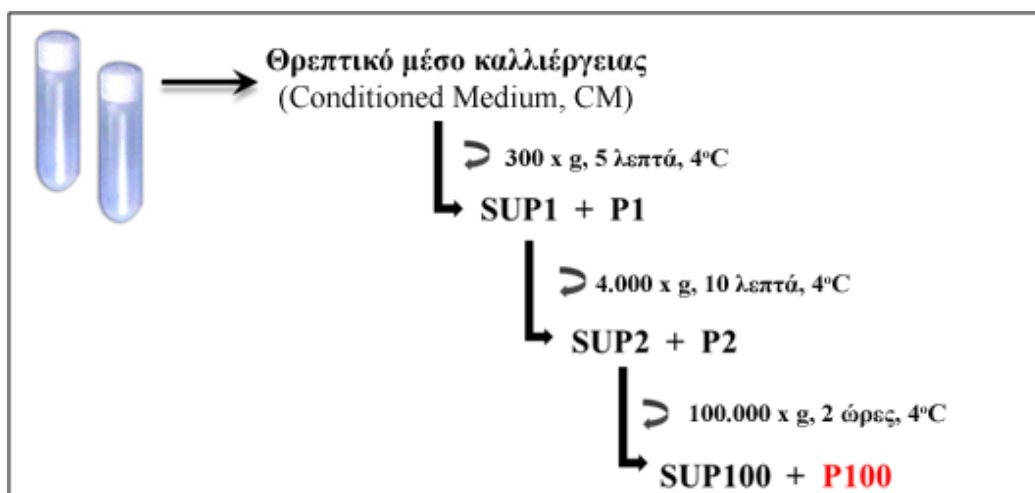
κατακρατούνται στην επιφάνεια της μεμβράνης, ενώ μόρια μικρότερου μεγέθους διαπερνούν την μεμβράνη. Συγκεκριμένα, για την συμπύκνωση του CM χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμες στήλες Amicon Ultra 3K Nominal Molecular Weight Limit (NMWL), (Millipore). Μετά την προσθήκη του CM στη στήλη, ακολουθεί φυγοκέντρηση στις $4000 \times g$, στους 4°C μέχρι μείωσης του αρχικού όγκου 35-40 φορές. Γίνεται προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford (βλπ. ενότητα 15.2) και το συμπυκνωμένο CM φυλάσσεται σε θερμοκρασία -80°C μέχρι περαιτέρω χρήσης του.

7. Προετοιμασία ορού απαλλαγμένου από εξωσώματα

Για τη συλλογή εξωσωμάτων από θρεπτικό μέσο καλλιέργειας νευρικών κυττάρων, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η χρήση ορού απαλλαγμένου από τα εαυτά εξωσώματα (They et al., 2006). Αρχικά θρεπτικό μέσο καλλιέργειας RPMI, που περιέχει 20% FBS, L-γλουταμίνη και μείγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, φυγοκεντρείται στα $100,000 \times g$, για 16 ώρες, στους 4°C . Το υπερκείμενο μεταγγίζεται προσεκτικά σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολουθεί αποστείρωση του υλικού με τη χρήση φίλτρων διαμέτρου $0.2 \mu\text{m}$ (Whatman) και συντήρηση στους 4°C .

8. Απομόνωση εξωσωμάτων από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κυττάρων

Για την απομόνωση εξωσωμάτων από κύτταρα SH-SY5Y, το μέσο καλλιέργειας αντικαταστάθηκε για 48 ώρες με RPMI που περιείχε 2% FBS απαλλαγμένο από εξωσώματα (βλπ. ενότητα 7). Για τη συλλογή των εξωσωμάτων ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο διαδοχικών, διαφορετικών φυγοκεντρήσεων των They et al. (They et al., 2006), με μικρές τροποποιήσεις (εικόνα 31).



Εικόνα 31: Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου απομόνωσης εξωσωμάτων από καλλιεργητικό μέσο.

Ακολουθείται μια σειρά διαφορετικών φυγοκεντρήσεων. Το ίζημα των 100.000 x g αναφέρεται ως «εξωσώματα». Το σύστημα έκφρασης Tet-Off.

Το υπερκείμενο των κυττάρων συλλέγεται και φυγοκεντρείται αρχικά στα 400 × g, για 5 λεπτά, ώστε να απαλλαγεί από τυχόν κύτταρα αιωρούμενα σε αυτό και κατόπιν στα 4.000 × g, για 10 λεπτά, ώστε να αφαιρεθούν κυτταρικά θραύσματα (βλπ. ενότητα 5). Το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωλήνα. Τελικά, το θρεπτικό μέσο φυγοκεντρείται στα 100.000 × g, για 2 ώρες, για την απομόνωση εξωσωμάτων. Το ίζημα που προκύπτει, έχει δείχθει ότι φέρει τα βιοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των εξωσωμάτων και στην παρούσα εργασία θα αναφέρεται ως «εξωσώματα». Μετά την υπερφυγοκέντρωση, τα εξωσώματα επαναιωρούνται είτε σε 40μL PBS με ήπια φύλαξη στους 4°C, σε περίπτωση άμεσης χρήσης (1-2 ημέρες μετά την απομόνωση) είτε διαλυτοποιούνται στο διάλυμα ραδιοανοσοκατακρήμνισης, RIPA, όποτε και φυλάσσονται στους -80°C. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι φυγοκεντρήσεις έγιναν στους 4°C.

9. Χρωματογραφία διήθησης πηκτής (*Size Exclusion Chromatography, SEC*)

Ένας από τους στόχους της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν ο διαχωρισμός και η απομόνωση των διαφορετικών μορφών της α-συνουκλεΐνης. Όπως ήδη αναφέρθηκε (βλπ. εισαγωγή, ενότητα 2.3.3.), μία από τις βασικές ιδιότητες της α-συνουκλεΐνης είναι η τάση της να δημιουργεί πολυμερή, τα οποία έχουν ενοχοποιηθεί για τοξική δράση στους νευρώνες. Προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα διάφορα διαλυτά ή αδιάλυτα σύμπλοκα της α-συνουκλεΐνης που είναι παρόντα στο

θρεπτικό μέσο κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χρωματογραφίας διήθησης περνώντας (Size Exclusion Chromatography, SEC), κατά την οποία οι πρωτεΐνες περνώντας από τη στήλη διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος.

Για την απομόνωση των διαφορετικών μορφών της α -συνουκλεΐνης, συμπυκνωμένο θρεπτικό μέσο (CM), πλούσιο σε εκκρινόμενες πρωτεΐνες, ολικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη 8-9 mg, αραιώνεται σε PBS. Το δείγμα εγχέεται στη στήλη Superdex 200 10/300 GL (Amersham Pharmacia), η οποία είναι ήδη εξισορροπημένη με PBS. Η έκλυση των κλασμάτων πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό ροής 0,25ml/λεπτό, σε διάλυμα PBS. Κλάσματα όγκου 250μl συλλέγονται και αναλύονται για την παρουσία α -συνουκλεΐνης με ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Κατόπιν, τα κλάσματα υψηλού (High Molecular Weight, HMW), καθώς και χαμηλού μοριακού βάρους (Low Molecular Weight, LMW) που περιέχουν την α -συνουκλεΐνη ενώνονται σε δύο διαφορετικές δεξαμενές πρωτεϊνών, μια HMW και μια LMW. Τα δύο αυτά διαφορετικά πρωτεϊνικά μείγματα συμπυκνώνονται με τη χρήση των εμπορικά διαθέσιμων στηλών, Amicon Ultra 3K Nominal Molecular Weight Limit (NMWL), (Millipore). Στη συνέχεια το διάλυμα PBS, στο οποίο οι πρωτεΐνες εκλύονται από τη στήλη, αντικαθίσταται από διάλυμα οξικού αμμωνίου 50mM, pH 7.5 (50mM ammonium acetate, pH 7.5), μέσω υπερδιήθησης. Τα δείγματα υφίστανται λυοφιλίωση, μέχρι την πλήρη αφυδάτωσή τους. Τέλος, τα λυοφιλιωμένα δείγματα επαναδιαλύονται σε 250μl πλήρους θρεπτικού RPMI και αποστειρώνονται με τη χρήση φίλτρων διαμέτρου 0.2 μ m (Whatman), προκειμένου να χορηγηθούν σε κύτταρα-δέκτες σε τελική αραιώση 2X.

10. Ανοσοκυτταροχημεία

Με την ανοσοκυτταροχημεία γίνεται δυνατή η ανίχνευση διαφόρων μορίων (αντιγόνων) σε κύτταρα που βρίσκονται ακινητοποιημένα σε σταθερό υπόστρωμα, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Έτσι λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με τη θέση ή την κατανομή του προς μελέτη μορίου σε έναν πληθυσμό κυττάρων και ελέγχεται εάν δυο (ή και περισσότερα) μόρια συνεντοπίζονται σε συγκεκριμένα διαμερίσματα του κυττάρου. Στην παρούσα εργασία, ως μέθοδος ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκε ο έμμεσος ανοσοφθορισμός, όπου αρχικά γίνεται επώαση των κυττάρων με ένα διάλυμα αντισώματος που αναγνωρίζει ειδικά την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος (πρωτογενές αντίσωμα) και στη συνέχεια ακολουθεί επώαση με διάλυμα ενός άλλου

αντισώματος (δευτερογενές αντίσωμα), που αναγνωρίζει το πρωτογενές και είναι συζευγμένο με μια φθορίζουσα χρωστική.

Ο φθορισμός του δευτερογενούς αντισώματος που επιτρέπει και τον εντοπισμό της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος γίνεται ορατός με παρατήρηση σε ειδικό μικροσκόπιο (μικροσκόπιο φθορισμού), μετά από έκθεση του μορίου της φθορίζουσας χρωστικής σε ακτινοβολία με μήκος κύματος ειδικό για κάθε χρωστική. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο χρωστικές, μια που απορροφά μέγιστα στο μπλε (495 nm) και εκπέμπει στο πράσινο (519 nm) και μια που απορροφά μέγιστα στο πράσινο (590 nm) και εκπέμπει στο κόκκινο (617 nm) φως. Η παρατήρηση και φωτογράφιση των δειγμάτων στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού Leica DMIRB με τη χρήση του λογισμικού LAS.

Τα κύτταρα μονιμοποιούνται *in situ* σε συσκευές διαμερισματοποίησης, στους 4°C για 15 λεπτά με 4% παραφορμαλδεΰδη (paraformaldehyde, PFA) σε PBS. Ακολουθούν δύο πλύσεις με 4°C PBS και παρεμπόδιση των μη-ειδικών αλληλεπιδράσεων (blocking) για 1 ώρα, σε PBS-0,1% Triton-X100 (PBS-T) με 10% ορό αίγας (normal goat serum, NGS). Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα διαλύθηκαν σε PBS-T με 1% NGS. Τα κύτταρα επώαστηκαν με πρωτογενή αντισώματα για 16 ώρες στους 4°C, και με δευτερογενή σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτάδι για 1 ώρα. Να σημειωθεί ότι στο μείγμα επώασης του δευτερογενούς αντισώματος προστέθηκε και η χρωστική Hoechst 33258, η οποία χρωματίζει αποκλειστικά τον πυρήνα των κυττάρων (βλπ. ενότητα 11). Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:

- **anti-GFP**: πολυκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε κουνέλι, έναντι της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης, αραιώση 1:200, #132003C3, Goettingen, Germany.
- **anti-M2 flag**: μονοκλωνικό αντίσωμα που παρασκευάζεται σε μύς έναντι της του συνθετικού πεπτιδίου FLAG (αμινοξική αλληλουχία: DYKDDDDK), αραιώση 1:400, #F3165, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.
- **CY3 (GFP-Cy3)**: δευτερογενές αντίσωμα από αίγα, έναντι επιτόπου από κουνέλι, αραιώση 1:1000, Jackson Immunoresearch, Laboratories, INC.
- **CY2 (M2flag-Cy2)**: δευτερογενές αντίσωμα από αίγα, έναντι επιτόπου από κουνέλι, αραιώση 1:1000, Jackson Immunoresearch, Laboratories, INC.

11. Μέτρηση κυτταρικού θανάτου

Η μέτρηση της τοξικότητας έγινε με διπλή χρώση των κυττάρων με τη χρωστική αποπτωτικών πυρήνων, διμερές του αιθιδίου (Ethidium Homodimer, EthD-1) και την γενική χρωστική πυρήνων, Hoechst 33258. Η μέθοδος είναι απλή, οικονομική, ταχεία και δεν απαιτεί μεγάλο αριθμό κυττάρων ανά δείγμα, με αποτέλεσμα να μπορεί να πραγματοποιηθεί μέτρηση σε πολλά δείγματα σε μικρό χρονικό διάστημα. Η χρωστική Hoechst, εξαιτίας της παρουσίας μιας ομάδας αιθυλίου στο μόριο της, είναι ιδιαίτερος λιπόφιλη και επομένως μπορεί να διαπεράσει την κυτταροπλασματική και την πυρηνική μεμβράνη ζωντανών κυττάρων και τέλος να προσδεθεί στο DNA. Κατόπιν πρόσδεσης, ανάγεται με υπεριώδη ακτινοβολία συχνότητας περίπου 350 nm και εκπέμπει ορατό κυανό χρώμα στα 461 nm. Η χρωστική Hoechst μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την χρώση των πυρήνων μονιμοποιημένων κυττάρων ή κυττάρων σε καλλιέργεια. Από την άλλη μεριά, η χρωστική EthD-1 δεν είναι ικανή να διαπεράσει τις βιολογικές μεμβράνες, παρά μόνο στην περίπτωση κυττάρων που βρίσκονται σε διαδικασία κυτταρικού θανάτου. Υπό αυτές τις συνθήκες μπορεί να προσδεθεί σε κατακερματισμένα μόρια DNA και στη συνέχεια, κατόπιν αναγωγής της με ακτινοβολία συχνότητας 488 nm, να εκπέμπει ορατό κόκκινο χρώμα στα 562-588 nm. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται, μεταξύ άλλων, για την χρώση αποπτωτικών κυττάρων σε καλλιέργεια.

Στην παρούσα μελέτη, προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης, σε διαιρούμενα και διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα, καθώς και σε πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων εμβρύων επίμυος, μετά την επώαση με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο, το καλλιεργητικό μέσο αντικαθίσταται από φρέσκο, που περιέχει 1 μ M της χρωστικής Hoechst και 1 μ M της χρωστικής EthD-1, για 30 λεπτά στους 37°C. Ακολουθούν 2 εκπλύσεις των κυττάρων με αποστειρωμένο διάλυμα PBS και προσθήκη νέου θρεπτικού. Η παρατήρηση και φωτογράφιση των κυττάρων έγινε σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού Leica DMIRB με τη χρήση του λογισμικού LAS. Οι φωτογραφίες που ελήφθησαν αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Image-J. Συγκεκριμένα, ελήφθησαν φωτογραφίες από 3 διαφορετικά, τυχαία επιλεγμένα πεδία για κάθε συνθήκη και μετρήθηκαν τουλάχιστον 100 κύτταρα σε κάθε πεδίο.

Η παρατηρούμενη τοξικότητα ποσοτικοποιήθηκε ως εξής:

$$\text{Κυτταρικός θάνατος} * 100\% = \frac{\text{Νεκρά κύτταρα (χρώση με EthD-1)}}{\text{Ολικά κύτταρα (χρώση με Hoechst)}} * 100$$

Σε κάποιες περιπτώσεις, στο μείγμα με τις χρωστικές προστέθηκε και 1μΜ της χρωστικής καλσεΐνης (calcein-AM), η οποία όταν προσληφθεί από ζωντανά κύτταρα, από μη φθορίζουσα ουσία, μετατρέπεται σε πράσινη φθορίζουσα καλσεΐνη, κατόπιν υδρόλυσης του ακετοξυμεθυλεστέρα από ενδοκυττάρια εστεράσες.

12. Μέτρηση κυτταρικής βιωσιμότητας

Για την ποσοτικοποίηση της κυτταρικής επιβίωσης έγινε καταμέτρηση των άθικτων κυτταρικών πυρήνων, με τη χρήση ειδικού διαλύματος κυτταρικής λύσης που επιτρέπει την περισυλλογή και διατήρηση των πυρήνων (lysis buffer for nuclear counts). Η μέθοδος είναι απλή, οικονομική, ταχεία και ακριβής.

Στην παρούσα μελέτη, διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα ή πρωτογενείς φλοιϊκοί νευρώνες εμβρύων επίμυος, επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη ή θρεπτικό μάρτυρα, παρουσία ή απουσία επιλεγμένων φαρμακολογικών παραγόντων. Οι χρόνοι επώασης αναφέρονται αναλυτικά στο κεφάλαιο των «Αποτελεσμάτων». Μετά την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης, τα κύτταρα περισυλλέγονται με μηχανικό τρόπο σε ειδικό διάλυμα κυτταρικής λύσης (0,1% (v/v) 10 x PBS, 0,5% (v/v) Triton-X-100, 2 mM χλωριούχο μαγνήσιο, 0,5% (w/v) αιθυλ-εξαδωδεκυλ-μεθυλ-βρωμο-αμμώνιο, 0,28% (v/v) οξικό οξύ, 100 mM χλωριούχο νάτριο, 0,02% (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης), όπως περιγράφηκε σε προηγούμενες μελέτες (Farinelli et al., 1998; Rukenstein et al., 1991; Stefanis et al., 1999). Το παραπάνω διάλυμα αφήνει άθικτους τους πυρήνες των κυττάρων, οι οποίοι επιπλέον βάφονται, εξαιτίας της παρουσίας της χρωστικής και γίνονται, έτσι, ορατοί σε οπτικό μικροσκόπιο. Οι απομονωμένοι πυρήνες μπορούν να διατηρηθούν στο διάλυμα λύσης για μια εβδομάδα στους 4°C.

Για τον υπολογισμό του ποσοστού επιβίωσης των κυττάρων, 10 μl του διαλύματος λύσης που περιέχει απομονωμένους πυρήνες, αφού αναδευτούν ήπια, μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρο πλάκα μέτρησης των κυττάρων (πλάκα Neubauer, Neubauer improved #717805, Brand), όπου και προσδιορίζεται ο αριθμός ζωντανών

πυρήνων με μορφολογικά κριτήρια (οι νεκροί πυρήνες έχουν μικρότερο μέγεθος, συμπαγέστερη όψη και πεπλατυσμένο σχήμα, και δεν προσμετρώνται). Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται υπολογίζοντας το μέσο όρο των άθικτων πυρήνων για κάθε συνθήκη, καθώς λαμβάνονται δεδομένα από τρεις επαναλήψεις, που εκτελούνται στο ίδιο πείραμα κάθε φορά. Στη συνέχεια, οι τιμές που υπολογίστηκαν εκφράζονται ως ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης, θεωρώντας πως το 100% της επιβίωσης εμφανίζουν τα κύτταρα-μάρτυρες, δηλαδή εκείνα τα οποία είχαν επωαστεί με το θρεπτικό μέσο μάρτυρα, απουσία οποιουδήποτε φαρμακολογικού αναστολέα (CM, WT+).

Οι φαρμακολογικοί παράγοντες που χορηγήθηκαν παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 4: Τελικές συγκεντρώσεις φαρμακολογικών παραγόντων.

	Διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα	
Νιφεδιπίνη (Nifedipine)	αναστολέας των L-τύπου τασεοελεγχόμενων καναλιών Ca ²⁺	1 μM
ω-κονοτοξίνη GVIA (ω-Conotoxin GVIA)	αναστολέας των N-τύπου τασεοελεγχόμενων καναλιών Ca ²⁺	100 nM
BAPTA 2AM	χηλικός παράγοντας δέσμησης του ενδοκυττάριου Ca ²⁺	2 μM
EGTA	χηλικός παράγοντας δέσμησης του εξωκυττάριου Ca ²⁺	0.25 mM
A6185 (Calpain Inhibitor I)	αναστολέας των καλπαϊνών	1 μM

*Οι παραπάνω συγκεντρώσεις αφορούν τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα.

	Πρωτογενείς Νευρώνες	
Νιφεδιπίνη (Nifedipine)	αναστολέας των L-τύπου τασσεοελεγχόμενων καναλιών Ca^{2+}	5 μ M
ω-κονοτοξίνη GVIA (ω-Conotoxin GVIA)	αναστολέας των N-τύπου τασσεοελεγχόμενων καναλιών Ca^{2+}	1 μ M
BAPTA 2AM	χηλικός παράγοντας δέσμησης του ενδοκυττάρου Ca^{2+}	2 μ M
EGTA	χηλικός παράγοντας δέσμησης του εξωκυττάρου Ca^{2+}	0.25 mM
A6185 (Calpain Inhibitor I)	αναστολέας των καλπαϊνών	5 μ M

*Οι παραπάνω συγκεντρώσεις αφορούν τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων εγκεφαλικού φλοιού από έμβρυα επίμυος.

13. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός του ελεύθερου κυτταροπλασματικού Ca^{2+}

13.1. Με τη χρήση φθορισμόμετρου

Για τη μέτρηση του ελεύθερου κυτταροπλασματικού ασβεστίου ($[Ca^{2+}]_i$) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της φθορισμομετρίας, όπως έχει περιγραφεί από τον Fasolato και συνεργάτες (Fasolato et al., 1991), με μικρές τροποποιήσεις ώστε να προσαρμοστεί στο σύστημα των SH-SY5Y κυττάρων. Η μέτρηση πραγματοποιείται με τη βοήθεια της χρωστικής Fura-2 σε ζωντανά κύτταρα με τη χρήση ειδικού φθορισμόμετρου και κατάλληλου λογισμικού σε έναν συνδεδεμένο ηλεκτρονικό υπολογιστή. Το μόριο Fura-2 είναι δείκτης φθορισμού με μεγάλη εξειδίκευση και ευαισθησία για τα ιόντα Ca^{2+} και χορηγείται στα κύτταρα με τη μορφή του ακετυλομεθυλεστέρα, Fura-2/AM (Grynkiewicz et al., 1985). Όταν τα μόρια της χρωστικής διαπεράσουν την πλασματική μεμβράνη, οι ομάδες ακετυλο-μεθυλεστέρα αποκόπτονται ενζυμικά από εστεράσες του κυττάρου, με αποτέλεσμα την παγίδευση της χρωστικής στο κυτταρόπλασμα. Σε αυτή τη μορφή, η Fura-2 παρουσιάζει ένα μέγιστο εκπομπής στα 510nm και δύο μέγιστα διέγερσης, ένα στα 340nm (το οποίο αυξάνεται με την αύξηση της $[Ca^{2+}]_i$) και ένα στα 380nm (το οποίο μειώνεται με την αύξηση της $[Ca^{2+}]_i$). Ο υπολογισμός της $[Ca^{2+}]_i$ σε κάθε περίπτωση βασίζεται στο λόγο των τιμών φθορισμού 340nm/380nm. Η μέθοδος επιτρέπει, τόσο την μέτρηση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα ή στις ενδοκυττάρια αποθήκες, όσο και την παρακολούθηση της κινητοποίησής τους, σε πραγματικό

χρόνο, με εξωγενή χορήγηση χημικών παραγόντων, που διαταράσσουν με ελεγχόμενο τρόπο την ομοιόσταση των ιόντων.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τα SH-SY5Y κύτταρα είναι η εξής: Μετά το τέλος της επώασης με τα κατάλληλα θρεπτικά μέσα, τα κύτταρα αποκολλώνται και επαναιωρούνται στο ίδιο θρεπτικό υλικό, στο οποίο έγινε η επώαση. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται με δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις ($400 \times g$, 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου) με το ισότονο διάλυμα KRH (25mM NaCl, 5mM KCl, 1,2mM MgSO₄, 1,2mM KH₂PO₄, 25mM HEPES/NaOH pH 7,4, 2mM CaCl₂, 6mM γλυκόζη). Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε KRH, στο οποίο έχει προστεθεί ο δείκτης Fura-2/AM σε τελική συγκέντρωση 2,5μM, καθώς και 50μM DTPA (diethylenetriaminepentanoic acid), το οποίο αυξάνει τη διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης. Τα κύτταρα επωάζονται στο διάλυμα αυτό για 30 λεπτά, στους 37°C, ώστε ο φθορίζων δείκτης να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, απομακρύνεται η περίσσεια του Fura-2/AM με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε KRH, το οποίο περιέχει 200μM σουλφινοπυραζόνης, προκειμένου να αποτραπεί τη διάχυση της χρωστικής. Πριν την έναρξη των μετρήσεων, τα κύτταρα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου, για 15-30 λεπτά. Ωστόσο, η παραμονή ενός δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη μέτρηση δεν πρέπει να ξεπερνά τις 2 ώρες. Στις περιπτώσεις προσδιορισμού της κινητοποίησης του ασβεστίου από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες (capacitative calcium entry, CCE), τα κύτταρα ξεπλένονται πριν την τοποθέτησή τους στο φθορισμόμετρο με διάλυμα KRH, το οποίο δεν περιέχει Ca²⁺ και στο ίδιο διάλυμα παραμένουν σε όλη τη διάρκεια της μέτρησης στο φθορισμόμετρο (KRH-Ca²⁺) (Papazafiri and Kletsas, 2003). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο φθορισμοφασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer LS-55 luminescence spectrometer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος FL WinLab.

13.2. Με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού (*Live Ca²⁺ Imaging*)

Για την παρακολούθηση των κυτταραπλασματικών επιπέδων [Ca²⁺]_i σε πραγματικό χρόνο με μικροσκοπία φθορισμού, νευρώνες από φλοιό εγκεφάλου εμβρύων επίμυος (75,000 κύτταρα/διαμέρισμα) καλλιεργούνται σε ειδικά

επικαλυμμένες με πολύ-L-λυσίνη συσκευές διαμερισματοποίησης (Integrated BioDiagnostics, Ibi, Munich, Germany), για 7 ημέρες. Στις ίδιες συσκευές διαφοροποιούνται για έξι ημέρες SH-SY5Y κύτταρα (10,000 κύτταρα/ διαμέρισμα). Μετά το τέλος των πειραματικών διαδικασιών, τα κύτταρα επωάζονται με πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, που περιέχει 2 μM της χρωστικής Fura 2-AM, 30 λεπτά, στους 37 °C. Στη συνέχεια, η χρωστική αφαιρείται και φρέσκο πλήρες θρεπτικό καλλιέργειας προστίθεται για 3 ώρες στους 37°C, προκειμένου να μεταβολιστεί ο εστέρας της χρωστικής. Ακριβώς πριν την έναρξη των μετρήσεων Ca^{2+} , τα κύτταρα πλένονται μια φορά με ειδικής σύστασης ρυθμιστικό διάλυμα (129 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 30 mM glucose, 1% BSA, 25 mM HEPES [pH 7.4]) και κατόπιν τοποθετούνται στην έδρα του μικροσκοπίου, η οποία είναι ρυθμισμένη στη σταθερή θερμοκρασία των 37°C. Για τη μέτρηση της εισροής Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας (CCE), σε συνθήκες απουσίας εξωκυττάρου Ca^{2+} , χορηγούνται 0.25 μM Tg, και ακολούθως 6 mM CaCl_2 . Η χρωστική διεγείρεται σε μήκος κύματος μεταξύ 340 και 380 nm και εκπέμπει στα 510 nm. Οι εικόνες φθορισμού λαμβάνονται, με τη χρήση του μικροσκοπίου φθορισμού TE 2000U-inverted fluorescence microscope (Nikon, Osaka, Japan) συνδεδεμένου με μια ψυχομένη CCD κάμερα (PTI-IC200) (Princeton Instruments, USA). Στο τέλος της κάθε μέτρησης, τα σήματα της Fura 2-AM κανονικοποιούνται με ταυτόχρονη προσθήκη 10 μM ιονομυκίνης (Iono) και 50 mM KCl, προκειμένου να ληφθεί ο μέγιστος φθορισμός. Οι εικόνες λαμβάνονται κάθε 10 δευτερόλεπτα και τα κύτταρα αναλύονται, με τη χρήση του εργαλείου της περιοχής ενδιαφέροντος (region of interest, ROI), προκειμένου να ληφθούν οι λόγοι φθορισμού. Οι αλλαγές στα επίπεδα του $[\text{Ca}^{2+}]_i$ υπολογίζονται στο επίπεδο του ενός κυττάρου, σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή, ως λόγοι φθορισμού (Smaili and Russell, 1999). Τα βασικά επίπεδα φθορισμού (baseline fluorescence) καθορίζονται στην αρχή της κάθε μέτρησης, από το μέσο όρο των πρώτων 20 εικόνων, πριν την προσθήκη των φαρμακολογικών παραγόντων, με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Image Master Software acquisition-analysis software (PTI, Birmingham, NJ, USA). Τα αποτελέσματα κανονικοποιούνται με βάση τα βασικά επίπεδα φθορισμού και εκφράζονται ως ποσοστό αυτών.

14. Εκχύλιση πρωτεϊνών

Οι μέθοδοι της εκχύλισης των πρωτεϊνών, περιλαμβάνουν την επώαση των κυττάρων σε ένα διάλυμα λύσης, το οποίο προκαλεί τη δομική καταστροφή των μεμβρανών του υλικού, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου (και πρωτεασών–φωσφατασών) στο διάλυμα. Κατά τη διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνών το διάλυμα λύσης πρέπει να περιέχει αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών και όλες οι διαδικασίες να πραγματοποιούνται στους 4°C. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η πιθανότητα πρωτεόλυσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων.

14.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών

Μετά το πέρας του χρόνου εφαρμογής των εκάστοτε πειραματικών συνθηκών, τα τρυβλία με τα κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και τα κύτταρα πλένονται δύο φορές με παγωμένο διάλυμα PBS. Μετά την απομάκρυνση όλης της ποσότητας του PBS, τα κύτταρα αποκολλώνται μηχανικά σε κατάλληλο όγκο PBS, συλλέγονται με τη βοήθεια κατάλληλου ξύστρου σε σωλήνα τύπου erpendorf και φυγοκεντρούνται (15000 × g, 4°C, 5 λεπτά). Στη συνέχεια, προστίθεται κατάλληλος όγκος διαλύματος λύσης (STET sample buffer) , το οποίο περιέχει: 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% (v/v) Triton-X-100, καθώς και μείγμα αναστολέων πρωτεασών (εκχύλισμα παγκρέατος, προνάση, θερμολυσίνη, χυμοθριψίνη και παπαΐνη, της εταιρείας Roche). Τα δείγματα αναδεύονται ισχυρά, επωάζονται για 30 λεπτά στον πάγο. Κατόπιν φυγοκεντρούνται στα 15000 × g, για 30 λεπτά στους 4°C. Στο υπερκείμενο κάθε δείγματος περιέχονται οι διαλυτές πρωτεΐνες, ενώ στο ίζημα οι αδιάλυτες καθώς και οι άθικτοι πυρήνες των κυττάρων (με το διάλυμα κατεργασίας STET δεν επιτυγχάνεται λύση των πυρήνων). Τέλος, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα, ενώ το ίζημα που παραμένει πλένεται δυο φορές με διάλυμα PBS. Η πυκνότητα της πρωτεΐνης που περιέχεται στο υπερκείμενο, προσδιορίζεται με τη μέθοδο Bradford (**βλπ. ενότητα 15.2**). Τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

14.2. Διαφορική απομόνωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών πρωτεϊνών

Η απομόνωση των μεμβρανικών και κυτοσολικών πρωτεϊνών βασίστηκε στο πρωτόκολλο που περιγράφεται από το Lansbury και τους συνεργάτες του (Liu et al., 2009b), με μερικές τροποποιήσεις που αυξάνουν την αποδοτικότητα της απομόνωσης στα SH-SY5Y κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Αναλυτικά, μετά την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο καλλιέργειας και την έκπλυση με PBS, τα κύτταρα συλλέγονται με ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης [50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA και μείγμα αναστολέων πρωτεασών (εκχύλισμα παγκρέατος, προνάση, θερμολυσίνη, χυμοθριψίνη και παπαΐνη, Roche)]. Το κυτταρικό διάλυμα ομογενοποιείται, καθώς περνά 10 φορές μέσα από σύριγγα με βελόνα διατομής 26-gauge. Το κυτταρικό εκχύλισμα φυγοκεντρείται στα 600 × g, για 5 λεπτά, στους 4 °C προκειμένου να απομακρυνθούν τα άθικτα κύτταρα. Ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση του υπερκείμενου στα 100,000 × g, για 2 ώρες, στους 4 °C, προς διαχωρισμό του μεμβρανικού (ίζημα) από το κυτοσολικό (υπερκείμενο) κλάσμα. Το μεμβρανικό κλάσμα πλένεται 5 φορές με το διάλυμα πλύσεων (50 mM TrisHCl, 1mM EDTA, και 1 M NaCl), στα 15000 × g, για 5 λεπτά, στους 4 °C. Η απομόνωση των πρωτεϊνών από το μεμβρανικό κλάσμα πραγματοποιείται με χορήγηση ισχυρού διαλύματος λύσης (SDS 4x + PI), επώαση 30 λεπτών στους 95 °C και ακόλουθη φυγοκέντρηση στα 15000 × g, για 30 λεπτά, στους 4 °C. Η ολική ποσότητα πρωτεΐνης προσδιορίζεται με τη μέθοδο Bradford (Biorad). Σε κάθε περίπτωση, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φυλάσσονται στους -20°C, μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

14.3. Αναλυτικό πρωτόκολλο κυτταρικής κλασμάτωσης

Η κυτταρική κλασμάτωση βασίστηκε στο πρωτόκολλο που περιγράφεται από το Rideout και τους συνεργάτες του (Rideout et al., 2003), με μερικές τροποποιήσεις, που αφορούν, κυρίως, στα στάδια της αρχικής ομογενοποίησης. Ακολουθώντας το συγκεκριμένο πρωτόκολλο προκύπτουν τέσσερα κλάσματα, το πρώτο είναι εμπλουτισμένο σε πυρήνες (P1), το δεύτερο σε μιτοχόνδρια (P2), το τρίτο σε μικροσώματα (ενδοσώματα, μεμβράνες του Ε.Δ. και του Golgi, P3) και το τελευταίο κλάσμα είναι το καθαρό κυτοσόλιο (P4, Sup).

Αναλυτικά, μετά την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από το τρυβλίο καλλιέργειας και την έκπλυση με PBS, τα κύτταρα συλλέγονται με ρυθμιστικό

διάλυμα ομογενοποίησης [250 mM Sucrose, 10 mM Sodium HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ και μείγμα αναστολέων πρωτεασών (εκχύλισμα παγκρέατος, προνάση, θερμολυσίνη, χυμοθριψίνη και παπαΐνη, Roche)]. Αρχικά, τα κύτταρα λύνονται, με 4 κύκλους ακαριαίας ψύξης και τήξης (snap freeze-thaw), με διαδοχική εμφύσηση σε δοχείο που περιέχει ξηρό πάγο και μεθανόλη και κατόπιν, σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C. Στη συνέχεια, το κυτταρικό διάλυμα ομογενοποιείται, καθώς περνά 10 φορές μέσα από σύριγγα με διατομής 26-gauge. Τέλος, ακολουθεί ομογενοποίηση στον ομογενοποιητή Teflon (3 κύκλοι, από 15 bounces/κύκλο).

Οι πυρήνες και τα άθραυστα κύτταρα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση στα 2000 x g, στους 4°C, για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και φυγοκεντρείται στα 9000 x g, στους 4°C, για 10 λεπτά. Το ίζημα, που είναι εμπλουτισμένο σε μιτοχόνδρια, εκπλένεται σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, το οποίο περιέχει αναστολείς πρωτεασών (15000 x g, 4°C, για 5 λεπτά/ έκπλυση) και λύνεται σε RIPA παρουσία αναστολέων πρωτεασών. Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται στα 100000 x g, 4°C, για 3 ώρες. Το ίζημα είναι εμπλουτισμένο σε ενδοσώματα, ενώ το υπερκείμενο αποτελεί το καθαρό κυτοσόλιο. Ακολουθεί έκπλυση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, που περιέχει και αναστολείς πρωτεασών (15000 x g, 4°C, για 5 λεπτά/ έκπλυση). Το ίζημα λύνεται σε RIPA παρουσία αναστολέων πρωτεασών.

15. Ποσοτικός προσδιορισμός

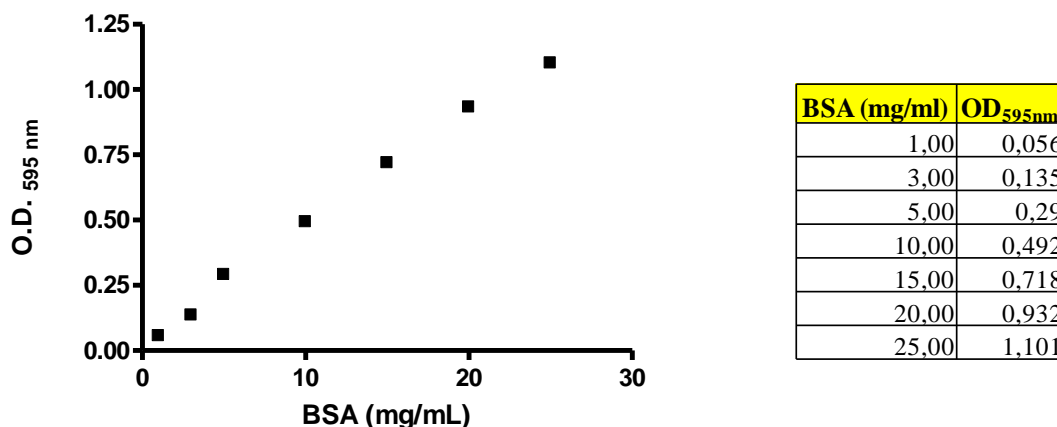
15.1. Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων με φωτομέτρηση

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) να απορροφούν μέγιστα στα 260 nm. Προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων σε κάθε δείγμα, καταγράφεται η οπτική του πυκνότητα στα 260 nm και στα 280 nm χρησιμοποιώντας κυψελίδα χαλαζία. Διάλυμα DNA ή RNA με συγκέντρωση 50 µg/ml αντιστοιχεί σε οπτική πυκνότητα (O.D.₂₆₀) ίση με 1 (Sambrook et al., 1989). Με αυτήν την παραδοχή μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα του DNA ή του RNA που βρίσκεται σε κάθε δείγμα. Η καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων υποδηλώνεται από το λόγο O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀, ενώ το κριτήριο για την καθαρότητα είναι ο λόγος αυτός να είναι μεγαλύτερος του 1.8.

15.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε ένα κυτταρικό εκχύλισμα, χρησιμοποιείται η φωτομετρική μέθοδος Bradford (Bradford, 1976). Η συγκεκριμένη μέθοδος στηρίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να δεσμεύεται μη αντιστρεπτά στις πρωτεΐνες, σε όξινο περιβάλλον, μεταβάλλοντας το χρώμα της. Η ελεύθερη χρωστική έχει μέγιστο απορρόφησης στα 465nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής στα 595nm. Σε σύγκριση με άλλες αντίστοιχες μεθόδους (όπως η Lowry, η Biuret ή η μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm) (Lowry et al., 1951), η Bradford πλεονεκτεί ως προς την ειδικότητά της για τις πρωτεΐνες, διότι επηρεάζεται λιγότερο από κοινά αντιδραστήρια και μη πρωτεϊνικά συστατικά, που πιθανώς περιέχονται στα δείγματα.

Απαραίτητη είναι η δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η οποία προκύπτει από τη μέτρηση της O.D. γνωστών συγκεντρώσεων προτύπων διαλυμάτων αλβουμίνης από ορό βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) σε απιονισμένο νερό (εικόνα 32). Συγκρίνοντας την O.D. του δείγματος, μετά από κατάλληλη αραιώσή του (100 φορές), με την O.D. των προτύπων, προκύπτει η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε αυτό. Αναλυτικότερα, γνωστές ποσότητες της πρωτεΐνης BSA (2μg, 4μg, 8μg, 12μg, 16μg, και 20μg), καθώς και τα αραιωμένα υπό εξέταση δείγματα, αντιδρούν με το αντιδραστήριο Bradford (αραιωμένο 1:4 (v/v) με απιονισμένο H₂O) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μετράται η O.D. στα 595nm. Η αραιώση των δειγμάτων θα πρέπει να είναι κατάλληλη, έτσι ώστε η οπτική τους πυκνότητα να βρίσκεται εντός του εύρους των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Επειδή οι ακριβείς τιμές της οπτικής πυκνότητας επηρεάζονται από το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την παρασκευή της χρωστικής μέχρι τη χρήση της, η πρότυπη καμπύλη πρέπει να κατασκευάζεται σε κάθε μέτρηση.



Εικόνα 32: Ενδεικτικές τιμές απορρόφησης O.D.(595nm) γνωστών συγκεντρώσεων διαλύματος BSA και πρότυπη καμπύλη Bradford.

16. Ηλεκτροφόρηση

16.1. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο διαχωρισμός, η ταυτοποίηση, ακόμη και ο καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων, γίνεται συνήθως με την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Καθώς τα μόρια του DNA ή του RNA είναι αρνητικά φορτισμένα, η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνησή τους προς την άνοδο. Η ηλεκτροφόρηση του DNA γίνεται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (Yue et al., 1999) σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης στα 70V, για 4-5 ώρες. 1.2 gr αγαρόζης διαλύονται σε 120 ml διαλύματος TBE [89mM Tris/HCl pH 8.0, 89 mM Βορικό οξύ, 2 mM EDTA], ώστε να προκύψει πήκτωμα με συγκέντρωση 1% (w/v) σε αγαρόζη. Η ηλεκτροφόρηση του RNA γίνεται σε ένα πήκτωμα αγαρόζης [2%, (w/v)], όπου 0.6 gr αγαρόζης διαλύονται σε 30 ml διαλύματος TAE (Tris/acetic acid/EDTA) το οποίο περιέχει: 4.84 gr Tris, 1.142 ml οξικού οξέος, 2 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0. Το διάλυμα της αγαρόζης και στις δυο περιπτώσεις θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Όταν η θερμοκρασία της υγρής αγαρόζης φτάσει στους 50-60°C, τοποθετείται στην ειδική υποδοχή της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Στη συσκευή έχει τοποθετηθεί προηγουμένως ειδικό κτενάκι ώστε κατά την πήξη του πηκτώματος να δημιουργηθούν τα φρεάτια όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Όταν ολοκληρωθεί η πήξη, το πήκτωμα μεταφέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία τοποθετείται διάλυμα TBE (DNA) ή TAE (RNA), έτσι ώστε να καλυφθεί ολόκληρο το πήκτωμα και αφαιρείται το χτενάκι. Σε κάθε φρεάτιο τοποθετείται ίση ποσότητα δείγματος DNA ή RNA (5 µg για κάθε δείγμα). Μετά την προσθήκη διαλύματος

φόρτωσης [0.25% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης και 30% (v/v) γλυκερόλη], ακολουθεί ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή τάση 70V. Μετά τη λήξη της ηλεκτροφόρησης, η συσκευή αποσυνδέεται και το πήκτωμα βάφεται για 15-20 λεπτά σε H₂O που περιέχει 0.5 µg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Στη συνέχεια, το πήκτωμα παρατηρείται κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφίζεται.

16.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών που περιέχονται στα διάφορα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης, που βασίζεται στο ότι οι πρωτεΐνες σε διαφορετικό pH από το ισοηλεκτρικό τους σημείο, μετακινούνται υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Ο ρυθμός με τον οποίο κινούνται εξαρτάται από το λόγο του φορτίου το οποίο φέρουν προς τη μάζα τους και μάλιστα, όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος αυτός τόσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα μετακίνησης. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη ηλεκτροφόρησης με συγκεκριμένα πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το αλκαλικό, ασυνεχές σύστημα SDS-ηλεκτροφόρησης, σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, όπως περιγράφεται από τον Laemmli (Laemmli, 1970). Στα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν έχει προστεθεί το διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων (sample buffer), το οποίο όπως ήδη αναφέρθηκε περιέχει: i) μερκαπτοαιθανόλη, η οποία δημιουργεί αποδιατακτικές συνθήκες (αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών), ii) SDS, το οποίο προσδίδει αρνητικό φορτίο σε όλες τις πρωτεΐνες, iii) γλυκερόλη, η οποία βοηθάει στην τοποθέτηση του δείγματος στην πηκτή και iv) κυανού της βρωμοφαινόλης, το οποίο επίσης βοηθάει στην τοποθέτηση του δείγματος στην πηκτή, αλλά και στην παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Το αποτέλεσμα είναι οι πρωτεΐνες των δειγμάτων να αποκτούν τυχαία διαμόρφωση (αποδιατάσσονται) και αρνητικό φορτίο, οπότε ο διαχωρισμός τους πραγματοποιείται αποκλειστικά με βάση το μοριακό τους βάρος, δηλαδή πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους κινούνται ταχύτερα κατά μήκος της πηκτής σε σχέση με πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους (Reynolds and Tanford, 1970; Weber and Osborn, 1969).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, όπου το πήκτωμα σχηματίζεται ανάμεσα σε δυο κάθετες πλάκες (επίπεδη πηκτή, slab

gel). Η πηκτή σχηματίζεται μετά από πολυμερισμό των μονομερών του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), που συνδέονται μεταξύ τους με μόρια N,N-μεθυλενοδισακρυλαμιδίου (ή bis ακρυλαμίδιο, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται παρουσία υπερθειικού αμμωνίου (APS) και N,N,N',N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TEMED). Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου και του bis ακρυλαμιδίου. Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών των δειγμάτων, χρησιμοποιείται πηκτή (separating gel) με συγκέντρωση ακρυλαμίδης από 10% (w/v) έως 15% (w/v), ανάλογα με τη μοριακή μάζα της εξεταζόμενης πρωτεΐνης. Πριν την είσοδό τους στην πηκτή διαχωρισμού, οι πρωτεΐνες «διασχίζουν» την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel), η οποία έχει διαφορετική συγκέντρωση ακρυλαμίδης [5% (w/v)] και διαφορετικό pH, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη και ομοιόμορφη είσοδο των πρωτεϊνών στην πηκτή διαχωρισμού.

Παράλληλα με τα δείγματα, ηλεκτροφορείται και μίγμα πρωτεϊνών γνωστής μοριακής μάζας (protein markers), που χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης και για την καλύτερη αναγνώριση μιας πρωτεΐνης άγνωστης μοριακής μάζας. Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται παρακάτω. Οι γυάλινες πλάκες καθαρίζονται με μεθανόλη και τοποθετούνται σε κατάλληλη συσκευή στήριξης. Στη συνέχεια το διάλυμα που θα σχηματίσει την πηκτή διαχωρισμού τοποθετείται ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες. Η σύστασή του είναι: 375 mM Tris/HCl pH 8.8, 10% έως 15% (w/v) ακρυλαμίδιο, 0.275% έως 0.4125% (w/v) bis ακρυλαμίδιο, 0.1% (w/v) SDS, 0.15% (w/v) APS και 0.07% (v/v) TEMED. Πριν πολυμεριστεί, προστίθεται στην κορυφή του μια στοιβάδα απιονισμένο νερό, ώστε να ευθυγραμμιστεί η επιφάνειά του. Μετά τον πολυμερισμό, αφαιρείται το επιπλέον νερό από την επιφάνεια του πηκτώματος και προστίθεται το διάλυμα του πηκτώματος επιστοίβαξης, το οποίο περιέχει: 125 mM Tris/HCl pH 6.8, 5% (w/v) ακρυλαμίδιο, 0.165% (w/v) bis ακρυλαμίδιο, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS και 0.07% (v/v) TEMED. Παράλληλα, τοποθετείται ειδική «χτένα» για το σχηματισμό των θέσεων που θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Οι πλάκες με το πηκτώμα τοποθετούνται στη συνέχεια στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης, η οποία γεμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (running buffer): 25 mM Tris-base, 192 mM Γλυκίνη, 0.1% (w/v) SDS. Κατόπιν, τα δείγματα βράζονται στους 100°C για 3 λεπτά, αναδεύονται και φορτώνονται με τη βοήθεια μικροσύριγγας και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 180 V. Η πορεία της ηλεκτροφόρησης

παρακολουθείται με τη βοήθεια της χρωστικής που περιέχεται στο διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων και τερματίζεται όταν η χρωστική φτάσει στο τέλος του πηκτώματος.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου που περιγράφηκε παραπάνω έχει το μειονέκτημα ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία πρωτεϊνών περιορισμένου εύρους μοριακών βαρών, το οποίο καθορίζεται από την αρχική συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου. Για παράδειγμα, ένα πήκτωμα ακρυλαμιδίου 12% μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πρωτεϊνών περίπου 10-100 kDa. Προκειμένου, να αναλυθούν πρωτεΐνες με μεγαλύτερες διαφορές ως προς το μοριακό τους βάρος, απαιτείται η χρήση πηκτώματος κλίσης, στο οποίο είναι δυνατή η ανάλυση πρωτεϊνών ευρύτερου φάσματος μοριακών βαρών. Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, σε πήκτωμα κλίσης ακρυλαμιδίου/bis- ακρυλαμιδίου 4-12% (w/v) στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε προκατασκευασμένο πήκτωμα 4-12% (w/v) (Invitrogen). Η επεξεργασία των πρωτεϊνών έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω, με τη διαφορά ότι, οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα MES (Invitrogen).

16.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα βορικού οξέος-πολυακρυλαμιδίου (Boric acid-PAGE)

Υπάρχουν περιπτώσεις, στις οποίες είναι προτιμητέες οι μη αποδιατακτικές συνθήκες, απουσία αποδιατακτικών παραγόντων, (λ.χ. β-μερκαπτοαιθανόλη) και απορρυπαντικών, (π.χ SDS, Triton-X) (Emmanouilidou et al., 2010b). Σε αυτές τις περιπτώσεις το ηλεκτροφορητικό πρότυπο εξαρτάται και από τη διαμόρφωση των πρωτεϊνών, πέραν του μοριακού τους βάρους.

Για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών των δειγμάτων, χρησιμοποιείται μόνο πηκτή (separating gel) με συγκέντρωση ακρυλαμιδίου από 4% (w/v) έως 10% (w/v), ανάλογα με τη μοριακή μάζα της εξεταζόμενης πρωτεΐνης, και όχι πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel). Όταν η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος είναι η α-συνουκλεΐνη προτιμάται συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 8% (w/v). Η σύσταση του το διαλύματος που θα σχηματίσει την πηκτή διαχωρισμού είναι: 90 mM Tris-HCl (pH 8.8), 80 mM βορικό οξύ, 80 μM EDTA, 8% (w/v) ακρυλαμίδιο, 0.275% έως 0.4125% (w/v) bis ακρυλαμίδιο, 0.15% (w/v) APS και 0.07% (v/v) TEMED. Η διαδικασία ηλεκτροφόρησης που ακολουθείται, είναι η ίδια με την περίπτωση των

αποδιατακτικών συνθηκών. Εξαιρείται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (running buffer), το οποίο είναι διαφορετικής σύστασης: 89 mM Tris-base, 89 mM Βορικό οξύ, 2 mM EDTA, με pH 7,6. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 50 V, στους 4 °C.

17. Υγρή ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες μετά τον διαχωρισμό τους στο πήκτωμα της ακρυλαμίδης μεταφέρονται ηλεκτροφορητικά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. (Burnette, 1981; Towbin et al., 1979). Η μέθοδος βασίζεται στο ότι οι πρωτεΐνες, που είναι αρνητικά φορτισμένες, λόγω του SDS, κινούνται από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο της συσκευής.

Μεταξύ των διαθέσιμων μεθόδων μεταφοράς, εκείνη που επιλέχθηκε στα συγκεκριμένα πειράματα, ήταν η υγρή μεταφορά. Ειδικότερα, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα διαχωρισμού, 2 φύλλα Whatman, 2 απορροφητικά υλικά και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης εξισορροπούνται για τουλάχιστον 15 λεπτά στο διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer), το οποίο περιέχει: 20 mM Tris-HCl pH 8.3, 192mM γλυκίνη και 20% (v/v) μεθανόλη. Στη συνέχεια, τοποθετούνται από το θετικό πόλο της συσκευής προς τον αρνητικό με την εξής σειρά: 1 απορροφητικό υλικό, 1 φύλλο Whatman, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα ακρυλαμίδης, άλλο 1 φύλλο Whatman και, τέλος, το δεύτερο απορροφητικό υλικό. Η τοποθέτηση γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται η παγίδευση φυσαλίδων αέρα μεταξύ των υλικών. Στη συσκευή τοποθετείται, επιπλέον, το διάλυμα μεταφοράς και ένα δοχείο με πάγο, έτσι ώστε να αποτραπεί η μεγάλη αύξηση της θερμοκρασίας. Η μεταφορά επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής έντασης και γίνεται σε ειδική συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Συνολικά για την συσκευή που χρησιμοποιήθηκε, εφαρμόζεται ρεύμα έντασης 400 mA και η μεταφορά ολοκληρώνεται σε 2 ώρες. Η νιτροκυτταρίνη με τις αποτυπωμένες πρωτεΐνες διατηρείται στους 4°C σε διάλυμα για μια περίπου εβδομάδα PBS.

18. Ανοσοδοκιμασία κατά Western (Western Blot, WB)

Με τη μέθοδο της ανοσοδοκιμασίας κατά Western, μπορεί να ανιχνευθεί μια πρωτεΐνη-στόχος, επάνω στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος (Burnette, 1981). Η παρασκευή ειδικών αντισωμάτων επιτρέπει την ειδική ανίχνευση πρωτεϊνών που διαφέρουν ελάχιστα, όπως στην περίπτωση πρωτεϊνών της ίδιας οικογένειας ή πρωτεϊνών που διαφέρουν μόνο ως προς τη φωσφορυλίωσή τους σε κάποιο αμινοξικό κατάλοιπο.

Αρχικά, ένα ειδικό αντίσωμα έναντι της υπό μελέτη πρωτεΐνης (πρωτογενές αντίσωμα) προσδένεται σε αυτή, πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια ένα δεύτερο αντίσωμα (δευτερογενές), συζευγμένο με ένα ένζυμο, αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης γίνεται μέσω του εντοπισμού του δευτερογενούς αντισώματος, με κατάλληλη μέθοδο, που στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν αυτή της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemilluminescence, ECL). Η μέθοδος βασίζεται στο φαινόμενο της φωταύγειας, δηλαδή στην εκπομπή φωτός από ένα μόριο, καθώς αυτό χάνει ενέργεια κατά τη μετάπτωσή του από μια διεγερμένη κατάσταση στη βασική. Ένα γνωστό σύστημα για την παραγωγή χημειοφωταύγειας είναι αυτό της υπεροξειδάσης της αγριοραφανίδας (Horseradish Peroxidase, HRP), που καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης σε αλκαλικές συνθήκες. Αμέσως μετά την οξείδωσή της, η λουμινόλη βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση και κατόπιν μεταπίπτει στη βασική μέσω της εκπομπής φωτός. Κατά την ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία χημικών ενισχυτών, όπως οι φαινόλες (Whitehead et al., 1979).

Αρχικά, κατά την ανάλυση κατά Western, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης επωάζεται για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, με διάλυμα δέσμευσης μη-ειδικών θέσεων [5% (w/v) σκόνη γάλακτος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, σε διάλυμα έκπλυσης TBS-T (Tris-Buffered Saline-Tween-20), το οποίο περιέχει 20mM Tris/HCl pH 7.6, 137mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20]. Στη συνέχεια, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης επωάζεται για 16-18 ώρες με κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα, αραιωμένο σε διάλυμα 5% (w/v) BSA ή 5% (w/v) σκόνη γάλακτος σε TBS-T, στους 4°C, υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθούν εκπλύσεις της μεμβράνης (3 x 10 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση) και επώαση με δευτερογενές αντίσωμα έναντι του πρωτογενούς, το οποίο είναι αραιωμένο σε διάλυμα 1% (w/v) σκόνης γάλακτος σε TBS-T, για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση. Τα

δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν (anti-rabbit ή anti-mouse, ανάλογα με το πρωτογενές) είναι συζευγμένα με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP). Μετά την έκπλυση της μεμβράνης (3 x 10 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση), εφαρμόζεται η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Η ομάδα των αντιδραστηρίων του ECL (#32106, Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo scientific) περιλαμβάνει δύο αντιδραστήρια. Το Α, το οποίο περιέχει το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂), το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα του ενζύμου-ιχνηθέτη, που είναι συζευγμένο με το δευτερογενές αντίσωμα και το Β, που περιέχει λουμινόλη και ενισχυτή της χημειοφωταύγειας. Τα αντιδραστήρια αναμιγνύονται σε αναλογία 1:1 λίγο πριν τη χρήση και ακολουθεί επώαση της μεμβράνης, για 2 λεπτά, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, η μεμβράνη καλύπτεται με ζελατίνη και εκτίθεται σε κατάλληλο φιλμ μέσα σε ειδική κασέτα. Ο χρόνος έκθεσης εξαρτάται από την υπό μελέτη πρωτεΐνη (την ποσότητά της στο κυτταρικό εκχύλισμα και την ειδικότητα της αλληλεπίδρασής της με το πρωτογενές αντίσωμα). Τέλος, γίνεται εμφάνιση του φιλμ (σε διάλυμα εμφανιστή, developer) και σταθεροποίηση του παραγόμενου σήματος (σε διάλυμα σταθεροποιητή, fixer). Η διαδικασία που ακολουθείται από την επώαση της μεμβράνης στο ECL μέχρι και την εμφάνιση του φιλμ, γίνεται σε ειδικό θάλαμο απουσία φωτός.

19. Αφαίρεση αντισώματος από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας εμφάνισης, υπάρχει η δυνατότητα αφαίρεσης του αντισώματος από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, έτσι ώστε αυτή να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μιας διαφορετικής πρωτεΐνης (stripping) (Kaufmann et al., 1987; Legocki and Verma, 1981). Αυτή η διαδικασία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην περίπτωση, όπου χρειάζεται να ελεγχθεί το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι μιας πρωτεΐνης μάρτυρα (π.χ. ακτίνη) ή όταν η ποσότητα των δειγμάτων δεν επαρκεί για επανάληψη της ηλεκτροφόρησης.

Στην περίπτωση που η νέα πρωτεΐνη ενδιαφέροντος βρίσκεται πολύ κοντά σε εκείνη που είχε ανιχνευθεί προηγουμένως, η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει την επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα αποκόλλησης του αντισώματος (100mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 2% (w/v) SDS, 62,5mM Tris/HCl pH 6,7) στους 55°C, για 1 ώρα, υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης (4 x 5

λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση) με TBS-T και επώαση με το νέο πρωτογενές αντίσωμα, όπως ακριβώς παρουσιάστηκε στην προηγούμενη ενότητα.

Εάν το μοριακό βάρος της νέας πρωτεΐνης ενδιαφέροντος διαφέρει σημαντικά από εκείνο της προηγούμενης, τότε ακολουθείται ένα πιο ήπιο πρωτόκολλο αποκόλλησης. Αρχικά, η μεμβράνη επώαζεται 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό συνεχή ανάδευση, σε διάλυμα αποκόλλησης των αντισωμάτων το οποίο περιέχει: 500 mM NaCl, 200mM Glycine, pH 2.6. Ακολουθεί έκπλυση με TBS-T, για 10 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, επώαση με διάλυμα δέσμευσης και το νέο πρωτογενές αντίσωμα, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (βλ. ανοσοδοκιμασία κατά Western).

20. Χρώση πρωτεϊνών με Ponceau S

Μετά τη μεταφορά, προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της διαδικασίας, αλλά και το ισόποσο φόρτωμα των δειγμάτων, η νιτροκυτταρίνη βάφεται με διάλυμα της χρωστικής Ponceau S. Σε αντίθεση με την χρωστική Coomassie Brilliant Blue, η πρόσδεση της Ponceau S στις πρωτεΐνες είναι αντιστρεπτή, με αποτέλεσμα να μην προκαλεί προβλήματα στην διαδικασία της ανοσοδοκιμασίας που θα ακολουθήσει και, επιπλέον, δεν προκαλεί ισχυρό σήμα «υποβάθρου», εφόσον η μεμβράνη αποχρωματιστεί κατάλληλα (Salinovich and Montelaro, 1986).

Συγκεκριμένα, η νιτροκυτταρίνη επώαζεται με το διάλυμα της χρωστικής [0.4% (w/v) Ponceau S, σε 7.5% (v/v) τριχλωροξικού οξέος (TCA)] για 1 έως 2 λεπτά, υπό ανάδευση. Ο αποχρωματισμός της μεμβράνης γίνεται με διαδοχικές εκπλύσεις με διάλυμα TBS-T. Όταν αποχρωματιστεί επαρκώς το «υπόβαθρο» διακρίνονται με ικανοποιητική ευκρίνεια οι ζώνες των πρωτεϊνών. Με περισσότερες εκπλύσεις, επιτυγχάνεται πλήρης αποχρωματισμός, προκειμένου η μεμβράνη να χρησιμοποιηθεί στα επόμενα στάδια της ανοσοδοκιμασίας.

21. Σήμανση ενδογενών και εκκρινόμενων πρωτεϊνών με ραδιενεργό θείο 35 (³⁵S)

Προκειμένου να υπολογιστεί η διάρκεια της ημιζωής των πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο, δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται για να μειωθούν τα επίπεδα μιας πρωτεΐνης κατά το ήμισυ, χρησιμοποιείται η μέθοδος της σήμανσης/εκδίωξης (pulse/chase), που περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Palade, G.E. και συνεργάτες (Palade, 1955). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την καταγραφή του ρυθμού αποικοδόμησης μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, *in vivo*, σε πραγματικό χρόνο. Για το σκοπό αυτό, οι πρωτεΐνες σημαίνονται με ραδιενεργά αμινοξέα σε μια δεδομένη χρονική στιγμή (pulse) και στη συνέχεια, γίνεται παρακολούθηση των επιπέδων τους σε επόμενες προεπιλεγμένες χρονικές στιγμές (chase). Η ραδιοσήμανση των πρωτεϊνών επιτρέπει μεγάλη διακριτική ικανότητα, γεγονός που αποτελεί το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής. Επιπλέον, δεν απαιτείται χρήση φαρμακολογικών αναστολέων (όπως στην περίπτωση της χρήσης του αναστολέα της σύνθεσης πρωτεϊνών, κυκλοεξιμιδίου, κατά την οποία, αφού διακοπεί η πρωτεϊνοσύνθεση, γίνεται στη συνέχεια παρακολούθηση των επιπέδων των πρωτεϊνών με ανοσοδοκιμασία κατά Western), οπότε αποφεύγονται οι πιθανές επιβλαβείς παρενέργειες και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Για την παρούσα διατριβή, η ραδιοσήμανση επιλέχθηκε να γίνει με [³⁵S] κυστεΐνη και [³⁵S] μεθειονίνη, καθώς το [³⁵S] έχει μεγάλη ημίσεια ζωής (87,1 ημέρες) και είναι αρκούντως ραδιενεργό, ώστε ακόμα και σχετικά χαμηλά ποσοστά επιτυχίας της ενσωμάτωσής του να οδηγήσουν σε μετρήσιμη συγκέντρωση ραδιενεργού υλικού. Έτσι, η ραδιοσήμανση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε σύντομα χρονικά διαστήματα και με μικρές ποσότητες ραδιενεργού υλικού. Επιπλέον, η ενέργεια που εκπέμπεται από το [³⁵S] είναι αρκετά μεγάλη με αποτέλεσμα να μην παρεμποδίζεται από διάφορα υλικά μέσα, όπως το ακρυλαμίδιο, και επομένως η ανάλυση των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει και σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής εκμεταλλευόμενοι τις αρχές της παραπάνω μεθόδου σημάναμε τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες με [³⁵S]. Όλες οι πρωτεΐνες οι οποίες συντίθενται κατά τη διάρκεια του παλμού (pulse), όπως περιγράφηκε και παραπάνω, σημαίνονται με ραδιενεργά αμινοξέα. Ύστερα από την αλλαγή του ραδιοσημασμένου θρεπτικού μέσου, με φρέσκο που περιέχει περίσσεια μη ραδιοσημασμένης κυστεΐνης και μεθειονίνης, όλες οι πρωτεΐνες, που εκκρίνονται στο μέσο και είναι σημασμένες με [³⁵S], έχουν παραχθεί κατά τη διάρκεια του

παλμού. Αυτές οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα πρόσληψης της α-συνουκλείνης από νευρωνικά κύτταρα, όπως θα περιγραφεί και παρακάτω.

Για την εκτέλεση των πειραμάτων pulse/chase, ίσοι αριθμοί κύτταρων SH-SY5Y, που με επαγόμενο τρόπο εκφράζουν είτε τη φυσικού τύπου α-συνουκλείνη είτε τη βακτηριακή πρωτεΐνη β-γαλακτοσιδάση (ως μάρτυρα του πειράματος), καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 150mm παρουσία ή απουσία dox, μέχρι να φτάσουν πυκνότητα 80-85%. Στη συνέχεια, το θρεπτικό μέσο αφαιρείται και τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με θρεπτικό μέσο RPMI το οποίο δεν περιείχε τα υπόλοιπα συστατικά του πλήρους καλλιεργητικού μέσου (ορό, αντιβιοτικά, L-γλουταμίνη). Ακολουθεί χορήγηση του ειδικού θρεπτικού μέσου νηστείας, το οποίο αποτελείται από: α) τροποποιημένο RPMI, από το οποίο έχουν αφαιρεθεί η κυστεΐνη και η μεθειονίνη, β) 1% μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης και γ) 1% L-γλουταμίνη, για 10 λεπτά στους 37 °C. Η πλήρης απουσία των δύο αμινοξέων από το θρεπτικό προκαλεί, εφόσον καταναλωθούν τα αποθέματα των δεξαμενών των κυττάρων, προσωρινή διακοπή της σύνθεσης πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα όταν, στη συνέχεια, γίνει η εκ' νέου προσθήκη ραδιενεργών, να χρησιμοποιηθούν κατ' αποκλειστικότητα για την σύνθεση των νέων πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης και της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Έτσι, μετά την ολοκλήρωση της επώασης στο θρεπτικό μέσο νηστείας, προστίθεται ισομοριακό μείγμα ραδιενεργής [³⁵S] κυστεΐνης και μεθειονίνης (2,5mCi), καθώς και ορός FBS σε τελική 1% συγκέντρωση μέσα στο θρεπτικό μέσο, για 3 ώρες στους 37°C (pulse). Κατόπιν, το ραδιενεργό θρεπτικό μέσο αφαιρείται και τα κύτταρα ξεπλένονται με σκέτο RPMI, ώστε να απομακρυνθούν όλα τα ελεύθερα εναπομείναντα ραδιενεργά αμινοξέα από το τρυβλίο και την επιφάνεια των κυττάρων. Τέλος, έγινε χορηγείται νέο θρεπτικό μέσο με περίσσεια μη ραδιενεργής κυστεΐνης / μεθειονίνης (10 mM) και ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 18 ώρες στους 37°C.

Ύστερα από την επώαση, το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, το οποίο περιέχει όλες τις ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες που έχουν εκκριθεί κατά το διάστημα αυτό, συλλέγεται όπως αναφέρεται στην **ενότητα 5 (βλπ. Μέθοδοι, ενότητα 5)** και αναλύεται μέσω ανοσοαποτυπώματος. Παράλληλα, προκειμένου να αναλυθούν οι ενδογενείς ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες, συλλέγονται τα κύτταρα, μετά από την αποκόλληση τους με τη χρήση τρυψίνης, ώστε να εξαλειφθεί κάθε μη ειδική

μεμβρανική πρόσδεση πρωτεϊνών και ακολουθεί η λύση τους όπως περιγράφηκε στην **ενότητα 14.1**. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα χρησιμοποιούνται για ανοσοκαθίζηση.

22. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών

22.1. Ανοσοκατακρήμνιση από κυτταρικά εκχυλίσματα

Για την ανίχνευση των ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την απομόνωση και συγκέντρωση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης από ένα μείγμα, όπως ένα κυτταρικό εκχύλισμα, που περιέχει ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών πρωτεϊνών. Έτσι, μπορεί να γίνει ακριβής εκτίμηση της ποσότητάς της μέσα στο μείγμα, ακόμα και αν αυτή βρίσκεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση. Για το σκοπό αυτό, γίνεται πρόσδεση των πρωτεϊνών-στόχων στα αντισώματα και στη συνέχεια το σύμπλοκο ακινητοποιείται και κατακρημνίζεται με τη βοήθεια σφαιριδίων αγαρόζης / σεφαρόζης ή μαγνητικών σφαιριδίων. Η κατακρήμνιση μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους: α) άμεσα, κατά τον οποίο γίνεται αρχικά η ακινητοποίηση των αντισωμάτων πάνω στα σφαιρίδια και στη συνέχεια η πρόσδεση της πρωτεΐνης-στόχου, και β) έμμεσα, κατά τον οποίο η πρόσδεση της πρωτεΐνης-στόχου στο αντίσωμα προηγείται της ακινητοποίησης του συμπλόκου. Ο έμμεσος τρόπος κατακρήμνισης πλεονεκτεί έναντι του πρώτου εφόσον έχει αποδειχθεί αποτελεσματικότερος για την κατακρήμνιση πρωτεϊνών που βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση μέσα στο δείγμα.

Για την κατακρήμνιση της ραδιοσημασμένης α-συνουκλείνης, χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα α-synuclein-1 (syn-1) και η κατακρήμνιση του συμπλόκου έγινε με τη χρήση σφαιριδίων αγαρόζης καλυμμένων με πρωτεΐνη G (Calbiochem). Η πρωτεΐνη G έχει προέλθει από βακτήρια του γένους *Streptococcus* και έχει την ικανότητα να προσδένει με μεγάλη συνάφεια τις βαριές αλυσίδες (Fc) των μονοκλωνικών και των πολυκλωνικών ανοσοσφαιρινών. Αρχικά, απομονώνονται τα κυτταρικά εκχυλίσματα (**βλπ. ενότητα 14.1**) και ακολουθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών (**βλπ. ενότητα 15.2**). Σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου erpendorf, προστίθεται το κυτταρικό εκχύλισμα (200 μg), μαζί με το διάλυμα δέσμευσης μη-ειδικών θέσεων (blocking buffer) [6,5% (v/v) ορός κουνελιού], 20 μl σφαιριδίων αγαρόζης καλυμμένων με πρωτεΐνη G σε διάλυμα σε διάλυμα RIPA (25 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium

deoxycholate, 0.1% SDS) σε τελικό όγκο 300 μ l. Το μείγμα επωάζεται για 90 λεπτά στους 4°C, υπό ήπια ανάδευση. Ακολουθεί η απομάκρυνση των σφαιριδίων αγαρόζης μαζί με τις πρωτεΐνες που είχαν προσδεθεί σε αυτά μη ειδικά, με ήπια φυγοκέντρηση στα 2000 \times g, για 10 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται με προσοχή, ώστε να μην αναταραχθεί το ίζημα, σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα, και προστίθεται 1 μ g αντισώματος για 12-14 ώρες στους 4°C, υπό ήπια ανάδευση. Στο διάστημα αυτό συντελείται η πρόσδεση του αντισώματος στην πρωτεΐνη-στόχο. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο ακινητοποιείται με προσθήκη 25 μ l σφαιριδίων αγαρόζης για 3-6 ώρες στους 4°C, υπό ήπια ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε μέτρια ταχύτητα (2000 \times g, 10 λεπτά, 4°C). Το ίζημα που προκύπτει περιέχει τα σφαιρίδια με το ακινητοποιημένο, πλέον, σύμπλοκο αντισώματος-πρωτεΐνης. Το υπερκείμενο αφαιρείται και ίζημα πλένεται 3 φορές με 300 μ l διαλύματος RIPA (2000 \times g, 10 λεπτά, 4°C). Μετά την τελευταία έκπλυση, προστίθεται στο ίζημα Laemmli sample buffer (βλ. ενότητα 16.2), και τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά, στους 85°C, προκειμένου να αποδιαταχθεί το σύμπλοκο αντισώματος-πρωτεΐνης-σφαιριδίων. Οι πρωτεΐνες απομονώνονται από το σύμπλοκο με φυγοκέντρηση στα 15000 \times g, για 15 λεπτά, στους 4°C και αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS-πολύ-ακρυλαμιδίου (βλ. ενότητα 16.2).

22.2. Ανοσοκατακρήμνιση από θρεπτικό μέσο καλλιέργειας

Προκειμένου να απομονωθεί η εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη από το θρεπτικό των κυττάρων, στα οποία είχε επαχθεί η έκφρασή της, εφαρμόζεται η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης. Για το σκοπό αυτό η πρωτεΐνη απομονώνεται από 7ml θρεπτικού μέσου (CM) μέσω ανοσοκαθίζησης με το anti- α -synuclein αντίσωμα (0,5 μ g αντισώματος/ml CM), ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε στην παραπάνω ενότητα (βλ. ενότητα 22.1). Το ανοσοτροποποιημένο CM συλλέγεται και αποστειρώνεται, με τη χρήση των ειδικών φίλτρων με πόρους διαμέτρου 0,2 μ M (Whatman), προτού προστεθεί σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων. Σαν μάρτυρας της ειδικότητας του αντισώματος έναντι της α -συνουκλεΐνης, χρησιμοποιείται το άσχετο αντίσωμα c-myc (mouse monoclonal, Santa Cruz), του ίδιου ισοτύπου με το syn-1. Επιπλέον, προκειμένου να διασφαλισθεί ότι τα παρατηρούμενα αποτελέσματα στη βιωσιμότητα των κυττάρων-δεκτών του ανοσοτροποποιημένου θρεπτικού δεν επηρεάζονται από την παρουσία κάποιου από τα συστατικά της

ανοσοκατακρήμισης, ως μάρτυρας χρησιμοποιείται θρεπτικό το οποίο είναι επεξεργασμένο μόνο με σφαιρίδια αγαρόζης καλυμμένα με πρωτεΐνη G (Protein G Plus-Agarose Suspension, #IP04, EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA USA).

23. Ξήρανση πηκτώματος πολυ-ακρυλαμιδίου

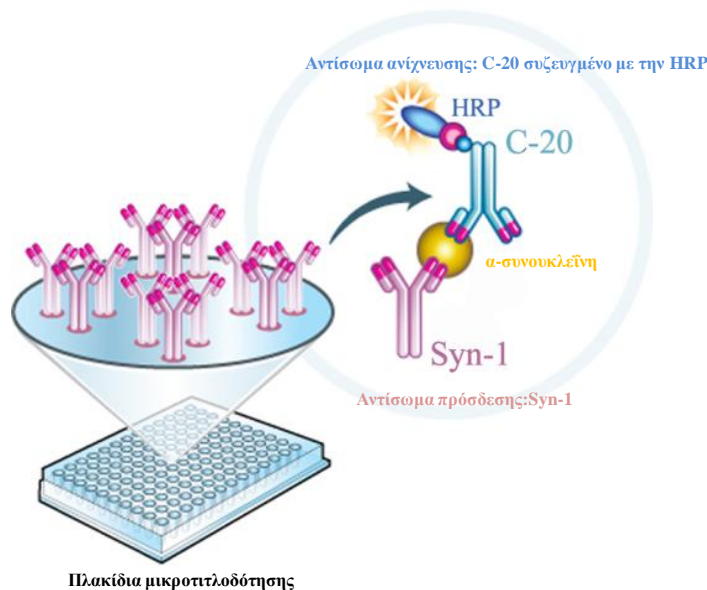
Με την ξήρανση του πηκτώματος είναι δυνατή η μονιμοποίηση των πρωτεϊνών, που βρίσκονται μέσα σε αυτό. Για το σκοπό αυτό, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε διάλυμα μονιμοποίησης (fixation buffer) [40% (v/v) μεθανόλη, 10% (v/v) οξικό οξύ σε H₂O] για 2 ώρες σε ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια, αφού γίνουν 2 σύντομες εκπλύσεις με ddH₂O, μεταφέρεται σε διάλυμα ενίσχυσης του ραδιενεργού σήματος (enhancer buffer) (Amersham) για 30 λεπτά, σε ήπια ανάδευση. Εν τέλει, το πήκτωμα, 2 χαρτιά Whatman N° 3 και μια πλαστική μεμβράνη, που έχουν τις διαστάσεις του πηκτώματος, διαβρέχονται με διάλυμα ξήρανσης (gel drying buffer) [20% (v/v) αιθανόλη, 10% (v/v) γλυκερόλη σε H₂O], για την αποφυγή σχισίματος τους πηκτώματος κατά την ξήρανση, και τοποθετούνται στη συσκευή ξήρανσης, με την εξής διάταξη: 2 χαρτιά Whatman-πήκτωμα-μεμβράνη. Η ξήρανση γίνεται σε κενό αέρος για 2 ώρες σε θερμοκρασία 72°C. Τέλος, το αποξηραμένο πήκτωμα εκτίθεται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας, μέσα σε ειδική κασέτα, για 1-3 ημέρες στους -80°C. Τέλος, γίνεται εμφάνιση του φιλμ και ποσοτικοποίηση των ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών με το πρόγραμμα Gel Analyzer v.1.0 (Biosure).

24. Δοκιμασίες πρόσληψης ραδιοσημασμένων εκκρινόμενων πρωτεϊνών

Τα κατάλληλα θρεπτικά μέσα, που περιλαμβάνουν τις εκκρινόμενες ραδιοσημασμένες με ³⁵S πρωτεΐνες (**βλπ. ενότητα 21**), χορηγούνται σε κύτταρα-δέκτες για 16 ώρες στους 37°C. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα-δέκτες συλλέγονται με τρυψίνη-EDTA, προκειμένου να εξαλειφθούν οι μη ειδικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Τέλος, τα κύτταρα λύνονται, ενώ το πρωτεϊνικό εκχύλισμα ελέγχεται για την παρουσία της ενδοκυτταρωμένης πρωτεΐνης μέσω ανοσοκατακρήμισης με αντίσωμα το syn-1 και αυτοραδιογραφίας.

25. Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης με ELISA τύπου Sandwich

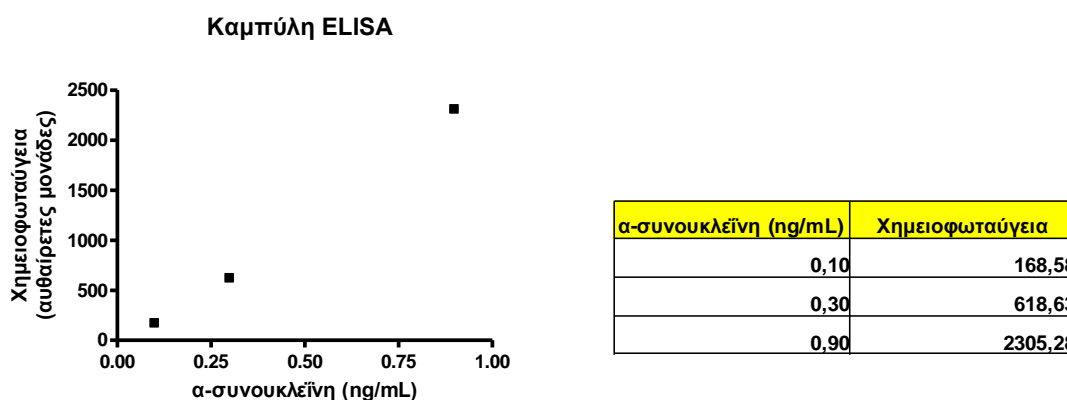
Για τη μέτρηση της ολικής εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης στο θρεπτικό μέσο των καλλιεργούμενων SH-SY5Y κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ELISA τύπου Sandwich, όπως περιγράφηκε από την Εμμανουηλίδου και τους συνεργάτες της (εικόνα 33) (Emmanouilidou et al., 2011). Ως αντίσωμα πρόσδεσης χρησιμοποιείται το μονοκλωνικό αντίσωμα Syn-1, το οποίο αναγνωρίζει έναν συντηρημένο επίτοπο στην α-συνουκλεΐνη ανθρώπου και τρωκτικών (αμινοξέα 91-99), ενώ δεν αναγνωρίζει τις ισομορφές β και γ-συνουκλεΐνης. Ως αντίσωμα ανίχνευσης χρησιμοποιείται το πολυκλωνικό αντίσωμα C-20, ομοιοπολικά συζευγμένο με την πρωτεΐνη υπεροξειδάση της αγριοραφανίδας (horseradish peroxidase, HRP). Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζει μια αλληλουχία, η οποία βρίσκεται στην περιοχή των 20 τελευταίων αμινοξέων του καρβοξυτελικού άκρου της α-συνουκλεΐνης ανθρώπου και τρωκτικών.



Εικόνα 33: Σχηματική απεικόνιση της Sandwich ELISA. Κάθε πλακίδιο μικροτιτλοδότησης επικαλύπτεται με το ειδικό αντίσωμα πρόσδεσης Syn-1. Η α-συνουκλεΐνη που περιέχεται στο θρεπτικό μέσο, δεσμεύεται αρχικά από το Syn-1 και εν συνεχεία από το αντίσωμα ανίχνευσης C-20, που είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με την HRP. Χορήγηση του κατάλληλου υποστρώματος έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή χημειοφωταύγειας.

Κάθε πλακίδιο μικροτιτλοδότησης επικαλύπτεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με 0.5 µg/ml Syn-1 (50 µL ανά πλακίδιο) διαλυμένο σε 100 mM NaHCO₃, pH 9.3. Τα πλακίδια πλένονται τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 0,04% Tween-20). Στη συνέχεια, 50 µL δείγματος ή συγκεκριμένη συγκέντρωση ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης ως πρότυπο [αραιωμένη σε TBS-T/BSA (10 mM Tris-Cl, pH 7.6, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20 και 1% BSA)] προστίθενται στα αντίστοιχα πλακίδια. Τα πλακίδια επωάζονται στους

37°C για 2.5 ώρες, ώστε να γίνει ειδική πρόσδεση της α-συνουκλείνης των δειγμάτων στο αντίσωμα πρόσδεσης. Τα πλακίδια πλένονται τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και ακολούθως, προστίθενται 50 µL HRP-συζευγμένου C-20 αντισώματος (4000 φορές αραιωμένο σε TBS-T/BSA), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις των πλακιδίων με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και προσθήκη 50 µL χημειοφωταγούς υποστρώματος λουμινόλης (ultrasensitive luminol reagent, BioFX Laboratories)-σε κάθε πλακίδιο. Κατόπιν επώασης 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, η χημειοφωταύγεια μετράται στο φωτόμετρο μέτρησης χημειοφωταύγειας Lucy (Anthos Mikrosysteme GmbH) Lucy με λογισμικό ADAP (Anthos Labtech Instruments Version1.6). Σε όλες τις περιπτώσεις, το δείγμα αραιώνεται δύο φορές σε TBS-T. Αντιπροσωπευτική πρότυπη καμπύλη ELISA παρουσιάζεται παρακάτω (εικόνα 34).

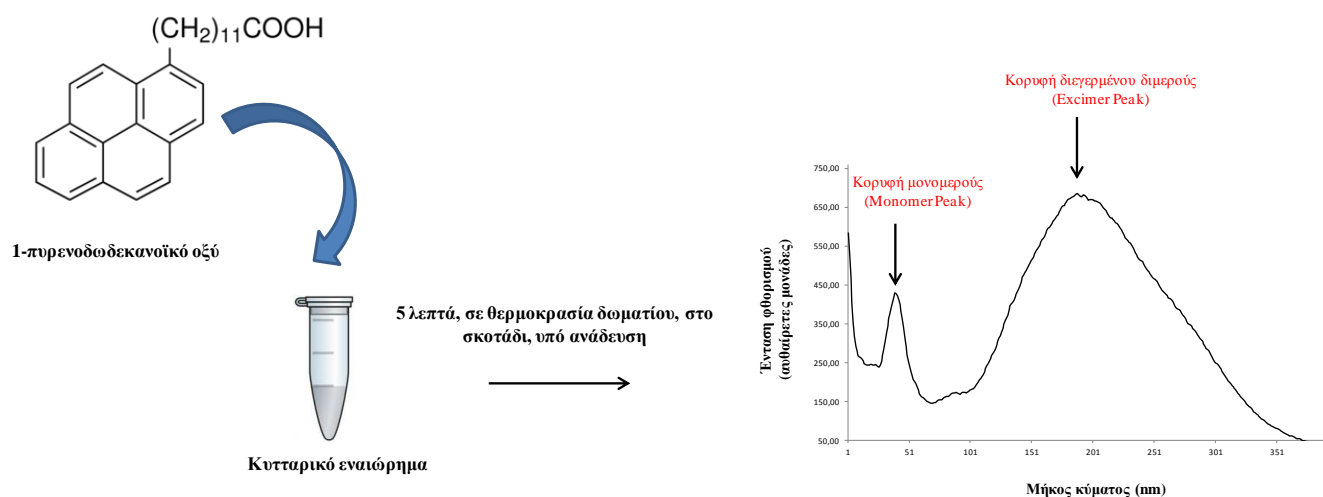


Εικόνα 34: Πρότυπη αντιπροσωπευτική καμπύλη τριών σημείων για τη μέτρηση α-συνουκλείνης με ELISA.

Διαδοχικές αραιώσεις ανθρώπινης ανασυνδυασμένης α-συνουκλείνης μετρήθηκαν εις διπλούν με τη μέθοδο της ELISA. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει την μέση τιμή που μετρήθηκε για κάθε συγκέντρωση. Οι τιμές χημειοφωταύγειας προέρχονται από ένα τυχαίο πείραμα, αλλά είναι χαρακτηριστικές για τις ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν.

26. Μέτρηση της ρευστότητας της πλασματικής μεμβράνης

Προκειμένου να εντοπιστούν αλλαγές στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης, παρουσία της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο μέτρησης της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης με χρώση της μεμβράνης με 1-πυρενοδωδεκανοϊκό οξύ (1-Pyrenedodecanoic acid), όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία (Dafnis et al., 2010; Galla and Luisetti, 1980; Hashimoto et al., 1999), με μικρές τροποποιήσεις (εικόνα 35).



Εικόνα 35: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου.

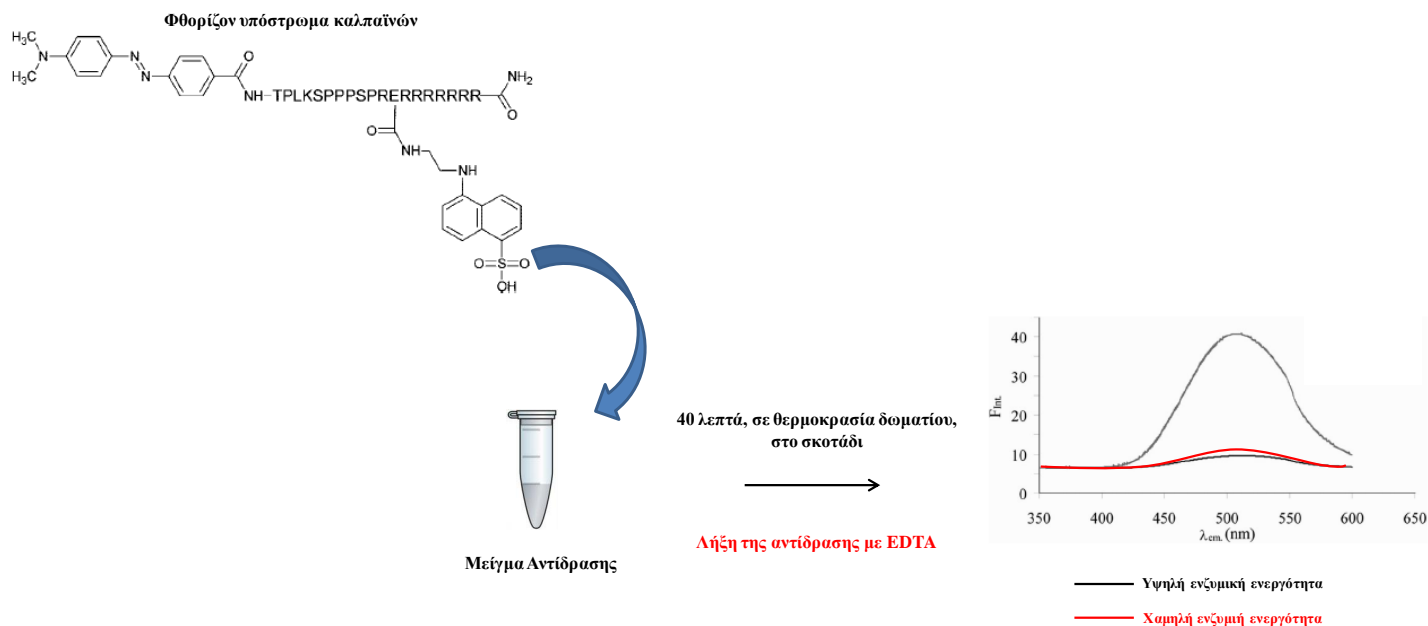
Στο κυτταρικό εναιώρημα προστίθενται 2 μM 1-πυρενοδωδεκανοϊκού οξέος και το μείγμα επωάζεται για 5 λεπτά, στο σκοτάδι, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Τα διεγερμένα διμερή με την ενσωμάτωσή τους στη λιπιδική διπλοστιβάδα, διασπώνται σε μονομερή, εκπέμποντας διαφορετική ένταση φθορισμού.

