ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάλυση της συμμετοχής ενζύμων του μεταβολισμού των λιπιδίων σε πορείες φλεγμονώδους απόκρισης

ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΘΗΒΑΙΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2015

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάλυση της συμμετοχής ενζύμων του μεταβολισμού των λιπιδίων σε πορείες φλεγμονώδους απόκρισης

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΘΗΒΑΙΟΣ

Α.Μ.: 61304

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:

ΝΤΙΑ ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΥ, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

ΓΙΩΡΓΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΟΥ, Ερευνητής Α', Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- ΓΙΩΡΓΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΟΥ, Ερευνητής Α', Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ»
- ΝΤΙΑ ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΥ, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.
- ΓΙΩΡΓΟΣ ΛΕΟΝΤΑΡΙΤΗΣ, Λέκτορας, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 12-10-2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Σκλήρυνση κατά Πλάκας (Σ.Κ.Π.) είναι μια αυτοάνοση ασθένεια που προσβάλει το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Κ.Ν.Σ). Τα αίτια της δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί, καθώς εμφανίζει μεγάλη γενετική ετερογένεια. Παρα ταύτα, είναι σαφές ότι προκαλείται, τόσο στην έναρξη όσο και κατά τη διάρκεια της ασθένειας, φλεγμονώδης απόκριση, η οποία καταστρέφει το έλυτρο μυελίνης των νευρικών κυττάρων, δυσκολεύοντας την διάδοση των νευρικών ώσεων. Εξαιτίας της ετερογένειας, δεν υπάρχει ένα μοναδικό μοντέλο εργαστηριακής μελέτης της Σ.Κ.Π, αλλά μια πληθώρα μοντέλων που προσομοιάζουν τους διαφορετικούς τύπους της ασθένειας. Ανάμεσα σε αυτά, ίσως τα πιο μελετημένα είναι τα μοντέλα της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας (Π.Α.Ε). Η παρούσα εργασία ασχολήθηκε με τη μελέτη της Π.Α.Ε. στο νωτιαίο μυελό του οργανισμού *Mus musculus*. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε το μονοπάτι παραγωγής φλεγμονωδών μορίων όπως προσταγλανδίνων, θρομβοξάνων και λευκοτριένιων από το αραχιδονικό οξύ. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα εργασία μελετήσαμε, την υπεροικογένεια των φωσφολιπασών A_2 και τις κυκλοξυγενάσες. Για τα ένζυμα αυτά προσδιορίστηκαν, με πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης δεκατεσσάρων γονίδιων φωσφολιπασών A_2 αλλά και των COX-1 και COX-2, σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία εξέλιξης της νόσου. Επιπλέον αναπτύχθηκε μια μέθοδος με χρήση φασματογραφίας μάζας, υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με λιπιδωμική μελέτη (HPLC-MS/MS) σε φυσιολογικούς ιστούς εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού από *Mus musculus*. Με χρήση της μεθόδου αυτής, θα μετρηθούν στο μέλλον τα υποστρώματα και τα προιόντα της ενζυμικής δράσης των COX-2 και διάφορων PLA_2. Αυτό θα προσφέρει μια ολιστική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων και των λιπιδικών πορειών, στις οποίες τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Γονιδιακή Έκφραση

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Φωσφολιπάσες A_2, Κυκλοξυγενάσες, Σκλήρυνση κατά Πλάκας, Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune disease that affects the Central Nervous System (C.N.S.). The cause for this disease has not been fully elucidated, because it presents a large genetic heterogeneity. Nevertheless, it is clear that an immune response is provoked at the onset and during the disease, that destroys the myelin sheath of nerve cells and, thus, blocks the transmission of the nerve impulses. Due to heterogeneity, there is no unique universal model for studying MS, but a variety of models that simulate the different types of the disease. Among them, the most studied are the models of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (E.A.E.). In the present work, we utilized Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the spinal cord of *Mus musculus*. More specifically the pathway that produces inflammatory molecules from arachidonic acid, such as prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes was studied. Therefore, the scientific research of this study focused on the study of the superfamily of Phospholipases A_2 (PLA_2) and Cyclooxygenases. For these enzymes, relative gene expression levels of fourteen PLA_2 genes, as well as those of COX-1 and COX-2, were determined by real time polymerase chain reaction experiments, during three different time points of disease progression. Moreover, a method based on lipidomic analysis with HPLC-MS/MS was established in physiological brain and spinal cord tissues of *Mus musculus*. Using this method, the substrates and the products of COX-2 and PLA_2 will be studied in the future. This will offer a more holistic view of the interactions of lipid pathways, in which these enzymes are being implicated.

SUBJECT AREA: Gene Expression

KEYWORDS: Phospholipases A_2, Cyclooxygenases, Multiple Sclerosis, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επιβλέποντες μου, δρ. Γιώργο Παναγιώτου, Ερευνητή Α' του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» και δρ. Ντία Γαλανοπούλου, καθηγήτρια Βιοχημείας του Ε.Κ.Π.Α. για τη συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της. Ο δρ. Γιώργος Παναγιώτου, με την στήριξη του σε όλες τις δύσκολες στιγμές αλλά και τη στάση του, συνέβαλλε τα μέγιστα στη διαμόρφωση μου από πλήρως μαθητευόμενο σε εν δυνάμει αυτόνομο ερευνητή, καθώς με υποστήριζε σε κάθε στιγμή και μου έδινε και βαθμούς ελευθερίας να δοκιμάζω! Παράλληλα, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω ειδική μνεία στην δρ. Μαρτίνα Σαμιωτάκη για την αμέριστη συμπαράσταση της αυτά τα δύο δημιουργικά χρόνια, καθώς η συνεισφορά της αποτέλεσε το συνεκτικό κρίκο για την κατανόηση των διαφόρων πτυχών της εργασίας μου, όλο το χρονικό διάστημα των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Μου μετέδωσε πληθώρα εφοδίων, τα οποία θεωρώ ότι θα μου φανούν ιδιαιτέρως χρήσιμα στη συνέχιση των ερευνητικών σπουδών μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστήριου μου και ιδιαίτερα τις μεταδιδακτορικές ερευνήτριες δρ. Μαρίνα Κοτσίκη και δρ. Κατερίνα Καρκαλή, που με τις εύστοχες παρατηρήσεις και τα σχόλια τους με βοήθησαν να εξελιχθώ αλλά και να βελτιώσω τις πειραματικές μου πρακτικές. Στα πλαίσια αυτά θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης και το δρ. Βασίλειο Αϊδίνη, Ερευνητή Α' του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» διότι στο εργαστήριο του πραγματοποιήθηκε μέρος των πειραμάτων μου. Ευχαριστώ και όλα τα νυν και πρώην μέλη του δικού του εργαστηρίου, που με ένα κλίμα αγαστής συναδελφικότητας με βοήθησαν στα πειράματα που διεξήχθησαν εκεί. Ιδιαίτερα δε ξεχωρίζω την προσφορά της μεταδιδακτορικής ερευνήτριας δρ. Ελεάννας Καφφέ για την κρίσιμη συμβολή της αναφορικά με τις λιπιδομικές τεχνικές, καθώς και την υποψήφια διδακτορική φοιτήτρια Ιωάννα Νίνου, η οποία συνέβαλλε καθοριστικά στη βελτίωση των πειραμάτων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, ενώ παράλληλα μου παρείχε το βασικό υλικό της εργασίας μου. Χωρίς αυτήν η όλη διπλωματική εργασία θα ήταν ανέφικτη και την ευχαριστώ θερμά!

Αφιερώσεις

Θα ήθελα να αφιερώσω την εργασία μου πρωτίστως στην οικογένεια μου που, παρά τις οικονομικές δυσκολίες που ταλανίζουν την καθημερινότητα μας λόγω της οικονομικής κρίσης, στάθηκε αρωγός πνευματικά και υλικά στο να καταφέρω να εκπληρώσω με επιτυχία τις υποχρεώσεις μου κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών αλλά και συνολικά όλης της εκπαιδευτικής μου πορείας έως τώρα. Οι θυσίες και οι στερήσεις τους όλα αυτά τα χρόνια με κατέστησαν ικανό να φθάσω έως εδώ. Επίσης η καθηγήτριά μου Ντία Γαλανοπούλου αποτέλεσε, από τα χρόνια της πτυχιακής μου εργασίας έως σήμερα, μια συνεχή πηγή άντλησης έμπνευσης, ενώ με το διδακτικό της χαρακτήρα που συνδύαζε τη χαρά της μάθησης με τις ερευνητικές αρετές έχει παίξει καθοριστικό ρόλο στην διάπλαση του χαρακτήρα μου αλλά και στην επιστημονική και κοινωνική εκπαίδευση μου. Ιδιαίτερα ο τρόπος που με βοήθησε να οργανώσω τη γνώση μου και να καλλιεργήσω το κριτικό μου πνεύμα με έμφαση σε ζητήματα Βιοχημείας είναι αξιοσημείωτος. Της οφείλω πολλά και την ευχαριστώ πολύ. Παράλληλα, η παρούσα εργασία αφιερώνεται και στην καθηγήτρια μου κ. Μαυρή και θα ήθελα να εκφράσω την αλληλεγγύη και το θαυμασμό μου για την επιστημονική και ηθική της προσφορά στο πρόσωπο μου. Είμαι σίγουρος ότι για πολλούς φοιτητές της, η κ. Μαυρή αποτελεί μια εξέχουσα επιστημονική προσωπικότητα, που κόσμησε με τις αρετές και τη δημοκρατική της δράση το δημόσιο ελληνικό πανεπιστήμιο. Με δίδαξε επιστημονικό και κοινωνικό ήθος σε όλα τα χρόνια μου σαν προπτυχιακός και εν συνεχεία μεταπτυχιακός φοιτητής. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα παλιά και νέα μέλη, του εργαστηρίου Βιοχημείας για την ανιδιοτελή βοήθεια τους προς εμένα. Τέλος η παρούσα εργασία μου αφιερώνεται στην κοπέλα μου και επίσης χημικό, Αλεξάνδρα Μπόνα! Ηταν δίπλα μου όποτε τη χρειάστηκα και πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει και να συζητήσει μαζί μου διάφορες απορίες, προβληματισμούς αλλά και σκέψεις που προέκυπταν κατά την εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ……...16

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ……17-25

1.1 Ιστορική αναδρομή 17

1.2 Το νευρικό σύστημα ……..18

1.2.1 Αγωγή σημάτων στο νευρικό σύστημα……....20

1.3 Μηχανισμός παθογένεσης της Σκλήρυνσης κατά Πλάκας……22

2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑΣ……26-32

2.1 Ιστορική αναδρομή……26

2.2 Ομοιότητες και διαφορές της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας με τη Σκλήρυνση κατά Πλάκας……27

2.3 Περιγραφή του μοντέλου της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας……..29

3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΗΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ.....33-54

3.1 Φωσφολιπάσες……...33

3.2 Η υπεροικογένεια των φωσφολιπασών A_2……34

3.3 Ο ρόλος των φωσφολιπασών A_2 στη φλεγμονώδη απόκριση……37

3.3.1 Μοντέλο Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας και φωσφολιπάσες A_2……38

3.4 Το μονοπάτι παραγωγής προσταγλανδίνων και ο μηχανισμός δράσης της κυκλοξυγενάσης……42

3.4.1 Ισομορφές της κυκλοξυγενάσης……44

3.5. Κυκλοξυγενάσες και φλεγμονώδης απόκριση στην Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα……...46

3.6 Μελέτη των υποστρωμάτων και των προϊόντων δράσης των ενζύμων της φλεγμονώδους απόκρισης με χρήση λιπιδωμικής……..…48

3.7 Σκοπός της ερευνητικής εργασίας……54

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ……..55-93

4.1 Απομόνωση RNA από ιστούς εγκεφάλου, πνευμόνων και ήπατος ποντικού ……55

4.2 Καθαρισμός ολικού RNA……..58

4.3 Μετατροπή του RNA σε cDNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση……....61

4.4 Σχεδιασμός εκκινητών για τα πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης……63

4.4.1 Η δημιουργία των ζευγαριών εκκινητών……..64

4.5 Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης σε δείγματα ιστών ποντικού……66

4.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης……...67

4.5.2 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης …….…69

4.5.3 Ηλεκτροφόρηση ενισχυμένων δειγμάτων cDNA των ιστών…..70

4.5.4 Βελτιωτικές τροποποιήσεις μέσω βαθμιδωτής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης……71

4.6 Έλεγχος ποιότητας των cDNA νωτιαίου μυελού ποντικού ……73

4.7 Πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο σε δείγματα πρότυπων αραιωμένων συγκεντρώσεων ολικού cDNA φυσιολογικών και ασθενών ποντικών με Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα……...77

4.8 Πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για τον προσδιορισμό των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων β2-μικροσφαιρίνης, υποξάνθινο-γουάνινο-ριβοσυλοτρανσφεράσης της

υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2, της COX-1 και της COX-2 σε δείγματα φυσιολογικών και ασθενών ποντικών……...81

4.9 Επεξεργασία δεδομένων……..….....87

4.10 Εκχύλιση λιπιδίων…….…….....90

4.11 Χρωματογραφική ανάλυση λιπιδίων…….……....92

5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ……...**94-134**

5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για όλα τα μέλη της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2 σε φυσιολογικούς ιστούς *Mus musculus* ……...95

5.2 Σχεδιασμός ζευγαριών εκκινητών…….....98

5.3 Βελτιωτικά πειράματα βαθμιδωτής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης……..103

5.4 Προσδιορισμός της σχετικής γονιδιακής έκφρασης των PLA_2 σε δείγματα νωτιαίου μυελού φυσιολογικών και ασθενών με Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα ποντικών με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο ……..109

5.5 Προσδιορισμός της σχετικής γονιδιακής έκφρασης των PLA_2 κατά την εξέλιξη της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας……..115

5.6 Προσδιορισμός της σχετικής γονιδιακής έκφρασης της COX-1 σε δείγματα νωτιαίου μυελού κατά την εξέλιξη της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας …...……..124

5.7 Προσδιορισμός της σχετικής γονιδιακής έκφρασης της COX-2 σε δείγματα νωτιαίου μυελού κατά την εξέλιξη της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας. ……..……..126

5.8 Λιπιδωμική ανάλυση πλάσματος, ήπατος, νωτιαίου μυελού και εγκεφάλου σε φυσιολογικούς ποντικούς ……130

6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΣΥΖΗΤΗΣΗ…….**135-137**

7. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ……...138

8. ΑΝΑΦΟΡΕΣ……140

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1 Κλίμακα κλινικής περιγραφής μοντέλου Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας

Πίνακας 3.1 Συστηματική κατάταξη της υπεροικογένειας των φωσφολιπασών A_2

Πίνακας 3.2 Αντιστοίχιση όρων υπεροικογένειας των φωσφολιπασών A_2

Πίνακας 4.1 Ποσότητες αντιδρώντων PCR

Πίνακας 4.2 Ποσότητες αντιδρώντων PCR, όπου στους εκκινητές R και F αντιστοιχούσαν τα δώδεκα ζευγάρια εκκινητών για την υπεροικογένεια των φωσφολιπασών A_2

Πίνακας 4.3 Δείγματα φυσιολογικών και ασθενών *Mus musculus*

Πίνακας 4.4 Πίνακας αντιδρώντων PCR γονιδίου αναφοράς B_2M

Πίνακας 4.5 Ποσότητες αντιδρώντων Real Time PCR για B_2M γονίδιο

Πίνακας 4.6 Ποσότητες αντιδρώντων Real Time PCR

Πίνακας 4.7 Ποσότητες αντιδρώντων Real Time-PCR για COX-1

Πίνακας 4.8 Ποσότητες αντιδρώντων Real-time PCR για COX-2

Πίνακας 5.1 Τα ζευγάρια των εκκινητών – μέρος πρώτο

Πίνακας 5.2 Τα ζευγάρια των εκκινητών – μέρος δεύτερο

Πίνακας 5.3 Αποτελεσματικότητες αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμερασών σε πραγματικό χρόνο

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1 Νευρώνες σε οπτικό μικροσκόπιο

Σχήμα 1.2 Σχηματική αναπαράσταση δομής του νευρώνα

Σχήμα 1.3 Διάδοση της νευρικής ώσης σε μυελινωμένους και απομυελινωμένους νευροάξονες

Σχήμα 1.4 Μηχανισμός Παθογένεσης της Σκλήρυνσης κατά Πλάκας

Σχήμα 2.1 Σχηματική αναπαράσταση της δομής της γλυκοπρωτεΐνης της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων (MOG) αποτελούμενης από δυο πανομοιότυπα μονομερή

Σχήμα 3.1 Κατηγοριοποίηση φωσφολιπασών με βάση τα σημεία υδρόλυσης

Σχήμα 3.2 Υδρόλυση που καταλύει η φωσφολιπάση A_2 όπου R1: λιπαρά οξέα, ή αλκύλιο, ή αλκένυλο ομάδες και R2: λιπαρά οξέα ή ακυλομάδες

Σχήμα 3.3 Εκκρινόμενη φωσφολιπάση $sPLA_2$ από δηλητήριο κόμπρας

Σχήμα 3.4 Φλεγμονώδη βιομόρια-παράγωγα του αραχιδονικού οξέος

Σχήμα 3.5 Μηχανισμός δράσης Κυκλοξυγενάσης (COX)

Σχήμα 3.6 Τρισδιάστατη δομή COX-1

Σχήμα 3.7 Τρισδιάστατη δομή COX-2

Σχήμα 3.8 Η λιπιδωμική αποτελεί ακμάζων παρακλάδι της μεταβολομικής

Σχήμα 3.19 Τάξεις φωσφολιπιδίων

Σχήμα 3.10 Χρωματογράφημα λιπιδίων στη ζύμη

Σχήμα 4.1 Οι δομικές διαφορές του DNA-RNA αποτελούν τη βιοχημική βάση του διαχωρισμού τους με εκχύλιση

Σχήμα 4.2 Σχεδιασμός εκκινητών με το Primer Blast (μέρος 1)

Σχήμα 4.3 Σχεδιασμός εκκινητών με το Primer Blast (μέρος 2)

Σχήμα 4.4 Σχεδιάγραμμα εργασίας

Σχήμα 4.5 Ενδεικτικό πρόγραμμα Real Time PCR για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης των PLA_2

Σχήμα 4.6 Διαγραμματική απεικόνιση real time PCR plate με PLA_2 εκκινητές

Σχήμα 4.7 Πρωτόκολλο Real Time PCR για COX-1

Σχήμα 4.8 Πρωτόκολλο Real Time PCR για COX-2

Σχήμα 4.9 Χρόνος έκλουσης από τη στήλη των διαφόρων λιπιδίων που ανακτήθηκαν στο ουδέτερο και οξινισμένο κλάσμα.

Σχήμα 5.1 Διάγραμμα πειραματικής ροής μελέτης Φωσφολιπασών A_2

Σχήμα 5.2 Διάγραμμα πειραματικής ροής μελέτης Κυκλοξυγενασών

Σχήμα 5.3 Αποτελέσματα καθαρισμού και ανάκτησης RNA εγκεφάλου από φυσιολογικό *Mus musculus* μετά από απομόνωση και κατεργασία με DNAse

Σχήμα 5.4 Αποτελέσματα καθαρισμού και ανάκτησης RNA ήπατος από φυσιολογικό *Mus musculus* μετά από απομόνωση και κατεργασία με DNAse

Σχήμα 5.5 Αποτελέσματα καθαρισμού και ανάκτησης RNA πνευμόνων και νεφρών από φυσιολογικό *Mus musculus* μετά από απομόνωση και κατεργασία με DNAse

Σχήμα 5.6 Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για τα γονίδια Pafah1b1 & Pafah1b2 σε φυσιολογικούς ιστούς Mus musculus

Σχήμα 5.7 Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για το γονίδιο Pla2g16 σε φυσιολογικούς ιστούς *Mus musculus*

Σχήμα 5.8 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ανίχνευσης γονιδίων υπεροικογένειας Φωσφολιπασών A_2 σε φυσιολογικούς ιστούς *Mus musculus* με πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Σχήμα 5.9 Αποτελέσματα gradient PCR, Pla2g1b

Σχήμα 5.10 Αποτελέσματα gradient PCR, Pla2g4a & Pla2g4c

Σχήμα 5.11 Αποτελέσματα gradient PCR, Pla2g6 & Pla2g7

Σχήμα *5.12* Αποτελέσματα gradient PCR, Pafah1b1 & Pafah1b2

Σχήμα 5.13 Αποτελέσματα gradient PCR, Pla2g15

Σχήμα 5.14 Αποτελέσματα gradient PCR, Pla2g16

Σχήμα 5.15 Αποτελέσματα gradient PCR, για Pla2g5 σε ενιαίο cDNA εγκεφάλου και πνεύμονα φυσιολογικού Mus musculus συγκεντρώσεως 40 ng/μL

Σχήμα 5.16 Διαγραμματική απεικόνιση πορείας και αποτελεσμάτων διπλών βελτιωτικών πειραμάτων βαθμιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Σχήμα 5.17 Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ελέγχου ποιότητας δειγμάτων νωτιαίου μυελού από φυσιολογικά και ασθενή με Π.Α.Ε *Mus musculus*, για γονίδιο αναφοράς β2-μικροσφαιρίνη

Σχήμα 5.18 Αποτελέσματα *RT-PCR για τα γονίδια Pla2g1b & Pla2g2e σε πρότυπες συγκεντρώσεις Α(* 50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0.4 ng/μL) νωτιαίου μυελού

Σχήμα 5.19 Αποτελέσματα RT-PCR για τα γονίδια Pla2g4c & Pla2g7 σε πρότυπες συγκεντρώσεις *Α(* 50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0,4 ng/μL) νωτιαίου μυελού

Σχήμα 5.20 Αποτελέσματα RT-PCR για τα γονίδια Pla2g6 & Pafah1b1 σε πρότυπες συγκεντρώσεις *Α(* 50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0.4 ng/μL) νωτιαίου μυελού

Σχήμα 5.21 Αποτελέσματα RT-PCR για τα γονίδια Pla2g16 & Pla2g15 σε πρότυπες συγκεντρώσεις *Α(* 50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0.4 ng/μL) νωτιαίου μυελού

Σχήμα 5.22 Αποτελέσματα RT-PCR για τα γονίδια Pla2g12a & Pla2g5 σε πρότυπες συγκεντρώσεις *Α(* 50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0.4 ng/μL) νωτιαίου μυελού

Σχήμα 5.23 Αποτελέσματα RT-PCR για τα γονίδια Pla2g4e & Pla2g12b σε πρότυπες συγκεντρώσεις *A(* 50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0.4 ng/μL) νωτιαίου μυελού

Σχήμα 5.24 Αποτελέσματα RT-PCR για τα γονίδια Pla2g3 & Pla2g4a σε πρότυπες συγκεντρώσεις *A(* 50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0.4 ng/μL) νωτιαίου μυελού

Σχήμα 5.25 Απολύτα επίπεδα έκφρασης B2M στην εξέλιξη της Π.Α.Ε.

Σχήμα 5.26 Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο της υποξάνθινο-γουάνινο-ριβοσυλοτρανσφεράσης (HPRT)

Σχήμα 5.27 Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g1b

Σχήμα 5.28 Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g3

Σχήμα 5.29 Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g4a

Σχήμα 5.30 Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g4c

Σχήμα 5.31 Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g4e

Σχήμα 5.32 Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g5

Σχήμα 5.33 Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g6

Σχήμα 5.34 Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pafah1b1

Σχήμα 5.35 Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g12a

Σχήμα 5.36 Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g15

Σχήμα 5.37 Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g16

Σχήμα 5.38 Διαγραμματική απεικόνιση σχετικής γονιδιακής έκφρασης των Pla2g1b, Pla2g3, Pla2g4a, Pla2g4c, Pla2g4e, Pla2g5

Σχήμα 5.39 Διαγραμματική απεικόνιση σχετικής γονιδιακής έκφρασης των Pla2g6, Pla2g7, Pafah1b1, Pla2g12a, Pla2g15, Pla2g16

Σχήμα 5.40 Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για προσδιορισμό της σχετικής γονιδιακής έκφρασης της COX-1

Σχήμα 5.41 Αποτελέσματα RT-PCR, COX-1

Σχήμα 5.42 Διαγραμματική απεικόνιση σχετικής γονιδιακής έκφρασης της COX-1

Σχήμα 5.43 Αποτελέσματα συμβατικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για το γονίδιο β2-μικροσφαιρίνη σε cDNA μακροφάγων, επεξεργασμένων με LPS

Σχήμα 5.44 Αποτελέσματα βαθμιδωτής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την COX-2

Σχήμα 5.45 Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για προσδιορισμό της σχετικής γονιδιακής έκφρασης της COX-2

Σχήμα 5.46 Αποτελέσματα RT-PCR, COX-2

Σχήμα 5.47 Διαγραμματική απεικόνιση σχετικής γονιδιακής έκφρασης της COX-2

Σχήμα 5.48 Ποσοστιαία κατανομή φωσφολιπιδίων, γλυκερολιπιδίων και σφιγγομυελίνης σε ιστούς φυσιολογικών ποντικών

Σχήμα 5.49 Ποσοστιαία κατανομή λυσοφωσφολιπιδίων σε ιστούς φυσιολογικών ποντικών

Σχήμα 5.50 Σύγκριση επιπέδων φωσφολιπιδίων, γλυκερολιπιδίων και σφιγγολιπιδίων ανάμεσα σε ιστούς εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού, φυσιολογικών ποντικών

Σχήμα 5.51 Συγκριτικό διάγραμμα ποσοστιαίων επιπέδων των τεσσάρων λιπιδικών τάξεων ανάμεσα σε διαφορετικούς φυσιολογικούς ιστούς ποντικών

Σχήμα 5.52 Heat Map λιπιδωμικού προφίλ εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού φυσιολογικών ποντικών

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία μου εκπονήθηκε από τον Οκτώβριο του 2014 έως και τον Αύγουστο του 2015 στο τμήμα Μοριακής Ογκολογίας του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», στο εργαστήριο του Ερευνητή Α' δρ. Γεωργίου Παναγιώτου, σε συνεργασία με το εργαστήριο Μοριακής Παθοφυσιολογίας, του Ερευνητή Α' δρ. Βασιλείου Αϊδίνη, του τμήματος Ανοσολογίας του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ».

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ

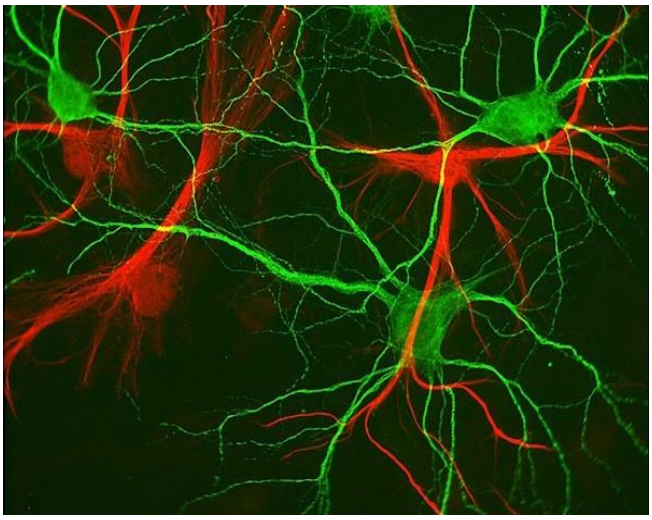
1.1 Ιστορική αναδρομή

Τα κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά της Σκλήρυνσης κατά Πλάκας (Σ.Κ.Π.) ήταν πλήρως περιγραμμένα στη Γαλλία και στη συνέχεια στην Αγγλία κατά το δεύτερο ήμισυ του δέκατου ένατου αιώνα, ωστόσο οι κλινικές περιγραφές, όπως και οι απεικονίσεις των συμπτωμάτων της νόσου, είχαν εμφανιστεί σε διάφορες στιγμές κατά τα προηγούμενα πενήντα χρόνια [1]. Συγκεκριμένα, ο εγγονός του Βασιλιά Γεωργίου του ΙΙΙ της Αγγλίας περιέγραφε τα συμπτώματα του σε ένα ημερολόγιο που κρατούσε μέχρι το θάνατο το 1848 για περισσότερο από είκοσι χρόνια. Η ασθένεια περιγράφηκε με τον πληρέστερο για την εποχή κλινικό τρόπο από τον Charcot, το 1868, ο οποίος μάλιστα περιέγραψε 38 περιπτώσεις. Η περιγραφή της εμφάνισης φλεγμονής και της απομυελίνωσης που λαμβάνει χώρα στους άξονες των νευρικών κυττάρων και αποτελεί χαρακτηριστικό της νόσου παρατηρήθηκε μέσω χρήσης οπτικού μικροσκοπίου από τον Dawson το 1916. Στη συνέχεια, το 1947, ο David Kalbat του Πανεπιστήμιου της Κολούμπια διαπίστωσε ότι οι άνθρωποι με Σ.Κ.Π. είχαν ασυνήθιστα, χαρακτηριστικά υποπροϊόντα πρωτεΐνης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό τους, ανοίγοντας έτσι το δρόμο για τις τεχνικές διάγνωσης της νόσου η οποία, το 1960, αναγνωρίστηκε ως αυτοάνοσο νόσημα. Το 1979 και 1981 οι ερευνητές Smith, Blakemore και McDonald έδειξαν το ρόλο της μυελίνης στην εκδήλωση της ασθένειας, καθώς πετύχαν μέσω επαναμυελίνωσης την αποκατάσταση της αγωγιμότητας σε νευρικά κύτταρα γάτας.

1.2 Το Νευρικό σύστημα

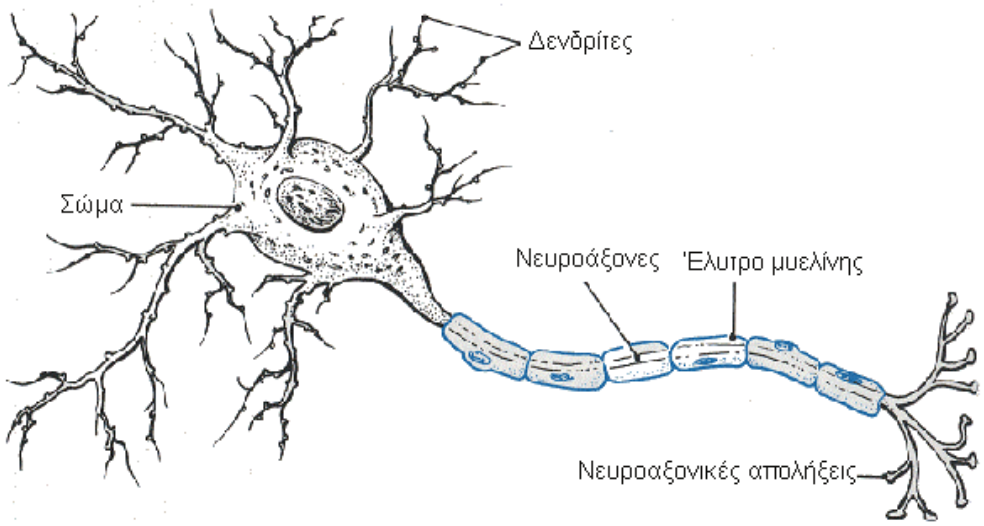
Η Σ.Κ.Π. κατηγοριοποιείται στις λεγόμενες απομυελινωτικές ασθένειες που χαρακτηρίζονται από δύο κοινά και ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, τα οποία είναι η δημιουργία φλεγμονώδους απόκρισης και η επιλεκτική καταστροφή του ελύτρου της μυελίνης των νευροαξόνων. Το σύνολο του νευρικού συστήματος απαρτίζεται από το κεντρικό νευρικό σύστημα που αποτελείται από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό και το περιφερικό νευρικό σύστημα που αποτελείται από τις διακλαδώσεις των νευρών και συνδέει το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Κ.Ν.Σ.) με τα διάφορα όργανα και τους μυς. Αυτό το ολοκληρωμένο σύστημα αποτελεί το δίκτυο με βάση το οποίο διαδίδονται νευρικές ώσεις, οι οποίες ξεκινούν από τον εγκέφαλο, «ταξιδεύουν» στο νωτιαίο μυελό και διαμέσου του περιφερικού νευρικού συστήματος διαδίδονται στα υπόλοιπα μέρη του ανθρώπινου σώματος.

Η διάχυση πολλών χημικών ενώσεων ανάμεσα στο αίμα και στο κεντρικό νευρικό σύστημα περιορίζεται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ο οποίος σχηματίζεται από τους στενοσυνδέσμους μεταξύ των ενδοεπιθηλιακών κυττάρων και των τριχοειδών αγγείων. Από κυτταρική σκοπιά, ο νευρικός ιστός αποτελείται από νευρώνες (σχήμα 1.1), καθώς και νευρογλοιακά κύτταρα. Οι νευρώνες είναι τα υπεύθυνα κύτταρα για την επικοινωνία των σημάτων μεταδίδοντας τις νευρικές ώσεις (τα ενεργά δυναμικά) επιτελώντας έτσι τον κύριο ρόλο τους νευρικού ιστού.



Σχήμα 1.1 *Νευρώνες σε οπτικό μικροσκόπιο* [2]

Τα νευρογλοιακά κύτταρα υποβοηθούν αυτή τη λειτουργία αφενός με το να προστατεύουν τα νευρικά κύτταρα και αφετέρου με το να διευκολύνουν τις νευρικές ώσεις. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα κύτταρα Schwann του περιφερικού νευρικού συστήματος και τα αστροκύτταρα και τα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα του Κ.Ν.Σ. Το σημαντικότερο κύτταρο όσον αφορά την επίδραση της Σ.Κ.Π., το οποίο αποτελεί τον κύριο στόχο της νόσου, είναι ο νευρώνας.



Σχήμα 1.2 *Σχηματική αναπαράσταση δομής του νευρώνα* [3]

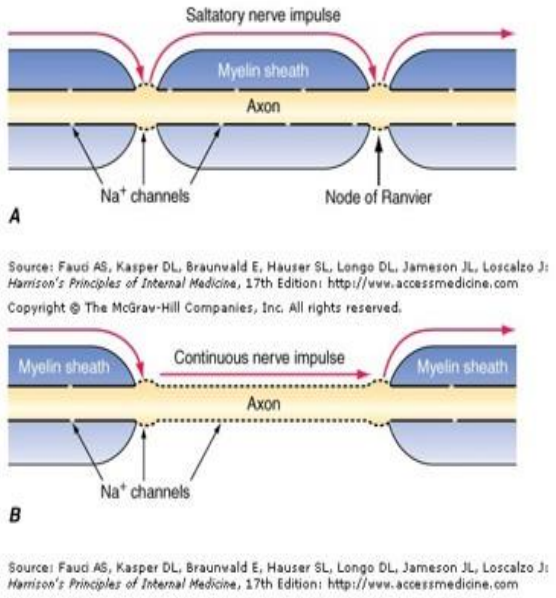
Ο νευρώνας αποτελείται από το κυτταρικό σώμα, με συνδεδεμένο έναν ή περισσότερους δενδρίτες και τον νευροάξονα (σχήμα 1.2). Το κυτταρικό σώμα περιέχει τον πυρήνα και τον πυρηνίσκο του κυττάρου καθώς και τα σωμάτια Nissl που είναι στιβάδες ενδοπλασματικού δικτύου και υπεύθυνα για την πρωτεϊνοσύνθεση στο κύτταρο. Επίσης δεσπόζει η παρουσία μιας συσκευής Golgi, η οποία συσκευάζει υλικά σε κυστίδια προκειμένου να μεταφερθούν σε άλλα τμήματα του κυττάρου. Συναντώνται επίσης μιτοχόνδρια, κυλινδροειδείς δομές μικροσωληνίσκων τουμπουλίνης και νευρικά νημάτια. Προεκτάσεις του κυτταρικού σώματος αποτελούν οι δενδρίτες οι οποίοι καταλαμβάνουν ο μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας των νευρώνων. Οι δενδρίτες που βρίσκονται κοντά στο κυτταρικό σώμα περιέχουν και αυτοί σωμάτια Nissl και ένα τμήμα της συσκευής Golgi, ωστόσο τα βασικά κοινά

δομικά συστατικά σε όλους είναι οι μικροσωληνίσκοι τουμπουλίνης και τα νευρικά νημάτια. Τέλος, ο νευροάξονας αποτελεί μια σχηματισμένη δομική προέκταση του κυτταρικού σώματος, η οποία δεν διαθέτει ούτε κοκκώδες ενδοπλασματικό δίκτυο (σωμάτια Nissl), ούτε συσκευή Golgi. Αντίθετα περιέχει τμήμα του λείου ενδοπλασματικού δικτύου και κυτταρικό σκελετό. Το μήκος των νευροαξόνων μπορεί να είναι είτε μικρό, όπως και οι δενδρίτες, να απολήγει κοντά στο σώμα, είτε μεγάλο, όπου οι νευροάξονες μπορούν να εκτείνονται μέχρι ένα μέτρο ή περισσότερο. Οι νευροάξονες μπορούν να περιβάλλονται από ένα έλυτρο μυελίνης ή να είναι «γυμνοί». Στο περιφερικό νευρικό σύστημα, οι νευροάξονες περιβάλλονται από κύτταρα Schwann τα οποία μέσω περιελίξεων της κυτταρικής τους μεμβράνης σχηματίζουν το έλυτρο της μυελίνης. Η μυελίνη έχει λιπόφιλο χαρακτήρα και η χαμηλή της διηλεκτρική σταθερά της προσδίδει ιδιότητα μονωτή. Οι αμυελίνωτοι νευροάξονες βρίσκονται εγκλεισμένοι μέσα στα κύτταρα Schwann. Στο Κ.Ν.Σ. οι μυελινωμένοι νευροάξονες περιβάλλονται από τα ολιγοδενδρογλοιακά κύτταρα, τα οποία επίσης σχηματίζουν το έλυτρο μυελίνης, ενώ οι υπόλοιποι είναι εντελώς γυμνοί. Και στις δύο περιπτώσεις σχηματισμού του ελύτρου, τα κενά πλευρικά διαστήματα του ελύτρου που παρατηρούνται κάθε ένα με δύο χιλιοστά, ονομάζονται κόμβοι Ranvier [4].

1.2.1 Αγωγή σημάτων στο νευρικό σύστημα

Το νευρικό σύστημα για τη λειτουργία του βασίζεται στην μεταγωγή σημάτων ως συνέπεια των ερεθισμάτων που δέχεται ο ζωντανός οργανισμός από το περιβάλλον του. **Η φύση όλων αυτών των σημάτων είναι κοινή γιατί πρόκειται για ηλεκτρικές ώσεις** [5]**.** Υπό κανονικές συνθήκες οι ηλεκτρικές νευρικές ώσεις ταξιδεύουν κατά μήκος των μυελινωμένων αξόνων των διάφορων νευρικών κυττάρων. Η ταχύτητα διαβίβασης των πληροφοριών εξαρτάται από την ταχύτητα αγωγής του νευροάξονα. Με τη σειρά της η ταχύτητα αγωγής του νευροάξονα εξαρτάται από το αν είναι αμύελος ή εμμύελος. Το έλυτρο μυελίνης μεταβάλλει τις ηλεκτρικές ιδιότητες της νευρικής ίνας και προκαλεί μεγάλη αύξηση της ταχύτητας αγωγής της. Η περιτυλιγμένη από μυελίνη μεμβράνη έχει πολύ μικρότερη ηλεκτρική χωρητικότητα από τη γυμνή νευραξονική μεμβράνη με αποτέλεσμα τα τοπικά ρεύματα να μπορούν

να εκπολώνουν ταχύτερα τη μεμβράνη, καθώς άγεται το σήμα. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 1.3, η διάδοση του σήματος στους **μυελινωμένους** άξονες συμβαίνει με ένα **πηδητικό** τρόπο, με την νευρική ώση να διαδίδεται από έναν κόμβο του Ranvier στον επόμενο χωρίς αποπόλωση της μεμβράνης των νευροαξόνων που αποτελούν το έλυτρο μυελίνης μεταξύ των κόμβων. Αυτό παράγει σημαντικά μεγαλύτερες ταχύτητες αγωγής (~ 70 m/s) σε σχέση με αυτές που παράγονται από απομυελινωμένα νεύρα (1 m/s). Στη Σ.Κ.Π. αυτός ο τρόπος διάδοσης παρεμποδίζεται διότι το **νευρικό ερέθισμα δεν είναι σε θέση να διασχίσει τον άξονα των νευρικών κυττάρων λόγω της απομυελίνωσης** που αυτά έχουν υποστεί. Η μεμβράνη του άξονα των νευρικών κυττάρων, στο σημείο το οποίο εκτίθεται, υπερπολώνεται λόγω της δράσης των εξαρτώμενων από δυναμικό διαύλων ιόντων νατρίου- καλίου που συνήθως βρίσκονται κάτω από το έλυτρο της μυελίνης. Μια προσωρινή αναστολή αγωγιμότητας συχνά προκύπτει ύστερα από ένα απομυελινωτικό συμβάν, έως ότου οι δίαυλοι νατρίου-καλίου αναδιανεμηθούν κατά μήκος του γυμνού νευροάξονα. Η αναδιανομή αυτή επιτρέπει ξανά τη διάδοση του δυναμικού της νευρικής ώσης κατά μήκος των αξόνων. Σε πολλές περιπτώσεις η διάδοση των σημάτων επιβραδύνεται με αποτέλεσμα το νευρικό σύστημα να μην λειτουργεί ικανοποιητικά και να δημιουργούνται στον ασθενή κινητικά προβλήματα [5].

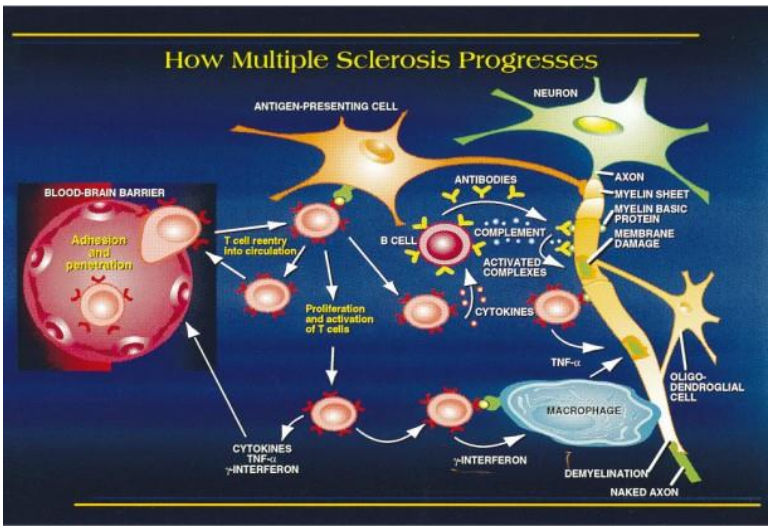


Σχήμα 1.3 *Διάδοση της νευρικής ώσης σε μυελινωμένους και απομυελινωμένους νευροάξονες* [5]

1.3 Μηχανισμός παθογένεσης της Σκλήρυνσης κατά Πλάκας

Το ανοσολογικό σύστημα διακρίνεται στο εγγενές και στο επίκτητο. Το πρώτο αποτελείται κυρίως από φαγοκύτταρα και το δεύτερο από Τ και Β-λεμφοκύτταρα. Το αντιγόνο συνδέεται στους αντιγονικούς υποδοχείς των Β-λεμφοκυττάρων και προκαλεί τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Β-κυττάρων σε πλασματοκύτταρα. Στη συνέχεια αυτά με τη σειρά τους παράγουν αντισώματα υψηλής συγγένειας. Οι δύο κύριοι υποπληθυσμοί των Τ-λεμφοκυττάρων είναι τα **CD4+ βοηθητικά κύτταρα**, τα οποία ενεργοποιούν το εγγενές ανοσολογικό σύστημα και τα Β-λεμφοκύτταρα μέσω κυτοκινών και τα **CD8+ κυτταροτοξικά κύτταρα**, τα οποία θανατώνουν τα προσβεβλημένα από ιούς κύτταρα. Στην έναρξη της αυτοάνοσης απομυελίνωσης συνεισφέρουν τα CD4+ βοηθητικά κύτταρα [6].

Η επικρατούσα άποψη για τη Σ.Κ.Π., όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι ότι αποτελεί μια αυτοάνοση νόσο κατά την οποία τα Τ-λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στο κυκλοφορικό σύστημα αναγνωρίζουν ως στόχο τους το έλυτρο της μυελίνης των νευροαξόνων. Τα CD4+ βοηθητικά κύτταρα του κυκλοφοριακού εκκρίνουν κυτοκίνες και ενεργοποιούν άλλα Τ-λεμφοκύτταρα, Β-λεμφοκύτταρα και μακροφάγα. Τα Β-λεμφοκύτταρα ενδέχεται να επιδεινώνουν τη βαρύτητα της νόσου, δεν απαιτούνται όμως για την έναρξη ή την διατήρηση της [7]. Στη συνέχεια με τη βοήθεια μορίων προσκόλλησης, όπως το όψιμο αντιγόνο-4, τα Τ-λεμφοκύτταρα διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.



Σχήμα 1.4 *Μηχανισμός Παθογένεσης της Σκλήρυνσης κατά Πλάκας* [7]

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι ένα σύνθετο κυτταρικό διαμέρισμα που διαχωρίζει το κυκλοφορικό σύστημα από το κεντρικό νευρικό σύστημα, επιτρέποντας την επιλεκτική ανταλλαγή μορίων και κυττάρων ανάμεσα στα δύο συστήματα. Επιφανειακά μεγαλύτερος για ανταλλαγή είναι ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός που διαχωρίζει το κυκλοφορικό από τον εγκέφαλο, συναντάται όμως μικρότερης έκτασης φραγμός ανάμεσα στο κυκλοφορικό σύστημα και το νωτιαίο μυελό [8]. Μόλις τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα περάσουν, εξακολουθούν να πρέπει να διεισδύσουν μέσα από ένα φραγμό του εξωκυττάριου χώρου που αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV. Το εμπόδιο αυτό υπερβαίνεται χάρη στις μεταλλοπρωτεάσες μήτρας οι οποίες επιτρέπουν στα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα να αποκτήσουν πρόσβαση στην λευκή ουσία που περιβάλλει τους νευροάξονες και επομένως να εισέρθουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Εκεί διεγείρονται από τα αντιγόνα της μυελίνης που παρουσιάζονται από τοπικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα APC. Ακολουθεί η διαφοροποίηση τους σε βοηθητικά Τ-κύτταρα τύπου 1 TH1 και η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, της ιντερφερόνης γ και του TNFα (σχήμα 1.4). Αυτοί οι παράγοντες σε συνδυασμό με τα ενεργοποιημένα Β-λεμφοκύτταρα, τα κυτταροτοξικά CD8+ Τ-λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα οδηγούν στη φλεγμονώδη απομυελίνωση του ελύτρου της μυελίνης που καλύπτει σημεία των νευροαξόνων των νευρικών κυττάρων [9].

