



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ»

ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΜΟΥ ΣΕ
ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

ΜΑΣΤΟΡΑ ΕΥΔΟΚΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ, Ε.Κ.Π.Α.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2019



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΟΝΑΔΑ Ι

ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΜΟΥ ΣΕ
ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

ΜΑΣΤΟΡΑ ΕΥΔΟΚΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ, Ε.Κ.Π.Α.

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: Διδώ Βασιλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Διδώ Βασιλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Διαμάντης Σίδερης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2019

Δηλώνω υπεύθυνα ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε κατά το Ακαδημαϊκό έτος 2017-2018 στον τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης «Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική».

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Διδώ Βασιλακοπούλου για το αμείωτο και συνεχές ενδιαφέρον από την αρχική ανάθεση της παρούσας μελέτης μέχρι το τέλος της. Την ευχαριστώ για τη συμπαράσταση καθοριστικής σημασίας και την καθοδήγηση κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους, την υλικοτεχνική στήριξη καθώς και για τις υποδείξεις κατά το συγγραφικό έργο. Σημαντική επίσης ήταν η ηθική στήριξη σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο όταν προέκυπταν απαιτητικές εργαστηριακές στιγμές.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής: τον Καθηγητή Ανδρέα Σκορίλα και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Διαμάντη Σίδηρη για τη συμμετοχή τους στην επιτροπή καθώς και για το χρόνο που διέθεσαν.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χριστίνα Ντάλλα για την εκμάθηση των εργαστηριακών τεχνικών αλλά κυρίως για τη βοήθεια, την ενθάρρυνση και την αμέριστη συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής μου πορείας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Μανώλη Βουράκη για τις πολύτιμες συμβουλές του καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής μονάδας Ι: τον κο. Νίκο Αρβανίτη, τον Βαγγέλη Καλαντζή, την Κατερίνα Στέφη και τον Δημήτρη Αρβανίτη για την ομαλή συνεργασία και όλες τις εργαστηριακές στιγμές που μοιραστήκαμε.

Τέλος, μία ξεχωριστή αναφορά ευγνωμοσύνης στην οικογένειά μου, στους γονείς μου Όλγα και Βασίλη, στον αδερφό μου Γιάννη καθώς και στους φίλους μου για την απεριόριστη στήριξη τόσο σε ψυχολογικό όσο και σε οικονομικό επίπεδο κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η συνεισφορά τους ήταν καταλυτική για την πραγματοποίηση και περάτωσή της.

Αθήνα, 2019

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- AD: Alzheimer's Disease, Νόσος του Alzheimer
- APP: Amyloid Precursor Protein, Πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς
- APS: Ammonium Persulfate, Υπερθειικό αμμώνιο
- APS I: Autoimmune polyendocrine syndrome type I, Αυτοάνοσο πολυενδοκρινικό σύνδρομο τύπου I
- ASYN: α -synuclein, α -συνουκλεΐνη
- BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, p toluidine salt, 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-φωσφορικό μετά της τολουιδίνης άλας
- BPD: Borderline personality disorder, μεταιχμιακή διαταραχή προσωπικότητας
- BSA: bovine serum albumin, Αλβουμίνη ορού βοός
- Carbidopa : α -methyl-Dopahydrazine, α -μεθυλ-υδραζίνη
- cDNA: complementary DNA, Συμπληρωματικό DNA
- COMT: catechol-O-methyltransferase, κατεχολ-Ο-μεθυλτρανσφεράση
- DA: dopamine, 3,4-dihydroxy-phenethylamine, 3,4-διϋδρόξυ-φαινυλαιθυλαμίνη
- DBH: Dopamine β -hydroxylase, β -υδροξυλάση της Ντοπαμίνης
- DDC: L-Dopa decarboxylase, L-Dopa αποκαρβοξυλάση
- DDC 442: L-Dopa αποκαρβοξυλάση που αποτελείται από 442 αμινοξέα
- DDC 480: L-Dopa αποκαρβοξυλάση που αποτελείται από 480 αμινοξέα
- DMF: Dimethylformamide, Διμεθυλοφορμαμίδιο
- DMSO: Dimethyl sulfoxide, Διμεθυλοσουλφοξείδιο
- DNA: Deoxyribonucleic Acid, Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
- LB: Lewy Bodies, σωματία Lewy
- LC: locus coeruleus, υπομέλας τόπος
- L-Dopa: L-3,4-dihydroxyphenylalanine, λεβοντόπα, L-3,4-διϋδροξυφαινυλαλανίνη
- MAO-B: Monoamine oxidase B, Οξειδάση της μονοαμίνης B
- mRNA: messenger RNA, Μήνυμα RNA

- NBT: nitro blue tetrazolium chloride, (3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenylene)bis[2,(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H]- chloride, 2,2'-δινιτροφαινυλ-5,5'-δифαινυλ-3,3'-(3,3'-διμεθοξυ-4,4'-δифαινυλεν-χλωριούχο) τετραζόλιο
- ND: neurodegenerative disease, νευροεκφυλιστική ασθένεια
- NFTs: Neurofibrillary tangles, νευροϊνιδιακοί κόμβοι
- NPAGE: Nondenaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες
- NSD-1015: 3-hydroxybenzyl hydrazine, 3-υδροξυ-βενζυλ-υδραζίνη
- PBS: Phosphate buffered saline, Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
- PCR: Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- PD: Parkinson's Disease, Νόσος του Parkinson
- PKA: cAMP dependent protein kinase, Πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από το cAMP
- PKC: protein kinase C, Πρωτεϊνική κινάση C
- PLP: 5-pyridoxal-phosphate, 5-φωσφορική πυριδοξάλη
- PNMT: phenylethanolamine N-methyltransferase, φαινυλαιθανολαμιν-N-μεθυλοτρανφεράση
- ROS: reactive oxygen species, δραστικές μορφές οξυγόνου
- PSCs: pluripotent stem cells, πολυδύναμα βλαστοκύτταρα
- RT: room temperature, Θερμοκρασία δωματίου
- RPM: revolutions per minute, στροφές ανά λεπτό
- SCLC: small cell lung cancer, μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα
- SDS: sodium dodecyl sulfate, θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο
- SNpc: substantia nigra pars compacta, συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας
- TCA: trichloroacetic acid, τριχλωροξικό οξύ
- TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine, N,N,N',N'-τετραμεθυλαμινομεθάνιο
- TH: tyrosine hydroxylase, υδροξυλάση τυροσίνης
- TPH: tryptophan hydroxylase, υδροξυλάση τρυπτοφάνης
- Tris : Tris (hydroxymethyl) aminomethane, τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθάνιο
- Tween 20: polyoxyethylen-sorbitan-monolaurate, πολυοξυαιθυλεν-σορβιτο-μονολαουρικό

- UTR: Untranslated region, Αμετάφραστη περιοχή
- UPS: Ubiquitin Proteasome system, Σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος
- v/v: volume per volume, Συγκέντρωση επί τοις εκατό όγκο κατ' όγκο, (ml διαλυμένης ουσίας ανά 100 ml διαλύτη)
- VMAT2: Vesicular monoamine transporter 2, Κυστικός μεταφορέας της μονοαμίνης 2
- VTA: ventral tegmental area, καλυπτρική κοιλιακή περιοχή
- w/v: weight per volume, Συγκέντρωση επί τοις εκατό βάρος κατ' όγκο, (g διαλυμένης ουσίας ανά 100 ml διαλύτη)
- ΕΝΥ: εγκεφαλονωτιαίο υγρό
- ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
- ΠΝΣ: Περιφερικό Νευρικό Σύστημα
- 5-HT : 5-hydroxytryptamine, serotonin, 5-υδροξυτρυπταμίνη, σεροτονίνη
- 5-HTP: 5-hydroxytryptophan, 5-υδροξυτρυπτοφάνη

Πίνακας Περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. 1. Εισαγωγή στο νευροεκφυλισμό	1
1.1.1. Μηχανισμοί Νευροεκφυλισμού	4
1.2. Η νόσος του Alzheimer (Alzheimer’s disease)	7
1.2.1. Παθοφυσιολογία της AD	7
1.2.2. Αιτιολογία της AD.....	8
1.2.3. Διάγνωση της AD.....	9
1.2.4. Η Πρόδρομη Πρωτεΐνη του Αμυλοειδούς-APP	9
1.2.4.1. Η επεξεργασία της APP	11
1.2.4.2. Η υπόθεση του αμυλοειδούς	12
1.2.4.3. Η σύνδεση της APP με την PD	14
1.2.5. Οι Νευροϊνιδιακοί κόμβοι (NFTs) και η Πρωτεΐνη Ταυ	15
1.2.6. Οι πρεσενιλίνες	16
1.3. Η νόσος του Parkinson (Parkinson’s disease)	19
1.3.1. Παθοφυσιολογία της PD	20
1.3.2. Αιτιολογία της PD.....	23
1.3.3. Διάγνωση και Συμπτωματολογία της PD	25
1.3.4. Η πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη (ASYN) και τα σωματία Lewy (LB)	27
1.4. Η αποκαρβοξυλάση της L-Dopa (DDC)	32
1.4.1. Ο ρόλος της DDC και έκφραση σε διαφορετικούς οργανισμούς	32
1.4.2. Δομή και ιδιότητες της DDC	36
1.4.4. Ρύθμιση της ενεργότητας της DDC.....	40
1.4.5. Το γονίδιο της DDC	42
1.4.5.1. Ανεπάρκεια της DDC	45
1.4.6. Αναστολείς της DDC	47
1.4.6.1. Ο αναστολέας της DDC: NSD-1015.....	49
1.4.7. Η σύνδεση της L-Dopa με την PD.....	50
1.4.8. Η σύνδεση της DDC με την AD	52
1.5. Ντοπαμίνη	53
1.5.1. Σύνδεση Ντοπαμίνης και AD	56
1.5.2. Αλληλεπίδραση της Ντοπαμίνης με την α-συνουκλεΐνη	58
1.6. Κοινά χαρακτηριστικά των νευροεκφυλιστικών νόσων: AD και PD	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	65
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	68

3.1. Υλικά και Αντισώματα	68
3.2. Ρυθμιστικά Διαλύματα	70
3.3. Κυτταρικές Σειρές	73
3.4. Καλλιέργεια Ευκαρυωτικών Κυττάρων in vitro	75
3.4.1. Παρασκευή θρεπτικού υλικού.....	75
3.4.2. Απόψυξη κυττάρων από το υγρό άζωτο.....	76
3.4.3. Διαμοιρασμός κυττάρων (Split)- Ανακαλλιέργεια.....	77
3.4.4. Εξωγενής χορήγηση παραγόντων (Carbidopa, L-Dopa, DA, NSD-1015).....	78
3.4.5. Κατάψυξη και φύλαξη των κυττάρων στους -80 °C και στο υγρό άζωτο	79
3.5. Ανοσοσύτρωμα κατά Western (Western Blot)	80
3.5.1. Συλλογή κυττάρων- Απομόνωση πρωτεϊνών.....	81
3.5.2. Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford....	81
3.5.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με SDS- PAGE σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.....	83
3.5.4. Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοσύτρωση κατά Western (Western Blot).	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	87
4.1. Μελέτη της επίδρασης των παραγόντων Carbidopa, L-Dopa, DA και NSD-1015 στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO	87
4.1.1. Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20 μM, 100 μM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία και στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στην κυτταρική σειρά CHO.....	87
4.1.2. Μελέτη της επίδρασης της L-Dopa (0.5 mM, 0.7 mM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία και στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στην κυτταρική σειρά CHO.....	88
4.1.3. Μελέτη της επίδρασης του NSD-1015 (170 μM, 230 μM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία και στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στην κυτταρική σειρά CHO.....	89
4.1.4. Μελέτη της επίδρασης της DA (25 μM, 75 μM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία και στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στην κυτταρική σειρά CHO.....	91
4.2. Μελέτη της επίδρασης της DDC στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP	92
4.2.1. Μελέτη της επίδρασης της πλήρους μήκους DDC και των ισομορφών της στην καρβοξυτελική επεξεργασία της APP	93
4.2.2. Μελέτη της επίδρασης της πλήρους μήκους DDC και των ισομορφών της στην αμυλοειδογενή επεξεργασία της APP και στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων	94
4.3. Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την πλήρους μήκους DDC και τις εναλλακτικές ισομορφές της	95
4.3.1. Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20μM και 100μM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO	95

4.3.2. Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20μM και 100μM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία και το σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στην κυτταρική σειρά CHO/DDC	96
4.3.3. Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20μM και 100μM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO/DDC-3	98
4.3.4. Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20μM και 100μM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO/Alt-DDC.....	99
4.3.5. Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20μM και 100μM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC	99
4.3.6. Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20μM και 100μM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y	101
4.4. Μελέτη της επίδρασης της L-Dopa στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την πλήρους μήκους DDC και τις εναλλακτικές ισομορφές της	102
4.4.1. Μελέτη της επίδρασης της L-Dopa (0.34 mM, 0.5 mM, 0.7 mM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με τη χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της APP	102
4.4.2. Μελέτη της επίδρασης της L-Dopa (0.34 mM, 0.7 mM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με τη χρήση αντισώματος έναντι του Αβ	105
4.5. Μελέτη της επίδρασης της DA στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την πλήρους μήκους DDC και τις εναλλακτικές ισομορφές της	106
4.5.1. Μελέτη της επίδρασης της DA (25μM, 75μM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με τη χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της APP	107
4.6. Μελέτη της επίδρασης της 3-υδροξυ-βενζυλ-υδραζίνης (NSD-1015) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την πλήρους μήκους DDC και τις εναλλακτικές ισομορφές της	109
4.6.1. Μελέτη της επίδρασης του NSD-1015 (170 μM, 230 μM) στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC.....	109
4.6.2. Μελέτη της επίδρασης του NSD-1015 (170 μM, 230 μM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC	110
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	113
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	123
ABSTRACT	125
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	127

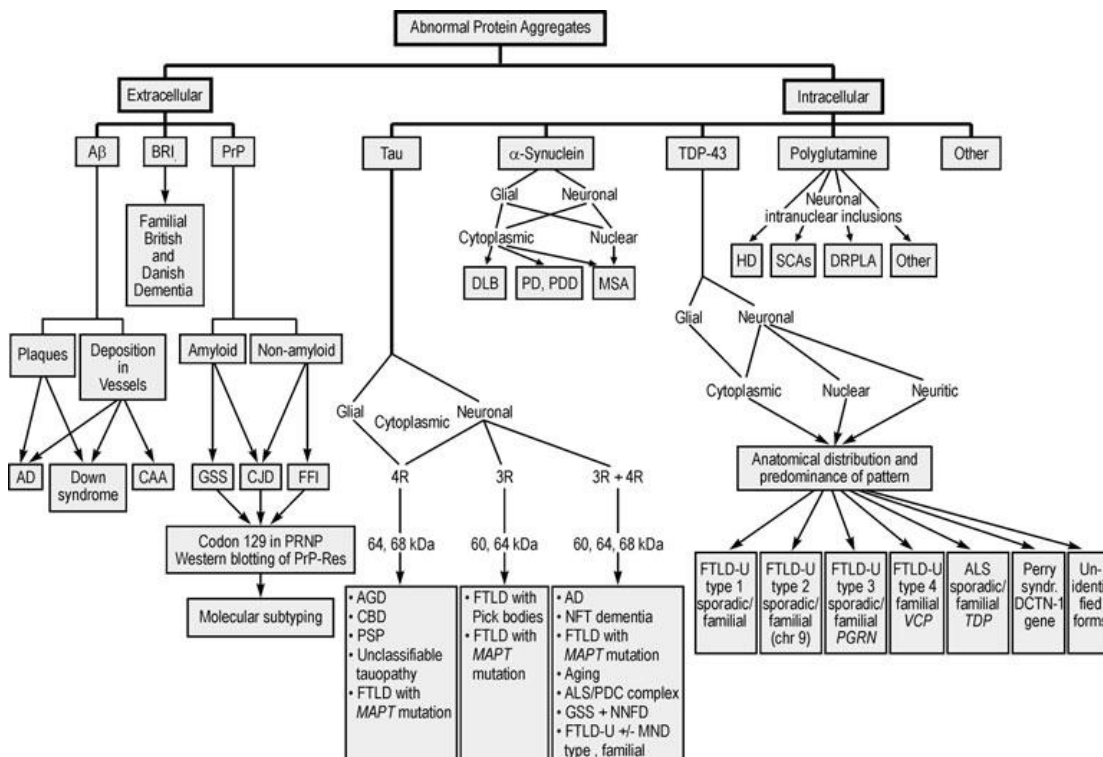
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. 1. Εισαγωγή στο νευροεκφυλισμό

Ο όρος εκφυλισμός αναφέρεται στην αλλαγή μίας μορφής από μία υψηλότερη κατάσταση σε μία χαμηλότερη με επιδείνωση των πνευματικών, φυσικών ή ηθικών αξιών [1]. Η πρώτη χρήση σε τίτλο ιατρικού περιοδικού έγινε το 1843 [2]. Μετά τον Β' Παγκόσμιο Πόλεμο ο όρος εκφυλισμός έπαψε να έχει χρήση στη γενετική και την ψυχιατρική αλλά παρέμεινε ως όρος που δηλώνει την έκπτωση των κυττάρων και των δομών [3]. Ο P.F.Bray θεωρείται ο συγγραφέας που συμπεριέλαβε το επίθετο «νευροεκφυλιστικός» σε ιατρικό άρθρο που δημοσιεύτηκε το 1965 σε Βρετανικό περιοδικό [4]. Ακόμη και σήμερα είναι δύσκολο να δοθεί ένας πλήρης ορισμός του νευροεκφυλισμού. Περιγράφεται ως η διαδικασία που οδηγεί σε μη αναστρέψιμη βλάβη και νέκρωση των νευρώνων, αποτελώντας το τελικό κοινό μονοπάτι που παρουσιάζεται κατά τη γήρανση και τις νευροεκφυλιστικές νόσους [5]. Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι αντιπροσωπεύουν μία μεγάλη ομάδα νευρολογικών διαταραχών με ετερογενή κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά. Προκύπτουν από άγνωστη αιτιολογία και εξελίσσονται με βίαιο τρόπο [6]. Παρουσιάζονται μέσω αργής προοδευτικής και μη αναστρέψιμης δυσλειτουργίας και απώλειας των νευρώνων και των συνάψεων σε συγκεκριμένα υποσύνολα του νευρικού συστήματος, που καθορίζουν την κλινική εικόνα και πορεία [7].

Η κατηγοριοποίηση των νευροεκφυλιστικών ασθενειών παραμένει μία πρόκληση, διότι ακόμη και σε μία δεδομένη ασθένεια η συμπτωματολογία διαφέρει σημαντικά [6]. Η διαγνωστική ακρίβεια είναι υψίστης σημασίας, καθώς επιτρέπει την εφαρμογή πιο αξιόπιστων και συγκεκριμένων οδηγιών θεραπείας και αντιμετώπισης [8]. Παρά τις δυσκολίες, η πιο δημοφιλής κατηγοριοποίηση των διαταραχών αυτών βασίζεται στο κυρίαρχο κλινικό χαρακτηριστικό ή στην τοπογραφία της κυρίαρχης αλλοίωσης ή συχνότερα στο συνδυασμό τους. Κατά συνέπεια οι διαταραχές του ΚΝΣ μπορούν να ομαδοποιηθούν σε ασθένειες του εγκεφαλικού φλοιού, των βασικών γαγγλίων, του εγκεφαλικού στελέχους, της παρεγκεφαλίδας και του νωτιαίου μυελού [6].

Οι κυριότερες νευροεκφυλιστικές νόσοι έχουν το χαρακτηριστικό της λανθασμένης αναδίπλωσης, συσσώρευσης και συσσωμάτωσης μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, που καθορίζει την παθογένεια της νόσου. Με έναν γενικότερο όρο μπορούν να περιγραφούν ως πρωτεϊνοπάθειες [7], [9]. Η υπόθεση που κυριαρχεί για τη δημιουργία αυτών των διαταραχών βασίζεται στον ανώμαλο μετασχηματισμό που υιοθετούν ορισμένες πρωτεΐνες όπως είναι η tau, η ASYN και τα πεππίδια του β αμυλοειδούς [9]. Έχει αποδειχθεί ότι, οι συσσωματωμένες πρωτεΐνες μπορούν να εξαπλωθούν από ένα κύτταρο ή μία περιοχή του εγκεφάλου σε άλλη κι αυτό να λειτουργήσει ως σπόρος, επάγοντας τη μη σωστή πτύχωση και συσσωμάτωση κι άλλων περιοχών που μέχρι πρότινος δεν είχαν επηρεαστεί [10].



Εικόνα 1.1.1.: Αλγόριθμος ταξινόμησης νευροεκφυλιστικών διαταραχών με εναποθέσεις πρωτεϊνών [7].

Οι κυριότερες νευροεκφυλιστικές ασθένειες είναι οι εξής : η νόσος Alzheimer (Alzheimer’s disease-AD), η νόσος Parkinson (Parkinson’s disease-PD), η νόσος Huntington (Huntington’s disease-HD), η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (amyotrophic lateral sclerosis-ALS), η μετωποκροταφική άνοια (frontotemporal dementia-FTD) και η νωτιαιοπαρεγκεφαλιδική αταξία

(spinocerebellar ataxias-SCA). Έχουν διαφορετική παθοφυσιολογία και επηρεάζουν τις γνωστικές λειτουργίες, την ικανότητα ομιλίας, κίνησης και αναπνοής [6], [9], [11].

Ο πιο σταθερός παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης μίας τέτοιας νόσου παραμένει η ηλικία. Με δεδομένο ότι έχει αυξηθεί το προσδόκιμο ζωής του πληθυσμού πάνω από τα 65 έτη στις βιομηχανοποιημένες χώρες και συνεχίζει να αυξάνεται, εικάζεται ότι, ο αριθμός των ατόμων που θα νοσήσουν από κάποια νευροεκφυλιστική ασθένεια θα αυξηθεί δραματικά [6]. Οι σοβαρές συνέπειες των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων επηρεάζουν περίπου 40 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως [12]. Οι επιπτώσεις επηρεάζουν σαφώς και την παγκόσμια οικονομία, με δεδομένο ότι οι Η.Π.Α. δαπανούν 226\$ δις ετησίως για την AD και 14,4\$ δις για την PD [13]. Αυτό μεταφράζεται σε ετήσιο κόστος ανά ασθενή για τη φαρμακευτική αγωγή, υποστηρικτική φροντίδα και έρευνα στα 45.805\$ [14].

Η AD είναι η πιο συχνή μορφή άνοιας, αποτελώντας το 60-80% των περιπτώσεων άνοιας και επηρεάζοντας περίπου 24 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως. Ο επιπολασμός της αυξάνεται εκθετικά με την πάροδο της ηλικίας που φτάνει μέχρι και την αύξηση κατά 15 φορές μεταξύ των ηλικιών 65-85 [8]. Επιπρόσθετοι παράγοντες κινδύνου, πέρα από την ηλικία, αποτελούν η παρουσία του αλληλίου ε4 της απολιποπρωτεΐνης E, η εγκεφαλοαγγειακή νόσος, η υπερλιπιδαιμία, το κάπνισμα, ο διαβήτης, η παχυσαρκία και ο τραυματισμός του εγκεφάλου. Αντίστοιχα, προστατευτικοί παράγοντες είναι το γνωστικό απόθεμα, η μεσογειακή διατροφή και η τακτική άσκηση [8]. Η PD αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη νευροεκφυλιστική νόσο μετά την AD και η συχνότητά της αυξάνεται επίσης δραματικά με την ηλικία, επηρεάζοντας το 1% του πληθυσμού άνω των 60 ετών και το 0,3% του γενικού πληθυσμού, ενώ η πρώιμη έναρξη οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες [8],[15]. Η επίπτωση κυμαίνεται μεταξύ 10 έως 50 στα 100.000 άτομα και ο επιπολασμός μεταξύ 100 έως 300 στα 100.000 άτομα του πληθυσμού. Συχνότερα πλήττει τους άντρες σε σύγκριση με τις γυναίκες εμφανίζοντας μία αναλογία 1:5 άντρας προς γυναίκα. Προστατευτικό ρόλο φαίνεται να έχουν: η καφεΐνη εξασθενώντας τη νευροτοξική δράση του MPTP, το κάπνισμα αναστέλλοντας της οξειδάση της μονοαμίνης B (MAO-B) και το ουρικό οξύ (UA-uric acid) ως αντιοξειδωτικό το οποίο εξασθενεί τις τοξίνες, που επάγονται από την πρωταρχική απώλεια νευρώνων σε κυτταροκαλλιέργειες. Αντίστοιχα στους παράγοντες κινδύνου υπάγονται: η έκθεση σε φυτοφάρμακα, ορισμένοι διαλύτες

και ειδικά όσοι είναι λιποφιλικό και συνεπώς μπορούν να διαπεράσουν το ΚΝΣ και το ΠΝΣ, η υπερκατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων και ο τραυματισμός του εγκεφάλου διότι μπορεί να διαταράξει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό επιτρέποντας στις νευροτοξίνες να διεισδύσουν στον εγκέφαλο. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι ο τραυματισμός μπορεί να αποτελέσει έναυσμα για τη συσσώρευση της ASYN [16].

Παρά την αύξηση του επιπολασμού και τις προσπάθειες για την ανεύρεση των μηχανισμών που προκαλούν τον νευροεκφυλισμό, δεν έχει βρεθεί κάποια ικανοποιητική θεραπεία [17]. Οι ήδη υπάρχουσες θεραπείες προσφέρουν συμπτωματική ανακούφιση, αλλά με την πάροδο του χρόνου καθίστανται αναποτελεσματικές και μάλιστα μπορεί να προκαλέσουν επιπλέον επιπλοκές [10].

1.1.1. Μηχανισμοί Νευροεκφυλισμού

Οι κυριότεροι μηχανισμοί του νευροεκφυλισμού εμπλέκουν γενετικούς, περιβαλλοντικούς και ενδογενείς παράγοντες των οποίων ο παθογόνος ρόλος και οι μοριακοί μηχανισμοί δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως [7]. Η κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τον νευροεκφυλισμό απαιτεί τη συνεργασία πολλών φορέων, καθώς και πολλαπλές προσεγγίσεις που θα φέρουν ένα βήμα πιο κοντά τη λύση στο θεραπευτικό αδιέξοδο. Για να επιτευχθεί αυτό, πρέπει να θεμελιωθεί η σύνδεση μεταξύ ακαδημαϊκής κοινότητας, βιομηχανίας και κοινού [9].

Ορισμένα κοινά στοιχεία παθογένειας που αλληλοσυνδέονται δημιουργώντας φαύλους κύκλους, οδηγώντας τελικά στην κυτταρική δυσλειτουργία και κατ'επέκταση στον κυτταρικό θάνατο περιλαμβάνουν τα εξής:

- Μη φυσιολογική δυναμική των πρωτεϊνών με λανθασμένη αναδίπλωση, συσσωμάτωση, ελαττωματική αποικοδόμηση και δυσλειτουργία του πρωτεασώματος, συνήθως επαγόμενη από μεταλλάξεις στους μοριακούς συνοδούς
- Οξειδωτικό στρες (OS) και σχηματισμός δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)
- Δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων
- Καταστροφή του DNA

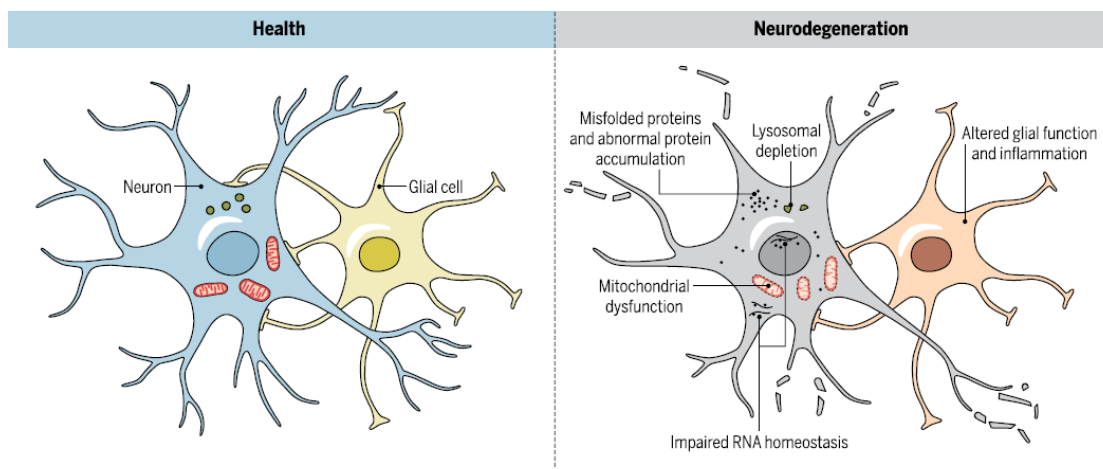
- Κατάτμηση του νευρωνικού συμπλέγματος Golgi
- Διαταραχή της κυτταρικής μεταφοράς
- Δυσλειτουργία των νευροτροφινών (NFTs)
- Νευροφλεγμονώδεις και νευροανοσοποιητικές λειτουργίες

Η βασική αιτία που συνδέει τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα με τον νευροεκφυλισμό, είναι η τοξική δράση των συστατικών που παράγονται κατά τα πρώιμα στάδια, όπως είναι τα διαλυτά ολιγομερή και τα παράγωγα πρωτοϊνιδίων των μη σωστά πτυχωμένων πρωτεϊνών. Η ταυτότητα της πρωτεΐνης που δεν πτυχώνεται ορθά, καθορίζει ποιοι νευρώνες επηρεάζονται και κατά συνέπεια την κλινική εκδήλωση της κάθε ασθένειας. Ωστόσο, δεν αποκλείεται οι ίδιοι νευρωνικοί πληθυσμοί να επηρεάζονται από διαφορετικές διαταραχές κι αυτό έγκειται στο γεγονός, ότι η ίδια μετάλλαξη σε γονίδια που κωδικοποιούν για μία πρωτεΐνη, σχετίζεται με μία πληθώρα κλινικοπαθολογικών φαινοτύπων. Αντίστοιχα, παρόμοιες κλινικοπαθολογικές εκδηλώσεις μπορεί να έχουν διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο, ως αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης γονιδίων μεταξύ τους ή με το περιβάλλον. Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στην αποσύνθεση του νευρωνικού δικτύου. Οι εναποθέσεις των μη πτυχωμένων πρωτεϊνών συσσωματώνονται σε καθορισμένες ινώδεις μορφές, που συχνά παρουσιάζουν τις ιδιότητες του αμυλοειδούς κι έτσι οι διαταραχές αυτές μπορούν να υποκατηγοριοποιηθούν ως αμυλοειδώσεις [7]. Ο μηχανισμός παθογένειας επηρεάζει τη μεμβρανική διαπερατότητα, μέσω ενός καναλιού ή μέσω μίας υδροφοβικής αλληλεπίδρασης των πρωτοϊνιδιακών ολιγομερών με κυτταρικούς στόχους. Η προοδευτική ενδοκυττάρια συσσώρευση των πρωτεϊνών μπορεί να προκληθεί από διάφορες παθολογικές διαδικασίες όπως: 1) μη φυσιολογική σύνθεση και πτύχωση 2) ανώμαλη αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες 3) υπερπαραγωγή πρωτεϊνικών προϊόντων 4) εξασθενημένη αποδόμηση 5) μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών 6) οξειδωση πρωτεϊνών 7) δομικές αλλαγές επαγόμενες από νουκλεϊκά οξέα 8) ανώμαλη πρωτεολυτική διάσπαση 9) ακατάλληλη έκφραση ή τροποποιημένο μάτισμα 10) ανεπαρκής δραστηριότητα των μοριακών συνοδών και 11) εξασθενημένη ενδοκυτταρική μεταφορά πρωτεϊνών [7].

Ανάμεσα στα συστήματα που εμπλέκονται στον νευροεκφυλισμό είναι και το σύστημα των λυσοσωμάτων, που αποτελούν τα κυτοπλασματικά οργανίδια

υπεύθυνα για την εκκαθάριση κυτταρικών υπολειμμάτων [9]. Η αυτοφαγία είναι σημαντική για τη νευρωνική βιωσιμότητα, τη νευρογένεση και διαφοροποίηση, την ωρίμανση των νευρώνων και τη συναπτική εκκαθάριση δίνοντας μεγάλο μερίδιο συμμετοχής στη διαδικασία του νευροεκφυλισμού. Υπάρχουν 3 τύποι αυτοφαγίας στα θηλαστικά : η μακροαυτοφαγία, η αυτοφαγία που μεσολαβείται από πρωτεΐνες συνοδούς και η μικροαυτοφαγία [18]. Οι εξωκυττάρειες ουσίες μεταφέρονται στα λυσοσώματα μέσω της ενδοκύτωσης και οι ενδοκυττάρειες μέσω της αυτοφαγίας. Καθώς η αυτοφαγία και τα λυσοσώματα αποτελούν δομικά στοιχεία για την απομάκρυνση κυτταρικών ουσιών, οποιαδήποτε δυσλειτουργία τους συμβάλλει στη συσσώρευση νευροτοξικών πρωτεϊνών που αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

Ένα ακόμη πεδίο που άπτεται των νευροεκφυλιστικών μηχανισμών είναι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Συγκεκριμένα, οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες παρουσιάζουν έντονη ευαισθησία σε ό,τι αφορά τη μη σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων [9].



Εικόνα 1.1.2.: Βασικές κυτταρικές και μοριακές διαδικασίες κατά τον νευροεκφυλισμό [9].

Παρά το γεγονός ότι η εστίαση για την κατανόηση του μηχανισμού του νευροεκφυλισμού γίνεται στις πρωτεΐνες που εκφράζονται στους νευρώνες, σημαντικό ρόλο στο νευρωνικό τραυματισμό και κυτταρικό θάνατο φαίνεται να διαδραματίζουν και μη-νευρωνικές κυτταρικές σειρές όπως είναι η γλοία [9]. Τα κύτταρα γλοίας είναι πιο άφθονα στον εγκέφαλο και στο ΚΝΣ σε σχέση με τους νευρώνες, διαδραματίζοντας σπουδαίο ρόλο στην εξέλιξη της νόσου [11]. Αυτό

έχει οδηγήσει στην προσέγγιση των νευροεκφυλιστικών νόσων ως πολυκυτταρικές ασθένειες, στις οποίες εμπλέκονται τόσο νευρωνικές όσο και μη κυτταρικές σειρές. Πρόσθετο δεδομένο στην παραπάνω τάση αποτελεί η εμπλοκή των γονιδίων APOE και TREM2 στην AD, τα οποία εκφράζονται κυρίως στη μικρογλοία [9].

1.2. Η νόσος του Alzheimer (Alzheimer's disease)

Πρόκειται για την κύρια αιτία άνοιας με σταδιακό εκφυλισμό και απώλεια των συνάψεων και των νευρώνων που μακροσκοπικά οδηγούν σε ατροφία του εγκεφάλου [19]. Η νόσος καθιερώθηκε από τον κλινικό ψυχίατρο και νευροανατόμο Alois Alzheimer τον Νοέμβριο του 1906 αναφέροντας μία «παράξενη και σοβαρή διαδικασία στον εγκεφαλικό φλοιό», έπειτα από παρατήρηση ορισμένων ιστοπαθολογικών αλλαγών στον εγκέφαλο μίας ασθενούς. Οι αλλαγές αυτές αφορούσαν στους πλέον γνωστούς νευροϊνδιακούς κόμβους και τις πλάκες του αμυλοειδούς [20].

Η νόσος του Alzheimer (AD) περιγράφει την παθολογική οντότητα και το κλινικό σύνδρομο με τα εξής δύο κύρια χαρακτηριστικά: τη συσσώρευση εξωκυττάρων πλακών του αμυλοειδούς που αποτελούνται κυρίως από το Aβ 42 αμινοξέων (Aβ₁₋₄₂) και σε μικρότερο βαθμό από το Aβ 40 αμινοξέων (Aβ₁₋₄₀), ως προϊόντα διάσπασης της APP καθώς και τις ενδοκυττάρια εναποθέσεις νευροϊνδιακών κόμβων (Neurofibrillary tangles-NFTs) που αποτελούνται από υπερφωσφορυλιωμένα είδη της σχετιζόμενης με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνης tau [8]. Πέρα από τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά παρατηρούνται επίσης δυστροφικοί νευρίτες, ενεργοποίηση της μικρογλοίας, αστρογλοίωση και εγκεφαλική αμυλοειδογενής αγγειοπάθεια [19].

1.2.1. Παθοφυσιολογία της AD

Η παθοφυσιολογία της νόσου εμπλέκει την εναπόθεση πλακών του αμυλοειδούς (Senile Aβ plaques) καθώς και τη δημιουργία νευροϊνδιακών κόμβων (NFTs). Οι νευροϊνδιακοί κόμβοι αρχικά παρατηρούνται στον ενδορινικό φλοιό πριν την εξάπλωσή τους στον ιππόκαμπο και σε άλλες παραμεμβρανικές δομές. Στη συνέχεια εξαπλώνονται στον μεσαίο κροταφικό και βρεγματικό ισοφλοιό και καταλήγουν σε προμετωπιαίες περιοχές [8], ενώ η εναπόθεση του αμυλοειδούς

συνήθως ξεκινά στον ισοφλοιό κι αργότερα επηρεάζονται κι άλλες υποφλοιώδεις δομές [19]. Οι δύο μορφές εγκλείστων σχηματίζονται ανεξάρτητα [21].

Καθώς η συναπτική και νευρωνική απώλεια συμβαίνει παράλληλα με το σχηματισμό των NFTs, η σοβαρότητα της ασθένειας συνδέεται περισσότερο με την παθολογία των νευροϊνιδιακών κόμβων και όχι τόσο με το αμυλοειδές καθώς το τελευταίο φτάνει νωρίς σε ένα πλατώ κατά τη συμπτωματική φάση της νόσου [19]. Η σπουδαιότητα του Αβ ωστόσο διαφαίνεται στην εμπλοκή του σε όλες τις οικογενείς περιπτώσεις της νόσου (fAD), όπου οι μεταλλάξεις σχετίζονται με την επεξεργασία ή δημιουργία του Αβ και κατ' επέκταση με την υπερπαραγωγή των νευροτοξικών διαλυτών ολιγομερών. Η ενεργοποίηση της μικρογλοίας έπειτα από την εναπόθεση του αμυλοειδούς δίνει νέες προοπτικές στην παθογένεια της νόσου [19].

Επιπλέον, υπάρχει η εικασία του προστατευτικού ρόλου των πλακών του αμυλοειδούς, καθώς η αναλογία διαλυτών ολιγομερών Αβ προς πλάκες είναι μικρότερη στους ασθενείς με ασυμπτωματική αμυλοείδωση σε σύγκριση με τους ασθενείς που πάσχουν από άνοια τύπου AD [19].

1.2.2. Αιτιολογία της AD

Ο κίνδυνος ανάπτυξης AD αυξάνεται με ένα επιβαρυσμένο οικογενειακό ιστορικό, ιδίως εάν πρόκειται για συγγενή πρώτου βαθμού, όπου ο κίνδυνος τριπλασιάζεται. Συνήθως, δεν ακολουθείται αυτοσωμικός τύπος κληρονομησης, αλλά τα τρία κύρια γονίδια των οποίων οι μεταλλάξεις σχετίζονται άμεσα με την εμφάνιση της νόσου είναι: η πρεσενιλίνη 1 (PSEN1) στο χρωμόσωμα 14, η πρεσενιλίνη 2 (PSEN2) στο χρωμόσωμα 1 και η πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (APP) στο χρωμόσωμα 21, με το 11% των οικογενών περιστατικών να αφορούν στην μετάλλαξη για την πρεσενιλίνη 1 [8], [12]. Οι μεταλλάξεις αυτές τροποποιούν την επεξεργασία της APP με κοινό αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη παραγωγή του Αβ₁₋₄₂ [22]. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά έχουν εντοπιστεί σε οικογένειες με πρώιμη έναρξη της νόσου κατά την τρίτη δεκαετία της ζωής [12]. Οι γενετικές μορφές της AD εμφανίζονται συνήθως μερικές δεκαετίες πριν από τις σποραδικές περιπτώσεις [8].

Η τυπική όψιμη εμφάνιση της νόσου φαίνεται να είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων [19]. Βασικός

γενετικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της σποραδικής AD είναι το γονίδιο της απολιποπρωτεΐνης E (APOE), συγκεκριμένα το αλληλίο ε4 αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης ενώ το αλληλίο ε2 φαίνεται να είναι ανασταλτικός παράγοντας [9]. Οι ετεροζυγώτες για το αλληλίο ε4 σε σύγκριση με όσους δεν το φέρουν παρουσιάζουν έναν λόγο πιθανοτήτων περίπου 3, ενώ για τους ομοζυγώτες αυξάνεται στο 12 [19]. Η συμβολή του αλληλίου ε4 (APOE4) στην παθογένεια της AD έγκειται στο ότι διαμορφώνει την παραγωγή και την απομάκρυνση του Αβ [23].

1.2.3. Διάγνωση της AD

Καθώς η AD αποτελεί την πιο κοινή μορφή άνοιας, η διάγνυσή της αποτελεί ζήτημα υψίστης σημασίας με δεδομένο ότι πολλές αυτοψίες ασθενών αναδεικνύουν εσφαλμένη κλινική διάγνωση της νόσου. Η εγκαθίδρυση και η περιγραφή των κλινικών κριτηρίων για τη διάγνωση της AD έχει υιοθετηθεί από το NINCDS-ADRDA (National and Communicative Disorders and Related Disorders Association- Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) το 1984 [24]. Τα κλινικά κριτήρια κατηγοριοποιούν τη νόσο σε: πιθανή, δυνατή και οριστική. Ως πιθανή AD χαρακτηρίζεται μία τυπική έναρξη άνοιας με πρόοδο χωρίς άλλες συστημικές ή εγκεφαλικές ασθένειες, στις οποίες μπορούν να αποδοθούν η έκπτωση των γνωστικών λειτουργιών και η απώλεια μνήμης. Ως εν δυνάμει AD χαρακτηρίζεται όταν παρουσία άλλων ασθενειών, η AD φαίνεται να είναι η κύρια αιτία άνοιας. Τέλος, ως οριστική ορίζεται η νόσος που συνοδεύεται από ιστοπαθολογικά δεδομένα. Η εφαρμογή των παραπάνω κριτηρίων απαιτεί την εκτέλεση ορισμένων νευρολογικών, ψυχιατρικών και κλινικών ελέγχων σε συνδυασμό με νευροψυχολογικά τεστ, εργαστηριακές εξετάσεις και λήψη ιατρικού ιστορικού [24].

1.2.4. Η Πρόδρομη Πρωτεΐνη του Αμυλοειδούς-APP

Το γονίδιο για την ανθρώπινη πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (Amyloid precursor protein-APP) ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1987 και εδράζεται στο χρωμόσωμα 21. Αποτελεί ένα από τα τρία μέλη μίας οικογένειας

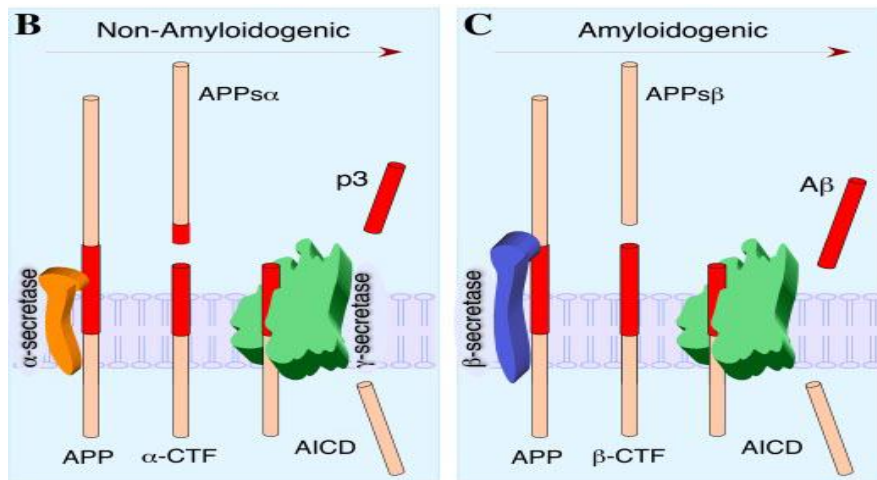
γονιδίων, που περιλαμβάνει τα APLP1 και APLP2 στον άνθρωπο, το App1 στη μύγα και το ap1-1 στο σκώληκα. Εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι μόνο η ανθρώπινη APP περιέχει το Αβ. Όλα τα γονίδια κωδικοποιούν για τύπου I διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με μία μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή και μία μικρότερη ενδοπλασματική περιοχή που υφίστανται παρόμοιες διαδικασίες [25]. Υπάρχουν 8-11 ισομορφές της APP που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα που ποικίλλουν σε μέγεθος αμινοξικών καταλοίπων. Οι κυριότερες από αυτές είναι οι APP 751, APP 770 που εκφράζονται στους περισσότερους ιστούς και η APP 695, η οποία είναι η κυρίαρχη μορφή που εκφράζεται στους νευρώνες [26]. Οι ισομορφές APP 751 και APP 770 περιέχουν έναν αναστολέα πρωτεάσης Kunitz (KPI) 56 αμινοξέων, ενώ η ισομορφή APP 695 δεν έχει αυτό το τμήμα [27].

Η πλήρης λειτουργία της APP δεν έχει αποσαφηνιστεί [26]. Η APP διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος κυρίως σε ό,τι σχετίζεται με τη δομή και λειτουργία των συνάψεων, όπως επίσης και με τη μετανάστευση των νευρώνων. Συγκεκριμένα, οι λειτουργίες της αφορούν στην κυτταρική προσκόλληση, όπου φαίνεται να αλληλεπιδρά με τη λαμινίνη και το κολλαγόνο, όπως επίσης και το γεγονός ότι συνεντοπίζεται με τις ιντεγκρίνες στην επιφάνεια των αξόνων. Ενδείξεις για την εμπλοκή της APP στη ρύθμιση των βλαστοκυττάρων, καθώς και στην ανάπτυξη των νευριτών και της συναπτογένεσης συνηγορούν στον τροφικό ρόλο που κατέχει στα βιολογικά συστήματα [25]. Σημαντικός δε, είναι και ο ρόλος της APP στη ρύθμιση γονιδίων καθώς η υπερέκφρασή της στα νευρικά κύτταρα έχει δείξει ότι επηρεάζει τα επίπεδα του συστήματος αποακετυλίωσης ιστονών, διαδικασία η οποία ελέγχει την αποσιώπηση γονιδίων [28].

Η κυκλοφορία της APP ακολουθεί τόσο εκκριτικά όσο και ενδοκυτταρικά μονοπάτια [26]. Αρχικά μεταφέρεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) στην πλασματική μεμβράνη, όπου εκεί η παραγόμενη APP υφίσταται μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση μέσω κυτοπλασματικής φωσφορυλίωσης, θείωσης της τυροσίνης και Ο- και Ν- γλυκοζυλίωσης. Η APP που πρωτεολύεται στην πλασματική μεμβράνη επανεισάγεται στο κύτταρο μέσω των ενδοσωμάτων ή των λυσοσωμάτων. Η μεγαλύτερη ποσότητα της APP βρίσκεται στο σύμπλεγμα Golgi και στο trans-Golgi, ενώ μόλις το 10% εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη [25], [26].

1.2.4.1. Η επεξεργασία της APP

Η επεξεργασία της APP απαιτεί την παρουσία ενζύμων, τις εκκρίτασες που καθορίζουν τη διάσπαση της πρωτεΐνης σε αμυλοειδογενή και μη. Το μη-αμυλοειδογενές μονοπάτι ξεκινά με την επίδραση της α-εκκρίτασης, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός διαλυτού τμήματος της APP (sAPP α) στον εξωκυττάριο χώρο και ένα καρβοξυτελικό θραύσμα της APP μήκους 83 αμινοξέων (CTF83), που παραμένει ενσωματωμένο στην πλασματική μεμβράνη. Στη συνέχεια, η γ -εκκρίταση διασπά το CTF83 σε ένα μικρότερο p3 πεππίδιο στον εξωκυττάριο χώρο και σε ένα τμήμα της APP (AICD), το οποίο παραμένει στο κυτταρόπλασμα. Αντιθέτως, το αμυλοειδογενές μονοπάτι ξεκινά με τη διάσπαση της APP από τη β -εκκρίταση, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός διαλυτού τμήματος της APP (sAPP β) στον εξωκυττάριο χώρο και ένα καρβοξυτελικό θραύσμα της APP μήκους 99 αμινοξέων (CTF99), το οποίο παραμένει ενσωματωμένο στην πλασματική μεμβράνη. Η γ -εκκρίταση, εν συνεχεία, διασπά το CTF99 ελευθερώνοντας το β αμυλοειδές (A β) στον εξωκυττάριο χώρο κι ένα αντίστοιχο AICD στο κυτταρόπλασμα [26]. Τόσο η sAPP α , όσο και η sAPP β , φαίνεται να έχουν νευροπροστατευτική λειτουργία, ωστόσο η sAPP α έχει 100 φορές μεγαλύτερη δυνατότητα προστασίας [23]. Η α-εκκρίταση είναι μία μεμβρανοσυνδεδεμένη μεταλλοπρωτεΐνάση ψευδαργύρου και η β -εκκρίταση είναι μία ασπαρτυλοπρωτεΐνάση με κυρίαρχη μορφή την BACE1 (β -site APP cleaving enzyme), η οποία κατέχει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό της APP [27]. Η γ -εκκρίταση είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα τεσσάρων τουλάχιστον υποενοτήτων περιέχοντας την πρεσενιλίνη 1 και 2, τη νικαστρίνη, την Aph-1 και Pen-2 και λειτουργεί ως διαμεμβρανική ασπαρτυλοπρωτεΐνάση έχοντας σημαντικό ρόλο τόσο στην παραγωγή του αμυλοειδούς όσο και στον καθορισμό της αναλογίας μεταξύ A β ₄₂ και A β ₄₀ [23], [25]. Αυξημένα ποσοστά α-εκκρίτασης μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή A β [23].



Εικόνα 1.2.1.: Η πρωτεολυτική επεξεργασία της APP καθώς και τα δύο μονοπάτια που ακολουθεί, αμυλοειδογενές και μη [25].

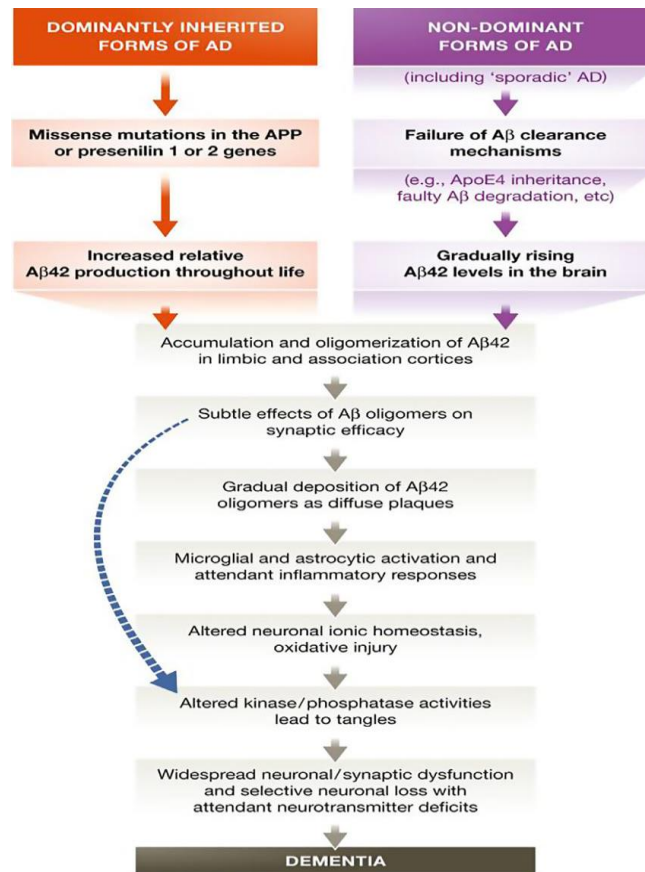
Το αμινοτελικό άκρο του Αβ βρίσκεται στο εξωκυττάριο τμήμα της APP, 28 αμινοξέα από τη διαμεμβρανική περιοχή και το καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται στη διαμεμβρανική περιοχή [21]. Τα ένζυμα που αποδίδουν ενεργότητα στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο είναι η β-εκκριτάση και η γ-εκκριτάση αντίστοιχα [21]. Εκτός από τις εκκριτάσες, μελέτες δείχνουν την εμπλοκή και των ενεργοποιημένων κασπασών κατά την απόπτωση στη διάσπαση της APP και κατ' επέκταση στην απελευθέρωση πρωτεολυτικών θραυσμάτων (C31, Jcasp) με νευροτοξικό χαρακτήρα [27].

1.2.4.2. Η υπόθεση του αμυλοειδούς

Η αιτιατή συσσώρευση του αμυλοειδούς εκφράστηκε για πρώτη φορά από τον George Glenner το 1984 [29]. Στις αρχές της δεκαετίας του '90 εισήχθη η υπόθεση του αμυλοειδούς, η οποία έγινε ευρέως γνωστή υποστηρίζοντας ότι η εναπόθεση του Αβ στις πλάκες του αμυλοειδούς αποτελεί το βασικό συστατικό παθολογίας της AD [30]. Ο συγκεκριμένος καταρράκτης εικάζει ότι, η εναπόθεση του αμυλοειδούς είναι καθοριστική για τον κυτταρικό θάνατο, τη συναπτική δυσλειτουργία, την αγγειακή καταστροφή, τη δημιουργία νευροϊνιδιακών κόμβων και τελικώς την άνοια [30],[31]. Βάσει πειραμάτων εξάγεται το συμπέρασμα ότι, η συσσώρευση του αμυλοειδούς στον εγκέφαλο είναι πρωταρχικής σημασίας για την AD καθώς ο σχηματισμός των NFTs προκύπτει έπειτα από απώλεια της

ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής και απομάκρυνσης του Αβ [32]. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις στην APP και τις πρεσενιλίνες οδηγούν σε πρόωμη εναπόθεση Αβ, που ακολουθείται από το σχηματισμό των NFTs ενώ το αντίστροφο δε συμβαίνει [29]. Άρα το Αβ δίνει το έναυσμα για τις νευροεκφυλιστικές διαδικασίες που συμβαίνουν κατά τη νόσο [31]. Ωστόσο, ένα από τα μελανά σημεία αυτής της υπόθεσης είναι ότι, η ποσότητα εναποθέσεων του αμυλοειδούς δε συνάδει επαρκώς με το βαθμό της γνωστικής έκπτωσης που παρουσιάζουν οι ασθενείς με AD [32]. Επιπρόσθετο στοιχείο είναι τα ευρήματα πλακών αμυλοειδούς σε εγκεφάλους ηλικιωμένων ατόμων με φυσιολογική γνωστική λειτουργία, μία κατάσταση που ονομάζεται αμυλοείδωση [31].

Από τα πεπτίδια του αμυλοειδούς που παράγονται τα πιο τοξικά θεωρούνται τα Αβ₄₂, Αβ₄₃ και τα μεγαλύτερου μήκους λόγω αυξημένης δυνατότητας συσσωμάτωσης ενώ το Αβ₄₀ φαίνεται να είναι μη-αμυλοειδογενές [29]. Το Αβ₄₂ εντοπίζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά εντός των πλακών, λόγω της δυνατότητας δημιουργίας ινιδίων καθώς και της αδιαλυτότητας σε σχέση με το Αβ₄₀ [19]. Το πεπτίδιο του αμυλοειδούς, επίσης, διαταράσσει την ομοιόσταση του Ca²⁺ αυξάνοντας τις συγκεντρώσεις του ασβεστίου εντός των νευρώνων [30]. Είναι πλέον αποδεκτό ότι, τα διαλυτά ολιγομερή του Αβ αποτελούν τους πρωτογενείς εκκινητές των νευροεκφυλιστικών διαδικασιών της AD. Τα διαλυτά ολιγομερή συνεισφέρουν στην συναπτική δυσλειτουργία κι απώλεια μέσω της δράσης τους σε πολλαπλούς συναπτικούς υποδοχείς, συμπεριλαμβάνοντας τον γλουταμικό τύπο NMDA και τον 7-νικοτινικό υποδοχέα ακετυλοχολίνης (α7-nACh). Οι NMDA υποδοχείς απαιτούνται για τη δημιουργία τόσο της μακροχρόνιας δυνατοποίησης (LTP), όσο και της μακροχρόνιας κατάπτωσης (LTD). Ο LTP είναι ένας συναπτικός μηχανισμός αποκωδικοποίησης της μνήμης στον ιππόκαμπο, ενώ ο LTD εμπλέκεται στην έκπτωση της μνήμης στον ιππόκαμπο [23]. Παρά το ευρέως αποδεκτό γεγονός ότι η συσσώρευση του αμυλοειδούς έχει καταστροφικές συνέπειες για τον εγκέφαλο, εμφανίζονται νέα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα χαμηλά επίπεδα του Αβ λειτουργούν ως ρυθμιστικοί παράγοντες στη νευροδιαβίβαση [27].



Εικόνα 1.2.2.: Κύρια σημεία παθογένειας της AD σύμφωνα με την υπόθεση του αμυλοειδούς [29].