SH-SY5Y κύτταρα διαφοροποιούνται για 6 ημέρες σε ειδικά πλαστικά τρυβλία καλλιέργειας έξι θέσεων (10^5 κύτταρα/διαμέρισμα). Ύστερα από επώαση 8 ωρών με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο στους 37°C , τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με PBS σε θερμοκρασία δωματίου και με τη χρήση του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος αποκολλώνται για να μεταφερθούν σε ειδική κυψελίδα μέτρησης φθορισμού. Στο κυτταρικό διάλυμα προστίθενται 2 μM 1-πυρενοδωδεκανοϊκού οξέος (Molecular Probes/Invitrogen). Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι, υπό ανάδευση. Τα διεγερμένα διμερή του 1-πυρενοδωδεκανοϊκού οξέος (excimers) διασπώνται σε μονομερή (monomers) στο λιπόφιλο περιβάλλον της πλασματικής μεμβράνης εκπέμποντας χαρακτηριστικό φάσμα φθορισμού, το οποίο δίνει πληροφορίες για το επίπεδο της ρευστότητας της μεμβράνης. Κατόπιν διέγερσης στα 340 nm, μετρήθηκε η ένταση του φθορισμού μεταξύ των 380 και 580 nm, σε ειδικό φθορισμοφασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer LS-55 luminescence spectrometer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). Ο λόγος της μέγιστης έντασης φθορισμού του διεγερμένου διμερούς ως προς το την αντίστοιχη ένταση του μονομερούς του πυρενίου μετράται στα 468 και τα 395 nm, αντίστοιχα. Όσο πιο ρευστή είναι η πλασματική μεμβράνη, τόσο περισσότερο ευνοείται ο σχηματισμός των μονομερών, και επομένως ο λόγος της μέγιστης έντασης φθορισμού του διεγερμένου διμερούς ως προς την αντίστοιχη ένταση του μονομερούς, είναι μικρότερος.

27. Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των καλπαϊνών

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν στο νευροτοξικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από την εκκρινόμενη α-συνουκλείνη, συμμετέχουν οι καλπαΐνες, μετρήθηκε η ενζυμική ενεργότητά τους σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων-δεκτών, με βάση το πρωτόκολλο που περιγράφηκε από τον Banoczi και τους συνεργάτες του (Banoczi et al., 2008), με ελαφρές τροποποιήσεις (εικόνα 36).

SH-SY5Y κύτταρα διαφοροποιούνται για 6 ημέρες σε ειδικά πλαστικά τρυβλία καλλιέργειας 6 θέσεων, (10^5 κύτταρα/διαμέρισμα). Ύστερα από την επώαση με το κατάλληλο θρεπτικό μέσο στους 37°C , ακολουθούν δύο εκπλύσεις των κυττάρων με 4°C PBS, λύση σε ειδικό διάλυμα (10 mM HEPES [pH 7.5], 5 mM DTT, 1% NP-40) (βλπ. ενότητα 14.1) και ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης (βλπ. ενότητα 15.2). Κυτταρικά εκχυλίσματα, ολικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη 2 μg , αραιώνονται σε 25 μl διαλύματος αντίδρασης (activity buffer: 50 mM Tris-HCl [pH 7.6], 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 mM CaCl_2), που περιέχει 10 μM φθορίζοντος υποστρώματος των καλπαϊνών (fluorogenic calpain substrate, Calpain Substrate IV, Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Το μείγμα επώαζεται για 400 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, ενώ η παύση της αντίδρασης πραγματοποιείται με την προσθήκη 500 μl διαλύματος 50 mM EDTA. Η ενζυμική δραστηριότητα των καλπαϊνών μετράται στα 320 nm, κατόπιν διέγερσης στα 480 nm, στο φθορισμοφασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer LS-55 luminescence spectrometer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). Ως μάρτυρας της ειδικότητας της αντίδρασης, προστέθηκαν στο μείγμα της αντίδρασης 200 μM του ειδικού αναστολέα καλπαϊνών A6185 (calpain inhibitor I A6185) (Banoczi et al., 2008).



Εικόνα 36: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου.

Στο μείγμα της αντίδρασης προστίθενται το φθορίζον υπόστρωμα των καλπαϊνών και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά, στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. Η παύση της αντίδρασης επιτυγχάνεται με προσθήκη EDTA. Η ενζυμική δραστηριότητα μετράται σε φθορισμόμετρο.

28. Χρήση λογισμικών προγραμμάτων

Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω λογισμικά προγράμματα:

- Microsoft Office Word 2010, για τη συγγραφή της διατριβής
- EndNote X5, για την εισαγωγή των βιβλιογραφικών αναφορών
- Adobe Photoshop CS5, για την επεξεργασία των εικόνων
- Gel Analyzer 1.0 και ImageJ 1.45s, για την πυκνομετρική ανάλυση των αποτελεσμάτων
- Microsoft Office Excel 2010 και GraphPad 5.0, για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και τη δημιουργία των γραφημάτων
- FL WinLab, για την καταγραφή των κυτταροπλασματικών επιπέδων ασβεστίου
- Image Master Software acquisition-analysis software (PTI, Birmingham, NJ, USA), για την καταγραφή και ανάλυση των αποτελεσμάτων της μέτρησης των επιπέδων του κυτταροπλασματικού $[Ca^{2+}]_i$ με μικροσκοπία φθορισμού.
- ADAP (Anthos Labtech Instruments Version1.6), για τη μέτρηση της χημειοφωταύγειας με τη μέθοδο της Sandwich ELISA.

29. Στατιστική επεξεργασία

Τα αποτελέσματα, που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο που ακολουθεί, είναι αντιπροσωπευτικά των αντίστοιχων πειραμάτων. Όλες οι τιμές συνιστούν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων μετρήσεων \pm τυπική απόκλιση (SD), εκτός αν αναφέρεται κάτι διαφορετικό. Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism 5.0 και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο εκάστοτε δείγμα και το δείγμα-μάρτυρα προσδιορίστηκαν με εφαρμογή του Student's unpaired t test. Η σύγκριση μεταξύ πολλαπλών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε – όπου ήταν απαραίτητη – με τη βοήθεια της μεθόδου ελέγχου διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one way ANOVA), ακολουθούμενη από το Student-Newman-Keuls' test. Σε κάθε περίπτωση, ως στατιστικά σημαντικές κρίθηκαν οι τιμές για τις οποίες ισχύει: $P < 0,05$.

30. Οργανολογία

Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω εργαστηριακός εξοπλισμός:

- Φυγόκεντρος για την επεξεργασία καλλιεργητικού μέσου Biofuge Stratos Heraus (Thermo Scientific)
- Φυγόκεντρος για την απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων Centrifuge 5804R (Eppendorf)
- Υπερφυγόκεντρος για την απομόνωση εξωσωμάτων: Sorvall Discovery 100SE T8100 rotorhead (Thermo Scientific)
- Μετρήσεις χημειοφωταύγειας ELISA: Anthos Mikrosysteme GmbH Lucy και Software ADAP Anthos Labtech Instruments Version 1.6
- Φθορισμοφασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer LS-55 luminescence spectrometer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), για τις φθορισμομετρικές μετρήσεις ελεύθερου κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , τις μετρήσεις ρευστότητας της πλασματικής μεμβράνης και τις μετρήσεις ενζυμικής ενεργότητας των καλπαϊνών.
- Μικροσκόπιο φθορισμού TE 2000U-inverted fluorescence microscope (Nikon, Osaka, Japan) συνδεδεμένου με ψυχομένη CCD κάμερα (PTI-IC200) (Princeton Instruments, USA), για την παρακολούθηση αλλαγών του

ελεύθερου κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , σε πραγματικό χρόνο, σε επίπεδο κυττάρου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

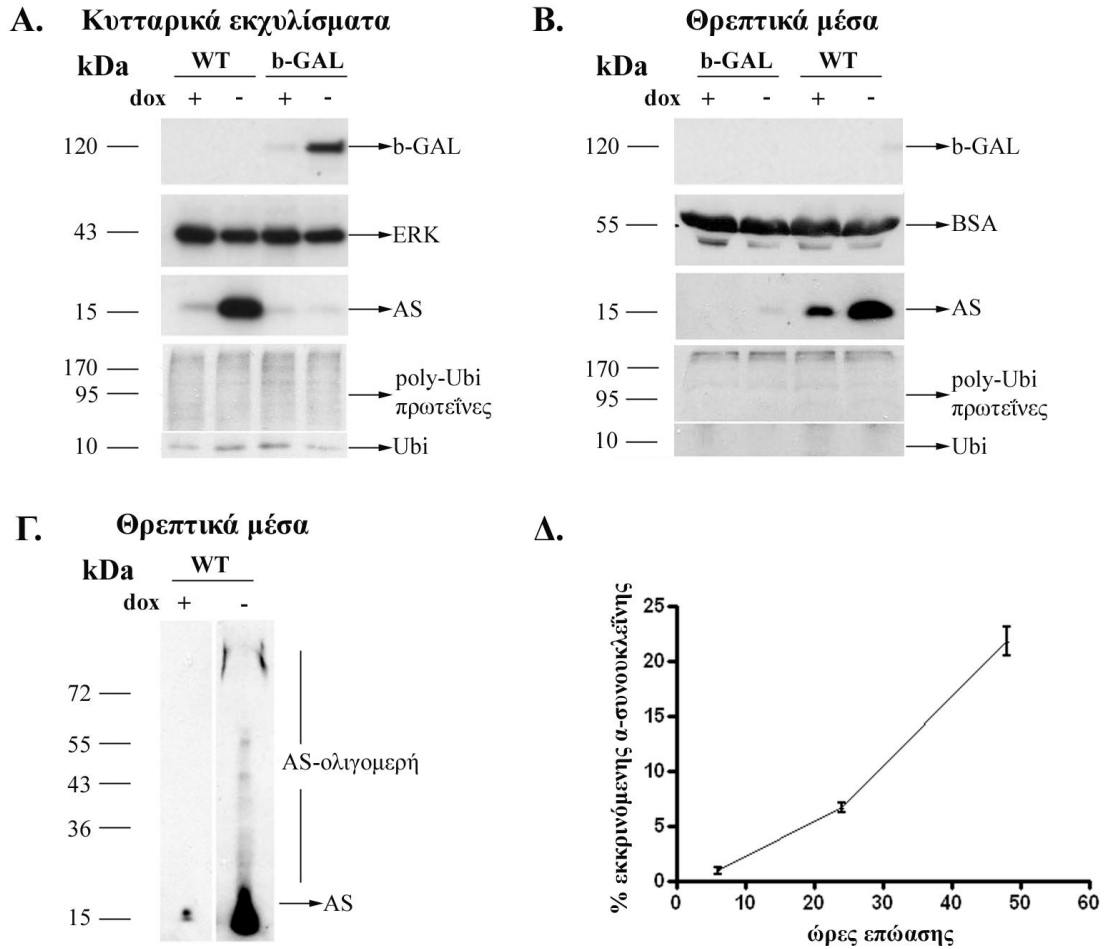
V. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μελέτη της έκκρισης της α-συνουκλεΐνης

Η α-συνουκλεΐνη, όπως αναφέρθηκε (βλπ. **Εισαγωγή, ενότητα 3.3**), στερείται πεπτιδίου στόχευσης για το ενδοπλασματικό δίκτυο (Ε.Δ.). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την κυρίαρχη παρουσία της στο κυτταρόπλασμα, είχε παγιώσει την άποψη ότι η α-συνουκλεΐνη αποτελεί τυπικό παράδειγμα κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης (Vekrellis et al., 2011). Ωστόσο, σύμφωνα με ολοένα αυξανόμενα δεδομένα, η α-συνουκλεΐνη εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο (El-Agnaf et al., 2003; El-Agnaf et al., 2006; Lee et al., 2005a; Sung et al., 2005), επηρεάζοντας την ομοιόσταση των γειτονικών κυττάρων. Η απελευθέρωση της α-συνουκλεΐνης στο περιβάλλον μέσο, ιδιαιτέρως σε παθολογικές καταστάσεις, θα μπορούσε να εξυπηρετήσει πιθανές παρακρινείς δράσεις σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, ενισχύοντας το τοξικό δυναμικό της α-συνουκλεΐνης και προάγοντας την εξάπλωση της νόσου του Parkinson. Κατά συνέπεια, η μελέτη της έκκρισης της α-συνουκλεΐνης, θα μπορούσε να συμβάλει στην κατανόηση της παθογένειας της νόσου, και παράλληλα να δώσει νέες προοπτικές στις μέχρι τώρα υπάρχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

1.1. Η α-συνουκλεΐνη εκκρίνεται φυσιολογικά και κατά τρόπο συνεχόμενο

Η μελέτη της έκκρισης της α-συνουκλεΐνης πραγματοποιήθηκε σε SH-SY5Y κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος ανθρώπου, οι οποίες με επαγόμενο τρόπο, υπερεκφράζουν είτε τη φυσικού τύπου α-συνουκλεΐνη, είτε την πρωτεΐνη μάρτυρα, βακτηριακής προέλευσης, β-γαλακτοσιδάση (Vekrellis et al., 2009; Vogiatzi et al., 2008). Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανότητα έκκρισης της α-συνουκλεΐνης, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες απουσίας του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη (doxycyclin, dox) (βλπ. **Μέθοδοι, ενότητα 5**) για 8 ημέρες. Κατόπιν, το πλήρες θρεπτικό υλικό, αντικαταστάθηκε από θρεπτικό μειωμένης συγκέντρωσης σε ορό, για 48 ώρες. Το κυτταρικό μέσο καλλιέργειας (CM), ύστερα από σειριακές φυγοκεντρήσεις, συμπυκνώθηκε, ενώ τα κύτταρα λύθηκαν, προκειμένου να απομονωθεί το πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Τόσο τα CMs όσο και τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτυπώματος κατά Western. Απουσία



Εικόνα 37: Η α-συνουκλείνη εκκρίνεται φυσιολογικά και με τρόπο συνεχή από τα SH-SY5Y κύτταρα που την υπερεκφράζουν.

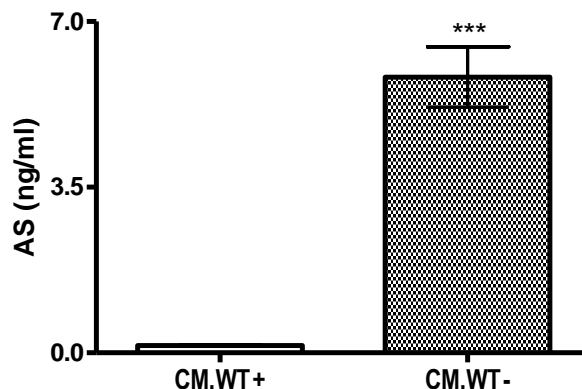
(Α, Β) SH-SY5Y κύτταρα με ενδογενή (WT+dox) ή αυξημένα (WT-dox) επίπεδα α-συνουκλείνης και SH-SY5Y κύτταρα στα οποία είχε επαχθεί η όχι η έκφραση της β-γαλακτοσιδάσης (bGAL-/dox, αντίστοιχα) καλλιιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με περιεκτικότητα σε ορό 2% για τα 48 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα (Α) και τα συμπυκνωμένα θρεπτικά μέσα (Β), αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western με αντισώματα έναντι της α-συνουκλείνης (AS) και της ουβικουιλίνης (Ubi). Τα επίπεδα ERK και BSA χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες ισόποσης φόρτωσης. (Γ) Ανάλυση θρεπτικού μέσου από SH-SY5Y κύτταρα με ενδογενή (CM, WT+) ή αυξημένα (CM, WT-) επίπεδα α-συνουκλείνης με ανοσοαπτύπωμα κατά Western με αντισώματα έναντι της α-συνουκλείνης (C-20). (Δ) Αντιπροσωπευτικό γράφημα του % ποσοστού της εξωκυττάριας α-συνουκλείνης προς την ενδοκυττάρια α-συνουκλείνη συναρτήσει του χρόνου. Κάθε χρονικό σημείο αντιπροσωπεύει το μέσο όρο ± SD 3 ανεξάρτητων μετρήσεων.

δοξυκυκλίνης, τα κύτταρα υπερεκφράζουν είτε την α-συνουκλείνη (WT-dox) είτε τη β-γαλακτοσιδάση (bGAL-dox) (εικόνα 37Α). Αντιθέτως, παρουσία του αντιβιοτικού, το διαγονίδιο καταστέλλεται και έτσι εκφράζονται μόνο τα ενδογενή επίπεδα της α-συνουκλείνης (WT+dox) ή μηδενικά επίπεδα της πρωτεΐνης μάρτυρα (bGAL+dox) (εικόνα 37Α). Στο δε θρεπτικό μέσο των κυττάρων που υπερεκφράζουν την α-συνουκλείνη (CM, WT-), εντοπίζονται με ακρίβεια τόσο μονομερείς (17 kDa), όσο

και διαλυτές ολιγομερείς μορφές της πρωτεΐνης (**εικόνα 37B, Γ**). Οι μορφές της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης συσσωρεύονται με το πέρασμα του χρόνου (**εικόνα 37Δ**) στο θρεπτικό μέσο, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα SH-SY5Y κύτταρα εκκρίνουν την α-συνουκλείνη με τρόπο συνεχή.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η παρουσία της α-συνουκλείνης στον εξωκυττάριο χώρο, δεν είναι αποτέλεσμα της υπερέκφρασής της, καθώς η πρωτεΐνη μάρτυρας β-γαλακτοσιδάση, που υπερεκφράζεται με τον ίδιο τρόπο, δεν ανιχνεύεται στο θρεπτικό μέσο (**εικόνα 37B**). Παράλληλα, η απουσία αυστηρά κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, όπως η ουβικουτίνη (Ubi), καθώς και οι πολύ-ουβικουτινυλιωμένες πρωτεΐνες (poly-Ubi πρωτεΐνες), από το κυτταρικό θρεπτικό μέσο (**εικόνα 37A, B**), πιστοποιεί ότι η έκκριση της α-συνουκλείνης είναι φυσιολογικό γεγονός, και όχι αποτέλεσμα διαρροής της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, εξαιτίας κυτταρικού θανάτου. Το παραπάνω εύρημα επιβεβαιώθηκε περαιτέρω, κατόπιν μέτρησης του ποσοστού κυτταρικού θανάτου πριν τη συλλογή του CM, με τη βοήθεια του LIVE/DEAD Cytotoxicity kit. Το επί τοις εκατό ποσοστό (% ποσοστό) του κυτταρικού θανάτου ήταν μικρότερο 5% είτε στα κύτταρα στα οποία το γονίδιο της α-συνουκλείνης ήταν ενεργοποιημένο (απουσία dox, WT-dox) είτε σε εκείνα στα οποία είχε απενεργοποιηθεί (παρουσία dox, WT+dox) (% κυτταρικού θανάτου = 4.1 ± 0.9 ή 3.8 ± 0.3 για τα WT+ και τα WT- κύτταρα, αντιστοίχως, μέσος όρος \pm SD, $n = 3$), αποκλείοντας το ενδεχόμενο η παρουσία της α-συνουκλείνης στο CM να οφείλεται σε κυτταρική λύση.

Κλινικές μελέτες που αφορούν περιπτώσεις διπλασιασμού ή τριπλασιασμού του γενετικού τόπου της α-συνουκλείνης (Chartier-Harlin et al., 2004; Ibanez et al., 2004; Nishioaka et al., 2006), καθώς και μελέτες μοντέλων υπερέκφρασης της πρωτεΐνης (Vekrellis et al., 2009), έχουν παγιώσει μια γραμμική σχέση μεταξύ των επιπέδων της α-συνουκλείνης και της βαρύτητας της νόσου (gene dosage effect). Σε αυτό το πλαίσιο, μετρήθηκε, με ELISA, η συγκέντρωση της ολικής ελεύθερης α-συνουκλείνης που είχε εκκριθεί στο καλλιεργητικό μέσο (**βλπ. Μέθοδοι, ενότητα 25**). Από την ανάλυση, προέκυψε ότι, υπό φυσιολογικές συνθήκες (CM, WT+), η ποσότητα της ελεύθερης α-συνουκλείνης εκτός κυττάρου είναι 0.16 ± 0.02 ng/ml ($n = 6$), ενώ σε συνθήκες υπερέκφρασης (CM, WT-), η συγκέντρωση φθάνει τα 5.83 ± 0.64 ng/ml ($n = 6$), γεγονός το οποίο σημαίνει 37 φορές επαγωγή της έκκρισης (**εικόνα 38**).



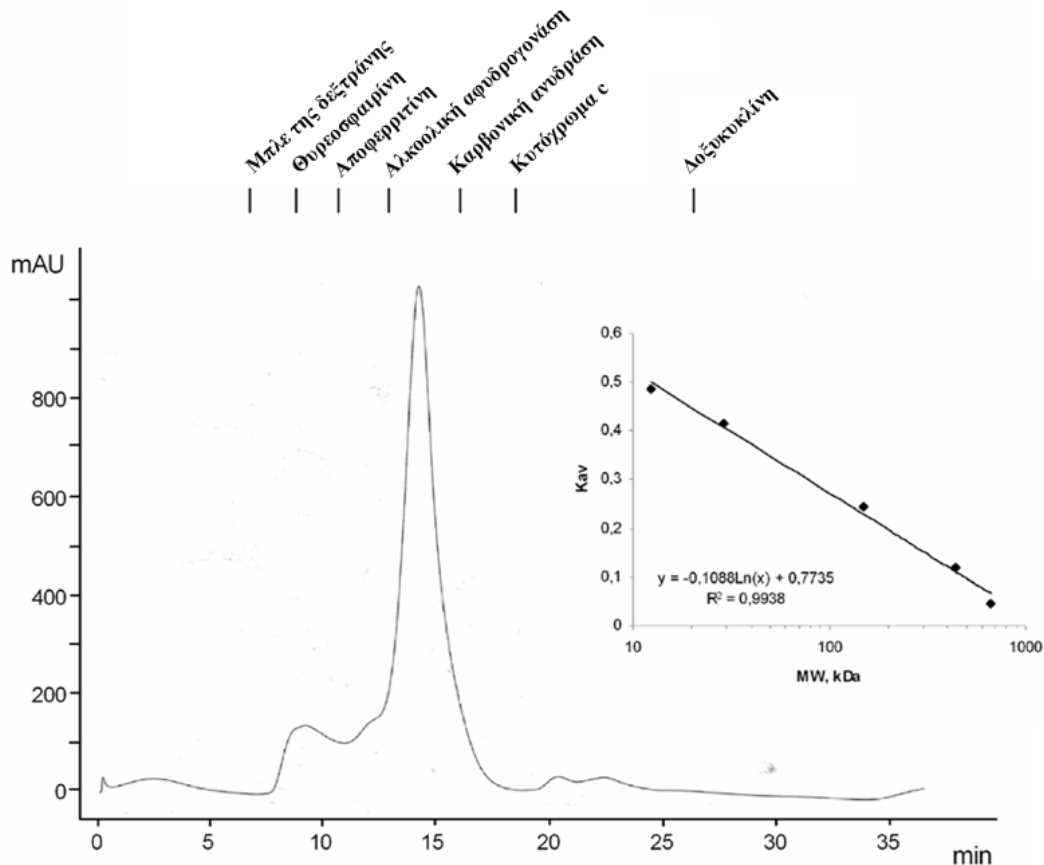
Εικόνα 38: Ποσοτικοποίηση της ολικής α-συνουκλεΐνης που εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο.

Θρεπτικό μέσο από SH-SY5Y κύτταρα με ενδογενή (CM, WT+) ή αυξημένα (CM, WT-) επίπεδα α-συνουκλεΐνης αναλύθηκε με τη μέθοδο της Elisa. Η συγκέντρωση της α-συνουκλεΐνης στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων που την υπερεκφράζουν είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με την αντίστοιχη συγκέντρωση στο θρεπτικό μάρτυρα. ($n = 6$, $p < 0.001$, unpaired t-test) Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο \pm SEM.

1.2. Ταυτοποίηση των εκκρινόμενων μορφών της α-συνουκλεΐνης

Μεγάλος όγκος βιβλιογραφικών αναφορών υποστηρίζει ότι το τοξικό δυναμικό της α-συνουκλεΐνης, πιθανά, να οφείλεται στην παρουσία διαλυτών ολιγομερών μορφών, παρότι μέχρι και σήμερα ο μηχανισμός μέσω του οποίου αυτές δημιουργούνται δεν έχει αποσαφηνιστεί (Tsigelny et al., 2007). Όπως ήδη αναφέρθηκε (βλπ. ενότητα 1.1), υπάρχουν ολιγομερείς μορφές της α-συνουκλεΐνης στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων που την υπερεκφράζουν. Αποτελέσματα που προέκυψαν από ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα κατά Western, χρησιμοποιώντας τόσο το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης C-20, όσο και το μονοκλωνικό Syn-1, επιδεικνύουν τη συνύπαρξη στον εξωκυττάριο χώρο της μονομερούς α-συνουκλεΐνης με σταθερές στο SDS ολιγομερείς μορφές (εικόνα 37Γ).

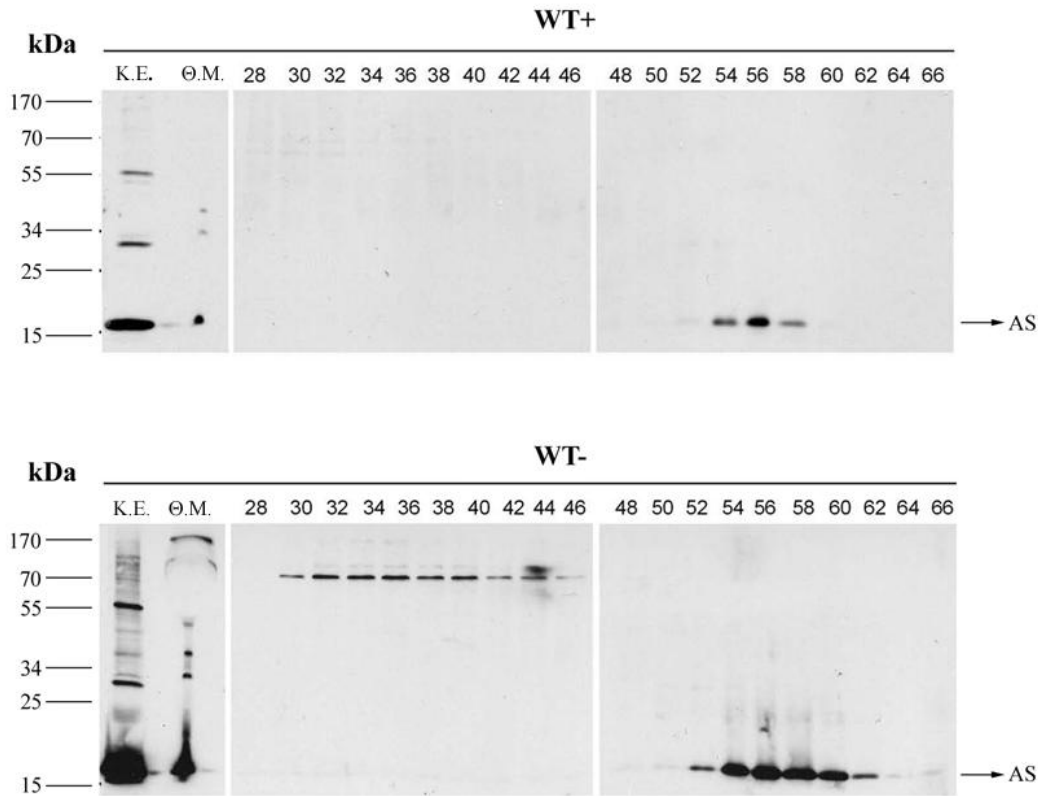
Με σκοπό τον ενδελεχή χαρακτηρισμό των μορφών της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης, το θρεπτικό μέσο από κύτταρα που εκφράζουν τα ενδογενή (CM, WT+) ή αυξημένα (CM, WT-) επίπεδα της α-συνουκλεΐνης, αρχικά συμπυκνώθηκε και στη συνέχεια, κλασματώθηκε μέσω χρωματογραφίας διήθησης πηκτής (SEC) (βλπ. Μέθοδοι, ενότητα 9) (εικόνα 39). Τα κλάσματα που



Εικόνα 39: Χρωματογραφικό πρότυπο των συμπυκνωμένων θρεπτικών μέσων κατόπιν, διήθησης πηκτής.

Θρεπτικό μέσο από SH-SY5Y κύτταρα με ενδογενή (CM, WT+) ή αυξημένα (CM, WT-) επίπεδα α-συνουκλεΐνης συμπυκνώθηκε και αναλύθηκε με χρωματογραφία διήθησης πηκτής. Απεικόνιση αντιπροσωπευτικού χρωματογραφήματος. Ως πρωτεΐνες μάρτυρες για το μοριακό βάρος χρησιμοποιήθηκαν: μπλε της δεξτράνης (2MDa), η θυρεοσφαιρίνη (666 kDa), η αποφερριτίνη (443 kDa), η αλκοολική αφυδρογονάση (150kDa), η καρβονική ανυδράση (29 kDa), το κυτόχρωμα c (12.5 kDa).

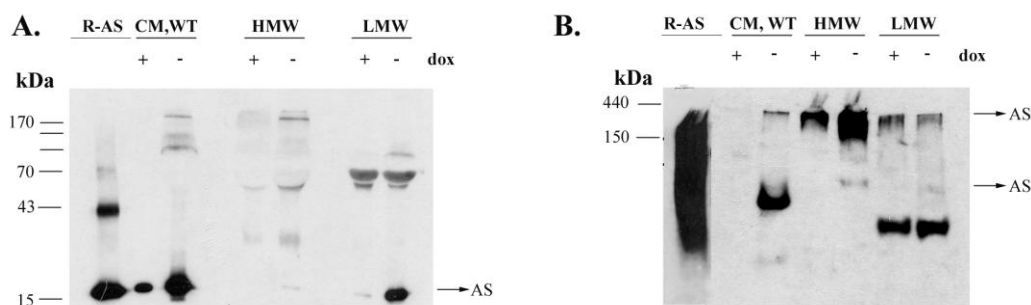
προέκυψαν από το διαχωρισμό, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και εξετάστηκε η παρουσία ύστερα από ανοσοαποτύπωμα κατά Western με το πολυκλωνικό αντίσωμα C-20 (εικόνα 40). Ακολουθώντας τη συγκεκριμένη τεχνική ταυτοποιήθηκαν και απομονώθηκαν επιτυχώς, τόσο υψηλού (high molecular weight, HMW) (>660 kDa), όσο και χαμηλού (low molecular weight species, LMW) (30-17 kDa) μοριακού βάρους μορφές της α-συνουκλεΐνης (εικόνα 40). Παρόμοια δεδομένα προέκυψαν και κατόπιν χρήσης του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της α-συνουκλεΐνης, Syn-1 (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα).



Εικόνα 40: Απομόνωση των εξωκυττάρων μορφών της α -συνουκλείνης με χρωματογραφία διήθησης πηκτής.

Θρεπτικό μέσο από SH-SY5Y κύτταρα με ενδογενή (CM, WT+) ή αυξημένα (CM, WT-) επίπεδα α -συνουκλείνης συμπυκνώθηκε και αναλύθηκε με χρωματογραφία διήθησης πηκτής. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα (Κ.Ε.), τα συμπυκνωμένα θρεπτικά μέσα (Θ.Μ.), τα κλάσματα που διαχωρίστηκαν, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανοσοαποτύπωμα κατά Western, με τη χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της α -συνουκλείνης C-20. Οι μονομερείς μορφές της α -συνουκλείνης συνυπάρχουν με διαλυτές ολιγομερείς στον εξωκυττάριο χώρο.

Η συνύπαρξη των ολιγομερών με τις μονομερείς μορφές της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης, στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων που την υπερεκφράζουν, επιβεβαιώθηκε και ύστερα από ανάλυση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Θρεπτικό υλικό από κύτταρα με ενδογενή (CM, WT+) ή αυξημένα επίπεδα α -συνουκλείνης (CM, WT-), συμπυκνώθηκαν και εν συνεχεία διαχωρίστηκαν μέσω χρωματογραφίας διήθησης πηκτής. Κατόπιν, τα κλάσματα υψηλού (HMW), καθώς και αυτά του χαμηλού μοριακού βάρους (LMW), που περιείχαν την α -συνουκλείνη, ενώθηκαν, ξεχωριστά, σε δύο διαφορετικές δεξαμενές πρωτεϊνών, μια HMW και μια LMW. Τα δύο διαφορετικά πρωτεϊνικά μείγματα συμπυκνώθηκαν με τις εμπορικά διαθέσιμες στήλες (βλ. **Μέθοδοι, ενότητα 9**). Στη συνέχεια το διάλυμα PBS, στο οποίο εκλύονται οι πρωτεΐνες από τη στήλη, αντικαταστάθηκε από 50mM οξικό αμμώνιο pH7.5, μέσω υπερφυγοκέντρησης,



Εικόνα 41: Ανάλυση των εξωκυττάρων μορφών της α-συνουκλεΐνης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Θρεπτικό μέσο από SH-SY5Y κύτταρα με ενδογενή (CM, WT+) ή αυξημένα (CM, WT-) επίπεδα α-συνουκλεΐνης συμπυκνώθηκε και αναλύθηκε με χρωματογραφία διήθησης πηκτής. Τα συμπυκνωμένα θρεπτικά μέσα (CM) και χωριστά, τα κλάσματα χαμηλού και υψηλού μοριακού βάρους αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανοσοαποτύπωμα κατά Western, με τη χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι στις α-συνουκλεΐνης C-20, σε αποδιατακτικές (A) και μη αποδιατακτικές (B) συνθήκες.

ενώ ακολούθησε λιοφιλίωση των δειγμάτων, μέχρι την πλήρη αφυδάτωσή τους (βλπ. **Μέθοδοι, ενότητα 16.3**). Τα δείγματα επανασυστάθηκαν σε 250μl πλήρους θρεπτικού RPMI, το οποίο περιείχε και 2% FBS και αναλύθηκαν μαζί με τα πλήρη συμπυκνωμένα θρεπτικά μέσα σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε αποδιατακτικές (εικόνα 41A) και μη αποδιατακτικές (εικόνα 41B) συνθήκες. Σε μη αποδιατακτικές συνθήκες η μονομερής α-συνουκλεΐνη μετατοπίζεται από τα 17 kDa (εικόνα 41A), περίπου στα 60 kDa, ενώ οι ολιγομερείς μορφές της εντοπίζονται σε σε πολύ υψηλότερα μοριακά βάρη άνω των 150 kDa (εικόνα 41B). Οι μεγάλες αποκλείσεις των μοριακών βαρών μεταξύ των δύο συνθηκών τονίζουν τη δυναμικότητα της δομής της φυσιολογικά εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης, υπό φυσιολογικές συνθήκες.

1.3. Μελέτη του μηχανισμού έκκρισης της α-συνουκλεΐνης

Σε παθολογικές συνθήκες, με βάση ολοένα αυξανόμενα δεδομένα, η εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη είναι δυνατόν να διαμεσολαβήσει τοξικές παρακρινείς δράσεις (Lashuel et al., 2013). Δεδομένου ότι η έκκριση της α-συνουκλεΐνης είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει φυσιολογικά, όπως ήδη αναφέρθηκε (βλπ. **Εισαγωγή, ενότητες 3.4 και 3.4.1**), προκύπτει το ερώτημα πώς μια συνεχής και φυσιολογική διαδικασία καταλήγει να είναι επιζήμια όταν διαταραχθεί η πρωτεόσταση της α-συνουκλεΐνης. Μέρος της απάντησης κρύβεται στη μελέτη των μηχανισμών που

διαμεσολαβούν στη φυσιολογική έκκριση της πρωτεΐνης και ειδικότερα στις μεταβολές αυτών των μηχανισμών κάτω από παθολογικές συνθήκες.

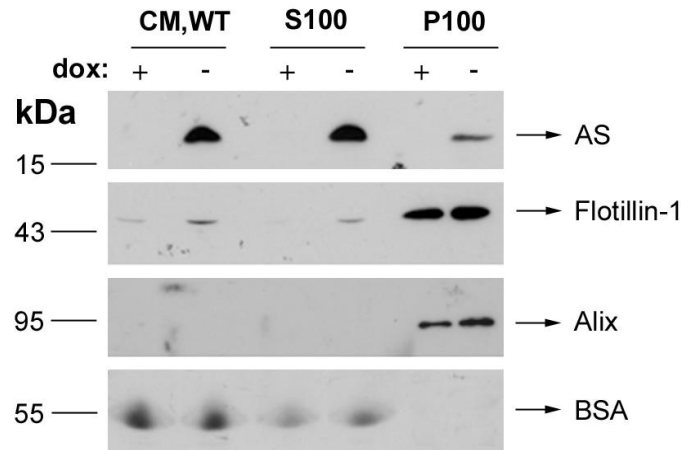
Με βάση πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου μας, η α -συνουκλείνη, που φυσιολογικά εκκρίνεται στο περιγραφόμενο Tet-Off σύστημα των SH-SY5Y κυττάρων, ακολουθεί ένα μη κλασικό μονοπάτι έκκρισης, το οποίο επηρεάζεται από τα ενδοκυττάρια επίπεδα ιόντων Ca^{2+} . Επίσης, σημαντικό εύρημα αποτελεί η συμμετοχή του ενδοκυτταρικού μονοπατιού στην έκκριση της α -συνουκλείνης, καθώς έχει βρεθεί ότι συνθήκες που εμποδίζουν τη μεταφορά από τα ώριμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα, αυξάνουν τα επίπεδα της εξωκυττάριας α -συνουκλείνης (Emmanouilidou et al., 2010a). Τουλάχιστον δύο μη-κλασικοί μηχανισμοί έκκρισης επιστρατεύουν μεμβρανικά κυστίδια προκειμένου να μεταφέρουν και να απελευθερώσουν το πρωτεϊνικό τους φορτίο στον εξωκυττάριο χώρο, η εξωκυττάρωση και η ενδοκυττάρωση (βλπ. **Εισαγωγή, ενότητα 3.1**) (Cooper and Barondes, 1990; Denzer et al., 2000; van Niel et al., 2006). Στην πρώτη περίπτωση μικροκυστίδια αποκόπτονται από την πλασματική μεμβράνη, ενώ στη δεύτερη, πολυκυστιδιακά σωμάτια (multivesicular bodies, MVBs) συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη, απελευθερώνοντας στον εξωκυττάριο χώρο μικρά κυστίδια, τα εξωσώματα (βλπ. **Εισαγωγή, ενότητες 3.1, 3.2**). Επομένως, ένα από τα καίρια ερωτήματα, αφορούν στο ενδεχόμενο η α -συνουκλείνη να εξωκυτταρώνεται μέσω μεμβρανικών κυστιδίων που απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο.

Βιβλιογραφικά, έχει πλέον τεκμηριωθεί, η σπουδαιότητα του ρόλου των εξωσωμάτων στη μετάδοση μη σωστά αναδιπλωμένων παθογόνων πρωτεϊνών, διαμεσολαβώντας τρόπον τινά την εξάπλωση της παθογένειας ασθενειών, όπως η νόσος του Prion (Caughey, 2000). Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες prion συνδέονται με εξωσώματα, τα οποία όταν χορηγηθούν σε ποντίκια, είναι δυνατόν να προκαλέσουν τη νόσο Prion (Vella et al., 2007). Συμπερασματικά, είναι πολύ πιθανό τα εξωσώματα ώντας σε θέση να μεταδώσουν το παθογόνο αίτιο, τόσο σε γειτονικά όσο και σε απομακρυσμένα κύτταρα, να έχουν τη δυναμική να ενισχύσουν την εξάπλωση της νόσου (βλπ. **Εισαγωγή, ενότητα 3.4**).

Προκειμένου να διερευνηθεί η συμμετοχή των εξωσωμάτων στην απελευθέρωση της α -συνουκλείνης, θρεπτικό μέσο από κύτταρα που υπερεκφράζουν την α -συνουκλείνη (CM, WT-) ή κύτταρα μάρτυρες (CM, WT+) συλλέχθηκαν και επεξεργάστηκαν (βλπ. **Μέθοδοι, ενότητα 8**), έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα. Στη συνέχεια, υπέστησαν υπερφυγοκέντρηση στα $100,000 \times$

g, προκειμένου να απομονωθούν τα εξωκυττάρια μεμβρανικά κυστίδια (P100) (Mehul and Hughes, 1997; They et al., 2006; Yuyama et al., 2008). Τόσο το υπερκείμενο, (S100), όσο και το ίζημα (P100) αναλύθηκαν για την παρουσία της α-συνουκλείνης με SDS PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Όπως, φαίνεται στην **εικόνα 42**, η α-συνουκλείνη που εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων την υπερεκφράζουν, εντοπίζεται τόσο στο υπερκείμενο, ως ελεύθερη α-συνουκλείνη, όσο και στο μεμβρανικό κλάσμα, ως συνδεδεμένη με τα κυστίδια. Η πρωτεΐνη του ορού BSA, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισόποσης φόρτωσης του υπερκείμενου.

Η ταυτότητα των μεμβρανικών κυστιδίων με τα οποία συνδέεται η εκκρινόμενη α-συνουκλείνη, αναλύθηκε βιοχημικά, με τη χρήση δυο καλά χαρακτηρισμένων βιοχημικών δεικτών των εξωσωμάτων, της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης Alix, και της πρωτεΐνης flotillin, η οποία βρίσκεται σε αφθονία στις λιπιδικές σχεδίες (Faure et al., 2006; Fevrier et al., 2004; Rajendran et al., 2006; They et al., 2006; Trajkovic et al., 2008). Οι πρωτεΐνες μάρτυρες, Alix και flotillin, ανιχνεύθηκαν στο κλάσμα P100, τόσο των κυττάρων που εκφράζουν τα ενδογενή επίπεδα, όσο και αυτών που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι πρωτεΐνες οι οποίες είναι γνωστό ότι απουσιάζουν από τα εξωσώματα, όπως η 14-3-3β και η cofilin (Simpson et al., 2008), καθώς και ο δείκτης για τα πρώιμα ενδοσώματα, Rab5, και ο υποδοχέας της τρανσφερρίνης, που αποτελεί γενικό δείκτη για την ανακύκλωση των ενδοσωμάτων, απουσίαζαν από τα P100 (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα). Τέλος, με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και φασματοσκοπίας μάζας επαληθεύθηκε η φύση των μικροκυστιδίων και πιστοποιήθηκε η παρουσία των εξωσωμάτων (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα). Συνοψίζοντας, ένα ποσοστό της α-συνουκλείνης εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο, μέσω μικρών μεμβρανικών κυστιδίων, τα οποία φέρουν τα χαρακτηριστικά των εξωσωμάτων. Αυτή η διάκριση υποδηλώνει ότι υπάρχουν δύο διακριτοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η πρωτεΐνη εξέρχεται από το κύτταρο, χωρίς όμως να γνωρίζουμε το ποσοστό που ο καθένας συμμετέχει στην έκκρισή της.

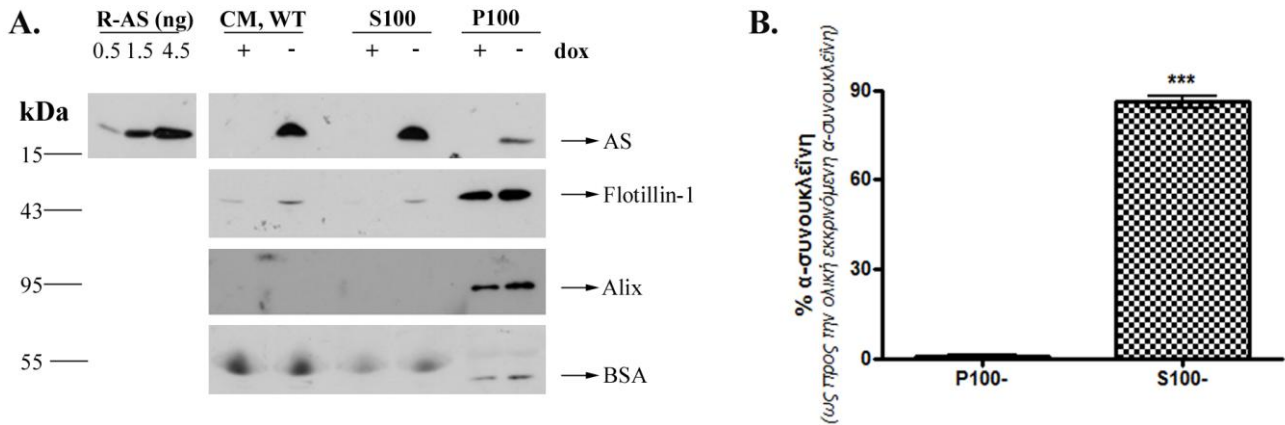


Εικόνα 42: Η α -συνουκλεΐνη εκκρίνεται εν μέρει μέσω εξωσωμάτων.

Θρεπτικό υλικό από κύτταρα μάρτυρες ή κύτταρα που υπερεκφράζουν την α -συνουκλεΐνη κλασματώθηκαν προκειμένου να απομονωθεί το υπερεκείμενο θρεπτικό (S100+, S100-, αντιστοίχως) και ένα εμπλουτισμένο με εξωσώματα ίζημα (P100+/-, αντιστοίχως). Τόσο τα ολικά θρεπτικά, (CM, WT+/-) όσο και τα δύο κλάσματα (S100+/-, και P100+/-) αναλύθηκαν για την παρουσία της α -συνουκλεΐνης με ανοσοαποτύπωμα κατά Western, με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος (C-20). Οι πρωτεΐνες Flotillin-1 και Alix, χρησιμοποιήθηκαν ως μοριακοί δείκτες των εξωσωμάτων, ενώ η BSA, ως μάρτυρας ισόποσης φόρτωσης για τα ολικά θρεπτικά μέσα και τα υπερεκείμενα. Η α -συνουκλεΐνη στον εξωκυττάριο χώρο, βρίσκεται είτε σε ελεύθερη μορφή είτε συνδεδεμένη με τα εξωσώματα.

Η ακριβής διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο οι δύο αυτοί μηχανισμοί επηρεάζονται υπό συνθήκες σχετιζόμενες με τη νόσο του Parkinson έχει μεγάλη βιολογική σημασία. Προς την κατεύθυνση αυτή ποσοτικοποιήθηκαν τα επίπεδα της α -συνουκλεΐνης που εκκρίνονται ύστερα από 48 ώρες, στο ολικό θρεπτικό των κυττάρων που την υπερεκφράζουν (CM, WT-), στο υπερεκείμενο (S100-) και τέλος στα εξωσώματα (P100-), χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα (με καθορισμένη συγκέντρωση) την ανασυνδυασμένη α -συνουκλεΐνη (**εικόνα 43A**). Κανονικοποίηση, ως προς τη συγκέντρωση της ολικής εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης, έδειξε ότι μόνο ένα εξαιρετικά μικρό ποσοστό συνδέεται με εξωσώματα (% α -συνουκλεΐνης συνδεδεμένης με εξωσώματα 0.76 ± 0.26), ενώ το μεγαλύτερο βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή (% ελεύθερης α -συνουκλεΐνης 86.07 ± 2.18) (**εικόνα 43B**). Συνοψίζοντας, θα μπορούσε κανείς να ισχυριστεί ότι τα εξωσώματα συμβάλλουν σε ελάχιστο βαθμό στην έκκριση της πρωτεΐνης εκτός του κυττάρου και επομένως δεν αποτελούν το βασικό μηχανισμό έκκρισης. Είναι πάντως δυνατό να είναι μεγαλύτερη αναλογικά η αρχική ποσότητα της α -συνουκλεΐνης που εκκρίνεται μέσω εξωσωμάτων, και να ακολουθεί διάσπασή των εξωσωμάτων στον εξωκυττάριο χώρο ή κατά την συλλογή του υλικού, με αποτέλεσμα την φαινομενική μείωση της συμμετοχής του μονοπατιού

αυτού στην έκκριση της α-συνουκλεΐνης. Τέλος, η πυκνομέτρηση των συγκεκριμένων πειραμάτων αφορά μόνο τη μονομερή μορφή της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης, χωρίς να λαμβάνονται υπόψη άλλες μορφές της πρωτεΐνης (συσσωματώματα, ολιγομερή). Δεδομένου του ρόλου της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης στην εξάπλωση της παθογένειας της νόσου του Parkinson, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης η εμπλοκή και άλλων μηχανισμών μη-κλασικής έκκρισης.



Εικόνα 43: Η α-συνουκλεΐνη ανιχνεύεται τόσο σε ελεύθερη (S100), όσο και σε συνδεδεμένη με εξωσώματα (P100), μορφή στον εξωκυττάριο χώρο.

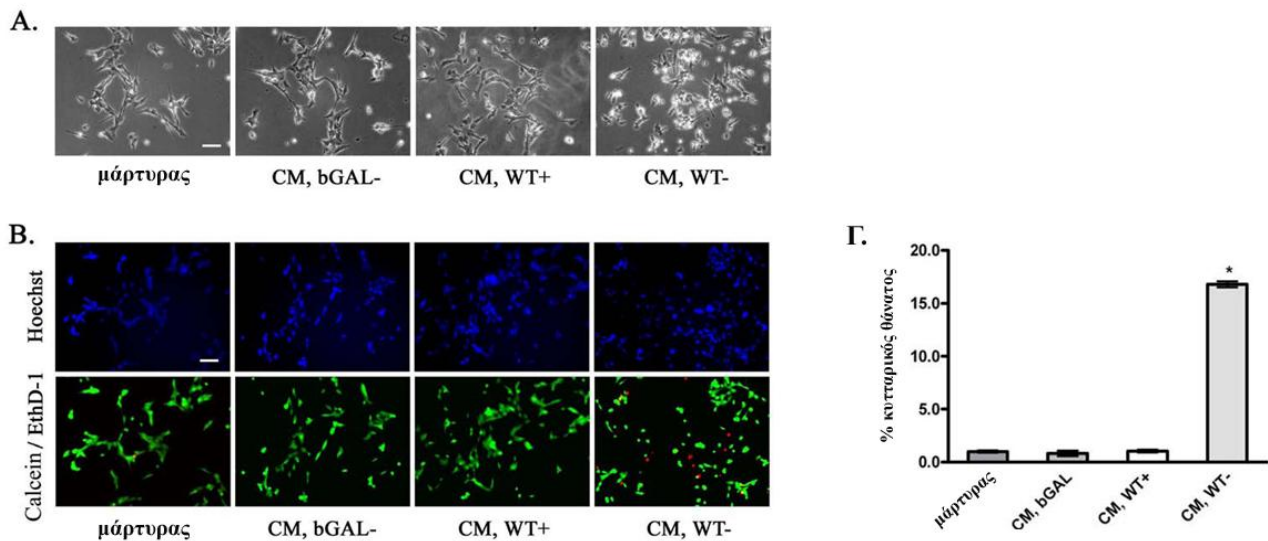
(A) Θρεπτικό μέσο από SH-SY5Y κύτταρα με αυξημένα επίπεδα α-συνουκλεΐνης κλασματώθηκε σε υπερκείμενο (S100-) και σε ίζημα εμπλουτισμένο σε εξωσώματα (P100-). Τόσο το ολικό θρεπτικό μέσο, όσο και τα δυο κλάσματα αναλύθηκαν για την παρουσία της α-συνουκλεΐνης με ανοσοαποτύπωμα κατά Western, ενώ η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε όλες τις περιπτώσεις, υπολογίστηκε με τη χρήση ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης προσδιορισμένης συγκέντρωσης ως μάρτυρα. (B) Στο γράφημα απεικονίζεται το ποσοστό της α-συνουκλεΐνης που βρίσκεται είτε σε ελεύθερη μορφή (S100-) είτε συνδέεται με εξωσώματα (P100-), κατόπιν κανονικοποίησης ως προς τη συγκέντρωση της ολικής εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης. (n = 4, p < 0.001, unpaired t-test) Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± SD.

2. Διερεύνηση του νευροτοξικού δυναμικού της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, η χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης σε υγιή κύτταρα-δέκτες προκαλεί κυτταρικό θάνατο (Ahn et al., 2006; Sung et al., 2001; Zhang et al., 2005). Ωστόσο, μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με το τοξικό δυναμικό της φυσιολογικά εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης.

2.1. Επίδραση της εξωκυττάριας α-συνουκλεΐνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων-δεκτών

Προκειμένου να διερευνηθεί το τοξικό δυναμικό της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης, κύτταρα τα οποία εξέφραζαν τα ενδογενή (WT+dox) ή αυξημένα επίπεδα της εν λόγω πρωτεΐνης (WT-dox), είτε κύτταρα τα οποία υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη μάρτυρα β-γαλακτοσιδάση (bGAL-dox), καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό μέσο περιεκτικότητας 2% σε FBS. Κατόπιν, το αντίστοιχο CM από τα παραπάνω κύτταρα χορηγήθηκε σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y για 24 ώρες. Η χορήγηση CM από τα κύτταρα που εξέφραζαν α-συνουκλεΐνη (CM, WT-) προκάλεσε δραματικές μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα-δέκτες, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές του κυτταρικού εκφυλισμού, όπως π.χ. συρρίκνωση των νευραξόνων και δημιουργία φυσαλίδων στην κυτταρική μεμβράνη (**εικόνα 44A**). Ο

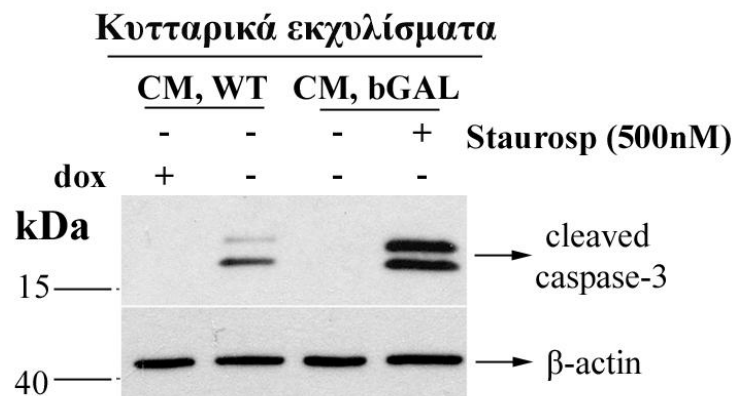


Εικόνα 44: Η εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα.

Θρεπτικό μέσο από κύτταρα που είτε υπερέκφραζαν (CM,WT-) ή όχι (CM,WT+) την α-συνουκλεΐνη, καθώς και κύτταρα που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη β-γαλακτοσιδάση (CM,bGAL) χορηγήθηκαν σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y για 24 ώρες. (A) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες οπτικού μικροσκοπίου των κυττάρων δεκτών. Κλίμακα: 50 μm. (B) Αντιπροσωπευτικές εικόνες φθορισμού, κατόπιν χρώσης των κυττάρων δεκτών με EthD-1 (κόκκινο), Hoechst (μπλέ) και Calcein-AM (πράσινο). Κλίμακα: 50 μm. (Γ) Γράφημα ποσοτικοποίησης του % ποσοστού κυτταρικού θανάτου (% ποσοστού των θετικών για τη χρώση EthD-1 κυττάρων προς τα θετικά για τη χρώση Hoechst). Παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση του κυτταρικού θανάτου, κατόπιν χορήγησης θρεπτικού πλούσιου σε εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη (n = 4, mean ± SD, one way ANOVA test followed by Tukey's test, *p<0.001).

κυτταρικός θάνατος προσδιορίστηκε περίπου στο 17% (% κυτταρικός θάνατος = 16.8 ± 0.6, μέσος όρος ± SD, n = 4) (**εικόνα 44B, Γ**). Τα κύτταρα-δέκτες του CM από

κύτταρα στα οποία η έκφραση του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης δεν είχε επαχθεί (CM, WT+) ή από κύτταρα που εξέφραζαν bGAL (CM, bGAL-), δεν επέδειξαν καμία ανωμαλία, ούτε παρουσίασαν κυτταρικό θάνατο. Το γεγονός αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη συσχέτισης της παρατηρούμενης κυτταροτοξικότητας με την παρουσία της α-συνουκλεΐνης στο CM. Επιπλέον, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων-δεκτών αναλύθηκαν με ανασοσύτρωμα κατά Western για την ενεργοποίηση της κασπάσης 3. Σημειώτέον ότι κατατετμημένη κασπάσης-3 ανιχνεύτηκε μόνο στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων που επώαστηκαν με θρεπτικό πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη (CM, WT-) (εικόνα 45). Σαν θετικός μάρτυρας για την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, χορηγήθηκαν 500 nM σταυροσπορίνης (Staurosporine, Staurosp), φαρμακολογικού αναστολέα μιας μεγάλης κατηγορίας κινασών (εικόνα 45). Συνοψίζοντας, η παρουσία της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης προκαλεί κυτταρικό θάνατο, ο οποίος συνοδεύεται από ενεργοποίηση της κασπάσης 3.

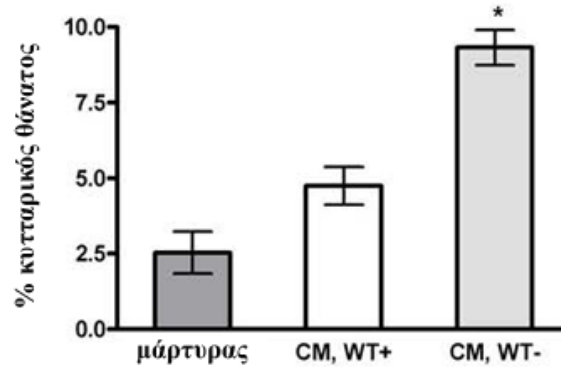


Εικόνα 45: Ενεργοποίηση της κασπάσης-3, κατόπιν επώασης των διαφοροποιημένων SH-SY5Y κυττάρων με θρεπτικό πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη.

Θρεπτικό μέσο από κύτταρα που είτε υπερέκφραζαν (CM, WT-) ή όχι (CM, WT+) την α-συνουκλεΐνη, καθώς και κύτταρα που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη β-γαλακτοσιδάση (CM, bGAL) χορηγήθηκαν σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y για 24 ώρες. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων-δεκτών αναλύθηκαν για την παρουσία ενεργοποιημένης κασπάσης-3, με ανοσοαποτύπωμα κατά Western, με ειδικό αντίσωμα έναντι των κατατετμημένων μορφών της κασπάσης-3. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ισόποσης φόρτωσης. Ως θετικός μάρτυρας για την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 χρησιμοποιήθηκε πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα που υπερέκφραζαν τη β-γαλακτοσιδάση (bGAL) και στα οποία είχαν χορηγηθεί 500 nM σταυροσπορίνης (Staurosp, 500 nM) για 16 ώρες.

Παράλληλα, τα παραπάνω θρεπτικά μέσα (CM, WT+, CM, WT-) χορηγήθηκαν και σε διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα, για 24 ώρες. Η παρουσία της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης μείωσε τη βιωσιμότητα των κυττάρων-δεκτών (9.3 ± 1.2 και 4.8 ± 1.3 , % κυτταρικού θανάτου προκαλούμενου από τη χορήγηση θρεπτικού που περιείχε

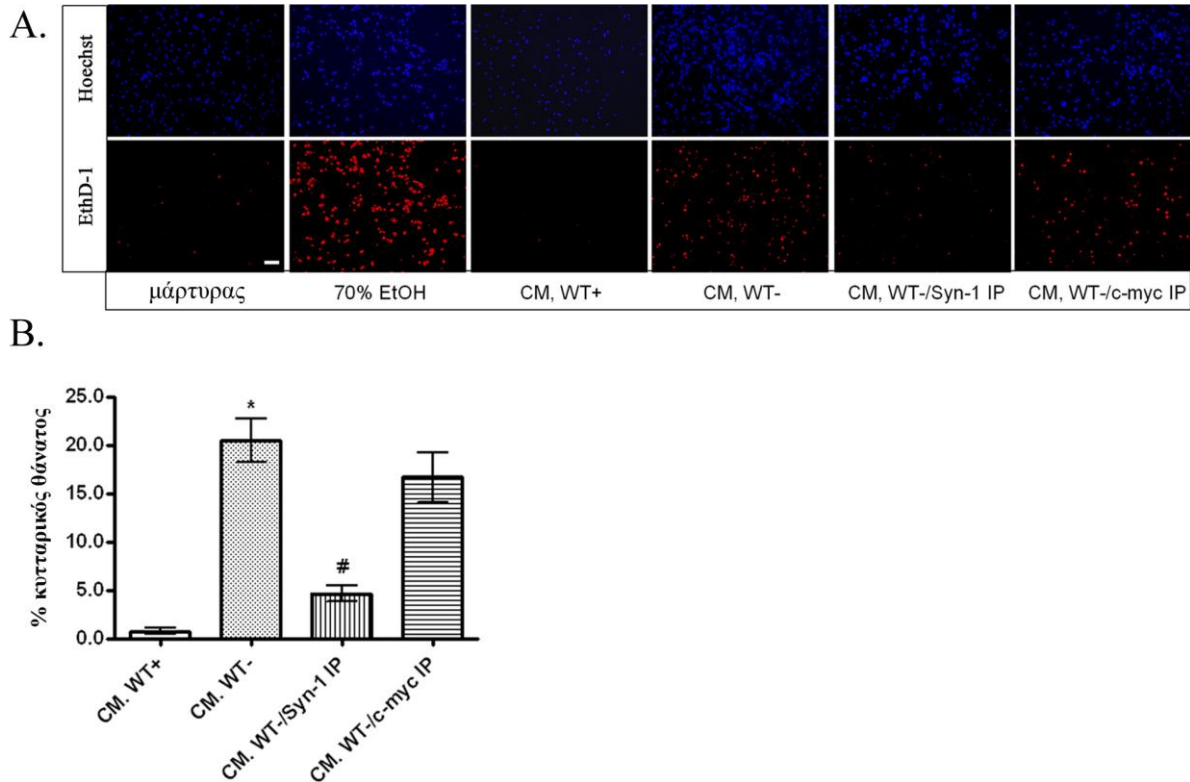
εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη CM,WT- και θεραπευτικού μάρτυρα CM,WT+, αντίστοιχα, μέσος όρος \pm SD, n = 4) (εικόνα 46), ωστόσο το ποσοστό κυτταρικού θανάτου ήταν πολύ χαμηλότερο συγκριτικά με το αντίστοιχο στην περίπτωση των διαφοροποιημένων κυττάρων (εικόνα 45).



Εικόνα 46: Η εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο σε διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα.

Θρεπτικό μέσο από κύτταρα που είτε υπερέκφραζαν (CM,WT-) ή όχι (CM,WT+) την α -συνουκλεΐνη, χορηγήθηκαν σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y για 24 ώρες. Ακολούθησε χρώση των κυττάρων-δεκτών με EthD-1 και Hoechst. Ποσοτική ανάλυση του κυτταρικού θανάτου έδειξε ότι η παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης στο θρεπτικό μέσο μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των διαιρούμενων SH-SY5Y κυττάρων. (n = 4, mean \pm SD, independent t-test, * p <0.01).

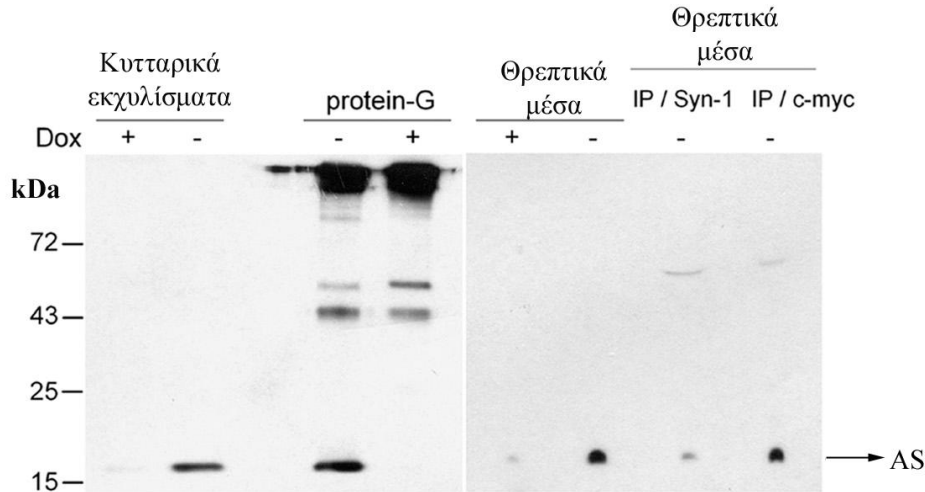
Η χορήγηση θεραπευτικού που περιείχε εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη (CM,WT-) σε πρωτογενείς φλοιϊκούς νευρώνες από έμβρυα επίμυος, για 24 ώρες, οδήγησε σε εντονότατη αύξηση του εκφυλισμού των νευρώνων, παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε και στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα (% κυτταρικός θάνατος = 20.5 ± 3.8 , μέσος όρος \pm SD, n = 3) (εικόνα 47A, B). Τέλος, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η νευροτοξική δράση της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης, προηγήθηκε επεξεργασία του εμπλουτισμένου στην εν λόγω πρωτεΐνη θρεπτικού, με το ειδικό αντίσωμα Syn-1, (CM,WT-/Syn-1 IP) (βλπ. Μέθοδοι, ενότητα 22.2). Η ανοσοκατακρήμνιση με το Syn-1 είχε ως αποτέλεσμα την εμφανή μείωση των



Εικόνα 47: Η ανοσοκατακρήμνιση της α -συνουκλείνης από το θρεπτικό μέσο αυξάνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων-δεκτών.

Θρεπτικό μέσο από κύτταρα που εκφράζουν τα ενδογενή (CM,WT+) ή αυξημένα (CM,WT-) επίπεδα α -συνουκλείνης, χωρίς ή κατόπιν επεξεργασίας με το αντίσωμα (CM,WT-/ Syn-1 IP) ή το c-myc (CM,WT-/ c-myc IP), χορηγήθηκαν σε φλοιϊκούς νευρώνες από έμβρυα επίμου, για 24 ώρες. (A) Ακολούθησε χρώση με EthD-1 (κόκκινο) και Hoechst (μπλε). Κλίμακα: 10 μ m. (B) Η ποσοτικοποίηση του κυτταρικού θανάτου αποκάλυψε σημαντική αύξηση της κυτταροτοξικότητας παρουσία της α -συνουκλείνης στο CM. Αφαίρεσή της από αυτό, κατόπιν ανοσοκατακρήμνισής της είχε προστατευτική δράση έναντι του φαινότυπου του θανάτου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος \pm SD, n = 3, και αναλύθηκαν με one way ANOVA test και κατόπιν με Tukey's test, * p <0.001 συγκρίνοντας το CM από τα κύτταρα που δεν εξέφραζαν την α -συνουκλείνη (WT+dox) με αυτό από τα κύτταρα που την εξέφραζαν (WT- dox), # p <0.001 συγκρίνοντας το CM από τα WT-dox με εκείνο που είχε ανοσοτροποποιηθεί για την α -συνουκλείνη (WT-/Syn-1 IP).

επιπέδων της πρωτεΐνης στο θρεπτικό, στα επίπεδα του μάρτυρα (εικόνα 48), η οποία ακολουθήθηκε από μειωμένα επίπεδα θανάτου των φλοιϊκών νευρώνων-δεκτών (εικόνα 47A, B). Η εν λόγω μείωση της απώλειας των νευρώνων, αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι η εκκρινόμενη α -συνουκλείνη είναι, σε ένα πολύ μεγάλο βαθμό, υπεύθυνη για την παρατηρούμενη νευροτοξικότητα. Ανοσοτροποποίηση του ίδιου θρεπτικού, μετά από ανοσοκαθίζηση με το μη-ειδικό για την α -συνουκλείνη αντίσωμα, c-myc (CM,WT-/c-myc IP), δεν οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού επιβίωσης των νευρώνων (εικόνα 47A, B), συνηγορώντας στο γεγονός ότι ο φαινότυπος του κυτταρικού θανάτου οφείλεται στην παρουσία της α -συνουκλείνης στο θρεπτικό.



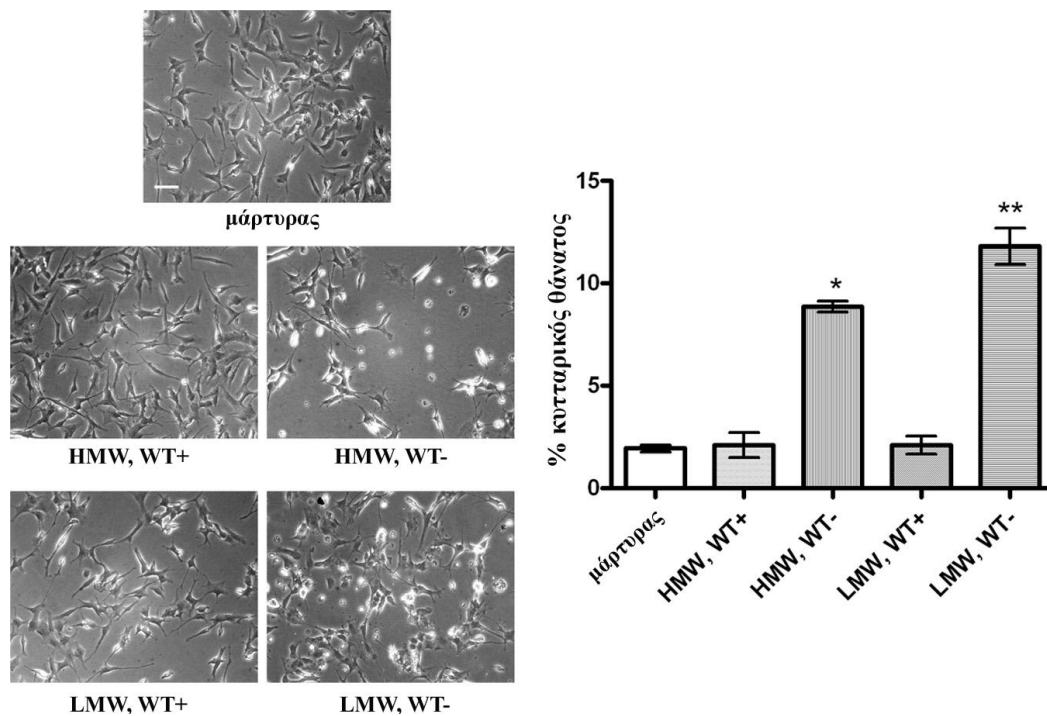
Εικόνα 48: Η α -συνουκλεΐνη αφαιρείται αποτελεσματικά από το θρεπτικό μέσο (CM), κατόπιν ανοσοκατακρήμνισής της.

Θρεπτικό μέσο από κύτταρα που εκφράζουν τα ενδογενή (CM, WT+) ή αυξημένα (CM, WT-) επίπεδα α -συνουκλεΐνη υπέστησαν ανοσοκατακρήμνιση ακολουθούμενη από ανοσοαποτύπωμα κατά Western, με το αντίσωμα Syn-1. Η α -συνουκλεΐνη ανοσοκατακρημνίστηκε αποτελεσματικά (αριστερά, διαδρομή 1). Η ποσότητα της α -συνουκλεΐνης που παρέμεινε στο θρεπτικό, μετά την ανοσοτροποποίηση, μειώθηκε (δεξιά, διαδρομή 3). Ανοσοκαθίζηση με το c-myc αντίσωμα (CM / IP / c-myc) απέτυχε να ανοσοκατακρημνίσει την α -συνουκλεΐνη (αριστερά, διαδρομή 2), με αποτέλεσμα να μην επέλθει καμία αλλαγή στα επίπεδα της εν λόγω πρωτεΐνης στο θρεπτικό (δεξιά, διαδρομή 4).

2.2. Διερεύνηση των τοξικών μορφών της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι διάφορες μορφές της α -συνουκλεΐνης, από μονομερείς, μέχρι χαμηλού αλλά και υψηλού μοριακού βάρους ολιγομερείς μορφές, εκκρίνονται φυσιολογικά και με τρόπο συνεχή στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων που την υπερεκφράζουν (βλπ. ενότητες 1.1, 1.2). Επιπλέον, η παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης στο θρεπτικό μέσο, μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων-δεκτών, και μάλιστα με τρόπο που φαίνεται να σχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησής τους. Με άλλα λόγια, η ευαισθησία στο τοξικό δυναμικό της εξωκυττάριας α -συνουκλεΐνης φαίνεται να αυξάνεται από τα διαιρούμενα προς τα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα και να κορυφώνεται στους πρωτογενείς φλοιϊκούς νευρώνες. Δεδομένων των παραπάνω ευρημάτων, γεννάται το ερώτημα σχετικά με τη φύση των βλαβερών μορφών της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης. Κατά συνέπεια, η ταυτοποίηση συγκεκριμένων μορφών της α -συνουκλεΐνης, στις οποίες θα μπορούσε να αποδοθεί η παρατηρούμενη τοξικότητα, έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς θα συνέβαλε στην κατανόηση της νευροεκφυλιστικής πορείας και στην προσέγγιση νέων θεραπευτικών στόχων.

Προκειμένου να απαντηθεί το παραπάνω καίριο ερώτημα, συλλέχθηκε θρεπτικό μέσο από κύτταρα με ενδογενή επίπεδα α-συνουκλείνης (CM,WT+), καθώς και από κύτταρα που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη (CM,WT-). Στη συνέχεια, τα θρεπτικά μέσα συμπυκνώθηκαν και κλασματώθηκαν μέσω υπερδιήθησης. Τα κλάσματα που περιείχαν τις υψηλού και τις χαμηλού μοριακού βάρους μορφές της α-συνουκλείνης ενώθηκαν, ξεχωριστά, σε δύο διαφορετικές δεξαμενές πρωτεϊνών, μια υψηλού (High Molecular Weight, HMW) και μια χαμηλού (Low Molecular Weight, LMW). Τα δύο διαφορετικά πρωτεϊνικά μείγματα συμπυκνώθηκαν με τις εμπορικά διαθέσιμες στήλες. Ακολούθησε αντικατάσταση του διαλύματος PBS, στο οποίο



Εικόνα 49: Οι απομονωμένες εκκρινόμενες ολιγομερείς και μονομερείς μορφές της α-συνουκλείνης μειώνουν τη βιωσιμότητα των διαφοροποιημένων SH-SY5Y κυττάρων.

Θρεπτικό μέσο από κύτταρα που εκφράζουν τα ενδογενή (CM,WT+) ή αυξημένα (CM,WT-) επίπεδα α-συνουκλείνη κλασματώθηκε με υπερδιήθηση. Οι εξωκυττάριας HMW και LMW μορφές της α-συνουκλείνης συνελέγησαν, λιοφιλιώθηκαν και χορηγήθηκαν σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα, για 48 ώρες. Αριστερά, αντιπροσωπευτικές εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο. Κλίμακα: 50 μm. Δεξιά, γράφημα ποσοτικοποίησης που παρουσιάζει την αύξηση του κυτταρικού θανάτου που παρατηρείται, κατόπιν χορήγησης, για 48 ώρες, των εκκρινόμενων μορφών της α-συνουκλείνης υψηλού (HMW) και χαμηλού μοριακού βάρους (LMW) (n = 3, μέσος όρος ± SD, one way ANOVA test, ακολουθούμενο από Tukey's test, *p<0.001).

είχαν εκλουσθεί οι πρωτεΐνες από τη στήλη, με 50mM οξικό αμμώνιο pH7.5, μέσω υπερφυγοκέντρησης και λυοφιλίωση μέχρι να την πλήρη αφυδάτωση (βλπ. **Μέθοδοι, ενότητα 9**). Κατόπιν, τα δείγματα επανασυστάθηκαν σε 250μl πλήρους θρεπτικού RPMI, το οποίο περιείχε και 10% FBS, αποστειρώθηκαν και χορηγήθηκαν χωριστά

σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα-δέκτες, σε τελική αραίωση 2X, για 48 ώρες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τόσο τα υψηλού (HMW), όσο και αυτά του χαμηλού μοριακού βάρους (LMW) κλάσματα προκάλεσαν εκφυλισμό στα κύτταρα-δέκτες (εικόνα 49A), στον ίδιο σχεδόν βαθμό, (% κυτταρικός θάνατος = 8.9 ± 0.5 και 11.8 ± 1.6 , για τα HMW και τα LMW κλάσματα, αντίστοιχα, μέσος όρος \pm SD, $n = 3$) (εικόνα 49B).

3. Μελέτη του μηχανισμού νευροτοξικής δράσης της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης

Τα παραπάνω αποτελέσματα, σε συνδυασμό με μεγάλο όγκο βιβλιογραφικών δεδομένων, τονίζουν τη βιολογική δράση των εκκρινόμενων μορφών της α-συνουκλεΐνης στην ομοιόσταση των κυττάρων-δεκτών. Αποδεδειγμένα, η εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη είναι σε θέση να μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των νευρωνικών κυττάρων-δεκτών. Κατά συνέπεια, η διαλεύκανση του μηχανισμού νευροτοξικής δράσης της εν λόγω πρωτεΐνης είναι κομβικής σημασίας, καταρχάς, για την κατανόηση της παθογένειας της νόσου του Parkinson και κατά δεύτερον για τη δημιουργία νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

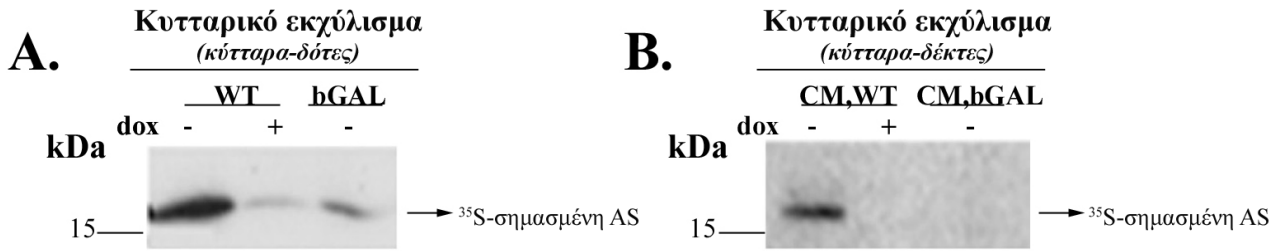
3.1. Μελέτη της πρόσληψης της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης ως πιθανού νευροτοξικού μηχανισμού δράσης

Η πρόσληψη της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης από τα κύτταρα με τα οποία έρχεται σε επαφή αποτελεί έναν από τους επικρατέστερους μηχανισμούς της νευροτοξικής της δράσης (Emmanouilidou et al., 2010a; Lee et al., 2008a; Luk et al., 2009). Η πρόσφατη υπόθεση της διακυτταρικής μετάδοσης της παθογένειας της νόσου του Parkinson, ενισχύεται, δε, από το γεγονός ότι ένα ποσοστό της α-συνουκλεΐνης εκκρίνεται μέσω εξωσωμάτων (Vekrellis et al., 2011). Το παραπάνω στηρίζεται στην πιθανή λειτουργία των εξωσωμάτων, αυτή της απομάκρυνσης του βλαβερού πρωτεϊνικού φορτίου ενός κυττάρου (βλπ. Εισαγωγή, ενότητα 3.2) (Putz et al., 2008).

3.1.1. Μελέτη της πρόσληψης της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης από διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα-δέκτες

Είναι γνωστό ότι η ανασυνδυασμένη α-συνουκλεΐνη προσλαμβάνεται από κύτταρα-δέκτες, μέσω ενδοκυττάρωσης (Ahn et al., 2006; Sung et al., 2001; Zhang et al., 2005). Ωστόσο, η πλειοψηφία των μελετώνων στηρίζεται στη χρήση εξωγενώς χορηγούμενης ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης και όχι φυσιολογικά εκκρινόμενης από τα κύτταρα πρωτεΐνης.

Αρχικά, διερευνήθηκε η ικανότητα των διαιρούμενων SH-SY5Y κυττάρων να προσλαμβάνουν την εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα τα οποία εκφράζουν ενδογενή επίπεδα α-συνουκλεΐνης (WT+dox) ή κύτταρα που υπερεκφράζουν την εν λόγω πρωτεΐνη (WT-dox) ή τη β-γαλακτοσιδάση (bGAL-dox), σημάνθηκαν με ραδιενεργό θείο 35 (^{35}S) (**εικόνα 50A**), ενώ το θρεπτικό τους μέσο συνελέγη, ως πηγή όλων των εκκρινόμενων ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών (**βλπ. Μέθοδοι, ενότητες 5, 21**). Στη συνέχεια, τα ραδιοσημασμένα θρεπτικά χορηγήθηκαν σε διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα για 16 ώρες (**βλπ. Μέθοδοι, ενότητα 24**). Τόσο τα κύτταρα-δότες του ραδιοσημασμένου θρεπτικού (**εικόνα 50A**), όσο και τα κύτταρα-δέκτες (**εικόνα 50B**), συνελέγησαν με τη χρήση τρυψίνης, προκειμένου να αποφευχθούν οι μη ειδικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Ακολούθησε λύση των κυττάρων και ανάλυση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων για την παρουσία ραδιοσημασμένης α-συνουκλεΐνης με ανοσοκατακρήμιση με το ειδικό αντίσωμα Syn-1 (**βλπ. Μέθοδοι, ενότητα 22.1**), ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και αυτοραδιοφραγία. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 50B**, τα διαιρούμενα κύτταρα προσέλαβαν τη φυσιολογικά εκκρινόμενη ραδιοσημασμένη α-συνουκλεΐνη, που περιεχόταν στο CM, WT-. Πρέπει να σημειωθεί, ότι η πρόσληψη της α-συνουκλεΐνης δεν οδήγησε στο σχηματισμό ενδοκυττάρων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, θετικών για τη χρώση με Thioflavin S (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα). Αντιθέτως, στα εκχυλίσματα κυττάρων που δέχτηκαν τα θρεπτικά μάρτυρες (CM, WT+ και CM, bGAL-), δεν ανιχνεύθηκε ραδιοσημασμένη α-συνουκλεΐνη (**εικόνα 50B**).



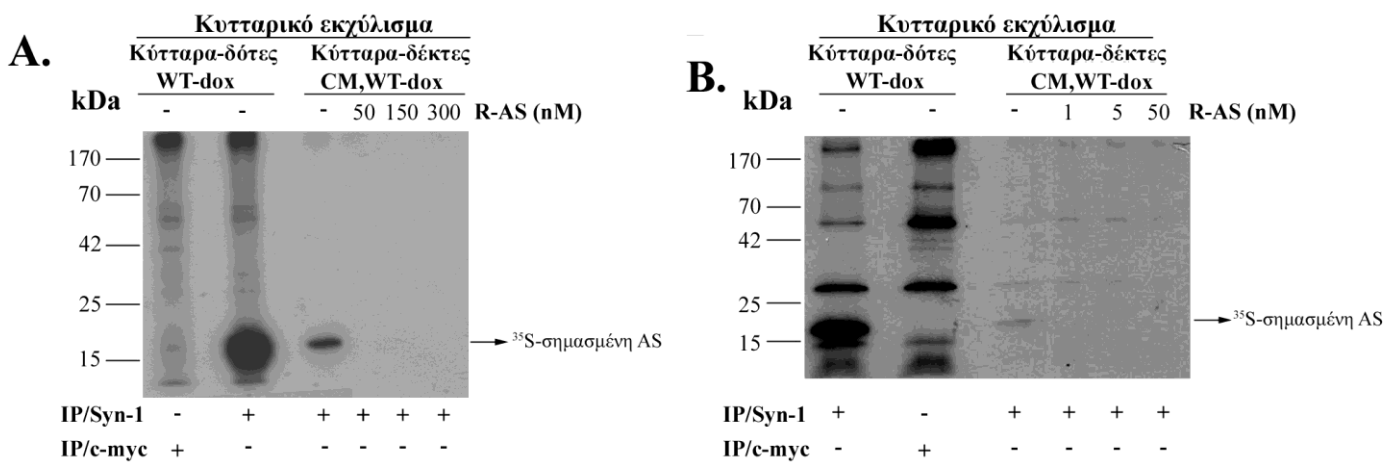
Εικόνα 50: Η εκκρινόμενη α-συνουκλείνη προσλαμβάνεται από διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα. Κύτταρα με ενδογενή (WT+dox) ή αυξημένα (WT-dox) επίπεδα α-συνουκλείνης είτε της πρωτεΐνης β-γαλακτοσιδάσης (CM,bGAL), σημάνθηκαν με ραδιενεργό ³⁵S. Το θρεπτικό μέσο από τα ραδιοσημασμένα κύτταρα, που περιείχε όλες τις σημασμένες με ³⁵S εκκρινόμενες πρωτεΐνες, χορηγήθηκε σε διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα-δέκτες. Η ενδογενής ραδιοσημασμένη α-συνουκλείνη των κυττάρων-δοτών (A) και αυτή που προσλήφθηκε από τα κύτταρα-δέκτες (B) ανιχνεύθηκε κατόπιν ανοσοκατακρήμνισης με το Syn-1 αντίσωμα και αυτοραδιογραφία.

Ο μηχανισμός πρόσληψης της α-συνουκλείνης αποτελεί ακόμα ένα μαύρο κουτί. Ωστόσο γίνονται διαρκείς προσπάθειες προς την κατεύθυνση αυτή. Μια πρόσφατη δημοσίευση του Lee και των συνεργατών του προτείνει ότι οι διαφορετικές μορφές ανασυνδυασμένης α-συνουκλείνης ακολουθούν διαφορετικά μονοπάτια πρόσληψης (Lee et al., 2008a). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εν λόγω μελέτης, η μονομερής α-συνουκλείνη προσλαμβάνεται από τα κύτταρα-δέκτες, μέσω παθητικής διάχυσης, σε αντίθεση με τις ολιγομερείς και ινδιακές μορφές της οι οποίες ακολουθούν το ενδοκυτταρικό μονοπάτι πρόσληψης (Lee et al., 2008a). Η ενδοκυττάρωση μέσω μεμβρανικού υποδοχέα, αποτελεί ένα εναλλακτικό μονοπάτι πρόσληψης. Μάλιστα, έχει προταθεί ότι στην ενδοκυττάρωση του Αβ-42, πιθανότατα, συμμετέχει ο α7 νικοτινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης (Nagele et al., 2002) ή ο υποδοχέας NMDA (Jellinger, 2002), οι οποίοι εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια των νευρώνων. Εντούτοις, μέχρι και σήμερα, δεν υπάρχουν δεδομένα για την ύπαρξη κάποιου συγκεκριμένου υποδοχέα ενδοκυττάρωσης της φυσιολογικά εκκρινόμενης α-συνουκλείνης.

Με βάση τα παραπάνω, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων, η οποία έδωσε κάποια πρωταρχικά αποτελέσματα, σχετικά με την ύπαρξη υποδοχέα ενδοκυττάρωσης της α-συνουκλείνης. Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε, είχε ως βάση της την προσθήκη περισσειας μη ραδιοσημασμένης ανασυνδυασμένης α-συνουκλείνης, παράλληλα με τη φυσιολογικά εκκρινόμενη ραδιοσημασμένη α-συνουκλείνη. Στην περίπτωση ύπαρξης υποδοχέα ενδοκυττάρωσης, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, λόγω της υψηλής συγκέντρωσής της, θα δεσμεύσει το

μεγαλύτερο αριθμό υποδοχέων, με αποτέλεσμα να μειώσει τον αριθμό των ραδιοσημασμένων μορίων που εισέρχονται στα κύτταρα με στοιχειομετρικό τρόπο.

Προς αυτή την κατεύθυνση, θρεπτικό μέσο, που περιείχε όλες τις ραδιοσημασμένες με ³⁵S εκκρινόμενες πρωτεΐνες, χορηγήθηκε σε διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα, παρουσία ή απουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων (50, 150, 300 nM) μη ραδιοσημασμένης ανασυνδυασμένης α-συνουκλείνης (εικόνα 51A). Τα κύτταρα επώαστηκαν, συνελέγησαν και αναλύθηκαν για την παρουσία ραδιοσημασμένης α-συνουκλείνης, όπως και παραπάνω. Η παρουσία της ανασυνδυασμένης α-συνουκλείνης, ακόμα και στη μικρότερη συγκεντρωση (50 nM),

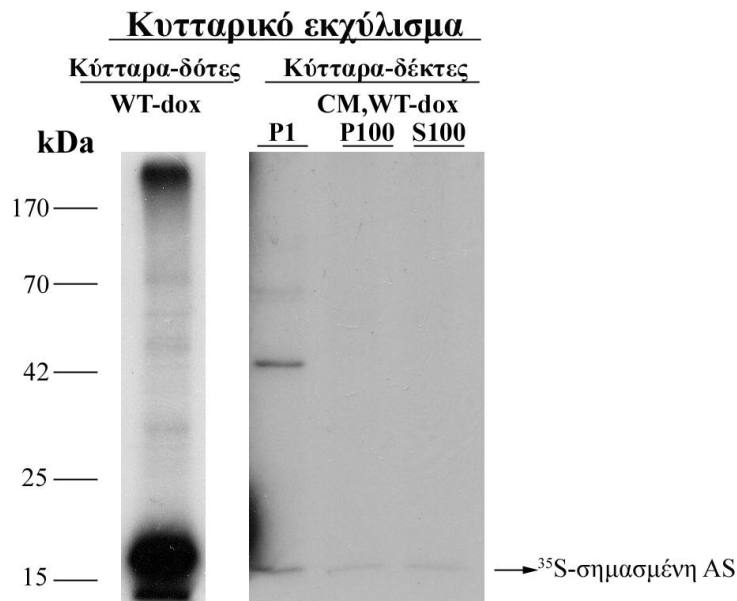


Εικόνα 51: Πιθανή ύπαρξη μεμβρανικού υποδοχέα για την πρόσληψη της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης από τα διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα.

