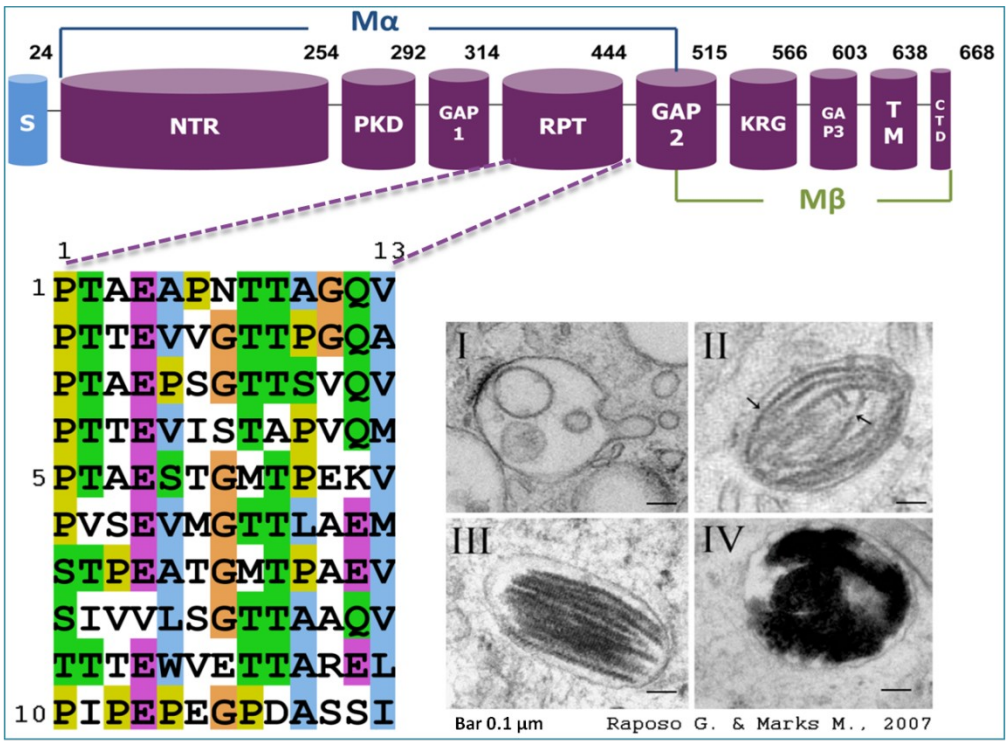
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ & ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ



ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΕΝΟΣ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ-ΑΝΑΛΟΓΟΥ ΤΟΥ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ Pmel17, ΜΕ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΓΟΝΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ

ΑΠΟΣΤΟΛΑΚΟΥ ΙΩΑΝΝΑ – ΒΑΡΒΑΡΑ

Επιβλέπουσα: Επίκουρη Καθηγήτρια Δρ. Βασιλική Οικονομίδου

ΑΘΗΝΑ 2016

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Πριν ακόμα φτάσω στο σημείο να αποφοιτήσω από το Γυμνάσιο, ήμουν βέβαιη για την μετέπειτα πορεία μου. Στόχος μου ήταν να τα καταφέρω στις Πανελλήνιες εξετάσεις και να κάνω το όνειρό μου πραγματικότητα. Να ασχοληθώ με τη Βιολογία. Τελικά, τα κατάφερα. Το 2011 πέρασα στο Βιολογικό Αθήνας και η χαρά μου ήταν απερίγραπτη. Εκπληρώθηκε το μισό μου όνειρο και πίστευα πως το μοναδικό μου πρόβλημα είχε λυθεί. Ακόμα προσπαθώ και θα προσπαθώ γιατί σημασία δεν έχει που θα φτάσεις, αλλά τί θα μάθεις από το ταξίδι σου. Και εγώ ήμουν, τουλάχιστον μέχρι σήμερα, πολύ τυχερή γιατί έμαθα πράγματα ουσιώδη και τα εκμεταλλεύτηκα για να γίνω καλύτερος άνθρωπος. Δεν ξέρω αν τα έχω καταφέρει, γι αυτό ποτέ δεν θα σταματήσω να επεξεργάζομαι τον κόσμο γύρω μου.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσά μου, την Επίκουρη Καθηγήτρια Δρ Βασιλική Οικονομίδου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε επιλέγοντάς με για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας καθώς και για την προθυμία της να με βοηθήσει κάθε φορά που εγώ την χρειαζόμουν. Την ευχαριστώ που με δέχτηκε στην ομάδα της και η πρώτη μου επαφή με την έρευνα ήταν σε ένα εργαστήριο που σαν αρχή του έχει την «συνεργασία» και την «ομαδικότητα».

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή Σταύρο Χαμόδρακα που κάθε φορά ήταν πρόθυμος να ανταλλάξει απόψεις μαζί μας και να μας χαράξει το δρόμο της πορείας μας στην έρευνα. Οι συμβουλές του ήταν πολύτιμες και νιώθω τυχερή που δούλεψα μαζί του.

Ευχαριστώ επίσης και τον Δρ Νικόλαο Λούρο και την υποψήφια διδάκτορα Εβίτα Τσιολάκη, για την επίβλεψη της εργασίας μου, για τις γνώσεις που μου χάρισαν καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας και για την αμέριστη βοήθειά τους.

Εξίσου σημαντικό ήταν το κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο, το οποίο, τολμώ να πω, πως ήταν από τα καλύτερα στη σχολή. Για το λόγο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κατερίνα, τον Φώτη, την Αναμπέλα, τη Σίσσυ, τη Μαρίνα, το Χάρη, την Κατερίνα, τον Αρσένη, τον Φίλιππο, την Αυγή, τη Γεωργία, την Έλενα, τον Γιώργο, την Έφη, την Χαρά, την Φωτεινή,

την Κωνσταντίνα, την Γεωργία. Ευχαριστώ που μου μάθατε να δουλεύω ομαδικά.

Τέλος, νιώθω ιδιαίτερα ευγνώμων σε όσους πάλεψαν για να μπορώ εγώ να καταφέρω όλα αυτά. Δεν νομίζω πως χρειάζεται να τους ονομάσω, γιατί εκείνοι ξέρουν και αυτό έχει σημασία. Χωρίς αυτούς δεν θα έγραφα ούτε μία πρόταση της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς δεν θα είχα καταφέρει να περάσω στο Πανεπιστήμιο. Σας ευχαριστώ από καρδιάς και η παρούσα διπλωματική εργασία ας είναι η αρχή όσων θα έρθουν.

Με εκτίμηση,

Ιωάννα

Κάποια μέρα κοιτάζοντας πίσω, τα χρόνια που αγωνίστηκες θα σου φαίνονται τα πιο ωραία.

Sigmund Freud



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Pmel17 είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου Ι, η οποία αποτελείται από 668 αμινοξικά κατάλοιπα. Παράγεται από εξειδικευμένα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του δέρματος, τα μελανοκύτταρα , που παράγουν την χρωστική μελανίνη. Συγκεκριμένα, η Pmel17 εντοπίζεται σε ειδικά οργανίδια των μελανοκυττάρων που ονομάζονται μελανοσώματα και σχηματίζει το απαραίτητο υπόστρωμα που συμμετέχει στη βιοσύνθεση της μελανίνης. Η Pmel17 διαθέτει εννέα αυτοτελείς δομικές περιοχές, με ιδιαίτερα σημαντική την περιοχή που διαθέτει 10 επαναλήψεις μεγέθους 13 αμινοξικών καταλοίπων και ονομάζεται RPT domain. Δομικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η περιοχή αυτή συμμετέχει στην δημιουργία του απαραίτητου υποστρώματος για την βιοσύνθεση της μελανίνης μέσω του σχηματισμού ινιδίων, που εμφανίζουν αμυλοειδογόνες ιδιότητες. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν για το RPT domain από τα εργαλεία AMYLPRED και AMYLPRED2, συναινετικών αλγορίθμων πρόγνωσης πρωτεϊνικών περιοχών επιρρεπών προς συσσωμάτωση που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριό μας, αλλά και βιβλιογραφικά δεδομένα, συντέθηκε χημικά ένα πεπτίδιο-ανάλογο του RPT domain. Το πεπτίδιο αυτό μελετήθηκε πειραματικά με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (αρνητική χρώση), περίθλαση ακτίνων Χ, φασματοσκοπία υπερερύθρου και πολωτική μικροσκοπία. Τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τις παραπάνω βιοφυσικές μεθόδους, υποδεικνύουν ότι το πεπτίδιο αυτό αυτοσυγκροτείται σχηματίζοντας ινίδια που πληρούν τα βασικά κριτήρια των αμυλοειδών ινιδίων.

Pmel17 is a 668-amino acid type I transmembrane glycoprotein. It is mainly produced by specific pigment cells located in the basal layer of the skin called melanocytes. Pmel17 forms a substrate involved in the biosynthesis of melanin in specific organelles of melanocytes, called melanosomes. The luminal part of Pmel17 includes a domain (RPT domain) containing 10 tandem repeats (each repeat consists of 13 residues). Structural studies indicate that this region forms the substrate of Pmel17 by forming amyloid fibrils. In this work, we applied AMYLPRED and AMYLPRED2, our consensus aggregation propensity prediction algorithm, on the RPT domain sequence. As a result, we have identified a segment of the RPT domain presenting strong aggregation propensity. Consequently, a peptide-analogue corresponding to this segment was synthesized and studied experimentally. Experimental results from Transmission Electron Microscopy (negative staining), X-ray fiber diffraction, ATR FT-IR spectroscopy and polarizing microscopy indicate that this peptide self-assembles into fibrils with amyloidogenic properties.

Πίνακας περιεχομένων

Εισαγωγή....8
1.1 Αμυλοειδή....8
1.1.1 Γενικά....8
1.1.3 Διαγνωστικά κριτήρια αμυλοειδών ινιδίων....14
1.1.3 Μηχανισμός δημιουργίας Αμυλοειδών Ινιδίων....17
1.1.4 Παθολογικά αμυλοειδή- Αμυλοειδώσεις....24
1.1.5 Φυσικά Προστατευτικά - Λειτουργικά αμυλοειδή....28
1.2 Μελανοκύτταρο....30
1.2.1 Προέλευση....30
1.2.2 Εντοπισμός....31
1.3.1 Ιστορική αναδρομή....34
1.3.2 Ορισμός....35
1.3.3 Βιογένεση....35
1.3.4 Μετακίνηση και μεταφορά....37
1.4 Μελανίνη....40
1.4.1 Ορισμός....40
1.4.2 Τύποι μελανίνης....41
1.4.3 Βιοσύνθεση....42
1.5 Διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες....43
1.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά....43
1.5.2 Κατηγορίες διαμεμβρανικών πρωτεϊνών....43
1.5.3 Διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες....44
1.6 Pmel17....45
1.6.1 Γενικά χαρακτηριστικά....45
1.6.2 Αυτοτελείς δομικές περιοχές....48
1.6.3 Μονοπάτι ωρίμανσης (maturation pathway)....51
1.6.4 Πώς σχηματίζονται τα αμυλοειδή ινίδια της Pmel17;....57
Στόχος της διπλωματικής εργασίας....64
Υλικά- Μέθοδοι....65
2.1 Πρόβλεψη και σύνθεση πεπτιδίου-αναλόγου....65
2.2 Διαλυτοποίηση του πεπτιδίου-αναλόγου....67
2.3 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Αρνητική Χρώση)....67

2.4 Χρώση με Congo Red και πολωτική μικροσκοπία.....67
2.4.1 Διαγνωστική χρώση με Congo Red.....67
2.4.2 Διαδικασία χρώσης με χρωστική Congo Red.....67
2.4.3 Πολωτική μικροσκοπία.....68
2.5 Περίθλαση ακτίνων-Χ.....68
2.6 Φασματοσκοπία υπερερύθρου (ATF-FT IR).....68
Αποτελέσματα.....70
3.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Αρνητική Χρώση).....70
3.2 Χρώση με Congo Red και πολωτική μικροσκοπία.....71
3.3 Περίθλαση ακτίνων-Χ.....72
3.4 Φασματοσκοπία υπερερύθρου (ATF-FT IR).....74
Συζήτηση.....76
Παράρτημα.....80
I. AMYLPRED.....80
II. AMYLPRED2.....82
III. Συμμετοχή σε συνέδριο.....85
Βιβλιογραφία.....88

1.1 Αμυλοειδή

1.1.1 Γενικά

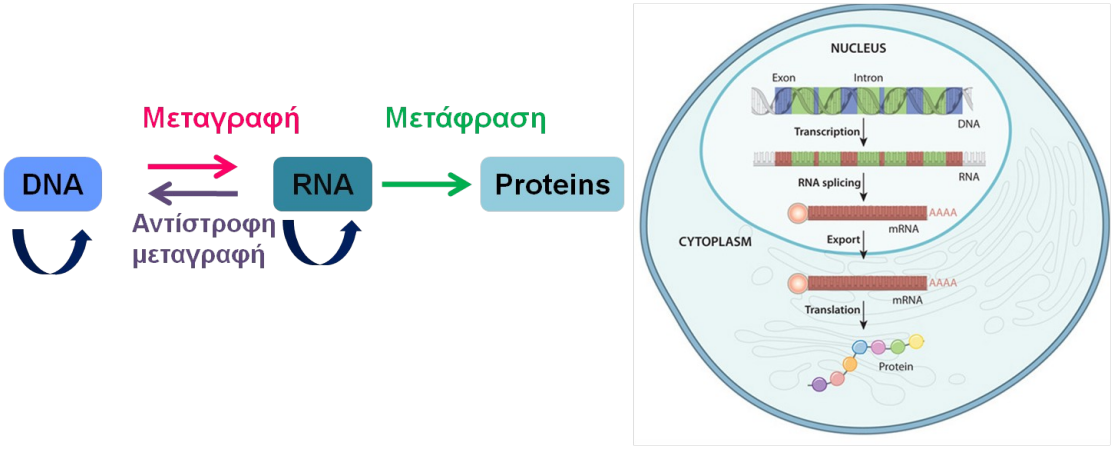
Με βάση το **κεντρικό δόγμα της βιολογίας**, το DNA αφού μεταγραφεί σε RNA εξέρχεται από τον πυρήνα και μεταφέρεται σε ειδικές θέσεις του ενδοπλασματικού δικτύου, όπου τα ριβοσώματα λαμβάνουν δράση και το μεταφράζουν σε πρωτεΐνη, υπακούοντας στους κανόνες του γενετικού κώδικα [1, 2]. Αφού συντεθούν, οι πρωτεΐνες λαμβάνουν την τελική τους μορφή, με τη βοήθεια άλλων μορίων (π.χ. μοριακοί συνοδοί) και ειδικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Εικόνα 1) [3]. Το 1917, ο Γερμανός χημικός Hermann Staudinger πρότεινε ότι βιολογικά μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, οργανώνονται σε πολυμερή, τα οποία αποτελούνται από μικρά μόρια που συνδέονται μεταξύ τους με χημικούς δεσμούς σε μακριές αλυσίδες [4]. Η ιδέα αυτή ήρθε σε αντιπαράθεση με την τότε επικρατούσα υπόθεση, και χρειάστηκαν μερικά χρόνια για να γίνει αποδεκτή. Σήμερα, οι ερευνητές γνωρίζουν ότι οι πρωτεΐνες είναι πολυμερή που δομούνται από ένα σύνολο είκοσι μορίων που ονομάζονται **αμινοξέα** [5].

Όσον αφορά το δίπλωμα των πρωτεϊνών, αυτό υπακούει στην «**θερμοδυναμική υπόθεση»** , η οποία προτείνει πως αυτό γίνεται υπό την επίδραση θερμοδυναμικών νόμων [6]. Με βάση την υπόθεση αυτή, σε δεδομένες περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, συγκέντρωση, διαλύτη, κ.τ.λ.) το φυσιολογικό δίπλωμα των πρωτεϊνών είναι μοναδικό, σταθερό και αντιστοιχεί στην στερεοδιάταξη ελάχιστης ενέργειας (Εικόνα 2). Για να συμβαίνουν όμως τα παραπάνω, θα πρέπει να ισχύουν οι παρακάτω προϋποθέσεις:

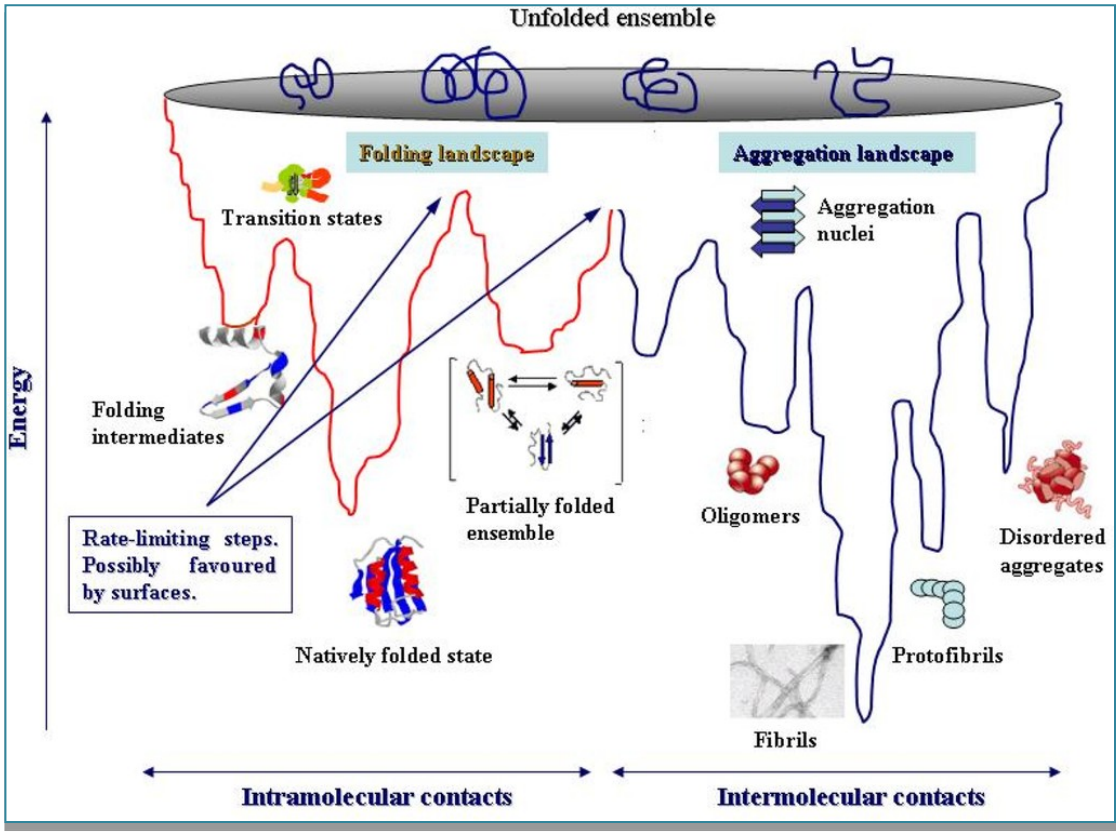
1. **ΜΟΝΑΔΙΚΟΤΗΤΑ**: να μην υπάρχει άλλη στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης κοντά στο ενεργειακό ελάχιστο του φυσιολογικού διπλώματος.

2. **ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ**: μικρές αλλαγές στο περιβάλλον θα πρέπει να μην προκαλούν αλλαγές στο φυσιολογικό δίπλωμα. Η ελεύθερη ενέργεια κοντά στο φυσιολογικό δίπλωμα θα πρέπει να είναι υψηλή και απότομη, για να διατηρείται η σταθερότητα.

3. **ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΠΡΟΣΒΑΣΙΜΟΤΗΤΑ**: το δίπλωμα της αλυσίδας δεν θα πρέπει να περιλαμβάνει πολύπλοκες αλλαγές στο σχήμα.



Εικόνα 1: Κεντρικό δόγμα της βιολογίας. Το DNA μπορεί να αυτοδιπλασιάζεται αλλά και να μεταφέρει την γενετική του πληροφορία στο RNA μέσω της μεταγραφής. Το RNA μπορεί και αυτό να αυτοδιπλασιάζεται αλλά και να μεταφράζεται σε πρωτεΐνη, με βάση το γενετικό κώδικα. Επίσης, με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων που ονομάζονται αντίστροφες μεταγραφάσες το RNA μεταγράφεται σε DNA.



Εικόνα 2: Το φυσιολογικό δίπλωμα της πρωτεΐνης είναι ενεργειακά χαμηλότερο από το μη φυσιολογικό δίπλωμα της πρωτεΐνης. Τα αμυλοειδή ινίδια, σε κάποιες περιπτώσεις, παγιδεύονται ενεργειακά σε κατώτερα ενεργειακά ελάχιστα από εκείνα του φυσιολογικού διπλώματος της πρωτεΐνης [7].

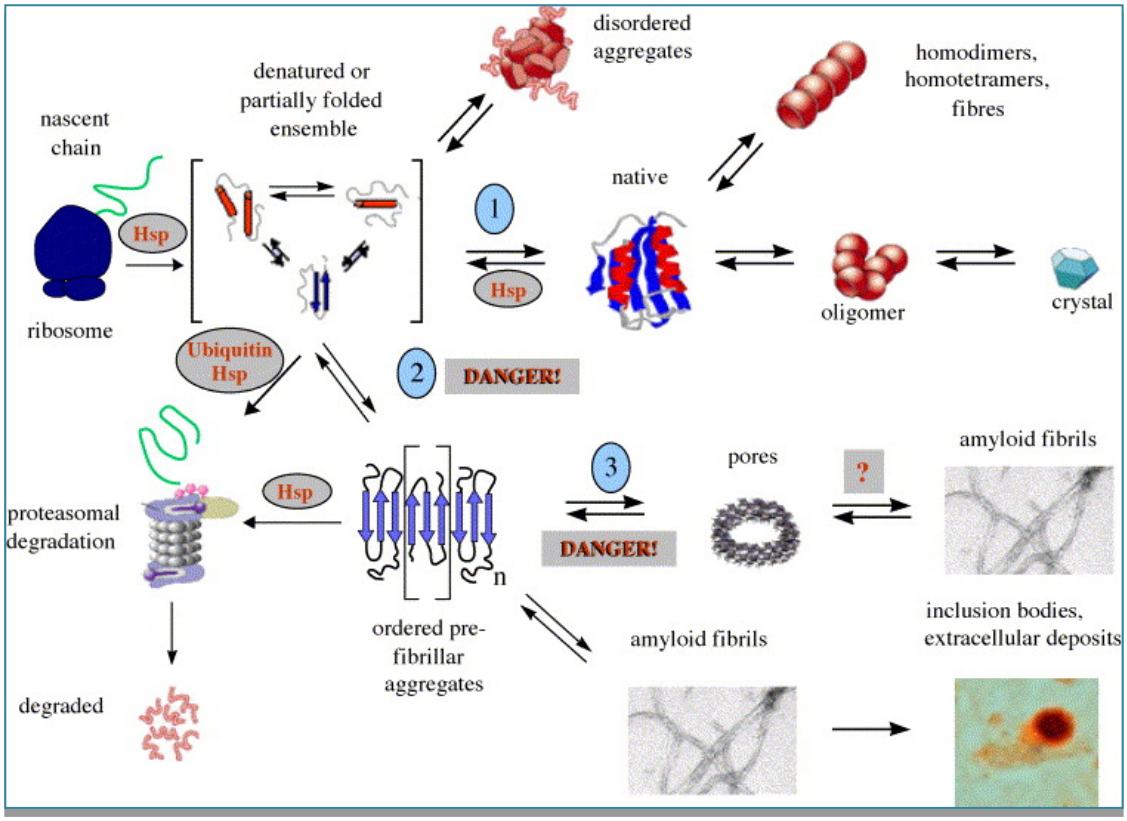
Η έννοια μιας «μολυσματικής πρωτεΐνης», ή prion, προτάθηκε στη δεκαετία του 1960 για να εξηγήσει τη νόσο που προκαλούσαν τα prions. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ο «μολυσματικός» παράγοντας που μεταδίδει τη νόσο αυτή είναι ανθεκτικός στην υπεριώδη ακτινοβολία (η οποία καταστρέφει τα νουκλεϊκά οξέα), και πρότειναν ότι αυτός ο παράγοντας ήταν στην πραγματικότητα πρωτεΐνη [8, 9]. Η ιδέα ότι οι πρωτεΐνες θα μπορούσαν να είναι «μολυσματικές» από μόνες τους ήταν εξαιρετικά αμφιλεγόμενη, διότι φάνηκε να αμφισβητεί το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας. Τελικά, ο Stanley B Prusiner και η ομάδα του κατέληξαν στο ότι η πρωτεΐνη prion ήταν υπεύθυνη για την νόσο αυτή, και απέδειξαν ότι οι πρωτεΐνες μπορεί πράγματι να είναι «μολυσματικές» [10]. Για το έργο αυτό, ο Prusiner τιμήθηκε με το Βραβείο Νόμπελ Ιατρικής το 1997.

Κατά συνέπεια, σήμερα γνωρίζουμε ότι υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες οι πρωτεΐνες αδυνατούν να διπλωθούν σωστά. Το **μη φυσιολογικό** αυτό **δίπλωμα**, μπορεί να

οφείλεται σε αρκετούς παράγοντες, όπως στο περιβάλλον του κυττάρου (θερμοκρασία, pH), σε μεταλλαγές ή ακόμα και σε αδυναμία της λειτουργίας των μοριακών συνοδών [11]. Κατά συνέπεια, δημιουργούνται πρωτεΐνες οι οποίες δεν είναι λειτουργικές και μπορεί να είναι τοξικές για το κύτταρο. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι ικανές να δημιουργήσουν σε ορισμένες περιπτώσεις, ινιδιακά συσσωματώματα, τα οποία είναι αδιάλυτα και εναποτίθενται ως **αμυλοειδή ινίδια** εντός ή και εκτός του κυττάρου (Εικόνα 3) [12]. Ο όρος αμυλοειδή ινιδία μέχρι πρόσφατα παρέπεμπε σε παθολογικές καταστάσεις και συγκεκριμένα σε εναποθέσεις ινιδίων που είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία στερεοδιαταξικών ασθενειών, τις **αμυλοειδώσεις** [13]. Η νόσος του Αλτσχάιμερ (Alzheimers Disease) [14], ο διαβήτης τύπου ΙΙ (Type II diabetes) [15], η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια (Creutzfeldt–Jakob's Disease) [16] και άλλες (Πίνακα 1), είναι αποτέλεσμα εναποθέσεων αμυλοειδών ινιδίων. Ωστόσο, το 2000 προτάθηκε από τους Iconomidou, et al πως πεπτίδια- ανάλογα του χορίου των μεταξοσκωλήκων είναι φυσικά **προστατευτικά αμυλοειδή** [17], μία ανακάλυψη που χάραξε νέους δρόμους για την μελέτη και τον τρόπο προσέγγισης των αμυλοειδών ινιδίων.

Συνεπώς, σήμερα με τον όρο **αμυλοειδή ινίδια** αναφερόμαστε σε εξωκυττάριες ή ενδοκυττάριες εναποθέσεις αδιάλυτων πρωτεϊνικών ινιδίων που δημιουργούνται από διαλυτές πρωτεΐνες/πεπτίδια όταν αυτές διπλώνονται και αυτοσυγκροτούνται [18]:

- με φυσιολογικό τρόπο και εκτελούν συγκεκριμένες πολύπλοκες βιολογικές διεργασίες (***ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ ΑΜΥΛΟΕΙΔΗ***) [19]
- με μη φυσιολογικό τρόπο προκαλώντας την καταστροφή κυττάρων και ιστών, δημιουργώντας ασθένειες που ονομάζονται αμυλοειδώσεις (***ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΑΜΥΛΟΕΙΔΗ***) [13]



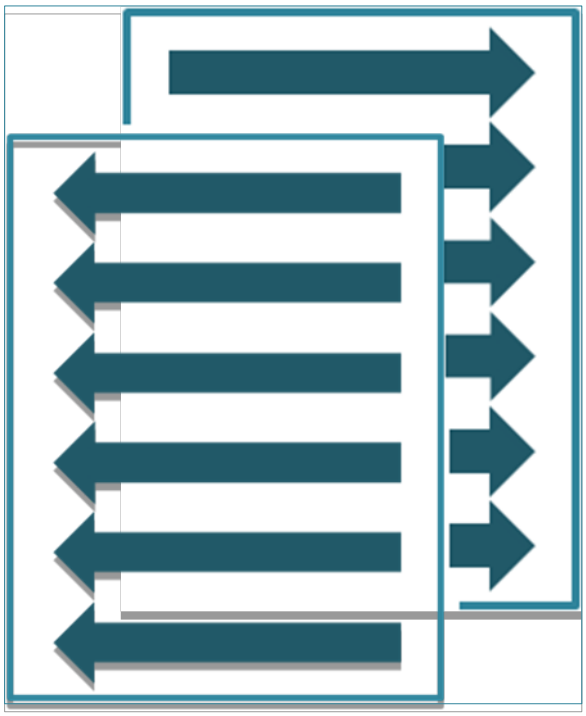
Εικόνα 3: Τα μονοπάτια που ακολουθούν οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες στο κύτταρο και ο τρόπος δημιουργίας αμυλοειδών ινιδίων όταν διπλώνονται κατά μη φυσιολογικό τρόπο.

Ο Rudolf Virchow, ο οποίος θεωρείται «πατέρας της παθολογίας», το 1854 χρησιμοποίησε ιώδιο για να βάψει σε τομές εγκεφάλου μη φυσιολογικές εναποθέσεις, άγνωστης μέχρι τότε φύσεως. Μετά την προσθήκη θειικού οξέος το χρώμα των εναποθέσεων έγινε μπλε, αντίδραση χαρακτηριστική της ύπαρξης αμύλου και για το λόγο αυτό ο Virchow ονόμασε τις εναποθέσεις αυτές αμυλοειδή [20]. Λίγο αργότερα, οι Friedreich και Kekulé βασιζόμενοι στην υψηλή περιεκτικότητα των αμυλοειδών σε άζωτο, απέδειξαν πως τα αμυλοειδή αποτελούνται από πρωτεΐνες και όχι από άμυλο όπως είχε προταθεί λίγα χρόνια πριν [21].

Το 1927, οι Divry και Florkin, χρησιμοποίησαν την χρωστική Congo Red σε δείγμα αμυλοειδών ινιδίων. Η χρωστική αυτή βάφει κόκκινα τα δείγματα. Τοποθετώντας το δείγμα σε πολωτικό μικροσκόπιο κάτω από διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη, παρατήρησαν την χαρακτηριστική για τα αμυλοειδή ινίδια **κιτρινοπράσινη διπλοθαστικότητα**, λόγω ευθυγράμμισης των μορίων της χρωστικής που προκαλείται από τα αμυλοειδή ινίδια. Η χρώση αυτή αποτέλεσε το πρώτο διαγνωστικό κριτήριο για την

ύπαρξη αμυλοειδών ινιδίων [22]. Επιπροσθέτως, τα αμυλοειδή ινίδια δεσμεύουν και άλλες χρωστικές, όπως τη θειοφλαβίνη Τ, η οποία φθορίζει, όταν παρατηρηθεί με μικροσκοπία φθορισμού [23].

Η πρωτεϊνική φύση των αμυλοειδών ινιδίων, ανεξάρτητα από τον ιστό προέλευσής τους, επιβεβαιώθηκε όταν παρατηρήθηκαν αμυλοειδείς εναποθέσεις κάτω από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [24], ενώ η κοινή τους δομή που είχε προταθεί το 1935, επιβεβαιώθηκε όταν προέκυψαν περιθλασιγράμματα *"cross- β"* δομής, με περίθλαση ακτίνων- Χ [25] . Στην *"cross-β"* δομή οι β-πτυχωτές επιφάνειες (παράλληλες ως προς τον άξονα της ίνας) προσανατολίζονται με τέτοιο τρόπο ώστε οι β-κλώνοι να είναι κάθετοι ως προς τον άξονα της ίνας [26] (Εικόνα 2). Τα αμυλοειδή ινίδια λόγω της "cross-β" δομής τους, είναι πιο ανθεκτικά στην πρωτεόλυση [27, 28].



Εικόνα 4: *"Cross-β"* δομή. Η *"cross-β"* δομή είναι δευτεροταγής δομή κατά την οποία οι β-πτυχωτές επιφάνειες προσανατολίζονται με τέτοιο τρόπο ώστε οι β-κλώνοι να είναι κάθετοι ως προς τον άξονα της ίνας, ο οποίος δημιουργείται από παράλληλα προσανατολισμένα ινίδια. Κόκκινο βέλος: Άξονας της ίνας.

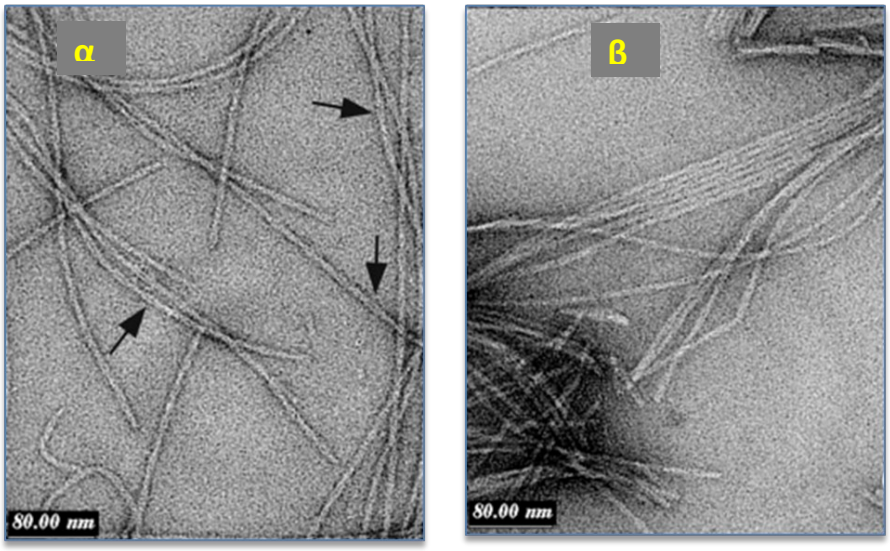
1.1.3 Διαγνωστικά κριτήρια αμυλοειδών ινιδίων

Τα αμυλοειδή ινίδια ανεξάρτητα από το είδος του οργανισμού ή το κύτταρο από το οποίο προέρχονται διαθέτουν κοινά μορφολογικά και δομικά χαρακτηριστικά, τα οποία

και μας επιτρέπουν να τα ανιχνεύουμε [24]. Αξίζει να σημειωθεί πως τα ώριμα ινίδια μπορεί να απαρτίζονται από λεπτότερα **πρωτοϊνίδια** [29], τα οποία συνήθως αλληλεπιδρούν πλευρικά με διάφορους τρόπους. Αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης πρωτοϊνιδίων είναι η δημιουργία **υπερδομών** όπως υπερέλικες ή ταινίες και για το λόγο αυτό θεωρείται πως τα αμυλοειδή ινίδια εμφανίζουν ευδιάκριτο **πολυμορφισμό**, του οποίου το αίτιο δημιουργίας μέχρι και σήμερα δεν έχει προσδιοριστεί (Εικόνα 5) [30].

