



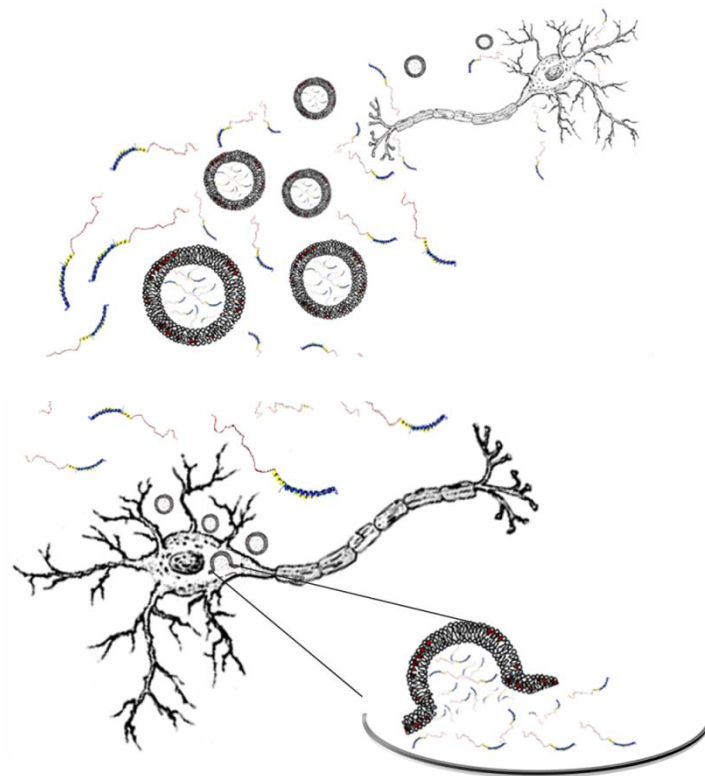
**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΤΗΣ  $\alpha$ -  
ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗΣ:**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΞΩΣΩΜΑΤΩΝ**



**ΓΕΩΡΓΙΑΣ ΜΗΝΑΚΑΚΗ**

**ΒΙΟΛΟΓΟΥ**

**ΑΘΗΝΑ 2012**

**Σε αυτούς που  
επέλεξαν να αγνοούν τα «πρέπει» των καιρών  
και διατηρούν το «θράσος» να κυνηγούν τα όνειρά τους.**

## **Ευχαριστίες**

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία (Μαστερ) εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη του Ερευνητού Γ' Κώστα Βεκρέλλη, PhD, στον Τομέα Βασικών Νευροεπιστημών στο Κέντρο Προληπτικής Ιατρικής, Νευροεπιστημών και Κοινωνικής Ιατρικής της Ακαδημίας Αθηνών κατά τα έτη 2010-2012.

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Κώστα Βεκρέλλη για την ανάθεση του θέματος και για τη συνεχή καθοδήγησή του κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Η στήριξή του υπήρξε πολύτιμη και πολύπλευρη σε όλες τις εκφάνσεις της προσπάθειάς μου. Κυρίως όμως τον ευχαριστώ για τον ενθουσιασμό που μου ενέπνευσε. Η δημιουργική μας συνεργασία ήταν για μένα μεγάλη χαρά και τιμή.

Επίσης, εκφράζω θερμές ευχαριστίες προς τη Δρ. Ευαγγελία Εμμανουηλίδου, διότι ως υπεύθυνη για την εκπαίδευσή μου στο εργαστήριο, μου έμαθε την αξία της ακρίβειας και της κριτικής θεώρησης κατά την πειραματική διαδικασία. Δουλέψαμε μαζί από την πρώτη μέρα και σε όλο αυτό το διάστημα δεν σταμάτησε να με στηρίζει και να με ενθαρρύνει. Την ευχαριστώ επίσης γιατί αφιέρωσε πολύ χρόνο στο να με διδάξει τον τρόπο σκέψης που απαιτείται κατά τον σχεδιασμό πειραμάτων και τη βελτιστοποίησης τεχνικών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης θερμά τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Π. Παπαζαφείρη και τον Καθηγητή κ. Α. Στεφανή για τις παρατηρήσεις τους και τις εύστοχες διορθώσεις τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Μαρία Ξυλούρη για τις συμβουλές της σε πολλά στάδια της εκπαίδευσής μου και όλους τους φίλους-συνεργάτες για το φιλικό και «ζωντανό» κλίμα που διατήρησαν. Η ευχάριστη ατμόσφαιρα, το πνεύμα συνεργασίας και η προθυμία τους να βοηθήσουν σε πολλές δύσκολες (πειραματικά-και-μη) στιγμές αυτών των δύο χρόνων υπήρξε καθοριστική.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου. Στα δύο χρόνια που πέρασαν, πολλές φορές άλλαξαν ριζικά την καθημερινότητά τους ώστε να ενσωματώσουν σε αυτήν τις απαιτήσεις της δικής μου καθημερινότητας. Χωρίς τη

στήριξή τους, πολύ μεγάλο μέρος της εργασίας αυτής δεν θα είχε εκπονηθεί με την ίδια αγάπη και αφοσίωση.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### **Μελέτη του προτύπου έκκρισης της α-συνουκλεΐνης: ο ρόλος των εξωσωμάτων**

#### **Μηνακάκη Γεωργία**

Η α-συνουκλεΐνη είναι μία κυτταρικά άφθονη πρωτεΐνη του κυττοσολίου, η οποία εκτελεί σημαντικές λειτουργίες σε προσυναπτικά νευρωνικά άκρα. Έχει συνδεθεί άμεσα βιοχημικά και γενετικά με ιδιοπαθείς και οικογενείς μορφές της νόσου του Parkinson. Η νόσος του Parkinson είναι μία προοδευτική νευροεκφυλιστική ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από την εξάπλωση πρωτεϊνικών εγκλείστων, κύριο συστατικό των οποίων είναι η α-συνουκλεΐνη. Τα τελευταία έτη, πληθώρα ευρημάτων συνηγορεί υπέρ του ότι η α-συνουκλεΐνη έχει παρακρινείς τοξικές δράσεις. Η α-συνουκλεΐνη εκκρίνεται μέσω μη-κλασικών κυτταρικών μονοπατιών τα οποία δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί πλήρως. Πρόσφατα δείχθηκε ότι ένα από αυτά είναι η έκκριση της μέσω των εξωσωμάτων, κυστιδίων που έχουν ενδοκυτταρική βιογένεση και συγκεκριμένα βιοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά. Τα εξωσώματα συγκεντρώνουν μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον ως λειτουργικοί μεσολαβητές της διακυτταρικής επικοινωνίας. Πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται με νευροεκφυλιστικές νόσους, όπως το αμυλοειδές β και η α-συνουκλεΐνη, έχειδειχθεί ότι εκκρίνονται μέσω των εξωσωμάτων. Βάσει αυτού έχει δημιουργηθεί η υπόθεση ότι τα εξωσώματα δρουν ως «Δούρειοι Ίπποι» μεταφέροντας τοξικές πρωτεΐνες σε υγιή κύτταρα.

Στην παρούσα μελέτη προσεγγίζεται για πρώτη φορά το πρότυπο έκκρισης της α-συνουκλεΐνης υπό φυσιολογικές συνθήκες και υπό συνθήκες που μιμούνται τη νόσο του Parkinson. Αρχικά, διερευνήθηκε η τοπολογία της φυσιολογικής έκκρισης της α-συνουκλεΐνης σε διαμερισματοποιημένες καλλιέργειες φλοιικών νευρώνων. Βελτιστοποιήθηκε η καλλιέργεια νευρώνων σε συσκευές που επιτρέπουν το διαχωρισμό των νευρωνικών σωμάτων από τους άξονες. Η μέτρηση της α-συνουκλεΐνης έγινε με μία υπερ-ευαίσθητη ELISA η οποία έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριό μας. Εν συνεχεία εξετάσθηκε πώς ο φυσιολογικός μηχανισμός έκκρισης

της πρωτεΐνης αλλάζει υπό συνθήκες που μιμούνται παθολογικές καταστάσεις σχετιζόμενες με τη νόσο του Parkinson. Χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα επαγόμενης έκφρασης της αγρίου τύπου και της A53T μεταλλαγμένης μορφής της α-συνουκλείνης. Μελετήθηκε ξεχωριστά αλλά και συγκριτικά η έκκριση της α-συνουκλείνης σε ελεύθερη μορφή και σε σύνδεση με τα εξωσώματα. Προς την κατεύθυνση αυτή, βελτιστοποιήθηκαν δύο ευαίσθητες ποσοτικές μέθοδοι για τη μέτρηση των εξωσωμάτων –η micro-Bradford και η δοκιμασία εστεράσης κατά Ellman. Χρησιμοποιώντας τις μεθόδους αυτές συμπληρωματικά ήταν εφικτή η σύγκριση του αριθμού των εξωσωμάτων που εκκρίνονται από συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων και ο υπολογισμός της α-συνουκλείνης που περιέχεται στον ίδιο αριθμό εξωσωμάτων από κάθε συνθήκη. Τέλος, βελτιστοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο σήμανσης των εξωσωμάτων για την μελέτη των κινητικών χαρακτηριστικών της πρόσληψής τους.

Η α-συνουκλείνη εκκρίνεται φυσιολογικά από τα σώματα και τους άξονες των νευρώνων. Η εξωκυττάρια πρωτεΐνη διακρίνεται σε ελεύθερη μορφή και σε σύνδεση με τα εξωσώματα. Ενδοκυττάρια επαγωγή της έκφρασης της α-συνουκλείνης οδήγησε σε πολύ μεγάλη αύξηση και σε παρόμοια επίπεδα έκκρισης της ελεύθερης α-συνουκλείνης, τόσο της αγρίου τύπου όσο και της A53T μεταλλαγμένης μορφής. Επομένως η μετάλλαξη δεν επηρεάζει, στο κυτταρικό μας μοντέλο, το πρότυπο έκκρισης της πρωτεΐνης. Στις συνθήκες αυτές, ο αριθμός των εξωσωμάτων παραμένει σταθερός, ωστόσο ο ίδιος αριθμός εξωσωμάτων περιέχει μεγαλύτερο φορτίο α-συνουκλείνης. Και στην περίπτωση αυτή, η μετάλλαξη δεν επηρεάζει το πρότυπο έκκρισης. Ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα ήταν ότι τα εξωσώματα δεν είναι ο κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου η πρωτεΐνη εξέρχεται από το κύτταρο στις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν. Τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι άλλοι μηχανισμοί ενεργοποιούνται για την έκκριση της πρωτεΐνης όταν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα είναι αυξημένα. Ωστόσο το ερώτημα του αν τα εξωσώματα αποτελούν σημαντικό μηχανισμό μέσω του οποίου τοξικές μορφές απομακρύνονται από το κύτταρο παραμένει αναπάντητο. Τέλος, δείχθηκε ότι τα εξωσώματα προσλαμβάνονται από διαφοροποιημένα κύτταρα και πρωτογενείς νευρώνες και ότι η πρόσληψη εξελίσσεται στο χρόνο.

Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας προτείνουν ότι η διατήρηση της ισορροπίας της α-συνουκλείνης εντός και εκτός κυττάρου είναι ένας πολλά υποσχόμενος θεραπευτικός στόχος κατά της εξάπλωσης της παθολογίας Parkinson. Τα εξωσώματα, θα μπορούσαν να αποτελέσουν τους πλέον κατάλληλους φορείς στοχευμένης θεραπείας λόγω της ιδιότητάς τους να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να παραδίδουν λειτουργικά το φορτίο τους.

## ABSTRACT

### Investigation of $\alpha$ -synuclein secretion: the role of exosomes

Minakaki Georgia

$\alpha$ -Synuclein is an abundant cytosolic protein which exerts very important functions in presynaptic nerve terminals. It has been directly linked to idiopathic and familial forms of Parkinson's disease through biochemical and genetic studies. Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative disorder which is characterized by the spread of proteinaceous inclusions, the main constituent of which is  $\alpha$ -synuclein. During the past years a plethora of findings suggests that  $\alpha$ -synuclein has toxic paracrine effects. This protein is secreted via non-classical pathways which have not been fully identified yet. Recently it was shown that one of them is the exosome secretion pathway. Exosomes are cell-secreted vesicles of endocytic biogenesis and specific biochemical and morphological characteristics. They have rightfully taken their place in the center of scientific research as functional mediators of intercellular communication. Proteins that are related to neurodegeneration, such as the A $\beta$  amyloid peptide and  $\alpha$ -synuclein, have been found to be secreted in association with exosomes. As such, the "Trojan Horse" hypothesis proposes that exosomes carry and deliver toxic protein species to healthy recipient cells.

In the present study, the secretion of  $\alpha$ -synuclein under physiological and disease-mimicking conditions is quantitatively assessed for the first time. Initially, the normal topology of  $\alpha$ -synuclein secretion was investigated in healthy primary cortical neurons. The culture of cells in compartmentalization devices was optimized.  $\alpha$ -Synuclein was assessed with an ultra-sensitive in-house ELISA. Next, we investigated how the physiological secretion of the protein is altered by conditions which mimic Parkinson's disease. Two cell-models of the disease were used, for the overexpression of the wild type and A53T mutant form of  $\alpha$ -synuclein, upon induction. The secretion of  $\alpha$ -synuclein in a free form and in association with exosomes was quantitatively assessed and comparisons were made as to the effect of the levels and mutation to either of the secreted forms. To this end, two sensitive quantitative

methods were optimized: micro-Bradford and the Ellman esterase assay. Using these methods together, the comparison of the number of exosomes secreted between different experimental conditions was achieved. Likewise, the quantity of  $\alpha$ -synuclein associated with the same number of exosomal particles was calculated with precision. Last, a protocol for exosome labeling was optimized in order to study the kinetics of exosome uptake.

$\alpha$ -Synuclein is normally secreted by both the soma and neuronal axons. The extracellular protein is encountered in a free and an exosome-associated form. The intracellular induction of  $\alpha$ -synuclein expression led to a significant increase of free  $\alpha$ -synuclein and at comparable levels between the wild type and mutant form. This suggests that the mutation does not alter the mechanism of  $\alpha$ -synuclein secretion. Under these conditions, the exosome number remains constant yet, more  $\alpha$ -synuclein load is packed into exosomes. Also in this case, the mutation does not affect the mechanism of exosome-mediated secretion. Another important finding is that exosomes are not the main non-classical secretion mechanism by which the protein is secreted out of the cell under these experimental conditions. This may signify that other mechanisms are activated when the intracellular levels of the protein are increased. Nevertheless, the question of whether exosomes are an important means by which toxic species of the protein exit the cell remains to be answered. Finally, it was demonstrated that exosomes are uptaken by differentiated cells and primary neurons and that their uptake is a time-dependent process.

The findings of the present study suggest that the maintenance of the equilibrium of  $\alpha$ -synuclein in and outside of the cell is a potent therapeutic target against the spread of Parkinson's-related pathology. Exosomes could be very promising carriers of targeted therapy, due to their unique ability to cross the plasma membrane and to functionally deliver their cargo intact.



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Μέχρι πρόσφατα η α-συνουκλείνη θεωρούνταν μία καθαρά κυτοσολική πρωτεΐνη. Ωστόσο το σύνολο των πρόσφατων δεδομένων συνηγορεί υπέρ του ότι η α-συνουκλείνη εκκρίνεται μέσω μη-κλασικών μονοπατιών, ένα εκ των οποίων είναι και τα εξωσώματα. Η εξωκυττάρια α-συνουκλείνη εμφανίζει τοξικές παρακρινείς δράσεις και συνδέεται με την εξάπλωση της παθολογίας της νόσου Parkinson μέσω διάδοσης από κύτταρο σε κύτταρο. Παρότι οι μηχανισμοί μέσω των οποίων εκκρίνεται δεν έχουν ταυτοποιηθεί πλήρως, είναι πιθανό ότι και αυτοί συμμετέχουν στην παθογένεση και την εξάπλωση της νόσου.

Πώς όμως επηρεάζεται η ισορροπία μεταξύ της ενδοκυττάριας και της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης από τα επίπεδα και τις μεταλλάξεις της πρωτεΐνης; Ποια είναι η συμβολή των εξωσωμάτων στην έκκριση και την εξάπλωση της πρωτεΐνης;

Η ποσοτική προσέγγιση των ερωτημάτων αυτών ήταν το αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Τα ευρήματα της εργασίας αυτής μαζί και με άλλα της πλέον πρόσφατης βιβλιογραφίας οδηγούν στην προοπτική νέων θεραπευτικών στόχων και μάλιστα προσεγγίσιμων μέσω φυσικών φορέων, όπως είναι τα εξωσώματα.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>12-32</b>
<b>1. Η κυτοσολική πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη.....</b>	<b>12</b>
1.1 Πρωτοταγής δομή.....	12
1.2 Φυσιολογική δράση α-συνουκλεΐνης.....	13
1.2.1 Η α-συνουκλεΐνη ελέγχει έμμεσα την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή.....	14
1.2.3 Ο ρόλος της α-συνουκλεΐνης στη συγκρότηση του συμπλόκου SNARE.....	15
1.3 Παθολογική δράση της α-συνουκλεΐνης.....	16
1.3.1 Η α-συνουκλεΐνη συνδέεται με την παθολογία της νόσου Parkinson.....	16
1.4 Η μη-κλασική έκκριση της α-συνουκλεΐνης συνδέεται με την εξάπλωσή της....	22
1.4.1 Κλασικά και μη-κλασικά μονοπάτια έκκρισης πρωτεϊνών.....	22
1.4.2 Η βιογένεση των εξωσωμάτων.....	24
1.4.3 Τα εξωσώματα ως διαμεσολαβητές της έκκρισης και μετάδοσης πληροφοριών.....	25
1.4.4 Τα εξωσώματα εμφανίζουν μεγάλη βιολογική δραστηριότητα.....	28
1.5 Η α-συνουκλεΐνη εκκρίνεται μέσω των εξωσωμάτων.....	29
<b>II ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>31</b>
<b>III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>32-44</b>
<b>1. Καλλιέργεια κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y και πρωτογενών φλοιικών νευρώνων.....</b>	<b>32</b>
<b>2. Προετοιμασία κυτταρικών εκχυλισμάτων και ανοσοσύτρωμα κατά Western....</b>	<b>33</b>
<b>3. Διαμερισματοποιημένες πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιικών νευρώνων.....</b>	<b>35</b>
3.1 Επίστρωση νευρώνων στις συσκευές SND.....	36
<b>4. Απομόνωση εξωσωμάτων από το μέσο καλλιέργειας νευρικών κυττάρων.....</b>	<b>37</b>
<b>5. Ποσοτικοποίηση του υλικού των εξωσωμάτων.....</b>	<b>38</b>

5.1 Μέθοδος μικρο-Bradford για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης εξωσωμάτων.....	39
5.2 Δοκιμασία Εστεράσης κατά Ellman για την σύγκριση αριθμού εξωσωμάτων.....	40
<b>6. <i>In vitro</i> σήμανση των εξωσωμάτων με BODIPY-TR-CERAMIDE.....</b>	<b>41</b>
<b>7. Χορήγηση <i>in vitro</i> σημασμένων εξωσωμάτων σε νευρικά κύτταρα .....</b>	<b>42</b>
<b>8. Χρώση ζωντανών κυττάρων και ανοσοφθορισμός.....</b>	<b>43</b>
<b>9. Επεξεργασία εξωσωμάτων για μέτρηση α-συνουκλεΐνης με ELISA.....</b>	<b>44</b>
<b>10. Υπερευαίσθητη ELISA για τη μέτρηση της α-συνουκλεΐνης.....</b>	<b>44</b>
<b>IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>45-69</b>
<b>1.Διερεύνηση της θέσης έκκρισης της α-συνουκλεΐνης σε πρωτογενείς.....</b>	<b>45</b>
<b>   .νευρώνες.....</b>	<b>45</b>
<b>2. Μελέτη του προτύπου έκκρισης της α-συνουκλεΐνης, ως ελεύθερης και.....</b>	<b>51</b>
<b>   συνδεδεμένης με τα εξωσώματα.....</b>	<b>51</b>
2.1 Η α-συνουκλεΐνη εκτός κυττάρου ανιχνεύεται «ελεύθερη» αλλά και σε συσχέτιση με τα εξωσώματα.....	52
2.2 Πώς η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων επηρεάζει την έκκριση της α-συνουκλεΐνης;.....	52
2.3 Πώς η έκφραση της μεταλλαγμένης A53T μορφής επηρεάζει την έκκριση της α-συνουκλεΐνης;.....	56
2.4 Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	60-62
<b>3. Μελέτη της πρόσληψης εξωσωμάτων από νευρικά κύτταρα.....</b>	<b>62</b>
3.1 Εξωγενώς χορηγούμενα εξωσώματα προσλαμβάνονται από νευρικά κύτταρα.....	62
3.2 Τα κύτταρα προσλαμβάνουν εξωσώματα κατά έναν χρονο-εξαρτώμενο τρόπο..	63
3.3 Μελέτη της διακίνησης της μεμβράνης των εξωσωμάτων σε κύτταρα-παραλήπτες..	64
3.4 Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	68-69
<b>V. ΓΕΝΙΚΑ</b>	
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ/ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>70-68</b>
<b>1.Αξιολόγηση αποτελεσμάτων σε σχέση με την πρόσφατη βιβλιογραφία...70-76</b>	

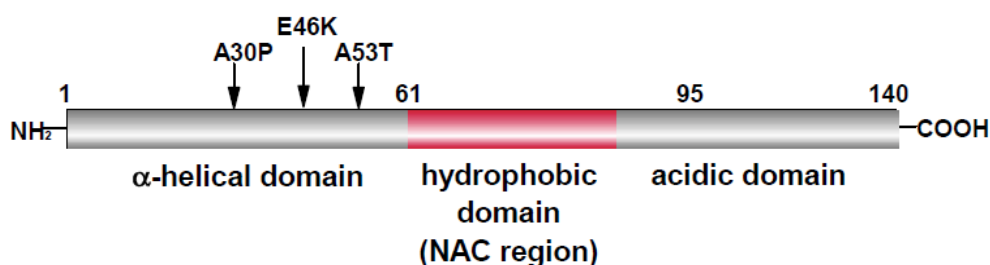
<b>2. Θεραπευτικοί στόχοι.....</b>	<b>76-79</b>
2.1 Στόχευση της ενδοκυττάριας και ελεύθερης εξωκυττάριας α-συνουκλεΐνης.....	76
2.2 Ανοσοποίηση.....	76
2.3 Γονιδιακή θεραπεία μέσω των εξωσωμάτων.....	77-79
<b>VI. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....</b>	<b>80</b>
<b>VII. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ.....</b>	<b>80-82</b>
<b>VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>83-91</b>

# I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. Η κυτσοσολική πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη

### 1.1 Πρωτοταγής δομή

Η α-συνουκλεΐνη είναι μία νευρωνική προσυναπτική πρωτεΐνη 140 αμινοξέων<sup>1,2</sup>. Ανήκει σε μία συντηρημένη οικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τις α,β και γ- συνουκλεΐνες. Είναι μία εγγενώς μη αναδιπλωμένη πρωτεΐνη, το οποίο σημαίνει ότι σε ουδέτερο pH δεν έχει συγκεκριμένη δευτεροταγή, τριτοταγή ή τεταρτοταγή δομή<sup>3</sup>. Η πρωτοταγής δομή και κύριες περιοχές της α-συνουκλεΐνης φαίνονται στην εικόνα 1. Η αμινοτελική αλληλουχία της πρωτεΐνης διαθέτει την αμινοξική αλληλουχία KTKEGV η οποία είναι συντηρημένη σε αμφιπαθικές έλικες απολιποπρωτεϊνών<sup>4</sup>. Η αλληλουχία αμινοξέων 61–95 αποτελεί την πλέον υδρόφοβη περιοχή της πρωτεΐνης και εμπεριέχει την περιοχή NAC (= non-amyloid-β component) η οποία μάλιστα εντοπίζεται και σε πλάκες Αβ αμυλοειδούς στον εγκέφαλο ασθενών με Alzheimer. Θεωρείται ότι ευθύνεται για αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια α-συνουκλεΐνης και εν δυνάμει τη δημιουργία β-πτυχωτών επιφανειών. Το καρβοξυτελικό άκρο της α-συνουκλεΐνης είναι πλούσιο σε όξινα αμινοξικά κατάλοιπα και έχει δειχθεί ότι αποτρέπει τη δημιουργία συσσωματωμάτων πρωτεΐνης. Η α-συνουκλεΐνη φαίνεται να αλληλεπιδρά σε μεγάλο βαθμό με λιπιδικές σχεδίες των προσυναπτικών άκρων, λαμβάνοντας διαμόρφωση α-έλικας<sup>5</sup>. Παρότι ο φυσιολογικός της ρόλος δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, αρκετές μελέτες έχουν ενδιαφέροντα ευρήματα ως προς το ρόλο της εντός κυττάρου –τη διατήρηση της νευρωνικής συναπτικής ομοιόστασης.



**Εικόνα 1: Η πρωτοταγής δομή της α-συνουκλεΐνης.** Το αμινοτελικό άκρο περιλαμβάνει μία συντηρημένη αλληλουχία. Το κεντρικό, υδρόφοβο τμήμα περιλαμβάνει την περιοχή NAC και το όξινο καρβοξυτελικό άκρο διαθέτει ρόλο σαπερόνης. Σημειώνονται οι θέσεις των τριών σημειακών μεταλλάξεων A30P, A53T και E46K. Εικόνα από Vekrellis, Minakaki and Emmanouilidou, 2010<sup>120</sup>.

## 1.2 Φυσιολογική δράση της α-συνουκλεΐνης

### 1.2.1 Η α-συνουκλεΐνη ελέγχει έμμεσα την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή

Από τις πρώτες ενδιαφέρουσες μελέτες σε σχέση με το γονίδιο της α-συνουκλεΐνης ήταν η μελέτη των Abeliovich, Schmitz et al. (2000)<sup>1</sup>, στην οποία μύες ΚΟ α-συνουκλεΐνης απελευθέρωναν ντοπαμίνη γρηγορότερα και έδειχναν μειωμένη απόκριση στην αμφεταμίνη –η οποία αναστέλλει την επαναπρόσληψη της ντοπαμίνης- σε σχέση με τα αγρίου τύπου ζώα<sup>1</sup>. Δείχθηκε ότι η α-συνουκλεΐνη έχει σημαντικό ρόλο στη νευροδιαβίβαση, ρυθμίζοντας την έκκριση ντοπαμίνης<sup>6</sup> και γλουταμικού οξέος<sup>7</sup>. Παρακολουθώντας την απελευθέρωση ντοπαμίνης σε πραγματικό χρόνο (*in vivo* καταμέτρηση), η κινητοποίηση απελευθέρωσης ντοπαμίνης φάνηκε να είναι μεγαλύτερη σε σειρές ΚΟ α-συνουκλεΐνης<sup>6</sup>, ενώ αντίθετα, η χορήγηση L-dopa, παρεμπόδισε την έκκριση ντοπαμίνης στα A30P ζώα, το οποίο δείχνει ότι η απουσία και όχι η μετάλλαξη επηρεάζει την απελευθέρωση ντοπαμίνης. Δείχθηκε επίσης ότι η απελευθέρωση του γλουταμικού οξέος μετά από επαναλαμβανόμενη διέγερση μειώνεται όταν υπάρχουν μη φυσιολογικά επίπεδα α-συνουκλεΐνης στη σύναψη<sup>7</sup>. Δημιουργήθηκε συνεπώς η υπόθεση ότι η α-συνουκλεΐνη, προσυναπτικά επηρεάζει άμεσα το «φορτίο» της διαθέσιμης δεξαμενής και έμμεσα την απόκριση στις απαιτήσεις της συναπτικής ενεργότητας.

Τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης είναι κριτικής σημασίας για την συναπτική ομοιόσταση. Πρόσφατα, Nemani et al. (2010), έδειξαν ότι ήπια αύξηση της α-συνουκλεΐνης προκαλεί αναστολή της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστή σε γλουταματεργικούς πυραμιδικούς νευρώνες του ιπποκάμπου και σε μεσεγκεφαλικούς ντοπαμινεργικούς νευρώνες λόγω αδυναμίας συγκέντρωσης των κυστιδίων ανακύκλωσης κοντά στις περιοχές συναπτικής απελευθέρωσης<sup>8</sup>. Περαιτέρω έμφαση στο φυσιολογικό ρόλο των συνουκλεϊνών στη συναπτική διαβίβαση δίνεται από πειράματα σε τριπλά ΚΟ α-, β-, and γ-συνουκλεΐνης που δημιουργήθηκαν από τους<sup>9</sup>. Οι μύες αυτοί, ήταν βιώσιμοι και γόνιμοι αλλά πέθαιναν μαζικά από τους 12 μήνες κι έπειτα, και εμφάνιζαν ηλικιο-εξαρτώμενες μεταβολές στη σύνθεση των συναπτικών πρωτεϊνών και την αξονική δομή. Οι μεταβολές αυτές είχαν ως αποτέλεσμα σοβαρή νευρωνική δυσλειτουργία στο κεντρικό νευρικό σύστημα, καταλήγοντας στο νευρωνικό θάνατο. Σημαντικό είναι ότι στον ιππόκαμπο, νεαρά ζώα χωρίς καθόλου

συνουκλεΐνη εμφανίζουν αυξημένα βασικά επίπεδα διαβίβασης, τα οποία μπορούν να διασωθούν από διαγονίδια της α-συνουκλεΐνης.

### 1.2.2 Ο ρόλος της α-συνουκλεΐνης στην συγκρότηση του συμπλόκου SNARE

Πρόσφατες μελέτες οι οποίες άλλαξαν ριζικά το ρόλο που αποδίδεται για την α-συνουκλεΐνη στη σύναψη στηρίχθηκαν στο φαινότυπο μυών οι οποίοι δεν εκφράζουν καθόλου τη συν-σαπερόνη (co-chaperone) CSPα. Αυτή η πρωτεΐνη διαμορφώνει ένα χαρακτηριστικό τριμερές σύμπλοκο σαπερονών<sup>10</sup>. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι μύες οι οποίοι δεν εκφράζουν καθόλου CSPα (CSPα KO) πεθαίνουν μετά από ένα μικρό διάστημα λόγω θανατηφόρου νευροεκφυλισμού<sup>11</sup>. Τα επίπεδα της SNAP-25 όπως και όλων των υπόλοιπων πρωτεϊνών του συμπλόκου SNARE είναι σημαντικά μειωμένα σε μύες CSPα KO το οποίο συνεπάγεται μείωση της λειτουργίας αλλά και της λειτουργικότητας του συμπλόκου, και υποδηλώνει μία συσχέτιση υπολειτουργίας του συμπλόκου SNARE με το νευροεκφυλισμό<sup>11,12</sup>. Ωστόσο, στα ζώα αυτά δεν φαίνεται να επηρεάζεται η συναπτική διαβίβαση κατά τα πρώιμα στάδια της ζωής. Ο δυναμικός ρόλος της α-συνουκλεΐνης στη σύναψη αποκαλύπτεται από το ότι η α-συνουκλεΐνη μπορεί να διασώσει το φαινότυπο απαλοιφής της CSPα<sup>12</sup>, σταματώντας το νευροεκφυλισμό χωρίς να επιδρά στα χαμηλότερα επίπεδα της SNAP-25. Επομένως φαίνεται ότι η CSPα και η α-συνουκλεΐνη έχουν διαφορετικούς αλλά παραπλήσιους μηχανισμούς δράσης. Επίσης, οι Burre et al., (2010), μελέτησαν μύες-τριπλά KO α, β και γ-συνουκλεΐνης που ήταν βιώσιμα και γόνιμα, ωστόσο πέθαιναν μαζικά μετά τους 6 μήνες<sup>13</sup>. Εμφάνιζαν έναν ηλικιο-εξαρτώμενο φαινότυπο με συμπεριφορικές διαταραχές όπως αδυναμία συντονισμού κινήσεων, απώλεια ενδιαφέροντος σε νέο αντικείμενο, ωστόσο, δεν εμφάνιζαν αλλαγές στη συναπτική διαβίβαση. Τα τριπλά KO, με το γήρας, έφτιαχναν πιο δύσκολα σύμπλοκα SNARE και εμφάνιζαν μια ηλικιο-εξαρτώμενη μείωση στη synaptobrevin-2, καθώς και πρόωρο θάνατο. Η σημασία παρουσίας των συνουκλεϊνών γινόταν εμφανέστερη σε πιο ηλικιωμένα ζώα, το οποίο υποδηλώνει ότι η α-συνουκλεΐνη διατηρεί τη φυσιολογική συναπτική λειτουργία κατά τη γήρανση. Επιπλέον, οι ερευνητές έδειξαν ότι η αποκατάσταση της α-συνουκλεΐνης σε νευρώνες σε καλλιέργεια από μύες-τριπλά KO βοήθησε στην αποκατάσταση των συμπλόκων SNARE με ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο. Οι Darios et al., (2010) επίσης έδειξαν ότι η α-συνουκλεΐνη έχει έμμεσο ρόλο στη συγκρότηση του συμπλόκου SNARE καθότι

σταματά την επαγόμενη από αραχιδονικό οξύ συγκρότηση του συμπλόκου SNARE *in vitro* και *in vivo*, χωρίς να αλληλεπιδρά άμεσα με τις πρωτεΐνες του συμπλόκου σε δοκιμασίες πρωτεϊνικής πρόσδεσης<sup>14</sup>.