Στο πρώιμο στάδιο της νόσου οι χρονικές περίοδοι απομυελίνωσης των νευροαξόνων ακολουθούνται από περιόδους ύφεσης της ασθένειας με δημιουργία νέων βλαβών ή υποτροπή των προηγούμενων στη λευκή ουσία του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού [10]. Αυτή η υποτροπιάζουσα και διαλείπουσα φάση συχνά ακολουθείται από μια φάση συνεχούς εξέλιξης της νόσου. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου οι ασθενείς δεν εμφανίζουν μια τέτοια εξέλιξη της ασθένειας αλλά, αντίθετα, μια συνεχόμενη προοδευτική εξέλιξη της νόσου. Ενώ οι θεραπείες είναι αρκετά αποτελεσματικές στο στάδιο της υποτροπιάζουσας και διαλείπουσας φάσης, στη φάση προοδευτικής εξέλιξης της ασθένειας λαμβάνει χώρα μόνο θεραπεία των συμπτωμάτων και φυσικοθεραπεία των ασθενών. Η κυριότερη αιτία για την απουσία αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων είναι η έλλειψη κατάλληλων πειραματικών μοντέλων. **Η κατανόηση της ακριβούς σχέσης ανάμεσα στην**

φλεγμονώδη απόκριση και τον νευροεκφυλισμό είναι καθοριστικής σημασίας για το μέλλον των θεραπευτικών προσεγγίσεων έναντι της ασθένειας, καθώς είναι πιθανή η ύπαρξη και άλλων νευροεκφυλιστικών παραγόντων πέραν της φλεγμονής που συμβάλλουν στα συμπτώματα αυτής.

Η φλεγμονώδης απόκριση συνδέεται με την καταστροφή των νευροαξόνων σε όλες τις φάσεις της ασθένειας [11]. Τα κυτταροτοξικά CD8+ Τ-λεμφοκύτταρα είναι αυτά τα οποία υπάρχουν σε μεγαλύτερο αριθμό σε σχέση με τα Β κύτταρα ή τα πλασματοκύτταρα, ενώ στη φλεγμονή και το νευροεκφυλισμό συμβάλλουν και τα ενεργοποιημένα μακρογλοιακά κύτταρα, τα οποία είναι δενδριτικά αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα με χαμηλό επίπεδο φαγοκυτταρικής δραστηριότητας. Ιδιαίτερα στην προοδευτική φάση εξέλιξης της ασθένειας δύναται να συμβάλλουν και άλλοι παράγοντες, όπως η λειτουργική εξασθένιση των νευρώνων, η έλλειψη τροφικής υποστήριξης, η χρόνια ενεργοποίηση των μικρογλοίων και η διαφοροποιημένη έκφραση και δράση των διαύλων ιόντων στους απομυελινωμένους άξονες [12]. Παράλληλα, μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες επαγόμενες από συνθήκες οξειδωτικού στρες συνδέονται με βασικά παθολογικά χαρακτηριστικά της Σ.Κ.Π., όπως η απόπτωση των ολιγοδενδροκυττάρων, η εν γένει απομυελίνωση, η καταστροφή των λεπτότερων νευροαξόνων και η μειωμένη ή απούσα επαναμυελίνωση των νευροαξόνων. Ειδικότερα, οι νευροάξονες καταστρέφονται μέσω ενεργειακής ανεπάρκειας, η οποία προκαλείται από διατάραξη της ιοντικής ισορροπίας λόγω συσσώρευσης ιόντων Ca^{2+} που οδηγεί σε διατάραξη της διάδοσης της νευρικής ώσης και σε νευροεκφυλισμό. Υπό συνθήκες ενεργειακής ελλείψεως, που εκφράζεται σε μείωση των επιπέδων του ATP και μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών, η εξαρτώμενη από ATP αντλία νατρίου-καλίου δεν απομακρύνει τα ιόντα Na^{+} που εισέρχονται στους νευροάξονες κατά τη διάδοση μια νευρικής ώσης, με αποτέλεσμα αυτά να συσσωρεύονται σε αυτούς. Στη συνέχεια τα ιόντα Na^{+} αντικαθίστανται από ιόντα Ca^{2+}, μέσω αντίστροφης λειτουργίας της αντλίας νατρίου-ασβεστίου. Παράλληλα, μέσω υποδοχέων γλουταμινικού και τασεοελεγχόμενων διαύλων Ca^{2+} εισέρχονται ακόμα περισσότερα ιόντα Ca^{2+}, ιδιαίτερα σε θέσεις όπου λόγω απομυελίνωσης έχει διαταραχθεί η διάδοση της νευρικής ώσης μέσω των

νευροαξόνων. Τα αυξημένα επίπεδα ιόντων Ca^{2+} ενεργοποιούν την καλπαΐνη, η οποία είναι μια πρωτεάση που αποδομεί τις ενδο-αξονικές πρωτεΐνες αλλά και της πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού των νευρικών κυττάρων που είναι κρίσιμες για την γρήγορη αξονική μεταφορά των νευρικών ώσεων. Αυτή η δυσαρμονία στη μεταγωγή των νευρικών ώσεων δημιουργεί πληθώρα συμπτωμάτων στους ασθενείς, δυσχεραίνοντας την καθημερινή τους ζωή. Συχνά, τα χαρακτηριστικά αυτά από ένα σημείο και μετά γίνονται μόνιμα και δε σχετίζονται με την ένταση της επίθεσης του ανοσολογικού συστήματος, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου η εξέλιξη της ασθένειας είναι προοδευτική [12].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑΣ

Η Σ.Κ.Π., όπως ήδη αναφέρθηκε είναι μια ασθένεια με μεγάλη ετερογένεια. Έτσι, για τη μελέτη της ασθένειας δεν υπάρχει ένα μοναδικό καθολικό μοντέλο, αλλά μια πληθώρα μοντέλων που προσομοιάζουν όψεις ή τους διαφορετικούς τύπους της. Ανάμεσα σε αυτά ίσως τα πιο μελετημένα είναι τα μοντέλα της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας (Π.Α.Ε.), η οποία αποτελεί ένα όρο «ομπρέλα» πολλών διαφορετικών πειραματικών μοντέλων σε ποντίκια, αρουραίους, ινδικά χοιρίδια κλπ [13].

2.1 Ιστορική αναδρομή

Το 1947 επιτεύχθηκε η πρώτη επαγωγή Π.Α.Ε. με χρήση εμβολίου γαλακτώματος ολόκληρου εγκεφάλου αναμιγμένου με ανοσοενισχυτικές ουσίες σε *Rhesus monkey* και στη συνέχεια η τεχνική, το 1949, επεκτάθηκε και σε πειραματόζωα *Mus musculus.* Από τις αρχικές εκείνες μελέτες το μοντέλο Π.Α.Ε. επεκτάθηκε και σε πληθώρα άλλων οργανισμών, τα κλινικά χαρακτηριστικά των οποίων διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Παραταύτα σήμερα το μοντέλο Π.Α.Ε. αποτελεί το καλύτερα χαρακτηρισμένο ζωικό μοντέλο μελέτης αυτοάνοσων ανθρώπινων νοσημάτων, ιδιαίτερα για την περίπτωση της Σ.Κ.Π., καθώς έχει παίξει σημαντικό ρόλο στον εντοπισμό πτυχών της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος και στη μελέτη ανοσο-εξαρτώμενων βλαβών σε ιστούς [14]. Ιδιαίτερα στην Σ.Κ.Π. , έχει αποτελέσει την πειραματική βάση για την ανάπτυξη τριών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Με βάση τα παραπάνω, το μοντέλο Π.Α.Ε. σε ποντικούς (*Mus musculus*), ήταν το ιδανικό μοντέλο για την παρούσα εργασία που στόχο είχε τη μελέτη ενζύμων που εμπλέκονταν σε βιοσυνθετικές πορείες σημαντικών πρόδρομων ενώσεων αλλά και μορίων της φλεγμονώδους απόκρισης.

2.2 Ομοιότητες και διαφορές της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας με τη Σκλήρυνση κατά Πλάκας

Οι λόγοι που προτιμάται ως μοντέλο η Π.Α.Ε. είναι οι ομοιότητες που παρουσιάζει με τους μηχανισμούς της Σ.Κ.Π., σημαντικότερες εκ των οποίων είναι [15]:

- Η ύπαρξη σημαντικών κοινών χαρακτηριστικών όπως είναι η καταστροφή των ελύτρων μυελίνης των νευροαξόνων και η σχετική διάσωση άλλων στοιχείων του νευρικού ιστού όπως για παράδειγμα, τα νευρικά κύτταρα ή οι κυλινδρικοί άξονες. Επίσης η παρουσία πολλαπλών βλαβών του Κ.Ν.Σ. σε διάφορες θέσεις και χρονικές στιγμές με κυρίαρχα μέρη τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό, όπως συμβαίνει και με τη Σ.Κ.Π. Είναι γεγονός ότι το μοντέλο Π.Α.Ε. έχει δώσει τη δυνατότητα στους ερευνητές να μελετήσουν τη σύνδεση της φλεγμονώδους απόκρισης και ιδιαίτερα το ρόλο των Τ-λεμφοκυττάρων στην καταστροφή του έλυτρου της μυελίνης των νευροαξόνων.
- Η πορεία δημιουργίας των βλαβών στο πειραματόζωο, η οποία ακολουθεί μια κοινή διαδρομή στην εξέλιξη της, δηλαδή από την ανάπτυξη φλεγμονώδους απόκρισης στην απομυελίνωση και εν συνεχεία στη γλειομάτωση των νευροαξόνων και τη μερική επαναμυελίνωση. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει το σημαντικό ρόλο της ανοσοαπόκρισης στο σχηματισμό των βλαβών, φαινόμενο που με διαφορετικές αφετηρίες συναντάται και στις δύο ασθένειες.
- Τόσο η Π.Α.Ε., όσο και η Σ.Κ.Π. εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια. Αποκρίνονται σε διαφορετικό βαθμό ανάλογα με το αυτοαντιγόνο που προκαλεί την ανοσοαπόκριση, το είδος του οργανισμού και το γενετικό του προφίλ. Επιπρόσθετα η Π.Α.Ε. επάγεται από την πολύπλοκη αλληλεπίδραση πολλών ανοσολογικών μηχανισμών και είναι εμφανές ότι και η Σ.Κ.Π. εμφανίζει αντίστοιχη πολυπλοκότητα. Έτσι, εκτός από τα Τ και Β-λεμφοκύτταρα, πιο πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν εμπλοκή και των μακροφάγων αλλά και τον υποδοχέων Toll TLRs που συναντώνται στις μεμβράνες των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων.

Εκτός όμως από τις παραπάνω ομοιότητες υπάρχει και μια σειρά σημαντικών διαφορών, οι οποίες είναι:

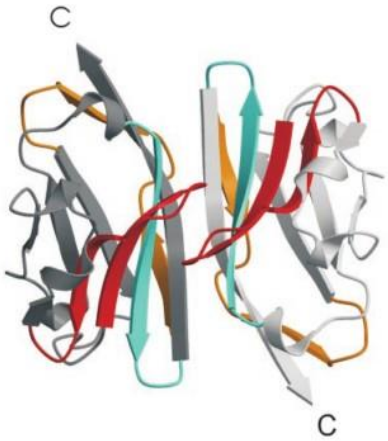
- Η προέλευση της ασθένειας. Συγκεκριμένα, η Σ.Κ.Π. είναι μια αυτοάνοση μεν αλλά αυθόρμητη ασθένεια, ενώ η Π.Α.Ε. επάγεται από ενεργή ευαισθητοποίηση με χρήση αντιγόνων προερχόμενων από τον εγκέφαλο. Η συγκεκριμένη διαφορά επιχειρείται να ξεπεραστεί με τη χρήση διαγονιδιακών προσεγγίσεων στην δημιουργία πειραματικών μοντέλων, κυρίως σε *Mus musculus.*
- Από τεχνικής σκοπιάς στα περισσότερα πρωτόκολλα επαγωγής Π.Α.Ε. σε πειραματόζωα χρειάζεται η χρήση ισχυρών ανοσοενισχυτικών εκδοχών ενώ στην Σ.Κ.Π. αυτό δεν είναι απαραίτητο για την έναρξη της νόσου.
- Επίσης για πρακτικούς λόγους και χάριν βέλτιστων όρων επαναληψιμότητας τα μοντέλα Π.Α.Ε. μελετώνται κυρίως σε γενετικά ομοιογενή πειραματόζωα. Έτσι, κάθε αυτοτελές πειραματικό μοντέλο Π.Α.Ε. αποτυγχάνει σε μεγάλο βαθμό να προσεγγίσει την γενετική ετερογένεια της Σ.Κ.Π.
- Οι περιορισμοί που προκύπτουν από τη διαφορά πειραματικού ζωικού μοντέλου και ανθρώπινου οργανισμού. Για αυτό και πολλές θεραπείες που αναπτύχθηκαν με βάση το πειραματικό μοντέλο της Π.Α.Ε. σε ανθρώπους έδρασαν με τρόπο που δεν μπορούσε να προβλεφθεί μέσα από τα πειραματικά μοντέλα και δημιούργησαν επιπλοκές [14], [15].

Από την πληθώρα των πειραματικών μοντέλων, που υπάρχουν σήμερα, το καθένα εμφανίζει τα δικά του συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με όψεις των συνολικών χαρακτηριστικών της Σ.Κ.Π. Όσο όμως οι πειραματικές τεχνικές βελτιώνονται και οι διαγονιδιακές προσεγγίσεις δημιουργίας μοντέλων αυξάνονται, προστίθενται περισσότερα νέα δεδομένα που μπορούν, με συνδυαστική χρήση πειραματικών μοντέλων να οδηγήσουν σε πληρέστερες ερμηνείες των αιτίων και των μηχανισμών της Σ.Κ.Π.

2.3 Περιγραφή του μοντέλου Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας

Ως γνωστόν η Π.Α.Ε. επάγεται από ανοσοποίηση με αυτο-αντιγόνα προερχόμενα από συστατικά της μυελίνης του Κ.Ν.Σ., όπως η μυελινώδης βασική πρωτεΐνη MBP, η πρωτεολιπιδική πρωτεΐνη PLP, η σχετιζόμενη με τη μυελίνη γλυκοπρωτεΐνη MAG ή η γλυκοπρωτεΐνη της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων MOG [16]. Από την πληθώρα μοντέλων Π.Α.Ε. για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ποντικοί *Mus musculus* σειράς C57BL/6 στα οποία η επαγωγή της νόσου πραγματοποιήθηκε με χορήγηση πεπτιδίου που αντιστοιχεί στον επίτοπο MOG_{35-55}, που αποτελεί τμήμα της MOG [16].

Η MOG είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί το 0.5% του ελύτρου μυελίνης και συγκεκριμένα μια τύπου 1 διαμεμβρανική πρωτεΐνη που αντιστοιχεί στο 1% των συνολικών πρωτεϊνών του Κ.Ν.Σ [17]. Εκφράζεται μόνο στα θηλαστικά και έχει μοριακό βάρος 54 kDa. Αποτελείται από ένα διμερές δύο όμοιων υπομονάδων, ενώ η δομή του κάθε μονομερούς αποτελείται από β- πτυχωτές επιφάνειες συνδεόμενες με θηλιές ενώ υπάρχει και ένας δισουλφιδικός δεσμός σχηματιζόμενος ανάμεσα σε δύο β-πτυχώσεις[17].



Σχήμα 2.1 *Σχηματική αναπαράσταση της δομής της γλυκοπρωτεΐνης της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων (MOG) αποτελούμενης από δυο πανομοιότυπα μονομερή* [17]

Οι λειτουργίες αυτής της πρωτεΐνης δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως. Είναι πιθανό ότι αποτελεί ένα διαμεμβρανικό κυτταρικό υποδοχέα του μυελινώδους ελύτρου που συνδέεται με διάφορα υποκυτταρικά σωματίδια του

νευρικού συστήματος (πχ μικροσωληνίσκους μυελίνης). Μια δεύτερη ερμηνεία είναι ότι είναι ρυθμιστής της σταθερότητας των μικροσωληνίσκων των ολιγοδενδρογλοιακών κυττάρων. Τέλος, εικάζεται ότι λειτουργικά αποτελεί ένα μεσολαβητή των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στη μυελίνη και το ανοσοποιητικό σύστημα, και συγκεκριμένα της δράσης του συμπληρώματος [18].

Η επαγόμενη Π.Α.Ε. του συγκεκριμένου μοντέλου αποτελείται από δύο φάσεις, την επαγωγική και την ενεργή. Η επαγωγική φάση της ασθένειας περιλαμβάνει την αναγνώριση του επιτόπου MOG_{35-55} από τα εξειδικευμένα CD4+ βοηθητικά κύτταρα, ακολουθούμενη από ανοσοποίηση με πεπτίδια σε πλήρες ανοσοενισχυτικό έκδοχο του Freund (CFA). Καθοριστικό ρόλο μετά τη χορήγηση μέσω ένεσης του αντιγόνου παίζει η παρουσίαση αυτού από τα δενδριτικά κύτταρα, καίριας σημασίας γεγονός για την έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης λόγω του ρόλου τους να δεσμεύουν και να μεταφέρουν τα αντιγόνα. Μετά την ενεργοποίηση τους με τη σύνδεση με το αντιγόνο τα δενδριτικά κύτταρα μεταναστεύουν από τους ιστούς στους λεμφαδένες, αυξάνοντας την δράση των μορίων του συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας των τάξεων I και II, καθώς και άλλων συνδιεγερτικών μορίων [16]. Το γεγονός αυτό είναι καθοριστικό για την ενεργοποίηση των ανώριμων Τ-λεμφοκυττάρων και την επαγωγή της ασθένειας. Παράλληλα, εκτός του επιτόπου MOG_{35-55} σε CFA χορηγείται και τοξίνη του κοκκύτη, η οποία ενισχύει περαιτέρω την επαγωγή της ασθένειας στα πειραματόζωα. Συγκεκριμένα, η τοξίνη του κοκκύτη προέρχεται από το βακτήριο *Bordetella pertussis και* αποτελείται από δύο υπομονάδες, Α και Β. Η Β-υπομονάδα της προσδένεται σε υποδοχείς στην επιφάνεια μεμβρανικών κυττάρων ενώ η ενζυμικώς ενεργή Α-υπομονάδα της μετά την πρόσδεση διακόπτει την ενδοκυτταρική σηματοδότηση μέσω ADP ριβοζυλίωσης των α-υπομονάδων των τριμερών πρωτεϊνων G[19]. Ο βασικός όμως λόγος ενίσχυσης της επαγωγής της νόσου με τη χρήση της συγκεκριμένη τοξίνης είναι το γεγονός ότι διαλύει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, αυξάνοντας κατά πολύ την διαπερατότητα του και επιτρέποντας έτσι την είσοδο των Τ-λεμφοκυττάρων και των υπολοίπων παραγόντων της ανοσοαπόκρισης στο Κ.Ν.Σ.

Η ενεργή φάση αποτελείται από πολλαπλά στάδια:

- Μετανάστευση των ενεργοποιημένων και εξειδικευμένων στη μυελίνη Τ-λεμφοκυττάρων στο Κ.Ν.Σ., που περιλαμβάνει πρόσδεση σε συγκεκριμένους ενδοθηλιακούς συνδέσμους του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.
- Παραγωγή χημειοκινών και κυτοκινών από τα εξειδικευμένα Τ-λεμφοκύτταρα και επαγωγή της εισόδου των φαγοκυττάρων στο παρέγχυμα του Κ.Ν.Σ.
- Ενεργοποίηση των μακροφάγων και των μικρογλοιακών κυττάρων του Κ.Ν.Σ. από κυτοκίνες των CD4+ βοηθητικών κυττάρων.
- Απομυελίνωση των ελύτρων μυελίνης των νευροαξόνων των νευρικών κυττάρων του Κ.Ν.Σ. από τα φαγοκύτταρα, τα μακροφάγα και τις φλεγμονώδεις και κυτταροτοξικές επιδράσεις των κυτοκινών (πχ. ιντερφερόνη γ, TNF-a) που παράγονται από τα CD4+ βοηθητικά κύτταρα [20].

Εν συνεχεία τα πειραματόζωα *Mus musculus* παρατηρούνται σε διάφορες χρονικές στιγμές εξέλιξης της νόσου. Για την κλινική περιγραφή τους, έχει θεσπιστεί η κλίμακα βαθμονόμησης του πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1 *Κλίμακα κλινικής περιγραφής μοντέλου Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας*

ΤΙΜΗ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
1	Αδυναμία κίνησης - χαλαρή ουρά
2	Παραπάρεση - Εξασθένιση του οπίσθιου σκέλους του ποντικού με ημιπαράλυση του ενός ή των δύο οπίσθιων άκρων του που συνεπάγεται αδυναμία στο βάδισμα.
3	Παραπληγία - Πλήρη παράλυση του ενός ή και των δύο οπίσθιων άκρων του.
4	Πλήρη παραπληγία - Πλήρη παράλυση τόσο των οπίσθιων όσο και των εμπρόσθιων άκρων του.
5	Πλήρης παράλυση σε βαθμό που το πειραματόζωο είναι ετοιμοθάνατο - νεκρό.

Η φύση της αύξουσας παράλυσης που αποτυπώνεται και στην παραπάνω κλίμακα οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του πειραματόζωου, αφού διεισδύσουν στην περιοχή του εγκεφάλου, συνεχίζουν στην οσφυϊκή περιοχή του νωτιαίου μυελού.

Συμπερασματικά, το μοντέλο αυτό είναι το μόνο που προκαλεί το αυτοάνοσο νόσημα in vivo μετά την διαδικασία ανοσοποίησης και έχει χρησιμοποιηθεί ιδιαίτερα για την εξαγωγή συμπερασμάτων του ρόλου της φλεγμονώδους απόκρισης στην απομυελίνωση. Είναι αξιοσημείωτο ότι υπάρχει μια προτίμηση για αλλοιώσεις στην ανάπτυξη του οπτικού σωλήνα τόσο στο πειραματικό μοντέλο Π.Α.Ε. επαγόμενης από το MOG, όσο και της Σ.Κ.Π., γεγονός που υποδηλώνει ότι η απώλεια της ανοσολογικής αυτοανοχής στο MOG εμπλέκεται στην ανάπτυξη της οπτικής νευρίτιδας στις αρχές της Σ.Κ.Π. [15]. Επίσης, μέσα από το συγκεκριμένο μοντέλο έχει ανακαλυφθεί και ο ρόλος των CD8+ κυτταροτοξικών κύτταρων, καθώς αυτά πολλαπλασιάζονται σε απόκριση προς τα αντιγόνα μυελίνης και κυκλοφορούν στα σημεία φλεγμονής του αυτοάνοσου Κ.Ν.Σ., σε αναλογία 10 προς 1 προς τα CD4+ βοηθητικά κύτταρα. Η συγκεκριμένη παρατήρηση ισχύει και στις περιοχές βλαβών της Σ.Κ.Π.

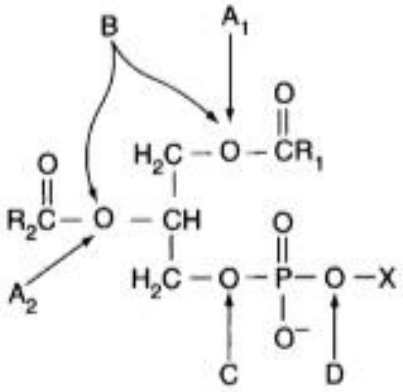
Από την άλλη όμως πρέπει να συνυπολογίζεται ότι γενικώς τα μοντέλα Π.Α.Ε. δεν αντανακλούν σε επαρκή βαθμό τη φύση των αλλοιώσεων στην προοδευτικού τύπου Σ.Κ.Π. **Ωστόσο στο συγκεκριμένο τύπο ποντικών της παρούσης εργασίας (C57BL/6J), η εξέλιξη της Π.Α.Ε. παρουσιάζει μια χρόνια προοδευτική κλινική πορεία, συνθήκη που προσομοιάζει περισσότερο σε αυτούς τους τύπους Σ.Κ.Π**. Ισχύουν πάντως οι περιορισμοί που αναφέρθηκαν στο υποκεφάλαιο 2.2. Εν τέλει τα πλεονεκτήματα από τη μελέτη αυτού του μοντέλου είναι ιδιαιτέρως σημαντικά και η σύγχρονη ερευνητική τάση που επικρατεί είναι ο συνδυασμός του παραπάνω πειραματικού μοντέλου επαγωγής Π.Α.Ε. με νέες μορφές διαγονιδιακών ποντικών. Το γεγονός αυτό, οδηγεί στην όλο και μεγαλύτερη παροχή εργαλείων έρευνας για την περαιτέρω κατανόηση της ανοσολογικής ανοχής, της ρύθμισης των δικτύων έκκρισης κυτοκινών/χημειοκινών και του ρόλου της φλεγμονής στην επιβίωση και την αναγέννηση των νευροαξόνων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΗΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΕΓΚΕΦΑΛΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑ

Η Π.Α.Ε. αυξάνεται σε ένταση όσο πιο πολύ αναπτύσσεται φλεγμονή στο νωτιαίο μυελό. Για τον λόγο αυτό, η παρούσα μελέτη εστιάστηκε στον νωτιαίο μυελό ποντικών, προερχόμενο από διαφορετικές χρονικές στιγμές για να συμβάλλει στην πληρέστερη ερμηνεία της φλεγμονώδους απόκρισης στην Π.Α.Ε., μέσα από την ανάλυση της συμμετοχής της υπεροικογένειας των φωσφολιπασών A_2 και των ενζύμων COX-1 και COX-2 σε αυτές.

3.1 Φωσφολιπάσες

Οι φωσφολιπάσες είναι μια υπεροικογένεια ενζύμων που κοινή τους ιδιότητα είναι η υδρόλυση φωσφολιπιδίων. Μεταξύ τους διαχωρίζονται ανάλογα με την ρύθμιση στην οποία υπόκεινται και τη θέση στην οποία υδρολύουν τα φωσφολιπίδια (σχήμα 3.1) .



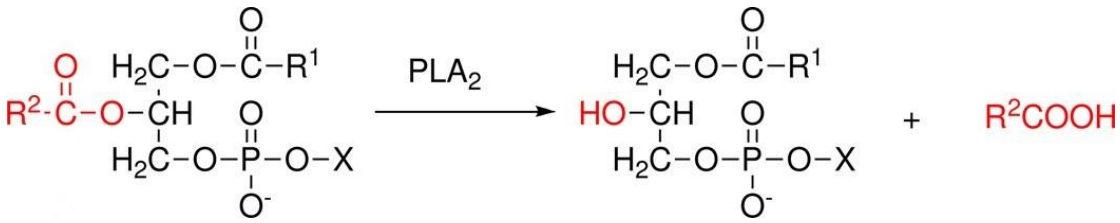
Σχήμα 3.1 *Κατηγοριοποίηση φωσφολιπασών με βάση τις θέσεις υδρόλυσης φωσφολιπιδίων* [21]

Με βάση το Σχήμα 3.1, οι φωσφολιπάσες Α είναι ακυλο-υδρολάσες φωσφολιπιδίων, οι οποίες υδρολύουν είτε τον 1-ακυλο-εστέρα (PLA_1), είτε τον 2-ακυλο-εστέρα (PLA_2) και παράγουν λυσο-φωσφολιπίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Συχνά το λιπαρό οξύ που απελευθερώνεται από τη θέση sn-2 είναι το

αραχιδονικό. Οι φωσφολιπάσες Β υδρολύουν και τις δύο ακυλο-ομάδες των φωσφολιπιδίων. Η υδρόλυση στον γλυκεροφωσφορικό δεσμό καταλύεται από την φωσφολιπάση C, ενώ υδρόλυση που οδηγεί στην αποχώρηση της βάσης καταλύεται από την φωσφολιπάση D. Επιπρόσθετα, υπάρχουν και οι λυσοφωσφολιπάσες, οι οποίες απομακρύνουν την μοναδική ακυλομάδα ενός μονοακυλιωμένου λυσο-φωσφολιπιδίου [21]. Στο σύνολο τους οι φωσφολιπάσες λειτουργούν και ως σηματοδοτικά μόρια καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι πέραν της καταλυτικής τους δράσης συνδέονται με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης [22].

3.2 Η υπεροικογένεια των φωσφολιπασών A_2

Η υπεροικογένεια των φωσφολιπασών A_2 αποτελείται από πολλές διαφορετικές ομάδες ενζύμων, που όλες καταλύουν την υδρόλυση του sn-2 εστερικού δεσμού του σκελετού της γλυκερόλης μιας μεγάλης ποικιλίας φωσφολιπιδίων. Προϊόντα της υδρόλυσης είναι ένα ελεύθερο λιπαρό οξύ και ένα λυσο-φωσφολιπίδιο, που έχουν διάφορους φυσιολογικούς ρόλους, όπως για παράδειγμα τη συμμετοχή σε βιοσυνθετικές πορείες του οργανισμού [23].



Σχήμα 3.2 *Υδρόλυση που καταλύει η φωσφολιπάση A_2 όπου R1: λιπαρά οξέα, ή αλκύλιο, ή αλκένυλο ομάδες και R2: λιπαρά οξέα ή ακυλομάδες* [24]

Στον πίνακα 3.1 φαίνεται η συστηματική κατάταξη των μελών της υπεροικογένειας αυτής.

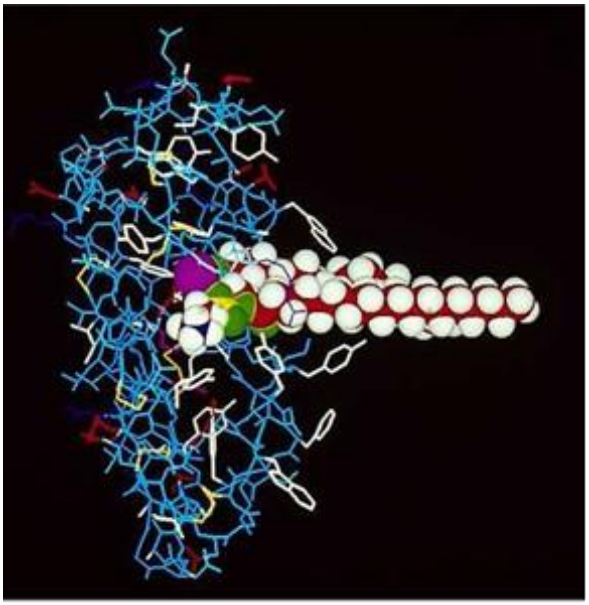
Πίνακας 3.1 *Συστηματική κατάταξη της υπεροικογένειας των φωσφολιπασών A_2 [23]*

Τύπος	Ομάδα	Υποομάδα	Μοριακή μάζα (kDa)	Καταλυτικά κατάλοιπα
	GI	A, B	13–15	
	GII	A, B, C, D, E, F	13–17	
	GIII		15–18	
	GV		14	
$sPLA_2$	GIX		14	His/Asp
	GX		14	
	GXI	A, B	12–13	
	GXII	A, B	19	
	GXIII		<10	
	GXIV		13–19	
$cPLA_2$	GIV	A(α), B(β), C(γ), D(δ), E(ε), F(ζ)	60–114	Ser/Asp
$iPLA_2$	GVI	A(β), B(γ), C(δ), D(ε), E(ζ), F(η)	84–90	Ser/Asp
PAF-AH	GVII	A(Lp-PLA_2), B(PAF-AH II)	40–45	Ser/His/Asp
	GVIII	A (α_1), B(α_2), β	26–40	
$LPLA_2$	GXV		45	Ser/His/Asp
AdPLA	GXVI		18	His/Cys

Οι φωσφολιπάσες A_2 κατατάσσονται σε έξι κύριους τύπους οι οποίοι, με βάση τα δομικά και λειτουργικά τους χαρακτηριστικά, κατανέμονται σε δεκαέξι ομάδες και υποομάδες αντίστοιχα. Ιδιαίτερα η κατανομή στους έξι τύπους εξαρτάται από την αλληλουχία, το μοριακό βάρος, την περιεκτικότητα σε δισουλφιδικούς δεσμούς, την απαίτηση για Ca^{2+}. Γενικότερα η παρουσία πολλών δισουλφιδικών δεσμών υποδείκνυαν ότι οι ενζυμικές δομές των PLA_2, ήταν πολύ σταθερές [25]. Οι έξι κύριοι τύποι είναι:

- Οι εκκρινόμενες μικρού μοριακού βάρους ($sPLA_2$s)
- Οι κυτοσολικές, εξαρτώμενες από Ca^{2+} ($cPLA_2$s)
- Οι μη εξαρτώμενες από Ca^{2+} ($iPLA_2$s)
- Οι PAF-ακετυλοϋδρολάσες (PAF-AH)
- Η λυσοσωμική ($LPLA_2$)
- Η λιπώδης ($AdPLA_2$)

Τα περισσότερα ένζυμα της οικογένειας των PLA_2 έχουν μελετηθεί από μη ανθρώπινες πηγές. Το 1902, σε μια εργασία του P. Keyes, το δηλητήριο της κόμπρας βρέθηκε να έχει αιμολυτική δράση ενάντια στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων. Αυτές οι έρευνες τροφοδότησαν μια περαιτέρω ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με αυτή την τάξη ενζύμων και το μηχανισμό με τον οποίο δρουν [21]. Η τριτοταγής δομή της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης A_2, του δηλητηρίου της κόμπρας φαίνεται στο σχήμα 3.3.



Σχήμα 3.3 *Εκκρινόμενη φωσφολιπάση $sPLA_2$ από δηλητήριο κόμπρας [20]*

Καθώς ανακαλύπτονταν όλο και περισσότερες PLA_2, αυτές ταξινομούνταν είτε με γράμματα είτε με υποομάδες στις κύριες κατηγορίες του πίνακα 3.1. Ειδικά απομονώθηκε πρόσφατα άλλος ένας καινούριος τύπος φωσφολιπάσης A_2, απομονωμένος από λιπώδη ιστό, που ονομάστηκε λιπώδης φωσφολιπάση A_2 και προστέθηκε σαν XVI ομάδα [24].

Στον πίνακα 3.2 φαίνεται πως αλλάζει η ονοματολογία των PLA_2 στις γονιδιακές βάσεις δεδομένων

Πίνακας 3.2 *Αντιστοίχιση όρων υπεροικογένειας των φωσφολιπασών A_2*

Ομάδα Φωσφολιπασών A_2 με βάση την κωδικοποίηση στις γονιδιακές βάσεις δεδομένων	Ομάδα και Υποομάδα Φωσφολιπασών A_2 με βάση την επιστημονική βιβλιογραφία
Pla2g1b	GIB
Pla2g2a	GIIA
Pla2g2c	GIIC
Pla2g2d	GIID
Pla2g2e	GIIE
Pla2g3	GIII
Pla2g4a	GIVA
Pla2g4b	GIVB
Pla2g4c	GIVC
Pla2g4d	GIVD
Pla2g4e	GIVE
Pla2g4f	GIVF
Pla2g5	GV
Pla2g6	GVI
Pla2g7	GVII
Pafah1b1	GVIIA
Pahah1b2	GVIIB
Pla2g10	GX
Pla2g12a	GXIIA
Pla2g12b	GXIIB
Pla2g15	GXV
Pla2g16	GXVI

3.3 Ο ρόλος των Φωσφολιπασών A_2 στην φλεγμονώδη απόκριση

Τα ένζυμα της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2 υδρολύουν εστερικούς δεσμούς στην sn-2 θέση γλυκεροφωσφολιπιδίων, παράγοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα πχ αραχιδονικό οξύ και λυσο-φωσφολιπίδια [26]. Το αραχιδονικό οξύ είναι πρόδρομη ένωση για το σχηματισμό εικοσανοειδών, σηματοδοτικά μόρια, που παράγονται από τις κυκλοξυγενάσες COX-1 και COX-2, τις λιποξυγενάσες και τις ενδοϋπεροξειδάσες. Όπως φαίνεται στο σχήμα 3.4, με την επίδραση αυτών των ενζύμων σχηματίζονται **προσταγλανδίνες,**

θρομβοξάνες, λευκοτριένια και **υδροϋπεροξυεικοσιτετραενικά οξέα**. Όλα αυτά τα **εικοσανοειδή** συνδέονται σε συγκεκριμένους υποδοχείς G-πρωτεϊνων και εκτελούν ένα πολύπλοκο έλεγχο στην φλεγμονώδη απόκριση και την ανοσία [27]. Από την άλλη πλευρά τα λυσοφωσφολιπίδια εξαιτίας των τασιενεργών ιδιοτήτων τους, μπορούν να αλλοιώνουν τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών, αυξάνοντας την αγγειακή διαπερατότητα και προκαλώντας χημειοταξία των ανοσοποιητικών κυττάρων, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη φλεγμονής [28].

3.3.1 Μοντέλο Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας και Φωσφολιπάσες A_2

Οι κυριότεροι τύποι φωσφολιπασών A_2 που συνδέονται με την ανάπτυξη της φλεγμονώδους απόκρισης και της απομυελίνωσης στο μοντέλο Π.Α.Ε. είναι οι κυτοσολικές, η μη εξαρτώμενες από Ca^{2+} και οι εκκρινόμενες. Έχει βρεθεί ότι η έκφραση τεσσάρων φωσφολιπασών A_2, συγκεκριμένα της κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2 GIVA (Pla2g4a), της μη εξαρτώμενης από Ca^{2+} GVIA (Pla2g6), όπως επίσης και των δύο εκκρινόμενων φωσφολιπασών A_2 GIIA (Pla2g2a), GV (Pla2g5) αυξάνεται σε πολλά στάδια εξέλιξης της νόσου [29]. Στο Κ.Ν.Σ. αυτές οι φωσφολιπάσες διανέμονται στους νευρώνες και στα νευρογλοιακά κύτταρα, ενώ εντοπίζονται όλες και στο νωτιαίο μυελό. Αν και ο φυσιολογικός ρόλος αυτών των φωσφολιπασών στη ρύθμιση της νευρικής λειτουργίας των κυττάρων δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί, υπάρχουν αυξανόμενα στοιχεία για τη συμμετοχή τους στη σηματοδότηση υποδοχέων και στα μεταγραφικά μονοπάτια που συνδέουν οξειδωτικά γεγονότα με φλεγμονώδεις αποκρίσεις και χαρακτηρίζουν πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Η κυτοσολική GIVA φωσφολιπάση A_2 (Pla2g4a) παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της νόσου, ενώ οι υπόλοιπες εμπλέκονται τόσο στην έναρξη όσο και στην εξέλιξη της στα επόμενα στάδια. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα ενδοεπιθηλιακά και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος σε περιοχές δράσης των παραγόντων της Π.Α.Ε. στο νωτιαίο μυελό. Αυτή η αυξημένη έκφραση στα ενδοεπιθηλιακά κύτταρα κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης της νόσου εικάζεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο

στην επαγωγή και δράση των ανοσολογικών κυττάρων στο Κ.Ν.Σ. Ειδικότερα η έκφραση σε Τ-λεμφοκύτταρα και μακροφάγα ίσως παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και άλλων ανοσολογικών κυττάρων καθώς εξελίσσεται η νόσος. Με πειράματα αναστολέων αυτού του ενζύμου έχει βρεθεί δραματική μείωση των συμπτωμάτων της ασθένειας που αποτυπώνεται τόσο σε μείωση των επιπέδων του ενζύμου, όσο και σε μείωση των επιπέδων των COX-2, του υποδοχέα 2 των LTB_4 στα CD4+ βοηθητικά και CD8+ κυτταροτοξικά κύτταρα Τ, καθώς και διάφορων χημειοκινών και κυτοκινών που συμβάλλουν στη ανάπτυξης φλεγμονής [30]. Το συγκεκριμένο ένζυμο εμπλέκεται τόσο στην αρχική όσο και στην επαγόμενη φάση της νόσου, ελέγχοντας τη διαφοροποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων σε Th1 φαινότυπο, καθώς είναι γνωστό ότι η έκφραση κυτοκινών Th1 είναι πολύ αυξημένη στα σημεία της αυτοάνοσης επίθεσης στο Κ.Ν.Σ. Βρέθηκε λοιπόν ότι σε ποντίκια με Π.Α.Ε. που όμως δεν εξέφραζαν την κυτοσολική φωσφολιπάση η ασθένεια εξελισσόταν με πιο αργό ρυθμό και με μικρής ένταση συμπτώματα [31]. Ο ρόλος γενικότερα των κυτοσολικών φωσφολιπασών A_2 ως καθοριστικών ενζύμων του μονοπατιού φλεγμονώδους απόκρισης αποτυπώνεται ιδιαίτερα στο μονοπάτι παραγωγής προσταγλανδινών, καθώς έχει βρεθεί υψηλή έκφραση αυτών των ενζύμων σε νεφρά από αρουραίους που πάσχουν από κύρωση του ήπατος [32]. Τέλος συνδέονται με φλεγμονώδεις βλάβες στους πνεύμονες ενώ συνεργάζονται και με τις εκκρινόμενες φωσφολιπάσες A_2 για την παραγωγή εικοσανοειδών [27].

Η μη εξαρτώμενη του Ca^{2+} GVIA (Pla2g6), ιδιαίτερα στο μέγιστο χρονικό όριο της εξέλιξης της Π.Α.Ε., εκφράζεται κυρίως στα διηθητικά κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος και όχι στα αστροκύτταρα. Πρόκειται για ένα ένζυμο 85 kDa το οποίο βρίσκεται σε τρεις ισομορφές λόγω εναλλακτικού ματίσματος και έχει μια καταλυτική περιοχή και μια περιοχή πρόσδεσης, καθώς και οχτώ επαναλήψεις των χαρακτηριστικών του ενζύμου δομών Ank. Ο κυρίαρχος ρόλος της, με βάση πειράματα αναστολέων του συγκεκριμένου ενζύμου, εντοπίζεται στην εξέλιξη τους νόσου καθώς βρέθηκε ότι, αναστέλλοντας τη δράση της, η ένταση των συμπτωμάτων μειώνεται σημαντικά. Επίσης, με ιστολογική ανάλυση δειγμάτων νωτιαίου μυελού όπου είχε επιδράσει ο αναστολέας για το συγκεκριμένο ένζυμο βρέθηκε στενή σύνδεση του με την έκταση των βλαβών και την επίθεση των ανοσοκυττάρων στα έλυτρα μυελίνης

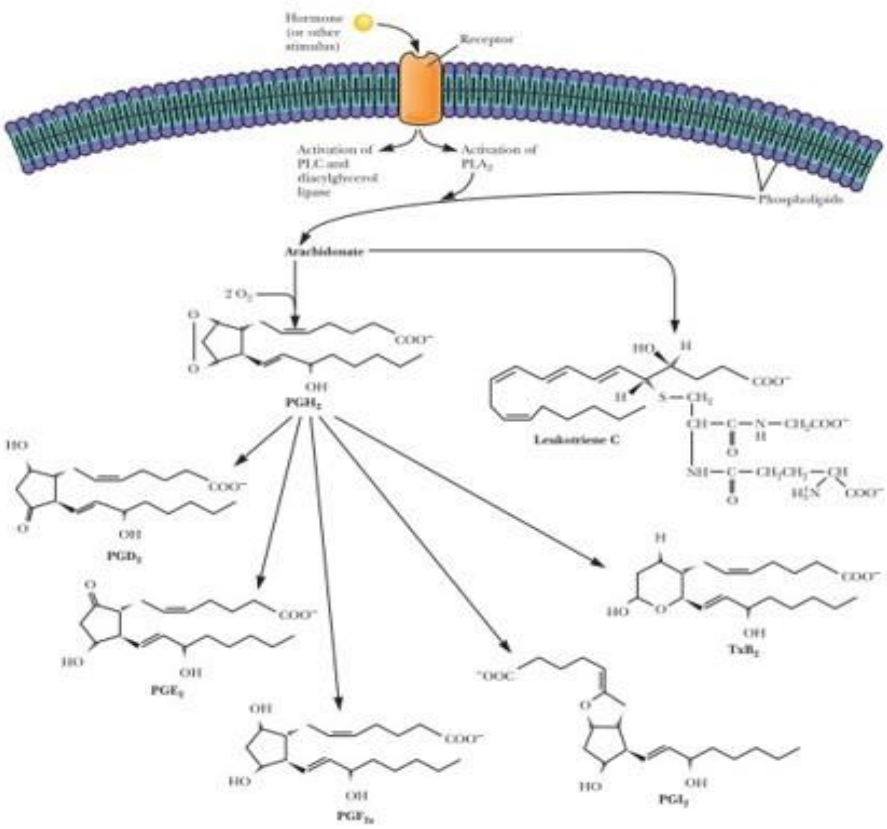
των νευροαξόνων [29]. Αν και ο ρόλος του GVIA iPLA$_2$ στη φλεγμονή είναι ακόμα ασαφής, έχουν προταθεί διάφοροι βιολογικοί ρόλοι στους οποίους ενδέχεται να συμμετέχει όπως στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση, τον σχηματισμό οστών, και την έκκριση ινσουλίνης, ενώ η λειτουργία του μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το κύτταρο και τον ιστό. Μειωμένη δραστικότητα του συγκεκριμένου ενζύμου έχει συσχετιστεί και με περιπτώσεις νευροεκφυλισμού και εξασθένισης της μνήμης στη νόσο του Alzheimer [33]. Πέραν αυτού παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταγωγή ενδοκυτταρικών σημάτων στο Κ.Ν.Σ. Επίσης μελέτες με ποντίκια τα οποία δεν εξέφραζαν το γονίδιο του ενζύμου έδειξαν ό,τι παρόλο που αυτά αναπτύσσονταν κανονικά, εμφάνιζαν πολλές δυσλειτουργίες των νευρώνων. Ύστερα από μελέτη του νευρικού τους συστήματος έγινε φανερό, όπως και στην περίπτωση της Π.Α.Ε., ότι εμφάνιζαν διευρυμένο εκφυλισμό των νευρικών αξόνων και των συνάψεων παράλληλα με την παρουσία σφαιροειδών και κενοτοπίων στα νευρικά κύτταρα [34]. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητα της GVIA iPLA$_2$ να συμβάλλει στην επαγόμενη από δράση των κυτοκινών έκφραση της εκκρινόμενης GIIA φωσφολιπάσης A$_2$ [35]. Το γεγονός αυτό τονίζει την εμπλοκή και το ρόλο του συγκεκριμένου ενζύμου στη ρύθμιση παραγωγής προσταγλανδινών.