1.2.4.3. Η σύνδεση της APP με την PD

Η σύνδεση των κυριότερων νευροεκφυλιστικών νόσων σε μοριακό επίπεδο αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες τάσεις στην έρευνα. Προς την κατεύθυνση αυτή, έρευνες έχουν συσχετίσει την πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς με την PD. Συγκεκριμένα, η κινάση LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2), η οποία είναι συνδεδεμένη με την οικογενή και σποραδική PD φωσφορυλιώνει την APP σε μία θέση εντός του τμήματος AICD, προάγοντας έτσι τη μεταγραφική δραστηριότητα του AICD με αποτέλεσμα την αφθονία του στον πυρήνα [33]. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι, η APP αποτελεί υπόστρωμα της LRRK2 ενισχύοντας την νευροτοξικότητα στην PD [33]. Επίσης, ευρήματα δείχνουν ότι η LRRK2 εμπλέκεται και στη φωσφορυλίωση και λανθασμένη τοποθέτηση της tau [34]. Επιπλέον, σωμάτια Lewy (LB) έχουν παρατηρηθεί σε εγκεφάλους ασθενών με οικογενή AD, οι οποίοι έχουν κάποια μετάλλαξη στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρεσενιλίνες και για την APP [35]. Ορισμένα αλληλόμορφα της APP έχουν

εντοπιστεί σε ασθενείς με PD και με άνοια τύπου Parkinson δηλώνοντας πιθανή εμπλοκή της APP στο φαινότυπο της PD [36].

Άλλα δεδομένα που υποστηρίζουν τη σύνδεση της APP με την PD είναι η επιρροή που ασκεί το AICD στη μιτοχονδριακή ομοίωση μέσω της ικανότητάς του να ρυθμίζει την έκφραση της μιτοχονδριακής κινάσης Pink-1, η οποία εμπλέκεται στον παρκινσονισμό [37]. Τέλος, η εναπόθεση του αμυλοειδούς αποτελεί παράγοντα στην εξασθένηση της γνωστικής λειτουργίας στις συνουκλείνοπάθειες και συγκεκριμένα στο φάσμα ασθενών με PD που έχει αυξημένο ρίσκο ανάπτυξης άνοιας [38].

1.2.5. Οι Νευροϊνιδιακοί κόμβοι (NFTs) και η Πρωτεΐνη Tau

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η πρωτεΐνη tau σχετίζεται με τους νευρικούς μικροσωληνίσκους σταθεροποιώντας τους και προάγοντας την ανάπτυξη των νευρώνων. Ανακαλύφθηκε το 1975, κωδικοποιείται από το σχετιζόμενο με μικροσωληνίσκους για την πρωτεΐνη tau γονίδιο MAPT (microtubule-associated protein tau gene), το οποίο αποτελείται από 16 εξώνια στο χρωμόσωμα 17q21 [39]. Στον ανθρώπινο εγκέφαλο παράγονται 6 ισομορφές που προκύπτουν έπειτα από εναλλακτικό μάτισμα των εξωνίων E2, E3 και E10 κι αποτελούνται από 352 έως 441 αμινοξέων [21], [39],[40]. Η tau έχει έναν τομέα που προβάλλεται στην εξωτερική όψη του πολυμερούς κι αλληλεπιδρά με στοιχεία του κυτταροσκελετού ή της πλασματικής μεμβράνης κι αποτελεί το αμινοτελικό άκρο. Αντιθέτως, το καρβοξυτελικό άκρο αποτελεί τον τομέα σύνδεσης της tau με τους μικροσωληνίσκους [40]. Η διαφορά των ισομορφών βασίζεται στην παρουσία 3 ή 4 διαδοχικών επαναλήψεων 31 ή 32 αμινοξέων στην καρβοξυτελική περιοχή [41]. Εμφανίζεται κυρίως στους νευρώνες και σε μικρότερο βαθμό στη γλοία και τους δένδριτες [42]. Η φυσιολογική tau εμφανίζει μικρή τάση για συσσωμάτωση και υψηλή διαλυτότητα με κύριες λειτουργίες την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και την αξονική μεταφορά [39]. Επιπλέον, προωθεί την ωρίμανση των νευρώνων και ρυθμίζει τη συναπτική λειτουργία [42]. Με δεδομένο ότι εντοπίζεται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα φαίνεται να συμμετέχει σε μία ποικιλία λειτουργιών ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται και η διαταραχή της κατανομής της, ίσως δίνει το έναυσμα για την απόκτηση της τοξικής λειτουργίας και συσσωμάτωσης που οδηγεί στον νευροεκφυλισμό.

Η συσσωμάτωση της tau σε ελικοειδή νημάτια ανά ζεύγη ή σε νευροϊνιδιακούς κόμβους προκαλεί τις λεγόμενες ταυ-πάθειες [39]. Η κυριότερη ταυ-πάθεια είναι η AD, με χαρακτηριστικό νευροπαθολογικό χαρακτηριστικό την παρουσία των NFTs, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Οι NFTs συμβάλλουν στην απώλεια των συνάψεων, στην εξασθένηση της αξονικής μεταφοράς, στην κυτταροσκελετική και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία καθώς και στην επαγωγή του οξειδωτικού στρες. Αποτελούνται από συσσωματωμένες πρωτεΐνες tau που φέρουν ανώμαλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, με κυριότερη την παρουσία της υπερφωσφορυλιωμένης tau [42]. Η φωσφορυλίωση της tau είναι απαραίτητη για μία σειρά από φυσιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων της σύνδεσής της με τους μικροσωληνίσκους, καθώς και τη ρύθμιση για τη συναρμολόγηση και σταθεροποίηση τους [39]. Το πρόβλημα δημιουργείται όταν η tau υπερφωσφορυλιώνεται συμβάλλοντας στην γνωστική έκπτωση της AD. Ο μηχανισμός που περιγράφει καλύτερα τη συσσωμάτωση της tau, είναι αυτός που εμπλέκει τη σύνδεση μεταξύ των νευρώνων και κατ' επέκταση τη μεταφορά της λανθασμένης tau από τον αρχικό νευρώνα στον γειτονικό, ξεπερνώντας τους φραγμούς της κυτταρικής μεμβράνης [43].

Η σύνδεση μεταξύ των δύο βασικών πρωτεϊνών που συσσωματώνονται στην AD, δηλαδή της tau και του Αβ δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Ωστόσο, δεδομένα από *in vitro* και *in vivo* πειράματα υποστηρίζουν ότι, το Αβ καθοδηγεί τη δημιουργία της tau και στη συνέχεια η tau μεσολαβεί για την τοξικότητα του Αβ [43].

1.2.6. Οι πρεσενιλίνες

Οι πρεσενιλίνες είναι διαμεμβρανικές πολυπαραγοντικές πρωτεΐνες, οι οποίες κατέχουν εξέχοντα ρόλο στην παθογένεια της AD, διότι μεσολαβούν κατά την ενδοκυττάρια διάσπαση της APP και κατά συνέπεια στην παραγωγή του Αβ [18]. Παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό ομολογίας μεταξύ τους, ειδικά στη διαμεμβρανική περιοχή [22]. Συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συνέχεια κατά τη μεταφορά τους στο σύμπλεγμα Golgi υφίστανται ενδοπρωτεόλυση και συνδέονται μαζί με τη νικαστρίνη, την Aph-1 και την Pen-2, έτσι ώστε να σχηματίσουν το καταλυτικά ενεργό σύμπλεγμα της γ-εκκριτάσης. Εκτός από το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύμπλεγμα Golgi εντοπίζονται επίσης

και σε υποκυττάρια μεμβρανικά συστήματα, όπως είναι η πλασματική μεμβράνη, τα ενδοσώματα, τα λυσοσώματα, ο πυρηνικός φάκελος και τα μιτοχόνδρια [18]. Έχουν παρόμοιο μοτίβο έκφρασης στον εγκέφαλο και σε αντίθεση με την APP που είναι ο τρίτος γενετικός παράγοντας για την fAD, οι πρεσενιλίνες εκφράζονται μόνο σε κυτταρικούς πληθυσμούς νευρικής προέλευσης [44].

Κατά την αρχική τους σύνδεση, είναι πρόδρομες πρωτεΐνες με μοριακή μάζα 50 kDa με 9 ελικοειδείς διαμεμβρανικές περιοχές που διευθετούνται με το υδρόφιλο αμινοτελικό άκρο στο κυτοσόλιο και με το καρβοξυτελικό άκρο να προβάλλει στον επιπλέον κυτταρικό χώρο. Κατά την ωρίμανσή τους, διασπώνται σε ένα αμινοτελικό θραύσμα των 30 kDa κι ένα καρβοξυτελικό θραύσμα των 20 kDa [45],[46]. Με δεδομένο ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν για την πρεσενιλίνη 1 και την πρεσενιλίνη 2 (PSEN1, PSEN2) είναι υπεύθυνα για το μεγαλύτερο ποσοστό της οικογενούς AD σίγουρα αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της έρευνας σχετικά με τη νόσο. Συγκεκριμένα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι πρεσενιλίνες 1 και 2 αποτελούν υποενότητες της γ-εκκριτάσης και συμμετέχουν σε μία πληθώρα λειτουργιών, όπως είναι ο μεταβολισμός των πρωτεϊνών, η μετάδοση σήματος, καθώς και η κυτταρική διαφοροποίηση. Η συμμετοχή τους στην ενδομεμβρανική πρωτεόλυση αποτελεί τη βασικότερη λειτουργία. Επιπλέον, συμβάλλουν στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης συμμετέχοντας στη λυσοσωμική δραστηριότητα και αυτοφαγία, καθώς και στην ενδοκυττάρια μεταφορά πρωτεϊνών μέσω κυστιδίων. Αλληλεπιδρούν με αρκετές πρωτεΐνες τροποποιώντας τη βιολογική τους δραστηριότητα όπως είναι η κινάση GSK3β, οι κατενίνες, οι υποδοχείς ρυανοδίνης και η αντλία Ca^{2+} SERCA [18]. Υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα, κυρίως στο εξώνιο 8, όπου κι εντοπίζεται η πλειοψηφία των μεταλλάξεων. Αυτό από μόνο του παρουσιάζει ενδιαφέρον διότι είναι κοντά στο σημείο όπου γίνεται η διάσπαση κι επιπλέον τόσο η PS1 όσο και η PS2 έχουν μικρότερες ισομορφές από τις οποίες το εξώνιο αυτό παραλείπεται δίνοντας την υποψία για την ύπαρξη μίας λειτουργικής περιοχής που είναι κεντρική στην παθογένεια των μεταλλάξεων. Οι μεταλλάξεις είναι όλες παρερμηνεύσιμες (missense) με εξαίρεση μόνο μία και οι νέες μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, που παράγονται αποκτούν επιπλέον τοξική λειτουργία (toxic gain of function) [22]. Οι μεταλλάξεις στις πρεσενιλίνες ευνοούν την παραγωγή μεγαλύτερων πεπτιδίων Αβ που συσσωρεύονται μαζί πιο εύκολα δημιουργώντας τα νευροτοξικά ολιγομερή [31]. Παρά το γεγονός ότι, οι μεταλλάξεις στις πρεσενιλίνες έχουν διαφορετικό

μοριακό υπόβαθρο, όλες έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής μακρύτερων υδροφοβικών πεπτιδίων του αμυλοειδούς με μεγαλύτερη δυνατότητα αυτό-συσσωμάτωσης [29].

Βασικό στοιχείο αποτελεί το γεγονός ότι, πάνω από το 99% όλων των περιπτώσεων της AD εκφράζουν τις πρεσενιλίνες αγρίου τύπου, αποκλείοντας έτσι την υπόθεση ότι η απώλεια λειτουργίας αυτών των γονιδίων αποτελεί βασικός μηχανισμός παθογένειας της AD [29]. Μερικά δεδομένα που συνηγορούν στη σύνδεση μεταξύ των μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρεσενιλίνες και την παραγωγή του Αβ είναι τα εξής: οι εγκέφαλοι ασθενών με μεταλλάξεις στις πρεσενιλίνες παρουσίασαν αυξημένες εναποθέσεις αμυλοειδούς, καθώς και οι ινοβλάστες αυτών παρήγαγαν μεγαλύτερου μήκους Αβ που είναι και τα πιο τοξικά. Η συγκεκριμένη τάση για παραγωγή μεγαλύτερου μήκους πεπτιδίων του αμυλοειδούς επιβεβαιώθηκε επίσης σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τη μεταλλαγμένη PS1, καθώς και σε κυτταροκαλλιέργειες που επιμολύνθηκαν με το συγκεκριμένο γονίδιο [22]. Μελέτες *in vivo* καταδεικνύουν ότι η τοπολογία τους είναι στα προσυναπτικά άκρα των νευρώνων κι εκεί συσσωρεύονται ορισμένα καρβοξυτελικά θραύσματα της APP που αποτελούν το υπόστρωμα για την παραγωγή του Αβ [47].

Η εξέλιξη των απεικονιστικών μεθόδων έχει επιτρέψει την παρατήρηση των πρεσενιλίνων ως μέρος του συμπλέγματος της γ-εκκρίτασης. Το σύμπλεγμα αυτό φαίνεται να είναι δυναμικό και να αλλάζει διαμόρφωση ανάλογα με την εκάστοτε λειτουργία, καθιστώντας το υποψήφιο θεραπευτικό στόχο για την AD αναστέλλοντας την γ-εκκρίταση [45]. Ωστόσο, επειδή έχουν προκύψει ενδείξεις που σχετίζουν την γ-εκκρίταση μαζί με το μόριο Notch το οποίο είναι υπεύθυνο για την κυτταρική σηματοδότηση κατά την ανάπτυξη, πιθανή αναστολή της γ-εκκρίτασης θα έχει αρνητική επίδραση και στη λειτουργία του Notch [46].

Νέες μελέτες δείχνουν ότι οι λειτουργικά διακριτές περιοχές στον ανθρώπινο εγκέφαλο εμφανίζουν ποικίλες αλλαγές στην πρωτεϊνική έκφραση ανάλογα με την περιοχή, δίνοντας το έναυσμα για την ανεύρεση νέων μονοπατιών που σχετίζονται με την AD. Η παρουσία μίας βαθμίδωσης πρωτεϊνικής έκφρασης από τις λιγότερο επηρεασμένες έως τις πιο ευάλωτες περιοχές παρέχει πληροφορίες για την εξέλιξη της νόσου και παράλληλα μπορεί να συμβάλλει στη δημιουργία ενός προστατευτικού πρωτεϊνικού προφίλ της παρεγκεφαλίδας [48].

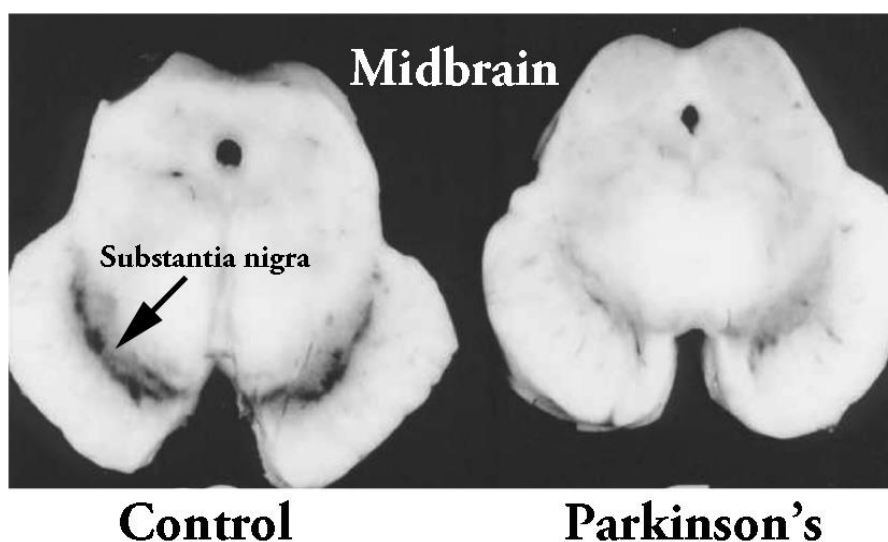
1.3. Η νόσος του Parkinson (Parkinson's disease)

Η νόσος του Parkinson (PD) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1817 από τον Άγγλο ιατρό James Parkinson στο δοκίμιο με τίτλο “ An Essay on the Shaking Palsy” έπειτα από την παρατήρηση της συμπτωματολογίας έξι ασθενών. Ο ορισμός που έδωσε για την τρομώδη παράλυση είναι ο εξής : ακούσια κίνηση με τρόπο, με ελαττωμένη μυϊκή δύναμη, σε μέρη όχι εν δράσει κι ακόμη όταν υποστηρίζονται, με μία ροπή να καμφθεί ο κορμός μπροστά και να περάσει από ρυθμό βαδίσματος σε ρυθμό τρεξίματος, χωρίς τη βλάβη των αισθήσεων και της νοημοσύνης [49]. Πρόκειται για τη δεύτερη πιο συχνή νευροεκφυλιστική νόσο έπειτα από την AD που χαρακτηρίζεται από την απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας (substantia nigra pars compacta-SNpc) που οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα DA στο ραβδωτό σώμα και κατά συνέπεια σε διαταραχή του ελέγχου της κίνησης καθώς κι από τη συσσώρευση σωματίων Lewy που αποτελούνται κυρίως από την ASYN [16]. Η νόσος επηρεάζει το ΚΝΣ, το ΠΝΣ και το εντερικό νευρικό σύστημα [50]. Είναι μία ετερογενής πολυσυστημική διαταραχή με ποικίλους νευροπαθολογικούς φαινοτύπους καλύπτοντας ένα ευρύ φάσμα κινητικών και μη χαρακτηριστικών καθώς και μηχανισμών νευροεκφυλισμού, επηρεάζοντας πολλές διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου [51].

Η αρχική κατηγοριοποίηση της PD είναι σε δύο υποτύπους, ο πρώτος με κυρίαρχο τον τρόπο και ο δεύτερος με χαρακτηριστικά την αστάθεια θέσης και τη δυσκολία στη βάδιση (postural instability and gait difficulty-PIGD). Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο τρόμος κατά την έναρξη της νόσου συνοδεύεται με πιο αργή εξέλιξη σε σύγκριση με την κατηγορία PiGD και με καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία με υποκατάσταση της DA ενώ οι ασθενείς PiGD πάσχουν κυρίως από μη-κινητικά χαρακτηριστικά [51],[52].

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κάποια επιτυχημένη οριστική θεραπεία για τη νόσο, με τις ήδη υπάρχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις να στοχεύουν στη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών προσφέροντας σχετική ανακούφιση συμπτωμάτων και επιβραδύνοντας την εξέλιξη της νόσου. Η κυριότερη αντιμετώπιση βασίζεται στην αποκατάσταση της απώλειας DA μέσω συστηματικής χορήγησης της L-Dopa που αποτελεί πρόδρομο μόριο στο συνθετικό μονοπάτι της DA. Προκειμένου να ενισχυθεί η βιοδιαθεσιμότητα της L-Dopa και να

περιοριστεί ο μεταβολισμός της πριν διασχίσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό γίνεται συγχορήγηση αναστολέων των κατεχολ-Ο-μεθυλτρανσφερασών (COMPT-catechol-O-methyltransferase) και των μονοαμινών οξειδάσης τύπου Β (MAOB-monoamine oxidase type B). Σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο και ανθεκτικότητα στη φαρμακευτική αγωγή προτείνεται η εν τω βάθει εγκεφαλική διέγερση (DBS-deep brain stimulation) που ανακουφίζει τις κινητικές διακυμάνσεις και τη δυσκινησία [53].



Εικόνα 1.3.1: Η χρώση των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη μέλαινα ουσία μειώνεται στους ασθενείς με PD (δεξιά) σε σχέση με τους φυσιολογικούς (πηγή: scienceofparkinsons.com).

1.3.1. Παθοφυσιολογία της PD

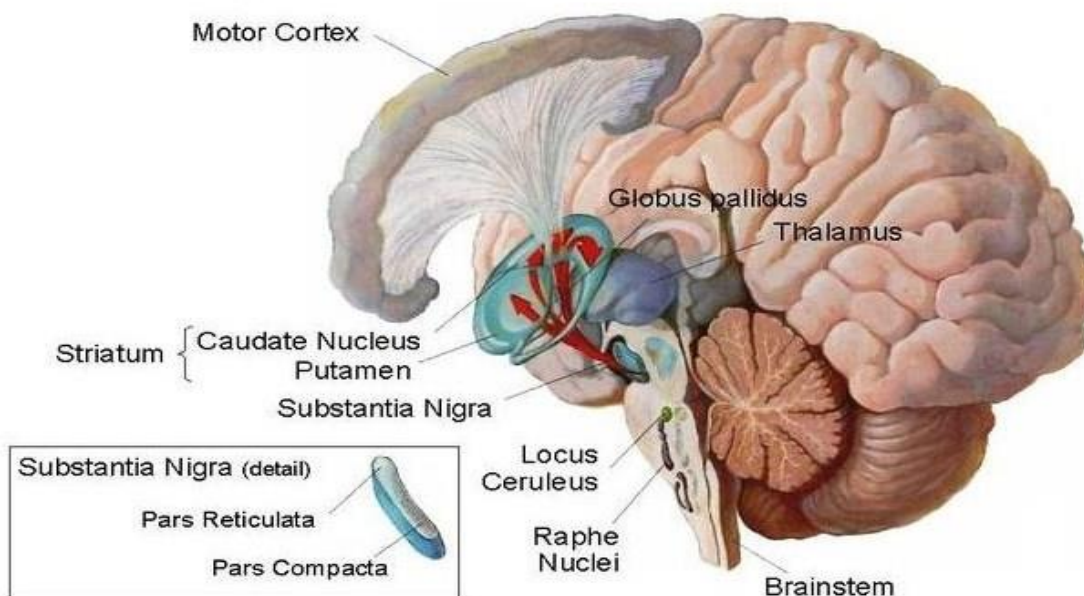
Η νόσος είναι το αποτέλεσμα αλλαγών στον νευρωνικό κυτταροσκελετό επηρεάζοντας συγκεκριμένους τύπους νευρικών κυττάρων, με το κινητικό και λιμπικό (μεταιχμιακό) σύστημα να υπόκεινται στη μεγαλύτερη καταστροφή. Συνέπεια των κυτταροσκελετικών αλλαγών αποτελεί ο σχηματισμός των σωματίων Lewy στους προσβεβλημένους νευρώνες [50]. Κατά τα αρχικά στάδια της νόσου, η απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων περιορίζεται στην πλαγιοκοιλιακή μέλαινα ουσία, ενώ οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες του μεσεγκεφάλου είναι σχετικά προστατευμένοι. Ωστόσο, κατά τα επόμενα στάδια της νόσου η απώλεια είναι διάχυτη [53]. Η έλλειψη DA σχετίζεται με την αυξημένη δραστηριότητα του ανασταλτικού γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), που χρησιμοποιείται από τους

GABAεργικούς πυρήνες εξόδου στα βασικά γάγγλια, στο εσωτερικό τμήμα της ωχράς σφαίρας και στη δικτυωτή μοίρα της μέλαινας ουσίας [54].

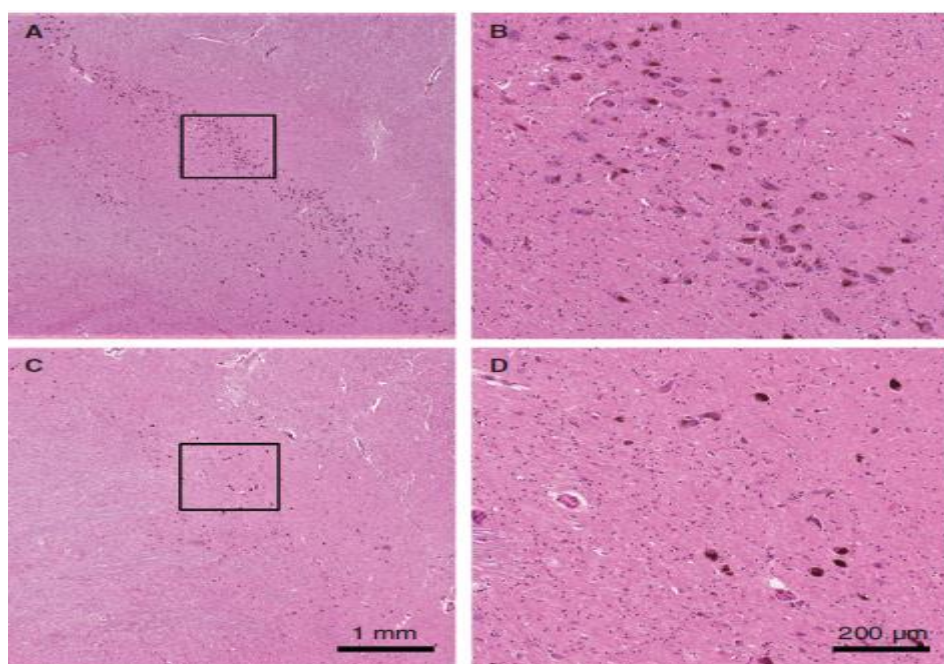
Το δεύτερο βασικό παθοφυσιολογικό χαρακτηριστικό είναι η μη φυσιολογική συσσώρευση της ASYN στο κυτταρόπλασμα ορισμένων νευρώνων σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου [53]. Η συσσωρευμένη ASYN δημιουργεί τα έγκλειστα σωμάτια Lewy, τα οποία αρχικά σχηματίζονται στους χολινεργικούς και μονοαμινεργικούς νευρώνες του εγκεφαλικού στελέχους. Επίσης, LB σχηματίζονται στους νευρώνες του οσφρητικού συστήματος και κατά την εξέλιξη της νόσου εξαπλώνονται στον νεοφλοιό και στο λιμπικό σύστημα [53]. Αρχικά, τα διαλυτά μονομερή της ASYN σχηματίζουν ολιγομερή, τα οποία συνδυάζονται και σχηματίζουν μικρά πρωτοϊνίδια καταλήγοντας σε μεγάλα αδιάλυτα ινίδια ASYN [55]. Είναι αποδεκτό ότι, επηρεάζονται διαφορετικοί πληθυσμοί κυτάρων, χωρίς ωστόσο να έχει αποσαφηνιστεί γιατί ορισμένα νευρικά κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερη ροπή στο να υποστούν παθολογικές αλλαγές με αποτέλεσμα να εμπλέκονται σε διαφορετικό στάδιο εξέλιξης της νόσου [56].

Η καθοριστική απώλεια των νευρώνων φαίνεται να πραγματοποιείται κατά τα αρχικά στάδια της νόσου, πριν ακόμη εμφανιστούν τα πρώτα κινητικά συμπτώματα [53]. Ωστόσο, οι προσβεβλημένοι νευρώνες παραμένουν ζωτικοί για ένα σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, πριν συμβεί ο πραγματικός κυτταρικός θάνατος, έχοντας όμως χάσει το μεγαλύτερο μέρος της λειτουργικής τους ακεραιότητας [50]. Οι τελευταίες μελέτες υποστηρίζουν ότι, η νόσος ίσως ξεκινά από το περιφερικό αυτόνομο νευρικό σύστημα ή/και τον οσφρητικό λοβό και στη συνέχεια η παθογένεια εξαπλώνεται στο ΚΝΣ επηρεάζοντας χαμηλότερες δομές του εγκεφαλικού στελέχους πριν την εμπλοκή της μέλαινας ουσίας [52].

Brain Regions Affected by Parkinson's Disease



Εικόνα 1.3.2.: Απεικόνιση των εγκεφαλικών περιοχών που προσβάλλονται στην PD (πηγή : parkinsoninfoblog.files.wordpress.com).



Εικόνα 1.3.3.: Χρώση ντοπαμινεργικών κυττάρων με αιματοξυλίνη- ηωσίνη. Η απώλεια της νευρομελανίνης είναι εμφανής στην PD (κάτω) σε σχέση με τον φυσιολογικό εγκέφαλο (πάνω) [52].

1.3.2. Αιτιολογία της PD

Η αιτιολογία της PD είναι πολυπαραγοντική, σύνθετη και ετερογενής καθιστώντας την προσέγγιση των αιτιών ένα γενικά δύσκολο εγχείρημα [57]. Ο πιο σχετικός παράγοντας κινδύνου παραμένει η αύξηση της ηλικίας, καθώς κατά τη διαδικασία της γήρανσης αυξάνονται τα λάθη κατά τις φυσιολογικές κυτταρικές και βιοχημικές διαδικασίες [58]. Η οικογενής PD αποτελεί το 5-10% της συνολικής επίπτωσης της νόσου με το 90% να συνιστά τις σποραδικές περιπτώσεις. Παρά το μικρό ποσοστό όμως οι περιπτώσεις με γενετική βάση παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για την καλύτερη κατανόηση της μοριακής και κυτταρικής παθογένειας της PD [59]. Επιπρόσθετα, τα γονίδια που εμπλέκονται στην PD εξυπηρετούν στην ταυτοποίηση των ατόμων που διατρέχουν κίνδυνο εμφάνισης της νόσου πολύ νωρίτερα από την κλινική εκδήλωση, ακόμη και πριν από τα πρώτα κινητικά συμπτώματα [60]. Πιο συγκεκριμένα οι μηχανισμοί που κυρίως μελετώνται περιλαμβάνουν : το οξειδωτικό στρες, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, την ομοιόσταση του ασβεστίου, την ASYN, την αξονική μεταφορά και τη νευροφλεγμονή [53]. Τα επικρατέστερα γονίδια που έχουν συσχετισθεί με την PD είναι τα εξής : SNCA, LRRK2, VPS35, Parkin, PINK1 και DJ-1 [57], [61], [62]. Τα SNCA, LRRK2 και VPS35 έχουν αυτοσωμικό επικρατή τρόπο κληρονομησης ενώ τα Parkin, PINK1 και DJ-1 ακολουθούν τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο [57].

Η ASYN ως κυρίαρχο χαρακτηριστικό παθολογίας δε θα μπορούσε να αποκλειστεί από τη γενετική σύνδεση με τη νόσο. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης της σχετίζονται με έναρξη της νόσου σε μικρότερη ηλικία. Διπλασιασμός και τριπλασιασμός ολόκληρου του γενετικού τόπου έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση της νόσου ακόμη και στα 30 έτη ηλικίας ανάλογα με τα επίπεδα της πρωτεΐνης που ανιχνεύονται στο αίμα [63],[64]. Το γονίδιο SNCA εδράζεται στο χρωμόσωμα 4 κι οι μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί είναι παρερμηνεύσιμες με χαρακτηριστικότερη την A53T ενώ ακολουθούν οι σημειακές μεταλλάξεις A30P, E46K, H50Q, G51D σε γερμανικό, ισπανικό, βρετανικό και γαλλικό πληθυσμό αντίστοιχα καθώς και η μετάλλαξη A53E [57], [61], [65]. Η ποικιλομορφία στον γενετικό τόπο της ASYN συμβάλλει στον κίνδυνο για την εμφάνιση της σποραδικής νόσου [61].

Όπως έχει προαναφερθεί το λυσοσωμικό σύστημα αυτοφαγίας εμπλέκεται στην παθολογία της νόσου, επομένως μεταλλάξεις που σχετίζονται με αυτό δε θα

μπορούσαν να παραληφθούν. Συγκεκριμένα, η μετάλλαξη G2019S στο γονίδιο LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) σχετίζεται με εξασθενημένο σύστημα αυτοφαγίας κι αυξημένη συσσώρευση της ASYN στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες [61], [66]. Το γονίδιο LRRK2 εδράζεται στο χρωμόσωμα 12 και η αυξημένη ενεργότητα κινάσης έχει συνδεθεί με το σχηματισμό των LB και τον εκφυλισμό του υπομέλανα τόπου (locus coeruleus, LC) [57]. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αποτελούν τον πιο κοινό γενετικό παράγοντα για την όψιμη έναρξη της PD [62].

Το γονίδιο Parkin εδράζεται στο χρωμόσωμα 6 και κωδικοποιεί για την E3 λιγάση ουβικιτίνης. Μεταλλάξεις στο Parkin προκαλούν λιγότερο σοβαρά μη-κινητικά συμπτώματα κι έχουν συνδεθεί με την πρόωμη έναρξη της PD [57], [65], [67]. Ακολουθούν οι μεταλλάξεις στα γονίδια PINK1 (PTEN induced kinase) και DJ-1 (Daisuke-Junko 1) στο χρωμόσωμα 1. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο PINK1 απορυθμίζουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία [9].

Το γονίδιο VPS35 (vacuolar protein sorting protein 35) ταυτοποιήθηκε το 2011 έπειτα από τον προσδιορισμό μίας σημειακής μετάλλαξης D620N που συνδέεται με την όψιμη έναρξη της PD [59]. Μία σχετικά πρόσφατη μετάλλαξη αφορά στο γονίδιο GBA1, το οποίο αποτελεί γενετικό υπόστρωμα για την PD και κωδικοποιεί για το λυσοσωμικό ένζυμο της γλυκοσερεβροσιδάσης (lysosomal enzyme Glucocerebrosidase-Gcase) που διασπά ένα σφιγγολιπίδιο [68]. Οι έρευνες ευρείας γενετικής συσχέτισης (GWAS) έχουν συμβάλει ελάχιστα στον τομέα της PD, αλλά μία εξ' αυτών συμπεραίνει ότι οι πολυμορφισμοί (SNPs) στα γονίδια για την ASYN (SNCA) στο χρωμόσωμα 4q22 και στο χρωμόσωμα 17q21 για το γονίδιο MAPT μπορούν να οδηγήσουν στην ανεύρεση υποψήφιων γονιδίων για την PD. Επίσης, μέσω αυτών των μελετών καταδεικνύεται η άμεση σχέση μεταξύ της σπάνιας οικογενούς μορφής της PD και της τυπικής σποραδικής μορφής της [65], [69].

Για τη σποραδική μορφή της PD επιδημιολογικές μελέτες έχουν εστιάσει στο εξασθενημένο μιτοχονδριακό σύμπλεγμα I το οποίο οδηγεί στη δημιουργία ελευθέρων ριζών, γεγονός που καθιστά τους νευρώνες επιρρεπείς στη διεγερτική τοξικότητα του γλουταμικού. Οι πρώτες έρευνες αναφέρουν ορισμένες τοξίνες όπως είναι η 1- μεθυλ- 4- φαινυλ- 1,2,3,6- τετραϋδροπυριδίνη (MPTP) ο ενεργός μεταβολίτης της οποίας MPP⁺ συγκεντρώνεται στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες μέσω των μεταφορέων DA και προκαλεί αναστολή της μιτοχονδριακής

λειτουργίας. Επίσης, το ζιζανιοκτόνο paraquat (1,1'-διμεθυλ- 4,4'-5'-διπυριδίνιο) όταν χορηγηθεί μαζί με το μυκητοκτόνο maneb οδηγεί σε επιλεκτικό εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Η ροτενόνη, ένα άλλο εντομοκτόνο προκαλεί παρκινσονισμό στα τρωκτικά [52], [58], [70].

Παρά τη συνεχή μελέτη για τον προσδιορισμό γονιδίων με μεγάλη επίδραση στη νόσο καθώς και καθοριστικών αιτιολογικών παραγόντων, η συνύπαρξη άλλων συνιστωσών εξακολουθεί να έχει εξέχοντα ρόλο. Το περιβάλλον, ο κλινικός φαινότυπος και η ανταπόκριση στη θεραπεία καθιστούν τη γενετική σύνδεση και τον τελικό προσδιορισμό της αιτιολογίας της νόσου ακόμη πιο δύσκολα [57].

1.3.3. Διάγνωση και Συμπτωματολογία της PD

Η ανάγκη για την καθιέρωση διαγνωστικών κριτηρίων με παγκόσμια αποδοχή είναι διάχυτη καθώς τα ποσοστά περιπτώσεων όπου δε γίνεται σωστή διάγνωση ή η διάγνωση επιβεβαιώνεται μόνο έπειτα από αυτοψία είναι μεγάλα [71], [72]. Η PD δεν αποτελεί μία ξεχωριστή κλινικοπαθολογική οντότητα διότι συμμετέχουν πολλοί παράγοντες στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου, καθιστώντας ακόμη πιο δύσκολη τη διαφοροδιάγνωση [65]. Σε μία πιο αδρή κατηγοριοποίηση, όπως και για την AD υπάρχουν τρία επίπεδα διάγνωσης: η οριστική, η δυνατή και η πιθανή με τις δύο τελευταίες να απαιτούν μόνο κλινικά κριτήρια ενώ η οριστική χρειάζεται επιπλέον νευροπαθολογική επιβεβαίωση [73].

Σύμφωνα με τα κριτήρια της PDSBB (Parkinson's Disease Society Brain Bank UK) το πρώτο βήμα για τη διάγνωση του παρκινσονικού συνδρόμου είναι η ύπαρξη βραδυκινήσις δηλαδή η βραδύτητα στην έναρξη της εθελοντικής κίνησης με προοδευτική μείωση της ταχύτητας και η συνύπαρξη τουλάχιστον ενός από τα κάτωθι συμπτώματα : μυϊκή δυσκαμψία, τρόμος εν ηρεμία και έλλειψη στατικής ισορροπίας που δεν έχει ως πρωτογενές αίτιο κάποια οπτική, αιθουσαία, παρεγκεφαλιδική ή ιδιοδεκτική δυσλειτουργία. Στο δεύτερο βήμα αναφέρονται τα κριτήρια αποκλεισμού και στο τρίτο βήμα τα υποψήφια υποστηρικτικά στοιχεία για την PD [74]. Αυτά είναι τα πρώτα κριτήρια που υιοθετήθηκαν για τη διάγνωση, ωστόσο καθώς η γνώση σχετικά με την PD προοδευτικά ενισχύεται έχουν βρει εφαρμογή κι άλλα κριτήρια όπως τα MDS-PD (International Parkinson and Movement Disorder Society Clinical Diagnostic Criteria for PD) τα οποία χωρίζονται σε δύο επίπεδα βεβαιότητας: στις κλινικώς αποδεδειγμένες

περιπτώσεις PD όπου αυξάνεται η ειδικότητα και στις κλινικώς πιθανές περιπτώσεις PD όπου υπάρχει μία ανισοροπία μεταξύ ειδικότητας και ευαισθησίας. Αρχικά προσδιορίζεται το παρκινσονικό σύνδρομο και αν όχι τότε λαμβάνεται υπόψη η πρόδρομη ή η μη-κλινική μορφή της PD [71]. Η νευροπαθολογική διάγνωση της PD απαιτεί την παρουσία τόσο της νευρωνικής απώλειας στη μέλαινα ουσία όσο και την ύπαρξη των σωματίων Lewy (LB). Ωστόσο, επικρατεί μία ασάφεια σχετικά με τα LB διότι υπάρχουν καταγραφές ασθενών με τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά και νευρωνική απώλεια χωρίς LB καθώς και ασθενείς κυρίως μεγαλύτερης ηλικίας με LB χωρίς όμως τον νευρωνικό εκφυλισμό, δημιουργώντας το εύλογο ερώτημα για το αν τα LB αποτελούν δείκτη για την PD ή είναι μέρος της φυσιολογικής γήρανσης [73],[75].

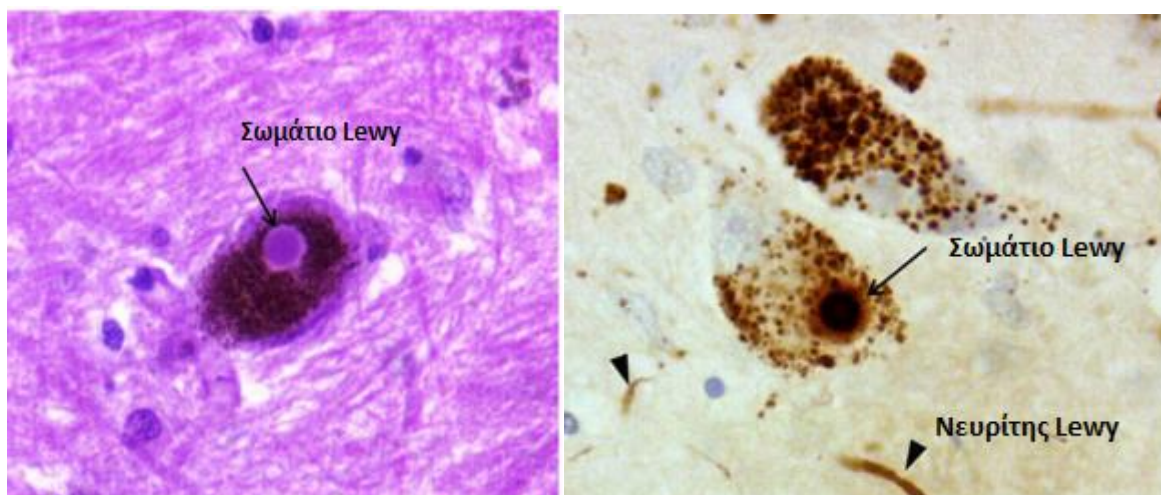
Αξίζει να σημειωθεί και η πρόδρομη μορφή της PD όπου δεν κυριαρχούν τα κινητικά συμπτώματα και η παθολογία ξεκινά σε μη ντοπαμινεργικές δομές του εγκεφάλου ή στο ΠΝΣ και είναι αποδεκτό πλέον ότι αποτελεί το πρωταρχικό στάδιο της νόσου [71]. Τα συμπτώματα κατά το στάδιο αυτό είναι ανεπαρκή για να ορίσουν την κλινική εικόνα της PD και είναι κυρίως μη κινητικής φύσεως μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται : η δυσκοιλιότητα, η οσφρητική δυσλειτουργία (υποσμία), η διαταραχή του ύπνου REM, η υπερβολική υπνηλία κατά τη διάρκεια της ημέρας, η συμπτωματική υπόταση, η δυσλειτουργία της ούρησης, η άνοια καθώς και η κατάθλιψη. Η μελέτη της πρόδρομης φάσης εξυπηρετεί στον καλύτερο προσδιορισμό του κινδύνου ανάπτυξης της νόσου σε προσυμπτωματικούς ασθενείς [72]. Μεταξύ των δευτερευόντων κινητικών συμπτωμάτων αλλά σε βαθμό που δεν έχουν αξιολογηθεί πλήρως είναι : ο βλεφαρόσπασμος, η δυσφαγία, η σιελόρροια, η δυστονία, το φαινόμενο «παγώματος» κατά το βάδισμα και ευδιάκριτες ανωμαλίες στην εκφορά του λόγου (δυσαρθρία) [73],[76].

Motor symptoms	Non-motor symptoms
Tremor, bradykinesia, rigidity, postural instability	Cognitive impairment, bradyphrenia, tip-of-the-tongue (word finding) phenomenon
Hypomimia, dysarthria, dysphagia, sialorrhoea	Depression, apathy, anhedonia, fatigue, other behavioural and psychiatric problems
Decreased arm swing, shuffling gait, festination difficulty arising from chair, turning in bed	Sensory symptoms: anosmia, ageusia, pain (shoulder, back), paresthesias
Micrographia, cutting food, feeding, hygiene, slow activities of daily living	Dysautonomia (orthostatic hypotension, constipation, urinary and sexual dysfunction, abnormal sweating, seborrhoea), weight loss
Glabellar reflex, blepharospasm, dystonia, striatal deformity, scoliosis, campocornia	Sleep disorders (REM behaviour disorder, vivid dreams, daytime drowsiness, sleep fragmentation, restless legs syndrome)

Εικόνα 1.3.4.: Τα κυριότερα κινητικά και μη συμπτώματα στην PD [76].

1.3.4. Η πρωτεΐνη α-συνουκλείνη (ASYN) και τα σωμάτια Lewy (LB)

Το δεύτερο κύριο νευροπαθολογικό χαρακτηριστικό της PD μετά την σταδιακή απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων είναι οι νευρίτες Lewy σε μορφή κλωστής (LN-Lewy Neurites) στις κυτταρικές διαδικασίες και τα σωμάτια Lewy (LB-Lewy Bodies) στα νευρωνικά περικάρυα [56],[77],[78]. Το 1912 ο ερευνητής Fritz Heinrich Lewy ήταν ο πρώτος που περιέγραψε τα κυτοπλασματικά σωμάτια στο εγκεφαλικό στέλεχος ως παθολογοανατομικό στοιχείο της PD [79]. Τα LB είναι στρογγυλά ηωσινόφιλα ενδοκυττάρια έγκλειστα αποτελούμενα από έναν κοκκιώδη κι έναν ινώδη πυρήνα περιβαλλόμενα από ένα φωτιστόφανο ινιδίων. Το μέγεθος τους ποικίλλει από 5 έως 30 μm και ο ίδιος νευρώνας μπορεί να περιέχει παραπάνω από ένα LB [27]. Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες: τα LB του εγκεφαλικού στελέχους που αποτελούν την τυπική πυκνή υαλώδη μορφή και τα φλοιώδη LB που είναι λιγότερο συμπαγή (cortical) [52],[75],[80].

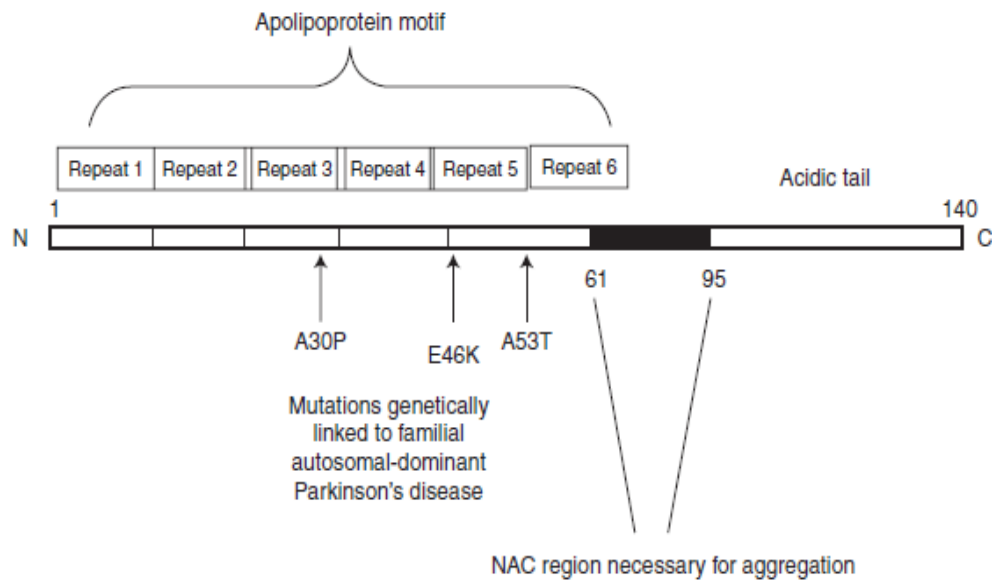


Εικόνα 1.3.5.: Στα αριστερά απεικονίζεται ένα LB σε έναν νευρώνα της μέλαινας ουσίας με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και στα δεξιά LB και LN με ανοσοχρώση έναντι της ASYN [81].

Τα κύρια συστατικά των LB είναι τα μη φυσιολογικά υπερφωσφορυλιωμένα νευροϊνίδια και η ASYN αλλά η μοριακή τους σύσταση περιλαμβάνει επίσης : πρωτεΐνες σχετικές με: το σύστημα ουβικιτίνης- πρωτεασώματος (UPS-ubiquitin proteasome system), τα αυτοφαγοσώματα και λυσοσώματα, την κυτταρική απόκριση, τα μιτοχόνδρια, τον κυτταροσκελετό και μόρια σχετικά με την πρωτεϊνική φωσφορυλίωση και μετάδοση σήματος [50],[82],[83].

Τα LB πέρα από τη μέλαινα ουσία εντοπίζονται και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου όπως είναι ο υπομέλας τόπος, ο ραχιαίος κινητικός πυρήνας, οι πυρήνες ραφής, ο πυρήνας Meynert, ο οσφρητικός λοβός, ο υποθάλαμος, ο οπίσθιος λοβός της υπόφυσης και τα συμπαθητικά και παρασυμπαθητικά γάγγλια [77], [82], [84]. Τα LN εντοπίζονται στους άξονες και τους δενδρίτες των νευρώνων που έχουν επηρεαστεί [80]. Τα LB και τα LN φαίνεται να έχουν ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά και ανοσοκυτταροχημικά προφίλ και να αναπτύσσονται στους ίδιους υποπληθυσμούς νευρικών κυττάρων τόσο στη σποραδική όσο και στην οικογενή PD [56]. Αρχικά, ο κυριότερος δείκτης για τον εντοπισμό των LB ήταν η ουβικιτίνη μέχρι που προσδιορίστηκε η ASYN ως το κύριο ινώδες συστατικό των LB και των LN [77].

Η ASYN ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στο ωδικό αρσενικό πτηνό σπίνος-ζέβρα (zebra finch) με το όνομα synelfin ενώ η ομόλογη πρωτεΐνη στον άνθρωπο αναφέρεται ως NACP (non-Aβ component) με κυρίαρχο ρόλο στην πλαστικότητα των συνάψεων [85]. Υπάρχουν τρία είδη συνουκλεϊνών: η α-, η β- και η γ-συνουκλεΐνη με παρόμοια δομική οργάνωση. Το αμινοτελικό τους άκρο αποτελείται από μία ατελή επανάληψη 11 αμινοξικών καταλοίπων που φέρουν την αλληλουχία KTKEGV. [86] Οι α- και β-συνουκλεΐνες αποτελούν το 0.1-0.2% των συνολικών πρωτεϊνών στον εγκέφαλο και έχουν μοριακή μάζα 19 kDa. Το γονίδιο για την α-συνουκλεΐνη εδράζεται στο χρωμόσωμα 4q21, για τη β- στο 5q35 και για τη γ- στο 10q23 [87]. Η ASYN είναι μία πρωτεΐνη που αποτελείται από 140 αμινοξικά κατάλοιπα με τη φυσιολογική νευρωνική της λειτουργία να μην έχει κατανοηθεί πλήρως [53]. Σε υδατικά διαλύματα δεν έχει συγκεκριμένη δομή κι έτσι θεωρείται μία φυσιολογικά μη πτυχωμένη πρωτεΐνη (natively unfolded protein) [88]. Η ονομασία της δηλώνει την τοπολογία της στα άκρα των προσυναπτικών νευρώνων και στον πυρηνικό φάκελο [86]. Αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές : 1) την αμινοτελική περιοχή που περιέχει τα αμινοξικά κατάλοιπα 1-60 και σχηματίζει μοτίβα δέσμωσης με τις λιπιδικές μεμβράνες, 2) την κεντρική υδροφοβική περιοχή NAC με τα αμινοξικά κατάλοιπα 61-95 που έχει υψηλή τάση να υιοθετεί β-διαμόρφωση κάνοντας την πρωτεΐνη επιρρεπή στη συσσωμάτωση και 3) την καρβοξυτελική περιοχή που είναι με υψηλό αρνητικό φορτίο κι έχει την τάση να μην είναι δομημένη [88],[89].



Εικόνα 1.3.6.: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της ASYN [88].

Σχηματίζεται στο κυτοσόλιο, πιθανά και στα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα και η επικρατέστερη λειτουργία της είναι στη δυναμική των συναπτικών κυστιδίων, τη μιτοχονδριακή λειτουργία, την ενδοκυττάρια μεταφορά και πιθανολογείται η ίδια να είναι μοριακή συνοδός [90]. Μπορεί να δεσμεύει ποικίλες πρωτεΐνες στα νευρικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένων και συστατικών μεταβολισμού της DA όπως είναι η υδροξυλάση της τυροσίνης (TH) και ο μεταφορέας της DA (DAT) τροποποιώντας τη λειτουργία τους και πιθανώς ασκώντας προ και αντι-αποπρωτικά αποτελέσματα [88]. Η DA και οι μεταβολίτες της αναστέλλουν την μετατροπή των πρωτοϊνιδίων σε ινίδια προκαλώντας συσσώρευση των πρωτοϊνιδίων, παρέχοντας έτσι μία πιθανή εξήγηση για το λόγο που οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες είναι οι πιο επιρρεπείς στις τοξικές δράσεις της ASYN [90].

Το γεγονός ότι η ASYN μπορεί να πάρει δομή β-πτυχωτής επιφάνειας υπό συνθήκες προκάλεσε προβληματισμό και σκέψεις παραλληλισμού με την ίδια διαμόρφωση που υιοθετεί το Αβ προσφέροντας την υπόθεση για μία κοινή βάση παθογένειας μεταξύ AD και PD. Προς την ίδια κατεύθυνση είναι το γεγονός ότι η ASYN φαίνεται να ενισχύει τη φωσφορυλίωση της tau και δευτερευόντως να προκαλεί διαταραχή στο δίκτυο των μικροσωληνίσκων [88].

Εναποθέσεις της ASYN έχουν εντοπισθεί και σε διάφορα περιφερικά όργανα όπως: η μήτρα, η ουροδόχος κύστη, ο αμφιβληστροειδής χιτώνας, το δέρμα, τμήματα του καρδιαγγειακού συστήματος (κυρίως στην αορτή και τις

κοιλίες) και το γαστρεντερικό σύστημα [52]. Τα ερυθροκύτταρα και τα αιμοπετάλια περιέχουν επίσης αξιοσημείωτες ποσότητες ASYN χωρίς να έχει επιβεβαιωθεί ο ρόλος της σε αυτά τα είδη κυττάρων [91]. Αρχικά, θεωρήθηκε μία αμιγώς ενδοκυττάρια πρωτεΐνη λόγω της απουσίας μίας σηματοδοτικής αλληλουχίας για το εκκριτικό μονοπάτι, αλλά σταδιακά ανιχνεύθηκε και σε εξωκυττάρια υγρά όπως το πλάσμα και το ENY [88],[90]. Μεταλλάξεις στο γονίδιο SNCA που κωδικοποιεί για την ASYN όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι υπεύθυνες για το 2% της οικογενούς μορφής της PD και για την άνοια με LB (DLB-Dementia with Lewy Bodies) [80]. Η πρώτη παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη που ταυτοποιήθηκε το 1997 είναι στο τέταρτο εξώνιο και είχε ως αποτέλεσμα την υποκατάσταση ενός καταλοίπου Ala από ένα κατάλοιπο Thr, η γνωστή πλέον A53T (Ala53Thr) [92]. Μεταξύ των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων της ASYN περιλαμβάνονται: η φωσφορυλίωση, η οξειδωση, η νιτροζυλίωση και η γλυκοζυλίωση [88].

Η συσσωμάτωση της ASYN μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική δυσλειτουργία και θάνατο επιδρώντας αρνητικά σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες όπως: η μιτοχονδριακή λειτουργία, η δίπλωση και η αποσύνθεση των πρωτεϊνών, η αξονική μεταφορά και η προσυναπτική λειτουργία [89]. Γενικά, το μεγαλύτερο μέρος της μη σωστά πτυχωμένης ASYN εντοπίζεται στις νευριτικές διαδικασίες. Γνωρίζοντας το σημαντικό ρόλο που κατέχει το Ca^{2+} στη συναπτική σηματοδότηση, είναι εύλογο να θεωρηθεί ότι οι διαταραχές στην ομοιόσταση του Ca^{2+} μπορεί να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στον νευροεκφυλισμό που επάγεται από την ASYN [88]. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα ολιγομερή της ASYN προωθούν το σχηματισμό των μεμβρανικών πόρων που λειτουργούν ως διάλυτοι ιόντων κι έτσι να αλλάζουν την κυτταρική ομοιόσταση με τους κατεχολαμινεργικούς νευρώνες να είναι ιδιαίτερα ευάλωτοι στις μεταβολές του Ca^{2+} . Επίσης τα συστήματα ουβικιτίνης- πρωτεασώματος και αυτοφαγίας κατέχουν σημαντικό ρόλο καθώς αναστολή των μοριακών συνοδών μέσω της αυτοφαγίας οδηγεί σε αύξηση της συσσωμάτωσης των υψηλομοριακών και αδιάλυτων μορφών της ASYN [90]. Ο μηχανισμός που χρησιμοποιεί η ASYN για να συσσωματωθεί δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Υπάρχει η εικασία για τη μετάδοση μέσω ενδοκύτωσης στους γειτονικούς νευρώνες και στα γειτονικά πρόδρομα νευρικά κύτταρα σχηματίζοντας τα έγκλειστα Lewy [93].

Ο καθορισμός της πιο τοξικής μορφής συσσωμάτωσης της ASYN είναι αντικείμενο έντονης έρευνας καθώς η ASYN έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει

πολλαπλά είδη διαλυτών ολιγομερών που ποικίλλουν από διμερή έως εκατομερή. Μπορούν να σχηματιστούν ακόμη μεγαλύτερα είδη τα οποία υιοθετούν δομή β-πτυχωτής επιφάνειας. Γνωρίζοντας ότι τα LB περιέχουν κυρίως την ινώδη και αδιάλυτη μορφή της ASYN κι ότι τα νευρικά κύτταρα επιβιώνουν για δεκαετίες παρουσία των LB και των LN έρχεται στο προσκήνιο μια αντιφατική υπόθεση υποστηρίζοντας ότι τα LB συμβάλλουν στην προστασία των νευρώνων και όχι στον ίδιο το νευροεκφυλισμό. Αντίστοιχα, τίθεται το ερώτημα για το αν τα συσσωματώματα της ASYN είναι ακίνδυνα, νευροπροστατευτικά ή επιβλαβή με επικρατέστερη την άποψη ότι τα ολιγομερή και τα πρωτοϊνίδια της ASYN να είναι τα πιο κυτταροτοξικά [80],[82]. Συνεπώς, ο προσδιορισμός του πιο τοξικού είδους της ASYN είναι σημαντικός προκειμένου να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο [61], [82], [91].