### 1.3 Παθολογική δράση της α-συνουκλεΐνης

#### 1.3.1 Η α-συνουκλεΐνη συνδέεται με την παθολογία της νόσου Parkinson

Η νόσος του Parkinson είναι μία προοδευτική νευροεκφυλιστική ασθένεια που έχει ως κινητικά κλινικά χαρακτηριστικά τον τρόπο ηρεμίας, τη βραδυκινησία και τη μυϊκή δυσκαμψία. Τα χαρακτηριστικά αυτά επιτρέπουν τη διάγνωση και αποτελούν κλινική αντανάκλαση της απώλειας του 60% των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας<sup>15</sup>. Η εκδήλωση της νόσου αφορά κυρίως άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Στην πλειοψηφία τους οι περιπτώσεις με νόσο του Parkinson είναι ιδιοπαθείς και σποραδικές και μόνο σε ένα μικρό ποσοστό των περιπτώσεων υπάρχει γενετική βάση<sup>16</sup>. Παθολογοανατομικά, η νόσος συνδέεται άμεσα με την α-συνουκλεΐνη, η οποία αποτελεί το κύριο συστατικό κυτταροπλασματικών έγκλειστων που ονομάζονται σωμάτια Lewy -όταν βρίσκονται στα νευρωνικά σώματα- και νευρίτες Lewy -όταν βρίσκονται σε νευρωνικούς άξονες<sup>2</sup>. Η παρουσία σωμάτων Lewy στη μέλαινα ουσία του ραβδώτου σώματος είναι διαγνωστική για τη νόσο, ωστόσο η παθολογία της α-συνουκλεΐνης συναντάται και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου και προκαλεί περαιτέρω συμπτώματα, πέραν των κινητικών<sup>17</sup>. Πέραν της α-συνουκλεΐνης, γονίδια που αφορούν στο σύστημα αποδόμησης πρωτεϊνών (PARKIN) ή την απόκριση στο οξειδωτικό στρες (PINK-1, DJ-1) επίσης έχουν σχετιστεί με τη νόσο, ωστόσο δεν θα δοθεί βαρύτητα σε αυτά στην παρούσα εργασία.

Στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης έχουν ταυτοποιηθεί τρεις σημειακές μεταλλάξεις: A53T<sup>18</sup>, A30P<sup>19</sup> και E46K<sup>20</sup> όπως επίσης διπλασιασμοί<sup>21</sup> και τριπλασιασμοί<sup>22</sup> του γονιδίου που κωδικοποιεί την α-συνουκλεΐνη και συνδέονται με οικογενείς μορφές της νόσου. Η α-συνουκλεΐνη έχει την ιδιότητα να συσσωματώνεται *in vitro* και να διαμορφώνει ολιγομερείς και ινδιακές μορφές<sup>4</sup>. Οι μεταλλάξεις A30P και A53T οδηγούν σε δημιουργία πρωτοϊνιδίων<sup>23</sup>, με μεγαλύτερη ευκολία απ' ό,τι συμβαίνει με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη, αλλά και ολιγομερών μορφών της<sup>24</sup>. Αντίστοιχα, οι μεταλλάξεις A53T και E64K αυξάνουν την κινητική δημιουργίας ινδιακών μορφών *in vitro*<sup>25, 26</sup>. Αλλά και η υπερέκφραση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης

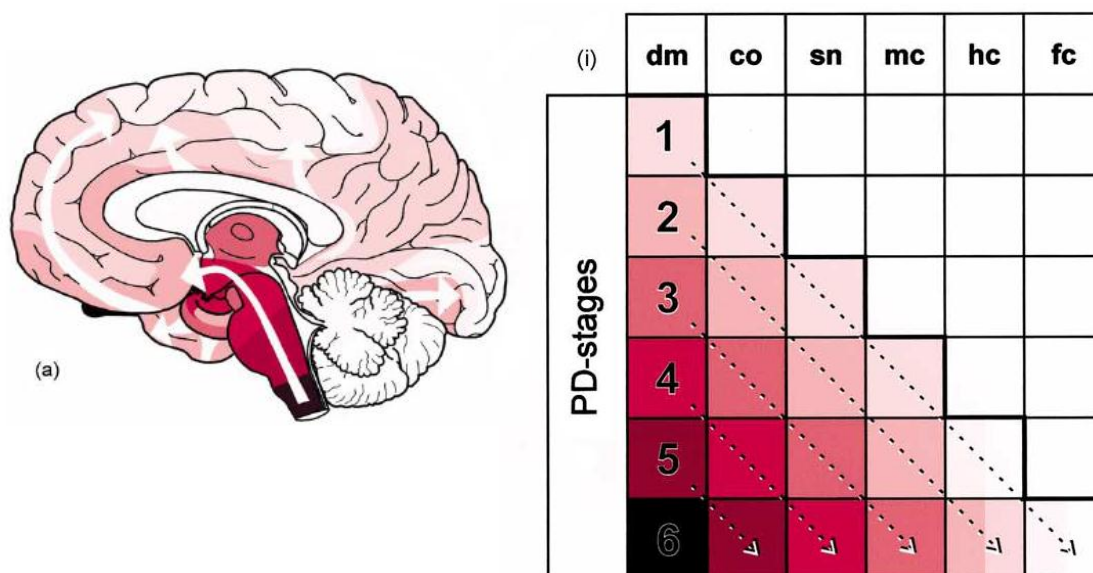


οδηγεί στο σχηματισμό ολιγομερών μορφών<sup>27,28</sup>. Διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις οδηγούν και αυτές στη δημιουργία σταθερών ολιγομερών. Για παράδειγμα, οξειδωση μέσω της ντοπαμίνης διευκολύνει τη συσσωμάτωση της ασυνουκλείνης<sup>29</sup>. Φωσφορυλίωση στα κατάλοιπα S129<sup>30</sup> και S87<sup>31</sup> παρατηρούνται σε σωματίδια και νευρίτες Lewy. Αποφωσφορυλίωση του S129 οδήγησε σε βελτίωση των συμπεριφορικών και ιστολογικών χαρακτηριστικών διαγονιδιακού για την ασυνουκλείνη ζωικού μοντέλου<sup>32</sup>. Παρόλα αυτά δεν είναι ακόμα σαφής η σημασία της φωσφορυλίωσης σε διάφορα κατάλοιπα για τη νόσο Parkinson.

Τόσο οι μεταλλάξεις όσο και τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης έχουν σημασία για τη νευρωνική ομοιόσταση και θεωρείται ότι σχετίζονται με το νευρωνικό θάνατο. Μέχρι στιγμής δεν έχει δειχθεί ευθεία αντιστοίχιση μεταξύ της ύπαρξης ολιγομερών μορφών και κυτταρικής τοξικότητας, υπάρχουν ωστόσο μελέτες που σχετίζουν τα ολιγομερή με την υπολειτουργία του πρωτεασώματος<sup>33</sup> αλλά και τη μετάλλαξη A53T -σε συνδυασμό με τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης- με τη δυσλειτουργία της μακροαυτοφαγίας<sup>34</sup>. Επίσης, η συγκέντρωση των ολιγομερών στο πλάσμα του αίματος έχει προταθεί ως βιοδείκτης, καθότι βρέθηκε ότι ασθενείς Parkinson είχαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα σε σχέση με φυσιολογικά άτομα<sup>35</sup>. Παρά ταύτα, το ερώτημα του πώς πυροδοτείται η παθογένεση της νόσου Parkinson σε οικογενείς και σποραδικές μορφές της νόσου παραμένει αναπάντητο.

Οι παθολογικές διεργασίες της νόσου Parkinson εξελίσσονται σε βάθος χρόνου και προοδεύουν ανοδικά, σε ανατομικά επικοινωνούσες δομές του εγκεφάλου, με προσθιο-οπίσθια (anterograde) κατεύθυνση<sup>36</sup>. Έχουν ως αποτέλεσμα την εξάπλωση της μοριακής παθολογίας στο ανθρώπινο νευρικό σύστημα με συνεπακόλουθη επιβάρυνση της κλινικής εικόνας των ασθενών. Μεταθανάτια εξέταση εγκεφάλων ασθενών αποκάλυψε ότι η ανοδική πορεία εξάπλωσης μπορεί να διακριθεί σε 6 στάδια της κλίμακας Braak (εικόνα 2). Κατά τα πρώιμα στάδια της ασθένειας (στάδιο 1-2), σωματίδια και νευρίτες Lewy εμφανίζονται στο κατώτερο τμήμα του στελέχους, έως ότου κατά το στάδιο 3 ή 4 η παθολογία έχει φτάσει στην μέλαινα ουσία του ραβδωτού σώματος και συνοδεύεται από απώλεια νευρώνων, λόγω της οποίας εμφανίζονται τα πρώτα κλινικά συμπτώματα. Κατά τα όψιμα στάδια της νόσου η παθολογία έχει εμφανιστεί και σε περιοχές του νεοφλοιού, το οποίο κλινικά συνοδεύεται και από μη-κινητικά συμπτώματα. Βάσει της

παθολογοανατομικής κλίμακας Braak, η παθολογία Lewy σε μία περιοχή είναι συνθήκη απαραίτητη και ικανή ώστε η παθολογία να εξαπλωθεί στην επόμενη, ωστόσο αυτό δεν ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις<sup>37</sup>.



**Εικόνα 2:** Τα στάδια της νόσου, όπως διακρίνονται από την προοδευτική εμφάνιση της παθολογίας σε συγκεκριμένες εγκεφαλικές περιοχές. Το στάδιο 1 αντιπροσωπεύει πρώιμα στάδια της νόσου δίχως κλινικά συμπτώματα, ενώ κατά τα στάδια 3-4 επιτρέπεται η διάγνωση της νόσου. (a) Ανοδική πορεία εξάπλωσης της παθολογίας Lewy σε (i) συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, ανάλογα με το στάδιο της νόσου. Εικόνα από Braak et al., 2003.

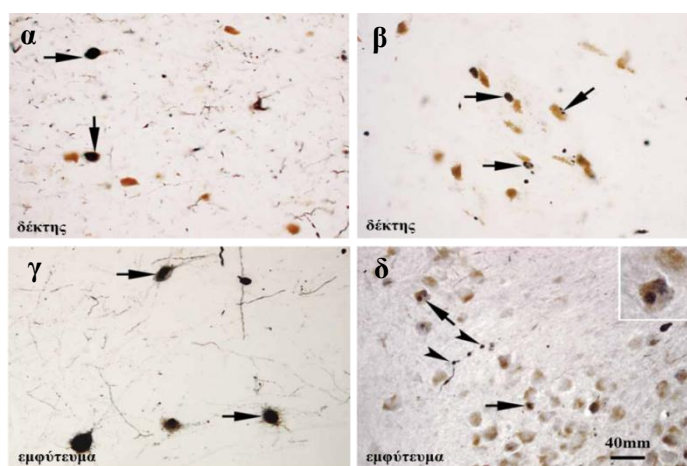
Συντομεύσεις: **co**: coeruleus–subcoeruleus σύμπλοκο, **dm**: ραχιαίος κινητικός πυρήνας (dorsal motor nucleus) **fc**: first order sensory association areas, premotor areas, as well as primary sensory and motor fields **hc**: high order sensory association areas and prefrontal fields, **mc**: anteromedial temporal mesocortex, **sn**: substantia nigra.

Η α-συνουκλεΐνη θεωρούνταν αρχικά μία αυστηρά κυτοσολική πρωτεΐνη, καθότι δεν διαθέτει την πεπτιδική αλληλουχία στόχευσης για εξωκυττάρωση μέσω του μονοπατιού Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ)/Golgi. Ωστόσο ανιχνεύεται εκτός κυττάρων σε ανθρώπινα βιολογικά υγρά, όπως το εγκεφαλονωτιαίο υγρό<sup>38</sup>, το πλάσμα του αίματος<sup>35</sup>, το παρέγχυμα του εγκεφάλου (interstitial fluid)<sup>39</sup> ασθενών Parkinson αλλά και φυσιολογικών ατόμων. Άρα η έκκρισή της συμβαίνει και υπό φυσιολογικές συνθήκες. Εγείρεται λοιπόν το ερώτημα πώς ένα φυσιολογικό φαινόμενο καταλήγει να συνδέεται μηχανιστικά με την παθολογία;

Η ως άνω έκκριση της α-συνουκλεΐνης γίνεται ανεξάρτητα από τη Brefeldin-A, το οποίο σημαίνει ότι δεν ελέγχεται από το μονοπάτι ΕΔ/Golgi<sup>40,28</sup>, αλλά από μη-κλασικούς εκκριτικούς μηχανισμούς. Χρησιμοποιώντας σύστημα επαγόμενης υπερέκφρασης της α-συνουκλεΐνης δείχθηκε ότι η α-συνουκλεΐνη εξέρχεται από το κύτταρο και μέρος αυτής συνδέεται με κυστίδια που φέρουν τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των εξωσωμάτων<sup>28</sup>. Πειράματα με χρήση ιονοφόρων και χειλωτών ασβεστίου έδειξε ότι η έξοδος της α-συνουκλεΐνης επηρεάζεται από αλλαγές του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Το γεγονός ότι και η ρύθμιση της έκκρισης εξωσωμάτων επηρεάζεται από τέτοιες αλλαγές<sup>41</sup> συνιστά ότι η έκκριση της α-συνουκλεΐνης και ο μηχανισμός των εξωσωμάτων ίσως συνδέονται. Μονομερείς και ολιγομερείς μορφές εξέρχονται και μέσω των εξωσωμάτων, το οποίο δείχνει ότι εν δυνάμει τα εξωσώματα θα μπορούσαν να εξαπλώνουν τοξικό φορτίο, άρα να έχουν ενεργό ρόλο στην εξάπλωση της παθολογίας Parkinson.

Η φλεγμονή και ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων συμπίπτει με ευρήματα του νευροεκφυλισμού Parkinson σε διάφορα ζωικά μοντέλα της νόσου<sup>42</sup>. Υπάρχουν δεδομένα ότι εξωγενώς προστιθέμενη ανασυνδυσμένη α-συνουκλεΐνη δίνει το ερέθισμα για ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων επάγοντας την παραγωγή κυτοκινών όπως η IL-1β και η IL-6, και ενζύμων που σχετίζονται με τη φλεγμονή<sup>43,44</sup>. Σε σύστημα συγκαλλιέργειας δείχθηκε ότι η παρουσία μικρογλοιακών κυττάρων ήταν απαραίτητη για την τοξική δράση της α-συνουκλεΐνης, δείχνοντας ότι η τοξικότητα οφείλεται κυρίως στην απόκριση των μικρογλοιακών κυττάρων<sup>43</sup>. Ωστόσο, βασικό μειονέκτημα όλων αυτών των μελετών είναι ότι χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυσμένη πρωτεΐνη παρά εκκρινόμενη από τα κύτταρα, η οποία μπορεί να έχει άλλες ιδιότητες. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η α-συνουκλεΐνη έχει τοξικές παρακρινείς δράσεις ενδέχεται να περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση συγκεκριμένων υποδοχέων ή την πρόσληψη της πρωτεΐνης από κύτταρα, όπως έχει προταθεί για την πρόσληψη της πρωτεΐνης από μικρογλοιακά κύτταρα με φαγοκύτωση<sup>45</sup>. Έχειδειχθεί ότι η μονομερής α-συνουκλεΐνη μπορεί να εισέλθει σε κύτταρα απ' ευθείας, χωρίς ενδοκύτωση ενώ η ολιγομερής μορφή με ενδοκύτωση<sup>46</sup> ή διανοίγοντας πόρους στη μεμβράνη<sup>47</sup>. Εναλλακτικά, η α-συνουκλεΐνη που εκκρίνεται από κύτταρα θα μπορούσε να προσλαμβάνεται από αστροκύτταρα, επάγοντας φλεγμονώδεις αντιδράσεις *in vivo* και *in vitro* ή βοηθώντας στην αποικοδόμησή της.

Ορισμένες μελέτες-κλειδιά έδειξαν ότι υπό παθολογικές συνθήκες, η α-συνουκλείνη έχει παρακρινείς τοξικές δράσεις *in vivo*. 14 χρόνια μετά την εμφύτευση εμβρυικών ντοπαμινεργικών νευρώνων στο ραβδωτό σώμα ατόμου με νόσο Parkinson, δείχθηκε ότι παρότι παρέμειναν ζωντανοί, είχαν αναπτύξει σωμάτια Lewy ανοσοθετικά για α-συνουκλείνη και ουμπικουϊτίνη (εικόνα 3) και είχαν μειωμένα επίπεδα μεταφορέα ντοπαμίνης<sup>48,49</sup>. Λόγω του ότι η ηλικία των εμφυτευμάτων ήταν νεαρή, δεν είναι πιθανό η παθολογία που αναπτύχθηκε να οφείλεται στην ενδογενή α-συνουκλείνη που εκφράζεται στα εμφυτεύματα.



**Εικόνα 3: Παθολογία Parkinson σε εμβρυικά νευρωνικά εμφυτεύματα στη μέλαινα ουσία.** Σε περιοχές της μέλαινας ουσίας που δεν υπάρχει εμφύτευμα, παρατηρείται τυπική παθολογική εικόνα α) α-συνουκλείνης και συνεντόπιση με β) την ουμπικουϊτίνη. γ) εκτενής παθολογία α-συνουκλείνης παρατηρήθηκε σε εμφυτευμένους νευρώνες, όπως κυτταροπλασματική και συσσωματωμένη α-συνουκλείνη (βέλη) αλλά και παθολογικά συσσωματώματα δ) ουμπικουϊτίνης. Περιγραφή από *Kordower et al., 2008*.

Μπορούν λοιπόν καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από την παθολογική εξάπλωση της α-συνουκλείνης να χαρακτηριστούν «μολυσματικές ασθένειες»; Οι Desplats et al., 2009 έδειξαν ότι α-συνουκλείνη μεταφέρεται *in vivo* από τον οργανισμό-δέκτη σε εμφυτευμένα εμβρυικά βλαστοκύτταρα<sup>50</sup>. Διαγονιδιακά για την α-συνουκλείνη ζώα υπεβλήθησαν σε στερεοταξικές ενέσεις φλοιικών νευρωνικών βλαστοκυττάρων. Τα βλαστοκύτταρα προσέλαβαν *in vivo* την α-συνουκλείνη του δέκτη κατά ένα χρονο-εξαρτώμενο τρόπο και ορισμένα ανέπτυξαν σωμάτια Lewy. Ομοίως, σε μοντέλο *in vitro* συγκαλλιέργειας κυττάρων παρατηρήθηκε μεταφορά της πρωτεΐνης *in trans* (χωρίς φυσική επαφή) από κύτταρα που υπερέκφραζαν την α-συνουκλείνη σε κύτταρα που εξέφραζαν ενδογενή επίπεδα. Η ομάδα του Patric

Brundin συγκαλλιέργησε κυτταρικές σειρές HEK και SH-SY5Y που σταθερά εξέφραζαν σημασμένη α-συνουκλείνη (DsRed ή AcGFP, αντίστοιχα) και είδαν ότι ένα ικανό ποσοστό κυττάρων εμφάνισε διπλή χρώση α-συνουκλείνης στο κυτταρικό σώμα κατά ένα χρονο-εξαρτώμενο τρόπο<sup>51</sup>. Μία σημαντική παρατήρηση ήταν ότι συχνά, τα ολιγομερή της α-συνουκλείνης που προέρχονταν από τα κύτταρα-δότες περιβάλλονταν από πρωτεΐνη των κυττάρων-δεκτών, επομένως η πρωτεΐνη των δοτών ενεργούσε ως «σπόρος» για την περαιτέρω συσσώρευση πρωτεΐνης στο κύτταρο-δέκτη, χαρακτηριστικό του μηχανισμού prion. Σε μετέπειτα μελέτη της ίδιας ομάδας, κατασκευάστηκαν νευρώνες μέλαινας ουσίας που εκφράζουν την ανθρώπινη α-συνουκλείνη κατόπιν διαμόλυνσης με ιό και εμφυτεύτηκαν σε επίμυες<sup>52</sup>. Μετά από κάποιες εβδομάδες όταν οι νευρώνες είχαν πλέον αρχίσει να εκφράζουν την α-συνουκλείνη στο ραβδωτό σώμα, εμφυτεύτηκαν εμβρυικοί νευρώνες μεσεγκεφάλου στο ραβδωτό σώμα στους οποίους και παρατηρήθηκε μεταφορά α-συνουκλείνης. Ανοσοσήμανση τομών έδειξε ότι η α-συνουκλείνη που είχε προσληφθεί συνεντοπιζόταν με τον δείκτη πρώιμων ενδοσωμάτων EEA1.

Βάσει των ευρημάτων αυτών, τοξικές μορφές της α-συνουκλείνης εξέρχονται από πάσχοντα κύτταρα και εισέρχονται σε υγιή κύτταρα. Μονομερείς, ολιγομερείς και ινιδιακές μορφές δείχθηκαν να εισέρχονται σε νευρώνες *in vivo*. Παρότι στα συστήματα που περιγράφηκαν, η πρόσληψη α-συνουκλείνης δεν συνδέθηκε άμεσα με την ανάπτυξη κάποιου κλινικού φαινότυπου *in vivo* ούτε οδήγησε σε κυτταρικό θάνατο *in vitro*, η πλέον πρόσφατη μελέτη από την ομάδα της Virginia Lee (2012) έδειξε ότι υπάρχει άμεση σύνδεση μεταξύ της εξάπλωσης ινιδιακών μορφών (συγκεκριμένα) α-συνουκλείνης και της παθολογίας Parkinson. Ένεση προσχηματισμένων ινιδίων α-συνουκλείνης στο ραβδωτό σώμα μύων οδήγησε αρχικά σε ανάπτυξη παθολογίας Lewy η οποία μεταδόθηκε σε περιοχές που συνδέονται μέσω των αξόνων και εν συνεχεία σε απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων κατά ένα χρονο-εξαρτώμενο τρόπο<sup>53</sup>. Η απώλεια των νευρώνων συνδέθηκε κλινικά με ελλιπή συντονισμό κινήσεων και ισορροπίας. Άρα η «μολυσματικότητα» της εξάπλωσης οφείλεται με κάποιο τρόπο στην ίδια η έκκριση ή τροποποιήσεις στην έκκριση της α-συνουκλείνης. Η πλήρης κατανόηση αυτού του μηχανισμού είναι προϋπόθεση για τη θέσπιση αποτελεσματικών θεραπευτικών στόχων και την ανάπτυξη νέων θεραπειών.

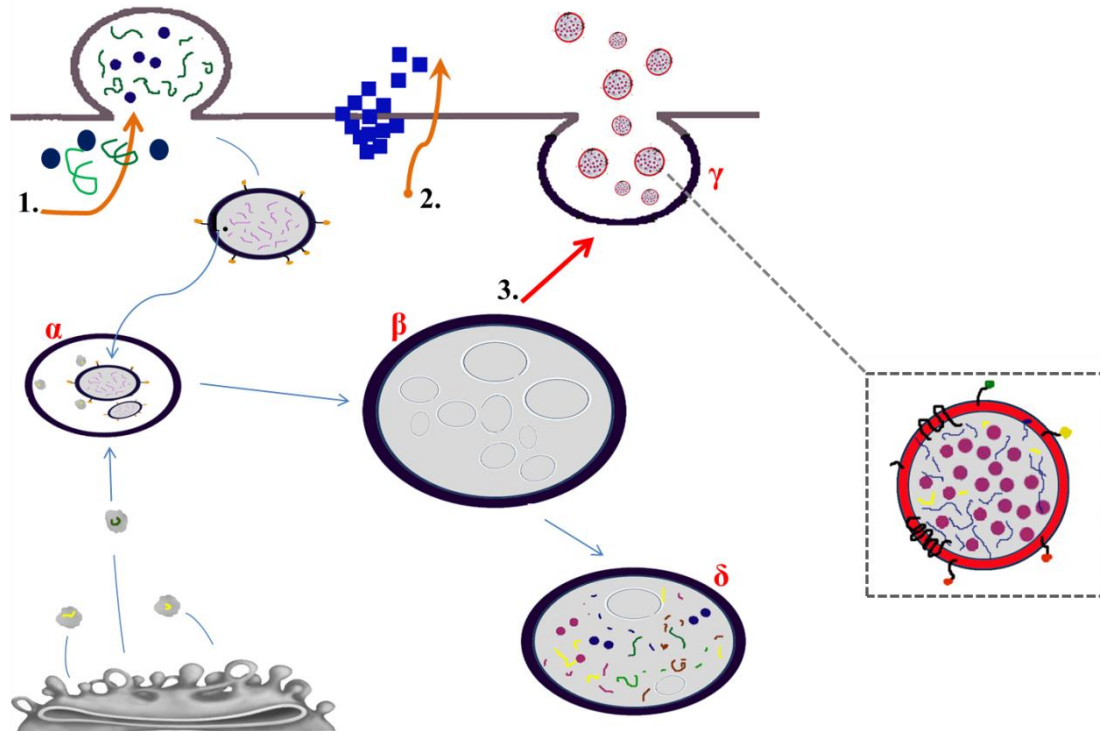
## 1.4 Η μη-κλασική έκκριση της α-συνουκλεΐνης συνδέεται με την εξάπλωσή της

### 1.4.1 Κλασικά και μη-κλασικά μονοπάτια έκκρισης πρωτεϊνών

Η έκκριση πρωτεϊνών είναι μία θεμελιώδης διεργασία της επικοινωνίας μεταξύ κυττάρων και συμβαίνει φυσιολογικά μέσω κλασικών και μη-κλασικών μονοπατιών<sup>54</sup>. Πρωτεΐνες που προορίζονται προς ενδοκυτταρικά και εκκριτικά μονοπάτια, την πλασματική μεμβράνη ή είναι φυσιολογικά εκκρινόμενες στον εξωκυττάριο χώρο διαθέτουν στο N-άκρο τους μία σηματοδοτική αλληλουχία. Αυτή στοχεύει τα ριβοσώματα που τις μεταφράζουν στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ) και οι πρωτεΐνες μπορούν να εισέλθουν στον αυλό (lumen) του. Από εκεί, εισέρχονται στο κλασικό εκκριτικό μονοπάτι: οι πρωτεΐνες διακινούνται στο σύμπλοκο trans-Golgi όπου και εισέρχονται σε εκκριτικά μεταφορικά κυστίδια. Η έκκρισή τους μέσω κυστιδίων είναι συνεχής ή ρυθμιζόμενη. Κατά τη συνεχή έκκριση, τα μεταφορικά κυστίδια μεταναστεύουν αμέσως στην πλασματική μεμβράνη ελευθερώνουν το περιεχόμενό τους με εξωκύτωση (πχ. συνεχής έκκριση κολλαγόνου). Κατά τη ρυθμιζόμενη έκκριση (πχ. επαγόμενη έκκριση νευροδιαβιβαστή), τα εκκριτικά κυστίδια συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη κατόπιν ερεθίσματος (πχ. αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου που προκαλείται λόγω πρόσδεσης μορίου σε ειδικό υποδοχέα).

Οι πρωτεΐνες του κυτοσολίου δεν διαθέτουν αλληλουχία-οδηγό στόχευσης στον αυλό του ΕΔ. Όμως έχει παρατηρηθεί ότι αρκετές εκκρίνονται συνεχώς ή κατόπιν ερεθίσματος μέσω ΕΔ/Golgi-ανεξάρτητων μηχανισμών (σχήμα 4)<sup>54</sup>. Αυτοί οι μηχανισμοί ονομάζονται μη-κλασικοί μηχανισμοί έκκρισης, όμως δεν έχουν ταυτοποιηθεί πλήρως. Ορισμένες πρωτεΐνες του κυτοσολίου εισέρχονται σε μικροκυστίδια τα οποία αποσχίζονται άμεσα από την πλασματική μεμβράνη. Για παράδειγμα, το μόριο πρόδρομο μόριο της Interleukin-1β εισέρχεται σε κυστίδια, επεξεργάζεται μέσα σε αυτά στην ώριμη μορφή του και βγαίνει από το κύτταρο ως ενεργό μόριο<sup>55</sup>. Ομοίως, η πρωτεΐνη Acb1 στους μύκητες, εισέρχεται σε ένα είδος «εκκριτικών αυτοφαγοσωμάτων», και εκκρίνεται με τα κυστίδια που αυτά ελευθερώνουν όταν συντηχθούν με την πλασματική μεμβράνη<sup>56</sup>. Επίσης, πρωτεΐνες του κυτοσολίου εξέρχονται και κατά την απόσχιση αποπτωτικών ασκών (apoptotic blebs) από παθολογικά κύτταρα. Ο τροφικός παράγοντας FGF2 είναι μία πρωτεΐνη

του κυττοσολίου που εκκρίνεται σταθερά, χωρίς τη διαμεσολάβηση κυστιδίων<sup>57,58</sup>. Αλληλεπιδρά άμεσα με τα PI(4,5)P2 στο εσωτερικό της πλασματικής μεμβράνης, όπου φωσφορυλιώνεται και ολιγομερίζεται<sup>59</sup>.



**Σχήμα 4: Μη κλασικοί μηχανισμοί έκκρισης πρωτεϊνών.** 1. Κυττοσολικές πρωτεΐνες εξέρχονται μέσω κυστιδίων που αποσχίζονται από την πλασματική μεμβράνη (πχ. κολλαγόνο). 2. Ορισμένες κυττοσολικές πρωτεΐνες διαπερνούν άμεσα την πλασματική μεμβράνη (πχ. FGF2, Galectins) 3. Έκκριση μέσω εξωσωμάτων (πχ. GAPDH, HSPs). Αυτός ο μηχανισμός περιλαμβάνει τρία στάδια. Πρωτεΐνες που εισέρχονται στο κύτταρο με ενδοκύτωση ή κυττοσολικές πρωτεΐνες εισέρχονται στα πρώιμα ενδοσώματα (α). Κατά τη διαδικασία «ωρίμανσης» τους, η μεμβράνη των ενδοσωμάτων αναδιπλώνεται προς-τα-έσω, δημιουργώντας τελικά πολυκυστιδιακά σωμάτια (β). Τα σωμάτια αυτά είτε συντήκονται με λυσοσώματα (δ) είτε συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη και απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους ως εξωσώματα (γ).

Η έκκριση πρωτεϊνών επίσης διευκολύνεται από ενδιάμεσα μόρια όπως οι μεταφορείς ABC (ATP-binding cassette), οι οποίοι μετατρέπουν την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP σε ενέργεια μετακίνησης υποστρωμάτων κατά μήκος της λιπιδικής διπλοστιβάδας προς το κυτταρόπλασμα (εισαγωγή) ή προς τον εξωκυττάριο χώρο (εξαγωγή)<sup>60</sup>. Αύξηση των επιπέδων ABC σε κύτταρα έχει *in vivo* συνδεθεί με τα επίπεδα του Aβ<sub>40</sub> και Aβ<sub>42</sub> αμυλοειδούς<sup>61</sup>. Επίσης, πολυμορφισμοί, μειωμένα επίπεδα

έκφρασης και υπολειτουργικότητα γονιδίων ABC συνδέονται με τη νόσο του Parkinson<sup>62</sup>.

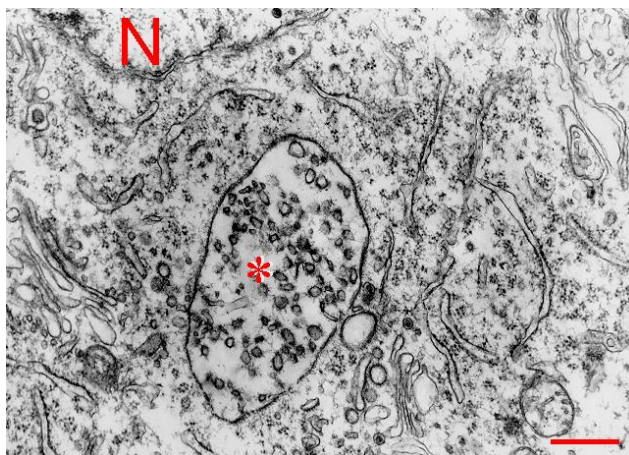
Μέχρι στιγμής δεν είναι γνωστό αν οι κυτοσολικές πρωτεΐνες έχουν κάποια «προτίμηση» σε κάποιον από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς μη-κλασσικής έκκρισης. Αντιθέτως, φαίνεται να εξέρχονται από το κύτταρο με πάνω από έναν μηχανισμούς. Βάσει του ότι η μεμβράνη είναι αδιαπέραστη, η ανακάλυψη ότι δημιουργούνται λιπιδικά κυστίδια ενδοκυτταρικής βιογένεσης που μεταφέρουν πρωτεΐνες αλλά και RNA, απελευθερώνονται από κύτταρα και μπορούν να επηρεάσουν τη βιολογική ενεργότητα προσλαμβανόντων κυττάρων χωρίς φυσική επαφή<sup>63</sup> ήταν πολύ σημαντική για τη θεώρηση της διακυτταρικής επικοινωνίας σε επίπεδο συστήματος. Η τρίτη αυτή κατηγορία μη-κλασσικά εκκρινόμενων πρωτεϊνών αφορά τα εξωσώματα.

#### **1.4.2 Η βιογένεση των εξωσωμάτων**

Η έκκριση πρωτεϊνών μέσω των εξωσωμάτων έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων, λόγω του ότι αποτελούν το μόνο τύπο κυστιδίων που εκκρίνονται από ένα ενδοκυτταρικό διαμέρισμα, μόνο από ζωντανά κύτταρα, και το περιεχόμενό τους επηρεάζει τα προσλαμβάνοντα κύτταρα σε επίπεδο περιφέρειας, κυτοσολίου, πιθανώς και πυρήνα. Τα εξωσώματα είναι κυστίδια με διάμετρο 30-100nm και χαρακτηριστική πρωτεϊνική και λιπιδική σύνθεση<sup>64,65</sup>. Χαρακτηρίστηκαν μικροσκοπικά για πρώτη φορά το 1985, από μία ομάδα που μελετούσε την απομάκρυνση του υποδοχέα της τρानσφερίνης από την πλασματική μεμβράνη, κατά την ωρίμανση ερυθροκυττάρων προβάτου<sup>66</sup>. Περιγράφηκαν ως «σφαιρικά σωμάτια» που ήταν παρόντα σε πολυκυστιδιακά σωμάτια (multivesicular bodies) και απελευθερώνονταν όταν αυτά συντήκονταν με την πλασματική μεμβράνη (εικόνα 5). Τα πολυκυστιδιακά σωμάτια είναι μέρος του πλειομορφικού συστήματος των ενδοσωμάτων, το οποίο αποτελείται από πρωτογενή ενδοκυτταρικά σφαιρίδια, τα πρώιμα ενδοσώματα, τα ώριμα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα<sup>67</sup>. Τα πρώιμα ενδοσώματα αποτελούν την κύρια οδό εισόδου υλικού που ενδοκυτταρώνεται. Τα λυσοσώματα και ώριμα ενδοσώματα είναι οι κύριοι σταθμοί αποδόμησης πρωτεϊνών και λιπιδίων και τα όρια που ως δομές διαχωρίζονται εντός του κυττάρου δεν είναι σαφή. Το περιεχόμενο των πολυκυστιδιακών σωμάτων απελευθερώνεται ως εξωσώματα όταν τα σωμάτια συντήκονται με την πλασματική μεμβράνη. Τα



εσωτερικά σφαιρίδια των πολυκυστιδιακών σωμάτων διαμορφώνονται κατά την «προς-τα-έσω» αναδίπλωση (inward budding) της μεμβράνης των ενδοσωμάτων, το οποίο δημιουργεί ένα διαμέρισμα που περιβάλλεται από μεμβράνη και στο οποίο ο αυλός ομοιάζει τοπολογικά με το κυτταρόπλασμα. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες και τα λιπίδια προέρχονται κατά κύριο λόγο από την περιφερική μεμβράνη των ενδοσωμάτων.



