



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Τομέας Κοινωνικής Ιατρικής – Ψυχιατρικής και Νευρολογίας

Βιολογικοί δείκτες στη Νόσο του Πάρκινσον

Διδακτορική Διατριβή
Παπαγιαννάκη Δ. Νικολάου
Ιατρού

Αθήνα 2019

Ημερομηνία Αιτήσεως:	14/06/2013
Ημερομηνία Ορισμού Τριμελούς:	14/07/2014
Ημερομηνία Ορισμού Θέματος:	04/10/2014
Ημερομηνία Ορισμού Επταμελούς:	24/07/2019
Ημερομηνία Υποστήριξης Δ.Δ.:	07/11/2019

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Στεφανής Λεωνίδας (επιβλέπων)	Καθηγητής Νευρολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Καπάκη Ελισσάβετ	Καθηγήτρια Νευρολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Βεκρέλης Κωνσταντίνος	Ερευνητής Β', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Στεφανής Λεωνίδας (επιβλέπων)	Καθηγητής Νευρολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Καπάκη Ελισσάβετ	Καθηγήτρια Νευρολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Βεκρέλης Κωνσταντίνος	Ερευνητής Β', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών
Παρασκευάς Γεώργιος	Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Παπαγεωργίου Σωκράτης	Αναπληρωτής Καθηγητής Νευρολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Κούτσης Γεώργιος	Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Δοξάκης Επαμεινώνδας	Ερευνητής Γ', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

Πρόεδρος Τμήματος Ιατρικής

Σφηκάκης Πέτρος

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής ξεκίνησε το 2014 και ολοκληρώθηκε το 2019. Η εκπόνηση πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια του Τομέα Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (I.I.B.E.A.A.), καθώς και στα ειδικά ιατρεία κινητικών διαταραχών της Β΄ Πανεπιστημιακής Νευρολογικής κλινικής στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικών» και της Α΄ Πανεπιστημιακής Νευρολογικής κλινικής στο Αιγινήτειο Νοσοκομείο. Στα χρόνια αυτά χρειάστηκα τη συνεισφορά και τη συμπαράσταση πολλών ανθρώπων για να μπορέσω να ολοκληρώσω τόσο το εργαστηριακό όσο και το θεωρητικό μέρος της έρευνάς μου, χωρίς τη συνδρομή των οποίων δεν θα μπορούσα να ολοκληρώσω αυτή τη μελέτη.

Κατ' αρχάς, αισθάνομαι βαθιά υποχρεωμένος να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Λεωνίδα Στεφανή, Καθηγητή Νευρολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, για την αμέριστη συμπαράστασή του αυτά τα χρόνια. Η μαθητεία δίπλα του και η ένταξή μου στην ερευνητική του ομάδα ήταν καθοριστική αφενός μεν για τη συγκρότηση της επιστημονικής μου σκέψης και αφετέρου για την απόφαση μου να ασχοληθώ με την παρούσα έρευνα. Ο συνεχής διάλογος μαζί του πάνω σε θέματα που σχετίζονται γενικά με τη Νευρολογία και πιο ειδικά με τη νόσο Πάρκινσον με βοήθησε να συλλάβω την αρχική ιδέα της έρευνας και εν συνεχεία με τις εμπειριστατωμένες γνώσεις του επί της νόσου, με καθοδήγησε στη συγγραφή αυτής της εργασίας. Τον ευχαριστώ, ακόμα, για την αμέριστη εμπιστοσύνη που έδειξε προς το άτομό μου, την άψογη συνεργασία και για την ενθάρρυνση να συνεχίσω την προσπάθεια μου μέχρι το τέλος.

Τις θερμές μου ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την Δρ. Ελισσάβετ Καπάκη, Καθηγήτρια Νευρολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, και τον Δρ. Κωνσταντίνο Βεκρέλη, Ερευνητή Β΄, του Τομέα Βασικής Έρευνας του I.I.B.E.A.A. Τους ευχαριστώ για μία ακόμη φορά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, για την προθυμία τους να ακούσουν τους προβληματισμούς μου, για τις ουσιαστικές τους παρεμβάσεις, υποδείξεις και παρατηρήσεις κατά τη φάση επεξεργασίας του θέματος αλλά και για την τιμή που μου έκαναν να είναι επόπτες της διατριβής μου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τους κ.κ. Παρασκευά Γεώργιο, Παπαγεωργίου Σωκράτη, Κούτση Γεώργιο και Δοξάκη Επαμεινώνδα για την συμπαράσταση και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρ. Μαρία Ξυλούρη, Ερευνήτρια Δ΄ του Τομέα Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α., η οποία με ευγένεια, προθυμία, υπομονή και κατανόηση με βοήθησε από την πρώτη στιγμή στα πρώτα μου βήματα που αφορούσαν στη διεξαγωγή των πειραμάτων. Χωρίς τη συμβολή της μέσω των πολύτιμων παραινέσεων και συμβουλών της δεν θα ήμουν σε θέση να φέρω εις πέρας το εργαστηριακό κομμάτι της έρευνας.

Ευχαριστώ, ακόμη την Δρ. Ματίνα Μανιάτη, Τεχνικός Εργαστηρίου Νευροεκφυλιστικών Νοσημάτων του Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α, οποία από την πρώτη στιγμή που καταπιάστηκα με τη διεξαγωγή των πειραμάτων στον εργαστηριακό πάγκο, σε ότι είχε να κάνει με την οργάνωση αυτών στάθηκε δίπλα μου και με υποστήριξε με κάθε τρόπο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στη συνάδελφο κ. Γεωργία Νικολοπούλου, η οποία ήταν από τα πρώτα άτομα που μου υπέδειξαν πώς να φέρνω εις πέρας τα πειράματα. Την ευχαριστώ για τη φιλία της, την υπομονή της, τις συμβουλές και την ενθάρρυνση που κατά καιρούς μου έδινε.

Δεν γίνεται να μην ευχαριστήσω την Δρ. Μαρία Σταμέλου Καθηγήτρια Νευρολογίας στο Philipps-Universität Marburg της Γερμανίας, για την εποικοδομητική συνεργασία μας. Η κ. Σταμέλου μου μετέδωσε τις γνώσεις της πάνω στις κινητικές διαταραχές και την ευγνωμονώ γι' αυτό.

Εν συνεχεία, οφείλω να ευχαριστήσω τους Χρήστο Κορό, Ρουμπίνα Αντωνέλου και Αθηνά Σιμιτσή για την άριστη και εποικοδομητική συνεργασία καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια που αλόγιστα μου προσέφεραν, αφού αυτοί ήταν επιφορτισμένοι με τη λήψη και τη συγκέντρωση των απαιτούμενων προς έρευνα δειγμάτων που λαμβάνονταν από τους ασθενείς.

Τέλος, δεν γίνεται να μην αναφερθώ στους συναδέλφους του εργαστηρίου με τους οποίους μοιράστηκα τις ανησυχίες, τους φόβους και τον ενθουσιασμό για την έρευνα. Με τους Κατερίνα Μελαχροινού, Γεωργία Ντερμεντζάκη, Oystein Brekk, Αλεξία Πολυσίδη, Hardy Rideout, Άννα Μέμου, Ευαγγελία Εμμανουηλίδου, Εμμανουέλα Λεάνδρου, Μάντια Καραμπέτσου, Μεθόδιο Ξημεράκη, Γιοβάννα Αριάνογλου, Μαρία Κεραμιώτη και Βάσια Συκιώτη αλληλεπιδράσαμε και αλληλο-

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

υποστηριχτήκαμε, βοηθώντας ο ένας τον άλλο να βγει από τα ερευνητικά αδιέξοδα στα οποία περιήλθαμε στα χρόνια της κοινής πορείας.

Βέβαια, αυτή η διατριβή δε θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς τη βοήθεια και τη συμπαράσταση με ποικίλους τρόπους των γονέων μου, της Βάσιας και των φίλων μου. Αρωγοί κάθε μου προσπάθειας, στα χρόνια ενασχόλησης μου με την παρούσα έρευνα υποστήριξαν την προσπάθειά μου, υπομένοντας το άγχος, τη νευρικότητα και την ένταση που συχνά με διακατείχαν.

Νίκος Παπαγιαννάκης
Αθήνα, Νοέμβριος 2019

Ὁρκος του Ιπποκράτη

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἱητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἵστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὅρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρῆζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτοῦ ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρῆζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἱητρικῷ, ἅλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἵρξῃν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρῆξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὁκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἦ ἀκούσω, ἦ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρήτα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὁρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποίοντι, καὶ μὴ ξυγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιорκοῦντι, τάναντία τουτέων.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

3-MA: 3-μεθυλαδενίνη

4-MU-β-Glc: 4-methylumbelliferyl β-D-glucopyranoside

A53T-PD: ασθενείς φορείς της p.A53T/c.G209A μετάλλαξης στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης, το SNCA

AD: νόσος Alzheimer, (Alzheimer's Disease)

ANOVA: Analysis Of Variance

APS: υπερθειϊκό αμμώνιο, (ammonium persulfate)

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

AUC: Area Under the Curve

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

CBE: conduritol-β-epoxide

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

ddH₂O: δισαπεσταγμένο νερό

DLB: άνοια με σωμάτια Lewy (Dementia with Lewy Bodies)

DMSO: διμεθυλο-σουλφοξείδιο, (dimethyl sulfoxide)

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

ECL: ενισχυμένη χημειοφωταύγεια, (Enhanced Chemiluminescence)

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EtBr: βρωμιούχο αιθίδιο, (Ethidium bromide)

FBS: Ορός εμβρύου μόσχου, (Fetal Bovine Serum)

g: πρότυπη επιτάχυνση της βαρύτητας, ίση με 9,806 m/s²

GBA: Γονίδιο της β-γλυκοσερεβροσιδάσης (Glucosylceramidase Beta Acid)

GBA-PD: ασθενείς φορείς μεταλλάξεων στο γονίδιο της β-γλυκοσερεβροσιδάσης

GCase: β-γλυκοσερεβροσιδάση, (β-glucocerebrosidase)

GD: Gaucher's Disease

GU-PD: ασθενείς αγνώστου γενετικού υποβάθρου, (Genetically Undetermined – PD Patients)

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

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

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)

iPS: Induced Pluripotent Stem cells

kDa: kilo Dalton, 1000 Dalton, μονάδας μέτρησης μοριακής μάζας

LB: σωματίδια Lewy, (Lewy bodies)

LN: νευρίτες Lewy, (Lewy neurites)

LRRK2: leu~~cine-rich rep~~e~~at serine/threonine-protein kinase 2~~

miRNA: micro RNA

MMSE: Mini-Mental Standard Examination

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)

mTOR: mammalian target of rapamycin

NaCl: Χλωριούχο Νάτριο

NACP: μη-Αβ αμυλοειδές συστατικό των πλακών της νόσου Alzheimer, (non Aβ-component of plaque of Alzheimer's disease)

NMDAR: υποδοχέας του NMDA, (NMDA receptor)

NMS: μη κινητικές διαταραχές, (non-motor symptoms)

PBMC: Μονοπύρηνια Κύτταρα του Περιφερικού Αίματος, (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PBS: διάλυμα φωσφορικών αλάτων, (phosphate buffered saline)

PD: νόσος του Parkinson, (Parkinson's disease)

PSP: Προϊούσα Υπερπυρηνική Παράλυση (Progressive Supranuclear Palsy)

PRKN: parkin

PrP: πρωτεΐνη prion, (Prion protein)

RBD: Διαταραχές ύπνου R.E.M (REM-sleep Behaviour Disorder)

RIPA Buffer: διάλυμα ραδιοανοσοκατακρήμνισης, (Radioummunoprecipitation Assay Buffer)

ROC: Reciever Operating Characteristic

ROI: περιοχής ενδιαφέροντος (region of interest)

ROS: ενεργές μορφές οξυγόνου, (reactive oxygen species)

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

RT: θερμοκρασία δωματίου, (room temperature)

RT-PCR: αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (ReaT-Time Polymerase Chain Reaction)

SDS: δωδεκυλο-θειικό νάτριο, (sodium dodecyl-sulphate)

SD: τυπική απόκλιση, (standard deviation)

SNARE: Soluble NSF Attachment Protein Receptor

SNCA: γονίδιο α-συνουκλεΐνης, (α-synuclein gene)

SNpc: συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας, (Substantia nigra pars compacta)

SNP: πολυμορφισμοί μεμονωμένου νουκλεοτιδίου, (Single-nucleotide polymorphism)

SNV: παραλλαγές μεμονωμένου νουκλεοτιδίου, (Single-nucleotide variation)

STET: Saline, Tris, EDTA, Triton X-100

TEMED: τετραμεθυλ-μεθυλ-αιθυλενο-διαμίνη, (tetramethyl-ethylene-diamine)

UPDRS: Unified Parkinson's Disease Rating Scale

UPP: μονοπάτι αποδόμησης ουβικουϊτινης-πρωτεασώματος, (Ubiquitin-proteasome pathway)

WFI: Water for Injection

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

ΔΕ: Διάστημα Εμπιστοσύνης

ΕΔ: Ενδοπλασματικό Δίκτυο

ΕΝΥ: εγκεφαλονωτιαίο υγρό

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

ΝΠ: Νόσος Πάρκινσον

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	iii
Όρκος του Ιπποκράτη.....	6
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	vii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Η νόσος Πάρκινσον.....	9
1.1.1 Κλινικά συμπτώματα.....	9
1.1.2 Παθολογοανατομικές αλλοιώσεις	13
1.1.3 Γενετικές μορφές της νόσου Πάρκινσον	16
1.1.4 Γενετικές μορφές της νόσου Πάρκινσον που ανευρίσκονται στον ελληνικό πληθυσμό.....	18
1.1.5 Περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου	20
1.1.6 Μηχανισμοί νευροεκφύλισης στη νόσο Πάρκινσον.....	21
1.2 Κυτταρική Βιολογία και Βιοχημεία της α-Συνουκλεΐνης	23
1.2.1 Δομή και εντοπισμός της α-συνουκλεΐνης	23
1.2.2 Ο φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης	27
1.2.3 Ο παθολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης και η σχέση της με τη νόσο Πάρκινσον	30
1.2.4 α-συνουκλεΐνη και τάση για συσσωμάτωση	32
1.3 Αυτοφαγία και ο ρόλος της στη νόσο Πάρκινσον.....	34
1.3.1 Κυτταρικά μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών.....	34
1.3.2 Το μονοπάτι Πρωτεασώματος – Ουβικουτίνης.....	34
1.3.3 Το μονοπάτι Αυτοφαγίας – Λυσοσώματος	35
1.3.4 Μικροαυτοφαγία	37
1.3.5 Μακροαυτοφαγία	37
1.3.6 Αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από Σαπερόνες	40
1.3.7 Λυσοσωμική λειτουργία και μονοπάτια αυτοφαγίας και η σχέση τους με την α-συνουκλεΐνη	43
1.4 Βιολογικοί δείκτες για τη νόσο Πάρκινσον.....	47
1.4.1 Βιολογικοί δείκτες – Γενικά.....	47
1.4.2 Βιοχημικοί δείκτες στο Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό.....	49
1.4.3 Βιοχημικοί δείκτες στο αίμα.....	52
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	55

2.1 Δείκτες αυτοφαγικής δυσλειτουργίας	55
2.1.1 Στα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος	56
2.1.2 Σε εγκεφαλικούς ιστούς.....	58
2.2 Ολιγομερισμός της α-συνουκλεΐνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια	59
2.3 Συνοπτικά	61
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	62
3.1 Συμμετέχοντες	62
3.1.1 Διαχωρισμός δειγμάτων σε γενετικές κατηγορίες.....	63
3.1.2 Δημογραφικά στοιχεία	64
3.2 Μέθοδοι συλλογής δειγμάτων	65
3.3 Μέθοδοι απομόνωσης	66
3.3.1 Απομόνωση DNA.....	66
3.3.2 Απομόνωση PBMCs.....	66
3.3.3 Απομόνωση ερυθρών αιμοσφαιρίων	67
3.3.4 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών.....	68
3.3.5 Απομόνωση mRNA.....	68
3.3.6 Δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης	70
3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός περιεκτικότητας.....	70
3.4.1 Προσδιορισμός περιεκτικότητας νουκλεϊκών οξέων με φωτομέτρηση	70
3.4.2 Προσδιορισμός περιεκτικότητας πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	71
3.5 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.....	71
3.6 Μέτρηση επιπέδων πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western ...	72
3.6.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) 72	
3.6.2 Αφαίρεση αντισώματος από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	74
3.6.3 Χρώση πρωτεϊνών με Ponceau S.....	74
3.6.4 Έλεγχος ειδικότητας αντισωμάτων	75
3.7 Μέτρηση επιπέδων mRNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.....	76
3.8 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γλυκοσερεβροσιδάσης.....	78
3.9 In vitro μελέτη λειτουργικότητας βασικών μονοπατιών αυτοφαγίας.....	80
3.10 Εγκεφαλικοί ιστοί.....	81
3.11 Κλασματοποίηση κυττάρων εγκεφαλικών ιστών.....	82
3.12 Στατιστικές Αναλύσεις	83
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	85
4.1 Μονοπύρρηνα Κύτταρα του Περιφερικού Αίματος (PBMC)	85

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

4.1.1 Μέτρηση πρωτεϊνικών επιπέδων με τη χρήση της μεθόδου Western	85
4.1.2 Μέτρηση επιπέδων mRNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο	90
4.1.3 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γλυκοσερεβροσιδάσης	92
4.1.4 In vitro μέτρηση λειτουργικότητας βασικών μονοπατιών αυτοφαγίας	93
4.2 Ερυθρά αιμοσφαίρια.....	94
4.3 Εγκεφαλικοί ιστοί.....	98
4.3.1 Επίπεδα πρωτεϊνών.....	98
4.3.2 Επίπεδα mRNA	104
4.4 Προσδιορισμός διακριτικής ευχέρειας βιοδεικτών	106
4.4.1 Hsc70 στα Μονοκύτταρα του Περιφερικού Αίματος.....	106
4.4.2 Λυσοσωμική λειτουργία Μονοκύτταρων Κυττάρων Περιφερικού Αίματος.....	107
4.4.3 Διμερής μορφή α-συνουκλεΐνης στα Ερυθρά Αιμοσφαίρια.....	108
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	111
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	126
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	168
Πληροφοριακό σημείωμα.....	168
Έντυπα συγκατάθεσης.....	173
Πρωτότυπες ερευνητικές δημοσιεύσεις στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής	176

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος Πάρκινσον είναι η δεύτερη συχνότερη νευροεκφυλιστική ασθένεια. Παθολογικά, χαρακτηρίζεται από την επιλεκτική απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου και από την παρουσία ενδοκυττάρων πρωτεϊνικών εγκλείστων στα κυτταρικά σώματα και στους νευράξονες, που ονομάζονται σωμάτια Lewy. Η α-συνουκλεΐνη είναι μία άφθονη νευρωνική πρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται στα προσυναπτικά άκρα των νευρικών συνάψεων και εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου Πάρκινσον. Η α-συνουκλεΐνη έχει την τάση να πολυμερίζεται και να δημιουργεί ολιγομερείς μορφές, οι οποίες θεωρούνται τοξικές για τα κύτταρα. Οι πρώτες μεταλλάξεις που συνδέθηκαν αιτιολογικά με την ανάπτυξη της νόσου βρέθηκαν στο γονίδιο *SNCA*, που κωδικοποιεί την α-συνουκλεΐνη.

Σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση και τον έλεγχο του ολιγομερισμού της α-συνουκλεΐνης διαδραματίζει το μονοπάτι της αυτοφαγίας – λυσοσώματος. Το μονοπάτι αυτό απαρτίζεται από τη μικροαυτοφαγία, τη μακροαυτοφαγία και την αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από σαπερόνες (CMA), με την τελευταία να αποτελεί, πιθανώς, τον κύριο μηχανισμό αποικοδόμησης της α-συνουκλεΐνης. Βασικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες της CMA είναι οι Hsc70 και Lamp2a, ενώ της μακροαυτοφαγίας οι p62 και LC3. Επίσης, μεταλλάξεις στο γονίδιο *GBA*, που κωδικοποιεί το ένζυμο β-γλυκοσερεβροσιδάση (GCase), έχουν ενοχοποιηθεί ως προδιαθετικοί παράγοντες για τη νόσο.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος προερχόμενα από εθελοντές. Απομονώθηκαν μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMC) και εξετάστηκαν τα επίπεδα των πρωτεϊνών Hsc70, Lamp2a, GCase, p62 και LC3. Συνολικά μετρήθηκαν δείγματα 148 εθελοντών που είχαν χωριστεί σε τέσσερις ομάδες, υγιείς μάρτυρες (n=56), ασθενείς χωρίς γνωστές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τη νόσο Πάρκινσον (n=56, GU-PD), ασθενείς φορείς της A53T μετάλλαξης του γονιδίου *SNCA* (n=18, A53T-PD) και ασθενείς φορείς μεταλλάξεων στο γονίδιο *GBA* (n=18, GBA-PD).

Τα επίπεδα της Hsc70 εντοπίστηκαν μειωμένα στους ασθενείς όλων των γενετικών κατηγοριών σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Τα επίπεδα της GCase ήταν μειωμένα στους ασθενείς φορείς μεταλλάξεων στα γονίδια *SNCA* και *GBA* σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, ενώ δεν αναδείχτηκαν διαφορές στις υπόλοιπες συγκρίσεις.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε ένα υποσύνολο των παραπάνω δειγμάτων (n=18 από κάθε μία από τις τέσσερις ομάδες) έγινε μέτρηση των επιπέδων του mRNA που προέρχεται από μεταγραφή των γονιδίων HSC70, LAMP2A, και GBA. Βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα του HSC70 mRNA στην ομάδα των GU-PD σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, χωρίς να ανευρίσκονται διαφορές στα επίπεδα του mRNA μεταξύ των ομάδων A53T-PD, GBA-PD και των υγιών μαρτύρων. Ακόμη, βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα του GBA mRNA στις ομάδες A53T-PD και GBA-PD σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες.

Επιπρόσθετα, μετρήθηκε στα PBMC η ενεργότητα της GCase, όπου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της ενεργότητας του ενζύμου στους ασθενείς φορείς μεταλλάξεων στο *GBA* σε σχέση με τα άτομα των άλλων τριών ομάδων.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε in vitro μελέτη της λειτουργικότητας των διαφόρων μονοπατιών αυτοφαγίας, και πιο συγκεκριμένα της ολικής λυσοσωμικής λειτουργίας, της μακροαυτοφαγίας και της CMA. Μετρήθηκαν συνολικά 36 δείγματα, 18 προερχόμενα από υγιείς μάρτυρες και 18 από ασθενείς με ιδιοπαθή νόσο Πάρκινσον. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της ενεργότητας των λυσοσωμάτων στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Μάλιστα, η μείωση αυτή εμφανίστηκε τόσο στη συνολική λυσοσωμική λειτουργία, όσο και στη μακροαυτοφαγία και τη CMA.

Ακόμη, μετρήθηκαν τα επίπεδα της μονομερούς και της διμερούς μορφής της α-συνουκλεΐνης στις μεμβράνες ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα κύτταρα αυτά απομονώθηκαν από αίμα εθελοντών, οι οποίοι είχαν τοποθετηθεί σε αντίστοιχες ομάδες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη των PBMC. Τα επίπεδα της διμερούς α-συνουκλεΐνης ήταν αυξημένα στις ομάδες GU-PD και GBA-PD σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, ενώ δεν σημειώθηκαν διαφορές στα αντίστοιχα επίπεδα στην ομάδα A53T-PD συγκριτικά με τους υγιείς μάρτυρες. Τα επίπεδα της μονομερούς μορφής της α-συνουκλεΐνης παρέμεναν σταθερά ανάμεσα στις διάφορες ομάδες.

Εν συνεχεία, μελετήθηκε μεταθανάτιο υλικό από ιστούς προερχόμενους από τη μέλαινα ουσία και το μετωπιαίο λοβό εγκεφάλων δωρητών. Οι εγκεφαλικοί ιστοί (n=10 υγιείς μάρτυρες, n=10 ασθενείς με ιδιοπαθή νόσο Πάρκινσον) κλασματοποιήθηκαν και διαχωρίστηκε το λυσοσωμικό από το κυτταροπλασματικό κλάσμα. Στο κάθε κλάσμα και σε κάθε περιοχή μετρήθηκαν τα επίπεδα των πρωτεϊνών Hsc70, GCase, Cathepsin D, α-συνουκλεΐνης και Lamp2a. Στην μέλαινα ουσία ανευρέθηκαν μειωμένα επίπεδα της Hsc70 και της α-συνουκλεΐνης στο

κυτταροπλασματικό κλάσμα των ασθενών και αύξηση της Cathepsin D στα λυσοσωμικά κλάσμα. Αντίστοιχα, στον μετωπιαίο λοβό ανευρέθηκε μείωση των επιπέδων της Hsc70 και της GCase στο κυτταροπλασματικό κλάσμα των ασθενών με ιδιοπαθή νόσο Πάρκινσον. Τα επίπεδα των υπόλοιπων πρωτεϊνών, καθώς και των HSC70, GBA και LAMP2A mRNA δεν εμφάνισαν διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες.

Συμπερασματικά, η λυσοσωμική δυσλειτουργία και η συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης αποτελούν μια συστημική διαταραχή αφού είναι εμφανείς και σε κύτταρα εκτός του κεντρικού νευρικού συστήματος. Τα επίπεδα των πρωτεϊνών, που σχετίζονται με το μονοπάτι αυτοφαγίας – λυσοσώματος, η ενεργότητα των λυσοσωμάτων και του ενζύμου GCase στα PBMC καθώς και η συγκέντρωση των ολιγομερών μορφών της α-συνουκλεΐνης στις μεμβράνες των ερυθρών αιμοσφαιρίων μπορούν να αποτελέσουν βάση για την ανάπτυξη νέων βιολογικών δεικτών και καινοτόμων διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων της νόσου Πάρκινσον.

ABSTRACT

BACKGROUND: Reduced expression of lysosomal-associated membrane protein 2a and heatshock-cognate 70 proteins, involved in chaperone-mediated autophagy and of glucocerebrosidase, is reported in PD brains. The aim of this study was to identify systemic alterations in lysosomal-associated membrane protein 2a, heatshock cognate-70, and glucocerebrosidase levels/activity in peripheral blood mononuclear cells from PD patients.

Alpha-synuclein aggregation is considered one of the main causes of Parkinson's Disease (PD). Malfunction of autophagy-lysosomal pathways is believed to be an underlying mechanism of α -synuclein aggregation. Although such malfunction has been observed in PD brains, it is unclear whether it may also occur in extraneuronal tissues.

Variations of α -synuclein levels or species have been reported in Parkinson's Disease (PD). There has been little systematic examination of erythrocytes, a rich source of α -synuclein.

METHODS: Protein/mRNA levels were assessed in PD patients from genetically undetermined background, alpha-synuclein (G209A/A53T), or glucocerebrosidase mutation carriers and age-/sex-matched controls.

Total protein degradation in cultured PBMCs was measured by labelling the cells with ³H-leucine using pulse-chase experiments. Different inhibitors were used to measure a range of autophagic pathways.

Erythrocyte membranes were obtained from PD patients (mutation carriers in the α -synuclein gene (A53T-PD) and glucocerebrosidase gene (GBA-PD) (n=18 each), and patients without known mutations (GU-PD, n=56)), and age-/sex-matched controls (n=56). Levels of monomeric and dimeric α -synuclein were assessed using Western immunoblotting.

RESULTS: Heatshock cognate 70 protein levels were reduced in all PD groups, whereas its mRNA levels were decreased only in the genetically undetermined group. Glucocerebrosidase protein levels were decreased only in the genetic PD groups, whereas increased mRNA levels and decreased activity were detected only in the glucocerebrosidase mutation group.

Protein degradation through the main autophagic pathways is reduced in PD patients (n = 18) compared to age- and sex-matched healthy controls (n = 18), (macroautophagy, p = .018; Chaperone-Mediated autophagy, p = .04; and total lysosomal function, p = .007).

A statistically significant increase of α -synuclein dimer and dimer to monomer ratio was found in GBA-PD and GU-PD. In contrast, dimer levels of A53T-PD were not different from controls. No difference was found in α -synuclein monomer levels.

CONCLUSIONS: Reduced heatshock cognate-70 levels are suggestive of an apparent systemic chaperone-mediated autophagy dysfunction irrespective of genetic background. Glucocerebrosidase activity may serve as a screening tool to identify glucocerebrosidase mutation carriers with PD.

Lysosomal dysfunction is present in cultured PBMCs of PD patients, suggesting that it may reflect a systemic feature of the disease.

The increased α -synuclein dimer in GBA-PD and GU-PD is suggestive of an apparent systemic dysfunction causing the dimerization, and potentially oligomerization, of α -synuclein. These results may have implications for PD pathogenesis and biomarker development.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η νόσος Πάρκινσον

1.1.1 Κλινικά συμπτώματα

Η νόσος Πάρκινσον (Parkinson Disease) περιγράφηκε 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 τη δεύτερη σε συχνότητα νευροεκφυλιστική νόσο του εγκεφάλου. Είναι μια προοδευτικά εξελισσόμενη νόσος η οποία επηρεάζει πρωτίστως την κινητικότητα και μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί αιτιολογική θεραπεία. Το ποσοστό εκδήλωσης της νόσου σχετίζεται με την ηλικία και ανέρχεται σε 0,5% στο γενικό πληθυσμό, φτάνει το 1-2% στα άτομα μεταξύ 50 και 80 ετών, ενώ ξεπερνά το 3 με 5% στα άτομα άνω των 80 ετών (de Lau and Breteler, 2006; Gasser, 2009; Hirsch et al., 2016; Pringsheim et al., 2014).

Η κλινική διάγνωση της νόσου βασίζεται, κατά κύριο λόγο, στην αξιολόγηση των διαταραχών των κινητικών λειτουργιών, που εμφανίζουν οι ασθενείς. Τα τρία κύρια κλινικά χαρακτηριστικά είναι η βραδυκινησία, η δυσκαμψία και ο τρόμος ηρεμίας. Η παρουσία βραδυκινησίας και ενός τουλάχιστον από τα άλλα δύο κλινικά σημεία ονομάζεται παρκινσονισμός, και η ύπαρξη του αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για να τεθεί η διάγνωση της νόσου Πάρκινσον (Postuma et al., 2015). Παράλληλα, παρατηρούνται διαταραχές της στάσης και της βάδισης, δυσκολία στο λόγο και την κατάποση, ανέκφραστο πρόσωπο, καθώς και δυσκολίες στη γραφή (Jankovic, 2008). Στην εικόνα 1-1 σκιαγραφείται η χαρακτηριστική στάση που λαμβάνουν οι ασθενείς κατά τα ενδιάμεσα στάδια της νόσου. Η διάγνωση της νόσου ενισχύεται περαιτέρω από την πολύ καλή ανταπόκριση στη χορήγηση ντοπαμινεργικών φαρμάκων και την πιθανή εμφάνιση δυσκινησιών επαγόμενων από λεβοντόπα σε μεταγενέστερα στάδια της νόσου (Postuma et al., 2015).



Εικόνα 1-1. Χαρακτηριστική στάση σώματος ασθενών με νόσο Πάρκινσον

Ωστόσο, νεότερα δεδομένα παγιώνουν την άποψη ότι η νόσος Πάρκινσον 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, η εμφάνιση μάλιστα για μερικές από τις παραπάνω διαταραχές συχνά προηγείται εκείνης των κινητικών συμπτωμάτων (Todorova et al., 2014; Zhang et al., 2016). Τα μη κινητικά συμπτώματα επηρεάζουν όλους τους ασθενείς, ενώ η συχνότητά τους αυξάνεται ανάλογα με τη βαρύτητα της νόσου (Dexter and Jenner, 2013). Τα μη κινητικά συμπτώματα της νόσου αποτελούν αντικείμενο μελέτης κυρίως τα τελευταία χρόνια, και ως εκ τούτου έχουν διερευνηθεί σε μικρότερο βαθμό από τα κινητικά συμπτώματα της νόσου.

Στον πίνακα 1-1 παρατίθενται τα επικαιροποιημένα κριτήρια για την διάγνωση της νόσου, όπως έχουν προταθεί από την International Parkinson and Movement Disorder Society.

Απαραίτητο κριτήριο για τη διάγνωση της νόσου είναι η ύπαρξη <u>Παρкинсонισμού</u>. <u>Παρкинсонισμός</u> ορίζεται η ύπαρξη βραδυκινησίας και ενός τουλάχιστον από τα παρακάτω κλινικά σημεία: τρόμος ηρεμίας ή/και δυσκαμψία. Αφού τεθεί η διάγνωση του Παρκινσονισμού τότε:
Για διάγνωση κλινικά διαπιστωμένης (established) νόσου απαιτούνται: 1. Απουσία κριτηρίων αποκλεισμού (absolute exclusion criteria) 2. Τουλάχιστον δύο υποστηρικτικά κριτήρια (supportive criteria) 3. Κανένα κριτήριο αμφισβήτησης (red flags)
Για διάγνωση κλινικά πιθανής (probable) νόσου απαιτούνται: 1. Απουσία κριτηρίων αποκλεισμού (absolute exclusion criteria) 2. Ύπαρξη κριτηρίων αμφισβήτησης αντισταθμισμένα από υποστηρικτικά κριτήρια I. Για ένα κριτήριο αμφισβήτησης απαιτείται και ένα υποστηρικτικό II. Για δύο κριτήρια αμφισβήτησης απαιτούνται και δύο υποστηρικτικά III. Δεν επιτρέπονται πάνω από <u>δύο</u> κριτήρια αμφισβήτησης
Κριτήρια υποστηρικτικά της διάγνωσης (supportive criteria) 1. Εμφανής και θεαματική βελτίωση με τη λήψη της ντοπαμινεργικής θεραπείας 2. Εμφάνιση υπερκινησιών οφειλόμενων στην λεβοντόπα 3. Τρόμος ηρεμίας σε κάποιο άκρο κατά την κλινική εξέταση 4. Εμφάνιση είτε υποσμίας είτε απονεύρωσης των καρδιακών συμπαθητικών ινών στο MIBG
Κριτήρια αποκλεισμού διάγνωσης (absolute exclusion criteria) 1. Αναμφισβήτητες παρεγκεφαλιδικές διαταραχές, όπως αταξία, νυσταγμός, κ.ά. 2. Παράλυση της προς τα κάτω στροφής του βλέμματος ή επιλεκτική μείωση των προς τα κάτω σακκαδικών κινήσεων 3. Διάγνωση μετωποκροταφικής άνοιας ή πρωτοπαθούς προϊούσας αφασίας στα 5 πρώτα χρόνια 4. Παρκινσονικά ευρήματα περιορισμένα στα κάτω άκρα για διάστημα άνω των 3 ετών 5. Ευρήματα συμβατά με φαρμακευτικό παρκινσονισμό 6. Απουσία αισθητής βελτίωσης ακόμη και με υψηλές δόσεις λεβοντόπα 7. Βεβαιωμένη φλοιϊκή αισθητηριακή απώλεια ή ύπαρξη σαφούς απραξίας ή προϊούσας αφασίας 8. Φυσιολογική λειτουργική νευροαπεικόνιση του προσυναπτικού ντοπαμινεργικού συστήματος 9. Τεκμηριωμένη ύπαρξη άλλης νόσου ή κατάστασης που μπορεί να σχετίζεται με τη συμπτωματολογία του ασθενούς
Κριτήρια αμφισβήτησης της διάγνωσης (Red Flags) 1. Ραγδαία επιδείνωση της βάδισης – μετακίνηση με αμαξίδιο μέσα στα 5 πρώτα έτη 2. Πλήρης απουσία επιδείνωσης των κινητικών συμπτωμάτων επί 5 και πλέον χρόνια, εκτός αν η σταθερότητα μπορεί να αποδοθεί στην επίδραση της θεραπείας 3. Πρώιμες προμηκικές διαταραχές: οξεία δυσφωνία ή δυσαρθρία ή δυσφαγία μέσα στα 5 πρώτα έτη 4. Αναπνευστικές διαταραχές 5. Έντονες διαταραχές από το Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα στα 5 πρώτα έτη, όπως: a. Ορθοστατική υπόταση που δεν οφείλεται σε χορήγηση φαρμάκων ή αφυδάτωση b. Οξεία κατακράτηση ούρων ή ακράτεια ούρων που δεν οφείλεται σε προστάτη ή άλλα αίτια 6. Συχνές πτώσεις (πάνω από μία ανά έτος) από αστάθεια μέσα στα 3 πρώτα έτη 7. Ασύμμετρες δυστονίες και συσπάσεις των άκρων στα 10 πρώτα έτη 8. Πλήρης απουσία των κλασικών μη κινητικών συμπτωμάτων της νόσου μετά από 5 χρόνια νόσου, όπως διαταραχή ύπνου REM, διαταραχές από το αυτόνομο, υποσμία ή ψυχιατρικά συμπτώματα 9. Μη εξηγήσιμα πυραμιδικά σημεία, όπως μυϊκή αδυναμία, ζωηρά τενόντια αντανακλαστικά 10. Τελείως συμμετρικός αμφοτερόπλευρος παρκινσονισμός κατά την αντικειμενική εξέταση

Πίνακας 1-1. Διαγνωστικά κριτήρια νόσου Πάρκινσον όπως έχουν προταθεί από την International Parkinson and Movement Disorder Society.

Για την κλινική εξέταση των κυρίων εκδηλώσεων γίνεται σύσταση να ακολουθούνται οι οδηγίες που προσδιορίζονται στην κλίμακα MDS-UPDRS (Goetz et al., 2008).

Μεταφρασμένα και προσαρμοσμένα από Postuma και συνεργάτες (2015).

Όπως προαναφέρθηκε, μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί αιτιολογική θεραπεία για τη νόσο Πάρκινσον. Παρά ταύτα, έχουν βρεθεί θεραπευτικές προσεγγίσεις οι οποίες στοχεύουν κυρίως στην καλυτέρευση των κινητικών συμπτωμάτων. Οι περισσότερες από αυτές στοχεύουν στο ντοπαμινεργικό σύστημα (Lim and Zhang, 2013). Ένας βασικός τρόπος δράσης είναι η αύξηση της ποσότητας της διαθέσιμης ντοπαμίνης στον εγκέφαλο είτε μέσω της αναστολής του μεταβολισμού της, είτε μέσω χορήγησης ποσότητας επιπλέον αυτής που παράγεται φυσικά στα κύτταρα του εγκεφάλου. Παράλληλα, χρησιμοποιούνται και θεραπείες που στοχεύουν στην ενεργοποίηση και ενίσχυση της δράσης των υποδοχέων ντοπαμίνης στα κύτταρα της μέλαινας ουσίας.

Η κύρια θεραπευτική οδός που ακολουθείται είναι η θεραπεία υποκατάστασης με τη χορήγηση λεβοντόπα (Levodopa ή L-DOPA), η οποία αποτελεί πρόδρομο μόριο στη σύνθεση της ντοπαμίνης (Connolly and Lang, 2014). Η λεβοντόπα πολύ συχνά χορηγείται μαζί με τον αναστολέα της αποκαρβοξυλάσης της ντοπαμίνης, με στόχο τη μείωση των περιφερειακών παρενεργειών και την αποτελεσματικότερη απορρόφηση της λεβοντόπα. Ωστόσο, η χρόνια χρήση της λεβοντόπα οδηγεί συχνά στην εμφάνιση ανεπιθύμητων παρενεργειών, όπως λ.χ. μειωμένη απόκριση σε κάθε δόση, επίμονες κράμπες, γρήγορη εναλλαγή μεταξύ φάσης με μειωμένα συμπτώματα και φάσης με έντονα συμπτώματα (on/off phenomenon), καθώς και το φαινόμενο των δυσκινησιών, δηλαδή ακούσιων χορειόμορφων κινήσεων. Για αυτόν το λόγο απαιτείται η συνετή χρήση της λεβοντόπα (Connolly and Lang, 2014; Jenner, 2015).

Με δεδομένες τις ανεπιθύμητες παρενέργειες που προκύπτουν από τη φαρμακευτική αντιμετώπιση της νόσου Πάρκινσον, η ανάγκη διατήρησης ενός αποδεκτού επιπέδου λειτουργικότητας με τις ελάχιστες δυνατές δόσεις είναι επιτακτική (Fernandez, 2012). Σημαντικό ρόλο σε αυτό διαδραματίζει και η βελτίωση του τρόπου ζωής, καθώς επίσης και όλων εκείνων των παραγόντων που επιδρούν θετικά προς αυτή την κατεύθυνση. Παρεμβάσεις που βελτιώνουν την καθημερινότητα του ασθενή, όπως η άσκηση, η φυσιοθεραπεία, η εργοθεραπεία, καθώς και η λογοθεραπεία μπορούν να αποδειχθούν εξαιρετικά ευεργετικές.

Εκτός όμως από τη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής έχουν δοκιμαστεί και χειρουργικές επεμβάσεις που ως σκοπό έχουν τον έλεγχο των συμπτωμάτων. Οι παρεμβάσεις αυτές γίνονται σε περιορισμένο αριθμό ασθενών και σχεδόν κατ' αποκλειστικότητα σε προχωρημένα στάδια της νόσου, λόγω της επικινδυνότητας, των ανεπιθύμητων ενεργειών τους και της σχέσης οφέλους – κόστους για την ποιότητα ζωής του ασθενή. Μια βασική χειρουργική θεραπευτική προσέγγιση είναι η εν τω

βάθει εγκεφαλική διέγερση (Deep Brain Stimulation, DBS), κατά την οποία ειδικά ηλεκτρόδια εμφυτεύονται σε περιοχές του εγκεφάλου που εμπλέκονται στη ρύθμιση της κίνησης, προκειμένου να τις διεγείρουν (Munhoz et al., 2016). Οι νεότερες επεμβατικές μέθοδοι στηρίζονται κυρίως στην άμεση χορήγηση των φαρμακευτικών ουσιών στον οργανισμό παρακάμπτοντας την από του στόματος χορήγηση (per os). Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η ενδονηστιδική χορήγηση λεβοντόπα (Olanow et al., 2014) και η υποδόρια έγχυση Απομορφίνης (Nomoto et al., 2015).

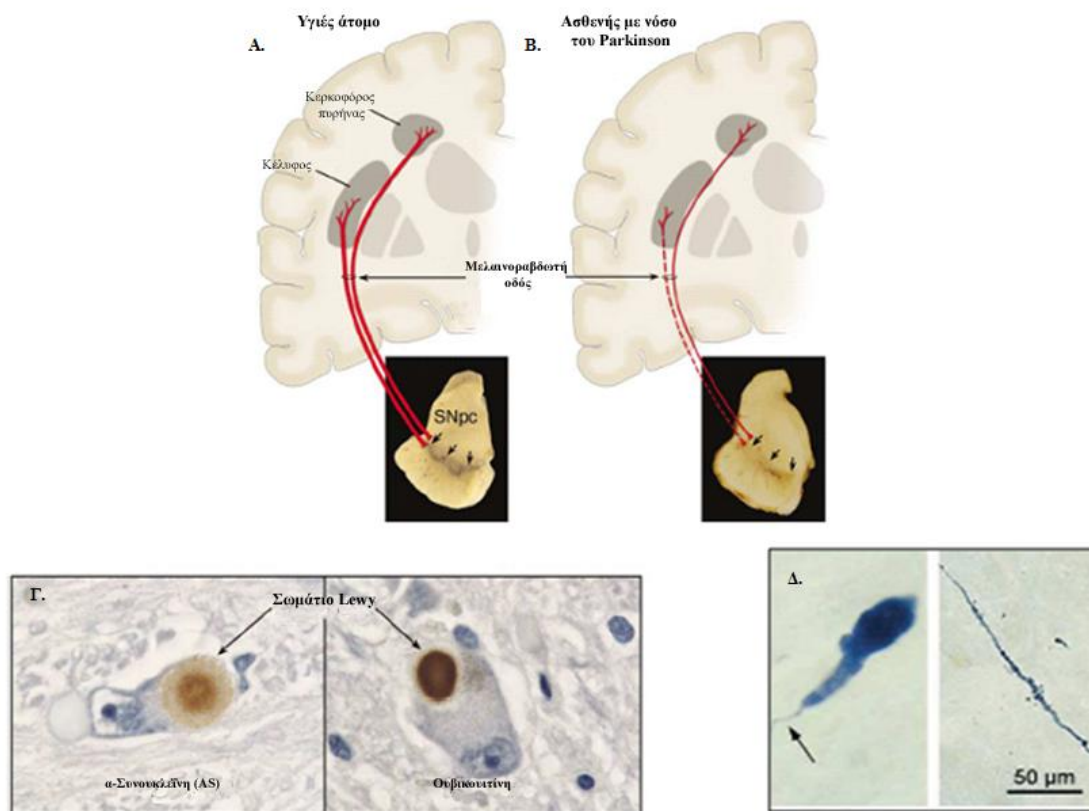
1.1.2 Παθολογοανατομικές αλλοιώσεις

Παθολογοανατομικά, η νόσος Πάρκινσον, 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). Η έναρξη του εκφυλισμού και της απόπτωσης των κυττάρων προηγείται αρκετά της εμφάνισης των πρώτων κινητικών συμπτωμάτων της νόσου.

Καθώς, οι εν λόγω νευρώνες παράγουν το νευροδιαβιβαστή *ντοπαμίνη*, ο εκφυλισμός τους διαταράσσει τη νευροδιαβίβαση κατά μήκος της μελαινοραβδωτής οδού (εικόνα 1-2Α, 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 1-2Γ) ή νευρίτες Lewy (Lewy neurites, LN) (εικόνα 1-2Δ), αντίστοιχα, τα οποία αποτελούν το κυρίαρχο παθολογικό χαρακτηριστικό στην πλειοψηφία των περιπτώσεων της νόσου Πάρκινσον (Conway et al., 2000).

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 1-2Γ, Δ). Κύριο συστατικό των περιγραφόμενων ενδοκυττάρων συσσωματωμάτων είναι η λανθασμένα αναδιπλωμένη πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη (Spillantini et al., 1997, 1998), ο ρόλος της οποίας θα αναλυθεί περισσότερο παρακάτω (βλ. ενότητα 1.2 *Κυτταρική Βιολογία και Βιοχημεία της α-Συνουκλεΐνης*). Ο ρόλος που διαδραματίζουν τα

σώματα και οι νευρίτες Lewy στην παθογένεια της νόσου, δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως.



Εικόνα 1-2. Σχηματική αναπαράσταση μέλαινας ουσίας και σωματίων Lewy.

Σχηματική αναπαράσταση της φυσιολογικής (Α) και της παθολογικής (Β) στη νόσο Πάρκινσον 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 σωματίνα Lewy με αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης (αριστερά) και έναντι της ουβικουτίνης (δεξιά).

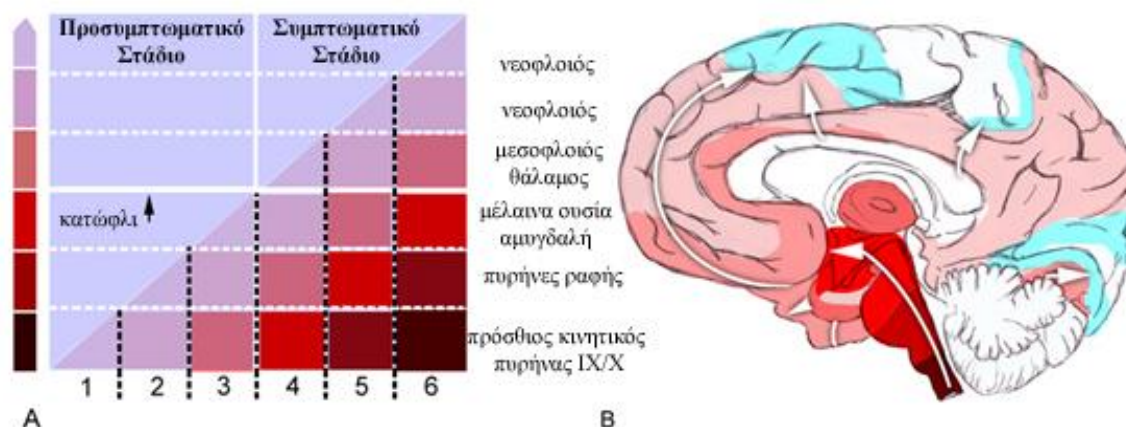
(Δ) Ανοσοϊστοχημική χρώση των νευριτών Lewy με αντίσωμα έναντι της α-συνουκλεΐνης.

Η απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων (εικόνα 1-2Β) και η ύπαρξη των σωματίων Lewy (εικόνα 1-2Γ, Δ) δεν περιορίζεται μόνο στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNpc), αλλά επεκτείνεται 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).

Αξίζει να σημειωθεί εδώ πως μεγάλος αριθμός από τα μη κινητικά συμπτώματα που συνδέονται με την εκδήλωση της νόσου οφείλεται στην επέκταση των παθολογοανατομικών αλλοιώσεων πέραν της μέλαινας ουσίας. Ο εντοπισμός των σωματίων Lewy στο μεσεντέριο πλέγμα (myenteric plexus) αντανakλά τις διαταραχές στην κινητικότητα του γαστρεντερικού συστήματος, που συναντώνται στη νόσο Πάρκινσον. 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).

Η υπόθεση Braak για την εξέλιξη των παθολογικών διεργασιών στη νόσο Πάρκινσον αναφέρει πως οι αλλοιώσεις 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 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 1-2) (Braak et al., 2004).

Κατά τα πρώιμα στάδια της ασθένειας (στάδια 1-2), σωματία και νευρίτες Lewy εμφανίζονται στο κατώτερο τμήμα του στελέχους. Τα πρώτα κινητικά συμπτώματα εμφανίζονται κατά τα στάδια 3 με 4, λόγω της απώλειας των ντοπαμινεργικών νευρώνων, επειδή η παθολογία έχει φτάσει πλέον στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (εικόνα 1-3). Κατά τα όψιμα στάδια της νόσου η παθολογία εντοπίζεται και σε περιοχές του νεοφλοιού (στάδια 5-6) και συνοδεύεται από μη κινητικά συμπτώματα (Braak et al., 2004). Βάσει της παθολογοανατομικής κλίμακας Braak, η ύπαρξη σωματίων Lewy σε μια περιοχή είναι ικανή και αναγκαία συνθήκη, ώστε η παθολογία να εξαπλωθεί στην επόμενη, ωστόσο αυτό δεν ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις (Burke et al., 2008).



Εικόνα 1-3. Σχηματική απεικόνιση της προοδευτικής εξάπλωσης της παθολογίας της νόσου Πάρκινσον, 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 (2004).

1.1.3 Γενετικές μορφές της νόσου Πάρκινσον

Με την εξέλιξη των τεχνικών της αλληλούχισης του γονιδιώματος και την παράλληλη μείωση του κόστους αυτών τα τελευταία χρόνια έχει επέλθει έκρηξη πληροφοριών και συνεχής εύρεση νέων γενετικών τόπων σχετιζόμενων με τη νόσο Πάρκινσον. Μέχρι στιγμής, οι μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-Wide Association Studies, GWAS) έχουν αποκαλύψει περισσότερους από 41 γενετικούς τόπους που φαίνεται να σχετίζονται με μορφές της νόσου (Chang et al., 2017; Moskvina et al., 2013). Ταυτόχρονα έχουν αναδειχθεί τουλάχιστον 24 γονίδια που ακολουθούν μεντέλειους τύπους κληρονομικότητας (Deng et al., 2018; Karimi-Moghadam et al., 2018). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες α-συνουκλεΐνη (α-synuclein, *SNCA*), parkin (*PRKN*), leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2 (*LRRK2*), και β-γλυκοσερεβροσιδάση (*GBA*) (Πίνακας 1-2).

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. Ας σημειωθεί ότι η α-συνουκλεΐνη εντοπίζεται υπερφωσφορυλιωμένη στα σωματίνα Lewy (Spillantini et al., 1998), που σε συνδυασμό με την ενεργότητα κινάσης της πρωτεΐνης *LRRK2*, υποδηλώνει μια

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

πιθανή συσχέτιση των δύο πρωτεϊνών, όχι απαραίτητα άμεση (Greggio et al., 2011). Το *SNCA* μάλιστα αποτέλεσε και το πρώτο γονίδιο στο οποίο βρέθηκε μετάλλαξη που συσχετίστηκε άμεσα με την εμφάνιση της νόσου, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω.

Γεν. Τύπος	Θέση	Πλήρης ονομασία γονιδίου	Επίσημο σύμβολο	Κληρονομικότητα
PARK1	4q22.1	synuclein alpha	SNCA	AE
PARK2	6q26	parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase	PRKN	AY
PARK3	2p13	Parkinson disease 3	PARK3	AE
PARK4	4q22.1	synuclein alpha	SNCA	AE
PARK5	4p13	ubiquitin C-terminal hydrolase L1	UCHL1	AE
PARK6	1p36	PTEN induced putative kinase 1	PINK1	AY
PARK7	1p36.23	parkinsonism associated deglycase	PARK7	AY
PARK8	12q12	leucine rich repeat kinase 2	LRRK2	AE
PARK9	1p36.13	ATPase 13A2	ATP13A2	AY
PARK10	1p32	Parkinson disease 10	PARK10	Άγνωστη
PARK11	2q37.1	GRB10 interacting GYF protein 2	GIGYF2	AE
PARK12	Xq21-q25	Parkinson disease 12	PARK12	Φ
PARK13	2p13.1	HtrA serine peptidase 2	HTRA2	AE
PARK14	22q13.1	phospholipase A2 group VI	PLA2G6	AY
PARK15	22q12.3	F-box protein 7	FBXO7	AY
PARK16	1q32	Parkinson disease 16	PARK16	Unclear
PARK17	16q11.2	VPS35, retromer complex component	VPS35	AE
PARK18	3q27.1	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	EIF4G1	AE
PARK19	1p31.3	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6	DNAJC6	AY
PARK20	21q22.1	synaptojanin 1	SYNJ1	AY
PARK21	20p13	transmembrane protein 230	TMEM230	AE
PARK22	7p11.2	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2	CHCHD2	AE
PARK23	15q22.2	vacuolar protein sorting 13 homolog C	VPS13C	AY
-	11p15.4	RIC3 acetylcholine receptor chaperone	RIC3	AE
-	1q21	Glucocerebrosidase	GBA	AE για PD
				AY για GD

Πίνακας 1-2. Γενετικοί τόποι που σχετίζονται με τη νόσο Πάρκινσον.

AE: αυτοσωμική επικρατής, AY: αυτοσωμική υπολειπόμενη, Φ: φυλοσύνδετο γονίδιο

Προσαρμογή από Deng (2018) και Karimi-Moghadam (2018).

Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως την τελευταία δεκαετία έχουν προκύψει νέα επιδημιολογικά και γενετικά στοιχεία που εμπλέκουν τη νόσο Πάρκινσον με τη νόσο Gaucher (GD). Το κοινό τους στοιχείο βρίσκεται στο γονίδιο *GBA* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη β-γλυκοσερεβροσιδάση (GCase). Η ύπαρξη ομόζυγων μεταλλάξεων στο γονίδιο οδηγεί στην εκδήλωση της νόσου Gaucher (Goldin, 2010), ενώ η ύπαρξη παθολογικών αλληλίων σε ετερόζυγη κατάσταση έχει αναδειχθεί ως ένας από τους πιο συχνούς προδιαθεσικούς παράγοντες της νόσου Πάρκινσον (Nalls et al., 2013; Sidransky et al., 2009). Η συμβολή των μεταλλάξεων του *GBA* στην παθογένεση του παρκινσονισμού παραμένει άγνωστη, αλλά έχει προταθεί η ύπαρξη μιας αμφίδρομης συσχέτισης μεταξύ ελλειμματικής λυσοσωμικής δράσης της GCase και παθολογικής α-συνουκλεΐνης (Manning-Bog et al., 2009; Mazzulli et al., 2011).

1.1.4 Γενετικές μορφές της νόσου Πάρκινσον που ανευρίσκονται στον ελληνικό πληθυσμό

Στον ελληνικό πληθυσμό η συνηθέστερη μετάλλαξη σε κληρονομικά περιστατικά εμφανίζεται στο γονίδιο *SNCA* (OMIM: 163890), ενώ οι συνηθέστεροι προδιαθεσικοί πολυμορφισμοί παρατηρούνται στο γονίδιο *GBA* (OMIM: 606463) (Bozi et al., 2014; Moraitou et al., 2011). Δείγματα από φορείς μεταλλάξεων στα παραπάνω γονίδια χρησιμοποιήθηκαν εκτενώς στην παρούσα διατριβή.

Ειδικότερα, στο γονίδιο που κωδικοποιεί την α-συνουκλεΐνη βρίσκεται η σημειακή μετάλλαξη c.157G>A που προκαλεί την αλλαγή του νουκλεοτιδίου στη θέση 157 του συμπληρωματικού DNA του γονιδίου από Γουανίνη σε Αδενοσίνη (με βάση την τελευταία στοίχιση αλληλουχιών του ανθρωπίνου γονιδιώματος GRCh38, στην παλαιότερη βιβλιογραφία αναφέρεται ως G209A). Η αλλαγή αυτή βρίσκεται στο πρώτο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου που κωδικοποιεί το αμινοξύ Αλανίνη και οδηγεί τελικά στην τοποθέτηση στη θέση 53 της τελικής πρωτεΐνης ενός αμινοξέος Θρεονίνης.

Η παραπάνω παραλλαγή αναφέρεται συχνά για συντομία στη βιβλιογραφία ως p.A53T, με τον αντίστοιχο πολυμορφισμό να φέρει τον κωδικό rs104893877 στη βάση δεδομένων dbSNP. Η συγκεκριμένη αποτελεί την πρώτη σημειακή μετάλλαξη που συσχετίστηκε άμεσα με ανάπτυξη οικογενούς μορφής της νόσου Πάρκινσον (Polymeropoulos et al., 1997) και καταγράφηκε σε μία οικογένεια Ιταλών

μεταναστών στην Αμερική (The Contursi Kindred) (Golbe et al., 1996). Εμφανίζεται και στον ελλαδικό χώρο κυρίως σε οικογένειες από την Δυτική και Βόρεια Πελοπόννησο (Bozi et al., 2014; Polymeropoulos et al., 1997). Η νόσος κληρονομείται κατά τον αυτοσωμικό επικρατούντα τρόπο.

Άλλες παθογόνες σημειακές παραλλαγές που έχουν παρατηρηθεί στο γονίδιο *SNCA*, αλλά όχι σε ελληνικές μελέτες κοόρτης είναι οι A30P, E46K και H50Q (OMIM: 163890.002, και .004 αντίστοιχα) (Appel-Cresswell et al., 2013; Krüger et al., 1998; Zarranz et al., 2004). Αυτές οι μεταλλάξεις κληρονομούνται με τον αυτοσωμικό επικρατούντα τρόπο κατ' αντιστοιχία με την A53T. Πολύ πρόσφατα, ανιχνεύθηκε και νέα σημειακή μετάλλαξη, η G51D (Lesage et al., 2013). Στην εικόνα 1-4 εμφανίζονται πάνω στο μόριο της α -συνουκλεΐνης τα σημεία που παρουσιάζονται οι αντικαταστάσεις των πεπτιδίων λόγω των σημειακών πολυμορφισμών. Τέλος, τόσο ο διπλασιασμός (Chartier-Harlin et al., 2004; Ibáñez et al., 2004) όσο και ο τριπλασιασμός (Oliveira et al., 2015; Singleton et al., 2003) του γενετικού επιτόπου του γονιδίου φέρεται να οδηγεί στην ανάπτυξη της νόσου.

Ακόμη, πολυμορφισμοί στον υποκινητή του γονιδίου *SNCA* (Rep1), καθώς και σε άλλες περιοχές κοντά στο 3' και 5'-άκρο του γονιδίου, που σχετίζονται με τη μεταγραφική του ρύθμιση, συνδέθηκαν με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου Πάρκινσον (Farrer et al., 2001; Hadjigeorgiou et al., 2006; Krüger et al., 1999; Pals et al., 2004; Tan et al., 2008).



Εικόνα 1-4. Μοντέλο δομής της α -συνουκλεΐνης.

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

Σημειώνεται, επιπλέον, ότι στον ελληνικό πληθυσμό παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός σημειακών πολυμορφισμών (Single-Nucleotide Polymorphisms) στο γονίδιο *GBA*, παρά στο γονίδιο *SNCA*. Οι συχνότεροι από αυτούς στις κωδικοποιούσες περιοχές του γονιδίου είναι οι: L444P (dbSNP: rs421016, c.1448T>G, νεότερη ονομασία p.L483P), N370S (rs76763715, c.1226A>G, ή p.N409S), D409H

(rs77369218, c.1343A>T ή p.D448H), ενώ ο πολυμορφισμός IVS10-1G>A βρίσκεται στην τελευταία βάση του 10^{ου} ιντρονίου (Kalinderi et al., 2009; Moraitou et al., 2011). Οι τρεις παραπάνω σημειακές μεταλλάξεις σε ομόζυγη μορφή είναι υπεύθυνες σε μεγάλο ποσοστό και για τις περιπτώσεις ασθενών με νόσο Gaucher στην χώρα μας (Dimitriou et al., 2010; Michelakakis et al., 1995).

1.1.5 Περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου

Πέραν των γενετικών παραγόντων που συντελούν στην εκδήλωση της νόσου Πάρκινσον, υπάρχουν συγκεκριμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, οι οποίοι έχουν ενοχοποιηθεί για την εκδήλωση και την εξέλιξη διαφόρων νευροεκφυλιστικών νόσων. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα μη γενετικού παράγοντα, και ένα από τα πρώτα που ανακαλύφθηκαν, αποτελεί η έκθεση στη μιτοχονδριακή τοξίνη MPTP (1-μεθυλο-4-φαινυλο-1,2,3,6,-τετραϋδροπυριδίνη) (Ikeda et al., 1992), που χρησιμοποιείται ως συστατικό διαφόρων εντομοκτόνων με χρήση στη γεωργία. Παλαιότερες μελέτες σχετικές με τη χρήση ζιζανιοκτόνων έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης της νόσου και της δόσης έκθεσης ιδίως στις οργανοχλωρίνες (Elbaz et al., 2009). Ως εκ τούτου στη Γαλλία η έκθεση σε εντομοκτόνα και ζιζανιοκτόνα θεωρείται επαγγελματική νόσος (Delamarre and Meissner, 2017). Νεότερες μετα-αναλύσεις αμφισβητούν τα αποτελέσματα αυτά, καθώς εμφανίζεται μεγάλη ετερογένεια και ασυνέπεια στα διάφορα αποτελέσματα (Breckenridge et al., 2016; Van Maele-Fabry et al., 2012).

Επιπλέον, ο σακχαρώδης διαβήτης, το υψηλό σωματικό βάρος και η χρήση στατινών έχουν προταθεί ως πιθανοί προδιαθεσικοί παράγοντες (Delamarre and Meissner, 2017), χωρίς όμως ακόμη να υπάρχει επιστημονική συμφωνία για την σημασία τους.

Τελευταία υπάρχουν αρκετές ενδείξεις μέσω παραδειγμάτων αθλητών ότι και το εγκεφαλικό τραύμα είναι ένας σημαντικός παράγοντας προδιάθεσης για νευροεκφύλιση, όπως επανειλημμένα έχει αναδειχθεί μέσα από επιδημιολογικές μελέτες (Lehman et al., 2012; Savica et al., 2012).

Η ηλικία, ακόμα, αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς προδιαθεσικούς παράγοντες για την ανάπτυξη της νόσου (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).

Επιπρόσθετα, αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για να μελετήσουν τη σχέση του καπνίσματος με τη νόσο. Τα περισσότερα επιδημιολογικά στοιχεία συγκλίνουν στο γεγονός πως οι καπνιστές έχουν μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης νόσου Πάρκινσον σε σχέση με τους μη καπνιστές (σχετικός κίνδυνος 0,23 με 0,70) (Breckenridge et al., 2016; Ritz et al., 2007). Η επικρατέστερη υπόθεση για την αιτιολόγηση της ύπαρξης της αρνητικής αυτής συσχέτισης μεταξύ καπνίσματος και εμφάνισης της νόσου είναι η αλλαγή των συνηθειών των μελλοντικών ασθενών πολύ πριν την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων. Μια δεύτερη άποψη που υποθέτει πως η νικοτίνη δρα νευροπροστατευτικά δεν φαίνεται μέχρι σήμερα να επιβεβαιώνεται από τα διάφορα ζωικά και *in vitro* μοντέλα.

Οι ευρέως διαδεδομένες συνήθειες του σύγχρονου πληθυσμού, η κατανάλωση καφέ και τσαγιού, πιστεύεται ότι σχετίζονται με τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου (Costa et al., 2010; Tan et al., 2008). Και σε αυτή την περίπτωση όμως οι μηχανισμοί νευροπροστασίας, εάν υπάρχουν, δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί (Chen et al., 2001).