1.4. Η αποκαρβοξυλάση της L-Dopa (DDC)

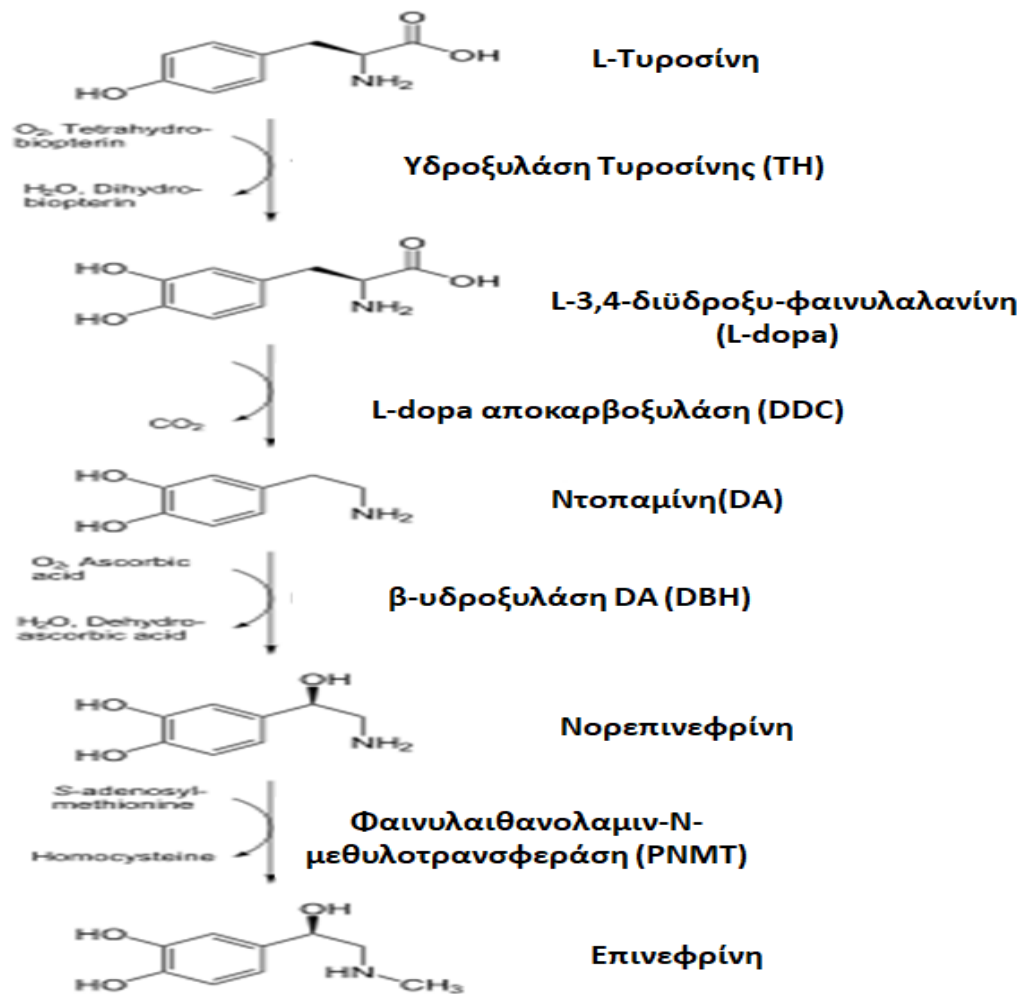
Η L-Dopa αποκαρβοξυλάση (Dopa Decarboxylase-DDC) ή αλλιώς η αρωματική αμινοξική αποκαρβοξυλάση (Aromatic Amino Acid Decarboxylase-AAAD) είναι το ένζυμο L-3,4-διϋδρόξυφαινυλαλανίνη αποκαρβοξυλάση που ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά το από τους Holtz et al. το 1938 σε νεφρό θλαστικού. Εξαρτάται από την 5'-φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) και καταλύει το βασικό μονοπάτι βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών [94], [95]. Ο βασικός της ρόλος είναι η παροχή των θεμελιωδών νευροδιαβιβαστών στον οργανισμό και παρά τη χαμηλή ειδικότητα υποστρώματος προς διάφορα αμινοξέα, συμμετέχει στον έλεγχο του επιπέδου των αρωματικών αμινών [95]. Ανήκει στην α-ομάδα των αμινοτρανσφερασών και πιο συγκεκριμένα στην υποομάδα II των α-αποκαρβοξυλασών [95]. Το όνομα AAAD αποδόθηκε έπειτα από την απόδειξη ότι το ένζυμο αυτό μπορεί να αποκαρβοξυλιώνει όλα τα φυσικά L-αμινοξέα μεταξύ των οποίων είναι η φαινυλαλανίνη, η τυροσίνη, η τρυπτοφάνη και η ιστιδίνη [96]. Οι μονοαμίνες εμπλέκονται στη συναπτική ρύθμιση σε μία μεγάλη ποικιλία ζώων καταδεικνύοντας τη σημασία της DDC που συμμετέχει στο βιοσυνθετικό μονοπάτι πολλών εξ' αυτών [97].

Γενικά λοιπόν, η DDC αποτελεί το βασικό συστατικό των μεταβολικών μονοπατιών που συνδέονται μεταξύ τους και ρυθμίζουν τα επίπεδα των αρωματικών αμινών και κατ' επέκταση τα επίπεδα των βασικών νευροδιαβιβαστών οι οποίοι με τη σειρά τους ρυθμίζουν το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, τη γνωστική λειτουργία, τη διάθεση και το συντονισμό της κίνησης [98].

1.4.1. Ο ρόλος της DDC και έκφραση σε διαφορετικούς οργανισμούς

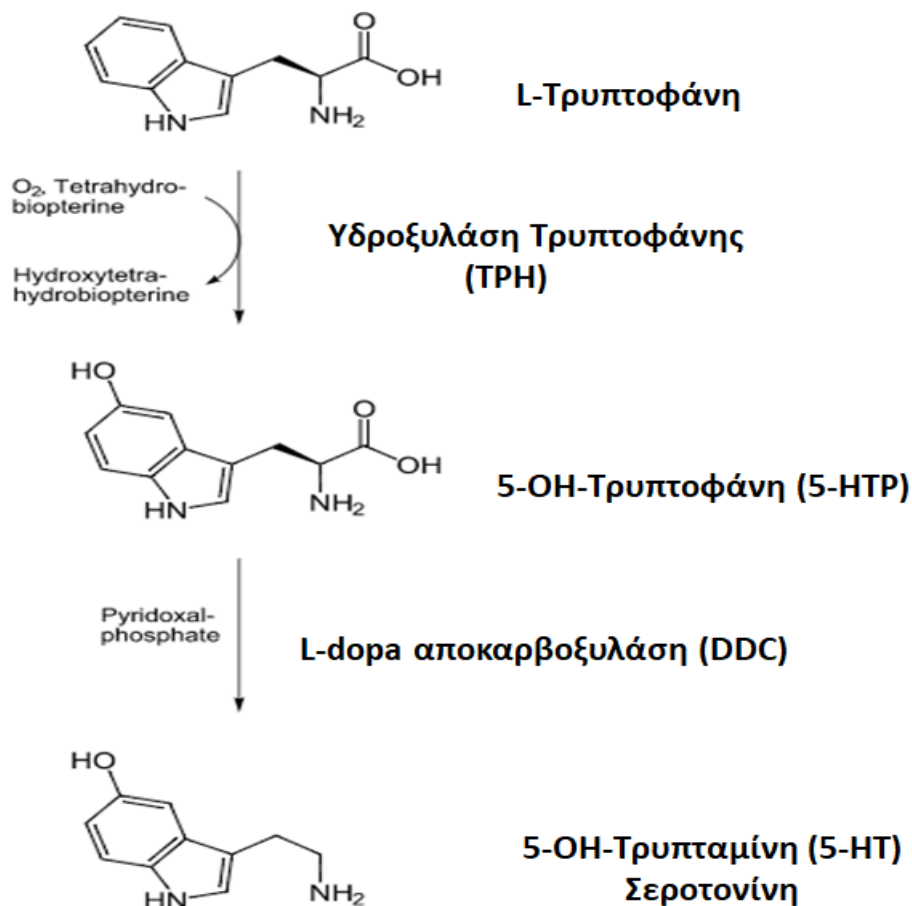
Η DDC συμμετέχει στην ενζυματική σύνθεση των βιογενών αμινών: 1) μετατρέπει την L-5-υδρόξυ-τρυπτοφάνη (L-5-HTP) σε σεροτονίνη και την L-3,4-διϋδρόξυ-φαινυλαλανίνη (L-DOPA) σε DA και νορεπινεφρίνη [99]. Αναλυτικότερα, η L-τυροσίνη υδροξυλιώνεται από την υδροξυλάση της τυροσίνης (TH) προς L-3,4-διϋδρόξυ-φαινυλαλανίνη (L-Dopa). Η L-Dopa αποκαρβοξυλιώνεται σε Ντοπαμίνη (DA) μέσω του ενζύμου DDC. Στη συνέχεια, η DA μετατρέπεται σε νορεπινεφρίνη (ή νοραδρεναλίνη) μέσω της β-υδροξυλάσης της DA (DBH) η οποία χρησιμοποιεί ως συμπαραγόντες μοριακό οξυγόνο και ασκορβικό οξύ. Η νορεπινεφρίνη

μετασχηματίζεται σε επινεφρίνη (ή αδρεναλίνη) με τη βοήθεια του ενζύμου φαινυλαιθανολαμιν-N-μεθυλοτρανσφεράση (PNMT) (Εικόνα 4.1.1.)



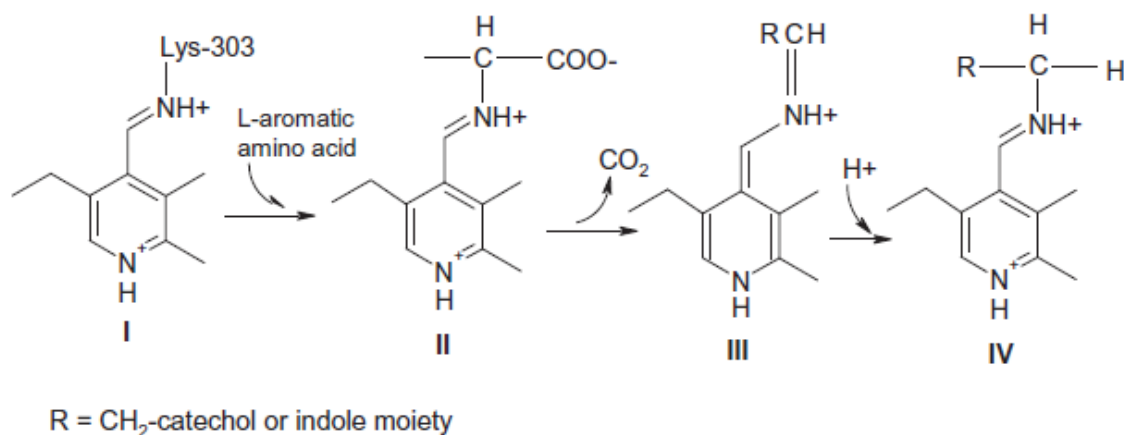
Εικόνα 4.1.1.: Βιοχημική οδός βιοσύνθεσης κατεχολαμινών.

Η DDC συμμετέχει και στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της σεροτονίνης (5-υδροξυτρυπταμίνη, 5-HT). Αρχικά η L-τρυπτοφάνη υδροξυλιώνεται σε 5-υδροξυτρυπτοφάνη (5-HTP) μέσω της υδροξυλάσης της τρυπτοφάνης (TPH). Στη συνέχεια, η DDC αποκαρβοξυλιώνει την 5-HTP σε 5-υδροξυτρυπταμίνη (5-HT) ή σεροτονίνη. (Εικόνα 4.1.2.)



Εικόνα 1.4.2.: Βιοχημική οδός βιοσύνθεσης της σεροτονίνης.

Αρχικά επειδή οι αμίνες που παράγονται με την επίδραση της DDC έχουν διαφορετική τοπολογία και διακριτές φυσιολογικές λειτουργίες θεωρήθηκε ότι πρόκειται για διαφορετικές αποκαρβοξυλάσες [99]. Πειραματικά δεδομένα ωστόσο απέδειξαν ότι πρόκειται για το ίδιο ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση των κατεχολαμινών δηλαδή της DA, της νοραδρεναλίνης ή νορεπινεφρίνης και της αδρεναλίνης ή επινεφρίνης καθώς και των ινδολαμινών δηλαδή της 5-υδροξυ-τρυπταμίνης και της μελατονίνης [99], [100]. Συνεπώς, η DDC αποτελεί ένα σημαντικό ένζυμο για την παραγωγή των κατεχολαμινών, της ινδολαμίνης, των νευροδιαβιβαστών και των ορμονών [101].



Εικόνα 1.4.3.: Αποκαρβοξυλίωση των L-αρωματικών αμινοξέων που καταλύονται από την DDC. Η φυσική μορφή του ενζύμου είναι μία αλδιμίνη με την PLP και το κατάλοιπο Lys-303 (I). Με τη δέσμευση του υποστρώματος η εσωτερική αλδιμίνη μετατρέπεται σε εξωτερική (II) και σύμφωνα με την υπόθεση του Dunathan η καρβοξυλομάδα λαμβάνει μία θέση που ευνοεί την αποκαρβοξυλίωση. Ακολούθως, το κινονοειδές ενδιάμεσο (III) πρωτονιώνεται στον α-άνθρακα για να σχηματιστεί η αντίστοιχη αμίνη (IV) αφήνοντας το ενεργό κέντρο ώστε να ξεκινήσει ο επόμενος καταλυτικός κύκλος [95].

Πέρα από τα βασικά βιοσυνθετικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει, η DDC φαίνεται να αποτελεί επίσης μία σημαντική φαινοτυπική έκφραση των διασκορπισμένων ενδοκρινικών κυττάρων που συνθέτουν και εκκρίνουν μικρές πολυπεπτιδικές ορμόνες [102]. Με δεδομένο αυτό, δημιουργείται η άμεση σύνδεση της DDC με πολλούς τύπους νεοπλασμάτων που εκφράζουν ενδοκρινή κύτταρα πλούσια στο ένζυμο, με χαρακτηριστικότερο τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα όπου σε διαφορετικά στάδια διαφοροποίησης εμφανίζει υψηλή δραστικότητα DDC τόσο *in vivo* όσο και σε κυτταροκαλλιέργειες [103], [104]. Υψηλή ενεργότητα της DDC εμφανίζει επίσης ο πρωτογενής καρκινοειδής όγκος εντέρου και ο καρκίνος ήπατος [105], [106].

Η DDC αρχικά εκχυλίστηκε και χαρακτηρίστηκε από νεφρό χοίρου [107]–[109] και στη συνέχεια από ήπαρ, νεφρό και φαιοχρωμοκύττωμα αρουραίου [110]–[112], ραβδωτό σώμα εγκεφάλου και μυελό επινεφριδίων βοός [113]–[115], ανθρώπινο νεφρό [116] και ανθρώπινο φαιοχρωμοκύττωμα [117], [118]. Μερικώς έχει εκχυλιστεί και από το λεπτό έντερο πιθήκου [119]. Επιπλέον, έχει προσδιοριστεί ενζυμική ενεργότητα στον ορό διάφορων θηλαστικών όπως είναι τα ινδικά χοιρίδια, οι αρουραίοι, τα ποντίκια και οι πίθηκοι [120]. Η ενεργότητα της DDC αποτελεί μέτρο ένδειξης της ικανότητας των ιστών να παράγουν DA σε

αντίθεση με την υδροξυλάση της τυροσίνης (TH) όπου η ενεργότητά της εξαρτάται και προσαρμόζεται στις ανάγκες της ντοπαμινεργικής δράσης [121], [122].

1.4.2. Δομή και ιδιότητες της DDC

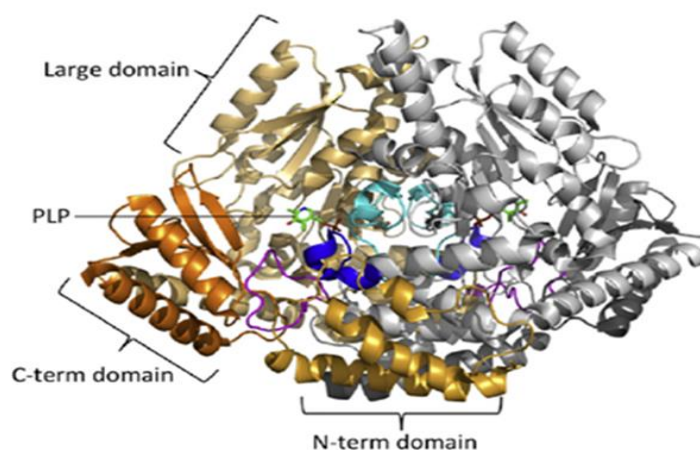
Η DDC αποτελεί ένα δομικό και λειτουργικό ομοδιμερές ένζυμο μοριακού βάρους 100-110 kDa με την τυπική οργάνωση των PLP ενζύμων της α-ομάδας αμινοτρανσφερασών και την κάθε υπομονάδα να έχει μοριακό βάρος μεταξύ 50-55 kDa [95], [116], [123], [124]. Η μελέτη της δομής του ενζύμου έχει πραγματοποιηθεί κυρίως σε νεφρό χοίρου όπου φαίνεται να αποτελείται από δύο υπομονάδες πανομοιότυπης μοριακής μάζας των 52 kDa [109], [125]. Η συνολική δομή της DDC δείχνει το στενά συνδεδεμένο διμερές να έχει το ενεργό κέντρο κρυμμένο στην κεντρική περιοχή. Το κάθε μονομερές συντίθεται από ένα μεγάλο τμήμα 309 αμινοξικών καταλοίπων που περιέχει το σημείο πρόσδεσης με την PLP, ένα καρβοξυτελικό τμήμα 86 καταλοίπων τυπικό γνώρισμα της οικογένειας των ασπαρτικών αμινοτρανσφερασών κι ένα αμινοτελικό τμήμα 85 καταλοίπων χαρακτηριστικό της υποομάδας II των αποκαρβοξυλασών [126], [127]. Η κεντρική περιοχή έχει διαμόρφωση β-πτυχωτής επιφάνειας και περιβάλλεται από 8 α-έλικες, η καρβοξυτελική περιοχή υιοθετεί διαμόρφωση αντιπαράλληλης β-επιφάνειας με 3 α-έλικες και η αμινοτελική περιοχή αποτελείται από 2 α-έλικες [124], [128], [129]. Υποστηρίζεται επίσης ότι η δομή του ενζύμου είναι ετεροδιμερής με τα δύο μονομερή που την αποτελούν να διαφέρουν σε μοριακό βάρος, 43 kDa και 50 kDa στο χοίρο και 46 kDa και 50 kDa στη νύμφη *Calliphora vicina* [130], [131].

Η ανθρώπινη DDC αποτελείται από 480 αμινοξέα [115]. Η ανάλυση του αποενζύμου της ανθρώπινης DDC έδειξε ότι υιοθετεί μία ανοιχτή διαμόρφωση με δύο λοβούς όπου το ενεργό κέντρο εκτίθεται στον διαλύτη και η διεπιφάνεια του διμερούς αποτελεί το σημείο περιστροφής του ενζύμου σε αντίθεση με το ολοένζυμο που έχει κλειστή διαμόρφωση. Η μεταβολή από τη μία μορφή στην άλλη πραγματοποιείται με την προσθήκη της PLP [124]. Μεταξύ των πιο συντηρημένων αμινοξικών καταλοίπων είναι σίγουρα το Lys303 καθώς αποτελεί το σημείο πρόσδεσης με την PLP. Έρευνες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις αυτού του καταλοίπου οδηγούν σε μείωση της αντίδρασης αποκαρβοξυλίωσης, καθώς εμπλέκεται στο σχηματισμό της εξωτερικής αλδιμίνης και την υδρόλυση [132].

Αντιθέτως, μεταλλάξεις στο κατάλοιπο Cys111 δείχνουν ότι δεν κατέχει καταλυτικό ρόλο, αλλά λόγω της τοπολογίας του κοντά στο σημείο πρόσδεσης με την PLP συμμετέχει ενεργά στη διατήρηση της σωστής διαμόρφωσης του ενεργού κέντρου [133]. Πειράματα μεταλλαξογένεσης σε αμινοξικά κατάλοιπα της DDC προερχόμενη από ήπαρ αρουραίου ανέδειξαν το ρόλο των His192, Asp252, Asp271, Ser296, Lys303, Tyr332 και Arg335 στη διατήρηση της καταλυτικά ενεργής DDC [134].

Το βέλτιστο pH ενζυμικής ενεργότητας με υπόστρωμα την L-Dopa είναι το 6.5 ενώ με την L-5-HTP το φάσμα του βέλτιστου pH είναι ευρύ μεταξύ των τιμών 7.0 και 8.4 [135]. Το ολοένζυμο της DDC περιέχει 1 mol φωσφορικής πυριδοξάλης ανά mol πρωτεΐνης συνδεδεμένο με ένα αμινοξικό κατάλοιπο λυσίνης της ε-αμινομάδας του αποενζύμου [136]. Η υποστρωματική εξειδίκευση της DDC είναι μικρή, ωστόσο παρουσιάζει υψηλή ενεργότητα έναντι της 5-HTP κι ακόμη μεγαλύτερη όταν το υπόστρωμα είναι η L-Dopa [137]. Γενικά στους περισσότερους ιστούς ο ρυθμός αποκαρβοξυλίωσης ακολουθεί την εξής σειρά : L-Dopa, 5-HTP, τρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη, p-τυροσίνη και ιστιδίνη [137].

Κατά γενική ομολογία, η DDC θεωρείται ένα κυτοσολικό ένζυμο. Ωστόσο έχει αναδειχθεί ενζυμική ενεργότητα που σχετίζεται και με τη μεμβράνη [138]. Η ενζυμική ενεργότητα είναι αυξημένη στην ελεύθερη DDC συγκριτικά με την μεμβρανοσυνδεδεμένη [139].



Εικόνα 1.4.4.: Αναπαράσταση της διμερούς δομής της DDC. Διακρίνεται το ενεργό κέντρο με την PLP, η κεντρική, η καρβοξυτελική και η αμινοτελική περιοχή του ενός μονομερούς [98].

1.4.3. Τοπολογία και έκφραση της DDC

Η DDC εντοπίζεται σε θηλαστικά, έντομα και φυτά. Στα θηλαστικά έχει ταυτοποιηθεί τόσο σε νευρικούς όσο και μη νευρικούς ιστούς. Ωστόσο, δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος της στους μη νευρικούς ιστούς όπως είναι οι νεφροί και το ήπαρ όπου εκεί παρουσιάζει υψηλή έκφραση [95].

Στα έντομα η συμπεριφορά και η ανάπτυξη εξαρτάται από την DA και τη σεροτονίνη που συντίθενται από την DDC. Συγκεκριμένα η DDC φαίνεται να εμπλέκεται στην επούλωση, στην άμυνα από παράσιτα, στη χρωστική και στη σκλήρυνση του επιδερμίδιου [140], [141]. Όπως στα σπονδυλωτά έτσι και στα ασπόνδυλα η DA και η σεροτονίνη εμπλέκονται στην εκμάθηση. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της DDC επηρέασαν αρνητικά την εκμάθηση στη *Drosophila* [97]. Επιπλέον, η διακύμανση της σύνθεσης των μονοαμινών φαίνεται να λειτουργεί ως παράγοντας στη φυσική ποικιλία της διάρκειας ζωής δείχνοντας ότι η DDC επηρεάζει τη μακροζωία στη *Drosophila* [142]. Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η DDC κατέχει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό της επιδερμίδας στο ημίπτερο *Rhodnius prolixus* επηρεάζοντας την έκδυση, την επιβίωση και την αναπαραγωγή [143].

Στα φυτά υπάρχουν δύο είδη αποκαρβοξυλασών, η αποκαρβοξυλάση της L-τρυπτοφάνης (L-Tryptophan Decarboxylase-TDC) και η αποκαρβοξυλάση της L-τυροσίνης (L-Tyrosine Decarboxylase-TYDC) οι οποίες παρουσιάζουν υποστρωματική εξειδίκευση για τα L-αμινοξέα με πλευρικές αλυσίδες είτε ινδόλης είτε φαινόλης αλλά όχι και για τα δύο. Ο ρόλος τους σχετίζεται με την ορμονική σύνθεση και την ωρίμανση των φυτών. Η απομόνωση των TDC και TYDC γονιδίων έχει χρησιμοποιηθεί για τη γενετική τροποποίηση της ρύθμισης δευτερογενών μεταβολικών μονοπατιών σε διάφορα είδη φυτών ενώ παράλληλα οι δύο αυτές μορφές της DDC μπορούν να παράγουν αρωματικά αλκαλοειδή που λειτουργούν ως πρόδρομα φαρμακευτικά ενεργά μόρια [144].

Το ένζυμο μεταξύ των θηλαστικών και των εντόμων παρουσιάζει μεγάλη ομολογία στη δομή των υπομονάδων, στο μοριακό βάρος, στις κινητικές ιδιότητες και στην υποστρωματική εξειδίκευση [145]. Το ποσοστό ομολογίας της DDC μεταξύ θηλαστικών και εντόμων προσεγγίζει το 52% [125]. Το ποσοστό ανέρχεται στο 70% εάν η σύγκριση περιοριστεί μεταξύ των θηλαστικών [109]. Αναλυτικότερα

μεταξύ ανθρώπινης DDC και βοός αγγίζει το 88% [115], η σύγκριση με τον αρουραίο φτάνει το 89 % και το χοίρο το 90% [95].

Η DDC εντοπίζεται σε όλη την έκταση του ΠΝΣ και του ΚΝΣ, από τον οσφρητικό λοβό μέχρι τον προμήκη μυελό κυρίως σε μονοαμινεργικούς νευρώνες (ή βιοενζυματικούς) που περιέχουν κατεχολαμίνες και σεροτονίνη όπως επίσης και στα χρωμιόφιλα κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων [146]. Ανοσοδραστικότητα της DDC έχει επίσης εντοπιστεί σε μη-μονοαμινεργικούς νευρώνες (ή μονοενζυματικούς) που κατηγοριοποιούνται ως νευρώνες τύπου D και δεν έχουν μονοαμινικούς νευροδιαβιβαστές [146]. Οι μονοαμινεργικοί νευρώνες μπορούν να υποδιαιρεθούν περαιτέρω σε αυτούς που παράγουν DA και 5-HT (5-υδρόξυ-τροπταμίνη, σεροτονίνη) ανάλογα με το αν περιέχουν υδροξυλάση τυροσίνης (TH) ή υδροξυλάση τρυπτοφάνης (TPH) αντίστοιχα [147], [148]. Οι περιοχές που εμφανίζουν υψηλή ενεργότητα του ενζύμου στον ανθρώπινο εγκέφαλο είναι: το κέλυφος, ο κερκοφόρος πυρήνας, η επίφυση, ο υποθάλαμος, ο δικτυωτός σχηματισμός και οι ραχιαίες περιοχές της ραφής του μεσεγκεφάλου [149]. Τα κύτταρα που περιέχουν DDC αλλά όχι TH και TPH ονομάζονται D-κύτταρα και συγκεκριμένα αυτά που βρίσκονται στο νωτιαίο μυελό είναι τα D1 [146]. Στον αρουραίο έχειδειχθεί ότι η DDC διανέμεται ετερογενώς σε πολλές περιοχές του νωτιαίου μυελού ασκώντας διαφορετικές λειτουργίες σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις ενώ έχει εντοπιστεί στον αμφιβληστροειδή και στα επινεφρίδια [150], [151]. Έκφραση της DDC έχει επίσης εντοπισθεί στα υποστηρικτικά κύτταρα του εγκεφάλου τη μικρογλοία σε ορισμένα θηλαστικά [152], [153].

Βιοχημικά και κυτταροχημικά έχει επίσης ανιχνευθεί σε περιφερικά όργανα συμπεριλαμβανομένων του νεφρού, του ήπατος, των ενδοκρινών αδένων, του στόμαχου, της σπλήνας, του παγκρέατος, του πνεύμονα, κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού, των ενδοθηλιακών κυττάρων στα αιμοφόρα αγγεία, των λευκοκυττάρων, του ορού και πλάσματος ορού και του πλακούντα [100], [120], [146], [154]–[160]. Ο εντοπισμός της DDC στα περιφερικά λευκοκύτταρα και στα T-κύτταρα καταδεικνύει την εμπλοκή των ενζυματικών μονοπατιών βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών στο ανοσοποιητικό σύστημα [157]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η υψηλότερη ενεργότητα του ενζύμου παρουσιάζεται στους νεφρούς και το ήπαρ με επικρατέστερο ρόλο το μεταβολισμό άλλων αρωματικών αμινοξέων [100]. Καθώς η DDC αποτελεί το βιοσυνθετικό ένζυμο για την παραγωγή της DA, η

τοπολογία της DA συνδέεται με την παρουσία της DDC. Για παράδειγμα, η παρουσία της DA στην εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος έχει αποδώσει στην DA έναν παρακρινή ορμονικό ρόλο εκτός ΚΝΣ, ο οποίος είναι η προστασία του βλεννογόνου του εντέρου από τη φλεγμονή [161]. Επίσης, η τοπικά παραγόμενη DA στο εγγύς νεφρικό σωληνάριο επάγει την αναστολή της δράσης της ATPάσης Na^+/K^+ με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Η αναστολή αυτή μεσολαβείται από έναν σύνθετο μηχανισμό που απαιτεί την ενεργοποίηση των δύο μεμβρανικών υποδοχέων της DA, DA-1 και DA-2 και της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) [162]. Το νεφρικό ντοπαμινεργικό σύστημα λοιπόν αποτελεί έναν φυσιολογικό ρυθμιστή της έκκρισης Na^+ και συμβάλλει στην ομοιοστάση της αρτηριακής πίεσης. Καθώς η DA στο εγγύς νεφρικό σωληνάριο παράγεται μέσω της DDC, πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η μη-συνώνυμη παραλλαγή στο εξόνιο 14 του γονιδίου της DDC, Arg462Gln, είναι λειτουργική και μεταβάλλει την έκκριση της νεφρικής DA και κατ'επέκταση επηρεάζει τη νεφρική λειτουργία [163].

Σχετικά με την υποκυτταρική τοπολογία της DDC η αρχική θεώρηση υποστήριζε ότι πρόκειται για ένα αμιγώς διαλυτό ένζυμο του κυτοσολίου [96], [164]. Ωστόσο, πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου μας σε κυτταρικές σειρές νευρικής και μη προέλευσης έχουν αποδείξει την παρουσία ενζυμικά ενεργής DDC τόσο στο διαλυτό όσο και στο μεμβρανικό κλάσμα [139]. Η παρουσία της DDC στα δύο κλάσματα έχει βρεθεί επίσης στην κυτταρική σειρά μακροφαγικής προέλευσης U937 [165] και σε περιφερικά λευκοκύτταρα [157]. Πειράματα ανοσοσύτωσης σε ιστούς θηλαστικών και στο έντομο *Ceratitis capitata* επίσης αποδεικνύουν την ύπαρξη της DDC στο μεμβρανικό κλάσμα και μάλιστα στο υδρόφοβο τμήμα [138], [166], [167].

1.4.4. Ρύθμιση της ενεργότητας της DDC

Ο συμπαραγοντας της DDC είναι η 5'-φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) που αποτελεί φωσφορικό εστέρα της βιταμίνης Β6. Όλα τα ένζυμα που χρησιμοποιούν την PLP ως συμπαραγοντα δρουν πάνω σε αμινοξέα. Η PLP έχει δύο βασικές χημικές ιδιότητες: μέσω της αλδεϋδικής ομάδας σχηματίζει ιμίνες με τις αμινομάδες των υποστρωμάτων οι οποίες σταθεροποιούνται με δεσμούς υδρογόνου κι επίσης αποσπά ηλεκτρόνια από το υπόστρωμα [168]. Διασχίζει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό υπό την μορφή των προδρόμων της βιταμίνης Β6, πυριδοξάλη (pyridoxal,

PL), πυριδοξίνη (pyridoxine, PN) και πυριδοξαμίνη (pyridoxamine, PM) και στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται από τη πυριδοξαλική κινάση (pyridoxal kinase, PLK) [169]. Συγκεκριμένα στην περίπτωση της DDC, η PLP δεσμεύεται ομοιοπολικά στο ενεργό κέντρο στο αμινοξικό κατάλοιπο Lys303 μέσω μίας βάσης Schiff (εσωτερική αλδιμίνη) που βρίσκεται στην επαφή των δύο μονομερών και αλληλεπιδρά με άλλα αμινοξικά κατάλοιπα [98]. Η σημασία της PLP έγκειται στο γεγονός ότι η διαθεσιμότητά της καθορίζει την ισορροπία μεταξύ του αποενζύμου και του ολοενζύμου και η δέσμευσή της στο αποένζυμο φαίνεται να αντιπροσωπεύει τον βασικό μηχανισμό ρύθμισης των ενζύμων [170], [171]. Επιπλέον, η εξωγενής χορήγηση PLP αυξάνει τη δραστηριότητα της DDC σε διπλάσια έως και πενταπλάσια επίπεδα [172].

Αρχικά υπήρχε η αντίληψη ότι η DDC είναι ένα μη ρυθμιζόμενο ένζυμο. Ωστόσο, ενδείξεις έπειτα από πειράματα στον αμφιβληστροειδή αρουραίου υποστηρίζουν ότι η αύξηση της ενεργότητας της DDC μπορεί να πραγματοποιηθεί έπειτα από τη χορήγηση αγωνιστών των $\alpha 2$ -αδρενοϋποδοχέων [173]. Η επιλεκτική χορήγηση των ανταγωνιστών D1, D2, D3, D4 ή ο συνδυασμός αυτών επίσης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της DDC ενεργότητας σε αντίθεση με τους αγωνιστές των υποδοχέων DA. Στους αρουραίους επίσης έχει δειχθεί ότι η δραστηριότητα της DDC επηρεάζεται και από τους D1 DA υποδοχείς, καθώς η DA που απελευθερώνεται στο σκοτάδι δεσμεύεται στους υποδοχείς D1 και καταστέλλει την έκφραση της DDC. Επομένως, το φως επηρεάζει την ενεργότητα της DDC [174], [175]. Επίσης, η φωσφορυλίωση φαίνεται να έχει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργότητας της DDC σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Ομογενοποιήματα προερχόμενα από το ραβδωτό σώμα και τον μεσεγκέφαλο ποντικού, έδειξαν ότι η cAMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και η ασβέστιο-καλμοντουλίνη-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση II (CaMKII) ενισχύουν την ενεργότητα του ενζύμου. Η έγχυση με φορσκολίνη (forskolin), με το φορβολ-12,13-μυριστικό οξύ (PMA) και με 8-bromo-cAMP ενδοεγκεφαλοκοιλιακά (icv) αυξάνει την ενεργότητα της DDC στο ραβδωτό σώμα [176]–[179].

Ορισμένα δισθενή κατιόντα φαίνεται να επηρεάζουν την ενεργότητα της DDC στα θηλαστικά, αναστέλλοντας τη δράση της. Τα κυριότερα είναι: Cu^{2+} , Hg^{2+} και Zn^{2+} . Μικρότερου βαθμού αναστολή παρατηρήθηκε παρουσία των ιόντων Ca^{2+} και Mg^{2+} [114], [116], [180]. Αντιθέτως, στα έντομα *Aedes aegypti* και *Ceratitis*

capitata δεν παρατηρείται αναστολή της DDC από τα δισθενή κατιόντα [181], [182].

Πρόσφατη έρευνα υποστηρίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) ενός βασικού ρυθμιστή μεταγωγής σήματος και της DDC, υπογραμμίζοντας το ρόλο του ενζύμου στη ρύθμιση θεμελιωδών διαδικασιών όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση [183].

1.4.5. Το γονίδιο της DDC

Το γονίδιο της DDC έχει μελετηθεί διεξοδικά στο είδος *Drosophila Melanogaster* και εδράζεται εντός ή πολύ κοντά στην πολυταινική χρωμοσωμική ζώνη 37C1-2. Το γονίδιο διακόπτεται από ένα τουλάχιστον εσώνιο και ο πρωταρχικός τρόπος ρύθμισης είναι προμεταφραστικός [184]. Στο έντομο αυτό εντοπίζεται κυρίως στο υπόδερμα και το RNA αντιπροσωπεύει μόλις το 0,01 έως 1% του πολυαδενυλιωμένου RNA ακόμη και κατά τη μέγιστη έκφραση της DDC [184]. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου αναφέρθηκε για πρώτη φορά στο έντομο όπου έχει διπλό ρόλο συμμετέχοντας στην παραγωγή των νευροδιαβιβαστών και στη σκλήρυνση της επιδερμίδας [145]. Η μελέτη στη *Drosophila Melanogaster* έδωσε τα πρώτα στοιχεία για την ύπαρξη δύο εναλλακτικών ισομορφών της DDC 2,3 kb και 2,0 kb αντίστοιχα. Η μετάφραση τους παράγει δύο πολυπεπίδια, η έκφραση των οποίων εξαρτάται από την προέλευση του ιστού και το αναπτυξιακό στάδιο και διαφέρουν κατά 25 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο του ενζύμου [145].

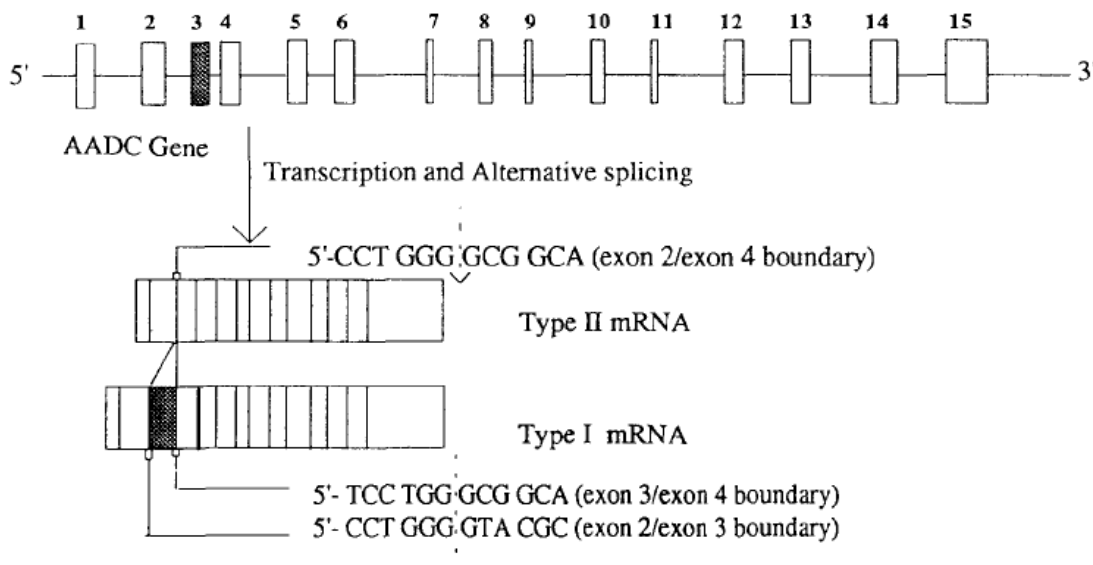
Η κλωνοποίηση του cDNA της DDC στο ήπαρ αρουραίου [185], στο μυελό των επινεφριδίων βοός [186] και στο ανθρώπινο φαιοχρωμοκύττωμα [187] δείχνει ότι οι βασικές δομές του ενζύμου είναι υψηλά διατηρημένες μεταξύ των ειδών. Στοιχείο που ενισχύει την ομολογία είναι η αμινοξική αλληλουχία Asn-Phe-Asn-Pro-His-Lys-Trp που εντοπίζεται κοντά στη θέση πρόσδεσης με την PLP και είναι ταυτόσημη μεταξύ χοίρου, ανθρώπου και *Drosophila* [187]. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την DDC σε νευρικούς και μη ιστούς είναι το ίδιο και έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 7 στην περιοχή p12.1-p12.3 [101], [125], [146]. Το γονίδιο για την ανθρώπινη DDC υφίσταται περίπλοκες διαδικασίες με αποτέλεσμα το σχηματισμό διαφορετικών ισομορφών. Το εναλλακτικό μάτισμα του

πρώτου εξωνίου στην 5'-UTR οδηγεί στην παραγωγή δύο ειδών μεταγράφων mRNA, καθένα από τα οποία εκφράζεται σε νευρικούς (N1) και μη νευρικούς ιστούς (L1) αντίστοιχα [188], [189]. Το μη νευρικού τύπου μετάγραφο φέρει το πρώτο εξώνιο (L1) με μήκος 200 ζεύγη βάσεων και εντοπίζεται 4.2 kb αναρροϊκά του πρώτου εξωνίου του νευρικού τύπου μεταγράφου και 22 kb από την αρχή του δεύτερου εξωνίου. Το μετάγραφο νευρικού τύπου φέρει το πρώτο εξώνιο (N1) μήκους 83 ζευγών βάσεων και απέχει 17,7 kb από το δεύτερο εξώνιο [188]. Η έκφραση της DDC λοιπόν στους νευρικούς και μη ιστούς φαίνεται να καθορίζεται από έναν διαφορετικό εκκινητή [188]. Επιπλέον, το mRNA της DDC περιέχει περίπου 800 αμετάφραστες βάσεις που ίσως κατέχουν κάποιο ρόλο στον καθορισμό της ιστοειδικότητας του ενζύμου [137]. Ωστόσο, υπάρχουν εξαιρέσεις ιστοειδικότητας του εναλλακτικού ματίσματος διότι στο ανθρώπινο νεφρό, στον ανθρώπινο πλακούντα, στα ανθρώπινα περιφερικά λευκοκύτταρα και πρόσφατα στο ανθρώπινο ήπαρ έχουν εντοπιστεί και τα δύο είδη mRNA (L1, N1) [156]–[158], [183], [188], [190]. Μάλιστα η ισομορφή που ταυτοποιήθηκε στον ανθρώπινο πλακούντα δεν παρουσιάζει ενζυμική ενεργότητα [158].

Το γονίδιο της ανθρώπινης DDC αποτελείται από 15 εξώνια που εκτείνονται σε περισσότερες από 85 kb, με το μέγεθος τους να ποικίλλει από 20 έως 400 ζεύγη βάσεων ενώ το μέγεθος των 14 εσωνίων βρίσκεται μεταξύ 1.0 και 17.7 kb με το πρώτο εσώνιο να έχει σημαντικά το μεγαλύτερο μήκος σε σύγκριση με τα υπόλοιπα [101]. Η κωδικοποιούσα πρωτεΐνη αποτελείται από 480 αμινοξέα (DDC₄₈₀) με μοριακή μάζα 53,9 kDa [101], [187]. Η ανάλυση των κλώνων cDNA καταδεικνύει την ύπαρξη ενός ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης μήκους 1440 νουκλεοτιδίων [189].

Το 1995 ο O 'Malley και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν ότι το γονίδιο της ανθρώπινης DDC υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα πέρα από την 5'-UTR παράγοντας δύο διαφορετικά πρωτεϊνικά προϊόντα: το DDC₄₈₀ και το DDC₄₄₂ έπειτα από πειράματα στην κυτταρική σειρά COS-7. Τα αμινοξικά κατάλοιπα 68-105 που λείπουν από την συντετηγμένη ισομορφή είναι από τα πιο συντηρημένα και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η ισομορφή αυτή δεν παρουσιάζει ενζυμική ενεργότητα ως προς την L-Dopa και την 5-HTP, εικάζεται ότι το εξώνιο 3 συμμετέχει σε λειτουργίες που καθορίζουν την τρισδιάστατη μορφή του ενζύμου που απαιτείται για να προσδεθεί το υπόστρωμα. Επιπλέον, η DDC₄₄₂ δείχνει να εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με την DDC₄₈₀ τόσο σε νευρικούς

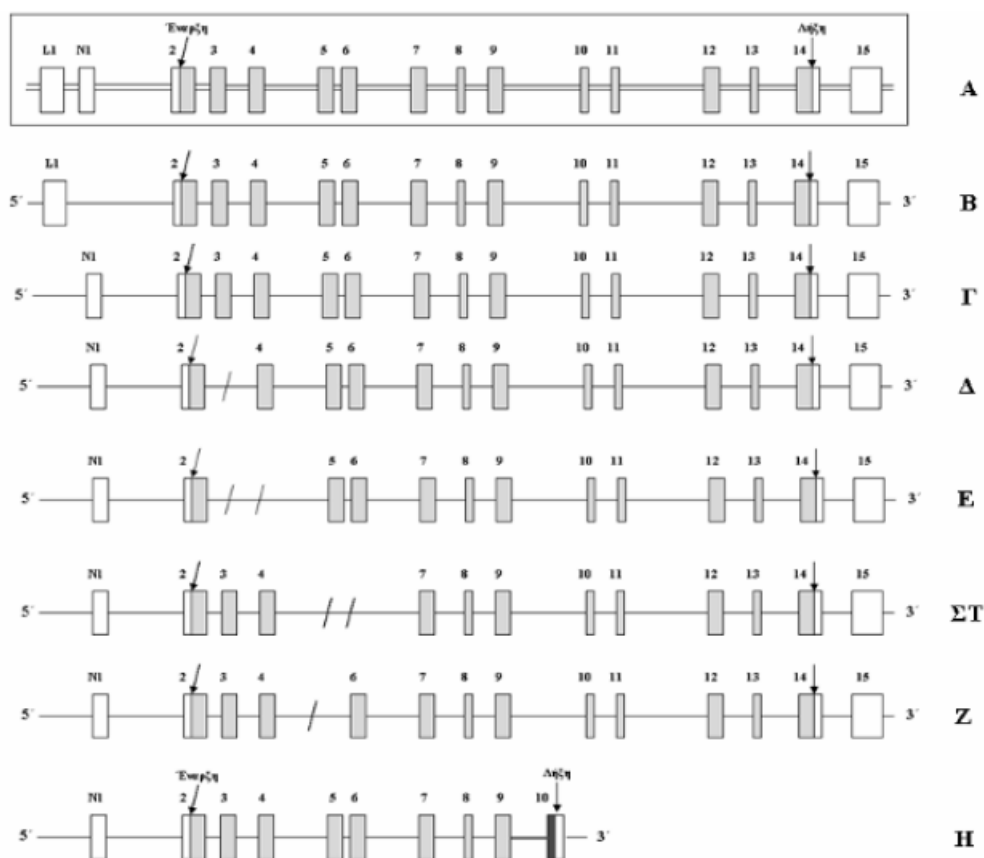
όσο και μη ιστούς και να καταλύει την αποκαρβοξυλίωση ορισμένων αμινοξέων (m-τυροσίνη, φαιτυλαλανίνη, p-τυροσίνη) με μεγαλύτερη συγγένεια [191]. Λίγο αργότερα ο Chang και οι συνεργάτες του επίσης διαπίστωσαν σε κύτταρα ανθρώπινου νευροβλαστώματος SK-N-SH ότι προκύπτει το μεταγγραφο από το οποίο λείπει το εξώνιο 3 μέσω του εναλλακτικού ματίσματος του γονιδίου της DDC. Το εναλλακτικό μάτισμα λαμβάνει χώρα εντός της κωδικής περιοχής ενισχύοντας τις υποψίες για δύο διαφορετικά πρωτεϊνικά προϊόντα που ωστόσο δε φαίνεται να ρυθμίζονται από κάποια ιστοειδικότητα καθώς τα δύο είδη mRNA συνεντοπίζονται τόσο σε νευρικούς όσο και μη νευρικούς ιστούς [192]. Η απουσία ενζυμικής ενεργότητας του εναλλακτικού μεταγράφου DDC₄₄₂ έχει αμφισβητηθεί, καθώς έχει ανιχνευθεί έκφραση του μεταγράφου στην κυτταρική σειρά μακροφαγικής προέλευσης U937 και κωδικοποιεί για μία ενεργή ισομορφή. Η παρουσία του συγκεκριμένου μεταγράφου έχει ανιχνευθεί και στα ανθρώπινα περιφερικά λευκοκύτταρα [157], [165].



Εικόνα 1.4.5.: Σχηματική απεικόνιση των δύο μορφών της DDC που προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου. Τα κουτιά αναπαριστούν τα εξώνια ενώ η γραμμή τα εσώνια. Ο τύπος I (Type I) δείχνει το πλήρες μεταγγραφο της DDC ενώ ο τύπος II (Type II) το μεταγγραφο από το οποίο λείπει το εξώνιο 3 [192].

Ένα ακόμη εύρημα του εργαστηρίου μας αποτελεί το εναλλακτικό μεταγγραφο της DDC μήκους 1.8 kb, Alt-DDC που απομονώθηκε από ανθρώπινο πλακούντα. Πρόκειται για ένα νευρικής φύσεως mRNA από το οποίο λείπουν τα

εξώνια 10-15 της πλήρους μήκους DDC και περιλαμβάνει ένα εναλλακτικό εξώνιο 10 μεγέθους 358 ζευγών βάσεων που βρίσκεται εντός του εσωνίου 9. Το μετάγραφο της Alt-DDC παρουσίασε υψηλή έκφραση στο ανθρώπινο ήπαρ δηλαδή σε μη νευρικό ιστό παρά το γεγονός ότι περιέχει το εξώνιο N1. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το συγκεκριμένο εναλλακτικό μετάγραφο έχει μοριακή μάζα 37 kDa και αποτελείται από 338 αμινοξέα εκ των οποίων τα 315 είναι ταυτόσημα με την πρωτεΐνη της DDC, ενώ τα υπόλοιπα 23 του καρβοξυτελικού άκρου που κωδικοποιούνται από το εναλλακτικό εξώνιο 10 δεν υπάρχουν στην πλήρους μήκους DDC [190].



Εικόνα 1.4.6.: Σχηματική απεικόνιση ορισμένων εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου της ανθρώπινης DDC.

1.4.5.1. Ανεπάρκεια της DDC

Ο ρόλος της DDC για το ΚΝΣ είναι υψίστης σημασίας κι αυτό διακρίνεται από τις εξαιρετικά σπάνιες περιπτώσεις των μεταλλάξεων που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του ενζύμου κι έχουν ως συνέπεια το καταστρεπτικό νευροαναπτυξιακό σύνδρομο της DDC ανεπάρκειας (DDC deficiency syndrome).

Με δεδομένο ότι η DDC συμμετέχει σε βιοσυνθετικά μονοπάτια αξίζει να αναφερθεί ότι η έλλειψη DA επηρεάζει τη γνωστική λειτουργία, τη συναισθηματική κατάσταση καθώς και την εκούσια κίνηση. Αντίστοιχα τα χαμηλά επίπεδα επινεφρίνης και νορεπινεφρίνης διαταράσσουν τα επίπεδα ορμονών, τη διάθεση, την προσοχή και τη λειτουργία του ύπνου. Η μειωμένη έκφραση σεροτονίνης επηρεάζει μία σειρά ανάλογων λειτουργιών συμπεριλαμβανομένων του ύπνου, της διάθεσης, της μνήμης, της μάθησης, της θερμοκρασίας του σώματος, της καρδιαγγειακής και ενδοκρινούς λειτουργίας [193].

Πρόκειται για μία αυτοσωμική επικρατή νευρομεταβολική διαταραχή που έχει ως συνέπεια την ανεπάρκεια συνδυασμού σεροτονίνης και κατεχολαμινών [98], [194]. Η πρώτη αναφορά που συσχέτισε την έλλειψη της DDC με την ελαττωματική βιοσύνθεση των αμινών έγινε το 1990 [195]. Η ελλιπής σύνθεση της DDC εξαιτίας κάποιας ανερμηνεύσιμης μετάλλαξης ή αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης λόγω αντικατάστασης ενός αμινοξικού καταλοίπου έχει ως αποτέλεσμα ποικίλες παθολογικές καταστάσεις μεταξύ των οποίων είναι η εξασθενημένη γνωστική και φυσιολογική ομοιόσταση, η απώλεια συντονισμού της κίνησης και οι νευροψυχιατρικές διαταραχές [95]. Κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου περιλαμβάνουν υποτονία, υποκινησία, βολβοστροφικές κρίσεις, καθυστέρηση ανάπτυξης και ενδείξεις δυσλειτουργίας της αυτονομίας από τη βρεφική ηλικία [194], [196]. Η πρωταρχική μέθοδος διάγνωσης του συνδρόμου αποτελεί η ανάλυση των νευροδιαβιβαστών από δείγμα ENY [196]. Η ανταπόκριση στη θεραπεία ειδικά των ασθενών με έντονα συμπτώματα δεν είναι ικανοποιητική και γι' αυτό οι μελέτες έχουν στραφεί προς τη γονιδιακή θεραπεία με χρήση ενός φορέα, όπου το γονίδιο της DDC με τον εκκινητή του κυτταρομεγαλοϊού (cytomegalovirus, CMV) εισάγεται μέσα σ' έναν φορέα του αδενοσχετιζόμενου ιού τύπου 2 (adenoassociated virus type 2, AAV-2) [98], [197], [198].

Αντίστοιχα, οι πολυμορφισμοί (SNPs) στο γονίδιο της DDC έχουν προταθεί ως πηγή των λιγότερο σοβαρών αλλά εξίσου κλινικώς σημαντικών αλλαγών στη λειτουργία του ενζύμου που ίσως συμβάλλουν στον κίνδυνο, την πορεία και τη θεραπευτική προσέγγιση ορισμένων νευροψυχιατρικών διαταραχών [199], για παράδειγμα η μεταιχμιακή διαταραχή προσωπικότητας (Borderline personality disorder, BPD) [200]. Η σύνδεση της DDC με τη σχιζοφρένεια είναι επίσης γνωστή καθώς πρόκειται για μία ντοπαμινεργική διαταραχή. Ανάλυση γενοτύπων

σχιζοφρενών ασθενών και φυσιολογικών ατόμων έδειξε τη σύνδεση μεταξύ της DDC και της προδιάθεσης για σχιζοφρένεια [201]. Αξίζει να αναφερθεί και η σύνδεση της DDC με το αυτοάνοσο πολυενδοκρινικό σύνδρομο τύπου I (Autoimmune polyendocrine syndrome type I), όπου η DDC αποτελεί αυτοαντιγόνο και μάλιστα ανάλυση του ορού ασθενών έδειξε ότι τα αντισώματα IgG αναστέλλουν την ενεργότητα του ενζύμου [202].

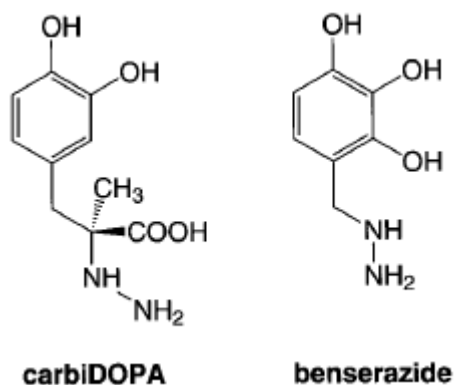
1.4.6. Αναστολείς της DDC

Η βασική θεραπευτική προσέγγιση της PD είναι η αναπλήρωση της απώλειας της DA καθώς οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες είναι αυτοί που πλήττονται. Επομένως, η χορήγηση της L-Dopa παραμένει ο χρυσός κανόνας με την παράλληλη συγχορήγηση περιφερικών αναστολέων της DDC που δεν διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό έτσι ώστε να παραχθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα DA στον εγκέφαλο μειώνοντας τον καταβολισμό της L-Dopa από το περιφερικό ντοπαμινεργικό σύστημα. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα ωστόσο, είναι ότι οι περισσότεροι αναστολείς στοχεύουν τον συμπαραγοντα PLP κι επομένως δεν είναι ειδικοί για την DDC [95]. Αξίζει να σημειωθεί ότι ανάλογα με την εξέλιξη της ντοπαμινεργικής απώλειας, η αποκαρβοξυλίωση της L-Dopa από την DDC στο ραβδωτό σώμα αναμένεται να πραγματοποιείται σταδιακά και σε μη ντοπαμινεργικές περιοχές χωρίς όμως να είναι ακόμη γνωστή η ρύθμιση της DDC σε αυτές τις περιοχές [176]. Επίσης, η μεμονωμένη χορήγηση L-Dopa δημιουργεί σοβαρές γαστρεντερικές παρενέργειες κυρίως κατά το πρώτο έτος της θεραπείας [203]. Συνεπώς, απαιτείται η χορήγηση της L-Dopa να πραγματοποιείται με τρόπο αποτελεσματικό που να αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα και να έχει τις λιγότερες παρενέργειες.

Η Carbidopa (α -methyL-Dopahydrazine) είναι μία εκ των περιφερικών μη ανταγωνιστικών αναστολέων της DDC, η δέσμευση της οποίας μιμείται το ενδιάμεσο της DDC που είναι μια εξωτερική αλδιμίνη [98]. Η χημεία της βασίζεται στην ομάδα της υδραζίνης (H_2NNH_2) που σχηματίζει ένα παράγωγο υδραζόνης με την PLP απενεργοποιώντας έτσι το ένζυμο κι επιτρέποντας μεγαλύτερη ποσότητα της L-Dopa να φτάσει στον εγκέφαλο και να μετατραπεί σε DA βελτιώνοντας τα συμπτώματα της PD [128]. Ως περιφερικός αναστολέας, η Carbidopa δε διασχίζει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και αναστέλλει την μετατροπή της L-Dopa σε DA

εκτός ΚΝΣ μειώνοντας έτσι τις παρενέργειες στους περιφερικούς ιστούς από τη χορήγηση της L-Dopa σε ασθενείς που βρίσκονται σε θεραπεία για την PD. Νέα δεδομένα, υποστηρίζουν επίσης τον ανοσοκατασταλτικό ρόλο της Carbidopa καθώς φαίνεται να εμπλέκεται στην αδρανοποίηση των αποκρίσεων των T-κυττάρων και της αυτοανοσίας [204]. Η Carbidopa έχει μελετηθεί από τον Gilbert και τους συνεργάτες του ως πιθανός αντικαρκινικός στόχος καθώς όπως έχει ήδη αναφερθεί η DDC παρουσιάζει υψηλή ενεργότητα σε νεοπλασίες. Συγκεκριμένα, σε καρκινοειδή κύτταρα πνεύμονα NCI-H727 και κύτταρα μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (small cell lung cancer, SCLC) NCI-H146 και NCI-H209 έδειξε πλήρη αναστολή της ενδοκυτταρικής DDC, ενώ μέτρια κυτταροτοξικότητα αναδείχθηκε στην κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος SK-N-SH και στην κυτταρική σειρά ραβδομυοσαρκώματος A204. Πιθανόν, η Carbidopa να εμπλέκεται στην αναστολή σχηματισμού ενός παράγοντα που απαιτείται για την ανάπτυξη και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί περαιτέρω ο μηχανισμός δράσης της [105].