Τα έτερα δύο βαρύνουσας σημασίας ένζυμα της υπεροικογένειας των φωσφολιπασών A$_2$ είναι οι εκκρινόμενες φωσφολιπάσες GIIA (Pla2g2a) και GV (Pla2g5). Η εκκρινόμενη GIIA φωσφολιπάση A$_2$ εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε αθηροσκληρωτικές βλάβες και έκτοτε τα επίπεδα του ενζύμου αποτελούν ένα γνωστό φλεγμονώδη δείκτη στην αθηροσκλήρωση. Λόγω της συμμετοχής της σε φλεγμονώδεις διεργασίες στα περιφερειακά συστήματα, η ισομορφή αυτή είναι η πιο μελετημένη από τον τύπο των εκκρινόμενων φωσφολιπασών A$_2$ [36]. Και οι δύο αυτές ισομορφές του εκκρινόμενου τύπου φωσφολιπασών A$_2$ δρουν συνεργατικά με τις κυτοσολικές φωσφολιπάσες A$_2$, ώστε να αυξάνουν την παραγωγή αραχιδονικού οξέος και κατά συνέπεια των εικοσανοειδών [37]. Οι εκκρινόμενες φωσφολιπάσες έχουν βρεθεί σε υψηλά επίπεδα έκφρασης τόσο σε αρουραίους με Π.Α.Ε. όσο και σε δείγματα ούρων ασθενών με Σ.Κ.Π. Με αναστολή αυτών των ενζύμων τα συμπτώματα της Π.Α.Ε. καλυτερεύουν [38]. **Ένα πολύ σημαντικό εύρημα είναι ότι η GIIA φωσφολιπάση A$_2$ εκφράζεται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που**

δρουν στις περιοχές απομυελίνωσης τον αξόνων στην Σ.Κ.Π. Επιπρόσθετα, η προτίμηση του για δράση σε συγκεκριμένα φωσφολιπίδια που οδηγεί σε απελευθέρωση λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης είναι ένα σημαντικό γεγονός, διότι ο μεταβολίτης αυτός σχετίζεται με τα φαινόμενα νευροεκφυλισμού και απομυελίνωσης. Για όλα τα παραπάνω είναι ιδιαίτερη σημασίας, από θεραπευτικής απόψεως, η χρήση αναστολέων του συγκεκριμένου ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου με χρήση του μη ειδικού αναστολέα AACOCF3 παρατηρείται μείωση στο 75% των χημειοκινών και των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, οι οποίες βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα στην Π.Α.Ε., ενώ παράλληλα αυξάνεται η έκφραση της IL-10 που έχει αντίθετα θετική επίδραση. Τέλος, παρεμποδίζεται η υδρόλυση των λιπαρών οξέων που εμπλέκονται σε προ-φλεγμονώδεις διαδικασίες. Για παράδειγμα το στεατικό και παλμιτικό οξύ προκαλούν την βιοσύνθεση των IL-1b, IL-2, IFN-g and TNF-a που αποτελούν κυτοκίνες που εμπλέκονται στην παθογένεση τόσο στην Π.Α.Ε. όσο και την Σ.Κ.Π. [29]. Ιδιαίτερα η εκκρινόμενη φωσφολιπάση A_2 GV ίσως παίζει έναν ρόλο στην παραγωγή ενδιάμεσων μεταβολικών λιπιδίων και στην φαγοκύτωση των μακροφάγων, καθώς επίσης στην υδρόλυση των επιφανειοδραστικών ουσιών των πνευμόνων [36]. Επίσης εμπλέκεται στις σηματοδοτικές πορείες του αραχιδονικού οξέος [39]. Τέλος, σημαντικό χαρακτηριστικό της δράσης των εκκρινόμενων φωσφολιπασών A_2 με συμβολή στις αυτοάνοσες νόσους, όπως και η Π.Α.Ε. είναι όπως έχει ήδη αναφερθεί, η απελευθέρωση της λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης η οποία εμπλέκεται σε πολλές όψεις της ανοσοαπόκρισης όπως η χημειοταξία των λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων καθώς και διαφοροποίηση δενδριτικών κυττάρων [40].

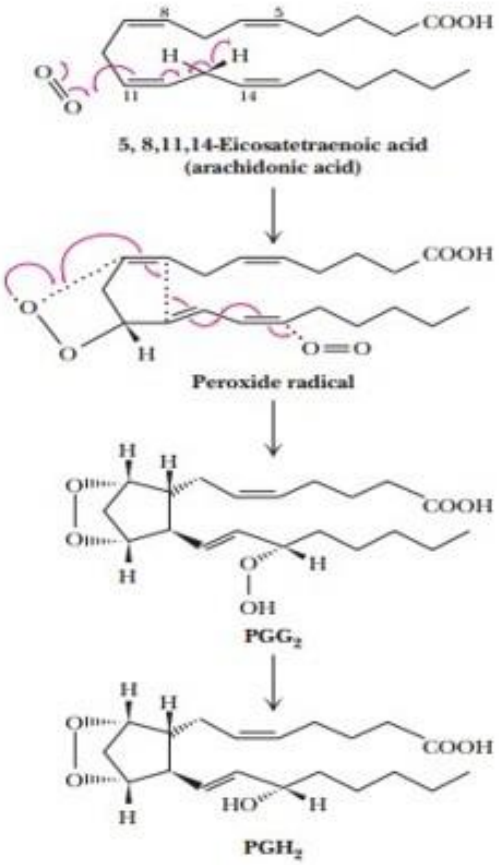
3.4 Το μονοπάτι παραγωγής προσταγλανδίνων και ο μηχανισμός δράσης της κυκλοξυγενάσης

Ως τώρα αναλύθηκε κυρίως η βιοχημεία και δράση των φωσφολιπασών A_2. Στο υποκεφάλαιο αυτό θα αναλυθούν τα ένζυμα που οδηγούν απευθείας στην παραγωγή των εικοσανοειδών, αξιοποιώντας το αραχιδονικό οξύ το οποίο απελευθερώνεται από τη δράση των φωσφολιπασών A_2. Τα κύτταρα των ευκαρυωτικών οργανισμών μπορούν τα τροποποιήσουν το αραχιδονικό οξύ και άλλα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μέσω αντιδράσεων κυκλοποίησης και οξυγόνωσης για την παραγωγή ενώσεων με ορμονική δράση, οι οποίες ασκούν τη δράση τους σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και παρουσιάζουν τοποειδική δράση στο σημείο παραγωγής τους. Αυτές οι ενώσεις περιλαμβάνουν τις προσταγλανδίνες (PG), τις θρομβοξάνες (Tx), τα λευκοτριένια και τα υδροϋπεροξυεικοσιτετραενικά οξέα. Όλες αυτές οι κατηγορίες ενώσεων αποτελούν την οικογένεια των εικοσανοειδών και είναι μόρια με φλεγμονώδη δράση [41].



Σχήμα 3.4 *Φλεγμονώδη βιομόρια- παράγωγα του αραχιδονικού οξέος* [41]

Το παραγόμενο αραχιδονικό οξύ που απελευθερώνεται από μεμβρανικά φωσφολιπίδια από τη δράση των φωσφολιπασών A_2, μετατρέπεται μέσω κυκλοποίησης και οξυγόνωσης από το ένζυμο κυκλοξυγενάση (COX) σε προσταγλανδίνη G_2 (PGG_2). Στη συνέχεια η προσταγλανδίνη G_2 μετατρέπεται μέσω μια αντίδρασης υπεροξειδάσης σε προσταγλανδίνη H_2 (PGH_2). Η αντίδραση αυτή καταλύεται επίσης από την κυκλοξυγενάση, καταδεικνύοντας ότι το συγκεκριμένο ένζυμο έχει διπλή δραστικότητα [42]. Στο παρακάτω σχήμα 3.5 διακρίνονται οι μηχανισμοί των δύο αντιδράσεων που καταλύει το ένζυμο.



Σχήμα 3.5 *Μηχανισμός δράσης κυκλοξυγενάσης (COX)* [41]

Περαιτέρω ενζυμική μετατροπή της PGH2 από τη συνθάση της προστακυκλίνης, διάφορες ισομεράσες και τη συνθάση της θρομβοξάνης οδηγεί στη δημιουργία των προστανοειδών, δηλαδή, των λειτουργικά σημαντικών προσταγλανδινών και θρομβοξανών. Οι προσταγλανδίνες είναι λιπαρά οξέα με ένα δακτύλιο κυκλοπεντανίου μεταξύ δύο πλευρικών αλυσίδων, η μία εκ τον οποίων καταλήγει στο καρβοξυτελικό άκρο. Οι θρομβοξάνες έχουν παρόμοια δομή αλλά έχουν ένα οξανικό δακτύλιο (εξαμελής κορεσμένος

δακτύλιος ανθράκων ενωμένων με ένα άτομο οξυγόνου) αντί του δακτυλίου κυκλοπεντανίου.

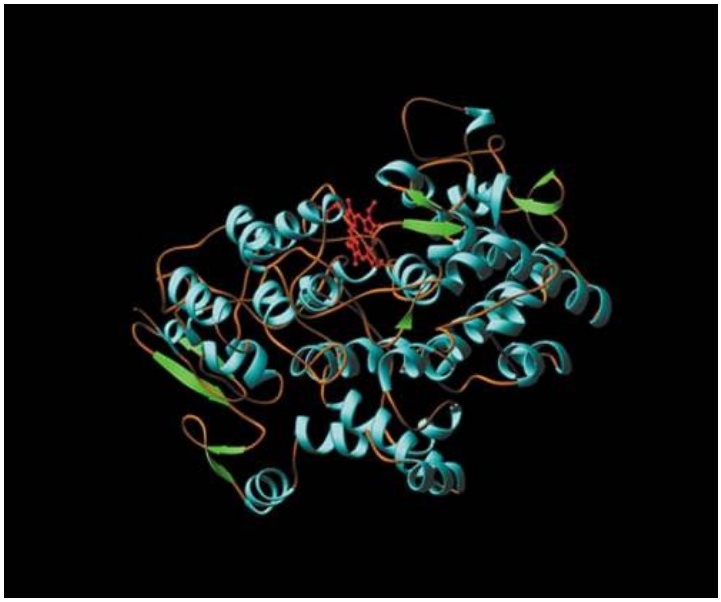
3.4.1 Ισομορφές της κυκλοξυγενάσης

Το ένζυμο αυτό διαθέτει τρεις ισομορφές.

Η πρώτη μορφή που ανακαλύφθηκε ήταν η κυκλοξυγενάση-1 (COX-1) η οποία απομονώθηκε από τον Miyamoto το 1971. Πρόκειται για ένα διαμεμβρανικό ένζυμο, το μοριακό βάρος του οποίου είναι 71 kDa και εντοπίζεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου των κυττάρων. Ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου είναι αυτός που περιεγράφηκε στο υποκεφάλαιο 3.4. Το ένζυμο (σχήμα 3.6) αποτελείται από τρεις υποπεριοχές. Μια EGF-περιοχή, μια περιοχή μεμβρανικής πρόσδεσης και την ενεργό περιοχή του ενζύμου. Η α-έλικες της μεμβρανικής περιοχής σχηματίζουν ένα κανάλι εισόδου στο ενεργό κέντρο και βρίσκονται συνδεδεμένες στη λιπιδική μεμβράνη, επιτρέποντας στο ελεύθερο αραχιδονικό οξύ να εισέρθει στην μεμβρανική διπλοστιβάδα και εν συνεχεία στα σημεία ενζυμικής δραστικότητας. Τα σημεία δράσης των δύο διαφορετικών αντιδράσεων που καταλύει το ένζυμο βρίσκονται σε διακριτές θέσεις αλλά το ένα δίπλα στο άλλο. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι ένα υδροφοβικό κανάλι η δράση του οποίου βασίζεται στα κατάλοιπα τυροσίνης 380 και σερίνης 530 [42]. Το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9.

Σχήμα 3.6 *Τρισδιάστατη δομή COX-1* [43]

Τη δεκαετία του 1990 έρευνες έδειξαν ότι υπήρχε αυξημένη δραστηριότητα της σε μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων μετά από έκθεση σε λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και κυτοκίνες. Αποδείχτηκε ότι επρόκειτο για μια επαγώγιμη ισομορφή του ενζύμου. Η ισομορφή αυτή ονομάστηκε **κυκλοξυγενάση-2 (COX-2)**. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη, τα επίπεδα της οποία είναι αυξημένα κατά την φλεγμονώδη απόκριση, ενώ η δράση του ενζύμου αναστέλλεται από τα γλυκοκορτικοειδή [42] . Το ένζυμο είναι διμερές (σχήμα 3.7) και κάθε μονομερές αποτελείται από μια καταλυτική περιοχή και μια περιοχή μεμβρανικής πρόσδεσης, που συνδέονται με την N-τελική περιοχή EGF. Η περιοχή μεμβρανικής πρόσδεσης σχηματίζει ένα κανάλι, το οποίο οδηγεί προς την ενεργό περιοχή [44]. Η COX-2 έχει μοριακό βάρος 70 kDa με παρόμοια ενεργά κέντρα με την COX-1 για την πρόσδεση του αραχιδονικού οξέος, που αποτελεί το υπόστρωμα της. Αν και η δομή του ενζύμου προσομοιάζει πολύ σε αυτή της COX-1, διαθέτει ένα μεγαλύτερο κεντρικό κανάλι σε σχέση με την πρώτη ισομορφή με πλατύτερη είσοδο και μια μικρή εσοχή στο εσωτερικό της κοιλότητας του ενζύμου που συχνά αξιοποιείται για την πρόσδεση των αναστολέων του. Η ιδιότητα αυτή βασίζεται σε μια μικρή διαφορά σε σχέση με την πρώτη ισομορφή, που είναι ότι το κατάλοιπο 523 είναι βαλίνη, αμινοξύ μικρότερο κατά μία μεθυλομάδα σε μέγεθος, σε σχέση με την ισολευκίνη που βρίσκεται στην COX-1. Επίσης το ένζυμο κωδικοποιείται από γονίδιο του χρωμοσώματος 1.



Σχήμα 3.7 *Τρισδιάστατη δομή COX-2* [45]

Αν και η COX-2 διαθέτει τις ίδιες καταλυτικές δραστικότητες με αυτές της COX-1 και χρησιμοποιεί το ίδιο υπόστρωμα, υπάρχουν πολύ σημαντικές βιολογικές διαφορές μεταξύ των δύο ισομορφών. **Η COX-2 είναι ένα επαγώγιμο ένζυμο το οποίο υποεκφράζεται ή δεν εκφράζεται από τους περισσότερους ιστούς σε κανονικές συνθήκες αλλά αυξάνεται ταχέως σε απόκριση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα όπως βακτηριακές ενδοτοξίνες, κυτοκίνες ή παράγοντες ανάπτυξης.** Επιπλέον, υπάρχουν διαφορές στην σύνδεση υποστρώματος, και ιδιαίτερα στις περιοχές σύνδεσης αναστολέων, γεγονός που επιτρέπει στις μορφές να αναστέλλονται με διαφορετικό τρόπο [46].

Πρόσφατα βρέθηκε και μια νέα ισομορφή που προέρχεται από το ίδιο γονίδιο που κωδικοποιεί την COX-1, μόνο που παρουσιάζει μια επιπρόσθετη αλληλουχία αμινοξέων που προέρχεται από τη διατήρηση του ιντρονίου 1 της COX-1. Η **COX-3 ή COX1b**, όπως ονομάζεται εναλλακτικά, εκφράζεται στο Κ.Ν.Σ. και την καρδιά. Όπως και η COX-1 το ένζυμο υπάρχει υπό φυσιολογικές συνθήκες, δηλαδή η έκφραση του δεν είναι επαγώγιμη όπως στην περίπτωση της COX-2 [47]. Το ένζυμο παίζει ρόλο στον έλεγχο της θερμοκρασίας του σώματος και στην οξεία αλγαισθησία [48].

3.5 Κυκλοξυγενάσες και φλεγμονώδης απόκριση στην Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα

Οι προσταγλανδίνες σε φυσιολογικές συνθήκες παράγονται από τη δράση και των δύο ισομορφών, αλλά κυρίαρχα της COX-1, η οποία συναντάται σχεδόν σε όλους του ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του νωτιαίου μυελού. Το γεγονός αυτό συνάδει με το ότι οι προσταγλανδίνες ρυθμίζουν ταχείες φυσιολογικές αποκρίσεις όπως την αγγειακή ομοιόσταση, τη γαστρική λειτουργία, τη δραστηριότητα των αιμοπεταλίων και τη νεφρική λειτουργία. Η συγκέντρωση

του ενζύμου είναι χαμηλή αλλά αυξάνει με τη διέγερση από ορμόνες ή παράγοντες ανάπτυξης. Ως γνωστόν η Π.Α.Ε. αφορά το νευρικό σύστημα. Τόσο η COX-1 όσο και η COX-2 εντοπίζονται στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό και πιο συγκεκριμένα στα νευρικά και νευρογλοιακά κύτταρα [49]. Οι προσταγλανδίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αλλά και εξέλιξη της ασθένειας και ιδιαίτερα οι PGE_2, PGD_2 και $PGF2_a$ που θεωρούνται τα κυρίαρχα

προστανοειδή στο νευρικό σύστημα. Η PGD_2 παράγεται συνεχώς στο νωτιαίο μυελό των υπό ανάπτυξη ποντικιών και έχει βρεθεί ότι στην Π.Α.Ε. οι πορείες βιοσύνθεσης της PGD_2, της PGI_2 και του μονοπατιού της 5-λιποξυγενάσης ατονούν, ενώ από τη δράση της COX-1 ευνοείται η παραγωγή της PGE_2 [50]. Από την άλλη όμως τα επίπεδα της προσταγλανδίνης PGD_2 έχουν βρεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στο νωτιαίο μυελό ποντικών με χρόνια μορφή Π.Α.Ε. Παρά το γεγονός ότι η COX-2 είναι ένα επαγόμενο ένζυμο, εντούτοις στο Κ.Ν.Σ. εκφράζεται σε σταθερές ποσότητες και παίζει ρόλο σε συναπτικές και νευροαγγειακές λειτουργίες [48].

Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την παρουσία των ενζύμων στους ιστούς δεν έχουν ξεκαθαριστεί αλλά σε ασθένειες όπως η Π.Α.Ε., αλλαγές στην έκφραση των τριών ισομορφών σχετίζονται με την εξέλιξη των συμπτωμάτων της νόσου. Μέσα από διάφορες in vivo μελέτες στη φλεγμονώδη απόκριση αποδεικνύεται ότι τα τρία είδη ισομορφών COX επηρεάζουν την έναρξη αλλά και τη μορφή της φλεγμονώδους απόκρισης. Στην οξεία Π.Α.Ε. η έκφραση της COX-2 έχει παρατηρηθεί αρχικά στα μακροφάγα και τελικώς στους νευρώνες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα. **Επίσης οι παρατηρήσεις ως προς τον έλεγχο των προσταγλανδινών δείχνουν μια αντίστροφη σχέση ανάμεσα στην COX-1 και COX-2** [48]. Παρόλο λοιπόν που η καταλυτική δράση της COX-2 μπορεί να επάγει νευροτοξικότητα σε μοντέλα απευθείας τραυματισμού των νευρώνων, ο ρόλος της αναφορικά με τη φλεγμονώδη απόκριση στο νευρικό σύστημα, μπορεί να είναι εντελώς διαφορετικός και εν τέλει να συνδέεται με την προστασία των νευρώνων. Κάτι τέτοιο είναι πιθανό να ισχύει μέσα από τη παραγωγή συγκεκριμένων νευροπροστατευτικών λιπιδικών μεσολαβητών ή με εκλεκτική ενεργοποίηση συγκεκριμένων υποδοχέων από το ένζυμο. Πρόσφατα μάλιστα ανακαλύφθηκαν παραγόμενα από την COX-2 ενδογενή εικοσανοειδή, όπως η λιποξίνη A_4 και οι προτεκτίνες της σειράς E και D, με αντιφλεγμονώδη και προληπτική δράση [51]. Τα δεδομένα αυτά ανατρέπουν την έως τώρα παραδοσιακή αντίληψη για την COX-2 και το ρόλο της στη φλεγμονή. Τα παραπάνω καθιστούν την έρευνα για το συγκεκριμένο ένζυμο που διενεργήθηκε στα πλαίσια αυτής της εργασίας ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα.

3.6 Μελέτη των υποστρωμάτων και των προϊόντων δράσης των ενζύμων της φλεγμονώδους απόκρισης με χρήση λιπιδωμικής

Στα προηγούμενα υποκεφάλαια του Κεφαλαίου 3 επιχειρήθηκε μια ανάλυση των ενζύμων που συμμετέχουν στο μονοπάτι φλεγμονώδους απόκρισης που βασίζεται στην απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος και τη μετατροπή του σε μια σειρά φλεγμονώδων βιομορίων. Τα ένζυμα της υπεροικογένειας των φωσφολιπασών A_2 είναι τα καθοριστικά ένζυμα για αυτό το βιοσυνθετικό μονοπάτι καθώς βρίσκονται στην αρχή του, καταλύοντας της υδρόλυση που απαιτείται για την παραγωγή του αραχιδονικού. Για το λόγο αυτό, ιδιαίτερα για τις εκκρινόμενες, τις κυτοσολικές και για τις ανεξάρτητες από Ca^{2+} φωσφολιπάσες A_2 έχουν αναπτυχθεί μια σειρά αναστολέων. Παρατηρώντας λοιπόν τα επίπεδα συγκεντρώσεων και την ύπαρξη κάποιον χαρακτηριστικών υποστρωμάτων ή προϊόντων της υδρόλυσης όπως το αραχιδονικό, το λυσοφωσφατιδικό οξύ και τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη είναι εφικτό να προσδιορίσουμε την καταλληλόλητα ενός υποψήφιου αναστολέα της φωσφολιπάσης A_2. Επίσης είναι δυνατόν να εξάγουμε συμπεράσματα για το πώς αλληλοεπιδρά και με το υπόλοιπο λιπιδικό περιβάλλον, αποκτώντας ένα πληρέστερο προφίλ για την αποτελεσματική ή όχι δράση του. Η μελέτη των κυτταρικών λιπιδίων μπορεί να βοηθήσει στο να εξαχθούν ενδιαφέροντα συμπεράσματα ειδικά σε ασθένειες του ανοσολογικού συστήματος.

Συγκεκριμένα στην Π.Α.Ε. έχουν ανιχνευτεί αυξημένα επίπεδα λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC) στην εμφάνιση της νόσου, τα οποία υποδεικνύουν και το ρόλο των φωσφολιπασών A_2 ως σημαντικούς σταθμούς ελέγχου και ρύθμισης των επιπέδων των φωσφολιπιδίων. Εκτός όμως αυτού, το συγκεκριμένο λιπίδιο όχι μόνο δρα σαν μυελινολυτικός παράγοντας αλλά σε προχωρημένα στάδια απομυελίνωσης μπορεί επίσης να επιδράσεις στις μεμβράνες των νευροαξόνων [30]. Ο τρόπος με τον οποίο επιδρά αρνητικά τόσο στις μεμβράνες όσο και στο έλυτρο μυελίνης είναι με την είσοδο του λιπιδίου στη λιπιδική διπλοστιβάδα προς σχηματισμό μικκυλίων [52]. Ο γενικότερος ακριβής μηχανισμός που συμμετέχει δεν είναι γνωστός αλλά εικάζεται ότι η λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη προκαλεί ταχεία και διευρυμένη

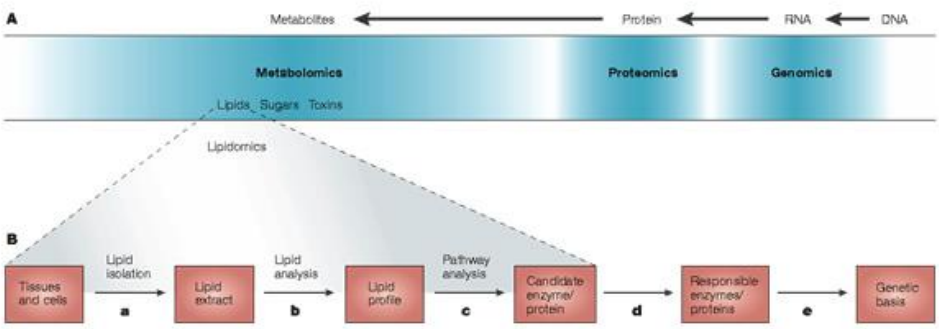
αποδιοργάνωση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, καθώς και μια πρώιμη απόκριση ουδετερόφιλων και Τ-λεμφοκυττάρων στο Κ.Ν.Σ. [38]. Από την άλλη το λυσοφωσφατιδικό οξύ παράγεται με τη δράση του ενζύμου autotaxin (ATX) από το LPC. Πρόκεται για μια πλασματική λυσοφωσφολιπάση D και αποτελεί μέλος της οικογένειας των ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (NPP) ενζύμων, που υδρολύουν τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς διάφορων νουκλεοτιδίων και παραγώγων τους. Παρουσιάζει όμως μεγαλύτερη συγγένεια υποστρώματος για το LPC παρά για τα νουκλεοτίδια [38].

Ανάλογα και με την ενεργοποίηση/αναστολή της ATX εικάζεται ότι συμμετέχει μέσω σηματοδοτικών πορειών στην ανάπτυξη φλεγμονής στο Κ.Ν.Σ. Το LPA σαν σηματοδοτικό μόριο μπορεί να συνδεθεί σε πληθώρα υποδοχέων στο Κ.Ν.Σ και συμμετέχει στη ρύθμιση μυελίνωσης/απομυελίνωσης, ενώ ρυθμίζεται από κοινού και με άλλα φλεγμονώδη μόρια, όπως πχ οι προσταγλανδίνες. Είναι ενδιαφέρον ότι στην Π.Α.Ε. τα επίπεδα έκφρασης της ATX βρέθηκαν 25% μειωμένα κατά την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι ακόμα πολλά ερωτήματα σε σχέση με τη δράση της ATX και του LPA στη Σ.Κ.Π. και τα ζωικά της μοντέλα παραμένουν αδιευκρίνιστα [38]. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι το LPA συμμετέχει σαν ένα σημαντικός διαμεσολαβητής της φλεγμονώδους απόκρισης που επάγεται μετά τον τραυματισμό νωτιαίου μυελού [53]. Το γεγονός αυτό έχει ιδιαίτερη αξία και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνησή σε νωτιαίους μυελούς ποντικών με Π.Α.Ε. καθώς ενδέχεται η μειωμένη έκφραση του να οφείλεται στην προσπάθεια του οργανισμού να επαναφέρει τη φυσιολογική λειτουργία των νευρικών κυττάρων σε αυτόν τον ιστό.

Πέραν όμως αυτών των δύο λιπιδίων LPC και LPA, είναι σημαντική πρόκληση η δυνατότητα ανάλυσης του πλήρους λιπιδικού προφίλ και των αυξομειώσεων του στην πορεία εξέλιξης της νόσου. Αυτό διότι τα λιπίδια εμπλέκονται σε μια σειρά λειτουργιών της φλεγμονώδους απόκρισης αλλά και εν τέλει, όπως υπονοήθηκε και παραπάνω, στην προσπάθεια των οργανισμών για πλήρη φυσική αποκατάσταση των λειτουργιών των ιστών τους. Παράλληλα η διαταραχή της ομοιόστασης των λιπιδίων μπορεί εν τέλει να οδηγήσει σε διάφορες παθοφυσιολογικές διαταραχές όπως ο διαβήτης, η αθηροσκλήρωση, η χρόνια φλεγμονώδης απόκριση, καθώς και ένα πλήθος άλλων νευρολογικών

διαταραχών [54]. Οι τεχνικές της λιπιδωμικής, μπορεί να είναι το αναλυτικό εργαλείο μελέτης των λιπιδίων σε τέτοιες περιπτώσεις.

Η λιπιδωμική αποτελεί ένα παρακλάδι της μεταβολομικής, που μελετά τα δίκτυα όλων των μεταβολιτών στους οργανισμούς, όπως φαίνεται και στο σχήμα 3.8. Πρόκειται για μια συστημική και ολιστική προσέγγιση μελέτης όλων των κατηγοριών των λιπιδίων, των αλληλεπιδράσεων και των λειτουργιών τους μέσα στα κύτταρα.



Σχήμα 3.8 *Η λιπιδωμική αποτελεί ακμάζον παρακλάδι της μεταβολομικής* [55]

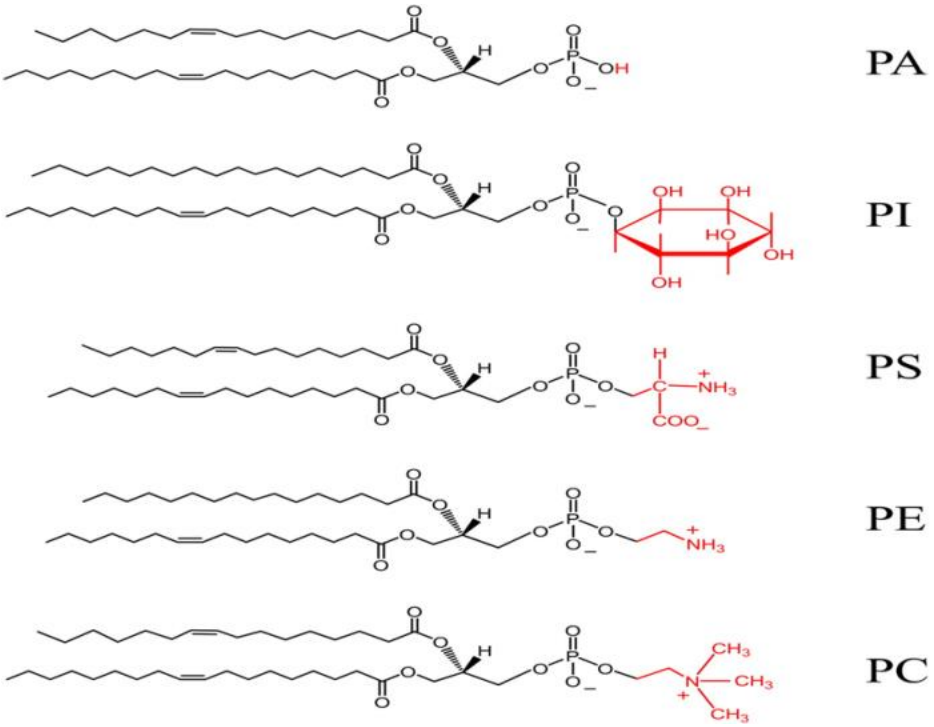
Παράλληλα η λιπιδωμική είναι κάτι περισσότερο από την πλήρη χαρακτηρισμό όλων των λιπιδίων σε ένα συγκεκριμένο τύπο κυττάρου. Είναι η ολοκληρωμένη κατανόηση της επίδρασης όλων των λιπιδίων σε ένα βιολογικό σύστημα σε σχέση με την κυτταρική σηματοδότηση, την αρχιτεκτονική και δομή των μεμβρανών, τη μεταγραφική και μεταφραστική ρύθμιση, τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα κύτταρα, τις αλληλεπιδράσεις κυττάρων και πρωτεϊνών και τέλος, της ανταπόκριση των κυττάρων στις περιβαλλοντικές αλλαγές με την πάροδο του χρόνου [56].

Η πλήρη συλλογή των λιπιδικών ειδών σε ένα βιολογικό σύστημα ονομάζεται λιπιδίωμα και διέπεται από ένα δίκτυο μεταβολικών οδών, οι οποίοι συνθέτους διακριτά είδη λιπιδίων με συναρμολόγηση ή αποσυναρμολόγηση μιας ποικιλίας υδρογονανθράκων στο σκελετό και πολικών ομάδων στην κεφαλή του μορίου [57].Τα λιπίδια αποτελούν το βασικό αντικείμενο μελέτης της λιπιδωμικής ανάλυσης. Αποτελούν τα θεμελιώδη συστατικά των βιολογικών μεμβρανών και έχουν σημαντικούς και πολλαπλούς ρόλους στους οργανισμούς. Ενας από αυτούς είναι να αποτελούν τα αποθηκευτικά

ενεργειακά μόρια του οργανισμού. Ταυτόχρονα, ορισμένα λιπίδια εμπλεκονται στην κυτταρική σηματοδότηση και τις ποικιλόμορφες διεργασίες μεταγωγής σήματος. Η ίδια η ποικιλία των δομών τους, τα καθιστά τα κατεξοχήν σηματοδοτικά μόρια σε πλήθος περιπτώσεων [58], [59]. Όσον αφορά την ταξινόμηση που συνήθως εξυπηρετεί τη λιπιδωμική ανάλυση, τα λιπίδια ομαδοποιούνται στις ακόλουθες 8 κατηγορίες που καλύπτουν ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς:

1) Λιπαρά οξέα [FA]
2) Γλυκερολιπίδια [GL]
3) Γλυκεροφωσφολιπίδια [GP]
4) Σφιγγολιπίδια [SP]
5) Λιπίδια στερολών [ST]
6) Λιπίδια πρενόλης [PR]
7) Σακχαρολιπίδια [SL]
8) Πολυκετίδια [PK].

Τα φωσφολιπίδια αποτελούνται από ένα μόριο γλυκερόλης εστεροποιημένο με 2 λιπαρά οξέα και ομαδοποιούνται σε κατηγορίες με βάση την φωσφοριλιωμένη πολική κεφαλή τους. Η γλυκερόλη αποτελεί τη βάση της δομής τους ενώ η πολική κεφαλή βρίσκεται συνδεδεμένη στην sn-3 θέση σε αυτήν. Οι κύριες κατηγορίες των φωσφολιπιδίων (σχήμα 3.9) που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες των θηλαστικών περιλαμβάνουν τα φωσφατιδικά οξέα [PA], τις φωσφατιδυλοχολίνες [PC], τις φωσφατιδυλοαιθανολαμίνες [PE], τις φωσφατιδυλοινοσιτόλες [PI], τις φωσφατιδυλογλυκερόλες [PG], τις φωσφατιδυλοσερίνες [PS] και τις καρδιολιπίνες [CL] [60].

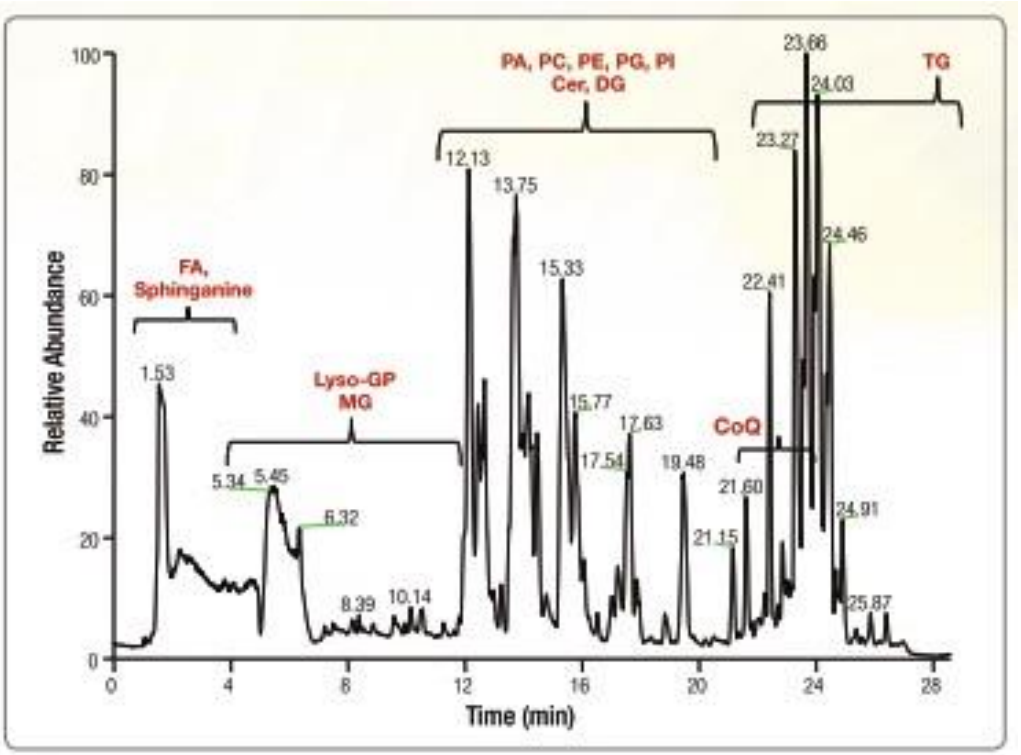


Σχήμα 3.9 *Τάξεις φωσφολιπιδίων* [61]

Κάθε κατηγορία περιλαμβάνει διαφορετικές υποκατηγορίες και υποομάδες. Είναι εμφανής η ποικιλομορφία αυτών των ενώσεων, αλλά χωρίς αυτά δεν θα καθίσταντο δυνατή η οργανωμένη στο χώρο συγκρότηση τόσο των υποκυτταρικών συστατικών όσο και των κυττάρων ως αυτοτελών οντότητων. Οι ανώτεροι οργανισμοί χαρακτηρίζονται από όλο και αυστηρότερη οργάνωση στο εσωτερικό τους. Χωρίς την ύπαρξη των λιπιδίων η παραπάνω απαίτηση της φύσης δεν θα ήταν δυνατή. Ωστόσο η δομική πολυποικιλότητα των λιπιδίων σε συνδυασμό με τη χημική τους φύση ως αμφιπρωτικές ενώσεις, τα καθιστά το βασικό συστατικό των μεμβρανών. Σαν μόρια χαρακτηρίζονται από σχετική ευκαμψία και ρυθμίζουν τη μεμβρανική ρευστότητα.

Οι βελτιωμένες λιπιδωμικές τεχνικές ενισχύουν τη γνώση για τις λιπιδικές λειτουργίες στο επίπεδο του κάθε μεμονωμένου είδους. Τα παλιότερα χρόνια η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography - T.L.C.), ήταν η κλασσική μέθοδος ανάλυσης των λιπιδίων, φθηνή και γρήγορη, με το βασικό περιορισμό ότι είναι πολύ περιορισμένη όταν επρόκειτο για θέματα αναγνώρισης κάτω από το επίπεδο των βασικών λιπιδικών τάξεων. Εξαιτίας της ευαισθησίας και της εκλεκτικότητα της η φασματομετρία μάζας σείναι πια

σήμερα η επιλεγμένη μέθοδος για ποιοτική και ποσοτική λιπιδωμική ανάλυση [54]. Ιδιαίτερα χρησιμοποιείται ο συνδυασμός της φασματομετρίας μάζας με την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography - H.P.L.C.). Συγκεκριμένα η HPLC χρησιμοποιείται στη λιπιδωμική ανάλυση για να διαχωρίσει τα λιπίδια σε τάξεις πριν τη ανάλυση μαζών [62]. Εν συνεχεία τα λιπίδια, μέσω συστημάτων ιονισμού, ιονίζονται και εισάγονται στο φασματόμετρο μάζας όπου θραυσματοποιούνται και καταγράφονται συγκεκριμένες κορυφές που αντιστοιχούν στο χαρακτηριστικό λόγο m/z. Εν συνεχεία τα φάσματα αυτά με χρήση ειδικών λογισμικών αναλύονται και συγκρίνονται οι τιμές με βάσεις δεδομένων, οπότε από τις χαρακτηριστικές κορυφές ταυτοποιούνται τα λιπίδια, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.10.



Σχήμα 3.10 *Χρωματογράφημα λιπιδίων στη ζύμη* [62]

3.7 Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Στην Εισαγωγή της παρούσας εργασίας δόθηκαν τα χαρακτηριστικά και ο μηχανισμός δράσης της Σ.Κ.Π., με ιδιαίτερη έμφαση στην φλεγμονώδη απόκριση. Ακολούθησε περιγραφή του μοντέλου Π.Α.Ε., το οποίο αποτελεί το κατεξοχήν μοντέλο μελέτης σε πειραματόζωα, ενώ δόθηκαν και οι ομοιότητες και οι διαφορές που αυτό παρουσιάζει σε σχέση με την Σ.Κ.Π. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων σε πορείες φλεγμονώδους απόκρισης και συγκεκριμένα των κυκλοξυγενασών και της υπεροικογένειας των φωσφολιπασών A_2. Τέλος, παρουσιάστηκε και η συμβολή των λιπιδωμικών τεχνικών στην ανάλυση των υποστρωμάτων και των προϊόντων δράσης των ενζύμων αυτών και ιδιαίτερα των λιπιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη της ασθένειας στην Π.Α.Ε.

Αξιοποιώντας την παραπάνω γνώση από τα παραπάνω, σκοπός της παρούσης εργασίας είναι:

- Με εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR) να προσδιορισθούν τα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων των έξι κύριων τάξεων της υπεροικογένειας των PLA_2, αλλά και των COX-1, COX-2. Έτσι, θα διαπιστωθούν πιθανές μεταβολές στην έκφραση των ενζύμων αυτών σε καταστάσεις φλεγμονώδους απόκρισης και θα μελετηθεί η σύνδεση των φωσφολιπασών A_2 και των κυκλοξυγενασών στο μεταβολισμό ενώσεων που οδηγούν στην παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων.

- Σκοπός επίσης είναι, με χρήση φασματογράφου μάζας και υγρής χρωματογραφίας και με λιπιδωμική μελέτη, να προσδιοριστούν όλα τα λιπίδια που υπάρχουν στο μεταβολικό μονοπάτι και που αποτελούν είτε υποστρώματα, είτε προϊόντα των PLA_2, COX-1 και COX-2 σε φυσιολογικά ποντίκια. Η μέθοδος αυτή θα αξιοποιηθεί μελλοντικά για τη μελέτη των λιπιδίων σε ιστούς, εγκεφαλονωτιαίο υγρό και πλάσμα ποντικών με Π.Α.Ε.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - Υλικά και μέθοδοι

4.1 Απομόνωση RNA από ιστούς εγκεφάλου, πνευμόνων και ήπατος ποντικού

Αντιδραστήρια

- Μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης -TRIzol Reagent Invitrogen (TR118)
- DEPC-H_2O (RNAse free)
- Χλωροφόρμιο
- Ισοπροπανόλη
- Διάλυμα άλατος (0.8M C6H5Na3O7.2H2O και 1.2M NaCl)
- Αιθανόλη 75%

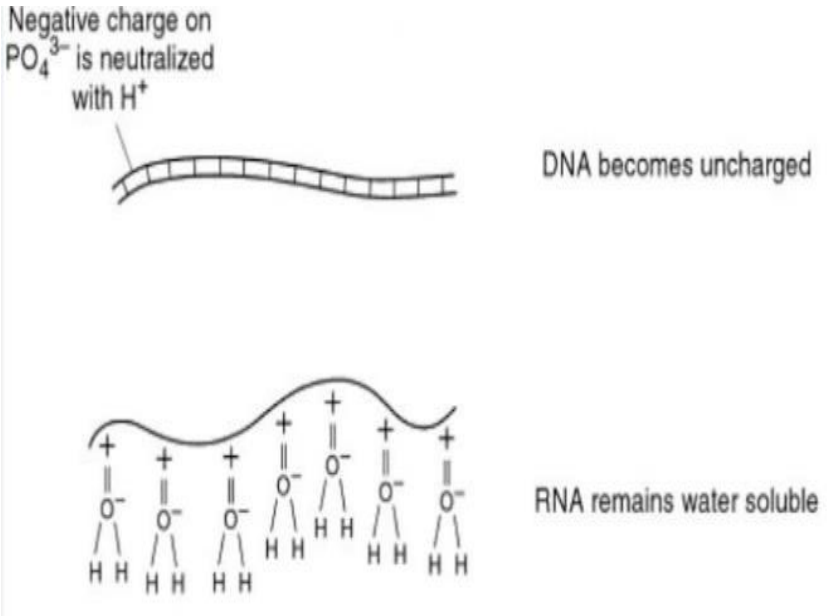
Υλικά – Συσκευές

- Ομογενοποιητής ULTRA TURRAX T25 basic (IKA-Werke)
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraeus Fresco 17 (Thermo scientific)
- Συσκευή Vortex
- Σωληνάρια 1.5 mL τύπου Eppendorf (Greiner bio-one # 616201)
- Σωληνάρια BIJOUX
- Αυτόματες πιπέτες
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips)

Όλα τα πλαστικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα ενώ και τα διαλύματα ήταν παρασκευασμένα με DEPC-H_2O. Η απομόνωση του RNA βασίστηκε στο ακόλουθο πρότυπο [63]

Πορεία εργασίας

- Τα δείγματα των ιστών μεταφέρθηκαν από δοχείο υγρού αζώτου όπου βρίσκονταν σε σωληνάρια “BIJOUX”, κατάλληλα για χρήση με τον ομογενοποιητή.
- Μετά την μεταφορά ομογενοποιήθηκαν με χρήση της συσκευής ομογενοποίησης σε 1 mL αντιδραστήριο TRIzol Reagent και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Εν συνεχεία τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε αριθμημένα σωληνάρια 1.5 mL Eppendorf και φυγοκεντρήθηκαν σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στα 12.000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Το μίγμα διαχωρίστηκε σε τρεις φάσεις: μια χαμηλότερη, φαινόλο-χλωροφρμική οργανική φάση η οποία περιείχε το μόρια DNA, μια μεσόφαση η οποία περιείχε τις πρωτεΐνες και μια άχρωμη ανώτερη υδατική φάση, η οποία περιείχε τα μόρια RNA. Η αιτία του διαχωρισμού φαίνεται και στο σχήμα 4.1



Σχήμα 4.1 *Οι δομικές διαφορές του DNA-RNA αποτελούν τη βιοχημική βάση του διαχωρισμού τους με εκχύλιση* [64]

- Επειδή ιδιαίτερα τα δείγματα του εγκεφάλου ενδέχεται να περιέχουν κομμάτια μεμβρανών, πολυσακχαριτών και μορίων DNA μεγάλου μοριακού βάρους, τα οποία μετά τη φυγοκέντρηση κατακάθονται σαν

ίζημα, το υπερκείμενο το οποίο περιέχει το RNA λήφθηκε με αυτόματη πιπέτα σε νέα αριθμημένα σωληνάρια Eppendorf ενώ το ίζημα απορρίφθηκε [65].

- Προστέθηκαν σε κάθε σωληνάριο 200 μL χλωροφόρμιο στον απαγωγό. Τα σωληνάρια με τα δείγματα πωματίστηκαν και ακολούθησε βίαιη ανάδευση με συσκευή Vortex για 15 δευτερόλεπτα.
- Ακολούθησε εκ νέου φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 15 λεπτά στους 4°C και μετά λήφθηκαν 500 μL της υδατικής φάσης κάθε δείγματος, τα οποία μεταφέρθηκαν σε νέα σωληνάρια Eppendorf.
- Προστέθηκαν 0.25 mL ισοπροπανόλης και 0.25 mL διαλύματος αλάτων (κιτρικό νάτρι 0.8M και χλωριούχο νάτριο 1.2M) και μετά τα δείγματα αφέθηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000 g για 8 λεπτά στους 4°C με αποτέλεσμα το RNA να κατακάτσει ως λευκό/ημιδιαφανές ίζημα ενώ το υπερκείμενο απορρίφθηκε προσεκτικά με χρήση πλαστικού ακρορυγχίου, προσαρμοσμένου σε σωλήνα κενού αέρος.
- Για πλύση του ιζήματος σε κάθε δείγμα προστέθηκε 1 mL αιθανόλη 75% και ακολούθησε βίαιη ανάδευση με Vortex.
- Τα παραπάνω στάδια φυγοκέντρησης και πλύσης επαναλήφθηκαν άλλη μια φορά.
- Τα δείγματα RNA αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

4.2 Καθαρισμός ολικού RNA

Αντιδραστήρια

- DEPC-H_2O (RNAse free)
- Ένζυμο: RQ1 & RNase-free DNAse (Promega, M6101)
- Διάλυμα RQ1 DNase 10X Reaction Buffer (Promega, M198A)
- Χλωροφόρμιο
- Μίγμα φαινόλης | χλωροφορμίου (1:1) (vol/vol)
- Διάλυμα γλυκογόνου 10 μg/μL
- Διάλυμα οξικού νατρίου 3M
- Αιθανόλη 100%

Υλικά – Συσκευές

- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraeus Fresco 17 (Thermo Scientific)
- Συσκευή Vortex
- Συσκευή Υδατόλουτρου Memert TYP:WB 10
- Φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Σωληνάρια 1.5 mL τύπου Eppendorf (Greiner bio-one # 616201)
- Σωληνάρια 0.5 mL τύπου Eppendorf
- Αυτόματες πιπέτες
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips)

  Όλα τα πλαστικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα ενώ και τα διαλύματα ήταν παρασκευασμένα με DEPC-H_2O.

Πορεία εργασίας

Σκοπός ήταν ο καθαρισμός του RNA από επιμολύνσεις DNA ώστε εν συνεχεία να απομονωθεί με υψηλή καθαρότητα. Για το σκοπό αυτό ακολούθησε ενζυμική κατεργασία με την RQ1 DNAse RNAse free DNAse 1 [66].