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΔΙΕΛΕΥΣΗΣ

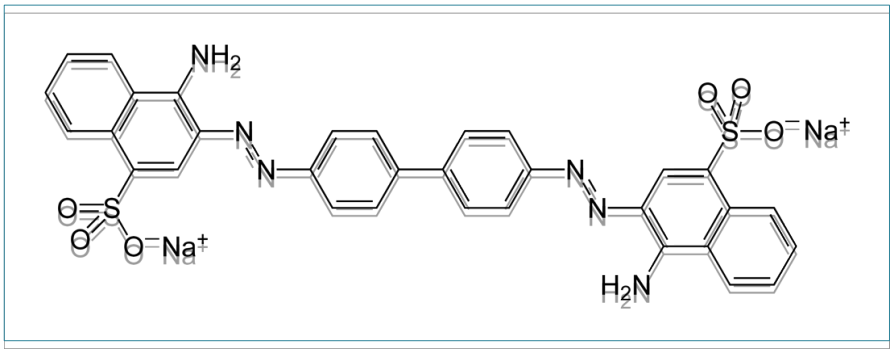
Τα αμυλοειδή ινίδια όταν παρατηρηθούν στο ***Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης*** φαίνονται ομοιόμορφα, ευθύγραμμα, αδιακλάδιστα, με ακαθόριστο μήκος και έχουν διάμετρο περίπου 100Å (Εικόνα 5). Η πρώτη περιγραφή τους έγινε από τους Cohen and Calkins το 1959, οι οποίοι παρατήρησαν αμυλοειδή σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης [24].



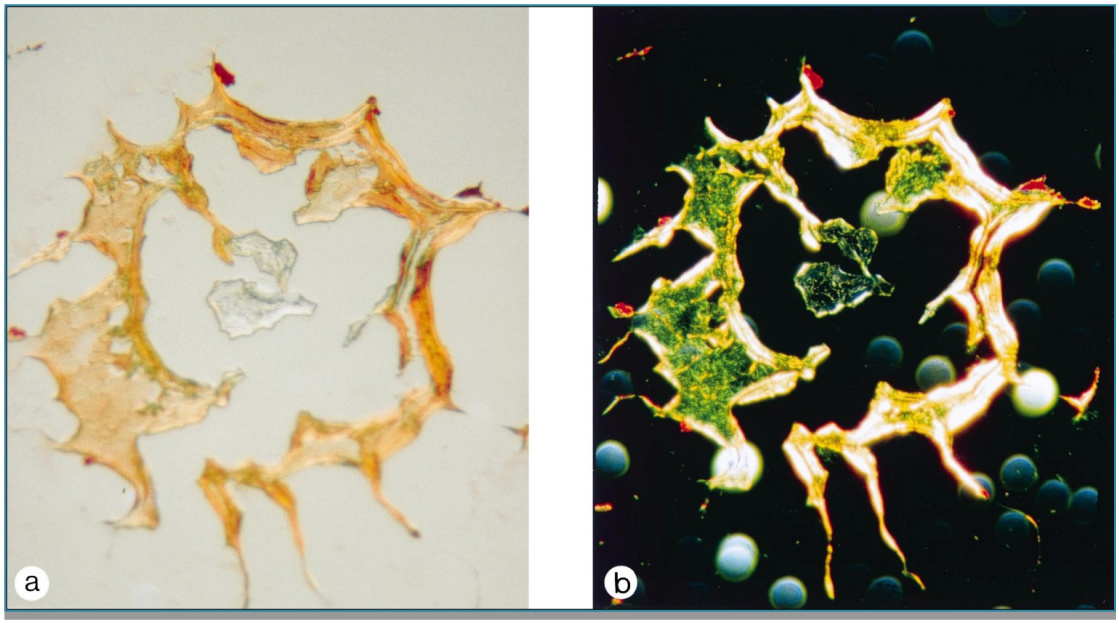
Εικόνα 5: Δημιουργία υπερδομών. Αμυλοειδή ινίδια ενός πεπτιδίου- αναλόγου του χορίου των μεταξοσκωλήκων. Τα πρωτοϊνίδια αυτά είναι ακαθόριστου μήκους, αδιακλάδιστα και με διάμετρο 60-70Å. Παρατηρούμε πως τα πρωτοϊνίδια αλληλεπιδρούν με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζονται υπερδομές (υπερέλικες με βέλη στην εικόνα α και ταινίες στην εικόνα β [31].

ΧΡΩΣΗ ΜΕ CONGO RED ΚΑΙ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΣΕ ΠΟΛΩΤΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

Σε σταγόνες από υδατικά διαλύματα αμυλοειδών ινιδίων, στις οποίες έχει γίνει χρώση με Congo Red (Εικόνα 6), πραγματοποιείται δέσμευση της χρωστικής και τα υμένια που έχουν δημιουργηθεί παρατηρούνται κόκκινα. Τοποθετώντας το δείγμα σε πολωτικό μικροσκόπιο με διασταυρωμένους πολωτή και αναλύτη εμφανίζεται **κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα** (Εικόνα 7), η οποία αποτελεί διαγνωστικό κριτήριο της ύπαρξης αμυλοειδών ινιδίων στο διάλυμα [32]. Η κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα οφείλεται στην ευθυγράμμιση των μορίων της χρωστικής πάνω στα αμυλοειδή ινίδια. Ωστόσο, έχει βρεθεί πως η χρωστική δεσμεύεται και σε υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, οπότε για τον προσδιορισμό των αμυλοειδών ινιδίων θα πρέπει να συνδυάζεται και με άλλες βιοφυσικές μεθόδους [33].



Εικόνα 6: Η χρωστική Congo Red είναι ένα διαζο-άλας του Νατρίου (3,3'-([1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(4-aminonaphthalene-1-sulfonic acid).



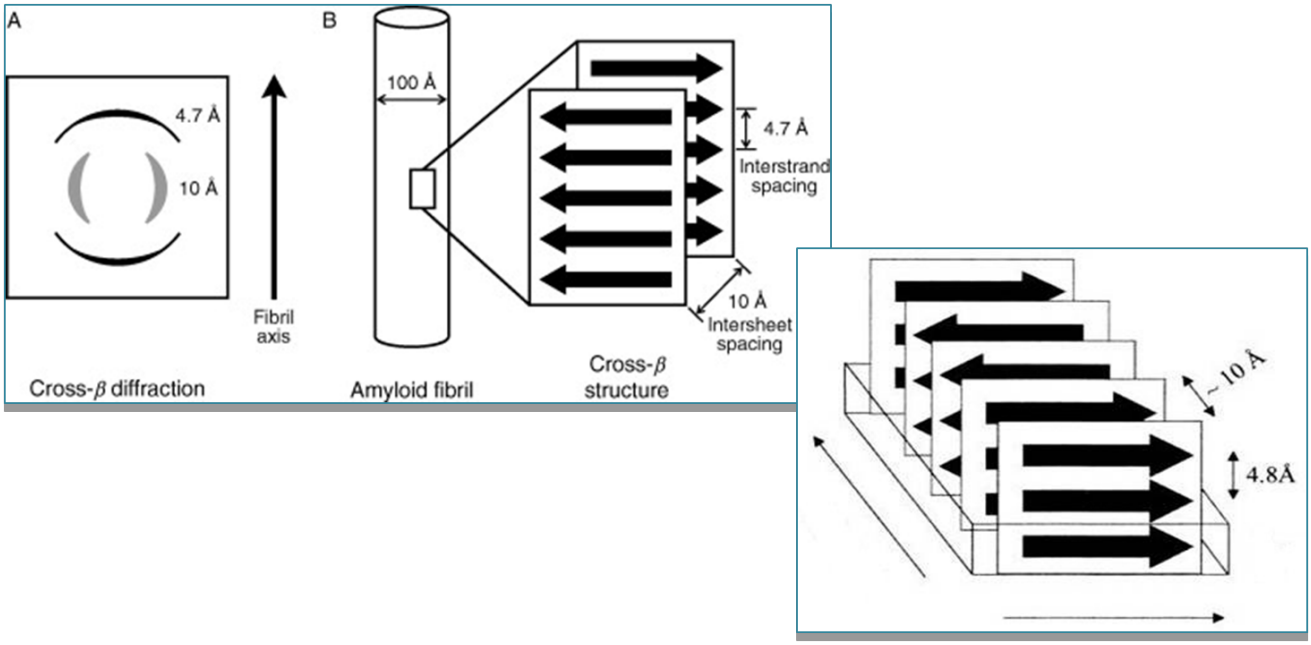
Εικόνα 7 Σταγόνα από διάλυμα ενός πεπτιδίου- αναλόγου του χορίου των μεταξοσκωλήκων μετά από χρώση με Congo Red. a) Πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα έχει δημιουργηθεί υμένιο και έπειτα από χρώση με Congo Red, φαίνεται κόκκινο. b) Έπειτα από παρατήρηση σε πολωτικό μικροσκόπιο με διασταυρωμένους πολωτή και αναλύτη, φαίνεται ξεκάθαρα η χαρακτηριστική για τα αμυλοειδή ινίδια κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα.

ΠΕΡΙΘΛΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ-Χ

Μελέτες στις πρωτεΐνες του εντόμου *Chrysopa flava* θεμελίωσαν την "cross-β" δομή των αμυλοειδών ινιδίων [26]. Με περίθλαση ακτίνων- Χ σε προσανατολισμένη ίνα πρωτεϊνών που σχηματίζουν αμυλοειδή ινίδια, προκύπτει περιθλασίγραμμα "cross-β" δομής, το οποίο εμφανίζει δύο χαρακτηριστικές ανακλάσεις (Εικόνα 8):

- Την **ισημερινή ανάκλαση** που υποδεικνύει την απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-πτυχωτών επιφανειών (Περίπου στα 8-12Å), που διευθετούνται παράλληλα ως προς τον άξονα της ίνας [26]. Η διακύμανση στην ισημερινή ανάκλαση οφείλεται στο μέγεθος των πλευρικών αλυσίδων που παρεμβάλλονται [34].

- Την **μεσημβρινή ανάκλαση** που υποδεικνύει την απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-κλώνων (Περίπου στα 4,7Å), οι οποίοι διευθετούνται κάθετα ως προς τον επιμήκη άξονα της ίνας [26] .



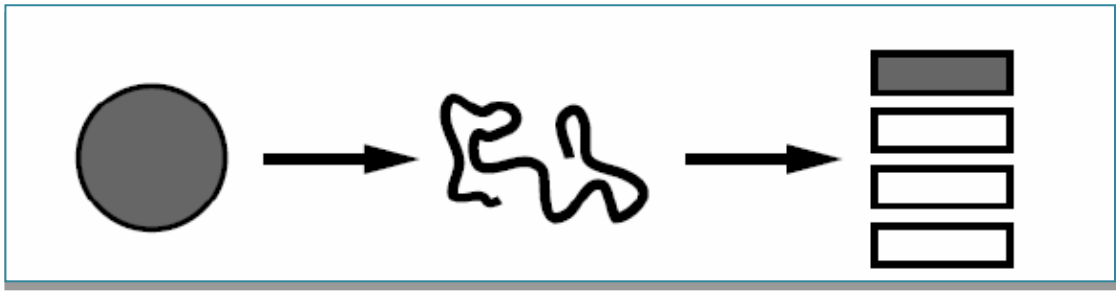
Εικόνα 8: Α) Περιθλασίγραμμα ακτίνων-Χ "cross-β" δομής. Φαίνονται οι χαρακτηριστικές "cross-β" ανακλάσεις. Β) Η ισημερινή ανάκλαση στα 10Å αντιστοιχεί στην απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών β-πτυχωτών επιφανειών. Η μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.7Å αντιστοιχεί στην απόσταση των διαδοχικών β-κλώνων οι οποίοι είναι κάθετοι στον επιμήκη άξονα της ίνας. Η διάμετρος των ινιδίων, από τα οποία αποτελείται η κάθε ίνα, είναι 100Å

Σημείωση: Οι β-κλώνοι στις β-πτυχωτές επιφάνειες μπορεί να είναι τόσο παράλληλοι, όσο και αντιπαράλληλοι.

1.1.3 Μηχανισμός δημιουργίας Αμυλοειδών Ινιδίων

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν προκύπτει το εξής βιολογικό ερώτημα: ***Ποιος είναι ο τρόπος δημιουργίας των αμυλοειδών ινιδίων;*** Η απάντηση στο παραπάνω ερώτημα δεν είναι εύκολη καθότι δεν υπάρχει κοινός μηχανισμός με βάση τον οποίο γίνεται η αυτοσυγκρότηση της πρωτεΐνης σε αμυλοειδή ινίδια. Ωστόσο, έπειτα από αρκετές βιοφυσικές και βιοχημικές μελέτες, έχουν προταθεί συγκεκριμένα πιθανά μοριακά μοντέλα για την δημιουργία της δομής των αμυλοειδών ινιδίων [35]. Τα μοντέλα αυτά μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις βασικές κατηγορίες [36]:

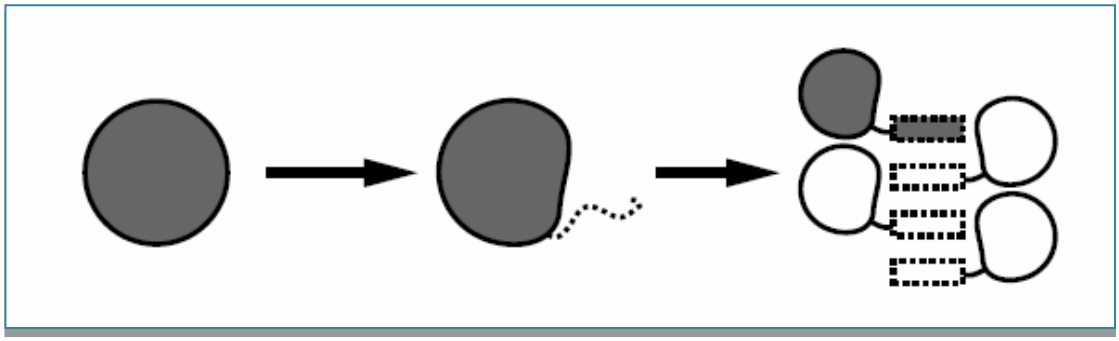
Refolding model- Μοντέλο αναδίπλωσης



Εικόνα 9: Refolding model για την αυτοσυγκρότηση πρωτεϊνών σε αμυλοειδή ινίδια. Οι πρωτεΐνες που εν δυνάμει μπορούν να δημιουργήσουν ινίδια, υπάρχουν σε δύο διακριτές καταστάσεις: την φυσική κατάσταση και την ινώδη κατάσταση. Για την μετατροπή της πρωτεΐνης από τη μία κατάσταση στην άλλη, η πρωτεΐνη θα πρέπει να ξεδιπλωθεί και να διπλωθεί εκ νέου.

Το μοντέλο αυτό προτείνει πως οι πρωτεΐνες που εν δυνάμει μπορούν να δημιουργήσουν ινίδια, υπάρχουν σε δύο διακριτές καταστάσεις: την φυσική κατάσταση και την κατάσταση που οδηγεί στο σχηματισμό ινιδίων [25]. Για την μετατροπή της πρωτεΐνης από τη μία κατάσταση στην άλλη, η πρωτεΐνη θα πρέπει να ξεδιπλωθεί και να διπλωθεί εκ νέου (Εικόνα 9). Στην διαδικασία αυτή σπουδαίο ρόλο διαδραματίζει ο σκελετός της πρωτεΐνης και όχι οι πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων [37]. Πρωτεΐνες οι οποίες πιθανόν ακολουθούν αυτό το μοντέλο κατά την ινιδογένεση, είναι η ινσουλίνη [38], τα prions [39], κ.α.

Gain of interaction - Μοντέλο αλληλεπίδρασης μέσω συνεισφοράς



Εικόνα 10: Μοντέλο αλληλεπίδρασης μέσω συνεισφοράς για την αυτοσυγκρότηση πρωτεϊνών σε αμυλοειδή ινίδια. Μια αλλαγή στην στερεοδιάταξη σε μία περιορισμένη περιοχή της φυσιολογικής πρωτεΐνης, εκθέτει στην επιφάνεια ένα τμήμα, το οποίο ήταν μη προσβάσιμο και είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία των αμυλοειδών ινιδίων

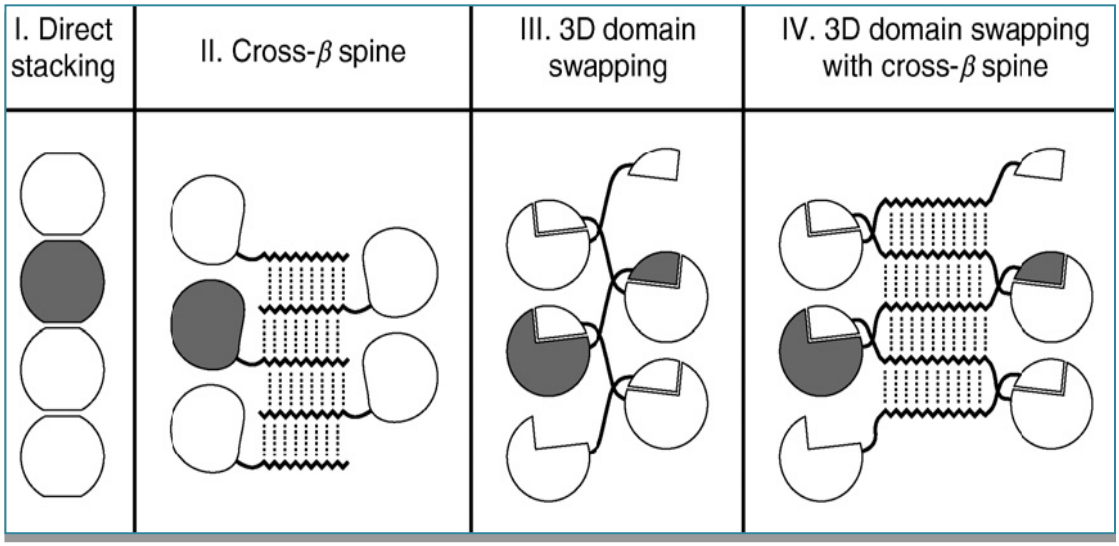
Το δεύτερο μοντέλο που αφορά τον σχηματισμό των ινιδίων προτείνει ότι μια αλλαγή στην στερεοδιάταξη σε μία περιορισμένη περιοχή της φυσιολογικής πρωτεΐνης, εκθέτει στην επιφάνεια ένα τμήμα, το οποίο ήταν προηγουμένως μη προσβάσιμο και είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία των αμυλοειδών ινιδίων [36]. Σε αυτά τα μοντέλα το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης διατηρεί την αρχική δομή του. Κατά τη διαδικασία δημιουργίας των ινιδίων, το τμήμα που έχει εκτεθεί, αλληλεπιδρά με άλλα όμοιά του και σχηματίζει τον πυρήνα των αμυλοειδών ινιδίων (Εικόνα 10) [36]. Με βάση την αλληλεπίδραση των μονομερών, διακρίνονται τέσσερις κατηγορίες (Εικόνα 11):

- ***Direct-stacking- μοντέλο της στοίβας***: μικρή αλλαγή της στερεοδιάταξης δημιουργεί στοίβα των υπομονάδων, επιτρέποντας τον σχηματισμό των ινιδίων , όπως πιθανόν να συμβαίνει στην περίπτωση της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) [40].

- ***Cross-β spine***: το τμήμα της περιοχής που εκτίθεται, αλλάζει δομικά και αποκτά δομή β-κλώνου. Πολλοί β-κλώνοι δημιουργούν β-πτυχωτές επιφάνειες, όπως πιθανόν να συμβαίνει στην περίπτωση της β2-μικροσφαιρίνης [41].

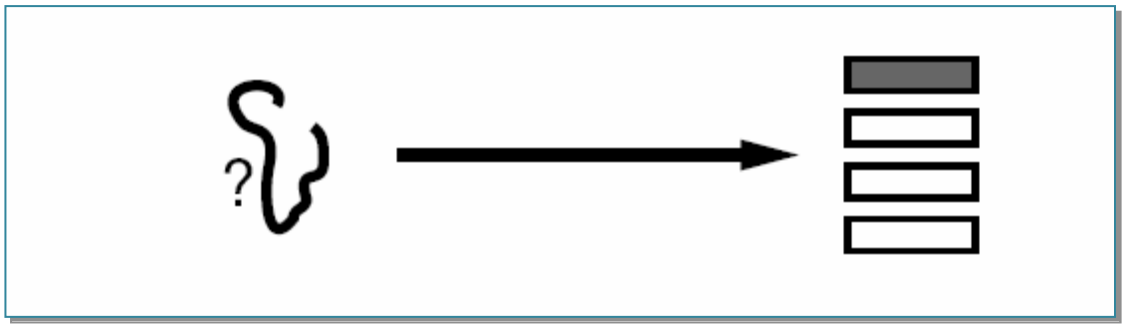
- ***Domain swapping models:*** με ανταλλαγή αυτοτελών δομικά περιοχών, όπως πιθανόν να συμβαίνει στην περίπτωση της Κυστατίνης C [42].

- ***Ανταλλαγή αυτοτελών δομικών περιοχών με ταυτόχρονη δημιουργία β-πτυχωτών επιφανειών:*** είναι ο συνδυασμός των δυο προηγούμενων μοντέλων**,** όπως πιθανόν να συμβαίνει στην περίπτωση της ριβονουκλεάσης Α [43].



Εικόνα 11: ***:*** *I. Direct-stacking: μικρή αλλαγή της στερεοδιάταξης επιτρέπει τον σχηματισμό των ινιδίων μέσω στοιβάγματος των υπομονάδων. II. Cross-β spine: το τμήμα της περιοχής που εκτίθεται, αλλάζει δομικά και αποκτά δομή β-κλώνου, πολυμερίζεται δημιουργώντας β-πτυχωτές επιφάνειες. III. Domain swapping models: με ανταλλαγή αυτοτελών δομικά περιοχών. IV. Ανταλλαγή αυτοτελών δομικών περιοχών με ταυτόχρονη δημιουργία β-πτυχωτών επιφανειών.*

Natively disordered proteins- Μοντέλο αυτοσυγκρότησης εγγενώς μη δομημένων πρωτεϊνών



Εικόνα 12: *Natively disordered proteins. Αφορά πρωτεΐνες οι οποίες δεν εμφανίζουν κάποια συγκεκριμένη δομή. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, τμήματα της πρωτεΐνης που δεν είναι πλήρως δομημένα, αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν αμυλοειδή ινίδια, όπως συμβαίνει στην περίπτωση Sup35p και Ure2p.*

Μέχρι το 1960 πιστευόταν πως οι πρωτεΐνες για να είναι λειτουργικές θα πρέπει να διαθέτουν σταθερή τριτοταγή δομή. Το 1960, ο Levinthal παρατήρησε πως λόγω του μεγάλου αριθμού των βαθμών ελευθερίας σε μία μη διπλωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα, το μόριο έχει αυξημένο αριθμό πιθανών στερεοδιατάξεων [44]. Είναι απίθανο να ληφθούν όλες οι πιθανές στερεοδιατάξεις μίας πρωτεΐνης, μέχρι να βρεθεί η κατάλληλη, ακόμη και αν η δημιουργία της κάθε μίας διαρκούσε nanoseconds ή picoseconds. Το παράδοξο είναι ότι οι μικρές πρωτεΐνες λαμβάνουν την τελική στερεοδιάταξή τους σε milliseconds ή microseconds [45]. Ο Levinthal πρότεινε πως το παράδοξο αυτό, μπορεί να εξηγηθεί με την ύπαρξη τοπικών αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται ταχύτατα και καθοδηγούν το δίπλωμα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων [46]. Για να συμβαίνει αυτό θα πρέπει να υπάρχουν κάποια αμινοξικά κατάλοιπα, που δημιουργούν σταθερές αλληλεπιδράσεις.

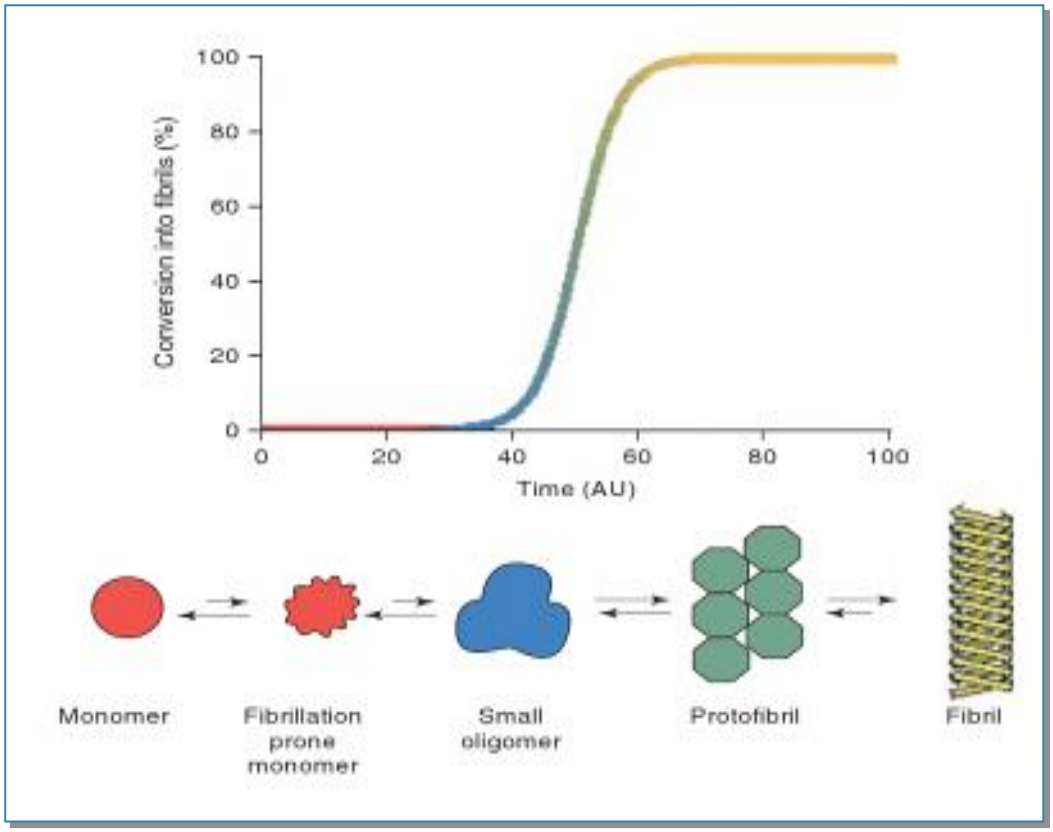
Οι **ενδογενώς μη δομημένες πρωτεΐνες ή πεπτίδια** (IDPs ή IDRs) είναι μία κατηγορία πρωτεϊνών που δεν έχουν σταθερή τρισδιάστατη δομή υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά είναι λειτουργικές. Μια τέτοια πρωτεΐνη μπορεί να είναι ολόκληρη μη δομημένη (disordered), ή να περιέχει μικρές ή μεγάλες εγγενώς μη δομημένες περιοχές (IDRs). Αυτού του τύπου οι πρωτεΐνες δεν αποτελούν εξαιρέσεις αλλά απαντώνται ευρέως και συνιστούν μια ομάδα με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά [47]. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα

συμβάλλουν στην επικοινωνία και στην ρύθμιση και είναι περισσότερες από ότι στα προκαρυωτικά κύτταρα, συμμετέχοντας και σε διαδικασίες μεταγωγής σήματος [48].

Το τελευταίο μοντέλο με βάση το οποίο γίνεται η αυτοσυγκρότηση της πρωτεΐνης σε αμυλοειδή ινίδια, αφορά τις παραπάνω πρωτεΐνες. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, τμήματα της πρωτεΐνης που δεν είναι πλήρως δομημένα, αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν αμυλοειδή ινίδια, όπως έχει προταθεί ότι συμβαίνει πιθανότατα στην περίπτωση του καρβοξυτελικού τμήματος της Ure2p (Εικόνα 12) [49].

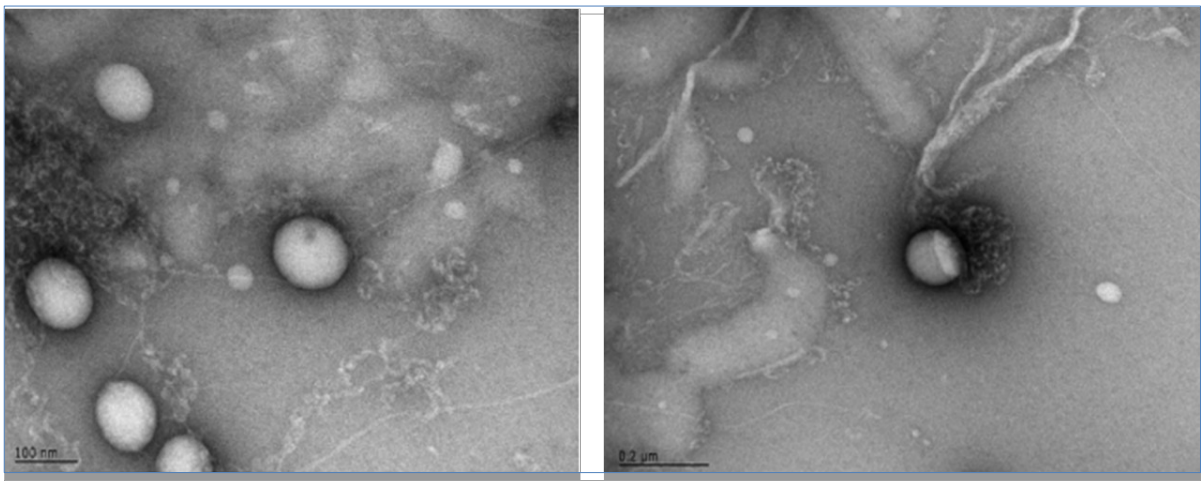
ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΗΣ ΙΝΙΔΟΓΕΝΕΣΗΣ

Μία άλλη σημαντική προσέγγιση της ινιδογένεσης είναι η κινητική προσέγγιση, με βάση την οποία κατά την δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων δημιουργούνται τρεις φάσεις. [50]. Η λανθάνουσα φάση, η φάση της επιμήκυνσης και η στατική φάση. Η ***λανθάνουσα φάση*** διαρκεί από μερικά λεπτά έως μερικές μέρες και δημιουργούνται τα αρχικά ολιγομερή των πρωτεϊνών, μέσω των μονομερών. Ακολουθεί η ***φάση επιμήκυνσης***, κατά την οποία έχουν ήδη δημιουργηθεί ολιγομερή πρωτεΐνης, τα οποία λειτουργούν ως πυρήνες στη φάση αυτή και επιμηκύνονται με γρήγορους ρυθμούς, σχηματίζοντας ινίδια και σε ορισμένες περιπτώσεις και πρωτοϊνίδια. Τέλος, κατά τη ***στατική φάση*** τα μονομερή της πρωτεΐνης, τα ολιγομερή, τα πρωτοϊνίδια (αν υπάρχουν) και τα ώριμα ινίδια βρίσκονται σε ισορροπία [51] (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: *Κινητική της ινιδογένεσης. Η **λανθάνουσα φάση** διαρκεί από μερικά λεπτά έως μερικές μέρες και δημιουργούνται τα αρχικά ολιγομερή των πρωτεϊνών, μέσω των μονομερών. Ακολουθεί η **φάση επιμήκυνσης**, κατά την οποία έχουν ήδη δημιουργηθεί ολιγομερή πρωτεΐνης, τα οποία λειτουργούν ως πυρήνες στη φάση αυτή και επιμηκύνονται με γρήγορους ρυθμούς, σχηματίζοντας ινίδια και σε ορισμένες περιπτώσεις και πρωτοϊνίδια. Τέλος, κατά τη **στατική φάση** τα μονομερή της πρωτεΐνης, τα ολιγομερή, τα πρωτοϊνίδια (αν υπάρχουν) και τα ώριμα ινίδια βρίσκονται σε ισορροπία [51].*

Σημαντική ανακάλυψη, όσον αφορά το μηχανισμό δημιουργίας των αμυλοειδών ινιδίων, ήταν η ανακάλυψη του πιθανού σχηματισμού δομών υγροκρυσταλλικής φυσής, των σφαιρουλιτών [52]. Πειράματα κινητικής σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης έδειξαν ότι από την διάρρηξη των σφαιρουλιτών αυτών απελευθερώνονται ινίδια διαμέτρου 50-100 Å, τα οποία στα αρχικά στάδια της ινιδογένεσης συνυπάρχουν με τους σφαιρουλίτες (Εικόνα 13).



Εικόνα 14: *α) Ηλεκτρονική μικρογραφία σφαιρουλιτών πεπτιδίου- αναλόγου του χορίου των μεταξοσκωλήκων μαζί με αμέσως σχηματιζόμενα αμυλοειδή ινίδια, τα οποία συχνά φαίνεται να προέρχονται από σφαιρουλίτες που έχουν διαρρηχθεί. Στο δείγμα έχει γίνει αρνητική χρώση με 1% οξικό ουρανύλιο. Bar 100 nm β) Ένα στιγμιότυπο σφαιρουλίτη που έχει σπάσει μετά από 2 ημέρες επώασης. Στο δείγμα έχει γίνει αρνητική χρώση με 1% οξικό ουρανύλιο. Bar 0,2 μm. [52]*

1.1.4 Παθολογικά αμυλοειδή- Αμυλοειδώσεις

Εξαιτίας του μη φυσιολογικού διπλώματος των πρωτεϊνών υπάρχουν κάποιες αναπόφευκτες συνέπειες, όπως η απώλεια της λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, η δημιουργία τοξικών ολιγομερών της πρωτεΐνης και σε ορισμένες περιπτώσεις η δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων [11]. Οι αμυλοειδώσεις μπορεί να επηρεάσουν ένα όργανο (**εντοπισμένες**) ή ένα εκτεταμένο δίκτυο ιστών και οργάνων (**συστημικές**) [53, 54]. Ακόμα, χαρακτηρίζονται ως **πρωτογενείς**, αν οι αμυλοειδείς εναποθέσεις είναι η άμεση αιτία πρόκλησης της νόσου ή **δευτερογενείς**, αν η διαταραχή είναι αποτέλεσμα κάποιας φλεγμονής ή αντίδρασης στην παρουσία των εναποθέσεων. Σε κάθε μία από τις παθολογικές καταστάσεις μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη ή θραύσμα αυτής, αλλάζει από τη φυσική διαλυτή της μορφή σε αδιάλυτα ινίδια που εμφανίζουν πολλές κοινές ιδιότητες [55]. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως σε κάποιες περιπτώσεις δεν είναι τα ινίδια που δημιουργούν τοξικές καταστάσεις, αλλά ο σχηματισμός ολιγομερών, όπως στην περίπτωση των σωματίων Lewy στη νόσο του Πάρκινσον [56].