Σε διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα χορηγήθηκε θρεπτικό μέσο, που περιείχε ραδιοσημασμένη με ³⁵S εκκρινόμενη α-συνουκλείνη, παρουσία ή απουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων μη ραδιοσημασμένης ανασυνδυασμένης α-συνουκλείνης για 16 ώρες. (A) 50, 150, 300 nM και (B) 1, 5, 50 nM. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα συνελέγησαν και αναλύθηκαν, όπως και παραπάνω. Η παρουσία ακόμα και της χαμηλότερης συγκέντρωσης ανασυνδυασμένης α-συνουκλείνης (1 nM), εξαλείφει το σήμα της ραδιοσημασμένης α-συνουκλείνης από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Ανοσοκατακτήμιση με το άσχετο για την α-συνουκλείνης αντίσωμα, c-myc, χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τα μη ειδικά σήματα.

εξαλείφει το σήμα της ραδιοσημασμένης εκκρινόμενης α-συνουκλείνης στο εκχύλισμα των κυττάρων δεκτών. Πρέπει να σημειωθεί, ότι ακόμη και η εξαιρετικά χαμηλή συγκέντρωση ανασυνδυασμένης α-συνουκλείνης, της τάξεως του 1 nM (εικόνα 51B), επιφέρει τα ίδια αποτελέσματα, μειώνοντας την πρόσληψη της ραδιοσημασμένης εκκρινόμενης α-συνουκλείνης. Δεδομένου ότι μια ιδιαίτερως χαμηλή συγκέντρωση, που αγγίζει τα επίπεδα προσδέτη, προκαλεί τόσο δραματική αναστροφή της πρόσληψης, ενισχύεται η υπόθεση ύπαρξης ενός υποδοχέα. Βεβαίως, οι παραπάνω παρατηρήσεις, αποτελούν πρωταρχικά δεδομένα και είναι σαφές ότι προς αυτή την κατεύθυνση χρειάζεται περαιτέρω και ενδελεχής μελέτη.

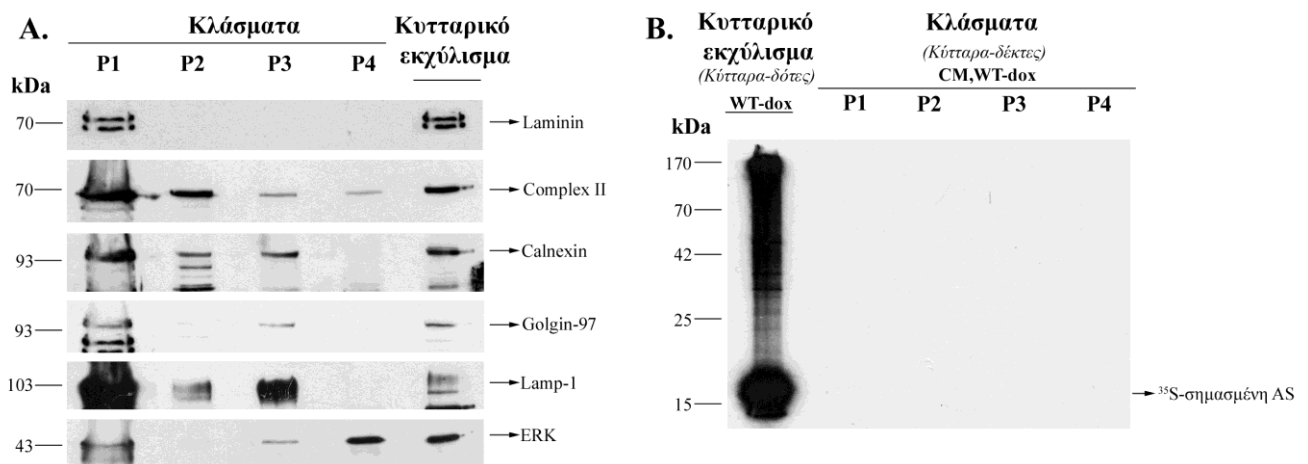
Συνοψίζοντας, η φυσιολογικά εκκρινόμενη ραδιοσημασμένη με ^{35}S α-συνουκλείνη προσλαμβάνεται από τα διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα στα οποία χορηγείται, πιθανότατα μέσω της ύπαρξης κάποιου μεμβρανικού υποδοχέα. Εύλογα, λοιπόν, γεννάται το ερώτημα εάν αυτή συσσωρεύεται σε κάποιο συγκεκριμένο υποκυτταρικό οργανίδιο. Για να απαντηθεί το παραπάνω ερώτημα, τα διαιρούμενα κύτταρα, τα οποία δέχθηκαν τα θρεπτικά που περιείχαν τις ραδιοσημασμένες εκκρινόμενες πρωτεΐνες, υπέστησαν κλασμάτωση με διαφορετικές φυγοκεντρήσεις και τα κλάσματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν για την παρουσία ραδιοσημασμένης α-συνουκλείνης, όπως και παραπάνω. Αρχικά, ακολουθήθηκε ένα απλό πρωτόκολλο κλασμάτωσης (εικόνα 52) (βλπ. Μέθοδοι, ενότητα 14.2) (Liu et al., 2002), από το οποίο προέκυψαν τρία κλάσματα, το πρώτο εμπλουτισμένο σε πυρήνες (P1), το δεύτερο εμπλουτισμένο σε όλα τα μεμβρανικά συστατικά (ενδοσώματα, μικροσώματα, μεμβράνες, P100) και τέλος το καθαρό κυτταρόπλασμα (S100). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αυτοραδιογραφίας, η ραδιοσημασμένη α-συνουκλείνη, κατόπιν της πρόσληψής της, εντοπίστηκε και στα τρία κλάσματα.



Εικόνα 52: Υποκυτταρικός εντοπισμός της ραδιοσημασμένης α-συνουκλείνης, κατόπιν πρόσληψής της από τα διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα.

Σε διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα χορηγήθηκε θρεπτικό μέσο, που περιείχε ραδιοσημασμένη με ^{35}S εκκρινόμενη α-συνουκλείνη. Το κυτταρικό εκχύλισμα κλασματώθηκε σε: (P1) κλάσμα πυρήνων, (P2) κλάσμα ενδοσωμάτων/ μικροσωμάτων και (S100) καθαρό κυτταρόπλασμα. Τα κλάσματα αναλύθηκαν για την παρουσία της ραδιοσημασμένης α-συνουκλείνης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και αυτοραδιογραφία. Ως θετικός μάρτυρας για την παρουσία της ραδιοσημασμένης α-συνουκλείνης, χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από τα κύτταρα-δότες του ραδιοσημασμένου θρεπτικού (^{35}S -labeled CL, WT-dox).

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε ένα αναλυτικότερο πρωτόκολλο κλασμάτωσης (εικόνα 53A), στο οποίο απομονώθηκε κλάσμα εμπλουτισμένο σε πυρήνες (θετικό για λαμινίνη, laminin), σε μιτοχόνδρια (θετικό για Complex II), σε Ε.Δ. (θετικό για Calnexin), σε σύμπλεγμα Golgi (θετικό για Golgin-97), σε ενδοσώματα (θετικό για Lamp-1) και τέλος κλάσμα που αντιπροσώπευε το καθαρό κυτοσόλιο (θετικό για ERK) (βλπ. Μέθοδοι, ενότητα 14.3). Στην προκειμένη περίπτωση, δεν εντοπίστηκε σε κανένα κλάσμα η ραδιοσημασμένη α-συνουκλείνη (εικόνα 53B). Δεδομένου ότι το εν λόγω πρωτόκολλο απαιτεί μεγάλο αριθμό διαφορικών φυγοκεντρήσεων, κατά τη διάρκεια του πειράματος υπάρχει απώλεια υλικού. Κατά συνέπεια, μειώνεται και η ποσότητα της ραδιοσημασμένης α-συνουκλείνης σε επίπεδα μη ανιχνεύσιμα από την ακολουθούμενη μέθοδο. Επομένως, η απουσία σήματος από τα κλάσματα δε σημαίνει απαραίτητα ότι η ραδιοσημασμένη α-συνουκλείνη απουσιάζει, αλλά ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση.

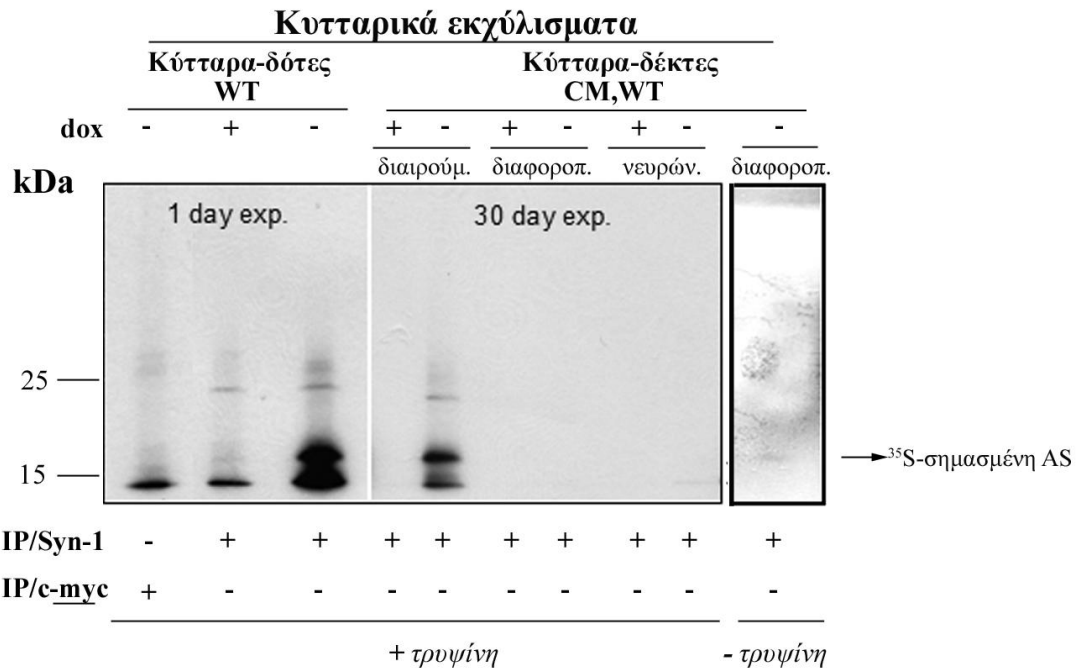


Εικόνα 53: Υποκυτταρικός εντοπισμός της ραδιοσημασμένης α-συνουκλείνης, κατόπιν πρόσληψης της από τα διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα.

Σε διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα χορηγήθηκε θρεπτικό μέσο, που περιείχε ραδιοσημασμένη με ³⁵S εκκρινόμενη α-συνουκλείνη. Το κυτταρικό εκχύλισμα υποβλήθηκε σε διαδοσικές φυγοκεντρήσεις από τις οποίες προέκυψαν τα εξής κλάσματα: (P1) πυρηνικό κλάσμα, (P2) μιτοχονδριακό κλάσμα, (P3) κλάσμα εμπλουτισμένο σε ενδοσώματα/ μικροσώματα και (P4) καθαρό κυτοσόλιο. (A) Τα κλάσματα αναλύθηκαν για την παρουσία της ραδιοσημασμένης α-συνουκλείνης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και αυτοραδιογραφία. Ως θετικός μάρτυρας για την παρουσία της ραδιοσημασμένης α-συνουκλείνης, χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από τα κύτταρα-δότες του ραδιοσημασμένου θρεπτικού (³⁵S-labeled CL, WT-dox). (B) Η λαμινίνη (laminin) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για το πυρηνικό κλάσμα, το Complex II για τα μιτοχόνδρια, η Calnexin για το Ε.Δ., η Golgin-97 για το σύμπλεγμα Golgi, το Lamp-1 για τα ενδοσώματα/ μικροσώματα, συμπεριλαμβανομένων των λυσοσωμάτων και τέλος το ERK ως κυτταροπλασματικός δείκτης.

3.1.2. Μελέτη της πρόσληψης της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης από διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα και πρωτογενείς νευρώνες

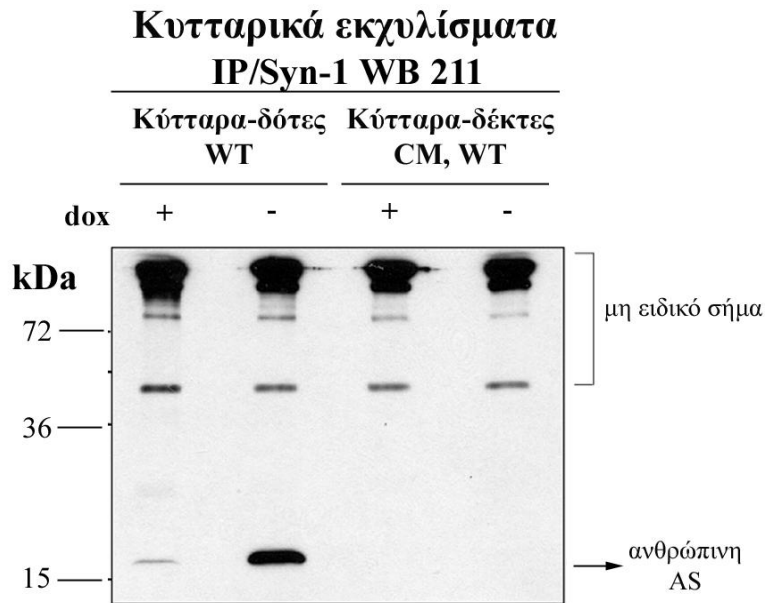
Στη συνέχεια εξετάστηκε το ενδεχόμενο η εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη να προσλαμβάνεται από διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα και πρωτογενείς νευρώνες. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα που εκφράζουν τα ενδογενή (WT+dox) ή αυξημένα (WT-dox) επίπεδα α-συνουκλεΐνης, σημάνθηκαν με ραδιοσημασμένη με ³⁵S κυστεΐνη και μεθειονίνη, ενώ τα θεραπευτικά μέσα που περιείχαν όλες τις ραδιοσημασμένες εκκρινόμενες πρωτεΐνες (CM,WT+, CM,WT-, αντίστοιχα), χορηγήθηκαν σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα και καλλιέργειες πρωτογενών φλοιϊκών νευρώνων από έμβρυα επίμου, για 16 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα συνελήγησαν και αναλύθηκαν για την παρουσία της ραδιοσημασμένης α-συνουκλεΐνης, όπως και παραπάνω. Σε αντίθεση με τα διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα, στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα των διαφοροποιημένων SH-SY5Y κυττάρων και των πρωτογενών νευρώνων, δεν ανιχνεύθηκε ραδιοσημασμένη α-συνουκλεΐνη, ακόμη και ύστερα από παρατεταμένη έκθεση του φωτογραφικού φιλμ (εικόνα 54). Ωστόσο, όταν τα διαφοροποιημένα κύτταρα-δέκτες του ραδιοσημασμένου θεραπευτικού συνελήγησαν χωρίς τη χρήση τρυψίνης, αλλά κατόπιν πολλών πλύσεων με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS, στα κυτταρικά εκχύλισμα που προέκυψε, εμφανίστηκε ένα αδύναμο σήμα στο μοριακό βάρος της α-συνουκλεΐνης. Το γεγονός αυτό πιθανά να σημαίνει ότι υπάρχει μια ασθενής αλληλεπίδραση της α-συνουκλεΐνης στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης, η οποία εξαλείφεται παρουσία τρυψίνης.



Εικόνα 54: Η ραδιοσημασμένη α-συνουκλείνη δεν προσλαμβάνεται από τα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα και τους πρωτογενείς νευρώνες.

Κύτταρα με ενδογενή (WT+dox) ή αυξημένα (WT-dox) επίπεδα α-συνουκλείνης σημάνθηκαν με ραδιενεργό ³⁵S. Το θρεπτικό μέσο από τα ραδιοσημασμένα κύτταρα, που περιείχε όλες τις σημασμένες με ³⁵S εκκρινόμενες πρωτεΐνες, χορηγήθηκε σε διαιρούμενα (διαρ.μ.) και διαφοροποιημένα (διαφοροπ.) SH-SY5Y κύτταρα και σε πρωτογενείς φλοιϊκούς νευρώνες (νευρών.). Η ενδογενής ραδιοσημασμένη α-συνουκλείνη των κυττάρων-δοτών (κύτταρα-δότες, αριστερά) και αυτή που προσλήφθηκε από τα κύτταρα-δέκτες (κύτταρα-δότες, δεξιά) ανιχνεύθηκε κατόπιν ανοσοκατακρήμνισης με το Syn-1 αντίσωμα και αυτοραδιογραφία. Μόνο τα διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα προσέλαβαν την εκκρινόμενη α-συνουκλείνη. Απουσία τρυψίνης (-τρυψίνη), ανιχνεύεται ραδιοσημασμένη α-συνουκλείνη και στο κυτταρικό εκχύλισμα των διαφοροποιημένων SH-SY5Y κυττάρων.

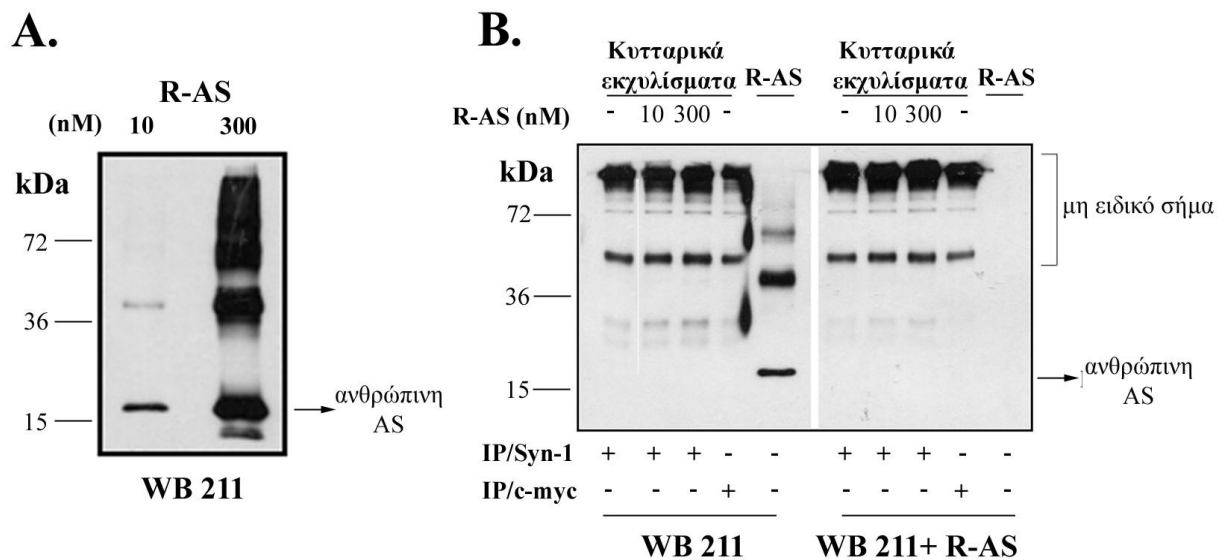
Προκειμένου να αποκλειστεί η περίπτωση τα επίπεδα της α-συνουκλείνης που προσλαμβάνονται από τους φλοιϊκούς νευρώνες να είναι πολύ χαμηλά για να ανιχνευθούν με την παραπάνω μέθοδο, χορηγήθηκε σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων μη ραδιοσημασμένο θρεπτικό μέσο, πλούσιο σε φυσιολογικά εκκρινόμενη α-συνουκλείνη, για 16 ώρες. Τα κυτταρικά εκχύλισματα ελέγχθηκαν για την παρουσία ανθρώπινης α-συνουκλείνης με ανοσοκατακρήμνιση, με το ειδικό για την πρωτεΐνη αντίσωμα Syn-1, ακολουθούμενη από ανοσοαποτύπωμα κατά Western με το ειδικό για την ανθρώπινη α-συνουκλείνη αντίσωμα LB 509 (εικόνα 55). Ακόμα και υπό αυτές τις συνθήκες δεν κατέστη δυνατό να πιστοποιηθεί η πρόσληψη της ανθρώπινης εκκρινόμενης α-συνουκλείνης από τους φλοιϊκούς νευρώνες.



Εικόνα 55: Οι πρωτογενείς φλοιϊκοί νευρώνες επίμουσ δεν προσλαμβάνουν τη φυσιολογικά εκκρινόμενη α-συνουκλείνη. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα με ενδογενή (WT+dox) ή αυξημένα (WT-dox) επίπεδα α-συνουκλείνης ανοσοκατακρημνίστηκαν με το αντίσωμα Syn-1. Η α-συνουκλείνη ανιχνεύθηκε με το ειδικό για την ανθρώπινη πρωτεΐνη αντίσωμα LB 509. Το θεραπευτικό μέσο από αυτά τα κύτταρα χορηγήθηκε σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων φλοιού επίμου. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση της α-συνουκλείνης από τα κυτταρικά εκχυλίσματα των νευρώνων-δεκτών, με το αντίσωμα Syn-1 και ανίχνευση της ανθρώπινης πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωμα κατά Western με το ειδικό αντίσωμα LB 509.

Εντούτοις, στη βιβλιογραφία, υπάρχει μεγάλος όγκος αναφορών που κάνει λόγο για την ενδοκυττάρωση εξωγενώς χορηγούμενης ανασυνδρασμένης α-συνουκλείνης από κύτταρα-δέκτες (Ahn et al., 2006; Lee et al., 2008a; Lee et al., 2008b; Liu et al., 2009a; Luk et al., 2009; Sung et al., 2001; Zhang et al., 2005). Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί, ότι σε αυτές τις περιπτώσεις έγινε χορήγηση εξαιρετικά υψηλών συγκεντρώσεων καθαρής ανασυνδρασμένης πρωτεΐνης, οι οποίες, ξεφεύγοντας από τα όρια του φυσιολογικού, πιθανώς να οδήγησαν υπό καθεστώς πίεσης τα κύτταρα-δέκτες να την προσλάβουν. Με βάση τα παραπάνω, διερευνήθηκε το ενδεχόμενο η αδυναμία ανίχνευσης της πρόσληψης της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης να οφείλεται στη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο θεραπευτικό μέσο. Για το σκοπό αυτό και ακολουθώντας τις σχετικές δημοσιεύσεις, δύο συγκεντρώσεις ανασυνδρασμένης ανθρώπινης α-συνουκλείνης, μια χαμηλή (10 nM) και μια υψηλή (300 nM) (**εικόνα 56A**), χορηγήθηκαν σε πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων. Η ολική α-συνουκλείνη ανοσοκατακρημνίστηκε από τα κυτταρικά εκχυλίσματα με το αντίσωμα Syn-1, ενώ η ανασυνδρασμένη πρωτεΐνη που είχε

προσληφθεί ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωμα κατά Western με το ειδικό για την ανθρώπινη πρωτεΐνη αντίσωμα 211 (εικόνα 56B, αριστερά). Προεπώαση του αντισώματος 211 με περίσσεια ανασυνδυασμένης α -συνουκλείνης, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αποκλειστούν τα μη ειδικά σήματα (εικόνα 56B, δεξιά). Παρά τη χρήση ιδιαίτερος υψηλών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης, δεν κατέστη δυνατό να επαναληφθούν τα ήδη υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα. Βεβαίως, δεν πρέπει να παραληφθεί ο παράγοντας της διαμόρφωσης, καθώς στις περισσότερες αναφορές, χορηγούνται προκατεργασμένες ινδιακές μορφές της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Ακόμα, όμως και ύστερα από τη χρήση απλών πρωτοκόλλων για το σχηματισμό *in vitro* ολιγομερών της ανασυνδυασμένης α -συνουκλείνης, και περαιτέρω χορήγησή τους σε νευρώνες, δεν επιβεβαιώθηκε η πρόσληψη της πρωτεΐνης από το υπό μελέτη κυτταρικό σύστημα (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα). Επιπλέον, σε πρόσφατη δημοσίευση από τον Kelvin C. Luk και τους συνεργάτες του, τονίστηκε ότι για την



Εικόνα 56: Οι πρωτογενείς φλοιϊκοί νευρώνες επίμυος δεν προσλαμβάνουν την ανασυνδυασμένη α -συνουκλείνη.

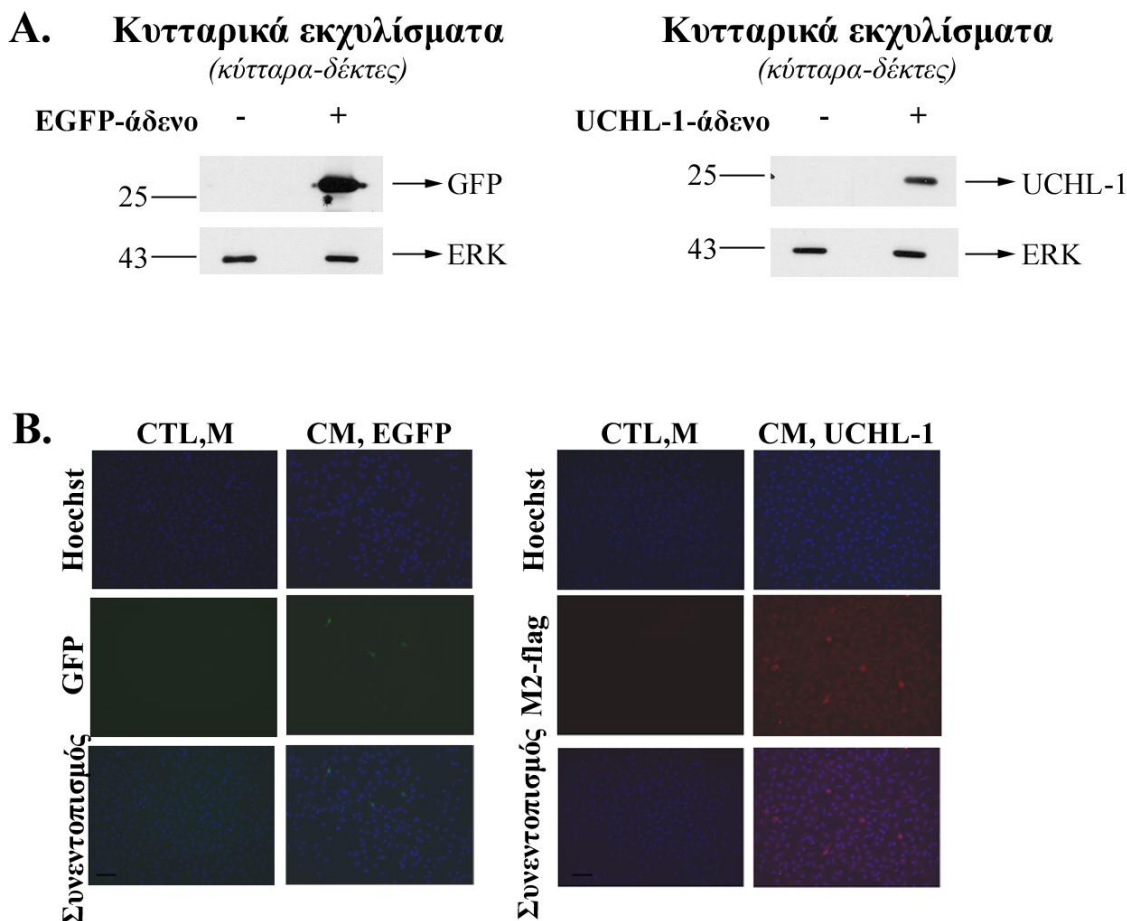
Δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ανασυνδυασμένης ανθρώπινης α -συνουκλείνης, 10 και 300 nM (A), χορηγήθηκαν σε πρωτογενείς καλλιέργειες νευρώνων φλοιού επίμυ. (B) Ακολούθησε ανοσοκατακρήμιση των κυτταρικών εκχυλισμάτων με το αντίσωμα Syn-1 και ανίχνευση της ανασυνδυασμένης α -συνουκλείνης με το ειδικό για την ανθρώπινη πρωτεΐνη αντίσωμα 211. Ως μάρτυρας για τα μη ειδικά σήματα, πραγματοποιήθηκε προεπώαση του αντισώματος 211 με περίσσεια ανασυνδυασμένης α -συνουκλείνης.

είσοδο της προσχηματισμένων ινιδίων ανασυνδυασμένης α -συνουκλείνης στα κύτταρα-δέκτες, απαραίτητη είναι η παρουσία κατιονικών λιποσωμάτων (Luk et al.,

2009). Κατά συνέπεια, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η πρόσληψη της εξωγενώς χορηγούμενης πρωτεΐνης, ακόμα και σε αυτές τις υψηλές συγκεντρώσεις και υπό αυτή την ινιδιακή διαμόρφωση, απαιτείται κάποιου είδους υποβοήθηση του συστήματος.

Από την άλλη πλευρά, η δημοσίευση των Desplats και συνεργατών, κάνει λόγο για μετάδοση της παθολογίας των σωματίων Lewy από τους πάσχοντες νευρώνες σε υγιή εμβρυϊκά εμφυτεύματα, μέσω μεταφοράς της α -συνουκλείνης από νευρώνα σε νευρώνα (Desplats et al., 2009). Εντούτοις, πρέπει να τονιστεί ότι στην παραπάνω μελέτη η υπερέκφραση της α -συνουκλείνης πραγματοποιήθηκε με ιικούς φορείς (Desplats et al., 2009). Προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσο αποδοτική θα μπορούσε να είναι η συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση για τους σκοπούς της παρούσας διδακτορικής διατριβής, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων. Διαιρούμενα SH-SY5Y επιμολύνθηκαν με αδενοϊούς που προκαλούν την υπερέκφραση είτε της αυστηρά κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης UCHL-1 (**εικόνα 57A, δεξιά**), η οποία σχετίζεται με τη νόσο του Parkinson, είτε της συνθετικής φθορίζουσας πρωτεΐνης EGFP (**εικόνα 57A, αριστερά**). Καμία από τις δύο πρωτεΐνες δεν εκκρίνεται υπό φυσιολογικές συνθήκες. Δεκαέξι ώρες μετά την επιμόλυνση, τα κύτταρα εκπλύθηκαν πολλές φορές και στη συνέχεια προστέθηκε φρέσκο καλλιεργητικό μέσο για άλλες 16 ώρες. Το θρεπτικό μέσο των επιμολυσμένων κυττάρων-δοτών (Viral CM, VCM), συνελέγη και τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνθηκαν, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Στη συνέχεια χορηγήθηκε σε καλλιέργειες διαφοροποιημένων SH-SY5Y κυττάρων, για 16 ώρες. Ακολούθησε μονιμοποίηση και χρώση των κυττάρων-δεκτών είτε έναντι της πρωτεΐνης UCHL-1 (CM, UCHL-1) είτε έναντι της πρωτεΐνης EGFP (CM, EGFP). Όπως φαίνεται σαφώς στην **εικόνα 57B**, η πυρηνική χρώση (μπλε χρώμα) Hoechst συνεντοπίζεται τόσο με τη χρώση έναντι της πρωτεΐνης UCHL-1 (κόκκινο), όσο και με τη χρώση έναντι της πρωτεΐνης EGFP (πράσινο). Αντιθέτως, στα κύτταρα που δέχθηκαν το θρεπτικό μέσο μάρτυρα (CTL, CM), δεν παρουσιάζεται συνεντοπισμός. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, τα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα-δέκτες των θρεπτικών μέσων CM, UCHL-1 και CM, EGFP, φαίνεται να έχουν προσλάβει τις αντίστοιχες πρωτεΐνες. Δεδομένου ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες δεν εκκρίνονται από τα κύτταρα τα οποία τις εκφράζουν, πιθανότατα, κάποια ιϊκά σωματίδια να απελευθερώθηκαν στο φρέσκο θρεπτικό, παρά τις εκτενείς πλύσεις που προηγήθηκαν, με αποτέλεσμα να επιμολύνουν σε μικρότερο βαθμό και λιγότερο

αποτελεσματικά τα κύτταρα-δέκτες. Συνεπώς, δεν πρόκειται για πρόσληψη, αλλά για επιμόλυνση. Για το λόγο αυτό, η συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση, χρειάζεται λεπτό χειρισμό, ενώ η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρήζει ιδιαίτερης προσοχής.



Εικόνα 57: Η υπερέκφραση πρωτεϊνών με ιϊκούς φορείς μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα επιμολύνθηκαν με αδενοϊούς για επαγωγή της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης EGFP και UCHL-1. Το θρεπτικό μέσο από τα κύτταρα-δότες συνελέγη και χορηγήθηκε σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα. (A) Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τα κύτταρα-δότες αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western για την υπερέκφραση των πρωτεϊνών EGFP (αριστερά) και UCHL-1 (δεξιά). (B) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοκυτταροφθορισμού των κυττάρων-δεκτών (χρώση Hoechst:μπλε, χρώση έναντι της πρωτεΐνης EGPF: πράσινο, χρώση έναντι της πρωτεΐνης UCHL-1: κόκκινο). Κλίμακα: 50 μm. Σαν αρνητικός μάρτυρας χορηγήθηκε θρεπτικό από μη επιμολυσμένα κύτταρα.

3.2. Διαταραχές στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης και της ομοιόστασης των ιόντων Ca^{2+} ως πιθανού μηχανισμού τοξικής δράσης

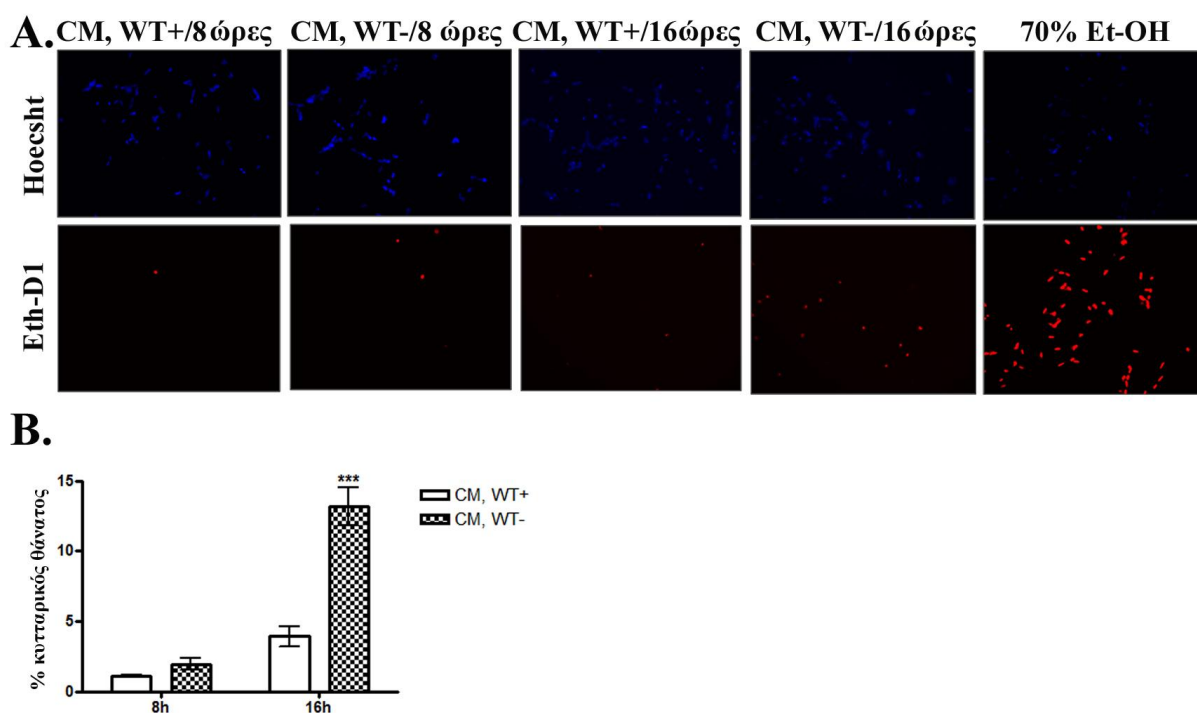
Συνοψίζοντας, η εκκρινόμενη α -συνουκλείνη μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων-δεκτών. Σημειωτέον δε, ότι το τοξικό δυναμικό της είναι ανάλογο του βαθμού διαφοροποίησης. Ωστόσο, τα κύτταρα που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία στην τοξική δράση της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης, δηλ. τα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα και οι πρωτογενείς νευρώνες, δε φαίνεται να προσλαμβάνουν την πρωτεΐνη, σε αντίθεση με τα περισσότερο «ανθεκτικά» διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα, τα οποία εμφανίζουν ενισχυμένη την ικανότητα πρόσληψής της. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, το νευροτοξικό μονοπάτι που επάγει η εκκρινόμενη α -συνουκλείνη, πιθανότατα να εντοπίζεται στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης.

Βιβλιογραφικές αναφορές προτείνουν ότι οι αμυλοειδογενείς πρωτεΐνες όπως, το πεπτιδίο του αμυλοειδούς Αβ, η πρωτεΐνη prion scrapie (PrPsc) και η α -συνουκλείνη είναι δυνατόν να διενεργούν τις τοξικές τους δράσεις μέσω αλληλεπίδρασης με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων-δεκτών και την επακόλουθη διατάραξη της ιονικής ισορροπίας μεταξύ του ενδοκυττάρου και του εξωκυττάρου χώρου (βλπ. **Εισαγωγή, ενότητα 4.2.4.**) (Danzer et al., 2007; Demuro et al., 2010; Kim et al., 2009; Marambaud et al., 2009; Quist et al., 2005; Tsigelny et al., 2007; Tsigelny et al., 2012). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, εξετάστηκε το ενδεχόμενο η επίδραση της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης στα κύτταρα-δέκτες να περιλαμβάνει αλλοιώσεις στο επίπεδο της κυτταρικής μεμβράνης και διαταραχές της ομοιόστασης του Ca^{2+} . Πιο συγκεκριμένα, δόθηκε έμφαση στην εξιχνίαση των βιολογικών γεγονότων που προηγούνται του προκαλούμενου από την α -συνουκλείνη κυτταρικού θανάτου.

3.2.1. Επίδραση της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης στην εισροή Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας στα διαιρούμενα και διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα-δέκτες

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ιδιαίτερη σημασία για την κατανόηση της πορείας νευροεκφυλισμού που πυροδοτεί η παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης, έχει η διερεύνηση των πρώιμων γεγονότων που λαμβάνουν χώρα, πριν την εκδήλωση του φαινότυπου του κυτταρικού θανάτου. Για το σκοπό αυτό, θρεπτικό μέσο από κύτταρα που εκφράζουν τα ενδογενή (CM, WT+) ή αυξημένα (CM, WT-) επίπεδα της α -

συνουκλείνης, χορηγήθηκε ως πηγή των φυσιολογικά εκκρινόμενων πρωτεϊνών σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα, για δύο διαφορετικά χρονικά διαστήματα, 8 και 16 ώρες. Τα χρονικά διαστήματα επιλέχθηκαν με σημείο αναφοράς τις 24 ώρες, όπου παρατηρείται ο κυτταρικός θάνατος παρουσία της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης (βλπ. ενότητα 2.1, εικόνα 44). Μετά το πέρας της επώασης, εξετάστηκε η επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων-δεκτών, με χρώση Hoechst (μπλε), που βάφει τους πυρήνες και αντιστοιχεί στον ολικό αριθμό των κυττάρων, και ομοδιμερές του αιθιδίου (EthD-1, κόκκινο), που σημαίνει τους πυρήνες των νεκρών κυττάρων (εικόνα 58A). Κατόπιν ποσοτικοποίησης του κυτταρικού θανάτου (εικόνα 58B), προέκυψε ότι οι 8 ώρες είναι το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, κατά τη



Εικόνα 58: Επώαση 8 ωρών είναι το μέγιστο χρονικό διάστημα, κατά το οποίο η τοξική δράση της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης δεν είναι εμφανής στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα.

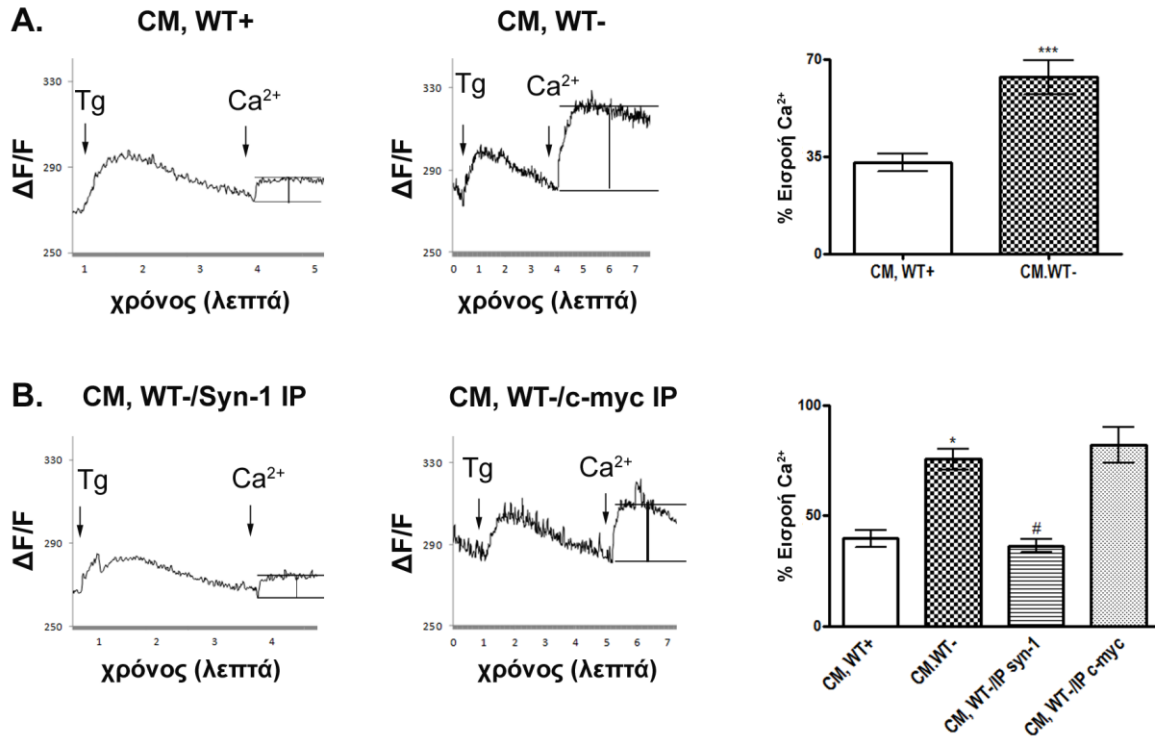
Θρεπτικό μέσο από κύτταρα που εκφράζουν τα ενδογενή (CM, WT+) ή αυξημένα (CM, WT-) επίπεδα α-συνουκλείνης χορηγήθηκε σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα., για 8 και 16 ώρες. (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοκυτταροφθορισμού των κυττάρων-δεκτών με χρώση Hoechst (μπλε) και PI (κόκκινο). Κλίμακα: 50 μm (B) Η ποσοτικοποίηση του % κυτταρικού θανάτου αποκάλυψε σημαντική αύξηση της κυτταροτοξικότητας παρουσία της α-συνουκλείνης στις 16 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος ± SEM, n = 3, και αναλύθηκαν με one way ANOVA test και κατόπιν με Tukey's test, *** $p < 0.001$ συγκρίνοντας το μεταξύ του CM, WT+ και του CM, WT-.

διάρκεια του οποίου, τα κύτταρα-δέκτες, παρουσία της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης, δεν παρουσίασαν βιοχημικά ή μορφολογικά χαρακτηριστικά του

κυτταρικού εκφυλισμού (**εικόνα 58A, B**). Κατά συνέπεια, ο χρόνος επώασης των 8 ωρών χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της επίδρασης της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης στην ομοιόσταση του Ca^{2+} .

Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω παρατηρήσεις, διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό πλούσιο σε εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη (CM,WT-) ή θρεπτικό μάρτυρα (CM,WT+), για 8 ώρες. Ακολούθησε σήμανση των κυττάρων-δεκτών με τη χρωστική Fura 2-AM, η οποία δεσμεύει το ελεύθερο κυτταροπλασματικό Ca^{2+} , (free cytosolic Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$) (**βλπ. Μέθοδοι, ενότητα 13.1**). Αφού τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα που δεν περιείχε Ca^{2+} , το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετήθηκε σε κυψελίδα, και μέσω του φθορισμόμετρου πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση και καταγραφή των μεταβολών του $[\text{Ca}^{2+}]_i$, σε πραγματικό χρόνο. Αρχικά, χορηγήθηκαν 100 nM θαψιγκαργκίνης (thapsigargin, Tg) (**εικόνα 59A**). Πρόκειται για φαρμακολογικό αναστολέα της ATPάσης του σαρκοενδοπλασματικού δικτύου (SERCA), που προκαλεί την εκκένωση του Ε.Δ. από το Ca^{2+} (πρώτη κορυφή). Στη συνέχεια, προστέθηκαν εξωγενώς 3 mM Ca^{2+} , υπό τη μορφή CaCl_2 και μετρήθηκε η ικανότητα των κυττάρων να προσλαμβάνουν το εξωγενώς χορηγούμενο Ca^{2+} , κατόπιν εκκένωσης του Ε.Δ. (δεύτερη κορυφή), με άλλα λόγια η εισροή ασβεστίου λόγω χωρητικότητας (CCE) (**εικόνα 59A**).

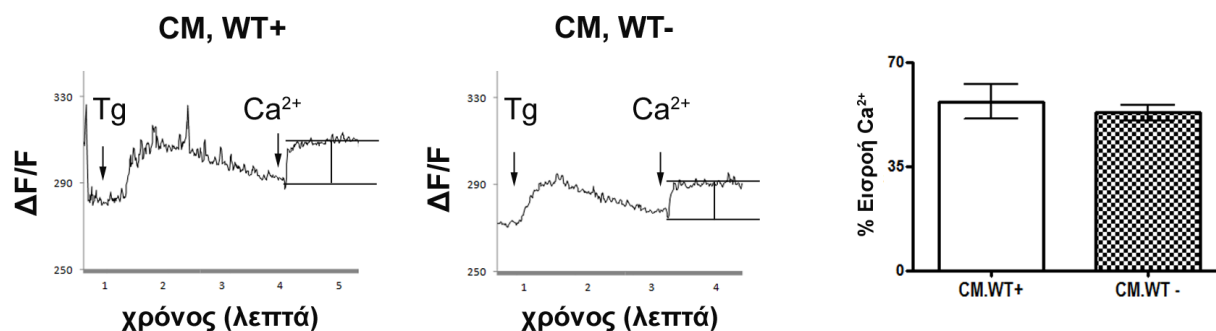
Τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με θρεπτικό πλούσιο σε εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη (CM, WT-) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του $[\text{Ca}^{2+}]_i$, συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες (CM, WT+) (**εικόνα 59A**). Σημειωτέον, η παρατηρούμενη αύξηση της εισροής Ca^{2+} (CCE), σχετίζεται άμεσα με την παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης, καθώς ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης από το θρεπτικό μέσο (CM,WT-/Syn-1 IP), μειώνει σημαντικά την προκαλούμενη από την θαψιγκαργκίνη εισροή Ca^{2+} (**εικόνα 59B**). Αντιθέτως, ανοσοκατακρήμνιση με το άσχετο αντίσωμα c-myc (CM, WT-/ c-myc IP), δεν οδήγησε σε αντίστοιχη μείωση (**εικόνα 59B**).



Εικόνα 59: Η εκκρινόμενη α-συνουκλείνη προκαλεί αύξηση της εισροής Ca²⁺ στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα.

(A) Διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλείνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μέσο μάρτυρα (CM, WT+), για 8 ώρες και μετρήθηκε η εισροή Ca²⁺, κατόπιν εκκένωσης του Ε.Δ. (CCE). Αντιπροσωπευτικές καμπύλες Ca²⁺ που απεικονίζουν την εισροή Ca²⁺ λόγω χωρητικότητας (CCE) (αριστερά). Ποσοτική ανάλυση του % ποσοστού εισροής Ca²⁺, κατόπιν κανονικοποίησης προς την κινητοποίηση Ca²⁺ που προκαλείται από την προσθήκη της Tg (1^η κορυφή), (δεξιά) (n = 16; *** p < 0.001). (B) Διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο από το οποίο είχε ανοσοκατακρημνιστεί η εκκρινόμενη α-συνουκλείνη (CM, WT-/Syn-1 IP) ή θρεπτικό μέσο μάρτυρα (CM, WT-/c-myc IP), για 8 ώρες. Αντιπροσωπευτικές καμπύλες Ca²⁺ (αριστερά). Ποσοτική ανάλυση του % ποσοστού εισροής Ca²⁺, (δεξιά) (n = 3; * p < 0.05, συγκρίνοντας μεταξύ των κυττάρων που επώαστηκαν με CM, WT+ και CM, WT-; # p < 0.05, συγκρίνοντας μεταξύ των κυττάρων που επώαστηκαν με CM, WT-/Syn-1 IP και CM, WT- ή CM, WT-/c-myc IP).

Τέλος, επώαση των διαιρούμενων SH-SY5Y κυττάρων με θρεπτικό πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλείνη (CM, WT-), σε αντίθεση με τα διαφοροποιημένα κύτταρα, δεν προκάλεσε αλλαγές στην εισροή Ca²⁺ (εικόνα 60). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η εκκρινόμενη α-συνουκλείνη διαταράσσει τη ομοιόσταση του Ca²⁺, μόνο σε κύτταρα τα οποία έχουν αποκτήσει έναν νευρωνικό φαινότυπο και είναι πιο ευάλωτα στην τοξική δράση τα εκκρινόμενης α-συνουκλείνης (εικόνες 44,46).



Εικόνα 60: Η εισροή Ca^{2+} στα διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα δεν επηρεάζεται από την παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης.

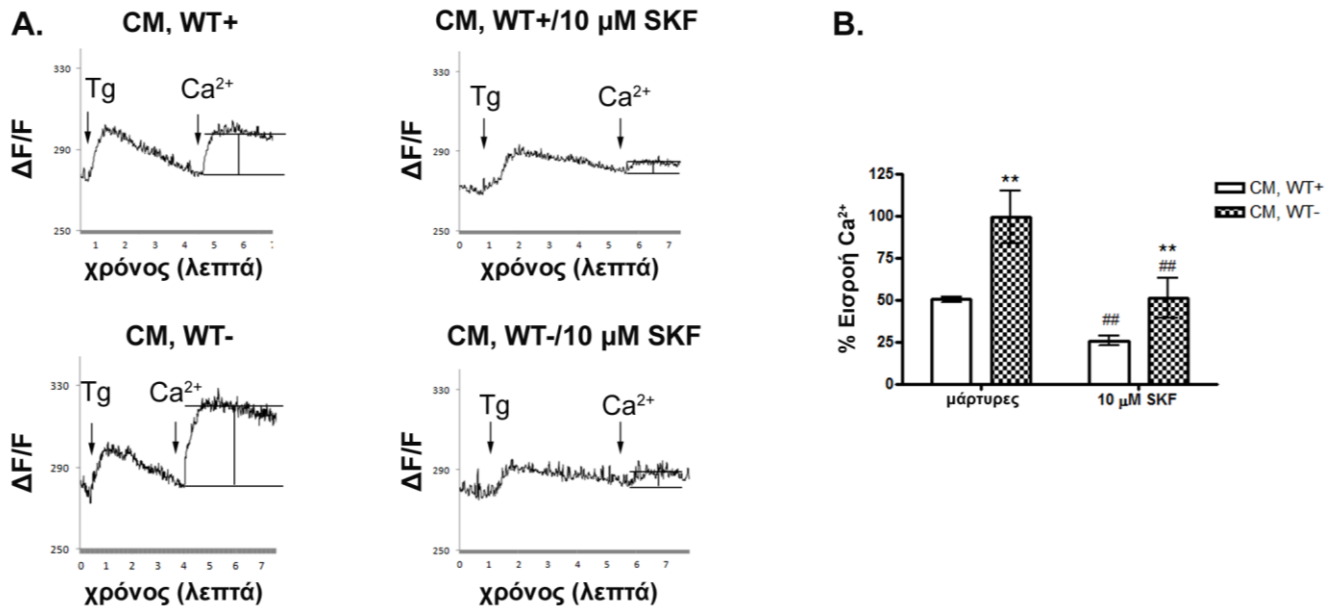
Διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα επώαστηκαν με CM, WT- ή CM, WT+, για 8 ώρες και η εισροή Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας μετρήθηκε, όπως παραπάνω. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην % εισροή Ca^{2+} μεταξύ των δύο ομάδων ($n = 3$).

3.2.2. Συμμετοχή των καναλιών Ca^{2+} της πλασματικής μεμβράνης, στην επαγόμενη από την εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη αύξηση της εισροής Ca^{2+} , στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα-δέκτες

Στα νευρικά κύτταρα, καθώς και σε πολλούς άλλους κυτταρικούς τύπους, τα ιόντα Ca^{2+} είναι δυνατόν να εισέλθουν μέσω ενός αριθμού διαφορετικών καναλιών στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης (βλπ. Εισαγωγή, ενότητα 4.2.2). Υπάρχουν κανάλια που ενεργοποιούνται κατόπιν εκκένωσης των ενδοκυττάρων αποθηκών Ca^{2+} , εκείνα που ενεργοποιούνται κατόπιν εκπόλωσης της πλασματικής μεμβράνης (τασεοελεγχόμενα κανάλια), καθώς και αυτά που ενεργοποιούνται από κάποιον προσδέτη (SOCs, VOCs, ROCs, αντιστοίχως).

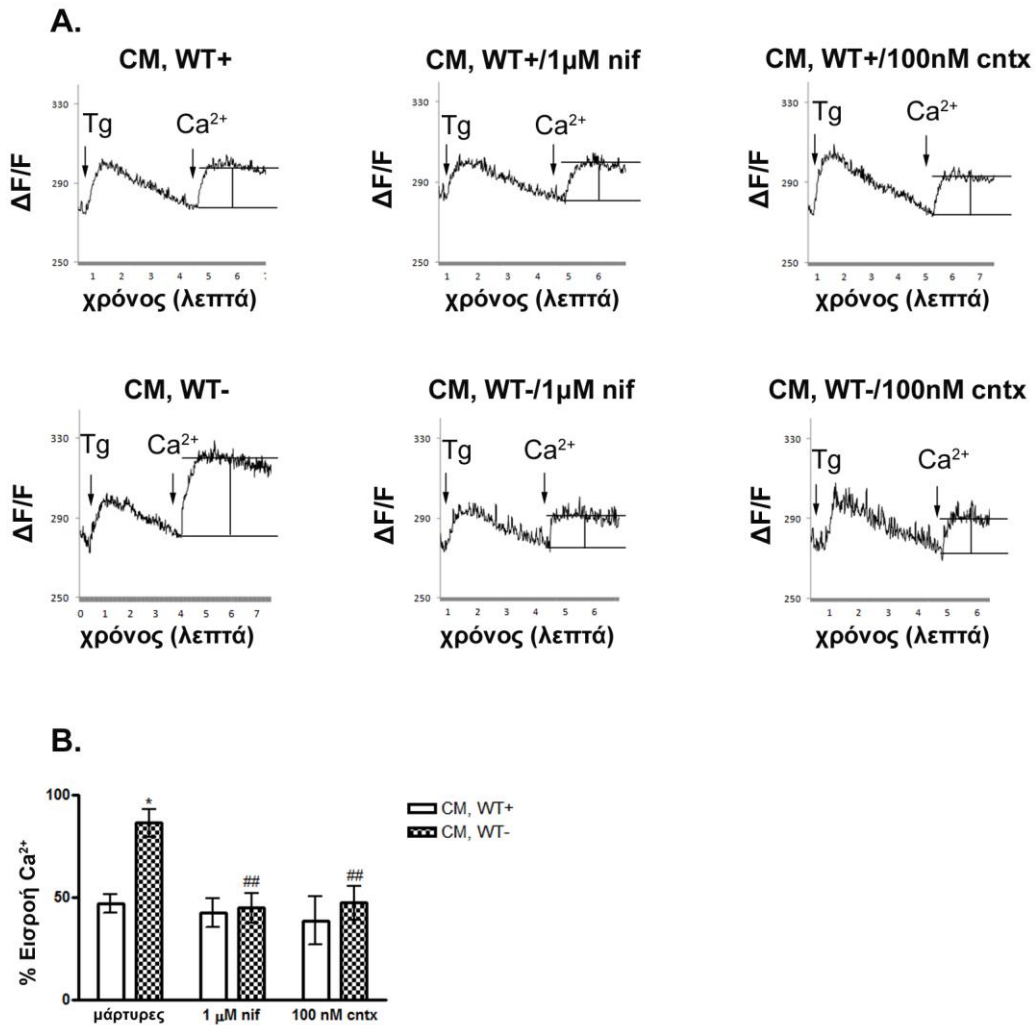
Αρχικά διερευνήθηκε ο ρόλος των μεμβρανικών καναλιών Ca^{2+} SOCs, στη διευκολυνόμενη από την παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης εισροή Ca^{2+} . Για το σκοπό αυτό, κατά τη διάρκεια της μέτρησης της εισροής Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας σε διαφοροποιημένα κύτταρα που είχαν επωαστεί όπως και παραπάνω, χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός αναστολέας των καναλιών SOCs, SKF (10 μ M) (βλπ. Υλικά, ενότητα 3.7). Σύντομη προεπώαση με τον SKF στην αρχή της μέτρησης, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της εισροής Ca^{2+} τόσο στα κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί με θρεπτικό πλούσιο σε εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη (CM,WT-), όσο και στα κύτταρα μάρτυρες (CM,WT+) (εικόνα 61A, B). Ωστόσο η διαφορά της εισροής Ca^{2+} μεταξύ των δύο ομάδων κυττάρων, παρουσία του αναστολέα SKF, παρέμεινε (εικόνα 61B). Το γεγονός αυτό

υποδεικνύει τη συμμετοχή και άλλων μεμβρανικών καναλιών στην παρατηρούμενη εισροή Ca^{2+} , παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης.



Εικόνα 61: Η αύξηση της εισροής Ca^{2+} , παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης, στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα, οφείλεται μόνο μερικώς στα κανάλια SOCs. Διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μέσο μάρτυρα (CM, WT+), για 8 ώρες και μετρήθηκε η εισροή Ca^{2+} , κατόπιν εκκένωσης του Ε.Δ. (CCE), παρουσία/απουσία του αναστολέα SKF. (Α) Αντιπροσωπευτικές καμπύλες εισροής Ca^{2+} . (Β) Ποσοτική ανάλυση του % της εισροής Ca^{2+} , κατόπιν κανονικοποίησης προς την κινητοποίηση Ca^{2+} που προκαλείται από την προσθήκη της Tg (1^η κορυφή) (n =4; * p <0.01, συγκρίνοντας μεταξύ των κυττάρων που επωάστηκαν με CM, WT+ και CM, WT-, παρουσία/απουσία του SKF; ## p <0.01 συγκρίνοντας μεταξύ των κυττάρων που επωάστηκαν ή όχι με τον SKF).

Σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές η α -συνουκλεΐνη είναι δυνατόν να διαμορφώνει τη λειτουργία των τασεοελεγχόμενων καναλιών VOCs (Adameczyk and Strosznajder, 2006; Hettiarachchi et al., 2009; Kang et al., 2012). Προκειμένου να διερευνηθεί η συμμετοχή των L- και N-τύπου τασεοελεγχόμενων καναλιών Ca^{2+} στο υπό μελέτη κυτταρικό μοντέλο, πραγματοποιήθηκε φαρμακολογική αναστολή τους, με τους ειδικούς αναστολείς νιφεδιπίνη (nifedipine, nif, 1 μ M) και ω -κονοτοξίνη (ω -conotoxin GVIA, cntx, 100 nM), αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ότι σύντομη προεπάση τόσο με τη νιφεδιπίνη, όσο και την ω -κονοτοξίνη, μείωσε στατιστικά σημαντικά την εισροή Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας (CCE), μόνο στα κύτταρα στα οποία είχε προηγουμένως χορηγηθεί θρεπτικό πλούσιο σε εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη (εικόνα 62A, B). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, τόσο οι L- όσο και οι N- τύποι



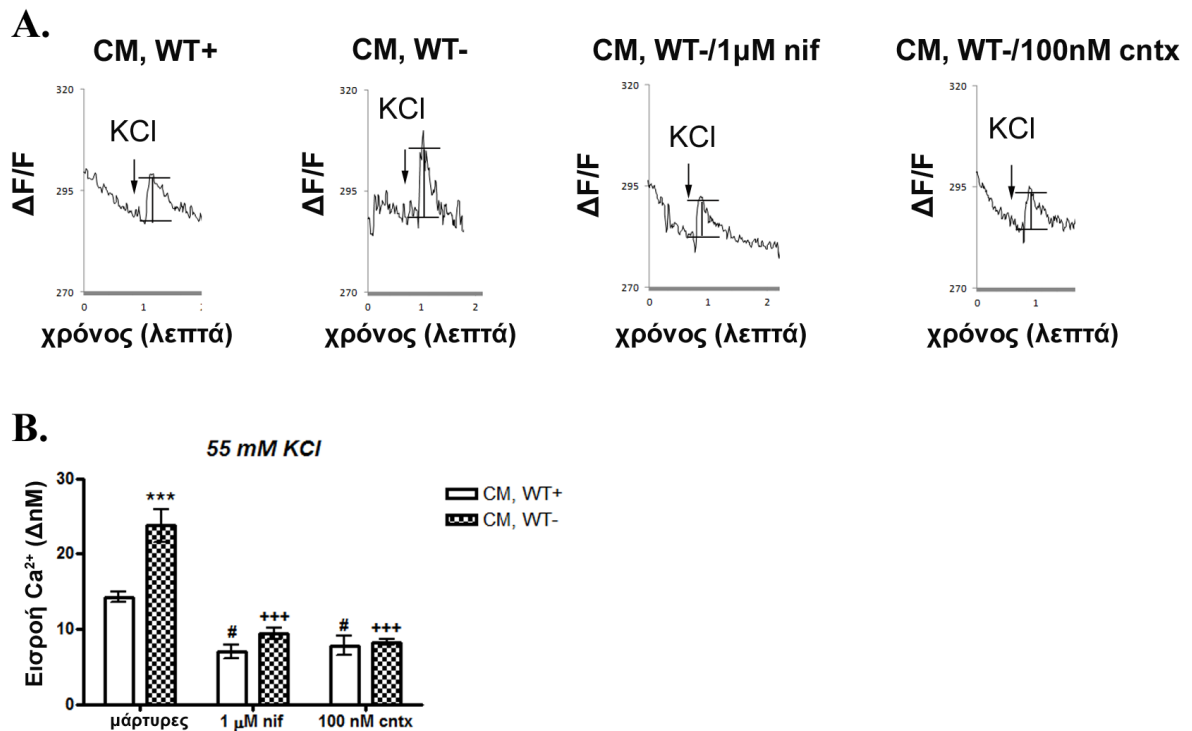
Εικόνα 62: Τα L- και N- τύπου τασεοελεγχόμενα κανάλια συμβάλλουν στην αύξηση της εισροής Ca²⁺, λόγω χωρητικότητας, παρουσία της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα.

Διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλείνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μέσο μάρτυρα (CM, WT+), για 8 ώρες και μετρήθηκε η εισροή Ca²⁺, κατόπιν εκκένωσης του Ε.Δ. (CCE), παρουσία/απουσία του αναστολέα νιφεδιπίνη (nif) ή ω-κοντοζίνη (cntx). (A) Αντιπροσωπευτικές καμπύλες εισροής Ca²⁺ παρουσία των αναστολέων. (B) Ποσοτική ανάλυση του % της εισροής Ca²⁺, κατόπιν κανονικοποίησης προς την κινητοποίηση Ca²⁺ που προκαλείται από την προσθήκη της Tg (1^η κορυφή) παρουσία/ απουσία των αναστολέων (n = 5; * p<0.05, συγκρίνοντας μεταξύ των κυττάρων που επωάστηκαν με CM, WT+ και CM, WT-; ##p<0.01 συγκρίνοντας μεταξύ των κυττάρων που επωάστηκαν με CM, WT-, παρουσία/απουσία των αναστολέων).

τασσεοελεγχόμενων καναλιών συμμετέχουν στην παρατηρούμενη αύξηση της εισροής Ca²⁺. Αντιθέτως, κανένας από του δύο αναστολείς δεν επηρέασε την εισροή Ca²⁺ λόγω χωρητικότητας στα κύτταρα μάρτυρες. Συμπερασματικά, παρουσία της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης, τα κανάλια VOCs πιθανά να ενεργοποιούνται και

τρόπον τινά να συμμετέχουν/συνεισφέρουν στη διαμεσολαβούμενη από τα κανάλια SOCs εισροή Ca^{2+} .

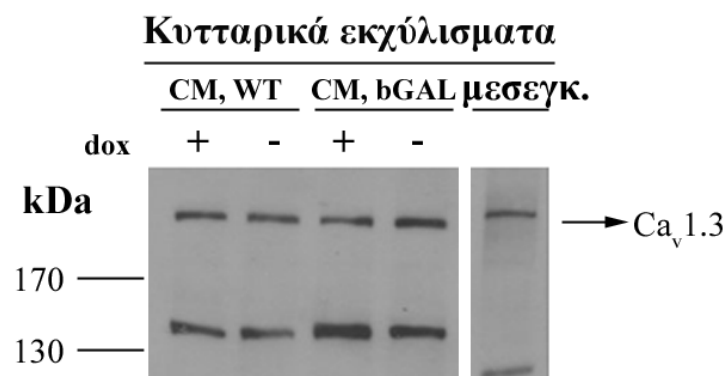
Λόγω της σημαντικής συμβολής των L- και N- τασεολεγχόμενων καναλιών στο φαινόμενο της αυξημένης εισροής Ca^{2+} , παρουσία της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης, ελέγχθηκε η λειτουργικότητά τους, στο υπό μελέτη σύστημα. Για το σκοπό αυτό, μετρήθηκε η εισροή Ca^{2+} , κατόπιν εκπόλωσης με 55 mM KCl, σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα, τα οποία είχαν προεπωαστεί για 8 ώρες, παρουσία (CM,WT-) ή απουσία (CM,WT+) εκκρινόμενης α-συνουκλείνης. Και οι δύο ομάδες κυττάρων αποκρίθηκαν ταχύτατα στη χορήγηση KCl, ωστόσο η



Εικόνα 63: Τα L- και N- τύπου τασεολεγχόμενα κανάλια ευθύνονται για την επαγόμενη από την α-συνουκλείνη αύξηση της εισροής Ca^{2+} , κατόπιν εκπόλωσης, στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα. Διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλείνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μέσο μάρτυρα (CM, WT+), για 8 ώρες και μετρήθηκε η εισροή Ca^{2+} , κατόπιν χορήγησης KCl, παρουσία/απουσία των αναστολέων νιφεδιπίνη (nif) ή ω-κονοτοξίνη (cntx). (A) Αντιπροσωπευτικές καμπύλες Ca^{2+} παρουσία/απουσία των αναστολέων. (B) Ποσοτική ανάλυση της μεταβολής των επιπέδων του $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta nM Ca^{2+}$), κατόπιν χορήγησης KCl, παρουσία/απουσία των αναστολέων ($n = 4$; *** $p < 0.001$, συγκρίνοντας μεταξύ των κυττάρων που επώαστηκαν με CM, WT+ και CM, WT-; # $p < 0.05$ συγκρίνοντας μεταξύ των κυττάρων που επώαστηκαν με CM, WT+, παρουσία/απουσία της νιφεδιπίνης ή της ω-κονοτοξίνης; +++ $p < 0.001$, συγκρίνοντας μεταξύ των κυττάρων που επώαστηκαν με CM, WT-, παρουσία/απουσία των αναστολέων).

παρουσία της α-συνουκλείνης φάνηκε να ενισχύει σημαντικά την εισροή Ca^{2+} (εικόνα 63A, B). Χορήγηση είτε της νιφεδιπίνης είτε της ω-κονοτοξίνης, μείωσε

στατιστικά σημαντικά την είσοδο του Ca^{2+} και στις δύο ομάδες, επιβεβαιώνοντας την ορθή λειτουργία των τασεοελεγχόμενων καναλιών στο εν λόγω σύστημα. Σημειωτέον, η προσθήκη και των δύο αναστολέων, χωριστά, εξαλείφει την παρατηρούμενη διαφορά στην εισροή Ca^{2+} , μεταξύ των συνθηκών παρουσίας και απουσίας της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης (εικόνα 63B). Κατά αυτόν τον τρόπο, υπογραμμίζεται η σπουδαιότητα του ρόλου των καναλιών αυτών στην αύξηση της εισροής Ca^{2+} παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί, ότι η φυσιολογικά εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη, δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των κεντρικών υπομονάδων L- και N- τύπου καναλιών (εικόνα 64).



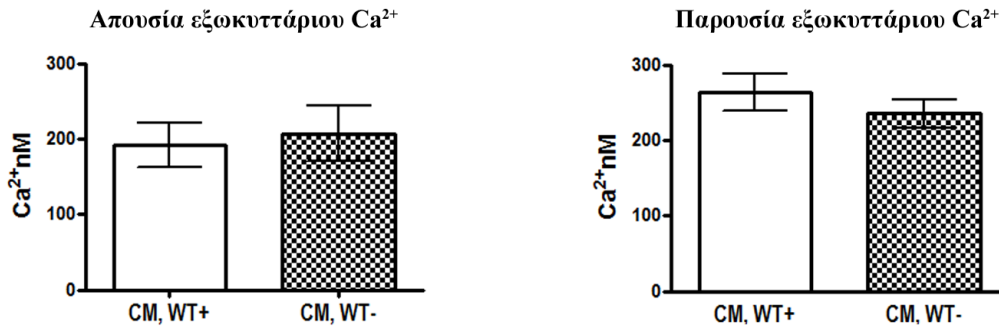
Εικόνα 64: Η εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης των L-τύπου τασεοελεγχόμενων καναλιών Ca^{2+} .

Θρεπτικό μέσο από κύτταρα που είτε υπερέκφραζαν (CM,WT-) ή όχι (CM,WT+) την α -συνουκλεΐνη, καθώς και κύτταρα που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη β -γαλακτοσιδάση (CM,bGAL) χορηγήθηκαν σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y για 8 ώρες. Τα επίπεδα έκφρασης των L-τύπου VOCs εξετάστηκαν με ανοσοαποτύπωμα κατά Western, με ειδικό αντίσωμα έναντι της υπομονάδας $\text{Ca}_v1.3$. Σαν θετικός μάρτυρας για την ανίχνευση της υπομονάδας $\text{Ca}_v1.3$ χρησιμοποιήθηκε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα από μεσεγκέφαλο ενήλικα επίμιος.

3.2.3. Υποκυτταρική διαμερισματοποίηση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} , στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα-δέκτες, παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης

Αυξημένα ενδοκυττάρια επίπεδα της α -συνουκλεΐνης, καθώς και πρωτοϊνιδιακές μορφές της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (prefibrillar forms) αυξάνουν τη διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης σε ιόντα, και κατά συνέπεια, τα επίπεδα του $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Danzer et al., 2007; Furukawa et al., 2006). Προς την κατεύθυνση αυτή, διερευνήθηκε το ενδεχόμενο η αυξημένη εισροή Ca^{2+} , παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης, να αντικατοπτρίζεται σε ανάλογη αύξηση των

επιπέδων του ελεύθερου κυτταροπλασματικού Ca^{2+} . Για το σκοπό αυτό, διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό πλούσιο σε α-συνουκλείνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μάρτυρα (CM, WT+), όπως και παραπάνω, και κατόπιν μετρήθηκαν τα επίπεδα $[\text{Ca}^{2+}]_i$, σε συνθήκες παρουσίας ή απουσίας Ca^{2+} . Ωστόσο, δεν εντοπίστηκε καμία διαφορά στα επίπεδα $[\text{Ca}^{2+}]_i$ μεταξύ των δύο ομάδων κυττάρων (εικόνα 65).

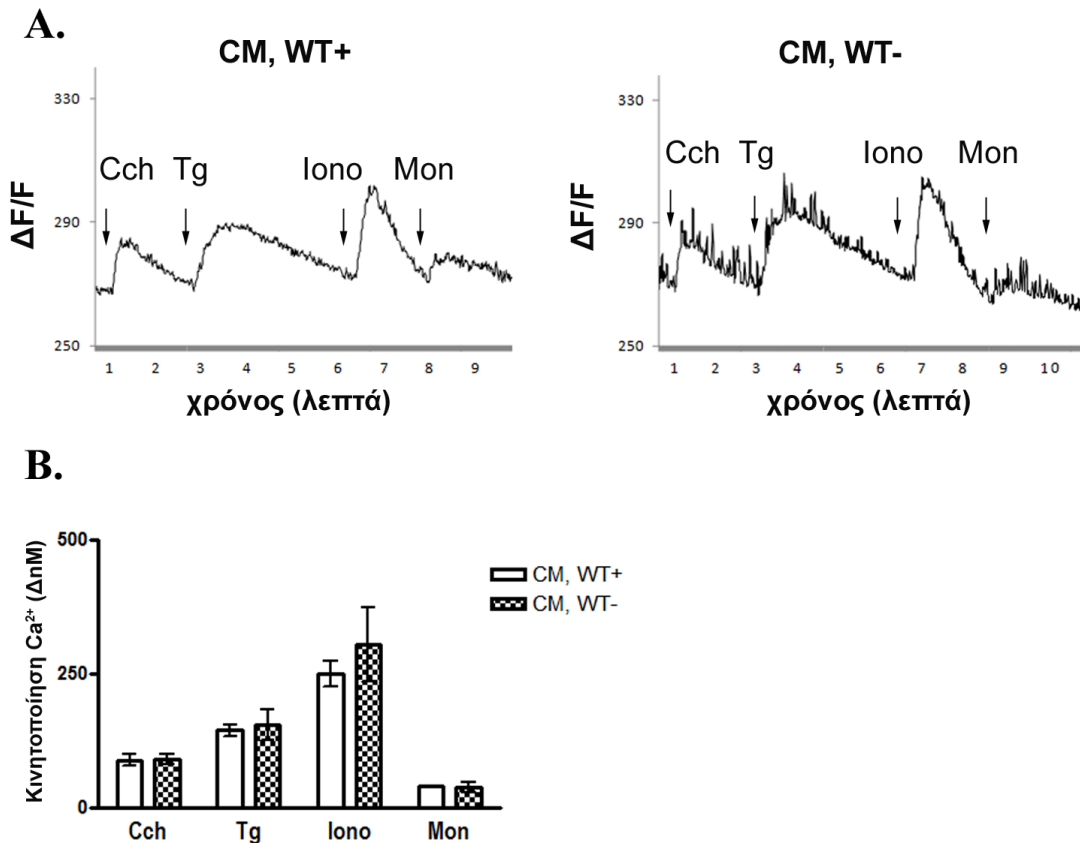


Εικόνα 65: Η εκκρινόμενη α-συνουκλείνη δεν επηρεάζει τα επίπεδα του $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Θρεπτικό μέσο από κύτταρα που υπερέκφραζαν (CM, WT-) ή όχι (CM, WT+) την α-συνουκλείνη, χορηγήθηκαν σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y για 8 ώρες. Ακολούθησε χρώση με Fura 2AM και υπολογισμός των επιπέδων του ελεύθερου κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , σε συνθήκες απουσίας (αριστερά) και παρουσίας Ca^{2+} (δεξιά). Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των κυττάρων που επώαστηκαν με CM, WT+ είτε με CM WT- (n = 3, σε συνθήκες παρουσίας Ca^{2+} ; n = 11, σε συνθήκες απουσίας Ca^{2+}).

Δεδομένου ότι η παρουσία της α-συνουκλείνης διευκολύνει την εισροή Ca^{2+} , χωρίς ωστόσο να μεταβάλλονται τα επίπεδα του $[\text{Ca}^{2+}]_i$, εξετάστηκε η περίπτωση της συσσώρευσης του πλεονάζοντος Ca^{2+} σε συγκεκριμένες ενδοκυττάρειες αποθήκες (βλπ. Μέθοδοι, ενότητα 13.1). Σε συνθήκες απουσίας Ca^{2+} (Ca^{2+} deprived conditions), χορηγήθηκαν, αρχικά, 5 μM καρβαχόλης (carbachol, Cch), ενός χολινεργικού αγωνιστή των υποδοχέων IP_3 στο Ε.Δ. (IP_3Rs), με αποτέλεσμα την εκροή Ca^{2+} από το Ε.Δ. στο κυτταρόπλασμα. Όταν η προκαλούμενη από την καρβαχόλη αύξηση των επιπέδων $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ρυθμίστηκε στα βασικά επίπεδα, προστέθηκαν 100 nM θαμγικαργκίνης (Tg), ενός μη αντιστρεπτού αναστολέα των αντλιών SERCA, επιτυγχάνοντας την πλήρη εκκένωση του Ε.Δ. Εν συνεχεία, χορηγήθηκαν 500 nM ιονομυκίνης (ionomycin, Iono), ενός ιονοφόρου Ca^{2+} . Με την ολοκλήρωση και αυτής της απόκρισης, 20 μM μονενσίνης Α (monensin A, Mon), ενός ιονοφόρου του Na^+ οδήγησαν σε απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} από τα όξινα σωματίδια, όπως τα λυσοσώματα. Αντιπροσωπευτική καμπύλη Ca^{2+} , κατόπιν της

σειριακής εκκένωσης των ενδοκυττάρων αποθηκών, παρουσιάζεται στην **εικόνα 66A**. Ποσοτικοποίηση της κινητοποίησης Ca^{2+} (αύξηση $[Ca^{2+}]_i$), ύστερα από τη χορήγηση του κάθε φαρμακολογικού παράγοντα, χωριστά, δεν αποκάλυψε σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων μαρτύρων και αυτών που είχαν προεπωαστεί με α -συνουκλείνη (**εικόνα 66B**). Παρόμοια ήταν και αποτελέσματα που προέκυψαν σε συνθήκες παρουσίας Ca^{2+} (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα).

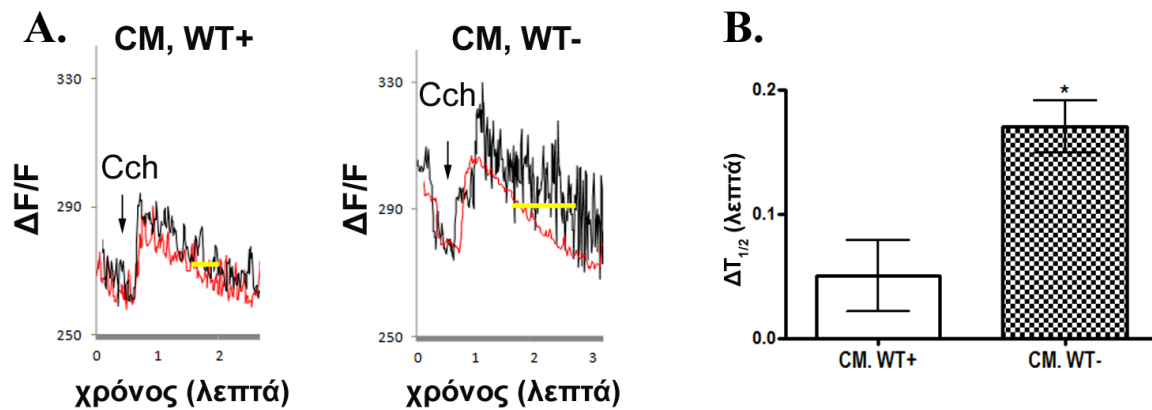


Εικόνα 66: Παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης, δεν παρατηρείται συσσώρευση ιόντων Ca^{2+} στο Ε.Δ. και τα όξινα σωματίδια.

Διαφοροποιημένα SH-SY5Y επώαστηκαν για 8 ώρες με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α -συνουκλείνη (CM,WT-) ή θρεπτικό μάρτυρα (CM,WT+) και ακολούθησε χρώση με Fura 2AM. (A) Αντιπροσωπευτικές καμπύλες Ca^{2+} , που απεικονίζουν τις μεταβολές του $[Ca^{2+}]_i$, κατόπιν σειριακής χορήγησης καρβαχόλης (Cch), θαμνιγκαρκίνης (Tg), ιονομυκίνης (Iono) και μονενσίνης (Mon), σε συνθήκες απουσίας Ca^{2+} . (B) Ποσοτική ανάλυση της κινητοποίησης Ca^{2+} , κατόπιν προσθήκης των φαρμακολογικών παραγόντων σε κύτταρα που επώαστηκαν με CM, WT+ και CM, WT-, απουσία Ca^{2+} (n = 3). Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων.

Επιπλέον, υπολογίστηκε η ταχύτητα της κινητοποίησης του Ca^{2+} , κατόπιν χορήγησης καρβαχόλης και στις δύο ομάδες κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της απόκρισης στην καρβαχόλη, τα κύτταρα που είχαν προεπωαστεί με εκκρινόμενη α -συνουκλείνη, εμφάνισαν σημαντική καθυστέρηση στο ρυθμό επαναφοράς του $[Ca^{2+}]_i$,

στα βασικά επίπεδα, παρουσία Ca^{2+} , συγκριτικά με τις συνθήκες απουσίας Ca^{2+} (εικόνα 67). Αντιθέτως, στα κύτταρα μάρτυρες, η αντίστοιχη καθυστέρηση ήταν σαφώς μικρότερη. Δεδομένου ότι η καρβαχόλη πυροδοτεί την εισροή Ca^{2+} από τον εξωκυττάριο χώρο, σε δεύτερο χρόνο, η παρατηρούμενη καθυστέρηση επιβεβαιώνει περαιτέρω το γεγονός ότι η εκκρινόμενη α -συνουκλείνη ενισχύει την είσοδο Ca^{2+} από την πλασματική μεμβράνη. Σημειωτέον, η καρβαχόλη είναι ένα πιο ήπιο ερέθισμα, συγκριτικά με το μη-αντιστρεπτό αναστολέα θαψιγκαργκίνη, ο οποίος αποτελεί παράγοντα κυτταρικού στρες.

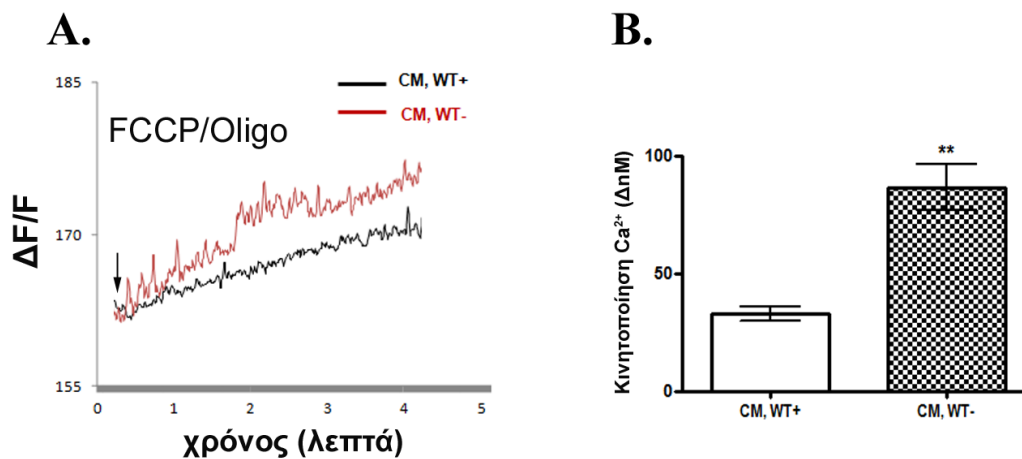


Εικόνα 67: Η παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης επηρεάζει την ταχύτητα κινητοποίησης του Ca^{2+} , κατόπιν χορήγηση καρβαχόλης.

(A) Αντιπροσωπευτικές καμπύλες Ca^{2+} από κύτταρα που επώαστηκαν με CM, WT+ και CM, WT-, όπως παραπάνω, οι οποίες απεικονίζουν την απόκριση στην καρβαχόλη (CCh), απουσία (κόκκινη καμπύλη) και παρουσία Ca^{2+} (μαύρη καμπύλη). (B) Γραφική απεικόνιση της σύγκρισης του χρόνου που απαιτείται, για να μειωθεί στο μισό η προκαλούμενη από την καρβαχόλη αύξηση των επιπέδων $[\text{Ca}^{2+}]_i$, σε συνθήκες παρουσίας και απουσίας Ca^{2+} ($\Delta T_{1/2}$). Τα κύτταρα που επώαστηκαν με CM, WT-, εμφανίζουν σημαντική καθυστέρηση στη ρύθμιση των επιπέδων $[\text{Ca}^{2+}]_i$, στις συνθήκες που υπάρχει εξωκυττάριο Ca^{2+} συγκριτικά με τις συνθήκες απουσίας Ca^{2+} ($n = 3$; * $p < 0.05$).

Συνοψίζοντας, η παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης διευκολύνει την εισροή Ca^{2+} , χωρίς ωστόσο, μέχρι στιγμής, να έχει παρατηρηθεί κάποιο προτιμητέο υποκυτταρικό οργανίδιο για την αποθήκευσή του. Επιπλέον, σε συνθήκες απουσίας Ca^{2+} , παρατηρήθηκε υψηλότερη κινητοποίηση του ιόντος, κατόπιν χορήγησης της ιονομυκίνης, στα κύτταρα που είχαν επωασθεί με α -συνουκλείνη, συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες (εικόνα 66B). Παρότι δεν πρόκειται για μια στατιστικά σημαντική διαφορά, αυτή η τάση υπονοεί τη συμμετοχή μιας δυναμικής δεξαμενής συσσώρευσης Ca^{2+} , διαφορετικής από αυτές που είχαν εξετασθεί μέχρι αυτό το σημείο. Κατά συνέπεια, εξετάστηκε η περίπτωση τα μιτοχόνδρια να επιτελούν αυτή τη λειτουργία στο υπό μελέτη σύστημα. Για το σκοπό αυτό, χορηγήθηκαν 5 μM του

μιτοχονδριακού αποσυζεύκτη FCCP, μαζί με 2.5 $\mu\text{g/mL}$ ολιγομυκίνης (oligomycin, Oligo) (βλπ. Μέθοδοι, ενότητα 13.1) και στις δύο ομάδες κυττάρων. Η ολιγομυκίνη παρεμποδίζει την κατανάλωση του ATP μέσω της αντιστροφής του τρόπου λειτουργίας (the reversed mode activity) της συνθετάσης του F1/F0. Σε συνθήκες απουσίας Ca^{2+} , η συνδυαστική χορήγηση FCCP και ολιγομυκίνης, εκκενώνει τις μιτοχονδριακές αποθήκες Ca^{2+} , με επακόλουθη αύξηση των επιπέδων του $[\text{Ca}^{2+}]_i$, η οποία αντικατοπτρίζει το μιτοχονδριακό φορτίο Ca^{2+} (Hettiarachchi et al., 2009). Τα κύτταρα που είχαν προεπωαστεί με εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη εμφάνισαν ιδιαίτερα υψηλή κινητοποίηση Ca^{2+} ύστερα από τη χορήγηση FCCP και ολιγομυκίνης (εικόνα 68A). Ποσοτικοποίηση της μεταβολής των επιπέδων του ελεύθερου κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , ύστερα από την προσθήκη των φαρμάκων (εκφραζόμενη ως $\Delta\text{nM } [\text{Ca}^{2+}]_i$ 4 min από τη στιγμή της προσθήκης) αποκάλυψε ότι το μιτοχονδριακό φορτίο Ca^{2+} είναι σημαντικά υψηλότερο, παρουσία α -συνουκλεΐνης, σε σχέση με τις συνθήκες μάρτυρα (32.83 ± 2.97 και 86.36 ± 9.75 , συγκρίνοντας μεταξύ CM, WT+ και CM, WT-, αντίστοιχα) (εικόνα 68B). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, κατόπιν έκθεσης των κυττάρων σε θρεπτικό πλούσιο σε α -συνουκλεΐνη, η επακόλουθη αυξημένη εισροή Ca^{2+} ρυθμίζεται, εν μέρει, μέσω της συσσώρευσης του ιόντος στα μιτοχόνδρια.