1.1.6 Μηχανισμοί νευροεκφύλισης στη νόσο Πάρκινσον

Με βάση τα παραπάνω, καθίσταται σαφές ότι η νόσος Πάρκινσον αποτελεί μια πολυπαραγοντική νοσολογική οντότητα. Η ακριβής αιτιολογία της παθολογο-ανατομικής εικόνας της νόσου δεν είναι επακριβώς γνωστή. Ωστόσο, η πληθώρα των επιδημιολογικών, γενετικών και μεταθανάτιων επιστημονικών μελετών σε αυτό το πεδίο, έχουν συνδράμει σημαντικά στην καλύτερη κατανόηση του μοριακού υπόβαθρου της ασθένειας. Οι μελέτες αυτές καταδεικνύουν δύο βασικά κυτταρικά συστήματα των οποίων ενδεχόμενες δυσλειτουργίες οδηγούν στην εκδήλωση της νόσου, το σύστημα της πρωτεόστασης και των μιτοχονδρίων.

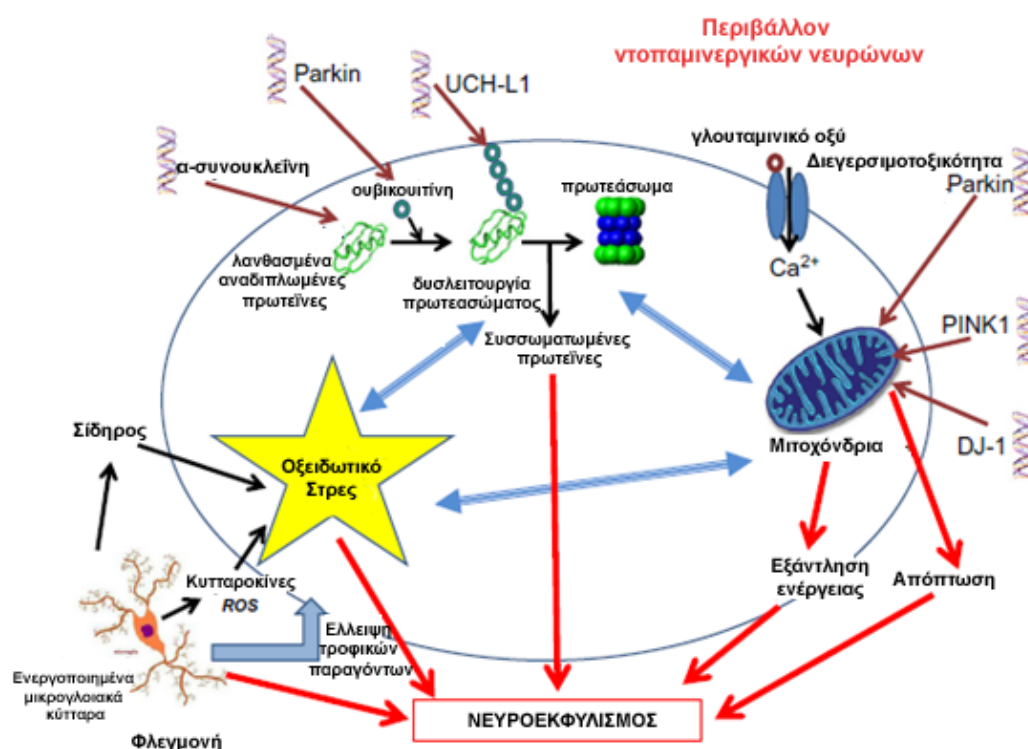
Η βλάβη στη λειτουργία των μιτοχονδρίων αποτελεί ένα ευρύ πεδίο έρευνας στις περιπτώσεις των νευροεκφυλιστικών νόσων. Οι νευρώνες παρουσιάζουν έντονη μεταβολική ενεργότητα και οι ενεργειακές τους απαιτήσεις εξαρτώνται από τον αερόβιο μεταβολισμό. Τα μιτοχόνδρια συσσωρεύουν πλήθος μεταλλάξεων κατά τη φυσιολογική διαδικασία της γήρανσης, με αποτέλεσμα την ανεπαρκή παραγωγή ATP και τη δημιουργία ενεργών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS). Στη νόσο Πάρκινσον 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, 2008; Schapira et al., 1992). Ορισμένα γονίδια που έχουν σχετιστεί με τη νόσο Πάρκινσον 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 (Narendra et al., 2010; Silvestri et al., 2005). Τέλος, σε κυτταρικά συστήματα έχει δείχθει ότι η Parkin επάγει την εκλεκτική απομάκρυνση των δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων, διαμεσολαβώντας στην εγκύστωσή τους από τα αυτοφαγοσώματα, σε μια διαδικασία που ονομάζεται μιτοφαγία (Narendra et al., 2008).

Καθώς η παθογένεια της νόσου συχνά αποδίδεται στην συσσώρευση ασυνουκλεΐνης, είναι αναμενόμενο να έχουν ενοχοποιηθεί για το γεγονός αυτό οι κυτταρικοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αποικοδόμηση και απομάκρυνση των «άχρηστων» και δυσλειτουργικών πρωτεϊνών. Τα βασικά μονοπάτια της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης είναι δύο, το μονοπάτι της αυτοφαγίας - λυσοσώματος (Autophagy Lysosomal Pathway, ALP) και το μονοπάτι της ουβικουτίνης - πρωτεασώματος (Ubiquitin Proteasome Pathway, UPP). Τα μονοπάτια αυτά, και ιδιαίτερα το μονοπάτι της αυτοφαγίας - λυσοσώματος, αποτελεί βασικό αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής, εξαιτίας της πιθανής συμμετοχής των ρυθμιστικών τους πρωτεϊνών στην πορεία και εξέλιξη της νόσου, καθώς και της σχετικής ευκολίας απομόνωσης, καταγραφής και μέτρησης των επιπέδων τους. Εκτενέστερη αναφορά θα γίνει στην ενότητα 1.3 *Αυτοφαγία και ο ρόλος της στη νόσο Πάρκινσον*.

Επίσης το οξειδωτικό στρες φαίνεται να προσδίδει αυξημένη ευπάθεια στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, οι οποίοι προσβάλλονται στη νόσο Πάρκινσον. 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 διαφανιζόμενη ανεπάρκεια των ενδογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων (Jenner, 2003).

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.



Εικόνα 1-5. Μοριακοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στη διαδικασία νευροεκφυλισμού των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας του εγκεφάλου στη νόσο Πάρκινσον.

Τα διπλά γαλάζια βέλη αντιπροσωπεύουν μοριακούς μηχανισμούς, οι οποίοι αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν μοριακές διαδικασίες, που λαμβάνουν χώρα στη νόσο Πάρκινσον. 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. Στο παρόν σχήμα δεν φαίνονται οι μηχανισμοί που εμπλέκουν το μονοπάτι της αυτοφαγίας – λυσοσώματος.

Προσαρμοσμένο από Dexter and Jenner, 2013.

1.2 Κυτταρική Βιολογία και Βιοχημεία της α-Συνουκλεΐνης

1.2.1 Δομή και εντοπισμός της α-συνουκλεΐνης

Η α-συνουκλεΐνη αποτελεί το πρώτο μέλος της οικογένειας των συνουκλεϊνών (α-, β- και γ-συνουκλεΐνη και συνορετίνη). Οι συνουκλεΐνες αποτελούν μικρές, ιδιαίτερα συντηρημένες πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται στη ρύθμιση της συναπτικής λειτουργίας και σχετίζονται με την παθογένεια ορισμένων νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, που συχνά αποκαλούνται και ως «συνουκλεϊνοπάθειες». Παραδείγματα τέτοιων νόσων αποτελούν η νόσος των σωματίων Lewy, η ατροφία πολλαπλών συστημάτων (Multiple System Atrophy, MSA), και, φυσικά η νόσος

Πάρκινσον (Dauer and Przedborski, 2003; Giasson et al., 2001; Vekrellis et al., 2004).

Η πρώτη συνουκλεΐνη απομονώθηκε αρχικά από τα χολινεργικά κυστίδια του ηλεκτρικού οργάνου του σαλαχιού *Torpedo californica* (Maroteaux et al., 1988) και οφείλει το όνομά της στον αρχικό υποκυττάριο εντοπισμό της τόσο στον πυρήνα όσο και στις συνάψεις. Για πρώτη φορά η ομόλογη πρωτεΐνη στον άνθρωπο ανακαλύφθηκε σε εγκεφάλους ασθενών με νόσο Alzheimer, όπου και ταυτοποιήθηκε ως το μη-αμυλοϊδικό συστατικό των νευριτικών πλακών που ανευρίσκονται χαρακτηριστικά στη συγκεκριμένη νόσο (Uéda et al., 1993). Η συμμετοχή της στην παθογένεια της νόσου Πάρκινσον καταδείχθηκε το 1997, όπου ανιχνεύτηκε ως το κύριο συστατικό των σωματίων Lewy (Spillantini et al., 1998, 1997), ενώ λίγους μήνες νωρίτερα, όπως έχει αναφερθεί, συνδέθηκε γενετικά με τη νόσο. Τα σωματία Lewy αποτελούν το βασικό παθολογοανατομικό εύρημα της νόσου Πάρκινσον, όπως προαναφέρθηκε και στην ενότητα 1.1.2 *Παθολογοανατομικές αλλοιώσεις*.

Η α-συνουκλεΐνη είναι, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, μια μικρή κυτταροπλασματική πρωτεΐνη 140 περίπου αμινοξικών καταλοίπων και μάζας περίπου 16 kDa. Στον άνθρωπο, το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης *SNCA*, εδράζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 4 (4q21.3). Χαρακτηριστικά της δομής της πρωτεΐνης είναι η ύπαρξη επαναλαμβανόμενων ατελών επαναλήψεων της αμινοξικής αλληλουχίας KTKEGV κατά μήκος του αμινοτελικού άκρου και το όξινο καρβοξυτελικό άκρο. Δομικά, το μόριο της α-συνουκλεΐνης μπορεί να χωριστεί σε τρεις διακριτές περιοχές, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1-6.



Εικόνα 1-6. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του μορίου της α-συνουκλεΐνης.

Στο σχήμα αναπαρίστανται οι τρεις δομικές περιοχές: 1) το αμφοφιλικό αμινοτελικό άκρο (μπλε) με τις επαναλήψεις της αλληλουχίας KTKEGV (κίτρινο), 2) η υδρόφοβη ενδιάμεση περιοχή (μωβ), και 3) το όξινο καρβοξυτελικό άκρο. Στο σχήμα σημειώνονται οι τρεις κυριότερες σημειακές μεταλλάξεις που συνδέονται με οικογενείς μορφές της νόσου Πάρκινσον και η θέση τους στο μόριο.

Προσαρμογή από Tenreiro και συνεργάτες (2014).

Ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο, παρατηρούνται αρχικά ατελείς επαναλήψεις του συντηρημένου μοτίβου KTKEGV, το οποίο μοιάζει με αντίστοιχα μοτίβα απολιποπρωτεϊνών. Τα μοτίβα αυτά μπορούν να σχηματίσουν αμφοφιλικές α-έλικες με σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση του μορίου σε μεμβράνες και λιπίδια

(George, 2002; George et al., 1995; Perrin et al., 2000). Το μήκος του τμήματος αυτού αποτελείται από περίπου 61 αμινοξέα.

Το ενδιάμεσο τμήμα της α -συνουκλεΐνης (αμινοξικά κατάλοιπα 62-95) αποτελεί τον υδροφοβικό σκελετό της πρωτεΐνης και είναι κυρίως γνωστό ως το μη-Αβ αμυλοειδές συστατικό των πλακών της νόσου Alzheimer (NACP) (Vekrellis et al., 2004). Στο τμήμα αυτό, οφείλεται και η ικανότητα του μορίου 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 (El-Agnaf and Irvine, 2000, 2002; Giasson et al., 2001, 1999; Hashimoto and Masliah, 1999). Ιδιαίτερο ρόλο στα παραπάνω διαδραματίζει ένα πεπτίδιο μήκους 12 αμινοξέων (στις θέσεις 71 με 82) το οποίο έχει δειχθεί ότι είναι σημαντικό για τη δημιουργία των συσσωμάτων της πρωτεΐνης (Iwai et al., 1995). Χαρακτηριστικό της σημασίας της συγκεκριμένης περιοχής είναι ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που στερείται της παραπάνω αλληλουχίας, καθώς και η β -συνουκλεΐνη που δεν την διαθέτει φυσικά, παρουσιάζουν μειωμένη δυνατότητα ολιγομερισμού (Giasson et al., 2001).

Τέλος, το καρβοξυτελικό άκρο της α -συνουκλεΐνης (θέσεις 96-140) έχει ιδιαίτερα μεταβλητή διαμόρφωση (Cookson, 2005) και είναι πλούσιο σε όξινα αμινοξέα, όπως προλίνη, γλουταμινικό και ασπαρτικό οξύ (Oueslati et al., 2010), το οποίο είναι υπεύθυνο για την λειτουργία της ως πρωτεΐνης – συνοδού. Μελέτες έχουν δείξει πως το καρβοξυτελικό άκρο παραμένει σε ελεύθερη διαμόρφωση ακόμη κι όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται σε μορφή ινιδίων (Der-Sarkissian et al., 2003), και πως δρα ανασταλτικά στην τάση της πρωτεΐνης για συσσωμάτωση (Murray et al., 2003). Στην καρβοξυτελική ουρά εδράζεται η πλειονότητα των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, συμπεριλαμβανομένων της φωσφορυλίωσης και της ουβικουιτινυλίωσης (Li et al., 2005; Oueslati et al., 2010), ενώ ταυτόχρονα εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες (Giasson et al., 2003; Jensen et al., 1999) και στην πρόσδεσή της στις μεμβράνες (Eliezer et al., 2001; Jo et al., 2000).

Η α -συνουκλεΐνη εκφράζεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και πιο συγκεκριμένα στο ραβδωτό σώμα, τον ιππόκαμπο, την παρεγκεφαλίδα και τον οσφρητικό βολβό. Παράλληλα εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα και σε άλλους ιστούς και κυτταρικούς τύπους, ιδιαίτερα στην καρδιά, στους μυς, στο πάγκρεας, στους νεφρούς, σε κύτταρα της γλοίας και σε κύτταρα του αίματος, όπως τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια (Barbour et al., 2008; Hashimoto and Masliah, 1999;

Iwai et al., 1995; Mori et al., 2002). Η α-συνουκλεΐνη, που ανευρίσκεται στα ερυθροκύτταρα, αποτελεί βασικό ερευνητικό πεδίο της παρούσας διατριβής.

Σε υποκυτταρικό επίπεδο η συνουκλεΐνη έχει ανιχνευθεί εμπλουτισμένη στις προσυναπτικές νευρικές απολήξεις, χωρίς όμως να έχει ανιχνευτεί μέσα στα ίδια τα κυστίδια (Iwai et al., 1995). Η έκφρασή της ρυθμίζεται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και μελέτες σε μύες και επίμυες έχουν καταδείξει πως τα επίπεδά της αυξάνονται κατά την πορεία της εμβρυϊκής ανάπτυξης (Hsu et al., 1998; Petersen et al., 1999). Στον άνθρωπο, κατά την ενήλικη ζωή, η έκφρασή της περιορίζεται στις νευρικές απολήξεις, ενώ κατά τη φυσιολογική γήρανση εντοπίζεται και σε κυτταρικά σώματα (Raghavan et al., 2004).

Στο κυτταρόπλασμα η α-συνουκλεΐνη βρίσκεται κυρίως σε διαλυτή μορφή, όπου αλληλεπιδρά ασθενώς με άλλες πρωτεΐνες και θεωρείται πως βρίσκεται σε αποδιατεταγμένη μορφή στη φυσική της κατάσταση (Weinreb et al., 1996). Μία πρόσφατη μελέτη έχει υποδείξει πως η συνουκλεΐνη ανευρίσκεται φυσιολογικά στα ερυθρά αιμοσφαίρια σε σταθερή δομή διαλυτού τετραμερούς αποτελούμενη από α-έλικες (Bartels et al., 2011), κάτι που δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί. Όταν η α-συνουκλεΐνη δεν συνδέεται με μεμβράνες φαίνεται πως διατηρεί την αποδιατεταγμένη της μορφή, όπως προτείνουν μελέτες που απομόνωσαν την α-συνουκλεΐνη από ανθρώπινους ιστούς και ερυθρά αιμοσφαίρια σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (Burré et al., 2014; Fauvet et al., 2012).

Παρόλα αυτά, η α-συνουκλεΐνη μέσω του αμινοτελικού της άκρου έχει την ικανότητα να προσδένεται αναστρέψιμα σε λιπιδικές μεμβράνες και συναπτικά κυστίδια, μικρής διαμέτρου κατά προτίμηση, και να αποκτά δευτεροταγή δομή σχηματίζοντας αμφιπαθείς α-έλικες προσομοιάζοντας τις απολιποπρωτεΐνες (Eliezer et al., 2001). Τα πρώτα έντεκα αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο φαίνεται να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη δημιουργία της α-έλικας και τη μεμβρανική σύνδεση αφού η απαλοιφή τους *in vitro* μειώνει δραματικά την πρόσδεση στα κυστίδια (Lorenzen et al., 2014; Vamvaca et al., 2009).

Επίσης, παρατηρούνται πολλαπλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοτελικού και καρβοξυτελικού άκρου που 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 (Bertoncini et al., 2005; Dedmon et al., 2005; Lee et al., 2005; Sandal et al., 2008). Η επικρατούσα θεωρία υποστηρίζει ότι σε φυσιολογικές συνθήκες το

μόριο της α-συνουκλεΐνης βρίσκεται σε μια δυναμική ισορροπία μεταξύ των μεμβρανικών πολυμερών της μορφών και της κυτταροπλασματικής, που υπό κανονικές συνθήκες παραμένει στην αδιαμόρφωτη μονομερή μορφή (Peelaerts and Baekelandt, 2016a). 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.

Συνοψίζοντας, 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 Πάρκινσον, ή οι λοιπές συνουκλεϊνοπάθειες. Σε αυτό το πλαίσιο, 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).

1.2.2 Ο φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης

Μέχρι και σήμερα ο φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, παρά την πληθώρα των μελετών πάνω στο αντικείμενο αυτό.

Η ικανότητα της α-συνουκλεΐνης να προσδένεται σε συναπτικά κυστίδια των τελικών απολήξεων του νευράξονα, όπως επίσης και η παρουσία στο αμινοτελικό της άκρο του επαναλαμβανόμενου μοτίβου KTKEGV μαρτυρούν πως η α-συνουκλεΐνη μπορεί να έχει έναν πιθανό ρόλο στη διακίνηση των κυστιδίων και στην διατήρηση των αποθεμάτων τους στον ώριμο νευρώνα μέσω της δυνατότητάς της να αλληλεπιδρά με λιπίδια (Scott and Roy, 2012). *In vitro* μελέτες μάλιστα έχουν δείξει ότι η α-συνουκλεΐνη μπορεί να προσδεθεί σε όξινα φωσφολιπιδικά κυστίδια, κατά τρόπο που επηρεάζει δραματικά τη δευτεροταγή δομή της, μεταβάλλοντας το ποσοστό των α-ελίκων που αυτή σχηματίζει (Davidson et al., 1998).

Μύες που δεν εκφράζουν την α-συνουκλεΐνη (Knock Out Mice, KO), δεν εμφανίζουν κάποιον σοβαρό νευρολογικό φαινότυπο, παρατήρηση που οδηγεί στο

συμπέρασμα ότι η α -συνουκλεΐνη δεν διαδραματίζει κάποιον κρίσιμης σημασίας ρόλο στην συναπτογένεση, τουλάχιστον όσον αφορά τους μύες. Παράλληλα, οι παραπάνω μύες παρουσιάζουν αυξημένη απελευθέρωση της ντοπαμίνης στο ραβδωτό σώμα, γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει έναν πιθανό ρόλο της πρωτεΐνης ως αρνητικού ρυθμιστή της νευροδιαβίβασης (Abeliovich et al., 2000). Υπάρχουν επίσης ισχυρά δεδομένα που υποδεικνύουν την α -συνουκλεΐνη ως ύψιστης σημασίας ρυθμιστή της δυναμικής των συναπτικών κυστιδίων (Burré et al., 2010; Chandra et al., 2004; Murphy et al., 2000).

Ένας ακόμη τομέας που μπορεί να συμμετέχει η α -συνουκλεΐνη, όπως δείχνουν διάφορες μελέτες, είναι η απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών. Σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης σε εκχύλισμα εγκεφάλου έχει δειχθεί ο συνεντοπισμός της με την υδροξυλάση της τυροσίνης, το καθοριστικό ένζυμο για τη σύνθεση της ντοπαμίνης, με την υπερέκφραση της συνουκλεΐνης να μειώνει την δραστικότητα του ενζύμου και συνακόλουθα τη σύνθεση της ντοπαμίνης (Perez et al., 2002). Υπάρχουν ενδείξεις πως η α -συνουκλεΐνη αλληλεπιδρά και με τον μεταφορέα της ντοπαμίνης (Dopamine Active Transporter, DAT) μέσω του αμινοτελικού άκρου και μειώνει την πρόσληψη της ντοπαμίνης (Wersinger et al., 2003; Wersinger and Sidhu, 2003). Στους ΚΟ μύες αντίθετα δεν παρατηρείται διαφοροποίηση στην ενεργότητα του μεταφορέα DAT (Dauer et al., 2002), παρατήρηση που συνάδει με το γεγονός πως οι ΚΟ μύες δεν εμφανίζουν νευρολογική σημειολογία.

Επιπλέον, η συνουκλεΐνη αλληλεπιδρά με μικρές GTPάσες που εμπλέκονται στην έκκριση και μεταφορά των κυτταρικών κυστιδίων, καθώς και στη διακίνησή τους μεταξύ ενδοπλασματικού δικτύου και του σωματίου Golgi (Cooper et al., 2006). Τόσο η καταστολή όσο και η υπερέκφραση του γονιδίου της α -συνουκλεΐνης επηρεάζει τη διακίνηση των κυστιδίων (Cooper et al., 2006; Dalfó et al., 2004). Επιπρόσθετα, η ενδιάμεση πεπτιδική αλληλουχία της α -συνουκλεΐνης παρουσιάζει σημαντικό βαθμό ομολογία με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη συνοδό, την 14-3-3, αποτέλεσμα που υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο της ως πρωτεΐνης - συνοδού (Ostrerova et al., 1999).

Ακόμη, παλαιότερες έρευνες έχουν δείξει ότι η α -συνουκλεΐνη 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- συνουκλεΐνης προκαλεί ηλικιοεξαρτώμενη νευρωνική διαταραχή σε μύες (Greten-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 Πάρκινσον (Sharma et al., 2012). Η αφετηρία δε, της αλληλουχίας των παραπάνω παθολογικών γεγονότων θα μπορούσε να εντοπιστεί στη λειτουργική παρέκκλιση της α-συνουκλεΐνης (Burré et al., 2010; Greten-Harrison et al., 2010; Nemani et al., 2010).

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

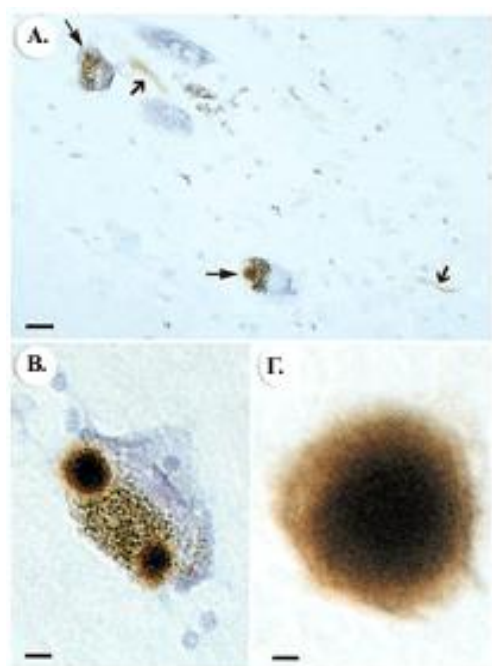
Πίνακας 1-3. Πιθανές φυσιολογικές λειτουργίες της α-συνουκλεΐνης.

Προσαρμογή από Chandra και συνεργάτες (2005), καθώς και από τους Hegde και Jagannatha-Rao (2003)

Συμπερασματικά, τα δεδομένα συγκλίνουν στο γεγονός πως ο φυσιολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης είναι πολυδιάστατος και υπάρχει πιθανή εμπλοκή της σε πολλά διαφορετικά ρυθμιστικά μονοπάτια του κυττάρου, όπως συνοψίζεται και στον πίνακα 1-3.

1.2.3 Ο παθολογικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης και η σχέση της με τη νόσο Πάρκινσον

Η σύνδεση της α-συνουκλεΐνης με τη νευροεκφύλιση προέκυψε από δύο κομβικές παρατηρήσεις. Η ταυτοποίηση, αρχικά, της πρώτης σημειακής μετάλλαξης, στο γονίδιο *SNCA* που την κωδικοποιεί, σε ένα μικρό αριθμό οικογενειών με αυτοσωμική επικρατή κληρονομικότητα για τη νόσο Πάρκινσον πρώιμης έναρξης, αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη για τη σημασία του μορίου στην παθογένεια της νόσου (Polymeropoulos et al., 1997). Η ανακάλυψη, την ίδια περίοδο, ότι η α-συνουκλεΐνη αποτελεί βασικό συστατικό των σωματίων Lewy (εικόνα 1-7), που ανευρίσκονται τόσο στην οικογενή όσο και στη σποραδική μορφή της νόσου, και αποτελούν το βασικό παθολογοανατομικό ‘σήμα κατατεθέν’ της νόσου, ενίσχυσε την σημασία αυτής της συσχέτισης (Spillantini et al., 1998, 1997).



Εικόνα 1-7. Ανοσοϊστοχημική απεικόνιση συσσωματωμάτων α-συνουκλεΐνης στη μέλαινα ουσία εγκεφάλου ασθενών με νόσο Πάρκινσον.

A) Απεικονίζονται δύο νευρικά κύτταρα που περιέχουν σωματίνα Lewy (λεπτά βέλη) και νευρίτες Lewy (παχιά βέλη) θετικούς στη χρώση για α-συνουκλεΐνη. Κλίμακα: 20μm.

B) Νευρικό κύτταρο με δύο σωματίνα Lewy θετικά στη χρώση για α-συνουκλεΐνη σε μεγέθυνση. Κλίμακα: 8μm.

C) Εξωκυττάριο σωματίνο Lewy θετικό στη χρώση για α-συνουκλεΐνη. Κλίμακα: 4μm.

Προσαρμογή από Spillantini και συνεργάτες (1997).

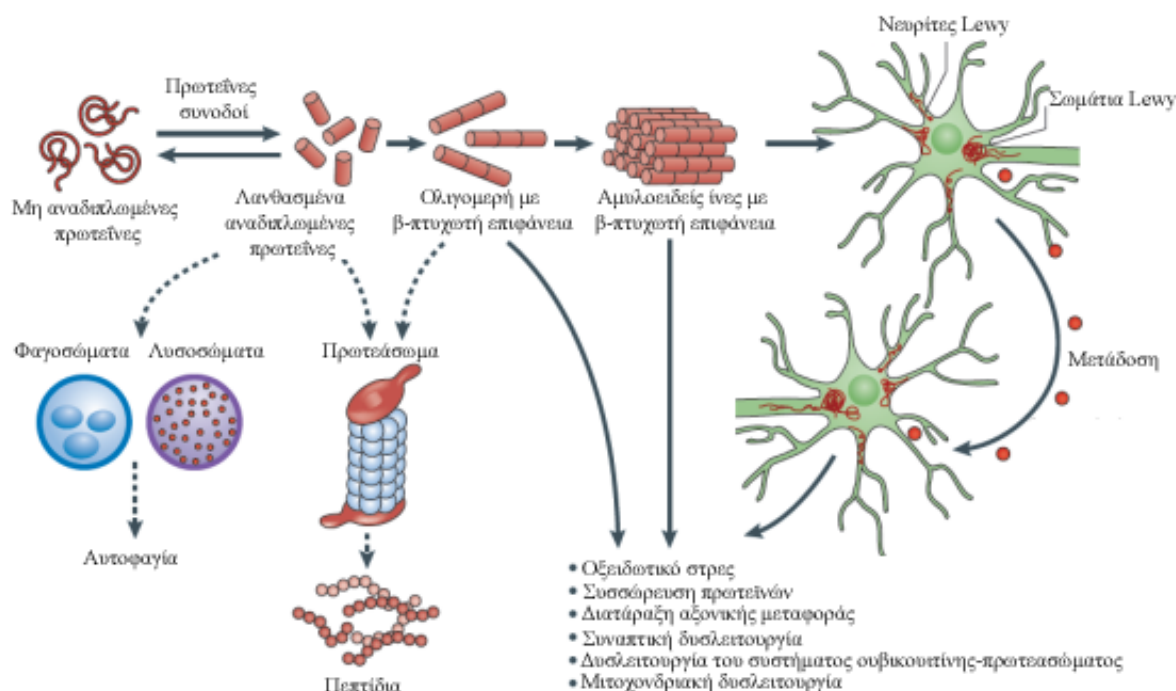
Το γεγονός ότι η α-συνουκλεΐνη αποτελεί το βασικό συστατικό των σωματίων Lewy τόσο στις γενετικές περιπτώσεις εμφάνισης της νόσου όσο και στις σποραδικές,

οδήγησε στη σκέψη ότι και η φυσικού τύπου α-συνουκλεΐνη είναι δυνατόν να αποκτήσει κάποια μη φυσιολογική λειτουργία, η οποία επιτείνεται στις περιπτώσεις των μεταλλάξεων.

Η α-συνουκλεΐνη, υπό συνθήκες, εμφανίζεται τοξική για τα κύτταρα επηρεάζοντας διάφορα μονοπάτια. Η αναστολή από την α-συνουκλεΐνη των κυρίων μονοπατιών πρωτεϊνικής αποικοδόμησης επάγει την τοξική της δράση, καθώς οδηγεί στην περαιτέρω συσσώρευση και ολιγομερισμό της. Τόσο το πρωτεάσωμα, όσο και το λυσόσωμα πιστεύεται πως συμμετέχουν στην αποικοδόμησή της (Cuervo et al., 2004; Webb et al., 2003). Η αναστολή της λειτουργίας του πρωτεασώματος στη μέλαινα ουσία επίμυων οδηγεί στη συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης και στον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων (McNaught et al., 2002). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει πως οι διαλυτές ολιγομερείς μορφές της κατευθύνονται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα και αναστέλλουν τη λειτουργία του (Emmanouilidou et al., 2010a).

Διάφορες μελέτες έχουν καταδείξει ότι τόσο η υπερέκφραση, όσο και η απώλεια της α-συνουκλεΐνης σε διαγονιδιακούς μύες, επηρεάζουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων (Ellis et al., 2005; Martin et al., 2006). Η υπερέκφραση της α-συνουκλεΐνης σε κύτταρα του ολιγοκύτταρου νηματώδους *Caenorhabditis elegans* οδηγεί στον κατακερματισμό των μεμβρανών των μιτοχονδρίων μέσω της πρόσδεσης της σε αυτές (Kamp et al., 2010). Παράλληλα, η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης α-συνουκλεΐνης σε κυτταρικά μοντέλα επάγει οξειδωτικό στρες και αυξημένα επίπεδα ελευθέρων ριζών που με τη σειρά τους οδηγούν σε βλάβες στα μιτοχόνδρια και σε κυτταρικό θάνατο (Smith et al., 2005).

Στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες η κύρια πηγή ελευθέρων ριζών είναι η ίδια η ντοπαμίνη. Ο καταβολισμός της ντοπαμίνης μέσα στους νευρώνες της μέλαινας ουσίας καταλήγει στο σχηματισμό ενδιάμεσων ελευθέρων ριζών οξυγόνου οι οποίες αποτελούν τα απαραίτητα συστατικά της νευρομελανίνης (Maguire-Zeiss et al., 2005). Οι οξειδωμένοι μεταβολίτες της ντοπαμίνης επιφέρουν αλλαγές στο μόριο της συνουκλεΐνης, μέσω αλληλεπιδράσεων με το καρβοξυτελικό της άκρο (Norris et al., 2005), με αποτέλεσμα να σταθεροποιούν τα σχηματισμένα ολιγομερή (Burke et al., 2003; Copway et al., 2001). Η επώαση κυττάρων, που υπερεκφράζουν την α-συνουκλεΐνη, με ντοπαμίνη έχει ως αποτέλεσμα αύξηση του ρυθμού του κυτταρικού θανάτου (Cappai et al., 2005).



Εικόνα 1-8. Υποθετικό μοντέλο νευροτοξικής δράσης της α -συνουκλεΐνης στη νόσο Πάρκινσον.

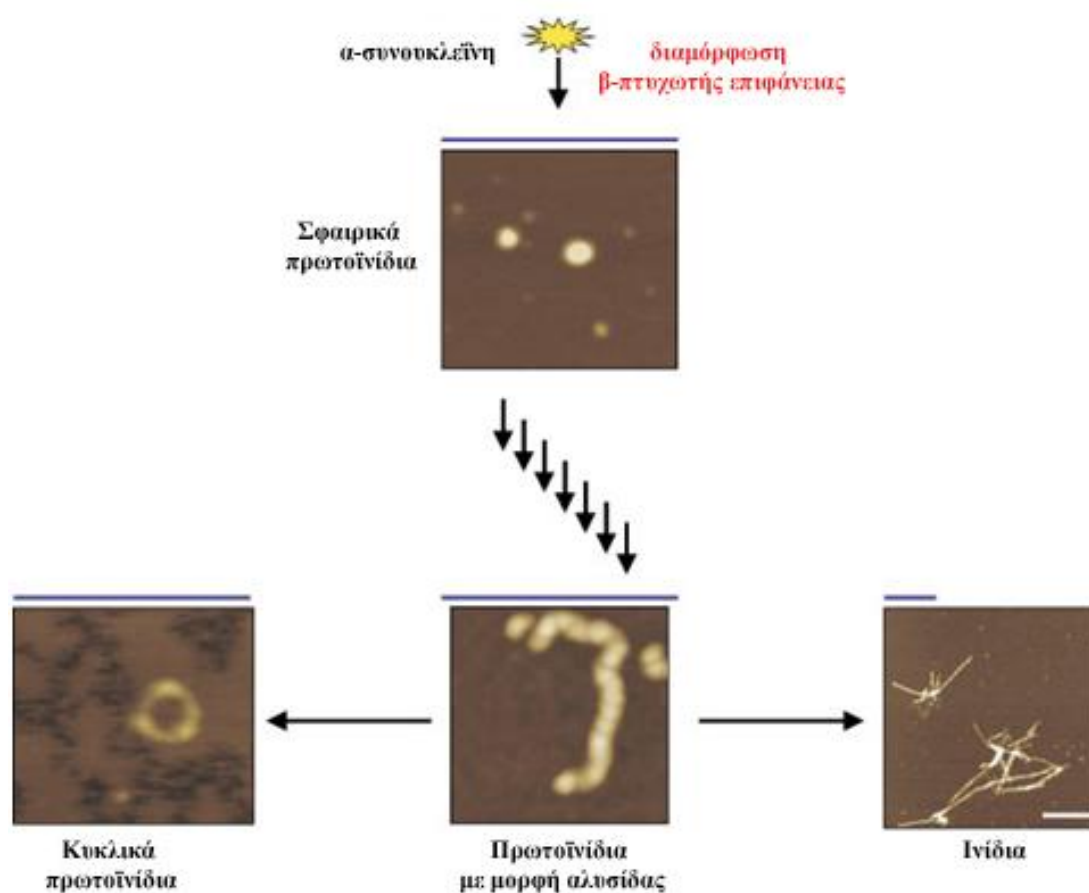
Υπό φυσιολογικές συνθήκες η α -συνουκλεΐνη βρίσκεται σε μια διαλυτή τυχαία διαμόρφωση, ως μη αναδιπλωμένη πρωτεΐνη. Υπό παθολογικές συνθήκες, υφίσταται λανθασμένη αναδίπλωση, μεταπίπτοντας στις παθολογικές ολιγομερείς μορφές (διμερείς, τριμερείς, ολιγομερείς), οι οποίες πολυμερίζονται περαιτέρω, σχηματίζοντας 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 Πάρκινσον, τα σωμάτια και τους νευρίτες Lewy. Προσαρμογή από Irwin και συνεργάτες (2013).

1.2.4 α -συνουκλεΐνη και τάση για συσσωμάτωση

Η α -συνουκλεΐνη, υπό φυσιολογικές συνθήκες σε υδατικό διάλυμα βρίσκεται σε αναδιαταγμένη μορφή (Weinreb et al., 1996). Όπως ήδη αναφέρθηκε, η α -συνουκλεΐνη χαρακτηρίζεται παράλληλα και 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. 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).

Σύμφωνα με *in vitro* μελέτες, η διαδικασία συσσωμάτωσης της α -συνουκλεΐνης ακολουθεί ένα μηχανισμό πυρήνωσης (εικόνα 1-9), ο οποίος χαρακτηρίζεται από μια αργή έναρξη (Cremades et al., 2012) και 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). Σε αντίθεση με τις *in vitro* συνθήκες, όπου η συσσωμάτωση της α -συνουκλεΐνης γίνεται ταχύτατα, στο κύτταρο η αντίστοιχη διαδικασία είναι εξαιρετικά αργή, γεγονός που υποδηλώνει τη ρύθμιση της διαδικασίας αυτής από ομοιστατικούς μηχανισμούς (Peelaerts and Baekelandt, 2016b). Παράλληλα, μελέτες υποστηρίζουν ότι ο διμερισμός της συνουκλεΐνης παίζει σπουδαίο ρόλο στην διαδικασία της πυρήνωσης, λειτουργώντας σαν εκμαγείο για την αναδιαμόρφωσή της (Takahashi et al., 2002).



Εικόνα 1-9. Διαδικασία πυρήνωσης.

Η μη αναδιπλωμένη α -συνουκλεΐνη (επάνω) αποκτά μια προφανή σφαιρική διαμόρφωση, η οποία είναι δυνατόν να συσσωρευτεί 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 σωμάτων Lewy (Giasson et al., 1999).

Η αύξηση της συγκέντρωσης της α-συνουκλεΐνης αποτελεί τον πιο κρίσιμο παράγοντα για τη σταδιακή μετατροπή της στην παθολογική της διαμόρφωση. Υπάρχουν και ενδογενείς παράγοντες που δρουν συνεργητικά στην έμφυτη τάση της συνουκλεΐνης για συσσωμάτωση, όπως το γήρας και η σταδιακή εκφύλιση των συστημάτων αποικοδόμησης πρωτεϊνών που αυτό επιφέρει.

Τέλος, οι σημειακές μεταλλάξεις (A53T, E46K, και A30P) στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης επάγουν τον σχηματισμό των ολιγομερών της μορφών (Conway et al., 2000, 1998).

1.3 Αυτοφαγία και ο ρόλος της στη νόσο Πάρκινσον

1.3.1 Κυτταρικά μονοπάτια αποικοδόμησης πρωτεϊνών

Όλες οι πρωτεΐνες υποβάλλονται σε συνεχή σύνθεση και αποικοδόμηση. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ανακύκλωση των δομικών υλικών της πρωτεΐνης, καθώς τα αμινοξέα που την αποτελούν μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκ νέου για την πρωτεϊνοσύνθεση. Παράλληλα, με αυτόν τον τρόπο ελέγχεται αυστηρά και ο χρόνος ζωής των πρωτεϊνών, ώστε να μπορεί το κύτταρο αφενός μεν να διατηρεί την ομοιόστασή του (πχ. καταστρέφοντας πρωτεΐνες που η δράση τους δεν έχει πλέον ωφέλιμο χαρακτήρα ή έχουν υποστεί δομικές βλάβες), αφετέρου δε να προσαρμόζεται στα εξωτερικά ερεθίσματα (Martinez-Vicente et al., 2005). Η αποικοδόμηση πρωτεϊνών και οργανιδίων στους ευκαριωτικούς οργανισμούς πραγματοποιείται μέσω δύο βασικών πρωτεολυτικών μονοπατιών, του πρωτεασώματος και του λυσοσώματος.

1.3.2 Το μονοπάτι Πρωτεασώματος – Ουβικουτίνης

Το μονοπάτι πρωτεασώματος – ουβικουτίνης (Ubiquitine – Proteasome Pathway, UPP) χρησιμοποιείται για την αποικοδόμηση πρωτεϊνών με μικρό χρόνο ημιζωής. Επιπλέον, αυτό το μονοπάτι συμβάλλει ενεργά στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών με λανθασμένη τριτοταγή δομή που προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο (Rubinsztein, 2006).

Το υπό εξέταση μονοπάτι αποτελείται από ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών κυλινδρικού σχήματος με πολλαπλά καταλυτικά κέντρα στο εσωτερικό του οποίου και πραγματοποιείται η αποικοδόμηση της πρωτεΐνης σε μικρότερα πεπτίδια

(DeMartino and Slaughter, 1999). Για να περάσουν μέσα από τον κύλινδρο του καταλυτικού κέντρου πρέπει να βρίσκονται σε αποδιατεταγμένη μορφή, κάτι που αποκλείει την αποικοδόμηση ολιγομερών ή συσσωματωμένων πρωτεϊνών (Verhoef et al., 2002).

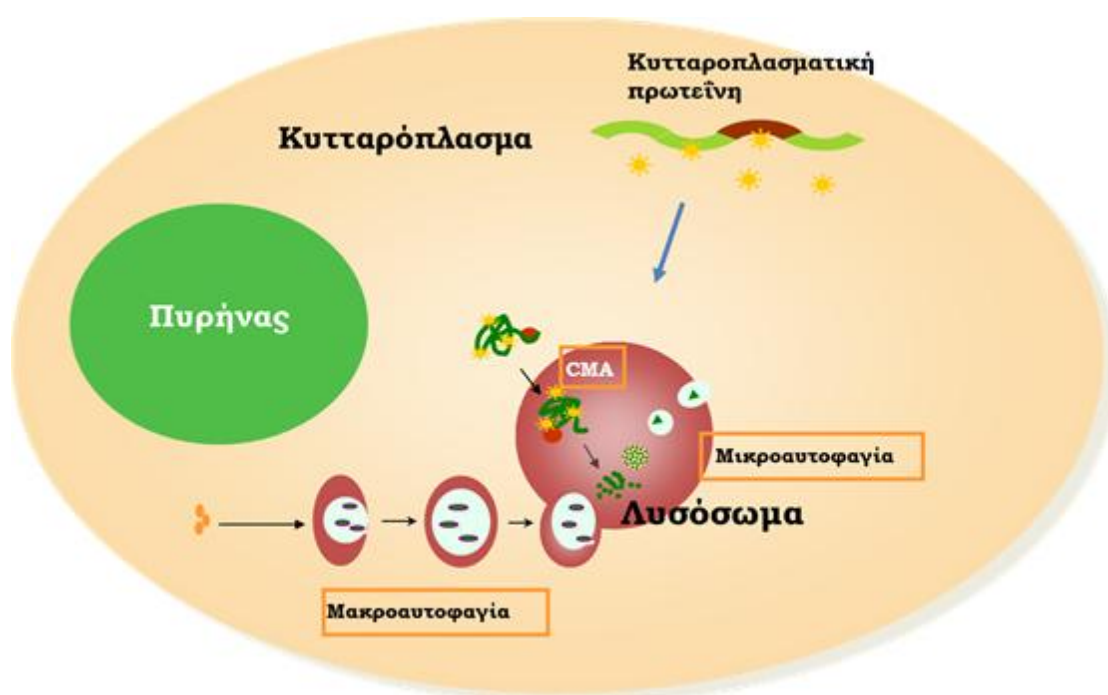
Βασική προϋπόθεση για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μέσω του συγκεκριμένου μονοπατιού είναι η σήμανσή τους με την πρόσδεση αλυσίδων ουβικουιτίνης μέσω ομοιοπολικών δεσμών με τα κατάλοιπα λυσίνης. Η σύνδεση ουβικουιτίνης – υποστρώματος επιτυγχάνεται με την κατανάλωση ενέργειας και καταλύεται με τη συμβολή τριών ενζύμων, των E1 (ubiquitine-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme), και E3 (ubiquitine-ligase).

Οι πολυουβικουιτινωμένες πρωτεΐνες εισέρχονται στο εσωτερικό του πρωτεασώματος, όπου αποικοδομούνται σε μικροσκοπικά πεπτίδια, ενώ οι αλυσίδες ουβικουιτίνης υδρολύονται από ειδικά ένζυμα με στόχο την επαναχρησιμοποίησή τους (Rubinsztein, 2006).

1.3.3 Το μονοπάτι Αυτοφαγίας – Λυσosώματος

Το λυσόσωμα είναι ένα κυτταρικό οργανίδιο το οποίο ευθύνεται για την αποικοδόμηση και ανακύκλωση οργανιδίων και πρωτεϊνών με μακρό χρόνο ημιζωής. Το λυσόσωμα συμμετέχει στη ρύθμιση των επιπέδων των μορίων και των υποδοχέων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, καθώς και στην άμυνα του κυττάρου μέσω του μονοπατιού της ετεροφαγίας. Από την άλλη πλευρά, μέσω του μονοπατιού της αυτοφαγίας (autophagy – lysosome pathway, ALP) το λυσόσωμα συμβάλει στην αποικοδόμηση των κυτταροπλασματικών συστατικών. Το μονοπάτι αυτό (de Duve and Wattiaux, 1966) διαφέρει σε αρκετά σημεία από εκείνο της ουβικουιτίνης-πρωτεασώματος, με πιο χαρακτηριστικό το γεγονός ότι μόνο το πρώτο μπορεί να αποικοδομήσει ολόκληρα οργανίδια, μέσω της μακροαυτοφαγίας (Xilouri and Stefanis, 2011).

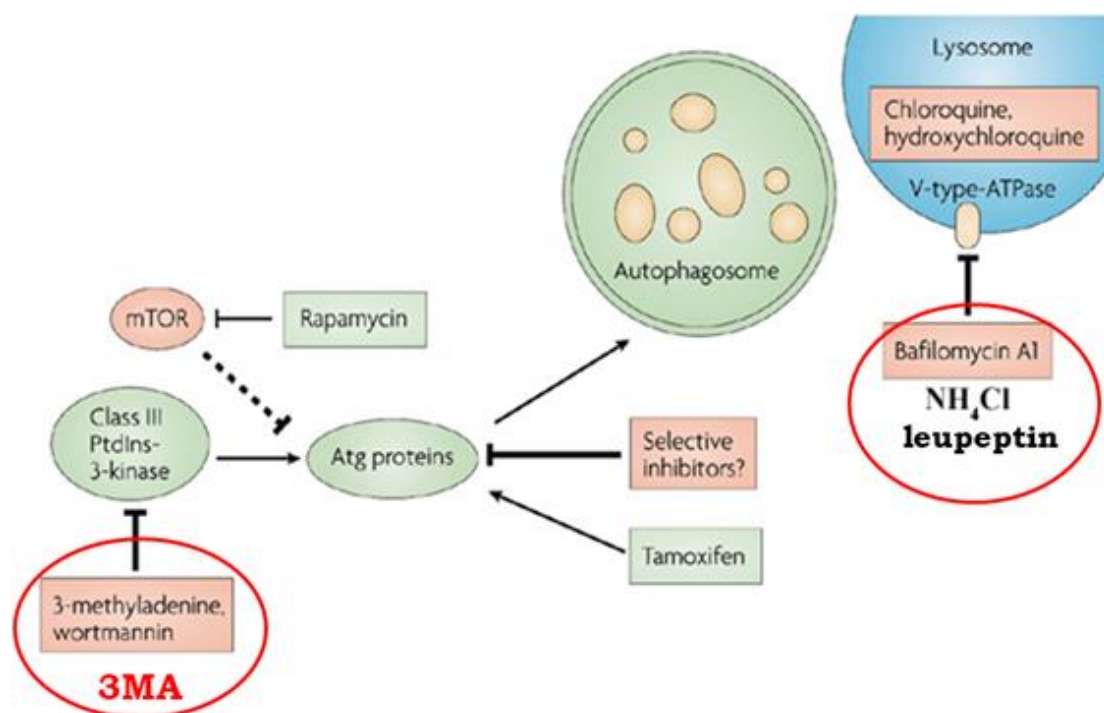
Η αυτοφαγία διακρίνεται σε τρεις τύπους, ανάλογα με τον τρόπο που μεταφέρονται τα διάφορα συστατικά στο λυσόσωμα: 1) τη μικροαυτοφαγία, 2) τη μακροαυτοφαγία και 3) την αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από σαπερόνες (εικόνα 1-10) (Nixon, 2013). Κοινή κατάληξη και των τριών τύπων αποτελεί το λυσόσωμα, αν και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το είδος των υποστρωμάτων, τη ρύθμιση και τις συνθήκες ενεργοποίησης του καθενός (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007).



Εικόνα 1-10. Σχηματική απεικόνιση των τριών αυτοφαγικών μονοπατιών.

Παρουσιάζεται ο τρόπος πρόσληψης και μεταφοράς των προς αποικοδόμηση πρωτεϊνών από τα τρία μονοπάτια της αυτοφαγίας: 1) Η μικροαυτοφαγία προσλαμβάνει τα συστατικά που βρίσκονται δίπλα στο λυσόσωμα μέσω προεκβολών της μεμβράνης, 2) στη μακροαυτοφαγία δημιουργείται το φαγόσωμα που περικλείει τις πρωτεΐνες ή τα οργανίδια και τα μεταφέρει στο λυσόσωμα και 3) η αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από σαπερόνες (CMA) όπου ειδικές πρωτεΐνες συνοδοί μεταφέρουν τις πρωτεΐνες-στόχους στο λυσόσωμα.

Αξίζει να προστεθεί, πως για τη μελέτη λειτουργίας του λυσοσώματος είναι απαραίτητη η χρήση του χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl) ή της Βαφλομυκίνης, καθώς αποτελεί αναστολέα της V-ΑΤΡάσης. Η συγκεκριμένη ΑΤΡάση βρίσκεται στη μεμβράνη του λυσοσώματος και είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση του όξινου, σε σχέση με το κυτταρόπλασμα, περιβάλλοντος εντός του, καθώς δρα ως αντλία κατιόντων υδρογόνου (H^+) προς το εσωτερικό του οργανιδίου. Με την αναστολή της αυξάνεται το pH του λυσοσώματος, με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση των πρωτεασών και των λοιπών καταλυτικών ενζύμων που βρίσκονται σε αυτό και την αναστολή της πρωτεολυτικής λειτουργίας του οργανιδίου (Εικόνα 1-11).



Εικόνα 1-11. Σχηματική αναπαράσταση των κυτταρικών μονοπατιών που αναστέλλουν το χλωριούχο αμμώνιο και η 3-μεθυλαδενίνη.

1.3.4 Μικροαυτοφαγία

Το μονοπάτι της μικροαυτοφαγίας χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία εγκολπωμάτων που αποτελούν προέκταση της ίδιας της λυσοσωμικής μεμβράνης. Τα εκκολπώματα αυτά απομονώνουν τα οργάνδια και τα κυτταροπλασματικά συστατικά, κατ' αντίστοιχο τρόπο με την φαγοκυττάρωση, και τα οδηγούν εντός του λυσοσώματος, όπου πραγματοποιείται η διάσπασή τους από τα λυσοσωμικά ένζυμα (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007). Αξίζει να σημειωθεί ότι στα κύτταρα των θηλαστικών το μονοπάτι της μικροαυτοφαγίας έχει μελετηθεί λιγότερο σε σύγκριση με τα άλλα δύο μονοπάτια, με αποτέλεσμα οι γνώσεις για τον τρόπο λειτουργίας ή ενεργοποίησης του να μην είναι επαρκείς (Li et al., 2012; Xilouri and Stefanis, 2011).

1.3.5 Μακροαυτοφαγία

Αρκετές φορές η μακροαυτοφαγία χρησιμοποιείται ως συνώνυμο ολόκληρου του μονοπατιού αυτοφαγίας – λυσοσώματος, αλλά αποτελεί ένα μόνο υποσύνολο (Shintani and Klionsky, 2004). Η διαδικασία της μακροαυτοφαγίας χαρακτηρίζεται από περισσότερα από ένα στάδια κατά τα οποία αρχικά σχηματίζεται ένα εγκόλπωμα, κυλινδρικού ή κυπελοειδούς συνήθως σχήματος (το φαγοφόριο), που οδηγεί στον σχηματισμό ενός κλειστού κυστιδίου, το οποίο ονομάζεται αυτοφαγόσωμα, όπου

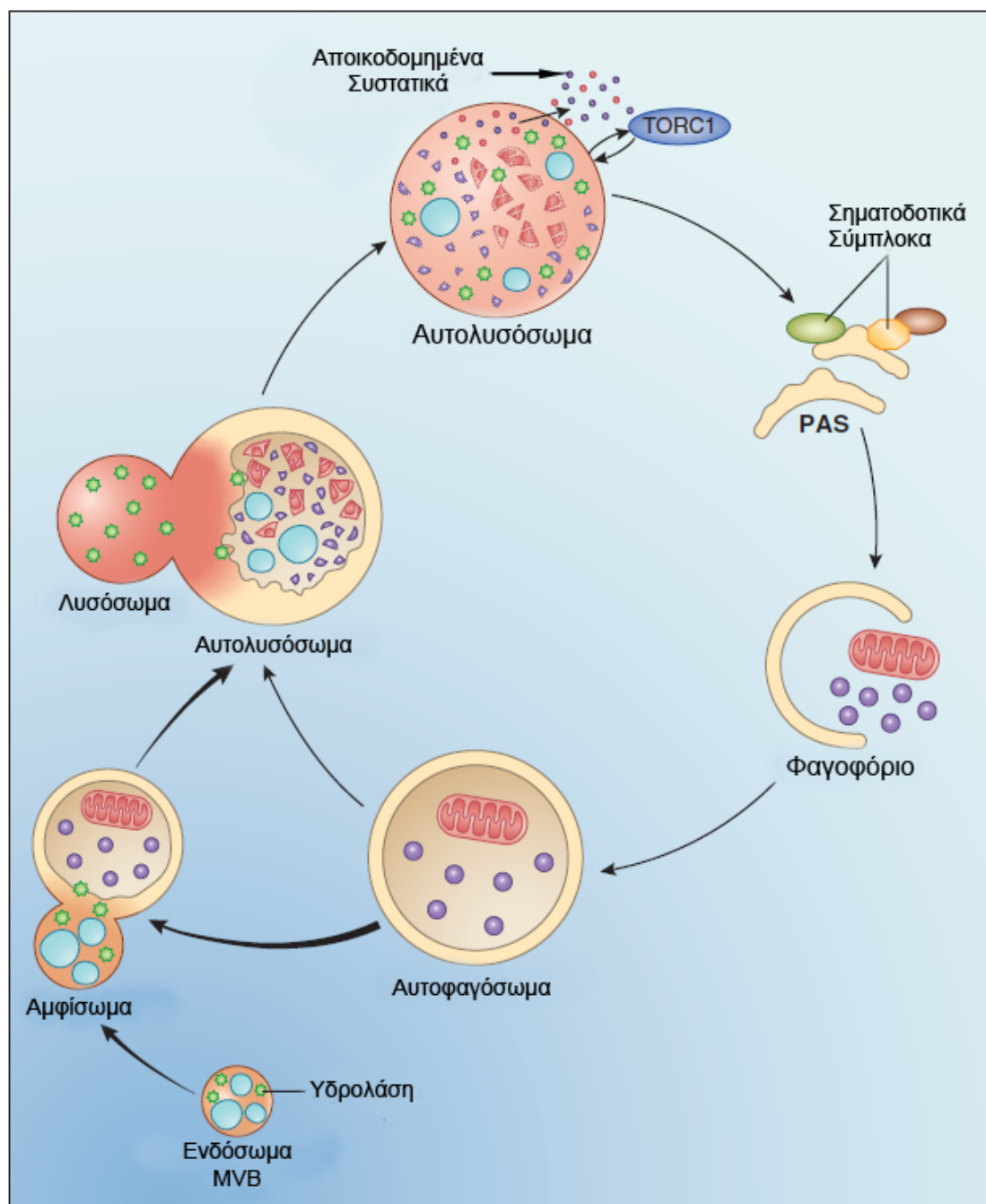
περιέχονται τα συστατικά του κυτταροπλάσματος ή τα οργάνidia που πρόκειται να αποικοδομηθούν. Ακολούθως, το αυτοφαγόσωμα ενσωματώνεται στο λυσόσωμα (το αυτοφαγολυσόσωμα) με στόχο να προχωρήσει η αποκοδόμηση των περιεχομένων του (Xilouri and Stefanis, 2011). Η προέλευση της αρχικής μεμβράνης βρίσκεται ακόμη υπό διερεύνηση, με τους πιθανούς υποψήφιους σχηματισμούς να προέρχονται από το ενδοπλασματικό δίκτυο ή τα σωμάτια Golgi (Hayashi-Nishino et al., 2009; Tooze and Yoshimori, 2010).

Παρότι η διαδικασία της μακροαυτοφαγίας φαίνεται παρόμοια με αυτή της μικροαυτοφαγίας, εντούτοις η πρώτη διαφέρει από τη δεύτερη στο ότι το αυτοφαγόσωμα μπορεί να δημιουργηθεί σε οποιοδήποτε μέρος του κυττάρου και όχι απαραίτητα κοντά στα λυσοσώματα (Köchl et al., 2006). Οι συγκεκριμένες δομές, μάλιστα, μπορούν να εμφανιστούν σε αρκετά απομακρυσμένα τμήματα του κυττάρου από τα λυσοσώματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι νευρώνες, όπου τα φαγοσώματα δημιουργούνται κατά μήκος των αξόνων σε μεγάλες αποστάσεις από τα λυσοσώματα που βρίσκονται, κατά κύριο λόγο, περιπυρηνικά (Hollenbeck, 1993). Εξ αυτού συμπεραίνεται πως μία σημαντική πτυχή της μακροαυτοφαγίας είναι ο κυτταρικός μηχανισμός μεταφοράς των αυτοφαγοσωμάτων από το, συχνά απομακρυσμένο, σημείο δημιουργίας τους στα λυσοσώματα.

Οι αρχικές μελέτες πάνω στην μακροαυτοφαγία έγιναν σε ζύμες, αλλά πρόσφατα η διαδικασία έχει περιγραφεί επαρκώς και σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών. Η διαδικασία του σχηματισμού του αυτοφαγοσώματος αποτελείται από μια σειρά διαφορετικών βημάτων: την εκκίνηση, την πυρήνωση, την αναγνώριση υποστρώματος, την επέκταση και την ολοκλήρωση. Αρκετά γονίδια σχετιζόμενα με την έναρξη και ολοκλήρωση της μακροαυτοφαγίας έχουν χαρακτηριστεί στις ζύμες, αλλά και σε θηλαστικά (Klionsky, 2005; Ohsumi, 2001).

Η μακροαυτοφαγία συμβαίνει και σε φυσιολογικές συνθήκες, αλλά είναι σαφώς αυξημένη σε συγκεκριμένες συνθήκες. Το κλασικό παράδειγμα είναι η έλλειψη θρεπτικών ουσιών. Στα κύτταρα των θηλαστικών η έλλειψη αμινοξέων οδηγεί στην απενεργοποίηση της κινάσης mTOR (mammalian target of rapamycin), η οποία αποτελεί βασικό ρυθμιστή της κατανάλωσης των θρεπτικών ουσιών στο κύτταρο μέσω της φωσφορυλίωσης καταλοίπων σερίνης ή θρεονίνης (Jung et al., 2010; Mehrpour et al., 2010). Επομένως, η χρήση της ραπαμικίνης, αναστολέα της mTOR, χρησιμοποιείται με σκοπό την επαγωγή της μακροαυτοφαγίας. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν ενδείξεις πως στα κύτταρα των θηλαστικών η

μακροαυτοφαγία επάγεται και από μονοπάτια ανεξάρτητα της mTOR (He and Klionsky, 2009; Ravikumar et al., 2010).



Εικόνα 1-12. Αναπαράσταση σχηματισμού των δομών της μακροαυτοφαγίας.
Προσαρμογή από Nixon (2013).

Παρότι δεν είναι με ακρίβεια γνωστό το ρυθμιστικό μονοπάτι που έπεται της ενεργοποίησης της mTOR, το πρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από τις ULK1, Atg13 και FIP200 φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο (Jung et al., 2010). Ο αναστολέας της μακροαυτοφαγίας 3-μεθυλοαδενίνη (3-MA) δρα στην φάση της

νουκλέωσης του αυτοφαγοσώματος ως αναστολέας του PI3K-III (Phosphoinositide 3-kinase class III). Επειδή ο αναστολέας 3-MA είναι εκλεκτικός για την μακροαυτοφαγία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με το χλωριούχο αμμώνιο, που προαναφέρθηκε, για τη διερεύνηση επακριβώς του μονοπατιού της αυτοφαγίας που εμφανίζεται δυσλειτουργία (Εικόνα 1-11). Αυτό καθίσταται δυνατό καθώς μετρώντας μέσω pulse-chase experiments (βλ. ενότητα 3.9) την *in vivo* αποικοδόμηση των πρωτεϊνών γίνεται να μετρηθεί η αποικοδόμηση που οφείλεται αποκλειστικά στην μακροαυτοφαγία, συγκρίνοντας τα επίπεδα της αποικοδόμησης που οφείλεται γενικά στο μονοπάτι αυτοφαγίας – λυσοσώματος με τα αντίστοιχα επίπεδα μετά από την εκλεκτική αναστολή της μακροαυτοφαγίας.

Δύο πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται συχνά ως δείκτες της μακροαυτοφαγίας είναι η p62 και η MAP1LC3 (microtubule-associated proteins 1 – light chain 3), που εφεξής θα καλείται LC3 για χάρη συντομίας. Η LC3 απαντάται φυσιολογικά σε δύο μορφές, την LC3-I (18 kDa) και την LC3-II (14 kDa) (Kabeya et al., 2000). Η LC3-I παράγεται από κατάτμηση της αρχικής LC3 αμέσως μετά τη σύνθεσή της και παραμένει ενεργή στο κυτταρόπλασμα. Κατόπιν της ενεργοποίησης της μακροαυτοφαγίας, η LC3-I υποβάλλεται σε έναν αριθμό μετατροπών και καταλήγει στην μορφή LC3-II (Yang et al., 2005).

Ο έτερος βιοχημικός δείκτης που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ενεργότητας της μακροαυτοφαγίας είναι η πρωτεΐνη p62 (ubiquitin - binding protein p62 ή Sequestosome-1). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη φαίνεται να αποτελεί υπόστρωμα της μακροαυτοφαγίας με αποτέλεσμα να μειώνονται τα επίπεδα της, όταν επάγεται η μακροαυτοφαγία και αντίστροφα (Bjørkøy et al., 2009). Η p62 προσδένεται απευθείας με την LC3 μέσω μιας ειδικής αλληλουχίας μοτίβου, παράλληλα με την πρόσδεση στις πολυουβικουιτινωμένες πρωτεΐνες. Έτσι, η p62 αποτελεί ένα σύνδεσμο μεταξύ της μακροαυτοφαγίας και του συστήματος του πρωτεασώματος, στρέφοντας υποστρώματα του UPP στο μονοπάτι των λυσοσωμάτων (Bjørkøy et al., 2006, 2005).