Η πρώτη αμυλοειδογόνος πρωτεΐνη που απομονώθηκε, αλληλουχήθηκε και χαρακτηρίστηκε ως μοναδική για τον τρόπο παραγωγής της, ήταν το αμυλοειδές Α (AA amyloid). Η αμυλοειδογόνος πρωτεΐνη αυτή, είναι υπεύθυνη για την δημιουργία της πρώτης αναγνωρίσιμης αμυλοείδωσης, η οποία είναι συστημική και δευτερογενής αμυλοειδώση (ΑΑ) [57]. Η αμυλοείδωση αυτή είναι μία επιπλοκή χρόνιων φλεγμονών που προκαλούν διαταραχές και αναπτύσσεται όταν πρωτεολυτικά θραύσματα του αμυλοειδούς Α αποτίθενται στους ιστούς ως αμυλοειδή ινίδια [58]. Έκτοτε, αρκετές ασθένειες σχετίστηκαν με την εναπόθεση αμυλοειδών ινιδίων, όπως αρκετές νευροεκφυλιστικές ασθένειες (νόσος Alzheimer, νόσος του Parkinson και άλλες) [59].

Σύμφωνα με την Διεθνή Κοινότητα των Αμυλοειδώσεων (International Society of Amyloidosis), όλες οι μέχρι σήμερα γνωστές αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες καθώς και οι ασθένειες που προκαλούν, βρίσκονται ομαδοποιημένες σε ένα κατάλογο, ο οποίος φαίνεται στον Πίνακα 1 [60].

Αμυλοειδογόνος πρωτεΐνη	Όργανα που προσβάλλει
β2 Microglobulin (wild type)	Μυοσκελετικό σύστημα
β2 Microglobulin (variant)	ΑΝΣ
Monoclonal immunoglobulin heavy chain (AH)	Όλα τα όργανα εκτός από το ΚΝΣ
Monoclonal immunoglobulin heavy chain (AL)	Όλα τα όργανα εκτός από το ΚΝΣ
Transthyretin (wild type)	Καρδιά σε άντρες κυρίως, τένοντες
Transthyretin (variant)	ΠΝΣ, ΑΝΣ, καρδιά, οφθαλμός
(Apo) Serum amyloid A	Όλα τα όργανα εκτός από το ΚΝΣ
Apolipoprotein AI (Apo AI)	Καρδιά, ήπαρ, νεφρούς, ΠΝΣ, λάρυγγα (C terminal variants), δέρμα(C terminal variants), όρχεις
Apolipoprotein AIII (Apo AIII)	Νεφρούς
Apolipoprotein AIV (Apo AIV)	Νεφρούς
Gelsolin	ΠΝΣ, κερατοειδής
Lysozyme	Νεφρούς
Leukocyte chemostatic factor-2	Νεφρούς
Fibrinogen a	Νεφρούς
Cystatin C	ΠΝΣ, δέρμα
ABri	ΚΝΣ
ADan[a]	ΚΝΣ
Aβ protein precursor	ΚΝΣ
Prion proteins (PrP) (wild type)	ΚΝΣ, θανατηφόρα αϋπνία
Prion proteins (PrP) (variant)	ΚΝΣ, θανατηφόρα αϋπνία, GSS σύνδρομο
Calcitonin	C- κύτταρα θυρεοειδούς αδένα
Islet Amyloid Polypeptide (IAPP)	Νησίδια Langerhans, Πάγκρεας
Atrial Natriuretic Factor	Κόλπος της καρδιάς
Prolactin	Προλακτίνωμα υπόφυσης
Insulin	Ιατρογενής, ινσουλινώματα, τοπική ένεση
Lung surfactant protein	Πνεύμονες
Galectin-7	Δέρμα
Corneodesmin	Κερατινοποιημένο επιθήλιο, θύλακες των τριχών
Kerato-epithelin	Κερατοειδή χιτώνα, κληρονομική
Lactoferrin	Κερατοειδή χιτώνα
Odontogenic ameloblast-associated protein	Οδοντοστοιχία
Semenogelin 1	Σπερματικά σωληνάρια
Superoxide dismutase	ΚΝΣ

την Διεθνή Κοινότητα για Αμυλοειδώσεις.

1.1.5 Φυσικά Προστατευτικά - Λειτουργικά αμυλοειδή

Τα τελευταία χρόνια, έχει βρεθεί ότι οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό λειτουργικό ρόλο σε πολλές περιπτώσεις, σε μία ποικιλία διαφορετικών ειδών [19]. Αυτές οι μελέτες κατέρριψαν τον ισχυρισμό ότι τα αμυλοειδή ινίδια προκύπτουν αποκλειστικά από το μη φυσιολογικό δίπλωμα μίας πρωτεΐνης και προκαλούν παθολογικές καταστάσεις. Αντίθετα, προτείνουν ότι τα φυσικά προστατευτικά αμυλοειδή ρυθμίζονται από την εξέλιξη προκειμένου να επιτελέσουν συγκεκριμένες πολύπλοκες βιολογικές διεργασίες, αφού είναι μηχανικά σταθερά, αδιάλυτα και ανθεκτικά στην πρωτεόλυση [61].

Στελέχη βακτηρίων της οικογένειας *Enterbacteriaceae,* δημιουργούν φυσικά προστατευτικά αμυλοειδή ινίδια (curli) για το σχηματισμό δομών (βιοϋμένια), που τους επιτρέπουν προσκόλληση σε επιφάνειες, είσοδό σε ξενιστές και αντοχή σε συνθήκες καταπόνησης [62] (Πίνακας 2).

Στο στέλεχος *Streptomyces ceolicolor*, τα chaplins συνιστούν μία τάξη υδρόφοβων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο σχηματισμό εναέριων υφών και σπορίων [63]. Τα chaplins μοιάζουν με τις υδροφοβίνες των νηματοειδών μυκήτων που είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία υφών και για την κυτταρική προσκόλληση [64]. Έχει βρεθεί πως τα chaplins και οι υδροφοβίνες αποτελούν αμυλοειδή ινίδια (Πίνακας 2).

Φυσικά προστατευτικά αμυλοειδή υπάρχουν και σε θηλαστικά. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα αμυλοειδή ινίδια της Pmel17, που σχηματίζουν το απαραίτητο υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση της μελανίνης, στα μελανοκύτταρα. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται όλες οι αμυλοειδογόνες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη δημιουργία φυσικών-προστατευτικών αμυλοειδών [60].

Αμυλοειδογόνος πρωτεΐνη	Οργανισμός	Λειτουργία
Curli	*Escherichia coli*	Βιοϋμένία, Κυτταρική προσκόλληση
Neuronal CPEB	*Homo sapiens*	Κυτταροπλασματική πολυαδενυλίωση
Pmel17	Mammals	Υπόστρωμα βιοσύνθεσης μελανίνης
Silkmoth Chorion	*A. polyphemus*	Πρωτεΐνες χορίου μεταξοσκωλήκων
Teleostean Chorion	*Teleostean fish*	Πρωτεΐνες χορίου τελεόστεων ιχθύων
Zona pellucida	*Homo sapiens*	Πρωτεΐνες Zona pellucida
Fibrin	Mammals	Ενεργοποίηση παργόντων πήξης αίματος
FapC	P. fluorescens	Βιοϋμένια
[HET-s] prion	P. anserina	Σχηματισμός Ετεροκαρύου
[PSI$^+$] prion	*S. cerevisiae*	Ρύθμιση πολυαμινών
[RNQ$^+$] prion	*S. cerevisiae*	Προστασία
Type I Antifreeze Protein	*P. americanus*	Παρεμπόδιση σχηματισμού πάγου
Chaplin	*S. ceolicolor*	Σχηματισμός υφών
Harpins	*Plant pathogenic bacteria*	Αποσταθεροποίηση μεμβράνης κυττάρου
Hydrophobins	*Most fungi*	Κυτταρική προσκόλληση/Σχηματισμός υφών
Sup35a	*S. cerevisiae*	Λήξη διαδικασίας μετάφρασης
Ure2pa	*S. cerevisiae*	Μονοπάτι καταβολισμού αζώτου
Rnq1p	*S. cerevisiae*	Προωθεί τον πολυμερισμό prion πρωτεϊνών
Mot3a	*S. cerevisiae*	Μεταγραφικός παράγοντας
Spidroins	*N. clavipes*	Δομικές (π.χ. ιστός αράχνης)
HpaG	X. genus	Ιωγενής παράγοντας φυτικών κυττάρων

Πίνακας 2:Κατάλογος αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη δημιουργία φυσικών προστατευτικών αμυλοειδών, σύμφωνα με την Διεθνή Κοινότητα για Αμυλοειδώσεις.

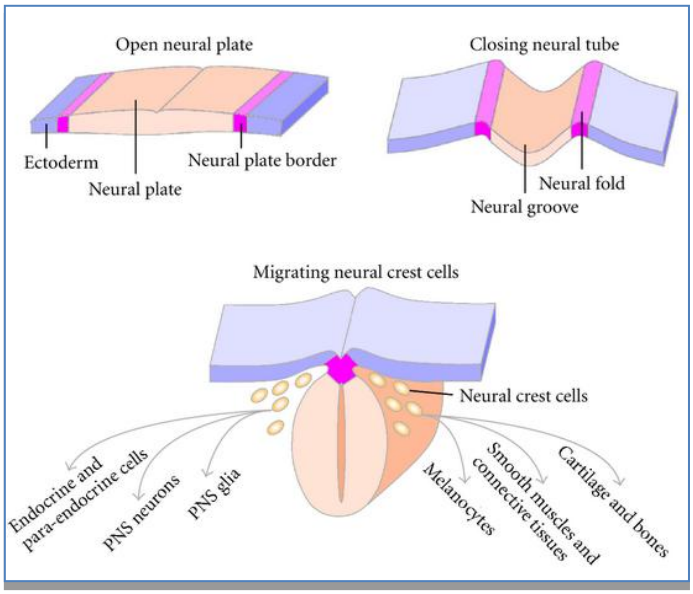
1.2 Μελανοκύτταρο

1.2.1 Προέλευση

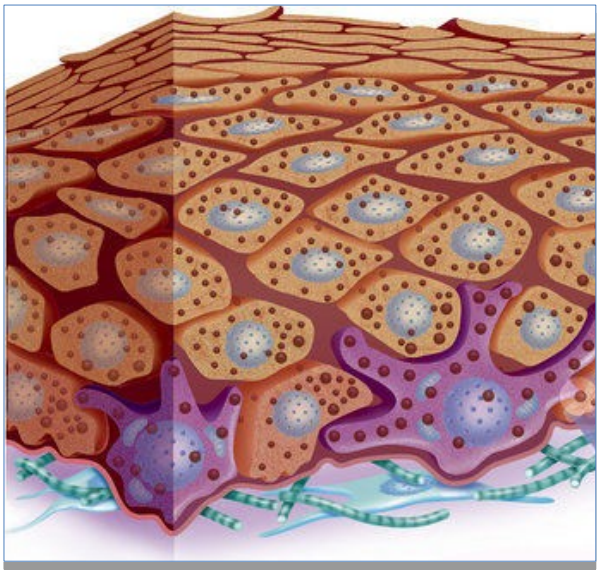
Τα νευρικά κύτταρα και τα κύτταρα της γλοίας προέρχονται από ένα στρώμα εξωδερμικών κυττάρων (ectoderm), που εντοπίζεται κατά μήκος της ραχιαίας γραμμής του εμβρύου [65]. Καθώς αυτό το στρώμα αποκτά ιδιότητες νευρικών κυττάρων, δημιουργείται η νευρική πλάκα (neural plate). Στη συνέχεια, η νευρική πλάκα διπλώνεται και εμφανίζονται κάποιες πτυχές. Τελικά, δημιουργείται μία σωληνοειδής δομή που ονομάζεται νευρικός σωλήνας [66]. Καθώς αποχωρίζεται ο νευρικός σωλήνας από το εξώδερμα, σχηματίζεται η νευρική ακρολοφία

(neural crest), η οποία με τη σειρα της, σχηματίζει μια κυτταρική μάζα ακανόνιστου σχήματος μεταξύ του νευρικού σωλήνα και του εξωδέρματος [65].

Τα μελανοκύτταρα προέρχονται από την νευρική ακρολοφία και κατά συνέπεια, εμφανίζουν ομοιότητες με τα νευρικά κύτταρα (Εικόνα 15) [67]. Διαθέτουν κυτταρικά σώματα από τα οποία εκφύονται αποφυάδες που διακλαδίζονται στην επιδερμίδα, περνούν μέσα από την βασική μεμβράνη και καταλήγουν σε εγκολπώσεις των κυττάρων (όπως ο νευράξονας σε μία νευρομυική σύναψη) [68]. Τα μελανοκύτταρα είναι δενδριτικά κύτταρα που παράγουν χρωστική (Εικόνα 16).



Εικόνα 15: Ο σχηματισμός της νευρικής ακρολοφίας. Μετά το κλείσιμο του νευρικού σωλήνα, η νευρική ακρολοφία διαχωρίζεται από την περιοχή μεταξύ του ραχιαίου σωλήνα και μεταναστεύει προς την περιφέρεια. Επιπρόσθετα, στην εικόνα φαίνεται ότι τα μελανοκύτταρα προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία. [69]



Εικόνα 16: Μελανοκύτταρα στην επιδερμίδα.Τα μελανοκύτταρα είναι δενδριτικά κύτταρα που παράγουν χρωστική. Με κόκκινο βέλος φαίνεται το κυτταρικό τους σώμα, ενώ οι αποφυάδες φαίνονται με μπλε βέλος και διακλαδίζονται στην επιδερμίδα.

1.2.2 Εντοπισμός

Τα μελανοκύτταρα που χαρακτηρίζονται ως «**κλασσικά μελανοκύτταρα**» είναι υπεύθυνα για τον χρωματισμό του δέρματος και των τριχών. Τα «**μη κλασσικά μελανοκύτταρα**» στον άνθρωπο δεν παράγουν χρωστική και εντοπίζονται στον οφθαλμό, στο εσωτερικό αυτί, στην καρδιά, στον λιπώδη ιστό και πιθανόν στα κόκκαλα [70]. Τα μελανοκύτταρα διακρίνονται σε αυτές τις δύο κατηγορίες με βάση τα εξής τρία κριτήρια:

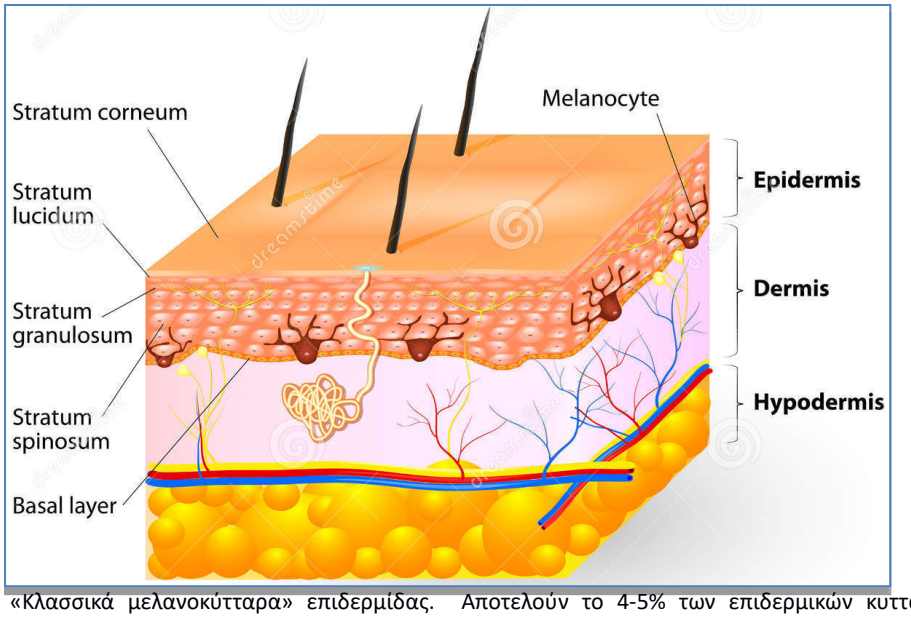
1. Βρίσκονται στο δέρμα (δερμίδα,επιδερμίδα)
2. Συμμετέχουν στον καθορισμό του χρώματος του δέρματος
3. Ακολουθούν το ραχιοπλευρικό μεταναστευτικό μονοπάτι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του (dorsolateral migratory pathway)

Εάν πληρούν τα τρία αυτά κριτήρια, τότε τα μελανοκύτταρα χαρακτηρίζονται ως «**κλασσικά μελανοκύτταρα**» [71]. Τα μελανοκύτταρα αυτά μπορούν να εντοπιστούν είτε στην δερμίδα, είτε στην επιδερμίδα. Στην επιδερμίδα εντοπίζονται στην βασική στοιβάδα ή στα τριχοθυλάκια και περιβάλλονται από κερατινοκύτταρα, ενώ στην δερμίδα περιβάλλονται από ινοβλάστες [71]. Μόνο τα επιδερμικά μελανοκύτταρα μπορούν να μεταφέρουν τη χρωστική μελανίνη στα γειτονικά τους κύτταρα, τα κερατινοκύτταρα [71].

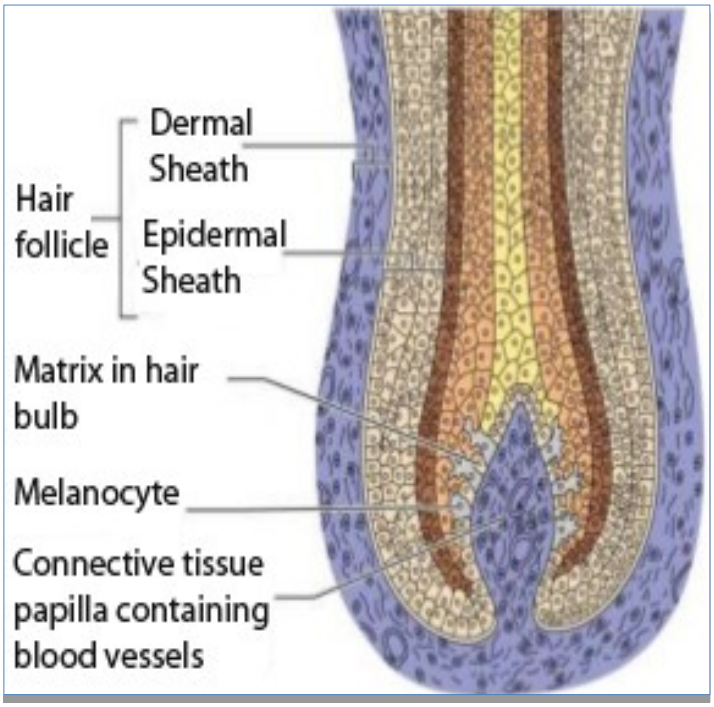
ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ: Τα μελανοκύτταρα αποτελούν το 4-5% των επιδερμικών κυττάρων. Σ'αυτά συντίθενται ευμελανίνη και φαίομελανίνη που δίνει χρώμα στο δέρμα και προστατεύει από την UV ακτινοβολία (Εικόνα 17) [71].

ΔΕΡΜΙΔΑ: Τα μελανοκύτταρα της δερμίδας θεωρούνται «**κλασσικά μελανοκύτταρα**» διότι συμμετέχουν στη χρώση του δέρματος. Παρόλα αυτά, δεν μεταφέρουν μελανίνη στα γειτονικά κύτταρα και δεν αλληλεπιδρούν με κερατινοκύτταρα. Στο δέρμα των ενήλικων ανθρώπων τα μελανοκύτταρα της δερμίδας είναι λίγα σε αριθμό [71].

ΤΡΙΧΟΘΥΛΑΚΙΑ: Τα μελανοκύτταρα συμμετέχουν στο χρωματισμό της τρίχας και καταστρέφουν τα τοξικά παραπροϊόντα που δημιουργούνται κατά τη βιοσύνθεση της μελανίνης (Εικόνα 18) [71].



Εικόνα 17: «Κλασσικά μελανοκύτταρα» επιδερμίδας. Αποτελούν το 4-5% των επιδερμικών κυττάρων. Σ'αυτά συντίθενται ευμελανίνη και φαίομελανίνη που δίνει χρώμα στο δέρμα και προστατεύει από την UV ακτινοβολία.



Εικόνα 18: Μελανοκύτταρα στα τριχοθυλάκια. Τα μελανοκύτταρα αυτά συμμετέχουν στο χρωματισμό της τρίχας και καταστρέφουν τα τοξικά παραπροϊόντα που δημιουργούνται κατά τη βιοσύνθεση της μελανίνης.

Σημείωση: Στην παρούσα διπλωματική εργασία με τον όρο «**μελανοκύτταρα**» θα αναφερόμαστε στα «**κλασσικά μελανοκύτταρα**» της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας.

1.3. Μελανόσωμα

1.3.1 Ιστορική αναδρομή

Τα μελανοσώματα προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά ως εξειδικευμένα οργανίδια που βρίσκονται μόνο σε κύτταρα που παράγουν χρωστική [72]. Υπήρξε λοιπόν η ανάγκη, να δοθεί στα οργανίδια αυτά μία ονομασία που να δηλώνει και την λειτουργία τους, διότι μέχρι εκείνη την εποχή ο κοινός όρος ήταν κόκκοι χρωστικής ή μελανίνης (melanin/pigment granule). Το πρώτο σύστημα ονοματολογίας που εξηγούσε τα τρία στάδια οντογένεσίς τους, δημιουργήθηκε το 1961 [73]. Σύμφωνα με το σύστημα αυτό τα μελανοσώματα αποδίδονταν ως:

I. **Προμελανόσωματα**: Σφαιρικά

II. **Μελανοσώματα**: Οργανίδια με εσωτερική δομή και δραστηριότητα τυροσινάσης.

III. **Κόκκοι μελανίνης**: Πολυμερή μελανίνης

Ένα ακόμα σύστημα που προτάθηκε για την ονοματολογία των μελανοσωμάτων ήταν το εξής [74]:

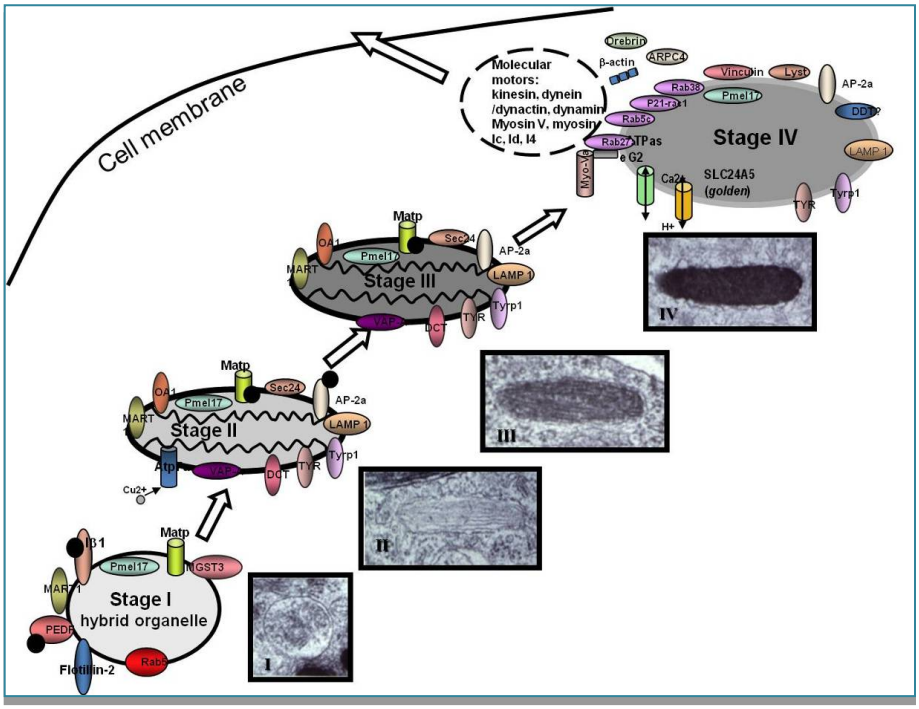
1. **Στάδιο Ι**: Βιοσύνθεση πρωτεΐνης
2. **Στάδιο ΙΙ:** Βιοσύνθεση οργανιδίου
3. **Στάδιο ΙΙΙ**: Βιοσύνθεση μελανίνης
4. **Τελικό προϊόν**: Κόκοι μελανίνης

Ωστόσο και τα δύο συστήματα προκάλεσαν σύγχυση καθότι δεν ήταν πλήρως ορθά. Συνεπώς, με την δημιουργία ενός ερωτηματολογίου και την έγκριση από τους συμμετέχοντες του 6^{ου} Διεθνούς Συνεδρίου για το Κύτταρο που παράγει Χρωστική στην Βουλγαρία, προτάθηκαν δύο όροι [75]:

Μελανόσωμα: ένα διακριτό οργανίδιο που περιέχει μελανίνη στο οποίο έχει ολοκληρωθεί η βιοσύνθεση της μελανίνης, όπως υποδεικνύεται από την ομοιόμορφη πυκνότητά του κατά την παρατήρηση σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο. Στα μελανοσώματα υπάρχει απουσία δραστηριότητας τυροσινάσης.

Προμελανόσωμα: ένας όρος που χρησιμοποιείται σε όλα τα στάδια της βιογένεσις των μελανοσωμάτων, που προηγούνται το στάδιο στο οποίο είναι πλήρως διαμορφωμένα.

Σήμερα κανένα από τα παραπάνω συστήματα δεν χρησιμοποείται, αλλά χρησιμοποιείται ένα σύστημα που προτάθηκε το 1968 [76, 77]. Σύμφωνα με το σύστημα αυτό χρησιμοποιούνται ο όρος «μελανόσωμα» και οι αριθμοί (I-IV) για να δηλώσουν το στάδιο των μελανοσωμάτων (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: *Στην εικόνα απεικονίζονται μελανοσώματα διαφόρων σταδίων και μέσα σ'αυτά φαίνεται η ύπαρξη ή όχι της μελανίνης. Σύστημα ονοματολογίας είναι εκείνο που προτάθηκε από τους Tado et al. το 1968 [78]*

.

1.3.2 Ορισμός

Σύμφωνα με όσα έχουν ήδη αναφερθεί, τα **μελανοσώματα** είναι εξειδικευμένα οργανίδια που εντοπίζονται στα μελανοκύτταρα με διάμετρο περίπου 500nm [79]. Προέρχονται από τα ενδοσώματα όπως και τα λυσοσώματα. Η πρώτη κοινή πρωτεΐνη που ανιχνεύθηκε μεταξύ λυσοσωμάτων και ενδοσωμάτων, ήταν η μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη Lamp-1 [80, 81]. Κατά συνέπεια τα μελανοσώματα μπορεί να αναφέρονται και ως **σχετιζόμενα με τα λυσοσώματα οργανίδια** (lysosome-related organelles) ή ως **εξειδικευμένα λυσοσώματα** (specialized lysosomes) [82, 83], επειδή διαθέτουν όξινο pH, αρκετά λυσοσωμικά ένζυμα συμπεριλαμβανομένων και των υδρολασών των μελανοκυττάρων. Στα οργανίδια αυτά λαμβάνει χώρα η βιοσύνθεση της χρωστικής μελανίνης.

1.3.3 Βιογένεση

Σύμφωνα με το σύστημα που προτάθηκε το 1968 [76, 77] τα μελανοσώματα μπορεί να είναι τεσσάρων σταδίων [79]. Τα στάδια των μελανοσωμάτων σχετίζονται με την βιοσύνθεση της χρωστικής μελανίνης που λαμβάνει χώρα στα οργανίδια αυτά. Πιο συγκεκριμένα,

I. **ΣΤΑΔΙΟ Ι** (Εικόνα 20a): Σε αυτό το στάδιο τα μελανοσώματα είναι κενοτοπικά πρώιμα ενδοσώματα. Φαίνονται σφαιρικά κατά την παρατήρηση σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο και δεν διαθέτουν χρωστική. Η πρωτεΐνη Pmel17

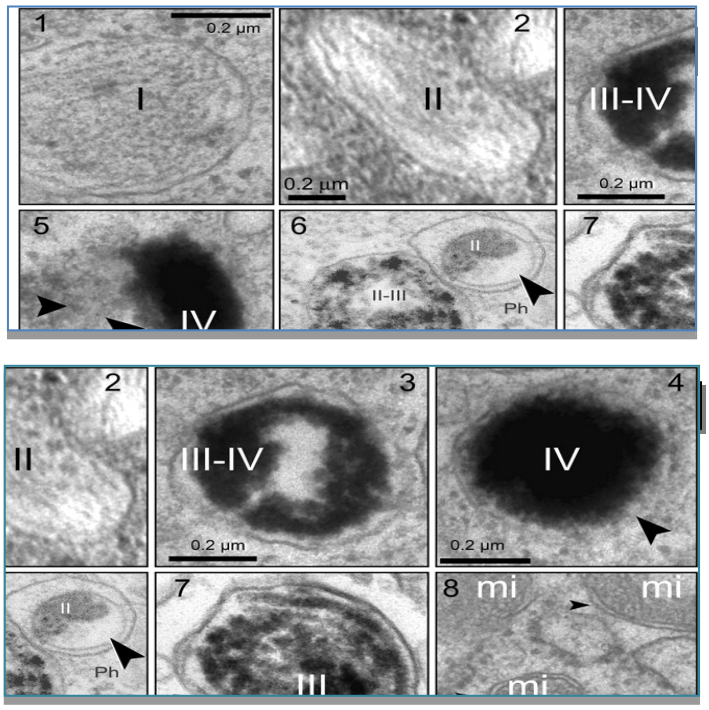
βρίσκεται στα μελανοσώματα σταδίου I σε ενδοαυλικά κυστίδια (IntraLumenal Vesicles, ILVS) και σχηματίζει ινίδια, των οποίων ο σχηματισμός ολοκληρώνεται στο στάδιο II.

II. **ΣΤΑΔΙΟ II** (Εικόνα 20b) : Σε αυτό το στάδιο τα μελανοσώματα είναι ελλειψοειδή. Εδώ, ολοκληρώνεται ο σχηματισμός των ινιδίων της Pmel17 και προσελκύονται τα κατάλληλα ένζυμα για την βιοσύνθεση της χρωστικής μελανίνης.

III. **ΣΤΑΔΙΟ III** (Εικόνα 20c): Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τα ινίδια της Pmel17, η τυροσινάση (υδρολάση) καταλύει τον σχηματισμό της μελανίνης. Τα μελανοσώματα είναι ελλειψοειδή και στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο φαίνονται γκρι-μαύρα εσωτερικά.

IV. **ΣΤΑΔΙΟ IV** (Εικόνα 20d): Η βιοσύνθεση της χρωστικής μελανίνης έχει ολοκληρωθεί και τα μελανοσώματα είναι πλέον σφαιρικά, γεμάτα χρωστική.

Το pH των μελανοσωμάτων διαφόρων σταδίων ποικίλλει και σχετίζεται με την δράση της τυροσινάσης (Εικόνα 21) [84].



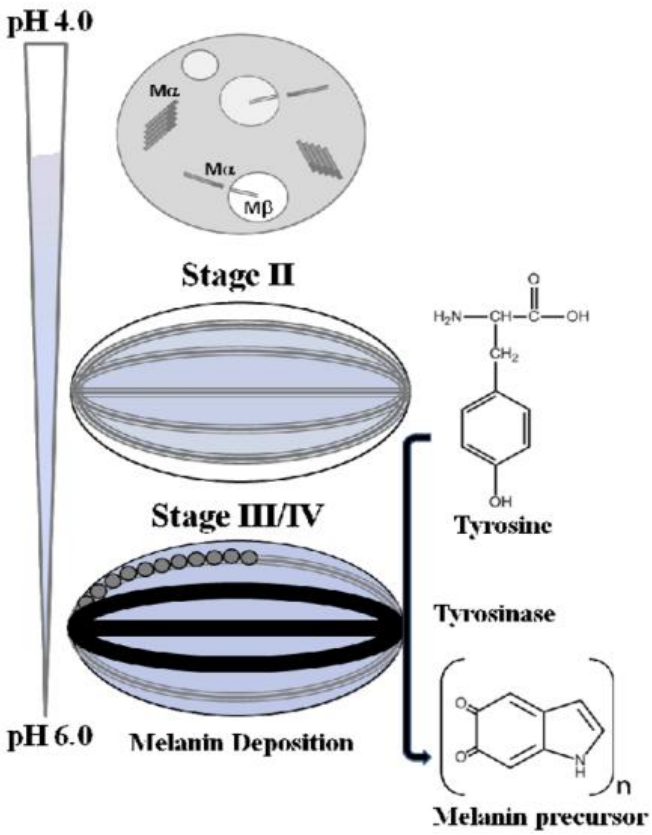
***Εικόνα 20**: Μελανοσώματα διαφόρων σταδίων Bar 0,2μm [85].*

a) Μελανοσώματα σταδίου I, σφαιρικά.

b) Μελανοσώματα σταδίου II ελλειψοειδή, με σχηματισμένα ινίδια της Pmel17.

c) Μελανοσώματα σταδίου III-IV (ενδιάμεσο στάδιο) στα οποία γίνεται βιοσύνθεση της μελανίνης.

d) Μελανοσώματα σταδίου IV στα οποία έχει ολοκληρωθεί η σύνθεης της μελανίνης



Εικόνα 21: *Μελανοσώματα σταδίου Ι έχουν pH 4.0 και σε μελανοσώματα μεγαλύτερων σταδίων το pH αυξάνεται, ώστε να μπορεί η τυροσινάση να λειτουργήσει [84].*

1.3.4 Μετακίνηση και μεταφορά

Μετακίνηση μελανοσωμάτων μέσα στα μελανοκύτταρα

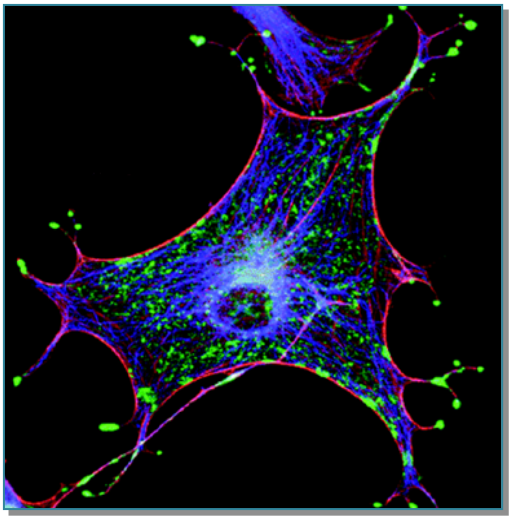
Σε ένα κύτταρο η μετακίνηση των οργανιδίων γίνεται είτε μέσω **μικροσωληνίσκων**, είτε μέσω **ινιδίων ακτίνης**. Οι μικροσωληνίσκοι χρησιμοποιούνται για τη μετακίνηση των οργανιδίων σε μεγάλες αποστάσεις, ενώ τα ινίδια ακτίνης χρησιμοποιούνται για τη μετακίνηση των οργανιδίων σε μικρές αποστάσεις. Απαραίτητες είναι ειδικές πρωτεΐνες που ονομάζονται κινητήριες πρωτεΐνες και στην περίπτωση των μικροσωληνίσκων είναι οι δυνεΐνες και οι κινεσίνες, ενώ στην περίπτωση των ινιδίων ακτίνης είναι οι μυοσίνες [86].

