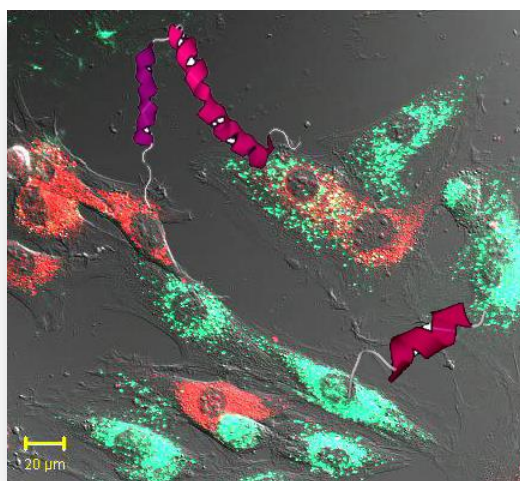




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς και των προϊόντων του μεταβολισμού της σε καρδιακά μυοκύτταρα θηλαστικού»



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Χαντζή Αδαμαντία
Α.Μ.: 1113201200126

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΕΣ: κα ΒΑΣΙΛΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΔΙΔΩ, Αν. Καθηγήτρια
Βιοχημείας Ευκαρυωτικών Οργανισμών

κα ΓΑΪΤΑΝΑΚΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ, Καθηγήτρια
Φυσιολογίας Ζώων

ΑΘΗΝΑ
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2017

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	3
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 ΠΡΟΔΡΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ	7
1.1.1 Γενικά στοιχεία.....	7
1.1.2 Διαδικασία πρωτεόλυσης	8
1.1.3 Τριτοταγής δομή προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς	11
1.1.4 Τοπολογία έκφρασης προδρόμου πρωτεΐνης αμυλοειδούς	12
1.1.4.1 Εντοπισμός του Αβ-πεπτιδίου στον εγκέφαλο	13
1.1.5 Πιθανοί ρόλοι της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς	13
1.2 ΚΑΡΔΙΑΚΑ ΜΥΟΚΥΤΤΑΡΑ-ΚΑΡΔΙΑ	16
1.2.1 Γενικά στοιχεία	16
1.2.2 Καρδιακοί μυοβλάστες H9c2	16
1.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	17
1.3.1 Γενικά στοιχεία	17
1.3.2 Οξειδωτικό στρες και νευροεκφυλισμός.....	18
1.3.3 Οξειδωτικό στρες και καρδιά.....	20
1.3.4 Αμυλοείδωση στην καρδιά.....	25
1.3.5 Παράγοντες που επάγουν οξειδωτικό στρες.....	27
1.3.5.1 Υπεροξειδίο υδρογόνου (H ₂ O ₂)	27
1.3.5.2 Σταυροσπορίνη.....	29
2.ΣΚΟΠΟΣ.....	29
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
3.1 ΥΛΙΚΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	30
3.2 ΚΑΡΔΙΑΚΟΙ ΜΥΟΒΛΑΣΤΕΣ.....	32
3.2.1 Γενικά	32
3.2.2 Συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας.....	32
3.2.3.Απενεργοποίηση του ορού (FBS).....	33

3.2.4 Ψύξη κυττάρων	33
3.2.5 Απόψυξη κυττάρων	33
3.2.6 Ανακαλλιέργεια H9c2 κυττάρων	34
3.2.7 Προετοιμασία τρυβλίων για επιδράσεις	35
3.2.8 Επιδράσεις ουσιών.....	36
3.2.9 Εκχύλιση πρωτεϊνών	36
3.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ.....	39
3.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	39
3.3.2 Δοκιμασία ανοσοσύτπωσης (Western blotting).....	40
3.3.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	41
3.3.4 Ημίστεγνη μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	45
3.3.5 Χρώση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με χρωστική Ponceau.....	46
3.3.6 Ανοσοδοκιμασία κατά Western (Western Blot)	47
3.3.7 Εμφάνιση	48
3.3.8 Αποκόλληση ανοσοσυμπλόκων από τη νιτροκυτταρίνη (Stripping).....	49
3.4 Χρήση λογισμικών προγραμμάτων για επεξεργασία και παρουσίαση αποτελεσμάτων.....	50
 4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	 51
4.1 Επίδραση H ₂ O ₂	51
4.1.1 Επίδραση H ₂ O ₂ και συγκέντρωση επώασης.....	51
4.1.2 Επίδραση H ₂ O ₂ και χρόνος επώασης.....	58
4.2 Επίδραση σταυροσπορίνης.....	61
4.2.1 Επίδραση σταυροσπορίνης και συγκέντρωση επώασης.....	61
4.2.2 Επίδραση σταυροσπορίνης και χρόνος επώασης.....	62
 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	 65
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	70
7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία δύο Τομέων, του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου και του Τομέα Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το Ακαδημαϊκό Έτος 2015-2016. Το θέμα υπέδειξαν η κυρία Διδώ Βασιλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κι η κυρία Αικατερίνη Γαϊτανάκη, Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, τις οποίες ευχαριστώ θερμά για τις πολύτιμες συμβουλές, την άρτια επιστημονική καθοδήγηση αλλά και την αρωγή τους στις πειραματικές προσπάθειές μου προκειμένου να επιτευχθεί ο στόχος της διπλωματικής εργασίας. Θα ήταν παράλειψη να μην δώσω ευχαριστίες στους υποψήφιους διδάκτορες Αικατερίνα Στέφη και Εμμανουήλ Βουράκη για την πολύτιμη βοήθειά τους και την αστείρευτη υπομονή για επίλυση αποριών, που ανέκυψαν κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον υποψήφιο διδάκτορα Ευάγγελο Καλαντζή καθώς και τις υποψήφιες μεταπτυχιακές φοιτήτριες Ελένη Τσούρη και Παναγιώτα Νταούτη, μέλη των δύο εργαστηρίων.

Αθήνα, Φεβρουάριος 2017

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ
AICD: Amyloid precursor protein Intracellular Cytoplasmic/C-terminal Domain / Αυτοτελής δομική περιοχή
APH-1: Gamma-secretase subunit / Υπομονάδα της γ-εκκριτάσης
APLP1,APLP2: Amyloid-like protein 1,2 / Ομοιάζουσα με αμυλοειδές πρωτεΐνη 1,2
APS: Ammonium persulfate/ Υπερθειϊκό αμμώνιο
ASK-1: Apoptosis signal-regulating kinase 1 / Κινάση-1 σηματοδότησης απόπτωσης
AT II: Angiotensin II / Αγγιοτενσίνη II
ATP: Adenosine triphosphate / Τριφωσφορική αδενοσίνη
APP: Amyloid precursor protein / πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς
BACE-1: Beta secretase-1 / β1-εκκριτάση
BSA: Bovine serum albumin / Αλβουμίνη ορού βοδιού
Cat-1: Catalase-1/ καταλάση-1
CTF: Carboxyterminal fragment / Καρβοξυτελικό θραύσμα
CuBD: Copper binding domain / Περιοχή πρόσδεσης με χαλκό
DMSO: Dimethyl-sulfate/ Διμεθυλ-σουλφοξείδιο
ECL: Enhanced Chemoluminescence / Ενισχυμένη χημιοφωταύγεια
ERK1/2: Extracellular signal–regulated kinases / Οικογένεια εξωκυττάρων πρωτεϊνικών κινασών
FBS: fetal bovine serum / ορός εμβρύου βοός
GaO: Guanosine 50-triphosphate-binding protein / Πρωτεΐνη
GluR2: Glutamate receptor 2 / Υποδοχέας του γλουταμικού-2
HBD: Heparin binding domain / Περιοχή πρόσδεσης στην ηπαρίνη
IL1b: Interleukin 1 beta / Ιντερλευκίνη β1
JNK: c-Jun N-terminal kinase / κινάση που προσδένεται στο αμινοτελικό άκρο του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun
KPI: Kunitz protease inhibitor / αναστολέας πρωτεασών τύπου Kunitz

M.B.: Μοριακό βάρος
MAPK: Mitogen-activated protein kinase / Πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα
MBA: Methylen-Bis-acrylamide / μεθυλένο-bis ακρυλαμίδη
MMPs: Matrix metalloproteinases / Μεταλλοπρωτεϊνάσες (μιτοχondριακής) μήτρας
NMDA: N-methyl-D-aspartate receptor / Υποδοχέας του N-μεθυλο-D-ασπαρτικού
p3: amyloid β- peptide (Aβ) _{17-40/42} / πεπτιδίο (Aβ) _{17-40/42}
p-38: Mitogen-activated protein kinases / Οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιείται από μιτογόνα
PBS: Phosphate-buffered saline / Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
Pen-2: presenilin enhancer 2 / ενισχυτής της πρεσενιλίνης 2
PKC: Phosphokinase C / Φωσφοκινάση C
PS1, PS2: Presenilin 1,2 / Πρεσενιλίνη 1,2
ROS: Reactive Oxygen Species / Ελεύθερες ενεργές ρίζες
sAPPa, sAPPβ: soluble APPα,β / διαλυτή APP α,β
SDS: Sodium dodecyl sulfate / Δωδεκυλ-θειικό νάτριο
Sod-2: Superoxide dismutase 2 / Υπεροξειδική δισμουτάση 2
staO: Staurosporine oxidase / οξειδάση της σταυροσπορίνης
T.B.: Transfer buffer / Διάλυμα μεταφοράς
TBS: Tris-buffered saline / Τρις- (υδροξυμέθυλο)- αμινοαιθάνιο
TEMED: Tetramethylethylenediamine / N, N, N, N,- τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη
TGFb: Transforming growth factor b /Αυξητικός παράγοντας b
TNFa: Tumor necrosis factor a / Παράγοντας νέκρωσης όγκων a
Tris: Τρις- (υδροξυμέθυλο)- αμινοαιθάνιο

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Θέμα της εν λόγω διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς και των προϊόντων του μεταβολισμού της σε καρδιακά μυοκύτταρα θηλαστικού.

Αρχικά όμως κρίνεται απαραίτητο να αποσαφηνιστούν ορισμένοι όροι, όπως πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς, προϊόντα μεταβολισμού και καρδιακά μυοκύτταρα, προκειμένου να μπορέσουμε να κατανοήσουμε πώς το συγκεκριμένο πρωτεϊνικό μόριο μπορεί να εκφράζεται σε καρδιακό ιστό και να αντιληφθούμε πιθανούς ρόλους που μπορεί να διαδραματίζει.

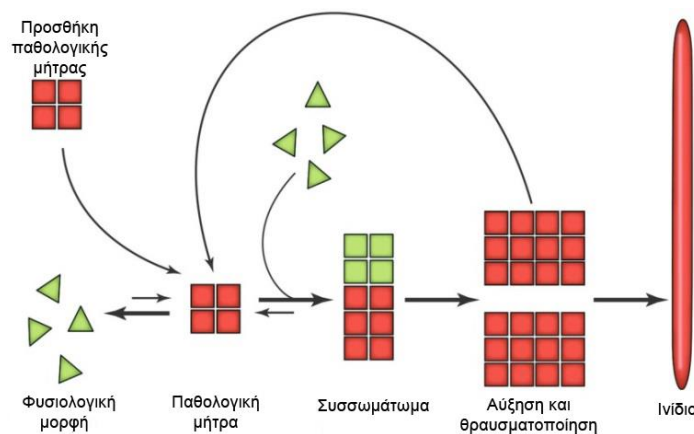
Παράλληλα θα αναφερθούμε στο οξειδωτικό στρες και τη σημασία του για την ομοιόσταση του κυττάρου, καθώς και σε παράγοντες που επάγουν τέτοιες καταστάσεις ενδοκυτταρικά, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η σταυροσπορίνη.

1.1 ΠΡΟΔΡΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ

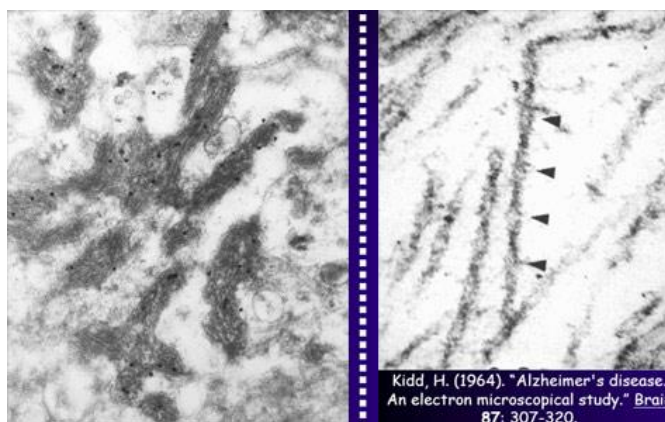
1.1.1 Γενικά στοιχεία

Η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (APP) ανήκει σε τύπου I διαμεμβρανική οικογένεια πρωτεϊνών η οποία περιλαμβάνει και τις ομοιάζουσες προς την APP πρωτεΐνες, APLP1 και APLP2 στα θηλαστικά (Wasco, Burp *et al.* 1992, Wasco, Gurubhagavatula *et al.* 1993, Coulson, Paliga *et al.* 2000). Οι APLP1 και APLP2, έχουν αρκετές κοινές συντηρημένες αλληλουχίες στην εξωκυττάρια περιοχή, η αλληλουχία του Αβ-πεπτιδίου όμως είναι μοναδική στην APP. Το γονίδιο της APP εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 21. Εναλλακτική συρραφή, κατά την ωρίμανση του mRNA της APP, έχει ως αποτέλεσμα την σύνθεση οκτώ εναλλακτικών ισομορφών της πρωτεΐνης (εκ των οποίων οι κυριότερες τρεις είναι οι APP695, APP751 και APP770) (Goate, Chartier-Harlin *et al.* 1991). Το συγκεκριμένο πρωτεϊνικό μόριο έχει εντοπιστεί κυρίως στους νευρώνες και συγκεκριμένα έχει δειχθεί η έκφρασή του στις συνάψεις, χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί η λειτουργικότητά του μέσα στο κύτταρο. Παρόλα αυτά, αποτελεί εξαιρετικά σημαντικό μόριο, καθώς είναι πρόδρομος του Αβ-πεπτιδίου, το οποίο έχει συσχετιστεί με νευροεκφυλιστικές ασθένειες και συγκεκριμένα με την ομάδα εκείνων που καλούνται αμυλοειδώσεις. Η ομάδα αυτή έχει το χαρακτηριστικό του σχηματισμού πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, λόγω μη ορθής πτύχωσης των πρωτεϊνών. Μέσω κατάλληλων διεργασιών καταλήγουμε στο σχηματισμό πρωτοϊνιδίων, τα οποία έχουν νευροτοξική δράση.

Τι είναι όμως τα ινίδια; Τα ινίδια είναι αδιακλάδωτοι σχηματισμοί διαμέτρου ~10nm και μήκους μέχρι και μm, σύμφωνα με πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Έχουν β-δομή, όπως έχει φανεί από περιθλασιγράμματα, δηλαδή αποτελούνται από τέσσερα συνεχή συστραμμένα β-φύλλα, τα οποία είναι παράλληλα με τον άξονα του ινιδίου. Τα β-φύλλα διευθετούνται σε ζεύγη και τα ζεύγη περιελίσσονται το ένα γύρω από το άλλο. Αυτή η συστραμμένη β-έλικα αποτελεί και τον περιοδικά επαναλαμβανόμενο πυρήνα του πρωτοϊνιδίου. Ο σχηματισμός των παθολογικών μητρώων είναι σπάνιος κι ενεργοβόρος, ενώ απαιτεί παράλληλα και την ύπαρξη ενός σκελετού αμινοξέων και υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών. Όταν όμως η μήτρα σχηματιστεί, μεμονωμένα μόρια αλλάζουν σχήμα και συνδέονται με τα αναπτυσσόμενα συσσωματώματα. Προσθήκη στη μήτρα επάγει ταχεία συσσωμάτωση της διαλυτής πρωτεΐνης και μετατροπή της σε αδιάλυτη.



Εικόνα 1.1: Ο προτεινόμενος μηχανισμός μέσω του οποίου προκύπτουν αδιάλυτα ινίδια. Αυτό το μονοπάτι αποτελεί πιθανή εξήγηση των μηχανισμών νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως Alzheimer και Parkinson. (Goedert 2015)



Εικόνα 1.2: Αριστερά: Αμυλοειδή ινίδια, Δεξιά: ζεύγη ελικοειδών ινιδίων (PHFs) και συστατικά αυτών (Kidd M. 1964)

1.1.2 Διαδικασία πρωτεόλυσης

Το «πέρασμα» της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς στη μορφή του Αβ-πεπτιδίου επιτυγχάνεται μέσω πρωτεόλυσης. Συγκεκριμένα, το πρωτεϊνικό μόριο της APP μπορεί να ακολουθήσει δύο μονοπάτια πρωτεόλυσης, αυτό της α-εκκριτάσης ή αυτό της β-εκκριτάσης. Το γεγονός πως υπάρχει ενζυμικός μηχανισμός πρωτεόλυσης αποκαλύφθηκε όταν βρέθηκε διαλυτό τμήμα της πρωτεΐνης σε

κυστίδια (Vassilacopoulou *et al.* 1995). Και στα δύο μονοπάτια απαντάται κι ένα τρίτο ένζυμο, η γ-εκκριτάση. Το πώς το μόριο επιλέγει κάθε φορά το μονοπάτι παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

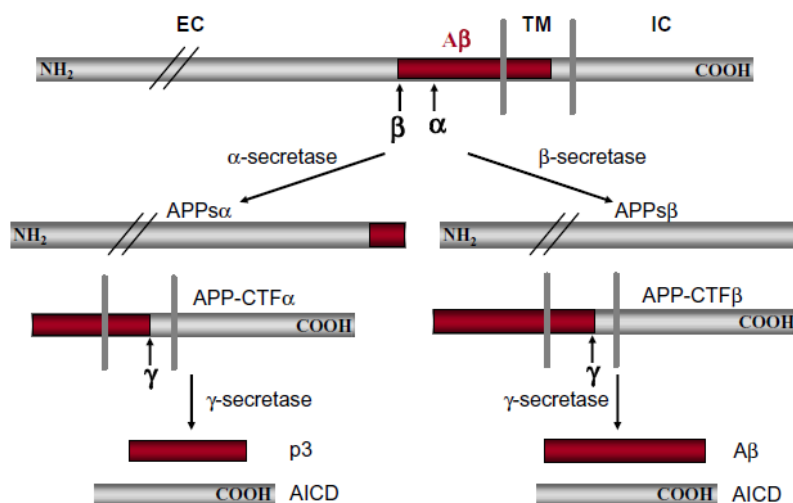
Η α-εκκριτάση, λοιπόν, ανήκει στην ομάδα πρωτεϊνών ADAM. Ως ένζυμο μπορεί να λειτουργήσει είτε ιδιοστατικά είτε επαγόμενα, δηλαδή συνυπάρχουν ταυτόχρονα ρυθμιζόμενη και συνεχής έκφραση πρωτεϊνικών υπομονάδων. Στην πλασματική μεμβράνη η α-εκκριτάση είναι συνεχώς ενεργή (de Strooper and Annaert 2000), ενώ στην περιοχή του trans-Golgi δικτύου η έκφρασή της ελέγχεται από το ένζυμο πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Παράλληλα έχειδειχθεί πως στη συγκεκριμένη περιοχή ανταγωνίζεται τη δράση της β-εκκριτάσης (Skononsky *et al.* 2000). Η ενεργοποίηση της α-εκκριτάσης μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης C γίνεται ως εξής: Εκπόλωση νευρώνων οδηγεί στην ενεργοποίηση της PKC καθώς και σε αυξημένη μεταφορά κυστιδίων και μεμβρανικού υλικού. Συνακόλουθο αυτών των γεγονότων είναι η εντονότερη ενεργοποίηση της α-εκκριτάσης μέσω ασβεστο-εξαρτώμενων μονοπατιών τόσο σε ώριμους νευρώνες όσο και σε πρόδρομα νευρικά κύτταρα. (Gakhar-Korppole *et al.* 2008, Hoey *et al.* 2009). Βέβαια, νευρική εκπόλωση μπορεί να συνεπάγεται και μειωμένη ενεργότητα α-εκκριτάσης (Lesne *et al.* 2005). Αν κι αυτή η διαπίστωση των ερευνητών έρχεται σε πλήρη αντίθεση με το προηγούμενο δεδομένο, εν τούτοις υπάρχει λογική εξήγηση. Επικρατή μεταλλάγματα για την ADAM-10 προκαλούν αύξηση των επιπέδων της α-εκκριτάσης σε μεταλλαγμένα για την APP ποντίκια, ενώ σε φυσιολογικά ζώα μείωση των επιπέδων του συγκεκριμένου μορίου. Δηλαδή σε περιπτώσεις αυξημένων επιπέδων του Αβ-πεπτιδίου είναι λογικό να παρατηρούνται χαμηλές συγκεντρώσεις sAPPα (του προϊόντος του μονοπατιού της εξαρτώμενης από την α-εκκριτάση πρωτεόλυσης), άρα μιλάμε για αρνητική ρύθμιση της α-εκκριτάσης.

Η δράση της α-εκκριτάσης μεταξύ των καταλοίπων 16 και 17 του πρόδρομου μορίου έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση στην εξωκυτάρια περιοχή μιας διαλυτής μορφής της APP (sAPPα) και του ενδοκυτταρικού τμήματος AICD (Sisodia 1992). Γενικά το κόψιμο από α-εκκριτάση δεν δημιουργεί πεπτίδια, που μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων.

Αντίθετα το μονοπάτι που μεσολαβείται από τη β-εκκριτάση έχειδειχθεί πως παράγει και τοξικά για το κύτταρο προϊόντα.

Η β-εκκριτάση ή αλλιώς BACE1, είναι μια μεμβρανική πρωτεάση ασπαραγινικού οξέος που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση στην εξωκυτάρια περιοχή μιας διαφορετικής διαλυτής μορφής της APP (sAPPβ). (Sinha, Anderson *et al.* 1999, Vassar, Bennett *et al.* 1999, Yan, Bienkowski *et al.* 1999, Lau, McLoughlin *et al.*

2000, Selkoe 2001). Μετά από πρωτεολυτική διεργασία από τις α - και β -εκκριτάσες τα καρβοξυτελικά άκρα (CTFs) της APP, α CTF και β CTF αντίστοιχα, παραμένουν προσδεμένα στην μεμβράνη και πέττονται περαιτέρω από την γ -εκκριτάση, παράγοντας τα πεπτίδια AICD και A β στο μεσολαβούμενο από τη β -εκκριτάση μονοπάτι και τα πεπτίδια AICD και p3 στο μεσολαβούμενο από την α -εκκριτάση. Η γ -εκκριτάση είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από τις πρωτεΐνες APH1, PEN2, νικαστρίνη και πρεσενιλίνη (PS1 ή PS2). Έχει υποστηριχθεί ότι το σύμπλοκο περιέχει κάθε μόριο μία μόνο φορά (Sato, Diehl *et al.* 2007). Η πρεσενιλίνη αποτελεί το ενεργό κέντρο του συμπλόκου. Αποτελείται από 9 διαμεμβρανικά τμήματα με δύο καταλυτικά μόρια ασπαρτικού να εντοπίζονται στα domains 6 κι 7. Κατά το σχηματισμό του συμπλόκου, η πρεσενιλίνη υπόκειται σε πρωτεόλυση μεταξύ των δύο αυτών περιοχών προκειμένου να σχηματιστεί η καταλυτικά ενεργή γ -σεκρετάση. Στην ωρίμανση υποβοηθά ο ενισχυτής Pen-2, ενώ η Aph-1 σταθεροποιεί το σύμπλοκο. Η νικαστρίνη, που αποτελεί τα 2/3 του συμπλόκου, λειτουργεί ως υποδοχέας του υποστρώματος του ενζυμικού συμπλόκου. Η ανθρώπινη γ -εκκριτάση αποτελείται από μια περιοχή από διαμεμβρανικά τμήματα, που μοιάζει με πέταλο, και μια μεγάλη εξωκυτταρική περιοχή. Η πέψη του καρβοξυτελικού άκρου από την γ -εκκριτάση δεν παρουσιάζει εξειδίκευση, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή πεπτιδίων A β ποικίλου μήκους. Το κύριο πρωτεολυτικό αποτέλεσμα της παραπάνω διεργασίας είναι το A β_{40} ($\approx$ 80-90%), με δεύτερο το A β_{42} ($\approx$ 5-10%). Έχει δειχθεί από τους Selkoe *et al.* (2001) πως οι μεγαλύτερες μορφές του A β κι ειδικά το A β_{42} , παρουσιάζουν αυξημένη υδροφοβικότητα, με αυξημένη δυνατότητα σχηματισμού ινιδίων και αποτελούν τις βασικές μορφές του A β που εναποτίθενται στον εγκέφαλο.



Εικόνα 1.3: Διαγραμματική απεικόνιση των δύο μονοπατιών πρωτεόλυσης της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP). Και στα δύο μονοπάτια ένα από τα τελικά προϊόντα είναι το AICD. (Zheng *et al.* 2011)

1.1.3 Τριτοταγής δομή προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς

Δομικά η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς θα μπορούσαμε να πούμε ότι ομοιάζει με μεμβρανικό υποδοχέα ή αυξητικό παράγοντα. Το τμήμα της πρωτεΐνης που μεταφράζεται περιέχει μια εξωκυτταρική μεγάλου μήκους περιοχή, η οποία με τη σειρά της περιέχει μια δομική περιοχή (domain) πλούσια σε κυστεΐνες (E1), μια αμινοτελική περιοχή, μια πλούσια σε α-έλικες περιοχή (E2), όπου εκεί εντοπίζεται κι η περιοχή του Αβ-πεπτιδίου. Όσον αφορά στη δομική περιοχή E1 είναι ένα πλούσια σε κυστεΐνες τμήμα, που διακρίνεται σε δύο επιμέρους υποπεριοχές, την HBD (Heparin Binding Domain) και την CuBD (copper/metal binding protein). Η περιοχή που συνδέεται με την ηπαρίνη αποτελείται μια α-έλικα κι ένα αντιπαράλληλο β-φύλλο που συνδέονται μέσω ενός θετικά φορτισμένου (πλούσιας σε βασικά αμινοξικά κατάλοιπα) βρόγχου στο εν λόγω μόριο (Small *et al.* 1994, Rossjohn *et al.* 1999). Από την άλλη η CuBD περιέχει μια α-έλικα κι ένα κοντό σε μήκος β-φύλλο.

Εξίσου σημαντικές δομικά αυτοτελείς περιοχές είναι η KPI (Kunitz-type protease inhibitor domain) και το O α -2 antigen domain, οι οποίες απαντώνται στις μεγαλύτερες ισομορφές της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς. Μάλιστα η δομικά αυτοτελής περιοχή KPI απαντάται συχνότερα σε μη νευρικά κύτταρα, γεγονός που οδηγεί στη σκέψη πως πιθανώς σχετίζεται με λειτουργίες της γλοίας όπως επούλωση τραυμάτων. Άλλωστε προς αυτή την κατεύθυνση συνέβαλε κι η εύρεση της APP σε αιμοπετάλια (Van Nostrand *et al.* 1991). Ένας ακόμη ρόλος που έχει αποδοθεί στη συγκεκριμένη περιοχή είναι η συμμετοχή της στη ρύθμιση της αύξησης ως αναστολέας πρωτεασών. Όσον αφορά στη δομικά αυτοτελή περιοχή O α -2 δε φαίνεται να έχει ακόμη αποσαφηνισμένο ρόλο.