Παρόμοια δράση με την Carbidopa έχει και η Benserazide (DL-σερυλ-τριϋδροξυ-βενζυλυδραζίνη, DL-Seryltrihydroxybenzylhydrazine) η οποία συγχορηγείται με την L-Dopa. Η μακροχρόνια χορήγηση της L-Dopa στους παρκινσονικούς ασθενείς οδηγεί στο φαινόμενο “on-off” κατά το οποίο σημειώνονται κινητικές διακυμάνσεις από ακινησία έως υπερκινησία [205], [206]. Αρχικές μελέτες υποστήριζαν ότι η συγχορήγηση ενός αναστολέα της DDC βελτιώνει τα συμπτώματα του φαινομένου κάτι που δεν ισχύει απόλυτα. Ο προτεινόμενος τρόπος αντιμετώπισης είναι η τροποποίηση του θεραπευτικού σχήματος αλλάζοντας τις δοσολογίες της L-Dopa προς επίτευξη της φυσιολογικής κινητικότητας [205]. Πρόσφατη έρευνα αναδεικνύει μία εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση όπου η benserazide θα χορηγείται ως ναυοφορέας. Στο σύστημα αυτό, γίνεται αξιοποίηση των ναυοσωματιδίων όπου με ρύθμιση των επιθυμητών χαρακτηριστικών (μέγεθος, σχήμα, υδροφοβικότητα) μπορεί να αυξηθεί η διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και τελικά μεγαλύτερη ποσότητα της L-Dopa να καταλήγει στον εγκέφαλο [207].



Εικόνα 1.4.7.: Χημική δομή των αναστολέων της DDC [128].

Μεταξύ άλλων αναστολέων της DDC είναι και η α-methyl-dopa (AMD) όπου πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι η χρόνια χορήγησή της μειώνει αισθητά τα επίπεδα της DDC πρωτεΐνης σε όλους τους ιστούς [208], [209]. Ορισμένα ανάλογα της α-methyl-dopa όπως είναι το D,L-α-μεθυλ-α-υδραζινο-3,4-διϋδροξυ-φαινυλπροπιονικό οξύ (HMD) λειτουργούν επίσης ανασταλτικά για την DDC καθώς επίσης και οι ενώσεις που αλκυλιώνουν την DDC όπως είναι τα παράγωγα της dopa: α-chloromethyl dopa και α-fluoromethyl dopa [95], [210], [211].

Εκτός από τους χημικούς αναστολείς της DDC έχουν προσδιοριστεί ενδογενείς αναστολείς στον όρο αίματος πιθήκου με κύριο υπόστρωμα την L-5-HTP, στους σιελογόνους αδένες αρουραίου, στο ανθρώπινο φαιοχρωμοκύττωμα, στον ανθρώπινο ορό αίματος με βασικό υπόστρωμα την L-Dopa και στο μεμβρανικό κλάσμα του ανθρώπινου πλακούντα που αποτελεί την αννεξίνη V και είναι μη συναγωνιστικός αναστολέας [118], [212]–[215].

1.4.6.1. Ο αναστολέας της DDC: NSD-1015

Ένας ακόμη χημικός αναστολέας της DDC που έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως *in vitro* για τον προσδιορισμό της ντοπαμινεργικής ενεργότητας είναι ο NSD-1015 ή 3-υδροξυ-βενζυλ-υδραζίνη (3-hydroxybenzylhydrazine). Τα πρώτα πειράματα με τον NSD-1015 σε αρουραίους έδειξαν ότι η χορήγησή του στον εγκέφαλο οδηγεί σε συσσώρευση της 5-υδροξυ-τρυπτοφάνης (5-HTP) και της L-Dopa και αποτελεί μέτρο της *in vivo* ενεργότητας της υδροξυλάσης τυροσίνης και τρυπτοφάνης [216]. Ο Li και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ο NSD-1015 ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου της DDC σε κύτταρα φαιοχρωμοκυττώματος από μυελό επινεφριδίων

αρουραίου (PC12), αυξάνοντας τα επίπεδα του mRNA και κατά συνέπεια της πρωτεΐνης της DDC με δοσοεξαρτώμενο τρόπο [217]. Σε συμπυκνωμένα θραύσματα από το ραβδωτό σώμα αρσενικών αρουραίων παρατηρήθηκε ότι ο NSD-1015 αυξάνει ισχυρά την απελευθέρωση της DA in vitro με τρόπο που εξαρτάται από το ασβέστιο, αναδεικνύοντας την εμπλοκή του αναστολέα της DDC στο μεταβολισμό της DA [218]. Προς την ίδια κατεύθυνση είναι τα αποτελέσματα διαφορετικής ερευνητικής ομάδας που υποστηρίζουν ότι ο NSD-1015 δρα ως αναστολέας της οξειδάσης της μονοαμίνης (MAO) διατηρώντας τα επίπεδα της DA στο ραβδωτό σώμα μέσω της μείωσης του μεταβολισμού της [219]. Σε αντίθεση με άλλους αναστολείς της DDC όπως είναι η Carbidopa και η Benserazide, ο NSD προκαλεί επιδείνωση των κινητικών συμπτωμάτων της PD, υποδεικνύοντας τον κεντρικό ρόλο που έχει στον έλεγχο της κίνησης. Η επιδείνωση αυτή πιθανόν προκύπτει από την ενδογενή συσσώρευση της L-Dopa κάτι που δεν παρατηρείται όταν η χορήγηση της L-Dopa είναι εξωγενής με περιφερικό αναστολέα πάλι τον NSD-1015 [220].

1.4.7. Η σύνδεση της L-Dopa με την PD

Η L-Dopa ή levodopa αποτελεί το φυσικό L-ισομερές του αμινοξέος L-διϋδροξυφαιτυλαλάνη και απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1910-1911 από τον κύαμο *Vicia faba*. Μόλις το 1960 ο Hornykiewicz παρατήρησε ότι οι εγκέφαλοι ασθενών με PD παρουσιάζουν αξιοσημείωτη απώλεια DA στον κερκοφόρο πυρήνα και στο κέλυφος και το 1967 ο Cotzias και οι συνεργάτες του εισήγαγαν στην κλινική πρακτική τη χρόνια υψηλή δόση L-Dopa εκ του στόματος [221], [222]. Το 1969 αποσαφηνίστηκε ότι το L-ισομερές μετατρέπεται σε DA και τελικά το 1970 η L-Dopa εγκρίθηκε από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων της Αμερικής (Food and Drug Administration, FDA) ως θεραπεία για την PD [223], [224]. Με δεδομένο ότι πλέον η L-Dopa συγχορηγείται με έναν περιφερικό αναστολέα της DDC, αρχικά μετατρέπεται στο μεταβολίτη 3-O-μεθυλντόπα (3-O-methyldopa, 3-OMD) από το ένζυμο κατεχολ-Ο-μεθυλτρανσφεράση (COMT) το οποίο βρίσκεται στους νευρώνες του μελαινοραβδωτού σώματος, στο αίμα καθώς και σε περιφερικούς ιστούς [225].

Η L-Dopa μπορεί να υποβληθεί σε διαδικασίες αυτοοξειδωσης παράγοντας τοξικά προϊόντα όπως είναι οι κινόνες, οι ελεύθερες ρίζες και η νευροτοξίνη 6-

υδροξυ-ντοπαμίνη επηρεάζοντας αρνητικά τα ντοπαμινεργικά και νοραδρενεργικά νευρικά κύτταρα έπειτα από χορήγησή της [226]. Στα ποντίκια η μακροχρόνια έκθεση σε L-Dopa δεν έδειξε να επηρεάζει τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, αλλά ο σχηματισμός των κυτταροτοξικών παραπροϊόντων στους εναπομείναντες νευρώνες μπορεί να προκαλέσει παρενέργειες που σχετίζονται με τον κυτταρικό μεταβολισμό χωρίς να προκαλούν επί της ουσίας νευρωνικό θάνατο [226].

Κατά τα αρχικά στάδια θεραπείας με L-Dopa οι παρκινσονικοί ασθενείς παρουσιάζουν ικανοποιητική απόκριση παρά το μικρό χρόνο ημίσειας ζωής (~ 1.5h) πιθανόν λόγω της καλά συντηρημένης ικανότητας των προσυναπτικών νευρικών απολήξεων να αποθηκεύουν DA. Στην εξέλιξη της νόσου όμως και με δεδομένο ότι το 56% της L-Dopa αποτυγχάνει να φτάσει στον εγκέφαλο, η συνεχής απώλεια της μέλαινας ουσίας καθιστά τη λήψη L-Dopa σταδιακά αναποτελεσματική προκαλώντας παράλληλα κινητικές διακυμάνσεις όπως έχει ήδη αναφερθεί [227], [228]. Ο Devos και οι συνεργάτες του υποστηρίζουν ότι ορισμένοι πολυμορφισμοί στον εκκινητή του γονιδίου της DDC (rs921451, rs3837091) μπορούν να επηρεάσουν την απόκριση στην L-Dopa στο επίπεδο της κίνησης θέτοντας το συλλογισμό ότι η DDC λειτουργεί ως γενετικός τροποποιητής στην απόκριση της θεραπείας [229]. Πολύ πρόσφατα, δημοσιεύτηκε μία έρευνα που διεξήχθη από τον Maini Rekdal και τους συνεργάτες του όπου εντόπισαν μία διασταυρούμενη μεταβολική οδό μεταξύ του βακτηριακού μεταβολισμού της L-Dopa στο έντερο και του ανθρώπινου μικροβιώματος, δίνοντας την πιθανότητα επεξήγησης της ετερογένειας στην απόκριση στην L-Dopa και στο ποσοστό που συμβάλλει το μικροβίωμα σε αυτό [230].

Οι κινητικές επιπλοκές που προκαλεί η μακροχρόνια χορήγηση της L-Dopa βασίζονται στην πιο κοινώς αποδεκτή υπόθεση: η απώλεια της λειτουργίας του προσυναπτικού ντοπαμινεργικού υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα τη χαμηλή συγκέντρωση DA και κατά συνέπεια αλλάζει η ενεργοποίηση του μετασυναπτικού υποδοχέα DA [225]. Συνεπώς, η εξωγενής χορήγηση της L-Dopa προκαλεί αλλαγές στους προσυναπτικούς και μετασυναπτικούς νευρώνες λόγω της διακοπτόμενης έκκρισης DA κι αυτό προκαλεί ενίσχυση των GABA-εργικών υποδοχέων προκαλώντας τις κινητικές διακυμάνσεις [228].

Η L-Dopa φαίνεται να εμπλέκεται και σε μονοπάτια μεθυλίωσης που οδηγούν σε περαιτέρω συσσώρευση της φωσφορυλιωμένης tau (p-tau) ενισχύοντας τα δεδομένα που αναφέρθηκαν προηγουμένως για τη σύνδεση της

tau με την DDC και κατά συνέπεια δίνουν το έναυσμα για την περαιτέρω μελέτη κοινών βιοχημικών μονοπατιών στη διαδικασία του νευροεκφυλισμού [231].

Τα τελευταία χρόνια ενισχύεται η άποψη ότι η L-Dopa κατέχει και ρόλο νευροδιαβιβαστή ανεξάρτητα από την οδό βιοσύνθεσης κατεχολαμινών. Επηρεάζει τα αντανακλαστικά των βαροϋποδοχέων στον προμήκη μυελό καθώς και την κεντρική ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης [222].

1.4.8. Η σύνδεση της DDC με την AD

Ο μεταβολισμός των νευροδιαβιβαστών αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της παθολογίας των νευροεκφυλιστικών ασθενειών και καθώς η DDC συμμετέχει στα βιοσυνθετικά μονοπάτια πολλών εξ αυτών, η μεταξύ τους σύνδεση παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Μελέτες δείχνουν ότι ορισμένοι εγκέφαλοι με παθολογία της AD αλλά με ακέραιη γνωστική λειτουργία μπορούν να παρουσιάσουν απώλεια DA και κατά συνέπεια διακρίνεται ανισορροπία των νευροδιαβιβαστών σε πολλούς εγκεφάλους ασθενών [232].

Μελέτη σε διαγονιδιακό σκουλήκι καινοραβδίτη (*C.Elegans*) που χρησιμοποιείται ως μοντέλο εκτίμησης της τοξικότητας της tau, έδειξε ότι το γονίδιο *bas-1* που είναι το ομόλογο της DDC λειτουργεί ως καταστολέας της τοξικότητας της tau. Απουσία του συγκεκριμένου γονιδίου μειώνεται η φωσφορυλίωση της tau καθώς και η συσσώρευση της αδιάλυτης πρωτεΐνης ενώ βελτιώνεται η γνωστική ανεπάρκεια με άμεση συνέπεια τη μείωση του νευροεκφυλισμού. Ένας πιθανός μηχανισμός για την καταστολή είναι ο συνδυασμός της συσσώρευσης της L-Dopa και της 5-HTP [233]. Στον ίδιο οργανισμό η ταυτόχρονη απενεργοποίηση των DOP-2 και DOP-3 που ανήκουν στην οικογένεια των D2 υποδοχέων DA έδειξε να έχει προστατευτική επίδραση έναντι της tau τοξικότητας, προτείνοντας τους ανταγωνιστές υποδοχέων D2 DA ως πιθανή νευροπροστατευτική θεραπεία που θα στοχεύει τη συσσωμάτωση και τη νευροτοξικότητα της tau [234]. Υποστηρίζεται ότι η απώλεια των D2 υποδοχέων DA καταστέλλει την tau μέσω της μείωσης της ενεργότητας της DDC [233]. Αντίστοιχα, η ενεργοποίηση των υποδοχέων DA D1 φαίνεται να επάγει τη φωσφορυλίωση της tau μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) [235].

Η σύνδεση της tau με την DA αναδεικνύεται επίσης στις ταυπάθειες, μετωποκροταφική άνοια και παρκινσονισμός όπου βάσει του παρκινσονικού

μοντέλου ποντικού με μετάλλαξη για την tau (N279K), η υπερέκφραση της ανθρώπινης μεταλλαγμένης tau προκάλεσε εκφυλισμό των νευρώνων του ραβδωτού σώματος και του ιππόκαμπτου. Αναλυτικότερα, η συσσώρευση της μεταλλαγμένης tau επάγει την απώλεια των ντοπαμινεργητικών νευρώνων (dopaminoreceptive, DAR) και απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 και σε μεταγενέστερο στάδιο προκαλείται έμμεση απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων [236].

Σύμφωνα λοιπόν με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, τονίζεται η άρρηκτη σχέση μεταξύ της παθολογίας της AD και του βιοσυνθετικού μονοπατιού των κατεχολαμινών σε πολλά στάδια.

1.5. Ντοπαμίνη

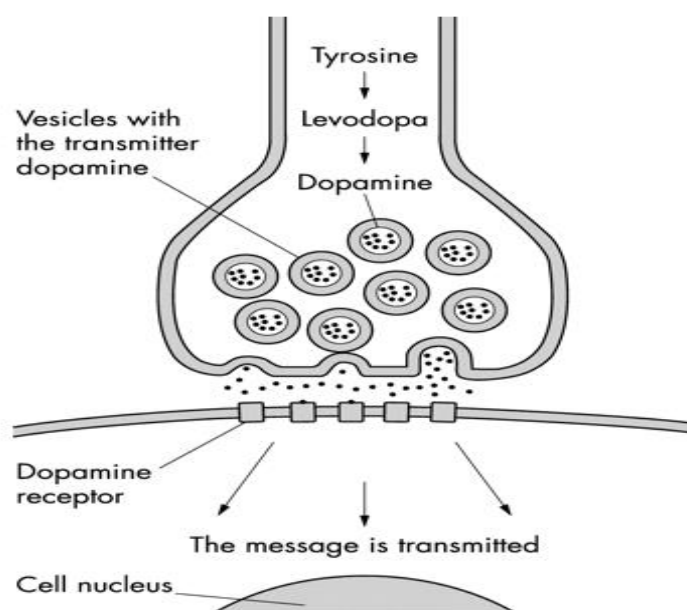
Η Ντοπαμίνη (DA) (3, 4-διϋδρόξυ-φαινυλαιθυλαμίνη ή 3-υδροξυτυρπταμίνη) αποτελεί έναν κύριο νευροδιαβιβαστή που ανήκει στην οικογένεια των κατεχολαμινών, βιοσυντίθεται από την L-τυροσίνη και στη συνέχεια από την L-Dopa μέσω δράσης των ενζύμων: υδροξυλάση της τυροσίνης και DDC και επιτελεί βασικές λειτουργίες στο ΚΝΣ ενώ δε διασχίζει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Μεταβολίζεται από την β-υδροξυλάση της DA (DA β-hydroxylase, DBH) σε νορεπινεφρίνη και στη συνέχεια από την οξειδάση της μονοαμίνης Β (monoamine oxidase B, MAO-B) και την κατεχολ-Ο-μεθυλτρανσφεράση (catechol-O-methyltransferase, COMT) στο ομοβανιλικό οξύ (homovanillic acid, HVA). Η DA έχει 5 υποτύπους υποδοχέων D1-D5 με τους δύο πρώτους (D1, D2) να εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα στο ραβδωτό σώμα σε ασθενείς με AD [237].

Η κύρια πηγή DA στον εγκέφαλο είναι οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες του μεσεγκεφάλου στην καλυπτρική κοιλιακή περιοχή (ventral tegmental area, VTA) και στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNc) που προβάλλουν σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου συμμετέχοντας έτσι σε ετερογενείς λειτουργίες [238]. Η καλυπτρική κοιλιακή περιοχή προβάλλει στον ιππόκαμπο, στον εγκεφαλικό φλοιό και τον επικλινή πυρήνα (nucleus accumbens), άρα επηρεάζει το σύστημα ανταμοιβής (reward system) και το κίνητρο. Αντίστοιχα, η συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας προβάλλει στον κερκοφόρο πυρήνα (caudate nuclei) και το κέλυφος (putamen) και συνεπώς έχει αντίκτυπο στον έλεγχο της εθελοντικής κίνησης [238]. Οι ντοπαμινεργικές οδοί είναι 4: η

μεσοφλοιώδης, η μεσομεταιχμιακή, η μελαινοραβδωτή και η φυματοχοανική ρυθμίζοντας τη διάθεση και συμβάλλοντας στη γνωστική και κινητική λειτουργία [232].

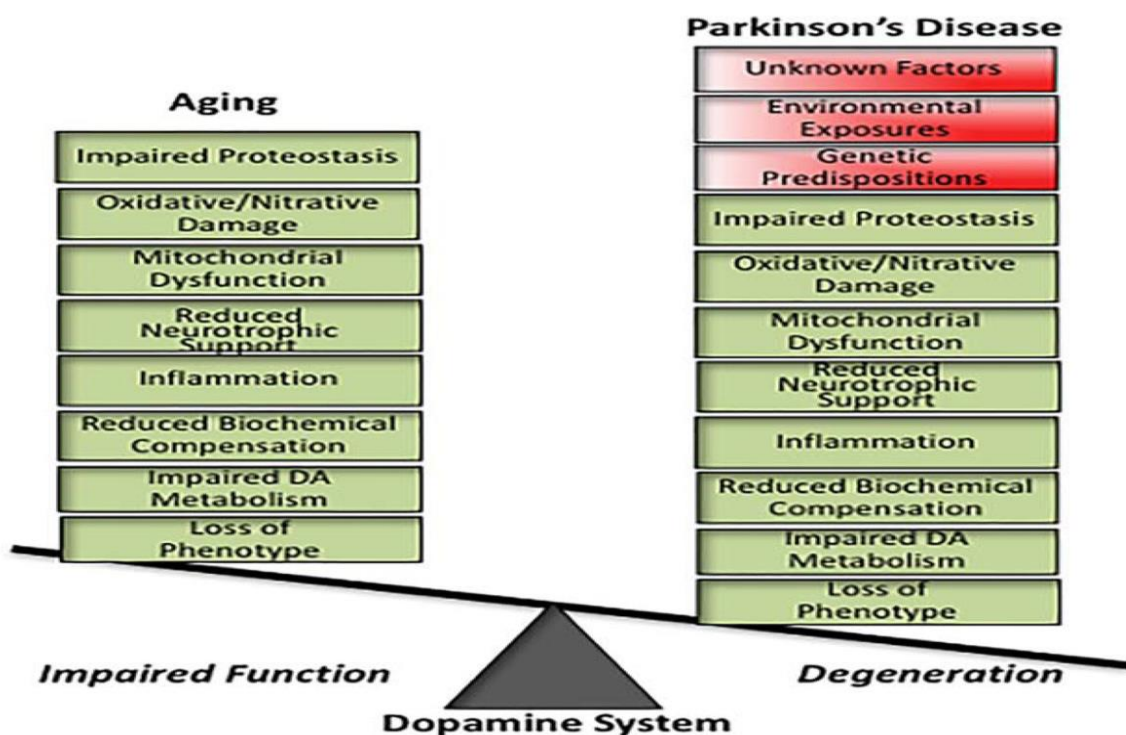
Η DA συντίθεται στο κυτοσόλιο και μεταφέρεται στα συναπτικά κυστίδια μέσω του κυστικού μεταφορέα της μονοαμίνης 2 (VMAT2). Η DA απελευθερώνεται από τα συναπτικά κυστίδια κατά κβάντα, όταν η νευρική ώση διασχίσει τον νευράξονα και καταλήξει στη νευρική απόληξη. Μπορεί να δράσει τόσο σε προσυναπτικούς όσο και μετασυναπτικούς υποδοχείς όταν βρίσκεται στη συναπτική σχισμή [239]. Για να διατηρηθεί η ομοιόσταση των νευροδιαβιβαστών υπάρχουν οι μεταφορείς DA (DA transporter, DAT) οι οποίοι αναλαμβάνουν την επαναπρόσληψη της DA από τη συναπτική σχισμή και στη συνέχεια η DA αποθηκεύεται ξανά στα συναπτικά κυστίδια μέσω του VMAT2, μία διαδικασία που φαίνεται να μειώνει τις επιβλαβείς οξειδωτικές ιδιότητες των μεταβολιτών της DA [240], [241].

Εκτός από το ΚΝΣ, η DA εντοπίζεται και σε περιφερικούς ιστούς όπως είναι η καρδιά, οι νεφροί και ο μυελός των επινεφριδίων [239]. Εξασθένιση του ντοπαμινεργικού συστήματος οδηγεί σε απώλεια μνήμης, κατάθλιψη, αδυναμία ελέγχου της κίνησης καθώς και διαταραχές στη συγκέντρωση και τον ύπνο [232]. Οι διαταραχές στα επίπεδα DA μπορούν να οδηγήσουν σε πολλές καταστάσεις μεταξύ των οποίων: η κατάθλιψη, η σχιζοφρένεια, η ψύχωση (με παραισθήσεις και παραλήρημα), το σύνδρομο Tourette, η PD, η HD, η MS και η AD [242].



Εικόνα 1.5.1.: Η ντοπαμινεργική σύναψη στο μελαινοραβδωτό σώμα [228].

Καθώς το κύριο χαρακτηριστικό της PD είναι η σταδιακή απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων και παράλληλα κατά τη φυσιολογική διαδικασία της γήρανσης σημειώνεται εξασθένηση του ντοπαμινεργικού συστήματος, επικρατεί η εικασία ότι η γήρανση αποτελεί ένα πρώιμο στάδιο της PD (pre-PD). Πειράματα σε πρωτεύοντα θηλαστικά (πίθηκοι) έδειξαν ότι το μελαινοραβδωτό ντοπαμινεργικό σύστημα κατά τη γήρανση και κατά την PD μοιράζεται κοινά βιολογικά χαρακτηριστικά μεταξύ των οποίων είναι το εξασθενημένο σύστημα πρωτεασώματος, η φλεγμονή και η οξειδωτική καταστροφή [243].



Εικόνα 1.5.2.: Κοινά βιολογικά χαρακτηριστικά στο ντοπαμινεργικό σύστημα κατά τη γήρανση και την PD [243].

Ενώ η παθολογία της PD έχει συνδεθεί άμεσα με το ντοπαμινεργικό σύστημα, πρόσφατη έρευνα από τον Wilson και τους συνεργάτες του έδειξε ότι οι φορείς της σημειακής μετάλλαξης A53T εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα σεροτονίνης δεκαετίες πριν την εμφάνιση της νόσου. Συνεπώς, εισάγεται κι η παθολογία του σεροτονεργικού συστήματος ως υποψήφια προς μελέτη στην εξέλιξη κι έγκαιρη διάγνωση της νόσου μέσω μοριακής απεικόνισης *in vivo* [244]. Πειράματα συσχέτισης των κατεχολαμινών με τον νευροεκφυλισμό έδειξαν ότι η χορήγηση

μικροποσοτήτων L-Dopa, επινεφρίνης, νορεπινεφρίνης και DA αναστέλλουν το σχηματισμό της ASYN καθώς και των ινιδίων του αμυλοειδούς in vitro. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το ποσοστό αναστολής εξαρτάται από την ποσότητα DA και L-Dopa. Δοσοεξαρτώμενη φάνηκε να είναι και η αποικοδόμηση των ήδη υπάρχοντων ινιδίων Αβ και ASYN έπειτα από τη χορήγηση DA και L-Dopa ανοίγοντας το δρόμο για αποτελεσματικότερες θεραπείες είτε για την αποφυγή σχηματισμού ινιδίων είτε για την αποτροπή περαιτέρω συσσωμάτωσης [245].

Παρά λοιπόν την κοινή αρχιτεκτονική δομή του ντοπαμινεργικού συστήματος, το γεγονός ότι η PD και η AD παρουσιάζουν διαφορετική επιρρέπεια ίσως οφείλεται στα διαφορετικά φυσιολογικά χαρακτηριστικά των ντοπαμινεργικών κυττάρων στην VTA και SNpc [246].

1.5.1. Σύνδεση Ντοπαμίνης και AD

Τα τελευταία χρόνια προκύπτουν ολοένα και περισσότερα δεδομένα που υποστηρίζουν την ισχυρή σύνδεση μεταξύ της ελαττωματικής ντοπαμινεργικής σηματοδότησης και των γνωστικών και μη-γνωστικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά την AD. Η μέτρηση των επιπέδων DA καθώς και μεταβολιτών αυτής σε εγκεφάλους με AD μετά θάνατον έδειξε σημαντική μείωση. Επιπλέον, πολυμορφισμοί σε γονίδια που αφορούν στη νευροδιαβίβαση της DA όπως είναι η COMT σχετίζονται με την παθολογία της AD [246]. Καθώς είναι ευρέως αποδεκτό ότι η DA αποτελεί ρυθμιστή της συναπτικής πλαστικότητας του ιππόκαμπου που με τη σειρά του αποτελεί βασική δομή του εγκεφάλου για τη μνήμη, προκύπτει η άμεση σύνδεση της DA με την AD [247].

Λαμβάνοντας ως δεδομένο ότι τα νευροψυχιατρικά συμπτώματα αποτελούν μείζοντα στοιχεία στην νευροπαθολογία της AD, η μέτρηση των βιογενών μονοαμινών παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς όπως έχει ήδη αναφερθεί οι μονοαμίνες καθορίζουν τη διάθεση και τη γνωστική λειτουργία. Το εξασθενημένο σύστημα νευροδιαβιβαστών νορεπινεφρίνης και DA στο ραχιαίο πλάγιο προμετωπιαίο φλοιό και το αντίστοιχο δυσλειτουργικό σεροτονεργικό σύστημα στον ιππόκαμπο συνδέονται με την κατάθλιψη και την επιθετικότητα στην AD προσθέτοντας στοιχεία παθοφυσιολογίας στη νευροχημική βάση της νόσου [248]. Είναι γνωστό ότι ο μειωμένος αριθμός σεροτονεργικών νευρώνων στους πυρήνες

ραφής συνδέεται με την AD καθώς η ανώμαλη νευροδιαβίβαση της σεροτονίνης συμβάλλει στην επιδείνωση των γνωστικών λειτουργιών και της μνήμης [249].

Η παθολογία της AD συνδέεται άρρηκτα με το μονοαμινεργικό σύστημα που περιλαμβάνει την DA, τη σεροτονίνη, τη νορεπινεφρίνη και την ισταμίνη. Η ευπάθεια του μονοαμινεργικού συστήματος στις νευροεκφυλιστικές διαταραχές έγκειται στο γεγονός ότι οι μονοαμινεργικοί νευρώνες στο εγκεφαλικό στέλεχος και τον υποθάλαμο είναι εξαιρετικά λίγοι και συνεπώς η έκθεση σε κάποιο εσωτερικό ή εξωτερικό παράγοντα κινδύνου τους καθιστά επιρρεπείς. Επιπλέον, οι μονοαμινεργικοί νευρώνες χαρακτηρίζονται από εκτεταμένα, μακρά και γενικά φτωχά σε μυελίνη άκρα αξόνων. Ένα ακόμη στοιχείο που αποδεικνύει την επιρρέπεια των νευρώνων αυτών είναι η τοπολογία τους καθώς προβάλλουν κυρίως στις περιοχές του ιππόκαμπου και του φλοιού οι οποίες επηρεάζονται από την παθολογία της tau και του αμυλοειδούς [237].

Η απάθεια και τα εξωπυραμιδικά συμπτώματα όπως είναι η βραδυκινησία, το καθηλωμένο προσωπείο, η διαταραχή στο βάδισμα και ο τρόμος αποτελούν αρνητικούς προγνωστικούς δείκτες και φαίνεται να συνδέονται με τη δυσλειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος. Είναι μάλιστα αξιοσημείωτο το γεγονός ότι όσο νωρίτερα συμβαίνει η δυσλειτουργία του ντοπαμινεργικού συστήματος τόσο πιο γρήγορα παρουσιάζεται η γνωστική έκπτωση [246], [250]. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι η σύνδεση της DA με το Αβ. Η υψηλή τοξικότητα των ολιγομερών του Αβ είναι δεδομένη, επηρεάζοντας τη νευρωνική ρύθμιση και νευροδιαβίβαση έχοντας ως τελική συνέπεια το νευρωνικό θάνατο. Βασικό στοιχείο του Αβ είναι η δέσμευσή του στους χολινεργικούς υποδοχείς και μάλιστα στους νικοτινικούς. Οι νευρωνικοί νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης (neuronal nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) βρίσκονται στα προσυναπτικά άκρα όπου ρυθμίζουν τη μετασυναπτική διαβίβαση και τροποποιούν την προσυναπτική απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή. Ουσιαστικά ο ρόλος των nAChRs είναι η απελευθέρωση της ακετυλοχολίνης μέσω των υποδοχέων $\alpha 4\beta 2$ και $\alpha 7$ για την επιτέλεση λειτουργιών όπως είναι η μάθηση, η μνήμη και η προσοχή. Συνεπώς, διαφαίνεται η εμπλοκή της δυσλειτουργίας της DA στην παθολογία της AD τουλάχιστον κατά τα πρώιμα στάδια μέσω της παραγωγής του Αβ και της παρατεταμένης αλληλεπίδρασής του με τους nAChRs [250].

Ο Nobili και οι συνεργάτες του απέδειξαν έπειτα από πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια Tg2576 (αποτελούν το σύνηθες μοντέλο για AD), που

υπερεκφράζουν την ανθρώπινη πρωτεΐνη APP695 με τη μετάλλαξη “Swedish” (APP^{swe}), ότι η απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην καλυπτρική κοιλιακή περιοχή (VTA) μπορεί να ανιχνευθεί σε πρώιμο στάδιο της νόσου, πριν ακόμη σχηματιστούν οι πλάκες του αμυλοειδούς και χωρίς να έχει πραγματοποιηθεί κανένα συμβάν κυτταρικού θανάτου στον ιππόκαμπο. Ο σταδιακός εκφυλισμός των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην VTA μέσω μίας ειδικής διαδικασίας απόπτωσης έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη εκροή DA στον ιππόκαμπο και στον επικλινή πυρήνα εξασθενώντας την CA1 συναπτική πλαστικότητα, την απόδοση μνήμης και το σύστημα ανταμοιβής. Συμπερασματικά, η επιδείνωση της μνήμης και μέρος των μη κινητικών συμπτωμάτων κατά τα πρώιμα στάδια της AD μπορούν να αποδοθούν στον εκφυλισμό των ντοπαμινεργικών νευρώνων της VTA [247].

Καθώς η νευροπαθολογία της AD εμπλέκει διαφορετικά κυκλώματα του εγκεφάλου, νέα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η δυσλειτουργία του νορεπινεφρινικού συστήματος στο εγκεφαλικό στέλεχος υφίσταται σημαντικές αλλαγές κατά τα αρχικά στάδια της AD. Το σύστημα φαίνεται να αλληλεπιδρά και με το νευροανοσοποιητικό σύστημα κυρίως με τη μικρογλοία προσφέροντας έτσι νέες θεραπευτικές εναλλακτικές που στοχεύουν στην απομάκρυνση των ινιδίων του αμυλοειδούς [251].

Συμπερασματικά λοιπόν, φαίνεται ότι ο εκφυλισμός του ντοπαμινεργικού συστήματος και η έλλειψη των τροποποιητικών επιδράσεων που έχει στις περιοχές του φλοιού διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο τόσο στις γνωστικές όσο και στις μη γνωστικές λειτουργίες που σχετίζονται με την AD [237].

1.5.2. Αλληλεπίδραση της Ντοπαμίνης με την α-συνουκλείνη

Οι δύο κύριες περιοχές του εγκεφάλου που πλήττονται στην PD είναι η συμπαγής μοίρα της μέλαινας ουσίας (SN_{pc}) και ο υπομέλας τόπος (LC). Η παρουσία αυξημένων επιπέδων Ca²⁺ καθώς και κατεχολαμινών όπως είναι η DA στο κυτοσόλιο έχει συνδεθεί ισχυρά με τον νευροεκφυλισμό. Καθώς το Ca²⁺ φαίνεται να πυροδοτεί ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες, εμπλέκεται και σε αλληλεπιδράσεις με την ASYN κυρίως μέσω του καρβοξυτελικού άκρου όπου γίνεται η σύνδεση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ASYN βρίσκεται στις μεμβράνες του ΕΔ που σχετίζονται με τα μιτοχόνδρια (mitochondria-associated membranes,

MAMs) όπου μπορεί να ρυθμίζει τη μεταφορά του Ca^{2+} μέσω του υποδοχέα της τριφωσφορικής ινοσιτόλης IP_3 . Η εξωκυτάρια προσθήκη ASYN αλλάζει τη δραστηριότητα των διαύλων αναδιοργανώνοντας τις μικροδομές των μεμβρανών μέσω της αύξησης της δραστηριότητας του καναλιού $Ca_v2.2$. Η αύξηση του διαύλου αυτού οδηγεί σε αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} και τελικώς επάγει την απελευθέρωση DA μέσω εξωκύττωσης [252].

Εκτός από τις αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο ραβδωτό σώμα για την παραγωγή των κατεχολαμινών, έχει παρατηρηθεί αλληλεπίδραση και μεταξύ της ASYN και της DA. Συγκεκριμένα, η ASYN μειώνει την ενεργότητα της DDC σε ντοπαμινεργικά κύτταρα που υπερεκφράζουν την ASYN αλλά δε φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης υποδεικνύοντας τον ενδεχόμενο ρόλο της ASYN στην ομοίωση της DA και κατ' επέκταση μία πιθανή αιτία για το γεγονός ότι οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στην PD [253]. Αυξημένα επίπεδα ASYN αγρίου τύπου (wt) επηρεάζουν την ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση σε πολλά στάδια μεταξύ των οποίων είναι: η σύνθεση, η αποθήκευση, η επαναπρόσληψη, η εκκαθάριση και η έκκριση της DA. Η αλληλεπίδραση πραγματοποιείται μέσω οξειδωσης των 4 καταλοίπων μεθειονίνης της ASYN με αποτέλεσμα το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση νευροτοξικών πρωτοϊνιδίων ASYN. Τα οξειδωτικά ενδιάμεσα της DA έχουν επίσης την ικανότητα να προωθούν τη συσσωμάτωση της ASYN. Έχει προταθεί ότι η ASYN μπορεί να τροποποιήσει το μέγεθος και τις ιδιότητες των συναπτικών κυστιδίων. Συγκεκριμένα, η ASYN αλληλεπιδρά με τον κυστικό μεταφορέα VMAT2, την υδροξυλάση τυροσίνης TH και τον μεταφορέα DAT. Η ASYN ανοσοκατακρημνίζεται μαζί με την TH και τη DDC με αποτέλεσμα τη μειωμένη φωσφορυλίωση και ενεργότητα και των δύο ενζύμων, πιθανόν μέσω τροποποίησης της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A (PP2A). Η υπερέκφρασή της μειώνει τη σύνθεση της DA μέσω μείωσης της σύνθεσης και της ενεργότητας της TH που αποτελεί το καθοριστικό ένζυμο για τη βιοσύνθεση της DA. Επίσης, τα επίπεδα του μεταφορέα VMAT2 τροποποιούνται όταν η ASYN βρίσκεται σε περίσσεια [253]–[256]. Πειράματα σε ποντίκια που εκφράζουν τη μεταλλαγμένη ASYN (A53T) έδειξαν προοδευτική εξασθένηση της κίνησης με ταυτόχρονο εκφυλισμό του μελαινοραβδωτού σώματος έπειτα από αύξηση των κυτταρικών επιπέδων DA σε σχέση με την ASYN wt [257]. Σχετικά με τον μεταφορέα DAT, έχει

βρεθεί ότι η πλειονότητα των πρωτεϊνικών συμπλόκων ASYN-DAT εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη των ντοπαμινεργικών νευρώνων [258].

Πέρα από την εμπλοκή της ASYN στη μεταφορά της DA μέσω των συναπτικών κυστιδίων, συμμετέχει και στην κυτταρική παραγωγή της DA καθώς ρυθμίζει τον σίδηρο που απαιτείται ως συμπαράγοντας της TH. Συνεπώς η ASYN κατέχει ρόλο και στην ομοίωση του σιδήρου που είναι σημαντικός για τη σύνθεση και το μεταβολισμό των νευροδιαβιβαστών. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίσταται η ASYN όπως είναι η φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση και η οξειδωση είναι καταλυτικές διότι ρυθμίζουν τη δομή και τη φυσιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης αλλά παράλληλα πυροδοτούν άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια που προκαλούν ανισορροπία του κυτταρικού συστήματος με αποτέλεσμα την έναρξη παθολογικών καταστάσεων [256].

Εκτός από την αλληλεπίδραση μεταξύ ASYN και DA, η ASYN αλληλεπιδρά και με το Αβ καθώς μία μερίδα ασθενών με AD χαρακτηρίζεται από τη συνύπαρξη σωματίων Lewy γεγονός μάλιστα που επιδεινώνει τη συμπτωματολογία της νόσου. Η υπόθεση που κυριαρχεί είναι ότι οι δύο πρωτεΐνες δρουν συνεργιστικά και προωθείται η μεταξύ τους συσσώρευση είτε μέσω εξασθένησης της πρωτεϊνικής αποδόμησης είτε μέσω αύξησης της φωσφορυλίωσης με την ενεργοποίηση κινασών με κοινό αποτέλεσμα την ταχύτερη γνωστική έκπτωση [259].

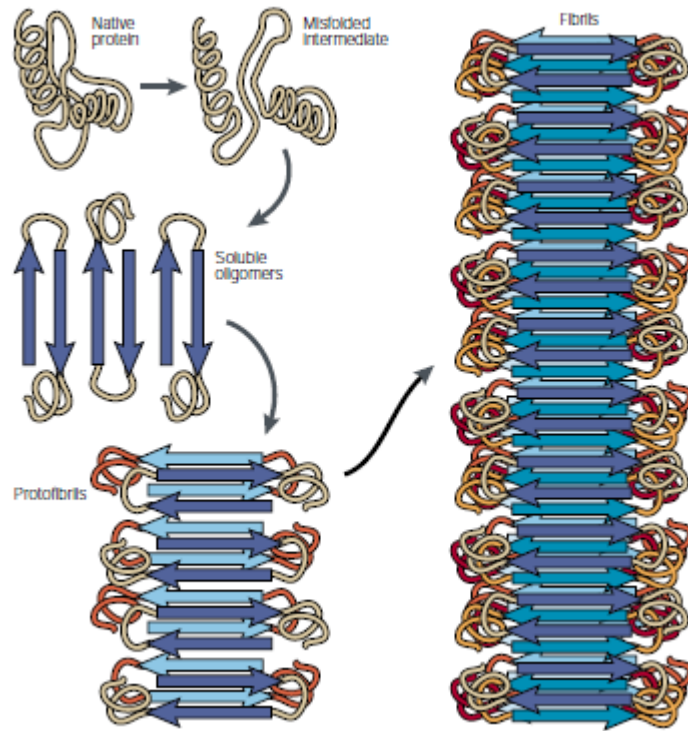
Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στην άποψη ότι η ASYN αποτελεί ένα μόριο που εμπλέκεται στην καταστροφή των συνάψεων και τη νευροτοξικότητα και τελικώς μειώνει την ντοπαμινεργική νευροδιαβίβαση στον εγκέφαλο. Συνεπώς, η αποσαφήνιση των μηχανισμών που εμπλέκουν την ASYN με τη δυσλειτουργία της DA μπορεί να θέσει νέους θεραπευτικούς στόχους [258], [260].

1.6. Κοινά χαρακτηριστικά των νευροεκφυλιστικών νόσων: AD και PD

Τόσο η AD όσο και η PD αποτελούν τις κυριότερες νευροεκφυλιστικές ασθένειες με πολυπαραγοντικό υπόβαθρο και αιτιολογία, καθιστώντας την προσέγγιση των μηχανισμών που τις διέπουν εξαιρετικά δύσκολη. Ωστόσο, ολοένα και περισσότερες μελέτες που πραγματοποιούνται τείνουν να αναδεικνύουν ορισμένες ομοιότητες μεταξύ των δύο αυτών νοσολογικών οντοτήτων.

Μεταξύ των κοινών χαρακτηριστικών της AD και της PD είναι: η ηλικιοεξαρτώμενη έναρξη της ασθένειας, η προοδευτική νευρωνική απώλεια και η συναπτική δυσλειτουργία που συμβαίνουν αρκετό χρονικό διάστημα πριν την κλινική εκδήλωση της νόσου, η αλλαγή της διαμόρφωσης ορισμένων πρωτεϊνών που οδηγεί σε συσσωμάτωση και συσσώρευσή τους προς τη δημιουργία νευροτοξικών παραγώγων, το πολυγονιδιακό υπόβαθρο σε συνδυασμό με επιγενετικές αλλαγές και περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, η έλλειψη βιοδεικτών για την έγκαιρη διάγνωση και πρόγνωση και τέλος το γεγονός ότι αυτές οι δύο νόσοι είναι μη ιάσιμες [261].

Σχετικά με τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών ακολουθείται ένα κοινό μοτίβο μεταξύ της ASYN, tau και Αβ: μικρές αλλαγές στη διαμόρφωση έχουν ως συνέπεια το σχηματισμό ενός μη σωστά πτυχωμένου ενδιαμέσου, το οποίο είναι ασταθές σε υδατικό περιβάλλον λόγω της έκθεσης υδρόφοβων τμημάτων στο διαλύτη. Το ενδιαμέσο στη συνέχεια σταθεροποιείται από διαμοριακές αλληλεπιδράσεις με αποτέλεσμα το σχηματισμό ολιγομερών με διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου. Τα ολιγομερή σταδιακά αυξάνονται και παράγουν ινίδια που έχουν καταστροφικές κυτταροτοξικές συνέπειες. Η συσσωμάτωση των πρωτεϊνών πέρα από την παθοφυσιολογία του νευροεκφυλισμού συνδέεται και με τη γενετική του βάση καθώς τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες έχουν συνδεθεί με κληρονομούμενες μορφές των ασθενειών [262]–[265]. Η δυσλειτουργία του συστήματος ουβικιίνης-πρωτεασώματος (UPS) έχει ως άμεση συνέπεια τη συσσώρευση των πρωτεϊνών που αναφέρθηκαν προηγουμένως καθώς είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση κι εκκαθάριση των μη σωστά πτυχωμένων, μεταλλαγμένων, κατεστραμμένων και μικρής διάρκειας ζωής πρωτεϊνών [266].



Εικόνα 1.6.1.: Σχηματική αναπαράσταση της συσσωμάτωσης των πρωτεϊνών ξεκινώντας από μία φυσιολογική πρωτεΐνη προς το σχηματισμό των ινιδίων [262].

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές προσπάθειες εντοπισμού κοινών γενετικών περιοχών και πλειοτροπικών γονιδίων παρά την ετερογένεια της γενετικής βάσης των ασθενειών καθώς και το μικρό ποσοστό που κατέχει το γενετικό υπόβαθρο στη συνολική αιτιοπαθογένεια [267]. Μελέτες ευρείας συσχέτισης έχουν εντοπίσει πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την PD στην περιοχή του γονιδίου MAPT, ενώ η πρωτεΐνη tau αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της παθολογίας της AD [268]. Η β υδροξυλάση της DA (DBH), το γονίδιο της οποίας εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 9q34, έχει αποτελέσει υποψήφιο γενετικό τόπο συσχέτισης των δύο ασθενειών χωρίς όμως αξιόπιστα αποτελέσματα [269]. Άλλο υποψήφιο γονίδιο είναι το PON1 (paraoxonase 1) που συμμετέχει στο μεταβολισμό των φυτοφαρμάκων, το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή. Επίσης, τα γονίδια GSTO1 (glutathione S-transferase omega-1), GSTO2 (glutathione S-transferase omega-2) και NEDD9 (Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated 9) που δείχνουν να συσχετίζονται με τις δύο ασθένειες [270].

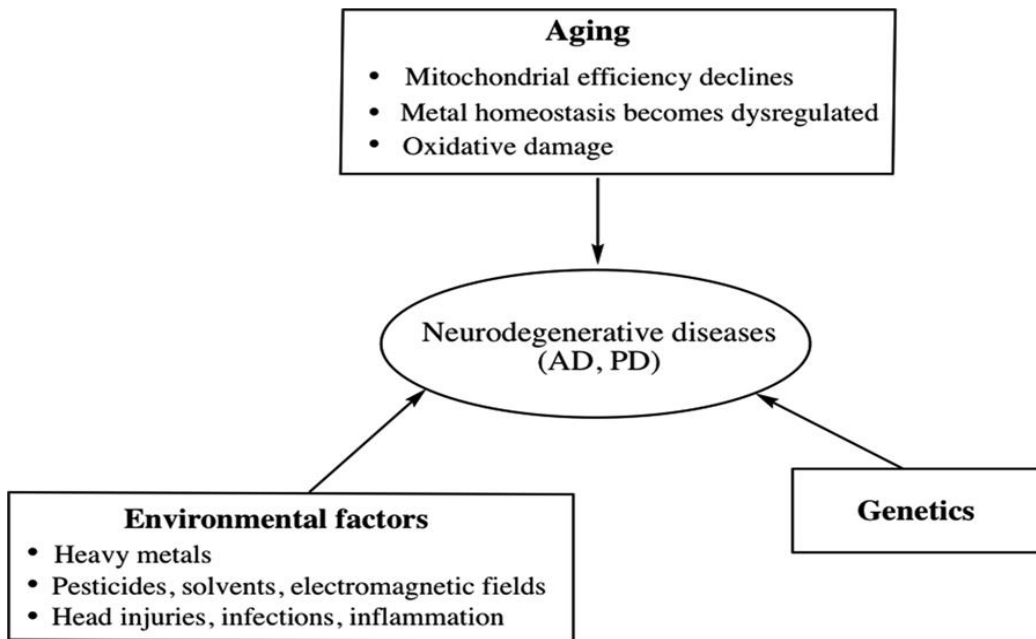
Πειράματα που διεξήχθησαν σε διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν το ανθρώπινο πεπτιδίδιο Αβ και την ανθρώπινη ASYN έδειξαν ότι προκαλείται πιο

έντονη και ταχύτερα εξελισσόμενη νοητική έκπτωση, όπως επίσης προβλήματα μνήμης και κίνησης σε σύγκριση με τα ποντίκια που εκφράζουν μόνο τη μία από τις 2 πρωτεΐνες [271]. Η συσχέτιση των δύο ασθενειών διαφαίνεται και σε έρευνες σχετικές με το διαβήτη τύπου II, καθώς αποτελεί κοινό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη του νευροεκφυλισμού. Η ινσουλίνη αποτελεί έναν αυξητικό παράγοντα με νευροπροστατευτική δράση και ρυθμίζει τη συγκέντρωση των νευροδιαβιβαστών στο ΚΝΣ. Δεδομένα υποστηρίζουν ότι η ινσουλίνη επηρεάζει τη φωσφορυλίωση της tau, τα επίπεδα της APP και την ντοπαμινεργική δραστηριότητα συνηγορώντας στο γεγονός ότι η απορρύθμισή της εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της AD και της PD [272], [273].

Ο Jellinger και οι συνεργάτες του μελέτησαν τον αντίκτυπο της συνύπαρξης PD μαζί με την άνοια που σχετίζεται με την παθολογία της AD. Η συννοσηρότητα φάνηκε να αυξάνει τον κίνδυνο θνησιμότητας και συνδέεται με φτωχή πρόγνωση σε σχέση με την ομάδα ασθενών που δεν παρουσίασε άνοια [274]. Αντίστοιχα, η συνύπαρξη ιδιοπαθούς PD με AD συνδέεται με μείωση του προσδόκιμου ζωής και θέτει το ερώτημα για το αν υπάρχει μία κοινή αιτιολογική βάση [275].

Κοινό νευροπαθολογικό χαρακτηριστικό αποτελεί επίσης η σημαντική μείωση των νοραδρενεργικών νευρώνων του υπομέλανα τόπου που πραγματοποιείται κατά τα πρώιμα στάδια του νευροεκφυλισμού [270]. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία οδηγεί στην υπερβολική παραγωγή ROS και κατ' επέκταση οξειδωτικού στρες που έχει συνδεθεί με την παθολογία των νόσων καθώς προκαλεί νευρωνικό θάνατο. Επίσης, η νευροφλεγμονή είναι ένα χαρακτηριστικό που συναντάται στο νευροεκφυλισμό διότι ενώ η φλεγμονή αποτελεί μία προστατευτική απόκριση κατά τον τραυματισμό των κυττάρων και των ιστών, όταν χαθεί ο έλεγχος δημιουργείται η χρόνια φλεγμονή που επάγει την καταστροφή και το θάνατο των κυττάρων. Το οξειδωτικό στρες αποτελεί το κυριότερο μόριο σηματοδότησης για την έναρξη μίας φλεγμονώδους απόκρισης που πραγματοποιείται από τη μικρογλοία και τα αστροκύτταρα, άρα διαφαίνεται ο ενεργός ρόλος της νευροφλεγμονής στην AD και την PD [266], [270].

Συμπερασματικά, παρά τα διαφορετικά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενειών, οι ομοιότητες που διακρίνονται μπορούν να αποτελέσουν σημαντικά θεμέλια για την αποσαφήνιση μοριακών μονοπατιών και την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων θεραπειών.



Εικόνα 1.6.2.: Κοινί παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη PD και AD [266].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο νευροεκφυλισμός συνιστά τη βιολογική διαδικασία κατά την οποία ένα πλήθος νευρώνων υπόκειται σε μόνιμη βλάβη και νέκρωση. Οι κυριότεροι εκπρόσωποι του νευροεκφυλισμού είναι οι νόσοι AD και PD επηρεάζοντας ένα μεγάλο κομμάτι του παγκόσμιου πληθυσμού με σοβαρές κοινωνικές και οικονομικές συνέπειες. Η πολυπαραγοντική αιτιοπαθογένεια καθιστά δύσκολη την κατανόηση των μηχανισμών καθώς και την εύρεση αποτελεσματικών θεραπειών που είτε αποτρέπουν την εμφάνιση των νόσων είτε εμποδίζουν την εξέλιξή τους.

Η PD αποτελεί μία από τις κύριες νευροεκφυλιστικές νόσους που χαρακτηρίζεται από την προοδευτική απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων της συμπαγούς μοίρας της μέλαινας ουσίας και την παρουσία ενδονευρωνικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων που είναι τα σωμάτια Lewy (LB). Κύριο συστατικό των LB είναι η ASYN η οποία κατέχει σημαντικό ρόλο στην παθολογία της νόσου καθώς η μη σωστή πτύχωσή της οδηγεί σε συσσωμάτωση, παραγωγή ινιδίων και δυσμενή εξέλιξη της νόσου. Η DA ως βασικός νευροδιαβιβαστής συμμετέχει στον έλεγχο της κίνησης, της γνωστικής λειτουργίας, της μνήμης και των συναισθημάτων. Σημαντική μείωση στα ποσοστά DA προκαλεί το φάσμα κινητικών και μη κινητικών συμπτωμάτων της PD.

Η AD είναι μία μη αναστρέψιμη προοδευτική διαταραχή του εγκεφάλου που σταδιακά καταστρέφει τη μνήμη και την ικανότητα σκέψης οδηγώντας τελικά στην ανικανότητα εκτέλεσης των απλούστερων διεργασιών. Η παθοφυσιολογία της νόσου εμπλέκει την εναπόθεση πλακών του αμυλοειδούς καθώς και ενδοκυττάρων νευροϊνιδιακών κόμβων (NFTs) αποτελούμενοι από την υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη tau. Σύμφωνα με την υπόθεση του αμυλοειδούς το Aβ παράγεται έπειτα από την πρωτεολυτική επεξεργασία του προδρόμου μορίου του αμυλοειδούς (APP) μέσω των πρωτεολυτικών ενζύμων που ονομάζονται εκκριτάσες. Η ομοιόσταση της tau κατέχει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων, στη δυναμική και τη νευρωνική ζωτικότητα. Η υπερφωσφορυλίωση οδηγεί σε δυναμική αστάθεια και αποσύνθεση του δικτύου των μικροσωληνίσκων και κατά συνέπεια στο σχηματισμό των NFTs.

Η L-Dopa αποκαρβοξυλάση (DDC) είναι ένα ένζυμο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας καθώς η έκφραση του εμπλέκεται σε πολλαπλούς ρυθμιστικούς

μηχανισμούς και συμμετέχει στο βασικό μονοπάτι βιοσύνθεσης κατεχολαμινών, καταλύοντας τη μετατροπή της L-Dopa σε DA. Καθώς η κύρια θεραπευτική προσέγγιση για την PD είναι η χορήγηση L-Dopa παράλληλα με έναν περιφερικό αναστολέα της DDC, οποιαδήποτε αλληλεπίδραση της DDC με αναστολείς ή προϊόντα του βιοσυνθετικού μονοπατιού είναι καθοριστικής σημασίας.

Η δημιουργία ολοένα και περισσότερων καινοτομιών στον τομέα της νευροβιολογίας έχει επιτρέψει την προσέγγιση ορισμένων διαδικασιών νευροεκφυλισμού σε μοριακό επίπεδο. Η εξέλιξη της αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS) έχει προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τα γονίδια που εμπλέκονται στη διαδικασία του νευροεκφυλισμού όπως επίσης η πρωτεομική και η μεταβολομική συμβάλλοντας στην κατανόηση ολόκληρου του συστήματος. Επιπλέον, η ανάπτυξη συστημάτων που βασίζονται σε κατάλληλα κύτταρα ή σε ζωικά μοντέλα έχει αποδειχθεί πολύτιμο εργαλείο στην ερευνητική κοινότητα για το σχεδιασμό θεραπειών. Ενθαρρυντικά είναι και τα δεδομένα που προκύπτουν από την ενσωμάτωση των miRNAs ως προγνωστικοί δείκτες, έχοντας ως δείγμα ENY ασθενών. Ωστόσο, δεν παύει να είναι αισθητή η απουσία προσυμπτωματικών δεικτών που να δίνουν επαρκή πληροφορία για την κινητική της καταστροφής των νευρώνων ώστε η θεραπευτική παρέμβαση να γίνει το ταχύτερο δυνατό. Παρά την έντονη ετερογένεια των δύο ασθενειών νευροεκφυλισμού σε μοριακό και βιοχημικό επίπεδο αρκετές είναι οι βιβλιογραφικές αναφορές που αναδεικνύουν ορισμένες ομοιότητες. Μερικές εξ αυτών είναι: η γήρανση ως παράγοντας κινδύνου, η συσσώρευση πρωτεϊνών, οι γενετικές μεταλλάξεις, το οξειδωτικό στρες, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες.