Τα μελανοκύτταρα διαθέτουν δενδρίτες μέσω των οποίων τα ώριμα μελανοσώματα μεταφέρονται στα κερατινοκύτταρα όπου και αποθηκεύονται. Πριν όμως μεταφερθούν στα κερατινοκύτταρα θα πρέπει τα μελανοσώματα να μεταφερθούν από την περιπυρηνική περιοχή προς τα ακραία σημεία των περιφερειακών δενδριτικών προεκβολών [86]. Στην μετακίνηση αυτή συμμετέχει το περιφερειακό δίκτυο ακτίνης και ο κεντρικός πυρήνας μικροσωληνίσκων που διαθέτουν οι δενδριτικές προεκβολές καθώς και η μυοσίνη V, η οποία βρίσκεται στην μεμβράνη των μελανοσωμάτων και συνδέεται με τα νημάτια ακτίνης. Όταν τα μελανοσώματα μέσω των μικροσωληνίσκων φθάσουν

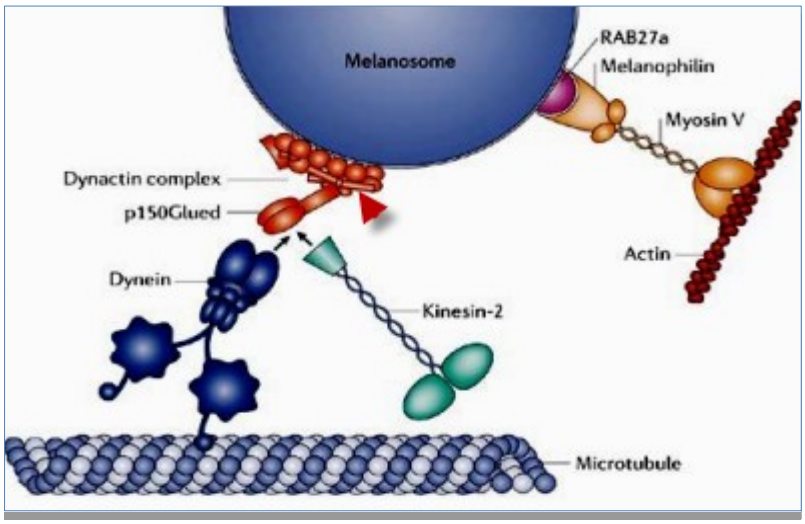
στην περιφέρεια του κυττάρου, απελευθερώνονται από τους μικροσωληνίσκους και συνδέονται με γειτονικά ινίδια ακτίνης. Η αντίθετη διαδρομή εμποδίζεται, αφού τα μελανοσώματα που φτάνουν στην άκρη των μικροσωληνίσκων στην περιφέρεια των άκρων των δενδριτών, αιχμαλωτίζονται από την μυοσίνη Va και διατηρούνται [86].

Η μυοσίνη Va είναι ένα διμερές μόριο που είναι απαραίτητο για την κίνηση των οργανιδίων. Όπως όλες οι μυοσίνες διαθέτει 3 αυτοτελείς δομικές περιοχές (domains): την κεφαλή (head), την ουρά (tale) και το λαιμό (neck). Η ουρά είναι εκείνη που οδηγεί την μυοσίνη στην θέση πρόσδεσης της ακτίνης [86]**.** ***Πώς όμως αυτό συμβαίνει στα μελανοσώματα;***

Εδώ φαίνεται να διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο και η Rab27a, μία πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια Rab της οποίας τα μέλη είναι GTP εξαρτώμενες πρωτεΐνες και συμμετέχουν στην διαμεμβρανική μετακίνηση. Έρευνες έδειξαν πως αυτές οι πρωτεΐνες ρυθμίζουν την κίνηση μέσω ακτίνης. Η Rab27a συνεντοπίζεται με την μυοσίνη Va, στα ώριμα μελανοσώματα και συνδέεται με την μυοσίνη Va in vitro κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα πως είναι εκείνη που καθοδηγεί την πρόσδεση της μυοσίνης στα μελανοσώματα. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η μυοσίνη V αποτυγχάνει να εδραιωθεί στα μελανοσώματα, όταν η Rab27a λείπει ή είναι αδρανής (Εικόνες: 22, 23) [87].



Εικόνα 22*: Μετακίνηση των μελανοσωμάτων. Με μπλε χρώμα φαίνονται οι μικροσωληνίσκοι, με κόκκινο χρώμα τα ινίδια ακτίνης στην περιφέρεια του μελανοκυττάρου και με πράσινο χρώμα η πρωτεΐνη Rab27a.*

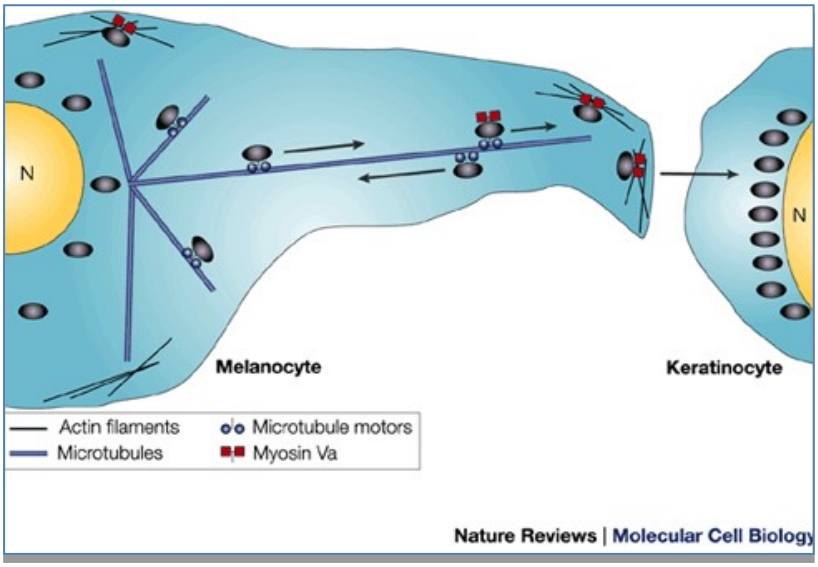


Εικόνα 23: *Μετακίνηση των μελανοσωμάτων. Εδώ φαίνεται ο τρόπος με τον οποίο οι μικροσωληνίσκοι και τα ινίδια ακτίνης συνδέονται με τα μελανοσώματα. Οι δυνεΐνες ή οι κινεσίνες συνδέονται με ένα ειδικό σύμπλεγμα το οποίο συνδέεται με το μελανόσωμα και τα ινίδια ακτίνης συνδέονται με την μυοσίνη V, η οποία μέσω μίας μελανοφιλίνης, συνδέεται με την πρωτεΐνη Rab27a και τελικά με το μελανόσωμα.*

Μεταφορά μελανοσωμάτων στα κερατινοκύτταρα

Τα μελανοσώματα αφού μεταφερθούν στην περιφέρεια των μελανοκυττάρων σύμφωνα με τον παραπάνω μηχανισμό, θα πρέπει με κάποιο τρόπο να μεταφερθούν στα κερατινοκύτταρα (Εικόνα: 24). Ο μηχανισμός μεταφοράς τους στα κερατινοκύτταρα δεν είναι γνωστός. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες θεωρίες που υποδεικνύουν τον τρόπο με τον οποίο γίνεται η μεταφορά αυτή [88].

- Απελευθέρωση μελανοσωμάτων από μελανοκύτταρα και μετέπειτα ενδοκύττωση των κυστιδίων, που απελευθερώνονται, από τα κερατινοκύτταρα.
- Τα κερατινοκύτταρα εγκλείουν τα άκρα των δενδριτών των μελανοκυττάρων με φαγοκυττάρωση και ενσωματώνουν τμήματά τους στο εσωτερικό τους.
- Ενεργή μεταφορά και ενσωμάτωση μελανοσωμάτων απευθείας στα κερατινοκύτταρα.
- Μέσω ενός πόρου, ο οποίος αναπτύσσεται μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης των μελανοκυττάρων και των κερατινοκυττάρων, περνούν τα μελανοσώματα.



***Εικόνα 24**: Μεταφορά των μελανοσωμάτων από τα μελανοκύτταρα στα κερατινοκύτταρα. Όταν τα μελανοσώματα μέσω των μικροσωληνίσκων φθάσουν στην περιφέρεια του κυττάρου, απελευθερώνονται από τους μικροσωληνίσκους και συνδέονται με γειτονικά ινίδια ακτίνης. Από εκεί μεταφέρονται στα γειτονικά κερατινοκύτταρα*

1.4 Μελανίνη

1.4.1 Ορισμός

Η **μελανίνη** αποτελεί μία οικογένεια χρωστικών που αποτελείται από ινδόλες και άλλα ενδιάμεσα προϊόντα, που προέρχονται από την οξείδωση της τυροσίνης [89]. Η μελανίνη είναι ένα πολυμερές που απορροφά φως. Το όνομά της προέρχεται κατά πάσα πιθανότητα από την λέξη «μελανός», η οποία στα ελληνικά σημαίνει σκούρος - μαύρος. Η λέξη μελανίνη χρησιμοποιούνταν για να χαρακτηρίσει οποιαδήποτε μαύρη χρωστική. Ωστόσο, σήμερα ο όρος αυτός έχει διευρυνθεί και χρησιμοποιείται για να περιγράψει κάθε φυσική χρωστική διάφορων οργανισμών.

Η μελανίνη στο δέρμα παράγεται ύστερα από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία προκαλώντας μαύρισμα και έχει την δυνατότητα να σκορπίζει περισσότερο από το 99,9% της υπεριώδους ακτινοβολίας λειτουργώντας ως φίλτρο που μειώνει την είσοδο της υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα, γεγονός που της προσδίδει προστατευτικές ιδιότητες έναντι του καρκίνου του δέρματος. Παράγεται στα μελανοσώματα, τα οποία βρίσκονται στα δενδριτικά μελανοκύτταρα, και συσσωρεύεται στα κερατινοκύτταρα, όπως προαναφέρθηκε [90].

1.4.2 Τύποι μελανίνης

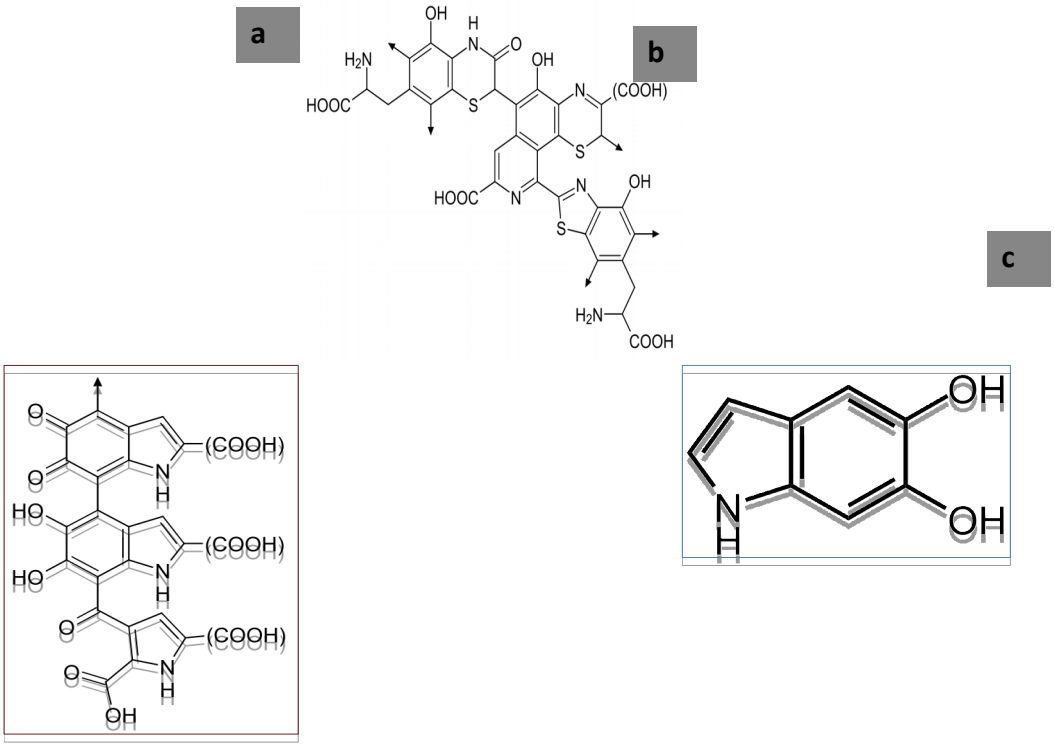
Η μελανίνη διακρίνεται σε τρεις διαφορετικούς τύπους (Εικόνα 25) [91, 92]:

I. **Ευμελανίνη**: Ο πιο κοινός τύπος μελανίνης που βρίσκεται στα μαλλιά και στο δέρμα των ανθρώπων. Συντίθενται και εναποτίθεται σε ελλειπτικά μελανοσώματα. Η ευμελανίνη διακρίνεται σε δύο τύπους:

- Ο **μαύρος τύπος** όταν υπάρχει σε μεγάλες ποσότητες παράγει το μαύρο χρώμα, ενώ όταν εμφανίζει έλλειψη παράγει το γκρι χρώμα. Εμφανίζεται κυρίως σε μη Ευρωπαίους πολίτες.
- Ο **καφέ τύπος** , ο οποίος εμφανίζεται κυρίως στους Ευρωπαίους, όταν είναι σε αφθονία παράγει το σκούρο καφέ χρώμα μαλλιών, ενώ όταν βρίσκεται σε μικρότερες ποσότητες παράγει το ανοιχτό καφέ και το ξανθό χρώμα μαλλιών.

II. **Φαιομελανίνη**: είναι ένα πολυμερές βενζοθειαζίνης που περιέχει κυστείνη και είναι υπεύθυνη για το κόκκινο χρώμα των μαλλιών και την δημιουργία φακίδων. Βρίσκεται περισσότερο στο δέρμα των γυναικών παρά στων ανδρών και συντίθενται σε μικρά κυκλικά μελανοσώματα.

III. **Νευρομελανίνη**: παράγεται σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες και παράγει το μαύρο χρώμα στα τμήματα του εγκεφάλου. Στους ανθρώπους εμφανίζεται σε μεγαλύτερες ποσότητες από ότι στα άλλα πρωτεύοντα, ενώ σε άλλα είδη δεν εμφανίζεται καθόλου. Η λειτουργία της παραμένει άγνωστη. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί πως στους ανθρώπους δεσμεύει μέταλλα και άλλα τοξικά μόρια και πως εάν βρίσκεται σε μικρή ποσότητα, τότε η σύνθεση της ντοπαμίνης είναι μειωμένη με αποτέλεσμα των εκφυλισμό των νευρώνων [93].



Εικόνα 25: Χημικοί τύποι μελανίνης.

a) Ευμελανίνη
b) Φαιομελανίνη
c) Νευρομελανίνη

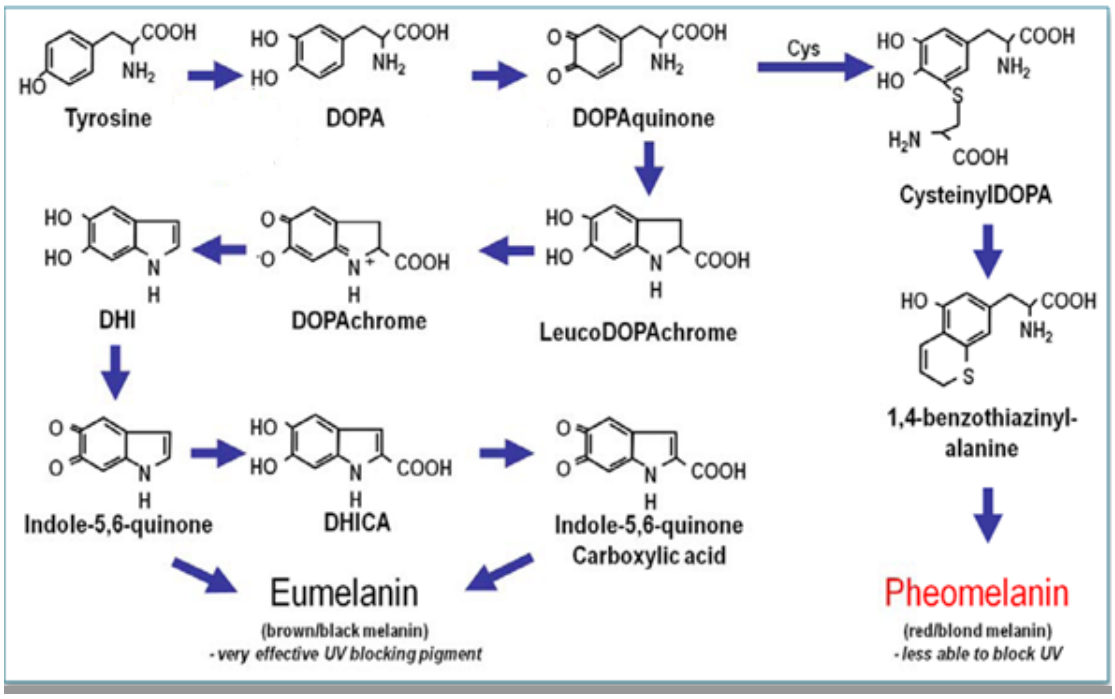
1.4.3 Βιοσύνθεση

Η μελανίνη παράγεται από το αμινοξύ τυροσίνη, με την δράση τόσο της τυροσινάσης, όσο και άλλων παραγόντων [94]. Η τυροσινάση μεταφέρεται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου των μελανοκυττάρων και συσσωρεύεται σε κυστίδια [94]. Σε περίπτωση που σε ένα άτομο δεν παράγεται η μελανίνη εξαιτίας της έλλειψης κάποιων ενζύμων, το άτομο πάσχει από αλφισμό. Τα τέσσερα στάδια που αφορούν την μορφολογία των μελανοσωμάτων και σχετίζονται με την παραγωγή μελανίνης, αναφέρονται στο Κεφάλαιο 1.3.3.

Η βιοσύνθεση της **ευμελανίνης** ξεκινά με την μετατροπή της L- τυροσίνης σε DOPA-quinone από την τυροσινάση, μέσω δύο διαφορετικών οξειδώσεων [95]. Αρχικά, γίνεται οξείδωση της L- τυροσίνης σε L-DOPA με τη συμμετοχή και του συμπαράγοντα τετραϋδροβιοπτερίνη (BH_4) και παράγεται και διϋδροβιοπτερίνη (BH_2). Έπειτα, η L-DOPA οξειδώνεται προς DOPA-quinone. Στη συνέχεια, με τη συμμετοχή της πρωτεΐνης που σχετίζεται με τυροσινάση (TRP-1) και της ταυτομεράσης του ντοπαχρώματος (DCT), η DOPA-quinone μετατρέπεται σε 5,6-indole quinone, η οποία πολυμερίζεται με σκοπό να δημιουργηθεί η ευμελανίνη. Πιο συγκεκριμένα, η DOPA-quinone μετατρέπεται σε 5,6-Dihydroxynole (DHI) μέσω πολλαπλών διεργασιών όπως αποκαρβοξυλίωσης και οξείδωσης, η οποία μετατρέπεται σε 5,6-indole quinone. Ένας άλλος τρόπος να δημιουργηθεί η ευμελανίνη είναι ο εξής: η DOPA-quinone να μετατραπεί σε

DOPAchrome, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε DHI -2 carboxylic acid (DHICA) και έπειτα σε 5,6-indole quinine-2- carboxylic acid. Το τελευταίο προϊόν πολυμερίζεται και σχηματίζεται η ευμελανίνη [95] (Εικόνα 26).

Κατά τη βιοσύνθεση της **φαιομελανίνης**, λαμβάνουν χώρα τα ίδια ακριβώς στάδια με την βιοσύνθεση της ευμελανίνης, μέχρι την σύνθεση της DOPA-quinone. Επειδή η φαιομελανίνη είναι πολυμερές βενζοθειαζίνης, είναι απαραίτητη η συμμετοχή της κυστεΐνης, ώστε να δημιουργηθεί η CysteinylDOPA, που θα οδηγήσει στην δημιουργία 1,4- benzothiazinylalanine, η οποία θα πολυμεριστεί προς σύνθεση της φαιομελανίνης (Εικόνα 26) [95].



***Εικόνα 26**: Βιοσυνθετικό μονοπάτι **ευμελανίνης** και **φαιομελανίνης [96]**.*

1.5 Διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες

1.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Γενικά, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες διαπερνούν τη μεμβράνη και διαθέτουν περιοχές που βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο, αλλά και στον ενδοκυττάριο χώρο. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για το κύτταρο, καθώς συμβάλλουν σε σημαντικές διεργασίες όπως η μεταγωγή σήματος, η κυτταρική επικοινωνία, η είσοδος ουσιών στο κύτταρο [97].

1.5.2 Κατηγορίες διαμεμβρανικών πρωτεϊνών

Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες διακρίνονται με βάση τη δευτεροταγή δομή των τμημάτων τους που διαπερνούν τη μεμβράνη. Τα τμήματα αυτά μπορεί να είναι είτε α- έλικες, είτε β-πτυχωτές επιφάνειες που δημιουργούν κλειστά β-βαρέλια. Όσον αφορά τις πρωτεΐνες των οποίων τα τμήματα που διαπερνούν την μεμβράνη είναι α-έλικες, αυτές διακρίνονται σε [98]:

- Πρωτεΐνες που διαθέτουν μόνο ένα διαμεμβρανικό τμήμα (**Single spanning**)
- Πρωτεΐνες που διαθέτουν περισσότερα του ενός διαμεμβρανικά τμήματα (**Multi- spanning**)

Δύο ακόμη ομάδες δημιουργούνται από τον διαχωρισμό των single spanning πρωτεϊνών, με βάση τον προσανατολισμό των διαμεμβρανικών τους ελίκων. Έτσι προκύπτουν, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες **Τύπου Ι**, των οποίων το αμινοτελικό άκρο εντοπίζεται στον εξωκυττάριο χώρο, και οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες **Τύπου ΙΙ**, των οποίων το αμινοτελικό ακρο εντοπίζεται στον ενδοκυττάριο χώρο [98].

1.5.3 Διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες

Οι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που συνδέονται με ολιγοσακχαρίτες, μέσω της γλυκοζυλίωσης. Η γλυκοζυλίωση, που λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σύμπλεγμα Golgi, περιλαμβάνει την ομοιοπολική σύνδεση του υδατάνθρακα, είτε στο άτομο αζώτου της αμινικής ομάδας (**Ν-γλυκοζιτικός δεσμός**), είτε στο άτομο του οξυγόνου της υδροξυλομάδας (**Ο- γλυκοζιτικός δεσμός**). Οι υδατανθρακικές αλυσίδες απαντώνται στις γλυκοπρωτεΐνες σε ευθείες ή διακλαδιζόμενες αλυσίδες μήκους δύο εώς 60 σακχαρικών καταλοίπων. Τα διαμεμβρανικά τμήματα των πρωτεϊνών αυτών, είναι συνήθως α-έλικες αποτελούμενες από 20-25 υδρόφοβα κατάλοιπα. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών είναι η ύπαρξη του σηματοδοτικού πεπτιδίου (signal peptide) στο αμινοτελικό τους άκρο, το οποίο δεν λαμβάνει μέρος στην τελική στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης και αποτελείται κυρίως από υδρόφοβα κατάλοιπα [99, 100].

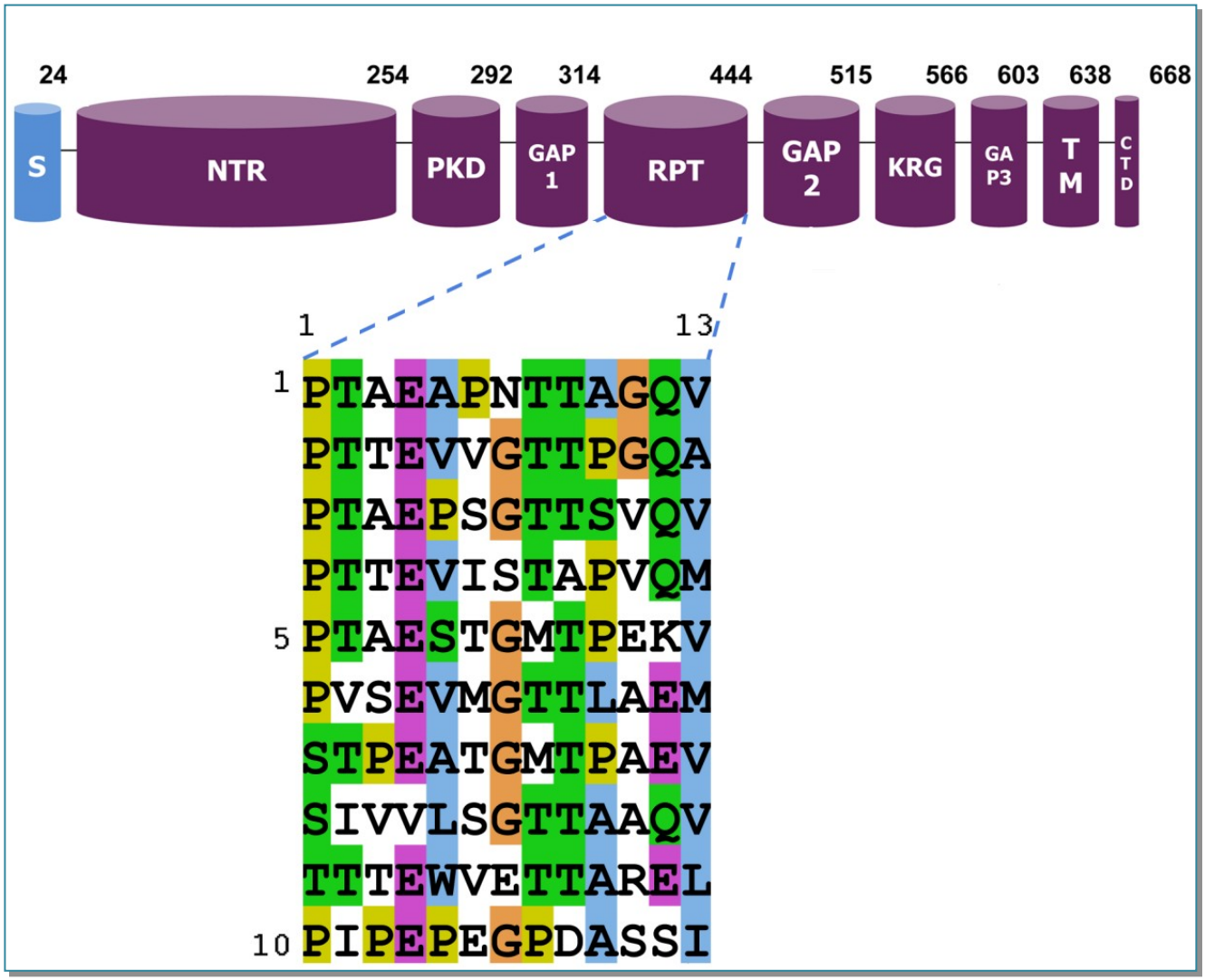
1.6 Pmel17

1.6.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η Pmel17 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη τύπου Ι, η οποία παράγεται στα μελανοκύτταρα και δρα σε εξειδικευμένα οργανίδια των μελανοκυττάρων, τα μελανοσώματα [101]. Εκεί η πρωτεΐνη αυτή δημιουργεί το απαραίτητο υπόστρωμα για την βιοσύνθεση της χρωστικής μελανίνης. Η θέση του γονιδίου (*Silver* locus), του οποίου προϊόν είναι η Pmel17, ταυτοποιήθηκε γενετικά για πρώτη φορά το 1930 [102]. Βρέθηκε πως το γονίδιο αυτό ήταν υπεύθυνο για την σταδιακή απώλεια του μαύρου χρώματος του τριχώματος ποντικών, που σχετίζεται με την ηλικία. Έκτοτε, το προϊόν του γονιδίου (*Silver* gene) αυτού βρέθηκε αρκετές φορές από ομάδες με διαφορετικά ερευνητικά ενδιαφέροντα. Κατά συνέπεια, η Pmel17 διαθέτει διαφορετικές ονομασίες [103], κάποιες από τις οποίες φαίνονται στον πίνακα 3. Σύμφωνα με την πρωτεϊνική βάση δεδομένων Uniprot, η Pmel17 διαθέτει πέντε (5) ισομορφές, οι οποίες δεν εμφανίζουν μεγάλες διάφορες (ΠΙΝΑΚΑΣ 4). Η πιο συνηθισμένη ισομορφή είναι η ισομορφή 2, που αποτελείται από 668 αμινοξικά κατάλοιπα.

Σημείωση: Στην παρούσα διπλωματική εργασία με τον όρο “Pmel17” θα αναφερόμαστε στην “Ισομορφή 2”.

Πιο συγκεκριμένα, η Pmel17 αποτελείται από εννέα αυτοτελείς δομικές περιοχές (domains) με πιο σημαντική το RPT domain, το οποίο σύμφωνα με αρκετές μελέτες φαίνεται να είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων της Pmel17. Επιπροσθέτως, λόγω του ότι ανήκει στις διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, διαθέτει ένα πεπτίδιο οδηγητή, το οποίο αποκόπτεται και δεν λαμβάνει μέρος στην τελική στερεοδιάταξη της πρωτεΐνης (Εικόνα 27). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η δομή της δεν έχει λυθεί.



Εικόνα 27: *Η Pmel17 είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου Ι και αποτελείται από 668 αμινοξικά κατάλοιπα. Διαθέτει πεπτίδιο οδηγητή (signal peptide), που φαίνεται με μπλε χρώμα και εννέα αυτοτελείς δομικές περιοχές ή αλλιώς domains. Το RPT domain αποτελείται από 10 επαναλήψεις μήκους 13 αμινοξικών καταλοίπων.*

Ονομασίες	Επεξήγηση
gp100	**G**lyco**P**rotein **100kDa**
RPE1	**R**etinal **P**igment **E**pithelium
ME20	**ME20** is a monoclonal antibody which detects Pmel17
SILV	**Silv**er locus protein homolog
MMP115	**115-kDa M**elanosomal **M**atrix **P**rotein
PMEL	**P**re**MEL**anosome protein

Πίνακας 3: Στον πίνακα αυτό φαίνονται κάποια από τα ονόματα που έχουν δοθεί στην Pmel17, από διάφορες ερευνητικές ομάδες. Η κάθε ονομασία στον πίνακα, έχει αποδοθεί με τον ίδιο τρόπο που έχει αποδοθεί στην εκάστοτε δημοσίευση ή με τον ίδιο τρόπο που είναι κατατεθειμένη στη βάση UNIPROT.

ΙΣΟΜΟΡΦΗ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΚΑΤΑΛΟΙΠΑ	ΔΙΑΦΟΡΕΣ
ΙΣΟΜΟΡΦΗ 1	Intermediate form	661 Κατάλοιπα	-
ΙΣΟΜΟΡΦΗ 2	Long form	668 Κατάλοιπα	587-587 P → PVPGILLT
ΙΣΟΜΟΡΦΗ 3	-	575 Κατάλοιπα	Δ26-111
ΙΣΟΜΟΡΦΗ 4	Short form	619 Κατάλοιπα	Δ373-414
ΙΣΟΜΟΡΦΗ 5	Short form	626 Κατάλοιπα	Δ373-414 587-587 P → PVPGILLT

Πίνακας 4: Στον πίνακα αυτό φαίνονται οι ισομορφές της Pmel17 σύμφωνα με την πρωτεϊνική βάση UNIPROT (AC: P40967, OS: HOMO SAPIENS). Η τελευταία στήλη αφορά τις διαφορές των ισομορφών σε σχέση με την ισομορφή 1.
Δ: έλλειψη ενός συγκεκριμένου τμήματος που αποδίδεται με αριθμούς. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στη θέση των καταλοίπων που απουσιάζουν.

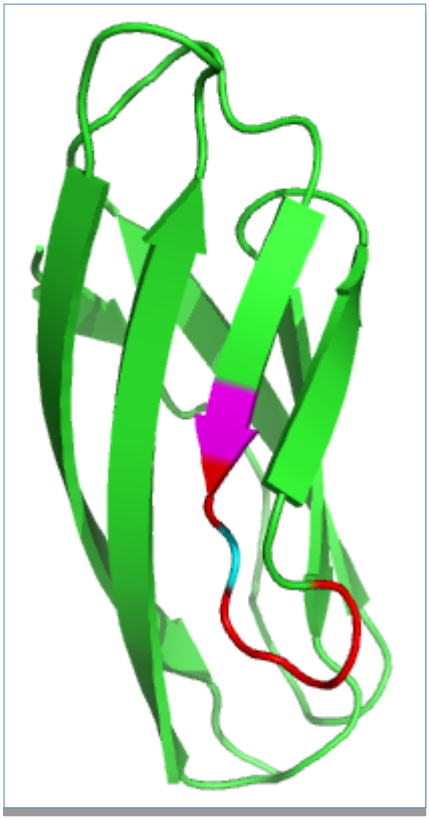
1.6.2 Αυτοτελείς δομικές περιοχές

NTR DOMAIN

Το NTR domain της Pmel17, πήρε το όνομά του από το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης (N- Terminal Domain). Σύμφωνα με τη βάση UNIPROT, αποτελείται από 230 αμινοξικά κατάλοιπα (25-254). Διάφορες μελέτες, κάποιες από τις οποίες θα αναφερθούν παρακάτω, πιθανολογούν πως το domain αυτό είναι σημαντικό για την σωστή πρωτεόλυση, την σταθεροποίηση των ινοδογόνων τμημάτων και την μεταφορά της πρωτεΐνης στα προμελανοσώματα [104, 105].