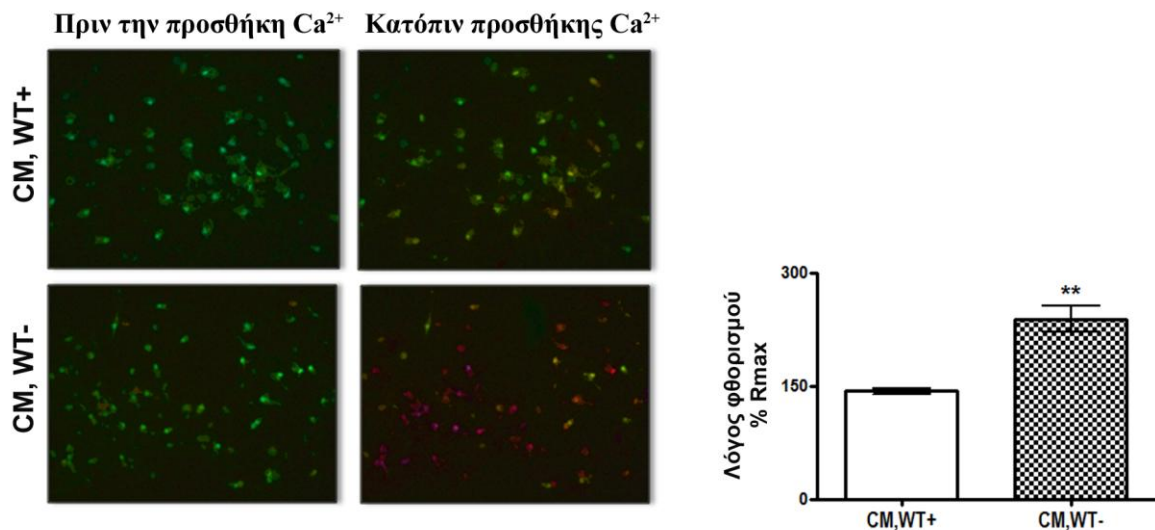


Εικόνα 68: Η αυξημένη εισροή Ca^{2+} , παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης, εξισορροπείται από τη συσσώρευση ιόντων Ca^{2+} στα μιτοχόνδρια.

Διαφοροποιημένα SH-SY5Y επώαστηκαν για 8 ώρες με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μάρτυρα (CM, WT+) και ακολούθησε χρώση με Fura 2AM. (A) Αντιπροσωπευτικές καμπύλες Ca^{2+} ύστερα από τη συνδυαστική χορήγηση του FCCP και της ολιγομυκίνης (Oligo), σε συνθήκες απουσίας Ca^{2+} . (B) Γράφημα που απεικονίζει την κινητοποίηση των ιόντων Ca^{2+} , κατόπιν εκκένωσης των μιτοχονδριακών αποθηκών Ca^{2+} . Παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη κινητοποίηση Ca^{2+} με την προσθήκη FCCP/Oligo στα κύτταρα που επώαστηκαν με CM, WT- ($n = 3$; ** $p < 0.01$).

3.2.4. Επίδραση της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης στην εισροή Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας στους πρωτογενείς νευρώνες

Όπως ήδη αναφέρθηκε, (ενότητα 2.1, εικόνα 47), η φυσιολογικά εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των πρωτογενών φλοιϊκών νευρώνων. Σαν επόμενο βήμα, εξετάστηκε το ενδεχόμενο η παρατηρούμενη νευροτοξική δράση, να σχετίζεται με πρώιμες αλλοιώσεις στην ομοιόσταση του Ca^{2+} . Για το σκοπό αυτό, σε 7 ημερών καλλιέργεια πρωτογενών νευρώνων από φλοιό εγκεφάλου επίμυ, χορηγήθηκε θρεπτικό που περιείχε φυσιολογικά εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μάρτυρα, για 8 ώρες. Ακολούθησε χρώση με Fura2-AM (βλπ. Μέθοδοι, ενότητα 13.2) και μέτρηση της εισροής Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας (CCE), με μικροσκοπία φθορισμού. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 69, οι πρωτογενείς νευρώνες που είχαν επωαστεί με εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη,



Εικόνα 69: Επώαση πρωτογενών φλοιϊκών νευρώνων με εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη αυξάνει την εισροή Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας (CCE).

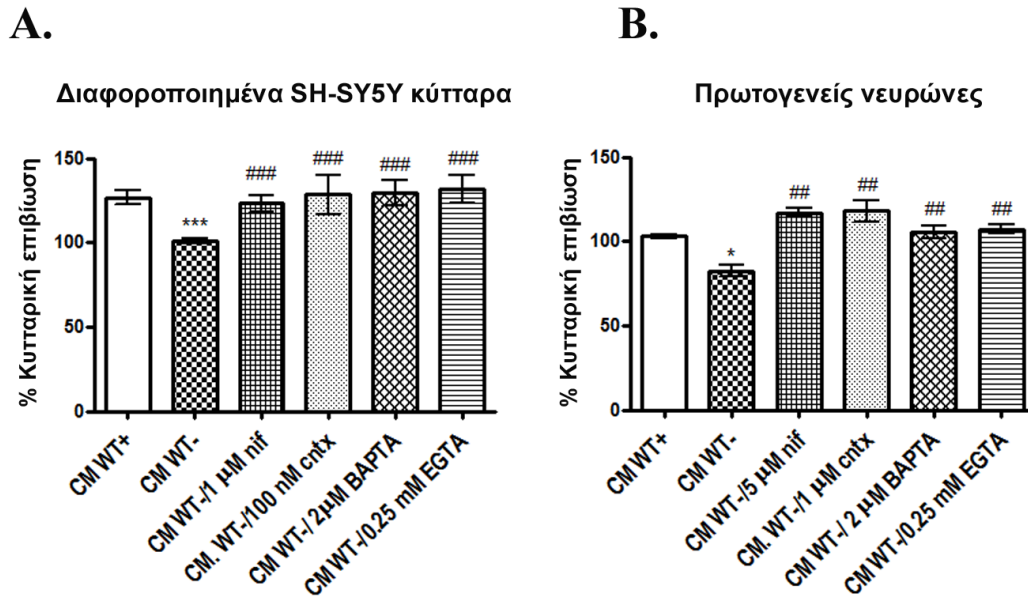
Πρωτογενείς φλοιϊκοί νευρώνες, (7 ημέρες σε καλλιέργεια), επώαστηκαν για 8 ώρες με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μάρτυρα (CM, WT+). Ακολούθησε χρώση με Fura 2AM και παρατήρηση της εισροής Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας με τη βοήθεια μικροσκοπίας φθορισμού. (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες που απεικονίζουν το λόγο φθορισμού 350/380, πριν και μετά την προσθήκη Ca^{2+} (πράσινο = αδέσμευτη χρωστική, χαμηλά επίπεδα $[Ca^{2+}]_i$; κόκκινο = δεσμευμένη χρωστική, υψηλά επίπεδα $[Ca^{2+}]_i$). (B) Ποσοτική ανάλυση του % του λόγου φθορισμού, κατόπιν κανονικοποίησης ως προς τα βασικά επίπεδα ($n = 3$; $**p < 0.005$).

παρουσίασαν αξιοσημείωτη αύξηση στην είσοδο Ca^{2+} , σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (% Λόγος φθορισμού 143.3 ± 3.79 ή 238.7 ± 17.5 για τα κύτταρα που

επώαστηκαν με CM, WT+ ή CM, WT-, αντίστοιχα), επιβεβαιώνοντας περαιτέρω τα αποτελέσματα στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα.

3.2.5. Επίδραση της μείωσης των επιπέδων του ελεύθερου κυτταροπλασματικού Ca^{2+} στην προκαλούμενη από την εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη νευροτοξικότητα

Μέχρι στιγμής, συλλογικά, τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η εξωκυττάρια α-συνουκλεΐνη πιθανά να επιτελεί τη νευροτοξική της δράση μέσω της αύξησης της εισροής Ca^{2+} . Προκειμένου να επιβεβαιωθεί το παραπάνω ενδεχόμενο, χρησιμοποιήθηκαν χηλικοί παράγοντες, οι οποίοι δεσμεύουν είτε το ενδοκυττάριο είτε το εξωκυττάριο Ca^{2+} , καθώς και αναστολείς που εμποδίζουν την είσοδό του στα κύτταρα. Διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα και (εικόνα 70A) και πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων (εικόνα 70B) επώαστηκαν είτε με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη (CM,WT-) είτε με θρεπτικό μάρτυρα (CM,WT+), παρουσία ή απουσία νιφεδιπίνης (nif) ή ω-κονοτοξίνης (cntx), ή ΒΑΡΤΑ-ΑΜ (χηλικός παράγοντας δέσμευσης ενδοκυττάριου Ca^{2+} , ΒΑΡΤΑ) ή ΕΓΤΑ (χηλικός παράγοντας δέσμευσης εξωκυττάριου Ca^{2+}), για 24 ώρες, στους 37°C. Η παρουσία της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης μείωσε σημαντικά την κυτταρική βιωσιμότητα και στα δύο συστήματα. Η χορήγηση, ωστόσο, της νιφεδιπίνης, της ω-κονοτοξίνης, του ΒΑΡΤΑ-ΑΜ και του ΕΓΤΑ ανέστρεψε τον παραπάνω φαινότυπο, αυξάνοντας τα επίπεδα της κυτταρικής επιβίωσης (εικόνα 70A, B). Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι η χορήγηση των παραπάνω φαρμάκων στις αναφερόμενες συγκεντρώσεις δεν επηρέασε τα επίπεδα βιωσιμότητας σε φυσιολογικές συνθήκες, όπως επιβεβαιώθηκε από πειράματα ελέγχου.

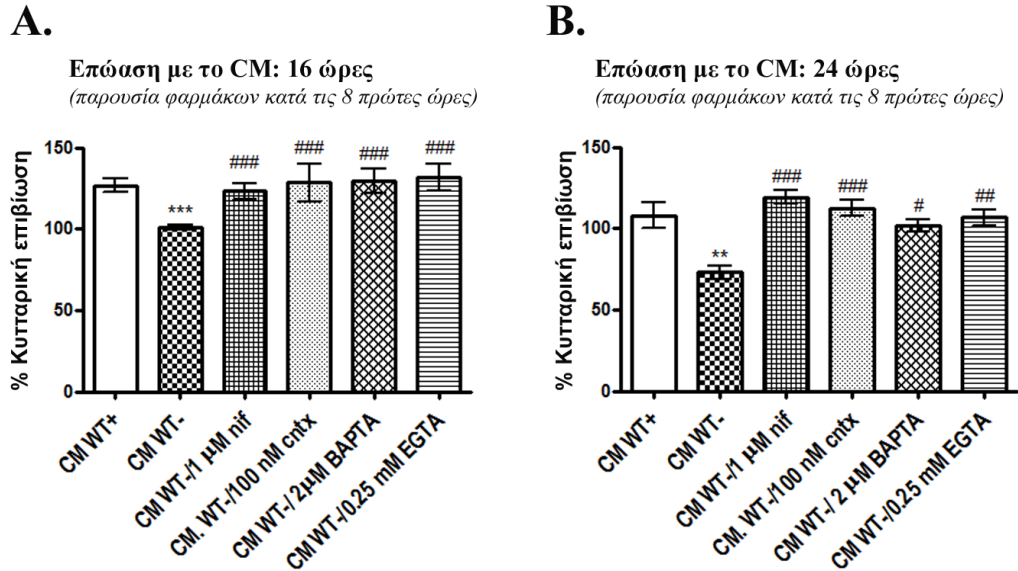


Εικόνα 70: Μείωση των επιπέδων του ελεύθερου κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , προστατεύει τα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα και τους πρωτογενείς φλοιϊκούς νευρώνες από τη νευροτοξική δράση της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης.

Διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα (A) και πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων (B) επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α -συνουκλείνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μάρτυρα (CM, WT+), παρουσία ή απουσία των χηλικών παραγόντων EGTA ή BAPTA-2AM, καθώς και των αναστολέων των νιφεδιπίνη (nif) ή ω -κονοτοξίνη GVIA (cntx), για 24 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση υπολογίστηκε κατόπιν μέτρησης του αριθμού των ακέραιων πυρήνων σε όλες τις συνθήκες. Η προσθήκη των χηλικών παραγόντων, καθώς και των αναστολέων των VOCs μείωσαν το τοξικό δυναμικό του CM, WT- (n = 3; *** $p < 0.001$ συγκρίνοντας τα διαφοροποιημένα κύτταρα που επωάστηκαν με CM, WT+ με αυτά που τους χορηγήθηκε CM, WT-; ### $p < 0.001$, συγκρίνοντας τα διαφοροποιημένα κύτταρα που επωάστηκαν με CM, WT-, παρουσία ή απουσία των φαρμακευτικών παραγόντων) (n = 4; * $p < 0.05$, συγκρίνοντας τους πρωτογενείς νευρώνες που επωάστηκαν με CM, WT+ με αυτούς που τους χορηγήθηκε CM, WT-; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, συγκρίνοντας τους πρωτογενείς νευρώνες που επωάστηκαν με CM, WT-, παρουσία ή απουσία των φαρμακευτικών παραγόντων). Όλα τα δεδομένα διορθώθηκαν ως προς τα βασικά επίπεδα των κυττάρων μαρτύρων (CM, WT+).

Στη συνέχεια, εξετάστηκε το κατά πόσον οι διαταραχές της ομοιόστασης του Ca^{2+} , που λαμβάνουν χώρα παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης, συνδέονται άμεσα με τον παρατηρούμενο κυτταρικό θάνατο. Αυτή τη φορά, οι φαρμακολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα του $[\text{Ca}^{2+}]_i$, προστέθηκαν μόνο για τις πρώτες 8 ώρες της επώασης των διαφοροποιημένων κυττάρων με την εκκρινόμενη α -συνουκλείνη. Μετά το πέρας των 8 ωρών, οι φαρμακολογικοί παράγοντες αφαιρέθηκαν, και επαναχορηγήθηκε στα κύτταρα θρεπτικό πλούσιο σε εκκρινόμενη α -συνουκλείνη, για επιπλέον 8 ή 16 ώρες. Μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας, όπως και παραπάνω, έδειξε ότι η επώαση 8 ωρών, με τους χηλικούς παράγοντες και

τους αναστολείς των VOCs, ήταν αρκετή για να αντισταθμίσει τη νευροτοξική δράση της α -συνουκλεΐνης και στα δύο χρονικές περιόδους (εικόνα 71A, B). Συμπερασματικά, η παρατηρούμενη απορρύθμιση του ομοιοστατικού μηχανισμού του Ca^{2+} τοποθετείται στα πρώιμα στάδια του μονοπατιού θανάτου, που πυροδοτείται από την εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη.



Εικόνα 71: Μείωση των επιπέδων του $[Ca^{2+}]_i$ κατά τις 8 πρώτες ώρες της επώασης με εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη προστατεύει τα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα από τον επικείμενο κυτταρικό θάνατο.

Διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μάρτυρα (CM, WT+), για 16 (A) ή 24 (B) ώρες, παρουσία ή απουσία των χηλικών παραγόντων EGTA ή BAPTA-2AM, καθώς και των αναστολέων των νιφεδιπίνη (nif) ή ω -κονοτοξίνη GVIA (cntx), μόνο κατά τη διάρκεια των 8 πρώτων ωρών της επώασης. Η κυτταρική επιβίωση υπολογίστηκε κατόπιν μέτρησης του αριθμού των ακέραιων πυρήνων σε όλες τις συνθήκες. Η προσθήκη των χηλικών παραγόντων, καθώς και των αναστολέων των VOCs μείωσαν το τοξικό δυναμικό του CM, WT- (n = 3, εις τριπλούν; *** $p < 0.001$ συγκρίνοντας τα κύτταρα που επώαστηκαν με CM, WT+ με αυτά που τους χορηγήθηκε CM, WT-; ### $p < 0.001$ συγκρίνοντας τα κύτταρα που επώαστηκαν με CM, WT-, παρουσία ή απουσία των φαρμακευτικών παραγόντων, # $p < 0.05$ συγκρίνοντας τα κύτταρα που επώαστηκαν με CM, WT-, παρουσία ή απουσία του BAPTA 2AM). Όλα τα δεδομένα διορθώθηκαν ως προς τα βασικά επίπεδα των κυττάρων μαρτύρων (CM, WT+).

3.2.6. Επίδραση εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης στα σηματοδοτικά μονοπάτια PI3K/Akt και MAPK/ERK

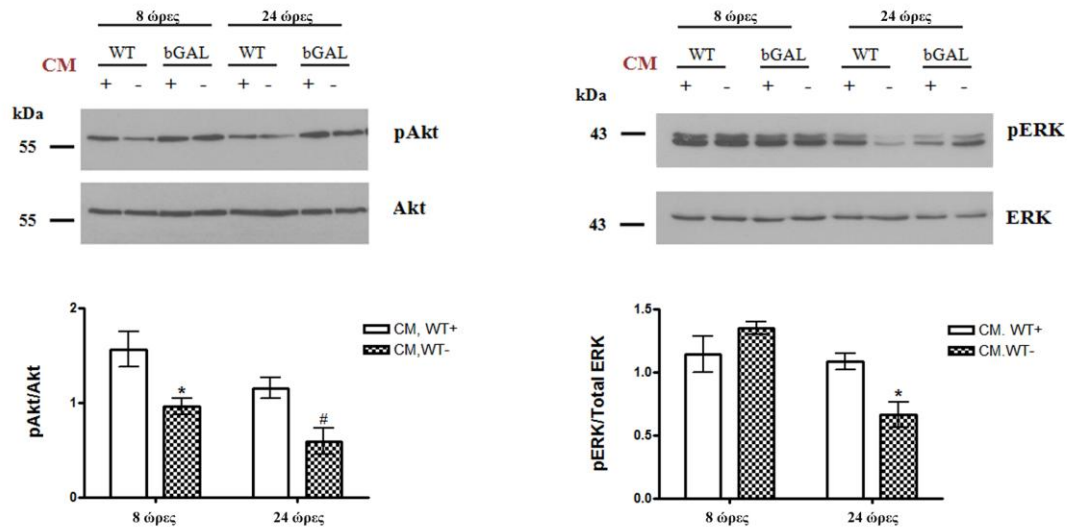
Τα σηματοδοτικά μονοπάτια, PI3K/Akt και MAPK/ERK, κατέχουν κομβική θέση σε αποφάσεις σχετικές με την κυτταρική επιβίωση ή τον κυτταρικό θάνατο. Με

στόχο την περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης, εξετάστηκε η πιθανή των συμμετοχή παραπάνω σηματοδοτικών μονοπατιών στην περιγραφόμενη πορεία κυτταρικής έκπτωσης.

Για το σκοπό αυτό, διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα, καθώς και καλλιέργειες πρωτογενών φλοιϊκών νευρώνων, επώαστηκαν με θρεπτικό πλούσιο σε α-συνουκλείνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μάρτυρα (CM, WT+), για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (8 και 24 ώρες για τα διαφοροποιημένα κύτταρα και 8,12,16, και 24 ώρες για τους πρωτογενείς νευρώνες). Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων-δεκτών, από κάθε διάστημα επώασης, απομονώθηκαν και αναλύθηκαν για μεταβολές στα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Akt και ERK1/2, με ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα, τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Akt ήταν σημαντικά μειωμένα ήδη από τις 8 ώρες επώασης, ενώ αντίστοιχη μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της ERK1/2 παρατηρήθηκε μόνο ύστερα από 24 ώρες (**εικόνα 72A**). Όσον αφορά στους πρωτογενείς νευρώνες, τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Akt ελαττώθηκαν σημαντικά μόνο ύστερα από την 24-ωρη παρουσία της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης, σε αντίθεση με τις φωσφορυλιωμένες μορφές της πρωτεΐνης ERK1/2, τα επίπεδα των οποίων παρουσίασαν πτωτική τάση, όχι στατιστικά σημαντική, μετά από 16 και 24 ώρες επώασης (**εικόνα 72B**).

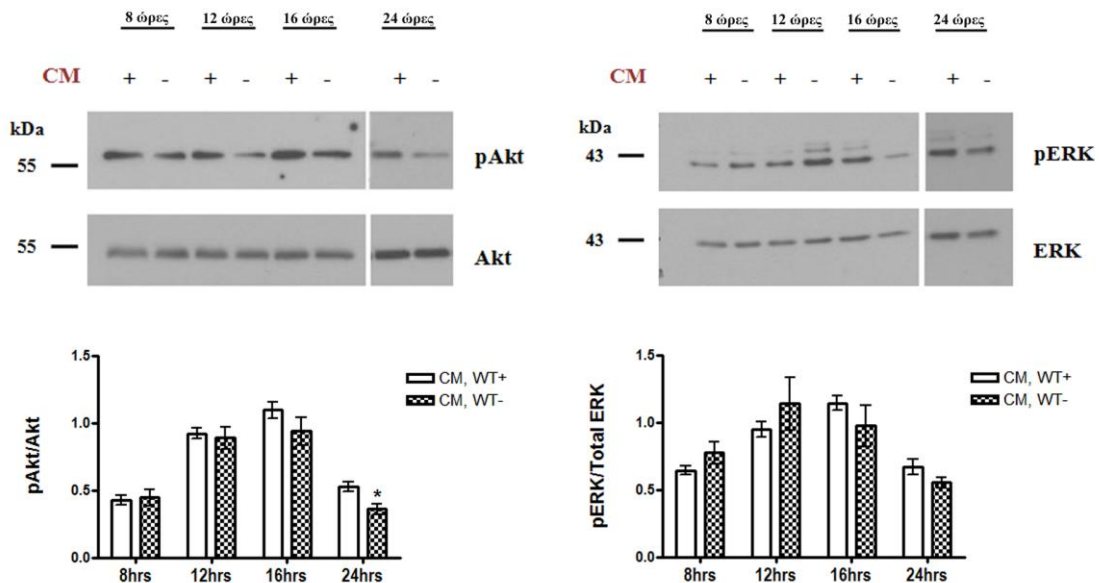
A.

Διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα



B.

Πρωτογενείς νευρώνες



Εικόνα 73: Μεταβολές των επιπέδων φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Akt και ERK1/2, κατόπιν επώασης με εκκρινόμενη α-συνουκλείνη.

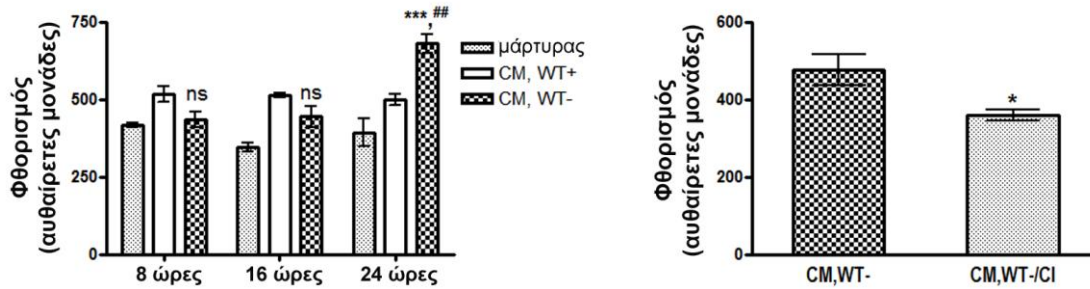
Θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλείνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μάρτυρα (CM, WT+) χορηγήθηκαν για 8, και 24 ώρες σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα (A), ή για 8, 12, 16 και 24 ώρες, σε πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων (B). Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων-δεκτών αναλύθηκαν για τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Akt (pAkt, αριστερά) και ERK1/2 (pERK, δεξιά), με ανοσοαποτύπωμα κατά western. Ποσοτική ανάλυση του λόγου της πυκνότητας των πρωτεϊνικών επιπέδων p-Akt/Akt και p-ERK/ERK έδειξε ότι τα επίπεδα της p-Akt μειώθηκαν και στα δύο κυτταρικά συστήματα παρουσία εκκρινόμενης α-συνουκλείνης, ενώ τα επίπεδα της p-ERK εμφάνισαν στατιστικά σημαντική πτώση μόνο στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα (n = 4; *p < 0.05, συγκρίνοντας τα κύτταρα που επώαστηκαν με CM, WT+ με αυτά που τους χορηγήθηκε CM, WT-).

3.2.7. Συμμετοχή των καλπαϊνών στο μονοπάτι νευροεκφυλισμού, που πυροδοτείται από την εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη

Ο εκφυλισμός που προκαλείται από την παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης, συνοδεύεται από την ενεργοποίηση της κασπάσης 3, όπως ήδη αναφέρθηκε (**βλπ. ενότητα 2.1, εικόνα 45**). Παράλληλα, σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, οι καλπαΐνες διασπών την προκασπάση 3 (Camins et al., 2006). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω σε συνδυασμό με την κοινή, πλέον, γνώση ότι οι καλπαΐνες ενεργοποιούνται σε καταστάσεις υπέρβασης των αυστηρών ορίων συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} , εξετάστηκε το ενδεχόμενο η συγκεκριμένη οικογένεια πρωτεασών να εμπλέκεται στο μονοπάτι που πυροδοτείται από την εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη.

Σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα χορηγήθηκε θρεπτικό μέσο από κύτταρα που εκφράζουν τα ενδογενή (CM, WT+) ή αυξημένα (CM, WT-) επίπεδα της α -συνουκλεΐνης είτε φρέσκο θρεπτικό μέσο (μάρτυρας) για 8, 16 και 24 ώρες. Τα κύτταρα-δέκτες ομογενοποιήθηκαν και η ενζυμική ενεργότητα των καλπαϊνών μετρήθηκε στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που προέκυψαν, με τη χρήση ενός φθορίζοντος υποστρώματος ειδικού για τις καλπαΐνες. Σύμφωνα με το διάγραμμα της **εικόνας 73**, η 24-ωρη επώαση με θρεπτικό πλούσιο σε α -συνουκλεΐνη (CM, WT-), συνοδεύεται από στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας των καλπαϊνών (393.7 ± 45.03 , 499.8 ± 17.31 και 679.7 ± 30.47 για τα κύτταρα-δέκτες του μάρτυρα, του CM, WT+ και του CM, WT-, αντίστοιχα) (**εικόνα 73, αριστερά**). Η ειδικότητα της ενζυμικής αντίδρασης πιστοποιήθηκε κατόπιν προσθήκης του ειδικού αναστολέα των καλπαϊνών, calpain I A6185 (CI). Όπως αναμενόταν, η χορήγησή του στο μείγμα αντίδρασης οδήγησε σε σημαντική μείωση της ενζυμικής ενεργότητας (**εικόνα 73, δεξιά**).

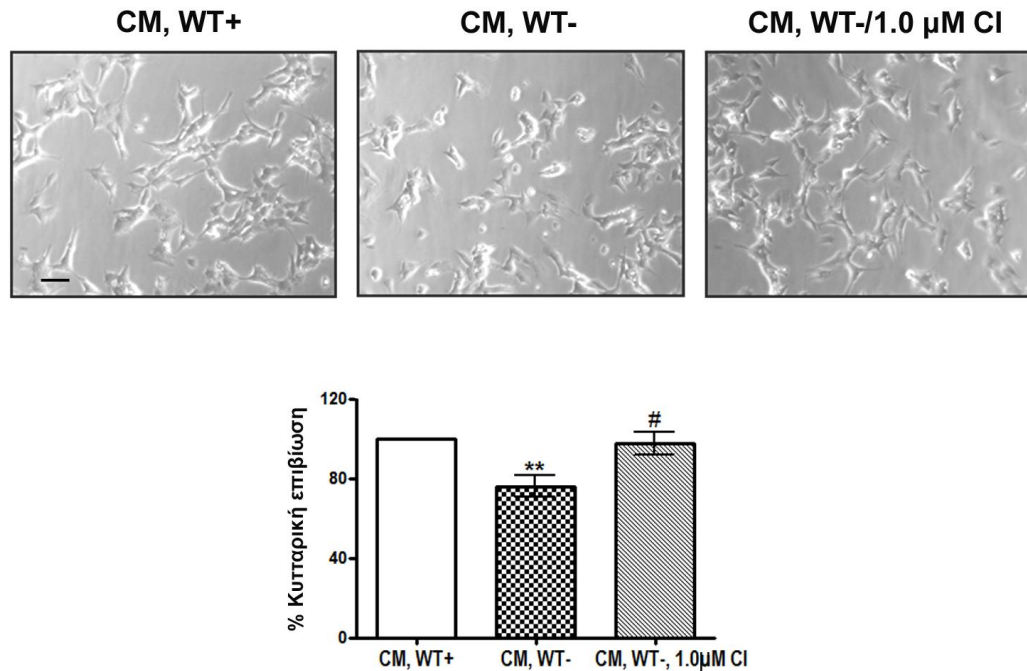
Ενεργοποίηση Καλπαϊνών



Εικόνα 73: Αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας των καλπαϊνών παρουσία της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης.

Θρεπτικό μέσο με υψηλά (CM, WT-) ή χαμηλά (CM, WT+) επίπεδα εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης ή φρέσκο θρεπτικό μάρτυρας (μάρτυρας) χορηγήθηκαν για 8, 16 και 24 ώρες σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα. Αυξημένη ενζυμική ενεργότητα των καλπαϊνών εντοπίστηκε ύστερα από επώαση με εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη ($n = 3$; *** $p < 0.001$, συγκρίνοντας τα κύτταρα που δέχθηκαν θρεπτικό μάρτυρα και CM, WT-; ## $p < 0.01$, για τα κύτταρα που επώαστηκαν με CM, WT+ και CM, WT-, αντίστοιχα) (αριστερά). Η ειδικότητα της μεθόδου επιβεβαιώθηκε με τη χρήση του ειδικού αναστολέα καλπαϊνών calpain inhibitor I A6185 (CI) ($n = 4$; * $p < 0.05$).

Σε περίπτωση που οι καλπαΐνες ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια των τοξικών διαδικασιών, οι οποίες πυροδοτούνται από την α-συνουκλεΐνη, η απενεργοποίησή τους, πιθανά να έχει προστατευτική δράση. Προκειμένου να ελεγχθεί η συγκεκριμένη υπόθεση, διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε α-συνουκλεΐνη (CM, WT-), παρουσία ή απουσία του αναστολέα καλπαϊνών (CI), για 24 ώρες. Η χορήγηση 1 μM CI βελτίωσε τη μορφολογία των κυττάρων δεκτών (εικόνα 74, επάνω), ενώ αύξησε σημαντικά τη βιωσιμότητά τους (εικόνα 74, κάτω).

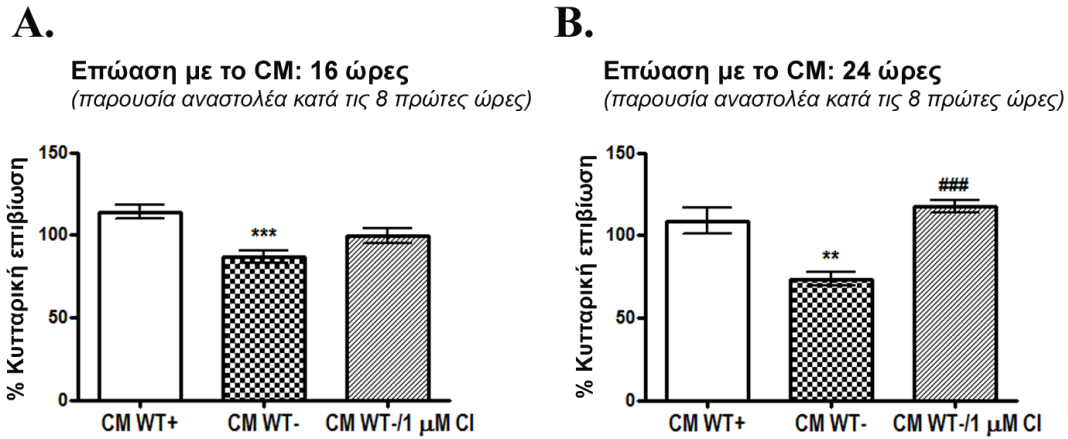


Εικόνα 74: Η ειδική αναστολή της ενεργότητας των καλπαϊνών προστατεύει τα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα από τη νευροτοξική δράση της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης.

Διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα επωάστηκαν με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μάρτυρα (CM, WT+), παρουσία ή απουσία ειδικού αναστολέα καλπαϊνών (CI). Η παρουσία του CI αύξησε τη βιωσιμότητα των κυττάρων που είχαν επωαστεί με εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη. Επάνω, παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίου αντίθεσης φάσης των κυττάρων-δεκτών (κλίμακα: 50 μm). Κάτω, απεικονίζεται το γράφημα ποσοτικοποίησης της % κυτταρικής βιωσιμότητας, κατόπιν κανονικοποίησης ως προς τα κύτταρα μάρτυρες, CM, WT+ (n = 4; **p < 0.01, μεταξύ των κυττάρων που επωάστηκαν με CM, WT+ και CM, WT-; #p < 0.05, συγκρίνοντας τα κύτταρα-δέκτες CM, WT-, παρουσία ή απουσία CI).

Στη συνέχεια εξετάστηκε η χρονική τοποθέτηση της ενεργοποίησης των καλπαϊνών. Σε αυτή την περίπτωση, το θρεπτικό μέσο πλούσιο σε α-συνουκλεΐνη (CM, WT-), χορηγήθηκε στα διαφοροποιημένα κύτταρα, παρουσία του CI, μόνο για 8 ώρες. Κατόπιν ο αναστολέας αφαιρέθηκε και επαναπροστέθηκε το πλούσιο σε α-συνουκλεΐνη θρεπτικό για επιπλέον 8 (εικόνα 75A) ή 16 ώρες (εικόνα 75B). Η μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων δεκτών αποκάλυψε ότι η προστατευτική δράση του CI εξακολουθεί να υφίσταται ακόμα και όταν αυτός χορηγήθηκε μόνο κατά τις 8 πρώτες ώρες της επώασης. Πιο συγκεκριμένα, υπό αυτές τις συνθήκες, η παρουσία του CI, είχε ως αποτέλεσμα μια τάση για προστασία, ύστερα από 16 ώρες συνολικής επώασης με την εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη, (82.38 ± 3.57 και 94.75 ± 4.39 για τα κύτταρα που επωάστηκαν με CM, WT-, απουσία ή παρουσία του CI, αντίστοιχα) (εικόνα 75A), η οποία κατέστη στατιστικά σημαντική μόνο ύστερα από

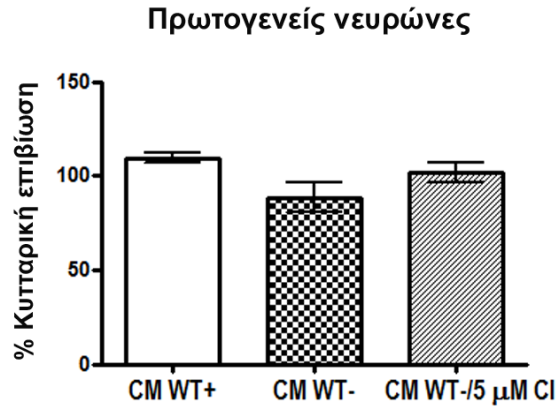
24 ώρες συνολικής επώασης (74.25 ± 4.40 και 118.8 ± 3.58 για τα κύτταρα που επώαστηκαν με CM, WT-, απουσία ή παρουσία του CI, αντίστοιχα) (εικόνα 76B).



Εικόνα 75: Η ενεργοποίηση των καλπαϊνών τοποθετείται στα αρχικά στάδια του νευροτοξικού μονοπατιού που πυροδοτείται από την εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη.

Διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μάρτυρα (CM, WT+), για συνολικά 16 (A) ή 24 (B) ώρες παρουσία του ειδικού αναστολέα καλπαϊνών (CI), μόνο για τις πρώτες 8 ώρες της επώασης. Ποσοτική ανάλυση της % κυτταρικής βιωσιμότητας, κατόπιν επώασης με CM, WT+ και CM, WT-παρουσία ή απουσία του CI, CM, WT+ (n = 4). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με one way ANOVA, ακολουθούμενη από Tukey's post-hoc test [*** $p < 0.001$ και ** $p < 0.01$, συγκρίνοντας τα κύτταρα που επώαστηκαν με CM, WT+ και CM, WT- (A, B), ### $p < 0.001$, συγκρίνοντας τα κύτταρα-δέκτες CM, WT-, παρουσία ή απουσία CI (B)].

Τέλος, πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων επώαστηκαν με θρεπτικό πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη, παρουσία ή απουσία CI για 24 ώρες. Η αναστολή των καλπαϊνών αύξησε την επιβίωση νευρώνων, οι οποίοι είχαν εκτεθεί σε εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη, αλλά η αύξηση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (εικόνα 76).



Εικόνα 77: Η ενεργοποίηση των καλαπινών τοποθετείται στα τελικά στάδια του νευροτοξικού μονοπατιού που πυροδοτείται από την εκκρινόμενη α-συνουκλείνη.

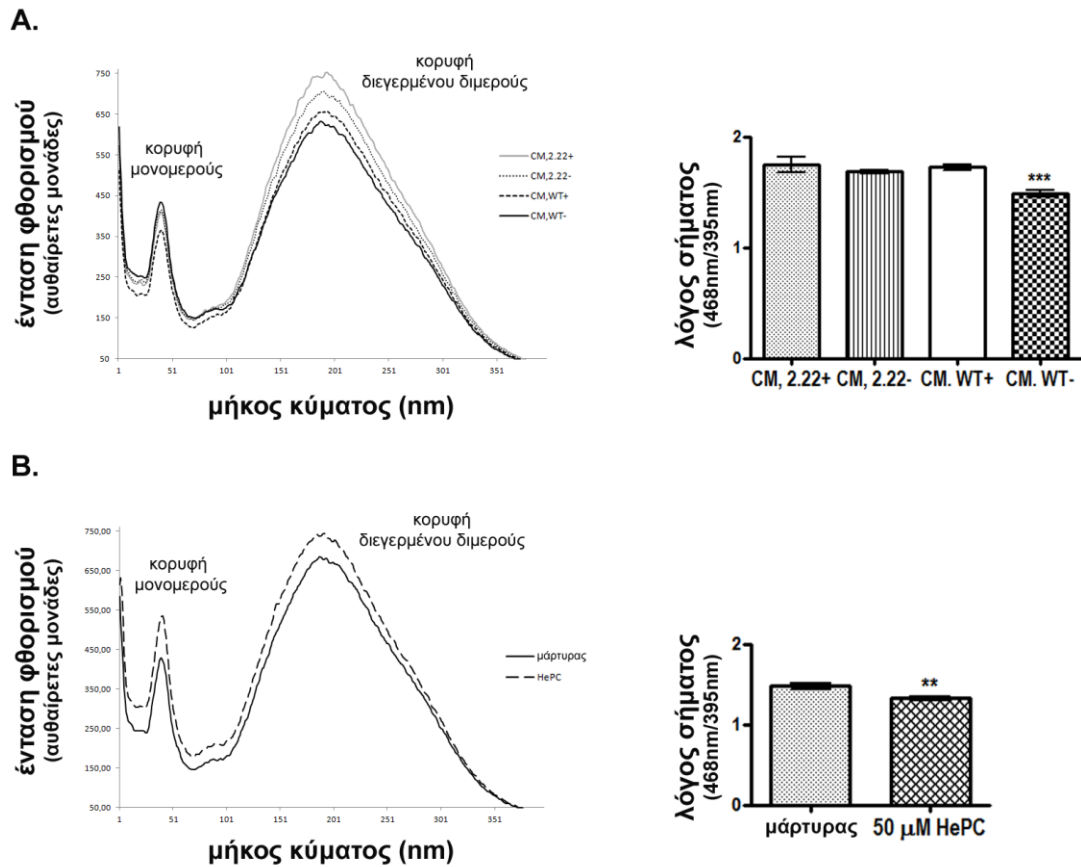
Πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλείνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μάρτυρα (CM, WT+), για 24 ώρες, παρουσία ή απουσία του ειδικού αναστολέα καλαπινών (CI). Ποσοτική ανάλυση της % κυτταρικής βιωσιμότητας (n = 4).

3.2.8. Αλληλεπίδραση της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων-δεκτών

Όπως ήδη αναφέρθηκε (ενότητα 3.1.2), στην παρούσα ερευνητική μελέτη η νευροτοξική δράση της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης δε φαίνεται να απαιτεί την πρόσληψή της από τα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα. Έτσι, εξετάστηκε το ενδεχόμενο αλληλεπίδρασης της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων-δεκτών.

Για το σκοπό αυτό, διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλείνη (CM,WT-) ή θρεπτικό μάρτυρα (CM,WT+), για 8 ώρες και παρακολούθηθηκαν αλλαγές στη ρευστότητα της μεμβράνης, με τη χρήση του 1-πυρενοδωδεκανοϊκού (1-pyrenedodecanoic acid, 2 μM). Τα διεγερμένα διμερή του 1-πυρενοδωδεκανοϊκού οξέος, διασπώνται σε μονομερή στο εσωτερικό της λιπόφιλης μεμβράνης, εκπέμποντας ένα διακριτό φάσμα φθορισμού, το οποίο είναι αντιπροσωπευτικό της ρευστότητας της πλασματικής μεμβράνης (Dafnis et al., 2010). Ο λόγος του φθορισμού του διεγερμένου διμερούς ως προς το μονομερές αποτελεί δείκτη ρευστότητας. Έτσι, ο υψηλός λόγος υποδηλώνει μια κατάσταση σταθερής και άκαμπτης μεμβράνης, η οποία ευνοεί τη γεινίαση των μονομερών και τον επακόλουθο σχηματισμό διεγερμένων διμερών. Αντίθετα, η αυξημένη ρευστότητα εμποδίζει το σχηματισμό διμερών, με αποτέλεσμα τη μείωση του λόγου. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 77Α**, ο λόγος του διεγερμένου

διμερούς ως προς το μονομερές παρουσιάζεται σημαντικά μειωμένος για κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε εκκρινόμενη α-συνουκλείνη (1.49 ± 0.07 , για τα CM, WT-, μέσος όρος \pm SEM; $n = 6$) συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες (1.73 ± 0.02 for CM, WT+, μέσος όρος \pm SEM; $n = 6$), υποδηλώνοντας αυξημένη μεμβρανική ρευστότητα.



Εικόνα 77: Η εκκρινόμενη α-συνουκλείνη επηρεάζει τη ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων-δεκτών.

(A) Διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα επώαστηκαν με θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλείνη (CM, WT-) ή θρεπτικά μάρτυρες (CM, 2.22+, CM, 2.22-, CM, WT+), για 8 ώρες. Η παρουσία της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης προκάλεσε αλλαγές στη ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων-δεκτών. Το γράφημα απεικονίζει το λόγο του εξιμερούς (468 nm) ως προς το μονομερές (395 nm) [$n = 6$; $*** p < 0.001$ συγκρίνοντας τα κύτταρα που επώαστηκαν με CM, WT- και τα κύτταρα μάρτυρες (CM, 2.22+, CM, 2.22-, CM, WT+)]. (B) Αύξηση της ρευστότητας της πλασματικής μεμβράνης των διαφοροποιημένων SH-SY5Y κυττάρων, κατόπιν επώασης με τη μιλτεφοσύνη (HePC), για 8 ώρες ($n = 5$; $** p < 0.01$, συγκρίνοντας τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης, παρουσία ή απουσία της HePC).

Προκειμένου να αποκλειστεί η περίπτωση η παρουσία της δοξυκυκλίνης (dox) στο θρεπτικό μάρτυρα να επηρεάζει το αποτέλεσμα, συνελέγη θρεπτικό μέσο από τον αρχικό Tet-Off κλώνο SH-SY5Y (2.22), ο οποίος εκφράζει μόνο τον παράγοντα ενεργοποίησης (transactivator factor), απουσία ή παρουσία της dox (CM,

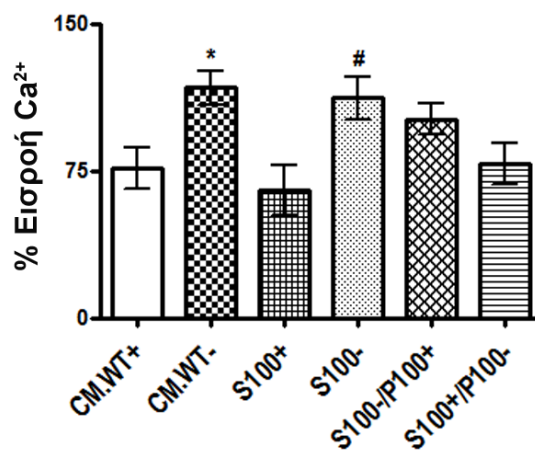
2.22- and CM, 2.22+, αντίστοιχα). Ο λόγος του διεγερμένου διμερούς προς το μονομερές, και στις δύο περιπτώσεις (CM, 2.22+ και CM, 2.22-), ήταν παρόμοιος με αυτόν των κυττάρων μαρτύρων (CM, WT+), αποδεικνύοντας ότι η dox δεν αλλοιώνει τις μετρήσεις της ρευστότητας της πλασματικής μεμβράνης. Τέλος, το αιθερικό φωσφολιπίδιο, μιλτεφοσύνη (HePC), το οποίο είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά άμεσα και ενσωματώνεται στην πλασματική μεμβράνη, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας αυξημένης μεμβρανικής ρευστότητας (**εικόνα 77B**).

3.2.9. Ο ρόλος της ελεύθερης και της συνδεδεμένης με τα εξωσώματα α-συνουκλεΐνης στην αύξηση της εισροής Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας

Ένα πολύ μικρό μέρος της α-συνουκλεΐνης απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο μέσω εξωσωμάτων (**βλπ. ενότητα 1.3, εικόνες 42, 43**), ενώ το υπόλοιπο, μέσω άλλων εκκριτικών μονοπατιών, βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή. Εύλογα, γεννήθηκε το ερώτημα ποια από τις δύο μορφές, η συνδεδεμένη με εξωσώματα ή η ελεύθερη εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη, προκαλεί τις περιγραφόμενες αλλαγές στην ομοιόσταση του Ca^{2+} . Για το σκοπό αυτό, θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη (CM, WT-) και θρεπτικό μάρτυρας (CM, WT+), κλασματώθηκαν, με διαφορετικές φυγοκεντρήσεις, στο υπερκείμενο που περιείχε μόνο τις ελεύθερες εκκρινόμενες πρωτεΐνες (S100- και S100+, αντίστοιχα), και στο ίζημα που ήταν εμπλουτισμένο σε εξωσώματα και περιείχε όλες τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με αυτά (P100- και P100+, αντίστοιχα). Ανάλυση με ανοσοαποτύπωμα κατά Western (**βλπ. ενότητα 1.3, εικόνα 42**), του πλήρους θρεπτικού (CM), των υπερκείμενων (S100) και των ιζημάτων (P100), όπως ήδη αναφέρθηκε, έδειξε ότι μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης συνδέεται με εξωσώματα (**βλπ. ενότητα 1.3, εικόνα 43B**).

Στη συνέχεια, τα εξωσώματα που προήλθαν από το εμπλουτισμένο σε εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη θρεπτικό μέσο (P100-) επαναδιαλύθηκαν στο υπερκείμενο (S100+) που είχε προκύψει από το θρεπτικό μάρτυρα, δίνοντας γένεση στο μείγμα S100+/P100- και το αντίστροφο, δημιουργώντας το μείγμα S100-/P100+. Διαφοροποιημένα SH-SY5Y επώαστηκαν με θρεπτικό εμπλουτισμένο σε εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μάρτυρα (CM, WT+) ή ένα από τα παραπάνω κλάσματα (S100+, S100-, S100+/P100- and S100-/P100+), για 8 ώρες. Ακολούθησε χρώση των κυττάρων-δεκτών με Fura 2-AM, και μέτρηση της εισροής

Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας (CCE), όπως και παραπάνω (εικόνα 78). Ποσοτικοποίηση της εισροής Ca^{2+} αποκάλυψε ότι η παρατηρούμενη αύξηση οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ελεύθερη εξωκυττάρια α -συνουκλείνη (S100-) (% εισροής Ca^{2+} 117.2 ± 8.79 και 111.9 ± 10.87 για τα κύτταρα που δέχθηκαν το πλήρες CM, WT- και αυτά που επώαστηκαν με το υπερκείμενο S100-, αντίστοιχα). Η προσθήκη της συνδεδεμένης με τα εξωσώματα α -συνουκλείνης (P100-) στο υπερκείμενο μάρτυρα (S100+), δεν ενίσχυσε την εισροή Ca^{2+} . Κατά συνέπεια, η ελεύθερη εκκρινόμενη α -συνουκλείνη καθίσταται ως ο κύριος υπεύθυνος για την περιγραφόμενη ενίσχυση της εισόδου του Ca^{2+} . Το γεγονός αυτό μπορεί να είναι θέμα συγκέντρωσης, δεδομένου του εξαιρετικά μικρού ποσοστού της α -συνουκλείνης που «συσκευάζεται» σε εξωσώματα. Τέλος, η προσθήκη του ιζήματος από το θρεπτικό μάρτυρα (P100+) στο υπερκείμενο που περιείχε την ελεύθερη α -συνουκλείνη (S100-), δεν προκάλεσε αλλαγές στην εισροή Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας (% εισροή Ca^{2+} 111.9 ± 10.87 και 101.3 ± 7.68 για τα κύτταρα που επώαστηκαν με S100- και αυτά που δέχθηκαν το μείγμα S100-/P100+, αντίστοιχα), υποδεικνύοντας ότι αυτή καθαυτή η παρουσία των εξωσωμάτων δεν επηρεάζει την εισροή Ca^{2+} .



Εικόνα 78: Η αύξηση της εισροής Ca^{2+} οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ελεύθερη εξωκυττάρια α -συνουκλείνης στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα.

Θρεπτικό μέσο πλούσιο σε εκκρινόμενη α -συνουκλείνη (CM, WT-) ή θρεπτικό μέσο μάρτυρα (CM, WT+) κλασματώθηκαν στα υπερκείμενα (S100-, S100+, αντίστοιχα) και τα εμπλουστίμενα σε εξωσώματα ιζήματα (P100-, P100+, αντίστοιχα). Το P100- επαναδιαλύθηκε στο S100+ (S100+/P100-) και το αντίστροφο, προς δημιουργία του μείγματος S100-/P100+. Διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα επώαστηκαν CM, WT+, CM, WT-, S100+, S100-, S100+/P100-, S100-/P100+, για 8 ώρες και μετρήθηκε η εισροή Ca^{2+} , κατόπιν εκκένωσης του Ε.Δ. (CCE). Το γράφημα απεικονίζει την ποσοτικοποίηση του CCE, κατόπιν κανονικοποίησης προς την κινητοποίηση Ca^{2+} που προκαλείται από την προσθήκη της Tg ($n = 3$; * $p < 0.05$ συγκρίνοντας τα κύτταρα που επώαστηκαν με CM, WT+ και αυτά που τους χορηγήθηκε CM, WT- ; # $p < 0.05$, μεταξύ των κυττάρων που δέχθηκαν S100+ και αυτών που επώαστηκαν με S100-).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

VI. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Η πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη συνδέεται βιοχημικά και γενετικά με την παθογένεια της νόσου του Parkinson (Vekrellis et al., 2004). Μάλιστα, σύμφωνα, με αδιάσειστα βιβλιογραφικά δεδομένα, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασής της θεωρούνται ικανή συνθήκη εκδήλωσης νευροεκφυλισμού (Chartier-Harlin et al., 2004; Ibanez et al., 2004). Ωστόσο, ο μηχανισμός μέσω του οποίου η α-συνουκλεΐνη επιτελεί τη νευροτοξική της δράση δεν είναι πλήρως κατανοητός. Επιστημονικές μελέτες έχουν καταδείξει τη λανθασμένη αναδίπλωση και τη συσσωμάτωση της μονομερούς πρωτεΐνης ως κομβικής σημασίας γεγονότα στην πορεία του νευροεκφυλισμού, καθώς δίνουν γένεση σε διαλυτές ολιγομερείς μορφές (πρωτοϊνίδια), οι οποίες με τη σειρά τους θεωρούνται ιδιαίτερες τοξικές (Conway et al., 2000b; Conway et al., 2001; Danzer et al., 2007). Εξαιτίας της έλλειψης σηματοδοτικού πεπτιδίου στόχευσης στο Ε.Δ., και του κυρίαρχου εντοπισμού της στο κυτταρόπλασμα, η α-συνουκλεΐνη για μεγάλο διάστημα θεωρείτο ως τυπικό παράδειγμα ενδοκυττάριας πρωτεΐνης, η οποία δρα στα στενά πλαίσια του κυττάρου που την παράγει (Pacheco et al., 2012). Εντούτοις, την τελευταία δεκαετία, ολοένα αυξανόμενα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η α-συνουκλεΐνη εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο, επηρεάζοντας τρόπον τινά την ομοιόσταση των γειτονικών κυττάρων (Desplats et al., 2009; Lee, 2008). Κατά συνέπεια, η διερεύνηση του μηχανισμού έκκρισης της α-συνουκλεΐνης, καθώς και του τρόπου με τον οποίο αυτή διαμορφώνει τη φυσιολογία των γειτονικών κυτταρικών τύπων, μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση της παθογένειας της νόσου του Parkinson, ανοίγοντας το δρόμο για καινοτόμες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

1.1. Μελέτη της έκκρισης της α-συνουκλεΐνης

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή τα παραπάνω ερωτήματα προσεγγίστηκαν με την επιστράτευση ενός Tet-Off κυτταρικού συστήματος, που δημιουργήθηκε στο εργαστήριό μας (Vekrellis et al., 2009). Ως βάση χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα SH-SY5Y από νευροβλάστωμα ανθρώπου, τα οποία υπέστησαν κατάλληλη γενετική επεξεργασία, έτσι ώστε η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη φυσικού τύπου ανθρώπινη α-συνουκλεΐνη να βρίσκεται υπό τον αυστηρό έλεγχο του υποκινητή pTRE-tight. Παρουσία του αντιβιοτικού δοξυκυκλίνη

(dox) το διαγονίδιο καταστέλλεται, και εκφράζονται μόνο τα χαμηλά ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης. Αντιθέτως, απομάκρυνση του αντιβιοτικού από την καλλιέργεια, επάγει την υπερέκφραση της α -συνουκλεΐνης, έως και 30 φορές (**εικόνα 37A**).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, η α -συνουκλεΐνη εκκρίνεται με τρόπο συνεχή στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων που την υπερεκφράζουν, καθότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης στο θρεπτικό αυξάνονται με το πέρασμα του χρόνου, ενώ τα ενδοκυττάρια επίπεδά της παραμένουν σταθερά (**εικόνα 37A**). Η απουσία, δε, από το θρεπτικό μέσο, καλά χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος, όπως π.χ. της ουβικουΐνης και πολύ-ουβικουΐνιλιωμένων πρωτεϊνών, της 14-3-3 β , της GAPDH κ.α., αποκλείει την πιθανότητα η παρατηρούμενη έκκριση να προκύπτει ως επακόλουθο θανάτου και κυτταρικής λύσης (**εικόνα 37B**). Για την περαιτέρω ενίσχυση των αποτελεσμάτων, δημιουργήθηκε και μια Tet-Off κυτταρική σειρά μάρτυρας, τα κύτταρα της οποίας εκφράζουν, με παρόμοιο επαγόμενο τρόπο, τη βακτηριακής προέλευσης κυτταροπλασματική πρωτεΐνη β -γαλακτοσιδάση. Η απουσία της β -γαλακτοσιδάσης από το θρεπτικό μέσο των κυττάρων που την υπερεκφράζουν, πιστοποιεί ότι η έκκριση της α -συνουκλεΐνης είναι φυσιολογική και όχι απόρροια της υπερέκφρασής της.

Στον εξωκυττάριο χώρο εντοπίστηκαν τόσο διαλυτές μονομερείς, όσο και ολιγομερείς μορφές της α -συνουκλεΐνης. Οι εκκρινόμενες μορφές της α -συνουκλεΐνης εξετάστηκαν, ενδελεχώς, κατόπιν κλασμάτωσης του κυτταρικού θρεπτικού μέσου, με χρωματογραφία διήθησης πηκτής, μέσω της οποίας απομονώθηκαν, χαμηλού και υψηλού μοριακού βάρους μορφές της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης (**εικόνα 40**). Η παρουσία των διαλυτών ολιγομερών μορφών είναι εξαιρετικά σημαντική, καθώς, σύμφωνα με αυξανόμενα βιβλιογραφικά δεδομένα, διαθέτουν δυνητικά νευροτοξικό δυναμικό, επηρεάζοντας τη βιωσιμότητα των κυττάρων-δεκτών (Danzer et al., 2007).

Παράλληλα, με τη χρήση ειδικής μεθόδου τύπου Elisa, που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο μας, μετρήθηκε η ολική συγκέντρωση της α -συνουκλεΐνης στον εξωκυττάριο χώρο (**εικόνα 38**). Έχει προταθεί ότι οι ολιγομερείς μορφές της α -συνουκλεΐνης βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία με τα μονομερή της. Κατά συνέπεια, η οποιαδήποτε αλλαγή στα επίπεδα της μονομερούς πρωτεΐνης είναι δυνατόν να επηρεάσει σημαντικά τη συγκέντρωση των ολιγομερών της, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και οι διαλυτές τοξικές μορφές. Επομένως, η ύπαρξη μιας

τόσο ευαίσθητης μεθόδου εκτίμησης της εξωκυττάριας μονομερούς πρωτεΐνης, συμβάλλει ουσιαστικά στην αξιολόγηση του νευροτοξικού δυναμικού του εκάστοτε θρεπτικού μέσου.

Κριτικής σημασίας για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης της εξωκυττάριας α-συνουκλεΐνης, αποτελεί ο μηχανισμός έκκρισης. Στο υπό μελέτη κυτταρικό σύστημα, ένα μικρό ποσοστό της α-συνουκλεΐνης, απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο μέσω εξωσωμάτων, μικρών κυστιδίων χαρακτηριστικής μορφολογίας και βιοχημικής σύστασης (**εικόνα 42**), τα οποία προκύπτουν από τη σύντηξη των πολυκυστιδιακών σωματίων με την πλασματική μεμβράνη (Chivet et al., 2012). Δεδομένου, του μικρού ποσοστού της α-συνουκλεΐνης που «συσκευάζεται» σε αυτές τις διακριτές δομές (**εικόνα 43**), καθίσταται σαφές ότι υπάρχουν και άλλοι εναλλακτικοί μηχανισμοί έκκρισης, όπως η εξωκυττάρωση μέσω εκκριτικών κυστιδίων, η οποία είναι δυνατόν να λαμβάνει χώρα στο υπό μελέτη σύστημα. Μάλιστα, υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που παρουσιάζουν την ενδοκυττάρια α-συνουκλεΐνη να συνεντοπίζεται με εκκριτικά κυστίδια, τα οποία διαμεσολαμβάνουν την έκκρισή της (Lee et al., 2005a). Βεβαίως, υπάρχει το ενδεχόμενο η ποσότητα της α-συνουκλεΐνης που εκκρίνεται μέσω εξωσωμάτων να είναι μεγαλύτερη αρχικά, και να παρουσιάζεται μειωμένη, εξαιτίας της πιθανής διάσπασης των εξωσωμάτων στον εξωκυττάριο χώρο ή κατά την συλλογή του υλικού.

Τα εξωσώματα θεωρούνται βιολογικά ενεργές οντότητες, οι οποίες είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με κύτταρα-δέκτες, ποικιλοτρόπως, π.χ. μέσω ενδοκυττάρωσης, πρόσδεσης σε κατάλληλο υποδοχέα, προσκόλλησης και σύντηξης με την πλασματική μεμβράνη (Keller et al., 2006; They et al., 2002; van Niel et al., 2006; Vincent and Magee, 2002). Εναλλακτικά, αποικοδόμηση της μεμβράνης των εξωσωμάτων στον εξωκυττάριο χώρο από πρωτεάσες ή λιπάσες, δυνητικά θα μπορούσε να απελευθερώσει το πρωτεϊνικό φορτίο που βρίσκεται στο εσωτερικό τους (Hughes, 1999; Mehul and Hughes, 1997). Μέχρι πρότινος, η απελευθέρωση των εξωσωμάτων θεωρείτο ως ένας κυτταρικός μηχανισμός εκκαθάρισης των ανεπιθύμητων πρωτεϊνών (Johnstone et al., 1987; Pan et al., 1985; van Niel et al., 2006; Vella et al., 2008). Εντούτοις, πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν νέες βιολογικές λειτουργίες αυτών των χαρακτηριστικών δομών, μεταξύ των οποίων η λειτουργική τροποποίηση των T-κυττάρων, η πρωτεόλυση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στόχων ή ακόμα και η διακυτταρική μεταφορά του εξωσωμικού φορτίου μέσω της σύντηξης των εξωσωμάτων με την πλασματική μεμβράνη των γειτονικών κυττάρων (Keller et

al., 2006; They et al., 2002). Κατά συνέπεια, η έκκριση της α -συνουκλεΐνης, μέσω εξωσωμάτων, παρέχει ένα κοινό μονοπάτι απελευθέρωσης δυνητικά τοξικών πρωτεϊνών στον εξωκυττάριο χώρο, διαμεσολαβώντας τρόπον τινά την εξάπλωση της παθολογίας στα γειτονικά υγιή κύτταρα (Ghidoni et al., 2008).

Στη βιβλιογραφία ολοένα και περισσότερες αναφορές συσχετίζουν την έκκριση των εξωσωμάτων με το νευροεκφυλισμό (Vella et al., 2008). Για παράδειγμα, εμβολιασμός σε μύες με εξωσώματα που περιέχουν prions, είναι ικανός να πυροδοτήσει τη μεταφορά των prions σε υγιή ανέπαφα κύτταρα, προκαλώντας την εκδήλωση της νόσου (Fevrier et al., 2004; Vella et al., 2007; Vella et al., 2008). Στη νόσο του Alzheimer, πεπτίδια Αβ, προερχόμενα από το εσωτερικό του κυττάρου έχει βρεθεί ότι απελευθερώνονται μέσω εξωσωμάτων (Rajendran et al., 2006). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι *in vitro* ότι πρωτογενείς φλοιϊκοί νευρώνες εκκρίνουν στο θρεπτικό μέσο εξωσώματα (Faure et al., 2006). Συμπερασματικά, τα δεδομένα που έχουν προκύψει από την παρούσα μελέτη μέχρι αυτό το σημείο, υποστηρίζουν την υπόθεση του «Δούρειου Ίππου», σύμφωνα με την οποία ο νευροεκφυλισμός προκύπτει από την προοδευτική μετάδοση παθολογικών γεγονότων, από κύτταρο σε κύτταρο, και τελικά τη διασπορά στις διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου. Η εν λόγω υπόθεση έχει επιβεβαιωθεί για τις ασθένειες prion, ενώ συζητιέται έντονα για την περίπτωση της νόσου του Alzheimer (Caughey, 2000; Ghidoni et al., 2008; Lee, 2008). Κορωνίδα των μελετών, που προτείνουν για την εξάπλωση της νόσου του Parkinson έναν μηχανισμό που προσομοιάζει σε αυτόν της μετάδοσης της πρωτεΐνης prion (prion-like mechanism), αποτελεί εκείνη του Brundin και των συνεργατών του. Στη μελέτη αυτή, υγιείς νευρώνες οι οποίοι είχαν εμφυτευτεί σε εγκέφαλο ασθενούς με τη νόσο του Parkinson, 14 χρόνια μετά τη μεταμόσχευση, εμφάνισαν τη χαρακτηριστική παθολογία της α -συνουκλεΐνης που ήδη παρουσίαζαν οι εαυτοί νευρώνες (Brundin et al., 2008).

1.2. Διερεύνηση του νευροτοξικού δυναμικού της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης

Οι εκκρινόμενες μορφές της α -συνουκλεΐνης μειώνουν σημαντικά τη βιωσιμότητα των υγιών κυττάρων-δεκτών (εικόνες 44, 46, 47). Σημειωτέον ότι καθώς τα κύτταρα-δέκτες αποκτούν νευρωνικό φαινότυπο, καθίστανται ολοένα και πιο ευαίσθητα στο τοξικό δυναμικό της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης. Με άλλα

λόγια, ο βαθμός του παρατηρούμενου εκφυλισμού εντείνεται, από τα διαιρούμενα στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα και από εκεί, στις πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιϊκών νευρώνων (εικόνες 44, 46, 47). Επίσης, ο κυτταρικός θάνατος σχετίζεται άμεσα με την παρουσία της α -συνουκλεΐνης στον εξωκυττάριο χώρο και συνοδεύεται από την ενεργοποίηση της κασπάσης-3 (εικόνα 45). Η σημαντική μείωση της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης από το θρεπτικό μέσο με ανοσοκατακρήμνιση (εικόνα 48), αμβλύνει σημαντικά τις τοξικές επιδράσεις αυτής (εικόνα 47). Όπως, αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι δυνατόν να απομονωθούν από το θρεπτικό μέσο, χωριστά, υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους μορφές της α -συνουκλεΐνης, μέσω κλασμάτωσης με χρωματογραφία διήθησης πηκτής. Και οι δύο κατηγορίες μορφών της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης, μειώνουν αισθητά την επιβίωση των διαφοροποιημένων SH-SY5Y κυττάρων (εικόνα 49). Η επίδραση των ολιγομερών μορφών της α -συνουκλεΐνης στη βιωσιμότητα των κυττάρων-δεκτών έχει πιστοποιηθεί και από προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριό μας. Η κατεργασία του πλούσιου σε α -συνουκλεΐνη θρεπτικού μέσου με φαρμακολογικούς παράγοντες που παρεμποδίζουν τον ολιγομερισμό, όπως το Congo Red (CR), μείωσε σημαντικά το τοξικό δυναμικό του και αύξησε την επιβίωση των κυττάρων-δεκτών. Παρόμοια χρήση του CR έχει αναφερθεί σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες που στοχεύουν στη διάλυση δομών πλούσιων σε β -πτυχωτές επιφάνειες, ανάμεσα στις οποίες συγκαταλέγονται η α -συνουκλεΐνη, η huntigtin και το πεπτίδιο A β (Heiser et al., 2000; Inouye and Kirschner, 2005; Sanchez et al., 2003).

Συνοψίζοντας, η παρουσία των φυσιολογικά εκκρινόμενων μορφών της α -συνουκλεΐνης, χαμηλού και υψηλού μοριακού βάρους, μειώνει την επιβίωση των κυττάρων-δεκτών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη μιας πιθανής συνεργατικής σχέσης, μεταξύ των υψηλού μοριακού βάρους n -πολυμερών και των χαμηλού μοριακού βάρους n -ολιγομερών ή και της μονομερούς μορφής, η οποία είναι σε θέση να πυροδοτήσει τον νευροεκφυλισμό. Σε έναν μεγάλο αριθμό αναφορών, τα προσχηματισμένα πρωτοϊνίδια, από ανασυνδυασμένη ανθρώπινη α -συνουκλεΐνη, έχουν νευροτοξική δράση, όταν χορηγηθούν σε καλλιέργειες υγιών κυττάρων (Danzer et al., 2007; Du et al., 2003; El-Agnaf et al., 1998; Zhang et al., 2005). Επίσης, σύμφωνα με την υπόθεση του σχηματισμού αμυλοειδούς πόρου, η επιλεκτική πρόσδεση των πρωτοϊνιδίων α -συνουκλεΐνης σε κυτταρικές μεμβράνες είναι σε θέση να προκαλέσει μεγάλες μεταβολές στην ισορροπία των ιόντων και των μικρών μεταβολιτών, μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του εξωκυτταρίου χώρου, με

επακόλουθο τον εκφυλισμό και τον κυτταρικό θάνατο. Εναλλακτικά, συσσωματωμένες μορφές της α-συνουκλεΐνης στο εξωκυττάριο περιβάλλον, είναι δυνατόν να πυροδοτήσουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις μέσω της ενεργοποίησης της μικρογλοίας, οδηγώντας στο νευροεκφυλισμό (Lee, 2008; Zhang et al., 2005). Αλλά ακόμα και η μονομερής α-συνουκλεΐνη είναι δυνατόν να δράσει μέσω των παραπάνω μονοπατιών, προκαλώντας κυτταροτοξικότητα (Su et al., 2008; Sung et al., 2001). Το γεγονός ότι, οι χαμηλού μοριακού βάρους μορφές, οι οποίες περιλαμβάνουν κυρίως τη μονομερή α-συνουκλεΐνη, είναι ικανές να μειώσουν την κυτταρική βιωσιμότητα, συνάδει με την παραπάνω υπόθεση. Εντούτοις, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα μια μικρή συγκέντρωση διαλυτών ολιγομερών να συνυπάρχει στο κλάσμα των χαμηλού μοριακού βάρους μορφών της α-συνουκλεΐνης, εξαιτίας των πειραματικών χειρισμών.

1.3. Μελέτη του μηχανισμού νευροτοξικής δράσης της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης

Σε πολλές περιπτώσεις, η πρόσληψη / ενδοκυττάρωση αποτελεί βασικό μηχανισμό μέσω του οποίου τοξικές πρωτεΐνες επιδρούν, ποικιλοτρόπως, στην ομοιόσταση των κυττάρων-δεκτών, π.χ. μέσω της αποδιοργάνωσης των μονοπατιών πρωτεϊνικής αποικοδόμησης (Inouye and Kirschner, 2005; Sanchez et al., 2003). Στα πλαίσια διερεύνησης της νευροτοξικής δράσης της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης, εξετάστηκε το ενδεχόμενο η εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη να προσλαμβάνεται από τα κύτταρα-δέκτες.

Η ραδιενεργά σημασμένη με ^{35}S εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη προσλαμβάνεται, άμεσα, από διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα (**εικόνα 50**). Η ενδοκυτταρωμένη α-συνουκλεΐνη εντοπίζεται τόσο στο μεμβρανικό, όσο και το κυτοσολικό κλάσμα (**εικόνα 52**). Εντούτοις, ο ακριβής υποκυτταρικός εντοπισμός της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα-δέκτες δεν κατέστη δυνατός, εξαιτίας τεχνικών περιορισμών (**εικόνα 53**).

Σύμφωνα με προκαταρκτικά δεδομένα, η πρόσληψη της φυσιολογικά εκκρινόμενης ραδιοσημασμένης α-συνουκλεΐνης, παρεμποδίζεται από την ταυτόχρονη χορήγηση μη ραδιοσημασμένης ανθρώπινης ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης σε περίσσεια (**εικόνα 51**). Το γεγονός αυτό, υπονοεί την ύπαρξη ενός πιθανού υποδοχέα, μέσω του οποίου η εξωκυττάρια α-συνουκλεΐνη εισέρχεται στα

διαιρούμενα κύτταρα-δέκτες. Βεβαίως, αυτή η αρχική υπόθεση χρήζει περαιτέρω και ενδελεχούς διερεύνησης. Γενικότερα, μέχρι και σήμερα ο μηχανισμός πρόσληψης της α -συνουκλείνης παραμένει υπό διερεύνηση. Υπάρχουν δεδομένα σύμφωνα με τα οποία οι διαφορετικές μορφές ανασυνδυασμένης α -συνουκλείνης ακολουθούν διαφορετικά μονοπάτια πρόσληψης (Lee et al., 2008a). Πιο συγκεκριμένα, η μονομερής α -συνουκλείνη προσλαμβάνεται από τα κύτταρα-δέκτες, μέσω παθητικής διάχυσης, σε αντίθεση με τις ολιγομερείς και ινδιακές μορφές της οι οποίες ενδοκυτταρώνονται με τη μεσολάβηση υποδοχέα, ενώ, κατόπιν, ακολουθούν το ενδοκυτταρικό μονοπάτι (Lee et al., 2008a). Ωστόσο, μέχρι και σήμερα, δεν υπάρχουν δεδομένα για την ύπαρξη κάποιου συγκεκριμένου υποδοχέα ενδοκυττάρωσης της φυσιολογικά εκκρινόμενης α -συνουκλείνης. Η ενδοκυττάρωση μέσω μεμβρανικού υποδοχέα, έχει προταθεί ως μηχανισμός πρόσληψης του αμυλοειδούς πεπτιδίου A β -42, με πιθανούς υποψήφιους τον α 7 νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης (Nagele et al., 2002) και τον υποδοχέα NMDA (Jellinger, 2002), οι οποίοι εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια των νευρώνων.

Σε αντίθεση με τα διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα, τα διαφοροποιημένα και οι πρωτογενείς φλοιϊκοί νευρώνες δε φαίνεται να προσλαμβάνουν τη φυσιολογικά εκκρινόμενη α -συνουκλείνη (εικόνες 54, 55, 56). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί σε διαφορετικούς μηχανισμούς πρόσληψης μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Ωστόσο, δε μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο τα διαφοροποιημένα κύτταρα και οι πρωτογενείς νευρώνες να προσλαμβάνουν μικρές ποσότητες α -συνουκλείνης, ο εντοπισμός των οποίων να βρίσκεται εκτός των διακριτικών ορίων των μεθόδων που ακολουθήθηκαν. Αυτό κυρίως αφορά στις ολιγομερείς μορφές της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης, οι οποίες εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσής τους, δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με τη μέθοδο της αυτοραδιογραφίας. Μάλιστα, σε μια σχετική μελέτη, ο Lee και οι συνεργάτες του (Lee et al., 2008a) πρότειναν ότι η συσσωματωμένη α -συνουκλείνη προσλαμβάνεται πιο αποτελεσματικά από τα κύτταρα-δέκτες, μέσω ενός διαφορετικού μονοπατιού σε σχέση με τη μονομερή πρωτεΐνη.

Παρόλα αυτά, μεγάλος όγκος βιβλιογραφικών δεδομένων κάνει λόγο για ενδοκυττάρωση της ανασυνδυασμένης α -συνουκλείνης από κύτταρα-δέκτες (Ahn et al., 2006; Lee et al., 2008a; Lee et al., 2008b; Liu et al., 2009a; Sung et al., 2001; Zhang et al., 2005). Πρέπει να τονιστεί, ωστόσο, ότι στις περισσότερες χορηγήθηκαν εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις καθαρής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, οι οποίες,

ξεφεύγοντας από τα όρια του φυσιολογικού, πιθανώς να οδήγησαν υπό καθεστώς πίεσης τα κύτταρα-δέκτες να την προσλάβουν (βλπ. **Εισαγωγή, ενότητα 3.3**). Μάλιστα, σε κάποιες δημοσιεύσεις αναφέρεται ότι για την είσοδο της ανασυνδυασμένης α-συνουκλείνης στα κύτταρα δέκτες, απαραίτητη είναι η παρουσία κατιονικών λιποσωμάτων (Luk et al., 2009). Επιπλέον, καθώς η φυσιολογικά εκκρινόμενη α-συνουκλείνη παράγεται και απελευθερώνεται από ευκαρυωτικά κύτταρα, είναι λογικό ότι φέρει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, τις οποίες στερείται η βακτηριακά παραγόμενη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Η εν λόγω διαφοροποίηση θα μπορούσε, ενδεχομένως, να εξηγήσει, ως έναν βαθμό, την ασυμφωνία, όσον αφορά την ικανότητα πρόσληψης της α-συνουκλείνης από τα νευρικά κύτταρα, μεταξύ των παραπάνω μελετών και της παρούσας, η οποία μελέτη στηρίζεται στη φυσιολογικά εκκρινόμενη και όχι την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη.

Από την άλλη πλευρά, η δημοσίευση των Desplats και συνεργατών, κάνει λόγο για μετάδοση της παθολογίας των σωματίων Lewy από τους πάσχοντες νευρώνες σε υγιή εμβρυικά εμφυτεύματα, μέσω μεταφοράς της α-συνουκλείνης από νευρώνα σε νευρώνα (Desplats et al., 2009). Στην ίδια δημοσίευση, σε πειράματα συγκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε επαγωγή της υπερέκφρασης της α-συνουκλείνης σε νευρικά κύτταρα, κατόπιν επιμόλυνσης με αδενοϊούς. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα μη επιμολυσμένα νευρικά κύτταρα της συγκαλλιέργειας φάνηκε να προσλαμβάνουν την πρωτεΐνη και να οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο. Η συγκεκριμένη προσέγγιση ωστόσο εγκυμονεί τεχνικούς κινδύνους. Όπως ήδη αναφέρθηκε στην παρούσα εργασία, η υπερέκφραση πρωτεϊνών με ιϊκούς φορείς μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα πρόσληψης (**εικόνα 57**). Για το λόγο αυτό, πρέπει να γίνεται αυστηρός έλεγχος των πρωτοκόλλων, χρήση των σωστών μαρτύρων και να επιστρατεύεται ιδιαίτερης προσοχή στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Με βάση τα παραπάνω, η ενδοκυττάρωση δε φαίνεται να αποτελεί το βασικό μηχανισμό, μέσω του οποίου η εκκρινόμενη α-συνουκλείνη διενεργεί τη νευροτοξική της δράση στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα και τους πρωτογενείς νευρώνες. Ωστόσο το γεγονός ότι οι συγκεκριμένοι κυτταρικοί τύποι παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στο τοξικό δυναμικό της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης, θέτει ως πιθανό σημείο εκκίνησης της πορείας νευροεκφυλισμού τη λιπιδική διπλοστιβάδα των κυττάρων-δεκτών. Η αλληλεπίδραση, άμεση ή έμμεση με τη διαμεσολάβηση κάποιου μη ταυτοποιημένου, μέχρι στιγμής, υποδοχέα, της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης με

την πλασματική μεμβράνη και η ενεργοποίηση ενός καταρροϊκού σηματοδοτικού μονοπατιού, αποτελεί μια ενδιαφέρουσα υπόθεση. Εναλλακτικά, με βάση το μοντέλο του σχηματισμού αμυλοειδούς πόρου, η άμεση αλληλεπίδραση είναι δυνατόν να οδηγήσει στο σχηματισμό πόρου, αλλοιώνοντας την ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης και τελικά στην κυτταρική έκπτωση (Heiser et al., 2000; Volles and Lansbury, 2003; Volles et al., 2001). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, διερευνήθηκε η επίδραση της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης και επακόλουθες διαταραχές της ομοιόστασης των ιόντων Ca^{2+} , ως πιθανός μηχανισμός νευροτοξικής δράσης.

Προκειμένου να διαλευκανθούν τα πρώιμα γεγονότα κυτταρικού εκφυλισμού, τα οποία προηγούνται του κυτταρικού θανάτου, επιλέχθηκε η επώαση 8 ωρών με θρεπτικό πλούσιο σε εκκρινόμενη α -συνουκλείνη, καθώς κατά το συγκεκριμένο διάστημα δεν παρατηρήθηκαν εμφανή σημάδια κυτταρικής έκπτωσης (εικόνα 58). Η παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης, για το αναφερόμενο χρονικό διάστημα, ήταν ικανή να προκαλέσει διαταραχές στην ομοιόσταση του Ca^{2+} , οι οποίες εκδηλώθηκαν ως έντονη αύξηση της εισροής Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας, τόσο στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα (εικόνα 59A), όσο και στους πρωτογενείς φλοιϊκούς νευρώνες (εικόνα 69). Το περιγραφόμενο φαινόμενο σχετίζεται άμεσα με την παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης στον εξωκυττάριο χώρο, καθώς απομάκρυνση της εν λόγω πρωτεΐνης με ανοσοκατακρήμιση, δε μετέβαλε την εισροή Ca^{2+} στα κύτταρα-δέκτες (εικόνα 59B).

Όπως αναφέρθηκε σε πολλά σημεία της παρούσας μελέτης, στο θρεπτικό μέσο κυριαρχούν οι μονομερείς μορφές της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης. Περιέχονται, σαφώς και ολιγομερείς μορφές, ωστόσο σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Κατά συνέπεια, οι μονομερείς μορφές της πρωτεΐνης πιθανότατα να ενοχοποιούνται περισσότερο για την παρατηρούμενη αύξηση της εισροής Ca^{2+} . Το συμπέρασμα αυτό δεν αντικρούει τα αποτελέσματα της μελέτης της Danzer και των συνεργατών της, σύμφωνα με τα οποία καθορισμένες προπαρασκευασμένες ολιγομερείς μορφές ανασυνδυασμένης α -συνουκλείνης, οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο, μέσω δημιουργίας πόρων και διαταραχών στην ομοιόσταση του Ca^{2+} (Danzer et al., 2007). Καταρχάς, σημαντικό ποσοστό των συγκεκριμένων παρασκευασμάτων ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, περιείχαν μονομερείς μορφές, υποδεικνύοντας ότι η ισορροπία μεταξύ των διαφορετικών μορφών διαδραματίζει μείζονα ρόλο. Επιπλέον, στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις ανασυνδυασμένης

πρωτεΐνης (7 μM), προκειμένου να παρατηρηθούν ακαριαίες αλλαγές στην εισροή Ca^{2+} . Αντιθέτως, στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικά εκκρινόμενη α -συνουκλείνη και παρατηρήθηκε η επίδρασή της σε βάθος 8 ωρών. Η σχέση μεταξύ της εξωκυττάριας α -συνουκλείνης και των διαταραχών στην ομοιόσταση του Ca^{2+} έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών, ωστόσο, σε αυτές τις περιπτώσεις η έρευνα βασίζεται στη χρήση ανασυνδυασμένων μορφών της πρωτεΐνης. Στην εν λόγω μελέτη, για πρώτη φορά μέχρι στιγμής, συνδέονται αιτιολογικά οι πρώιμες διαταραχές της εισροής Ca^{2+} με τη νευροτοξική δράση της φυσιολογικά εκκρινόμενης α -συνουκλείνης.

Όσον αφορά στα διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα, η εκκρινόμενη α -συνουκλείνη αφήνει ανεπηρέαστη την εισροή Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας. Δεδομένου ότι τα διαιρούμενα κύτταρα εμφανίζονται πιο ανθεκτικά στη νευροτοξική δράση της α -συνουκλείνης, θα μπορούσε να ισχυριστεί κανείς, ότι η παραπάνω παρατήρηση αποτελεί μια έμμεση συσχέτιση των διαταραχών της ομοιόστασης του Ca^{2+} και του νευροτοξικού δυναμικού της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης. Προς αυτή την κατεύθυνση, η δέσμευση των επιπέδων του κυτταροπλασματικού ή εξωκυττάριας Ca^{2+} με τη βοήθεια των χηλικών παραγόντων BAPTA-AM και EGTA, αντίστοιχα, έχει προστατευτική δράση έναντι του νευροτοξικού δυναμικού της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα και τους πρωτογενείς νευρώνες (εικόνα 70). Συνοψίζοντας, οι διαταραχές της ομοιόστασης του Ca^{2+} που παρατηρήθηκαν στα κύτταρα-δέκτες, διαμεσολαβούν, τουλάχιστον μερικώς, τη νευροτοξικότητα της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης. Πιθανότατα, λοιπόν, η διαφορετική ένταση με την οποία επιδρά η εκκρινόμενη α -συνουκλείνη στα διαιρούμενα σε σχέση με τα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα και τους πρωτογενείς νευρώνες, να σχετίζεται με την ικανότητα της πρωτεΐνης να επηρεάζει την ισορροπία των ιόντων Ca^{2+} σε κάθε κυτταρικό σύστημα.

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω το νευροτοξικό μονοπάτι που πυροδοτείται από την εκκρινόμενη α -συνουκλείνη, εξετάστηκε η συμμετοχή στο περιγραφόμενο φαινόμενο, καναλιών Ca^{2+} που εδράζονται στην πλασματική μεμβράνη. Από τη στιγμή που η παρουσία της α -συνουκλείνης προκαλεί αύξηση της εισροής Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας, ελέγχθηκε ο ρόλος των καναλιών που εξαρτώνται από τις ενδοκυττάριας αποθήκες (SOCs), και ενεργοποιούνται κατόπιν εκκένωσης του Ε.Δ. Η φαρμακολογική παρεμπόδιση των SOCs, με τη χρήση του ειδικού αναστολέα SKF, οδηγεί σε σημαντική μείωση της εισροής Ca^{2+} , τόσο παρουσία όσο

και απουσία α -συνουκλεΐνης. Ωστόσο, η διαφορά στην εισροή Ca^{2+} μεταξύ των δύο ομάδων κυττάρων-δεκτών παρέμεινε και παρουσία του αναστολέα (εικόνα 61). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη και άλλων καναλιών, τα οποία συνδράμουν στην διευκολυνόμενη από την α -συνουκλεΐνη εισροή Ca^{2+} .

Έτσι, μελετήθηκε ο ρόλος των L- και N- τύπου τασεοελεγχόμενων καναλιών Ca^{2+} (VOCs). Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, τα $\text{CaV}(1.3)$ L-τύπου κανάλια, έχουν συνδεθεί με το προερχόμενο από τα μιτοχόνδρια οξειδωτικό στρες, κομβικής σημασίας για την παθογένεση της νόσου του Parkinson (Chan et al., 2009; Kang et al., 2012; Mosharon et al., 2009; Surmeier et al., 2010). Από την άλλη πλευρά, έχει δειχθεί ότι τα N-τύπου κανάλια, διαμεσολαβούν την αυξημένη εισροή Ca^{2+} που πυροδοτείται από την ανασυνδυασμένη α -συνουκλεΐνη σε συναπτοσώματα επίμυος (Adameczyk and Strosznajder, 2006). Σε αυτά τα πλαίσια, η συμμετοχή των L- και N- τύπου τασεοελεγχόμενων καναλιών Ca^{2+} , στο περιγραφόμενο σύστημα, εξετάστηκε μέσω της φαρμακολογικής αναστολής τους με τη χρήση της νιφεδιπίνης και της ω-κονοτοξίνης GVIA, αντίστοιχα. Η χορήγηση και των δύο αναστολέων, μείωσε σημαντικά την εισροή Ca^{2+} , στα κύτταρα-δέκτες της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης, επαναφέροντάς τη στα βασικά επίπεδα και πιστοποιώντας, την εμπλοκή τους στην περιγραφόμενη διαταραχή (εικόνα 62). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, άμεση ενεργοποίηση των τασεοελεγχόμενων καναλιών VOCs, κατόπιν εκπόλωσης με KCl, προκάλεσε σημαντικά υψηλότερη είσοδο ιόντων Ca^{2+} στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη, συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες (εικόνα 63). Σημειωτέον, φαρμακολογική αναστολή των L- ή N- τύπου VOCs, μείωσε σημαντικά την εισροή Ca^{2+} κατόπιν εκπόλωσης και στις δύο ομάδες, εκμηδενίζοντας τη μεταξύ τους διαφορά (εικόνα 63). Το συγκεκριμένο εύρημα, πιστοποιεί την ομαλή λειτουργία των VOCs στο εν λόγω κυτταρικό σύστημα και κυρίως, επιβεβαιώνει τη συμμετοχή των VOCs στη διατάραξη της ομοιόστασης του Ca^{2+} που προκαλείται από την εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη. Δεδομένου ότι τα επίπεδα έκφρασης των VOCs δεν αυξήθηκαν ύστερα από έκθεση σε εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη (εικόνα 64), η παρατηρούμενη αύξηση της εισροής Ca^{2+} δεν μπορεί να αποδοθεί σε αύξηση του αριθμού των καναλιών. Ωστόσο, υπό τις συνθήκες αυτές, παρατηρήθηκε έντονη αύξηση της ρευστότητας της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων-δεκτών (εικόνα 77). Κάτι τέτοιο πιθανότατα μπορεί, επιτρέποντας την ανακατανομή και το σχηματισμό συμπλόκων υποδοχέων, συμπεριλαμβανομένων και των καναλιών Ca^{2+} στη λιπιδική διπλοστιβάδα, να διευκολύνει την ενεργοποίησή

τους και να ενισχύει την ευαισθησία τους στα ιόντα Ca^{2+} . Εντούτοις, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ της εξωκυττάριας α -συνουκλείνης και των μεμβρανικών υποδοχέων, με αποτέλεσμα την τροποποίηση της λειτουργίας τους, όπως έχει προταθεί και για το πεπτίδιο του αμυλοειδούς Αβ (Demuro et al., 2010).

Η ικανότητα της ανασυνδυασμένης α -συνουκλείνης να αλληλεπιδρά με τεχνητές και βιολογικές μεμβράνες, σχηματίζοντας δακτυλιοειδείς πόρους, είναι, πλέον, ευρέως αποδεκτό γεγονός (Danzer et al., 2007; Tsigelny et al., 2012). Με αυτό το δεδομένο, εξετάστηκε η επίδραση της ιονομυκίνης στα κύτταρα-δέκτες της εκκρινόμενης α -συνουκείνης. Η ιονομυκίνη, είναι ένα ιονοφόρο Ca^{2+} , με αποτέλεσμα να καθιστά όλες τις μεμβράνες διαπερατές σε αυτό, συμπεριλαμβανομένης και της πλασματικής μεμβράνης. Στην περίπτωση που η αλληλεπίδραση της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων-δεκτών κατέληγε στο σχηματισμό τέτοιων πόρων, η χορήγηση της ιονομυκίνης, υπό συνθήκες παρουσίας εξωκυττάριας Ca^{2+} , θα προκαλούσε αξιοσημείωτη άνοδο των επιπέδων του $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Εντούτοις, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην κινητοποίηση του Ca^{2+} μεταξύ των κυττάρων μαρτύρων και αυτών που είχαν επωαστεί με α -συνουκλείνη. Συνεπώς, η περίπτωση της διατάραξης της μεμβρανικής ακεραιότητας λόγω της δημιουργίας δακτυλιοειδούς πόρου, τουλάχιστον σε τόσο πρώιμο χρονικό σημείο, θεωρείται μάλλον απίθανη. Βεβαίως, ο σχηματισμός τέτοιων δομών σε μεταγενέστερο χρόνο δεν μπορεί να αποκλειστεί (Schmidt et al., 2012; Tsigelny et al., 2012).

