



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

**ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ  
NF-κΒ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΤΩΝ ΚΑΡΔΙΑΚΩΝ  
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ**

**ΧΡΥΣΑΝΘΗ ΚΑΓΙΟΥ**

**A.M: 1113201300039**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Επιβλέπουσα: Κα. Αικατερίνη Γαϊτανάκη,  
Καθηγήτρια του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου

ΑΘΗΝΑ 2017

## Πρόλογος

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελούν μαζί με τον καρκίνο την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως, με τα ποσοστά να αυξάνονται όσο αυξάνεται και ο μέσος όρος ζωής του ανθρώπου. Κατανοούμε, λοιπόν, ότι είναι κρίσιμη η εύρεση τρόπων για την πρόληψη, τη διάγνωση και φυσικά τη θεραπεία των ασθενειών αυτών. Γι' αυτό το λόγο, υπάρχει ένας πολύ μεγάλος όγκος εργασιών οι οποίες στοχεύουν στη μελέτη των διαδικασιών που εμπλέκονται στην εκδήλωση των καρδιαγγειακών νόσων. Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί, η κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τις ασθένειες της καρδιάς και η απόκριση της στα διάφορα ερεθίσματα, βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο.

Έχει γίνει, πλέον, αντιληπτό ότι η μελέτη της καρδιάς σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο μπορεί να ρίξει φως σε πολλές πτυχές της λειτουργίας του συγκεκριμένου οργάνου, οι οποίες δεν φαίνονται μακροσκοπικά ή μέσω της φυσιολογίας της. Σε αυτήν την ιδέα βασίζεται και η παρούσα διπλωματική εργασία, η οποία αποσκοπεί στη διερεύνηση της απόκρισης των καρδιακών κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Ο καρδιακός μυς, λόγω της ενεργοβόρας λειτουργίας του, έρχεται πολύ συχνά αντιμέτωπος με οξειδωτικά γεγονότα, τα οποία αν δεν αντιμετωπιστούν μπορεί να οδηγήσουν σε παθολογικές καταστάσεις. Συνεπώς, γίνεται προσπάθεια εύρεσης τρόπων για την προστασία της καρδιάς, μέσω της στόχευσης διαφόρων μορίων τελεστών που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες. Ο NF-κΒ είναι ένα από αυτά τα μόρια, του οποίου ο ρόλος στην καρδιά, δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός. Γι' αυτό το λόγο η παρούσα εργασία επικεντρώνεται σε αυτόν τον μεταγραφικό παράγοντα σε μια προσπάθεια εξακρίβωσης της συσχέτισής του με τις αποκρίσεις της καρδιάς στο οξειδωτικό στρες και στην απόπτωση που προκαλείται από αυτό.

Η διεκπεραίωση αυτής της εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την καθοδήγηση και τη βοήθεια των καθηγητριών μου, συναδέλφων και φίλων μου, προς τους οποίους, θα ήθελα να εκφράσω βαθύτατη ευγνωμοσύνη.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υπεύθυνη μου, Καθηγήτρια και Διευθύντρια του τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, κυρία Αικατερίνη Γαϊτανάκη, η οποία με εμπιστεύτηκε για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Οι υποδείξεις και οι χρήσιμες συμβουλές της τόσο στον πάγκο, όσο και εκτός αυτού, ήταν πολύτιμες για μένα και με βοήθησαν όχι μόνο να ολοκληρώσω την εργασία αυτή, αλλά και να βελτιωθώ ως βιολόγος και επιστήμονας. Ακόμα περισσότερο, όμως, την ευχαριστώ για την υποστήριξη, την εμπιστοσύνη και την ενθάρρυνση της καθόλη την πορεία της διπλωματικής μου.

Φυσικά, θερμές ευχαριστίες ανήκουν στην κυρία Ιωάννα-Κατερίνα Αγγελή, Επίκουρη Καθηγήτρια του τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, απουσία της οποίας δε θα βρισκόμουν σε αυτό το σημείο. Την ευχαριστώ ιδιαίτερος για τις γνώσεις που μου μετέδωσε, την υπομονή που υπέδειξε και την αμέριστη στήριξη και συμπαράσταση της καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις φίλες και συναδέλφους μου, Λίδια Μουρατίδου, Δανάη Γάτα και Δανάη Αγγελιδάκη, για τις αμέτρητες ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο, τη στήριξη τους σε καθετί, τις απογοητεύσεις και τις χαρές που περάσαμε μαζί. Χωρίς εκείνες, η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήταν αδύνατη και μέσω της συνεργασίας μας, προέκυψαν φίλιες που δε θα ήθελα να

χάσω. Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω ξεχωριστά, τη φίλη μου Νάντια Παπαδοπούλου, η οποία εκπονούσε παράλληλα με εμένα τη διπλωματική της εργασία στο εργαστήριο του κυρίου Ευθυμιόπουλου, για τη πολύτιμη βοήθεια της, τη στήριξή της και τις χρήσιμες συμβουλές της. Δε γίνεται να ξεχάσω την αγαπημένη μου φίλη και συνάδελφο, Αφροδίτη Δασκαλοπούλου, η οποία βρισκόταν δίπλα μου σε κάθε βήμα μου στο τμήμα Βιολογίας. Την ευχαριστώ για την αμέριστη στήριξη της, την πίστη της σε εμένα και τη βοήθεια της σε ο,τι κι αν κάνω.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου για την υπομονή, τη συμπαράσταση και την αγάπη τους όλα αυτά τα χρόνια και ιδιαίτερα για την βοήθεια τους όποτε τους χρειάζομαι. Ελπίζω να τους κάνω περήφανους.

Χρυσάνθη Κάγιου

# Περιεχόμενα

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Πρόλογος .....                                                                            | 2  |
| Συντμήσεις .....                                                                          | 7  |
| Περίληψη.....                                                                             | 12 |
| I. Εισαγωγή .....                                                                         | 13 |
| I.A. Οξειδωτικό στρες.....                                                                | 13 |
| I.A.1 Χημεία H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                                          | 13 |
| I.A.2 Ρόλος ROS στη καρδιά.....                                                           | 16 |
| I.A.3 ROS και μεταγωγή σήματος .....                                                      | 18 |
| I.A.3.1 ROS και σηματοδοτικά μονοπάτια στην καρδιά.....                                   | 18 |
| I.A.3.2 ROS και MAPKs.....                                                                | 19 |
| I.B Απόπτωση .....                                                                        | 22 |
| I.B.1 Γενικά για την απόπτωση .....                                                       | 22 |
| I.B.2 Φυσιολογικός και παθολογικός ρόλος της απόπτωσης.....                               | 24 |
| I.B.3 Απόπτωση στην καρδιά .....                                                          | 25 |
| I.B.4 PARP-1 και ο ρόλος της στην απόπτωση.....                                           | 26 |
| I.Γ NF-κΒ .....                                                                           | 29 |
| I.Γ.1 Γενικά για τον NF-κΒ.....                                                           | 29 |
| I.Γ.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποίησης του NF-κΒ και κυρίαρχα μόρια<br>τελεστές ..... | 32 |
| I.Γ.2.1 Κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης.....                                               | 32 |
| I.Γ.2.2 Μη κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης .....                                           | 34 |
| I.Γ.2.3 Σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποίησης του NF-κΒ στην καρδιά.....                   | 35 |
| I.Γ.2.4 Σύμπλοκο IKK και αναστολείς IκΒ .....                                             | 36 |
| I.Γ.2.5 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της υπομονάδας p65 του NF-κΒ.....                | 38 |
| I.Γ.3 Ρόλος του NF-κΒ στο οξειδωτικό στρες.....                                           | 40 |
| I.Γ.4 Ρόλος του NF-κΒ στην απόπτωση.....                                                  | 41 |
| I.Γ.5 Ρόλος του NF-κΒ στην καρδιά .....                                                   | 42 |
| I.Δ. Κουρκουμίνη.....                                                                     | 44 |
| I.Ε. Καρδιακά κύτταρα θηλαστικών H9c2 .....                                               | 46 |
| Σκοπός .....                                                                              | 48 |
| II. Υλικά και μέθοδοι .....                                                               | 49 |
| II.A Υλικά .....                                                                          | 49 |
| II.A.1 Βιολογικό υλικό .....                                                              | 49 |
| II.A.2 Υλικά κυτταροκαλλιέργειας .....                                                    | 49 |
| II.A.3 Επιδράσεις.....                                                                    | 50 |

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Π.Α.4 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ομογενοποίηση των κυττάρων .....                                             | 50 |
| Π.Α.5 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης .....                             | 50 |
| Π.Α.6 Υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοδοκιμασία Western Blotting .....                              | 50 |
| Π.Α.7 Αντισώματα .....                                                                                                        | 51 |
| Π.Α.8 Γενικά υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεκπεραίωση της εργασίας .....                            | 52 |
| Π.Α.9 Όργανα και εξοπλισμός εργαστηρίου .....                                                                                 | 52 |
| Π.Β. Μέθοδοι .....                                                                                                            | 52 |
| Π.Β.1 Κυτταροκαλλιέργειες .....                                                                                               | 52 |
| Π.Β.2 Απόψυξη κυττάρων .....                                                                                                  | 53 |
| Π.Β.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων .....                                                                                           | 54 |
| Π.Β.4 Ψύξη κυττάρων .....                                                                                                     | 54 |
| Π.Β.5 Καταμέτρηση κυττάρων .....                                                                                              | 55 |
| Π.Β.6 Επιδράσεις .....                                                                                                        | 55 |
| Π.Β.7 Ομογενοποίηση .....                                                                                                     | 56 |
| Π.Β.8 Bradford .....                                                                                                          | 59 |
| Π.Β.9 Ανάλυση κατά Western .....                                                                                              | 59 |
| Π.Β.9.1 Ηλεκτροφόρηση .....                                                                                                   | 60 |
| Π.Β.9.2 Μεταφορά .....                                                                                                        | 61 |
| Π.Β.9.3 Αντισώματα .....                                                                                                      | 63 |
| Π.Β.9.4 Εμφάνιση .....                                                                                                        | 64 |
| Π.Β.10 Λογισμικά προγράμματα και επεξεργασία αποτελεσμάτων .....                                                              | 65 |
| Π.Γ Βελτιστοποίηση μεθόδων .....                                                                                              | 65 |
| Π.Γ.1 Ομογενοποίηση .....                                                                                                     | 65 |
| Π.Γ.2 Συγκέντρωση πηκτώματος ηλεκτροφόρησης .....                                                                             | 66 |
| Π.Γ.3 μg πρωτεΐνης .....                                                                                                      | 66 |
| Π.Γ.4 PVDF μεμβράνη .....                                                                                                     | 67 |
| Π.Γ.5 Διάρκεια μεταφοράς και σύσταση του διαλύματος μεταφοράς .....                                                           | 68 |
| Π.Γ.6 Δέσμευση μη ειδικών θέσεων (Blocking) .....                                                                             | 68 |
| ΙΙΙ. Αποτελέσματα .....                                                                                                       | 70 |
| ΙΙΙ.1 Το H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> επάγει την φωσφορυλίωση του NF-κB στη σερίνη 536 συναρτήσει του χρόνου επίδρασης ..... | 70 |
| ΙΙΙ.2 Το H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> επάγει χρονο-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της p38-MAPK, των JNKs, και των ERKs .....        | 71 |
| ΙΙΙ.3 Οι MAPKs και η MSK1 σχετίζονται με την φωσφορυλίωση της p65 .....                                                       | 72 |
| ΙΙΙ.4 Η φωσφορυλίωση της p65 ακολουθείται από τη μετατόπιση της στον πυρήνα .                                                 | 74 |

|                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| III.5 Το H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> επάγει την απόπτωση των καρδιακών μυοβλαστών H9c2.....                                                      | 75  |
| III.6 Οι αναστολείς των ERKs και της MSK1 αναστέλλουν τη θραύση της PARP....                                                                       | 76  |
| III.7 Η κουρκουμίνη αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του NF-κΒ και τη θραύση της PARP που επάγονται από το H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....           | 77  |
| IV. Συζήτηση .....                                                                                                                                 | 79  |
| IV.1 Το H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> επάγει την φωσφορυλίωση της p65 υπομονάδας του NF-κΒ στη σερίνη 536 και την μετατόπιση της στον πυρήνα ..... | 79  |
| IV.2 Το H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> επάγει τη φωσφορυλίωση των MAPKs .....                                                                       | 81  |
| IV.3 Το H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> επάγει την μεσολαβούμενη από τον NF-κΒ απόπτωση των καρδιακών μυοβλαστών.....                                | 84  |
| IV.4 Οι MAPKs και η MSK1 σχετίζονται με τη φωσφορυλίωση του NF-κΒ και την απόπτωση που επάγεται από το H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....         | 88  |
| IV.5 Η κουρκουμίνη αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της p65 και την απόπτωση που επάγεται από το H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                     | 93  |
| IV.6 Προτεινόμενο μονοπάτι εμπλοκής του NF-κΒ στην επαγωγή της απόπτωσης από το H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> στα H9c2 .....                       | 98  |
| Συμπεράσματα .....                                                                                                                                 | 99  |
| Βιβλιογραφία.....                                                                                                                                  | 100 |

## Συντμήσεις

|        |                                                                                          |                                                          |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| AIDS   | Σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανοσοανεπάρκειας                                         | Acquired immune deficiency syndrome                      |
| AIF    | Παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης                                                        | Apoptosis inducing factor                                |
| ALPS   | Αυτοάνοσο λεμφοπολλαπλασιαστικό σύνδρομο                                                 | Autoimmune lymphoproliferative syndrome                  |
| AMPK   | Ενεργοποιούμενη από AMP πρωτεϊνική κινάση                                                | AMP-activated protein kinase,                            |
| AP-1   | Πρωτεΐνη ενεργοποιητής 1                                                                 | Activator protein 1                                      |
| Apaf1  | Παράγοντας 1 ενεργοποίησης της αποπτωτικής πρωτεάσης                                     | Apoptotic protease activating factor 1                   |
| ARD    | Περιοχή με επαναλήψεις αγκυρίνης                                                         | Ankyrin repeat domain                                    |
| ARH3   | Γλυκοϋδρολάση πολύ-ADP-ριβόζης 3                                                         | Poly (ADP-ribose) glycohydrolase                         |
| ASK    | Κινάση-ρυθμιστής του αποπτωτικού σήματος                                                 | Apoptosis signal-regulating kinase                       |
| BAD    | Bcl-2-σχετιζόμενος επαγωγέας της απόπτωσης                                               | Bcl-2-associated death promoter                          |
| BAFF   | Παράγοντας ενεργοποίησης των B-κυττάρων                                                  | B-cell activating factor                                 |
| Bak    | Bcl-2 ομόλογη πρωτεΐνη ανταγωνιστής/«δολοφόρος»                                          | Bcl-2 homologous antagonist/killer                       |
| Bax    | Bcl-2 σχετιζόμενη πρωτεΐνη X                                                             | Bcl-2-associated X protein                               |
| Bcl-2  | Λέμφωμα B κυττάρων 2                                                                     | B-cell lymphoma 2                                        |
| Bcl-xL | Λέμφωμα B κυττάρων-πολύ μεγάλο                                                           | B-cell lymphoma-extra large                              |
| BMK1   | Μεγάλη πρωτεϊνική κινάση 1 επαγόμενη από μιτογόνα                                        | Big mitogen-activated protein kinase 1                   |
| BNIP3  | Πρωτεΐνη 3 της Bcl-2 οικογένειας που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη 19 kDa E1B του αδενοϊού | BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 |
| CAD    | Ενεργοποιούμενη από κασπάση DNάση                                                        | Caspase-Activated DNase                                  |
| CaMKII | Εξαρτώμενη από $Ca^{2+}$ /καλμοδουλίνη πρωτεϊνική κινάση II                              | $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II        |
| cAMP   | Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη                                                          | Cyclic adenosine monophosphate                           |
| CARD   | Καρβοξυτελική περιοχή που σχετίζεται με την ενεργοποίηση των κασπασών                    | C-terminal caspase activation domain                     |
| CAT    | Καταλάση                                                                                 | Catalase                                                 |
| CBP    | Πρωτεΐνη που προσδένεται στη CREB                                                        | CREB-binding protein                                     |
| CD40L  | Προσδέτης CD40                                                                           | CD40 Ligand                                              |
| Cdc42  | Πρωτεΐνη ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης 42                                             | Cell division control protein 42                         |
| cFLIP  | Κυτταρική πρωτεΐνη αναστολέας τύπου FLICE                                                | Cellular FLICE-like inhibitor protein                    |
| cIAPs  | Κυτταρικές πρωτεΐνες-αναστολείς της απόπτωσης                                            | Cellular inhibitors of apoptosis                         |

|          |                                                                      |                                               |
|----------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| c-Myc    | Ομόλογη πρωτεΐνη του ιϊκού ογκογόνου της μυελοκυτωμάτωσης των πτηνών | Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog |
| COX-2    | Κυκλοοξυγενάση-2                                                     | Cyclooxygenase 2                              |
| CREB     | Πρωτεΐνη που συνδέεται στο στοιχείο απόκρισης στο κυκλικό AMP        | cAMP responsive element binding protein       |
| CuZnSOD  | Δισμουτάση σουπεροξειδίου χαλκού ψευδάργυρου                         | Copper zinc superoxide dismutase              |
| CVB3     | Ιός Κοξάκι B3                                                        | Coxsackie-virus B3                            |
| DAG      | Διακυλογλυκερόλη                                                     | Diacylglycerol                                |
| DD       | Περιοχή θανάτου                                                      | Death domain                                  |
| DHA      | Δοκοσαεξανοϊκό οξύ                                                   | Docosaehaenoic acid                           |
| DISC     | Συμπλόκο σηματοδοτικής επαγωγής θανάτου                              | Death-inducing signaling complex              |
| DR       | Υποδοχέας θανάτου                                                    | Death receptor                                |
| DSB      | Θραύσεις σε δίκλωνη έλικα                                            | Double-strand breaks                          |
| ECT      | Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων                                        | Electron transport chain,                     |
| EGF      | Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας                                     | Epidermal growth factor                       |
| ERK1/2   | Κινάσες ρυθμιζόμενες από εξωκυτταρικά σήματα                         | Extracellular signal-regulated kinases        |
| FAD      | Φλαβιν-αδένινο-δινουκλεοτίδιο                                        | Flavin adenine dinucleotid                    |
| FADD     | Fas σχετιζόμενη πρωτεΐνη με περιοχή θανάτου                          | Fas-associated protein with death domain      |
| FasL     | Προσδέτης Fas                                                        | Fas ligand                                    |
| FeTBAP   | Fe(III)τετρακίς-4-βενζοϊκό οξύ-πορφυρίνη                             | Fe(III)tetrakis-4-benzoic acid-porphyrin      |
| FLICE    | Ένζυμο-μετατροπέας της ιντερλευκίνης 1β -τύπου FADD                  | FADD-like IL-1β-converting enzyme             |
| GO       | Οξειδάσης της γλυκόζης                                               | Glucose oxidase                               |
| GPCR     | Υποδοχέας συζευγμένος με G πρωτεΐνες                                 | G protein-coupled receptors                   |
| GPx      | Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης                                       | Glutathione peroxidase                        |
| GSH      | Γλουταθειόνη                                                         | Glutathione                                   |
| GSK3β    | Κινάση 3β της συνθάσης του γλυκογόνου                                | Glycogen synthase kinase-3 beta               |
| GSSG     | Δισουλφίδιο γλουταθειόνης                                            | Glutathione disulfide                         |
| HDAC     | Απακετυλάση των ιστονών                                              | Histone deacetylase                           |
| HIF1     | Επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1                               | Hypoxia inducible factor 1                    |
| HO-1     | Οξυγενάση-1 της αίμης                                                | Heme oxygenase                                |
| I/R      | Ισχαιμία/επανοξυγόνωση                                               | Ischemia/reperfusion                          |
| IKK      | Κινάση του αναστολέα κΒ                                              | IκB kinase                                    |
| IL-1R    | Υποδοχέας της ιντερλευκίνης 1                                        | Interleukin-1 receptor                        |
| IL-1β    | Ιντερλευκίνη 1β                                                      | Interleukin-1                                 |
| IL-R1AcP | Πρωτεΐνη προσαρμογέας στον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1              | IL-1 receptor accessory protein               |
| iNOS     | Επαγόμενη συνθάση του νιτρικού οξειδίου                              | Inducible nitric oxide synthase               |
| IP3      | Τριφωσφορική ινοσιτόλη                                               | Inositol trisphosphate                        |
| IRAK     | Σχετιζόμενες με τον υποδοχέα της IL-1 κινάσες                        | Interleukin-1 receptor-associated kinase      |
| IκB      | Πρωτεΐνη-αναστολέας κΒ                                               | κB Inhibitor                                  |



|                    |                                                                                       |                                                                |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| JAK-STAT           | Κινάση Janus-Μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής                      | Janus kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription  |
| JNK                | c-Jun αμινοτελικές κινάσες                                                            | c-Jun N-terminal kinases                                       |
| Ipr                | Λεμφοπολλαπλασιασμός                                                                  | Lymphoproliferation                                            |
| LPS                | Λιποπολυσακχαρίτης                                                                    | Lipopolysaccharide                                             |
| LT-β               | Λεμφοτοξίνη-β                                                                         | Lymphotoxin B                                                  |
| MAPKK              | Κινάση της MAP κινάσης                                                                | MAP kinase kinase                                              |
| MAPKKK             | Κινάσης της κινάσης της MAP κινάσης                                                   | MAP kinase kinase kinase                                       |
| MAPKs              | Επαγόμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση                                              | Mitogen-activated protein kinase                               |
| MCP-1              | Χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων                                               | Monocyte chemoattractant protein-1                             |
| MEFs               | Εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού                                                         | Mouse embryonic fibroblasts                                    |
| MEK1/2             | Επαγόμενη από μιτογόνα κινάση της ERK                                                 | MAPK/ERK Kinase                                                |
| MKK                | Κινάση της MAP κινάσης                                                                | MAP kinase kinase                                              |
| MLK                | Κινάση μικτής γενιάς                                                                  | Mixed lineage kinase                                           |
| MnSOD              | Δισμουτάση σουπεροξειδίου με Mn                                                       | Manganese superoxide dismutase                                 |
| MSK1               | Κινάση που ενεργοποιείται από στρες και μιτογόνα 1                                    | Mitogen- and stress-activated protein kinase 1                 |
| MSP                | Πρωτεΐνη ενεργοποιητής των μακροφάγων                                                 | Macrophage stimulating protein                                 |
| MyD88              | Πρωτεΐνη πρώιμης απόκρισης στη μυελοειδή διαφοροποίηση 88                             | Myeloid differentiation primary response protein 88            |
| MyoD               | Παράγοντας μυογενούς διαφοροποίησης                                                   | Myogenic differentiation protein                               |
| NaAsO <sub>2</sub> | Αρσενικό νάτριο                                                                       | Sodium arsenite                                                |
| NAD <sup>+</sup>   | Νικοτινάμιδο-αδενινο-δινουκλειοτίδιο                                                  | Nicotinamide adenine dinucleotide                              |
| NADPH              | Φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλειοτίδιο                                        | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate                    |
| NEMO               | Ή IKKγ, κρίσιμος ρυθμιστής του NF-κB                                                  | NF-kappa-B essential modulator                                 |
| NES                | Αλληλουχίες εξόδου από τον πυρήνα                                                     | Nuclear Export Sequences                                       |
| NF-κB              | Πυρηνικός παράγοντας-ενισχυτής της κ ελαφριάς αλυσίδας των ενεργοποιημένων B κυττάρων | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |
| NIK                | Κινάση επαγωγής NF-κB                                                                 | NF-κB-inducing kinase                                          |
| NLS                | Σήμα πυρηνικού εντοπισμού                                                             | Nuclear Localising Signal                                      |
| NMDA               | N-μέθυλο-D-ασπαρτικό                                                                  | N-methyl-D-aspartate                                           |
| Nox                | Οξειδάση του NADPH                                                                    | NADPH oxidase                                                  |
| Nrf-2              | Πυρηνικός παράγοντας 2 τύπου παράγοντα προερχόμενου από ερυθροειδές 2                 | Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2                    |
| OGD/R              | Στέρηση οξυγόνου-γλυκόζης και επανοξυγόνωση                                           | Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation                       |
| PARchain           | Αλυσίδα πολυ-ADP-ριβόζης                                                              | Poly-ADP-ribose chain                                          |
| PARG               | Γλυκοϋδρολάση πολυ-ADP-ριβόζης                                                        | Poly-ADP-ribose glycohydrolase                                 |

|              |                                                                         |                                                                              |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| PARP         | Πολυμεράση της πολυ-διφωσφορικής-αδενοσίνου-ριβόζης                     | Poly-adenosine diphosphate ribose-polymerase                                 |
| PDGF         | Αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από τα αιμοπετάλια                    | Platelet-derived growth factor                                               |
| PHD          | Περιοχή με ενεργότητα υδροξυλάσης προλίνης                              | Prolyl hydroxylase domain                                                    |
| PI3K         | Κινάση 3 της 4,5-διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης                     | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase                               |
| PID          | Περιοχή αναστολής της επεξεργασίας                                      | Processing inhibitory domain                                                 |
| PKA          | Πρωτεϊνική κινάση A                                                     | Protein kinase A                                                             |
| PKC          | Πρωτεϊνική κινάση C                                                     | Protein kinase C                                                             |
| PKD1         | Πρωτεϊνική κινάση D1                                                    | Protein kinase D1                                                            |
| PKG          | Πρωτεϊνική κινάση G                                                     | Protein kinase G                                                             |
| PLC $\gamma$ | Ισομορφή $\gamma$ της φωσφολιπάσης C του φωσφοϊνοσιτιδίου               | Phosphoinositide phospholipase C $\gamma$                                    |
| PMA          | 12-μυριστικό-13-οξικό-φορβόλη                                           | Phorbol 12-myristate 13-acetate                                              |
| Prx          | Περοξυρεδοξίνη                                                          | Peroxyredoxin                                                                |
| PTDC         | Διθειοκαρβαμική πυρρολιδίνη                                             | Pyrrolidine dithio-carbamate                                                 |
| PTP          | Πρωτεϊνική φωσφατάση τυροσίνης                                          | Protein tyrosine phosphatases                                                |
| Puma         | Πρωτεΐνη-ρυθμιστής της απόπτωσης που επάγεται από την p53               | p53 upregulated modulator of apoptosis                                       |
| RA           | Ρετινοϊκό οξύ                                                           | All-trans retinoic acid                                                      |
| RHD          | Αυτοτελής δομική περιοχή ομολογίας Rel                                  | Rel homology domain                                                          |
| RIP          | Πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης με υποδοχέα                                     | Receptor-interacting protein                                                 |
| RNF146       | Κυτταροπλασματική E3-λιγάση της ουβικιτίνης                             | Ring finger protein 146                                                      |
| RNS          | Δραστικές ρίζες οξυγόνου αζώτου                                         | Reactive nitrogen species                                                    |
| ROS          | Δραστικές ρίζες οξυγόνου                                                | Reactive oxygen species                                                      |
| RSK1         | Κινάση 1 της ριβοσωμικής υπομονάδας                                     | Ribosomal subunit kinase-1                                                   |
| SCF          | Λιγάση ουβικιτίνης τύπου Skp-1/Cullins/F box                            | Skp-1/Cullins/F box protein                                                  |
| SOD          | Σουπεροξειδική δισμουτάση                                               | Superoxide dismutase                                                         |
| -SOH         | Σουλφενικό οξύ                                                          | Sulfenic acid                                                                |
| SSB          | Θραύσεις μονής αλυσίδας DNA                                             | Single-strand breaks                                                         |
| TAD          | Περιοχή σχετιζόμενη με τη μεταγραφή                                     | Transactivation domain                                                       |
| TAK1         | Επαγόμενη-από τον τροποποιητικό αυξητικό παράγοντα $\beta$ -κινάση 1    | Transforming growth factor beta-activated kinase                             |
| TANK         | Ενεργοποιητής NF- $\kappa$ B σχετιζόμενος με μέλος της οικογένειας TRAF | TRAF family member associated NF- $\kappa$ B activator                       |
| TBK1         | Κινάση που προσδένει τον TANK                                           | TRAF family member associated NF- $\kappa$ B activator (TANK) binding kinase |
| TNF          | Παράγοντας νέκρωσης όγκων                                               | Tumor necrosis factor                                                        |
| TNFR         | Υποδοχέας παράγοντα νέκρωσης όγκων                                      | Tumor necrosis factor receptor                                               |
| TRADD        | Πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τον TNFR1 με περιοχή θανάτου                    | TNFR1-associated death domain protein                                        |

|        |                                                         |                                         |
|--------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| TRAF   | Παράγοντας που σχετίζεται με τον TNFR                   | TNF receptor-associated factor          |
| TRAIL  | TNF-σχετιζόμενος προσδέτης-επαγωγέας της απόπτωσης      | TNF-related apoptosis-inducing ligand   |
| Trx    | Θειορεδοξίνη                                            | Thioredoxin                             |
| TSA    | Τριχοστατίνη Α                                          | Trichostatin A                          |
| XIAP   | X-συνδεόμενος πρωτεϊνικός αναστολέας της απόπτωσης      | X-linked inhibitor of apoptosis protein |
| β-TrCP | F-box πρωτεΐνη 1A με επαναλήψεις τρυπτοφάνης/ασπαρτικού | F-box/WD repeat-containing protein 1A   |

## Περίληψη

Το οξειδωτικό στρες στην καρδιά σχετίζεται με την παθογένεια πολλών καρδιαγγειακών νόσων. Μια σοβαρή επίπτωση του παρατεταμένου οξειδωτικού στρες στον καρδιακό μυ είναι η απόπτωση των καρδιακών μυοκυττάρων. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ φαίνεται να εμπλέκεται σε διάφορες καρδιαγγειακές ασθένειες, όμως δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως ο ρόλος του σε αυτές. Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήσαμε τον ρόλο του NF-κΒ στην απόπτωση που επάγεται κατά την επίδραση με  $H_2O_2$  σε καρδιακούς μυοβλάστες της κυτταρικής σειράς H9c2. Στη συνέχεια, προσπαθήσαμε να συσχετίσουμε την ενεργοποίηση του με τα μονοπάτια των MAPKs, ERKs, JNKs και p38 MAPK στις ίδιες συνθήκες, με τη χρήση ειδικών για την κάθε κινάση αναστολέων. Τέλος, για να εξακριβώσουμε τη συσχέτιση του NF-κΒ με την απόπτωση χρησιμοποιήσαμε τον αναστολέα του, κουρκουμίνη, σε συγκεντρώσεις 0,1-1  $\mu M$  και μελετήσαμε την απόκριση των καρδιακών κυττάρων στο  $H_2O_2$ . Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το  $H_2O_2$  συγκέντρωσης 400  $\mu M$  επάγει την απόπτωση στους καρδιακούς μυοβλάστες και ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ. Επιπλέον, στις ίδιες συνθήκες, παρατηρήσαμε αύξηση στα επίπεδα των p-JNKs, p-p38 MAPK και p-ERKs, ενώ με τη χρήση των αναστολέων PD98059, SB203580 και SP600125, παρεμποδίστηκε η παρατηρούμενη από το  $H_2O_2$  φωσφορυλίωση του NF-κΒ. Μάλιστα, διαπιστώθηκε ότι οι αναστολείς PD98059 και H89 παρεμποδίζουν την απόπτωση των κυττάρων. Τέλος, η κουρκουμίνη σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, 0,1  $\mu M$  και 1  $\mu M$ , εκτός από την αναστολή της φωσφορυλίωσης της p65 υπομονάδας του μεταγραφικού παράγοντα, συντέλεσε και στην αναστολή της απόπτωσης. Συνολικά, τα αποτελέσματά μας συνηγορούν στο ότι ο NF-κΒ στις δεδομένες συνθήκες δρα προ-αποπτωτικά και μάλιστα η ενεργοποίησή του σχετίζεται με τα αναρροϊκά μονοπάτια των MAPKs. Επιπλέον, διαπιστώσαμε τον αντι-οξειδωτικό και αντι-αποπτωτικό ρόλο της κουρκουμίνης στα καρδιακά κύτταρα μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την αναστολή του NF-κΒ, καθιστώντας την πιθανή ουσία με προστατευτική δράση έναντι του οξειδωτικού στρες στην καρδιά.

---

## I. Εισαγωγή

---

### I.A. Οξειδωτικό στρες

Το μεγαλύτερο ποσοστό του οξυγόνου που καταναλώνεται από τα κύτταρα, ανάγεται σε  $H_2O$ , μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και βασικό ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η κυτοχρωμική οξειδάση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι κύριες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου είναι η διαρροή ηλεκτρονίων από τις μιτοχονδριακές αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων, η φαγοκυττάρωση και τα ενδογενή ενζυμικά συστήματα. (Akopova et al., 2012). Είναι πλέον γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διττό ρόλο: άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε βλαπτικές και τα κύτταρα, για να καταφέρουν να επιβιώσουν, έχουν αναπτύξει μια σειρά από αμυντικά συστήματα (Ray et al., 2012). Η σύσταση και η διάρθρωση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών διαφέρει όχι μόνο μεταξύ των διαφόρων ιστών αλλά ακόμα και μεταξύ διαφόρων τύπων κυττάρων του ίδιου ιστού.

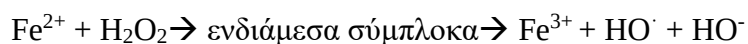
Οι οικογένειες των ενζύμων, δισμουτάση του σουπεροξειδίου (superoxide dismutase, SOD), καταλάση (catalase, CAT), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase, GPx) και υπεροξυρεδοξίνη (peroxyredoxin, Prx), αποτελούν την πρώτη και κύρια γραμμή άμυνας εναντίον της οξειδωτικής πίεσης. Η συντονισμένη δράση τους έχει ως αποτέλεσμα την τελική αναγωγή του  $O_2$  σε  $H_2O$ , χωρίς ανεξέλεγκτες οξειδώσεις των κυτταρικών συστατικών. Εκτός από τα κύρια αυτά αμυντικά ένζυμα, υπάρχει και μια πλειάδα άλλων ενζύμων τα οποία είτε αναστέλλουν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, είτε είναι υποβοηθητικά για τη δράση των παραπάνω ενζύμων, είτε, τέλος, βοηθούν στην επιδιόρθωση των κυτταρικών συστατικών που έχουν οξειδωθεί (Dan et al., 2015).

Παρ' όλη την αφθονία των παραπάνω ενζυμικών συστημάτων σε όλους τους ιστούς και τα κύτταρα των αερόβιων οργανισμών, είναι γεγονός ότι ορισμένες ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν και να αρχίσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις. Σ' αυτήν την περίπτωση, είναι απαραίτητες αντιοξειδωτικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, οι οποίες είναι ικανές να εξουδετερώνουν τις δραστικές ελεύθερες ρίζες και να αναστέλλουν τις βλάβες που προκαλούν. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται αντιοξειδωτικά. Οι σημαντικότερες αντιοξειδωτικές ενώσεις που διαθέτει ο οργανισμός είναι η  $\alpha$ -τοκοφερόλη (βιταμίνη E) και το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) (Valko et al., 2007).