PKD DOMAIN

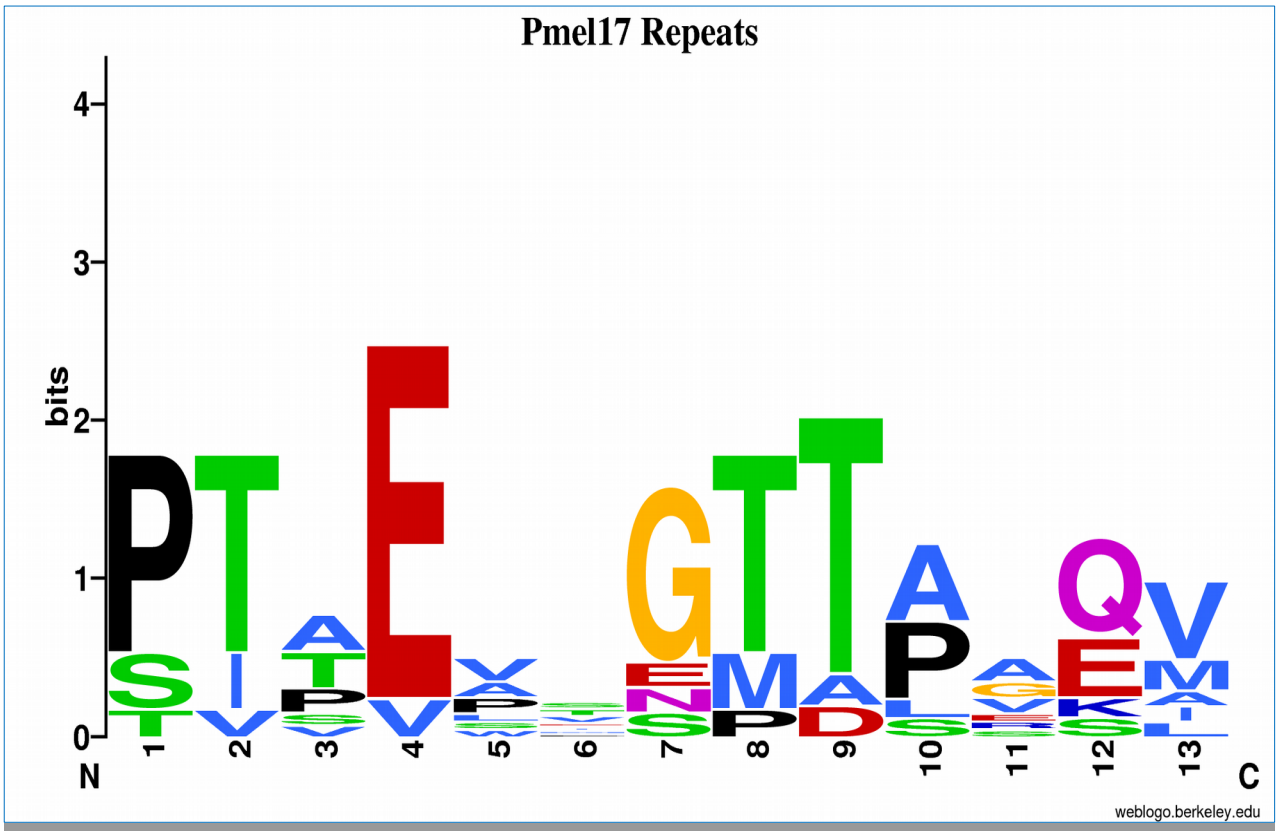
Το PKD domain της Pmel17, πήρε το όνομά του λόγω της ομολογίας που εμφανίζει με μία περιοχή επαναλαμβανόμενων τμημάτων που εντοπίζεται στην PKD1 πρωτεΐνη. Η στερεοδιάταξη των domains αυτής της μορφής είναι όμοια με των ανοσοσφαιρινών, δηλαδή αποτελούνται από ένα β- sandwich, με 7 κλώνους σε 2 β-πτυχωτές επιφάνειες, με τοπολογία ελληνικού κλειδιού. Διαθέτουν ένα μοτίβο το οποίο είναι αρκετά συντηρημένο και υπάρχει και στην Pmel17 (Εικόνα 27). Το μοτίβο αυτό φαίνεται να έχει δομικό ρόλο [106]. Σύμφωνα με τη βάση UNIPROT, αποτελείται από 38 αμινοξικά κατάλοιπα (255-292).



***Εικόνα 28**: PKD domain της Pmel17. Με τα διαφορετικά χρώματα φαίνεται το συντηρημένο μοτίβο **(WDFGDSS)** . Απεικόνιση μέσω Pymol. PDBID: 1B4R*

RPT DOMAIN

Το RPT domain της Pmel17, αποτελείται από 10 διαδοχικές επαναλήψεις, μήκους 13 αμινοξικών καταλοίπων και για το λόγο αυτό ονομάστηκε RPT (RePeaT domain). Κάθε θέση καταλαμβάνεται από συγκεκριμένα κατάλοιπα σύμφωνα με το παρακάτω μοτίβο: **PTXEXXGTTPXQV [107]**, όπως φαίνεται και στην εικόνα 29. Σύμφωνα με την πρωτεϊνική βάση δεδομένων UNIPROT, αποτελείται από 130 αμινοξικά κατάλοιπα. Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν πως το domain αυτό είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό του πυρήνα των αμυλοειδών ινιδίων της Pmel17 [107-110] και πιο συγκεκριμένα οι 7, 8 και 9 επαναλήψεις του [111]. Η άποψη αυτή ενισχύεται και από το γεγονός ότι υπάρχουν πρωτεΐνες με υψηλή ομολογία με την Pmel17, οι οποίες δεν δημιουργούν αμυλοειδή ινίδια και η μόνη διαφορά τους είναι ότι δεν περιέχουν το RPT domain (π.χ. Nmb) [103]. Ωστόσο, άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι ή ότι το NTR και το PKD domain δημιουργούν τον πυρήνα των αμυλοειδών ινιδίων και έπειτα το RPT domain δημιουργεί τα ινίδια πάνω στο σχηματισμένο πυρήνα [112] ή ότι το PKD domain είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων εξ ολοκλήρου [104] ή ότι τα PKD και RPT domains είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων [113]. Το γεγονός ότι δεν υπάρχει λυμένη κρυσταλλογραφικά δομή της πρωτεΐνης, δυσκολεύει ακόμα περισσότερο την εύρεση ενός πιθανού μοντέλου.



Εικόνα 29: *Μοτίβο επαναλήψεων του RPT domain της Pmel17. Παρατηρούμε πως κατά κύριο λόγο στην θέση 1 υπάρχουν προλίνη, στην θέση 2 θρεονίνη, στην θέση 4 γλουταμικο, τα οποία ίσως να συμμετέχουν στην αυτοσυγκρότηση της πρωτεΐνης και κατ΄ επέκταση στην δημιουργία των αμυλοειδών ινιδίων, στη θέση 7 γλυκίνη, στις θέσεις 8 και 9 πάλι θρεονίνη, στην θέση 10 αλανίνη και προλίνη, στην θέση 12 γλουταμίνη και στην θέση 13 βαλίνη.*

GAP1- GAP2- GAP3 DOMAINS

Τα GAPS domains της Pmel17, ονομάστηκαν gap (κενό), διότι η λειτουργία τους παραμένει άγνωστη. Ωστόσο, κατά την πρωτεόλυση τα GAP2 και GAP3 φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο [114]. Επίσης, πολύ σημαντική φαίνεται να είναι η κυστεΐνη που διαθέτει το GAP2 domain. Σύμφωνα με την UNIPROT, διαθέτουν 22 (293-314), 71 (445-515) και 37 (603-567) κατάλοιπα, αντίστοιχα.

KRG DOMAIN

Το KRG domain της Pmel17, ονομάστηκε κατ' αυτό τον τρόπο διότι χαρακτηρίζεται από αυξημένη παρουσία συντηρημένων κυστεϊνών, όπως το kringle –like fold. Τα domains τύπου Kringle-like fold, δημιουργούν μεγάλες λούπες, οι οποίες σταθεροποιούνται με δισουλφιδικούς δεσμούς [115]. Είναι αρκετά σημαντικά για πρόσδεση π.χ. σε

μεμβράνες ή και για την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών και φαίνεται να ρυθμίζουν την πρωτεολυτική δραστηριότητα. Όσον αφορά την Pmel17, δεν έχει προταθεί η λειτουργία του domain αυτού [108]. Ωστόσο, είναι πολύ πιθανό οι κυστεΐνες που διαθέτει να συμβάλλουν στην δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών κατά την πρωτεόλυση, με άλλα domains [112]. Σύμφωνα με την πρωτεϊνική βάση δεδομένων UNIPROT, το KRG ή αλλιώς KLD domain διαθέτει 51 κατάλοιπα (516-566).

TM DOMAIN

Το domain αυτό ονομάστηκε TM καθότι είναι το διαμεμβρανικό domain (TransMembrane) της πρωτεΐνης Pmel17. Σύμφωνα με την πρωτεϊνική βάση δεδομένων UNIPROT, αποτελείται από 34 κατάλοιπα (604-638).

CTD DOMAIN

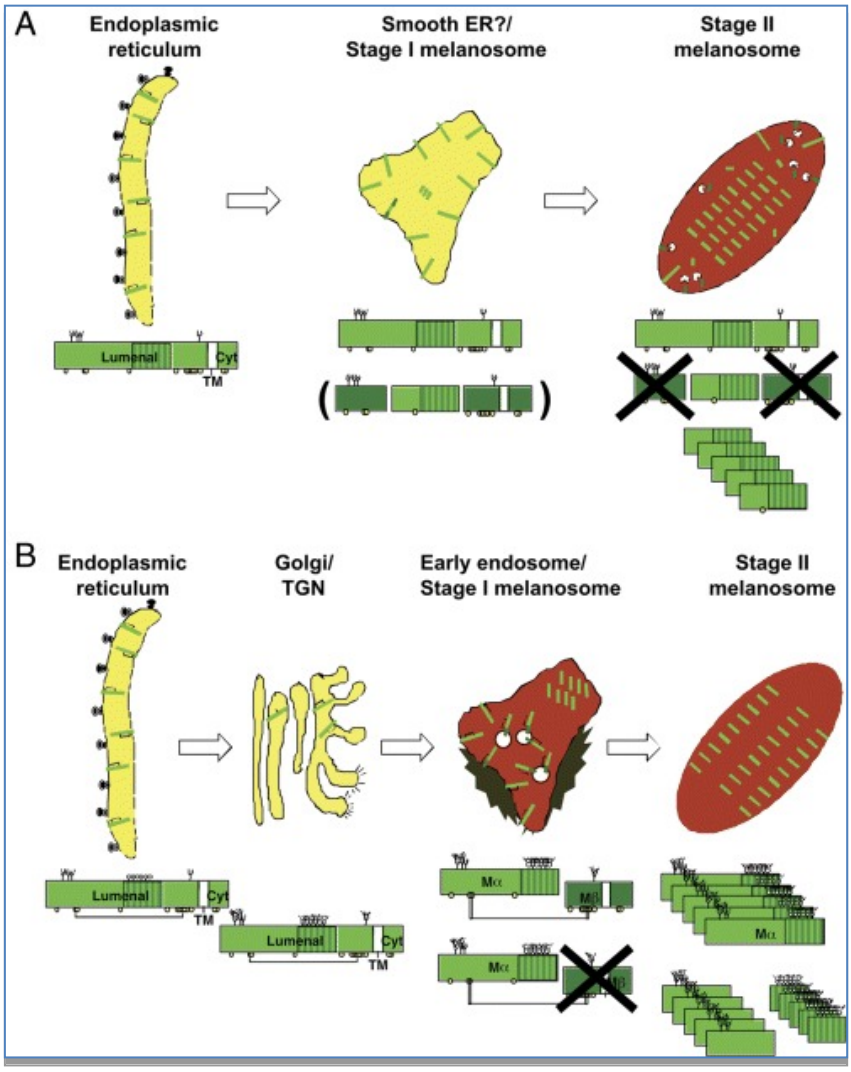
Το domain αυτό ονομάστηκε CTD καθότι είναι το domain που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό τμήμα (C- Terminal Domain) της πρωτεΐνης. Σύμφωνα με την πρωτεϊνική βάση δεδομένων UNIPROT, αποτελείται από 51 κατάλοιπα (617-668).

1.6.3 Μονοπάτι ωρίμανσης (maturation pathway)

Για να γίνει καλύτερα κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο ελέγχεται ο σχηματισμός των αμυλοειδών ινιδίων της Pmel17, θα πρέπει να εμβαθύνουμε στην διαδοχική πρωτεολυτική ωρίμανση που υφίσταται σε διακριτά εκκριτικά και ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Το 1965 ο Maul παρατήρησε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ανθρώπινα κύτταρα μελανώματος και εντόπισε δομές που έμοιαζαν μορφολογικά με μελανοσώματα σταδίου II σε σωληνοειδείς μεμβράνες κοντά στο σύμπλεγμα Golgi [116]. Σήμερα, γνωρίζουμε πως οι σωληνοειδείς μεμβράνες αντιπροσωπεύουν το Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ). Λίγο αργότερα, με μελέτες επεξεργασίας πρωτεϊνών (protein processing studies) σε κύτταρα μελανώματος ποντικών, υποστηρίχθηκε η άποψη ότι η Pmel17 τροποποιείται με Ν-γλυκοζυλίωση στο ΕΔ και έπειτα μεταφέρεται στα προμελανοσώματα [117]. Ακόμα, φαίνεται πως απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία των Ν-συνδεδεμένων ολιγοσακχαριτών στο σύμπλεγμα Golgi, όπως συμβαίνει στις πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα μελανοσώματα. Ωστόσο, σε κάποιες μελέτες δεν παρατηρήθηκε επεξεργασία της Pmel17 στο σύμπλεγμα Golgi και για το λόγο αυτό υπάρχουν δύο μοντέλα που αφορούν την επεξεργασία της Pmel17 (Εικόνα 30) [117, 118]:

- Με βάση το μοντέλο αυτό, η Pmel17 υφίσταται επεξεργασία **μόνο στο ΕΔ** και μεταφέρεται στα προ- μελανοσώματα.

- Με βάση το μοντέλο αυτό η Pmel17 υφίσταται επεξεργασία **στο σύμπλεγμα Golgi και στο ΕΔ.** Έπειτα, μεταφέρεται στα προ- μελανοσώματα [119, 120].

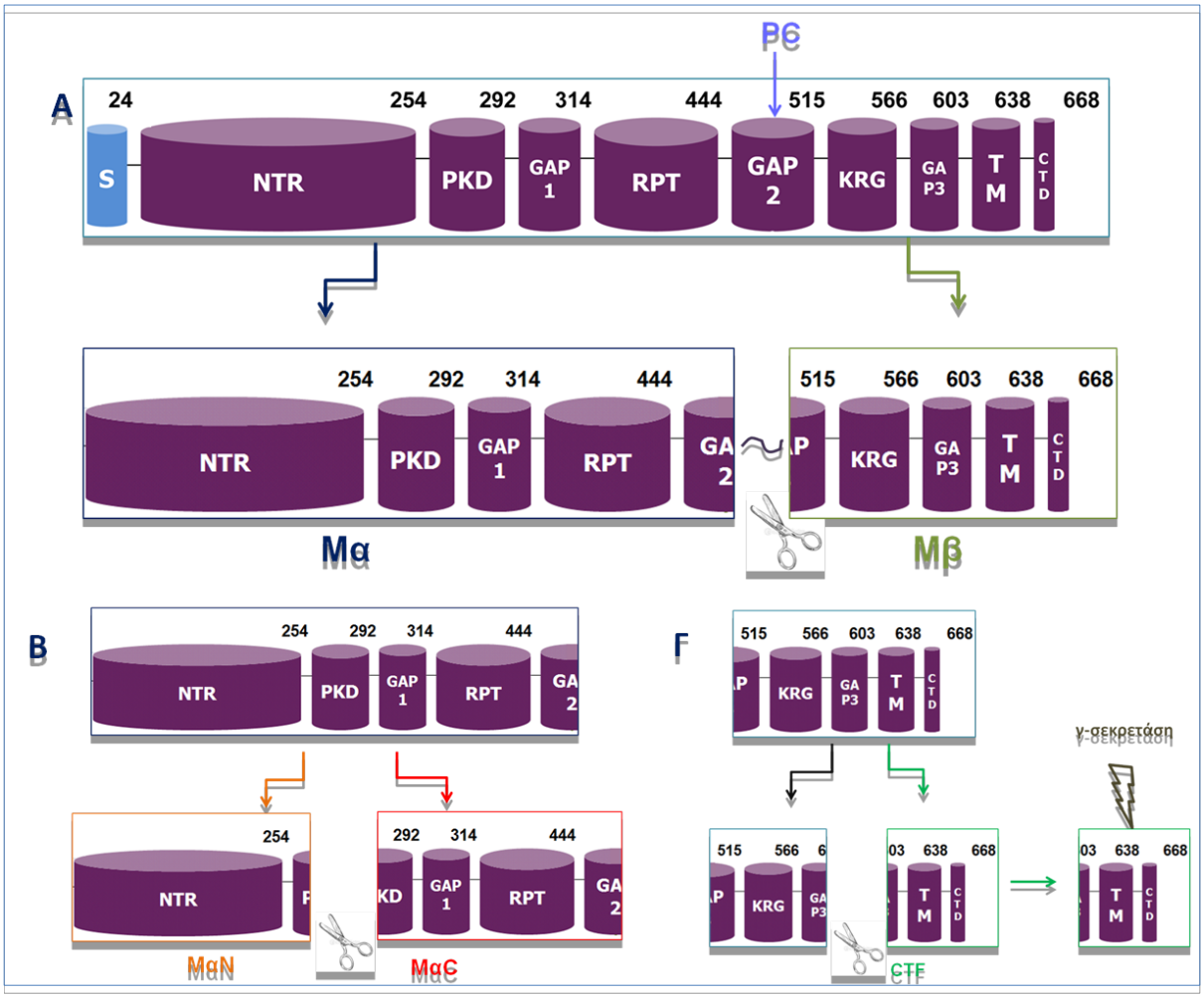


***Εικόνα 30**: Δύο μοντέλα για την μεταφορά της Pmel17 στα μελανοσώματα. Α) Με βάση το μοντέλο αυτό, η Pmel17 υφίσταται επεξεργασία μόνο στο ΕΔ και μεταφέρεται στα προ- μελανοσώματα.Β) Με βάση το μοντέλο αυτό η Pmel17 υφίσταται επεξεργασία και στο το σύμπλεγμα Golgi και στο ΕΔ. Έπειτα, μεταφέρεται στα προ- μελανοσώματα. Με κύκλους επισημαίνονται οι πιθανές θέσεις Ο- γλυκοζυλίωσης, ενώ με γραμμές επισημαίνονται οι πιθανές θέσεις Ν- γλυκοζυλίωσης.*

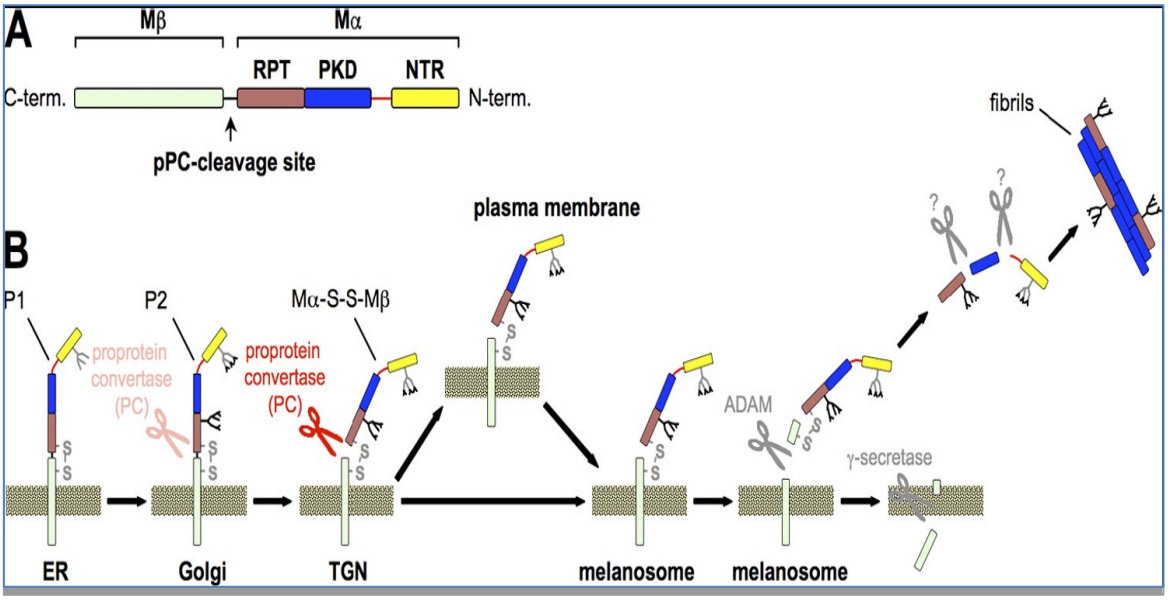
ΜΟΝΤΕΛΟ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΟΠΟΙΟ Η Pmel17 ΠΕΡΝΑΕΙ ΚΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ GOLGI

Η αρχική μορφή της Pmel17 είναι η **P1** μορφή, η οποία είναι 100kDa, εισέρχεται στο ΕΔ και υφίσταται Ν-γλυκοζυλίωση. Στη συνέχεια, μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi, όπου οι Ν-συνδεδεμένοι ολιγοσακχαρίτες ωριμάζουν και λαμβάνει χώρα Ο-γλυκοζυλίωση, μετατρέποντας την P1 μορφή σε **P2** μορφή (120kDa) [114]. Έπειτα, η προκύπτουσα P2 μορφή πρωτεολύεται από μία proprotein κονβερτάση ανάμεσα στην 469R και στην 470Q [121]. Κατά συνέπεια, δημιουργούνται δύο τμήματα, το **Μα** και το **Μβ**, τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα με δισουλφιδικό δεσμό [113, 122]. Ο δεσμός αυτός δεν γνωρίζουμε με ακρίβεια μεταξύ ποιων καταλοίπων δημιουργείται [119]. Στη συνέχεια, η Pmel17 μεταναστεύει στα προ- μελανοσώματα [120], στην μορφή **Μα-S-S-Μβ** και μεταφέρεται από την μεμβράνη σε ειδικά **ενδοαυλικά κυστίδια (ILVs)**, μία διαδικασία που υποκινείται από την τετρασπανίνη CD63 [123]. Έπειτα, υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία κοντά στη μεμβράνη, από μια **μεταλλοπρωτεάση** της οικογένειας ADAM και απελευθερώνεται από το Μβ τμήμα. Στη συνέχεια, πρωτεολύεται περαιτέρω και παράγονται δύο μικρότερα τμήματα, το **ΜαΝ** και το **ΜαC** [108]. Το ΜαC φαίνεται να είναι υπεύθυνο για την δημιουργία των αμυλοειδών ινιδίων. Το Μβ τμήμα αφού πρωτεολυθεί και από την γ- σεκρετάση [124], αποικοδομείται πλήρως(Εικόνα 31). Στο σημείο αυτό δημιουργείται το εξής βιολογικό ερώτημα, το οποίο δεν μπορεί να απαντηθεί με τα μέχρι τώρα δεδομένα: ***Γιατί το τμήμα Μβ πρωτεολύεται περαιτέρω πριν αποικοδομηθεί και δεν αποικοδομείται απευθείας;*** Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τα domains που περιέχει διαδραματίζουν κάποιο σπουδαίο ρόλο (π.χ. KRG για την πρόσδεση στην μεμβράνη), μέχρι τη στιγμή που αποικοδομείται πλήρως, όμως τίποτα δεν είναι σίγουρο. Έπειτα, σύμφωνα με τον Leonhardt et al., τα RPT και PKD domains αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν τον πυρήνα των αμυλοειδών ινιδίων [113] (Εικόνα 32).

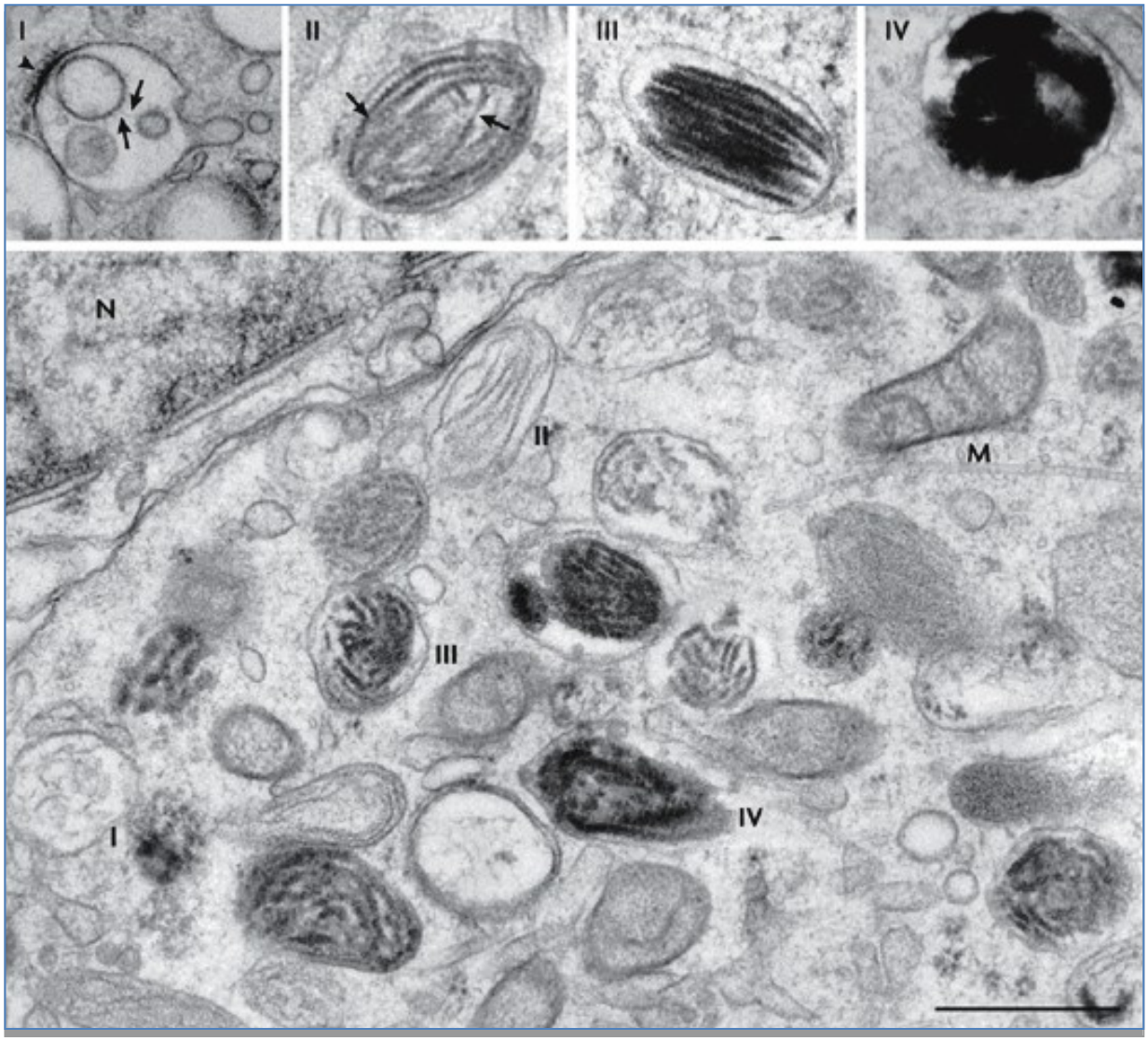
Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα μελανοσώματα ωριμάζουν ανάλογα με την μορφή που λαμβάνει η Pmel17 μέσα σ' αυτά σε συνδυασμό με το στάδιο βιοσύνθεσης της μελανίνης. Πιο συγκεκριμένα, τα **προμελανοσώματα** διαθέτουν ILVs, μέσα στα οποία είναι η Pmel17 σε μορφή Μα-S-S-Μβ και κάποια στιγμή το τμήμα Μα απελευθερώνεται. Στη συνέχεια, σε **μελανοσώματα σταδίου ΙΙ**, παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη έχει αυτοσυγκροτηθεί και έχει σχηματίσει αμυλοειδή ινίδια, τα οποία αποτελούν το απαραίτητο υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση της χρωστικής μελανίνης στο **στάδιο ΙΙΙ**. Στα **μελανοσώματα σταδίου IV** παρατηρούμε πως δεν υπάρχουν ινίδια της πρωτεΐνης και η βιοσύνθεση της μελανίνης έχει ολοκληρωθεί (Εικόνα 33).



Εικόνα 31*: Μονοπάτι ωρίμανσης της Pmel17. Α) HP2 μορφή πρωτεολύεται από μία proprotein κονβερτάση ανάμεσα στην 469R και στην 470Q . Κατά συνέπεια, δημιουργούνται δύο τμήματα, το Μα και το Μβ, τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα με δισουλφιδικό δεσμό. Έπειτα, υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία κοντά στη μεμβράνη, από μια μεταλλοπρωτεάση της οικογένειας ADAM και απελευθερώνεται από το Μβ τμήμα Β). Στη συνέχεια, πρωτεολύεται περαιτέρω και παράγονται δύο μικρότερα τμήματα, το ΜαΝ και το ΜαC. Γ) Το Μβ τμήμα αφού πρωτεολυθεί και από την γ- σεκρετάση, αποικοδομείται πλήρως.*



***Εικόνα 32**: Μονοπάτι ωρίμανσης της Pmel17, με βάση το οποίο η πρωτεΐνη εισέρχεται στο Golgi.*
Α) Φαίνονται με διαφορετικά χρώματα τα domains της Pmel17 και τα Μα και Μβ τμήματα που προκύπτουν έπειτα από την πρωτεόλυσή της. Β) Η αρχική μορφή της Pmel17 είναι η P1 μορφή, η οποία είναι 100kDa, εισέρχεται στο ΕΔ και υφίσταται Ν-γλυκοζυλίωση. Στη συνέχεια, μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi, όπου οι Ν-συνδεδεμένοι ολιγοσακχαρίτες ωριμάζουν και λαμβάνει χώρα Ο-γλυκοζυλίωση, μετατρέποντας την P1 μορφή σε P2 μορφή (120 kDa). Στην συνέχεια, η προκύπτουσα P2 μορφή πρωτεολύεται από μία proprotein κονβερτάση ανάμεσα στην 469R και στην 470Q. Κατά συνέπεια, δημιουργούνται δύο τμήματα, το Μα και το Μβ, τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα με δισουλφιδικό δεσμό. Ο δεσμός αυτός δεν γνωρίζουμε με ακρίβεια μεταξύ ποιων καταλοίπων δημιουργείται. Στη συνέχεια, η Pmel17 μεταναστεύει στα προ- μελανοσώματα, στην μορφή Μα-S-S-Μβ και μεταφέρεται από την μεμβράνη σε ειδικά ενδοαυλικά κυστίδια (ILVs), μία διαδικασία που υποκινείται από την τετρασπανίνη CD63. Έπειτα, υφίσταται περαιτέρω επεξεργασία κοντά στη μεμβράνη, από μια μεταλλοπρωτεάση της οικογένειας ADAM και απελευθερώνεται από το Μβ τμήμα. Στη συνέχεια, πρωτεολύεται περαιτέρω και παράγονται δύο μικρότερα τμήματα, το ΜαΝ και το ΜαC. Το ΜαC φαίνεται να είναι υπεύθυνο για την δημιουργία των αμυλοειδών ινιδίων. Το Μβ τμήμα αφού πρωτεολυθεί και από την γ- σεκρετάση, αποκοδομείται πλήρως. Τα RPT και PKD domains, αφού κοπούν από κάποια άγνωστη μέχρι τώρα πρωτεΐνη, σχηματίζουν τον πυρήνα των αμυλοειδών ινιδίων.



Εικόνα 33: *I. Τα προμελανοσώματα διαθέτουν ILVs, μέσα στα οποία είναι η Pmel17 σε μορφή Μα-S-S-Μβ. Με βέλη φαίνονται ινίδια που έχουν σχηματιστεί από το Μα τμήμα, όταν έρθει σε επαφή με το όξινο pH των μελανοσωμάτων. II. Σε μελανοσώματα σταδίου II, παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη έχει αυτοσυγκροτηθεί και έχει σχηματίσει αμυλοειδή ινίδια τα οποία αποτελούν το απαραίτητο υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση της χρωστικής μελανίνης. III. Έχει ξεκινήσει η βιοσύνθεση της μελανίνης. IV. Παρατηρούμε πως δεν υπάρχουν ινίδια και η βιοσύνθεση της μελανίνης έχει ολοκληρωθεί. Bar: 0,5μm*

1.6.4 Πώς σχηματίζονται τα αμυλοειδή ινίδια της Pmel17;

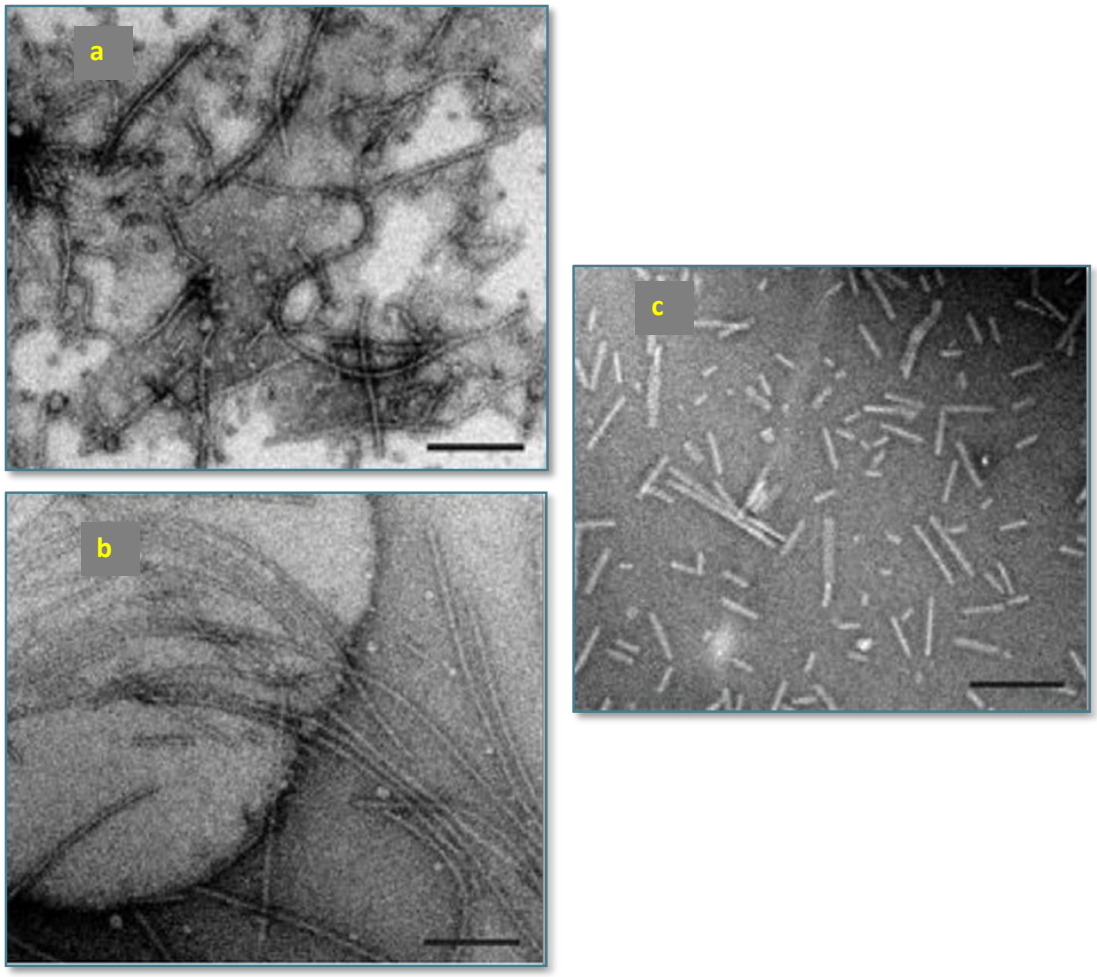
Με όσα έχουν αναφερθεί είναι φανερό πως δεν είναι ξεκάθαρος ο τρόπος με τον οποίο σχηματίζεται ο πυρήνας των αμυλοειδών ινιδίων και αυτό γιατί κάθε ερευνητική ομάδα μελετάει με διαφορετικούς τρόπους την πρωτεΐνη και προτείνει κάτι καινούργιο. Στο κεφάλαιο αυτό της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα αναφερθούμε σε διάφορες μελέτες που έχουν γίνει κατά καιρούς για την εύρεση ενός πιθανού μηχανισμού δημιουργίας αμυλοειδών ινιδίων.