1.3.6 Αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από Σαπερόνες

Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα αυτοφαγικά μονοπάτια η αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από σαπερόνες (Chaperone-mediated Autophagy, CMA) έχει βρεθεί μόνο σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών και θεωρείται πως εμφανίστηκε πιο πρόσφατα στην φυλογενετική κλίμακα (Bandyopadhyay et al., 2007). Βασική της διαφορά από τα

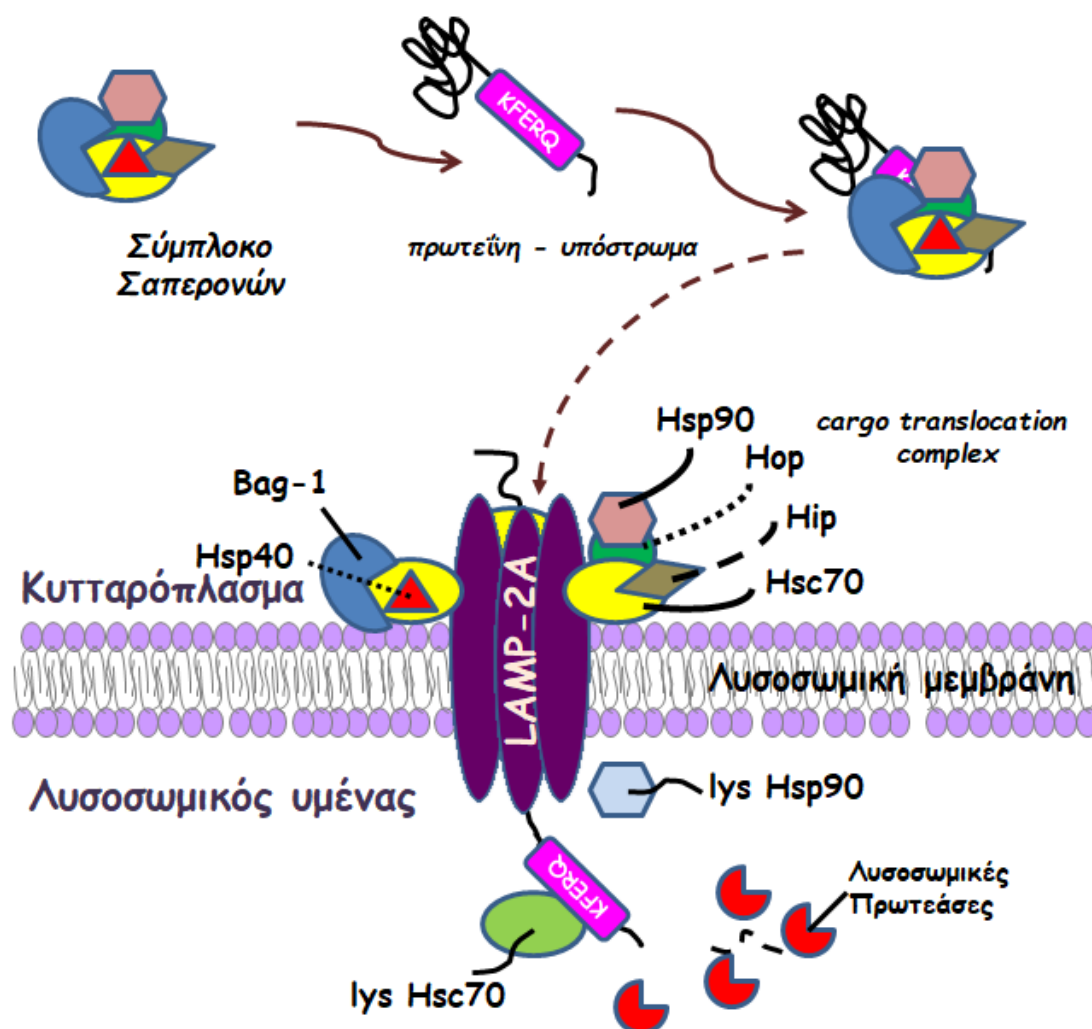
υπόλοιπα μονοπάτια είναι η εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμά της. Στοχεύει μόνο διαλυτές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, και όχι οργανίδια, οι οποίες φέρουν ένα πενταπεπτιδίο βιοχημικά σχετιζόμενο με το μοτίβο λυσίνη-φαινυλαλανίνη-γλουταμικό-αργινίνη-γλουταμίνη (KFERQ) (Dice, 1990; Dice et al., 1990). Το κατάλοιπο της γλουταμίνης είναι απαραίτητο να βρίσκεται είτε στην αρχή είτε στο τέλος της αλληλουχίας, ενώ συνολικά περιέχεται ένα υδροφοβικό, ένα βασικό και ένα όξινο αμινοξύ μαζί με ένα ακόμη υδροφοβικό ή βασικό αμινοξύ σε οποιαδήποτε σειρά (Dice, 1990; Orenstein and Cuervo, 2010). Υπολογίζεται πως έως και το 30% των πρωτεϊνών που περιέχουν το παραπάνω μοτίβο μπορεί να αποικοδομηθεί μέσω του συγκεκριμένου μονοπατιού (Chiang and Dice, 1988).

Το σύμπλοκο αναγνώρισης του προαναφερθέντος πεπτιδικού μοτίβου περιλαμβάνει μεταξύ άλλων την Heat Sock Cognate protein μοριακής μάζας 70 kDa (Hsc70), η οποία είναι μέλος της heat sock protein 70 οικογένειας σαπερονών και της οικογένειας των συν-σαπερονών (cochaperones), που περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τις Hsp40, Hsp90 και Bag-1 (Chiang et al., 1989). Αρχικά, για να πραγματοποιηθεί η πρόσδεση της πρωτεΐνης – υποστρώματος με την Hsc70 απαιτείται η κατανάλωση ATP (Agarraberes et al., 1997). Κατόπιν, η Hsc70 μαζί με τις συν-σαπερόνες σχηματίζουν ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που μεταφέρει την πρωτεΐνη - υπόστρωμα στη μεμβράνη των λυσοσωμάτων, όπου και παραλαμβάνεται από έναν εξειδικευμένο υποδοχέα.

Το βασικό στοιχείο του συμπλέγματος του υποδοχέα αυτού είναι η lysosome-associated membrane protein type 2A (Lamp2a), μια εναλλακτικά ματισμένη μορφή του γονιδίου *LAMP2* και η μόνη γνωστή μορφή του μεταγράφου του γονιδίου που συμμετέχει στην αυτοφαγία (Cuervo and Dice, 2000a; Hatem et al., 1995). Η Lamp2a μπορεί να δημιουργήσει ολιγομερή, που θεωρείται πως σχηματίζουν τον πόρο από όπου μετατοπίζονται οι πρωτεΐνες στο εσωτερικό του λυσοσώματος. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη – υπόστρωμα, αποικοδομείται αφού έχει αποδιαταχθεί και εισέλθει στη λυσοσωμική κοιλότητα με τη βοήθεια της λυσοσωμικής Hsc70. Έχει δειχθεί πως οι λυσοσωμικές Hsc70 και Hsp90 είναι απαραίτητες για τη σταθεροποίηση, τη συναρμολόγηση και την αποσυναρμολόγηση των πλούσιων σε Lamp2a συμπλόκων (Bandyopadhyay et al., 2008). Στην εικόνα 1-13 παρουσιάζονται σχηματικά οι βασικές συνιστώσες του συστήματος της CMA.

Η πρόσδεση του συμπλέγματος της πρωτεΐνης με τις σαπερόνες στο σύμπλοκο πάνω στην μεμβράνη του λυσοσώματος είναι το βήμα που καθορίζει τον ρυθμό της

αποικοδόμησης των πρωτεϊνών μέσω της CMA. Επομένως, η ενεργότητα της CMA είναι άμεσα εξαρτημένη από τα επίπεδα της Lamp2a στην μεμβράνη του λυσοσώματος (Agarraberes et al., 1997; Cuervo et al., 1995; Cuervo and Dice, 2000a).



Εικόνα 1-13. Σχηματική αναπαράσταση των βασικών συνιστωσών του συστήματος της αυτοφαγίας διαμεσολαβούμενης από Σαπερόνες. Προσαρμογή από Ξυλούρη και Στεφανή (2016).

Τα επίπεδα της ενεργότητας της CMA είναι μεταβαλλόμενα στα περισσότερα κύτταρα και ιστούς, αλλά είναι συχνά υψηλότερα σε περιόδους στρες και έλλειψης θρεπτικών ουσιών (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007). Μάλιστα, η CMA ενεργοποιείται και κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες. Είναι το μοναδικό λυσοσωμικό μονοπάτι που η έρευνα έχει δείξει ότι εμπλέκεται στην απόσυρση οξειδωμένων πρωτεϊνών, μια λειτουργία που μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν αποκλειστικά πρωτεασωμική. Θεωρητικά, η οξείδωση των πρωτεϊνών ευθύνεται

μεταξύ άλλων και για την τάση τους να αποδιατάσσονται ευκολότερα με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η είσοδός τους στο λυσόσωμα (Finn and Dice, 2005; Kiffin et al., 2004).

Η CMA και η μακροαυτοφαγία πιστεύεται πως είναι διασυνδεδεμένα μονοπάτια, αν και οι μηχανισμοί της ενδοεπικοινωνίας τους δεν έχουν αποσαφηνιστεί ακόμη πλήρως. Το συμπέρασμα αυτό συνάγεται από το γεγονός πως μια πληθώρα μελετών δείχνει πως η αναστολή του ενός μονοπατιού οδηγεί στην επαγωγή του άλλου (Kaushik et al., 2008; A. C. Massey et al., 2006; Vogiatzi et al., 2008; Wang et al., 2008).

Σπουδαίο εύρημα αποτελεί η μείωση της ενεργότητας της CMA κατά τη γήρανση του οργανισμού, όπως έχει φανεί σε όλους τους ιστούς που έχουν αναλυθεί μέχρι σήμερα (Cuervo and Dice, 2000b; Cuervo and Wong, 2014; Ashish C. Massey et al., 2006). Σε διάφορα κυτταρικά συστήματα η υπερέκφραση του Lamp2a είναι αρκετή για να βελτιώσει τη λειτουργία της CMA. Αυτό υποδηλώνει πως η αύξηση των επιπέδων της Lamp2a είναι από μόνη της ικανή να βελτιώσει την απόδοση της CMA (Cuervo and Dice, 2000a), κάτι που τονίζει τη δυνατότητα βελτίωσης της λειτουργίας της CMA μέσω της στόχευσης της Lamp2a (Xilouri et al., 2013).

1.3.7 Λυσοσωμική λειτουργία και μονοπάτια αυτοφαγίας και η σχέση τους με την α-συνουκλεΐνη

Όπως έχει προαναφερθεί η ποσότητα της α-συνουκλεΐνης είναι καθοριστική για την εξέλιξη της νόσου Πάρκινσον. Τα τοξικά πρωτοϊνίδια, που σχηματίζονται, όταν αυτή βρίσκεται σε περίσσεια, οδηγούνται σταδιακά προς τον σχηματισμό συσσωματωμάτων.

Οι πρώτες μελέτες πάνω στην αποικοδόμηση της α-συνουκλεΐνης πρότειναν το πρωτεάσωμα ως το κύριο μέσο αποικοδόμησής της (Imai et al., 2000; Tofaris et al., 2001). Μεταγενέστερες μελέτες ήρθαν να αμφισβητήσουν τα προηγούμενα αποτελέσματα (Rideout et al., 2001; Rideout and Stefanis, 2002), με τις διαφορές που παρατηρήθηκαν να αποδίδονται στις διαφορετικές μεθόδους και τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν (Biasini et al., 2004).

Αντίθετα, περισσότερο συνεπή αποτελέσματα έδωσε η μελέτη της λυσοσωμικής αποικοδόμησης της α-συνουκλεΐνης. Σε πρώτο στάδιο, η χρήση του γενικού αναστολέα του λυσοσώματος, του χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl), σε

κύτταρα HEK293 μείωσε τον ρυθμό της αποικοδόμησής της (Paxinou et al., 2001). Σε επόμενα στάδια, έγινε προσπάθεια για ταυτοποίηση του ακριβούς μονοπατιού που μετέχει στην αποικοδόμηση της συνουκλεΐνης. Η χρήση του αναστολέα της μακροαυτοφαγίας 3-MA δεν οδήγησε σε μετρήσιμες αλλαγές τα επίπεδα της συνουκλεΐνης στα διαμολυσμένα κύτταρα PC12 που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ η χρήση της ραπαμυκίνης ως προαγωγού της μακροαυτοφαγίας μείωσε τα αντίστοιχα επίπεδα (Sarkar et al., 2007a, 2007b). Επομένως, υπάρχουν ενδείξεις για τη συμμετοχή της μακροαυτοφαγίας στην αποικοδόμησή της.

Η α-συνουκλεΐνη περιέχει μια πενταπεπτιδική ακολουθία ανάλογη του μοτίβου KFERQ που αναγνωρίζεται από την CMA, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Η ακολουθία αυτή είναι VKKDQ (Βαλίνη – Λυσίνη – Λυσίνη – Ασπαρτικό – Γλουταμίνη), που είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση της πρωτεΐνης από το σύμπλοκο της Hsc70. Η αντικατάσταση μάλιστα του ασπαρτικού οξέως και της γλουταμίνης από δύο κατάλοιπα αλανίνης μείωσε την ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης στο σύμπλοκο της Lamp2a και την είσοδο σε απομονωμένα λυσοσώματα (Cuervo et al., 2004). Η μελέτη αυτή αποτέλεσε την πρώτη απόδειξη ότι η α-συνουκλεΐνη μπορεί να αποικοδομηθεί και από τη CMA. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μετέπειτα διαπίστωση ότι η UCH-L1 μπορεί να αλληλεπιδρά απευθείας με τις πρωτεΐνες της CMA, ενώ μια μεταλλαγμένη μορφή της, που έχει ανακαλυφθεί σε άτομα με οικογενή νόσο Πάρκινσον, προκαλεί δυσλειτουργία της CMA με συνακόλουθη συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης, γεγονός που ενισχύει την παραπάνω υπόθεση περί του μηχανισμού αποικοδόμησης της συνουκλεΐνης (Kabuta et al., 2008).

Τα παθολογικά έγκλειστα της α-συνουκλεΐνης αποτελούν, πιθανώς, ταυτόχρονα και αιτία και αποτέλεσμα της αναστολής των μονοπατιών αποικοδόμησής της, καθώς η συγκέντρωσή τους αναστέλλει τη λειτουργία αυτών των μονοπατιών με αποτέλεσμα λιγότερη αποικοδόμηση, περαιτέρω συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης και άλλων πρωτεϊνών στο κύτταρο (Dehay et al., 2013). Με τη σειρά της, η μειωμένη ενεργότητα της λυσοσωμικής αποικοδόμησης βοηθάει τη δημιουργία και διάδοση των παθολογικών εγκλείστων και παρατείνει το χρόνο παρουσίας τους στο κύτταρο, με αποτέλεσμα αυτά να λειτουργούν ως εκμαγεία, γεγονός που αυξάνει τον αριθμό τους και κατά συνέπεια τον ρυθμό έκκρισής τους (Brundin and Melki, 2017; Chu et al., 2009; Kim et al., 2016).

Έχει φανεί από την έρευνα ότι τόσο κάποιες μεταλλαγμένες μορφές της α -συνουκλεΐνης (A53T και A30P), όσο και η τροποποιημένη α -συνουκλεΐνη, που προκύπτει από την αλληλεπίδραση της με μόρια ντοπαμίνης, συνδέονται ισχυρά με τον υποδοχέα Lamp2a των λυσοσωμάτων, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η είσοδος της στα λυσοσώματα. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί σε αναστολή του μονοπατιού και επανεκκίνηση του φαύλου κύκλου (Cuervo et al., 2004; Martinez-Vicente et al., 2008; Xilouri et al., 2016). Αντίστοιχη αλληλεπίδραση υφίσταται και μεταξύ α -συνουκλεΐνης και μακροαυτοφαγίας, καθώς φαίνεται ότι και η ίδια η α -συνουκλεΐνη μπορεί να την αναστείλει με τη σειρά της (Crews et al., 2010; Winslow et al., 2010). Εκτός από την αναστολή της αυτοφαγίας, υπάρχουν αρκετές ενδείξεις πως αναστέλλεται και το σύστημα του πρωτεασώματος (Emmanouilidou et al., 2010b; Martinez-Vicente et al., 2008).

Βάσει των ανωτέρω διαπιστώνεται ότι βασικός ρυθμιστής για την απομάκρυνση της α -συνουκλεΐνης αποτελεί η λειτουργία του συστήματος της αποικοδόμησης, κυρίως μέσω των λυσοσωμάτων. Δυστυχώς, τα συστήματα αυτά εκπίπτουν με το χρόνο και τη γήρανση, με αποτέλεσμα οι μη ορθά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, οι οποίες σε φυσιολογικές συνθήκες θα οδηγούνταν στην αποικοδόμηση, να διαφεύγουν δημιουργώντας με τη σειρά τους περαιτέρω συσσώρευση (Kaushik and Cuervo, 2015).

Επιπρόσθετα, εκτός από την έκπτωση του συστήματος της αυτοφαγίας-λυσοσώματος λόγω γήρανσης, εντοπίζονται και γενετικοί, κυρίως, παράγοντες που επηρεάζουν την λειτουργία του. Αρκετοί από τους γνωστούς γενετικούς τόπους που σχετίζονται με τη νόσο Πάρκινσον, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 1-2, αφορούν πρωτεΐνες που μετέχουν στα συστήματα αποικοδόμησης των πρωτεϊνών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα γονίδια: *PRKN*, *LRRK2*, *PINK1*, *UCH-L1*, *ATP13A2* και *GBA*.

Σε ότι αφορά την β -γλυκοσερεβροσιδάση (GCase) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *GBA* που βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 1, ιδιαίτερη αναφορά θα γίνει στη συνέχεια, καθώς είναι αρκετά συχνή η ύπαρξη μεταλλάξεων στο γονίδιο αυτό στον ελληνικό πληθυσμό (βλ. ενότητα 1.1.4).

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες με σκοπό την ανακάλυψη του ακριβούς μηχανισμού που συνδέει την GCase με τη νόσο Πάρκινσον και έχουν προταθεί αντίστοιχα διάφορα μονοπάτια, ώστε να αιτιολογήσουν την συσχέτιση αυτή. Αρχικά, το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε στην εξέταση του υποστρώματος της GCase,

το γλυκοσυλκεραμίδιο, και στο αν ενδέχεται η αύξηση της συγκέντρωσής του να οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης της α-συνουκλεΐνης. Μάλιστα, η ερευνητική ομάδα του Mazzulli και συνεργατών (2011) υποστήριξε πως η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση δρα και προς τις δύο μεριές, καθώς και η αύξηση της συγκέντρωσης της α-συνουκλεΐνης δύναται να αυξήσει τα επίπεδα του γλυκοσυλκεραμιδίου στο κύτταρο.

Εξ αυτού εικάζεται ότι μικρές αλλαγές στα λιπίδια λόγω μερικής έστω ανεπάρκειας της GCase τροποποιούν την αλληλεπίδραση μεταξύ λιπιδίων και α-συνουκλεΐνης, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε συναπτική δυσλειτουργία και εκλεκτική νευρωνική απόπτωση (Farfel-Becker et al., 2014; Ginns et al., 2014). Εκτός, όμως, από τους έμμεσους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης έχει προταθεί και η άμεση συμμετοχή της GCase στην αποικοδόμηση της α-συνουκλεΐνης. Πρόσφατη μελέτη έδειξε άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών κάτω από όξινες συνθήκες, σαν αυτές που επικρατούν εντός των λυσοσωμάτων (Yap et al., 2011).

Φαίνεται, επίσης, πως η αναστολή της GCase είτε μέσω φαρμακευτικών ουσιών είτε μέσω τεχνικών σίγασης mRNA οδηγεί σε μειωμένη ενεργότητα των λυσοσωμάτων και συγκέντρωση δομών αποτελούμενων από lamp-1 και αυτοφαγοσωμάτων σε διάφορα μοντέλα νευρικών κυττάρων, αν και δεν υπάρχει πλήρης συμφωνία μεταξύ των μελετών (Bae et al., 2014; Dermentzaki et al., 2013; Gegg et al., 2012; Osellame et al., 2013). Η λυσοσωμική δυσλειτουργία έχει βρεθεί και σε ιστούς απομονωμένους από ασθενείς με νόσο Πάρκινσον σχετιζόμενη με το γονίδιο *GBA* (Gegg et al., 2012; Schondorf et al., 2014).

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός προδιάθεσης σε νόσο Πάρκινσον είναι μέσω στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Είναι γνωστό πως η συγκέντρωση της α-συνουκλεΐνης αναστέλλει την κίνηση μεταξύ ενδοπλασματικού δικτύου και σωματίου Golgi (Cooper et al., 2006). Η δυσλειτουργία που παρατηρείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο παρουσία μεταλλαγμένων μορφών της GCase ενισχύει την υπόθεση πως το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου συμμετέχει στην παθογένεια της νόσου σε άτομα φορείς μεταλλάξεων του *GBA* (Fernandes et al., 2016; Ron and Horowitz, 2005; Zimmer et al., 1999). Ακόμη, υπάρχουν ενδείξεις ότι η GCase αλληλεπιδρά με την parkin, μια άλλη πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη νόσο του Πάρκινσον (Ron et al., 2010).

Το παραπάνω προτεινόμενο μονοπάτι παρόλα αυτά αμφισβητείται καθώς έχει δείχθει πως υφίστανται μεταλλάξεις του γονιδίου *GBA* που έχουν ως αποτέλεσμα την

μη παραγωγή πρωτεΐνης (Zimmer et al., 1999), αλλά αυξάνουν και αυτές τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου (Sunwoo et al., 2011). Ενδεχομένως, το στρες που παρατηρείται στο ενδοπλασματικό δίκτυο να είναι αποτέλεσμα της συγκέντρωσης της συνουκλεΐνης και όχι της GCase, ή να υπάρχουν και εναλλακτικά μονοπάτια τα οποία επηρεάζονται από τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *GBA*.

1.4 Βιολογικοί δείκτες για τη νόσο Πάρκινσον

1.4.1 Βιολογικοί δείκτες – Γενικά

Σύμφωνα με το Biomarkers Definitions Working Group (2001) ο βιολογικός δείκτης (ή βιοδείκτης) ορίζεται ως «ένα χαρακτηριστικό που μετράται αντικειμενικά και αξιολογείται ως ένδειξη φυσιολογικής βιολογικής διαδικασίας, παθολογικής διεργασίας ή κλινικής απόκρισης σε μια θεραπευτική παρέμβαση». Επιπρόσθετα, το διεθνές πρόγραμμα χημικής ασφάλειας του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας διατυπώνει για τον ίδιο όρο τον παρακάτω ορισμό: «μία ουσία, δομή ή διαδικασία που μπορεί να μετρηθεί στο σώμα ή στα παράγωγά του και να επηρεάσει ή προβλέψει την επίπτωση μια συγκεκριμένης κλινικής πορείας της νόσου» (International Programme on Chemical Safety, 2001).

Υπάρχουν τρεις τομείς ως προς την περιγραφή των ασθενειών στους οποίους μπορούν να βοηθήσουν οι βιοδείκτες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες χαρακτηριστικών γνωρισμάτων της νόσου (trait), δείκτες κατάστασης (state) της νόσου, και δείκτες ρυθμού εξέλιξης (rate). Ένας δείκτης χαρακτηριστικού γνωρίσματος της νόσου (trait biomarker) είτε προβλέπει την πιθανότητα να προσβληθεί κάποιος από τη νόσο είτε υποδεικνύει την επιρρέπειά του σε αυτήν, λ.χ. τα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο αίμα ως δείκτης κινδύνου για καρδιακό επεισόδιο.

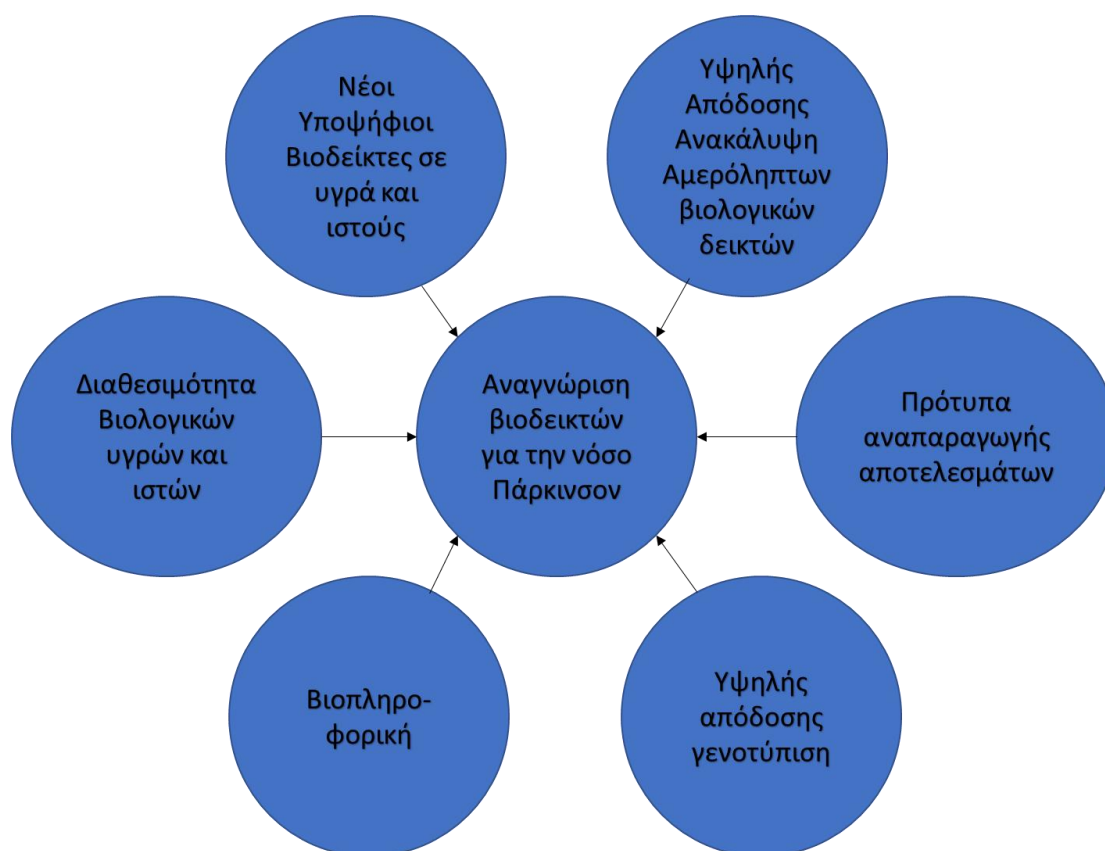
Ο δείκτης της κατάστασης (state biomarker) της νόσου είναι ουσιαστικά ο δείκτης με βάση τον οποίο μπορεί να τεθεί με αρκετή ακρίβεια η διάγνωση. Ένας τέτοιος δείκτης απαιτείται να έχει αφενώς υψηλή ευαισθησία και αφετέρου ειδικότητα (κατά προτίμηση άνω του 90%), για να έχει μεγάλη επίδραση στην κλινική πράξη. Τέλος, ένας βιοδείκτης ρυθμού (rate biomarker) παρακολουθεί την πορεία εξέλιξης της παθοφυσιολογίας της νόσου και έτσι μπορεί να εκτιμήσει την απόκριση στην θεραπευτική αντιμετώπιση (Fox and Growdon, 2004).

Οι βιολογικοί δείκτες δύνανται να χωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες, στους κλινικούς, τους απεικονιστικούς, τους γενετικούς και τους βιοχημικούς (Chahine et al., 2014). Οι κλινικοί βιοδείκτες αποτελούνται από χαρακτηριστικά που ελέγχονται κατά τη διάρκεια της φυσικής εξέτασης, λ.χ. η βραδυκινησία και ο τρόμος ηρεμίας όσον αφορά την ύπαρξη ή μη Παρκινσονισμού. Στους απεικονιστικούς συγκαταλέγονται, λογικά, οι εξετάσεις ιατρικής απεικόνισης ή πυρηνικής ιατρικής, όπως η χρήση του 123I-FP-CIT SPECT (DaTSCAN®) για την εκτίμηση του βαθμού εκφύλισης της μελαινораβδωτής οδού, ενώ οι γενετικοί βιοδείκτες αποτελούν βασικό κριτήριο σε νόσους με γενετική βάση, π.χ. ο αριθμός των επαναλήψεων της τριπλέτας CAG στο γονίδιο της Χαντινγκτίνης ως δείκτης για τη νόσο Χάντινγκτον.

Τέλος, οι βιοχημικοί δείκτες απαρτίζονται από όλες τις βιοχημικές, αιματολογικές και κυτταρολογικές εξετάσεις που πραγματοποιούνται σε διάφορους ιστούς, με τη συντριπτική τους πλειονότητα βέβαια, να εξετάζονται σε παράγωγα του αίματος. Αποτελούν μια σπουδαία υποκατηγορία των βιολογικών δεικτών, καθώς πολλοί από αυτούς είναι εύκολοι στην χρήση τους στη καθημερινή κλινική πράξη, σχετικά χαμηλού κόστους και με ελάχιστες παρενέργειες για τον ασθενή. Το πιο βασικό και χρήσιμό τους, όμως, χαρακτηριστικό είναι πως αρκετές φορές μπορούν να ανακαλύψουν διαταραχές, πριν αυτές προκαλέσουν κλινικά εμφανή σημεία και συμπτώματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μέτρηση του σακχάρου καθώς και του ποσοστού της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) στον ορό του αίματος. Η τιμές τους ανευρίσκονται αυξημένες πριν ακόμη εμφανιστούν τα συμπτώματα του σακχαρώδους διαβήτη, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η έγκαιρη έναρξη θεραπείας και η πρόληψη των συμβαμάτων της νόσου.

Μέχρι στιγμής, έχουν αναπτυχθεί δύο βασικές προσεγγίσεις ανακάλυψης νέων βιοδεικτών. Η πρώτη μεθοδολογία είναι αυτή της στοχοποιημένης προσέγγισης των υποψήφιων δεικτών, όπου οι υποψήφιοι δείκτες επιλέγονται με βάση την παθοφυσιολογία της υπό εξέτασης νόσου και τα μονοπάτια, όπου υπάρχει ήδη το θεωρητικό υπόβαθρο της συμμετοχής τους στην παθογένειά της. Η δεύτερη προσέγγιση είναι αυτή της ανακάλυψης αμερόληπτων βιοδεικτών (unbiased biomarker discovery), όπου δοκιμάζεται ένας αρκετά μεγάλος αριθμός από πιθανούς βιολογικούς δείκτες. Από αυτούς προκύπτει ένας μικρότερος αριθμός υποψήφιων δεικτών, οι οποίοι διαλέγονται με κριτήριο την ισχυρή στατιστική συσχέτιση με την εκάστοτε νόσο και τη συνάφεια του πιθανού μηχανισμού (Chahine and Stern, 2017) (Εικόνα 1-14). Σε κάθε περίπτωση, για να επιβεβαιωθεί ο υποψήφιος δείκτης

απαιτείται μια καινούρια σειρά μελετών σε νέους ασθενείς, ώστε στη συνέχεια να ενταχθεί στην καθημερινή ιατρική πράξη (Chahine et al., 2014).



Εικόνα 1-14. Σχηματική αναπαράσταση των βασικών συστατικών για την επιτυχή ανάπτυξη βιολογικών δεικτών.

Προσαρμογή από Chahine και Stern (2017).

Όσον αφορά τη νόσο Πάρκινσον, για να μπορέσουν να ενταχθούν στην καθημερινή ιατρική πράξη οι νέοι δείκτες οφείλουν να έχουν υψηλή διακριτική ικανότητα σε έναν τουλάχιστον από τους παρακάτω τέσσερεις τομείς: 1) στο διαχωρισμό ασθενών με νόσο Πάρκινσον από υγιή άτομα, 2) στο διαχωρισμό ασθενών με νόσο Πάρκινσον από ασθενείς με άτυπα Παρκινσονικά σύνδρομα, 3) καλή συσχέτιση με τη βαρύτητα της νόσου ή τη νοητική έκπτωση, και 4) υψηλή προγνωστική αξία ως προς τη βαρύτητα των συμπτωμάτων ή τη νοητική έκπτωση (Andersen et al., 2017).

1.4.2 Βιοχημικοί δείκτες στο Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό

Το Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό (ΕΝΥ) έχει βρεθεί στο επίκεντρο πολλών μελετών για την ανάπτυξη νέων βιοδεικτών της νόσου Πάρκινσον, επειδή το συγκεκριμένο

Υγρό παράγεται στον εγκέφαλο. Αποτέλεσμα του οργάνου παραγωγής αυτού είναι η δυνατότητα ανίχνευσης ουσιών που διαφεύγουν από τα νευρικά κύτταρα είτε λόγω κυτταρικής καταστροφής είτε λόγω φυσικής απέκκρισης. Επομένως, από τα υπόλοιπα βιολογικά υγρά διαταραχές στο ENY είναι πιο πιθανό να αντανακλούν ανωμαλίες στο ΚΝΣ (Mollenhauer et al., 2012).

Ο πρώτος βιοδείκτης, και ίσως ο πιο καλά μελετημένος μέχρι σήμερα, που εξετάστηκε στο ENY ήταν η α-συνουκλεΐνη. Η εμπλοκή της α-συνουκλεΐνης στην παθογένεια της νόσου Πάρκινσον, έστω και χωρίς να είναι πλήρως κατανοητός ο μηχανισμός, είναι γνωστή τουλάχιστον μία 20ετία (Spillantini et al., 1998, 1997), και μάλιστα με αρκετά δεδομένα να ενισχύουν την σχέση αυτή, όπως περιγράφεται και στην ενότητα 1.2.

Με βάση την πρώτη στρατηγική για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών, όπως προαναφέρθηκε, αυτή της στοχευμένης προσέγγισης, η α-συνουκλεΐνη αποτελεί έναν εξαιρετο υποψήφιο δείκτη, τουλάχιστον σε θεωρητικό επίπεδο, καθώς εμπλέκεται άμεσα στην παθογένεια της νόσου. Αρχικά, υπήρχε μεγάλη αισιοδοξία για την επιτυχία του εγχειρήματος, καθώς στην περίπτωση της νόσου Alzheimer, τα επίπεδα του β-αμυλοϊδούς και της πρωτεΐνης του, που συμβάλουν στην παθογένεια της AD, στο ENY, αποτελούν έναν πολύ καλό δείκτη τόσο για τη διάγνωση της νόσου, όσο και για τη διαφοροδιάγνωσή της από τα υπόλοιπα ανοϊκά σύνδρομα (Höglund et al., 2015).

Αρχικά, εξετάστηκε η ολική συγκέντρωση της α-συνουκλεΐνης στο ENY. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει ασχοληθεί με το συγκεκριμένο βιοδεικτή με ανάμικτα αποτελέσματα. Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν πως είναι μετρήσιμα τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης στο ENY μέσω παραδοσιακών μεθόδων μέτρησης, όπως η ELISA (Kalia, 2018). Η πιο πρόσφατη μετανάλυση πάνω στο θέμα, όπου συγκρίθηκαν συνολικά 17 μελέτες με συνολικό αριθμό 1482 ασθενών και 1012 υγιών μαρτύρων (Eusebi et al., 2017), έδειξε μείωση των επιπέδων της α-συνουκλεΐνης στο ENY στους ασθενείς με νόσο Πάρκινσον.

Το αποτέλεσμα αυτό δεν ήταν σταθερό ανάμεσα στις διάφορες υπό έλεγχο μελέτες, αλλά ακόμη και σε αυτές που υπήρχε διαφοροποίηση, το εύρος των διαφορών ήταν μικρό και κυμαινόταν μεταξύ 10 και 20%. Στην μετανάλυση αυτή βρέθηκε μια συγκεντρωτική ευαισθησία και ειδικότητα, 72% και 65% αντίστοιχα (Eusebi et al., 2017). Τουλάχιστον δύο μετανalύσεις δεν κατάφεραν να βρουν διαφορές στα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης μεταξύ ασθενών με νόσο Πάρκινσον και

ασθενών με άλλες νευροεκφυλιστικές νόσους που σχετίζονται με παθολογία α-συνουκλείνης (ατροφία πολλαπλών συστημάτων, άνοια με σωμάτια Lewy) (Gao et al., 2015).

Μια πιθανή αιτία για την αποτυχία των παραπάνω μελετών να αναδείξουν έναν νέο βιοδείκτη είναι το γεγονός πως οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν μετρούσαν το σύνολο της συνουκλείνης, χωρίς να κάνουν διακρίσεις ανάμεσα στις διάφορες μορφές της, όπως οι ολιγομερείς, οι φωσφορυλιωμένες ή οι ουβικουιτινιωμένες της μορφές (Kalia, 2018), οπότε η μέτρηση συγκεκριμένων μορφών αναμένεται να δώσει συνεπέστερα αποτελέσματα. Αρκετές έρευνες έχουν δείξει πως τα επίπεδα των ολιγομερών μορφών, καθώς και της φωσφορυλιωμένης α-συνουκλείνης στο κατάλοιπο σερίνης στη θέση 129 (pSer129) είναι αυξημένα σε ασθενείς με νόσο Πάρκινσον (Eusebi et al., 2017; Gao et al., 2015).

Παλαιότερες μελέτες έδειξαν πως τα ολιγομερή είναι αυξημένα σε ασθενείς που εμφανίζουν παράλληλα και διαταραχές ύπνου REM (RBD) (Hu et al., 2015), αλλά όχι σε ασθενείς από ιδιοπαθές RBD επιβεβαιωμένο μέσω πολυ-υπνογραφίας (Compta et al., 2015), γεγονός που μειώνει τη χρησιμότητά του για τη διαπίστωση της πρόδρομης μορφής της νόσου. Αντίθετα, η άνοδος των επιπέδων των ολιγομερών της α-συνουκλείνης μπορεί να έχει προγνωστική αξία στις περιπτώσεις του DLB και της άνοιας στη νόσο Πάρκινσον (Compta et al., 2015; Hansson et al., 2014). Αντίστοιχα, τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης μορφής διαφοροποιούνται κατά τη διάρκεια της νόσου (Stewart et al., 2015; Wang et al., 2012).

Δυστυχώς, λίγες μελέτες περιλαμβάνουν χωριστές ομάδες ασθενών για ανακάλυψη και για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων (Tokuda et al., 2010; Wang et al., 2012). Επίσης, τα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών ήταν αντικρουόμενα μεταξύ τους και δεν κατέστη δυνατό να αναπαραχθούν τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνητικών εργασιών, πιθανώς λόγω επιμόλυνσης του ENY, διαφορών στις τεχνικές μέτρησης ή σε συγχυτικούς παράγοντες που σχετίζονται με τους ασθενείς (πχ. φαρμακευτική αγωγή και συννοσηρότητα) (Mollenhauer et al., 2017, 2016).

Πολύ πρόσφατα δεδομένα δείχνουν πως η τεχνική της Real-Time Quaking-Induced Conversion (RT-QuIK) είναι πολλά υποσχόμενη για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση συσσωμάτων α-συνουκλείνης (Paciotti et al., 2018). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την ανίχνευση της PrP^{SC}, της πρωτεΐνης – prion που έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη της νόσου Creutzfeldt Jacobs (Atarashi et al., 2011).

Λόγω της επιτυχίας της στο να ανιχνεύει πρωτεΐνες με παθολογική διαμόρφωση, δοκιμάστηκε και σε άλλες παθήσεις που οφείλονται σε λανθασμένη διαμόρφωση πρωτεϊνών, όπως χαρακτηριστικά είναι οι συνουκλεϊνοπάθειες (Sano et al., 2017).

Η έρευνα πάνω στη χρήση της τεχνικής αυτής είναι ακόμη στα πρώτα στάδια με μικρό αριθμό ατόμων. Ο έλεγχος για τα παράγωγά της α-συνουκλεΐνης πραγματοποιήθηκε στο ENY και έδειξε μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα για τις συνουκλεϊνοπάθειες (92% και 95% αντίστοιχα), και βοήθησε στη διαφοροδιάγνωση από τις ταουπάθειες, καθώς τα αποτελέσματα σε άτομα με προϊούσα υπερπυρηνική παράλυση ή νόσο Alzheimer ήταν αρνητικά (Fairfoul et al., 2016). Μια δεύτερη μελέτη, πάλι σε μικρό αριθμό ασθενών, επιβεβαίωσε τα προηγούμενα αποτελέσματα (Shahnawaz et al., 2017).

Εκτός από την α-συνουκλεΐνη έχουν προταθεί κι άλλοι πιθανοί βιοδείκτες, χωρίς όμως θεαματικά αποτελέσματα (Andersen et al., 2017). Αντίθετα με την α-συνουκλεΐνη, αυτοί δεν έχουν ακόμη ερευνηθεί στον ίδιο βαθμό. Μερικοί από τους υποψήφιους δείκτες είναι οι μεταβολίτες της ντοπαμίνης, Διυδροξυφαινυλακετικό οξύ (DOPAC) και ομοβαλινικό οξύ (HVA) (Goldstein et al., 2012, 2008; LeWitt et al., 2011), το DJ-1 (Herbert et al., 2014; Hong et al., 2010, p. 1; Waragai et al., 2006), και το UCH-L1 (Mondello et al., 2014), όπου μεταλλάξεις στο γονίδιο τους έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση της νόσου. Τέλος, έχει διερευνηθεί και το β-αμυλοειδές 1/42 ως δείκτης της νοητικής έκπτωσης στη νόσο (Dolatshahi et al., 2018; Hu et al., 2017).

1.4.3 Βιοχημικοί δείκτες στο αίμα

Εκτός από το ENY, πληθώρα δεδομένων για τους βιολογικούς δείκτες έχει συλλεχθεί μέχρι στιγμής και από το αίμα. Η χρήση βιοδεικτών που ανευρίσκονται στο αίμα έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Ένα από τα αυτά τα πλεονεκτήματα σχετίζεται με τη διαδικασία λήψης αίματος, τη φλεβοκέντηση. Η φλεβοκέντηση είναι μια ελάχιστα επεμβατική μέθοδος με εύκολη πρόσβαση που δεν απαιτεί ιδιαίτερες και εξειδικευμένες γνώσεις από αυτόν που την πραγματοποιεί. Η μέθοδος αυτή είναι ασφαλής, με εξαιρετικά χαμηλό κόστος, αλλά μειονεκτεί σε δύο σημεία. Πρώτον, στη μη σύνδεση μεταξύ της περιφέρειας και του εγκεφάλου λόγω του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού και δεύτερον, στο γεγονός πως το αίμα είναι ένα ετερογενές

μίγμα αποτελούμενο από κύτταρα, λιπίδια, πρωτεΐνες και ανόργανα στοιχεία από όπου απομονώνεται συνήθως ο ορός και το πλάσμα (Chahine et al., 2014).

Αντίστοιχα με το ENY, μία από τις πρώτες ουσίες που μελετήθηκαν στο αίμα ήταν η α-συνουκλεΐνη. Η πλειονότητα της α-συνουκλεΐνης στο αίμα βρίσκεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια (Barbour et al., 2008). Παρά ταύτα έχει απομονωθεί και μετρηθεί στο πλάσμα σε διάφορες μορφές της, όπως στην ολιγομερή (El-Agnaf et al., 2006), στη φωσφορυλιωμένη (Foulds et al., 2011) και στη μονομερή ελεύθερη μορφή της (Tinsley et al., 2010). Τα αποτελέσματα των ερευνών είναι αντιφατικά. Έχει δημοσιευτεί μια πληθώρα μελετών που δείχνουν τόσο αύξηση της α-συνουκλεΐνης στον ορό όσο και στο πλάσμα (Duran et al., 2010; Lee et al., 2006; Ohmichi et al., 2018), όσο και μείωση της (Ishii et al., 2015; Li et al., 2007). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε τεχνικά προβλήματα κατά τη μέτρηση της συνουκλεΐνης (Chahine et al., 2014) ή στην επιμόλυνση των δειγμάτων από την α-συνουκλεΐνη που ανευρίσκεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια λόγω αιμόλυσης (El-Agnaf et al., 2003).

Η πρωτεΐνη DJ-1 έχει προταθεί ως υποψήφιος δείκτης στο πλάσμα, αν και σε μια πρώιμη μελέτη δεν είχαν φανεί διαφοροποιήσεις στα επίπεδά της μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων (Maita et al., 2008). Τα επόμενα χρόνια σε πιο εκτεταμένη μελέτη έγινε προσπάθεια να απομονωθούν αρκετοί συγχυτικοί παράγοντες και σύμφωνα με τα αποτελέσματά της φάνηκε πως το 95% της DJ-1 και της α-συνουκλεΐνης στο πλάσμα προέρχεται από τα ερυθρά αιμοσφαίρια (Shi et al., 2010). Οι συγγραφείς της μελέτης οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα αυτό αφού πρώτα μέτρησαν τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης στα δείγματα και αφού παρατήρησαν μια έντονα θετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ της αιμοσφαιρίνης και των επιπέδων της DJ-1 και της α-συνουκλεΐνης (Shi et al., 2010). Δυστυχώς, ακόμη και μετά από τις προαναφερθείσες διορθώσεις δεν βρέθηκε κάποια διαφορά στα επίπεδα της DJ-1.

Οι ερευνητές, επίσης, έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στη μελέτη ενός ακόμα βιοχημικού δείκτη, του ουρικού οξέος, προσπαθώντας να βρουν αν σχετίζεται η συγκέντρωση του οξέος στο αίμα με τη νόσο Πάρκινσον. Η σχέση του οξέος με τη νόσο προτάθηκε αρχικά λόγω της παρατήρησης της μειωμένης συγκέντρωσης του στην μέλαινα ουσία και των γνωστών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του (Church and Ward, 1994). Μία μεγάλη προοπτική μελέτη στην Χαβάη με 7968 συμμετέχοντες ήταν η πρώτη που έδειξε πως τα αυξημένα επίπεδα του ουρικού οξέος στο αίμα σχετίζονταν με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Davis et al., 1996). Στη

συνέχεια παρόμοια αποτελέσματα παρουσίασαν δύο ακόμη μεγάλες προοπτικές μελέτες (de Lau et al., 2005; Weisskopf et al., 2007).

Σε μια μεταγενέστερη προοπτική μελέτη οι ερευνητές εστίασαν τις προσπάθειες τους στην εύρεση συσχέτισης μεταξύ της κλίμακας UPDRS και των αποτελεσμάτων του DaTSCAN με τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο αίμα. Εν συνεχεία διαπιστώθηκε πως τα άτομα, των οποίων τα επίπεδα του ουρικού οξέος ανήκαν στο υψηλότερο τεταρτημόριο, εμφάνισαν βραδύτερη επιδείνωση των συμπτωμάτων και περισσότερη καθυστέρηση στην έναρξη αγωγής με λεβοντόπα. (Schwarzschild et al., 2008).

Τέλος, έχουν διερευνηθεί ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Chen-Plotkin et al., 2011) και η ApoA1 (Qiang et al., 2013, p. 1; Swanson et al., 2015, p. 1) ως δείκτες της νοητικής έκπτωσης στη νόσο.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στηριζόμενος στα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας, όπως αυτά αναφέρθηκαν εκτενώς στην εισαγωγή, βασική επιδίωξη της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η ανάδειξη πιθανών βιολογικών δεικτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόωπη διάγνωση, την πρόγνωση, ή και για τον έλεγχο της ανταπόκρισης στην θεραπεία σε ασθενείς με νόσο Πάρκινσον. Για την πληρέστερη προσέγγιση του προαναφερθέντος στόχου είναι επιτακτική ανάγκη να διερευνηθούν παράλληλα ορισμένοι παθογενετικοί μηχανισμοί της νόσου στους οποίους συμμετέχουν οι ελεγχόμενοι βιοδείκτες.

2.1 Δείκτες αυτοφαγικής δυσλειτουργίας

Η α-συνουκλεΐνη διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην παθογένεια της νόσου και αποτελεί το βασικό συστατικό των σωματίων Lewy που σχηματίζονται στους νευρώνες των ασθενών με νόσο Πάρκινσον (Spillantini et al., 1997), όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή (βλ. ενότητα 1.1.2). Τα επίπεδα της, μάλιστα, είναι ζωτικής σημασίας για την παθογένεια της νόσου και η παρουσία των διαφόρων ανώμαλων μορφών της α-συνουκλεΐνης καθώς και των συσσωματωμάτων της είναι πολύ πιθανό να οφείλονται σε δυσλειτουργία των μηχανισμών της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης μέσω των λυσοσωμάτων (βλ. ενότητα 1.3.7).

Η αποικοδόμηση μέσω των λυσοσωμάτων ρυθμίζεται όσον αφορά τις ενδοκυττάριες πρωτεΐνες από την αυτοφαγία (βλ. ενότητα 1.3.1), που χωρίζεται περαιτέρω σε τρία υπομονοπάτια, της μικροαυτοφαγίας, της μακροαυτοφαγίας και της αυτοφαγίας διαμεσολαβούμενης από σαπερόνες (CMA) (Xilouri and Stefanis, 2011) (βλ. ενότητα 1.3.3). Από τα μονοπάτια, εκείνο της CMA είναι το πιο ειδικό, καθώς αναγνωρίζει πρωτεΐνες που φέρουν ένα συγκεκριμένο αμινοξικό μοτίβο (KFERQ-like motif, βλ. ενότητα 1.3.6) (Dice, 1990).

Είναι γνωστό πως η α-συνουκλεΐνη φέρει το συγκεκριμένο μοτίβο και πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως πράγματι η αποικοδόμηση της φυσιολογικής α-συνουκλεΐνης πραγματοποιείται κυρίως στο λυσόσωμα μέσω του μονοπατιού της CMA και της μακροαυτοφαγίας (Vogiatzi et al., 2008). Το μοτίβο αυτό αναγνωρίζεται από την Hsc70 πρωτεΐνη, η οποία μαζί και με άλλες σαπερόνες, οδηγεί την α-συνουκλεΐνη στη λυσοσωμική μεμβράνη (Chiang et al., 1989), όπου και

προσδένεται σε ένα σύμπλοκο που έχει ως πρωτεΐνη-βάση την Lamp2a (Cuervo and Dice, 1996) και μέσω αυτού εισέρχεται στο λυσόσωμα για να αποικοδομηθεί. Επομένως, η ενεργότητα της CMA σχετίζεται άμεσα με τα επίπεδα των Lamp2a και Hsc70.

Παράλληλα, διάφορες μελέτες έχουν δείξει πως υπάρχει μείωση στα επίπεδά τους στους εγκεφάλους ασθενών με νόσο Πάρκινσον (Alvarez-Erviti et al., 2010; Chu et al., 2009). Μάλιστα τα επίπεδα της Lamp2a φαίνεται να έχουν αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης σε εγκεφαλικά κύτταρα απομονωμένα από ασθενής με πρώιμα στάδια της νόσου, δείχνοντας την ύπαρξη μιας δυσλειτουργίας στην CMA η οποία ενδέχεται να σχετίζεται και αιτιολογικά με την συγκέντρωση της α-συνουκλεΐνης (Murphy et al., 2015).

Ένας ακόμη επιβαρυντικός παράγοντας φαίνεται πως είναι η μείωση των επιπέδων της β-γλυκοσερεβρισιδάσης (GCase) και η αλληλεπίδραση της με την α-συνουκλεΐνη. Η αυξημένη συγκέντρωση της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα εμποδίζει την φυσιολογική λειτουργία της GCase, και αντίστροφα η δυσλειτουργία της ενζυμικής δράσης της GCase αυξάνει την συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης (Manning-Bog et al., 2009; Mazzulli et al., 2011).

Επιπλέον, έχουν αναφερθεί μεταβολές στα επίπεδα των πρωτεϊνών p62 και LC3, που σχετίζονται με την μακροαυτοφαγία, σε εγκεφαλικούς ιστούς ασθενών με νόσο Πάρκινσον. Η μεταβολές αυτές εκδηλώνονται στους νευρώνες με αυξημένο αριθμό αυτοφαγοσωμάτων και διαταραχές στο μονοπάτι λυσοσώματος – ενδοσωμάτων (Anglade et al., 1997; Zhu et al., 2003).

Επομένως, οι προαναφερθείσες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στα συγκεκριμένα μονοπάτια είναι μιας πρώτης τάξεως στόχοι για την ανακάλυψη πιθανών βιοδεικτών.

2.1.1 Στα μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος

Το αίμα αποτελεί έναν εξαιρετικό στόχο για την ανεύρεση πιθανών βιοδεικτών μιας και είναι ένα από τα πιο εύκολα προσβάσιμα βιολογικά υγρά. Η συλλογή του αίματος μέσω της αιμοληψίας είναι ανώδυνη, γρήγορη και χωρίς παρενέργειες για τον ασθενή. Κατά συνέπεια η ενδεχόμενη χρήση βιοδεικτών που θα μετρούνται στο αίμα θα είναι πολύ εύκολο να εφαρμοστεί στην καθημερινή κλινική πράξη. Παράλληλα, το αίμα περιέχει εκτός από το πλάσμα και έμμορφα στοιχεία (κύτταρα) τα οποία μπορεί να φέρουν αλλοιώσεις που να σχετίζονται με τις αντίστοιχες που

παρατηρούνται στα εγκεφαλικά κύτταρα και οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου Πάρκινσον.

Τα ιδανικά κύτταρα στο αίμα, για να μετρηθούν οι διάφοροι δείκτες της λυσοσωμικής λειτουργίας, είναι τα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC), καθώς λόγω του φυσιολογικού τους ρόλου ως αποικοδομητών ξένων ως προς τον οργανισμό ουσιών έχουν αυξημένα επίπεδα λυσοσωμικής λειτουργίας. Αντίθετα, με τα ερυθρά αιμοσφαίρια που δεν φέρουν οργανίδια, όπως πυρήνα ή λυσόσωμα, τα PBMC φέρουν ανέπαφες όλες τις κυτταρικές λειτουργίες, με πιο σημαντικές για τη μελέτη αυτή, τη λειτουργία των λυσοσωμάτων και την ικανότητα να αναπτύσσονται σε κυτταροκαλλιέργειες.

Οι βασικοί δείκτες που μετρήθηκαν σχετίζονταν με τη λειτουργία του μονοπατιού λυσοσώματος – αυτοφαγίας και πιο συγκεκριμένα με τα επίπεδα βασικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών των διεργασιών της μακροαυτοφαγίας (p62, LC3), και της CMA (Hsc70, Lamp2a). Παράλληλα, εξετάστηκε και το ένζυμο GCase που έχει συσχετιστεί με προδιάθεση για ανάπτυξη νόσου Πάρκινσον. Στην GCase, συν τοις άλλοις, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την ενζυμική της ενεργότητα.

Η προηγούμενη έρευνα στις παραπάνω πρωτεΐνες εστιάστηκε κυρίως στα επίπεδα τους στον εγκέφαλο, με μια μικρή μόνο σειρά μελετών πάνω σε άλλα κύτταρα του σώματος. Ένα βασικό ερώτημα στο οποίο έρχεται να δώσει περαιτέρω στοιχεία η συγκεκριμένη διατριβή, είναι το κατά πόσον οι διαφορές που ανιχνεύονται στους νευρώνες εμφανίζονται και στην περιφέρεια. Είναι, δηλαδή, η λυσοσωμική δυσλειτουργία υπαρκτή μόνο στον εγκέφαλο ή είναι ένα γενικευμένο φαινόμενο που τελικά οδηγεί στην αυξημένη συγκέντρωση της α-συνουκλεΐνης και τη δημιουργία των σωματίων Lewy, πιθανώς και με τη συνέργεια και άλλων παραγόντων.

Κατά την έναρξη των πειραμάτων υπήρχαν περιορισμένα στοιχεία για τις παραπάνω πρωτεΐνες στα PBMC. Μια έρευνα των Wu και συνεργατών (2011) έδειξε μειωμένα επίπεδα Lamp2a και αυξημένα επίπεδα LC3-II σε PBMC ασθενών με νόσο Πάρκινσον. Σε επόμενη μελέτη, που δημοσιεύτηκε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, αναφέρθηκαν μειωμένα επίπεδα τόσο της πρωτεΐνης Hsc70 όσο και του αντίστοιχου mRNA στα PBMC ασθενών δίχως όμως αλλαγές στην Lamp2a (Sala et al., 2014). Και οι δύο αυτές μελέτες χρησιμοποίησαν δείγματα από ασθενείς με ιδιοπαθή νόσο Πάρκινσον χωρίς κάποια γνωστή μετάλλαξη σχετιζόμενη με τη νόσο.

Ενώ υπήρχαν δεδομένα για την ενεργότητα της GCase στον εγκέφαλο (Gegg et al., 2012), δεν υπήρχαν αντίστοιχες πληροφορίες για κύτταρα του αίματος. Δεν

υπήρχαν, επίσης, μελέτες που να είχαν εξετάσει την λειτουργικότητα των διαφόρων μονοπατιών της αυτοφαγίας *in vitro* σε PBMC. Αυτοί είναι δύο ακόμη τομείς που καταβλήθηκε προσπάθεια στο πλαίσιο της διατριβής να συμπληρωθεί η υπάρχουσα γνώση με νέα δεδομένα.

Ένα άλλο ερώτημα που ενώ είχε τεθεί αρκετές φορές, δεν υπήρχαν επαρκή στοιχεία για την απάντησή του, ήταν η διαφοροποίηση της παθοφυσιολογίας της νόσου ανάλογα με το γενετικό αίτιο που την προκαλεί. Δεν υπήρχαν, αρχικά, μελέτες που να συνέκριναν τα αποτελέσματα μεταξύ διαφορετικών γενετικών κατηγοριών ασθενών. Στην παρούσα διατριβή τα δείγματα προήλθαν τόσο από υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με ιδιοπαθή νόσο Πάρκινσον, όσο και από ασθενείς με γενετικές μορφές της νόσου και πιο συγκεκριμένα, με μεταλλάξεις στα γονίδια *SNCA* και *GBA* (βλ. ενότητα 1.1.4 και 3.1.1). Μάλιστα, οι δύο αυτές γενετικές μορφές φαίνεται να επηρεάζουν την ανάπτυξη της νόσου μέσω διαφορετικών μονοπατιών. Οι μεταλλάξεις στο *SNCA* επιδρούν άμεσα στη δομή της α -συνουκλεΐνης και έχουν αιτιολογική συσχέτιση με τη νόσο, ενώ οι μεταλλάξεις στο *GBA* αυξάνουν την προδιάθεση για την εμφάνιση της νόσου, πιθανώς μέσω δυσλειτουργίας των λυσοσωμάτων.

Επομένως, μέσω των συγκρίσεων των γενετικών κατηγοριών θα μπορέσουν να εξαχθούν συμπεράσματα για τις τυχόν διαφορές που υπάρχουν στους ποικίλους παθογενετικούς μηχανισμούς της νόσου, και μέσω της μελέτης των λυσοσωμικών μονοπατιών θα καταστεί πιθανώς εφικτή η ανάπτυξη ενός αξιόπιστου, φτηνού και εύχρηστου βιολογικού δείκτη για τη νόσο Πάρκινσον.

2.1.2 Σε εγκεφαλικούς ιστούς

Εξαιτίας του ότι οι βασικές αλλοιώσεις της νόσου Πάρκινσον παρατηρούνται στον εγκέφαλο, οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στους διάφορους εγκεφαλικούς ιστούς, με προεξάρχοντες τους νευρώνες της μέλαινας ουσίας.

Όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή της ενότητας αυτής, τα περισσότερα βιβλιογραφικά δεδομένα για τη λυσοσωμική λειτουργία και τη λειτουργία του μονοπατιού της αυτοφαγίας αναφέρονται σε εγκεφαλικούς ιστούς. Επιγραμματικά, στους ασθενείς με νόσο Πάρκινσον ανευρίσκονται χαμηλότερα επίπεδα Hsc70 και Lamp2a (Alvarez-Erviti et al., 2010; Chu et al., 2009), μείωση στα επίπεδα και την ενεργότητα της GCase (Manning-Bog et al., 2009; Mazzulli et al., 2011), και

μεταβολές στα επίπεδα των πρωτεϊνών p62 και LC3 (Anglade et al., 1997; Zhu et al., 2003).

Τα παραπάνω δεδομένα έχουν συλλεχθεί από το ολικό κλάσμα των νευρώνων, χωρίς να γίνεται διαχωρισμός με βάση τα διάφορα υποσυστήματα του κυττάρου. Παρουσιάζει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον σε ποιο βαθμό οι παρατηρούμενες μεταβολές στους νευρώνες είναι γενικευμένες ή περιορίζονται μόνο στα λυσοσώματα, καθώς δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες πάνω στο θέμα αυτό. Οι πληροφορίες αυτές θα μπορούσαν να οδηγήσουν στον ακριβέστερο προσδιορισμό των σημείων που δυσλειτουργούν και οδηγούν στην απορρύθμιση της λυσοσωμικής λειτουργίας.

Για την καλύτερη διερεύνηση των διαταραχών των επιπέδων των βασικών αυτών αυτοφαγικών και λυσοσωμικών πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των διαφόρων οργανιδίων των νευρώνων από το κυτταρόπλασμα. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν για μελέτη δύο κυτταρικά κλάσματα, τα οποία περιείχαν το κυτταρόπλασμα και το λυσόσωμα, καθώς με τη χρήση του διαχωρισμού αυτού καθίσταται ευκολότερος ο έλεγχος και η διερεύνηση των λυσοσωμικών μεταβολών.

Τέλος, με την ταυτόχρονη μελέτη τόσο κυττάρων του περιφερικού αίματος, όσο και εγκεφαλικών ιστών μπορεί να γίνει εφικτή η σύγκριση των λυσοσωμικών μεταβολών μεταξύ κεντρικού νευρικού συστήματος και κυττάρων της περιφέρειας.

2.2 Ολιγομερισμός της α-συνουκλεΐνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια

Η νόσος Πάρκινσον χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη των σωματίων Lewy στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες της μέλαινας ουσίας, με την α-συνουκλεΐνη να αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά τους (Spillantini et al., 1998, 1997). Παρότι ο ακριβής φυσιολογικός της ρόλος δεν είναι πλήρως κατανοητός, η α-συνουκλεΐνη έχει ανιχνευτεί στο ENY, στο πλάσμα και στα ερυθρά αιμοσφαίρια (Barbour et al., 2008; El-Agnaf et al., 2003).

Το αίμα αποτελεί ένα από τα πιο εύκολα προσβάσιμα βιολογικά υγρά και αποτελεί έναν εξαιρετικό στόχο για την ανεύρεση πιθανών βιοδεικτών, για τους λόγους που αναφέρθηκαν και στην ενότητα 2.1.1. Η α-συνουκλεΐνη ανιχνεύεται στο πλάσμα και στα ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ, εάν εκφράζεται στα λευκοκύτταρα, αυτό γίνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Barbour et al., 2008). Οι διάφορες μελέτες που έχουν μετρήσει τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης στο πλάσμα έχουν καταλήξει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα για τη σχέση των επιπέδων της στους ασθενείς σε

σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (Duran et al., 2010; El-Agnaf et al., 2006; Eller and Williams, 2011, 2009), με κυριότερη αιτία, όπως πιστεύουν, να είναι η επιμόλυνση των δειγμάτων από τη συνουκλεΐνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων λόγω της αιμόλυσης.

Για τη μείωση της επίδρασης της αιμόλυσης στην παρούσα μελέτη, η μέτρηση των επιπέδων της α-συνουκλεΐνης εστιάστηκε στις μεμβράνες των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα ερυθροκύτταρα περιέχουν το 99% της α-συνουκλεΐνης στο αίμα (Barbour et al., 2008), ενώ η λύση τους απελευθερώνει την κυτταροπλασματική α-συνουκλεΐνη στο πλάσμα. Αντίθετα, η α-συνουκλεΐνη των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών παραμένει ανέπαφη σε περίπτωση αιμόλυσης. Με αυτό τον τρόπο, δεν υπάρχει πρόσμιξη μεταξύ της α-συνουκλεΐνης του πλάσματος με αυτή που περιέχεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια και έτσι αποφεύγεται ένας πιθανός παράγοντας μείωσης της ακρίβειας των μετρήσεων, καθώς δεν υπάρχει αμφιβολία για την αρχική προέλευση της α-συνουκλεΐνης που μετράται.

Με τον έλεγχο των ερυθρών αιμοσφαιρίων επιτυγχάνονται δύο ακόμη στόχοι: πρώτον, να δοθεί ορθή απάντηση στο ερώτημα για το βαθμό που οι διαταραχές και η συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης αποτελούν ένα γενικευμένο φαινόμενο, το οποίο εμφανίζεται και σε άλλα κύτταρα εκτός του ΚΝΣ, ή περιορίζεται μόνο σε αυτό, και δεύτερον, αν δύναται να χρησιμοποιηθεί η α-συνουκλεΐνη ως βιοδείκτης για τη νόσο Πάρκινσον.

Παράλληλα, τεράστιο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διερεύνηση πιθανών διαφορών στη συγκέντρωση και τον ολιγομερισμό της α-συνουκλεΐνης μεταξύ των διαφόρων γενετικών κατηγοριών των ασθενών με νόσο Πάρκινσον, όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα για τα PBMC. Μάλιστα, η A53T μετάλλαξη βρίσκεται στο γονίδιο που κωδικοποιεί την α-συνουκλεΐνη και θεωρείται αιτιολογικής σημασίας για της αλλοιώσεις που υφίσταται η α-συνουκλεΐνη στους ασθενείς αυτούς. Με αυτόν τον τρόπο, θα διερευνηθούν οι τροποποιήσεις του μορίου αυτού και εκτός του ΚΝΣ.

Η περίπτωση των ασθενών-φορέων μεταλλάξεων του *GBA* είναι ιδιαίτερη, καθώς στην ομόζυγη μορφή τους προκαλούν τη νόσο Gaucher, μια νόσο αποθήκευσης των λυσοσωμάτων, ενώ στην ετερόζυγη αυξάνουν τον κίνδυνο για εμφάνιση της νόσου Πάρκινσον (βλ. ενότητα 1.1.4). Έχουν δημοσιευτεί μελέτες που μετράνε τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια τέτοιων ατόμων και αναδεικνύουν αύξηση του διμερισμού της α-συνουκλεΐνης (Argyriou et al., 2012). Ακόμη, αναφέρονται στην βιβλιογραφία αρκετά δεδομένα για την αύξηση της α-συνουκλεΐνης στο πλάσμα σε ασθενείς με νόσο Gaucher (Nuzhnyi et al., 2015). Δεν

υπήρχαν όμως, στο σημείο έναρξης της διατριβής, δεδομένα σχετικά με την πιθανή συσσώρευση μορφών της α-συνουκλεΐνης σε ετερόζυγους φορείς μεταλλάξεων στο GBA, φορείς οι οποίοι ταυτόχρονα πάσχουν από Νόσο Πάρκινσον.

Η σύγκριση της συγκέντρωσης και του ολιγομερισμού της α-συνουκλεΐνης στις μεμβράνες των ερυθρών αιμοσφαιρίων μεταξύ των διαφόρων γενετικών κατηγοριών αλλά και της ιδιοπαθούς νόσου Πάρκινσον, σε σχέση με άτομα ελέγχου, θα παράσχει χρήσιμες πληροφορίες, αρχικά, για την αποσαφήνιση των παθογενετικών μηχανισμών των διαταραχών της α-συνουκλεΐνης και, στη συνέχεια, της ίδιας της νόσου Πάρκινσον, ενώ παράλληλα μπορεί να προσδιορίσει ένα χρήσιμο στην καθημερινή κλινική πράξη βιοδείκτη.