**Εικόνα 5: Μεγάλο πολυκυστιδιακό σωματίο (κόκκινος αστερίσκος).**  
N είναι ο πυρήνας πυριμιδικού νευρώνα. Scale = 1  $\mu\text{m}$ . Το περιεχόμενό του θα απελευθερωθεί ως εξωσώματα.

Εικόνα από [http://synapses.clm.utexas.edu/atlas/1\\_1\\_5\\_3.stm](http://synapses.clm.utexas.edu/atlas/1_1_5_3.stm)

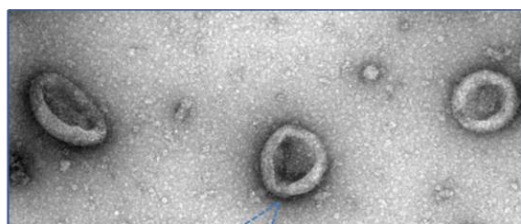
### **1.4.3 Τα εξωσώματα ως διαμεσολαβητές της έκκρισης και μετάδοσης πληροφοριών.**

Ο πλήρης χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων περιλαμβάνει την εξέτασή τους μορφολογικά και βιοχημικά (εικόνα 6). Τα εξωσώματα χαρακτηρίζονται βάσει της μορφολογίας τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αλλά και βάσει των ιδιοτήτων που τους προσδίδει η λιπιδική τους σύσταση. Επίσης, φέρουν στη μεμβράνη και τον αυλό τους (lumen) χαρακτηριστικές πρωτεΐνες σε αφθονία, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως «δείκτες». Βάσει της προέλευσης των εξωσωμάτων, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη διακίνηση μεμβρανών (Annexins), πρωτεΐνες που είναι ενσωματωμένες σε λιπιδικές σχεδίες (Flotillins), πρωτεΐνες με διαμεμβρανικές περιοχές-tetraspanins (CD9, CD63, CD81, CD82), πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsc70, Hsp90) και κυτοσολικές πρωτεΐνες

του συμπλόκου διαλογής πρωτεϊνών στα ενδοσώματα (endosomal sorting complex) (Alix, TSG101) βρίσκονται σε αφθονία στα εξωσώματα και χαρακτηρίζονται ως βιοχημικοί δείκτες εξωσωμάτων (exosomal “markers”)<sup>68</sup>.

### Το «προφίλ» των εξωσωμάτων

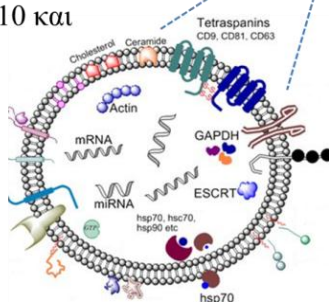
- **Χαρακτηριστική μορφολογία**  
(Ηλεκτρονική Μικροσκοπία)  
Σχήμα κοίλο, με διάμετρο 30-100nm



- **Λιπιδική σύσταση**  
επιπλέον σε βαθμίδωση συγκέντρωσης  
σουκρόζης μεταξύ της πυκνότητας 1.10 και  
1.18 g/mL

- **Μεμβρανικές πρωτεΐνες (32%)**  
δείκτες: flotillin-1, tetraspanins

- **Πρωτεΐνες κυτοσολίου (18%)**  
δείκτες: Alix, TSG101



### Εικόνα 6: Χαρακτηρισμός των εξωσωμάτων βάσει μορφολογίας, λιπιδικής και πρωτεϊνικής σύστασης.

Έχει δειχθεί ότι η μεμβράνη των εξωσωμάτων είναι ιδιαίτερα συμπαγής και διαθέτει λιπιδικές σχεδίες. Για παράδειγμα οι πρωτεΐνες GM1, Lyn, flotillin-1, και stomatin, διαλέγονται ως συστατικά λιπιδικής σχεδίας και στα εξωσώματα<sup>69</sup>. Μάλιστα δείχθηκε ότι λόγω αυτής της σύστασης των εξωσωμάτων, διευκολύνεται η ενσωμάτωση πρωτεϊνικών μορίων της πλασματικής μεμβράνης -όπως τα μόρια τάξης II αντιγόνων ιστοσυμβατότητας (MHC II)- στη μεμβράνη των εξωσωμάτων κατά την έκκρισή τους από το κύτταρο. Επίσης, η ύπαρξη εξωσωμικών λιπιδικών σχεδιών επιβεβαιώνεται από την αφθονία συγκεκριμένων λιπιδίων όπως η cholesterol, το ceramide και άλλα σφιγγολιπίδια και φωσφογλυκερίδια με μακριές κορεσμένες αλυσίδες (σε περίληψη στο <sup>68</sup>). Παρότι ο διαχωρισμός των πολυκυστιδιακών σωμάτων που θα καταλήξουν σε αποδόμηση από αυτά που θα απελευθερώσουν εξωσώματα είναι δύσκολος, έχει δειχθεί ότι το λιπίδιο κεραμίδιο/ceramide ρυθμίζει

τη δημιουργία ενδοσωμικών κυστιδίων μέσα σε μεγαλύτερα λιπιδικά κυστίδια<sup>70</sup> προσομοιώνοντας τη δημιουργία πολυκυστιδιακών σωματίων), δείχνοντας έτσι ότι πιθανώς να ρυθμίζει και τη διαφορετική μοίρα μεταξύ πρωτεϊνών που εξέρχονται μέσω εξωσωμάτων από αυτές που αποδομούνται. Το περιεχόμενο που εισέρχεται σε ενδοσώματα διαλέγεται σε διάφορα επίπεδα<sup>71</sup>. Κατ' αρχάς, διάφορες πρωτεΐνες-μέλη του συμπλόκου ESCRT I-III εισέρχονται στα ενδοσώματα– η πρωτεΐνη Alix αλληλεπιδρά με την TSG101 και υπάρχει σε αφθονία εντός εξωσωμάτων. Θεωρείται ότι η TSG101 προσδένεται συγκεκριμένα σε μονοουβικιτινιωμένες πρωτεΐνες ενώ μέλη του ESCRT III προσελκύουν πρωτεΐνες οι οποίες αφαιρούν την ουβικιτίνη πριν αυτές εισέλθουν σε πολυκυστιδιακά σωματίδια. Ένα άλλο επίπεδο είναι η υψηλής συγγένειας αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών- πρωτεϊνών ή πρωτεϊνών –λιπιδίων. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη Hsc70 βρίσκεται σε αφθονία στα εξωσώματα και είναι βασικό συστατικό πολλών δικτύων αλληλεπίδρασης (interactomes). Η flotillin1 και οι tetraspanins προσδένονται με υψηλή συγγένεια σε λιπιδικές σχεδίες οι οποίες επίσης βρίσκονται στα εξωσώματα και αποτελούν επίσης βιοχημικούς δείκτες εξωσωμάτων. Τέλος, έχει αναφερθεί ένας μηχανισμός μικροαυτοφαγίας ενδοσωμάτων, μία διαδικασία κατά την οποία στα ενδοσώματα διαλέγονται πρωτεΐνες αλλά και miRNAs που βρίσκονται πολύ κοντά στην τοπολογία ενός συγκεκριμένου ενδοσώματος. Και η διαδικασία αυτή είναι επιλεκτική υπό την έννοια ότι οδηγεί σε εξωσώματα με φορτίο που αντιπροσωπεύει συγκεκριμένες ενδοκυτταρικές συντεταγμένες. Το πρώτο βήμα που σχετίζεται απόλυτα με τη βιογένεση των εξωσωμάτων είναι η προς-τα-έσω αναδίπλωση της μεμβράνης, η οποία εν πολλοίς υπαγορεύεται από τη συγκέντρωση πρωτεϊνών ανά μονάδα επιφάνειας. Κατά τη διαδικασία αυτή, η συσσώρευση πρωτεϊνών ή η παρουσία λιπιδίων όπως το ceramide προσδίδουν στη μεμβράνη μία αρνητική τάση αναδίπλωσης (negative curvature) που τελικά οδηγεί στη δημιουργία κυστιδίων μέσα στο ενδοσώμα<sup>70</sup>. Προς το παρόν δεν γνωρίζουμε πλήρως τις πρωτεΐνες, όλα τα μόρια RNA ή τα λιπίδια που μπορεί να σχετίζονται με τα εξωσώματα. Ωστόσο, έχει δημιουργηθεί η βάση δεδομένων Exocarta<sup>72</sup>, που περιλαμβάνει όλες τις πρωτεΐνες, λιπίδια και μόρια RNA που έχουν σχετιστεί με τα εξωσώματα μέχρι σήμερα. Εξέταση των καταχωρήσεων δείχνει ότι διάφορες λειτουργικές κατηγορίες μορίων εισέρχονται σε αυτά και αποκαλύπτει τις πιθανές βιολογικές δράσεις των εξωσωμάτων .

#### 1.4.4 Τα εξωσώματα εμφανίζουν μεγάλη βιολογική δραστηριότητα

Τα εξωσώματα δεν είναι κυτία εναπόθεσης άχρηστων πρωτεϊνών. Οι πρώτες μελέτες γύρω από τη βιολογική τους δράση έδιναν έμφαση στην αποβολή ανεπιθύμητων συστατικών της πλασματικής μεμβράνης μέσω αυτών, κατά την κυτταρική διαφοροποίηση<sup>73</sup>. Επομένως, αρχικά ερευνήθηκαν από την σκοπιά ότι μέσω αυτών αποβάλλονται οι άχρηστες πρωτεΐνες χωρίς τη διαμεσολάβηση ενδοκυτταρικών μηχανισμών αποδόμησης/καθαρισμού. Όμως όπως αποκαλύφθηκε στο σύνολο της βιβλιογραφίας που ακολούθησε, τα εξωσώματα έχουν μία ιδιαίτερα σημαντική λειτουργία: διαμεσολαβούν την ανταλλαγή πληροφοριών μεταξύ συγκεκριμένων κυττάρων σε συστημικό επίπεδο, εφόσον μπορούν να μεταφέρουν πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα που διατηρούν τη λειτουργικότητά τους. Τα εξωσώματα περιέχουν σημαντική ποσότητα miRNA, μη κωδικά RNAs και mRNA<sup>74</sup>. Στα εξωσώματα βρέθηκαν σπασμένα κομμάτια 200 νουκλεοτιδίων όπως και ορισμένα ολόκληρα μόρια που *in vitro* έδωσαν πλήρους μήκους πρωτεΐνες. Μελέτη των επιπέδων miRNAs σε εξωσώματα από ανθρώπινο μητρικό γάλα έδειξε ότι τα miR-181a και miR-155, τα οποία εμπλέκονται σε ανοσορύθμιση ήταν παρόντα κατά τους 6 πρώτους μήνες της γαλουχίας αλλά τα επίπεδά τους ελαττώνονταν σημαντικά μετά από αυτό το διάστημα<sup>75</sup>. Αυτό σημαίνει ότι παίζουν ρόλο στη μετάδοση ανοσίας από τη μητέρα στο μωρό. Έχει δειχθεί *in vivo* ότι μέσω των εξωσωμάτων επιτυγχάνεται σηματοδότηση διαμεσολαβούμενη από υποδοχέα. Κακοήθεις επιθετικοί όγκοι του εγκεφάλου (γλοιώματα) εκφράζουν μία μορφή του EGFRvIII (epidermal growth factor receptor). Αυτός ο παράγοντας μπορεί να μεταδοθεί μέσω των εξωσωμάτων που εισέρχονται στη ροή του αίματος και συντήκονται με άλλα καρκινικά κύτταρα που δεν διαθέτουν τον παράγοντα αυτό<sup>76</sup>. Αυτό οδηγεί στη μεταφορά ογκογενούς ενεργότητας στα κύτταρα-στόχους, όπως φαίνεται από την ενεργοποίηση των μονοπατιών MAPK και Akt και τις αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που ρυθμίζονται μέσω αυτών, αλλάζοντας το φαινότυπο άλλων καρκινικών κυττάρων. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε επιτυχή χρήση των εξωσωμάτων για την χορήγηση θεραπείας με siRNA στον εγκέφαλο μυών<sup>77</sup>. Για τη στόχευση των εξωσωμάτων, δημιουργήθηκαν δενδριτικά κύτταρα που εξέφραζαν Lamp2b σε σύντηξη με ένα πεπτίδιο που είναι ειδικό σε νευρώνες, το RVG peptide3. Η ομάδα απομόνωσε εξωσώματα από το καλλιεργητικό μέσο και τους έβαλε συνθετικό siRNA με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation). Τα σημασμένα με RVG-p3-tagged εξωσώματα

μετέδωσαν το siRNA ειδικά σε νευρώνες, μικρογλοία και ολιγοδενδροκύτταρα στον εγκέφαλο οδηγώντας σε 60% σίγαση του γονιδίου BACE1 που είναι θεραπευτικός στόχος της νόσου Alzheimer.

Τα εξωσώματα επίσης μπορούν να παίξουν ρόλο στην εξάπλωση παθογόνων μορίων όπως τα prions και οι ιοί από το ένα κύτταρο στο άλλο<sup>7879</sup>. Οι Pegtel et al. έδειξαν ότι miRNAs που εκκρίνονται από κύτταρα μολυσμένα με Epstein Barr ιό μεταφέρονται μέσω των εξωσωμάτων σε μη μολυσμένα κύτταρα<sup>78</sup>. Επίσης, όταν μολυνθούν με HIV, τα δενδριτικά κύτταρα, τα μονοκύτταρα, μακροφάγα και λεμφοκύτταρα εκκρίνουν ιούς και εξωσώματα, όπου το 10% των πρωτεϊνών που περιέχουν είναι πανομοιότυπες<sup>8081</sup>. Μάλιστα, τα εξωσώματα ανταγωνίζονται τον HIV για την είσοδο σε ενδοκυτταρικά διαμερίσματα.

Διακρίνουμε λοιπόν ότι υπάρχει μία λεπτή ισορροπία μεταξύ του ρόλου των εξωσωμάτων ως διαμεσολαβητών της φυσιολογικής διακυτταρικής επικοινωνίας και της εξάπλωσης παθολογικών στοιχείων. Αυτό έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπου μετά την παθογένεση, στο κύτταρο υπάρχουν οι ίδιες πρωτεΐνες με νέες, τοξικές ιδιότητες. Έχει διαμορφωθεί η υπόθεση ότι κατά τη βιογένεση των εξωσωμάτων, πέραν των πρωτεϊνών που φυσιολογικά διαλέγονται εντός των ενδοσωμάτων, συσσωρεύονται επιπλέον και τοξικές πρωτεΐνες, με ανώμαλη αναδίπλωση ή συνοδευόμενες από επιβλαβείς αλληλεπιδράσεις. Οι πρωτεΐνες αυτές εξέρχονται από το κύτταρο μέσω των εξωσωμάτων αλλά και μέσω αυτών προσλαμβάνονται τελικά από άλλα, υγιή κύτταρα. Θα μπορούσε άραγε η βιολογική πορεία των εξωσωμάτων -τα οποία μεταφέρουν υλικό φυσιολογικά και διαρκώς από το ένα κύτταρο στο άλλο- να εξηγήσει μερικώς την δυναμική στο χρόνο εξάπλωση πρωτεϊνικής παθολογίας, η οποία αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό του νευροεκφυλισμού;

### **1.5 Η α-συνουκλεΐνη εκκρίνεται μέσω των εξωσωμάτων**

Η υπόθεση του «Δούρειου Ίππου» υποστηρίζει ότι αμυλοειδή του κυτοσολίου εισέρχονται στο βιογενετικό μονοπάτι, ενσωματώνονται στα εξωσώματα και εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο<sup>82,83</sup>. Συνεπώς, μπορούν να εισέλθουν σε κύτταρα στα πλαίσια της διακυτταρικής αλληλεπίδρασης και να απελευθερώσουν το υλικό τους. Αυτός ο μηχανισμός ενδέχεται να λειτουργεί προοδευτικά και συσσωρευτικά

ώστε μακροπρόθεσμα, οι νευρώνες-παραλήπτες του υλικού να έχουν αναπτύξει και αυτοί την μοριακή παθολογία.

Διάφορες πρωτεΐνες που συνδέονται βιοχημικά με το νευροεκφυλισμό έχειδειχθεί ότι συνδέονται με τα εξωσώματα<sup>72</sup>. Ορισμένες εξ αυτών είναι το Αβ αμυλοειδές<sup>84</sup> και η πρωτεΐνη prion PrP<sup>85</sup> όπως και τα πρόδρομα μόριά τους, η tau<sup>86</sup>, αλλά και η α-συνουκλεΐνη<sup>28</sup>. Η συσχέτιση των πρωτεϊνών αυτών με τα εξωσώματα δεν είναι αρκετή για να επιβεβαιώσει ή να απορρίψει την υπόθεση ότι τα εξωσώματα λειτουργούν και ως «Δούρειοι Ίπποι» που συνεισφέρουν στην εξέλιξη της νευροεκφυλισμού.

Μέρος της α-συνουκλεΐνης εξέρχεται από το κύτταρο σε σύνδεση με τη μεμβράνη και τον αυλό (lumen) των εξωσωμάτων<sup>28</sup>. Το γεγονός ότι μονομερείς και ολιγομερείς μορφές της πρωτεΐνης διαλέγονται κατά τη βιογένεση των εξωσωμάτων σημαίνει ότι εν δυνάμει, τα εξωσώματα διαμεσολαβούν και την εξάπλωση της παθολογίας που σχετίζεται με την α-συνουκλεΐνη σε κύτταρα-παραλήπτες. Ως εκ τούτου θα ήταν ένας πιθανός θεραπευτικός στόχος. Θεωρείται ότι τα εξωσώματα διακινούνται ελεύθερα μεταξύ των κυττάρων. Δεν γνωρίζουμε ωστόσο πώς τα κύτταρα-παραλήπτες «διαχειρίζονται» το υλικό αυτό. Βάσει των ιδιοτήτων της, η α-συνουκλεΐνη θα μπορούσε να επηρεάζει το κύτταρο σε επίπεδο πλασματικής μεμβράνης, κατά τη **σύντηξη**<sup>87</sup> των εξωσωμάτων με αυτή. Θα μπορούσε επίσης να επηρεάζει μηχανισμούς αποδόμησης του κυττάρου (πρωτεάσωμα/λυσοςώματα) κατόπιν **ενδοκυττάρωσης**<sup>88,89</sup>. Είναι εξίσου πιθανό να διακινείται σε διάφορες περιοχές κατά την αλληλεπίδραση ενδοσωμικών κυστιδίων που την περιέχουν με τον κυτταροσκελετό. Παρότι μπορούμε να διατυπώσουμε διάφορες υποθέσεις για το πώς η συσχέτιση της πρωτεΐνης με τα εξωσώματα θα μπορούσε να δράσει, η θεώρησή αυτή δεν τηρεί ουσιώδεις προϋποθέσεις.

Μέχρι στιγμής δεν έχει ταυτοποιηθεί η βιοχημική σύνδεση μεταξύ της παθογένεσης της νόσου Parkinson και της έκκρισης της α-συνουκλεΐνης. Δεν είναι γνωστό αν οι μεταλλάξεις ή τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης επηρεάζουν την έκκριση της πρωτεΐνης και τον μηχανισμό έκκρισής της μέσω των εξωσωμάτων κατά τον ίδιο τρόπο. Τέλος, η παρουσία και μόνο της α-συνουκλεΐνης εντός των εξωσωμάτων δεν αποδεικνύει ότι αυτά συμβάλλουν σημαντικά στην εξάπλωση της παθολογίας που

σχετίζεται με αυτή. Στην παρούσα εργασία προσεγγίσαμε ποσοτικά όλα τα παραπάνω σημεία, μελετώντας το πρότυπο έκκρισης της α-συνουκλείνης υπό φυσιολογικές συνθήκες και συνθήκες που συνδέονται με την παθολογία της νόσου Parkinson.

## II. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η εργασία αυτή έχει 3 βασικούς στόχους. Ο πρώτος είναι η διερεύνηση της τοπολογίας της φυσιολογικής έκκρισης της α-συνουκλεΐνης. Αυτή η πληροφορία είναι σημαντική για την περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου η πρωτεΐνη και οι τοξικές της μορφές εξαπλώνονται στον εγκέφαλο πασχόντων. Ο δεύτερος στόχος είναι να κατανοήσουμε πώς ο φυσιολογικός μηχανισμός έκκρισης της πρωτεΐνης αλλάζει υπό συνθήκες που μιμούνται παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με τη νόσο του Parkinson. Προς αυτή την κατεύθυνση χρησιμοποιούμε ένα σύστημα επαγόμενης έκφρασης της αγρίου τύπου και της A53T μεταλλαγμένης α-συνουκλεΐνης. Ο τρίτος στόχος είναι να προσεγγιστεί ποσοτικά η συμβολή των εξωσωμάτων στην έκκριση της α-συνουκλεΐνης και να εξεταστεί κατά πόσο μέσω αυτών μπορεί να εξαπλώνεται σε άλλα κύτταρα.



### III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 1. Καλλιέργεια κυττάρων ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y και πρωτογενών φλοιικών νευρώνων.

Χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές SH-SY5Y που επαγόμενα εκφράζουν την αγρίου τύπου ή τη μεταλλαγμένη μορφή A53T  $\alpha$ -συνουκλεΐνης<sup>27</sup>. Ο έλεγχος της έκφρασης επιτυγχάνεται με το σύστημα Tet-Off. Παρουσία δοξυκυκλίνης 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , τα κύτταρα εκφράζουν χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης ενώ απουσία δοξυκυκλίνης υπερ-εκφράζουν την αγρίου τύπου (WT SH-SY5Y) ή την A53T μεταλλαγμένη μορφή (A53T SH-SY5Y). Οι κυτταρικές αυτές σειρές καλλιεργήθηκαν (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά) σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 που περιέχει 2 mM L-γλουταμίνη, 10% ορό εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  στρεπτομυκίνη. Ως καλλιεργητικό μέσο ελέγχου, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με προσθήκη 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  υγρομυκίνης (hygromycin) B, κάθε 15 ημέρες. Τα κύτταρα διατηρούνται παρουσία δοξυκυκλίνης και σε κάθε πείραμα η έκφραση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης επάγεται για 10 ημέρες απουσία δοξυκυκλίνης, από διαφορετικό αρχικό κυτταρικό πληθυσμό. Η διαφοροποίηση των κυττάρων SH-SY5Y προς νευρώνες γίνεται με την προσθήκη 10  $\mu\text{M}$  all-trans ρετινοϊκού οξέος στο θρεπτικό μέσο για 5 ημέρες. Η προσθήκη ρετινοϊκού οξέος γίνεται κάθε δεύτερη ημέρα.

Φλοικοί νευρώνες απομονώθηκαν από E18 έμβρυα επίμυων, ακολουθώντας το πρωτόκολλο που έχει ήδη περιγραφεί<sup>90</sup>. Εν συντομία, ο ιστός του φλοιού καθαρίστηκε από τις μήνιγγες και πρωτεολύθηκε με τρυψίνη 0,5%/mL και DNάση 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  για 30' στους 37°C. Ακολούθησαν πλύσεις και επαναδιάλυση στο καλλιεργητικό μέσο Neurobasal, με 2% προσθήκη συμπληρώματος B27 χωρίς ορό, L-γλουταμίνη 0.5 mM και πενικιλίνη 100 U/ml, στρεπτομυκίνη 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Τα κύτταρα επιστρώθηκαν με πυκνότητα  $6 \times 10^4/\text{cm}^2$  σε καλλιεργητικά τρυβλία επικαλυμμένα με poly-D- Lysine 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Το καλλιεργητικό μέσο συμπληρωνόταν κατά 20% κάθε τρεις ημέρες *in vitro*. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν τη 10<sup>η</sup> ημέρα *in vitro*, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Για τα πειράματα σε διαμερισματοποιημένες καλλιέργειες, ο αριθμός των κυττάρων ήταν  $2,5 \times 10^5$  (ή  $3.5 \times 10^5$  για κύτταρα από μύες) κύτταρα ανά συσκευή.

Οι κυτταρικές καλλιέργειες SH-SY5Y και πρωτογενών νευρώνων διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> και σχετική υγρασία 95%.

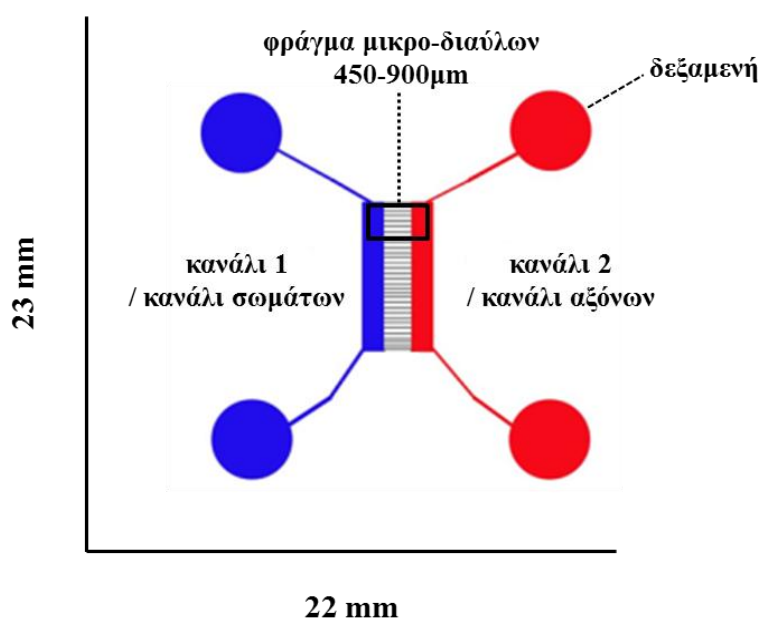
## 2. Προετοιμασία κυτταρικών εκχυλισμάτων και ανοσοστύπωμα κατά Western

Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με μηχανικό τρόπο σε διάλυμα PBS 4°C και συλλέχθηκαν κατόπιν φυγοκέντρησης στα 1000xg για 5 λεπτά. Μετά από μία επιπλέον πλύση με κρύο διάλυμα PBS και φυγοκέντρηση στα 1000x g για 5 λεπτά στους 4°C, τα κύτταρα λύθηκαν με εφαρμογή υπέρηχων σε φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα (20mM HEPES, 0.15M NaCl, pH7.6). Τα θραύσματα φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου στα 15000x g για 10 λεπτά και το υπερκείμενο (πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων) φυλάχθηκε στους -20°C. Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης έγινε με τη μέθοδο Bradford. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών έγινε σε πήκτωμα SDS-Πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) 12% και ακολούθησε ανοσοστύπωμα κατά Western με τη χρήση των πρωτογενών αντισωμάτων που αναφέρονται στον πίνακα. Ως δευτερογενή χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα IgG συζευγμένα με την πρωτεΐνη HRP. Χρησιμοποιήθηκε ομάδα αντιδραστηρίων ECL για ενισχυμένη χημειοφωταύγεια και η εμφάνιση έγινε σε X RAY φιλμ, με έκθεση για 1 έως 10 λεπτά.

<u>Αντίσωμα</u>	<u>Τύπος αντισώματος</u>	<u>Εταιρεία</u>
<b>α-synuclein (syn-1)</b>	Μονοκλωνικό αντίσωμα από μύ (αραίωση 1:1000)	BD Biosciences
<b>α-synuclein (C-20)</b>	Πολυκλωνικό αντίσωμα από κουνέλι (αραίωση 1:1000)	Santa Cruz
<b>β-actin</b>	Μονοκλωνικό αντίσωμα από μύ (αραίωση 1:10000)	Sigma
<b>Anti-flotillin-1</b>	Μονοκλωνικό αντίσωμα από μύ (αραίωση 1:1000)	Santa Cruz
<b>IgG-HRP conjugated</b>	Κατά επιτόπου κουνελιού (αραίωση 1:10000)	Jackson Immuno Research Laboratories
<b>IgG-HRP conjugated</b>	Κατά επιτόπου μύ (αραίωση 1:10000)	Jackson Immuno Research

### 3. Διαμερισματοποιημένες πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιικών νευρώνων

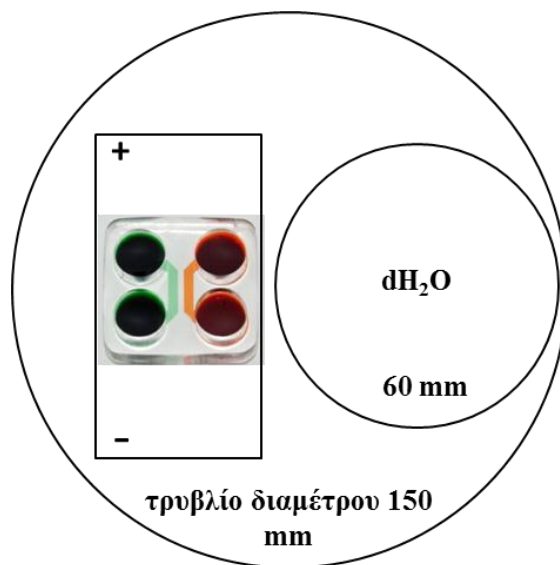
Για τον επιτυχή διαχωρισμό των αξόνων από τα σώματα πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιικών νευρώνων καλλιεργήθηκαν σε συσκευές διαμερισματοποίησης SND450 και 900 της εταιρείας Xona Microfluidics<sup>91</sup>. Οι συσκευές αυτές είναι φτιαγμένες από PDMS, ένα βιολογικά ανενεργό και αρνητικά φορτισμένο πολυμερές σιλικόνης. Η αρχή λειτουργίας των συσκευών βασίζεται στην τρισδιάστατη κατασκευή, μέσω φωτολιθογραφίας, δύο διαμερισμάτων που χωρίζονται από ένα φυσικό φράγμα μικρο-διαύλων, το οποίο αποτρέπει τη μεταφορά κυττάρων και την ελεύθερη ανταλλαγή υγρών. Καθένα από τα δύο διαμερίσματα της συσκευής περιλαμβάνει δύο δεξαμενές και ένα κύριο κανάλι (σχήμα 7). Ο διαχωρισμός των διαμερισμάτων γίνεται από μικρο-διαύλους διαστάσεων: 3μm ύψος, 10μm πλάτος, 450 ή 900μm μήκος (SND450 ή 900, αντίστοιχα). Τα κύρια κανάλια έχουν χωρητικότητα υγρού περίπου 2μL και διαστάσεις 100 μm ύψος, 1500 μm πλάτος, και



Σχήμα 7: Σχηματική απεικόνιση των διαμερισμάτων της συσκευής SND.

8 mm μήκος. Σε αυτές τις συσκευές, οι άξονες προοδευτικά μεγαλώνουν από το ένα διαμέρισμα, μέσω ενός φυσικού φράγματος προς ένα διακριτό και απομονωμένο ως προς τη ροή υγρών διαμέρισμα της ίδιας συσκευής. Οι συσκευές χρησιμοποιήθηκαν με βάση τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας (<http://www.xonamicrofluidics.com/media.html>). Πολλά σημεία που αφορούν στη

διάταξη και την επίστρωση των κυττάρων βελτιστοποιήθηκαν και η τελική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται στο σχήμα (σχήμα 8).



**Σχήμα 8:** Η βελτιστοποιημένη πειραματική διάταξη για την καλλιέργεια διαμερισματοποιημένων νευρώνων. Μετά την απομόνωσή τους οι νευρώνες προστίθενται στη δεξαμενή «+» και μέσω της ροής μετακινούνται προς τη δεξαμενή «-». Μεγάλο μέρος τους επιστρώνεται στο κανάλι. Η συσκευή SND τοποθετείται σε καλλιεργητικό τρυβλίο διαμέτρου 150mm. Τέλος, η προσθήκη τρυβλίου 60mm με αποστειρωμένο νερό διατηρεί υγρασία εντός της διάταξης και διασφαλίζει την ελάχιστη εξάτμιση καλλιεργητικού μέσου από τη συσκευή.

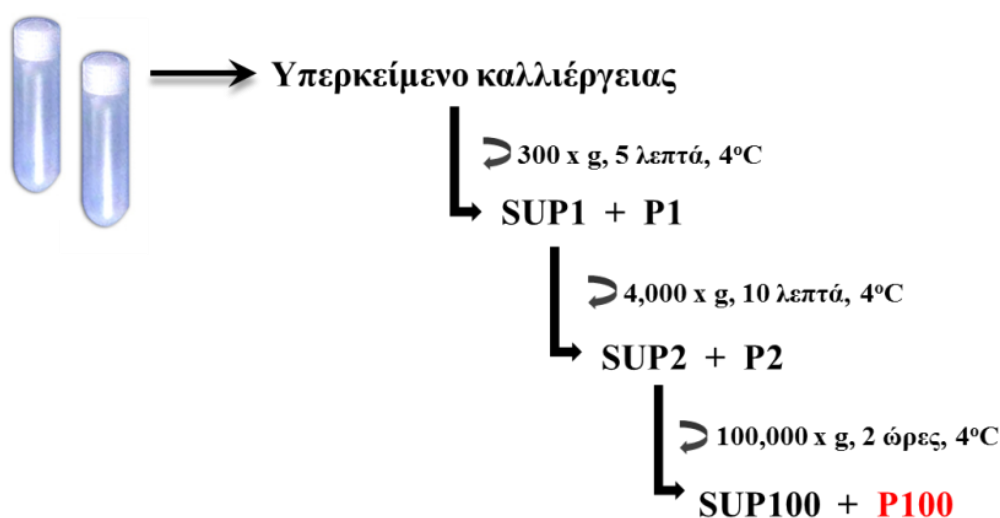
### 3.1 Επίστρωση νευρώνων στις συσκευές SND:

Μετά την απομόνωσή τους, οι νευρώνες προστίθενται στην συσκευή σε μία σταγόνα (έως 60  $\mu\text{L}$ ) που περιέχει  $2,5 \times 10^5$  κύτταρα από φλοιό επίμυων ή  $3,5 \times 10^5$  κύτταρα από φλοιό μυών. Η σταγόνα προστίθεται –εφαρμόζοντας χαμηλή πίεση– σε μία από τις δύο δεξαμενές ενός διαμερίσματος της συσκευής («+» στο σχήμα P) και αφήνεται να περάσει με τη ροή προς την δεύτερη δεξαμενή («-» στο σχήμα P). Μετά την προσθήκη κυττάρων, το σύστημα αφήνεται εντός του επωαστήρα ( $37^\circ\text{C}$ ) για περίπου 10 λεπτά ώστε να οριστικοποιηθεί η θέση των κυττάρων στο κανάλι. Μετά την πάροδο 10 λεπτών προστίθεται προσεκτικά ο υπόλοιπος όγκος ( 300 $\mu\text{L}$  ανά δεξαμενή). Η εξάτμιση υγρού από τις συσκευές περιορίζεται στο ελάχιστο μέσω τοποθέτησης τρυβλίου με αποστειρωμένο νερό δίπλα στη συσκευή (σχήμα 8 ). Σε αυτές τις συνθήκες, απαιτείται συμπλήρωση του μέσου καλλιέργειας (προσθήκη 50 $\mu\text{L}$  τη φορά) ανά δύο ή τρεις ημέρες και οι νευρώνες καλλιεργούνται και διαμερισματοποιούνται στις συσκευές SND με μεγάλη επαναληψιμότητα.