Ένα επιπλέον στοιχείο που ενισχύει την άποψη ότι η φυσιολογικά εκκρινόμενη α -συνουκλείνη διαταράσσει την ομαλή λειτουργία της πλασματικής μεμβράνης, αποτελεί ο χαρακτηριστικά αργός ρυθμός επαναφοράς του κυτταροπλασματικού $[\text{Ca}^{2+}]_i$ στα βασικά επίπεδα, που εμφανίζουν τα κύτταρα-δέκτες, κατόπιν χορήγησης της καρβαχόλης, σε συνθήκες παρουσίας Ca^{2+} (εικόνα 67). Η καρβαχόλη, ως μουσκαρινικός αγωνιστής, ενεργοποιεί τους υποδοχείς IP_3 στο Ε.Δ., προκαλώντας την εκροή ιόντων Ca^{2+} προς το κυτταρόπλασμα. Ως απόκριση στην εκκένωση του Ε.Δ., σχεδόν αντανακλαστικά, εισέρχονται ιόντα Ca^{2+} από την πλασματική μεμβράνη, οδηγώντας σε περαιτέρω αύξηση των επιπέδων του $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Η παρατηρούμενη καθυστέρηση της επαναφοράς στα βασικά επίπεδα, υποδεικνύει ότι η παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης διευκολύνει τη δίοδο του Ca^{2+} από την πλασματική μεμβράνη, όχι μόνο κατόπιν χορήγησης του μη αντιστρεπτού αναστολέα θαμψικαργκίνη, αλλά και ύστερα από τη χρήση ενός πιο «φυσιολογικού κυτταρικού

ερεθίσματος», όπως είναι η καρβαχόλη. Τέτοιου τύπου δυσλειτουργία δεν παρατηρήθηκε στα κύτταρα μάρτυρες.

Η αξιοσημείωτη αύξηση στην εισροή των ιόντων Ca^{2+} , που παρατηρείται παρουσία της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης, δε συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση των βασικών επιπέδων του ελεύθερου κυτταροπλασματικού $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (εικόνα 66). Έτσι, εξετάστηκε η διαμερισματοποίηση των ιόντων Ca^{2+} στις κύριες ενδοκυττάρια αποθήκες Ca^{2+} . Διαδοχική εκκένωση του Ε.Δ. και των όξινων οργανιδίων, συμπεριλαμβανομένων και των λυσοσωμάτων, παρουσία ή απουσία εξωκυττάρου Ca^{2+} , δεν αποκάλυψε αξιοπρόσεχτες διαφορές μεταξύ των κυττάρων-δεκτών και των κυττάρων μαρτύρων (εικόνα 66). Κατά συνέπεια, αποκλείστηκε η περίπτωση συσσώρευσης ιόντων Ca^{2+} σε αυτά τα οργανίδια. Αντιθέτως, ταυτόχρονη χορήγηση του μιτοχονδριακού αποσυζεύκτη FCCP και της ολιγομυκίνης, που οδηγεί σε άμεση εκκένωση του μιτοχονδριακού φορτίου, έδειξε σημαντική συσσώρευση ιόντων Ca^{2+} στα κύτταρα-δέκτες της εκκρινόμενης α -συνουκλείνης (εικόνα 68). Μια τέτοια κατάσταση είναι πιθανό να προκαλέσει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, συσχετίζοντας, τρόπον τινά, την εξωκυττάρια α -συνουκλείνη, με τη θεωρία της μιτοχονδριακής συσσώρευσης ιόντων Ca^{2+} που συνοδεύει την παθογένεση της νόσου του Parkinson (Benner et al., 2004; Cali et al., 2012; Vekrellis and Stefanis, 2012; Zhou et al., 2004). Η επικοινωνία μεταξύ του Ε.Δ. και των μιτοχονδρίων, περιλαμβάνει γεγονότα μεταφοράς ιόντων Ca^{2+} από το ένα οργανίδιο στο άλλο, ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο τις διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις (Bassik et al., 2004; Cali et al., 2012; Mirnikjoo et al., 2009; Szalai et al., 1999; Zundorf and Reiser, 2011). Μια πιθανή διατάραξη της μεταφοράς των ιόντων Ca^{2+} μεταξύ του Ε.Δ. και των μιτοχονδρίων μπορεί να αποβεί μοιραία για την κυτταρική επιβίωση. Έχει δειχθεί ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες, η α -συνουκλείνη διαμεσολαβεί την επικοινωνία μεταξύ των δύο οργανιδίων, και ότι μάλιστα η υπερέκφρασή της προκαλεί αλλαγές στον κυτταρικό εντοπισμό, την κατανομή της μέσα στο κύτταρο και την λειτουργική τους επικοινωνία, με άμεσο επακόλουθο τη διατάραξη της ομοιόστασης του μιτοχονδριακού Ca^{2+} (Cali et al., 2012). Λανθασμένη διευθέτηση του πλεονάζοντος Ca^{2+} έχει συσχετισθεί με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και τον κυτταρικό θάνατο που λαμβάνουν χώρα στη νόσο του Parkinson (Benner et al., 2004; Vekrellis and Stefanis, 2012; Zhou et al., 2004).

Η ανεξέλεγκτη είσοδος ιόντων Ca^{2+} είναι δυνατόν να πυροδοτήσει την ενεργοποίηση των καλπαϊνών, μιας ειδικής κατηγορίας πρωτεασών κυστεΐνης, οι

οποίες αποκρίνονται σε σήματα Ca^{2+} (Medeiros et al., 2012). Διαρκώς αυξανόμενα βιβλιογραφικά δεδομένα παγιώνουν την άποψη ότι λανθασμένη ενεργοποίηση των καλπαϊνών αποτελεί τον κύριο ένοχο σε ένα ευρύ φάσμα εγκεφαλικών διαταραχών, μεταξύ των οποίων η νόσος του Parkinson, η νόσος του Alzheimer, η ασθένεια του Huntington, καθώς και η ισχαιμία, η διεγερσιμοτοξικότητα και το εγκεφαλικό τραύμα (Camins et al., 2006). Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου οι καλπαΐνες ρυθμίζουν τα μονοπάτια θανάτου, παραμένει αδιευκρίνιστος (Camins et al., 2006). Η ενεργότητα των καλπαϊνών βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων που είχαν επωαστεί με θρεπτικό πλούσιο σε εκκρινόμενη α-συνουκλείνη για 24 ώρες (**εικόνα 73**). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση των καλπαϊνών λαμβάνει χώρα σε δεύτερο χρόνο, ακολουθώντας τις διαταραχές της ομοιόστασης του Ca^{2+} . Δεδομένου ότι οι καλπαΐνες διαμεσολαβούν την κατάτμηση και επακόλουθη ενεργοποίηση των κασπασών (Camins et al., 2006), σε συνδυασμό με το ότι η εκκρινόμενη α-συνουκλείνη, όπως ήδη αναφέρθηκε, οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3 (**εικόνα 45**), είναι πολύ πιθανή η ύπαρξη μιας σχέσης μεταξύ των καλπαϊνών και των κασπασών. Στην παρούσα μελέτη, η φαρμακολογική αναστολή των καλπαϊνών, είχε προστατευτική δράση έναντι του κυτταρικού θανάτου που προκαλεί η παρουσία της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης (**εικόνες 74, 76**), ενισχύοντας περαιτέρω την άποψη σχετικά με τη συμμετοχή των καλπαϊνών στην περιγραφόμενη νευροεκφυλιστική διαδικασία. Η ευεργετική επίδραση της αναστολής των καλπαϊνών ήταν σαφώς εμφανέστερη στην περίπτωση των διαφοροποιημένων SH-SY5Y κυττάρων (**εικόνα 74**), συγκριτικά με τους πρωτογενείς νευρώνες (**εικόνα 76**). Πιθανότατα, στην περίπτωση των φλοιϊκών νευρώνων να απαιτείται υψηλότερη δόση του αναστολέα, προκειμένου να επιτευχθεί αποτελεσματικότερη παρεμπόδιση. Ωστόσο, η χορήγηση υψηλότερων συγκεντρώσεων του αναστολέα επέφερε τοξικά αποτελέσματα. Σε κάθε περίπτωση, η μερική προστασία που παρέχει η αναστολή των καλπαϊνών στους πρωτογενείς νευρώνες υποδηλώνει τη συμμετοχή και άλλων μονοπατιών θανάτου. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, ο ευεργετικός ρόλος της αναστολής των καλπαϊνών έχει αναφερθεί και σε περιπτώσεις ζωικών μοντέλων MPP^+ για τη νόσο του Parkinson (MPP^+ -induced models of PD) (Camins et al., 2006; Li et al., 1998; Nakamura et al., 2003).

Στο σημείο αυτό, πρέπει να τονιστεί ότι η επώαση 8 ωρών με τους ηλικικούς παράγοντες του Ca^{2+} (BAPTA-AM, EGTA), καθώς και τους αναστολείς των τασσεοελεγχόμενων καναλιών VOCs, ήταν ικανή για να προστατεύσει τα

διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα, από συνολική επώαση 16 ή 24 ωρών με θρεπτικό πλούσιο σε εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη (**εικόνα 71**). Κατά συνέπεια, η απορρύθμιση της ομοιόστασης του Ca^{2+} τοποθετείται χρονικά στα πρώτα στάδια του νευροτοξικού μονοπατιού που πυροδοτείται από την εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη. Αντιθέτως, χορήγηση του αναστολέα των καλπαϊνών με τον ίδιο τρόπο, φάνηκε να έχει ήπια ευεργετικά αποτελέσματα ύστερα από 16 ώρες συνολικής παρουσίας της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης (**εικόνα 75A**), τα οποία απέκτησαν στατιστική σημαντικότητα μόνο ύστερα από 24 ώρες συνολικής επώασης (**εικόνα 75B**). Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της ενζυμικής ενεργότητας, σύμφωνα με τα οποία εμφανής ενεργοποίηση των καλπαϊνών παρατηρείται μετά τις 16 ώρες επώασης, τα παραπάνω ευρήματα υπονοούν μια εξαιρετικά χαμηλή ενζυμική δραστηριότητα, εκτός των διακριτικών ορίων ανίχνευσης της μεθόδου, στις 16 ώρες, η οποία κορυφώνεται στις 24 ώρες. Έτσι, φαίνεται ότι η ενεργοποίηση των καλπαϊνών, τοποθετείται στα μεθύτερα στάδια της περιγραφόμενης νευροτοξικής πορείας, καταρροϊκά των διαταραχών της ομοιόστασης του Ca^{2+} . Παρόλα αυτά, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ακριβής ρόλος των καλπαϊνών στο περιγραφόμενο φαινόμενο, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K/Akt διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στις καίριες αποφάσεις που αφορούν στην επιβίωση ή το θάνατο των κυττάρων. Εύλογο είναι επομένως, να ρυθμίζεται αυστηρά. Η οποιαδήποτε εκτροπή από τη σωστά συντονισμένη λειτουργία, μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στην περίπτωση της νόσου του Parkinson, του Alzheimer, και του Huntington (Chong et al., 2012). Πιο συγκεκριμένα, σε ζωικά μοντέλα για τη νόσο του Parkinson, έχειδειχθεί ότι αλλαγές στο μονοπάτι της PI3K/Akt είναι δυνατόν να επιφέρουν ευεργετική δράση (Chong et al., 2012; Malagelada et al., 2010). Στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε ότι η εκκρινόμενη α -συνουκλεΐνη μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Akt, ήδη από τις 8 ώρες επώασης (**εικόνα 72**). Η παρατηρούμενη μείωση διατηρήθηκε μέχρι και ύστερα από 24 ώρες συνολικής επώασης (**εικόνα 72**). Αντιθέτως, στους πρωτογενείς νευρώνες παρόμοια μείωση ήταν εμφανής μόνο ύστερα από 24 ώρες παρουσίας της εκκρινόμενης α -συνουκλεΐνης (**εικόνα 72**). Από την άλλη πλευρά, το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK/ERKs ρυθμίζει σημαντικές λειτουργίες υπεύθυνες για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να ενεργοποιηθεί σε απόκριση σημάτων Ca^{2+} , καταρροϊκά διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών (Marambaud et al.,

2009). Επιπλέον, τα επίπεδα της πρωτεΐνης ERK παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση σε πλήρως διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα, υπογραμμίζοντας, τρόπον τινά τη σπουδαιότητα της εν λόγω πρωτεΐνης στη διατήρηση και επιβίωση των νευρώνων (Marambaud et al., 2009). Η παρουσία της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης μείωσε σημαντικά τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ERK, μόνο ύστερα από 24 ώρες επώασης και όχι νωρίτερα, τόσο στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα, όσο και τους πρωτογενείς νευρώνες (εικόνα 72). Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι από τη στιγμή που στις 24 ώρες, όπως ήδη έχει αναφερθεί πολλές φορές, ο κυτταρικός εκφυλισμός είναι εμφανής, η μείωση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης Akt και ERK, και γενικότερα ο αποσυντονισμός των μονοπατιών επιβίωσης είναι συμπαρομαρτούντα.

Τέλος, έχοντας δείξει στην παρούσα εργασία ότι η α-συνουκλεΐνη εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω της σύνδεσής της με εξωσώματα (εικόνες 42, 43), εξετάστηκε η συμμετοχή της συνδεδεμένης με τα εξωσώματα πρωτεΐνης στις παρατηρούμενες διαταραχές της ομοιόστασης του Ca^{2+} . Οι μετρήσεις της εισροής Ca^{2+} λόγω χωρητικότητας, σε κύτταρα που επώαστηκαν είτε με την ελεύθερη εξωκυττάρια α-συνουκλεΐνη είτε με αυτή που ήταν συνδεδεμένη με εξωσώματα, αποκάλυψε ότι η πρώτη είναι περισσότερο σε θέση να αυξήσει την εισροή Ca^{2+} , συγκριτικά με τη δεύτερη (εικόνα 78). Η παρατηρούμενη διαφορά πιθανά να οφείλεται σε αλλαγές που υφίσταται η πρωτεΐνη στη διαμόρφωσή της κατά τη διάρκεια της «συσκευασίας» της στα εξωσώματα, και οι οποίες να επηρεάζουν τις βιοχημικές ιδιότητές της. Τέλος, καθώς μόνο ένα μικρό τμήμα της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης είναι συνδεδεμένο με εξωσώματα, (Danzer et al., 2012), είναι δυνατόν η εξαιρετικά μικρή επιρροή που ασκεί στην εισροή Ca^{2+} αυτή η μορφή α-συνουκλεΐνης να αντανακλά τη μικρή συγκέντρωσή της στο θρεπτικό μέσο, συγκριτικά με την ελεύθερη.

Συνοψίζοντας τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, η α-συνουκλεΐνη εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσο των νευρικών κυττάρων. Στον εξωκυττάριο χώρο, απελευθερώνονται τόσο μονομερείς όσο και ολιγομερείς μορφές της πρωτεΐνης, μέσω διαφορετικών μηχανισμών, μεταξύ των οποίων και η απελευθέρωση με εξωσώματα. Η παρουσία της ελεύθερης εξωκυττάριας α-συνουκλεΐνης, σε οποιαδήποτε μορφή (μονομερή ή ολιγομερή), είναι σε θέση να μειώσει την κυτταρική βιωσιμότητα, ακόμα και σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, διαταραχές του δικτύου ομοιόστασης των ιόντων Ca^{2+} εμπλέκονται, τουλάχιστον μερικώς, στο νευροτοξικό

μονοπάτι που πυροδοτείται από την εκκρινόμενη α-συνουκλείνη. Στα πλαίσια αυτά, ο χειρισμός των καταρρακτών σηματοδότησης του Ca^{2+} είναι δυνατόν να αντιπροσωπεύει έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο για τη νόσο του Parkinson και τις σχετιζόμενες συνουκλείνοπάθειες, αντιμετωπίζοντας τη νευροτοξική δράση της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης. Επιπρόσθετα, η συγκεκριμένη μελέτη παρέχει έναν αριθμό σημαντικών καινοτόμων μηχανιστικών δεδομένων, που αφορούν στην επίδραση της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης, σε νευρωνικά κύτταρα. Η εκκρινόμενη α-συνουκλείνη επιδρώντας, αρχικά, στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης, αυξάνει τη ρευστότητά της, επιτρέποντας, ενδεχομένως, την αναδιάρθρωση και τη συμπλεγματοποίηση των τασεοελεγχόμενων καναλιών Ca^{2+} , με αποτέλεσμα τη διευκόλυνση της εισροής ιόντων Ca^{2+} . Ωστόσο, σε αυτό το πρόωρο χρονικό διάστημα δεν παρατηρείται ο σχηματισμός δακτυλιοειδών πόρων στη μεμβράνη. Στη συνέχεια, καταρροϊκά του μονοπατιού που ενεργοποιείται από την εκκρινόμενη α-συνουκλείνη, η ενεργοποίηση των καλπαϊνών και πιθανότατα η συσσώρευση του Ca^{2+} στα μιτοχόνδρια, να αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που να συντελούν στο νευροεκφυλισμό και τελικά στον κυτταρικό θάνατο.

2. Γενικά συμπεράσματα.

Η παθολογική συσσώρευση της α-συνουκλείνης, με τη μορφή των σωματίων και νευριτών Lewy και ο επακόλουθος κυτταρικός εκφυλισμός, διαδραματίζουν μείζονα ρόλο στην παθογενετική διαδικασία που χαρακτηρίζει τη νόσο του Parkinson, όπως ήδη αναφέρθηκε (George et al., 2013; Vekrellis and Stefanis, 2012). Πρόσφατα δεδομένα ενισχύουν την υπόθεση της διακυτταρικής μεταφοράς των τοξικών μορφών της α-συνουκλείνης από τα πάσχοντα στα υγιή εγκεφαλικά κύτταρα (Angot et al., 2012; Hansen et al., 2011). Ωστόσο, μέχρι και σήμερα η παραπάνω υπόθεση παραμένει αμφιλεγόμενη (Ahn et al., 2012; Mendez et al., 2008). Είναι εύλογο, λοιπόν, η εν λόγω πρωτεΐνη να αποτελεί στόχαστρο των θεραπευτικών προσεγγίσεων που αφορούν γενικότερα όλη την κατηγορία των συνουκλείνοπαθειών.

Πιο συγκεκριμένα, γίνεται λόγος για την ικανότητα της α-συνουκλείνης να μεταδίδει την παθολογία της νόσου, με έναν τρόπο που προσομοιάζει με αυτόν της πρωτεΐνης prion. Η παραπάνω υπόθεση προϋποθέτει την αλληλουχία τριών κομβικών γεγονότων, με πρώτο την απελευθέρωση της α-συνουκλείνης στον εξωκυττάριο χώρο, την ακόλουθη πρόσληψή της από τα γειτονικά υγιή κύτταρα και τέλος, τη

δημιουργία πυρήνα πρωτεϊνικής συσσωμάτωσης, οδηγώντας στον κυτταρικό εκφυλισμό.

Η παρουσία της α-συνουκλεΐνης σε ανθρώπινα βιολογικά υγρά παραπέμπει στην ικανότητα της πρωτεΐνης να εκκρίνεται *in vivo*. Ωστόσο ο μηχανισμός έκκρισης παραμένει μερικώς χαρακτηρισμένος. Η σύνδεση της α-συνουκλεΐνης με τα εξωσώματα (εικόνες 42, 43) αποτελεί εύρημα-κλειδί, όσον αφορά στην εξάπλωση της παθολογίας της. Οι βιοχημικές ιδιότητες των μικρών αυτών κυστιδίων είναι δυνατόν να εξασφαλίσουν την είσοδό της πρωτεΐνης σε γειτονικούς νευρώνες, όπως προτείνεται από την υπόθεση του «Δούρειου Ίππου». Εντούτοις, με βάση τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, καθώς και με άλλα μη δημοσιευμένα δεδομένα του εργαστηρίου μας, η απελευθέρωση μέσω εξωσωμάτων δεν αποτελεί τον κύριο μηχανισμό έκκρισης της α-συνουκλεΐνης. Η διαλεύκανση εναλλακτικών μονοπατιών έκκρισης παρέχει προοπτικές φαρμακευτικής παρέμβασης, μειώνοντας τα επίπεδα της εξωκυττάριας πρωτεΐνης.

Στο περιγραφόμενο πειραματικό μοντέλο, η έκκριση της α-συνουκλεΐνης αποτελεί φυσιολογικό γεγονός, καθώς η παρουσία της στον εξωκυττάριο χώρο δεν είναι αποτέλεσμα διατάραξης της πλασματικής μεμβράνης και επακόλουθου κυτταρικού θανάτου (εικόνα 37). Σημειωτέον, η επαγωγή της υπερέκφρασης της α-συνουκλεΐνης, επάγει και την απελευθέρωσή της στο θρεπτικό μέσο (εικόνα 37). Τα παραπάνω δεδομένα ενισχύουν την άποψη σύμφωνα με την οποία η έκκριση αποτελεί και ένα μέσο «αποτοξίνωσης» του κυττάρου από την περίσσεια της πρωτεΐνης ή ακόμα και από τις επιβλαβείς μορφές της (Lee, 2008). Υπό αυτήν την έννοια, η ρύθμιση των ενδοκυττάριας επιπέδων της α-συνουκλεΐνης θα μπορούσε να αποτελέσει μέσο ελέγχου της εξωκυττάριας συγκέντρωσής της. Προς αυτή την κατεύθυνση μπορεί να συμβάλλει η ενίσχυση των συστημάτων πρωτεϊνικής αποικοδόμησης. Ο μηχανισμός αποικοδόμησης της α-συνουκλεΐνης παραμένει αμφιλεγόμενος (Vekrellis and Stefanis, 2012). Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, η κύρια οδός αποικοδόμησης, τουλάχιστον της φυσικού τύπου μονομερούς α-συνουκλεΐνης είναι η διαμεσολαβούμενη από μόρια συνοδούς αυτοφαγία και η μακροαυτοφαγία, (Cuervo et al., 2004; Vogiatzi et al., 2008). Εντούτοις, υπάρχουν *in vitro* (Tofaris et al., 2003; Webb et al., 2003), αλλά και πρόσφατα *in vivo* (Ebrahimi-Fakhari et al., 2011) δεδομένα που αναδεικνύουν και την πρωτεοσωμική οδό αποικοδόμησης για την α-συνουκλεΐνη.

Μείωση των ενδοκυττάρων επιπέδων της α-συνουκλεΐνης είναι δυνατόν να επιτευχθεί και μέσω της μεταγραφικής ρύθμισής της. Ακόμη δεν είναι διαθέσιμη η πληροφορία των πιθανών μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την έκφραση της α-συνουκλεΐνης *in vivo*. Ωστόσο, κυτταρικές μελέτες έχουν δείξει ότι η περιοχή του εσωνίου 1 και το 5' άκρο του υποκινητή του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης διαθέτει στοιχεία απόκρισης σε μεταγραφικούς παράγοντες. Ο μεταγραφικός παράγοντας ZSCAN είναι απαραίτητος για τη μεταγραφική ενεργότητα του εσωνίου 1 (Clough et al., 2009). Ο ρόλος του ZSCAN στη μεταγραφική ρύθμιση της α-συνουκλεΐνης επαληθεύτηκε, κατόπιν προσέγγισης με siRNA έναντι αυτού, σε κύτταρα PC12 και πρωτογενείς νευρώνες (Clough et al., 2009). Επομένως, η στόχευση του εν λόγω μεταγραφικού παράγοντα ή και άλλων που θα ταυτοποιηθούν στο μέλλον, θα μπορούσε να ανοίξει νέες θεραπευτικές οδούς στη νόσο του Parkinson και τις συναφείς συνουκλεϊνοπάθειες (Vekrellis and Stefanis, 2012).

Η ικανότητα πρόσληψης της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον κυτταρικό τύπο καθώς και τις μορφές της πρωτεΐνης (Danzer et al., 2007; Emmanouilidou et al., 2010a; Lee et al., 2005a). Έχει ήδη γίνει μνεία σε σχετική βιβλιογραφία, που αφορά σε πιθανούς μηχανισμούς πρόσληψης, μεταξύ των οποίων η παθητική διάχυση και η ενδοκυττάρωση, αναλόγως της μορφής της α-συνουκλεΐνης (Lee et al., 2008a). Μάλιστα, σε κυτταρικά μοντέλα έχει δειχθεί ότι ολιγομερείς και ινιδιακές μορφές της α-συνουκλεΐνης αρχικά ενδοκυτταρώνονται από τα κύτταρα-δέκτες και ακολούθως οδηγούνται στα λυσοσώματα προς αποικοδόμηση (Hansen et al., 2011; Lee et al., 2008b; Luk et al., 2009; Volpicelli-Daley et al., 2011). Σημειωτέον, έχει αναφερθεί ότι η χρήση φαρμακολογικών αναστολέων της ενδοκυττάρωσης, ελαττώνουν σημαντικά την πρόσληψη της α-συνουκλεΐνης (Hansen et al., 2011; Lee et al., 2008a). Αν όντως ισχύει η υπόθεση της διάδοσης της παθολογίας της α-συνουκλεΐνης, η μείωση της πρόσληψής της από υγιή κύτταρα, θα μπορούσε πιθανά να επιβραδύνει το ρυθμό εξάπλωσης.

Πέραν της πρόσληψης, η αλληλεπίδραση στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης και οι διαταραχές της ομοιόστασης του Ca^{2+} αποτελούν κοινό τόπο για πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες, μεταξύ των οποίων και η νόσος του Parkinson (Marambaud et al., 2009). Στην παρούσα εργασία η φυσιολογικά εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη επηρεάζει τη ρευστότητα της μεμβράνης (εικόνα 77), ενώ διευκολύνει την είσοδο των ιόντων Ca^{2+} κατόπιν ερεθίσματος (εικόνες 59, 63, 69). Η εισροή των ιόντων διαμεσολαβείται από τα L- και N-τύπου τασεοελεγχόμενα κανάλια Ca^{2+}

(εικόνες 62, 63). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, *in vitro* μελέτες, που στηρίζονται στην ανασυνδυασμένη α-συνουκλεΐνη, έχουν δείξει ότι επηρεάζει τη λειτουργία των N-τύπου καναλιών (Adamczyk and Strosznajder, 2006), ενώ ολιγομερείς μορφές αυτής είναι σε θέση να επάγουν την εισροή Ca^{2+} και την επακόλουθη ενεργοποίηση των κασπασών σε πρωτογενείς νευρώνες και κύτταρα νευροβλαστώματος ανθρώπου (Danzer et al., 2007; Furukawa et al., 2006; Martin et al., 2012). Κατά συνέπεια, η κατανόηση των «μοριακών γεγονότων» που συνδέουν τις διαταραχές των ιόντων Ca^{2+} και τη διαδικασία του νευροεκφυλισμού είναι δυνατόν να υποστηρίξουν τις προσπάθειες για νέες θεραπευτικές παρεμβάσεις.

Η δέσμευση των ιόντων Ca^{2+} με χηλικούς παράγοντες αντιστρέφει το φαινόμενο της κυτταρικής έκπτωσης (εικόνα 70). Η ευεργετική δράση της δέσμευσης του Ca^{2+} ιδιαίτερα στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας, επιβεβαιώνεται από ευρήματα σύμφωνα με τα οποία τα υψηλά επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών που προσδέουν το ελεύθερο Ca^{2+} , τους θωρακίζουν έναντι του εκφυλισμού που χαρακτηρίζει τη νόσο του Parkinson (Surmeier et al., 2010). Παρόμοια προστατευτική δράση έχει η φαρμακολογική αναστολή των L- και N-τύπου τασεοελεγχόμενων καναλιών Ca^{2+} (εικόνα 70). Εξαιτίας του ρόλου των Cav (1.3) L-τύπου καναλιών Ca^{2+} στη διεγερσιμότητα των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας (Chan et al., 2009; Mosharov et al., 2009), επιδημιολογικές μελέτες εξετάζουν τη δράση αναστολέων τασεοελεγχόμενων καναλιών, που χρησιμοποιούνται ως αντιϋπερτασικά φάρμακα, ως παραγόντων μείωσης του κινδύνου εκδήλωσης της νόσου (Surmeier, 2007). Τα πιο γνωστά αντιϋπερτασικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται είναι το verapamil και diltiazem. Σε πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη, δε φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των παραπάνω φαρμάκων και της εκδήλωσης της νόσου του Parkinson (Ton et al., 2007). Ωστόσο, κανένα από τα δύο αντιϋπερτασικά δεν αποτελεί ισχυρό αναστολέα των Cav1.3 καναλιών. Αντιθέτως, αναδρομική εξέταση ασθενών, που έλαβαν διϋδροπυριδίνες ως θεραπεία για την υπέρταση, έδειξε μια χαμηλότερη από την αναμενόμενη συχνότητα εμφάνισης της νόσου (Rodnitzky, 1999). Η εν λόγω κατηγορία φαρμάκου έχει χρησιμοποιηθεί σε μοντέλα επίμυων, για την αναστροφή της αυτόνομης ικανότητας των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας, με νευροπροστατευτικά αποτελέσματα (Surmeier, 2007).

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι οι διαφορετικές μορφές της α-συνουκλεΐνης εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, όσον αφορά τα συστήματα

αποικοδόμησης, έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα της μονομερούς α-συνουκλεΐνης μειώνονται μέσω της λυσοσωμικής οδού (Cuervo et al., 2004; Vogiatzi et al., 2008), ενώ επιλεκτικές μορφές που απαρτίζονται από διαλυτά ολιγομερή (Ebrahimi-Fakhari et al., 2011), καθώς και η φωσφορυλιωμένη α-συνουκλεΐνη (Machiya et al., 2010) αποικοδομούνται μέσω του πρωτεασώματος. Παρομοίως και ο μηχανισμός πρόσληψης, ο οποίος φαίνεται να διαφέρει μεταξύ της μονομερούς ανασυνδυσμένης α-συνουκλεΐνης, που ακολουθεί την παθητική διάχυση και των ολιγομερών και ινδιακών μορφών οι οποίες ενδοκυττάρωνονται (Lee et al., 2008a). Επομένως, το είδος της α-συνουκλεΐνης (ανασυνδυσμένη ή φυσιολογικά εκκρινόμενη), καθώς και η μορφή της (μονομερής, ολιγομερής ή ινδιακή μορφή) μπορεί, εν μέρει, να εξηγήσει πιθανές διαφορές μεταξύ ανεξάρτητων μελετών, σχετικά με το ρόλο της εν λόγω πρωτεΐνης στα παθογενετικά γεγονότα που καταλήγουν στο νευροεκφυλισμό. Για παράδειγμα, η ανασυνδυσμένη α-συνουκλεΐνη στερείται των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της φυσιολογικά εκκρινόμενης. Στα ίδια πλαίσια, η πρόσληψη εξωγενώς προστιθέμενων προσχηματισμένων ινδιακών μορφών α-συνουκλεΐνης επάγει τη συσσωμάτωση της ενδοκυττάριας πρωτεΐνης (Luk et al., 2009), ενώ η στερεοτακτική χορήγηση των ίδιων μορφών σε ζωικά μοντέλα ακολουθεί το πρότυπο διακυτταρικής εξάπλωσης της νόσου (Luk et al., 2012). Ωστόσο, δεν είναι γνωστό αν *in vivo* είναι δυνατόν να παραχθούν τέτοιου τύπου μορφές και αν ακόμη αυτές απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο. Συμπερασματικά, η ανάπτυξη τεχνικών χαρακτηρισμού της διαμόρφωσης της φυσιολογικά εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης και αξιολόγησης του τοξικού δυναμικού κάθε μιας από αυτές, είναι δυνατόν να αναδείξουν νέους θεραπευτικούς στόχους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

2011. A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson's disease. *PLoS genetics*. 7:e1002142.
- Abeliovich, A., Y. Schmitz, I. Farinas, D. Choi-Lundberg, W.H. Ho, P.E. Castillo, N. Shinsky, J.M. Verdugo, M. Armanini, A. Ryan, M. Hynes, H. Phillips, D. Sulzer, and A. Rosenthal. 2000. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. 25:239-252.
- Adam-Vizi, V., and A.A. Starkov. 2010. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 20 Suppl 2:S413-426.
- Adamczyk, A., and J.B. Strosznajder. 2006. Alpha-synuclein potentiates Ca²⁺ influx through voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Neuroreport*. 17:1883-1886.
- Ahn, K.J., S.R. Paik, K.C. Chung, and J. Kim. 2006. Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of alpha-synuclein. *Journal of neurochemistry*. 97:265-279.
- Ahn, T.B., J.W. Langston, V.R. Aachi, and D.W. Dickson. 2012. Relationship of neighboring tissue and gliosis to alpha-synuclein pathology in a fetal transplant for Parkinson's disease. *American journal of neurodegenerative disease*. 1:49-59.
- Alves, G., E.B. Forsaa, K.F. Pedersen, M. Dreetz Gjerstad, and J.P. Larsen. 2008. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol*. 255 Suppl 5:18-32.
- Angot, E., J.A. Steiner, C.M. Lema Tome, P. Ekstrom, B. Mattsson, A. Bjorklund, and P. Brundin. 2012. Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons in vivo. *PloS one*. 7:e39465.
- Appel-Cresswell, S., C. Vilarino-Guell, M. Encarnacion, H. Sherman, I. Yu, B. Shah, D. Weir, C. Thompson, C. Szu-Tu, J. Trinh, J.O. Aasly, A. Rajput, A.H. Rajput, A. Jon Stoessel, and M.J. Farrer. 2013. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 28:811-813.
- Arundine, M., and M. Tymianski. 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*. 34:325-337.
- Ausubel, F. 1991. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley Interscience.
- Azeredo da Silveira, S., B.L. Schneider, C. Cifuentes-Diaz, D. Sage, T. Abbas-Terki, T. Iwatsubo, M. Unser, and P. Aebischer. 2009. Phosphorylation does not prompt, nor prevent, the formation of alpha-synuclein toxic species in a rat model of Parkinson's disease. *Human molecular genetics*. 18:872-887.
- Bain, G., W.J. Ray, M. Yao, and D.I. Gottlieb. 1994. From embryonal carcinoma cells to neurons: the P19 pathway. *Bioessays*. 16:343-348.
- Banoczi, Z., A. Alexa, A. Farkas, P. Friedrich, and F. Hudecz. 2008. Novel cell-penetrating calpain substrate. *Bioconjugate chemistry*. 19:1375-1381.
- Bar-On, P., L. Crews, A.O. Koob, H. Mizuno, A. Adame, B. Spencer, and E. Masliah. 2008. Statins reduce neuronal alpha-synuclein aggregation in in vitro models of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 105:1656-1667.
- Bardo, S., M.G. Cavazzini, and N. Emptage. 2006. The role of the endoplasmic reticulum Ca²⁺ store in the plasticity of central neurons. *Trends in pharmacological sciences*. 27:78-84.

- Bartels, T., J.G. Choi, and D.J. Selkoe. 2011. alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*. 477:107-110.
- Bassik, M.C., L. Scorrano, S.A. Oakes, T. Pozzan, and S.J. Korsmeyer. 2004. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *The EMBO journal*. 23:1207-1216.
- Beal, M.F. 1998. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Annals of neurology*. 44:S110-114.
- Belkacemi, L., I. Bedard, L. Simoneau, and J. Lafond. 2005. Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: a review. *Cell calcium*. 37:1-8.
- Bellingham, S.A., B.B. Guo, B.M. Coleman, and A.F. Hill. 2012. Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Frontiers in physiology*. 3:124.
- Bendor, J.T., T.P. Logan, and R.H. Edwards. 2013. The Function of alpha-Synuclein. *Neuron*. 79:1044-1066.
- Benner, E.J., R.L. Mosley, C.J. Destache, T.B. Lewis, V. Jackson-Lewis, S. Gorantla, C. Nemachek, S.R. Green, S. Przedborski, and H.E. Gendelman. 2004. Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:9435-9440.
- Bertocini, C.W., Y.S. Jung, C.O. Fernandez, W. Hoyer, C. Griesinger, T.M. Jovin, and M. Zweckstetter. 2005. Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured alpha-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:1430-1435.
- Bezprozvanny, I. 2007. Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, calcium signalling and Huntington's disease. *Sub-cellular biochemistry*. 45:323-335.
- Bezprozvanny, I., and M.P. Mattson. 2008. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends in neurosciences*. 31:454-463.
- Biedler, J.L., L. Helson, and B.A. Spengler. 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*. 33:2643-2652.
- Bisaglia, M., S. Mammi, and L. Bubacco. 2009. Structural insights on physiological functions and pathological effects of alpha-synuclein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 23:329-340.
- Bisaglia, M., L. Tosatto, F. Munari, I. Tessari, P.P. de Laureto, S. Mammi, and L. Bubacco. 2010. Dopamine quinones interact with alpha-synuclein to form unstructured adducts. *Biochemical and biophysical research communications*. 394:424-428.
- Bobrie, A., M. Colombo, G. Raposo, and C. Thery. 2011. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*. 12:1659-1668.
- Bonci, A., P. Grillner, N.B. Mercuri, and G. Bernardi. 1998. L-Type calcium channels mediate a slow excitatory synaptic transmission in rat midbrain dopaminergic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 18:6693-6703.
- Bonifati, V., P. Rizzu, F. Squitieri, E. Krieger, N. Vanacore, J.C. van Swieten, A. Brice, C.M. van Duijn, B. Oostra, G. Meco, and P. Heutink. 2003. DJ-1 (PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 24:159-160.

- Borghi, R., R. Marchese, A. Negro, L. Marinelli, G. Forloni, D. Zaccheo, G. Abbruzzese, and M. Tabaton. 2000. Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neuroscience letters*. 287:65-67.
- Braak, H., R.A. de Vos, J. Bohl, and K. Del Tredici. 2006. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience letters*. 396:67-72.
- Braak, H., K. Del Tredici, U. Rub, R.A. de Vos, E.N. Jansen Steur, and E. Braak. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*. 24:197-211.
- Braak, H., E. Ghebremedhin, U. Rub, H. Bratzke, and K. Del Tredici. 2004. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and tissue research*. 318:121-134.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-254.
- Breydo, L., J.W. Wu, and V.N. Uversky. 2012. Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochimica et biophysica acta*. 1822:261-285.
- Brundin, P., J.Y. Li, J.L. Holton, O. Lindvall, and T. Revesz. 2008. Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. *Nature reviews. Neuroscience*. 9:741-745.
- Burke, R.E., W.T. Dauer, and J.P. Vonsattel. 2008. A critical evaluation of the Braak staging scheme for Parkinson's disease. *Annals of neurology*. 64:485-491.
- Burnette, W.N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 112:195-203.
- Burre, J., M. Sharma, T. Tsetsenis, V. Buchman, M.R. Etherton, and T.C. Sudhof. 2010. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science*. 329:1663-1667.
- Burre, J., S. Vivona, J. Diao, M. Sharma, A.T. Brunger, and T.C. Sudhof. 2013. Properties of native brain alpha-synuclein. *Nature*. 498:E4-6; discussion E6-7.
- Cali, T., D. Ottolini, and M. Brini. 2011. Mitochondria, calcium, and endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. *Biofactors*. 37:228-240.
- Cali, T., D. Ottolini, and M. Brini. 2013. Calcium and endoplasmic reticulum-mitochondria tethering in neurodegeneration. *DNA and cell biology*. 32:140-146.
- Cali, T., D. Ottolini, A. Negro, and M. Brini. 2012. alpha-Synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions. *The Journal of biological chemistry*. 287:17914-17929.
- Camins, A., E. Verdaguer, J. Folch, and M. Pallas. 2006. Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS drug reviews*. 12:135-148.
- Catterall, W.A. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3:a003947.
- Caughey, B. 2000. Transmissible spongiform encephalopathies, amyloidoses and yeast prions: common threads? *Nat Med*. 6:751-754.
- Chan, C.S., T.S. Gertler, and D.J. Surmeier. 2009. Calcium homeostasis, selective vulnerability and Parkinson's disease. *Trends in neurosciences*. 32:249-256.

- Chan, C.S., J.N. Guzman, E. Ilijic, J.N. Mercer, C. Rick, T. Tkatch, G.E. Meredith, and D.J. Surmeier. 2007. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature*. 447:1081-1086.
- Chandra, S., X. Chen, J. Rizo, R. Jahn, and T.C. Sudhof. 2003. A broken alpha-helix in folded alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry*. 278:15313-15318.
- Chandra, S., F. Fornai, H.B. Kwon, U. Yazdani, D. Atasoy, X. Liu, R.E. Hammer, G. Battaglia, D.C. German, P.E. Castillo, and T.C. Sudhof. 2004. Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:14966-14971.
- Chandra, S., G. Gallardo, R. Fernandez-Chacon, O.M. Schluter, and T.C. Sudhof. 2005. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell*. 123:383-396.
- Chartier-Harlin, M.C., J. Kachergus, C. Roumier, V. Mouroux, X. Douay, S. Lincoln, C. Levecque, L. Larvor, J. Andrieux, M. Hulihan, N. Waucquier, L. Defebvre, P. Amouyel, M. Farrer, and A. Destee. 2004. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*. 364:1167-1169.
- Chen, L., and M.B. Feany. 2005. Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease. *Nature neuroscience*. 8:657-663.
- Chiba-Falek, O., J.W. Touchman, and R.L. Nussbaum. 2003. Functional analysis of intra-allelic variation at NACP-Rep1 in the alpha-synuclein gene. *Human genetics*. 113:426-431.
- Chivet, M., F. Hemming, K. Pernet-Gallay, S. Fraboulet, and R. Sadoul. 2012. Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system. *Frontiers in physiology*. 3:145.
- Chong, Z.Z., Y.C. Shang, S. Wang, and K. Maiese. 2012. A Critical Kinase Cascade in Neurological Disorders: PI 3-K, Akt, and mTOR. *Future neurology*. 7:733-748.
- Clapham, D.E. 2007. Calcium signaling. *Cell*. 131:1047-1058.
- Clayton, D.F., and J.M. George. 1998. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends in neurosciences*. 21:249-254.
- Clayton, D.F., and J.M. George. 1999. Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *Journal of neuroscience research*. 58:120-129.
- Clough, R.L., G. Dermentzaki, and L. Stefanis. 2009. Functional dissection of the alpha-synuclein promoter: transcriptional regulation by ZSCAN21 and ZNF219. *Journal of neurochemistry*. 110:1479-1490.
- Cole, N.B., D.D. Murphy, T. Grider, S. Rueter, D. Brasaemle, and R.L. Nussbaum. 2002. Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry*. 277:6344-6352.
- Conway, K.A., J.D. Harper, and P.T. Lansbury. 1998. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nature medicine*. 4:1318-1320.
- Conway, K.A., J.D. Harper, and P.T. Lansbury, Jr. 2000a. Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry*. 39:2552-2563.

- Conway, K.A., S.J. Lee, J.C. Rochet, T.T. Ding, R.E. Williamson, and P.T. Lansbury, Jr. 2000b. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:571-576.
- Conway, K.A., J.C. Rochet, R.M. Bieganski, and P.T. Lansbury, Jr. 2001. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science*. 294:1346-1349.
- Cookson, M.R. 2005. The biochemistry of Parkinson's disease. *Annual review of biochemistry*. 74:29-52.
- Cookson, M.R., and M. van der Brug. 2008. Cell systems and the toxic mechanism(s) of alpha-synuclein. *Experimental neurology*. 209:5-11.
- Cooper, D.N., and S.H. Barondes. 1990. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol*. 110:1681-1691.
- Cremades, N., S.I. Cohen, E. Deas, A.Y. Abramov, A.Y. Chen, A. Orte, M. Sandal, R.W. Clarke, P. Dunne, F.A. Aprile, C.W. Bertocini, N.W. Wood, T.P. Knowles, C.M. Dobson, and D. Klenerman. 2012. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of alpha-synuclein. *Cell*. 149:1048-1059.
- Csordas, G., C. Renken, P. Varnai, L. Walter, D. Weaver, K.F. Buttle, T. Balla, C.A. Mannella, and G. Hajnoczky. 2006. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *The Journal of cell biology*. 174:915-921.
- Cuervo, A.M., L. Stefanis, R. Fredenburg, P.T. Lansbury, and D. Sulzer. 2004. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*. 305:1292-1295.
- Dafnis, I., E. Stratikos, A. Tzinia, E.C. Tsilibary, V.I. Zannis, and A. Chroni. 2010. An apolipoprotein E4 fragment can promote intracellular accumulation of amyloid peptide beta 42. *Journal of neurochemistry*. 115:873-884.
- Danzer, K.M., D. Haasen, A.R. Karow, S. Moussaud, M. Habeck, A. Giese, H. Kretschmar, B. Hengerer, and M. Kostka. 2007. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 27:9220-9232.
- Danzer, K.M., L.R. Kranich, W.P. Ruf, O. Cagsal-Getkin, A.R. Winslow, L. Zhu, C.R. Vanderburg, and P.J. McLean. 2012. Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Molecular neurodegeneration*. 7:42.
- Danzer, K.M., W.P. Ruf, P. Putcha, D. Joyner, T. Hashimoto, C. Glabe, B.T. Hyman, and P.J. McLean. 2011. Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular alpha-synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 25:326-336.
- Dauer, W., and S. Przedborski. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 39:889-909.
- Davidson, W.S., A. Jonas, D.F. Clayton, and J.M. George. 1998. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *The Journal of biological chemistry*. 273:9443-9449.
- de Brito, O.M., and L. Scorrano. 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 456:605-610.

- Deb, T.B., C.M. Coticchia, and R.B. Dickson. 2004. Calmodulin-mediated activation of Akt regulates survival of c-Myc-overexpressing mouse mammary carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 279:38903-38911.
- Dedmon, M.M., K. Lindorff-Larsen, J. Christodoulou, M. Vendruscolo, and C.M. Dobson. 2005. Mapping long-range interactions in alpha-synuclein using spin-label NMR and ensemble molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*. 127:476-477.
- Dello Sbarba, P., and E. Rovida. 2002. Transmodulation of cell surface regulatory molecules via ectodomain shedding. *Biological chemistry*. 383:69-83.
- Demuro, A., I. Parker, and G.E. Stutzmann. 2010. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry*. 285:12463-12468.
- Denzer, K., M.J. Kleijmeer, H.F. Heijnen, W. Stoorvogel, and H.J. Geuze. 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci*. 113 Pt 19:3365-3374.
- Desplats, P., H.J. Lee, E.J. Bae, C. Patrick, E. Rockenstein, L. Crews, B. Spencer, E. Masliah, and S.J. Lee. 2009. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:13010-13015.
- Dexter, D.T., and P. Jenner. 2013. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free radical biology & medicine*.
- Ding, T.T., S.J. Lee, J.C. Rochet, and P.T. Lansbury, Jr. 2002. Annular alpha-synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes. *Biochemistry*. 41:10209-10217.
- Ding, Z.T., Y. Wang, Y.P. Jiang, Y. Hashizume, M. Yoshida, M. Mimuro, T. Inagaki, and T. Iwase. 2006. Characteristics of alpha-synucleinopathy in centenarians. *Acta neuropathologica*. 111:450-458.
- Diociaiuti, M., F. Bordi, A. Motta, A. Carosi, A. Molinari, G. Arancia, and C. Coluzza. 2002. Aggregation of gramicidin A in phospholipid Langmuir-Blodgett monolayers. *Biophysical journal*. 82:3198-3206.
- Dowd, D.R. 1995. Calcium regulation of apoptosis. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 30:255-280.
- Du, H.N., L. Tang, X.Y. Luo, H.T. Li, J. Hu, J.W. Zhou, and H.Y. Hu. 2003. A peptide motif consisting of glycine, alanine, and valine is required for the fibrillization and cytotoxicity of human alpha-synuclein. *Biochemistry*. 42:8870-8878.
- Ebrahimi-Fakhari, D., I. Cantuti-Castelvetri, Z. Fan, E. Rockenstein, E. Masliah, B.T. Hyman, P.J. McLean, and V.K. Unni. 2011. Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of alpha-synuclein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 31:14508-14520.
- El-Agnaf, O.M., and G.B. Irvine. 2000. Review: formation and properties of amyloid-like fibrils derived from alpha-synuclein and related proteins. *Journal of structural biology*. 130:300-309.
- el-Agnaf, O.M., and G.B. Irvine. 2002. Aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein and related peptides. *Biochemical Society transactions*. 30:559-565.
- El-Agnaf, O.M., R. Jakes, M.D. Curran, D. Middleton, R. Ingenito, E. Bianchi, A. Pessi, D. Neill, and A. Wallace. 1998. Aggregates from mutant and wild-type

- alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments. *FEBS letters*. 440:71-75.
- El-Agnaf, O.M., S.A. Salem, K.E. Paleologou, L.J. Cooper, N.J. Fullwood, M.J. Gibson, M.D. Curran, J.A. Court, D.M. Mann, S. Ikeda, M.R. Cookson, J. Hardy, and D. Allsop. 2003. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 17:1945-1947.
- El-Agnaf, O.M., S.A. Salem, K.E. Paleologou, M.D. Curran, M.J. Gibson, J.A. Court, M.G. Schlossmacher, and D. Allsop. 2006. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 20:419-425.
- ElAli, A., and D.M. Hermann. 2011. ATP-binding cassette transporters and their roles in protecting the brain. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 17:423-436.
- Eliezer, D., E. Kutluay, R. Bussell, Jr., and G. Browne. 2001. Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *Journal of molecular biology*. 307:1061-1073.
- Elkon, H., J. Don, E. Melamed, I. Ziv, A. Shirvan, and D. Offen. 2002. Mutant and wild-type alpha-synuclein interact with mitochondrial cytochrome C oxidase. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 18:229-238.
- Emmanouilidou, E., D. Elenis, T. Papasilekas, G. Stranjalis, K. Gerozissis, P.C. Ioannou, and K. Vekrellis. 2011. Assessment of alpha-synuclein secretion in mouse and human brain parenchyma. *PloS one*. 6:e22225.
- Emmanouilidou, E., K. Melachroinou, T. Roumeliotis, S.D. Garbis, M. Ntzouni, L.H. Margaritis, L. Stefanis, and K. Vekrellis. 2010a. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:6838-6851.
- Emmanouilidou, E., L. Stefanis, and K. Vekrellis. Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiol Aging*. 31:953-968.
- Emmanouilidou, E., L. Stefanis, and K. Vekrellis. 2010b. Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiology of aging*. 31:953-968.
- Engelholm, M., and T. Gasser. 2013. Parkinson's disease: Is it all in the Genes? *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*.
- Erickson, R.P. 2010. Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. *Mutation research*. 705:96-106.
- Fan, M.M., and L.A. Raymond. 2007. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Progress in neurobiology*. 81:272-293.
- Farinelli, S.E., L.A. Greene, and W.J. Friedman. 1998. Neuroprotective actions of dipyrindamole on cultured CNS neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 18:5112-5123.
- Farrer, M., D.M. Maraganore, P. Lockhart, A. Singleton, T.G. Lesnick, M. de Andrade, A. West, R. de Silva, J. Hardy, and D. Hernandez. 2001. alpha-

- Synuclein gene haplotypes are associated with Parkinson's disease. *Human molecular genetics*. 10:1847-1851.
- Fasolato, C., M. Zottini, E. Clementi, D. Zacchetti, J. Meldolesi, and T. Pozzan. 1991. Intracellular Ca²⁺ pools in PC12 cells. Three intracellular pools are distinguished by their turnover and mechanisms of Ca²⁺ accumulation, storage, and release. *The Journal of biological chemistry*. 266:20159-20167.
- Faure, J., G. Lachenal, M. Court, J. Hirrlinger, C. Chatellard-Causse, B. Blot, J. Grange, G. Schoehn, Y. Goldberg, V. Boyer, F. Kirchhoff, G. Raposo, J. Garin, and R. Sadoul. 2006. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Molecular and cellular neurosciences*. 31:642-648.
- Fauvet, B., M.B. Fares, F. Samuel, I. Dikiy, A. Tandon, D. Eliezer, and H.A. Lashuel. 2012a. Characterization of semisynthetic and naturally Nalpha-acetylated alpha-synuclein in vitro and in intact cells: implications for aggregation and cellular properties of alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry*. 287:28243-28262.
- Fauvet, B., M.K. Mbefo, M.B. Fares, C. Desobry, S. Michael, M.T. Ardah, E. Tsika, P. Coune, M. Prudent, N. Lion, D. Eliezer, D.J. Moore, B. Schneider, P. Aebischer, O.M. El-Agnaf, E. Masliah, and H.A. Lashuel. 2012b. alpha-Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and Escherichia coli exists predominantly as disordered monomer. *The Journal of biological chemistry*. 287:15345-15364.
- Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, and M. Danielsen. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:7413-7417.
- Feng, L.R., H.J. Federoff, S. Vicini, and K.A. Maguire-Zeiss. 2010. Alpha-synuclein mediates alterations in membrane conductance: a potential role for alpha-synuclein oligomers in cell vulnerability. *The European journal of neuroscience*. 32:10-17.
- Fernandez, H.H. 2012. Updates in the medical management of Parkinson disease. *Cleveland Clinic journal of medicine*. 79:28-35.
- Fevrier, B., D. Vilette, F. Archer, D. Loew, W. Faigle, M. Vidal, H. Laude, and G. Raposo. 2004. Cells release prions in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:9683-9688.
- Fortin, D.L., M.D. Troyer, K. Nakamura, S. Kubo, M.D. Anthony, and R.H. Edwards. 2004. Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 24:6715-6723.
- Franco, R., S. Li, H. Rodriguez-Rocha, M. Burns, and M.I. Panayiotidis. 2010. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chemico-biological interactions*. 188:289-300.
- Freshney, R. 1993. Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique. New York: Wiley-Liss.
- Friedman, J.R., L.L. Lackner, M. West, J.R. DiBenedetto, J. Nunnari, and G.K. Voeltz. 2011. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*. 334:358-362.
- Fujiwara, H., M. Hasegawa, N. Dohmae, A. Kawashima, E. Masliah, M.S. Goldberg, J. Shen, K. Takio, and T. Iwatsubo. 2002. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature cell biology*. 4:160-164.

- Furukawa, K., M. Matsuzaki-Kobayashi, T. Hasegawa, A. Kikuchi, N. Sugeno, Y. Itoyama, Y. Wang, P.J. Yao, I. Bushlin, and A. Takeda. 2006. Plasma membrane ion permeability induced by mutant alpha-synuclein contributes to the degeneration of neural cells. *Journal of neurochemistry*. 97:1071-1077.
- Galla, H.J., and J. Luisetti. 1980. Lateral and transversal diffusion and phase transitions in erythrocyte membranes. An excimer fluorescence study. *Biochimica et biophysica acta*. 596:108-117.
- Galvin, J.E., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski. 2001. Synucleinopathies: clinical and pathological implications. *Archives of neurology*. 58:186-190.
- Gasser, T. 2009a. Genomic and proteomic biomarkers for Parkinson disease. *Neurology*. 72:S27-31.
- Gasser, T. 2009b. Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. *Expert reviews in molecular medicine*. 11:e22.
- Gautier, C.A., T. Kitada, and J. Shen. 2008. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:11364-11369.
- George, J.M. 2002. The synucleins. *Genome biology*. 3:REVIEWS3002.
- George, S., N.L. Rey, N. Reichenbach, J.A. Steiner, and P. Brundin. 2013. alpha-Synuclein: the long distance runner. *Brain Pathol*. 23:350-357.
- Ghidoni, R., L. Benussi, and G. Binetti. 2008. Exosomes: the Trojan horses of neurodegeneration. *Medical hypotheses*. 70:1226-1227.
- Giasson, B.I., J.E. Duda, M.S. Forman, V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski. 2001. Prominent perikaryal expression of alpha- and beta-synuclein in neurons of dorsal root ganglion and in medullary neurons. *Experimental neurology*. 172:354-362.
- Giasson, B.I., J.E. Duda, I.V. Murray, Q. Chen, J.M. Souza, H.I. Hurtig, H. Ischiropoulos, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee. 2000a. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*. 290:985-989.
- Giasson, B.I., J.E. Duda, S.M. Quinn, B. Zhang, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee. 2002. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron*. 34:521-533.
- Giasson, B.I., R. Jakes, M. Goedert, J.E. Duda, S. Leight, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee. 2000b. A panel of epitope-specific antibodies detects protein domains distributed throughout human alpha-synuclein in Lewy bodies of Parkinson's disease. *Journal of neuroscience research*. 59:528-533.
- 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*. 274:7619-7622.
- Goldberg, M.S., S.M. Fleming, J.J. Palacino, C. Cepeda, H.A. Lam, A. Bhatnagar, E.G. Meloni, N. Wu, L.C. Ackerson, G.J. Klapstein, M. Gajendiran, B.L. Roth, M.F. Chesselet, N.T. Maidment, M.S. Levine, and J. Shen. 2003. Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *The Journal of biological chemistry*. 278:43628-43635.
- Goldberg, M.S., and P.T. Lansbury, Jr. 2000. Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nature cell biology*. 2:E115-119.
- Goldin, E. 2010. Gaucher disease and parkinsonism, a molecular link theory. *Molecular genetics and metabolism*. 101:307-310.

- Gossen, M., and H. Bujard. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:5547-5551.
- Grace, A.A., and B.S. Bunney. 1983. Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--2. Action potential generating mechanisms and morphological correlates. *Neuroscience*. 10:317-331.
- Gray, B.C., Z. Siskova, V.H. Perry, and V. O'Connor. 2009. Selective presynaptic degeneration in the synaptopathy associated with ME7-induced hippocampal pathology. *Neurobiology of disease*. 35:63-74.
- Green, K.N., and F.M. LaFerla. 2008. Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease. *Neuron*. 59:190-194.
- Greggio, E., M. Bisaglia, L. Civiero, and L. Bubacco. 2011. Leucine-rich repeat kinase 2 and alpha-synuclein: intersecting pathways in the pathogenesis of Parkinson's disease? *Molecular neurodegeneration*. 6:6.
- Greten-Harrison, B., M. Polydoro, M. Morimoto-Tomita, L. Diao, A.M. Williams, E.H. Nie, S. Makani, N. Tian, P.E. Castillo, V.L. Buchman, and S.S. Chandra. 2010. Alphasynuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:19573-19578.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*. 260:3440-3450.
- Hadjigeorgiou, G.M., G. Xiromerisiou, V. Gourbali, K. Aggelakis, N. Scarmeas, A. Papadimitriou, and A. Singleton. 2006. Association of alpha-synuclein Rep1 polymorphism and Parkinson's disease: influence of Rep1 on age at onset. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 21:534-539.
- Hallett, P.J., and D.G. Standaert. 2004. Rationale for and use of NMDA receptor antagonists in Parkinson's disease. *Pharmacology & therapeutics*. 102:155-174.
- Hansen, C., E. Angot, A.L. Bergstrom, J.A. Steiner, L. Pieri, G. Paul, T.F. Outeiro, R. Melki, P. Kallunki, K. Fog, J.Y. Li, and P. Brundin. 2011. alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *The Journal of clinical investigation*. 121:715-725.
- Hardy, J. 2010. Genetic analysis of pathways to Parkinson disease. *Neuron*. 68:201-206.
- Harper, J.D., S.S. Wong, C.M. Lieber, and P.T. Lansbury. 1997. Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol*. 4:119-125.
- Hashimoto, M., S. Hossain, and S. Masumura. 1999. Effect of aging on plasma membrane fluidity of rat aortic endothelial cells. *Experimental gerontology*. 34:687-698.
- Hashimoto, M., L.J. Hsu, A. Sisk, Y. Xia, A. Takeda, M. Sundsmo, and E. Masliah. 1998. Human recombinant NACP/alpha-synuclein is aggregated and fibrillated in vitro: relevance for Lewy body disease. *Brain research*. 799:301-306.
- Hashimoto, M., and E. Masliah. 1999. Alpha-synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 9:707-720.

- Hebert, D.N., and M. Molinari. 2007. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiological reviews*. 87:1377-1408.
- Hegde, M.L., and K.S. Jagannatha Rao. 2003. Challenges and complexities of alpha-synuclein toxicity: new postulates in unfolding the mystery associated with Parkinson's disease. *Archives of biochemistry and biophysics*. 418:169-178.
- Heiser, V., E. Scherzinger, A. Boeddrich, E. Nordhoff, R. Lurz, N. Schugardt, H. Lehrach, and E.E. Wanker. 2000. Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: implications for Huntington's disease therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:6739-6744.
- Herrera, F.E., A. Chesi, K.E. Paleologou, A. Schmid, A. Munoz, M. Vendruscolo, S. Gustinich, H.A. Lashuel, and P. Carloni. 2008. Inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopamine is mediated by interactions with five C-terminal residues and with E83 in the NAC region. *PLoS one*. 3:e3394.
- Herrero, C.J., E. Garcia-Palomero, A.J. Pintado, A.G. Garcia, and C. Montiel. 1999. Differential blockade of rat alpha3beta4 and alpha7 neuronal nicotinic receptors by omega-conotoxin MVIIC, omega-conotoxin GVIA and diltiazem. *British journal of pharmacology*. 127:1375-1387.
- Hettiarachchi, N.T., A. Parker, M.L. Dallas, K. Pennington, C.C. Hung, H.A. Pearson, J.P. Boyle, P. Robinson, and C. Peers. 2009. alpha-Synuclein modulation of Ca²⁺ signaling in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *Journal of neurochemistry*. 111:1192-1201.
- Hilgemann, D.W., A. Yaradanakul, Y. Wang, and D. Fuster. 2006. Molecular control of cardiac sodium homeostasis in health and disease. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 17 Suppl 1:S47-S56.
- Holroyd, C., U. Kistner, W. Annaert, and R. Jahn. 1999. Fusion of endosomes involved in synaptic vesicle recycling. *Molecular biology of the cell*. 10:3035-3044.
- Holzmann, C., R. Kruger, A.M. Saecker, I. Schmitt, L. Schols, K. Berger, and O. Riess. 2003. Polymorphisms of the alpha-synuclein promoter: expression analyses and association studies in Parkinson's disease. *J Neural Transm*. 110:67-76.
- Hoyer, W., D. Cherny, V. Subramaniam, and T.M. Jovin. 2004. Impact of the acidic C-terminal region comprising amino acids 109-140 on alpha-synuclein aggregation in vitro. *Biochemistry*. 43:16233-16242.
- Hsu, L.J., Y. Sagara, A. Arroyo, E. Rockenstein, A. Sisk, M. Mallory, J. Wong, T. Takenouchi, M. Hashimoto, and E. Masliah. 2000. alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *The American journal of pathology*. 157:401-410.
- Hubble, J.P., T. Cao, R.E. Hassanein, J.S. Neuberger, and W.C. Koller. 1993. Risk factors for Parkinson's disease. *Neurology*. 43:1693-1697.
- Hughes, R.C. 1999. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1473:172-185.
- Huls, S., T. Hogen, N. Vassallo, K.M. Danzer, B. Hengerer, A. Giese, and J. Herms. 2011. AMPA-receptor-mediated excitatory synaptic transmission is enhanced by iron-induced alpha-synuclein oligomers. *Journal of neurochemistry*. 117:868-878.
- Ibanez, P., A.M. Bonnet, B. Debarges, E. Lohmann, F. Tison, P. Pollak, Y. Agid, A. Durr, and A. Brice. 2004. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet*. 364:1169-1171.

- Ikeda, H., C.J. Markey, and S.P. Markey. 1992. Search for neurotoxins structurally related to 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain research*. 575:285-298.
- Ikeuchi, T., A. Kakita, A. Shiga, K. Kasuga, H. Kaneko, C.F. Tan, J. Idezuka, K. Wakabayashi, O. Onodera, T. Iwatsubo, M. Nishizawa, H. Takahashi, and A. Ishikawa. 2008. Patients homozygous and heterozygous for SNCA duplication in a family with parkinsonism and dementia. *Archives of neurology*. 65:514-519.
- Inouye, H., and D.A. Kirschner. 2005. Alzheimer's beta-amyloid: insights into fibril formation and structure from Congo red binding. *Subcell Biochem*. 38:203-224.
- Irwin, D.J., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski. 2013. Parkinson's disease dementia: convergence of alpha-synuclein, tau and amyloid-beta pathologies. *Nature reviews. Neuroscience*.
- Itier, J.M., P. Ibanez, M.A. Mena, N. Abbas, C. Cohen-Salmon, G.A. Bohme, M. Laville, J. Pratt, O. Corti, L. Pradier, G. Ret, C. Joubert, M. Periquet, F. Araujo, J. Negroni, M.J. Casarejos, S. Canals, R. Solano, A. Serrano, E. Gallego, M. Sanchez, P. Deneffe, J. Benavides, G. Tremp, T.A. Rooney, A. Brice, and J. Garcia de Yébenes. 2003. Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet*. 12:2277-2291.
- Jalava, A.M., J. Heikkila, G. Akerlind, G.R. Pettit, and K.E. Akerman. 1990. Effects of bryostatins 1 and 2 on morphological and functional differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 50:3422-3428.
- Jankovic, J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 79:368-376.
- Jellinger, K.A. 2002. Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J Neural Transm*. 109:813-836.
- Jellinger, K.A. 2012. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 27:8-30.
- Jenco, J.M., A. Rawlingson, B. Daniels, and A.J. Morris. 1998. Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry*. 37:4901-4909.
- Jenner, P. 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology*. 53 Suppl 3:S26-36; discussion S36-28.
- Jensen, P.H., M.S. Nielsen, R. Jakes, C.G. Dotti, and M. Goedert. 1998. Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. *The Journal of biological chemistry*. 273:26292-26294.
- Jeong, S.Y., and D.W. Seol. 2008. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB reports*. 41:11-22.
- Jo, E., J. McLaurin, C.M. Yip, P. St George-Hyslop, and P.E. Fraser. 2000. alpha-Synuclein membrane interactions and lipid specificity. *The Journal of biological chemistry*. 275:34328-34334.
- Johnson, K.A., P.J. Conn, and C.M. Niswender. 2009. Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. *CNS & neurological disorders drug targets*. 8:475-491.
- Johnstone, R.M., M. Adam, J.R. Hammond, L. Orr, and C. Turbide. 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 262:9412-9420.

- Jones-Villeneuve, E.M., M.W. McBurney, K.A. Rogers, and V.I. Kalnins. 1982. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol.* 94:253-262.
- Junn, E., and M.M. Mouradian. 2002. Human alpha-synuclein over-expression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine. *Neuroscience letters.* 320:146-150.
- Kang, S., G. Cooper, S.F. Dunne, B. Dusel, C.H. Luan, D.J. Surmeier, and R.B. Silverman. 2012. Ca(V)1.3-selective L-type calcium channel antagonists as potential new therapeutics for Parkinson's disease. *Nature communications.* 3:1146.
- Kaufmann, S.H., C.M. Ewing, and J.H. Shaper. 1987. The erasable Western blot. *Anal Biochem.* 161:89-95.
- Kay, D.M., S.A. Factor, A. Samii, D.S. Higgins, A. Griffith, J.W. Roberts, B.C. Leis, J.G. Nutt, J.S. Montimurro, R.G. Keefe, A.J. Atkins, D. Yearout, C.P. Zabetian, and H. Payami. 2008. Genetic association between alpha-synuclein and idiopathic Parkinson's disease. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics.* 147B:1222-1230.
- Kayed, R., Y. Sokolov, B. Edmonds, T.M. McIntire, S.C. Milton, J.E. Hall, and C.G. Glabe. 2004. Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *The Journal of biological chemistry.* 279:46363-46366.
- Keller, S., M.P. Sanderson, A. Stoeck, and P. Altevogt. 2006. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunology letters.* 107:102-108.
- Kempster, P.A., S.S. O'Sullivan, J.L. Holton, T. Revesz, and A.J. Lees. 2010. Relationships between age and late progression of Parkinson's disease: a clinico-pathological study. *Brain : a journal of neurology.* 133:1755-1762.
- Kiely, A.P., Y.T. Asi, E. Kara, P. Limousin, H. Ling, P. Lewis, C. Proukakis, N. Quinn, A.J. Lees, J. Hardy, T. Revesz, H. Houlden, and J.L. Holton. 2013. alpha-Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta neuropathologica.* 125:753-769.
- Kim, C., D.H. Ho, J.E. Suk, S. You, S. Michael, J. Kang, S. Joong Lee, E. Masliah, D. Hwang, H.J. Lee, and S.J. Lee. 2013. Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nature communications.* 4:1562.
- Kim, H.Y., M.K. Cho, A. Kumar, E. Maier, C. Siebenhaar, S. Becker, C.O. Fernandez, H.A. Lashuel, R. Benz, A. Lange, and M. Zweckstetter. 2009. Structural properties of pore-forming oligomers of alpha-synuclein. *Journal of the American Chemical Society.* 131:17482-17489.
- Kitada, T., A. Pisani, D.R. Porter, H. Yamaguchi, A. Tscherter, G. Martella, P. Bonsi, C. Zhang, E.N. Pothos, and J. Shen. 2007. Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:11441-11446.
- Kordower, J.H., and P. Brundin. 2009. Propagation of host disease to grafted neurons: accumulating evidence. *Experimental neurology.* 220:224-225.
- Kordower, J.H., Y. Chu, R.A. Hauser, T.B. Freeman, and C.W. Olanow. 2008. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nature medicine.* 14:504-506.

- Kostka, M., T. Hogen, K.M. Danzer, J. Levin, M. Habeck, A. Wirth, R. Wagner, C.G. Glabe, S. Finger, U. Heinzelmann, P. Garidel, W. Duan, C.A. Ross, H. Kretschmar, and A. Giese. 2008. Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein oligomers. *The Journal of biological chemistry*. 283:10992-11003.
- Kramer-Albers, E.M., N. Bretz, S. Tenzer, C. Winterstein, W. Mobius, H. Berger, K.A. Nave, H. Schild, and J. Trotter. 2007. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics. Clinical applications*. 1:1446-1461.
- Kruger, R., W. Kuhn, T. Muller, D. Woitalla, M. Graeber, S. Kosel, H. Przuntek, J.T. Epplen, L. Schols, and O. Riess. 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature genetics*. 18:106-108.
- Kruger, R., A.M. Vieira-Saecker, W. Kuhn, D. Berg, T. Muller, N. Kuhn, G.A. Fuchs, A. Storch, M. Hungs, D. Woitalla, H. Przuntek, J.T. Epplen, L. Schols, and O. Riess. 1999. Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined alpha-synuclein/apolipoprotein E genotype. *Annals of neurology*. 45:611-617.
- Lachenal, G., K. Pernet-Gallay, M. Chivet, F.J. Hemming, A. Belly, G. Bodon, B. Blot, G. Haase, Y. Goldberg, and R. Sadoul. 2011. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Molecular and cellular neurosciences*. 46:409-418.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lamarca, V., and L. Scorrano. 2009. When separation means death: killing through the mitochondria, but starting from the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal*. 28:1681-1683.
- Langston, J.W. 2006. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Annals of neurology*. 59:591-596.
- Langston, J.W., P. Ballard, J.W. Tetrud, and I. Irwin. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 219:979-980.
- Langston, J.W., L.S. Forno, J. Tetrud, A.G. Reeves, J.A. Kaplan, and D. Karluk. 1999. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Annals of neurology*. 46:598-605.
- Lashuel, H.A., C.R. Overk, A. Oueslati, and E. Masliah. 2013. The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nature reviews. Neuroscience*. 14:38-48.
- Lashuel, H.A., B.M. Petre, J. Wall, M. Simon, R.J. Nowak, T. Walz, and P.T. Lansbury, Jr. 2002. Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *Journal of molecular biology*. 322:1089-1102.
- Lee, H.J., and S.J. Lee. 2002. Characterization of cytoplasmic alpha-synuclein aggregates. Fibril formation is tightly linked to the inclusion-forming process in cells. *The Journal of biological chemistry*. 277:48976-48983.
- Lee, H.J., S. Patel, and S.J. Lee. 2005a. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25:6016-6024.

- Lee, H.J., J.E. Suk, E.J. Bae, J.H. Lee, S.R. Paik, and S.J. Lee. 2008a. Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 40:1835-1849.
- Lee, H.J., J.E. Suk, E.J. Bae, and S.J. Lee. 2008b. Clearance and deposition of extracellular alpha-synuclein aggregates in microglia. *Biochemical and biophysical research communications*. 372:423-428.
- Lee, H.J., J.E. Suk, C. Patrick, E.J. Bae, J.H. Cho, S. Rho, D. Hwang, E. Masliah, and S.J. Lee. 2010. Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *The Journal of biological chemistry*. 285:9262-9272.
- Lee, J.C., H.B. Gray, and J.R. Winkler. 2005b. Tertiary contact formation in alpha-synuclein probed by electron transfer. *Journal of the American Chemical Society*. 127:16388-16389.
- Lee, S.J. 2008. Origins and effects of extracellular alpha-synuclein: implications in Parkinson's disease. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 34:17-22.
- Lee, T.H., E. D'Asti, N. Magnus, K. Al-Nedawi, B. Meehan, and J. Rak. 2011. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris'. *Seminars in immunopathology*. 33:455-467.
- Legocki, R.P., and D.P. Verma. 1981. Multiple immunoreplica Technique: screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel. *Anal Biochem*. 111:385-392.
- Lehman, E.J., M.J. Hein, S.L. Baron, and C.M. Gersic. 2012. Neurodegenerative causes of death among retired National Football League players. *Neurology*. 79:1970-1974.
- Lesage, S., M. Anheim, F. Letournel, L. Bousset, A. Honore, N. Rozas, L. Pieri, K. Madiona, A. Durr, R. Melki, C. Verny, and A. Brice. 2013. G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Annals of neurology*.
- Lesage, S., and A. Brice. 2009. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Human molecular genetics*. 18:R48-59.
- Li, J., R. Nixon, A. Messer, S. Berman, and S. Bursztajn. 1998. Altered gene expression for calpain/calpastatin system in motor neuron degeneration (Mnd) mutant mouse brain and spinal cord. *Brain research. Molecular brain research*. 53:174-186.
- Li, J., V.N. Uversky, and A.L. Fink. 2001. Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry*. 40:11604-11613.
- Li, J.Y., E. Englund, J.L. Holton, D. Soulet, P. Haggell, A.J. Lees, T. Lashley, N.P. Quinn, S. Rehncrona, A. Bjorklund, H. Widner, T. Revesz, O. Lindvall, and P. Brundin. 2008. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nature medicine*. 14:501-503.
- Li, W., N. West, E. Colla, O. Pletnikova, J.C. Troncoso, L. Marsh, T.M. Dawson, P. Jakala, T. Hartmann, D.L. Price, and M.K. Lee. 2005. Aggregation promoting C-terminal truncation of alpha-synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:2162-2167.

- Lim, K.L., and C.W. Zhang. 2013. Molecular events underlying Parkinson's disease - an interwoven tapestry. *Frontiers in neurology*. 4:33.
- Liu, C.W., B.I. Giasson, K.A. Lewis, V.M. Lee, G.N. Demartino, and P.J. Thomas. 2005. A precipitating role for truncated alpha-synuclein and the proteasome in alpha-synuclein aggregation: implications for pathogenesis of Parkinson disease. *The Journal of biological chemistry*. 280:22670-22678.
- Liu, J., J.P. Zhang, M. Shi, T. Quinn, J. Bradner, R. Beyer, S. Chen, and J. Zhang. 2009a. Rab11a and HSP90 regulate recycling of extracellular alpha-synuclein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 29:1480-1485.
- Liu, Y., L. Fallon, H.A. Lashuel, Z. Liu, and P.T. Lansbury, Jr. 2002. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*. 111:209-218.
- Liu, Z., R.K. Meray, T.N. Grammatopoulos, R.A. Fredenburg, M.R. Cookson, Y. Liu, T. Logan, and P.T. Lansbury, Jr. 2009b. Membrane-associated farnesylated UCH-L1 promotes alpha-synuclein neurotoxicity and is a therapeutic target for Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:4635-4640.
- Locher, K.P. 2009. Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 364:239-245.
- Lodish, H., A. Berk, and S.L. Zipursky. 2008. Overview of the Secretory Pathway. In *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman, editor, New York.
- LoPachin, R.M., and E.J. Lehning. 1997. Mechanism of calcium entry during axon injury and degeneration. *Toxicol Appl Pharmacol*. 143:233-244.
- Lotharius, J., and P. Brundin. 2002. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nature reviews. Neuroscience*. 3:932-942.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 193:265-275.
- Luk, K.C., V.M. Kehm, B. Zhang, P. O'Brien, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee. 2012. Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. *The Journal of experimental medicine*. 209:975-986.
- Luk, K.C., C. Song, P. O'Brien, A. Stieber, J.R. Branch, K.R. Brunden, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee. 2009. Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:20051-20056.
- Lundvig, D., E. Lindersson, and P.H. Jensen. 2005. Pathogenic effects of alpha-synuclein aggregation. *Brain research. Molecular brain research*. 134:3-17.
- Machiya, Y., S. Hara, S. Arawaka, S. Fukushima, H. Sato, M. Sakamoto, S. Koyama, and T. Kato. 2010. Phosphorylated alpha-synuclein at Ser-129 is targeted to the proteasome pathway in a ubiquitin-independent manner. *The Journal of biological chemistry*. 285:40732-40744.
- Malagelada, C., Z.H. Jin, V. Jackson-Lewis, S. Przedborski, and L.A. Greene. 2010. Rapamycin protects against neuron death in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:1166-1175.

- Mann, V.M., J.M. Cooper, S.E. Daniel, K. Srai, P. Jenner, C.D. Marsden, and A.H. Schapira. 1994. Complex I, iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. *Ann Neurol.* 36:876-881.
- Marambaud, P., U. Dreses-Werringloer, and V. Vingtdeux. 2009. Calcium signaling in neurodegeneration. *Molecular neurodegeneration.* 4:20.
- Maroteaux, L., J.T. Campanelli, and R.H. Scheller. 1988. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 8:2804-2815.
- Martin, Z.S., V. Neugebauer, K.T. Dineley, R. Kaye, W. Zhang, L.C. Reese, and G. Tagliavola. 2012. alpha-Synuclein oligomers oppose long-term potentiation and impair memory through a calcineurin-dependent mechanism: relevance to human synucleopathic diseases. *Journal of neurochemistry.* 120:440-452.
- Martinez-Vicente, M., Z. Talloczy, S. Kaushik, A.C. Massey, J. Mazzulli, E.V. Mosharov, R. Hodara, R. Fredenburg, D.C. Wu, A. Follenzi, W. Dauer, S. Przedborski, H. Ischiropoulos, P.T. Lansbury, D. Sulzer, and A.M. Cuervo. 2008. Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *The Journal of clinical investigation.* 118:777-788.
- Marzocco, A.M., P. Janich, M. Wilsch-Brauninger, V. Dubreuil, K. Langenfeld, D. Corbeil, and W.B. Huttner. 2005. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *Journal of cell science.* 118:2849-2858.
- Maslah, E., E. Rockenstein, I. Veinbergs, M. Mallory, M. Hashimoto, A. Takeda, Y. Sagara, A. Sisk, and L. Mucke. 2000. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science.* 287:1265-1269.
- Mathivanan, S., C.J. Fahner, G.E. Reid, and R.J. Simpson. 2012. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic acids research.* 40:D1241-1244.
- Mazzulli, J.R., Y.H. Xu, Y. Sun, A.L. Knight, P.J. McLean, G.A. Caldwell, E. Sidransky, G.A. Grabowski, and D. Krainc. 2011. Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell.* 146:37-52.
- McCormack, A.L., M. Thiruchelvam, A.B. Manning-Bog, C. Thiffault, J.W. Langston, D.A. Cory-Slechta, and D.A. Di Monte. 2002. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiology of disease.* 10:119-127.
- McGeer, P.L., S. Itagaki, B.E. Boyes, and E.G. McGeer. 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology.* 38:1285-1291.
- McNaught, K.S., and P. Jenner. 2001. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroscience letters.* 297:191-194.
- Medeiros, R., M. Kitazawa, M.A. Chabrier, D. Cheng, D. Baglietto-Vargas, A. Kling, A. Moeller, K.N. Green, and F.M. LaFerla. 2012. Calpain inhibitor A-705253 mitigates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline in aged 3xTgAD mice. *The American journal of pathology.* 181:616-625.
- Mehul, B., and R.C. Hughes. 1997. Plasma membrane targeting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J Cell Sci.* 110 (Pt 10):1169-1178.

- Mellick, G.D., D.M. Maraganore, and P.A. Silburn. 2005. Australian data and meta-analysis lend support for alpha-synuclein (NACP-Rep1) as a risk factor for Parkinson's disease. *Neuroscience letters*. 375:112-116.
- Mendez, I., A. Vinueza, A. Astradsson, K. Mukhida, P. Hallett, H. Robertson, T. Tierney, R. Holness, A. Dagher, J.Q. Trojanowski, and O. Isacson. 2008. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nature medicine*. 14:507-509.
- Mengedorf, T., S. Althausen, I. Oberndorfer, and W. Paschen. 2001. Response of neurons to an irreversible inhibition of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase: relationship between global protein synthesis and expression and translation of individual genes. *Biochem J*. 356:805-812.
- Meredith, G.E., S. Totterdell, E. Petroske, K. Santa Cruz, R.C. Callison, Jr., and Y.S. Lau. 2002. Lysosomal malfunction accompanies alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Brain research*. 956:156-165.
- Miller, D.W., S.M. Hague, J. Clarimon, M. Baptista, K. Gwinn-Hardy, M.R. Cookson, and A.B. Singleton. 2004. Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology*. 62:1835-1838.
- Mirnikjoo, B., K. Balasubramanian, and A.J. Schroit. 2009. Mobilization of lysosomal calcium regulates the externalization of phosphatidylserine during apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 284:6918-6923.
- Mizuta, I., W. Satake, Y. Nakabayashi, C. Ito, S. Suzuki, Y. Momose, Y. Nagai, A. Oka, H. Inoko, J. Fukae, Y. Saito, M. Sawabe, S. Murayama, M. Yamamoto, N. Hattori, M. Murata, and T. Toda. 2006. Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Human molecular genetics*. 15:1151-1158.
- Mori, F., K. Tanji, M. Yoshimoto, H. Takahashi, and K. Wakabayashi. 2002. Demonstration of alpha-synuclein immunoreactivity in neuronal and glial cytoplasm in normal human brain tissue using proteinase K and formic acid pretreatment. *Experimental neurology*. 176:98-104.
- Moseroova, I., and J. Kralova. 2012. Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways. *PLoS one*. 7:e32972.
- Mosharov, E.V., K.E. Larsen, E. Kanter, K.A. Phillips, K. Wilson, Y. Schmitz, D.E. Krantz, K. Kobayashi, R.H. Edwards, and D. Sulzer. 2009. Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron*. 62:218-229.
- Mueller, J.C., J. Fuchs, A. Hofer, A. Zimprich, P. Lichtner, T. Illig, D. Berg, U. Wullner, T. Meitinger, and T. Gasser. 2005. Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease. *Annals of neurology*. 57:535-541.
- Murphy, D.D., S.M. Rueter, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee. 2000. Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 20:3214-3220.
- Murray, I.V., B.I. Giasson, S.M. Quinn, V. Koppaka, P.H. Axelsen, H. Ischiropoulos, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee. 2003. Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry*. 42:8530-8540.

- Myhre, R., M. Toft, J. Kachergus, M.M. Hulihan, J.O. Aasly, H. Klungland, and M.J. Farrer. 2008. Multiple alpha-synuclein gene polymorphisms are associated with Parkinson's disease in a Norwegian population. *Acta neurologica Scandinavica*. 118:320-327.
- Nagele, R.G., M.R. D'Andrea, W.J. Anderson, and H.Y. Wang. 2002. Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 110:199-211.
- Nakamura, M., M. Yamaguchi, O. Sakai, and J. Inoue. 2003. Exploration of cornea permeable calpain inhibitors as anticataract agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 11:1371-1379.
- Nalls, M.A., V. Plagnol, D.G. Hernandez, M. Sharma, U.M. Sheerin, M. Saad, J. Simon-Sanchez, C. Schulte, S. Lesage, S. Sveinbjornsdottir, K. Stefansson, M. Martinez, J. Hardy, P. Heutink, A. Brice, T. Gasser, A.B. Singleton, and N.W. Wood. 2011. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet*. 377:641-649.
- Narendra, D., A. Tanaka, D.F. Suen, and R.J. Youle. 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology*. 183:795-803.
- Narhi, L., S.J. Wood, S. Steavenson, Y. Jiang, G.M. Wu, D. Anafi, S.A. Kaufman, F. Martin, K. Sitney, P. Denis, J.C. Louis, J. Wypych, A.L. Biere, and M. Citron. 1999. Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *The Journal of biological chemistry*. 274:9843-9846.
- Negro, A., A.M. Brunati, A. Donella-Deana, M.L. Massimino, and L.A. Pinna. 2002. Multiple phosphorylation of alpha-synuclein by protein tyrosine kinase Syk prevents eosin-induced aggregation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 16:210-212.
- Nemani, V.M., W. Lu, V. Berge, K. Nakamura, B. Onoa, M.K. Lee, F.A. Chaudhry, R.A. Nicoll, and R.H. Edwards. 2010. Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron*. 65:66-79.
- Nguyen, H.N., C. Wang, and D.C. Perry. 2002. Depletion of intracellular calcium stores is toxic to SH-SY5Y neuronal cells. *Brain Res*. 924:159-166.
- Nickel, W. 2005. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic*. 6:607-614.
- Nickel, W., and C. Rabouille. 2009. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:148-155.
- Nishioka, K., S. Hayashi, M.J. Farrer, A.B. Singleton, H. Yoshino, H. Imai, T. Kitami, K. Sato, R. Kuroda, H. Tomiyama, K. Mizoguchi, M. Murata, T. Toda, I. Imoto, J. Inazawa, Y. Mizuno, and N. Hattori. 2006. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Annals of neurology*. 59:298-309.
- Nixon, R.A. 2013. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature medicine*. 19:983-997.
- Norris, E.H., B.I. Giasson, R. Hodara, S. Xu, J.Q. Trojanowski, H. Ischiropoulos, and V.M. Lee. 2005. Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. *The Journal of biological chemistry*. 280:21212-21219.

- Okochi, M., J. Walter, A. Koyama, S. Nakajo, M. Baba, T. Iwatsubo, L. Meijer, P.J. Kahle, and C. Haass. 2000. Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry*. 275:390-397.
- Olanow, C.W., and P. Brundin. 2013. Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder? *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 28:31-40.
- Outeiro, T.F., and S. Lindquist. 2003. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science*. 302:1772-1775.
- Outeiro, T.F., P. Putcha, J.E. Tetzlaff, R. Spoelgen, M. Koker, F. Carvalho, B.T. Hyman, and P.J. McLean. 2008. Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. *PloS one*. 3:e1867.
- Pacheco, C., L.G. Aguayo, and C. Opazo. 2012. An extracellular mechanism that can explain the neurotoxic effects of alpha-synuclein aggregates in the brain. *Frontiers in physiology*. 3:297.
- Pahlman, S., A.I. Ruusala, L. Abrahamsson, M.E. Mattsson, and T. Esscher. 1984. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ*. 14:135-144.
- Palade, G.E. 1955. Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple dispositions in cells in situ. *J Biophys Biochem Cytol*. 1:567-582.
- Paleologou, K.E., A. Oueslati, G. Shakked, C.C. Rospigliosi, H.Y. Kim, G.R. Lamberto, C.O. Fernandez, A. Schmid, F. Chegini, W.P. Gai, D. Chiappe, M. Moniatte, B.L. Schneider, P. Aebischer, D. Eliezer, M. Zweckstetter, E. Masliah, and H.A. Lashuel. 2010. Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:3184-3198.
- Pals, P., S. Lincoln, J. Manning, M. Heckman, L. Skipper, M. Hulihan, M. Van den Broeck, T. De Pooter, P. Cras, J. Crook, C. Van Broeckhoven, and M.J. Farrer. 2004. alpha-Synuclein promoter confers susceptibility to Parkinson's disease. *Annals of neurology*. 56:591-595.
- Pan, B.T., K. Teng, C. Wu, M. Adam, and R.M. Johnstone. 1985. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*. 101:942-948.
- Papazafiri, P., and D. Kletsas. 2003. Developmental and age-related alterations of calcium homeostasis in human fibroblasts. *Exp Gerontol*. 38:307-311.
- Park, S.M., H.Y. Jung, H.O. Kim, H. Rhim, S.R. Paik, K.C. Chung, J.H. Park, and J. Kim. 2002a. Evidence that alpha-synuclein functions as a negative regulator of Ca(++)-dependent alpha-granule release from human platelets. *Blood*. 100:2506-2514.
- Park, W.H., J.G. Seol, E.S. Kim, W.K. Kang, Y.H. Im, C.W. Jung, B.K. Kim, and Y.Y. Lee. 2002b. Monensin-mediated growth inhibition in human lymphoma cells through cell cycle arrest and apoptosis. *Br J Haematol*. 119:400-407.
- Patel, S., and R. Docampo. 2010. Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca²⁺ signaling. *Trends in cell biology*. 20:277-286.
- Perez-Garcia, M.J., V. Cena, Y. de Pablo, M. Llovera, J.X. Comella, and R.M. Soler. 2004. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases intracellular calcium concentration. Role of calcium/calmodulin in the activation of the

- phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *The Journal of biological chemistry*. 279:6132-6142.
- Perrin, R.J., W.S. Woods, D.F. Clayton, and J.M. George. 2000. Interaction of human alpha-Synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry*. 275:34393-34398.
- Peters, C., and A. Mayer. 1998. Ca²⁺/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature*. 396:575-580.
- Petrucelli, L., C. O'Farrell, P.J. Lockhart, M. Baptista, K. Kehoe, L. Vink, P. Choi, B. Wolozin, M. Farrer, J. Hardy, and M.R. Cookson. 2002. Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron*. 36:1007-1019.
- Pinterova, M., P. Karen, J. Kunes, and J. Zicha. 2010. Role of nifedipine-sensitive sympathetic vasoconstriction in maintenance of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effect of Gi-protein inactivation by pertussis toxin. *Journal of hypertension*. 28:969-978.
- Polymeropoulos, M.H., C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E.S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe, and R.L. Nussbaum. 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 276:2045-2047.
- Potolicchio, I., G.J. Carven, X. Xu, C. Stipp, R.J. Riese, L.J. Stern, and L. Santambrogio. 2005. Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism. *J Immunol*. 175:2237-2243.
- Proukakis, C., C.G. Dudzik, T. Brier, D.S. MacKay, J.M. Cooper, G.L. Millhauser, H. Houlden, and A.H. Schapira. 2013a. A novel alpha-synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology*. 80:1062-1064.
- Proukakis, C., H. Houlden, and A.H. Schapira. 2013b. Somatic alpha-synuclein mutations in Parkinson's disease: Hypothesis and preliminary data. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 28:705-712.
- Pryor, P.R., B.M. Mullock, N.A. Bright, S.R. Gray, and J.P. Luzio. 2000. The role of intraorganellar Ca(2+) in late endosome-lysosome heterotypic fusion and in the reformation of lysosomes from hybrid organelles. *The Journal of cell biology*. 149:1053-1062.
- Puopolo, M., E. Raviola, and B.P. Bean. 2007. Roles of subthreshold calcium current and sodium current in spontaneous firing of mouse midbrain dopamine neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 27:645-656.
- Putney, J.W. 2009. Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunological reviews*. 231:10-22.
- Putney, J.W., Jr. 2007. Recent breakthroughs in the molecular mechanism of capacitative calcium entry (with thoughts on how we got here). *Cell calcium*. 42:103-110.
- Putz, U., J. Howitt, J. Lackovic, N. Foot, S. Kumar, J. Silke, and S.S. Tan. 2008. Nedd4 family-interacting protein 1 (Ndfip1) is required for the exosomal secretion of Nedd4 family proteins. *The Journal of biological chemistry*. 283:32621-32627.