- Τα δείγματα απομονωμένου RNA φυγοκεντρήθηκαν στα 6.000 g για 5 λεπτά στους 4°C για καταβύθιση του RNA ενώ η αιθανόλη 75% που αποτελούσε το διαλύτη, απορρίφθηκε προσεκτικά με χρήση πλαστικού ακρορυγχίου, προσαρμοσμένου σε σωλήνα κενού αέρος.
- Εν συνεχεία στα δείγματα όπου το ίζημα ήταν μη ορατό (αραιό) προστέθηκαν 20 μL DEPC-$H_2$0 ενώ στα υπόλοιπα 100 μL DEPC-H_2O και επωάστηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60°C για 10 λεπτά. Όπου το ίζημα δεν είχε διαλυτοποιηθεί έγινε χρήση πλαστικού ακρορυγχίου με ρυθμιζόμενη παλίνδρομη εισροή/εκροή μέσω της πιπέτας έως ότου να διαλυτοποιηθούν τα ιζήματα σε όλα τα δείγματα.
- Προσδιορίστηκε η συγκέντωση και μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 πριν προχωρήσουμε παραπέρα στην ενζυμική κατεργασία με την RQ1 DNAse RNAse free DNAse 1, ώστε να αποκτήθει μια πρώτη εικόνα σχετικά με το πόση συγκέντρωση RNA έχει εκχυλίστει από τους ιστούς και ποια είναι η υφιστάμενη μόλυνση των δειγμάτων από DNA.
- Μετά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του φασματοφωτομέτρου κατασκευάστηκε πίνακας ποσοτήτων για τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που θα προστίθεντο στη συνέχεια. Οι υπολογισμοί βασίστηκαν σε δύο προϋποθέσεις. Η πρώτη ήταν ο τελικός όγκος των δειγμάτων να μην ξεπερνά τα 20 μL ενώ παράλληλα οι ποσότητες του ενζύμου και του RQ1 DNase 10X Reaction Buffer ήταν σταθερές στα 2 μL. Η δεύτερη ήταν η ύπαρξη 10μg RNA στα δείγματα. Επομένως στους υπολογισμούς αυξομειώθηκαν οι ποσότητες του RNA και του DEPC-$H_2$0. Τα περισσότερα δείγματα ικανοποιούσαν και τις δύο συνθήκες, ενώ σε κάποιες μεμονωμένες εξαιρέσεις χρησιμοποιήθηκε αναγκαστικά λιγότερη αρχική ποσότητα RNA.
- Ακολούθησε η προσθήκη των υπολογισμένων όγκων DEPC-H_2O, RNA σε νέα αντιστοίχως αριθμημένα σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 mL και μετά η προσθήκη 2 μL RQ1 DNase 10X Reaction Buffer και 2 μL του ενζύμου. Όλη η εργασία πραγματοποιήθηκε με νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 mL στον πάγο ενώ τα παλιά σωληνάρια με το

ακαθάριστο απομονωμένο RNA φυλάχθηκαν για μελλοντική χρήση στους -20ºC.

- Τα δείγματα επωάστηκαν στους 37ºC για μία ώρα στο υδατόλουτρο. Με το πέρας του χρόνου ακολούθησε προσθήκη 200 μL DEPC-H_2O και 200 μL μίγματος αποτελούμενο από φαινόλη και χλωροφόρμιο σε αναλογία όγκων 1:1, ακολουθούμενη από στιγμιαία έντονη ανάδευση σε συσκευή Vortex για 30 δευτερόλεπτα.
- Μετά τοποθετήθηκαν σε επιτραπέζια φυγόκεντρο για φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι οργανικές κάτω φάσεις απορρίφθηκαν ενώ οι υδατικές άνω φάσεις των δειγμάτων που περιείχαν το RNA συλλέχθηκαν σε νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf των 0.5 mL
- Προστέθηκαν 200 μL χλωροφόρμιο στο καθένα. Εν συνεχεία ακολούθησε έντονη ανάδευση με συσκευή Vortex για δέκα δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο στα 12.000 g για δέκα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Συλλέχθηκαν οι υδατικές φάσεις (V') έως ορίου V'max=180 μL σε νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf των 0.5 mL και προστέθηκε στο καθένα από αυτά 2 μL γλυκογόνο ως συμπαράγοντας κατακρήμνισης (10 μg/μL). Αν V' ο αντίστοιχος ληφθείς όγκος RNA, προστέθηκαν στο δείγμα αντίστοιχα 1/10xV' διάλυμα οξικό νάτριο συγκέντρωσης 3M και 2.5xV' παγωμένη αιθανόλη 100%, συνοδευόμενα από καλή ανάμειξη των δειγμάτων με χρήση της συσκευής Vortex κάθε φορά.
- Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20ºC. Εναλλακτικώς θα μπορούσαν για άμεση χρήση στην επόμενη μία ώρα αποθηκεύτηκαν στους -80ºC για είκοσι λεπτά.

4.3 Μετατροπή του RNA σε cDNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση

Αντιδραστήρια

- DEPC-H_2O (RNAse free)
- Αιθανόλη 75%
- oligo(dT)-18 εκκινητής
- Ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης, M-MLV RT (Promega)
- M-MLV 5x buffer (Promega)
- Δεοξυνουκλεοτίδια (10mM)

Υλικά – Συσκευές

- Επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraeus Fresco 17 (Thermo Scientific)
- Φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Συσκευή Υδατόλουτρου Memert TYP:WB 10
- Σωληνάρια 0.5 mL τύπου Eppendorf
- Αυτόματες πιπέτες
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips)

Όλα τα πλαστικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα ενώ και τα διαλύματα ήταν παρασκευασμένα με DEPC-H_2O(RNAse free).

Η κατεργασία της αντιστροφής μεταγραφής σε συνδυασμό με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελούν την πιο ευαίσθητη και αξιοποιήσιμη τεχνική ώστε να ανιχνευτεί το mRNA ενός γονιδίου. Το απομονωμένο και καθαρισμένο ολικό RNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για να συντεθεί το συμπληρωματικό DNA (cDNA) με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση [67].

Πορεία εργασίας

- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000 g για 10 λεπτά στους 4°C ώστε το RNA να καθιζάνει σαν ίζημα και να απομακρυνθεί εν συνεχεία μετά το πέρας της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο με χρήση πλαστικού ακρορυγχίου, προσαρμοσμένου σε σωλήνα κενού αέρος.
- Σε κάθε δείγμα έγινε προσθήκη 500 μL αιθανόλης 75% (RNAse free) για πλύση του ιζήματος
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν προσεκτικά σε επιτραπέζια συσκευή φυγοκέντρησης, ώστε να φυγοκεντρηθούν ξανά στα 12.000 g για 10 λεπτά στους 4°C. Ακολούθησε εκ νέου απομάκρυνση της υπερκείμενης οργανικής φάσης και τα δείγματα ξηράθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έγινε αναδιάλυση των ιζημάτων σε 20 μL DEPC-H_2O και ακολούθησε μέτρηση απορρόφησης των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop ND-1000 ώστε να προσδιοριστεί η τελική συγκέντρωση ολικού RNA σε αυτά.
- Δημιουργήθηκαν δείγματα RNA συγκέντρωσης 2000 ng/μL RNA σε νέα αριθμημένα σωληνάρια τύπου Eppendorf στον πάγο.
- Προστέθηκε 1.5 μL oligo(dT)-18 προς υβριδοποίηση όλων των μεταγραφημάτων με poly-A ουρά και οι όγκοι συμπληρώθηκαν με DEPC-H_2O, έως τελικού όγκου 16.75 μL
- Τα δείγματα θερμάνθηκαν για πέντε λεπτά στους 70°C, ώστε να διασπαστούν τυχόν σχηματισμένες δευτεροταγείς δομές και τοποθετήθηκαν στο πάγο για άμεση ψύξη ώστε να αποφευχθεί ο τυχόν αυθόρμητος ανασχηματισμός τους.
- Ακολούθησε ένα στιγμιαίο spin σε επιτραπέζια φυγόκεντρο ώστε να συλλεχθεί ο όγκος κάθε δείγματος στο κάτω μέρος των σωληνάριων.
- Προστέθηκαν κατά σειρά 5 μL M-MLV 5x buffer, 1.25 μL δεοξυνουκλεοτίδια (10mM) και τέλος 2 μL του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV RT του ρετροϊού *Moloney Leukemia Virus.* Ο συνολικός όγκος όλων των δειγμάτων με βάση

και τις οδηγίες του πρωτοκόλλου αντίστροφης μεταγραφής της Promega ήταν 25 μL.

- Τα δείγματα επωάστηκαν για μία ώρα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42°C.
- Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο για δέκα λεπτά και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

4.4 Σχεδιασμός εκκινητών για τα πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Δημιουργήθηκαν εκκινητές για τα γονίδια των PLA_2, Ptgs1, Ptgs2. Τα γονίδια της PLA_2 κωδικεύουν τα διάφορα ένζυμα της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2 και η Ptgs1 και Ptgs2 κωδικεύουν την έκφραση των COX-1 και COX-2 αντίστοιχα. Για τα διάφορα γονίδια PLA_2 αποφασίστηκε να ευρεθούν δύο ζευγάρια εκκινητών, εκ των οποίων το ένα να σχεδιαστεί μέσω χρήσης του προγράμματος 'Primer-Blast' και το δεύτερο από την ηλεκτρονική τράπεζα δεδομένων ζευγών εκκινητών του Harvard, με όνομα "Primer bank", στην ηλεκτρονική διεύθυνση http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών βασίστηκε στα εξής κριτήρια [68], [69]:

1. Να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης (Tm) ανάμεσα στους 55 με 65 βαθμούς Κελσίου.
2. Να έχουν μια ισορροπημένη περιεκτικότητα GC βάσεων μεταξύ τους, με βέλτιστο ποσοστό 40-60%.
3. Να έχουν συγκεκριμένο μήκος που να ποικίλλει από 17 έως 23 ολιγονουκλεοτίδια.
4. Την ύπαρξη βάσης γουανίνης ή κυτοσίνης στο 3' άκρο των εκκινητών.
5. Την αποφυγή συμπληρωματικότητας ανάμεσα στα 3' άκρα των εκκινητών.
6. Τη μη ύπαρξη επαναλαμβανόμενων μοτίβων δύο ή ενός νουκλεοτιδίου.
7. Να επιτελούν υβριδισμό στο 3' άκρο ενός εξονίου και στο 5΄ άκρο του δεύτερου γειτονικού εξονίου αντίστοιχα ώστε να μην ενισχύουν το γενωμικό DNA.

8. Το εύρος αριθμού νουκλεοτιδίων της τελικώς ενισχυόμενης αλληλουχίας στόχου, δηλαδή το μέγεθος του «προϊόντος» της PCR να είναι 80-200 bp.

4.4.1 Η δημιουργία των ζευγαριών εκκινητών

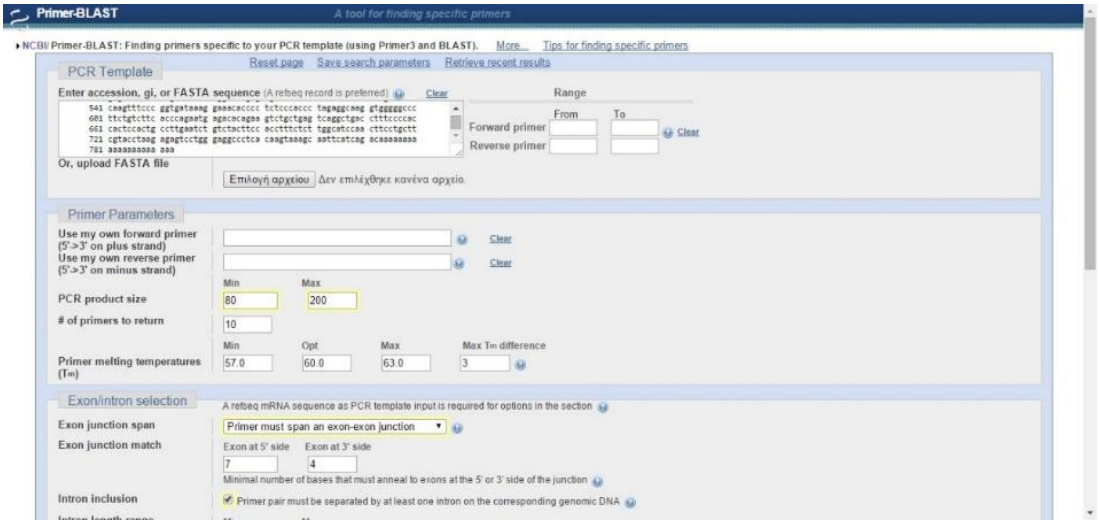
Τα ζευγάρια εκκινητών δημιουργήθηκαν ως εξής [70]:

- Αρχικά μέσω αναζήτησης των βάσεων δεδομένων νουκλεοτιδίων του NCBI στο σύνδεσμο http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide, βρέθηκαν για κάθε ένα από τα γονίδια το αντίστοιχο mRNA. Εν συνεχεία αυτό σε μορφή αρχείου 'fasta' εισήχθηκε στο Primer Blast.
- Ορίστηκε το μέγεθος του προϊόντος της PCR στα 80 κατά ελάχιστο έως 200 κατά μέγιστο νουκλεοτίδια.
- Οι θερμοκρασίες υβριδισμού των εκκινητών τοποθετήθηκαν ανάμεσα στους 57°C με 63°C με επιδίωξη για βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού τους 60°C. Παράλληλα η διαφορά ανάμεσα στις τελικές θερμοκρασίες υβριδισμού του κάθε εκκινητή σε ένα ζευγάρι ορίστηκε να μην υπερβαίνει τους 3°C.
- Ορίστηκε οι εκκινητές να υβριδίζουν ένα σύνδεσμο εξονίου/εξονίου.
- Ορίστηκε το ζευγάρι εκκινητών να διαχωρίζεται τουλάχιστον από ένα ιντρόνιο από το γενωμικό DNA.
- Ορίστηκε σαν οργανισμός για τον οποίο παρέχεται η βάση του ολικού mRNA, ο *Mus musculus*, taxid: 10090
- Αναφορικά με την ειδικότητα των εκκινητών ορίστηκαν οι κάτωθι επιλογές, για να αυξηθεί η πιθανότητα ενίσχυσης του σωστού στόχου:

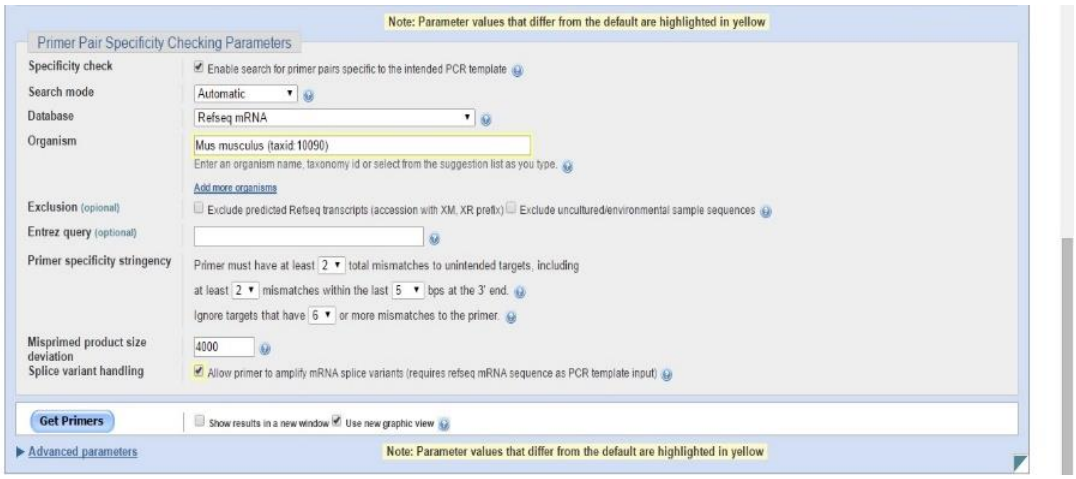
1. Οι εκκινητές να έχουν τουλάχιστον δύο αταίριαστα ολιγονουκλεοτίδια με μη επιθυμητούς υποψήφιους στόχους ενίσχυσης.
2. Όσον αφορά τους ανεπιθύμητους υποψήφιους στόχους ενίσχυσης, αυτοί να περιέχουν τουλάχιστον 2 αταίριαστα ολιγονουκλεοτίδια στις 5 τελευταίες βάσεις που βρίσκονται στο 3' άκρο της αλληλουχίας.

3. Επίσης να απορριφθούν εξαρχής υποψήφιοι στόχοι οι οποίοι να έχουν από έξι και περισσότερα αταίριαστα ολιγονουκλεοτίδια με τους εκκινητές.
4. Τέλος ορίστηκε οι εκκινητές να ενισχύουν όλα τα διαφορετικά αντίγραφα που έχουν προκύψει εξαιτίας ματίσματος του ολικού mRNA.

Η όλη διαδικασία που ακολουθήκε φαίνεται στα σχήματα 4.2 και 4.3



Σχήμα 4.2 *Σχεδιασμός εκκινητών με το Primer Blast (μέρος 1)*



Σχήμα 4.3 *Σχεδιασμός εκκινητών με το Primer Blast (μέρος 2)*

Μέσω της διαδικασίας σχεδιασμού παράχθηκαν τελικώς τα εξής ζευγάρια εκκινητών με εξαίρεση αυτούς για το γονίδιο Ptgs1, το οποίο κωδικοποιεί την COX-1 . Ενώ αρχικώς σχεδιάστηκαν κάποιοι, εν τέλει λόγω αποτυχίας κατά τα πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο ζευγάρι εκκινητών της εταιρείας “Qiagen” με εμπορικό όνομα “QuantiTect primers” και κωδικό

QT00155330. Το συγκεκριμένο ζευγάρι εκκινητών παραχωρήθηκε από το εργαστήριο Ανοσολογίας του δρ Γεώργιου Κόλλια, στο Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ».Επίσης η αλληλουχία του πρώτου ζεύγους εκκινητών για το γονίδιο “Pafah1b1” δόθηκε από το εργαστήριο Μοριακής Παθοφυσιολογίας του δρ. Βασίλη Αϊδίνη.

4.5 Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης σε δείγματα ιστών ποντικού

Αντιδραστήρια

- H_2O (RNase / DNase free) (Gibco)
- Διάλυμα 10x PCR (500 mM χλωριούχο κάλιο, 100mM Tris-υδροχλωρίου με pH 9.0 στους 25^oC, 1% Triton X-100)
- Χλωριούχο μαγνήσιο (Panreac, CR 161696)
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια 2.5 mM (Fermentas, R0181)
- Εκκινητές με συγκέντρωση 5 pmol/μL, Macrogen
- Ένζυμο: Taq πολυμεράση
- Εκμαγείο cDNA 40 ng/μL

Υλικά – Συσκευές

- Σωληνάρια 1.5 mL τύπου Eppendorf (Greiner bio-one # 616201)
- Σωληνάρια 0.5 mL τύπου Eppendorf με κατάλληλου πάχους ενισχυμένα τοιχώματα για χρήση PCR (Sarstedt, 72.699)
- Συσκευή PCR “PeqStar 2x”
- Αυτόματες πιπέτες
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips)

Αφού σχεδιάστηκαν και παραγγέλθηκαν τα ζευγάρια των εκκινητών από την εταιρεία “Macrogen”, ακολούθησε μια σειρά πειραμάτων ανίχνευσης των διαφόρων γονιδίων στα δείγματα cDNA των ιστών ήπατος, πνευμόνων και εγκεφάλου που είχαν παρασκευαστεί μέσω του πρωτόκολλου της αντίστροφης μεταγραφάσης από απομονωμένο και καθαρισμένο ολικό RNA. Η πειραματική τεχνική που ακολούθησε ηταν η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης [71], [72], [73]. Παράλληλα το εργαστήριο Μοριακής Παθοφυσιολογίας του δρ. Βασίλη Αϊδίνη για τα πειράματα αυτά προμήθευσε cDNA νεφρού και καρδιάς. Όλα τα δείγματα προέρχονταν από φυσιολογικά *Mus musculus* στην πλειονότητα των πειραμάτων με εξαίρεση τον ιστό του νεφρού, όπου σε τρία πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για λόγους οικονομίας, χρησιμοποιήθηκε cDNA νεφρού από *Mus musculus* στο οποίο είχε χορηγηθεί τετραχλωράνθρακας. Ο σκοπός αυτών των πειραμάτων ήταν διττός. Πρωταρχικός στόχος ήταν να ελεγχθούν ως προς την αποτελεσματικότητα τους οι εκκινητές και να επιλεχθεί ένα από τα δύο υποψήφια ζευγάρια εκκινητών για κάθε γονίδιο. Επιπλέον, να ανιχνευτεί η έκφραση γονιδίων της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2 στους παραπάνω ιστούς.

4.5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

- Οι εκκινητές ήταν αποθηκευμένοι στους -20°C σε συγκέντρωση 100 pmol/μL. Από αυτούς ένα μέρος αραιώθηκε σε τελική συγκέντρωση 5 pmol/μL για χρήση στα πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Συγκεκριμένα σε σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 mL, προστέθηκαν 5 μL του αντίστοιχου εκκινητή και 95 μL H_2O.
- Τα σωληνάρια 0.5 mL τύπου Eppendorf τοποθετήθηκαν σε πάγο.
- Σε κάθε ένα μεταφέρθηκαν 2 μL cDNA εγκεφάλου, συκωτιού, H_2O, νεφρού, πνεύμονα, καρδιάς αντίστοιχα. Τα cDNA όλων των ιστών είχαν συγκέντρωση 40 ng/μL.
- Παρασκευάστηκαν στον πάγο τα μείγματα αντιδραστηρίων της PCR σε σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 mL, με βάση των παρακάτω πίνακα ποσοτήτων**:**

Πίνακας 4.1 *Ποσότητες αντιδρώντων PCR*

Εκκινητής R.	10 μL
Εκκινητής F.	10 μL
10x PCR buffer	20 μL
dNTPs 2.5 mM	20 μL
$MgCl_2$ 1.2 mM	12 μL
H_2O	104 μL
Πολυμεράση Taq	4 μL

όπου στους εκκινητές R και F αντιστοιχούσαν τα διάφορα ζευγάρια εκκινητών για την υπεροικογένεια των φωσφολιπασών A_2 και το ζευγάρι εκκινητών για το γονίδιο αναφοράς β-2 μικροσφαιρίνη.

- Μετά το πέρας της παρασκευής των μειγμάτων της αντίδρασης, διαμοιράστηκαν 18 μL από κάθε ένα από αυτά, στα αντίστοιχα σωληνάρια τύπου Eppendorf 0.5 που περιείχαν τα cDNA των ιστών μέχρι τελικό όγκο σε κάθε δείγμα τα 20 μL.
- Το πρόγραμμα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής:

α) 95°C για 5:00 λεπτά

β) 95°C για 1:00 λεπτό

γ) 56°C για 1:00 λεπτό

δ) 72°C για 1:00 λεπτό

ε) Επανάληψη των βημάτων β έως δ για 35 φορές

στ) 72°C για 10:00 λεπτά

ζ) 16°C για 2:00 λεπτά

4.5.2. Παρασκευή πηκτής Αγαρόζης

Αντιδραστήρια

- Αγαρόζη (BIO-RAD)
- Διάλυμα TBE 1x : Τρις – βορικό οξύ – EDTA
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- H_2O (RNase / DNase free) (Gibco)

Υλικά – Συσκευές

- Φούρνος μικροκυμάτων
- Εκμαγείο συσκευής ηλεκτροφόρησης
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips)
- Αυτόματες πιπέτες
- Αναλυτικός ζυγός
- Απαγωγός

- Ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό 5 g Αγαρόζης και μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη.
- Προστέθηκαν 250 mL TBE 1x
- Η κωνική φιάλη πωματίστηκε με ζελατίνα και τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων, όπου θερμάνθηκε ελεγχόμενα για 5 λεπτά έως ότου το διάλυμα καταστεί διαυγές.

- Παράλληλα στήθηκε το εκμαγείο της συσκευή ηλεκτροφόρησης και μετρήθηκε η κλίση του ώστε η πηκτή να έχει παντού ομοιόμορφο πάχος.
- Με το πέρας της θέρμανσης στο φούρνο μικροκυμάτων, η κωνική φιάλη υπό συνεχή ανάδευση τοποθετήθηκε με πλάγια κλίση κάτω από βρύση με συνεχή ροή κρύου νερού έως ότου το διάλυμα έρθει σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προστέθηκαν 2 μL βρωμιούχο αιθίδιο και ακολούθησε μια προσεκτική ήπια ανάδευση έως ότου το διάλυμα αποκτήσει ένα ομοιογενές ελαφρώς ιώδες χρώμα.

- Το διάλυμα με προσοχή αποχύθηκε στο εκμαγείο με αργό ρυθμό και τα σημεία των εγκοπων εισαγωγής δείγματος ελέχθηκαν ώστε να μην υπάρχουν ανεπιθύμητες φυσαλίδες αέρα.
- Το εκμαγείο αφέθηκε για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό, για να στερεοποιηθεί η αγαρόζη.

4.5.3 Ηλεκτροφόρηση ενισχυμένων δειγμάτων cDNA των ιστών

Αντιδραστήρια

- “Orange” loading dye (BBH laboratory supplies, 437252Q)
- GeneRuler DNA Ladder Mix (SM#0333) συγκέντρωσης 1 μg/mL

Υλικά – Συσκευές

- Συσκευή παροχής ηλεκτρικού ρεύματος
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Συσκευή με λάμπα UV
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips)
- Αυτόματες πιπέτες
- Αναλυτικός ζυγός

- Με το πέρας των δύο ωρών το εκμαγείο με τη στερεοποιημένη πηκτή αγαρόζης τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης της οποία ο όγκος πληρώθηκε με διάλυμα TBE 1x.
- Στα δείγματα προστέθηκαν 4 μL της χρωστικής Orange loading dye, η οποία βοηθά στην ομοιόμορφη και ομαλή εισαγωγή τους στο πυθμένα των πηγαδιών της πηκτής αγαρόζης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Σε κάθε εγκοπή της πηκτής αγαρόζης φορτώθηκαν 10 μL κατά σειρά από τα δείγματα τα οποία είχαν ενισχυθεί με PCR μαζί με τα ομοίως ενισχυμένα αρνητικά πρότυπα τους. Σε ενδεικτικές θέσεις στην αρχή και το τέλος των δειγμάτων που αντιστοιχούσαν σε ένα ζεύγος

εκκινητών προστέθηκαν 5 μL GeneRuler DNA Ladder mix , το οποίο αποτελεί τον δείκτη μεγέθους των προϊόντων [74].

- Η ηλεκτροφόρηση διενεργήθηκε για 30 λεπτά στα 120 Volt.
  Η πηκτή μεταφέρθηκε σε ειδική συσκευή με λάμπα UV, όπου και φωτογραφήθηκε ώστε να παρατηρηθεί ποιοτικά η ύπαρξη DNA και η καθαρότητα του.

4.5.4 Βελτιωτικές τροποποιήσεις μέσω βαθμιδωτής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Μετά τα προκαταρκτικά πειράματα, ακολούθησε μια πορεία βελτιωτικών τροποποιήσεων ώστε να εξασφαλιστεί η όσο το δυνατόν αποδοτικότερη λειτουργία των ζευγαριών των εκκινητών και η σωστή επιλογή των βέλτιστων συνθηκών κατά τη διαδικασία της υβριδοποίησης των εκκινητών. Μέσα από αυτή τη φάση των πειραμάτων ξεκαθαρίστηκαν τα ζευγάρια των εκκινητών τα οποία έδιναν αποδοτικά αποτελέσματα. Αφού παρατηρήθηκαν τα αποτελέσματα από την αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης διενεργήθηκαν για όλα τα ζευγάρια εκκινητών αντιδράσεις με κλιμακούμενες θερμοκρασίες υβριδοποίησης για ένα εύρος 10 βαθμών της κλίμακας Κελσίου. Για λόγους οικονομίας του cDNA δημιουργήθηκε ένα ενιαίο δείγμα με συγκέντρωση 40 ng/μL, απαρτιζόμενο από cDNA εγκεφάλου, ήπατος και πνεύμονα φυσιολογικών ποντικών.

- Στην πρώτη σειρά του Real Time PCR plate προστέθηκαν 2 μL H_2O ως αρνητικό control αντί για cDNA.
- Παρασκευάστηκαν στον πάγο τα μείγματα αντιδραστηρίων της PCR σε σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 mL, με βάση των πίνακα ποσοτήτων της διπλανής σελίδας.

Πίνακας 4.2 *Ποσότητες αντιδρώντων PCR, όπου στους εκκινητές R και F αντιστοιχούσαν τα δώδεκα ζευγάρια εκκινητών για την υπεροικογένεια των φωσφολιπασών A_2*

Εκκινητής R.	10 μL
Εκκινητής F.	10 μL
10x PCR buffer	20 μL
dNTPs 2.5 mM	20 μL
$MgCl_2$ 1.2 mM	12 μL
H_2O	104 μL
Πολυμεράση Taq	4 μL

- 18 μL από το κάθε μείγμα αντιδρώντων μοιράστηκαν κατά σειρά σε κάθε αντίστοιχο πηγάδι του Real Time PCR plate στη 1 οριζόντια σειρά του.
- Ακολούθως σε κάθε σωληνάριο Eppendorf 1.5 mL που περιείχε το κάθε μείγμα αντιδρώντων μοιράστηκαν 14 μL του ενωμένου cDNA δείγματος.
- Μοιράστηκαν με τη χρήση αυτόματης πιπέτας 20μL από το κάθε μείγμα αντιδρώντων.
- Τα δείγματα έτρεξαν στο πρόγραμμα “gradient PCR” για ένα εύρος θερμοκρασιών από 52°C έως 62°C.
- Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% σε TBE κατά τα γνωστά και φωτογράφιση στη συσκευή με τη λάμπα UV για να εξαχθούν αποτελέσματα.

Μετά το πέρας αυτού του κύκλου προσδιορίστηκαν οι κατάλληλες θερμοκρασίες υβριδοποίησης για κάποια ζευγάρια εκκινητών.

Για όσα ζευγάρια εκκινητών δεν πήραμε όμως ικανοποιητικά αποτελέσματα ακολούθησε άλλος ένας κύκλος πειραμάτων βαθμιδωτής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε συνδυασμό με αλλαγές στην συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνήσιου. Συγκεκριμένα τα πειράματα επαναλήφθηκαν με χρήση δύο μειγμάτων αντιδρώντων τα οποία περιείχαν τελική συγκέντρωση 1.8 mM χλωριούχου μαγνήσιου και 2.2 mM χλωριούχου μαγνήσιου αντίστοιχα για κάθε

εκκινητή. Η μεθοδολογία των πειραμάτων ήταν η ίδια με τη διαφορά ότι σε κάθε πιάτο ελέγχονταν λιγότεροι εκκινητές.. Η συγκέντρωση των cDNA ήταν ξανά 40ng/μL. Τα ιόντα μαγνησίου αυξάνουν τη δραστικότητα της Taq πολυμεράσης. Αναμένεται λοιπόν να παρατηρηθούν υψηλότερης οπτικής έντασης ζώνες. Παράλληλα όμως ευνοείται και η ενίσχυση μη επιθυμητών αλληλουχιών πέρα από κάποια όρια. Για αυτό επιλέχθηκαν δύο τιμές που αντιστοιχούσαν σε μικρή αύξηση της συγκέντρωσης ώστε να υπάρχει μεγαλύτερη σιγουριά κατά την παρατήρηση των αποτελεσμάτων. Στο τέλος των πειραμάτων τα διφορούμενα ζευγάρια εκκινητών είχαν ξεκαθαριστεί ως προς την αποτελεσματικότητα τους και για όσα αποδείχθηκαν εν τέλει λειτουργικά επιλέχθηκαν και οι κατάλληλες θερμοκρασίες υβριδοποίησης.

4.6 Έλεγχος ποιότητας των cDNA νωτιαίου μυελού ποντικού

Για την επόμενη φάση πειραμάτων η εργαστηριακή ομάδα του δρ Βασίλη Αϊδίνη παρείχε δείγματα cDNA νωτιαίου μυελού προερχόμενα τόσο από φυσιολογικά όσο και από ασθενή πειραματόζωα σε διαφορετικό στάδιο εξέλιξης της Π.Α.Ε. Με το παρών πείραμα ελέγχθηκε η λειτουργικότητα τους καθώς θα μπορούσαν είτε λόγω των συνθηκών ψύξης-απόψυξης, είτε λόγω αποικοδόμησης από εξωγενείς παράγοντες να είχε επηρεαστεί η ποιότητα τους [75]. Κάτι τέτοιο θα επηρέαζε άμεσα τα πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο καθώς πρόκειται για μια τεχνική με περισσότερη ευαισθησία σε σχέση με τη συμβατική PCR. Είναι απαραίτητο λοιπόν πέρα από την βελτιστοποίηση των ζευγαριών εκκινητών να υπάρχει σιγουριά για την ποιότητα του cDNA που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο.

Αντιδραστήρια

- Διάλυμα 10x PCR (500 mM χλωριούχου καλίου, 100mM Tris-υδροχλωρίου με pH 9.0 στους 25 ^{0}C,1% Triton X-100)
- Χλωριούχο μαγνήσιο (Panreac, CR 161696)
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια 2.5 mM (Fermentas,R0181)
- Εκκινητές με συγκέντρωση 5 pmol/μL για B_2M
- Ένζυμο: Taq πολυμεράση
- Εκμαγείο cDNA 40 ng/μL

- H_2O (RNase / DNase free) (Gibco)

Υλικά – Συσκευές

- Σωληνάρια 1.5 mL τύπου Eppendorf (Greiner bio-one # 616201)
- Σωληνάριου 0.5 mL τύπου Eppendorf με κατάλληλου πάχους ενισχυμένα τοιχώματα για χρήση PCR (Sarstedt, 72.699)
- Συσκευή PCR “PeqStar 2x”
- Αυτόματες πιπέτες
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips)

Πορεία εργασίας

- Σε σωληνάρια 1.5 mL τύπου Eppendorf έγινε παραλαβή των δειγμάτων cDNA, τα οποία τοποθετήθηκαν σε δοχείο με πάγο. Στον πίνακα 4.3 φαίνεται η ονοματολογία, η προέλευση και η συγκέντρωση των δειγμάτων.

Πίνακας 4.3 *Δείγματα φυσιολογικών και ασθενών Mus musculus*

1. Τα δείγματα S1, S2, S3, S4, S14 προέρχονταν από φυσιολογικούς ποντικούς και είχαν συγκέντρωση 100 ng/μL.
2. Τα δείγματα d7E1, d7E2, d7E4, d7E5, d7E7 προέρχονταν από ασθενείς με Π.Α.Ε. ποντικούς εφτά ημερών και είχαν συγκέντρωση 100 ng/μL.
3. Τα δείγματα d12E1, d12E2, d12E3, d12E4, d12E5 προέρχονταν από ασθενείς με Π.Α.Ε. ποντικούς δώδεκα ημερών και είχαν συγκέντρωση 100 ng/μL.
4. Τα δείγματα d15E1, d15E2, d15E3, d15E4, d15E5 προέρχονταν από ασθενείς με Π.Α.Ε. ποντικούς δεκαπέντε ημερών και είχαν συγκέντρωση 100 ng/μL εκτός από το d15E5 που είχε 50 ng/μL.

- Σε κάθε ένα, από τα 20 σωληνάρια 0.5 mL τύπου Eppendorf για PCR, στον πάγο προστέθηκε 1 μL από το αντίστοιχο cDNA νωτιαίου μυελού. Επίσης σε ένα προστέθηκε 1 μL H_2O για το αρνητικό control. Επίσης σε ένα προστέθηκε 1 μL θετικού control, το οποίο αποτελείτο από cDNA ιστού που εκφράζει το γονίδιο της β2-μικροσφαιρίνης και είχε δοκιμαστεί πρωτύτερα σε πειράματα της εργαστηριακής ομάδας του δρ. Βασίλη Αϊδίνη.
- Παρασκευάστηκε το μείγμα των αντιδρώντων για την αντίδραση με βάση τις ποσότητες του πίνακα 4.4.

Πίνακας 4.4 *Πίνακας αντιδρώντων PCR γονιδίου αναφοράς B_2M*

Εκκινητής P111	25 μL
Εκκινητής P112	25 μL
10 x PCR buffer	50 μL
dNTPs (2.5mM)	50 μL
$MgCl_2$	60 μL
Gibco H_2O	285 μL
Taq πολυμεράση	10 μL

Η Taq πολυμεράση προστέθηκε στο τέλος και ακολούθησε ήπια ανάδευση του σωληνάριου τύπου Eppendorf, που περιείχε τα αντιδραστήρια.

- Εν συνεχεία από το μείγμα αντιδρώντων μοιράστηκαν 19 μL στα σωληνάρια που περιείχαν 1μL από τα αντίστοιχα cDNA, το θετικό και το αρνητικό control, μέχρι τελικού όγκου 20 μL.
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στη συσκευή PCR “PeqStar 2x” και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής

α) 95ºC για 05:00 λεπτά

β) 95ºC για 00:30 λεπτό

γ) 95ºC για 00:30 λεπτό

δ) 57ºC για 00:45 λεπτό

ε) 72ºC για 00:45λεπτό

στ) Επανάληψη των βημάτων γ έως ε 30 φορές

ζ) 72ºC για 10:00 λεπτά

η) 16ºC για 2:00 λεπτά

- Μετά το πέρας της συμβατικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% σε TBE, με σταθερό δυναμικό 120 Volt για περίπου τριάντα λεπτά.
- Η πηκτή αγαρόζης μεταφέρθηκε σε συσκευή με λάμπα UV για φωτογράφιση και παρατηρήθηκαν τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

4.7 Πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο σε δείγματα πρότυπων αραιωμένων συγκεντρώσεων ολικού cDNA φυσιολογικών και ασθενών ποντικών με Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα

Αντιδραστήρια

- Εκκινητές με συγκέντρωση 5 pmol/μL
- H_2O (RNase / DNase free) (Gibco)
- Εκμαγεία cDNA νωτιαίου μυελού 50, 10, 2, 0.4 ng/μL
- SsoFast ™ EvaGreen® Supermix (BIO-RAD)

Υλικά – Συσκευές

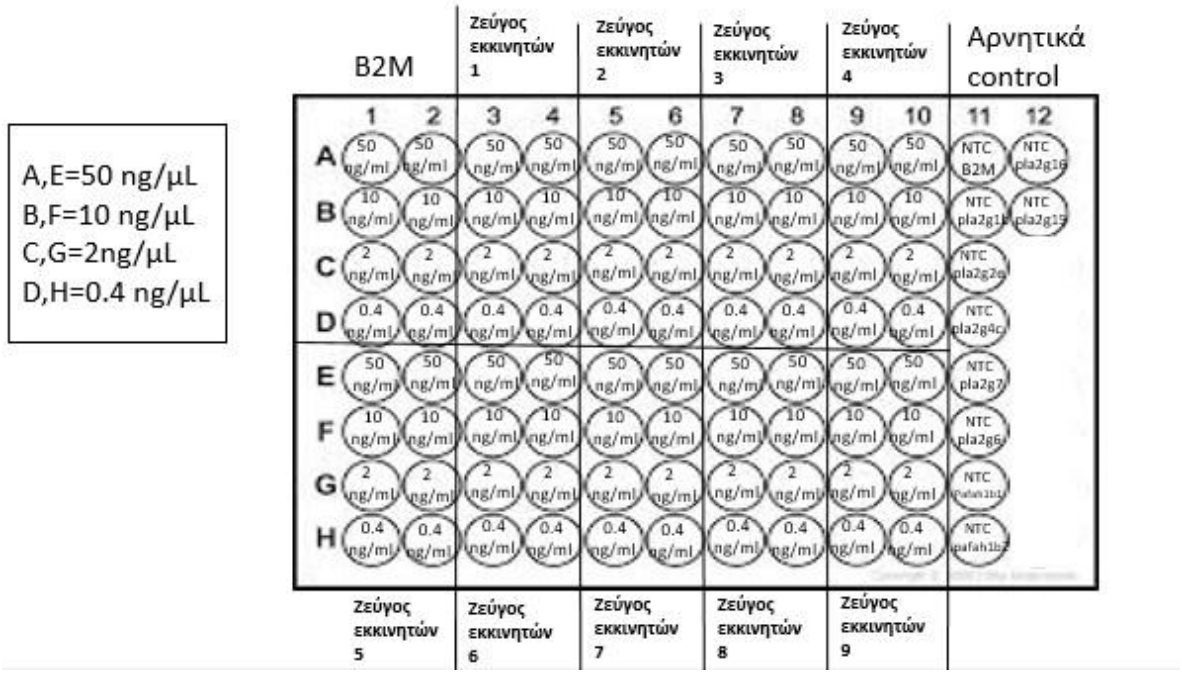
- Σωληνάρια 1.5 mL τύπου Eppendorf (Greiner bio-one # 616201)
- CFX96 Real-Time System
- C1000 Thermal Cycler
- Real Time PCR Plate
- Microseal ® 'B' seals (BIO-RAD, MSB1001)

Τα ζευγάρια εκκινητών για τα γονίδια της υπεροικογένειας των φωσφολιπασών A_2 που είχαν δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα επιλέχθηκαν για χρήση σε πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο σε δείγματα πρότυπων συγκεντρώσεων cDNA νωτιαίου μυελού προερχόμενα από *Mus musculus* είτε φυσιολογικών είτε με Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα. Δεδομένου ότι η τεχνική αυτή έχει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με την συμβατική PCR, με αυτόν τον κύκλο πειραμάτων στόχος ήταν ο έλεγχος ακόμα καλύτερα των συγκεκριμένων ζευγαριών εκκινητών ως προς την αποτελεσματικότητα και τη δράση τους. Τα τρία πρότυπα δείγματα συγκεντρώσεων δημιουργήθηκαν από τα διάφορα δείγματα cDNA νωτιαίου μυελού που πιστοποιήθηκαν για τη λειτουργικότητα τους με το πείραμα του υποκεφαλαίου 4.6. Ως εκ τούτου δεύτερη βασική επιδίωξη, πριν την τελική φάση πειραμάτων όπου το κάθε δείγμα θα ελεγχθεί ξεχωριστά, ήταν

να διενεργηθεί μια ποιοτική εκτίμηση ώστε να ευρεθούν τα γονίδια της υπεροικογένειας των φωσφολιπασών A_2, που εκφράζονται καταρχάς στην ασθένεια. Αποτέλεσμα αυτού θα ήταν στην επόμενη φάση πειραμάτων να προσδιοριστούν πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα έκφρασης τους στα διαφορετικά σημεία εξέλιξης της ασθένειας και να συγκριθούν μεταξύ τους, με εφαρμογή της μεθόδου σχετικής ποσοτικοποίησης (υποκεφάλαιο 4.9). Επίσης έταιρος βασικός στόχος των συγκεκριμένων πειραμάτων ήταν η ενίσχυση της αλληλουχίας του γονιδίου που αποτελεί στόχο με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια με παράλληλο έλεγχο για τη μη ύπαρξη διμερών τα οποία θα επηρέαζαν το δυναμικό εύρος της καμπύλης των πρότυπων αραιωμένων συγκεντρώσεων που θα δοκιμαστούν και το οποίο εύρος είναι διαφορετικό για κάθε ζευγάρι εκκινητών. Παράλληλα θα ελέγχονταν τα κατάλληλα επίπεδα συγκεντρώσεως του εκμαγείου DNA. Υψηλές συγκεντρώσεις του μορίου επηρεάζουν επίσης το δυναμικό εύρος της μέτρησης, μιας και τότε αυτό δρα σαν αναστολέας της αντίδρασης.Ανασταλτικό παράγοντα όμως αποτελούν και οι χαμηλές συγκεντρώσεις του εκμαγείου DNA διότι τότε σε μεγάλο βαθμό ελοχεύει ο κίνδυνος αναστολής της αντίδρασης από τυχόν επιμολύνσεις του δείγματος.

Πορεία εργασίας

- Από όλα τα δείγματα πλην του δείγματος d15E5 για λόγους οικονομίας πάρθηκαν 2 μL, τα οποία ενώθηκαν σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1.5 mL για το σχηματισμό ενός ενιαίου δείγματος cDNA νωτιαίου μυελού με συγκέντρωση 100 ng/μL
- Παρασκευάστηκαν μέσω διαδοχικών αραιώσεων τα εκμαγεία cDNA Α (50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0.4 ng/μL) που θα χρησιμοποιούνταν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο και τοποθετήθηκαν στον πάγο.
- Ακολούθως καταρτίστηκε το επόμενο σχεδιάγραμμα εργασίας (σχήμα 4.4) :



Σχήμα 4.4: *Σχεδιάγραμμα εργασίας*

- Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα 1μL από κάθε εκμαγείο cDNA τοποθετήθηκε κατά μήκος των οριζόντιων σειρών εναλλάξ ανά σειρά από το πυκνότερο (διάλυμα Α) στο αραιότερο (διάλυμα Δ).Μετά το πέρας της προσθήκης τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.
- Στις δύο τελευταίες κάθετες στήλες 11 και 12 του Real Time PCR plate τοποθετήθηκε με τη χρήση αυτόματης πιπέτας 1 μL H_2O το οποίο αποτελούσε το αρνητικό control.
- Παρασκευάστηκαν τα μίγματα αντιδρώντων της αντίδρασης (πίνακας 4.5) για τα ζεύγη εκκινητών του γονιδίου αναφοράς β2-μικροσφαιρίνη και των γονιδίων της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2.

Πίνακας 4.5 *Ποσότητες αντιδρώντων Real Time PCR για B_2M γονίδιο*

Εκκινητής	10 μL
Εκκινητής	10 μL
Gibco H_2O	70 μL
EvaGreen	100 μL

- Αμέσως μετά τηνπροσθήκη της EvaGreen σε κάθε μείγμα αντιδρώντων, ακολουθούσε με χρήση αυτόματης πιπέτας η προσθήκη 19 μL από αυτό σε κάθε ένα από τα αντίστοιχα πηγάδια του σχεδιαγράμματος εργασίας που είχε καταρτιστεί πρωτύτερα και τα οποία περιείχαν τα εκμαγεία cDNA.
- Με το πέρας της προσθήκης όλων των μειγμάτων αντιδρώντων το πιάτο μεταφέρθηκε στη συσκευή CFX96 Real-Time System, όπου και τοποθετήθηκε στην ειδικά διαμορφωμένη θέση πιάτου.
- Παράλληλα στον συνδεδεμένο C1000 Thermal Cycler ορίστηκε το παρακάτω πρόγραμμα, αξιοποιώντας και την εμπειρία από τα βελτιωτικά πειράματα προσδιορισμού των βέλτιστών θερμοκρασιών υβριδοποίησης για τα ζεύγη των εκκινητών, που είχαν προηγηθεί.

    α) 95°C για 03:00 λεπτά

    β) 95°C για 00:10 λεπτά

    γ) 58°C για 00:45 λεπτά

    δ) Επανάληψη των βημάτων β και γ για 39 φορές

    ε) 65°C για 00:05 λεπτά

    στ) 95°C για 00:50 λεπτά

- Μετά το πέρας του προγράμματος, παρατηρήθηκαν ποιοτικά τα διαγράμματα μέσω Η/Υ, για κάθε ζεύγος εκκινητών και επιλέχθηκαν οι κατάλληλοι.
- Τα πειράματα επαναλήφθηκαν έως ότου ελεγχθούν όλα τα ζευγάρια των εκκινητών με μόνη διαφοροποίηση ότι για δύο ζευγάρια εκκινητών άλλαξε η θερμοκρασία υβριδοποίησης στο εφαρμοζόμενο πρόγραμμα από 58°C στους 60°C.