Ωστόσο, τα δεδομένα που συσχετίζουν με σαφήνεια τους μηχανισμούς του νευροεκφυλισμού είναι απογοητευτικά λίγα έως ανύπαρκτα, διότι έχουν μελετηθεί μεμονωμένα μοριακά μονοπάτια και στάδια είτε της AD είτε της PD χωρίς να έχει αποδοθεί μία ολιστική εικόνα του νευροεκφυλισμού μέσα από το φάσμα των δύο αυτών βασικών ασθενειών. Προς αυτήν την κατεύθυνση κινείται η παρούσα μελέτη, έτσι ώστε να μειωθεί το χάσμα των μοριακών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα κατά το νευροεκφυλισμό. Κάθε βήμα πιο κοντά στη σύνδεση AD και PD θέτει αισιόδοξα θεμέλια για την καλύτερη και αποτελεσματικότερη θεραπευτική προσέγγιση προς βελτίωση της ποιότητας και της διάρκειας ζωής των ασθενών.

Αφορμή για την παρούσα διπλωματική εργασία, αποτέλεσαν τα πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου μας στα πλαίσια της Διπλωματικής

Ερευνητικής Εργασίας Ειδίκευσης της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Χριστίνας Ντάλλα. Τα εν λόγω ευρήματα ανακοινώθηκαν στα πρακτικά του 68^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (ΕΕΒΜΒ), σύμφωνα με τα οποία η πλήρους μήκους DDC καθώς και οι συντετμημένες ισομορφές της τροποποιούν την πρωτεολυτική επεξεργασία της APP.

Βάσει λοιπόν των προαναφερθέντων, προέκυψε ο στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ο οποίος είναι η περαιτέρω κατανόηση των κοινών μοριακών μηχανισμών που διέπουν τις δύο κυριότερες νευροεκφυλιστικές ασθένειες AD και PD. Για την προσέγγιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ τους χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο που συμμετέχει στο βασικό βιοσυνθετικό μονοπάτι των κατεχολαμινών, η DDC καθώς και οι εναλλακτικές της ισομορφές. Τροποποίηση της DA σε πολλαπλά επίπεδα (ρύθμιση, σύνθεση, έκκριση κ.α.) παρατηρείται τόσο στην PD όσο και στην AD. Η DDC μελετήθηκε σε συνάρτηση με την πρωτεολυτική επεξεργασία της APP όπου αντίστοιχα το Αβ που προκύπτει από την APP εμπλέκεται σε πιθανούς μηχανισμούς επαγωγής νευροεκφυλισμού. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση των χημικών αναστολέων της DDC: NSD-1015 και Carbidopa καθώς και η αλληλεπίδραση του παραπάνω πειραματικού μοντέλου με την DA και την L-Dopa που αποτελούν προϊόν και υπόστρωμα της DDC αντίστοιχα. Η προσέγγιση αφορά σε πειραματικές διαδικασίες σε κυτταρικές σειρές μη νευρικής φύσεως.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά και Αντισώματα

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας.

Οι χημικές ουσίες και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις ακόλουθες εταιρίες:

Για τις κυτταροκαλλιέργειες:

- ❖ Οι φλάσκες και τα τρυβλία πολυστυρενίου από την SPL Life Sciences (Korea)
- ❖ Το θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), ο ορός εμβρύου βοός FBS, η θρυψίνη καθώς και το αντιβιοτικό penicillin-streptomycin από την Biosera (France)
- ❖ Το αντιβιοτικό G418 από την Biochrom GmbH (Germany)
- ❖ Οι παράγοντες Carbidoρα, NSD-1015 από τη Sigma (USA)
- ❖ Τα φίλτρα Millex 33mm από τη Millipore (Ireland)
- ❖ Οι σύριγγες των 10ml από την Terumo (Philippines)
- ❖ Το DMSO (Dimethyl sulfoxide for cell culture) από την Applichem (Germany)

Για το ανοσοσύτρωμα κατά Western (Western Blot):

- ❖ Το διάλυμα ακρυλαμίδης/N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδης (Bis) 30% mix 29:1 από την Applichem
- ❖ Οι πρωτεΐνες μάρτυρες με γνωστή μοριακή μάζα (bluestar prestained protein marker) από τη Nippon Genetics (Germany)
- ❖ Η μεμβράνη νιτροκυταρίνης (0.45 μm) από την GE Healthcare Life Science (USA)
- ❖ Οι συσκευές ηλεκτροφόρησης από την BIO-RAD (USA)
- ❖ Το υπερθειικό αμμώνιο (APS) από την Ferak (Germany)
- ❖ Το TEMED από τη Fluka (Germany)
- ❖ Το χαρτί χρωματογραφίας Whatman 3M από την Macherey-Nagel

- ❖ Τα στερεά 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-φωσφορικό μετά της τολουϊδίνης άλας (BCIP) και 2,2'-δινιτροφαινυλ-5,5'-διφαινυλ-3,3'-(3,3'-διμεθοξυ-4,4'-διφαινυλεν-χλωριούχο) τετραζόλιο (NBT) από την Applichem
- ❖ Η β-μερκαπτοαιθανόλη, η χρωστική Ponceau stain και η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης από τη Serva (Germany)
- ❖ Το τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθάνιο (Tris), η γλυκίνη, το θειικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS), η μεθανόλη (MeOH), η αιθανόλη (EtOH), το χλωριούχο νάτριο (NaCl) από την Applichem
- ❖ Το απορρυπαντικό Tween 20 και το μονόξινο φωσφορικό νάτριο από τη Merck
- ❖ Το DMSO από τη Sigma
- ❖ Το χλωριούχο κάλιο (KCl), το χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂) από τη Scharlau (Spain)
- ❖ Το διμεθυλφορμαμίδιο και το υδροχλωρικό οξύ (HCl) από τη Carlo Erba (France)
- ❖ Το μονόξινο φωσφορικό κάλιο από τη Fisher (UK)

Για τις υπόλοιπες πειραματικές μεθόδους:

- ❖ Το διάλυμα Bradford από την Applichem
- ❖ Η χρωστική Trypan blue από την Gibco
- ❖

Αντισώματα

Τα ειδικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έναντι: α) της καρβοξυτελικής περιοχής της APP και β) του πεπτιδίου του αμυλοειδούς (Αβ) της APP παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο της Αν. Καθηγήτριας Δρ Δ. Βασιλακοπούλου.

Τα δευτερογενή αντισώματα έναντι των IgG αιγός (alkaline-phosphatase conjugated rabbit anti-goat IgG) και κουνελιού (alkaline-phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG) συζευγμένα με αλκαλική φωσφατάση αποκτήθηκαν από τη Sigma.

3.2. Ρυθμιστικά Διαλύματα

1. Διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων για SDS-PAGE 1x (Διάλυμα Φόρτωσης)

10 mM Tris-βάση
10 % (κ.ο.) γλυκερόλη
2 % (κ.β.) SDS
5 % (κ.ο.) β-μερκαπτοαιθανόλη
0,002 % χρωστική Bromophenol blue

2. Πήκτωμα διαχωρισμού SDS-PAGE (Separating Gel Buffer)

0,375 M Tris-HCl pH 8.8
0,1 % (κ.β.) SDS
0,1 % (κ.β.) APS
0,04 % (κ.ο.) Temed

3. Πήκτωμα συμπύκνωσης SDS-PAGE (Stacking Gel Buffer)

0,125 M Tris-HCl pH 6.8
0,1 % (κ.β.) SDS
0,1 % (κ.β.) APS
0,1 % (κ.ο.) Temed

4. Διάλυμα ηλεκτροδίων SDS-PAGE (Running Buffer)

25 mM Tris-HCl pH 8.3
0,192 M γλυκίνη
0,1 % (κ.β.) SDS

5. Διάλυμα ηλεκτροφορητικής μεταφοράς (Transfer Buffer)

48 mM Tris-HCl pH 9.2
39 mM γλυκίνη
20 % (κ.ο.) μεθανόλη
3,75 % (κ.β.) SDS

6. Διάλυμα χρώσης Ponceau Stain

0,5 % (κ.β.) Ponceau Stain

5 % TCA

7. Διάλυμα κορεσμού ηλεκτροφορητικής μεταφοράς (Blocking Solution)

5 % (κ.β.) dried skimmed milk

10 mM Tris-HCl pH 8.0

150 mM NaCl

0,05 % (κ.β.) Tween 20

8. Διάλυμα πλύσεων ηλεκτροφορητικής μεταφοράς (TNT)

10 mM Tris-HCl pH 8.0

150 mM NaCl

0,05 % (κ.β.) Tween 20

9. Διάλυμα ανάπτυξης ανοσοαντίδρασης (Alkaline Phosphatase Buffer)

100 mM Tris-HCl pH 9.5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂·6H₂O

10. Διάλυμα χρωματικής ανοσοαντίδρασης (Development Buffer)

100 mM Tris-HCl pH 9.5

100 mM NaCl

5 mM MgCl₂·6H₂O

0,033 % (κ.β.) NBT

0,0165 % (κ.β.) BCIP

11. Διάλυμα Bradford

0,01 % (κ.β.) Coomassie Brilliant Blue G-250

4,7 % (κ.ο.) αιθανόλη

8,5 % (κ.ο.) ορθοφωσφορικό οξύ

12. Θρεπτικό Μέσο Καλλιέργειας

89 % DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

10 % FBS (Εμβρυϊκός ορός βοός)

1 % μίγμα αντιβιοτικών (10.000 units πενικιλίνης/ στρεπτομυκίνης)

13. PBS 1x (Phosphate Buffered Saline)

0,137 M NaCl

3,2 mM KCl

1,5 mM KH_2PO_4

10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

14. Διάλυμα παγώματος κυττάρων (Freezing Medium)

90 % DMEM

10 % DMSO

15. Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης επιμολυσμένων κυτταρικών κλώνων

89 % DMEM

10% FBS

1 % μίγμα αντιβιοτικών (10.000 units πενικιλίνης/ στρεπτομυκίνης)

200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 sulfate

16. Διάλυμα λύσης κυττάρων RIPA

50 mM tris pH 7.4

150 mM NaCl

250 mM EDTA pH 8.0

15 mM Triton X (10 %)

1 mM Sodium Vanadate

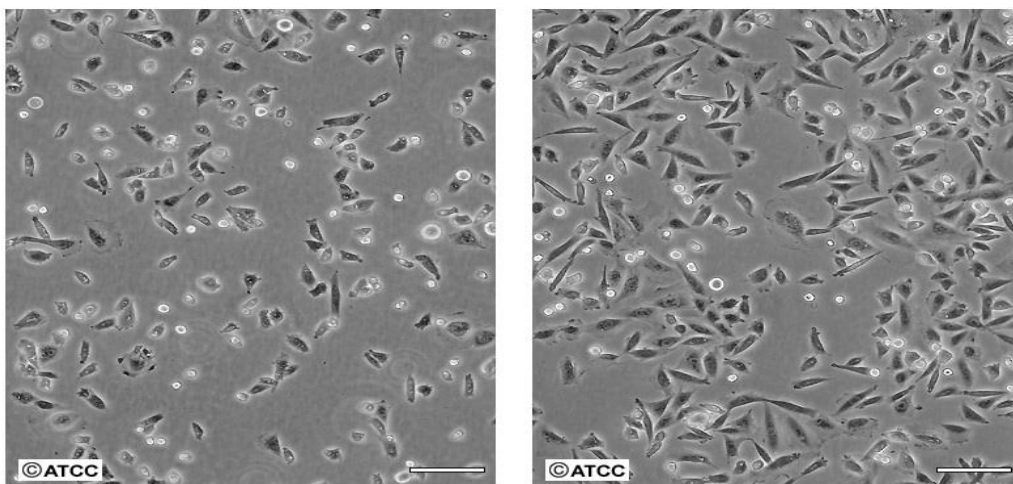
1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)

3.3. Κυτταρικές Σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν είναι η CHO (Chinese Hamster Ovarian cells) και η SH-SY5Y οι οποίες προμηθεύτηκαν από την ATCC (The American Type Culture Collection).

Η κυτταρική σειρά CHO

Η κυτταρική σειρά CHO (Chinese Hamster Ovarian cells) προέρχεται από την ωθήκη κινεζικού χάμστερ με μορφολογία που προσομοιάζει την επιθηλιακή (epithelial-like). Η πρώτη απομόνωση πραγματοποιήθηκε από τον T. Ruck το 1957 στο Ίδρυμα Ερευνών Καρκίνου της Βοστώνης [276]. Χρησιμοποιούνται συχνά στη βιολογική, φαρμακευτική και ιατρική έρευνα καθώς επίσης και για την παραγωγή θεραπευτικών πρωτεϊνών. Αποτελούν τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα κύτταρα θηλαστικών για τη βιομηχανική παραγωγή ανασυνδυασμένων θεραπευτικών πρωτεϊνών. Έχουν ταχύ ρυθμό ανάπτυξης και υψηλή παραγωγή πρωτεΐνης. Οι συνθήκες καλλιέργειας είναι προσκολλητικές. Το θρεπτικό υλικό ανάπτυξης πρέπει να περιέχει εμβρυϊκό ορό βοός σε τελική συγκέντρωση 10%. Επιπλέον απαιτείται η παρουσία του αμινοξέος προλίνη προκειμένου να αναπτυχθούν. Ο χρόνος διπλασιασμού είναι $2n=22$. Η επώαση γίνεται σε κλίβανο στους 37°C ενώ η διατήρηση σε κρυοφιαλίδιο στο υγρό άζωτο με χρήση DMSO κατάλληλο για κυτταροκαλλιέργεια τελικής συγκέντρωσης 10%. Είναι κατάλληλη κυτταρική σειρά για την επίτευξη διαμόλυνσης καθώς και για τη μελέτη της DDC καθώς δεν εκφράζει την DDC και τους μεταφορείς της DA, DAT και VMAT-2.



Εικόνα 3.1.: Εικόνα από ανάστροφο μικροσκόπιο με χαμηλή πληρότητα (confluency) ταπητίου στα αριστερά και υψηλή στα δεξιά. Πρόκειται για την κυτταρική σειρά CHO.

Τροποποιημένες κυτταρικές σειρές

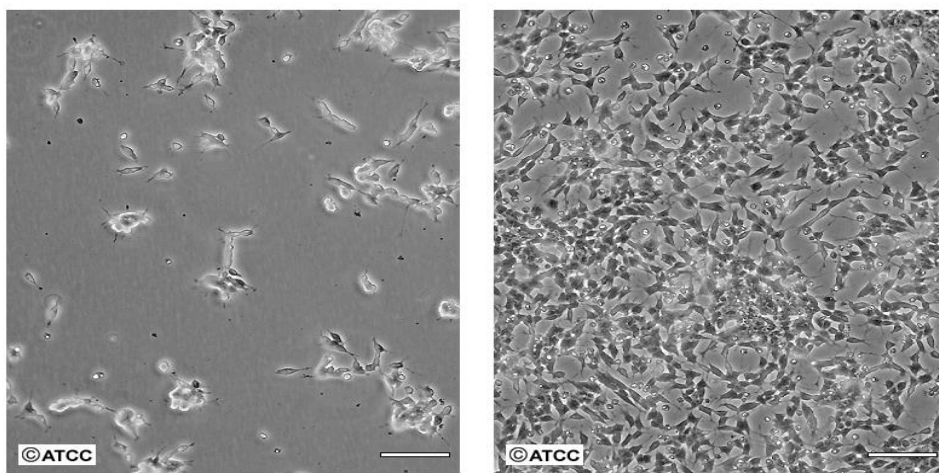
Οι παρακάτω κυτταρικές σειρές παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο της Αν. Καθηγήτριας Δρ Δ. Βασιλακοπούλου και χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η επιλογή των επιμολυσμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη του αντιβιοτικού G418 (200 µg/ml) στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

- CHO/DDC: Κυτταρική σειρά CHO επιμολυσμένη με το cDNA της πλήρους μήκους ανθρώπινης DDC
- CHO/Alt-DDC: Κυτταρική σειρά CHO επιμολυσμένη με το cDNA του εναλλακτικού μεταγράφου Alt-DDC
- CHO/DDC-3: Κυτταρική σειρά CHO επιμολυσμένη με το cDNA του εναλλακτικού μεταγράφου DDC-3

Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y

Τα κύτταρα SH-SY5Y απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1970 από το μυελό των οστών ενός κοριτσιού ηλικίας 4 ετών που έπασχε από νευροβλάστωμα. Ο κλώνος SH-SY5Y προέκυψε έπειτα από την τρίτη κλωνοποίηση του SK-N-SH. Συγκεκριμένα ο κλώνος SH-SY κλωνοποιήθηκε δίνοντας τον κλώνο SH-SY5 και στη συνέχεια προέκυψε ο SH-SY5Y [277]–[279]. Χρησιμοποιούνται ευρέως για την in vitro μελέτη των νευροεκφυλιστικών ασθενειών AD και PD καθώς επίσης και για τη μελέτη της νευρογένεσης. Οι κυτταροκαλλιέργειες περιλαμβάνουν τόσο προσκολλημένα όσο και αιωρούμενα κύτταρα. Επίσης μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ώριμους νευρώνες που χαρακτηρίζονται από ορισμένους νευρωνικούς δείκτες [280]–[283]. Έχει βρεθεί ότι η κυτταρική σειρά SH-SY5Y εκφράζει τόσο το πλήρους μήκους μετάγραφο της DDC νευρικής φύσεως όσο και το μετάγραφο από το οποίο απουσιάζει το εξώνιο 3 [156].

Οι συνθήκες καλλιέργειας είναι παρόμοιες με εκείνες της κυτταρικής σειράς CHO.



Εικόνα 3.2.: Εικόνα από ανάστροφο μικροσκόπιο με χαμηλή πληρότητα (confluency) ταπητίου στα αριστερά και υψηλή στα δεξιά. Πρόκειται για την κυτταρική σειρά SH-SY5Y.

3.4. Καλλιέργεια Ευκαρυωτικών Κυττάρων *in vitro*

Όλες οι κάτωθι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιούνται υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar Flow). Τα ειδικά δοχεία καλλιέργειας (τρυβλία, φλάσκες, 6-well) καθώς και όλα τα σκεύη και υλικά που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα. Πριν από την έναρξη εργασίας στο θάλαμο νηματικής ροής, προηγείται η έκθεση του θαλάμου σε υπεριώδη ακτινοβολία (UVC λαμπτήρας) για 30 περίπου min έτσι ώστε να αποστειρωθεί ο χώρος ενώ η αποστείρωση περιορισμένου χώρου (τοπική) πραγματοποιείται με διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v). Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM με 10% συμπληρωματικό ορό εμβρύου βοός FBS που περιέχει τους κατάλληλους αυξητικούς παράγοντες και 1% μίγματος αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης. Τα κύτταρα διατηρούνται σε θάλαμο επώασης στους 37°C με επίπεδο CO₂ 5% και σχετική υγρασία 95%.

3.4.1. Παρασκευή θρεπτικού υλικού

Ως θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το DMEM, το οποίο αγοράστηκε από την εταιρία Biosera ως ήδη αποστειρωμένο από τον κατασκευαστή (Gibco). Στο θρεπτικό μέσο προστέθηκαν ορός βοός και αντιβιοτικά εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες με τελική

σύσταση: 89% DMEM, 10% FBS και 1% μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης επίσης από τη Biosera. Το θρεπτικό υλικό αποτελεί την κύρια πηγή γλυκόζης και αμινοξέων για τα κύτταρα, ενώ ο ορός FBS περιέχει τους αυξητικούς παράγοντες που απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό τους. Ο ορός εμβρύου βοός πρέπει να απενεργοποιηθεί πριν από τη χρήση του. Αυτό επιτυγχάνεται με θέρμανση στους 56°C για 30 min και στη συνέχεια γίνεται διαμοιρασμός του ορού σε ίσα κλάσματα (aliquots) τα οποία πριν από την τοποθέτησή τους μέσα στο DMEM πρέπει να φιλτραριστούν για την αποφυγή εισόδου συσσωματωμάτων του ορού. Το θρεπτικό υλικό παρασκευάζεται πάντα μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής, φιλτράρεται και φυλάσσεται στο cold room στους 4°C με το πώμα κλειστό με parafilm. Επιπλέον, προστέθηκε αντιβιοτικό συγκέντρωσης 200 μg/ml G418 στο DMEM για την ανάπτυξη και την επιλογή των κλώνων που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο και μας ενδιαφέρει να επιβιώσουν, δηλαδή των κυτταρικών σειρών : CHO/DDC, CHO/DDC-3 και CHO/Alt-DDC.

3.4.2. Απόψυξη κυττάρων από το υγρό άζωτο

Η διαδικασία της καλλιέργειας των κυττάρων ξεκινά με την απόψυξη των κυττάρων από το υγρό άζωτο (-196°C), διαδικασία η οποία πρέπει να εκτελείται όσο το δυνατόν γρηγορότερα. Τα ειδικά κρυοφιαλίδια (cryovials) από το υγρό άζωτο θερμαίνονται τρίβοντάς τα με τα χέρια και όταν το περιεχόμενό τους (κύτταρα και ειδικό διάλυμα ψύξης) ξεπαγώσει, μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου falcon (15ml), το οποίο περιέχει ήδη 2ml θρεπτικού υλικού και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5min στις 1440 στροφές σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα, το οποίο περιέχει τα κύτταρα, επαναδιαλυτοποιείται σε 1ml θρεπτικού υλικού και μεταφέρεται σε ειδικό δοχείο καλλιέργειας (φλάσκα ή τρυβλίο) που περιέχει περίπου 10ml θρεπτικού υλικού. Οι καλλιέργειες τοποθετούνται στον ειδικό επωαστικό κλίβανο στους 37°C. Την επόμενη μέρα, το ειδικό δοχείο καλλιέργειας παρατηρείται σε ανάστροφο μικροσκόπιο ώστε να επιβεβαιωθεί η βιωσιμότητα των κυττάρων. Πριν την παρατήρηση, η τράπεζα καθώς και οι λοιπές επιφάνειες του μικροσκοπίου καθαρίζονται με διάλυμα αιθανόλης 70% για την τοπική αποστείρωση. Την επόμενη μέρα ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό για την πλήρη απομάκρυνση του

DMSO και τυχόν νεκρών κυττάρων που εμποδίζουν τη σωστή ανάπτυξη των κυττάρων. Τα κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται. Το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται ανά δύο ημέρες και σε κάθε ανανέωση ακολουθεί προσθήκη του αντιβιοτικού G418 για την επιλογή των κλώνων που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο στις κυτταρικές σειρές όπου απαιτείται.



Εικόνα 3.3.: Ανάστροφο μικροσκόπιο με ειδικό δοχείο καλλιέργειας (τρυβλίο) στην τράπεζα για την παρατήρηση των κυττάρων.

3.4.3. Διαμοιρασμός κυττάρων (Split)- Ανακαλλιέργεια

Τα κύτταρα καθώς ξεκινούν τις μιτωτικές διαιρέσεις τους, καλύπτουν προοδευτικά όλη την επιφάνεια του ειδικού δοχείου καλλιέργειας, δημιουργώντας ένα ταπήτιο. Προοδευτικά, έρχονται σε στενή επαφή μεταξύ τους με αποτέλεσμα τη διακοπή της ανάπτυξής τους, ένα φαινόμενο που ονομάζεται αναστολή εξ επαφής. Όταν η πληρότητα του ταπητίου φθάνει στο 80% (80% confluency) για την αποφυγή της δημιουργίας του φαινομένου αναστολής εξ επαφής και την περαιτέρω συνέχιση της καλλιέργειας, τα κύτταρα θα πρέπει να αποκολληθούν και να διαμοιραστούν σε περισσότερα ειδικά δοχεία καλλιέργειας (split). Η διαδικασία που ακολουθείται για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων είναι η εξής: αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από το δοχείο καλλιέργειας και πραγματοποιείται ένα ξέπλυμα του δοχείου με 3ml PBS 1x. Στη συνέχεια προστίθενται 2ml θρυψίνης προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ελάχιστη

διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών που προκαλούν προσκόλληση των κυττάρων στον πάτο του δοχείου καλλιέργειας και να αποκολληθούν τα κύτταρα ώστε να πραγματοποιηθεί η αποκόλληση των κυττάρων από το ταπήτιο. Τα δοχεία καλλιέργειας μεταφέρονται στον επωαστικό κλίβανο για περίπου 5min με σκοπό να δράσει η θρυψίνη. Μετά το πέρας των 5min κι εφόσον τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί από το ταπήτιο, δημιουργώντας ένα θολό διάλυμα, στο θάλαμο νηματικής ροής προστίθεται τριπλάσιος όγκος θρεπτικού υλικού (6ml) έτσι ώστε ο ορός FBS να απενεργοποιήσει την πρωτεολυτική δραστηριότητα της θρυψίνης. Στη συνέχεια, αφού επιβεβαιωθεί μέσω μικροσκοπίου η αποκόλληση των κυττάρων, το μίγμα κυττάρων-θρεπτικού υλικού-θρυψίνης αναρροφάται με τη βοήθεια πιπέτας και το εναιώρημα συλλέγεται σε νέο σωληνάκι τύπου Falcon. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5min στις 1440 στροφές, το υπερκείμενο αποχύνεται και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 1ml θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια έπειτα από ανάδευση διαχωρίζεται σε νέα δοχεία καλλιέργειας με επιπλέον προσθήκη θρεπτικού υλικού έτσι ώστε να έχουμε την επιθυμητή αραιώση σε κάθε τρυβλίο. Τα τρυβλία/φλάσκες τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο για την περαιτέρω διατήρηση της καλλιέργειας. Η καθεμία καλλιέργεια αναφέρεται και ως passage.

3.4.4. Εξωγενής χορήγηση παραγόντων (Carbidopa, L-Dopa, DA, NSD-1015)

Σε καλλιέργεια κυττάρων CHO, CHO/ DDC, CHO/ Alt- DDC, CHO/ DDC- 3 και SH-SY5Y συγκέντρωσης 2×10^5 κύτταρα/ mL χορηγήθηκαν 20 και 100 μM Carbidopa για 24 ώρες.

Σε καλλιέργεια κυττάρων CHO, CHO/ DDC, CHO/ Alt- DDC και CHO/ DDC- 3 συγκέντρωσης 2×10^5 κύτταρα/ mL χορηγήθηκαν 0.34, 0.5 και 0.7 mM L-Dopa για 24 ώρες.

Σε καλλιέργεια κυττάρων CHO, CHO/ DDC, CHO/ Alt- DDC και CHO/ DDC- 3 συγκέντρωσης 2×10^5 κύτταρα/ mL χορηγήθηκαν 25 και 75 μM DA για 24 ώρες.

Σε καλλιέργεια κυττάρων CHO, CHO/ DDC, CHO/ Alt- DDC και CHO/ DDC- 3 συγκέντρωσης 2×10^5 κύτταρα/ mL χορηγήθηκαν 170 και 230 μM NSD-1015 για 24 ώρες.

Η παρασκευή των παραγόντων έγινε έπειτα από τη ζύγιση του αντίστοιχου στερεού σε ζυγό ακριβείας και διαλυτοποίηση με τον αντίστοιχο διαλύτη (dH₂O) ανάλογα με τη διαλυτότητα της κάθε χημικής ουσίας. Αφού διαλυθεί το στερεό και αποκτηθεί ένα ομοιογενές διάλυμα μέσα σε σωληνάκι τύπου falcon γίνεται διαμοιρασμός (aliquots) και η συντήρηση πραγματοποιείται στους -18 °C.

Μετά την έκθεσή τους στους παραπάνω παράγοντες, τα κύτταρα λύθηκαν, απομονώθηκε η πρωτεΐνη τους και υποβλήθηκαν σε τεχνική του ανοσοεντοπισμού με ανάλυση κατά Western.

3.4.5. Κατάψυξη και φύλαξη των κυττάρων στους -80 °C και στο υγρό άζωτο

Κατά την πορεία της ανακαλλιέργειας, είναι δυνατό κάποιο ή κάποια από τα δοχεία καλλιέργειας, να μην είναι απαραίτητα για την χρήση τους στην πειραματική διαδικασία. Τα δοχεία αυτά, φυλάσσονται στο υγρό άζωτο, για μελλοντική χρήση. Τα δοχεία καλλιέργειας τα οποία προορίζονται για τη φύλαξη στο υγρό άζωτο, υφίστανται τη διαδικασία της ανακαλλιέργειας, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Ωστόσο, η τελική επαναιώρηση των κυττάρων μετά τη φυγοκέντρηση, πραγματοποιείται σε ειδικό διάλυμα ψύξης. Τα κύτταρα αποκολλώνται από το τρυβλίο, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη διαδικασία, με μόνη διαφορά ότι η τελική επαναιώρηση των κυττάρων πραγματοποιείται σε διάλυμα ψύξης. Το διάλυμα ψύξης των κυττάρων αποτελείται από 10% DMSO σε διάλυμα του θρεπτικού υλικού και η προσθήκη του γίνεται πολύ γρήγορα. Το εναιώρημα κυττάρων μοιράζεται στα ειδικά κρυοφιαλίδια τα οποία μεταφέρονται στους -80 °C για μία ημέρα ή σε υγρό άζωτο για μεγαλύτερη διάρκεια διατήρησης των κλώνων (-196 °C).

Κατά την κρυοσυντήρηση επιδιώκεται η αποφυγή δημιουργίας σχηματισμού πάγου ενδοκυτταρικά, αφού οι κρύσταλλοι του πάγου, οι οποίοι καταλαμβάνουν μεγαλύτερο όγκο από το νερό, είναι δυνατόν είτε να καταστρέψουν τις μεμβράνες των κυττάρων είτε λόγω της δέσμευσης μορίων νερού στον πάγο, να προκαλέσουν αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων ουσιών, η οποία μπορεί να είναι καταστροφική για το κύτταρο. Κατά τη διάρκεια της ψύξης στο υγρό άζωτο, το νερό στερεοποιείται στην κρυσταλλική μορφή του πάγου. Το DMSO, είναι ένα διαπερατό κρυοπροστατευτικό (με υψηλή διαλυτότητα στο νερό σε

χαμηλές θερμοκρασίες), το οποίο προκαλεί αναδιάταξη της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητάς της. Διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, διαχέεται στο κυτταρόπλασμα και αντικαθιστά το μεγαλύτερο μέρος του ενδοκυττάριου νερού. Τα μόρια του DMSO, όταν βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο νερό, αναστέλλουν το σχηματισμό των κρυστάλλων του πάγου και δημιουργούν την κατάσταση του υαλώδους πάγου (vitrification), όπου το νερό μπορεί να στερεοποιηθεί χωρίς την περαιτέρω επέκτασή του. Σε αυτό το διάλυμα τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα.



Εικόνα 3.4.: Κρυοφιαλίδια για τη διατήρηση των κυττάρων στο υγρό άζωτο.

3.5. Ανοσοστύπωμα κατά Western (Western Blot)

Για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε δείγματα από ομογενοποιημένους ιστούς ή από κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιείται η τεχνική του ανοσοεντοπισμού με ανάλυση κατά Western. Η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, καθώς βασίζεται στην εξειδικευμένη αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Στη διαδικασία του ανοσοεντοπισμού, το αντιγόνο βρίσκεται ακινητοποιημένο σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη επώαζεται με ειδικό αντίσωμα (μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό) έναντι του αντιγόνου, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος. Ακολουθεί η προσθήκη δεύτερου αντισώματος κι η επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με αυτό για διάστημα 1 ώρας. Η αντίδραση του δεύτερου αντισώματος περιλαμβάνει τη σύνδεση αυτού με το πρώτο. Πρέπει να αναφερθεί ότι το δεύτερο αντίσωμα φέρει προσδεδωμένο ένζυμο (υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση), το οποίο καταλύει μια αντίδραση, όπου παράγεται έγχρωμο προϊόν. Η δημιουργία συμπλόκου αντιγόνου-

αντισώματος στη μεμβράνη πιστοποιείται με την ανίχνευση έγχρωμου προϊόντος. Με τη διαδικασία αυτή είναι δυνατό να ανιχνευθούν πρωτεΐνες που μπορεί να εκφράζονται σε πολύ μικρές ποσότητες στο δείγμα.

3.5.1. Συλλογή κυττάρων- Απομόνωση πρωτεϊνών

Για τη συλλογή των κυττάρων απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και ακολουθεί πλύση με PBS 1x. Προστίθεται κατάλληλος όγκος PBS 1x και με τη χρήση ειδικού εργαλείου cell scraper αποκολλώνται τα κύτταρα και συλλέγονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου erpendorf. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4° C για 15 λεπτά. Το ίζημα συλλέγεται και είναι έτοιμο για λύση είτε για αποθήκευση στους -20° C για μελλοντική χρήση.

Για την απομόνωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται το διάλυμα λύσης: RIPA BUFFER του οποίου τα συστατικά αναλύονται παραπάνω. Ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος καθορίζεται ο όγκος του διαλύματος λύσης που θα τοποθετηθεί. Το διάλυμα αναδεύεται και τοποθετείται στους 4° C συνολικά για 30 λεπτά ενώ κάθε 5-10 λεπτά πραγματοποιείται έντονη ανάδευση Vortex. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 13.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4° C για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο περιέχει τις πρωτεΐνες που έχουν διαλυθεί και παραλαμβάνεται. Το υπερκείμενο θα περιέχει διαλυμένες κυτταροπλασματικές, μεμβρανικές και πυρηνικές πρωτεΐνες. Το υπερκείμενο που περιέχει τις διαλυμένες πρωτεΐνες σε κάθε περίπτωση αποθηκεύεται στους -20° C. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση κάθε δείγματος προσδιορίζεται με τη μέθοδο Bradford.

3.5.2. Ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford, είναι μια χρωματομετρική πρωτεϊνική διαδικασία και χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της συνολικής πρωτεΐνης σε ένα δείγμα. Στην συγκεκριμένη διαδικασία, η χρωστική ουσία Coomassie G-250 διαλύεται σε ένα όξινο διάλυμα, κάνοντας το να απορροφήσει στα 465nm (καφεκόκκινο χρώμα). Την στιγμή που η βαφή, η οποία είναι αρνητικά φορτισμένη, συνδεθεί με τα θετικά φορτισμένα μόρια της πρωτεΐνης, η απορρόφηση του διαλύματος φτάνει τα 595nm (μπλε χρώμα). Η τιμή της απορρόφησης είναι ανάλογη με την

συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο διάλυμα. Η ανάπτυξη του χρώματος, αποδίδεται στην παρουσία ορισμένων αμινοξέων (αργινίνη, λυσίνη και ιστιδίνη) στην πρωτεΐνη. Δυνάμεις Van der Waals δημιουργούνται μεταξύ της καρβοξυλικής ομάδας και της βαφής ενώ ηλεκτροστατικές δυνάμεις δημιουργούνται μεταξύ αμινομάδας και βαφής. Τα ελεύθερα αμινοξέα και γενικά πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους δεν παράγουν χρώμα όταν χρησιμοποιούμε τέτοια αντιδραστήρια βαφής.

Κατά τη διαδικασία το αντιδραστήριο Bradford αραιώνεται 1:5 στη δική μας περίπτωση και στη συνέχεια προστίθεται 1 μl πρωτεϊνικού δείγματος και 1 mL αντιδραστηρίου Bradford σε κάθε ειδική κυψελίδα φωτομέτρησης. Έπειτα από ανάδευση Vortex και μια σύντομη αναμονή, ακολουθεί φωτομέτρηση όπου προσδιορίζεται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 595nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης γίνεται μέσω σύγκρισης των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων με τις τιμές της πρότυπης καμπύλης που έχει σχεδιαστεί και ελεγχθεί στο εργαστήριο. Η πρότυπη καμπύλη έχει σχεδιαστεί με προσδιορισμό της απορρόφησης στα 595 nm μιας σειράς δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης (BSA-Bovine Serum Albumin) σε απιονισμένο νερό. Η συγκέντρωση προσδιορίζεται σε μg/μl. Σε περίπτωση που οι τιμές συγκέντρωσης που προσδιορίζονται είναι μεγαλύτερες από αυτές της καμπύλης, τα δείγματα φωτομετρούνται πάλι ύστερα από αραιώση. Η πραγματική συγκέντρωση του δείγματος υπολογίζεται με πολλαπλασιασμό του αποτελέσματος με το συντελεστή αραιώσης. Σε περίπτωση που η προσδιοριζόμενη συγκέντρωση είναι μικρότερη της καμπύλης ακολουθείται η μέθοδος Microbradford.

Η λογική της μεθόδου είναι ίδια με την μέθοδο Bradford με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό μικρότερων συγκεντρώσεων πρωτεΐνης σε μg/μL. Επίσης, η τοποθέτηση των υπό μέτρηση δειγμάτων γίνεται σε ειδικά πιάτα Greiner 96 Flat Transparent 96 θέσεων, ενώ κάθε δείγμα τοποθετείται σε δύο θέσεις και χρησιμοποιείται ο μέσος όρος της απορρόφησης για προσδιορισμό μεγαλύτερης ακρίβειας. Κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης BSA από μια αρχική συγκέντρωση, BSA 1mg/mL σε H₂O. Η χρώση Bradford αραιώνεται 1:5 και σε κάθε θέση του πιάτου τοποθετούνται 2 μl του κάθε δείγματος και 198 μl μείγματος Bradford δύο φορές για κάθε δείγμα και κάθε συγκέντρωση της καμπύλης. Ύστερα μετράται η απορρόφηση στα 595 nm μετά από ανάδευση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου.

3.5.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με SDS- PAGE σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική, που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση τη μοριακή τους μάζα. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων εκτελείται παρουσία του απορρυπαντικού SDS. Το SDS είναι ένα ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό, το οποίο αφενός αποδιατάσσει τις δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές των πρωτεϊνών (εκτός από αυτές που δημιουργούνται από δισουλφιδικούς δεσμούς) κι αφετέρου προσδίδει αρνητικό φορτίο στα πρωτεϊνικά μόρια, ανάλογο της μάζας τους. Απόρροια αυτού είναι πως η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνικών μορίων μπορεί να αποτελεί συνάρτηση μόνο της μοριακής τους μάζας. Στα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν προστίθεται κατάλληλος όγκος διαλύματος φόρτωσης (10 mM Tris-βάση, 10 % (κ.ο) γλυκερόλη, 2 % (κ.β) SDS, 5 % (κ.ο) β-μερκαπταιθανόλη, 0,002 % χρωστική Bromophenol blue). Τα δείγματα θερμαίνονται στους 100°C για 10 λεπτά. Παράλληλα με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και μείγμα πρωτεϊνών γνωστών μοριακών μαζών, προκειμένου να εκτιμηθεί η μοριακή μάζα των πρωτεϊνών των δειγμάτων. Η ηλεκτροφόρηση επιτελείται στη συσκευή Mini protean II και III της BIO-RAD (Laemmli 1970) και το πήκτωμα διαχωρισμού (0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % (κ.β.) SDS, 0,1 % (κ.β.) APS, 0,04 % (κ.ο.) Temed) έχει διαστάσεις 85 x 55 x 0,75 mm. Τέλος, στη συσκευή συμπληρώνεται το πήκτωμα συμπίκνωσης (0,125 M Tris- HCl, pH 6,8, 0,1 % (κ.β.) SDS, 0,1 % (κ.β.) APS, 0,1 % (κ.ο.) Temed) και η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται σε συνθήκες σταθερής τάσης 150 V σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 1 ώρα, παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 0,192 M γλυκίνη , 0,1 % (κ.β.) SDS).

Η ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών στο εκχύλισμα του ιστού αλλά και των κυττάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης ηλεκτροφορήθηκε σε αποδιατακτικές συνθήκες κατά Laemmli. Τα δείγματα των πρωτεϊνών που ηλεκτροφορήθηκαν περιείχαν επιπλέον H₂O και Laemmli διάλυμα Φόρτωσης (Sample Buffer). Το διάλυμα αυτό περιέχει μερκαπταιθανόλη για την αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Επίσης, περιέχει SDS που προσφέρει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες, γλυκερόλη για την σωστή τοποθέτηση των δειγμάτων στις ειδικές

θέσεις. Τέλος, περιέχει και κυανούν της βρωμοφαινόλης τόσο για τη σωστή τοποθέτηση των δειγμάτων όσο και για την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Η ύπαρξη του ισχυρού απορρυπαντικού σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για πέντε λεπτά έχει ως αποτέλεσμα να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 1 λεπτό στις 13.000 στροφές ανά λεπτό. Σε κάθε πήκτωμα φορτώνονται 5 μ L του μάρτυρα μεγεθών πρωτεϊνών Page Ruler Prest Protein Ladder και ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση τους. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν πήκτες με δύο στρώσεις (stacking & separating gel) για την άριστη ανάλυση των πρωτεϊνών. Καθώς τα δείγματα μετακινούνται, περνούν από την πρώτη στρώση η οποία αποτελείται από χαμηλότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης 5% (w.v), χαμηλότερο pH και μικρότερο ιοντικό περιεχόμενο. Η σύσταση αυτή, επιτρέπει στις πρωτεΐνες να δομήσουν μία συμπυκνωμένη ζώνη και να εισέλθουν ταυτόχρονα στη δεύτερη στρώση διαχωρισμού. Η δεύτερη στρώση μπορεί να έχει περιεκτικότητα πολυακρυλαμίδης 8%, 12% και 15% (w/v), αναλόγως του είδους της προσδιοριζόμενης πρωτεΐνης. Η ηλεκτροφόρηση, πραγματοποιείται σε σταθερή τάση 120 V σε θερμοκρασία δωματίου και παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος τρεξίματος πρωτεϊνών (Running Buffer 1x). Η μετακίνηση των επεξεργασμένων πρωτεϊνών που έχουν αποκτήσει αρνητικό φορτίο και έχουν αποδιαταχθεί πραγματοποιείται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο της συσκευής μόνο με βάση το μοριακό τους βάρος. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί μέχρι να ολοκληρωθεί η κατανομή των πρωτεϊνών σε όλο το μήκος του πηκτώματος και οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους μετακινούνται πιο γρήγορα σε σχέση με τις μεγαλύτερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες.



Εικόνα 3.5.: Εξοπλισμός για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με SDS-PAGE σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

3.5.4. Ανάλυση πρωτεϊνών με ανοσοσύτπωση κατά Western (Western Blot).

Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με χρήση ειδικής συσκευής μεταφοράς. Στην περίπτωση που το ενδιαφέρον μας εστίαζε στον εντοπισμό της DDC και των ισομορφών της, χρησιμοποιήθηκε συσκευή ημί-ξηρης μεταφοράς της BIO-RAD. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιήθηκε μόνο σε αυτή την περίπτωση σε σταθερή τάση 20 V για 60 λεπτά. Η κατασκευή της κασέτας που θα τοποθετηθεί στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς περιλαμβάνει τοποθέτηση υλικών που έχουν διαβραχεί πρώτα με το διάλυμα μεταφοράς, με την παρακάτω σειρά : 2 χαρτιά Whatman 7x9 cm, πήκτωμα, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 7x9 cm, 2 χαρτιά Whatman 7x9 cm. Η προετοιμασία γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να απομακρυνθούν φυσαλίδες αέρα που θα εμπόδιζαν τη μεταφορά των πρωτεϊνών. Η κασέτα σφραγίζεται και τοποθετείται ώστε η μεταφορά των αρνητικά φορτισμένων (λόγω του SDS) πρωτεϊνών να γίνει από τον αρνητικό στο θετικό πόλο με τη δέσμευση τους στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Έπειτα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην οποία έχουν δεσμευτεί οι πρωτεΐνες υφίσταται χρώση Ponseau, η οποία δεσμεύεται σε όλες τις πρωτεΐνες και διαπιστώνεται εάν η μεταφορά είναι πετυχημένη. Η μεμβράνη, ξεπλένεται με απιονισμένο νερό ώσπου να απομακρυνθεί η χρωστική. Ακολουθεί η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων με

επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα σκόνης γάλατος χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά 5% (w/v) σε διάλυμα πλύσεων ηλεκτροφορητικής μεταφοράς (TNT), για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια, σε κάθε μεμβράνη τοποθετείται πρωτογενές αντίσωμα έναντι της επιθυμητής πρωτεΐνης, το οποίο έχει διαλυθεί σε διαφορετικές αραιώσεις ανάλογα με το είδος του σε σκόνη γάλατος-TNT 1x 5% (w/v). Η έκθεση της μεμβράνης στο αντίσωμα διαρκεί 16 ώρες στους 4°C, υπό ήπια ανάδευση. Την επόμενη ημέρα η μεμβράνη ξεπλένεται τρεις φορές για 10 λεπτά με TNT-1x, υπό ήπια ανάδευση για την απομάκρυνση του αντισώματος από τις μη ειδικές θέσεις. Στη συνέχεια, επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1,5 ώρα, υπό ήπια ανάδευση με δευτερογενές αντίσωμα, που είναι συζευγμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, και παρασκευάζεται σε αραιώση 1:10.000 σε σκόνη γάλατος 5% σε TNT-1x (w/v). Ακολουθούν, τρεις δεκάλεπτες πλύσεις με TNT-1x, υπό ήπια ανάδευση. Η εμφάνιση των ζωνών γίνεται αρχικά μέσω επώασης σε διάλυμα ανάπτυξης και στη συνέχεια μέσω προσθήκης διαλύματος χρωματικής αντίδρασης. Η αντίδραση σταματά με τη μεταφορά νιτροκυτταρίνης σε απεσταγμένο νερό.



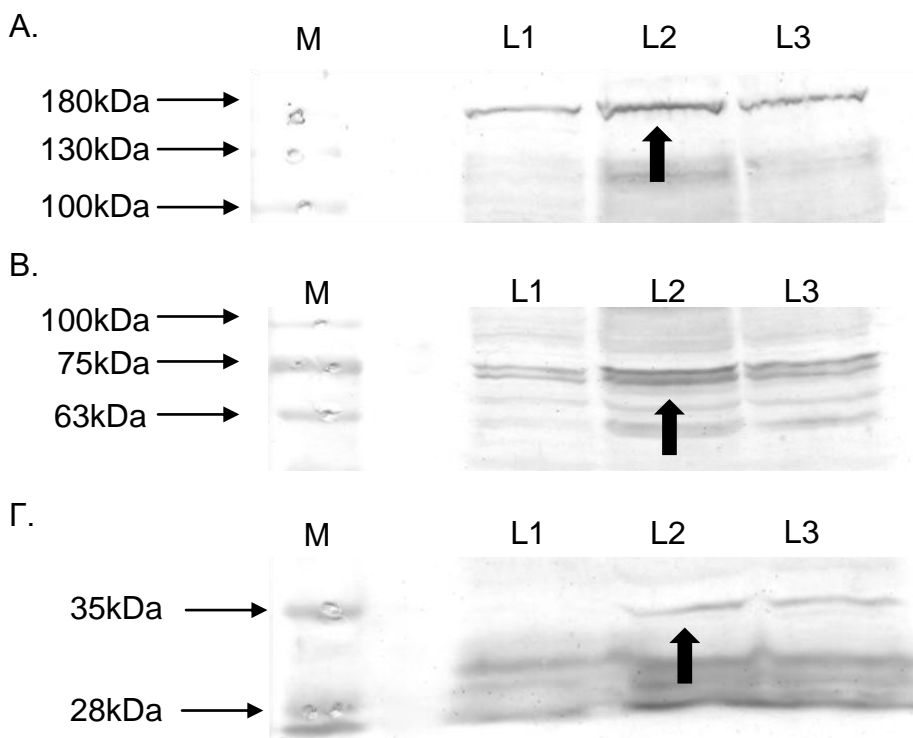
Εικόνα 3.6.: Συσσκευή ημίξηρης μεταφοράς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Μελέτη της επίδρασης των παραγόντων Carbidopa, L-Dopa, DA και NSD-1015 στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO

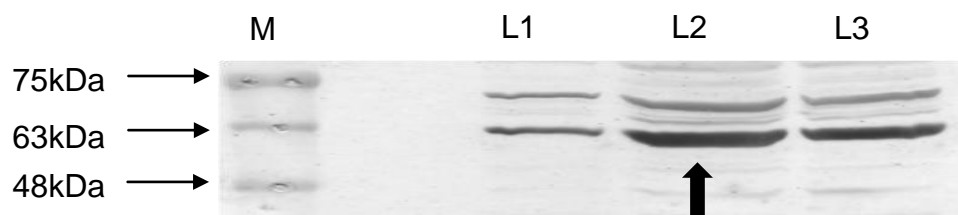
Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των παραγόντων στην κυτταρική σειρά CHO η οποία εκφράζει μικρά ποσοστά της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης, πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων όπου κύτταρα CHO επωάστηκαν με τους εξής παράγοντες: Carbidopa, L-Dopa, DA, NSD-1015. Τα αποτελέσματα αποτελούν μία χρήσιμη βάση ώστε να διαχωριστεί ο ρόλος των παραγόντων στις κυτταρικές σειρές που αναλύθηκαν στη συνέχεια απουσία και παρουσία της DDC.

4.1.1. Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20 μ M, 100 μ M) στην πρωτεολυτική επεξεργασία και στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στην κυτταρική σειρά CHO



Εικόνα 4.1.1.: Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20 μ M, 100 μ M) στην πρωτεολυτική επεξεργασία και στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στην κυτταρική σειρά CHO με χρήση αντισώματος για το A β .

Εικόνες Α-Γ: L1:CHO, L2:CHO+Carbidopa 20μM, L3:CHO+Carbidopa 100μM

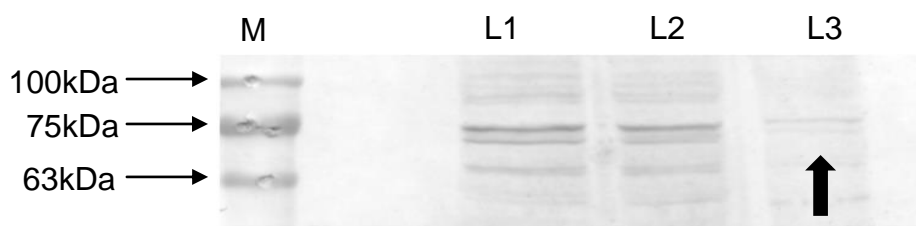


Εικόνα 4.1.2.: Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20 μM, 100 μM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO με χρήση αντισώματος για την καρβοξυτελική περιοχή της APP.

L1:CHO, L2:CHO+Carbidopa 20μM, L3:CHO+Carbidopa 100μM

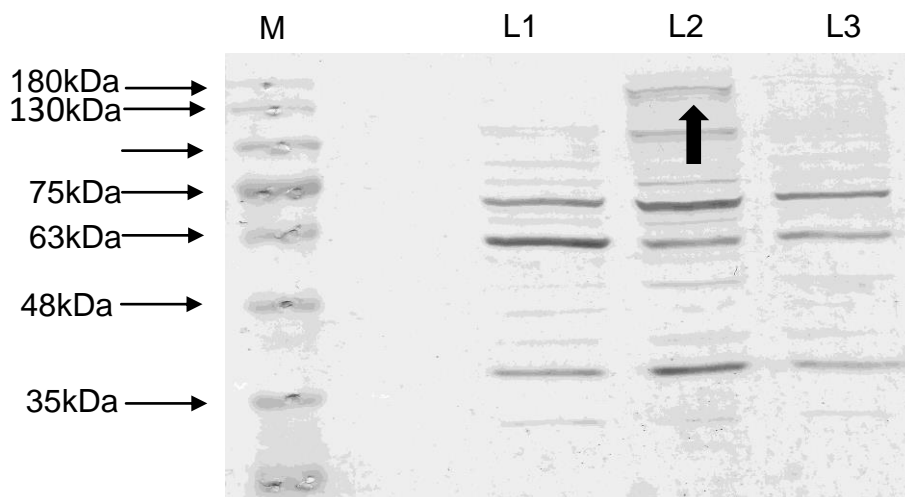
Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30 μg πρωτεΐνης και χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 10%. Σύμφωνα με τις παραπάνω εικόνες φαίνεται ότι η Carbidopa αυξάνει τον καταβολισμό της APP κυρίως έπειτα από την επώαση 20 μM. Ωστόσο, καθώς οι διαφορές μεταξύ των διαδρομών δεν αναδεικνύουν ξεκάθαρη επίδραση απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

4.1.2. Μελέτη της επίδρασης της L-Dopa (0.5 mM, 0.7 mM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία και στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στην κυτταρική σειρά CHO



Εικόνα 4.1.3.: Μελέτη της επίδρασης της L-Dopa (0.5 mM, 0.7 mM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO με χρήση αντισώματος για το Αβ.

L1:CHO, L2:CHO+L-Dopa 0.5 mM, L3:CHO+ L-Dopa 0.7 mM

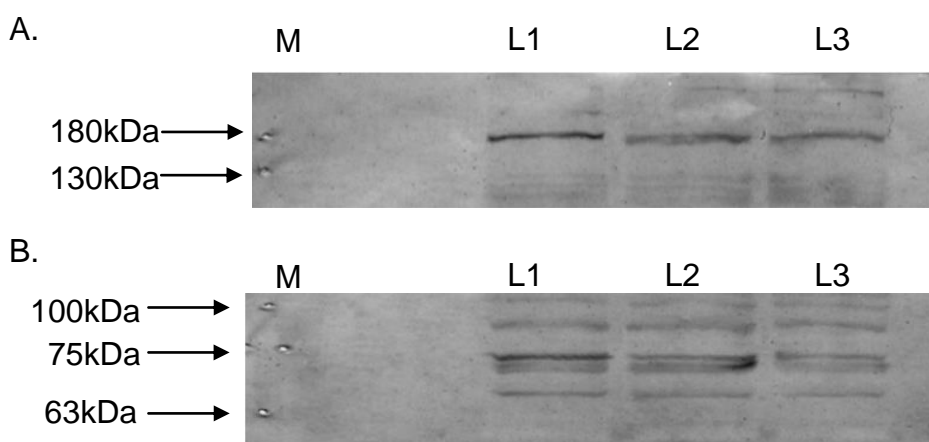


Εικόνα 4.1.4.: Μελέτη της επίδρασης της L-Dopa (0.5 mM, 0.7 mM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία και στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στην κυτταρική σειρά CHO με χρήση αντισώματος για την καρβοξυτελική περιοχή της APP.

L1:CHO, L2:CHO+L-Dopa 0.5 mM, L3:CHO+ L-Dopa 0.7 mM

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30 µg πρωτεΐνης και χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 10%. Η επώαση της κυτταρικής σειράς CHO με 0.5 mM L-Dopa φαίνεται να επηρεάζει τον καταβολισμό της APP στην περιοχή 75-35 kDa καθώς και την επαγωγή σχηματισμού υψηλομοριακών συμπλόκων. Η δόση 0.7 mM L-Dopa εμφανίζει αναστολή καταβολισμού της APP.

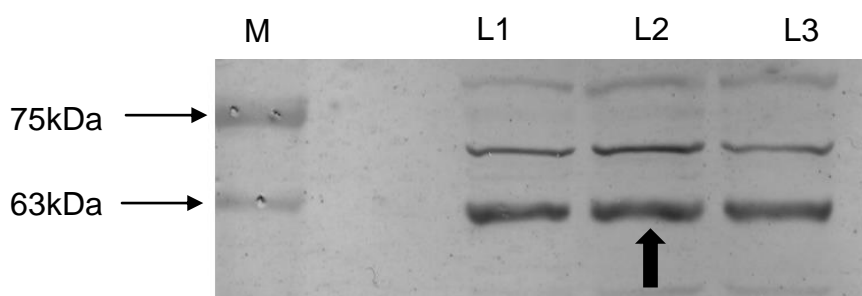
4.1.3. Μελέτη της επίδρασης του NSD-1015 (170 µM, 230 µM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία και στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στην κυτταρική σειρά CHO



Εικόνα 4.1.5.: Μελέτη της επίδρασης του NSD-1015 (170 µM, 230 µM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία και στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στην κυτταρική σειρά CHO με χρήση αντισώματος για το Αβ.

Εικόνες A,B: L1:CHO, L2:CHO+NSD-1015 170 μ M, L3:CHO+ NSD-1015 230 μ M

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30 μ g πρωτεΐνης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10%. Η επώαση της κυτταρικής σειράς CHO με τον παράγοντα NSD-1015 επάγει την αναστολή του καταβολισμού της APP στη δόση των 230 μ M. Η επαγωγή σχηματισμού υψηλομοριακών συμπλόκων της APP δε φαίνεται να επηρεάζεται ιδιαίτερα από την παρουσία του NSD-1015.

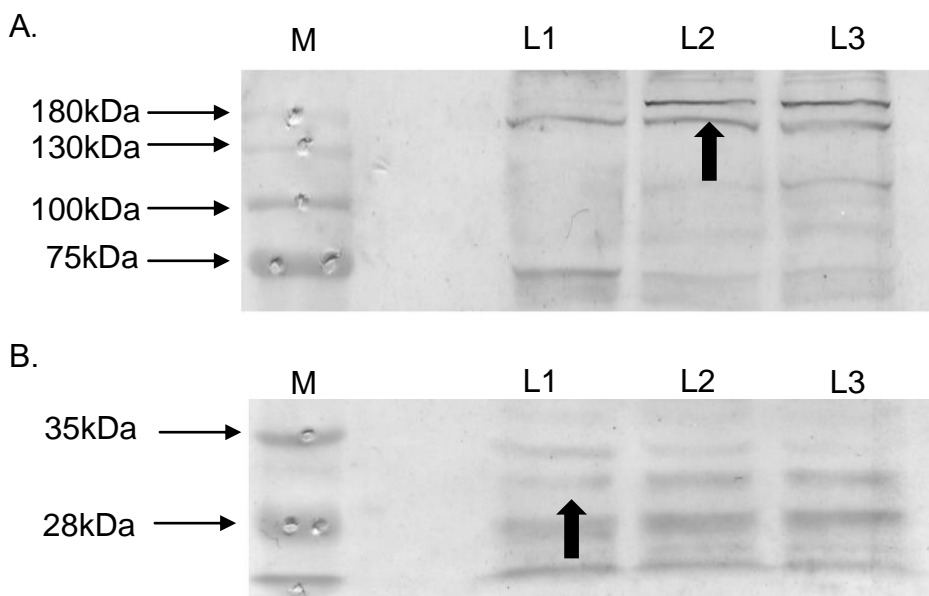


Εικόνα 4.1.6.: Μελέτη της επίδρασης του NSD-1015 (170 μ M, 230 μ M) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO με χρήση αντισώματος για την καρβοξυτελική περιοχή της APP.