- Quist, A., I. Doudevski, H. Lin, R. Azimova, D. Ng, B. Frangione, B. Kagan, J. Ghiso, and R. Lal. 2005. Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:10427-10432.
- Rajendran, L., M. Honsho, T.R. Zahn, P. Keller, K.D. Geiger, P. Verkade, and K. Simons. 2006. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:11172-11177.
- Ramsay, R.R., J.I. Salach, J. Dadgar, and T.P. Singer. 1986. Inhibition of mitochondrial NADH dehydrogenase by pyridine derivatives and its possible relation to experimental and idiopathic parkinsonism. *Biochem Biophys Res Commun*. 135:269-275.
- Ramsey, I.S., M. Delling, and D.E. Clapham. 2006. An introduction to TRP channels. *Annual review of physiology*. 68:619-647.
- Raposo, G., H.W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C.V. Harding, C.J. Melief, and H.J. Geuze. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of experimental medicine*. 183:1161-1172.
- Raposo, G., and W. Stoorvogel. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*. 200:373-383.
- Recchia, A., P. Debetto, A. Negro, D. Guidolin, S.D. Skaper, and P. Giusti. 2004. Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 18:617-626.
- Rekas, A., R.B. Knott, A. Sokolova, K.J. Barnham, K.A. Perez, C.L. Masters, S.C. Drew, R. Cappai, C.C. Curtain, and C.L. Pham. 2010. The structure of dopamine induced alpha-synuclein oligomers. *European biophysics journal : EBJ*. 39:1407-1419.
- Reynolds, J., and C. Tanford. 1970. The cross conformation of protein-sodium dodecyl sulphate complexes. *J Biol Chem*. 245:5161-5165.
- Rhoades, E., T.F. Ramlall, W.W. Webb, and D. Eliezer. 2006. Quantification of alpha-synuclein binding to lipid vesicles using fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical journal*. 90:4692-4700.
- Rhodes, J.D., and J. Sanderson. 2009. The mechanisms of calcium homeostasis and signalling in the lens. *Experimental eye research*. 88:226-234.
- Rideout, H.J., Q. Wang, D.S. Park, and L. Stefanis. 2003. Cyclin-dependent kinase activity is required for apoptotic death but not inclusion formation in cortical neurons after proteasomal inhibition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 23:1237-1245.
- Rivier, J., R. Galyean, W.R. Gray, A. Azimi-Zonooz, J.M. McIntosh, L.J. Cruz, and B.M. Olivera. 1987. Neuronal calcium channel inhibitors. Synthesis of omega-conotoxin GVIA and effects on ⁴⁵Ca uptake by synaptosomes. *The Journal of biological chemistry*. 262:1194-1198.
- Rizzuto, R., P. Pinton, W. Carrington, F.S. Fay, K.E. Fogarty, L.M. Lifshitz, R.A. Tuft, and T. Pozzan. 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*. 280:1763-1766.
- Rizzuto, R., and T. Pozzan. 2006. Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiological reviews*. 86:369-408.
- Rodnitzky, R.L. 1999. Can calcium antagonists provide a neuroprotective effect in Parkinson's disease? *Drugs*. 57:845-849.

- Romo, R., and W. Schultz. 1990. Dopamine neurons of the monkey midbrain: contingencies of responses to active touch during self-initiated arm movements. *Journal of neurophysiology*. 63:592-606.
- Rowland, A.A., and G.K. Voeltz. 2012. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 13:607-625.
- Rubartelli, A., F. Cozzolino, M. Talio, and R. Sitia. 1990. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *The EMBO journal*. 9:1503-1510.
- Rukenstein, A., R.E. Rydel, and L.A. Greene. 1991. Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by translation- and transcription-independent mechanisms. *J Neurosci*. 11:2552-2563.
- Russo, I., L. Bubacco, and E. Greggio. 2012. Exosomes-associated neurodegeneration and progression of Parkinson's disease. *American journal of neurodegenerative disease*. 1:217-225.
- Saha, A.R., N.N. Ninkina, D.P. Hanger, B.H. Anderton, A.M. Davies, and V.L. Buchman. 2000. Induction of neuronal death by alpha-synuclein. *The European journal of neuroscience*. 12:3073-3077.
- Salinovich, O., and R.C. Montelaro. 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 156:341-347.
- Saman, S., W. Kim, M. Raya, Y. Visnick, S. Miro, B. Jackson, A.C. McKee, V.E. Alvarez, N.C. Lee, and G.F. Hall. 2012. Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry*. 287:3842-3849.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A Laboratory manual 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, I., C. Mahlke, and J. Yuan. 2003. Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature*. 421:373-379.
- Sandal, M., F. Valle, I. Tessari, S. Mammi, E. Bergantino, F. Musiani, M. Bruciale, L. Bubacco, and B. Samori. 2008. Conformational equilibria in monomeric alpha-synuclein at the single-molecule level. *PLoS biology*. 6:e6.
- Savica, R., J.E. Parisi, L.E. Wold, K.A. Josephs, and J.E. Ahlskog. 2012. High school football and risk of neurodegeneration: a community-based study. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*. 87:335-340.
- Schapira, A.H., V.M. Mann, J.M. Cooper, D. Krige, P.J. Jenner, and C.D. Marsden. 1992. Mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol*. 32 Suppl:S116-124.
- Schmidt, F., J. Levin, F. Kamp, H. Kretschmar, A. Giese, and K. Botzel. 2012. Single-channel electrophysiology reveals a distinct and uniform pore complex formed by alpha-synuclein oligomers in lipid membranes. *PloS one*. 7:e42545.
- Schneider, A., and M. Simons. 2013. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication in neurodegenerative disorders. *Cell and tissue research*. 352:33-47.
- Seo, J.H., J.C. Rah, S.H. Choi, J.K. Shin, K. Min, H.S. Kim, C.H. Park, S. Kim, E.M. Kim, S.H. Lee, S. Lee, S.W. Suh, and Y.H. Suh. 2002. Alpha-synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3/Akt kinase pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 16:1826-1828.

- Serpell, L.C., J. Berriman, R. Jakes, M. Goedert, and R.A. Crowther. 2000. Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:4897-4902.
- Sharma, M., J. Burre, P. Bronk, Y. Zhang, W. Xu, and T.C. Sudhof. 2012. CSPalpha knockout causes neurodegeneration by impairing SNAP-25 function. *The EMBO journal*. 31:829-841.
- Shvadchak, V.V., D.A. Yushchenko, R. Pievo, and T.M. Jovin. 2011. The mode of alpha-synuclein binding to membranes depends on lipid composition and lipid to protein ratio. *FEBS letters*. 585:3513-3519.
- Sidransky, E. 2005. Gaucher disease and parkinsonism. *Molecular genetics and metabolism*. 84:302-304.
- Sidransky, E., and G. Lopez. 2012. The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet neurology*. 11:986-998.
- Siegel, G.J., and N.B. Chauhan. 2000. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain research. Brain research reviews*. 33:199-227.
- Silvestri, L., V. Caputo, E. Bellacchio, L. Atorino, B. Dallapiccola, E.M. Valente, and G. Casari. 2005. Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet*. 14:3477-3492.
- Simon-Sanchez, J., C. Schulte, J.M. Bras, M. Sharma, J.R. Gibbs, D. Berg, C. Paisan-Ruiz, P. Lichtner, S.W. Scholz, D.G. Hernandez, R. Kruger, M. Federoff, C. Klein, A. Goate, J. Perlmutter, M. Bonin, M.A. Nalls, T. Illig, C. Gieger, H. Houlden, M. Steffens, M.S. Okun, B.A. Racette, M.R. Cookson, K.D. Foote, H.H. Fernandez, B.J. Traynor, S. Schreiber, S. Arepalli, R. Zonozi, K. Gwinn, M. van der Brug, G. Lopez, S.J. Chanock, A. Schatzkin, Y. Park, A. Hollenbeck, J. Gao, X. Huang, N.W. Wood, D. Lorenz, G. Deuschl, H. Chen, O. Riess, J.A. Hardy, A.B. Singleton, and T. Gasser. 2009. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nature genetics*. 41:1308-1312.
- Simons, M., and G. Raposo. 2009. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology*. 21:575-581.
- Simpson, P.B., R.A. Challiss, and S.R. Nahorski. 1995. Neuronal Ca²⁺ stores: activation and function. *Trends in neurosciences*. 18:299-306.
- Simpson, R.J., S.S. Jensen, and J.W. Lim. 2008. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics*. 8:4083-4099.
- Singleton, A.B., M. Farrer, J. Johnson, A. Singleton, S. Hague, J. Kachergus, M. Hulihan, T. Peuralinna, A. Dutra, R. Nussbaum, S. Lincoln, A. Crawley, M. Hanson, D. Maraganore, C. Adler, M.R. Cookson, M. Muentner, M. Baptista, D. Miller, J. Blancato, J. Hardy, and K. Gwinn-Hardy. 2003. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. 302:841.
- Smaili, S.S., and J.T. Russell. 1999. Permeability transition pore regulates both mitochondrial membrane potential and agonist-evoked Ca²⁺ signals in oligodendrocyte progenitors. *Cell calcium*. 26:121-130.
- Smalheiser, N.R. 2007. Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. *Biology direct*. 2:35.
- Smith, W.W., R.L. Margolis, X. Li, J.C. Troncoso, M.K. Lee, V.L. Dawson, T.M. Dawson, T. Iwatsubo, and C.A. Ross. 2005. Alpha-synuclein phosphorylation enhances eosinophilic cytoplasmic inclusion formation in SH-SY5Y cells. *The*

- Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 25:5544-5552.
- Sonsalla, P.K., D.S. Albers, and G.D. Zeevalk. 1998. Role of glutamate in neurodegeneration of dopamine neurons in several animal models of parkinsonism. *Amino acids.* 14:69-74.
- Souza, J.M., B.I. Giasson, Q. Chen, V.M. Lee, and H. Ischiropoulos. 2000. Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha -synuclein polymers. Implication of nitrative and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies. *The Journal of biological chemistry.* 275:18344-18349.
- Spector, D., R.R. Goldman, and L.A. Leinwand. 1998. *Cells: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Spillantini, M.G., M.L. Schmidt, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, R. Jakes, and M. Goedert. 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 388:839-840.
- Stefanis, L., D.S. Park, W.J. Friedman, and L.A. Greene. 1999. Caspase-dependent and -independent death of camptothecin-treated embryonic cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 19:6235-6247.
- Striessnig, J., A. Koschak, M.J. Sinnegger-Brauns, A. Hetzenauer, N.K. Nguyen, P. Busquet, G. Pelster, and N. Singewald. 2006. Role of voltage-gated L-type Ca²⁺ channel isoforms for brain function. *Biochemical Society transactions.* 34:903-909.
- Su, X., K.A. Maguire-Zeiss, R. Giuliano, L. Prifti, K. Venkatesh, and H.J. Federoff. 2008. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiology of aging.* 29:1690-1701.
- Sung, J.Y., J. Kim, S.R. Paik, J.H. Park, Y.S. Ahn, and K.C. Chung. 2001. Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry.* 276:27441-27448.
- Sung, J.Y., S.M. Park, C.H. Lee, J.W. Um, H.J. Lee, J. Kim, Y.J. Oh, S.T. Lee, S.R. Paik, and K.C. Chung. 2005. Proteolytic cleavage of extracellular secreted {alpha}-synuclein via matrix metalloproteinases. *The Journal of biological chemistry.* 280:25216-25224.
- Surmeier, D.J. 2007. Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet neurology.* 6:933-938.
- Surmeier, D.J., J.N. Guzman, and J. Sanchez-Padilla. 2010. Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Cell calcium.* 47:175-182.
- Szalai, G., R. Krishnamurthy, and G. Hajnoczky. 1999. Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *The EMBO journal.* 18:6349-6361.
- Takahashi, T., H. Yamashita, T. Nakamura, Y. Nagano, and S. Nakamura. 2002. Tyrosine 125 of alpha-synuclein plays a critical role for dimerization following nitrative stress. *Brain research.* 938:73-80.
- Tan, E.K., T. Matsuura, S. Nagamitsu, M. Khajavi, J. Jankovic, and T. Ashizawa. 2000. Polymorphism of NACP-Rep1 in Parkinson's disease: an etiologic link with essential tremor? *Neurology.* 54:1195-1198.
- Tanner, C.M., F. Kamel, G.W. Ross, J.A. Hoppin, S.M. Goldman, M. Korell, C. Marras, G.S. Bhudhikanok, M. Kasten, A.R. Chade, K. Comyns, M.B. Richards, C. Meng, B. Priestley, H.H. Fernandez, F. Cambi, D.M. Umbach, A. Blair, D.P. Sandler, and J.W. Langston. 2011. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental health perspectives.* 119:866-872.

- Tanner, C.M., R. Ottman, S.M. Goldman, J. Ellenberg, P. Chan, R. Mayeux, and J.W. Langston. 1999. Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 281:341-346.
- Taylor, A.R., M.B. Robinson, D.J. Gifondorwa, M. Tytell, and C.E. Milligan. 2007. Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Developmental neurobiology*. 67:1815-1829.
- They, C., S. Amigorena, G. Raposo, and A. Clayton. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. Chapter 3:Unit 3 22.
- They, C., M. Boussac, P. Veron, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, J. Garin, and S. Amigorena. 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*. 166:7309-7318.
- They, C., M. Ostrowski, and E. Segura. 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews. Immunology*. 9:581-593.
- They, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2:569-579.
- Thomas, B., and M.F. Beal. 2007. Parkinson's disease. *Human molecular genetics*. 16 Spec No. 2:R183-194.
- Tofaris, G.K., P. Garcia Reitböck, T. Humby, S.L. Lambourne, M. O'Connell, B. Ghetti, H. Gossage, P.C. Emson, L.S. Wilkinson, M. Goedert, and M.G. Spillantini. 2006. Pathological changes in dopaminergic nerve cells of the substantia nigra and olfactory bulb in mice transgenic for truncated human alpha-synuclein(1-120): implications for Lewy body disorders. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 26:3942-3950.
- Tofaris, G.K., A. Razaq, B. Ghetti, K.S. Lilley, and M.G. Spillantini. 2003. Ubiquitination of alpha-synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function. *The Journal of biological chemistry*. 278:44405-44411.
- Ton, T.G., S.R. Heckbert, W.T. Longstreth, Jr., M.A. Rossing, W.A. Kukull, G.M. Franklin, P.D. Swanson, T. Smith-Weller, and H. Checkoway. 2007. Calcium channel blockers and beta-blockers in relation to Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 13:165-169.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76:4350-4354.
- Trajkovic, K., C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brugger, and M. Simons. 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 319:1244-1247.
- Triezenberg, S.J., R.C. Kingsbury, and S.L. McKnight. 1988. Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev*. 2:718-729.
- Tsigelny, I.F., P. Bar-On, Y. Sharikov, L. Crews, M. Hashimoto, M.A. Miller, S.H. Keller, O. Platoshyn, J.X. Yuan, and E. Masliah. 2007. Dynamics of alpha-synuclein aggregation and inhibition of pore-like oligomer development by beta-synuclein. *The FEBS journal*. 274:1862-1877.
- Tsigelny, I.F., L. Crews, P. Desplats, G.M. Shaked, Y. Sharikov, H. Mizuno, B. Spencer, E. Rockenstein, M. Trejo, O. Platoshyn, J.X. Yuan, and E. Masliah.

2008. Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases. *PLoS one*. 3:e3135.
- Tsigelny, I.F., Y. Sharikov, W. Wrasidlo, T. Gonzalez, P.A. Desplats, L. Crews, B. Spencer, and E. Masliah. 2012. Role of alpha-synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation. *The FEBS journal*.
- Ulusoy, A., F. Febbraro, P.H. Jensen, D. Kirik, and M. Romero-Ramos. 2010. Co-expression of C-terminal truncated alpha-synuclein enhances full-length alpha-synuclein-induced pathology. *The European journal of neuroscience*. 32:409-422.
- Uversky, V.N. 2003. A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders. *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 21:211-234.
- Uversky, V.N. 2007. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *Journal of neurochemistry*. 103:17-37.
- Uversky, V.N., H.J. Lee, J. Li, A.L. Fink, and S.J. Lee. 2001a. Stabilization of partially folded conformation during alpha-synuclein oligomerization in both purified and cytosolic preparations. *The Journal of biological chemistry*. 276:43495-43498.
- Uversky, V.N., J. Li, and A.L. Fink. 2001b. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *The Journal of biological chemistry*. 276:44284-44296.
- Vamvaca, K., M.J. Volles, and P.T. Lansbury, Jr. 2009. The first N-terminal amino acids of alpha-synuclein are essential for alpha-helical structure formation in vitro and membrane binding in yeast. *Journal of molecular biology*. 389:413-424.
- van der Putten, H., K.H. Wiederhold, A. Probst, S. Barbieri, C. Mistl, S. Danner, S. Kauffmann, K. Hofele, W.P. Spooren, M.A. Ruegg, S. Lin, P. Caroni, B. Sommer, M. Tolnay, and G. Bilbe. 2000. Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 20:6021-6029.
- van Niel, G., I. Porto-Carreiro, S. Simoes, and G. Raposo. 2006. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem*. 140:13-21.
- van Rooijen, B.D., M.M. Claessens, and V. Subramaniam. 2010. Membrane Permeabilization by Oligomeric alpha-Synuclein: In Search of the Mechanism. *PLoS one*. 5:e14292.
- Vekrellis, K., H.J. Rideout, and L. Stefanis. 2004. Neurobiology of alpha-synuclein. *Molecular neurobiology*. 30:1-21.
- Vekrellis, K., and L. Stefanis. 2012. Targeting intracellular and extracellular alpha-synuclein as a therapeutic strategy in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Expert opinion on therapeutic targets*. 16:421-432.
- Vekrellis, K., M. Xilouri, E. Emmanouilidou, H.J. Rideout, and L. Stefanis. 2011. Pathological roles of alpha-synuclein in neurological disorders. *Lancet neurology*. 10:1015-1025.
- Vekrellis, K., M. Xilouri, E. Emmanouilidou, and L. Stefanis. 2009. Inducible over-expression of wild type alpha-synuclein in human neuronal cells leads to caspase-dependent non-apoptotic death. *Journal of neurochemistry*. 109:1348-1362.

- Vella, L.J., R.A. Sharples, V.A. Lawson, C.L. Masters, R. Cappai, and A.F. Hill. 2007. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol.* 211:582-590.
- Vella, L.J., R.A. Sharples, R.M. Nisbet, R. Cappai, and A.F. Hill. 2008. The role of exosomes in the processing of proteins associated with neurodegenerative diseases. *Eur Biophys J.* 37:323-332.
- Verkhatsky, A. 2002. The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signalling. *Cell Calcium.* 32:393-404.
- Vincent, J.P., and T. Magee. 2002. Argosomes: membrane fragments on the run. *Trends Cell Biol.* 12:57-60.
- Vlachos, M., and N. Tavernarakis. 2010. Non-apoptotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 239:1337-1351.
- Vogiatzi, T., M. Xilouri, K. Vekrellis, and L. Stefanis. 2008. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *The Journal of biological chemistry.* 283:23542-23556.
- Volles, M.J., and P.T. Lansbury, Jr. 2003. Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry.* 42:7871-7878.
- Volles, M.J., S.J. Lee, J.C. Rochet, M.D. Shtilerman, T.T. Ding, J.C. Kessler, and P.T. Lansbury, Jr. 2001. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry.* 40:7812-7819.
- Volpicelli-Daley, L.A., K.C. Luk, T.P. Patel, S.A. Tanik, D.M. Riddle, A. Stieber, D.F. Meaney, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee. 2011. Exogenous alpha-synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron.* 72:57-71.
- von Lewinski, F., and B.U. Keller. 2005. Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. *Trends in neurosciences.* 28:494-500.
- Walsh, D.M., A. Lomakin, G.B. Benedek, M.M. Condron, and D.B. Teplow. 1997. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *The Journal of biological chemistry.* 272:22364-22372.
- Wang, C.K., C.M. Chen, C.Y. Chang, K.H. Chang, I.C. Chen, M.L. Li, G.J. Lee-Chen, and Y.R. Wu. 2006. alpha-Synuclein promoter RsaI T-to-C polymorphism and the risk of Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 113:1425-1433.
- Wang, W., I. Perovic, J. Chittuluru, A. Kaganovich, L.T. Nguyen, J. Liao, J.R. Auclair, D. Johnson, A. Landeru, A.K. Simorellis, S. Ju, M.R. Cookson, F.J. Asturias, J.N. Agar, B.N. Webb, C. Kang, D. Ringe, G.A. Petsko, T.C. Pochapsky, and Q.Q. Hoang. 2011. A soluble alpha-synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 108:17797-17802.
- Waring, P. 2005. Redox active calcium ion channels and cell death. *Archives of biochemistry and biophysics.* 434:33-42.
- Webb, J.L., B. Ravikumar, J. Atkins, J.N. Skepper, and D.C. Rubinsztein. 2003. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *The Journal of biological chemistry.* 278:25009-25013.

- Weber, K., and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem.* 244:4406-4412.
- Weinreb, P.H., W. Zhen, A.W. Poon, K.A. Conway, and P.T. Lansbury, Jr. 1996. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry.* 35:13709-13715.
- White, C., and J.G. McGeown. 2002. Carbachol triggers RyR-dependent Ca(2+) release via activation of IP(3) receptors in isolated rat gastric myocytes. *The Journal of physiology.* 542:725-733.
- Whitehead, T.P., D.G. Bullock, and T.J. Carter. 1979. High-density lipoprotein cholesterol analysis. *Clin Chem.* 25:2055-2057.
- Whitton, P.S. 2007. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *British journal of pharmacology.* 150:963-976.
- Whitworth, A.J., D.A. Theodore, J.C. Greene, H. Benes, P.D. Wes, and L.J. Pallanck. 2005. Increased glutathione S-transferase activity rescues dopaminergic neuron loss in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 102:8024-8029.
- Wilson, C.J., and J.C. Callaway. 2000. Coupled oscillator model of the dopaminergic neuron of the substantia nigra. *Journal of neurophysiology.* 83:3084-3100.
- Winkler, S., J. Hagenah, S. Lincoln, M. Heckman, K. Haugarvoll, K. Lohmann-Hedrich, V. Kostic, M. Farrer, and C. Klein. 2007. alpha-Synuclein and Parkinson disease susceptibility. *Neurology.* 69:1745-1750.
- Witt, M., K. Bormann, V. Gudziol, K. Pehlke, K. Barth, A. Minovi, A. Hahner, H. Reichmann, and T. Hummel. 2009. Biopsies of olfactory epithelium in patients with Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society.* 24:906-914.
- Wolf, A., B. Bauer, and A.M. Hartz. 2012. ABC Transporters and the Alzheimer's Disease Enigma. *Frontiers in psychiatry / Frontiers Research Foundation.* 3:54.
- Wood, S.J., J. Wypych, S. Steavenson, J.C. Louis, M. Citron, and A.L. Biere. 1999. alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *The Journal of biological chemistry.* 274:19509-19512.
- Xia, Y., H.A. Rohan de Silva, B.L. Rosi, L.H. Yamaoka, J.B. Rimmler, M.A. Pericak-Vance, A.D. Roses, X. Chen, E. Masliah, R. DeTeresa, A. Iwai, M. Sundsmo, R.G. Thomas, C.R. Hofstetter, E. Gregory, L.A. Hansen, R. Katzman, L.J. Thal, and T. Saitoh. 1996. Genetic studies in Alzheimer's disease with an NACP/alpha-synuclein polymorphism. *Annals of neurology.* 40:207-215.
- Xia, Y., T. Saitoh, K. Ueda, S. Tanaka, X. Chen, M. Hashimoto, L. Hsu, C. Conrad, M. Sundsmo, M. Yoshimoto, L. Thal, R. Katzman, and E. Masliah. 2001. Characterization of the human alpha-synuclein gene: Genomic structure, transcription start site, promoter region and polymorphisms. *Journal of Alzheimer's disease : JAD.* 3:485-494.
- Xilouri, M., T. Vogiatzi, K. Vekrellis, D. Park, and L. Stefanis. 2009. Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PloS one.* 4:e5515.
- Yang, L., T.A. Harroun, T.M. Weiss, L. Ding, and H.W. Huang. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical journal.* 81:1475-1485.

- Ye, Y., Y. Zhang, X. Lu, X. Huang, X. Zeng, X. Lai, and Y. Zeng. 2011. The anti-inflammatory effect of the SOCC blocker SK&F 96365 on mouse lymphocytes after stimulation by Con A or PMA/ionomycin. *Immunobiology*. 216:1044-1053.
- Yue, T.L., E.H. Ohlstein, and R.R. Ruffolo. 1999. Apoptosis: a potential target for discovering novel therapies for cardiovascular diseases. *Curr Opin Chem Biol*. 3:474-480.
- Yuyama, K., N. Yamamoto, and K. Yanagisawa. 2008. Accelerated release of exosome-associated GM1 ganglioside (GM1) by endocytic pathway abnormality: another putative pathway for GM1-induced amyloid fibril formation. *Journal of neurochemistry*. 105:217-224.
- Zakharov, S.D., J.D. Hulleman, E.A. Dutseva, Y.N. Antonenko, J.C. Rochet, and W.A. Cramer. 2007. Helical alpha-synuclein forms highly conductive ion channels. *Biochemistry*. 46:14369-14379.
- Zarranz, J.J., J. Alegre, J.C. Gomez-Esteban, E. Lezcano, R. Ros, I. Ampuero, L. Vidal, J. Hoenicka, O. Rodriguez, B. Atares, V. Llorens, E. Gomez Tortosa, T. del Ser, D.G. Munoz, and J.G. de Yebenes. 2004. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of neurology*. 55:164-173.
- Zeng, B.Y., A.D. Medhurst, M. Jackson, S. Rose, and P. Jenner. 2005. Proteasomal activity in brain differs between species and brain regions and changes with age. *Mech Ageing Dev*. 126:760-766.
- Zhang, W., T. Wang, Z. Pei, D.S. Miller, X. Wu, M.L. Block, B. Wilson, Y. Zhou, J.S. Hong, and J. Zhang. 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*. 19:533-542.
- Zhou, C., S. Emadi, M.R. Sierks, and A. Messer. 2004. A human single-chain Fv intrabody blocks aberrant cellular effects of overexpressed alpha-synuclein. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 10:1023-1031.
- Zhou, W., M.S. Hurlbert, J. Schaack, K.N. Prasad, and C.R. Freed. 2000. Overexpression of human alpha-synuclein causes dopamine neuron death in rat primary culture and immortalized mesencephalon-derived cells. *Brain research*. 866:33-43.
- Zhou, W., J. Schaack, W.M. Zawada, and C.R. Freed. 2002. Overexpression of human alpha-synuclein causes dopamine neuron death in primary human mesencephalic culture. *Brain research*. 926:42-50.
- Zhu, N., and Z. Wang. 1999. Calreticulin expression is associated with androgen regulation of the sensitivity to calcium ionophore-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*. 59:1896-1902.
- Zundorf, G., and G. Reiser. 2011. Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxidants & redox signaling*. 14:1275-1288.

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ
ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

(στην ελληνική & αγγλική γλώσσα)



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

**Επίδραση της εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης στην
ομοίωση των νευρικών κυττάρων -
Συσχέτιση με τη νόσο του Parkinson.**

Διδακτορική Διατριβή
Αικατερίνης Χ. Μελαχροινού
Βιολόγου

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

ΕΥΘΥΜΙΟΠΟΥΛΟΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ, Καθηγητής (Επιβλέπων)
ΠΑΠΑΖΑΦΕΙΡΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
ΣΤΕΦΑΝΗΣ ΛΕΩΝΙΔΑΣ, Καθηγητής

Αθήνα 2013
Περίληψη Διδακτορικής Διατριβής

Η νόσος του Parkinson είναι μία σημαντική νευροεκφυλιστική ασθένεια. Παθολογικά, χαρακτηρίζεται από την επιλεκτική απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου και την παρουσία ενδοκυττάρων πρωτεϊνικών εγκλείστων στα κυτταρικά σώματα και τους νευράξονες, σωματία και νευρίτες Lewy, αντίστοιχα. Η α-συνουκλεΐνη (ΑΣΥΝ) είναι μία άφθονη νευρωνική πρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται στα προσυναπτικά άκρα και εμπλέκεται στην παθογένεση της νόσου του Parkinson. Η ΑΣΥΝ έχει την τάση να πολυμερίζεται, δημιουργώντας ολιγομερείς μορφές, οι οποίες θεωρούνται τοξικές. Αρχικά, η ΑΣΥΝ αποτελούσε παράδειγμα τυπικής κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης. Εντούτοις, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, εντοπίζεται στο ανθρώπινο πλάσμα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝ.Υ), καθώς και στο καλλιεργητικό μέσο νευρωνικών κυττάρων. Επομένως, ενισχύεται το ενδεχόμενο της παρακρινούς δράσης της ΑΣΥΝ, ως πιθανού μηχανισμού εξάπλωσης της νόσου του Parkinson.

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της εκκρινόμενης ΑΣΥΝ στην ομοιόσταση των νευρικών κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε το επαγόμενο Tet-Off κυτταρικό σύστημα. Ως βάση του έχει τα SH-SY5Y κύτταρα, τα οποία υπερεκφράζουν τη φυσικού τύπου ανθρώπινη ΑΣΥΝ, με επαγόμενο τρόπο, που ελέγχεται από τη δοξυκυκλίνη. Σημειωτέον, η ΑΣΥΝ εκκρίνεται φυσιολογικά στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (conditioned medium, CM) των παραπάνω κυττάρων. Ένα μικρό ποσοστό της ΑΣΥΝ, απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο, μέσω της αλληλεπίδρασής του με μικρά κυστίδια, τα οποία φέρουν τα κύρια χαρακτηριστικά των εξωσωμάτων. Η δε έκκριση της ΑΣΥΝ εξαρτάται από τα επίπεδα του ενδοκυττάρου Ca^{2+} . Σημειωτέον, στο CM εντοπίζεται πληθώρα διαφορετικών μορφών της ΑΣΥΝ, από μονομερείς έως υψηλού μοριακού βάρους ολιγομερείς μορφές, οι οποίες διαχωρίστηκαν με τη βοήθεια της χρωματογραφίας διήθησης πεκτητής (Size Exclusion Chromatography, SEC). Η χορήγηση CM εμπλουτισμένου σε εκκρινόμενη ΑΣΥΝ μειώνει τη βιωσιμότητα των νευρωνικών κυττάρων και των νευρώνων. Το τοξικό δυναμικό των υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους απομονωμένων μορφών της ΑΣΥΝ, είναι παρόμοιο. Ωστόσο, ο εν λόγω φαινότυπος αντιστρέφεται κατόπιν απομάκρυνσης της ΑΣΥΝ από το θρεπτικό μέσο, μέσω ανοσοκατακρήμνισης. Τέλος, ο μηχανισμός νευροτοξικής δράσης της ΑΣΥΝ δε φαίνεται να περιλαμβάνει την πρόσληψή της από τα διαφοροποιημένα κύτταρα-

δέκτες και τους πρωτογενείς νευρώνες. Αντιθέτως, τα διαιρούμενα SH-SY5Y κύτταρα-δέκτες, τα οποία παρουσιάζουν ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στο τοξικό δυναμικό της εκκρινόμενης ΑΣΥΝ, φαίνεται να την προσλαμβάνουν.

Στη συνέχεια, εξετάστηκαν τυχόν αλλοιώσεις στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης και ενδεχόμενες διαταραχές στην ομοιόσταση των ιόντων Ca^{2+} , ως πιθανοί μηχανισμοί νευροτοξικής δράσης της εξωκυτταριας ΑΣΥΝ στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα-δέκτες και τους πρωτογενείς φλοιϊκούς νευρώνες. Η παρουσία της εκκρινόμενης ΑΣΥΝ, αρχικά αλλάζει τη ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων-δεκτών και αυξάνει την ικανότητά τους να προσλαμβάνουν Ca^{2+} , ενώ σε βάθος χρόνου ενεργοποιεί τις καλπαΐνες. Σημειωτέον, η παρατηρούμενη αύξηση της εισροής ιόντων Ca^{2+} οφείλεται, ως επί το πλείστον, στην ελεύθερη ΑΣΥΝ και όχι σε αυτή που συνδέεται με εξωσώματα. Φαρμακολογική αναστολή των τασεοελεγχόμενων καναλιών Ca^{2+} (Voltage Operated Ca^{2+} Channels, VOCs) μειώνει σημαντικά την επαγόμενη από την ΑΣΥΝ εισροή ιόντων Ca^{2+} , τονίζοντας την εμπλοκή των εν λόγω καναλιών στο περιγραφόμενο φαινόμενο. Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα του ελεύθερου κυτταροπλασματικού Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). Εντούτοις, εντοπίστηκε σημαντική συσσώρευση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} στα μιτοχόνδρια των κυττάρων-δεκτών. Τέλος, η παρουσία χηλικών παραγόντων, που δεσμεύουν το ελεύθερο Ca^{2+} ή φαρμακολογικών ουσιών που αναστέλλουν τους VOCs ή τις καλπαΐνες εξουδετερώνει το τοξικό δυναμικό της εκκρινόμενης ΑΣΥΝ.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω δεδομένα, η ΑΣΥΝ εκκρίνεται φυσιολογικά στο θρεπτικό μέσο των Tet-Off επαγόμενων SH-SY5Y κυττάρων, εν μέρει, μέσω της σύνδεσής της με εξωσώματα, και επιφέρει τοξική δράση στα νευρωνικά κύτταρα-δέκτες και τους πρωτογενείς νευρώνες. Η σπουδαιότητα της παρούσας μελέτης έγκειται στο κεντρικό και καινοτόμο εύρημα, το οποίο, για πρώτη φορά στα βιβλιογραφικά δεδομένα, αποδεικνύει την ύπαρξη αιτιολογικής σχέσης μεταξύ της επαγόμενης από την εξωκυττάρια ΑΣΥΝ τοξικότητας και των διαταραχών της ομοιόστασης των ιόντων Ca^{2+} . Συμπερασματικά, η έκκριση της ΑΣΥΝ συμβάλλει στην ενίσχυση και την εξάπλωση της παθολογίας που σχετίζεται με τη νόσο του Parkinson, έστω και μερικώς, μέσω της συμμετοχής των ομοιοστατικών μηχανισμών του Ca^{2+} . Επομένως, η διαχείριση των σηματοδοτικών μονοπατιών του Ca^{2+} , δυνητικά θα μπορούσε να αποτελέσει μία πιθανή θεραπευτική στρατηγική για τη νόσο του Parkinson και των σχετικών συνουκλείνοπαθειών.



NATIONAL & KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY
Department of Animal & Human Physiology

Doctorate (*Ph.D.*) Thesis Abstract:

***Effects of secreted α -synuclein on neuronal
homeostasis -
Correlation with Parkinson's Disease.***

Doctorate (*Ph.D.*) Thesis

Aikaterini C. Melachroinou

Biologist

Three-member consulting committee:

EFTHYMIOPOULOS SPYRIDON, Professor (Supervisor)

PAPAZAFIRI PANAGIOTA, Associate Professor

STEFANIS LEONIDAS, Professor

Athens 2013

Doctorate (Ph.D.) Thesis Abstract

Parkinson's disease (PD) is a major neurodegenerative disease pathologically characterized by the selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra and aggregated protein deposits called Lewy bodies and Lewy neurites. Alpha-synuclein (AS) is an abundant presynaptic brain protein, which is implicated in PD pathogenesis. AS has the tendency to form oligomers and these are thought to be the toxic species in PD. Although initially AS was considered a purely intracellular protein, recent data suggest that it can be detected in the plasma and cerebrospinal fluid (CSF) of humans and in the culture media of neuronal cells. Therefore, there is a possibility of a paracrine mode of action of AS for the spread of pathology in PD.

SH-SY5Y cells, inducibly overexpressing human wild-type AS, were used as a means to assess the effects of secreted AS on neuronal homeostasis. AS is physiologically secreted in the conditioned media (CM) of the induced cells, partly via externalized vesicles, which bear the characteristic hallmarks of exosomes. Importantly, a wide range of different AS species, from monomeric to high molecular weight soluble oligomers, is readily detected in the CM of these cells, and was isolated via Size Exclusion Chromatography. Application of CM containing secreted AS causes cell death of recipient neuronal cells and neurons, which can be reversed following AS immunodepletion from the CM. High and low molecular weight AS species, isolated from this CM, significantly decrease cell viability. However, AS-induced toxicity does not involve uptake of the protein by neuronal cells and neurons. On the contrary, proliferating SH-SY5Y cells, which are shown to be less susceptible to AS toxic potential, are able to uptake secreted AS.

In order to decipher the mechanism of extracellular-AS conferred toxicity in recipient differentiated SH-SY5Y cells and primary cortical neurons, plasma membrane alterations and perturbations of Ca^{2+} homeostasis were tested, as potential toxic modes of action. Application of secreted AS alters membrane fluidity and increases Ca^{2+} entry. Importantly, the increased Ca^{2+} entry is attributed mainly to the free extracellular, rather than the exosome-associated AS. Pharmacological inhibition of voltage operated Ca^{2+} channels (VOCs) reduces AS-facilitated Ca^{2+} entry, pointing to the importance of these channels in the observed phenomenon. Although no change in free cytosolic Ca^{2+} levels ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) is observed, a significantly increased mitochondrial Ca^{2+} sequestration is found in recipient cells. Application of VOCs

blockers or Ca^{2+} chelators abolishes AS-mediated toxicity. AS-treated cells exhibit increased calpain activation, while calpain inhibition greatly alleviates the observed toxicity.

Collectively, our data indicate that AS is physiologically secreted by the inducible SH-SY5Y cells and that it exerts toxicity to the recipient neuronal cells and neurons. The basic novel findings of this study show that at least in part cell-produced AS is secreted via an exosomal, Ca^{2+} -dependent mechanism and for the first time, provide an etiological link between secreted AS-conferred toxicity and perturbations of Ca^{2+} homeostasis. Taken together, AS secretion serves to amplify and propagate PD-related pathology, through engagement, at least in part, of the Ca^{2+} homeostatic machinery. Therefore, manipulating Ca^{2+} signaling pathways may represent a potential therapeutic strategy for PD and related synucleinopathies.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΤΟ
ΠΛΑΙΣΙΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Emmanouilidou E, **Melachroinou K**, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, Stefanis L, Vekrellis K. (2010) Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. J Neurosci. 30 (20):6838-51

Melachroinou K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Masgrau R, Papazafiri P, Stefanis L, Vekrellis K. (2013) Deregulation of Ca²⁺ homeostasis mediates secreted alpha-synuclein-induced neurotoxicity. Neurobiol Aging 34 (12):2853-65

Cell-Produced α -Synuclein Is Secreted in a Calcium-Dependent Manner by Exosomes and Impacts Neuronal Survival

Evangelia Emmanouilidou,¹ Katerina Melachroinou,¹ Theodoros Roumeliotis,² Spiros D. Garbis,² Maria Ntzouni,³ Lukas H. Margaritis,³ Leonidas Stefanis,^{1,4} and Kostas Vekrellis¹

Divisions of ¹Basic Neurosciences and ²Biotechnology, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Athens 11527, Greece, ³Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Athens 15701, Greece, and ⁴Second Department of Neurology, University of Athens Medical School, Athens 11527, Greece

α -Synuclein is central in Parkinson's disease pathogenesis. Although initially α -synuclein was considered a purely intracellular protein, recent data suggest that it can be detected in the plasma and CSF of humans and in the culture media of neuronal cells. To address a role of secreted α -synuclein in neuronal homeostasis, we have generated wild-type α -synuclein and β -galactosidase inducible SH-SY5Y cells. Soluble oligomeric and monomeric species of α -synuclein are readily detected in the conditioned media (CM) of these cells at concentrations similar to those observed in human CSF. We have found that, in this model, α -synuclein is secreted by externalized vesicles in a calcium-dependent manner. Electron microscopy and liquid chromatography–mass spectrometry proteomic analysis demonstrate that these vesicles have the characteristic hallmarks of exosomes, secreted intraluminal vesicles of multivesicular bodies. Application of CM containing secreted α -synuclein causes cell death of recipient neuronal cells, which can be reversed after α -synuclein immunodepletion from the CM. High- and low-molecular-weight α -synuclein species, isolated from this CM, significantly decrease cell viability. Importantly, treatment of the CM with oligomer-interfering compounds before application rescues the recipient neuronal cells from the observed toxicity. Our results show for the first time that cell-produced α -synuclein is secreted via an exosomal, calcium-dependent mechanism and suggest that α -synuclein secretion serves to amplify and propagate Parkinson's disease-related pathology.

Introduction

Genetic and biochemical data indicate that an increase in the levels of expression of the wild-type (WT) α -synuclein protein is sufficient to cause neurodegeneration in Parkinson's disease (PD) (Singleton et al., 2003; Chartier-Harlin et al., 2004; Ibáñez et al., 2004). The aberrant function of α -synuclein is not understood, although there is evidence that abnormal folding and aggregation may play a role and that the toxic α -synuclein species may be oligomeric intermediates (Conway et al., 2000, 2001; Goldberg and Lansbury, 2000; Olanow et al., 2004; Vekrellis et al., 2004). Until recently, α -synuclein was considered to exert its pathogenic effects intracellularly. However, El-Agnaf et al. (2003, 2006) showed that α -synuclein species can be detected in human plasma and CSF and that it could be secreted into the medium of cultured neuronal cells. In another report, monomeric and oligomeric α -synuclein were shown to be secreted from differentiated human neuroblastoma cells and primary cortical neurons

(Lee et al., 2005). Using a similar model, Sung et al. (2005) demonstrated that secreted α -synuclein from SK-N-BE cells reduces the viability of these cells and can be cleaved by matrix metalloproteases. These results suggest that the pathogenic actions of α -synuclein extend to the extracellular space and neighboring cells. In support for this hypothesis, exogenously added recombinant α -synuclein to cell culture medium can be internalized by the recipient cells (Sung et al., 2001; Ahn et al., 2006; Lee et al., 2008; Luk et al., 2009) and cause cell death (Du et al., 2003; Albani et al., 2004; Zhang et al., 2005). Such studies have used very high concentrations of recombinant α -synuclein and cationic liposomes to assist its uptake.

The pathophysiological role of the secreted α -synuclein forms remains essentially unknown. In one study (Zhang et al., 2005), it was demonstrated that the interaction between recombinant α -synuclein and microglia could activate these cells, which in turn induces neurotoxicity. It has also been suggested that α -synuclein aggregates can transmit pathology via neuron-to-neuron interactions (Desplats et al., 2009). The secretion of α -synuclein has been reported to be insensitive to brefeldin A (BFA) (Lee et al., 2005), suggesting that it is secreted via an endoplasmic reticulum (ER)/Golgi-independent pathway. Electron microscopy and density gradient ultracentrifugation suggested that the vesicles containing α -synuclein have morphologies and sedimentation properties similar to the dense core vesicles (Lee et al., 2005), but their exact identities remain unknown. To investigate

Received Nov. 17, 2009; revised March 16, 2010; accepted March 19, 2010.

This work was supported in part by National Institutes of Health Grant R21 NS05556 (L.S., K.V.) and by a Rapid Response Grant from the Michael J. Fox Foundation (E.E.).

The authors have nothing to disclose.

Correspondence should be addressed to Kostas Vekrellis, Division of Basic Neurosciences, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, 4, Soranou Efessiou Street, Athens 11527, Greece. E-mail: vekrellis@bioacademy.gr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010

Copyright © 2010 the authors 0270-6474/10/306838-14\$15.00/0

the underlying mechanisms of neurotoxicity caused by cell-secreted α -synuclein species, we have generated WT α -synuclein–Tet-off inducible SH-SY5Y cells. We show that α -synuclein is associated with externalized membrane vesicles, suggestive of a vesicle-based exporting mechanism. Our results show that different species of naturally secreted α -synuclein cause cell death to neuronal cells. Immunodepletion of α -synuclein from the medium rescues this death. Finally, we demonstrate that treatment of the conditioned medium (CM) with oligomer-disrupting compounds reduces the secreted α -synuclein-related cytotoxicity.

Materials and Methods

Reagents. All reagents were obtained from Sigma unless otherwise specified. Doxycycline (Dox) was purchased from Clontech. Recombinant α -synuclein was from Millipore Bioscience Research Reagents. Cytochalasin D (CytoD) and protein G agarose beads were purchased from Calbiochem.

Cell culture. The generation of the stable SH-SY5Y cell lines inducibly expressing WT α -synuclein was described previously (Vekrellis et al., 2009). SH-SY5Y cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), and 2 mM L-glutamine. Cells overexpressing either WT α -synuclein or β -galactosidase (bGAL) were cultured in the presence of 250 μ g/ml G418 and 50 μ g/ml hygromycin B. α -Synuclein expression was switched off by the addition of doxycycline (0.5 μ g/ml). Stock cultures were kept in the presence of doxycycline. Neuronal differentiation was performed with the addition of 10 μ M all-trans retinoic acid for 5 d. Cultures of rat (embryonic day 18) cortical neurons were prepared as described previously (Vogiatzi et al., 2008). Dissociated cells were plated onto poly-D-lysine-coated 12-well dishes at a density of \sim 250,000/cm². Cells were maintained in Neurobasal medium (Invitrogen), with B27 serum-free supplements (Invitrogen), 0.5 mM L-glutamine, and penicillin/streptomycin (as above). More than 98% of the cells cultured under these conditions represent postmitotic neurons (Rideout et al., 2001). Mouse BV2 microglia cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), and 2 mM L-glutamine.

Preparation of conditioned medium and cell extract. SH-SY5Y cells inducibly expressing WT α -synuclein were cultured in 140-mm-diameter dishes in RPMI 1640 medium containing 10% FBS in the presence or absence of doxycycline (0.5 μ g/ml) until 70–80% confluent. The medium was then replaced with RPMI 1640 medium containing 2% FBS. After 48 h, the culture supernatant (CM) was collected and centrifuged at 4000 \times g for 10 min at 4°C to remove cell debris. For Western blotting and size exclusion chromatography (SEC), the CM was concentrated using 3 kDa cutoff Amicon Ultra filters (Millipore). For toxicity assays, the CM was used without concentration. In some cases, CM was treated with 0.4 μ M of either Congo Red (CR) or scyllo-inositol (SI) for 4 h at 4°C before its addition to recipient cells.

For extraction of cellular proteins, cells were harvested, washed twice with ice-cold PBS, and lysed with STEN lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, and 2 mM EDTA) on ice for 15 min. Protein content was estimated using the Bradford method (Bio-Rad).

Isolation of externalized membrane vesicles. The isolation of the externalized membrane vesicles was performed as described previously (Tanudji et al., 2002). Briefly, the CM was first centrifuged at 4000 \times g for 10 min at 4°C to remove dead cells and debris, and the supernatant was further centrifuged at 100,000 \times g for 2 h at 4°C. The supernatant (S100) was collected, and the pellet (P100) containing the externalized vesicles was reconstituted in 25 μ l of radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, and 0.1% SDS).

Preparation of exosome-depleted medium. The depletion of the medium from bovine serum-derived exosomes was performed as described previously (Théry et al., 2006). Briefly, RPMI 1640 medium containing 20% FBS, penicillin/streptomycin, and L-glutamine was centrifuged at 100,000 \times g for 16 h at 4°C. The supernatant was carefully removed and

sterilized by filtering through a 0.2 μ m filter (Whatman) and stored at 4°C until additional use in exosome preparation.

Purification of exosomes. Exosomes were prepared as described previously (Théry et al., 2006). Briefly, SH-SY5Y cells were cultured in two 140 mm dishes in 10% FBS. At 48 h before the exosome preparation, culture medium was replaced with exosome-depleted medium diluted 10-fold with RPMI 1640 medium containing only penicillin/streptomycin and L-glutamine. Culture supernatants of cells grown for 48 h were collected and spun at 300 \times g for 10 min to remove cells. The supernatants were then sequentially centrifuged at 2000 \times g for 10 min, 10,000 \times g for 30 min, and 100,000 \times g for 90 min. The pellet (P100) containing exosomes was washed once with cold PBS and centrifuged again at 100,000 \times g for 90 min. P100 was resuspended in 50 μ l of RIPA buffer. All centrifugations were performed at 4°C.

Electron microscopy. Externalized membrane vesicles were isolated from 15 ml of CM, and electron microscopy was performed as described previously (Théry et al., 2006) with some modifications. Briefly, vesicles were fixed with 2% paraformaldehyde in 100 mM Na₂HPO₄, applied to a Formvar-coated copper grid, and negatively stained with 2% uranyl acetate. Microphotographs were obtained using a Phillips EM 300 electron microscope.

Mass spectrometric protein analyses. The proteins were extracted from the exosomes using an acetone–TCA precipitation procedure followed by washes with acetonitrile and tetrahydrofuran. The resulting protein pellets were subjected to reduction, alkylation, and in-solution phase proteolysis with trypsin as described previously (Kouri et al., 2009). The resulting tryptic digest was analyzed with an Agilent 1200 nano-liquid chromatography system interfaced with an Agilent 6330 MSD ion trap mass spectrometer system retrofitted to a nano-electrospray ionization source [liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS)]. The capillary column used for the peptide separation was the Agilent C₁₈ Zorbax at 1.8 μ m particle size, 75 μ m inner diameter, and 150 mm length. Before the analyses, the LC-MS system was tuned and calibrated to meet the specifications of the manufacturer for mass accuracy and detection sensitivity. The obtained product ion MS² peptide spectra were searched against the Swiss Prot nonredundant sequence database. The search engine used was Protein Pilot (version 2.0.1) with the ESI-Trap instrument option, Search Effort at Thorough ID, and a detection protein threshold >1.3 (>95% confidence).

Treatment of vesicles with Na₂CO₃. To remove non-integral membrane proteins, exosomes were treated with Na₂CO₃ 100 mM, pH 11, for 30 min at 4°C (Fujiki et al., 1982). After centrifugation at 50,000 \times g, integral exosomal membrane proteins were recovered in the pellet fraction, whereas the exosomal lumen proteins remained in the soluble fraction.

³⁵S radiolabeling. SH-SY5Y cells inducibly expressing WT α -synuclein were cultured in 140-mm-diameter dishes in RPMI 1640 medium containing 10% FBS in the presence or absence of Dox until 70–80% confluent. Cells were starved from methionine and cysteine for 15 min at 37°C. After starvation, 2.5 mCi of ³⁵S-Protein Labeling mix (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) were added for 3 h. Cells were rinsed twice with plain RPMI 1640 medium and grown overnight in fresh unlabeled culture medium with excess of L-methionine and L-cysteine (10 mM final concentration). The CM, containing radiolabeled secreted proteins, was collected, cleared from cell debris, concentrated, and analyzed by immunoblotting. To detect intracellular radiolabeled proteins, cells were first washed for 2 min with trypsin–EDTA to remove non-integral membrane-bound proteins. After centrifugation at 400 \times g for 5 min, cell pellets were lysed in STEN lysis buffer and used for immunoprecipitation.

Immunoprecipitation of labeled α -synuclein. Cell lysates were cleared with protein-G agarose beads for 1 h at 4°C. Agarose beads were removed by centrifugation at 1000 \times g for 5 min at 4°C, and anti- α -synuclein antibody (Syn-1, mouse monoclonal, 5 μ g/mg protein; BD Biosciences) was added for 6 h at 4°C by rotation. At the end of this period, protein-G agarose beads were added and the mixture was incubated overnight at 4°C by rotation. Labeled α -synuclein was detected by gel autoradiography.

Immunodepletion of CM. Conditioned medium (7 ml) was immunodepleted of α -synuclein by immunoprecipitation with anti- α -synuclein anti-

body (0.5 μ g/ml CM) as described above. Immunodepleted CM was collected and sterilized by filtering through a 0.2 μ m filter (Whatman) before being applied on recipient cells. Control immunodepletion was performed with either anti-c-myc antibody (mouse monoclonal; Santa Cruz Biotechnology) or protein-G agarose alone.

Uptake of radiolabeled proteins. Cells were treated overnight with CM containing radiolabeled secreted proteins (see above). After 2 min treatment with trypsin–EDTA to remove nonspecific surface protein binding, cells were examined for the internalization of labeled α -synuclein by immunoprecipitation and gel autoradiography.

Subcellular fractionation. After overnight application of CM containing 35 S-labeled secreted proteins, recipient cells were treated with trypsin–EDTA, washed once with PBS, and centrifuged at $400 \times g$ for 5 min at 4°C. Cell pellet was resuspended in a detergent-free buffer containing 0.25 M sucrose, 10 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, and 1 \times cocktail protease inhibitors (Roche). Homogenization was achieved first by four freeze–thaw cycles, followed by three sets of 15 bounces of a Teflon homogenizer. Finally, the homogenate was passed a few times through an insulin syringe. For nuclei sedimentation, the homogenate was centrifuged at $2000 \times g$ for 15 min at 4°C. To isolate microsomes, the supernatant was further centrifuged at $100,000 \times g$ for 2 h at 4°C. Pellets were washed twice with PBS containing protease inhibitors and reconstituted in RIPA buffer. Nuclear, microsomal, and cytosolic fractions were finally analyzed for the presence of internalized α -synuclein by immunoprecipitation and autoradiography.

Toxicity assays. Toxicity was assessed by using the LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit (Invitrogen). Briefly, cells were stained by 2 μ M calcein-AM, which labels living cells, and 1 μ M ethidium homodimer (EthD-1), which labels dead cells, for 30 min. Hoechst 33258 dye was used at the same time for total nuclei staining. After staining, cells were washed once with normal RPMI 1640 medium and immediately visualized on a Leica DMIRB inverted fluorescence microscope. Images were captured under 20 \times magnification with a Leica DFC-350FX digital cooled CCD camera using the LAS AF software. Toxicity was defined in each image as the percentage of dead cells versus the total number of cells, counting at least 150 cells per image.

Size exclusion chromatography. For SEC, 8–9 mg of protein of concentrated CM diluted in PBS were injected into a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare) previously equilibrated with PBS. Elution was performed at a constant flow rate of 0.25 ml/min in PBS. The 250 μ l fractions were collected and analyzed by Western immunoblotting for the presence of α -synuclein. High-molecular-weight (HMW) and low-molecular-weight (LMW) fractions containing α -synuclein were separately pooled and concentrated using 3 kDa cutoff filters (Millipore). PBS was exchanged to 50 mM ammonium acetate buffer, pH 7.5, by means of ultrafiltration, and the samples were further lyophilized to dryness. Finally, samples were reconstituted in 250 μ l of RPMI 1640 medium containing 10% FBS, sterilized by filtering, and applied to recipient cells in 2 \times concentration.

Western immunoblotting. Denaturing gel electrophoresis was performed in 12% SDS-PAGE gels in Tris–glycine buffer. Immunoblotting was performed using the following antibodies: anti- α -synuclein (rabbit polyclonal from Santa Cruz Biotechnology; C-20 or Syn-1 monoclonal from BD Biosciences), anti- β -actin (mouse monoclonal; Sigma), anti- γ -tubulin (mouse monoclonal; Sigma), anti-BSA (mouse monoclonal; Antibody Shop), anti-Alix (mouse monoclonal; Santa Cruz Biotechnology), anti-heat shock protein 70 (Hsp70) (mouse monoclonal; Stressgen), anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (mouse monoclonal; Sigma), anti-14-3-3 β (rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology), anti-extracellular signal-regulated kinase (ERK) (rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology), anti-ubiquitin (mouse monoclonal; Millipore Bioscience Research Reagents), anti-cofilin (goat polyclonal; Santa Cruz Biotechnology), anti-flotillin-1 (mouse monoclonal; Santa Cruz Biotechnology), anti-annexin II (rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology), anti-c-myc (mouse monoclonal; Sigma), anti-cleaved caspase-3 (rabbit monoclonal; Cell Signaling Technology), and anti-19S Rpt6 proteasome subunit (mouse monoclonal; Biomol). All immunoblots represent one of at least three experiments. Quantification of bands on Western immunoblots was performed using Gel Analyser

software (Biosure). Differences in protein expression levels were quantified after standardization of all values using the appropriate loading controls (γ -tubulin, β -actin, ERK, and BSA). All statistical analyses were performed using the Student's *t* test, and *p* values of <0.05 were considered significant.

Immunocytochemistry and confocal microscopy. For confocal microscopy, cells grown on glass coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. After PBS washes, cells were blocked with 10% normal goat serum (NGS) in PBS. Primary anti-GM130 antibody (mouse monoclonal, 1:100; BD Biosciences Transduction Laboratories) was applied for 16 h in PBS containing 2% NGS and 0.1% Triton X-100. Mouse cyanine 3 (Cy3) secondary antibody (Jackson ImmunoResearch) was added for 1 h in PBS/Triton X-100/NGS. Alternatively, cells were stained for 16 h with Alexa 633–phalloidin (1:500; Invitrogen). Cell nuclei were stained with Hoechst 33258 dye. Coverslips were mounted in Mowiol mounting media and visualized under 63 \times magnification using a Leica TCS SP5 confocal microscope combined with dual (tandem) scanner.

Results

α -Synuclein is constitutively and physiologically secreted

In our SH-SY5Y cell system, the expression of WT α -synuclein is tightly regulated through the Tet-off regulatory system (Vekrellis et al., 2009). To investigate whether α -synuclein is released from our cells, we induced α -synuclein expression by culturing cells in the absence of Dox for 8 d and examined the culture medium (CM) for the presence of secreted α -synuclein (Fig. 1A). CM was concentrated and Western immunoblotted with Syn-1 antibody. Secreted monomeric (Fig. 1A) and oligomeric (Fig. 1B) α -synuclein was clearly detected in the CM and accumulated over time (Fig. 1A, right). This was suggestive of α -synuclein being secreted by SH-SY5Y cells in a constitutive manner (Fig. 1C). We confirmed that the presence of α -synuclein in the CM was not attributable to cell death by measuring the percentage cell death before CM collection. Using the LIVE/DEAD Cytotoxicity kit, cell death was <5% in cells expressing or not expressing α -synuclein (percentage cell death, 4.1 ± 0.9 or $3.8 \pm 0.3\%$ for WT-positive and WT-negative cells, respectively, mean \pm SD; *n* = 3). We further confirmed the physiologic secretion of α -synuclein by analyzing the CM for the presence of cytosolic proteins, such as ubiquitin (Fig. 1A), protein kinase α (PKC α), and 19S Rpt6 proteasome subunit (supplemental Fig. S1A, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Both polyubiquitinated proteins and monomeric ubiquitin were absent in the CM of SH-SY5Y cells (Fig. 1A). We also examined the CM from SH-SY5Y cells overexpressing bGAL in a similar manner. No bGAL was detected in the CM of these cells (data not shown), arguing that overexpression alone was not sufficient to lead to α -synuclein release. In agreement with a physiological mode of release, secreted α -synuclein was detected in low levels in control (+Dox) SH-SY5Y cells (see Figs. 1B, 3A, B) (supplemental Figs. S1A, available at www.jneurosci.org as supplemental material). We also quantified the levels of α -synuclein in the CM after 48 h using recombinant α -synuclein as standard. The concentration of secreted α -synuclein was estimated to be 2–12 nM, which resembles the levels so far detected in biological fluids (data not shown) (Borghetti et al., 2000; El-Agnaf et al., 2003, 2006).

Having shown that our cells physiologically secrete α -synuclein, we went on to investigate the manner of this secretion. It has been suggested previously that α -synuclein exocytosis is mediated by a nonclassical, BFA-independent, secretory mechanism (Lee et al., 2005). Treatment of SH-SY5Y cells with 2 μ g/ml BFA, an effective inhibitor of the classical ER/Golgi-dependent pathway, for 6 h resulted in a robust disassembly of the Golgi complex (supplemental Fig. S1B, available at

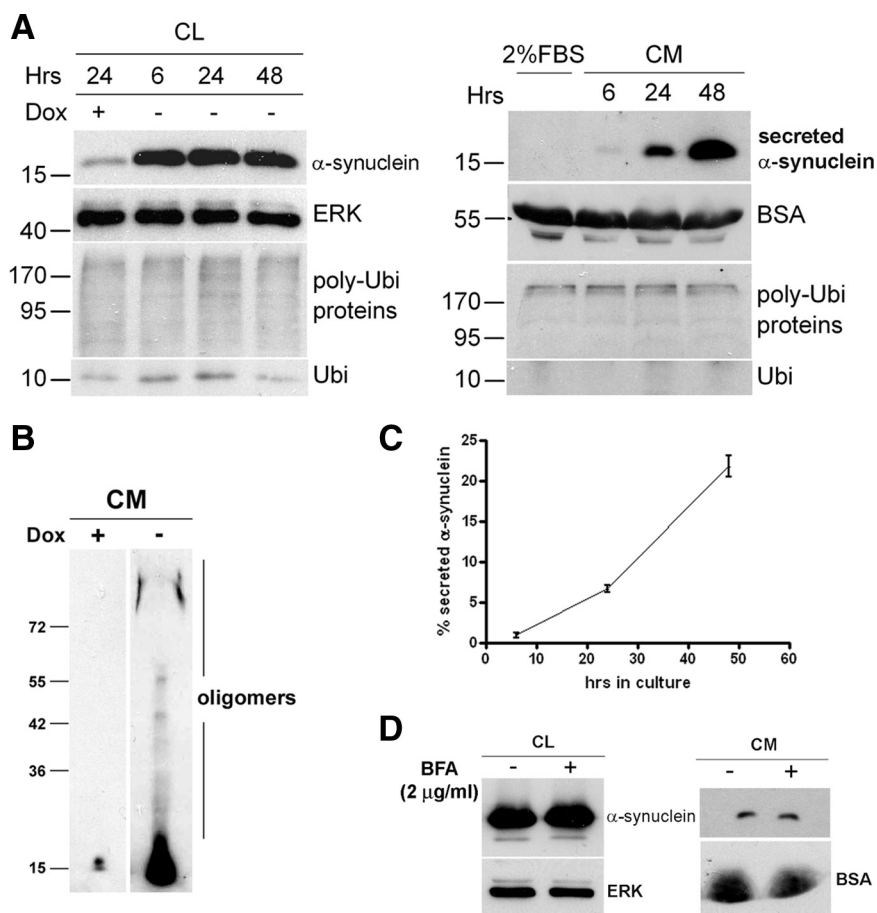


Figure 1. α -Synuclein is constitutively released by a nonclassical secretory pathway. **A**, SH-SY5Y cells were cultured in the presence or absence of Dox for 8 d in 10% FBS. After that period, the culture medium was replaced with 2% FBS medium for the indicated times. Cell lysates (CL; left) and concentrated CM (right) were analyzed by Western immunoblotting with antibodies to α -synuclein or ubiquitin (Ubi). ERK and BSA levels were used as loading controls. **B**, SH-SY5Y cells were cultured as in **A**, and the CM was collected after 48 h and analyzed by Western immunoblotting with C-20 antibody. **C**, Representative plot showing the levels of secreted α -synuclein, estimated as the percentage ratio of the extracellular α -synuclein versus the intracellular α -synuclein, over time. Each point represents the mean \pm SD of three measurements. **D**, α -Synuclein-expressing cells were treated with 2 μ g/ml BFA (+) or without (–) for 6 h. The levels of intracellular α -synuclein (CL) and extracellular α -synuclein (CM) were assessed by Western immunoblotting. ERK and BSA were used as loading controls.

www.jneurosci.org as supplemental material). BFA-induced disruption of the classical secretory pathway did not alter the levels of secreted α -synuclein (percentage secreted α -synuclein, 3.5 ± 0.3 and $2.1 \pm 1.1\%$ for CTL untreated and BFA-treated cells, respectively, mean \pm SD; $n = 3$), suggesting that α -synuclein indeed follows an unconventional secretory pathway (Figs. 1D, 2B).

Externalization of α -synuclein is sensitive to changes in temperature and serum content

Facilitated protein secretion, such as classical ER/Golgi transport, is generally a temperature-dependent process (Saraste et al., 1986). However, passive diffusion through a pore in the cell membrane is not affected by changes in temperature (Melchior and Gerace, 1995). In addition, heat shock conditions can induce the release of some proteins exported via leaderless secretory pathways (Rubartelli et al., 1990; Jackson et al., 1992; Lindstedt et al., 1993). The effect of heat shock on α -synuclein export was tested by culturing α -synuclein-expressing cells at 40°C for 6 h. Under these conditions, an upregulation of

Hsp70 was observed (supplemental Fig. S1C, top, available at www.jneurosci.org as supplemental material), whereas cell viability remained unchanged (data not shown). CM from CTL and heat-shocked cells was concentrated and subjected to SDS-PAGE and immunoblotting analysis for the presence of secreted α -synuclein. The release of α -synuclein was greatly increased under heat shock conditions (percentage secreted α -synuclein, 3.4 ± 0.4 and $11.6 \pm 3.0\%$ for CTL and heat-shocked cells, respectively, mean \pm SD; $n = 3$) (supplemental Fig. S1C, top, available at www.jneurosci.org as supplemental material) but not in lower temperatures such as 25°C (supplemental Fig. S1C, bottom, available at www.jneurosci.org as supplemental material). These results suggest that the externalization of α -synuclein does not occur through passive diffusion across the plasma membrane.

It has been reported that unconventional protein secretion is affected by factors present in serum (Chang et al., 1997; Tanudji et al., 2002). To examine this possibility, α -synuclein-expressing cells were cultured in medium containing 0, 2, and 5% FBS for 6 h. Quantification of cell death verified that, under these conditions, serum deprivation did not affect cell viability (percentage cell death, 2.2 ± 0.6 , 2.8 ± 0.2 , 2.3 ± 0.6 , and $3.2 \pm 0.3\%$ for 0, 2, 5, and 10%, respectively, mean \pm SD; $n = 3$). However, the release of α -synuclein observed was inversely related to the serum content (percentage secreted α -synuclein, 2.8 ± 0.4 and $21.7 \pm 1.5\%$ for 2 and 0% FBS, respectively, mean \pm SD; $n = 3$) (supplemental Fig. S1D, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

α -Synuclein is released by a calcium-dependent endosomal mechanism

To dissect the secretory mechanism of α -synuclein in more detail, we tested whether the levels of extracellular α -synuclein were altered after treatment with chemical compounds that have been reported previously to influence the nonclassical secretion of other proteins. Because the importance of the actin network on endocytosis/exocytosis and vesicle trafficking has been well established (Lanzetti, 2007), we first investigated the role of actin cytoskeleton on α -synuclein secretion. For this purpose, cells expressing α -synuclein were treated for 6 h with 2 μ M of the actin polymerization inhibitor CytoD (supplemental Fig. S2A, available at www.jneurosci.org as supplemental material). The CM from CTL and CytoD-treated cells were concentrated and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting for secreted α -synuclein. Actin depolymerization did not affect α -synuclein externalization to a significant extent (percentage secreted α -synuclein, 2.5 ± 1.7 and $2.9 \pm 1.1\%$ for CTL and CytoD-treated cells, mean \pm SD; $n = 3$) (Fig. 2B). Under these conditions, cell viability was not compromised (Fig. 2C).

Protein kinases play a prominent role in signal transduction pathways that could facilitate protein trafficking, including unconventional secretion (Seino and Shibasaki, 2005). We have used staurosporin, a nonselective, broad kinase inhibitor (Klinkspoor et al., 1996; Smolian et al., 2001), to test whether protein kinases are involved in the unconventional secretion of α -synuclein. α -Synuclein-expressing cells were treated for 6 h with 100 nM staurosporin, and the CM were collected and concentrated. This treatment inhibited the phosphorylation of p-MARCKS (myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate), a specific substrate of PKC, without affecting the levels of the enzyme (supplemental Fig. S2B, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Again, cell viability was not compromised (Fig. 2C). Protein kinase inhibition did not change the levels of extracellular α -synuclein (percentage secreted α -synuclein, 2.5 ± 0.8 and $3.0 \pm 1.4\%$ for CTL and staurosporin-treated cells, mean \pm SD; $n = 3$), indicating that protein kinases do not mediate α -synuclein export (Fig. 2B).

Calcium is fundamental in regulating exocytosis, early endosome fusion, and exosome-mediated release (Mills et al., 2001; Savina et al., 2003; Barclay et al., 2005). To determine whether changes in Ca^{2+} levels modulate α -synuclein secretion, we first treated cells with 0.5 mM EDTA for 6 h, and the CM were collected and concentrated. Secreted α -synuclein levels were assessed by SDS-PAGE and immunoblotting. Removal of extracellular Ca^{2+} did not change the levels of secreted α -synuclein (percentage secreted α -synuclein, 3.8 ± 1.7 and $3.1 \pm 0.5\%$ for CTL and EDTA-treated cells, mean \pm SD; $n = 3$) (Fig. 2A,B). However, when cells were treated with 100 nM thapsigargin (Thastrup et al., 1990), which raises cytosolic Ca^{2+} concentration, we observed a significant increase in the levels of secreted α -synuclein (percentage secreted α -synuclein, 2.6 ± 0.3 and $7.7 \pm 2.2\%$ for CTL and thapsigargin-treated cells, mean \pm SD; $n = 3$) (Fig. 2A,B). This result was confirmed using the calcium ionophore ionomycin. Treatment of α -synuclein-expressing cells with 100 nM ionomycin for 6 h led to a significant increase in the levels of extracellular α -synuclein (percentage secreted α -synuclein, 3.1 ± 0.8 and $6.6 \pm 0.9\%$ for CTL and ionomycin-treated cells, mean \pm SD; $n = 3$) (Fig. 2A,B). As expected, ionomycin treatment also increased the levels of secreted oligomeric α -synuclein (supplemental Fig. S2C, available at www.jneurosci.org as supplemental material). To further verify that intracellular Ca^{2+} is important for α -synuclein secretion, we used the membrane-permeable Ca^{2+} -chelator BAPTA-AM. Treatment with 2 μM BAPTA-AM for 6 h decreased the levels of secreted α -synuclein, further supporting the idea that intracellular Ca^{2+} acts as a key regulator of α -synuclein export (percentage secreted α -synuclein, 3.4 ± 0.4 and $1.8 \pm 0.5\%$ for CTL and BAPTA-AM-treated cells, mean \pm SD; $n = 3$) (Fig. 2A,B). It

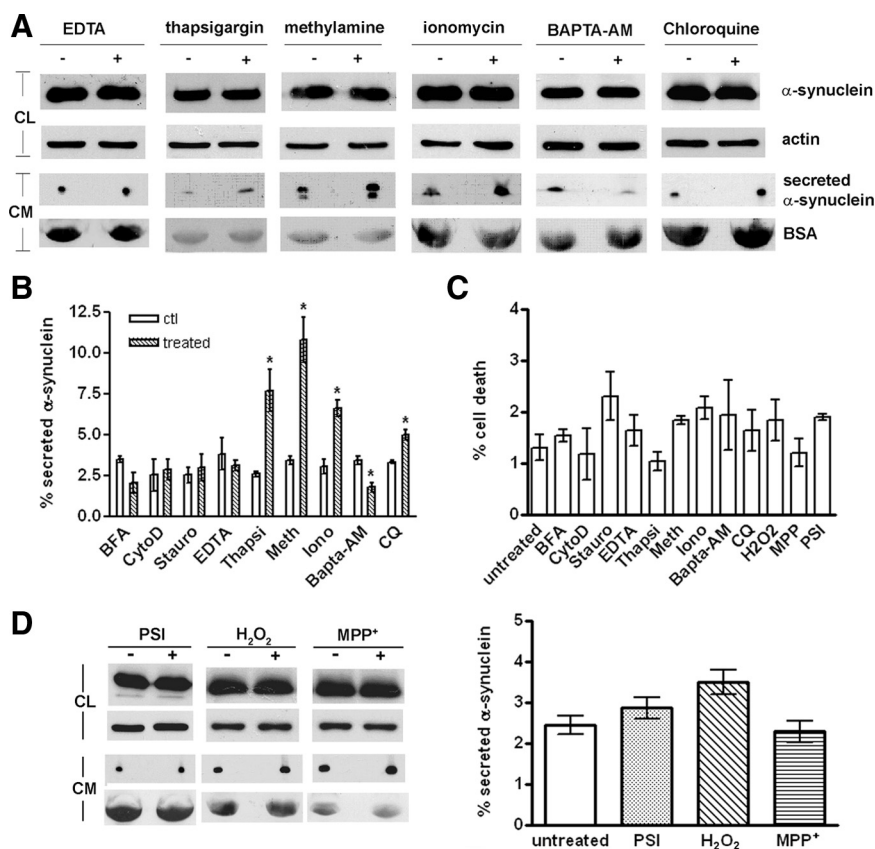


Figure 2. α -Synuclein is released by a calcium-dependent endocytic mechanism. **A**, Representative immunoblots showing the levels of intracellular and extracellular α -synuclein after no treatment (–) or a 6 h treatment (+) with compounds that either affect Ca^{2+} concentration or impair the endosomal pathway. Actin and BSA levels were used as loading controls. **B**, Graph summarizing the effect of various chemical compounds on α -synuclein secretion after the 6 h treatments. Data are shown as mean \pm SD ($n = 3$). * $p < 0.05$, statistically significant differences (independent t test). **C**, α -Synuclein-expressing cells were treated with various chemical compounds for 6 h. Cell viability was assessed with EthD-1/Hoechst staining. Data are presented as mean \pm SD ($n = 3$) and statistically analyzed by an independent t test. **D**, α -Synuclein-expressing cells were treated for 6 h with vehicle, PSI (10 nM), H_2O_2 (0.5 μM), or MPP^+ (0.25 mM). After treatment, cell homogenates and concentrated CM were analyzed by Western immunoblotting using C-20 antibody. Actin and BSA were used as loading controls. One representative immunoblot from each treatment is shown. The graph is summarizing the results of three independent experiments ($n = 3$; mean \pm SD, one-way ANOVA test followed by Tukey's test). Stauro, Staurosporin; Thapsi, thapsigargin; Meth, methionine; Iono, ionomycin.

should be noted that all compounds used for manipulation of Ca^{2+} concentration did not affect cell viability (Fig. 2C).

We next investigated whether the endocytic pathway is implicated in the process of α -synuclein externalization. Weak bases have been shown to prevent endosomal/lysosomal acidification, ultimately resulting in osmotic swelling and vacuolation of lysosomes (Poole and Ohkuma, 1981). We have initially used the lysosomotropic amine methylamine, to impair the lysosomal pathway (Lindstedt et al., 1993; Geetha and Wooten, 2008). We found that blockage of the lysosomal pathway by 2 mM methylamine caused a profound increase in the levels of secreted α -synuclein (percentage secreted α -synuclein, 3.4 ± 0.4 and $10.8 \pm 2.4\%$ for CTL and methylamine-treated cells, mean \pm SD; $n = 3$) (Fig. 2A,B) without affecting cell viability (Fig. 2C). This indicated that the endocytic pathway could be involved in α -synuclein secretion. We verified this finding by using chloroquine (CQ), which potentially perturbs membrane trafficking from endosomes to lysosomes (Andrei et al., 1999; Savina et al., 2003; Yuyama et al., 2008). Treatment with 25 μM CQ for 6 h, which resulted in obvious vacuolation (supplemental Fig. S2D, available at www.jneurosci.org as supplemental material) but not cell death (Fig. 2C), induced a significant increase in the levels of

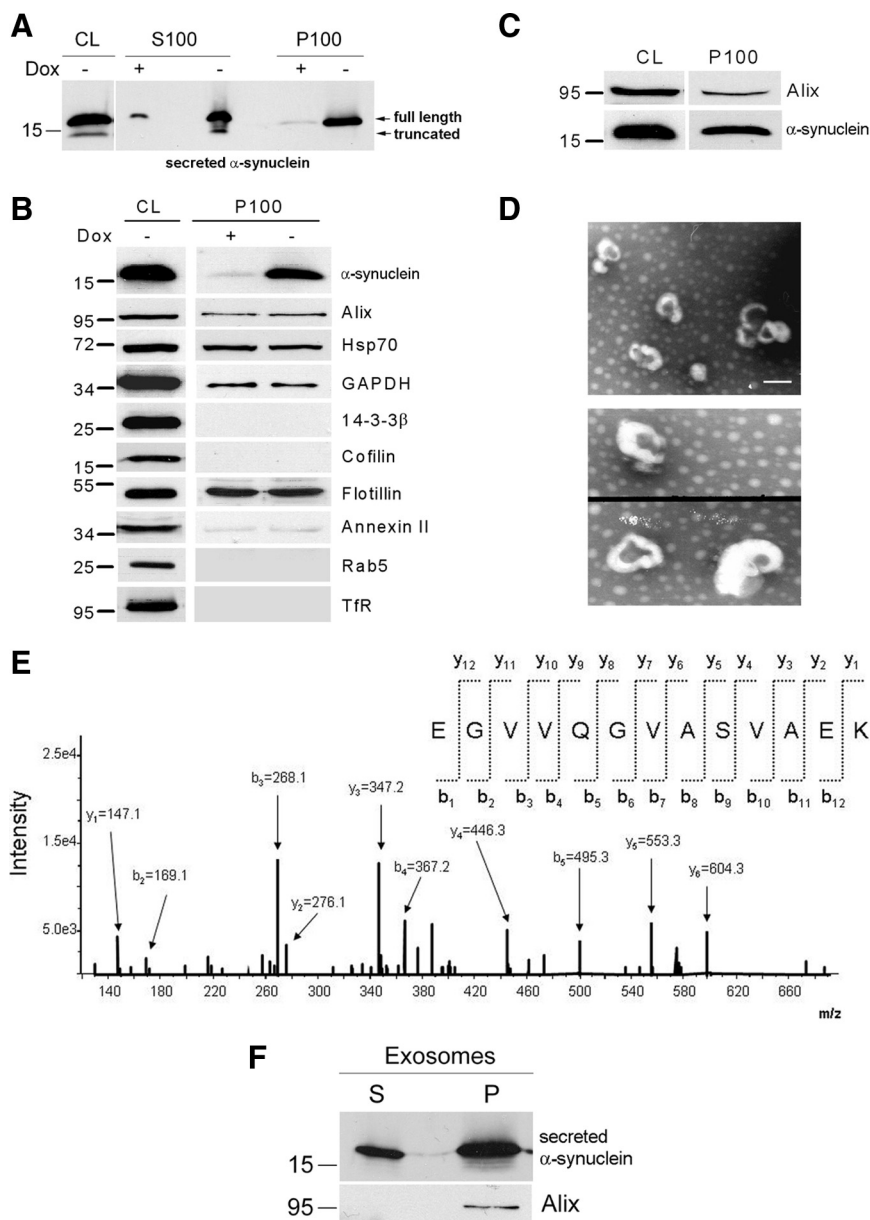


Figure 3. α -Synuclein exocytosis is mediated by membrane vesicles that resemble exosomes. **A**, α -Synuclein-expressing cells and nonexpressing CTL cells were cultured in 2% FBS for 48 h. After ultracentrifugation of the CM, the membrane (P100) and the soluble (S100) fractions were analyzed for α -synuclein with the polyclonal C-20 antibody. **B**, P100 pellets were reconstituted in RIPA buffer and analyzed by Western immunoblotting with antibodies against the proteins indicated. TfR, Transferrin receptor. **C**, P100 pellet representing pure exosomes was analyzed using antibodies against α -synuclein (C-20) and Alix. **D**, Externalized membrane vesicles were prepared as in **A**. After fixation, vesicles were negatively stained with 2% uranyl acetate and observed by electron microscopy. Scale bar, 100 nm. **E**, Analysis of externalized membrane vesicles by mass spectrometry. The annotated product ion MS² spectrum of the tryptic peptide EGVVQGVASVAEK traceable to α -synuclein is depicted. **F**, The P100 fraction containing exosomes was treated with Na₂CO₃. After a 50,000 \times g centrifugation, the integral membrane proteins were recovered in the pellet (P), whereas non-integral and lumen proteins remained in the supernatant (S). P and S were analyzed for α -synuclein by immunoblotting with the C-20 antibody.

secreted α -synuclein, although the increase was not as profound as with methylamine (percentage secreted α -synuclein, 3.6 ± 0.5 and $5.0 \pm 0.5\%$ for CTL and CQ-treated cells, mean \pm SD; $n = 3$) (Fig. 2*A,B*). We concluded that the endocytic pathway is involved in α -synuclein secretion.

Cellular stressors do not lead to alterations of α -synuclein secretion

Oxidative stress has been shown to increase α -synuclein levels and apoptosis in a variety of cell models (Sherer et al., 2002). To

examine the effect of oxidative stress on α -synuclein secretion, we treated α -synuclein-expressing cells with $0.5 \mu\text{M}$ H₂O₂ and 0.25 mM 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) for 6 h and assessed extracellular α -synuclein levels by immunoblotting using the C-20 antibody. Our results suggest that oxidative stress does not affect the levels of secreted α -synuclein in our cell system (percentage secreted α -synuclein, 2.44 ± 0.63 , 3.48 ± 0.52 , and $2.28 \pm 0.44\%$ for CTL, H₂O₂-treated, and MPP⁺-treated cells, mean \pm SD; $n = 3$) (Fig. 2*D*). In another study (Lee et al., 2005), it was demonstrated that proteasome inhibition increases intracellular and extracellular α -synuclein aggregates. To address a role of proteasomal function in α -synuclein secretion, we treated α -synuclein-expressing cells with the potent proteasome inhibitor I (PSI) (10 nM) for 6 h. Immunoblotting of the concentrated CM with the C-20 antibody revealed that proteasome inhibition did not alter extracellular α -synuclein levels (percentage secreted α -synuclein, 2.44 ± 0.63 and $2.86 \pm 0.46\%$ for CTL and PSI-treated cells, mean \pm SD; $n = 3$) (Fig. 2*D*).

In these studies, we ensured that the levels of the pharmacological stressors used did not lead to cytotoxicity (Fig. 2*C*), so as to avoid the confounding factor of leakage of α -synuclein from dying cells. We cannot therefore exclude the possibility that higher levels of these stressors could impact, in addition to viability, α -synuclein secretion.

α -Synuclein is exported in association with membrane vesicles that have the hallmarks of exosomes

We addressed the question of whether the nonclassical α -synuclein secretion occurred via externalized membrane vesicles (Cooper and Barondes, 1990; Denzer et al., 2000; van Niel et al., 2006). Extracellular membrane vesicles were precipitated from the CM of α -synuclein-expressing and nonexpressing CTL cells by centrifugation at 100,000 \times g. The supernatant (S100) and the pellet (P100) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting for the presence of α -synuclein. α -Synuclein was readily detected in both the soluble and the membrane fraction of the CM, suggesting that α -synuclein is secreted, at least in part, in association with externalized membrane vesicles (Fig. 3*A*). Interestingly, oligomeric forms of α -synuclein were also detected in the vesicle P100 fraction (supplemental Fig. S3*A*, available at www.jneurosci.org as supplemental material). To ensure that the presence of doxycycline itself or expression of α -synuclein does not interfere with the generation of these externalized vesicles, we analyzed whole P100 pellets from the CM of α -synuclein expressing (–dox) and nonexpressing CTL (+dox)

cells by highly sensitive Coomassie blue staining and found that protein patterns were identical (supplemental Fig. S3B, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

Recent studies have suggested that exosome-mediated export could play a critical role in the processing of proteins associated with neurodegenerative diseases, because β -amyloid ($A\beta$) peptides and prions were found to be externalized from cells via this pathway (Fevrier et al., 2004; Rajendran et al., 2006; Vella et al., 2008). To biochemically analyze the extracellular α -synuclein-containing vesicles, the vesicular fraction (P100) from the CM of α -synuclein-expressing and non-expressing CTL cells was prepared and subjected to SDS-PAGE and immunoblotting. We found that P100 was positive for the exosome-specific proteins Alix and flotillin, as well as for Hsp70, GAPDH, and annexin II, proteins thought to be related with exosomes (Fevrier et al., 2004; Fauré et al., 2006; Rajendran et al., 2006; Théry et al., 2006; Trajkovic et al., 2008) (Fig. 3B). In addition, proteins reported to be excluded from exosomes, such as 14-3-3 β and cofilin (Simpson et al., 2008), were both absent from P100 (Fig. 3B) (supplemental Fig. S3C, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Unlike cofilin, which was shown to be absent from the S100 fraction, 14-3-3 β was detected in the same fraction consistent with reports (Berg et al., 2003) showing the presence of 14-3-3 family members extracellularly (supplemental Fig. S3C, available at www.jneurosci.org as supplemental material). P100 also did not contain Rab5, a marker for early endosomes, or the transferrin receptor, a general marker for endosomal recycling (Fig. 3B).

To confirm that the CM of α -synuclein-expressing cells contained exosomes, we isolated pure exosomes from the CM using a validated differential ultracentrifugation procedure (Théry et al., 2006). Western immunoblotting revealed that purified, Alix-positive, exosomes (P100) contained α -synuclein (Fig. 3C). The morphological characteristics of α -synuclein-positive vesicles were analyzed by electron microscopy. Electron micrographs of P100 revealed uniformly rounded, cap-shaped vesicles with diameters in the range of 50–140 nm (mean size, 89.1 ± 2.3 nm, mean \pm SEM; $n = 77$), further arguing for the exosomal nature of these vesicles (Fig. 3D) (supplemental Fig. S3D, available at www.jneurosci.org as supplemental material). These results are in agreement with previous reports (Théry et al., 2002, 2006; Fauré et al., 2006; Vingtdeux et al., 2007; Yuyama et al., 2008). The protein composition of externalized exosomes was also analyzed using mass spectrometry. Proteomic analysis confirmed the presence of α -synuclein in the exosome pellet of α -synuclein-expressing cells (Fig. 3E). In agreement with previous studies (Wubboldt et al., 2003; Valadi et al., 2007; Simpson et al., 2008; Gonzalez-Begne et al.,

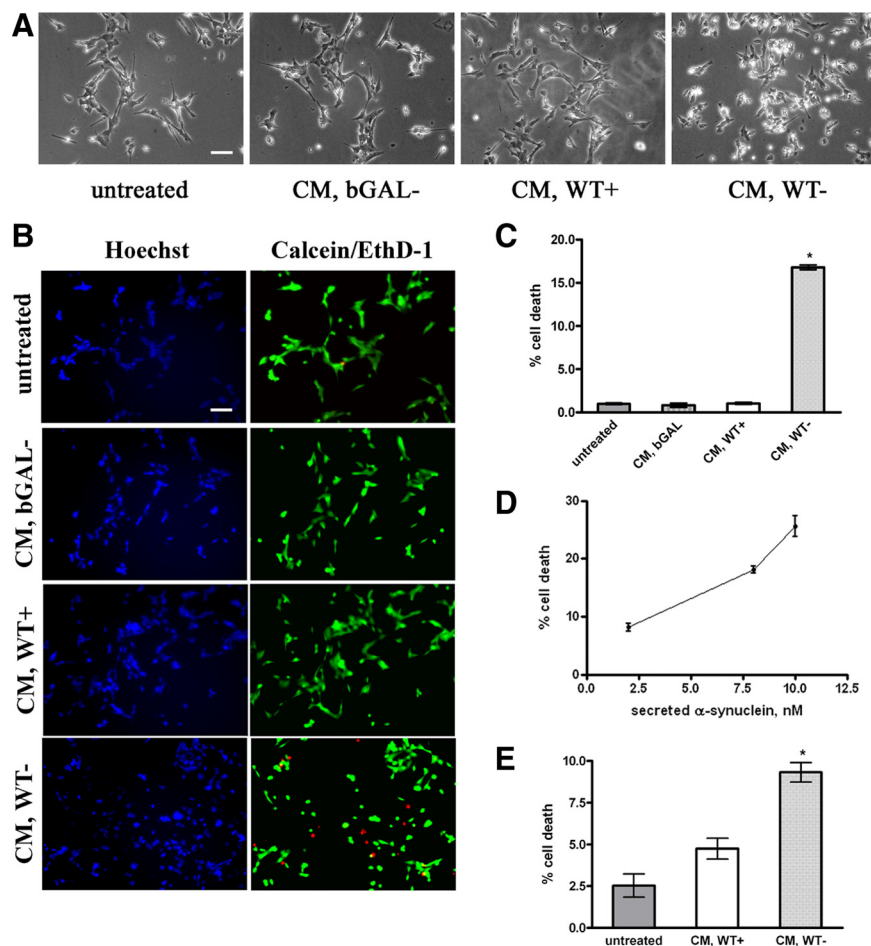


Figure 4. Secreted α -synuclein induces cell death to differentiated SH-SY5Y cells. **A**, α -Synuclein-expressing and uninduced CTL cells, as well as bGAL-expressing cells, were cultured in 2% FBS for 48 h. CM was collected and applied to differentiated SH-SY5Y cells for 24 h. Representative phase micrographs of the recipient cells are shown. Scale bar, 50 μ m. **B**, CM was prepared and used to treat recipient SH-SY5Y cells as in **A**. After 24 h, the recipient cells were stained with EthD-1 (red) and Hoechst (blue). Scale bar, 50 μ m. **C**, Percentage cell death was determined by counting the percentage ratio of EthD-1-positive cells versus the Hoechst-positive cells. Quantitative analysis demonstrated a statistically significant increase in cell death when recipient cells were treated with CM from α -synuclein-expressing cells ($n = 4$; mean \pm SD, one-way ANOVA test followed by Tukey's test, $*p < 0.001$). **D**, CM was collected from α -synuclein-expressing cells as in **A** and applied to differentiated SH-SY5Y cells for 24 h. Cell death was quantified by EthD-1/Hoechst staining. The amount of secreted α -synuclein present in the CM was determined by Western immunoblotting and recombinant α -synuclein as standard. The average of three experiments is shown. **E**, CM from α -synuclein-expressing or uninduced CTL cells were applied to cycling SH-SY5Y cells for 24 h, and the recipient cells were stained with EthD-1 and Hoechst. Quantitative analysis showed a reduction in cell viability from α -synuclein-rich CM ($n = 4$; mean \pm SD, independent t test, $*p < 0.01$).