4.8 Πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για τον προσδιορισμό των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων β2-μικροσφαιρίνης, υποξάνθινο-γουάνινο-ριβοσυλοτρανσφεράσης (HPRT), της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2, της COX-1 και της COX-2 σε δείγματα φυσιολογικών και ασθενών ποντικών

Αντιδραστήρια

- Εκκινητές για τα γονίδια αναφοράς β2-μικροσφαιρίνη και HPRT (γονίδια αναφοράς), PLA_2, COX-2, συγκέντρωσης 5 pmol/μL
- Εκκινητές για την COX-1 (Qiagen, QT00155330)
- Gibco RNase, DNase free H_2O
- Δείγματα cDNA νωτιαίου μυελού φυσιολογικών και ασθενών με Π.Α.Ε. ποντικών συγκέντρωσης 15 ng/μL
- Εκκινητές με συγκέντρωση 5 pmol/μL για την COX-2
- Fast SYBR® Green Master Mix
- SsoFast ™ EvaGreen® Supermix (BIO-RAD)
- H_2O (RNase / DNase free) (Gibco)

Υλικά – Συσκευές

- Σωληνάρια 1.5 mL τύπου Eppendorf (Greiner bio-one # 616201)
- CFX96 Real-Time System
- C1000 Thermal Cycler
- Real Time PCR Plate
- Microseal ® 'B' seals (BIO-RAD, MSB1001)

Πορεία εργασίας

- Από την αποθήκη των εκκινητών με συγκέντρωση 100 pmol/μL ευρισκόμενη σε θερμοκρασία -20°C ελήφθησαν τα σωληνάρια των εκκινητών και τοποθετήθηκαν στον πάγο.

- Με αραίωση σε νέα σωληνάρια τα ζευγάρια εκκινητών αραιώθηκαν σε τελική συγκέντρωση 5 pmol/μL
- Από τα δείγματα που μου δόθηκαν από την διδακτορική φοιτήτρια Ιωάννα Νίνου και με αραίωση σε νέα σωληνάρια Eppendorf δημιουργήθηκαν δείγματα cDNA νωτιαίου μυελού συγκέντρωσης 15 ng/μL.
- Στο Real Time PCR plate σε κάθε εγκοπή τοποθετήθηκε 1 μL από το κάθε εκμαγείο cDNA, συγκέντρωσης 15 ng/μL.
- Τοποθετήθηκε επίσης 1 μL H_2O ως αρνητικό control και 1 μL από τα αραιωμένα δείγματα νωτιαίων μυελών Α (50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), με βάση το σχήμα 4.6.

  Παρασκευάστηκε το μίγμα αντιδρώντων, της αντίδρασης και με την προσθήκη της φθορίζουσας πολυμεράσης διαμοιράστηκαν 19 μL σε κάθε εγκοπή.Το μίγμα αποτελούνταν από από H_20, το ζεύγος των εκκινητών και το αντίστοιχο ένζυμο πολυμεράσης σε συγκεκριμένες ποσότητες που φαίνονται στον πίνακα 4.6.

Πίνακας 4.6 *Ποσότητες αντιδρώντων Real Time PCR*

Εκκινητής	53 μL
Εκκινητής	53 μL
Gibco H_2O	371 μL
EvaGreen	530 μL

- Το Real Time PCR plate τοποθετήθηκε στην συσκευή CFX96 Real-Time System
- Παράλληλα στον συνδεδεμένο επί της συσκευής, C1000 Thermal Cycler ορίστηκε το πρόγραμμα του σχήματος 4.5 το οποίο ήταν:

  α) 95ºC για 03:00 λεπτά

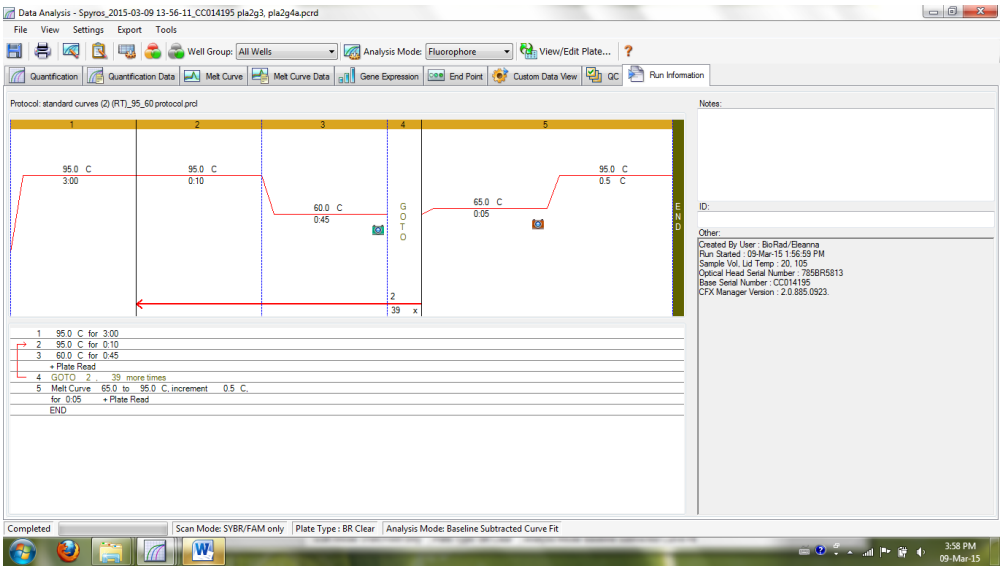
  β) 95ºC για 00:10 λεπτά

  γ) 58ºC για 00:45 λεπτά

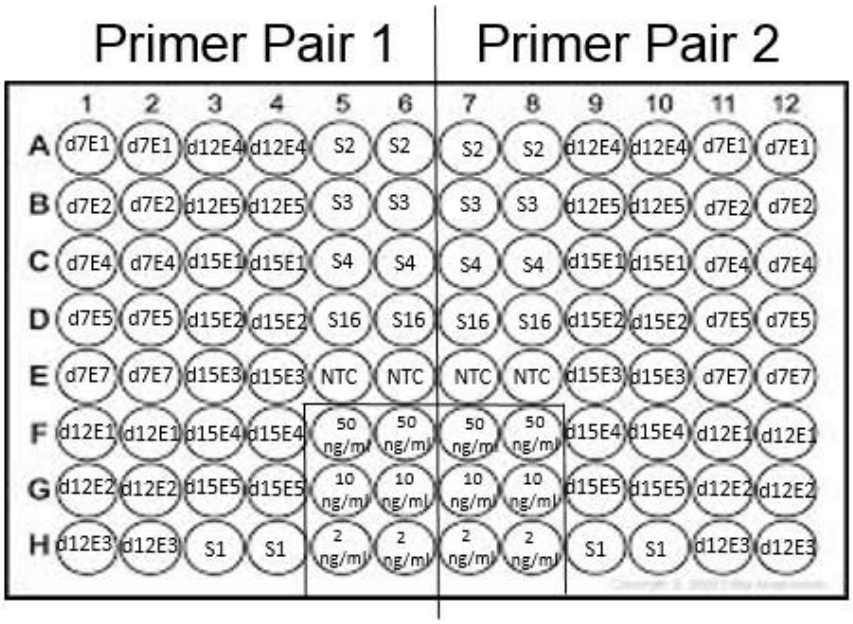
δ) Επανάληψη των βημάτων β και γ για 39 φορές

ε) 65ºC για 00:05 λεπτά

στ) 95ºC για 00:50 λεπτά



Σχήμα 4.5 *Ενδεικτικό πρόγραμμα Real Time PCR για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης των PLA_2*



Σχήμα 4.6 *Διαγραμματική απεικόνιση real time PCR plate με PLA_2 εκκινητές*

- Παρατηρήθηκαν ποιοτικά τα διαγράμματα μέσω Η/Υ και καταγράφηκαν οι τιμές του «Κύκλου κατωφλίου» (Ct) για όλα τα μεμονωμένα δείγματα cDNA φυσιολογικού και ασθενή νωτιαίου μυελού. Οι συγκεκριμένες τιμές

χρησιμοποιήθηκαν αργότερα κατά τη διαδικασία της σχετικής ποσοτικοποίησης για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και την κατασκευή των αντίστοιχων διαγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης.

Η παραπάνω βασική μεθοδολογία ακολουθήθηκε τις περισσότερες φορές, με μικρές παραλλαγές ανάλογα την περίπτωση που καταγράφονται παρακάτω:

1. Λόγω ακαταλληλότητας του B2M ως γονιδίου αναφοράς στην Π.Α.Ε., πραγματοποιήθηκαν πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για τον προσδιορισμό των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης της υποξάνθινο-γουάνινο-ριβοσυλοτρανσφεράσης (HPRT) με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Η μόνη διαφορά ήταν ότι ο τρόπος αραίωσης, τόσο των HPRT ¨όσο και των B2M εκκινητών ήταν διαφορετικός από των υπολοίπων παρόλο που εν τέλει η τελική συγκέντρωση ήταν ίδια (5 pmol/μL). Συγκεκριμένα, 10 μL του κάθε εκκινητή του ζεύγους αραιώθηκαν με 190 μL H_2O.
2. Στο πείραμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για το γονίδιο της COX-1, χρησιμοποιήθηκαν έτοιμοι εκκινητές για το γονίδιο COX-1 που δόθηκαν από το εργαστήριο του δρ. Γεωργίου Κόλλια στο Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ». Επίσης χρησιμοποιήθηκε και θετικό control πέραν του αρνητικού, κάτι που ήταν εφικτό καθώς θα μετριόταν η γονιδιακή έκφραση ενός μόνο γονιδίου και όχι δύο όπως πρωτύτερα. Το θετικό control δόθηκε από τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ελεάννα Καφφέ, από το εργαστήριο του δρ. Βασίλη Αϊδίνη στο Ε.ΚΕ.Β.Ε. « Αλέξανδρος Φλέμινγκ » και αποτελείτο από δείγμα ήπατος, στο οποίο σε παλιότερα πειράματα είχε προσδιοριστεί επιτυχώς η γονιδιακή έκφραση της COX-1. Επίσης χρησιμοποιήθηκε αντί της πολυμεράσης EvaGreen, η SYBER Green I και άλλαξαν τόσο οι ποσότητες αντιδρώντων του μίγματος της αντίδρασης (πίνακας 4.7), όσο και το πρόγραμμα που τέθηκε στην συσκευή C1000 Thermal Cycler και το οποίο πέρα από διαφορετική θερμοκρασία υβριδοποίησης, είχε και ένα επιπλέον στάδιο (σχήμα 4.7).

Πίνακας 4.7 *Ποσότητες αντιδρώντων Real Time-PCR για COX-1*

Fast SYBR® Green Master Mix	550 μL
Qiagen Primers	110 μL
H_2O	385 μL

α) 95ºC για 00:15 λεπτά
β) 94ºC για 00:15 λεπτά
γ) 57ºC για 00:30 λεπτά
δ) 72ºC για 00:30 λεπτά
ε) Επανάληψη των βημάτων β έως δ για 39 φορές
στ) 65ºC για 00:05 λεπτά
ζ) 95ºC για 00:50 λεπτά

Σχήμα 4.7 *Πρωτόκολλο Real Time PCR για COX-1*

3. Στο πείραμα αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για το γονίδιο της COX-2 χρησιμοποιήθηκε επίσης ως θετικό δείγμα εκμαγείο cDNA από καλλιέργεια μακροφάγων κυττάρων στα οποία είχε επιδράσει πολυσακχαρίτης. Το συγκεκριμένο δόθηκε από το μεταδιδακτορικό ερευνητή του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλεμιγκ» Αντώνη Σκλήρη υπό μορφή RNA. Ως εκ τούτου, μεσολάβησε για την παρασκευή του cDNA, ένας κύκλος πειραμάτων αντίστροφής μεταγραφάσης, συμβατικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με βαθμίδωση των θερμοκρασιών υβριδοποίησης, από τους 50ºC έως τους 60ºC με ζεύγη εκκινητών για COX-2 και β2-μικροσφαιρίνη. Επιπρόσθετα λοιπόν στο τελικό πείραμα χρησιμοποιήθηκαν πέραν

του θετικού control, και του διαφορετικού γονιδίου αναφοράς HPRT, τόσο άλλο μίγμα αντιδρώντων (πίνακας 4.8, όσο και διαφορετικό πρόγραμμα με άλλη θερμοκρασία υβριδοποίησης (σχήμα 4.8).

Πίνακας 4.8 *Ποσότητες αντιδρώντων Real-time PCR για COX-2*

Εκκινητής για COX-2 (Ptgs2)	58 μL
Εκκινητής για COX-2 (Ptgs2)	58 μL
Gibco H_2O	406 μL
EvaGreen	580 μL

α) 95ºC για 03:00 λεπτά

β) 95ºC για 00:10 λεπτά

γ) 56.3ºC για 00:45 λεπτά

δ) Επανάληψη των βημάτων β και γ για 39 φορές

ε) 65ºC για 00:05 λεπτά

στ) 95ºCγια 00:50 λεπτά

Σχήμα 4.8 *Πρωτόκολλο Real Time PCR για COX-2*

4.9 Επεξεργασία δεδομένων

Η διαφορά της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο ως προς την συμβατική PCR είναι η δυνατότητα που παρέχει για ποσοτικοποίηση των δεδομένων με έναν πιο ακριβή τρόπο, καθώς αναλύει τα δεδομένα στην εκθετική φάση της αντίδρασης, κατά την οποία με τον ακριβή πολλαπλασιασμό της αλληλουχίας-στόχου σε κάθε κύκλο συσσωρεύεται η διπλάσια ποσότητα της επιθυμητής ενισχυόμενης περιοχής [76].

Οι δύο βασικότερες μέθοδοι ανάλυσης των δεδομένων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για πειράματα ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης είναι η απόλυτη και η σχετική ποσοτικοποίηση[76].

Η απόλυτη ποσοτικοποίηση προσδιορίζει την ακριβή ποσότητα του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου-στόχου συγκρίνοντας το σήμα που δίνει η Real Time PCR, δηλαδή τη τιμή των «Κύκλων Κατωφλίου» με μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Το τελικό αποτέλεσμα της σύγκρισης είναι η ποσότητα του νουκλεϊκού οξέος (αριθμός αντιγράφων, μg) ανά δεδομένη ποσότητα του δείγματος (ανά κύτταρο ή ανά μg συνολικού RNA). Αντίθετα, η σχετική ποσοτικοποίηση εκφράζει την μεταβολή στην έκφραση του γονιδίου-στόχου σε σχέση με κάποιο δείγμα αναφοράς, όπως πχ ένα μη επεξεργασμένο δείγμα. Αυτό γίνεται μέσω της συσχέτισης των «Κύκλων Κατωφλίου» των δειγμάτων με αυτούς της ομάδας αναφοράς. Το τελικό αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι ένας λόγος που εκφράζει το πόσες φορές περισσότερη είναι η ποσότητα του γονιδίου-στόχου σε σχέση με την ποσότητα του στο δείγμα αναφοράς. Στα πειράματα μας, ως δείγμα αναφοράς επιλέχθηκε η ομάδα των δειγμάτων που αποτελούνταν από φυσιολογικό νωτιαίο μυελό ποντικού. Για αμφότερες τις μεθόδους ποσοτικοποίησης οι μετρήσεις που λαμβάνονται από ένα πείραμα πρέπει να κανονικοποιηθούν, ώστε τα δεδομένα να είναι συγκρίσιμα. Συγκεκριμένα, στη απόλυτη ποσοτικοποίηση η κανονικοποίηση γίνεται για να προσαρμοστεί η ληφθείσα ποσότητα του στόχου σε συγκεκριμένα πρότυπα επίπεδα της τάξης μεγέθους του δείγματος. Στην σχετική ποσοτικοποίηση η κανονικοποίηση λαμβάνει χώρα ώστε να εξασφαλιστεί ότι οι ποσότητες του γονιδίου στόχου συγκρίνονται σε ισοδύναμες ποσότητες δειγμάτων. Σαν μέσο κανονικοποίησης και στις δύο μεθόδους μπορεί να χρησιμοποιηθεί [76]:

- ο αριθμός των κυττάρων που περιέχει το εκμαγείο cDNA που χρησιμοποιείται στο πείραμα,
- τα μg νουκλεϊκού οξέος της πρότυπης ουσίας που χρησιμοποιείται στην PCR
- το επίπεδο έκφρασης ενός γονιδίου αναφοράς.

Έχει επικρατήσει τα δύο πρώτα μέσα κανονικοποίησης να χρησιμοποιούνται στην απόλυτη ποσοτικοποίηση, ενώ αντίθετα το τρίτο στην σχετική ποσοτικοποίηση. Ως γονίδιο **αναφοράς** επιλέγεται αυτό, του οποίου τα επίπεδα έκφρασης είναι σταθερά και υπάρχουν σε όλα τα δείγματα και των οποίων η έκφραση δεν επηρεάζεται από την πειραματική αγωγή που χρησιμοποιείται στη μελέτη. Η χρήση ενός γονιδίου αναφοράς είναι πλεονεκτική σε περιπτώσεις όπου η ακριβής ποσοτικοποίηση της ποσότητας του RNA από την οποία φτιάχτηκε το εκμαγείο cDNA δεν είναι ακριβής. Στην περίπτωση μας ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των δειγμάτων είχε επιλεχθεί αρχικώς η β2-μικροσφαιρίνη αλλά εν τέλει προτιμήθηκε η υποξάνθινο-γουάνινο ριβοσυλοτρανσφεράση (HPRT), ένα ένζυμο που συμμετέχει στο μεταβολισμό των πουρίνων και παράγει νουκλεοτίδια και πυροφωσφορικό.

Η μέθοδος που επιλέχθηκε για την ποσοτικοποίηση των δεδομένων μας ήταν η σχετική ποσοτικοποίηση και συγκεκριμένα η χρήση της μεθόδου $2^{-\Delta\Delta CT}$ [77] για να συγκρίνουμε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που αντιστοιχούν σε ένζυμα που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απόκριση που παρουσιάζεται στην Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα ανάμεσα σε ασθενή και σε φυσιολογικά *Mus musculus* σε δείγματα cDNA νωτιαίου μυελού.

Πορεία Εργασίας

- Καταρτίστηκε πίνακας με τις αποτελεσματικότητες ενίσχυσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης τόσο για το γονίδιο αναφοράς όσο και για τα υπόλοιπα γονίδια-στόχους. Η μέθοδος $2^{-\Delta\Delta Ct}$ προϋποθέτει ότι τόσο το γονίδιο αναφοράς όσο και το γονίδιο στόχος ενισχύονται με αποτελεσματικότητα κοντά στο 100% ενώ οι τιμές των αποτελεσματικοτήτων τους δεν πρέπει να διαφέρουν πάνω από 5%.
- Χρησιμοποιώντας το Microsoft Excel καταρτίστηκαν συγκεκριμένες λίστες τιμών. Μία με τους «Κύκλους Κατωφλίου» για τη γονιδιακή έκφραση του γονιδίου αναφοράς και μία με τους «Κύκλους Κατωφλίου» για κάθε ένα από τα γονίδια-στόχους, για τα οποία διενεργήθηκαν τα πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.
- Έγινε κανονικοποίηση των τιμών των δειγμάτων αφού αφαιρέθηκαν οι Ct του γονιδίου αναφοράς από τις τιμές Ct στα φυσιολογικά και στα δείγματα Π.Α.Ε., οπότε προέκυψαν οι τιμές ΔC_T.
- Προσδιορίστηκε ο μέσος όρος των ΔC_T των φυσιολογικών δειγμάτων που αποτελούσαν την ομάδα control.
- Αφαιρέθηκε η τιμή του μέσου όρου ΔC_T των φυσιολογικών δειγμάτων από τα ΔC_T ‘όλων των δειγμάτων ξεχωριστά και καταγράφηκαν οι τιμές σε νέα στήλη ($\Delta\Delta C_T$)
- Στη συνέχεια υψώθηκε το 2 εις την - $\Delta\Delta C_T$ ($2^{-\Delta\Delta CT}$)και υπολογίστηκε έτσι ο κανονικοποιημένος λόγος που προσδιορίζει πόσο αυξήθηκε η μειώθηκε η γονιδιακή έκφραση του κάθε γονιδίου στα δείγματα προερχόμενα από ασθενή *Mus musculus* σε σχέση με την φυσιολογική ομάδα (control group).
- Με τη χρήση του προγράμματος SigmaPlot της Systat Software Inc. κατασκευάστηκαν διαγράμματα απεικόνισης της σχετικής γονιδιακής έκφρασης για όλα τα γονίδια της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2, καθώς και για την COX-1 και COX-2, των δειγμάτων νωτιαίου μυελού 7, 12 και 15 ημερών από την επαγωγή της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας.

4.10 Εκχύλιση λιπιδίων

Αντιδραστήρια

- Χλωροφόρμιο
- Μεθανόλη
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-άλατος (PBS)
- Προπανόλη
- Υδροχλώριο 6N
- Μίγμα εσωτερικού προτύπου (17:0 LPC, 17:0 PC, 17:0 LPA)

Υλικά – Συσκευές

- Σωληνάρια 1.5 mL τύπου Eppendorf (Greiner bio-one # 616201)
- Υάλινοι σωλήνες (ISOLAB)
- Υάλινα σιφώνια
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips)
- Αυτόματες πιπέτες
- Απαγωγός
- Συσκευή Speed Vac
- Φυγόκεντρος Sorval
- HPLC filters

Η εκχύλιση των λιπιδίων πραγματοποιήθηκε με τροποποιημένη μέθοδο Folch [78].

Πορεία εργασίας

- Αριθμήθηκαν δεκαέξι υάλινοι σωλήνες που αντιστοιχούσαν στα δείγματα προς μέτρηση εις τετραπλούν (πλάσμα, ήπαρ, νωτιαίο μυελό και εγκέφαλο).

- Σε κάθε αριθμημένο υάλινο σωλήνα προστέθηκαν κατά σειρά 50 μL πλάσματος ή 500 μL ομογενοποιημένου ιστού σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-άλατος (PBS) και 10 μL εσωτερικού προτύπου (μείγμα 17:0 LPC, 17:0 PC, 17:0 LPA)
- Προστέθηκαν 630 μL χλωροφόρμιο στον απαγωγό και 315 μL παγωμένη μεθανόλη σε κάθε σωλήνα.
- Ακολούθησε βίαιη ανάδευση με συσκευή Vortex για ένα λεπτό.
- Προστέθηκαν 200 μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-άλατος προς σχηματισμό δύο φάσεων. Η πάνω φάση (υδατική) εμπεριέχει τις υδρόφιλες και αμφιπολικές ουσίες και η κάτω (χλωροφορμική) τις άπολες.
- Ακολούθησε στιγμιαίο Vortex στους σωλήνες και αφέθηκαν σε ηρεμία για 25 λεπτά.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 3500 rpm για 10 λεπτά
- Πάρθηκε σε νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 mL η κάτω φάση με τα άπολα λιπίδια, τα οποία αφέθηκαν να εξατμιστούν στη συσκευή Speed Vac για 30 λεπτά. Εν συνεχεία επαναδιαλύθηκαν σε 150 μL προπανόλη το καθένα και φιλτραρίστηκαν για να είναι έτοιμα για HPLC.
- Η πάνω φάση είχε αφεθεί για 10 λεπτά στον πάγο.
- Εν συνεχεία προστέθηκαν 20 μL υδροχλωρίου 6N και 630 μL χλωροφορμίου και ακολούθησε ανάδευση.
- Η πάνω φάση φυγοκεντρήθηκε ξανά στα 3500 rpm για 10 λεπτά
- Οι δύο φάσεις που σχηματίστηκαν μεταφέρθηκαν σε νέα σωληνάρια τύπου Eppendorf και ακολούθησαν τα στάδια ξήρανσης, επαναδιάλυσης σε προπανόλη και φιλτραρίσματος των δειγμάτων για HPLC, ως ανωτέρω.
- Η ανάκτηση των λιπιδίων κυμαινόταν μεταξύ 60 % και 100 %. Η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) ήταν μικρότερη από 7% στο πλάσμα το οποίο περιείχε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.1, 0.5 και 1 μM) των LPA, LPE, LPS, LPG, Lyso-PAF και (0.5, 5 και 50 μM) των LPC, PC.

4.11 Χρωματογραφική ανάλυση λιπιδίων

Αντιδραστήρια

- Ισοπροπανόλη
- Εξάνιο
- Φορμικό αμμώνο

Υλικά-Συσκευές

- Χρωματογραφική στήλη Luna Silica 2-250 mm, μεγέθους σωματιδίων 5μm) (Phenomenex)
- RSLC nano system Ultimate 3000 (Thermo Scientific)
- LTQ Orbitrap XL hybrid FTMS (Thermo Scientific)

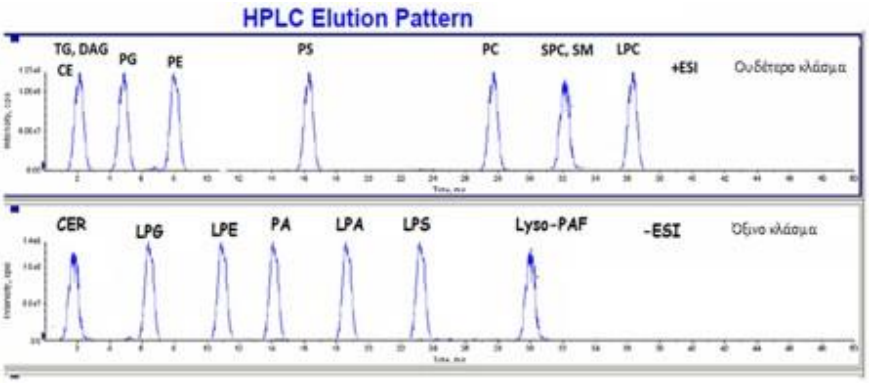
Σε συνεργασία με το Εργαστήριο Μακρομοριακής Ανάλυσης και τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ελεάννα Καφφέ του Ε.Κ.Ε.Β.Ε ‘’Αλέξανδρος Φλέμινγκ’ χρησιμοποιήθηκε μιας μέθοδος LC/ESI-MS/MS (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 RSLC/ESI- LTQ Orbitrap XL hybrid FT-MS) για τη μέτρηση των φωσφολιπιδίων, ουδέτερων λιπών και εστέρων της χοληστερόλης. Τα λιπίδια διαχωρίσθηκαν με τη στήλη χρησιμοποιώντας για την έκλουση τους ένα βαθμιδωτό πρόγραμμα που συνίστατο από Ισοπροπανόλη : Εξάνιο: 100 mM φορμικό αμμώνιο (aq) 58:40:2 (κινητή φάση A) και Ισοπροπανόλη : Εξάνιο: 100 mM φορμικό αμμώνιο (aq) 50:40:10 (κινητή φάση B). Η κινητή φάση είχε ρυθμό ροής 0.3 mL/λεπτό και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 50 λεπτά/δείγμα. Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι τα λιπίδια που δεν είναι πολύ άφθονα (LPA, LPS, LPG, LPE, PA) εκλούονται σε διαφορετικούς χρόνους από τα λιπίδια που είναι άφθονα (PC, LPC, TG). Αυτό μειώνει τον κίνδυνο να κατασταλεί ο ιονισμός των χαμηλότερης συγκέντρωσης λιπιδίων από τα υψηλότερης συγκέντρωσης λιπίδια αν περνούσαν ταυτόχρονα από το φασματογράφο μάζας.

Πορεία εργασίας

- Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (Electro-Spray Ionization) σε αρνητική φόρτιση για τα λιπίδια που

ανακτήθηκαν από το οξινισμένο πλάσμα και σε θετική φόρτιση για τα λιπίδια που προέρχονταν από το ουδέτερο κλάσμα. Η ανάλυση έγινε με 100 K διακριτική ικανότητα παρέχοντας υψηλή ακρίβεια για τη μέτρηση και ταυτοποίηση των λυσοφωσφολιπιδίων. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν με το πακέτο λογισμικού ‘’Xcalibur’’ (Thermo Scientific). Η μάζα του προδρόμου ιόντος (precursor ion) χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό, ενώ η ταυτότητα κάθε λιπιδίου επιβεβαιώθηκε με την τεχνική CID (Collision Induced Dissociation). Οι αναλογίες των εμβαδών κορυφής (λιπίδιο/εσωτερικό πρότυπο) έναντι της μοριακής αναλογίας (λιπίδιο/εσωτερικό πρότυπο) υπολογίστηκαν και κατασκευάστηκαν οι πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης. Λόγω της μη ύπαρξης όλων των λιπιδίων σε μορφή προτύπου και του ότι ο ιονισμός εξαρτάται από την υδροφοβικότητα του μορίου (αριθμό ατόμων άνθρακα), χρησιμοποιήθηκαν εναλλακτικά πρότυπα λιπίδια όσο το δυνατόν πλησιέστερα σε υδροφοβικότητα με τα προς μέτρηση λιπίδια. Για τις τάξεις των λιπιδίων που δεν υπήρχε πρότυπο η ποσοτικοποίηση τους έγινε με βάση τη μάζα και το χαρακτηριστικό προφίλ θραυσμάτων MS/MS.

- Με την παραπάνω μέθοδο ποσοτικοποιήθηκαν όλα τα λιπίδια που παρατίθενται μαζί με τους χρόνους έκλουσης τους από τη στήλη, στο παρακάτω σχήμα: Τα λιπίδια που ανακτήθηκαν από το ουδέτερο κλάσμα φορτίσθηκαν θετικά στην πηγή ιονισμού (+ESI) ενώ τα λιπίδια που ανακτήθηκαν στο οξινισμένο κλάσμα φορτίσθηκαν αρνητικά στην πηγή ιονισμού.



Σχήμα 4.9 *Χρόνος έκλουσης από τη στήλη των διαφόρων λιπιδίων που ανακτήθηκαν στο ουδέτερο και οξινισμένο κλάσμα*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πρωταρχικός σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν ο έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης των ενζύμων της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2 καθώς και δύο ισομορφών των Κυκλοξυγενασών σε ποντικούς με Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν μια σειρά πειραμάτων ανίχνευσης και βελτιστοποίησης όλων σχετικών παραμέτρων. Τα πειράματα μπορούν να χωριστούν σε δύο ενότητες. Η πρώτη αφορά την οικογένεια των Φωσφολιπασών A_2 και η δεύτερη τις κυκλοξυγενάσες. Στα παρακάτω σχήματα 5.1 και 5.2 φαίνονται ενδεικτικά οι πειραματικές πορείες που ακολουθήθηκαν.

Ενότητα πειραμάτων Φωσφολιπασών A_2

1. Απομόνωση RNA από δείγματα φυσιολογικών ιστών lung, liver και brain από *Mus musculus*. Καθαρισμός μέσω κατεργασία τους με DNAση και σύνθεση cDNA με τη χρήση oligo dT-18 και μέσω του πρωτόκολλου αντίστροφης μεταγραφάσης.
2. Δημιουργία εκκινητών με χρήση του NCBI Primer Blast.
3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης για όλα τα μέλη της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2
4. Διπλή φάση βελτιωτικών πειραμάτων βαθμιδωτής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για προσδιορισμό των βέλτιστων θερμοκρασιών υβριδισμού για τους εκκινητές, ακολουθούμενα από επανάληψη των πειραμάτων με συνδυασμό αλλαγών της συγκεντρώσεως Mg^{2+} για όσους εκκινητές δεν δώσαν σαφή αποτελέσματα.
5. Πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για τα δεκαέξι ζευγάρια εκκινητών σε δείγματα cDNA νωτιαίου μυελού πρότυπων συγκεντρώσεων (50, 10, 5 ng/μL), φυσιολογικών και ασθενών *Mus musculus*
6. Πείραμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR) προσδιορισμού της σχετικής γονιδιακής έκφρασης των PLA_2 σε δείγματα νωτιαίου μυελού από φυσιολογικά και ασθενή με Π.Α.Ε. *Mus musculus* 7, 12, 15 ημερών

Σχήμα 5.1 *Διάγραμμα πειραματικής ροής μελέτης Φωσφολιπασών A_2*

Ενότητα πειραμάτων Κυκλοξυγενασών

COX-1

1. Πείραμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR) προσδιορισμού της σχετικής γονιδιακής έκφρασης COX-1 σε δείγματα νωτιαίου μυελού από φυσιολογικά και ασθενή με Π.Α.Ε. *Mus musculus* 7, 12, 15 ημερών

COX-2

2. Μετατροπή δοθέντος RNA συγκεντρώσεως 1210 ng/μL, προερχόμενο από κύτταρα μακροφάγων επεξεργασμένων με Lys, σε cDNA με το πρωτόκολλο αντίστροφής μεταγραφάσης.
3. Πείραμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR) προσδιορισμού της σχετικής γονιδιακής έκφρασης COX-2 σε δείγματα νωτιαίου μυελού από φυσιολογικά και ασθενή με Π.Α.Ε. *Mus musculus* 7, 12,15 ημερών

Σχήμα 5.2 *Διάγραμμα πειραματικής ροής μελέτης Κυκλοξυγενασών*

Τα πειράματα και των δύο αυτών ενοτήτων διεξάχθηκαν μαζί. Τελικό στάδιο πειραμάτων είναι το πείραμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο των φυσιολογικών αλλά και παθογόνων, από ποντικούς με Π.Α.Ε, νωτιαίων μυελών.

5.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για όλα τα μέλη της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2 σε φυσιολογικούς ιστούς *Mus musculus*

Σκοπός αυτού του κύκλου πειραμάτων ήταν η ανίχνευση των μελών της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2 σε ιστούς φυσιολογικών *Mus musculus.* Λόγω των μικρών ποσοτήτων νωτιαίου μυελού, χρησιμοποιήθηκαν αντ' αυτού δείγματα εγκεφάλου, ήπατος, πνεύμονα, νεφρού, καρδιάς. Τα cDNA νεφρού και καρδιάς είχαν παρασκευαστεί από το εργαστήριο του δρ Βασίλειου Αιδίνη.

Στα παρακάτω σχήματα 5.3, 5.4 και 5.5 φαίνονται τα ποσά του RNA που εκχυλίστηκαν από τους ιστούς εγκεφάλου, συκωτιού, πνεύμονα και νεφρού αλλά και τα ποσοστά απώλειας και ανάκτησης τους, λόγω του καθαρισμού των δειγμάτων από υπολλείματα DNA, μέσω κατεργασίας με το ένζυμο DNAse .

Πριν την κατεργασία με DNAse				Μετά την κατεργασία με DNAse			
Δείγματα	A (ng/μL)	260/280	260/230	Δείγματα	A (ng/μL)	260/280	260/230
Brain 1	335.2	2.11	2.04	Brain 1	115.6	1.98	2.14
Brain 2	924.9	2.07	2.13	Brain 2	282.6	2	2.1
Brain 3	985.4	2.09	2.12	Brain 3	118.2	2	2.13

	Εγκέφαλος	
Δείγματα	Απωλεια RNA	Ανάκτηση RNA
Brain 1	77	23
Brain 2	43	57
Brain 3	76	24

Σχήμα 5.3 *Αποτελέσματα καθαρισμού και ανάκτησης RNA εγκεφάλου από φυσιολογικό Mus musculus μετά από απομόνωση και κατεργασία με DNAse.*

Πριν την κατεργασία με DNAse				Μετά την κατεργασία με DNAse			
Δείγματα	A(ng/μL)	260/280	260/230	Δείγματα	A(ng/μL)	260/280	260/230
L241	766	2.09	1.84	L241	128	2.03	2.24
L266	672	2.07	1.77	L266	264.2	2.04	2.12
L263	905	2.1	2.02	L263	260.4	2.08	2.1
L196	787	2.09	2.03	L196	293.1	2.03	1.96
L259	1866	2.1	2.07	L259	148.9	2.04	2.14
L262	1414	2.1	1.98	L262	410.7	2.03	1.75

	Συκώτι	
Δείγματα	Απώλεια RNA	Ανάκτηση RNA
L241	**74**	**26**
L266	47	53
L263	48	52
L196	41	59
L259	**70**	**30**
L262	18	82

Σχήμα 5.4 *Αποτελέσματα καθαρισμού και ανάκτησης RNA ήπατος από φυσιολογικό Mus musculus μετά από απομόνωση και κατεργασία με DNAse.*

Πριν την κατεργασία με DNAse				Μετά την κατεργασία με DNAse			
Δείγματα	A (ng/μL)	260/280	260/230	Δείγματα	A (ng/μL)	260/280	260/230
lung	2619.3	1.94	1.92	lung	124.7	2.07	2.15
kidney	817.3	2.13	1.98	kidney	479.6	2.04	2.11

	Πνεύμονας & Νεφρό	
Δείγματα	Απώλεια	Ανάκτηση
lung	75.06	24.94
kidney	4.08	95.92

Σχήμα 5.5 *Αποτελέσματα καθαρισμού και ανάκτησης RNA πνευμόνων και νεφρών από φυσιολογικό Mus musculus μετά από απομόνωση και κατεργασία με DNAse.*

Ο αποτελεσματικός διαχωρισμός του RNA από το DNA οφείλεται στο ότι το μόριο του DNA χάνει την πολικότητα του σε όξινες συνθήκες λόγω της εξουδετέρωσης των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων (PO_4^{3-}) του κορμού του. Αποτέλεσμα είναι η καταβύθιση αυτού στην οργανική και μη πολική κάτω φάση. Αντίθετα το RNA παρόλο που έχει και το ίδιο αρνητικό φορτίο, επειδή είναι μονόκλωνο, έχει εκτεθειμένες τις βάσεις του με αποτέλεσμα να σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου με το νερό και το RNA να παραμένει στην υδατική φάση [64]. Ως εκ τούτου μετρήθηκαν πέραν των συγκεντρώσεων των δειγμάτων και οι λόγοι απορροφήσεων στα 260/280 και 260/230 νανόμετρα. Ο πρώτος λόγος χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί η καθαρότητα του RNA καθώς για το RNA τιμή πλησίον του 2.0 είναι αποδεκτή. Αν ο λόγος έχει σημαντικά χαμηλότερη τιμή αυτό υποδεικνύει ότι ενδέχεται να υπάρχει μόλυνση των δειγμάτων ιδίως από DNA. Ο λόγος 260/230 είναι ένα επιπλέον δευτερεύον μέτρο καθαρότητας του RNA. Το αναμενόμενο εύρος των τιμών του είναι ανάμεσα στο 2.0 και 2.2. Αν η τιμή αυτού του λόγου είναι μικρότερη από το λόγο απορροφήσεων 260/280, τότε αυτό θα καταδείκνυει επιμόλυνση του δείγματος από άλλες χημικές ουσίες όπως φαινόλη ή άλλα οργανικά μόρια που απορροφούν στα 230 nm [79].

5.2 Σχεδιασμός ζευγαριών εκκινητών

Σαν διαδικασία, ο σχεδιασμός ζευγαριών εκκινητών αποβλέπει στη δημιουργία κατάλληλων αλληλουχιών DNA για ενίσχυση της αλληλουχίας του γονιδίου-στόχου. Στη βάση αυτή ο σχεδιασμός των εκκινητών στοχεύει στο να διατηρήσει μια ισορροπία ανάμεσα σε δύο βασικούς άξονες, την ειδικότητα και την αποτελεσματικότητα, κατά το στάδιο της ενίσχυσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Η ειδικότητα ορίζεται σαν η συχνότητα κατά την οποία συμβαίνουν λάθη στη σύνδεση του εκκινητή και του εκμαγείου DNA. Εκκινητές με μέτρια ως φτωχή ειδικότητα τείνουν να υβριδοποιούνται με μη επιθυμητά νουκλεοτίδια του εκμαγείου DNA και να παράγουν παραπροϊόντα, πέραν του επιθυμητού προϊόντος. Με τον όρο αποτελεσματικότητα ορίζεται το μέτρο της ικανότητας ενός ζεύγους εκκινητών να ενισχύει την αλληλουχία στόχο ως προς την θεωρητικά βέλτιστη συνθήκη, του διπλασιασμού αυτής σε κάθε κύκλο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Η επιλογή αλλά και ο ορθολογικός σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών είναι ίσως ο καθοριστικότερος παράγοντας για την επιτυχή έκβαση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Παρακάτω παρατίθενται οι πίνακες 5.1 και 5.2 με τα ζευγάρια εκκινητών που δημιουργήθηκαν, όπου:

- Οι επισημασμένοι με μωβ εκκινητές προέρχονται από τη βάση δεδομένων στην ιστοσελίδα του “PrimerBank”
- Οι υπόλοιποι είναι σχεδιασμένοι μέσω του εργαλείου δημιουργίας εκκινητών “PrimerBlast” στο σύνδεσμο http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
- Με κίτρινο επισυνάπτονται οι εκκινητές που δόθηκαν από άλλες ομάδες

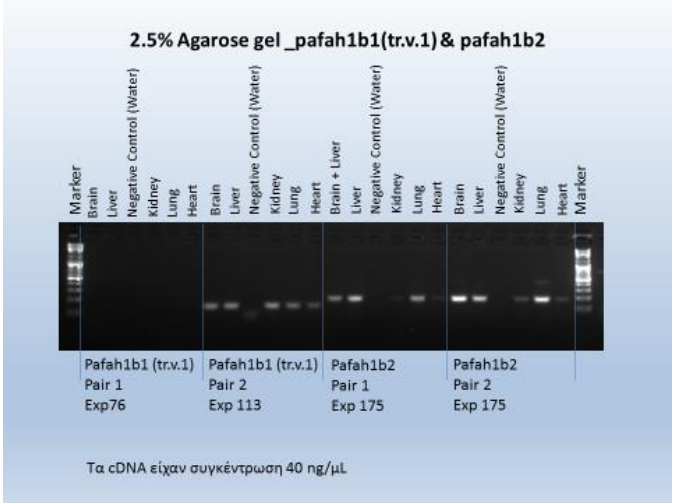
Πίνακας 5.1 *Τα ζευγάρια των εκκινητών – μέρος πρώτο*

Pla2g1b	F	GTGTGGCAGTTCCGCAATATG	21	61.9	70-90	126bp
	R	CCTGTCTAAGTCGTCCACTGG	21	61.5	195-175	
	F	CACCCCAGTGGACGACTTAG	20	59.75	192-211	169bp
	R	GCATTTGTTGTTTTTGGCGCT	21	59.67	360-340	
Pla2g2a	F	CTATGCCTTCTATGGATGCCAC	22	60.3	123-144	205bp
	R	CAGCCGTTTCTGACAGGAGT	20	61.8	327-308	
	F	CAGACCGGTGCTGTGTTACT	20	59.97	218-237	146bp
	R	CAGCCGTTTCTGACAGGAGT	20	59.97	363-344	
Pla2g2c	F	GCTGCCAACCCATCTTGAATG	21	61.9	233-253	125bp
	R	CACAGACTGTTTGTCACACTCA	22	60.4	357-336	
	F	GGATGCCACAGACAGGTGCT	20	62.4	523-542	177bp
	R	TTGTCACACTCACAGGCCTTC	21	60.48	699-679	
Pla2g2d	F	TGCTGGCCGGTATAACTGC	19	62.1	29-47	150bp
	R	CTGTGGCATCTTTGGGTTGC	20	61.9	178-159	
	F	TATGAGACTCGCCCTGCTGT	20	60.68	79-98	195bp
	R	TTCTGACAGCACCAGTCTGTGG	22	62.44	273-252	
Pla2g2e	F	CCAGTGGACGAGACGGATTG	20	62.3	160-179	198bp
	R	GTTGTGGCGAAAGCAGAGAG	20	61.3	357-338	
	F	TTGCAACAGGGACAGAGCTT	20	59.82	79-98	136bp
	R	CCAGGGGCACCAGGAGG	17	61.45	214-198	
Pla2g3	F	AGAGACCACAGGGCCATTAAG	21	61.2	1309-1329	141bp
	R	GCTGTAGAATGACATGGTGCT	21	60.1	1449-1429	
	F	ACTGTGACGCCAGGTTTCAA	20	60.11	748-767	109bp
	R	TTCAGCACAAAGCAGGGGAT	20	59.89	856-837	
Pla2g4a	F	CAGCACATTATAGTGGAACACCA	23	60.3	22-44	102bp
	R	AGTGTCCAGCATATCGCCAAA	21	61.8	123-103	
	F	GAAGACCTGGGAAGTGTGAGA	21	59.03	119-139	166bp
	R	GAGTGTCCAGCATATCGCCA	20	59.9	284-265	
Pla2g4b	F	TGGCCCCTAGCCAACTTTG	19	61.9	1142-1160	173bp
	R	GTTCTGGCCTCGACTCAGG	19	61.7	1314-1296	
	F	TGTGGACTTGGTCTCATGGC	20	59.96	51-70	135bp
	R	GTCAGAGGAGGTTACTAGGTCC	22	58.71	185-164	
Pla2g4c	F	AGGAGCTGAAACATCGGTATGA	22	60.9	341-362	213bp
	R	CTGCAAAGATGGGATAGGGC	20	60.2	553-534	
	F	TGGCTGGGAATCCTGGGAA	19	60.54	1773-1791	185bp
	R	GAGAGCACAGGTGGTGAGTC	20	60.04	1957-1938	
Pla2g4d	F	TCAGCTTCCACTACATGAGGG	21	60.9	647-667	102bp
	R	TGAAAGGTGTCACCGAGGTAT	21	60.5	748-728	
	F	CACCCGAGAGACTACATGGC	20	59.9	79-98	113bp
	R	CTGACTCAACAGGTCAGCCC	20	60.32	191-172	
Pla2g4e	F	ATGGTGACAGACTCCTTCGAG	21	60.9	730-750	118bp
	R	CCTCTGCGTAAAGCTGTGG	19	60.5	847-829	
	F	CTTGCAGTTCTCAGGAGGGG	20	60.04	637-656	196bp
	R	AAGCTTTCGTCCCACTCTGG	20	59.96	832-813	
Pla2g4f	F	AGCCATACTGCTACGGAAGAC	21	61.3	57-77	136bp
	R	TTTGGACAACTTATCTGTGTGCT	23	60.1	192-170	
	F	GCAGCAGGATCCAAAAGAGCTG	22	62.09	550-571	178bp
	R	CAGCTGGATCTGCCTGGAG	19	59.85	727-709	

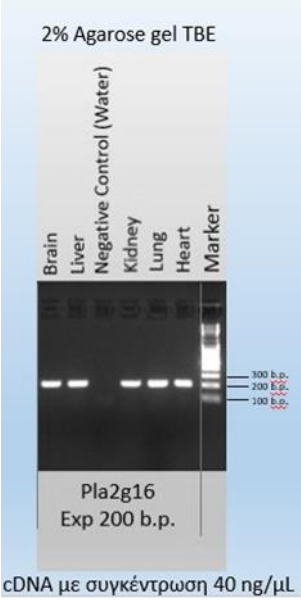
Πίνακας 5.2 *Τα ζευγάρια των εκκινητών – μέρος δεύτερο*

Pla2g5	F	CCAGGGGGCTTGCTAGAAC	19	62.1	55-73	136bp
	R	AGCACCAATCAGTGCCATCC	20	62.5	190-171	
	F	AGAAGAGGAAATGAGGTGCTTG	22	58.32	283-304	173bp
	R	AACCAAGCCAGTGTGAGGAG	20	59.89	455-436	
Pla2g6 (transcript variant 2)	F	GCAAGCTGATTACCAGGAAGG	21	60.7	1181-1201	129bp
	R	GAGAGAAGAGGGGGTGAGTTG	21	61.2	1309-1289	
	F	AATCATCCAGGGGGTCTCCA	20	59.95	2026-2045	193bp
	R	GTGGTCGTGACTCCGCTTCT	20	62.14	2218-2199	
pla2g7	F	CTTTTCACTGGCAAGACACATCT	23	61	62-84	132bp
	R	CGACGGGGTACGATCCATTTC	21	62.6	193-173	
	F	TGGCATTGCTGCGCTC	16	58.25	284-299	200bp
	R	AACATTACTGACGGCCTGAAG	21	58.3	483-463	
pafah1b1 (transcipt variant 1)	F	AATGGGTACGTATGGTGCGG	20		887-906	76bp
	R	ACACGCACAGTCTGGTCATT	20		962-943	
	F	AAGACCCTCCGTGTATGGGA	20		1261-1280	113bp
	R	GTAACCACATAGGGTGCCGT	20		1373-1354	
(pafah1b2)	F	CGGGATCAAGCGAGCGA	17	59.53	91-107	175bp
	R	ACCTATTATGCTGAGACATCCAC	23	57.78	265-243	
	F	GGATCAAGCGAGCGACTG	18	58.3	93-110	175bp
	R	AAACCTATTATGCTGAGACATCCAC	25	58.94	267-243	
Pla2g10	F	GTGCAGGTGTGACGAGGAG	19	62.3	345-363	105bp
	R	CACTTGGGAGAGTCCTTCTCA	21	60.5	449-429	
	F	GGACCTGGACCCGGATT	17	57.78	205-221	189bp
	R	GTGGTAGCAGCACCAGTCAA	20	60.25	393-374	
Pla2g12a	F	GCAACGGCATCCACAAGATAG	21	59.67	238-258	117bp
	R	CATAGCGTGGAACAGGCTTC	20	58.99	354-335	
	F	GAACAGGACCAGACCACCGA	20	61.47	192-211	153bp
	R	AACAGGCTTCGATCCGTCG	19	60.15	344-326	
Pla2g12b	F	GAACCTGGCTCAGAGTGACC	20	61.9	48-67	122bp
	R	GCAGCTCCATGAAGGAATCCA	21	62.2	169-149	
	F	ACCGGTGTCGATATGGAAAGG	21	59.86	283-303	185bp
	R	GTATTTGTTGGCACCGCAGG	20	60.11	467-448	
Pla2g15	F	GGGTAACCAGTTGGAAGCAAA	21	60.4	141-161	138bp
	R	TTGTCAATCCAGCAGTCAATGAT	23	60.2	278-256	
	F	CACACTCTGGCTGAATCTGGA	21	59.72	307-327	195bp
	R	AAATAGGAACCCACATTCCTCTTGC	25	61.33	501-477	
Pla2g16	F	GACGAGGAGTACACCCCACT	20	62.5	241-260	102bp
	R	CTCACAGTTCTCGCTGGTCA	20	61.5	342-323	
	F	GGACCCAAGCAAAGGCATCC	20	61.61	93-112	200bp
	R	CCAGCTCCTGCGATTTCACT	20	60.39	292-273	
Ptgs2 (COX-2)	F	TCAGTTTTTCAAGACAGATC	20	51.02	679-698	197bp
	R	TCTCTACCTGAGTGTCTTTG	20	53.76	875-856	
Ptgs1 (COX-1)	Qiagen's QuantiTect primers - (QT00155330)					

Μετά τη σύνθεση των εκκινητών αλλά και την ετοιμασία των cDNA διενεργήθηκαν τα πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2. Για κάθε γονίδιο δοκιμάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών. Στο σχήματα 5.6 υπάρχει θετικό αποτέλεσμα για το πρώτο ζεύγος εκινητών του γονιδιου Pafah1b2, ενώ αντίθετα το δεύτερο ζεύγος ενισχύει και παραπροιόντα. Επίσης στο σχήμα 5.7 φαίνονται τα αποτελέσματα ανίχνευσης του γονιδίου της Pla2g16, που ανιχνεύθηκε και στους πέντε ιστούς.