L1:CHO, L2:CHO+NSD-1015 170 μ M, L3:CHO+ NSD-1015 230 μ M

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30 μ g πρωτεΐνης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10%. Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα, φαίνεται ότι ο παράγοντας NSD-1015 έχει επίδραση στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP κυρίως στη δόση των 170 μ M όπου αυξάνεται ο καταβολισμός της APP ενώ με τη δόση των 230 μ M παρατηρείται σχετική αναστολή.

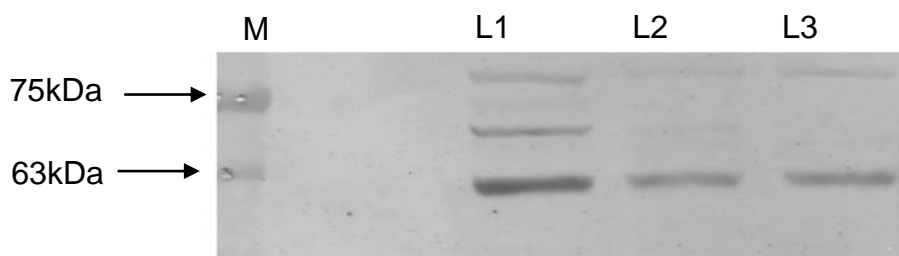
4.1.4. Μελέτη της επίδρασης της DA (25 μ M, 75 μ M) στην πρωτεολυτική επεξεργασία και στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στην κυτταρική σειρά CHO



Εικόνα 4.1.7.: Μελέτη της επίδρασης της DA (25 μ M, 75 μ M) πρωτεολυτική διαδικασία και στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στην κυτταρική σειρά CHO με τη χρήση αντισώματος Αβ.

Εικόνες A,B: L1:CHO, L2:CHO+DA 25 μ M, L3:CHO+ DA 75 μ M

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30 μ g πρωτεΐνης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10%. Παρατηρείται ότι η επίδραση της DA αυξάνει τον καταβολισμό της APP (35-28 kDa) καθώς και την επαγωγή δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων (180-130 kDa) σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν επωάστηκαν με DA.



Εικόνα 4.1.8.: Μελέτη της επίδρασης της DA (25 μ M, 75 μ M) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO με χρήση αντισώματος για την καρβοξυτελική περιοχή της APP.

L1:CHO, L2:CHO+DA 25 μ M, L3:CHO+ DA 75 μ M

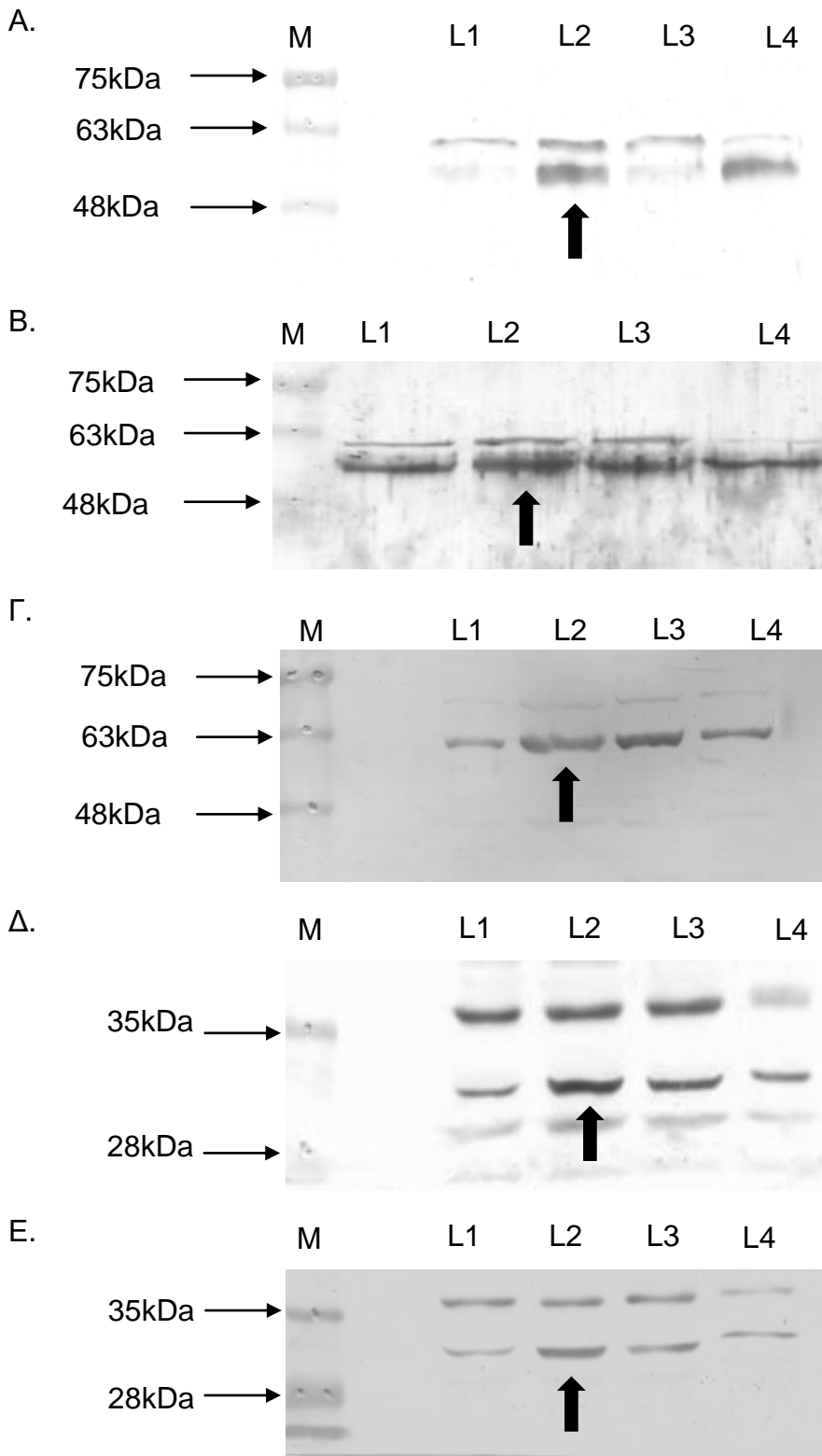
Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30 μ g πρωτεΐνης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10%. Σε αντίθεση με τα χαμηλομοριακά θραύσματα, όπου η χορήγηση DA αυξάνει τον καταβολισμό της APP, στην περιοχή 75-63 kDa αναστέλλεται ο καταβολισμός της APP έπειτα από την επίδραση της DA και ορισμένα πρωτεϊνικά θραύσματα εξαφανίζονται.

Συνολικά, η Carbidopa δεν ασκεί ιδιαίτερη επίδραση στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP κι απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση. Η L-Dopa, η DA και ο NSD-1015 επηρεάζουν διαφορετικά την έκφραση και την πρωτεόλυση της APP. Τροποποιημένη επίδραση παρατηρείται και μεταξύ των διαφορετικών δόσεων του ίδιου παράγοντα.

4.2. Μελέτη της επίδρασης της DDC στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η συσσώρευση του Αβ αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου AD. Το Αβ προκύπτει σύμφωνα με την υπόθεση του αμυλοειδούς έπειτα από την επίδραση των πρωτεολυτικών ενζύμων, τις εκκριτάσες στην πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς APP. Συγκεκριμένα, το πεπτιδίδιο του αμυλοειδούς προκύπτει από τη δράση των β και γ εκκριτασών. Αντίστοιχα, όταν η APP πρωτεολύεται μέσω των α και β εκκριτασών προκύπτουν ορισμένες διαλυτές μορφές της APP : sAPP α και sAPP β αντίστοιχα οι οποίες μαζί με τη διαλυτή μορφή της πλήρους μήκους πρωτεΐνης (sAPP f) αποτελούν υποψήφιους βιοδείκτες στο ENY για την AD. Έρευνες δείχνουν ότι η οικογένεια της APP υφίσταται cis και trans αλληλεπιδράσεις σχηματίζοντας ετερομερή σύμπλοκα [284], [285]. Από την άλλη, η L-Dopa αποκαρβοξυλάση εμπλέκεται στη σύνθεση της DA, ενός βασικού νευροδιαβιβαστή τόσο στην PD όσο και στην AD. Συνεπώς, πραγματοποιήθηκε το εγχείρημα προσέγγισης της επίδρασης της DDC στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP.

4.2.1. Μελέτη της επίδρασης της πλήρους μήκους DDC και των ισομορφών της στην καρβοξυτελική επεξεργασία της APP



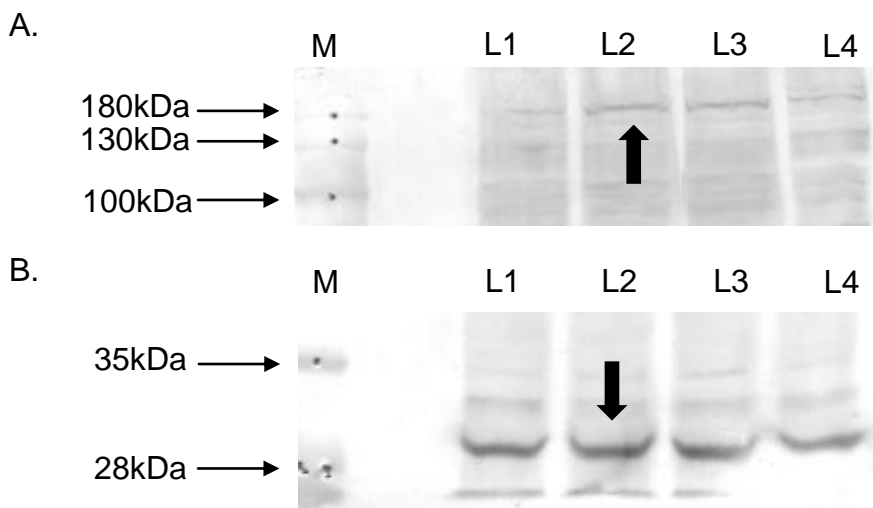
Εικόνα 4.2.1.: Μελέτη της επίδρασης της πλήρους μήκους DDC και των ισομορφών της στην καρβοξυτελική επεξεργασία της APP.

Εικόνες A,B: L1:CHO, L2:CHO/DDC, L3:CHO/Alt-DDC, L4:CHO/DDC-3

Εικόνες Γ-Ε: L1:CHO, L2:CHO/DDC, L3:CHO/DDC-3, L4:CHO/Alt-DDC

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30μg πρωτεΐνης. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10% (Εικόνες A,B,Δ,E) και 15% (Εικόνα Γ). Σε όλες τις παραπάνω εικόνες επαναλαμβάνεται ο έντονος καταβολισμός της APP στην περιοχή 75-28 kDa στην κυτταρική σειρά CHO/DDC και σε μικρότερο βαθμό στην κυτταρική σειρά που είναι επιμολυσμένη με την ισομορφή DDC-3.

4.2.2. Μελέτη της επίδρασης της πλήρους μήκους DDC και των ισομορφών της στην αμυλοειδογενή επεξεργασία της APP και στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων



Εικόνα 4.2.2.: Μελέτη της επίδρασης της πλήρους μήκους DDC και των ισομορφών της στην αμυλοειδογενή επεξεργασία της APP.

Εικόνες A,B:L1:CHO, L2:CHO/DDC, L3:CHO/DDC-3, L4:CHO/Alt-DDC

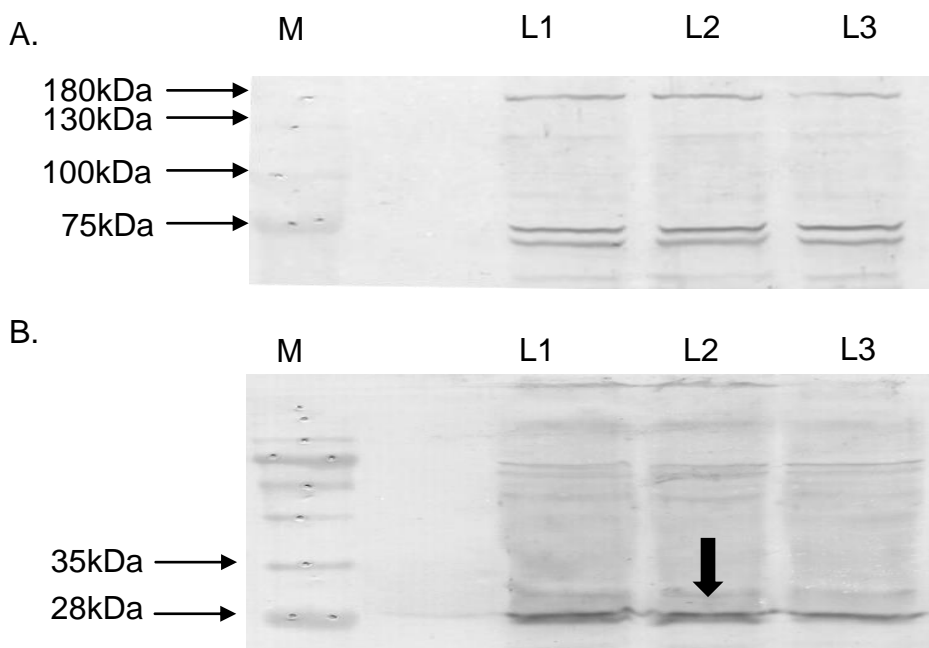
Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30μg πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές και αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 10%. Στις παραπάνω εικόνες παρατηρείται η επαγωγή δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων της APP κυρίως στις κυτταρικές σειρές CHO/DDC και CHO/DDC-3. Επιπλέον, χαμηλομοριακά (35-28 kDa) παρατηρείται αυξημένος καταβολισμός της APP στην κυτταρική σειρά CHO/DDC.

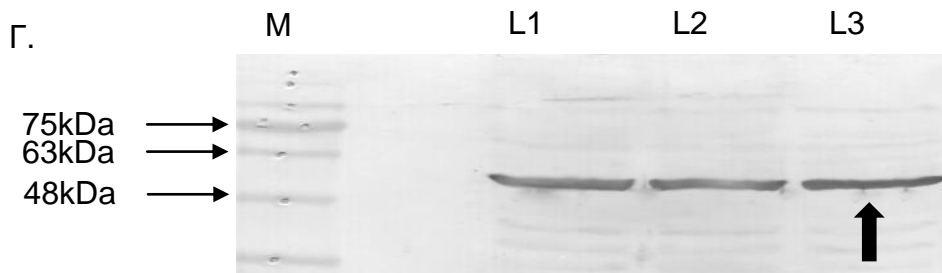
Συνολικά, η παρουσία της DDC επάγει το σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στις κυτταρικές σειρές CHO/DDC και CHO/DDC-3. Ο ενεργός ρόλος της DDC στην πρωτεόλυση της APP διακρίνεται από τη διαφορετική επεξεργασία στις κυτταρικές σειρές που περιέχουν την DDC και τις ισομορφές της σε σύγκριση με τη μη επιμολυσμένη κυτταρική σειρά CHO.

4.3. Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την πλήρους μήκους DDC και τις εναλλακτικές ισομορφές της

Η Carbidopa (α-μεθυλ-ντοπα-υδραζίνη) αποτελεί έναν χημικό περιφερικό αναστολέα της DDC (υποενότητα 1.4.6.) που συγχορηγείται με την L-Dopa στους παρκινσονικούς ασθενείς ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα L-Dopa στον εγκέφαλο που θα μετατραπεί εν συνεχεία σε DA. Στην παρούσα υποενότητα παρουσιάζεται η διερεύνηση του πιθανού συσχετισμού της DDC με την πρωτεόλυση της APP έπειτα από την εξωγενή χορήγηση του αναστολέα Carbidopa.

4.3.1. Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20μM και 100μM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO



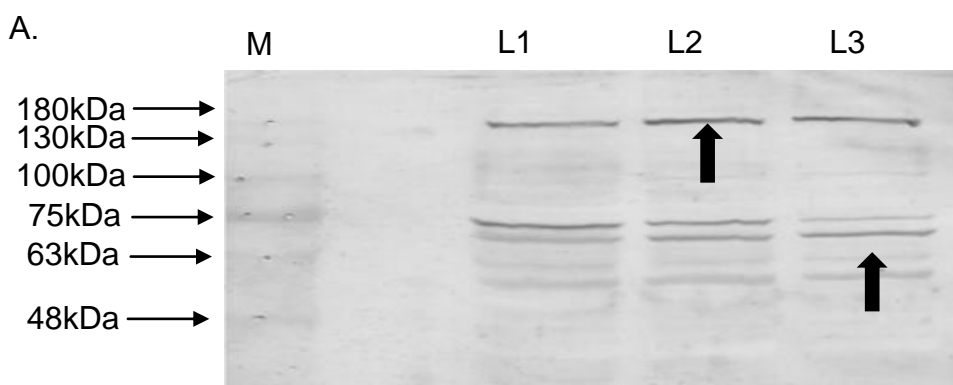


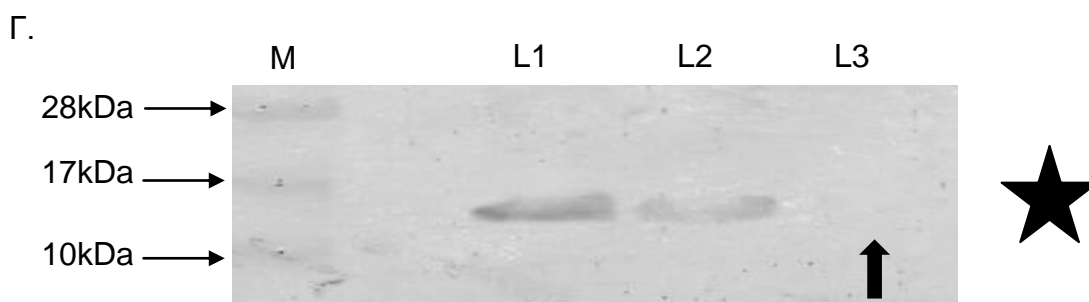
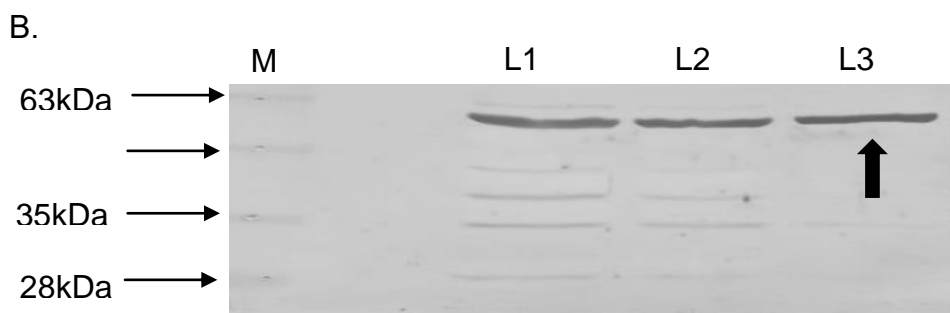
Εικόνα 4.3.1.: Μελέτη της επίδρασης της Carbidoopa (20μM και 100μM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO.

Εικόνες A-Γ: L1:CHO, L2:CHO+Carbidoopa 20μM, L3:CHO+Carbidoopa 100μM

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30μg πρωτεΐνης. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10% (A) και 15% (B,Γ). Ο εντοπισμός των θραυσμάτων έγινε με επώαση αντισώματος έναντι της περιοχής Aβ (A,B) και έναντι της καρβοξυτελικής περιοχής (Γ). Μεταξύ 75-63 kDa (Εικόνα A) και 35-28 kDa (Εικόνα B) παρατηρείται αύξηση της πρωτεολυτικής διαδικασίας της APP έπειτα από την επώαση 20μM Carbidoopa καθώς και σχετική αναστολή του καταβολισμού της APP έπειτα από την επώαση 100μM Carbidoopa (Εικόνες B,Γ). Συνολικά ωστόσο δεν υπάρχει αξιοσημείωτη επίδραση του αναστολέα Carbidoopa στην κυτταρική σειρά CHO.

4.3.2. Μελέτη της επίδρασης της Carbidoopa (20μM και 100μM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία και το σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στην κυτταρική σειρά CHO/DDC



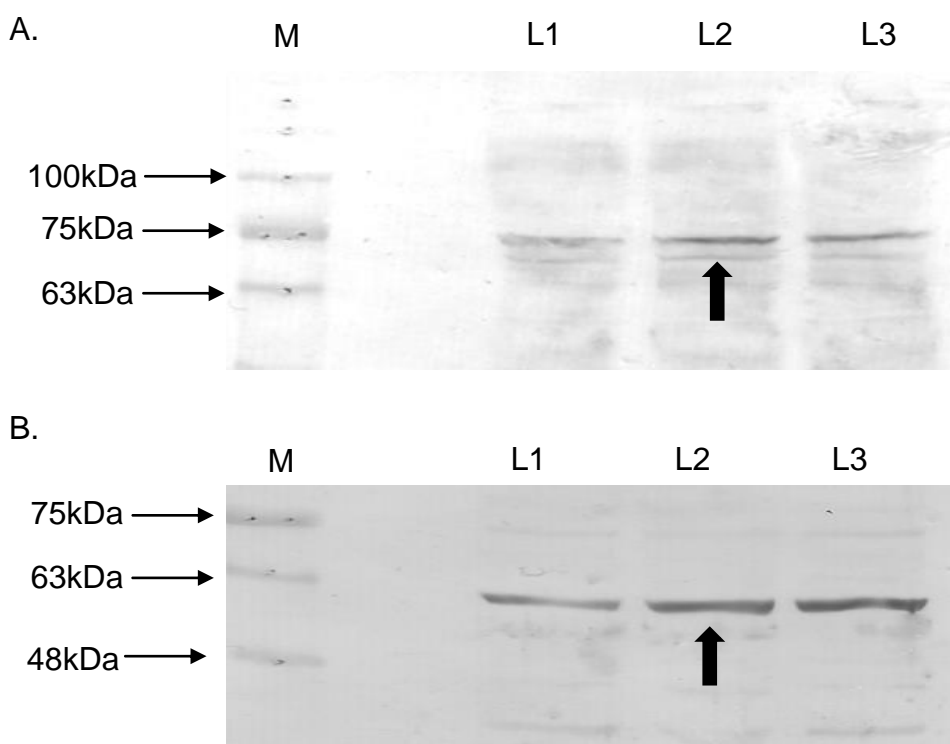


Εικόνα 4.3.2.: Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20µM και 100µM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO/DDC.

Εικόνες A-Γ: L1:CHO/DDC, L2:CHO/DDC+Carbidopa 20µM, L3: CHO/DDC+Carbidopa 100µM

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 40µg πρωτεΐνης. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10% (A,B) και 15% (Γ). Ο εντοπισμός των θραυσμάτων έγινε με επώαση αντισώματος έναντι της περιοχής Αβ (Α) και έναντι της καρβοξυτελικής περιοχής (B,Γ). Παρατηρείται επαγωγή σχηματισμού υψηλομοριακών συμπλόκων στα 130-180 kDa που δεν εμφανίζονται σε άλλες κυτταρικές σειρές. Στην περιοχή 75-48 kDa η επίδραση στον καταβολισμό της APP είναι διαφορετική μεταξύ των δειγμάτων. Έπειτα από τη χορήγηση 100µM Carbidopa μειώνεται η έκφραση της APP μέχρι και εξαφάνιση πρωτεϊνικών θραυσμάτων στην περιοχή 35-10 kDa. Τα θραύσματα αυτά δεν παρουσιάζονται στη μη επιμολυσμένη κυτταρική σειρά CHO αναδεικνύοντας τον ενεργό ρόλο της DDC στην πρωτεόλυση της APP.

4.3.3. Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20 μ M και 100 μ M) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO/DDC-3

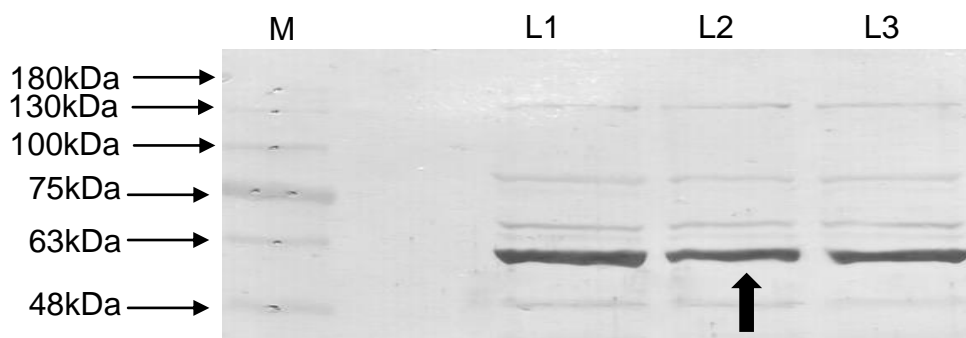


Εικόνα 4.3.3.: Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20 μ M και 100 μ M) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO/DDC-3.

Εικόνες A,B: L1:CHO/DDC-3, L2:CHO/DDC-3+Carbidopa 20 μ M, L3:CHO/DDC-3+Carbidopa 100 μ M

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 40 μ g πρωτεΐνης. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10%. Ο εντοπισμός των θραυσμάτων έγινε με επώαση αντισώματος έναντι της περιοχής A β (A) και έναντι της καρβοξυτελικής περιοχής (B). Διακρίνεται ότι η επώαση με Carbidopa 20 μ M επάγει την πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην περιοχή 75-48 kDa. Η επίδραση της Carbidopa στην κυτταρική σειρά CHO/DDC-3 παρουσιάζει διαφορετική εικόνα σε σύγκριση με τη σειρά CHO/DDC.

4.3.4. Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20 μ M και 100 μ M) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO/Alt-DDC

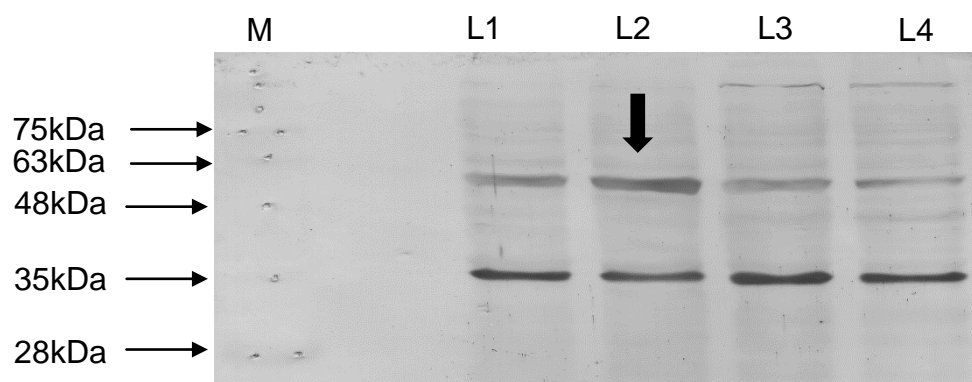


Εικόνα 4.3.4.: Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20 μ M και 100 μ M) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά CHO/Alt-DDC.

L1:CHO/Alt-DDC, L2:CHO/Alt-DDC+Carbidopa 20 μ M, L3:CHO/Alt-DDC+Carbidopa 100 μ M

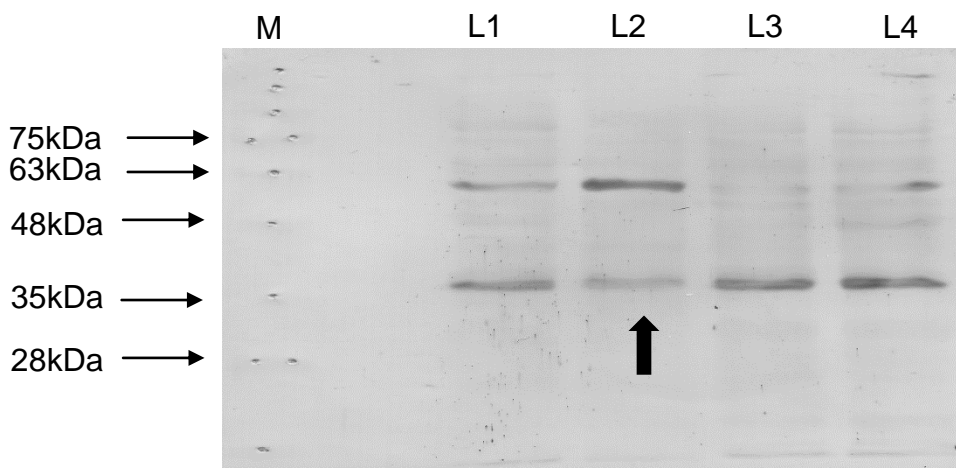
Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 40 μ g πρωτεΐνης. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10%. Ο εντοπισμός των θραυσμάτων έγινε με επώαση αντισώματος έναντι της καρβοξυτελικής περιοχής. Παρατηρείται αναστολή της πρωτεολυτικής επεξεργασίας της APP έπειτα από τη χορήγηση Carbidopa. Ειδικά η δόση των 20 μ M (διαδρομή L2) προκαλεί έντονη αναστολή του καταβολισμού στα 75-48 kDa. Στην κυτταρική σειρά CHO/Alt-DDC η επίδραση της Carbidopa είναι διαφορετική σε σύγκριση με τις σειρές CHO/DDC και CHO/DDC-3.

4.3.5. Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20 μ M και 100 μ M) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC



Εικόνα 4.3.5.: Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa 20μM στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC.

L1:CHO+Carbidopa 20μM, L2:CHO/DDC+Carbidopa 20μM, L3:CHO/DDC-3+Carbidopa 20μM, L4:CHO/Alt-DDC+Carbidopa 20μM



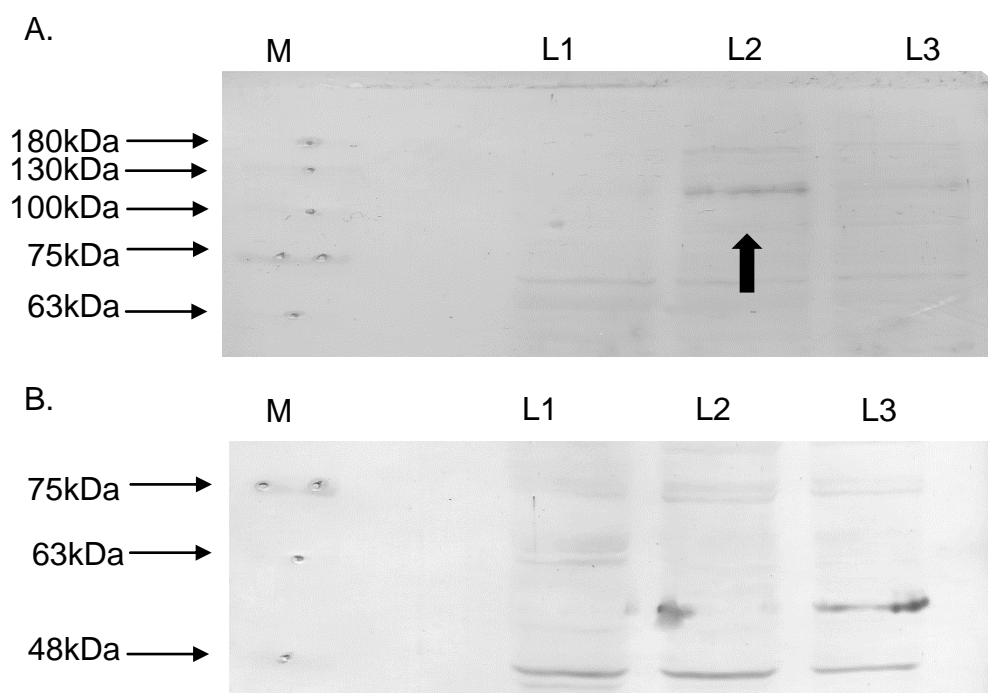
Εικόνα 4.3.6.: Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa 100μM στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC.

L1:CHO+Carbidopa 100μM, L2:CHO/DDC+Carbidopa 100μM, L3:CHO/DDC-3+Carbidopa 100μM, L4:CHO/Alt-DDC+Carbidopa 100μM

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 50μg πρωτεΐνης. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 15% και ο εντοπισμός των θραυσμάτων έγινε με επώαση αντισώματος έναντι της καρβοξυτελικής περιοχής της APP.

Κατά την επίδραση 20μM Carbidopa παρατηρείται αύξηση του καταβολισμού στην κυτταρική σειρά CHO/DDC στα 63-48kDa ενώ αντίστοιχα είναι αυξημένος ο καταβολισμός τα CHO/DDC-3 στα 35 kDa. Κατά την επίδραση 100μM Carbidopa υπάρχει η ίδια τάση με πιο έντονη την αναστολή του καταβολισμού της APP στην κυτταρική σειρά CHO/DDC. Συμπερασματικά, η πλήρους μήκους DDC καθώς και οι ισομορφές της (DDC-3, Alt-DDC) ασκούν διαφορετικές δράσεις στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP.

4.3.6. Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20 μ M και 100 μ M) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y



Εικόνα 4.3.7.: Μελέτη της επίδρασης της Carbidopa (20 μ M και 100 μ M) στην έκφραση και πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y.

L1:SH-SY5Y, L2:SH-SY5Y+Carbidopa 20 μ M, L3:SH-SY5Y +Carbidopa 100 μ M

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30 μ g πρωτεΐνης. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10%. Ο εντοπισμός των θραυσμάτων έγινε με επώαση αντισώματος έναντι της περιοχής A β (A) και έναντι της καρβοξυτελικής περιοχής (B). Παρατηρείται αναστολή του καταβολισμού της APP έπειτα από την επώαση της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y με Carbidopa 20 μ M καθώς αυξάνεται η έκφρασή της στην περιοχή 100-130 kDa. Επίσης, το πρωτεϊνικό θραύσμα μεταξύ 63-48 kDa (Εικόνα B) στη διαδρομή L3, το οποίο δεν υπάρχει στις υπόλοιπες διαδρομές, δείχνει τον περαιτέρω καταβολισμό που υφίσταται η APP παρουσία της Carbidopa. Όλα τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν στην πιθανότητα εμπλοκής του αναστολέα της DDC, Carbidopa στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP.

Συνολικά, η Carbidopa εμπλέκεται στην πρωτεολυτική επεξεργασία και έκφραση της APP παρουσία της DDC, με κάθε ισομορφή της να παρουσιάζει διαφορετικό προφίλ αλληλεπίδρασης. Στην κυτταρική σειρά CHO φάνηκε να μην ασκεί

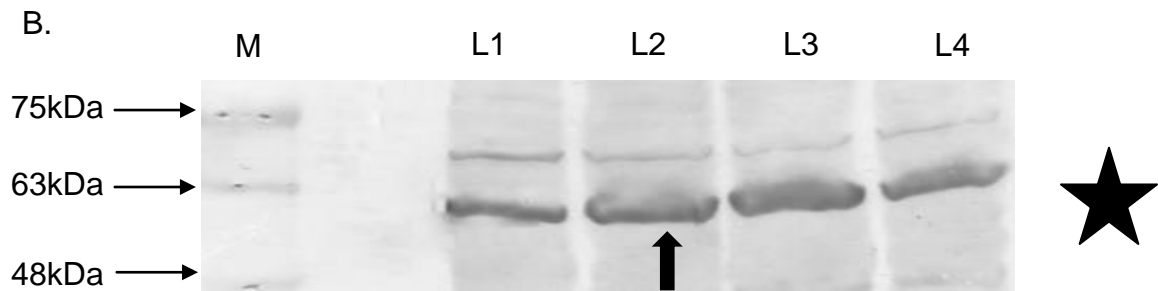
ιδιαίτερη επίδραση. Στην κυτταρική σειρά CHO/DDC παρατηρήθηκε η επαγωγή υψηλομοριακών συμπλόκων καθώς και διαφορετική πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στο τμήμα 75-10 kDa. Αντίστοιχα, οι κυτταρικές σειρές CHO/DDC-3 και CHO/Alt-DDC έδειξαν διαφορετική επίδραση στον καταβολισμό της APP παρουσία του αναστολέα Carbidopa. Τέλος, φαίνεται ότι παράγοντες που αναστέλλουν την ενεργότητα της DDC μπορούν να επηρεάζουν τον καταβολισμό της APP και στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y.

4.4. Μελέτη της επίδρασης της L-Dopa στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την πλήρους μήκους DDC και τις εναλλακτικές ισομορφές της

Η L-Dopa (L-3,4-διϋδροξυφαιτυλαλίνη) αποτελεί βασικό μόριο στην οδό βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών καθώς με την επίδραση της DDC μετατρέπεται σε DA (υποενότητα 1.4.7.). Επίσης, η χορήγηση της L-Dopa μαζί με έναν περιφερικό αναστολέα της DDC αποτελεί τη βασική μέθοδο θεραπείας για την PD προκειμένου να αντισταθμιστεί η απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων. Στην υποενότητα αυτή πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης της L-Dopa στην πρωτεόλυση της APP παρουσία της DDC και των ισομορφών της.

4.4.1. Μελέτη της επίδρασης της L-Dopa (0.34 mM, 0.5 mM, 0.7 mM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με τη χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της APP

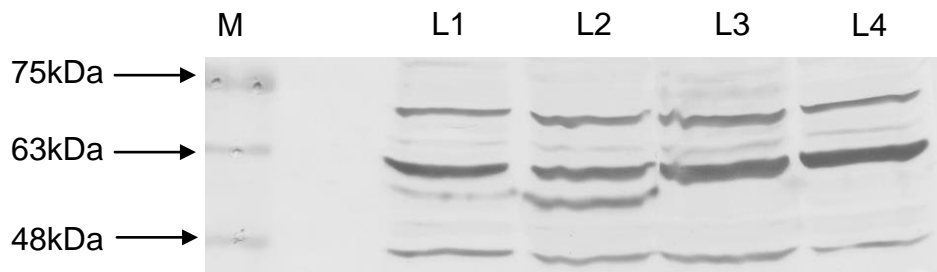




Εικόνα 4.4.1.: Μελέτη της επίδρασης της L-Dopa 0.34 mM στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με τη χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της APP.

Εικόνες A,B: L1:CHO+L-Dopa 0.34mM, L2:CHO/DDC+L-Dopa 0.34mM, L3:CHO/DDC-3+L-Dopa 0.34mM, L4:CHO/Alt-DDC+ L-Dopa 0.34mM

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 40 µg πρωτεΐνης και το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε ήταν πυκνότητας 10%. Εντυπωσιακός είναι ο καταβολισμός της APP στις κυτταρικές σειρές CHO/DDC και CHO/DDC-3 στα 63 kDa έπειτα από την επώαση με 0.34 mM L-Dopa. Παρατηρείται πιθανή επαγωγή δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στην κυτταρική σειρά CHO/DDC.

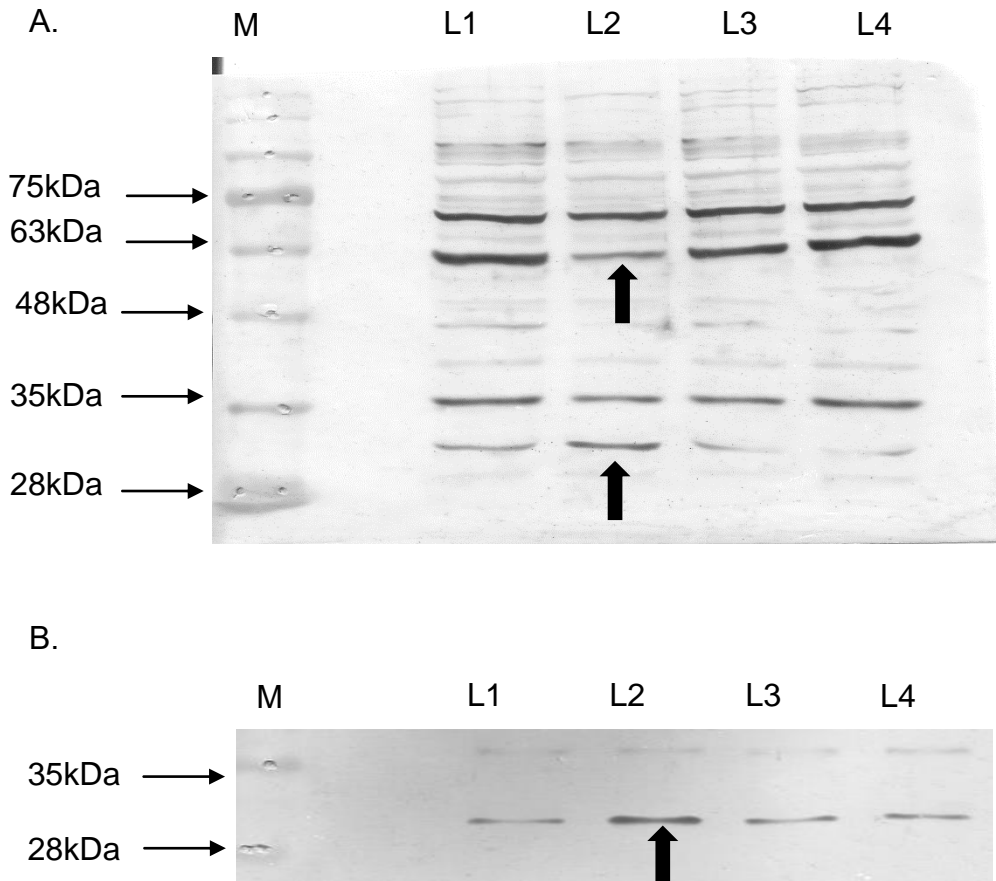


Εικόνα 4.4.2.: Μελέτη της επίδρασης της L-Dopa 0.5 mM στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με τη χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της APP.

L1: CHO+L-Dopa 0.5mM, L2: CHO/DDC+L-Dopa 0.5mM, L3: CHO/DDC-3+L-Dopa 0.5mM, L4 : CHO/Alt-DDC+ L-Dopa 0.5mM

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30 µg πρωτεΐνης και το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε ήταν πυκνότητας 10%. Παρατηρείται η αύξηση του καταβολισμού της APP στην κυτταρική σειρά CHO/DDC μετά τη χορήγηση 0.5 mM L-Dopa όπως συνέβη και με τη δόση των 0.34 mM L-Dopa. Στις άλλες κυτταρικές σειρές CHO/DDC-3 και CHO/Alt-DDC διαπιστώνεται αναστολή

του καταβολισμού της APP καθώς το πρωτεϊνικό θραύσμα μεταξύ 63-48 kDa που υπάρχει στη διαδρομή L2 εξαφανίζεται. Συνεπώς, η δόση των 0.5mM L-Dopa αναδεικνύει διαφορετική πρωτεολυτική συμπεριφορά.

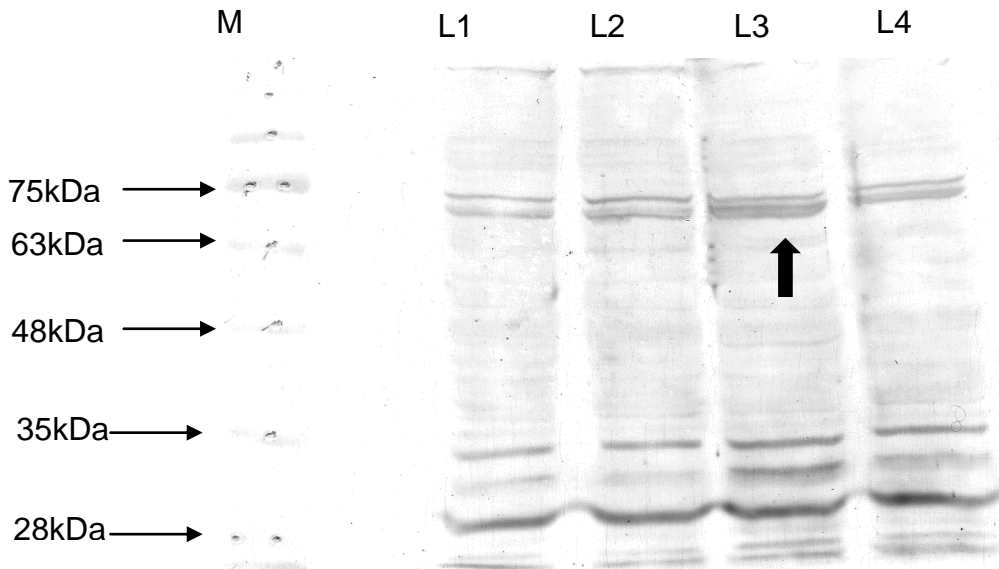


Εικόνα 4.4.3.: Μελέτη της επίδρασης της L-Dopa 0.7 mM στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με τη χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της APP.

Εικόνες A,B: L1:CHO+L-Dopa 0.7mM, L2:CHO/DDC+L-Dopa 0.7mM, L3:CHO/DDC-3+L-Dopa 0.7mM, L4:CHO/Alt-DDC+ L-Dopa 0.7mM

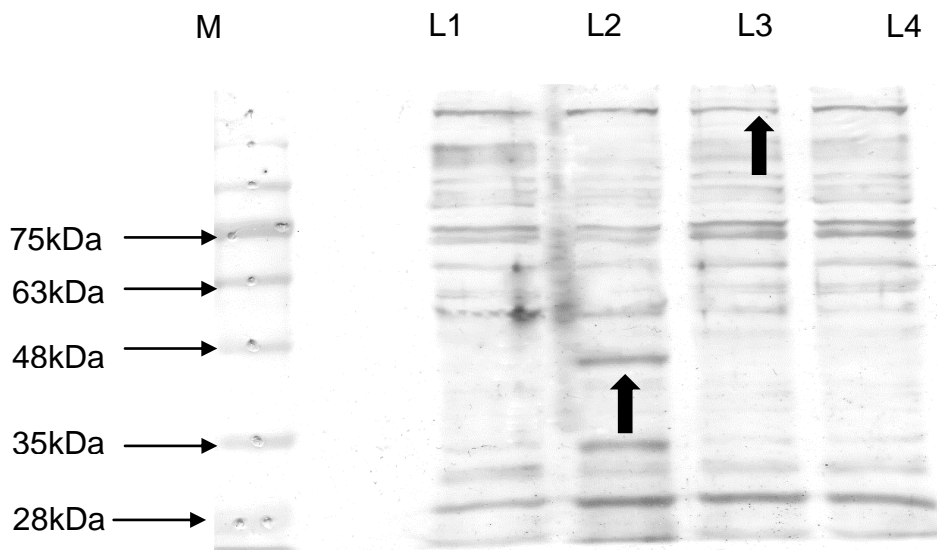
Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30 µg πρωτεΐνης και το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε ήταν πυκνότητας 10%. Η επώαση των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών με 0.7 mM L-Dopa εμφανίζει περαιτέρω καταβολισμό της APP στην κυτταρική σειρά που εκφράζει την πλήρους μήκους DDC στα 35-28 kDa. Επίσης στην κυτταρική σειρά CHO/DDC η πρωτεολυτική επεξεργασία της APP είναι διαφορετική σε σύγκριση τόσο με την κυτταρική σειρά ελέγχου CHO όσο και με τις άλλες κυτταρικές σειρές στην περιοχή 75-63 kDa.

4.4.2. Μελέτη της επίδρασης της L-Dopa (0.34 mM, 0.7 mM) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με τη χρήση αντισώματος έναντι του Αβ



Εικόνα 4.4.4.: Μελέτη της επίδρασης της L-Dopa 0.34 mM στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με τη χρήση αντισώματος έναντι του Αβ.

L1:CHO+L-Dopa 0.34mM, L2:CHO/DDC+L-Dopa 0.34mM, L3:CHO/DDC-3+L-Dopa 0.34mM, L4:CHO/Alt-DDC+ L-Dopa 0.34mM



Εικόνα 4.4.5.: Μελέτη της επίδρασης της L-Dopa 0.7 mM στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με τη χρήση αντισώματος έναντι του Αβ.

L1:CHO+L-Dopa 0.7mM, L2:CHO/DDC+L-Dopa 0.7mM, L3:CHO/DDC-3+L-Dopa 0.7mM, L4:CHO/Alt-DDC+ L-Dopa 0.7mM

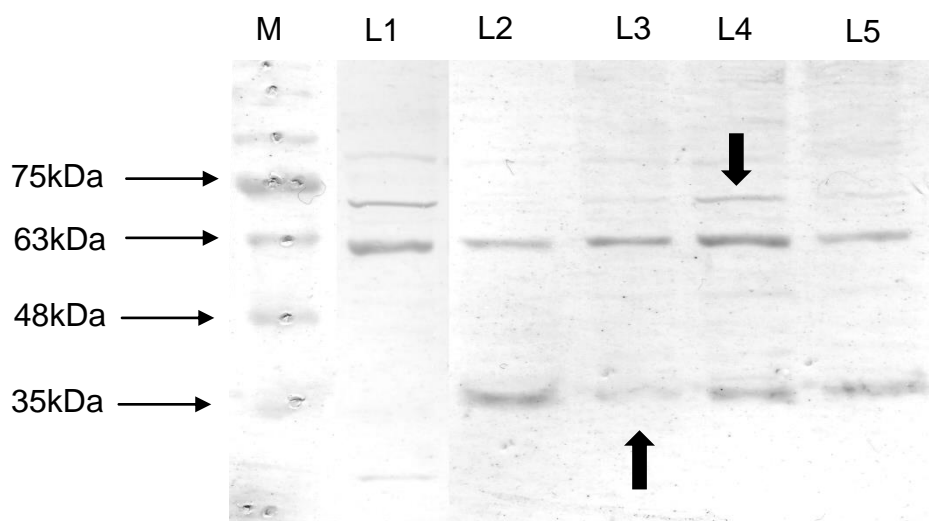
Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30 μg πρωτεΐνης και το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που χρησιμοποιήθηκε ήταν πυκνότητας 10%. Παρατηρείται ότι η επώαση με 0.7 mM L-Dopa προκαλεί τροποποίηση του καταβολισμού της APP στις σειρές CHO/DDC-3 και CHO/Alt-DDC. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αναστολή του καταβολισμού της APP σε σχέση με την κυτταρική σειρά CHO/DDC, όπου υπάρχει ένα ξεχωριστό πρωτεϊνικό θραύσμα μεταξύ 48-35 kDa.

Συμπερασματικά, η L-Dopa ενεργοποιεί την DDC και επηρεάζει τον καταβολισμό της APP. Συγκεκριμένα, στην κυτταρική σειρά CHO/DDC η L-Dopa επάγει τη δημιουργία υψηλομοριακών συμπλόκων της APP και αυξάνει τον καταβολισμό της στην περιοχή 63-28 kDa. Στις κυτταρικές σειρές CHO/DDC-3 και CHO/Alt-DDC παρατηρείται τροποποιημένος καταβολισμός και διαφορετική επίδραση της L-Dopa στην πρωτεόλυση της APP ανάλογα με την ισομορφή.

4.5. Μελέτη της επίδρασης της DA στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την πλήρους μήκους DDC και τις εναλλακτικές ισομορφές της

Η Ντοπαμίνη (3,4-διϋδρόξυ-φαινυλαιθυλαμίνη, DA) αποτελεί κύριο νευροδιαβιβαστή του ΚΝΣ και μία από τις βασικότερες κατεχολαμίνες (υποενότητα 1.5.). Η εκφύλιση του ντοπαμινεργικού συστήματος έχει συνδεθεί πρωτίστως με την PD, ωστόσο καθώς η γνωστική λειτουργία πλήττεται ανεπανόρθωτα και στην AD, αντίστοιχα η DA εμπλέκεται και στα τα μοριακά μονοπάτια της AD. Συνεπώς, πραγματοποιήθηκε εξωγενής χορήγηση DA στις κάτωθι κυτταρικές σειρές προς μελέτη του ρόλου της DDC στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP.

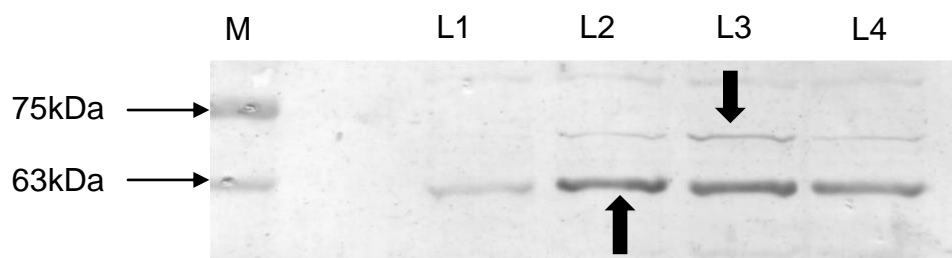
4.5.1. Μελέτη της επίδρασης της DA (25 μ M, 75 μ M) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με τη χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της APP



Εικόνα 4.5.1.: Μελέτη της επίδρασης της DA 25 μ M στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με τη χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της APP.

L1:CHO, L2:CHO+DA 25 μ M, L3:CHO/DDC+DA 25 μ M, L4:CHO/DDC-3+DA 25 μ M, L5:CHO/Alt-DDC+DA 25 μ M

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 30 μ g πρωτεΐνης που απομονώθηκαν από τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10%. Παρατηρείται η αναστολή του καταβολισμού της APP στις κυτταρικές σειρές CHO/DDC και CHO/DDC-3 με διαφορετικό τρόπο καθώς προκύπτουν άλλα πρωτεϊνικά θραύσματα. Επίσης είναι έντονη η πρωτεόλυση της APP σε όλες τις διαδρομές εκτός από την L1 όπου έχει αναλυθεί πρωτεΐνη από την κυτταρική σειρά CHO, δείχνοντας τη διαφορετική επίδραση της DDC παρουσία DA.



Εικόνα 4.5.2.: Μελέτη της επίδρασης της DA 75μM στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με τη χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της APP.

L1:CHO+DA 75μM, L2:CHO/DDC+DA 75μM, L3:CHO/DDC-3+DA 75μM, L4:CHO/Alt-DDC+DA 75μM

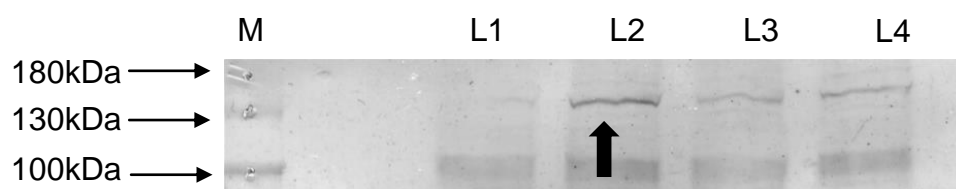
Η ανάλυση των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από τις κυτταρικές σειρές έγινε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10%. Παρουσιάζεται η διαφορετική πρωτεόλυση που υφίσταται η APP παρουσία της DA στις 3 ισομορφές της DDC. Εντυπωσιακά είναι τα έντονα πρωτεϊνικά θραύσματα μεταξύ 75-63 kDa στις διαδρομές L2-L4, καταδεικνύοντας ότι σε αυτή τη δόση DA (75 μM) η πρωτεολυτική επεξεργασία της APP είναι διαφορετική.

Συνοπτικά, στην κυτταρική σειρά CHO/DDC η επώαση DA 25 μM είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του καταβολισμού της APP στα 35 kDa. Μετά από την επώαση DA 75 μM προκύπτει έντονη πρωτεολυτική επεξεργασία την περιοχή 75-63 kDa υποδηλώνοντας ότι η DA πιθανώς αναστέλλει τη λειτουργία της DDC, κάτι που δεν παρατηρείται στις δύο άλλες ισομορφές της DDC. Οι ισομορφές DDC-3 και Alt-DDC είναι ένζυμα με άγνωστη λεπτομερή λειτουργία. Σε αυτές τις κυτταρικές σειρές, CHO/Alt-DDC και CHO/DDC-3 φαίνεται να τροποποιείται διαφορετικά η πρωτεολυτική επεξεργασία της APP.

4.6. Μελέτη της επίδρασης της 3-υδροξυ-βενζυλ-υδραζίνης (NSD-1015) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την πλήρους μήκους DDC και τις εναλλακτικές ισομορφές της

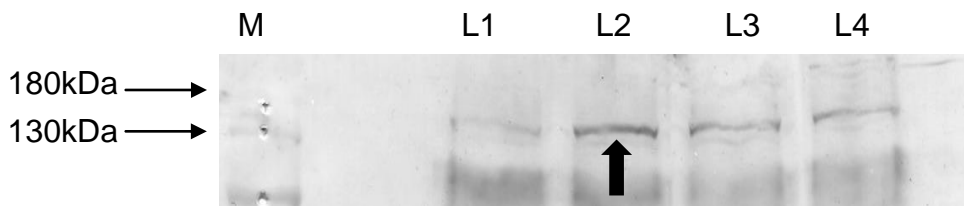
Η 3-υδροξυ-βενζυλ-υδραζίνη ή κοινώς ο NSD-1015 όπως έχει αναφερθεί στην υποενότητα 1.4.6.1. αποτελεί έναν χημικό αναστολέα της ενεργότητας της DDC. Ανήκει στους αναστολείς της οξειδάσης της μονοαμίνης (MAO) και χρησιμοποιείται συχνά για τη μελέτη της δράσης της L-Dopa στη νευροδιαβίβαση. Στην παρούσα υποενότητα παρουσιάζεται η προσπάθεια διερεύνησης πιθανού συσχετισμού της DDC με την πρωτεόλυση της APP έπειτα από την εξωγενή χορήγηση του χημικού αναστολέα της DDC NSD-1015.