2009), LC-MS proteomic analysis of our exosome preparation identified common, as well as cell-type-specific, proteins (supplemental table, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

Together, these data demonstrate that α -synuclein is exported via membrane vesicles that possess the characteristics of exosomes. To examine the topology of α -synuclein found in the exosomes, we treated the P100 fraction with Na_2CO_3 . Interestingly, α -synuclein was present both in the membrane (P) and the lumen (S) of Na_2CO_3 -treated exosomes (Fig. 3F).

Medium from α -synuclein-expressing cells is toxic to differentiated SH-SY5Y cells and primary cortical neurons

Recombinant α -synuclein can cause cell death when added to recipient cells (Sung et al., 2001; Zhang et al., 2005; Ahn et al., 2006). We wanted to examine whether the physiologically secreted α -synuclein from our cells could affect cell viability.

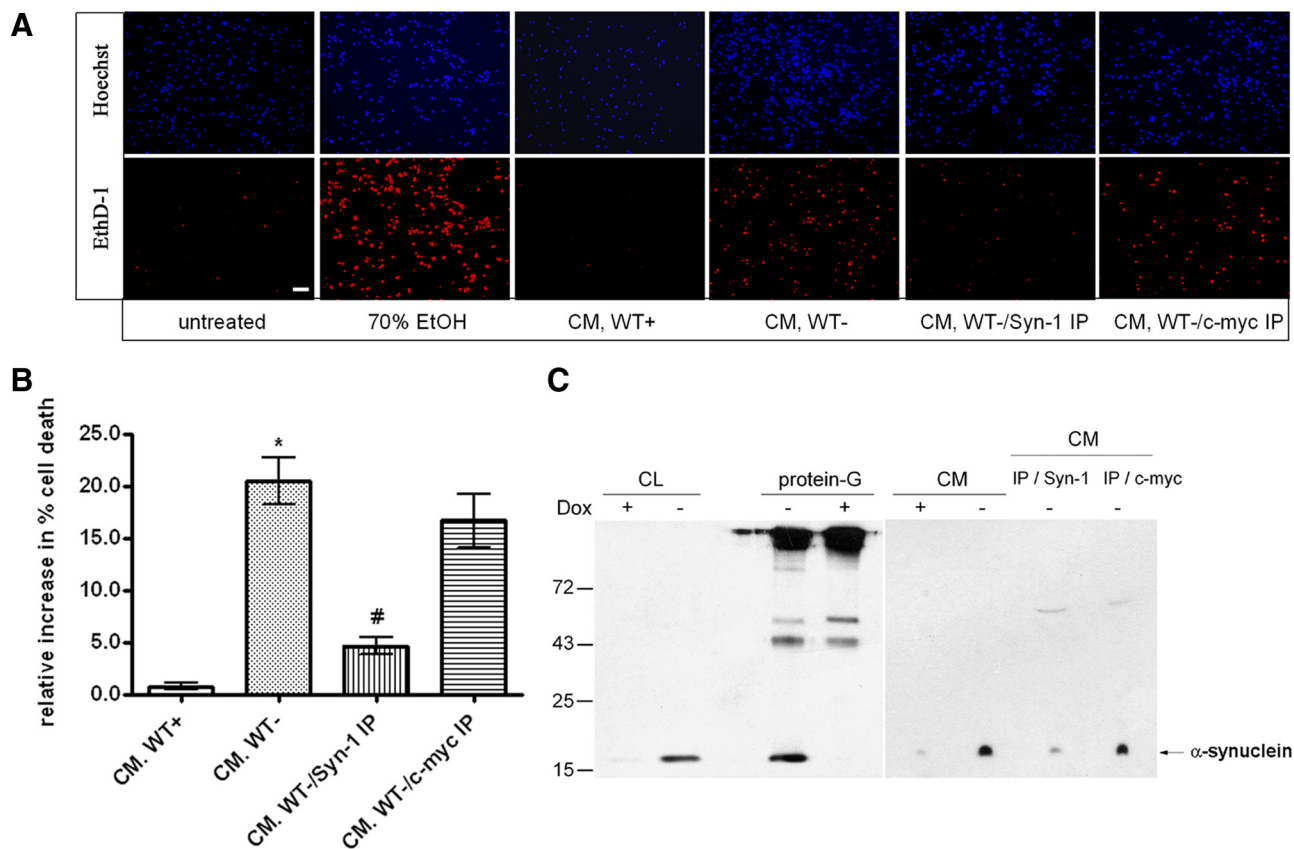


Figure 5. Immunodepletion of α -synuclein from the CM reduces CM-induced toxicity. **A**, α -Synuclein-expressing and nonexpressing CTL cells were cultured in 2% FBS for 48 h. The CM was cleared from cell debris and immunoprecipitated with antibodies to α -synuclein or c-myc. Immunodepleted and control CM were applied to rat embryonic cortical neurons for 24 h. Recipient neurons were stained with EthD-1 (red) and Hoechst (blue). Scale bar, 10 μ m. **B**, Quantification of the cell death revealed significant increases in cytotoxicity when α -synuclein was present in the CM. Immunodepletion of α -synuclein from the CM was protective against the death phenotype. Data are presented as mean \pm SD ($n = 3$) and analyzed with one-way ANOVA test followed by Tukey's test; * $p < 0.001$ comparing CM from WT+ with CM from WT-; # $p < 0.001$ comparing CM from WT- with α -synuclein-immunodepleted CM (WT-/Syn-1 IP). **C**, Cell lysates (CL) of α -synuclein-expressing (-dox) or nonexpressing CTL (+dox) cells were immunoprecipitated and Western immunoblotted with the Syn-1 antibody. α -Synuclein was successfully immunoprecipitated. α -Synuclein present in the CM of these cells was similarly immunoprecipitated. Under such conditions, the CM was almost completely depleted of α -synuclein (CM/IP/Syn-1). As expected, control immunoprecipitation using the A-14 c-myc antibody (CM/IP/c-myc) had no effect on α -synuclein levels.

α -Synuclein-expressing and nonexpressing CTL cells, as well as bGAL-expressing cells, were cultured for 48 h in 2% FBS, and the CM was applied to differentiated SH-SY5Y cells for 24 h. Application of the CM from α -synuclein-expressing cells induced drastic morphological changes to recipient cells, characteristic of cellular degeneration such as process retraction and membrane blebbing (Fig. 4A). Cell death was determined to be $\sim 17\%$ (percentage cell death, $16.8 \pm 0.6\%$, mean \pm SD; $n = 4$) (Fig. 4B,C). Cells treated with CM from uninduced SH-SY5Y cells or bGAL-expressing cells did not exhibit any abnormalities or cell death, suggesting that the observed cytotoxicity could be associated with the presence of α -synuclein in the CM. Using recombinant α -synuclein, we estimated the concentration of α -synuclein in the CM. Interestingly, cell death correlated with the amount of secreted α -synuclein present in the CM (Fig. 4D). Neuronal death was verified by assessment of caspase-3 activation in the CM-treated differentiated SH-SY5Y cells. After treatment with CM, the recipient cells were lysed and analyzed by Western immunoblotting using an antibody against the cleaved caspase-3. Caspase-3 activation was only evident when cells were treated with CM containing secreted α -synuclein (supplemental Fig. S4A, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

CM from α -synuclein-expressing and nonexpressing CTL cells was also applied to cycling SH-SY5Y cells. Treatment of

cycling cells with secreted α -synuclein-containing CM for 24 h affected cell viability (percentage cell death, 9.3 ± 1.2 and $4.8 \pm 1.3\%$ for CM from α -synuclein-expressing and CTL cells, respectively, mean \pm SD; $n = 4$) but to a lower extent compared with differentiated recipient sister cultures (Fig. 4E). Treatment of rat primary cortical neurons for 24 h with secreted α -synuclein-rich CM resulted in a profound increase in neuronal degeneration, similar to that of differentiated SH-SY5Y cells (percentage cell death, $20.5 \pm 3.8\%$, mean \pm SD; $n = 3$) (Fig. 5A,B). Importantly, effective immunodepletion of α -synuclein from the CM using the α -synuclein-specific antibody Syn-1 (Fig. 5C), before application on recipient neurons, significantly reduced neuronal loss (Fig. 5A,B), indicating that secreted α -synuclein is, to a great extent, responsible for the observed neurotoxicity. Control immunodepletion using an irrelevant antibody did not rescue primary neurons from the secreted α -synuclein-induced toxicity (Fig. 5B), further arguing that the death phenotype was attributable to the presence of α -synuclein in the CM.

Extracellular α -synuclein is internalized by proliferating SH-SY5Y cells but not differentiated SH-SY5Y cells or cortical neurons

It has been reported that recombinant α -synuclein can be internalized by cells via endocytosis (Sung et al., 2001; Zhang et al.,

2005; Ahn et al., 2006). We used ^{35}S -labeled CM as a source of secreted α -synuclein to investigate whether cell-produced externalized α -synuclein was uptaken by recipient proliferating cells. Labeled CM from bGAL-expressing cells was used as control. After ^{35}S labeling of intracellular α -synuclein (Fig. 6A, left), cells were grown in fresh medium for 16 h, and the CM containing secreted labeled α -synuclein was applied onto proliferating SH-SY5Y cells for 24 h. After a 2 min treatment with trypsin–EDTA to remove nonspecific surface protein binding, cells were lysed and immunoprecipitated with Syn-1 antibody. Autoradiography demonstrated that labeled α -synuclein could indeed be uptaken by recipient cycling cells (Fig. 6A, right). The uptake of extracellular α -synuclein did not result in the formation of intracellular inclusions as was confirmed by negative Thioflavin S staining (data not shown). Interestingly, inhibition of the lysosomal pathway of recipient cells by 1 mM NH_4Cl for 24 h exacerbated the toxicity of CM from α -synuclein-expressing cells, suggesting that uptaken α -synuclein may be degraded by the lysosome (supplemental Fig S4B, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Subcellular fractionation demonstrated the presence of labeled α -synuclein in the microsomal fraction of the recipient cells (data not shown). To investigate whether neurons also uptake secreted α -synuclein, we applied the CM containing labeled α -synuclein to differentiated SH-SY5Y cells and rat cortical neurons. Unlike proliferating cells, cell-produced labeled α -synuclein could not be detected inside neuronal cells even after prolonged film exposure (Fig. 6B). To rule out the possibility that the levels of internalized α -synuclein were too low to be detected, we applied “cold” CM from α -synuclein-expressing cells on rat cortical neuronal cultures for 16 h and checked for the presence of internalized human α -synuclein. Lysates (600 μg) were immunoprecipitated with the Syn-1 antibody and Western blotted with the human-specific LB 509 antibody. Internalization of human α -synuclein was not evident even under these conditions (supplemental Fig. S4C, available at www.jneurosci.org as supplemental material). However, a very small amount of uptaken α -synuclein could be detected in differentiated SH-SY5Y when trypsin–EDTA treatment was replaced by extensive (three times) washing with cold PBS (Fig. 6B).

It has been reported that recombinant α -synuclein can activate microglia cells (Zhang et al., 2005; Su et al., 2008). To exam-

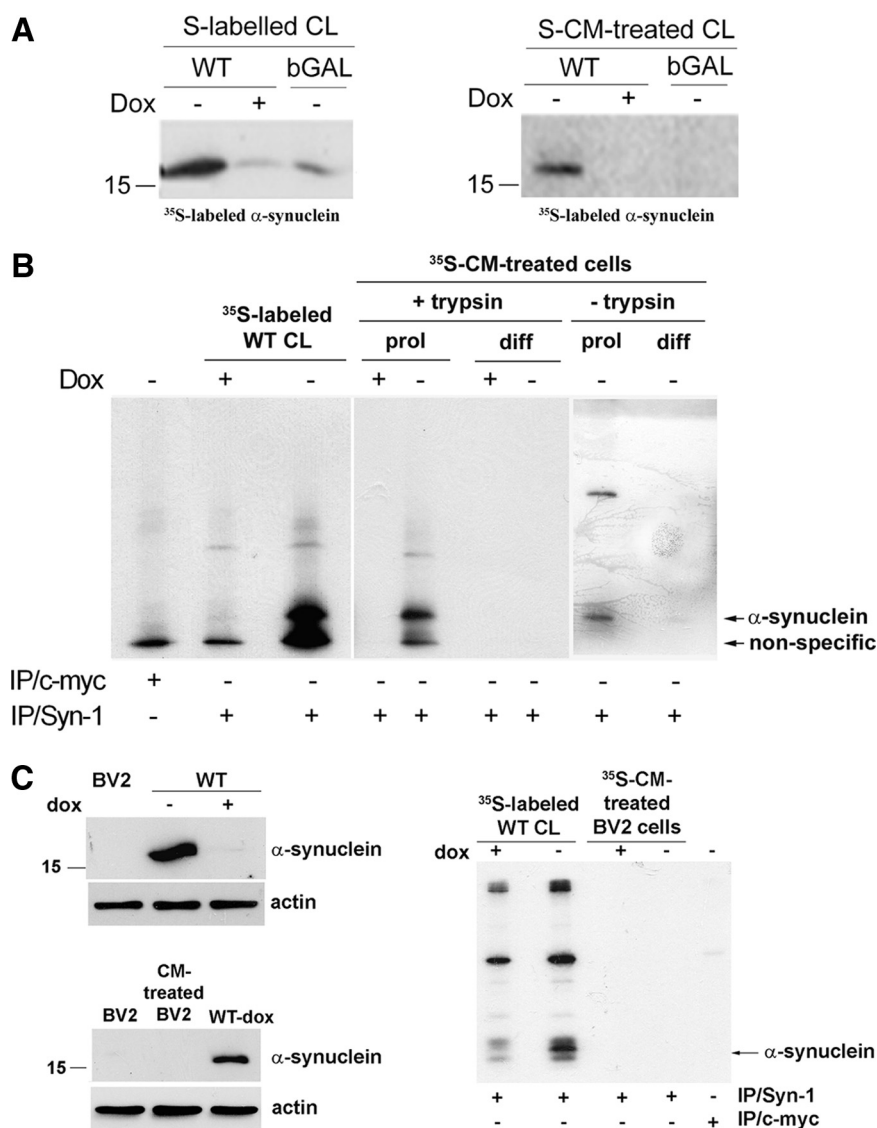


Figure 6. Externalized α -synuclein is uptaken by proliferating SH-SY5Y cells but not neuronal cells. **A**, α -Synuclein-expressing (–dox) or nonexpressing CTL (+dox) cells and bGAL-expressing (bGAL–dox) cells were ^{35}S labeled. CM from the labeled cells, containing labeled secreted proteins (see Materials and Methods), was applied to recipient cycling SH-SY5Y cells. Endogenously expressed (left) or uptaken (right) labeled α -synuclein was detected in recipient cell extracts by gel autoradiography after immunoprecipitation of the cell lysates with Syn-1 antibody. **B**, As in **A**, but c-myc immunoprecipitation was used as a negative control and CM from cells, containing abundant labeled secreted proteins, was applied to both recipient proliferating (prol) and differentiated (diff) SH-SY5Y cells. The recipient cells were either treated with trypsin–EDTA (+trypsin) or washed thoroughly (–trypsin). Gels were exposed for 30 d. **C**, Left, BV2 cell lysate was analyzed for the presence of α -synuclein by Syn-1 immunoblotting compared with cells expressing (–dox) or nonexpressing (+dox) α -synuclein. CM from α -synuclein-expressing cells (WT–dox) was collected and applied to BV2 cells. Uptake of α -synuclein by recipient BV2 cells was assessed in the cell lysates by Western immunoblotting using the Syn-1 antibody. Actin was used as loading control. Right, α -Synuclein-expressing (–dox) or nonexpressing CTL (+dox) cells were ^{35}S labeled (^{35}S -labeled WT CL). CM from the labeled cells was applied to recipient cycling BV2 cells, which were subsequently treated with trypsin–EDTA (^{35}S -CM-treated BV2 cells). Cell-produced (first and second lanes) or uptaken labeled α -synuclein (third and fourth lanes) was detected in cell extracts by gel autoradiography after immunoprecipitation of the cell lysates with Syn-1 antibody. c-myc immunoprecipitation was used as a negative control (fifth lane).

ine whether naturally secreted α -synuclein could be uptaken by microglia cells, murine BV2 microglia, which normally do not express α -synuclein (Fig. 6C, left), were treated with CM rich in α -synuclein or labeled α -synuclein for 24 h. Uptaken α -synuclein was assessed by immunoprecipitation and Western blotting. As depicted in Figure 6C, BV2 cells did not uptake extracellular α -synuclein.

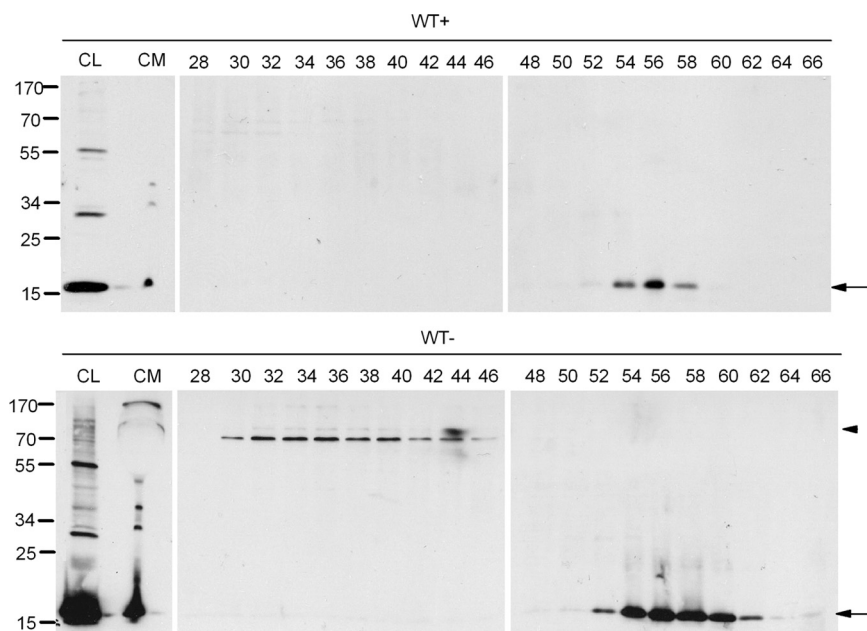


Figure 7. Extracellular α -synuclein oligomeric and monomeric species are present in CM. α -Synuclein-expressing (WT $-$) and nonexpressing CTL (WT $+$) cells were cultured in 2% FBS for 48 h. The CM was cleared from cell debris, concentrated, and fractionated by SEC. The cell lysates (CL), the concentrated CM, and the SEC fractions corresponding to WT $+$ and WT $-$ cells were further analyzed for α -synuclein with the Syn-1 antibody. Arrows show α -synuclein present in LMW fractions, and arrowhead shows α -synuclein present in HMW fractions.

clein oligomeric species were readily detected in the CM of α -synuclein-expressing cells after concentration and immunoblotting with the polyclonal C-20 antibody (Figs. 1B, 7). These results were confirmed using the monoclonal Syn-1 antibody (data not shown). To provide additional evidence for the identity of these species, the concentrated CM from α -synuclein-expressing and nonexpressing CTL cells was analyzed by SEC (supplemental Fig. S5A, available at www.jneurosci.org as supplemental material). SEC fractions were then subjected to SDS-PAGE and immunoblotting for the presence of α -synuclein using the C-20 antibody. Using this technique, HMW (>580 kDa) and LMW (<38 kDa) α -synuclein species, migrating under reducing conditions as (potentially) tetrameric and monomeric α -synuclein, respectively, were effectively identified and separated (Fig. 7). Similar results were obtained with the Syn-1 antibody (data not shown).

Treatment of CM with oligomer-interfering compounds partially rescues recipient cells from α -synuclein-induced toxicity

To investigate whether extracellular α -synuclein oligomers are critical for the observed secreted α -synuclein-induced cytotoxicity, we treated the CM with two oligomer-interfering compounds, CR and SI. CR has been shown to effectively disrupt preformed oligomeric/aggregated forms of various proteins, including mutant α -synuclein or Huntingtin (Carter and Chou, 1998; Sánchez et al., 2003; Emmanouilidou et al., 2010). SI, a cell-permeable sugar, can successfully neutralize the adverse effects of A β oligomeric species, possibly by stabilizing a nontoxic conformation of A β oligomers (McLaurin et al., 2000; Townsend et al., 2006). CM from α -synuclein-expressing cells and nonexpressing CTL cells was treated with 0.4 μ M CR or SI for 4 h at 4°C. SDS-PAGE and immunoblotting analysis of such CM after concentration revealed that, consistent with previous findings, treatment of the CM with CR caused an obvious reduction of extracellular α -synuclein oligomeric species and a simultaneous increase of monomeric α -synuclein, possibly attributable to the collapse of oligomers to

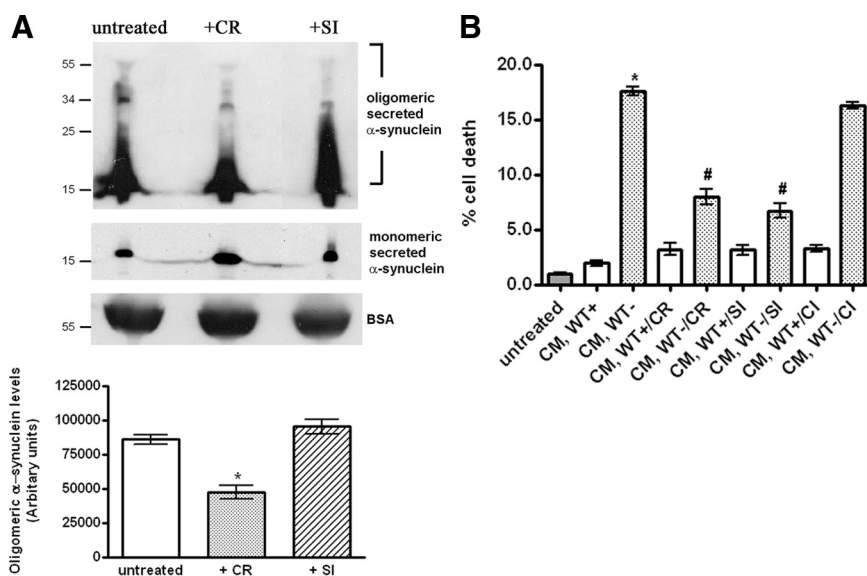


Figure 8. Treatment of secreted α -synuclein-rich CM with oligomer-interfering compounds reduces CM-induced toxicity. **A**, α -Synuclein-expressing cells were cultured in 2% FBS for 48 h. The CM was cleared from cell debris and equal parts were treated with vehicle, CR (0.4 μ M), or SI (0.4 μ M) for 4 h at 4°C. CM was then concentrated and analyzed for α -synuclein with the C-20 antibody. After treatment, the levels of secreted α -synuclein oligomers were quantified ($n = 3$; mean \pm SD, one-way ANOVA test, $*p < 0.01$). **B**, CM was collected and treated as in **A**. After treatment with the compounds, CM was applied to differentiated SH-SY5Y cells for 24 h. Survival was assayed by EthD-1/Hoechst staining. Data are shown as mean \pm SD ($n = 3$). Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA test followed by Tukey's test ($*p < 0.001$ comparing CM, WT $+$ with CM, WT $-$; $\#p < 0.001$ comparing CM, WT $-$ with CM, WT $-$ /CR or CM, WT $-$ /SI).

Both oligomeric and monomeric α -synuclein species are found extracellularly

It has been reported that the presence of soluble oligomers of α -synuclein may account for the pathogenic actions of α -synuclein, although the mechanism through which this occurs remains unresolved (Vekrellis et al., 2004). Interestingly, α -synu-

clein oligomers were readily detected in the CM of α -synuclein-expressing cells after concentration and immunoblotting with the polyclonal C-20 antibody (Figs. 1B, 7). These results were confirmed using the monoclonal Syn-1 antibody (data not shown). To provide additional evidence for the identity of these species, the concentrated CM from α -synuclein-expressing and nonexpressing CTL cells was analyzed by SEC (supplemental Fig. S5A, available at www.jneurosci.org as supplemental material). SEC fractions were then subjected to SDS-PAGE and immunoblotting for the presence of α -synuclein using the C-20 antibody. Using this technique, HMW (>580 kDa) and LMW (<38 kDa) α -synuclein species, migrating under reducing conditions as (potentially) tetrameric and monomeric α -synuclein, respectively, were effectively identified and separated (Fig. 7). Similar results were obtained with the Syn-1 antibody (data not shown).

resulted in a significant, $\sim 50\%$, reduction of toxicity from secreted α -synuclein (Fig. 8B). When CM was treated with chiroinositol (CI), an inactive isomer of SI, there was no promotion of survival of the recipient cells (Fig. 8B), indicating that the rescue effect of SI was indeed related with its anti-oligomeric action. These data suggest that naturally secreted α -synuclein oligomers are, at least in part, responsible for the α -synuclein-induced cytotoxicity in recipient cells.

SEC fractions containing either HMW or LMW secreted α -synuclein species reduce the viability of differentiated SH-SY5Y cells

Our data using CR and SI supported the notion that α -synuclein oligomers could be involved in secreted α -synuclein-induced toxicity. Because we detected several distinct α -synuclein species in the CM (Fig. 7), we wanted to examine whether the toxicity observed could be attributed to particular α -synuclein species. For this purpose, α -synuclein-expressing and nonexpressing CTL cells were cultured in 2% FBS for 48 h, and the CM was concentrated and analyzed by SEC. HMW and LMW fractions containing α -synuclein were pooled, buffer exchanged, and lyophilized. After their reconstitution in growth medium, HMW and LMW fractions were applied separately on differentiated SH-SY5Y cells for 48 h. Interestingly, both HMW and LMW fractions induced cell degeneration to recipient cells (Fig. 9A) almost to the same extent (percentage cell death, 8.9 ± 0.5 and $11.8 \pm 1.6\%$ for HMW and LMW fractions, respectively, mean \pm SD; $n = 3$) (Fig. 9B).

Discussion

Because of the lack of an ER signaling peptide from its sequence, α -synuclein was considered to be exclusively localized and exert its pathogenic effects intracellularly. However, there is emerging evidence suggesting that α -synuclein can be secreted in the extracellular space, thereby affecting the homeostasis of neighboring neurons possibly by a neuron-to-neuron transmission mechanism (Lee, 2008; Desplats et al., 2009). In the current study, using an inducible WT α -synuclein SH-SY5Y cell line, we investigated the mechanism of α -synuclein secretion and the effects of this secretion in the homeostasis of recipient neurons. Importantly, the levels of secreted α -synuclein (2–12 nm) in our cell system were similar to those reported in biological fluids (Borghi et al., 2000; El-Agnaf et al., 2003). Our data strongly support that α -synuclein is physiologically secreted in the extracellular space in association with membrane vesicles. The protein composition, morphology, and size of these vesicles were found to be similar to exosomes, small (40–100 nm), endosome-derived vesicles secreted by a multitude of cell types during fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane. In support of this idea, impairment of the endocytic pathway by weak bases resulted in a profound increase in α -synuclein secretion. Exosome-mediated exocytosis is a calcium-dependent process (Raposo et al., 1997; Savina et al., 2003, 2005). By using Ca^{2+} ionophores/chelators, we have found that α -synuclein secretion is greatly affected by

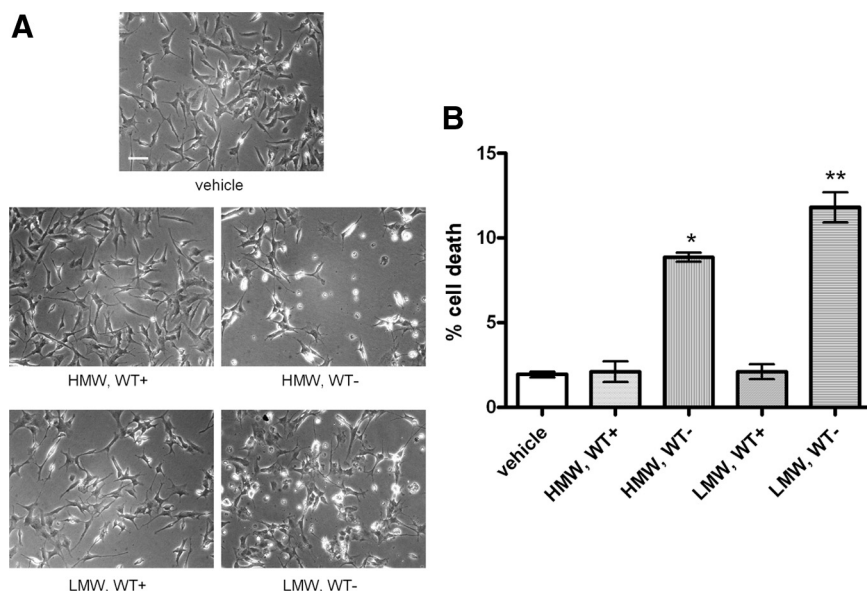


Figure 9. Isolated secreted α -synuclein oligomeric and monomeric species decrease the viability of differentiated SH-SY5Y cells. **A**, α -Synuclein-expressing and uninduced CTL cells were cultured in 2% FBS for 48 h. After removal of cell debris, the CM was fractionated by SEC. Extracellular HMW and LMW α -synuclein-containing species were collected, lyophilized, and applied to differentiated SH-SY5Y cells for 48 h. Representative phase micrographs are shown. Scale bar, 50 μm . **B**, Quantification graph presenting the increase in cell death after application of extracellular HMW or LMW α -synuclein species for 48 h ($n = 3$; mean \pm SD, one-way ANOVA test followed by Tukey's test, $*p < 0.001$, $**p = 0.001$).

changes in intracellular, but not extracellular, calcium concentration. However, we cannot exclude the possibility that alternative mechanisms for α -synuclein secretion, such as secretory vesicle-mediated exocytosis, may also operate in our cell system. Indeed, part of intracellular α -synuclein was found previously to be localized in secretory vesicles (Lee et al., 2005).

Exosomes are considered to be biologically active entities that can interact with recipient cells in a variety of ways, such as endocytosis, receptor-ligand binding, attachment, or fusion with the plasma membrane (Théry et al., 2002; Vincent and Magee, 2002; Keller et al., 2006; van Niel et al., 2006). Alternatively, extracellular degradation of the exosomal membrane by proteases or lipases could allow the release of proteins from the exosomal lumen to the extracellular matrix (Mehul and Hughes, 1997; Hughes, 1999). Initially, the release of exosomes was considered to be a cellular mechanism of clearing unnecessary proteins (Pan et al., 1985; Johnstone et al., 1987; van Niel et al., 2006; Vella et al., 2008). The novel finding that α -synuclein can be exported from the cell via the exosomal pathway provides a common pathway for the delivery of a potentially toxic protein in the extracellular space, thereby spreading its pathogenic actions in neighboring healthy cells. Interestingly, exosomes bearing prions were efficient initiators of prion propagation in uninfected recipient cells and produced prion disease when inoculated into mice (Fevrier et al., 2004; Vella et al., 2007, 2008). β -Amyloid peptides of intracellular origin were found to be released in association with exosomes (Rajendran et al., 2006). Moreover, cultured cortical neurons can secrete exosomes (Fauré et al., 2006). In this context, our data support the Trojan Horse hypothesis in which neurodegeneration results from the progressive propagation of pathogenic events, cell by cell, throughout brain areas (Caughey, 2000; Ghidoni et al., 2008; Lee, 2008). The finding that grafted healthy neurons can gradually develop α -synuclein pathology as host neurons many years after transplantation provides additional support for a prion-like mechanism for the spread of PD

(Brundin et al., 2008). However, it remains unclear whether internalization of released α -synuclein or some other factor is responsible for the development of α -synuclein deposits in the transplanted cells.

We show that CM containing soluble secreted α -synuclein can cause cell death to healthy recipient cells that is associated with caspase-3 activation. Degeneration was greatly amplified when the recipient cells have a neuronal phenotype, such as differentiated SH-SY5Y cells or primary cortical neurons. The cell death was associated with secreted α -synuclein because immunodepletion of α -synuclein from the CM significantly ameliorated the cytotoxic effects. Importantly, death correlated with extracellular α -synuclein concentration.

CM from WT-expressing SH-SY5Y cells was found to contain soluble monomeric and oligomeric α -synuclein. We isolated HMW and LMW secreted α -synuclein species and evaluated their toxicity. Both species decreased the viability of recipient differentiated neuroblastoma cells. Our data indicate that presence of either cell-derived HMW or LMW α -synuclein species extracellularly can decrease cell viability, suggesting that high n -oligomeric or low n -monomeric α -synuclein could act in a synergistic way to trigger neurodegeneration. Importantly, the molar amount of HMW α -synuclein was much lower than that of LMW α -synuclein, suggesting that, on a molar basis, HMW oligomeric α -synuclein exerted greater cytotoxicity.

Further supporting a critical role for the extracellular α -synuclein oligomers, treatment of the CM with oligomer-interfering compounds, such as CR and SI, partially rescued the recipient cells from α -synuclein-induced toxicity. In a number of studies, CR has been used to disrupt β -sheet-rich species, including α -synuclein, huntingtin, and $A\beta$ (Heiser et al., 2000; Sánchez et al., 2003; Inouye and Kirschner, 2005). Indeed, CR dissociated the α -synuclein oligomeric species contained in the CM. Although CR did not affect the integrity of the exosomes in the CM, we cannot exclude the possibility that CR may also act by preventing the interaction of exosomes with the plasma membrane. The mechanism by which SI interacts with β -sheet conformations is not known. In our hands, SI did not disrupt the extracellular α -synuclein oligomeric species, nor did it affect exosomal integrity. This is consistent with our previous finding that SI does not disrupt intracellular α -synuclein oligomeric species despite its survival-promoting effects (Vekrellis et al., 2009). It has been hypothesized that SI could stabilize a nontoxic oligomeric conformation preventing the production of the more toxic protofibrils (McLaurin et al., 2000; Townsend et al., 2006).

Critical to the understanding of the toxic effects of secreted α -synuclein is the issue of whether it is internalized by recipient cells. In our hands, secreted α -synuclein appears to be readily uptaken by cycling SH-SY5Y cells but not to any significant degree by neuronal cells or microglia. This difference may point to cell-type-specific mechanisms of uptake. This may be especially applicable to oligomeric species, which, because of their low abundance, cannot be detected by autoradiography in our hands. Recent evidence suggests that α -synuclein uptake by neuronal cells depends highly on its fibrillarization state. Furthermore, cationic liposomes have been shown to be necessary for the delivery of fibrillar recombinant α -synuclein inside neuronal cells (Luk et al., 2009). Because we can only detect soluble but not fibrillar α -synuclein species in the medium of our cells, it is possible that these do not efficiently enter recipient neurons. Lee et al. (2008) have also suggested that aggregated α -synuclein is internalized more efficiently, and via a different pathway, compared with the monomeric protein. However, caution is needed in the interpretation

of these results, because they are based on very high amounts of the recombinant protein.

Although we cannot exclude the possibility that secreted α -synuclein exerts its toxic effects by uptake into recipient cells, in which it could impact cellular homeostasis in various ways, for example via disruption of protein degradation pathways (Sánchez et al., 2003; Inouye and Kirschner, 2005), the fact that these effects are more pronounced in neuronal cells in which limited uptake is detected raises the possibility that they are mediated extracellularly at the level of cell membrane. It is tempting to speculate that extracellular secreted α -synuclein could trigger degeneration via a specific signaling process. This process could be initiated by an interaction of secreted α -synuclein with the plasma membrane, possibly through a specialized, so far unidentified, receptor. Alternatively, and according to the amyloid pore model, the interaction of secreted α -synuclein with cellular membranes could result in pore formation, which greatly compromises membrane integrity, and lead to neuronal degeneration via the creation of significant alterations in the equilibrium of ions and small metabolites between the cytoplasm and the extracellular space (Heiser et al., 2000; Volles et al., 2001; Volles and Lansbury, 2003). In support of this idea, in a number of studies pre-formed α -synuclein protofibrils generated from recombinant α -synuclein have been shown to cause neurotoxicity when added to the culture medium of healthy cells (El-Agnaf et al., 1998; Du et al., 2003; Zhang et al., 2005).

In conclusion, we demonstrate here that α -synuclein is secreted from neuronal cells in a calcium-dependent manner by exosomes and that, at physiological concentrations, it can impact the viability of neighboring neurons. Oligomeric secreted α -synuclein species are in part responsible for these effects. These findings provide an understanding of the mechanism of spread of pathology in PD and offer the opportunity to modulate this process at either the level of secretion of α -synuclein or the level of its impact on neighboring cells.

References

- Ahn KJ, Paik SR, Chung KC, Kim J (2006) Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of alpha-synuclein. *J Neurochem* 97:265–279.
- Albani D, Peverelli E, Rametta R, Batelli S, Veschini L, Negro A, Forloni G (2004) Protective effect of TAT-delivered alpha-synuclein: relevance of the C-terminal domain and involvement of HSP70. *FASEB J* 18:1713–1715.
- Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, Rubartelli A (1999) The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell* 10:1463–1475.
- Barclay JW, Morgan A, Burgoyne RD (2005) Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell Calcium* 38:343–353.
- Berg D, Holzmann C, Riess O (2003) 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 4:752–762.
- Borghi R, Marchese R, Negro A, Marinelli L, Forloni G, Zaccheo D, Abbruzzese G, Tabaton M (2000) Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. *Neurosci Lett* 287:65–67.
- Brundin P, Li JY, Holton JL, Lindvall O, Revesz T (2008) Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. *Nat Rev Neurosci* 9:741–745.
- Carter DB, Chou KC (1998) A model for structure-dependent binding of Congo red to Alzheimer beta-amyloid fibrils. *Neurobiol Aging* 19:37–40.
- Caughey B (2000) Transmissible spongiform encephalopathies, amyloidoses and yeast prions: common threads? *Nat Med* 6:751–754.
- Chang HC, Samanigo F, Nair BC, Buonaguro L, Ensoli B (1997) HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *AIDS* 11:1421–1431.
- Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln

- S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destée A (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1167–1169.
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT Jr (2000) Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:571–576.
- Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT Jr (2001) Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 294:1346–1349.
- Cooper DN, Barondes SH (1990) Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol* 110:1681–1691.
- Denzer K, Kleijmeier MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ (2000) Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* 113:3365–3374.
- Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, Spencer B, Masliah E, Lee SJ (2009) Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13010–13015.
- Du HN, Tang L, Luo XY, Li HT, Hu J, Zhou JW, Hu HY (2003) A peptide motif consisting of glycine, alanine, and valine is required for the fibrillization and cytotoxicity of human alpha-synuclein. *Biochemistry* 42:8870–8878.
- El-Agnaf OM, Jakes R, Curran MD, Middleton D, Ingenito R, Bianchi E, Pessi A, Neill D, Wallace A (1998) Aggregates from mutant and wild-type alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments. *FEBS Lett* 440:71–75.
- El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, Curran MD, Court JA, Mann DM, Ikeda S, Cookson MR, Hardy J, Allsop D (2003) Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J* 17:1945–1947.
- El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Curran MD, Gibson MJ, Court JA, Schlossmacher MG, Allsop D (2006) Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 20:419–425.
- Emmanouilidou E, Stefanis L, Vekrellis K (2010) Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiol Aging* 31:953–968.
- Fauré J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, Grange J, Schoehn G, Goldberg Y, Boyer V, Kirchhoff F, Raposo G, Garin J, Sadoul R (2006) Exosomes are released by cultured cortical neurons. *Mol Cell Neurosci* 31:642–648.
- Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G (2004) Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9683–9688.
- Fujiki Y, Hubbard AL, Fowler S, Lazarow PB (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 93:97–102.
- Geetha T, Wooten MW (2008) TrkA receptor endolysosomal degradation is both ubiquitin and proteasome dependent. *Traffic* 9:1146–1156.
- Ghidoni R, Benussi L, Binetti G (2008) Exosomes: the Trojan horses of neurodegeneration. *Med Hypotheses* 70:1226–1227.
- Goldberg MS, Lansbury PT Jr (2000) Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol* 2:E115–E119.
- Gonzalez-Begne M, Lu B, Han X, Hagen FK, Hand AR, Melvin JE, Yates JR (2009) Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multi-dimensional protein identification technology (MudPIT). *J Proteome Res* 8:1304–1314.
- Heiser V, Scherzinger E, Boeddrich A, Nordhoff E, Lurz R, Schugardt N, Lehrach H, Wanker EE (2000) Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: implications for Huntington's disease therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6739–6744.
- Hughes RC (1999) Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1473:172–185.
- Ibáñez P, Bonnet AM, Débarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Dürr A, Brice A (2004) Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1169–1171.
- Inouye H, Kirschner DA (2005) Alzheimer's beta-amyloid: insights into fibril formation and structure from Congo red binding. *Subcell Biochem* 38:203–224.
- Jackson A, Friedman S, Zhan X, Engleka KA, Forough R, Maciag T (1992) Heat shock induces the release of fibroblast growth factor 1 from NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10691–10695.
- Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 262:9412–9420.
- Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P (2006) Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett* 107:102–108.
- Klinkspoor JH, Tytgat GN, Lee SP, Groen AK (1996) Mechanism of bile salt-induced mucin secretion by cultured dog gallbladder epithelial cells. *Biochem J* 316:873–877.
- Kouri ED, Labrou NE, Garbis SD, Kalliampakou KI, Stedel C, Dimou M, Udvardi MK, Katinakis P, Flietakis E (2009) Molecular and biochemical characterization of the parvulin-type PPIases in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 150:1160–1173.
- Lanzetti L (2007) Actin in membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 19:453–458.
- Lee HJ, Patel S, Lee SJ (2005) Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci* 25:6016–6024.
- Lee HJ, Suk JE, Bae EJ, Lee JH, Paik SR, Lee SJ (2008) Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1835–1849.
- Lee SJ (2008) Origins and effects of extracellular alpha-synuclein: implications in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 34:17–22.
- Lindstedt R, Apodaca G, Barondes SH, Mostov KE, Leffler H (1993) Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *J Biol Chem* 268:11750–11757.
- Luk KC, Song C, O'Brien P, Stieber A, Branch JR, Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM (2009) Exogenous α -synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20051–20056.
- McLaurin J, Golomb R, Jurewicz A, Antel JP, Fraser PE (2000) Inositol stereoisomers stabilize an oligomeric aggregate of Alzheimer amyloid beta peptide and inhibit A β -induced toxicity. *J Biol Chem* 275:18495–18502.
- Mehul B, Hughes RC (1997) Plasma membrane targeting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J Cell Sci* 110:1169–1178.
- Melchior F, Gerace L (1995) Mechanisms of nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol* 7:310–318.
- Mills IG, Urbé S, Clague MJ (2001) Relationships between EEA1 binding partners and their role in endosome fusion. *J Cell Sci* 114:1959–1965.
- Olanow CW, Perl DP, DeMartino GN, McNaught KS (2004) Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol* 3:496–503.
- Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 101:942–948.
- Poole B, Ohkuma S (1981) Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. *J Cell Biol* 90:665–669.
- Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, Simons K (2006) Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11172–11177.
- Raposo G, Tenza D, Mecheri S, Peronet R, Bonnerot C, Desaymard C (1997) Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell* 8:2631–2645.
- Rideout HJ, Larsen KE, Sulzer D, Stefanis L (2001) Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *J Neurochem* 78:899–908.
- Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R (1990) A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J* 9:1503–1510.
- Sánchez I, Mählke C, Yuan J (2003) Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature* 421:373–379.
- Saraste J, Palade GE, Farquhar MG (1986) Temperature-sensitive steps in

- the transport of secretory proteins through the Golgi complex in exocrine pancreatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:6425–6429.
- Savina A, Furlán M, Vidal M, Colombo MI (2003) Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem* 278:20083–20090.
- Savina A, Fader CM, Damiani MT, Colombo MI (2005) Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* 6:131–143.
- Seino S, Shibasaki T (2005) PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev* 85:1303–1342.
- Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov AV, Cookson MR, Greenamyre JT (2002) An *in vitro* model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered α -synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci* 22:7006–7015.
- Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW (2008) Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* 8:4083–4099.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blacato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003) α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302:841.
- Smolian H, Aurer A, Sittlinger M, Zacher J, Bernimoulin JP, Burmester GR, Kolkenbrock H (2001) Secretion of gelatinases and activation of gelatinase A (MMP-2) by human rheumatoid synovial fibroblasts. *Biol Chem* 382:1491–1499.
- Su X, Maguire-Zeiss KA, Giuliano R, Prifti L, Venkatesh K, Federoff HJ (2008) Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 29:1690–1701.
- Sung JY, Kim J, Paik SR, Park JH, Ahn YS, Chung KC (2001) Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of α -synuclein. *J Biol Chem* 276:27441–27448.
- Sung JY, Park SM, Lee CH, Um JW, Lee HJ, Kim J, Oh YJ, Lee ST, Paik SR, Chung KC (2005) Proteolytic cleavage of extracellular secreted α -synuclein via matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 280:25216–25224.
- Tanudji M, Hevi S, Chuck SL (2002) Improperly folded green fluorescent protein is secreted via a non-classical pathway. *J Cell Sci* 115:3849–3857.
- Thastrup O, Cullen PJ, Dröbak BK, Hanley MR, Dawson AP (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2466–2470.
- Théry C, Zitvogel L, Amigorena S (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2:569–579.
- Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3:Unit 3.22.
- Townsend M, Cleary JP, Mehta T, Hofmeister J, Lesne S, O'Hare E, Walsh DM, Selkoe DJ (2006) Orally available compound prevents deficits in memory caused by the Alzheimer amyloid-beta oligomers. *Ann Neurol* 60:668–676.
- Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwillie P, Brügger B, Simons M (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319:1244–1247.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9:654–659.
- van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G (2006) Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem* 140:13–21.
- Vekrellis K, Rideout HJ, Stefanis L (2004) Neurobiology of α -synuclein. *Mol Neurobiol* 30:1–21.
- Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Stefanis L (2009) Inducible overexpression of wild type α -synuclein in human neuronal cells leads to caspase-dependent non-apoptotic death. *J Neurochem* 109:1348–1362.
- Vella LJ, Sharples RA, Lawson VA, Masters CL, Cappai R, Hill AF (2007) Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol* 211:582–590.
- Vella LJ, Sharples RA, Nisbet RM, Cappai R, Hill AF (2008) The role of exosomes in the processing of proteins associated with neurodegenerative diseases. *Eur Biophys J* 37:323–332.
- Vincent JP, Magee T (2002) Argosomes: membrane fragments on the run. *Trends Cell Biol* 12:57–60.
- Vingtdeux V, Hamdane M, Loyens A, Gelé P, Drobeck H, Bégard S, Galas MC, Delacourte A, Beauvillain JC, Buée L, Sergeant N (2007) Alkalinizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *J Biol Chem* 282:18197–18205.
- Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L (2008) Wild type α -synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem* 283:23542–23556.
- Volles MJ, Lansbury PT Jr (2003) Zeroing in on the pathogenic form of α -synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry* 42:7871–7878.
- Volles MJ, Lee SJ, Rochet JC, Shtilerman MD, Ding TT, Kessler JC, Lansbury PT Jr (2001) Vesicle permeabilization by protofibrillar α -synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry* 40:7812–7819.
- Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Möbius W, Hoernschemeyer J, Slot JW, Geuze HJ, Stoorvogel W (2003) Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 278:10963–10972.
- Yuyama K, Yamamoto N, Yanagisawa K (2008) Accelerated release of exosome-associated GM1 ganglioside (GM1) by endocytic pathway abnormality: another putative pathway for GM1-induced amyloid fibril formation. *J Neurochem* 105:217–224.
- Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, Wilson B, Zhang W, Zhou Y, Hong JS, Zhang J (2005) Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J* 19:533–542.

Supplemental material

Figure S1

(A) The presence of α -synuclein in the CM is not due to cell membrane leakage. SH-SY5Y cells were cultured in the presence or absence of dox for 8 days in 10 % FBS. After that period, the culture medium was replaced with 2 % FBS medium and the CM was collected after 48 hours. Cell lysates (CL) and concentrated CM (CM) were analyzed by western immunoblotting with antibodies to PKC α , 19S Rpt6 proteasome subunit and α -synuclein. ERK and BSA levels were used as loading controls. (B) BFA disrupts the Golgi compartment. α -synuclein-expressing cells were treated with 2 μ g/ml BFA or vehicle for 6 hours. The Golgi compartment was labeled by immunostaining using anti-GM130 antibody (red). Nuclei were stained with Hoechst dye (blue). After staining, cells were visualized with confocal microscopy. Scale bar: 10 μ m. (C) α -Synuclein secretion is increased in elevated temperatures. α -synuclein-expressing cells were cultured in 2 % FBS at 37 or 40 $^{\circ}$ C (top) or 37 or 25 $^{\circ}$ C (bottom) for 6 hours. Cell homogenates and concentrated CM were analyzed by Western immunoblotting with antibodies to α -synuclein and Hsp70. Actin and BSA were used as loading controls. Data are presented as the mean \pm SD and analyzed by an independent t-test ($n = 3$, * $p < 0.05$). (D) α -Synuclein secretion is affected by changes in serum content. α -synuclein-expressing cells were cultured in 0, 2, and 5 % FBS for 6 hours. Differences in the levels of % secreted α -synuclein following serum deprivation are shown ($n = 3$, mean \pm SD, independent t-test, * $p < 0.0005$).

Figure S2

(A) CytoD treatment results in retraction of cell processes. α -synuclein expressing cells were treated with 2 μ M CytoD or vehicle for 6 hours. Cells were stained with phalloidin conjugated to Alexa 633 and visualized by fluorescence microscopy. Scale bar: 10 μ m. (B) Staurosporin inhibits PKC phosphorylation. α -synuclein expressing and non expressing CTL cells were treated with 100 nM staurosporin for 6 hours. Cell lysates and concentrated CM were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting using antibodies against α -synuclein, pMARCKS and PKC α . γ -tubulin and BSA are shown as loading controls. (C) CQ

treatment causes vacuolation in SHSY5Y cells. α -synuclein expressing cells (WT-) were treated with 25 μ M CQ or vehicle, for 6 hours. Characteristic photomicrographs are shown. Scale bar: 50 μ m. (D) Ionomycin-induced secretion of oligomeric and monomeric α -synuclein species. Representative immunoblot showing the levels of extracellular oligomeric and monomeric α -synuclein following 6-hour treatment with ionomycin (100 nM).

Figure S3

(A) α -synuclein oligomers are present in exosomes. α -synuclein expressing cells (-dox) and non expressing CTL cells (+dox) were cultured in 2 % FBS for 48 hours. After ultracentrifugation of the CM, the membrane (P100) and the soluble fraction (S100) were analyzed for α -synuclein with the polyclonal C-20 antibody. A low (left) and a high (right) exposure of the immunoblot are shown. (B) α -synuclein expressing cells (-dox) and non expressing CTL cells (+dox) were cultured in 2 % FBS for 48 hours. After ultracentrifugation of the CM, the membrane (P100) pellets were reconstituted in RIPA buffer and analyzed by SDS-PAGE. Protein bands were stained by SimplyBlue Safestain (Invitrogen). (C) 14-3-3 β and cofilin are excluded from exosomes. CM was ultracentrifuged as in (A). The membrane P100 fraction, containing exosomes, and the soluble S100 fraction were analyzed by western immunoblotting with antibodies against 14-3-3 β and cofilin. (D) Frequency distribution of exosomes isolated from SHSY5Y cells expressing α -synuclein. A total of 77 vesicles were measured (mean \pm SEM = 89.1 \pm 2.3, minimum value = 48.8 nm, maximum value = 141.4 nm, Skewness = 0.263, Kurtosis = -0.005). Statistical analysis was performed using SPSS 15.0 software.

Figure S4

(A) Caspase-3 is activated in the recipient cells following application of α -synuclein-rich CM. CM was collected (see Materials and Methods) from α -synuclein-expressing and uninduced CTL cells, as well as bGAL-expressing cells and applied to differentiated SH-SY5Y cells for 24 hours. The recipient cells were harvested, lysed and analyzed for the presence of cleaved caspase-3 by western immunoblotting using an antibody that specifically recognizes processed forms of caspase 3. Actin is used as loading control.

Staurosporin (2.5 μ M for 16 hours) was applied at bGAL expressing cells as a positive control for caspase-3 cleavage. (B) Lysosome inhibition exacerbates CM-induced cytotoxicity. Cycling SH-SY5Y cells were treated with CM from α -synuclein expressing (WT-) or non expressing CTL (WT+) cells in the absence or the presence of the lysosomal inhibitor, NH₄Cl (1 mM), for 24 hours. Cell death was determined using EthD-1 / Hoechst staining. Data are shown as mean \pm SD (n = 3). Statistical analysis was performed using the one way ANOVA test followed by Tukey's test ($p < 0.05$, comparing CM, WT+ with CM, WT-, $^{\#}p < 0.05$ comparing CM, WT- to CM, WT-/NH₄Cl, NS, no significant difference comparing CM, WT+ to CM, WT+ / NH₄Cl). (C) Rat cortical neurons do not uptake secreted α -synuclein. Cell lysates (CL) from α -synuclein-expressing (-dox) or non-expressing CTL (+dox) cells were immunoprecipitated with the Syn-1 antibody. α -synuclein was detected by western immunoblotting using the human specific LB509 antibody. The CM from these cells, containing secreted proteins, was applied to rat cortical neurons. Following cell lysis, α -synuclein was immunoprecipitated from cell extracts with Syn-1 antibody and precipitates were analyzed for the presence of α -synuclein by western immunoblotting using the human specific LB 509 antibody.

Figure S5

(A) Chromatographic profile of concentrated CM following gel filtration analysis. α -synuclein-expressing (WT-) and non-expressing CTL (WT+) cells were cultured in 2 % FBS for 48 hours. The CM was cleared from cell debris, concentrated and analyzed by SEC as described in Materials and Methods. A representative chromatograph is shown. Protein markers are: blue dextran (2 MDa), thyroglobulin (669 kDa), apoferritin (443 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrome c (12.5 kDa). (B) CR and SI do not compromise the membrane integrity of exosomes in the CM. CM from α -synuclein-expressing cells was treated with 0.4 μ M CR or SI for 4 hours at 4 $^{\circ}$ C. Following treatment, CM was centrifuged at 100,000 \times g for 2 hours at 4 $^{\circ}$ C to pellet exosomes. The pellet was diluted in 25 μ l of 2 % PFA / 100 mM Na₂HPO₄ and further analyzed by electron microscopy for the presence of intact exosomes.

Supplementary Table

Proteomic results from LC-MS/MS analysis of exosomes from SH-SY5Y cells expressing α -synuclein.

Proteins of SH-SY5Y exosomes were isolated as described in Materials and Methods section, trypsinized and analyzed by mass spectrometry. The experiment was repeated three times. All proteins identified are shown in the table.

FIGURE S1

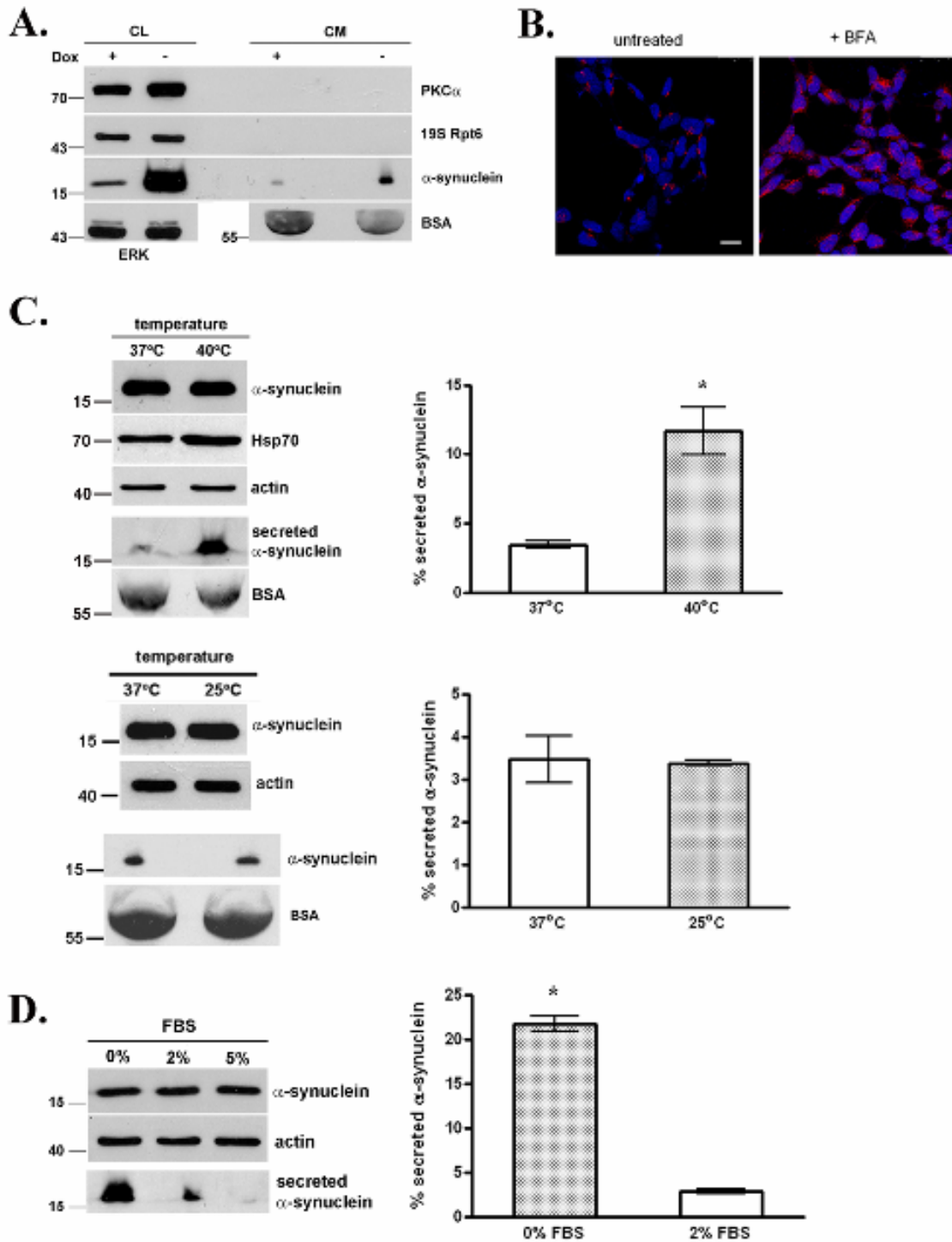


FIGURE S2

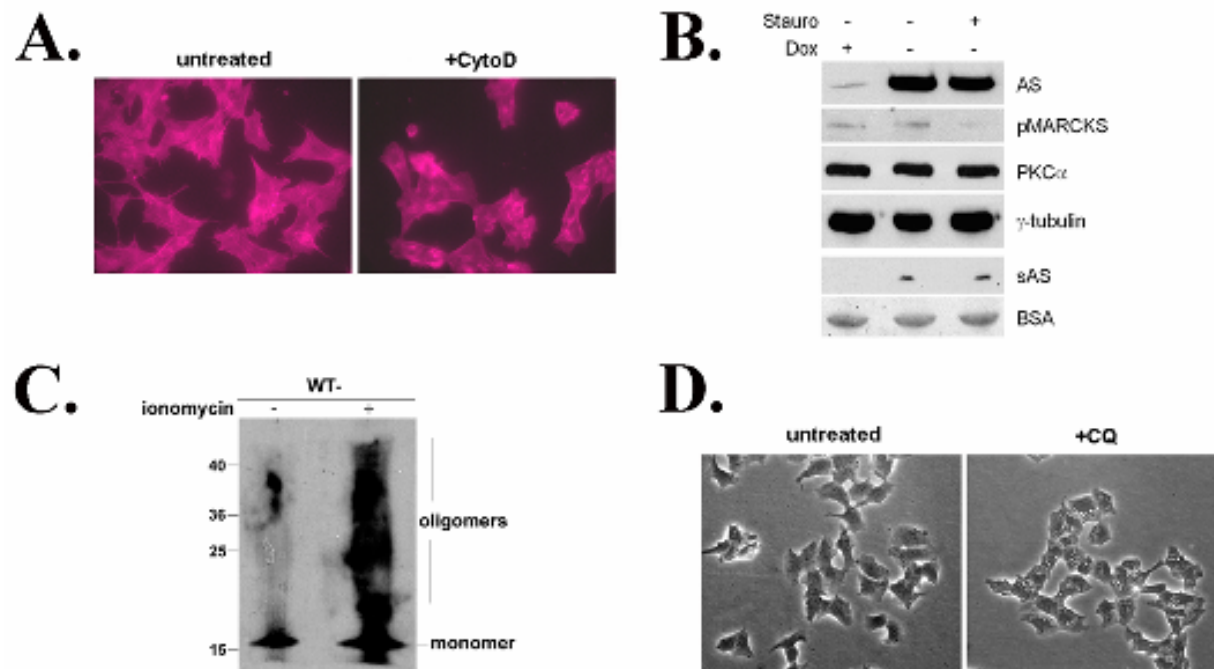


FIGURE S3

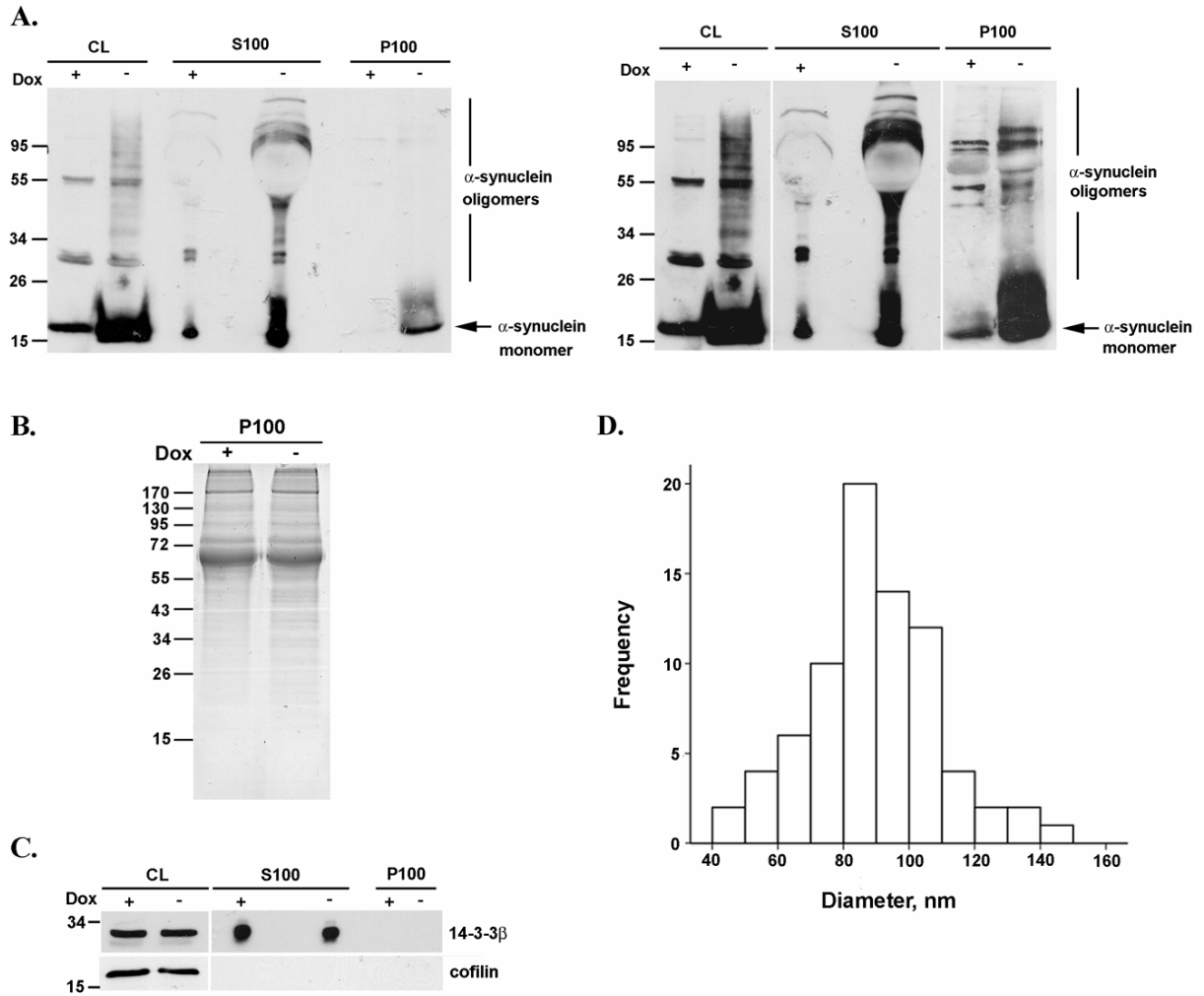


FIGURE S4

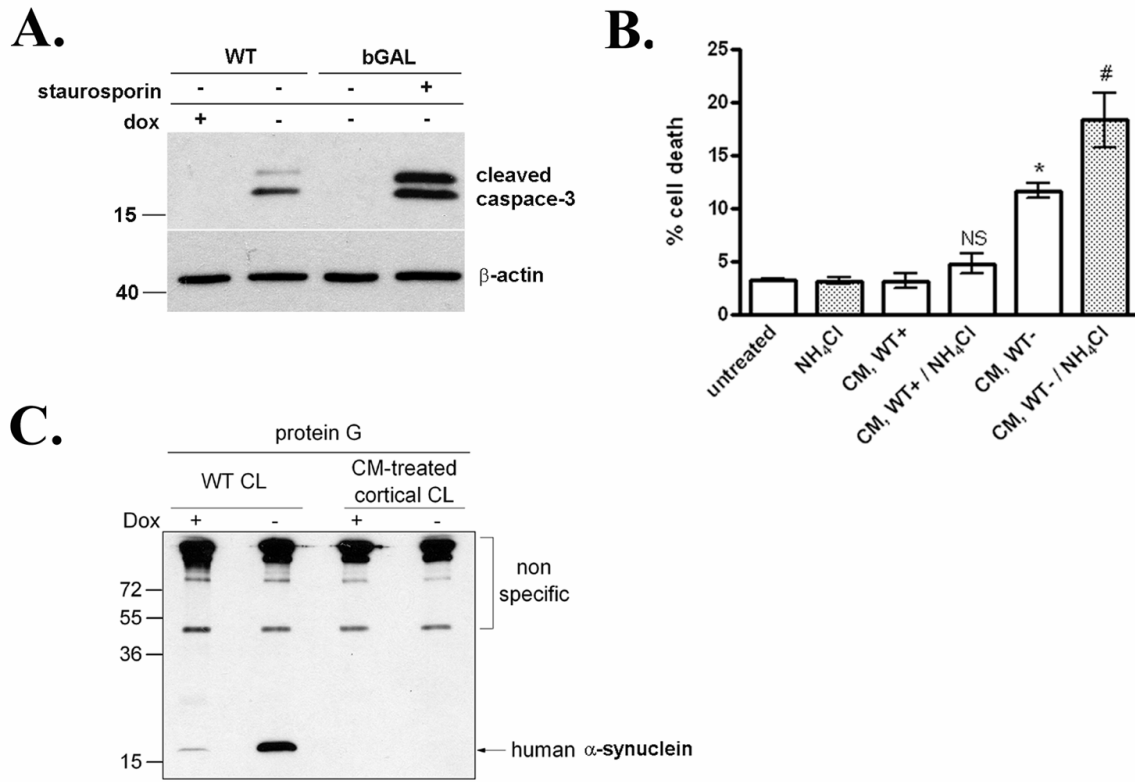
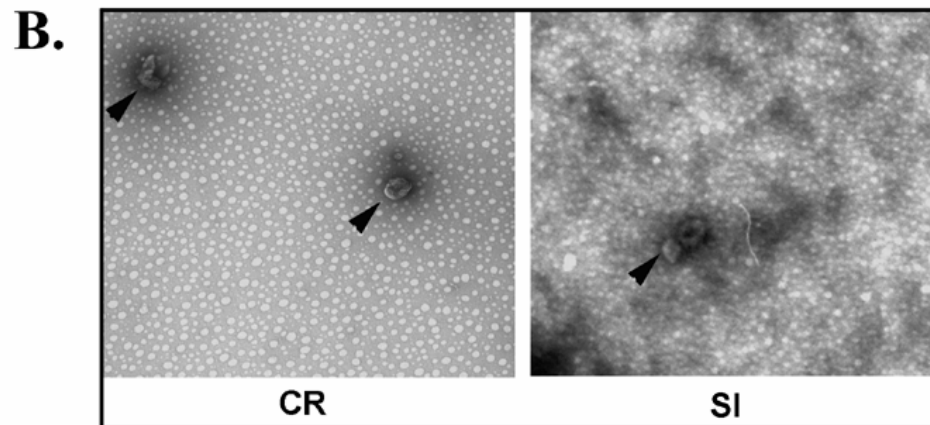
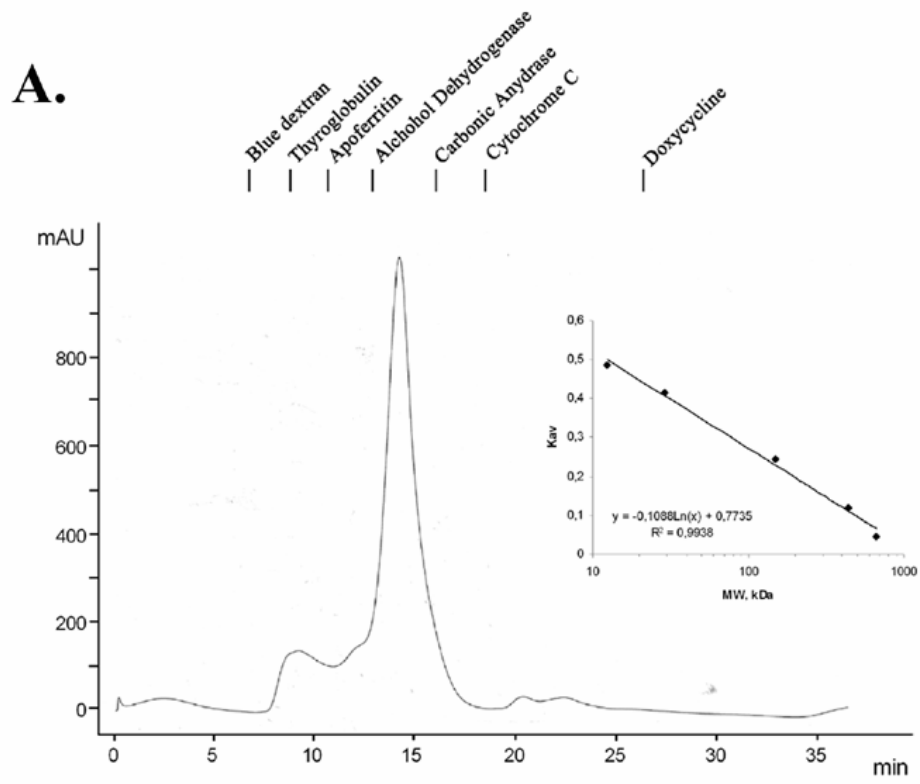


FIGURE S5



SUPPLEMENTARY TABLE

Accession No	Protein name	Location	Pathway
Q16512	Serine/threonine protein kinase N1/ Protein kinase C-like 1	cytoplasm	activation of JUN kinase
Q8N568	Serine/threonine protein kinase DCLK2 / CAM kinase-like 2	cytoplasm	protein phosphorylation
Q9H792	Tyrosine protein kinase SgK269 / Sugen kinase 269	cytoplasm	protein phosphorylation
P23443	Ribosomal protein S6 kinase beta-1	cytoplasm	protein phosphorylation
P27448	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	cytoplasm	microtubule-based movement
Q2KJY2	Kinesin-like protein KIF26B	cytoplasm	microtubule-based movement
Q8WXX0	Dynein heavy chain 7, axonemal	cytoplasm	microtubule-based movement
Q0VDD8	Dynein heavy chain 14, axonemal	cytoplasm	microtubule-based movement
Q8TE73	Dynein heavy chain 5, axonemal	cytoplasm	microtubule-based movement
O43237	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	cytoplasm	microtubule-based movement
Q96NW7	Leucine-rich repeat-containing protein 7	cytoplasm	unknown
Q8ND23	Leucine-rich repeat-containing protein 16B	cytoplasm	unknown
Q9C0D2	Leucine-rich repeat-containing protein KIAA1731	cytoplasm	unknown
O75334	Liprin-alpha-2	cytoplasm	cell-matrix adhesion
Q96JP2	Putative myosin-XVB	cytoplasm	unknown
P12882	Myosin-1	cytoplasm	filament aggregation
Q6Q759	Sperm-associated antigen 17	cytoplasm	microtubule organization
Q92619	Minor histocompatibility protein HA-1	cytoplasm	Precursor of the histocompatibility antigen HA-1
O75167	Phosphatase and actin regulator 2	cytoplasm	phosphatase and actin regulation
O14513	Nck-associated protein 5	cytoplasm	signal transduction
P20930	Filaggrin	cytoplasm	calcium binding / filament aggregation
A1L390	Pleckstrin homology domain-containing family G member 3	cytoplasm	Rho protein signal transduction
O60292	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 3	cytoplasm	GTPase activator
P69905	Hemoglobin subunit alpha	cytoplasm	oxygen transport
O14559	TC10/CDC42 GTPase-activating protein	cytoplasm	intracellular trafficking
O60890	Oligophrenin-1	cytoplasm	Pho GTPase activation
P0C2W1	F-box/SPRY domain-containing protein 1	cytoplasm	protein ubiquitination
Q70EL4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 43	cytoplasm	processing of ubiquitinated proteins
P40818	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8	cytoplasm	processing of ubiquitinated proteins
Q70CQ4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 31	cytoplasm	processing of ubiquitinated proteins
O00458	Interferon-related developmental regulator 1	cytoplasm	differentiation
Q99490	Arf-GAP, GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	cytoplasm	protein transport
Q9BTC0	Death-inducer obliterator 1	cytoplasm	apoptosis

Q9NYF0	Dapper homolog 1	cytoplasm	Wnt signalling
Accession No	Protein name	Location	Pathway
Q14765	Signal transducer and activator of transcription 4	cytoplasm	transcription regulation
P51911	Calponin-1	cytoplasm	actin binding
Q8WWK9	Cytoskeleton-associated protein 2	cytoplasm	cytoskeleton
Q8N3K9	Cardiomyopathy-associated protein 5	cytoplasm	cytoskeleton
O75147	Obscurin-like protein 1	cytoplasm	cytoskeleton
O94833	Bullous pemphigoid antigen 1, isoforms 6/9/10 / Dystonin	cytoplasm	cytoskeleton
Q03001	Bullous pemphigoid antigen 1, isoforms 1/2/3/4/5	cytoplasm	cytoskeleton
Q12955	Ankyrin-3	cytoplasm	cytoskeleton
Q01484	Ankyrin-2	cytoplasm	cytoskeleton
O75122	CLIP-associating protein 2	cytoplasm	cytoskeleton
Q96PK2	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoform 4	cytoplasm	cytoskeleton
P20929	Nebulin	cytoplasm	cytoskeleton
Q01082	Spectrin beta chain, brain 1	cytoplasm	cytoskeleton
Q8NEF9	Serum response factor-binding protein 1	cytoplasm	transcription regulation
Q8WZ42	Titin/connectin	nucleus / cytoplasm	protein phosphorylation / cytoskeleton
Q8WYP5	AT-hook-containing transcription factor 1	nucleus / cytoplasm	transcription regulation
Q96EB1	Elongator complex protein 4	nucleus / cytoplasm	transcription regulation
P15822	Zinc finger protein 40	Nucleus	transcription regulation
Q86UP3	Zinc finger homeobox protein 4	Nucleus	transcription regulation
O60281	Zinc finger protein 292	Nucleus	transcription regulation
P10071	Zinc finger protein GLI3	Nucleus	transcription regulation
A7E2V4	Zinc finger SWIM domain-containing protein KIAA0913	Nucleus	transcription regulation
Q86VM9	Zinc finger CCCH domain-containing protein 18	Nucleus	unknown
Q9NYV4	Cell division cycle 2-related protein kinase 7	Nucleus	protein phosphorylation
Q5VT06	Centrosome-associated protein 350	Nucleus	microtubule organization
Q9H7N4	Splicing factor, arginine/serine-rich 19	Nucleus	mRNA processing
Q9UQ35	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	Nucleus	mRNA processing
P38159	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	Nucleus	mRNA processing
Q96L91	E1A-binding protein p400	Nucleus	chromatin modification
Q86U70	LIM domain-binding protein	Nucleus	transcription regulation
Q15652	Probable JmjC domain-containing histone demethylation protein 2C	Nucleus	transcription regulation
Q7Z589	Protein EMSY	Nucleus	transcription regulation
Q9NSC2	Sal-like protein 1	Nucleus	transcription regulation
Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2	Nucleus	transcription regulation
Q15424	Scaffold attachment factor B1	Nucleus	transcription regulation
Q14938	Nuclear factor 1 X-type	Nucleus	transcription regulation
P46013	Antigen KI-67	Nucleus	cell cycle
Q6KC79	Nipped-B-like protein	Nucleus	cell cycle
Q8WWL7	G2/mitotic-specific cyclin-B3	Nucleus	cell cycle
Q5UIP0	Telomere-associated protein RIF1	Nucleus	cell cycle
Q9NTI5	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B	Nucleus	cell cycle
Q13428	Treacle protein	Nucleus	nucleolar-cytoplasmic transport
Q8IVL1	Neuron navigator	nucleus	unknown
O60287	Nucleolar pre-ribosomal-associated protein	nucleus	unknown

	1		
Q8TE96	ATP-dependent RNA helicase DQX1	nucleus	unknown
Accession No	Protein name	Location	Pathway
Q86WZ0	HEAT repeat-containing protein 4	nucleus	unknown
Q8TC05	Nuclear protein MDM1	nucleus	unknown
P98161	Polycystin-1	intracellular membrane	cell-matrix adhesion
O00592	Podocalyxin-like protein 1	intracellular membrane	cell adhesion
Q9NZR2	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1B	intracellular membrane	receptor-mediated endocytosis
P98164	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	intracellular membrane	receptor-mediated endocytosis
Q13936	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C	intracellular membrane	calcium transport
Q00975	Voltage-dependent N-type calcium channel subunit alpha-1B	intracellular membrane	calcium transport
Q9P0X4	Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1I	intracellular membrane	calcium transport
O60840	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1F	intracellular membrane	calcium transport
Q14028	Cyclic nucleotide-gated cation channel beta	intracellular membrane	ion transport
Q14CX5	Transmembrane protein 180	intracellular membrane	unknown
Q6UXY8	Transmembrane channel-like protein	intracellular membrane	ion transport
Q9UMZ3	Phosphatidylinositol phosphatase PTPRQ	intracellular membrane	protein amino acid dephosphorylation
O60353	Frizzled-6	intracellular membrane	Wnt signalling
Q6UX68	XK-related protein 5	intracellular membrane	Unknown
Q96Q45	Amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosomal region candidate gene 4 protein	intracellular membrane	Unknown
P69849	Nodal modulator 3	intracellular membrane	unknown
Q4KWH8	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-1	intracellular membrane	lipid degradation
Q6P1J6	Phospholipase B1 (membrane-associated)	intracellular membrane	lipid degradation
O14828	Secretory carrier-associated membrane protein 3	intracellular membrane	vesicle-mediated transport
Q99805	Transmembrane 9 superfamily member 2	endosome membrane	protein transport
Q9H598	Vesicular inhibitory amino acid transporter / Vesicular GABA transporter	vesicle membrane	neurotransmitter transport
Q5T5U3	Rho GTPase-activating protein 21	vesicle membrane / cytoplasm	GTPase activator
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein precursor	Secreted	phagocytosis / insulin receptor signalling
P17948	Vascular endothelial growth factor receptor 1	Secreted	differentiation
P01023	Alpha-2-macroglobulin	Secreted	protease inhibition
P02788	Lactotransferrin / Lactoferrin (precursor)	Secreted	iron transport / cell proliferation
P02787	Serotransferrin	Secreted	iron transport / cell proliferation
Q92954	Proteoglycan 4	Secreted	cell proliferation
P56706	Protein Wnt-7b	Secreted	Wnt signalling
P02771	Alpha-fetoprotein	Secreted	pl. membrane transport
P01024	Complement C3	Secreted	G-protein coupled receptor signalling / complement activation
P01009	Alpha-1-antitrypsin precursor	Secreted	protease inhibition
P20848	Alpha-1-antitrypsin-related protein precursor	Secreted	protease inhibition

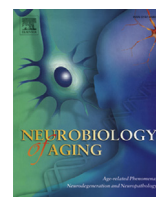
Q9HC84	Mucin-5B	Secreted	cell adhesion
Accession No	Protein name	Location	Pathway
Q8WXI7	Mucin-16	Secreted / plasma membrane	cell adhesion
P04275	von Willebrand factor	Secreted	cell-substrate adhesion
P02768	Serum albumin precursor	Secreted	cellular response to starvation
Q14031	Collagen alpha-6 (IV) chain precursor	Secreted	cell adhesion
P02452	Collagen alpha-1 (I) chain precursor	Secreted	cell adhesion
Q01955	Collagen alpha-3(IV) chain	Secreted	cell adhesion
Q9P218	Collagen alpha-1(XX) chain	Secreted	cell adhesion
Q9BWW1	Brother of CDO precursor / protein BOC	plasma membrane	cell adhesion
Q96JQ0	Protocadherin-16	plasma membrane	cell adhesion
Q6V017	Protocadherin Fat 4	plasma membrane	cell adhesion
Q9Y511	Protocadherin alpha-11	plasma membrane	cell adhesion
O60245	Protocadherin-7	plasma membrane	cell adhesion
Q86SQ6	Probable G-protein coupled receptor 123	plasma membrane	G-protein coupled receptor signalling
O60242	Brain-specific angiogenesis inhibitor 3	plasma membrane	G-protein coupled receptor signalling
P41587	Vasoactive intestinal polypeptide receptor 2	plasma membrane	G-protein coupled receptor signalling
Q9Y4G8	Rap guanine nucleotide exchange factor 2	plasma membrane	GTPase mediated signal transduction
Q86XX4	Extracellular matrix protein FRAS1	plasma membrane	calcium binding / cell communication
Q2M3G0	ATP-binding cassette sub-family B member 5	plasma membrane	plasma membrane transport
Q13508	Ecto-ADP-ribosyltransferase 3	plasma membrane (lipid anchor)	protein amino acid ADP-ribosylation
O95057	GTP-binding protein Di-Ras1	plasma membrane (lipid anchor)	GTPase mediated signal transduction
Q96Q06	Protein KIAA1881	plasma membrane / cytoplasm / lipid bodies	lipid storage regulation
Q70E73	Ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1	plasma membrane / cytoplasm (cytoskeleton)	cell-matrix adhesion
Q9Y4G6	Talin-2	plasma membrane / cytoplasm (cytoskeleton)	actin binding / cytoskeletal anchoring at plasma membrane
O95425	Supervillin	plasma membrane / cytoplasm (cytoskeleton)	actin binding / cytoskeletal anchoring at plasma membrane
O60610	Protein diaphanous homolog 1	plasma membrane / cytoplasm (cytoskeleton)	actin binding / cytoskeletal anchoring at plasma membrane
Q8TDM6	Disks large homolog 5	cell junction / plasma membrane	cell adhesion
Q99959	Plakophilin-2	cell junction / nucleus	cell adhesion
Q9Y566	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1	cell junction / cytoplasm	cytoskeletal anchoring at plasma membrane
Q2M1Z3	Cdc42 GTPase-activating protein	cell junction / cytoplasm	GTPase activator
P55196	Afadin	cell junction	cell adhesion / cell-cell signalling
P49448	Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial	Mitochondrion	oxidation reduction
Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	Mitochondrion	tRNA processing

Q9H845	Acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial	Mitochondrion	oxidation reduction
Accession No	Protein name	Location	Pathway
Q9NTG7	NAD-dependent deacetylase sirtuin-3, mitochondrial	Mitochondrion	protein amino acid deacetylation
A4D1P6	WD repeat-containing protein 91	Unknown	Unknown
O94967	WD repeat-containing protein 47	Unknown	Unknown
Q2LD37	Uncharacterized protein KIAA1109	unknown	unknown
O60303	Uncharacterized protein KIAA0556	Unknown	Unknown
Q9Y4B5	Uncharacterized protein KIAA0802	Unknown	Unknown
Q5JPF3	Uncharacterized protein KIAA1641-like 2	Unknown	Unknown
Q8IXW0	Uncharacterized protein C11orf35	Unknown	Unknown
Q9BRU9	Uncharacterized protein C8orf53	Unknown	Unknown
Q6ZU21	Uncharacterized protein FLJ44048	Unknown	Unknown
A6NGG8	Uncharacterized protein FLJ34931 / Uncharacterized protein C2orf71	Unknown	Unknown
Q5T5F5	Uncharacterized protein C1orf138	Unknown	Unknown
Q8TET4	Neutral alpha-glucosidase C	Unknown	
Q6UX53	Methyltransferase-like protein 7B	Unknown	Unknown
Q53SF7	Cordon-bleu protein-like 1	Unknown	Unknown
Q9C0A6	SET domain-containing protein 5	Unknown	Unknown



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Neurobiology of Aging

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuagingDeregulation of calcium homeostasis mediates secreted α -synuclein-induced neurotoxicityKaterina Melachroinou^a, Maria Xilouri^a, Evangelia Emmanouilidou^a, Roser Masgrau^b, Panagiota Papazafiri^c, Leonidas Stefanis^{a,d}, Kostas Vekrellis^{a,*}^a Division of Basic Neurosciences, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Athens, Greece^b Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, and Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain^c Division of Animal and Human Physiology, Department of Biology, University of Athens, Athens, Greece^d Second Department of Neurology, University of Athens Medical School, Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2013

Received in revised form 4 June 2013

Accepted 14 June 2013

Keywords:

Parkinson's disease

Alpha-synuclein

Secretion

Exosomes

Calpains

Membrane fluidity

Mitochondria

Neurodegeneration

ABSTRACT

α -Synuclein (AS) plays a crucial role in Parkinson's disease pathogenesis. AS is normally secreted from neuronal cells and can thus exert paracrine effects. We have previously demonstrated that naturally secreted AS species, derived from SH-SY5Y cells inducibly overexpressing human wild type AS, can be toxic to recipient neuronal cells. In the current study, we show that application of secreted AS alters membrane fluidity and increases calcium (Ca^{2+}) entry. This influx is reduced on pharmacological inhibition of voltage-operated Ca^{2+} channels. Although no change in free cytosolic Ca^{2+} levels is observed, a significantly increased mitochondrial Ca^{2+} sequestration is found in recipient cells. Application of voltage-operated Ca^{2+} channel blockers or Ca^{2+} chelators abolishes AS-mediated toxicity. AS-treated cells exhibit increased calpain activation, and calpain inhibition greatly alleviates the observed toxicity. Collectively, our data suggest that secreted AS exerts toxicity through engagement, at least in part, of the Ca^{2+} homeostatic machinery. Therefore, manipulating Ca^{2+} signaling pathways might represent a potential therapeutic strategy for Parkinson's disease.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The pathological hallmark of Parkinson's disease (PD) is the loss of the dopaminergic neurons primarily in the substantia nigra pars compacta and the presence of proteinaceous inclusions, termed Lewy bodies and Lewy neurites, in the somata or axons, respectively, of the remaining neurons (Dauer and Przedborski, 2003; Spillantini et al., 1997). The primary structural component of these intraneuronal aggregates is α -synuclein (AS), a small acidic protein that is mainly found in presynaptic terminals. AS is genetically linked to familial and sporadic disease (Gasser, 2009; Nalls et al., 2011). Importantly, AS is detected in human biological fluids and in the culture medium of neuronal cells, suggesting a possible paracrine mode of action in the extracellular milieu (Vekrellis et al., 2011). AS has been found to be secreted, via a nonclassical, calcium-dependent mechanism that partly relies on exosomes (Emmanouilidou et al., 2010), small extracellular vesicles

which derive from endosomes after fusing with the plasma membrane (Chivet et al., 2012). Extracellular AS can be toxic to recipient cells, and has assumed an augmented importance, for the reason that it might be involved in disease propagation, otherwise known as 'spreading' in the context of PD (Kordower et al., 2008; Li et al., 2008).