Σχήμα 5.6 *Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για τα γονίδια Pafah1b1 & Pafah1b2 σε φυσιολογικούς ιστούς Mus musculus*



Σχήμα 5.7 *Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για το γονίδιο Pla2g16 σε φυσιολογικούς ιστούς Mus musculus*

Όλα τα δεδομένα των πειραμάτων ανίχνευσης της παρουσίας των γονιδίων των Φωσφολιπασών A_2, αποτυπώνονται στο σχήμα 5.8

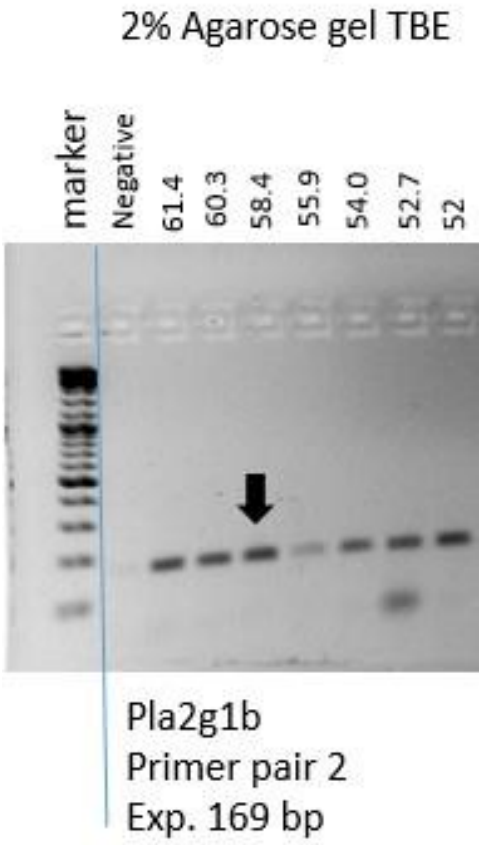
Ιστοί / PLA_2s	Brain Pair 1	Liver Pair 1	Kidney Pair 1	Lung Pair 1	Heart Pair 1	Brain Pair 2	Liver Pair 2	Kidney Pair 2	Lung Pair 2	Heart Pair 2
Pla2g1b		■	■	■			■		■	
Pla2g2a										
Pla2g2c						■	■			
Pla2g2d	■			■						
Pla2g2e		■								
Pla2g3	■					■				
Pla2g4a										
Pla2g4b										
Pla2g4c									■	
Pla2g4d										
Pla2g4e	■					■				
Pla2g4f				■						
Pla2g5	■		■	■	■					
Pla2g6	■	■	■	■						
Pla2g7	■	■	■	■		■	■	■	■	
Pafah1b1						■	■	■	■	■
Pafah1b2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Pla2g10			■	■					■	
Pla2g12a	■	■	■	■	■	■	■		■	
Pla2g12b		■				■	■	■	■	
Pla2g15						■				
Pla2g16		■	■	■	■	■	■	■	■	■

Σχήμα 5.8 *Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ανίχνευσης γονιδίων υπεροικογένειας Φωσφολιπασών A_2 σε φυσιολογικούς ιστούς Mus musculus με πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης*

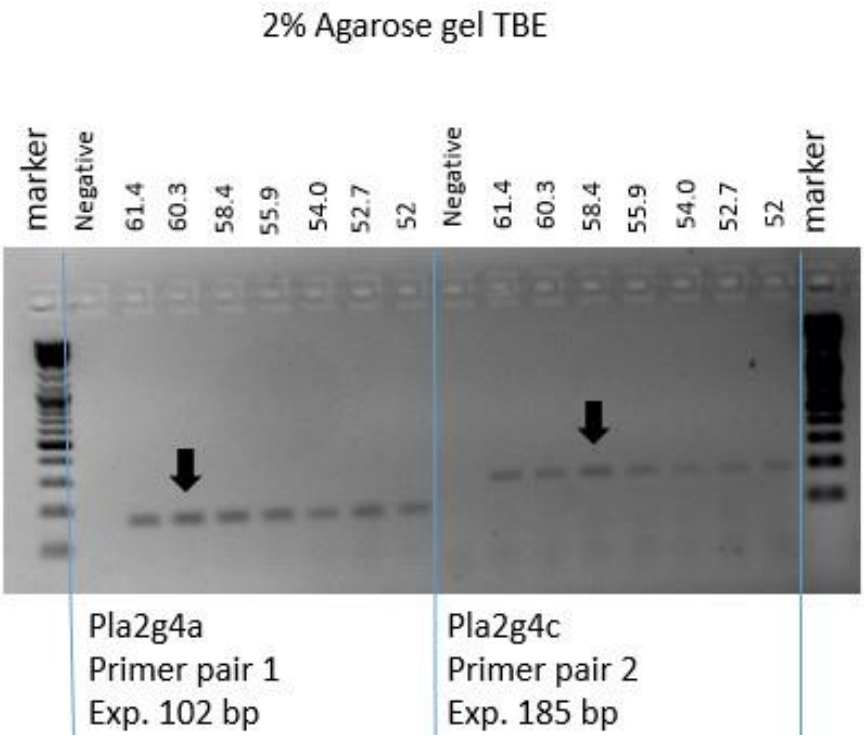
Με βάση αυτά τα δεδομένα επιλέχθηκαν 20 ζευγάρια εκκινητών που αντιστοιχούσαν σε 19 γονίδια PLA_2. Αυτά τα ζευγάρια είχαν δώσει τα καλύτερα αποτελέσματα και αποφασίστηκε να βελτιστοποιηθούν περισσότερο οι συνθήκες δράσης τους, στο επόμενο σετ πειραμάτων βαθμιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

5.3 Βελτιωτικά πειράματα βαθμιδωτής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

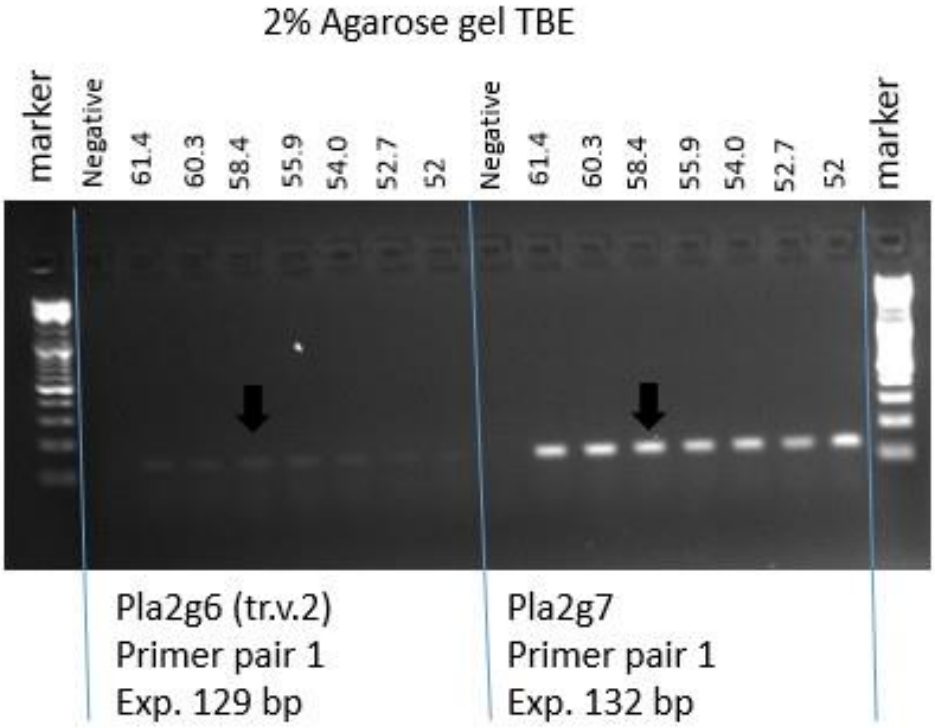
Στόχος αυτών των πειραμάτων ήταν η εύρεση των καλύτερων τιμών υβριδισμού των εκκινητών. Τα πειράματα διενεργήθηκαν με βάση τους εκκινητές που είχαν επιλεχθεί μετά τα προηγούμενα πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Η διεξαγωγή τους και η συλλογή των αποτελεσμάτων έγινε σε δύο φάσεις. Αρχικά έγιναν πειράματα βαθμιδωτής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Gradient PCR) στα οποία χρησιμοποιήθηκε στο μείγμα αντιδρώντων συγκέντρωση Mg^{2+} 1.2 mM. Στα σχήματα 5.9 έως 5.14 φαίνονται επιτυχή αποτελέσματα από τα συγκεκριμένα πειράματα και υποδεικνύονται οι βέλτιστες θερμοκρασίες υβρισδιμού που επιλέχθηκαν για κάθε ζευγάρι εκκινητών που ελέγχθηκε.



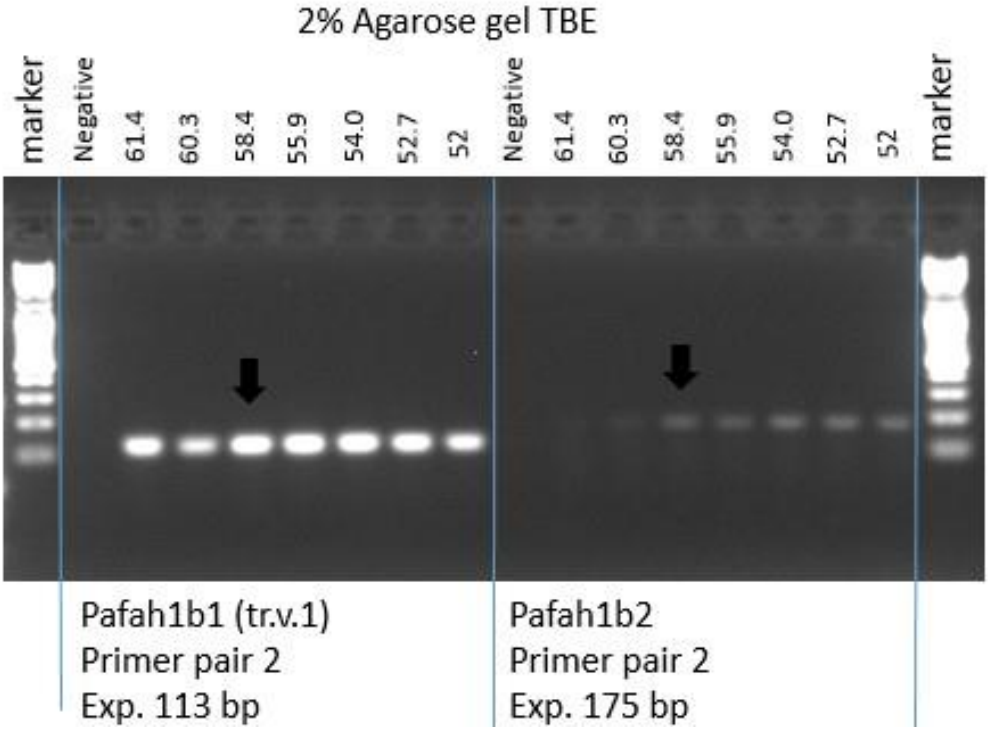
Σχήμα 5.9 *Αποτελέσματα gradient-PCR, Pla2g1b*



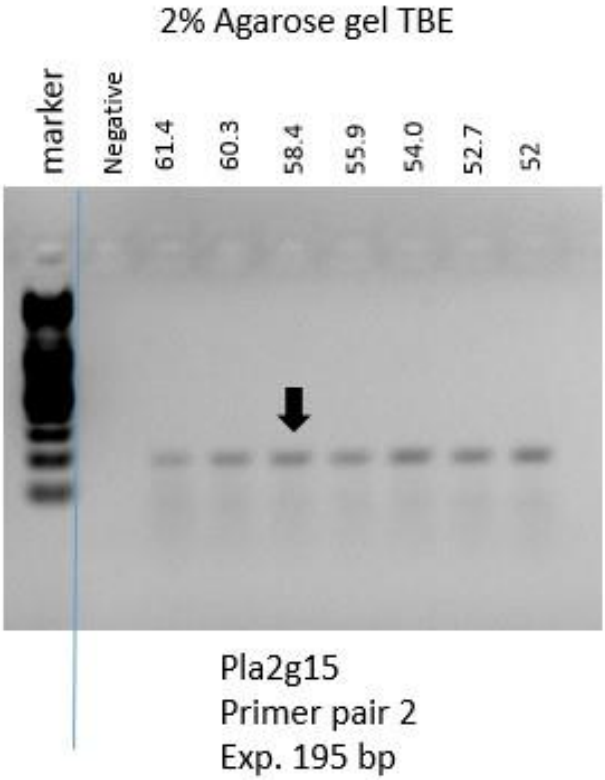
Σχήμα 5.10 *Αποτελέσματα gradient PCR, Pla2g4a & Pla2g4c*



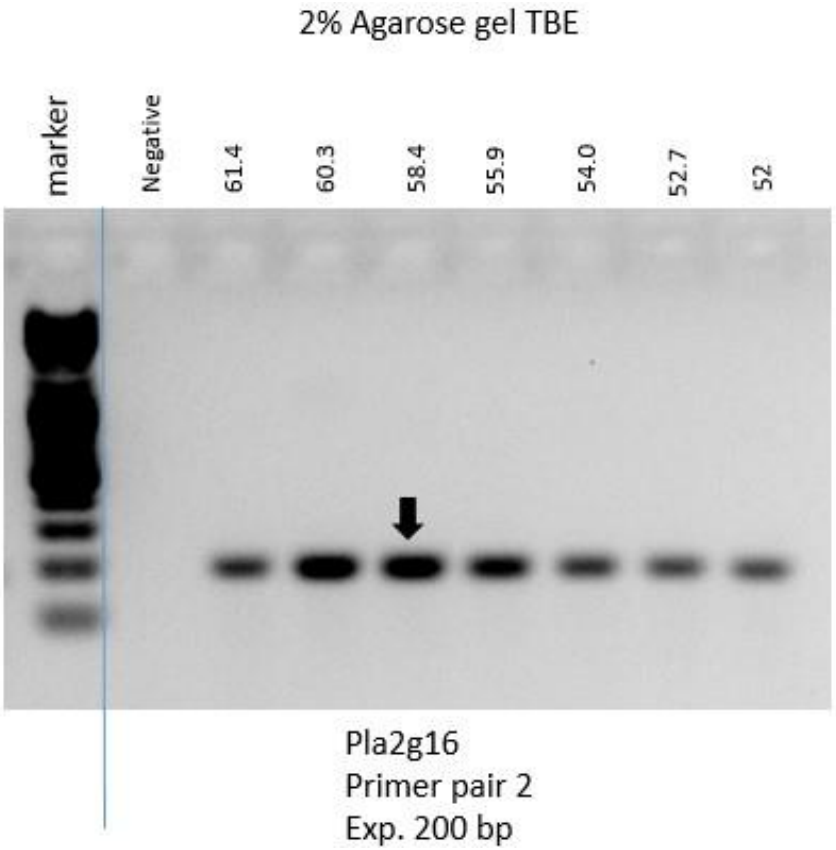
Σχήμα 5.11 *Αποτελέσματα gradient PCR, Pla2g6 & Pla2g7*



Σχήμα 5.12 *Αποτελέσματα gradient PCR, Pafah1b1 & Pafah1b2*



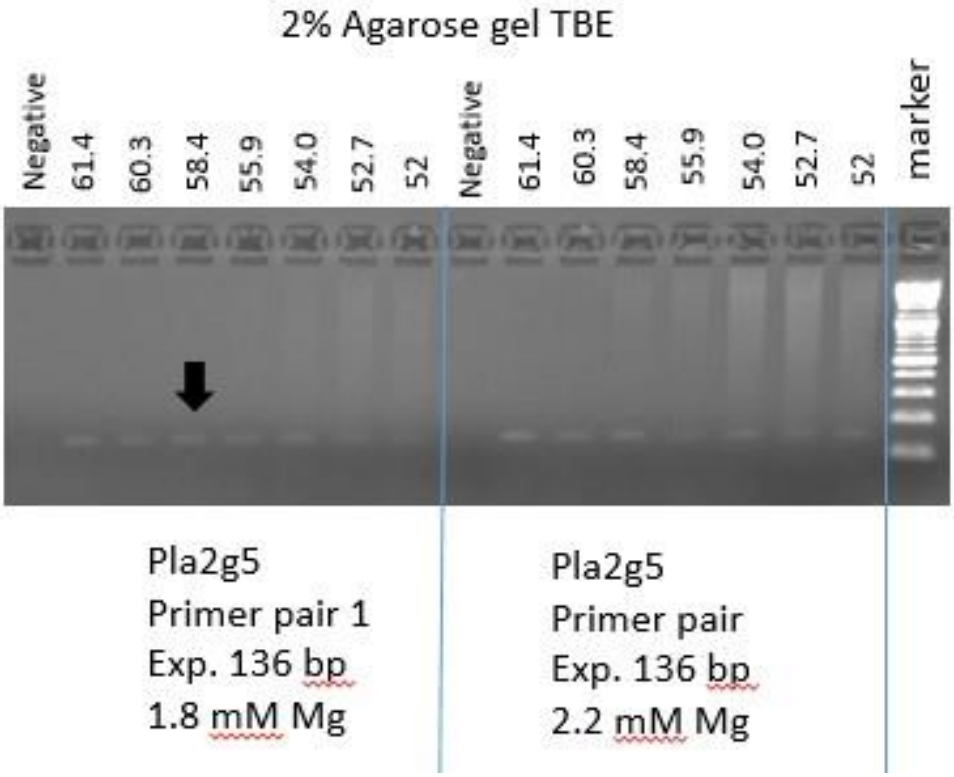
Σχήμα 5.13 *Αποτελέσματα gradient PCR, Pla2g15*



Σχήμα 5.14 *Αποτελέσματα gradient PCR, Pla2g16*

Σε αυτή τη φάση 12 ζευγάρια εκκινητών που αντιστοιχούσαν σε 12 γονίδια PLA_2 έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα και επιλέχθηκε για 11 από αυτά ως βέλτιστη θερμοκρασία τήξης των προϊόντων οι 58.4^{o}C. Για το απομένον επιλέχθηκαν οι 60.3^{o}C. Για τα υπόλοιπα 8 ζευγάρια εκκινητών που δεν δώσανε καθαρό αποτέλεσμα ή δεν εκτελέστηκε επιτυχώς το πείραμα αποφάσίστηκε να διεξαχθεί ένας δεύτερος γύρος συμπληρωματικών βαθμιδωτών αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης με τροποποιημένες συγκεντρώσεις του Mg^{2+} στα μείγματα αντιδρώντων. Συγκεκριμένα για κάθε εξεταζόμενο γονίδιο ετοιμάστηκαν δύο μείγματα αντιδρώντων, το ένα με συγκέντρωση μαγνησίου 1.8 mM και το άλλο με 2.2 mM.

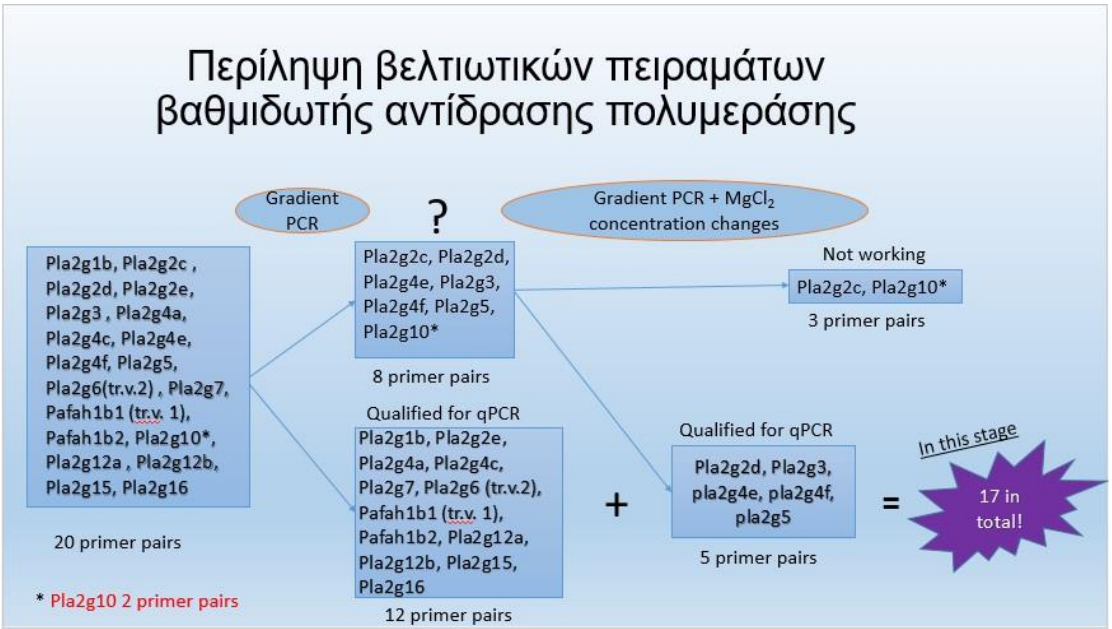
Στο σχήμα 5.15 φαίνεται το αποτέλεσμα του πειράματος για το ζεύγος εκκινητών που αντιστοιχεί στο γονίδιο Pla2g5, το οποίο αρχικώς δεν είχε δώσει καθαρό αποτέλεσμα, στην προηγούμενη φαση πειραμάτων.



Σχήμα 5.15 *Αποτελέσματα gradient PCR για Pla2g5 σε ενιαίο cDNA εγκεφάλου και πνεύμονα φυσιολογικού Mus musculus συγκεντρώσεως 40 ng/μL*

Χάρη σε αυτή τη συμπληρωματική φάση πειραμάτων πέντε από τα εφτά ζευγάρια εκκινητών που αντιστοιχούσαν στα γονίδια Pla2gd, Pla2g3, Pla2g4e, Pla2g4f, Pla2g5 έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα στον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδισμού. Μετά το πέρας αυτών των πειραμάτων τα ζεύγη εκκινητών ξεχωρίστηκαν ως προς την αποτελεσματικότητα τους. Συνολικά από τα είκοσι ζευγάρια εκκινητών ικανοποιητικά αποτελέσματα πάρθηκαν εν τέλει για δεκαέξι από αυτούς που αντιστοιχούσαν σε δεκαέξι διαφορετικά γονίδια της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2. Αντίθετα τρία ζευγάρια εκκινητών που αντιστοιχούσαν στα γονίδια Pla2g2c και Pla2g10 απορρίφθηκαν. Στο σχήμα 5.16 φαίνεται η

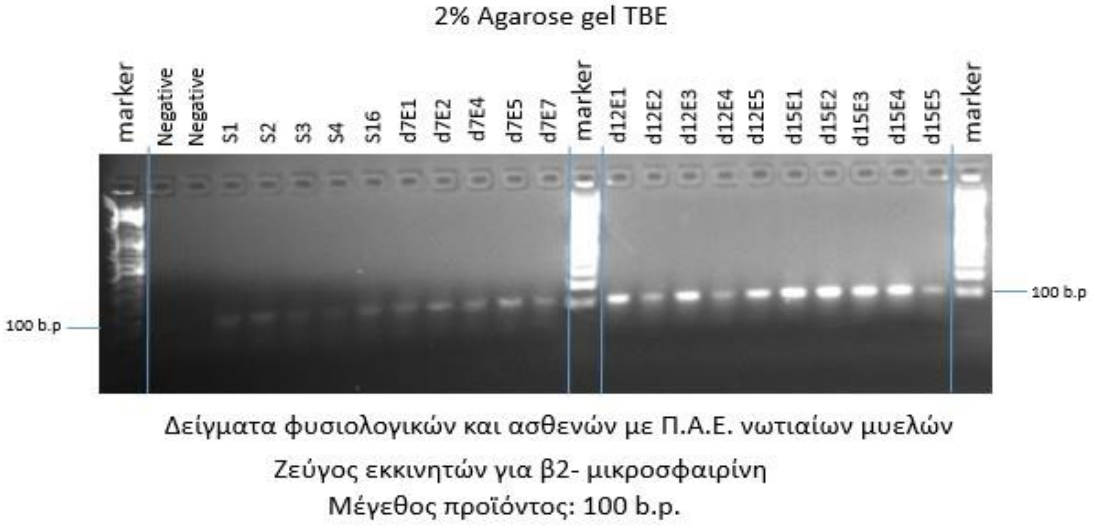
σύνοψη των αποτελεσμάτων αυτών των δύο ειδών πειραμάτων. Με τον παραπάνω τρόπο τα ζεύγη εκκινητών ελέχθηκαν για την αποτελεσματικότητα τους. Παράλληλα ανιχνέυτηκε η παρουσία γονιδίων των Φωσφολιπασών A_2 σε ιστούς ποντικών. Τέλος προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες θερμοκρασίες υβριδισμού για τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα που ακολούθησαν. **Τα ζεύγη εκκινητών για τα γονίδια Pla2g4a και Pla2g3 έδωσαν βέλτιστα αποτελέσματα για θερμοκρασία υβριδισμού 60.3^{o}C. Αντίθετα για τα υπόλοιπα ζεύγη επιλέχθηκαν ως βέλτιστη θερμοκρασία υβριδοποίησης οι 58.4^{o}C.**



Σχήμα 5.16 *Διαγραμματική απεικόνιση πορείας και αποτελεσμάτων διπλών βελτιωτικών πειραμάτων βαθμιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης*

5.4 Προσδιορισμός της σχετικής γονιδιακής έκφρασης των PLA_2 σε δείγματα νωτιαίου μυελού φυσιολογικών και ασθενών με Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα ποντικών με χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο

Σκοπός αυτών των πειραμάτων ήταν αφενός μια ποιοτική ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων στο νωτιαίο μυελό και αφετέρου η βελτιστοποίηση παραγόντων που συμβάλλουν στην ύπαρξη κατάλληλου δυναμικού εύρους της αντίδρασης, όπως η αρχική ποσότητα του εκμαγείου cDNA. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο λόγω της μεγαλύτερη ευαισθησίας της δίνει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Τα πειράματα διενεργήθηκαν με τα 17 ζευγάρια εκκινητών που προέκυψαν μετά το ξεκαθάρισμα της προηγούμενης διπλής πειραματικής φάσης. Τα δείγματα cDNA των νωτιαίων μυελών ελέχθηκαν για την ποιότητα και την καταλληλότητα τους μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για το γονίδιο αναφοράς β2-μικροσφαιρίνη. Τα αποτελέσματα αυτής της αντίδρασης πιστοποίησαν την καταλλήλότητα τους για τα πειράματα και αποτυπώνονται στο σχήμα 5.17.

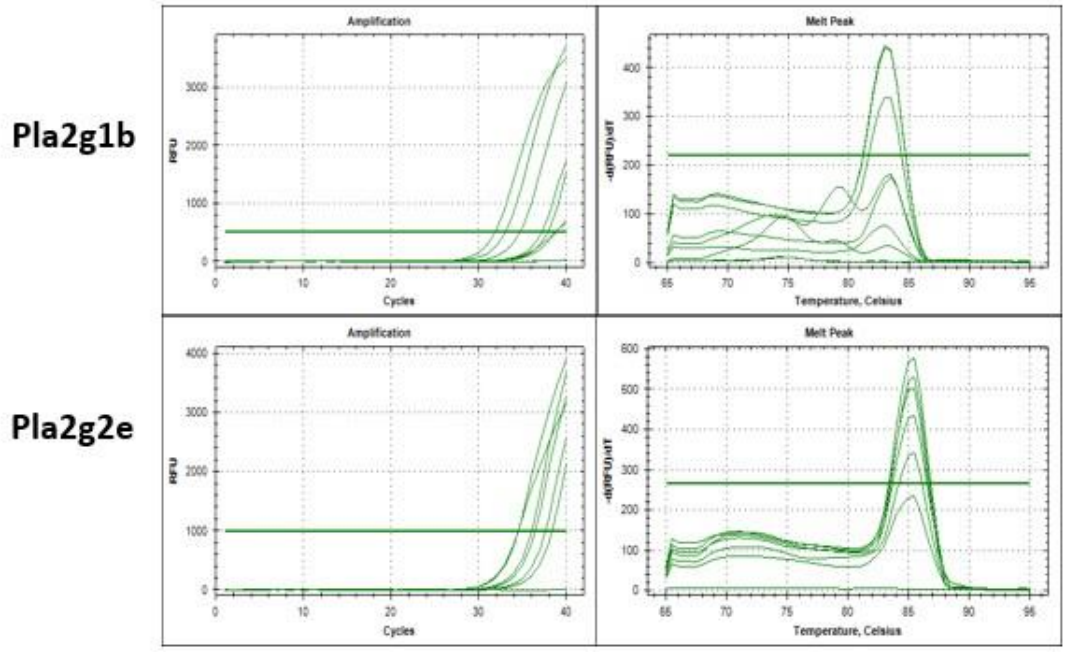


Σχήμα 5.17 *Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ελέγχου ποιότητας δειγμάτων νωτιαίου μυελού από φυσιολογικά και ασθενή με Π.Α.Ε Mus musculus, για γονίδιο αναφοράς β2-μικροσφαιρίνη*

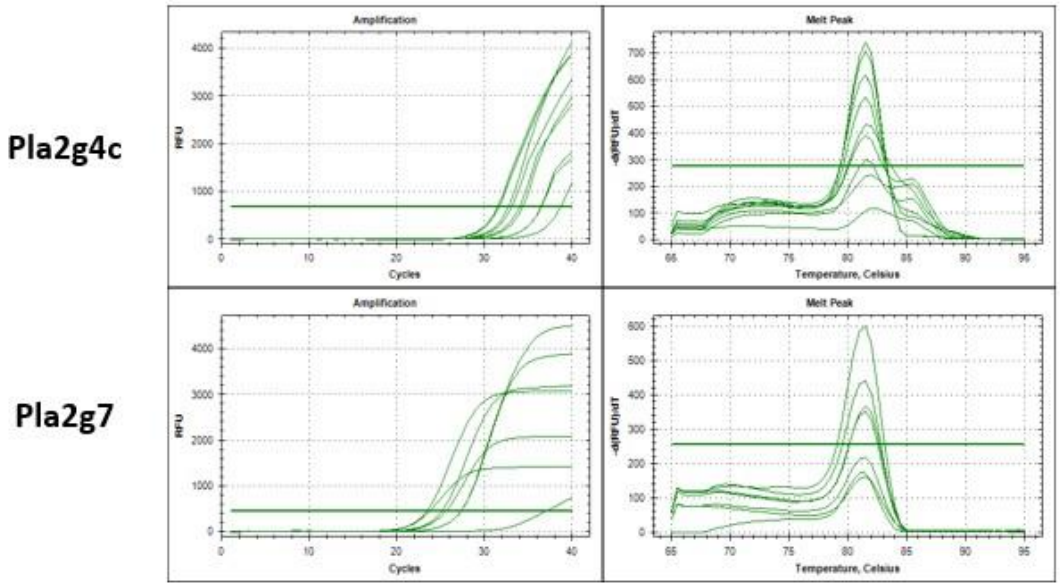
Τα cDNA νωτιαίου μυελού αποδείχτηκαν λειτουργικά και στη συνέχεια δημιουργήθηκαν τέσσερα δείγματα πρότυπων συγκεντρώσεων από αυτά Α (50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0.4 ng/μL) και διενεργήθηκαν πειράματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο. Παρακάτω, στα σχήματα 5.18 έως 5.24 παρατίθενται τα διαγράμματα «Κύκλων Κατωφλίων» & κορυφών θερμοκρασιών τήξεως, τα οποία παρατηρήθηκαν με βάση τα εξής δύο βασικά κριτήρια:

- ✓ Την ύπαρξης μιας και μοναδικής κορυφής τήξης για τα δείγματα και όχι δύο που θα μείωνε σημαντικά την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης και την ακρίβεια των δεδομένων ως συνέπεια της ενίσχυσης ανεπιθύμητων αλληλουχιών ή της παρουσίας διμερών των εκκινητών [80].

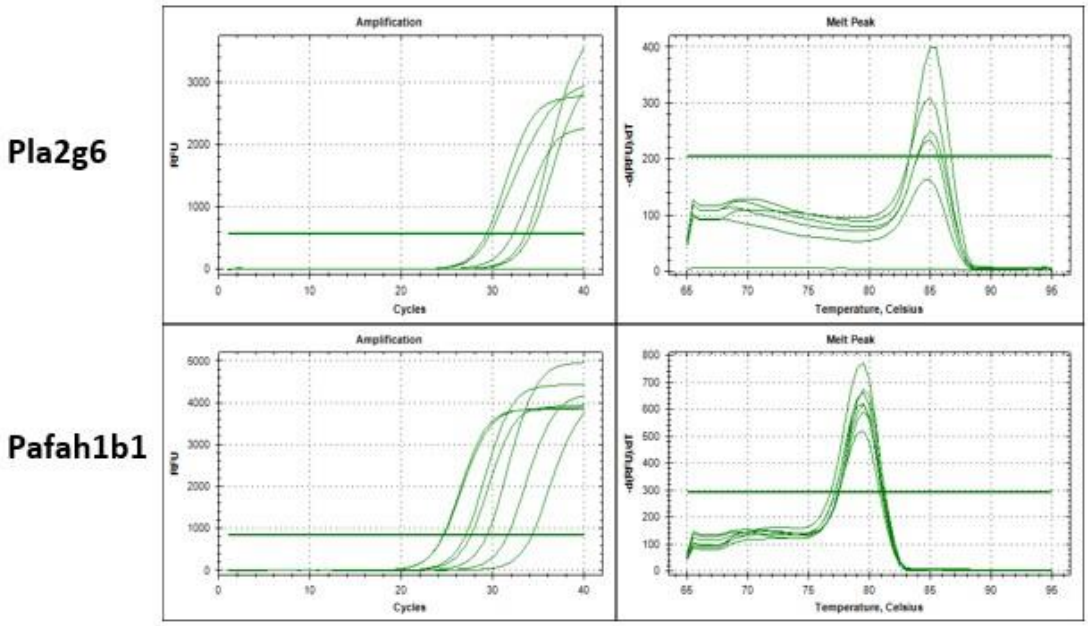
- ✓ Την τιμή του μεγέθους «Κύκλος κατωφλίου» (Ct) το οποίο είναι ο κύκλος της ενίσχυσης στον οποίον ο φθορισμός ξεπερνά το θόρυβο του background και το όργανο αρχίζει να ανιχνεύει τα παραγόμενα ενισχυμένα προϊόντα. Διαγραμματικά απεικονίζεται σαν το σημείο όπου η καμπύλη ξεκινά τη εκθετική φάση της. Η τιμή του μεγέθους αυτού έχει ιδιαίτερη σημασία διότι επιτρέπει την ποσοτικοποίηση αλλά και καταδεικνύει σε τι ποσότητα υπάρχει η αλληλουχία-στόχος στο εκμαγείο cDNA που χρησιμοποιείται. Είναι σημαντική η καταγραφή της για τις ενισχυόμενες αλληλουχίες τόσο για το γονίδιο-στόχο, όσο και για το γονίδιο αναφοράς [81].



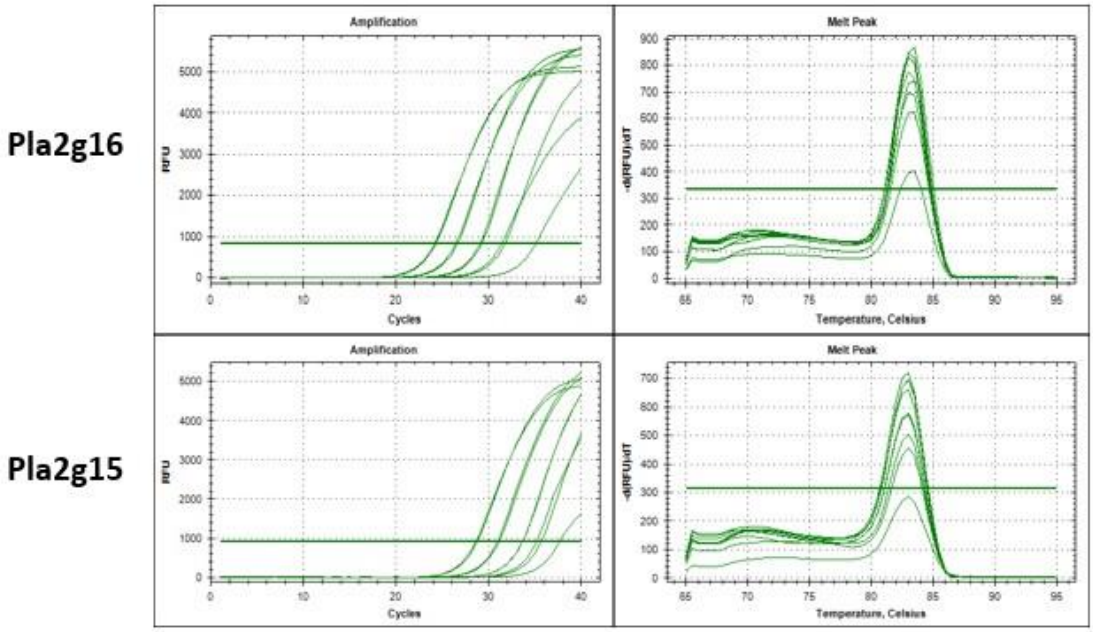
Σχήμα 5.18 *Αποτελέσματα RT-PCR για τα γονίδια Pla2g1b & Pla2g2e σε πρότυπες συγκεντρώσεις Α(50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0.4 ng/μL) νωτιαίου μυελού*



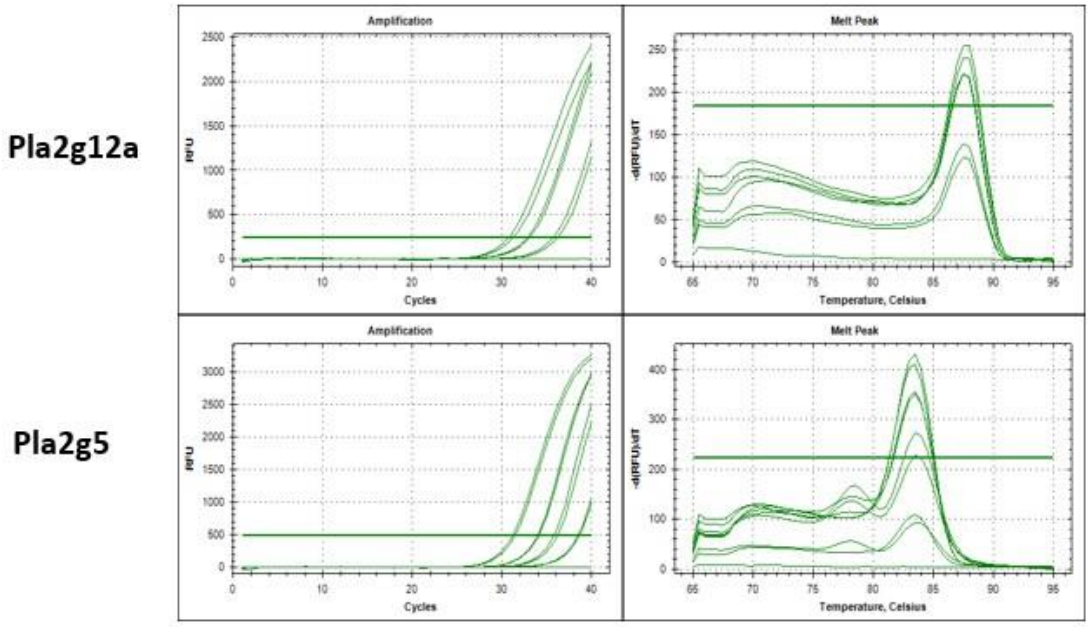
Σχήμα 5.19 *Αποτελέσματα RT-PCR για τα γονίδια Pla2g4c & Pla2g7 σε πρότυπες συγκεντρώσεις Α (50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0.4 ng/μL) νωτιαίου μυελού*



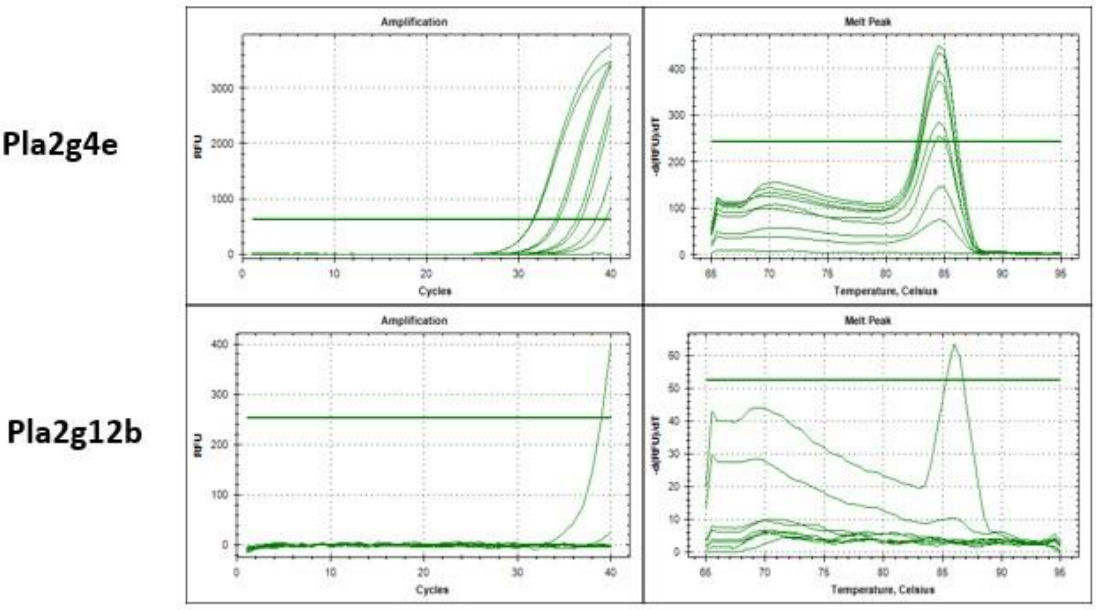
Σχήμα 5.20 *Αποτελέσματα RT-PCR για τα γονίδια Pla2g6 & Pafah1b1 σε πρότυπες συγκεντρώσεις Α (50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0.4 ng/μL) νωτιαίου μυελού*



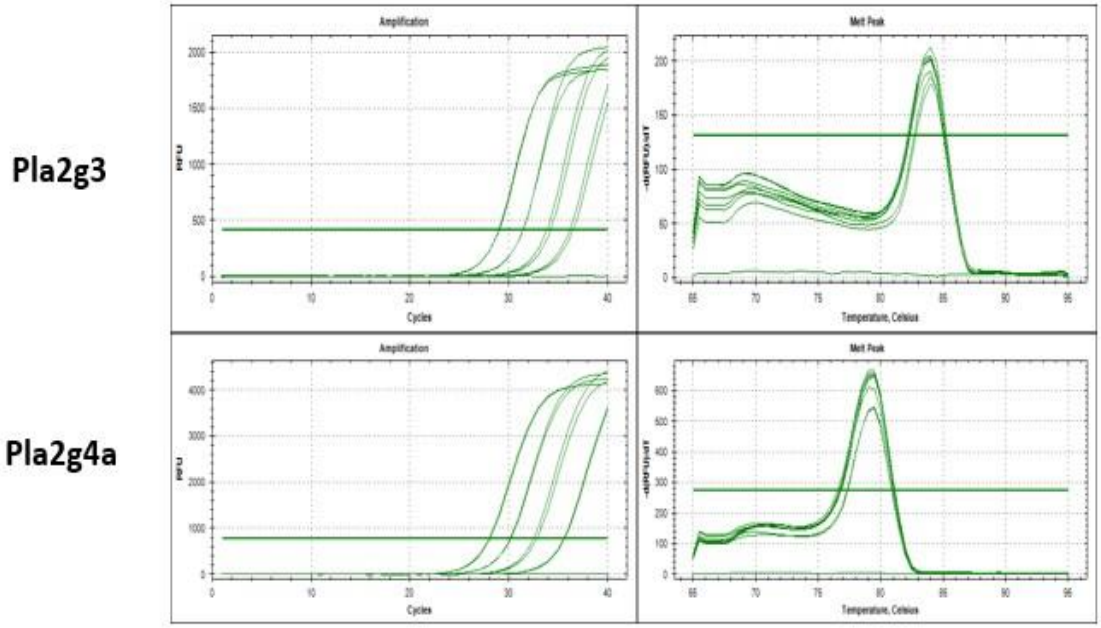
Σχήμα 5.21 *Αποτελέσματα RT-PCR για τα γονίδια Pla2g16 & Pla2g15 σε πρότυπες συγκεντρώσεις Α (50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0.4 ng/μL) νωτιαίου μυελού*



Σχήμα 5.22 *Αποτελέσματα RT-PCR για τα γονίδια, Pla2g12a & Pla2g5 σε πρότυπες συγκεντρώσεις Α (50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0.4 ng/μL) νωτιαίου μυελού*



Σχήμα 5.23 *Αποτελέσματα RT-PCR για τα γονίδια Pla2g4e & Pla2g12b σε πρότυπες συγκεντρώσεις Α (50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0.4 ng/μL) νωτιαίου μυελού*



Σχήμα 5.24 *Αποτελέσματα RT-PCR για τα γονίδια Pla2g3 & Pla2g4a σε πρότυπες συγκεντρώσεις Α (50 ng/μL), Β (10 ng/μL), Γ (2 ng/μL), Δ (0.4 ng/μL) νωτιαίου μυελού*

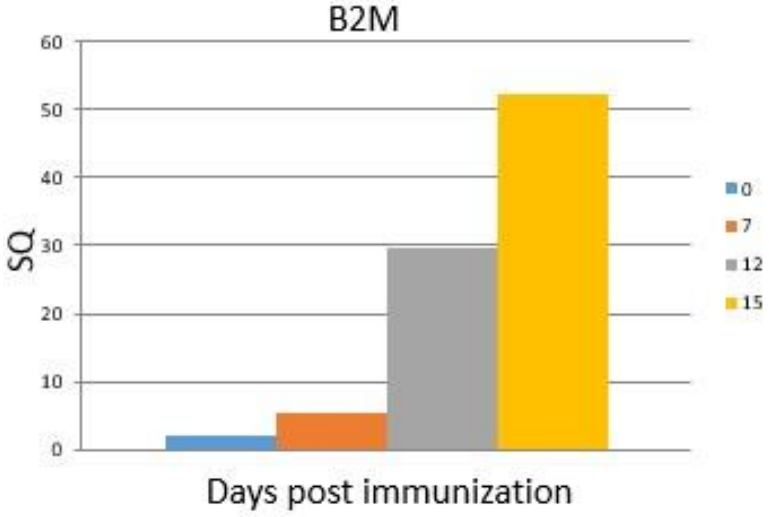
Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι 14 από τα 17 ζευγάρια εκκινητών που αντιστοιχούσαν σε 14 γονίδια της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2 ανιχνεύτηκαν στο νωτιαίο μυελό από *Mus Musculus*. Εκφράζονταν βέβαια σε διαφορετικό βαθμό κάτι που φανερώνεται από τους «Κύκλους Κατωφλιού» στα παραπάνω διαγράμματα. Επίσης τα 14 ζευγάρια εκκινητών που αντιστοιχούσαν στα γονίδια Pla2g5, Pla2g6, Pla2g16, Pla2g15, Pla2g3, Pla2g4a, Pla2g12a, Pla2g4e, Pla2g12b, Pla2g4c, Pla2g7, Pafah1b1, Pla2g1b, Pla2g2e εμφάνισαν μία μόνο κορυφή τήξης γεγονός που καταδεικνύει την αποτελεσματικότητα των εκκινητών, δηλαδή ότι δεν ενισχύουν άλλες ανεπιθύμητες αλληλουχίες και επίσης δεν σχηματίζουν διμερή. Αντίθετα τα ζεύγη εκκινητών για τα γονίδια pafah1b2, Pla2g4f, Pla2g2d εμφάνισαν διπλές κορυφές και έως εκ τούτου δεν έδωσαν ακριβή αποτελέσματα. Επομένως απορρίφθηκαν για το τελικό στάδιο πειραμάτων που ακολούθησε. Τέλος από την παρατήρηση των «Κύκλων Κατοφλίων» στα παραπάνω πειράματα αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν στα επόμενα πειράματα εκμαγεία cDNA νωτιαίου μυελού συγκέντρωσης 15 ng/μL

5.5 Προσδιορισμός της σχετικής γονιδιακής έκφρασης των PLA_2 κατά την εξέλιξη της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας

Στα τελικά αυτά πειράματα προσδιορισμού της γονιδιακής έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν τα 14 ζευγάρια εκκινητών που είχαν επιλεγεί ύστερα από τα πειράματα της ενότητας 5.4 . Συγκεκριμένα αυτά ήταν τα ζευγάρια εκκινητών για τα γονίδια Pla2g5, Pla2g6, Pla2g16, Pla2g15, Pla2g3, Pla2g4a, Pla2g12a, Pla2g4e, Pla2g12b, Pla2g4c, Pla2g7, Pafah1b1, Pla2g1b και Pla2g2e. Οι παθολογικοί ιστοί προέρχονταν από ποντίκια 7, 12 και 15 ημερών εξέλιξης της Π.Α.Ε, στα οποία η νόσος είχε επαχθεί με χορήγηση μέσω ενδοδερμικής ένεσης 150 mg πεπτιδίου μήκους 20 αμινοξέων της Μυελώδους Ολιγοδενδροκυττάριας Γλυκοπρωτεΐνης, με παράλληλη χορήγηση μέσω ενδοπεριτοναϊκής ένεσης, 100 ng της τοξίνης κοκκύτη. Από τα δείγματα νωτιαίου μυελού απομονώθηκε RNA και μετατράπηκε σε cDNA από την υποψήφια διδακτορική φοιτήτρια Ιωάννα Νίνου. Τα cDNA νωτιαίου μυελού που χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για την αντίδραση ήταν συγκεντρώσεως 15 ng/μL. Τα δεδομένα εξάχθηκαν μέσω σχετικής ποσοτικοποίησης για να δούμε την αυξομείωση των επιπέδων έκφρασης των 14 γονιδίων Φωσφολιπασών A_2 που αναφέρθηκαν, ανάμεσα στους φυσιολογικούς και με Π.Α.Ε. ποντικούς στους τρεις χρόνους (7, 12, 15 ημέρες) Εν τέλει ληφθηκαν μετρήσεις τόσο για το γονίδιο αναφοράς, όσο και για όλα τα υπόλοιπα δείγματα ξεχωριστά.