#### I.A.1 Χημεία $H_2O_2$

Με χημικούς όρους, το  $H_2O_2$  είναι ελάχιστα δραστικό· μπορεί να δράσει είτε ως ήπιο οξειδωτικό είτε ως ήπιο αναγωγικό, αλλά δεν οξειδώνει την πλειονότητα των βιολογικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, του DNA και των πρωτεϊνών. Εξάιρεση αποτελούν εκείνες οι πρωτεΐνες που φέρουν πολύ δραστικές σουλφιδρυλικές ομάδες. Ωστόσο, το  $H_2O_2$  προκαλεί προβλήματα στους οργανισμούς λόγω της αλληλεπίδρασης του με μέταλλα, κυρίως τον ανηγμένο δισθενή σίδηρο  $Fe^{2+}$  ή τον χαλκό  $Cu^+$ , και της μετέπειτα μετατροπής του σε πολύ δραστικές ρίζες

υδροξυλίου  $\text{HO}^\cdot$ . *In vivo*, ο σίδηρος είναι συζευγμένος με πρωτεΐνες της αίμης- όπως αιμοσφαιρίνη, τρανσφερίνη, φερριτίνη και λακτοφερίνη- επομένως δεν αλληλεπιδρά με το  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Στις περιπτώσεις όμως, που η συγκέντρωση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  είναι υψηλή, επάγεται η απελευθέρωση του σιδήρου από τις πρωτεΐνες αυτές (Halliwell et al., 2000). Επομένως, ο ρυθμιστικός ρόλος του  $\text{H}_2\text{O}_2$  υφίσταται όταν οι συγκεντρώσεις του είναι χαμηλές λόγω της οξείδωσης σουλφιδρυλομάδων, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις επέρχεται κυτταρικός θάνατος, είτε απόπτωση, είτε νέκρωση εξαιτίας της παραγωγής δραστικών ριζών  $\text{HO}^\cdot$  μέσω της αντίδρασης Fenton :

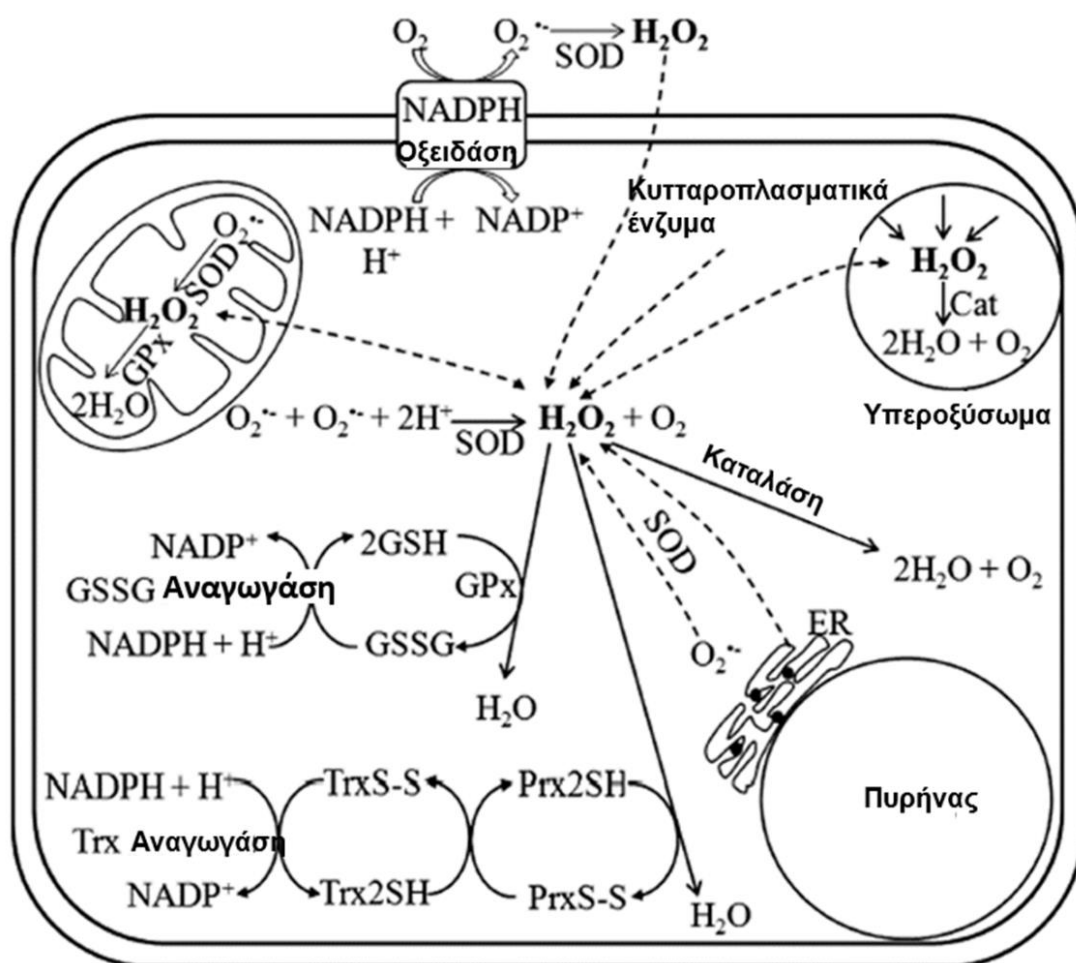


Η οξείδωση των σουλφιδρυλομάδων δεν είναι μια απλή διαδικασία καθώς μπορούν να πραγματοποιηθούν διαφορετικά επίπεδα οξείδωσης, ανάλογα με τις οξειδωτικές συνθήκες που επιβάλλονται στο κύτταρο. Τα δραστικά κατάλοιπα κυστεΐνης των πρωτεϊνών έχουν χαμηλό  $\text{pK}_a$  και βρίσκονται στην θειολική μορφή ( $\text{S}^-$ ) σε ουδέτερο pH. Έτσι, αποτελούν στόχο του  $\text{H}_2\text{O}_2$  με αποτέλεσμα, η οξείδωση τους να οδηγεί σε μεταβολές στη δομή και την λειτουργία των πρωτεϊνών που τα φέρουν. Οι σουλφιδρυλική ομάδα ενός καταλοίπου κυστεΐνης, μπορεί να οξειδωθεί προς σουλφενικό οξύ ( $-\text{SOH}$ ), το οποίο, όντας ασταθές, μπορεί να αντιδράσει με μια γειτονική θειόλη, όπως της γλουταθειόνης (glutathione, GSH). Η GSH ανάγει το σουλφενικό οξύ με S-γλουταθειονυλίωση, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ της ομάδας SH της GSH και της ομάδας SH της οξειδωμένης πρωτεΐνης. Η διαδικασία που περιεγράφηκε είναι αντιστρεπτή και συμβαίνει και υπό φυσιολογικές συνθήκες μέσα στο κύτταρο. Ωστόσο, αποτελεί μια πρόωπη απόκριση του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες και επηρεάζει το οξειδωτικό φορτίο του (Schafer & Buettner, 2001; Thannickal & Fanburg, 2000). Η αναγωγή των δισουλφιδίων που αναφέρθηκαν εξαρτάται από τη δεξαμενή φωσφορικού νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουλεοτιδίου (adenine nicotinamide dinucleotide phosphate, NADPH). Το καλύτερο παράδειγμα ρύθμισης μέσω του σχηματισμού του σουλφενικού οξέος, είναι η παρεμπόδιση των πρωτεϊνικών φωσφατασών τυροσίνης (Protein tyrosine phosphatases, PTPs), το οποίο συνεπάγεται αυξημένα επίπεδα φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών σε κατάλοιπα τυροσίνης, γεγονός που συνδέεται άρρηκτα με τη μεταγωγή σήματος (Lee et al., 1998). Επιπλέον, αν στην ίδια πρωτεΐνη υπάρχουν τουλάχιστον δύο κατάλοιπα κυστεΐνης, τότε, μπορεί να οξειδωθούν από το  $\text{H}_2\text{O}_2$  σχηματίζοντας ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της στερεοδιάταξης και ακολούθως της λειτουργίας της πρωτεΐνης.

Συνεπώς, ανάλογα με την συγκέντρωση του  $\text{H}_2\text{O}_2$ , προκύπτουν και διαφορετικά επίπεδα οξείδωσης των δραστικών καταλοίπων κυστεΐνης, οδηγώντας σε πληθώρα δομικών και άρα λειτουργικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών. Καθώς το  $\text{H}_2\text{O}_2$  αυξάνεται, αυξάνονται αναλογικά και οι δραστικές ρίζες οδηγώντας σε βλάβες.

Το  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ενώ μπορεί να προκύψει από ποικίλες πηγές, το μεγαλύτερο ποσοστό παράγεται μέσω των δισμουτασών σουπεροξειδίου (SOD) από το  $\text{O}_2^-$ . Τα  $\text{O}_2^-$ -παράγονται με τη σειρά τους σε διάφορες υποκυτταρικές θέσεις όπως τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο, το κυτταρόπλασμα και την πλασματική μεμβράνη. Η παραγωγή των δραστικών ριζών οξυγόνου έχει συσχετιστεί με την εξουδετέρωση

παθογόνων μικροοργανισμών στα φαγοσώματα (Karlsson & Dahlgren, 2002), ενώ ειδικά το  $H_2O_2$  φαίνεται να εμπλέκεται σε πληθώρα διαδικασιών μεταγωγής σήματος.



**Εικόνα 1.1 Πηγές και δεξαμενές  $H_2O_2$ .** Το  $H_2O_2$  σχηματίζεται κυρίως από ρίζες  $O_2^{\cdot-}$  με τη δράση των δισμουτασών σουπεροξειδίου, είτε στα μιτοχόνδρια (MnSOD), είτε στο κυτταρόπλασμα (CuZnSOD), είτε εξωκυτταρικά. Το  $O_2^{\cdot-}$  παράγεται υπό φυσιολογικές μεταβολικές διαδικασίες, όπως κατά την αναπνοή στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, ή από τη δραστηριότητα ενζύμων πχ  $P_{450}$  (ενδοπλασματικό δίκτυο και μιτοχόνδρια), οξειδάση της ξανθίνης (κυτταρόπλασμα) και οξειδάση NADPH (πλασματική μεμβράνη). Άμεση παραγωγή  $H_2O_2$ , πραγματοποιείται μέσα στα υπεροξυσώματα αλλά και στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου οι σουλφιδρυλικές οξειδάσες εισάγουν δισουλφιδικούς δεσμούς κατά το δίπλωμα των πρωτεϊνών. Οι ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις του  $H_2O_2$ , ελέγχονται από τα ένζυμα καταλάσες, υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPxs) και τις υπεροξυρεδοξίνες (Prx). Η αναγωγή του  $H_2O_2$  που καταλύεται από τις GPx και Prx εξαρτάται από την γλουταθειόνη (GSH) και την ανηγμένη θειορεδοξίνη (Trx2SH) οι οποίες με τη σειρά τους παραμένουν στην ανηγμένη τους δομή μέσω των NADPH-εξαρτώμενων ενζύμων, GSSG αναγωγάση, και αναγωγάση Trx. TrxS-S: οξειδωμένη θειορεδοξίνη, Trx2SH: ανηγμένη θειορεδοξίνη, GSH: ανηγμένη γλουταθειόνη, GSSG: οξειδωμένη γλουταθειόνη, Prx2SH: ανηγμένη υπεροξυρεδοξίνη, PrxS-S: οξειδωμένη υπεροξυρεδοξίνη, CAT: καταλάση (Oliveira-Marques et al., 2009b)

### 1.A.2 Ρόλος ROS στη καρδιά

Η καρδιά αποτελεί ένα από τα όργανα με τη μεγαλύτερη κατανάλωση οξυγόνου. Όπως είναι αναμενόμενο, ο μεταβολισμός του οξυγόνου, η παραγωγή δραστικών ριζών του και η «οξειδοαναγωγική σηματοδότηση» σχετίζονται με την προσαρμογή της καρδιάς σε διάφορους τύπους φυσιολογικού και παθολογικού στρες (Santos et al., 2011). Λόγω της κρίσιμης λειτουργίας που επιτελεί, η καρδιά μπορεί να προσαρμόσει προσωρινά τη συστολική της λειτουργία αλλά και να πραγματοποιήσει χρόνια τροποποίηση της δομής και της λειτουργίας της ώστε να ανταποκριθεί σε συνεχόμενη πίεση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της χρόνιας αναδιαμόρφωσης (remodeling) είναι η αύξηση του μεγέθους των καρδιακών μυοκυττάρων και του κοιλιακού τοιχώματος (καρδιακή υπερτροφία), ενώ το διαρκές στρες μπορεί να οδηγήσει σε ανεπανόρθωτη δομική και συστολική δυσλειτουργία, όπως για παράδειγμα, καρδιακή ανεπάρκεια. Είναι πλέον γνωστό, ότι στις παραπάνω διαδικασίες, κυρίαρχο ρόλο παίζουν τα οξειδοαναγωγικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος (Shah & Mann, 2011).

Μερικές από τις κύριες πηγές δραστικών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) είναι τα πολυάριθμα μιτοχόνδρια, οι NADPH οξειδάσες (NADPH oxidases, Noxs), οι μη συζευγμένες NO συνθάσες, η οξειδάση της ξανθίνης και οι μονοαμινο-αξειδάσες (Burgoyne et al., 2012). Όσον αφορά στα μιτοχόνδρια, η παραγωγή των ROS πραγματοποιείται σε διάφορα στάδια κατά την αναγωγή του  $O_2$  σε  $H_2O$  στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Electron transport chain, ECT), κάτι που έχει συσχετιστεί με την ισχαιμία/επανοξυγόνωση (Ischemia reperfusion, I/R). Ως κύτταρα με έντονη μεταβολική δραστηριότητα, τα καρδιακά κύτταρα διατηρούν υψηλά επίπεδα φωσφοκρεατίνης και τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate, ATP), τα οποία είναι απαραίτητα για την διαρκή καρδιακή λειτουργία. Η πολύπλοκη διαδικασία παραγωγής ATP από ανθρακικό υπόστρωμα, που στην καρδιά είναι κυρίως τα λιπαρά οξέα, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου και δραστικών ριζών αζώτου (reactive nitrogen species, RNS). Οι ROS παράγονται κυρίως με τη μορφή σουπεροξειδίου ( $O_2^-$ ) ενώ οι RNS με τη μορφή υπεροξυνιτρώδους ανιόντος ( $ONOO^-$ ). Το  $O_2^-$  παράγεται από την μη ολική αναγωγή του μοριακού οξυγόνου κυρίως στα σύμπλοκα I και III και είναι έντονα δραστικό (Murphy, 2009).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το  $O_2^-$  ανάγεται στα μιτοχόνδρια, είτε αυθόρμητα, είτε με τη δράση της εξαρτώμενης από μαγγάνιο δισμουτάσης του σουπεροξειδίου (manganese-dependent superoxide dismutase, MnSOD) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Για την αποφυγή οξειδωτικού στρες, το  $H_2O_2$  που εξέρχεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα, διασπάται σε  $O_2$  και  $H_2O$ . Το πρώτο ένζυμο που βρέθηκε να καταλύει αυτήν την αντίδραση είναι η καταλάση, η οποία εντοπίζεται σε όλα τα κύτταρα, ενώ στα θηλαστικά βρίσκεται μέσα στα υπεροξυσώματα (Santos et al., 2011). Το 1957 βρέθηκε και η κλασική GPx, η οποία καταλύει την αναγωγή  $H_2O_2$  μέσω της GSH (MILLS, 1957). Εκτός από τις 2 αυτές «κλασικές» οικογένειες ενζύμων εξουδετέρωσης του  $H_2O_2$ , υπάρχει ακόμη μια, οι Prxs, οι οποίες διαθέτουν 2 ανηγμένα κατάλοιπα κυστεΐνης στο ενεργό τους κέντρο που είναι υπεύθυνα για την αναγωγή του  $H_2O_2$ , ενώ η μετέπειτα αναγωγή των ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού που σχηματίζεται, συμβαίνει μέσω της θειορεδοξίνης (Wood et



al., 2003). Επομένως, λόγω της πληθώρας των ενδογενών μηχανισμών προστασίας που διαθέτουν τα κύτταρα, καταφέρνουν και διατηρούν την ομοιόσταση του  $H_2O_2$ .

Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, η μιτοχονδριακή παραγωγή ROS ξεπερνά την ικανότητα εξουδετέρωσης τους, δηλαδή την αντιοξειδωτική ικανότητα, όπως για παράδειγμα στις περιπτώσεις οξειδωτικού στρες που ακολουθεί την I/R μετά από ανακοπή (Supinski, Murphy, & Callahan, 2009). Ένας από τους κυρίαρχους παράγοντες που καθιστούν τα καρδιακά κύτταρα ευάλωτα σε οξειδωτικές βλάβες είναι η ύπαρξη πολυάριθμων μιτοχονδρίων, αφού τουλάχιστον το 30% της κυτταροπλασματικής περιοχής καλύπτεται από τα οργανίδια αυτά. Από την άλλη, η παραγωγή των ROS μέσω των μονοαμινο-οξειδασών φαίνεται να εμπλέκεται στην καρδιακή ανεπάρκεια. Ωστόσο, τα καρδιακά μυοκύτταρα φέρουν προστατευτικούς μηχανισμούς έναντι του οξειδωτικού στρες που ανταποκρίνονται ταχύτατα και εξασφαλίζουν την επιβίωση τους. Τέτοιοι μηχανισμοί, επάγουν διαδικασίες επιβίωσης, προστασίας και αποτροπής της απόπτωσης ή/και νέκρωσης.

Γενικώς, είναι γνωστό πως το οξειδωτικό φορτίο του κυττάρου επηρεάζει διάφορα μόρια που σχετίζονται με την μεταγωγή σήματος, όπως είναι οι μικρές G πρωτεΐνες Ras, κινάσες όπως οι ρυθμιζόμενες από εξωκυτταρικά σήματα κινάσες (extracellular signal-regulated kinases, ERK1/2), η p38 MAPK, η πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C, PKC) και η Akt, καθώς και μεταγραφικούς παραγόντες όπως η πρωτεΐνη ενεργοποιητής (activator protein 1, AP-1) και ο πυρηνικός παράγοντας-ενισχυτής της  $\kappa$  ελαφριάς αλυσίδας των ενεργοποιημένων B κυττάρων (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- $\kappa$ B). Ακόμη, οι Noxs που αποτελούν οικογένεια ενζύμων εξειδικευμένη στην παραγωγή ROS, παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην οξειδοαναγωγική σηματοδότηση. Τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιούν το NADPH ως δότη ηλεκτρονίων ώστε να καταλυθεί η αναγωγή του  $O_2$  σε  $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ . Ο ρόλος τους στην οξειδοαναγωγική σηματοδότηση φαίνεται από την ειδική ενεργοποίηση τους από ποικίλα μόρια, από την παραγωγή ROS σε διακριτές υποκυτταρικές θέσεις αλλά και από τον συνεντοπισμό τους με διάφορους σηματοδοτικούς στόχους (Lassegue et al., 2012). Στην καρδιά, έχει βρεθεί πως η εξαρτώμενη από τη Nox2 ενεργοποίηση των ERK1/2 και Akt, εμπλέκεται στην ανάπτυξη υπερτροφικής καρδιοπάθειας επαγόμενης από ανταγωνιστή των υποδοχέων συζευγμένων με G πρωτεΐνες (G protein-coupled receptors, GPCRs) (Burgoyne et al., 2012). Επιπλέον, η επαγωγή της απόπτωσης μέσω των AP-1 και p38 MAPK/JNK (c-Jun N-terminal kinases) πιθανότατα με τη μεσολάβηση της Nox2, συμβάλλει στον κυτταρικό θάνατο των καρδιακών μυοκυττάρων και την αναδιαμόρφωση των κοιλιών στην καρδιακή ανεπάρκεια (Yamaguchi et al., 2003).

Ακόμη, η θειορεδοξίνη (thioredoxin, Trx) , είναι ένα μόριο απαραίτητο για τη ρύθμιση της οξειδοαναγωγής των πρωτεϊνικών θειολών. Φέρει δύο συντηρημένες κυστεΐνες, οι οποίες μπορούν να σχηματίσουν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό. Η Trx ανάγει τις οξειδωμένες θειόλες των πρωτεϊνών-στόχων, μέσω αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να οξειδώνεται η ίδια. Στη συνέχεια, ανάγεται ξανά από την αντίστοιχη αναγωγή μέσω αντίδρασης που εξαρτάται από το NADPH και το φλαβιν-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (flavin adenine dinucleotide, FAD) . Επομένως, οι Trxs και οι υπεροξυρεδοξίνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν ιδιαίτερα με το  $H_2O_2$ , μπορούν να λειτουργήσουν ως τελεστές στην μετάδοση των σημάτων από αυτό

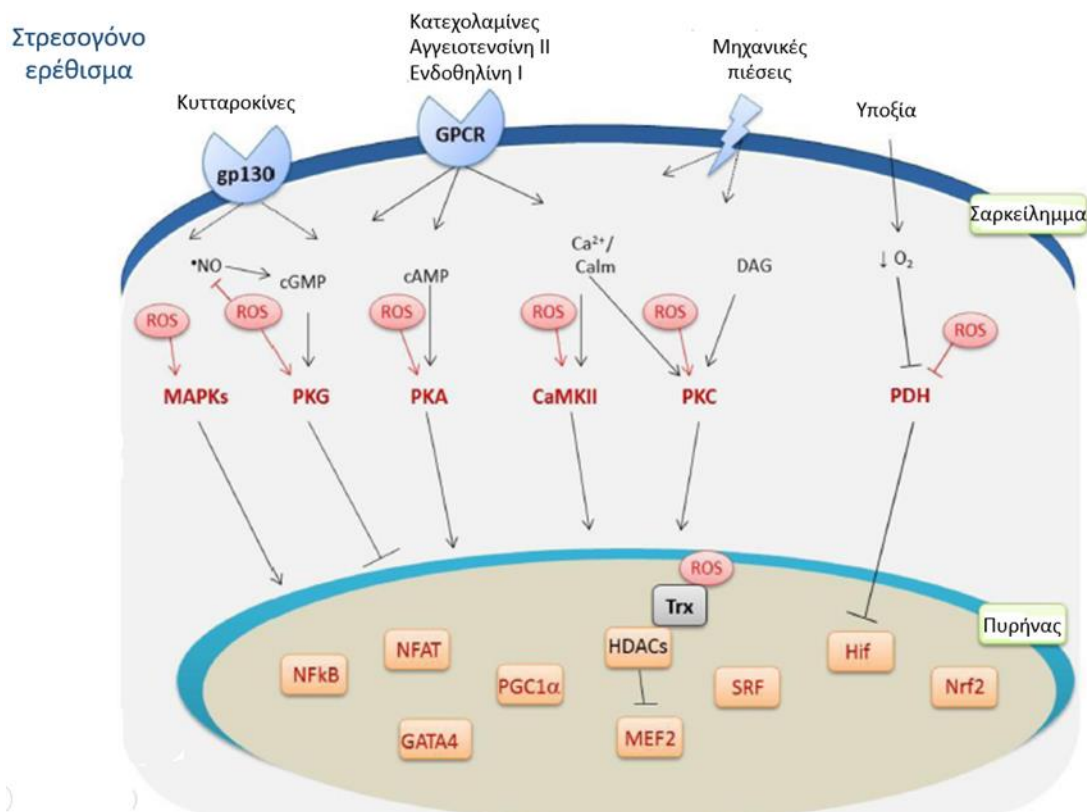
(Sobotta et al., 2015). Δυσλειτουργία των Trx1/2 σχετίζεται με την αυξημένη παραγωγή ROS και την καρδιακή αναδιαμόρφωση, ενώ από την άλλη, υπερέκφραση της Trx1 επάγει την καρδιακή υπετροφία (Stanley et al., 2011).

### **I.A.3 ROS και μεταγωγή σήματος**

Πληθώρα εργασιών αναφέρουν το ρόλο των δραστικών ριζών οξυγόνου, των υπεροξειδίων και άλλων δραστικών ριζών που σχηματίζονται σε πρωτεΐνες, λιπίδια και μόρια DNA, σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος.

#### **I.A.3.1 ROS και σηματοδοτικά μονοπάτια στην καρδιά**

Έως σήμερα, έχει ταυτοποιηθεί πληθώρα μοριακών στόχων κατά την σηματοδότηση από τις δραστικές ρίζες οξυγόνου, σε περιπτώσεις όπως η καρδιακή ανεπάρκεια και άλλες καρδιακές δυσλειτουργίες. Τα στρεσογόνα ερεθίσματα που μπορεί να δεχτεί η καρδιά, τα κυρίαρχα σηματοδοτικά μόρια που επηρεάζονται, καθώς και τα μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται, παρουσιάζονται στην εικόνα I.2. Συγκεκριμένα, το υπερμοριακό σύμπλοκο CaMKII, αποτελεί πολυ-λειτουργική κινάση, η οποία σχετίζεται με τον καρδιακό ρυθμό και την συστολή της καρδιάς. Οξείδωση της κινάσης αυτής φαίνεται να συμβάλλει στον αυξημένο κυτταρικό θάνατο των καρδιακών μυοκυττάρων και την καρδιακή ανεπάρκεια, ύστερα από έμφραγμα ή χρόνιο στρες από την αγγειοτενσίνη II (Erickson et al., 2008). Η πρωτεϊνική κινάση G (protein kinase G, PKG) είναι μια ομοδιμερής κυτταροπλασματική κινάση, η οποία στα καρδιακά κύτταρα φέρει τουλάχιστον 5 κυστεΐνες που είναι ευάλωτες σε οξείδωση. Η οξείδωση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε ενδομοριακούς δεσμούς που συνεπάγονται συνεχόμενη ενεργοποίηση της κινάσης. Η διαδικασία αυτή έχει συσχετιστεί με την καρδιακή ανεπάρκεια επαγόμενη από το αιμοδυναμικό στρες (Nakamura et al., 2015). Από την άλλη, η ετεροτετραμερής κινάση PKA ενεργοποιείται από τη κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) και αποτελεί κεντρικό ρυθμιστή της καρδιακής συστολής. Οξείδωση της, οδηγεί σε συνεχή ενεργοποίηση της απουσία cAMP γεγονός που έχει συσχετιστεί με την αγγειογένεση και την ισχαιμία (Burgoyne et al., 2015). Τα ένζυμα που έχουν αυτοτελή δομική περιοχή υδροξυλάσης προλίνης (Prolyl hydroxylase domain, PHD enzymes), χρησιμοποιούν το O<sub>2</sub> για την υδροξυλίωση καταλοίπων προλίνης των πρωτεϊνών. Η υδροξυλίωση της προλίνης του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1 (hypoxia inducible factor 1, HIF-1) επάγει την αποικοδόμηση του στο πρωτεάσωμα. Στην καρδιά, ο HIF-1, επάγεται σε συνθήκες υποξίας ή χρόνιας αιμοδυναμικής πίεσης και ενεργοποιεί διαδικασίες όπως η αγγειογένεση. Η υποξία και οι ROS μπορεί να μειώνουν τη δράση της PHD και άρα να επάγουν τον HIF-1, ο οποίος δρα προστατευτικά. Ωστόσο, παρατεταμένη αναστολή της PHD έχει συσχετιστεί με μυοκαρδιοπάθειες (Moslehi et al., 2010). Τέλος, οι επαγόμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (mitogen activated protein kinases, MAPKs), ως κινάσες που επάγονται από το στρες, έχουν συσχετιστεί με την απόπτωση των καρδιακών κυττάρων εξαιτίας του οξειδωτικού στρες και με την αναδιαμόρφωση των κοιλιών κατά την καρδιακή ανεπάρκεια (Burgoyne et al., 2012).



**Εικόνα 1.2** ROS και σηματοδοτικά μονοπάτια στην καρδιά. Απεικονίζονται τα κυριότερα μόρια τελεστές που επάγονται εξαιτίας στρεσογόνων ερεθισμάτων καθώς και η εμπλοκή των δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) στα μονοπάτια που ενεργοποιούνται στην καρδιά (Santos et al., 2011).

### 1.A.3.2 ROS και MAPKs

Οι επαγόμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) περιλαμβάνουν τις ρυθμιζόμενες από εξωκυτταρικά σήματα κινάσες (extracellular signal-regulated kinases 1/2, ERK1/2), τις c-Jun αμινοτελικές κινάσες (c-Jun N-terminal kinases, JNKs), την p38 MAPK και την μεγάλη MAP κινάση 1 (Big MAPK1/extracellular signal related kinase 5, BMK1/ERK5), οι οποίες αποτελούν κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAP κινασών παίζουν κυρίαρχο ρόλο σε πληθώρα κυτταρικών διαδικασιών, όπως η κυτταρική αύξηση, η διαφοροποίηση, η ανάπτυξη, ο κυτταρικός κύκλος, η επιβίωση αλλά και ο κυτταρικός θάνατος (Zhang et al., 2016). Το γενικό μονοπάτι ενεργοποίησης των MAPKs περιλαμβάνει την αρχική ενεργοποίηση μιας κινάσης της κινάσης της MAP κινάσης (MAP kinase kinase kinase, MAPKKK) από εξωκυτταρικό ή ενδοκυτταρικό σήμα, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μια κινάση της MAP κινάσης (MAP kinase kinase, MAPKK) που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μια MAPK. Οι ενεργοποιημένες MAPKs, φωσφορυλιώνουν μια σειρά από υποστρώματα με αποτέλεσμα την ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών δραστηριοτήτων (Kyriakis & Avruch, 2001; Pimienta & Pascual, 2007).

Το μονοπάτι των ERKs, επάγεται κυρίως από αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες, ενώ η ενεργοποίησή του σχετίζεται με την επαγωγή υποδοχέων-κινασών

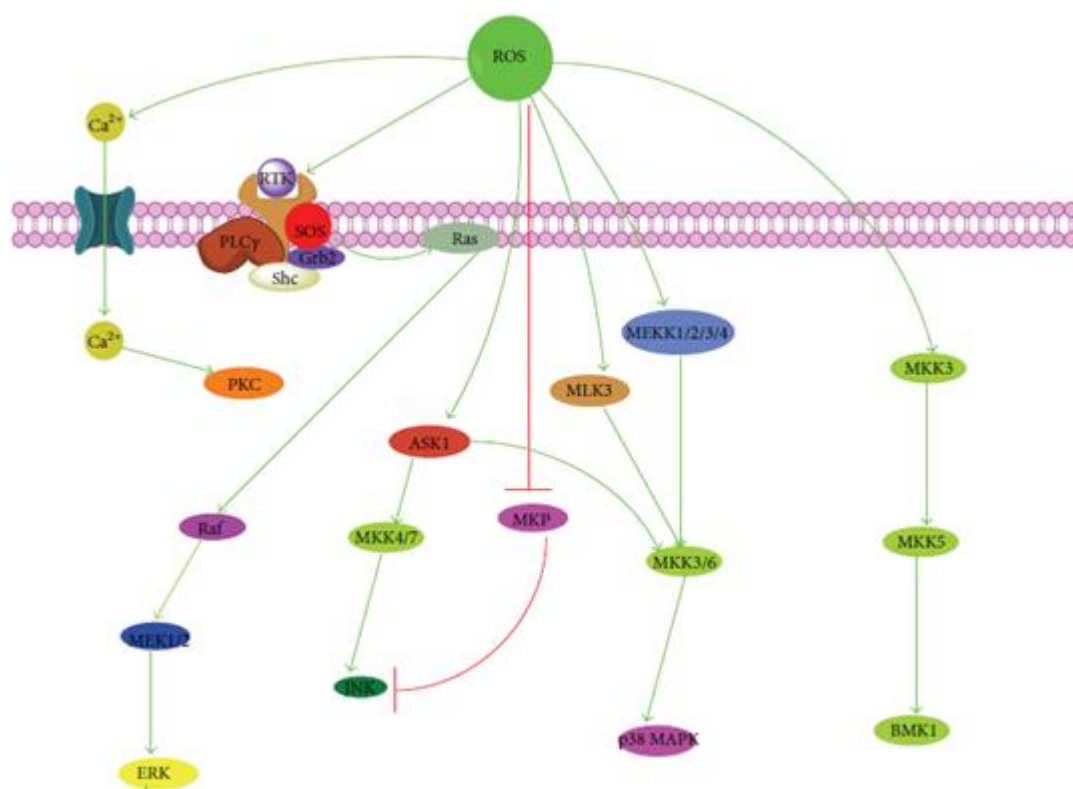
τυροσίνης. Η σύνδεση υποδοχέα-προσδέτη επάγει την αντικατάσταση της διφωσφορικής γουανωσίνης (guanosine diphosphate, GDP) της Ras με τριφωσφορική γουανωσίνη (guanosine triphosphate, GTP) και άρα την ενεργοποίηση της Ras. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την στρατολόγηση της κυτταροπλασματικής Raf (MAPKKK) στην πλασματική μεμβράνη. Η Raf φωσφορυλιώνει τις MEK1/2 (MAPK/ERK kinase, MAPKK), που με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τις ERK1/2 (MAPK). Οι ERKs μετατοπίζονται στον πυρήνα και ενεργοποιούν διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες (Ho et al., 1998). Οι ROS, φαίνεται να ενεργοποιούν τους υποδοχείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor, EGF) και του προερχόμενου από τα αιμοπετάλια αυξητικού παράγοντα (platelet-derived growth factor, PDGF), απουσία του προσδέτη, επάγοντας έτσι το επακόλουθο μονοπάτι ενεργοποίησης των ERKs (Lei & Kazlauskas, 2009; Leon-Buitimea et al., 2012). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> οδηγεί στην φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της ισομορφής γ της φωσφολιπάσης C του φωσφοϊνοσιτιδίου (Phosphoinositide phospholipase Cγ, PLCγ) που συμμετέχει στην παραγωγή τριφωσφορικής ινοσιτόλης (inositol triphosphate, IP3) και διακυλογλυκερόλης (diacylglycerol, DAG). Η IP3 συμβάλλει στην αύξηση του ενδοκυττάριου ασβεστίου και την μετέπειτα ενεργοποίηση των ERKs, ενώ η DAG και τα Ca<sup>2+</sup> μεσολαβούν στην ενεργοποίηση της PKC, η οποία οδηγεί στην αύξηση της δράσης των Ras/Raf (Banan et al., 2001; Franklin et al., 2000). (Εικόνα Ι.3)

Το μονοπάτι των JNKs ενεργοποιείται από περιβαλλοντικές πιέσεις (πχ οξειδωτικό στρες) και κυτταροκίνες, και περιλαμβάνει αντίστοιχο καταρράκτη αντιδράσεων με αυτό των ERKs. MAPKKKs στο μονοπάτι αυτό είναι οι MEKK1, MEKK2, MEKK3, MEKK4, η κινάση-ρυθμιστής του αποπτωτικού σήματος (Apoptosis signal-regulating kinase, ASK) και η κινάση μικτής γραμμής (mixed lineage kinase, MLK), ενώ MAPKKs είναι οι MKK3, MKK4, MKK6 και MKK7 (Davies & Tournier, 2012). Η εμπλοκή των ROS στο μονοπάτι, φαίνεται να σχετίζεται με τη δράση τους στη θειορεδοξίνη και την γλουταρεδοξίνη, οξειδοαναγωγικά-ευαίσθητες πρωτεΐνες, ώστε αυτές να αποσυνδεθούν από την ASK-1 για την ενεργοποίηση της τελευταίας και άρα την επαγωγή των JNKs. Επιπλέον, οι ROS μπορεί να επάγουν την αποδέσμευση των JNKs από την S-τρανσφεράση p1 της γλουταθειόνης (Glutathione S-transferase P, GSTP), η οποία όταν αλληλεπιδρά με τις JNKs τις αναστέλλει. Ακόμη, οι ROS επιτρέπουν τον ολιγομερισμό και αυτοφωσφορυλίωση της ASK1, και άρα ενεργοποίηση της, μέσω οξείδωσης της θειορεδοξίνης η οποία προσδένεται στο αμινοτελικό άκρο της ASK1 και την αναστέλλει (Castro-Caldas et al., 2012; Katagiri et al., 2010). (Εικόνα Ι.3) Η μεσολαβούμενη, από τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor receptor, TNFR), ενεργοποίηση των JNKs θεωρείται ότι περιλαμβάνει, εν μέρει, ρίζες οξυγόνου, αφού αναστολείς των ριζών αυτών, εμποδίζουν την ενεργοποίηση των κινασών. Τέλος, είναι πιθανό ότι χαμηλά επίπεδα ROS, δεν επηρεάζουν την δραστηριότητα φωσφατάσης, με αποτέλεσμα την παροδική ενεργοποίηση των JNKs. Αντιθέτως, υψηλότερα επίπεδα ROS μπορεί να απενεργοποιήσουν τις φωσφατάσες συμβάλλοντας σε παρατεταμένη ενεργοποίηση των JNKs.

Το μονοπάτι της p38 ενεργοποιείται από εξωκυττάρια πιέσεις, αυξητικούς παράγοντες και κυτταροκίνες όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α και η ιντερλευκίνη 1β (tumor necrosis factor, TNF-α, interleukin 1β, IL-1β). Η ενεργοποίηση

από τον TNFR περιλαμβάνει την πρωτεΐνη ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης (Cell division control protein 42, cdc42), ενώ από τους αυξητικούς παράγοντες τις Ras και Rac1. Οι μικρές G-πρωτεΐνες Rac1 και cdc42 ενεργοποιούν τις ASK1 και MLK3 που ενεργοποιούν απευθείας τις MKK3 και MKK6. Οι τελευταίες φωσφορυλιώνουν την p38 σε κατάλοιπα τυροσίνης και θρεονίνης, με συνέπεια την ενεργοποίησή της. Κάποια αρχικά μόρια του μονοπατιού (πχ ASK1) είναι κοινά με το μονοπάτι των JNKs. Το οξειδωτικό στρες επηρεάζει είτε άμεσα, είτε έμμεσα τις ASK1, MEKK1, MEKK2, MEKK3, MEKK4 και MLK3, συνεπώς και το μονοπάτι της p38 (Cuadrado & Nebreda, 2010). (Εικόνα 1.3)

Η BMK1/ERK5 (Big mitogen-activated protein kinase 1, BMK1)/extracellular signal regulated kinase 5, ERK5) έχει συσχετιστεί με την κυτταρική επιβίωση, την αντι-αποπτωτική σηματοδότηση, την αγγειογένεση, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό, ενώ αποτελεί τη λιγότερο μελετημένη MAPK. Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μπορεί να επηρεάζει την BMK1 μέσω της άμεσης ενεργοποίησης των MEKK2-3. Έπειτα, ενεργοποιούνται οι MEK5 και BMK1 και η τελευταία δρα σε διάφορα υποστρώματα, όπως c-Myc και πιθανώς, Nrf2 (avian myelocytomatosis viral oncogene homolog, c-Myc, Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, Nrf-2). (Εικόνα 1.3)



**Εικόνα 1.3** ROS και MAPKs. Απεικονίζονται τα μονοπάτια ενεργοποίησης των μελών των MAPKs και ο ρόλος των δραστικών ριζών οξυγόνου σε αυτά (Jixiang Zhang et al., 2016).