Πλησιάζοντας προς το εσωτερικό της μεμβράνης εντοπίζουμε τη δομική περιοχή E2, μια πλούσια σε α-έλικες περιοχή, η οποία έχει προταθεί ως υπεύθυνη για την ικανότητα συσσωμάτωσης της APP. Ανήκει κι αυτή στις αυτοτελείς περιοχές που έχουν ικανότητα πρόσδεσης στην ηπαρίνη. Η εν λόγω περιοχή έχει συσχετιστεί και με μεταφορά του μορίου της φερριτίνης, μια λειτουργία που έχει αποδοθεί στο μόριο της APP. Προχωρώντας προς το εσωτερικό του κυτάρου και κατόπιν του διαμεμβρανικού τμήματος εντοπίζεται το ενδοκυττάριο τμήμα. Αποτελεί πολύ συντηρημένη μεταξύ των μελών της APP οικογένειας περιοχή, η οποία περιλαμβάνει το μοτίβο YENPTY, το οποίο με τη σειρά του εμπλέκεται σε μηχανισμούς διαμεσολαβούμενης από κλαθρίνη ενδοκύττωσης. Το συγκεκριμένο πρωτεϊνικό μοτίβο είναι αρκετά σύνηθες σε διάφορους τύπους υποδοχέων, όπως σε υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (Bonifacino and Traub 2003).

1.1.4 Τοπολογία έκφρασης προδρόμου πρωτεΐνης αμυλοειδούς

Το προκύπτον πρωτεϊνικό μόριο μπορεί να υποστεί διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως γλυκοζυλίωση, σουλφυλίωση, φωσφορυλίωση ή/και προσθήκη παλμιτικής ομάδας (Selkoe 2001, Bhattacharyya *et al.* 2013), οι οποίες συμβαίνουν στο σύμπλεγμα Golgi. Κατόπιν εγκολπώνεται μέσω κυστιδίων κλαθρίνης στο ενδόσωμα και μεταφέρεται στην επιφάνεια του κυττάρου ή στο λυσόσωμα, προκειμένου ν' αποικοδομηθεί. (Yamazaki *et al.* 1996).

Αποτελέσματα διαφορετικών ερευνητικών ομάδων έχουν καταδείξει την έκφραση της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε μεγάλο εύρος ιστών. Συγκεκριμένα έχουν εντοπιστεί μόρια APP mRNA τόσο σε νευρικής προέλευσης ιστούς, όπως εγκέφαλος, σπονδυλική στήλη όσο και σε ιστούς του ανοσοποιητικού συστήματος (θύμος, σπλήνας) αλλά και σ' εκείνους του μυϊκού (λείος, σκελετικός, καρδιακός μυς (Liu *et al.* 2008). Συνεπώς μπορούμε να πούμε πως η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς είναι ένα σημαντικό μόριο, καθώς εκφράζεται σε διαφορετικής λειτουργικότητας ιστούς.

Κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, όπως έχει δείχθει με ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις, η APP εμφανίζεται πρώτα στους κινητικούς νευρώνες της σπονδυλικής στήλης και του ρομβοειδούς εγκεφάλου και στη συνέχεια στους νευρώνες του κρανιακού και του συμπαθητικού νεύρου καθώς και στα γάγγλια ραχιαίας ρίζας. Χρονικά η εμφάνισή της συμπίπτει με την έναρξη της αύξησης του νευράξονα. Είναι ενδιαφέρον ότι, η εν λόγω πρωτεΐνη ήταν ανιχνεύσιμη μόνο σε υποσύνολα των νευρώνων. Σε αναπτυσσόμενους αρουραίους εντοπίζεται σε άξονες, δένδριτες και σώματα των νευρώνων στην παρεγκεφαλίδα με τα μέγιστα επίπεδα της ανοσοδραστικότητας του μορίου σε δένδριτες των κυττάρων Purkinje να συμπίπτουν με την περίοδο της μέγιστης συναπτογένεσης. (Ohta *et al.*)

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι κι οι APLPs εκφράζονται στο νευρικό σύστημα κι υποβοηθούν λειτουργίες παρόμοιες ή συμπληρωματικές προς το Αβ πεπτίδιο. Για παράδειγμα, η APLP2 εκφράζεται ευρέως σε όλο τον εγκέφαλο, αν και η υποκυτταρική διαμερισματοποίηση της εμφανίζει ποικιλία με αποτέλεσμα σε ιππόκαμπο και φλοιικούς νευρώνες να εντοπίζεται σε μετασυναπτικές θέσεις, ενώ στο οσφρητικό σύστημα σε άξονες και τερματικούς νευράξονες.

1.1.4.1 Εντοπισμός του Αβ-πεπτιδίου στον εγκέφαλο

Το Αβ-πεπτίδιο παράγεται μέσω διαδοχικών διασπάσεων της APP από τις β- και γ-εκκρινάσες. Το προκύπτον πεπτίδιο είναι συνήθως μήκους 40 αμινοξέων, αλλά το μήκος του πεπτιδίου μπορεί να κυμαίνεται από 38 έως 43 αμινοξέα. Ορισμένες μορφές (π.χ. Αβ 1-42, Αβ 3-40) θεωρούνται πιο αμυλοειδογόνες από άλλες (π.χ. Αβ1-40 ή 1-38). Τα συσσωματώματα του Αβ-πεπτιδίου εντοπίζονται στον ανθρώπινο εγκέφαλο στο βασικό κροταφικό φλοιό καθώς και στον κογχομετωπιαίο φλοιό. Κατόπιν εξαπλώνονται σε όλο το νεοφλοιό καθώς και στον ιππόκαμπο, το διεγκέφαλο και τα βασικά γάγγλια. Σε σοβαρά ασθενείς εντοπίζονται και στην παρεγκεφαλίδα και το στέλεχος του εγκεφάλου (προμήκης μυελός, γέφυρα και θάλαμος).

Δεδομένου ότι οι δραστηριότητες των ενζύμων BACE1 και γ-εκκρινάσης εντοπίζονται στο ενδόσωμα και στο trans-Golgi σύμπλεγμα, πιθανολογείται πως και το Αβ-πεπτίδιο εντοπίζεται αρχικά στα εν λόγω διαμερίσματα και κατόπιν εκκρίνεται με εξωκύττωση. Άλλωστε έχει εντοπιστεί ενδοκυτταρικά Αβ-πεπτίδιο τόσο σε μοντέλα-ζώα όσο και σε ασθενείς με Alzheimer (Wirths *et al.* 2001, Gómez-Ramos and Asuncion Morán 2007). Το πεπτίδιο Αβ φαίνεται ότι υπόκειται σε πρωτεόλυση, μέσω ειδικών πρωτεασών, όπως το ένζυμο διάσπασης της ινσουλίνης, η καθεψίνη κ ή BACE1, με τα δύο πρώτα ένζυμα να παράγουν πεπτίδια με μη αμυλοειδογόνο δράση ενώ το τελευταίο είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό των τοξικών πεπτιδίων. Πιθανές τροποποιήσεις, όπως σχηματισμός του πυρογλουταμικού ή μετατροπή του ασπαρτικού σε ισοασπαρτικό, αυξάνουν την πιθανότητα συσσωμάτωσης.

1.1.5 Πιθανοί ρόλοι της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς

Μέχρι σήμερα ο ρόλος της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς παραμένει άγνωστος. Βέβαια διάφορες επιστημονικές ομάδες έχουν κατά καιρούς προτείνει πιθανούς ρόλους της συγκεκριμένης πρωτεΐνης μεταξύ των οποίων κυτταρικός πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση, κυτταρική προσκόλληση και νευρογένεση.

Όσον αφορά στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων, έχει διαπιστωθεί η συντονισμένη έκφραση του εν λόγω μορίου τόσο σε νευρώνες όσο και σε νευροβλάστες, γεγονός που υποδεικνύει το ρόλο της πρωτεΐνης στη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων. Άλλωστε η ρύθμισή της θυμίζει πολύ το μονοπάτι της Notch πρωτεΐνης, η οποία ξέρουμε ότι εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων. Τα τμήματα sAPPα και sAPPβ φαίνεται να προάγουν τον πολλαπλασιασμό νευρικών βλαστικών κυττάρων και μάλιστα η ισομορφή 770 επάγει ισχυρότερα φαινόμενα από την 695.

Η APP φαίνεται να εμπλέκεται και στο νευρικό πολλαπλασιασμό, όπως έχει δείχθει σε κυτταροκαλλιέργειες (Small *et al.* 1994). Μάλιστα σε περιπτώσεις τραυματισμού των αξόνων η έκφρασή της ρυθμίζεται θετικά, δηλαδή υπάρχει επαγωγή, με αποτέλεσμα την επαγωγή επιδιορθωτικών μηχανισμών. Πώς ακριβώς όμως επάγει τον πολλαπλασιασμό νευρικών κυττάρων η APP; Μια πιθανή εξήγηση είναι μέσω ρύθμισης της κυτταρικής προσκόλλησης. Συγκεκριμένα συνδέεται με μόρια, που αποδεδειγμένα επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως λαμινίνη, κολλαγόνο τύπου I, ηπαρίνη (Kibbey *et al.* 1993, Beher *et al.* 1996, Clarris *et al.* 1997) και μάλλον επάγει φαινόμενα προσκόλλησης. Πέραν όμως της σύνδεσης της με πρωτεϊνικά μόρια, η APP μπορεί και να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες, όπως ιντεγκρίνες, φασιλίνη, κοντακτίνη κ.α. (Yamazaki *et al.* 1997, Ashley *et al.* 2005, Ma *et al.* 2008, Osterfield *et al.* 2008). Σε πειράματα που έγιναν σε ποντίκια, τα οποία δεν εξέφραζαν το γονίδιο της APP παρατηρήθηκαν αλλαγή στη λειτουργικότητα των συνάψεων, υπερευαισθησία σε μετρήσεις που σχετίζονται με τους υποδοχείς του καϊνικού (οι υποδοχείς αυτοί σχετίζονται με τη μεταφορά του γλουταμικού στους νευρώνες), αλλαγές στην πυκνότητα δενδριτών όπως και μειωμένη απόδοση σε τεστ μνήμης. Οι παραπάνω ενδείξεις ενισχύουν την υπόθεση πως η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς συμμετέχει στη γένεση νευρώνων.

Σε αυτό το σημείο βέβαια πρέπει να τονιστεί πως όλα τα παραπάνω αποτελούν ενδείξεις, χωρίς να μπορεί να δοθεί σαφής απάντηση για το μηχανισμό δράσης της APP.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος της APP στη ρύθμιση πλήθους κυτταρικών διαδικασιών όπως πλαστικότητα συνάψεων, μάθηση, μνήμη. Πιθανώς η APP να αλλάζει την έκφραση ενός υποδοχέα - συγκεκριμένα της υπομονάδας GluR2 του α-αμινο-3-υδροξυ-5-μεθυλο-4-ισοξαζολοπροπιονικού υποδοχέα- ο οποίος σχετίζεται με τη ρύθμιση της διαπερατότητας σε ασβέστιο των συνάψεων (Lee *et al.* 2010). Η συγκέντρωση του ασβεστίου, που απαντάται στις συνάψεις μπορεί να επηρεαστεί κι από αλλαγές στην έκφραση του υποδοχέα NMDA (Cousins *et al.* 2009, Hoe *et al.* 2009). Μια ακόμη λειτουργία που έχει αποδοθεί στην πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς είναι η πήξη του αίματος. Οι κυρίαρχες μορφές της APP που συμμετέχουν στη ρύθμιση της πήξης στο αίμα περιλαμβάνουν την αυτοτελή δομική περιοχή KPI (Bush *et al.* 1990, Gardella *et al.* 1990, Van Nostrand *et al.* 1991α). Στα αιμοπετάλια, μόρια APP, sAPP και Αβ συσσωρεύονται σε α-κοκκία τα οποία είναι κυστίδια που αποθηκεύουν μια ποικιλία παραγόντων πήξης (Van Nostrand *et al.* 1991b, Blair και Flaumenhaft 2009). Όταν λοιπόν διεγερθούν τα αιμοπετάλια, τότε οι πρωτεΐνες APP, sAPP και το Αβ πεπτιδίο απελευθερώνονται, μαζί με μια σειρά από άλλα συστατικά του μονοπατιού της πήξης.

Η περιοχή KPI αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα των παραγόντων πήξης XIa, IXa και Xa. Πέραν όμως αυτής περιοχής μπορεί κι άλλες περιοχές του μορίου της APP να προκαλούν αναστολή, όπως για παράδειγμα, η αναστολή του παράγοντα XIa, παρουσία της ηπαρίνης, επιτυγχάνεται με τη συμμετοχή της περιοχής δέσμευσης ηπαρίνης που εντοπίζεται στην APP (Smith *et al.* 1990). Γενετική υπερέκφραση της APP σε ποντίκια μειώνει την εγκεφαλική θρόμβωση και επίσης αυξάνει την σοβαρότητα της αιμορραγίας, ενώ σε ποντίκια στα οποία έχει εξαλειφθεί το γονίδιο του APP έχουμε αντίθετα αποτελέσματα (Xu *et al.* 2005, 2007). Η αντι-πηκτική λειτουργία της APP εμφανίζεται και σε άλλα μέλη της οικογένειας APP, άρα μάλλον πρόκειται για μια συντηρημένη ιδιότητα. Ως εκ τούτου, μπορεί κι άλλα μόρια-μέλη της οικογένειας APP να συμμετέχουν στο μονοπάτι της πήξης.

Αν και δομικά η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς προσομοιάζει με υποδοχέα, εν τούτοις ο ρόλος της δεν είναι ακριβώς ο ίδιος όπως εκείνος ενός υποδοχέα. Έχει προταθεί πως το καρβοξυτελικό άκρο (κατάλοιπα 732-751) της πρωτεΐνης αποτελεί περιοχή σύνδεσης με G-πρωτεΐνες (Nishimoto *et al.* 1993), ενώ το αμινοτελικό άκρο μάλλον οδηγεί σε μεταγωγή σήματος μέσω ενεργοποίησης της GaO (guanosine 50-triphosphate-binding protein) (Okamoto *et al.* 1995, Murayama *et al.* 1996). Μια ακόμη περιοχή που εμπλέκεται σε γεγονότα σηματοδότησης είναι το θραύσμα AICD, που φαίνεται ότι μεταφέρεται στον πυρήνα, όταν συνδεθεί με το μόριο Fe65, το οποίο με τη σειρά του είναι συνδεδεμένο με το μοτίβο YENPTY μέσω μιας φωσφοτυροσινικής περιοχής πρόσδεσης. Το θραύσμα σταθεροποιείται κι αφού το σύμπλοκο Fe65- AICD εισέλθει στον πυρήνα, ενεργοποιείται η μετάφραση γονιδίων. Πέραν όμως της φυσιολογικής λειτουργίας της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς υπάρχουν ενδείξεις που κάνουν λόγο για ανάμιξη του Αβ πεπτιδίου σε φυσιολογικές λειτουργίες, όπως μεταφορά χοληστερόλης (Yao and Papadopoulos 2002) ή κυτταρική προσκόλληση και πολλαπλασιασμό νευρώνων (Koo *et al.* 1993). Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η δραστηριότητα των συνάψεων ρυθμίζεται μέσω της παραγωγής του Αβ πεπτιδίου και ότι το πεπτίδιο αυτό, με τη σειρά του, καταστέλλεται επιλεκτικά από διεγερτική νευροδιαβίβαση, γεγονός που υποδηλώνει ότι η συναπτική δραστηριότητα μπορεί να ρυθμίζεται από ένα βρόγχο αρνητικής ανάδρασης που περιλαμβάνει την έκκριση του Αβ πεπτιδίου. Μάλιστα σε πρόσφατη έρευνα (Abramov *et al.* 2009) βρέθηκε πως το πεπτίδιο Αβ αποτελεί ενδογενή ρυθμιστή της ενεργοποίησης της κυστιδιακής μεταφοράς μεταξύ των συνάψεων στην περιοχή του ιπποκάμπου.

1.2 ΚΑΡΔΙΑΚΑ ΜΥΟΚΥΤΤΑΡΑ-ΚΑΡΔΙΑ

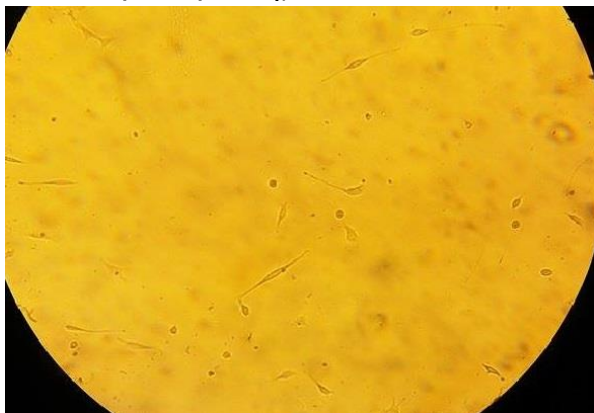
1.2.1 Γενικά στοιχεία

Η καρδιά είναι ένα μυϊκό όργανο που περικλείεται από το περικάρδιο, έναν ινώδη σάκο, ενώ το εσωτερικό της, δηλαδή τα τοιχώματά της αποτελούνται από κύτταρα καρδιακού μυός, που ονομάζονται μυοκάρδιο. Τα κύτταρα του μυοκαρδίου είναι διατεταγμένα σε στιβάδες και σφιχτά συνδεδεμένες μεταξύ τους. Ο συγκεκριμένος τύπος μυός εμφανίζει ιδιότητες και σκελετικού και λείου μυός. Ως όργανο η καρδιά δέχεται νευρικές ίνες, τόσο παρασυμπαθητικές όσο και συμπαθητικές, με τις μεν πρώτες να αποτελούν κλάδο του πνευμονογαστρικού νεύρου και να απελευθερώνουν ακετυλοχολίνη, ενώ οι δεύτερες είναι μεταγαγγλιακές κι εκκρίνουν νορεπινεφρίνη.

1.2.2 Καρδιακοί μυοβλάστες H9c2

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ήταν η H9c2, η οποία προέρχεται από εμβρυικό μυοκαρδικό ιστό αρουραίου.

Σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα η σειρά αυτή δεν εμφανίζει τα τυπικά χαρακτηριστικά των καρδιακών κυττάρων- απουσιάζουν τα μικροσπήλαια, τα T-σωληνάρια, οι χασμοσύνδεσμοι. Παρόλα αυτά τα κύτταρα είναι πλούσια σε αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο κι αντί των μυοϊνιδίων εμφανίζουν έναν άλλο τύπο ινιδίων (stress fibers). Επίσης φέρουν κάποια χαρακτηριστικά που υπάρχουν και στα καρδιακά κύτταρα όπως ροή ασβεστίου (L-type Ca^{2+} current), θέσεις σύνδεσης (θέσεις σύνδεσης για 1,4-διϋδροπυριδίνη).



Εικόνα 1.4: Καρδιακοί μυοβλάστες (επιμήκεις σχηματισμοί) όπως φαίνονται στο οπτικό μικροσκόπιο.

1.3 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

1.3.1 Γενικά στοιχεία

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η ανισορροπία που παρατηρείται μεταξύ των ελεύθερων οξειδωτικών ριζών του περιβάλλοντος και της ικανότητας του κυττάρου να καταστρέφει αυτές τις ρίζες, που θα μπορούσαν να διαταράξουν την ομοιοστασία του κυττάρου, και κατ' επέκταση του οργανισμού.

Πιθανές διαταραχές του συστήματος καταστροφής ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) μπορεί να οδηγήσουν σε τοξικότητα, λόγω παραγωγής υπεροξειδίου και ελεύθερων ριζών, που μπορούν να καταστρέψουν DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια. Επίσης μπορούν να δημιουργηθούν προβλήματα και στα σηματοδοτικά μονοπάτια.

Οι οξειδωτικές ρίζες ή αλλιώς ROS είναι χημικώς ενεργά μόρια που περιέχουν οξυγόνο και ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες (Padurariu M. *et al.* 2013):

Ιόν υπεροξειδίου (O_2^-),
Υδροξυλική ρίζα ($OH^\cdot$),
Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2),
Μονοξειδίο του αζώτου (NO),
Peroxy(ROO) &
ενεργοποιημένες αλδεΐδες ($ROCH$)

Οι ελεύθερες ρίζες, που χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα, είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής, αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, κλέβοντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο για να ζευγαρώσουν το δικό τους. Αποτέλεσμα; Τα παρακείμενα μόρια μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες και με αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται η μοριακή τάξη και ξεκινά μία αλυσιδωτή αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη. Οι ελεύθερες ρίζες προκύπτουν είτε ενδογενώς, δηλαδή από κυτταρικές διεργασίες (ως παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού ή δευτερογενή μηνύματα σηματοδοτικών μονοπατιών) είτε εξωγενώς, δηλαδή από το εξωτερικό περιβάλλον (άμεσα ή ως αποτέλεσμα της απόκρισης των ίδιων των κυττάρων σε εξωτερικά ερεθίσματα) (Martindale και Holbrook 2002). Αν και υπάρχουν πολλοί στρεσογόνοι παράγοντες που οδηγούν στην παραγωγή ROS και στις μετέπειτα δημιουργούμενες βλάβες, κυριότερη πηγή τους εντός των κυττάρων θεωρούνται τα μιτοχόνδρια και ειδικότερα το σύμπλοκο I όσον αφορά στην ανεπάρκεια του μυοκαρδίου (Ide *et al.* 1999). Οι αποκρίσεις που οφείλονται στις ROS και το οξειδωτικό στρες διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του κύτταρου και τον παράγοντα που τις προκάλεσε.

Έχει δειχθεί ότι οι ROS και οξειδωτικό στρες συμμετέχουν στη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στην διακοπή της αύξησης του κυττάρου, στη θανάτωσή του και ίσως στην απομάκρυνση κυτταρικών συστατικών που έχουν υποστεί γήρανση. Ειδικότερα πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι το οξειδωτικό στρες σχετίζεται καθοριστικά με τη διαδικασία της γήρανσης (Finkel and Holbrook 2000) ενώ εμπλέκεται και στην ενεργοποίηση πολυάριθμων και ποικίλων μονοπατιών μεταγωγής σήματος, άρα και στην ενεργοποίηση αντίστοιχων παραγόντων και γονιδίων. Ανάλογα, με το σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται, προωθείται είτε η επιβίωση είτε η απόπτωση, δηλαδή ο θάνατος του κυττάρου. Οι βλάβες μπορούν να εντοπιστούν κυρίως στο επίπεδο της ομοιόστασης του κυττάρου, καθώς προκύπτουν προβλήματα που επηρεάζουν τη φυσιολογία και την παθολογία του. Μεγάλο διάστημα παραμονής των ROS στο κύτταρο είναι ικανό να επιφέρει σοβαρά προβλήματα τόσο στην κυτταρική λειτουργία όσο και στη δομή καθώς προκαλούνται βλάβες σε απαραίτητα συστατικά (γενετικό υλικό, πρωτεΐνες, λιπίδια) αλλά και σε διαδικασίες (π.χ. αναπνοή μιτοχονδρίων, εξασφάλιση αντιοξειδωτικών) (He *et al.* 2008, Kasprzak 2002). Οι παραπάνω λόγοι συσχετίζουν τις ROS με ένα εύρος ασθενειών, όπως είναι οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, ο διαβήτης, η αθηροσκλήρωση, κ.α.

1.3.2 Οξειδωτικό στρες και νευροεκφυλισμός

Όσον αφορά στο νευροεκφυλισμό κι ειδικά στη νόσο Alzheimer είναι γνωστό πως είναι μια νόσος που η εμφάνισή της έχει σχέση με την ηλικία του ατόμου. Βέβαια πέραν της ηλικίας αυτό που φαίνεται να έχει άμεση σχέση με την εμφάνιση της εν λόγω νόσου είναι το οξειδωτικό στρες κι οι οξειδωτικές ρίζες. Όμως ακόμη δεν έχει διαλευκανθεί αν το οξειδωτικό στρες αποτελεί την αιτία ή το αποτέλεσμα για την αμυλοείδωση που παρατηρείται στα πάσχοντα άτομα. Υπάρχουν δύο μοντέλα, που προσπαθούν να εξηγήσουν το μηχανισμό τοξικότητας. Σύμφωνα με το ένα, το πεπτιδίο Αβ δεν αποτελεί την αιτία εμφάνισης της νόσου, αλλά μάλλον είναι συνέπεια του οξειδωτικού στρες. Ο δεύτερος προτεινόμενος μηχανισμός υποστηρίζει πως το Αβ πεπτιδίο μπορεί να επάγει οξειδωτικό στρες με την παραγωγή ROS. Αν και κατά πάσα πιθανότητα το δεύτερο μοντέλο αποσαφηνίζει πληρέστερα ποια μονοπάτια-καταρράκτες ενεργοποιούνται και τελικά οδηγούν στη συσσωμάτωση του Αβ-πεπτιδίου άρα και σε παθολογική κατάσταση, εν τούτοις δεν υπάρχει κοινά αποδεκτό μοντέλο που να εξηγεί πώς το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Πειράματα που έγιναν στη ζύμη *S.cerevisiae* (Franca B.M.*et al.* 2016), η οποία φέρει γονίδια που σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις νευροεκφυλισμού

[illegible]

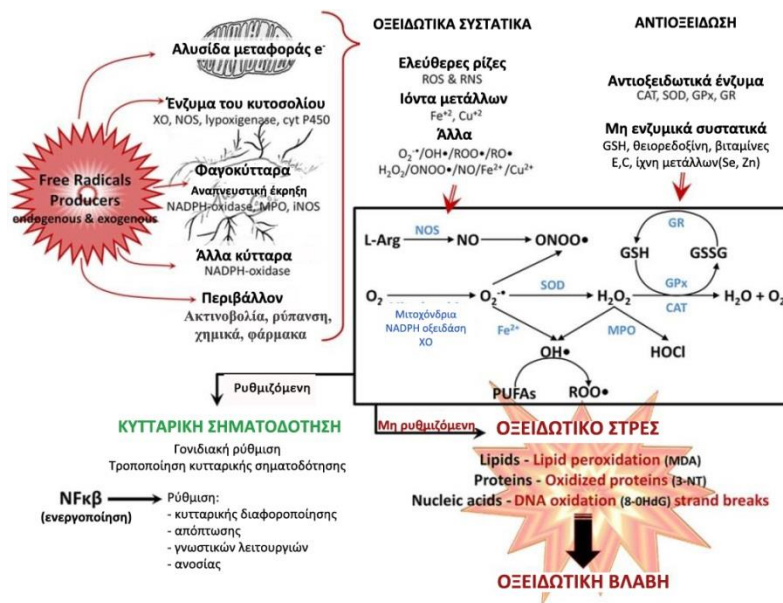
μικρογλοία θα έπρεπε να μπορεί ν' απομακρύνει τα συσσωματώματα, εν τούτοις παρατηρείται το εξής φαινόμενο: τα κύτταρα της μικρογλοίας σχηματίζουν κι αυτά συσσωματώματα γύρω από τις ήδη υπάρχουσες πλάκες αμυλοειδούς κι ενεργοποιούνται, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. (Lull and Block 2010)

Τι ακριβώς όμως περιλαμβάνει ο όρος φλεγμονή του νευρικού συστήματος; Η φλεγμονή σε κύτταρα του νευρικού συστήματος αφορά σε αυξημένα επίπεδα διαφόρων μορίων-μεσολαβητών της συγκεκριμένης ανοσολογικής απόκρισης, μεταξύ των οποίων IL1b, TNF-α and TGFb. Η αύξηση των επιπέδων εξαρτάται κι από την ηλικία, δηλαδή αυξανόμενης της ηλικίας του ατόμου παρατηρείται συσσώρευση τέτοιων μορίων.(McGeer and McGeer 2001, von Bernhardi 2007, von Bernhardi *et al.* 2010).