Η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης που εφαρμόστηκε βασίζεται στον υπολογισμό του $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Για να μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης και να κανονικοποιηθούν οι τιμές, πραγματοποιηθήκαν μετρήσεις της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για ένα γονίδιο αναφοράς, κοινό τόσο στην control ομάδα όσο και στις υπόλοιπες [77]. Αρχικά το γονίδιο αναφοράς ήταν η β-2 μικροσφαιρίνη που είχε χρησιμοποιηθεί και στα πειράματα της συμβατικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Ωστόσο το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικεύει μια πρωτείνη που αποτελεί συστατικό μέρος του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας -I (MHC-1), του οποίου τα επίπεδα εμφανίζουν αύξηση κατά την εξέλιξη της

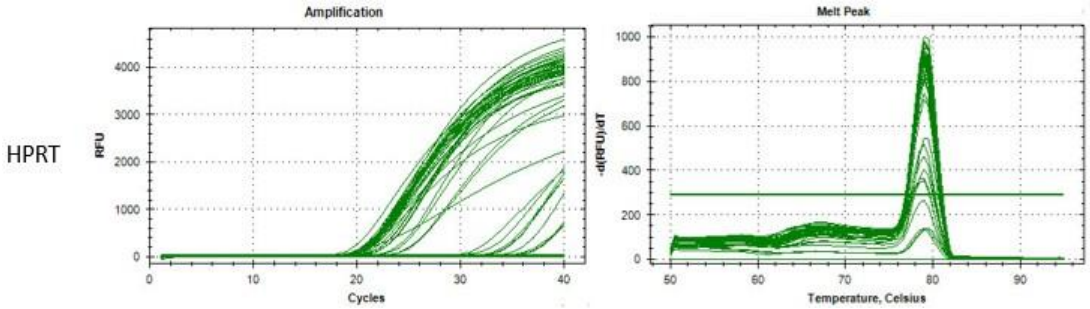
Π.Α.Ε. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται και στην παρούσα εργασία στο σχήμα 5.25, όσο και από ερευνητικές αναφορές [82].



Σχήμα 5.25 *Απολύτα επίπεδα έκφρασης B2M στην εξέλιξη της Π.Α.Ε.*

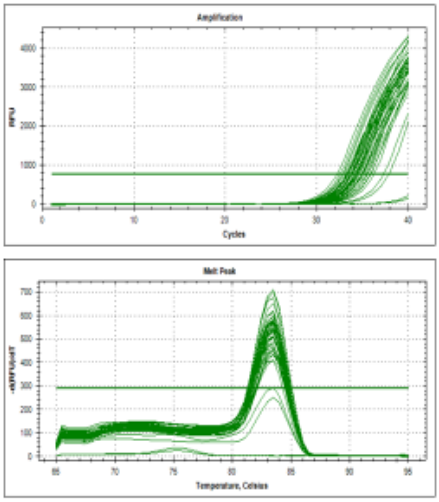
Ετσι λοιπόν για τα τελικά πειράματα και την σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το HPRT, του οποίου τα επίπεδα δεν επηρεάζονταν από την ασθένεια.

Για κάθε μέλος της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2 που ελέχθηκε αλλά και για το γονίδιο αναφοράς δίδονται παρακάτω διαγράμματα «Κύκλων Κατωφλίων» & κορυφών θερμοκρασιών τήξεως (σχήματα 5.26 έως 5.37).



Σχήμα 5.26 *Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο της υποξάνθινο-γουάνινο-ριβοσυλοτρανσφεράσης (HPRT)*

Pla2g1b

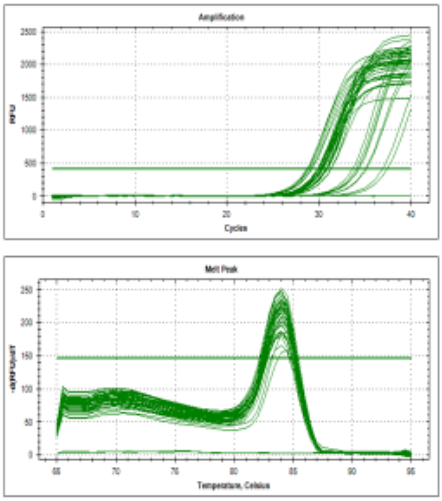


Δείγματα	HPRT	Pla2g1b
Ct	Ct	Ct
S1	17.57	33.73
S2	22.96	35.59
S3	18.62	33.96
S4	20.54	34.01
S16	18.60	32.72
d7E1	19.42	33.58
d7E2	18.38	33.47
d7E4	18.95	34.02
d7E5	19.00	34.23
d7E7	19.22	33.54

Δείγματα	HPRT	Pla2g1b
Ct	Ct	Ct
d12E1	18.93	34.19
d12E2	18.56	32.91
d12E3	19.22	34.09
d12E4	18.74	33.35
d12E5	18.94	35.10
d15E1	20.13	34.55
d15E2	18.61	33.91
d15E3	20.09	35.47
d15E4	19.27	34.76
d15E5	21.87	35.98

Σχήμα 5.27 *Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g1b*

Pla2g3

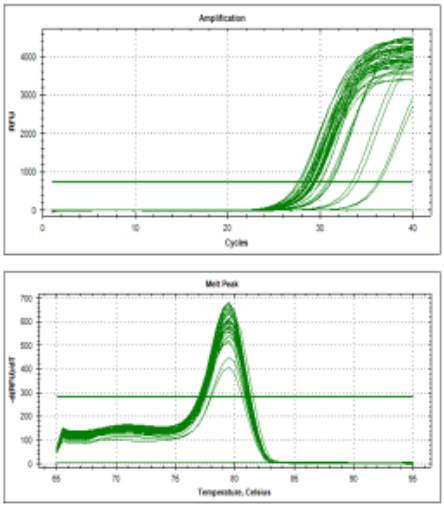


Δείγματα	HPRT	Pla2g3
Ct	Ct	Ct
S1	17.57	30.50
S2	22.96	37.76
S3	18.62	30.67
S4	20.54	34.39
S16	18.60	30.69
d7E1	19.42	30.52
d7E2	18.38	31.00
d7E4	18.95	30.63
d7E5	19.00	31.61
d7E7	19.22	30.77

Δείγματα	HPRT	Pla2g3
Ct	Ct	Ct
d12E1	18.93	31.05
d12E2	18.56	30.74
d12E3	19.22	29.83
d12E4	18.74	31.06
d12E5	18.94	29.43
d15E1	20.13	31.52
d15E2	18.61	30.83
d15E3	20.09	31.38
d15E4	19.27	31.27
d15E5	21.87	34.88

Σχήμα 5.28 *Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g3*

Pla2g4a

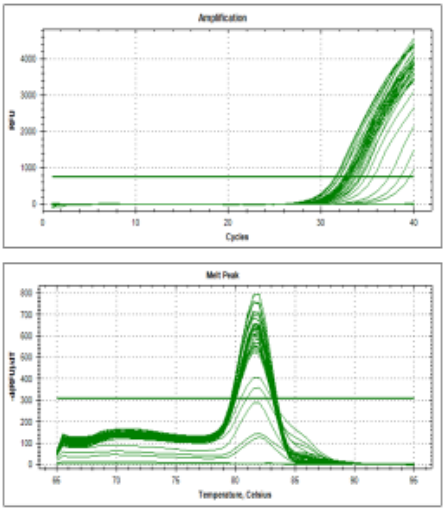


Δείγματα	HPRT	Pla2g4a
Ct	Ct	Ct
S1	17.57	29.10
S2	22.96	35.87
S3	18.62	28.98
S4	20.54	30.74
S16	18.60	28.70
d7E1	19.42	28.85
d7E2	18.38	28.88
d7E4	18.95	28.76
d7E5	19.00	28.87
d7E7	19.22	28.87

Δείγματα	HPRT	Pla2g4a
Ct	Ct	Ct
d12E1	18.93	27.58
d12E2	18.56	28.25
d12E3	19.22	27.80
d12E4	18.74	28.08
d12E5	18.94	27.82
d15E1	20.13	28.39
d15E2	18.61	28.37
d15E3	20.09	28.09
d15E4	19.27	28.73
d15E5	21.87	30.37

Σχήμα 5.29 *Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g4a*

Pla2g4c

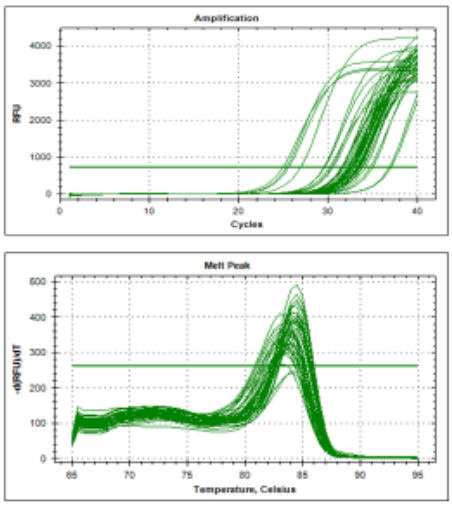


Δείγματα	HPRT	Pla2g4c
Ct	Ct	Ct
S1	17.57	33.11
S2	22.96	39.52
S3	18.62	33.32
S4	20.54	34.01
S16	18.60	32.76
d7E1	19.42	33.34
d7E2	18.38	33.01
d7E4	18.95	33.17
d7E5	19.00	33.20
d7E7	19.22	33.26

Δείγματα	HPRT	Pla2g4c
Ct	Ct	Ct
d12E1	18.93	32.58
d12E2	18.56	31.84
d12E3	19.22	32.63
d12E4	18.74	32.43
d12E5	18.94	32.81
d15E1	20.13	33.01
d15E2	18.61	32.65
d15E3	20.09	34.32
d15E4	19.27	32.52
d15E5	21.87	35.25

Σχήμα 5.30 *Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g4c*

Pla2g4e

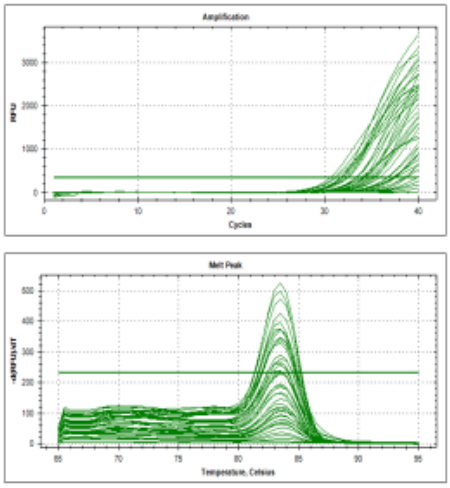


Δείγματα	HPRT	Pla2g4e
Ct	Ct	Ct
S1	17.57	31.56
S2	22.96	33.56
S3	18.62	32.88
S4	20.54	34.35
S16	18.60	32.47
d7E1	19.42	32.11
d7E2	18.38	33.79
d7E4	18.95	32.94
d7E5	19.00	30.21
d7E7	19.22	33.01

Δείγματα	HPRT	Pla2g4e
Ct	Ct	Ct
d12E1	18.93	31.08
d12E2	18.56	32.05
d12E3	19.22	31.73
d12E4	18.74	31.69
d12E5	18.94	32.84
d15E1	20.13	32.85
d15E2	18.61	32.43
d15E3	20.09	33.30
d15E4	19.27	33.10
d15E5	21.87	31.87

Σχήμα 5.31 *Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g4e*

Pla2g5

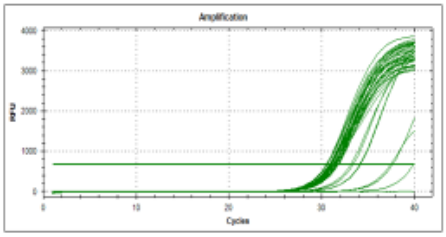


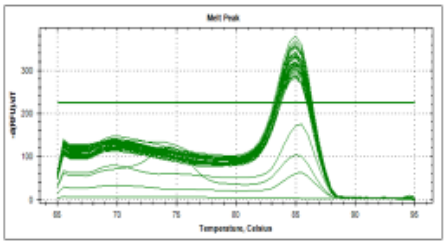
Δείγματα	HPRT	Pla2g5
Ct	Ct	Ct
S1	17.57	32.11
S2	22.96	38.79
S3	18.62	32.91
S4	20.54	37.56
S16	18.60	34.50
d7E1	19.42	35.76
d7E2	18.38	34.37
d7E4	18.95	34.29
d7E5	19.00	31.90
d7E7	19.22	34.22

Δείγματα	HPRT	Pla2g5
Ct	Ct	Ct
d12E1	18.93	38.17
d12E2	18.56	32.58
d12E3	19.22	33.75
d12E4	18.74	34.79
d12E5	18.94	37.15
d15E1	20.13	32.36
d15E2	18.61	36.60
d15E3	20.09	36.36
d15E4	19.27	32.19
d15E5	21.87	35.99

Σχήμα 5.32 *Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g5*

Pla2g6



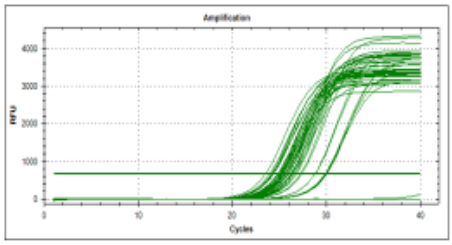


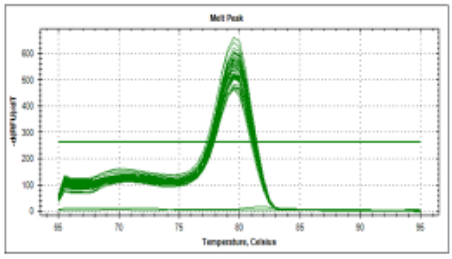
Δείγματα	HPRT	Pla2g6
Ct	Ct	Ct
S1	17.57	30.94
S2	22.96	37.63
S3	18.62	31.77
S4	20.54	34.21
S16	18.60	31.04
d7E1	19.42	31.14
d7E2	18.38	31.22
d7E4	18.95	31.60
d7E5	19.00	31.61
d7E7	19.22	31.58

Δείγματα	HPRT	Pla2g6
Ct	Ct	Ct
d12E1	18.93	31.23
d12E2	18.56	30.66
d12E3	19.22	31.56
d12E4	18.74	31.38
d12E5	18.94	31.27
d15E1	20.13	30.64
d15E2	18.61	31.27
d15E3	20.09	31.62
d15E4	19.27	31.62
d15E5	21.87	33.33

Σχήμα 5.33 *Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g6*

Pafah1b1



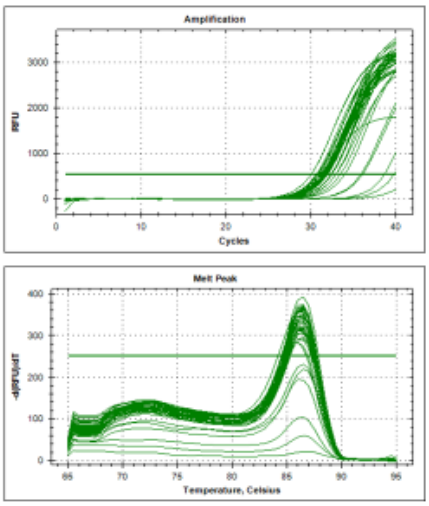


Δείγματα	HPRT	Pafah1b1
Ct	Ct	Ct
S1	17.57	25.16
S2	22.96	30.09
S3	18.62	25.97
S4	20.54	27.42
S16	18.60	24.01
d7E1	19.42	25.31
d7E2	18.38	25.52
d7E4	18.95	25.27
d7E5	19.00	25.62
d7E7	19.22	25.77

Δείγματα	HPRT	Pafah1b1
Ct	Ct	Ct
d12E1	18.93	25.11
d12E2	18.56	24.33
d12E3	19.22	25.93
d12E4	18.74	25.22
d12E5	18.94	25.55
d15E1	20.13	26.12
d15E2	18.61	26.04
d15E3	20.09	26.90
d15E4	19.27	26.35
d15E5	21.87	28.96

Σχήμα 5.34 *Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pafah1b1*

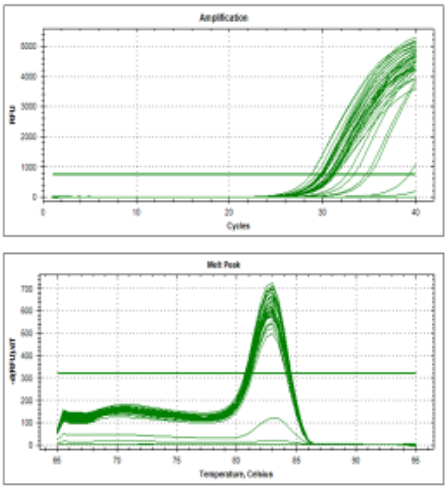
Pla2g12a



Δείγματα	HPRT	Pla2g12a	Δείγματα	HPRT	Pla2g12a
Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
S1	17.57	31.04	d12E1	18.93	32.05
S2	22.96	36.29	d12E2	18.56	31.45
S3	18.62	31.51	d12E3	19.22	32.76
S4	20.54	32.70	d12E4	18.74	31.78
S16	18.60	31.74	d12E5	18.94	0
d7E1	19.42	31.59	d15E1	20.13	32.08
d7E2	18.38	31.78	d15E2	18.61	32.01
d7E4	18.95	32.46	d15E3	20.09	32.03
d7E5	19.00	32.22	d15E4	19.27	32.74
d7E7	19.22	31.66	d15E5	21.87	33.24

Σχήμα 5.35 *Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g12a*

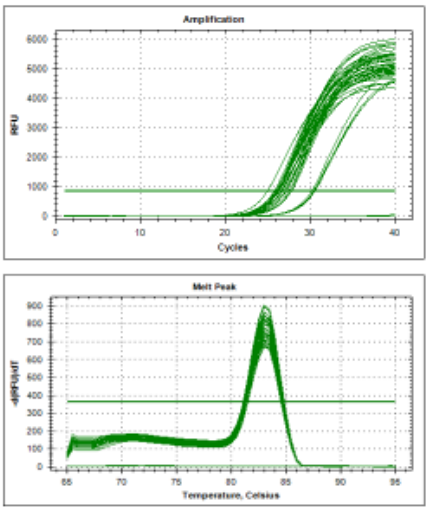
Pla2g15



Δείγματα	HPRT	Pla2g15	Δείγματα	HPRT	Pla2g15
Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
S1	17.57	30.91	d12E1	18.93	29.76
S2	22.96	39.19	d12E2	18.56	29.91
S3	18.62	31.20	d12E3	19.22	30.47
S4	20.54	34.78	d12E4	18.74	30.51
S16	18.60	30.89	d12E5	18.94	29.89
d7E1	19.42	30.94	d15E1	20.13	28.63
d7E2	18.38	30.39	d15E2	18.61	29.57
d7E4	18.95	31.06	d15E3	20.09	29.69
d7E5	19.00	31.23	d15E4	19.27	29.46
d7E7	19.22	31.03	d15E5	21.87	32.86

Σχήμα 5.36 *Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g15*

Pla2g16



Δείγματα	HPRT	Pla2g16
Ct	Ct	Ct
S1	17.57	26.21
S2	22.96	26.16
S3	18.62	30.48
S4	20.54	26.75
S16	18.60	27.12
d7E1	19.42	26.14
d7E2	18.38	26.29
d7E4	18.95	26.46
d7E5	19.00	27.14
d7E7	19.22	26.57

Δείγματα	HPRT	Pla2g16
Ct	Ct	Ct
d12E1	18.93	26.15
d12E2	18.56	25.83
d12E3	19.22	26.14
d12E4	18.74	26.15
d12E5	18.94	26.17
d15E1	20.13	26.20
d15E2	18.61	26.05
d15E3	20.09	26.21
d15E4	19.27	26.24
d15E5	21.87	27.71

Σχήμα 5.37 *Αποτελέσματα RT-PCR για το γονίδιο Pla2g16*

Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν και αποτυπώνονται στα παραπάνω σχήματα χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή διαγραμμάτων σχετικής γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων που εξετάστηκαν. Αυτά αποτυπώνονται στα σχήματα 5.38 και 5.39. Για να εφαρμοσθεί η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης ελέχθηκε η αποτελεσματικότητα των αντιδράσεων με την τιμή αποτελεσματικότητας του γονιδίου αναφοράς (πίνακας 5.3).

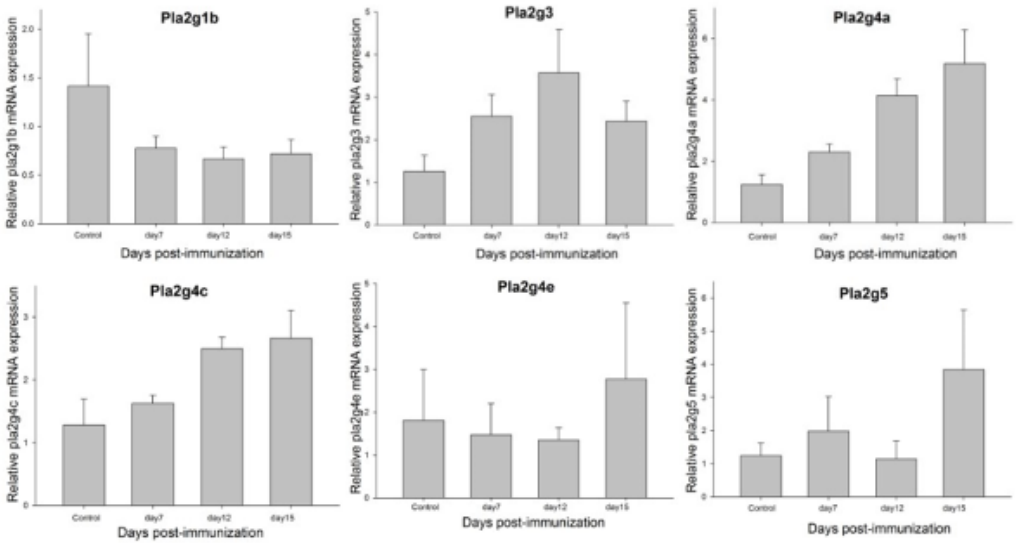
Πίνακας 5.3 *Αποτελεσματικότητες αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμερασών σε πραγματικό χρόνο*

Αποτελεσματικότητες αντιδράσεων

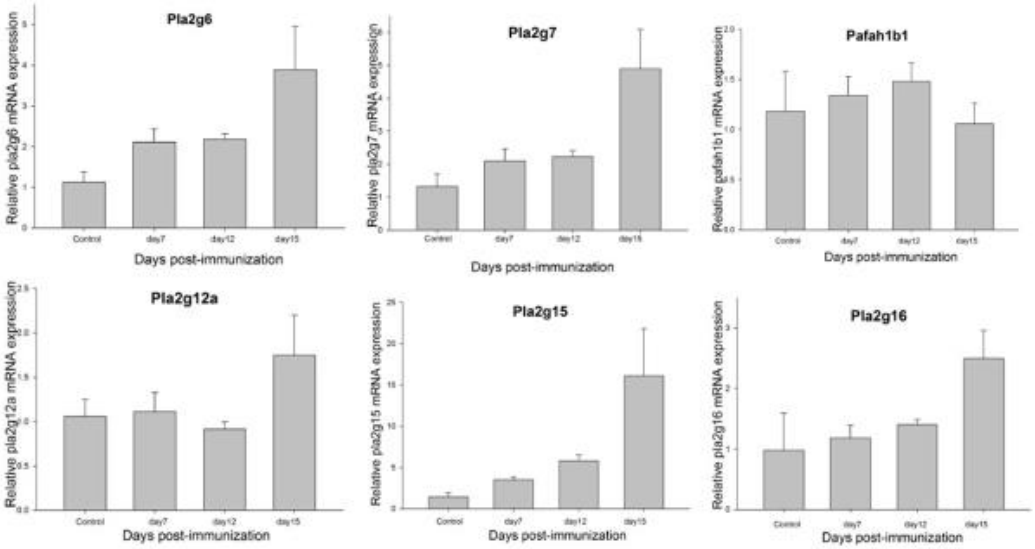
Γονίδιο	Efficiency (%)
HPRT	102
Pla2g1b	114.2
Pla2g2e	152.6
Pla2g3	93.0
Pla2g4a	90.1
Pla2g4c	80.2
Pla2g4e	94.1
Pla2g4f	290.7
Pla2g5	97.6

Γονίδιο	Efficiency (%)
Pla2g6	108.4
Pla2g7	137.5
Pafah1b1	99.6
Pla2g12a	91.4
Pla2g15	102.8
Pla2g16	92.3
Ptgs1	94.3
Ptgs2	80.9

Τελικώς για τα περισσότερα γονίδια ήταν εφικτή η μέθοδος $2^{-\Delta\Delta Ct}$ για την σχετική ποσοτικοποίηση των δεδομένων που προέκυψαν, καθώς οι διαφορές ανάμεσα στην αποτελεσματικότητα για κάθε γονίδιο σχετικά με το γονίδιο αναφοράς ήταν μέσα στο όριο του 5% απόκλισης μεταξύ τους.



Σχήμα 5.38 *Διαγραμματική απεικόνιση σχετικής γονιδιακής έκφρασης των Pla2g1b, Pla2g3, Pla2g4a, Pla2g4c, Pla2g4e, Pla2g5*

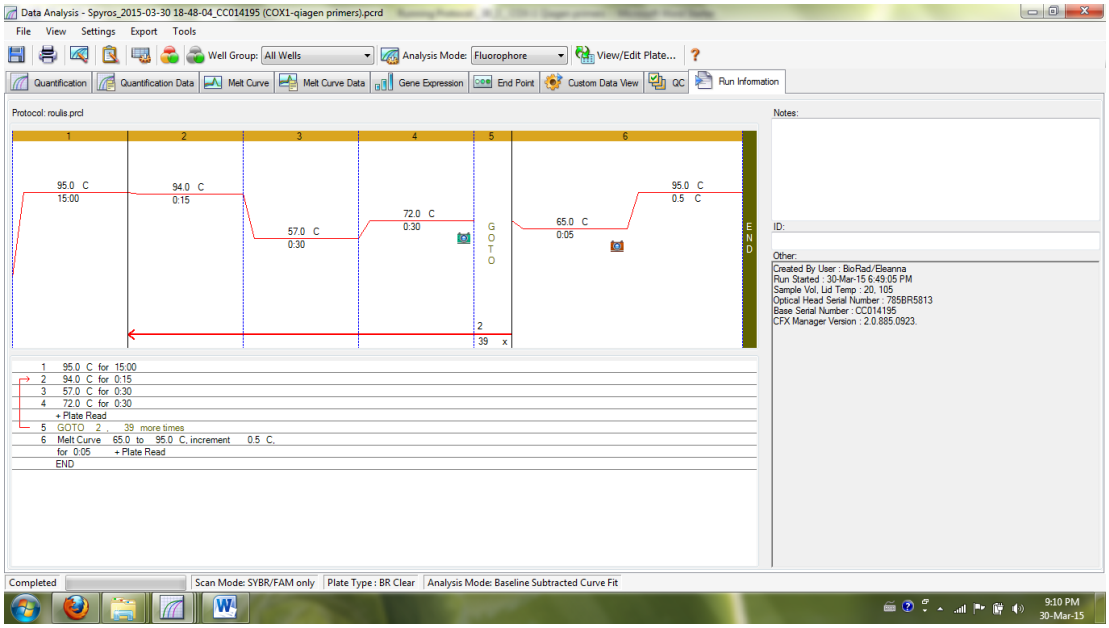


Σχήμα 5.39 *Διαγραμματική απεικόνιση σχετικής γονιδιακής έκφρασης των Pla2g6, Pla2g7, Pafah1b1, Pla2g12a, Pla2g15, Pla2g16*

Μέσω αυτών των πειραμάτων προσδιορίστηκαν τα σχετικά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης για 14 γονίδια της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2 και συγκεκριμένα για τα Pla2g1b, Pla2g2e, Pla2g3, Pla2g4a, Pla2g4c, Pla2g4e, Pla2g4f, Pla2g5, Pla2g6, Pla2g7, Pafah1b1, Pla2g12a, Pla2g15, Pla2g16. Στα περισσότερα παρατηρείται με την πρόοδο της νόσου και ιδιαίτερα στις 15 ημέρες μετά την επαγωγή της, αύξηση των επιπέδων έκφρασης τους στο νωτιαίο μυελό.

5.6 Προσδιορισμός της σχετικής γονιδιακής έκφρασης της COX-1 σε δείγματα νωτιαίου μυελού κατά την εξέλιξη της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας

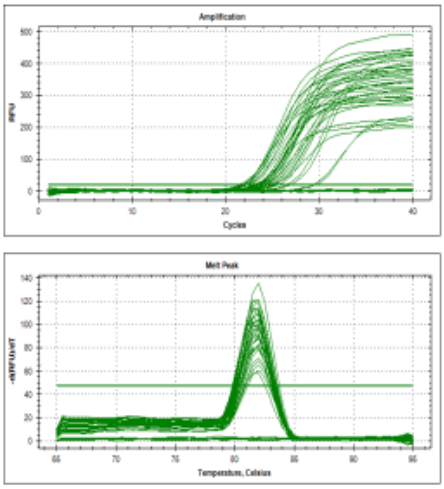
Το συγκεκριμένο πείραμα διεξήχθηκε παράλληλα και με χρήση των ίδιων εκμαγείων των τελικών πειραμάτων των Φωσφολιπασών A_2. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε και εδώ η HPRT. Επίσης χρησιμοποιήθηκε τόσο θετικό όσο και αρνητικό control, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο των «Μεθοδων και Υλικών». Στο επόμενο σχήμα 5.40 φαίνεται το διαφορετικό πρωτόκολο το οποίο ακολουθήθηκε κατά το πείραμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, καθώς το ζευγάρι εκκινητών της Qiagen, ήταν πρότυπο. Το πρωτόκολλο ήταν το προτεινόμενο για τους συγκεκριμένους εκκινητές ώστε να υπάρχει μέγιστη αποτελεσματικότητα κατά την αντίδραση.



Σχήμα 5.40 *Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για προσδιορισμό της σχετικής γονιδιακής έκφρασης της COX-1*

Το σχήμα 5.41 εμπεριέχει το διαγράμμα «Κύκλων Κατωφλίων» & κορυφών θερμοκρασιών τήξεως. Το μεν θετικό control έδειξε ότι οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν καλές και ότι το ζευγάρι εκκινητών ήταν κατάλληλο, ενώ το αρνητικό control επισήμανε την καθαρότητα του μίγματος αντιδρώντων.

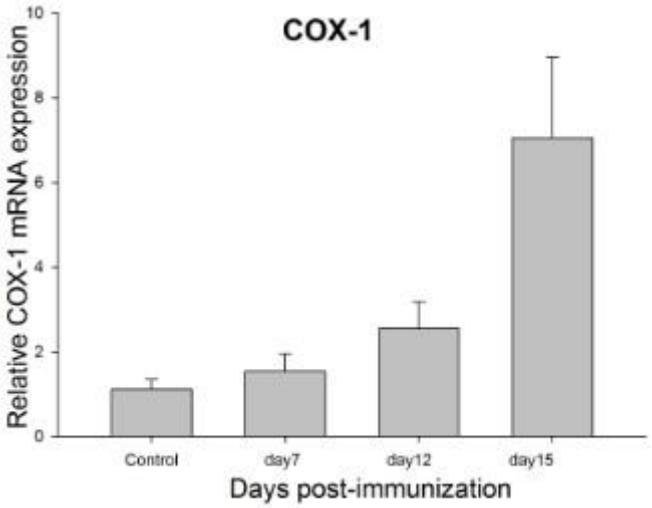
COX-1



Δείγματα	HPRT	COX-1	Δείγματα	HPRT	COX-1
Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
S1	17.57	23.66	d12E1	18.93	22.38
S2	22.96	29.54	d12E2	18.56	23.38
S3	18.62	23.74	d12E3	19.22	23.53
S4	20.54	25.47	d12E4	18.74	24.35
S16	18.60	23.39	d12E5	18.94	22.52
d7E1	19.42	23.31	d15E1	20.13	21.76
d7E2	18.38	23.20	d15E2	18.61	21.87
d7E4	18.95	24.69	d15E3	20.09	23.16
d7E5	19.00	24.04	d15E4	19.27	22.31
d7E7	19.22	25.10	d15E5	21.87	25.08

Σχήμα 5.41 Αποτελέσματα RT-PCR, COX-1

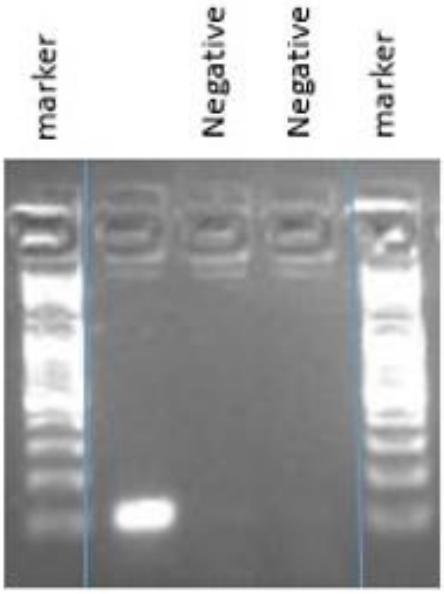
Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 5.42 παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση των επιπέδων έκφρασης του ενζύμου κατά την εξέλιξη της Π.Α.Ε.



Σχήμα 5.42 *Διαγραμματική απεικόνιση σχετικής γονιδιακής έκφρασης της COX-1*

5.7 Προσδιορισμός της σχετικής γονιδιακής έκφρασης της COX-2 σε δείγματα νωτιαίου μυελού κατά την εξέλιξη της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας

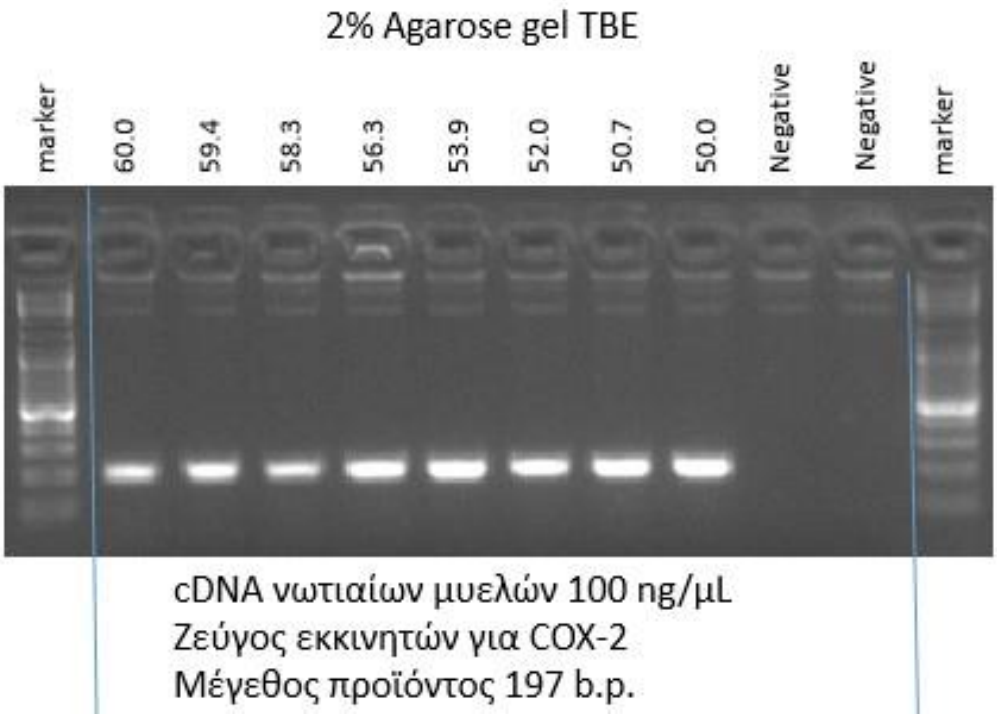
Για τα πειράματα αυτά, χρησιμοποιήθηκε θετικό control από RNA μακροφάγων επεξεργασμένων με Lys που είχε απομονωθεί και καθαριστεί από τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Αντώνιο Σκλήρη του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ». Το RNA συγκεντρώσεως 1210 ng/μL μετατράπηκε σε cDNA και ακολούθησε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με γονίδιο αναφοράς β2-μικροσφαιρίνη ώστε να προσδιοριστεί η λειτουργικότητα του και άρα η επιτυχία του πρωτοκόλλου αντίστροφης μεταγραφάσης που είχε ακολουθηθεί πρωτύτερα. Τα αποτελέσματα φαινόνται στο σχήμα 5.44 και αποδείχτηκαν θετικά.



cDNA μακροφάγων 40 ng/μL
Ζεύγος εκκινητών για β2-μικροσφαιρίνη
Μέγεθος προϊόντος 100 b.p.

Σχήμα 5.43 *Αποτελέσματα συμβατικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για το γονίδιο β2-μικροσφαιρίνη σε cDNA μακροφάγων, επεξεργασμένων με LPS*

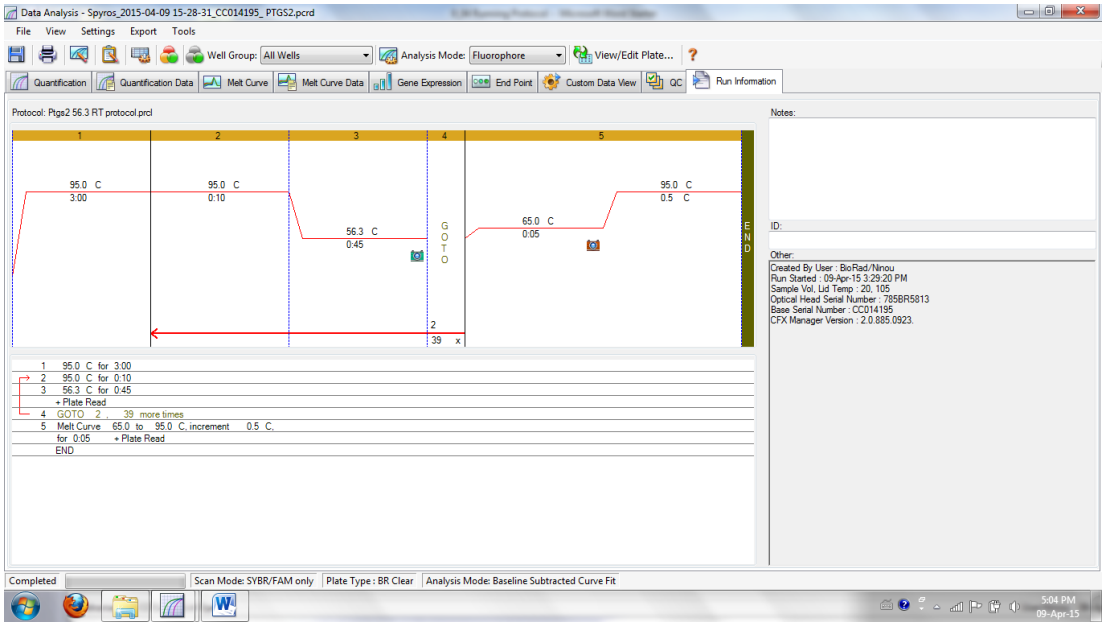
Στη συνέχεια για προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδισμού διενεργήθηκε ένα πείραμα βαθμιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για το γονίδιο COX-2. Το εύρος των θερμοκρασιών που επιλέχθηκε ήταν από 50°C έως 60°C και τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 5.45.



Σχήμα 5.44 *Αποτελέσματα βαθμιδωτής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την COX-2*

Ως βέλτιστη θερμοκρασία για το τελικό πείραμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, επιλέχθηκαν οι 56.3^{o}C. Η σχετικά χαμηλή θερμοκρασία υβριδισμού βοηθάει στην αποφυγή σχηματισμού παραπροιόντων, όπως διμερών εκκινητών.

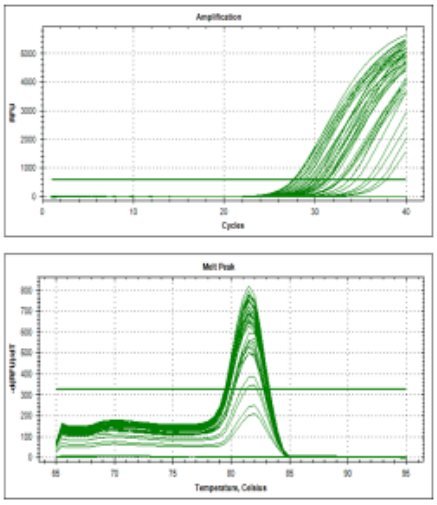
Τελικώς με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR) προσδιορίστηκε η σχετική γονιδιακή έκφραση της COX-2 σε δείγματα νωτιαίου μυελού από φυσιολογικούς και ασθενείς με Π.Α.Ε. ποντικούς. Για τα πειράματα αυτά όπως και στις φωσφολιπασες A_2, χρησιμοποιήθηκε το πιο αξιόπιστο γονίδιο HPRT. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στο σχήμα 5.45.