#### 4. Απομόνωση εξωσωμάτων από το μέσο καλλιέργειας νευρικών κυττάρων

Για την απομόνωση εξωσωμάτων από κύτταρα SH-SY5Y, το μέσο καλλιέργειας αντικαταστάθηκε για 32 ώρες με RPMI που περιείχε 2% FBS απαλλαγμένο από εξωσώματα. Για την απαλλαγή από εξωσώματα, το RPMI με 20% FBS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη φυγοκεντρήθηκε για 16 ώρες, στα 100.000xg, στους 4°C, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα και αποστειρώθηκε με φίλτρο 0,22 μm. τα κύτταρα αναπτύσσονται σε αυτό το μέσο έως και 48 ώρες

Για τη συλλογή των εξωσωμάτων ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο διαδοχικών, διαφορετικών φυγοκεντρήσεων των Théry et al. (2006)<sup>92</sup>, με μικρές τροποποιήσεις (σχήμα 9).



**Σχήμα 9:** Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου απομόνωσης εξωσωμάτων από καλλιεργητικό μέσο. Ακολουθείται μία σειρά διαφορετικών φυγοκεντρήσεων. Το ίζημα των 100.000 x g αναφέρεται ως «εξωσώματα».

Το υπερκείμενο των κυτταρικών σειρών συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε αρχικά στα 300 x g για 5 λεπτά ώστε να απαλλαγεί από τυχόν κύτταρα αιωρούμενα σε αυτό. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα και φυγοκεντρήθηκε ξανά στα 4.000 x g για 10 λεπτά ώστε να αφαιρεθούν κυτταρικά θραύσματα. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέο σωλήνα. Τελικά, το θρεπτικό μέσο φυγοκεντρήθηκε στα 100.000 x g για 2 ώρες για την απομόνωση εξωσωμάτων. Η πελέτα αυτή έχει δείχθει ότι φέρει τα βιοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των εξωσωμάτων<sup>28</sup>

και στην παρούσα εργασία θα αναφέρεται ως «εξωσώματα». Μετά την υπερφυγοκέντρωση, τα εξωσώματα επαναιωρήθηκαν σε 40μL PBS με ήπια ανάδευση και φυλάχθηκαν στους -20°C έως την χρήση τους. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι φυγοκεντρήσεις έγιναν στους 4°C.

Στην περίπτωση των πρωτογενών καλλιιεργειών νευρώνων, δεν υπήρξε κάποια επεξεργασία του μέσου καλλιέργειας για αφαίρεση εξωσωμάτων καθότι εξ ορισμού δεν περιέχει ορό. Τα κύτταρα καλλιιεργήθηκαν 8 ημέρες *in vitro* στο μέσο καλλιέργειας όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Το υπερκείμενο των φλοιικών νευρώνων συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε διαφορετικά όπως στην περίπτωση του θρεπτικού μέσου των κυττάρων SH-SY5Y. Σε περιπτώσεις που κρίθηκε απαραίτητο, ακολούθησε μία πλύση σε 5mL PBS και επαναφυγοκέντρωση εκ νέου στα 100.000 x g για 1,5 ώρες. Η πελέτα που απομονώθηκε και αντιπροσωπεύει τα εξωσώματα επαναιωρήθηκε σε 50-100 μL PBS ανάλογα με την ποσότητα. Τα εξωσώματα φυλάχθηκαν στους -20°C έως την χρήση τους. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι φυγοκεντρήσεις έγιναν στους 4°C.

Αξίζει να σημειωθεί ως γενική παρατήρηση ότι για την παραπάνω διαδικασία θα πρέπει να χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο από τουλάχιστον 10<sup>6</sup> κύτταρα για την επιτυχή απομόνωση εξωσωμάτων.

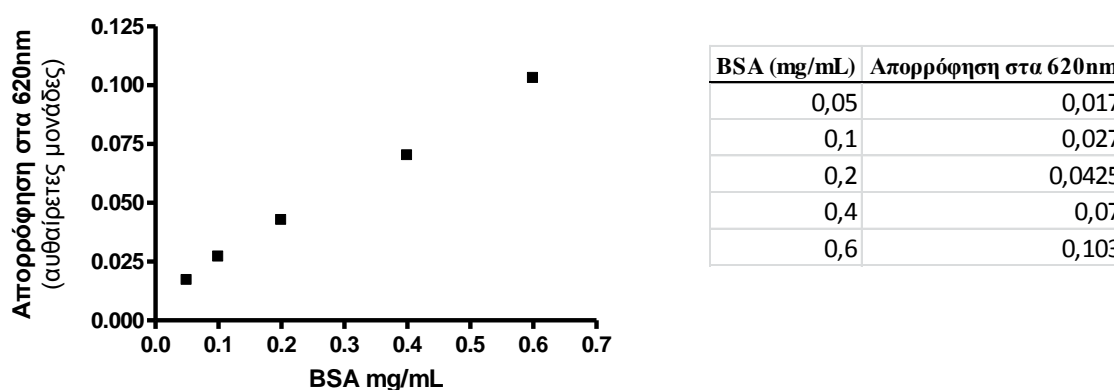
## **5. Ποσοτικοποίηση του υλικού των εξωσωμάτων**

Βασικός στόχος της εργασίας αυτής ήταν να μελετηθεί η κατανομή της ασυνουκλείνης εκτός κυττάρου, με την ποσοτική σύγκριση της ελεύθερης και συνδεδεμένης με τα εξωσώματα πρωτεΐνης. Δεδομένου ότι το υλικό των εξωσωμάτων που απομονώνεται στις πειραματικές μας διατάξεις είναι περιορισμένο και περνά από διάφορα στάδια επεξεργασίας με ενδεχόμενο πειραματικό σφάλμα, ήταν απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν ακριβείς και ευαίσθητες ποσοτικές μέθοδοι. Χρησιμοποιήθηκαν η μικρο-Bradford και η δοκιμασία εστεράσης κατά Ellman. Η πρώτη επιτρέπει τη μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης στα δείγματα των εξωσωμάτων ενώ η δεύτερη είναι ένας έμμεσος τρόπος προσδιορισμού του αριθμού των εξωσωμάτων. Χαρακτηρίζεται έμμεσος διότι γίνεται ποσοτική εκτίμηση ενός ενζύμου που φέρουν τα εξωσώματα στην επιφάνειά τους και όχι του ίδιου του

αριθμού των εξωσωμάτων. Η ευαισθησία των μεθόδων έγκειται στο ότι με πολύ μικρή ποσότητα υλικού εξωσωμάτων μπορούμε να υπολογίσουμε με ακρίβεια και επαναληψιμότητα το υλικό που έχει εκκριθεί από ένα πληθυσμό κυττάρων και να συγκρίνουμε την σχετική αφθονία των εξωσωμάτων μεταξύ διαφορετικών πειραματικών συνθηκών.

### 5.1 Μέθοδος μικρο-Bradford για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης εξωσωμάτων

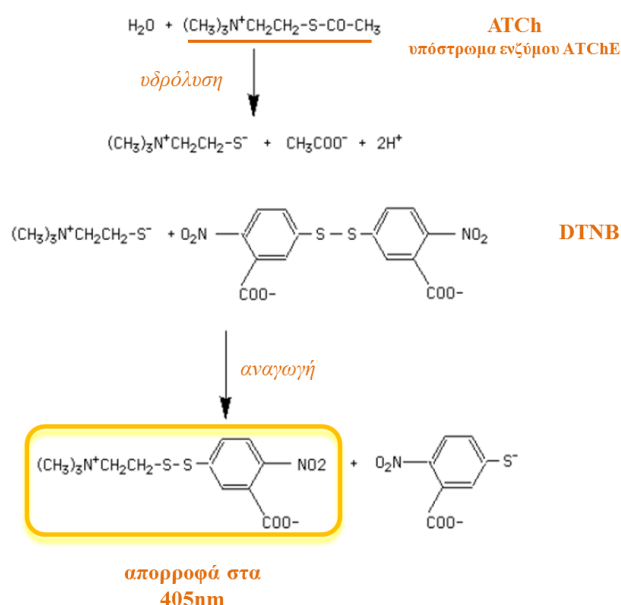
Μια πρότυπη καμπύλη που καλύπτει εύρος πρωτεΐνης 0,05-0,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  φαίνεται στο σχήμα 10. Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 200 $\mu\text{L}$  αντιδραστηρίου Bradford σε πλακίδια μικροτιτλοδότησης. 0,5-1  $\mu\text{L}$  από το δείγμα εξωσωμάτων Κάθε δείγμα μετράται εις διπλούν. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και με ήπια ανάδευση. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετράται στα 620 nm. Όλες οι τιμές απορρόφησης διορθώθηκαν με την αφαίρεση της απορρόφησης που οφείλεται στο διαλύτη των εξωσωμάτων (PBS). Πρέπει να αναφερθεί ότι η δοκιμασία αυτή έχει χρησιμοποιηθεί και για μέτρηση εξωσωμάτων λυμένων σε ρυθμιστικό διάλυμα RIPA το οποίο περιέχει και απορρυπαντικό 1% NP-40. Στην περίπτωση αυτή χρειάστηκε η αραίωση του δείγματος 10-20 φορές ώστε να γίνει αντίστοιχη αραίωση του απορρυπαντικού και η παρουσία του να μην παρεμποδίζει τη δοκιμασία. Στην αραίωση αυτή η παρουσία του απορρυπαντικού είχε μικρή επίδραση στην απορρόφηση.



Σχήμα 10: Καμπύλη μικρο-Bradford που καλύπτει εύρος πρωτεΐνης 0.05-0.6 mg/mL.

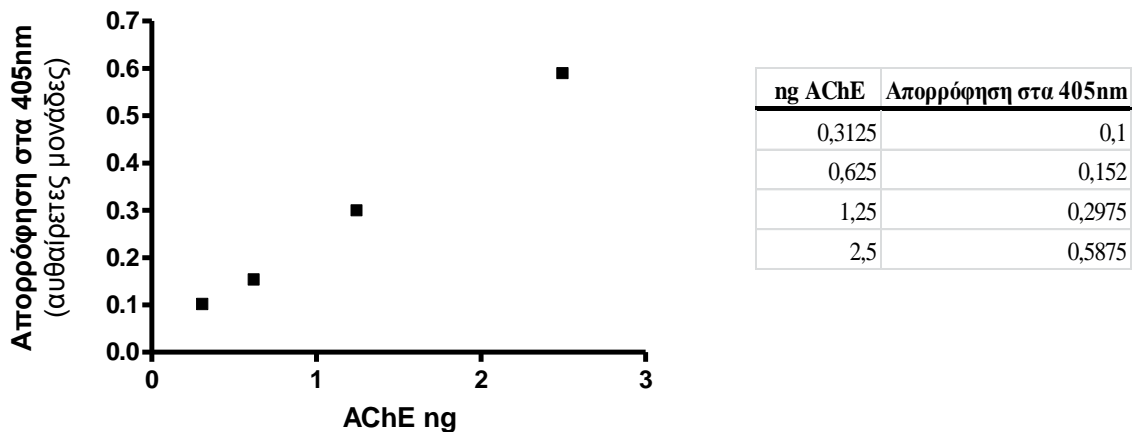
## 5.2 Δοκιμασία Εστεράσης κατά Ellman για την σύγκριση αριθμού εξωσωμάτων

Η δοκιμασία εστεράσης κατά Ellman <sup>93</sup> βασίζεται στην μέτρηση της αλλαγής απορρόφησης η οποία είναι ανάλογη με την ποσότητα του τελικού της αντίδρασης (σχήμα 11) που καταλύει το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση. Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 250  $\mu\text{L}$  διαλύματος αντίδρασης ακετυλοθειοχολινεστεράσης (AChE) που περιέχει το υπόστρωμα ιωδιούχου ακετυλοθειοχολίνη (ACh) και το DTNB (1,25mM ACh, 0,1mM DTNB, pH 7,5 σε PBS) και 10  $\mu\text{L}$  πρότυπης ποσότητας ενζύμου ή δείγματος αραιωμένου σε PBS, σε πλακίδια μικροτιτλοδότησης. 0,3 $\mu\text{g}$  εξωσωμάτων (που αντιστοιχούν σε 0,5-1  $\mu\text{L}$ ) από το δείγμα εξωσωμάτων είναι αρκετή ποσότητα ώστε να λάβουμε ένα αξιόπιστο σήμα. Κάθε δείγμα μετράται εις διπλούν. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και με ήπια ανάδευση. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετράται στα 405 nm. Όλες οι τιμές απορρόφησης διορθώθηκαν με την αφαίρεση της απορρόφησης που οφείλεται στο διαλύτη των εξωσωμάτων (PBS). Βάσει των συνολικών παρατηρήσεων, η δοκιμασία AChE είναι συμπληρωματική της μικρο-Bradford για την εκτίμηση της σχετικής αφθονίας των εξωσωμάτων σε δύο ή περισσότερες πειραματικές συνθήκες. Μια πρότυπη καμπύλη που καλύπτει εύρος ποσότητας ενζύμου 0,3125-2,5ng φαίνεται στο σχήμα 12.



**Σχήμα 11: Πορεία αντίδρασης AChE.** Χρησιμοποιείται ο θειικός εστέρας ακετυλοθειοχολίνη (ATCh) ως υπόστρωμα του ενζύμου ακετυλοθειοχολινεστεράση (ATChE). Η ATChE υδρολύει την ATCh προς θειοχολίνη και οξικό. Η θειοχολίνη εν συνεχεία ανάγει το Dithiobis-Nitrobenzoic Acid (DTNB), απελευθερώνοντας νιτροβενζοϊκό, το οποίο απορροφά στα 405 nm.





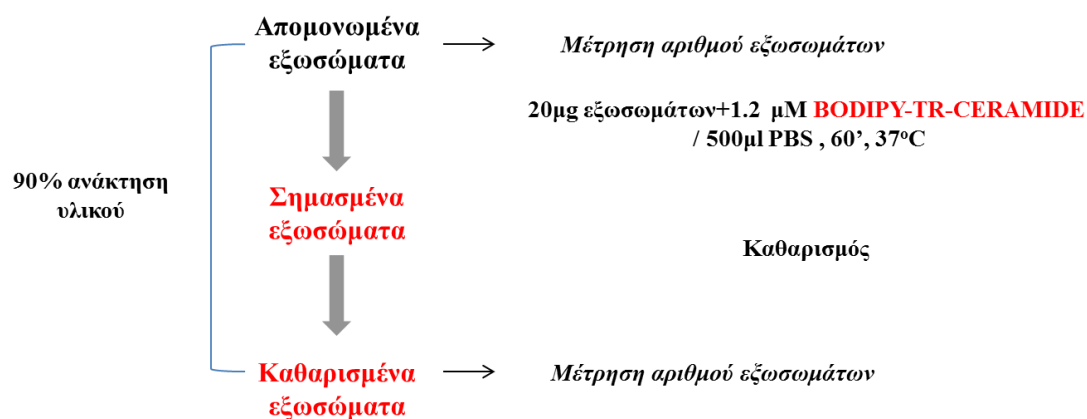
Σχήμα 12: Καμπύλη AChE που καλύπτει εύρος ενζύμου 0,3125-2,5ng

## 6. *In vitro* σήμανση των εξωσωμάτων με BODIPY-TR-CERAMIDE

Τα εξωσώματα σημάνθηκαν *in vitro* με BODIPY-TR-CERAMIDE. Πρόκειται για ένα ανάλογο του σφιγγολιπιδίου ceramide, στο οποίο η φυσιολογική ομάδα του λιπαρού οξέος έχει αντικατασταθεί από BODIPY-σημασμένο λιπαρό οξύ, που έχει φάσμα όμοιο με αυτό της χρωστικής Texas Red (εξ' ου ονομάζεται BODIPY-TR), με μέγιστο διέγερσης/ακτινοβολίας ~592/618nm. Το συγκεκριμένο φθορίζον μόριο BODIPY είναι σχετικά μη πολωμένο και ηλεκτρικά ουδέτερο, χαρακτηριστικά που του επιτρέπουν να ενσωματώνεται με μεγαλύτερη ευκολία στην λιπιδική μεμβράνη σε σχέση με άλλα υδρόφιλα μόρια-χρωστικές<sup>94,95</sup>.

Για τη σήμανση των εξωσωμάτων ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο σήμανσης των Subra C. et al. (2010)<sup>89</sup> με ορισμένες βελτιστοποιήσεις στην αντίδραση ενσωμάτωσης και τη διαδικασία καθαρισμού των εξωσωμάτων από την περίσσεια της χρωστικής (σχήμα 13). Συγκεκριμένα, 20μg εξωσωμάτων από κύτταρα SH-SY5Y ή πρωτογενείς νευρώνες επώαστηκαν για μία ώρα στους 37°C (εντός επωαστήρα κυττάρων) με 1,2 μM BODIPY-TR-CERAMIDE αραιωμένο σε PBS. Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 500 μL. Για να καθαριστούν τα δείγματα εξωσωμάτων από την περίσσεια της χρωστικής, η οποία θα μπορούσε να σημάνει μη ειδικά μεμβράνες των κυττάρων στα οποία χορηγούνται τα εξωσώματα, χρησιμοποιήσαμε φίλτρα VIVASPIN Santorius 50 kDa cut-off (μέγιστος όγκος 500 μL) που έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί με PBS (δύο φορές φυγοκέντρηση με 500 μL, 9.000 x

g, για 10'). Για τον καθαρισμό των εξωσωμάτων, 500 μL μίγματος εξωσωμάτων-χρωστικής φυγοκεντρήθηκε στα 9000 x g για 10' σε θερμοκρασία δωματίου. Η φυγοκέντρηση επαναλήφθηκε 4 φορές, ώστε η χρωστική τελικά να αραιωθεί 40 φορές από το αρχικό δείγμα. Στο τέλος του καθαρισμού 50 μL δείγματος χρησιμοποιήθηκαν άμεσα στο πείραμα ή φυλάχθηκαν στους 4°C έως 16 ώρες. Χρησιμοποιώντας συμπληρωματικά τις μεθόδους μικρο-Bradford και AChE έχει υπολογιστεί ότι αυτό το πρωτόκολλο σήμανσης και καθαρισμού δίνει 90% ανάκτηση εξωσωμάτων.



**Σχήμα 13: Πρωτόκολλο σήμανσης εξωσωμάτων.** Τα εξωσώματα σημαίνονται με BODIPY-TR-CERAMIDE. Αναγράφονται τα διάφορα στάδια σήμανσης και καθαρισμού. Η διαδικασία επιτρέπει την ανάκτηση των εξωσωμάτων.

## 7. Χορήγηση *in vitro* σημασμένων εξωσωμάτων σε νευρικά κύτταρα

Πριν τη χορήγηση εξωσωμάτων τα κύτταρα πλύθηκαν δύο φορές με το αντίστοιχο φρέσκο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας,. Τα σημασμένα εξωσώματα (50μL) διαλύθηκαν σε τελικό όγκο 250 μL στο αντίστοιχο φρέσκο καλλιεργητικό μέσο και χορηγήθηκαν για διαφορετικούς χρόνους (από 5 λεπτά έως και 4 ώρες) στα κύτταρα. Στο τέλος της επώασης τα κύτταρα πλύθηκαν δύο φορές με φρέσκο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας για να απομακρυνθεί η περίσσεια εξωσωμάτων που δεν είχαν προσληφθεί από τα κύτταρα. Ανάλογα με το στόχο κάθε πειράματος, ακολουθήθηκαν διαδικασίες χρώσης και ανοσοφθορισμού, όπως περιγράφονται παρακάτω.

## 8. Χρώση ζωντανών κυττάρων και ανοσοφθορισμός

Για χρώση ζωντανών κυττάρων, τα κύτταρα SH-SY5Y επώαστηκαν για 20 λεπτά ταυτόχρονα με 4  $\mu\text{M}$  (0,4  $\mu\text{M}$  για πρωτογενείς νευρώνες) Calcein AM και 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hoechst 33258. Ο εστέρας της Calcein εισέρχεται από την πλασματική μεμβράνη ζώντων κυττάρων όπου υδρολύεται από ενδοκυττάρια εστεράσες. Το προϊόν της υδρόλυσης φθορίζει με πράσινο χρώμα (~492/514nm μέγιστο διέγερσης/απορρόφησης). Η χρωστική Hoechst 33258 χρωματίζει αποκλειστικά τον πυρήνα των κυττάρων. Μετά τη χρώση, τα κύτταρα πλύθηκαν δύο φορές με το αντίστοιχο καλλιεργητικό μέσο και είτε μονιμοποιήθηκαν αμέσως, είτε επεξεργάστηκαν περαιτέρω για ανοσοφθορισμό.

Για ανοσοφθορισμό, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν *in situ* σε καλυπτρίδες ή συσκευές διαμερισματοποίησης, στους 4°C για 15 λεπτά με 4% παραφορμαλδεΰδη (paraformaldehyde, PFA) σε PBS. Πλύθηκαν δύο φορές με 4°C PBS και εν συνεχεία έγινε δέσμευση μη-ειδικών αλληλεπιδράσεων (blocking) για μία ώρα σε PBS-0,1% Triton-X100 (PBS-T) με 10% ορό αίγας (normal goat serum, NGS). Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα διαλύθηκαν σε PBST με 1% NGS. Τα κύτταρα επώαστηκαν με πρωτογενή αντισώματα για 16 ώρες στους 4°C, και με δευτερογενή σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτάδι για 1 ώρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χρωστική BODIPY-TR-CERAMIDE βρέθηκε συμβατή με το αυτό το πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού. Οι εικόνες φθορισμού λήφθηκαν με ανάστροφο Leica SP5 συνενεστικό μικροσκόπιο (καταδυτικός φακός x63, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά). Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα:

<u>Αντίσωμα</u>	<u>Τύπος αντισώματος</u>	<u>Εταιρεία</u>
<b><math>\beta</math>-actin</b>	Μονοκλωνικό αντίσωμα από μν (αραίωση 1:100)	Santa Cruz
<b><math>\beta</math>III-tubulin</b>	Μονοκλωνικό αντίσωμα από μν (αραίωση 1:100)	Calbiochem
<b><math>\gamma</math>-tubulin</b>	Πολυκλωνικό αντίσωμα από κουνέλι (αραίωση 1:100)	Santa Cruz

<b>CY3</b>	Αίγας κατά επιτόπου κουνελιού (αραιώση 1:100)	Jackson Immunoresearch Laboratories, INC
<b>CY5</b>	Αίγας κατά επιτόπου μύ (αραιώση 1:100)	Jackson Immunoresearch Laboratories, INC

## 9. Επεξεργασία εξωσωμάτων για μέτρηση α-συνουκλεΐνης με ELISA

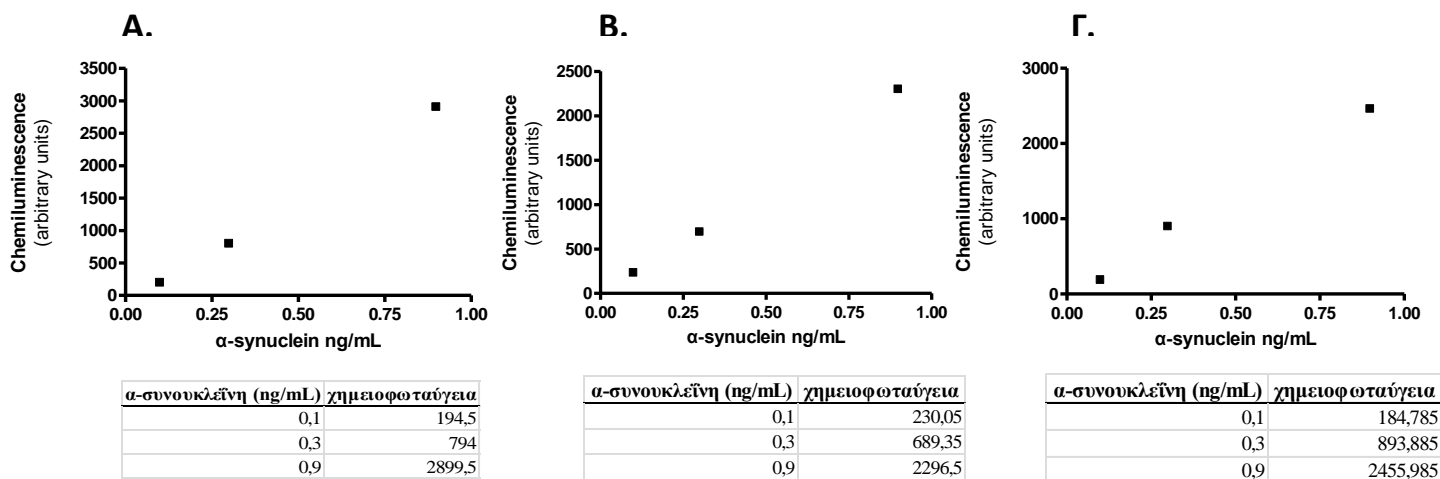
Κατόπιν δοκιμών βελτιστοποίησης, επιλέχθηκε η μηχανική θραύση των εξωσωμάτων μέσω υπέρηχων, προκειμένου το υλικό να μετρηθεί με ELISA για α-συνουκλεΐνη. Εφαρμόστηκαν υπέρηχοι πλάτους 30% πλάτους για 5'', σε 3 επαναλήψεις, με ενδιάμεση ψύξη του δείγματος, σε τελικό όγκο 50 μL PBS.

## 10. Υπερευαίσθητη ELISA για τη μέτρηση της α-συνουκλεΐνης

Χρησιμοποιήθηκε η sandwich ELISA όπως έχει αναπτυχθεί από Emmanouilidou et al. (2011). Ως αντίσωμα πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα Syn-1, το οποίο αναγνωρίζει έναν συντηρημένο επίτοπο στην α-συνουκλεΐνη ανθρώπου και τρωκτικών (αμινοξέα 91-99), ενώ δεν αναγνωρίζει τις ισομορφές β και γ-συνουκλεΐνης. Ως αντίσωμα ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα C-20 που αναγνωρίζει μία αλληλουχία στο καρβοξυτελικό άκρο της α-συνουκλεΐνης ανθρώπου και τρωκτικών, ομοιοπολικά συζευγμένο με την πρωτεΐνη υπεροξειδάση του ραπανιού (horseradish peroxidase, HRP). Κάθε πλακίδιο μικροτιτλοδότησης επικαλύφθηκε για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με 0,5 μg/ml Syn-1 (50 μL ανά πλακίδιο) διαλυμένο σε 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,3. Τα πλακίδια πλύθηκαν τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 0,04% Tween-20). Στη συνέχεια, 50 μL δείγματος ή συγκεκριμένη συγκέντρωση ανασυνδυασμένης α-συνουκλεΐνης ως πρότυπο (αραιωμένη σε TBST/BSA (10 mM Tris-Cl, pH 7.6, 100 mM NaCl, 0.1% Tween-20 και 1% BSA)) προστέθηκαν στα αντίστοιχα πλακίδια.. Τα πλακίδια επώαστηκαν στους 37°C για 2,5 ώρες ώστε να γίνει ειδική πρόσδεση της α-συνουκλεΐνης των δειγμάτων στο αντίσωμα πρόσδεσης. Τα πλακίδια πλύθηκαν τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και προστέθηκαν 50 μL HRP-συζευγμένου C-20 αντισώματος (4000 φορές αραιωμένο σε TBST/BSA) για 1 ώρα σε θερμοκρασία

δωματίου. Τα πλακίδια πλύθηκαν τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης και προστέθηκαν 50  $\mu$ L χημειοφωταγούς υποστρώματος λουμινόλης (ultrasensitive luminol reagent, BioFX Laboratories)- σε κάθε πλακίδιο. Κατόπιν επώασης 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, η χημειοφωταύγεια μετρήθηκε στο χημειοφωταυγείομετρο Lucy (Anthos Mikrosysteme GmbH) Lucy με λογισμικό ADAP (Anthos Labtech Instruments Version1.6). Σε όλες τις περιπτώσεις, το δείγμα αραιώθηκε δύο φορές σε TBST/BSA (εξωσώματα) ή TBST (πλήρες καλλιεργητικό μέσο Neurobasal ή μέσο συλλογής εξωσωμάτων RPMI). Αντιπροσωπευτικές πρότυπες καμπύλες για τις τρεις ELISA που χρησιμοποιήθηκαν, ακολουθούν.

### Καμπύλες ELISA



#### Καμπύλη ELISA για μέτρηση

**A.** Εξωσωμάτων κατόπιν μηχανικής θραύσης με υπέρηχους.

**B.** Καλλιεργητικού μέσου συλλογής εξωσωμάτων.

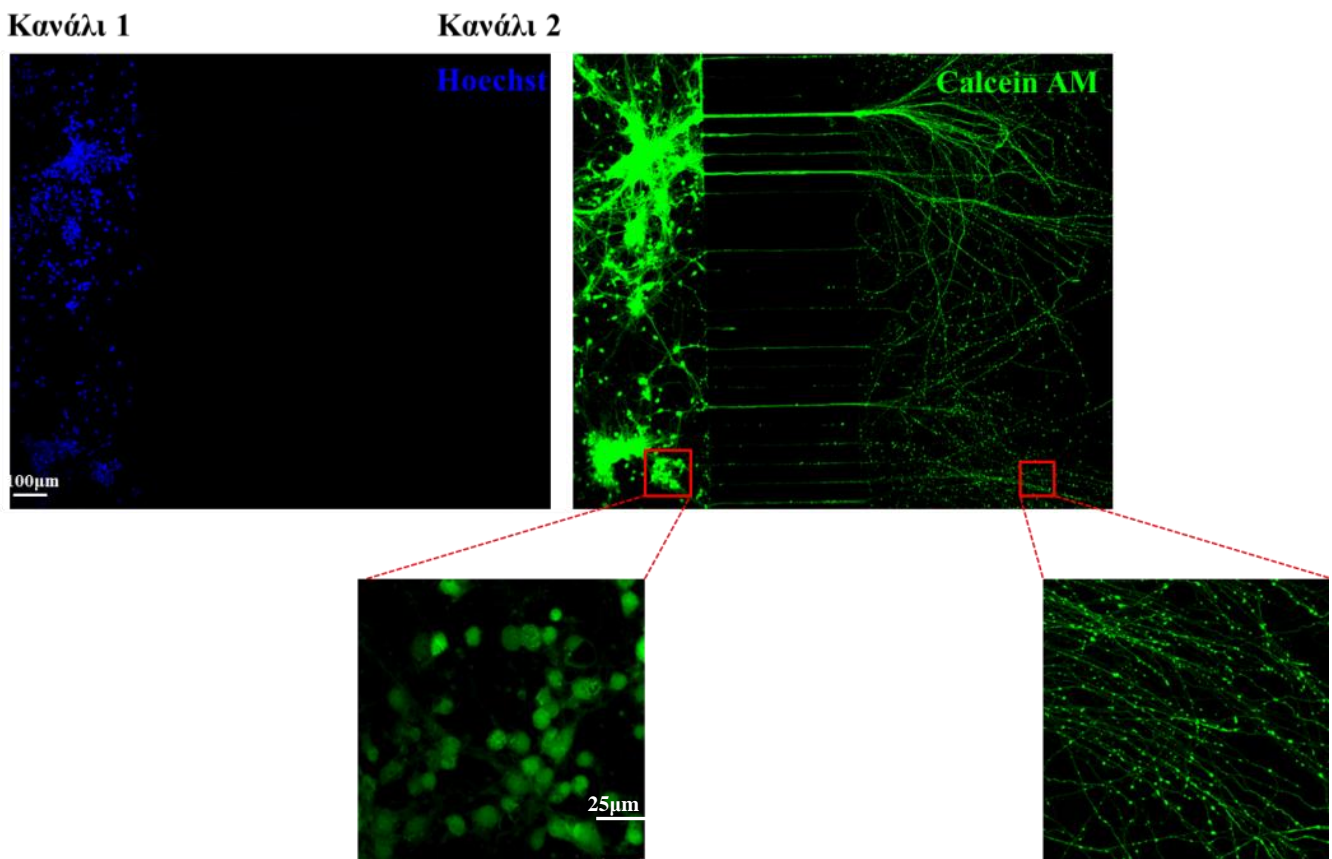
**Γ.** Καλλιεργητικού μέσου πρωτογενών νευρώνων.

## IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. Διερεύνηση της θέσης έκκρισης της $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε πρωτογενείς νευρώνες

Για να διερευνηθεί η περιοχή έκκρισης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, βελτιστοποιήθηκαν πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιικών νευρώνων από επίμυ. Οι νευρώνες καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε συσκευές διαμερισματοποίησης SND όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι» με σκοπό τον επιτυχή διαχωρισμό των σωμάτων από τους άξονες. Πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα ελέγχου.

Στο πρώτο, κατά τη 10<sup>η</sup> μέρα *in vitro* καλλιέργειας στη συσκευή, απομακρύνθηκε το καλλιεργητικό μέσο και ακολούθησε χρώση με τα φθορίζοντα μόρια Calcein AM (βάφει κατ' αποκλειστικότητα τα ζωντανά κύτταρα, σε όλο τους το μήκος) και Hoechst (χρώση πυρήνων) και στα δύο διαμερίσματα (κανάλι 1 και 2) της συσκευής. Τα διαμερίσματα παρατηρήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού.