Επανερχόμενοι στη μικρογλοία και το ρόλο που διαδραματίζει στην άμυνα του οργανισμού πρέπει να τονίσουμε πως αποτελεί για τον εγκέφαλο ό,τι και τα μακροφάγα για το αίμα, δηλαδή είναι μια πρώτη γραμμή άμυνας (Hemmer *et al.* 2002, Ransohoff and Perry 2009, Rivest 2009). Σε υγιή άτομα η μικρογλοία αποτελείται από κύτταρα με λεπτές διακλαδώσεις, τα οποία παρεμβάλλονται από εγκεφαλικό παρέγχυμα. Η ενεργοποίηση της συγκεκριμένης κυτταρικής ομάδας οδηγεί και σε αύξηση του μεγέθους τους (Nimmerjahn *et al.* 2005, Frank-Cannon *et al.* 2009) και σε αλλαγές στη φυσιολογία τους(Liu *et al.* 2001, Lue *et al.* 2010). Η ομάδα αυτή δρα σε μεγάλο εύρος εξωτερικών ερεθισμάτων, όπως αυτοανοσία, μόλυνση, ισχαιμία κ.α, αναγνωρίζοντας πληθώρα σημάτων μεταξύ των οποίων γλυκολιπίδια, πρωτεΐνες, αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, τραυματισμένους νευρώνες. Ανάλογα με το σήμα επάγεται και διαφορετικό μονοπάτι απόκρισης κάθε φορά(Gordon 2003, Martinez *et al.* 2008, Mosser and Edwards 2008). Μεταξύ των πιθανών επαγόμενων μονοπατιών είναι το κλασσικό μονοπάτι ενεργοποίησης M1, το οποίο έχει συσχετιστεί με κυτταροτοξικότητα, το εναλλακτικό φαγοκυτταρικό/νευροπροστατευτικό M2 (Gordon 2003, Martinez *et al.* 2008) και τέλος η ρυθμιστική ενεργοποίηση.

Τα μικρογλοιακά κύτταρα ενεργοποιούνται σε όλες τις ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος παράγοντας κι εκκρίνοντας ένα ευρύ φάσμα μεσολαβητών φλεγμονής, όπως χημειοκίνες, νιτρικό οξείδιο, ROS, πρωτεάσες. Όλοι αυτοί οι παράγοντες ρυθμίζουν την ανοσολογική άμυνα του κυττάρου, με συνέπεια αλλαγές στη συναπτική λειτουργία (Selkoe 2002, Di Filippo *et al.* 2008). Η φλεγμονή του νευρικού συστήματος σημαίνει αλληλεπίδραση μεταξύ οξειδωτικών παραγόντων κι αντιοξειδωτικών ενδοκυτταρικών μηχανισμών. Ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών κι αντιοξειδωτικών μορίων οδηγεί στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες.

Ένας από τους κύριους υπεύθυνους για την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες και κατ' επέκταση των αυξημένων συγκεντρώσεων των ελεύθερων ριζών είναι τα μιτοχόνδρια. Στο παρακάτω σχήμα βλέπουμε συνοπτικά τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις εντός μιτοχονδρίου.



Εικόνα 1.7 : Διαγραμματική απεικόνιση των μονοπατιών που επάγονται κατά την παραγωγή ενδογενών κι εξωγενών ελεύθερων ριζών (von Bernhardt et al. 2015)

1.3.3 Οξειδωτικό στρες και καρδιά

Αν κι ήταν γνωστή η ύπαρξη των ελευθέρων ριζών όπως κι η πιθανή εμπλοκή τους στην εμφάνιση πλήθους ασθενειών, εν τούτοις ο ρόλος τους στην εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων αποσαφηνίστηκε τη δεκαετία του '70, όταν ανακαλύφθηκε το ένζυμο, υπεροξειδική δισμουτάση. Το ένζυμο αυτό καταστρέφει τις ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου, προσδίδοντας έτσι στο κύτταρο ισορροπία μεταξύ ελευθέρων ριζών κι ενδογενών μηχανισμών αποικοδόμησής τους.

Το οξειδωτικό στρες είναι μια κατάσταση, όπου το κύτταρο δε μπορεί να καταστρέψει τις ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα τη διατάραξη της ομοιόστασης και πιθανή βλάβη. Όπως έχει δειχθεί, άλλωστε, σχετίζεται με πληθώρα ασθενειών σχετικών με την καρδιά, όπως αθηροσκλήρωση, οξεία θρόμβωση, δυσλιπιδαιμία, δυσλειτουργία ενδοθηλίου, ισχαιμικό τραυματισμό μυοκαρδίου.

Η καρδιά για την κάλυψη των ενεργειακών της αναγκών μπορεί να χρησιμοποιήσει μια ποικιλία μεταβολικών καυσίμων, συμπεριλαμβανομένων των λιπαρών οξέων, γλυκόζης, γαλακτικού οξέος, κετονών, αλλά κι αμινοξέων. Κατά τη λήψη τροφής, τα λιπαρά οξέα είναι η προτιμώμενη πηγή καυσίμων, αντιπροσωπεύοντας μέχρι το 90% του συνολικού ακετυλο-CoA που παρέχεται σε καρδιακά μιτοχόνδρια (Jafri M.S., Dudycha S.J. and O'Rourke B. 2001). Τα λιπαρά οξέα μεταβολίζονται μέσω β-οξειδωσης, παράγοντας ακετυλο-CoA, NADH, και FADH₂. Το ακετυλο-CoA εισέρχεται στον κύκλο του Krebs, όπου παράγεται NADH και FADH₂. Η γλυκόζη μεταβολίζεται αρχικά μέσω της γλυκολυτικής οδού, παράγοντας μια σχετικά μικρή ποσότητα ATP και πυροσταφυλικό, το οποίο εισέρχεται στον κύκλο του Krebs, παράγοντας NADH και FADH₂. Οι ανάγκες της καρδιάς σε ενέργεια ικανοποιούνται από την είσοδο του παραγόμενου NADH και FADH₂ στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η οποία παράγει ATP με οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια. Το οξυγόνο χρησιμεύει ως τελικός δέκτης των ηλεκτρονίων στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, οπότε ελλείψει επαρκούς ποσότητας οξυγόνου, παύει η μεταφορά των ηλεκτρονίων κι άρα η καρδιά δε τροφοδοτείται με οξυγόνο.

Οι ελεύθερες ρίζες ROS μπορούν να σχηματιστούν στην καρδιά μέσω διαφόρων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής τους κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια ως παραπροϊόν του αερόβιου μεταβολισμού (Davies K.J. 1995). Η κύρια διαδικασία, μέσω της οποίας η καρδιά αντλεί ενέργεια μπορεί επίσης να οδηγήσει στην παραγωγή των ROS (Ide T. *et al.* 1999). Ως γνωστόν, κάθε άτομο οξυγόνου περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα του, γι' αυτό χαρακτηρίζεται κι ως ελεύθερη ρίζα. Είναι δραστική που σημαίνει ότι μπορεί εύκολα να συμμετάσχει σε μία ποικιλία χημικών/βιοχημικών αντιδράσεων. Δωρεά ενός ηλεκτρονίου οδηγεί στο σχηματισμό της ρίζας υπεροξειδίου (O₂⁻). Δωρεά ενός δεύτερου ηλεκτρονίου δίνει υπεροξείδιο, το οποίο στη συνέχεια υποβάλλεται σε πρωτονίωση για να αποδώσει υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Δωρεά ενός τρίτου ηλεκτρονίου, όπως συμβαίνει κατά την αντίδραση Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$), έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της υψηλής δραστηριότητας ρίζα υδροξυλίου ($\bullet\text{OH}$). Τέλος, η δωρεά ενός τέταρτου ηλεκτρονίου αποδίδει ένα μόριο νερού.

ROS μπορεί να σχηματιστούν στην καρδιά, αλλά και σε άλλους ιστούς, και με άλλους μηχανισμούς, όπως μέσω της οξειδάσης ξανθίνης (XO), μέσω NAD(P)H οξειδασών, με τη βοήθεια του κυτοχρώματος P450, με αυτοοξειδωση των κατεχολαμινών και τέλος με την αποσύνδεση της NO συνθάσης (NOS) (Giordano F. 2005). Ο σχηματισμός ROS στην καρδιά μπορεί να προκληθεί επίσης κι από τη δράση των κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων. Η αγγειοτενσίνη II (ATII), ο PDGF, και ο TNF-α, μπορούν, επίσης, να οδηγήσουν στο σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου και ελευθέρων ριζών οξυγόνου μέσω ενεργοποίησης των NAD(P)H οξειδασών.

Από τα παραπάνω λοιπόν καθίσταται σαφές πως οι ελεύθερες δραστικές ρίζες αποτελούν παραπροϊόν μεταβολικών μονοπατιών, δηλαδή παράγονται ενδογενώς από το κύτταρο. Το ερώτημα που ανακύπτει εποιοι ενδοκυτταρικοί μηχανισμοί ενεργοποιούνται προκειμένου να καταστραφούν τα συγκεκριμένα τοξικά προϊόντα.

Υπάρχουν διάφοροι κυτταρικοί μηχανισμοί που αντισταθμίζουν την παραγωγή των ROS, συμπεριλαμβανομένων ενζυμικών αλλά και μη μονοπατιών. Οι πλέον γνωστές ενζυμικές οδοί είναι αυτή της καταλάσης καθώς επίσης και το μεσολαβούμενο από τις δισμουτάσες υπεροξειδίου (SODs) μονοπάτι, ένζυμα τα οποία διευκολύνουν το σχηματισμό υπεροξειδίου υδρογόνου από τη δραστική ρίζα οξυγόνου (Kirkman H.N. and Gaetani G.F. 1984, Kirkman H.N. *et al.* 1999, Ursini F. *et al.* 1995, de Haan J.B. *et al.* 2004). Οι μη ενζυμικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες E, C, και το β-καροτένιο (πρόδρομος της βιταμίνης A), ουβικινόνη, λιποϊκό οξύ, και ουρικό οξύ (Nordberg J. and Arner E.S. 2001). Ένας ακόμη μηχανισμός καταστροφής των ενεργών ριζών είναι το μεσολαβούμενο από γλουταθειόνη μονοπάτι, όπου η γλουταθειόνη δρα ως αναγωγικό υπόστρωμα για την ενζυμική δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.

Πέραν όμως της πιθανής τοξικής τους δράσης, οι ROS παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της «οξειδωτικής έκρηξης», μιας αντίδρασης απαραίτητης για τα φαγοκύτταρα (Hensley K., Robinson K.A., Gabbita S.P., Salsman S., and Floyd R.A. 2000). Έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται και σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης, ενεργώντας σε ορισμένες περιπτώσεις ως αγγελιαφόροι δευτερογενών μηνυμάτων (TGF-β1, PDGF, ATII, FGF-2, ενδοθηλίνη κ.α). Τέλος, οι ελεύθερες δραστικές ρίζες σχετίζονται με τροποποίηση της ενεργότητας ειδικών μεταγραφικών παραγόντων π.χ.: NF-κB και AP-1. Για παράδειγμα, η αποικοδόμηση του IκB (αναστολέας του NF-κB) με τη βοήθεια των ROS, αυξάνει την ενεργότητα του παράγοντα NF-κB. Έτσι, διαφαίνεται ο ρόλος των ROS στη ρύθμιση της φλεγμονής. Μια από τις πιο ευρέως αναγνωρισμένες βιολογικές επιδράσεις των ROS, ωστόσο, είναι η αλληλεπίδραση τους με κυτταρικά λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA, όταν ενεργοποιούνται ενδοκυτταρικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί, με συνέπεια να προκληθούν κυτταρικές βλάβες και πιθανώς το κύτταρο να οδηγηθεί στο θάνατο (Davies K.J. 1995, Suematsu N. *et al.* 2003). Επίσης, στις μακροπρόθεσμες σωρευτικές επιπτώσεις των ROS έχουν αποδοθεί φαινόμενα γενικευμένης γήρανσης και μεταβολές στο καρδιαγγειακό σύστημα, οι οποίες προφανώς εξαρτώνται από την ηλικία, χωρίς όμως να έχουν διαλευκανθεί πλήρως οι εμπλεκόμενοι μηχανισμοί.

Είναι γνωστό ότι η στεφανιαία νόσος (CAD) είναι η κύρια αιτία καρδιακής ανεπάρκειας σε όλο τον κόσμο, η οποία οδηγεί σε ισχαιμία του μυοκαρδίου και πιθανή νέκρωσή του. Αυτό που αξίζει να σημειωθεί είναι ο καταλυτικός ρόλος που

παίζουν οι ROS στη γένεση και την εξέλιξη της νόσου (Pennathur S. *et al.* 2001, Khatri J.J. *et al.* 2004). Η δραστηριότητα ROS στα τοιχώματα των αγγείων, για παράδειγμα, πιστεύεται ότι συνεισφέρει στο σχηματισμό της οξειδωμένης LDL, άρα και στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης (Witztum J.L. and Steinberg D. 1991). Οι ROS έχουν δείχθει ότι ενεργοποιούν τις μεταλλοπρωτεϊνάσες της μιτοχονδριακής μήτρας (MMPs) και πιθανώς να σχετίζονται και με διάρρηξη της αγγειακής πλάκας, όπως και με την έναρξη της στεφανιαίας θρόμβωσης κι απόφραξη. Στη ρύθμιση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου (MI), οι ROS παρεμποδίζουν την επαναδιάχυση, επιταχύνοντας τη νέκρωση ιστού. Διαγονιδιακή υπερέκφραση της υπεροξειδικής δισμουτάσης μειώνει την έκταση του εμφράγματος σε ποντικούς, που υποδηλώνει πως οι ελεύθερες ρίζες μεσολαβούν της βλάβης του μυοκαρδίου (Chen E.P. *et al.* 1996). Ωστόσο, προσπάθειες για στοχευμένη έκφραση του συγκεκριμένου ενζύμου (SOD), προκειμένου να μειωθεί η ένταση των βλαβών μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, έχουν αποφέρει ανάμεικτα αποτελέσματα, υποδηλώνοντας ότι η ενεργοποίηση των ROS είναι μία μόνο παράμετρος του εν λόγω φαινομένου ή /και ότι η SOD από μόνη της είναι ανεπαρκής για να εξουδετερώσει την τοξικότητα των ROS.

20% τουλάχιστον των ασθενών, που έχουν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου, αναπτύσσουν καρδιακή ανεπάρκεια. Ο τρόπος με τον οποίο οι καρδιακές κοιλίες «επουλώνονται» κι επαναλειτουργούν μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι καθοριστικός για την καρδιακή λειτουργία και την εξέλιξη της καρδιακής ανεπάρκειας (Pfeffer M.A. and Braunwald E. 1990). Αν και γενικά δεν είναι αποδεδειγμένη η κλινική σημασία των ROS στην αναχαίτιση της εξέλιξης της νόσου, τα εργαστηριακά ευρήματα ενισχύουν την υπόθεση περί συμβολής των ROS σε αυτή τη διαδικασία.

Καθοριστικός όμως είναι κι ο ρόλος που διαδραματίζουν οι ελεύθερες ρίζες σε φαινόμενα καρδιακής υπερτροφίας. Η καρδιακή υπερτροφία μπορεί να είναι είτε αντισταθμιστική και προσαρμοστική ή μη προσαρμοστική. Πολλοί εξωκυττάριοι παράγοντες είναι ικανοί να επάγουν υπερτροφία των καρδιακών μυοκυττάρων και πολλές από τις διάφορες οδούς που μεσολαβούν την υπερτροφική ανάπτυξη μπορεί να ενεργοποιηθούν άμεσα ή έμμεσα από τις ROS. Στους παράγοντες αυτούς ανήκουν η PKC, η MAPK p38, η JNK, η κινάση-1 σηματοδότησης απόπτωσης (ASK-1), και οι ERK1/2 καθώς κι άλλα μόρια (Sabri A., Hughie H.H. and Lucchesi P.A. 2003). Η επαγόμενη από την αγγειοτενσίνη υπερτροφία είναι ένα παράδειγμα, όπου ένα εξωκυτταρικό σήμα προκαλεί καρδιακή υπερτροφία μέσω ενός ROS-εξαρτώμενου μονοπατιού. Πλέον η αγγειοτενσίνη αποτελεί ένα καθοριστικής σημασίας μόριο στην εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκειας και μέσω αναστολής της (παρεμποδίζοντας το σχηματισμό ATII ή την πρόσδεση ATII στον υποδοχέα AT1) παρατείνεται το προσδόκιμο ζωής σε ασθενείς. Η ATII διεγείρει την καρδιακή υπερτροφία μέσω ενός εξαρτώμενου από G-πρωτεΐνες μονοπατιού, που

περιλαμβάνει την παραγωγή ROS κι ενεργοποίηση άλλων μορίων, τα οποία εξαρτώνται από την παρουσία ROS, για παράδειγμα των MAPKs (Nakamura, K. *et al.* 1998).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αγγειοτενσίνη II επάγει το σχηματισμό ROS σε μεγάλο βαθμό μέσω NAD(P)H οξειδασών, αν και ο μηχανισμός μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση δεν είναι πλήρως κατανοητός.

In vitro και in vivo δεδομένα υποδεικνύουν ότι η Rho πρωτεΐνη μπορεί να συμμετέχει σε αυτό το μονοπάτι. Σε πειράματα που έγιναν, φάνηκε πως αναστολή της Rho σε καρδιομυοκύτταρα νεογέννητου αρουραίου αναστέλλει οξειδωτικά γεγονότα, τα οποία διαμεσολαβούνται από ATII. Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο οι ROS μπορεί να επάγουν καρδιακή υπερτροφία είναι μέσω μεταβολών στη γονιδιακή έκφραση μεταγραφικών παραγόντων. Για παράδειγμα, η ATII ενεργοποιεί μέσω του ROS μονοπατιού τον παράγοντα μεταγραφής NF-κΒ. Επίσης, ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 φαίνεται να ρυθμίζεται από ROS και συμμετέχει στην έκφραση αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται στην καρδιακή υπερτροφία. Είναι πιθανό, λοιπόν, η ρύθμιση της μεταγραφής από τις ROS να είναι πιο διαδεδομένη από ό, τι αναμένεται, με αποτέλεσμα η γονιδιακή ρύθμιση μέσω του ROS μονοπατιού να επιταχύνει την εμφάνιση διαφόρων νοσημάτων όχι μόνο στην καρδιά, αλλά και σε άλλους ιστούς.

Ένα άλλο μέλος της οικογένειας MAPK, η οξειδοαναγωγικά ευαίσθητη κινάση ASK-1 φαίνεται να εμπλέκει ROS και υπερτροφία. Η ASK-1 ενεργοποιείται από ROS και με τη σειρά της ενεργοποιεί την MAPK p38 και την JNK. Εξάλειψη του ASK-1 οδηγεί σε μειωμένη ενεργοποίηση των p38 και JNK και την καρδιακή υπερτροφία (Izumiya Y. *et al.* 2003). Η ASK-1 μεσολαβεί επίσης στην απόπτωση που επάγεται από τον παράγοντα TNF-α, γεγονός που υποδεικνύει τη συσχέτιση μεταξύ ROS και απόπτωσης (Yamaguchi O. *et al.* 2003).

Σε περιπτώσεις υπερτροφίας, ισχαιμίας και καρδιακής ανεπάρκειας παρατηρούνται εντονότερα φαινόμενα απόπτωσης. Η απόπτωση αποτελεί ένα μηχανισμό που μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη και την εξέλιξη καρδιακής δυσλειτουργίας κι ανεπάρκειας (Cesselli D. *et al.* 2001).

Είναι ενδιαφέρον ότι, έστω κι αν η απόπτωση σε καρδιομυοκύτταρα επάγεται ή όχι από το οξειδωτικό στρες φαίνεται να εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις των ROS (Kwon S.H. *et al.* 2003). Για παράδειγμα, σε ενήλικα καρδιακά μυοκύτταρα, σχετικά χαμηλά επίπεδα H₂O₂ συνδέονται με ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK1 / 2 MAPK και τη διέγερση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Αντιστρόφως, υψηλά επίπεδα H₂O₂, ενώ διατηρούν ενεργοποιημένες τις κινάσες ERK1/2, ενεργοποιούν ταυτόχρονα τις JNK, p38 MAPK και Akt με αποτέλεσμα να επάγονται φαινόμενα απόπτωσης. Μια άλλη κλινικά σημαντική πιθανή σχέση μεταξύ καρδιακής ανεπάρκειας και ROS

περιλαμβάνει σηματοδότηση αδρενεργικών υποδοχέων. Συγκεκριμένα έχειδειχθεί ότι η παρεμπόδιση της β-AR επαγόμενης απόπτωσης σχετίζεται με την ενεργοποίηση των ROS (Remondino A. *et al.* 2003).

Με βάση τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα διαπιστώνουμε πως η ενεργοποίηση κι ο σχηματισμός των ελεύθερων δραστικών ριζών συμβαίνει κι ενδοκυτταρικά. Οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται στις περιπτώσεις αυτές είναι πολλοί και αλληλοεξαρτώμενοι. Άρα μιλάμε για ένα πολύπλοκο σύστημα, το οποίο δε μπορεί να μελετηθεί μονομερώς, αλλά πρέπει να εξεταστεί διεξοδικά.

1.3.4 Αμυλοείδωση στην καρδιά

Ως αμυλοείδωση χαρακτηρίζεται μια ομάδα ασθενειών, η οποία προκαλείται από συσσώρευση μιας «ουσίας» (κατά βάση πρωτεΐνης) γνωστής ως αμυλοιδές, σε ιστούς και όργανα. Το αμυλοιδές μπορεί να είναι το προϊόν συσσώρευσης φυσιολογικών ή μη πρωτεϊνών. Εναποθέσεις αμυλοειδούς παρατηρούνται σε διάφορους ιστούς κι όργανα, όπως και στην καρδιά, όπου μπορεί να προκαλέσουν μια ομάδα ασθενειών, γνωστή ως καρδιακή αμυλοείδωση. Υπάρχουν διάφοροι τύποι αμυλοείδωσης, και οι διαφορετικές μορφές αμυλοειδώσεων προέρχονται από διαφορετικές πρωτεΐνες. Είναι εξαιρετικά σημαντικό να καθοριστεί ο τύπος του αμυλοειδούς που προκαλεί την ασθένεια κάθε φορά, διότι κάθε τύπος αμυλοείδωσης εξελίσσεται σε διαφορετικό ρυθμό, και η θεραπεία διαφέρει σημαντικά για κάθε περίπτωση.

Ανεξάρτητα από τον εμπλεκόμενο στη νόσο τύπο αμυλοειδούς, έχει παρατηρηθεί πως ασθενείς που δεν υπόκεινται σε θεραπευτική αγωγή εμφανίζουν έντονη πάχυνση των τοιχωμάτων της καρδιάς. Αυτό συχνά οδηγεί σε αυξημένη συγκέντρωση υγρών στο σώμα, μια κατάσταση γνωστή ως συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. Τα πιο κοινά συμπτώματα περιλαμβάνουν δύσπνοια και πρήξιμο των ποδιών και της κοιλιάς. Ένα αίσθημα πίεσης ή δυσφορία στο στήθος κατά τη διάρκεια προσπάθειας (που συνήθως αναφέρεται ως στηθάγχη) μπορεί να οφείλεται σε αποθέσεις αμυλοειδούς στα αιμοφόρα αγγεία της καρδιάς.

Επειδή η αμυλοείδωση συχνά δεν περιορίζεται στην καρδιά, συμπτώματα εμφανίζονται και σε άλλα όργανα, όπως τσούξιμο και μούδιασμα στα χέρια και τα πόδια (λόγω βλάβης των νεύρων), σύνδρομο καρπιαίου σωλήνα, ζάλη κατά την παραμονή, αφρώδη ούρα και ανεξήγητες μελανίες.(Quarta C.C., Kruger J.L., Falk R.H. 2012).

1.3.5 Παράγοντες που επάγουν οξειδωτικό στρες

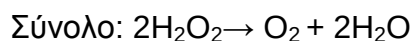
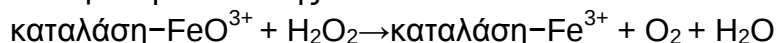
1.3.5.1 Υπεροξειδίο υδρογόνου (H_2O_2)

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου αποτελεί το σύνηθες προϊόν αερόβιου μεταβολισμού του οξυγόνου. Οι αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό του είναι τρεις :

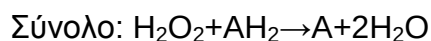
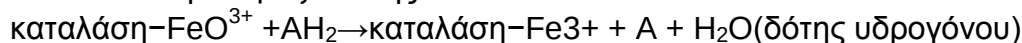
Σχηματισμός συμπλόκου I:



Αντίδραση κατάλυσης:



Αποσύνθεση υπεροξειδάσης:



Μέσα στο κύτταρο η συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου δεν είναι σταθερή-αντίθετα υπάρχει διαβάθμιση. Για παράδειγμα εντός του χώρου μεταξύ των μιτοχονδριακών ακρολοφιών εντοπίζεται υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οποίο προέρχεται από το σύμπλοκο III ενώ η συγκέντρωση του υπεροξειδίου στη μήτρα είναι αποτέλεσμα δράσης των συμπλόκων I και II. Οι μηχανισμοί που διαθέτει το μιτοχόνδριο προκειμένου να «απτοοξινωθεί», δηλαδή να καταστρέψει τις ελεύθερες ρίζες, επάγονται με ασβεστο-εξαρτώμενο τρόπο (λόγω ύπαρξης κατάλληλης σηματοδότησης στην επιφάνεια του μιτοχονδριακού ενδοπλασματικού δικτύου που οδηγεί στην αναγνώριση των ιόντων ασβεστίου από το υπεροξειδίο).

Γιατί όμως να υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση υπεροξειδίου υδρογόνου; Φαίνεται πως αυξημένα επίπεδα του συγκεκριμένου οξειδωτικού παράγοντα επάγουν φλεγμονώδη αντίδραση, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην παύση της ανάπτυξης του κυττάρου και εν τέλει στον κυτταρικό θάνατο. Άρα μιλάμε για έναν εύκολο τρόπο «καθαρισμού» του οργανισμού από άχρηστα και νεκρά προϊόντα.

Ένα επόμενο ερώτημα που εγείρεται είναι πώς το υπεροξειδίο του υδρογόνου συμμετέχει στη μεταγωγή σήματος. Το εν λόγω μόριο αποτελεί μεταφορέα μηνυμάτων, καθώς μεταβιβάζει στην περιοχή-στόχο ένα οξειδοαναγωγικό σήμα. Κατόπιν αυτού μεταβάλλεται η ενεργότητα μεταγραφικών παραγόντων με αποτέλεσμα την επαγωγή έκφρασης γονιδίων.

1.3.5.2 Σταυροσπορίνη

Η σταυροσπορίνη αποτελεί έναν αλκαλοειδή παράγοντα που απομονώνεται από το βακτήριο *Streptomyces staurosporeus*. Αποτελεί έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο αναστολέα κινασών, μιας ομάδας πρωτεϊνών που οδηγεί σε φωσφορυλίωση άλλων μορίων επάγοντας έτσι έναν καταρράκτη αντιδράσεων με τελικό σκοπό την επαγωγή έκφρασης πυρηνικών γονιδίων (Nakano and Ōmura 2009) Χρησιμοποιείται ευρέως σε κυτταρικές σειρές ως επαγωγέας ενός τύπου κυτταρικού θανάτου, της απόπτωσης. Βέβαια δεν ενεργοποιεί μόνο το μονοπάτι της απόπτωσης που μεσολαβείται από τη δράση κασπασών, αλλά και το ανεξάρτητο από κασπάσες. Όταν απομονώθηκε η συγκεκριμένη ουσία, κανένας δεν ήταν σε θέση να γνωρίζει την πολλαπλή χρησιμότητά της για ερευνητικούς σκοπούς. Όπως έχει δειχθεί η συγκεκριμένη φαρμακευτική ουσία, μπορεί να προσδένεται και σε DNA τοποϊσομεράσες, με αποτέλεσμα το παροδικό σπάσιμο της δίκλωνης αλυσίδας και την εκ νέου σύνθεση κλώνου DNA.