4.6.1. Μελέτη της επίδρασης του NSD-1015 (170 μ M, 230 μ M) στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC



Εικόνα 4.6.1.: Μελέτη της επίδρασης του NSD-1015 170 μ M στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με χρήση του αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της APP.

L1:CHO+NSD 170 μ M, L2:CHO/DDC+NSD 170 μ M, L3:CHO/DDC-3+NSD 170 μ M, L4:CHO/Alt-DDC+NSD 170 μ M



Εικόνα 4.6.2.: Μελέτη της επίδρασης του NSD-1015 230 μ M στο σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με χρήση του αντισώματος έναντι του β αμυλοειδούς της APP.

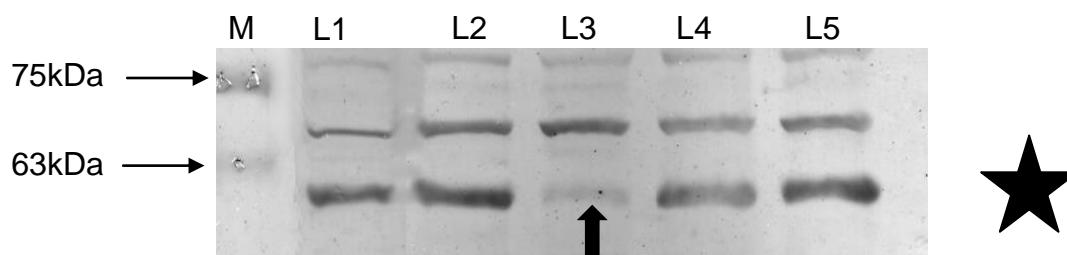
L1:CHO+NSD 230 μ M, L2:CHO/DDC+NSD 230 μ M, L3:CHO/DDC-3+NSD 230 μ M, L4:CHO/Alt-DDC+NSD 230 μ M

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 60 μ g από τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές. Πρόκειται για πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 10%. Η ανίχνευση των υψηλομοριακών συμπλόκων της APP έγινε με αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της APP (Εικόνα 4.6.1.) και έναντι της αμυλοειδικής περιοχής της APP (Εικόνα 4.6.2.)

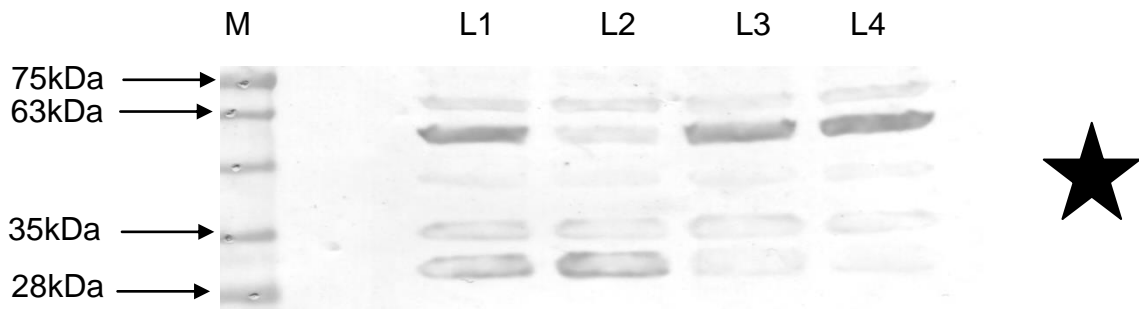
Στην εικόνα παρουσιάζονται πιθανά σύμπλοκα της APP στην περιοχή μεταξύ 130-180 kDa σε όλες τις κυτταρικές σειρές εκτός από την κυτταρική σειρά CHO. Εντυπωσιακή είναι η επαγωγή δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων στην κυτταρική σειρά CHO/DDC έπειτα από τη χορήγηση NSD 230 μ M σε σύγκριση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές.

4.6.2. Μελέτη της επίδρασης του NSD-1015 (170 μ M, 230 μ M) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC

A.



B.



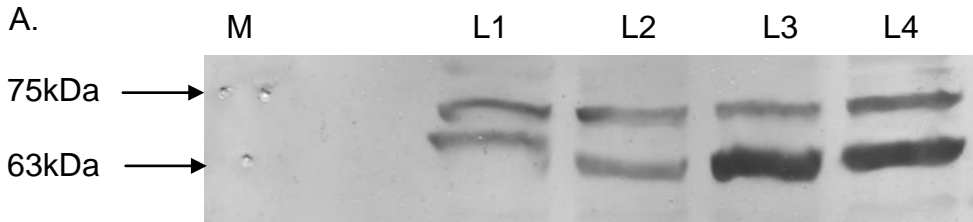
Εικόνα 4.6.3.: Μελέτη της επίδρασης του NSD-1015 170 μM στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC.

Εικόνα A: L1:CHO, L2:CHO+NSD 170 μM , L3:CHO/DDC+NSD 170 μM , L4:CHO/DDC-3+NSD 170 μM , L5:CHO/Alt-DDC+NSD 170 μM

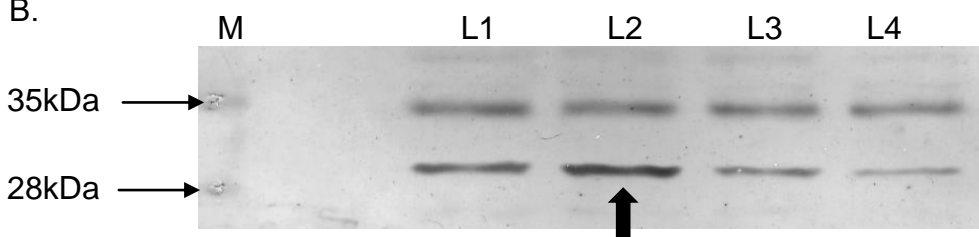
Εικόνα B: L1:CHO+NSD 170 μM , L2:CHO/DDC+NSD 170 μM , L3:CHO/DDC-3+NSD 170 μM , L4:CHO/Alt-DDC+NSD 170 μM

Σε όλες τις διαδρομές αναλύθηκαν 60 μg από τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές. Πρόκειται για πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 10%. Η ανίχνευση των θραυσμάτων της APP έγινε με αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της APP. Παρατηρείται η έντονη αναστολή της πρωτεολυτικής επεξεργασίας της APP στην κυτταρική σειρά CHO/DDC στα 63 kDa και η εντυπωσιακή αύξηση του καταβολισμού της APP στην περιοχή 35-28 kDa. Αντιθέτως, στις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές φαίνεται να αυξάνεται ο καταβολισμός της APP στα 63 kDa και μάλιστα πολύ περισσότερο σε σύγκριση με τα κύτταρα που δεν επωάστηκαν με NSD-1015.

A.



B.



Εικόνα 4.6.4.: Μελέτη της επίδρασης του NSD-1015 230 μM στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC με χρήση αντισώματος για την καρβοξυτελική περιοχή της APP.

Εικόνες A,B: L1:CHO+NSD 230 μM , L2:CHO/DDC+NSD 230 μM , L3:CHO/DDC-3+NSD 230 μM , L4:CHO/Alt-DDC+NSD 230 μM

Σε όλες τις διαδρομές της εικόνας A αναλύθηκαν 90 μg ενώ στην εικόνα B 60 μg πρωτεΐνης από τις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές. Πρόκειται για πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 10%. Η ανίχνευση των θραυσμάτων της APP έγινε με αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της APP. Διερευνώντας τα χαμηλομοριακά θραύσματα της APP φαίνεται ότι η έλλειψη καταβολισμού της APP στα 63 kDa στην κυτταρική σειρά CHO/DDC μετατίθεται σε χαμηλότερα μοριακά βάρη λόγω του πρωτεϊνικού θραύσματος μεταξύ 35-28 kDa. Στην εικόνα A αναδεικνύεται η διαφορετική πρωτεολυτική επεξεργασία της APP στις κυτταρικές σειρές CHO/DDC-3 και CHO/Alt-DDC στα 63 kDa. Παρατηρείται λοιπόν ότι κάθε κυτταρική σειρά εμφανίζει διαφορετική επίδραση στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP παρουσία του NSD-1015.

Συμπερασματικά, ο αναστολέας NSD-1015 εμφανίζει διαφορετική επίδραση στις ισομορφές της DDC. Η χορήγηση 170 μM αλλά κυρίως η χορήγηση 230 μM NSD-1015 στην κυτταρική σειρά CHO/DDC είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή δημιουργίας υψηλομοριακών συμπλόκων της APP και τροποποίηση του καταβολισμού της APP στην περιοχή 75-28 kDa. Στις κυτταρικές σειρές CHO/DDC-3 και CHO/Alt-DDC επίσης αλλάζει η πρωτεόλυση της APP στα 63 kDa.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρατεταμένη οικονομική ευημερία σε πολλές χώρες τις τελευταίες δεκαετίες έχει οδηγήσει στην αύξηση του προσδόκιμου ζωής και κατ' επέκταση τον παγκόσμιο πληθυσμό [237]. Το γεγονός αυτό συνδέεται άμεσα με την αύξηση της επιδημιολογίας των κυριότερων εκπροσώπων νευροεκφυλιστικών ασθενειών που είναι η AD και η PD. Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες χαρακτηρίζονται από τη σταδιακή και προοδευτική απώλεια των νευρώνων οδηγώντας το νευρικό σύστημα σε δυσλειτουργία. Τόσο η περιοχή στην οποία επεκτείνεται ο κυτταρικός θάνατος όσο και ο τύπος των νευρώνων που επηρεάζεται, αντικατοπτρίζουν τα γνωστικά συμπεριφοριστικά και κινητικά συμπτώματα της κάθε ασθένειας.

Καθώς η διαδικασία της γήρανσης αποτελεί σταθερά έναν αξιοσημείωτο παράγοντα κινδύνου πολλές είναι οι μελέτες που προσεγγίζουν ιστοπαθολογικές ομοιότητες μεταξύ AD, PD και γήρανσης. Μία εξ αυτών μελέτησε τον εκφυλισμό του μεσοραβδωτού ντοπαμινεργικού συστήματος σε αρουραίους, όπου εντόπισε δύο βιοχημικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα σ' αυτήν την εγκεφαλική περιοχή και είναι ηλικιοεξαρτώμενες. Αρχικά, η μείωση της DDC είναι υπεύθυνη για τη σχετική μείωση της DA και εμπλέκει τμήματα του μελαινοραβδωτού και μεσομεταιχμιακού. Η άλλη διαδικασία περιλαμβάνει τον εκφυλισμό των αξόνων με συσσωμάτωση φωσφορυλιωμένων μορφών της TH και της APP μόνο στο μεσομεταιχμιακό σύστημα [286]. Πέρα από τον ηλικιακό παράγοντα υπάρχουν κι άλλες ομοιότητες που συνδέουν το νευροεκφυλισμό, όπως είναι η προοδευτική νευρωνική απώλεια, η συναπτική δυσλειτουργία και η αλλαγή διαμόρφωσης χαρακτηριστικών πρωτεϊνών για την κάθε ασθένεια που συσσωματώνονται και δημιουργούν νευροτοξικά παράγωγα. Η συμβολή και η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αποτέλεσε κίνητρο για την παρούσα μελέτη καθώς αναζητήθηκε η σχέση που συνδέει τις δύο κύριες νόσους.

Η αναζήτηση κατάλληλων βιοδεικτών είναι ακόμη πιο επιτακτική στο νευροεκφυλισμό, όπου η διάγνωση της νόσου πραγματοποιείται με βάση τα κλινικά συμπτώματα, δηλαδή όταν η πλειοψηφία των νευρώνων έχει ήδη χαθεί. Ολοένα και περισσότερες μελέτες εστιάζουν στα κυκλοφορούντα micro-RNAs (mi-RNAs) ως θεωρούμενοι μη-επεμβατικοί βιοδείκτες στη διάγνωση, πρόγνωση και απόκριση στη θεραπεία. Η τροποποίηση των επιπέδων mi-RNAs στο ENY, στον ορό και στο πλάσμα μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στον τομέα του

νευροεκφυλισμού. Άλλοι πιθανοί βιοδείκτες είναι μόρια που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της νόσου, όπως για παράδειγμα μορφές της ASYN και του Αβ, λυσοσωμικά ένζυμα καθώς και δείκτες της tau παθολογίας και του σχηματισμού νευροϊνιδίων [287], [288].

Στην παρούσα μελέτη, παρουσιάζονται επιβεβαιωτικά πειράματα προγενέστερης έρευνας του εργαστηρίου μας καθώς και νέα δεδομένα που συνηγορούν στην επίδραση της DDC και των ισομορφών της στο μεταβολισμό της APP. Βασικός στόχος της εργασίας ήταν να διερευνηθεί η εμπλοκή της DDC στους μηχανισμούς παθογένεσης τόσο της AD όσο και της PD και να γίνει μία προσέγγιση της πιθανής αλληλεπίδρασης των δύο κύριων αυτών νευροεκφυλιστικών νόσων. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα ντοπαμινεργικό μοντέλο *in vitro* με επιλογή των κατάλληλων κυτταρικών σειρών.

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες κυττάρων από ωοθήκη κινεζικού χάμστερ (CHO) διότι παρουσιάζουν σχετική διαπερατότητα στην DA αλλά δεν έχουν τη δυνατότητα αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa και συνεπώς αποτελούν ιδανικό μοντέλο μελέτης της DDC [289]. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές που έχουν επιμολυνθεί με το cDNA της πλήρους μήκους DDC και των ισομορφών αυτής: CHO/DDC, CHO/DDC-3 και CHO/Alt-DDC. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά νευρικής προέλευσης SH-SY5Y. Οι προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές, επώαστηκαν με δύο χημικούς αναστολείς της DDC: την Carbidopa (α-μεθυλ-ντοπα-υδραζίνη) και τον NSD-1015 (3-υδροξυ-βενζυλ-υδραζίνη).

Η DDC αποτελεί ένα θεμελιώδες ένζυμο σε μία πληθώρα βιολογικών διεργασιών και βιοσυνθετικών μονοπατιών. Πρωταρχικώς, παρέχει τους βασικούς νευροδιαβιβαστές στα θηλαστικά καθώς μετατρέπει την L-Dopa σε DA, συμμετέχοντας στην κύρια οδό βιοσύνθεσης των κατεχολαμινών. Επίσης, συμμετέχει στη βιοσύνθεση της σεροτονίνης καθώς και στην αποκαρβοξυλίωση άλλων αρωματικών αμινών. Έλλειψη του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια συντονισμού κίνησης, εξασθενημένη γνωστική λειτουργία και νευροψυχιατρικές διαταραχές [95]. Η χορήγηση της L-Dopa παράλληλα με έναν περιφερικό αναστολέα της DDC στους παρκινσονικούς ασθενείς αποτελεί τη βέλτιστη θεραπευτική προσέγγιση διότι η DA δε διασχίζει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και μάλιστα η ποσότητα που σχηματίζεται κυρίως στη γαστρεντερική οδό

λόγω αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa προκαλεί παρενέργειες, οι οποίες ποικίλλουν μεταξύ των ασθενών.

Έχει ταυτοποιηθεί ένας αξιοσημείωτος αριθμός εναλλακτικών μεταγράφων της DDC, μεταξύ των οποίων στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν σε επίπεδο έκφρασης οι ισομορφές DDC-3 και Alt-DDC που απομονώθηκαν από ανθρώπινο ιστό, με την πρώτη να μην παρουσιάζει ενζυμική ενεργότητα [190], [191]. Η γνώση σχετικά με το βιολογικό ρόλο των ισομορφών της DDC είναι σχεδόν ανύπαρκτη. Αδημοσίευτα πειραματικά δεδομένα του εργαστηρίου μας υποστηρίζουν την ύπαρξη επιπλέον εναλλακτικών μεταγράφων της DDC.

Σημαντική είναι η έκφραση της DDC σε διαφορετικούς τύπους νεοπλασίας με κυριότερα είδη τα εξής: μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος προστάτη, ήπατος και οι καρκινοειδείς όγκοι [104], [106]. Αρκετές είναι οι έρευνες που έχουν εστιάσει στη δυνατότητα της DDC σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, να αποτελέσει έναν χρήσιμο βιοδείκτη για τη πρόγνωση και διάγνωση νεοπλασμάτων, μεταξύ των οποίων ο καρκίνος του λάρυγγα, το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, ο καρκίνος του προστάτη και το αδενοκαρκίνωμα στομάχου [290]–[293]. Πρόσφατα δεδομένα του εργαστηρίου μας έδειξαν την πιθανή εμπλοκή της έκφρασης της DDC σε αντικαρκινικούς παράγοντες μέσω των διαδικασιών της απόπτωσης και της κυτταροτοξικότητας [294].

Η DA ως βασικός νευροδιαβιβαστής του ΚΝΣ θα μπορούσε να αποτελέσει το συνδετικό κρίκο μεταξύ των δύο ασθενειών καθώς το ντοπαμινεργικό σύστημα πλήττεται γενικά κατά τη διαδικασία του νευροεκφυλισμού. Ρυθμίζει τη διάθεση, τη γνωστική και κινητική λειτουργία ενώ οποιαδήποτε διαταραχή μπορεί να οδηγήσει σε πολλές καταστάσεις μεταξύ των οποίων: η κατάθλιψη, η σχιζοφρένεια, η ψύχωση, το σύνδρομο Tourette, η PD, η HD, η πολλαπλή σκλήρυνση (MS) και η AD [242]. Το ντοπαμινεργικό σύστημα πιθανόν να εμπλέκεται στη γνωστική έκπτωση και κατά συνέπεια να υπόκειται σε δυσλειτουργία κατά την εξέλιξη της AD. Υπάρχει η εικασία εμπλοκής του τροποποιημένου μεταβολισμού ορισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών όπως είναι η ακετυλοχολίνη στην παραγωγή τοξικών ολιγομερών του αμυλοειδούς [250]. Η ASYN φαίνεται να αλληλεπιδρά τόσο με την DA όσο και με το Αβ. Μειώνει την ενεργότητα της DDC στα ντοπαμινεργικά κύτταρα [253] κι επίσης δρα συνεργιστικά με το Αβ προωθώντας τη μεταξύ τους συσσώρευση [259].

Η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς APP αποτελεί μία τύπου I διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη από την οποία παράγεται το Αβ έπειτα από την επίδραση των πρωτεολυτικών ενζύμων, τις εκκρίσεις. Η μελέτη της πρωτεολυτικής επεξεργασίας και έκφρασης της APP στα δύο βασικά μονοπάτια, τόσο στο αμυλοειδογενές όσο και στο μη-αμυλοειδογενές, είναι υψίστης σημασίας για την κατανόηση της ρύθμισης της APP στα διάφορα στάδια της AD και την εύρεση κατάλληλων βιοδεικτών που θα αντιπροσωπεύουν τη σταδιοποίηση της νόσου και συνεπώς θα προσφέρουν τη βέλτιστη δυνατή θεραπευτική παρέμβαση. Ήδη υπάρχουν στοιχεία για την παρουσία διαλυτής μορφής APP στο ENY (sAPPf) καθώς και τον μορφών που δημιουργούνται έπειτα από τη δράση των εκκριτασών, sAPPα και sAPPβ, που πιθανολογείται ότι μπορούν να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες [284]. Προς αυτήν την κατεύθυνση κινήθηκαν και τα πειράματά μας, σε μία προσπάθεια προσέγγισης των πρωτεϊνικών θραυσμάτων APP που προκύπτουν σε συνάρτηση με ορισμένους παράγοντες.

Η επεξεργασία της APP είναι διαφορετική ανάλογα με την κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται σε κάθε σύστημα μελέτης, όπως για παράδειγμα στις σειρές HeLa και PC12. Συνεπώς, η παραγωγή αμυλοειδογενών θραυσμάτων φαίνεται να εξαρτάται από τη σταθερότητα της APP σε κάθε κυτταρικό τύπο. Αναφέρεται επίσης ότι τα χαμηλομοριακά θραύσματα της APP ανοσοεντοπίζονται μόνο με τη χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της APP [295]. Η συγκεκριμένη παρατήρηση αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα εξαγωγής γενικευμένων συμπερασμάτων για την πρωτεολυτική επεξεργασία της APP καθώς πρέπει να κατανοηθούν τα ενδιάμεσα στάδια της επεξεργασίας της πρωτεΐνης ώστε να γίνει η σύνδεση με την AD. Ωστόσο, είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας καθώς η κάθε ισομορφή της DDC φαίνεται να επηρεάζει διαφορετικά την έκφραση και πρωτεόλυση της APP. Η ανίχνευση της διαλυτής πλήρους μήκους APP καθώς και μικρότερα πεπτίδια της πρωτεΐνης σε κοκκία χρωμαφίνης μυελού επινεφριδίων βοός δίνουν χρήσιμες πληροφορίες για το μηχανισμό επεξεργασίας της APP μέχρι το στάδιο παραγωγής πεπτιδίων Αβ [296]. Μελέτη της APP προερχόμενη από το ίδιο είδος ιστού ταυτοποίησε 3 μορφές πλήρους μήκους APP: τη διαλυτή, τη διαμεμβρανική και τη μεμβρανοσχετιζόμενη [297].

Σημαντικός δε είναι ο ρόλος της APP και στη νευρωνική ανάπτυξη. Μελέτη της έκφρασης και της πρωτεολυτικής επεξεργασίας της APP κατά τη διαδικασία

διαφοροποίησης από πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (pluripotent stem cells, PSCs) σε νευρώνες του φλοιού, έδειξε ότι η έκφραση παρέμεινε σταθερή ενώ η πρωτεολυτική επεξεργασία σημείωσε αρκετές αλλαγές. Το διαλυτό θραύσμα της APP προερχόμενο από την πρωτεόλυση της α-εκκριτάσης (sAPPα) εκκρίθηκε πρώτο ενώ σε μεταγενέστερο στάδιο προέκυψε το αντίστοιχο με την επεξεργασία της β-εκκριτάσης (sAPPβ). Αντίστοιχα, τα πεπτίδια του Αβ που είναι συνυφασμένα με την παθογένεση της AD, Αβ 1-40/42, σχηματίστηκαν έπειτα από μετα-μιτωτικές διαδικασίες και συνδέθηκαν με ώριμους νευρωνικούς φαινοτύπους [298]. Σε μία άλλη μελέτη, τα επίπεδα sAPPβ στον εγκεφαλικό φλοιό βρέθηκαν μειωμένα σε ασθενείς με AD σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα, ενώ τα επίπεδα πεπτιδίων Αβ ήταν ανεβασμένα με την ενεργότητα της BACE1 να παραμένει αμετάβλητη. Εικάζεται ότι αυτό συμβαίνει στα τελικά στάδια της νόσου όπου η πλήρους μήκους APP ως υπόστρωμα έχει μειωθεί αισθητά [299]. Πειράματα σε κύτταρα CHO που εκφράζουν σταθερά την APP έδειξαν ότι μετά από επώαση των κυττάρων με φαινυλπροπανοϊδή, που αποτελούν συστατικά του φλοιού της κανέλλας, παρατηρήθηκε μείωση του Αβ40 προτείνοντας ότι τα συστατικά αυτά κατέχουν αντι-αμυλοειδογενή ενεργότητα μέσω μείωσης της ποσότητας της β-εκκριτάσης [300]. Σε άλλη μελέτη, διαμόλυνση CHO κυττάρων που υπερεκφράζουν την APP με τα μεταλλαγμένα γονίδια PS1 και PS2 που ευθύνονται για τη fAD οδήγησε σε έντονο σχηματισμό του υψηλά αμυλοειδογενούς καταλοίπου Αβ42. Συνεπώς, οι μεταλλαγμένες πρεσενιλίνες ενισχύουν την πρωτεόλυση του Αβ στο συγκεκριμένο κατάλοιπο μέσω της γ-εκκριτάσης και προωθούν την αμυλοειδογένεση [301]. Ολοένα και περισσότερα στοιχεία προστίθενται σχετικά με την επεξεργασία της APP και πώς αυτή συμβάλλει στην παθογένεια της AD, αναδεικνύοντας ακόμη πιο έντονα ότι πρόκειται για μία δύσκολη αποσαφήνιση μηχανισμών. Πρόσφατα, ταυτοποιήθηκαν νέα μεταβολικά γεγονότα κατά την επεξεργασία της APP μέσω της δ-εκκριτάσης (delta-secretase) και την η-εκκριτάσης (eta-secretase). Η παραγωγή πρωτεϊνικών θραυσμάτων που μέχρι πρότινος δεν είχαν χαρακτηριστεί συμβάλλει στην περαιτέρω κατανόηση της παθογένειας της AD [302].

Τα πρωτεϊνικά θραύσματα που προέκυψαν από τα πειράματα ανοσοσύτωσης κατά Western της παρούσας εργασίας αποτελούν μία απόδειξη για τον ενεργό ρόλο της L-Dopa αποκαρβοξυλάσης στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP και κατ' επέκταση στην παραγωγή αμυλοειδογενών θραυσμάτων. Η ανίχνευση έντονου πρωτεϊνικού θραύσματος μοριακής μάζας 63

kDa στην κυτταρική σειρά που εκφράζει την πλήρους μήκους DDC δείχνει ότι η DDC επάγει σε μεγαλύτερο βαθμό την πρωτεόλυση της APP. Σημαντική είναι η επανάληψη του ίδιου μοτίβου χαμηλομοριακά, όπου πάλι η DDC εμφανίζει αυξημένο καταβολισμό της APP. Αξιοσημείωτη είναι η επίδραση της ισομορφής DDC-3 στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP ενώ τα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι δεν παρουσιάζει ενζυμική ενεργότητα, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι η τροποποίηση του μεταβολισμού της APP δεν οφείλεται στην ενζυμική ενεργότητα της DDC αλλά στην αλληλεπίδραση της DDC με την APP. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η DDC και σε μικρότερο βαθμό οι ισομορφές της επηρεάζουν την έκφραση και την πρωτεόλυση της APP.

Η χρήση αντισώματος για τον επίτοπο Αβ ανέδειξε την επαγωγή σχηματισμού υψηλομοριακών συμπλόκων της APP μεταξύ 130-180 kDa. Βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν την ύπαρξη της κυτταρικής APP υπό τη μορφή ομοδιμερών και ετερομερών στις πρωτεϊνικές ισομορφές APLP1 και APLP2 (Amyloid precursor like proteins). Πιθανολογείται ότι ο διμερισμός αποτελεί σημαντικό φυσιολογικό ρόλο για τη ρύθμιση της σηματοδοτικής δραστηριότητας της APP [284], [303]. Άλλη μελέτη σχετική με το διμερισμό της APP, υποστηρίζει ότι πραγματοποιείται στο διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης και καθορίζεται από τέσσερα αμινοξικά κατάλοιπα εντός της C99 διαμεμβρανικής έλικας που εντοπίζονται γύρω από την περιοχή της γ-εκκρίτασης. Η συγκεκριμένη αλληλουχία είναι επίσης επιρρεπής σε μεταλλάξεις σχετιζόμενες με την fAD [304].

Στη συνέχεια, ακολούθησε μία σειρά πειραμάτων όπου οι κυτταρικές σειρές επωάστηκαν με ορισμένους εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν την βιολογική δράση της DDC. Αρχικά χορηγήθηκε ο περιφερικός χημικός αναστολέας της DDC Carbidopa σε συγκεντρώσεις 20 και 100 μM στις κυτταρικές σειρές CHO, CHO/DDC, CHO/DDC-3, CHO/Alt-DDC και SH-SY5Y. Στην κυτταρική σειρά ελέγχου CHO δεν παρατηρήθηκε κάποια ιδιαίτερη επίδραση της Carbidopa. Αντιθέτως, στην κυτταρική σειρά CHO/DDC είναι εντυπωσιακή η εξαφάνιση πρωτεϊνικών θραυσμάτων μεταξύ 10-35 kDa έπειτα από τη χορήγηση 100 μM Carbidopa, όπως και η επαγωγή σχηματισμού υψηλομοριακών συμπλόκων της APP. Αναδεικνύεται λοιπόν, ο ενεργός ρόλος της DDC στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP παρουσία της Carbidopa. Στην περίπτωση της ισομορφής DDC-3 η χορήγηση 20 μM Carbidopa αυξάνει τον καταβολισμό της APP στα 63 kDa, κάτι που δε συμβαίνει στην κυτταρική σειρά CHO, όπου παρατηρείται

αναστολή του καταβολισμού της APP. Στη νευρικής προέλευσης κυτταρική σειρά SH-SY5Y παρατηρείται αναστολή του καταβολισμού της APP καθώς αυξάνεται η έκφρασή της μεταξύ 110-130 kDa έπειτα από τη χορήγηση 20 μ M Carbidopa. Στη βιβλιογραφία δεν έχει αναφερθεί κάποια συσχέτιση μεταξύ της DDC και της APP.

Η χρήση του υποστρώματος της DDC, L-Dopa (L-3,4-διϋδροξυφαιτυλαανίνη) στην ίδια σειρά πειραμάτων έδωσε ενδιαφέροντα αποτελέσματα αναδεικνύοντας το ρόλο της APP και στην οδό βιοσύνθεσης κατεχολαμινών. Βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι η L-Dopa ίσως κατέχει νευροπροστατευτικό ρόλο στα ντοπαμινεργικά κύτταρα ειδικά έναντι της παραγωγής ROS παρά την πληθώρα δεδομένων που υποστηρίζει τη συμβολή της στο σχηματισμό μορίων οξειδωτικού στρες. Πρόκειται για μελέτη σε κατεχολαμινεργικά κύτταρα νευροβλαστώματος ανθρώπινης προέλευσης όπου η χορήγηση L-Dopa μαζί με Carbidopa μείωσε την καταστροφή που επάγεται από τα δραστικά ενδιάμεσα οξυγόνου [305]. Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η χορήγηση L-Dopa σε συνδυασμό με την βενσεραζίδη *in vivo* μείωσε τη συσσώρευση της φωσφορυλιωμένης ASYN στη μέλαινα ουσία, υποθέτοντας ότι η L-Dopa επιβραδύνει την εξέλιξη της PD καταστέλλοντας τη συσσωμάτωση της ASYN στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες και τη διάδοση της από κύτταρο σε κύτταρο [306]. Αποτελέσματα ανάλυσης του ανθρώπινου γονιδιώματος συσχέτισαν ορισμένους πολυμορφισμούς στο γονίδιο της DDC με την απόκριση των ασθενών στη χορήγηση της L-Dopa αναδεικνύοντας την άρρηκτη σχέση μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος [229]. Η επίδραση των συγκεντρώσεων 0.34 και 0.5 mM L-Dopa έδειξε αυξημένο καταβολισμό της APP στις κυτταρικές σειρές CHO/DDC και CHO/DDC-3 στα 63 kDa. Η επώαση μεγαλύτερης ποσότητας L-Dopa (0.7mM) εμφάνισε περαιτέρω καταβολισμό της APP στην κυτταρική σειρά CHO/DDC μεταξύ 28-35 kDa. Διαπιστώνεται ότι η L-Dopa ενεργοποιεί την DDC και επηρεάζει τον καταβολισμό της APP διαφορετικά σε κάθε ισομορφή της DDC, επομένως μπορεί να ειπωθεί ότι η L-Dopa επάγει τροποποιημένο καταβολισμό της APP παρουσία της DDC.

Ο επόμενος παράγοντας που μελετήθηκε ήταν η DA (3,4-διϋδροξυφαιτυλαιθυλαμίνη) ως βασικός νευροδιαβιβαστής και προϊόν της αποκαρβοξυλίωσης της L-Dopa. Οι Li, Zhu κ.α. μελέτησαν την επίδραση της DA στο A β και την ASYN σε ποντίκια κι έδειξαν ότι αναστέλλει το σχηματισμό ινιδίων αμυλοειδούς και ASYN και συμβάλλει στην αποικοδόμησή τους [245]. Η εξωγενής

χορήγηση DA μαρτυρά την επίδρασή της στην APP, παρουσία της DDC. Συγκεκριμένα, στη δόση των 25 μM παρατηρείται αναστολή του καταβολισμού στην κυτταρική σειρά CHO/DDC και λιγότερο έντονα στη CHO/DDC-3. Τόσο τα καρβοξυτελικά όσο και τα αμυλοειδογενή θραύσματα, δίνουν την υποψία ότι η DA αναστέλλει τη λειτουργία της DDC και γι' αυτό αναστέλλεται ο καταβολισμός της APP. Η ίδια αναστολή δε συμβαίνει στις ισομορφές DDC-3 και Alt-DDC καθώς πρόκειται για ένζυμα με άγνωστη λεπτομερή λειτουργία. Είναι σημαντικό να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του εξωνίου 3 που απουσιάζει και του εναλλακτικού εξωνίου 10 που έχει προστεθεί για πιθανή αλληλεπίδραση με την APP παρουσία της DA.

Ένας ακόμη παράγοντας επώασης των προαναφερθέντων κυτταρικών σειρών είναι ο NSD-1015. Πρόκειται για έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο *in vitro* χημικό αναστολέα της DDC. Η χορήγηση 230 μM επάγει το σχηματισμό υψηλομοριακών συμπλόκων μεταξύ 130-180 kDa στην κυτταρική σειρά CHO/DDC. Εντυπωσιακή δε, είναι η αναστολή της πρωτεολυτικής επεξεργασίας στα 63 kDa στην ίδια σειρά ενώ στις υπόλοιπες σειρές παρατηρείται αύξηση του καταβολισμού. Η διερεύνηση των χαμηλομοριακών πρωτεϊνικών θραυσμάτων δείχνει ότι ο καταβολισμός της APP στη σειρά CHO/DDC μετατίθεται στην περιοχή 28-35 kDa. Παρατηρώντας τις δύο ισομορφές της DDC διαπιστώνεται για μία ακόμη φορά ο διαφορετικός τρόπος πρωτεολυτικής επεξεργασίας της APP, ενισχύοντας την ιδέα για διαφορετική αλληλεπίδραση και λειτουργία. Αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα που να συσχετίζουν την APP με τον αναστολέα NSD-1015 είναι ανύπαρκτα.

Τέλος, η επώαση της κυτταρικής σειράς CHO με όλους τους προαναφερθέντες παράγοντες ρύθμισης της DDC αποτέλεσε πολύτιμο εργαλείο για τη σύγκριση με τις κυτταρικές σειρές που έχουν επιμολυνθεί με το cDNA της πλήρους μήκους DDC καθώς και των ισομορφών της DDC-3 και Alt-DDC.

Στα πλαίσια μίας ολοκληρωμένης ερευνητικής προσέγγισης θα ήταν χρήσιμο να πραγματοποιηθεί μία σειρά πειραμάτων που θα συμβάλλει στην περαιτέρω κατανόηση των ήδη υπαρχόντων δεδομένων. Αρχικά, θα μπορούσαν να ελεγχθούν οι εξωγενείς παράγοντες που ήδη χορηγήθηκαν στις κυτταρικές σειρές με διαφορετικές παραμέτρους, όπως είναι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις και η επώαση σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (time courses). Σημαντική δε, είναι η πραγματοποίηση δοκιμασιών απόπτωσης και κυτταροτοξικότητας έτσι

ώστε να κατανοηθεί περαιτέρω η προέλευση των πρωτεϊνικών θραυσμάτων από τα πειράματα ανοσοσύτωσης κατά Western, κάτι που δεν πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία λόγω τεχνικών προβλημάτων. Πειράματα ανοσοκατακρήμισης θα προσέφεραν πολύτιμη πληροφορία για την αλληλεπίδραση μεταξύ της APP και της DDC. Ενδιαφέρουσα θα ήταν η εξωγενής χορήγηση και άλλων παραγόντων που επηρεάζουν τη ρύθμιση της DDC, είτε πρόκειται για χημικούς και ενδογενείς αναστολείς της DDC είτε για μόρια που συμμετέχουν στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των κατεχολαμινών. Για παράδειγμα, ουσίες όπως η βενσεραζίδη η οποία έχει παρόμοια δράση με την Carbidopa, η α-μεθυλ-ντόπα (AMD) και η α-μονο-φλουορο-μεθυλ-ντόπα (MFMD). Επιπλέον, καθώς η παθολογία της PD εμπλέκει και το σεροτονεργικό σύστημα στα κινητικά συμπτώματα της νόσου [244], θα ήταν εύλογο να εξεταστεί η εξωγενής χορήγηση σεροτονίνης. Η μελέτη του μηχανισμού ρύθμισης της πρωτεολυτικής επεξεργασίας και έκφρασης της APP καθώς και της DDC μαζί με τις ισομορφές της με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) θα προσέδιδε χρήσιμα στοιχεία σε επίπεδο μεταγραφής που θα ολοκλήρωναν τα μοριακά δεδομένα που έχουν συλλεχθεί σε επίπεδο έκφρασης.

Σαφώς, η χρήση ζωικών πειραματικών μοντέλων θα πρόσφερε ένα σύστημα πιο αντιπροσωπευτικό και κοντά στη συμπεριφορά της ανθρώπινης DDC. Η ίδια μελέτη *in vivo* περιέχει όλους τους μηχανισμούς ρύθμισης των σηματοδοτικών μονοπατιών που στα αντίστοιχα *in vitro* μοντέλα είτε απουσιάζουν είτε είναι διαφορετικά και καθίσταται αδύνατη η μελέτη τους. Προς αυτήν την κατεύθυνση και με βάση την απουσία εγκαταστάσεων και χειρισμού πειραματικών ζωικών μοντέλων στο εργαστήριό μας, ο ορθός συλλογισμός είναι να γίνει η ίδια σειρά πειραμάτων σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινης νευρικής προέλευσης. Προοπτική σίγουρα παρουσιάζει και η ανάλυση σε ανθρώπινους ιστούς.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα ερευνητική εργασία ενισχύονται τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα για το βιολογικό ρόλο της DDC καθώς και τον ισομορφών της. Προστίθενται νέα στοιχεία που επιβεβαιώνουν την αλληλεπίδραση του ενζύμου με την πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς APP, παρουσία και απουσία εξωγενών παραγόντων. Η ετερόκλητη συμπεριφορά των ισομορφών της DDC ενισχύει την επιτακτική ανάγκη να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους τόσο στο ΚΝΣ όσο και στους περιφερικούς ιστούς, παράλληλα με την περαιτέρω μελέτη του ίδιου του ενζύμου. Τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν θέτουν τη βάση και τα εύλογα

ερωτήματα για τη συσχέτιση των κύριων ασθενειών νευροεκφυλισμού. Αναδεικνύουν νέα πιθανά μοριακά μονοπάτια που εν δυνάμει μπορούν να επεξηγήσουν τα χαρακτηριστικά των μοριακών μηχανισμών του νευροεκφυλισμού. Συγκεκριμένα, τονίζεται η εμπλοκή της DDC και των ισομορφών αυτής στην έκφραση και την πρωτεολυτική επεξεργασία της APP τόσο κατά την αμυλοειδογενή οδό όσο και κατά τη μη-αμυλοειδογενή όπου προκύπτουν υψηλομοριακά σύμπλοκα. Καθώς το πεπτίδιο του Αβ αποτελεί το χαρακτηριστικότερο γνώρισμα της παθογένειας της AD ενώ παράλληλα εμπλέκεται και στην PD, τα παρόντα δεδομένα αποτελούν κίνητρο προβληματισμού για τη διασύνδεση των δύο νόσων. Σαφώς πρέπει να πραγματοποιηθούν επιπλέον πειράματα για την επιβεβαίωση και ολοκλήρωση των αποτελεσμάτων, τα οποία προσθέτουν νέα δεδομένα στους κοινούς μοριακούς μηχανισμούς παθογένειας του νευροεκφυλισμού.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτη μοριακών μηχανισμών νευροεκφυλισμού σε κύτταρα θηλαστικών

Μάστορα Ευδοκία

Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι αντιπροσωπεύουν μία ετερογενή ομάδα νευρολογικών διαταραχών που επηρεάζουν συγκεκριμένα υποσύνολα του νευρικού συστήματος. Η αιτιολογία και η παθογένειά τους οφείλεται τόσο σε γενετικούς όσο και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η νόσος του Alzheimer (AD) είναι η πιο κοινή νευροεκφυλιστική διαταραχή. Χαρακτηρίζεται από προοδευτική εξασθένηση της μνήμης και των γνωστικών λειτουργιών. Τα ιστοπαθολογικά γνωρίσματα της AD είναι η εναπόθεση του πεπτιδίου του αμυλοειδούς (Αβ) και ο σχηματισμός των νευροϊνιδιακών κόμβων (NFTs). Το πεπτίδιο του αμυλοειδούς παράγεται μέσω της πρωτεολυτικής επεξεργασίας της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP). Η APP είναι μία διαμεμβρανική τύπου I γλυκοπρωτεΐνη και πρωτεολύεται μέσω των εκκριτασών. Η δράση των β- και γ-εκκριτασών παράγει το πεπτίδιο του αμυλοειδούς, ενώ η δράση της α-εκκριτάσης εντός της περιοχής του αμυλοειδούς αποκλείει την παραγωγή του Αβ. Η νόσος του Parkinson (PD) συνιστά τη δεύτερη πιο κοινή νευροεκφυλιστική ασθένεια, η οποία χαρακτηρίζεται από την εκτεταμένη και προοδευτική απώλεια των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη συμπαγή μοίρα της μέλαινας ουσίας (SNpc). Τα σωμάτια Lewy (LB) είναι ενδοκυττάρια έγκλειστα με βασικό συστατικό την α-συνουκλεΐνη (ASYN). Τα LB αποτελούν κύριο ιστοπαθολογικό χαρακτηριστικό της PD. Η L-Dopa αποκαρβοξυλάση (DDC) είναι ένα ένζυμο, το οποίο καταλύει την αποκαρβοξυλίωση της L-Dopa σε DA. Η DDC εμπλέκεται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι ο νευροεκφυλισμός και ο καρκίνος. Τα γεγονότα εναλλακτικής συρραφής που υφίσταται η DDC οδηγούν στην παραγωγή πολλαπλών ισομορφών.

Ολοένα και περισσότερες μελέτες επιχειρούν να διασυνδέσουν την AD με την PD σε βιοχημικό και μοριακό επίπεδο. Κοινό χαρακτηριστικό αποτελεί η συσσώρευση και συσσωμάτωση ορισμένων πρωτεϊνών. Το ντοπαμινεργικό σύστημα επηρεάζεται έντονα στην παθογένεια της PD. Πρόσφατα πειραματικά

δεδομένα αναφέρουν ότι η ντοπαμινεργική δυσλειτουργία εμπλέκεται στη γνωστική εξασθένηση που συμβαίνει στην AD.

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, ο σκοπός της παρούσας Ερευνητικής Εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της ανθρώπινης DDC και των ισομορφών αυτής στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε κύτταρα ωθήκης κινεζικού χάμστερ CHO, τα οποία δεν εκφράζουν τους μεταφορείς DA, DAT και VMAT-2. Επίσης, χρησιμοποιήσαμε κύτταρα CHO που εκφράζουν σταθερά την πλήρους μήκους DDC και τις συντετμημένες ισομορφές της, DDC-3 και Alt-DDC. Στη συνέχεια, μελετήσαμε την επίδραση ορισμένων εξωγενών παραγόντων (Carbidopa, L-Dopa, DA, NSD-1015) στην πρωτεολυτική επεξεργασία της APP παρουσία της DDC. Τα πειραματικά μας δεδομένα τονίζουν την πιθανή εμπλοκή της DDC στην παθογένεση της AD και προσθέτουν στοιχεία που ενισχύουν την ύπαρξη κοινών μοριακών και βιοχημικών μηχανισμών στο νευροεκφυλισμό.

ABSTRACT

A study of molecular mechanisms of neurodegeneration in mammalian cells

Mastora Evdokia

Neurodegenerative diseases represent a heterogeneous group of neurological disorders with clinical and pathological expressions affecting specific neuronal populations. The etiology and pathogenesis of these disorders is attributed to environmental and genetic risk factors. Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder, which gradually impairs memory and cognitive abilities. Abnormal accumulation of A β peptide in the brain and formation of neurofibrillary tangles (NFTs) are the pathological hallmarks of AD. The A β peptide is generated by the proteolytic processing of the amyloid precursor protein (APP) which is considered a type I transmembrane glycoprotein. APP is cleaved by proteolytic enzymes, termed secretases. The action of α -secretase within the A β domain precludes the production of A β peptide, while cleavage by β - and γ -secretases generates A β peptide. Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder defined by extensive and progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc). Histopathological feature of PD is the presence of Lewy bodies (LB), which are intracellular inclusions of aggregated α -synuclein (ASYN). L-Dopa decarboxylase (DDC) catalyzes the decarboxylation of L-Dopa to Dopamine (DA). DDC is implicated in many pathological conditions, such as neurodegeneration and cancer. DDC undergoes alternative splicing events that lead to the formation of multiple DDC isoforms.

Over the past decade, the number of studies that attempt to explain common biochemical and molecular pathways between PD and AD is increasing rapidly. The pathogenesis of AD and PD shares common features, such as the accumulation and aggregation of proteins. The dopaminergic system is highly affected in the pathogenesis of PD. Recent experimental data reported that dopaminergic dysfunction is also involved in the occurrence of cognitive decline symptoms of AD.

According to the above mentioned, the aim of the present Master's Thesis was to investigate the effect of human DDC and its isoforms in the proteolytic processing of APP. In order to fulfill this objective, we employed CHO (Chinese Hamster Ovary) cells, which do not express DA transporters, DAT and VMAT-2. We also employed CHO cells stably expressing full-length human DDC and its truncated isoforms DDC-3 and Alt-DDC. We examined the effect of the exogenous administration of factors affecting the activity of L-Dopa decarboxylase, namely Carbidopa, L-Dopa, DA and NSD-1015. Our results indicate that APP protein expression and proteolytic processing is differentially affected by full-length DDC as well as its truncated isoforms. Our findings highlight the possible involvement of DDC in the pathogenesis of AD and provide further data that reinforce the existence of common molecular and biochemical mechanisms in neurodegeneration.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] J. Stegman and E. Branger, *Stedman's Medical Dictionary*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- [2] G. Gulliver, "On fatty degeneration of the arteries, with a note on some other fatty degenerations," *Med. Chir. Trans.*, vol. 26, pp. 86-428.1, 1843.
- [3] F. G. I. Jennekens, "A short history of the notion of neurodegenerative disease," *J. Hist. Neurosci.*, 2014.
- [4] P. F. Bray, "Sex-linked neurodegenerative disease associated with monilethrix.," *Pediatrics*, vol. 36, no. 3, pp. 417–420, Sep. 1965.
- [5] N. B. Chauhan and J. Mehla, "Chapter 27 - Ameliorative Effects of Nutraceuticals in Neurological Disorders," R. R. Watson and V. R. B. T.-B. N. and D. S. in N. and B. D. Preedy, Eds. San Diego: Academic Press, 2015, pp. 245–260.
- [6] S. Przedborski, M. Vila, and V. Jackson-Lewis, "Neurodegeneration: what is it and where are we?," *J. Clin. Invest.*, vol. 111, no. 1, pp. 3–10, Jan. 2003.
- [7] K. A. Jellinger, "Basic mechanisms of neurodegeneration: A critical update," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 14, no. 3, pp. 457–487, 2010.
- [8] M. G. Erkinen, M.-O. Kim, and M. D. Geschwind, "Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 10, no. 4, Apr. 2018.
- [9] A. Katsnelson, B. De Strooper, and H. Y. Zoghbi, "Neurodegeneration: From cellular concepts to clinical applications," *Sci. Transl. Med.*, vol. 8, no. 364, pp. 364ps18 LP-364ps18, Nov. 2016.
- [10] M. T. Herrero and M. Morelli, "Multiple mechanisms of neurodegeneration and progression," *Prog. Neurobiol.*, vol. 155, p. 1, 2017.
- [11] A. D. Gitler, P. Dhillon, and J. Shorter, "Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope," *Dis. Model. Mech.*, vol. 10, no. 5, pp. 499–502, May 2017.
- [12] R. Mayeux, "Epidemiology of Neurodegeneration," *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 26, no. 1, pp. 81–104, Mar. 2003.
- [13] A. B. Nager and R. D. Atkinson, "A Trillion-Dollar Opportunity: How Brain Research Can Drive Health and Prosperity," *Inf. Technol. Innov. Found.*, no. July, pp. 1–31, 2016.

- [14] C. L. Gooch, E. Pracht, and A. R. Borenstein, "The burden of neurological disease in the United States: A summary report and call to action," *Ann. Neurol.*, vol. 81, no. 4, pp. 479–484, Apr. 2017.
- [15] O.-B. Tysnes and A. Storstein, "Epidemiology of Parkinson's disease.," *J. Neural Transm.*, vol. 124, no. 8, pp. 901–905, Aug. 2017.
- [16] A. Elbaz, L. Carcaillon, S. Kab, and F. Moisan, "Epidemiology of Parkinson's disease," *Rev. Neurol. (Paris)*, vol. 172, no. 1, pp. 14–26, 2016.
- [17] P. Taylor, R. Brown, and D. Cleveland, "Neurodegenerative diseases - insight," *Nature*, vol. 539, no. 7628, p. 7628, 2016.
- [18] N. Oikawa and J. Walter, "Presenilins and γ -Secretase in Membrane Proteostasis," *Cells*, vol. 8, no. 3, p. 209, 2019.
- [19] C. A. Lane, J. Hardy, and J. M. Schott, "Alzheimer's disease," *Eur. J. Neurol.*, vol. 25, no. 1, pp. 59–70, Jan. 2018.
- [20] H. Hippus and G. Neundörfer, "The discovery of Alzheimer's disease," *Dialogues Clin. Neurosci.*, vol. 5, no. 1, pp. 101–108, Mar. 2003.
- [21] M. Goedert and M. G. Spillantini, "A Century of Alzheimer's Disease," *Science (80-.)*, vol. 314, no. 5800, pp. 777 LP – 781, Nov. 2006.
- [22] J. Hardy, "Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease," *Trends Neurosci.*, vol. 20, no. 4, pp. 154–159, 1997.
- [23] S. Jeong, "Molecular and Cellular Basis of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease," *Mol. Cells*, vol. 40, no. 9, pp. 613–620, Sep. 2017.
- [24] G. McKhann, D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price, and E. M. Stadlan, "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease," *Neurology*, vol. 34, no. 7, pp. 939 LP – 939, Jul. 1984.
- [25] G. Thinakaran and E. H. Koo, "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 44, pp. 29615–29619, 2008.
- [26] H. M. Wilkins and R. H. Swerdlow, "Amyloid precursor protein processing and bioenergetics," *Brain Res. Bull.*, vol. 133, pp. 71–79, 2017.
- [27] Y. Zhang, R. Thompson, H. Zhang, and H. Xu, "APP processing in Alzheimer's disease," *Mol. Brain*, vol. 4, no. 1, p. 3, 2011.
- [28] N. N. Nalivaeva, "Role of amyloid precursor protein (APP) in regulation of

- neuronal genes,” *Springerplus*, vol. 4, no. Suppl 1, pp. L40–L40, Jun. 2015.
- [29] D. J. Selkoe and J. Hardy, “The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease at 25 years,” *EMBO Mol. Med.*, 2016.
- [30] J. A. Hardy and G. A. Higgins, “Alzheimer’s disease: the amyloid cascade hypothesis.,” *Science*, vol. 256, no. 5054, pp. 184–185, Apr. 1992.
- [31] S. Makin, “The amyloid hypothesis on trial.,” *Nature*, vol. 559, no. 7715, pp. S4–S7, Jul. 2018.
- [32] J. Hardy and D. J. Selkoe, “The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease: progress and problems on the road to therapeutics.,” *Science*, vol. 297, no. 5580, pp. 353–356, Jul. 2002.
- [33] Z.-C. Chen *et al.*, “Phosphorylation of amyloid precursor protein by mutant LRRK2 promotes AICD activity and neurotoxicity in Parkinson’s disease.,” *Sci. Signal.*, vol. 10, no. 488, Jul. 2017.
- [34] K. Same, F. Ghazi Sherbaf, and M. H. Aarabi, “New link between Parkinson’s and Alzheimer’s: Research uncovers the role of mutant leucine rich repeat kinase 2 and amyloid precursor protein.,” *Mov. Disord.*, vol. 32, no. 10, pp. 1378–1379, Oct. 2017.
- [35] C. F. Lippa *et al.*, “Lewy bodies contain altered alpha-synuclein in brains of many familial Alzheimer’s disease patients with mutations in presenilin and amyloid precursor protein genes,” *Am. J. Pathol.*, vol. 153, no. 5, pp. 1365–1370, Nov. 1998.
- [36] M. J. Molnar *et al.*, “Rare variants in β -Amyloid precursor protein (APP) and Parkinson’s disease,” *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 23, no. 10, pp. 1328–1333, 2015.
- [37] T. Goiran *et al.*, “beta-Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain Controls Mitochondrial Function by Modulating Phosphatase and Tensin Homolog-Induced Kinase 1 Transcription in Cells and in Alzheimer Mice Models.,” *Biol. Psychiatry*, vol. 83, no. 5, pp. 416–427, Mar. 2018.
- [38] M. Petrou *et al.*, “Amyloid deposition in Parkinson’s disease and cognitive impairment: a systematic review.,” *Mov. Disord.*, vol. 30, no. 7, pp. 928–935, Jun. 2015.
- [39] Y. Wang and E. Mandelkow, “Tau in physiology and pathology,” *Nat. Rev. Neurosci.*, 2016.
- [40] G. Farias, A. Cornejo, J. Jimenez, L. Guzman, and R. B. Maccioni,

- “Mechanisms of Tau Self-Aggregation and Neurotoxicity,” *Curr. Alzheimer Res.*, 2011.
- [41] M. G. Spillantini and M. Goedert, “Tau protein pathology in neurodegenerative diseases,” *Trends Neurosci.*, vol. 21, no. 10, pp. 428–433, 1998.
- [42] Y. Gao, L. Tan, J.-T. Yu, and L. Tan, “Tau in Alzheimer’s Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies.,” *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 15, no. 3, pp. 283–300, 2018.
- [43] J. Brettschneider, K. Del Tredici, V. M.-Y. Lee, and J. Q. Trojanowski, “Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies.,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 16, no. 2, pp. 109–120, Feb. 2015.
- [44] D. M. Kovacs *et al.*, “Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: Neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells,” *Nat. Med.*, vol. 2, no. 2, pp. 224–229, 1996.
- [45] D. S. Johnson, Y.-M. Li, M. Pettersson, and P. H. St George-Hyslop, “Structural and Chemical Biology of Presenilin Complexes.,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 7, no. 12, Dec. 2017.
- [46] B. De Strooper, T. Iwatsubo, and M. S. Wolfe, “Presenilins and gamma-secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease.,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, no. 1, p. a006304, Jan. 2012.
- [47] C. Zhang *et al.*, “Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release,” *Nature*, vol. 460, p. 632, Jul. 2009.
- [48] J. Xu *et al.*, “Regional protein expression in human Alzheimer’s brain correlates with disease severity,” *Commun. Biol.*, vol. 2, no. 1, p. 43, 2019.
- [49] J. Parkinson, “An essay on the shaking palsy. 1817.,” *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, vol. 14, no. 2, pp. 223–36; discussion 222, 2002.
- [50] H. Braak and E. Braak, “Pathoanatomy of Parkinson’s disease.,” *J. Neurol.*, vol. 247 Suppl, pp. I13-10, Apr. 2000.
- [51] M. A. Thenganatt and J. Jankovic, “Parkinson disease subtypes.,” *JAMA Neurol.*, vol. 71, no. 4, pp. 499–504, Apr. 2014.
- [52] A. Kouli, K. M. Torsney, and W.-L. Kuan, “Parkinson’s Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis,” T. B. Stoker and J. C. Greenland, Eds. Codon Publications, 2018, pp. 3–26.
- [53] W. Poewe *et al.*, “Parkinson disease.,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 3, p. 17013,

- Mar. 2017.
- [54] A. E. Lang and A. M. Lozano, "Parkinson's disease. First of two parts.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 339, no. 15, pp. 1044–1053, Oct. 1998.
 - [55] C. Kim and S.-J. Lee, "Controlling the mass action of α -synuclein in Parkinson's disease," *J. Neurochem.*, vol. 107, no. 2, pp. 303–316, Oct. 2008.
 - [56] H. Braak, K. Del Tredici, U. Rüb, R. A. I. de Vos, E. N. H. Jansen Steur, and E. Braak, "Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease," *Neurobiol. Aging*, vol. 24, no. 2, pp. 197–211, 2003.
 - [57] C. Y. Kim and R. N. Alcalay, "Genetic Forms of Parkinson's Disease.," *Semin. Neurol.*, vol. 37, no. 2, pp. 135–146, Apr. 2017.
 - [58] A. H. Schapira and P. Jenner, "Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease.," *Mov. Disord.*, vol. 26, no. 6, pp. 1049–1055, May 2011.
 - [59] A. A. Rahman and B. E. Morrison, "Contributions of VPS35 Mutations to Parkinson's Disease," *Neuroscience*, vol. 401, pp. 1–10, 2019.
 - [60] C. Klein and A. Westenberger, "Genetics of Parkinson's disease.," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, no. 1, p. a008888, Jan. 2012.
 - [61] J. Hardy, H. Cai, M. R. Cookson, K. Gwinn-Hardy, and A. Singleton, "Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism," *Ann. Neurol.*, vol. 60, no. 4, pp. 389–398, Oct. 2006.
 - [62] D. G. Hernandez, X. Reed, and A. B. Singleton, "Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance.," *J. Neurochem.*, vol. 139 Suppl, pp. 59–74, Oct. 2016.
 - [63] D. W. Miller *et al.*, "Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication.," *Neurology*, vol. 62, no. 10, pp. 1835–1838, May 2004.
 - [64] A. B. Singleton *et al.*, " α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease," *Science (80-.)*, vol. 302, no. 5646, pp. 841 LP – 841, Oct. 2003.
 - [65] M. Ferreira and J. Massano, "An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations.," *Acta Neurol. Scand.*, vol. 135, no. 3, pp. 273–284, Mar. 2017.
 - [66] L. A. Volpicelli-Daley *et al.*, "G2019S-LRRK2 Expression Augments alpha-Synuclein Sequestration into Inclusions in Neurons.," *J. Neurosci.*, vol. 36, no. 28, pp. 7415–7427, Jul. 2016.