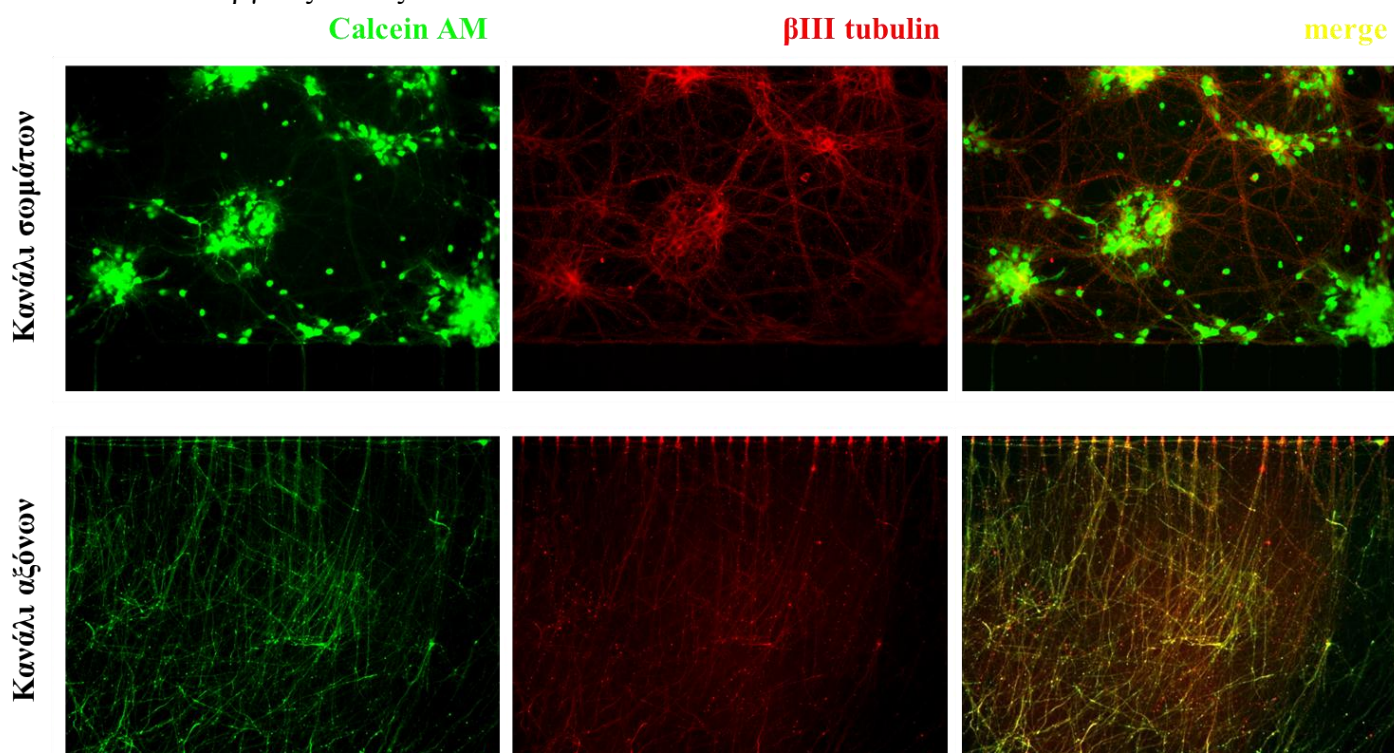


**Εικόνα 14:** Φλοιικοί νευρώνες E18 επίμυων την 10<sup>η</sup> μέρα *in vitro* καλλιέργειας. Έγινε χρώση Hoechst, τόσο στο κανάλι των σωμάτων όσο και στο κανάλι των αξόνων για τη σήμανση πυρήνων. Επίσης, χρώση Calcein AM αποκαλύπτει ότι οι καλλιέργειες είναι υγιείς και ένα δυναμικό δίκτυο έχει δημιουργηθεί στο κανάλι των αξόνων. Οι μεγεθυμένες φωτογραφίες δείχνουν σε λεπτομέρεια τη μορφολογία των σωμάτων (κανάλι 1) και αξόνων και αξονικών κομβίων (κανάλι 2), αντίστοιχα.



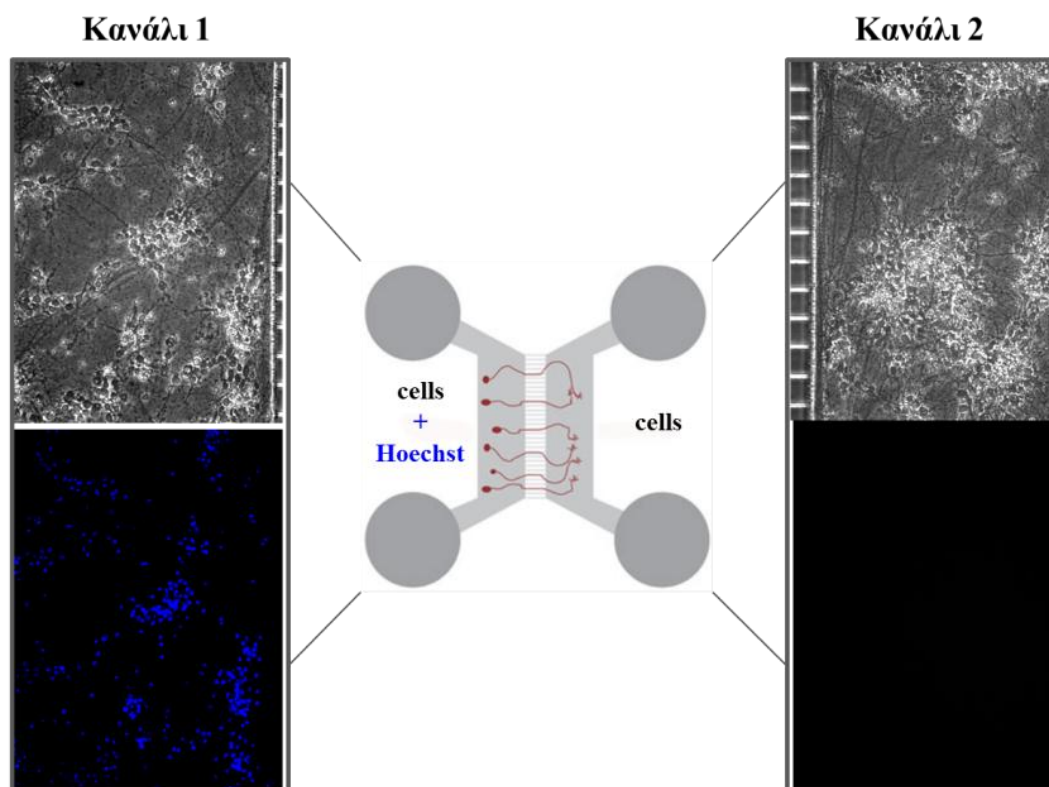
Όπως φαίνεται και στην εικόνα 14, παρατηρείται πυρηνική χρώση αποκλειστικά στο κανάλι 1 (κανάλι σωμάτων) και καθόλου στο κανάλι 2 (κανάλι ανάπτυξης αξόνων), άρα το κανάλι των σωμάτων περιλαμβάνει σώματα και άξονες, ενώ το κανάλι των αξόνων αποκλειστικά άξονες.

Η μελέτη της τοπολογίας έκκρισης της  $\alpha$ -συνουκλείνης απαιτεί το να είναι τόσο τα νευρωνικά σώματα όσο και οι άξονές τους υγιείς και πλήρως ανεπτυγμένοι. Για το λόγο αυτό, σε ένα δεύτερο πείραμα-ελέγχου εξετάστηκε η ακεραιότητα των νευρώνων εντός της συσκευής. Καλλιεργήθηκαν πρωτογενείς νευρώνες σε συσκευή διαμερισματοποίησης SND για 10 ημέρες. Τη 10<sup>η</sup> ημέρα, αφαιρέθηκε το καλλιεργητικό μέσο και ακολουθήθηκε πρωτόκολλο φθορίζουσας σήμανσης με Calcein AM. Εν συνεχεία, ακολουθήθηκε πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού με το αντίσωμα  $\beta$ III-tubulin το οποίο βάφει τον κυτταροσκελετό. Τα δύο διαμερίσματα της συσκευής παρατηρήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. Όπως φαίνεται και στην εικόνα (εικόνα 15), τόσο στο κανάλι των σωμάτων όσο και στο κανάλι των αξόνων, υπάρχει πλήρης συνεντόπιση (colocalization) των φθορισμών του αντισώματος  $\beta$ III-tubulin και του μορίου Calcein AM. Αυτό σημαίνει ότι καθ' όλο το μήκος τους, οι νευρώνες που περιέχονται στη συσκευή τη 10<sup>η</sup> ημέρα *in vitro* καλλιέργειας είναι ζωντανοί.



**Εικόνα 15:** Ακεραιότητα νευρωνικών σωμάτων και αξόνων τη 10<sup>η</sup> ημέρα *in vitro* καλλιέργειας. Πραγματοποιήθηκε χρώση με μόριο Calcein AM (ζωντανά κύτταρα) και ανοσοφθορισμός με  $\beta$ III-tubulin. Η πλήρης συνεντόπιση (εικόνα merge) Calcein AM και  $\beta$ III-tubulin αποκαλύπτει οι νευρώνες και το δίκτυό τους είναι υγιείς. Οι εικόνες λήφθηκαν με φακό μεγέθυνσης 10x.

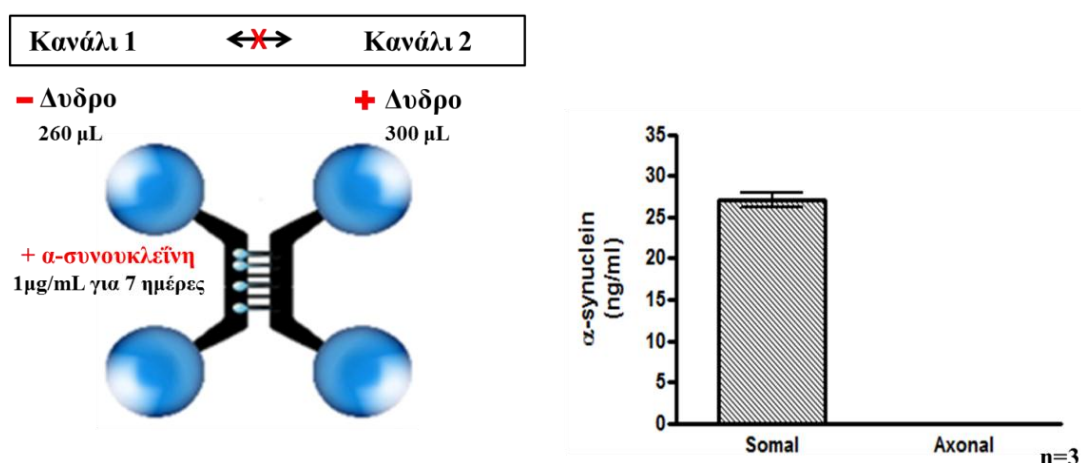
Στα τελικά πειράματα ελέγχου, επιβεβαιώθηκε ότι δεν γίνεται μεταφορά μικρο-μορίων μεταξύ των καναλιών, λόγω ελεύθερης διάχυσης. Η ελεύθερη διάχυση μορίων από το ένα διαμέρισμα στο άλλο στις συσκευές αυτές παρεμποδίζεται μέσω διατήρησης μίας διαφοράς υδροστατικής πίεσης ή αλλιώς διαφορά στον συνολικό όγκο του υγρού στις δεξαμενές των δύο διαμερισμάτων. Επιστρώθηκαν κύτταρα και στα δύο διαμερίσματα της συσκευής (κανάλι 1 και 2). Μετά από 4 ημέρες καλλιέργειας *in vitro* προσθέσαμε χρωστική Hoechst 1μg/mL μόνο στο ένα διαμέρισμα (κανάλι 1), διατηρώντας αρνητική υδροστατική πίεση στο κανάλι 1 ( $\Delta V_{1,2} = -40\mu\text{L}$ ) και η συσκευή επωάστηκε στους 37°C για 3 ώρες. Μετά το πέρασμα των 3 ωρών, τα δύο διαμερίσματα της συσκευής παρατηρήθηκαν με μικροσκοπία φθορισμού. Όπως φαίνεται στο σχήμα (εικόνα 16), η χρωστική Hoechst διατηρήθηκε αποκλειστικά στο διαμέρισμα που είχε τοποθετηθεί βάφοντας τους πυρήνες των νευρικών σωμάτων που βρίσκονταν εκεί. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η διαφορά στον όγκο του υγρού που περιεχόταν στις δεξαμενές των δύο διαμερισμάτων είναι αρκετή για να παρεμποδίσει τη διάχυση μικρο-μορίων από το ένα διαμέρισμα στο άλλο.



**Εικόνα 16:** Παρεμπόδιση διάχυσης Hoechst μεταξύ των διαμερισμάτων της συσκευής. Φλουικοί νευρώνες επιστρώθηκαν στα δύο διαμερίσματα. Την 4<sup>η</sup> μέρα *in vitro* καλλιέργειας προστέθηκε χρωστική Hoechst μόνο στο κανάλι 1 και διατηρήθηκε αρνητική υδροστατική πίεση για 3 ώρες. Η χρωστική σήμανε αποκλειστικά πυρήνες στο κανάλι 1.



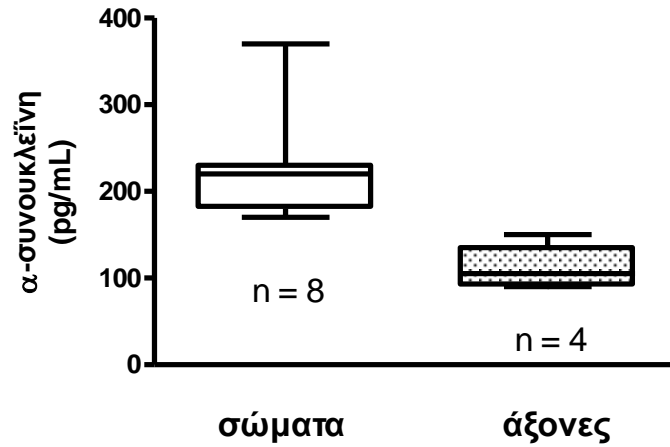
Τέλος, αποκλείσθηκε η περίπτωση μη ειδικής μεταφοράς α-συνουκλείνης από το διαμέρισμα των σωμάτων στο διαμέρισμα των αξόνων. Για να αποδειχθεί ότι τέτοιου είδους μεταφορά δεν συμβαίνει, χρησιμοποιήθηκε μία συσκευή χωρίς επίστρωση κυττάρων. Στο κανάλι 1 προστέθηκε 1μg/mL ανασυνδυασμένης α-συνουκλείνης, διαλυμένης σε μέσο καλλιέργειας, διατηρώντας αρνητική υδροστατική πίεση. Η συσκευή τοποθετήθηκε 8 ημέρες εντός του επωαστήρα κυττάρων στους 37°C. Το μέσο συλλέχθηκε ξεχωριστά από τα δύο κανάλια και μετρήθηκε με ELISA. 27 ng/mL α-συνουκλείνης ανιχνεύθηκαν αποκλειστικά στο κανάλι 1 στο οποίο και είχε τοποθετηθεί (εικόνα 17). Επομένως, η διαφορά στον όγκο του υγρού είναι αρκετή ώστε να μη διαχέεται ελεύθερα η α-συνουκλείνη μεταξύ των καναλιών. Η πτώση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης μεταξύ των ημερών αυτών θα μπορούσε να οφείλεται στην εξάτμιση ή/και τη μη σταθερότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στις συνθήκες του πειράματος αυτού. Επίσης, η μετρούμενη συγκέντρωση βρίσκεται στο όριο γραμμικότητας της ELISA οπότε μπορεί να υποτιμούμε την συγκέντρωση που πραγματικά έχουμε. Συνολικά, τα δεδομένα των πειραμάτων ελέγχου διασφαλίζουν ότι αυτό που μετράται στο τελικό πείραμα από κάθε κανάλι ξεχωριστά είναι προϊόν έκκρισης από υγιή νευρωνικά σώματα ή τους άξονές τους και δεν προέρχεται από κυτταρική νέκρωση, αξονικό εκφυλισμό ή μη-ειδική διάχυση από το κανάλι των σωμάτων στο κανάλι των αξόνων.



**Εικόνα 17: Παρεμπόδιση διάχυσης α-συνουκλείνης μεταξύ των διαμερισμάτων της συσκευής.** 1μg/mL ανασυνδυασμένης α-συνουκλείνης προστέθηκε στο κανάλι 1 και διατηρήθηκε αρνητική υδροστατική πίεση. Μετά από 8 ημέρες, α-συνουκλείνη ανιχνεύεται με ELISA μόνο στο κανάλι 1.

Στο τελικό πείραμα, κύτταρα πρωτογενών φλοιικών νευρώνων E18 επίμυων καλλιεργήθηκαν σε συσκευές διαμερισματοποίησης με συμπλήρωση μέσου καλλιέργειας κάθε 3 ημέρες έως την 8η-10η ημέρα *in vitro*. Για να αποφευχθεί η ελεύθερη διάχυση α-συνουκλεΐνης προς το κανάλι των αξόνων, διατηρήθηκε διαφορά υδροστατικής πίεσης μεταξύ των καναλιών (όγκος μεγαλύτερος στους άξονες). Το μέσο καλλιέργειας συλλέχθηκε τη 10<sup>η</sup> ημέρα *in vitro* καλλιέργειας, ξεχωριστά από τους άξονες και τα σώματα. Αυτό έγινε μέσω των δεξαμενών της συσκευής με ήπια αναρρόφηση έως την ολοκληρωτική του απομάκρυνση και από τα κύρια κανάλια (χωρίς να αποκολληθούν σώματα ή άξονες). Φυγοκεντρήθηκε αρχικά στα 300 x g, για 5' στους 4°C για την απομάκρυνση αιωρούμενων κυττάρων και στη συνέχεια στα 4000 x g, για 10' στους 4°C για την απομάκρυνση κυτταρικών θραυσμάτων. Το υπερκείμενο φυλάχθηκε στους -20°C έως την μέτρησή του με ELISA.

Κατόπιν δοκιμών βελτιστοποίησης, για τη μέτρηση της α-συνουκλεΐνης με τη μέθοδο ELISA, το δείγμα αραιώθηκε 2 φορές σε TBS-T/1% BSA. Τη 10<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας, κατά μέσο όρο 200 pg/mL α-συνουκλεΐνης ανιχνεύθηκαν στο διαμέρισμα των σωμάτων και 100 pg/mL ανιχνεύθηκαν στο διαμέρισμα των αξόνων (εικόνα 18). Δεν είναι εφικτή η ποσοτική σύγκριση της έκκρισης της πρωτεΐνης μεταξύ των δύο διαμερισμάτων, διότι δεν γνωρίζουμε από πόσα σώματα προέρχονται οι άξονες που έχουν αναπτυχθεί στο αξονικό διαμέρισμα. Το εύρημα ότι η α-συνουκλεΐνη εκκρίνεται φυσιολογικά τόσο από τα σώματα όσο και από τους άξονες των νευρώνων υπό φυσιολογικές συνθήκες, ενδεχομένως σημαίνει ότι υπάρχουν φυσιολογικοί μηχανισμοί και μονοπάτια μέσω των οποίων η πρωτεΐνη διακινείται σε συναπτικά επικοινωνούσες περιοχές του εγκεφάλου. Αυτές οι φυσιολογικές οδοί θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα άμεσο κυτταρικό δίαυλο, μέσω του οποίου η α-συνουκλεΐνη εξαπλώνεται υπό παθολογικές καταστάσεις.



**Εικόνα 18:** Η α-συνουκλεΐνη εκκρίνεται φυσιολογικά από τα σώματα και τους άξονες. Μετά από 10 ημέρες καλλιέργειας, η α-συνουκλεΐνη ανιχνεύθηκε με ELISA στο καλλιεργητικό μέσο που συλλέχθηκε χωριστά από τα δύο διαμερίσματα της συσκευής. Επομένως, η πρωτεΐνη εκκρίνεται φυσιολογικά από τα νευρωνικά σώματα και τους άξονες.

## **2. Μελέτη του προτύπου έκκρισης της α-συνουκλεΐνης, ως ελεύθερης και συνδεδεμένης με τα εξωσώματα**

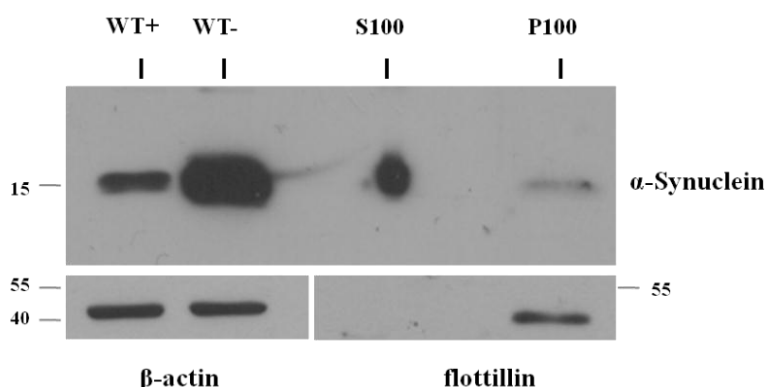
Η έκκριση της α-συνουκλεΐνης είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει φυσιολογικά. Το γεγονός ότι η εκκρινόμενη α-συνουκλεΐνη έχει επίσης συνδεθεί με τοξικές παρακρινείς δράσεις σε παθολογικές συνθήκες εγείρει το ερώτημα πώς μία συνεχής και φυσιολογική διαδικασία καταλήγει να είναι επιζήμια όταν διαταραχθεί η πρωτεόσταση της α-συνουκλεΐνης. Μέρος της απάντησης κρύβεται στη μελέτη των μηχανισμών που διαμεσολαβούν στη φυσιολογική έκκριση της πρωτεΐνης και τα επίπεδα στα οποία αυτοί αλλάζουν σε παθολογικές συνθήκες. Με άλλα λόγια είναι πιθανό μηχανισμοί έκκρισης της α-συνουκλεΐνης να αποτελούν στόχους για θεραπεία.

Ένα ποσοστό της ενδοκυττάριας α-συνουκλεΐνης εξέρχεται από το κύτταρο μέσω των εξωσωμάτων <sup>28</sup>. Βάσει της υπόθεσης του «Δούρειου Ίππου» τα εξωσώματα ενδέχεται να συμβάλλουν καθοριστικά στην εξάπλωση της α-συνουκλεΐνης και άλλων αμυλοειδών πρωτεϊνών που σχετίζονται με αυτά. Όμως απαιτείται ακριβής ποσοτική ανάλυση για να απαντηθεί αν πράγματι τα εξωσώματα συμβάλλουν σημαντικά στην έκκριση της α-συνουκλεΐνης και τη μετάδοσή της σε άλλα κύτταρα. Στην παρούσα εργασία προσεγγίζουμε το ερώτημα αυτό.

### **2.1 Η α-συνουκλεΐνη εκτός κυττάρου ανιχνεύεται «ελεύθερη» αλλά και σε συσχέτιση με τα εξωσώματα**

Μελετήθηκε η παρουσία της α-συνουκλεΐνης εντός και εκτός κυττάρου. Καλλιεργήθηκαν κύτταρα SH-SY5Y τα οποία φέρουν το διαγονίδιο της αγρίου τύπου (WT) α-συνουκλεΐνης<sup>27</sup> με (WT+) ή χωρίς (WT-) δοξυκυκλίνη έως την πυκνότητα 80-90%. Το καλλιεργητικό μέσο αντικαταστάθηκε με 6 mL/τρυβλίο μέσο συλλογής εξωσωμάτων για 30-32 ώρες. Τα κύτταρα λύθηκαν σε φυσιολογικό διάλυμα HEPES-NaCl παρουσία μίγματος αναστολέων πρωτεασών, για την απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων. Το καλλιεργητικό μέσο φυγοκεντρήθηκε για την απομάκρυνση αιωρούμενων κυττάρων και εν συνεχεία ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο διαφορικών φυγοκεντρήσεων για την απομόνωση εξωσωμάτων. Μετά το πέρας της τελικής υπερφυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο (S100) το οποίο δεν περιέχει εξωσώματα συμπυκνώθηκε περαιτέρω. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων WT+ και WT-, το συμπυκνωμένο S100 και το ίζημα εξωσωμάτων (P100) αναλύθηκαν κατά Western με

το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (C-20) (εικόνα 19). Η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη ανιχνεύεται τόσο στο δείγμα S100 όσο και στο P100, κάτι που υποδεικνύει ότι εξωκυτταρικά απαντά ως «ελεύθερη» αλλά και συσχετιζόμενη με τα εξωσώματα. Αυτή η διάκριση υποδηλώνει ότι υπάρχουν δύο διακριτοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η πρωτεΐνη εξέρχεται από το κύτταρο, χωρίς όμως να γνωρίζουμε το ποσοστό που ο καθένας συμμετέχει στην έκκρισή της.



**Εικόνα 19:** Τα εξωσώματα απομονώθηκαν από το μέσο καλλιέργειας των κυττάρων που υπερεκφράζουν την αγρίου τύπου  $\alpha$ -συνουκλεΐνη με διαφορεική φυγοκέντρηση. Κυτταρικά εκχυλίσματα, το καλλιεργητικό μέσο και τα εξωσώματα που απομονώθηκαν από αυτό αναλύθηκαν με ανοσοστύπωμα κατά Western ως προς την παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (C-20) και της flotillin1 ως πρωτεΐνης-μάρτυρα που ενσωματώνεται στη μεμβράνη των εξωσωμάτων. Η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη εκτός κυττάρου ανιχνεύεται ελεύθερη στο καλλιεργητικό μέσο αλλά και σε σύνδεση με τα εξωσώματα.

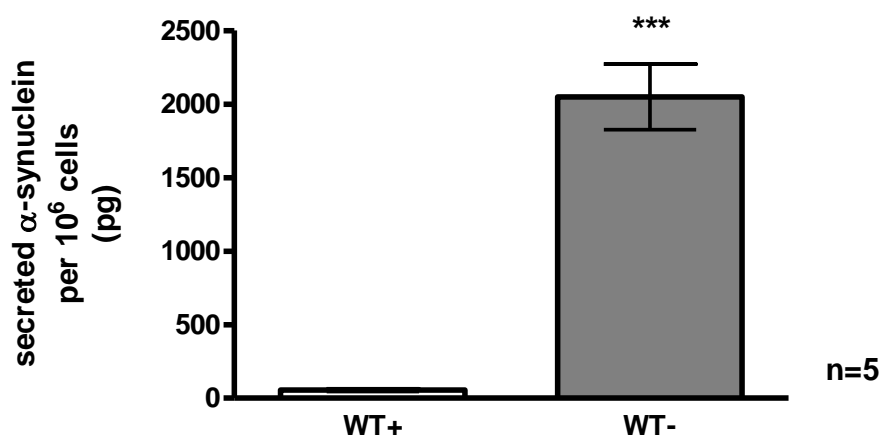
Η ακριβής διερεύνηση του πώς οι δύο αυτοί μηχανισμοί επηρεάζονται υπό συνθήκες σχετιζόμενες με τη νόσο του Parkinson έχει μεγάλη βιολογική σημασία. Προς την κατεύθυνση αυτή μελετήσαμε ποσοτικά το πρότυπο έκκρισης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης (ελεύθερης και σχετιζόμενης με τα εξωσώματα) α) υπό φυσιολογικές συνθήκες β) όταν υπερεκφράζεται η αγρίου τύπου μορφή γ) όταν υπερεκφράζεται η μεταλλαγμένη A53T μορφή.

## 2.2 Πώς η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων επηρεάζει την έκκριση της $\alpha$ -συνουκλεΐνης;

Μελετήθηκε η παρουσία της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης εκτός κυττάρου, σε κύτταρα SH-SY5Y τα οποία υπερεκφράζουν την WT  $\alpha$ -συνουκλεΐνη κατόπιν επαγωγής. Συνολικά  $16 \times 10^6$  κύτταρα επωάστηκαν σε καλλιεργητικό μέσο συλλογής εξωσωμάτων, παρουσία ή απουσία δοξυκυκλίνης για 32 ώρες.

Αρχικά μετρήθηκε με ELISA η συγκέντρωση της ελεύθερης α-συνουκλεΐνης στο καλλιεργητικό μέσο για να συγκριθεί πόσο αυτή μεταβάλλεται όταν τα κύτταρα εκφράζουν ενδογενή (WT+) ή αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης (WT-) (εικόνα 20). Από τη μέτρηση αυτή υπολογίσθηκαν τα pg της ελεύθερης α-συνουκλεΐνης σε όλο τον όγκο της καλλιέργειας. Ο αριθμός αυτός κανονικοποιήθηκε (διαιρέθηκε) με τον αριθμό των κυττάρων που βρίσκονταν στο τρυβλίο καλλιέργειας μετά το πέρας της επώασης των 32 ωρών. Ο τελικός αριθμός αντιπροσωπεύει τα pg της ελεύθερης α-συνουκλεΐνης που εκκρίνονται από  $10^6$  κύτταρα.

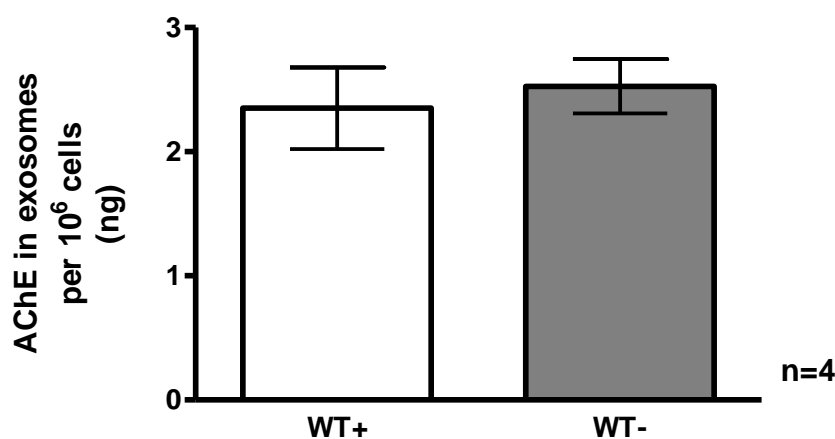
Υπό φυσιολογικές συνθήκες (WT+), η ποσότητα της ελεύθερης α-συνουκλεΐνης εκτός κυττάρου είναι  $54.40 \pm 9.973$  pg (n=5) ανά  $10^6$  κύτταρα. Όταν υπερεκφράζεται η WT πρωτεΐνη, η ποσότητα αυτή φθάνει τα  $2049 \pm 222.9$  (n=5), το οποίο σημαίνει 37 φορές επαγωγή της έκκρισης.



**Εικόνα 20:** Ποσοτικοποίηση της ελεύθερα εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης στο καλλιεργητικό μέσο από τον ίδιο αριθμό κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη σε ενδογενή WT+ ή αυξημένα επίπεδα WT- (n=5). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με διπλής κατεύθυνσης t-test (\*\*\*) $p < 0,0001$ .

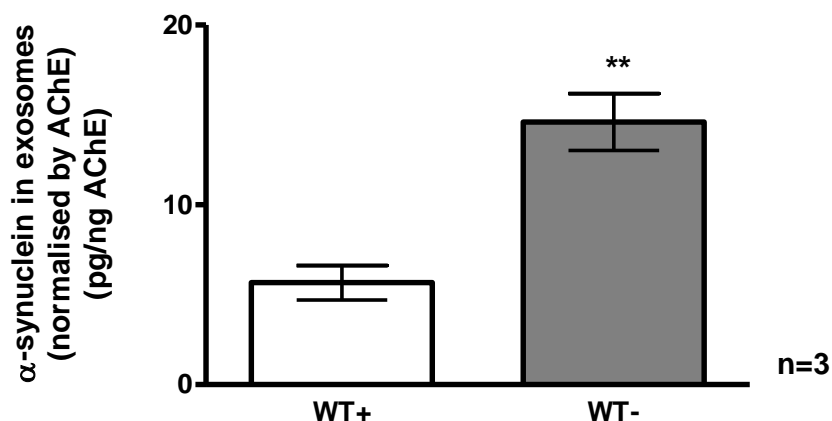
Τα εξωσώματα που είχαν απομονωθεί από τους πληθυσμούς αυτούς μετρήθηκαν με τη μέθοδο μικρο-Bradford (συγκέντρωση πρωτεΐνης) και δοκιμασία εστεράσης κατά Ellman (εικόνα 21) (έμμεσος υπολογισμός αριθμού εξωσωμάτων), όπως έχει περιγραφεί. Συνοπτικά, υπολογίστηκε η ποσότητα AChE στη μεμβράνη

των εξωσωμάτων κάθε πληθυσμού και κανονικοποιήθηκε με τον αριθμό των κυττάρων από τα οποία είχαν εκκριθεί τα εξωσώματα. Ο τελικός αριθμός έμμεσα αντιπροσωπεύει τον αριθμό των εξωσωμάτων που εκκρίνονται από  $10^6$  κύτταρα.



**Εικόνα 21:** Επίπεδα ενζύμου AChE σε εξωσώματα που εκκρίνονται από τον ίδιο αριθμό κυττάρων τα οποία εκφράζουν την  $\alpha$ -συνουκλείνη σε ενδογενή WT+ ή αυξημένα επίπεδα WT- (n=4). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα. Ο αριθμός των εξωσωμάτων παραμένει ίδιος.