2.3 Συνοπτικά

Η καινοτομία της παρούσας διατριβής έγκειται στην απευθείας μελέτη μονοπατιών σε κύτταρα της περιφέρειας. Για τα υπό μελέτη μονοπάτια υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις πως συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου, ενώ παράλληλα τα περιφερικά κύτταρα που επιλέχθηκαν είναι εύκολα προσβάσιμα και συλλέξιμα από τον κλινικό γιατρό. Ταυτόχρονα, η απευθείας μελέτη στα κύτταρα του αίματος βοηθάει στον περιορισμό συγχυτικών παραγόντων που υπάρχουν στο πλάσμα (πχ. προϊόντα αιμόλυσης) και χρησιμεύει στην άμεση διερεύνηση των μηχανισμών της νόσου στα κύτταρα, και αποφεύγεται η έμμεση διερεύνηση των μηχανισμών αυτών μέσω των προϊόντων απέκκρισής των κυττάρων. Παράλληλα, ακολουθήθηκε και η προσέγγιση της απ' ευθείας μελέτης παθολογοανατομικού υλικού εγκεφάλων ασθενών, πάντα εστιάζοντας στο επίπεδο της λυσοσωμικής λειτουργίας.

Συνοψίζοντας, ο απώτερος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η απόκτηση γνώσης, η οποία θα μπορέσει αρχικά να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας της νόσου Πάρκινσον, και πιθανότατα να αποτελέσει εφαλτήριο για την ανάπτυξη καινοτόμων διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων της νόσου.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**3.1 Συμμετέχοντες**

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν κατά κύριο λόγο από ασθενείς της Β΄ Πανεπιστημιακής Νευρολογικής κλινικής που εδρεύει στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν», στο Χαϊδάρι Αττικής.

Όλοι οι συμμετέχοντες, μετά από ενδελεχή ενημέρωσή τους και παραλαβή του ειδικού ενημερωτικού σημειώματος, συμπλήρωσαν και υπέγραψαν έντυπα συγκατάθεσης (το πληροφοριακό σημείωμα και τα έντυπα συγκατάθεσης παρουσιάζονται στο Παράρτημα). Ο τύπος του εντύπου συγκατάθεσης και οι λοιπές διαδικασίες παροχής συναίνεσης και λήψης των δειγμάτων είχαν λάβει την έγκριση του Επιστημονικού Συμβουλίου – Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας του νοσοκομείου, η οποία δόθηκε στην 17^η συνεδρίασή της, στις 24/09/2014. Η συλλογή έγινε στο πλαίσιο των ερευνητικών προγραμμάτων ΑΡΙΣΤΕΙΑ, ΜΕFOPA (European Project on Mendelian Forms of Parkinson's Disease) και PPMI (Parkinson's Progression Markers Initiative).

Βασική προϋπόθεση για τη συμμετοχή στη μελέτη στην κατηγορία των ασθενών ήταν να πληρούνται τα κλινικά κριτήρια του Gelb (1999) για πιθανή ή ενδεχόμενη διάγνωση της νόσου Πάρκινσον. Δεν υπήρξαν περιορισμοί για τη συμμετοχή με βάση την ηλικία έναρξης, τη διάρκεια της νόσου, την παρουσία συνοδών διαταραχών μνήμης ή την λήψη θεραπείας με λεβοντόπα. Στην κατηγορία των υγιών μαρτύρων η ύπαρξη συγγενούς έως δευτέρου βαθμού με γνωστή νευρολογική πάθηση αποτέλεσε βασικό κριτήριο αποκλεισμού.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν ανώνυμα και κάθε συμμετέχων λάμβανε έναν ειδικό μοναδικό κωδικό με στόχο αφενός μεν την προστασία των προσωπικών δεδομένων και αφετέρου την καταγραφή και ταξινόμηση των δειγμάτων. Παράλληλα, για κάθε συμμετέχοντα συμπληρώθηκε ερωτηματολόγιο με όλα τα βασικά δημογραφικά και κλινικά στοιχεία του. Το ερωτηματολόγιο επισυνάπτεται στο Παράρτημα. Ενδεικτικά, στοιχεία που περιλαμβάνονταν στο ερωτηματολόγιο ήταν: το φύλο, η ηλικία, ο τόπος γέννησης, ανατροφής, και καταγωγής των γονέων, το οικογενειακό ιστορικό και το γενεαλογικό δέντρο όσον αφορά νευρολογικά νοσήματα, η ηλικία και το έτος έναρξης των συμπτωμάτων, η ηλικία και το έτος έναρξης της αγωγής με λεβοντόπα, τα συμπτώματα, η φαρμακευτική αγωγή, η κλινική σταδιοποίηση κατά

Hoehn & Yahr, UPDRS, και Swab & England, καθώς και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας MMSE.

3.1.1 Διαχωρισμός δειγμάτων σε γενετικές κατηγορίες

Για την πληρέστερη κατανόηση της παθογένειας της νόσου Πάρκινσον είναι αναγκαίο να διαχωριστούν στο μέτρο του δυνατού τα δείγματα κατά πιθανό αιτιολογικό παράγοντα. Οι αιτίες της σποραδικής μορφής της νόσου μπορεί να παραμένουν άγνωστες ακόμη, όμως οι έρευνες έχουν καταδείξει ένα πλήθος γονιδίων που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη της νόσου ή συνδέονται αιτιολογικά με την εμφάνισή της (βλ. ενότητα 1.1.3).

Προηγούμενες μελέτες είχαν ασχοληθεί με την κατανομή και την επιδημιολογία των σχετιζόμενων με την νόσο Πάρκινσον μεταλλάξεων που ανευρίσκονται συχνότερα στον ελληνικό πληθυσμό (Bozi et al., 2014; Moraitou et al., 2011). Οι πιο συχνά ευρισκόμενες είναι η c.G209A/p.A53T σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο που κωδικοποιεί την α-συνουκλεΐνη (SNCA), και οι L444P, D409H, N370S και IVS10-1G>A σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-γλυκοσερεβροσιδάση (GCase) (βλ. ενότητα 1.1.4). Η αναζήτηση γενετικών μεταλλάξεων περιορίστηκε στις προαναφερθείσες, καθώς είναι αυτές με τη μεγαλύτερη συχνότητα ύπαρξης στον ελληνικό πληθυσμό που έχει αποδειχθεί η συσχέτισή τους με την εμφάνιση της νόσου.

Ως κριτήρια υψηλής υποψίας ύπαρξης γενετικών παραγόντων τέθηκαν: 1) η πρώιμη έναρξη των συμπτωμάτων της νόσου, σε ηλικία κάτω των 50 ετών, και 2) η ύπαρξη συγγενούς με διαγνωσμένη νόσο Πάρκινσον. Στους ασθενείς που πληρούσαν το ένα τουλάχιστον από τα δύο παραπάνω κριτήρια πραγματοποιήθηκε γενετικός έλεγχος (βλ. ενότητα 3.4) για την ύπαρξη μεταλλάξεων σχετιζόμενων με τη νόσο, συχνών στον ελληνικό πληθυσμό.

Οι ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί στην A53T μετάλλαξη εντάχθηκαν στην κατηγορία A53T-PD, ενώ οι ασθενείς που βρέθηκαν θετικοί σε οποιαδήποτε μετάλλαξη στο γονίδιο GBA εντάχθηκαν στην κατηγορία GBA-PD. Οι υπόλοιποι κατηγοριοποιήθηκαν ως ασθενείς αγνώστου γενετικού υποβάθρου (Genetically Undetermined – PD Patients, GU-PD), καθώς δεν ήταν γνωστό εάν ήταν φορείς κάποιας μετάλλαξης σχετιζόμενης με τη νόσο Πάρκινσον, ειδικά δε στις περιπτώσεις με γνωστό οικογενειακό ιστορικό.

Κατά αντιστοιχία, χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες και οι υγιείς μάρτυρες. Η πρώτη κατηγορία (Control 1) περιείχε όλους τους μάρτυρες, ενώ οι κατηγορίες 2 και 3 περιείχαν ένα τυχαία επιλεγμένο υποσύνολο, το οποίο και είχε παραπλήσιο μέσο όρο ηλικίας και κατανομή φύλων με αυτόν των αντίστοιχων κατηγοριών ασθενών (A53T-PD και GBA-PD αντίστοιχα). Ο διαχωρισμός αυτός σε υποομάδες σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε κατά αυτόν τον τρόπο με στόχο τη μείωση της επίδρασης της ηλικίας και του φύλου στα αποτελέσματα και τις στατιστικές αναλύσεις, λόγω της διαφοράς που υπήρχε ανάμεσα στις τρεις κατηγορίες των ασθενών όπως φαίνεται και στον πίνακα 3-1.

3.1.2 Δημογραφικά στοιχεία

Τα βασικά δημογραφικά στοιχεία των συμμετεχόντων από τους οποίους χρησιμοποιήθηκαν δείγματα PBMCs φαίνονται στον πίνακα 3-1, ενώ οι ίδιες πληροφορίες για τα δείγματα των ερυθρών αιμοσφαιρίων παρουσιάζονται στον πίνακα 3-2.

	Control 1	GU-PD	Control 2	A53T-PD	Control 3	GBA-PD
Αριθμός	56	56	18	18	18	18
Φύλο (Α/Θ)	27/29	32/24	7/11	8/10	9/9	10/8
Ηλικία μελέτης (έτη)	63,7 (7,9)	66,4 (11,5)	56,2 (11,6)	51,6 (7,5)	59,4 (7,9)	59,5 (11,8)
Ηλικία έναρξης (έτη)	-	58,9 (11,4)	-	45,4 (7,9)	-	54,6 (10,1)
Διάρκεια νόσου (έτη)	-	7,46 (7,94)	-	5,64 (4,11)	-	4,94 (4,3)
UPDRS III score	-	19,6 (12,0)	-	23,63 (21,0)	-	22,6 (13,2)

Πίνακας 3-1. Παρουσίαση κατά κατηγορίες των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των συμμετεχόντων από τους οποίους λήφθηκαν τα δείγματα PBMC.

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή: μέσος όρος (τυπική απόκλιση).

Η καταγωγή των ασθενών και των υγιών μαρτύρων ήταν από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και εκπροσωπούσαν σχεδόν το σύνολο της εδαφικής της έκτασης. Οι φορείς της A53T μετάλλαξης προέρχονταν κυρίως από την περιφέρεια της Πελοποννήσου και πιο συγκεκριμένα κατάγονταν από τους νομούς Κορινθίας, Αχαΐας και Ηλίας.

Δώδεκα (12) από τους συμμετέχοντες GU-PD ασθενείς στο σκέλος των PBMCs είχαν συγγενείς που έπασχαν από τη νόσο Πάρκινσον, ενώ αντίστοιχα στο σκέλος

των ερυθρών ο αντίστοιχος αριθμός ανερχόταν σε δέκα (10) άτομα. Το σύνολο των ασθενών φορέων της A53T μετάλλαξης είχαν γνωστό οικογενειακό ιστορικό, όπως αναμενόταν λόγω της υψηλής διεισδυτικότητας της συγκεκριμένης μετάλλαξης. Αντίθετα, οχτώ (8) φορείς μεταλλάξεων στο γονίδιο *GBA* δεν είχαν συγγενείς πάσχοντες από γνωστή νευρολογική πάθηση.

	Control 1	GU-PD	Control 2	A53T-PD	Control 3	GBA-PD
Αριθμός	56	56	18	18	18	18
Φύλο (Α/Θ)	25/31	30/26	7/11	8/10	8/6	10/8
Ηλικία μελέτης (έτη)	65,8 (6,6)	69,5 (7,5)	57,3 (11,2)	51,6 (7,5)	60,1 (8,1)	59,5 (11,8)
Ηλικία έναρξης (έτη)	-	64,7 (10,8)		45,9 (7,9)		54,6 (10,0)
Διάρκεια νόσου (έτη)	-	4,61 (4,1)		5,64 (4,1)		4,94 (4,3)
UPDRS III score	-	17,5 (11,7)		23,6 (21,0)		22,6 (13,2)

Πίνακας 3-2. Παρουσίαση κατά κατηγορίες των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των συμμετεχόντων από τους οποίους λήφθηκαν τα δείγματα για τα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή: μέσος όρος (τυπική απόκλιση).

Η κατανομή των φύλων μεταξύ μαρτύρων και ασθενών δεν ήταν η ίδια, καθώς η νόσος Πάρκινσον προσβάλλει συχνότερα τους άντρες. Έγινε έλεγχος με τη χρήση των κατάλληλων στατιστικών μεθόδων τόσο για την απόκλιση της κατανομής από την ιδεατή (δηλαδή το ίδιο ακριβώς ποσοστό ανδρών/γυναικών σε όλες τις κατηγορίες), όσο και για τον βαθμό επίδρασης στο τελικό αποτέλεσμα της ανομοιογένειας αυτή (βλ. ενότητα 3.12). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανομή ανδρών/γυναικών μεταξύ της ομάδας των μαρτύρων και των ασθενών (PBMCs: chi-sq: 2.782, $p = 0,426$ | ερυθρά: chi-sq: 1.346, $p = 0,718$).

3.2 Μέθοδοι συλλογής δειγμάτων

Η συλλογή του αίματος πραγματοποιήθηκε με φλεβοκέντηση (με χρήση πεταλούδας BD Vacutainer® Safety-Lok™, Ref #367292) και το αίμα συγκεντρώθηκε σε ειδικά φιαλίδια, ανάλογα με το μέρος του αίματος που χρειαζόταν να εξαχθεί. Για την απομόνωση του DNA και των ερυθρών αιμοσφαιρίων το αίμα συλλέχθηκε σε φιαλίδια των 10 ml επικαλυμμένα με K₂EDTA (BD Vacutainer® Plastic Whole Blood tube with spray-coated K₂EDTA, Ref #366643), ενώ για την απομόνωση των PBMCs η συλλογή έγινε σε φιαλίδια των 10 ml επικαλυμμένα με

ηπαρίνη (BD Vacutainer® Plasma Tube, 150 USP Units of Lithium Heparin [spray-coated], Ref #367880). Η φύλαξη των δειγμάτων που προορίζονταν για την απομόνωση του DNA και των ερυθρών γινόταν στους 4°C, ενώ η φύλαξη αυτών που προορίζονταν για την απομόνωση των PBMC σε θερμοκρασία δωματίου. Η απομόνωση των PBMC πραγματοποιούνταν αυστηρά εντός 24 ωρών από τη συλλογή.

3.3 Μέθοδοι απομόνωσης

3.3.1 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA από το αίμα χρησιμοποιήθηκε το FlexiGene DNA kit της Qiagen (Fenlo, Finland, Cat #51206) και ακολουθήθηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο από την εταιρεία (QIAGEN Co., 2014).

Σε πρώτο στάδιο 5 ml αίματος διαλύθηκαν σε 12,5 ml από το διάλυμα FG1 του kit και πραγματοποιήθηκε ανάδευση. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στα 2181g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο που δημιουργήθηκε από την προηγούμενη διαδικασία συλλέχθηκε και διαχωρίστηκε από το ίζημα, το οποίο στη συνέχεια απορρίφθηκε. Κατόπιν, έγινε προσθήκη 10 ml από το διάλυμα FG2 και 100 µl πρωτεάσης, με στόχο τη δημιουργία ιζήματος. Το ίζημα που προέκυψε μετά την απόρριψη του υπερκειμένου επώαστηκε για 10 λεπτά στους 65°C.

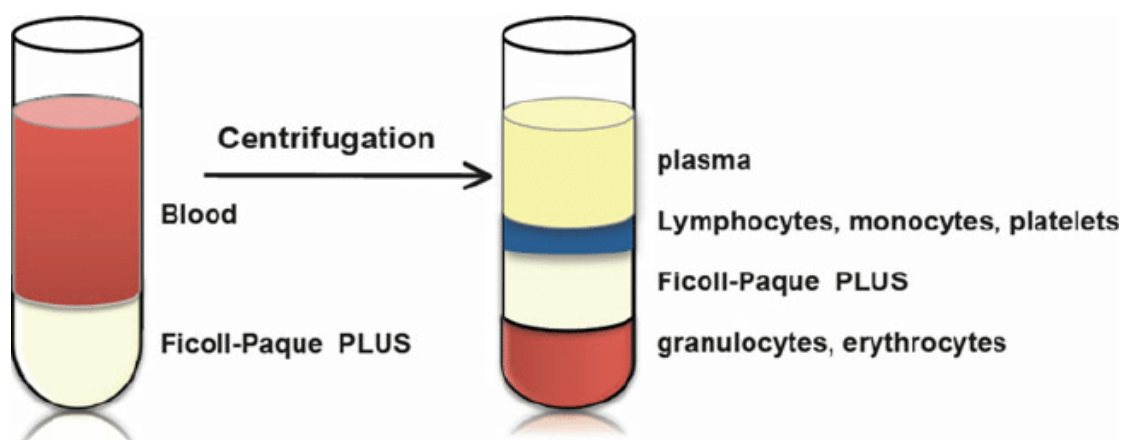
Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικά ξεπλύματα, το πρώτο με τη χρήση ισοπροπανόλης και το δεύτερο με τη χρήση διαλύματος αιθανόλης περιεκτικότητας 70%. Σε κάθε στάδιο γινόταν προσθήκη 2,5 ml από το ανάλογο διάλυμα το οποίο και φυγοκεντρήθηκε για 3 λεπτά στα 2.000 g. Το τελικό προϊόν διαλυτοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου FG3 και φυλάσσεται στους -20°C.

3.3.2 Απομόνωση PBMCs

Η απομόνωση των PBMCs ήταν δυνατή με τη χρήση ισότονου διαλύματος φικόλης πυκνότητας 1,077 g/ml (Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Berlin, Germany, Cat. #L6115). Η όλη διαδικασία διενεργήθηκε σε στείρες συνθήκες.

Αρχικά, το διαλυμένο σε ηπαρίνη αίμα αραιώθηκε σε ίσο όγκο PBS, ώστε να προκύψει διάλυμα διπλάσιου τελικού όγκου. Τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες 3 ml διαλύματος φικόλης και από πάνω με προσοχή επιστοιβάστηκαν 8 ml αραιωμένου αίματος. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε στα 1200 g για 15 λεπτά στους

4°C. Η διάταξη των στοιχείων του αίματος μετά την φυγοκέντρωση παρουσιάζεται στην εικόνα 3-1.



Εικόνα 3-1. Στοιβάδες στοιχείων του αίματος που δημιουργούνται μετά την φυγοκέντρωση παρουσία φικόλης.

Κατόπιν, συλλέχθηκε η στοιβάδα των μονοκυττάρων και μεταφέρθηκε σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες. Το υλικό που συλλέχθηκε αραιώθηκε σε ίσο όγκο PBS και φυγοκεντρήθηκαν στις 1900 rpm για 30 λεπτά στους 4°C και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Η συγκεκριμένη διαδικασία ξεπλύματος επαναλήφθηκε δύο φορές (Panda and Ravindran, 2013).

Το τελικό ίζημα είτε χρησιμοποιήθηκε άμεσα για κυτταροκαλλιέργεια είτε ψύχθηκε για συντήρηση προς μελλοντική χρήση. Για την προστασία των κυτταρικών μεμβρανών από τη ρήξη λόγω του φαινομένου της διαστολής του πάγου έγινε χρήση δύο διαλυμάτων. Η σύσταση του πρώτου διαλύματος αποτελούνταν από 95% RPMI και 5% FBS, ενώ το δεύτερο περιείχε 80% FBS και 20% DMSO. Τα κύτταρα διαλύθηκαν πρώτα στο διάλυμα #1 και κατόπιν στο διάλυμα #2. Στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

3.3.3 Απομόνωση ερυθρών αιμοσφαιρίων

Η διαδικασία της απομόνωσης συμπυκνωμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων αποτελούνταν από τέσσερις διαδοχικές πλύσεις του αίματος. Σε κάθε στάδιο το αίμα αραιώθηκε σε ίσο όγκο φυσιολογικού ορού (Natural Saline 0,9% περιεκτικότητας w/v σε χλωριούχο νάτριο – NaCl) και φυγοκεντρήθηκε στα 2.200g για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, απορρίφθηκε όλο το υπερκείμενο (που περιείχε κυρίως στοιχεία από το πλάσμα και λευκά αιμοσφαίρια) και διατηρήθηκε το ίζημα. Το τελικό προϊόν

φυλάχθηκε στους -80°C μέχρι τη χρήση του (Argyriou et al., 2012; Evans et al., 2013).

Για την περαιτέρω λύση των κυττάρων και την απομόνωση των μεμβρανών τους έγινε ξεπάγωμα του αποθηκευμένου υλικού, το οποίο προκάλεσε μία πρώτη κυτταρική λύση. Οι επαναλαμβανόμενες πλύσεις με PBS και η απόρριψη του υπερκείμενου, που περιείχε κυρίως κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και αιμοσφαιρίνη, οδήγησαν στον καθαρισμό του προϊόντος. Το μεμβρανικό ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος STET (50 mM Tris [pH 7,6] 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton-X) για 30 λεπτά σε πάγο. Πραγματοποιήθηκε μια τελευταία φυγοκέντρωση στις 13.800g για 10 λεπτά στους 4°C , όπου απομονώθηκε το υπερκείμενο με σκοπό τον υπολογισμό επιπέδων των προς μελέτη πρωτεϊνών με τη μέθοδο Western (Argyriou et al., 2012). Σε περίπτωση που δεν χρησιμοποιούνταν άμεσα το μεμβρανικό παρασκεύασμα για ανοσοαποτύπωση κατά Western, αυτό φυλασσόταν στους -80°C .

3.3.4 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνών

Για την απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών ήταν απαραίτητη η λύση των κυττάρων. Τα κύτταρα εμβαπτίστηκαν αρχικά σε διάλυμα STET (50 mM Tris [pH 7,6] 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 1% Triton-X) με προσθήκη κατάλληλου μίγματος αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών (PhosSTOPTM, Roche). Στη συνέχεια αναδεύτηκαν ισχυρά και επωάστηκαν για 30 λεπτά στον πάγο. Κατόπιν, φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000g για 20 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε νέο σωλήνα, όπου και περιέχονταν οι διαλυτές πρωτεΐνες, ενώ το ίζημα απορρίφθηκε, γιατί σε αυτό περιέχονταν αδιάλυτες πρωτεΐνες και άθικτοι κυτταρικοί πυρήνες (με το διάλυμα κατεργασίας STET δεν επιτυγχάνεται λύση των πυρήνων). Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -80°C .

3.3.5 Απομόνωση mRNA

Η απομόνωση του mRNA απαιτεί στείρες και αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες για να αποφευχθεί η αποδόμησή του. Το RNA έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής λόγω της ύπαρξης μεγάλης ποσότητας RNAσών (ενζύμων που καταλύουν την αποικοδόμηση του RNA) στο περιβάλλον, αλλά και της λιγότερο σταθερής μοριακής δομής του σε σχέση με το DNA. Ως εκ τούτου απαιτήθηκε η χρήση ειδικού

δισαπεσταγμένου ύδατος ελεύθερου RNAασών σε όλα τα στάδια της επεξεργασίας, και η προετοιμασία των επιφανειών, όπου πραγματοποιήθηκε η διαδικασία απομόνωσης, με τη χρήση ειδικών αναστολέων των RNAασών (RNaseZap™, Invitrogen). Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί σωλήνες τύπου eppendorf αποστειρωμένοι και ελεύθεροι RNAασών.

Αρχικά, τα κυτταρικά δείγματα ομογενοποιήθηκαν σε 1 ml αντιδραστηρίου TRIZOL® για κάθε 100 mg δείγματος και φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000g για 10 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα περιείχε κυρίως κυτταρικές μεμβράνες, πολυσακχαρίτες, και DNA (λόγω του υψηλού μοριακού του βάρους), ενώ το υπερκείμενο περιείχε το RNA, το οποίο και συλλέχθηκε.

Το υπερκείμενο επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προστέθηκαν 5 ml χλωροφόρμιου για κάθε 1ml TRIZOL® που είχε χρησιμοποιηθεί αρχικά. Πραγματοποιήθηκε έντονη ανακίνηση των δοχείων για τουλάχιστον 15 δευτερόλεπτα και αφέθηκαν σε ηρεμία για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για επώαση. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000g για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρωση είχαν δημιουργηθεί τρεις φάσεις στο κάθε δείγμα, η κατώτερη, που είχε κόκκινο χρώμα και είχε ως κύρια σύσταση φαινόλη και χλωροφόρμιο, η ενδιάμεση λευκόχρωμη φάση και η ανώτερη φάση. Η ανώτερη φάση, η οποία συλλέχθηκε ήταν διαυγής και περιείχε το RNA. Οι χειρισμοί όφειλαν να είναι ακριβείς για να αποφευχθεί ανάμιξη των φάσεων.

Στη συνέχεια έγινε προσθήκη ισοπροπανόλη με στόχο την κατακρίμνηση και τη συγκέντρωση του RNA. Η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,5 ml για κάθε 1ml αρχικής ποσότητας TRIZOL®. Τα δείγματα παρέμειναν για επώαση στους -20°C για ένα βράδυ (τουλάχιστον 16 ώρες). Την επόμενη μέρα φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Μετά την αφαίρεση του υπερκειμένου το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος αιθανόλης περιεκτικότητας 75% v/v και έγινε μια τελευταία φυγοκέντρωση στα 7.500 g για 5 λεπτά στους 4°C.

Τέλος, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα παρέμεινε στον αέρα με σκοπό την αποξήρανσή του. Κατόπιν, το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε ύδωρ ελεύθερο από RNAάσες και επώαστηκε για 10 λεπτά στους 55°C με στόχο την καλύτερη διάλυση του (Chirgwin et al., 1979). Πριν την περαιτέρω χρήση του RNA πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση (βλ. ενότητα 3.4.1) για την μέτρηση της περιεκτικότητας και της καθαρότητας του τελικού προϊόντος και ηλεκτροφόρηση 0,7 μg σε γέλη αгарόζης

περιεκτικότητας 1,5% (βλ. ενότητα 3.5) για τον έλεγχο της δομικής ακεραιότητας του μορίου. Τα δείγματα στη συνέχεια φυλάχθηκαν στους -80°C .

3.3.6 Δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης

Ένα βασικό χαρακτηριστικό του mRNA είναι η πολυαδενινική ουρά του μορίου. Το χαρακτηριστικό αυτό έχει διπλή ωφέλεια, πρώτον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το συμπλήρωμα της συγκεκριμένης περιοχής ως εκκινητής (primer) και δεύτερον το cDNA που θα σχηματιστεί με τη χρήση του εκκινητή αυτού θα αποτελείται αποκλειστικά από mRNA λόγω της απουσίας της συγκεκριμένης περιοχής από τα υπόλοιπα είδη RNA. Για αυτό το λόγο σαν εκκινητής χρησιμοποιείται ένα ολιγονουκλεοτίδιο αποτελούμενο αποκλειστικά από νουκλεοτίδια θυμίνης (Buell et al., 1978).

Αρχικά, το δείγμα τοποθετήθηκε σε ένα σωλήνα τύπου eppendorf 2 μg RNA μαζί με 1 μl oligo-DT primers και ο όγκος συμπληρώθηκε με δισαπασταγμένο νερό ελεύθερο RNAσών μέχρι τα 13 μl . Το δείγμα επώαστηκε για 5 λεπτά στους 70°C για να διασπαστούν πιθανοί δεσμοί μεταξύ των μορίων RNA που μπορεί να δυσχεράνουν την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 12 μl από το διάλυμα που περιγράφεται στον πίνακα 3-3 και επώαστηκαν για 60 λεπτά στους 37°C .

	Ποσότητα (μl)
Reverse Transcription Buffer	5
dNTPs (10mM)	5
RNase Out	1
M-MLV RT	1

Πίνακας 3-3. Σύσταση διαλύματος λύσης. Τα παραπάνω συστατικά διαλύθηκαν σε δισαπασταγμένο νερό (ddH_2O).

3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός περιεκτικότητας

3.4.1 Προσδιορισμός περιεκτικότητας νουκλεϊκών οξέων με φωτομέτρηση

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) να εμφανίζουν τη μέγιστη απορρόφηση του φωτός σε μήκος κύματος 260 nm. Προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων σε κάθε δείγμα,

καταγράφηκε η οπτική του πυκνότητα στα 260 nm και στα 280 nm χρησιμοποιώντας κυψελίδα χαλαζία. Διάλυμα DNA ή RNA με συγκέντρωση 50 µg/ml αντιστοιχούσε σε οπτική πυκνότητα ($O.D_{260}$) ίση με 1. Με αυτήν την παραδοχή ήταν δυνατό να υπολογιστεί η ποσότητα του DNA ή του RNA που βρισκόταν σε κάθε δείγμα. Η καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων υποδηλωνόταν από το λόγο $O.D_{260}/O.D_{280}$, ενώ το κριτήριο για την καθαρότητα ήταν ο λόγος αυτός να ήταν μεγαλύτερος του 1.7 (QIAGEN Co., 2014).

3.4.2 Προσδιορισμός περιεκτικότητας πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η μέτρηση της πρωτεϊνικής περιεκτικότητας των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου 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 465 nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνης – χρωστικής στα 595 nm.

Απαραίτητη ήταν η δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η οποία προέκυψε από τη μέτρηση της O.D. γνωστών συγκεντρώσεων προτύπων διαλυμάτων αλβουμίνης από ορό βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) σε απιονισμένο νερό. Συγκρίνοντας την οπτική πυκνότητα (Optical Dencity, OD) του δείγματος, μετά από κατάλληλη αραιώσή του (100 φορές), με την O.D. των προτύπων, προέκυψε 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, αντέδρασαν με το αντιδραστήριο Bradford (αραιωμένο 1:4 (v/v) με απιονισμένο H_2O) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μετρήθηκε 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.

3.5 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των νουκλεϊκών οξέων γίνεται με την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης (Smisek and Hoagland, 1989). 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 έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης στα 70 V, για 4 – 5 ώρες (Ninfa et al., 2010). 1,2 gr αγαρόζης αραιώθηκαν 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 έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης [2%, (w/v)], όπου 0.6 gr αγαρόζης είχαν διαλυθεί σε 30 ml TAE (Tris/acetic acid/EDTA) το οποίο περιείχε: 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 θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Όταν η θερμοκρασία της αγαρόζης, η οποία βρισκόταν ακόμη σε υγρή μορφή, έφτανε στους 50 - 60°C τοποθετούνταν στην ειδική υποδοχή της συσκευής ηλεκτροφόρησης, με σκοπό την πήξη του διαλύματος. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, το πήκτωμα τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και εμβαπτίστηκε σε διάλυμα TBE (DNA) ή TAE (RNA), με στόχο να καλυφθεί πλήρως το πήκτωμα (Brody and Kern, 2004). Σε κάθε φρεάτιο τοποθετήθηκε 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], ακολούθησε ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή τάση 70 V. Μετά τη λήξη της ηλεκτροφόρησης, η συσκευή αποσυνδέθηκε και το πήκτωμα βαφόταν για 15 – 20 λεπτά σε διάλυμα που περιείχε 0,5 µg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) (Higuchi et al., 1992). Στη συνέχεια, το πήκτωμα εξετάστηκε κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία και φωτογραφήθηκε.

3.6 Μέτρηση επιπέδων πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western

3.6.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)

Με τη μέθοδο της ανοσοδοκιμασίας κατά Western, μπορεί να ανιχνευθεί μια πρωτεΐνη – στόχος, επάνω στη μεμβράνη της νιτροκυταρίνης, 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) προσδέθηκε σε αυτή και στη συνέχεια ένα δεύτερο αντίσωμα (δευτερογενές), συζευγμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης της αγριοραφανίδας, αναγνώρισε και προσδέθηκε στο πρώτο. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε μέσω του εντοπισμού του δευτερογενούς αντισώματος, με κατάλληλη μέθοδο, που στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν αυτή της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL). Η μέθοδος αυτή 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.

Αρχικά, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης επώαστηκε 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 περιείχε 20mM Tris/HCl pH 7.6, 137mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20]. Στη συνέχεια, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης επώαστηκε 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. Ακολούθησαν εκπλύσεις της μεμβράνης (3 x 10 λεπτά, με συνεχή ανάδευση) και επώαση με δευτερογενές αντίσωμα έναντι του πρωτογενούς, το οποίο ήταν 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) ήταν συζευγμένα με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP). Μετά την έκπλυση της μεμβράνης (3 x 10 λεπτά, με συνεχή ανάδευση), εφαρμόστηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Η ομάδα των αντιδραστηρίων του ECL (#32106, Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo scientific) περιλάμβανε δύο αντιδραστήρια. Το Α, το οποίο περιείχε το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα του ενζύμου – ιχνηθέτη, που ήταν συζευγμένο με το δευτερογενές

αντίσωμα, και το B, που περιείχε λουμινόλη και ενισχυτές της χημειοφωταύγειας. Τα αντιδραστήρια αναμίχθηκαν σε αναλογία 1:1 λίγο πριν τη χρήση και ακολούθησε επώαση της μεμβράνης, για 2 λεπτά, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, η μεμβράνη καλύφθηκε με ζελατίνη και εκτέθηκε σε κατάλληλο φιλμ μέσα σε ειδική κασέτα. Ο χρόνος έκθεσης εξαρτήθηκε από την υπό μελέτη πρωτεΐνη (την ποσότητά της στο κυτταρικό εκχύλισμα και την ειδικότητα της αλληλεπίδρασής της με το πρωτογενές αντίσωμα). Τέλος, έγινε εμφάνιση του φιλμ (σε διάλυμα εμφανιστή, developer) και σταθεροποίηση του παραγόμενου σήματος (σε διάλυμα σταθεροποιητή, fixer). Η διαδικασία από την επώαση της μεμβράνης στο ECL μέχρι και την εμφάνιση του φιλμ, γινόταν σε ειδικό θάλαμο απουσία φωτός.

3.6.2 Αφαίρεση αντισώματος από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας εμφάνισης, υπήρχε 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 ήταν ιδιαίτερα χρήσιμη στην περίπτωση, που χρειαζόταν να ελεγχθεί σημαντικός αριθμός πρωτεϊνών και η ποσότητα των δειγμάτων δεν επαρκούσε για επανάληψη της ηλεκτροφόρησης.

Αρχικά, η μεμβράνη επωαζόταν 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, με συνεχή ανάδευση, σε διάλυμα αποκόλλησης των αντισωμάτων το οποίο περιείχε: 500 mM NaCl, 200mM Glycine, pH 2.6. Ακολουθούσε έκπλυση με TBS-T, για 10 λεπτά, με συνεχή ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, επώαση με διάλυμα δέσμευσης και το νέο πρωτογενές αντίσωμα, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (βλ. ανοσοδοκιμασία κατά Western 3.6.1).

3.6.3 Χρώση πρωτεϊνών με Ponceau S

Μετά τη μεταφορά, προκειμένου να ελεγχθεί η επιτυχία της διαδικασίας, αλλά και το ισόποσο φόρτωμα των δειγμάτων, η νιτροκυτταρίνη βάφτηκε με διάλυμα της χρωστικής Ponceau S. Η πρόσδεση της Ponceau S στις πρωτεΐνες ήταν αντιστρεπτή, με αποτέλεσμα να μην προκαλούσε προβλήματα στην διαδικασία της ανοσοδοκιμασίας που ακολουθούσε και, επιπλέον, δεν προκαλούσε ισχυρό σήμα

«υποβάθρου», εφόσον η μεμβράνη είχε αποχρωματιστεί κατάλληλα (Salinovich and Montelaro, 1986).

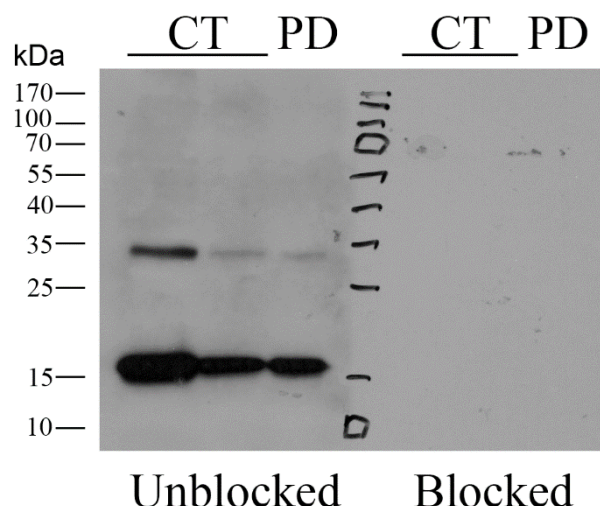
Συγκεκριμένα, η νιτροκυτταρίνη επώαστηκε με το διάλυμα της χρωστικής [0.4% (w/v) Ponceau S, σε 7.5% (v/v) τριχλωροξικού οξέος (TCA)] για 1 έως 2 λεπτά, με ανάδευση. Ο αποχρωματισμός της μεμβράνης γινόταν με διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα TBS-T. Όταν είχε αποχρωματιστεί επαρκώς το «υπόβαθρο» διακρίνονταν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

3.6.4 Έλεγχος ειδικότητας αντισωμάτων

Στα ερυθρά αιμοσφαίρια μετρήθηκαν τα επίπεδα της α -συνουκλεΐνης, τόσο της μονομερούς της μορφής, όσο και των διαφόρων πολυμερών της μορφών. Για τον αποκλεισμό πιθανών ψευδών αποτελεσμάτων λόγω μη ειδικής πρόσδεσης του συγκεκριμένου αντισώματος σε διαφορετικές πρωτεΐνες πέραν της α -συνουκλεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αναστολής του αντισώματος C-20.

Για την παρασκευή του ανεσταλμένου αντισώματος αναμείχθηκαν: 1) 42 μ l Tris 10 μ M pH=7,6, 2) 3 μ l αντίσωμα C-20, και 3) 8 μ l ανασταλτικού πεπτιδίου του αντισώματος C-20. Το παραπάνω μείγμα επώαστηκε για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Για τον τελικό έλεγχο πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση στα ίδια ακριβώς δείγματα τόσο του ανεσταλμένου αντισώματος, όσο και του μη ανεσταλμένου. Οι δέσμες που εμφανίστηκαν στην ανοσοαποτύπωση με τη χρήση του μη ανεσταλμένου αντισώματος, αλλά εξαφανίστηκαν με τη χρήση του ανεσταλμένου ήταν αληθείς και μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την μέτρηση των επιπέδων των διαφόρων μορφών της α -συνουκλεΐνης (εικόνα 3-2). Για την διαδικασία αυτή επιλέχτηκαν τρία δείγματα με υψηλά επίπεδα α -συνουκλεΐνης. Δύο από υγιείς μάρτυρες και ένα από ασθενή.



Εικόνα 3-2. Έλεγχος ειδικότητας αντισώματος C-20 έναντι της α-συνουκλεΐνης.

Στην αριστερή στήλη οι πρωτεΐνες έχουν υποστεί επεξεργασία παρουσία του αντισώματος C-20 έναντι της α-συνουκλεΐνης, ενώ στην δεξιά στήλη το αντίσωμα είχε επωαστεί πρώτα με το αντίστοιχο περιοριστικό πεπτίδιο.

Οι αριθμοί στην αριστερή στήλη δηλώνουν το μοριακό βάρος σε kilodalton.

3.7 Μέτρηση επιπέδων mRNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο

Για την μέτρηση της ποσότητας του παραγόμενου mRNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), μέσω της οποίας μπορεί να γίνει μια άμεση εκτίμηση των επιπέδων της μεταγραφικής δραστηριότητας βασικών γονιδίων σχετιζόμενων με την εμφάνιση της νόσου Πάρκινσον (Kubista et al., 2006). Τα γονίδια που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή είναι τα: *LAMP2A*, *HSC70*, *GBA*, *GAPDH*. Το γονίδιο *GAPDH* χρησιμοποιήθηκε ως housekeeping gene με στόχο την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων ως προς τις πιθανές διαφορές στην αρχική συγκέντρωση του cDNA, για αυτό και η μέτρησή του συμπεριλήφθηκε σε κάθε πείραμα (Bustin, 2000; Ponchel et al., 2003; Logan et al., 2009).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αραίωση 1:10 των δειγμάτων του cDNA που χρησιμοποιήθηκαν για την RT-PCR. Σε κάθε «πηγάδι» του πλατό μέτρησης τοποθετήθηκαν 9 μl από το cDNA του δείγματος που εξεταζόταν. Κατόπιν, προστέθηκε το βασικό μείγμα της RT-PCR με βάση τη σύσταση που παρουσιάζεται στον πίνακα 3-4, μέχρι τη συμπλήρωση συνολικού όγκου 20 μl. Οι εκκινητές ήταν διαφορετικοί και ειδικοί για κάθε εξεταζόμενο γονίδιο από τα προαναφερθέντα και παρουσιάζονται στον πίνακα 3-5.

	Ποσότητα (μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα	2
Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl ₂)	0,6
dNTP	0,4
Syber Green	0,6
Πρόσθιος Εκκινητής (Forward)	0,6
Οπίσθιος Εκκινητής (Reverse)	0,6
Taq Πολυμεράση	0,1

Πίνακας 3-4. Σύσταση διαλύματος RT-PCR. Τα παραπάνω συστατικά διαλύονταν σε δισαπεν-σταγμένο νερό.

Τα δείγματα φορτώθηκαν σε ειδικά πλατό των 96 «πηγαδιών». Για την ακριβέστερη μέτρηση των επιπέδων μεταγραφής από κάθε δείγμα cDNA, και ξεχωριστά για κάθε γονίδιο, η μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν, όπου και χρησιμοποιήθηκαν δύο διαδοχικές θέσεις στο πλατό. Για τον αποκλεισμό πιθανής επιμόλυνσης των δειγμάτων τοποθετήθηκαν παράλληλα ένα δείγμα ελέγχου για κάθε εξεταζόμενο γονίδιο, το οποίο αποτελείτο μόνο από το βασικό μείγμα της RT-PCR με τους αντίστοιχους εκκινητές (πίνακας 3-5). Η σχετική έκφραση των γονιδίων στο δείγμα αυτό έπρεπε να είναι μηδενική. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε ένα κοινό δείγμα – πρότυπο σε κάθε πείραμα με σκοπό τον προσδιορισμό της σχετικής έκφρασης των γονιδίων σε σύγκριση με αυτό.

LAMP2A
Fw: GAATGGGAAGGGTCCAAAAT
Rv: TGGCTCCTTAACCCAGTGTC
HSC70 (HSPA8)
Fw: CAGGTTTATGAAGGCGAGCGTGCC
Rv: GGGTGCAGGAGGTATGCCTGTGA
GBA
Fw – TGCATCCTGCCTTCAGAGTC
Rv – GATAGAGGATCCACGTCGGC
GAPDH
Fw: CCTCTGACTTCAACAGCGACAC
Rv: AGCCAAATTCGTTGTCATACCAG

Πίνακας 3-5. Νουκλεοτιδικές ακολουθίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των αναφερόμενων γονιδίων.

Το πλατό τοποθετήθηκαν στην συσκευή που πραγματοποιούσε την RT-PCR, όπου εκτελούνταν ένα συγκεκριμένο πρόγραμμα θερμάνσεων – ψύξεων. Το πρόγραμμα αυτό αποτελούνταν από τρεις φάσεις: 1) μία εισαγωγική φάση προετοιμασίας των δειγμάτων, 2) την κυρίως διεργασία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, όπου πραγματοποιούνταν η αντιγραφή των μορίων του DNA, 3) μια τελική φάση για τον τερματισμό και την ολοκλήρωση της διαδικασίας. Η 1^η φάση αποτελούνταν από δύο βήματα, ένα των 50°C για 120 δευτερόλεπτα και ένα 95°C για 10 λεπτά. Η 2^η φάση αποτελούνταν από 40 επαναλήψεις της ακολουθίας: 1) 95°C για 10 s, 2) 60°C για 50 s και 3) 72°C για 10 s. Τέλος, η 3^η φάση αποτελούνταν από τέσσερα βήματα: 1) στους 95°C για 60 s, 2) 65°C για 60 s, 3) 95 °C για 10 s, και 37°C για 30 s.

Η $2^{-\Delta\Delta Ct}$ μέθοδος, όπως περιγράφηκε στο άρθρο των Livak και Schmittgen (2001) χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της ποσότητας του cDNA, και κατ' επέκταση του mRNA, σε σχέση με ένα κοινό δείγμα – πρότυπο, όπως προαναφέρθηκε.

3.8 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β -γλυκοσερεβροσιδάσης

Η μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της GCase (GCase Activity Assay) στηρίχθηκε στη μέθοδο που ανέπτυξε ο Urban και συνεργάτες (2008). Τα PBMCs λύνονταν σε 50 μ l ρυθμιστικού διαλύματος τελικού pH 5,9, αποτελούμενο από Κιτρικό Οξύ 50 mM, K₂HPO₄ 176 mM, Ταυροχολικό Νάτριο 10 mM, Tween-20 0.01%.

Αρχικά, από το κάθε κυτταρικό εκχύλισμα λήφθηκαν τέσσερα δείγματα των 5 μ l το καθένα, δύο για κάθε μία από τις δύο συνθήκες που εξετάστηκαν. Ο λόγος που λήφθηκαν δύο διαφορετικά δείγματα για κάθε συνθήκη ήταν η μείωση της επίδρασης εξωγενών παραγόντων και μεγαλύτερη ακρίβεια στις μετρήσεις. Στην πρώτη συνθήκη τα δείγματα επωάστηκαν με 5 μ l από το προαναφερθέν ρυθμιστικό διάλυμα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ στη δεύτερη τα δείγματα επωάστηκαν παρουσία 5 μ l CBE συγκέντρωσης 40 mM, πάλι για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το CBE αποτελεί ισχυρό αναστολέα της GCase.

Στη συνέχεια, προστέθηκαν ταυτόχρονα σε όλα τα δείγματα 25 μ l 4-MU- β -Glc συγκέντρωσης 5 mM και επωάστηκαν στους 37°C για 25 λεπτά. Κατόπιν, τα

δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο και διακόπηκε η κατάλυση προσθέτοντας 465 μ l διαλύματος 1 M υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) και 1 M γλυκίνης με pH 10.

Το 4MU- β -Glc αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου της β -γλυκοσερεβροσιδάσης. Σε όλα τα δείγματα είχε προστεθεί η ίδια ποσότητα υποστρώματος, η οποία ήταν αρκετά μεγαλύτερη από την ποσότητα κορεσμού του ενζύμου. Επομένως, η συγκέντρωση των προϊόντων της υδρόλυσης του 4MU- β -Glc ήταν ανάλογη της ενεργότητας του ενζύμου και της ταχύτητας με την οποία καταλύθηκε η συγκεκριμένη αντίδραση.

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των προϊόντων αυτών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της φθοροφωτομετρίας. Τα παράγωγα της υδρόλυσης του 4-MU- β -Glc έχουν φθορίζουσες ιδιότητες, απορροφούν, χαρακτηριστικά, φως μήκους κύματος 365 nm και εκπέμπουν στα 440 nm, επομένως η ένταση του εκπεμπόμενου φωτός μήκους κύματος 440 nm ήταν ανάλογη της ποσότητας του 4-MU- β -Glc που είχε μεταβολιστεί στο δείγμα. Η ένταση αυτή μετρήθηκε σε σχετικές μονάδες φθορισμού (Relative Fluorescent Units), σε σχέση με ένα εσωτερικό πρότυπο του μηχανήματος μέτρησης.

Επειδή η υδρόλυση πραγματοποιείται και αυθόρμητα χωρίς την ανάγκη παρουσίας καταλύτη, για τον τελικό υπολογισμό της ενεργότητας του ενζύμου έπρεπε να ληφθεί υπόψη το συγκεκριμένο φαινόμενο, και να αφαιρεθεί η ποσότητα που δεν παράχθηκε μέσω του ενζύμου. Η ποσότητα των παραγώγων της υδρόλυσης του 4-MU- β -Glc που ανευρέθηκε στα δείγματα που είχε προστεθεί το CBE δεν αποτελούσε προϊόν ενζυμικής δράσης, λόγω της αναστολής της δράσης του ενζύμου.

Ο τελικός υπολογισμός της ενεργότητας της GCase προέκυψε από την διαφορά των σχετικών μονάδων φθορισμού της δεύτερης συνθήκης (προσθήκη CBE) από την πρώτη συνθήκη (χωρίς CBE), διαιρεμένη με την συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο αρχικό κυτταρικό εκχύλισμα, ώστε το αποτέλεσμα να είναι κανονικοποιημένο ως προς της συνολική ποσότητα πρωτεϊνών, όπως φαίνεται στον παρακάτω τύπο:

$$\text{ενεργότητα} = \frac{RFU(\text{χωρίς CBE}) - RFU(\text{με CBE})}{\text{ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών}}$$

Η κανονικοποίηση ως προς την συνολική ποσότητα πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε καθώς αρχικά δοκιμαστικά πειράματα κατέδειξαν πως η ενεργότητα του ενζύμου, μετρημένη σε σχετικές μονάδες φθορισμού, έχει γραμμική σχέση με την αρχική ποσότητα πρωτεΐνης του δείγματος ($R^2 = 0,952$). Για τα

πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν έξι δείγματα από κοινό δότη, γνωστής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη το καθένα. Ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 βρέθηκε με τη χρήση απλής γραμμικής παλινδρόμησης. Τιμές του R^2 που πλησιάζουν τη μονάδα υποδηλώνουν αναλογία μεταξύ των μεταβλητών που ελέγχονται.

Η μέτρηση της συνολικής συγκέντρωσης των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο που περιγράφεται στην ενότητα 3.5.2. Στους παραπάνω υπολογισμούς για κάθε συνθήκη χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων του κάθε δείγματος που την αποτελεί.

3.9 *In vitro* μελέτη λειτουργικότητας βασικών μονοπατιών αυτοφαγίας

Η *in vitro* μελέτη λειτουργικότητας των διαφόρων μονοπατιών αυτοφαγίας έγινε μόνο σε υγιείς μάρτυρες και ασθενείς με νόσο Πάρκινσον αγνώστου γενετικού υποβάθρου, και σε ένα υποσύνολο των ατόμων που συμμετείχαν στην μελέτη ($n = 18$ σε κάθε ομάδα, πίνακας 3-6).

	Υγιείς Μάρτυρες	Ασθενείς με ΝΠ
Αριθμός	18	18
Φύλο (Α/Θ)	8/10	10/8
Ηλικία θανάτου (έτη)	65.1 (6.5)	68.9 (7.9)
Ηλικία έναρξης (έτη)	-	64.2 (8.8)
Διάρκεια νόσου (έτη)	-	4.72 (4.5)
UPDRS III score	-	17.5 (11.3)
MMSE	28.9 (28.25-30)	28.7 (28-29)

Πίνακας 3-6. Παρουσίαση κατά κατηγορίες των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των συμμετεχόντων από τους οποίους λήφθηκαν τα δείγματα για τη μέτρηση της λυσοσωμικής λειτουργίας.

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή: μέσος όρος (τυπική απόκλιση).

Ένα μέρος από τα PBMCs που απομονώθηκαν καλλιεργήθηκε για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό που περιείχε λευκίνη σημασμένη με τρίτιο (^3H). Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε άμεσα μετά την απομόνωση, χωρίς να προηγηθεί ψύξη και απόψυξη των δειγμάτων. Μετά έγινε έκπλυση με phosphate buffer saline (PBS) και μετά επώαση σε θρεπτικό υλικό που περιείχε περίσσεια μη σημασμένης λευκίνης για 6 ώρες. Κατόπιν, στο ένα τρίτο τον κυττάρων προστέθηκε θρεπτικό υλικό μαζί με τους αναστολείς της λυσοσωμικής λειτουργίας χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) και leupeptin, στο άλλο τρίτο προστέθηκε παράλληλα ο αναστολέας της

μακροαυτοφαγίας 3-μεθυλαδενίνη (3-MA), ενώ τα υπόλοιπα δείγματα επωάστηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς πρόσθετες φαρμακευτικές ουσίες. Μετά από 14 ώρες συλλέχθηκε, αρχικά, τμήμα από το υπερκείμενο του θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια, μετά από πλύσεις με PBS, και τα κύτταρα, τα οποία και λύθηκαν σε διάλειμμα υδροξειδίου του Νατρίου (NaOH) και δεοξυχολικού οξέος. Η ραδιενεργός δραστηριότητα του τριτίου μετρήθηκε σε ειδικό μηχάνημα (Wallac T414, Perkin Elmer) με τη βοήθεια υγρού σπινθηρισμού (Vogiatzi et al., 2008).

Η συμμετοχή των επιμέρους αυτοφαγικών μονοπατιών εκτιμήθηκε από την διαφορά των επιπέδων της αποικοδόμησης μεταξύ των δειγμάτων όπου είχαν προστεθεί αναστολείς της αυτοφαγίας και αυτών που δεν είχαν. Ειδικότερα, η μέτρηση της ολικής λυσοσωμικής λειτουργίας προέκυψε από τη διαφορά ανάμεσα στα δείγματα μάρτυρες και τα δείγματα που επωάστηκαν παρουσία NH_4Cl , ενώ η μέτρηση της μακροαυτοφαγίας από τη διαφορά ανάμεσα στους μάρτυρες και τα δείγματα με 3-MA. Η διαφορά ανάμεσα στην ολική λυσοσωμική λειτουργία και την μακροαυτοφαγία αποδόθηκε στην CMA (βλ. ενότητα 1.3.6).

3.10 Εγκεφαλικοί ιστοί

Στη διατριβή αυτή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από ανθρώπινους εγκεφαλικούς ιστούς είκοσι (20) συνολικά δωρητών, τα οποία συλλέχθηκαν μετά θάνατον και συντηρήθηκαν. Τα δείγματα αυτά προήλθαν από την Parkinson's UK Brain Bank.

Δέκα (10) δείγματα προέρχονταν από δωρητές με νόσο Πάρκινσον, ενώ τα υπόλοιπα δέκα (10) από υγιείς μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας. Για κάθε δωρητή ελήφθησαν ιστοί από επτά (7) διαφορετικές εγκεφαλικές περιοχές. Τα δημογραφικά στοιχεία των δωρητών παρουσιάζονται στον πίνακα 3-7.

	Υγιείς Μάρτυρες	Ασθενείς με ΝΠ
Αριθμός	10	10
Φύλο (Α/Θ)	4/6	6/4
Ηλικία θανάτου (έτη)	82, 1 (6,02)	81 (3,65)
Ηλικία έναρξης (έτη)	-	65,9 (7,99)
Διάρκεια νόσου (έτη)	-	15,1 (5,64)
Χρόνος ταρίχευσης	18 (6,97)	16,3 (6,7)

Πίνακας 3-7. Παρουσίαση κατά κατηγορίες των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των δωρητών των εγκεφαλικών ιστών.

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή: μέσος όρος (τυπική απόκλιση).

Οι περιοχές από τις οποίες συλλέχθηκαν ιστοί είναι οι εξής:

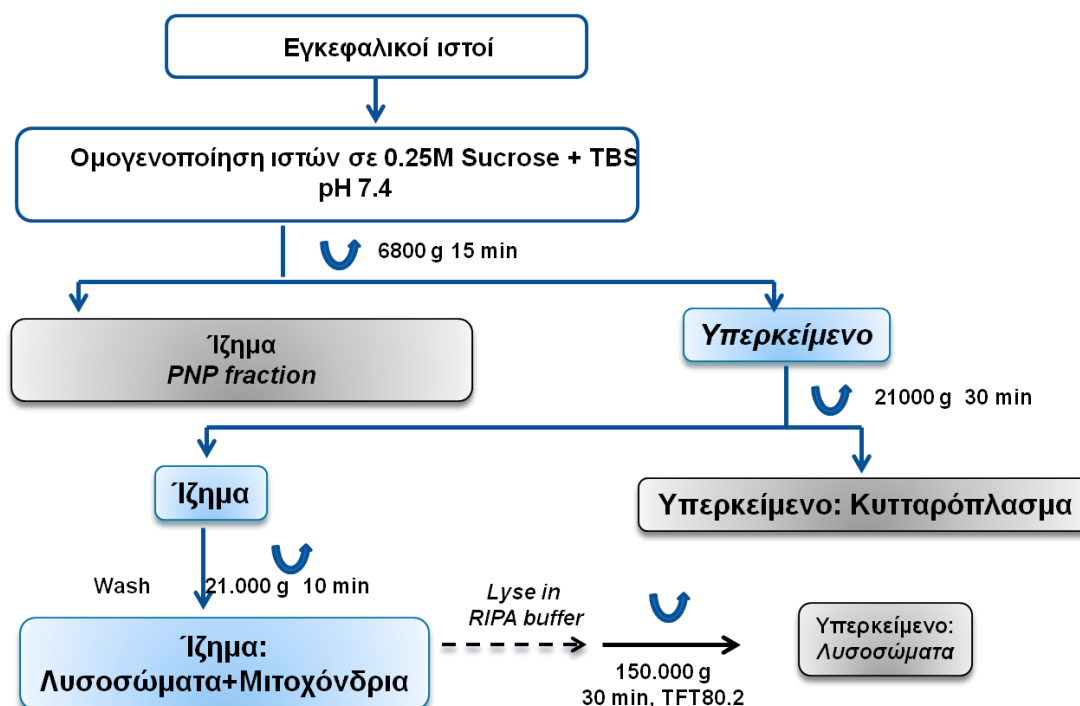
1. Μέλαινα Ουσία
2. Βασικά Γάγγλια
3. Αμυγδαλή
4. Ιππόκαμπος
5. Κερκοφόρος Πυρήνας
6. Μετωπιαίος Λοβός
7. Παρεγκεφαλίδα

Από τις παραπάνω περιοχές χρησιμοποιήθηκαν ιστοί από την μέλαινα ουσία και το μετωπιαίο λοβό για τον έλεγχο επιπέδων πρωτεϊνών και αγγελιοφόρου RNA. Η εκτίμηση των επιπέδων αυτών έγινε με Western immunoblot και RT-PCR, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

3.11 Κλασματοποίηση κυττάρων εγκεφαλικών ιστών

Για την πληρέστερη ανάλυση του πρωτεϊνικού προφίλ των εγκεφαλικών ιστών, η καλύτερη πρακτική είναι ο διαχωρισμός των λυσοσωμάτων και του κυτταροπλάσματος από το υπόλοιπο κύτταρο ώστε να εξεταστούν ξεχωριστά και να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές ανάμεσα στα δύο αυτά τμήματα του κυττάρου.

Αρχικά, οι εγκεφαλικοί ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα σουκρόζης 0,75 M με pH 7,4. Στη συνέχεια διενεργήθηκαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις για την σταδιακή απομόνωση σε πρώτο στάδιο του κυτταροπλάσματος και σε δεύτερο στάδιο των λυσοσωμάτων, τα οποία διαχωρίστηκαν από τα υπόλοιπα οργάνidia του κυττάρου όπως προκύπτει από το διάγραμμα 3-1.



Διάγραμμα 3-1. Πρωτόκολλο απομόνωσης Κυτταροπλάσματος - Λυσοσωμάτων

3.12 Στατιστικές Αναλύσεις

Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των στατιστικών πακέτων GraphPad Prism 5.0, και R v3.6.0 (μέσω του RStudio v0.96) (R Core Team, 2018). Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν με το πρόσθετο ggplot2 v3.2.0 της R (Wickham, 2016), οι αναλύσεις της καμπύλης του λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη πραγματοποιήθηκαν με το προσθετό pROC (Robin et al., 2011), και η γενική επεξεργασία δεδομένων με το πρόσθετο data.table (Dowle and Srinivasan, 2019). Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε το $p < 0,05$.

Όλες οι ομάδες δεδομένων υποβλήθηκαν στη δοκιμασία Shapiro-Wilk για τον έλεγχο της κανονικής κατανομής των τιμών τους, με στόχο την επιλογή της χρήσης παραμετρικών ή μη παραμετρικών στατιστικών δοκιμασιών για την σύγκρισή τους. Οι στατιστικές δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της συσχέτισης και των συγκρίσεων των μέσων όρων, ανάλογα της κατανομής των δεδομένων, παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 3-7.

Παράλληλα, έγινε προσπάθεια διασφάλισης των αποτελεσμάτων από την επίδραση συγχυτικών παραγόντων, με κυριότερους το φύλο και την ηλικία, καθώς οι κατανομές τους δεν ήταν απόλυτα ομοιόμορφες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι. Η πρώτη συνίστατο στον σχηματισμό τριών

διαφορετικών κατηγοριών μαρτύρων κατ' αντιστοιχία με τις κατηγορίες των ασθενών και η πραγματοποίηση των πειραμάτων και των συγκρίσεων με αυτές, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.1.1, και η δεύτερη στον στατιστικό χειρισμό των πιθανών συγχυτικών παραγόντων σε συνάρτηση με τα αποτελέσματα από τα πειράματα. Στα πλαίσια της δεύτερης μεθόδου πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες για την ανεύρεση στατιστικά σημαντικών διαφορών στην κατανομή του φύλου και της ηλικίας μεταξύ των κατηγοριών. Για το φύλο χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία ανεξαρτησίας χ^2 , ενώ για την ηλικία η δοκιμασία t-test.

Για την μέτρηση της γραμμικής συσχέτισης χρησιμοποιήθηκαν, ανάλογα με την κατανομή των τιμών των δειγμάτων, οι μέθοδοι που περιγράφονται στον πίνακα 3-8. Για την αντιμετώπιση του ζητήματος των πολλαπλών συγκρίσεων επιλέχθηκε η διόρθωση Bonferroni, η οποία έγκειται στην χρήση ως ορίου για την στατιστική σημαντικότητα του γενικού ορίου σημαντικότητας ($p < 0,05$ εν προκειμένω) διαιρεμένου με τον αριθμό των στατιστικών συγκρίσεων που πραγματοποιήθηκαν.

Ο έλεγχος για τη χρησιμότητα των επιπέδων των διαφόρων πρωτεϊνών που μετρήθηκαν ως βιολογικών δεικτών για την νόσο Πάρκινσον έγινε με τη χρήση της καμπύλης λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (Receiver-Operator Characteristic Curve, ROC Curve) και μέτρηση της περιοχής κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve, AUC). Ο προσδιορισμός του ιδανικού σημείου αποκοπής (cut-off point) για τον χαρακτηρισμό μιας δοκιμασίας ως θετικής ή αρνητικής για τη νόσο πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Youden.

	Παραμετρική δοκιμασία	Μη Παραμετρική δοκιμασία
Γραμμική Συσχέτιση	Pearson's correlation r	Spearman's rho
Σύγκριση μέσων όρων δύο (2) ακριβώς κατηγοριών	Student's t-test	Mann-Whitney U test
Σύγκριση μέσων όρων άνω των δύο (2) κατηγοριών	ANOVA ^a	Kruskal-Wallis ^b

Πίνακας 3-8. Οι στατιστικές δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν.

^a Ακολουθούμενο από την post hoc δοκιμασία Dunnett's.

^b Ακολουθούμενο από την post hoc δοκιμασία Dunn's.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Μονοπύρηνια Κύτταρα του Περιφερικού Αίματος (PBMC)

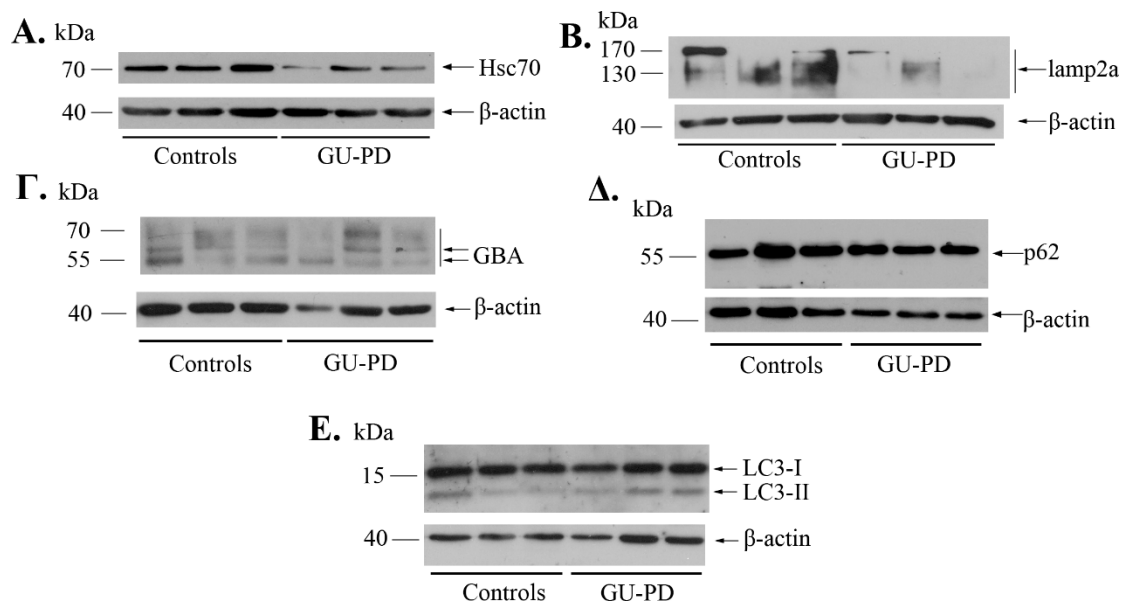
4.1.1 Μέτρηση πρωτεϊνικών επιπέδων με τη χρήση της μεθόδου Western

Συνολικά μετρήθηκαν επίπεδα πρωτεϊνών σε 148 δείγματα μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερειακού αίματος (PBMCs) από εθελοντές, χωρισμένα σε 4 κατηγορίες, (Υγιείς μάρτυρες [CT], GU-PD, A54T-PD, GBA-PD) όπως παρουσιάζεται στην ενότητα 3.1 *Συμμετέχοντες*. Εξαιτίας της διαφορετικής μέσης ηλικίας των ασθενών με νόσο Πάρκινσον γενετικής αιτιολογίας σε σχέση με τους ασθενείς αγνώστου γενετικού υποβάθρου, καθώς και των διαφορών στη μέση ηλικία έναρξης, δημιουργήθηκαν και 3 αντίστοιχες υποκατηγορίες υγιών μαρτύρων με παραπλήσια μέση ηλικία με την αντίστοιχη κατηγορία ασθενών (Controls 1-3, βλ. πίνακα 3-1 της ενότητας 3.1.2 και ενότητα *Στατιστικές Αναλύσεις* 3.12). Στόχος του διαχωρισμού αυτού ήταν να μειωθεί το ενδεχόμενο τυχόν παρατηρούμενες διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα να οφείλονταν στη διαφορά ηλικίας μεταξύ των συμμετεχόντων.