Η σταυροσπορίνη αποτελεί μια ινδολική σύνθετη ένωση. Η βιοσύνθεσή της ξεκινά με τη βοήθεια δύο (αφόρτιστων) L-τρυπτοφανών. Με τη βοήθεια του ενζύμου οξειδάση της σταυροσπορίνης (staO) μετατρέπονται σε ιμίνες, οι οποίες στην πορεία θα δώσουν με κατάλληλες αντιδράσεις ένα μόριο σταυροσπορίνης. Αποτελεί ένα αρκετά σύνθετο μονοπάτι που δεν κρίνεται σκόπιμο να αναλυθεί στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η μελέτη της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς αποτελεί ένα ερευνητικό πεδίο που συγκεντρώνει το ενδιαφέρον των ερευνητών, κυρίως λόγω της αποδεδειγμένης σχέσης της με νευροεκφυλιστικά νοσήματα (νόσος Alzheimer). Έτσι κι η παρούσα διπλωματική εργασία προσπαθεί να φωτίσει ορισμένα σημεία που αφορούν στην έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες σε καρδιακούς μυοβλάστες.

Στόχος ήταν να μελετηθεί η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στους καρδιακούς μυοβλάστες και δη να εξεταστεί το πρότυπο πρωτεόλυσης που ακολουθεί παρουσία οξειδωτικών παραγόντων, οι οποίοι ως γνωστόν επάγουν τέτοιες διαδικασίες. Φυσικά όμως η χρήση ενός μόνο οξειδωτικού παράγοντα δεν αποτελεί ικανή απόδειξη για την επαγωγή οξειδωτικών φαινομένων γι' αυτό και μελετήθηκε η επίδραση δύο παραγόντων, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αρχική υπόθεση ότι δηλαδή το οξειδωτικό στρες επάγει αύξηση της ούτως ή άλλως φυσιολογικής πρωτεόλυσης της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς. Πέραν αυτού όμως ένας ακόμη στόχος ήταν να μελετηθεί η θραυσματοποίηση που παρατηρήθηκε κατά την επώαση με οξειδωτικούς παράγοντες και να εξηγηθεί το εν λόγω πρότυπο, με βάση γνωστά πρωτεολυτικά πρότυπα σε άλλες κυτταρικές σειρές.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για τη διεκπεραίωση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν διάφορα διαλύματα, η σύσταση των οποίων θα περιγραφεί παρακάτω.

Αρχικά για τον ποσοτικό προσδιορισμό ακολουθήθηκε η μέθοδος Bradford, η οποία στηρίζεται στη χρήση κατάλληλου αντιδραστήριου, που χρωματίζει το δείγμα ανάλογα με το αν περιέχει ή όχι πρωτεΐνη. Η σύσταση της εν λόγω χρωστικής είναι η εξής:

Αντιδραστήριο Bradford (Biorad)

- 0,01% v/v χρωστική Coomassie Brilliant Blue
- 4,7% v/v αιθανόλη
- 8,5% w/v φωσφορικό οξύ

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε αλβουμίνη ορού βοδινού BSA (Fluka Biochemika).

Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης και της μεταφοράς απαιτείται η χρήση δύο διαλυμάτων, του διαλύματος ηλεκτροφόρησης και του διαλύματος μεταφοράς, αντίστοιχα. Η σύσταση των διαλυμάτων αυτών είναι η κάτωθι:

1. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10x (Running Buffer 10x)

- ✓ 25 mM Tris –Base (AppliChem)
- ✓ 192 mM Γλυκίνη (AppliChem)

Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (*Biorad Mini-Protean® 3 Cell*) χρησιμοποιείται το διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x, δηλαδή το διάλυμα 10x αραιωμένο με την κατάλληλη ποσότητα νερού, ώστε στο τελικό διάλυμα η συγκέντρωσή του να είναι 10%.

2. Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x (Running Buffer 1x)

- ✓ Running buffer 1x (αρχικό διάλυμα 10x)
- ✓ 0.1% v/v SDS (αρχικό διάλυμα 10% w/v) (AppliChem)

Κατά τη μεταφορά χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη συσκευή για ημίστεγνη μεταφορά πρωτεϊνών (*Biorad Trans-Blot SD/Semi-dry transfer cell*), όπου χρησιμοποιήθηκε διάλυμα μεταφοράς, προκειμένου να διαβραχούν οι μεμβράνες και να καταστεί δυνατή η διαδικασία.

3. Διάλυμα μεταφοράς TB (Transfer Buffer 1x)

- ✓ 25mM Tris pH=8,3 (η σκόνη που ζυγίζεται για την παρασκευή του διαλύματος είναι της εταιρείας AppliChem)
- ✓ 192mM γλυκίνη (AppliChem)
- ✓ 10% (v/v) μεθανόλη (AppliChem)

Μετά τη μεταφορά ακολουθεί παροδική χρώση με χρωστική Ponceau και κατόπιν ξεπλύματα με χρήση διαλύματος TBS-T. Η σύσταση των διαλυμάτων περιγράφεται παρακάτω:

4. Διάλυμα Ponceau

- ✓ 0,4% (w/v) Ponceau S
- ✓ 7,5% (w/v) τριχλωρικό οξύ (TCA)

5. Διάλυμα TBS 10x

- ✓ 200 mM Tris-HCl, pH 7,6 (AppliChem)
- ✓ 150 mM NaCl (AppliChem)

6. Διάλυμα πλύσης (TBS-T)

- ✓ TBS 1x
- ✓ 0.05% (v/v) Tween-20
- ✓ Το διάλυμα συμπληρώνεται με ddH₂O

Για την ολοκλήρωση της ανοσοστύπωσης κατά Western και την εμφάνιση πρωτεϊνικών ζωνών στη μεμβράνη απαιτείται η χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Τα πρωτογενή αντισώματα είναι χειροποίητα και παραχωρήθηκαν από την Αν. Καθηγήτρια, κα Βασιλακοπούλου Διδώ. Συγκεκριμένα στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τρία αντισώματα σε διαφορετικές αραιώσεις. Το αντίσωμα έναντι του Αβ-πεπτιδίου (347) χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:1000, το αντίσωμα έναντι του καρβοξυτελικού άκρου της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (275) σε αραιώση 1:750 και το αντίσωμα έναντι του αμινοτελικού άκρου της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς(348) σε αραιώση 1:500. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με υπεροξειδάση (HRP) της εταιρείας. Τέλος τα

αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την εμφάνιση ανήκουν στην εταιρεία Thermofisher (Chemiluminescent Trial Kit)

3.2 ΚΑΡΔΙΑΚΟΙ ΜΥΟΒΛΑΣΤΕΣ

3.2.1 Γενικά

Κυτταροκαλλιέργεια είναι η διαδικασία κατά την οποία κύτταρα αναπτύσσονται *in vitro*, υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Πρακτικά, ο όρος κυτταροκαλλιέργεια αναφέρεται σε κύτταρα που προέρχονται από πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και συνηθέστερα ζώα.

3.2.2 Συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας

Στο χώρο των καλλιεργειών τηρείται πρωτόκολλο εφαρμογής κανόνων ασφαλείας, υγιεινής και καθαρισμού. Αυτό συμβαίνει διότι τόσο τα μη αποστειρωμένα υλικά όσο κι οι χώροι εργασίας είναι πηγές μόλυνσης από μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες, ιοί), γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την κυτταροκαλλιέργεια, και συχνά αποδεικνύονται επιβλαβείς έως και θανατηφόροι για τα κύτταρα.

Στο χώρο των καλλιεργειών υπάρχει ειδικός θάλαμος νηματικής ροής (hood), στον οποίο πραγματοποιούνται όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων κι ένας κλίβανος, όπου φυλάσσονται τα τρυβλία ή οι φλάσκες, στα οποία περιέχονται κύτταρα. Ο θάλαμος αποτελείται από ειδικούς ηθμούς υψηλής απόδοσης που έχουν τη δυνατότητα να συγκρατούν το 99,97% των σωματιδίων διαμέτρου 0.3μm καθώς και από μια λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας για αποστείρωση πριν από κάθε χειρισμό, με σκοπό τη μείωση της πιθανότητας μόλυνσης των κυττάρων αλλά και των λοιπών υλικών. Για τη διατήρηση των συνθηκών υγιεινής και την ελαχιστοποίηση του μικροβιακού φορτίου στην αίθουσα φύλαξης των κυττάρων υπάρχει σύστημα ακτινοβολίας UV στο χώρο, το οποίο προστατεύει από τυχόν μολύνσεις, καθώς καταστρέφει το DNA των κυττάρων που εκτίθενται σε αυτή, κυρίως λόγω σχηματισμού διμερών πυριμιδίνης στις αλυσίδες του DNA, γεγονός που παρεμποδίζει τη φυσιολογική διεξαγωγή του κυτταρικού κύκλου κι άρα βοηθά στο θάνατο των μικροοργανισμών. Πριν τη χρήση του θαλάμου, πρέπει πρώτα να ψεκάσουμε οποιοδήποτε αντικείμενο επιθυμούμε να εισάγουμε σ' αυτόν με απολυμαντικό [αιθανόλη 70%(v/v)]. Επίσης για περαιτέρω προστασία όλες οι επιφάνειες και τα όργανα απολυμαίνονται με αιθανόλη ενώ πραγματοποιείται συνεχής καθαρισμός του χώρου. Παράλληλα, στην υπεριώδη

ακτινοβολία εκτίθενται αποστειρωμένο νερό (1L) και απολυμαντικό Incuwater-Clean (10mL), τα οποία θα γεμίσουν τον δίσκο. Το αποστειρωμένο νερό έχει τοποθετηθεί πριν σε αυτόκαυστο, και χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της υγρασίας στον κλίβανο.

Επίσης, κάθε αναλώσιμο υλικό που χρησιμοποιείται για το χειρισμό των κυττάρων είναι αποστειρωμένο και πάντα για μια χρήση, τόσο το θρεπτικό υλικό των κυτταροκαλλιιεργειών (DMEM) όσο και το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Κατά την αποστείρωση με υγρή θερμότητα καταστρέφεται το σύνολο των ανεπιθύμητων μικροβίων επειδή οι πρωτεΐνες τους μετουσιώνονται.

3.2.3.Απενεργοποίηση του ορού (FBS)

Ο ορός εμβρύου βοός (FBS) χρησιμοποιείται για την παρασκευή των θρεπτικών μέσων καλλιέργειας των κυττάρων αφού προηγουμένως απενεργοποιηθεί με θέρμανση σε υδατόλουτρο 56°C για 30 λεπτά για να καταστραφούν τα προϊόντα ανοσοαπόκρισης, όπως οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος. Μετά την απενεργοποίηση και το φιλτράρισμά του, ο ορός μοιράζεται σε σωληνάρια των 50mL και φυλάσσεται στους -20°C. Όταν επιθυμούμε να φτιάξουμε θρεπτικό υλικό για τα κύτταρα, αποψύχουμε ένα σωληνάριο και όχι όλη την ποσότητα, μειώνοντας έτσι την πιθανότητα πιθανής μόλυνσης.

3.2.4 Ψύξη κυττάρων

Για να διατηρούνται τα κύτταρα για μεγάλο χρονικό διάστημα ώστε να μπορούν να δημιουργούνται εκ νέου κυτταροκαλλιέργειες, ψύχονται και αποθηκεύονται σε υγρό άζωτο (-196°C), ενώ βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης και ως μέσο κατάψυξης (και άρα κρυοπροστατευτική ουσία) χρησιμοποιείται το DMSO.

3.2.5 Απόψυξη κυττάρων

Κάθε φορά που επιθυμούμε να καλλιιεργήσουμε εκ νέου κύτταρα τα αποψύχουμε ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα:

1. Το επιθυμητό φιαλίδιο τοποθετείται γρήγορα από τους -196°C στους 37°C . Έτσι η απόψυξη των κυττάρων είναι άμεση και η τήξη των κρυστάλλων τα τραυματίζει λιγότερο.
2. Σε ειδική φλάσκα (25mm) προστίθενται 4mL θρεπτικό υλικό DMEM 15%(v/v) FBS (αντί για 10%, προκειμένου ο ρυθμός κυτταρικής αύξησης να είναι μεγαλύτερος) και αυτή τοποθετείται στον κλίβανο ώστε να αποκτήσει την επιθυμητή θερμοκρασία. Με τον τρόπο αυτό, το θρεπτικό υλικό αποκτά το φυσιολογικό του pH (7.0-7.6).
3. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του φιαλιδίου αποχύνεται σε αποστειρωμένο σωληνάριο και φυγοκεντρείται (1500rpm για 5 λεπτά) προκειμένου να κατακαθίσουν τα κύτταρα και να απομακρυνθεί στη συνέχεια το DMSO, που είναι τοξικό για αυτά.
4. Το ίζημα επαναιωρείται σε 5mL DMEM 15%(v/v) FBS και το περιεχόμενο του σωληναρίου μεταφέρεται στη φλάσκα, όπου και διατηρείται.
5. Με το πέρασ ενός εικοσιτετραώρου, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό της φλάσκας και η επιφάνεια όπου αναπτύσσονται τα κύτταρα ξεπλένεται με 1,5mL αποστειρωμένου PBS 1x, προκειμένου να απομακρυνθούν νεκρά κύτταρα αλλά και υπολείμματα του DMSO.
6. Προστίθεται εκ νέου θρεπτικό υλικό και ανανεώνεται κάθε δεύτερη ημέρα.

Σημείωση: Το DMSO χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτική ουσία, γιατί παρεμποδίζει το σχηματισμό κρυστάλλων νερού που προκαλούν βλάβες στα κύτταρα. Παράλληλα, το DMSO είναι τοξικό και δρα αναστέλλοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να δρα και ως μέσο τελικής διαφοροποίησης. Έτσι είναι αναγκαίο να απομακρυνθεί από τα κύτταρα κατά την απόψυξη.

3.2.6 Ανακαλλιέργεια H9c2 κυττάρων

Ως γνωστόν τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται συνεχώς, εφόσον βέβαια το περιβάλλον είναι ευνοϊκό, επιτυγχάνοντας έτσι την αύξησή τους σε αριθμό και κατ' επέκταση την ανάπτυξή τους. Στον περιορισμένο όμως χώρο της φλάσκας (ή του τρυβλίου) στον οποίο διεξάγονται οι κυτταροκαλλιέργειες, εγείρεται το πρόβλημα της χωρητικότητας για τον αυξανόμενο αριθμό των κυττάρων, που οδηγεί σε συνωστισμό κι έτσι τα κύτταρα επάγουν αποπτωτικούς μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου. Επομένως είναι αναγκαία η επανακαλλιέργεια των κυττάρων σε μικρότερες συγκεντρώσεις, και άρα απαιτείται αραιώση, διαδικασία που πραγματοποιείται στο hood.

- Με το οπτικό μικροσκόπιο παρατηρείται αν τα κύτταρα έχουν καλύψει πλήρως τη φλάσκα μέχρι την επιφάνεια (80-90% πληρότητα).
- Πριν υπάρξει πληρότητα αυτού του ποσοστού, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό (8mL) και μαζί με αυτό νεκρά ή γηρασμένα κύτταρα.
- Η φλάσκα ξεπλένεται με 3mL αποστειρωμένου PBS (1x) κι έτσι απομακρύνονται τα παραπροϊόντα του μεταβολισμού και τα ίχνη θρεπτικού υλικού.
- Μέσα στη φλάσκα τοποθετείται 1,5mL θρυψίνης κι η φλάσκα τοποθετείται ξανά στον κλίβανο για 1 με 1 ½ λεπτά. Έτσι επιτυγχάνεται ενεργοποίηση του ενζύμου με αποτέλεσμα την υδρόλυση των πρωτεϊνών υποστρώματος των κυττάρων, ώστε αυτά να αποκολληθούν τόσο από την επιφάνεια όσο και μεταξύ τους.
- Απομακρύνεται η φλάσκα από τον κλίβανο και σε οριζόντια θέση την ανακινούμε μέσω ελαφρών χτυπημάτων, για να αποκολληθούν όλα τα κύτταρα από την επιφάνειά της.
- Προστίθεται 3,5mL θρεπτικό υλικό DMEM/ 10% (v/v) FBS για να ανασταλεί η δράση του ενζύμου ενώ σε όρθια θέση με τη χρήση πιπέτας γίνεται ανακίνηση του περιεχομένου προκειμένου να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα κυττάρων που υπάρχουν και να γίνει ομοιόμορφη κατανομή τους μέσα στο υγρό.
- Από τα 5mL που υπάρχουν συνολικά μέσα στη φλάσκα, αφήνουμε 1mL και συμπληρώνεται μέχρι τον όγκο των 8mL με DMEM 10% (v/v) FBS.
- Τοποθετείται ξανά στον κλίβανο η φλάσκα με την αραίωση και έτσι αρχίζει η αύξηση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων.
- Τα 4mL που περισσεύουν είτε απορρίπτονται είτε φυλάσσονται σε αποστειρωμένο σωλήνα (falcon) για να χρησιμοποιηθούν στην προετοιμασία τρυβλίων.

3.2.7 Προετοιμασία τρυβλίων για επιδράσεις

Στα πειράματα που διεξήχθησαν χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία χωρητικότητας 4 ml, προκειμένου να αναπτυχθούν τα κύτταρα και κατόπιν να δεχθούν επιδράσεις με χορήγηση διαφόρων χημικών ενώσεων. Βρίσκοντας την ποσότητα του εναιωρήματος που πρέπει να προστεθεί σε κάθε τρυβλίο, την τοποθετούμε σε κάθε ένα από αυτά. Έστερα, συμπληρώνουμε με θρεπτικό υλικό μέχρι τον όγκο των 4mL και τα ανακινούμε ελαφρώς με κυκλικές κινήσεις, προκειμένου η ποσότητα των κυττάρων να κατανεμηθεί ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνεια των τρυβλίων.

Αφήνουμε 0,5ml στη φλάσκα (από τελικό όγκο 5ml) και τοποθετούμε τα υπόλοιπα 4,5ml ισόποσα σε 5 τρυβλία, δηλαδή τοποθετούμε 900μL σε κάθε τρυβλίο. Αφού γίνουν τα παραπάνω, τα τρυβλία με τα κύτταρα φυλάσσονται πάλι στον κλίβανο επώασης, στους 37°C. Πριν τη διεξαγωγή οποιασδήποτε επίδρασης και εφόσον η πληρότητα της επιφάνειας των τρυβλίων σε κύτταρα είναι 80-90%, προβαίνουμε στη διαδικασία της στέρησης ορού, δηλαδή αντικαθιστούμε το θρεπτικό υλικό DMEM/10%(v/v) FBS με ισόποση ποσότητα DMEM, χωρίς την παρουσία ορού. Οι επιδράσεις που επιθυμούμε γίνονται συνήθως μετά από 24 ώρες.

3.2.8 Επιδράσεις ουσιών

Οι επιδράσεις με τις διάφορες επιθυμητές ουσίες γίνονται μετά το πέρας του απαιτούμενου χρόνου επώασης των κυττάρων σε απλό θρεπτικό χωρίς ορό, κι επιστρέφονται πάλι στον κλίβανο. Για τις επιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν υπεροξείδιο του υδρογόνου και σταυροσπορίνη. Στα πειράματα όπου οι επιδράσεις έγιναν με υπεροξείδιο του υδρογόνου, χρησιμοποιήθηκε το εν λόγω αντιδραστήριο αραιωμένο σε θρεπτικό μέσο (DMEM) με τελική συγκέντρωση 10μM 10% mMstock. Αντίστοιχες αραιώσεις έγιναν και για το αντιδραστήριο της σταυροσπορίνης, όπου η αρχική συγκέντρωση του αντιδραστήριου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10^{-3} M.

Τα τρυβλία εξάγονται από τον κλίβανο και τοποθετούνται άμεσα στον πάγο αμέσως μετά το τέλος της επίδρασης, για να τερματιστεί η κάθε αντίδραση, ενώ πάντα υπάρχει ένα τρυβλίο-μάρτυρας, στο οποίο δεν πραγματοποιείται αντίδραση.

3.2.9 Εκχύλιση πρωτεϊνών

Η μελέτη πρωτεϊνών απαιτεί λύση των κυτταρικών μεμβρανών προκειμένου ν' απελευθερωθούν οι πρωτεΐνες. Η λύση επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλων διαλυμάτων-στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ένα διάλυμα που περιέχει Tris-HCl/NaCl (RIPA buffer) αλλά και αναστολείς των πρωτεασών που εξασφαλίζουν την ακεραιότητα των πρωτεϊνών. Μετά τη λύση των κυττάρων πραγματοποιείται φυγοκέντρηση, με αποτέλεσμα να διαχωρίζεται το διάλυμα σε δύο φάσεις, στο ίζημα και στο υπερκείμενο. Το πρώτο απορρίπτεται καθώς περιέχει τις μεμβράνες των κυττάρων ενώ το δεύτερο χρησιμοποιείται καθώς περιέχει το σύνολο των πρωτεϊνών.

Η διαδικασία που αναφέρεται γίνεται σε πάγο ώστε να υπάρξει αναστολή των πρωτεασών και να διατηρηθούν ακέραιες οι πρωτεΐνες.

Συγκεκριμένα, ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- Τα τρυβλία μεταφέρονται από τον κλίβανο στον πάγο για να σταματήσει κάθε αντίδραση ενώ γίνεται ταυτόχρονη απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από αυτά.
- Ξέπλυμα των κυττάρων 2-3 φορές με κρύο, μη αποστειρωμένο PBS και τινάζονται δυνατά και διεξοδικά για να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του PBS.
- Με τη χρήση πιπέτας, προστίθενται σε κάθε τρυβλίο διάλυμα λύσης (lysis buffer).
- Γίνεται συλλογή των κυττάρων από την επιφάνεια της καλλιέργειας με τη χρήση ειδικού συλλέκτη (scraper) με κυκλικές κινήσεις.
- Μεταφέρουμε το διάλυμα που προκύπτει και περιέχει τα κύτταρα με πιπέτα σε errendorf που έχουμε αριθμήσει.
- Τα δείγματα στα errendorfs διατηρούνται στον πάγο για 15 λεπτά με παράλληλη ανακίνησή τους στο vortex.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στη φυγόκεντρο του ψυχρού θαλάμου (4°C) και φυγοκεντρούνται για 7 λεπτά στις 10.000rpm.
- Από το υπερκείμενο που προκύπτει, 2λ μεταφέρονται σε errendorfs, στα οποία υπάρχουν 98λ ddH₂O, προκειμένου να γίνει ποσοτική εκτίμηση των ολικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.

Από το υπερκείμενο που απομένει, 75λ μεταφέρονται σε ξεχωριστό errendorf, στα οποία προστίθενται 1/3 του όγκου των δειγμάτων (δηλαδή 25λ) SDS-PAGE Sample Buffer 4X [300mM Tris-HCl, pH 6.8, 13%(v/v) γλυκερόλη, 10%(w/v) SDS, 0,2%(w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης, 20%(v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη]. Η χρήση της γλυκερόλης αυξάνει το βάρος των δειγμάτων και τα βοηθά να καθιζάνουν πιο εύκολα στις θέσεις του πηκτώματος επιστοίβαξης ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη που είναι ουσία που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και το SDS που φορτίζει αρνητικά όλες τις πρωτεΐνες βοηθούν ώστε τελικά ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στο πήκτωμα να γίνει βάσει του μοριακού τους βάρους και όχι βάσει του φορτίου τους. Το SB προστίθεται για να είναι ορατά τα δείγματα κατά την ηλεκτροφόρηση. Τα δείγματα μετά την προσθήκη SB αναδεύονται με vortex και φυλάσσονται στους (-20°C) μέχρι τη στιγμή που θα ηλεκτροφορηθούν.

Διάλυμα λύσης κυττάρων (RIPA buffer)
50mM Tris-HCl pH=7.4
1% NP40
0.1% SDS
150mM NaCl
2mM EDTA
50mM NaF
0.5% Na-deoxycholate
1mM PMSF
Cocktail αναστολέων πρωτεασών

Πίνακας 3.2.1: Σύσταση διαλύματος λύσης κυττάρων (RIPA buffer)

Επειδή όμως κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ανέκυψαν κάποιες δυσκολίες εφαρμόστηκε ένα άλλο πρωτόκολλο εκχύλισης πρωτεϊνών, όπου δεν απαιτείται η χρήση ειδικού διαλύματος λύσης των κυττάρων. Συγκεκριμένα τα βήματα που ακολουθούνται μετά το πέρασ των επιδράσεων είναι τα εξής:

- Τα τρυβλία μεταφέρονται από τον κλίβανο στον πάγο για να σταματήσει κάθε αντίδραση ενώ γίνεται ταυτόχρονη απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από αυτά.
- Ξέπλυμα των κυττάρων 2-3 φορές με κρύο, μη αποστειρωμένο PBS και τινάζονται δυνατά και διεξοδικά για να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του PBS.
- Κατόπιν προστίθεται ποσότητα S.B. (3x), ικανή για να αποκολλήσει όλα τα κύτταρα από τα τοιχώματα του τρυβλίου, αλλά και για να καταστρέψει τις κυτταρικές μεμβράνες, προκαλώντας ουσιαστικά λύση.
- Γίνεται συλλογή των κυττάρων από την επιφάνεια της καλλιέργειας με τη χρήση ειδικού συλλέκτη (scraper) με κυκλικές κινήσεις.
- Μεταφέρουμε το διάλυμα που προκύπτει και περιέχει τα κύτταρα με πιπέτα σε erpendorf που έχουμε αριθμήσει.
- Τα δείγματά μας είναι έτοιμα προς αποθήκευση, στους -20°C.

3x Sample Buffer	
1M Tris-Base pH=6.8	18,75mL
Γλυκερόλη	30mL
SDS	6g
β-μερκαπταιθανόλη	9mL
Μπλε της βρωμοφαινόλης	0,03g
H ₂ O	42,25mL

Πίνακας 3.2.2: Σύσταση Sample buffer 3x

Σημείωση: Η β-μερκαπταιθανόλη προστίθεται τελευταία στο διάλυμα!

3.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ

3.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford προτάθηκε το 1975 από την ομώνυμη ερευνήτρια (Bradford M. Marion 1975). Αποτελεί μια χρωματογραφική μέθοδο, που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών που περιέχονται σε κυτταρικό εκχύλισμα. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G- 250 που περιέχεται στο αντιδραστήριο Bradford, να προσδένεται σε πρωτεΐνες, μεταβάλλοντας το μέγιστο της απορρόφησής της από τα 465 στα 595nm. Η μετατόπιση αυτή οφείλεται στη σύνδεση της χρωστικής με τις ελεύθερες αμινομάδες των πρωτεϊνών που περιέχονται στο διάλυμα. Η αλλαγή του χρώματος που παρατηρείται προκαλείται από τη σταθεροποίηση της ανιονικής μορφής της χρωστικής, χάρη στην ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων υδρόφοβης και ιοντικής φύσεως.

Η ένταση του χρώματος κι άρα η οπτική πυκνότητα συνδέονται άμεσα με την ποσότητα της περιεχόμενης στο διάλυμα πρωτεΐνης, καθώς όσο περισσότερη πρωτεΐνη υπάρχει στο διάλυμα τόσο περισσότερες είναι και οι διαθέσιμες αμινομάδες για να προσδεθεί η χρωστική, επομένως τόσο πιο έντονο είναι το χρώμα. Έτσι, η οπτική πυκνότητα και η ποσότητα πρωτεϊνών είναι μεγέθη ανάλογα, δηλαδή μεταβάλλονται ανάλογα. Με βάση αυτή τη διαπίστωση κατασκευάζεται κι η πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια της οποίας υπολογίζεται η ποσότητα πρωτεϊνών των δειγμάτων.

Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες (π.χ. η Lowry και η Biuret). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο κατά Lowry, η ποσότητα πρωτεΐνης

που πρέπει να περιέχει το δείγμα είναι 0.01–1.0 mg/mL, ποσότητα πολύ μικρή ενώ στη μέθοδο Biuret 5–160 mg/mL. Αντίθετα η μέθοδος Bradford παρέχει τη δυνατότητα να μπορεί να εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό τόσο μεγάλων όσο και μικρών ποσοτήτων πρωτεΐνης στο δείγμα. Εμφανίζει πληθώρα πλεονεκτημάτων, εξ' ου κι είναι τόσο διαδεδομένη. Κατ' αρχάς είναι πολύ απλή, γρήγορη (καθώς δε χρειάζεται επώαση), εύκολη στην εφαρμογή της και αρκετά ευαίσθητη. Επιπλέον, εμφανίζει υψηλή ειδικότητα ως προς τις πρωτεΐνες καθώς δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα σε σχέση με κοινά αντιδραστήρια και από μη πρωτεϊνικά συστατικά που υπάρχουν στα δείγματα.

Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών των δειγμάτων είναι απαραίτητη η δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Η καμπύλη αυτή κατασκευάζεται μετά από τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (Ο.Π.) γνωστών συγκεντρώσεων προτύπων διαλυμάτων αλβουμίνης ορού βοδιού (BSA, Bovine Serum Albumin, 1 mg/ml σε απιονισμένο νερό). Μια ποσότητα του δείγματος, μετά από κατάλληλη αραίωση φωτομετρείται και γίνεται σύγκριση της Ο.Π. του σε σχέση με την Ο.Π. των προτύπων. Έτσι προκύπτει η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που υπάρχουν στο εκάστοτε δείγμα. Αναλυτικά, γνωστές ποσότητες πρότυπης πρωτεΐνης BSA (0μg, 1μg, 2μg, 3μg, 4μg, 5μg, και 6μg), καθώς και τα αραιωμένα εξεταζόμενα δείγματα, αντιδρούν με 1ml αντιδραστηρίου Bradford (Bio-Rad) (**Πίνακας 3.3.1**) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου κι έπειτα μετράται η Ο.Π. στα 595 nm. Για κάθε ξεχωριστή μέτρηση δειγμάτων πρέπει να κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη.

Σωλήνας	μg BSA	V _{BSA} (μL)	V _{H2O} (μL)	Χρωστική
1(τυφλό)	0	0	100	1ml
2	1	5	95	1ml
3	2	10	90	1ml
4	3	15	85	1ml
5	4	20	80	1ml
6	5	25	75	1ml

Πίνακας 3.3.1: Σύσταση δειγμάτων για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης

3.3.2 Δοκιμασία ανοσοσύτωσης (Western blotting)

Η μέθοδος Western blotting είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για το διαχωρισμό και την ανίχνευση μιας πρωτεΐνης σε ένα μίγμα πρωτεϊνών. Προτάθηκε από τον ερευνητή Ewan Burnette (Burnette WN. 1981). Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε πήκτωμα ηλεκτροφόρησης και στη συνέχεια γίνεται η

μεταφορά αυτών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεμβράνη άρα κι οι πρωτεΐνες επωάζεται για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα με αντίσωμα ειδικό για την προς ανίχνευση πρωτεΐνη. Έπειτα, προστίθεται δευτερογενές αντίσωμα, που συνδέεται με τη σταθερή (Fc) περιοχή του πρωτογενούς. Το δευτερογενές αντίσωμα φέρει μόνιμα συζευγμένο ενεργό ένζυμο, το οποίο αντιδρά με το υπόστρωμά του κι έτσι πραγματοποιείται τελικά η ανίχνευση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

3.3.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών των δειγμάτων που έχουν προκύψει από πρωτεϊνική εκχύλιση πραγματοποιείται με κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS απορρυπαντικού-αποδιατακτικού παράγοντα (*SDS-PAGE/ Poly-Acrylamide- Gel- Electrophoresis*) (**Εικόνα 3.1**). Αυτή η μέθοδος βασίζεται στη συνθήκη κατά την οποία οι πρωτεΐνες όταν βρίσκονται σε διαφορετικό από το ισοηλεκτρικό τους σημείο pH κινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Ο ρυθμός με τον οποίο κινούνται οι πρωτεΐνες εξαρτάται από το φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα τους, και πιο συγκεκριμένα από το λόγο του φορτίου το οποίο φέρουν ως προς τη μάζα τους.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών υποβοηθείται με τις αποδιατακτικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, η παρουσία του SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, θειικό δωδεκακυλικό νάτριο) είναι απαραίτητη προκειμένου να καταστραφούν οι ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, με αποτέλεσμα την αποδιάταξη όλων των πρωτεϊνών και την απόκτηση αρνητικού φορτίου. Επομένως, ο διαχωρισμός τους γίνεται με βάση το μοριακό βάρος και όχι το φορτίο των μακρομορίων. Ταυτόχρονα, η αποδιάταξη των πρωτεϊνών ενισχύεται και με το βρασμό των δειγμάτων για 3-5 λεπτά πριν την ηλεκτροφόρηση αλλά και με τη χρήση β-μερκαπτοαιθανόλης, η οποία προκαλεί αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών. (Τα συστατικά αυτά περιέχονται στο διάλυμα κατεργασίας δειγμάτων). Επιπλέον, το διάλυμα περιέχει γλυκερόλη αλλά και μπλε της βρωμοφαινόλης, συστατικά τα οποία βοηθούν στην τοποθέτηση του δείγματος στο πήκτωμα, ενώ το δεύτερο βοηθά και στην παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Έτσι οι πρωτεΐνες που περιέχονται στα δείγματα και θέλουμε να ανιχνεύσουμε αποκτούν τυχαία διαμόρφωση (αποδιάταξη) και αρνητικό φορτίο, γεγονός που όπως αναφέρθηκε βοηθά στο να διαχωριστούν με βάση αποκλειστικά και μόνο το μοριακό τους βάρος (MB). Οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους κινούνται ταχύτερα κατά μήκος του πηκτώματος συγκριτικά με αυτές με μεγάλο μοριακό βάρος. Έτσι, ανάλογα με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που επιθυμούμε, αλλάζουμε και την συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στο πήκτωμα για να προκύψει διαφορετικό εύρος μοριακών βαρών πρωτεϊνών για το ίδιο δείγμα. Τα μακρομόρια μεγάλου MB

διαχωρίζονται σε πυκνότερα πηκτώματα ενώ αυτά με μικρό MB σε λιγότερο πυκνά πηκτώματα. Ως διαδικασία η ηλεκτροφόρηση θεωρείται γρήγορη, ευαίσθητη και με μεγάλη διαχωριστική ικανότητα.

Για το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης κατασκευάζονται δύο επιμέρους πηκτώματα:

- το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel), το οποίο διαχωρίζει τις πρωτεΐνες
- το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel), που είναι απαραίτητο για την εναπόθεση των πρωτεϊνών αλλά και την επιβράδυνση της μετακίνησής τους προς το θετικό πόλο, ώστε όλες οι πρωτεΐνες να ξεκινήσουν από το ίδιο σημείο και να αυξηθεί η διακριτική ικανότητα διαχωρισμού.

Το pH των πηκτωμάτων ρυθμίζεται από τα ρυθμιστικά διαλύματα Tris-HCl, συγκέντρωσης 1.5M και pH= 8,8 στο πήκτωμα διαχωρισμού και 1M και pH=6,8 στο πήκτωμα επιστοίβαξης.

Στην διαδικασία χρησιμοποιούμε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης και το πήκτωμα, που αποτελείται από ένα τρισδιάστατο πλέγμα μακρινών αλυσίδων πολυμερισμένης ακρυλαμίδης, σχηματίζεται ανάμεσα σε δύο γυάλινες πλάκες-τζαμάκια. Οι αλυσίδες της ακρυλαμίδης ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλένο-bis ακρυλαμίδης (MBA). Ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης και του MBA καταλύεται από υπερθειικό αμμώνιο (APS) και αυτή η διαδικασία επιταχύνεται με την παρουσία N,N,N',N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TEMED). Γι' αυτό το λόγο τα διαλύματα APS και TEMED προστίθενται στο τέλος σε σχέση με τα υπόλοιπα, λίγο πριν προστεθεί το κάθε διάλυμα στα γυάλινα πλακάκια. Επίσης, το διάλυμα APS παρασκευάζεται κάθε φορά εκ νέου. Όπως προαναφέρθηκε, ανάλογα με το μέγεθος της πρωτεΐνης που επιθυμούμε να εντοπίσουμε καθορίζεται και η συγκέντρωση του πηκτώματος διαχωρισμού. Για πρωτεΐνες μεγάλου μεγέθους (μεγάλο MB) απαιτούνται μεγαλύτεροι σε μέγεθος πόροι στο πήκτωμα ώστε να περνάνε οι πρωτεΐνες και να διακινούνται, ενώ για μικρότερου μεγέθους πρωτεΐνες απαιτούνται μικρότεροι μεγέθους πόροι. Το μέγεθος των πόρων καθορίζεται με βάση τη συγκέντρωση του πηκτώματος σε πολυακρυλαμίδη και υψηλή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιείται για μικρούς πόρους και άρα χαμηλού MB πρωτεΐνες. Στα πειράματά μας επιθυμούσαμε να εντοπίσουμε πρωτεΐνες τέτοιου μοριακού βάρους που χρησιμοποιούσαμε συνήθως πηκτώματα 10%. Το πήκτωμα επιστοίβαξης ωστόσο έχει διαφορετική συγκέντρωση ακρυλαμίδης αλλά και διαφορετικό pH, έτσι ώστε να γίνει ομοιόμορφη είσοδος των πρωτεϊνών στο πήκτωμα διαχωρισμού. Παράλληλα, προστίθεται και ρυθμιστικό διάλυμα (Running Buffer) κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης, το οποίο βοηθά στην ανάλυση των πρωτεϊνών. Ταυτόχρονα με τα δείγματα, ηλεκτροφορείται και μίγμα πρωτεϊνών με γνωστά μοριακά βάρη (markers), που χρησιμεύει, αφενός για να παρακολουθείται η πορεία της ηλεκτροφόρησης και αφετέρου, για να αναγνωρίζεται ευκολότερα μια πρωτεΐνη του δείγματος της οποίας γνωρίζουμε το μοριακό βάρος, ή να

προσδιορίζεται κατά προσέγγιση το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης όταν αυτό δεν είναι γνωστό.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για την ηλεκτροφόρηση είναι η κάτωθι:

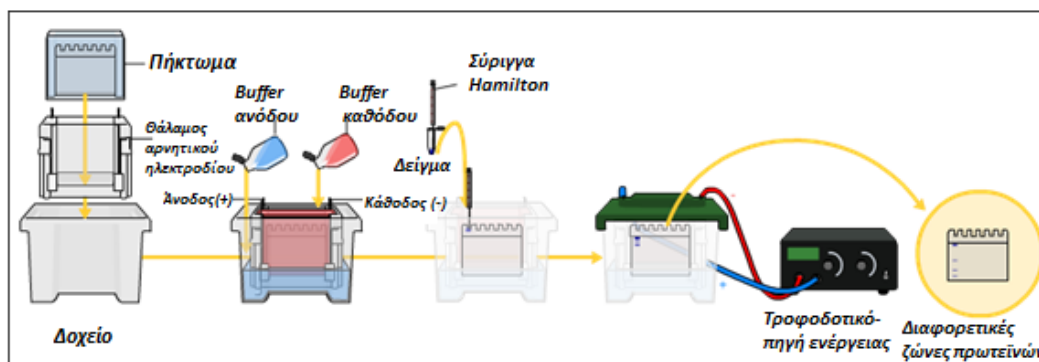
- 1) Παρασκευάζεται διάλυμα APS 10% (w/v).
- 2) Οι γυάλινες πλάκες καθαρίζονται προσεκτικά με μεθανόλη και τοποθετούνται σε κατάλληλη συσκευή στήριξης.
- 3) Συναρμολογείται η συσκευή στήριξης του πηκτώματος.
- 4) Παρασκευάζεται το διάλυμα διαχωρισμού (separating gel) και προστίθεται στο κενό ανάμεσα σ
- 5) τις δύο γυάλινες πλάκες μέχρι ενός σημείου και στη συνέχεια συμπληρώνεται το υπόλοιπο κενό με ddH₂O (ή ισοπροπανόλη, η οποία βοηθά στον καλύτερο διαχωρισμό των δύο φάσεων του πηκτώματος) για να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων, με τη χρήση πιπέτας Pasteur. Μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος, απομακρύνεται η περίσσεια ddH₂O(ή) και μετά από ξέπλυμα, το κενό ανάμεσα στις πλάκες στεγνώνεται με τη βοήθεια ειδικού απορροφητικού χαρτιού.
- 6) Παρασκευάζεται το διάλυμα επιστοίβαξης (stacking gel) και τοποθετείται στο κενό που έχει απομείνει, με τη χρήση πιπέτας ή πιπέτας Pasteur. Ταυτόχρονα, όσο ακόμη είναι υγρό το διάλυμα τοποθετείται ειδική οδοντωτή χτένα, με τη βοήθεια της οποίας σχηματίζονται οι ειδικές θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων. Η διαδικασία απαιτεί προσοχή για να αποφευχθεί ο εγκλωβισμός φυσαλίδων μέσα στο πήκτωμα.
- 7) Μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος, οι πλάκες απομακρύνονται από τη συσκευή στήριξης και τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- 8) Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετείται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (RB) (όγκου ~900ml), έτσι ώστε να καλυφθούν πλήρως τα πηκτώματα.
- 9) Φορτώνονται τα δείγματα και οι πρωτεϊνικοί δείκτες με τη χρήση ειδικής μικροσύριγγας Hamilton των 50μl στα ειδικά πηγαδάκια και συνήθως στην πρώτη θέση τοποθετούνται οι δείκτες. Ανάμεσα στη φόρτωση απαιτούνται ξεπλύματα της σύριγγας με ddH₂O για να μην υπάρχει ανάμειξη των δειγμάτων.
- 10) Συνδέεται η συσκευή με το τροφοδοτικό και ξεκινά η διαδικασία σε σταθερή τάση 110Volt. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί μέχρι να φύγει τελείως το μέτωπο της χρωστικής των δειγμάτων από το πήκτωμα (Ο αντίστοιχος χρόνος είναι 1h και 50').
- 11) Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, αποσυνδέεται το τροφοδοτικό και απορρίπτεται το ρυθμιστικό διάλυμα, οι γυάλινες πλάκες αφαιρούνται από τη συσκευή στήριξης και αποκολλώνται μεταξύ τους με τη χρήση ειδικής σπάτουλας.
- 12) Το πήκτωμα επιστοίβαξης κόβεται με τη χρήση κατάλληλης σπάτουλας κι αφαιρείται.

Αντιδραστήρια	Όγκοι για πήκτωμα διαχωρισμού 10% ($V_{sep} = 10\text{mL}$)	Όγκοι για πήκτωμα διαχωρισμού 12% ($V_{sep} = 10\text{mL}$)	Όγκοι για πήκτωμα διαχωρισμού 15% ($V_{sep} = 10\text{mL}$)
H ₂ O	4mL	3,33mL	2,3mL
Δις- ακρυλαμίδα (30%)	3,33mL	4mL	5mL
Tris/HCl pH 8,8 (1,5 M)	2,5mL	2,5mL	2,5mL
SDS 10%	0,1mL	0,1mL	0,1mL
APS 10%	75μL	0,1mL	0,1mL
TEMED	10μL	10μL	10μL

Πίνακας 3.3.2: Σύσταση πηκτωμάτων διαχωρισμού (separating gels) 10% και 15%

Αντιδραστήρια	Όγκοι για πήκτωμα επιστοίβαξης ($V_{stacking} = 5\text{mL}$)
H ₂ O	3,3mL
Δις- ακρυλαμίδα (30%)	1mL
Tris/HCl pH 6,8 (1 M)	0,625mL
SDS 10%	0,05mL
APS 10%	25μL
TEMED	10μL

Πίνακας 3.3.3: Σύσταση πηκτώματος επιστοίβαξης (stacking gel)



Εικόνα 3.1: Κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS απορρυπαντικού-αποδιατακτικού παράγοντα (en.wikipedia.org)

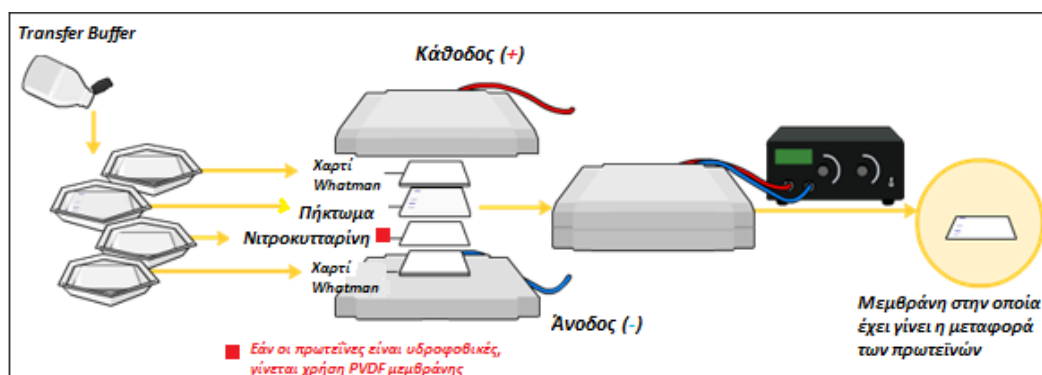
3.3.4 Ημίστεγνη μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού των πρωτεϊνών, ακολουθεί το βήμα της μεταφοράς τους από το πήκτωμα της ακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Κι αυτή η διαδικασία γίνεται με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου. Το αποτέλεσμα είναι η αποτύπωση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη όπως ακριβώς έχουν διαχωριστεί από την ηλεκτροφόρηση. Η διαδικασία λέγεται ημίστεγνη, καθώς όλη η διαδικασία πραγματοποιείται μέσω διαβροχής των εμπλεκόμενων στη μεταφορά συστατικών και όχι μέσω της κάλυψής τους με το διάλυμα μεταφοράς. Θεωρείται σημαντική, καθώς παρέχει τη δυνατότητα της ανοσοεντόπισης πάνω σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, γεγονός που δεν είναι εφικτό πάνω στο πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης. Πιο αναλυτικά, οι πρωτεΐνες συνδέονται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς με τη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης και έτσι η μεμβράνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω δοκιμασίες καθώς τα μακρομόρια που βρίσκονται στην επιφάνειά της μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια διαλυμάτων με τα οποία έρχονται σε επαφή. Αντίθετα, στην περίπτωση του πολυακρυλαμίδικού πηκτώματος οι πρωτεΐνες είναι μέσα στο πλέγμα και δε μπορούν να αντιδράσουν.

Τα βήματα που ακολουθούνται στην μέθοδο της ημίστεγνης μεταφοράς είναι τα ακόλουθα:

- 1) Κόβονται οκτώ χαρτιά Whatman (διαστάσεων συνήθως 7x9 cm) κι ένα κομμάτι νιτροκυτταρίνης διαστάσεων 6x8 cm και τοποθετούνται σε δοχείο με διάλυμα μεταφοράς (TB), περίπου 15 λεπτά πριν το πέρας της ηλεκτροφόρησης, προκειμένου να διαβραχούν.
- 2) Ένα χαρτί Whatman τοποθετείται στην κάτω πλευρά της συσκευής και με τη χρήση ενός μικρού γυάλινου δοκιμαστικού σωλήνα αφαιρούνται τυχόν φυσαλίδες που είναι εγκλωβισμένες μεταξύ του χαρτιού και της συσκευής.
- 3) Τέσσερα χαρτιά Whatman τοποθετούνται ακριβώς πάνω από το πρώτο και στο τέταρτο πριν την τοποθέτηση της νιτροκυτταρίνης ξαναχρησιμοποιούμε τον σωλήνα.
- 4) Τοποθετείται με μεγάλη προσοχή η νιτροκυτταρίνη με τη χρήση «σπάτουλας» πάνω στα χαρτιά Whatman και στη συνέχεια τοποθετείται το πήκτωμα με προσοχή. Γίνονται οι κατάλληλοι χειρισμοί ώστε να εξαφανιστούν τυχόν φυσαλίδες και στη συνέχεια τοποθετούνται άλλα τέσσερα χαρτιά Whatman με αντίστοιχη χρήση του δοκιμαστικού σωλήνα.
- 5) Διαβρέχεται η επιφάνεια της ανόδου για να κλείσει το κύκλωμα και γίνεται σύνδεση της συσκευής με το τροφοδοτικό. Η διαδικασία ξεκινά και διαρκεί μία ώρα υπό σταθερή τάση 12V.
- 6) Με το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη κόβεται ακριβώς στο σχήμα του πηκτώματος και σημαδεύεται στις ζώνες των markers με τη χρήση νυστεριού.

- 7) Ακολουθούν ξεπλύματα της νιτροκυτταρίνης (τουλάχιστον 2x10 και 2x5 λεπτά) με διάλυμα TBS-T
- 8) Γίνεται χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα χρωστικής ρονσέου για να διαπιστωθεί αν έχει γίνει σωστά η μεταφορά. Αντίστοιχα, το πήκτωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για χρώση με τη χρωστική Coomassie brilliant blue.



Εικόνα 3.2: Ημίστεγνη μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (en.wikipedia.org)

3.3.5 Χρώση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με χρωστική Ponceau

Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών, ακολουθεί η χρώση της μεμβράνης με τη χρωστική Ponceau, διαδικασία που διαρκεί περίπου 10 λεπτά. Αναλυτικά, η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό δοχείο και καλύπτεται με τη χρωστική με χρήση πιπέτας Pasteur. Μετά το πέρας του χρόνου, γίνεται έκπλυση με διάλυμα TBS (Tris-based saline) – 0,05% (v/v) Tween (TBS-T) για μερικό αποχρωματισμό της. Μετά τον σχετικό αποχρωματισμό της μεμβράνης, μπορούμε να διακρίνουμε τις ζώνες των πρωτεϊνών. Στο στάδιο αυτό η μεμβράνη είτε φωτογραφίζεται είτε σαρώνεται με τη χρήση μηχανήματος σάρωσης για να αποτυπωθεί η εικόνα των ζωνών. Ακολουθούν περαιτέρω πλύσεις με διάλυμα TBS-T ώστε να επιτευχθεί ο πλήρης αποχρωματισμός της μεμβράνης, που καθιστά τη μεμβράνη ικανή για περαιτέρω μελέτη, δηλαδή για ανάλυση κατά Western. Με το τέλος της διαδικασίας η χρωστική επιστρέφεται στο δοχείο της.

Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής να προσδένεται σε πολυπεπίδια. Αποτελεί ένα τρόπο ελέγχου για το αν επετεύχθη η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Η χρώση αυτή, σε αντίθεση με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue, δεν είναι μόνιμη, άρα η μεμβράνη μπορεί να

αποχρωματιστεί εύκολα και να επαναχρησιμοποιηθεί. Η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές.

3.3.6 Ανοσοδοκιμασία κατά Western (Western Blot)

Αφού επιβεβαιώσουμε τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, ακολουθεί ο εντοπισμός της εκάστοτε πρωτεΐνης-στόχου πάνω σε αυτήν με τη χρήση ειδικού αντισώματος. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην υψηλή ειδικότητα που εμφανίζει ένα αντίσωμα ως προς την ικανότητά σύνδεσης με ένα αντιγόνο, εν προκειμένω με μια πρωτεΐνη. Χάρη στη σύγχρονη τεχνολογία παρασκευής αντισωμάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί ειδική ανίχνευση πρωτεϊνών ακόμη και όταν αυτές διαφέρουν ελάχιστα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των πρωτεϊνών που ανήκουν στην ίδια οικογένεια, ή αυτών που διαφέρουν μόνο στη φωσφορυλίωσή τους σε κάποιο αμινοξικό κατάλοιπο. Για να γίνει ανίχνευση συγκεκριμένης πρωτεΐνης-στόχου απαιτείται η κάλυψη των μη-ειδικών θέσεων δέσμευσης των αντισωμάτων, των πρωτεϊνών που έχουν μεταφερθεί πάνω στη νιτροκυτταρίνη. Έτσι η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα δέσμησης μη ειδικών θέσεων (blocking). Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται είτε με 5% (w/v) λυοφιλιωμένο αποβουτυρωμένο γάλα διαλυμένο σε TBS-T (10ml σε σακουλάκι για μία μεμβράνη, 50 ml σε δοχείο) είτε με 1% BSA σε ίδιες ποσότητες TBS-T και η μεμβράνη επωάζεται με αυτό το διάλυμα για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ενώ ταυτόχρονα αναδεύεται με ειδικό μηχανήμα. Στη συνέχεια γίνονται εκπλύσεις της μεμβράνης (2x10 και 2x5 λεπτά) με TBS-T 5% (v/v) και ακολουθεί ολονύκτια επώαση της μεμβράνης με διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος, αραιώσης 1:1000, σε 5% (w/v) BSA διαλυμένο σε TBS-T (2ml συνολικά για κάθε μεμβράνη) στους 4°C υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της επώασης, δηλαδή την επόμενη μέρα, αφαιρείται το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο φυλάσσεται για μελλοντική επαναχρησιμοποίηση, γίνονται ξεπλύματα με TBS-T 5% (v/v) (2x10, 2x5 λεπτά), ενώ η μεμβράνη επωάζεται με το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος (αναγνωρίζει τμήμα του πρωτογενούς αντισώματος) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση. Το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος, αραιώσης 1:5000, παρασκευάζεται με λυοφιλιωμένο αποβουτυρωμένο γάλα 1% διαλυμένο σε TBS-T 5% (v/v) (5 ml ανά μεμβράνη) και απορρίπτεται μετά τη μία χρήση. Ακολουθούν ξεπλύματα της μεμβράνης με TBS-T 5% (v/v) (2x10, 2x5 λεπτά). Όλα τα ξεπλύματα γίνονται σε ειδικό μηχανήμα ανάδευσης.

Επομένως, στη μεμβράνη όπου έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες από τα δείγματα, έχει συνδεθεί το πρωτογενές αντίσωμα με την πρωτεΐνη-στόχο και πάνω στο πρωτογενές έχει συνδεθεί το δευτερογενές αντίσωμα, που είναι συζευγμένο με

υπεροξειδάση (HPR) και που αναγνωρίζει ένα τμήμα του πρωτογενούς αντισώματος. Η ανοσοεντόπιση ολοκληρώνεται με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

3.3.7 Εμφάνιση

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών με τα αντισώματα γίνεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL- Enhanced ChemiLuminescence), η οποία βασίζεται στο φαινόμενο της φωταύγειας. Συγκεκριμένα, βασίζεται στην εκπομπή φωτεινής ακτινοβολίας μέσω μιας χημικής αντίδρασης και στην αποτύπωση των φωτονίων που εκπέμπονται. Σύμφωνα με τη χημειοφωταύγεια, μια χημική αντίδραση προκαλεί τη διέγερση για αυτήν την εκπομπή φωτός. Ένα από τα γνωστότερα συστήματα για την παραγωγή χημειοφωταύγειας είναι αυτό της υπεροξειδάσης (horse radish peroxidase-HRP)/υπεροξειδίου (H_2O_2), το οποίο καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης σε αλκαλικές συνθήκες. Η οξείδωση της λουμινόλης οδηγεί το μόριο σε διεγερμένη κατάσταση. Η λουμινόλη όμως δε διατηρείται σε αυτή την κατάσταση για μεγάλο χρονικό διάστημα και μεταπίπτει στη βασική, εκπέμποντας φως. Η ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL) γίνεται παρουσία χημικών ενισχυτών, όπως είναι οι φαινόλες. Η ακτινοβολία που εκπέμπεται αποτυπώνεται είτε ως εικόνα στην οθόνη του υπολογιστή είτε πάνω σε κατάλληλο φωτογραφικό φιλμ. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται είναι το ECL που αποτελείται από δύο αντιδραστήρια, το διάλυμα 1 που περιέχει υπεροξείδιο (υπόστρωμα για το ένζυμο ιχνηθέτη που βρίσκεται συζευγμένο στο δεύτερο αντίσωμα) και το διάλυμα 2 που περιέχει λουμινόλη και ενισχυτή της χημειοφωταύγειας. Τα αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται σε αναλογία 1:1 κι αναμιγνύονται πριν την χρήση.