Οι Hu et al., θέλοντας απαντήσουν στο παραπάνω βιολογικό ερώτημα, ξεκίνησαν μία σειρά πειραμάτων για το RPT domain της Pmel17, που περιελάμβανε πειράματα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας και πειράματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) [111]. Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποίησαν τρία διαλύματα:

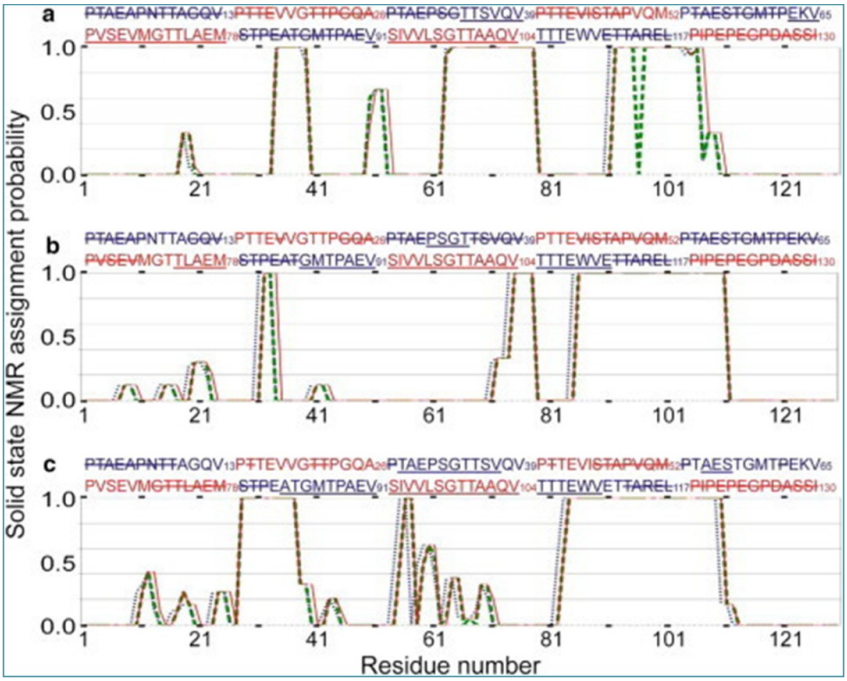
- ***P1***: 120μM Pmel17:RPT σε 125 mM οξικό κάλιο, pH=5 σε θερμοκρασία δωματίου, ανάδευση
- ***P2***: Ινίδια από το P1 έσπασαν σε μικρότερα τμήματα με τη χρήση υπερήχων και τοποθετήθηκαν σε ίδιο διάλυμα με το P1. Η διαδικασία αυτή έγινε τρεις φορές. Το διάλυμα P2 είναι από την δεύτερη γενιά.
- ***P3***: 60μM Pmel17:RPT σε 100mM NaCl και 25 mM CH3COOK, pH=5.5 και θερμοκρασία 37°C, ανάδευση

Στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης έπειτα από αρνητική χρώση, παρατηρήθηκαν ινίδια που σχηματίστηκαν και από τα τρία διαλύματα, τα οποία είχαν παρόμοιες διαμέτρους (100-140 Å). Τα ινίδια του διαλύματος P2 φαίνεται να είναι μεγαλύτερα σε μήκος, λόγω της μη ανάδευσης κατά τη διάρκεια ανάπτυξης (Εικόνα 34).

Με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR) μπορούσαν να εντοπίσουν την πιθανότητα κάποια κατάλοιπα να δημιουργήσουν β-δομή. Με τον τρόπο αυτό κατάφεραν να εντοπίσουν μία κοινή περιοχή και για τα τρία διαλύματα, η οποία κατά πάσα πιθανότητα είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων του RPT domain της Pmel17 (Εικόνα 35).



***Εικόνα 34**: Στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης έπειτα από αρνητική χρώση, παρατηρήθηκαν ινίδια που σχηματίστηκαν και από τα τρία διαλύματα, τα οποία έχουν παρόμοιες διαμέτρους (100-140 Å). a) Ινίδια που σχηματίστηκαν από το διάλυμα P1 b) Ινίδια που σχηματίστηκαν από το διάλυμα P2. Εδώ τα ινίδια είναι μεγαλύτερα σε μήκος, λόγω της μη ανάδευσης κατά τη διάρκεια ανάπτυξης. c) Ινίδια που σχηματίστηκαν από το διάλυμα P3 Bar: 200nm*



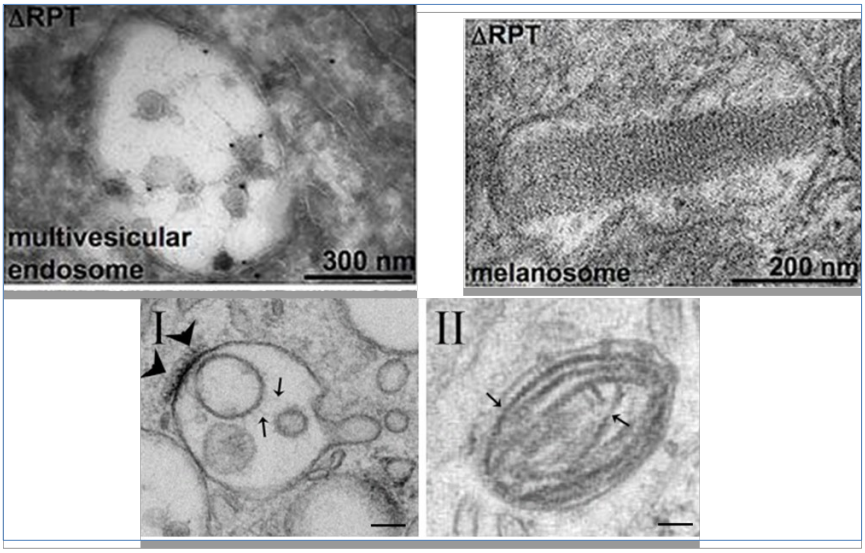
1	PTAEAPNTTAGQV	13
1	PTTEVVGTTPGQA	13
1	PTAEPSGTTSVQV	13
1	PTTEVISTAPVQM	13
1	PTAESTGMTPEKV	13
1	PVSEVMGTTLAEM	13
1	STPEATGMTPAEV	13
1	SIVVLSGTTAAQV	13
1	TTTEWVETTAREL	13
1	PIPEPEGPDASSI	13

Εικόνα 35: *Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) των τριών διαλυμάτων. Κάθε κατάλοιπο εκπέμπει σήμα ανάλογα με την πιθανότητα που έχει να βρίσκεται σε β-δομή. Διαγραμμένα είναι τα κατάλοιπα που δεν εκπέμπουν σήμα. Χωρίς γραμμή είναι τα κατάλοιπα που εκπέμπουν χαμηλό σήμα. Υπογραμμισμένα είναι τα κατάλοιπα που εκπέμπουν αυξημένο σήμα. Με τον τρόπο αυτό κατάφεραν να εντοπίσουν μία κοινή περιοχή και για τα τρία διαλύματα, η οποία κατά πάσα πιθανότητα είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων του RPT domain της Pmel17 και φαίνεται με ροζ δεξιά της εικόνας.*

Οι Leonhardt et al., το 2013 [104] θέλοντας να απαντήσουν στο παραπάνω ερώτημα ξεκίνησαν μία σειρά πειραματικών διαδικασιών, in vivo σε κύτταρα μελανώματος (MEL220), που περιλάμβανε πειράματα ανοσοϊστοχημείας με αντισώματα ειδικά για κάθε domain της Pmel17, πειράματα ηλεκτροφόρησης, πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, αλλαγές σε αμινοξέα (single aa exchanges), διαδοχικές διαγραφές (sequential deletions) και μεταλλαγές αμινοξέων σε αλανίνη (alanine-scanning mutagenesis), παρατηρώντας όσα φαίνονται στον πίνακα 5. Συνεπώς, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το RPT domain **ΔΕΝ** είναι αυτό που δημιουργεί τον πυρήνα των αμυλοειδών ινιδίων σε κύτταρα μελανώματος MEL220, ενώ είναι πιθανό να συμμετέχει στον **έλεγχο και την οργάνωση** του συσσωματώματος, επειδή τα ινίδια που παρατηρήθηκαν με διαγραφή του RPT domain (ΔRPT) εμφανίζονται μόνο σε παθολογικές καταστάσεις (Εικόνα 36). Επιπρόσθετα, συμπέραναν πως το NTR domain πιθανόν ελέγχει την μεταφορά και την επεξεργασία της Pmel17, ενώ το PKD domain σχηματίζει τον πυρήνα των αμυλοειδών ινιδίων. Η μελέτη αυτή έρχεται σε αντίθεση με όσα έχουν προταθεί μέχρι σήμερα. Ωστόσο, στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως σε κύτταρα HeLa, με πλήρη διαγραφή του RPT domain (ΔRPT) δεν σχηματίστηκαν ινίδια [108, 125].

ΔNTR	ΔRPT
Γίνεται πρωτεολυτική διάσπαση από proprotein κονβερτάσες στην θέση PC, ΟΜΩΣ δεν ωριμάζει πρωτεολυτικά το MαC.	Πιο συμπαγής μορφή ινιδίων (με περιοδικότητα κάθετα στον άξονα) που εμφανίζεται σε παθολογικούς φαινοτύπους και οφείλεται σε υπερβολική συσσώρευση ινιδίων ή στο ότι τα ινίδια είναι πυκνά.
Μεταφέρεται στα προμελανοσώματα ΟΜΩΣ δεν σταθεροποιούνται τα ινοδογόνα τμήματα. (γρήγορη αποδόμηση)	
Ωρίμανση μελανοσωμάτων	
Όχι ινίδια σε Η.Μ.	

ληρου του NTR (ΔNTR) και του RPT domain (ΔRPT).

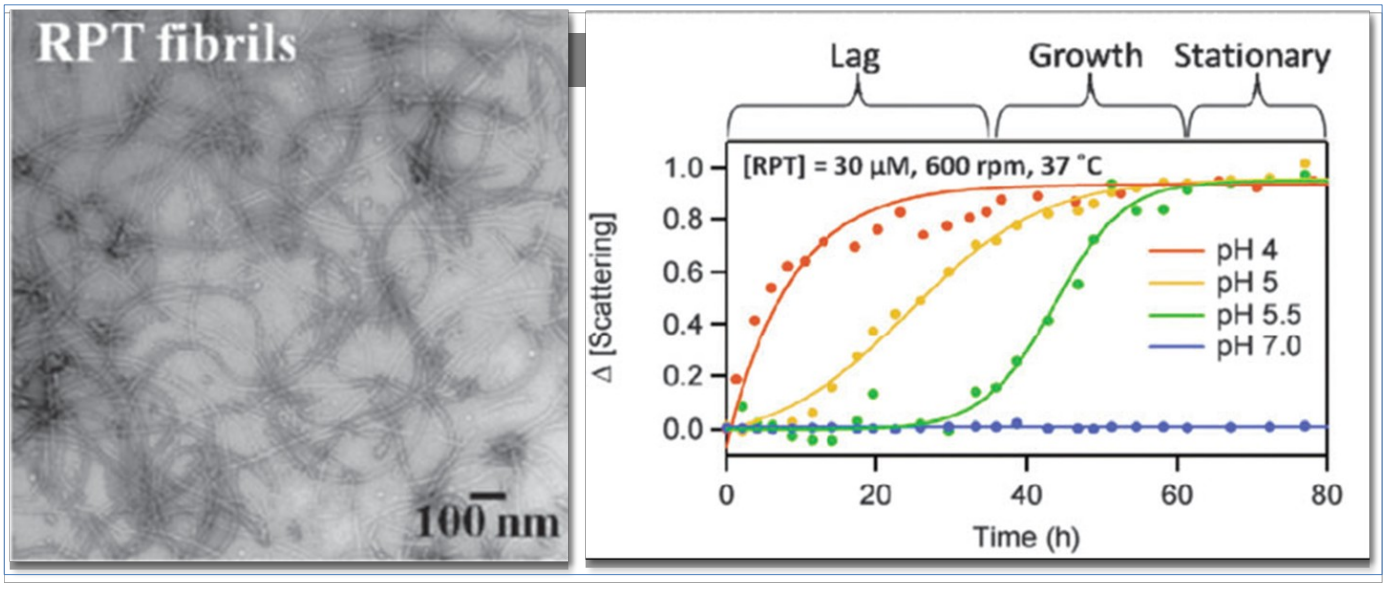


Εικόνα 36: *α) Διαγραφή του RPT domain από την Pmel17, εισαγωγή σε MEL220 και παρατήρηση σε ΗΜΔ. Παρατηρούμε προμελανοσώματα με ενδοαυλικά κυστίδια (ILVs) που περιέχουν την Pmel17 και ινίδια τα οποία ξεπροβάλλουν από τα ILVs. Bar 300nm. b) Διαγραφή του RPT domain από την Pmel17, εισαγωγή σε MEL220 και παρατήρηση σε ΗΜΔ. Τα μελανοσώματα είναι περίπου ελλειψοειδή και διαθέτουν ινίδια, τα οποία όμως είναι πιο συμπαγή. Ο φαινότυπος αυτός παρατηρείται συνήθως σε παθολογικές καταστάσεις. Bar 200nm I) Φυσιολογικό προμελανόσωμα, με ILVs και ινίδια που ξεπροβάλλουν. Bar 0,1μm II) Φυσιολογικό μελανόσωμα σταδίου II, με σχηματισμένα ινίδια που εμφανίζουν περιοδικότητα κάθετη ως προς τον άξονα. Bar 0,1μm*

Ένα άλλο βιολογικό ερώτημα που προκύπτει είναι εάν **το όξινο p Η των μελανοσωμάτων διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην δημιουργία των αμυλοειδών ινιδίων της Pmel17**.

Οι McGlinchey et al., απάντησαν στο παραπάνω βιολογικό ερώτημα, παρακολουθώντας τις αλλαγές στη μορφολογία και στη δομή των ινιδίων που δημιουργούνται από το RPT domain της Pmel17, σαν συνάρτηση του pH, με ένα συνδυασμό τεχνικών που περιλάμβανε πειράματα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας και σκέδασης φωτός [110]. Στη συγκεκριμένη μελέτη ο σχηματισμός των ινιδίων τηρεί την κινητική προσέγγιση της ινιδογένεσης, δηλαδή παρατηρήθηκε σιγμοειδές διάγραμμα το οποίο αποτελούνταν από αργή φάση, φάση επιμήκυνσης και στατική φάση. Η συσσωμάτωση έλαβε χώρα σε όξινο κυρίως pH (4.0-5.5). Πιο συγκεκριμένα, σε pH 4.0, το RPT domain συσσωματώνεται με γρήγορο ρυθμό, σχηματίζοντας μικρά προϊνιδιακά συσσωματώματα. Παρόλα αυτά, σε ελαφρώς πιο όξινες συνθήκες (pH 5.0–5.5), παρατηρούνται μακριά αδιακλάδιστα ινίδια με κάποιες διαφορές στην κινητική και στην μορφολογία τους. Τα ινίδια που σχηματίζονται σε pH 5.5, παραπέμπουν σε εκείνα που σχηματίζονται στα μελανοσώματα σταδίου II (Εικόνα 37) [110].

Συμπερασματικά, σύμφωνα με την παραπάνω μελέτη, για το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων από το RPT domain της Pmel17, είναι απαραίτητο το όξινο pH των μελανοσώματων σταδίου II. Όσο η βιοσύνθεση της μελανίνης προχωρά, το pH ολοένα και αυξάνεται. Για το λόγο αυτό, στα μελανοσώματα σταδίου IV δεν παρατηρούνται ινίδια.



Εικόνα 37: α) Παρατηρηση σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο. Ινίδια που σχηματίζονται από το RPT domain σε pH 5.5, με διάμετρο περίπου 140Å. Bar 100nm. b) Σιγμοειδής κινητική του RPT domainπου προέκυψε με σκέδαση φωτός. Σε pH 4.0, το RPT domain συσσωματώνεται με γρήγορο ρυθμό, σχηματίζοντας μικρά προϊνιδιακά συσσωματώματα. Σε pH 5.5 παρατηρείται η βέλτιστη σιγμοειδής καμπύλη που αποτελείται από αργή φάση, φάση επιμήκυνσης και στατική φάση.

Στόχος της διπλωματικής εργασίας

Η Pmel17 είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου Ι, η οποία σύμφωνα με την Uniprot, εντοπίζεται σε αρκετά είδη συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Η πρωτεΐνη αυτή είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό του απαραίτητου υποστρώματος για τη βιοσύνθεση της μελανίνης. Η μελανίνη είναι μία χρωστική, η οποία απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία μειώνοντας την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του δέρματος (μελάνωμα) [126]. Με βάση τα παραπάνω, κρίθηκε απαραίτητο να γίνουν μελέτες ως προς τον σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων της Pmel17.

Ένας επιπλέον στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να ενισχυθεί η ακεραιότητα του πιθανού μοντέλου δομής που έχει κατασκευαστεί στο εργαστήριό μας. Αν το μοντέλο ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα, θα μπορέσει να εξηγηθεί ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρούν οι επαναλήψεις του RPT domain και δημιουργούν τα αμυλοειδή ινίδια. Δεδομένου ότι μέχρι σήμερα δεν έχει κατασκευαστεί κάποιο πιθανό μοντέλο δομής για την Pmel17, το βήμα αυτό είναι αρκετά σημαντικό για την επιστημονική κοινότητα.

Επιπροσθέτως, παρακολουθώντας τις διάφορες μελέτες που αφορούν στην Pmel17, εντοπίστηκαν και κάποιες μελέτες, οι οποίες είναι πρόσφατες και υποδεικνύουν πως το RPT domain δεν είναι αυτό που σχηματίζει τον πυρήνα των αμυλοειδών ινιδίων της Pmel17 [127]. Με βάση αυτό το γεγονός, πάρθηκε η απόφαση να μελετηθεί η ικανότητα του RPT domain να δημιουργεί αμυλοειδή ινίδια *in vitro*.

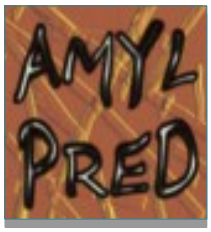
Στην παρούσα διπλωματική εργασία, στόχος είναι να γίνει έλεγχος με βιοφυσικές μεθόδους, αν τμήμα του RPT domain της Pmel17, έχει την ικανότητα να δημιουργει αμυλοειδή ινίδια, τα οποία θα αποτελέσουν υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση της μελανίνης στα μελανοκύτταρα.

2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πρόβλεψη και σύνθεση πεπτιδίου-αναλόγου

Η ακολουθία της ανθρώπινης Pmel17, η οποία βρίσκεται κατατεθειμένη στην βάση δεδομένων UNIPROT (www.uniprot.org/) με κωδικό AC (accession number) P40967 (PMEL_HUMAN), χρησιμοποιηθήκε για την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η πρωτεΐνη αυτή είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου Ι και αποτελείται από 668 αμινοξικά κατάλοιπα. Διαθέτει πεπτίδιο οδηγητή (signal peptide) 25 αμινοξικών καταλοίπων και εννέα αυτοτελείς δομικές περιοχές ή αλλιώς domains, με πιο σημαντικό το RPT domain, το οποίο φαίνεται να συμβάλλει στην δημιουργία του πυρήνα των αμυλοειδών ινιδίων της Pmel17. Το RPT domain, όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή, διαθέτει δέκα επαναλήψεις μήκους δεκατριών αμινοξικών καταλοίπων (Εικόνα 27).

Με την επεξεργασία της ακολουθίας του RPT domain της Pmel17 με τα εργαλεία AmylPred και AmylPred2 (παράρτημα I,II), δύο συναινετικούς αλγορίθμους πρόγνωσης πρωτεϊνικών περιοχών επιρρεπών προς συσσωμάτωση που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριό μας το 2009 και το 2013 αντίστοιχα, προγνώστηκαν τμήματα της ακολουθίας ως πιθανοί αμυλοειδογόνοι καθοριστές [128, 129]. Με βάση τις βιβλιογραφικές αναφορές, τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων και την ταύτιση των προβλέψεων και των δύο εργαλείων, συντέθηκε και μελετήθηκε με βιοφυσικές μεθόδους το πεπτίδιο-ανάλογο ^{405}**VSIVVLSGT**^{413} όπως επισημαίνεται στις εικόνες 38 και 39 σε ροζ πλαίσιο.




```
                    ....,....|....,....|....,....|....,....|....,....|....,....|
RPT domain...   1   PTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTTPGQAPTAEPSGTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGM  60
Prediction          ------------------------------------------------------------

                    ....,....|....,....|....,....|....,....|....,....|....,....|
RPT domain...  61   TPEKVPVSEVMGTTLAEMSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWVETTARELPIP 120
Prediction          ---------####----------------#######----------------------

                    ....,....|
RPT domain... 121   EPEGPDASSI                                                  130
Prediction          ----------
```

***Εικόνα 38**: Πρόγνωση τμημάτων της ακολουθίας του RPT domain της Pmel17 ως πιθανών αμυλοειδογόνων καθοριστών από τον συναινετικό αλγόριθμο πρόγνωσης AmylPred. Σε ροζ πλαίσιο φαίνεται το πεπτίδιο που συντέθηκε και μελετήθηκε με βιοφυσικές μεθόδους.*




```
                    ....,....|....,....|....,....|....,....|....,....|
RPT domain      1   PTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTTPGQAPTAEPSGTTSVQVPTTEVISTAPV  50
CONSENSUS5          --------------######----------------------#####---

                    ....,....|....,....|....,....|....,....|....,....|
RPT domain     51   QMPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLAEMSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTT 100
CONSENSUS5          ------------------------------------##########-

                    ....,....|....,....|....,....|
RPT domain    101   AAQVTTTEWVETTARELPIPEPEGPDASSI                      130
CONSENSUS5          #######----------------------
```

***Εικόνα 39**: Πρόγνωση τμημάτων της ακολουθίας του RPT domain της Pmel17 ως πιθανών αμυλοειδογόνων καθοριστών από τον συναινετικό αλγόριθμο πρόγνωσης AmylPred2. Σε ροζ πλαίσιο φαίνεται το πεπτίδιο που συντέθηκε και μελετήθηκε με βιοφυσικές μεθόδους.*

2.2 Διαλυτοποίηση του πεπτιδίου-αναλόγου

Το πεπτίδιο **VSIVVLSGT** διαλυτοποιήθηκε σε απεσταγμένο νερό με pH=5.75 σε τελική συγκέντρωση 15mg ml^{-1} και επωάστηκε για περίπου δύο εβδομάδες. Έπειτα, το πεπτίδιο μελετήθηκε με τις παρακάτω βιοφυσικές μεθόδους, για να επιβεβαιωθεί η ικανότητά του να σχηματίζει αμυλοειδή ινίδια:

- Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης
- Πολωτική Μικροσκοπία (χρώση Congo red)
- Περίθλαση ακτίνων-Χ
- Φασματοσκοπία Υπερερύθρου.

2.3 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Αρνητική Χρώση)

Μετά από δύο περίπου εβδομάδες επώασης σταγόνες 3μl από το διάλυμα του πεπτιδίου τοποθετήθηκαν σε ειδικά χάλκινα πλέγματα καλυμμένα με ένα λεπτό στρώμα άνθρακα για 90s, με αποτέλεσμα τα ινίδια που πιθανόν υπάρχουν στο διάλυμα να αποτεθούν στο πλέγμα. Στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνθηκε με διηθητικό χαρτί και έπειτα ακολούθησε χρώση με σταγόνα 3μl οξικού ουρανυλίου (UA) 2% w/v στο πλέγμα όπου έχει προσροφηθεί το διάλυμα του πεπτιδίου. Μετά από 60s η περίσσεια της χρωστικής απομακρύνεται με διηθητικό χαρτί. Τέλος, τα πλέγματα αφήνονται να στεγνώσουν, τοποθετούνται σε ειδικό κουτί και παρατηρούνται σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης Morgagni™ 268, που λειτουργεί στα 80 kV. Οι φωτογραφίες αποτυπώθηκαν από κατάλληλα προσαρτημένη ψηφιακή CCD κάμερα Morada - 11 Mpixel (Soft Imaging System, Muenster, Germany).

2.4 Χρώση με Congo Red και πολωτική μικροσκοπία

2.4.1 Διαγνωστική χρώση με Congo Red

Η μεθοδολογία της χρώσης με Congo Red είναι μία διαγνωστική τεχνική για την ταυτοποίηση οργανωμένων συσσωματωμάτων, δηλαδή αμυλοειδών ινιδίων, τόσο σε ιστούς όσο και σε διαλύματα αμυλοειδογόνων πρωτεϊνών. Η ευθυγράμμιση των μορίων της χρωστικής στα αμυλοειδή ινίδια εμφανίζει μία χαρακτηριστική και διαγνωστική κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα, κάτω από διασταυρωμένο πολωτή και αναλύτη πολωτικού μικροσκοπίου[130].

2.4.2 Διαδικασία χρώσης με χρωστική Congo Red

Τοποθετούμε σταγόνες 5μl του πεπτιδίου-αναλόγου σε αντικειμενοφόρο πλάκα και αφήνουμε να στεγνώσουν σε συνθήκες δωματίου. Καθώς οι σταγόνες στεγνώνουν δημιουργούν ένα λεπτό υμένιο λόγω της αργής εξάτμισης, πάνω στο οποίο θα αποτεθεί η χρωστική Condo Red (Congo red 10mM) διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7.4 (phosphate-buffered saline. Μόλις δημιουργηθεί το υμένιο, 5μl χρωστικής τοποθετούνται πάνω από κάθε σταγόνα και αφήνονται να στεγνώσουν σε συνθήκες δωματίου μακριά από το φως για περίπου 30-60’. Μετά την παρέλευση 60 λεπτών

περίπου, γίνεται προσεκτική απομάκρυνση της περίσσειας της χρωστικής με διαδοχικές πλύσεις της σταγόνας με διάλυμα αιθανόλης 90%.

2.4.3 Πολωτική μικροσκοπία

Αφού έχει απομακρυνθεί η περίσσεια της χρωστικής, τα δείγματα αφήνονται να στεγνώσουν πριν παρατηρηθούν στο πολωτικό μικροσκόπιο. Η παρατήρηση έγινε σε πολωτικό μικροσκόπιο Leica MZ_{75}, με διασταυρωμένους και μη διασταυρωμένους πολωτή και αναλύτη. Με φωτογραφική μηχανή γίνεται η λήψη φωτογραφιών και στις δύο περιπτώσεις.

2.5 Περίθλαση ακτίνων-Χ

Για την διεξαγωγή της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε μία σταγόνα (~ 10μl) από το διάλυμα του πεπτιδίου (15 mg ml^{-1}). Η σταγόνα του διαλύματος αφέθηκε μεταξύ δύο γυάλινων ράβδων, σταθεροποιημένων σε αντικειμενοφόρο πλάκα και απόλυτα ευθυγραμμισμένων, με την μεταξύ τους απόσταση να είναι περίπου 2mm. Στη συνέχεια η σταγόνα αφέθηκε σε συνθήκες δωματίου (σταθερή θερμοκρασία και υγρασία) για περίπου μισή με μία ώρα, με στόχο τον προσανατολισμό των ινιδίων του προς μελέτη διαλύματος και την τελική δημιουργία κατάλληλης για περίθλαση ακτίνων-Χ ίνας.

Για την παραγωγή δέσμης ακτίνων-Χ χρησιμοποιήθηκε η γεννήτρια SuperNova-Agilent Technologies X-ray, που διαθέτει τον ανιχνευτή 135-mm ATLAS CCD με γωνιομετρική κεφαλή 4-circle kappa. Η γεννήτρια χρησιμοποιήθηκε στα 50 kV, 0.8 mA (CuKα high intensity X-ray micro-focus source, λ = 1.5418 Å). Η απόσταση του δείγματος από τον ανιχνευτή ορίστηκε στα 52 mm και ο χρόνος έκθεσης ήταν 400s. Η περίθλαση ακτίνων-Χ έγινε στο Ινστιτούτο Βιολογίας, στο τμήμα Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

2.6 Φασματοσκοπία υπερερύθρου (ATF-FT IR)

Μία σταγόνα (~5μl) του διαλυτοποιημένου πεπτιδίου, αφέθηκε σε συνθήκες δωματίου να στεγνώσει σε υδρόφοβο υπόστρωμα (SpectRIM, Tienta Sciences, Inc. Indianapolis, USA), με σκοπό να δημιουργηθεί λεπτό φιλμ, κατάλληλο για την συλλογή φασμάτων. Συλλέχθηκαν 10 φάσματα 32 σαρώσεων το καθένα με διακριτικότητα 4cm^{-1} από τα οποία μετρήθηκε ο μέσος όρος με στόχο την βελτίωση του λόγου σήμα/θόρυβος (S/N). Αφού διορθωθεί το βάθος διείσδυσης των φασμάτων συναρτήσει του μήκους κύματος (d_p/λ), τα φάσματα απεικονίζονται με μορφή απορρόφησης.
Τα μέγιστα των ταινιών απορρόφησης υπολογίστηκαν σε συνδυασμό με τα ελάχιστα των δεύτερων παραγώγων των φασμάτων. Οι παράγωγοι υπολογίστηκαν μέσω ρουτίνας του προγράμματος OPUS/OS2 μετά την εξομάλυνση των φασμάτων από τον αλγόριθμο Savitsky-Golay κατά ± 4cm^{-1} (υπερέρυθρο), γύρω από κάθε σημείο. Η εξομάλυνση σε στενότερα εύρη τιμών είχε ως αποτέλεσμα την χειροτέρευση του λόγου S/N και κατά

συνέπεια δεν μπορούσε να αυξηθεί ο αριθμός των ελαχίστων που θα μπορούσαν να προσδιοριστούν με εμπιστοσύνη.
Τα φάσμα τα συλλέχθηκαν με μικροσκόπιο υπερερυθρού (IRScope II της Bruker Optics, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών) με αντικειμενικό φακό (20x) από κρύσταλλο Ge εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR), προσαρτημένο σε φασματοσκόπιο μετασχηματισμού Fourier (Equinox 55 της Bruker Optics).

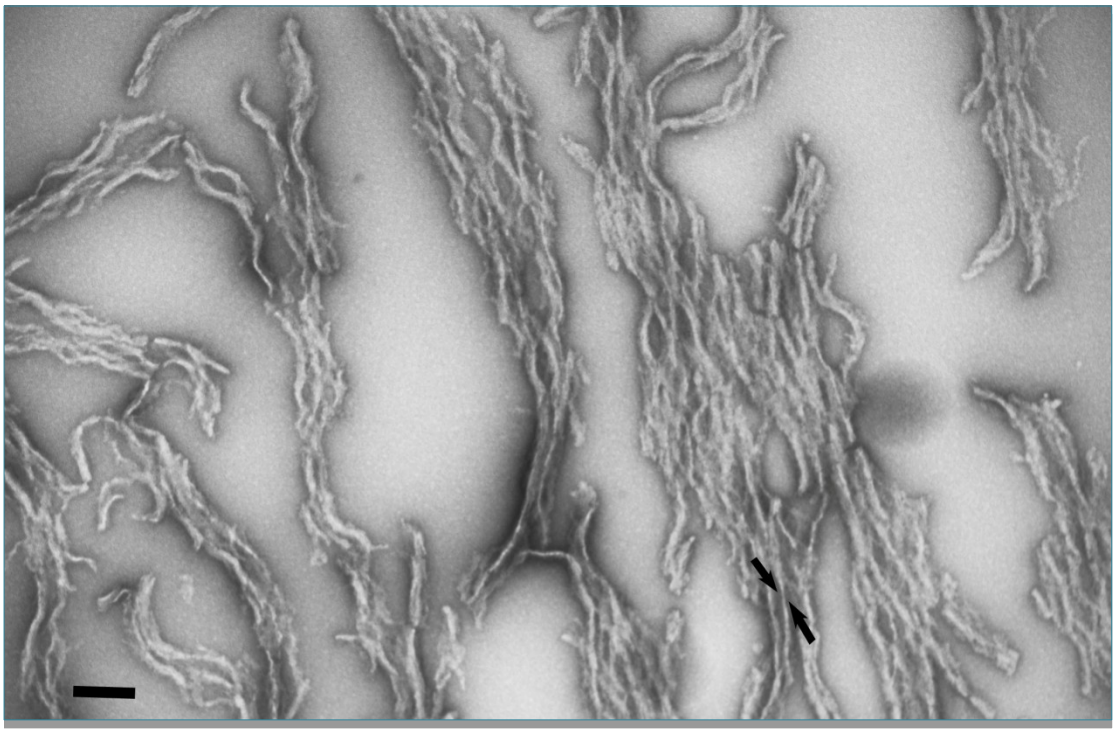
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου Ι, Pmel17, είναι ένα φυσικό προστατευτικό αμυλοειδές. Ωθούμενοι από αυτή της την ιδιότητα και από τα αποτελέσματα που λάβαμε από τους συναινετικούς αλγορίθμους πρόγνωσης AmylPred, μελετήσαμε ένα συγκεκριμένο τμήμα της Pmel17 και πιο συγκεκριμένα του RPT domain (^{405}**VSIVVLSGT**^{413}), ως προς την ικανότητά του να συμμετέχει στην δημιουργία του πυρήνα των αμυλοειδών ινιδίων της πρωτεΐνης. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος, πραγματοποιήθε μελέτη των ινιδίων με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης, με Πολωτική Μικροσκοπία (χρώση Congo red), με Περίθλαση ακτίνων-Χ και με Φασματοσκοπία Υπερερύθρου.

3.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Αρνητική Χρώση)

Μετά από επώαση 2 περίπου εβδομάδων σε υδατικό διάλυμα, το πεπτίδιο ^{405}**VSIVVLSGT**^{413} δημιουργεί gel το οποίο είναι αποτέλεσμα της αυτοσυγκρότησής του και του σχηματισμού ώριμων ινιδίων. Τα ινίδια αυτά φαίνεται να διαθέτουν όμοια δομικά χαρακτηριστικά με αυτά των αμυλοειδών ινιδίων.

Μετά την παρατήρηση στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης τα ινίδια του πεπτιδίου ^{405}**VSIVVLSGT**^{413} φαίνοται αδιακλάδιστα με διάμετρο 100-150 Å. Τα ινίδια αυτά εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά των αμυλοειδών ινιδίων. Συχνά παρατηρείται να αλληλεπιδρούν πλευρικά σχηματίζοντας κορδελές διαφόρων διαμέτρων και οδηγώντας στο σχηματισμό πηκτωμάτων (Εικόνα 40).