Παράλληλα, για να καταστεί εφικτή η αποτελεσματική και πλήρης σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ δειγμάτων που μετρήθηκαν σε διαφορετικές συνεδρίες, σε κάθε ένα από αυτά χρησιμοποιήθηκε ένα κοινό δείγμα (Master Sample). Η συγκέντρωση του συγκεκριμένου δείγματος για κάθε πρωτεΐνη που μετρήθηκε τέθηκε ίση με την μονάδα (1).

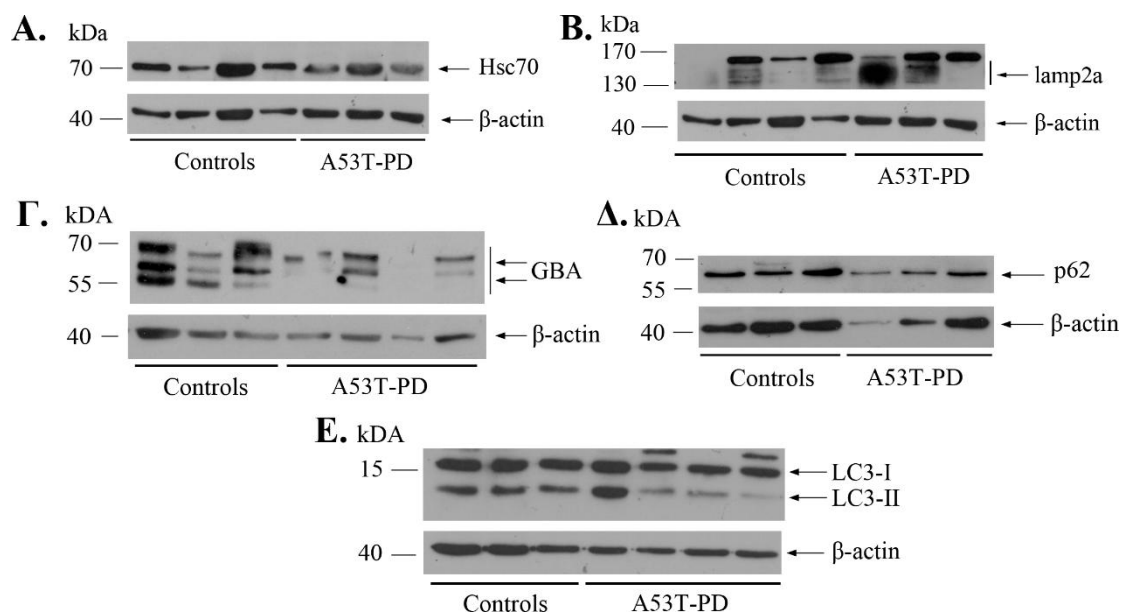
Σε κάθε κατηγορία μετρήθηκαν τα επίπεδα των ακόλουθων πρωτεϊνών: Lamp2a, Hsc70, GCase, p62, και MAP1LC3 (τύποι I και II, εν συντομία LC3-I και LC3-II), ενώ η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς (housekeeping protein) με σκοπό την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων ως προς την συνολική πρωτεϊνική συγκέντρωση των δειγμάτων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 4-1. Ανοσοαποτυπώση κατά Western και επίπεδα πρωτεϊνών σε ασθενείς αγνώστου γενετικού υποβάθρου και υγιείς μάρτυρες

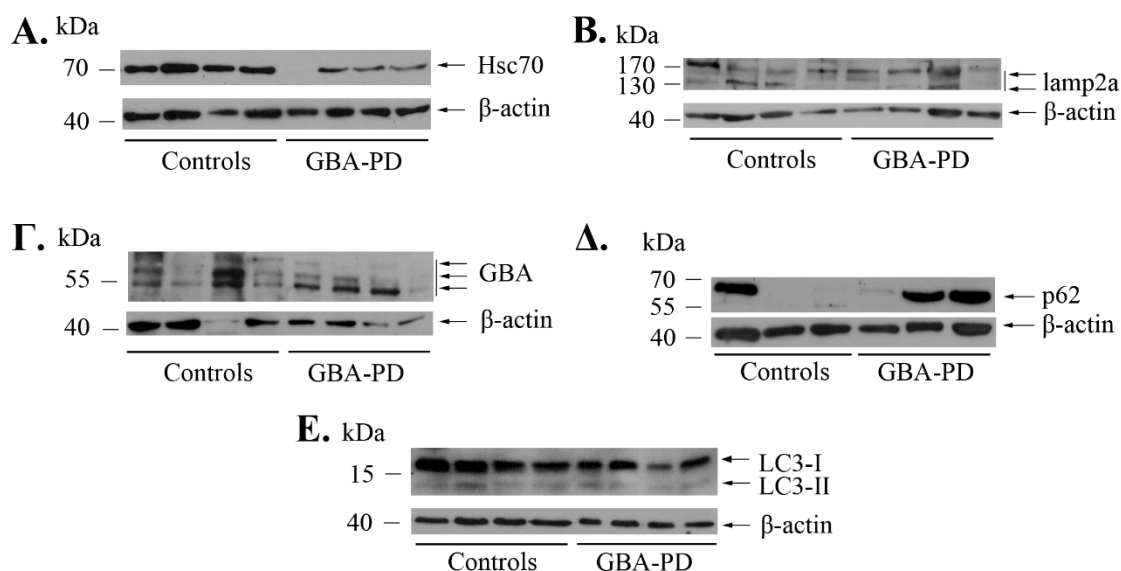
Αντιπροσωπευτικές αποτυπώσεις κατά Western των επιπέδων της πρωτεΐνης **(Α)** Hsc70, **(Β)** Lamp2a, **(Γ)** GCase, **(Δ)** p62, **(Ε)** LC3-I και II έναντι των υγιών μαρτύρων. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.



Εικόνα 4-2. Ανοσοαποτυπώση κατά Western και επίπεδα πρωτεϊνών σε ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο της α-συναουκλείνης και υγιείς μάρτυρες

Αντιπροσωπευτικές αποτυπώσεις κατά Western των επιπέδων της πρωτεΐνης **(Α)** Hsc70, **(Β)** Lamp2a, **(Γ)** GCase, **(Δ)** p62, **(Ε)** LC3-I και II έναντι των υγιών μαρτύρων. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



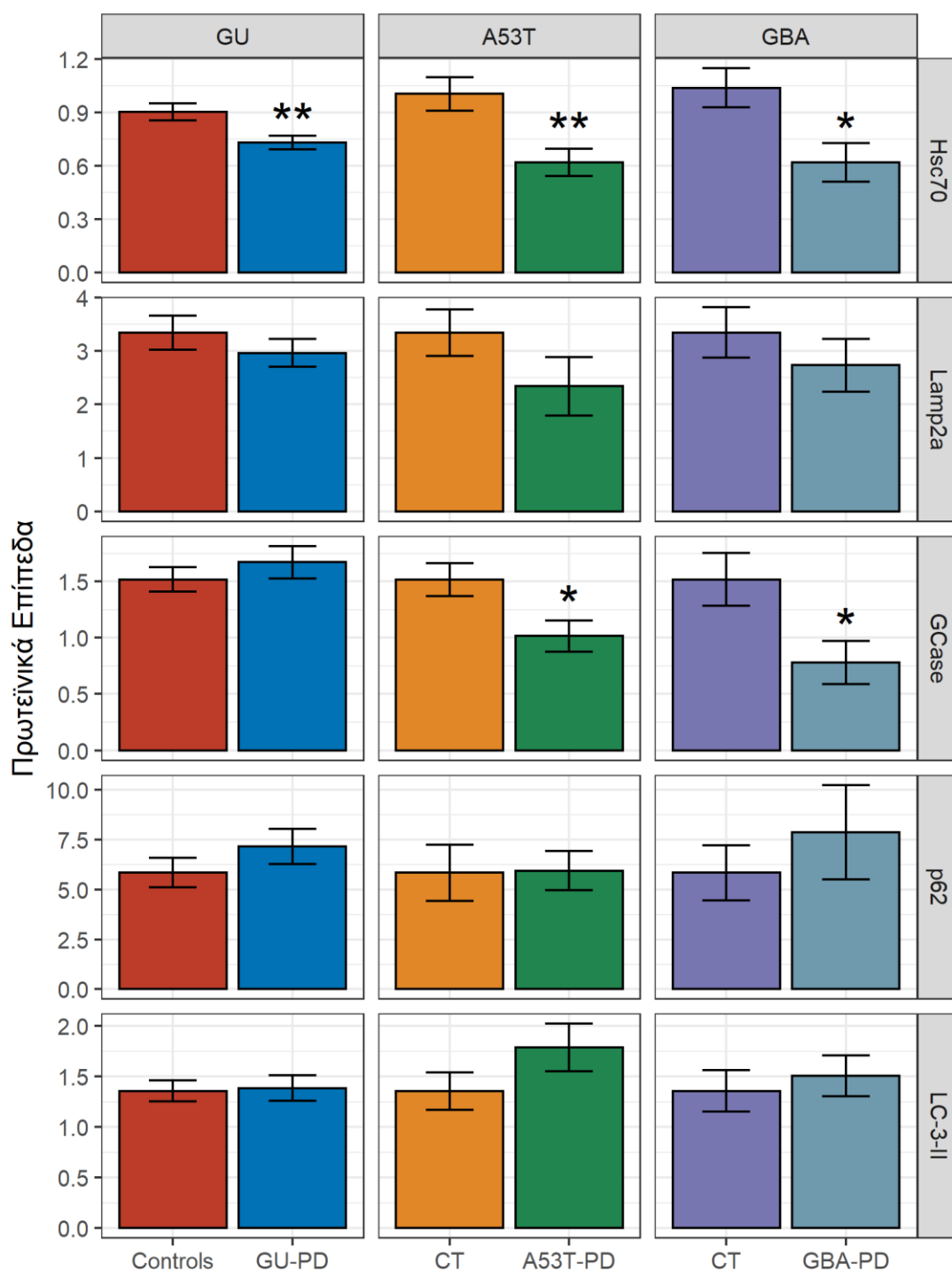
Εικόνα 4-3. Ανοσοαποτυπώση κατά Western και επίπεδα πρωτεϊνών σε ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο της β-γλυκοσερεβροσιδάσης και υγιείς μάρτυρες

Αντιπροσωπευτικές αποτυπώσεις κατά Western των επιπέδων της πρωτεΐνης (Α) Hsc70, (Β) Lamp2a, (Γ) GCase, (Δ) p62, (Ε) LC3-I και II έναντι των υγιών μαρτύρων. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς.

Τα επίπεδα της Hsc70 βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένα στους ασθενείς με νόσο Πάρκινσον σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες και στις 3 γενετικές κατηγορίες (GU $t = 2,82$, $p = 0,005$; A53T $t = 3,17$, $p = 0,003$; GBA $t = 2,72$, $p = 0,012$). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στα επίπεδα της GCase, αλλά μόνο στους ασθενείς φορείς μεταλλάξεων στα γονίδια *SNCA* ή *GBA* (GU $t = -0,85$, $p = 0,39$; A53T $t = 2,49$, $p = 0,018$; GBA $t = 2,43$, $p = 0,022$), όπως φαίνεται και στο γράφημα 4-1.

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικές σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των υπολοίπων πρωτεϊνών που εξετάστηκαν ή στις άλλες γενετικές κατηγορίες (γράφημα 4-1 α-β).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γράφημα 4-1α. Αποτελέσματα μέτρησης των πρωτεϊνικών επιπέδων εκχυλισμάτων Μονοπύρηνων Κυττάρων του Περιφερικού Αίματος με τη μέθοδο Western Blot.

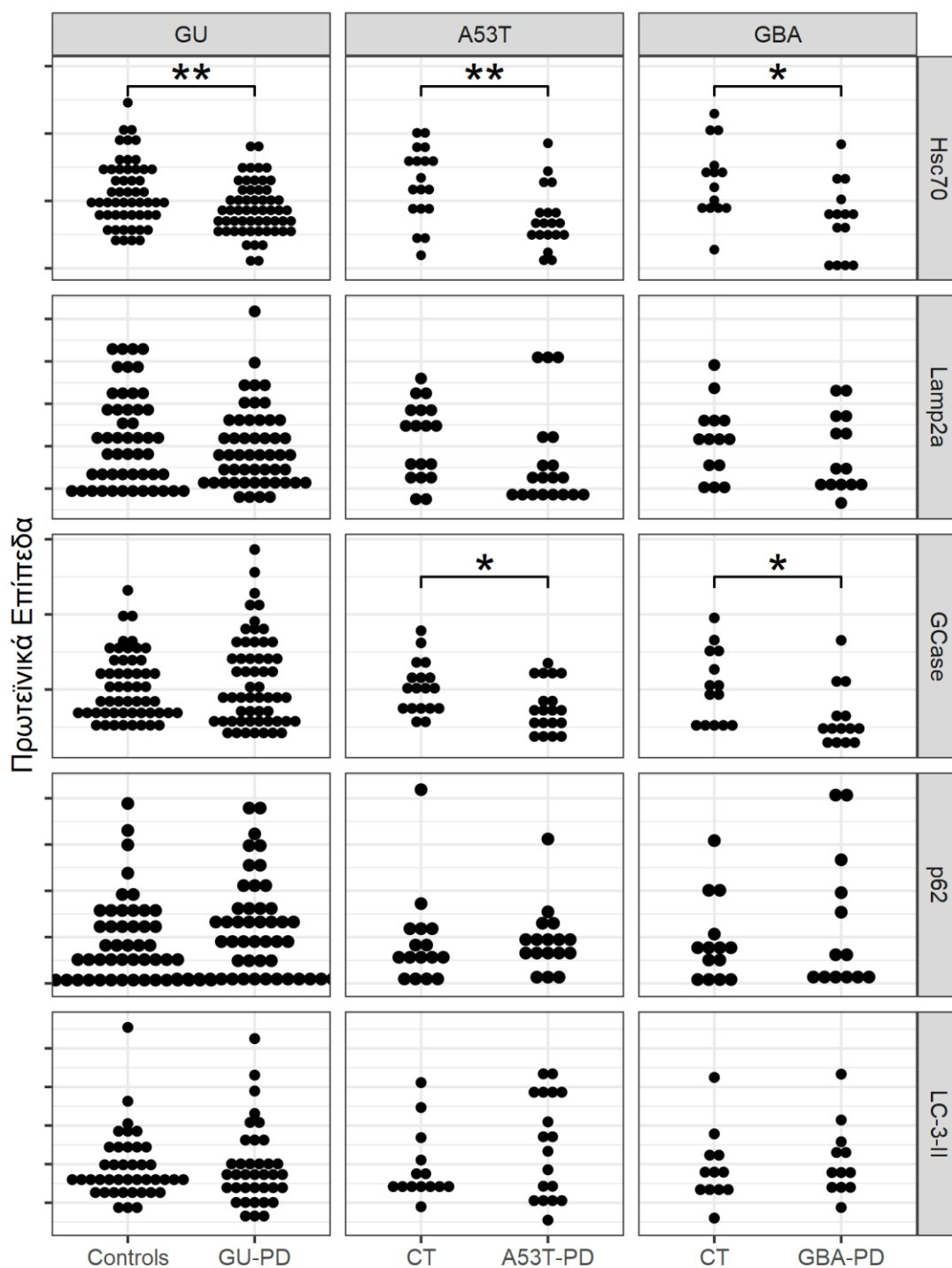
Οι τρεις γενετικές κατηγορίες στις οποίες χωρίστηκαν τα δείγματα αντιπροσωπεύονται στις στήλες του γραφήματος, ενώ οι διαφορετικές πρωτεΐνες που μετρήθηκαν παρουσιάζονται στις γραμμές του γραφήματος.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή μέσος όρος $\pm$ 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Σε όλες τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα της β-ακτίνης ως πρωτεΐνη αναφοράς.

Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται ως, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γράφημα 4-1β. Αποτελέσματα μέτρησης των πρωτεϊνικών επιπέδων με τη μέθοδο Western Blot. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του γραφήματος 4-1α με τη μορφή διαγράμματος διασποράς.

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων κάποιας από τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν με την ηλικία, τη διάρκεια της νόσου ή τα κλινικά της χαρακτηριστικά, όπως λ.χ. η βαρύτητα των κινητικών ή νοητικών ελλειμμάτων, μετρημένα αντίστοιχα με τις κλίμακες UPDRS και MMSE (πίνακας 4-1).

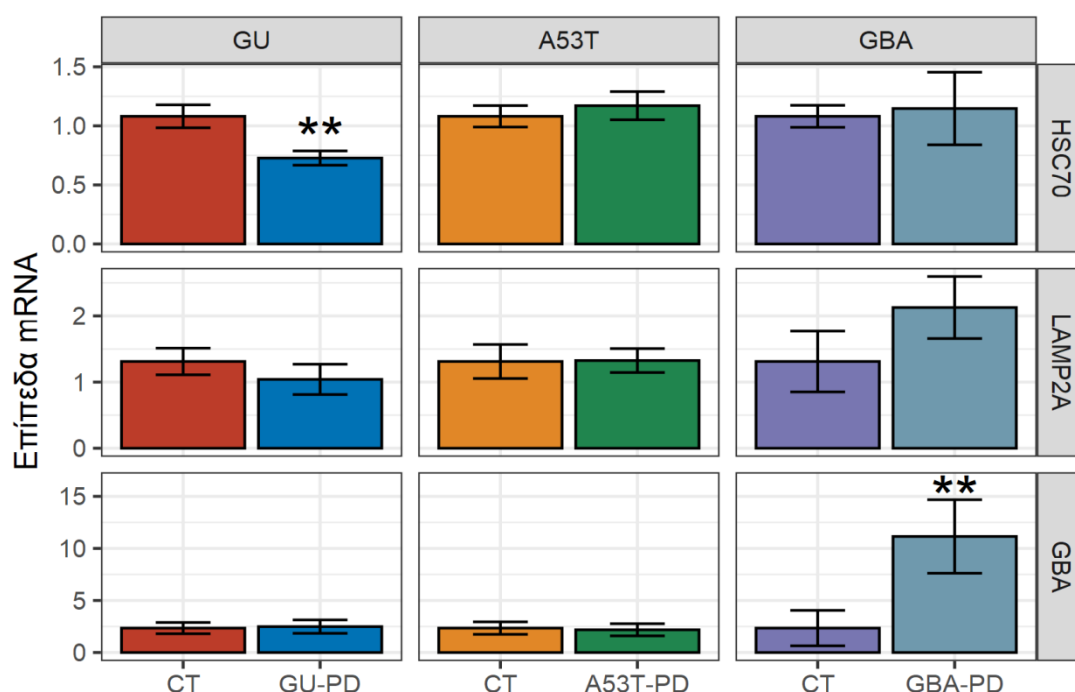
	Lamp2a	Hsc70	GCase	p62	LC3-II
Ηλικία	0,287 (0,004)	0,064 (0,42)	0,293 (0,003)	0,105 (0,213)	0,137 (0,215)
Μελέτης					
Ηλικία	0,275 (0,01)	0,102 (0,349)	0,275 (0,011)	0,156 (0,187)	0,091 (0,565)
Έναρξης					
Διάρκεια	0,078 (0,474)	0,001 (0,995)	-0,047 (0,671)	-0,222 (0,059)	0,272 (0,082)
Νόσου					
UPDRS III	-0,023 (0,838)	0,053 (0,643)	-0,024 (0,836)	-0,012 (0,923)	-0,03 (0,862)
score					
MMSE	0,118 (0,242)	0,158 (0,115)	-0,089 (0,374)	0,054 (0,59)	-0,154 (0,116)

Πίνακας 4-1. Παρουσίαση γραμμικών συσχετίσεων με τη μέθοδο Spearman.

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή: Spearman's rho (unadjusted p-value)

4.1.2 Μέτρηση επιπέδων mRNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο

Τα επίπεδα του mRNA μετρήθηκαν σε ένα υποσύνολο των δειγμάτων που συλλέχθηκαν (βλ. ενότητα 3.1.1). Πιο συγκεκριμένα, μετρήθηκαν 18 δείγματα από κάθε μία από τις 4 προαναφερθείσες κατηγορίες (βλ. ενότητα 4.1.1). Τα δείγματα αυτά επιλέχθηκαν ώστε τα άτομα από τα οποία προέρχονται να είναι όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτικά των δημογραφικών στοιχείων της εκάστοτε κατηγορίας.



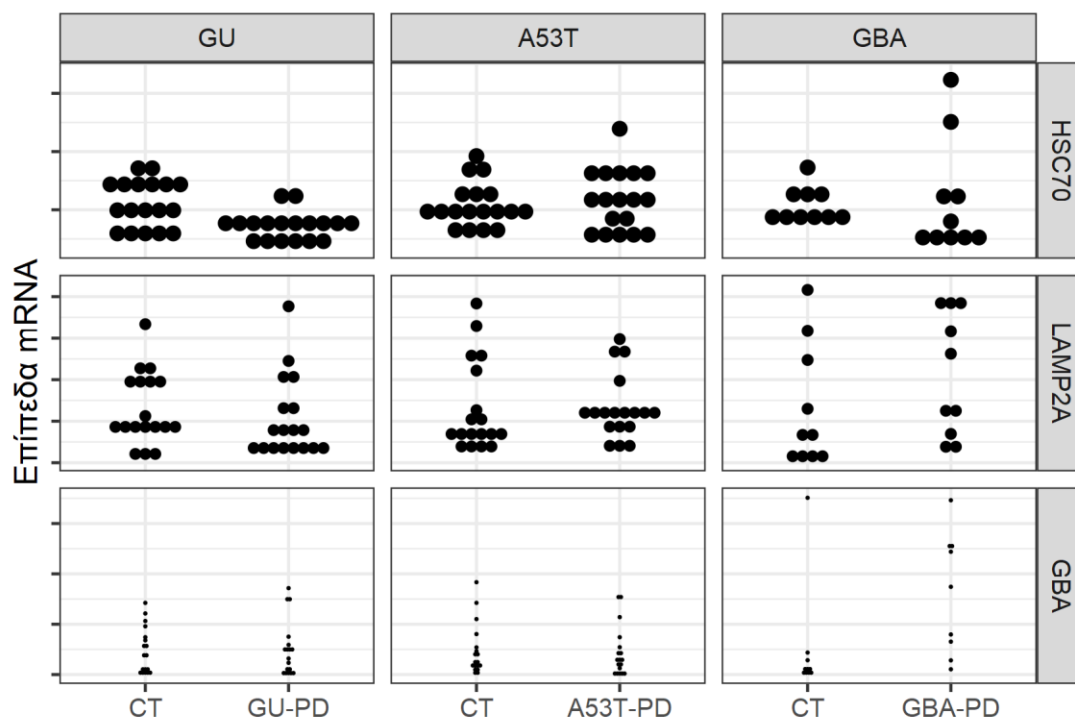
Γράφημα 4-2α. Αποτελέσματα μέτρησης των επιπέδων mRNA από εκχύλισμα PBMCs με τη μέθοδο Real Time PCR.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή μέσος όρος $\pm$ 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται ως, **: $p < 0,01$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Βρέθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων του mRNA που παράγεται από την μεταγραφή του γονιδίου *HSC70* μεταξύ των υγιών μαρτύρων και των ασθενών με νόσο Πάρκινσον αγνώστου γενετικού υποβάθρου ($t = 3,09$; $p = 0,004$, γράφημα 4-2). Η διαφορά αυτή δεν παρουσιάστηκε σε καμία από τις δύο άλλες γενετικές κατηγορίες.



Γράφημα 4-2β. Αποτελέσματα μέτρησης των επιπέδων mRNA από εκχύλισμα PBMCs με τη μέθοδο Real Time PCR.

Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του γραφήματος 4-1α με τη μορφή διαγράμματος διασποράς.

Παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του μεταγράφου του γονιδίου *GBA*, μεταξύ των υγιών μαρτύρων και των ασθενών φορέων γενετικών πολυμορφισμών στο συγκεκριμένο γονίδιο ($W = 14$; $p = 0,005$, γράφημα 4-2 α-β). Η παραπάνω διαφορά δεν παρουσιάστηκε στις υπόλοιπες γενετικές κατηγορίες. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα του mRNA που παράγεται από την μεταγραφή του γονιδίου *LAMP2A* μεταξύ οποιασδήποτε γενετικής κατηγορίας και των αντίστοιχων υγιών μαρτύρων. Δεν αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (πίνακας 4-2).

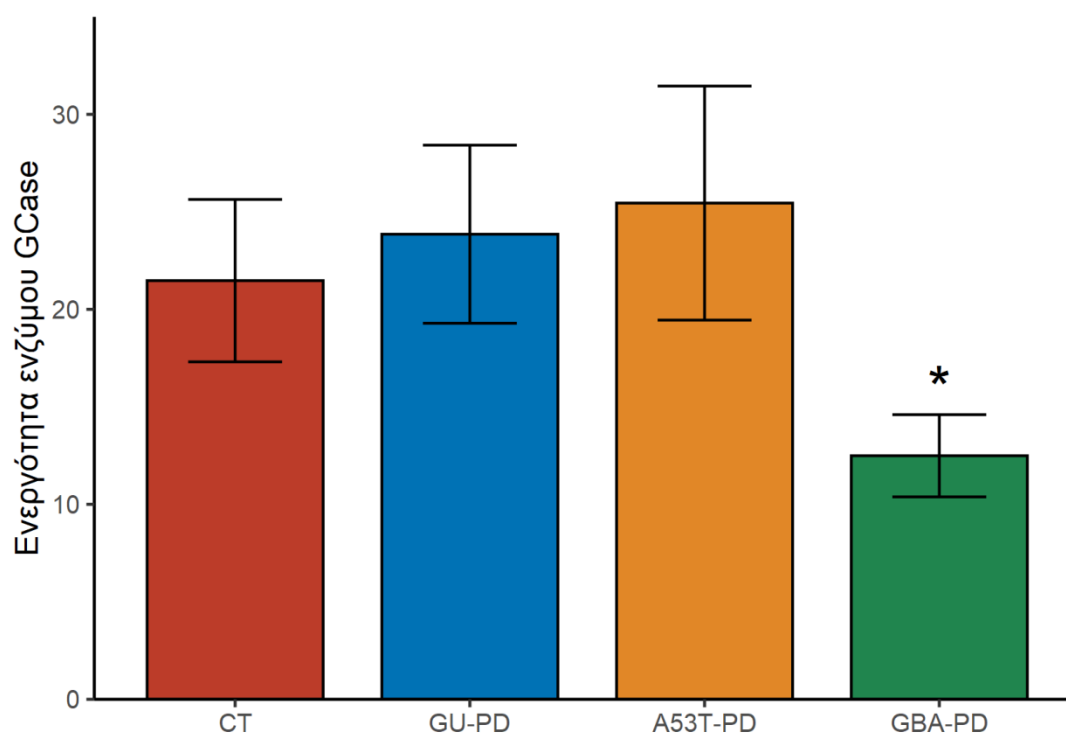
	LAMP2A	HSC70	GBA
Ηλικία Μελέτης	-0,158 (0,161)	0,034 (0,758)	-0,204 (0,062)
Ηλικία Έναρξης	-0,092 (0,579)	-0,245 (0,127)	-0,183 (0,245)
Διάρκεια Νόσου	-0,137 (0,406)	0,196 (0,227)	-0,073 (0,648)
UPDRS III score	0,043 (0,81)	-0,125 (0,48)	0,043 (0,801)
MMSE	-0.024 (0,88)	-0.093 (0,567)	-0.046 (0,776)

Πίνακας 4-2. Παρουσίαση γραμμικών συσχετίσεων με τη μέθοδο Spearman.

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή: Spearman's rho (unadjusted p-value)

4.1.3 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γλυκοσερεβροσιδάσης

Για την ενζυμική ενεργότητα μετρήθηκαν συνολικά 18 δείγματα από κάθε γενετική κατηγορία (CT, GU-PD, A53T-PD και GBA-PD). Βρέθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της ενεργότητας του ενζύμου GCase στα άτομα φορείς μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτή σε σχέση με υγιείς μάρτυρες (CT), χωρίς να παρατηρείται κάποια μεταβολή σε ασθενείς άλλης αιτιολογίας της νόσου ($F = 5,875$, $df = (3;65)$, $p = 0,001$; Dunnet's post hoc test για GBA-PD vs Control group $p = 0,029$; γράφημα 4-3).



Γράφημα 4-3. Αποτελέσματα μέτρησης ενεργότητας του ενζύμου GCase.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή μέσος όρος ± 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Η ενεργότητα μετράται σε σχετικές μονάδες φθορισμού (Relative Fluorescent Units). * : $p < 0,05$

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας του ενζύμου και των χαρακτηριστικών της νόσου (πίνακας 4-3).

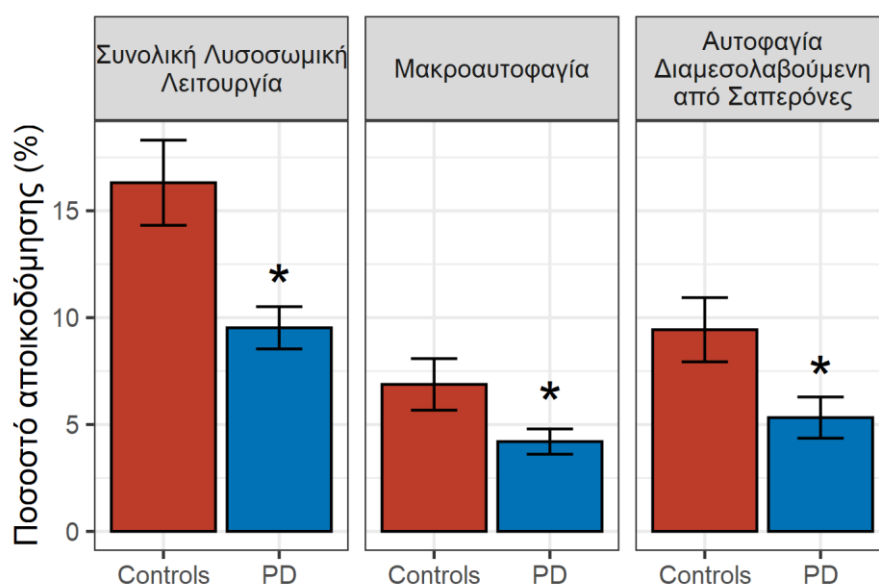
	Ηλικία μελέτης (έτη)	Ηλικία έναρξης (έτη)	Διάρκεια νόσου (έτη)	UPDRS III score	MMSE
Ενεργότητα GCase	0,012 (0,927)	0,021 (0,889)	0,129 (0,398)	0,105 (0,524)	-0,084 (0,795)

Πίνακας 4-3. Παρουσίαση γραμμικών συσχετίσεων με τη μέθοδο Spearman.

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή: Spearman's rho (unadjusted p-value)

4.1.4 In vitro μέτρηση λειτουργικότητας βασικών μονοπατιών αυτοφαγίας

Στο υποσύνολο των δειγμάτων που μετρήθηκε η αυτοφαγική λειτουργία (βλ. ενότητα 3.9) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση και στα δύο βασικά μονοπάτια της αυτοφαγίας, μακροαυτοφαγία ($U = 249.5$, $p = 0.0059$, adjusted $p = .0177$), αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από σαπερόνες ($U = 240.5$, $p = 0.0136$, adjusted $p = 0.04$), καθώς και στη συνολική λειτουργία του λυσοσώματος ($U = 247.5$, $p = 0.0072$, adjusted $p = 0.0215$) (γράφημα 4-4).



Γράφημα 4-4. Αποτελέσματα in vitro μέτρησης λυσοσωμικής αποικοδόμησης κυτταρικών πρωτεϊνών σε PBMCs.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή μέσος όρος $\pm$ 95% διάστημα εμπιστοσύνης

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων λειτουργικότητας κάποιου από τα αυτοφαγικά μονοπάτια που μελετήθηκαν με την ηλικία, τη διάρκεια της νόσου ή τα κλινικά της χαρακτηριστικά, όπως λ.χ. η

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

βαρύτητα των κινητικών ή νοητικών ελλειμμάτων (μετρημένα αντίστοιχα με τις κλίμακες UPDRS και MMSE, όπως προαναφέρθηκε) (πίνακας 4-4).

	Ηλικία	Ηλικία Έναρξης νόσου	UPDRS III Score	MMSE
Συνολική Λυσοσωμική Λειτουργία	-0.10 (0.57)	0.15 (0.55)	0.16 (0.51)	0.02 (0.89)
Μακροαντοφαγία	0.06 (0.71)	0.20 (0.44)	-0.20 (0.43)	0.17 (0.32)
Αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από Σαπερόνες	-0.27 (0.11)	-0.10 (0.69)	0.12 (0.63)	0.08 (0.63)

Πίνακας 4-4. Παρουσίαση γραμμικών συσχετίσεων με τη μέθοδο Spearman.

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή: Spearman's rho (unadjusted p-value)

Δέκα δείγματα από κάθε κατηγορία (CT – PD) είχαν μελετηθεί και στο πλαίσιο των μετρήσεων επιπέδων πρωτεϊνών συναφών με την αυτοφαγία και τη νόσο Πάρκινσον (βλ. ενότητα 4.1.1). Σε αυτά τα δείγματα πραγματοποιήθηκε μελέτη συσχέτισης, η οποία δεν ανέδειξε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (πίνακας 4-5), ενδεχομένως και λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων.

	Hsc70	Lamp2a	GCase
Συνολική Λυσοσωμική Λειτουργία	0.32 (0.17)	0.12 (0.61)	0.14 (0.56)
Μακροαντοφαγία	0.27 (0.25)	-0.1 (0.67)	0.04 (0.87)
Αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από Σαπερόνες	0.30 (0.19)	-0.09 (0.70)	-0.06 (0.80)

Πίνακας 4-5. Παρουσίαση γραμμικών συσχετίσεων με τη μέθοδο Spearman.

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή: Spearman's rho (unadjusted p-value)

4.2 Ερυθρά αιμοσφαίρια

Συνολικά μετρήθηκαν τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης σε 148 δείγματα μεμβρανών ερυθρών αιμοσφαιρίων από εθελοντές, χωρισμένα σε 4 κατηγορίες, αντίστοιχα με το διαχωρισμό των PBMCs (βλ. ενότητα 3.1). Οι υγιείς μάρτυρες χωρίστηκαν περαιτέρω σε 3 υποκατηγορίες (Controls 1-3, βλ. πίνακα 3-2 της ενότητας 3.1.2) για τους λόγους που προαναφέρθηκαν στην παραπάνω ενότητα για τα PBMCs. Κατ' αναλογία με τα PBMCs και για την αποτελεσματική και πλήρη

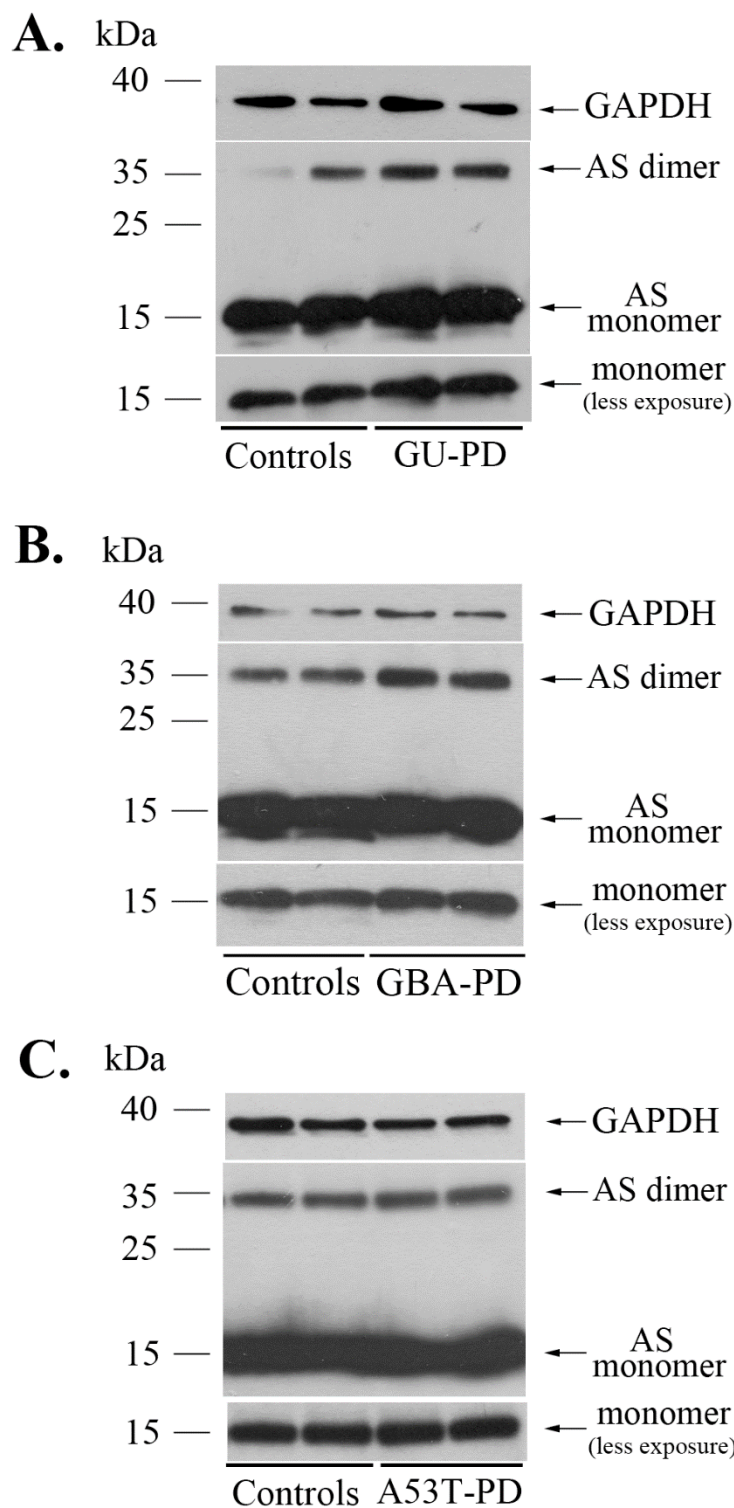
σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ δειγμάτων σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε ένα κοινό δείγμα (Master Sample), η συγκέντρωση του οποίου θεωρήθηκε ίση με τη μονάδα (1). Ο αριθμός των δειγμάτων σε κάθε κατηγορία αναφέρεται στον πίνακα 3-2.

Σε κάθε κατηγορία μετρήθηκαν τα επίπεδα δύο βασικών μορφών της α-συνουκλεΐνης, η μονομερής και η διμερής της μορφή, ενώ η GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς με σκοπό την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων ως προς την συνολική πρωτεϊνική συγκέντρωση των δειγμάτων.

Παράλληλα, για να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ των μορφών αυτών εξετάστηκε και υπολογίστηκε το πηλίκο των επιπέδων της διμερούς μορφής προς τη μονομερή. Πιο συγκεκριμένα, στις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε ο λογαριθμικός μετασχηματισμός του προαναφερθέντος πηλίκου. Η χρήση του μετασχηματισμού αυτού πραγματοποιήθηκε, καθώς η μαθηματική συμπεριφορά του λογαρίθμου όσον αφορά τις στατιστικές αναλύσεις είναι προτιμότερη από αυτή του απλού λόγου (Keene, 1995).

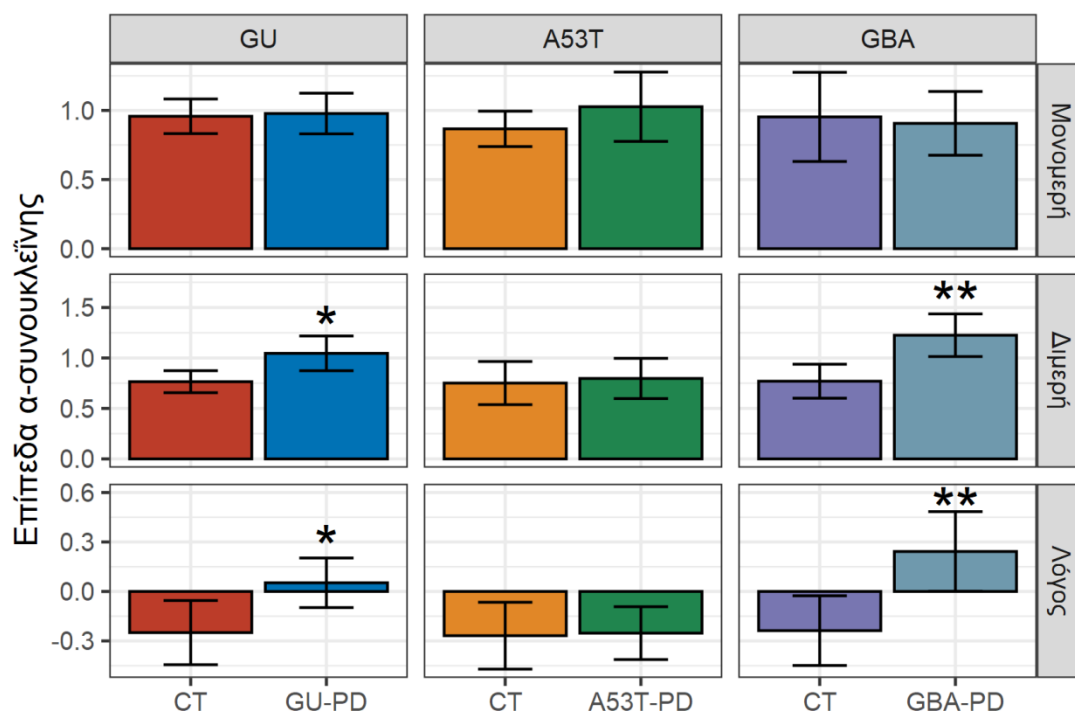
Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα της μονομερούς μορφής της α-συνουκλεΐνης. Αντίθετα, ανιχνεύτηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της διμερούς μορφής της α-συνουκλεΐνης μεταξύ των ασθενών με νόσο Πάρκινσον και των υγιών μαρτύρων στα άτομα φορείς μεταλλάξεων στο γονίδιο *GBA*, καθώς και στους ασθενείς αγνώστου γενετικού υποβάθρου (GU: $t = -2,76$ · $p = 0,007$; A53T $t = -0,32$ · $p = 0,74$; *GBA*: $t = -2,13$ · $p = 0,04$). Η διαφορά αυτή δεν βρέθηκε στην κατηγορία με τους φορείς της A53T (γραφήματα 4-5 α-β).

Ως άμεσο αποτέλεσμα των παραπάνω, ο (λογαριθμικά μετασχηματισμένος) λόγος των επιπέδων των δύο μορφών που μετρήθηκαν ήταν αυξημένος στους ασθενείς – φορείς *GBA* μεταλλάξεων και στους αγνώστου γενετικού υποβάθρου (GU: $W = 1154$ · $p = 0,016$; *GBA*: $W = 293$ · $p = 0,008$) (γραφήματα 4-5 α-β).



Εικόνα 4-3. Ανοσοαποτύπωση κατά Western και επίπεδα μορφών α-συνουκλεΐνης
Αντιπροσωπευτικές αποτυπώσεις κατά Western των μορφών της α-συνουκλεΐνης για τις ομάδες (A) GU-PD, (B) GBA-PD, και (C) A53T-PD έναντι των υγιών μαρτύρων.
Σε κάθε εικόνα περιλαμβάνεται στην πρώτη γραμμή η αποτύπωση της πρωτεΐνης GAPDH που χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς. Στην δεύτερη γραμμή η ταυτόχρονη αποτύπωση των μορφών της α-συνουκλεΐνης, ενώ στην τρίτη σειρά μόνο η μονομερής μορφή.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γράφημα 4-5α. Αποτελέσματα μέτρησης των επιπέδων α-συνουκλεΐνης από κυτταρικές μεμβράνες ερυθρών αιμοσφαιρίων με τη μέθοδο Western Blot.

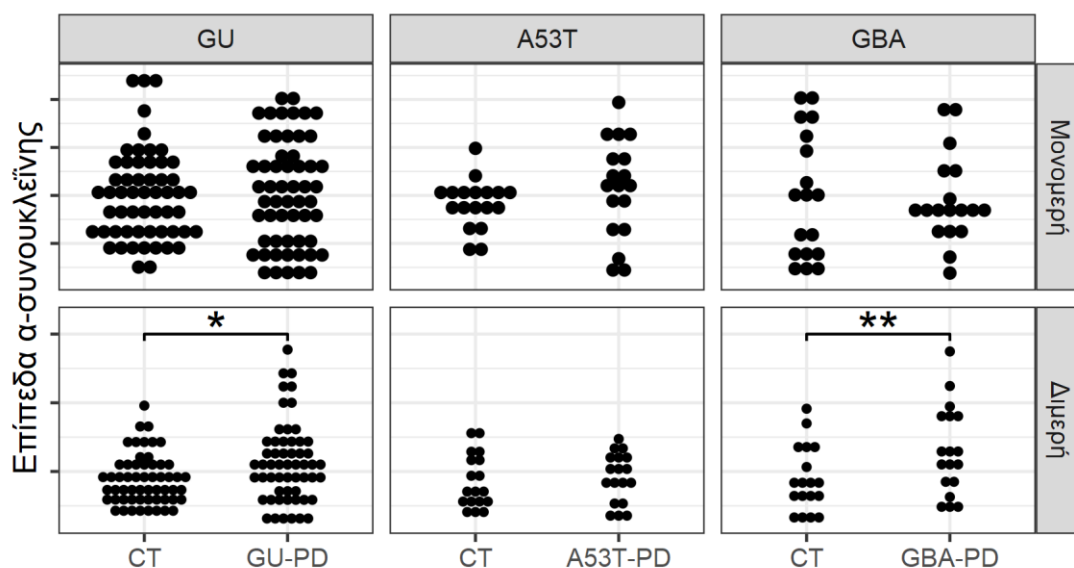
Οι τρεις γενετικές κατηγορίες στις οποίες χωρίστηκαν τα δείγματα αντιπροσωπεύονται στις στήλες του γραφήματος. Οι διαφορετικές μορφές της α-συνουκλεΐνης που μετρήθηκαν παρουσιάζονται στις δύο πρώτες γραμμές του γραφήματος, ενώ στην τρίτη παρουσιάζεται ο λογάριθμος του πηλίκου των επιπέδων της διμερούς προς την μονομερή μορφή.

Αριθμός δειγμάτων κατά γενετική κατηγορία: GU n=56, A53T n=18, GBA n=18.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή μέσος όρος $\pm$ 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Σε όλες τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα της GAPDH ως πρωτεΐνη αναφοράς.

Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται ως, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$.



Γράφημα 4-5β. Αποτελέσματα μέτρησης των επιπέδων της α-συνουκλεΐνης με τη μέθοδο Western Blot.

Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του γραφήματος 4-5α με τη μορφή διαγράμματος διασποράς.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων οποιασδήποτε από τις μορφές της α-συνουκλεΐνης που μελετήθηκαν, με την ηλικία, τη διάρκεια της νόσου ή τα κλινικά της χαρακτηριστικά, όπως λ.χ. η βαρύτητα των κινητικών ή νοητικών ελλειμμάτων (μετρημένα αντίστοιχα με τις κλίμακες UPDRS και MMSE, όπως προαναφέρθηκε) (πίνακας 4-6).

	Μονομερή	Διμερή	Λόγος
Ηλικία Μελέτης	0,188 (0,06)	0,291 (0,003)	0,137 (0,17)
Ηλικία Έναρξης	0,176 (0,231)	0,307 (0,034)	0,135 (0,36)
Διάρκεια Νόσου	0,018 (0,906)	-0,083 (0,573)	-0,055 (0,709)
UPDRS III score	-0,103 (0,56)	0,019 (0,914)	0,153 (0,389)
MMSE	0,07 (0,498)	-0,08 (0,407)	-0,14 (0,177)

Πίνακας 4-6. Παρουσίαση γραμμικών συσχετίσεων με τη μέθοδο Spearman.

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή: Spearman's rho (unadjusted p-value)

4.3 Εγκεφαλικοί ιστοί

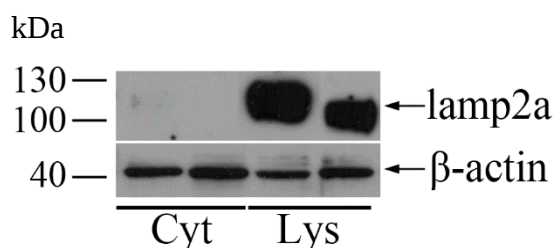
4.3.1 Επίπεδα πρωτεϊνών

Από τις συνολικά επτά περιοχές που υπήρχαν διαθέσιμες χρησιμοποιήθηκαν αρχικά δύο, η μέλαινα ουσία και ο μετωπιαίος λοβός. Οι περιοχές αυτές επιλέχθηκαν καθώς είναι από τις βασικές εγκεφαλικές περιοχές που επηρεάζονται στη νόσο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πάρκινσον (βλ. ενότητα *Εισαγωγή*). Η περιοχή της μέλαινας ουσίας εμφανίζει εκτεταμένη νευροεκφύλιση, ενώ αυτή είναι πολύ πιο περιορισμένη στον μετωπιαίο λοβό.

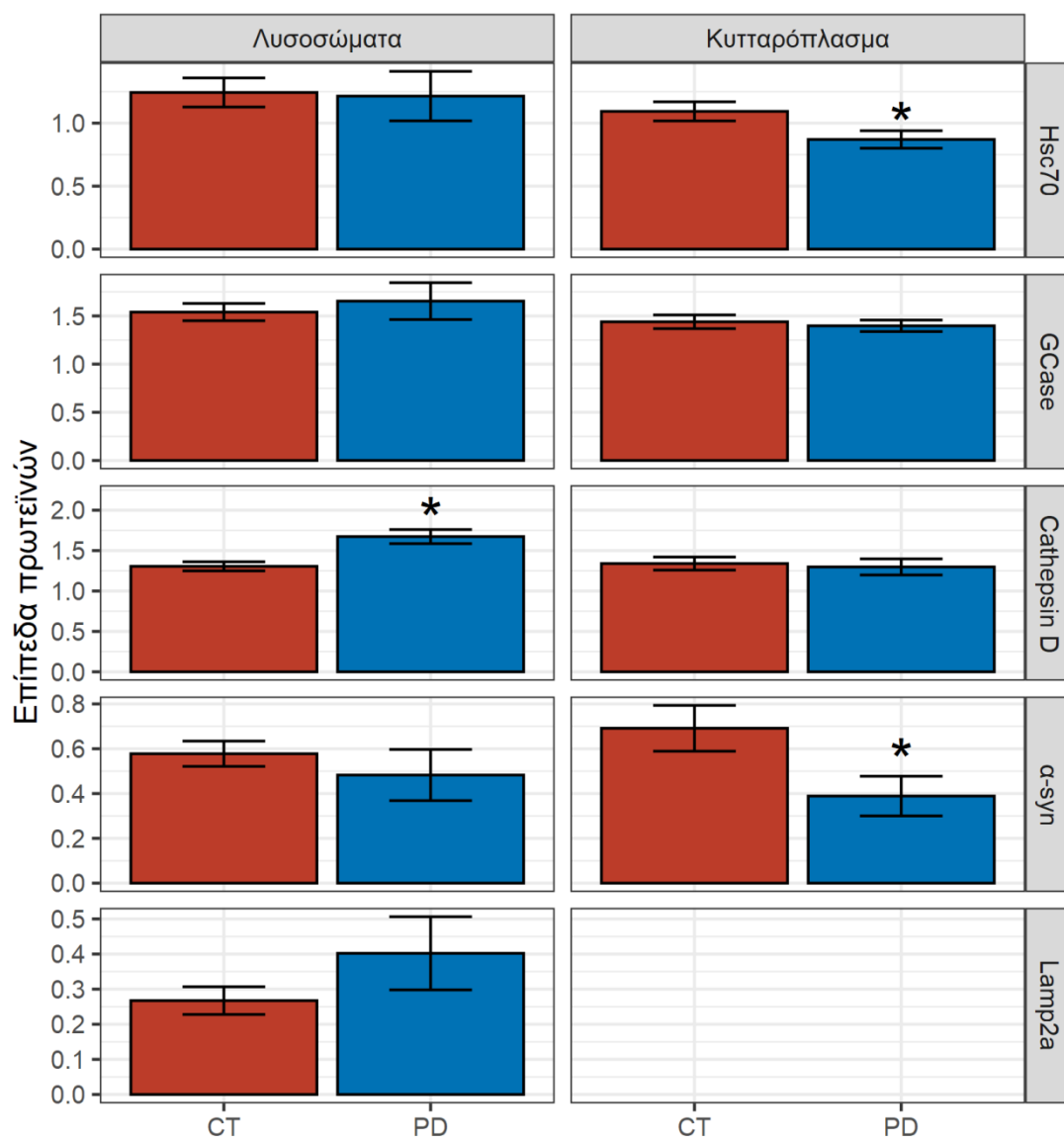
Παράλληλα, για την καλύτερη κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών της νόσου και τον εντοπισμό πιθανών δυσλειτουργιών, η μέτρηση των πρωτεϊνικών επιπέδων πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά στα διάφορα κλάσματα του κυττάρου (βλ. ενότητα 3.11). Έτσι, εξετάστηκαν ξεχωριστά τα επίπεδα των πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα και τα λυσοσώματα (εικόνες 4-5, 4-6). Στα λυσοσώματα εξετάστηκαν οι πρωτεΐνες: Lamp2a, Hsc70, GCase, Cathepsin D και α-συνουκλεΐνη, ενώ ως πρωτεΐνη αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η Lamp1. Αντίστοιχα στο κυτταρόπλασμα μετρήθηκαν οι παραπάνω πρωτεΐνες με τη χρήση όμως της β-ακτίνης ως πρωτεΐνης αναφοράς. Τα επίπεδα της Lamp2a στο κυτταρόπλασμα ήταν κάτω από τον ουδό ανίχνευσης της Western, επομένως δεν αξιολογήθηκαν (εικόνα 4-4).



Εικόνα 4-4. Σύγκριση επιπέδων Lamp2a σε κυτταροπλασματικό και λυσοσωμικό κλάσμα. Τα δείγματα στην αριστερή στήλη προήλθαν από το κυτταροπλασματικό κλάσμα, ενώ στη δεξιά στήλη από λυσοσωμικό κλάσμα εκχυλίσματος κυττάρων της μέλαινας ουσίας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στους ασθενείς με νόσο Πάρκινσον υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της Hsc70 ($t = 2,17$; $p = 0,044$) και της α-συνουκλεΐνης ($t = 2,23$; $p = 0,042$) στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων της μέλαινας ουσίας, ενώ υπήρξε αύξηση στα επίπεδα της Cathepsin D στο λυσοσωμικό κλάσμα ($t = 2,44$; $p = 0,025$) (εικόνα 4-5 και γράφημα 4-6). Υπήρξε, επίσης, αύξηση των επιπέδων της Lamp2a στο λυσοσωμικό κλάσμα, η διαφορά όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



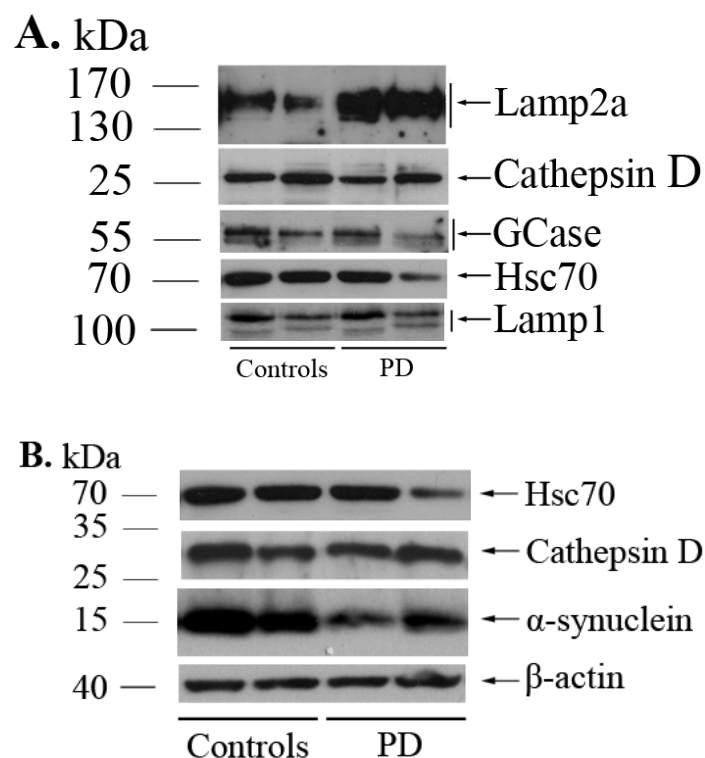
Γράφημα 4-6. Αποτελέσματα μέτρησης πρωτεϊνικών επιπέδων από κύτταρα της μέλαινας ουσίας με τη μέθοδο Western Blot.

Αποτελέσματα από τις μετρήσεις των πρωτεϊνικών επιπέδων στα κύτταρα της μέλαινας ουσίας.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα.

Στις μετρήσεις στο κυτταροπλασματικό κλάσμα χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα της β-ακτίνης ως πρωτεΐνη αναφοράς, ενώ στο λυσοσωμικό κλάσμα χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα της Lamp1.

Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται ως *, $p < 0,05$.



Εικόνα 4-5. Ανοσοαποτύπωση κατά Western και πρωτεϊνικά επίπεδα στην μέλαινα ουσία

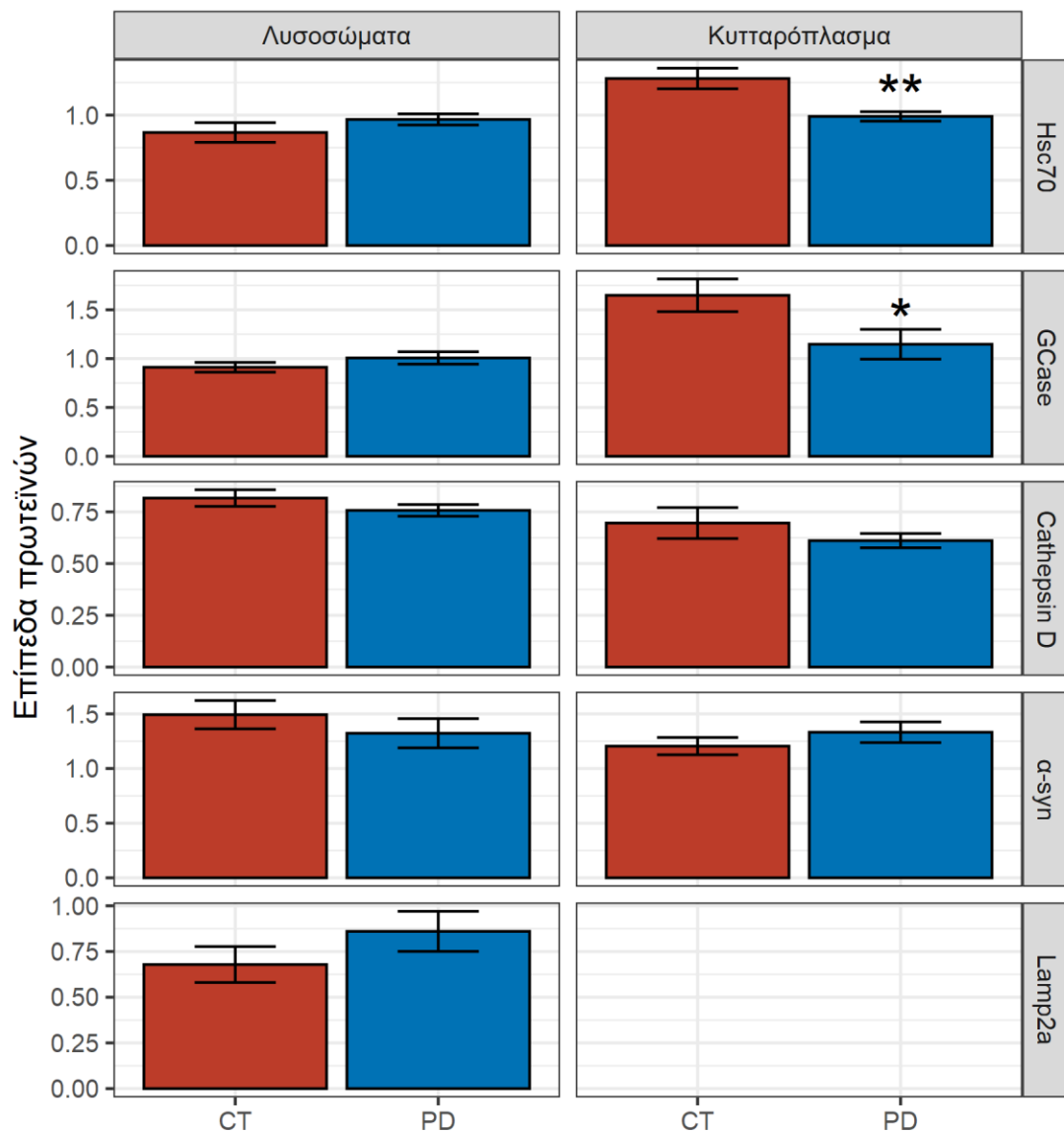
Αντιπροσωπευτικές αποτυπώσεις κατά Western των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν στην μέλαινα ουσία στο (Α) λυσοσωμικό και στο (Β) κυτταροπλασματικό κλάσμα.

Στις δύο εικόνες περιλαμβάνεται η αποτύπωση της αντίστοιχης πρωτεΐνης αναφοράς: (Α) Lamp1 και (Β) β -ακτίνη.

Δεν παρουσιάστηκε κάποια διαφορά στα πρωτεϊνικά επίπεδα στα λυσοσώματα του μετωπιαίου λοβού. Αντίθετα, στο κυτταροπλασματικό κλάσμα βρέθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της GCase ($t = 2,21$; $p = 0,44$) και της Hsc70 ($t = 3,35$; $p = 0,008$) (εικόνα 4-6 και γράφημα 4-7).

Ένα κοινό εύρημα τόσο στη μέλαινα ουσία όσο και στον μετωπιαίο λοβό είναι η ύπαρξη αυξητικής τάσης στα επίπεδα του Lamp2a στους ασθενείς με νόσο Πάρκινσον σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Η διαφορά αυτή δεν είναι όμως στατιστικά σημαντική, πιθανώς λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων και της μεγάλης σχετικά διασποράς των τιμών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γράφημα 4-7. Αποτελέσματα μέτρησης πρωτεϊνικών επιπέδων από κύτταρα του μετωπιαίου λοβού με τη μέθοδο Western Blot.