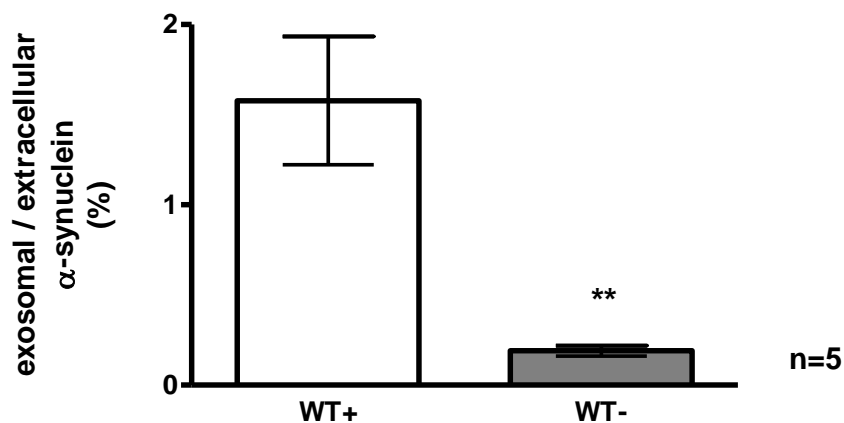
εφαρμόσθηκε μηχανική θραύση των εξωσωμάτων με υπέρηχους. Χρησιμοποιήθηκαν 5 έως 10  $\mu$ g πρωτεΐνης από δείγματα WT+ και WT-, για τη μέτρηση της  $\alpha$ -συνουκλείνης που σχετίζεται με τα εξωσώματα με ELISA. Από την μέτρηση αυτή, υπολογίσθηκε η συνολική  $\alpha$ -συνουκλείνη που συνδέεται με τα εξωσώματα σε κάθε ξεχωριστό πείραμα. Ο αριθμός αυτός κανονικοποιήθηκε με την ποσότητα ενζύμου που αντιστοιχεί σε κάθε μέτρηση. Με τον τρόπο αυτό επιτεύχθηκε η σύγκριση της ποσότητας  $\alpha$ -συνουκλείνης που συνδέεται με τον ίδιο αριθμό εξωσωμάτων από κάθε συνθήκη (εικόνα 22). Υπό φυσιολογικές συνθήκες (WT+), η ποσότητα της  $\alpha$ -συνουκλείνης που σχετίζεται με τα εξωσώματα είναι  $5.670 \pm 0.9539$  pg (n=3). Όταν υπερεκφράζεται η αγρίου τύπου πρωτεΐνη, η ποσότητα αυτή φθάνει τα  $14.61 \pm 1.589$  pg (n=3), το οποίο σημαίνει αύξηση 2,6 φορές.



**Εικόνα 22:** : Ποσοτικοποίηση της α-συνουκλείνης στον ίδιο αριθμό εξωσωμάτων προερχόμενα από κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη σε ενδογενή WT+ ή αυξημένα επίπεδα WT- (n=3). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με διπλής κατεύθυνσης t-test (\*\*p<0,01). Το φορτίο εξωσωμάτων WT- είναι περίπου 3 φορές μεγαλύτερο από αυτό των WT+.

Συνοψίζοντας, παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση της WT α-συνουκλείνης επάγει την έκκρισή της σε ελεύθερη μορφή 37 φορές. Ο αριθμός των εξωσωμάτων που εκκρίνονται παραμένει ίδιος αλλά το φορτίο α-συνουκλείνης στα εξωσώματα αυτά αυξάνεται περίπου 3 φορές. Είναι φανερό ότι η επαγωγή της έκκρισης μέσω εξωσωμάτων (3 φορές) είναι μικρότερη σε σχέση με την επαγωγή έκκρισης της ελεύθερης α-συνουκλείνης (37 φορές). Η παρατήρηση αυτή εκφράσθηκε ποσοτικά ως % λόγος της εξωκυττάριας α-συνουκλείνης που σχετίζεται με τα εξωσώματα προς την ελεύθερη α-συνουκλείνη (εικόνα 23). Κάνοντας τη σύγκριση αυτή φαίνεται ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες (+), τα εξωσώματα μεταφέρουν ποσότητα που αντιστοιχεί στο  $1.578 \pm 0.3557$  % της ελεύθερης α-συνουκλείνης. Όταν υπερεκφράζεται η WT α-συνουκλείνη, τα εξωσώματα μεταφέρουν ποσότητα που αντιστοιχεί στο  $0.1900 \pm 0.02881$  % της ελεύθερης α-συνουκλείνης. Επομένως, τα εξωσώματα συμβάλλουν σε ελάχιστο βαθμό στην έκκριση της πρωτεΐνης εκτός του κυττάρου. Η πτώση του % λόγου βιολογικά σημαίνει ότι η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της πρωτεΐνης μάλλον ενεργοποιεί άλλους μηχανισμούς μη-κλασικής έκκρισης.





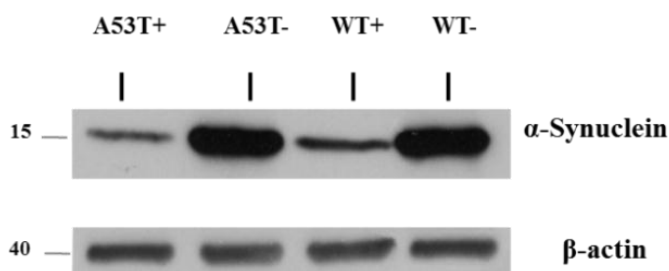
**Εικόνα 23:** % λόγος της εξωκυττάριας  $\alpha$ -συνουκλεΐνης που σχετίζεται με τα εξωσώματα προς την ελεύθερη πρωτεΐνη από πληθυσμούς WT+ και WT-. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με διπλής κατεύθυνσης t-test.

### 2.3 Πώς η έκφραση της μεταλλαγμένης A53T μορφής επηρεάζει την έκκριση της $\alpha$ -συνουκλεΐνης;

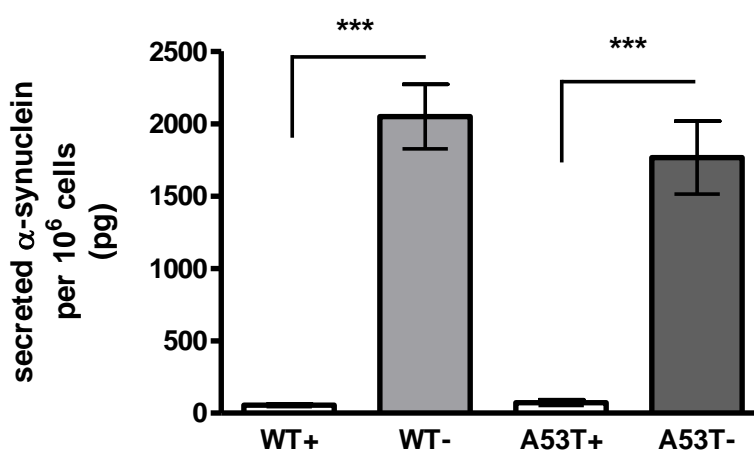
Δείχθηκε ποσοτικά ότι η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της WT πρωτεΐνης οδηγεί σε επαγωγή της έκκρισης της πρωτεΐνης κυρίως σε ελεύθερη μορφή. Προχωρήσαμε στη μελέτη τού αν και πώς η A53T μετάλλαξη της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, η οποία βιοχημικά διαθέτει μεγαλύτερη τάση να δημιουργεί συσσωματώματα, επηρεάζει το πρότυπο αυτό.

Σημαντικό σημείο στη σύγκριση αυτή είναι η δυνατότητα επαγωγής της έκφρασης των μορφών WT και A53T σε παρόμοια ενδοκυτταρικά επίπεδα. Πράγματι, στα συστήματα WT και A53T  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, η ενδοκυτταρική έκφραση της πρωτεΐνης επάγεται σε παρόμοια επίπεδα (εικόνα 24). Αρχικά μετρήθηκε με ELISA η συγκέντρωση της ελεύθερης  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στο καλλιεργητικό μέσο για να συγκριθεί πόσο αυτή μεταβάλλεται όταν τα κύτταρα εκφράζουν ενδογενή (A53T+) ή αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης (A53T-) (εικόνα 25). Υπό φυσιολογικές συνθήκες (+), η ποσότητα της ελεύθερης  $\alpha$ -συνουκλεΐνης που εκκρίνεται από  $10^6$  κύτταρα είναι  $72.84 \pm 19.85$  pg (n=4). Όταν υπερεκφράζεται η A53T πρωτεΐνη, η

ποσότητα αυτή φθάνει τα  $1767 \pm 252.1$  pg (n=4), το οποίο σημαίνει 24 φορές επαγωγή της έκκρισης. Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται και η σύγκριση με τα ευρήματα σε αντίστοιχες μετρήσεις του WT κυτταρικού μοντέλου. Η αριθμητική ανάλυση της ελεύθερης εξωκυττάριας ποσότητας της  $\alpha$ -συνουκλείνης και της επαγωγής της έκκρισής της έδειξε ότι οι διαφορές που παρατηρούνται δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Επομένως, η μετάλλαξη δεν επηρεάζει το πρότυπο έκκρισης της  $\alpha$ -συνουκλείνης σε ελεύθερη μορφή.



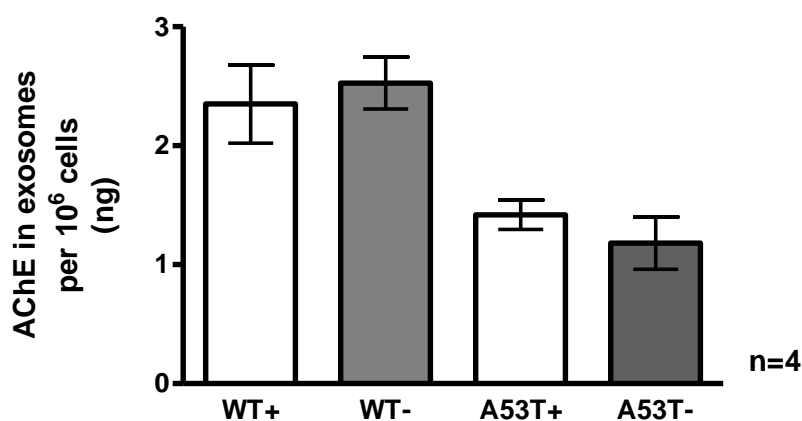
**Εικόνα 24:** Κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοστίπωμα κατά Western ως προς την ενδοκυτταρική έκφραση της  $\alpha$ -συνουκλείνης (C-20 αντίσωμα). Απουσία δοξυκυκλίνης, η WT και A53T μορφή επάγονται σε παρόμοια επίπεδα.



**Εικόνα 25:** Ποσοτικοποίηση της ελεύθερα εκκρινόμενης  $\alpha$ -συνουκλείνης στο καλλιεργητικό μέσο από τον ίδιο αριθμό κυττάρων που εκφράζουν την WT (n=5) και A53T(n=4) πρωτεΐνη σε ενδογενή WT/A53T+ ή αυξημένα επίπεδα WT/A53T-. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με διπλής κατεύθυνσης t-test (\*\*\*) (\*\*\*p<0,0001).

Η σύγκριση του αριθμού των εξωσωμάτων που εκκρίνονται από τον ίδιο αριθμό κυττάρων έδειξε ότι η υπερέκφραση της μετάλλαξης A53T δεν επηρεάζει τον

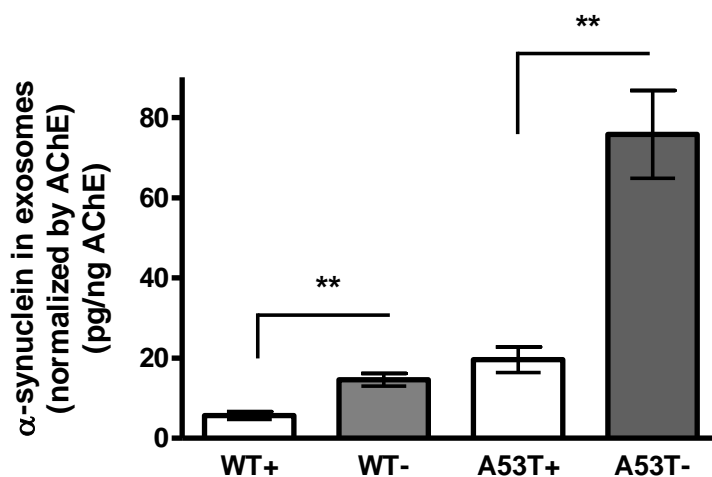
αριθμό των εξωσωμάτων που εκκρίνονται (εικόνα 26). Η διαφορά του αριθμού των εξωσωμάτων στα μοντέλα WT και A53T δεν έχει κάποια βιολογική σημασία.



**Εικόνα 26:** Επίπεδα ενζύμου AChE σε εξωσώματα που εκκρίνονται από τον ίδιο αριθμό κυττάρων τα οποία εκφράζουν την α-συνουκλείνη σε ενδογενή WT/A53T+ ή αυξημένα επίπεδα WT/A53T-. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα. Ο αριθμός των εξωσωμάτων παραμένει ίδιος είτε υπερεκφράζεται η WT είτε η A53T α-συνουκλείνη.

Χρησιμοποιήθηκαν 5 έως 10  $\mu$ g πρωτεΐνης εξωσωμάτων από δείγματα A53T+ και A53T-, για τη μέτρηση της α-συνουκλείνης που σχετίζεται με τα εξωσώματα με ELISA (κατόπιν μηχανικής θραύσης όπως περιγράφηκε). Από την μέτρηση αυτή, υπολογίστηκε η συνολική α-συνουκλείνη που συνδέεται με τα εξωσώματα σε κάθε ξεχωριστό πείραμα. Ο αριθμός αυτός κανονικοποιήθηκε με την ποσότητα ενζύμου που αντιστοιχεί σε κάθε μέτρηση. Με τον τρόπο αυτό επιτεύχθηκε η σύγκριση της ποσότητας α-συνουκλείνης που συνδέεται με τον ίδιο αριθμό εξωσωμάτων από κάθε συνθήκη (εικόνα 27). Υπό φυσιολογικές συνθήκες (+), η ποσότητα της α-συνουκλείνης που σχετίζεται με τα εξωσώματα είναι  $19.60 \pm 3.191$  pg (n=4). Όταν υπερεκφράζεται η A53T μεταλλαγμένη πρωτεΐνη, η ποσότητα αυτή φθάνει τα  $75.79 \pm 10.92$  pg (n=4), το οποίο σημαίνει αύξηση 3,8 φορές. Η αριθμητική διαφορά στην συσχετιζόμενη με τα εξωσώματα α-συνουκλείνη μεταξύ των συστημάτων WT και A53T στη συγκεκριμένη ανάλυση οφείλεται στο διαφορετικό αριθμό εξωσωμάτων που εκκρίνονται από τους δύο κυτταρικούς κλώνους. Η αριθμητική ανάλυση της αύξησης του φορτίου α-συνουκλείνης μεταξύ των συνθηκών + και - στα μοντέλα WT και A53T έδειξε ότι οι διαφορές που παρατηρούνται δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

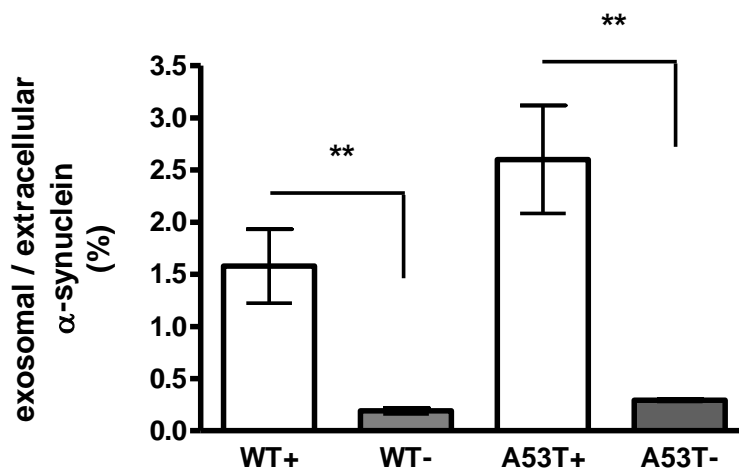
Επομένως, η μετάλλαξη δεν επηρεάζει το πρότυπο έκκρισης της α-συνουκλεΐνης μέσω των εξωσωμάτων.



**Εικόνα 27:** Ποσοτικοποίηση συσχετιζόμενης με τα εξωσώματα α-συνουκλεΐνης στον ίδιο αριθμό εξωσωμάτων που προέρχονται από κύτταρα WT (n=3) και A53T(n=4) που εκφράζουν την πρωτεΐνη σε ενδογενή WT+/A53T+ ή αυξημένα επίπεδα WT-/A53T-. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± τυπικό σφάλμα. Η υπερέκφραση της A53T α-συνουκλεΐνης επάγει την ποσότητα εντός εξωσωμάτων 3,8 φορές κατά μέσο όρο (συγκριτικά με 2,6 φορές στην περίπτωση υπερέκφρασης της WT). Η αριθμητική διαφορά στην συσχετιζόμενη με τα εξωσώματα α-συνουκλεΐνη μεταξύ των συστημάτων WT και A53T οφείλεται στον διαφορετικό αριθμό εξωσωμάτων που εκκρίνονται από τους δύο κυτταρικούς κλώνους.

Συνοψίζοντας, παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση της A53T α-συνουκλεΐνης επάγει την έκκρισή της σε ελεύθερη μορφή 24 φορές. Ο αριθμός των εξωσωμάτων που εκκρίνονται παραμένει ίδιος αλλά το φορτίο α-συνουκλεΐνης στα εξωσώματα αυτά αυξάνεται 3,8 φορές. Είναι φανερό ότι η επαγωγή της έκκρισης μέσω εξωσωμάτων (3,8 φορές) είναι μικρότερη σε σχέση με την επαγωγή έκκρισης της ελεύθερης α-συνουκλεΐνης (24 φορές). Η παρατήρηση αυτή εκφράστηκε ποσοτικά ως % λόγος της εξωκυττάριας α-συνουκλεΐνης που σχετίζεται με τα εξωσώματα προς την ελεύθερη α-συνουκλεΐνη (εικόνα 28). Κάνοντας τη σύγκριση αυτή φαίνεται ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες (+), τα εξωσώματα μεταφέρουν ποσότητα που αντιστοιχεί στο  $2.601 \pm 0.5172$  % της ελεύθερης α-συνουκλεΐνης. Όταν υπερεκφράζεται η A53T α-συνουκλεΐνη, τα εξωσώματα μεταφέρουν ποσότητα που αντιστοιχεί στο  $0.2935 \pm 0.01135$  % της ελεύθερης α-συνουκλεΐνης. Επομένως, τα εξωσώματα συμβάλλουν σε ελάχιστο βαθμό στην έκκριση της A53T πρωτεΐνης εκτός

του κυττάρου. Η πτώση του % λόγου βιολογικά σημαίνει ότι η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της A53T πρωτεΐνης μάλλον ενεργοποιεί άλλους μηχανισμούς μη-κλασικής έκκρισης. Και στην περίπτωση αυτή, η A53T ακολουθεί το ίδιο πρότυπο με τη WT α-συνουκλεΐνη.



**Εικόνα 28:** % λόγος της εξωκυττάριας α-συνουκλεΐνης που σχετίζεται με τα εξωσώματα προς την ελεύθερη πρωτεΐνη από πληθυσμούς WT (n=5) και A53T (n=4). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες (+), τα εξωσώματα μεταφέρουν ποσότητα που αντιστοιχεί περίπου έως στο 3% της ελεύθερα εκκρινόμενης πρωτεΐνης. Σε συνθήκες υπερέκφρασης είτε της WT είτε της A53T α-συνουκλεΐνης, λιγότερο από το 0,5% αντιστοιχεί στα εξωσώματα.

## 2.4 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Η έκκριση της ελεύθερης α-συνουκλεΐνης επάγεται ως απόκριση στην υπερέκφραση της αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένης A53T μορφής. Αυτό δείχνει ότι τα ενδοκυτταρικά επίπεδα είναι καθοριστικά για την έκκριση της ελεύθερης α-συνουκλεΐνης ενώ η μετάλλαξη δεν επηρεάζει το μηχανισμό αυτό. Εφόσον η κύρια βιοχημική της διαφορά από την αγρίου τύπου α-συνουκλεΐνη είναι ότι έχει την τάση να δημιουργεί συσσωματώματα ευκολότερα, ίσως θα μπορούσαν να εντοπιστούν διαφορές στα είδη της ελεύθερα εκκρινόμενης πρωτεΐνης – για παράδειγμα θα μπορούσαν να εκκρίνονται περισσότερες ολιγομερείς μορφές μεταλλαγμένης πρωτεΐνης σε σχέση με την αγρίου τύπου. Το σύστημά μας δεν επιτρέπει αυτή την σύγκριση διότι η ELISA που χρησιμοποιήθηκε αναγνωρίζει μόνο το μονομερές της α-συνουκλεΐνης. Ωστόσο, το γεγονός ότι η ελεύθερη πρωτεΐνη επάγεται και

εκκρίνεται σε παρόμοιο επίπεδο δείχνει ότι η περίσσεια της ελεύθερης εξωκυττάριας α-συνουκλείνης έχει εκκριθεί σε μονομερή μορφή. Δεν είναι γνωστό αν η πρωτεΐνη που εκκρίνεται από τα κύτταρα ολιγομερίζεται μετά την έκκρισή της, όπως έχει δείχθει *in vitro* για την ανασυνδυασμένη A53T. Εναλλακτικά, το μεγαλύτερο μέρος της ελεύθερης A53T α-συνουκλείνης ενδέχεται να διατηρείται σε μονομερή μορφή και ο ολιγομερισμός να παρατηρείται κυρίως στην πρωτεΐνη που βρίσκεται εντός κυττάρου.

Όταν διαταράσσεται η ενδοκυτταρική πρωτεόσταση, υπάρχουν δύο κύρια επίπεδα στα οποία ενδέχεται να επηρεαστεί ο μηχανισμός έκκρισης εξωσωμάτων α) ο ίδιος αριθμός εξωσωμάτων να μεταφέρει μεγαλύτερο πρωτεϊνικό φορτίο β) να αλλάξει ο αριθμός των εξωσωμάτων που δημιουργούνται και εκκρίνονται. Πολύ σημαντικό σημείο της παρούσας μελέτης υπήρξε η έμμεση εκτίμηση του αριθμού των εξωσωμάτων μέσω της δοκιμασίας εστεράσης κατά Ellman, η οποία επέτρεψε την ακριβή ανάλυση των μετρήσεων.

Δείχθηκε ότι η υπερέκφραση της WT ή A53T α-συνουκλείνης δεν επηρεάζει τον αριθμό των εξωσωμάτων που εκκρίνονται. Επομένως, ούτε τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της πρωτεΐνης ούτε η μετάλλαξή της επηρεάζουν την έκκριση ή/και τη βιογένεση των εξωσωμάτων. Το εύρημα αυτό ήταν αναμενόμενο για τους εξής δύο λόγους. Πρώτον, όπως δείχθηκε, σε συνθήκες έκφρασης ενδογενών επιπέδων της πρωτεΐνης (συνθήκες +dox), η εξωκυττάρια α-συνουκλείνη που συνδέεται με τα εξωσώματα αντιστοιχεί μόλις στο 2-3% της ελεύθερης πρωτεΐνης. Δεύτερον η α-συνουκλείνη δεν βρίσκεται σε αφθονία μέσα στα εξωσώματα. Αυτό είναι γνωστό από το γεγονός ότι μέχρι στιγμής δεν έχει ανιχνευτεί με φασματοσκοπία μάζας σε καμία πρωτεωμική μελέτη (πληροφορία από τη βάση δεδομένων Exocarta<sup>72</sup>, η οποία περιλαμβάνει όλα τα μόρια πρωτεϊνών και RNA που έχουν βρεθεί στα εξωσώματα). Βάσει αυτών, ο μηχανισμός των εξωσωμάτων είναι αναμενόμενο να μην επηρεάζεται σε επίπεδο έκκρισης ή/και βιογένεσης από την ποσότητα της α-συνουκλείνης.

Παρότι δεν αλλάζει ο αριθμός τους, τα εξωσώματα μεταφέρουν περισσότερη α-συνουκλείνη σε συνθήκες -dox, ανεξαρτήτως της μορφής της πρωτεΐνης. Πώς όμως επιτυγχάνεται το «πακετάρισμα» περισσότερης πρωτεΐνης; Σύμφωνα με το βιογενετικό μονοπάτι των εξωσωμάτων α) είτε λόγω αυξημένης συγκέντρωσης στο

κυτοσόλιο έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να αλληλεπιδράσει με την μεμβράνη των ενδοσωμάτων και να εγκολπωθεί σε ενδοσωμικά κυστίδια β) είτε μεταφέρεται επιλεκτικά από πρωτεΐνες-μέλη του συμπλόκου ESCRT λόγω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (πχ. μονο-ουβικιτινιλίωση) ή λόγω δημιουργίας τοξικών μορφών/αλληλεπιδράσεων. Δεν μπορούμε να προσδιορίσουμε αν η αύξηση του φορτίου των εξωσωμάτων συμβαίνει για να αποβληθεί η περίσσεια της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, συγκεκριμένες τοξικές μορφές της ή αν είναι ένα στοχαστικό γεγονός. Σε προηγούμενη μελέτη είχε δειχθεί ότι η  $\alpha$ -συνουκλεΐνη συνδέεται με τις μεμβράνες και τον αυλό των εξωσωμάτων<sup>28</sup>. Μοριακά, η μελέτη της τοπολογίας/κατανομής της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης μέσα στα εξωσώματα θα μπορούσε να διαφωτίσει το πώς η σύνδεση της πρωτεΐνης με τη μεμβράνη ή τον αυλό των εξωσωμάτων αλλάζει σε συνθήκες –dox.

Δείχθηκε τέλος ότι η συμβολή των εξωσωμάτων στην έκκριση της WT και A53T  $\alpha$ -συνουκλεΐνης είναι μικρή. Μάλιστα, σε συνθήκες –dox φαίνεται ότι άλλοι, μη-κλασικοί μηχανισμοί έκκρισης ενεργοποιούνται και όχι αυτός των εξωσωμάτων.

Συμπερασματικά, οικογενείς μορφές της νόσου Parkinson συνδέονται με διπλασιασμό και τριπλασιασμό του γονιδίου της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης αλλά και μεταλλάξεις. Χρησιμοποιήσαμε δύο συστήματα που μιμούνται αυτές τις παθολογικές καταστάσεις. Στο WT κυτταρικό μοντέλο επάγεται η υπερέκφραση της αγρίου τύπου  $\alpha$ -συνουκλεΐνης, προσομοιάζοντας τον τριπλασιασμό του γενετικού τόπου. Στο A53T κυτταρικό μοντέλο επάγεται η υπερέκφραση της A53T μετάλλαξης της πρωτεΐνης. Το πρώτο βασικό συμπέρασμα ήταν ότι η αύξηση στα επίπεδα της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης επάγει άμεσα και σε μεγάλο βαθμό την έκκριση της αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Άρα όταν αυτή η αύξηση των επιπέδων διατηρείται χρόνια σε νευρώνες, η συνεχής έκκριση της πρωτεΐνης θα μπορούσε να οδηγήσει στην εξάπλωση της παθολογίας και την επέκταση των παρακρινών τοξικών της δράσεων σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου. Εφόσον και οι δύο μορφές εκκρίνονται μετά το ίδιο πρότυπο, και οι δύο μορφές της πρωτεΐνης μπορούν να έχουν παρακρινείς δράσεις. Δεν μπορούν ωστόσο να εξαχθούν συμπεράσματα για το ποια εκ των δύο μορφών είναι πιο τοξική. Παρότι η συμβολή των εξωσωμάτων στην έκκριση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης κρίθηκε ποσοτικά μικρή, πρέπει να απαντηθεί το ενδιαφέρον ερώτημα

αν μέσω αυτών μεταφέρονται πιο τοξικές για το κύτταρο μορφές οι οποίες διατηρούν τη λειτουργικότητά τους και επηρεάζουν τη νευρωνική ομοιόσταση.

### **3. Μελέτη της πρόσληψης εξωσωμάτων από νευρικά κύτταρα**

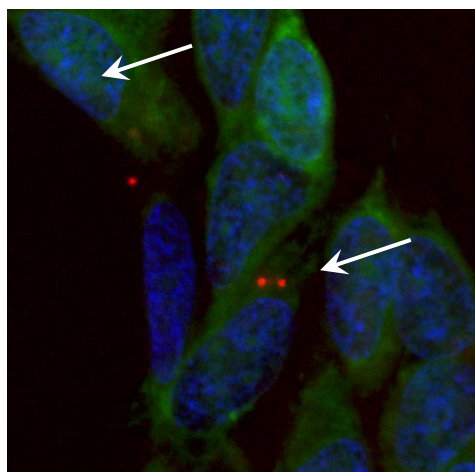
Στην προηγούμενη ενότητα εξετάστηκε ποσοτικά πώς επηρεάζεται το φορτίο α-συνουκλείνης που σχετίζεται με τα εξωσώματα από τα επίπεδα και τη μετάλλαξη της α-συνουκλείνης. Μέχρι τώρα, τα δεδομένα δείχνουν ότι η ποσότητα της πρωτεΐνης που σχετίζεται με τα εξωσώματα είναι μικρή αναλογικά με αυτή που βρίσκεται ελεύθερη εκτός του κυττάρου. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου δείχθηκε ότι η εκκρινόμενη α-συνουκλείνη είναι τοξική για τα κύτταρα κατά έναν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο<sup>28</sup>. Ο τρίτος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστεί το πώς η α-συνουκλείνη που συνδέεται με τα εξωσώματα επηρεάζει τη νευρωνική ομοιόσταση. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω πειράματα που ερευνούν τη δυνατότητα πρόσληψης εξωσωμάτων από νευρικά κύτταρα, την εξέλιξη του φαινομένου στο χρόνο και τη διακίνηση του υλικού των εξωσωμάτων μέσα στα κύτταρα-παραλήπτες.

#### **3.1 Εξωγενώς χορηγούμενα εξωσώματα προσλαμβάνονται από νευρικά κύτταρα**

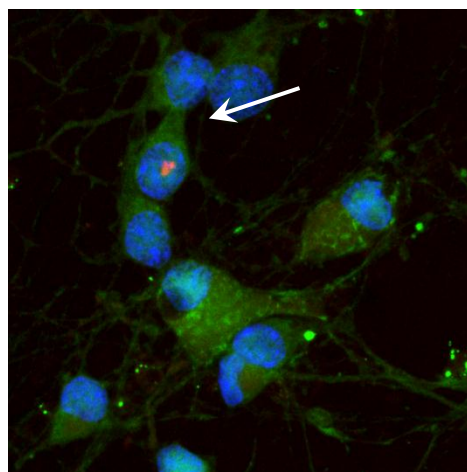
Αρχικά, εξετάστηκε αν τα εξωσώματα προσλαμβάνονται από νευρικά κύτταρα. Εξωσώματα απομονώθηκαν και χορηγήθηκαν σε κύτταρα του ίδιου είδους (δηλ. ανθρώπινα εξωσώματα σε ανθρώπινα κύτταρα κ.ο.κ). 8μg σημασμένων εξωσωμάτων προστέθηκαν *in vitro* σε  $10 \times 10^5$  SH-SY5Y αλλά και πρωτογενείς φλοιικούς νευρώνες μυών και επίμυων για 20 λεπτά, διαλυμένα στο αντίστοιχο καλλιεργητικό μέσο. Μετά το τέλος της επώασης, η περίσσεια εξωσωμάτων εκκλύθηκε και ακολούθησε χρώση με τα φθορίζοντα μόρια Calcein AM και Hoechst. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και παρατηρήθηκαν με μικροσκοπία φθορισμού. Πολλαπλασιαζόμενα και διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y αλλά και οι πρωτογενείς νευρώνες προσλαμβάνουν εξωσώματα (εικόνα 29), όπως αξιολογήθηκε από την παρουσία κόκκινου φθορισμού BODIPY-TR-CERAMIDE εντός της επικράτειας των κυττάρων (όπως ορίζεται από την CalceinAM).



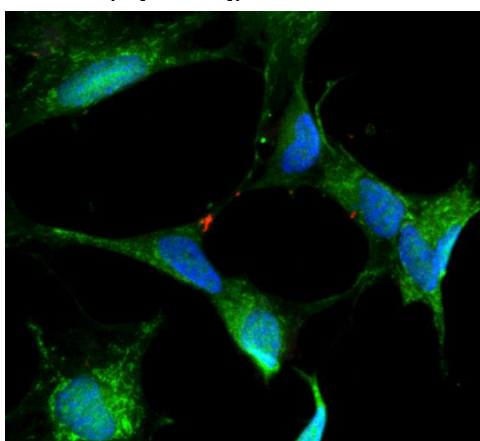
**Πολλαπλασιαζόμενα SH-SY5Y**



**Πρωτογενείς νευρώνες**



**Διαφοροποιημένα SH-SY5Y**

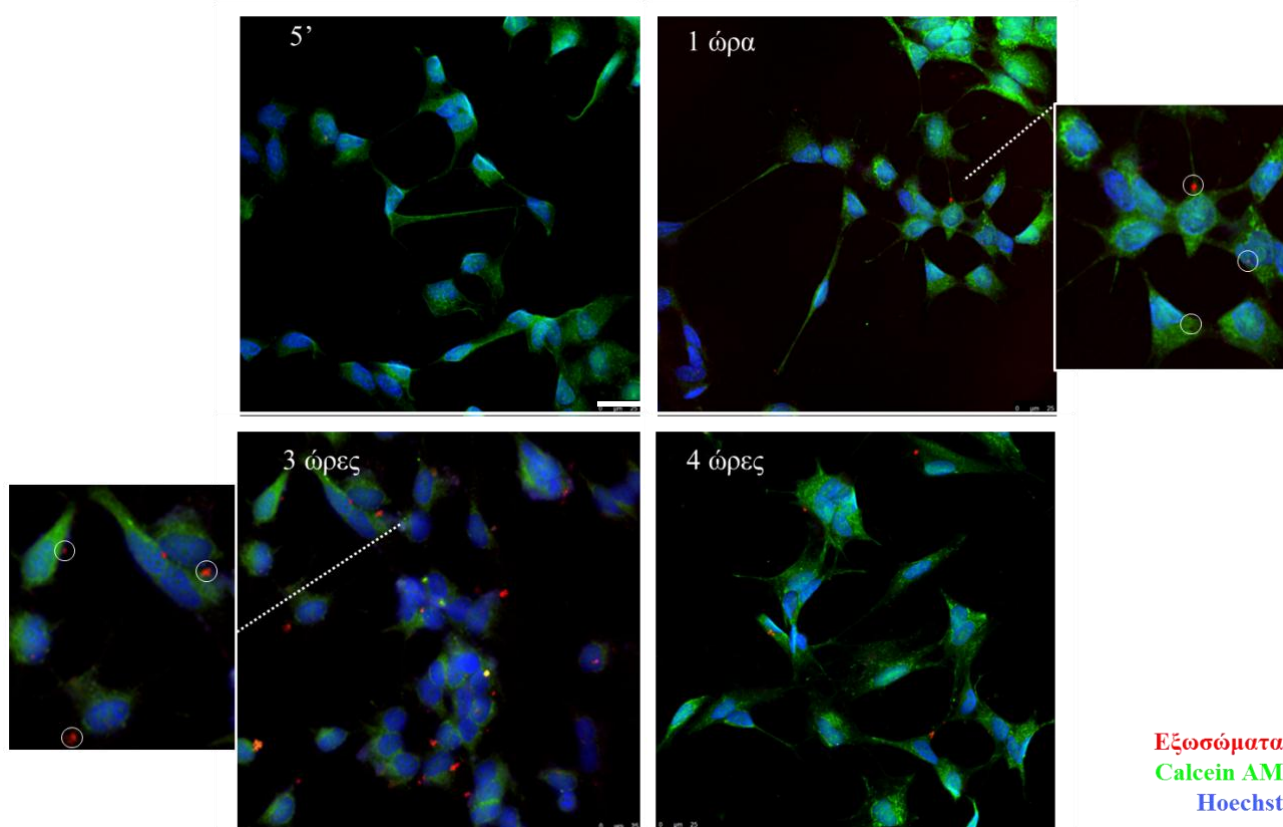


**Εικόνα 29: BODIPY-TR-CERAMIDE-σημασμένα εξωσώματα (κόκκινο) προσλαμβάνονται από νευρικά κύτταρα.** 8μg σημασμένων εξωσωμάτων χορηγήθηκαν σε νευρικά κύτταρα για 20 λεπτά. Όλα τα είδη κυττάρων που εξετάστηκαν προσέλαβαν εξωσώματα, όπως φαίνεται από τον εντοπισμό κόκκινου φθορισμού εντός του κυττάρου.