## **I.B Απόπτωση**

### **I.B.1 Γενικά για την απόπτωση**

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ή απόπτωση, διακρίνεται βάσει συγκεκριμένων μορφολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών. Αποτελεί κρίσιμη διαδικασία για την ανάπτυξη, την ομοιόσταση αλλά και την παθογένεια ποικίλων ασθενειών (Hotchkiss et al., 2009). Ο κυτταρικός θάνατος με την έννοια της απόπτωσης, εισήχθη για πρώτη φορά το 1972 από τους Kerr και συνεργάτες, (Kerr et al., 1972) και έκτοτε, οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί γύρω από το συγκεκριμένο θέμα, έχουν αποκαλύψει πληθώρα μηχανισμών, μορίων τελεστών και σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή. Αρχικά, ο ορισμός της απόπτωσης βασιζόταν σε μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως η συμπύκνωση και κατάτμηση της χρωματίνης, συμπύκνωση του πυρηνοπλάσματος και του κυτταροπλάσματος, η συρρίκνωση του κυττάρου και ο σχηματισμός των αποπτωτικών σωματιδίων τα οποία, τελικώς, φαγοκυττάρωνονται (Elmore, 2007b). Η φαγοκυττάρωση από γειτονικά φαγοκύτταρα ή παρεγχυματικά κύτταρα, είναι κρίσιμη ώστε να αποφευχθεί η φλεγμονή και η βλάβη στα περιβάλλοντα κύτταρα, ενώ το σήμα για την αναγνώριση των αποπτωτικών σωματιδίων είναι η εξωτερικευμένη φωσφατιδυλοσερινή (Arandjelovic & Ravichandran, 2015). Έπειτα, με την πρόοδο στις μελέτες των μηχανισμών που διέπουν το συγκεκριμένο φαινόμενο, οι διάφοροι τύποι κυτταρικού θανάτου διακρίνονται βάσει των βιοχημικών τους χαρακτηριστικών. Οι μοριακές αλλαγές που επάγονται κατά την απόπτωση, περιλαμβάνουν, κατά κύριο λόγο, μια σειρά από ελεγχόμενες θραύσεις πρωτεϊνών-στόχων που επιτελούν κρίσιμες λειτουργίες για τα κύτταρα, οι οποίες πραγματοποιούνται από μια ομάδα πρωτεασών σερίνης που ονομάζονται κασπάσες (Green & Llamby, 2015). Αν μπορούσε, λοιπόν, να δοθεί ένας ορισμός για την απόπτωση, αυτός θα αναφερόταν σε μια ελεγχόμενη, εξαρτώμενη από κασπάσες, προγραμματισμένη μορφή κυτταρικού θανάτου. Φυσικά, υπάρχουν κι άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου, όπως ο αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος και η νέκρωση (Galluzzi et al., 2015).

Οι μηχανισμοί της απόπτωσης είναι ιδιαίτερα πολύπλοκοι και περιλαμβάνουν ενεργειακά-εξαρτώμενους «καταρράκτες» μεταγωγής σήματος. Δύο είναι τα βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια επαγωγής της απόπτωσης: το εσωτερικό ή μέσω υποδοχέα θανάτου και το εξωτερικό ή μιτοχονδριακό μονοπάτι (Sinha et al., 2013). Υπάρχουν, βέβαια, δεδομένα που υποστηρίζουν την αλληλεπίδραση των δύο αυτών μονοπατιών μέσω κοινών μορίων τελεστών. Ακόμη, αναφέρεται και η ύπαρξη ενός επιπρόσθετου αποπτωτικού μονοπατιού, το οποίο περιλαμβάνει την κυτταροτοξική δράση των T-λεμφοκυττάρων και την εξόντωση του κυττάρου μέσω του μηχανισμού περφορίνης-granzyme A ή B (Voskoboinik et al., 2015). Και τα τρία μονοπάτια, συγκλίνουν τελικά στην ενεργοποίηση των κασπασών-εκτελεστών, οι οποίες είναι ουσιώδεις για την εκτέλεση της απόπτωσης, αφού προκαλούν τη θραύση πολλών πρωτεϊνών και συμβάλλουν στην αποσυγκρότηση του κυττάρου. Οι κασπάσες, εκφράζονται με τη μορφή ανενεργών προ-κασπασών σχεδόν σε όλα τα κύτταρα, ενώ μετά από σήμα απόπτωσης διασπώνται σε κασπάσες με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους. Έπειτα, διεγείρουν διαδοχικά κι άλλες καταρροϊκές κασπάσες, επάγοντας έτσι έναν καταρράκτη πρωτεασών, ώστε το αρχικό σήμα της απόπτωσης να πολλαπλασιαστεί και να οδηγήσει, τελικά, σε ταχύ κυτταρικό θάνατο (Shalini et al., 2015).



Το εσωτερικό μονοπάτι, το οποίο ονομάζεται και μιτοχονδριακό, επάγεται από μια σειρά μη μεσολαβούμενων από υποδοχείς ερεθισμάτων όπως η έλλειψη αυξητικών παραγόντων, ορμονών και κυτταροκινών που αναστέλλουν την απόπτωση, οι ακτινοβολίες, οι τοξίνες, η υποξία, υπερθερμία, οι ιϊκές λοιμώξεις, και διάφορες ενδοκυτταρικές συνθήκες στρες, όπως το οξειδωτικό στρες, οι συγκεντρώσεις  $Ca^{2+}$  και οι βλάβες στο DNA (Vyas et al., 2013). Τα ερεθίσματα αυτά επάγουν ενδοκυτταρικά σήματα που μπορούν να οδηγήσουν σε αλλαγή της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, με το σχηματισμό σε αυτήν, πόρων· μια διαδικασία που μεσολαβείται από τα μόρια Bcl-2 σχετιζόμενη πρωτεΐνη X/Bcl-2 ομόλογη πρωτεΐνη ανταγωνιστής/«δολοφόνος» (Bcl-2-associated X protein/Bcl-2 homologous antagonist/killer, Bax/Bak). Ως αποτέλεσμα, διαταράσσεται το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης και απελευθερώνεται κυτόχρωμα c από τα μιτοχόνδρια στο κυτοσόλιο. Το τελευταίο, σε συνδυασμό με τον παράγοντα 1 ενεργοποίησης της αποπτωτικής πρωτεάσης (Apoptotic protease activating factor 1, Apaf1) και την προκασπάση 9, σχηματίζουν το αποπτώσωμα για την ενεργοποίηση της κασπάσης 9. Σε επόμενο χρόνο, αφού το κύτταρο καταδικαστεί σε θάνατο, απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια και άλλοι προ-αποπτωτικοί παράγοντες όπως ο παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης (Apoptosis inducing factor, AIF), η ενδονουκλεάση G και η ενεργοποιούμενη από κασπάση DNάση (Caspase-Activated DNase, CAD), οι οποίοι σχετίζονται με την θραύση του DNA (Sinha et al., 2013). Η ρύθμιση των παραπάνω διαδικασιών πραγματοποιείται μέσω των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, η οποία περιλαμβάνει τόσο προ-αποπτωτικά, όσο και αντι-αποπτωτικά μόρια (Siddiqui et al., 2015).

Από την άλλη, το εξωτερικό μονοπάτι, επάγεται από εξωκυτταρικά στρεσογόνα ερεθίσματα και μεσολαβείται από υποδοχείς θανάτου (death receptors, DR) (Vyas et al., 2013). Τα τρία βασικά μόρια-προσδέτες είναι ο TNF- $\alpha$ , ο προσδέτης του υποδοχέα Fas (Fas ligand, FasL) και ο σχετιζόμενος με τον TNF-προσδέτης που αποτελεί επαγωγέα της απόπτωσης (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL), οι οποίοι προσδένονται στους αντίστοιχους υποδοχείς τους, TNFR1, Fas και TRAILR1/2. Στη συνέχεια, οι υποδοχείς θανάτου προσελκύουν μόρια προσαρμογής που φέρουν τις περιοχές θανάτου, μέσω των οποίων αλληλεπιδρούν. Κατά τη σηματοδότηση που επάγεται από τον FasL, προσελκύεται το μόριο FADD που αποτελεί μια Fas σχετιζόμενη πρωτεΐνη με περιοχή θανάτου (Fas-associated protein with death domain, FADD). Ομοίως, από τον TNF- $\alpha$  προσελκύεται το μόριο TRADD, που είναι μια πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τον TNFR1 με περιοχή θανάτου (TNFR1-associated death domain protein, TRADD), μέσω των FADD και μιας πρωτεΐνης αλληλεπίδρασης με υποδοχέα (receptor-interacting protein, RIP). Ο FADD, στη συνέχεια, συνδέεται με την προ-κασπάση 8 σε ένα συμπλόκο σηματοδοτικής επαγωγής θανάτου (death-inducing signaling complex, DISC), οδηγώντας στην αυτο-καταλυτική ενεργοποίηση της προ-κασπάσης 8 σε κασπάση 8. Οι ενεργήτριες κασπάσες 8 και 9, επάγουν την περαιτέρω ενεργοποίηση των κασπασών-τελεστών 3, 6 και 7, με αποτέλεσμα την διάσπαση κρίσιμων κυτταρικών υποστρωμάτων και τελικώς, τον αποπτωτικό θάνατο του κυττάρου (Sinha et al., 2013). Η αναστολή του εξωτερικού μονοπατιού της απόπτωσης μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω μιας κυτταρικής πρωτεΐνης αναστολέα τύπου FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme, c-FLIP), η οποία προσδένεται στο σύμπλοκο FADD/κασπάση-8, με αποτέλεσμα να το καθιστά ανενεργό.

Τόσο το εξωτερικό, όσο και το εσωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης καταλήγουν στην ενεργοποίηση κασπασών-εκτελεστών οι οποίες, ουσιαστικά,

σημαίνουν την έναρξη της φάσης της απόπτωσης. Οι εκτελεστικές κασπάσες ενεργοποιούν κυτταροπλασματικές ενδονουκλεάσες που διασπούν πυρηνικά υλικά, καθώς και πρωτεάσες που αποικοδομούν πυρηνικές και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Οι κασπάσες 3, 6 και 7 αποτελούν τις εκτελεστικές κασπάσες, οι οποίες διασπούν πληθώρα υποστρωμάτων με αποτέλεσμα τις μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές που χαρακτηρίζουν τα αποπτωτικά κύτταρα. Ιδιαίτερα η κασπάση 3, φαίνεται να είναι η σημαντικότερη εκτελεστική κασπάση και ενεργοποιείται από οποιαδήποτε από τις αρχικές κασπάσες 8,9, ή 10. Η δράση της σχετίζεται τόσο με την αποικοδόμηση του χρωμοσωμικού DNA μέσω της CAD, όσο και με την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και το σχηματισμό των αποπτωτικών σωματίων (Shalini et al., 2015).

Το τελικό στάδιο της απόπτωσης είναι η εγκόλπωση των αποπτωτικών σωματίων από τα φαγοκύτταρα. Το σήμα για την φαγοκυττάρωση είναι η μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης από την εσωτερική πλασματική μεμβράνη, όπου βρίσκεται φυσιολογικά, στην εξωτερική, δηλαδή στην επιφάνεια των αποπτωτικών κυττάρων. Ο μηχανισμός μετατόπισης της φωσφατιδυλοσερίνης δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Ωστόσο, σε ερυθροκύτταρα που υπόκεινται σε οξειδωτικό στρες, η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης φαίνεται να ρυθμίζεται από τον Fas, την κασπάση-8 και την κασπάση-3, ενώ στα πρώιμα T-λεμφοκύτταρα η εξωτερίκευση της είναι ανεξάρτητη από κασπάσες (Kay & Grinstein, 2013).

### **I.B.2 Φυσιολογικός και παθολογικός ρόλος της απόπτωσης**

Η απόπτωση, φυσιολογικά, είναι εξίσου σημαντική με την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Για να διατηρηθεί η ομοιόσταση οποιουδήποτε οργανισμού, καθημερινά προκύπτει ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων ώστε να αντικατασταθούν τα αποπίπτοντα κύτταρα. Μάλιστα, ο αριθμός αυτός αυξάνεται όσο αυξάνονται και τα κύτταρα που υπόκεινται σε απόπτωση, είτε κατά τις φυσιολογικές διαδικασίες της ανάπτυξης και της γήρανσης, είτε σε περιπτώσεις ασθενειών (Elmore, 2007a).

Η σημασία της απόπτωσης στις αναπτυξιακές διαδικασίες είναι αναμφισβήτητη. Για παράδειγμα, το νευρικό και το ανοσοποιητικό σύστημα σχηματίζονται μέσω υπερπαραγωγής κυττάρων στα οποία πρέπει, στη συνέχεια, να γίνει επιλογή εκείνων που είναι λειτουργικά ή σωστά εξειδικευμένα, αντίστοιχα. Επομένως, τα υπόλοιπα, πρέπει να απομακρυνθούν «αθόρυβα» από τον οργανισμό, γεγονός που επιτυγχάνεται μέσω της απόπτωσης (Nijhawani et al., 2000; Opferman & Korsmeyer, 2003). Επιπλέον, είναι κρίσιμη η απομάκρυνση εκείνων των κυττάρων του οργανισμού που έχουν προσβληθεί από παθογόνα, ώστε να επιτευχθεί η επούλωση τραυμάτων και να αποφευχθούν οι μολύνσεις (Greenhalgh, 1998). Ακόμη, στις περιπτώσεις κυττάρων του ανοσοποιητικού που αναγνωρίζουν και επιτίθενται σε εαυτά κύτταρα, είναι απαραίτητη η απομάκρυνση τους από τον οργανισμό, ώστε να αποφευχθούν αυτοάνοσες ασθένειες (Osborne, 1996). Τέλος, είναι γνωστό πως η αύξηση της ηλικίας σχετίζεται με την επαγόμενη από οξειδωτικό στρες γήρανση των κυττάρων, με αποτέλεσμα να αυξάνεται και ο ρυθμός απομάκρυνσης τους, μέσω της απόπτωσης (Ozawa, 1995).



Είναι προφανές πως ο ρυθμός της απόπτωσης πρέπει να είναι αυστηρά ελεγχόμενος, καθώς διαταραγμένος κυτταρικός θάνατος μπορεί να επάγει παθολογικές καταστάσεις, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται διάφορες αναπτυξιακές ανωμαλίες, αυτοάνοσα νοσήματα, νευροεκφυλιστικές ασθένειες και καρκίνος (Elmore, 2007a). Στον καρκίνο για παράδειγμα, που χαρακτηρίζεται από απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, η καταστολή της απόπτωσης αποτελεί κυρίαρχη «στρατηγική» των καρκινικών κυττάρων για την ανάπτυξη του όγκου (Abend, 2003). Από την άλλη, τα αυτοάνοσα νοσήματα, μπορεί να σχετίζονται είτε με την αναστολή της απόπτωσης, όπως στην περίπτωση του αυτοάνοσου λεμφοπολλαπλασιαστικού συνδρόμου (autoimmune lymphoproliferative syndrome, ALPS) (Worth et al., 2006), είτε με την ανεξέλεγκτη απόπτωση, όπως συμβαίνει στη επίκτητη ανοσολογική ανεπάρκεια (AIDS) (Estaquier et al., 2013). Επιπροσθέτως, στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως στην νόσο του Alzheimer, βασικό χαρακτηριστικό της παθογένειας της είναι η απόπτωση των νευρώνων (Ethell & Buhler, 2003). Τέλος, η μη ελεγχόμενη απόπτωση έχει συσχετιστεί εκτενώς με ποικίλες βλάβες που προκαλούνται από την ισχαιμία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, είναι η ισχαιμία του μυοκαρδίου που προκαλείται από ανεπαρκή αιμάτωση του μυ, με αποτέλεσμα τη μείωση της οξυγόνωσης και τον επικείμενο θάνατο των καρδιακών μυοκυττάρων (Hochhauser et al., 2003). Παρότι στην περίπτωση της παρατεταμένης ισχαιμίας παρατηρείται κυρίως νέκρωση, διάφορες θεραπείες που στοχεύουν στην αναστολή της απόπτωσης στον καρδιακό ιστό κατά την ισχαιμία, επιτυγχάνουν μείωση στην έκταση της καταστροφής του (Freude et al., 2000).

### **1.B.3 Απόπτωση στην καρδιά**

Το μυοκάρδιο αποτελείται από πλήρως διαφοροποιημένα καρδιακά μυοκύτταρα τα οποία είναι υπεύθυνα για την συσταλτική λειτουργία. Εφόσον η καρδιά έχει περιορισμένες δυνατότητες αναπλήρωσης των κυττάρων της, είναι σημαντικό να διατηρείται η μάζα του καρδιακού μυ, ώστε να επιτυγχάνεται και η σωστή του λειτουργία (Daniell, 2012). Επομένως, γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι απώλεια των κυττάρων του, μέσω ανεξέλεγκτου κυτταρικού θανάτου, σχετίζεται άμεσα με παθολογικές καταστάσεις. Σε διαγωνιδιακά ποντίκια με διαρκώς ενεργή κασπάση στο μυοκάρδιο, παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό των κυττάρων που αποπίπτουν, αν και πάρα πολύ μικρό, είναι ικανό να προκαλέσει θανατηφόρο διατακτική μυοκαρδιοπάθεια. Υποτέθηκε έτσι, ότι η απόπτωση των καρδιακών μυοκυττάρων αποτελεί μηχανισμό της παθογένειας της καρδιακής ανεπάρκειας (Wencker et al., 2003). Έπειτα, η αυξημένη απώλεια καρδιακών κυττάρων έχει συσχετιστεί έντονα και με άλλες καρδιαγγειακές ασθένειες όπως είναι η ισχαιμία/επανοξυγόνωση (I/R) και το έμφραγμα (Appukuttan et al., 2012; Rosca et al., 2012; Skemienne et al., 2013), ενώ και άλλες μελέτες τονίζουν τον κρίσιμο ρόλο της απόπτωσης στην συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια. Η απώλεια των κυττάρων της καρδιάς συμβαίνει κυρίως μέσω απόπτωσης και νέκρωσης. Τόσο η οξεία απώλεια σημαντικού αριθμού καρδιακών μυοκυττάρων, όσο και η χρόνια απώλεια μικρού αριθμού κυττάρων μέσω απόπτωσης, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας (Wencker et al., 2003). Επιπλέον, και η νέκρωση εξαιτίας της απορρύθμισης των επιπέδων του  $Ca^{2+}$  έχει συνδεθεί με την δυσλειτουργία της καρδιάς και την πρόοδο της καρδιακής ανεπάρκειας (Nakayama et al., 2007). Ανέκαθεν, έχει δοθεί μεγάλη σημασία στις πρωτεΐνες των μιτοχονδρίων καθώς και στα μόρια που εμπλέκονται στους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου, ώστε να εφαρμοστούν θεραπευτικές προσεγγίσεις έναντι των καρδιακών νόσων. Πληθώρα

μελετών που χρησιμοποιούν διάφορα μοντέλα, αποδεικνύουν την αύξηση του αποπτωτικού θανάτου των κυττάρων του μυοκαρδίου κατά την I/R. (Gottlieb et al., 1994; Kim et al., 2003; Maulik et al., 1998) Οι Rosca και συνεργάτες έδειξαν ότι τόσο η πρόκληση ισχαιμίας/επανοξυγόνωσης, όσο η επίδραση με εξωγενή οξειδωτικά μόρια, προκαλούν την απόπτωση των καρδιακών μυοκυττάρων. Ωστόσο, στο ίδιο μοντέλο, δεν παρατηρήθηκε απόπτωση όταν προκλήθηκε ισχαιμία χωρίς επικείμενη επανοξυγόνωση. Επομένως, θεωρείται ότι η απόπτωση δεν επάγεται από την ισχαιμία αυτή καθαυτή, αλλά από τα περιβάλλοντα οξειδωτικά μόρια κατά την επανοξυγόνωση (Rosca et al., 2012).

Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει σημαντική πρόοδος στη διαλεύκανση των μονοπατιών που διέπουν την απόπτωση των καρδιακών μυοκυττάρων. Η πολυπλοκότητα των μονοπατιών αυτών είναι ιδιαίτερα αυξημένη, αφενός διότι εμπλέκονται πολλά μόρια τελεστές κι αφετέρου διότι τα μονοπάτια αυτά διαπλέκονται κι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (Corbalan et al., 2016). Όσον αφορά στο εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης, κατά την ισχαιμία του μυοκαρδίου εκκρίνεται TNF-α από τα περιβάλλοντα μαστοκύτταρα και μακροφάγα, ενώ ο παράγοντας αυτός συντίθεται και απελευθερώνεται και από τα ίδια τα καρδιακά μυοκύτταρα (Gilles et al., 2003). Επιπλέον, διαγονιδιακά ποντίκια με υπερέκφραση του TNF-α, έχει φανεί να αναπτύσσουν διατακτική μυοκαρδιοπάθεια (Kubota et al., 1997). Από την άλλη, η ενεργοποίηση του μονοπατιού Fas/FasL, μέσω υπερέκφρασης τους FasL, επάγει την απόπτωση των κυττάρων της καρδιάς τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, ενώ ποντίκια με λεμφοπολλαπλασιαστική μεταλλαγή, *Ipr*, που δεν εκφράζουν τον Fas εμφανίζουν μειωμένη απόπτωση και λιγότερα εμφράγματα κατά την I/R (Lee et al., 2003). Όσον αφορά στο εσωτερικό μονοπάτι, τα σημαντικά μόρια τελεστές που σχετίζονται με αυτό, φαίνεται να παίζουν κυρίαρχο ρόλο στο μυοκάρδιο. Πιο συγκεκριμένα, τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 έχουν εντοπιστεί σε πολλά μοντέλα παθήσεων της καρδιάς (Gustafsson & Gottlieb, 2007). Υπερέκφραση μιας πρωτεΐνης που ανήκει στην οικογένεια Bcl-2 και αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη 19kDa E1B του αδενοϊού (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3, BNIP3), στα μυοκύτταρα οδηγεί σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και κυτταρικό θάνατο (Hamacher-Brady et al., 2007). Αποκοπή του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis), μια πρωτεΐνη που επάγεται από την p53 και αποτελεί ρυθμιστή της απόπτωσης, φαίνεται να μειώνει την απώλεια των καρδιακών κυττάρων και την απόκριση σε I/R (Toth et al., 2006). Ποντίκια στα οποία λείπει η Bax ή υπερεκφράζουν την Bcl-2, εμφανίζουν ελάττωση της απόπτωσης και μικρότερο μέγεθος εμφράγματος μετά την I/R (Chen et al., 2001). Επομένως, είναι φανερό πως οι πρωτεΐνες Bcl-2 είναι κρίσιμοι ρυθμιστές της βιωσιμότητας των μυοκυττάρων κατά την απόκριση στο στρες.

#### **I.B.4 PARP-1 και ο ρόλος της στην απόπτωση**

Οι πολυμεράσες της πολυ-διφωσφορικής αδενοσινο-ριβόζης (poly-adenosine diphosphate ribose-polymerases, PARPs) αποτελούν μια οικογένεια ενζύμων που συμμετέχουν σε πληθώρα κρίσιμων διαδικασιών του κυττάρου όπως είναι η γονιδιακή ρύθμιση, η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, η επιδιόρθωση του DNA και η απόπτωση (Jubin et al., 2016). Εντοπίζονται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς εκτός από τις ζύμες (Schreiber et al., 2006). Ο ρόλος των ενζύμων αυτών έγκειται στην

μεταφορά μιας ή περισσότερων μονάδων ADP-ριβόζης από το νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλειοτίδιο (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD<sup>+</sup>) σε υποστρώματα, οδηγώντας στο σχηματισμό αλυσίδων πολυ-ADP-ριβόζης (poly-ADP-ribose chain, PAR chain). Το μήκος και ο αριθμός των διακλαδώσεων αυτών, ποικίλει (Lautier et al., 1993). Τα πολυμερή PAR αποικοδομούνται γρήγορα μέσω γλυκοϋδρολασών πολυ-ADP-ριβόζης (poly-ADP-ribose glycohydrolase, PARG) που καταλύουν τόσο ενδογλυκολυτικές όσο και εξωγλυκολυτικές αντιδράσεις, αλλά και μέσω της υδρολάσης-αποδέκτη της ριβόζης του ADP (ADP-ribosyl-acceptor hydrolase, ARH3) (Jubin et al., 2016). Στην οικογένεια των PARP ανήκουν 17 μέλη που φέρουν συντηρημένη καταλυτική περιοχή. Η PARP-1 είναι η πρώτη που χαρακτηρίστηκε και αποτελεί αντικείμενο πολλών μελετών λόγω του κρίσιμου ρόλου που έχει στην επιδιόρθωση του DNA και στον κυτταρικό θάνατο (Morales et al., 2014). Επίσης, αποτελεί το κυρίαρχο μόριο της οικογένειας, καταλύοντας το 80-90% της συνολικής PARυλίωσης, δηλαδή προσθήκης μονάδων πολυ-ADP-ριβόζης σε υποστρώματα. Είναι πυρηνικό ένζυμο και αποτελείται από μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA που φέρει δάκτυλα ψευδαργύρου, μια καταλυτική περιοχή με έξι β-κλώνους και μία α-έλικα όπου προσδένεται το NAD<sup>+</sup> και το γλουταμικό, καθώς και μια περιοχή αυτορρύθμισης που σχετίζεται με την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Langelier et al., 2008).

Η ενεργοποίηση της PARP-1 μπορεί να γίνει μέσω διαφόρων ερεθισμάτων με κυρίαρχο τις βλάβες στο DNA. Οι πιο καλά χαρακτηρισμένοι προσδέτες της PARP-1 είναι οι μονόκλωνες (single-strand breaks, SSBs) και οι δίκλωνες (double-strand breaks, DSBs) θραύσεις στο DNA (Eustermann et al., 2015; Woodhouse et al., 2008). Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και DNA-ανεξάρτητοι τρόποι ενεργοποίησης της PARP-1, μέσω καταρράκτη κινασών. Πιο συγκεκριμένα, η φωσφορυλιωμένη ERK2 φαίνεται να ενισχύει σημαντικά την καταλυτική δράση της PARP-1 είτε παρουσία είτε απουσία βλαβών στο DNA (Cohen-Armon et al., 2007; Kauppinen et al., 2006), ενώ η εξαρτώμενη από ασβέστιο πρωτεϊνική κινάση CaMKII, συμβάλλει στην ενεργοποίηση της PARP-1 κατά την νευρωνική ανάπτυξη (Ju et al., 2004).

Οι βλάβες στο DNA, οι οποίες μπορεί να προκληθούν από διάφορους παράγοντες, όπως είναι οι ιονίζουσες ακτινοβολίες, οι αλκυλιώσεις, το οξειδωτικό στρες κ.α. επάγουν άμεσα την δράση ADP-ριβοζυλίωσης της PARP-1. Η PARP-1 λειτουργεί ως ένα ενδογενές σύστημα επιτήρησης και αναγνώρισης βλαβών στο DNA (Scovassi & Diederich, 2004). Σε χαμηλά επίπεδα βλαβών του DNA, η PARP-1 που συνδέεται σε αυτό, προσθέτει αλυσίδες ADP-ριβόζης σε διάφορες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη χρωματίνη, αλλά και στο ίδιο της το μόριο. Το αρνητικό φορτίο των αλυσίδων έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση της από το DNA, καθιστώντας το προσβάσιμο σε επιδιορθωτικά ένζυμα. Με αυτόν τον τρόπο, το DNA επανέρχεται στη φυσιολογική του δομή και επάγεται η επιβίωση του κυττάρου (Scovassi & Diederich, 2004). Στην περίπτωση ενδιάμεσων επιπέδων βλαβών του DNA, το κύτταρο εισέρχεται σε διαδικασία απόπτωσης. Μετά την ενεργοποίησή της, η PARP, παράγει πολυμερή ADP-ριβόζης συντελώντας στην μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του νικοτιναμιδίου. Εφόσον το NAD<sup>+</sup> συμμετέχει σε ποικίλες κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες, προτείνεται ότι η κατανάλωση του επάγει την αυτοκτονία του κυττάρου (Andrabi et al., 2014). Επομένως, για να αποφευχθεί η μεγάλη κατανάλωση NAD, η PARP-1 διασπάται από τις κασπάσες 3 και 7 σε δύο θραύσματα 89 και 24 kDa (Soldani

& Scovassi, 2002), που αποτελούν αναγνωριστικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης (Donzelli et al., 1997). Το αμινοτελικό θραύσμα των 24 kDa παραμένει στον πυρήνα, διατηρεί την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, αναστέλλει την καταλυτική ενεργότητα της εναπομένουσας συνολικής πρωτεΐνης, ενώ εμποδίζει και την επιδιόρθωση του DNA. Το μεγαλύτερο θραύσμα, μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα όπου λειτουργεί ως στόχος της αυτοανοσίας, ώστε τα φαγοκυτταρωθούν τα αποπίπτοντα κύτταρα (Scovassi & Diederich, 2004). Όταν οι βλάβες στο DNA είναι ιδιαίτερα σοβαρές, τότε το κύτταρο ακολουθεί μονοπάτι προγραμματισμένης νέκρωσης μέσω της υπερ-ενεργοποίησης της PARP-1, διαφορετικό από αυτό που επάγεται από τον TNF-α (Sosna et al., 2014).

Κατά την I/R του μυοκαρδίου, φάνηκε ότι η κυτταροπλασματική E3-λιγάση της ουβικιτίνης RNF146 (ring finger protein 146) αλληλεπιδρά άμεσα με την PARP-1, επάγει την έξοδο της από τον πυρήνα και την τελική αποικοδόμηση της στο κυτταρόπλασμα. Υπερέκφραση της RNF146 φάνηκε να προστατεύει τα καρδιακά μυοκύτταρα από τον νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο που προκαλείται λόγω του οξειδωτικού στρες, αποτελώντας πιθανό θεραπευτικό στόχο στην οξειδωτική βλάβη του καρδιακού μυ (Gero et al., 2014). Από την άλλη, υπάρχει σημαντική συσχέτιση της PARP-1 με έναν ιδιαίτερο τύπο κυτταρικού θανάτου που είναι ανεξάρτητος από κασπάσες και χαρακτηρίζεται «παρθάνατος» (Yu et al., 2006). Πιο συγκεκριμένα, κατά την ενεργοποίηση της PARP-1 λόγω βλαβών του DNA από παράγοντες όπως το N-μέθυλο-D-ασπαρτικό (N-methyl-D-aspartate, NMDA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> κ.α., ο παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης AIF μετατοπίζεται από τα μιτοχόνδρια στον πυρήνα συντελώντας, έτσι, στον κυτταρικό θάνατο (Fatokun et al., 2014).

Η PARP-1 έχει συσχετιστεί και με την νευρωνικό θάνατο καθώς η ενεργειακή ομοιόσταση παίζει κρίσιμο ρόλο στο νευρικό σύστημα (Ha & Snyder, 2000). Σε εγκεφάλους ασθενών με νόσο του Alzheimer έχει εντοπιστεί αυξημένη ενεργότητα της PARP-1 σε νευρώνες του φλοιού και στα αστροκύτταρα, αλλά όχι στα μικρογλοιακά κύτταρα (Love et al., 1999). Είναι πιθανό, το μονοπάτι αυτοκτονίας του κυττάρου να ενεργοποιείται από την PARP-1 μέσω τη επαγόμενης συνθάσης του νιτρικού οξειδίου (Inducible nitric oxide synthase, iNOS). Έχει βρεθεί συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας της PARP-1 και του NF-κB, ο οποίος αποτελεί γενικό μεταγραφικό παράγοντα που συμμετέχει σχεδόν σε κάθε κατάσταση στρες. Μάλιστα, υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση της PARP-1 με τις υπομονάδες p65 και p50 του NF-κB, η οποία είναι απαραίτητη για την πρόσδεση στο DNA. Επειδή ο NF-κB λειτουργεί ως συμπαράγοντας για την σηματοδότηση από το iNOS και σχετίζεται με την έκφραση διαφόρων πρωτεϊνών επαγόμενων από το στρες, είναι πιθανό ότι κύτταρα που εκφράζουν iNOS υπόκεινται σε κυτταρικό θάνατο που επάγεται από το οξειδωτικό στρες και μεσολαβείται από την PARP (Chiarugi & Moskowitz, 2003; Le Page et al., 1998).

Τέλος, η PARP-1 φαίνεται να σχετίζεται και με την γονιδιακή έκφραση, ρυθμίζοντας την είτε θετικά είτε αρνητικά, γεγονός που εξαρτάται τόσο από το εκάστοτε γονίδιο, όσο και από τον κυτταρικό τύπο. Σε γενικές γραμμές, η αυξημένη πολυ-ADP-ριβοζυλίωση λειτουργεί ανασταλτικά καθώς φαίνεται να εμποδίζει την πρόσδεση διαφόρων πρωτεϊνών στο DNA ώστε να ξεκινήσει η μεταγραφή (Bauer et al., 2001; Oei et al., 1998). Ο σχηματισμός του συμπλόκου PARP-1/NF-κB ρυθμίζει

την έκφραση της ιντεγκρίνης CD11a που σχετίζεται με την μετατόπιση των μικρογλοιακών κυττάρων στις θέσεις νευρωνικής βλάβης (Ullrich et al., 2001). Επιπλέον, η συσχέτιση της PARP με την p53 φαίνεται να απαιτείται για τον έλεγχο της ακεραιότητας του DNA. Κατά την αρχική φάση της απόπτωσης, η πολυ-ριβοζυλίωση της p53 είναι πιθανό να σχετίζεται με την μεταγραφική ενεργοποίηση που μεσολαβείται από την p53 κατά το αποπτωτικό μονοπάτι (Simbulan et al., 2001). Διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία απουσιάζει η PARP-1, είναι ανθεκτικά σε σηπτικό σοκ, μέσω παρεμπόδισης του NF-κΒ. Ωστόσο, σε κύτταρα χωρίς PARP-1, η μετατόπιση του NF-κΒ στον πυρήνα δεν επηρεάζεται γεγονός που υποδηλώνει ότι η PARP-1 επιδρά στη δράση του μεταγραφικού παράγοντα (Oliver et al., 1999).

## **I.Γ NF-κΒ**

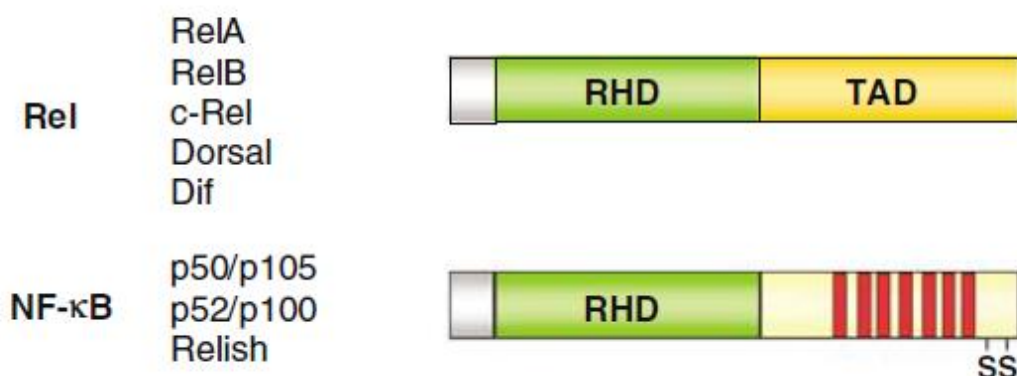
### **I.Γ.1 Γενικά για τον NF-κΒ**

Η ανακάλυψη του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ αριθμεί ήδη 30 χρόνια, όταν ο David Baltimore και οι συνεργάτες του, εντόπισαν έναν μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος συνδέεται στον υποκινητή της κ ελαφριάς αλυσίδας των ανοσοσφαιρινών στα Β λεμφοκύτταρα (Sen & Baltimore, 1986). Έκτοτε, πραγματοποιείται εκτενής μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών, των μορίων ρυθμιστών καθώς και του πλήθους των διαδικασιών στις οποίες λαμβάνει μέρος ο εν λόγω μεταγραφικός παράγοντας.

Η ευρύτερη οικογένεια NF-κΒ διακρίνεται σε δύο υποοικογένειες, τις πρωτεΐνες NF-κΒ και Rel. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες φέρουν μια ιδιαίτερα συντηρημένη περιοχή που ονομάζεται αυτοτελής δομική περιοχή Rel (Rel homology domain, RHD), ρόλος της οποίας είναι η πρόσδεση στο DNA ή/και ο διμερισμός της πρωτεΐνης (Gilmore, 1990). Στην υποοικογένεια Rel ανήκουν οι πρωτεΐνες c-Rel, Rel-B και Rel-A/p65 όσον αφορά στα θηλαστικά και Dorsal και Dif όσον αφορά στη *Drosophila*. Οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο, μια περιοχή που σχετίζεται με το μεταγραφικό τους ρόλο (Transactivation domain, TAD). Η συγκεκριμένη περιοχή είναι λιγότερο συντηρημένη μεταξύ των ειδών, παρόλα αυτά μπορεί να επάγει τη μεταγραφή σε μια ποικιλία οργανισμών συμπεριλαμβανομένης και της ζύμης. Από την άλλη, η υποοικογένεια NF-κΒ περιλαμβάνει τις p105 (NF-κΒ1), p100 (NF-κΒ2) και την Relish της *Drosophila*. Βασικό χαρακτηριστικό των μελών αυτών είναι το αρκετά επίμηκες καρβοξυτελικό τους άκρο που περιέχει πολλαπλές επαναλήψεις αγκυρίνης, οι οποίες λειτουργούν ανασταλτικά (Εικόνα I.4). Η ενεργοποίηση των NF-κΒ προϋποθέτει την μερική πρωτεόλυση των αρχικών πρωτεϊνών p100 και p105 ώστε να προκύψουν τα πεπτίδια p52 και p50, αντίστοιχα.

Η ύπαρξη της περιοχής TAD είναι απαραίτητη για την επαγωγή της μεταγραφής και η συγκεκριμένη περιοχή είναι παρούσα στις p65, c-Rel και Rel-B. Επομένως, τα μέλη της υποοικογένειας NF-κΒ, δηλαδή οι p50 και p52, δε λειτουργούν ως ενεργοποιητές της μεταγραφής-μáλλον δε την καταστέλλουν- και η επαγωγή της μπορεί να πραγματοποιηθεί παρά μόνο όταν σχηματίζουν διμερή με μέλη της υποοικογένειας Rel.

Στα κύτταρα, ο NF-κB βρίσκεται με τη μορφή διμερών, που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση των μελών της υπερικογένειας. Το ομοδιμερές p50/p50 και τα ετεροδιμερή p50/p52 και p50/p65 είναι τα πιο συχνά εμφανιζόμενα διμερή στα κύτταρα των θηλαστικών. Στην καρδιά, κυρίαρχο είναι το σύμπλοκο p50/p65.