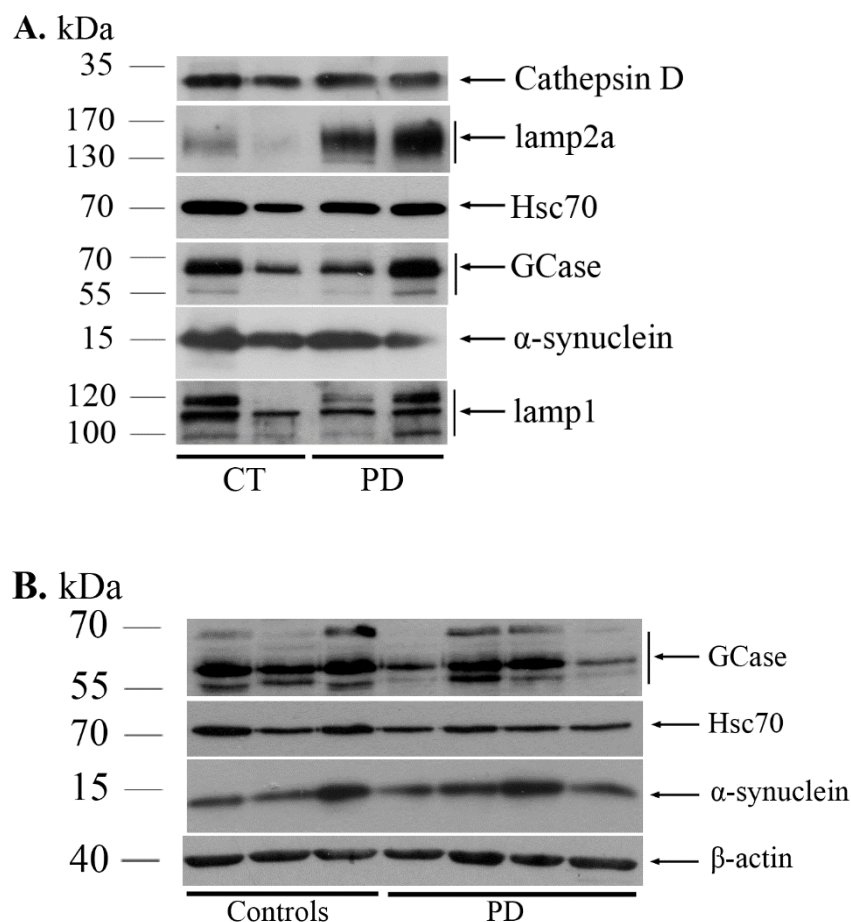
Αποτελέσματα από τις μετρήσεις των πρωτεϊνικών επιπέδων στον μετωπιαίο λοβό.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα.

Στις μετρήσεις στο κυτταροπλασματικό κλάσμα χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα της β-ακτίνης ως πρωτεΐνη αναφοράς, ενώ στο λυσοσωμικό κλάσμα χρησιμοποιήθηκαν τα επίπεδα της Lamp1.

Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται ως, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 4-6. Ανοσοαποτυπώση κατά Western και πρωτεϊνικά επίπεδα στον μετωπιαίο λοβό

Αντιπροσωπευτικές αποτυπώσεις κατά Western των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν στον μετωπιαίο λοβό στο (A) λυσοσωμικό και στο (B) κυτταροπλασματικό κλάσμα.

Στις δύο εικόνες περιλαμβάνεται η αποτύπωση της αντίστοιχης πρωτεΐνης αναφοράς: (A) Lamp1 και (B) β-ακτίνη.

Πέραν των προαναφερθέντων, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στα επίπεδα των υπόλοιπων πρωτεϊνών που μελετήθηκαν.

Παράλληλα, δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των διαφόρων πρωτεϊνών που μελετήθηκαν με την ηλικία και τη διάρκεια της νόσου. Επίσης, ο χρόνος μέχρι την ταρίχευση δεν βρέθηκε να επηρεάζει τα αποτελέσματα των μετρήσεων των πρωτεϊνικών επιπέδων στα κυτταρικά εκχυλίσματα από την μέλαινα ουσία ή τον μετωπιαίο λοβό (πίνακες 4-7 και 4-8).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μέλαινα ουσία		Ηλικία Έναρξης	Διάρκεια Νόσου	Ηλικία	Χρόνος Ταρίχευσης
Λυσοσώματα	Hsc70	-0,15 (0,693)	-0,108 (0,781)	-0,29 (0,217)	0,201 (0,393)
	GCase	0,024 (0,934)	-0,059 (0,885)	0,244 (0,299)	0,058 (0,804)
	Cathepsin D	0,064 (0,848)	-0,423 (0,234)	0,229 (0,331)	-0,004 (0,989)
	α -συνουκλεΐνη	0,269 (0,445)	-0,273 (0,459)	-0,117 (0,626)	0,031 (0,893)
	Lamp2a	-0,261 (0,48)	0,368 (0,291)	0,002 (0,991)	0,289 (0,216)
Κυτταρό-πλάσμα	Hsc70	0,064 (0,848)	-0,343 (0,344)	-0,172 (0,47)	-0,285 (0,225)
	Gcase	-0,025 (0,959)	-0,332 (0,361)	-0,226 (0,341)	0,087 (0,714)
	Cathepsin D	-0,321 (0,379)	-0,17 (0,653)	0,073 (0,757)	-0,086 (0,72)
	α -συνουκλεΐνη	-0,173 (0,647)	-0,181 (0,631)	-0,442 (0,019)	0,076 (0,747)

Πίνακας 4-7. Παρουσίαση γραμμικών συσχετίσεων με τη μέθοδο Spearman για τη μέλαινα ουσία.

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή: Spearman's rho (unadjusted p-value)

Μετωπιαίος Λοβός		Ηλικία Έναρξης	Διάρκεια Νόσου	Ηλικία	Χρόνος Ταρίχευσης
Λυσοσώματα	Hsc70	-0,304 (0,406)	0,225 (0,523)	0,292 (0,211)	0,217 (0,357)
	GCase	-0,084 (0,832)	-0,124 (0,748)	0,048 (0,838)	-0,175 (0,463)
	Cathepsin D	0,111 (0,748)	0,167 (0,635)	0,144 (0,542)	-0,296 (0,206)
	α -συνουκλεΐνη	0,028 (0,926)	0,2 (0,57)	-0,103 (0,668)	-0,301 (0,198)
	Lamp2a	0,027 (0,927)	0,092 (0,788)	-0,121 (0,613)	0,39 (0,088)
Κυτταρό-πλάσμα	Hsc70	0,316 (0,367)	-0,443 (0,21)	-0,018 (0,941)	-0,178 (0,455)
	Gcase	0,11 (0,75)	0,397 (0,251)	0,053 (0,822)	-0,381 (0,098)
	Cathepsin D	-0,221 (0,554)	-0,118 (0,759)	-0,222 (0,349)	0,214 (0,364)
	α -συνουκλεΐνη	0,152 (0,664)	0,054 (0,871)	-0,112 (0,64)	0,377 (0,101)

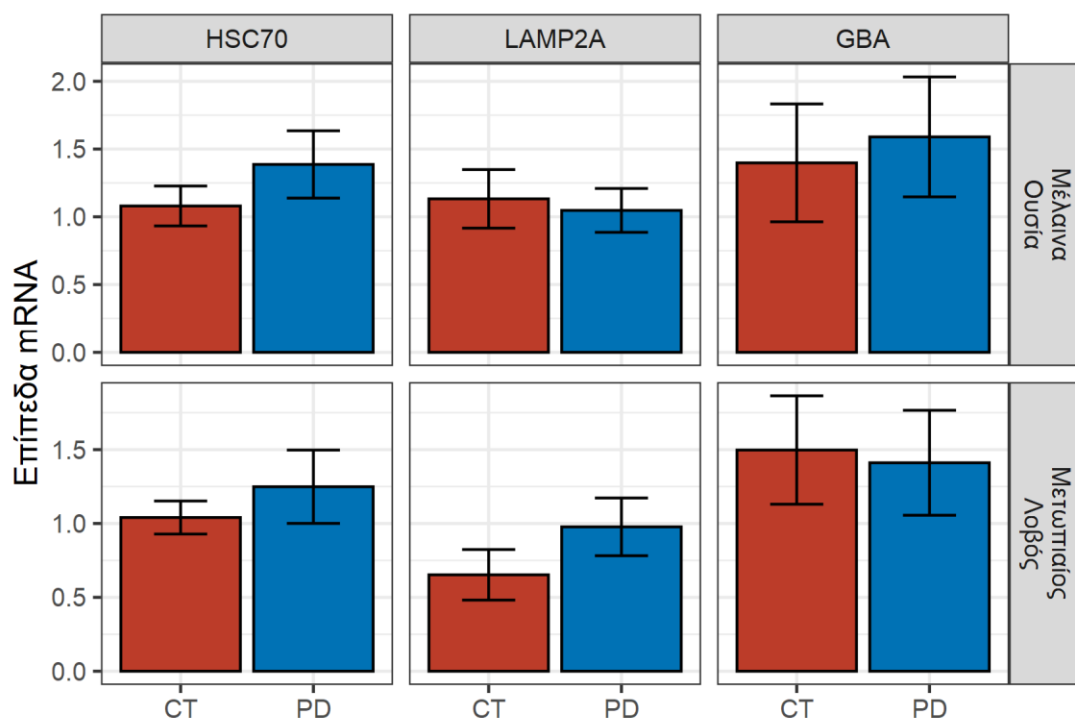
Πίνακας 4-8. Παρουσίαση γραμμικών συσχετίσεων με τη μέθοδο Spearman για το μετωπιαίο λοβό.

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή: Spearman's rho (unadjusted p-value)

4.3.2 Επίπεδα mRNA

Όλα τα δείγματα που υπήρχαν διαθέσιμα χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή mRNA και τη συνακόλουθη μέτρηση των επιπέδων του με τη μέθοδο της Real-Time PCR. Η απομόνωση έγινε τόσο από τμήμα της μέλαινας ουσίας, όσο και από τμήμα του μετωπιαίου λοβού. Έγινε έλεγχος για τα μετάγραφα των γονιδίων *HSC70*, *LAMP2A*, *GBA*, ενώ το μετάγραφο γονίδιο *GAPDH* χρησιμοποιήθηκε ως mRNA αναφοράς.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Γράφημα 4-8. Αποτελέσματα μέτρησης των επιπέδων mRNA από εκχύλισμα εγκεφαλικών ιστών με τη μέθοδο Real Time PCR.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή μέσος όρος $\pm$ τυπικό σφάλμα.

Τα επίπεδα του mRNA δεν διέφεραν ανάμεσα στους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς με νόσο Πάρκινσον σε κανένα από τα δύο τμήματα του εγκεφάλου που μελετήθηκαν (γράφημα 4-8). Τέλος, η ανάλυση των γραμμικών συσχετίσεων δεν κατέδειξε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση σε αυτές που εξετάστηκαν (πίνακας 4-9).

		Ηλικία Έναρξης	Διάρκεια Νόσου	Ηλικία	Χρόνος Ταρίχευσης
Μέλαινα Ουσία	HSC70	0,062 (0,852)	0,195 (0,58)	-0,298 (0,203)	-0,177 (0,457)
	LAMP2A	0,078 (0,819)	0,321 (0,359)	-0,232 (0,328)	-0,002 (0,997)
	GBA	0,062 (0,852)	-0,02 (0,97)	0,334 (0,149)	0,125 (0,597)
Μετωπιαίος Λοβός	HSC70	0,09 (0,793)	0,298 (0,396)	0,356 (0,122)	-0,076 (0,753)
	LAMP2A	0,34 (0,33)	-0,123 (0,749)	-0,279 (0,235)	-0,318 (0,174)
	GBA	0,354 (0,31)	0,178 (0,614)	0,363 (0,115)	-0,131 (0,585)

Πίνακας 4-9. Παρουσίαση γραμμικών συσχετίσεων με τη μέθοδο Spearman.

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή: Spearman's rho (unadjusted p-value)

4.4 Προσδιορισμός διακριτικής ευχέρειας βιοδεικτών

Για την εκτίμηση της χρησιμότητας των αποτελεσμάτων μίας μέτρησης ως δοκιμασίας για την διάγνωση μιας νόσου χρησιμοποιείται η ανάλυση της καμπύλης του λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη (Receiver Operating Characteristic Curve, ROC Curve).

Η ανάλυση αυτή μας βοηθάει στην εύρεση του ιδανικού ουδού για τον διαχωρισμό της εξέτασης μεταξύ υγιών και ασθενών ατόμων, ενώ η περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve, AUC) μας δείχνει πόσο κατάλληλος είναι ο διαγνωστικός δείκτης στο να διαχωρίζει τα πάσχοντα από τα υγιή άτομα.

Ακόμη, δύο πολύ σημαντικοί επιδημιολογικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην καθημερινή ιατρική πράξη είναι η ειδικότητα και η ευαισθησία μιας διαγνωστικής δοκιμασίας, στοιχεία τα οποία επηρεάζουν εν πολλοίς τη λήψη των θεραπευτικών αποφάσεων.

Στην παρούσα διατριβή όσον αφορά το συγκεκριμένο κομμάτι η ανάλυση περιορίζεται μόνο στις κατηγορίες των υγιών μαρτύρων και ασθενών με νόσο Πάρκινσον αγνώστου γενετικού υποβάθρου. Ο λόγος είναι πως η διάγνωση της νόσου είναι κλινική χωρίς την ύπαρξη κάποιας εύκολης και χαμηλού κόστους διαγνωστικής εξέτασης, οπότε σε αυτόν τον τομέα παρατηρούνται οι μεγαλύτερες ελλείψεις. Για τις γενετικές μορφές, αντιθέτως, υπάρχουν πάρα πολλές εξετάσεις αλληλούχισης του DNA και συνήθως έπονται της διάγνωσης της νόσου.

Ευνόητο είναι πως επειδή η εξαγωγή και απομόνωση εγκεφαλικών ιστών είναι ανέφικτη κατά τη διάρκεια της ζωής των ασθενών η χρήση των παραπάνω αποτελεσμάτων ως βάση διαγνωστικών εξετάσεων είναι αδύνατη. Επομένως, τα αποτελέσματα αυτά δεν συμπεριλήφθηκαν σε αυτό το τμήμα της ανάλυσης.

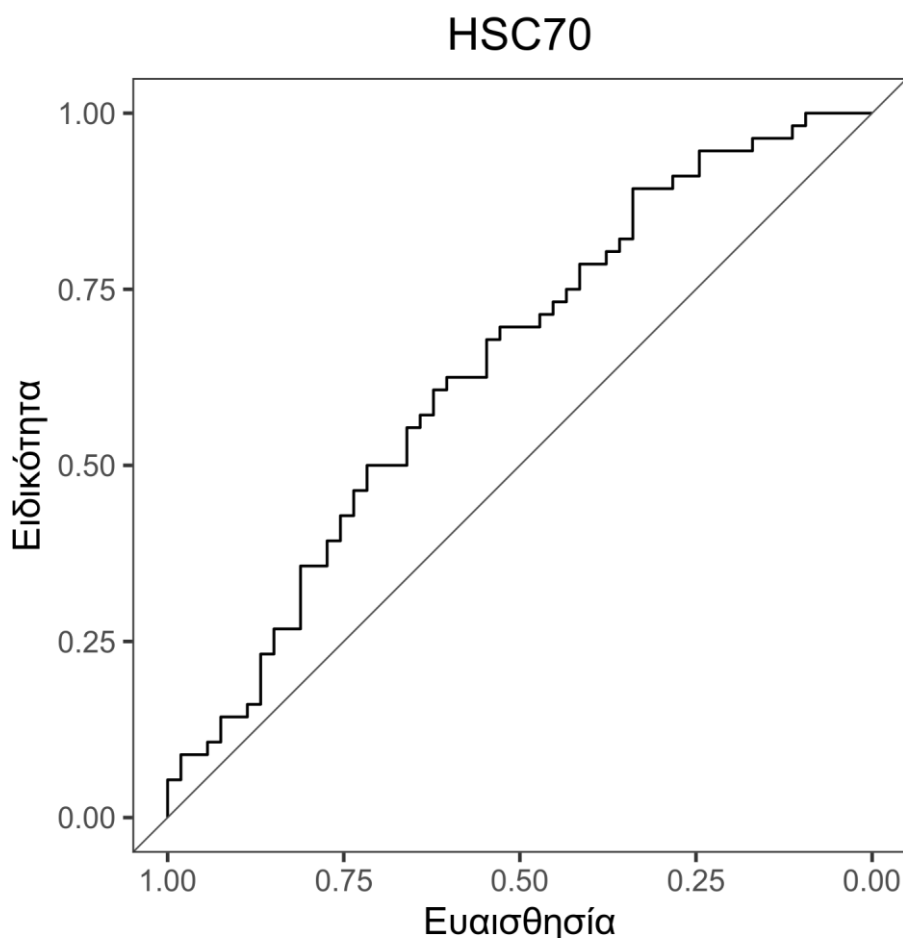
4.4.1 Hsc70 στα Μονοπύρρηνα Κύτταρα του Περιφερικού Αίματος

Το κοινό εύρημα σε όλες τις κατηγορίες ασθενών είναι η μείωση της πρωτεΐνης Hsc70 στα PBMCs. Οι υπόλοιπες διαφορές που παρατηρήθηκαν περιορίζονται μόνο στις γενετικής αιτιολογίας μορφές της νόσου, επομένως δεν εξετάστηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης ανάλυσης.

Η AUC της συγκεκριμένης εξέτασης είναι 0,641 με 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0,537 – 0,745, ενώ η ευαισθησία της είναι 60,7% (46,8% - 73,5%) και

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

η ειδικότητά της είναι 62,3% (47,9% – 75,2%). Στο γράφημα 4-9 παρατίθεται η καμπύλη ROC.



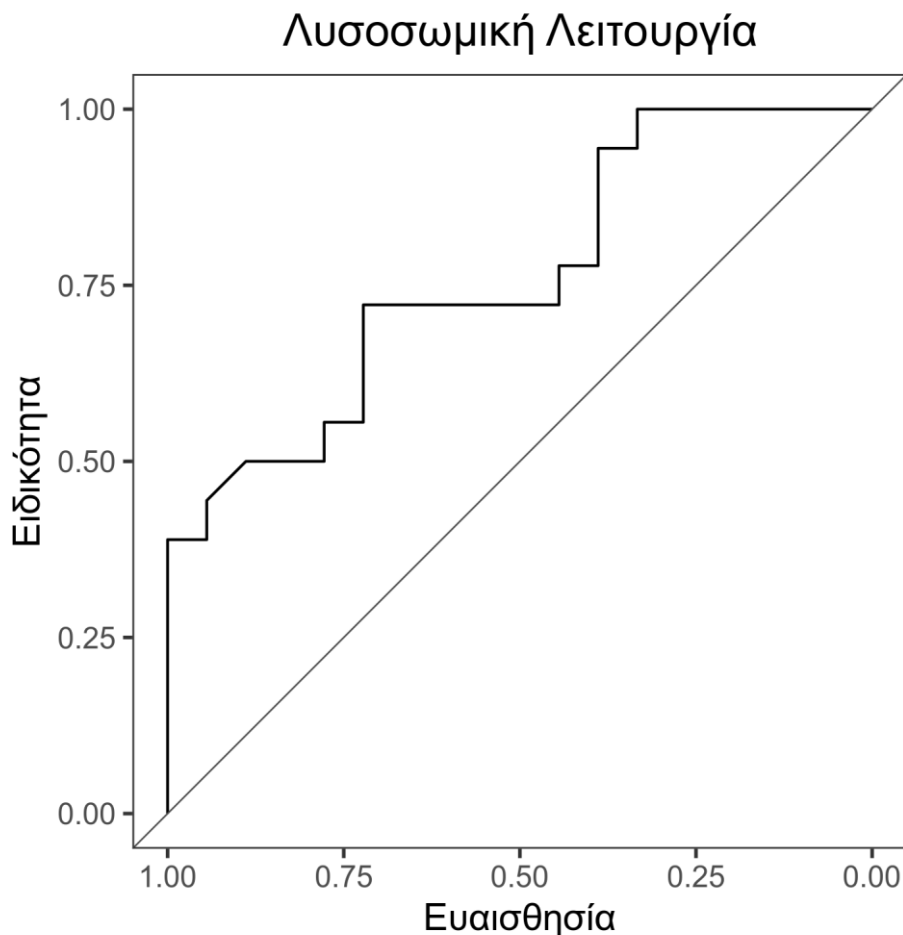
Γράφημα 4-9. Καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη για την πρωτεΐνη Hsc70 στα PBMCs.

4.4.2 Λυσοσωμική λειτουργία Μονοπύρηνων Κυττάρων Περιφερικού

Αίματος

Το μονοπάτι λυσοσώματος – αυτοφαγίας φαίνεται να παρουσιάζει μειωμένη λειτουργικότητα στα PBMCs, τόσο όταν μελετάται η λειτουργία του στο σύνολο της, όσο και στα επιμέρους μονοπάτια του. Για τον έλεγχο της καταλληλότητας ως διαγνωστικής εξέτασης στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε μόνο ένα από τα μονοπάτια, καθώς η χρήση και των τριών ταυτόχρονα θα οδηγούσε σε πλεονασμό, επειδή είναι σημαντικού βαθμού η στατιστική συσχέτιση μεταξύ τους. Επιλέχθηκε η συνολική λυσοσωμική λειτουργία γιατί αποτελεί το άθροισμα των άλλων δυο μονοπατιών και ως εκ τούτου εμπεριέχει στατιστικά τα στοιχεία των άλλων δύο.

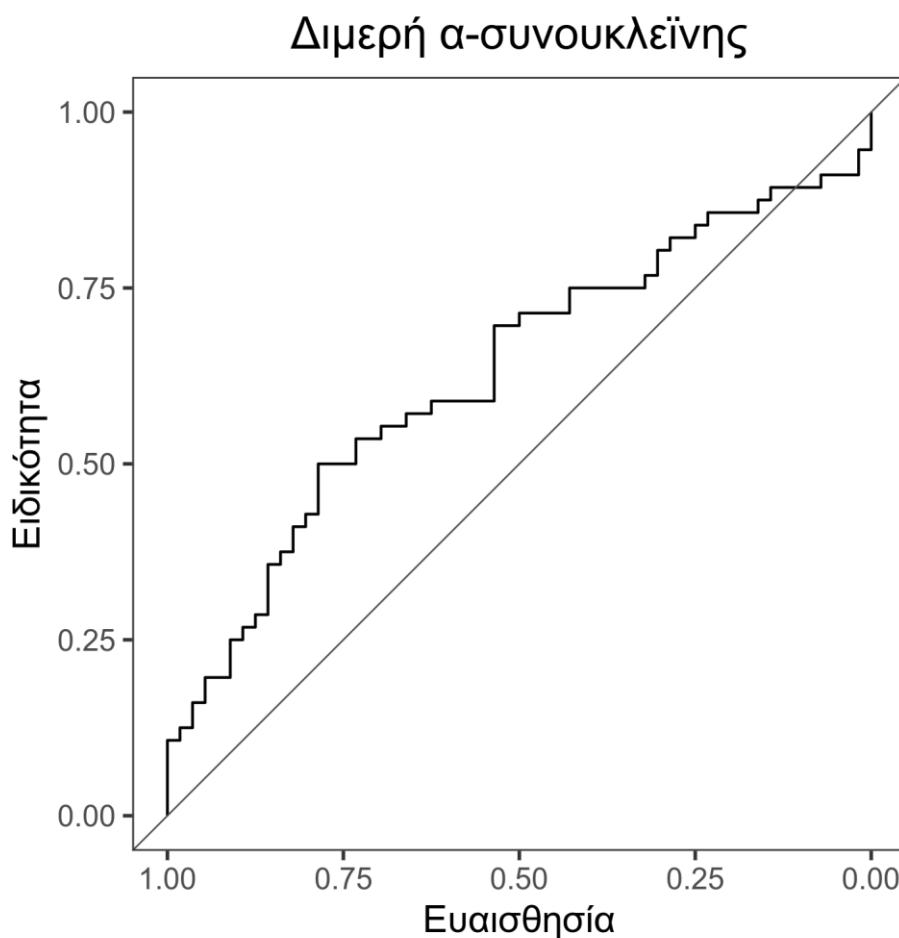
Η AUC της συγκεκριμένης εξέτασης είναι 0,764 με 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0,608 – 0,92, ενώ η ευαισθησία και η ειδικότητα της είναι 72,2% (46,5% – 90,3%) (γράφημα 4-10).



Γράφημα 4-10. Καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη για λυσοσωμική λειτουργία των PBMCs.

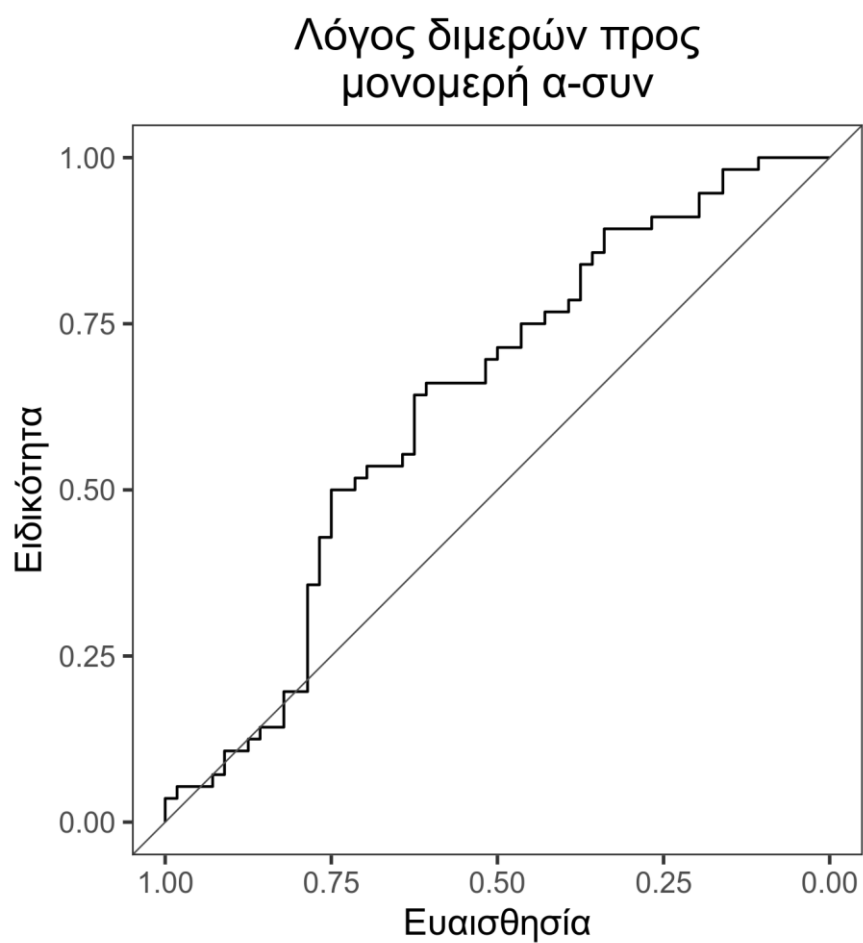
4.4.3 Διμερής μορφή α-συνουκλεΐνης στα Ερυθρά Αιμοσφαίρια

Στον έλεγχο που πραγματοποιήθηκε στα ερυθρά αιμοσφαίρια η βασική διαφορά που παρατηρήθηκε μεταξύ υγιών μαρτύρων και ασθενών με νόσο Πάρκινσον ήταν στην αυξημένη συγκέντρωση της α-συνουκλεΐνης σε διμερή σύμπλοκα σε σχέση με την παρουσία της στην κυτταρική μεμβράνη σε μονομερή μορφή. Λόγω της διαφοράς αυτής αυξημένος παρατηρήθηκε και ο λόγος των διμερών προς τις μονομερείς μορφές της α-συνουκλεΐνης στις μεμβράνες των ερυθρών αιμοσφαιρίων.



Γράφημα 4-11α. Καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη για τις διμερείς μορφές της α-συνουκλεΐνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Η AUC της εξέτασης για τα διμερή σύμπλοκα είναι 0,63 με 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0,525 – 0,735, ενώ η ευαισθησία της είναι 53,6% (39,7% – 67%) και η ειδικότητά της είναι 73,2% (59,7% – 84,2%) (γράφημα 4-11 α). Αντίστοιχα, για τον λόγο η AUC είναι πάλι 0,63 με 95% ΔΕ 0,527 – 0,737, ενώ η ευαισθησία της είναι 64,2% (50,3% - 76,6%) και η ειδικότητά της είναι 62,5% (48,5% – 75,1%) (γράφημα 4-11 β).



Γράφημα 4-11β. Καμπύλη λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη για το λόγο των διμερών προς τις μονομερείς μορφές της α-συνουκλεΐνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διατριβή ερευνήθηκε κατά πόσο οι συστημικές μεταβολές στις βασικές λυσοσωμικές πρωτεΐνες, οι οποίες μπορούν να αντανakλούν παρόμοιες μεταβολές στον εγκέφαλο, εμφανίζονται σε μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMC) τα ανωτέρω κύτταρα προήλθαν από ασθενείς με νόσο Πάρκινσον με διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα: 1) απροσδιορίστου γενετικού υποβάθρου (GU-PD), 2) φορείς της c.G209A/p.A53T σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο που κωδικοποιεί την α-συνουκλεΐνη (A53T-PD), και 3) φορείς διαφόρων μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη β-γλυκοσερεβροσιδάση (GBA-PD) (βλέπε ενότητα 3.1.1 *Διαχωρισμός δειγμάτων σε γενετικές κατηγορίες*).

Τα ευρήματα αποκάλυψαν μια σημαντική μείωση των επιπέδων της σαπερόνης Hsc70 στα PBMC που προήλθαν από όλες τις ομάδες ασθενών με νόσο Πάρκινσον σε σχέση με υγιείς μάρτυρες αντιστοιχισμένους ως προς το φύλο και την ηλικία. Παράλληλα, το mRNA που προερχόταν από τη μεταγραφή του γονιδίου *HSC70* βρέθηκε μειωμένο μόνο στην ομάδα GU-PD, αλλά όχι στις γενετικές ομάδες A53T-PD και GBA-PD. Αντίστοιχα, η πρωτεΐνη GCase βρέθηκε μειωμένη στις ομάδες A53T-PD και GBA-PD, αλλά όχι στην ομάδα GU-PD. Αυτή η μείωση της GCase συνδέεται με στατιστικά σημαντική μείωση της ενζυμικής ενεργότητας μόνο στους ασθενείς φορείς μεταλλάξεων του *GBA* γονιδίου, στοιχείο ενδεικτικό της απώλειας της λειτουργικότητας της GCase λόγω της ύπαρξης μεταλλαγμένου αλληλόμορφου στους ασθενείς της ομάδας αυτής. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, ότι τα επίπεδα του *GBA* mRNA βρέθηκαν αυξημένα στην παραπάνω ομάδα (Papagiannakis et al., 2015).

Δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στα επίπεδα της πρωτεΐνης Lamp2a και στους δείκτες της μακροαυτοφαγίας LC3-II και p62 μεταξύ των διαφόρων ομάδων που εξετάστηκαν.

Πληθώρα μελετών έχει δείξει μεταβολές στα επίπεδα βασικών πρωτεϊνών-δεικτών της λειτουργίας των λυσοσωμικών μονοπατιών σε εγκεφάλους ασθενών με νόσο Πάρκινσον συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες (Alvarez-Erviti et al., 2010; Gegg et al., 2012; Murphy et al., 2014) και την ενσωμάτωσή τους στα σωματίδια Lewy (Chu et al., 2009; Dehay et al., 2010; Goker-Alpan et al., 2010). Τέτοια λυσοσωμικά ελλείμματα μπορούν δυνητικά να εξηγήσουν όχι μόνο τη δυσλειτουργία / απόπτωση των ντοπαμινεργικών νευρώνων, αλλά και τη συνάθροιση της α-συνουκλεΐνης, μιας

πολύ σημαντικής πρωτεΐνης για την παθογένεια της νόσου. Το ερώτημα που τέθηκε προς απάντηση όταν ξεκίνησε η παρούσα έρευνα ήταν εάν αυτές οι διαφορές μπορούν να ανιχνευτούν σε περιφερικούς ιστούς ασθενών.

Η πρώτη μελέτη που προσπάθησε να απαντήσει στο ερώτημα αυτό ανέδειξε μειωμένα επίπεδα Lamp2a και αυξημένα επίπεδα LC3-II στα PBMC που προήλθαν από ασθενείς με νόσο Πάρκινσον σε σχέση με απομονωμένα από υγιείς μάρτυρες (Wu et al., 2011). Σε νεότερη μελέτη βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα τόσο της πρωτεΐνης Hsc70 όσο και του αντίστοιχου mRNA στα PBMC ασθενών δίχως όμως αλλαγές στην Lamp2a (Sala et al., 2014). Και οι δύο αυτές μελέτες χρησιμοποίησαν δείγματα από ασθενείς με ιδιοπαθή νόσο Πάρκινσον χωρίς κάποια γνωστή μετάλλαξη σχετιζόμενη με τη νόσο. Η παρούσα μελέτη ήταν η πρώτη που ανέδειξε μεταβολές σε γενετικά σχετιζόμενες μορφές της νόσου (Papagiannakis et al., 2015) καθώς μέχρι τότε δεν υπήρχαν δημοσιευμένα στοιχεία για δυνητικές συστημικές λυσοσωμικές διακυμάνσεις στους συγκεκριμένους τύπους της ασθένειας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έδειξαν μείωση στα επίπεδα της Hsc70 και του αντίστοιχου mRNA σε PBMC απομονωμένα από ασθενείς αγνώστου γενετικού υποβάθρου και συμφωνούν με την αντίστοιχη μελέτη που διεξήγαγαν η Sala και συνεργάτες (2014), όπως και με άλλες που ανέφεραν μειωμένα επίπεδα της Hsc70 σε εγκεφάλους ασθενών με νόσο Πάρκινσον (Alvarez-Erviti et al., 2010; Chu et al., 2009; Mandel et al., 2005; Murphy et al., 2015).

Μία από τις κύριες συνεισφορές της παρούσας μελέτης είναι η παρουσίαση δεδομένων που έδειξαν ότι τα χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης Hsc70 εμφανίστηκαν όχι μόνο στους ασθενείς χωρίς γνωστή γενετική επιβάρυνση, αλλά και στους ασθενείς με γνωστή γενετική επιβάρυνση, όπως η A53T μετάλλαξη στο γονίδιο της α-συνουκλείνης και οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της γλυκοσερεβροσιδάσης.

Ενδιαφέρον είναι, ότι η μείωση των επιπέδων του mRNA από τη μεταγραφή του γονιδίου βρέθηκε μόνο στα κύτταρα των ασθενών αγνώστου γενετικού υποβάθρου κι όχι σε παρκινσονικούς ασθενείς με γενετική επιβάρυνση. Αυτό είναι ενδεικτικό της παρουσίας εναλλακτικών μηχανισμών ρύθμισης της συγκέντρωσης της Hsc70 σε μετα-μεταγραφικό ή μεταφραστικό επίπεδο, που οδηγούν σε μείωση της συγκέντρωσης της σχετικής πρωτεΐνης.

Η μείωση της συγκέντρωσης της Hsc70 στους ασθενείς φορείς μεταλλάξεων στα γονίδια *SNCA* και *GBA* μπορεί να οφείλεται στην ταχύτερη αποικοδόμηση της από το πρωτεάσωμα ή το μονοπάτι της μακροαυτοφαγίας. Η μείωση αυτή ενδέχεται

να λειτουργεί ως αντισταθμιστικός μηχανισμός αντίδρασης στην εν εξελίξει λυσοσωμική δυσλειτουργία, που πιθανόν να εμφανίζεται λόγω της παρουσίας των μεταλλαγμένων μορφών της α-συνουκλεΐνης και της β-γλυκοσερεβροσιδάσης. Ένας αντίστοιχος αντισταθμιστικός μηχανισμός είναι και η αύξηση του ρυθμού αποικοδόμησης των πρωτεϊνών μέσω του μονοπατιού της μακροαυτοφαγίας σε νευρωνικά δίκτυα στα οποία υπήρχε είτε υπερέκφραση μεταλλαγμένης α-συνουκλεΐνης (Xilouri et al., 2009) είτε δυσλειτουργία της διαμεσολαβούμενης από σαπερόνες αυτοφαγίας (CMA) (A. C. Massey et al., 2006).

Εξάλλου, η μειωμένη μεταγραφή του *HSC70* στην ομάδα GU-PD συγκρινόμενη με τους υγιείς μάρτυρες δείχνει γενετική προδιάθεση ή επιγενετική διαμόρφωση που μειώνει τα επίπεδα της Hsc70 στην ομάδα GU-PD. Προς αυτή την κατεύθυνση η Alvarez-Erviti και συνεργάτες (2013) αναγνώρισαν ειδικά microRNA (miRNA) που ελέγχουν την έκφραση του *HSC70* σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και μεταθανάτιο υλικό ανθρώπινων ιστών. Ειδικότερα, οι συγγραφείς έδειξαν ότι τρία miRNA που στοχεύουν το γονίδιο *HSC70* (hsa-miR-26b; hsa-miR-106a* and hsa-miR-301b) αυξήθηκαν σημαντικά στη μέλαινα ουσία ασθενών με νόσο Πάρκινσον με συνέπεια τη μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης Hsc70 (Alvarez-Erviti et al., 2013). Επιπλέον, μεταγενέστερη μελέτη έδειξε ότι το miR-320a στοχεύει ειδικά την 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-Untranslated Region, 3'-UTR) του *HSC70* mRNA, προκαλώντας μείωση της έκφρασης της Hsc70, σε επίπεδο πρωτεΐνης και mRNA, σε κύτταρα SH-SY5Y που υπερεκφράζουν την α-συνουκλεΐνη (Li et al., 2014).

Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης Lamp2a εμφάνισαν τάση μείωσης στους ασθενείς με νόσο Πάρκινσον σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν σύμφωνο με τη μελέτη των Sala και συνεργατών (2014), αλλά όχι με αυτή των Wu και συνεργατών (2011).

Αξιοσημείωτο είναι ότι τα επίπεδα της Lamp2a πρωτεΐνης παρουσίαζαν εξαιρετικά μεγάλη διακύμανση σε όλα τα δείγματα και το ευρύ και κακώς περιγεγραμμένο πρότυπο της ανοσοαντίδρασης περιόρισε περαιτέρω την ακρίβεια της εκτίμησης των επιπέδων της. Παρόμοιες δυσκολίες στην εκτίμηση ενός καθαρού σήματος της Lamp2a μέσω της τεχνικής Western έχουν περιγραφεί και σε άλλες μελέτες (Malkus and Ischiropoulos, 2012; Sala et al., 2014). Σε γενικές γραμμές τα διαθέσιμα στοιχεία, συμπεριλαμβανομένων και των πληροφοριών από το mRNA που παρουσιάζονται στη παρούσα διατριβή, δείχνουν ότι η μείωση της Lamp2a που εμφανίζεται σε παρκινσονικούς εγκεφάλους δεν απαντάται συστηματικά.

Τα επίπεδα των βασικών μακροαυτοφαγικών πρωτεϊνών, LC3-II και p62, δεν βρέθηκαν να παρουσιάζουν μεταβολές μεταξύ των διαφόρων γενετικών ομάδων και των υγιών μαρτύρων. Παρόλο που τουλάχιστον δύο μελέτες αναφέρουν αύξηση της LC3-II στα PBMC που προήλθαν από παρκινσονικούς ασθενείς (Prigione et al., 2009; Wu et al., 2011), η διαφορά αυτή δεν αναδείχθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη, εκτός ίσως από μία αυξητική τάση, όχι όμως στατιστικά σημαντική, στις γενετικές μορφές της νόσου. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για τη διευκρίνιση του ρόλου μακροαυτοφαγίας στην παθογένεια της νόσου.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα αναδύθηκε από το διαφορετικό μοτίβο της έκφρασης της GCase, που βρέθηκε μειωμένη στις γενετικές ομάδες και όχι στην ιδιοπαθή μορφή της νόσου. Στους ασθενείς με την A53T μετάλλαξη η πιθανή αιτία θα μπορούσε να είναι η επιταχυνόμενη αποικοδόμηση της πρωτεΐνης, καθώς τα επίπεδα του mRNA δεν επηρεάστηκαν. Ερώτημα τίθεται, γιατί παρά αυτή τη διαφορά στα επίπεδα της πρωτεΐνης η ενζυμική ενεργότητα της GCase δεν διέφερε ανάμεσα στην ομάδα A53T-PD και τους υγιείς μάρτυρες. Στους GBA-PD μια πιθανή αιτία της παρατηρούμενης μείωσης είναι ο υψηλός ρυθμός σύνθεσης και αποικοδόμησης της παθολογικής μορφής του ενζύμου. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται περαιτέρω από την αντισταθμιστική αύξηση των επιπέδων του GBA mRNA και τη διαφανόμενη δυσλειτουργία της πρωτεΐνης, όπως προκύπτει από τη μειωμένη ενεργότητα του ενζύμου σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

Μειωμένη ενεργότητα της GCase σχετιζόμενη με μειωμένη δραστηριότητα της CMA και συνακόλουθη παρουσία συσσωμάτων α-συνουκλεΐνης έχει αναφερθεί σε δύο εγκεφαλικές περιοχές ασθενών με νόσο Πάρκινσον, τον πρόσθιο φλοιό του προσαγωγίου, όπου τα συνολικά επίπεδα της α-συνουκλεΐνης είναι αυξημένα, και τον ινιακό λοβό, στον οποίο τα ολικά επίπεδα παρατηρήθηκαν αμετάβλητα (Murphy et al., 2014). Επίσης, διάφορες μελέτες του Gegg και συνεργατών ανέφεραν μειωμένη την ενεργότητα της GCase στην μέλαινα ουσία (Gegg et al., 2012), χωρίς όμως να εντόπισαν αυξημένη συγκέντρωση των υποστρωμάτων του ενζύμου (Gegg et al., 2015) σε ασθενείς με νόσο Πάρκινσον. Επιπλέον, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ, σε μελέτη που δημοσίευσε ο Alcalay και συνεργάτες (2015), αναφέρθηκε μείωση της ενεργότητας της GCase σε ετεροζυγώτες για το γονίδιο *GBA* σε αποστάγματα αποξηραμένων κηλίδων αίματος.

Ως συνέπεια της παρατηρούμενης σημαντικής μείωσης της ενεργότητας της GCase είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία αυτή ως μια πιθανή μέθοδος

διαλογής ασθενών που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο της *GBA*. Το γεγονός αυτό καθίσταται εξαιρετικά σπουδαίο, ειδικά στο πλαίσιο της γενετικής συμβουλευτικής, ενός κλάδου που αναπτύσσεται ταχύτατα και όλο και μεγαλύτερος αριθμός ασθενών προσφεύγουν σε αυτόν.

Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως υφίσταται μείωση της ενεργότητας της *GCase* στα μονοκύτταρα που έχουν απομονωθεί από ασθενείς με ιδιοπαθή νόσο Πάρκινσον (Alcalay et al., 2015; Atashrazm et al., 2018). Στη μελέτη του Alcalay και συνεργατών (2015) βρέθηκε μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική, μείωση της ενεργότητας της *GCase* και στους ασθενείς με τη σποραδική μορφή της νόσου, ενώ η μείωση ήταν ακόμη πιο εμφανής στους φορείς μεταλλάξεων (ετερόζυγων ή ομόζυγων) στο γονίδιο *GBA*.

Οι Atashrazm και συνεργάτες (2018) διαπίστωσαν ότι η μείωση της ενεργότητας της *GCase* στους ασθενείς που έπασχαν από νόσο Πάρκινσον παρέμενε σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες ακόμη και όταν εξαιρούνταν τα δείγματα από τους φορείς μεταλλάξεων στο *GBA*. Ένα χαρακτηριστικό δεδομένο που προέκυψε από την συγκεκριμένη μελέτη είναι πως η μείωση αυτή παρατηρούνταν μόνο στα μονοκύτταρα και όχι στα λεμφοκύτταρα.

Στην παρούσα μελέτη δεν πραγματοποιήθηκε κάποια μορφή διαχωρισμού και ξεχωριστής μέτρησης των διαφόρων υποπληθυσμών των PBMC. Καθώς τα λεμφοκύτταρα αποτελούν περίπου το 85% των PBMC, με το υπόλοιπο ποσοστό να αποτελείται από μονοκύτταρα (Kleiveland, 2015), η επίδραση των μονοκυττάρων στο συνολικό αποτέλεσμα δεν είναι σημαντική. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνεύσει, εν μέρει, την απουσία διαφορών στην ενεργότητα της *GCase* μεταξύ ασθενών με ιδιοπαθή νόσο Πάρκινσον και υγιών μαρτύρων στην παρούσα διατριβή. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την επιβεβαίωση αυτών των αποτελεσμάτων και τον έλεγχο για την ύπαρξη εκλεκτικής δυσλειτουργίας του ενζύμου στους διάφορους υποπληθυσμούς.

Η χρήση των επιπέδων της Hsc70 ως κριτήριο διαχωρισμού ασθενών από υγιή άτομα είχε μικρή διακριτική ικανότητα για τη νόσο και χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα, όπως προέκυψε από την ανάλυση της καμπύλης του λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης Hsc70 εμφάνιζαν σχετικά μικρή διαφοροποίηση και σημαντικού βαθμού διακύμανση μεταξύ των δειγμάτων, παρόλο που παρατηρήθηκαν μειωμένα σε όλες τις γενετικές ομάδες ασθενών με νόσο Πάρκινσον.

Εντούτοις, είναι δυνατόν θεραπείες που επιδρούν στην ασθένεια (disease modifying therapies) να μπορούν να αλλάζουν τα επίπεδα ορισμένων πρωτεϊνών που σχετίζονται με την λυσοσωμική λειτουργία, ένα γεγονός που θα απαιτήσει περισσότερες μελέτες στο μέλλον.

Συν τοις άλλοις, οι αναλύσεις συσχέτισης δεν απεκάλυψαν στατιστικά σημαντικούς συσχετισμούς μεταξύ κάποιου από τους βιολογικούς δείκτες, που μετρήθηκαν, και της ηλικίας, της διάρκειας ή της κλινικής βαρύτητας της νόσου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην διαφαίνεται κάποιος κατάλληλος δείκτης για την κλινική πορεία της νόσου ή την ανταπόκριση στην φαρμακευτική αγωγή.

Ένας άλλος δείκτης στα PBMC που μπορεί να χρησιμοποιηθεί συνδυαστικά με τα πρωτεϊνικά επίπεδα είναι το συνολικό επίπεδο ενεργότητας των λυσοσωμάτων και η δυνατότητά τους να αποικοδομούν τις ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες. Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν τις ελλείψεις στο μονοπάτι της αυτοφαγίας – λυσοσώματος στο πλαίσιο της νόσου Πάρκινσον εστιάζονται περισσότερο σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες παρά στο σύνολο της λυσοσωμικής λειτουργίας.

Αρχικά, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο κύριος στόχος για την αξιολόγηση αυτών των πρωτεϊνών ήταν τα κύτταρα του εγκεφάλου (Alvarez-Erviti et al., 2010; Gegg et al., 2012; Mandel et al., 2005, p. 70). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μελέτες και στην περιφέρεια με τη χρήση κυρίως λευκών αιμοσφαιρίων (Sala et al., 2014; Wu et al., 2011) αλλά και πάλι μελετώντας συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Η παρούσα μελέτη ήταν η πρώτη που έλεγξε απευθείας τη λειτουργία των λυσοσωμάτων σε κυτταρικές καλλιέργειες PBMC (Papagiannakis et al., 2019).

Όσον αφορά τη λυσοσωμική λειτουργία, το βασικό εύρημα ήταν η μειωμένη λειτουργικότητα του μονοπατιού της αυτοφαγίας – λυσοσώματος στους ασθενείς, όπως μετρήθηκε μέσω του ρυθμού της αποικοδόμησης των διαφόρων πρωτεϊνών σε καλλιεργημένα PBMC, τα οποία απομονώθηκαν από ασθενείς με νόσο Πάρκινσον και από υγιείς μάρτυρες. Το εύρημα αυτό μάλιστα ίσχυε και για τα επιμέρους μονοπάτια της αυτοφαγίας που εξετάστηκαν, και πιο συγκεκριμένα αυτά της μακροαυτοφαγίας και της αυτοφαγίας διαμεσολαβούμενης από σαπερόνες (CMA). Είναι ένα σημαντικό εύρημα καθώς υποδηλώνει την ύπαρξη μίας συστημικής δυσλειτουργίας και των δύο αυτών βασικών αυτοφαγικών μονοπατιών στη νόσο Πάρκινσον.

Η Hsc70 είναι ένα σημαντικό στοιχείο του συμπλόκου των σαπερονών, υπεύθυνη για την πρόσδεση και αναγνώριση των πρωτεϊνών – στόχων της CMA. Η

μείωση των επιπέδων της μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των πρωτεϊνών που εισέρχονται στο λυσόσωμα μέσω του CMA μονοπατιού, με αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού αποικοδόμησης πρωτεϊνών που εξαρτάται από το CMA. Είναι, λοιπόν, πιθανό τουλάχιστον η μείωση της δραστηριότητας του CMA μονοπατιού να οφείλεται στα χαμηλότερα επίπεδα Hsc70.

Πρέπει να αναφερθεί πως δεν διαπιστώθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δεικτών λυσοσωμικής λειτουργίας και των επιπέδων των λυσοσωμικών πρωτεϊνών που μετρήθηκαν στα ίδια δείγματα. Ο αριθμός των κοινών δειγμάτων ήταν αρκετά μικρός με αποτέλεσμα τη μειωμένη στατιστική δύναμη της δοκιμασίας αυτής. Ένας μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων είναι πολύ πιθανό να αναδείξει τέτοιες συσχετίσεις.

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλες οι προηγούμενες μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινα κύτταρα απευθείας μετά την απομόνωσή τους, ενώ η παρούσα εργασία είναι η πρώτη που εκτιμά τη λυσοσωμική λειτουργία σε κύτταρα υπό συνθήκες καλλιέργειας. Η σύνθεση των καλλιεργημένων PBMC μπορεί ενδεχομένως να διαφέρει από εκείνη των πρόσφατα απομονωμένων κυττάρων, λόγω των συνθηκών της καλλιέργειας (Kleiveland, 2015). Σε κάθε περίπτωση, η μείωση της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών που εξαρτάται από τα μονοπάτια της μακροαυτοφαγίας και της CMA δείχνει ότι η γενικευμένη λυσοσωμική δυσλειτουργία που εμφανίζεται σε καλλιεργημένα PBMC ασθενών μπορεί επίσης να εμφανιστεί *in vivo*, τουλάχιστον στους τύπους των PBMC που ευνοούνται στην κυτταροκαλλιέργεια.

Με δεδομένο τα χαμηλά επίπεδα α-συνουκλεΐνης σε αυτό τον τύπο κυττάρων, τα οποία είναι κατώτερα του ουδού ανίχνευσης με τη χρήση της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, είναι εξαιρετικά απίθανο τα αποτελέσματα αυτά να είναι συνέπεια της συσσώρευσης της α-συνουκλεΐνης. Αντίθετα είναι πιθανό να είναι τα κύρια γενεσιουργά γεγονότα που παίζουν ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Η γενικευμένη λυσοσωμική διαταραχή μπορεί να οδηγήσει δευτερευόντως σε μεταβολές της α-συνουκλεΐνης, όπως έχει φανεί και στην περίπτωση της έλλειψης της λυσοσωμικής πρωτεάσης Cathepsin D (Stoka et al., 2016).

Ένας περιορισμός της παρούσας μελέτης είναι η φαρμακευτική ετερογένεια των παρκινσονικών ασθενών (και των τριών ομάδων), καθώς δεν βρίσκονταν όλοι στην ίδια φαρμακευτική αγωγή. Ορισμένοι είχαν ήδη αρχίσει να λαμβάνουν *per os* αγωγή υποκατάστασης της ντοπαμίνης ή λάμβαναν ντοπαμινεργικούς αγωνιστές, ενώ άλλοι ήταν άνευ αγωγής λόγω ήπιων συμπτωμάτων κατά τα αρχικά στάδια της

νόσου. Είναι δυνατόν η χρήση της φαρμακευτικής αγωγής να επηρέασε τόσο τη λυσοσωμική λειτουργία στα PBMC, όσο και τα επίπεδα των υπόλοιπων πρωτεϊνών που μετρήθηκαν. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της βαρύτητας της νόσου ή των λοιπών κλινικών χαρακτηριστικών της και της λυσοσωμικής ενεργότητας, πιθανώς λόγω και του μικρού αριθμού δειγμάτων.

Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν πως η ανευρεθείσα λυσοσωμική δυσλειτουργία αντιπροσωπεύει μάλλον ένα παθογενετικό χαρακτηριστικό και όχι ένα βιοδείκτη προόδου της νόσου.

Από τα ανωτέρω συνάγεται πως δύσκολα κάποιος από τους δείκτες οι οποίοι μελετήθηκαν στα PBMC μπορεί από μόνος του να διαχωρίσει επαρκώς τους ασθενείς από τον υγιή πληθυσμό. Όμως, με δεδομένες έστω τις μικρές αυτές διαφορές, με μεγαλύτερο αριθμό συμμετεχόντων είναι εφικτό να αναπτυχθεί ένας μεικτός δείκτης, οποίος θα συνδυάζει δύο ή και περισσότερες διαφορετικές μετρήσεις με στόχο τον καλύτερο διαχωρισμό των ασθενών και υγιών ατόμων. Ένας τέτοιος μεικτός δείκτης, εφ' όσον σχετίζεται με την παθογένεια της νόσου, θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει και την προδιάθεση για την εμφάνιση της νόσου, πριν ακόμη εκδηλωθούν τα πρώτα κινητικά συμπτώματα. Ένα πιθανό παράδειγμα τέτοιου δείκτη είναι ο συνδυασμός της ενεργότητας των λυσοσωμάτων με τα επίπεδα της Hsc70 στα PBMC, εάν αυτές οι δύο μεταβλητές βρεθούν ότι είναι ανεξάρτητες.

Συμπερασματικά, όσον αφορά τα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος, παρέχονται στοιχεία που καταδεικνύουν τη μείωση των επιπέδων της Hsc70 στις διάφορες κατηγορίες ασθενών με νόσο Πάρκινσον, κάτι που μπορεί να σχετίζεται με μια προφανή συστημική δυσλειτουργία στα λυσοσώματα και την αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από Σαπερόνες. Ο μηχανισμός, πάντως, της μείωσης της Hsc70, φαίνεται να διαφέρει ανάμεσα στις γενετικές και μη γενετικές μορφές της νόσου. Τα επίπεδα της ενεργότητας της GCase βρέθηκαν μειωμένα μόνο στους φορείς μεταλλάξεων στο *GBA*, ενώ τα επίπεδά της μειώνονταν και στους ασθενείς με την A53T μετάλλαξη. Τέλος, διαπιστώθηκε πως η διαταραχή της λυσοσωμικής λειτουργίας είναι γενικευμένη στους ασθενείς με νόσο Πάρκινσον και αφορά όλα τα υπομονοπάτια της αυτοφαγίας.

Ένα άλλο εύρημα της παρούσας μελέτης είναι η αύξηση των διμερών της ασυνουκλείνης στις μεμβράνες των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ασθενείς αγνώστου γενετικού υποβάθρου και σε ασθενείς φορείς μεταλλάξεων στο γονίδιο *GBA* σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες και όχι στους ασθενείς με την A53T μετάλλαξη.

Δεν είναι ξεκάθαρο αν τα ευρήματα αυτά αντανακλούν αυξημένη δέσμευση της διμερούς μορφής της α-συνουκλεΐνης από τις τροποποιημένες ερυθροκυτταρικές μεμβράνες ή αυξημένο διμερισμό σε έδαφος αυξημένης πρόσδεσης της μονομερούς μορφής της α-συνουκλεΐνης.

Καθώς οι μεταβολές αυτές δεν συνοδεύονταν από αύξηση της μονομερούς μορφής της α-συνουκλεΐνης, αυτό υπονοεί αυξημένη τάση μετατροπής της μονομερούς στη διμερή μορφή στις κατηγορίες GU- και GBA-PD. Επειδή η διμερής μορφή θεωρείται το πρωταρχικό βήμα στο σχηματισμό των ολιγομερών μορφών, μέσω του οποίου καθορίζεται και ο ρυθμός της μετατροπής αυτής (Krishnan et al., 2003) είναι πιθανόν μεγαλύτερα ολιγομερή, αποτελούμενα, δηλαδή, από περισσότερα των δύο μορίων συνουκλεΐνης να μπορούν να σχηματιστούν στις ερυθροκυτταρικές μεμβράνες αυτών των ασθενών.

Η παρούσα μελέτη είναι η δεύτερη που περιγράφει αυξημένα ολιγομερή της α-συνουκλεΐνης σε ερυθρά αιμοσφαίρια σε ασθενείς με σποραδική νόσο Πάρκινσον. Μια προγενέστερη μελέτη (Wang et al., 2015) έδειξε αυξημένα επίπεδα ολιγομερών, με τη χρήση ειδικής ELISA για ολιγομερή της α-συνουκλεΐνης, σε ασθενείς με νόσο Πάρκινσον και ασθενείς με ατροφία πολλαπλών συστημάτων σε σχέση με υγιείς μάρτυρες. Παρόλα αυτά στη μελέτη των Wang και συνεργατών (2015) δεν εκτιμήθηκε η συνολική ή η μονομερής μορφή της α-συνουκλεΐνης.

Η παρούσα έρευνα επιβεβαιώνει και διευρύνει τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης, δείχνοντας ότι μόνο η διμερής και όχι η μονομερής μορφή αυξάνεται στα ερυθροκύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με πρόσφατη μελέτη που έδειξε αυξημένα επίπεδα συνολικής α-συνουκλεΐνης, όταν αυτή ποσοτικοποιήθηκε μέσω της ικανότητας της να προσδένεται σε φωσφολιπίδια αντί της πιο συνηθισμένης μεθόδου της sandwich ELISA (Abd-Elhadi et al., 2015). Η ίδια μελέτη έδειξε διαφορά στα είδη της α-συνουκλεΐνης, και ειδικότερα στο λόγο των επιπέδων της ολικής α-συνουκλεΐνης προς τα επίπεδα της ανθεκτικής στην πρωτεάση K μορφής της, μεταξύ ασθενών με νόσο Πάρκινσον και υγιών μαρτύρων.

Τα αποτελέσματα της διατριβής είναι, επίσης, σύμφωνα με μελέτες όπου αναφέρονται αυξημένες ολιγομερείς μορφές της α-συνουκλεΐνης στο πλάσμα ασθενών με νόσο Πάρκινσον (Duran et al., 2010; El-Agnaf et al., 2006). Εντούτοις μια πιο πρόσφατη μελέτη δεν ανίχνευσε διαφορές στα επίπεδα των ολιγομερών της α-συνουκλεΐνης στο πλάσμα (Pchelina et al., 2017). Σε συνδυασμό, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχει αυξημένη τάση της α-συνουκλεΐνης να

δημιουργεί διμερή, ολιγομερή και σχετικά αδιάλυτους σχηματισμούς στα περιφερικά κύτταρα και βιολογικά υγρά, τα οποία προέρχονται από ασθενείς με νόσο Πάρκινσον.

Η ύπαρξη ομόζυγων μεταλλάξεων στο γονίδιο *GBA* είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη της νόσου Gaucher, ενώ η παρουσία ετερόζυγων μεταλλάξεων προδιαθέτει σε εμφάνιση νόσου Πάρκινσον. Ως εκ τούτου, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η εκτίμηση των μορφών της α -συνουκλεΐνης στους ετεροζυγώτες παρκινσονικούς ασθενείς (GBA-PD). Αντίστοιχες έρευνες σε ασθενείς με νόσο Gaucher κατέδειξαν αυξημένο διμερισμό της α -συνουκλεΐνης στις μεμβράνες των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Argyriou et al., 2012), αλλά και στο πλάσμα (Pchelina et al., 2014).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν την ύπαρξη σαφούς αύξησης των επιπέδων της διμερούς α -συνουκλεΐνης και του λόγου των διμερών προς τα μονομερή στους ασθενείς με νόσο Πάρκινσον σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Τα επίπεδα των διμερών στην ομάδα GBA-PD ήταν υψηλότερα από αυτά της ομάδας των GU-PD. Τα αποτελέσματα που δημοσίευσαν οι Pchelina και συνεργάτες (2017) αναφέρουν αύξηση των επιπέδων των ολιγομερών της α -συνουκλεΐνης στο πλάσμα ασθενών με μεταλλάξεις στο γονίδιο *GBA*.

Η ακριβής σημασία των αποτελεσμάτων αυτών δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί. Είναι δυνατόν το αυξημένο διμερές στους GBA-PD να αντανakλά απλά το γεγονός πως πάσχουν από νόσο Πάρκινσον, αφού το ίδιο ισχύει και στα άτομα με την σποραδική μορφή της νόσου. Επίσης, είναι πιθανό να οφείλεται στην ετερόζυγη κατάσταση για το γονίδιο *GBA*, χωρίς να μπορεί να αποκλειστεί, ακόμη, και η πιθανότητα να αποτελεί συνδυαστικό αποτέλεσμα των δύο προηγούμενων αιτιών. Φως σε αυτό θα μπορούσε να ρίξει η μελέτη των διμερών σε άτομα φορείς μεταλλάξεων στο γονίδιο *GBA* πριν αναπτύξουν τη νόσο.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει το στοιχείο ότι οι ασθενείς με την A53T μετάλλαξη, σε αντιδιαστολή με τις άλλες δύο κατηγορίες ασθενών, δεν παρουσίαζαν εμφανείς διαφορές στα επίπεδα της μονομερούς ή της διμερούς μορφής της α -συνουκλεΐνης σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Όπως αναφέρθηκε εκτενέστερα και στην ενότητα 1.2 η συγκεκριμένη μετάλλαξη στο γονίδιο *SNCA* πιστεύεται ευρέως ότι προκαλεί μια οικογενή μορφή της νόσου (Polymeropoulos et al., 1997) μέσω ‘απόκτησης λειτουργικότητας’ (gain of function) της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης και ειδικότερα μέσω μιας αυξανόμενης τάσης προς ολιγομερισμό (Lazaro et al., 2014).

Επομένως, ήταν μη αναμενόμενο ότι δεν βρέθηκε αύξηση της διμερούς μορφής της α -συνουκλεΐνης στους A53T-PD ασθενείς, στο πλαίσιο της μελέτης αυτής. Είναι

πιθανό, να είναι απαραίτητη η παρουσία πρόσθετων κυτταρικών στοιχείων, τα οποία δεν υφίστανται στα ερυθροκύτταρα, ώστε η μεταλλαγμένη α-συνουκλεΐνη να παρουσιάσει το υψηλό δυναμικό ολιγομερισμού της. Το λυσόσωμα αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα οργανιδίου, που δεν υφίσταται στα ερυθροκύτταρα, αλλά υπάρχουν πολλαπλές ενδείξεις συμμετοχής του στην παθογένεια της νόσου. Εναλλακτικά, το αυξημένο δυναμικό ολιγομερισμού της συνδυασμένης έκφρασης της αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνης (Wild Type) και της A53T-α-συνουκλεΐνης, αφού η μετάλλαξη A53T βρίσκεται σε ετερόζυγη κατάσταση, δεν είναι εμφανές στις μεμβράνες που μελετήθηκαν στην παρούσα έρευνα.

Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα αυτά βοηθούν στο να αποκλειστεί η πιθανότητα ότι η αντιπαρκινσονική φαρμακευτική αγωγή είναι υπεύθυνη για τα παρατηρούμενα αποτελέσματα στους GU και GBA-PD, καθώς όλοι οι A53T ασθενείς λάμβαναν θεραπεία.

Ποια όμως θα μπορούσε να είναι η παθοφυσιολογική βάση στην παρατηρηθείσα αύξηση των επιπέδων της διμερούς μορφής στις κατηγορίες GU-PD και GBA-PD; Είναι γνωστό ότι αλλαγές στη σύνθεση της μεμβράνης και των λιπιδίων μπορούν να επιδράσουν σημαντικά στην τάση της α-συνουκλεΐνης προς ολιγομερισμό (Abd-Elhadi et al., 2015; Sharon et al., 2003).

Έχει αναφερθεί πρόσφατα πως τα επίπεδα της διμερούς μορφής της α-συνουκλεΐνης εμφανίζουν θετική συσχέτιση με τα επίπεδα του γλυκοσυλκεραμιδίου και άλλων μεμβρανικών φωσfolιπιδίων στις ερυθροκυτταρικές μεμβράνες ασθενών με νόσο Gaucher και ηπιότερη συσχέτιση στους υγιείς μάρτυρες (Moraitou et al., 2016). Η συσσώρευση των γλυκοφωσfolιπιδίων και ιδιαίτερα της γλυκοσερεβροσίδης μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές στη διακίνηση των μεμβρανικών λιπιδίων σε ινοβλάστες (Glaros et al., 2005).

Στους ασθενείς με νόσο Gaucher τα ερυθρά αιμοσφαίρια, παρά την απουσία λυσοσωμάτων, έχουν αυξημένα επίπεδα γλυκοσερεβροσίδης, πιθανώς μέσω ενδοκύττωσης της γλυκοσερεβροσίδης του πλάσματος που προέρχεται από λιποπρωτεΐνες (Clarke, 1981). Τα επίπεδα των ολιγομερών της α-συνουκλεΐνης στο πλάσμα παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση με την ενεργότητα της GCase σε ασθενείς με νόσο Gaucher, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι η πιθανή συσσώρευση των υποστρωμάτων της GCase, όπως τα γλυκοσφιγγολιπίδια, συνεισφέρει στον πολυμερισμό της α-συνουκλεΐνης (Nuzhnyi et al., 2015).

Στην παρούσα διατριβή διαπιστώθηκε μείωση των επιπέδων της ενεργότητας της GCase στα PBMC ασθενών ετερόζυγων το γονίδιο *GBA*. Κάτι που υποδηλώνει ότι κατ' αντιστοιχία με τη νόσο Gaucher, η πιθανή συσσώρευση των υποστρωμάτων της GCase, σε συνδυασμό με άλλους άγνωστους μέχρι στιγμής περιβαλλοντικούς και γενετικούς συντελεστές, μπορεί να διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο.