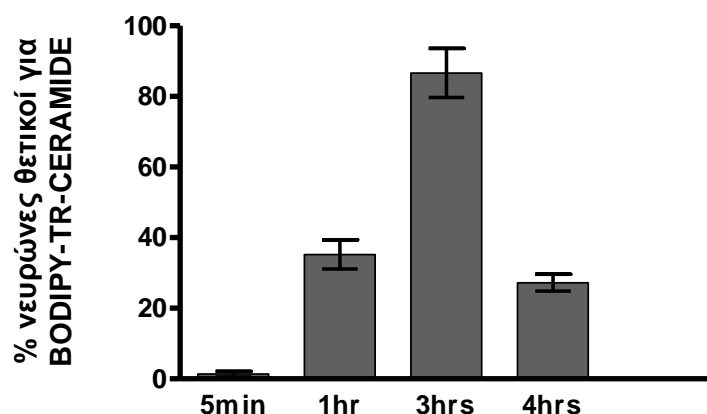
### **3.2 Τα κύτταρα προσλαμβάνουν εξωσώματα κατά έναν χρονο-εξαρτώμενο τρόπο**

Εφόσον η πρόσληψη υλικού από τον εξωκυττάριο χώρο είναι ένα δυναμικό φαινόμενο, ερευνήθηκε περαιτέρω πώς εξελίσσεται η πρόσληψη των εξωσωμάτων στο χρόνο. Προστέθηκαν 8μg εξωσώματα σημασμένα *in vitro* σε  $60 \times 10^4$  διαφοροποιημένα SH-SY5Y έως και 4 ώρες, διαλυμένα σε φρέσκο καλλιεργητικό μέσο. Μετά το τέλος της επώασης, η περίσσεια εξωσωμάτων εκπλύθηκε και ακολούθησε χρώση με τα φθορίζοντα μόρια Calcein AM και Hoechst. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και παρατηρήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. Εξετάστηκαν 3 έως 5 τυχαία πεδία (30 έως 50 κύτταρα ανά πεδίο) από

κάθε συνθήκη ως προς την παρουσία εξωσωμάτων εντός των κυττάρων. Παρατηρήθηκε πρόσληψη του υλικού ακόμη και έπειτα από 5 λεπτά επώασης (εικόνα 30). Μέγιστο πρόσληψης εξωσωμάτων παρατηρήθηκε μετά από 3 ώρες επώασης, όπου περίπου το 85% των κυττάρων (80% με  $\pm$  5%) έχει προσλάβει εξωσώματα (εικόνα 31).



**Εικόνα 30: BODIPY-TR-CERAMIDE** σημασμένα εξωσώματα (κόκκινο) προσλαμβάνονται από νευρικά κύτταρα κατά έναν χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. 8μg σημασμένα εξωσώματα χορηγήθηκαν σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y για τα αναγραφόμενα χρονικά διαστήματα. Η συχνότητα εμφάνισης σήματος εξωσωμάτων σε κύτταρα αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου (σύγκριση 5', 1 ώρα, 3 ώρες). Η μπάρα δείχνει 25μm.

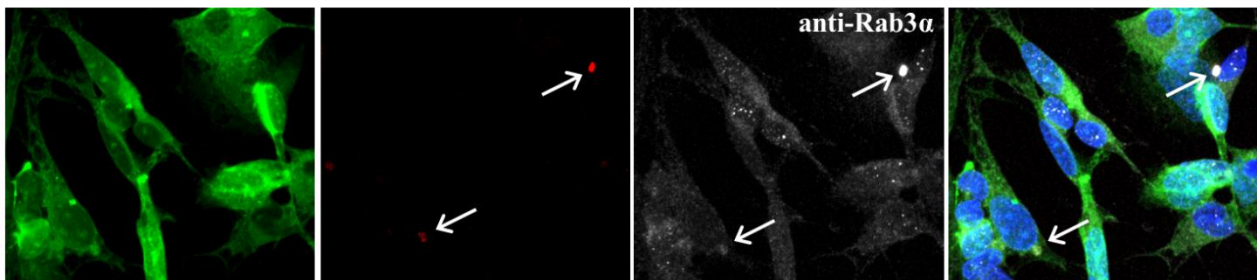
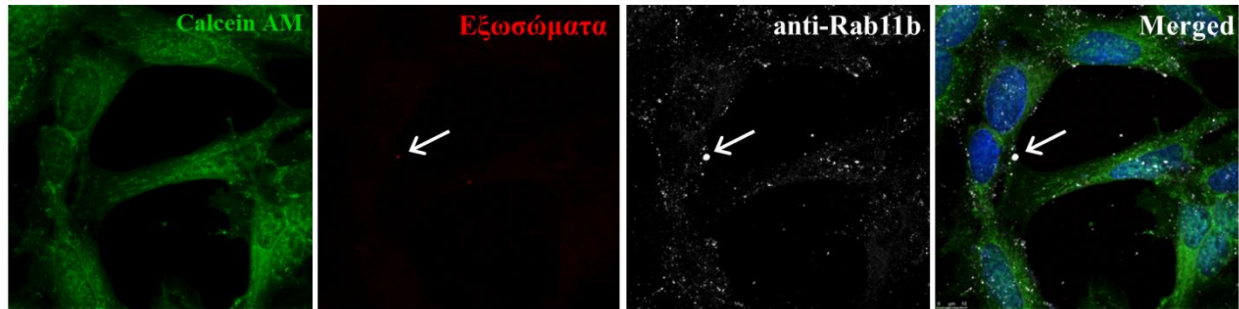


**Εικόνα 31:** % διαφοροποιημένων νευρικών κυττάρων που έχουν προσλάβει εξωσώματα. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο  $\pm$  τυπικό σφάλμα. Τα κύτταρα προσλαμβάνουν δυναμικά εξωσώματα, με μέγιστη πρόσληψη στις 3 ώρες.

Στο πείραμά αυτό δεν ήταν εφικτή η μέτρηση της ποσότητας των εξωσωμάτων που προσλήφθηκαν σε σύγκριση με αυτά που χορηγήθηκαν. Οι δύο λόγοι είναι ότι δεν υπήρχε α) δυνατότητα μέτρησης της ποσότητας των εξωσωμάτων που σημαίνονταν (απόδοση αντίδρασης σήμανσης) και β) αντιστοίχισης της έντασης του φθορισμού εντός των κυττάρων με την ποσότητα εξωσωμάτων που έχει προσληφθεί. Ωστόσο οι παρατηρήσεις μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η πρόσληψη των εξωσωμάτων είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο που εξελίσσεται με το χρόνο και στην πλειοψηφία των κυττάρων. Παρότι στο συγκεκριμένο πείραμα δεν μπορεί να μελετηθεί η κατανομή των εξωσωμάτων που προσλαμβάνονται εντός των κυττάρων, παρατηρήθηκε ότι στις 3 ώρες ο φθορισμός των εξωσωμάτων ήταν μεγαλύτερης έκτασης και έντασης σε σχέση με τα προηγούμενα χρονικά σημεία. Αυτό ίσως οφείλεται στη συσσωμάτωση του λιπιδίου ceramide μέσα στο κύτταρο λόγω εισόδου των εξωσωμάτων σε ενδοσωμικά μονοπάτια ανακύκλωσης/αποδόμησης. Σε αυτό συνηγορεί και η παρατήρηση ότι στις 4 ώρες το ποσοστό κυττάρων με κόκκινο φθορισμό μειώθηκε, το οποίο ίσως οφείλεται στην αποδόμηση/ανακύκλωση της μεμβράνης των εξωσωμάτων.

### 3.3 Μελέτη της διακίνησης της μεμβράνης των εξωσωμάτων σε κύτταρα-παραλήπτες

Σε ακόλουθα πειράματα, προσεγγίστηκε η διακίνηση των εξωσωμάτων εντός των κυττάρων-παραληπτών, μέσω του φθορισμού τους. Η μελέτη του πού εντοπίζεται η μεμβράνη των εξωσωμάτων (δηλαδή το μόριο χρώσης BODIPY-TR-CERAMIDE), θα μπορούσε να μας κατευθύνει για το πώς αφομοιώνεται και το φορτίο των εξωσωμάτων, μετά την πρόσληψή τους. Προστέθηκαν 8μg εξωσώματα σημασμένα *in vitro* σε  $6 \times 10^4$  διαφοροποιημένα SH-SY5Y για 3 ώρες, διαλυμένα σε φρέσκο καλλιεργητικό μέσο. Μετά το τέλος της επώασης, η περίσσεια εξωσωμάτων εκπλύθηκε και ακολούθησε χρώση με τα φθορίζοντα μόρια Calcein AM και Hoechst. Εν συνεχεία, ακολουθήθηκε πρωτόκολλο ανοσοφθορισμού με δύο αντισώματα μικρών GTPασών Rab - Rab11b και Rab3a (εικόνα 32). Οι μικρές GTPασες Rab διατηρούν την ομοιόσταση των μεμβρανών ελέγχοντας την απόσχιση των κυστιδίων, την απομάκρυνση περιβλημάτων, τη διακίνηση των μεμβρανών και τη σύντηξη, αλληλεπιδρώντας με άλλα μόρια. Η Rab11b χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ενδοσωμάτων ανακύκλωσης<sup>96,97</sup> και η Rab3a ως δείκτης κυστιδίων που οδεύουν προς εξωκυττάρωση<sup>98</sup>. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. Παρατηρείται μερική συνεντόπιση και με τις δύο πρωτεΐνες Rab. Αυτό συνιστά ότι η μεμβράνη των εξωσωμάτων εισέρχεται σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια έκκρισης υλικού. Δεν γνωρίζουμε αν αυτό το πρότυπο συνεντόπισης αλλάζει με το χρόνο ή/και αν η μεμβράνη των εξωσωμάτων που προσλαμβάνονται πράγματι θα επανεκκριθεί μέσω των μονοπατιών αυτών. Θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω η συνεντόπιση και με άλλες πρωτεΐνες-δείκτες δομών/οργανιδίων του κυττάρου όπως τα λυσοσώματα και το δίκτυο Golgi, που συνδέονται με την αποδόμηση και τη βιογένεση/έκκριση πρωτεϊνών, αντίστοιχα.



**Εικόνα 32:** Συνεντόπιση μικρών GTPασων Rab11b και Rab3a με τη μεμβράνη εξωσωμάτων που έχουν προσληφθεί από διαφοροποιημένα *Barc*. Μετά την επώαση με σημασμένα εξωσώματα (κόκκινο) για 3 ώρες, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ανοσοσημάνθηκαν με Rab11b Rab3a (γκρι). Τα εξωσώματα που έχουν προσληφθεί συνεντοπίζονται και με τις δύο πρωτεΐνες (άσπρα βελάκια).

### 3.4 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Στα πειράματα αυτά, τα σημασμένα εξωσώματα προσλαμβάνονται από πολλαπλασιαζόμενα και διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα και πρωτογενείς νευρώνες. Στο σύνολο των πειραμάτων, η πρόσληψη εξωσωμάτων από μεταμιτωτικά κύτταρα ήταν μειωμένη σε σχέση με την πρόσληψη από πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Ειδικά στην περίπτωση των πρωτογενών νευρώνων, παρατηρήθηκε πρόσληψη από πολύ λίγα κύτταρα. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οι πρωτογενείς νευρώνες έχουν μειωμένη ικανότητα πρόσληψης εξωσωμάτων. Έχει δειχθεί ότι οι πρωτογενείς νευρώνες εκκρίνουν λιγότερα εξωσώματα σε σχέση με πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα ελλείψει ερεθίσματος<sup>99,100</sup>. Είναι πιθανό να μπορούν να προσλάβουν και λιγότερα, εφόσον ακολουθείται εν πολλοίς το ίδιο κυτταρικό μονοπάτι για την έκκριση και πρόσληψη υλικού. Το σημείο αυτό θα μπορούσε να διαλευκανθεί με το να μετρηθεί η απόδοση της σήμανσης εξωσωμάτων με BODIPY-

TR-CERAMIDE και να υπολογισθεί πόσο από το υλικό που χορηγείται εξωγενώς προσλαμβάνεται, συγκρίνοντας μιτωτικά κύτταρα και πρωτογενείς νευρώνες.

Έχειδειχθεί ότι τα εξωσώματα προσλαμβάνονται με ενδοκύτωση<sup>8889</sup> ή απ' ευθείας σύντηξη<sup>87</sup> της μεμβράνης τους με την πλασματική μεμβράνη κυττάρων. Η πρόσληψη των εξωσωμάτων έχειδειχθεί σε πληθώρα μελετών, λείπει ωστόσο η εκτίμηση του ποσοστού των κυττάρων που προσλαμβάνουν εξωσώματα. Αυτό έχει βιολογική σημασία για την περαιτέρω εκτίμηση του δυναμικού των εξωσωμάτων στο να μεταδίδουν την α-συνουκλείνη ή όποια άλλη πρωτεΐνη από ένα κύτταρο σε ένα άλλο. Είδαμε ότι η πρόσληψη των εξωσωμάτων είναι ένα φαινόμενο δυναμικό, το οποίο εξαρτάται από το χρόνο. Στις 3 ώρες είδαμε ότι τα περισσότερα κύτταρα έχουν προσλάβει εξωσώματα, παρότι δεν γνωρίζουμε πόσα. Έχειδειχθεί ότι περίπου 1μg εξωσωμάτων προσλαμβάνεται από 10<sup>6</sup> μαστοκύτταρα σε μία ώρα και αντιστρόφως 1,44 μg εκκρίνονται<sup>89</sup>. Επομένως, ενδέχεται η πρόσληψη των εξωσωμάτων να έχει ως συνιστώσα της το χρόνο, παρά την ποσότητα που είναι διαθέσιμη.

Όπως είναι αναμενόμενο, η εξωγενής χορήγηση εξωσωμάτων στα πειράματά μας δεν έδειξε κάποια τοξικότητα στα προσλαμβάνοντα κύτταρα. Λόγω της μικρής ποσότητας α-συνουκλείνης που περιέχουν, ενδέχεται να δρουν σε βάθος χρόνου και σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα των κυττάρων-παραληπτών. Η ανίχνευση φθορισμού σημασμένων εξωσωμάτων εντός του κυττάρου, όπως μελετήθηκε στα πειράματα που παρουσιάστηκαν, δεν μπορεί να δώσει κάποια πληροφορία για το πού βρίσκονται τα εξωσώματα. Θα πρέπει λοιπόν να μελετηθεί ξεχωριστά η φυσιολογική διακίνηση των εξωσωμάτων που προσλαμβάνονται εντός του κυττάρου. Προς αυτή την κατεύθυνση, διαπιστώσαμε ότι η μεμβράνη των εξωσωμάτων συνεντοπίζεται πρωτεΐνες Rab- την πρωτεΐνη-δείκτη ενδοσωμάτων ανακύκλωσης Rab11b και αυτή των κυστιδίων που είναι έτοιμα προς εξωκύτωση Rab3a. Επόμενοι στόχοι μελέτης θα μπορούσαν να είναι πρωτεΐνες-δείκτες διαμερισμάτων αποδόμησης όπως αυτό των λυσοσωμάτων (δείκτης Lamp2a) ή το Golgi, στο οποίο ειδικά το λιπίδιο ceramide θα μπορούσε να ανακυκλώνεται. Επίσης, θα είχε μεγάλο ενδιαφέρον να εξεταστεί αν και τα εξωσώματα μπορούν επίσης να διακινούνται άθικτα μέσα στο κύτταρο από τα κυτταρικά σώματα προς τους άξονες ή αντιστρόφως και να επανεκκρίνονται.

## V. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ / ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 1. Αξιολόγηση αποτελεσμάτων σε σχέση με την πρόσφατη βιβλιογραφία

Παρότι έχουν διατυπωθεί διάφορες υποθέσεις σχετικά με την εξάπλωση της παθολογίας της νόσου Parkinson, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων συμβαίνει δεν είναι γνωστοί. Ωστόσο, μια πιθανότητα είναι να περιλαμβάνουν και τη δράση της εκκρινόμενης α-συνουκλείνης. Η έκκριση αυτή είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο, καθότι η πρωτεΐνη ανιχνεύεται σε βιολογικά υγρά, μεταξύ των οποίων και το πარέγχυμα του εγκεφάλου μυών και ανθρώπων που δεν νοσούν από τη νόσο του Parkinson<sup>39</sup>. Δεν έχει όμως ακόμα διαπιστωθεί αν υπάρχουν νευρωνικά δίκτυα μέσω των οποίων η πρωτεΐνη εξαπλώνεται άμεσα από μία περιοχή σε μία άλλη. Στην παρούσα εργασία, μελετώντας την έκκριση της α-συνουκλείνης σε υγιείς φλουικούς νευρώνες είδαμε ότι η πρωτεΐνη εκκρίνεται τόσο από τα κυτταρικά σώματα όσο και τους άξονές τους. Επομένως, η πρωτεΐνη μπορεί να διακινείται φυσιολογικά και άμεσα από μία περιοχή του εγκεφάλου σε άλλη στην οποία προβάλλουν οι νευρωνικοί άξονες.

Πρόσφατα οι Volpicelli-Daley et al. (2011)<sup>101</sup>, προσέθεσαν προσχηματισμένες ινιδιακές μορφές α-συνουκλείνης στους άξονες νευρώνων ιπποκάμπου (διαμερισματοποιημένες καλλιέργειες). Δείχθηκε ότι οι μορφές αυτές, προσελήφθησαν από τα κύτταρα και πυροδότησαν το σχηματισμό παθολογίας νευριτών Lewy, κατά τον οποίο η ενδογενής πρωτεΐνη έδρασε ως υπόστρωμα. Τα αδιάλυτα συσσωματώματα α-συνουκλείνης που δημιουργήθηκαν στα άκρα των αξόνων μετακινήθηκαν προς το κυτταρικό σώμα, όπου οδήγησαν σε ανάπτυξη παθολογίας Lewy και κυτταρικό θάνατο. Σε μια ανάλογη εργασία<sup>102</sup>, χορηγήθηκαν ινίδια α-συνουκλείνης σημασμένα με μόρια Alexa Fluor 488- και ATTO 550 στα κυτταρικά σώματα διαμερισματοποιημένων πρωτογενών νευρώνων. Χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία για την παρατήρηση κυττάρων σε πραγματικό χρόνο και παρατηρήθηκε ότι τα ινίδια της α-συνουκλείνης μετακινήθηκαν από το κυτταρικό σώμα προς τα άκρα των αξόνων και από εκεί εισήλθαν σε άλλους νευρώνες, χωρίς φυσική επαφή. Εφόσον και οι δύο αυτές μελέτες χρησιμοποίησαν ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, μένει να δειχθεί αν η ίδια μεταφορά συμβαίνει και στην πρωτεΐνη που συντίθεται και εκκρίνεται από τους νευρώνες. Δεν είναι γνωστό επίσης ποιες μορφές

της α-συνουκλεΐνης εκκρίνονται φυσιολογικά από τα κύτταρα. Στην παρούσα μελέτη δείχθηκε ότι το μονομερές της α-συνουκλεΐνης εκκρίνεται φυσιολογικά από τα σώματα και τους άξονες των νευρώνων. Ενδέχεται και άλλες μορφές της πρωτεΐνης να εκκρίνονται φυσιολογικά, όπως έχει δειχθεί και από την ανίχνευση ολιγομερών α-συνουκλεΐνης στο πλάσμα του αίματος φυσιολογικών ατόμων<sup>35</sup>.

Οικογενείς μορφές της νόσου Parkinson συνδέονται με διπλασιασμό και τριπλασιασμό του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι μηχανισμοί αποικοδόμησης της πρωτεΐνης υπολειπώνουν στη νόσο του Parkinson<sup>103</sup>. Φαίνεται ότι τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της α-συνουκλεΐνης, είτε λόγω αυξημένης μεταγραφής είτε λόγω μειωμένης αποδόμησης είναι κριτικής σημασίας σε ιδιοπαθείς μορφές της νόσου. Σε αυτή την υπόθεση, η παρούσα μελέτη προσθέτει ένα επιπλέον στοιχείο: η αύξηση στα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης οδηγεί στην αύξηση της έκκρισής της, σε ελεύθερη μορφή αλλά και σε σύνδεση με τα εξωσώματα. Άρα τα επίπεδα της πρωτεΐνης μπορεί να καθορίζουν και το δυναμικό εξάπλωσης της πρωτεΐνης σε άλλα κύτταρα μέσω της έκκρισής της.

Όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενη μελέτη στο ίδιο σύστημα, η ελεύθερη α-συνουκλεΐνη που εκκρίνεται κατόπιν επαγωγής των ενδοκυτταρικών επιπέδων επιφέρει τοξικότητα σε νευρικά κύτταρα κατά ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο<sup>28</sup>. Στην παρούσα μελέτη, καθορίστηκε το πώς επηρεάζεται το πρότυπο έκκρισης της α-συνουκλεΐνης από τα ενδοκυτταρικά επίπεδά της αλλά και τη μετάλλαξη της πρωτεΐνης. Ενδοκυττάρια επαγωγή της έκφρασης της α-συνουκλεΐνης οδήγησε σε πολύ μεγάλη αύξηση και σε παρόμοια επίπεδα έκκρισης της ελεύθερης α-συνουκλεΐνης, τόσο της αγρίου τύπου όσο και της A53T μεταλλαγμένης μορφής. Επομένως η μετάλλαξη δεν επηρεάζει, στο κυτταρικό μας μοντέλο, το πρότυπο έκκρισης της πρωτεΐνης. Ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα ήταν ότι ένα αμελητέο ποσοστό της ελεύθερα εκκρινόμενης πρωτεΐνης αντιστοιχεί στα εξωσώματα, το οποίο πιθανώς σημαίνει ότι άλλοι μηχανισμοί ενεργοποιούνται όταν υπάρχει ενδοκυτταρική περίσσεια της πρωτεΐνης και όχι αυτός των εξωσωμάτων. Τα δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα εξωσώματα δεν συμβάλλουν σημαντικά στην έκκριση της πρωτεΐνης εκτός κυττάρου. Ωστόσο, ενδέχεται να μεταφέρουν μορφές της πρωτεΐνης που έχουν διαφορετικές ιδιότητες από αυτές της ελεύθερα εκκρινόμενης πρωτεΐνης. Δεδομένου ότι ο ολιγομερισμός εξαρτάται από τη συγκέντρωση της α-συνουκλεΐνης, είναι



πιθανό τοξικά ολιγομερή να «πακετάρονται» ή να δημιουργούνται εντός των εξωσωμάτων.

Στα κυτταρικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν, η επαγωγή της έκφρασης της α-συνουκλεΐνης οδηγεί σε ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις που είναι κατά πολύ αυξημένες σε σχέση με αυτές που προκύπτουν σε διπλασιασμούς/τριπλασιασμούς του γονιδίου. Ίσως, η χρήση άλλων μοντέλων που πλησιάζουν ποσοτικά αυτές τις καταστάσεις θα οδηγούσαν σε μεγαλύτερη διάκριση της σχέσης μεταξύ της ελεύθερης και της α-συνουκλεΐνης που συνδέεται με τα εξωσώματα. Είναι πιθανό να υποτιμάται η συμβολή των εξωσωμάτων λόγω μειωμένης χωρητικότητας ή ύπαρξη ανώτατου ορίου (plateau) συγκέντρωσης πάνω από την οποία εμποδίζεται η είσοδος της α-συνουκλεΐνης στα εξωσώματα.

Μονομερείς και ολιγομερείς μορφές συνδέονται με τα εξωσώματα και η πρωτεΐνη κατανέμεται στη μεμβράνη και τον αυλό των εξωσωμάτων<sup>28,104</sup>. Στην παρούσα εργασία, μετρήθηκε η ποσότητα του μονομερούς της α-συνουκλεΐνης εντός των εξωσωμάτων και το πώς αλλάζει όταν αυξάνονται τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της πρωτεΐνης. Δείχθηκε ότι τα εξωσώματα μετέφεραν περίπου 3 φορές περισσότερη ποσότητα της μονομερούς μορφής της α-συνουκλεΐνης. Μένει να εξεταστεί με ποσοτικό τρόπο και η παρουσία άλλων μορφών της α-συνουκλεΐνης και να δειχθεί αν υπάρχει κάποια «προτίμηση» για το ποιες μορφές της πρωτεΐνης εξέρχονται μέσω των εξωσωμάτων. Αυτό θα είχε μεγάλη σημασία για την αξιολόγηση της υπόθεσης του «Δούρειου Ίππου» που θέλει αμυλοειδή του κυτοσολίου να εισέρχονται εντός των εξωσωμάτων και μέσω αυτών να μεταδίδονται σε άλλα κύτταρα, εξαπλώνοντας την παθολογία.

Μέχρι στιγμής υπάρχει μόνο μία πρόσφατη μελέτη η οποία δείχνει ότι οι ολιγομερείς μορφές της α-συνουκλεΐνης που συνδέονται με τα εξωσώματα σχετίζονται με κυτταρική τοξικότητα (ενεργοποίηση της Caspase 3/7)<sup>104</sup>. Στη μελέτη αυτή, κύτταρα διαμολύνθηκαν με α-συνουκλεΐνη η οποία είχε συντηχθεί με το N- ή C- άκρο της λουσιφεράσης Gaussia. Δείχθηκε ότι ολιγομερείς μορφές της α-συνουκλεΐνης που συνδέονται με τα εξωσώματα προσλαμβάνονται ευκολότερα από κύτταρα σε σχέση με αυτές που είναι ελεύθερες. Ωστόσο, στη μελέτη αυτή δεν υπήρχε άμεσα ποσοτική μέτρηση των ολιγομερών μορφών που χορηγήθηκαν σε

ελεύθερη μορφή ή σε σύνδεση με τα εξωσώματα. Το όριο ευαισθησίας της ELISA που χρησιμοποιήθηκε (όριο ανίχνευσης 200 pg/mL) ήταν χαμηλό σε σχέση με την ευαισθησία της μεθόδου στην παρούσα εργασία (κατώτατο όριο ανίχνευσης 5 pg/mL). Ακόμα και διαμόλυνση με GFP οδήγησε σε ανίχνευση σήματος στην ELISA, το οποίο σημαίνει ότι δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για την ποσότητα των ολιγομερών που χορηγήθηκαν. Γενικά, δεν υπάρχουν μέχρι στιγμής αρκετά ευαίσθητες ELISA για τη μέτρηση της ποσότητας των ολιγομερών  $\alpha$ -συνουκλείνης που συνδέονται με τα εξωσώματα. Δεδομένου ότι πληθώρα ευρημάτων συνηγορούν στο ότι τα εξωσώματα είναι ένας νέος και πολλά υποσχόμενος θεραπευτικός στόχος, είναι σημαντικό οι μελέτες που διερευνούν το δυναμικό των εξωσωμάτων στην εξάπλωση της παθολογίας του νευροεκφυλισμού να πραγματοποιούνται με ποσοτικούς όρους. Μία άμεση προσέγγιση θα ήταν να μετρηθεί η ελεύθερη και συνδεδεμένη με τα εξωσώματα  $\alpha$ -συνουκλείνη σε διάφορα ζώα-μοντέλα της νόσου Parkinson που σχετίζονται με τα επίπεδα και τις μεταλλάξεις της  $\alpha$ -συνουκλείνης. Εν συνεχεία να συγκριθεί πώς η χορήγηση της ελεύθερης αλλά και συνδεδεμένης με τα εξωσώματα πρωτεΐνης επηρεάζει τη νευρωνική ομοιόσταση.

Η μελέτη της κατανομής της  $\alpha$ -συνουκλείνης στα εξωσώματα θα ήταν επίσης διαφωτιστική ως προς τα κυτταρικά επίπεδα/μηχανισμούς που μπορεί να επιδρά σε κύτταρα που την προσλαμβάνουν μέσω αυτών. Για παράδειγμα, η  $\alpha$ -συνουκλείνη που προσδένεται στην έξω μεριά της μεμβράνης των εξωσωμάτων, θα μπορούσε να αναγνωρίζεται από κυτταρικούς υποδοχείς της  $\alpha$ -συνουκλείνης, πυροδοτώντας σηματοδοτικά μονοπάτια χωρίς την είσοδό της σε κύτταρα. Αντιθέτως, αν το μεγαλύτερο μέρος της  $\alpha$ -συνουκλείνης βρίσκεται εντός των εξωσωμάτων, θα ήταν πιθανότερο να επηρεάζει τα προσλαμβάνοντα κύτταρα σε διάφορα επίπεδα, όπως την πλασματική μεμβράνη, ενδοκυτταρικά μονοπάτια αποδόμησης κ.α.

Στα πειράματα που περιγράφηκαν, η  $\alpha$ -συνουκλείνη μετρήθηκε με ELISA κατόπιν μηχανικής θραύσης με υπέρηχους. Όπως αναφέρθηκε, έγιναν ορισμένες δοκιμές προκειμένου να βρεθεί η βέλτιστη μέθοδος επεξεργασίας των εξωσωμάτων, στις οποίες διαμορφώθηκαν σημαντικές παρατηρήσεις ως προς την κατανομή της  $\alpha$ -συνουκλείνης μέσα στα εξωσώματα. Έχειδειχθεί ότι η  $\alpha$ -συνουκλείνη συνδέεται με τη μεμβράνη και τον αυλό των εξωσωμάτων<sup>28</sup>. Βάσει αυτού, αρχικά μετρήθηκαν ακέραια εξωσώματα τα οποία όμως δεν ανιχνεύτηκαν στην ELISA. Αυτό σημαίνει

είτε ότι το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης δεν προβάλλει προς τον εξωκυττάριο χώρο (δεν αναγνωρίστηκε από τα αντισώματα πρόσδεσης και αναγνώρισης), είτε ότι η ποσότητα με την διαμόρφωση αυτή ήταν κάτω από το κατώτατο όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα με Triton-X100 (100 mM Tris pH8, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Triton-X100) για τη διάνοιξη πόρων και την απελευθέρωση των πρωτεϊνών που είναι διαλυτές στον αυλό. Ούτε στην περίπτωση αυτή υπήρξε σήμα ανίχνευσης στην ELISA. Ομοίως, το καθαρά διαλυτό στον αυλό μέρος της πρωτεΐνης μπορεί να είναι σε ποσότητα πολύ χαμηλή για να ανιχνευτεί από τη μέθοδο. Αντιθέτως, η εφαρμογή υπερήχων επέτρεψε τη μέτρηση της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης σε όλα τα πειράματα, το οποίο σημαίνει ότι το μεγαλύτερο μέρος της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης είναι προσδεμένο στις μεμβράνες των εξωσωμάτων και το -C-τελικό άκρο της προβάλλει στον αυλό τους. Θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να επεκταθούν οι παρατηρήσεις αυτές χρησιμοποιώντας και άλλες προσεγγίσεις διάκρισης της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης στις μεμβράνες και τον αυλό των εξωσωμάτων όπως είναι η διάνοιξη των εξωσωμάτων με ιδιαίτερα βασικό διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ <sup>105</sup> ή την χρώση με αντίσωμα συνδεδεμένο με σφαιρίδια χρυσού.

Η έκκριση των εξωσωμάτων κατά τη σύντηξη πολυκυστιδιακών σωμάτων με την πλασματική μεμβράνη ενδέχεται να ρυθμίζεται από τη συναπτική ενεργότητα. Πολυκυστιδιακά σώματα απαντούν σε κυρίως σε σωματο-δενδριτικά διαμερίσματα<sup>106</sup>. Όμως, όπως έχει δειχθεί, μεταναστεύουν κοντά σε денδριτικές ακάνθους (spines) όταν επάγεται η συναπτική ενεργότητα με χορήγηση πεπτιδίων που βελτιώνουν την γνωσιακή λειτουργία<sup>107,108</sup>, κατόπιν έκθεσης σε νευροτροφικούς παράγοντες<sup>109</sup>, ακόμα και λόγω εκπαίδευσης ζώων σε συμπεριφορικές δοκιμασίες<sup>108</sup>. Τα εξωσώματα απελευθερώνονται από αστροκύτταρα<sup>110</sup>, μικρογλοιακά κύτταρα<sup>111</sup>, ολιγοδενδροκύτταρα<sup>112</sup> και αναπτυσσόμενους νευρώνες<sup>99</sup>.