**Εικόνα I.4 Μέλη της υπερικογένειας του NF-κB.** Οι πρωτεΐνες Rel φέρουν δύο περιοχές : την περιοχή ομολογίας Rel (RHD) και την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (TAD). Οι πρωτεΐνες NF-κB φέρουν, επίσης, την περιοχή Rel, αλλά αντί για την περιοχή TAD, διαθέτουν μια περιοχή με επαναλήψεις αγκυρίνης (Hayden & Ghosh, 2008).

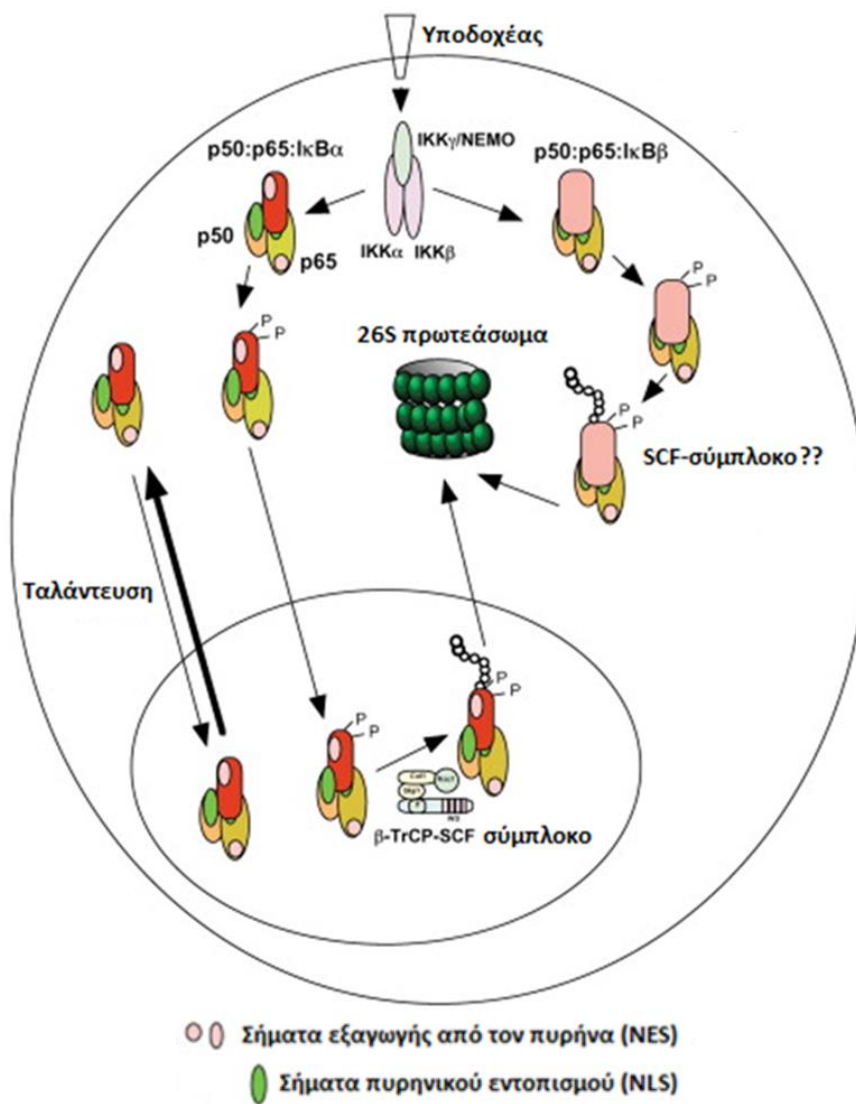
Η τοπολογία του NF-κB είναι συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση του. Συγκεκριμένα, απουσία επαγωγικών μηνυμάτων, ο NF-κB βρίσκεται ανενεργός στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένος με μια πρωτεΐνη-αναστολέα κB (κB Inhibitor, IκB,). Υπάρχουν διάφορες πρωτεΐνες-αναστολείς (IκBa, IκBβ, IκBγ, IκBe, Bcl-3, οι πρόδρομοι p100 και p105 καθώς και η Cactus της *Drosophila*) οι οποίες εμφανίζουν διαφορετική συγγένεια προς το κάθε διμερές (Ghosh et al., 1998). Η p100, μάλιστα, μπορεί να δρα είτε ως αναστολέας, είτε ως εξειδικευμένος εταίρος της Rel-B, αφού η μερική πρωτεόλυση του συνεπάγεται την παραγωγή ετεροδιμερών p50/Rel-B (Solan et al., 2002).

Ο πιο καλά μελετημένος αναστολέας είναι ο IκBa, ο οποίος αποικοδομείται ταχύτατα στο κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα, ωστόσο φαίνεται ότι το ετεροδιμερές p65/p50 είναι ο κυρίαρχος στόχος του. Όταν ο διμερής NF-κB είναι ανενεργός, σχηματίζει σύμπλοκο με τον αναστολέα με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η μετατόπιση του στον πυρήνα και η μεταγραφική του δραστηριότητα. Βέβαια, η πρόταση αυτή είναι αρκετά απλουστευμένη και η πραγματικότητα είναι αρκετά πιο περίπλοκη. Συγκεκριμένα, στο ετεροδιμερές p65/p50, ο IκBa καλύπτει το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localising Signal, NLS) μόνο της p65, ενώ αυτό της p50, παραμένει εκτεθειμένο. Το εκτεθειμένο NLS της p50 επάγει την μετατόπιση στον πυρήνα, ενώ αντίθετα οι αλληλουχίες εξαγωγής από τον πυρήνα (Nuclear Export Sequences, NES) των IκBa και p65 επάγουν την έξοδο από αυτόν. Συνεπώς πραγματοποιείται μια αδιάκοπη ταλάντευση μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος και όχι σταθερή παραμονή στο κυτταρόπλασμα (Huang et al.,

2000; Johnson et al., 1999). (Εικόνα I.5) Ωστόσο, η κυρίαρχη θέση του ανενεργού συμπλόκου είναι στο κυτταρόπλασμα καθώς η επίδραση των σημάτων NES της p65 και του IκBα υπερσχύουν του NLS της p50 (Harhaj & Sun, 1999).

Η διέγερση των κυττάρων από μια ποικιλία μηνυμάτων, επάγει διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, τα οποία έχουν ως στόχο την ενεργοποίηση μια ειδικής, για τον αναστολέα IκB, κινάσης (IκB kinase, IKK). Η IKK αποτελείται από τρεις υπομονάδες, την IKKα, την IKKβ και τον κρίσιμο ρυθμιστή του NF-κB, IKKγ/NEMO (NF-kappa-B essential modulator, NEMO) (Karin & Ben-Neriah, 2000). Οι IKKα και IKKβ είναι οι καταλυτικές υπομονάδες ενώ η IKKγ/NEMO είναι η ρυθμιστική (Rothwarf & Karin, 1999). Ρόλος της IKK είναι η φωσφορυλίωση του αναστολέα IκB η οποία επάγει την πολυουβικιτινίωση του από μια λιγάση ουβικιτίνης που ανήκει στην οικογένεια SCF (Skp-1/Cullins/F box protein). Η φωσφορυλίωση γίνεται σε δύο συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης στο αμινοτελικό άκρο του αναστολέα τα οποία στη συνέχεια αναγνωρίζονται από μια πρωτεΐνη που φέρει επαναλήψεις τρυπτοφάνης/ασπαρτικού, την β-TrCP (Ben-Neriah, 2002). Με την ουβικιτινίωση, οι αναστολείς οδηγούνται στο πρωτεάσωμα όπου και αποικοδομούνται ταχύτατα, απελευθερώνοντας τον NF-κB ώστε να μετατοπιστεί στον πυρήνα, να συνδεθεί με το DNA και να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. (Εικόνα I.5) Η IKK επίσης συμμετέχει στην επαγόμενη από φωσφορυλίωση επεξεργασία της p100 και συνεπώς στην ενεργοποίηση των διμερών p52/Rel-B (Senftleben et al., 2001).





**Εικόνα 1.5 NF-κB σε κυτταρόπλασμα και πυρήνα.** Απεικονίζεται η μετατόπιση του συμπλόκου p50/p65/IκBα στον πυρήνα και η διαρκής ταλάντευση μεταξύ των δύο διαμερισμάτων, πυρήνας-κυτοσόλιο (Hayden & Ghosh, 2008)

## Ι.Γ.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποίησης του NF-κB και κυρίαρχα μόρια τελεστές

### Ι.Γ.2.1 Κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης

Στο κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB, ύστερα από το εναρκτήριο ερέθισμα, όπως για παράδειγμα την πρόσδεση του TNF-α στον υποδοχέα του TNFR1, στρατολογούνται στον υποδοχέα πρωτεΐνες προσαρμογείς TRADD που φέρουν περιοχές θανάτου (DD, death domain), γεγονός που επιτυγχάνεται μέσω της αλληλεπίδρασης με την DD του TNFR1 (Hsu et al., 1995). Οι TRADD φέρουν περιοχές αλληλεπίδρασης με τους παράγοντες που σχετίζονται με τον TNFR (TNF receptor-associated factor, TRAF), προσελκύνοντας τους στο σύμπλοκο. Οι TRADD



μπορούν και προσελκύουν είτε τον FADD με αποτέλεσμα το σχηματισμό προ-αποπτωτικού συμπλόκου, είτε τις πρωτεΐνες RIP1 και TRAF2 που σχετίζονται με την φλεγμονή και την επιβίωση (Hsu et al., 1996; Liu et al., 1996). Η RIP1 μπορεί να προσδεθεί και άμεσα στο DD του TNFR (Zheng et al., 2006) ή ακόμα και στο TRAF, ωστόσο φαίνεται ότι προτιμάται η πρόσδεση στο προσαρμογέα TRADD (Hsu & Huang, 1996; Hsu & Shu, 1996). Τα παραπάνω γεγονότα οδηγούν στο σχηματισμό ενός προ-φλεγμονώδους, με πολλές υπομονάδες, σηματοδοτικού συμπλόκου που αναφέρεται ως σύμπλοκο I, το οποίο διακρίνεται από το προ-αποπτωτικό σύμπλοκο II και το νεκρόσωμα (Micheau et al., 2001).

Έπειτα από την συναρμολόγηση του συμπλόκου I, προσελκύεται σε αυτό το σύμπλοκο της IKK. Η προσέλκυση αυτή μπορεί να γίνει με διάφορους μηχανισμούς με κυρίαρχο την άμεση πρόσδεση του TRAF2 στην υπομονάδα IKKα ή IKKβ (Devin et al., 2001). Ωστόσο, μελέτες με ποντίκια knock out για τον TRAF2 υποδεικνύουν τη δυνατότητα στρατολόγησης της IKK και την ενεργοποίηση του NF-κΒ (Kelliher et al., 1998). Από την άλλη, η RIP1 φαίνεται να είναι απαραίτητη για το κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κΒ, όμως, όχι και η δραστηριότητα κινάσης της, αφού απουσία αυτής, επιτυγχάνεται σηματοδότηση του TNFR1 προς την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα (Devin et al., 2000; Lee et al., 2004). Επομένως, είναι αποδεκτό ότι η RIP1 λειτουργεί ως ικρίωμα για την ενεργοποίηση του NF-κΒ, συμβάλλοντας στην επαγωγή της IKK μέσω ενός μηχανισμού εγγύτητας (Delhase et al., 1999; Inohara et al., 2000). Συγκεκριμένα, η προσέλκυση της IKK στον TNFR1 από την RIP1 γίνεται μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασής της με την ρυθμιστική υπομονάδα NEMO (Zhang et al., 2000). Επιπλέον, η RIP1 φαίνεται να στρατολογεί και την επαγόμενη-από τον τροποποιητικό αυξητικό παράγοντα β-κινάση 1 (Transforming growth factor beta-activated kinase, TGFβ activated kinase, TAK1) στο σύμπλοκο του υποδοχέα, φανερώνοντας έναν διττό ρόλο στην ενεργοποίηση του μονοπατιού, δηλαδή μέσω προσέλκυσης των δύο κυρίαρχων μορίων ενεργοποιητών, της TAK1 και της IKK (Ea et al., 2006; Li et al., 2006). Ένα κρίσιμο γεγονός για τη δράση της RIP1 φαίνεται να είναι η ουβικιτινίωση της η οποία μεσολαβείται από τις κυτταρικές πρωτεΐνες-αναστολείς της απόπτωσης 1 και 2 (Cellular inhibitors of apoptosis 1 and 2, cIAP1, 2) που προσελκύονται στο σύμπλοκο του υποδοχέα μέσω του TRAF2 (Lee et al., 2004; Wertz et al., 2004; Yin et al., 2009). Η ενεργοποίηση της IKK συμβαίνει πολύ γρήγορα καθοδικά του TNFR1, συνήθως μέσα σε 3 λεπτά, με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση και αποικοδόμηση του αναστολέα IκΒα και την μετέπειτα μετατόπιση του NF-κΒ στον πυρήνα (Blackwell et al., 2013). Ενώ η IKK έχει διάφορα υποστρώματα, κυρίαρχος στόχος της στο κλασικό μονοπάτι είναι ο IκΒα (Polley et al., 2013). Καθοδικά του IκΒα, εμπλέκονται διάφορα παράλληλα μονοπάτια που συντελούν στην μετα-μεταφραστική τροποποίηση του NF-κΒ, ρυθμίζοντας έτσι την δυνατότητα ενεργοποίησης γονιδίων-στόχων (Bhatt & Ghosh, 2014; Huang et al., 2010; Natoli, 2012).

Ο τερματισμός του κλασικού μονοπατιού είναι εξίσου κρίσιμος με την ενεργοποίησή του, καθώς αυξημένη και παρατεταμένη δράση του NF-κΒ σχετίζεται με την παθολογική φλεγμονή και την ογκογένεση (Baker et al., Hayden, & Ghosh, 2011; DiDonato et al., 2012). Ένας βασικός μηχανισμός αναστολής του μονοπατιού είναι η μείωση της συγκέντρωσης του υποδοχέα TNFR1 μέσω εσωτερίκευσης και

αποικοδόμησής του στα λυσοσώματα (Schutze et al., 2008). Επιπλέον, εξίσου σημαντικός μηχανισμός τερματισμού είναι μέσω αρνητικής ανάδρασης, αφού μετά την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα, αυτός επάγει και την μεταγραφή του αναστολέα του IκBα (Sun et al., 1993). Φυσικά, στην αναστολή του NF-κB, συμμετέχουν κι άλλοι μηχανισμοί που αφορούν στην παρεμπόδιση της δράσης του, στους οποίους συμπεριλαμβάνεται η αφαίρεση συν-ενεργοποιητών, όπως CBP/p300, η προσέλευση συν-καταστολέων, η απομάκρυνση των διμερών NF-κB από το DNA ή ακόμα και η αποικοδόμηση του ενεργού μεταγραφικού παράγοντα (Hayden & Ghosh, 2014). Για παράδειγμα, η επίδραση με αναστολέα των HDACs, την τριχοστατίνη A (trichostatin A, TSA), φάνηκε να επάγει την απόκριση του NF-κB στον TNF-α, υποδηλώνοντας ότι οι HDACs καταστέλλουν ενεργά τη δράση του εν λόγω μεταγραφικού παράγοντα (Ashburner et al., 2001). Να σημειωθεί ότι, το κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης επάγεται επίσης και από την IL-1 μετά την πρόσδεση της στον υποδοχέα της IL-1R και τον υποδοχέα τύπου Toll 4 (Toll-like receptor, TLR-4) όταν σε αυτόν προσδεθεί ο βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης (lipopolysaccharide, LPS) (Verstrepen et al., 2008).

### **I.Γ.2.2 Μη κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης**

Το μη κλασικό μονοπάτι σηματοδότησης του NF-κB αφορά στην τελική ενεργοποίηση του ετεροδιμερούς συμπλόκου p52/RelB. Η πρωτεΐνη p52 προκύπτει μέσω της επεξεργασίας της αρχικής πρωτεΐνης p100, η οποία αφενός είναι πρόδρομος πρωτεΐνη της ενεργούς p52 και αφετέρου, στην ακέραιη μορφή της, λειτουργεί ως αναστολέας της RelB. Η κινάση επαγωγής του NF-κB (NF-κB-inducing kinase, NIK) παίζει κρίσιμο ρόλο στην έναρξη του μονοπατιού καθώς, μετά από κατάλληλο ερέθισμα, ενεργοποιεί την IKKα που φωσφορυλιώνει την p100 προωθώντας την μετέπειτα επεξεργασία της. Η ρύθμιση της NIK από το σύμπλοκο TRAF-cIAP είναι και αυτή που καθορίζει την πορεία του μονοπατιού (Sun, 2011). Η δομή της p100 συντελεί στην αυτορρύθμιση της και την καθιστά ένα μόριο με λειτουργία παρόμοια των αναστολέων IκB. Στο καρβοξυτελικό της άκρο φέρει μια περιοχή αναστολής της επεξεργασίας της (processing inhibitory domain, PID), η οποία καλύπτει μια περιοχή θανάτου (death domain, DD), καθώς και μια περιοχή με επαναλήψεις αγκυρίνης (ankyrin repeat domain, ARD). Η ARD αλληλεπιδρά με την RHD με τη μεσολάβηση της DD σχηματίζοντας τρισδιάστατη δομή που παρεμποδίζει την επεξεργασία της p100 (Liao & Sun, 2003).

Τα ερεθίσματα που επάγουν το μη κλασικό μονοπάτι του NF-κB διαφέρουν από τα αντίστοιχα του κλασικού μονοπατιού. Έχει βρεθεί ότι η NIK αποτελεί κυρίαρχο μόριο του μονοπατιού και όλα τα μόρια που επάγουν το μη κλασικό μονοπάτι, επηρεάζουν τη συγκεκριμένη κινάση (Matsushima et al., 2001). Η NIK αποτελεί μια MAP3K και η δράση της εκδηλώνεται μέσω της φωσφορυλίωσης της IKKα. Μόνο η IKKα και όχι οι IKKβ/γ σχετίζεται με το μονοπάτι αυτό (Kayagaki et al., 2002; Liang et al., 2006). Η NIK επάγει την επεξεργασία της p100, αφενός μέσω της φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης της IKKα και αφετέρου διευκολύνοντας την πρόσδεση της IKKα με το υπόστρωμα της p100, πιθανώς στρατολογώντας και άλλα βοηθητικά μόρια (Odqvist et al., 2013).

Σε φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα της NIK είναι αρκετά χαμηλά λόγω της διαρκούς αποικοδόμησης της μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από την ουβικιτίνη. Βασικό συστατικό του μηχανισμού αρνητικής ρύθμισης είναι το μόριο TRAF3, που αλληλεπιδρά άμεσα με τη NIK και εξασφαλίζει την αποικοδόμηση της στο πρωτεάσωμα (Liao et al., 2004). Βέβαια, πιο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι αποικοδόμηση της NIK, δεν εξαρτάται μόνο από το TRAF3, αλλά μάλλον από ένα σύμπλοκο μορίων που περιλαμβάνει τα TRAF2/3 και cIAP1/2 (Varfolomeev et al., 2007; Zarnegar et al., 2009). Η ενεργοποίηση του μονοπατιού από διάφορα ερεθίσματα συντελεί στη σταθεροποίηση της NIK και αύξηση των επιπέδων της, μέσω διαταραχής του συμπλόκου αρνητικής ρύθμισης (Gardam et al., 2008).

### **I.Γ.2.3 Σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποίησης του NF-κΒ στην καρδιά**

Δύο είναι τα βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποίησης του NF-κΒ, το κλασικό και το μη-κλασικό μονοπάτι. Στο πρώτο μονοπάτι ενεργοποιείται το ετεροδιμερές p65/p50 ενώ στο άλλο το RelB/p52 (Hayden & Ghosh, 2004). Σε καρδιακά μυοκύτταρα, έχει αναφερθεί ότι η υπομονάδα p65 ενεργοποιείται ως απόκριση στον TNF-α, στους βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και άλλους υπερτροφικούς αγωνιστές. Μετά την πρόσδεση του TNFα στον υποδοχέα του TNFR1, στρατολογούνται διάφορες πρωτεΐνες προσαρμογείς όπως ο TRADD και ο TRAF. Το σύμπλοκο που σχηματίζεται ενεργοποιεί διάφορα μονοπάτια όπως αυτό των JNK και p38 MAP κινασών, της κασπάσης 8 αλλά και το κλασικό μονοπάτι του NF-κΒ (Hayden & Ghosh, 2004). Επιπλέον, κατά την ενεργοποίηση του NF-κΒ, σημαντικός είναι ο ρόλος του μορίου RIP1 που αλληλεπιδρά με την υπομονάδα NEMO του συμπλόκου της κινάσης του αναστολέα του NF-κΒ, IKK (Poyet et al., 2000). Ακόμα ένας σημαντικός ρυθμιστής στο μονοπάτι που οδηγεί σε φωσφορυλίωση της υπομονάδας p65 στη σερίνη 536, είναι η TAK1, που αλληλεπιδρά στο επίπεδο των RIP1 και IKK (Sakurai et al., 2003). Ο τερματισμός του μονοπατιού αυτού βασίζεται στην αρνητική ανάδραση καθώς ο NF-κΒ επάγει την έκφραση του αναστολέα IκΒα, αναστολέων της IKK, όπως την A20 καθώς και άλλων αναστολέων που σχετίζονται με το μονοπάτι του TNF-α. Τέτοιο παράδειγμα είναι η c-FLIP που σχετίζεται με την αναστολή της απόπτωσης, εμποδίζοντας τα μονοπάτια των JNK και p38 MAP κινασών (Zhang et al., 2009). Τέλος, όσον αφορά στο μονοπάτι της κασπάσης-8, η επαγωγή των αναστολέων της απόπτωσης c-IAPs από τον NF-κΒ οδηγεί σε αναστολή της απόπτωσης που ενεργοποιείται από τον TNF-α (Wang et al., 1998).

Στην καρδιά, υπάρχουν πολύ λίγες έρευνες σχετικά με το μη-κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κΒ. Μελέτες σε άλλες κυτταρικές σειρές, υποδεικνύουν ως κυρίαρχους ενεργοποιητές του μονοπατιού αυτού την λεμφοτοξίνη-β (lymphotoxin B, LT-β), τον παράγοντα ενεργοποίησης των Β-κυττάρων (B-cell activating factor, BAFF) και τον προσδέτη του CD40 (CD40 ligand, CD40L) (Hayden & Ghosh, 2004). Το μονοπάτι ξεκινάει με την ενεργοποίηση την επαγωγικής κινάσης του NF-κΒ, NIK, η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί άμεσα την IKKα. Επομένως, η IKKα και όχι η IKKβ είναι κρίσιμη στο εναλλακτικό μονοπάτι, η οποία συνεπάγεται την φωσφορυλίωση της p100 στις σερίνες 866 και 870 οδηγώντας στο ενεργοποιημένο διμερές p52/RelB (Perkins, 2006).

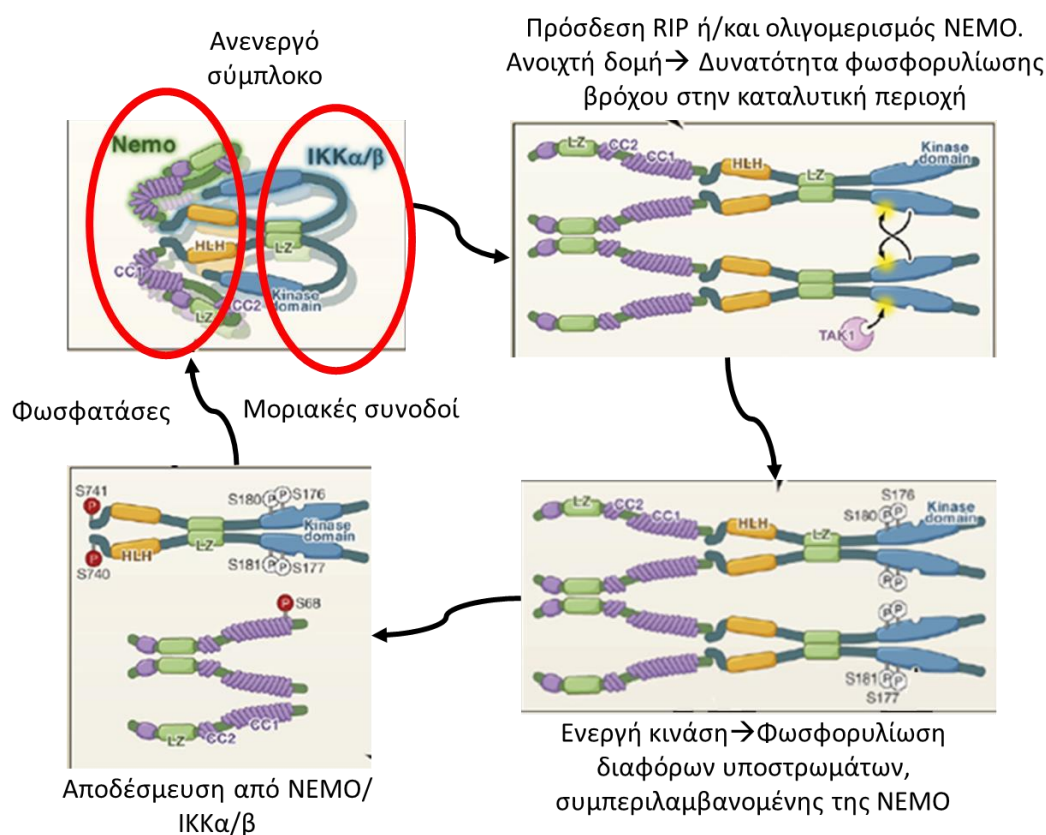
#### 1.Γ.2.4 Σύμπλοκο IKK και αναστολείς IκB

Η κινάση του IκB απομονώθηκε για πρώτη φορά ως ένα σύμπλοκο υψηλού μοριακού βάρους, το οποίο ήταν ικανό να φωσφορυλιώνει τον αναστολέα IκBα στις σερίνες 32 και 36 (Chen et.al, 1996). Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι το σύμπλοκο της κινάσης αποτελείται από 2 καταλυτικές υπομονάδες, IKKα και IKKβ, και μια ρυθμιστική υπομονάδα, NEMO ή IKKγ (DiDonato et al., 1997). Πολλαπλές αναφορές επιβεβαιώνουν τη σημασία της IKKα στο κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB, αλλά κυρίως στο μη-κλασικό. Ο ρόλος της IKKβ είναι εξίσου σημαντικός, ωστόσο υπάρχουν και αναφορές στις οποίες η απουσία της IKKβ δεν επηρέασε το κλασικό μονοπάτι του NF-κB (Solt et al., 2007). Από την άλλη, η ρυθμιστική υπομονάδα NEMO, παίζει κρίσιμο ρόλο στο κλασικό μονοπάτι. Μάλιστα, ο διαχωρισμός των μονοπατιών ενεργοποίησης του NF-κB μπορεί να γίνει βάσει της ύπαρξης της NEMO στο μονοπάτι, ή των IκB και p100, παρά βάσει της επαγωγής των IKKα/β.

Οι υπομονάδες IKKα και IKKβ σχηματίζουν ετεροδιμερή, τα οποία έχουν μεγαλύτερη καταλυτική ενεργότητα σε σχέση με το εκάστοτε ομοδιμερές. Οι IKKα και IKKβ προσδένονται στην NEMO μέσω ενός εξαπεπτιδίου στο καρβοξυτελικό τους άκρο που αποκαλείται περιοχή πρόσδεσης στη NEMO (NEMO binding domain, NBD) (May et al., 2000). Επιπλέον, έχει φανεί ότι η IKKβ έχει μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης με τη NEMO σε σχέση με την IKKα. (May et al., 2002).

Η ενεργοποίηση του συμπλόκου της IKK απαιτεί τη φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης στο βρόχο ενεργοποίησης, τουλάχιστον μιας εκ των δύο καταλυτικών υπομονάδων IKKα/β (Hacker & Karin, 2006). Ωστόσο, ακόμη δεν έχει διευκρινιστεί αν η φωσφορυλίωση αυτή συμβαίνει από κινάση αναρροϊκά της IKK, ή αν είναι αποτέλεσμα τρανς-φωσφορυλίωσης. Σε κατάσταση ηρεμίας, οι υπομονάδες της IKK σχηματίζουν ένα σύμπλοκο της μορφής (IKKα/β/NEMO)<sub>2</sub>, στο οποίο οι IKKα/β είναι ανενεργές λόγω αλληλεπίδρασης με τη NEMO. Μετά από ερέθισμα, η NEMO προσδένεται σε μια πρωτεΐνη RIP, πιθανώς μέσω μηχανισμού εξαρτώμενου από ουβικιτίνη, με αποτέλεσμα να επάγονται αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του συμπλόκου οι οποίες επιτρέπουν είτε την τρανς-αυτοφωσφορυλίωση, είτε την εξαρτώμενη από IKK-K φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης του βρόχου ενεργοποίησης της IKK. Έτσι, επάγεται η ενεργότητα κινάσης της IKK η οποία φωσφορυλιώνει διάφορα υποστρώματα της, όπως τους αναστολείς IκB, τη σερίνη 740 της IKKβ και τη σερίνη 68 της NEMO. Η σερίνη 68 της NEMO βρίσκεται στην περιοχή πρόσδεσης στο σύμπλοκο IKK, ενώ η σερίνη 740 στην περιοχή NBD της IKKβ. Οι φωσφορυλιώσεις αυτές, διαταράσσουν τα διμερή NEMO και την αλληλεπίδραση μεταξύ IKKα/β-NEMO (Palkowitsch et al., 2008). Τα παραπάνω γεγονότα συμβάλουν στην αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης του συμπλόκου το οποίο αποκτά μια πιο «ανοιχτή» δομή, η οποία με τη σειρά της επιτρέπει την πρόσβαση φωσφατασών. Οι τελευταίες, αποφωσφορυλιώνουν τα κατάλοιπα του βρόχου, αναστέλλοντας την ενεργότητα κινάσης. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται ένας μηχανισμός αρνητικής ανάδρασης που συντελεί στην απενεργοποίηση της κινάσης. Η συμμετοχή της μοριακής συνοδού HSP-90 σε συνδυασμό με την αποφωσφορυλίωση της σερίνης 740 της IKKβ, απαιτούνται για τη μετρίαση της υψηλής συγγένειας της αλληλεπίδρασης IKKβ-NEMO. Χαμηλότερη συγγένεια συνεπάγεται την διαφυγή της ενεργούς IKKα από το σύμπλοκο φωσφορυλιωμένη-NEMO/IKK και την μετέπειτα φωσφορυλίωση

καταρροϊκών μορίων-στόχων (Kray et al., 2005; Prajapati et al., 2004). Τα παραπάνω γεγονότα οδηγούν τελικά στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. (Εικόνα I.6)



**Εικόνα I.6 Γεγονότα ενεργοποίησης/απενεργοποίησης του συμπλόκου της IKK.** Η φωσφορυλίωση της καρβοξυτελικής περιοχής της IKK όπου προσδένεται η NEMO (NEMO binding domain, NBD) αποτελεί μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης. Η ανοιχτή δομή του συμπλόκου επιτρέπει την τρανς-αυτοφωσφορυλίωση ή/και την φωσφορυλίωση από αναρροϊκή κινάση στην καταλυτική περιοχή. Η ενεργή IKK φωσφορυλιώνει διάφορα υποστρώματα συμπεριλαμβανομένων των NEMO και IκΒ. Η αποδέσμευση από τη NEMO και οι δομικές αλλαγές προσελκύουν φωσφατάσες και μοριακές συνοδούς, οι οποίες εξασφαλίζουν την επαναφορά του συμπλόκου στην ανενεργή του μορφή (Hayden & Ghosh, 2008).

Ο IκΒα αποτελεί ένα από τα πιο καλά μελετημένα μέλη της οικογένειας των αναστολέων του NF-κΒ και σχετίζεται κυρίως με την παρεμπόδιση του ετεροδιμερούς p50/p65 στο κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης. Η επαγόμενη από ερέθισμα, αποικοδόμηση του αναστολέα στο πρωτεάσωμα, επιτρέπει την απελευθέρωση του NF-κΒ και την μετέπειτα μετατόπιση του στον πυρήνα όπου ασκεί τη δράση του. Να σημειωθεί ότι και σε αυτό το σημείο, δρα ένας μηχανισμός αρνητικής ανάδρασης, με τον NF-κΒ να επάγει, ανάμεσα σε διάφορα γονίδια-στόχους, και την έκφραση του ίδιου του αναστολέα (Gerondakis et al., 2006; Pasparakis et al., 2006). Εκτός από τον IκΒα, οι IκΒβ και IκΒε λειτουργούν με αντίστοιχο τρόπο, δηλαδή σχηματίζουν σύμπλοκο με τα διμερή του NF-κΒ παρεμποδίζοντάς τον. Υπάρχουν, ωστόσο,



διαφορές μεταξύ αυτών των αναστολέων ως προς τις διαδικασίες αποικοδόμησης και επανασύνθεσης (Alexander Hoffmann et al., 2002). Ειδικότερα, ο IκΒε, ενώ δρα όπως και ο IκΒα, η κινητική της αποικοδόμησης/επανασύνθεσης του είναι πιο αργή, γεγονός που έχει συσχετιστεί με τη διαφορική απόκριση στον TNF-α (Kearns et al., 2006). Από την άλλη, ο IκΒβ, έχει φανεί να συνδέεται με τα διμερή του NF-κΒ όταν αυτά σχηματίζουν σύμπλοκο με το DNA, υποδηλώνοντας το ρυθμιστικό του ρόλο όταν ο NF-κΒ είναι στον πυρήνα (Suyang et al., 1996).

Οι πρόδρομες πρωτεΐνες p100 και p105, στην ακέραιη μορφή τους, λειτουργούν ως αναστολείς τύπου IκΒ. Η p105 υπόκειται σε επεξεργασία στο πρωτεάσωμα, ώστε να προκύψει η ενεργή p50. Μελέτες έχουν δείξει ότι η φωσφορυλίωση της p105 από την IKKβ σε συγκεκριμένα κατάλοιπα, σερίνη 923 και σερίνη 927, επάγει την πλήρη αποικοδόμηση της, κατ' αντίστοιχο τρόπο με τον IκΒα. (Perkins, 2006). Η επεξεργασία της p105 σε p50 γίνεται μεν στο πρωτεάσωμα, δεν απαιτεί δε την μεσολάβηση ουβικιτίνης (Moorthy et al., 2006). Όταν η p105 είναι συνδεδεμένη με διμερή NF-κΒ, τότε αναστέλλεται η πρωτεολυτική επεξεργασία της και προτιμάται η πλήρης αποικοδόμηση, λειτουργώντας όπως οι κλασικοί IκBs (Cohen et al., 2001). Η p100, απαιτεί τις κινάσες NIK και IKKα για την πρωτεολυτική ενεργοποίηση της (Xiao et al., 2004). Η ρύθμιση της RelB από την p100 είναι ιδιαίτερα κρίσιμη, καθώς διμερή RelB απαιτούν την p100 για την σταθεροποίηση τους (Solan et al., 2002). Η πρωτεόλυση της p100 σε p52 και ο σχηματισμός του ετεροδιμερούς p52/RelB, αποτελεί κρίσιμο σημείο στο μη κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κΒ. Ενώ η RelB ρυθμίζεται αποκλειστικά από την p100, το αντίστροφο δεν ισχύει. Με άλλα λόγια, η p100 έχει βρεθεί να ρυθμίζει διμερή του NF-κΒ που περιέχουν την p65 (Basak et al., 2007; Ishimaru et al., 2006).

Τέλος, οι δύο μη τυπικοί αναστολείς IκΒζ και Bcl-3, ρυθμίζουν τον NF-κΒ με διαφορετικούς μηχανισμούς. Η Bcl-3 εντοπίζεται στον πυρήνα δεσμευμένη σε διμερή που περιέχουν p50 ή p52. Ο μηχανισμός δράσης της δεν έχει εξακριβωθεί, αλλά πιθανώς σχετίζεται με την απομάκρυνση των διμερών p50 από τις αλληλουχίες κΒ, επιτρέποντας την πρόσβαση άλλων ενεργών διμερών στα στοιχεία κΒ για ενεργοποίηση της μεταγραφής (Perkins, 2006). Εναλλακτικά, μπορεί να σταθεροποιεί ομοδιμερή p50, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση του NF-κΒ (Carmody et al., 2007). Ο IκΒζ εκφράζεται ως απόκριση στην IL-1 και τον TLR4 και συνδέεται με τα ομοδιμερή p50 λειτουργώντας ως συνενεργοποιητής (Yamamoto et al., 2004). Επιπλέον, έχει αναφερθεί και ο κατασταλτικός ρόλος του στα σύμπλοκα που περιέχουν p65 (Motoyama et al., 2005).