- [67] C. B. Lücking *et al.*, “Association between Early-Onset Parkinson’s Disease and Mutations in the Parkin Gene,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 342, no. 21, pp. 1560–1567, May 2000.
- [68] C. Koros, A. Simitsi, and L. Stefanis, “Chapter Eight - Genetics of Parkinson’s Disease: Genotype–Phenotype Correlations,” in *Parkinson’s Disease*, vol. 132, K. P. Bhatia, K. R. Chaudhuri, and M. B. T.-I. R. of N. Stamelou, Eds. Academic Press, 2017, pp. 197–231.
- [69] J. Simón-Sánchez *et al.*, “Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson’s disease,” *Nat. Genet.*, vol. 41, p. 1308, Nov. 2009.
- [70] T. M. Dawson and V. L. Dawson, “Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson’s Disease,” *Science (80-.)*, vol. 302, no. 5646, pp. 819 LP – 822, Oct. 2003.
- [71] R. B. Postuma *et al.*, “MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson’s disease.,” *Mov. Disord.*, vol. 30, no. 12, pp. 1591–1601, Oct. 2015.
- [72] L. Marsili, G. Rizzo, and C. Colosimo, “Diagnostic Criteria for Parkinson’s Disease: From James Parkinson to the Concept of Prodromal Disease,” *Front. Neurol.*, vol. 9, p. 156, Mar. 2018.
- [73] D. J. Gelb, E. Oliver, and S. Gilman, “Diagnostic Criteria for Parkinson Disease,” *Arch. Neurol.*, vol. 56, no. 1, pp. 33–39, Jan. 1999.
- [74] A. J. Hughes, S. E. Daniel, L. Kilford, and A. J. Lees, “Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson’s disease: a clinico-pathological study of 100 cases.,” *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 55, no. 3, pp. 181–184, Mar. 1992.
- [75] D. W. Dickson *et al.*, “Neuropathological assessment of Parkinson’s disease: refining the diagnostic criteria,” *Lancet Neurol.*, vol. 8, no. 12, pp. 1150–1157, 2009.
- [76] J. Jankovic, “Parkinson’s disease: clinical features and diagnosis,” *J. Neurol. Neurosurg. & Psychiatry*, vol. 79, no. 4, pp. 368 LP – 376, Apr. 2008.
- [77] M. G. Spillantini, R. A. Crowther, R. Jakes, M. Hasegawa, and M. Goedert, “alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson’s disease and dementia with lewy bodies.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 11, pp. 6469–6473, May 1998.

- [78] D. Galasko, "Lewy Body Disorders.," *Neurol. Clin.*, vol. 35, no. 2, pp. 325–338, May 2017.
- [79] B. Holdorff, A. M. Rodrigues e Silva, and R. Dodel, "Centenary of Lewy bodies (1912-2012).," *J. Neural Transm.*, vol. 120, no. 4, pp. 509–516, Apr. 2013.
- [80] M. Goedert, M. G. Spillantini, K. Del Tredici, and H. Braak, "100 years of Lewy pathology.," *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 9, no. 1, pp. 13–24, Jan. 2013.
- [81] R. Taipa, J. Pinho, and M. Melo-Pires, *Clinico-Pathological Correlations of the Most Common Neurodegenerative Dementias*, vol. 3. 2012.
- [82] K. Wakabayashi, K. Tanji, S. Odagiri, Y. Miki, F. Mori, and H. Takahashi, "The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders.," *Mol. Neurobiol.*, vol. 47, no. 2, pp. 495–508, Apr. 2013.
- [83] K. Wakabayashi, K. Tanji, F. Mori, and H. Takahashi, "The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates.," *Neuropathology*, vol. 27, no. 5, pp. 494–506, Oct. 2007.
- [84] W. R. Gibb and A. J. Lees, "The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease.," *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 51, no. 6, pp. 745–752, Jun. 1988.
- [85] J. M. George, H. Jin, W. S. Woods, and D. F. Clayton, "Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch," *Neuron*, vol. 15, no. 2, pp. 361–372, 1995.
- [86] M. Goedert, "Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 2, no. 7, pp. 492–501, Jul. 2001.
- [87] M. G. Spillantini and M. Goedert, "The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 920, pp. 16–27, 2000.
- [88] L. Stefanis, "α-Synuclein in Parkinson's disease," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, no. 2, pp. a009399–a009399, Feb. 2012.
- [89] K. Rosborough, N. Patel, and L. V Kalia, "alpha-Synuclein and Parkinsonism: Updates and Future Perspectives.," *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, vol. 17, no. 4, p. 31, Apr. 2017.
- [90] K. Vekrellis, M. Xilouri, E. Emmanouilidou, H. J. Rideout, and L. Stefanis, "Pathological roles of α-synuclein in neurological disorders," *Lancet Neurol.*,

- vol. 10, no. 11, pp. 1015–1025, 2011.
- [91] L. V Kalia and S. K. Kalia, “alpha-Synuclein and Lewy pathology in Parkinson’s disease.,” *Curr. Opin. Neurol.*, vol. 28, no. 4, pp. 375–381, Aug. 2015.
- [92] M. H. Polymeropoulos *et al.*, “Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson’s Disease,” *Science (80-.)*, vol. 276, no. 5321, pp. 2045 LP – 2047, Jun. 1997.
- [93] P. Desplats *et al.*, “Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 31, pp. 13010–13015, Aug. 2009.
- [94] P. Holtz, K. Stock, and E. Westermann, “Formation of Tetrahydropapaveroline from Dopamine in vitro,” *Nature*, vol. 203, no. 4945, pp. 656–658, 1964.
- [95] M. Bertoldi, “Mammalian dopa decarboxylase: Structure, catalytic activity and inhibition,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 546, pp. 1–7, 2014.
- [96] W. Lovenberg, H. Weissbach, and S. Udenfriend, “Aromatic L-amino acid decarboxylase.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 237, pp. 89–93, Jan. 1962.
- [97] B. L. Tempel, M. S. Livingstone, and W. G. Quinn, “Mutations in the dopa decarboxylase gene affect learning in Drosophila,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 81, no. 11, pp. 3577 LP – 3581, Jun. 1984.
- [98] N. Himmelreich *et al.*, “Aromatic amino acid decarboxylase deficiency: Molecular and metabolic basis and therapeutic outlook.,” *Mol. Genet. Metab.*, Mar. 2019.
- [99] J. G. Christenson, W. Dairman, and S. Udenfriend, “On the identity of DOPA decarboxylase and 5-hydroxytryptophan decarboxylase (immunological titration-aromatic L-amino acid decarboxylase-serotonin-dopamine-norepinephrine).,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 69, no. 2, pp. 343–347, Feb. 1972.
- [100] M. K. Rahman, T. Nagatsu, and T. Kato, “Aromatic L-amino acid decarboxylase activity in central and peripheral tissues and serum of rats with L-DOPA and L-5-hydroxytryptophan as substrates.,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 30, no. 6, pp. 645–649, Mar. 1981.
- [101] C. Sumi-Ichinose, H. Ichinose, E. Takahashi, T. Hori, and T. Nagatsu, “Molecular cloning of genomic DNA and chromosomal assignment of the

- gene for human aromatic L-amino acid decarboxylase, the enzyme for catecholamine and serotonin biosynthesis," *Biochemistry*, vol. 31, no. 8, pp. 2229–2238, Mar. 1992.
- [102] A. G. Pearse, "The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept.," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 17, no. 5, pp. 303–313, May 1969.
- [103] S. B. Baylin, M. D. Abeloff, G. Goodwin, D. N. Carney, and A. F. Gazdar, "Activities of L-dopa decarboxylase and diamine oxidase (histaminase) in human lung cancers and decarboxylase as a marker for small (oat) cell cancer in cell culture.," *Cancer Res.*, vol. 40, no. 6, pp. 1990–1994, Jun. 1980.
- [104] T. Nagatsu *et al.*, "Aromatic l-amino acid decarboxylase activities in human lung tissues: Comparison between normal lung and lung carcinomas," *Biochem. Med.*, vol. 34, no. 1, pp. 52–59, 1985.
- [105] J. A. Gilbert, L. M. Frederick, and M. M. Ames, "The aromatic-L-amino acid decarboxylase inhibitor carbidopa is selectively cytotoxic to human pulmonary carcinoid and small cell lung carcinoma cells.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 6, no. 11, pp. 4365–4372, Nov. 2000.
- [106] J. A. Gilbert, L. A. Bates, and M. M. Ames, "Elevated aromatic-l-amino acid decarboxylase in human carcinoid tumors," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 50, no. 6, pp. 845–850, 1995.
- [107] G. A. Lancaster and T. L. Sourkes, "Purification and properties of hog-kidney 3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase.," *Can. J. Biochem.*, vol. 50, no. 7, pp. 791–797, Jul. 1972.
- [108] C. B. Voltattorni, A. Minelli, P. Vecchini, A. Fiori, and C. Turano, "Purification and characterization of 3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase from pig kidney.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 93, no. 1, pp. 181–188, Jan. 1979.
- [109] B. Maras, P. Dominici, D. Barra, F. Bossa, and C. B. Voltattorni, "Pig kidney 3,4-dihydroxyphenylalanine (Dopa) decarboxylase," *Eur. J. Biochem.*, vol. 201, no. 2, pp. 385–391, Oct. 1991.
- [110] P. Dominici, B. Tancini, D. Barra, and C. B. Voltattorni, "Purification and characterization of rat-liver 3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 169, no. 1, pp. 209–213, Nov. 1987.

- [111] K. Shirota and H. Fujisawa, "Purification and Characterization of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase from Rat Kidney and Monoclonal Antibody to the Enzyme," *J. Neurochem.*, vol. 51, no. 2, pp. 426–434, Aug. 1988.
- [112] F. Coge, M. Krieger-Poullet, J. C. Guillemot, P. Ferrara, F. Gros, and J. Thibault, "Purification and partial sequencing of L-dopa decarboxylase from pheochromocytoma in rats.," *C. R. Acad. Sci. III.*, vol. 309, no. 14, pp. 587–592, 1989.
- [113] I. Nishigaki, H. Ichinose, K. Tamai, and T. Nagatsu, "Purification of aromatic-amino acid decarboxylase from bovine brain with a monoclonal antibody," *Biochem. J.*, vol. 252, no. 2, pp. 331 LP – 335, Jun. 1988.
- [114] Y. L. Siow and K. Dakshinamurti, "Purification of dopa decarboxylase from bovine striatum.," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 94, no. 2, pp. 121–131, May 1990.
- [115] S. Nasrin, H. Ichinose, and T. Nagatsu, *Comparison of characteristics of bovine aromatic L-amino acid decarboxylase with human enzyme*, vol. 1118. 1992.
- [116] D. G. Mappouras, J. Stiakakis, and E. G. Fragoulis, "Purification and characterization of L-dopa decarboxylase from human kidney.," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 94, no. 2, pp. 147–156, May 1990.
- [117] R. Maneckjee and S. B. Baylin, "Use of radiolabeled monofluoromethyl-Dopa to define the subunit structure of human L-Dopa decarboxylase.," *Biochemistry*, vol. 22, no. 26, pp. 6058–6063, Dec. 1983.
- [118] H. Ichinose *et al.*, "Simple purification of aromatic l-amino acid decarboxylase from human pheochromocytoma using high-performance liquid chromatography," *Anal. Biochem.*, vol. 150, no. 2, pp. 408–414, 1985.
- [119] D. K. Murali and A. N. Radhakrishnan, "Purification and properties of 5-hydroxytryptophan decarboxylase from monkey small intestine.," *Indian J. Biochem.*, vol. 7, no. 1, pp. 13–18, Mar. 1970.
- [120] M. K. Rahman, T. Nagatsu, and T. Kato, "Determination of aromatic L-amino acid decarboxylase in serum of various animals by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.," *Life Sci.*, vol. 28, no. 5, pp. 485–492, Feb. 1981.
- [121] A. Gjedde *et al.*, "Dopa decarboxylase activity of the living human brain.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 88, no. 7, pp. 2721 LP – 2725, Apr. 1991.

- [122] J. M. Masserano and N. Weiner, "Tyrosine hydroxylase regulation in the central nervous system.," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 53–54, no. 1–2, pp. 129–152, 1983.
- [123] M. Y. Zhu and A. V. Juorio, "Aromatic L-amino acid decarboxylase: biological characterization and functional role.," *Gen. Pharmacol.*, vol. 26, no. 4, pp. 681–696, Jul. 1995.
- [124] G. Giardina *et al.*, "Open conformation of human DOPA decarboxylase reveals the mechanism of PLP addition to Group II decarboxylases," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 51, pp. 20514 LP – 20519, Dec. 2011.
- [125] P. Dominici, P. Filipponi, M. E. Schinina, Do. Barra, and C. B. Voltattorni, "Pig Kidney DOPA Decarboxylase," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 585, no. 1, pp. 162–172, May 1990.
- [126] R. Montioli, B. Cellini, M. Dindo, E. Oppici, and C. Voltattorni, *Interaction of Human Dopa Decarboxylase with L-Dopa: Spectroscopic and Kinetic Studies as a Function of pH*, vol. 2013. 2013.
- [127] M. Bertoldi, M. Gonsalvi, R. Contestabile, and C. B. Voltattorni, "Mutation of Tyrosine 332 to Phenylalanine Converts Dopa Decarboxylase into a Decarboxylation-dependent Oxidative Deaminase," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 39, pp. 36357–36362, Sep. 2002.
- [128] P. Burkhard, P. Dominici, C. Borri-Voltattorni, J. N. Jansonius, and V. N. Malashkevich, "Structural insight into Parkinson's disease treatment from drug-inhibited DOPA decarboxylase," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 8, no. 11, pp. 963–967, 2001.
- [129] V. N. Malashkevich, P. Filipponi, U. Sauder, P. Dominici, J. N. Jansonius, and C. Borri Voltattorni, "Crystallization and preliminary X-ray analysis of pig kidney DOPA decarboxylase.," *J. Mol. Biol.*, vol. 224, no. 4, pp. 1167–1170, Apr. 1992.
- [130] C. B. Voltattorni, A. Minelli, C. Cirotto, D. Barra, and C. Turano, "Subunit structure of 3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylase from pig kidney," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 217, no. 1, pp. 58–64, 1982.
- [131] E. G. Fragoulis and C. E. Sekeris, "Purification and characteristics of DOPA-decarboxylase from the integument of *Calliphora vicina* larve," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 168, no. 1, pp. 15–25, 1975.
- [132] M. Bertoldi and C. B. Voltattorni, "Multiple roles of the active site lysine of

- Dopa decarboxylase.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 488, no. 2, pp. 130–139, Aug. 2009.
- [133] P. Dominici, P. S. Moore, S. Castellani, M. Bertoldi, and C. B. Voltattorni, "Mutation of cysteine 111 in Dopa decarboxylase leads to active site perturbation," *Protein Sci.*, vol. 6, no. 9, pp. 2007–2015, Sep. 1997.
- [134] S. Ishii, H. Mizuguchi, J. Nishino, H. Hayashi, and H. Kagamiyama, "Functionally Important Residues of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Probed by Sequence Alignment and Site-Directed Mutagenesis," *J. Biochem.*, vol. 120, no. 2, pp. 369–376, Aug. 1996.
- [135] C. Sumi, H. Ichinose, and T. Nagatsu, "Characterization of Recombinant Human Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Expressed in COS Cells," *J. Neurochem.*, vol. 55, no. 3, pp. 1075–1078, Sep. 1990.
- [136] C. B. Voltattorni, A. Giartosio, and C. Turano, "Aromatic-L-amino acid decarboxylase from pig kidney.," *Methods Enzymol.*, vol. 142, pp. 179–187, 1987.
- [137] Y. L. Siow and K. Dakshinamurti, "Neuronal dopa decarboxylase.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 585, pp. 173–188, 1990.
- [138] P. Poulikakos, D. Vassilacopoulou, and E. G. Fragoulis, "L-DOPA decarboxylase association with membranes in mouse brain.," *Neurochem. Res.*, vol. 26, no. 5, pp. 479–485, May 2001.
- [139] I. Chalatsa, E. G. Fragoulis, and D. Vassilacopoulou, "Release of membrane-associated L-dopa decarboxylase from human cells.," *Neurochem. Res.*, vol. 36, no. 8, pp. 1426–1434, Aug. 2011.
- [140] R. B. Hodgetts and S. L. O'Keefe, "DOPA DECARBOXYLASE: A Model Gene-Enzyme System for Studying Development, Behavior, and Systematics," *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 51, no. 1, pp. 259–284, Dec. 2005.
- [141] C. Vavricka *et al.*, "From L-dopa to dihydroxyphenylacetaldehyde: a toxic biochemical pathway plays a vital physiological function in insects.," *PLoS One*, vol. 6, no. 1, p. e16124, Jan. 2011.
- [142] M. De Luca, N. V Roshina, G. L. Geiger-Thornsberry, R. F. Lyman, E. G. Pasyukova, and T. F. C. Mackay, "Dopa decarboxylase (Ddc) affects variation in *Drosophila* longevity," *Nat. Genet.*, vol. 34, p. 429, Jul. 2003.
- [143] M. Sterkel, S. Ons, and P. L. Oliveira, "DOPA decarboxylase is essential for cuticle tanning in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), affecting

- ecdysis, survival and reproduction,” *Insect Biochem. Mol. Biol.*, vol. 108, pp. 24–31, 2019.
- [144] P. J. Facchini, K. L. Huber-Allanach, and L. W. Tari, “Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications,” *Phytochemistry*, vol. 54, no. 2, pp. 121–138, 2000.
- [145] D. D. Eveleth, R. D. Gietz, C. A. Spencer, F. E. Nargang, R. B. Hodgetts, and J. L. Marsh, “Sequence and structure of the dopa decarboxylase gene of *Drosophila*: evidence for novel RNA splicing variants.” *EMBO J.*, vol. 5, no. 10, pp. 2663–2672, Oct. 1986.
- [146] C. B. Jaeger, D. A. Ruggiero, V. R. Albert, D. H. Park, T. H. Joh, and D. J. Reis, “Aromatic L-amino acid decarboxylase in the rat brain: immunocytochemical localization in neurons of the brain stem.” *Neuroscience*, vol. 11, no. 3, pp. 691–713, Mar. 1984.
- [147] M. V Ugrumov, “Non-dopaminergic neurons partly expressing dopaminergic phenotype: Distribution in the brain, development and functional significance,” *J. Chem. Neuroanat.*, vol. 38, no. 4, pp. 241–256, 2009.
- [148] F. Tison, E. Normand, M. Jaber, I. Aubert, and B. Bloch, “Aromatic L-amino acid decarboxylase (DOPA decarboxylase) gene expression in dopaminergic and serotonergic cells of the rat brainstem,” *Neurosci. Lett.*, vol. 127, no. 2, pp. 203–206, 1991.
- [149] K. G. Lloyd and O. Hornykiewicz, “Occurrence and distribution of aromatic L-amino acid (L-DOPA) decarboxylase in the human brain.” *J. Neurochem.*, vol. 19, no. 6, pp. 1549–1559, Jun. 1972.
- [150] L.-Q. Ren, M. Chen, H. Hultborn, S. Guo, Y. Zhang, and M. Zhang, “Heterogenic Distribution of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Neurons in the Rat Spinal Cord,” *Frontiers in Integrative Neuroscience*, vol. 11, p. 31, 2017.
- [151] D. H. Park *et al.*, “Phenylethanolamine N-methyltransferase-containing neurons in rat retina: immunohistochemistry, immunochemistry, and molecular biology,” *J. Neurosci.*, vol. 6, no. 4, pp. 1108 LP – 1113, Apr. 1986.
- [152] A. V Juorio, X. M. Li, W. Walz, and I. A. Paterson, “Decarboxylation of L-dopa by cultured mouse astrocytes.” *Brain Res.*, vol. 626, no. 1–2, pp. 306–

309, Oct. 1993.

- [153] X. M. Li, A. V. Juorio, I. A. Paterson, W. Walz, M. Y. Zhu, and A. A. Boulton, "Gene expression of aromatic L-amino acid decarboxylase in cultured rat glial cells.," *J. Neurochem.*, vol. 59, no. 3, pp. 1172–1175, Sep. 1992.
- [154] V. R. Albert, J. M. Allen, and T. H. Joh, "A single gene codes for aromatic L-amino acid decarboxylase in both neuronal and non-neuronal tissues.," *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 19, pp. 9404–9411, Jul. 1987.
- [155] P. Lindstrom and J. Sehlin, "Mechanisms underlying the effects of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan in pancreatic islets. A proposed role for L-aromatic amino acid decarboxylase.," *Endocrinology*, vol. 112, no. 4, pp. 1524–1529, Apr. 1983.
- [156] I. Chalatsa, E. Nikolouzou, E. G. Fragoulis, and D. Vassilacopoulou, "L-Dopa decarboxylase expression profile in human cancer cells.," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 38, no. 2, pp. 1005–1011, Feb. 2011.
- [157] I. Kokkinou, E. Nikolouzou, A. Hatzimanolis, E. G. Fragoulis, and D. Vassilacopoulou, "Expression of enzymatically active L-DOPA decarboxylase in human peripheral leukocytes.," *Blood Cells. Mol. Dis.*, vol. 42, no. 1, pp. 92–98, 2009.
- [158] M.-Z. Siaterli, D. Vassilacopoulou, and E. G. Fragoulis, "Cloning and expression of human placental L-Dopa decarboxylase.," *Neurochem. Res.*, vol. 28, no. 6, pp. 797–803, Jun. 2003.
- [159] G. Eisenhofer *et al.*, "Substantial production of dopamine in the human gastrointestinal tract.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 82, no. 11, pp. 3864–3871, Nov. 1997.
- [160] F. Boomsma, F. A. van der Hoorn, and M. A. Schalekamp, "Determination of aromatic-L-amino acid decarboxylase in human plasma.," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 159, no. 2, pp. 173–183, Sep. 1986.
- [161] E. Mezey *et al.*, "A novel nonneuronal catecholaminergic system: exocrine pancreas synthesizes and releases dopamine.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 19, pp. 10377–10382, Sep. 1996.
- [162] A. Bertorello and A. Aperia, "Short-term regulation of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by dopamine.," *Am. J. Hypertens.*, vol. 3, no. 6 Pt 2, pp. 51S–54S, Jun. 1990.
- [163] J. P. Miramontes-Gonzalez *et al.*, "A new common functional coding variant

- at the DDC gene change renal enzyme activity and modify renal dopamine function," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 5055, 2019.
- [164] K. L. Sims, G. A. Davis, and F. E. Bloom, "Activities of 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine and 5-hydroxy-L-tryptophan decarboxylases in rat brain: assay characteristics and distribution.," *J. Neurochem.*, vol. 20, no. 2, pp. 449–464, Feb. 1973.
- [165] I. Kokkinou, E. G. Fragoulis, and D. Vassilacopoulou, "The U937 macrophage cell line expresses enzymatically active L-Dopa decarboxylase.," *J. Neuroimmunol.*, vol. 216, no. 1–2, pp. 51–58, Nov. 2009.
- [166] P. Poulikakos, V. D, and F. E.G, *A membrane-associated form of L-DOPA decarboxylase in the white prepuparium and adult eclosion developmental stages of the Mediterranean fruit fly, Ceratitis capitata*, vol. 17. 2002.
- [167] N. Yamazaki and J. Sudo, "Activities of aromatic L-amino acid decarboxylase with L-dopa as substrate in brush-border- and basolateral membranes and cytoplasm obtained from rat renal cortex.," *Jpn. J. Pharmacol.*, vol. 46, no. 2, pp. 193–196, Feb. 1988.
- [168] R. A. John, "Pyridoxal phosphate-dependent enzymes," *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, vol. 1248, no. 2, pp. 81–96, 1995.
- [169] M. L. di Salvo, R. Contestabile, and M. K. Safo, "Vitamin B(6) salvage enzymes: mechanism, structure and regulation.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1814, no. 11, pp. 1597–1608, Nov. 2011.
- [170] M. K. Rahman, T. Nagatsu, T. Sakurai, S. Hori, M. Abe, and M. Matsuda, "Effect of pyridoxal phosphate deficiency on aromatic L-amino acid decarboxylase activity with L-DOPA and L-5-hydroxytryptophan as substrates in rats.," *Jpn. J. Pharmacol.*, vol. 32, no. 5, pp. 803–811, Oct. 1982.
- [171] H. Hayashi, H. Kagamiyama, N. Matsuda, S. Miyatake, and T. Kuroiwa, "Instability of the Apo Form of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase In Vivo and In Vitro: Implications for the Involvement of the Flexible Loop That Covers the Active Site," *J. Biochem.*, vol. 135, no. 1, pp. 33–42, Jan. 2004.
- [172] M. J. Jung, *Substrates and inhibitors of aromatic amino acid decarboxylase*, vol. 14. 1986.
- [173] Z. Rossetti, D. Krajnc, N. H. Neff, and M. Hadjiconstantinou, "Modulation of retinal aromatic L-amino acid decarboxylase via alpha 2 adrenoceptors.," *J.*

- Neurochem.*, vol. 52, no. 2, pp. 647–652, Feb. 1989.
- [174] Z. L. Rossetti, C. P. Silvia, D. Krajnc, N. H. Neff, and M. Hadjiconstantinou, “Aromatic L-amino acid decarboxylase is modulated by D1 dopamine receptors in rat retina.,” *J. Neurochem.*, vol. 54, no. 3, pp. 787–791, Mar. 1990.
- [175] M. Hadjiconstantinou, Z. Rossetti, C. Silvia, D. Krajnc, and N. H. Neff, “Aromatic L-amino acid decarboxylase activity of the rat retina is modulated in vivo by environmental light.,” *J. Neurochem.*, vol. 51, no. 5, pp. 1560–1564, Nov. 1988.
- [176] M. Hadjiconstantinou and N. H. Neff, “Enhancing aromatic L-amino acid decarboxylase activity: implications for L-DOPA treatment in Parkinson’s disease.,” *CNS Neurosci. Ther.*, vol. 14, no. 4, pp. 340–351, 2008.
- [177] E. A. Young, N. H. Neff, and M. Hadjiconstantinou, “Phorbol ester administration transiently increases aromatic L-amino acid decarboxylase activity of the mouse striatum and midbrain.,” *J. Neurochem.*, vol. 63, no. 2, pp. 694–697, Aug. 1994.
- [178] E. A. Young, N. H. Neff, and M. Hadjiconstantinou, “Evidence for cyclic AMP-mediated increase of aromatic L-amino acid decarboxylase activity in the striatum and midbrain.,” *J. Neurochem.*, vol. 60, no. 6, pp. 2331–2333, Jun. 1993.
- [179] B. E. Kemp and R. B. Pearson, “Protein kinase recognition sequence motifs.,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 15, no. 9, pp. 342–346, Sep. 1990.
- [180] J. G. Christenson, W. Dairman, and S. Udenfriend, “Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney.,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 141, no. 1, pp. 356–367, Nov. 1970.
- [181] D. G. Mappouras and E. G. Fragoulis, “L-dopa decarboxylase in *Ceratitis capitata* white puparia and human: a comparative study.,” *Comp. Biochem. Physiol. B.*, vol. 97, no. 2, pp. 301–306, 1990.
- [182] S.-H. Kang, M. S. Fuchs, and P. M. Webb, “Purification and characterization of DOPA-decarboxylase from adult gravid *Aedes aegypti*.,” *Insect Biochem.*, vol. 10, no. 5, pp. 501–508, 1980.
- [183] A. G. Vassiliou *et al.*, “L-Dopa decarboxylase interaction with the major signaling regulator PI3K in tissues and cells of neural and peripheral origin.,”

Biochimie, vol. 160, pp. 76–87, May 2019.

- [184] J. Hirsh and N. Davidson, "Isolation and characterization of the dopa decarboxylase gene of *Drosophila melanogaster*.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 1, no. 6, pp. 475 LP – 485, Jun. 1981.
- [185] T. Tanaka *et al.*, "Molecular cloning and sequencing of a cDNA of rat dopa decarboxylase: partial amino acid homologies with other enzymes synthesizing catecholamines.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, no. 20, pp. 8142–8146, Oct. 1989.
- [186] U. J. Kang and T. H. Joh, "Deduced amino acid sequence of bovine aromatic L-amino acid decarboxylase: homology to other decarboxylases.,” *Brain Res. Mol. Brain Res.*, vol. 8, no. 1, pp. 83–87, Jun. 1990.
- [187] H. Ichinose, Y. Kurosawa, K. Titani, K. Fujita, and T. Nagatsu, "Isolation and characterization of a cDNA clone encoding human aromatic L-amino acid decarboxylase.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 164, no. 3, pp. 1024–1030, Nov. 1989.
- [188] H. Ichinose, C. Sumi-Ichinose, T. Ohye, Y. Hagino, K. Fujita, and T. Nagatsu, "Tissue-specific alternative splicing of the first exon generates two types of mRNAs in human aromatic L-amino acid decarboxylase.,” *Biochemistry*, vol. 31, no. 46, pp. 11546–11550, Nov. 1992.
- [189] M. Krieger, F. Coge, F. Gros, and J. Thibault, "Different mRNAs code for dopa decarboxylase in tissues of neuronal and nonneuronal origin.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 6, pp. 2161–2165, Mar. 1991.
- [190] D. Vassilacopoulou, D. C. Sideris, A. G. Vassiliou, and E. G. Fragoulis, "Identification and characterization of a novel form of the human L-dopa decarboxylase mRNA.,” *Neurochem. Res.*, vol. 29, no. 10, pp. 1817–1823, Oct. 2004.
- [191] K. L. O'Malley, S. Harmon, M. Moffat, A. Uhland-Smith, and S. Wong, "The human aromatic L-amino acid decarboxylase gene can be alternatively spliced to generate unique protein isoforms.,” *J. Neurochem.*, vol. 65, no. 6, pp. 2409–2416, Dec. 1995.
- [192] Y. T. Chang, G. Mues, and K. Hyland, "Alternative splicing in the coding region of human aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA.,” *Neurosci. Lett.*, vol. 202, no. 3, pp. 157–160, Jan. 1996.
- [193] L. Brun *et al.*, "Clinical and biochemical features of aromatic L-amino acid

- decarboxylase deficiency.," *Neurology*, vol. 75, no. 1, pp. 64–71, Jul. 2010.
- [194] T. Wassenberg *et al.*, "Consensus guideline for the diagnosis and treatment of aromatic l-amino acid decarboxylase (AADC) deficiency.," *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 12, no. 1, p. 12, Jan. 2017.
- [195] K. Hyland and P. T. Clayton, "Aromatic amino acid decarboxylase deficiency in twins," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 13, no. 3, pp. 301–304, May 1990.
- [196] L. Dai, C. Ding, and F. Fang, "A novel DDC gene deletion mutation in two Chinese mainland siblings with aromatic l-amino acid decarboxylase deficiency," *Brain Dev.*, vol. 41, no. 2, pp. 205–209, 2019.
- [197] K. Kojima *et al.*, "Gene therapy improves motor and mental function of aromatic l-amino acid decarboxylase deficiency," *Brain*, vol. 142, no. 2, pp. 322–333, Jan. 2019.
- [198] C.-H. Tseng *et al.*, "Gene therapy improves brain white matter in aromatic l-amino acid decarboxylase deficiency," *Ann. Neurol.*, vol. 0, no. 0, Mar. 2019.
- [199] D. P. Eisenberg *et al.*, "Common Variation in the DOPA Decarboxylase (DDC) Gene and Human Striatal DDC Activity In Vivo," *Neuropsychopharmacology*, vol. 41, p. 2303, Feb. 2016.
- [200] A. Mobascher *et al.*, "Association between dopa decarboxylase gene variants and borderline personality disorder.," *Psychiatry Res.*, vol. 219, no. 3, pp. 693–695, Nov. 2014.
- [201] A. D. Borglum *et al.*, "Dopa decarboxylase genotypes may influence age at onset of schizophrenia.," *Mol. Psychiatry*, vol. 6, no. 6, pp. 712–717, Nov. 2001.
- [202] E. S. Husebye *et al.*, "Inhibition of aromatic L-amino acid decarboxylase activity by human autoantibodies.," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 120, no. 3, pp. 420–423, Jun. 2000.
- [203] J. K. B. T.-M. S. E. of D. (Sixteenth E. Aronson, Ed., "Levodopa and dopa decarboxylase inhibitors," Oxford: Elsevier, 2016, pp. 545–555.
- [204] H. Zhu *et al.*, "Carbidopa, a drug in use for management of Parkinson disease inhibits T cell activation and autoimmunity," *PLoS One*, vol. 12, no. 9, p. e0183484, Sep. 2017.
- [205] R. M. Pinder, R. N. Brogden, P. R. Sawyer, T. M. Speight, and G. S. Avery, "Levodopa and Decarboxylase Inhibitors: A Review of their Clinical Pharmacology and Use in the Treatment of Parkinsonism," *Drugs*, vol. 11,

- no. 5, pp. 329–377, 1976.
- [206] N. H. Neff and M. Hadjiconstantinou, “Aromatic L-amino acid decarboxylase modulation and Parkinson’s disease.,” *Prog. Brain Res.*, vol. 106, pp. 91–97, 1995.
- [207] M. Yoosefian, E. Rahmanifar, and N. Etminan, “Nanocarrier for levodopa Parkinson therapeutic drug; comprehensive benserazide analysis,” *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*, vol. 46, no. sup1, pp. 434–446, Oct. 2018.
- [208] A. J. Culvenor and B. Jarrott, “Reduction of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Protein in Rats after Chronic Administration of Alpha-Methyldopa,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 15, no. 1, pp. 86 LP – 98, Jan. 1979.
- [209] T. L. Sourkes, “The action of a-Methyldopa in the Brain,” *Br. Med. Bull.*, vol. 21, no. 1, pp. 66–69, Jan. 1965.
- [210] C. C. Porter, L. S. Watson, D. C. Titus, J. A. Totaro, and S. S. Byer, “Inhibition of dopa decarboxylase by the hydrazino analog of α -methyldopa,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 11, no. 11, pp. 1067–1077, 1962.
- [211] M. J. Jung *et al.*, “Inhibition of monoamine synthesis by irreversible blockade of aromatic aminoacid decarboxylase with alpha-monofluoromethyldopa.,” *Life Sci.*, vol. 24, no. 11, pp. 1037–1042, Mar. 1979.
- [212] A.-G. Vassiliou, D. Vassilacopoulou, and E. G. Fragoulis, “Purification of an endogenous inhibitor of L-Dopa decarboxylase activity from human serum.,” *Neurochem. Res.*, vol. 30, no. 5, pp. 641–649, May 2005.
- [213] M. K. Rahman, A. Togari, K. Kojima, K. Takahashi, and T. Nagatsu, “Presence of endogenous inhibitor of aromatic L-amino acid decarboxylase in monkey serum.,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 63, no. 1, pp. 53–58, Aug. 1984.
- [214] A.-G. Vassiliou, E. G. Fragoulis, and D. Vassilacopoulou, “Detection, purification and identification of an endogenous inhibitor of L-Dopa decarboxylase activity from human placenta.,” *Neurochem. Res.*, vol. 34, no. 6, pp. 1089–1100, Jun. 2009.
- [215] S. Hashimoto, T. Ikeno, J. Hasegawa, T. Nagatsu, and H. Kuzuya, “Endogenous inhibitors of DOPA decarboxylase in rat submandibular gland,” *Arch. Oral Biol.*, vol. 25, no. 3, pp. 195–199, 1980.
- [216] A. Carlsson, J. N. Davis, W. Kehr, M. Lindqvist, and C. V Atack, “Simultaneous measurement of tyrosine and tryptophan hydroxylase

- activities in brain in vivo using an inhibitor of the aromatic amino acid decarboxylase.," *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, vol. 275, no. 2, pp. 153–168, 1972.
- [217] X. M. Li, A. V. Juorio, and A. A. Boulton, "NSD-1015 alters the gene expression of aromatic L-amino acid decarboxylase in rat PC12 pheochromocytoma cells.," *Neurochem. Res.*, vol. 18, no. 8, pp. 915–919, Aug. 1993.
- [218] D. Dluzen, A. Reddy, and J. McDermott, "The aromatic amino acid decarboxylase inhibitor, NSD-1015, increases release of dopamine: response characteristics.," *Neuropharmacology*, vol. 31, no. 12, pp. 1223–1229, Dec. 1992.
- [219] S. A. Treseder, S. Rose, and P. Jenner, "The central aromatic amino acid DOPA decarboxylase inhibitor, NSD-1015, does not inhibit L-DOPA-induced circling in unilateral 6-OHDA-lesioned-rats.," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 13, no. 1, pp. 162–170, Jan. 2001.
- [220] S. A. Treseder, M. Jackson, and P. Jenner, "The effects of central aromatic amino acid DOPA decarboxylase inhibition on the motor actions of L-DOPA and dopamine agonists in MPTP-treated primates.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 129, no. 7, pp. 1355–1364, Apr. 2000.
- [221] O. Hornykiewicz, "A brief history of levodopa.," *J. Neurol.*, vol. 257, no. Suppl 2, pp. S249-52, Nov. 2010.
- [222] O. Hornykiewicz, "L-DOPA: from a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent.," *Amino Acids*, vol. 23, no. 1–3, pp. 65–70, 2002.
- [223] M. D. Yahr, R. C. Duvoisin, M. J. Scheer, R. E. Barrett, and M. M. Hoehn, "Treatment of Parkinsonism With Levodopa," *JAMA Neurol.*, vol. 21, no. 4, pp. 343–354, Oct. 1969.
- [224] M. Goedert, R. Jakes, and M. G. Spillantini, "The Synucleinopathies: Twenty Years On.," *J. Parkinsons. Dis.*, vol. 7, no. s1, pp. S51–S69, 2017.
- [225] T. Müller, "Chapter 10 - The Role of Levodopa in the Chronic Neurodegenerative Disorder – Parkinson's Disease," G. A. L. I. QURESHI and S. H. B. T.-O. S. and N. D. PARVEZ, Eds. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2007, pp. 237–246.
- [226] F. Hefti, E. Melamed, J. Bhawan, and R. J. Wurtman, "Long-term

- administration of L-DOPA does not damage dopaminergic neurons in the mouse,” *Neurology*, vol. 31, no. 9, pp. 1194 LP – 1194, Sep. 1981.
- [227] N. Tambasco, M. Romoli, and P. Calabresi, “Levodopa in Parkinson’s Disease: Current Status and Future Developments.,” *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 16, no. 8, pp. 1239–1252, 2018.
- [228] B. R. Thanvi and T. C. N. Lo, “Long term motor complications of levodopa: clinical features, mechanisms, and management strategies,” *Postgrad. Med. J.*, vol. 80, no. 946, pp. 452 LP – 458, Aug. 2004.
- [229] D. Devos *et al.*, “Dopa-decarboxylase gene polymorphisms affect the motor response to L-dopa in Parkinson’s disease.,” *Parkinsonism Relat. Disord.*, vol. 20, no. 2, pp. 170–175, Feb. 2014.
- [230] V. Maini Rekdal, E. N. Bess, J. E. Bisanz, P. J. Turnbaugh, and E. P. Balskus, “Discovery and inhibition of an interspecies gut bacterial pathway for Levodopa metabolism.,” *Science*, vol. 364, no. 6445, Jun. 2019.
- [231] T. Bottiglieri, E. Arning, B. Wasek, V. Nunbhakdi-Craig, J.-M. Sontag, and E. Sontag, “Acute Administration of L-Dopa Induces Changes in Methylation Metabolites, Reduced Protein Phosphatase 2A Methylation, and Hyperphosphorylation of Tau Protein in Mouse Brain,” *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 27, pp. 9173 LP – 9181, Jul. 2012.
- [232] S. G. Snowden *et al.*, “Neurotransmitter imbalance in the brain and Alzheimer’s pathology,” *bioRxiv*, p. 220699, Jan. 2018.
- [233] R. L. Kow, C. Sikkema, J. M. Wheeler, C. W. Wilkinson, and B. C. Kraemer, “DOPA Decarboxylase Modulates Tau Toxicity,” *Biol. Psychiatry*, vol. 83, no. 5, pp. 438–446, 2018.
- [234] A. V McCormick, J. M. Wheeler, C. R. Guthrie, N. F. Liachko, and B. C. Kraemer, “Dopamine D2 Receptor Antagonism Suppresses Tau Aggregation and Neurotoxicity,” *Biol. Psychiatry*, vol. 73, no. 5, pp. 464–471, 2013.
- [235] M. Lebel, C. Patenaude, J. Allyson, G. Massicotte, and M. Cyr, “Dopamine D1 receptor activation induces tau phosphorylation via cdk5 and GSK3 signaling pathways,” *Neuropharmacology*, vol. 57, no. 4, pp. 392–402, 2009.
- [236] S. Chiba *et al.*, “Loss of dopaminoreceptive neuron causes L-dopa resistant parkinsonism in tauopathy,” *Neurobiol. Aging*, vol. 33, no. 10, pp. 2491–2505, 2012.

- [237] L. Trillo *et al.*, “Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer’s disease. translating basic science into clinical care.,” *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 37, no. 8, pp. 1363–1379, Sep. 2013.
- [238] M. D’Amelio and R. Nisticò, “Unlocking the secrets of dopamine in Alzheimer’s Disease,” *Pharmacol. Res.*, vol. 128, p. 399, 2018.
- [239] S. Fahn, “The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson’s disease.,” *Mov. Disord.*, vol. 23 Suppl 3, pp. S497-508, 2008.
- [240] H. You, L.-L. Mariani, G. Mangone, D. Le Febvre de Nailly, F. Charbonnier-Beaupel, and J.-C. Corvol, “Molecular basis of dopamine replacement therapy and its side effects in Parkinson’s disease.,” *Cell Tissue Res.*, vol. 373, no. 1, pp. 111–135, Jul. 2018.
- [241] Y. Liu, E. S. Schweitzer, M. J. Nirenberg, V. M. Pickel, C. J. Evans, and R. H. Edwards, “Preferential localization of a vesicular monoamine transporter to dense core vesicles in PC12 cells.,” *J. Cell Biol.*, vol. 127, no. 5, pp. 1419–1433, Dec. 1994.
- [242] C. Rangel-Barajas, I. Coronel, and B. Florán, “Dopamine Receptors and Neurodegeneration,” *Aging Dis.*, 2015.
- [243] T. J. Collier, N. M. Kanaan, and J. H. Kordower, “Aging and Parkinson’s disease: Different sides of the same coin?,” *Mov. Disord.*, vol. 32, no. 7, pp. 983–990, Jul. 2017.
- [244] H. Wilson *et al.*, “Serotonergic pathology and disease burden in the premotor and motor phase of A53T α -synuclein parkinsonism: a cross-sectional study,” *Lancet Neurol.*, 2019.
- [245] J. Li, M. Zhu, A. B. Manning-Bog, D. A. Di Monte, and L. A. Fink, “Dopamine and L-dopa disaggregate amyloid fibrils: implications for Parkinson’s and Alzheimer’s disease,” *FASEB J.*, vol. 18, no. 9, pp. 962–964, Apr. 2004.
- [246] M. D’Amelio, S. Puglisi-Allegra, and N. Mercuri, “The role of dopaminergic midbrain in Alzheimer’s disease: Translating basic science into clinical practice.,” *Pharmacol. Res.*, vol. 130, pp. 414–419, Apr. 2018.
- [247] A. Nobili *et al.*, “Dopamine neuronal loss contributes to memory and reward dysfunction in a model of Alzheimer’s disease,” *Nat. Commun.*, vol. 8, 2017.
- [248] Y. Vermeiren, D. Van Dam, T. Aerts, S. Engelborghs, and P. P. De Deyn, “Monoaminergic neurotransmitter alterations in postmortem brain regions of depressed and aggressive patients with Alzheimer’s disease,” *Neurobiol.*

- Aging*, vol. 35, no. 12, pp. 2691–2700, 2014.
- [249] J. J. Rodríguez, H. N. Noristani, and A. Verkhatsky, “The serotonergic system in ageing and Alzheimer’s disease,” *Prog. Neurobiol.*, vol. 99, no. 1, pp. 15–41, 2012.
- [250] A. Martorana and G. Koch, “Is dopamine involved in Alzheimer’s disease?,” *Front. Aging Neurosci.*, vol. 6, no. SEP, pp. 1–6, 2014.
- [251] R. Ponnusamy, M. W. McNerney, S. Moghadam, and A. Salehi, “Assessing disease-modifying effects of norepinephrine in Down syndrome and Alzheimer’s disease,” *Brain Res.*, vol. 1702, pp. 3–11, 2019.
- [252] M. R. Post, O. J. Lieberman, and E. V Mosharov, “Can Interactions Between alpha-Synuclein, Dopamine and Calcium Explain Selective Neurodegeneration in Parkinson’s Disease?,” *Front. Neurosci.*, vol. 12, p. 161, 2018.
- [253] R. Tehranian, S. E. Montoya, A. D. Van Laar, T. G. Hastings, and R. G. Perez, “Alpha-synuclein inhibits aromatic amino acid decarboxylase activity in dopaminergic cells.,” *J. Neurochem.*, vol. 99, no. 4, pp. 1188–1196, Nov. 2006.
- [254] B. Butler, D. Sambo, and H. Khoshbouei, “Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission.,” *J. Chem. Neuroanat.*, vol. 83–84, pp. 41–49, Oct. 2017.
- [255] R. G. Perez, J. C. Waymire, E. Lin, J. J. Liu, F. Guo, and M. J. Zigmond, “A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis.,” *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 8, pp. 3090–3099, Apr. 2002.
- [256] J. A. Duce, B. X. Wong, H. Durham, J.-C. Devedjian, D. P. Smith, and D. Devos, “Post translational changes to alpha-synuclein control iron and dopamine trafficking; a concept for neuron vulnerability in Parkinson’s disease.,” *Mol. Neurodegener.*, vol. 12, no. 1, p. 45, Jun. 2017.
- [257] D. E. Mor *et al.*, “Dopamine induces soluble alpha-synuclein oligomers and nigrostriatal degeneration.,” *Nat. Neurosci.*, vol. 20, no. 11, pp. 1560–1568, Nov. 2017.
- [258] B. Butler *et al.*, “Dopamine Transporter Activity Is Modulated by alpha-Synuclein.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 49, pp. 29542–29554, Dec. 2015.
- [259] S. E. Marsh and M. Blurton-Jones, “Examining the mechanisms that link β -amyloid and α -synuclein pathologies,” *Alzheimers. Res. Ther.*, vol. 4, no. 2,

p. 11, Apr. 2012.

- [260] M. Hashimoto and E. Masliah, "Alpha-synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease.," *Brain Pathol.*, vol. 9, no. 4, pp. 707–720, Oct. 1999.
- [261] R. Cacabelos, "Pharmacogenomics of Alzheimer's and Parkinson's diseases," *Neurosci. Lett.*, 2018.
- [262] C. Soto, "Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 4, p. 49, Jan. 2003.
- [263] D. J. Selkoe, "Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 6, no. 11, pp. 1054–1061, Nov. 2004.
- [264] C. A. Ross and M. A. Poirier, "Protein aggregation and neurodegenerative disease," *Nat. Med.*, vol. 10, p. S10, Jul. 2004.
- [265] G. B. Irvine, O. M. El-Agnaf, G. M. Shankar, and D. M. Walsh, "Protein Aggregation in the Brain: The Molecular Basis for Alzheimer's and Parkinson's Diseases," *Mol. Med.*, vol. 14, no. 7, pp. 451–464, 2008.
- [266] S. H. Tan *et al.*, "Emerging pathways to neurodegeneration_ Dissecting the critical molecular mechanisms in Alzheimer's disease, Parkinson's disease," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 111, pp. 765–777, 2019.
- [267] V. Moskvina *et al.*, "Analysis of Genome-Wide Association Studies of Alzheimer Disease and of Parkinson Disease to Determine If These 2 Diseases Share a Common Genetic Risk HHS Public Access," *JAMA Neurol*, vol. 70, no. 10, pp. 1268–1276, 2013.
- [268] G. Charlesworth *et al.*, "Tau acts as an independent genetic risk factor in pathologically proven PD.," *Neurobiol. Aging*, vol. 33, no. 4, pp. 838.e7–11, Apr. 2012.
- [269] S. Tang, B. Yao, N. Li, S. Lin, and Z. Huang, "Association of Dopamine Beta-Hydroxylase Polymorphisms with Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Schizophrenia: Evidence Based on Currently Available Loci.," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 51, no. 1, pp. 411–428, 2018.
- [270] A. Xie, J. Gao, L. Xu, and D. Meng, "Shared mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease and Parkinson's disease," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, p. 648740, 2014.
- [271] E. Masliah *et al.*, " β -Amyloid peptides enhance α -synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's

- disease and Parkinson's disease," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 21, pp. 12245 LP – 12250, Oct. 2001.
- [272] C. Hölscher, "Novel dual GLP-1/GIP receptor agonists show neuroprotective effects in Alzheimer's and Parkinson's disease models," *Neuropharmacology*, vol. 136. Pergamon, pp. 251–259, 01-Jul-2018.
- [273] S. Craft and G. Stennis Watson, "Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms," *Lancet Neurol.*, vol. 3, no. 3, pp. 169–178, 2017.
- [274] K. A. Jellinger, K. Seppi, G. K. Wenning, and W. Poewe, "Impact of coexistent Alzheimer pathology on the natural history of Parkinson's disease," 2002.
- [275] A. H. Rajput, B. Rozdilsky, and A. Rajput, "Alzheimer's Disease and Idiopathic Parkinson's Disease Coexistence," *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.*, vol. 6, no. 3, pp. 170–176, Jul. 1993.
- [276] T. T. PUCK, S. J. CIECIURA, and A. ROBINSON, "Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects.," *J. Exp. Med.*, vol. 108, no. 6, pp. 945–956, Dec. 1958.
- [277] J. L. Biedler, L. Helson, and B. A. Spengler, "Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture.," *Cancer Res.*, vol. 33, no. 11, pp. 2643–2652, Nov. 1973.
- [278] J. L. Biedler, S. Roffler-Tarlov, M. Schachner, and L. S. Freedman, "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones.," *Cancer Res.*, vol. 38, no. 11 Pt 1, pp. 3751–3757, Nov. 1978.
- [279] R. A. Ross, B. A. Spengler, and J. L. Biedler, "Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 71, no. 4, pp. 741–747, Oct. 1983.
- [280] L. Agholme, T. Lindstrom, K. Kagedal, J. Marcusson, and M. Hallbeck, "An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons.," *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 20, no. 4, pp. 1069–1082, 2010.
- [281] J. Kovalevich and D. Langford, "Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1078, pp. 9–21, 2013.

- [282] H. XIE, L. HU, and G. LI, "SH-SY5Y human neuroblastoma cell line:in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease," *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 123, no. 8, 2010.
- [283] H. Xicoy, B. Wieringa, and G. J. M. Martens, "The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review," *Mol. Neurodegener.*, vol. 12, no. 1, p. 10, 2017.
- [284] I. Cuchillo-Ibañez *et al.*, "Heteromers of amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid," *Mol. Neurodegener.*, vol. 10, p. 2, Jan. 2015.
- [285] P. Soba *et al.*, "Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion," *EMBO J.*, vol. 24, no. 20, pp. 3624–3634, Oct. 2005.
- [286] I. Cruz-Muros *et al.*, "Aging of the rat mesostriatal system: differences between the nigrostriatal and the mesolimbic compartments.," *Exp. Neurol.*, vol. 204, no. 1, pp. 147–161, Mar. 2007.
- [287] M. S. Batistela, N. D. Josviak, C. D. Sulzbach, and R. L. R. de Souza, "An overview of circulating cell-free microRNAs as putative biomarkers in Alzheimer's and Parkinson's Diseases," *Int. J. Neurosci.*, 2017.
- [288] L. Parnetti *et al.*, "CSF and blood biomarkers for Parkinson's disease," *Lancet Neurol.*, vol. 18, no. 6, pp. 573–586, 2019.
- [289] P. Weingarten, J. Bermak, and Q. Y. Zhou, "Evidence for non-oxidative dopamine cytotoxicity: potent activation of NF-kappa B and lack of protection by anti-oxidants.," *J. Neurochem.*, vol. 76, no. 6, pp. 1794–1804, Mar. 2001.
- [290] C. Patsis, V. Glyka, I. Yiotakis, E. G. Fragoulis, and A. Scorilas, "L-DOPA Decarboxylase (DDC) Expression Status as a Novel Molecular Tumor Marker for Diagnostic and Prognostic Purposes in Laryngeal Cancer," *Transl. Oncol.*, vol. 5, no. 4, pp. 288–296, Aug. 2012.
- [291] E. I. Papadopoulos, C. Petraki, A. Gregorakis, E. Chra, E. G. Fragoulis, and A. Scorilas, "L-DOPA decarboxylase mRNA levels provide high diagnostic accuracy and discrimination between clear cell and non-clear cell subtypes in renal cell carcinoma.," *Clin. Biochem.*, vol. 48, no. 9, pp. 590–595, Jun. 2015.
- [292] M. Avgeris, G. Koutalellis, E. G. Fragoulis, and A. Scorilas, "Expression analysis and clinical utility of L-Dopa decarboxylase (DDC) in prostate cancer.," *Clin. Biochem.*, vol. 41, no. 14–15, pp. 1140–1149, Oct. 2008.

- [293] D. Florou, I. N. Papadopoulos, E. G. Fragoulis, and A. Scorilas, "L-Dopa decarboxylase (DDC) constitutes an emerging biomarker in predicting patients' survival with stomach adenocarcinomas," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 139, no. 2, pp. 297–306, 2013.
- [294] E. D. Kalantzis, A. Scorilas, and D. Vassilacopoulou, "Evidence for L-Dopa Decarboxylase Involvement in Cancer Cell Cytotoxicity Induced by Docetaxel and Mitoxantrone.," *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 19, no. 13, pp. 1087–1096, 2018.
- [295] D. K. Lahiri, "The stability of beta-amyloid precursor protein in nine different cell types.," *Biochem. Mol. Biol. Int.*, vol. 29, no. 5, pp. 849–858, Apr. 1993.
- [296] D. Vassilacopoulou, J. A. Ripellino, N. Tezapsidis, V. Y. Hook, and N. K. Robakis, "Full-length and truncated Alzheimer amyloid precursors in chromaffin granules: solubilization of membrane amyloid precursor is mediated by an enzymatic mechanism.," *J. Neurochem.*, vol. 64, no. 5, pp. 2140–2146, May 1995.
- [297] N. Tezapsidis *et al.*, "Release of nontransmembrane full-length Alzheimer's amyloid precursor protein from the lumenar surface of chromaffin granule membranes.," *Biochemistry*, vol. 37, no. 5, pp. 1274–1282, Feb. 1998.
- [298] P. Bergstrom *et al.*, "Amyloid precursor protein expression and processing are differentially regulated during cortical neuron differentiation.," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 29200, Jul. 2016.
- [299] G. Wu, S. Sankaranarayanan, S. H.-K. Hsieh, A. J. Simon, and M. J. Savage, "Decrease in brain soluble amyloid precursor protein beta (sAPPbeta) in Alzheimer's disease cortex.," *J. Neurosci. Res.*, vol. 89, no. 6, pp. 822–832, Jun. 2011.
- [300] Y. J. Kang, D.-G. Seo, and S.-Y. Park, "Phenylpropanoids from cinnamon bark reduced β -amyloid production by the inhibition of β -secretase in Chinese hamster ovarian cells stably expressing amyloid precursor protein," *Nutr. Res.*, vol. 36, no. 11, pp. 1277–1284, 2016.
- [301] W. Xia *et al.*, "Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins.," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 12, pp. 7977–7982, Mar. 1997.
- [302] E. Norstrom, "Metabolic processing of the amyloid precursor protein -- new

- pieces of the Alzheimer's puzzle.," *Discov. Med.*, vol. 23, no. 127, pp. 269–276, Apr. 2017.
- [303] S. Scheuermann *et al.*, "Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 36, pp. 33923–33929, Sep. 2001.
- [304] Y. Yan, T.-H. Xu, K. G. Harikumar, L. J. Miller, K. Melcher, and H. E. Xu, "Dimerization of the transmembrane domain of amyloid precursor protein is determined by residues around the gamma-secretase cleavage sites.," *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 38, pp. 15826–15837, Sep. 2017.
- [305] M. Colamartino *et al.*, "Protective Effects of L-Dopa and Carbidopa Combined Treatments on Human Catecholaminergic Cells," *DNA Cell Biol.*, vol. 31, no. 11, pp. 1572–1579, Sep. 2012.
- [306] A. Shimozawa *et al.*, "Effect of L-DOPA/Benserazide on Propagation of Pathological alpha-Synuclein.," *Front. Neurosci.*, vol. 13, p. 595, 2019.