Πρόσφατα δείχθηκε ότι και οι ώριμοι νευρώνες εκκρίνουν εξωσώματα από τα σώματα και τους денδρίτες και αυτό ρυθμίζεται από την εισροή ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και από την γλουταματεργική συναπτική ενεργότητα<sup>100</sup>. Τα εξωσώματα έχουν προταθεί ως τρόπος διακυτταρικής επικοινωνίας που συμβάλλει στη φυσιολογία του νευρικού συστήματος αλλά και την trans-συναπτική μετάδοση παθολογικών πρωτεϊνών<sup>64,82,113</sup>. Έχει δειχθεί ότι τα εξωσώματα προσλαμβάνονται με ενδοκύτωση<sup>88,89</sup> ή απ' ευθείας σύντηξη<sup>87</sup> της μεμβράνης τους με την πλασματική

μεμβράνη κυττάρων. Μέχρι στιγμής δεν έχουν πραγματοποιηθεί κινητικές μελέτες των χαρακτηριστικών της πρόσληψης εξωσωμάτων από νευρώνες. Αυτό έχει μεγάλη βιολογική σημασία για την εκτίμηση του δυναμικού των εξωσωμάτων στο να μεταφέρουν το φορτίο τους σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου αλλά και για την αξιολόγησή τους ως θεραπευτικών στόχων του νευροεκφυλισμού ή ως φορέων θεραπείας.

Στην παρούσα μελέτη προσεγγίσαμε το πώς εξελίσσεται στο χρόνο η πρόσληψη των εξωσωμάτων από νευρικά κύτταρα. Η πρόσληψη των εξωσωμάτων είναι ένα φαινόμενο δυναμικό. Τα εξωσώματα προσλαμβάνονται από κύτταρα ακόμη και από τα 5 πρώτα λεπτά της χορήγησής τους. Με την πάροδο του χρόνου, σταδιακά μεγαλύτερο ποσοστό των νευρικών κυττάρων προσέλαβε εξωσώματα και παρατηρήθηκε μέγιστο πρόσληψη του υλικού των εξωσωμάτων στις 3 ώρες, όπου το  $86.67 \pm 6.939\%$  των κυττάρων που εξετάστηκαν ανά πεδίο είχε προσλάβει εξωσώματα. Συμπληρωματικά, θα πρέπει να αποσαφηνιστεί η ποσότητα του υλικού που προσλαμβάνεται. Για τη διατήρηση της νευρωνικής ομοιόστασης, θα ήταν λογικό η πρόσληψη του υλικού των εξωσωμάτων να φθάνει σε κάποιο σημείο κορεσμού, το οποίο πρέπει να είναι ποσοτικά γνωστό. Αυτή η πληροφορία θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμη μελλοντικά, σε φαρμακο-κινητικές μελέτες όπου χρησιμοποιούνται τα εξωσώματα ως φορείς θεραπείας.

Επιπλέον, απαιτείται γνώση του μηχανισμού πρόσληψης των εξωσωμάτων αλλά και το πώς το φορτίο τους διακινείται μετά την πρόσληψή τους. Στην παρούσα εργασία δείχθηκε ότι οι μεμβράνες των εξωσωμάτων συνεντοπίζονται, μετά από 3 ώρες, με δείκτες ενδοσωμάτων ανακύκλωσης όπως το Rab11 και εκκριτικών κυστιδίων -Rab3a. Παρότι η πληροφορία που εξάχθηκε αφορά αποκλειστικά στη μεμβράνη των εξωσωμάτων, δεν αποκλείει το ενδεχόμενο ένα μέρος των εξωσωμάτων να επανεκκρίνεται από τα κύτταρα παραλήπτες. Κάτι τέτοιο θα είχε πολύ μεγάλη θεραπευτική αξία, καθότι φαρμακολογικά μόρια που συνδέονται ισχυρά με τη μεμβράνη των εξωσωμάτων θα μπορούσαν να δρουν σε πάνω από ένα κύτταρα, πολλαπλασιάζοντας τα οφέλη της θεραπείας. Και στην περίπτωση αυτή απαιτείται α) η παρακολούθηση της διακίνησης του φορτίου των εξωσωμάτων εντός του κυττάρου-παραλήπτη β) η μελέτη άλλων πιθανών υποκυτταρικών δομών στις οποίες διακινείται, όπως για παράδειγμα τα λυσοσώματα. Η γνώση αυτή θα επιτρέψει

ενδεχομένως τη «φυσική» στόχευση των δομών αυτών, όπως θα συζητηθεί παρακάτω.

## **2. Θεραπευτικοί στόχοι**

### **2.1 Στόχευση της ενδοκυττάριας και ελεύθερης εξωκυττάριας α-συνουκλεΐνης**

Όπως αναλύθηκε βιβλιογραφικά και δείχθηκε στην παρούσα εργασία ποσοτικά, η έκκριση της α-συνουκλεΐνης σε ελεύθερη μορφή είναι ένας μηχανισμός που είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με την ενδοκυτταρική πρωτεόσταση. Ακόμη δεν είναι διαθέσιμη η πληροφορία των πιθανών μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν την έκφραση της α-συνουκλεΐνης *in vivo*. Ωστόσο, κυτταρικές μελέτες έχουν δείξει ότι η περιοχή του ιντρονίου 1 και το 5' άκρο του εκκινήτη του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης διαθέτει στοιχεία απόκρισης σε μεταγραφικούς παράγοντες. Ο μεταγραφικός παράγοντας ZSCAN είναι απαραίτητος για τη μεταγραφική ενεργότητα του ιντρονίου 1<sup>114</sup>. Στόχευση με siRNA κατά του μεταγραφικού παράγοντα αυτού οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της α-συνουκλεΐνης σε κύτταρα PC12 και πρωτογενείς νευρώνες. Επομένως, η στόχευση του μεταγραφικού παράγοντα αυτού (ή άλλων που θα ταυτοποιηθούν στο μέλλον) θα μπορούσε να ανοίξει νέες θεραπευτικές οδούς στη νόσο του Parkinson και άλλες συνουκλεϊνοπάθειες<sup>115</sup>.

Ακόμη κι αν ένας πληθυσμός κυττάρων οδεύει προς τον εκφυλισμό, η στόχευση της ελεύθερα εκκρινόμενης α-συνουκλεΐνης θα ήταν ένας πρώτος στόχος για τον περιορισμό της εξάπλωσης της παθολογίας. Επίσης, εφόσον η α-συνουκλεΐνη σχετίζεται με την ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων<sup>43,44</sup>, τα αντισώματα κατά της α-συνουκλεΐνης θα περιορίζαν την φλεγμονώδη απόκριση η οποία επιδεινώνει την εξέλιξη της παθολογίας στη νόσο του Parkinson. Δεδομένου του φυσιολογικού ρόλου της α-συνουκλεΐνης στη συναπτική λειτουργία, η στόχευση απαιτεί επαρκή γνώση του ποιες μορφές της α-συνουκλεΐνης είναι οι πλέον τοξικές για τους νευρώνες, η οποία δεν είναι πλήρως διαθέσιμη.

### **2.2 Ανοσοποίηση**

Μία θεραπευτική προσέγγιση της νόσου Parkinson είναι η ανοσοθεραπεία. Διαγονιδιακά ζώα στα οποία χορηγήθηκαν αντισώματα κατά της ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης, εμφάνισαν βελτίωση στα συμπεριφορικά προβλήματα που σχετίζονται

με τη νόσο του Parkinson και μείωση της συσσώρευσης α-συνουκλεΐνης<sup>116</sup>. Τα αντισώματα αυτά φάνηκε να βοηθούν στην αποδόμηση της α-συνουκλεΐνης μέσω φαγοκύτωσης και αυτοφαγίας. Η ίδια ομάδα έδειξε ότι η ενεργός ανοσοποίηση μέσω της χορήγησης ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης, μείωσε σημαντικά τα συσσωματώματα της α-συνουκλεΐνης στα νευρωνικά σώματα και τις συνάψεις<sup>117</sup>. Κατά παρόμοιο τρόπο ενδέχεται η άμεση χορήγηση εξωσωμάτων τα οποία εκθέτουν στην επιφάνεια ή διαθέτουν στον αυλό τους τοξικές μορφές της α-συνουκλεΐνης να είναι ένα τρόπος ενεργού ανοσοποίησης, πριν ή κατά τα πρώτα στάδια παθογένεσης της νόσου Parkinson.

### 2.3 Γονιδιακή θεραπεία μέσω των εξωσωμάτων

Ενδέχεται τα εξωσώματα που απομονώνονται από έναν οργανισμό, εν δυνάμει να είναι οι καταλληλότεροι φορείς γονιδιακής θεραπείας γιατί αποτελούνται από μη συνθετικά και μη ιικά στοιχεία. Επίσης, το μικρό τους μέγεθος και η ευελιξία επιτρέπει να διαπερνούν βιολογικές μεμβράνες ενώ η διπλοστιβάδα της μεμβράνης τους προστατεύει το RNA και το πρωτεϊνικό τους φορτίο από την αποδόμηση, διευκολύνοντας την αποτελεσματική του παράδοση.

Εξωσώματα που απομονώνονται από προγονικά κύτταρα έχει δείχθει ότι μεταφέρονται λειτουργικά σε άλλα κύτταρα. Το 2007, η ομάδα του Camussi απομόνωσε μικροκυτίδια από ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (endothelial progenitor cells, EPCs) τα οποία περιείχαν πρόδρομα αγγειογενικά μόρια miR-126 και miR-296<sup>118</sup>. Η μεταφορά αυτών των μορίων πυροδότησε την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt και τη φωσφορυλίωση συνθασών του νιτρικού οξέος και οδήγησε τα ενδοθηλιακά κύτταρα να μπουν σε αποπτωτικό και αγγειογενετικό όπως δείχθηκε *in vitro* και *in vivo*. Τα ίδια μόρια miRNA μπορούσαν να επάγουν θεραπευτικά αποτελέσματα σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Για παράδειγμα μπορούσαν να επάγουν αγγειογενετικό πρόγραμμα σε κυτταρικές νησίδες παραγωγής ινσουλίνης, που σημαίνει ότι εν δυνάμει θα ήταν χρήσιμα για την διατήρηση της αποτελεσματικότητας της παραγωγής ινσουλίνης από κύτταρα νησίδων μετά την εμφύτευσή τους.

Δύο μελέτες μέχρι στιγμής δείχνουν ότι τα εξωσώματα, κατόπιν μετατροπής μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δυναμικοί μεταφορείς θεραπείας, στο νευρικό

σύστημα και την περιφέρεια. Οι Alvarez-Erviti et al. χορήγησαν εξωσώματα που τροποποιήθηκαν ώστε να φέρουν ένα ιικό γλυκοπρωτεϊνικό πεπτιδίο-στόχευσης κυττάρων του εγκεφάλου (μέσω αναγνώρισης από τον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης)<sup>77</sup>. Τα χορήγησαν με ενδοφλέβια ένεση στην ουρά μυών. Τα εξωσώματα μετανάστευσαν στοχευμένα στον εγκέφαλο με ελάχιστη εξάπλωση σε περιφερικά όργανα και μείωσαν σημαντικά τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης του ενζύμου BACE1, που είναι θεραπευτικός στόχος της νόσου Alzheimer. Μάλιστα, λόγω αυτού μειώθηκαν τα επίπεδα παραγωγής του Aβ<sub>40</sub> που είναι προϊόν επεξεργασίας του BACE1. Η ομάδα της Valadi πρόσφατα εξέτασε εξωσώματα από το περιφερικό αίμα σαν φορείς γονιδιακής θεραπείας για ετερόλογο siRNA κατά του MAPK-1<sup>119</sup>. Αυτά τα εξωσώματα παραδόθηκαν σε ανθρώπινα μονοκύτταρα του αίματος και αποτελεσματικά σίγησαν το γονίδιο. Σε καμία από τις δύο μελέτες δεν παρατηρήθηκε ανοσολογική απόκριση, το οποίο καθιστά τα εξωσώματα «έξυπνα» εργαλεία στοχευμένης θεραπείας.

Βάσει των μελετών που περιγράφηκαν, θα μπορούσαν να προταθούν διάφορα επίπεδα στόχευσης μέσω των εξωσωμάτων στη νόσο του Parkinson. Εφόσον τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της α-συνουκλεΐνης έχουν μεγάλη σημασία για τη νευρωνική ομοιόσταση, μία προσέγγιση θα ήταν η χορήγηση siRNA κατά του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης, το οποίο θα οδηγούσε σε μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης, μείωση της έκκρισής και εν δυνάμει επιβράδυνση της εξάπλωσης της παθολογίας και εξέλιξης των συμπτωμάτων της νόσου Parkinson. Με την ίδια λογική θα ήταν αποτελεσματική και η στόχευση μονοπατιών αποικοδόμησης της πρωτεΐνης, τα οποία υπολειπώνονται λόγω υπερβολικών επιπέδων της πρωτεΐνης<sup>33</sup>, ύπαρξης ολιγομερών ή παρουσίας μεταλλαγμένων μορφών<sup>34</sup>. Για παράδειγμα, θα μπορούσε να στοχευθεί η αύξηση της λειτουργίας του πρωτεασώματος και της μακροαυτοφαγίας, ώστε να υπάρχει αποτελεσματικότητα στην αποδόμηση ανώμαλα διπλωμένων μορφών α-συνουκλεΐνης από το ίδιο το κύτταρο. Οι ιοί χρησιμοποιούνται ευρέως ως φορείς γονιδιακής θεραπείας μέσω της πυροδότησης της έκφρασης της ντοπαμίνης ή/και πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ανακύκλωση και το μεταβολισμό της. Η αποτελεσματική πρόσληψη των εξωσωμάτων από κύτταρα σημαίνει ότι ίσως μπορούν να αντικαταστήσουν τους ιούς ως φορείς γονιδιακής θεραπείας εφόσον τα εξωσώματα σχεδιάζονται ώστε να έχουν κατάλληλη στόχευση και περιορισμένες μη-

ειδικές αλληλεπιδράσεις. Τέλος, τα εξωσώματα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς «φυσικής» θεραπείας. Για παράδειγμα, οι σαπερόνες θερμικού σοκ (HSPs), βρίσκονται επίσης σε αφθονία μέσα στα εξωσώματα. Επομένως, η κατασκευή εξωσωμάτων στα οποία οι σαπερόνες αυτές διατηρούν τη λειτουργικότητά τους και στοχεύοντάς τα σε περιοχές που είναι επιρρεπείς στη δημιουργία εγκλείστων, θα οδηγούσε στον περιορισμό της ανώμαλης αναδίπλωσης πρωτεϊνών.



## VI. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

1. Φυγόκεντρος για επεξεργασία καλλιεργητικού μέσου Biofuge Stratos Heraus (Thermo Scientific)
2. Φυγόκεντρος για απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων Centrifuge 5804R (eppendorf)
3. Υπερφυγόκεντρος για απομόνωση εξωσωμάτων: Sorvall Discovery 100SE T8100 rotorhead (Thermo Scientific)
4. Μετρήσεις χημειοφωταύγειας ELISA: Anthos Mikrosysteme GmbH Lucy και Software ADAP Anthos Labtech Instruments Version 1.6

## VII. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

### 1. Κυτταρικές καλλιέργειες

Για τις κυτταρικές καλλιέργειες των κυττάρων SH-SY5Y, καθώς και για τις πρωτογενείς καλλιέργειες φλοιικών νευρώνων χρησιμοποιήθηκαν:

- Θρεπτικό υλικό: RPMI 1640-Roswell Park Memorial Institute (#31870025, Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).
- Neurobasal Medium (#21103-049, Gibco Life Technologies, Invitrogen)
- HBSS: Hank's Balanced Salt Solution (# 14180-046, Invitrogen)
- 25% TRYPSIN-EDTA: (#25200-072, Gibco Life Technologies, Invitrogen)
- DMSO: Dimethyl Sulfoxide (#100950636, Sigma)
- Ορός εμβρύου βοός: Fetal Bovine Serum-FBS (#S1500, Biowest, Nuaille, France).
- B-27 Serum-Free Supplement (#7504044 Gibco Life Technologies, Invitrogen)
- Μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνη: Penicillin-Streptomycin (#P4458, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- Συμπληρωματικό αμινοξύ: L-γλουταμίνης-L-glutamine (#21051024, Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

- all-trans-Πετινοϊκό Οξύ (all-trans -RA: (#R2625, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).
- DNAση: (DNase, #D 4527-20, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Τρυψίνη: (trypsin, #T4674, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Πολυ- D -λυσίνη: (Poly-D-Lysine, #P1024-500MG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

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

Για την διατήρηση των SH-SY5Y επαγόμενης έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν τα αντιβιοτικά:

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

## 2. Ανοσοστύπωμα κατά Western

- Για την εκχύλιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το μείγμα αναστολέων πρωτεασών σε σκεύασμα: Complete, Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets (#11836153001, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN).
- Το μείγμα δεικτών γνωστού μοριακού βάρους για τις πρωτεΐνες: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#SM0671)
- Διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων (*sample buffer*): DualColor™ Protein Loading Buffer Pack (#R1011) της εταιρείας Fermentas (Vilnius, Lithuania).
- Αντιδραστήριο Bradford (Bio-Rad Protein Assay, #500-0006) για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών
- Μείγμα ακρυλαμίδιου/bis-ακρυλαμίδιου: 30% Acrylamide/Bis Solution (#161-0157) και οι συσκευές ηλεκτροφόρησης και μεταφοράς αγοράστηκαν από την εταιρεία Bio-Rad (Munich, Germany).

- Η νιτροκυτταρίνη [Protran BA Nitrocellulose (0.45  $\mu$ M)] που χρησιμοποιήθηκε για τη μεταφορά των πρωτεϊνών αγοράστηκε από την Schleicher & Schuell (Keene NH, USA).
- X RAY φιλμ (Super RX Film) αγοράστηκε από την εταιρεία Fuji Medical (Tokyo, Japan).

### **3. Φθορίζοντα μόρια για παρατήρηση με συνεστιακή μικροσκοπία**

- Hoechst 33342: (bisBenzimide H 33342 trihydrochloride, # B2261, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Calcein-AM: (#C3099, 1mg/ml solution in dry DMSO, Molecular Probes, Invitrogen Ltd, Carlsbad, USA)
- BODIPY-TR-CERAMIDE (#D-7540 Molecular Probes, Life Technologies)

### **4. Δοκιμασία εστεράσης κατά Ellman**

- 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (# D8130, Sigma)
- Υπόστρωμα ακετυλοθειοχολίνη (Acetylthiocholine iodide, ACh) (#A5751, Sigma)
- Ένζυμο ακετυλοθειοχολινστερινάσης (Acetylcholinesterase from bovine erythrocytes AChE) (#C5021, Sigma)

## VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abeliovich, a *et al.* Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* **25**, 239–52 (2000).
2. Kingdom, U.  $\alpha$ -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **95**, 6469–6473 (1998).
3. Trojanowski JQ, L. V. Y. Aggregation of neurofilament and  $\alpha$ -synuclein proteins in lewy bodies: Implications for the pathogenesis of parkinson disease and lewy body dementia. *Archives of Neurology* **55**, 151–152 (1998).
4. Bisaglia, M., Mammi, S. & Bubacco, L. Structural insights on physiological functions and pathological effects of alpha-synuclein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**, 329–40 (2009).
5. Zhu, M. & Fink, A. L. Lipid binding inhibits alpha-synuclein fibril formation. *The Journal of biological chemistry* **278**, 16873–7 (2003).
6. Yavich, L., Tanila, H., Vepsäläinen, S. & Jäkälä, P. Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 11165–70 (2004).
7. Gureviciene, I., Gurevicius, K. & Tanila, H. Role of  $\alpha$ -synuclein in synaptic glutamate release. *Neurobiology of Disease* **28**, 83–89 (2007).
8. Nemani, V. M. *et al.* NIH Public Access. **65**, 66–79 (2011).
9. Greten-Harrison, B. *et al.*  $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 19573–8 (2010).
10. Tobaben, S. *et al.* A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. *Neuron* **31**, 987–99 (2001).
11. Sharma, M., Burré, J. & Südhof, T. C. CSP $\alpha$  promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nature cell biology* **13**, 30–9 (2011).
12. Chandra, S., Gallardo, G., Fernández-Chacón, R., Schlüter, O. M. & Südhof, T. C. Alpha-synuclein cooperates with CSP $\alpha$  in preventing neurodegeneration. *Cell* **123**, 383–96 (2005).
13. Burré, J. *et al.* Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science (New York, N.Y.)* **329**, 1663–7 (2010).
14. Darios, F. *et al.* Alpha-synuclein sequesters arachidonic acid to modulate SNARE-mediated exocytosis. *EMBO reports* **11**, 528–33 (2010).

15. Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* **39**, 889–909 (2003).
16. Irvine, G. B., El-Agnaf, O. M., Shankar, G. M. & Walsh, D. M. Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **14**, 451–64 (2008).
17. Bate, C., Gentleman, S. & Williams, A. A-Synuclein Induced Synapse Damage Is Enhanced By Amyloid-B1-42. *Molecular neurodegeneration* **5**, 55 (2010).
18. Hollmann, M. *et al.* Mutation in the  $\alpha$ -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. **276**, 2045–2047 (1997).
19. Kruger, R. *et al.* AlaSOPro mutation in the gene encoding [alpha]-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* **18**, 106–108 (1998).
20. Zarranz, J. J. *et al.* The new mutation, E46K, of  $\alpha$ -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. *Annals of Neurology* **55**, 164–173 (2004).
21. Chartier-Harlin, M.-C. *et al.*  $\alpha$ -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *The Lancet* **364**, 1167–1169 (2004).
22. Singleton, A. B. *et al.*  $\alpha$ -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. **302**, 2003 (2003).
23. Li, J., Uversky, V. N. & Fink, A. L. Effect of Familial Parkinson's Disease Point Mutations A30P and A53T on the Structural Properties, Aggregation, and Fibrillation of Human  $\alpha$ -Synuclein<sup>†</sup>. *Biochemistry* **40**, 11604–11613 (2001).
24. Conway, K. A. *et al.* Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both  $\alpha$ -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 571–576 (2000).
25. Conway, K. a, Harper, J. D. & Lansbury, P. T. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nature medicine* **4**, 1318–20 (1998).
26. Choi, W. *et al.* Mutation E46K increases phospholipid binding and assembly into filaments of human alpha-synuclein. *FEBS letters* **576**, 363–368 (2004).
27. Vekrellis, K., Xilouri, M., Emmanouilidou, E. & Stefanis, L. Inducible over-expression of wild type alpha-synuclein in human neuronal cells leads to caspase-dependent non-apoptotic death. *Journal of neurochemistry* **109**, 1348–62 (2009).
28. Emmanouilidou, E. *et al.* Cell-Produced  $\alpha$ -Synuclein Is Secreted in a Calcium-Dependent Manner by Exosomes and Impacts Neuronal Survival. **30**, 6838–6851 (2010).
29. Conway, K. A., Rochet, J.-C., Bieganski, R. M. & Lansbury, P. T. Kinetic Stabilization of the  $\alpha$ -Synuclein Protofibril by a Dopamine- $\alpha$ -Synuclein Adduct. *Science* **294**, 1346–1349 (2001).

30. Paleologou, K. E. *et al.* Phosphorylation at Ser-129 but not the phosphomimics S129E/D inhibits the fibrillation of alpha-synuclein. *The Journal of biological chemistry* **283**, 16895–905 (2008).
31. Paleologou, K. E. *et al.* Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 3184–98 (2010).
32. Lee, K.-W. *et al.* Enhanced phosphatase activity attenuates  $\alpha$ -synucleinopathy in a mouse model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**, 6963–71 (2011).
33. Emmanouilidou, E., Stefanis, L. & Vekrellis, K. Cell-produced  $\alpha$ -synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiology of aging* **31**, 953–968 (2010).
34. Xilouri, M., Vogiatzi, T., Vekrellis, K., Park, D. & Stefanis, L. Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PloS one* **4**, e5515 (2009).
35. El-Agnaf, O. M. a *et al.* 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 (2006).
36. Braak, H. *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging* **24**, 197–211 (2003).
37. Burke, R. E., Dauer, W. T. & Vonsattel, J. P. G. A critical evaluation of the Braak staging scheme for Parkinson's disease. *Annals of Neurology* **64**, 485–491 (2008).
38. Borghi, R. *et al.* Full length a-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and normal subjects. **287**, 65–67 (2000).
39. Emmanouilidou, E. *et al.* Assessment of  $\alpha$ -synuclein secretion in mouse and human brain parenchyma. *PloS one* **6**, e22225 (2011).
40. Lee, H.-J., Patel, S. & Lee, S.-J. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 6016–24 (2005).
41. Savina, A., Furlán, M., Vidal, M. & Colombo, M. I. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *The Journal of biological chemistry* **278**, 20083–90 (2003).
42. Langston, J. W., Forno, L. S., Tetrud, J. & Reeves, A. G. Evidence of Active Nerve Cell Degeneration in the Substantia Nigra of Humans Years. 598–605 (1999).
43. Zhang, W. *et al.* Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 533–42 (2005).

44. Su, X. *et al.* Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiology of aging* **29**, 1690–1701 (2008).
45. Zhang, W. *et al.* Aggregated  $\alpha$ -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *The FASEB Journal* **19**, 533–542 (2005).
46. Lee, H.-J. *et al.* Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular  $\alpha$ -synuclein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 1835–1849 (2008).
47. Lashuel, H. A. *et al.*  $\alpha$ -Synuclein, Especially the Parkinson's Disease-associated Mutants, Forms Pore-like Annular and Tubular Protofibrils. *Journal of Molecular Biology* **322**, 1089–1102 (2002).
48. Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B. & Olanow, C. W. Lewy body – like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. 6–8 (2008).doi:10.1038/nmXXXX
49. Li, J.-Y. *et al.* Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* **14**, 501–503 (2008).
50. Desplats, P. *et al.* Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13010–5 (2009).
51. Hansen, C. *et al.*  $\alpha$ -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. **121**, 715–725 (2011).
52. Angot, E. *et al.* Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons in vivo. *PloS one* **7**, e39465 (2012).
53. Luk, K. C. *et al.* Pathological  $\alpha$ -Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like Neurodegeneration in Nontransgenic Mice. *Science* **338**, 949–953 (2012).
54. Hebert, D. N. & Molinari, M. In and Out of the ER : Protein Folding , Quality Control , Degradation , and Related Human Diseases. 1377–1408 (2007).doi:10.1152/physrev.00050.2006.
55. Rubartelli, A., Cozzolinol, F., Talio, M. & Sitia, R. protein. **9**, 1503–1510 (1984).
56. Duran, J. M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W. F. & Malhotra, V. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *The Journal of cell biology* **188**, 527–36 (2010).
57. Nickel, W. & Rabouille, C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 148–55 (2009).
58. Nickel, W. The unconventional secretory machinery of fibroblast growth factor 2. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **12**, 799–805 (2011).

59. Ebert, A. D. *et al.* Tec-kinase-mediated phosphorylation of fibroblast growth factor 2 is essential for unconventional secretion. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **11**, 813–26 (2010).
60. Locher, K. P. Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **364**, 239–45 (2009).
61. Wolf, A., Bauer, B. & Hartz, A. M. S. ABC Transporters and the Alzheimer's Disease Enigma. *Frontiers in psychiatry / Frontiers Research Foundation* **3**, 54 (2012).
62. ElAli, A. & Hermann, D. M. ATP-binding cassette transporters and their roles in protecting the brain. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **17**, 423–36 (2011).
63. Simons, M. & Raposo, G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current opinion in cell biology* **21**, 575–81 (2009).
64. Février, B. & Raposo, G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 415–421 (2004).
65. Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A. & Altevogt, P. Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunology Letters* **107**, 102–108 (2006).
66. Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M. & Johnstone, R. M. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of cell biology* **101**, 942–8 (1985).
67. Denzer, K., Kleijmeer, M. J., Heijnen, H. F., Stoorvogel, W. & Geuze, H. J. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of cell science* **113 Pt 19**, 3365–74 (2000).
68. Vlassov, A. V, Magdaleno, S., Setterquist, R. & Conrad, R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1820**, 940–948 (2012).
69. De Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G. & Vidal, M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* **102**, 4336–44 (2003).
70. Trajkovic, K. *et al.* Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)* **319**, 1244–7 (2008).
71. Record, M., Subra, C., Silvente-Poirot, S. & Poirot, M. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochemical pharmacology* **81**, 1171–82 (2011).
72. Mathivanan, S., Fahner, C. J., Reid, G. E. & Simpson, R. J. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Research* (2011).at <<http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2011/10/11/nar.gkr828.abstract>>



73. Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L. & Turbide, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry* **262** , 9412–9420 (1987).
74. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**, 654–659 (2007).
75. Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K. & Ochiya, T. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence* **1**, 7 (2010).
76. Al-Nedawi, K. *et al.* Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* **10**, 619–624 (2008).
77. Alvarez-Erviti, L. *et al.* Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotech* **29**, 341–345 (2011).
78. Pegtel, D. M. *et al.* Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 6328–33 (2010).
79. Leblanc, P. *et al.* Retrovirus infection strongly enhances scrapie infectivity release in cell culture. *The EMBO journal* **25**, 2674–85 (2006).
80. Chertova, E. *et al.* Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *Journal of virology* **80**, 9039–52 (2006).
81. Izquierdo-Useros, N. *et al.* HIV and Mature Dendritic Cells: Trojan Exosomes Riding the Trojan Horse? *PLoS Pathog* **6**, e1000740 (2010).
82. Smalheiser, N. R. Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. *Biology direct* **2**, 35 (2007).
83. Ghidoni, R., Benussi, L. & Binetti, G. Exosomes: The Trojan horses of neurodegeneration. *Medical hypotheses* **70**, 1226–1227 (2008).
84. Rajendran, L. *et al.* Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103** , 11172–11177 (2006).
85. Fevrier, B. *et al.* Cells release prions in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9683–8 (2004).
86. Saman, S. *et al.* Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry* **287**, 3842–9 (2012).
87. Stoorvogel, W. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood* **119**, 646–8 (2012).

88. Morelli, A. E. *et al.* Endocytosis , intracellular sorting , and processing of exosomes by dendritic cells. **104**, 3257–3266 (2004).
89. Subra, C. *et al.* Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *Journal of lipid research* **51**, 2105–20 (2010).
90. Vekrellis, K. *et al.* Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 1657–65 (2000).
91. Park, J. W., Vahidi, B., Taylor, A. M., Rhee, S. W. & Jeon, N. L. Microfluidic culture platform for neuroscience research. *Nature protocols* **1**, 2128–36 (2006).
92. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology* (2001).at <<http://dx.doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>>
93. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres jr., V. & Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**, 88–95 (1961).
94. Marks, D. L., Bittman, R. & Pagano, R. E. Use of Bodipy-labeled sphingolipid and cholesterol analogs to examine membrane microdomains in cells. *Histochemistry and cell biology* **130**, 819–32 (2008).
95. Laulagnier, K. *et al.* Characterization of exosome subpopulations from RBL-2H3 cells using fluorescent lipids. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **35**, 116–121 (2005).
96. Grant, B. D. & Donaldson, J. G. NIH Public Access. **10**, 597–608 (2011).
97. Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 513–525 (2009).
98. Zheng, L. *et al.* Intracellular distribution of amyloid beta peptide and its relationship to the lysosomal system. *Translational Neurodegeneration* **1**, 19 (2012).
99. Fauré, J. *et al.* Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Molecular and Cellular Neuroscience* **31**, 642–648 (2006).
100. Lachenal, G. *et al.* Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Molecular and Cellular Neuroscience* **46**, 409–418 (2011).
101. Volpicelli-daley, L. A. *et al.* NIH Public Access. **72**, 57–71 (2012).
102. Freundt, E. C. *et al.* Neuron-to-neuron transmission of  $\alpha$ -synuclein fibrils through axonal transport. *Annals of Neurology* **72**, 517–524 (2012).
103. Alvarez-Erviti, L. *et al.* Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiology of disease* **42**, 360–7 (2011).

104. Danzer, K. M. *et al.* Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Molecular neurodegeneration* **7**, 42 (2012).
105. Fujiki, Y., Hubbard, a L., Fowler, S. & Lazarow, P. B. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* **93**, 97–102 (1982).
106. Von Bartheld, C. S. & Altick, A. L. Multivesicular bodies in neurons: Distribution, protein content, and trafficking functions. *Progress in Neurobiology* **93**, 313–340 (2011).
107. Popov, V. I. *et al.* A cell adhesion molecule mimetic, FGL peptide, induces alterations in synapse and dendritic spine structure in the dentate gyrus of aged rats: a three-dimensional ultrastructural study. *European Journal of Neuroscience* **27**, 301–314 (2008).
108. Stewart, M. G. *et al.* Stress suppresses and learning induces plasticity in CA3 of rat hippocampus: A three-dimensional ultrastructural study of thorny excrescences and their postsynaptic densities. *Neuroscience* **131**, 43–54 (2005).
109. Rind, H. B., Butowt, R. & Von Bartheld, C. S. Synaptic targeting of retrogradely transported trophic factors in motoneurons: comparison of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor, and cardiotrophin-1 with tetanus toxin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 539–49 (2005).
110. Taylor, A. R., Robinson, M. B., Gifondorwa, D. J., Tytell, M. & Milligan, C. E. Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: Role of signaling kinases. *Developmental Neurobiology* **67**, 1815–1829 (2007).
111. Potolicchio, I. *et al.* Proteomic Analysis of Microglia-Derived Exosomes: Metabolic Role of the Aminopeptidase CD13 in Neuropeptide Catabolism. *The Journal of Immunology* **175** , 2237–2243 (2005).
112. Krömer-Albers, E. M. *et al.* Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics. Clinical Applications* **1**,
113. Vella, L. J., Greenwood, D. L. V, Cappai, R., Scheerlinck, J.-P. Y. & Hill, A. F. Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **124**, 385–393 (2008).
114. Clough, R. L., Dermentzaki, G. & Stefanis, L. Functional dissection of the  $\alpha$ -synuclein promoter: transcriptional regulation by ZSCAN21 and ZNF219. *Journal of Neurochemistry* **110**, 1479–1490 (2009).
115. Vekrellis, K. & Stefanis, L. Targeting intracellular and extracellular alpha-synuclein as a therapeutic strategy in Parkinson’s disease and other synucleinopathies. *Expert opinion on therapeutic targets* **16**, 421–32 (2012).

116. Masliah, E. *et al.* Passive immunization reduces behavioral and neuropathological deficits in an alpha-synuclein transgenic model of Lewy body disease. *PloS one* **6**, e19338 (2011).
117. Masliah 2005 immunization.pdf.
118. Cantaluppi, V. *et al.* Microvesicles derived from endothelial progenitor cells enhance neoangiogenesis of human pancreatic islets. *Cell Transplant* **21**, 1305–1320 (2012).
119. Wahlgren, J., Karlson, T. D. L., Brisslert, M. & Sani, F. V. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. 1–12 (2012).doi:10.1093/nar/gks463
120. Vekrellis, K., Minakaki, G. & Emmanouilidou, E. Effects of Alpha-Synuclein on Cellular Homeostasis. (2010).