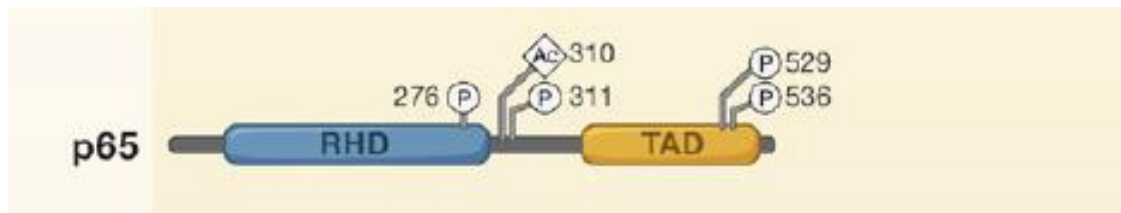
#### **1.Γ.2.5 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της υπομονάδας p65 του NF-κΒ**

Δεδομένης της ποικιλότητας των ρόλων του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ καθώς και των πολλαπλών μονοπατιών στα οποία συμμετέχει, είναι προφανές ότι η ρύθμιση του θα είναι ιδιαίτερα περίπλοκη και δε θα βασίζεται μόνο στην IKK και στους αναστολείς του. Η πρώτη προσπάθεια προσέγγισης της πολυπλοκότητας αυτής έγινε το 1995 από τον Scheidereit και τους συνεργάτες του, οι οποίοι έδειξαν ότι η υπομονάδα p65 φωσφορυλιώνεται μετα-μεταφραστικά και ότι αυτή η φωσφορυλίωση επάγεται μετά την κυτταρική διέγερση (Naumann & Scheidereit, 1994; Neumann et al.,

1995). Η PKA σχηματίζει σύμπλοκο με τη το κυτοσολικό NF-κB:IkB και αμέσως μετά την αποικοδόμηση του αναστολέα φωσφορυλιώνει την p65 στη σερίνη 276, επάγοντας έτσι την αλληλεπίδραση της υπομονάδας αυτής με τους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές, την πρωτεΐνη που προσδένεται στη CREB (CREB-binding protein, CBP) και την p300 (Zhong et al., 1998). Επιπλέον, άλλες κινάσες όπως οι MSK1 και MSK2, έχει αναφερθεί να φωσφορυλιώνουν την p65 στο ίδιο κατάλοιπο. Οι κινάσες αυτές είναι πυρηνικές και ενεργοποιούνται από πληθώρα μονοπατιών συμπεριλαμβανομένων αυτών των ERKs και p38 MAPK (Perkins, 2006).

Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές για φωσφορυλίωση της υπομονάδας p65 σε διαφορετικό κατάλοιπο και από διαφορετικές κινάσες. Οι Chen και Greene το 2004 και ο Perkins και συνεργάτες το 2006, υπέδειξαν την φωσφορυλίωση της σερίνης 536 στην υπομονάδα p65 από τις κινάσες IKKα και IKKβ (Chen & Greene, 2004; Perkins, 2006). Υπάρχουν κι άλλες θέσεις φωσφορυλίωσης της p65, όπως στη σερίνη 529 από την κινάση καζεΐνης 2 (casein kinase 2, CK2), η οποία ενεργοποιείται κατά τη δράση της IL-1 ή του TNF-α και στη σερίνη 311 από την PKCζ. Φαίνεται ότι καθεμία από αυτές τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σχετίζεται με την αλλαγή της δομής της p65 ώστε αυτή να αλληλεπιδρά βέλτιστα με τη CBP/p300 (Bird et al., 1997; Duran et al., 2003).

Από την άλλη, η φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα όπως η σερίνη 468, αναστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα του NF-κB. Η φωσφορυλίωση αυτή μεσολαβείται από τις κινάσες IKKβ, IKKε και την κινάση 3β της συνθάσης του γλυκογόνου (Glycogen synthase kinase-3 beta, GSK3β). Η p65 φωσφορυλιώνεται συνεχώς στο συγκεκριμένο κατάλοιπο, κι αυτό συντελεί στην αρνητική ρύθμιση του απουσία ερεθισμάτων. (Buss et al., 2004) Φωσφορυλίώσεις σε άλλα κατάλοιπα, μπορεί να υποβοηθούν τη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κB, όπως στην περίπτωση της σερίνης 311, ή μπορεί να την παρεμποδίζουν, όπως στις περίπτωση των θρεονινών 435 και 505 (Campbell et al., 2006; O'Shea & Perkins, 2010). Εκτός βέβαια από την φωσφορυλίωση, η p65 υφίσταται κι άλλες τροποποιήσεις όπως η ακετυλίωση της λυσίνης 310 και μάλιστα, οι δύο αυτές τροποποιήσεις, φωσφορυλίωση και ακετυλίωση, φαίνεται να μην είναι ανεξάρτητες (Chen et al., 2005). (Εικόνα 1.7) Αντίστοιχα, υπάρχουν και πολλές άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως μεθυλίσεις, ακετυλίσεις και ουβικιτινιώσεις, ο ρόλος των οποίων είναι ιδιαίτερα πολύπλοκος και εξειδικευμένος. Μάλιστα, στην πραγματικότητα, τα γεγονότα αυτά είναι ακόμα πιο περίπλοκα καθώς, πολύ συχνά, συσχετίζονται και δρουν συνδυαστικά ή ανταγωνιστικά στη δράση του NF-κB (Huang et al., 2010).



**Εικόνα 1.7 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της p65.** Οι φωσφορυλιώσεις στη σερίνη 276 της περιοχής ομολογίας Rel (RHD) και στη σερίνη 536 της περιοχής που σχετίζεται με το μεταγραφικό ρόλο της πρωτεΐνης (TAD) είναι οι περισσότερο μελετημένες. Τα γεγονότα φωσφορυλίωσης και ακετυλίωσης δεν είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους (Hayden & Ghosh, 2008).

### 1.Γ.3 Ρόλος του NF-κΒ στο οξειδωτικό στρες

Στα κύτταρα, τα σηματοδοτικά «κυκλώματα» δρουν ώστε να διατηρείται η ομοιόσταση και να αποφεύγονται δραστικές ενδοκυττάρειες αλλαγές όπως οι μεταβολές στο οξειδωτικό φορτίο. Μεταξύ των πολλαπλών μονοπατιών που εμπλέκονται, η μεταγωγή σήματος μέσω του NF-κΒ φαίνεται να κατέχει ρόλο-κλειδί στη ρύθμιση διαδικασιών όπως η φλεγμονή, η ανοσία, η ανάπτυξη, η κυτταρική αύξηση και η επιβίωση. Ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας, σχετίζεται με τη μεταγραφή πάνω από 100 γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων με αντι-οξειδωτική αλλά και προ-οξειδωτική δράση (Morgan & Liu, 2011). Ο TNF-α αποτελεί γνωστό ενεργοποιητή του NF-κΒ και μάλιστα η ενεργοποίησή αυτή μεσολαβείται από τις ROS (Jamaluddin, Wang, Boldogh, Tian, & Brasier, 2007). Γενικά, πληθώρα αναφορών τονίζουν την ενεργοποίηση του NF-κΒ από αντιοξειδωτικές ουσίες (Jiqin Liu et al., 2008). Ωστόσο, ολόένα και αυξανόμενες εργασίες επιβεβαιώνουν τον κυρίαρχο ρόλο πολλών οξειδωτικών μορίων στην επαγωγή του NF-κΒ, γεγονότα που σχετίζονται και με διάφορες ασθένειες (Gloire & Piette, 2009; Kamata et al., 2002; Schoonbroodt & Piette, 2000; Takada et al., 2003). Μάλιστα, αξίζει να σημειωθεί, ότι διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι αντιοξειδωτικά όπως η NAC, αναστέλλουν τον NF-κΒ, παρεμποδίζοντας την μετατόπιση του στον πυρήνα (Dirsch et al., 1998).

Το 1990, φάνηκε για πρώτη φορά πως ο NF-κΒ ρυθμίζεται από την κατάσταση οξείδωσης του κυττάρου από την ομάδα του Herzenberg, η οποία υποστήριξε ότι οι ενδοκυτταρικές θειόλες μεσολαβούν στην ενεργοποίηση του NF-κΒ από τον TNF-α και τη 12-μυριστικό-13-οξικό-φορβόλη (Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA). Πιο συγκεκριμένα, η μείωση των επιπέδων της γλουταθειόνης, που αποτελεί το βασικό οξειδοαναγωγικό ρυθμιστικό διάλυμα των κυττάρων, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργοποίησης του NF-κΒ. Αντίθετα, η χρήση ενός προδρόμου της σύνθεσης της γλουταθειόνης, τη Ν-ακετυλ-L-κυστεΐνη (NAC), τα επίπεδα του NF-κΒ μειώθηκαν (Staal et al., 1990). Ομοίως, το αντιοξειδωτικό διθειοκαρβαμική πυρρολιδίνη (pyrrolidine dithio-carbamate, PDTTC), παρεμποδίζει την απελευθέρωση του NF-κΒ από τον αναστολέα του και συνεπώς την ενεργοποίησή του (Schreck et al., 1992). Άμεσες αποδείξεις της ρύθμισης του NF-κΒ από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> προέρχονται από το εργαστήριο του Schreck, που έδειξε ότι το μονοπάτι του μεταγραφικού αυτού παράγοντα ενεργοποιείται με την προσθήκη 150 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε κύτταρα Wurzburg (Schreck et al., 1991). Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> δεν ενεργοποιεί το



καθαρό σύμπλοκο NF-κB/IκBα *in vitro*, υποδηλώνοντας ότι η ενεργοποίηση στα κύτταρα βασίζεται σε υποκείμενους μηχανισμούς, όπως για παράδειγμα τις αλλαγές στο οξειδωτικό φορτίο του κυττάρου. Επιπλέον, καθώς γνωστοί ενεργοποιητές του NF-κB, όπως ο TNF-α και η IL-1, επάγουν την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου, (Jamaluddin et al., 2007; Park et al., 2004), οι τελευταίες φαίνεται να αποτελούν γενικούς ρυθμιστές του μονοπατιού του NF-κB.

Υπάρχει πληθώρα ασύμφωνων δεδομένων σχετικά με την ενεργοποίηση του NF-κB από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, γεγονός που υποδηλώνει την ειδικότητα ως προς τον κυτταρικό τύπο. Από μόνο του το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, είναι ασθενής ενεργοποιητής του NF-κB. Σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους ο NF-κB φαίνεται να είναι ανεξάρτητος του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ενώ σε άλλους η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα αυτού είναι ελάχιστη σε σχέση με κλασσικούς ενεργοποιητές (π.χ TNF-α) καθώς εμφανίζει χαμηλότερα επίπεδα ενεργοποίησης και βραδύτερο κινητικό πρότυπο (Oliveira-Marques et al., 2007). Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι η ενεργοποίηση του NF-κB σε σημαντικό ποσοστό, από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, υποδεικνύει εναλλακτικό μονοπάτι, καθώς δεν ταυτοποιήθηκαν τροποποιήσεις σε αναρροϊκές κινάσες ή τον IκBα. Σε κάθε περίπτωση, η συγκέντρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> πρέπει να υπερβαίνει τα 100μM ώστε να παρατηρηθεί σημαντική ενεργοποίηση του NF-κB, γεγονός που εγείρει αμφιβολίες ως προς την *in vivo* συσχέτιση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με τον NF-κB. Μάλιστα, υπάρχουν και περιπτώσεις στις οποίες το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αναστέλλει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα (Choi et al., 2007; Zmijewski et al., 2007).

#### **Ι.Γ.4 Ρόλος του NF-κB στην απόπτωση**

Ο πιο καλά χαρακτηρισμένος ρόλος του NF-κB αφορά στην ικανότητα του να προωθεί την κυτταρική επιβίωση. Η ικανότητα του αυτή, φαίνεται σε πολλές μελέτες που αφορούν διάφορους τύπους καρκίνου. Σε αυτές, έχει διαπιστωθεί ότι ο NF-κB επάγει γονίδια ανάπτυξης όπως τη κυκλίνη D1, το c-myc και το c-myb (Duyao et al., 1992; Guttridge et al., 1999; Toth et al., 1995) και αντι-αποπτωτικά γονίδια όπως τα c-IAP1/2 και XIAP (Kucharczak et al., 2003). Η έκφραση των γονιδίων αυτών έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας στην ανάπτυξη του όγκου. Επιπλέον, διάφορα ογκογόνα μόρια όπως το Ras, φαίνεται να επάγουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό μέσω του μεταγραφικού αυτού παράγοντα (Kim et al., 2002). Μάλιστα, ο ρόλος του γίνεται ακόμα πιο κρίσιμος στις περιπτώσεις χημειοθεραπειών, αφού πολύ συχνά, ενεργοποιείται ως απόκριση στη φαρμακευτική αγωγή και εξαιτίας του αντι-αποπτωτικού του ρόλου, δημιουργεί χημειοανθεκτικούς όγκους (Lin et al., 2010).

Από την άλλη, αυξανόμενος αριθμός μελετών αναφέρει τον προ-αποπτωτικό ρόλο του NF-κB υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Για παράδειγμα, η καταστολή του NF-κB σε κυτταρική σειρά Saos-2, παρεμπόδισε και την μεσολαβούμενη από την p53-απόπτωση. Βέβαια, η υπερέκφραση της p65, φάνηκε να μην είναι επαρκής από μόνη της για να επάγει την απόπτωση (Ryan et al., 2000). Σε άλλες περιπτώσεις, όπως σε καρκινικά κύτταρα μαστού και μελανώματος, έχει φανεί ότι η p65 είναι επαρκής για να επαχθεί ο κυτταρικός θάνατος, υποδεικνύοντας τον προ-αποπτωτικό ρόλο του NF-κB (Ricca et al., 2001).

Προφανώς, ο τύπος του ερεθίσματος αποτελεί βασικό παράγοντα που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό, το αν ο NF-κΒ θα λειτουργήσει προ- ή αντι-αποπτωτικά. Για παράδειγμα, σε κύτταρα Hela, ο TNF-α προκάλεσε την προστατευτική δράση του NF-κΒ, ενώ το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και το περβαναδικό, οδήγησαν σε απόπτωση των κυττάρων αυτών, μεσολαβούμενη από τον NF-κΒ (Kaltschmidt et al., 2000). Ομοίως, η hypericin που είναι αντι-καρκινικός παράγοντας, συντέλεσε στην προστασία των νευρικών κυττάρων επάγοντας τον NF-κΒ, ενώ η σταυροσπορίνη προκάλεσε κυτταρικό θάνατο, επίσης, μέσω του εν λόγω μεταγραφικού παράγοντα (Kaltschmidt et al., 2002). Ακόμη μια έρευνα σε νευρικά κύτταρα της σειράς PC12, έδειξε ότι ο NF-κΒ είχε προ-αποπτωτικό ρόλο ως απόκριση στην 6-υδροξυ-ντοπαμίνη και αντι-αποπτωτικό ως απόκριση σε TNF-α (Tarabin & Schwaninger, 2004). Τέλος, σε υβριδικά T κύτταρα, η επίδραση με PMA/ιομυκίνη, ενεργοποίησε την προ-αποπτωτική δράση του NF-κΒ μέσω της επαγωγής του FasL, ενώ η δεξαμεθασόνη την αντι-αποπτωτική του δράση (Lin et al., 1999).

Εκτός από τον τύπο του ερεθίσματος, σημαντικό ρόλο παίζει και ο τρόπος με τον οποίο το συγκεκριμένο ερέθισμα επιδρά στην ενεργοποίηση του NF-κΒ. Για παράδειγμα, η υπερέκφραση της c-Rel σε κύτταρα Hela, αρχικά συντέλεσε στην προστασία από την απόπτωση που προκλήθηκε από τον TNF-α, μέσω μετατροπής των τοξικών O<sub>2</sub><sup>-</sup> σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Όμως, με το πέρασμα του χρόνου, η σταδιακή συσσώρευση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, οδήγησε στην απόπτωση. Και οι δύο δράσεις, αντι-αποπτωτική και προ-αποπτωτική φάνηκαν να αυξάνονται με την υπερέκφραση της c-Rel (Bernard et al., 2002).

Όλα τα παραπάνω, υποδηλώνουν ότι ο NF-κΒ αποτελεί τμήμα ενός πολύπλοκου δικτύου αλληλεπιδράσεων και δε μπορεί εύκολα να καταταχθεί σε προ-αποπτωτικό ή αντι-αποπτωτικό παράγοντα. Η δράση του εξαρτάται από το ερέθισμα, το κυτταρικό τύπο, τις εκάστοτε πειραματικές συνθήκες, τον τύπο της υπομονάδας, ακόμα και από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που θα υποστεί (Radhakrishnan & Kamalakaran, 2006).

### **I.Γ.5 Ρόλος του NF-κΒ στην καρδιά**

Ο ρόλος του NF-κΒ στα καρδιακά κύτταρα, όπως και στους άλλους κυτταρικούς τύπους, είναι ιδιαίτερα αμφιλεγόμενος. Είναι αξιοσημείωτο ότι ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας έχει βρεθεί να εμπλέκεται σε πολλές καρδιαγγειακές ασθένειες, όπως η ισχαιμική και διατατική καρδιακή ανεπάρκεια, η ισχαιμική προγύμναση και η μυοκαρδίτιδα (Hall et al., 2001; Zhang et al., 2003). Επιπλέον, ερεθίσματα όπως η I/R με τις ROS, ο TNF-α και η β-αδρενεργική ενεργοποίηση, έχουν φανεί να επάγουν τον NF-κΒ στην καρδιά (Dawn et al., 2001; Purcell et al., 2001). Είναι προφανές ότι υπάρχει εμπλοκή του μεταγραφικού παράγοντα στις ασθένειες της καρδιάς, όμως δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως ο τρόπος με τον οποίο αυτή επιτυγχάνεται. Το πιο πιθανό είναι ότι μπορεί να λειτουργεί είτε προστατευτικά είτε να συντελεί στην καρδιακή παθογένεια, ανάλογα με την χρονική και τοπική ενεργοποίηση του (Dhingra et al., 2010).

Η απόκριση της καρδιάς στην I/R είναι δυναμική και περίπλοκη και γι' αυτό η χρονική μεταβλητή είναι σημαντικός παράγοντας κατά τη μελέτη του NF-κΒ στην καρδιακή I/R. Σε μελέτη που έγινε σε καρδιά μετά την I/R, διαπιστώθηκαν δύο φάσεις

ενεργοποίησης του NF-κB, η μία 15 λεπτά μετά την ισχαιμία και 15 λεπτά μετά την επανοξυγόνωση που διήρκεσε 1 ώρα, και η άλλη 3 ώρες μετά την επανοξυγόνωση η οποία διήρκεσε μέχρι και 6 ώρες (Chandrasekar et al., 2001). Από την άλλη σε κυτταρική σειρά καρδιακών μυοβλαστών, σε συνθήκες υποξίας, ο NF-κB ενεργοποιήθηκε στη 1 ώρα υποξίας, ενώ υπήρχε καταστολή του στις 24 ώρες (Baetz et al., 2005; Matsui et al., 1999). Γενικώς, είναι γνωστό ότι η σηματοδότηση από τον NF-κB ακολουθεί κυκλικές φάσεις, λόγω του μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης που περιλαμβάνει την επαγωγή της έκφρασης του ίδιου του αναστολέα (Hoffmann et al., 2006; Hoffmann & Baltimore, 2006). Με δεδομένο το προ-φλεγμονώδη ρόλο του NF-κB στις συνθήκες αυτές, έχουν γίνει προσπάθειες αναστολής του, για να προστατευθεί ο καρδιακός μυς (Meldrum et al., 1998). Ο Pye και συνεργάτες είδαν ότι παρεμπόδιση της δράσης του πρωτεασώματος και επακόλουθη αναστολή του NF-κB, συντέλεσαν σε λιγότερο σοβαρό έμφραγμα (Pye et al., 2003). Ομοίως, ένας αναστολέας της IKKβ βελτίωσε την λειτουργία του μυοκαρδίου και περιόρισε τη σοβαρότητα του εμφράγματος (Moss et al., 2007). Τέλος, μύες στους οποίους υπερεκφράζονταν ο αναστολέας IκBa του NF-κB, διαπιστώθηκε βελτίωση των αρνητικών συνεπειών της I/R (Dawn et al., 2001). Τα παραπάνω, υποδηλώνουν τον παθολογικό ρόλο του εν λόγω μεταγραφικού παράγοντα στις δεδομένες συνθήκες.

Παρότι από τα ανωτέρω προκύπτει ότι η αναστολή του NF-κB είναι πιθανώς θεραπευτική, όλο και περισσότερες αναφορές παρουσιάζουν ενδείξεις για τον καρδιοπροστατευτικό ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα. Έτσι, φαίνεται να παρεμποδίζει την απόπτωση, να μειώνει το μέγεθος του εμφράγματος και να παίζει κάποιο ρόλο στην ισχαιμική προγύμναση (Kurrelmeyer et al., 2000; Misra et al., 2003; Mustapha et al., 2000). Πράγματι, παρεμπόδιση του NF-κB φαίνεται να αναστέλλει και τις προστατευτικές δράσεις της προγύμνασης του μυοκαρδίου (Misra et al., 2003; Mustapha et al., 2000).

Καθώς, από την ευρύτερη βιβλιογραφία υπάρχει μεγάλη συζήτηση για το ποιος είναι πραγματικά ο ρόλος του NF-κB στην απόπτωση, το ερώτημα που καλούνται οι επιστήμονες να απαντήσουν είναι τι ισχύει στην καρδιά. Υπερέκφραση του αναστολέα IκBa στην καρδιά συντέλεσε σε σοβαρότερο καρδιακό επεισόδιο και αυξημένη απόπτωση του μυοκαρδίου, υποδεικνύοντας έναν προστατευτικό ρόλο του NF-κB (Misra et al., 2003). Ομοίως, καρδιακά κύτταρα από τα οποία είχαν απαλειφθεί τα γονίδια TNFR1/2, εμφάνισαν αυξημένα ποσοστά απόπτωσης, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με την αναστολή ενός προστατευτικού μονοπατιού TNF-α/NF-κB (Kurrelmeyer et al., 2000).

Από την άλλη, κλινικές μελέτες έχουν δείξει τη συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης ενεργοποίησης του NF-κB και της καρδιακής ανεπάρκειας (Frantz et al., 2006). Ομοίως, έχει γίνει και προσπάθεια συσχέτισης του με την υπερτροφία του καρδιακού μυ. Φάνηκε, λοιπόν, ότι η γενετική απαλοιφή του NF-κB1 οδήγησε σε μειωμένο υπετροφικό φαινότυπο και βελτίωσε την σοβαρότητα της καρδιακής ανεπάρκειας (Kawano et al., 2005). Ωστόσο, τα αποτελέσματα είναι αρκετά περίπλοκα, καθώς ο NF-κB1 λειτουργεί αφενός ως αναστολέας μέσω της αέρας p105, αφετέρου ως ενεργή υπομονάδα p50 (Frantz et al., 2006). Πιο ξεκάθαρα αποτελέσματα προέκυψαν από τη στοχευμένη αναστολή του NF-κB σε καρδιακά μυοκύτταρα. Στην περίπτωση αυτή, μειώθηκε η καρδιακή υπερτροφία και προάχθηκε η καρδιακή ανεπάρκεια μετά το έμφραγμα (Freund et al., 2005; Zelarayan et al., 2009). Φαίνεται, λοιπόν, ότι ο NF-κB είναι θετικός ρυθμιστής της υπερτροφίας τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Higuchi et al., 2002; Li et al., 2004), και επάγει αντι-αποπτωτικά γονίδια σε καρδιακά μυοκύτταρα *in vitro* (Cook et al., 2003).

Συνολικά, ο NF-κB κατά πάσα πιθανότητα εμπλέκεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις της καρδιάς, έχοντας όμως πολλαπλές διαφορετικές επιδράσεις. Η ενεργοποίηση του μπορεί είτε να προάγει την παθογένεια της νόσου, είτε να δρα προστατευτικά, κάνοντας τον έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο στις καρδιαγγειακές νόσους (van der Heiden et al., 2010).

### **I.A. Κουρκουμίνη**

Η κουρκουμίνη προέρχεται από το φυτό *Curcuma longa*, με την κοινή ονομασία κουρκουμάς ή κιτρινόριζα. Ο κουρκουμάς είναι ένα ριζωματοειδές πολυετές, ποώδες φυτό που αναπτύσσεται στην νότια και νοτιοδυτική τροπική περιοχή της Ασίας. Κατέχει ξεχωριστή θέση στην ασιατική κουζίνα και χρησιμοποιείται τόσο για τη γεύση όσο και για το χρώμα του. Για αιώνες χρησιμοποιούνταν στην Ινδία και την Κίνα στις ιατρικές πρακτικές (Gupta et al., 2013). Η επίδραση του κουρκουμά στην υγεία έχει πλέον συσχετιστεί με μια πορτοκαλο-κίτρινη, λιπόφιλη πολυφαινόλη από το ρίζωμα του φυτού, την κουρκουμίνη (Jurenka, 2009). Τα τελευταία χρόνια, έχει διαπιστωθεί ότι η κουρκουμίνη έχει αντι-οξειδωτικές, αντι-φλεγμονώδεις, αντι-καρκινικές και αντι-μικροβιακές δράσεις με αποτέλεσμα να γίνεται προσπάθεια χορήγησης της για την πρόληψη και τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών (Prasad et al., 2014). Σε αυτές, περιλαμβάνονται ο καρκίνος, τα αυτοάνοσα νοσήματα, νευρολογικές και καρδιαγγειακές ασθένειες και ο διαβήτης. Επιπλέον, γίνεται προσπάθεια να βελτιωθεί η βιολογική δραστηριότητα της ουσίας μέσω της σύνθεσης αναλόγων της (Kocaadam & Şanlıer, 2017). Κλινικές μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι η κουρκουμίνη είναι ασφαλής και αποτελεσματική, ενώ και η υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) έχει επιβεβαιώσει την καταλληλότητα της (Prasad et al., 2014).

Ο χημική ονομασία της κουρκουμίνης είναι 1,7-δις-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλ)-επτα-1,6-διεν-3,5-διόνη ή διφερυλοϋμεθάνιο, με τύπο  $C_{21}H_{20}O_6$  (Kumar et al., 2016). Η κουρκουμίνη δε διαλύεται στο νερό και σε ουδέτερο pH, αλλά είναι διαλυτή σε ακετόνη, μεθανόλη και αιθανόλη (Jurenka, 2009). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι είναι ευαίσθητη στο φως και γι' αυτό πρέπει να προστατεύεται από αυτό (Prasad et al., 2014).

Εξαιτίας της ανεπαρκούς απορρόφησης της από το σώμα και της αυξημένης ταχύτητας μεταβολισμού και απέκκρισης της, περιορίζεται σημαντικά η δραστηριότητα της (Devassy et al., 2015). Συνεπώς, γίνονται προσπάθειες να αυξηθεί η βιοδραστηριότητα της, με μία από αυτές να περιλαμβάνει την προσθήκη πιπερίνης μαζί με την κουρκουμίνη (Aggarwal & Harikumar, 2009). Επιπλέον, άλλες προσεγγίσεις αφορούν στη χρήση λιποσωμάτων με κουρκουμίνη, νανοσωματιδίων με κουρκουμίνη και συμπλόκων φωσφολιπιδίων, ενώ αναδύεται και η χρήση βιοδραστηκότερων αναλόγων της (Helson, 2013).

Η κουρκουμίνη θεωρείται ότι είναι αποτελεσματική έναντι διαφόρων ασθενειών, εξαιτίας της ικανότητας της να τροποποιεί διάφορους μοριακούς στόχους που σχετίζονται με την μοριακή παθογένεια της εκάστοτε ασθένειας. Έχει φανεί ότι παίζει κρίσιμο ρόλο στην ρύθμιση κυτταροκινών, κινασών, ενζύμων, μεταγραφικών

παραγόντων, αυξητικών παραγόντων, υποδοχέων, μεταστατικών και αποπτωτικών μορίων, σε όλες σχεδόν τις φάσεις ανάπτυξης μιας ασθένειας (Gupta et al., 2013). Η δομή της, λόγω της υψηλής μεθοξυλίωσης και χαμηλής υδρογόνωσης, της επιτρέπει να καταστρέφει τις ελεύθερες δραστικές ρίζες, δίνοντας της αντι-οξειδωτικές, αντι-φλεγμονώδεις και αντι-καρκινικές δράσεις (Devassy et al., 2015).

Η αντι-καρκινική δράση της κουρκουμίνης βρίσκεται υπό εντατική μελέτη, καθώς έχει βρεθεί να είναι αποτελεσματική έναντι πολλών σταδίων της νόσου, όπως η ανάπτυξη του όγκου, η διείσδυση, η αγγειογένεση και η μετάσταση. Η καταστολή της προόδου του καρκινικού όγκου μέσω της κουρκουμίνης, έχει βρεθεί να μεσολαβείται από το μονοπάτι του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (κυκλίνη D1, c-myc), της επιβίωσης (Bcl-2, Bcl-xL, cFLIP, XIAP, cIAP1), της ενεργοποίησης του μονοπατιού των κασπασών (caspase-8, 3, 9), των υποδοχέων θανάτου (DR4, DR5) καθώς και μονοπατιών σηματοδότησης πρωτεϊνικών κινάσων (JNK, Akt και ενεργοποιούμενη από AMP πρωτεϊνική κινάση-AMPK) (Ravindran et al., 2009). Έχει βρεθεί ότι μέσω αυτών των μονοπατιών, η κουρκουμίνη λειτουργεί ανασταλτικά σε διάφορους καρκινικούς τύπους και αυξάνει την αποτελεσματικότητα πολλών χημειοθεραπειών (Vallianou et al., 2015).

Επιπλέον, ο ρόλος της ως αντι-φλεγμονώδης παράγοντας, εκδηλώνεται μέσω της αρνητικής ρύθμισης προ-φλεγμονωδών ιντερλευκινών (IL-1, -2, -6, -8, -12), κυτταροκινών (TNF-α, χημειοτακτική πρωτεΐνη των μονοκυττάρων 1/MCP-1), ενζύμων (iNOS, κυκλοξυγενάση-2/COX-2, λιποξυγενάση, οξειδάση της ξανθίνης) και μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-κB (Menon & Sudheer, 2007), ενώ η αντι-οξειδωτική της δράση σχετίζεται με την καταστροφή ελεύθερων ριζών (Barzegar & Moosavi-Movahedi, 2011).

Ο καρδιοπροστατευτικός ρόλος της κουρκουμίνης, έχει συσχετιστεί με την αντι-οξειδωτική, αντι-φλεγμονώδη και αντι-αποπτωτική δράση της (S. Jiang et al., 2017). Το οξειδωτικό στρες, αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στην εκδήλωση πολλών καρδιαγγειακών νόσων, λόγω της υψηλής κατανάλωσης ενέργειας από την καρδιά, του οξειδωτικού περιβάλλοντος της και της ευαισθησίας της στις μεταβολές του περιβάλλοντος της. Έχει βρεθεί ότι η κουρκουμίνη, σε συνθήκες οξειδωτικούς στρες στην καρδιά, επάγει αντι-οξειδωτικά ένζυμα (Ansari et al., 2007; Sompamit et al., 2009), καταστέλλει μάρτυρες του οξειδωτικού στρες ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , μεταβολίτες του νιτρικού οξειδίου κλπ) (Yang et al., 2013) και παρεμποδίζει τη δράση της NADPH οξειδάσης, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα των ROS (Soetikno et al., 2012). Ακόμη, η επαναφορά του σωστού οξειδοαναγωγικού δυναμικού των μιτοχονδρίων από την κουρκουμίνη, αποτελεί πιθανή θεραπευτική προσέγγιση για την καρδιακή βλάβη που προκαλείται από την I/R (Yang et al., 2013). Όσον αφορά στην απόπτωση, η οποία έχει συσχετιστεί εκτενώς με τις καρδιαγγειακές νόσους, η κουρκουμίνη φαίνεται να δρα ενάντια της, υποδηλώνοντας έναν καρδιοπροστατευτικό μηχανισμό. Η ενεργοποίηση μονοπατιών επιβίωσης όπως της κινάσης 3 της 4,5-διφωσφορικής φωσφατιδυλινωσιτόλης (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, PI3K), της Akt, των ERK1/2 και η αναστολή μονοπατιών κυτταρικού θανάτου όπως των JNKs, αποτελούν πιθανούς μηχανισμούς δράσης της (Jeong et al., 2012). Τέλος, η αντι-φλεγμονώδης δράση της κουρκουμίνης υπό συνθήκες στρες, έχει φανεί να αναχαιτίζει την πρόοδο νόσων που αφορούν στην καρδιά. Η ιϊκή μυοκαρδίτιδα, αποτελεί μια

μορφή φλεγμονής του μυοκαρδίου που προκαλείται από τον ιό CVB3 (coxsackie-virus B3). Η επίδραση κουρκουμίνης μειώνει την τοπική και συστηματική έκφραση προ-φλεγμονωδών παραγόντων, όπως NF-κB, IL-6, IL-1β, βελτιώνοντας τα συμπτώματα της νόσου (Song et al., 2013). Ομοίως, η αναστολή του μονοπατιού JNK/NF-κB σε διαβητικούς επίμυες, παρεμποδίζει την υπερέκφραση TNF-α και IL-6 στα μακροφάγα, οδηγώντας σε μειωμένη βλάβη του μυοκαρδίου (Pan et al., 2013). Επιπλέον, η καταστολή της έκφρασης μορίων προσκόλλησης από την κουρκουμίνη, μειώνει τις επιπτώσεις της φλεγμονής στην καρδιά (Kim et al., 2007). Όλα τα παραπάνω, υποδεικνύουν ότι ο προστατευτικός ρόλος της κουρκουμίνης στην καρδιά εκδηλώνεται σε πολλά επίπεδα και ότι το συγκεκριμένο μόριο πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στις σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Τέλος, όσον αφορά στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, υποστηρίζεται ότι η κουρκουμίνη, καθώς εμπλέκεται στους μηχανισμούς γήρανσης, πιθανώς παρεμποδίζει κυτταρικές αλλαγές που προκύπτουν εξαιτίας αυτής. Κατ' επέκταση, συμβάλλει στην διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων και στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με τη γήρανση (Monroy et al., 2013). Επιπλέον, η ιδιότητα της να καταστρέφει τις δραστικές ρίζες την καθιστά πιθανό νευρο-προστατευτικό παράγοντα (Ghosh et al., 2015). Στη νόσο του Alzheimer, η κουρκουμίνη φαίνεται να βελτιώνει τις νοητικές λειτουργίες, να μειώνει την παρουσία των β-αμυλοειδικών πλακών και να περιορίζει τον εκφυλισμό των νευρώνων (Mishra & Palanivelu, 2008). Στη νόσο του Parkinson, η κουρκουμίνη μείωσε τα επίπεδα της ντοπαμίνης και συντέλεσε στην προστασία των νευρώνων της μέλαινας ουσίας, δύο γεγονότα που σχετίζονται με την παθογένεια της συγκεκριμένης ασθένειας (Mythri & Bharath, 2012). Τέλος, στην πολλαπλή σκλήρυνση, η εμπλοκή της κουρκουμίνης στα μονοπάτια σηματοδότησης κινάση Janus/μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής (Janus kinase and Signal Transducer and Activator of Transcription, JAK-STAT), AP-1 και NF-κB, μείωσε τις παρενέργειες της φλεγμονώδους αυτοάνοσης ασθένειας (Tegenge et al., 2014).

### **I.E. Καρδιακά κύτταρα θηλαστικών H9c2**

Τα πρωτογενή καρδιακά μυοκύτταρα, δηλαδή οι άμεσοι απόγονοι των κυττάρων που απομονώθηκαν από τον οργανισμό, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η διατήρησή τους στην καλλιέργεια για μεγάλα διαστήματα (Xu & Colecraft, 2009). Επιπλέον, η απομόνωση τους απαιτεί την συνεχή θυσία εργαστηριακών πειραματόζωων, γεγονός που εγείρει πολλές αντιδράσεις. Έτσι, είναι κρίσιμο να υπάρχουν *in vitro* μοντέλα κυττάρων που να προσομοιάζουν στα καρδιακά κύτταρα και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην βιολογική έρευνα. Η κυτταρική σειρά μυοβλαστών H9c2, η οποία απομονώνεται από την κοιλία καρδιάς αρουραίου, χρησιμοποιείται σε μελέτες που αφορούν σε σκελετικούς και καρδιακούς μυοβλάστες λόγω των βιοχημικών, μορφολογικών και ηλεκτρο-ορμονικών σηματοδοτικών τους ιδιοτήτων (Hescheler et al., 1991). Η απομόνωση των κυττάρων είχε γίνει αρχικά από καρδιά αρουραίου BDIX (Kimes & Brandt, 1976). 13 μέρες μετά τη γονιμοποίηση, τα κύτταρα απομονώνονται και «αθανатоποιούνται». Κατά τις διαδοχικές διαιρέσεις, η διαφορετική κινητική του εκάστοτε κυτταρικού πληθυσμού στο ετερογενές κλάσμα που απομονώθηκε αρχικά, οδηγεί σε διαχωρισμό των



πληθυσμών αυτών στο τρυβλίο της καλλιέργειας. Σε αυτό το στάδιο, τα κύτταρα δεν έχουν διαφοροποιηθεί πλήρως σε ενήλικα καρδιακά μυοκύτταρα, ωστόσο, εκφράζουν ειδικούς γι' αυτά μάρτυρες. Βασικό στοιχείο της συγκεκριμένης εμβρυϊκής κυτταρικής σειράς είναι η ικανότητα των κυττάρων να διαφοροποιηθούν από μονοπύρηνους μυοβλάστες σε σωληνώμορφα κύτταρα, όταν καλλιεργηθούν σε θρεπτικό μέσο με χαμηλή συγκέντρωση ορού. Ως αποτέλεσμα, αποκτούν επιμηκυμένο σχήμα και διατάσσονται σε παράλληλες σειρές (Sardao et al., 2007). Κατά τη διαφοροποίηση, τα κύτταρα αποκτούν φαινότυπο περισσότερο παρόμοιο με αυτόν των σκελετικών μυών, όπως φαίνεται και από την έκφραση κυτταρο-ειδικών μαρτύρων (μυογενίνη και παράγοντας μυογενοῦς διαφοροποίησης-MyoD) (Menard et al., 1999). Επιπλέον, η επίδραση με ρετινοϊκό οξύ (all-trans retinoic acid, RA) σε θρεπτικό μέσο με 1% ορό, οδηγεί σε διαφοροποίηση των κυττάρων προς ενήλικα καρδιακά μυοκύτταρα που χαρακτηρίζονται από την παρουσία της υπομονάδας α1 των καναλιών ασβεστίου τύπου L (Menard et al., 1999).