Το σήμα που προέρχεται από τον υβριδισμό ανιχνεύεται, αναλύεται και μετράται μέσω ειδικής συσκευής ανίχνευσης φωτός, που είναι συνδεδεμένη με ένα οπτικό μικροσκόπιο και με έναν υπολογιστή (*Alpha innotech*), μέσω του οποίου θα γίνει ποσοτική ανάλυση των δεδομένων. Γενικά, το σύστημα για την ανίχνευση θετικών σημάτων μετά από *in situ* υβριδοποίηση λειτουργεί σε τρία στάδια: πρώτον οι δομές ιστών και κυττάρων καταγράφονται σε μεταδιδόμενο φως, το σήμα φωταύγειας μετράται και στη συνέχεια, μετά από επεξεργασία μέσω υπολογιστή, λαμβάνουμε μια επικάλυψη των δύο εικόνων στην οθόνη, που προκύπτει από το εκπεμπόμενο και το απορροφούμενο φως και τέλος αξιολογείται το αποτέλεσμα. Τα κύρια πλεονεκτήματα της χημειοφωταύγειας είναι κυρίως η ευαισθησία, η δυνατότητα ποσοτικοποίησης των δεδομένων, η αντικειμενικότητα αξιολόγησης κι η ψηφιακή απεικόνιση των αποτελεσμάτων.

Στην περίπτωση που επιθυμούμε το αποτέλεσμα να ληφθεί σε ηλεκτρονική μορφή ακολουθούμε τα εξής βήματα:

- 1) Η μεμβράνη που έχει επωαστεί με το πρωτογενές και το δευτερογενές αντίσωμα σκουπίζεται από την περίσσεια TBS-T και στη συνέχεια επωάζεται με το αντιδραστήριο ECL σε αναλογία 1:1 (Διάλυμα 1 και Διάλυμα 2) , για 5-10 λεπτά υπό την απουσία φωτός.
- 2) Η μεμβράνη σκουπίζεται ελαφρώς από την περίσσεια ECL και τοποθετείται σε μια ζελατίνα.
- 3) Η ζελατίνα με τη μεμβράνη τοποθετείται στο ειδικό μηχάνημα εμφάνισης.
- 4) Ρυθμίζουμε τις παραμέτρους(χρόνος έκθεσης/ ποιότητα έκθεσης) από την οθόνη του υπολογιστή (Συνήθως ο χρόνος εμφάνισης ήταν 10 λεπτά)
- 5) Πατάμε OK όταν είμαστε έτοιμοι κι αναμένουμε να εμφανιστεί το αποτέλεσμα στην οθόνη.
- 6) Αποθηκεύουμε την εικόνα που εμφανίζεται προκειμένου να την επεξεργαστούμε αργότερα με κατάλληλα λογισμικά προγράμματα.

Με βάση το σήμα που λαμβάνεται, καθίσταται δυνατό να προσδιοριστεί και ποσοτικά και ποιοτικά η πρωτεΐνη που μελετάται και έτσι να διεξαχθούν συμπεράσματα για την έκφραση ή μη της πρωτεΐνης κάθε φορά.

3.3.8 Αποκόλληση ανοσοσυμπλόκων από τη νιτροκυτταρίνη (Stripping)

Πολλές φορές στην ίδια μεμβράνη επιθυμούμε να μελετήσουμε την έκφραση περισσοτέρων της μίας πρωτεΐνης ή τμημάτων της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Αυτή η δυνατότητα δίνεται με τη μέθοδο της αποκόλλησης ανοσοσυμπλόκων από τη νιτροκυτταρίνη και προσδιορίζεται με τον αγγλικό όρο stripping. Με αυτή τη μέθοδο είναι δυνατή η αφαίρεση των αντισωμάτων από μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η επαναχρησιμοποίηση της μεμβράνης με έκθεση σε διαφορετικό πρωτογενές αντίσωμα. Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί έναν τρόπο εξοικονόμησης χρόνου κι αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιείται κυρίως στην περίπτωση που είναι αναγκαία η ανίχνευση πρωτεϊνών με παραπλήσια μοριακά βάρη στην ίδια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- 1) Παρασκευή του διαλύματος αποκόλλησης και προσθήκη στη μεμβράνη (Σε μία μεμβράνη αντιστοιχεί όγκος διαλύματος αποκόλλησης ανοσοσυμπλόκων ίσος με 20mL).
- 2) Επώαση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης στο διάλυμα αφαίρεσης του αντισώματος σε ειδικό καλυπτόμενο σκεύος στο υδατόλουτρο στους 40°C για 15 λεπτά και διακοπή για ανάδευση 1 λεπτού. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται για μία ώρα.

- 3) Αφού αφαιρεθεί το διάλυμα stripping (4x10λεπτά πλύσεις με TBST), η νιτροκυτταρίνη μπορεί να επωαστεί και πάλι με πρωτογενές αντίσωμα ολονύχτια.

Διάλυμα αποκόλλησης αντισωμάτων (stripping buffer)	
60 mM Tris-HCl pH 6.8	1,514g
7% β-μερκαπταιθανόλη	15μL/20mL stripping buffer
2% SDS (αρχικό διάλυμα 10% w/v)	40mL
ddH ₂ O	200mL

Πίνακας 3.3.4 : Σύσταση διαλύματος αποκόλλησης

3.4 Χρήση λογισμικών προγραμμάτων για επεξεργασία και παρουσίαση αποτελεσμάτων

Τα ακόλουθα προγράμματα χρησιμοποιήθηκαν για επεξεργασία και για παρουσίαση των αποτελεσμάτων:

- Image J για την εμφάνιση και την επεξεργασία των εικόνων από το μικροσκόπιο φθορισμού.
- Adobe Photoshop CC 2015 για την επεξεργασία των εικόνων
- Microsoft Office Excel 2010 για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και το σχεδιασμό γραφημάτων.
- Microsoft Office Word 2010 για τη συγγραφή της διπλωματικής εργασίας

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

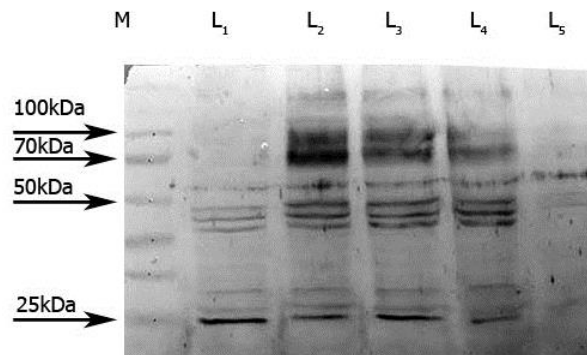
Το πειραματικό μέρος της συγκεκριμένης διπλωματικής αποτελείτο από δύο σκέλη, όπου στο μεν πρώτο εξετάστηκε αν η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς όντως εκφράζεται σε καρδιακά κύτταρα κι ιστούς υπό συνθήκες επαγόμενου από τη χρήση υπεροξειδίου του υδρογόνου οξειδωτικού στρες, ενώ στο δεύτερο σκέλος, μετά την απόδειξη πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκφράζεται στη καρδιά, μελετήθηκε η έκφρασή της υπό την επίδραση άλλων οξειδωτικών παραγόντων και συγκεκριμένα της σταυροσπορίνης.

Κατά το τρίμηνο Οκτώβριος-Δεκέμβριος τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της κυρίας Βασιλακοπούλου, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του Τομέα Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας. Στο πλαίσιο αυτών των πειραμάτων εξετάσαμε το πρότυπο έκφρασης της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε κύτταρα τόσο νευρικής προέλευσης (SY5Y) όσο και καρδιακής προέλευσης (H9c2). Στο διάστημα Φεβρουάριος-Ιούλιος τα πειράματα εκπονήθηκαν στο εργαστήριο της κυρίας Γαϊτανάκη, Καθηγήτριας του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, όπου σε συνέχεια των προηγούμενων πειραμάτων επαναλήφθηκαν πειράματα σε κυτταροκαλλιέργειες όπου είχε προκληθεί επαγόμενο οξειδωτικό στρες, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση του χρόνου έκθεσης σε τέτοιες συνθήκες στα επίπεδα της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε και σταυροσπορίνη, ένας άλλος οξειδωτικός παράγοντας, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδρασή της στους καρδιακούς μυοβλάστες, με αυξανόμενη συγκέντρωση και με αυξανόμενο χρόνο επώασης.

4.1 Επίδραση H_2O_2

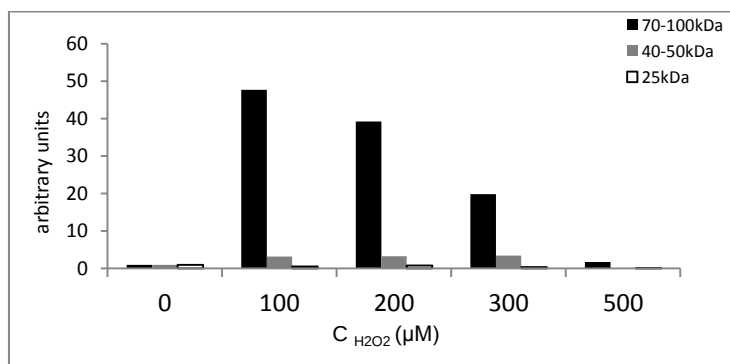
4.1.1 Επίδραση H_2O_2 και συγκέντρωση επώασης

Προκειμένου να εντοπίσουμε πιθανές διαφορές στην έκφραση της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς στην κυτταρική σειρά H9c2 σε σχέση με το ήδη γνωστό από προηγούμενα πειράματα, που έχουν γίνει στο εργαστήριο της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Κας Βασιλακοπούλου Διδούς, πρότυπο πρωτεόλυσης που παρουσιάζουν τα SY5Y(κύτταρα νευροβλαστώματος). Συγκεκριμένα το πρότυπο πρωτεόλυσης στα νευρικά κύτταρα είναι αυτό της εικόνας 4.1:



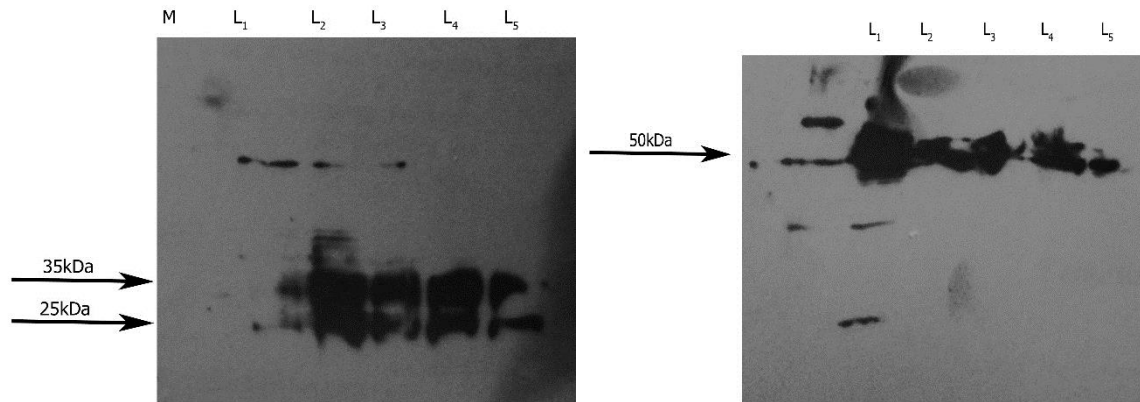
Εικόνα 4.1: Απεικόνιση θραυσμάτων της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε κύτταρα SY5Y μέσω ανοσοσύτωσης Western σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επώασης με H_2O_2 , μετά από χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει τον επίτοπο του Αβ-πεπτιδίου

Στην εικόνα 4.1 απεικονίζεται η μεταβολή της έκφρασης θραυσμάτων της APP, τα οποία αναγνωρίζουν τον επίτοπο του Αβ-πεπτιδίου, γεγονός που διαπιστώνεται με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του οξειδωτικού παράγοντα H_2O_2 . (L_1 :control, L_2 :100 μ M, L_3 :200 μ M, L_4 :300 μ M, L_5 :500 μ M) Παρατηρούμε, λοιπόν, αύξηση των θραυσμάτων στις συγκεντρώσεις 100 και 200 μ M, με τη συγκέντρωση 100 μ M να δείχνει συσσώρευση θραυσμάτων 70-100kDa, τα οποία αυξανόμενης της συγκέντρωσης φαίνεται πως διασπώνται περαιτέρω με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων θραυσμάτων M.B. 25kDa.



Διάγραμμα 4.1: Ποσοτική απεικόνιση της μεταβολής θραυσμάτων της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε κύτταρα SY5Y στις διαφορετικές συγκεντρώσεις επώασης με H_2O_2

Εφόσον λοιπόν διαπιστώσαμε το πρότυπο ζώνωσης του Αβ-πεπτιδίου στην κυτταρική σειρά SY5Y προχωρήσαμε στη μελέτη του προτύπου πρωτεόλυσης της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε καρδιακά κύτταρα H9c2. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στις εικόνες 4.2 και 4.3:

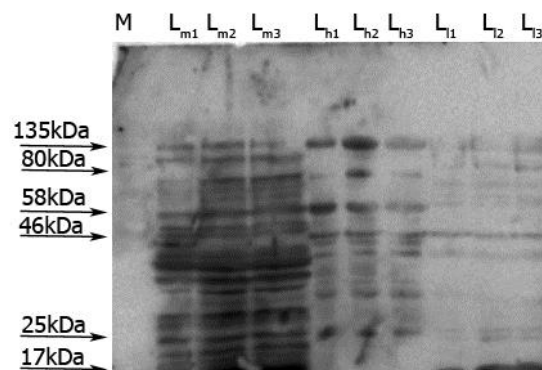


Εικόνα 4.2 (αριστερά): Απεικόνιση θραυσμάτων της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε κύτταρα SY5Y μέσω ανοσοσύτωσης Western σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επώασης με H₂O₂, μετά από χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει τον επίτοπο του Αβ-πεπτιδίου ,

Εικόνα 4.3 (δεξιά): Απεικόνιση θραυσμάτων της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε κύτταρα H9c2 μέσω ανοσοσύτωσης Western σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επώασης με H₂O₂, μετά από χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει τον επίτοπο του Αβ-πεπτιδίου

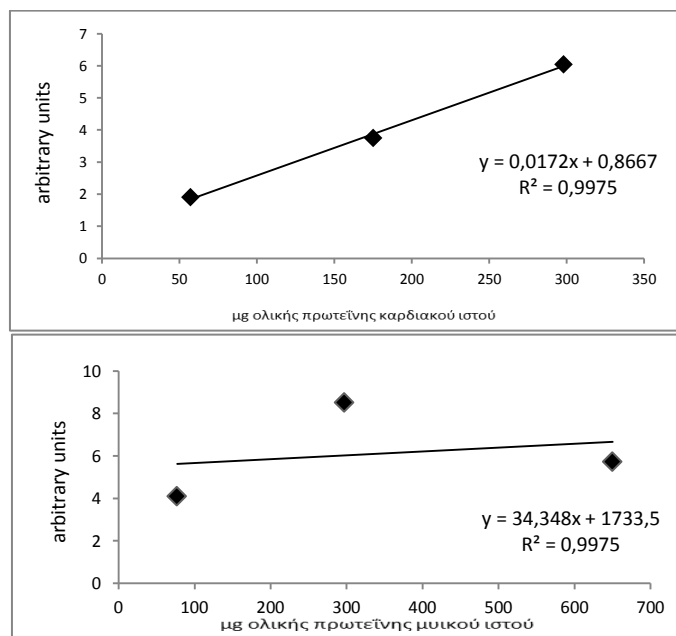
Από τις εικόνες 4.2 και 4.3 φαίνεται πως η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς στις δύο κυτταρικές σειρές (SY5Y και H9c2) ακολουθεί διαφορετικό πρότυπο πρωτεόλυσης.

Επίσης πέραν της κυτταροκαλλιέργειας δοκιμάσαμε την απομόνωση ιστού από διάφορα όργανα του ζώου που θυσιάσαμε, ο οποίος κατόπιν ομογενοποιήθηκε. Χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες ποσότητες πρωτεΐνης από μυϊκό, καρδιακό και ηπατικό ιστό βατράχου. Το αποτέλεσμα συνοψίζεται στην εικόνα 4.4:

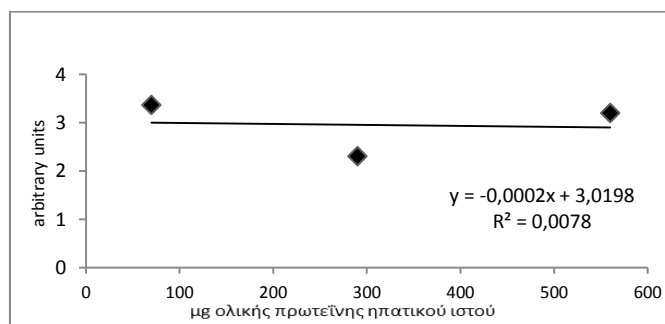


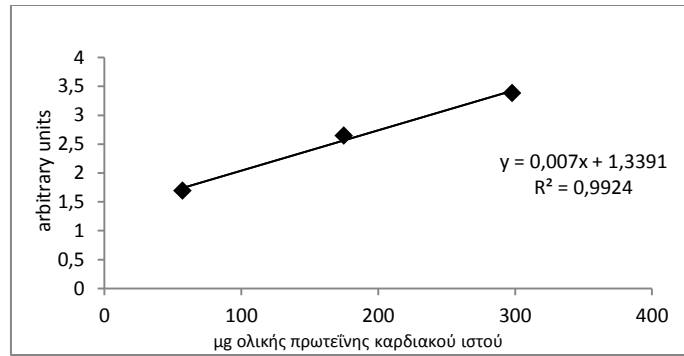
Εικόνα 4.4: Απεικόνιση πρωτεολυτικής διάσπασης της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε δείγματα από ιστούς βατράχου μέσω ανοσοσύτωσης Western με αυξανόμενη ποσότητα πρωτεΐνης.

Από την εικόνα 4.4 βλέπουμε πως αυξανόμενη της ποσότητας πρωτεΐνης που εμπεριέχεται εντός του δείγματος (L_{m1} , L_{m2} , L_{m3} :αντιστοιχούν στα δείγματα που προέρχονται από το μυϊκό ιστό του ζώου L_{h1} , L_{h2} , L_{h3} : αντιστοιχούν στα δείγματα που προέρχονται από τον καρδιακό ιστό του ζώου L_{l1} , L_{l2} , L_{l3} :αντιστοιχούν στα δείγματα που προέρχονται από τον ηπατικό ιστό) αυξάνεται κι η ποσότητα των αμυλοειδογενών θραυσμάτων που προκύπτουν, δηλαδή των θραυσμάτων που περιέχουν τον επίτοπο του Αβ-πεπτιδίου.

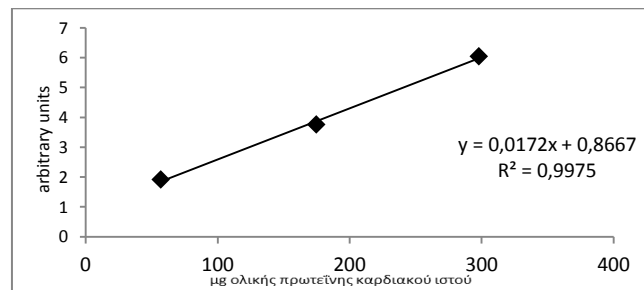
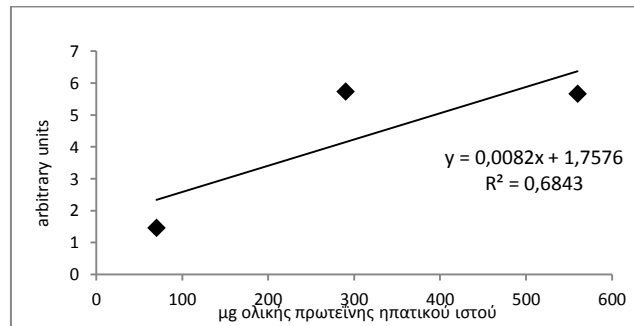


Απεικόνιση μεταβολής του πρωτεολυτικού θραύσματος 80kDa σε καρδιακό (Διάγραμμα 4.2(πάνω)) και σε μυϊκό ιστό (Διάγραμμα 4.3 (κάτω))





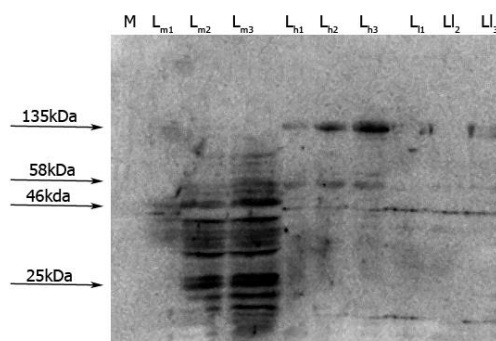
Διαγράμματα απεικόνισης μεταβολής του θραύσματος ~50kDa της APP σε ηπατικό (Διάγραμμα 4.4(πάνω)) και σε καρδιακό ιστό (Διάγραμμα 4.5 (κάτω))



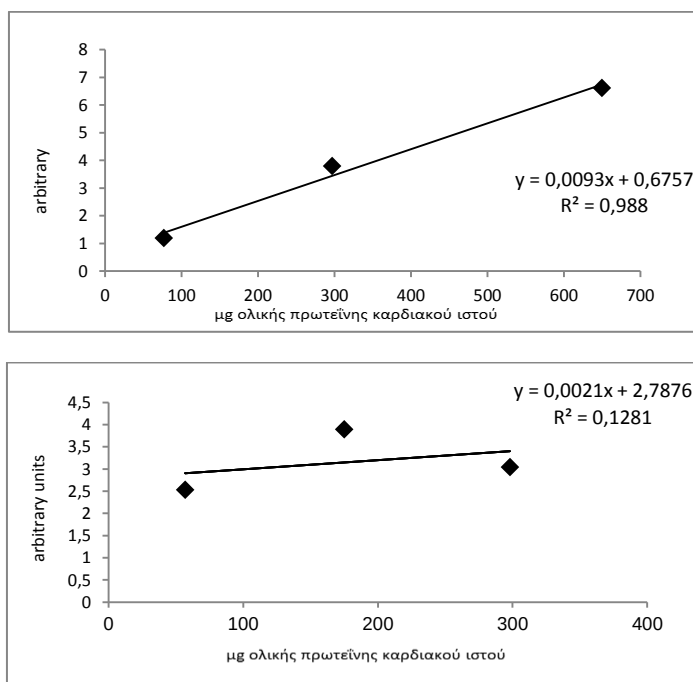
Διαγράμματα απεικόνισης μεταβολής του τμήματος της APP με μοριακό βάρος 20kDa σε ηπατικό (Διάγραμμα 4.6(πάνω)) και σε καρδιακό ιστό (Διάγραμμα 4.7 (κάτω))

Από τα διαγράμματα 4.4, 4.5, 4.6 και 4.7 φαίνεται πως ο καρδιακός ιστός εμφανίζει ξεκάθαρη θετική συσχέτιση μεταξύ ολικής πρωτεΐνης και Αβ-πεπτιδίου και καρβοξυτελικού θραύσματος, δηλαδή αυξανόμενης της ποσότητας πρωτεΐνης του δείγματος αυξάνονται και τα επίπεδα των εν λόγω θραυσμάτων, άρα μιλάμε για συσσώρευσή τους. Όσον αφορά στο μυικό και τον ηπατικό ιστό δεν είναι ξεκάθαρο αν υπάρχει θετική ή αρνητική συσχέτιση μεταξύ της ολικής πρωτεΐνης και του θραύσματος με τα συγκεκριμένα M.B.

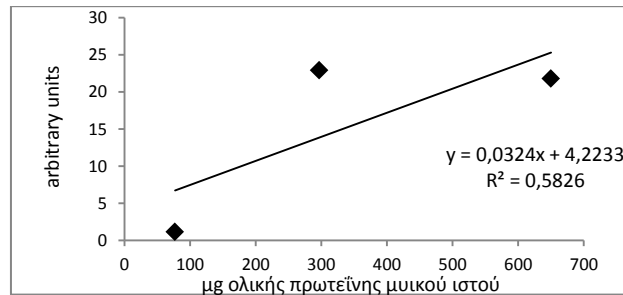
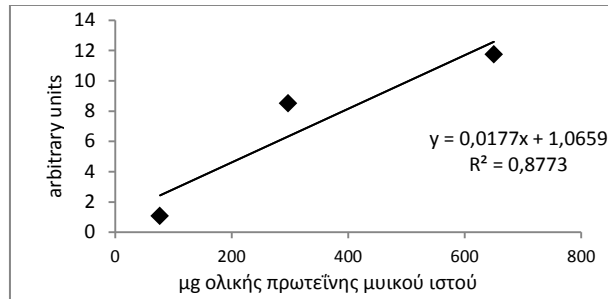
Στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση τόσο του καρβοξυτελικού άκρου όσο και του αμινοτελικού άκρου, χρησιμοποιώντας την ίδια μεμβράνη (εφαρμόστηκε ουσιαστικά η μέθοδος αποκόλλησης πρωτεϊνικών συμπλόκων). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 4.5.



Εικόνα 4.5: Πρότυπο θραυσματοποίησης της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς σε δείγματα διαφορετικών ιστών βατράχου μέσω ανοσοσύτωσης Western με αυξανόμενη ποσότητα πρωτεΐνης.



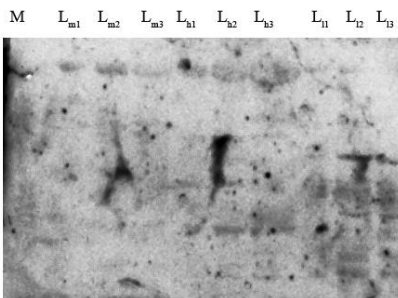
Διαγράμματα απεικόνισης μεταβολής του θραύσματος 80kDa (**Διάγραμμα 4.8(πάνω)**) και της ζώνης ~50kDa (**Διάγραμμα 4.9 (κάτω)**) σε καρδιακό ιστό με τη χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού τμήματος της APP.



Απεικόνιση μεταβολής του θραύσματος μοριακού βάρους 30-46kDa (**Διάγραμμα 4.10(πάνω)**) και του θραύσματος ~25kDa (**Διάγραμμα 4.11 (κάτω)**) σε μυϊκό ιστό με τη χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού τμήματος της APP.

Από τα διαγράμματα 4.8, 4.9, 4.10 και 4.11 μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα πως υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της ολικής πρωτεΐνης και του καρβοξυτελικού θραύσματος της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς, ανεξαρτήτως του ιστού. Δηλαδή αύξηση της ποσότητας του δείγματος συνεπάγεται και συσσώρευση του καρβοξυτελικού τμήματος ενδοκυτταρικά.

Τέλος μετά από εφαρμογή της μεθόδου του stripping και την επανεπώαση της μεμβράνης με αντίσωμα έναντι του αμινοτελικού θραύσματος της APP το αποτέλεσμα που πήραμε φαίνεται στην εικόνα 4.6.

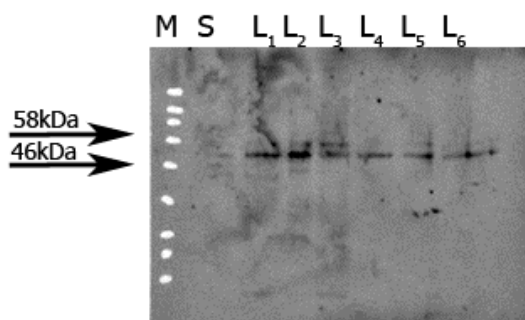


Εικόνα 4.6: Απεικόνιση θραυσμάτων της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς μετά από χρήση αντισώματος έναντι του αμινοτελικού τμήματος μέσω ανοσοσύτωσης Western σε δείγματα διαφορετικών ιστών βατράχου αυξανόμενης ποσότητας πρωτεΐνης.

Το αποτέλεσμα αυτό δεν είναι ικανοποιητικό, καθώς δεν φαίνονται πιθανές ζώνες, γι' αυτό και δεν είναι αξιολογήσιμο.