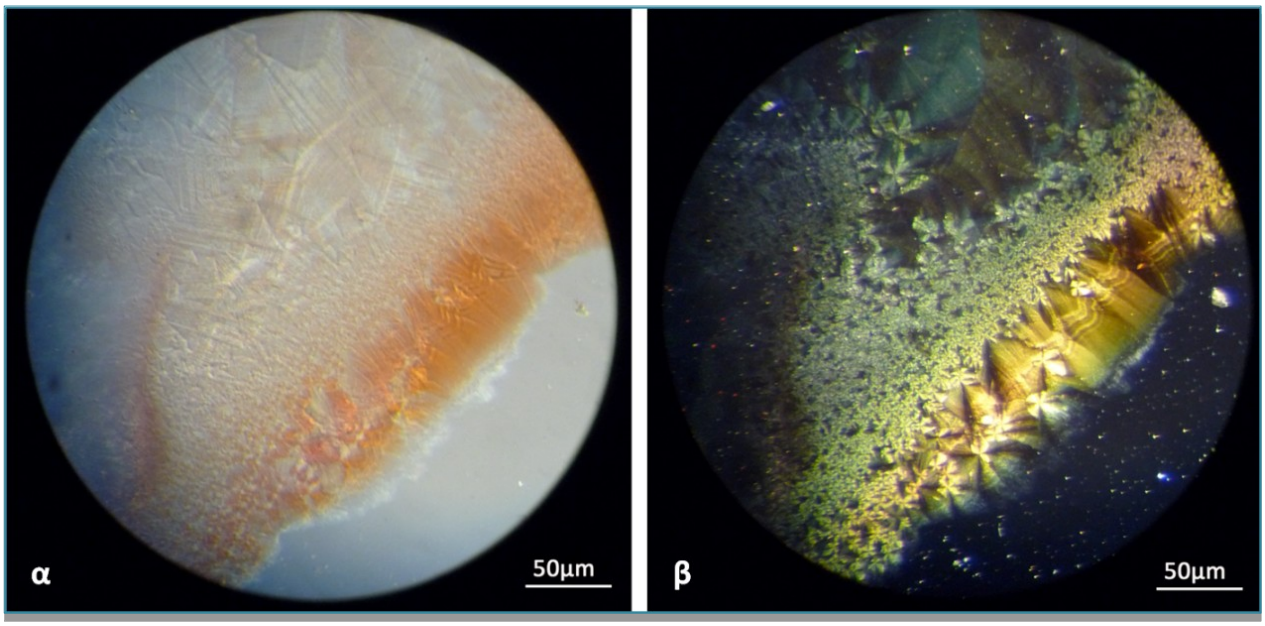


***Εικόνα 40**: Ινίδια που προκύπτουν από αυτοσυγκρότηση του πεπτιδίου-αναλόγου ^{405}VSIVVLSGT^{413} . παρατηρούνται σε ΗΜΔ ως αδιακλάδιστα με διάμετρο περίπου 100-150 Å (βέλη). Εμφανίζουν χαρακτηριστικά των αμυλοειδών ινιδίων. Bar: 200nm*

3.2 Χρώση με Congo Red και πολωτική μικροσκοπία

Χαρακτηριστική ιδιότητα των αμυλοειδών ινιδίων είναι η δέσμευση της χρωστικής Congo Red. Λόγω της ευθυγράμμισης των μορίων της χρωστικής στα ινίδια, εμφανίζεται κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα κάτω από διασταυρωμένους πολωτή και αναλύτη κατά την παρατήρηση σε πολωτικό μικροσκόπιο. Συνεπώς, για την ταυτοποίηση της ύπαρξης αμυλοειδών ινιδίων στο διάλυμα έγινε χρώση μίας σταγόνας και παρατήρηση αυτής σε πολωτικό μικροσκόπιο.

Στην Εικόνα 41α παρατηρούμε, με μη διασταυρωμένους πολωτή και αναλύτη, την δέσμευση της χρωστικής από το υμένιο που δημιούργησαν τα αμυλοειδή ινίδια του πεπτιδίου ^{405}**VSIVVLSGT**^{413} (κόκκινη περιοχή). Στην Εικόνα 41β, ο πολωτής και ο αναλύτης του πολωτικού μικροσκοπίου είναι διασταυρωμένοι και παρατηρούμε την χαρακτηριστική για ινίδια αυτά κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα, διαγνωστική της ύπαρξης των αμυλοειδών ινιδίων (Εικόνα 41).

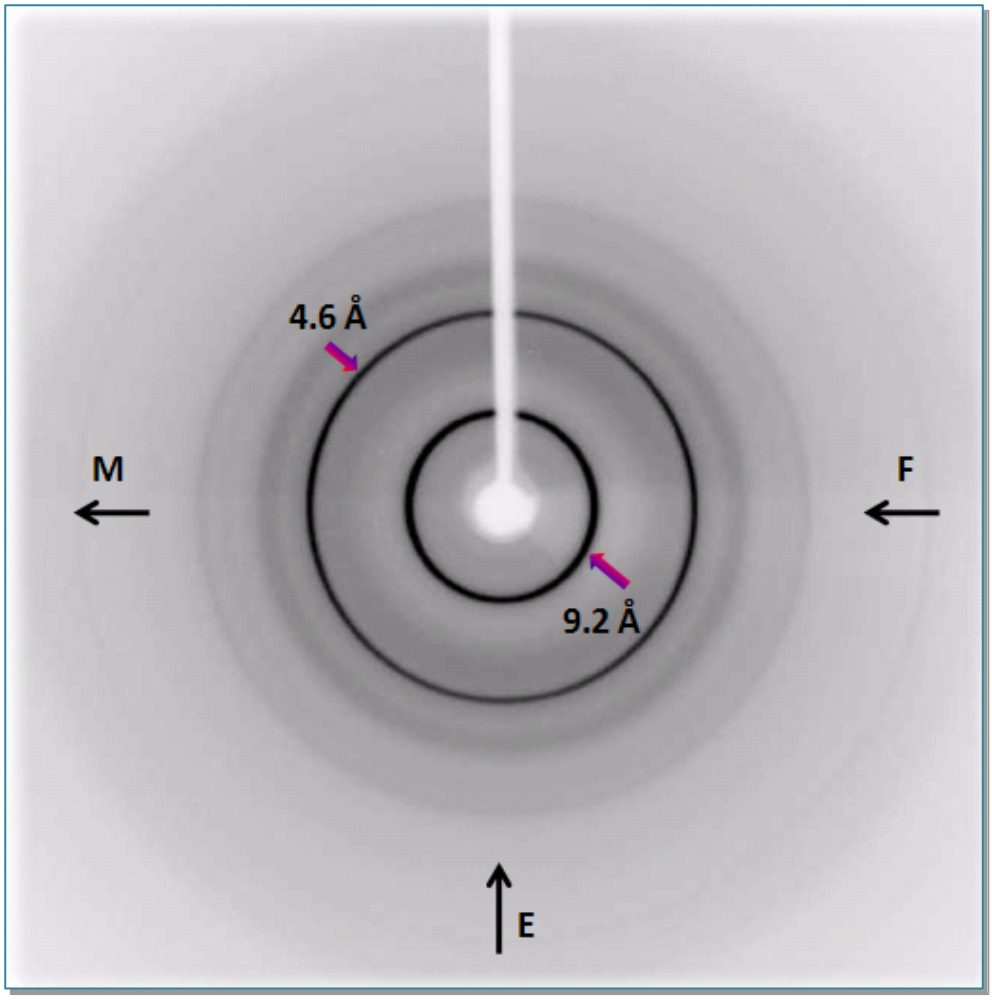


Εικόνα 41: *Δέσμευση της χρωστικής Congo Red από τα ινίδια του πεπτιδίου. Απεικονίζεται και στις δύο εικόνες συγκεκριμένο σημείο της σταγόνας. α) Μη διασταυρωμένος πολωτής και αναλύτης β) Διασταυρωμένος πολωτής και αναλύτης. Εμφάνιση, χαρακτηριστικής για τα αμυλοειδή ινίδια, κιτρινοπράσινης διπλοθλαστικότητας έπειτα από τη δέσμευση της χρωστικής. Bar 50μm*

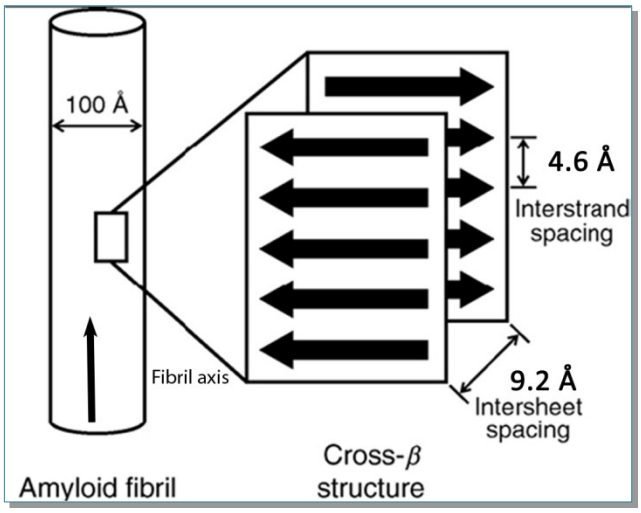
3.3 Περίθλαση ακτίνων-Χ

Ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία του διαλύματος δημιουργείται ίνα προσανατολισμένων ινιδίων, με τον άξονά τους να είναι παράλληλος ως προς τον άξονα της ίνας.

Το περιθλασίγραμμα που προέκυψε από το πεπτίδιο-ανάλογο, εμφανίζει τις χαρακτηριστικές «cross-β» ανακλάσεις στα 4.6Å και 9.2Å. Η **μεσημβρινή ανάκλαση** στα 4.6 Å, υποδεικνύει την απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-κλώνων οι οποίοι διευθετούνται κάθετα στον επιμήκη άξονα της ίνας, ενώ η **ισημερινή ανάκλαση** στα 9.2Å υποδεικνύει την απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-πτυχωτών επιφανειών που διευθετούνται παράλληλα στον επιμήκη άξονα της ίνας (Εικόνες 42 και 43).



Εικόνα 42: *Περιθλασίγραμμα από προσανατολισμένη ίνα του πεπτιδίου, με χαρακτηριστικές «cross-β» ανακλάσεις. Η μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.6 Å υποδεικνύει την απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-κλώνων, ενώ η ισημερινή ανάκλαση στα 9.2Å υποδεικνύει την απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-πτυχωτών επιφανειών. Λόγω έλλειψης καλού προσανατολισμού οι ανακλάσεις εμφανίζονται*



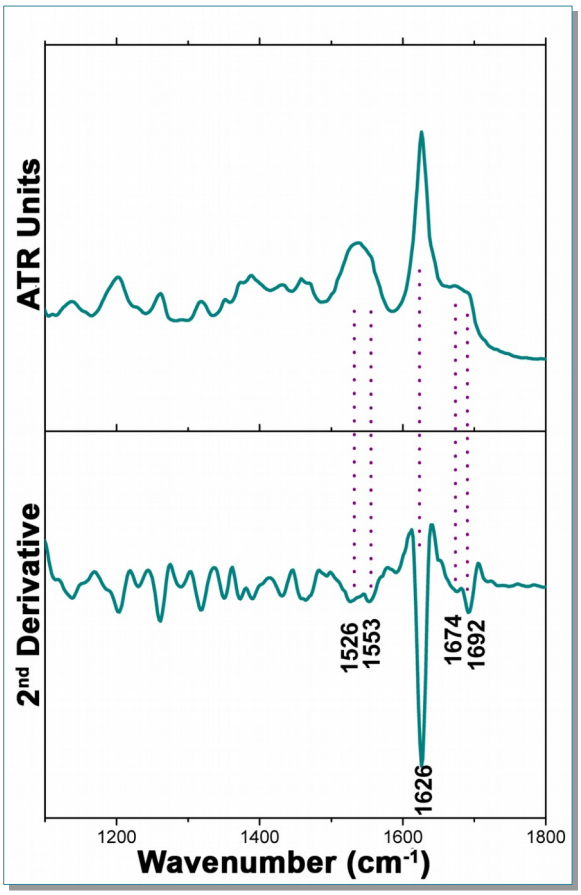
Εικόνα 43*: Η μεσημβρινή ανάκλαση στα 4.6 Å υποδεικνύει την απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-κλώνων, ενώ η ισημερινή ανάκλαση στα 9.2Å υποδεικνύει την απόσταση μεταξύ διαδοχικών β-πτυχωτών επιφανειών.*

3.4 Φασματοσκοπία υπερερύθρου (ATF-FT IR)

Βασική αρχή της φασματοσκοπίας υπερερύθρου είναι η αλληλεπίδραση της ύλης με την υπέρυθρη ακτινοβολία, η οποία προκαλεί αλλαγές στην διπολική ροπή του μορίου που μελετάται, δημιουργώντας δονήσεις. Μέσα από αυτές τις δονήσεις μπορούν να ταυτοποιηθούν χημικά μόρια που υπάρχουν στο δείγμα. Στην παρούσα εργασία η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της στερεοδιάταξης (δευτεροταγή δομή) του προς μελέτη συντιθέμενου πεπτιδίου.

Στο φάσμα διακρίνονται τρεις ταινίες σε διαφορετικές περιοχές οι οποίες υποδηλώνουν την ύπαρξη β-πτυχωτών επιφανειών. Οι ταινίες αυτές είναι οι εξής: **1526 cm^{-1}(Αμιδική II), 1553 cm^{-1} (Αμιδική II), , 1626 cm^{-1} (Αμιδική I).** Λίγο ψηλότερα και πιο συγκεκριμένα στα **1692 cm^{-1}** υπάρχει μία ταινία, η οποία υποδηλώνει την ύπαρξη αντιπαράλληλων β-πτυχωτών επιφανειών (Εικόνα 44).

Συμπερασματικά, όλα τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το πεπτίδιο ^{405}**VSIVVLSGT**^{413} δημιουργεί ινίδια, τα οποία υιοθετούν μία «cross-β» δομή στο χώρο. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τα προηγούμενα αποτελέσματα μας επιτρέπει να υποθέσουμε, πως τα ινίδια που δημιουργούνται από το πεπτίδιο- ανάλογο που μελετήθηκε στο εργαστήριό μας, παραπέμπουν σε αμυλοειδή ινίδια.



Κυματάριθμος	Απόδοση
1526 cm^{-1}	β-πτυχωτές επιφάνειες (αμιδική ΙΙ)
1553 cm^{-1}	β-πτυχωτές επιφάνειες (αμιδική ΙΙ)
1626 cm^{-1}	β-πτυχωτές επιφάνειες (αμιδική Ι)
1674 cm^{-1}	TFA
1692 cm^{-1}	Αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες

Εικόνα 44: *Φάσμα ATR-FT IR του πεπτιδίου. Περιλαμβάνεται και το φάσμα της 2ης παραγώγου. Στο φάσμα διακρίνονται τρεις ταινίες σε διαφορετικές περιοχές οι οποίες υποδηλώνουν την ύπαρξη β-πτυχωτών επιφανειών. Οι ταινίες αυτές είναι οι εξής:* ***1526 cm^{-1}(Αμιδική ΙΙ), 1553 cm^{-1} (Αμιδική ΙΙ), , 1626 cm^{-1} (Αμιδική Ι).*** *Λίγο ψηλότερα και πιο συγκεκριμένα στα* ***1692 cm^{-1}*** *υπάρχει μία ταινία, η οποία υποδηλώνει την ύπαρξη αντιπαράλληλων β-πτυχωτών επιφανειών.*

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Συζήτηση

Έχει προταθεί πως τμήματα της αμινοξικής ακολουθίας μίας πρωτεΐνης, είναι ικανά να οδηγήσουν στο σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων [131, 132]. Τα τμήματα αυτά της πρωτεΐνης χαρακτηρίζονται ως ***αμυλοειδογενείς καθοριστές*** (amyloidogenic determinants – aggregation prone segments) και προσδιορίζονται με κατάλληλες υπολογιστικές μεθόδους. Με βάση τα παραπάνω, δεν είναι απίθανο το πεπτίδιο-ανάλογο που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, να αποτελεί ***αμυλοειδογόνο καθοριστή*** και να καθοδηγεί το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων της Pmel17. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι το ^{405} **VSIVVLSGT** ^{413}, το οποίο προβλέφθηκε ως πιθανός ***αμυλοειδογόνος καθοριστής*** από ειδικά εργαλεία (Κεφ. 2.1.), σχηματίζει *in vitro* ινίδια που φέρουν αμυλοειδογενή χαρακτηριστικά.

Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν ασχοληθεί με την Pmel17 και πιο συγκεκριμένα με τα ινίδια που αυτή σχηματίζει ,[112, 114, 121, 124, 133, 134]. Οι περισσότερες ερευνητικές απ' αυτές υποστηρίζουν πως για το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων υπεύθυνο είναι το RPTdomain. Άλλες υποστηρίζουν πως υπεύθυνο είναι το PKD domain και το RPT domain είναι εκείνο που οργανώνει το συσσωμάτωμα [127], ενώ κάποιες άλλες υποστηρίζουν πως το RPT domain σχηματίζει τα αμυλοειδή ινίδια, με την προϋπόθεση ότι τα PKD domain και NTR domain έχουν δημιουργήσει τον πυρήνα των αμυλοειδών ινίδιων [112].

Με γνώμονα τις μελέτες που υποδεικνύουν ότι το RPT domain είναι εκείνο που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων της Pmel17 και δεδομένου ότι διαθέτει επαναλήψεις, αποφασίσαμε να το μελετήσουμε ως προς την ικανότητά του να δημιουργεί αμυλοειδή ινίδια *in vitro*. Ένα γεγονός που ενίσχυσε περαιτέρω την επιλογή του ^{405} **VSIVVLSGT** ^{413}, για την μελέτη του ως πιθανό αμυλοειδογόνο καθοριστή, ήταν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR), των Hu, et al. (Κεφ. 1.6.4), σε συνδυασμό με την πρόβλεψή του από τα εργαλεία AMYLPRED και AmylPred 2 [111] (Παράρτημα I,II).

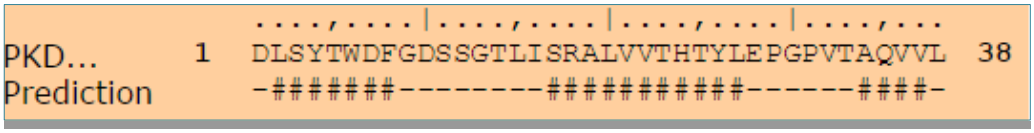
Η επιλογή του πεπτιδίου ^{405} **VSIVVLSGT** ^{413} , φάνηκε ελπιδοφόρα, αφού τα πειραματικά μας αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το πεπτίδιο- ανάλογο αυτό, είναι ικανό να δημιουργήσει ινίδια *in vitro*, που φέρουν αμυλοειδογενή χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα, τα ινίδια που δημιουργεί φαίνονται αδιακλάδιστα με διάμετρο 100-150 Å, σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Εικόνα 40). Επιπρόσθετα, κάτω από διασταυρωμένους πολωτή και αναλύτη έπειτα από χρώση με Congo Red, τα αμυλοειδή ινίδια που σχηματίζει το ^{405} **VSIVVLSGT** ^{413}, εμφανίζουν κιτρινοπράσινη διπλοθλαστικότητα (Εικόνα 41), γεγονός που χαρακτηρίζει τα αμυλοειδή ινίδια. Το περιθλασίγραμμα που προέκυψε από προσανατολισμένη ίνα του πεπτιδίου-αναλόγου, εμφανίζει τις χαρακτηριστικές «cross-β» ανακλάσεις στα 4.6Å και 9.2Å (Εικόνα 42). Τέλος, το φάσμα που προκύπτει από Φασματοσκοπία Υπερερύθρου (ATF-FT IR),

υποδηλώνει την ύπαρξη β δομής. Κατά συνέπεια, μπορούμε να δηλώσουμε ότι το πεπτίδιο που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, είναι ικανό να δημιουργήσει αμυλοειδή ινίδια *in vitro.* Ωστόσο, δεν μπορούμε να γενικεύσουμε περαιτέρω και να υποστηρίξουμε ότι το πεπτίδιο αυτό είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων *in vivo*. Συνεπώς, ένας μελλοντικός στόχος θα ήταν να μελετηθούν υπολογιστικά όλα τα domains της Pmel17 και να βρεθούν πιθανοί αμυλοειδογόνοι καθοριστές, οι οποίοι στη συνέχεια θα μελετηθούν με βιοφυσικές μεθόδους. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να προσθέσω πως η αλληλουχία του PKD domain μελετήθηκε με τα AMYLPRED και AmylPred 2. Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν δεν μπορούμε να τα προσπεράσουμε και για το λόγο αυτό ένας μελλοντικός στόχος είναι η βιοφυσική ανάλυση των τμημάτων που προβλέπονται για το PKD domain ως πιθανοί αμυλοειδογόνοι καθοριστές (Εικόνες 45, 46). Έπειτα θα μπορούμε να συνδυάσουμε τα αποτελέσματα των δύο εργασιών και να καταλήξουμε σε ένα συνδυαστικό συμπέρασμα που πιθανόν θα ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα.

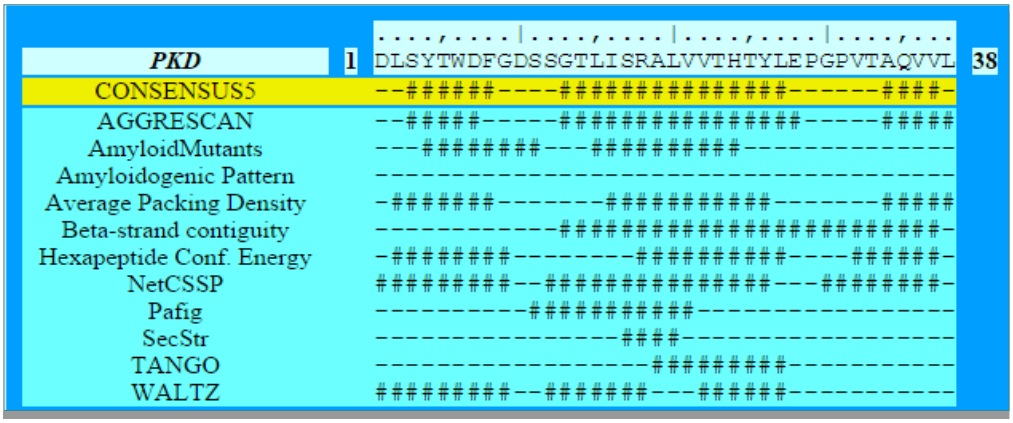
Οι επαναλήψεις του RPT domain διαθέτουν συντηρημένα κατάλοιπα γλουταμικού οξέος (Εικόνα 29) τα οποία φαίνεται να είναι αρκετά σημαντικά για το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων της Pmel17, αφού σε συνθήκες όπου το pH είναι πάνω από 5, δεν μπορούν να σχηματιστούν αμυλοειδή ινίδια [84]. Σε όξινες συνθήκες (pH<5), τα κατάλοιπα γλουταμικού οξέος χάνουν το φορτίο τους και κατά συνέπεια οι απωστικές δυνάμεις παύουν να υπάρχουν. Έτσι, η πρωτεΐνη μπορεί να συγκροτηθεί και να σχηματίσει αμυλοειδή ινίδια. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με την παρουσία πολικών καταλοίπων θρεονίνης, που μπορούν να σχηματίσουν γέφυρες δεσμών υδρογόνου, και με την παρουσία συντηρημένων καταλοίπων γλυκίνης, υποδεικνύουν ότι το συγκεκριμένο τμήμα της πρωτεΐνης Pmel17 μπορεί να σχηματίσει ένα β-σωληνοειδές. Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο η Pmel7 πολυμερίζεται δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως. Στα παραπάνω δεδομένα στηρίχθηκε το εργαστήριό μας και κατασκεύασε ένα πιθανό μοντέλο του RPT domain της Pmel17, και χρησιμοποιώντας σαν πρότυπη δομή τη λυμένη κρυσταλλογραφικά δομή της YadA (PDB ID: 1P9H) [135]. Με βάση το μοντέλο αυτό, τα κατάλοιπα θρεονίνης (T), συμμετέχουν στο σχηματισμό 3 γεφυρών δεσμών υδρογόνου, σταθεροποιώντας τη δομή του. Στη διαδικασία αυτή βοηθούν και τα κατάλοιπα προλίνης (P), τα οποία στοιβάζονται στην μία πλευρά του β-σωληνοειδούς και ίσως να συμμετέχουν και στις πλευρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονομερών. Όπως προαναφέρθηκε, πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα συντηρημένα κατάλοιπα γλουταμικού οξέος (E), τα οποία σύμφωνα με το μοντέλο στοιβάζονται στην ίδια πλευρά εξωτερικά του β- σωληνοειδούς και σε όξινο pH επιτρέπουν τον πολυμερισμό της Pmel17. Σύμφωνα με το μοντέλο, το πεπτίδιο που εμείς μελετήσαμε εντοπίζεται στην εξωτερική πλευρά, γεγονός που μας επιτρέπει να υποστηρίξουμε την αμυλοειδογονικότητά του, αφού θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με άλλα μονομερή και να οδηγήσει την πρωτεΐνη σε πολυμερισμό, δεδομένου ότι μπορεί in vitro να



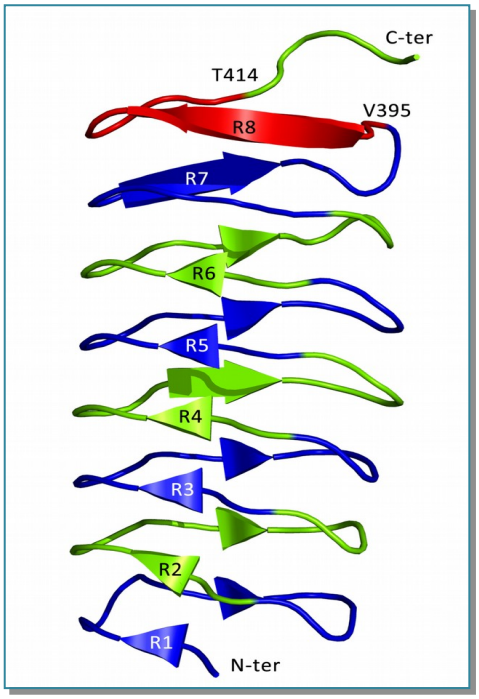
σχηματίσει αμυλοειδή ινίδια (Εικόνα 47). Με άλλα λόγια, το πεπτίδιο [405] **VSIVVLSGT** [413], βρίσκεται στο καρβοξυτελικό τμήμα του σωληνοειδούς και λόγω της αμυλοειδογονικότητάς του μπορεί να προωθήσει την αυτοσυγκρότηση του RPT domain και κατ' επέκταση το σχηματισμό των αμυλοειδών ινιδίων.



Εικόνα 45: *Πρόγνωση τμημάτων της ακολουθίας του PKD domain της Pmel17 ως πιθανών αμυλοειδογόνων καθοριστών από τον συναινετικό αλγόριθμο πρόγνωσης AMYLPRED. Σχεδόν ολόκληρο το domain προβλέπεται ως πιθανός αμυλοειδογόνος καθοριστής.*



Εικόνα 46: *Πρόγνωση τμημάτων της ακολουθίας του PKD domain της Pmel17 ως πιθανών αμυλοειδογόνων καθοριστών από τον συναινετικό αλγόριθμο πρόγνωσης AmylPred. Παρόμοια με τα αποτελέσματα του AMYLPRED.*



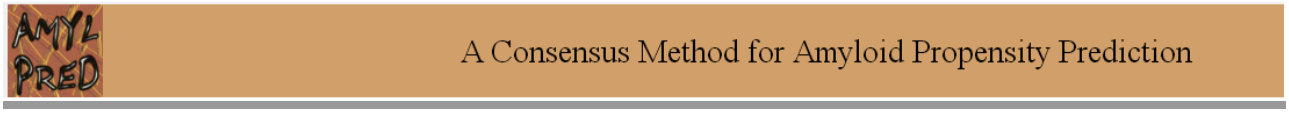
***Εικόνα 47**: Πιθανό μοντέλο δομής του RPT domain της Pmel17. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνεται το πεπτίδιο-ανάλογο που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία. Παρατηρούμε πως βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο του σωληνοειδους, οπότε μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλα μονομερή και να οδηγήσει την πρωτεΐνη σε πολυμερισμό, δεδομένου ότι μπορεί in vitro να σχηματίσει αμυλοειδή ινίδια.*

Συμπερασματικά, η Pmel17 έχει την ικανότητα να σχηματίζει αμυλοειδή ινίδια μόνο σε όξινες συνθήκες, οι οποίες εντοπίζονται στα μελανοσώματα. Έτσι, το κύτταρο προστατεύει τον οργανισμό από την τοξικότητα των αμυλοειδών, που μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις. Το τμήμα της πρωτεΐνης που συμμετέχει στον πολυμερισμό, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο γίνεται ο πολυμερισμός είναι μέχρι σήμερα άγνωστα. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία καταφέραμε να υποδείξουμε ένα τμήμα του RPT domain, το οποίο φαίνεται να διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο σ' αυτή τη διαδικασία.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

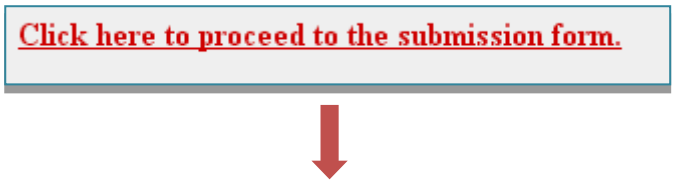
I. AMYLPRED

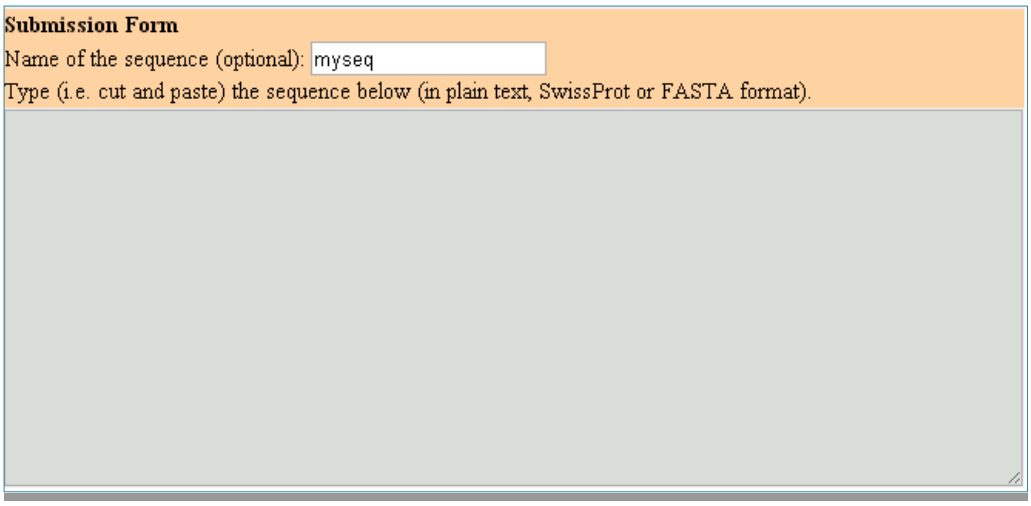
http://aias.biol.uoa.gr/AMYLPRED/



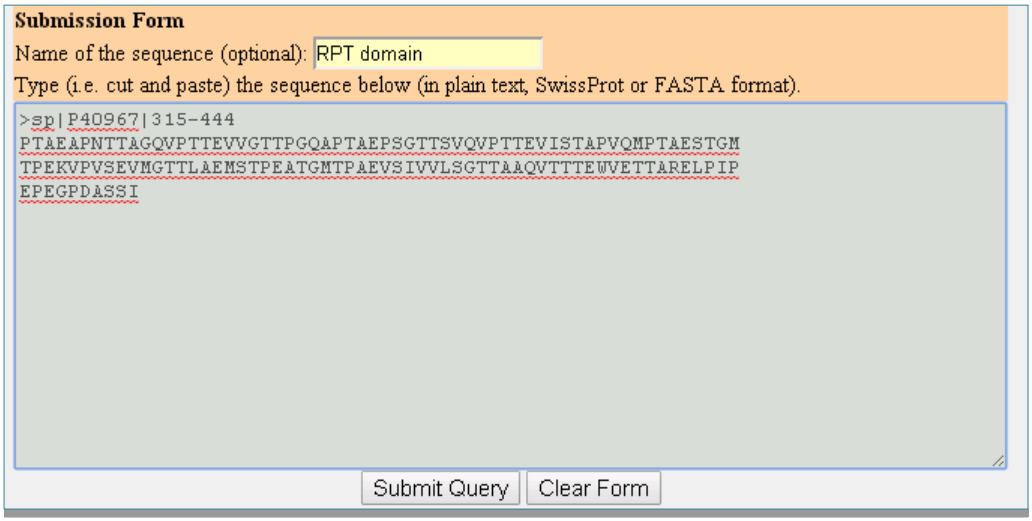
Το εργαλείο AmylPred είναι ένας συναινετικός αλγόριθμος πρόγνωσης πρωτεϊνικών περιοχών επιρρεπών προς συσσωμάτωση που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας το 2009. Συνδυάζει πέντε μεθόδους πρόγνωσης και δίνει αποτέλεσμα μόνο όταν συμφωνούν τουλάχιστον δύο από αυτούς. Οι αλγόριθμοι που συνδυάζει είναι οι εξής:

1. Average Packing Density
2. Possible Conformational Switches
3. Amyloidogenic Pattern
4. TANGO
5. Hexapeptide Conformational Energy\





Όσον αφορά τη φόρμα υποβολής του AmylPred, περιλαμβάνει ένα πεδίο εισαγωγής της ακολουθίας. Η ακολουθία μπορεί να εισαχθεί ή σαν απλό αρχείο, ή σαν SwissProt format, ή σαν FASTA format.



Αφού γίνει εισαγωγή της ακολουθίας στο κατάλληλο πεδίο, η ακολουθία θα επεξεργαστεί και από τους πέντε αλγορίθμους και θα δοθεί αποτέλεσμα από τον συναινετικό αλγόριθμο μόνο αν συμφωνούν τουλάχιστον δύο από τους αλγορίθμους.