Σχήμα 5.45 *Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο για προσδιορισμό της σχετικής γονιδιακής έκφρασης της COX-2*

Το σχήμα 5.46 εμπεριέχει το διαγράμμα «Κύκλων Κατωφλίων» & κορυφών θερμοκρασιών τήξεως καθώς και τις τιμές που καταγράφηκαν. Η μία κορυφή τήξης για κάθε δείγμα αποδεικνύει ότι δεν υπήρχε ανεπιθύμητη παρουσία παραπροιόντων. Οι τιμές των «Κύκλων Κατοφλίου» καταδεικνύουν ότι ιδιαίτερα τα δείγματα των 12 ημερών έχουν καλύτερη έκφραση από τα υπόλοιπα του COX-2.

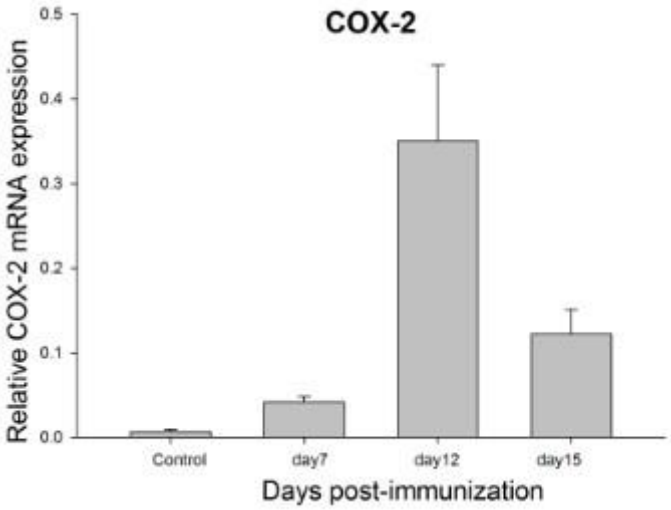
COX-2



Δείγματα	HPRT	COX-2	Δείγματα	HPRT	COX-2
Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
S1	17.57	34.27	d12E1	18.93	28.00
S2	22.96	0	d12E2	18.56	28.74
S3	18.62	32.85	d12E3	19.22	27.59
S4	20.54	37.01	d12E4	18.74	29.29
S16	18.60	32.74	d12E5	18.94	27.98
d7E1	19.42	32.58	d15E1	20.13	30.58
d7E2	18.38	30.14	d15E2	18.61	29.73
d7E4	18.95	31.28	d15E3	20.09	30.50
d7E5	19.00	31.30	d15E4	19.27	29.39
d7E7	19.22	31.43	d15E5	21.87	35.09

Σχήμα 5.46 *Αποτελέσματα RT-PCR, COX-2*

Μετα από επεξεργασία των παραπάνω δεδομένων, στο σχήμα 5.47 φαίνεται η σχετική γονιδιακή έκφραση για την COX-2 σε συναρτήση με την εξέλιξης της ασθένειας. Είναι ενδιαφέρον ότι αντίθετα με την COX-1, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του γονιδίου της COX-2 από τις 12 στις 15 μέρες.

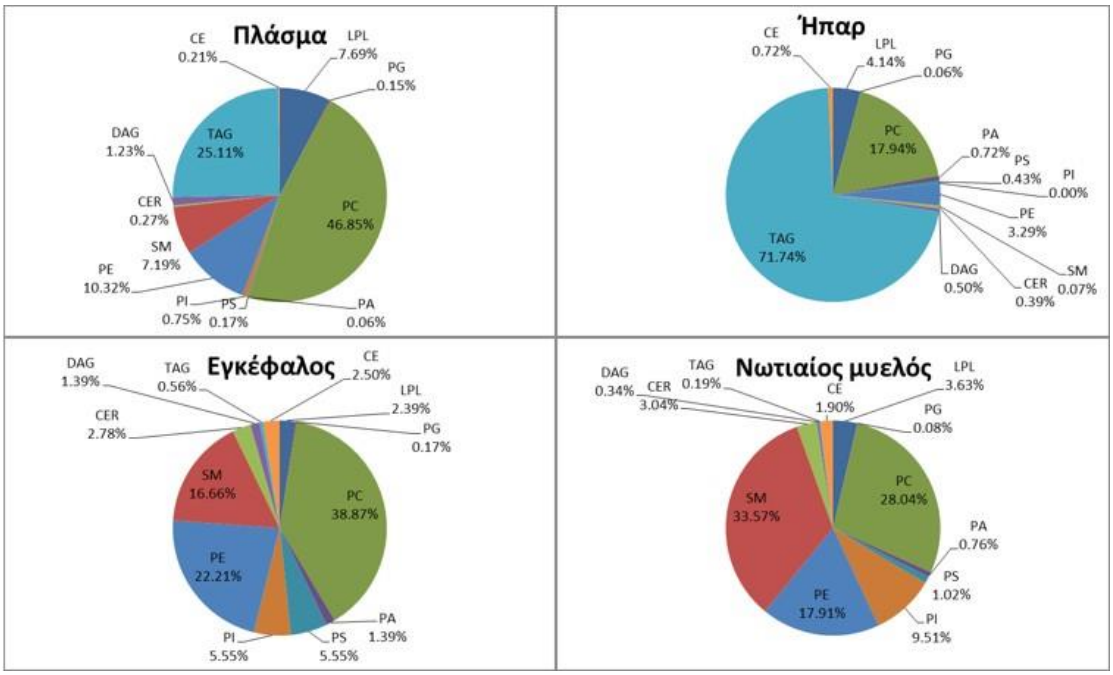


Σχήμα 5.47 *Διαγραμματική απεικόνιση σχετικής γονιδιακής έκφρασης της COX-2*

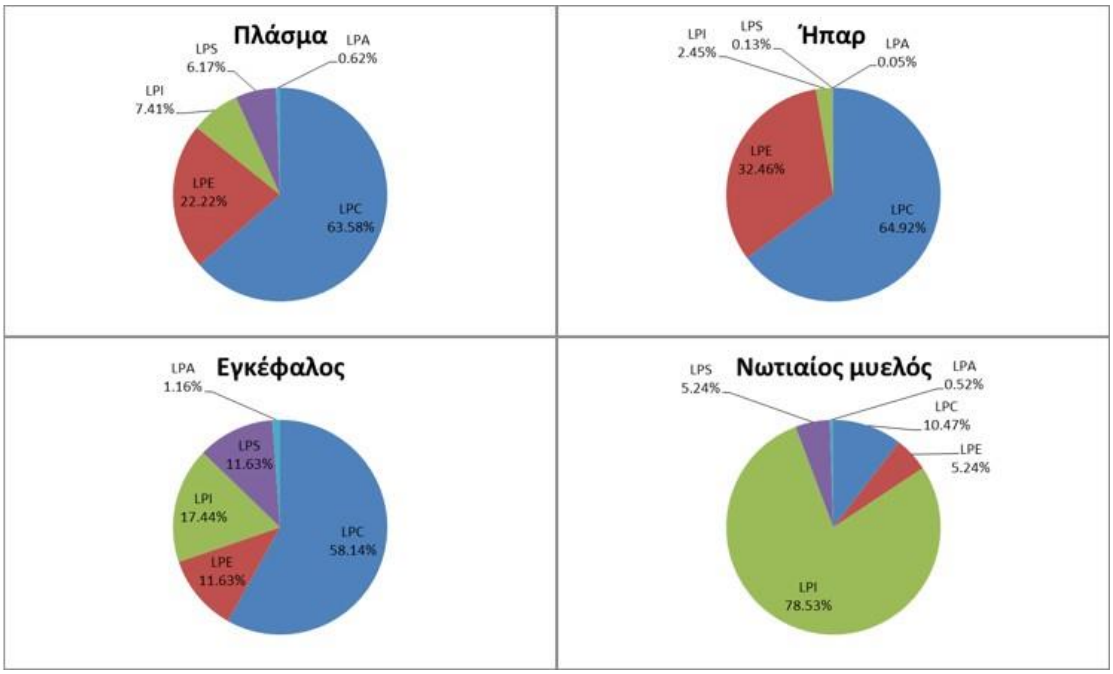
5.8 Λιπιδωμική ανάλυση πλάσματος, ήπατος, νωτιαίου μυελού και εγκεφάλου σε φυσιολογικούς ποντικούς

Ο βασικός ρόλος των υπο μελέτη ενζύμων είναι η υδρόλυση διάφορων φωσφολιπιοδίων σε προφλεγμονώδη λιπίδια. Συνεπώς είναι πολύ σημαντικό τα επίπεδα έκφρασης τους να συσχετίζονται με τη δραστικότητα τους στους ιστούς, η οποία αντικατοπτρίζεται από την αλλαγή των προιόντων τους ή σε κάποιες περιπτώσεις των υποστρωμάτων τους. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε μια μέθοδος μέτρησης όλων των λιπιδίων που είναι στο ίδιο μεταβολικό μονοπάτι με τα υποστρώματα και τα προϊόντα των PLA_2, COX-1, COX-2 σε φυσιολογικά ποντίκια. Η εν λόγω μέθοδος θα χρησιμοποιηθεί μελλοντικά για τη μέτρηση των λιπιδίων σε ιστούς, εγκεφαλονωτιαίο υγρό και πλάσμα ποντικών με Π.Α.Ε.

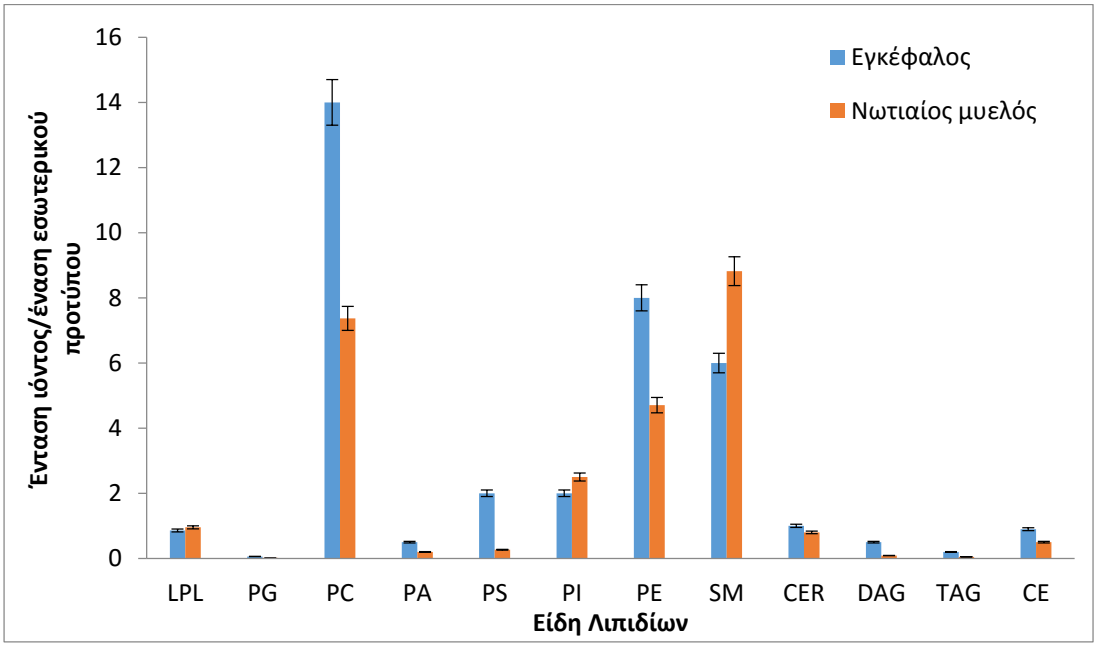
Στα σχήματα 5.48 και 5.49 απεικονίζεται η ποσοστιαία κατανομή των λιπιδίων σε 3 ιστούς (ήπαρ, εγκέφαλο και νωτιαίο μυελό) και στο πλάσμα. Το ήπαρ χρησιμοποιήθηκε ως ένας ιστός προς σύγκριση. Παρατηρείται πως ο εγκέφαλος με το νωτιαίο μυελό έχουν παρόμοια κατανομή διάκυλο-λιπιδίων (Σχήμα 5.48, 5.50) ενώ διαφέρουν στα λυσοφωσφολιπίδια LPI και LPC (Σχήμα 5.49). Η SM (σφιγγομυελίνη) και η PE (φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη) είναι σε υψηλότερα επίπεδα στο Κ.Ν.Σ. από ότι στο πλάσμα και το ήπαρ ενώ το LPC (λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη) που προκαλεί απομυελίνωση είναι σε χαμηλότερα επίπεδα στο νωτιαίο μυελό. Το σχήμα 5.51 παρουσιάζει τη σύσταση των λιπιδίων του κάθε ιστού. Ο νωτιαίος μυελός φαίνεται να έχει λιγότερα φωσφολιπίδια από τον άλλο ιστό του κεντρικού νευρικού συστήματος, τον εγκέφαλο, αλλά περιέχει περισσότερα σφιγγολιπίδια. Τα TAG (τριακυλογλυκερόλες) που συχνά χρησιμοποιούνται ως αποθήκη ενέργειας των οργανισμών, κυριαρχούν συντριπτικά στο συκώτι των ποντικών, σε σχέση με τους άλλους ιστούς.



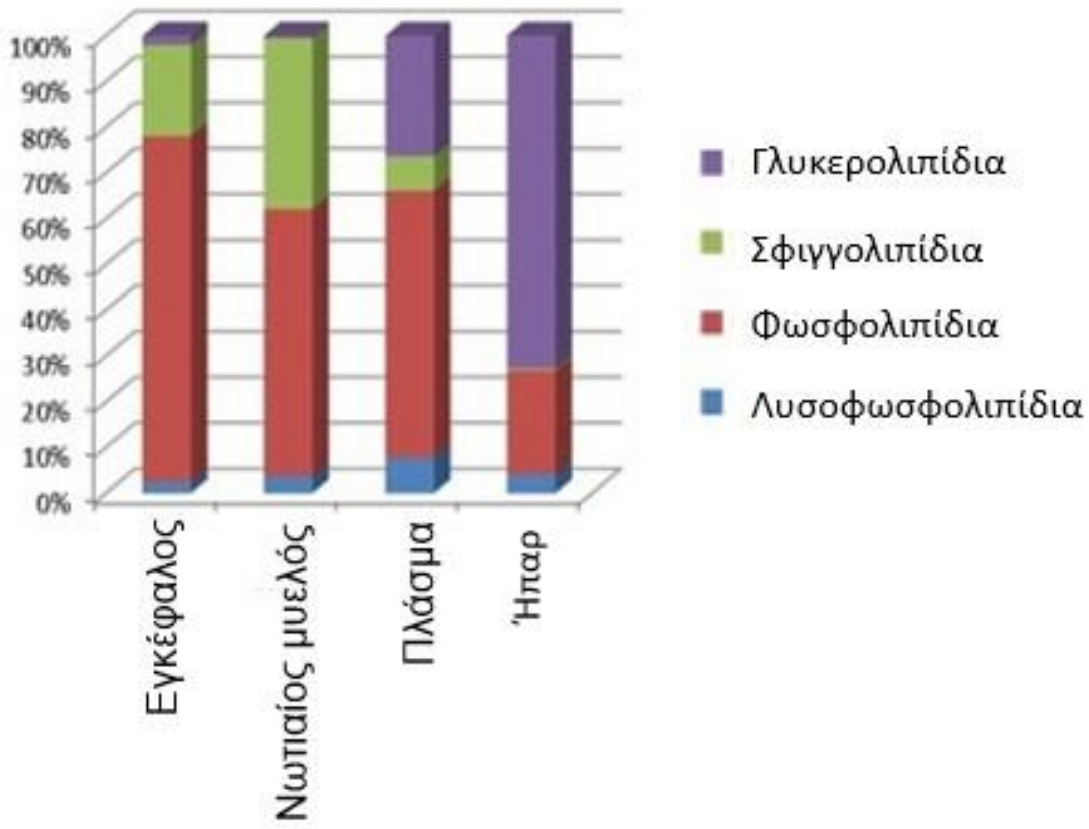
Σχήμα 5.48 *Ποσοστιαία κατανομή φωσφολιπιδίων, γλυκερολιπιδίων και σφιγγομυελίνης σε ιστούς φυσιολογικών ποντικών*



Σχήμα 5.49 *Ποσοστιαία κατανομή λυσοφωσφολιπιδίων σε ιστούς φυσιολογικών ποντικών*

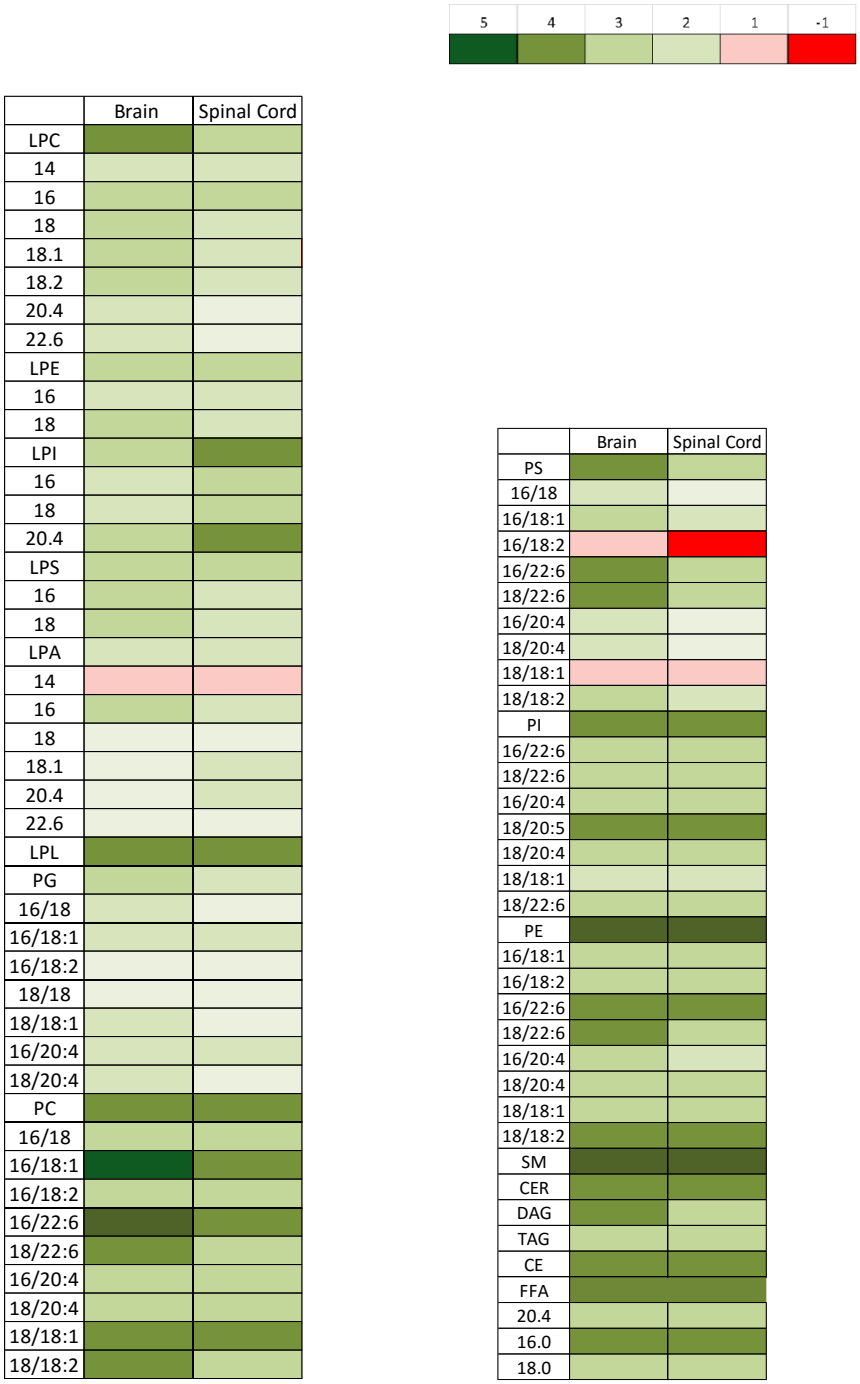


Σχήμα 5.50 *Σύγκριση επιπέδων φωσφολιπιδίων, γλυκερολιπιδίων και σφιγγολιπιδίων ανάμεσα σε ιστούς εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού, φυσιολογικών ποντικών*



Σχήμα 5.51 *Συγκριτικό διάγραμμα ποσοστιαίων επιπέδων των τεσσάρων λιπιδικών τάξεων ανάμεσα σε διαφορετικούς φυσιολογικούς ιστούς ποντικών*

Τέλος το σχήμα 5.52 απεικονίζει τις διαφορές ανάμεσα στα λιπίδια εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού. Αξιοσημείωτο είναι ότι τα διάκυλο-φωσφολιπίδια που περιέχουν δοκοσαεξανοϊκο οξύ συνδεδεμένο στο σκελετό γλυκερόλης τους είναι πιο άφθονα. Αυτό ίσως να συμβαδίζει με το νευροπροστατευτικό ρόλο του συγκεριμένου λιπαρού οξέος [83] Είναι λοιπόν πιθανό το συγκεκριμένο λιπαρό οξύ να υφίσταται μείωση των επιπέδων του στην Π.Α.Ε., κάτι το οποίο θα αποτελέσει αντικείμενο μελλοντικών ερευνών.



Σχήμα 5.52 *Heat Map λιπιδωμικού προφίλ εγκεφάλου και νωτιαίου μυελού φυσιολογικών ποντικών*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση μελών της υπεροικογένειας των Φωσφολιπασών A_2, καθώς και των κυκλοξυγενασών COX-1 και COX-2 κατά την εκθετική αύξηση των συμπτωμάτων στο μοντέλο Π.Α.Ε. Το συγκεκριμένο μοντέλο αποτελεί ένα καλό εργαλείο για την μελέτη της φλεγμονώδους απόκρισης στην απομυελίνωση που χαρακτηρίζει τους νευροάξονες των νευρικών κυττάρων και κατ' επέκταση στην σημαντική ανθρώπινη νόσο της Σ.Κ.Π. Στο συγκεκριμένο τύπο ποντικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία (C57BL/6J) η εξέλιξη της Π.Α.Ε. παρουσιάζει μια χρόνια προοδευτική κλινική πορεία που προσομοιάζει ιδιαίτερα στον Προοδευτικό τύπο της Σ.Κ.Π. Εκτός όμως από τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης για τα παραπάνω ένζυμα, έμφαση δόθηκε και στη μελέτη των υποστρωμάτων και της κατανομής τους στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελο.

Το καινοτόμο στην παρούσα έρευνα είναι ότι προσεγγίστηκε με ολοκληρωμένο τρόπο η ανίχνευση αλλά και ο ποσοτικός έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης των περισσότερων μελών της υπεροικογένειας των φωσφολιπασών A_2 στο νωτιαίο μυελό. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης δεκατεσσάρων γονίδιων, των Pla2g1b, Pla2g2e, Pla2g3, Pla2g4a, Pla2g4c, Pla2g4e, Pla2g4f, Pla2g5, Pla2g6, Pla2g7, Pafah1b1, Pla2g12a, Pla2g15 και Pla2g16. Με εξαίρεση το γονίδιο του Pla2g2a που δεν εκφράζεται στο συγκεκριμένο τύπο ποντικού λόγω μετάλλαξης [30], προσδιορίστηκαν τα υπόλοιπα τρία σημαντικά γονίδια για την ανάπτυξη φλεγμονής στην Π.Α.Ε, δηλαδή τα Pla2g4a, Pla2g5, Pla2g6. Για τις περισσότερες μορφές με εξαίρεση της Pla2g1b, Pla2g3 και Pafah1b1 βρέθηκε ότι αυξάνουν σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης τους ιδιαίτερα στην 15 ημέρες που είναι το μέγιστο σημείο στην εκθετική φάση εξέλιξης της ασθένειας στα ποντίκια. Επίσης τα επίπεδα έκφρασης ήταν στην πλειοψηφία των PLA_2 μεγαλύτερα στα ασθενή από τα φυσιολογικά δείγματα. Το συμπέρασμα αυτό συμπίπτει με τα υπάρχοντα δεδομένα ιδιαίτερα για την Pla2g4a, Pla2g5, Pla2g6 [27]. Συγκεκριμένα οι ομάδες του Dr. Samuel David και του καθηγητή δρ. Γεώργιου Κόκκοτου, χρησιμοποιώντας ένα άλλο είδος ποντικών και συγκεκριμένα θηλυκά SJL/J, επήγαγαν την Π.Α.Ε στα ποντίκια με χορήγηση

Πρωτεολιπιδικής πρωτεΐνης (PLP1) σε CFA, αντί για χρήση MOG_{33-55} όπως στην παρούσα μελέτη. Εν συνεχεία, με απομόνωση RNA από τους ιστούς και αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, αλλά με διαφορετικό γονίδιο αναφοράς (GAPDH αντί για HPRT), βρήκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των Pla2g6 και Pla2g4a σε σχέση με τα φυσιολογικά ποντίκια τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης της Π.Α.Ε. Η παρούσα εργασία τόσο για αυτές όσο και για την Pla2g5 κατέληξε επίσης στο ίδιο συμπέρασμα αλλά επιπροσθέτως μελέτησε της αυξομειώσεις των επιπέδων στην εξέλιξης της ασθένειας. Το σημαντικό εύρημα που παρατηρήθηκε ότι παρά τα συνεχώς αυξημένα σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης, υπήρξε κυρίαρχα άνοδος αυτών στις 15 ημέρες από την επαγωγή της νόσου στα ποντίκια, γεγονός που αποδεικνύει τη στενή σύνδεση των PLA_2 με την ένταση της φλεγμονώδους απόκρισης στην Π.Α.Ε. Επίσης ενδιαφέρον παρουσιάζει η σημαντική αύξηση των σχετικών επιπέδων έκφρασης της Pla2g15 που εντοπίζεται κυρίαρχα στα μακροφάγα, καθώς και της Pla2g16. Τέλος εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι μειώνονται τα επίπεδα έκφρασης της Pla2g1b στην εξέλιξη της Π.Α.Ε παρά το ότι η δράση της απελευθερώνει αραχιδονικό οξύ, το οποίο αποτελεί σημαντικό μόριο κατά την ανάπτυξη της φλεγμονώδους απόκρισης. Τα παραπάνω καταδεικνύουν την αναγκαιότητα για περισσότερες μελέτες για καθένα από τα παραπάνω ένζυμα στο νωτιαίο μυελό και τον εγκέφαλο, στην προσπάθεια μας να κατανοήσουμε τη δράση αυτών των ενζύμων στην Π.Α.Ε.

Το δεύτερο πολύ ενδιαφέρον αποτέλεσμα της παρούσης εργασίας είναι η διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των COX-1 και COX-2. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι ενώ τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της COX-1 από τις 12 στις 15 ημέρες από την επαγωγή της νόσου στα ποντίκια αυξάνονται, στο ίδιο διάστημα τα επίπεδα της COX-2 μειώνονται. Το παραπάνω εύρημα είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την κατανόηση του ρόλου των προσταγλανδίνων στην ανάπτυξη της φλεγμονώδους απόκρισης. Σήμερα θεωρείται ότι η COX-1 είναι το κυρίαρχο ένζυμο για την παραγωγή της PGD_2, ενώ η COX-2 για την PGH_2, PGE_2, PGI_2 [84]. Η σύνθεση όλων αυτών των εικοσανοειδών από τα ένζυμα των κυκλοξυγενασών βασίζεται στο κύριο προϊόν που απελευθερώνεται από τη δράση των φωσφολιπασών A_2, που είναι το αραχιδονικό οξύ. Τα αντιθετικά

δεδομένα της γονιδιακής έκφρασης των συγκεκριμένων ενζύμων βρίσκονται σε συμφωνία με τα πορίσματα άλλων ερευνητικών ομάδων [48], [85], [51]. Δεν έχει διαλευκανθεί γιατί συμβαίνει αυτό αλλά τα δεδομένα της βιβλιογραφίας καταδεικνύουν ότι πιθανόν να υπάρχει ανταγωνιστική σχέση ανάμεσα στα δύο ένζυμα για το υπόστρωμα το οποίο χρησιμοποιούν στη καταλυτική δράση τους. Συγκεκριμένα, καθώς τα επίπεδα του αραχιδονικού οξέος αυξάνονται ενδοκυτταρικά λόγω της μείωμένης έκφρασης της COX-1, ενδέχεται ως αποτέλεσμα να ενεργοποιείται αρχικά η έκφραση και η δράση της COX-2. Οταν όμως τα επίπεδα του υποστρώματος μειωθούν, τότε επανακάμπτει η δράση της COX-1. Το συμπέρασμα αυτό καταδεικνύει έναν ευέλικτο τρόπο ελέγχου με τον οποίο ένας οργανισμός προσδιορίζει το είδος και τα επίπεδα των προσταγλανδίνων που παράγει. Είναι προφανές ότι για την ασφαλέστερη διεξαγωγή συμπερασμάτων απαιτείται περαιτέρω ερευνητικές μελέτες. Σημαντικό ρόλο σε αυτές θα έχει η χρήση λιπιδομικών αναλύσεων, όπως αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για την ανάλυση της κατανομής διαφόρων λιπιδίων σε φυσιολογικούς ιστούς ποντικών με έμφαση στον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Η πληρέστερη κατανόηση του φυσιολογικού λιπιδικού προφίλ των ιστών αυτών, μπορεί σε ένα επόμενο στάδιο να συμβάλλει στην καλύτερη παρατήρηση των διαφορών της ομοιόστασης των λιπιδίων που χαρακτηρίζουν την Π.Α.Ε.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

$AdPLA_2$	Λιπώδης Φωσφολιπάση A_2
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
ATX	Autotaxin
B_2M	Β2-μικροσφαιρίνη
CFA	Ανοσοενισχυτικό έκδοχο του Freund
CL	Καρδιολιπίνες
COX-1	Κυκλοξυγενάση 1
COX-2	Κυκλοξυγενάση 2
$cPLA_2$	Κυτοσολική Φωσφολιπάση A_2
FA	Λιπαρά οξέα
GAPDH	3-φωσφορική αφυδρογονάση της γλυκεραλδεϋδης
Gradient PCR	Βαθμιδωτή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
GL	Γλυκερολιπίδια
GP	Γλυκεροφωσφολιπίδια
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HPRT	Υποξανθινο-γουανινο-ριβοσυλοτρανσφεράση
$iPLA_2$	Μη εξαρτώμενη από Ca^{2+} Φωσφολιπάση A_2
LPA	Λυσοφωσφατιδικό οξύ
LPC	Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
$LPLA_2$	Λυσοσωμική Φωσφολιπάση A_2
LPS	Λιποπολυσακχαρίτης
MBP	Μυελινώδης βασική πρωτεΐνη
MOG	Γλυκοπρωτεΐνη της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων
PAF-AH	Ακετυλο-υδρολάση του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PG	Προσταγλανδίνες
PI	Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PK	Σακχαρολιπίδια
PLA_2	Φωσφολιπάση A_2

PLP	Πρωτεολιπιδική πρωτεΐνη
PLP1	Σφιγγομυελίνη
PR	Λιπίδια πρενόλης
PS	Φωσφατιδυλοσερίνη
RT-PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο
SL	Σακχαρολιπίδια
$sPLA_2$	Εκκρινόμενη Φωσφολιπάση A_2
SP	Σφιγγολιπίδια
ST	Λιπίδια στερολών
TBE	Τρις/Βορικό οξύ/EDTA
TH1	Βοηθητικά Τ-κύτταρα τύπου 1
TLC	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
TLR	Υποδοχείς τύπου Toll
TNFa	Παράγοντας νέκρωσης όγκων α
Tx	Θρομβοξάνες
Κ.Ν.Σ.	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
Π.Α.Ε.	Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα
Σ.Κ.Π.	Σκλήρυνση κατά Πλάκας

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

[1] A. Compston, The 150th anniversary of the first depiction of the lesions of multiple sclerosis, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 51, no. 10, 1988, pp. 1249–1252

[2] http://fractalfoundation.org/OFC/OFC-1-6.html

[3] http://captain-nitrogen.tumblr.com/post/15061405889/no-healing-for-you-spinal-cord

[4] R.M. Berne and M. Levy, *Αρχές Φυσιολογίας*, τόμος 1, 3η Εκδοση., Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2003

[5] L. S. Illis, Harrison's Principles of Internal Medicine 14th Edition, *Spinal Cord*, vol. 36, no. 9, 1998, pp. 665–665

[6] M. J. Olek, Current clinical neurology: Multiple sclerosis. Etiology, diagnosis and new treatment strategies, 2005

[7] Χ. Παπαδημητρίου, Ο ρόλος της μικρογλοίας στη φαγοκυττάρωση αποπτωτικών κυττάρων σε αυτοάνοσες παθήσεις του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 2007

[8] A.M. Palmer, Multiple sclerosis and the autonomic nervous system, *Cardiovasc. Pschiatry Neurol.*, vol. 2013, 2013, pp. 1–10

[9] L. Steinman, Multiple sclerosis: A coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system, *Cell*, vol. 85, no. 3, 1996, pp. 299–302

[10] H. Lassmann, J. van Horssen, and D. Mahad, Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis, *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 8, no. 11, 2012, .pp. 647–656

[11] J.M. Frischer, S. Bramow, A. Dal-Bianco, C.F. Lucchinetti, H. Rauschka, M. Schmidbauer, H. Laursen, P.S. Sorensen, and H. Lassmann, The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains, *Brain*, vol. 132, no. 5, 2009, pp. 1175–1189

[12] A.S. Fauci, E. Braunwald, D.L. Kasper, S.L. Hauser, D.L. Longo, J.L. Jameson, and J. Loscalzo, *Harrison's Principles of Internal Medicine* 17th edition, Mc-Graw Hill, 2008

[13] M. Rangachari, and V.K. Kurchoo, Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology, *J. Autoimmun.*, vol. 29, no. 6, 2012, pp. 997–1003

[14] A.G. Baxter, The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis, *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, no. 11, 2007, pp. 904–912

[15] R. Gold, C. Linington, and H. Lassmann, Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research, *Brain*, vol. 129, no. 8, 2006, pp. 1953–1971

[16] C.R. Weir, K. Nicolson, and B.T. Bäckström, Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in naive mice by dendritic cells presenting a self-peptide, *Immunol. Cell Biol.*, vol. 80, no. 1, 2002, pp. 14–20

[17] C.S. Clements, H.H. Reid, T. Beddoe, F.E. Tynan, M.A. Perugini, T.G. Johns, C.C.A. Bernard, and J. Rossjohn, The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* U S A, vol. 100, no. 19, 2003, pp. 11059–11064

[18] T.G. Johns and C.C.A. Bernard, The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein, *J. Neurochem.*, vol. 72, no. 1, 1999, pp. 1–9

[19] H.H. Hofstetter, C.L. Shive, and T.G. Forsthuber, Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells, *J. Immunol.*, vol. 169, no. 1, 2002, pp. 117–125

[20] S.D. Miller, W.J. Karpus, and T.S. Davidson, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the mouse, *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. 15.1, no. 2, pp. 2007, 1–26

[21] D.C. Wilton, Phospholipases, Elsevier, 2008, p. 313

[22] E. A. Dennis, Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A_2, *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 18, 1994, pp. 13057–13060

[23] J.E. Burke and E.A. Dennis, Phospholipase A_2 Biochemistry, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, vol. 23, no. 1, 2010, pp. 1–22

[24] E.A. Dennis, G. Kokotos et. al., Phospholipase A_2 Enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention, *Chem Rev.*, vol. 111, no. 10, 2012, pp. 6130–6185

[25] F. Zhou and K. Schulten, Molecular dynamics study of phospholipase A_2 on a membrane surface, *Proteins*, vol. 25, no. 1. 1996, pp. 12–27

[26] J. Lindbom, A.G. Ljungman, M. Lindahl, and C. Tagesson, Expression of members of the phospholipase A_2 family of enzymes in human nasal mucosa, *Eur. Respir. J.*, vol. 18, no. 1, 2001, pp. 130–138

[27] E. Kitsiouli, G. Nakos, and M.E. Lekka, Phospholipase A_2 subclasses in acute respiratory distress syndrome, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1792, no. 10, 2009, pp. 941–953

[28] E.A. Dennis, S.G. Rhee, M.M. Billah, Y.A. Hannun, Role of phospholipases in generating lipid second messengers in signal transduction, *FASEB J.*, 1991, pp. 2068–2077

[29] A. Kalyvas, C. Baskakis, V. Magrioti, V. Constantinou-Kokotou, D. Stephens, R. Lpez-Vales, J.Q. Lu, V.W. Yong, E.A. Dennis, G. Kokotos, and S. David, Differing roles for members of the phospholipase A_2 superfamily in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Brain*, vol. 132, no. 5, 2009, pp. 1221–1235

[30] A. Kalyvas and S. David, Cytosolic phospholipase A_2 plays a key role in the pathogenesis of multiple sclerosis-like disease, *Neuron*, vol. 41, no. 3, 2004, pp. 323–335

[31] S. Marusic, M.W. Leach, J.W. Pelker, M.L. Azoitei, N. Uozumi, J. Cui, M.W.H. Shen, C.M. DeClercq, J.S. Miyashiro, B.A. Carito, P. Thakker, D.L. Simmons, J.P. Leonard, T. Shimizu, and J.D. Clark, Cytosolic

phospholipase A_2 alpha-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Exp. Med.*, vol. 202, no. 6, 2005. pp. 841–851

[32] M. Niederberger, P. Ginès, P.Y. Martin, J. St John, P. Woytaszek, L. Xu, P. Tsai, R.A. Nemenoff, and R.W. Schrier, Increased renal and vascular cytosolic phospholipase A_2 activity in rats with cirrhosis and ascites, *Hepatology*, vol. 27, no. 1, 1998, pp. 42–47

[33] W.F. Gattaz, L.L. Talib, E.L. Schaeffer, B.S. Diniz, and O.V. Forlenza, Low platelet $iPLA_2$ activity predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease: a 4-year follow-up study, *J. Neural Transm.*, vol. 121, no. 2, 2014, pp. 193–200

[34] K. Shinzawa, H. Sumi, M. Ikawa, Y. Matsuoka, M. Okabe, S. Sakoda, and Y. Tsujimoto, Neuroaxonal dystrophy caused by group VIA phospholipase A_2 deficiency in mice: a model of human neurodegenerative disease, *J. Neurosci.*, vol. 28, no. 9, 2008, pp. 2212–2220

[35] H. Kuwata, C. Fujimoto, E. Yoda, S. Shimbara, Y. Nakatani, S. Hara, M. Murakami, and I. Kudo, A novel role of group VIB calcium-independent phospholipase A_2 (iPLA2γ) in the inducible expression of group IIA secretory PLA2 in rat fibroblastic cells, *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 28, 2007, pp. 20124–20132

[36] G.Y. Sun and M.B. Jensen, Phospholiases A_2 and Inflammatory responses in the Central Nervous System, *NeuroMolecular Med.*, vol. 12, no. 2, 2010, pp. 133–148

[37] G. Lambeau and M.H. Gelb, Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A_2, *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 77, 2008, pp. 495–520

[38] I. Sevastou, E. Kaffe, M. Mouratis, and V. Aidinis, Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders : The PLA_2/ LPC and ATX/LPA axes, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1831, 2013, pp. 42–60

[39] M.A. Balboa, J. Balsinde, M.V. Winstead, J.A. Tischfield, and E.A. Dennis, Novel group V phospholipase A_2 involved in arachidonic acid mobilization in murine P388D1 macrophages, *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 50, 1996, pp. 32381–32384

[40] T.J. Cunningham, L. Yao, M. Oetinger, L. Cort, E.P. Blankenhorn, and J.I. Greenstein, "Secreted phospholipase A_2 activity in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis, *J. Neuroinflammation*, vol. 3, 2006, p. 26

[41] C.M.G. Reginald, and H. Garrett, *Biochemistry*, 5th ed., Cengage Learning, 2012

[42] P.C.A. Kam, and A.U.L. See, Cyclo-oxygenase isoenzymes: Physiological and pharmacological role, *Anaesthesia*, vol. 55, no. 5, 2000, pp. 442–449

[43] https://semayjohnston.wordpress.com/author/semayjohnston/

[44] S.Y.V. Gupta, Cyclooxygenase-2: Pathway from anti-inflammatory to anti-cancer drugs, *Int. J. Pharm. Life Sci.*, vol. 2, no. 2, 2011, pp. 571–582

[45] http://www.mc.vanderbilt.edu/lens/images/uploaded/0823081428343art.jpg

[46] Y. Bakhle, Structure of COX-1 and COX-2 enzymes and their interaction with inhibitors, *Drugs Today*, vol. 35, no. 4–5, 1999, pp. 237–250

[47] S.S. Shaftel, J.A. Olschowka, S.D. Hurley, A.H. Moore, and M.K. O'Banion, COX-3: A splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells, *Mol. Brain Res.*, vol. 119, no. 2, 2003, pp. 213–215

[48] S.S. Ayoub, E.G. Wood, S.U. Hassan, and C. Bolton, Cyclooxygenase expression and prostaglandin levels in central nervous system tissues during the course of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), *Inflamm. Res.*, vol. 60, no. 10, 2011, pp. 919–928

[49] H. Vanegas and H.G. Schaible, Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord, *Prog. Neurobiol.*, vol. 64, no. 4, 2001, pp. 327–363

[50] Y. Kihara, T. Matsushita, Y. Kita, S. Uematsu, S. Akira, J. Kira, S. Ishii, and T. Shimizu, Targeted lipidomics reveals mPGES-1-PGE2 as a therapeutic target for multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* U S A, vol. 106, no. 51, 2009, pp. 21807–21812

[51] S.H. Choi, S. Aid, and F. Bosetti, The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research, *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 30, no. 4, 2009, pp. 174–181

[52] S.S. Ousman and S. David, Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cord, *Glia*, vol. 30, no. 1, 2000, pp. 92–104

[53] Y. Goldshmit, R. Matteo, T. Sztal, F. Ellett, F. Frisca, K. Moreno, D. Crombie, G.J. Lieschke, P.D. Currie, R.A. Sabbadini, and A. Pébay, Blockage of lysophosphatidic acid signaling improves spinal cord injury outcomes, *Am. J. Pathol.*, vol. 181, no. 3, 2012, pp. 978–992

[54] H. C. Köfeler, A. Fauland, G. N. Rechberger, and M. Trötzmüller, Mass Spectrometry Based Lipidomics: An Overview of Technological Platforms, *Metabolites*, vol. 2, no. 1, 2012, pp. 19–38

[55] M.R. Wenk, The emerging field of lipidomics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, no. 7, 2005, pp. 594–610

[56] A.D. Watson, Lipidomics: A global approach to lipid analysis in biological systems, *J. Lipid Res.*, vol 47, 2006, pp. 2101–2111

[57] R. Almeida, J.K. Pauling, E. Sokol, H.K. Hannibal-Bach, and C.S. Ejsing, Comprehensive lipidome analysis by shotgun lipidomics on a hybrid quadrupole-orbitrap-linear ion trap mass spectrometer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 26, no. 1, 2014, pp. 133–148

[58] P.T. Ivanova, S.B. Milne, M.O. Byrne, Y. Xiang, and H.A. Brown, Glycerophospholipid identification and quantitation by electrospray ionization mass spectrometry, *Methods Enzymol.*, vol. 432. 2007, pp. 21–57

[59] Π. Μεγαδούκας, Λιπιδωμική ανάλυση φωσφολιπιδίων σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις (πνευμονική ίνωση, άσθμα , ηπατίτιδα),

Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας Ε.Κ.Π.Α., 2014

[60] E. Fahy, S. Subramaniam, R.C. Murphy, M. Nishijima, C.R.H. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M.J.O. Wakelam, and E.A. Dennis, Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids, *J. Lipid Res.*, vol. 50, 2009, pp. S9–S14

[61] A. Linsday, *Encyclopedia of Human Nutrition*, 2nd ed. Elsevier, 2005

[62] Automated ıdentification and relative quantitation of lipids by LC / MS. The promise of lipidomics, Thermo Scientific, 2014

[63] P. Chomczynski and K. Mackey, TRIZOL RNA isolation protocol, *Biotechniques*, vol. 19, no. 6, 1995, pp. 942–5

[64] C.E. Mason, Phenol - chloroform extraction, Weil Corner Medical College, pp. 1–7

[65] TRI reagent, *Cold Spring Harb. Protoc.*, Life Technologies, 2008

[66] Usage Notes : RQ1 RNase-Free DNase protocol, P. Corporation, 2009

[67] M-MLV Reverse Transcriptase Product Information, P. Corporation, pp. 9–10

[68] C.W. Dieffenbach, T.M. Lowe, and G.S. Dveksler, General concepts for PCR primer design, *PCR Methods Appl.*, vol. 3, no. 3, 1993, pp. S30–S37

[69] T.C. Lorenz, Polymerase Chain Reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies, *J. Vis. Exp.*, no. 63, 2012, pp. 1–15

[70] J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, and T.L. Madden, Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics*, vol. 13, no. 1, 2012, p. 134

[71] M. Kubista, J.M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögreen, L. Strömbom, A. Ståhlberg, and N.

Zoric, The real-time polymerase chain reaction, *Mol. Aspects Med.*, vol. 27, no. 2–3, 2006, pp. 95–125

[72] J. Clark and R. Switzer, Πειραματική Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1992

[73] H.F. Lodish et al., Molecular Cell biology, 7th ed., W.H. Freeman and Company, 2013

[74] GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas, 2004

[75] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, and C.T. Wittwer, The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin. Chem.*, vol. 55, no. 4, 2009, pp. 611–622

[76] qPCR-Technique-Biorad-Real Time PCR Applications Guide,2006

[77] K.J. Livak and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method, *Methods*, vol. 25, no. 4, 2001, pp. 402–408

[78] J. Folch, M. Lees, and G. H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, vol. 55, no. 5, 1987, pp. 999–1033

[79] 260/280 and 260/230 RatiosNanoDrop®ND-1000 and ND-8000 8-SampleSpectrophotometers, *NanoDrop Prod. Tech. Bull.*, 2007, pp. 1–2

[80] M. Brisson, L. Tan, R. Park, K. Hamby, and B. Laboratories, Identification of nonspecific products using melt-curve analysis on the iCycler iQ detection system, *Methods*, 2000, pp. 1–6

[81] B. Practices and M. Guidelines, The Future of qPCR Webinar Q & A, *Thermo Scientific*

[82] C.M. Freria, R.G. Zanon, L.M.B. Santos, and A.L.R. Oliveira, Major histocompatability complex class I expression and glial reaction influence spinal motoneuron synaptic plasticity during the course of experimental

autoimmune encephalomyelitis, *J. Comp. Neurol.*, vol. 518, no. 7, 2010, pp. 990–1007

[83] S.M. Innis, Dietary (n-3) fatty acids and brain development, *J. Nutr.*, no. 13, 2007, pp. 855–859

[84] E.A. Dennis and P.C. Norris, Eicosanoid storm in infection and inflammation, *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, no. 8, 2015, pp. 511–523

[85] F. Bosetti, R. Langenbach, and G.R. Weerasinghe, Prostaglandin E2 and microsomal prostaglandin E synthase-2 expression are decreased in the cyclooxygenase-2-deficient mouse brain despite compensatory induction of cyclooxygenase-1 and Ca2+-dependent phospholipase A2, *J. Neurochem.*, vol. 91, no. 6, 2004, pp. 1389–1397