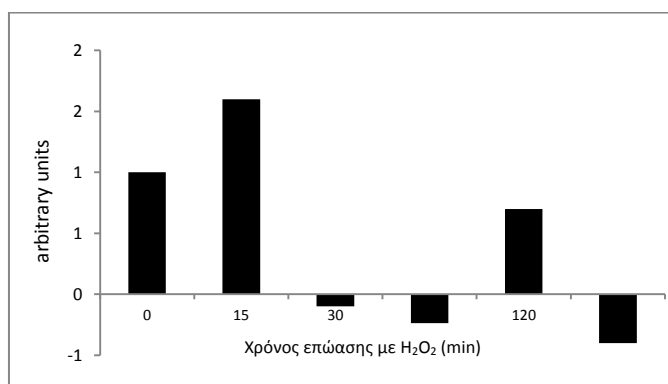
4.1.2 Επίδραση H_2O_2 και χρόνος επώασης

Στο συγκεκριμένο κύκλο πειραμάτων χρησιμοποιήσαμε διαφορετικούς χρόνους επώασης, αφότου καταφέραμε να εντοπίσουμε ποια είναι πιθανώς η βέλτιστη συγκέντρωση δράσης του H_2O_2 ως οξειδωτικού παράγοντα (200 μM). Συγκεκριμένα οι χρόνοι επώασης ήταν 15min, 30min, 60min, 90min, 120min, 240min. Οι χρόνοι αυτοί αντιστοιχούν στα L_1 (15min), L_2 (30min), L_3 (60min), L_4 (90min), L_5 (120min) και L_6 (240min). Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκαν τρία αντισώματα έναντι διαφορετικών τμημάτων της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς. Τα αποτελέσματα με τη χρήση αντισώματος έναντι του Αβ πεπτιδίου (347) απεικονίζονται στην εικόνα 4.7.

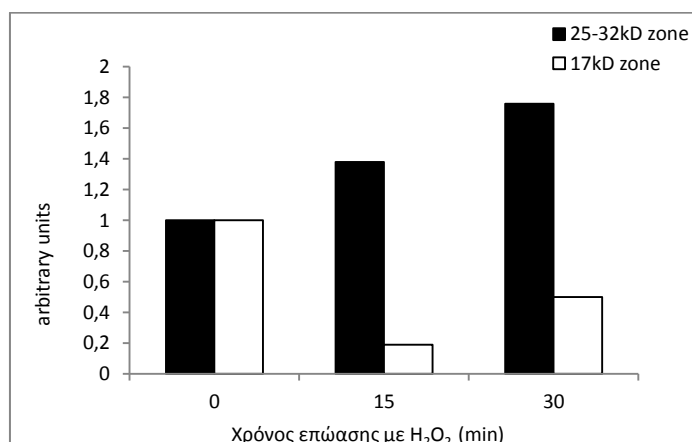


Εικόνα 4.7: Απεικόνιση αμυλοειδογόνων θραυσμάτων της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς μετά από χρήση κατάλληλου αντισώματος μέσω ανοσοσύτωσης Western σε διαφορετικούς χρόνους επώασης με H_2O_2

Στα διαγράμματα 4.11 και 4.12 περιγράφεται η μεταβολή των επιπέδων των θραυσμάτων που περιλαμβάνουν την περιοχή του Αβ-πεπτιδίου έναντι της οποίας χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα. Συγκεκριμένα από τη μεμβράνη προκύπτει η ύπαρξη ενός θραύσματος μεταξύ 46-58kDa, τα επίπεδα του οποίου αν και σε χρόνο επώασης 15min αυξάνονται κατόπιν παρουσιάζουν έντονη μείωση. Η αύξηση που παρατηρείται σε χρόνο επώασης 2h πιθανώς να οφείλεται σε κάποιο λάθος χειρισμό, όπως μεγαλύτερη των υπολοίπων δειγμάτων ποσότητα πρωτεΐνης στο δείγμα.

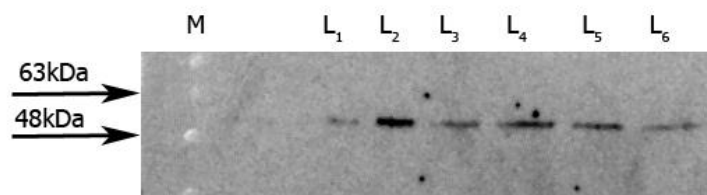


Διάγραμμα 4.11: Απεικόνιση μεταβολής των επιπέδων του θραύσματος 46-58kDa της APP στα διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης με H₂O₂

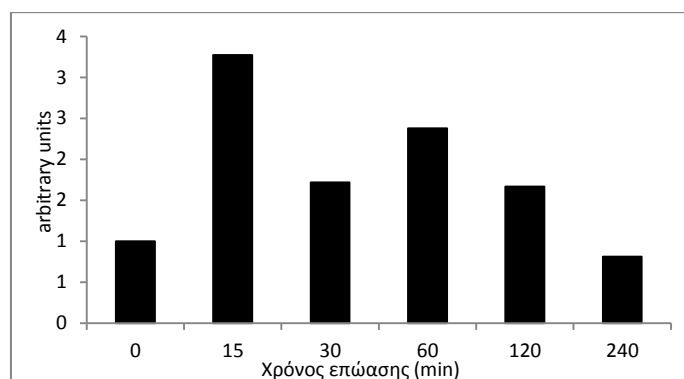


Διάγραμμα 4.12: Απεικόνιση μεταβολής των θραυσμάτων της APP με μοριακά βάρη 25-32kDa και 17kDa στα διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης με H₂O₂ 0, 15min και 30min.

Πέραν όμως του συγκεκριμένου αντισώματος χρησιμοποιήθηκαν κι αντισώματα έναντι του ενδοκυτταρικού καρβοξυτελικού τμήματος και του εξωκυτταρικού αμινοτελικού άκρου της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς. Τα αποτελέσματα από τις συγκεκριμένες ανοσοδοκιμασίες απεικονίζονται στις εικόνες 4.8 και 4.9.



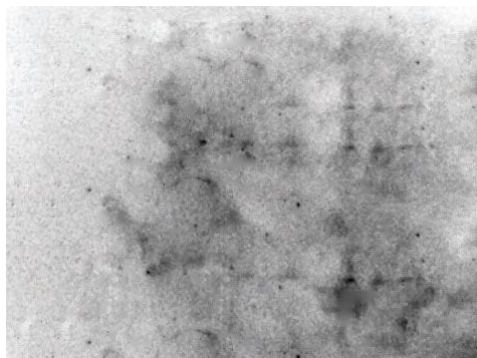
Εικόνα 4.8: Απεικόνιση θραυσμάτων της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς μετά από χρήση αντισώματος έναντι του καρβοξυτελικού τμήματος μέσω ανοσοσύτωσης Western σε διαφορετικούς χρόνους επώασης με H_2O_2



Διάγραμμα 4.13: Απεικόνιση μεταβολής των επιπέδων της ζώνης 46-58kDa στα διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης με H_2O_2 .

Σύμφωνα με το διάγραμμα 4.13 παρατηρούμε μια ραγδαία αύξηση σε χρόνο επώασης 15min της ζώνης 46-58kDa, η οποία όμως οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της ζώνης αυτής στους μεγαλύτερους χρόνους επώασης.

Το αποτέλεσμα της εικόνας 4.9 δεν ήταν ικανοποιητικό για να μπορούμε να εξαγάγουμε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα. Πιθανώς αυτό να οφείλεται στο αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει ισομορφές της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς που περιέχουν την KPI περιοχή, ενώ τα θραύσματα που παρατηρούμε εμείς δεν περιέχουν αυτή την περιοχή (γιατί είναι μικρότερου M.B.)



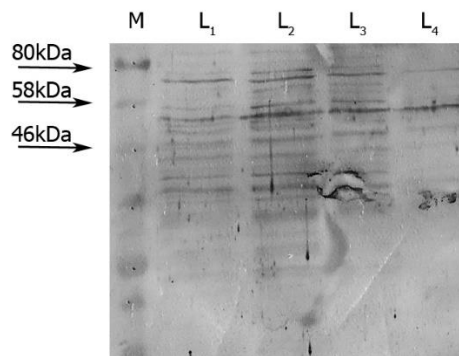
Εικόνα 4.9: Απεικόνιση θραυσμάτων της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς μέσω ανοσοσύτωσης Western σε διαφορετικούς χρόνους επώασης με H_2O_2 , μετά από χρήση αντισώματος έναντι του αμινοτελικού τμήματος.

4.2 Επίδραση σταυροσπορίνης

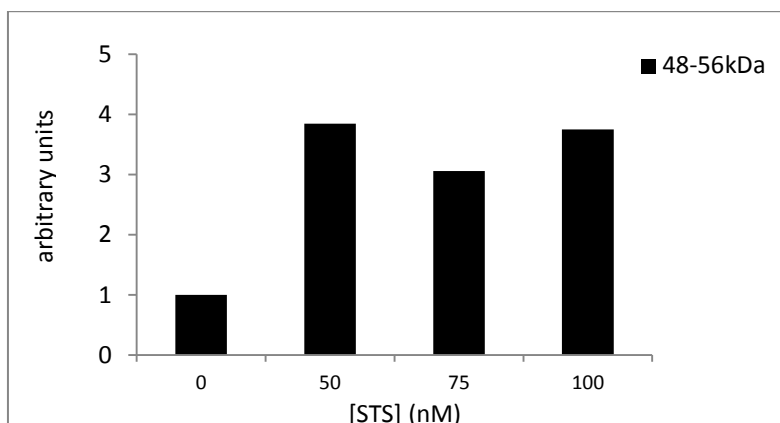
Έπειτα από τη χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, που γνωρίζουμε ότι αποτελεί έναν ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα, δηλαδή επάγει ισχυρά διαδικασίες πρωτεόλυσης και απόπτωσης, χρησιμοποιήθηκε κι ένας δεύτερος οξειδωτικός παράγοντας (σταυροσπορίνη), ο οποίος όμως είναι λιγότερο ισχυρός ως προς την ένταση των φαινομένων που προκαλούνται εξαιτίας του. Η σταυροσπορίνη έχει δειχθεί άλλωστε ότι μπορεί να επάγει απόπτωση, καθώς ενεργοποιεί το μονοπάτι των κασπασών.

4.2.1 Επίδραση σταυροσπορίνης και συγκέντρωση επώασης

Στη συγκεκριμένη πειραματική ενότητα χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις σταυροσπορίνης αρχικής συγκέντρωσης 10^{-3} M. Τα δείγματα της εικόνας 4.10 είναι L₁:control, L₂:50nM, L₃:75nM, L₄:100nM.



Εικόνα 4.10 : Απεικόνιση θραυσμάτων της APP, τα οποία περιέχουν την περιοχή του Αβ-πεπτιδίου, μέσω ανοσοσύτωσης Western(12% πήκτωμα) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επώασης με σταυροσπορίνη.

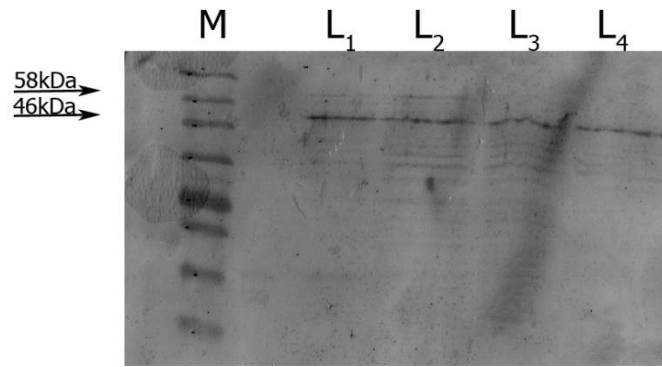


Διάγραμμα 4.14: Απεικόνιση μεταβολής των επιπέδων του θραύσματος 46-58 kDa σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επώασης με H_2O_2 .

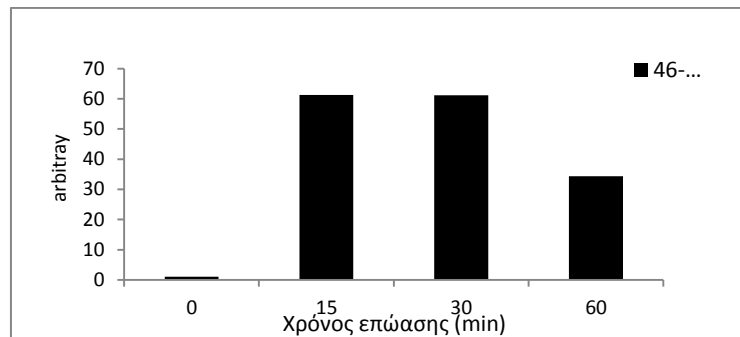
Από το διάγραμμα 4.14 προκύπτει το συμπέρασμα πως αυξανόμενης της συγκέντρωσης της σταυροσπορίνης που χρησιμοποιείται υπάρχει κι αύξηση της συσσώρευσης του θραύσματος 46-58kDa.

4.2.2 Επίδραση σταυροσπορίνης και χρόνος επώασης

Πέραν της επίδρασης της συγκέντρωσης σταυροσπορίνης μελετήθηκε κι ο χρόνος επώασης με το συγκεκριμένο οξειδωτικό παράγοντα, δηλαδή αν επηρεάζεται το πρότυπο πρωτεόλυσης, όταν αυξάνουμε το χρόνο επώασης. Τα δείγματα της εικόνας 4.12 είναι L1:control, L2:15min, L3:30min, L4:60min.

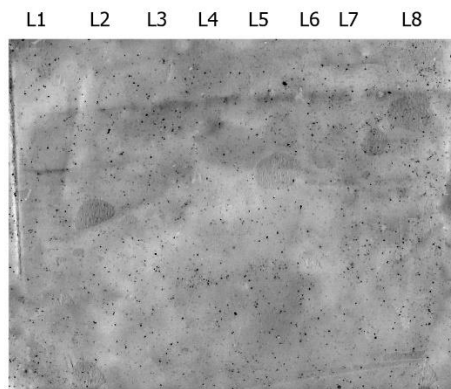


Εικόνα 4.12: Απεικόνιση θραυσμάτων της APP, τα οποία περιλαμβάνουν την περιοχή του Αβ-πεπτιδίου, μέσω ανοσοσύτωσης Western (12% πήκτωμα) σε διαφορετικούς χρόνους επώασης με σταυροσπορίνη.



Διάγραμμα 4.15: Απεικόνιση μεταβολής των επιπέδων των θραυσμάτων 46-58kDa στους διαφορετικούς χρόνους επώασης με σταυροσπορίνη .

Από το διάγραμμα 4.15 παρατηρούμε αύξηση της ζώνης 46-58 σε χρόνο 15-30' για τα δείγματα L2 & L3, τα οποία αντιστοιχούν σε χρόνους 15' και 30' επώασης με σταυροσπορίνη. Μετά τη 1 ώρα παρατηρούμε μείωση της συσσώρευσης του εν λόγω θραύσματος, που εμπεριέχει τον επίτοπο του Αβ-πεπτιδίου.



Εικόνα 4.13: Πρότυπο ζώνωσης για το Αβ-πεπτίδιο μέσω ανοσοσύτωσης Western(15% πήκτωμα) σε διαφορετικούς χρόνους επώασης με σταυροσπορίνη.

Το αποτέλεσμα της εικόνας 4.13 δεν είναι δυνατό να επεξεργαστεί, καθώς το σήμα στη μεμβράνη είναι αρκετά αχνό.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κίνηση του μυοκαρδίου συνίσταται στη συστολή και διαστολή του. Ο μεταβολισμός του καρδιακού μυός επιτελείται εξολοκλήρου στην αερόβια αναπνοή εξ' ου κι η συνεχής παροχή της κατάλληλης ποσότητας οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο, σε περιπτώσεις οξειδωτικού στρες, όπου παράγονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, η ποσότητα οξυγόνου που φτάνει στην καρδιά προς οξυγόνωση είναι ανεπαρκής με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση κατάλληλων μηχανισμών προκειμένου να «λυθεί» το πρόβλημα. Αν όμως υπάρχουν καταστάσεις ισχαιμίας αυξάνεται η παραγωγή των ROS, γεγονός που έχει βλαβερές συνέπειες για το κύτταρο. Συγκεκριμένα, διάφορα κυτταρικά συστατικά όπως είναι το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια των μεμβρανών οξειδώνονται (Shlafer *et al.* 1987, Kehrer 1993, Halliwell *et al.* 1994, Kramer *et al.* 1994, Wang *et al.* 1998a). Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι αντιδράσεις που συμβαίνουν λόγω της οξείδωσης μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την απόπτωση των κυττάρων ή πολύ σοβαρές βλάβες (Mizukami *et al.* 2001). Άλλωστε το οξειδωτικό στρες έχειδειχθεί ως υπεύθυνο για σειρά ασθενειών μεταξύ των οποίων η αθηροσκλήρωση κι η καρδιακή ανεπάρκεια. Η ανισορροπία μεταξύ υπεροξειδίου και οξειδίου του αζώτου στα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί στην παραγωγή και την απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών (π.χ. παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, παράγοντας νέκρωσης όγκου) που οδηγούν σε βλάβες ή ακόμη και σε απόπτωση (Donna *et al.* 2000). Πολύ πρόσφατες μελέτες μάλιστα έδειξαν ότι η καρδιακή δυσλειτουργία σε αρουραίους διέπεται από διαταραχή στον οξειδωτικό μεταβολισμό και στη διακίνηση του ασβεστίου (Willis *et al.* 2015).

Από την άλλη βέβαια έχειδειχθεί ότι αντιδράσεις που συμβαίνουν λόγω της οξείδωσης μπορεί να βοηθούν στην επιβίωση του κυττάρου (Wang *et al.* 1998b). Παλιότερες έρευνες σε είδη που παρουσιάζουν αντοχή στην ανοξία έχουνδείξει την ύπαρξη ειδικών προσαρμογών στους οργανισμούς. Τέτοιες είναι η επαγωγή ή η υπερέκφραση διαφόρων αντιοξειδωτικών συστημάτων, τα οποία συμβάλλουν στην ταχεία μετάβαση από την κατάσταση ανοξίας στις φυσιολογικές συγκεντρώσεις οξυγόνου, μειώνοντας έτσι το στρες αλλά και των τραυματισμό των κυττάρων λόγω της αυξημένης παραγωγής ROS (Pritchard 2002).

Αναφορικά με την πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς, αποτελεί ένα μόριο που συμμετέχει σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες εξ' ου κι η υψηλή συντηρητικότητά της μεταξύ των οργανισμών. Σε κατάλληλες συνθήκες οδηγείται σε πρωτεόλυση, η οποία αναλόγως της ενζυμικής δράσης μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό του τοξικού, αν συσσωρευθεί, πεπτιδίου Αβ.

Τι γίνεται όμως σε περιπτώσεις οξειδωτικών συνθηκών στο κύτταρο; Το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε μεταβολική ανεπάρκεια κι απόπτωση στα νευρικά κύτταρα.

Παράλληλα παρατηρείται κι αύξηση των επιπέδων mRNA του κύριου πρωτεολυτικού ενζύμου(BACE1), το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης JNK. Πώς ακριβώς όμως ενεργοποιείται η JNK; Έχει δειχθεί σε πειράματα *in vivo* (ποντίκια με μεταλλαγμένα τα γονίδια *APP/PS1*) και *in vitro* (κυτταροκαλλιέργειες νευροβλαστώματος,SH-SY5Y, όπου προκλήθηκε τεχνητή επαγωγή οξειδωτικού στρες με τη χρήση υπεροξειδίου του υδρογόνου) ότι τα επίπεδα της JNK ελέγχονται από μια άλλη κινάση, την PKR (double-stranded RNA dependent protein kinase), η οποία στη φωσφορυλιωμένη της μορφή φωσφορυλιώνει τον μεταφραστικό παράγοντα eIF2α, ο οποίος στη φωσφορυλιωμένη μορφή του αυξάνει τα επίπεδα του πρωτεολυτικού ενζύμου.(Hugon J. *et al.* 2012) . Άρα μιλάμε για ένα καταρράκτη ενεργοποιήσεων κινασών.

Η νόσος του Alzheimer (AD) είναι μια καταστροφική νευροεκφυλιστική διαταραχή χωρίς ακόμη να έχει βρεθεί θεραπεία. Οι περισσότερες περιπτώσεις AD είναι σποραδικές, με την ηλικία ν' αποτελεί τον μεγαλύτερο παράγοντα κινδύνου. Έχει παρατηρηθεί πως η απώλεια συνάψεων στις πληγείσες περιοχές του εγκεφάλου σχετίζεται με τη γνωστική δυσλειτουργία σε ασθενείς με AD και έχει θεωρηθεί ως πυλώνας για την απώλεια νευρώνων. Το οξειδωτικό στρες έχει αναγνωρισθεί ως παράγοντας που συμβάλλει στη γήρανση και στην εξέλιξη πολλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης και της νόσου Alzheimer. Η αυξημένη παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) σχετίζεται με την ηλικία και την απώλεια της μιτοχονδριακής λειτουργίας, την αλλοιωμένη ομοιόσταση και τη μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα. Όλα αυτά επηρεάζουν άμεσα τη δραστηριότητα των συνάψεων και νευροδιαβίβαση σε νευρώνες που σχετίζονται με γνωστική λειτουργία, οδηγώντας τελικά σε δυσλειτουργία. Όταν ο κυτταρικός μεταβολισμός εμφανίζει ανωμαλίες, μπορεί κι αυτός με τη σειρά του να επηρεάσει την παραγωγή και τη συσσώρευση του αμυλοειδούς και της υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau, μιας πρωτεΐνης που σχετίζεται με νευροεκφυλισμό. Το μονοπάτι αυτό δρα ανεξάρτητα προκαλώντας μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και την παραγωγή ROS, συμβάλλοντας έτσι σε ένα φαύλο κύκλο. Διαπιστώνεται, λοιπόν, πως το αποτέλεσμα δράσης των ελεύθερων ριζών είναι η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, η οποία λόγω της ζωτικότητας του συγκεκριμένου οργανιδίου (εργοστάσιο παραγωγής ενέργειας) θα οδηγήσει με μαθηματική ακρίβεια στην επαγωγή φαινομένων απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου.

Αμυλοείδωση πέραν του εγκεφάλου παρατηρείται και στην καρδιά. Οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται προκειμένου να γίνει συσσώρευση ινιδίων έχουν μελετηθεί κυρίως σε μία μορφή της κατηγορίας των νοσημάτων αυτών, την αμυλοείδωση ελαφράς αλυσίδας.

Αναδυόμενα πειραματικά αποτελέσματα υποστηρίζουν πως η συσσωμάτωση κι εναπόθεση ινιδίων είναι μόνο μία πλευρά της ασθένειας. Σύμφωνα λοιπόν με κλινικές μελέτες ασθενείς που πάσχουν από τη συγκεκριμένη ασθένεια, έχουν συμπτώματα

παρόμοια με αυτά της ATTR μυοκαρδιοπάθειας, η οποία οφείλεται σε προβλήματα της τρανσθυρετίνης, του μορίου-μεταφορέα της θυροξίνης, της ορμόνης του θυροειδούς. Οι πρωτεΐνες ελαφράς αλυσίδας σχετίζονται με τοξικότητα σε καρδιομυοκύτταρα.

Η πρώτη πειραματική απόδειξη, που υποστήριζε τις τοξικές επιδράσεις των αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών στην καρδιά προήλθε από τον Liao και τους συνεργάτες του (Liao *et al.* 2001), αποδεικνύοντας ότι η έγχυση αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών ελαφράς αλυσίδας οδηγεί σε διαστολική δυσλειτουργία σε καρδιά ποντικού. Περαιτέρω εργασίες κατέδειξαν την άμεση καρδιακή τοξικότητα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε κυτταροκαλλιέργειες, καθώς υπήρξε αύξηση του οξειδωτικού στρες (Brenner DA *et al.* 2004). Τα επόμενα χρόνια αποδείχθηκε πως ασθενείς που πάσχουν από αμυλοείδωση ελαφράς αλυσίδας έχουν στον ορό του αίματος υψηλότερες συγκεντρώσεις δεικτών οξειδωτικού στρες. Μάλιστα, αρτηριόλια που εκτέθηκαν στην αμυλοειδογόνο πρωτεΐνη εμφάνισαν χαλάρωση των λείων αγγειακών κυττάρων. Σχετικά πρόσφατα, μάλιστα, βρέθηκε πως αναστολή της p38 MAPK παρουσία της αμυλοειδογούς πρωτεΐνης οδηγεί σε μη φυσιολογική ενεργοποίηση του p38 MAPK μονοπατιού και μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στην ικανότητα συστολής του οργάνου και κυτταρικό θάνατο (Shi *et al.* 2010). Άρα διαφαίνεται ο ρόλος της p38 MAPK στην παθολογία της αμυλοείδωσης ελαφράς αλυσίδας.

Στα μιτοχόνδρια, η οξειδωτική φωσφορυλίωση κι ενζυμική οξείδωση των βιογενών αμινών παράγουν δραστικές ρίζες οξυγόνου αι αζώτου, αντίστοιχα, οι οποίες είναι υπεύθυνες για φαινόμενα νευρωνικού κυτταρικού θανάτου σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων του Parkinson και του Alzheimer. Σε αυτές τις διαταραχές παρατηρούνται μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, αυξημένο οξειδωτικό στρες, και συσσώρευση οξειδωμένων μορφών πρωτεϊνών. Σε πειράματα που έγιναν (Naoi *et al.* 2005) φάνηκε πως τα νευρικά κύτταρα (SY5Y) ούτως ή άλλως υπόκεινται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων, καθώς κι εμείς παρατηρήσαμε πρωτεόλυση της APP τόσο στα νευρικά όσο και στα καρδιακά κύτταρα (εικόνες 4.1, 4.2, 4.3, 4.7, 4.11 και 4.12)

Αναφέρθηκε προηγουμένως πως το οξειδωτικό στρες μεταξύ των άλλων προκαλεί ενεργοποίηση της κινάσης JNK (Tian *et al.* 2016). Η εν λόγω όμως κινάση εκφράζεται και σε καρδιακούς μυοβλάστες (H9c2), όταν υπάρχουν συνθήκες οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, επαγόμενη αύξηση των επιπέδων των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), η οποία επετεύχθη με χρήση υπεροξειδίου του υδρογόνου (200 μM H_2O_2), οδηγεί αρχικά στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών (A. Clerk, A. Michael, P.H. Sugden 1998) ενώ κατόπιν φωσφορυλιώνονται κι άλλα μόρια, όπως η MSK1, p-38 MAPK και JNK. Η φωσφορυλίωση αυτών των

πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα τη μεταγωγή του σήματος στην οξυγενάση της αίμης (HOX-1), η οποία πιθανώς επάγει διαδικασίες κυτταρικής επιβίωσης. (Gaitanaki *et al.* 2006).

Όπως και σε κύτταρα νευρικής προέλευσης, έτσι και στους μυοβλάστες γνωρίζουμε ότι το οξειδωτικό στρες επάγει μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Γίνεται λοιπόν σαφές από τα παραπάνω ότι το μονοπάτι απόκρισης που ακολουθεί το κύτταρο σε συνθήκες οξειδωτικού στρες παρουσιάζει κοινά στοιχεία μεταξύ διαφορετικών ιστών (καρδιακός και νευρικός ιστός). Άρα μιλάμε για γενικευμένη απόκριση.

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκε το πρότυπο έκφρασης της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς υπό οξειδωτικές για το κύτταρο συνθήκες. Όπως αναφέρθηκε στα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε εντονότερη πρωτεόλυση στα δείγματα που επώαστηκαν με οξειδωτικό παράγοντα, δηλαδή παρατηρήσαμε αυξημένα επίπεδα θραυσμάτων της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς.

Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς εκφράζεται στους καρδιακούς μυοβλάστες και μάλιστα η παρουσία οξειδωτικών παραγόντων επάγει την πρωτεόλυσή της στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά.