Πάντως, μέχρι σήμερα η συσσώρευση των γλυκοσφιγγολιπιδίων δεν έχει αποδειχθεί οριστικά σε ιστούς από ετερόζυγους φορείς μεταλλάξεων στο *GBA*, αν και έχει αναφερθεί σε μια μελέτη με νευρώνες προερχόμενους από iPS κύτταρα (Schondorf et al., 2014). Η γήρανση μπορεί να είναι ένας ακόμη παράγοντας που σχετίζεται με τις μεταβολές στις κυτταρικές μεμβράνες (Martin et al., 2010). Η μελέτη της Αργυρίου και συνεργατών (2012) έδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ του διμερισμού της συνουκλεΐνης και της ηλικίας στα υγιή άτομα. Γενικά, υπάρχουν ενδείξεις πως η τάση για διμερισμό της α-συνουκλεΐνης συνδέεται ελαφρά με την ηλικία, αλλά το μέγεθος της συσχέτισης αυτής είναι μικρό και δύσκολα ορατό σε όλες τις περιπτώσεις. Μάλιστα καθίσταται ακόμη πιο δύσκολη η ανεύρεση της συσχέτισης αυτής, αν το εύρος ηλικιών των υπό εξέταση ατόμων είναι μικρό, όπως στην παρούσα μελέτη.

Κάποιοι άλλοι παράγοντες, άσχετοι με τα γλυκοσφιγγολιπίδια, που μπορούν να σχετιστούν με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής είναι η συσσώρευση οξειδωμένων προϊόντων των λιπιδίων, τα μειωμένα επίπεδα της γλουταθιόνης και η αυξημένη ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων που έχει αναφερθεί σε παρκινσονικούς ασθενείς (Kilinc et al., 1988). Όμως, η αρνητική συσχέτιση μεταξύ των δεικτών του οξειδωτικού στρες και του διμερισμού που έχει περιγραφεί αντίκειται σε αυτή την πιθανότητα (Moraitou et al., 2016).

Οι διαφορές μεταξύ των ασθενών αγνώστου γενετικού υποβάθρου και υγιών μαρτύρων ήταν στατιστικά σημαντικές, αλλά εμφάνιζαν αλληλοεπικάλυψη σε αρκετό βαθμό. Το γεγονός αυτό μειώνει την διακριτική ικανότητα της μέτρησης των επιπέδων των διμερών της α-συνουκλεΐνης ως κριτήριο διαχωρισμού ασθενών από υγιή άτομα, όπως φανερώνεται και από την τιμή της περιοχής κάτω από την καμπύλη του λειτουργικού χαρακτηριστικού δέκτη. Για την χρήση των μετρήσεων των επιπέδων των διμερών και των ολιγομερών μορφών της α-συνουκλεΐνης ως διαγνωστικών βιοδεικτών, θα χρειαστεί περαιτέρω βελτίωση των μεθόδων μέτρησής τους, και πιθανώς συνδυασμό και με τη χρήση επιπλέον παραγόντων. Οι δείκτες

αυτοί μπορούν να καταστούν χρήσιμοι ειδικά στην περίπτωση που αναπτυχθούν θεραπείες που στοχεύουν τα συσσωματώματα της α-συνουκλεΐνης.

Επομένως, τα επίπεδα των διμερών της α-συνουκλεΐνης και ο λόγος των επιπέδων των διμερών προς τις μονομερείς μορφές της μπορεί να είναι ένας χρήσιμος βιοδείκτης στο πλαίσιο διερεύνησης της νόσου Πάρκινσον και των συναφών της διαταραχών, και ίσως να οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου.

Τέλος, είναι απαραίτητη και η ενδελεχής μελέτη των δυσλειτουργιών που εμφανίζονται στα κύτταρα του εγκεφάλου για την καλύτερη κατανόηση του παθογενετικού μηχανισμού της νόσου, καθώς εκεί ανευρίσκεται η χαρακτηριστική παθολογία της νόσου Πάρκινσον. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν μετρήσει τα επίπεδα των βασικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών των διαφόρων λυσοσωμικών μονοπατιών στο σύνολο των εγκεφαλικών κυττάρων και όχι στα διάφορα επιμέρους οργανίδια (Alvarez-Erviti et al., 2010; Moors et al., 2019; Raghavan et al., 2004).

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιείται για πρώτη φορά διάκριση των πρωτεϊνικών επιπέδων με βάση τα κυτταρικά διαμερίσματα στα οποία ανιχνεύονται, μέσω της τεχνικής της κλασματοποίησης. Με αυτήν τη μέθοδο κατέστη δυνατό να εξεταστεί χωριστά το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του κυτταροπλάσματος, από το αντίστοιχο περιεχόμενο των λυσοσωμάτων.

Μια βασική παρατήρηση που αναφέρεται στην βιβλιογραφία είναι η μείωση των επιπέδων της Hsc70 στα κύτταρα της μέλαινας ουσίας (Alvarez-Erviti et al., 2010). Η μείωση αυτή παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη, όμως ήταν εμφανής μόνο στο κυτταροπλασματικό κλάσμα και όχι στο λυσοσωμικό. Τα επίπεδα της Hsc70 δεν παρουσίασαν διαφορές στο λυσοσωμικό κλάσμα που είχε απομονωθεί από κύτταρα ασθενών με νόσο Πάρκινσον, ενώ εμφάνιζαν μείωση στο αντίστοιχο κυτταροπλασματικό κλάσμα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα συνολικά επίπεδα της Hsc70 στο κύτταρο να είναι μειωμένα στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, καθώς η πλειονότητα της Hsc70 ανευρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συμβατά με εκείνα παλαιότερων μελετών (Alvarez-Erviti et al., 2010), που έδειχναν μείωση της συνολικής Hsc70, αφού δεν είχε πραγματοποιηθεί διαχωρισμός των διαφόρων οργανιδίων των νευρώνων. Η μείωση των επιπέδων της Hsc70 δεν φαίνεται, γενικά, να εδράζεται στην μειωμένη

μεταγραφή του γονιδίου, αφού τα επίπεδά της ήταν παρόμοια μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων, τουλάχιστον με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Αξίζει σε αυτό το σημείο να τονιστεί πως ακριβώς η ίδια μείωση διαπιστώθηκε και στα κύτταρα του μετωπιαίου λοβού, γεγονός που δείχνει προς μια κοινή παθογενετική αιτία στους διάφορους τύπους εγκεφαλικών κυττάρων.

Διάφορες έρευνες έχουν καταδείξει τη μείωση των επιπέδων της GCase (Gegg et al., 2012; Murphy et al., 2014), αλλά και τη μείωση στην ενεργότητα του ενζύμου (Alcalay et al., 2015; Moors et al., 2019) στα κύτταρα της μέλαινας ουσίας ασθενών με νόσο Πάρκινσον. Τα αποτελέσματα αυτά αναπαράχθηκαν μερικώς στην συγκεκριμένη μελέτη, αφού βρέθηκε μείωση της GCase στο κυτταροπλασματικό κλάσμα των κυττάρων του μετωπιαίου λοβού, αλλά όχι στο αντίστοιχο κλάσμα της μέλαινας ουσίας.

Παράλληλα, οι όποιες διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ ασθενών και υγιών μαρτύρων στα επίπεδα της GCase, εμφανίστηκαν στο κυτταρόπλασμα και όχι στο λυσόσωμα. Η GCase εντοπίζεται κυρίως εντός του λυσοσώματος με αρκετά μικρότερη ποσότητα ελεύθερη στο κυτταρόπλασμα (Rijnboutt et al., 1991), επομένως προξενεί εντύπωση οι όποιες διαταραχές να εμφανίζονται στο κυτταρόπλασμα. Ενδεχομένως, το λυσόσωμα για να αντισταθμίσει τα εν γένει προβλήματα που παρουσιάζονται με την λειτουργία της GCase, να αυξάνει την πρόσληψή της, και να μειώνονται έτσι τα επίπεδά της στο κυτταρόπλασμα. Ο μικρός αριθμός δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκε μπορεί ενδεχομένως να είναι ένας ανασταλτικός παράγοντας για την καταγραφή διαφορών στα επίπεδα της GCase στα κύτταρα της μέλαινας ουσίας.

Μια πολύ ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι η μείωση που παρατηρείται στα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων της μέλαινας ουσίας. Το αποτέλεσμα αυτό, μπορεί να αιτιολογηθεί μέσω της τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε για την κλασματοποίηση, που έχει ως αποτέλεσμα την απομόνωση υλικού μόνο από ακέραια κύτταρα. Η πλειονότητα των κυττάρων στη μέλαινα ουσία των παρκινσονικών ασθενών έχει υποστεί απόπτωση με αποτέλεσμα να μη μπορούν να αξιολογηθούν τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης στα παραπάνω κύτταρα. Ενδεχομένως, τα ‘ανθεκτικά’ στην απόπτωση κύτταρα να είναι αυτά που έχουν χαμηλό φορτίο α-συνουκλεΐνης. Η πιθανή δυσλειτουργία των μηχανισμών που εμποδίζουν την συσσωμάτωση της α-συνουκλεΐνης δημιουργεί έναν χαμηλότερο ουδό στην απαιτούμενη συγκέντρωση της α-συνουκλεΐνης που χρειάζεται για να

εκκινήσει η διαδικασία της συσσωμάτωσης και της συνακόλουθης απόπτωσης των νευρικών κυττάρων. Έτσι, ενώ σε υγιή άτομα η συγκεκριμένη συγκέντρωση α-συνουκλεΐνης είναι καλά ανεκτή, στα κύτταρα των ασθενών με νόσο Πάρκινσον μπορεί να σηματοδοτεί την αρχή του τέλους μέσω της νευροεκφύλισης και του σχηματισμού των σωματίων Lewy. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται στα κύτταρα του μετωπιαίου λοβού, καθώς αυτά δεν εμφανίζουν ρυθμούς απόπτωσης και συσσώρευσης της α-συνουκλεΐνης αντίστοιχους με αυτούς των κυττάρων της μέλαινας ουσίας.

Η Cathepsin D αποτελεί βασικό συστατικό των λυσοσωμάτων (Barrett, 1970) και η μείωση της ενεργότητάς της έχει συνδεθεί με την συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης στα κύτταρα και την εμφάνιση της νόσου Πάρκινσον (Moors et al., 2019). Ένα υπαρκτό ενδεχόμενο είναι λόγω της μειωμένης ενεργότητας που παρουσιάζει η Cathepsin D, να εμφανίζεται μια αντισταθμιστική αύξηση των επιπέδων της.

Το κύτταρο για να ανταπεξέλθει στην ελλειμματική δράση του ενζύμου, αυξάνει την συγκέντρωσή του εντός των λυσοσωμάτων, με αποτέλεσμα την παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων της στα λυσοσώματα των κυττάρων της μέλαινας ουσίας των ασθενών με νόσο Πάρκινσον. Το γεγονός αυτό πιθανώς να είναι πιο εμφανές στη μέλαινα ουσία σε σχέση με τις υπόλοιπες περιοχές του εγκεφάλου, αφού εκεί εμφανίζονται οι σημαντικότερες δυσλειτουργίες από την συγκέντρωση των σωματίων Lewy και ο μεγαλύτερος αριθμός κατεστραμμένων κυττάρων. Έτσι μπορεί να εξηγηθεί το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη αύξηση στα λυσοσώματα των κυττάρων του μετωπιαίου λοβού.

Ο μικρός αριθμός των δειγμάτων εγκεφαλικών ιστών περιορίζει την δύναμη των διαφόρων στατιστικών δοκιμασιών που χρησιμοποιήθηκαν και δυσχεραίνει την εύρεση πιθανών διαφορών στα επίπεδα των πρωτεϊνών και των mRNA που εξετάστηκαν, με αποτέλεσμα να απαιτούνται περισσότερες μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων για την ασφαλέστερη εξαγωγή συμπερασμάτων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abd-Elhadi, S., Honig, A., Simhi-Haham, D., Schechter, M., Linetsky, E., Ben-Hur, T., Sharon, R., 2015. Total and Proteinase K-Resistant alpha-Synuclein Levels in Erythrocytes, Determined by their Ability to Bind Phospholipids, Associate with Parkinson's Disease. *Scientific reports* 5, 11120.
<https://doi.org/10.1038/srep11120>
- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Fariñas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W.H., Castillo, P.E., Shinsky, N., Verdugo, J.M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D., Rosenthal, A., 2000. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25, 239–252.
- Agarraberes, F.A., Terlecky, S.R., Dice, J.F., 1997. An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J. Cell Biol.* 137, 825–834.
- Alcalay, R.N., Levy, O.A., Waters, C.C., Fahn, S., Ford, B., Kuo, S.H., Mazzoni, P., Pauciulo, M.W., Nichols, W.C., Gan-Or, Z., Rouleau, G.A., Chung, W.K., Wolf, P., Oliva, P., Keutzer, J., Marder, K., Zhang, X., 2015. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain : a journal of neurology* 138, 2648–58.
<https://doi.org/10.1093/brain/awv179>
- Alvarez-Erviti, L., Rodriguez-Oroz, M.C., Cooper, J.M., Caballero, C., Ferrer, I., Obeso, J.A., Schapira, A.H., 2010. Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Archives of neurology* 67, 1464–72.
<https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.198>
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Schapira, A.H., Rodriguez-Oroz, M.C., Obeso, J.A., Cooper, J.M., 2013. Influence of microRNA deregulation on chaperone-mediated autophagy and alpha-synuclein pathology in Parkinson's disease. *Cell death & disease* 4, e545. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.73>
- Andersen, A.D., Binzer, M., Stenager, E., Gramsbergen, J.B., 2017. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson's disease - a systematic review. *Acta Neurol. Scand.* 135, 34–56. <https://doi.org/10.1111/ane.12590>
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Michel, P.P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E.C., Agid, Y., 1997. Apoptosis and

- autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histology and histopathology* 12, 25–31.
- Appel-Cresswell, S., Vilarino-Guell, C., Encarnacion, M., Sherman, H., Yu, I., Shah, B., Weir, D., Thompson, C., Szu-Tu, C., Trinh, J., Aasly, J.O., Rajput, A., Rajput, A.H., Jon Stoessl, A., Farrer, M.J., 2013. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 28, 811–813. <https://doi.org/10.1002/mds.25421>
- Argyriou, A., Dermentzaki, G., Papasilekas, T., Moraitou, M., Stamboulis, E., Vekrellis, K., Michelakakis, H., Stefanis, L., 2012. Increased dimerization of alpha-synuclein in erythrocytes in Gaucher disease and aging. *Neuroscience letters* 528, 205–9. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.08.069>
- Atarashi, R., Sano, K., Satoh, K., Nishida, N., 2011. Real-time quaking-induced conversion: A highly sensitive assay for prion detection. *Prion* 5, 150–153. <https://doi.org/10.4161/pri.5.3.16893>
- Atashrazm, F., Hammond, D., Perera, G., Dobson-Stone, C., Mueller, N., Pickford, R., Kim, W.S., Kwok, J.B., Lewis, S.J.G., Halliday, G.M., Dzamko, N., 2018. Reduced glucocerebrosidase activity in monocytes from patients with Parkinson's disease. *Sci Rep* 8, 15446. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33921-x>
- Bae, E.J., Yang, N.Y., Song, M., Lee, C.S., Lee, J.S., Jung, B.C., Lee, H.J., Kim, S., Masliah, E., Sardi, S.P., Lee, S.J., 2014. Glucocerebrosidase depletion enhances cell-to-cell transmission of alpha-synuclein. *Nature communications* 5, 4755. <https://doi.org/10.1038/ncomms5755>
- Bandyopadhyay, U., Bandhyopadhyay, U., Cuervo, A.M., 2007. Chaperone-mediated autophagy in aging and neurodegeneration: lessons from alpha-synuclein. *Exp. Gerontol.* 42, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.05.019>
- Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., Cuervo, A.M., 2008. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5747–5763. <https://doi.org/10.1128/MCB.02070-07>
- Barbour, R., Kling, K., Anderson, J.P., Banducci, K., Cole, T., Diep, L., Fox, M., Goldstein, J.M., Soriano, F., Seubert, P., Chilcote, T.J., 2008. Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neuro-degenerative diseases* 5, 55–9. <https://doi.org/10.1159/000112832>

- Barrett, A.J., 1970. Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver. *Biochem. J.* 117, 601–607. <https://doi.org/10.1042/bj1170601>
- Bartels, T., Choi, J.G., Selkoe, D.J., 2011. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 477, 107–110. <https://doi.org/10.1038/nature10324>
- Bertoncini, C.W., Jung, Y.-S., Fernandez, C.O., Hoyer, W., Griesinger, C., Jovin, T.M., Zweckstetter, M., 2005. Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1430–1435. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407146102>
- Biasini, E., Fioriti, L., Ceglia, I., Invernizzi, R., Bertoli, A., Chiesa, R., Forloni, G., 2004. Proteasome inhibition and aggregation in Parkinson’s disease: a comparative study in untransfected and transfected cells. *J. Neurochem.* 88, 545–553.
- Biomarkers Definitions Working Group, 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., Johansen, T., 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* 171, 603–614. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507002>
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Johansen, T., 2006. p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy* 2, 138–139.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., Johansen, T., 2009. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Meth. Enzymol.* 452, 181–197. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03612-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03612-4)
- Bozi, M., Papadimitriou, D., Antonellou, R., Moraitou, M., Maniati, M., Vassilatis, D.K., Papageorgiou, S.G., Leonardos, A., Tagaris, G., Malamis, G., Theofilopoulos, D., Kamakari, S., Stamboulis, E., Hadjigeorgiou, G.M., Athanassiadou, A., Michelakakis, H., Papadimitriou, A., Gasser, T., Stefanis, L., 2014. Genetic assessment of familial and early-onset Parkinson’s disease in a Greek population. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 21, 963–8. <https://doi.org/10.1111/ene.12315>

- Braak, H., de Vos, R.A.I., Bohl, J., Del Tredici, K., 2006. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* 396, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.012>
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., Braak, E., 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 197–211.
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., Del Tredici, K., 2004. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* 318, 121–134. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0956-9>
- Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Breckenridge, C.B., Berry, C., Chang, E.T., Sielken, R.L., Mandel, J.S., 2016. Association between Parkinson's Disease and Cigarette Smoking, Rural Living, Well-Water Consumption, Farming and Pesticide Use: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 11, e0151841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151841>
- Brody, J.R., Kern, S.E., 2004. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 333, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.05.054>
- Brundin, P., Melki, R., 2017. Prying into the Prion Hypothesis for Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* 37, 9808–9818. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1788-16.2017>
- Buell, G.N., Wickens, M.P., Payvar, F., Schimke, R.T., 1978. Synthesis of full length cDNAs from four partially purified oviduct mRNAs. *J. Biol. Chem.* 253, 2471–2482.
- Burke, R.E., Dauer, W.T., Vonsattel, J.P.G., 2008. A critical evaluation of the Braak staging scheme for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 64, 485–491. <https://doi.org/10.1002/ana.21541>
- Burke, W.J., Li, S.W., Williams, E.A., Nonneman, R., Zahm, D.S., 2003. 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde is the toxic dopamine metabolite in vivo: implications for Parkinson's disease pathogenesis. *Brain Res.* 989, 205–213.

- Burré, J., Sharma, M., Südhof, T.C., 2014. α -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E4274-4283.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1416598111>
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M.R., Südhof, T.C., 2010. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329, 1663–1667. <https://doi.org/10.1126/science.1195227>
- Bustin, S., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169–193. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>
- Cappai, R., Leck, S.-L., Tew, D.J., Williamson, N.A., Smith, D.P., Galatis, D., Sharples, R.A., Curtain, C.C., Ali, F.E., Cherny, R.A., Culvenor, J.G., Bottomley, S.P., Masters, C.L., Barnham, K.J., Hill, A.F., 2005. Dopamine promotes alpha-synuclein aggregation into SDS-resistant soluble oligomers via a distinct folding pathway. *FASEB J.* 19, 1377–1379.
<https://doi.org/10.1096/fj.04-3437fje>
- Chahine, L.M., Stern, M.B., 2017. Parkinson’s Disease Biomarkers: Where Are We and Where Do We Go Next? *Movement Disorders Clinical Practice* 4, 796–805. <https://doi.org/10.1002/mdc3.12545>
- Chahine, L.M., Stern, M.B., Chen-Plotkin, A., 2014. Blood-based biomarkers for Parkinson’s disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 20 Suppl 1, S99-103.
[https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(13\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70025-7)
- Chandra, S., Fornai, F., Kwon, H.-B., Yazdani, U., Atasoy, D., Liu, X., Hammer, R.E., Battaglia, G., German, D.C., Castillo, P.E., Südhof, T.C., 2004. Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14966–14971.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0406283101>
- Chandra, S., Gallardo, G., Fernández-Chacón, R., Schlüter, O.M., Südhof, T.C., 2005. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123, 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.028>
- Chang, D., Nalls, M.A., Hallgrímsdóttir, I.B., Hunkapiller, J., van der Brug, M., Cai, F., International Parkinson’s Disease Genomics Consortium, 23andMe Research Team, Kerchner, G.A., Ayalon, G., Bingol, B., Sheng, M., Hinds, D., Behrens, T.W., Singleton, A.B., Bhangale, T.R., Graham, R.R., 2017. A

- meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci. *Nat. Genet.* 49, 1511–1516.
<https://doi.org/10.1038/ng.3955>
- Chartier-Harlin, M.C., 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., Destee, A., 2004. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* (London, England) 364, 1167–9. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)17103-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(04)17103-1)
- Chen, J.F., Xu, K., Petzer, J.P., Staal, R., Xu, Y.H., Beilstein, M., Sonsalla, P.K., Castagnoli, K., Castagnoli, N., Schwarzschild, M.A., 2001. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 21, RC143.
- Chen-Plotkin, A.S., Hu, W.T., Siderowf, A., Weintraub, D., Goldmann Gross, R., Hurtig, H.I., Xie, S.X., Arnold, S.E., Grossman, M., Clark, C.M., Shaw, L.M., McCluskey, L., Elman, L., Van Deerlin, V.M., Lee, V.M.-Y., Soares, H., Trojanowski, J.Q., 2011. Plasma epidermal growth factor levels predict cognitive decline in Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 69, 655–663.
<https://doi.org/10.1002/ana.22271>
- Chiang, H.L., Dice, J.F., 1988. Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J. Biol. Chem.* 263, 6797–6805.
- Chiang, H.L., Terlecky, S.R., Plant, C.P., Dice, J.F., 1989. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246, 382–5.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., Rutter, W.J., 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294–5299.
- Chu, Y., Dodiya, H., Aebischer, P., Olanow, C.W., Kordower, J.H., 2009. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiology of disease* 35, 385–98.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.05.023>
- Church, W.H., Ward, V.L., 1994. Uric acid is reduced in the substantia nigra in Parkinson's disease: effect on dopamine oxidation. *Brain Res. Bull.* 33, 419–425.

- Clarke, J.T., 1981. The glycosphingolipids of human plasma lipoproteins. *Canadian journal of biochemistry* 59, 412–7.
- Compta, Y., Valente, T., Saura, J., Segura, B., Iranzo, Á., Serradell, M., Junqué, C., Tolosa, E., Valldeoriola, F., Muñoz, E., Santamaria, J., Cámara, A., Fernández, M., Fortea, J., Buongiorno, M., Molinuevo, J.L., Bargalló, N., Martí, M.J., 2015. Correlates of cerebrospinal fluid levels of oligomeric- and total- α -synuclein in premotor, motor and dementia stages of Parkinson’s disease. *J Neurol* 262, 294–306. <https://doi.org/10.1007/s00415-014-7560-z>
- Connolly, B.S., Lang, A.E., 2014. Pharmacological Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA* 311, 1670. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654>
- Conway, K.A., Harper, J.D., Lansbury, P.T., 1998. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat. Med.* 4, 1318–1320. <https://doi.org/10.1038/3311>
- Conway, K.A., Lee, S.J., Rochet, J.C., Ding, T.T., Williamson, R.E., Lansbury, P.T., 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, K.A., Rochet, J.C., Bieganski, R.M., Lansbury, P.T., 2001. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 294, 1346–1349. <https://doi.org/10.1126/science.1063522>
- Cookson, M.R., 2005. The biochemistry of Parkinson’s disease. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 29–52. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133400>
- Cooper, A.A., Gitler, A.D., Cashikar, A., Haynes, C.M., Hill, K.J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K.E., Liu, F., Cao, S., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Marsischky, G., Kolodner, R.D., Labaer, J., Rochet, J.-C., Bonini, N.M., Lindquist, S., 2006. Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson’s models. *Science* 313, 324–328. <https://doi.org/10.1126/science.1129462>
- Costa, J., Lunet, N., Santos, C., Santos, J., Vaz-Carneiro, A., 2010. Caffeine Exposure and the Risk of Parkinson’s Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studiess. *Journal of Alzheimer’s Disease* 20, S221–S238. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091525>

- Cremades, N., Cohen, S.I.A., Deas, E., Abramov, A.Y., Chen, A.Y., Orte, A., Sandal, M., Clarke, R.W., Dunne, P., Aprile, F.A., Bertoncini, C.W., Wood, N.W., Knowles, T.P.J., Dobson, C.M., Klenerman, D., 2012. Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein. *Cell* 149, 1048–1059. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.037>
- Crews, L., Spencer, B., Desplats, P., Patrick, C., Paulino, A., Rockenstein, E., Hansen, L., Adame, A., Galasko, D., Masliah, E., 2010. Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with Lewy body disease and in models of alpha-synucleinopathy. *PLoS ONE* 5, e9313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009313>
- Cuervo, A.M., Dice, J.F., 2000a. Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *Journal of cell science* 113 Pt 24, 4441–50.
- Cuervo, A.M., Dice, J.F., 2000b. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.* 275, 31505–31513. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002102200>
- Cuervo, A.M., Dice, J.F., 1996. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273, 501–3.
- Cuervo, A.M., Knecht, E., Terlecky, S.R., Dice, J.F., 1995. Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am. J. Physiol.* 269, C1200–1208. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.5.C1200>
- Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., Sulzer, D., 2004. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305, 1292–5. <https://doi.org/10.1126/science.1101738>
- Cuervo, A.M., Wong, E., 2014. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell research* 24, 92–104. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.153>
- Dalfó, E., Gómez-Isla, T., Rosa, J.L., Nieto Bodelón, M., Cuadrado Tejedor, M., Barrachina, M., Ambrosio, S., Ferrer, I., 2004. Abnormal alpha-synuclein interactions with Rab proteins in alpha-synuclein A30P transgenic mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 302–313.
- Dauer, W., Kholodilov, N., Vila, M., Trillat, A.-C., Goodchild, R., Larsen, K.E., Staal, R., Tieu, K., Schmitz, Y., Yuan, C.A., Rocha, M., Jackson-Lewis, V., Hersch, S., Sulzer, D., Przedborski, S., Burke, R., Hen, R., 2002. Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 14524–14529. <https://doi.org/10.1073/pnas.172514599>

- Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889–909.
- Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F., George, J.M., 1998. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* 273, 9443–9449.
- Davis, J.W., Grandinetti, A., Waslien, C.I., Ross, G.W., White, L.R., Morens, D.M., 1996. Observations on serum uric acid levels and the risk of idiopathic Parkinson's disease. *Am. J. Epidemiol.* 144, 480–484.
- de Duve, C., Wattiaux, R., 1966. Functions of Lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* 28, 435–492. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.28.030166.002251>
- de Lau, L.M., Breteler, M.M., 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology* 5, 525–35. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70471-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70471-9)
- de Lau, L.M.L., Koudstaal, P.J., Hofman, A., Breteler, M.M.B., 2005. Serum uric acid levels and the risk of Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 58, 797–800. <https://doi.org/10.1002/ana.20663>
- Dedmon, M.M., Lindorff-Larsen, K., Christodoulou, J., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., 2005. Mapping long-range interactions in alpha-synuclein using spin-label NMR and ensemble molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 476–477. <https://doi.org/10.1021/ja044834j>
- Dehay, B., Bove, J., Rodriguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P., Vila, M., 2010. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 12535–44. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1920-10.2010>
- Dehay, B., Martinez-Vicente, M., Caldwell, G.A., Caldwell, K.A., Yue, Z., Cookson, M.R., Klein, C., Vila, M., Bezaud, E., 2013. Lysosomal impairment in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 28, 725–32. <https://doi.org/10.1002/mds.25462>
- Delamarre, A., Meissner, W.G., 2017. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *Presse Med* 46, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2017.01.001>
- DeMartino, G.N., Slaughter, C.A., 1999. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274, 22123–22126.
- Deng, H., Wang, P., Jankovic, J., 2018. The genetics of Parkinson disease. *Ageing Research Reviews* 42, 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.12.007>

- Dermentzaki, G., Dimitriou, E., Xilouri, M., Michelakakis, H., Stefanis, L., 2013.
Loss of beta-glucocerebrosidase activity does not affect alpha-synuclein levels
or lysosomal function in neuronal cells. *PloS one* 8, e60674.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060674>
- Der-Sarkissian, A., Jao, C.C., Chen, J., Langen, R., 2003. Structural organization of
alpha-synuclein fibrils studied by site-directed spin labeling. *J. Biol. Chem.*
278, 37530–37535. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305266200>
- Dexter, D.T., Jenner, P., 2013. Parkinson disease: from pathology to molecular
disease mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 132–144.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018>
- Dice, J.F., 1990. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal
proteolysis. *Trends in biochemical sciences* 15, 305–9.
- Dice, J.F., Terlecky, S.R., Chiang, H.L., Olson, T.S., Isenman, L.D., Short-Russell,
S.R., Freundlieb, S., Terlecky, L.J., 1990. A selective pathway for degradation
of cytosolic proteins by lysosomes. *Seminars in cell biology* 1, 449–55.
- Dimitriou, E., Moraitou, M., Troungos, C., Schulpis, K., Michelakakis, H., 2010.
Gaucher disease: frequency of the N370S mutation in the Greek population.
Clin. Genet. 78, 195–196. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01381.x>
- Dolatshahi, M., Pourmirbabaei, S., Kamalian, A., Ashraf-Ganjouei, A., Yaseri, M.,
Aarabi, M.H., 2018. Longitudinal Alterations of Alpha-Synuclein, Amyloid
Beta, Total, and Phosphorylated Tau in Cerebrospinal Fluid and Correlations
Between Their Changes in Parkinson’s Disease. *Front. Neurol.* 9, 560.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00560>
- Dowle, M., Srinivasan, A., 2019. `data.table`: Extension of ``data.frame``.
- Duran, R., Barrero, F.J., Morales, B., Luna, J.D., Ramirez, M., Vives, F., 2010.
Plasma alpha-synuclein in patients with Parkinson’s disease with and without
treatment. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder
Society* 25, 489–93. <https://doi.org/10.1002/mds.22928>
- El-Agnaf, O.M., Irvine, G.B., 2000. Review: formation and properties of amyloid-like
fibrils derived from alpha-synuclein and related proteins. *J. Struct. Biol.* 130,
300–309. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4262>
- El-Agnaf, O.M., Salem, S.A., Paleologou, K.E., Cooper, L.J., Fullwood, N.J., Gibson,
M.J., Curran, M.D., Court, J.A., Mann, D.M., Ikeda, S., Cookson, M.R.,
Hardy, J., Allsop, D., 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, 1945–7. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0098fje>
- El-Agnaf, O.M., Salem, S.A., Paleologou, K.E., Curran, M.D., Gibson, M.J., Court, J.A., Schlossmacher, M.G., Allsop, D., 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, 419–25. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1449com>
- El-Agnaf, O.M.A., Irvine, G.B., 2002. Aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein and related peptides. Biochem. Soc. Trans. 30, 559–565. <https://doi.org/10.1042/>
- Elbaz, A., Clavel, J., Rathouz, P.J., Moisan, F., Galanaud, J.-P., Delemotte, B., Alépérovitch, A., Tzourio, C., 2009. Professional exposure to pesticides and Parkinson disease: Professional Pesticide Exposure and PD. Annals of Neurology 66, 494–504. <https://doi.org/10.1002/ana.21717>
- Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell, R., Browne, G., 2001. Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. J. Mol. Biol. 307, 1061–1073. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4538>
- Eller, M., Williams, D.R., 2011. alpha-Synuclein in Parkinson disease and other neurodegenerative disorders. Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC 49, 403–8. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.077>
- Eller, M., Williams, D.R., 2009. Biological fluid biomarkers in neurodegenerative parkinsonism. Nature reviews. Neurology 5, 561–70. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.135>
- Ellis, C.E., Murphy, E.J., Mitchell, D.C., Golovko, M.Y., Scaglia, F., Barceló-Coblijn, G.C., Nussbaum, R.L., 2005. Mitochondrial lipid abnormality and electron transport chain impairment in mice lacking alpha-synuclein. Mol. Cell. Biol. 25, 10190–10201. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.22.10190-10201.2005>
- Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S.D., Ntzouni, M., Margaritis, L.H., Stefanis, L., Vekrellis, K., 2010a. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts

- neuronal survival. *J. Neurosci.* 30, 6838–6851.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010>
- Emmanouilidou, E., Stefanis, L., Vekrellis, K., 2010b. Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiol. Aging* 31, 953–968. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.008>
- Eusebi, P., Giannandrea, D., Biscetti, L., Abraha, I., Chiasserini, D., Orso, M., Calabresi, P., Parnetti, L., 2017. Diagnostic utility of cerebrospinal fluid α -synuclein in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis: CSF α -Synuclein for PD Diagnosis. *Mov Disord.* 32, 1389–1400.
<https://doi.org/10.1002/mds.27110>
- Evans, B.C., Nelson, C.E., Yu, S.S., Beavers, K.R., Kim, A.J., Li, H., Nelson, H.M., Giorgio, T.D., Duvall, C.L., 2013. Ex Vivo Red Blood Cell Hemolysis Assay for the Evaluation of pH-responsive Endosomolytic Agents for Cytosolic Delivery of Biomacromolecular Drugs. *Journal of Visualized Experiments*.
<https://doi.org/10.3791/50166>
- Fairfoul, G., McGuire, L.I., Pal, S., Ironside, J.W., Neumann, J., Christie, S., Joachim, C., Esiri, M., Evetts, S.G., Rolinski, M., Baig, F., Ruffmann, C., Wade-Martins, R., Hu, M.T.M., Parkkinen, L., Green, A.J.E., 2016. Alpha-synuclein RT-QuIC in the CSF of patients with alpha-synucleinopathies. *Ann Clin Transl Neurol* 3, 812–818. <https://doi.org/10.1002/acn3.338>
- Farfel-Becker, T., Vitner, E.B., Kelly, S.L., Bame, J.R., Duan, J., Shinder, V., Merrill, A.H., Dobrenis, K., Futerman, A.H., 2014. Neuronal accumulation of glucosylceramide in a mouse model of neuronopathic Gaucher disease leads to neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 23, 843–854.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddt468>
- Farrer, M., Maraganore, D.M., Lockhart, P., Singleton, A., Lesnick, T.G., de Andrade, M., West, A., de Silva, R., Hardy, J., Hernandez, D., 2001. alpha-Synuclein gene haplotypes are associated with Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1847–1851.
- Fauvet, B., Mbefo, M.K., Fares, M.-B., Desobry, C., Michael, S., Ardah, M.T., Tsika, E., Coune, P., Prudent, M., Lion, N., Eliezer, D., Moore, D.J., Schneider, B., Aebischer, P., El-Agnaf, O.M., Masliah, E., Lashuel, H.A., 2012. α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and

- Escherichia coli exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* 287, 15345–15364. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318949>
- Fernandes, H.J.R., Hartfield, E.M., Christian, H.C., Emmanoulidou, E., Zheng, Y., Booth, H., Bogetofte, H., Lang, C., Ryan, B.J., Sardi, S.P., Badger, J., Vowles, J., Evetts, S., Tofaris, G.K., Vekrellis, K., Talbot, K., Hu, M.T., James, W., Cowley, S.A., Wade-Martins, R., 2016. ER Stress and Autophagic Perturbations Lead to Elevated Extracellular α -Synuclein in GBA-N370S Parkinson's iPSC-Derived Dopamine Neurons. *Stem Cell Reports* 6, 342–356. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.01.013>
- Fernandez, H.H., 2012. Updates in the medical management of Parkinson disease. *Cleve Clin J Med* 79, 28–35. <https://doi.org/10.3949/ccjm.78gr.11005>
- Finn, P.F., Dice, J.F., 2005. Ketone bodies stimulate chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.* 280, 25864–25870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502456200>
- Foulds, P.G., Mitchell, J.D., Parker, A., Turner, R., Green, G., Diggle, P., Hasegawa, M., Taylor, M., Mann, D., Allsop, D., 2011. Phosphorylated α -synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J.* 25, 4127–4137. <https://doi.org/10.1096/fj.10-179192>
- Fox, N., Growdon, J.H., 2004. Biomarkers and surrogates. *Neurotherapeutics* 1, 181–181. <https://doi.org/10.1602/neurorx.1.2.181>
- Gao, L., Tang, H., Nie, K., Wang, Limin, Zhao, J., Gan, R., Huang, J., Zhu, R., Feng, S., Duan, Z., Zhang, Y., Wang, Lijuan, 2015. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein as a biomarker for Parkinson's disease diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Neuroscience* 125, 645–654. <https://doi.org/10.3109/00207454.2014.961454>
- Gasser, T., 2009. Genomic and proteomic biomarkers for Parkinson disease. *Neurology* 72, S27-31. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318198e054>
- Gegg, M.E., Burke, D., Heales, S.J., Cooper, J.M., Hardy, J., Wood, N.W., Schapira, A.H., 2012. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Annals of neurology* 72, 455–63. <https://doi.org/10.1002/ana.23614>
- Gegg, M.E., Sweet, L., Wang, B.H., Shihabuddin, L.S., Sardi, S.P., Schapira, A.H.V., 2015. No evidence for substrate accumulation in Parkinson brains with GBA mutations. *Mov. Disord.* 30, 1085–1089. <https://doi.org/10.1002/mds.26278>

- Gelb, D.J., Oliver, E., Gilman, S., 1999. Diagnostic criteria for Parkinson disease. Archives of neurology 56, 33–9.
- George, J.M., 2002. The synucleins. Genome Biol. 3, REVIEWS3002.
- George, J.M., Jin, H., Woods, W.S., Clayton, D.F., 1995. Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. Neuron 15, 361–372.
- Giasson, B.I., Duda, J.E., Forman, M.S., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2001. Prominent perikaryal expression of alpha- and beta-synuclein in neurons of dorsal root ganglion and in medullary neurons. Exp. Neurol. 172, 354–362. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7805>
- Giasson, B.I., Forman, M.S., Higuchi, M., Golbe, L.I., Graves, C.L., Kotzbauer, P.T., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2003. Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. Science 300, 636–640. <https://doi.org/10.1126/science.1082324>
- Giasson, B.I., Uryu, K., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 1999. Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. J. Biol. Chem. 274, 7619–7622.
- Ginns, E.I., Mak, S.K.-K., Ko, N., Karlgren, J., Akbarian, S., Chou, V.P., Guo, Y., Lim, A., Samuelsson, S., LaMarca, M.L., Vazquez-DeRose, J., Manning-Boğ, A.B., 2014. Neuroinflammation and α -synuclein accumulation in response to glucocerebrosidase deficiency are accompanied by synaptic dysfunction. Mol. Genet. Metab. 111, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.12.003>
- Glaros, E.N., Kim, W.S., Quinn, C.M., Wong, J., Gelissen, I., Jessup, W., Garner, B., 2005. Glycosphingolipid accumulation inhibits cholesterol efflux via the ABCA1/apolipoprotein A-I pathway: 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol is a novel cholesterol efflux accelerator. The Journal of biological chemistry 280, 24515–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413862200>
- Goetz, C.G., Tilley, B.C., Shaftman, S.R., Stebbins, G.T., Fahn, S., Martinez-Martin, P., Poewe, W., Sampaio, C., Stern, M.B., Dodel, R., Dubois, B., Holloway, R., Jankovic, J., Kulisevsky, J., Lang, A.E., Lees, A., Leurgans, S., LeWitt, P.A., Nyenhuis, D., Olanow, C.W., Rascol, O., Schrag, A., Teresi, J.A., van Hilten, J.J., LaPelle, N., Movement Disorder Society UPDRS Revision Task Force, 2008. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified

- Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov. Disord.* 23, 2129–2170.
<https://doi.org/10.1002/mds.22340>
- Goker-Alpan, O., Stubblefield, B.K., Giasson, B.I., Sidransky, E., 2010. Glucocerebrosidase is present in alpha-synuclein inclusions in Lewy body disorders. *Acta neuropathologica* 120, 641–9. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0741-7>
- Golbe, L.I., Di Iorio, G., Sanges, G., Lazzarini, A.M., La Sala, S., Bonavita, V., Duvoisin, R.C., 1996. Clinical genetic analysis of Parkinson's disease in the Contursi kindred. *Ann. Neurol.* 40, 767–775.
<https://doi.org/10.1002/ana.410400513>
- Goldin, E., 2010. Gaucher disease and parkinsonism, a molecular link theory. *Mol. Genet. Metab.* 101, 307–310. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.08.004>
- Goldstein, D.S., Holmes, C., Benth, O., Sato, T., Moak, J., Sharabi, Y., Imrich, R., Conant, S., Eldadah, B.A., 2008. Biomarkers to detect central dopamine deficiency and distinguish Parkinson disease from multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat. Disord.* 14, 600–607.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.01.010>
- Goldstein, D.S., Holmes, C., Sharabi, Y., 2012. Cerebrospinal fluid biomarkers of central catecholamine deficiency in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Brain* 135, 1900–1913.
<https://doi.org/10.1093/brain/aws055>
- Gray, B.C., Siskova, Z., Perry, V.H., O'Connor, V., 2009. Selective presynaptic degeneration in the synaptopathy associated with ME7-induced hippocampal pathology. *Neurobiol. Dis.* 35, 63–74.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.04.001>
- Greggio, E., Bisaglia, M., Civiero, L., Bubacco, L., 2011. Leucine-rich repeat kinase 2 and alpha-synuclein: intersecting pathways in the pathogenesis of Parkinson's disease? *Mol Neurodegener* 6, 6. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-6>
- Greten-Harrison, B., Polydoro, M., Morimoto-Tomita, M., Diao, L., Williams, A.M., Nie, E.H., Makani, S., Tian, N., Castillo, P.E., Buchman, V.L., Chandra, S.S., 2010. $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal

- dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 19573–19578.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1005005107>
- Hadjigeorgiou, G.M., Xiomerisiou, G., Gourbali, V., Aggelakis, K., Scarmeas, N., Papadimitriou, A., Singleton, A., 2006. Association of alpha-synuclein Rep1 polymorphism and Parkinson's disease: influence of Rep1 on age at onset. *Mov. Disord.* 21, 534–539. <https://doi.org/10.1002/mds.20752>
- Hansson, O., Hall, S., Öhrfelt, A., Zetterberg, H., Blennow, K., Minthon, L., Nägga, K., Londos, E., Varghese, S., Majbour, N.K., Al-Hayani, A., El-Agnaf, O.M., 2014. Levels of cerebrospinal fluid α -synuclein oligomers are increased in Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies compared to Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 6, 25.
<https://doi.org/10.1186/alzrt255>
- Hashimoto, M., Masliah, E., 1999. Alpha-synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 9, 707–720.
- Hatem, C.L., Gough, N.R., Fambrough, D.M., 1995. Multiple mRNAs encode the avian lysosomal membrane protein LAMP-2, resulting in alternative transmembrane and cytoplasmic domains. *J. Cell. Sci.* 108 (Pt 5), 2093–2100.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., Yamamoto, A., 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* 11, 1433–1437.
<https://doi.org/10.1038/ncb1991>
- He, C., Klionsky, D.J., 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67–93. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102808-114910>
- Hegde, M.L., Jagannatha Rao, K.S., 2003. Challenges and complexities of alpha-synuclein toxicity: new postulates in unfolding the mystery associated with Parkinson's disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 418, 169–178.
- Herbert, M.K., Eeftens, J.M., Aerts, M.B., Esselink, R.A.J., Bloem, B.R., Kuiperij, H.B., Verbeek, M.M., 2014. CSF levels of DJ-1 and tau distinguish MSA patients from PD patients and controls. *Parkinsonism Relat. Disord.* 20, 112–115. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.09.003>
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Bio/Technology* 10, 413–417. <https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>

- Hirsch, L., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T., Pringsheim, T., 2016. The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology* 46, 292–300. <https://doi.org/10.1159/000445751>
- Höglund, K., Fourier, A., Perret-Liaudet, A., Zetterberg, H., Blennow, K., Portelius, E., 2015. Alzheimer's disease--Recent biomarker developments in relation to updated diagnostic criteria. *Clin. Chim. Acta* 449, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.041>
- Hollenbeck, P.J., 1993. Products of endocytosis and autophagy are retrieved from axons by regulated retrograde organelle transport. *J. Cell Biol.* 121, 305–315.
- Hong, Z., Shi, M., Chung, K.A., Quinn, J.F., Peskind, E.R., Galasko, D., Jankovic, J., Zabetian, C.P., Leverenz, J.B., Baird, G., Montine, T.J., Hancock, A.M., Hwang, H., Pan, C., Bradner, J., Kang, U.J., Jensen, P.H., Zhang, J., 2010. DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain* 133, 713–726. <https://doi.org/10.1093/brain/awq008>
- Hsu, L.J., Mallory, M., Xia, Y., Veinbergs, I., Hashimoto, M., Yoshimoto, M., Thal, L.J., Saitoh, T., Masliah, E., 1998. Expression pattern of synucleins (non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid precursor protein/alpha-synuclein) during murine brain development. *J. Neurochem.* 71, 338–344.
- Hu, X., Yang, Y., Gong, D., 2017. Changes of cerebrospinal fluid Aβ42, t-tau, and p-tau in Parkinson's disease patients with cognitive impairment relative to those with normal cognition: a meta-analysis. *Neurol Sci* 38, 1953–1961. <https://doi.org/10.1007/s10072-017-3088-1>
- Hu, Y., Yu, S.-Y., Zuo, L.-J., Cao, C.-J., Wang, F., Chen, Z.-J., Du, Y., Lian, T.-H., Wang, Y.-J., Chan, P., Chen, S.-D., Wang, X.-M., Zhang, W., 2015. Parkinson disease with REM sleep behavior disorder: Features, -synuclein, and inflammation. *Neurology* 84, 888–894. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001308>
- Ibáñez, P., Bonnet, A.-M., 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. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17104-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17104-3)

- Ikedo, H., Markey, C.J., Markey, S.P., 1992. Search for neurotoxins structurally related to 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain Res.* 575, 285–298.
- Imai, Y., Soda, M., Takahashi, R., 2000. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 35661–35664. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000447200>
- International Programme on Chemical Safety (Ed.), 2001. Biomarkers in risk assessment: validity and validation, Environmental health criteria. World Health Organization, Geneva.
- Irwin, D.J., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., 2013. Parkinson's disease dementia: convergence of α -synuclein, tau and amyloid- β pathologies. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 626–636. <https://doi.org/10.1038/nrn3549>
- Ishii, R., Tokuda, T., Tatebe, H., Ohmichi, T., Kasai, T., Nakagawa, M., Mizuno, T., El-Agnaf, O.M., 2015. Decrease in plasma levels of alpha-synuclein is evident in patients with Parkinson's disease after elimination of heterophilic antibody interference. *PloS one* 10, e0123162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123162>
- Iwai, A., Masliah, E., Yoshimoto, M., Ge, N., Flanagan, L., de Silva, H.A., Kittel, A., Saitoh, T., 1995. The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14, 467–475.
- Jankovic, J., 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 368–376. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>
- Jellinger, K.A., 2012. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. *Mov. Disord.* 27, 8–30. <https://doi.org/10.1002/mds.23795>
- Jenner, P., 2015. Treatment of the later stages of Parkinson's disease - pharmacological approaches now and in the future. *Transl Neurodegener* 4, 3. <https://doi.org/10.1186/2047-9158-4-3>
- Jenner, P., 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 53 Suppl 3, S26-36; discussion S36-38. <https://doi.org/10.1002/ana.10483>
- Jensen, P.H., Hager, H., Nielsen, M.S., Hojrup, P., Gliemann, J., Jakes, R., 1999. alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau

- phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J. Biol. Chem.* 274, 25481–25489.
- Jo, E., McLaurin, J., Yip, C.M., St George-Hyslop, P., Fraser, P.E., 2000. α -Synuclein membrane interactions and lipid specificity. *J. Biol. Chem.* 275, 34328–34334. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004345200>
- Johnson, K.A., Conn, P.J., Niswender, C.M., 2009. Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson’s disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8, 475–491.
- Jung, C.H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N.M., Kim, D.-H., 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 584, 1287–1295.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.017>
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720–5728.
<https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720>
- Kabuta, T., Furuta, A., Aoki, S., Furuta, K., Wada, K., 2008. Aberrant interaction between Parkinson disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.* 283, 23731–23738. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801918200>
- Kalia, L.V., 2018. Diagnostic biomarkers for Parkinson’s disease: focus on α -synuclein in cerebrospinal fluid. *Parkinsonism & Related Disorders*.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.11.016>
- Kalinderi, K., Bostantjopoulou, S., Paisan-Ruiz, C., Katsarou, Z., Hardy, J., Fidani, L., 2009. Complete screening for glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease patients from Greece. *Neurosci. Lett.* 452, 87–89.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.01.029>
- Kamp, F., Exner, N., Lutz, A.K., Wender, N., Hegermann, J., Brunner, B., Nuscher, B., Bartels, T., Giese, A., Beyer, K., Eimer, S., Winklhofer, K.F., Haass, C., 2010. Inhibition of mitochondrial fusion by α -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *EMBO J.* 29, 3571–3589.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2010.223>
- Karimi-Moghadam, A., Charsouei, S., Bell, B., Jabalameli, M.R., 2018. Parkinson Disease from Mendelian Forms to Genetic Susceptibility: New Molecular

- Insights into the Neurodegeneration Process. *Cell. Mol. Neurobiol.* 38, 1153–1178. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0587-4>
- Kaufmann, S.H., Ewing, C.M., Shaper, J.H., 1987. The erasable Western blot. *Analytical Biochemistry* 161, 89–95. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90656-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90656-7)
- Kaushik, S., Cuervo, A.M., 2015. Proteostasis and aging. *Nat. Med.* 21, 1406–1415. <https://doi.org/10.1038/nm.4001>
- Kaushik, S., Massey, A.C., Mizushima, N., Cuervo, A.M., 2008. Constitutive activation of chaperone-mediated autophagy in cells with impaired macroautophagy. *Mol. Biol. Cell* 19, 2179–2192. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-11-1155>
- Keene, O.N., 1995. The log transformation is special. *Statistics in medicine* 14, 811–9.
- Kempster, P.A., O’Sullivan, S.S., Holton, J.L., Revesz, T., Lees, A.J., 2010. Relationships between age and late progression of Parkinson’s disease: a clinico-pathological study. *Brain* 133, 1755–1762. <https://doi.org/10.1093/brain/awq059>
- Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E., Cuervo, A.M., 2004. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol. Biol. Cell* 15, 4829–4840. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-06-0477>
- Kilinc, A., Yalcin, A.S., Yalcin, D., Taga, Y., Emerk, K., 1988. Increased erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation in human Parkinson’s disease. *Neuroscience letters* 87, 307–10.
- Kim, D.-K., Lim, H.-S., Kawasaki, I., Shim, Y.-H., Vaikath, N.N., El-Agnaf, O.M.A., Lee, H.-J., Lee, S.-J., 2016. Anti-aging treatments slow propagation of synucleinopathy by restoring lysosomal function. *Autophagy* 12, 1849–1863. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1207014>
- Kleiveland, C.R., 2015. Peripheral Blood Mononuclear Cells, in: Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H. (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. Springer, Cham (CH).
- Klionsky, D.J., 2005. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell. Sci.* 118, 7–18. <https://doi.org/10.1242/jcs.01620>

- Köchl, R., Hu, X.W., Chan, E.Y.W., Tooze, S.A., 2006. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* 7, 129–145. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00368.x>
- Krishnan, S., Chi, E.Y., Wood, S.J., Kendrick, B.S., Li, C., Garzon-Rodriguez, W., Wypych, J., Randolph, T.W., Narhi, L.O., Biere, A.L., Citron, M., Carpenter, J.F., 2003. Oxidative dimer formation is the critical rate-limiting step for Parkinson's disease alpha-synuclein fibrillogenesis. *Biochemistry* 42, 829–37. <https://doi.org/10.1021/bi026528t>
- Krüger, R., Kuhn, W., Müller, T., Voitalla, D., Graeber, M., Kösel, S., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schöls, L., Riess, O., 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 18, 106–108. <https://doi.org/10.1038/ng0298-106>
- Krüger, R., Vieira-Saecker, A.M., Kuhn, W., Berg, D., Müller, T., Kühnl, N., Fuchs, G.A., Storch, A., Hungs, M., Voitalla, D., Przuntek, H., Epplen, J.T., Schöls, L., Riess, O., 1999. Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined alpha-synuclein/apolipoprotein E genotype. *Ann. Neurol.* 45, 611–617.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- Lashuel, H.A., Overk, C.R., Oueslati, A., Masliah, E., 2013. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 38–48. <https://doi.org/10.1038/nrn3406>
- Lazaro, D.F., Rodrigues, E.F., Langohr, R., Shahpasandzadeh, H., Ribeiro, T., Guerreiro, P., Gerhardt, E., Krohnert, K., Klucken, J., Pereira, M.D., Popova, B., Kruse, N., Mollenhauer, B., Rizzoli, S.O., Braus, G.H., Danzer, K.M., Outeiro, T.F., 2014. Systematic comparison of the effects of alpha-synuclein mutations on its oligomerization and aggregation. *PLoS genetics* 10, e1004741. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004741>
- Lee, H.-J., Patel, S., Lee, S.-J., 2005. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J. Neurosci.* 25, 6016–6024. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0692-05.2005>

- Lee, P.H., Lee, G., Park, H.J., Bang, O.Y., Joo, I.S., Huh, K., 2006. The plasma alpha-synuclein levels in patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Journal of neural transmission* 113, 1435–9.
<https://doi.org/10.1007/s00702-005-0427-9>
- Legocki, R.P., Verma, D.P.S., 1981. Multiple immunoreplica technique: Screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel. *Analytical Biochemistry* 111, 385–392.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90577-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90577-7)
- Lehman, E.J., Hein, M.J., Baron, S.L., Gersic, C.M., 2012. Neurodegenerative causes of death among retired National Football League players. *Neurology* 79, 1970–1974. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31826daf50>
- Lesage, S., Anheim, M., Letournel, F., Bousset, L., Honoré, A., Rozas, N., Pieri, L., Madiona, K., Dürr, A., Melki, R., Verny, C., Brice, A., French Parkinson's Disease Genetics Study Group, 2013. G51D α -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann. Neurol.* 73, 459–471.
<https://doi.org/10.1002/ana.23894>
- Lesage, S., Brice, A., 2009. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Human Molecular Genetics* 18, R48–R59.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddp012>
- LeWitt, P., Schultz, L., Auinger, P., Lu, M., Parkinson Study Group DATATOP Investigators, 2011. CSF xanthine, homovanillic acid, and their ratio as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1408, 88–97.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.057>
- Li, G., Yang, H., Zhu, D., Huang, H., Liu, G., Lun, P., 2014. Targeted suppression of chaperone-mediated autophagy by miR-320a promotes alpha-synuclein aggregation. *International journal of molecular sciences* 15, 15845–57.
<https://doi.org/10.3390/ijms150915845>
- Li, J., Uversky, V.N., Fink, A.L., 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, Q.X., Mok, S.S., Laughton, K.M., McLean, C.A., Cappai, R., Masters, C.L., Culvenor, J.G., Horne, M.K., 2007. Plasma alpha-synuclein is decreased in subjects with Parkinson's disease. *Experimental neurology* 204, 583–8.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.12.006>

- Li, W., Li, J., Bao, J., 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1125–1136. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0865-5>
- Li, W., West, N., Colla, E., Pletnikova, O., Troncoso, J.C., Marsh, L., Dawson, T.M., Jäkälä, P., Hartmann, T., Price, D.L., Lee, M.K., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2162–2167. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406976102>
- Lim, K.-L., Zhang, C.-W., 2013. Molecular events underlying Parkinson's disease - an interwoven tapestry. *Front Neurol* 4, 33. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00033>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Logan, J., Edwards, K., Saunders, N. (Eds.), 2009. Real-time PCR: current technology and applications. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Lorenzen, N., Lemminger, L., Pedersen, J.N., Nielsen, S.B., Otzen, D.E., 2014. The N-terminus of α -synuclein is essential for both monomeric and oligomeric interactions with membranes. *FEBS Lett.* 588, 497–502. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.12.015>
- Maguire-Zeiss, K.A., Short, D.W., Federoff, H.J., 2005. Synuclein, dopamine and oxidative stress: co-conspirators in Parkinson's disease? *Brain Res. Mol. Brain Res.* 134, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.09.014>
- Maita, C., Tsuji, S., Yabe, I., Hamada, S., Ogata, A., Maita, H., Iguchi-Ariga, S.M.M., Sasaki, H., Ariga, H., 2008. Secretion of DJ-1 into the serum of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 431, 86–89. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.11.027>
- Malkus, K.A., Ischiropoulos, H., 2012. Regional deficiencies in chaperone-mediated autophagy underlie alpha-synuclein aggregation and neurodegeneration. *Neurobiology of disease* 46, 732–44. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.03.017>
- Mandel, S., Grunblatt, E., Riederer, P., Amariglio, N., Jacob-Hirsch, J., Rechavi, G., Youdim, M.B., 2005. Gene expression profiling of sporadic Parkinson's disease substantia nigra pars compacta reveals impairment of ubiquitin-proteasome subunits, SKP1A, aldehyde dehydrogenase, and chaperone HSC-

70. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1053, 356–75.
<https://doi.org/10.1196/annals.1344.031>
- Mann, V.M., Cooper, J.M., Daniel, S.E., Srai, K., Jenner, P., Marsden, C.D., Schapira, A.H., 1994. Complex I, iron, and ferritin in Parkinson’s disease substantia nigra. *Ann. Neurol.* 36, 876–881.
<https://doi.org/10.1002/ana.410360612>
- Manning-Bog, A.B., Schule, B., Langston, J.W., 2009. Alpha-synuclein-glucocerebrosidase interactions in pharmacological Gaucher models: a biological link between Gaucher disease and parkinsonism. *Neurotoxicology* 30, 1127–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.06.009>
- Maroteaux, L., Campanelli, J.T., Scheller, R.H., 1988. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* 8, 2804–2815.
- Martin, L.J., Pan, Y., Price, A.C., Sterling, W., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Price, D.L., Lee, M.K., 2006. Parkinson’s disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *J. Neurosci.* 26, 41–50. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4308-05.2006>
- Martin, M., Dotti, C.G., Ledesma, M.D., 2010. Brain cholesterol in normal and pathological aging. *Biochimica et biophysica acta* 1801, 934–44.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.03.011>
- Martinez-Vicente, M., Cuervo, A.M., 2007. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* 6, 352–361.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70076-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70076-5)
- Martinez-Vicente, M., Sovak, G., Cuervo, A.M., 2005. Protein degradation and aging. *Exp. Gerontol.* 40, 622–633. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.07.005>
- Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Kaushik, S., Massey, A.C., Mazzulli, J., Mosharov, E.V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D.-C., Follenzi, A., Dauer, W., Przedborski, S., Ischiropoulos, H., Lansbury, P.T., Sulzer, D., Cuervo, A.M., 2008. Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J. Clin. Invest.* 118, 777–788. <https://doi.org/10.1172/JCI32806>
- Massey, A. C., Kaushik, S., Sovak, G., Kiffin, R., Cuervo, A.M., 2006. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 5805–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507436103>

- Massey, Ashish C., Zhang, C., Cuervo, A.M., 2006. Chaperone-Mediated Autophagy in Aging and Disease, in: *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier, pp. 205–235. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)73007-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)73007-6)
- Mazzulli, J.R., Xu, Y.H., Sun, Y., Knight, A.L., McLean, P.J., Caldwell, G.A., Sidransky, E., Grabowski, G.A., Krainc, D., 2011. Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* 146, 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.001>
- McNaught, K.S.P., Björklund, L.M., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P., Olanow, C.W., 2002. Proteasome inhibition causes nigral degeneration with inclusion bodies in rats. *Neuroreport* 13, 1437–1441.
- Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., Codogno, P., 2010. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res.* 20, 748–762. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.82>
- Michelakakis, H., Dimitriou, E., Van Weely, S., Boot, R.G., Mavridou, I., Verhoek, M., Aerts, J.M., 1995. Characterization of glucocerebrosidase in Greek Gaucher disease patients: mutation analysis and biochemical studies. *J. Inherit. Metab. Dis.* 18, 609–615.
- Mollenhauer, B., Batrla, R., El-Agnaf, O., Galasko, D.R., Lashuel, H.A., Merchant, K.M., Shaw, L.M., Selkoe, D.J., Umek, R., Vanderstichele, H., Zetterberg, H., Zhang, J., Caspell-Garcia, C., Coffey, C., Hutten, S.J., Frasier, M., Taylor, P., for the Investigating Synuclein Consortium of the Michael J. Fox Foundation for Parkinson’s Research, 2017. A user’s guide for α -synuclein biomarker studies in biological fluids: Perianalytical considerations: α -synuclein biomarker studies in PD. *Mov Disord.* 32, 1117–1130. <https://doi.org/10.1002/mds.27090>
- Mollenhauer, B., Parnetti, L., Rektorova, I., Kramberger, M.G., Pikkarainen, M., Schulz-Schaeffer, W.J., Aarsland, D., Svenningsson, P., Farotti, L., Verbeek, M.M., Schlossmacher, M.G., 2016. Biological confounders for the values of cerebrospinal fluid proteins in Parkinson’s disease and related disorders. *J. Neurochem.* 139, 290–317. <https://doi.org/10.1111/jnc.13390>
- Mollenhauer, B., Trautmann, E., Otte, B., Ng, J., Spreer, A., Lange, P., Sixel-Döring, F., Hakimi, M., Vonsattel, J.-P., Nussbaum, R., Trenkwalder, C., Schlossmacher, M.G., 2012. α -Synuclein in human cerebrospinal fluid is

- principally derived from neurons of the central nervous system. *J Neural Transm (Vienna)* 119, 739–746. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0784-0>
- Mondello, S., Constantinescu, R., Zetterberg, H., Andreasson, U., Holmberg, B., Jeromin, A., 2014. CSF α -synuclein and UCH-L1 levels in Parkinson's disease and atypical parkinsonian disorders. *Parkinsonism Relat. Disord.* 20, 382–387. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.01.011>
- Moors, T.E., Paciotti, S., Ingrassia, A., Quadri, M., Breedveld, G., Tasegian, A., Chiasserini, D., Eusebi, P., Duran-Pacheco, G., Kremer, T., Calabresi, P., Bonifati, V., Parnetti, L., Beccari, T., van de Berg, W.D.J., 2019. Characterization of Brain Lysosomal Activities in GBA-Related and Sporadic Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies. *Mol. Neurobiol.* 56, 1344–1355. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1090-0>
- Moraitou, M., Dermentzaki, G., Dimitriou, E., Monopolis, I., Dekker, N., Aerts, H., Stefanis, L., Michelakakis, H., 2016. α -Synuclein dimerization in erythrocytes of Gaucher disease patients: correlation with lipid abnormalities and oxidative stress. *Neuroscience letters* 613, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.12.013>
- Moraitou, M., Hadjigeorgiou, G., Monopolis, I., Dardiotis, E., Bozi, M., Vassilatis, D., Vilageliu, L., Grinberg, D., Xiromerisiou, G., Stefanis, L., Michelakakis, H., 2011. beta-Glucocerebrosidase gene mutations in two cohorts of Greek patients with sporadic Parkinson's disease. *Molecular genetics and metabolism* 104, 149–52. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.06.015>
- Mori, F., Tanji, K., Yoshimoto, M., Takahashi, H., Wakabayashi, K., 2002. Demonstration of α -synuclein immunoreactivity in neuronal and glial cytoplasm in normal human brain tissue using proteinase K and formic acid pretreatment. *Exp. Neurol.* 176, 98–104.
- Moskvina, V., Harold, D., Russo, G., Vedernikov, A., Sharma, M., Saad, M., Holmans, P., Bras, J.M., Bettella, F., Keller, M.F., Nicolaou, N., Simon-Sanchez, J., Gibbs, J.R., Schulte, C., Durr, A., Guerreiro, R., Hernandez, D., Brice, A., Stefansson, H., Majamaa, K., Gasser, T., Heutink, P., Wood, N., Martinez, M., Singleton, A.B., Nalls, M.A., Hardy, J., Owen, M.J., O'Donovan, M.C., Williams, J., Morris, H.R., Williams, N.M., Ipdgc, Gerad Investigators, 2013. Analysis of genome-wide association studies of Alzheimer disease and of Parkinson disease to determine if these 2 diseases

- share a common genetic risk. *JAMA neurology* 70, 1268–76.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.448>
- Munhoz, R.P., Picillo, M., Fox, S.H., Bruno, V., Panisset, M., Honey, C.R., Fasano, A., 2016. Eligibility Criteria for Deep Brain Stimulation in Parkinson’s Disease, Tremor, and Dystonia. *Can J Neurol Sci* 43, 462–471.
<https://doi.org/10.1017/cjn.2016.35>
- Murphy, D.D., Rueter, S.M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2000. Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 20, 3214–3220.
- Murphy, K.E., Gysbers, A.M., Abbott, S.K., Spiro, A.S., Furuta, A., Cooper, A., Garner, B., Kabuta, T., Halliday, G.M., 2015. Lysosomal-associated membrane protein 2 Isoforms Are Differentially Affected in Early Parkinson’s Disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. <https://doi.org/10.1002/mds.26141>
- Murphy, K.E., Gysbers, A.M., Abbott, S.K., Tayebi, N., Kim, W.S., Sidransky, E., Cooper, A., Garner, B., Halliday, G.M., 2014. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased alpha-synuclein in sporadic Parkinson’s disease. *Brain : a journal of neurology* 137, 834–48.
<https://doi.org/10.1093/brain/awt367>
- Murray, I.V.J., Giasson, B.I., Quinn, S.M., Koppaka, V., Axelsen, P.H., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2003. Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry* 42, 8530–8540. <https://doi.org/10.1021/bi027363r>
- Nalls, M.A., Duran, R., Lopez, G., Kurzawa-Akanbi, M., McKeith, I.G., Chinnery, P.F., Morris, C.M., Theuns, J., Crosiers, D., Cras, P., Engelborghs, S., De Deyn, P.P., Van Broeckhoven, C., Mann, D.M., Snowden, J., Pickering-Brown, S., Halliwell, N., Davidson, Y., Gibbons, L., Harris, J., Sheerin, U.M., Bras, J., Hardy, J., Clark, L., Marder, K., Honig, L.S., Berg, D., Maetzler, W., Brockmann, K., Gasser, T., Novellino, F., Quattrone, A., Annesi, G., De Marco, E.V., Rogaeva, E., Masellis, M., Black, S.E., Bilbao, J.M., Foroud, T., Ghetti, B., Nichols, W.C., Pankratz, N., Halliday, G., Lesage, S., Klebe, S., Durr, A., Duyckaerts, C., Brice, A., Giasson, B.I., Trojanowski, J.Q., Hurtig, H.I., Tayebi, N., Landazabal, C., Knight, M.A., Keller, M., Singleton, A.B.,

- Wolfsberg, T.G., Sidransky, E., 2013. A multicenter study of glucocerebrosidase mutations in dementia with Lewy bodies. *JAMA neurology* 70, 727–35. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.1925>
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., Youle, R.J., 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183, 795–803. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>
- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.-F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., Youle, R.J., 2010. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 8, e1000298. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000298>
- Nemani, V.M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M.K., Chaudhry, F.A., Nicoll, R.A., Edwards, R.H., 2010. Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle recluster after endocytosis. *Neuron* 65, 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.023>
- Ninfa, A.J., Ballou, D.P., Benore, M., 2010. Fundamental laboratory approaches for biochemistry and biotechnology, 2. ed. ed. Wiley, Hoboken, NJ.
- Nixon, R.A., 2013. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature medicine* 19, 983–97. <https://doi.org/10.1038/nm.3232>
- Nomoto, M., Kubo, S., Nagai, M., Yamada, T., Tamaoka, A., Tsuboi, Y., Hattori, N., PD Study Group, 2015. A Randomized Controlled Trial of Subcutaneous Apomorphine for Parkinson Disease: A Repeat Dose and Pharmacokinetic Study. *Clin Neuropharmacol* 38, 241–247. <https://doi.org/10.1097/WNF.0000000000000111>
- Norris, E.H., Giasson, B.I., Hodara, R., Xu, S., Trojanowski, J.Q., Ischiropoulos, H., Lee, V.M.-Y., 2005. Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. *J. Biol. Chem.* 280, 21212–21219. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412621200>
- Nuzhnyi, E., Emelyanov, A., Boukina, T., Usenko, T., Yakimovskii, A., Zakharova, E., Pchelina, S., 2015. Plasma oligomeric alpha-synuclein is associated with glucocerebrosidase activity in Gaucher disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 30, 989–91. <https://doi.org/10.1002/mds.26200>

- Ohmichi, T., Mitsuhashi, M., Tatebe, H., Kasai, T., Ali El-Agnaf, O.M., Tokuda, T., 2018. Quantification of brain-derived extracellular vesicles in plasma as a biomarker to diagnose Parkinson's and related diseases. *Parkinsonism Relat. Disord.* <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.11.021>
- Ohsumi, Y., 2001. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 211–216. <https://doi.org/10.1038/35056522>
- Olanow, C.W., Kieburtz, K., Odin, P., Espay, A.J., Standaert, D.G., Fernandez, H.H., Vanagunas, A., Othman, A.A., Widnell, K.L., Robieson, W.Z., Pritchett, Y., Chatamra, K., Benesh, J., Lenz, R.A., Antonini, A., 2014. Continuous intrajejunal infusion of levodopa-carbidopa intestinal gel for patients with advanced Parkinson's disease: a randomised, controlled, double-blind, double-dummy study. *The Lancet Neurology* 13, 141–149. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70293-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70293-X)
- Oliveira, L.M.A., Falomir-Lockhart, L.J., Botelho, M.G., Lin, K.-H., Wales, P., Koch, J.C., Gerhardt, E., Taschenberger, H., Outeiro, T.F., Lingor, P., Schüle, B., Arndt-Jovin, D.J., Jovin, T.M., 2015. Elevated α -synuclein caused by SNCA gene triplication impairs neuronal differentiation and maturation in Parkinson's patient-derived induced pluripotent stem cells. *Cell Death Dis* 6, e1994. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.318>
- Orenstein, S.J., Cuervo, A.M., 2010. Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Seminars in cell & developmental biology* 21, 719–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2010.02.005>
- Osellame, L.D., Rahim, A.A., Hargreaves, I.P., Gegg, M.E., Richard-Londt, A., Brandner, S., Waddington, S.N., Schapira, A.H.V., Duchon, M.R., 2013. Mitochondria and quality control defects in a mouse model of Gaucher disease--links to Parkinson's disease. *Cell Metab.* 17, 941–953. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.014>
- Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, N., Choi, P., Hardy, J., Wozozin, B., 1999. α -Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J. Neurosci.* 19, 5782–5791.
- Oueslati, A., Fournier, M., Lashuel, H.A., 2010. Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of α -synuclein: implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies.