Τα κύτταρα H9c2 δεν εμφανίζουν συσταλτική δραστηριότητα, ούτε όταν είναι διαφοροποιημένα. Ωστόσο, όπως και τα νεογνικά καρδιακά μυοκύτταρα, αποκρίνονται με παρόμοιο τρόπο σε διάφορα ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένης της εμφάνισης υπερτροφικού φαινοτύπου (Watkins et al., 2011). Η πλειοψηφία των ερευνών που έχει γίνει με τη χρήση μη διαφοροποιημένων μυοβλαστών H9c2, εγείρει ερωτήματα σχετικά με την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων όταν γίνεται σύγκριση με πρωτογενή καρδιακά μυοκύτταρα. Αυτό είναι ακόμα πιο έντονο στις περιπτώσεις κυτταροτοξικότητας, στις οποίες η δοσο-εξαρτώμενη απόκριση τροποποιείται ανάλογα με το στάδιο της διαφοροποίησης (Branco et al., 2011, 2012). Εφόσον, λοιπόν, ο ενήλικος καρδιακός ιστός αποτελείται κυρίως από πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα χωρίς πολλαπλασιαστική ικανότητα, είναι πιθανό τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα H9c2 να διαφέρουν σε σχέση με αυτόν. Σε πρόσφατη έρευνα, έγινε προσπάθεια να διαπιστωθεί αν το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης των H9c2 κατά την διαφοροποίησή τους σε φαινότυπο καρδιακού μυοκυττάρου, διαφέρει σε σχέση με τα ενήλικα μυϊκά κύτταρα του καρδιακού ιστού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα διαφοροποιημένα H9c2 κύτταρα, μέσω της επίδρασης με ρετινοϊκό οξύ και της χαμηλής συγκέντρωσης ορού, αποτελούν καλύτερο μοντέλο για τα πρωτογενή καρδιακά μυοκύτταρα σε σχέση με τα αδιαφοροποίητα (Branco et al., 2015). Έτσι, το χαμηλό κόστος διατήρησης της καλλιέργειας, η αποφυγή θυσίας των πειραματόζωων και η έκφραση πολλών ειδικών μαρτύρων και πρωτεϊνικών/μεταβολικών στοιχείων που προσομοιάζουν τα ενήλικα καρδιακά κύτταρα, καθιστά την εν λόγω κυτταρική σειρά κατάλληλη για τη μελέτη της καρδιάς.



## Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη του διττού ρόλου του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στην απόπτωση των καρδιακών μυοκυττάρων αρουραίου της κυτταρικής σειράς H9c2. Αρχικά, έγινε προσπάθεια διερεύνησης της φωσφορυλίωσης της υπομονάδας p65 του NF-κΒ στη σερίνη 536, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες που επάγεται κατά την επίδραση των κυττάρων με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Έπειτα, θέλαμε να διαπιστώσουμε αν στις ίδιες συνθήκες η φωσφορυλιωμένη p65 μεταβαίνει στον πυρήνα ώστε να ασκήσει τη δράση της ως συστατικό του συμπλόκου του NF-κΒ. Στη συνέχεια, αφού επιβεβαιώθηκε η ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα στις δεδομένες συνθήκες, στοχεύσαμε στην διερεύνηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση αυτή, συμπεριλαμβανομένων και αυτών των MAPKs. Έτσι, προχωρήσαμε στη μελέτη της επίδρασης καθιερωμένων αναστολέων των MAPKs -SB203580 για την p38 MAPK, SP600125 για τις JNKs και PD98059 για τις ERKs-, στην φωσφορυλίωση της p65 υπομονάδας. Σε συνέχεια της διερεύνησης των εμπλεκόμενων μονοπατιών, ελέγχθηκε και η επίδραση του αναστολέα της MSK1, H89, η οποία αποτελεί καταρροϊκό στόχο της p38 MAPK και άμεση κίνηση που φωσφορυλιώνει την p65 στη σερίνη 276. Σε επόμενο στάδιο, θέλαμε να διαπιστώσουμε αν η παρατεταμένη επώαση των κυττάρων με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, συντελεί στην επαγωγή της απόπτωσης, ελέγχοντας τη θραύση της PARP. Η μελέτη της επίδρασης συγκεκριμένων αναστολέων, PD98059 και H89 είχε ως στόχο τον εντοπισμό των μονοπατιών μέσω των οποίων συντελείται η απόπτωση. Επιπλέον, βασικό μας μέλημα ήταν να εξακριβώσουμε το ρόλο του NF-κΒ στην επαγωγή της απόπτωσης, ώστε να μπορέσουμε να τον χαρακτηρίσουμε ως προ-αποπτωτικό ή αντι-αποπτωτικό μεταγραφικό παράγοντα, δηλαδή παράγοντα που επάγει τη μεταγραφή γονιδίων επιβίωσης ή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Έτσι, έγινε προσπάθεια μελέτης της επίδρασης που έχει η προ-επώαση με τους ανωτέρω αναστολείς στη θραύση της PARP, οι οποίοι φάνηκε, προηγουμένως, να παρεμποδίζουν τη φωσφορυλίωση της p65. Επιπροσθέτως, στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε και η δράση διαφορετικών συγκεντρώσεων, 0,1μM και 1μM, μιας φυσικής ουσίας με ποικίλες δράσεις, της κουρκουμίνης, τόσο στη φωσφορυλίωση της υπομονάδας p65 όσο και στην επαγωγή της απόπτωσης. Συμπερασματικά, ευρύτερος στόχος της διπλωματικής αυτής εργασίας ήταν η εύρεση και η περιγραφή ενός πιθανού μηχανισμού μέσω του οποίου το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επάγει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ κατά την απόπτωση των καρδιακών μυοκυττάρων και πως τα μονοπάτια που εμπλέκονται μπορούν, ενδεχομένως, να αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους για την αναστολή της απόπτωσης. Μάλιστα, η διερεύνηση του αντιοξειδωτικού και αντι-αποπτωτικού ρόλου της κουρκουμίνης μπορεί να αποκαλύψει καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες της ουσίας αυτής.

---

## II. Υλικά και μέθοδοι

---

### II.A Υλικά

#### II.A.1 Βιολογικό υλικό

Το βιολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την περάτωση της παρούσας μελέτης ήταν καλλιέργειες καρδιακών μυοβλαστών της κυτταρικής σειράς H9c2, που προήλθαν από αρουραίους του είδους *Rattus norvegicus*. Η κυτταρική σειρά χορηγήθηκε από την εταιρεία ATCC (American Type Culture Collection) με κωδικό CRL-1446.

#### II.A.2 Υλικά κυτταροκαλλιέργειας

- Θρεπτικό υπόστρωμα DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) της εταιρείας Gibco (Κωδικός: 41966-029). Αποτελείται από 4.5 g/L D-Γλυκόζης, 584 mg/L L-Γλουταμίνης και Πυροφωσταφυλικό.
- Απενεργοποιημένος ορός εμβρύου βοδιού (FBS-Fetal Bovine Serum) της εταιρείας PAA Laboratories GmbH (Κωδικός: A15-043).
- Διάλυμα τρυψίνης-EDTA 10%(v/v) διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS της εταιρείας Gibco. Το EDTA είναι ένα χηλικό αντιδραστήριο που έχει την ικανότητα να δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$  στα κύτταρα, έτσι ώστε να μην μπορούν να παραμείνουν προσδεδεμένα στην επιφάνεια που αναπτύσσονται. Η δράση της τρυψίνης απενεργοποιείται από το DMEM.
- Αντιβιοτικά πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη της εταιρείας PAA Laboratories GmbH (Κωδικός: P11-010). Τα αντιβιοτικά προστίθενται στις φιάλες κυτταροκαλλιέργειας σε συγκεντρώσεις 100 U/mL και 100 µg/mL αντίστοιχα, προς αποφυγή των μολύνσεων από διάφορους μικροοργανισμούς.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων για τη πλύση των κυττάρων (PBS). Το PBS στερείται των δισθενών κατιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$  για την καλύτερη δράση του παγκρεατικού ενζύμου τρυψίνη. Περιέχει 137mM NaCl, 10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2.7mM KCl, 1.7mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  και έχει pH 7.4.
- Incuwater-clean της εταιρείας AppliChem (Κωδικός: A5219,0100). Προστίθεται στο απεσταγμένο νερό του δίσκου που βρίσκεται στο εσωτερικό του κλιβάνου. Το νερό αυτό χρησιμοποιείται ώστε να διατηρείται ένα περιβάλλον υγρασίας που είναι απαραίτητο για την σωστή επώαση των κυττάρων. Ωστόσο, επειδή το νερό και η περιβάλλουσα θερμοκρασία ευνοούν την ανάπτυξη μικροοργανισμών, χρησιμοποιείται το inquwater για την αποστείρωση του νερού.
- Θρεπτικό μέσο για τη ψύξη των κυττάρων (Freezing medium) που περιέχει 90%(v/v) ορού βοδιού (FBS) και 10%(v/v) DMSO. Χρησιμοποιείται για την αποτελεσματικότερη συντήρηση και αποθήκευση των κυττάρων.
- Αιθανόλη 70% από stock 96%

### Π.Α.3 Επιδράσεις

- Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% (w/v) της εταιρείας AppliChem Panreac (Κωδικός: 141076.1211)
- Αναστολείς : Από την εταιρεία Calbiochem-Milipore είναι οι αναστολείς SB203580 (#559389), PD98059 (#513000) και SP600125 (#4201119), ενώ η κουρκουμίνη είναι από την εταιρεία Chemical (Ann Arbor, MI, USA)

### Π.Α.4 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ομογενοποίηση των κυττάρων

- Διάλυμα λύσης κυττάρων Buffer G (Glycerophosphate Buffer pH 7.5) που περιέχει 20mM β-γλυκεροφωσφορικό, 20mM NaF, 2mM EDTA, 0.2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10mM βενζαμιδίνη και 20mM Tris/HCl pH 6.7
- Διάλυμα λύσης κυττάρων Buffer A pH 7.9 που περιέχει 10mM HEPES, 10mM KCl, 0.1mM EGTA, 0.1mM EDTA, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> και 20mM β-γλυκεροφωσφορικό
- Διάλυμα λύσης κυττάρων Buffer B pH 7.9 που περιέχει 20mM HEPES, 400mM NaCl, 1mM EGTA, 0.1mM EDTA, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20% (v/v) γλυκερόλη και 20mM β-γλυκεροφωσφορικό
- Αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών: 20μM Leupeptin (Κωδικός: L2884), 10μM E-64 (Κωδικός: E3132-1MG), 5μM dithiothreitol DTT (Κωδικός: 4315-1G), 300μM phenyl methyl sulfonyl fluoride PMSF (Κωδικός: P7626-250MG) της εταιρείας Sigma και Aprotinin της εταιρείας AppliChem (Κωδικός: A2132,0010). Οι αναστολείς αποτρέπουν την πρωτεόλυση, την αποφωσφορυλίωση καθώς και τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Επίσης, χρησιμοποιούμε 0.05% (v/v) ήπιο απορρυπαντικό Triton X-100.

### Π.Α.5 Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης

- Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης ορού βοδιού (BSA, Bovine Serum Albumin pH 7,0) της εταιρείας BioChemica AppliChem (Κωδικός: LOT7M007605). Παρασκευάζεται stock 0,2 mg/mL, από το οποίο γίνεται η κατασκευή πρότυπης καμπύλης γνωστών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης.
- Αντιδραστήριο Bradford της εταιρείας AppliChem (Κωδικός: A6932,0500) το οποίο περιέχει 0.01%(v/v) χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, 8.5%(w/v) φωσφορικό οξύ και 4.7%(v/v) μεθανόλη.

### Π.Α.6 Υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοδοκιμασία Western Blotting

- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διαστάσεις 0,3x3m και πόρους 0,45μm, της εταιρείας MACHEREY-NAGEL (Κωδικός: 741280)
- Χαρτιά Whatman (30x60cm) της εταιρείας MACHEREY-NAGEL (Κωδικός:742112)
- Υλικά στησίματος
- Γυάλινες πλάκες- Glass Plates της εταιρείας BIO-RAD (Κωδικός:1653310)

- Πρωτεϊνικοί δείκτες γνωστού μοριακού βάρους (Color Prestained Protein Standard Broad Range 11-245 kDa) της εταιρείας BioLabs New England (Κωδικός: P77125). Το μίγμα αυτό είχε την ακόλουθη πρωτεϊνική σύσταση:

**Πίνακας II.1** Πρωτεϊνικοί δείκτες

| Πρωτεΐνη                                         | Μοριακή Μάζα |
|--------------------------------------------------|--------------|
| MBP-β-γαλακτοσιδάση από Escherichia coli         | 175,0 kDa    |
| MBP-παραμυοσίνη από Escherichia coli             | 83,0 kDa     |
| Αφυδρογονάση γλουταμινικού οξέος από ήπαρ βοδιού | 62,0 kDa     |
| Αλδολάση από μυ κουνελιού                        | 47,5 kDa     |
| Ισομεράση φωσφορικής τριόζης από μυ κουνελιού    | 32,5 kDa     |
| β-γαλακτοσφαιρίνη από γάλα βοδιού                | 25,0 kDa     |
| Λυσοζύμη από τη λέκιθο αυγού κοτόπουλου          | 16,5 kDa     |
| Απροτινίνη από πνεύμονα βοδιού                   | 6,5 kDa      |

- Χρωστική Ponceau που περιέχει 0,1%(w/v) Ponceau και 5%(v/v) οξικό οξύ
- Χρωστική 10%(v/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, με 10%(v/v) οξικό οξύ
- Φωτογραφικό φιλμ (Fuji medical X-ray film, super RX 18x24cm) της εταιρείας Kodak GBX (Κωδικός :4741008389)
- Διάλυμα εμφανιστή (Developer and Replenisher) της εταιρείας Kodak GBX (Κωδικός: 1900943)
- Διάλυμα μονιμοποιητή (Fixer and Replenisher) της εταιρείας Kodak GBX (Κωδικός:1901875)
- Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη στιγμιαίας διάλυσης της εταιρείας Regilait CS
- ECL Western Blotting Detection Reagents της εταιρείας GE Healthcare (Κωδικός: RPN2209)

## **II.A.7 Αντισώματα**

- Πρωτογενή αντισώματα

Τα αντισώματα για : phospho-NF-κB (3031S), total-NF-κB (4764), phospho-p38 (9211S), phospho-ERK1/2 (9102S), phospho-JNKs, PARP-cPARP (9542S) είναι από την εταιρεία Cell Signaling Technology. Το αντίσωμα αντι-β-ακτίνη (A2103) είναι από την Sigma.

- Δευτερογενή αντισώματα

Το δευτερογενές αντίσωμα έναντι των ανοσοσφαιρινών λαγού, συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση του μαύρου ρεπανιού (Horseradish Peroxidase, HRP), HRP-anti-rabbit, είναι από την εταιρεία Dako A/S (Glostrup, Denmark)

## **Π.Α.8 Γενικά υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεκπεραίωση της εργασίας**

- Falcon 15mL της εταιρείας Greiner Bio-One (Κωδικός: 430766)
- Falcon 50mL της εταιρείας Greiner Bio-One (Κωδικός: 227261)
- Πιπέτες των 5mL της εταιρείας Greiner Bio-One (Κωδικός: 606180)
- Πιπέτες των 10mL της εταιρείας Greiner Bio-One (Κωδικός: 607180)
- Parafilm της εταιρείας PECHINEY- plastic packaging (Κωδικός: PM-996)
- Αιθανόλη 96% (v/v)
- Μεθανόλη της εταιρείας AppliChem (Κωδικός: 131091.1214)
- Tween 20 της εταιρείας AppliChem GmbH (Κωδικός: A4974)
- Eppendorfs και Tips

## **Π.Α.9 Όργανα και εξοπλισμός εργαστηρίου**

- Πιπέτες Gilson
- Επωαστικός κλίβανος (MCO15AC) της εταιρείας SANYO (Κωδικός: 60603824).
- Θάλαμος νηματικής ροής με πηγή υπεριώδους φωτός (KB/KBM horizontal laminar airflow bench class100) της εταιρείας Faster.
- Οπτικό μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων (IN834) της εταιρείας Nova-Tech International.
- Λάμπα UV ακτινοβολίας για την αποστείρωση του θαλάμου των κυτταροκαλλιιεργειών.
- Φυγόκεντρος (Universal Mikro 12-24 Centrifuge w/24-Well Fixed Angel Rotor) της εταιρείας.
- Φασματοφωτόμετρο (Ultrosepct 2000) της εταιρείας Pharmacia Biotech.
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini Protean III Electrophoresis Cell της εταιρείας BIO- RAD (Κωδικός: 675100792).
- Συσκευή ημίστεγνης μεταφοράς (TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL) της εταιρείας BIO-RAD.
- Τροφοδοτικό Power Pac 300 και Power Pac 1000 της εταιρείας BIO-RAD.
- Πεχάμετρο pH/mV/Temp Meter PL-600.
- Υδατόλουτρο (WB3015) της εταιρείας Bioline Scientific.
- Ανακινούμενη πλάκα Heidolph Promax 2020.
- Αναδευτήρας Vortex, MS2 Minishaker της εταιρείας Bacacos Scientific.
- Σακουλοποιός (Severin 3602).
- Ζυγός ακριβείας (KERN 410) της εταιρείας KERN.

## **Π.Β. Μέθοδοι**

### **Π.Β.1 Κυτταροκαλλιέργειες**

Η καλλιέργεια των καρδιακών μυοβλαστών H9c2 καθώς και όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν στον θάλαμο των κυτταροκαλλιιεργειών στον οποίο υπάρχει ένας κλίβανος σταθερής θερμοκρασίας και συνθηκών CO<sub>2</sub>, ένα οπτικό μικροσκόπιο και ο θάλαμος νηματικής ροής. Κάθε διαδικασίας που αφορά στις κυτταροκαλλιιεργειες, προηγείται κατάλληλη προετοιμασία του θαλάμου. Συγκεκριμένα, τόσο στο δωμάτιο,

όσο και στον θάλαμο νηματικής ροής εφαρμόζεται UV για 15 λεπτά. Η δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας έγκειται στην ιδιότητα της να καταστρέφει τα νουκλεϊκά οξέα των μικροοργανισμών, καθώς απορροφάται από αυτά και οδηγεί στο σχηματισμό διπλών δεσμών ή διμερών νουκλεοτιδίων, κυρίως θυμίνης. Οι αλλαγές αυτές, εμποδίζουν το διπλασιασμό των μικροοργανισμών και την ικανότητα τους για μόλυνση, προστατεύοντας έτσι τις κυτταροκαλλιέργειες από πιθανή ανάπτυξη μικροοργανισμών. Έπειτα, τίθεται σε λειτουργία ο θάλαμος νηματικής ροής, ο οποίος εξασφαλίζει τις ασηπτικές συνθήκες εργασίας. Συγκεκριμένα, επιτρέπει τη διέλευση του αέρα μέσα από ένα φίλτρο ώστε να συγκρατηθεί το μεγαλύτερο ποσοστό (99,7%) των αέριων σωματιδίων μέχρι και διαμέτρου 0,3μm, τα οποία στη συνέχεια απομακρύνονται με αποτέλεσμα την αποστείρωση του αέρα στο χώρο εργασίας. Επιπλέον, για να μεγιστοποιηθεί η αποφυγή μολύνσεων χρησιμοποιούνται αποστειρωμένες πιπέτες, τρυβλία και φιάλες κυτταροκαλλιέργειας, καθώς και κάθε αντικείμενο ψεκάζεται με διάλυμα αιθανόλης 70%. Η αιθανόλη σε αυτήν τη συγκέντρωση συντελεί στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών και των λιπιδίων των κυτταρικών τοιχωμάτων και μεμβρανών των περισσότερων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την θανάτωσή τους.

Για την συντήρηση της κυτταρικής σειράς H9c2, είναι απαραίτητη η καλλιέργεια της σε θρεπτικό μέσο DMEM παρουσία 10% (v/v) θερμικά απενεργοποιημένου ορού εμβρύου βοδιού (FBS) και αντιβιοτικών. Το θρεπτικό υλικό σε συνδυασμό με τον ορό είναι απαραίτητα για την κάλυψη των θρεπτικών αναγκών των κυττάρων ώστε να μπορέσουν να πολλαπλασιαστούν, ενώ τα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη προστίθενται στο διάλυμα για να αποτραπούν οι μολύνσεις. Η απενεργοποίηση του FBS, αναφέρεται στην απενεργοποίηση του συμπληρώματος και γίνεται με θέρμανση του στους 56°C για μισή ώρα υπό ανάδευση. Οι συνθήκες καλλιέργειας, δηλαδή 37°C και 5% CO<sub>2</sub> καθώς και η υγρασία μέσα στον κλίβανο εξασφαλίζουν την προσκόλληση των κυττάρων στον πυθμένα της φιάλης κυτταροκαλλιέργειας, τον πολλαπλασιασμό τους και την δημιουργία ενός μονοκυτταρικού στρώματος (Kimes & Brandt, 1976).

## **II.B.2 Απόψυξη κυττάρων**

Τα κύτταρα διατηρούνται ανενεργά σε υγρό άζωτο ώστε να υπάρχει απόθεμα τους. Για να μπορέσουν να πολλαπλασιαστούν πρέπει να καλλιεργηθούν σε ευνοϊκές συνθήκες. Όμως, για να γίνει αυτό, πρέπει να προηγηθεί η απόψυξή τους από τους -196°C, δηλαδή τη θερμοκρασία του υγρού αζώτου. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την αφαίρεση της αμπούλας που περιέχει 1mL αιωρήματος κυττάρων, από το υγρό άζωτο και την απευθείας τοποθέτηση της στους 37°C. Αφού ξεπαγώσουν, το 1mL μεταφέρεται σε falcon όπου προστίθενται 4mL θρεπτικού μέσου DMEM με FBS 15%, και όχι 10% που χρησιμοποιείται στην απλή καλλιέργεια των κυττάρων. Αυτό συμβαίνει ώστε να δοθεί έναυσμα για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων καθώς σε αυτή τη φάση είναι ανενεργά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του διαλύματος στα 1500 rpm για 5 λεπτά στους 20°C και το ίζημα επαναιωρείται σε 5mL θρεπτικού DMEM/15% FBS σε μικρή φιάλη κυτταροκαλλιέργειας (T25) η οποία διατηρείται στον κλίβανο. Τις πρώτες μέρες γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου έως ότου τα κύτταρα αποκτήσουν κανονικούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού. Όταν αυτό συμβεί, γίνεται ανακαλλιέργεια



των κυττάρων σε μεγάλη φιάλη κυτταροκαλλιέργειας (T75) με DMEM στο οποίο υπάρχει, πλέον, FBS 10% (Yokoyama et al., 2012).

### **II.B.3 Ανακαλλιέργεια κυττάρων**

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, πρέπει αρχικά να γίνει παρατήρηση της φιάλης κυτταροκαλλιέργειας στο μικροσκόπιο, ώστε να εξασφαλιστεί ότι η πυκνότητα των κυττάρων στον πυθμένα της φιάλης κυτταροκαλλιέργειας είναι επαρκής (70-80% κάλυψη). Ακολούθως, αφαιρείται όλο το θρεπτικό μέσο της φιάλης και γίνεται ένα ξέπλυμα με 3mL PBS. Το PBS πρέπει με αργές κινήσεις να καλύψει όλον τον πυθμένα, ώστε να γίνει καλό ξέπλυμα πιθανών νεκρών κυττάρων και τοξικών προϊόντων του μεταβολισμού τους. Στη συνέχεια, αφαιρείται το PBS και προστίθεται στη φιάλη κυτταροκαλλιέργειας 1,5mL τρυψίνης. Η τρυψίνη είναι ένα ένζυμο το οποίο διασπά μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, οδηγώντας έτσι στην αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα της φιάλης. Για να δράσει, αφού η φιάλη ανακινείται με αργές κινήσεις, τοποθετείται στον κλίβανο για 2-3 λεπτά. Μετά την επώαση, γίνεται παρατήρηση ώστε να επιβεβαιωθεί η αποκολλήση των κυττάρων και στην φιάλη κυτταροκαλλιέργειας προστίθενται 3,5 mL DMEM/FBS 10%. Αφού γίνει καλή ανάδευση για να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα κυττάρων, απορροφάται το συνολικό εναιώρημα και από αυτό αφήνεται 1mL στη φιάλη. Το υπόλοιπο είτε απορρίπτεται, είτε διαμοιράζεται σε τρυβλία που θα χρησιμοποιηθούν στα πλαίσια των πειραμάτων. Ο όγκος του εναιωρήματος που προστίθεται σε κάθε τρυβλίο καθορίζεται από την καταμέτρηση των κυττάρων που έχει προηγηθεί. Το εναιώρημα της φιάλης κυτταροκαλλιέργειας, συμπληρώνεται με DMEM/FBS 10% σε τελικό όγκο 8mL και τοποθετείται στον κλίβανο για επώαση. Για να γίνει σωστά η επώαση, πρέπει μέσα στον κλίβανο να γίνει χαλάρωση στο πώμα της φιάλης ώστε να επιτρέπεται η διέλευση του αέρα. Να σημειωθεί ότι, πριν από οποιουδήποτε χειρισμούς, όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, πλην της τρυψίνης ή οποία χρησιμοποιείται απευθείας από το ψυγείο για να ενεργοποιηθεί μόνο όταν προστεθεί στα κύτταρα, πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία 37°C, γι' αυτό και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο. Φυσικά, καθ' όλη τη διάρκεια των χειρισμών είναι απαραίτητη η διατήρηση των ασηπτικών συνθηκών (Freshney, 1993).

### **II.B.4 Ψύξη κυττάρων**

Η αντίστροφη διαδικασία της απόψυξης, δηλαδή η ψύξη των κυττάρων, απαιτείται για την διατήρηση του αποθέματος της κυτταρικής σειράς. Σε φιάλη κυτταροκαλλιέργειας με όσο το δυνατόν περισσότερα κύτταρα, κατά προτίμηση μικρής γενιάς, γίνεται ξέπλυμα με 3mL PBS και στη συνέχεια προστίθεται τρυψίνη ώστε να επιτευχθεί η αποκόλληση των κυττάρων, αντίστοιχα με την διαδικασία της ανακαλλιέργειας. Μετά την προσθήκη 3,5mL DMEM/FBS 10%, το εναιώρημα μεταφέρεται σε αποστειρωμένο falcon των 15mL και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1500 rpm για 5 λεπτά στους 20°C. Μετά τη φυγοκέντρηση, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 1mL freezing medium, δηλαδή σε μέσο ψύξης που περιλαμβάνει 5% DMSO σε FBS και το διάλυμα τοποθετείται σε ειδικές αμπούλες που μπορούν να αποθηκευτούν στο υγρό άζωτο. Έπειτα, γίνεται σταδιακή



ψύξη τους, με την παραμονή τους για ένα εικοσιτετράωρο στους -20oC, για ένα εικοσιτετράωρο στους -80oC και τελικώς, αποθήκευση στους -196oC του υγρού αζώτου. Η σταδιακή ψύξη σε συνδυασμό με τη χρήση του DMSO που είναι κρυοπροστατευτικό, είναι απαραίτητα ώστε να αποφευχθεί η πιθανή δημιουργία παγοκρυστάλλων που θα μπορούσαν να προκαλέσουν βλάβες στα οργάνδια και τις μεμβράνες των κυττάρων (Yokoyama et al., 2012).

### **II.B.5 Καταμέτρηση κυττάρων**

Η καταμέτρηση των κυττάρων αποτελεί απαραίτητο βήμα για τον υπολογισμό του όγκου του εναιωρήματος που πρέπει να προστεθεί σε κάθε τρυβλίο, ώστε να επιτευχθεί ένας συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων σε αυτό. Για να γίνει η καταμέτρηση χρησιμοποιείται η πλάκα Neubauer, στην οποία προστίθενται 1λ του εναιωρήματος και ακολουθεί παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Μετρώνται τα κύτταρα που βρίσκονται στα 4 γωνιακά τετράγωνα του κεντρικού σταυρού της πλάκας και εξάγεται ο μέσος όρος τους. Καθένα από αυτά τα τετράγωνα έχει διαστάσεις 0,1cm x 0,1cm x 0,1mm δηλαδή 0,0001cm<sup>3</sup> ή 0,0001mL. Επομένως, πολλαπλασιάζοντας x10000 βρίσκουμε τον αριθμό των κυττάρων σε 1mL. Με απαραίτητους υπολογισμούς στους οποίους λαμβάνονται υπόψη οι τελικοί όγκοι και οι τυχόν αραιώσεις, οδηγούμαστε στον όγκο που απαιτείται ώστε ο τελικός αριθμός των κυττάρων, για τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, να είναι 200.000. Αφού τοποθετηθεί ο υπολογισθέντας όγκος, προστίθεται DMEM/FBS 10%, ώστε να επιτευχθεί ο τελικός όγκος που πρέπει να υπάρχει ανάλογα με το μέγεθος του τρυβλίου (Sukcharoen et al., 1994).

### **II.B.6 Επιδράσεις**

Πριν από τη διεξαγωγή κάθε πειράματος είναι απαραίτητη μια διαδικασία που αποκαλείται στέρηση ορού. Κατά την διαδικασία αυτή, 24 ώρες πριν από το πείραμα, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο DMEM/FBS 10% από όλα τα τρυβλία και στη θέση του προστίθεται σκέτο θρεπτικό DMEM, χωρίς ορό. Τα τρυβλία στη συνέχεια επανατοποθετούνται στον κλίβανο και γίνεται επώαση όλη τη νύχτα. Σκοπός του συγκεκριμένου χειρισμού είναι η παύση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, ώστε να εξασφαλιστεί ότι όλα τα κύτταρα βρίσκονται στην ίδια φάση του κυτταρικού κύκλου κατά το χρόνο της επίδρασης την επόμενη μέρα. Επιπλέον, στον ορό περιέχονται διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες σε αντίθετη περίπτωση μπορεί να επηρέαζαν τα αποτελέσματα του πειράματος.

Τη μέρα της διεξαγωγής του πειράματος, ανάλογα με τον εκάστοτε σχεδιασμό, προετοιμάζονται τα διαλύματα που θα προστεθούν στα τρυβλία και υπολογίζονται οι όγκοι που χρειάζονται ώστε να επιτευχθούν οι τελικές συγκεντρώσεις. Στην παρούσα εργασία, επιλέχθηκαν μια σειρά από αναστολείς οι οποίοι για να δράσουν έπρεπε να προστεθούν στο εκάστοτε τρυβλίο 30 λεπτά πριν από την προσθήκη του οξειδωτικού μέσου, δηλαδή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Συγκεκριμένα, αφού ανοιχθεί προσεκτικά το καπάκι του τρυβλίου, βυθίζεται η άκρη του tip στο θρεπτικό και απελευθερώνεται η εκάστοτε ουσία. Ακολουθεί ήπια κυκλική ανάδευση ώστε η δραστική ουσία να διαχυθεί σε όλη την επιφάνεια και το τρυβλίο επανατοποθετείται στον κλίβανο για την προσχεδιασμένη επώαση.

### II.B.7 Ομογενοποίηση

Για την μελέτη των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στα μονοπάτια που μελετήσαμε, ήταν απαραίτητη η εκχύλιση τους από τα κύτταρα, μέσω της διαδικασίας της ομογενοποίησης. Κατά την διαδικασία αυτή, τα κύτταρα που έχουν υποστεί ορισμένες επιδράσεις, λύνονται και από αυτά απομονώνεται το πρωτεϊνικό περιεχόμενο. Ανάλογα με τους στόχους του εκάστοτε πειράματος, επιλέγονται εκείνα τα διαλύματα ομογενοποίησης και το κατάλληλο πρωτόκολλο ώστε το τελικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα να προέρχεται από όλο το κύτταρο ή από κάποιο υποκυτταρικό διαμέρισμα. Στην παρούσα εργασία ακολουθήθηκαν δύο προσεγγίσεις :

- Συλλογή συνολικού εκχυλίσματος (Whole extraction)

Ένα με δύο λεπτά πριν το τέλος της επώασης, τα τρυβλία παραλαμβάνονται από τον κλίβανο και μεταφέρονται στον πάγκο εργασίας, σε πάγο. Είναι σημαντικό, όλες οι επιδράσεις να τερματιστούν ταυτόχρονα ώστε οι οποιεσδήποτε διακυμάνσεις να είναι αξιόπιστες και όχι εξαιτίας διαφορετικών συνθηκών. Για να γίνει ο τερματισμός της οποιασδήποτε αντίδρασης χρησιμοποιείται παγωμένο διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Από κάθε τρυβλίο απορρίπτεται το θρεπτικό μέσο και προστίθεται παγωμένο PBS. Ακολουθεί άλλο ένα ξέπλυμα με PBS και γίνεται προσθήκη του διαλύματος ομογενοποίησης. Για να επιτευχθεί ή συλλογή του συνολικών πρωτεϊνών των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Buffer G. Η σύσταση του διαλύματος συνοψίζεται στον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας II.2) Πιο συγκεκριμένα, το Buffer G περιλαμβάνει ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl για την σταθεροποίηση του pH στο 7,5, που είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της δομής των πρωτεϊνών που θα εκχυλιστούν. Ακόμη περιλαμβάνεται γλυκεροφωσφορικό που είναι αναστολέας φωσφατασών Ser/Thr, βενζαμιδίνη που είναι αναστολέας πρωτεασών όπως η τρυψίνη, πρωτεασών τύπου-τρυψίνης και πρωτεασών Ser και EDTA που είναι αναστολέας μεταλλο-πρωτεασών που χρειάζονται ιόντα Mn και Mg για να δράσουν. Κάθε φορά που πρόκειται να γίνει ομογενοποίηση προστίθενται ξεχωριστά leupeptin ως αναστολέας πρωτεασών Ser/Thr/Cys, PMSF ως αναστολέας πρωτεασών Ser, E-64 ως αναστολέας πρωτεασών Cys και DTT ο οποίος είναι αναγωγικός παράγοντας που διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Τέλος, για να μπορέσει να γίνει η λύση των κυττάρων προστίθεται, κάθε φορά, απορρυπαντικό Triton-X. Αυτό αποτελεί ήπιο, μη ιοντικό απορρυπαντικό, το οποίο αλληλεπιδρά με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες διαταράσσοντας τη δομή της μεμβράνης, διευκολύνοντας έτσι την εκχύλιση των πρωτεϊνών.

Ανάλογα με το μέγεθος του τρυβλίου, προστίθεται συγκεκριμένος όγκος διαλύματος G και τα κύτταρα αποκολλώνται από τον πάτο του τρυβλίου με cell scraper και συγκεντρώνονται σε μια περιοχή του. Με τη βοήθεια της πιπέτας διαλύονται τα συσσωματώματα και το εναίωρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε αριθμημένο Eppendorf. Γίνεται καλό vortex και τα eppendorfs παραμένουν στον πάγο για 10 λεπτά για να γίνει ομογενοποίηση. Έπειτα,

ακολουθεί φυγοκέντρωση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4°C για 5 λεπτά στα 5.000 rpm. Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο περιέχει το ζητούμενο σύνολο των πρωτεϊνών, ενώ το ίζημα περιέχει μεμβρανικά υπολείμματα που θα απορριφθούν. Από το υπερκείμενο, 2μL μεταφέρονται σε eppendorfs που περιέχουν 98μL νερό για να πραγματοποιηθεί ποσοτικός προσδιορισμός με μέθοδο Bradford, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα μεταφέρεται σε καινούρια eppendorfs που αποτελούν το τελικό πρωτεϊνικό δείγμα. Στο τελικό δείγμα προστίθεται μια ποσότητα από το διάλυμα «φόρτωσης» ή Sample buffer με σύσταση που συνοψίζεται στον πίνακα 2. Το Sample buffer παρασκευάζεται ως πιο πυκνό, 4x, και σε κάθε δείγμα θα πρέπει η αραίωση του να είναι 1:3, για τελική συγκέντρωση 1x. Περιλαμβάνει ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH 6,8 για τη διατήρηση σταθερού pH, SDS που είναι αποδιατακτικός παράγοντας, β-μερκαπτοαιθανόλη για τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών, γλυκερόλη ώστε το διάλυμα να γίνει πιο πυκνό και μπλε της βρωμοφαινόλης ώστε το διάλυμα να χρωματιστεί για να διακρίνεται στο επόμενο στάδιο της ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα διατηρούνται στους -20°C (Zikaki et al., 2014).