Από την επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων φάνηκε πως το κύριο θραύσμα που εμφανίζει το πρότυπο πρωτεόλυσης της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς είναι μεταξύ 46 και 58kDa. Πέραν όμως αυτής του θραύσματος εμφανίζονται και άλλα θραύσματα είτε μεγαλύτερου (80kDa) είτε μικρότερου μοριακού βάρους (25,30kDa), με τα μικρότερου μοριακού βάρους να είναι ορατά όταν αυξάνεται ο χρόνος επώασης με τον οξειδωτικό παράγοντα. Δηλαδή παρατηρείται συσσώρευση θραυσμάτων μικρότερου μοριακού βάρους με την πάροδο του χρόνου. Δεν είναι όμως μόνο ο χρόνος επώασης που επηρεάζει το πρότυπο πρωτεόλυσης της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς. Στις εικόνες 4.3 και 4.10 απεικονίζεται το πρότυπο πρωτεόλυσης της APP, το οποίο εξαρτάται από τη συγκέντρωση του οξειδωτικού παράγοντα. Επιβεβαιώνεται λοιπόν πως κι η συγκέντρωση του οξειδωτικού παράγοντα παίζει καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή του πρωτεολυτικού μονοπατιού. Αυξανόμενης της συγκέντρωσης του οξειδωτικού παράγοντα αυξάνεται η επαγόμενη από οξειδωτικό στρες πρωτεόλυση. Βέβαια όπως κατέστη σαφές από το διάγραμμα 4.14 υπάρχει ένα κατώφλι, όπου η συγκέντρωση του οξειδωτικού παράγοντα έχει τη βέλτιστη δράση, το οποίο αν ξεπεραστεί οδηγεί σε αντιστροφή του αποτελέσματος, δηλαδή σε μείωση των επιπέδων των θραυσμάτων της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς. Η μείωση των επιπέδων του Αβ-πεπτιδίου παρουσία οξειδωτικού παράγοντα (διαγράμματα 4.11, 4.13, 4.15) μας οδηγεί στην υπόθεση πως πιθανώς τα θραύσματα της πρωτεόλυσης να αποικοδομούνται από το κύτταρο, πιθανώς λόγω της τοξικής τους δράσης, όταν η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή

τους είναι αυξημένη. Επομένως, έκφραση της APP και πρωτεόλυσή της στα καρδιακά κύτταρα παρουσία οξειδωτικών παραγόντων σχετίζεται με προβλήματα στην ομοιόσταση του συγκεκριμένου τύπου κυττάρων, στην εμφάνιση πιθανής φλεγμονής και σε μια σειρά ενδοκυτταρικών αντιδράσεων που οδηγούν εν τέλει στην ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικού θανάτου, τύπου απόπτωσης. Άλλωστε είναι γνωστό, ότι κι οι δύο οξειδωτικοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν επάγουν απόπτωση.

Οι εικόνες 4.9 και 4.13 που απεικονίζουν το αποτέλεσμα με τη χρήση αντισώματος έναντι του αμινοτελικού άκρου της υπό μελέτη πρωτεΐνης δεν έδωσαν ξεκάθαρο αποτέλεσμα. Πιθανώς αυτό να οφείλεται στο ότι το εν λόγω αντίσωμα αναγνωρίζει επιτόπους που περιλαμβάνουν και την KPI περιοχή, ενώ η ισομορφή που εντοπίζεται στην καρδιά πιθανώς να μην περιέχει το εν λόγω τμήμα.

Το Αβ-πεπτιδίο αποτελεί την αιτία για την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Πρόσφατα όμως, δείχθηκε πως το Αβ₁₋₄₂ μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο και στη ρύθμιση της καρδιαγγειακής λειτουργίας. Σε πειράματα που έγιναν σε καρδιά κι ειλεό αρουραίου χορηγήθηκε εξωγενώς το αμυλοειδογενές πεπτιδίο σε διαβάθμιση συγκεντρώσεων και μελετήθηκαν διάφορες παράμετροι που θα μπορούσαν να επηρεαστούν από την παρουσία του πεπτιδίου, όπως πίεση αριστερής κοιλίας(LVDP), μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης της πίεσης της αριστερής κοιλίας (+ dP / dt max), ο καρδιακός ρυθμός, στεφανιαία ροή, πλάτος δυναμικού δράσης (MAPamp), διάρκεια MAP σε 90%επαναπόλωση (MAP90) και συστολές του ειλεού. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των προαναφερθέντων παρατηρήσεων ήταν πως το Αβ-πεπτιδίο οδηγεί σε αύξηση του χρόνου MAP90, ενώ ταυτόχρονα μειώνονται η πίεση, ο ρυθμός ανάπτυξης πίεσης κι ο καρδιακός ρυθμός. Από τα παραπάνω λοιπόν οι ερευνητές υπέθεσαν πως το πεπτιδίο Αβ σχετίζεται με αρνητικά ινότροπες και χρονότροπες αποκρίσεις, δηλαδή με μείωση της συστολής του καρδιακού μυός, αλλά και της συχνότητας συστολής, αντίστοιχα. Δηλαδή το αμυλοειδογενές πεπτιδίο, όταν υπάρχει σε κατάλληλη συγκέντρωση ενδοκυτταρικά, οδηγεί σε προβληματική λειτουργία της καρδιάς. (Neda Y. *et al.* 2016).

Σύμφωνα με τα παραπάνω η λειτουργία της καρδιάς επηρεάζεται άμεσα από την ύπαρξη του τοξικού προϊόντος πρωτεόλυσης της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρατηρούμε αύξηση των θραυσμάτων που περιέχουν τον τοξικό επίτοπο. Δηλαδή θα μπορούσε το οξειδωτικό στρες, πέραν της επαγωγής φαινομένων πρωτεόλυσης, όπως στην περίπτωση της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς, να προάγει μειωμένη καρδιακή λειτουργία, λόγω συσσώρευσης

θραυσμάτων με πιθανή αμυλοειδογόνο δράση. Άρα διαφαίνεται η πιθανή σχέση μεταξύ νευροεκφυλισμού και καρδιακής αμυλοείδωσης, καθώς και στις δύο περιπτώσεις συμμετέχει το ίδιο μόριο, η APP. Βέβαια, τα ερωτήματα που προκύπτουν είναι πολλά, καθώς τα ερευνητικά δεδομένα σχετικά με τους μηχανισμούς που επάγουν τέτοιες παθολογικές καταστάσεις είναι περιορισμένα, όπως επίσης και σχετικά με τη σειρά εμφάνισης τέτοιων γεγονότων. Δεν είναι ακόμη γνωστό, αν το Αβ-πεπτίδιο εκφράζεται ταυτοχρόνως και στους δύο τύπους κυττάρων (καρδιακά και νευρικά) ή η συσσώρευσή του στο ένα όργανο επάγει τη μετανάστευση και συσσώρευσή του σε άλλους ιστούς κι όργανα.

Πέραν της μελέτης του προτύπου πρωτεόλυσης της APP μελετήσαμε και την ενδογενή έκφρασή της σε ιστούς βατράχου, όπου διαφάνηκε καθαρά η πρωτεόλυσή της, επομένως κι η έκφρασή της. Η παρατήρηση αυτή είναι σημαντική, καθώς επιβεβαιώνει τη διαπίστωση περί συντηρητικότητας του μορίου. Η συντηρητικότητα αυτή επιβεβαιώνει τις λειτουργικότητες, που έχουν προταθεί από πλήθος ερευνητικών ομάδων, για το μόριο της APP. Παρ' όλα αυτά δεν είναι αποδεδειγμένη η δράση του συγκεκριμένου μορίου σε φυσιολογικές λειτουργίες που αφορούν στην καρδιά.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία είχε ως στόχο να αποδείξει αρχική υπόθεση που διατυπώθηκε από τις Δρ Βασιλακόπουλου Διδώ και Δρ Γαϊτανάκη Αικατερίνη, αν δηλαδή η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (APP) εκφράζεται σε καρδιακούς μυοβλάστες παρουσία οξειδωτικού στρες. Τα αποτελέσματά μας απέδειξαν την ορθότητα της αρχικής υπόθεσης. Πράγματι, η παρουσία οξειδωτικών παραγόντων, σταυροσπορίνης κι υπεροξειδίου του υδρογόνου, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης κατέδειξε τροποποίηση του πρωτεολυτικού μονοπατιού της APP. Επομένως, ένας ακόμη τύπος κυττάρων εκφράζει την APP, ενώ το οξειδωτικό στρες τροποποιεί το πρωτεολυτικό πρότυπο που ακολουθεί η συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

Λέξεις-κλειδιά: APP, H9c2, καρδιακοί μυοβλάστες, H₂O₂, σταυροσπορίνη, οξειδωτικοί παράγοντες, πρωτεόλυση

7. BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abramov *et al.* (2009) **Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses.**, *Nat. Neurosci.* 12(12):1567-76.
- Ashley J., Packard M., Ataman B. and Budnik V. (2005) **Fasciclin II signals new synapse formation through amyloid precursor protein and the scaffolding protein dX11/Mint.**, *J. Neurosci.* 25(25):5943-55
- Beher D., Hesse L., Masters C.L. and Multhaup G. (1996) **Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I.**, *J. Biol. Chem.* 271(3):1613-20
- Bhattacharyya , Barren C., Kovacs D.M. (2013) **Palmitoylation of amyloid precursor protein regulates amyloidogenic processing in lipid rafts.** *J Neurosci.* 33(27):11169-83
- Blair and Flaumenhaft (2009) **Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates.**, *Blood Rev.* 23(4):177-89
- Bonifacino and Traub (2003) **Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes.**, *Annu Rev Biochem.* 72:395-447
- Bradford M. Marion (1975) **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.**, *Analytical Biochemistry* 72:248-54
- Brenner D.A. *et al.* (2004) **Human amyloidogenic light chains directly impair cardiomyocyte function through an increase in cellular oxidant stress.**, *Circ Res* 94(8):1008-10
- Burnette W.N. (1981) **“Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio iodinated protein A.**, *Anal Biochem.* 112(2):195-203
- Bush *et al.* (1990) **The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is released by human platelets.**, *J. Biol. Chem.* 265(26):15977-83
- Cesselli D. *et al.* (2001) **Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy.**, *Circ. Res.* 89(3):279-86
- Chen E.P., Bittner H.B., Davis R.D., Folz R.J. and Van Trigt P. (1996) **Extracellular superoxide dismutase transgene overexpression preserves post ischemic myocardial function in isolated murine hearts.**, *Circulation.* 94(9 Suppl):II412-7
- Chow Vivian W., Mattson Mark P., Wong Philip C., and Gleichmann Marc (2010) **An Overview of APP Processing Enzymes and Products.**, *Neuromolecular Med.* 12(1): 1–12.
- Clarris H.J., Cappai R., Heffernan D., Beyreuther K., Masters C.L. and Small D.H. (1997) **Identification of heparin-binding domains in the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease by deletion mutagenesis and peptide mapping.**, *J. Neurochem.* 68(3):1164-72

- Clerk A. *et al.* (1998) **Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes.**, *Biochem J.* 333(Pt 3):581-9
- Clerk A., Fuller S.J., Michael A., Sugden P.H. (1998) **Stimulation of "stress-regulated" mitogen-activated protein kinases (stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses.**, *J Biol Chem.* 273(13):7228-34
- Coulson, Paliga *et al.* (2000) **What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function.**, *Neurochem. Int.* 36(3):175-84
- Cousins S.L., Hoey S.E., Anne Stephenson F. and Perkinson M.S. (2009) **Amyloid precursor protein 695 associates with assembled NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors to result in the enhancement of their cell surface delivery.**, *J. Neurochem.* 111(6):1501-13
- Davies K.J. (1995) **Oxidative stress: the paradox of aerobic life.**, *Biochem. Soc. Symp.* 61:1-31
- Dawkins E. and Small DH. (2014) **Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease.**, *J. Neurochem.* 129(5):756-69
- De Haan J.B. *et al.* (2004) **Fibroblasts derived from Gpx1 knockout mice display senescent-like features and are susceptible to H₂O₂-mediated cell death.**, *Free. Radic. Biol. Med.* 36(1):53-64
- De Strooper and Annaert (2000) **Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein.**, *J Cell Sci.* 113 (Pt 11):1857-70
- Di Filippo M., Sarchielli P., Picconi B. and Calabresi P.(2008) **Neuroinflammation and synaptic plasticity: theoretical basis for a novel, immune-centred, therapeutic approach to neurological disorders.**, *Trends Pharmacol. Sci* 29(8):402-12
- Finkel T., Holbrook N.J. (2000) **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.**, *Nature* 408(6809):239-47
- Franca MB *et al.* (2016) **Oxidative stress and amyloid toxicity: insights from yeast.**, *J Cell Biochem.*
- Frank-Cannon T.C., Alto L.T., McAlpine F.E. and Tansey M.G.(2009) **Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases?**, *Mol. Neurodegener.* [Epub ahead of print]
- Gaitanaki *et al.* (2006) **Involvement of JNKs and p38-MAPK/MSK1 pathways in H₂O₂-induced upregulation of heme oxygenase-1 mRNA in H9c2 cells.**, *Cell Signal.* 4:47
- Gakhar-Koppole *et al.* (2008) **Activity requires soluble amyloid precursor protein alpha to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway.**, *Eur J Neurosci.* 28(5):871-82

- Gardella *et al.* (1990) **Intact Alzheimer amyloid precursor protein (APP) is present in platelet membranes and is encoded by platelet mRNA.**, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 173(3):1292-8
- Giordano F. (2005) **Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure.**, *J Clin Invest.*
- Goate, Chartier-Harlin *et al.* (1991) **Sequencing of exons 16 and 17 of the beta-amyloid precursor protein gene in 14 families with early onset Alzheimer's disease fails to reveal mutations in the beta-amyloid sequence**, *Neurosci Lett.* 133(1):1-2
- Goedert M. (2015) **Neurodegeneration. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein**, *Science* 349(6248):1255-55
- Gómez-Ramos and Asuncion Morán (2007) **Ultrastructural localization of intraneuronal Abeta-peptide in Alzheimer disease brains.**, *J Alzheimers Dis.* 11(1):53-9.
- Gordon S. (2003) **Alternative activation of macrophages.**, *Nat. Rev.Immunol.* 3(1):23-35
- Halliwell B. (1994) **Free radicals and antioxidants: a personal view.**, *Nutr Rev.* 70(5):257-65
- He X., Chen M.G. and Ma Q (2008) **Activation of NRF2 in Defense against Cadmium-Induced Oxidative Stress.**, *Chem Res Toxicol.* 21(7):1375-83
- Hemmer B., Archelos J.J. and Hartung H.P. (2002) **New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis.**, *Nat. Rev.Neurosci.* 3(4):291-301
- Hensley K., Robinson K.A., Gabbita S.P., Salsman S. and Floyd R.A. (2000) **Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury.**, *Free Radic. Biol. Med.*
- Hoe H.S., Fu Z., Makarova A. *et al.* (2009) **The effects of amyloid precursor protein on postsynaptic composition and activity.**, *J. Biol.Chem.* 284(13):8495-506
- Hoey S.E., Williams R.J., Perikinton M.S. (2009) **Synaptic NMDA receptor activation stimulates alpha-secretase amyloid precursor protein processing and inhibits amyloid-beta production.**, *J Neurosci.* 29(14):4442-60
- Hugon J. *et al.* (2012) **Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2 α pathway.**, *Biochim. Biophys. Acta* 1822(6):885-96
- Ide T. *et al.* (1999) **Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium.**, *Circ. Res.* 85(4):357-63
- Izumiya Y. *et al.* (2003) **Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II induced cardiac hypertrophy and remodeling.**, *Circ. Res.* 93(9):874-83
- Jafri M.S., Dudycha S.J. and O'Rourke B. (2001) **Cardiac energy metabolism: models of cellular respiration.**, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 3:57-81

- Kasprzak K.S. (2002) **Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis.**, *Free Radic Biol Med.* 32(10):958-67
- Kehrer J.P. (1993) **Free radicals as mediators of tissue injury and disease.** *Crit Rev Toxicol.* 23(1):21-48
- Khatri J.J. *et al.* (2004) **Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma.**, *Circulation* 109(4):520-5
- Kibbey M.C., Jucker M., Weeks B.S., Neve R.L., Van Nostrand W.E. and Kleinman H.K. (1993) **beta-Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin.**, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90(21):10150-3
- Kidd *et al.* (1964) **Alzheimer's disease: an electron microscopical study.** *Brain.* 87:307-20
- Kirkman H.N. *et al.* (1999) **Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry.**, *J. Biol. Chem.* 274(20):13908-14
- Kirkman H.N., and Gaetani G.F. (1984) **Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* ;81(14):4343-7.
- Koo *et al.* (1993) **Amyloid beta-protein as a substrate interacts with extracellular matrix to promote neurite outgrowth.**, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 90(10):4748-52
- Kramer J.H., Misik V., Weglicki W.B. (1994) **Lipid peroxidation-derived free radical production and post ischemic myocardial reperfusion injury.**, *Ann N Y Acad Sci.* 723:180-96
- Kwon S.H., Pimentel D.R., Remondino A., Sawyer D.B. and Colucci W.S. (2003) **H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways.**, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35 (6):615-21
- Lau, McLoughlin *et al.* (2000) **Fe65 and X11beta co-localize with and compete for binding to the amyloid precursor protein.**, *Neuroreport.* 11(16):3607-10
- Lee K.J., Moussa C.E., Lee Y., Sung Y., Howell B.W., Turner R.S., Pak D.T. and Hoe H.S. (2010) **Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines.**, *Neuroscience* 169(1):344-56
- Lesne *et al.* (2005) **NMDA receptor activation inhibits alpha-secretase and promotes neuronal amyloid-beta production.**, *J Neurosci.* 25(41):9367-77
- Liao R. *et al.* (2001) **Infusion of light chains from patients with cardiac amyloidosis causes diastolic dysfunction in isolated mouse hearts.**, *Circulation* 104(14):1594-7
- Liu B., Wang K., Gao H.M., Mandavilli B., Wang J.Y. and Hong J.S.(2001). **Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis.**, *J. Neurochem.* 77(1):182-9
- Liu *et al.* (2008) **TiGER: a database for tissue-specific gene expression and regulation.**, *BMC Bioinformatics* 9:271
- Lue L.F.,Kuo Y.M., Beach T. and Walker D.G.(2010) **Microglia activation and anti-inflammatory regulation in Alzheimer's disease.**, *Mol. Neurobiol.* 41(2-3):115-28
- Lull ME. and Block ML. (2010) **Microglial Activation and Chronic Neurodegeneration.**, *Neurotherapeutics* 7(4):354-65

- Ma Q.H., Futagawa T., Yang W.L. *et al.* (2008) **A TAG1-APP signalling pathway through Fe65 negatively modulates neurogenesis.**, *Nat. Cell Biol.* 10(3):283-94
- Martindale J.L., Holbrook N.J. (2002) **Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival.**, *J Cell Physiol.* 192(1):1-15
- Martinez F.O., Sica A., Mantovani A. and Locati M. (2008) **Macrophage activation and polarization.**, *Front. Biosci.* 13:453-61
- McGeer EG, McGeer PL. (2001) **Innate immunity in Alzheimer's disease: a model for local inflammatory reactions.**, *Mol Interv.* 1(1):22-9
- Mosser D.M. and Edwards J.P. (2008) **Exploring the full spectrum of macrophage activation.**, *Nat. Rev. Immunol.* 8(12):958-69
- Murayama Y., Takeda S., Yonezawa K., Giambarella U., Nishimoto I. and Ogata E. (1996) **Cell surface receptor function of amyloid precursor protein that activates Ser/Thr kinases.**, *Gerontology* 42 Suppl 1:2-11
- Nakamura, K. *et al.* (1998) **Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II.**, *Circulation* 98(8):794-9
- Nakano H., Omura S. (2009) **Chemical biology of natural indolocarbazole products: 30 years since the discovery of staurosporine.**, *J Antibiot (Tokyo)* 62(1):17-26
- Naoi M. *et al.* (2005) **Oxidative stress in mitochondria: decision to survival and death of neurons in neurodegenerative disorders.**, *Mol Neurobiol.* 31(1-3):81-93
- Neda Yousefirad Ziya Kaygisiz Yasemin Aydin (2016) **The Effects of Beta Amyloid Peptide 1–42 on Isolated Rat Hearts and Ileum Smooth Muscle.**, *Pharmacology* 98:261–266
- Nimmerjahn A., Kirchhoff F. and Helmchen F. (2005) **Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo.**, *Science* 308(5726):1314-8
- Nishimoto *et al.* (1993) **Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o).**, *Nature* 362(6415):75-9
- Nordberg J. and Arner E.S. (2001) **Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.**, *Free Radic. Biol. Med.* 31(11):1287-312
- Okamoto T., Takeda S., Murayama Y., Ogata E. and Nishimoto I. (1995) **Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor.**, *J. Biol. Chem.* 270(9):4205-8
- Osterfield M., Egelund R., Young L. M. and Flanagan J. G. (2008) **Interaction of amyloid precursor protein with contactins and NgCAM in the retinotectal system.**, *Development* 135(6):1189-99
- Padurariu M. *et al.* (2013) **The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease.**, *Psychiatria Danubina* 25(4):401-9
- Pennathur S., Wagner J.D., Leeuwenburgh C., Litwak K.N. and Heinecke J.W. (2001) **A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease.**, *J. Clin. Invest.* 107(7):853-60

- Pfeffer M.A. and Braunwald E. (1990) **Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications.**, *Circulation* 81(4):1161-72
- Pritchard KA, Ackerman AW, Ou J, Curtis M, Smalley DM, Fontana JT, Stemerman MB, Sessa WC. (2002) **Native low-density lipoprotein induces endothelial nitric oxide synthase dysfunction: role of heat shock protein 90 and caveolin-1.**, *Free Radic Biol Med.* 33(1):52-62
- Quarta C.C., Kruger J.L., Falk R. H. (2012) **Cardiac Amyloidosis**, *Circulation* 126(12):e178-82
- Ransohoff R.M. and Perry V.H. (2009) **Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses.**, *Annu. Rev.Immunol.* 27:119-45
- Remondino A. et al. (2003) **Beta-adrenergic receptor- stimulated apoptosis in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2- terminal kinase-dependent activation of the mitochondrial pathway.**, *Circ. Res* 92(2):136-8
- Rivest S. (2009) **Regulation of innate immune responses in the brain.**, *Nat. Rev. Immunol.* 9(6):429-39
- Rossjohn et al. (1999) **Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein.**, *Nat Struct Biol.* 6(4):327-31
- Sabri A., Hughie H.H. and Lucchesi P.A. (2003) **Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes.**, *Antioxid. Redox Signal.* 5(6):731-40
- Sato, Diehl et al. (2007) **Active gamma-secretase complexes contain only one of each component.**, *J Biol. Chem.* 282(47):33985-93
- Selkoe D.J. (2001) **Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein.**, *J Alzheimers Dis.* 3(1):75-80
- Selkoe D.J. (2002) **Alzheimer's disease is a synaptic failure.**, *Science* 298(5594):789-91
- Shi J. et al. (2010) **Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38-alpha MAPK pathway.**, *Proc Natl Acad Sci USA* 107(9):4188-93
- Shlafer M., Myer C.L., Adkins S. (1987) **Mitochondrial hydrogen peroxide generation and activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase following global ischemia.**, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 19(12):1195-206
- Sinha, Anderson et al. (1999) **Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain.**, *Nature* 402(6761):537-40
- Sisodia SS. (1992) **Secretion of the beta-amyloid precursor protein.**, *Ann N.Y Acad Sci.* 674:53-7
- Skovronsky et al. (2000) **In vivo detection of amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease.**, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 97(13):7609-14
- Small D.H., Nurcombe V., Reed G., Clarris H., Moir R., Beyreuther K., Masters C.L. (1994) **A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of**

Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth., *J Neurosci.* 14(4):2117-27

- **Smith *et al.* (1990) Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein., *Science* 248(4959):1126-8**
- **Suematsu N. *et al.* (2003) Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes., *Circulation* 107(10):1418-23.**
- **Tian H, Ye X, Hou X, Yang X, Yang J, Wu C. (2016) SVCT2, a potential therapeutic target, protects against oxidative stress during ethanol-induced neurotoxicity via JNK/p38 MAPKs, NF- κ B and miRNA125a-5p., *Free Radic Biol Med.* 96:362-73.**
- **Treusch S. *et al.* (2011) Functional Links Between Ab Toxicity, Endocytic Trafficking, and Alzheimer's Disease Risk Factors in Yeast., *Science* 334(6060):1241-5**
- **Ursini F. *et al.* (1995) Diversity of glutathione peroxidases., *Methods Enzymol.* 252:38-53**
- **Van Nostrand *et al.* (1991a) Protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor in blood is a platelet-specific protein., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175(1):15-21**
- **Van Nostrand *et al.* (1991b) Platelet protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor. Possible pathologic and physiologic functions., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 640:140-4.**
- **Vassar, Bennett *et al.* (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE., *Science* 286(5440):735-41**
- **Vassilacopoulou *et al.* (1995) Full-length and truncated Alzheimer amyloid precursors in chromaffin granules: solubilization of membrane amyloid precursor is mediated by an enzymatic mechanism., *J. Neurochem.* 64(5):2140-6**
- **Von Bernhardi R. *et al.* (2015) Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration., *Front. Aging Neurosci.* 7:124**
- **Von Bernhardi R.(2007) Glial cell dysregulation: a new perspective on Alzheimer disease., *Neurotox. Res.* 12(4):215-32**
- **Von Bernhardi R.(2010) Immunotherapy in Alzheimer's disease: where do we stand? Where should we go?, *J. Alzheimers Dis.* 19(2):405-21**
- **Wang P., Chen H., Qin H., Sankarapandi S., Becher M.W., Wong P.C., Zweier J.L. (1998a). Overexpression of human copper, zinc superoxide dismutase (SOD1) prevents post ischemic injury., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA***
- **Wang X., Martindale J.L., Liu Y., Holbrook N.J. (1998b) The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival., *Biochem. J.* 95(8):4556-60**
- **Wasco, Bupp *et al.* (1992) Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor., *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 89(22):10758-62**

- Wasco, Gurubhagavatula *et al.* (1993) **Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor.**, *Nat. Genet.* 5(1):95-100
- Willis B.C., Salazar-Cantú A., Silva-Platas C., Fernández-Sada E., Villegas C.A., Rios-Argaiz E., González-Serrano P., Sánchez L.A., Guerrero-Beltrán C.E., García N., Torre-Amione G., García-Rivas G.J., Altamirano J. (2015) **Impaired oxidative metabolism and calcium mishandling underlie cardiac dysfunction in a rat model of post-acute isoproterenol-induced cardiomyopathy.**, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 308(5):467-477
- Wirths *et al.* (2001) **Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice.**, *Neurosci Lett.* 306(1-2):116-20
- Witztum J.L. and Steinberg D. (1991) **Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis.**, *J. Clin. Invest.* 88(6):1785-92
- Xu *et al.* (2005) **Protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor limits cerebral thrombosis.**, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 102(50):18135-40
- Xu *et al.* (2007) **Increased severity of hemorrhage in transgenic mice expressing cerebral protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor.**, *Stroke* 38(9):2598-601
- Yamaguchi O. *et al.* (2003) **Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(26):15883-8
- Yamazaki T., Koo E.H., Selkoe D.J. (1997) **Cell surface amyloid beta-protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells.**, *J Neurosci.* 17(3):1004–1010
- Yan, Bienkowski *et al.* (1999) **Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity.**, *Nature* 402(6761):533-7.
- Yao Z.X. and Papadopoulos V. (2002) **Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity.**, *FASEB J.* 16(12):1677-9
- Zheng H., Koo E.H. (2011) **Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein.**, *Mol Neurodegener.* 6(1):27

Συγγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν:

Carl Branden, John Tooze (2006) Εισαγωγή στη δομή των πρωτεϊνών, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα & ΣΙΑ Ο.Ε., Αλεξανδρούπολη

Vander, Widmaier E. (2001) Φυσιολογία του Ανθρώπου, Broken Hill Publishers Ltd, Αθήνα