- Average Packing Density Profile ... *calculated.*
- % B-Aggregation Profile ... *calculated.*
- Hexapeptide Energy Profile ... *calculated.*
- Pattern Scan ... *performed.*
- Secondary Structure Results ... *received.*

Στο συγκεκριμένο παράδειγμα τα αποτελέσματα που δίνονται από το AmylPred είναι τα εξής:

```
_CONSENSUS PREDICTION_:
70 - 73
91 - 97
```



CONSENSUS RESULTS

...based on at least 2 out of 5 successful methods. The '#' symbol marks the hits:

```
                  ....,....|....,....|....,....|....,....|....,....|....,....|
RPT domain...   1 PTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTTPGQAPTAEPSGTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGM  60
Prediction        ------------------------------------------------------------

                  ....,....|....,....|....,....|....,....|....,....|....,....|
RPT domain...  61 TPEKVPVSEVMGTTLAEMSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWVETTARELPIP 120
Prediction        ---------####----------------########----------------------

                  ....,....|
RPT domain... 121 EPEGPDASSI                                                 130
Prediction        ----------
```

II. AMYLPRED2

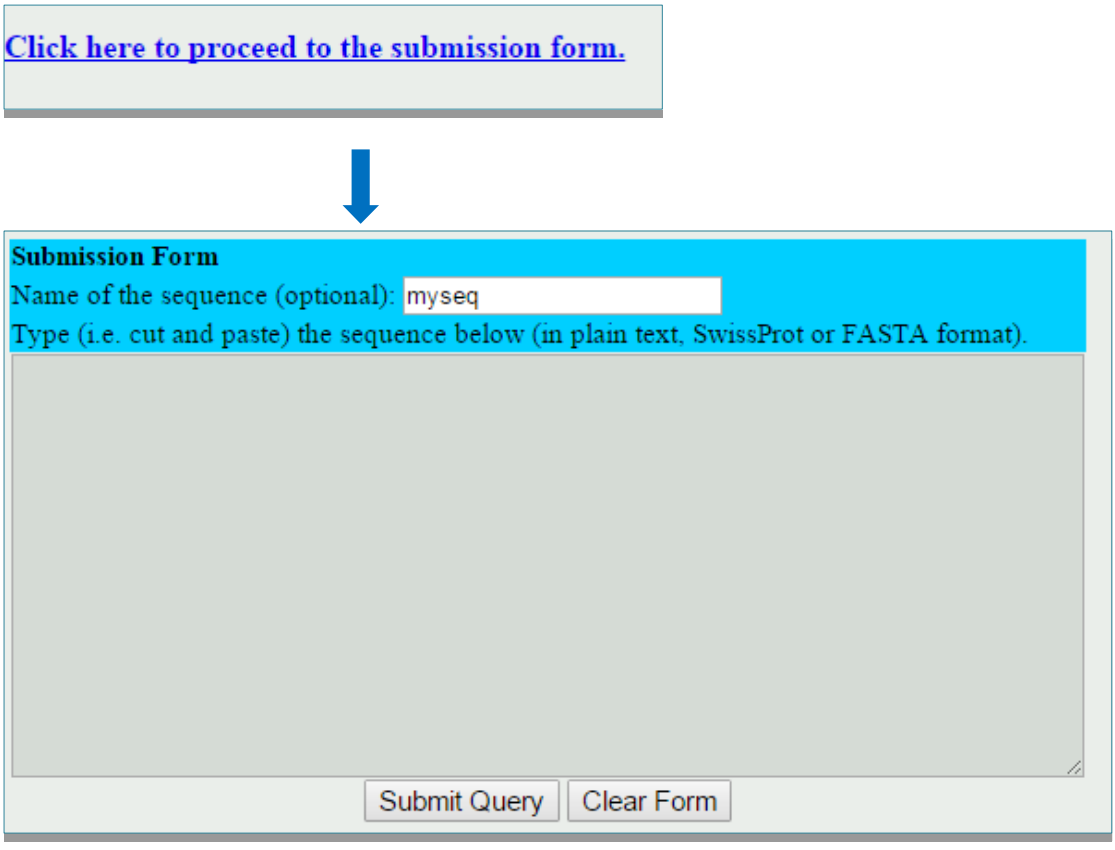
http://aias.biol.uoa.gr/AMYLPRED2/



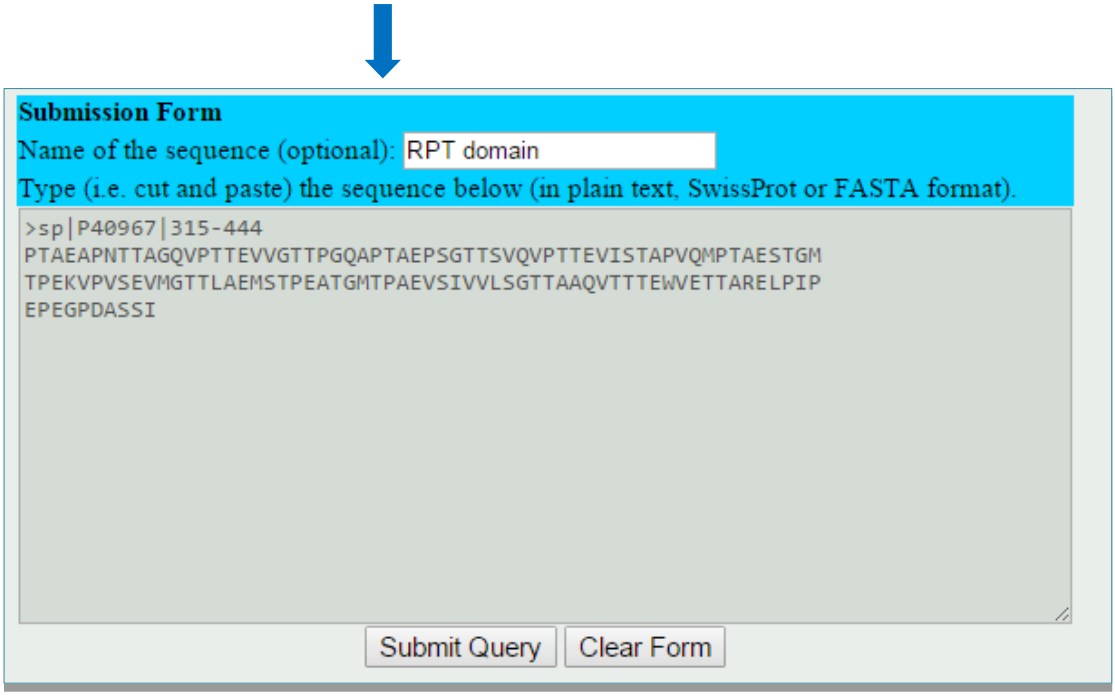
Το εργαλείο AmylPred2 είναι ένας συναινετικός αλγόριθμος πρόγνωσης πρωτεϊνικών περιοχών επιρρεπών προς συσσωμάτωση που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας το 2013. Συνδυάζει έντεκα μεθόδους πρόγνωσης και δίνει αποτέλεσμα μόνο όταν συμφωνούν τουλάχιστον πέντε από αυτούς. Οι αλγόριθμοι που συνδυάζει είναι οι εξής:

1. AGGRESCAN

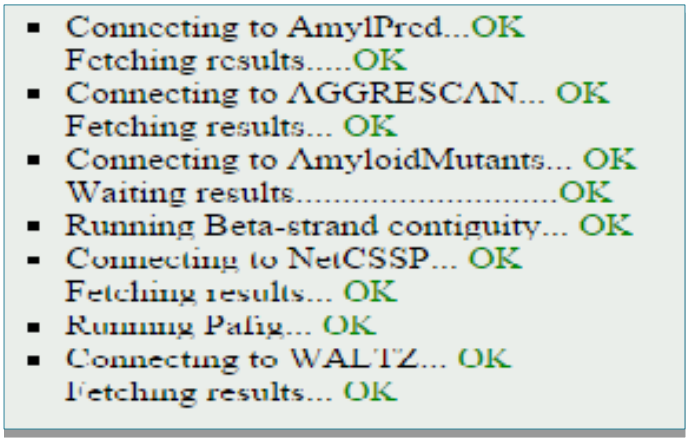
2. AmyloidMutants
3. Amyloidogenic Pattern
4. Average Packing Density
5. Beta-strand contiguity
6. Hexapeptide Conformational Energy
7. NetCSSP
8. Pafig
9. SecStr (Possible Conformational Switches)
10. TANGO
11. Waltz



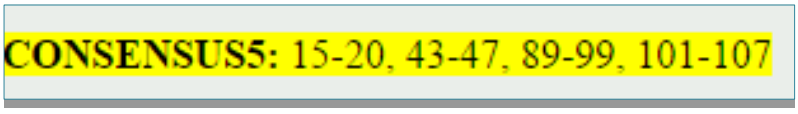
Όσον αφορά τη φόρμα υποβολής του AmylPred2, περιλαμβάνει ένα πεδίο εισαγωγής της ακολουθίας. Η ακολουθία μπορεί να εισαχθεί ή σαν απλό αρχείο, ή σαν SwissProt format, ή σαν FASTA format.

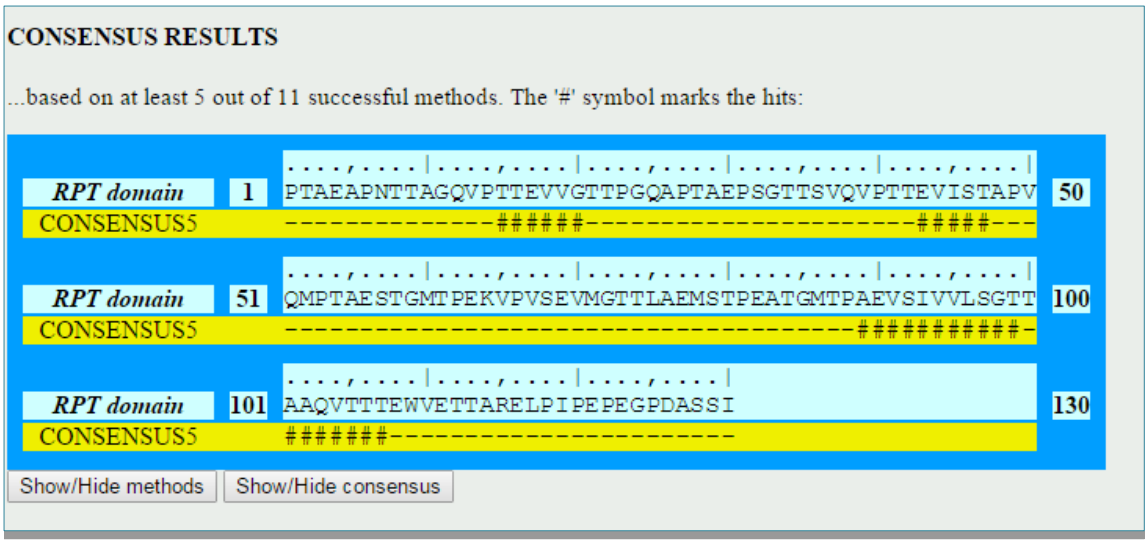


Αφού γίνει εισαγωγή της ακολουθίας στο κατάλληλο πεδίο, η ακολουθία θα επεξεργαστεί και από τους έντεκα αλγορίθμους και θα δοθεί αποτέλεσμα από τον συναινετικό αλγόριθμο μόνο αν συμφωνούν τουλάχιστον πέντε από τους αλγορίθμους.



Στο συγκεκριμένο παράδειγμα τα αποτελέσματα που δίνονται από το AmylPred2 είναι τα εξής:





III. Συμμετοχή σε συνέδριο

37^{Ο} ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ, ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΒΟΛΟΣ, 21-23 ΜΑΙΟΥ 2015

Δομικές μελέτες ενός πεπτιδίου-αναλόγου του επαναλαμβανόμενου τμήματος της πρωτεΐνης Pmel17 με αμυλοειδογόνες ιδιότητες

Αποστολάκου, Ι.Ε., Λούρος, Ν.Ν., Οικονομίδου, Β.Α. και Χαμόδρακας, Σ.Ι.

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 157 01

Η Pmel17 είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου Ι, η οποία αποτελείται από 668 αμινοξικά κατάλοιπα. Παράγεται από

εξειδικευμένα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του δέρματος, τα μελανοκύτταρα , που παράγουν την χρωστική μελανίνη. Συγκεκριμένα, η Pmel17 εντοπίζεται σε ειδικά οργανίδια των μελανοκυττάρων που ονομάζονται μελανοσώματα και σχηματίζει το απαραίτητο υπόστρωμα που συμμετέχει στη βιοσύνθεση της μελανίνης. Η Pmel17 διαθέτει μία δομικά αυτοτελή περιοχή που περιέχει 10 επαναλήψεις μεγέθους 13 αμινοξικών καταλοίπων (RPT domain). Δομικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η περιοχή αυτή συμμετέχει στην δημιουργία του απαραίτητου υποστρώματος για την βιοσύνθεση της μελανίνης μέσω του σχηματισμού ινιδίων, που εμφανίζουν αμυλοειδογόνες ιδιότητες. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν για το RPT domain από το εργαλείο AMYLPRED, ενός συναινετικού αλγορίθμου πρόγνωσης πρωτεϊνικών περιοχών επιρρεπών προς συσσωμάτωση που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας, συντέθηκε χημικά ένα πεπτίδιο-ανάλογο του RPT domain. Το πεπτίδιο αυτό μελετήθηκε πειραματικά με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (αρνητική χρώση), περίθλαση ακτίνων Χ, φασματοσκοπία υπερερύθρου και πολωτική μικροσκοπία. Τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τις παραπάνω βιοφυσικές μεθόδους, υποδεικνύουν ότι το πεπτίδιο αυτό αυτοσυγκροτείται σχηματίζοντας ινίδια που πληρούν τα βασικά κριτήρια των αμυλοειδών ινιδίων.

Structural studies of a peptide-analogue located in RPT domain of protein Pmel17 with amyloidogenic properties

Apostolakou, I.E., Louros, N.N., Iconomidou, V.A. and Hamodrakas, S.J.
Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, University of Athens, Athens 157 01

Pmel17 is a 668-amino acid type I transmembrane glycoprotein. It is mainly produced by specific pigment cells located in the basal layer of the skin called melanocytes. Pmel17 forms a substrate involved in the biosynthesis of melanin in specific organelles of melanocytes, called melanosomes. The luminal part of Pmel17 includes a domain (RPT domain) containing 10 tandem repeats (each repeat consists of 13 residues). Structural studies indicate that this region forms the substrate



of Pmel17 by forming amyloid fibrils. In this work, we applied AMYLPRED, our consensus aggregation propensity prediction algorithm, on the RPT domain sequence. As a result, we have identified a segment of the RPT domain presenting strong aggregation propensity. Consequently, a peptide-analogue corresponding to this segment was synthesized and studied experimentally. Experimental results from Transmission Electron Microscopy (negative staining), X-ray fiber diffraction, ATR FT-IR spectroscopy and polarizing microscopy indicate that this peptide self-assembles into fibrils with amyloidogenic properties.



Βιβλιογραφία

1. Crick, F., *Central dogma of molecular biology.* Nature, 1970. **227**(5258): p. 561-563.
2. Frank, J., et al., *A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the E. coli ribosome.* Nature, 1995. **376**(6539): p. 441-444.
3. Lebrilla, C.B. and L.K. Mahal, *Post translation modifications.* Current opinion in chemical biology, 2009. **13**(4): p. 373.
4. Muelhaupt, R., *Hermann Staudinger and the origin of macromolecular chemistry.* Angewandte Chemie International Edition, 2004. **43**(9): p. 1054-1063.
5. Μαργαρίτης, Λ., et al., *Βιολογία Κυττάρου.* Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 2004.
6. Anfinsen, C.B., *Principles that govern the folding of protein chains.* Science, 1973. **181**(4096): p. 223-30.
7. Stefani, M., *Protein folding and misfolding on surfaces.* International journal of molecular sciences, 2008. **9**(12): p. 2515-2542.
8. Alper, T. and W. Cramp, *Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?* Nature, 1967. **214**: p. 764-766.
9. Griffith, J.S., *Self-replication and scrapie.* Nature, 1967. **215**(5105): p. 1043.
10. Prusiner, S.B., *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.* Science, 1982. **216**(4542): p. 136-144.
11. Dobson, C.M., *Protein folding and misfolding.* Nature, 2003. **426**(6968): p. 884-890.
12. Reynaud, E., *Protein misfolding and degenerative diseases.* Nat Educ, 2010. **3**(9): p. 28.
13. Kyle, R. and P. Greipp. *Amyloidosis (AL). Clinical and laboratory features in 229 cases*. in *Mayo Clinic Proceedings*. 1983.
14. Shoji, M., et al., *Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing.* Science, 1992. **258**(5079): p. 126-129.
15. Clark, A., et al., *Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes.* Diabetes research (Edinburgh, Scotland), 1988. **9**(4): p. 151-159.
16. Snow, A., et al., *Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie.* Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1990. **63**(5): p. 601-611.
17. Iconomidou, V.A., G. Vriend, and S.J. Hamodrakas, *Amyloids protect the silkmoth oocyte and embryo.* FEBS Lett, 2000. **479**(3): p. 141-5.
18. Sipe, J.D. and A.S. Cohen, *Review: history of the amyloid fibril.* Journal of structural biology, 2000. **130**(2): p. 88-98.
19. Fowler, D.M., et al., *Functional amyloid–from bacteria to humans.* Trends in biochemical sciences, 2007. **32**(5): p. 217-224.
20. Virchow, R., *Zur cellulose-frage.* Virchows Archiv, 1855. **8**(1): p. 140-144.
21. Friedreich, N. and A. Kekulé, *Zur amyloidfrage.* Virchows Archiv, 1859. **16**(1): p. 50-65.
22. Divry, P. and M. Florkin, *Sur les proprietes optiques de l'amyloide.* CR Soc. Biol, 1927. **97**: p. 1808-1810.
23. Ban, T., et al., *Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence.* Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(19): p. 16462-16465.
24. Cohen, A.S. and E. Calkins, *Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins.* 1959.
25. Astbury, W.T., S. Dickinson, and K. Bailey, *The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins.* Biochemical Journal, 1935. **29**(10): p. 2351.

26. Geddes, A., et al., *"Cross-β" conformation in proteins.* Journal of molecular biology, 1968. **32**(2): p. 343-358.
27. Knauer, M.F., et al., *Intracellular accumulation and resistance to degradation of the Alzheimer amyloid A4/beta protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7437-41.
28. Koscielska-Kasprzak, K. and J. Otlewski, *Amyloid-forming peptides selected proteolytically from phage display library.* Protein science, 2003. **12**(8): p. 1675-1685.
29. Shirahama, T. and A.S. Cohen, *Structure of amyloid fibrils after negative staining and high-resolution electron microscopy.* Nature, 1965. **206**(985): p. 737-8.
30. Thirumalai, D., G. Reddy, and J.E. Straub, *Role of water in protein aggregation and amyloid polymorphism.* Accounts of chemical research, 2011. **45**(1): p. 83-92.
31. Iconomidou, V.A., et al., *The silkmoth eggshell as a natural amyloid shield for the safe development of insect oocyte and embryo: insights from studies of silkmoth chorion protein peptide-analogues of the B family.* Biopolymers, 2011. **96**(6): p. 723-33.
32. Puchtler, H., F. Sweat, and M. Levine, *On the binding of Congo red by amyloid.* Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1962. **10**(3): p. 355-364.
33. Khurana, R., et al., *Is Congo red an amyloid-specific dye?* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(25): p. 22715-22721.
34. Fändrich, M., *On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2007. **64**(16): p. 2066-2078.
35. Makin, O.S., et al., *Molecular basis for amyloid fibril formation and stability.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(2): p. 315-320.
36. Nelson, R. and D. Eisenberg, *Recent atomic models of amyloid fibril structure.* Current opinion in structural biology, 2006. **16**(2): p. 260-265.
37. Fändrich, M., M.A. Fletcher, and C.M. Dobson, *Amyloid fibrils from muscle myoglobin.* Nature, 2001. **410**(6825): p. 165-166.
38. Jiménez, J.L., et al., *The protofilament structure of insulin amyloid fibrils.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(14): p. 9196-9201.
39. Govaerts, C., et al., *Evidence for assembly of prions with left-handed β-helices into trimers.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(22): p. 8342-8347.
40. Elam, J.S., et al., *Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant proteins linked to familial ALS.* Nature Structural & Molecular Biology, 2003. **10**(6): p. 461-467.
41. Ivanova, M.I., et al., *An amyloid-forming segment of β2-microglobulin suggests a molecular model for the fibril.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(29): p. 10584-10589.
42. Abrahamson, M., *Molecular basis for amyloidosis related to hereditary brain hemorrhage.* Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 1996. **56**(sup226): p. 47-56.
43. Sambashivan, S., et al., *Amyloid-like fibrils of ribonuclease A with three-dimensional domain-swapped and native-like structure.* Nature, 2005. **437**(7056): p. 266-269.
44. Levinthal, C., *How to fold graciously.* Mossbauer spectroscopy in biological systems, 1969: p. 22-24.
45. Zwanzig, R., A. Szabo, and B. Bagchi, *Levinthal's paradox.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(1): p. 20-22.
46. Rooman, M., et al., *What is paradoxical about Levinthal paradox?* Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2002. **20**(3): p. 327-329.



47. Tompa, P., *Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap.* Trends in biochemical sciences, 2012. **37**(12): p. 509-516.
48. Tompa, P. and D. Kovacs, *Intrinsically disordered chaperones in plants and animals This paper is one of a selection of papers published in this special issue entitled "Canadian Society of Biochemistry, Molecular & Cellular Biology 52nd Annual Meeting-Protein Folding: Principles and Diseases" and has undergone the Journal's usual peer review process.* Biochemistry and Cell Biology, 2010. **88**(2): p. 167-174.
49. Kajava, A.V., et al., *A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: The parallel superpleated β-structure.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(21): p. 7885-7890.
50. Otzen, D. and P.H. Nielsen, *We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. **65**(6): p. 910-927.
51. Otzen, D.E., *Amyloid Fibrils and Prefibrillar Aggregates: Molecular and Biological Properties*. 2013: John Wiley & Sons.
52. Hamodrakas, S., A. Hoenger, and V. Iconomidou, *Amyloid fibrillogenesis of silkmoth chorion protein peptide-analogues via a liquid-crystalline intermediate phase.* Journal of structural biology, 2004. **145**(3): p. 226-235.
53. Merlini, G., *Systemic amyloidosis: are we moving ahead?* Neth J Med, 2004. **62**(4): p. 104-5.
54. Pepys, M.B., *Amyloidosis.* Annu Rev Med, 2006. **57**: p. 223-41.
55. Uversky, V.N., *Amyloidogenesis of natively unfolded proteins.* Curr Alzheimer Res, 2008. **5**(3): p. 260-87.
56. Lashuel, H.A., et al., *Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils.* J Mol Biol, 2002. **322**(5): p. 1089-102.
57. Gertz, M.A. and R.A. Kyle, *Secondary Systemic Amyloidosis (AA): Response and Survival in 64 Patients*, in *Amyloid and Amyloidosis 1990*. 1991, Springer. p. 817-820.
58. Dember, L.M., et al., *Eprodisate for the treatment of renal disease in AA amyloidosis.* N Engl J Med, 2007. **356**(23): p. 2349-60.
59. Glabe, C.G., *Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease.* Neurobiol Aging, 2006. **27**(4): p. 570-5.
60. Sipe, J.D., et al., *Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis.* Amyloid, 2012. **19**(4): p. 167-70.
61. de Laureto, P.P., et al., *Protein aggregation and amyloid fibril formation by an SH3 domain probed by limited proteolysis.* Journal of molecular biology, 2003. **334**(1): p. 129-141.
62. Larsen, P., et al., *Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms.* Environmental microbiology, 2007. **9**(12): p. 3077-3090.
63. Maury, C.P., *The emerging concept of functional amyloid.* J Intern Med, 2009. **265**(3): p. 329-34.
64. Claessen, D., et al., *A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in Streptomyces coelicolor by forming amyloid-like fibrils.* Genes & development, 2003. **17**(14): p. 1714-1726.
65. Gilbert, S.F., *Developmental biology*. 9th ed. 2010, Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. xxi, 711, 80 p.
66. Keller, R., et al., *Planar induction of convergence and extension of the neural plate by the organizer of Xenopus.* Developmental dynamics, 1992. **193**(3): p. 218-234.
67. Goding, C.R., *Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage.* Genes & Development, 2000. **14**(14): p. 1712-1728.



68. Cramer, S., *The origin of epidermal melanocytes. Implications for the histogenesis of nevi and melanomas.* Archives of pathology & laboratory medicine, 1991. **115**(2): p. 115-119.
69. Wislet-Gendebien, S., et al., *Adult bone marrow: which stem cells for cellular therapy protocols in neurodegenerative disorders?* J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 601560.
70. Colombo, S., et al., *Classical and nonclassical melanocytes in vertebrates.* Melanins and melanosomes. Biosynthesis, biogenesis, physiological and pathological functions, Willey-Blackwell, iWeinheim, 2011.
71. Borovanský, J. and P.A. Riley, *Melanins and melanosomes : biosynthesis, biogenesis, physiological, and pathological functions*. 2011, Weinheim: Wiley-Blackwell. xxii, 407 p.
72. Baker, R.V., et al., *Melanin granules and mitochondria.* Nature, 1960. **187**: p. 392-4.
73. Seiji, M., T.B. Fitzpatrick, and M.S. Birbeck, *The melanosome: a distinctive subcellular particle of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis.* J Invest Dermatol, 1961. **36**: p. 243-52.
74. Seiji, M., et al., *Chemical composition and terminology of specialized organelles (melanosomes and melanin granules) in mammalian melanocytes.* Nature, 1963. **197**: p. 1082-4.
75. Fitzpatrick, T.B., et al., *Terminology of vertebrate melanin-containing cells: 1965.* Science, 1966. **152**(3718): p. 88-9.
76. Toda, K., Y. Hori, and F. TB. *ISOLATION OF INTERMEDIATE VESICLES DURING ONTOGENY OF MELANOSOMES IN EMBRYONIC CHICK RETINAL PIGMENT EPITHELIUM*. in *FEDERATION PROCEEDINGS*. 1968. FEDERATION AMER SOC EXP BIOL 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998.
77. Toda, K. and T. Fitzpatrick, *The origin of melanosomes.* Biology of Normal and Abnormal Melanocytes, 1971. **265**: p. 278.
78. Valencia, J.C. and V.J. Hearing, *The Role of Glycosylation in the Control of Processing and Cellular Transport of the Functional Amyloid PMEL17.* 2012.
79. Wasmeier, C., et al., *Melanosomes at a glance.* J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 24): p. 3995-9.
80. Orlow, S.J., et al., *Subcellular distribution of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1: implications for melanosomal biogenesis.* J Invest Dermatol, 1993. **100**(1): p. 55-64.
81. Zhou, B.K., et al., *Lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1) is the melanocyte vesicular membrane glycoprotein band II.* J Invest Dermatol, 1993. **100**(2): p. 110-4.
82. Diment, S., et al., *Lysosomal hydrolases are present in melanosomes and are elevated in melanizing cells.* J Biol Chem, 1995. **270**(9): p. 4213-5.
83. Orlow, S.J., *Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles.* J Invest Dermatol, 1995. **105**(1): p. 3-7.
84. McGlinchey, R.P., T.L. Yap, and J.C. Lee, *The yin and yang of amyloid: insights from α-synuclein and repeat domain of Pmel17.* Physical Chemistry Chemical Physics, 2011. **13**(45): p. 20066-20075.
85. Chen, K.G., et al., *Influence of melanosome dynamics on melanoma drug sensitivity.* Journal of the National Cancer Institute, 2009.
86. Vale, R.D., *The molecular motor toolbox for intracellular transport.* Cell, 2003. **112**(4): p. 467-80.
87. Marks, M.S. and M.C. Seabra, *The melanosome: membrane dynamics in black and white.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(10): p. 738-48.
88. Boissy, R.E., *Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte.* Experimental dermatology, 2003. **12**(s2): p. 5-12.

89. Riley, P.A., *Melanin.* Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(11): p. 1235-9.
90. Riesz, J., T. Sarna, and P. Meredith, *Radiative relaxation in synthetic pheomelanin.* J Phys Chem B, 2006. **110**(28): p. 13985-90.
91. Thody, A.J., et al., *Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis.* Journal of Investigative Dermatology, 1991. **97**(2): p. 340-344.
92. GRAHAM, D.G., *Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones.* Molecular pharmacology, 1978. **14**(4): p. 633-643.
93. Zhang, Q., et al., *The gene for the muted (mu) mouse, a model for Hermansky-Pudlak syndrome, defines a novel protein which regulates vesicle trafficking.* Hum Mol Genet, 2002. **11**(6): p. 697-706.
94. Lerner, A.B. and T.B. Fitzpatrick, *Biochemistry of melanin formation.* Physiological reviews, 1950. **30**(1): p. 91-126.
95. Prota, G., *Melanins and melanogenesis*. 1992, San Diego: Academic Press. xiii, 290 p.
96. D'Orazio, J., et al., *UV radiation and the skin.* International journal of molecular sciences, 2013. **14**(6): p. 12222-12248.
97. Krogh, A., et al., *Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes.* Journal of molecular biology, 2001. **305**(3): p. 567-580.
98. Alberts, B., et al., *Molecular biology of the cell. 1994, New York and London*. 1994, Garland Publishing, Inc.
99. Cooper, G.M. and R.E. Hausman, *The cell : a molecular approach*. 6th ed. 2013, Sunderland, MA: Sinauer Associates. xxv, 832 p.
100. Russell, P.J. *iGenetics : a Mendelian approach*. 2006; xx. 842 p. ill. (chiefly col.) 29 cm. + 1 CD-ROM (4 3/4 in.)].
101. Kwon, B.S., et al., *A melanocyte-specific gene, Pmel 17, maps near the silver coat color locus on mouse chromosome 10 and is in a syntenic region on human chromosome 12.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(20): p. 9228-9232.
102. Dunn, L.C. and L.W. Thigpen, *The silver mouse a recessive color variation.* Journal of Heredity, 1930. **21**(12): p. 495-498.
103. Theos, A.C., et al., *The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: controversial in name and in function.* Pigment Cell Res, 2005. **18**(5): p. 322-36.
104. Leonhardt, R.M., et al., *Critical residues in the PMEL/Pmel17 N-terminus direct the hierarchical assembly of melanosomal fibrils.* Mol Biol Cell, 2013. **24**(7): p. 964-81.
105. Watt, B., et al., *N-terminal domains elicit formation of functional Pmel17 amyloid fibrils.* J Biol Chem, 2009. **284**(51): p. 35543-55.
106. Bycroft, M., et al., *The structure of a PKD domain from polycystin-1: implications for polycystic kidney disease.* EMBO J, 1999. **18**(2): p. 297-305.
107. McGlinchey, R.P., et al., *The repeat domain of the melanosome fibril protein Pmel17 forms the amyloid core promoting melanin synthesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(33): p. 13731-6.
108. Hoashi, T., et al., *The repeat domain of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 is required for the formation of organellar fibers.* J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 21198-208.
109. McGlinchey, R.P., et al., *Repeat domains of melanosome matrix protein Pmel17 orthologs form amyloid fibrils at the acidic melanosomal pH.* J Biol Chem, 2011. **286**(10): p. 8385-93.
110. McGlinchey, R.P., T.L. Yap, and J.C. Lee, *The yin and yang of amyloid: insights from alpha-synuclein and repeat domain of Pmel17.* Phys Chem Chem Phys, 2011. **13**(45): p. 20066-75.



111. Hu, K.N., et al., *Segmental polymorphism in a functional amyloid.* Biophys J, 2011. **101**(9): p. 2242-50.
112. Watt, B., et al., *PMEL: a pigment cell-specific model for functional amyloid formation.* Pigment cell & melanoma research, 2013. **26**(3): p. 300-315.
113. Leonhardt, R.M., et al., *Proprotein convertases process Pmel17 during secretion.* J Biol Chem, 2011. **286**(11): p. 9321-37.
114. Theos, A.C., et al., *The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: controversial in name and in function.* Pigment Cell Research, 2005. **18**(5): p. 322-336.
115. Patthy, L., et al., *Kringles: modules specialized for protein binding.* FEBS letters, 1984. **171**(1): p. 131-136.
116. Maul, G.G., *Golgi-melanosome relationship in human melanoma in vitro.* Journal of ultrastructure research, 1969. **26**(1): p. 163-176.
117. Kobayashi, T., et al., *The Pmel 17/silver locus protein. Characterization and investigation of its melanogenic function.* Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(46): p. 29198-29205.
118. Yasumoto, K.-i., et al., *Epitope Mapping of the Melanosomal Matrix Protein gp100 (PMEL17) RAPID PROCESSING IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM AND GLYCOSYLATION IN THE EARLY GOLGI COMPARTMENT.* Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(27): p. 28330-28338.
119. Berson, J.F., et al., *Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies.* Molecular biology of the cell, 2001. **12**(11): p. 3451-3464.
120. Raposo, G., et al., *Distinct Protein Sorting and Localization to Premelanosomes, Melanosomes, and Lysosomes in Pigmented Melanocytic Cells ✪.* The Journal of cell biology, 2001. **152**(4): p. 809-824.
121. Hoashi, T., K. Tamaki, and V.J. Hearing, *The secreted form of a melanocyte membrane-bound glycoprotein (Pmel17/gp100) is released by ectodomain shedding.* The FASEB Journal, 2010. **24**(3): p. 916-930.
122. Berson, J.F., et al., *Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis.* The Journal of cell biology, 2003. **161**(3): p. 521-533.
123. van Niel, G., et al., *The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and-dependent endosomal sorting during melanogenesis.* Developmental cell, 2011. **21**(4): p. 708-721.
124. Kummer, M.P., et al., *Formation of Pmel17 amyloid is regulated by juxtamembrane metalloproteinase cleavage, and the resulting C-terminal fragment is a substrate for γ-secretase.* Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(4): p. 2296-2306.
125. Theos, A.C., et al., *A lumenal domain-dependent pathway for sorting to intralumenal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis.* Developmental cell, 2006. **10**(3): p. 343-354.
126. Hosoi, J., et al., *Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1α, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid.* Cancer Research, 1985. **45**(4): p. 1474-1478.
127. Leonhardt, R.M., et al., *Critical residues in the PMEL/Pmel17 N-terminus direct the hierarchical assembly of melanosomal fibrils.* Molecular biology of the cell, 2013. **24**(7): p. 964-981.
128. Frousios, K.K., et al., *Amyloidogenic determinants are usually not buried.* BMC structural biology, 2009. **9**(1): p. 1.
129. Tsolis, A.C., et al., *A consensus method for the prediction of 'aggregation-prone'peptides in globular proteins.* PloS one, 2013. **8**(1): p. e54175.



130. Glenner, G.G., E.D. Eanes, and D.L. Page, *The relation of the properties of Congo red-stained amyloid fibrils to the -conformation.* J Histochem Cytochem, 1972. **20**(10): p. 821-6.
131. Beerten, J., J. Schymkowitz, and F. Rousseau, *Aggregation prone regions and gatekeeping residues in protein sequences.* Current topics in medicinal chemistry, 2012. **12**(22): p. 2470-2478.
132. Pawar, A.P., et al., *Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases.* Journal of molecular biology, 2005. **350**(2): p. 379-392.
133. Raposo, G., M.S. Marks, and D.F. Cutler, *Lysosome-related organelles: driving post-Golgi compartments into specialisation.* Current opinion in cell biology, 2007. **19**(4): p. 394-401.
134. Watt, B., et al., *N-terminal domains elicit formation of functional Pmel17 amyloid fibrils.* Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(51): p. 35543-35555.
135. Louros, N.N., et al., *A β-solenoid model of the Pmel17 repeat domain: insights to the formation of functional amyloid fibrils.* Journal of computer-aided molecular design, 2016. **30**(2): p. 153-164.