**Πίνακας II.2.** Σύσταση Buffer G

| Buffer G                        |             |
|---------------------------------|-------------|
| Συστατικό                       | Συγκέντρωση |
| Tris-HCl pH 7,5                 | 20mM        |
| β-γλυκεροφωσφορικό              | 20mM        |
| EDTA                            | 2mM         |
| Βενζαμιδίνη                     | 10mM        |
| NaF                             | 20mM        |
| Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> | 0,2mM       |
| Leupeptin                       | 200μM       |
| E-64                            | 10μM        |
| DTT                             | 5mM         |
| PMSF                            | 300μM       |
| Triton                          | 0,5%(v/v)   |

**Πίνακας II.3.** Σύσταση Sample Buffer

| Sample Buffer      |             |
|--------------------|-------------|
| Συστατικό          | Συγκέντρωση |
| Tris-HCl 6,8       | 0,33 mol/L  |
| SDS                | 10%(w/v)    |
| Γλυκερόλη          | 13%(v/v)    |
| β-μερκαπτοαιθανόλη | 20% (v/v)   |
| Μπλε βρωμοφαινόλης | 0,2%(w/v)   |

- Συλλογή πυρηνικού εκχυλίσματος (Nuclear Extraction)

Για τις ανάγκες του πειράματος, έπρεπε να διαχωριστεί το κυτταροπλασματικό από το πυρηνικό εκχύλισμα, ώστε να μελετηθούν πιθανές διαφοροποιήσεις των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Η πορεία της μεθόδου είναι ανάλογη με αυτή της απομόνωσης του συνολικού εκχυλίσματος· ωστόσο υπάρχουν ορισμένες διαφοροποιήσεις και προσθήκες. Καταρχάς, τα τρυβλία που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη διαδικασία είναι μεγάλου μεγέθους,

διαμέτρου 100mm , ώστε να εξασφαλιστεί η εκχύλιση ανιχνεύσιμης ποσότητας πυρηνικών πρωτεϊνών. Μετά το τέλος των επωάσεων, γίνονται δύο ξεπλύματα με παγωμένο PBS και προστίθενται στο τρυβλίο 300λ διαλύματος ομογενοποίησης A, η σύσταση του οποίου φαίνεται στον πίνακα 3. Αυτό φέρει τους ίδιους αναστολείς πρωτεασών/φωσφατασών με το buffer G, συν την απροτινίνη, έχει pH 7,9 και άλατα KCl και MgCl<sub>2</sub> για την αύξηση της ιονικής ισχύος τους διαλύματος. Μετά τη συλλογή του εναιωρήματος των κυττάρων με cell scraper, αυτά παραμένουν για 15 λεπτά στον πάγο ώστε να γίνει η ομογενοποίηση και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 10.000 rpm στους 4°C. Το αποτέλεσμα της φυγοκέντρησης είναι οι δύο διακριτές φάσεις· το υπερκείμενο που περιλαμβάνει τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και το ίζημα στο οποίο εντοπίζονται οι βαρύτερες μεμβράνες και οι πυρήνες. Από το υπερκείμενο συλλέγονται 2λ για Bradford και μια ποσότητα που θα αποτελεί το τελικό δείγμα στο οποίο προστίθεται sample buffer 4x. Τα δείγματα αυτά αποθηκεύονται στους -20°C. Το υπόλοιπο υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 100λ Buffer A στο οποίο προστίθεται 0,1% Nonidet P-40. Το NP-40 είναι ένα μη-ιοντικό επιφανειοδραστικό απορρυπαντικό που χρησιμεύει στη διαλυτοποίηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Μετά από vortex, τα δείγματα αφήνονται στον πάγο για 10 λεπτά και ακολουθεί μια δεύτερη φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 5.000 rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 60λ από ένα διαφορετικό διάλυμα ομογενοποίησης, το Buffer B. (Πίνακας II.4) Κοιτώντας τη σύσταση του στον πίνακα, αυτή διαφέρει ως προς το buffer A σε δύο βασικά σημεία: στο είδος του ρυθμιστικού διαλύματος και στην ύπαρξη 25% γλυκερόλης. Το συγκεκριμένο διάλυμα είναι απαραίτητο για τη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης και την εκχύλιση των πυρηνικών πρωτεϊνών. Τα δείγματα, παραμένουν στον πάγο για 1 ώρα κατά τη διάρκεια της οποίας γίνεται έντονο vortex ανά 10 λεπτά, ώστε να γίνει η ομογενοποίηση. Μετά την παρέλευση της μιας ώρας, ακολουθεί τρίτη φυγοκέντρηση στα 10.000 rpm, για 10 λεπτά στους 4°C. Από το υπερκείμενο, στο οποίο περιλαμβάνονται οι πυρηνικές πρωτεΐνες, 2λ χρησιμοποιούνται για Bradford, ενώ το υπόλοιπο μεταφέρεται σε νέο Eppendorf στο οποίο προστίθεται sample buffer 4x και τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C (Kefaloyianni et al., 2006).

**Πίνακας II.4.** Σύσταση Buffer A και Buffer B

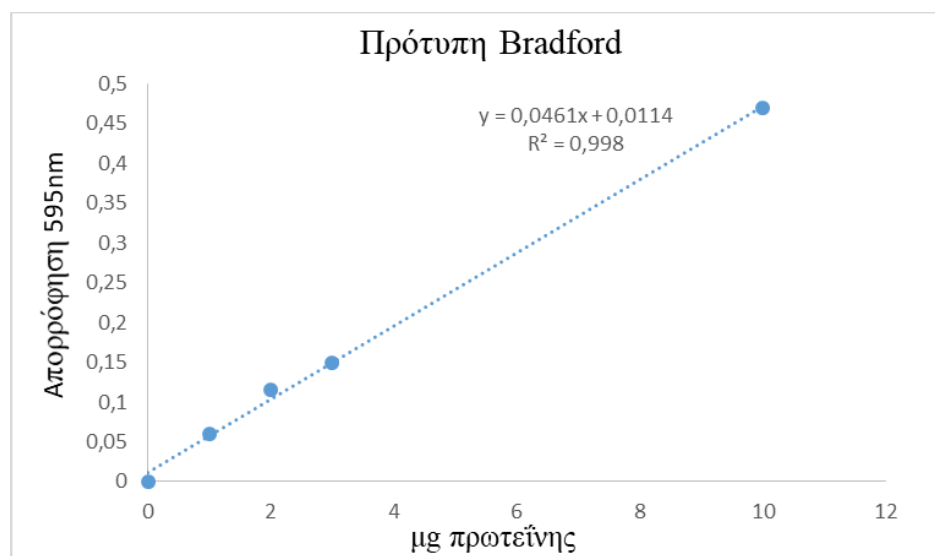
| Buffer A                        |             | Buffer B                        |             |
|---------------------------------|-------------|---------------------------------|-------------|
| Συστατικό                       | Συγκέντρωση | Συστατικό                       | Συγκέντρωση |
| Tris-HCl pH 7,9                 | 10mM        | Hepes pH 7,9                    | 20mM        |
| KCl                             | 10mM        | MgCl <sub>2</sub>               | 1,5mM       |
| MgCl <sub>2</sub>               | 1,5mM       | NaCl                            | 420μM       |
| Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> | 0,3mM       | EDTA                            | 0,2mM       |
| Leupeptin                       | 200μM       | Γλυκερόλη                       | 25%         |
| E-64                            | 10μM        | DTT                             | 5mM         |
| DTT                             | 5mM         | Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> | 0,3mM       |
| PMSF                            | 300μM       | Leupeptin                       | 200μM       |
| Aprotinin                       | 2,5mM       | E-64                            | 10μM        |

|       |           |           |       |
|-------|-----------|-----------|-------|
| NP-40 | 0,1%(v/v) | PMSF      | 300μM |
|       |           | Aprotinin | 2,5mM |

### II.B.8 Bradford

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών κάθε δείγματος. Είναι απαραίτητη διότι, κατά την ηλεκτροφόρηση, πρέπει να φορτωθεί η ίδια ποσότητα πρωτεΐνης από κάθε δείγμα ώστε τα αποτελέσματα που θα ληφθούν να είναι συγκρίσιμα και αξιόπιστα. Το αντιδραστήριο Bradford περιέχει τη χρωστική Coomassie brilliant blue G-250 σε όξινο διάλυμα, η οποία συνδέεται με τις ελεύθερες αμινομάδες των πρωτεϊνών του δείγματος. Το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής είναι τα 465nm, ωστόσο λόγω της παραπάνω σύνδεσης μετατοπίζεται στα 590nm, όπου και γίνεται η φωτομέτρηση των δειγμάτων (Bradford, 1976).

Μετά την ομογενοποίηση, 2λ από κάθε δείγμα προστίθενται σε 98λ νερό. Ταυτόχρονα προετοιμάζονται δείγματα με γνωστές ποσότητες διαλύματος BSA, 0(σκέτο νερό), 1, 2, 3 και 10 μg. Έπειτα, προστίθεται σε όλα τα δείγματα, γνωστά και άγνωστα, 1mL από το αντιδραστήριο Bradford και γίνεται φωτομέτρηση στα 595 nm, με το τυφλό να είναι τα 0μg BSA. Μετά την φωτομέτρηση κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη (εικόνα II.1) και από την εξίσωση που προκύπτει υπολογίζεται ο όγκος από κάθε δείγμα, ώστε να φορτωθούν τα απαραίτητα μg πρωτεΐνης.



**Εικόνα II.1** Πρότυπη καμπύλη όπως αυτή προκύπτει από την φωτομέτρηση των δειγμάτων στα οποία είχε προστεθεί 1mL από το αντιδραστήριο Bradford.

### II.B.9 Ανάλυση κατά Western

Η ανάλυση κατά Western είναι μια τεχνική που δίνει τη δυνατότητα ταυτοποίησης συγκεκριμένων πρωτεϊνών από ένα πολύπλοκο μίγμα αυτών (Burnette, 1981). Βασίζεται: 1) στο διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε ζώνες βάσει του μοριακού τους βάρους που επιτυγχάνεται μέσω της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης, 2) στη μεταφορά των πρωτεϊνικών ζωνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF και

3) στον εντοπισμό της συγκεκριμένης πρωτεΐνης-στόχου με τη χρήση κατάλληλου πρωτογενούς και δευτερογενούς αντισώματος.

### Π.Β.9.1 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί κυρίαρχη μέθοδο διαχωρισμού μακρομορίων και βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων, όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA, μέσα σε ηλεκτρικά πεδία (Jensen, 1965). Η κινητική των μορίων αυτών εξαρτάται τόσο από το φορτίο τους, όσο και από το μοριακό τους βάρος. Στην παρούσα εργασία, ακολουθήθηκε η μέθοδος της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης σε πολυακρυλαμίδη (SDS-PAGE, SDS polyacrylamide gel electrophoresis), στην οποία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών βάσει μόνο του μοριακού τους βάρους, και όχι του φορτίου τους (Jann et al., 1975). Συγκεκριμένα, στα πρωτεϊνικά δείγματα προστίθεται SDS, το οποίο είναι αποδιατακτικός παράγοντας με ισχυρά αρνητικό φορτίο. Το SDS, συντελεί στο ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών και ταυτόχρονα καλύπτει τα πρωτεϊνικά μόρια δίνοντας τους έτσι αρνητικό φορτίο. Με αυτόν τον τρόπο, πλέον, η διαφορική κίνηση των πρωτεϊνών δεν εξαρτάται από το φορτίο τους- καθώς όλες φέρουν αρνητικό και κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο- αλλά μόνο από το μοριακό τους βάρος. Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-δισ ακρυλαμίδης, το οποίο λειτουργεί σαν μοριακός ηθμός, ανάμεσα από τους πόρους του οποίου κινούνται οι πρωτεΐνες ως απόκριση στο ηλεκτρικό πεδίο. Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδης. Το μέγεθος των πόρων του πλέγματος μπορεί να ρυθμιστεί ανάλογα με τη συγκέντρωση ακρυλαμίδης-δισ-ακρυλαμίδης, κάτι που είναι χρήσιμο καθώς μικρότερα μόρια κινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν.

Για να γίνει η ηλεκτροφόρηση, αρχικά στήνεται ο απαραίτητος εξοπλισμός. Το «καλούπι» για να σχηματιστεί το πήκτωμα είναι ένα σάντουιτς επίπεδων τζαμιών το οποίο στερεώνεται σε κατάλληλη βάση. Τα τζάμια πρέπει προηγουμένως να έχουν καθαριστεί καλά με μεθανόλη ώστε να μην υπάρχουν σκόνες ή ακαθαρσίες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το gel. Ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων για τα πηκτώματα. Η ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιούμε είναι ασυνεχής, δηλαδή επιτελείται σε δύο διαδοχικά πηκτώματα, το πήκτωμα επιστοίβαξης ή πακεταρίσματος (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Στο πρώτο πήκτωμα, το επιστοίβαξης, τοποθετούνται τα δείγματα, και σε αυτό δε γίνεται διαχωρισμός αλλά συγκέντρωση όλων των δειγμάτων σε μια μικρή ζώνη, ώστε όλες οι πρωτεΐνες των δειγμάτων να φθάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού. Έπειτα, στο πήκτωμα διαχωρισμού οι πρωτεΐνες κινούνται βάσει του μοριακού τους βάρους και διαχωρίζονται σε διακριτές ζώνες. Τα συστατικά κάθε πηκτώματος αναγράφονται στον πίνακα. Η ταυτόχρονη προετοιμασία των δύο πηκτωμάτων σταματάει πριν από την προσθήκη των πολυμεριστικών παραγόντων, του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθανίου (TEMED) που καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Οι παράγοντες αυτοί είναι απαραίτητοι για τον πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης-δισ ακρυλαμίδης, ώστε να σχηματιστεί το σταθερό πλέγμα του πηκτώματος. Αφού έχουν προστεθεί όλα τα

συστατικά εκτός από APS και TEMED και για τα δύο πηκτώματα, το πήκτωμα επιστοιβαξης αφήνεται στην άκρη και στο πήκτωμα διαχωρισμού προστίθενται οι πολυμεριστικοί παράγοντες. Ακολουθεί καλή ανάδευση με πιπέτα Pasteur και προσθήκη του διαλύματος στο «καλούπι», μέχρι ενός σημείου ώστε να αφηθεί χώρος και για το διάλυμα επιστοιβαξης. Στον κενό χώρο, προστίθεται άμεσα νερό ώστε να σχηματιστεί ίσια γραμμή και αφήνεται να πήξει. Όταν έχει ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, κάτι που γίνεται αντιληπτό αν είναι ορατή η διαχωριστική γραμμή πηκτώματος-νερού, απορρίπτεται το νερό και στεγνώνονται καλά τα τζάμια με χαρτί Watman. Ακολούθως, στο πήκτωμα επιστοιβαξης προστίθενται οι πολυμεριστικοί παράγοντες και ακολουθεί προσεκτική ανάδευση ώστε να μη σχηματιστούν φυσαλίδες. Το διάλυμα τοποθετείται πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού και αμέσως, πριν προλάβει να πήξει, εφαρμόζεται σε αυτό ένα «χτενάκι» το οποίο θα σχηματίσει τα πηγαδάκια για το φόρτωμα των δειγμάτων.

Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, το πήκτωμα στερεώνεται κατακόρυφα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και σε αυτήν προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης (Running Buffer). Το διάλυμα αυτό, πρέπει να βρίσκεται τόσο στο πάνω όσο και στο κάτω μέρος της συσκευής, αλλά και σε επαφή με το πήκτωμα ώστε να μπορεί να δημιουργηθεί κλειστό κύκλωμα κατά την εφαρμογή ρεύματος. Αφαιρείται το χτενάκι από το πήκτωμα επιστοιβαξης, και στις θέσεις που έχουν δημιουργηθεί φορτώνεται ο κατάλληλος όγκος δείγματος, όπως αυτός έχει υπολογιστεί βάσει της Bradford. (Εικόνα II.1) Σε κάθε πήκτωμα χωράνε μέχρι 10 δείγματα και πρέπει ένα από αυτά να είναι ο μάρτυρας με πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους. Μετά το φόρτωμα των δειγμάτων διαβιβάζεται ρεύμα τάσης 190V για περίπου 1 ώρα. Η ηλεκτροφόρηση τερματίζεται τη στιγμή που το μέτωπο της χρωστικής διαχέεται στο ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης. Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης ανοίγεται η συσκευή και παραλαμβάνεται το σάντουιτς των τζαμιών ανάμεσα στα οποία βρίσκεται το πήκτωμα με τις διαχωρισμένες, πλέον, πρωτεϊνικές ζώνες. Με τη βοήθεια σπάτουλας η οποία εφαρμόζεται ανάμεσα στα 2 τζαμάκια, γίνεται διαχωρισμός τους έτσι ώστε το πήκτωμα να παραμείνει, τελικά, σε ένα από τα δύο. Το πήκτωμα στη συνέχεια μπορεί να χρωματιστεί με διάφορες χρωστικές, όπως τη coomassie brilliant blue, είτε να χρησιμοποιηθεί για στύπωμα κατά Western.

### **II.B.9.2 Μεταφορά**

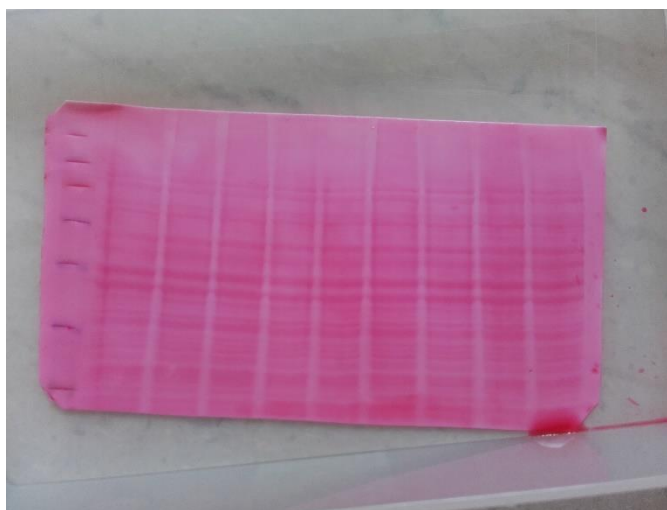
Η μεταφορά των πρωτεϊνικών ζωνών από το πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης στη μεμβράνη, βασίζεται στη χρήση ειδικής συσκευής μέσω της οποίας εφαρμόζεται κατάλληλα προσανατολισμένο ηλεκτρικό πεδίο στο πήκτωμα, προκαλώντας την μετατόπιση των πρωτεϊνών από αυτό στην μεμβράνη (Towbin et al., 1979). Για να γίνει αυτό, είναι απαραίτητος ο σχηματισμός ενός σάντουιτς, τα συστατικά του οποίου πρέπει να είναι τοποθετημένα με σωστό προσανατολισμό. Συγκεκριμένα, από τον θετικό προς τον αρνητικό πόλο στοιβάζονται διαδοχικά 4 χαρτιά Whatman διαστάσεων ίδιων με αυτών του πηκτώματος, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το πήκτωμα και άλλα 4 χαρτιά Whatman. Ο προσανατολισμός αυτός είναι απαραίτητος διότι, οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεϊνικές ζώνες θα κινηθούν προς τον θετικό πόλο, με αποτέλεσμα,



αφήνοντας το πήκτωμα να βρεθούν στη μεμβράνη. Ο τύπος αυτός μεταφοράς ονομάζεται «ημι-στεγνή μεταφορά» διότι δε γίνεται μέσα σε διάλυμα, ωστόσο, είναι απαραίτητη η διάβρεξη των χαρτιών Whatman, της νιτροκυτταρίνης, του πηκτώματος αλλά και της συσκευής με το ρυθμιστικό διάλυμα της μεταφοράς (Transfer Buffer), για να μπορέσει να κλείσει το ηλεκτρικό κύκλωμα και το ρεύμα να φτάσει στο πήκτωμα. Γι' αυτό το λόγο, τα χαρτιά Whatman και η νιτροκυτταρίνη εμποτίζονται με το Transfer Buffer για τουλάχιστον 15 λεπτά πριν την μεταφορά, ενώ το πήκτωμα για περίπου 3-5 λεπτά αμέσως μετά την ηλεκτροφόρηση. Ακόμη ένα σημείο που πρέπει να τονιστεί, είναι ότι κατά το στήσιμο του σάντουιτς πρέπει να αποφευχθεί ο εγκλωβισμός φυσαλίδων, διότι η ύπαρξη τους εμποδίζει την ομοιόμορφη διέλευση του ρεύματος, συνεπώς και τη σωστή μεταφορά των πρωτεϊνών. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της μεταφοράς και η διάρκεια της εξαρτώνται από τις πρωτεΐνες-στόχους. Γενικά, οι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους χρειάζονται περισσότερη ώρα για να μεταφερθούν και στο Transfer Buffer πρέπει εκτός από τα βασικά συστατικά να προστεθεί και μια ποσότητα του αποδιατακτικού παράγοντα SDS, ώστε να διαλύονται τα μεγάλα συσσωματώματα και να μπορούν οι πρωτεΐνες αυξημένου μοριακού βάρους να μεταφερθούν στη μεμβράνη. Οι μικρότερες πρωτεΐνες, μεταφέρονται πολύ πιο γρήγορα και απουσία SDS. Μόλις τελειώσει η μεταφορά, είναι σημαντικό να διαπιστωθεί αν αυτή έχει γίνει σωστά και αποτελεσματικά. Μπορούν να εφαρμοστούν δύο συμπληρωματικοί τρόποι ελέγχου της επιτυχίας μιας μεταφοράς: χρώση Ponceau πάνω στη μεμβράνη για να διαπιστωθούν οι ζώνες που μεταφέρθηκαν στην νιτροκυτταρίνη και χρώση Coomassie στο πήκτωμα για να διαπιστωθούν οι ζώνες που παρέμειναν σε αυτό.

➤ Ponceau

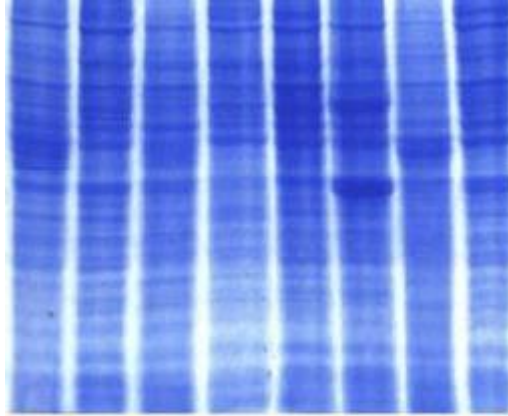
Αποτελεί μια ταχεία και αντιστρεπτή μέθοδο χρώσης των πρωτεϊνικών ζωνών στην μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης. Δίνει κόκκινες-ροζ ζώνες (Εικόνα II.2) και είναι λιγότερο ευαίσθητη από την Coomassie blue. Χρησιμοποιείται ευρέως διότι δεν επηρεάζει τα πολυπεπτίδια και ξεπλένεται εύκολα με το διάλυμα TBS-Tween (Salinovich & Montelaro, 1986).



**Εικόνα II.2** Ενδεικτική χρώση με Ponceau 0,1% με 5% οξικό οξύ.

➤ **Coomassie blue**

Η πρόσδεση της χρωστικής στις πρωτεΐνες του πηκτώματος γίνεται μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων και δεσμών Van der Waals. Η τοποθέτηση του πηκτώματος σε διάλυμα οξικού οξέος δίνει μπλε πρωτεϊνικές ζώνες σε ανοιχτόχρωμο υπόστρωμα. (Εικόνα II.3) Μπορεί και ανιχνεύει μέχρι και 0,1 μg πρωτεΐνης (Gasparov & Degtiar, 1994).



**Εικόνα II.3** Ενδεικτική χρώση με Coomassie blue G-250.

### **II.B.9.3 Αντισώματα**

Πριν τη προσθήκη των ειδικών, για τις υπό μελέτη πρωτεΐνες, αντισωμάτων είναι απαραίτητο ένα ακόμη βήμα, που αφορά στη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων πάνω στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης (blocking). Συνήθως στο blocking χρησιμοποιείται 5% άπαχο γάλα σε σκόνη ή 5% BSA σε TBS-T. Η χρήση του συγκεκριμένου διαλύματος αποσκοπεί στην κάλυψη των μη ειδικών θέσεων στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, όπου πιθανώς θα δεσμεύονταν το πρωτογενές αντίσωμα, δίνοντας μη ειδικό σήμα (background). Το γάλα προτιμάται κυρίως επειδή είναι πιο φθινό και εύκολα διαθέσιμο, ωστόσο σε μερικές περιπτώσεις εξαιτίας της ύπαρξης καζεΐνης, μπορεί να δίνει μη ειδικό σήμα σε δοκιμασίες με αντισώματα αντι-φωσφοπρωτεϊνών ή αντισώματα συζευγμένα με βιοτίνη. Η διάρκεια του blocking εξαρτάται από το πρωτογενές αντίσωμα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί καθώς αντισώματα που είναι λιγότερο ειδικά μπορεί να δεσμεύονται σε περισσότερες μη ειδικές θέσεις και αντιστρόφως (Baldo et al., 1986).

Μετά την παρέλευση του επιθυμητού χρόνου blocking, ακολουθούν 3 πεντάλεπτα ξεπλύματα με TBS-T και στη συνέχεια γίνεται επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα. Η χρήση πρωτογενούς αντισώματος βασίζεται στην αρχή ότι τα αντισώματα είναι ειδικά για συγκεκριμένους επιτόπους πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να δεσμεύονται μόνο σε αυτές τις περιοχές. Επομένως, εντοπίζεται, αν υπάρχει ή/και είναι ανιχνεύσιμη η πρωτεΐνη-στόχος. Για να γίνει η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, η νιτροκυτταρίνη τοποθετείται σε ζελατίνη, η οποία κλείνεται με τη βοήθεια σακουλοποιού στις τρεις πλευρές της. Έπειτα, προστίθεται το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος, με προσοχή ώστε να εξασφαλιστεί ότι δεν υπάρχουν διαρροές και ότι το αντίσωμα βρίσκεται προς την πλευρά της νιτροκυτταρίνης στην οποία βρίσκονται η ζώνες. Το «σακουλάκι» κλείνει και από την τέταρτη πλευρά του και τοποθετείται στους 4°C για επώαση όλη τη νύχτα. Την επομένη, η μεμβράνη αφαιρείται από το σακουλάκι και ξεπλένεται σε TBS-T. Το πρωτογενές αντίσωμα, δεν

απορρίπτεται, αλλά διατηρείται στο ψυγείο και μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί. Τα πρωτογενή αντισώματα είναι συνήθως διαλυμένα σε BSA, με αποτέλεσμα να διατηρείται η δομή τους και να μπορούν να ξαναχρησιμοποιηθούν για τη στόχευση της ίδια πρωτεΐνης.

Μετά τα ξεπλύματα στην νιτροκυτταρίνη όπου έχει γίνει η δέσμευση του πρωτογενούς αντισώματος, πρέπει να προστεθεί το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο είναι ειδικό για το πρωτογενές. Τα δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία του ανοσοστυπώματος Western, έχουν δύο βασικά χαρακτηριστικά. Το πρώτο αφορά στην ειδικότητα τους, η οποία δεν είναι συγκεκριμένη για τις πρωτεΐνες-στόχους, αλλά είναι συγκεκριμένη για έναν οργανισμό. Με άλλα λόγια, το δευτερογενές αντίσωμα, εντοπίζει επιτόπους των πρωτογενών αντισωμάτων που έχουν παραχθεί σε συγκεκριμένο οργανισμό. Το δεύτερο χαρακτηριστικό των δευτερογενών αντισωμάτων, είναι το ότι βρίσκονται συζευγμένα με κάποιο μόριο, το οποίο θα χρησιμεύσει στην ανίχνευση της εκάστοτε πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο το οποίο ονομάζεται υπεροξειδάση του μαύρου ρεπανιού (Horseradish peroxidase, HRP). Το ένζυμο αυτό μπορεί και καταλύει την οξείδωση συγκεκριμένων υποστρωμάτων παρουσία του  $H_2O_2$  ως οξειδωτικού παράγοντα, με αποτέλεσμα να παράγεται ανιχνεύσιμο σήμα (Madamanchi & Runge, 2001).

#### II.B.9.4 Εμφάνιση

Η εμφάνιση αφορά στην διαδικασία εκείνη κατά την οποία το σήμα που παράγεται εξαιτίας της ύπαρξης συγκεκριμένων πρωτεϊνών, ανιχνεύεται με συγκεκριμένο τρόπο και καθίσταται ορατό και διατηρήσιμο. Στην παρούσα εργασία, η ανίχνευση του εν λόγω σήματος, βασίζεται στην αντίδραση της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας και τη μετέπειτα δέσμευση του φωτός σε φιλμ. Η χημειοφωταύγεια αποτελεί μια χημική αντίδραση κατά την οποία απελευθερώνεται ενέργεια με τη μορφή φωτονίων (Constantine et al., 1994). Παρουσία της HRP και  $H_2O_2$ , το υπόστρωμα λουμινόλη οξειδώνεται σε 3-αμινοφθαλικό, παράγοντας φως, το οποίο δεσμεύεται στο φιλμ. Η αντίδραση αυτή ενισχύεται έως και 1000 φορές παρουσία χημικών μέσων όπως ιωδο-φαινόλες, ώστε να διευκολυνθεί η ανίχνευση του φωτός και να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου. Η εκπομπή του φωτός συμβαίνει για όσο πραγματοποιείται η αντίδραση, ενώ όταν το υπόστρωμα εξαντληθεί τότε αυτή σταματά και το σήμα εξασθενεί. Η νιτροκυτταρίνη στην οποία πρόκειται να γίνει εμφάνιση στεγνώνεται σε απορροφητικό χαρτί και τοποθετείται σε ζελατίνα. Ίσες ποσότητες από τα διαλύματα 1 και 2 του ECL προστίθενται σε Eppendorf και αφού αναδευτούν εφαρμόζονται πάνω στην νιτροκυτταρίνη με τέτοιο τρόπο ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνεια της. Η νιτροκυτταρίνη με το μίγμα ECL καλύπτονται από σκοτεινό κουτί για 1 λεπτό, ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση στο σκοτάδι. Αμέσως μετά, η νιτροκυτταρίνη στεγνώνεται και τοποθετείται στην κασετίνα εμφάνισης η οποία μεταφέρεται στον σκοτεινό θάλαμο. Από εδώ και εμπρός όλοι οι χειρισμοί πρέπει να γίνονται στο σκοτάδι, παρουσία μόνο του κόκκινου φωτός. Με γρήγορες κινήσεις, κόβεται ένα κομμάτι από το φιλμ σε μέγεθος λίγο μεγαλύτερο από αυτό της νιτροκυτταρίνης και τοποθετείται πάνω σε αυτήν. Η κασετίνα εμφάνισης κλείνει και ακολουθεί αναμονή, τόση ώρα όση χρειάζεται ανάλογα με την πρωτεΐνη που μελετάται. Στον πάγκο του σκοτεινού

θαλάμου θα πρέπει να έχουν ήδη τοποθετηθεί 3 λεκάνες, μία για τον εμφανιστή (developer), μία για τον μονιμοποιητή (fixer) και μία μικρή λεκάνη με νερό βρύσης. Μετά την παρέλευση του χρονικού διαστήματος αναμονής, το φιλμ εισάγεται στον developer και ανακινείται ήπια έως ότου εμφανιστούν οι ζώνες. Έπειτα, ξεπλένεται σε νερό και εισάγεται στον μονιμοποιητή (fixer). Με αυτόν τον τρόπο, γίνεται μονιμοποίηση και το φιλμ προστατεύεται παρουσία φωτός (Krajewski et al., 1996).

### **II.B.10 Λογισμικά προγράμματα και επεξεργασία αποτελεσμάτων**

Για την επεξεργασία και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν μια σειρά από λογισμικά προγράμματα. Συγκεκριμένα, η επεξεργασία των εικόνων έγινε με το πρόγραμμα Adobe Photoshop CS5, η πυκνομέτρηση των ζωνών με το Image J, η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και ο σχεδιασμός των γραφημάτων με τα Graph Pad Prism 6 και Microsoft Office Excel 2013, ενώ τα Microsoft Office Word & Powerpoint χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγγραφη του κειμένου και την προετοιμασία της παρουσίασης.

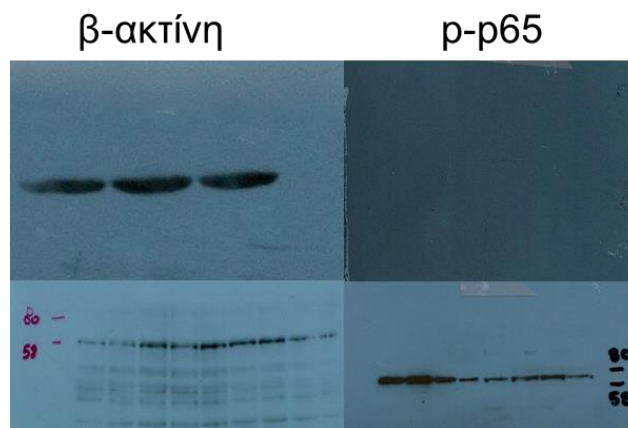
Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων υπολογίσθηκαν οι φορές μεταβολής σε αυθαίρετες μονάδες συγκριτικά με τον μάρτυρα, με την τιμή του μάρτυρα να θεωρείται ίση με τη μονάδα. Επίσης, υπολογίσθηκαν ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD) μεταξύ των τιμών που προέκυψαν από πειράματα που επαναλήφθηκαν 2 ή περισσότερες φορές. Η διερεύνηση της στατιστικής σημαντικότητας έγινε με τη χρήση του Student's t-test, με στατιστικά σημαντικές να θεωρούνται οι διαφορές για τις οποίες ισχύει:  $p < 0,05$ .

## **II.Γ Βελτιστοποίηση μεθόδων**

Μετά από μια σειρά δοκιμών και αξιολογήσεων των αποτελεσμάτων, οδηγηθήκαμε στην σταθεροποίηση του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήσαμε για τη μελέτη του θέματος.

### **II.Γ.1 Ομογενοποίηση**

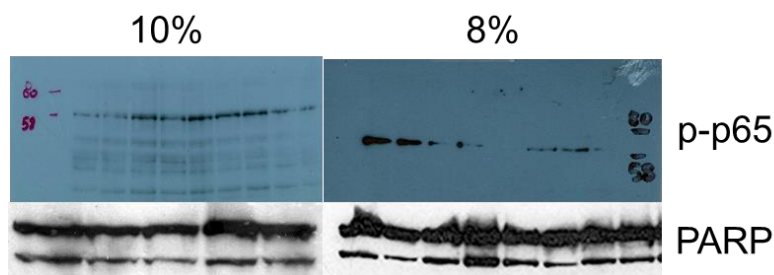
Αρχικά, για τη λύση των κυττάρων και την λήψη του ολικού εκχυλίσματος των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα «φορτώματος» (sample buffer) (Πίνακας II.3). Στην περίπτωση αυτή, διαπιστώθηκε ότι, ενώ η β-ακτίνη ήταν ανιχνεύσιμη, η βασική πρωτεΐνη στόχος, η φωσφορυλιωμένη μορφή της p65, δεν ανιχνεύονταν. Επομένως, στραφήκαμε προς τη χρήση του διαλύματος G (Buffer G), (Πίνακας II.2), το οποίο επέτρεψε τη λήψη ικανοποιητικού σήματος της βασικής πρωτεΐνης στόχου, όσο και άλλων πρωτεϊνών που ανιχνεύθηκαν για τις ανάγκες των πειραμάτων. Επιπλέον, γνωρίζοντας ότι ο NF-κB είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που δρα στον πυρήνα, επιλέξαμε να ακολουθήσουμε ένα πρωτόκολλο υποκυτταρικής κλασμάτωσης, ώστε να διαχωρίσουμε το κυτταροπλασματικό από το πυρηνικό εκχύλισμα των πρωτεϊνών και να συγκρίνουμε τυχόν διακυμάνσεις (Εικόνα II.4).



**Εικόνα II.4** Διαφορετικές διαδικασίες ομογενοποίησης. Πάνω: Το Sample Buffer δεν είναι κατάλληλο για την ανίχνευση της p65. Κάτω αριστερά: ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα με Buffer G, κάτω δεξιά: Κυτταροπλασματικό και πυρηνικό εκχύλισμα με Buffers A και B.

### II.Γ.2 Συγκέντρωση πηκτώματος ηλεκτροφόρησης

Η επιλογή της συγκέντρωσης του πηκτώματος ακρυλαμίδης αποτελεί κρίσιμο σημείο για το σωστό διαχωρισμό και την τελική ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών-στόχων. Οι σχετικές συγκεντρώσεις ακρυλαμίδης-δισ ακρυλαμίδης και νερού είναι αυτές που καθορίζουν και την τελική συγκέντρωση του πηκτώματος. Γενικώς, μικρότερες συγκεντρώσεις χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις, για πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους. Η παραπάνω διαπίστωση βασίζεται στο γεγονός ότι όσο μεγαλύτεροι είναι οι πόροι που δημιουργούνται στο πλέγμα του πηκτώματος, δηλαδή όσο πιο αραιή η ακρυλαμίδα, τόσο πιο εύκολα μπορεί να κινηθεί μια πρωτεΐνη μέσω των πόρων αυτών. Επομένως, μεγάλες πρωτεΐνες θα διαχωριστούν καλύτερα σε πιο αραιό πήκτωμα. Δοκιμάστηκαν πηκτώματα συγκεντρώσεων, 8%, 10% και 12% και διαπιστώθηκε ότι για τον NF-κΒ με μοριακό βάρος 65 kDa, το βέλτιστο αποτέλεσμα λαμβάνεται σε 10% gel, ενώ για την PARP με μοριακό βάρος 116 kDa, σε 8% (Εικόνα II.5).



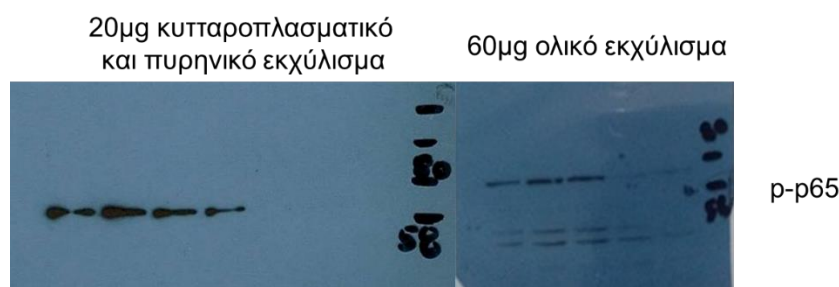
**Εικόνα II.5** Συγκέντρωση πηκτώματος ακρυλαμίδης-δισ-ακρυλαμίδης. Για τον NF-κΒ το βέλτιστο αποτέλεσμα προκύπτει σε πήκτωμα συγκέντρωσης 10% (πάνω αριστερά), ενώ για την PARP σε πήκτωμα συγκέντρωσης 8% (κάτω δεξιά).