It has been shown that aberrant forms of recombinant AS (oligomers, aggregates) can create pores that compromise plasma membrane integrity, much like other aggregating-prone proteins such as amyloid beta peptide and prion (Danzer et al., 2007; Tsigelny et al., 2012). Alternatively, such proteins can interact with calcium (Ca^{2+}) channels, thereby altering their function and compromising Ca^{2+} equilibrium between intracellular and extracellular spaces (Demuro et al., 2010). Ca^{2+} ions play a pivotal role in neuronal plasticity and survival (Berridge et al., 2003; Greer and Greenberg, 2008); thus, an extremely complex homeostatic network operates to regulate intracellular Ca^{2+} levels. Ca^{2+} influx has long been considered as a key source of Ca^{2+} signals, and together with Ca^{2+} release from internal stores, such as the endoplasmic reticulum (ER), plays a major role in Ca^{2+} homeostasis (Patel and Docampo, 2010). Acidic organelles have also been shown to be intracellular Ca^{2+} stores (Churchill et al., 2002; Yamasaki et al., 2004) and

* Corresponding author at: Division of Basic Neurosciences, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens (BRFAA), 4, Soranou Efessiou Street, Athens 11527, Greece. Tel.: +30 210 6597523; fax: +30 210 6597545.

E-mail address: vekrellis@bioacademy.gr (K. Vekrellis).

emerging evidence highlights their important role in Ca^{2+} signaling and cell physiology (Patel and Docampo, 2010). Additionally, mitochondria play a very important role on Ca^{2+} signaling, being physically and functionally linked to the ER, thus shaping intracellular Ca^{2+} responses (de Brito and Scorrano, 2008; Lamarca and Scorrano, 2009).

Deregulation of Ca^{2+} homeostasis has been recently proposed as a major age-related condition driving neurodegeneration in sporadic PD (Zundorf and Reiser, 2011). This view is supported by the finding that dopaminergic neurons expressing higher levels of Ca^{2+} -binding proteins, such as calbindin D28K, calretinin, and parvalbumin, seem to be resistant to degeneration in PD (Surmeier et al., 2010). Moreover, recombinant AS has been shown to trigger Ca^{2+} influx and induce caspase activation in a variety of neuronal systems (Danzon et al., 2007; Furukawa et al., 2006; Martin et al., 2012). However, the effects of cell-derived naturally secreted AS on Ca^{2+} homeostasis in a neuronal cell context have not been assessed.

To address this issue, we have used the human SH-SY5Y neuroblastoma cell line, in which the expression of human wild type (WT) AS can be induced, as a source of naturally secreted AS (Vekrellis et al., 2009). We have previously shown that these cells readily secrete a wide range of AS species, which are toxic to recipient neuronal cells (Emmanouilidou et al., 2010). Here, we show that application of medium enriched in secreted AS on neuronally differentiated SH-SY5Y cells and primary rat cortical neurons, is accompanied by perturbation of Ca^{2+} homeostasis and neuronal death. These effects are ameliorated by blockage of voltage-operated Ca^{2+} channels (VOCs), Ca^{2+} chelation, or calpain inhibition. The increase in Ca^{2+} influx is mostly attributed to free extracellular, rather than exosome-associated AS. We further show that extracellular AS alters membrane fluidity properties of the recipient cells, and evokes Ca^{2+} sequestration into the mitochondria. Collectively, our data suggest that secreted AS is toxic to recipient neuronal cells, at least in part, through the disruption of the Ca^{2+} homeostatic machinery.

2. Methods

2.1. Reagents

Reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) unless otherwise specified. G agarose beads, Fluorogenic Substrate IV, and Fura 2-AM calcium indicator were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), ω -conotoxin GVIA (cntx) and SKF 96365 hydrochloride (SKF) were purchased from Tocris Bioscience. 1-Pyrenedodecanoic acid was obtained from Molecular Probes/Invitrogen (Eugene, OR, USA).

2.2. Cell culture

Stable SH-SY5Y cell lines inducibly expressing WT AS were generated as previously described (Vekrellis et al., 2009). Cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and 2 mM L-glutamine. AS expression was switched off by the addition of doxycycline (dox) (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Neuronal differentiation was performed with the addition of 10 μM all-trans retinoic acid for 6 days. Cultures of rat (embryonic day 18) cortical neurons were prepared as previously described (Vogiatzi et al., 2008). Dissociated cells were plated onto poly-D-lysine-coated 24-well dishes at a density of 150,000–200,000 cells per cm^2 and maintained in Neurobasal medium (Gibco, Invitrogen), containing 2% B27 supplement (Gibco, Invitrogen), 0.5 mM L-glutamine, and 1% penicillin/streptomycin.

2.3. Preparation of conditioned medium

SH-SY5Y cells inducibly expressing WT AS were cultured in 140 mm dishes in RPMI medium containing 10% FBS in the presence (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or absence of dox until 70%–80% confluency was reached. The medium was then replaced with RPMI containing 2% FBS. After 48 hours, the culture supernatant (conditioned medium [CM]) was collected and centrifuged sequentially at 400g for 5 minutes at 4 °C to remove unbroken cells and at 4000g for 10 minutes at 4 °C to remove cell debris.

2.4. Exosome purification

Before use, FBS exosomes were depleted from the culture medium as described previously (Thery et al., 2006). Before exosome isolation, the culture medium of SH-SY5Y cells was replaced with exosome-depleted medium diluted 10-fold with RPMI containing only penicillin/streptomycin and L-glutamine for 48 hours. The culture supernatant was collected and sequentially centrifuged at 400g for 10 minutes, and at 2000g for 10 minutes, 10,000g for 30 minutes, and 100,000g for 90 minutes. The obtained pellet (P100) containing mostly exosomes was washed once with ice-cold phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged again at 100,000g for 90 minutes. The final P100 pellet was resuspended in PBS buffer or lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer.

2.5. Immunodepletion of AS from CM

AS was immunodepleted from CM as described previously (Emmanouilidou et al., 2010). The anti-AS antibody (Syn-1, mouse monoclonal; BD Biosciences; 0.5 μg antibody per mL CM) was used to immunoprecipitate AS from the CM overnight. Immunodepleted CM was collected and sterilized through a 0.2 μm filter (Whatman) before application to recipient cells. Control immunodepletion was performed using an anti-c-myc antibody of the same isotype (mouse monoclonal; Santa Cruz Biotechnology).

2.6. Western blot analysis

For Western blot analysis, CM and exosome-depleted supernatants (S100) were concentrated using 3-kDa cutoff Amicon Ultra filters (Millipore). The P100 containing exosomes was reconstituted in 25 μL of RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na deoxycholate, and 0.1% sodium dodecyl sulfate). Denaturing gel electrophoresis was performed in 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis gels in Tris-glycine buffer. Immunoblot analysis was performed using the following antibodies: anti-AS (rabbit polyclonal; C-20), anti-bovine serum albumin (anti-BSA) (mouse monoclonal), anti-Alix (mouse monoclonal), and anti-Flotillin (mouse monoclonal). All antibodies were from Santa Cruz Biotechnology.

2.7. Assessment of survival

Six-day differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells or 7-day-old rat cortical neurons were treated with AS-containing (CM, WT–) or control (CM, WT+) CM in the presence or absence of Ca^{2+} modulators or calpain inhibitors. Concentrations of the compounds are mentioned in the figures. Recipient cells were lysed in a detergent-containing solution, which enables the quantification of viable cells by counting the number of intact nuclei in a hemacytometer (Farinelli et al., 1998; Stefanis et al., 1999). Cell counts were performed in triplicate.

2.8. *In vitro* assessment of calpain enzymatic activity

Six-day differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells, grown in 6-well plates, were incubated with control CM or CM containing secreted AS for 8, 12, 16, and 24 hours. Recipient cells were washed with ice-cold PBS and homogenized in a buffer containing 10 mM HEPES (pH 7.5), 5 mM DTT, 1% NP-40 on ice for 30 minutes. Cell lysates (2 µg) were mixed with 25 µL of activity buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.6], 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 mM CaCl₂) containing 10 µM fluorogenic calpain substrate (Calpain Substrate IV; Calbiochem, San Diego, CA, USA) and incubated at room temperature for 40 minutes in the dark. The reaction was stopped by adding 500 µL of 50 mM EDTA. Calpain activity was measured at 320 nm after excitation at 480 nm in a Perkin-Elmer LS-55 luminescence spectrometer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). To test the specificity of the assay, 200 µM of the calpain inhibitor I A6185 (CI) was included where indicated (Banoczy et al., 2008).

2.9. 1-Pyrenedodecanoic acid fluorescence measurements

1-Pyrenedodecanoic acid labeling of plasma membranes and fluorescence measurements were carried out as described elsewhere (Galla and Luisetti, 1980; Hashimoto et al., 1999). SH-SY5Y cells were seeded on 6-well plates at a density of 1.0×10^5 cells per well, and differentiated for 6 days. Subsequently, cells were treated with secreted CM, WT– for 8 hours at 37 °C. At the end of the incubation period, cells were resuspended in PBS and transferred into a fluorimeter cuvette. 1-Pyrenedodecanoic acid (2 µM) was added for 5 minutes in the dark at room temperature (RT). After excitation at 340 nm, the fluorescence intensity was scanned from 380 to 580 nm in a luminescence spectrometer. The ratio of the maximum fluorescent intensity of excimer and pyrene monomers was calculated at 468 and 395 nm, respectively.

2.10. Free cytosolic Ca²⁺ measurements

Cells were loaded with Fura 2-AM as described (Papazafiri et al., 1994). Briefly, 6-day differentiated SH-SY5Y cells were treated with control or secreted CM, WT– for 8 hours, harvested in RPMI culture medium and centrifuged at 400g for 5 minutes at RT. Cell pellets were suspended in Krebs-Ringer-HEPES (KRH) buffer (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 6 mM D-glucose, and 25 mM HEPES-NaOH [pH 7.4]) containing 2% FBS, counted in a hemocytometer and loaded with Fura 2-AM dye (2.5 µM), for 30 minutes at RT in the dark. Cells were resuspended in KRH supplemented with 250 mM sulfinpyrazone to prevent dye leakage, transferred to a thermostatted cuvette (37 °C), maintained in a continuous stirring condition, and analyzed in a Perkin-Elmer LS-55 luminescence spectrometer. To estimate capacitative calcium entry (CCE), 1.8×10^6 cells were resuspended in a CaCl₂-depleted KRH medium and 10 µM EGTA was added. Thapsigargin ([Tg] 100 nM) was added to deplete ER Ca²⁺ stores; CaCl₂ (3 mM) was reintroduced into the medium and the ensuing CCE was recorded. Results represent the maximal peak values normalized to ER content as exemplified by Tg-induced Ca²⁺ efflux of at least 3 independent experiments. Nifedipine ([nif] 1 µM), cntx (100 nM), or SKF (10 µM) was added after EGTA normalization and before the addition of Tg. VOCs were stimulated with 55 mM KCl, in the presence or absence of either 1 µM nif or 100 nM cntx. To estimate Ca²⁺ load in the diverse subcellular compartments, intracellular Ca²⁺ pools were depleted sequentially with the addition of the appropriate pharmacological compounds: 5 µM carbachole (Cch), followed by the addition of 100 nM Tg, 500 nM ionomycin (Iono), and 20 µM monensin A, in the presence or absence of extracellular Ca²⁺. To estimate the mitochondrial Ca²⁺ load, 1.8×10^6 Fura

2-loaded cells suspended in Ca²⁺-depleted KRH, were treated with 5 µM of the mitochondrial uncoupler FCCP, together with 2.5 µg/mL oligomycin (Oligo), to prevent ATP consumption via the reversed mode activity of the F1/F0 synthase.

2.11. Live Ca²⁺ imaging

For live Ca²⁺ imaging, 7-day-old rat cortical neurons (75,000 cells per chamber) plated on poly-L-lysine-coated 8-chamber slides (Integrated BioDiagnostics, Munich, Germany), were incubated with 2 µM Fura 2-AM in culture medium for 30 minutes at 37 °C, then returned to culture medium and incubated for 3 hours at 37 °C. Just before Ca²⁺ measurements, cells were washed once with microscopy buffer (129 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 30 mM glucose, 1% BSA, 25 mM HEPES [pH 7.4]) and positioned in a temperature-controlled microscope. During measurements, CCE was assessed using stimulation with 0.25 µM Tg, followed by the addition of 6 mM CaCl₂. Fluorescence images obtained at 340 and 380 nm excitation and 510 nm emission were acquired by using a TE 2000U-inverted fluorescence microscope (Nikon, Osaka, Japan) coupled to a cooled charge-coupled device (CCD) camera (PTI-IC200) (Princeton Instruments). At the end of each experiment, the Fura 2-AM signals were calibrated with the simultaneous addition of 10 µM Iono and 50 mM KCl, to obtain the maximum fluorescence. Images were acquired every 10 seconds and cells were analyzed using the region of interest tool, to extract the fluorescence ratios. Changes in Ca²⁺ were determined using temporal analyses of single cells to express the data as fluorescence ratios as described (Smaili and Russell, 1999). The baseline fluorescence was determined at the beginning of each experiment by obtaining the average of the first 20 data points before compound addition, using the Image Master 3 Software (Graph-Pad Prism 4.0) acquisition-analysis software (PTI, Birmingham, NJ, USA). The results were normalized in relation to the baseline fluorescence and the data expressed as a percent of increase relative to baseline. The histograms represent the average peak response.

2.12. Statistical analysis

All data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical analysis for multiple comparisons was performed using a 1-way analysis of variance followed by Tukey honestly significant difference (HSD) post hoc test. Nondirectional Student *t* tests were performed for comparisons involving only 2 groups. All statistical analyses were conducted using the Graph-Pad Prism software. Results were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Secreted AS induces an increase in capacitative Ca²⁺ entry in neuronally differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells

We wanted to investigate whether the mechanism via which secreted AS triggers the neurotoxic cascade involves alterations in the Ca²⁺ homeostatic machinery. As a source of cell-secreted AS, we used CM from SH-SY5Y cells inducibly overexpressing human WT AS (Emmanouilidou et al., 2010; Vekrellis et al., 2009). To elucidate the events that precede AS-induced cell death, we applied CM from the induced (CM, WT–) or the control uninduced cells (CM, WT+) to differentiated SH-SY5Y cells for 8 hours, because this was the longest incubation time during which the recipient cells did not exhibit any morphological or biochemical characteristics of cell degeneration (data not shown). After the 8-hour treatment, free cytosolic Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) recordings of the recipient cells were obtained using the Fura 2-AM dye. After ER depletion by Tg (100 nM), we measured CCE using exogenous

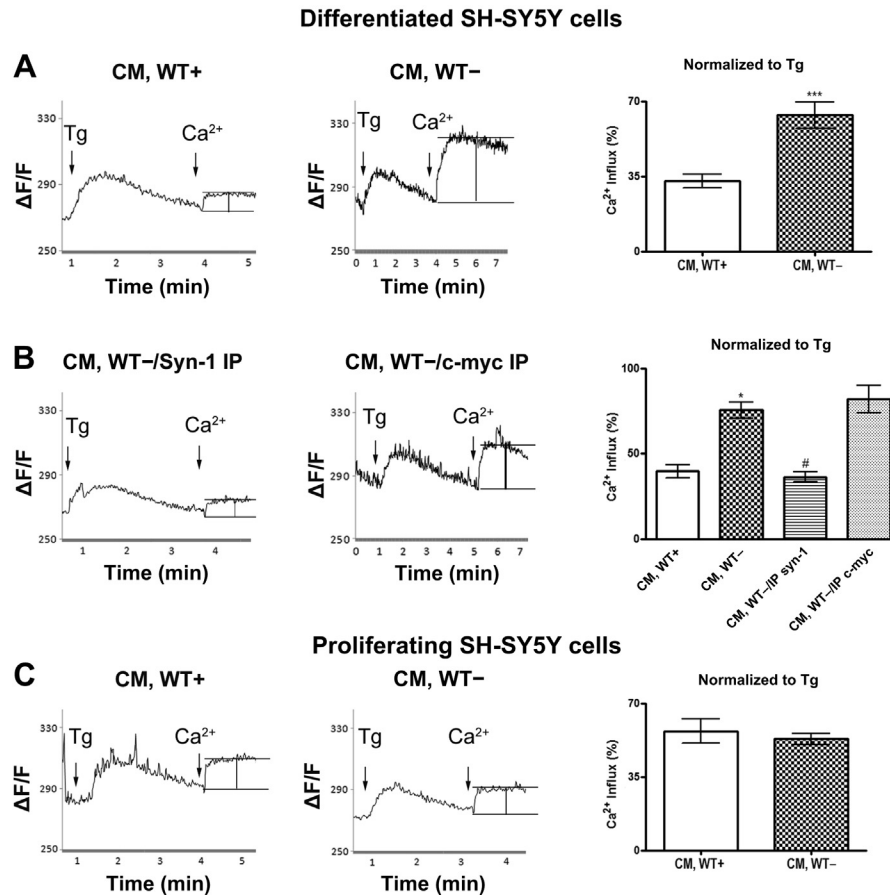


Fig. 1. Application of secreted AS increases CCE in differentiated, but not in proliferating recipient SH-SY5Y cells. (A) Differentiated SH-SY5Y cells were treated with CM, WT- or CM, WT+ for 8 hours and CCE was measured as described. Representative Ca^{2+} measurements depicting CCE are shown in the left panel and quantitative analysis of the percentage of Ca^{2+} influx, normalized to Tg-evoked Ca^{2+} release (first peak), is depicted in the right panel ($n = 16$; *** $p < 0.001$). (B) Differentiated SH-SY5Y cells were treated with AS-depleted (CM, WT-/Syn-1 IP) or control immunodepleted (CM, WT-/c-myc IP) CM for 8 hours. Representative Ca^{2+} measurements are shown in the left panel and quantitative analysis of the percentage of Ca^{2+} influx is depicted in the right panel ($n = 3$; * $p < 0.05$, comparing cells treated with CM, WT+ and CM, WT-; # $p < 0.05$, comparing between cells treated with CM, WT-/Syn-1 IP and cells treated with CM, WT-/c-myc IP). (C) Proliferating SH-SY5Y cells were treated with CM, WT- or CM, WT+ for 8 hours. The difference in percentage of Ca^{2+} influx between cells treated with CM, WT+ and CM, WT- was not statistically significant ($n = 3$). Abbreviations: AS, α -synuclein; Ca^{2+} , calcium; CCE, capacitative calcium entry; CM, conditioned medium; CM, WT+, control CM; CM, WT-, AS-containing medium; c-myc IP, control immunoprecipitation; F/F, fluorescence ratio; Syn-1 IP, alpha-synuclein immunoprecipitation; Tg, thapsigargin.

addition of 3 mM CaCl_2 (Fig. 1). Treatment of differentiated SH-SY5Y cells with the secreted CM, WT- resulted in a statistically significant increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, compared with cultures incubated with CM, WT+ (Fig. 1A). Importantly, this increase in CCE was AS-dependent, because effective immunodepletion of AS from the CM, before its application to recipient cells, greatly reduced the Tg-evoked Ca^{2+} entry (Fig. 1B). Control immunodepletion with an irrelevant antibody (c-myc) failed to reduce CCE. In contrast, incubation of proliferating SH-SY5Y cells with the CM, WT+ or the CM, WT- resulted in similar CCE responses (Fig. 1C), suggesting that secreted AS only disturbs Ca^{2+} homeostasis in cells that have a neuronal phenotype.

3.2. Secreted AS-induced increase in Ca^{2+} entry is amplified by the L- and the N-type voltage-operated Ca^{2+} channels

In neurons, as in many other cell types, Ca^{2+} ions can enter cells via a number of channels, such as storage-operated channels (SOCs), VOCs, and receptor-operated plasma membrane Ca^{2+} channels. To assess the contribution of such channels to the AS-facilitated Ca^{2+} entry, we first examined the participation of SOC by blocking them with the SOC-specific inhibitor, SKF (10 μM). Addition of SKF resulted in a significant reduction in CCE, in

secreted AS- and control CM-treated cultures (Fig. 2A and B). However, the difference in CCE between the 2 groups in the presence of SKF, was maintained (Fig. 2B), implying that other plasma membrane channels might participate in the observed Ca^{2+} entry in the presence of secreted AS.

Previous reports have suggested that AS modulates the function of VOCs (Adamczyk and Strosznajder, 2006; Hettiarachchi et al., 2009; Kang et al., 2012). To test such a hypothesis in our cellular system, we used the L- and N-type specific VOC blockers, nif (1 μM) and cntx (100 nM), respectively. We found that nif and cntx reduced the Tg-evoked Ca^{2+} entry, only in cells treated with secreted AS (Fig. 2C and D). These results imply a participation of both L- and N-type Ca^{2+} channels in the observed CCE increase. Neither inhibitor affected the CCE of cells treated with the CM, WT+. Based on these findings we could surmise that in the presence of extracellular AS, VOCs might become active, thereby contributing to the SOC-facilitated Ca^{2+} entry.

To directly investigate the role of VOCs, we stimulated the cells with 55 mM KCl. Control and AS-treated cells responded to KCl stimulation robustly, yet Ca^{2+} entry was significantly greater in the latter (Fig. 2E and F). Addition of either nif or cntx, significantly reduced KCl-induced Ca^{2+} entry in both groups, verifying the functionality of these channels. Notably, the

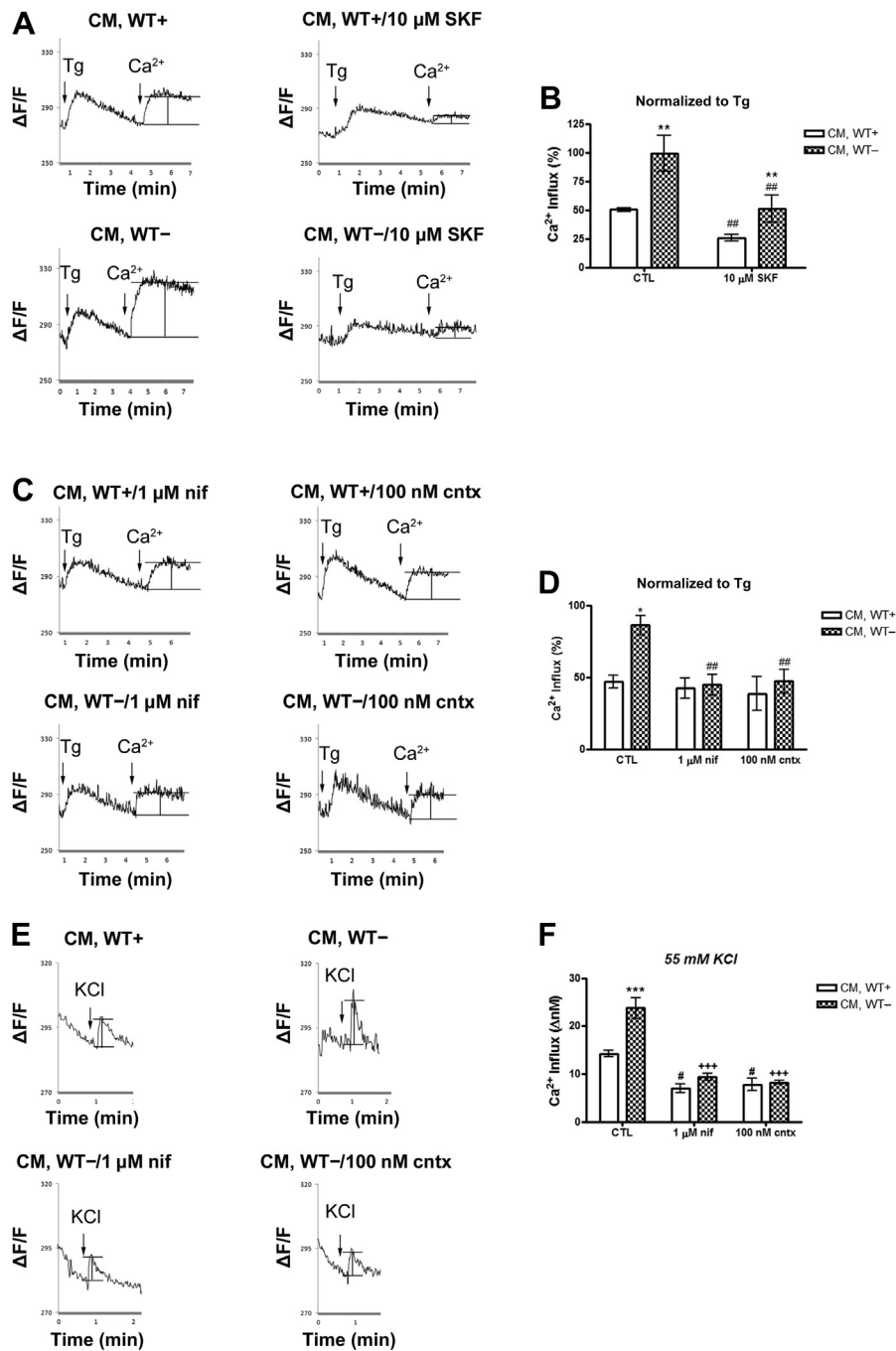


Fig. 2. L-type and N-type VOCs are implicated in the observed secreted AS-induced Ca²⁺ entry. Differentiated SH-SY5Y cells were treated with CM from AS-expressing (CM, WT-) or control (CM, WT+) cells for 8 hours. (A and C) Representative Ca²⁺ measurements depicting CCE in the absence or presence of SKF (A) and nif or cntx (C). (B and D) Quantitative analysis of the percentage of Ca²⁺ influx normalized to Tg-evoked Ca²⁺ release (first peak) between groups in the presence/absence of SKF (B) ($n = 4$, in duplicate; ** $p < 0.01$, comparing cells treated with CM, WT+ and CM, WT- in the presence/absence of SKF; ## $p < 0.01$ comparing SKF-treated and SKF-untreated cells) and nif or cntx (D) ($n = 5$, in duplicate; * $p < 0.05$, comparing cells treated with CM, WT+ and CM, WT-; ## $p < 0.01$ comparing cells treated with CM, WT- in the presence or absence of nif or cntx). (E) Representative Ca²⁺ recordings on KCl stimulation in the presence or absence of nif or cntx. (F) Quantification of Ca²⁺ influx (ΔnM) after KCl addition, in the presence or absence of the inhibitors ($n = 4$, in duplicate; *** $p < 0.001$, comparing cells treated with CM, WT+ and CM, WT-; # $p < 0.05$ comparing cells treated with CM, WT+ in the presence or absence of nif or cntx; +++ $p < 0.001$, comparing cells treated with CM, WT- in the presence or absence of the inhibitors). Abbreviations: AS, α -synuclein; Ca²⁺, calcium; CCE, capacitative calcium entry; CM, conditioned medium; CM, WT+, control CM; CM, WT-, AS-containing medium; cntx, ω -conotoxin GVIA; F/F, fluorescence ratio; nif, nifedipine; SKF, SKF 96365 hydrochloride; Tg, thapsigargin; VOC, voltage-operated Ca²⁺ channel.

difference in Ca²⁺ influx between control and AS-treated cells was abolished in the presence of VOC inhibitors (Fig. 2F), highlighting the important role of these channels in secreted AS-facilitated Ca²⁺ entry.

3.3. Naturally secreted AS induces mitochondrial Ca²⁺ uptake

Increased intracellular AS, and prefibrillar forms of recombinant AS, have been shown to induce higher plasma membrane ion

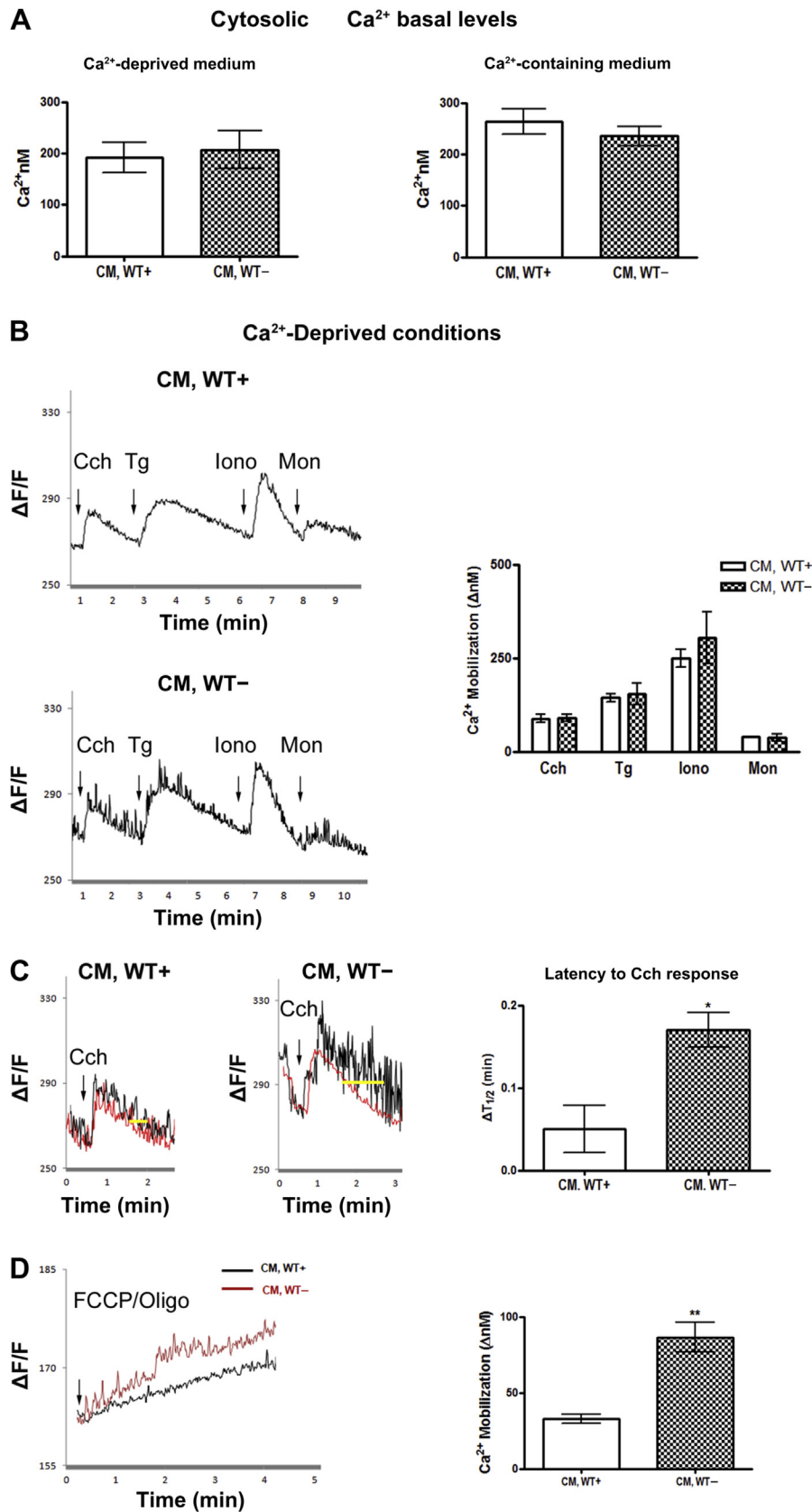


Fig. 3. AS-facilitated Ca^{2+} entry is driven to the mitochondria. Differentiated SH-SY5Y cells were treated with secreted CM, WT⁻ or CM, WT⁺ for 8 hours, after labeling with Fura 2-AM. (A) The concentration of free cytosolic Ca^{2+} was estimated in Ca^{2+} -deprived conditions (left panel) and Ca^{2+} -containing conditions (right panel). No significant difference between the cells treated with CM, WT⁺ or with the CM, WT⁻ was observed in either condition ($n = 3$, for Ca^{2+} -deprived conditions; $n = 11$, for Ca^{2+} -containing conditions). (B) Representative Ca^{2+} recordings depicting changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ on sequential application of Cch, Tg, Iono, and Mon in Ca^{2+} -deprived conditions (left panel). Quantitative analysis of Ca^{2+} mobilization on addition of the compounds in the cells treated with CM, WT⁺ and CM, WT⁻ in Ca^{2+} -deprived (right panel, $n = 3$), no statistical significant difference in Ca^{2+}

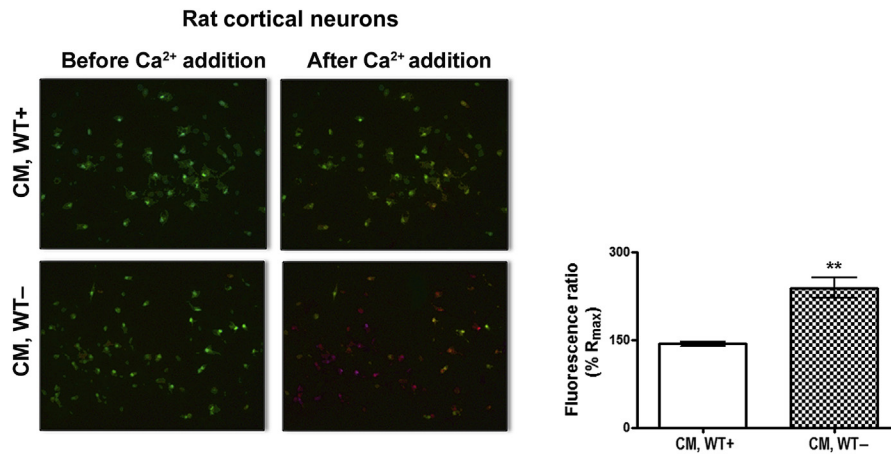


Fig. 4. Treatment with naturally secreted AS increases Ca^{2+} entry in primary rat cortical neurons. Seven-day-old rat cortical neurons were treated with secreted CM, WT⁻ or CM, WT⁺ for 8 hours. After loading with Fura 2-AM dye, CCE was monitored using a fluorescence microscope. Representative images illustrating the 350/380 fluorescence ratio before and after Ca^{2+} administration are shown in the left panel and quantitative analysis of the percentage of fluorescence ratio, normalized to baseline fluorescence, is depicted in the right panel ($n = 3$; ** $p < 0.005$). Abbreviations: AS, α -synuclein; Ca^{2+} , calcium; CCE, capacitative calcium entry; CM, conditioned medium; CM, WT⁺, control CM; CM, WT⁻, AS-containing medium; % R_{max} , percent of increase relative to baseline.

permeability and subsequent $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise (Danzer et al., 2007; Furukawa et al., 2006). Taking these, and our results, into account, we investigated whether the increased Ca^{2+} entry could lead to a subsequent rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels. To this end, differentiated SH-SY5Y cells were treated as previously described and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels were examined in Ca^{2+} -free and Ca^{2+} -containing environments. No significant difference in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was observed between AS-treated and control-treated cells in either condition (Fig. 3A).

Next, we asked whether the increased Ca^{2+} entry could lead to sequestration into specific intracellular Ca^{2+} pools. Under Ca^{2+} -depleted conditions, we first added Cch (5 μM), a cholinergic agonist that activates inositol trisphosphate receptor (IP₃R), resulting in Ca^{2+} efflux from the ER to the cytosol. When the Cch response was buffered, Tg (100 nM), a noncompetitive inhibitor of sarcoendoplasmic reticulum (SR) calcium transport ATPase (SERCA) pumps, was added to allow total ER Ca^{2+} depletion. Subsequently, we administered 500 nM Iono, a Ca^{2+} ionophore. After the Iono-evoked response, 20 μM of the sodium ionophore (Na^+/H^+ exchanger), monensin A, was added to release Ca^{2+} from acidic compartments, such as lysosomes. A representative Ca^{2+} trace after sequential addition of the examined agents is shown in Fig. 3B. Quantification of Ca^{2+} mobilization (i.e., Ca^{2+} rise), after the administration of each drug, revealed no statistically significant differences between AS-treated and control cells (Fig. 3C). Similar results were obtained in Ca^{2+} -containing conditions (data not shown).

Additionally, to further support our data regarding AS-induced Ca^{2+} entry, we investigated Cch-induced Ca^{2+} mobilization kinetics in differentiated cells exposed to secreted CM, WT⁻ and CM, WT⁺. Interestingly, the rate of Ca^{2+} buffering after stimulation with Cch in Ca^{2+} -containing compared with Ca^{2+} -depleted conditions was significantly slower in AS-treated compared with control cells (Fig. 3D). Because Cch triggers Ca^{2+} influx from the extracellular space as a secondary effect, the observed latency further supports that CM, WT⁻ potentiates Ca^{2+} entry from the plasma membrane, not only after stimuli such as Tg, but also on more physiological stimulations such as Cch.

Altogether, these results show a facilitated calcium entry in cells cultured with CM, WT⁻, with no apparent preferential Ca^{2+} distribution in a subcellular compartment. However, it is important to note that there was a higher Iono-evoked Ca^{2+} release in AS-treated compared with control cells, in Ca^{2+} -depleted conditions (Fig. 3B, right panel). Although it did not reach statistical significance, this trend implies the participation of a different subcellular Ca^{2+} pool. Therefore, we examined whether the mitochondria could be a potential pool for Ca^{2+} sequestration. To this end, 5 μM of the mitochondrial uncoupler, FCCP, together with 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Oligo were added to control and AS-treated cells. Oligo prevents ATP consumption via the reversed mode activity of the F₁/F₀ synthase. In Ca^{2+} -depleted conditions, addition of FCCP with Oligo discharges mitochondrial Ca^{2+} stores, causing a rise of cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]_i$, which reflects the mitochondrial Ca^{2+} load (Hettiarachchi et al., 2009). Secreted AS-treated cells exhibited a more profound response to the FCCP/Oligo treatment (Fig. 3E). Quantification of the Ca^{2+} mobilization on drug administration (expressed as ΔnM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ at 4 minutes after drug addition) revealed significantly higher levels of mitochondrial Ca^{2+} content in AS-treated cells compared with control cells (32.83 ± 2.97 and 86.36 ± 9.75 , comparing cells treated with CM, WT⁺ and CM, WT⁻, respectively) (Fig. 3E). These results suggest that on exposure of recipient cells to CM, WT⁻, part of the excessive Ca^{2+} entry is driven to the mitochondrial Ca^{2+} pool.

3.4. Cell-secreted AS leads to a profound increase in CCE in primary rat cortical neurons

We have previously shown that primary cortical neurons are also susceptible to secreted AS neurotoxic effects (Emmanouilidou et al., 2010). We further examined whether application of cell-secreted AS on primary rat cortical neurons had similar effects on Ca^{2+} influx. To this end, 7-day-old rat cortical neurons were treated with CM, WT⁻ or CM, WT⁺ for 8 hours, after loading with Fura 2-AM and changes in CCE were recorded. As shown in Fig. 4, cortical neurons receiving secreted AS exhibited a profound increase in

mobilization was observed. (C) Representative Ca^{2+} recordings from cells treated with CM, WT⁺ and CM, WT⁻ illustrating the response to Cch in Ca^{2+} -depleted (red curve) and Ca^{2+} -containing conditions (black curve). Quantitative analysis of the time lapse ($\Delta T_{1/2}$) in the Cch curve revealed a significant delay in the decay of Cch-evoked Ca^{2+} release in the cells treated with CM, WT⁻ in Ca^{2+} -containing conditions, compared with the control-treated cells ($n = 3$; * $p < 0.05$). (D) Representative Ca^{2+} traces on addition of FCCP/Oligo in Ca^{2+} -depleted conditions (left panel). Graph depicting Ca^{2+} mobilization (ΔnM) after the discharge of mitochondrial Ca^{2+} stores (right panel). A significant increase of Ca^{2+} mobilization after FCCP/Oligo addition in the cells treated with CM, WT⁻ was observed ($n = 3$, in duplicate; ** $p < 0.01$). Abbreviations: AS, α -synuclein; Ca^{2+} , calcium; $[\text{Ca}^{2+}]_i$, free cytosolic Ca^{2+} ; Cch, carbachole; CM, conditioned medium; CM, WT⁺, control CM; CM, WT⁻, AS-containing medium; F/F, fluorescence ratio; FCCP, carbonyl cyanide p-trifluoromethoxy-phenylhydrazone; Iono, ionomycin; Mon, monensin A; Oligo, oligomycin; Tg, thapsigargin.

Ca²⁺ entry compared with control cells (percent of fluorescence ratio 143.3 ± 3.79 or 238.7 ± 17.5 in cells treated with CM, WT+ and CM, WT-, respectively), confirming the results obtained with differentiated SH-SY5Y cells.

3.5. Reduction of cytosolic Ca²⁺ levels protects from secreted AS-induced neurotoxicity

To investigate whether extracellular AS mediates its pathogenic actions through increased Ca²⁺ influx, we used chemical compounds that chelate intracellular or extracellular Ca²⁺ or prohibit Ca²⁺ from entering the cell. Six-day differentiated SH-SY5Y cells (Fig. 5A) and 7-day-old rat cortical neurons (Fig. 5D) were incubated for 24 hours at 37 °C with CM, WT- or CM, WT+, in the presence or absence of nif or cntx, and the intracellular or extracellular Ca²⁺ chelators, BAPTA-AM (BAPTA) or EGTA, respectively. In both cell types, the presence of extracellular AS led to a decrease in neuronal survival, which was mitigated on addition of either nif, cntx, BAPTA,

or EGTA (Fig. 5A and D). Drug application had no background toxicity, confirmed in control experiments.

To decipher whether AS-induced Ca²⁺ deregulation is directly linked to the observed cell death, Ca²⁺ modulators were added for the first 8 hours together with CM, WT-. Subsequently, the compounds were removed and CM, WT- was added to the cells for additional 8 or 16 hours. We found that the 8-hour treatment with the chelating compounds and the VOC inhibitors was sufficient to protect differentiated cells from AS-mediated toxicity at all time points (Fig. 5B and C). These results indicate that disturbances in Ca²⁺ homeostasis are the primary event in AS-triggered neurotoxic cascade.

3.6. Calpain activation is implicated in the extracellular AS-evoked neurotoxic effects

We have previously shown that treatment of neuronal cells with secreted AS results in caspase-3 cleavage (Emmanouilidou et al.,

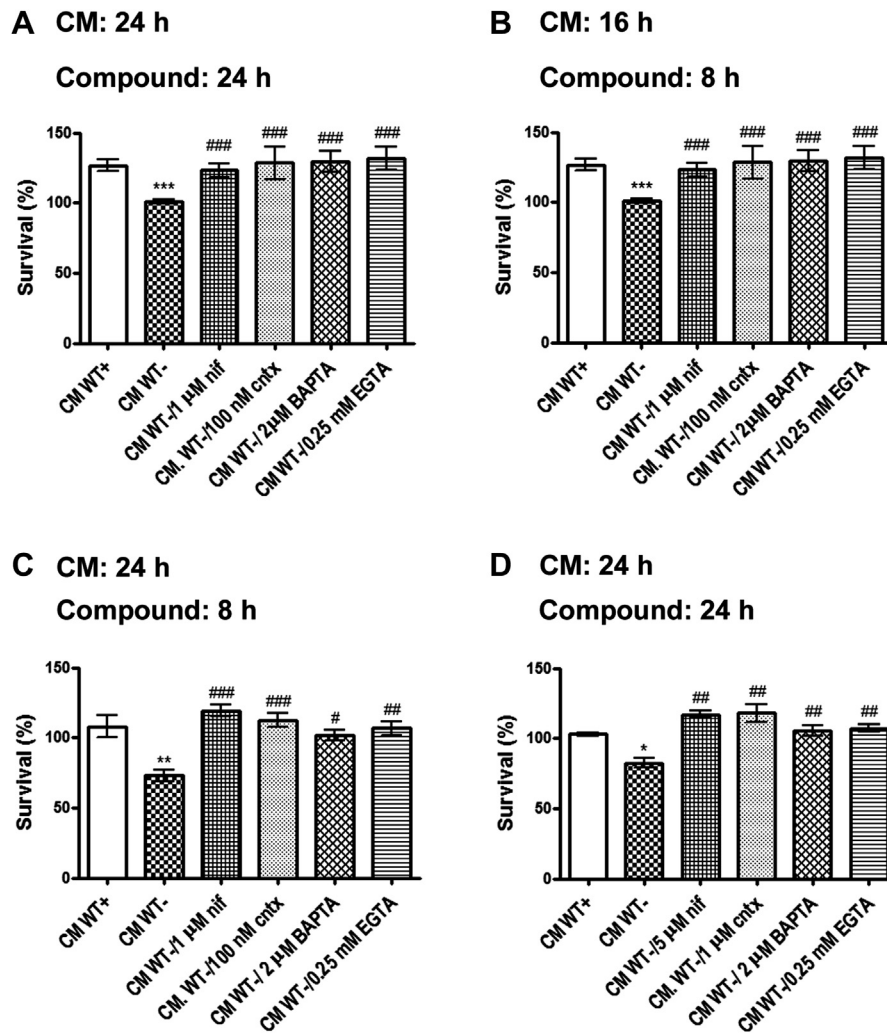


Fig. 5. Reduction of cytosolic Ca²⁺ levels protects neuronal cells against secreted AS-mediated neurotoxicity. (A–C) Differentiated SH-SY5Y cells were incubated with secreted CM, WT- or CM, WT+ for 24 hours (A, and C) or 16 hours (B), in the absence or presence of Ca²⁺ modulators. Neuronal survival was estimated by counting the number of intact nuclei in all conditions. All compounds significantly increased viability ($n = 3$, in triplicate; *** $p < 0.001$ for cells treated with CM, WT+ versus CM, WT-; ### $p < 0.001$ for cells treated with CM, WT- in the presence or absence of Ca²⁺ modulators, # $p < 0.05$ comparing AS-treated cells in the presence or absence of BAPTA). (D) Seven-day-old rat primary cortical neurons were treated with CM, WT- or CM, WT+, in the presence or absence of Ca²⁺ modulators for 24 hours and neuronal survival was measured using the same method. All compounds had a protective effect on cultures treated with CM, WT- ($n = 4$, in triplicate; * $p < 0.05$, for cells treated with CM, WT+ vs. CM, WT-, using unpaired t test; ## $p < 0.01$, for cells treated with CM, WT- in the absence/presence of Ca²⁺ modulators). All data are corrected to the baseline of control cells treated with CM, WT+. Abbreviations: AS, α -synuclein; Ca²⁺, calcium; CM, conditioned medium; CM, WT+, control CM; CM, WT-, AS-containing medium.

2010). Because calpains have been reported to cleave pro-caspase-3 (Camins et al., 2006) and to be activated in the setting of excess Ca^{2+} , we aimed to examine whether calpains are involved in the secreted AS-induced neurotoxicity. We incubated differentiated SH-SY5Y cells with CM, WT⁻, CM, WT⁺, or unconditioned medium (vehicle) for 8, 16, and 24 hours. Calpain activity was determined in the homogenates of the recipient cells using a calpain-specific fluorogenic substrate. As depicted in Fig. 6A, a statistically significant increase in calpain activity was observed after 24-hour incubation with AS (393.7 ± 45.03 , 499.8 ± 17.31 , and 679.7 ± 30.47 , for the cells treated with vehicle, CM, WT⁺, and CM, WT⁻, respectively). The specificity of the reaction was verified by the addition of the specific CI, which, as expected, resulted in a significant decrease of calpain activity (Fig. 6A, right panel).

We reasoned that if calpains are indeed activated during the process of AS-induced toxicity, their inactivation should result in an increase of cell survival after AS treatment. To test this hypothesis, we incubated cells with CM, WT⁻ in the presence or absence of the CI, for 24 hours. Addition of 1 μM CI greatly improved cell morphology (data not shown) and significantly increased cell viability (Fig. 6B). In a similar fashion to the survival assays with the Ca^{2+} modulators, we investigated whether calpain activation is a primary event for the observed death. CI was added for 8 hours together with the CM, WT⁻. Then, the inhibitor was removed and the cells were incubated for an additional 8 hours or 16 hours with CM, WT⁻ alone. Such treatment showed a trend of protection, after 16-hour incubation with CM, WT⁻ (82.38 ± 3.57 and 94.75 ± 4.39 ,

for the cells treated CM, WT⁻, in the absence or presence of CI, respectively) (Fig. 6C), but reached statistical significance only after 24 hours of incubation (74.25 ± 4.40 and 118.8 ± 3.58 , for the cells treated CM, WT⁻, in the absence or presence of CI, respectively) (Fig. 6D).

Similar experiments were performed in rat cortical cultures treated with CM, WT⁻ in the presence or absence of the CI for 24 hours. Such treatment showed that calpain inhibition also improved the survival of primary neurons exposed to AS, however, this effect did not reach statistical significance (Fig. 6E).

3.7. Interaction of secreted AS with the plasma membrane of recipient cells

In our previous work, we showed that secreted AS could exert its deleterious effects without frank internalization by differentiated SH-SY5Y cells (Emmanouilidou et al., 2010). Hence we wanted to investigate a potential association between AS and the plasma membrane of recipient cells. To do so, we examined changes in the microfluidic properties of the membrane of AS-treated cells. Cells were treated with CM from induced AS-overexpressing cells, or uninduced cells for 8 hours and incubated with 1-pyrenedodecanoic acid (2 μM). 1-Pyrenedodecanoic acid excimers break into monomers in the lipophilic interior of the membrane giving a distinct fluorescence spectrum that is indicative of the microfluidic properties of the membrane (Dafnis et al.,

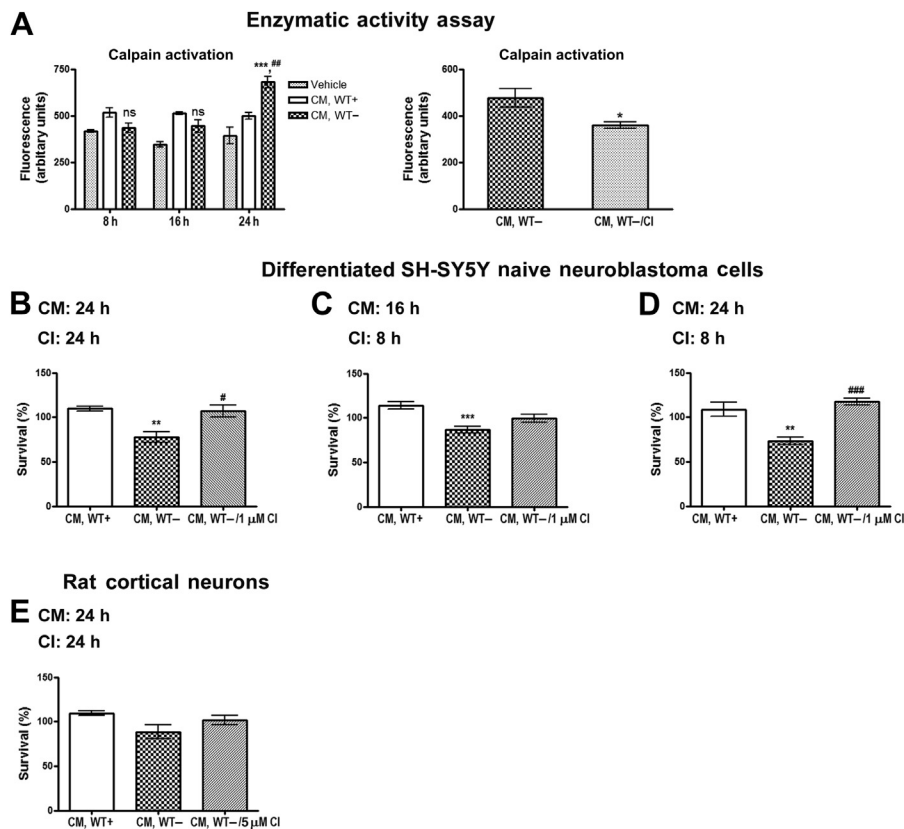


Fig. 6. Activation of calpains in recipient cells is a late effect of secreted AS. (A) Differentiated SH-SY5Y cells were incubated with CM, WT⁻, CM, WT⁺, or unconditioned medium (vehicle) for 8, 16, and 24 hours. (Left panel) Increased calpain activation was detected in AS-treated cells ($n = 3$; *** $p < 0.001$, comparing cells treated with vehicle and CM, WT⁻; ## $p < 0.01$, comparing cells treated with CM, WT⁺ and CM, WT⁻). (Right panel) Specificity of the assay was verified using CI ($n = 4$; * $p < 0.05$, comparing cells treated with CM, WT⁻). (B–D) Quantitative analysis of the percentage of cell survival after treatment with CM, WT⁺ or CM, WT⁻ in the presence or absence of CI ($n = 4$ in triplicate for all time points). Statistics were performed using 1-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, for cells treated with CM, WT⁺ vs. CM, WT⁻ in B, C, and D; # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$, for cells treated with CM, WT⁻ in the presence or absence of CI in B, and D). (E) Primary rat cortical neurons were incubated with CM, WT⁻ or CM, WT⁺ in the presence or absence of 5.0 μM CI for 24 hours. Abbreviations: AS, α -synuclein; CI, calpain inhibitor I A6185; CM, conditioned medium; CM, WT⁺, control CM; CM, WT⁻, AS-containing medium.

2010). The excimer to monomer ratio is an indicator of membrane fluidity with membrane rigidity bringing monomers in close proximity so as to create excised dimers, termed excimers. As shown in Fig. 7A, the excimer to monomer ratio is significantly reduced in AS-treated cells (1.488 ± 0.071 for CM, WT⁻, mean \pm SEM; $n = 6$) compared with CM, WT⁺-treated cells (1.725 ± 0.024 for CM, WT⁺, mean \pm SEM; $n = 6$), implying increased membrane fluidity. To exclude the possibility of dox interference in this setup, we collected CM from the Tet-Off parental SH-SY5Y line (2.22) expressing only the transactivator factor, in the absence or presence of dox. In both cases the excimer to monomer ratio was similar to that of the cells treated with the CM, WT⁺, suggesting that dox does not interfere with the fluidity assay. The ether phospholipid, miltefosine, known to directly interact and incorporate into the cell membrane, was used as a positive control for increased membrane fluidity (Fig. 7B).

3.8. The observed increase in Ca²⁺ entry is mostly attributed to the free extracellular- rather than the exosome-associated AS

Because AS is partly secreted via exosomes (Emmanouilidou et al., 2010), we finally sought to investigate the contribution of exosomes in the observed Ca²⁺ entry. We fractionated CM, WT⁻ and CM, WT⁺ into exosome-depleted supernatant (S100⁻ and S100⁺, respectively) and into exosome-enriched pellet (P100⁻ and P100⁺, respectively). Full CM and S100 supernatants were concentrated with using 3-kDa cutoff filters. P100 fractions were solubilized in RIPA buffer. Western blot analysis (Fig. 8A) revealed that only a small portion of secreted AS is present in the exosomal fraction, in accordance with our previous results (Emmanouilidou et al., 2010). Alix and flotillin-1 were used as biochemical markers for the exosome-enriched fraction, and BSA was used as loading control for CM and S100.

Exosomes from the CM, WT⁻ medium (P100⁻) were added in the S100⁺ supernatant from the CM, WT⁺ (S100⁺/P100⁻) and vice versa to yield an S100⁻/P100⁺ preparation. Cells were incubated with CM, WT⁻, control medium, or 1 of the previously described preparations (S100⁺, S100⁻, S100⁺/P100⁻, and S100⁻/P100⁺) for 8 hours. The recipient cells were loaded with Fura 2-AM, and ER depletion-induced Ca²⁺ influx was measured, as described earlier in text (Fig. 8B). Quantification of Ca²⁺ influx revealed that the observed increase is attributed largely to free extracellular AS (S100⁻) (percentage of Ca²⁺ influx, 117.2 ± 8.79 and 111.9 ± 10.87 , for cells treated with CM, WT⁻ and S100⁻, respectively). The addition of the exosome-associated AS (P100⁻) in the control S100⁺ supernatant did not significantly alter the CCE. This suggests that mainly free extracellular AS accounts for secreted AS-facilitated Ca²⁺ entry. This might be attributed to AS concentration, because only a small portion of secreted AS is packed in exosomes (Fig. 8A). Finally, the addition of P100⁺ to the S100⁻ did not lead to dramatic alterations of the CCE (percentage of Ca²⁺ influx 111.9 ± 10.87 and 101.3 ± 7.68 , for cells treated with S100⁻ and S100⁻/P100⁺, respectively), suggesting that the exosomes per se do not influence CCE.

4. Discussion

We have previously shown that cell-produced secreted AS is toxic to neuronal cells. Importantly, this toxicity did not appear to involve internalization of AS by the recipient neurons (Emmanouilidou et al., 2010). The aim of the current study was to investigate whether the effects of secreted AS on the recipient cells involve alterations at the level of the plasma membrane and deregulation of Ca²⁺ homeostasis.

To capture early events that could be pathologically relevant, the 8-hour treatment with CM containing secreted AS was chosen, because until that time point there are no overt signs of cellular degeneration. According to our results, 8-hour incubation with

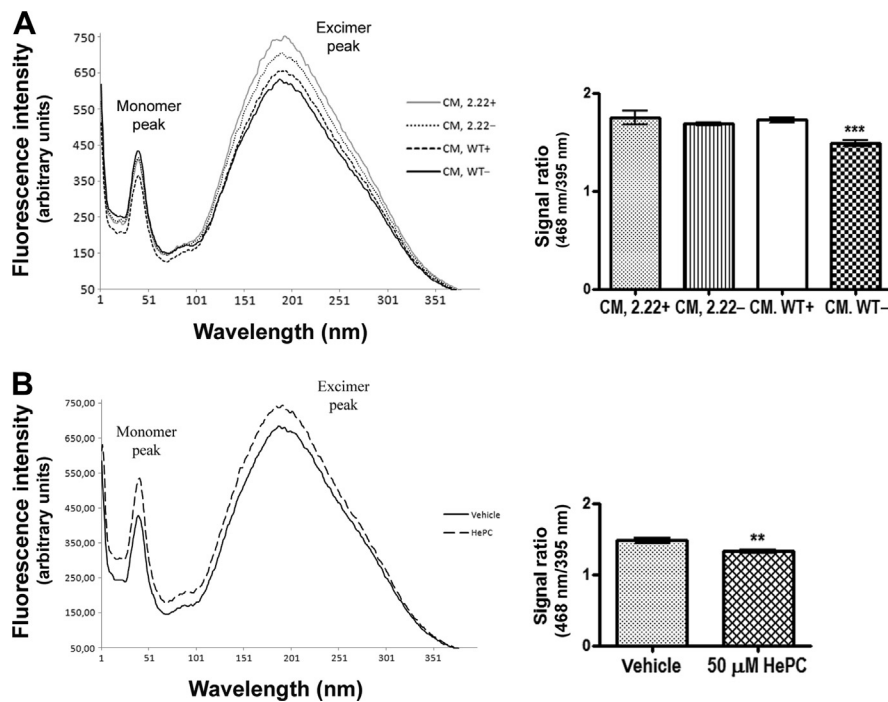


Fig. 7. Application of secreted AS-containing medium to neuronal cells affects their plasma membrane fluidity. (A) Differentiated SH-SY5Y cells were treated with CM, WT⁻ or control (CM, 2.22⁺, CM, 2.22⁻, CM, WT⁺) for 8 hours. Secreted AS induced changes in the microfluidic properties of the plasma membrane of the recipient cells. The graph depicts the excimer (468 nm) to monomer (395 nm) ratio ($n = 6$; *** $p < 0.001$ comparing the cells treated with CM, WT⁻ and control CMs [CM, 2.22⁺, CM, 2.22⁻, CM, WT⁺]). (B) Increased plasma membrane fluidity on treatment of differentiated SH-SY5Y cells with HePC for 8 hours ($n = 5$; ** $p < 0.01$, comparing the cells treated with vehicle and HePC, using unpaired t test). Abbreviations: AS, α -synuclein; CM, conditioned medium; CM, WT⁺, control CM; CM, WT⁻, AS-containing medium; HePC, miltefosine.

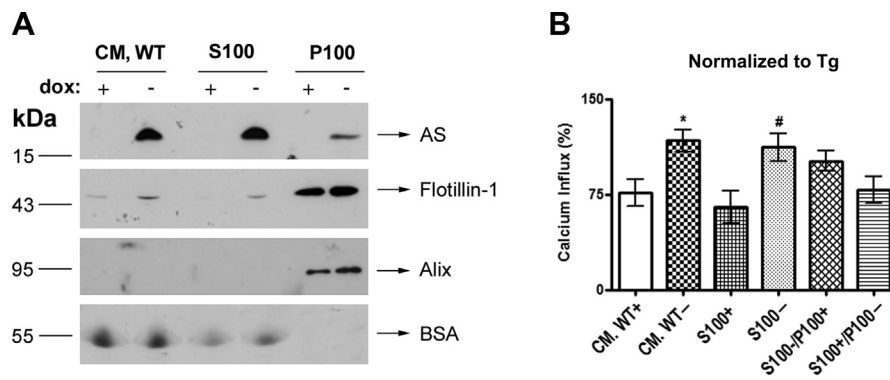


Fig. 8. Secreted AS-induced increase of CCE in recipient differentiated SH-SY5Y cells is mainly attributed to free AS. Control or secreted AS-containing CM was fractionated to yield exosome-depleted CM (S100⁺, S100⁻, respectively) and exosome-enriched pellet (P100). (A) CM, WT⁺/-, S100⁺/-, and P100⁺/-, were analyzed using Western immunoblot with antibodies against AS, flotillin-1, alix, and BSA. (B) The P100 isolated from CM, WT⁻ (P100⁻) was mixed with S100⁺ (S100⁺/P100⁻) and vice versa to create the S100⁻/P100⁺ preparation. Differentiated SH-SY5Y cells were treated either with CM, WT⁺ or CM, WT⁻ or with one of the following preparations: S100⁺, S100⁻, S100⁺/P100⁻, S100⁻/P100⁺, for 8 hours and CCE was measured. The graph illustrates quantification of CCE normalized to Tg-evoked Ca²⁺ release ($n = 3$, in duplicate; * $p < 0.05$ comparing cells treated with CM, WT⁺ and cells treated with CM, WT⁻; # $p < 0.05$ comparing between cells treated with S100⁺ and cells receiving S100⁻, using unpaired t test). Abbreviations: AS, α -synuclein; BSA, bovine serum albumin; Ca²⁺, calcium; CCE, capacitative calcium entry; CM, conditioned medium; CM, WT⁺, control CM; CM, WT⁻, AS-containing medium; dox, doxycycline; Tg, thapsigargin.

secreted AS was enough to cause Ca²⁺ perturbations, manifested by a significant increase in depleted ER-evoked Ca²⁺ entry (CCE), in differentiated SH-SY5Y cells and primary rat cortical neurons. The observed phenomenon greatly relies on the presence of secreted AS, because immunodepletion of the protein from the CM before administration to the cells does not alter CCE. Importantly, the presence of extracellular AS did not have any effect on the CCE of proliferating cells, which we have shown to be less susceptible to AS-conferred toxicity (Emmanouilidou et al., 2010). Additionally, reduction of cytosolic or extracellular Ca²⁺ levels via the BAPTA and EGTA Ca²⁺ chelators, respectively, spared recipient neuronal cells from AS-evoked toxicity. These data indicate that deregulation of Ca²⁺ homeostasis of the recipient cells is responsible, at least in part, for the neurotoxic potential of secreted AS. This raises the possibility that the differential toxic effects of secreted AS in neuronally differentiated versus proliferating cells (Emmanouilidou et al., 2010) might be related to its ability to alter Ca²⁺ homeostasis in the former, but not in the latter. Although an interplay between extracellular AS and alterations of Ca²⁺ homeostasis in the recipient cells has been suggested in previous reports, these were largely based on the use of recombinant AS; the current study is, to our knowledge, the first that etiologically links such early Ca²⁺ perturbations to secreted AS-mediated neurotoxicity.

To further elucidate the neurotoxic pathway triggered by secreted AS, we investigated the participation of plasma membrane Ca²⁺ channels. Because CCE was found to be increased in the presence of secreted AS, we sought to examine the involvement of SOCs. Although inhibition of SOCs by the specific inhibitor SKF, resulted in a significant reduction of CCE in control and AS-treated differentiated cells, the difference between the 2 groups in the presence of the inhibitor was not completely abolished. Such a finding implies that other plasma membrane channels could contribute to the AS-facilitated Ca²⁺ entry. Therefore we examined the role of the L- and N-type VOCs, using pharmacological inhibition with nif and cntx, respectively. Such treatment significantly reduces CCE to the control levels in differentiated cells, greatly alleviating AS-induced Ca²⁺ entry, suggestive of the involvement of VOCs in the observed phenomenon. In accordance with these findings, direct stimulation of VOCs by KCl depolarization led to a significantly higher Ca²⁺ influx in AS-treated cells compared with the control cells. Notably, inhibition of either L- or N-type VOCs greatly reduced Ca²⁺ influx on depolarization in both groups,

abolishing the difference between them. These findings prove the proper function of VOCs in the described cellular system and more importantly, verify the role of VOCs in secreted AS-evoked Ca²⁺ deregulation. Considering that we did not find any changes in the protein levels of VOCs (data not shown) on exposure of the cells to secreted AS, the described Ca²⁺ increase cannot be attributed to an upregulation of the expression levels of these channels. Instead, we saw that the presence of extracellular AS increased membrane fluidity of the recipient neuronal cells, potentially allowing the redistribution and clustering of plasma membrane receptors (including Ca²⁺-dependent channels), which in turn might facilitate their activation and sensitivity to Ca²⁺. Nonetheless, we cannot exclude the possibility of a direct interaction between secreted AS and the plasma membrane receptors, resulting in alteration of their function.

Because recombinant AS species have been shown to interact with artificial and biological membranes creating annular pores (Danzer et al., 2007; Tsigelny et al., 2012), we investigated the effect of AS on an Iono-evoked response. If the interaction of AS with the plasma membrane caused the formation of pores, the Iono-evoked response would result in a profound Ca²⁺ rise, in Ca²⁺-containing conditions. Nevertheless, we found no significant difference in [Ca²⁺]_i between AS-treated and control cells suggesting that the likelihood of pore formation (at least at this early time point) is unlikely. However, we cannot exclude the possibility that such pores are formed at later time points (Schmidt et al., 2012; Tsigelny et al., 2012). The notion that secreted AS perturbs the normal function of the plasma membrane of the recipient cells, by facilitating increased Ca²⁺ influx, is further supported by the significantly slow buffering rate of the Cch-evoked Ca²⁺ rise in Ca²⁺-containing compared with Ca²⁺-depleted conditions, exhibited by AS-treated cells compared with the control cells.

Despite the profound increase in the observed Ca²⁺ entry, no significant changes in the steady-state levels of [Ca²⁺]_i were measured in AS-treated cells compared with control cells. Sequential Ca²⁺ release from the ER and the acidic stores did not reveal any striking differences in both Ca²⁺-depleted and Ca²⁺-containing conditions, excluding the possibility of alterations in Ca²⁺ mobilization. Direct discharge of the mitochondrial Ca²⁺ content using simultaneous administration of the mitochondrial uncoupler FCCP and Oligo, showed significantly increased Ca²⁺ sequestration in AS-treated cells, suggestive of mitochondrial Ca²⁺

overload. It is possible that such overload might lead to mitochondrial dysfunction, thus linking extracellular AS and Ca^{2+} overload to the mitochondrial theory of PD pathogenesis (Benner et al., 2004; Cali et al., 2012; Vekrellis and Stefanis, 2012; Zhou et al., 2004).

Uncontrolled Ca^{2+} entry can result in the activation of calpains, a specific type of cysteine-protease that responds to Ca^{2+} signals (Medeiros et al., 2012). An increasing body of evidence gradually cements the notion that abnormal activation of calpains is 1 of the major culprits in a wide spectrum of brain disorders (Camins et al., 2006). However, the precise mechanism via which calpains regulate cell death pathways remains to be deciphered. Calpain activity was found to be increased in the protein preparations extracted from cells treated with AS for 24 hours, suggesting that calpain activation is a secondary event that follows Ca^{2+} deregulation. Considering that calpains can mediate caspase cleavage and activation (Camins et al., 2006), and that secreted AS-induced toxicity results in caspase-3 cleavage (Emmanouilidou et al., 2010), these data suggest a potential cross-talk between calpains and caspases. In our study, pharmacological inhibition of calpains protected neuronal cells from AS-induced death, further reinforcing the involvement of calpains in the described neurodegenerative process. However, this effect was more profound in differentiated SH-SY5Y cells than in rat cortical neurons, possibly because higher doses and more effective calpain inhibition were not achieved in the latter case, because of pharmacological toxicity observed with higher doses. In any case, the incomplete effects of calpain inhibition in rat cortical neurons suggest that other death pathways could contribute to the observed neurotoxicity.

It is important to note that an 8-hour treatment with chelating compounds (BAPTA, EGTA) and VOC inhibitors was enough to protect differentiated SH-SY5Y cells from 16 or 24 hours of total incubation with CM, WT-, thus placing Ca^{2+} deregulation at the beginning of the AS-triggered neurotoxic cascade. On the contrary, similar administration of CI started to be protective after the 16-hour incubation with CM, WT- and showed maximum protection after the 24-hour treatment. Taking into account the enzymatic activity data, which shows calpain activation after 16 hours of exposure to secreted AS, the above finding implies that calpains might be activated at 16 hours (albeit at low, nondetectable levels), but this activation was significant only at 24 hours. Therefore, it seems that calpain activation is 1 of the late events of the secreted AS-evoked neurotoxic cascade, downstream Ca^{2+} deregulation. However, further investigation is required to elucidate the precise involvement of calpains in this phenomenon.

We have shown that AS species can be delivered to the extracellular space, at least partly, via their association with exosomes. Measurements of CCE in recipient cells treated with free extracellular AS or exosome-associated AS preparations, revealed that free extracellular AS was more potent in inducing increased Ca^{2+} entry, compared with the exosome-associated protein. This difference in Ca^{2+} response might be because of the conformational changes that AS undergoes on packaging into exosomes which might affect its biochemical properties. In addition, considering that only a minor fraction of secreted AS is associated with exosomes (Danzer et al., 2012), this result might also reflect concentration differences.

Concluding, our findings indicate that secreted AS has neurotoxic effects, at least in part, through engagement of the Ca^{2+} homeostatic machinery. In this context, handling of Ca^{2+} signaling cascades might represent a potential therapeutic target for PD and related synucleinopathies by alleviating secreted AS-conferred neurotoxicity. Furthermore, our study provides a number of important novel mechanistic insights regarding the effect of secreted AS on neuronal cells. Initial effects leading to increased Ca^{2+} influx are linked to altered membrane fluidity, likely causing

clustering or oversensitization of VOCs, whereas pore formation does not appear to play a role at these early time points. In the further cascade of events, calpain activation and, possibly, mitochondrial Ca^{2+} overload, are important factors leading to neurotoxicity.

Disclosure statement

There is no actual or potential conflicts of interest related to the work presented in this manuscript.

All animals were handled according to the ethical standards of BRFAA under protocols approved by the Animal Care and Use Committee of the Institution and in accordance with the European Convention 123/Council of Europe and Directive 86/609/EEC.

Acknowledgements

The authors thank the BRFFA biological imaging facility for assistance with Ca^{2+} imaging experiments, and Dr Chroni for her technical advice on the setup of the membrane fluidity assay. This research was cofinanced by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds of the National Strategic Reference Framework (NSRF) – Research Funding Program: Heracleitus II. Additional funding for this project was provided by MEFOPA, FP7.

References

- Adamczyk, A., Strosznajder, J.B., 2006. Alpha-synuclein potentiates Ca^{2+} influx through voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Neuroreport* 17, 1883–1886.
- Banoczi, Z., Alexa, A., Farkas, A., Friedrich, P., Hudecz, F., 2008. Novel cell-penetrating calpain substrate. *Bioconjug. Chem.* 19, 1375–1381.
- Benner, E.J., Mosley, R.L., Destache, C.J., Lewis, T.B., Jackson-Lewis, V., Gorantla, S., Nemachek, C., Green, S.R., Przedborski, S., Gendelman, H.E., 2004. Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9435–9440.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529.
- Cali, T., Ottolini, D., Negro, A., Brini, M., 2012. α -Synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions. *J. Biol. Chem.* 287, 17914–17929.
- Camins, A., Verdaguier, E., Folch, J., Pallas, M., 2006. Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Rev.* 12, 135–148.
- Chivet, M., Hemming, F., Pernet-Gallay, K., Fraboulet, S., Sadoul, R., 2012. Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system. *Front. Physiol.* 3, 145.
- Churchill, G.C., Okada, Y., Thomas, J.M., Genazzani, A.A., Patel, S., Galione, A., 2002. NAADP mobilizes Ca^{2+} from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell* 111, 703–708.
- Dafnis, I., Stratikos, E., Tzinia, A., Tsilibary, E.C., Zannis, V.I., Chroni, A., 2010. An apolipoprotein E4 fragment can promote intracellular accumulation of amyloid peptide beta 42. *J. Neurochem.* 115, 873–884.
- Danzer, K.M., Haasen, D., Karow, A.R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B., Kostka, M., 2007. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J. Neurosci.* 27, 9220–9232.
- Danzer, K.M., Kranich, L.R., Ruf, W.P., Cagsal-Getkin, O., Winslow, A.R., Zhu, L., Vanderburg, C.R., McLean, P.J., 2012. Exosomal cell-to-cell transmission of alpha-synuclein oligomers. *Mol. Neurodegener.* 7, 42.
- Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889–909.
- de Brito, O.M., Scorrano, L., 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605–610.
- Demuro, A., Parker, I., Stutzmann, G.E., 2010. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 285, 12463–12468.
- Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S.D., Ntzouni, M., Margaritis, L.H., Stefanis, L., Vekrellis, K., 2010. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J. Neurosci.* 30, 6838–6851.
- Farinelli, S.E., Greene, L.A., Friedman, W.J., 1998. Neuroprotective actions of dipyrindamole on cultured CNS neurons. *J. Neurosci.* 18, 5112–5123.
- Furukawa, K., Matsuzaki-Kobayashi, M., Hasegawa, T., Kikuchi, A., Sugeno, N., Itoyama, Y., Wang, Y., Yao, P.J., Bushlin, I., Takeda, A., 2006. Plasma membrane ion permeability induced by mutant alpha-synuclein contributes to the degeneration of neural cells. *J. Neurochem.* 97, 1071–1077.

- Galla, H.J., Luisetti, J., 1980. Lateral and transversal diffusion and phase transitions in erythrocyte membranes. An excimer fluorescence study. *Biochim. Biophys. Acta* 596, 108–117.
- Gasser, T., 2009. Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. *Expert Rev. Mol. Med.* 11, e22.
- Greer, P.L., Greenberg, M.E., 2008. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron* 59, 846–860.
- Hashimoto, M., Hossain, S., Masumura, S., 1999. Effect of aging on plasma membrane fluidity of rat aortic endothelial cells. *Exp. Gerontol.* 34, 687–698.
- Hettiarachchi, N.T., Parker, A., Dallas, M.L., Pennington, K., Hung, C.C., Pearson, H.A., Boyle, J.P., Robinson, P., Peers, C., 2009. α -Synuclein modulation of Ca²⁺ signaling in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *J. Neurochem.* 111, 1192–1201.
- Kang, S., Cooper, G., Dunne, S.F., Dusel, B., Luan, C.H., Surmeier, D.J., Silverman, R.B., 2012. CaV1.3-selective L-type calcium channel antagonists as potential new therapeutics for Parkinson's disease. *Nat. Commun.* 3, 1146.
- Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Olanow, C.W., Freeman, T.B., 2008. Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report. *Mov. Disord.* 23, 2303–2306.
- Lamarca, V., Scorrano, L., 2009. When separation means death: killing through the mitochondria, but starting from the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 28, 1681–1683.
- Li, J.Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehnroona, S., Bjorklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O., Brundin, P., 2008. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* 14, 501–503.
- Martin, Z.S., Neugebauer, V., Dineley, K.T., Kaye, R., Zhang, W., Reese, L.C., Tagliatela, G., 2012. α -Synuclein oligomers oppose long-term potentiation and impair memory through a calcineurin-dependent mechanism: relevance to human synucleinopathies. *J. Neurochem.* 120, 440–452.
- Medeiros, R., Kitazawa, M., Chabrier, M.A., Cheng, D., Baglietto-Vargas, D., Kling, A., Moeller, A., Green, K.N., LaFerla, F.M., 2012. Calpain inhibitor A-705253 mitigates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline in aged 3xTgAD mice. *Am. J. Pathol.* 181, 616–625.
- Nalls, M.A., Plagnol, V., Hernandez, D.G., Sharma, M., Sheerin, U.M., Saad, M., Simon-Sanchez, J., Schulte, C., Lesage, S., Sveinbjornsdottir, S., Stefansson, K., Martinez, M., Hardy, J., Heutink, P., Brice, A., Gasser, T., Singleton, A.B., Wood, N.W., 2011. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet* 377, 641–649.
- Papazafiri, P., Bossi, M., Meldolesi, J., 1994. Expression of muscle calsequestrin in epithelial HeLa cells: distribution and functional role. *Biochim. Biophys. Acta* 1223, 333–340.
- Patel, S., Docampo, R., 2010. Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca²⁺ signaling. *Trends Cell Biol.* 20, 277–286.
- Schmidt, F., Levin, J., Kamp, F., Kretzschmar, H., Giese, A., Botzel, K., 2012. Single-channel electrophysiology reveals a distinct and uniform pore complex formed by alpha-synuclein oligomers in lipid membranes. *PLoS One* 7, e42545.
- Smaili, S.S., Russell, J.T., 1999. Permeability transition pore regulates both mitochondrial membrane potential and agonist-evoked Ca²⁺ signals in oligodendrocyte progenitors. *Cell Calcium* 26, 121–130.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., Goedert, M., 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840.
- Stefanis, L., Park, D.S., Friedman, W.J., Greene, L.A., 1999. Caspase-dependent and -independent death of camptothecin-treated embryonic cortical neurons. *J. Neurosci.* 19, 6235–6247.
- Surmeier, D.J., Guzman, J.N., Sanchez-Padilla, J., 2010. Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Cell Calcium* 47, 175–182.
- Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., Clayton, A., 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 3, Unit 3.22.
- Tsigelny, I.F., Sharikov, Y., Wrasidlo, W., Gonzalez, T., Desplats, P.A., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., 2012. Role of alpha-synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation. *FEBS J.* 279, 1000–1013.
- Vekrellis, K., Stefanis, L., 2012. Targeting intracellular and extracellular alpha-synuclein as a therapeutic strategy in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Expert Opin. Ther. Targets* 16, 421–432.
- Vekrellis, K., Xilouri, M., Emmanouilidou, E., Rideout, H.J., Stefanis, L., 2011. Pathological roles of alpha-synuclein in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 10, 1015–1025.
- Vekrellis, K., Xilouri, M., Emmanouilidou, E., Stefanis, L., 2009. Inducible over-expression of wild type alpha-synuclein in human neuronal cells leads to caspase-dependent non-apoptotic death. *J. Neurochem.* 109, 1348–1362.
- Vogiatzi, T., Xilouri, M., Vekrellis, K., Stefanis, L., 2008. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 283, 23542–23556.
- Yamasaki, M., Masgrau, R., Morgan, A.J., Churchill, G.C., Patel, S., Ashcroft, S.J., Galione, A., 2004. Organelle selection determines agonist-specific Ca²⁺ signals in pancreatic acinar and beta cells. *J. Biol. Chem.* 279, 7234–7240.
- Zhou, C., Emadi, S., Sierks, M.R., Messer, A., 2004. A human single-chain Fv intrabody blocks aberrant cellular effects of overexpressed alpha-synuclein. *Mol. Ther.* 10, 1023–1031.
- Zundorf, G., Reiser, G., 2011. Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antiox. Redox Signal* 14, 1275–1288.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Αικατερίνη Χ. Μελαχροινού

ΗΜ/ΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 13/04/1984

ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Μαρούσι Αττικής

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: ΑΓΑΜΕΜΝΟΝΟΣ 28, Τ.Κ.:176 75, ΚΑΛΛΙΘΕΑ

ΤΗΛΕΦΩΝΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ: 210-9417174, +306944633616

email: kmelachr@bioacademy.gr

kmelachroinou@yahoo.com

ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2008-2013:** Διδακτορική διατριβή: «*Επίδραση των εκκρινόμενων μορφών της α-συνουκλεΐνης σε νευρικά κύτταρα. Συσχέτιση με τη νόσο του Parkinson*». Τομέας βασικών Νευροεπιστημών, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών & Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- 2007:** Εκπαίδευση στο χειρισμό διαγονιδιακών μυγών, στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Πτυχίο Βιολογίας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»
- 2002-2007:** Πτυχίο Βιολογίας «Λίαν Καλώς» (7,43/10). Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- 2005-2006:** Εκπόνηση προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας: «Μελέτη του ομοδιμερισμού της πρωτεΐνης BRI2». «Άριστα» (10/10). Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

ΑΓΓΛΙΚΑ (First Certificate in English, Cambridge University, Certificate of Proficiency in English, University of Michigan)

ΓΑΛΛΙΚΑ (DEL F 1 Certificate, DEL F 2 Certificate, DAL F Certificate)

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ:

2010-2013: Υποτροφία Ηράκλειτος ΙΙ, Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου. Συγχρηματοδότηση της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και εθνικών πόρων μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ).

2011: FEBS Travel Grant

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΤΡΟΠΕΣ ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ:

2013: Μέλος της οργανωτικής επιτροπής διοργάνωσης του 1^{ου} Πανελληνίου Forum Νέων Επιστημόνων, στα πλαίσια του 63^{ου} Συνεδρίου της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- Κυτταροκαλλιέργειες (καλλιέργεια κυτταρικών σειρών, πρωτογενείς καλλιέργειες)
- Διαμόλυνση κυττάρων με cDNA
- Επιμόλυνση κυττάρων με ιούς
- Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες
- Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης
- Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης
- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

- Υποκλωνοποίηση κομματιών DNA σε φορείς έκφρασης
- Παρασκευή δεκτικών βακτηρίων (competent)
- Μετασηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA (transformation)
- Απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και διαφορική απομόνωση πυρηνικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών
- Ανοσοκατακρήμνιση & συνανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών από ολικό κυτταρικό εκχύλισμα
- Σήμανση κυττάρων με ραδιενέργεια (^{35}S labeling)
- Ανοσοδοκιμασία κατά Western
- Ανοσοκυτταροχημεία
- Ανοσοϊστοχημεία
- Φθορισμομετρικός προσδιορισμός ιόντων Ca^{2+}
- Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας καλπαϊνών
- Προσδιορισμός ρευστότητας πλασματικής μεμβράνης κυττάρων
- Χημική διασύνδεση πρωτεϊνών με ειδικά αντιδραστήρια (cross linking)
- Ανατομία εγκεφάλου μύος & επίμυος
- Χειρισμός μυών & επίμυων
- Χειρισμός μυγών *Drosophila melanogaster* και δημιουργία διαγονιδιακών μυγών

ΆΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Πολύ καλή γνώση των ακόλουθων λογισμικών προγραμμάτων ηλεκτρονικού υπολογιστή:

- Εφαρμογές Microsoft Office 2010: Word, Excel, PowerPoint
- Λογισμικά επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνων: Adobe Photoshop CS5, GelAnalyzer 1.0, ImageJ
- Λογισμικό στατιστικής ανάλυσης: GraphPad Prism 5

ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

- Emmanouilidou E, **Melachroinou K**, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, Stefanis L, Vekrellis K. (2010) Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. J Neurosci. 30(20):6838-51
- **Melachroinou K**, Xilouri M, Emmanouilidou E, Masgrau R, Papazafiri P, Stefanis L, Vekrellis K. (2013) Deregulation of Ca²⁺ homeostasis mediates secreted alpha-synuclein-induced neurotoxicity. Neurobiology of Aging 34(12):2853-65

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **5^ο Συνέδριο EMBO, 21-24 Σεπτεμβρίου 2013, Αμσטרνταμ, Ολλανδία**
Melachroinou K., Xilouri M, Emmanouilidou E, Masgrau R, Papazafiri P., Stefanis L., Vekrellis K. Deragulation of Ca²⁺ homeostasis mediates secreted α-synuclein-induced neurotoxicity.
- **Διημερίδα Νευροεπιστημών της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες, 02-04 Νοεμβρίου 2012, Αθήνα, Ελλάδα**
Melachroinou K., Xilouri M, Emmanouilidou E, Papazafiri P., Stefanis L., Vekrellis K. Dysregulation of Ca²⁺ homeostasis contributes to extracellular α-synuclein-mediated neurotoxicity.
- **8^ο Συνέδριο της Ομοσπονδίας των Ευρωπαϊκών Νευροεπιστημών (FENS), 14-18 Ιουλίου 2012, Βαρκελώνη, Ισπανία**
Melachroinou K., Xilouri M, Emmanouilidou E, Papazafiri P., Stefanis L., Vekrellis K. Dysregulation of Ca²⁺ homeostasis contributes to extracellular α-synuclein-mediated toxicity.
- **Δορυφορικό Συνέδριο της Διεθνούς Εταιρείας Νευρογερμείας, 02-04 Σεπτεμβρίου 2011, Νάξος, Ελλάδα**
Melachroinou K., Xilouri M, Martzoukou O., Papazafiri P., Stefanis L., Vekrellis K. α-Synuclein-induced dysregulation of Ca²⁺ homeostasis contributes to neuronal toxicity.

- **Συνέδριο Διεθνούς Εταιρείας Νευροχημείας, 28-31 Αυγούστου 2011, Αθήνα, Ελλάδα.**
Melachroinou K., Xilouri M, Martzoukou O., Emmanouilidou E., Papazafiri P., Stefanis L., Vekrellis K. Effects of Secreted wild type a-synuclein on Ca²⁺ homeostasis in neuronal cells.
- **36^ο Συνέδριο της Ομοσπονδίας Ευρωπαϊκών Βιοχημικών Εταιρειών (FEBS), 25-30 Ιουνίου 2011, Τορίνο, Ιταλία**
Melachroinou K., Xilouri M, Martzoukou O., Emmanouilidou E., Stefanis L., Papazafiri P., Vekrellis K. Effects of Secreted wild type a-synuclein on Ca²⁺ homeostasis
- **7^ο Συνέδριο της Ομοσπονδίας των Ευρωπαϊκών Νευροεπιστημών (FENS), 03-07 Ιουλίου 2010, Αμστερνταμ, Ολλανδία**
Melachroinou K., Emmanouilidou E., Stefanis L., Vekrellis K. Effects of Secreted wild type a-synuclein on neuronal homeostasis.
- **23^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες, 13-18 Σεπτεμβρίου 2009, Ρόδος, Ελλάδα**
Melachroinou K., Emmanouilidou E., Stefanis L., Vekrellis K. Effects of Secreted wild type a-synuclein on neuronal homeostasis.
- **31^ο Συνέδριο Βιολογίας της Ελληνικής Εταιρείας για τις Βιολογικές Επιστήμες, 14-16 Μαΐου 2009, Πάτρα, Ελλάδα**
Melachroinou K., Emmanouilidou E., Stefanis L., Vekrellis K. Effects of Secreted wild type a-synuclein on neuronal homeostasis.
- **22^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες, 16-19 Οκτωβρίου 2008, Αθήνα, Ελλάδα**
Melachroinou K., Emmanouilidou E., Stefanis L., Vekrellis K. Secreted wild type a-synuclein is toxic to neurons.
- **6^ο Συνέδριο της Ομοσπονδίας των Ευρωπαϊκών Νευροεπιστημών (FENS), 12-16 Ιουλίου 2008, Γενεύη, Ελβετία**
Tsachaki M., Melachroinou K., Kyrargyri V., Rostagno A., Ghiso J., Efthimiopoulos S. BRI2 protein homodimerizes via disulfide bond formation.
- **21^ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας για τις Νευροεπιστήμες, 30 Νοεμβρίου-01 Δεκεμβρίου 2008, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα**
Tsachaki M., Melachroinou K., Kyrargyri V., Rostagno A., Ghiso J., Efthimiopoulos S. BRI2 protein homodimerizes via disulfide bond formation.

- **29^ο Συνέδριο Βιολογίας της Ελληνικής Εταιρείας για τις Βιολογικές Επιστήμες, 17-19 Μαΐου 2007, Καβάλα, Ελλάδα**

Tsachaki M., Melachroinou K., Toli D., Efthimiopoulos S. BRI2 protein forms homodimers with the contribution of disulfide bonds.

Tsachaki M., Melachroinou K., Kyrargyri V., Efthimiopoulos S. Cysteine at position 89 and non-covalent interactions participate in homodimerization of BRI2 protein expressed at the cell-surface.

- **28^ο Συνέδριο Βιολογίας της Ελληνικής Εταιρείας για τις Βιολογικές Επιστήμες, 18-20 Μαΐου 2006, Ιωάννινα, Ελλάδα**

Tsachaki M., Melachroinou K., Ghiso J., Efthimiopoulos S. The formation of disulfide bonds between cysteine residues participates in BRI2 protein homodimerization.

ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΟ ΕΡΓΟ:

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΠΙΒΛΕΨΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

Προπτυχιακές διπλωματικές εργασίες:

Μαρτζούκου Όλγα (2011-2012): «Ρόλος της απορρύθμισης της ομοιόστασης ασβεστίου στην τοξικότητα που επιφέρει η α -συνουκλεΐνη σε SH-SY5Y κύτταρα νευροβλαστώματος ανθρώπου»