- Prog. Brain Res. 183, 115–145. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)83007-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)83007-9)
- Paciotti, S., Bellomo, G., Gatticchi, L., Parnetti, L., 2018. Are We Ready for Detecting α -Synuclein Prone to Aggregation in Patients? The Case of “Protein-Misfolding Cyclic Amplification” and “Real-Time Quaking-Induced Conversion” as Diagnostic Tools. *Front. Neurol.* 9, 415. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00415>
- Pals, P., Lincoln, S., Manning, J., Heckman, M., Skipper, L., Hulihan, M., Van den Broeck, M., De Pooter, T., Cras, P., Crook, J., Van Broeckhoven, C., Farrer, M.J., 2004. α -Synuclein promoter confers susceptibility to Parkinson’s disease. *Ann. Neurol.* 56, 591–595. <https://doi.org/10.1002/ana.20268>
- Panda, S., Ravindran, B., 2013. Isolation of Human PBMCs. *BIO-PROTOCOL* 3. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.323>
- Papagiannakis, N., Xilouri, M., Koros, C., Simitsi, A.-M., Stamelou, M., Maniati, M., Stefanis, L., 2019. Autophagy dysfunction in peripheral blood mononuclear cells of Parkinson’s disease patients. *Neuroscience Letters* 704, 112–115. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.04.003>
- Papagiannakis, N., Xilouri, M., Koros, C., Stamelou, M., Antonelou, R., Maniati, M., Papadimitriou, D., Moraitou, M., Michelakakis, H., Stefanis, L., 2015. Lysosomal alterations in peripheral blood mononuclear cells of Parkinson’s disease patients. *Movement Disorders* 30, 1830–1834. <https://doi.org/10.1002/mds.26433>
- Paxinou, E., Chen, Q., Weisse, M., Giasson, B.I., Norris, E.H., Rueter, S.M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Ischiropoulos, H., 2001. Induction of α -synuclein aggregation by intracellular oxidative insult. *J. Neurosci.* 21, 8053–8061.
- Pchelina, S., Emelyanov, A., Baydakova, G., Andoskin, P., Senkevich, K., Nikolaev, M., Miliukhina, I., Yakimovskii, A., Timofeeva, A., Fedotova, E., Abramychева, N., Usenko, T., Kulabukhova, D., Lavrinova, A., Kopytova, A., Garaeva, L., Nuzhnyi, E., Illarioshkin, S., Zakharova, E., 2017. Oligomeric α -synuclein and glucocerebrosidase activity levels in GBA-associated Parkinson’s disease. *Neuroscience letters* 636, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.10.039>

- Pchelina, S.N., Nuzhnyi, E.P., Emelyanov, A.K., Boukina, T.M., Usenko, T.S., Nikolaev, M.A., Salogub, G.N., Yakimovskii, A.F., Zakharova, E.Y., 2014. Increased plasma oligomeric alpha-synuclein in patients with lysosomal storage diseases. *Neuroscience letters* 583, 188–93.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.041>
- Peelaerts, W., Baekelandt, V., 2016a. α -synuclein folds: the cards are on the table. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 359–360. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3209>
- Peelaerts, W., Baekelandt, V., 2016b. α -Synuclein strains and the variable pathologies of synucleinopathies. *J. Neurochem.* 139 Suppl 1, 256–274.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13595>
- Perez, R.G., Waymire, J.C., Lin, E., Liu, J.J., Guo, F., Zigmond, M.J., 2002. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J. Neurosci.* 22, 3090–3099. <https://doi.org/20026307>
- Perrin, R.J., Woods, W.S., Clayton, D.F., George, J.M., 2000. Interaction of human alpha-Synuclein and Parkinson’s disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 275, 34393–34398. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004851200>
- Petersen, K., Olesen, O.F., Mikkelsen, J.D., 1999. Developmental expression of alpha-synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex. *Neuroscience* 91, 651–659.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., Nussbaum, R.L., 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson’s disease. *Science* 276, 2045–7.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F.T., Douglas, S.H., Field, S.L., Bell, S.M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A.J., Robinson, P.A., Inglehearn, C.F., Isaacs, J.D., Markham, A.F., 2003. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 3, 18. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-18>
- Postuma, R.B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C.W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A.E., Halliday, G., Goetz, C.G., Gasser, T.,

- Dubois, B., Chan, P., Bloem, B.R., Adler, C.H., Deuschl, G., 2015. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson’s disease: MDS-PD Clinical Diagnostic Criteria. *Movement Disorders* 30, 1591–1601.
<https://doi.org/10.1002/mds.26424>
- Prigione, A., Isaias, I.U., Galbussera, A., Brighina, L., Begni, B., Andreoni, S., Pezzoli, G., Antonini, A., Ferrarese, C., 2009. Increased oxidative stress in lymphocytes from untreated Parkinson’s disease patients. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15, 327–328. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.05.013>
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T.D.L., 2014. The prevalence of Parkinson’s disease: A systematic review and meta-analysis: PD PREVALENCE. *Movement Disorders* 29, 1583–1590.
<https://doi.org/10.1002/mds.25945>
- QIAGEN Co., 2014. FlexiGene(R) DNA Handbook.
- Qiang, J.K., Wong, Y.C., Siderowf, A., Hurtig, H.I., Xie, S.X., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., Yearout, D., B Leverenz, J., Montine, T.J., Stern, M., Mendick, S., Jennings, D., Zabetian, C., Marek, K., Chen-Plotkin, A.S., 2013. Plasma apolipoprotein A1 as a biomarker for Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 74, 119–127. <https://doi.org/10.1002/ana.23872>
- R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raghavan, R., Kruijff, L. de, Sterrenburg, M.D., Rogers, B.B., Hladik, C.L., White, C.L., 2004. Alpha-synuclein expression in the developing human brain. *Pediatr. Dev. Pathol.* 7, 506–516. <https://doi.org/10.1007/s10024-003-7080-9>
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D.C.O., Menzies, F.M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F.H., Underwood, B.R., Winslow, A.R., Rubinsztein, D.C., 2010. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 90, 1383–1435. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2009>
- Rideout, H.J., Larsen, K.E., Sulzer, D., Stefanis, L., 2001. Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *J. Neurochem.* 78, 899–908.

- Rideout, H.J., Stefanis, L., 2002. Proteasomal inhibition-induced inclusion formation and death in cortical neurons require transcription and ubiquitination. *Mol. Cell. Neurosci.* 21, 223–238.
- Rijnboutt, S., Aerts, H.M., Geuze, H.J., Tager, J.M., Strous, G.J., 1991. Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 266, 4862–4868.
- Ritz, B., Ascherio, A., Checkoway, H., Marder, K.S., Nelson, L.M., Rocca, W.A., Ross, G.W., Strickland, D., Van Den Eeden, S.K., Gorell, J., 2007. Pooled Analysis of Tobacco Use and Risk of Parkinson Disease. *Archives of Neurology* 64, 990. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.7.990>
- Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tiberti, N., Lisacek, F., Sanchez, J.-C., Müller, M., 2011. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* 12, 77. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-77>
- Ron, I., Horowitz, M., 2005. ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2387–2398. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi240>
- Ron, I., Rapaport, D., Horowitz, M., 2010. Interaction between parkin and mutant glucocerebrosidase variants: a possible link between Parkinson disease and Gaucher disease. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3771–3781. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq292>
- Rubinsztein, D.C., 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443, 780–786. <https://doi.org/10.1038/nature05291>
- Sala, G., Stefanoni, G., Arosio, A., Riva, C., Melchionda, L., Saracchi, E., Fermi, S., Brighina, L., Ferrarese, C., 2014. Reduced expression of the chaperone-mediated autophagy carrier hsc70 protein in lymphomonocytes of patients with Parkinson’s disease. *Brain research* 1546, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.017>
- Salinovich, O., Montelaro, R.C., 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 156, 341–347. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90263-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90263-0)

- Sandal, M., Valle, F., Tessari, I., Mammi, S., Bergantino, E., Musiani, F., Brucale, M., Bubacco, L., Samori, B., 2008. Conformational equilibria in monomeric alpha-synuclein at the single-molecule level. *PLoS Biol.* 6, e6. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060006>
- Sano, K., Atarashi, R., Satoh, K., Ishibashi, D., Nakagaki, T., Iwasaki, Y., Yoshida, M., Murayama, S., Mishima, K., Nishida, N., 2017. Prion-Like Seeding of Misfolded α -Synuclein in the Brains of Dementia with Lewy Body Patients in RT-QUIC. *Mol Neurobiol.* <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0624-1>
- Sarkar, S., Davies, J.E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., Rubinsztein, D.C., 2007a. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 282, 5641–5652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609532200>
- Sarkar, S., Perlstein, E.O., Imarisio, S., Pineau, S., Cordenier, A., Maglathlin, R.L., Webster, J.A., Lewis, T.A., O’Kane, C.J., Schreiber, S.L., Rubinsztein, D.C., 2007b. Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington’s disease models. *Nat. Chem. Biol.* 3, 331–338. <https://doi.org/10.1038/nchembio883>
- Savica, R., Parisi, J.E., Wold, L.E., Josephs, K.A., Ahlskog, J.E., 2012. High school football and risk of neurodegeneration: a community-based study. *Mayo Clin. Proc.* 87, 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.12.016>
- Schapira, A.H., 2008. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson’s disease. *The Lancet. Neurology* 7, 97–109. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(07\)70327-7](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(07)70327-7)
- Schapira, A.H., Mann, V.M., Cooper, J.M., Krige, D., Jenner, P.J., Marsden, C.D., 1992. Mitochondrial function in Parkinson’s disease. The Royal Kings and Queens Parkinson’s Disease Research Group. *Ann. Neurol.* 32 Suppl, S116–124.
- Schondorf, D.C., Aureli, M., McAllister, F.E., Hindley, C.J., Mayer, F., Schmid, B., Sardi, S.P., Valsecchi, M., Hoffmann, S., Schwarz, L.K., Hedrich, U., Berg, D., Shihabuddin, L.S., Hu, J., Pruszek, J., Gygi, S.P., Sonnino, S., Gasser, T., Deleidi, M., 2014. iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson’s disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. *Nature communications* 5, 4028. <https://doi.org/10.1038/ncomms5028>

- Schwarzschild, M.A., Schwid, S.R., Marek, K., Watts, A., Lang, A.E., Oakes, D., Shoulson, I., Ascherio, A., Parkinson Study Group PRECEPT Investigators, Hyson, C., Gorbald, E., Rudolph, A., Kiebertz, K., Fahn, S., Gauger, L., Goetz, C., Seibyl, J., Forrest, M., Ondrasik, J., 2008. Serum urate as a predictor of clinical and radiographic progression in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 65, 716–723. <https://doi.org/10.1001/archneur.2008.65.6.nct70003>
- Scott, D., Roy, S., 2012. α -Synuclein inhibits intersynaptic vesicle mobility and maintains recycling-pool homeostasis. *J. Neurosci.* 32, 10129–10135. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0535-12.2012>
- Serpell, L.C., Berriman, J., Jakes, R., Goedert, M., Crowther, R.A., 2000. Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4897–4902.
- Shahnawaz, M., Tokuda, T., Waragai, M., Mendez, N., Ishii, R., Trenkwalder, C., Mollenhauer, B., Soto, C., 2017. Development of a Biochemical Diagnosis of Parkinson Disease by Detection of α -Synuclein Misfolded Aggregates in Cerebrospinal Fluid. *JAMA Neurol* 74, 163. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.4547>
- Sharma, M., Burré, J., Bronk, P., Zhang, Y., Xu, W., Südhof, T.C., 2012. CSP α knockout causes neurodegeneration by impairing SNAP-25 function. *EMBO J.* 31, 829–841. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.467>
- Sharon, R., Bar-Joseph, I., Frosch, M.P., Walsh, D.M., Hamilton, J.A., Selkoe, D.J., 2003. The formation of highly soluble oligomers of alpha-synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease. *Neuron* 37, 583–95.
- Shi, M., Zabetian, C.P., Hancock, A.M., Ginghina, C., Hong, Z., Yearout, D., Chung, K.A., Quinn, J.F., Peskind, E.R., Galasko, D., Jankovic, J., Leverenz, J.B., Zhang, J., 2010. Significance and confounders of peripheral DJ-1 and alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 480, 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.06.009>
- Shintani, T., Klionsky, D.J., 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306, 990–5. <https://doi.org/10.1126/science.1099993>
- Sidransky, E., Nalls, M.A., Aasly, J.O., Aharon-Peretz, J., Annesi, G., Barbosa, E.R., Bar-Shira, A., Berg, D., Bras, J., Brice, A., Chen, C.M., Clark, L.N., Condroyer, C., De Marco, E.V., Durr, A., Eblan, M.J., Fahn, S., Farrer, M.J.,

- Fung, H.C., Gan-Or, Z., Gasser, T., Gershoni-Baruch, R., Giladi, N., Griffith, A., Gurevich, T., Januario, C., Kropp, P., Lang, A.E., Lee-Chen, G.J., Lesage, S., Marder, K., Mata, I.F., Mirelman, A., Mitsui, J., Mizuta, I., Nicoletti, G., Oliveira, C., Ottman, R., Orr-Urtreger, A., Pereira, L.V., Quattrone, A., Rogaeva, E., Rolfs, A., Rosenbaum, H., Rozenberg, R., Samii, A., Samaddar, T., Schulte, C., Sharma, M., Singleton, A., Spitz, M., Tan, E.K., Tayebi, N., Toda, T., Troiano, A.R., Tsuji, S., Wittstock, M., Wolfsberg, T.G., Wu, Y.R., Zabetian, C.P., Zhao, Y., Ziegler, S.G., 2009. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *The New England journal of medicine* 361, 1651–61. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0901281>
- Silvestri, L., Caputo, V., Bellacchio, E., Atorino, L., Dallapiccola, B., Valente, E.M., Casari, G., 2005. Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3477–3492. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi377>
- Singleton, A.B., 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, M.R., Muentner, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J., Gwinn-Hardy, K., 2003. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841. <https://doi.org/10.1126/science.1090278>
- Smisek, D.L., Hoagland, D.A., 1989. Agarose gel electrophoresis of high molecular weight, synthetic polyelectrolytes. *Macromolecules* 22, 2270–2277. <https://doi.org/10.1021/ma00195a048>
- Smith, W.W., Jiang, H., Pei, Z., Tanaka, Y., Morita, H., Sawa, A., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Ross, C.A., 2005. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3801–3811. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi396>
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., Goedert, M., 1998. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6469–73.

- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., Goedert, M., 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–40.
<https://doi.org/10.1038/42166>
- Stewart, T., Sossi, V., Aasly, J.O., Wszolek, Z.K., Uitti, R.J., Hasegawa, K., Yokoyama, T., Zabetian, C.P., Leverenz, J.B., Stoessl, A.J., Wang, Y., Ginchina, C., Liu, C., Cain, K.C., Auinger, P., Kang, U.J., Jensen, P.H., Shi, M., Zhang, J., 2015. Phosphorylated α -synuclein in Parkinson's disease: correlation depends on disease severity. *Acta Neuropathol Commun* 3, 7.
<https://doi.org/10.1186/s40478-015-0185-3>
- Stoka, V., Turk, V., Turk, B., 2016. Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Res. Rev.* 32, 22–37.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.04.010>
- Sunwoo, M.-K., Kim, S.-M., Lee, S., Lee, P.H., 2011. Parkinsonism associated with glucocerebrosidase mutation. *J Clin Neurol* 7, 99–101.
<https://doi.org/10.3988/jcn.2011.7.2.99>
- Swanson, C.R., Berlyand, Y., Xie, S.X., Alcalay, R.N., Chahine, L.M., Chen-Plotkin, A.S., 2015. Plasma apolipoprotein A1 associates with age at onset and motor severity in early Parkinson's disease patients. *Mov. Disord.* 30, 1648–1656.
<https://doi.org/10.1002/mds.26290>
- Takahashi, T., Yamashita, H., Nakamura, T., Nagano, Y., Nakamura, S., 2002. Tyrosine 125 of alpha-synuclein plays a critical role for dimerization following nitritative stress. *Brain Res.* 938, 73–80.
- Tan, L.C., Koh, W.-P., Yuan, J.-M., Wang, R., Au, W.-L., Tan, J.H., Tan, E.-K., Yu, M.C., 2008. Differential effects of black versus green tea on risk of Parkinson's disease in the Singapore Chinese Health Study. *Am. J. Epidemiol.* 167, 553–560. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm338>
- Tenreiro, S., Eckermann, K., Outeiro, T.F., 2014. Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe? *Front Mol Neurosci* 7, 42.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00042>
- Tinsley, R.B., Kotschet, K., Modesto, D., Ng, H., Wang, Y., Nagley, P., Shaw, G., Horne, M.K., 2010. Sensitive and specific detection of α -synuclein in human plasma. *J. Neurosci. Res.* 88, 2693–2700. <https://doi.org/10.1002/jnr.22417>

- Todorova, A., Jenner, P., Ray Chaudhuri, K., 2014. Non-motor Parkinson's: integral to motor Parkinson's, yet often neglected. *Practical Neurology* 14, 310–322.
<https://doi.org/10.1136/practneurol-2013-000741>
- Tofaris, G.K., Layfield, R., Spillantini, M.G., 2001. alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett.* 509, 22–26.
- Tokuda, T., Qureshi, M.M., Ardah, M.T., Varghese, S., Shehab, S.A., Kasai, T., Ishigami, N., Tamaoka, A., Nakagawa, M., El-Agnaf, O.M., 2010. Detection of elevated levels of alpha-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* 75, 1766–72.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181fd613b>
- Tooze, S.A., Yoshimori, T., 2010. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat. Cell Biol.* 12, 831–835. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-831>
- Tsigelny, I.F., Bar-On, P., Sharikov, Y., Crews, L., Hashimoto, M., Miller, M.A., Keller, S.H., Platoshyn, O., Yuan, J.X.-J., Masliah, E., 2007. Dynamics of alpha-synuclein aggregation and inhibition of pore-like oligomer development by beta-synuclein. *FEBS J.* 274, 1862–1877. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05733.x>
- Uéda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D.A., Kondo, J., Ihara, Y., Saitoh, T., 1993. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11282–11286.
- Urban, D.J., Zheng, W., Goker-Alpan, O., Jadhav, A., Lamarca, M.E., Inglese, J., Sidransky, E., Austin, C.P., 2008. Optimization and validation of two miniaturized glucocerebrosidase enzyme assays for high throughput screening. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 11, 817–24.
- Uversky, V.N., 2007. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J. Neurochem.* 103, 17–37.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04764.x>
- Uversky, V.N., Lee, H.J., Li, J., Fink, A.L., Lee, S.J., 2001a. Stabilization of partially folded conformation during alpha-synuclein oligomerization in both purified and cytosolic preparations. *J. Biol. Chem.* 276, 43495–43498.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C100551200>

- Uversky, V.N., Li, J., Fink, A.L., 2001b. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J. Biol. Chem.* 276, 44284–44296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105343200>
- Vamvaca, K., Volles, M.J., Lansbury, P.T., 2009. The first N-terminal amino acids of alpha-synuclein are essential for alpha-helical structure formation in vitro and membrane binding in yeast. *J. Mol. Biol.* 389, 413–424. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.021>
- Van Maele-Fabry, G., Hoet, P., Vilain, F., Lison, D., 2012. Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Environ Int* 46, 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.05.004>
- Vekrellis, K., Rideout, H.J., Stefanis, L., 2004. Neurobiology of alpha-synuclein. *Molecular neurobiology* 30, 1–21. <https://doi.org/10.1385/MN:30:1:001>
- Verhoef, L.G.G.C., Lindsten, K., Masucci, M.G., Dantuma, N.P., 2002. Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2689–2700.
- Vogiatzi, T., Xilouri, M., Vekrellis, K., Stefanis, L., 2008. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 283, 23542–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801992200>
- Walsh, D.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Condron, M.M., Teplow, D.B., 1997. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol. Chem.* 272, 22364–22372.
- Wang, X., Yu, S., Li, F., Feng, T., 2015. Detection of alpha-synuclein oligomers in red blood cells as a potential biomarker of Parkinson's disease. *Neuroscience letters* 599, 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.05.030>
- Wang, Y., Shi, M., Chung, K.A., Zabetian, C.P., Leverenz, J.B., Berg, D., Srulijes, K., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., Siderowf, A.D., Hurtig, H., Litvan, I., Schiess, M.C., Peskind, E.R., Masuda, M., Hasegawa, M., Lin, X., Pan, C., Galasko, D., Goldstein, D.S., Jensen, P.H., Yang, H., Cain, K.C., Zhang, J., 2012. Phosphorylated -Synuclein in Parkinson's Disease. *Science Translational Medicine* 4, 121ra20-121ra20. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002566>

- Wang, Y., Singh, R., Massey, A.C., Kane, S.S., Kaushik, S., Grant, T., Xiang, Y., Cuervo, A.M., Czaja, M.J., 2008. Loss of macroautophagy promotes or prevents fibroblast apoptosis depending on the death stimulus. *J. Biol. Chem.* 283, 4766–4777. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706666200>
- Waragai, M., Wei, J., Fujita, M., Nakai, M., Ho, G.J., Masliah, E., Akatsu, H., Yamada, T., Hashimoto, M., 2006. Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 967–972. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.011>
- Webb, J.L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J.N., Rubinsztein, D.C., 2003. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.* 278, 25009–25013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300227200>
- Weinreb, P.H., Zhen, W., Poon, A.W., Conway, K.A., Lansbury, P.T., 1996. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35, 13709–13715. <https://doi.org/10.1021/bi961799n>
- Weisskopf, M.G., O'Reilly, E., Chen, H., Schwarzschild, M.A., Ascherio, A., 2007. Plasma urate and risk of Parkinson's disease. *Am. J. Epidemiol.* 166, 561–567. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm127>
- Wersinger, C., Prou, D., Vernier, P., Sidhu, A., 2003. Modulation of dopamine transporter function by alpha-synuclein is altered by impairment of cell adhesion and by induction of oxidative stress. *FASEB J.* 17, 2151–2153. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0152fje>
- Wersinger, C., Sidhu, A., 2003. Attenuation of dopamine transporter activity by alpha-synuclein. *Neurosci. Lett.* 340, 189–192.
- Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Winslow, A.R., Chen, C.-W., Corrochano, S., Acevedo-Arozena, A., Gordon, D.E., Peden, A.A., Lichtenberg, M., Menzies, F.M., Ravikumar, B., Imarisio, S., Brown, S., O'Kane, C.J., Rubinsztein, D.C., 2010. α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J. Cell Biol.* 190, 1023–1037. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003122>
- Wood, S.J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J.C., Citron, M., Biere, A.L., 1999. alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* 274, 19509–19512.

- Wu, G., Wang, X., Feng, X., Zhang, A., Li, J., Gu, K., Huang, J., Pang, S., Dong, H., Gao, H., Yan, B., 2011. Altered expression of autophagic genes in the peripheral leukocytes of patients with sporadic Parkinson's disease. *Brain research* 1394, 105–11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.04.013>
- Xilouri, M., Brekk, O.R., Kirik, D., Stefanis, L., 2013. LAMP2A as a therapeutic target in Parkinson disease. *Autophagy* 9, 2166–8. <https://doi.org/10.4161/auto.26451>
- Xilouri, M., Brekk, O.R., Stefanis, L., 2016. Autophagy and Alpha-Synuclein: Relevance to Parkinson's Disease and Related Synucleopathies. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 31, 178–92. <https://doi.org/10.1002/mds.26477>
- Xilouri, M., Stefanis, L., 2016. Chaperone mediated autophagy in aging: Starve to prosper. *Ageing Res. Rev.* 32, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.07.001>
- Xilouri, M., Stefanis, L., 2011. Autophagic pathways in Parkinson disease and related disorders. *Expert reviews in molecular medicine* 13, e8. <https://doi.org/10.1017/S1462399411001803>
- Xilouri, M., Vogiatzi, T., Vekrellis, K., Park, D., Stefanis, L., 2009. Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PloS one* 4, e5515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005515>
- Yang, Y.-P., Liang, Z.-Q., Gu, Z.-L., Qin, Z.-H., 2005. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol. Sin.* 26, 1421–1434. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00235.x>
- Yap, T.L., Gruschus, J.M., Velayati, A., Westbroek, W., Goldin, E., Moaven, N., Sidransky, E., Lee, J.C., 2011. Alpha-synuclein interacts with Glucocerebrosidase providing a molecular link between Parkinson and Gaucher diseases. *J. Biol. Chem.* 286, 28080–28088. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237859>
- Zarranz, J.J., Alegre, J., Gómez-Esteban, J.C., Lezcano, E., Ros, R., Ampuero, I., Vidal, L., Hoenicka, J., Rodriguez, O., Atarés, B., Llorens, V., Gomez Tortosa, E., del Ser, T., Muñoz, D.G., de Yebenes, J.G., 2004. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 55, 164–173. <https://doi.org/10.1002/ana.10795>

- Zhang, T.-M., Yu, S.-Y., Guo, P., Du, Y., Hu, Y., Piao, Y.-S., Zuo, L.-J., Lian, T.-H., Wang, R.-D., Yu, Q.-J., Jin, Z., Zhang, W., 2016. Nonmotor symptoms in patients with Parkinson disease: A cross-sectional observational study. *Medicine (Baltimore)* 95, e5400.
<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000005400>
- Zhu, J.H., Guo, F., Shelburne, J., Watkins, S., Chu, C.T., 2003. Localization of phosphorylated ERK/MAP kinases to mitochondria and autophagosomes in Lewy body diseases. *Brain pathology* 13, 473–81.
- Zimmer, K.P., le Couteur, P., Aerts, H.M., Harzer, K., Fukuda, M., O'Brien, J.S., Naim, H.Y., 1999. Intracellular transport of acid beta-glucosidase and lysosome-associated membrane proteins is affected in Gaucher's disease (G202R mutation). *J. Pathol.* 188, 407–414.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199908\)188:4<407::AID-PATH377>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199908)188:4<407::AID-PATH377>3.0.CO;2-Z)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πληροφοριακό σημείωμα

ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΕΣ ΣΕ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ Β' ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ

Σας προσκαλούμε να συμμετάσχετε στην ερευνητική μελέτη με τίτλο:
«Μέτρηση επιπέδων και μορφών α-συνουκλείνης σε βιολογικό υλικό ασθενών με νόσο
Πάρκινσον και μαρτύρων, και συσχέτιση με γενετικούς πολυμορφισμούς»

Αγαπητέ/Αγαπητή συμμετέχοντα στην μελέτη,

Οι πληροφορίες που περιέχονται σε αυτό το σημείωμα στοχεύουν στην ενημέρωσή σας σχετικά με τους στόχους, την πορεία, τα πλεονεκτήματα, αλλά και πιθανά μειονεκτήματα και κινδύνους που ενδέχεται να παρουσιαστούν κατά την διάρκεια της Μελέτης. Αυτό το Ενημερωτικό Σημείωμα μπορεί να περιέχει εκφράσεις που δεν γνωρίζετε ή δεν καταλαβαίνετε. Παρακαλώ διαβάστε το προσεκτικά και απευθύνετε όσες ερωτήσεις πιστεύετε είναι απαραίτητες. Παρακαλώ μην υπογράψετε για την συμμετοχή σας, παρά μόνον εάν όλα τα ερωτήματά σας απαντηθούν με ικανοποιητικό τρόπο. Παρακαλώ επικοινωνήστε με έναν από τα μέλη της Ερευνητικής ομάδας ή με τον ιατρό της Μελέτης στην περίπτωση που υπάρχουν ερωτήσεις, ή ορισμένες από τις έννοιες δεν είναι κατανοητές. Σε περίπτωση που θέλετε να συζητήσετε την συμμετοχή σας στην Μελέτη με άλλο ή άλλα πρόσωπα, είναι δυνατόν να σας δοθεί ένα αντίγραφο του Πληροφοριακού Σημειώματος πριν υπογράψετε.

Εισαγωγή

Η νόσος Πάρκινσον είναι μία νευρολογική διαταραχή. Πρόκειται για την δεύτερη συνηθέστερη νευροεκφυλιστική διαταραχή μετά τη νόσο Αλτσχάιμερ. Επηρεάζει περίπου 1% του πληθυσμού άνω των 65 ετών. Η μέση ηλικία έναρξης είναι τα 60 έτη. Αφορά στα νευρικά κύτταρα μιας συγκεκριμένης περιοχής του εγκεφάλου που ονομάζεται μέλαινα ουσία, τα οποία παθαίνουν βλάβη ή πεθαίνουν. Φυσιολογικά, τα κύτταρα αυτά παράγουν μία ουσία η οποία ονομάζεται ντοπαμίνη και επιτρέπει την ομαλή και συντονισμένη κίνηση των μυών. Όταν το μεγάλο ποσοστό των κυττάρων αυτών υποστούν βλάβη, εμφανίζονται τα συμπτώματα της νόσου δηλαδή ο τρόμος, η βραδύτητα των κινήσεων, η δυσκαμψία και η διαταραχή της ισορροπίας. Μέχρι τώρα η αιτία της νόσου Πάρκινσον είναι άγνωστη. Μελέτες που έχουν γίνει συγκλίνουν στη διαπίστωση ότι σε πολλές περιπτώσεις, προκαλείται είτε από γενετικές ανωμαλίες είτε από την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα. Έχει διαπιστωθεί τελευταία ότι υπάρχει οικογενειακό ιστορικό της νόσου σε ποσοστό 5-10% των ασθενών. Έχουν ενοχοποιηθεί συγκεκριμένα γονίδια για πρόκληση της νόσου σε οικογένειες Παρκινσονικών. Μελέτες σε οικογένειες ασθενών μπορούν να οδηγήσουν σε περαιτέρω διαλεύκανση της αιτιολογίας της νόσου. Έχουν μέχρι στιγμής ανευρεθεί 15 γονιδιακοί τύποι, δηλαδή περιοχές του γενετικού υλικού όπου υπάρχουν γενετικές παραλλαγές που σχετίζονται με την ανάπτυξη της νόσου. Ανάμεσα σε αυτά τα γονίδια, το γονίδιο SNCA, που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη α-συνουκλείνη είναι ιδιαίτερα σημαντικό. Η ανώμαλη εναπόθεση α-συνουκλείνης αποτελεί βασικό παθολογοανατομικό

χαρακτηριστικό της νόσου. Εάν και η αιτιολογία της νόσου παραμένει άγνωστη στα περισσότερα περιστατικά, θεωρείται ότι σημαντικό ρόλο παίζει η απορρύθμιση της λειτουργίας της α-συνουκλεΐνης. Υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα σχετικά με την δυνατότητα χρησιμοποίησης της μέτρησης των επιπέδων της α-συνουκλεΐνης ως βιολογικού δείκτη στη νόσο Πάρκινσον. Συμμετέχετε στην Μελέτη αυτή γιατί έχετε διαγνωσθεί με νόσο Πάρκινσον. Εναλλακτικά, συμμετέχετε ως άτομο ελέγχου. Δεν είναι γνωστό ποιές είναι οι αλλαγές που συμβαίνουν στους εγκεφάλους των ασθενών πριν ακόμη νοσήσουν φανερά, και που οδηγούν με τα χρόνια στο νευρωνικό εκφυλισμό. Είναι πολύ σημαντικό να βρεθούν βιολογικοί δείκτες που με έγκυρο τρόπο θα προβλέπουν ότι το άτομο θα νοσήσει ακόμη και πολλά χρόνια πριν την εκδήλωση της νόσου. Οι ίδιοι βιολογικοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για να παρακολουθηθεί με αντικειμενικό τρόπο η πορεία της νόσου. Αυτό θα έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς ελπίζουμε ότι τα επόμενα χρόνια θα αναπτυχθούν θεραπείες που θα είναι νευροπροστατευτικές, θα αντιμετωπίζουν δηλαδή τη νόσο στην βάση της, και θα μπορούν να εφαρμόζονται ακόμη και σε άτομα που ακόμη δεν έχουν συμπτώματα.

Σας ζητάμε σήμερα να μας βοηθήσετε σε αυτή την προσπάθεια.

Συμμετοχή

Αφού ενημερωθείτε σχετικά με την Μελέτη και τις εξετάσεις που θα διενεργηθούν στα πλαίσιά της, θα σας ζητηθεί να υπογράψετε μία φόρμα συγκατάθεσης. Με την υπογραφή σας συμφωνείτε να λάβετε μέρος στην παρούσα Μελέτη. Δεν έχετε υποχρέωση να λάβετε μέρος στην Μελέτη. Η συμμετοχή σας είναι προαιρετική και είστε ελεύθεροι να την ακυρώσετε σε οποιοδήποτε χρονικό σημείο. Σε περίπτωση που δεν θέλετε να συμμετάσχετε στην Μελέτη, αυτό δεν θα επηρεάσει την ιατρική σας περίθαλψη. Ο ιατρός της μελέτης, όμως, ή ο κύριος ερευνητής, έχει και αυτός το δικαίωμα να τερματίσει τη συμμετοχή σας στην Μελέτη για οποιονδήποτε λόγο και σε οποιαδήποτε στιγμή.

Στόχος και Πορεία της μελέτης

Ο γενικός στόχος της μελέτης είναι η ανακάλυψη χαρακτηριστικών βιολογικών δεικτών της νόσου Πάρκινσον. Ο ειδικότερος στόχος είναι η μελέτη επιπέδων της α-συνουκλεΐνης. Θεωρούμε ότι μία μέρα αυτοί οι βιολογικοί δείκτες θα βοηθήσουν στην διάγνωση και την πρόγνωση της πορείας της νόσου. Επιπλέον, είναι πιθανό να ανοίξουν τον δρόμο σε πρωτοπόρες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Αρχικά, μια κλινική εξέταση, επικεντρωμένη στην εξέταση κινητικών λειτουργιών, και ερωτήσεις στις οποίες θα υποβληθείτε θα επιβεβαιώσουν κατά πόσον είστε κατάλληλος/η για την συμμετοχή σας σε αυτή την μελέτη. Στην περίπτωση που η πρώτη αυτή εκτίμηση δείξει ότι είστε κατάλληλος/η για συμμετοχή στην Μελέτη, και έχετε δώσει την συγκατάθεσή σας, θα λάβουμε ένα δείγμα αίματος (για την απομόνωση DNA, πλάσματος και ερυθρών αιμοσφαιρίων), και, εφ' όσον δώσετε την συγκατάθεσή σας, ένα δείγμα εγκεφαλονωτιαίου υγρού, για την ανάλυση των γενετικών πληροφοριών, βιολογικών δεικτών και μεταβολικών μονοπατιών. Τα ευρήματα από τους βιολογικούς σας δείκτες θα χρησιμοποιηθούν για να απαντήσουν επιστημονικά ζητήματα σχετικά με τη νόσο Πάρκινσον. Τα δεδομένα σας θα χρησιμοποιηθούν μόνο για ερευνητικούς σκοπούς. Οι εξετάσεις, ωστόσο, αυτές που θα πραγματοποιηθούν στα πλαίσια της παρούσας Μελέτης δεν πρόκειται να αλλάξουν την διάγνωσή σας, ούτε την θεραπευτική σας αντιμετώπιση. Αυτή η Μελέτη πραγματοποιείται στην Β' Νευρολογική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών,

και σε επιπλέον 2 Ελληνικά Ακαδημαϊκά Κέντρα, στα πλαίσια του Προγράμματος «Θαλής», που επιχορηγείται από την Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας.

Διαδικασία: Δειγματοληψία και Αποθήκευση των δειγμάτων

Κατά τη διάρκεια της Μελέτης θα ληφθούν δείγματα αίματος, και, πιθανώς, εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Δειγματοληψία Εγκεφαλονωτιαίου Υγρού (ENY). Θα σας ζητηθεί να υπογράψετε και ξεχωριστά κατά πόσον συγκατατίθεστε για την λήψη ENY. Η συμμετοχή σας στην Μελέτη δεν εξαρτάται από το εάν συμφωνήσετε ή όχι στην διενέργεια αυτής της εξέτασης. Μπορείτε και να το σκεφτείτε και να αλλάξετε γνώμη κατά την διάρκεια αυτής της Μελέτης σχετικά με αυτό το θέμα. Το ENY είναι ιδιαίτερα κατάλληλο για την εκτίμηση αλλαγών που επισυμβαίνουν στον εγκέφαλο ασθενών, καθώς περιέχει πολλά από τα συστατικά που υπάρχουν και στον εγκέφαλο. Ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός περιβάλλονται από 150 ml αυτού του υγρού, που ανανεώνεται 3 φορές την ημέρα. Η λήψη 10-20 ml ENY γίνεται με την διάτρηση του νωτιαίου σωλήνα με μία λεπτή, αμβλεία βελόνα, ανάμεσα σε δύο σπονδυλικά σώματα, στην κατώτερη οσφυϊκή μοίρα. Προηγείται ο αποκλεισμός κάποιας αιμορραγικής διάθεσης. Το δέρμα διατιτράινεται από μία λεπτή αιχμηρή βελόνα, δια μέσου της οποίας διαπερνά η εσωτερική αμβλεία βελόνα. Δεν χρειάζεται συνήθως τοπική αναισθησία, αλλά αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί εάν ο ιατρός σας ή εσείς το θεωρήσετε σκόπιμο.

Δειγματοληψία Αίματος: Θα σας ζητηθεί να υπογράψετε και ξεχωριστά κατά πόσον συγκατατίθεστε για την λήψη αίματος. Το ποσό του αίματος (περίπου 25 ml) που λαμβάνεται δεν αντιπροσωπεύει απειλή για σας υγεία σας. Χρησιμοποιείται η παρακάτω διαδικασία: γίνεται καθαρισμός και αποστείρωση συγκεκριμένης περιοχής του δέρματος, που συνήθως είναι στον βραχίονα, και εισάγεται ένας φλεβοκαθετήρας δια μέσου του οποίου απορροφάται αίμα. Το αίμα στη συνέχεια τοποθετείται σε ειδικό σωλήνα. Μετά την λήψη της απαιτούμενης ποσότητας, αφαιρείται ο φλεβοκαθετήρας και τοποθετείται μικρό έμπλαστρο. Τα δείγματα αυτά θα αποθηκευθούν κατ' αρχήν στο τοπικό Κέντρο, και θα αναλυθούν από τα μέλη της ερευνητικής ομάδας της Μελέτης. Μέρος των εν λόγω δειγμάτων καθώς και δημογραφικά και κλινικά δεδομένα θα αποθηκευθούν σε μία κοινή Βιοτράπεζα των συμμετεχόντων Ιδρυμάτων για τουλάχιστον 20 χρόνια. Αν κατά τη διάρκεια αυτή ανακαλυφθούν νέα γονίδια ή καινούργια μονοπάτια μεταβολισμού, που ενδεχομένως συνδέονται με τη νόσο Πάρκινσον, τα δείγματά σας μπορεί να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση. Είστε, φυσικά, ο/η κάτοχος του δείγματος κατά τη διάρκεια και μετά την Μελέτη, κάτι που σας παρέχει το δικαίωμα για καταστροφή των δειγμάτων ανά πάσα στιγμή. Στην περίπτωση που επιθυμείτε κάτι τέτοιο, πρέπει να επικοινωνήσετε με τον ιατρό της Μελέτης και να τον ενημερώσετε για την απόφασή σας.

Πλεονεκτήματα συμμετοχής στην Μελέτη

Η Μελέτη αυτή έχει ερευνητικούς σκοπούς. Εσείς προσωπικά δεν θα έχετε κάποια άμεσο θεραπευτικό όφελος από την συμμετοχή σας, και ούτε θα υπάρχει κάποιο άμεσο πλεονέκτημα σε σχέση με την διάγνωση ή θεραπεία της ασθένειάς σας. Υπάρχει η πιθανότητα έμμεσης ωφέλειας για εσάς, εφ' όσον η Μελέτη βοηθήσει στην ανακάλυψη καινούργιων νευροπροστατευτικών θεραπειών ή βιολογικών δεικτών. Επιπλέον, με την συμμετοχή σας θα βοηθήσετε μελλοντικούς ασθενείς, που μπορεί να συμπεριλαμβάνουν και μέλη της οικογένειάς σας.

Πιθανά Προβλήματα συμμετοχής στην Μελέτη

Αιμοληψία: Μπορεί ορισμένοι ασθενείς να εμφανίσουν έναν τοπικό πόνο, ένα τοπικό αιμάτωμα, ζάλη ή λιποθυμία κατά τη διάρκεια ή μετά την αιμοληψία. Θρόμβοι ή λοιμώξεις σπάνια παρουσιάζονται.

Δειγματοληψία Εγκεφαλονωτιαίου Υγρού (ENY) με Οσφυονωτιαία Παρακέντηση: Κατά την διάτρηση του νωτιαίου σωλήνα, η βελόνα μπορεί να αγγίξει νωτιαία νεύρα που θα μπορούσαν να αποτελέσουν το έναυσμα για ένα αίσθημα σαν τρύπημα με αγκάθι, ή μια ελαφρά αίσθηση ηλεκτρικού ερεθισμού στα πόδια. Η βελόνα δεν μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο νωτιαίο μυελό, καθώς ο μυελός τελειώνει επάνω από την περιοχή διάτρησης. Τα τυχόν συμπτώματα είναι παροδικά. Μερικοί άνθρωποι (10 έως 25 %) αντιμετωπίζουν πονοκέφαλο μετά από μια οσφυονωτιαία παρακέντηση. Οι μισές από αυτές τις περιπτώσεις περιγράφονται ως σοβαρές. Ο πονοκέφαλος αυτός συνήθως εμφανίζεται με την έγερση από την κατακεκλιμένη θέση, δεν διαρκεί περισσότερο από 48 έως 72 ώρες και εξαφανίζεται από μόνος του. Τα παυσίπονα είναι συνήθως αναποτελεσματικά, παρόλο που μπορεί να βοηθήσει η κατάκλιση για μερικές ώρες. Επιπλέον, μερικοί ασθενείς μετά από μια οσφυονωτιαία παρακέντηση είναι δυνατόν να αισθάνονται κουρασμένοι ή να έχουν έναν ελαφρύ πόνο στην περιοχή της σπονδυλικής στήλης όπου έγινε η διάτρηση. Ορισμένοι ασθενείς μπορεί να παρουσιάσουν ελαφρές διαταραχές ύπνου για μία ή δύο ημέρες μετά από μια οσφυονωτιαία παρακέντηση.

Εμπιστευτικότητα και Ιδιωτικό απόρρητο

Η συμμετοχή σας στην Μελέτη καθώς και τα αποτελέσματα που θα προκύψουν είναι αυστηρά εμπιστευτικά. Γνωρίζουμε ότι σε περίπτωση που τα αποτελέσματα αυτά περιέλθουν εν γνώσει συγγενών σας ή τρίτων προσώπων, ενδέχεται να χρησιμοποιηθούν λανθασμένα. Κακή χρήση θα μπορούσε να οδηγήσει σε δυσμενείς ψυχολογικές επιπτώσεις ή μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες επιπτώσεις όσον αφορά τις πιθανότητες εύρεσης εργασίας ή κάλυψης ασφάλισης. Αυτό μπορεί επίσης να επηρεάσει μέλη της οικογένειάς σας. Για να αποφευχθούν αυτοί οι κίνδυνοι, όλα τα δεδομένα της Μελέτης όσον αφορά τους βιολογικούς δείκτες καθώς και όλες τις κλινικές πληροφορίες θεωρούνται αυστηρά εμπιστευτικά. Δείγματα και στοιχεία τα οποία λαμβάνουμε, είναι κωδικοποιημένα δύο φορές, προκειμένου να βεβαιωθείτε ότι όλα τα δεδομένα είναι εμπιστευτικά. Η διαδικασία της διπλής κωδικοποίησης είναι ως εξής: Μόλις γίνει η εισαγωγή σας στην Μελέτη, λαμβάνετε έναν κωδικό της Μελέτης. Όλα τα κλινικά στοιχεία και τα δείγματα που σας αναλογούν φέρουν αυτό τον κωδικό. Το αρχικό δείγμα κωδικοποιείται και δεν εμφανίζει κανένα στοιχείο της ταυτότητάς σας. Οι πληροφορίες που αφορούν τα δεδομένα των βιολογικών δεικτών αποθηκεύονται σε μια δεύτερη ανεξάρτητη ασφαλή βάση δεδομένων. Μόνον εξουσιοδοτημένο προσωπικό έχει πρόσβαση στα κωδικοποιημένα δεδομένα των βιολογικών δεικτών σας. Το προσωπικό αυτό δεν έχει πρόσβαση στο όνομά σας ή τα κλινικά σας στοιχεία. Στα πλαίσια της Μελέτης όλα τα στοιχεία σας (πχ ηλικία, φύλο) αποθηκεύονται με κωδικούς χωρίς να αναφέρεται το όνομά σας. Όλα τα δεδομένα που συλλέγονται στα πλαίσια της Μελέτης καταγράφονται ηλεκτρονικά και αξιολογούνται στατιστικά. Μετά την ολοκλήρωση της Μελέτης όλα τα δεδομένα αποθηκεύονται και αρχειοθετούνται σύμφωνα με τις ισχύουσες κατευθυντήριες γραμμές. Η μεταφορά και ανταλλαγή των στοιχείων σας ανάμεσα στους ερευνητικούς εταίρους της Μελέτης γίνεται πάντα με την χρήση κωδικών. Στην περίπτωση της δημοσίευσης των αποτελεσμάτων της Μελέτης, το απόρρητο των προσωπικών σας δεδομένων είναι εγγυημένο. Εάν

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε τα βιολογικά σας δείγματα με οποιοδήποτε άλλον τρόπο από αυτόν που αναφέρεται σε αυτό το φύλλο πληροφοριών, θα πρέπει να ληφθεί πρώτα έγκριση της αντίστοιχης Επιτροπής Βιοηθικής. Σε περίπτωση που λάβουμε έγκριση, θα σας ζητήσουμε για άλλη μια φορά συγκατάθεση για την συμμετοχή σας, σύμφωνα με τη νέα Μελέτη.

Ασφάλιση

Η Μελέτη δεν προσφέρει κάποιο ειδικό είδος ασφάλισης. Παρακαλώ να ενημερώσετε αμέσως τον ιατρό της Μελέτης εάν νομίζετε ότι η συμμετοχή σας στην Μελέτη σας προξένησε κάποια σωματική βλάβη ή οδύνη. Ο ιατρός της Μελέτης θα κάνει ό,τι είναι δυνατόν για την ιατρική σας φροντίδα.

Έντυπα συγκατάθεσης

ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ #1

ΤΙΤΛΟΣ: «Μέτρηση επιπέδων και μορφών α-συνουκλείνης σε βιολογικό υλικό ασθενών με νόσο Πάρκινσον και μαρτύρων, και συσχέτιση με γενετικούς πολυμορφισμούς»

1. Παρακαλώ διαβάστε προσεκτικά αυτό το κείμενο.
 2. Αν υπάρχει κάτι που δεν καταλαβαίνετε όσον αφορά το πληροφοριακό σημείωμα ή θέλετε να ρωτήσετε οποιαδήποτε άλλη ερώτηση που σχετίζεται με τη Μελέτη παρακαλώ επικοινωνήστε με τον ιατρό της Μελέτης όπως αναφέρεται στο τέλος του πληροφοριακού σημειώματος
 3. Παρακαλώ ελέγξτε αν οι κάτωθι πληροφορίες είναι σωστές. Αν είναι έτσι και αν έχετε κατανοήσει τις εξηγήσεις που σας δόθηκαν και δεν έχετε άλλες απορίες τότε σημειώστε με ένα τικ στα κάτωθι κουτάκια και υπογράψτε.
- ☐ Ο ιατρός της Μελέτης, που αναγράφεται στο παρόν έγγραφο, μου έχει δώσει γραπτό πληροφοριακό σημείωμα για τη Μελέτη με τον τίτλο που αναφέρεται πιο πάνω. Αυτό περιλαμβάνει τους πιθανούς κινδύνους, τα δικαιώματά μου σαν ασθενής και τι θα μου συμβεί στη Μελέτη. Μου δόθηκε η ευκαιρία να υποβάλω ερωτήσεις και να λάβω απαντήσεις για τις απορίες μου. Μου δόθηκε αρκετός χρόνος για να αποφασίσω για την συμμετοχή μου ή όχι στη Μελέτη. Γνωρίζω ότι ο ιατρός της Μελέτης θα είναι διαθέσιμος για επιπλέον ερωτήματα, εάν αυτά προκύψουν κατά την διάρκεια της Μελέτης.
 - ☐ Έχω καταλάβει ότι η συμμετοχή μου είναι εθελοντική και είμαι ελεύθερος να αποσυρθώ από τη Μελέτη οποιαδήποτε στιγμή το θελήσω, χωρίς να δώσω καμία εξήγηση και χωρίς αυτό να επηρεάσει την ιατρική μου φροντίδα ή τα νομικά δικαιώματά μου.
 - ☐ Έχω αντιληφθεί ότι η αναγνώριση των βιολογικών δειγμάτων μου και των πληροφοριών που με αφορούν θα γίνεται με έναν κωδικό που θα δοθεί σε αυτά και ότι έτσι εξασφαλίζεται η ανώνυμη συμμετοχή μου στην Μελέτη.
 - ☐ Έχω καταλάβει ότι ο ιατρικός μου φάκελος και τα στοιχεία από το ιατρικό ιστορικό μου μπορεί να αναζητηθούν και να μελετηθούν από εξουσιοδοτημένα άτομα της ερευνητικής ομάδας που έχει σχεδιάσει και θα εκτελέσει τη Μελέτη. Αυτό θα γίνει με εμπιστευτικότητα. Δίδω την άδεια μου σε αυτά τα άτομα για την πρόσβασή τους στον ιατρικό μου φάκελο. Τα στοιχεία του φακέλου μου θα εμπλουτιστούν κατά την διάρκεια της συμμετοχής μου στην Μελέτη με επιπλέον στοιχεία, που θα αφορούν την κλινική μου κατάσταση. Στον ιατρικό μου φάκελο δεν θα αναφέρονται στοιχεία από την μελέτη των βιολογικών δεικτών που θα προκύψουν κατά την διάρκεια της Μελέτης. Στοιχεία από τον ιατρικό μου φάκελο θα χρησιμοποιηθούν σε επιπλέον αρχεία (ηλεκτρονικά ή γραπτά), όπου δεν θα αναφέρεται το όνομά μου, παρά μόνον ο κωδικός που θα αντιστοιχεί στα δεδομένα μου. Τα δεδομένα σε αυτά τα επιπλέον αρχεία θα αναλυθούν στα πλαίσια της Μελέτης με στατιστικές μεθόδους. Τα αρχεία αυτά θα αρχειοθετηθούν και θα είναι διαθέσιμα σε ερευνητές και μετά το πέρας της μελέτης, για τουλάχιστον 20 έτη. Η αντιστοίχιση του ιατρικού μου φακέλου με τον κωδικό θα υπάρχει μόνο σε ειδικό έγγραφο που θα είναι σε ξεχωριστό αρχείο, που θα φυλάσσεται από τον υπεύθυνο της Μελέτης και δεν θα είναι διαθέσιμο σε άλλα άτομα.
 - ☐ Δέχομαι τα βιολογικά μου δείγματα να αποθηκευτούν από τον Ιατρό της Μελέτης και να σταλούν σε συνεργαζόμενα κέντρα για περαιτέρω ανάλυση. Δέχομαι τα δείγματα που δεν θα χρησιμοποιηθούν να παραμείνουν αποθηκευμένα για 20 έτη. Σε οποιαδήποτε στιγμή, μπορώ να ζητήσω να καταστραφούν τα βιολογικά μου δείγματα.
 - ☐ Έχω αντιληφθεί ότι αυτή την στιγμή οι εξετάσεις που θα διενεργηθούν δεν σχετίζονται με κάποιο διαγνωστικό ή θεραπευτικό όφελος, και, για αυτό τον λόγο, δεν θα ενημερωθώ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

για αποτελέσματα που θα προκύψουν στα πλαίσια της Μελέτης σχετικά με τα προσωπικά κλινικά μου χαρακτηριστικά ή τους βιολογικούς μου δείκτες (εκτός από αποτελέσματα γενετικής ανάλυσης, στην περίπτωση που συμφώνησα να διενεργηθεί και δέχτηκα να ενημερωθώ για τα αποτελέσματά της). Σε περίπτωση που στο παρελθόν δεν δέχτηκα να ενημερωθώ για τα αποτελέσματα των γενετικών εξετάσεων, αλλά ανέπτυξα συμπτώματα νόσου Πάρκινσον κατά την διάρκεια της συμμετοχής μου στην παρούσα Μελέτη, θα έχω την δυνατότητα να ενημερωθώ για τα αποτελέσματα αυτά στα πλαίσια της παρούσας Μελέτης.

- ☐ Έχω παραλάβει ένα αντίγραφο του πληροφοριακού σημειώματος και της παρούσας συγκατάθεσης.
- ☐ Ως εκ τούτου δέχομαι να συμμετάσχω στη παρούσα Μελέτη. Συγκεκριμένα, δέχομαι να συμμετάσχω στις κλινικές, γενετικές και βιοχημικές εξετάσεις που αποτελούν μέρος της παρούσας Μελέτης, και συνυπογράφω κατωτέρω. Παρακάτω αναφέρονται επιμέρους εξετάσεις στις οποίες δέχομαι να συμμετάσχω.

☐ Ναι ☐ Όχι	Δέχομαι να διενεργηθεί φλεβοτομή για την λήψη αίματος. Το αίμα θα χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση DNA, ερυθρών αιμοσφαιρίων και πλάσματος, που θα αναλυθούν στα πλαίσια της Μελέτης.
☐ Ναι ☐ Όχι	Δέχομαι να υποστώ οσφυονωτιαία παρακέντηση. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό θα αναλυθεί στα πλαίσια της Μελέτης.
☐ Ναι ☐ Όχι	Δέχομαι να χρησιμοποιηθούν οι πληροφορίες σχετικά με τα δημογραφικά και κλινικά μου δεδομένα και τα βιολογικά μου δείγματα

Ονοματεπώνυμο συμμετέχοντα

Ημερομηνία

Υπογραφή

Έχω ενημερώσει τον/την ασθενή/φορέα/άτομο ελέγχου για την συμμετοχή του/της στην Μελέτη και έχω παραδώσει το Πληροφοριακό Σημείωμα.

Ονοματεπώνυμο ιατρού Μελέτης

Ημερομηνία

Υπογραφή

Σε περίπτωση που ο/η συμμετέχων δεν έχει την ικανότητα να αποφασίσει για την συμμετοχή του/της στην μελέτη, την απόφαση λαμβάνει νόμιμος εκπρόσωπός του/της, μετά από την ίδια ως άνω διαδικασία, και συνυπογράφει.

Ονοματεπώνυμο νόμιμου
εκπροσώπου συμμετέχοντα

Ημερομηνία

Υπογραφή

ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗ #2

ΤΙΤΛΟΣ: «Δημιουργία Τράπεζας Πληροφοριών Ελλήνων Παρκινσονικών – Ανίχνευση και Λειτουργική Ανάλυση Μεταλλάξεων Γονιδίων Σχετικών με τη Νόσο»

1. Παρακαλώ διαβάστε προσεκτικά αυτό το κείμενο.
 2. Αν υπάρχει κάτι που δεν καταλαβαίνετε όσον αφορά το πληροφοριακό σημείωμα ή θέλετε να ρωτήσετε οποιαδήποτε άλλη ερώτηση που σχετίζεται με τη Μελέτη παρακαλώ επικοινωνήστε με τον ιατρό της Μελέτης όπως αναφέρεται στο τέλος του πληροφοριακού σημειώματος
 3. Παρακαλώ ελέγξτε αν οι κάτωθι πληροφορίες είναι σωστές. Αν είναι έτσι και αν έχετε κατανοήσει τις εξηγήσεις που σας δόθηκαν και δεν έχετε άλλες απορίες τότε σημειώστε με ένα τικ στα κάτωθι κουτάκια και υπογράψτε.
- ☐ Ο ιατρός της Μελέτης, που αναγράφεται στο παρόν έγγραφο, μου έχει δώσει γραπτό πληροφοριακό σημείωμα για τη Μελέτη με τον τίτλο που αναφέρεται πιο πάνω. Αυτό περιλαμβάνει τι συνεπάγεται η συμμετοχή μου στην μελέτη, και τους πιθανούς κινδύνους και τα δικαιώματά μου σαν ασθενής. Μου δόθηκε η ευκαιρία να υποβάλω ερωτήσεις και να λάβω απαντήσεις για τις απορίες μου. Μου δόθηκε αρκετός χρόνος για να αποφασίσω για την συμμετοχή μου ή όχι στη Μελέτη.
 - ☐ Έχω καταλάβει ότι η συμμετοχή μου είναι εθελοντική και είμαι ελεύθερος να αποσυρθώ από τη μελέτη οποιαδήποτε στιγμή το θελήσω, χωρίς να δώσω καμία εξήγηση και χωρίς αυτό να επηρεάσει την ιατρική μου φροντίδα ή τα νόμιμα δικαιώματά μου.
 - ☐ Έχω καταλάβει ότι ο ιατρικός μου φάκελος και τα στοιχεία από το ιατρικό ιστορικό μου μπορεί να αναζητηθούν και να μελετηθούν από εξουσιοδοτημένα άτομα της ερευνητικής ομάδας που έχει σχεδιάσει και θα εκτελέσει τη Μελέτη. Αυτό θα γίνει με εμπιστευτικότητα. Δίδω την άδεια μου σε αυτά τα άτομα για την πρόσβασή τους στον ιατρικό μου φάκελο.
 - ☐ Έχω καταλάβει ότι η αναγνώρισή μου θα γίνεται με τα αρχικά του ονόματός μου και ένα κωδικό που θα μου δοθεί.
 - ☐ Ως εκ τούτου δέχομαι να συμμετάσχω στη παρούσα Μελέτη.
 - ☐ Έχω παραλάβει ένα αντίγραφο του πληροφοριακού σημειώματος και της παρούσας συγκατάθεσης.

 Ονοματεπώνυμο ασθενή

 Ημερομηνία

 Υπογραφή

 Ονοματεπώνυμο ιατρού Μελέτης

 Ημερομηνία

 Υπογραφή

Πρωτότυπες ερευνητικές δημοσιεύσεις στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής

Papagiannakis N., Xilouri M, Koros C, Stamelou M, Antonelou R, Maniati M, Papadimitriou D, Moraitou M, Michelakakis H, Stefanis L, *Lysosomal Alterations in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Parkinson Disease Patients*, *Mov Disord* 2015 vol. 30(13) pages 1830–1834, Nov 2015

Papagiannakis N., Koros C, Stamelou M, Simitsi AM, Maniati M, Antonelou R, Papadimitriou D, Dermentzaki G, Moraitou M, Michelakakis H, Stefanis L., *Alpha-synuclein dimerization in erythrocytes of patients with genetic and non-genetic forms of Parkinson's Disease*, *Neurosci Lett*. 2018 Apr 13; 672:145-149. doi: 10.1016/j.neulet.2017.11.012. Epub 2017 Nov 10.

Papagiannakis N., Xilouri M., Koros C., Simitsi AM., Stamelou M., Maniati M., Stefanis L., *Autophagy dysfunction in peripheral blood mononuclear cells of Parkinson's disease patients*, *Neurosci Lett*. 2019 Apr 4; 704:112-115. doi: 10.1016/j.neulet.2019.04.003.