### II.Γ.3 $\mu$ g πρωτεΐνης

Η ποσότητα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που φορτώνεται στα «πηγαδάκια» του πηκτώματος της ηλεκτροφόρησης, μπορεί να εξαρτηθεί από ποικίλους παράγοντες,



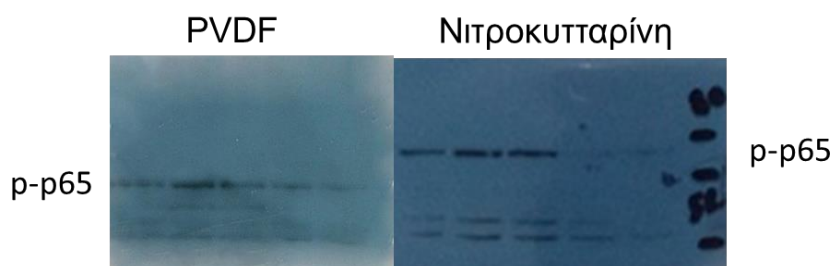
όπως για παράδειγμα από τη χωρητικότητα του πηγαδιού, την επιτυχία της ομογενοποίησης, την πυκνότητα των κυττάρων στο τρυβλίο αλλά και από την εκάστοτε πρωτεΐνη στόχο. Στην συγκεκριμένα εργασία, διαπιστώθηκε ότι απαιτούνται διαφορετικές ποσότητες ανάλογα με την πρωτεΐνη που μελετάται. Για τον NF-κB, η λήψη ικανοποιητικού σήματος απαιτεί 60  $\mu$ g ολικού εκχυλίσματος ή πυρηνικού εκχυλίσματος και μόνο 20  $\mu$ g κυτταροπλασματικού (Εικόνα II.6). Για την PARP και τις MAPKs, 30-40  $\mu$ g ήταν αρκετά ώστε να ανιχνευτεί καθαρό και επαρκές σήμα. Οι παραπάνω διαφοροποιήσεις, πιθανώς σχετίζονται με την εγγενή συγκέντρωση των εκάστοτε πρωτεϊνών.



**Εικόνα II.6**  $\mu$ g πρωτεΐνης που απαιτούνται για την ανίχνευση της p-p65. Τα 20 $\mu$ g είναι αρκετά για την ανίχνευση της κυτταροπλασματικής p65, όχι όμως και της πυρηνικής για την οποία απαιτούνται 40 $\mu$ g (αριστερά, δε φαίνονται οι πυρηνικές ζώνες). Για βέλτιστο σήμα απαιτούνται 60  $\mu$ g από το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα (δεξιά).

#### II.Γ.4 PVDF μεμβράνη

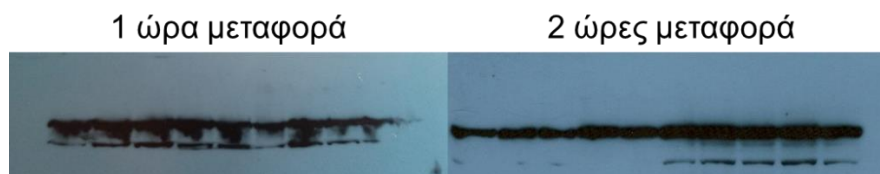
Υπάρχουν δύο βασικά είδη μεμβρανών που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση κατά Western: η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η μεμβράνη φθοριούχου πολυβινυλιδενίου (polyvinylidene fluoride, PVDF). Η πρόσδεση των πρωτεϊνών στην νιτροκυτταρίνη βασίζεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ενώ στην PVDF σε συνδυασμό υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου. Η δυνατότητα δέσμευσης στην PVDF είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτήν στην νιτροκυτταρίνη, με αποτέλεσμα η μεταφορά στην PVDF μεμβράνη να είναι μεν πιο ευαίσθητη, υπάρχει δε μεγαλύτερη πιθανότητα μη ειδικού σήματος (background). Στην συγκεκριμένη εργασία, χρησιμοποιήθηκαν και οι δύο διαφορετικές μεμβράνες και συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα (Εικόνα II.7). Διαπιστώθηκε ότι για τις υπό μελέτη πρωτεΐνες, δεν εντοπίζονται σημαντικές διαφορές ως προς τις δύο μεμβράνες, επομένως επιλέχθηκε η χρήση αυτής της νιτροκυτταρίνης, διότι δεν ενέχει τον κίνδυνο πολύ αυξημένου background.



**Εικόνα II.7** Επιλογή μεμβράνης. Δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των σημάτων των δύο μεμβρανών. Στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης (δεξιά) φαίνονται σχετικά πιο ξεκάθαρες ζώνες και περιορίζεται ο κίνδυνος αυξημένου σήματος υποστρώματος (background).

### II.Γ.5 Διάρκεια μεταφοράς και σύσταση του διαλύματος μεταφοράς

Οι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους, είναι πιο δύσκολο να μεταφερθούν σε σχέση με αυτές μικρότερου μοριακού βάρους. Συνεπώς, απαιτούνται ορισμένες τροποποιήσεις, ώστε να βελτιστοποιηθεί η απόδοση της μεταφοράς. Συγκεκριμένα, για την ανίχνευση της PARP, που είναι μια πρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους, αυξήσαμε τη διάρκεια της μεταφοράς από τη μία στις δύο ώρες, ενώ ταυτόχρονα προσθέσαμε 0,1% SDS στο διάλυμα μεταφοράς (Εικόνα II.8). Οι χειρισμοί αυτοί έγιναν, αφενός γιατί οι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους μεταφέρονται πιο αργά από το πηκτώμα στην νιτροκυτταρίνη κι αφετέρου, η προσθήκη SDS συντελεί στην αποτροπή της δημιουργίας συσσωματωμάτων υποβοηθώντας τη μεταφορά.



**Εικόνα II.8** Διάρκεια μεταφοράς για την ανίχνευση της PARP. Οι 2 ώρες μεταφοράς σε συνδυασμό με 0,1% SDS στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer) συνέβαλαν στην ανίχνευση βέλτιστου σήματος (δεξιά), σε αντίθεση με τη 1 ώρα μεταφοράς (αριστερά).

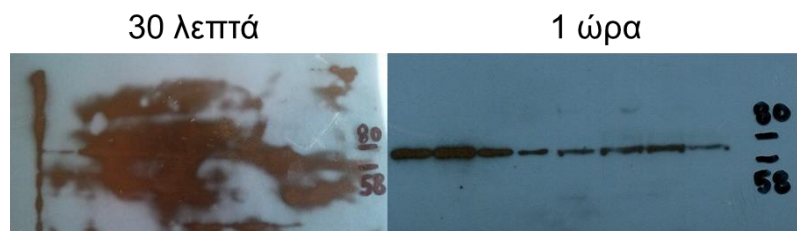
### II.Γ.6 Δέσμευση μη ειδικών θέσεων (Blocking)

Η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων πάνω στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης είναι απαραίτητη ώστε να εξασφαλιστεί ότι τα πρωτογενή αντισώματα θα προσδεθούν στους επιτόπους για τους οποίους είναι ειδικά, και όχι σε άλλες θέσεις. Στο εργαστήριο μας, στο blocking χρησιμοποιείται κυρίως 5% άπαχο γάλα σε σκόνη διαλυμένο σε TBS-T. Το γάλα προτιμάται κυρίως επειδή είναι πιο φθηνό και εύκολα διαθέσιμο, ωστόσο σε μερικές περιπτώσεις εξαιτίας της ύπαρξης καζεΐνης, μπορεί να δίνει μη ειδικό σήμα σε δοκιμασίες με αντισώματα αντι-φωσφοπρωτεϊνών ή αντισώματα συζευγμένα με βιοτίνη. Η διάρκεια του blocking εξαρτάται από το πρωτογενές αντίσωμα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί καθώς αντισώματα που είναι λιγότερο ειδικά μπορεί να δεσμεύονται σε περισσότερες μη ειδικές θέσεις και αντιστρόφως. Για το αντίσωμα αντι-p-p65, ο χρόνος blocking που χρησιμοποιήσαμε αρχικά ήταν 30 λεπτά, στον οποίο παρατηρήσαμε αυξημένο μη ειδικό σήμα που δεν επέτρεπε την διάκριση των ζωνών-στόχων. Γι' αυτό το λόγο, αυξήσαμε το χρόνο στη μία ώρα και το αποτέλεσμα ήταν διαυγείς και ξεκάθαρες ζώνες στο επιθυμητό μοριακό βάρος (Εικόνα II.9).

Ακόμη, επειδή σε κάποια πειράματα, οι ζώνες που λαμβάναμε ήταν αρκετά αχνές, υποθέσαμε ότι το γάλα θα μπορούσε να επηρεάζει την αποδοτικότητα δέσμευσης του πρωτογενούς αντισώματος. Έτσι, δοκιμάσαμε το blocking με 5% BSA σε TBS-T και διαπιστώσαμε ορισμένες διαφορές οι οποίες ωστόσο δεν ήταν τόσο



σημαντικές, με αποτέλεσμα να συνεχίσουμε να χρησιμοποιούμε το γάλα ως κύριο διάλυμα για τη δέσμευση των μη-ειδικών θέσεων.

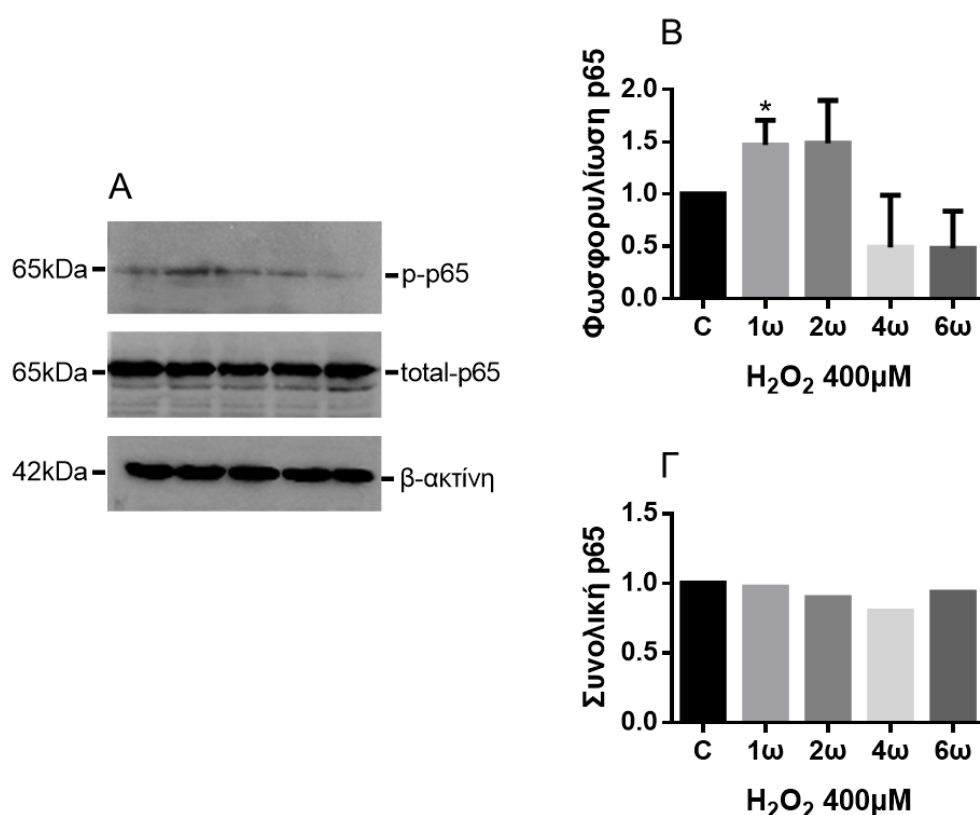


**Εικόνα Π.9** Διάρκεια διαδικασίας δέσμευσης των μη ειδικών θέσεων (Blocking). Στα 30 λεπτά παρατηρήθηκε αυξημένο background (αριστερά), ενώ στη 1 ώρα οι ζώνες είναι ξεκάθαρες (δεξιά)

### III. Αποτελέσματα

#### III.1 Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επάγει την φωσφορυλίωση του NF-κB στη σερίνη 536 συναρτήσει του χρόνου επίδρασης

Αρχικά, διερευνήσαμε την χρονο-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της υπομονάδας p65 του NF-κB στην σερίνη 536, παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Οι καρδιακοί μυοβλάστες της κυτταρικής σειράς H9c2 επωάστηκαν με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 400μM για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα, 0, 1, 2, 4 και 6 ώρες. Μετά τις επωάσεις πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών και με ανάλυση κατά Western ανιχνεύθηκαν τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης p65 στη σερίνη 536. Στην εικόνα III.1.B απεικονίζονται οι μεταβολές στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p65 συναρτήσει του χρόνου. Η φωσφορυλίωση αυτή φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά στη 1 (1,4710 ± 0,1370 φορές σε σχέση με το control, p<0,05) και στις 2 ώρες (1,486 ± 0,2363 φορές σε σχέση με το control), ενώ φθίνει στις 4 (0,4898 ± 0,3536 φορές σε σχέση με το control) και 6 ώρες (0,4810 ± 0,2061 φορές σε σχέση με το control) σε επίπεδα χαμηλότερα του control. Αντίθετα, η συνολική p65 φαίνεται να παραμένει σταθερή ανεξαρτήτως του χρόνου επίδρασης (Εικόνα III.1.Γ).

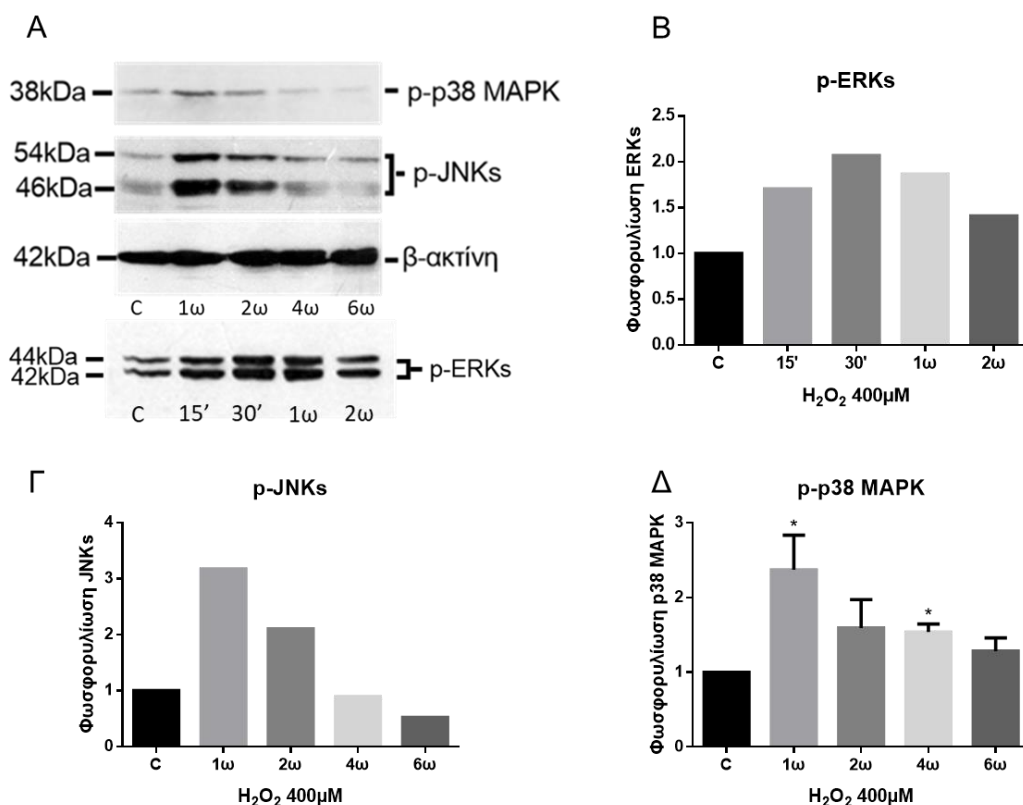


**Εικόνα III.1** Χρονο-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της υπομονάδας p65 κατά την επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 400μM σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2. Το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα

από κύτταρα που επωάστηκαν για 0, 1, 2, 4 και 6 ώρες με 400μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, αναλύθηκε κατά Western (60μg πρωτεΐνης/δείγμα) ως προς τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p65 υπομονάδας του NF-κB στη σερίνη 536. Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από τη δοκιμασία Western. Β και Γ) Τα γραφήματα μεταβολής των επιπέδων φωσφορυλίωσης της p65 (Β) και των επιπέδων της συνολικής p65 (Γ). Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για να εξασφαλιστεί το σωστό φόρτωμα των δειγμάτων.

### III.2 Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επάγει χρονο-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της p38-MAPK, των JNKs και των ERKs

Έπειτα, θέλαμε να ελέγξουμε ποια είναι η απόκριση των MAPKs κατά την επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400μM, για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση και των τριών μελών των MAPKs, p38 MAPK, ERKs και JNKs εξαρτάται από τη διάρκεια επίδρασης με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην εικόνα III.2.B, οι p-ERKs αποκρίνονται πιο άμεσα, ήδη από τα πρώτα 15 λεπτά επίδρασης (1,703 φορές σε σχέση με το control), εμφανίζοντας μέγιστο στα 30 λεπτά (2,067 φορές σε σχέση με το control) και έπειτα μείωση των επιπέδων τους στη 1 (1,866 φορές σε σχέση με το control) και 2 ώρες (1,409 φορές σε σχέση με το control). Από την άλλη, οι p-JNKs παρουσιάζουν μέγιστη τιμή στη 1 ώρα (3,175 φορές σε σχέση με το control), η οποία διατηρείται σε σχετικά υψηλά επίπεδα στις 2 ώρες (2,103 φορές σε σχέση με το control), ενώ στις 4 και 6 ώρες έχει επιστρέψει στα επίπεδα του control (Εικόνα III.2.Γ). Κατά παρόμοιο τρόπο, η p38 MAPK εμφανίζει μέγιστη φωσφορυλίωση στη 1 ώρα επίδρασης ( $2,374 \pm 0,2675$  φορές σε σχέση με το control,  $p < 0,05$ ), η οποία στη συνέχεια μειώνεται στις 2 ώρες ( $1,595 \pm 0,2676$  φορές σε σχέση με το control) και σχεδόν σταθεροποιείται στις 4 ( $1,538 \pm 0,0760$  φορές σε σχέση με το control,  $p < 0,05$ ) και 6 ώρες ( $1,283 \pm 0,1260$  φορές σε σχέση με το control) (Εικόνα III.2.Δ).

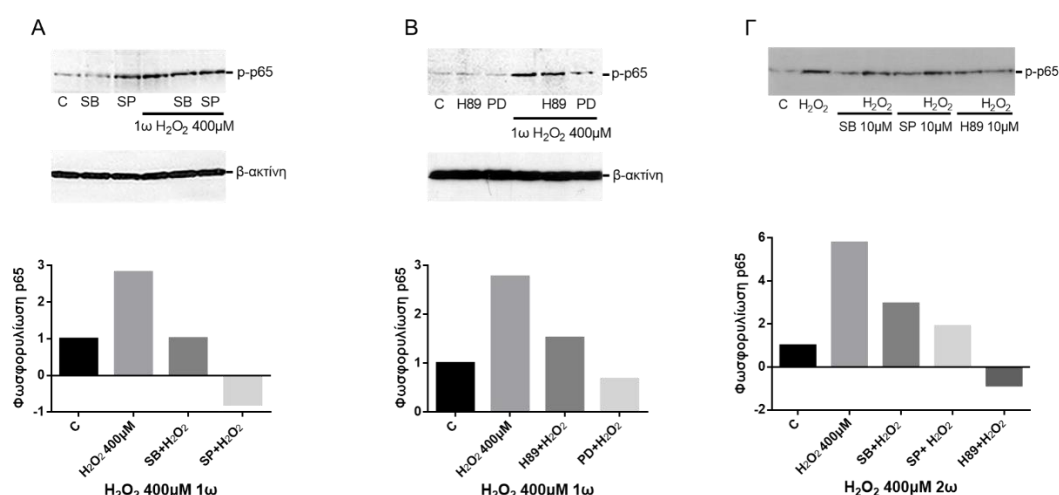


**Εικόνα III.2** Χρονο-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση των p38 MAPK, JNKs και ERKs κατά την επίδραση με  $H_2O_2$  συγκέντρωσης 400 $\mu$ M σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2. Το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα που επωάστηκαν για 0, 1, 2, 4 και 6 ώρες με 400 $\mu$ M  $H_2O_2$ , αναλύθηκε κατά Western (40 $\mu$ g πρωτεΐνης/δείγμα) ως προς τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p38 MAPK και των JNKs. Ομοίως, ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα από κύτταρα που επωάστηκαν για 0, 15', 30', 1w και 2w με 400 $\mu$ M  $H_2O_2$ , αναλύθηκε κατά Western (40 $\mu$ g πρωτεΐνης/δείγμα) ως προς τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των ERKs. Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ανάλυση Western. Β, Γ και Δ) Τα γραφήματα μεταβολής των επιπέδων φωσφορυλίωσης των ERKs (Β), των JNKs (Γ) και της p38 MAPK (Δ). Η  $\beta$ -ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για να εξασφαλιστεί το σωστό φόρτωμα των δειγμάτων.

### III.3 Οι MAPKs και η MSK1 σχετίζονται με την φωσφορυλίωση της p65

Για να διαπιστώσουμε αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της φωσφορυλίωσης του NF- $\kappa$ B και των MAP κινασών, χρησιμοποιήσαμε ειδικούς για την κάθε κινάση αναστολείς: τον SB203580 (10 $\mu$ M) για την p38 MAPK, τον PD98059 (25 $\mu$ M) για τις ERKs και τον SP600125 (10 $\mu$ M) για τις JNKs και διερευνήσαμε αν οι επιδράσεις αυτές επηρεάζουν την φωσφορυλίωση της p65. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα επωάστηκαν για 1 και 2 ώρες παρουσία μόνο των αναστολέων ή παρουσία του συνδυασμού αναστολείς- $H_2O_2$  400 $\mu$ M και με δοκιμασία Western ανιχνεύθηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p65. Στην εικόνα III.3 παρουσιάζεται η φωσφορυλίωση της p65 όπως αυτή προκύπτει αν από την τιμή της φωσφορυλίωσης παρουσία του συνδυασμού αναστολέας- $H_2O_2$ , αφαιρεθεί η τιμή της φωσφορυλίωσης παρουσία μόνο του αναστολέα. Ταυτόχρονα, εκτός από τους αναστολείς των MAPKs, έγινε επίδραση και με ακόμη έναν αναστολέα, τον H89, ο οποίος παρεμποδίζει την κινάση MSK1 που έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνει τον NF- $\kappa$ B στη σερίνη 276 και αποτελεί καταρροϊκό στόχο της p38 MAPK. Από τα

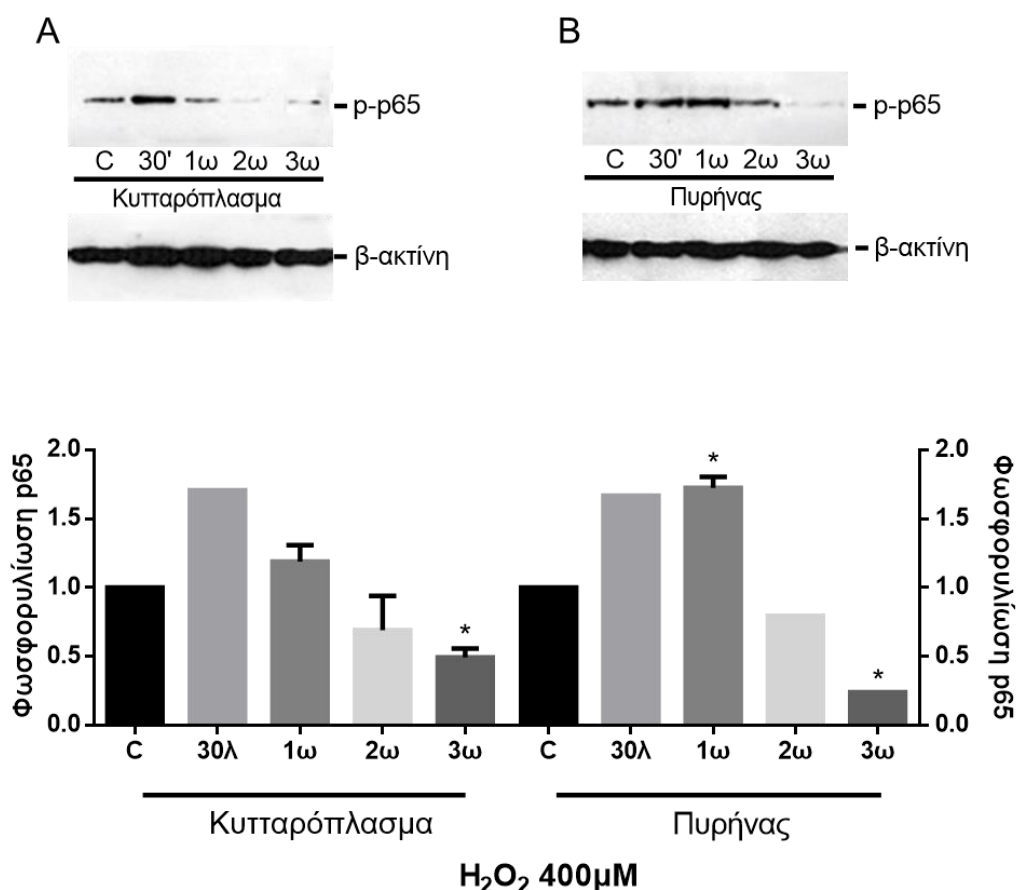
αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα III.3, φαίνεται ότι στη 1 ώρα και οι τρεις αναστολείς των MAPKs, παρεμποδίζουν τη φωσφορυλίωση της p65 που επάγεται κατά την επίδραση με  $H_2O_2$ , καθώς αυτή μειώνεται σημαντικά, στα επίπεδα του control (1,014 φορές σε σχέση με το control για τον SB203580, -0,792 φορές σε σχέση με το control για τον SP600125, 0,6800 φορές σε σχέση με το control για τον PD98059). Η αρνητική τιμή που προκύπτει κατά την προ-επώαση με τον αναστολέα των JNKs, SP600125, υποδηλώνει πλήρη αναστολή της φωσφορυλίωσης (Εικόνα III.3.A). Επιπλέον, παρουσία του H89, παρεμποδίζεται εν μέρει η φωσφορυλίωση της p65 στην σερίνη 536, αφού αυτή μειώνεται σημαντικά σε σχέση με το  $H_2O_2$ , παραμένοντας όμως σε τιμές υψηλότερες συγκριτικά με το control (1,519 φορές σε σχέση με το control) (Εικόνα III.3.B). Από την άλλη, στις 2 ώρες, οι επιλεγμένοι αναστολείς, SB203580 και SP600125 φαίνεται, επίσης να αναστέλλουν τη φωσφορυλίωση που επάγεται από το  $H_2O_2$ , ωστόσο, η αναστολή αυτή συμβαίνει σε μικρότερο ποσοστό με την αντίστοιχη στη 1 ώρα (2,9440 φορές σε σχέση με το control για τον SB203580 και 1,8980 φορές σε σχέση με το control για τον SP600125). Ο H89, στην προκειμένη περίπτωση, συντελεί στην πλήρη αναστολή της φωσφορυλίωσης της p65, όπως υποδηλώνεται από την αρνητική τιμή στο γράφημα III.3.Γ (-0,8440 φορές σε σχέση με το control).



**Εικόνα III.3** Επίδραση των ειδικών αναστολέων SB203580, SP600125, PD98059 και H89 στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p65. Οι καρδιακοί μυοβλάστες H9c2 δεν υπέστησαν καμία επίδραση (control) ή προ-επώαστηκαν για 30 λεπτά με καθέναν από τους αναστολείς SB203580 (10μM), SP600125 (10μM), PD98059 (25μM) και H89 (10μM) και έπειτα με  $H_2O_2$  (400μM) για 1 και 2 ώρες. 60μg ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κάθε δείγμα αναλύθηκαν κατά Western ως προς τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p65 υπομονάδας του NF-κΒ. Α, Β και Γ) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ανάλυση κατά Western και τα αντίστοιχα γραφήματα μεταβολής της φωσφορυλίωσης της p65 κατά την επώαση με  $H_2O_2$  για 1 ώρα (Α,Β) και για 2 ώρες (Γ). Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για να εξασφαλιστεί το σωστό φόρτωμα των δειγμάτων.

### III.4 Η φωσφορυλίωση της p65 ακολουθείται από τη μετατόπιση της στον πυρήνα

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB, όταν είναι ανενεργός παραμένει στο κυτταρόπλασμα, ενώ μετά την ενεργοποίηση του μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου και ασκεί τη δράση του. Εφόσον από τα παραπάνω αποτελέσματα μας, φάνηκε ότι το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επάγει τη φωσφορυλίωση της p65, διερευνήσαμε αν η φωσφορυλίωση αυτή ακολουθείται από μετατόπιση της από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Έτσι, μετά από διαφορετικούς χρόνους επίδρασης με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 400μM στους καρδιακούς μυοβλάστες, πραγματοποιήθηκε υποκυτταρική κλασμάτωση και αναλύθηκαν κατά Western τόσο το κυτταροπλασματικό όσο και το πυρηνικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Όπως φαίνεται στην εικόνα III.4.A, η φωσφορυλιωμένη p65 στο κυτταρόπλασμα, αυξάνεται σημαντικά στα 30 πρώτα λεπτά επίδρασης με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,7054 φορές σε σχέση με το control) και έπειτα μειώνεται σταδιακά στο διάστημα 1-3 ώρες (1,187 ± 0,0851 φορές σε σχέση με το control στη 1 ώρα, 0,6905 ± 0,1755 φορές σε σχέση με το control στις 2 ώρες και 0,4912 ± 0,0459 φορές σε σχέση με το control στις 3 ώρες με p<0,01). Ταυτόχρονα, στον πυρήνα, παρατηρείται αύξηση της p-p65 στα 30 λεπτά επίδρασης (1,6680 φορές σε σχέση με το control), η οποία μεγιστοποιείται στη 1 ώρα (1,724 ± 0,0576 φορές σε σχέση με το control, p<0,05), ενώ στη συνέχεια μειώνεται στις 2 ώρες (0,7961 φορές σε σχέση με το control) και σχεδόν εξαφανίζεται στις 3 ώρες (0,2390 ± 0,0004 φορές σε σχέση με το control, p<0,05).

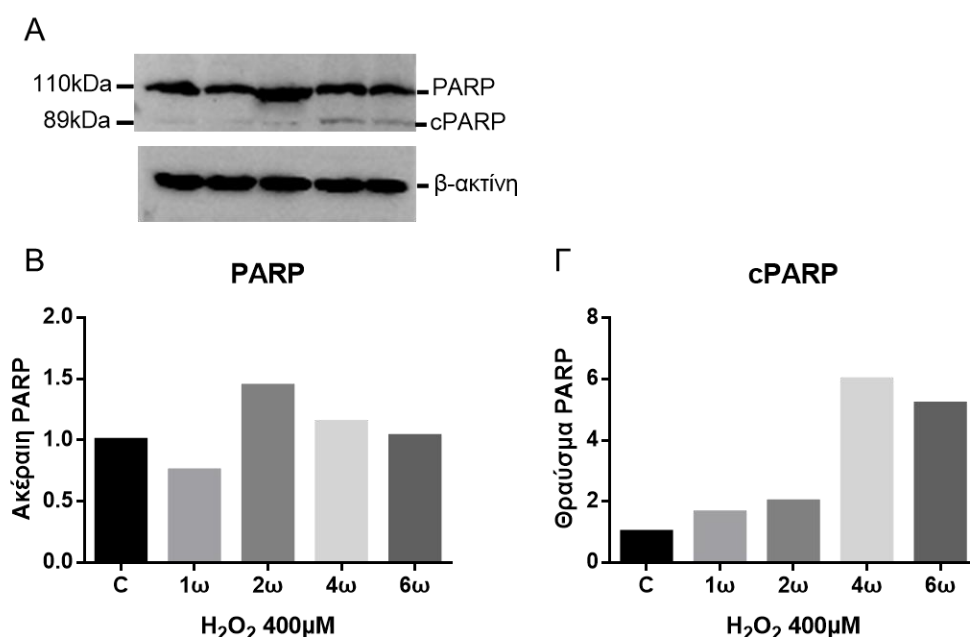


**Εικόνα III.4** Χρονικό πρότυπο μετατόπισης της φωσφορυλιωμένης υπομονάδας p65 από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα υπό την επίδραση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 0, 0.5, 1, 2 και 3 ώρες με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 400μM και ακολούθησε υποκυτταρική κλασμάτωση του

πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. 20μg από το κυτταροπλασματικό κλάσμα και 40μg από το πυρηνικό αναλύθηκαν κατά Western ως προς τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της υπομονάδας p65 του NF-κB. Απεικονίζονται οι αντιπροσωπευτικές εικόνες από τη δοκιμασία Western και τα αντίστοιχα γραφήματα μεταβολής της p-p65 στο κυτταρόπλασμα (A) και τον πυρήνα (B). Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για να εξασφαλιστεί το σωστό φόρτωμα των δειγμάτων.

### III.5 Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επάγει την απόπτωση των καρδιακών μυοβλαστών H9c2

Για να διαπιστώσουμε αν το οξειδωτικό στρες που προκαλείται κατά την επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400μM, είναι ικανό να επάγει την απόπτωση των καρδιακών μυοβλαστών, έγινε επίδραση τους με αυτό για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, 0, 1, 2, 4 και 6 ώρες. Στις συνθήκες αυτές ελέγξαμε αν υπάρχει θραύση της πολυμεράσης πολύ-ADP ριβόζης (PARP), γεγονός που αποτελεί δείκτη ότι τα κύτταρα αποπίπτουν. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δείχνουν ότι η απόπτωση των καρδιακών κυττάρων έχει ξεκινήσει ήδη από τις 4 ώρες επίδρασης με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, εφόσον ανιχνεύεται το θραύσμα της PARP (cPARP). Στα γραφήματα της εικόνας III.5, δεν παρατηρείται σημαντική διακύμανση των επιπέδων της ακέραιης PARP σε αντίθεση με το θραύσμα της, cPARP, τα επίπεδα του οποίου αυξάνονται κατά πολύ στις 4 (5,9864 φορές σε σχέση με το control) και 6 ώρες (5,1970 φορές σε σχέση με το control).

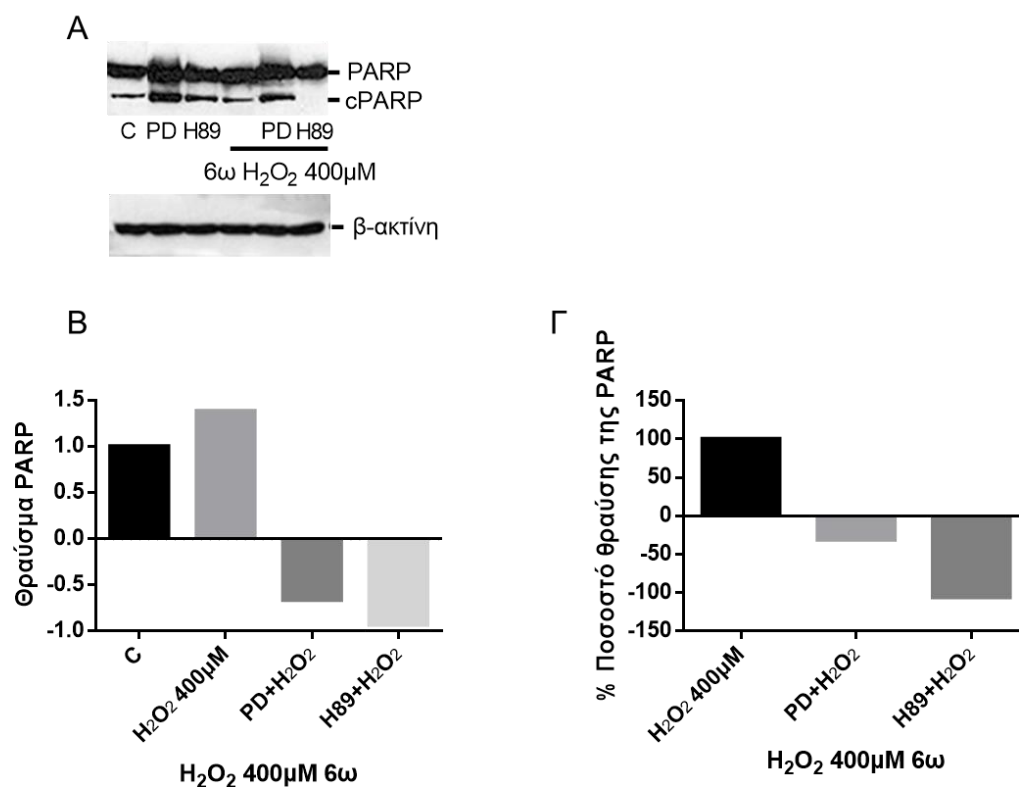


**Εικόνα III.5** Θραύση της PARP κατά την επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400μM. Τα κύτταρα H9c2 επώαστηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα 0, 1, 2, 4 και 6 ώρες με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 400μM και το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα (40μg/δείγμα) αναλύθηκε κατά Western ως προς τα επίπεδα της ακέραιης PARP και του θραύσματός της, cPARP. Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ανάλυση Western. Β και Γ) Γραφήματα απεικόνισης των επιπέδων της ακέραιης PARP (Β) και του θραύσματος cPARP (Γ). Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για να εξασφαλιστεί το σωστό φόρτωμα των δειγμάτων.



### III.6 Οι αναστολείς των ERKs και της MSK1 αναστέλλουν τη θραύση της PARP

Αφού διαπιστώσαμε την επαγωγή της απόπτωσης από το  $H_2O_2$  στους καρδιακούς μυοβλάστες, διερευνήσαμε πιθανά μονοπάτια που σχετίζονται με τη διαδικασία αυτή. Έτσι, μελετήσαμε την επίδραση των αναστολέων των ERKs, PD98059 (25 $\mu$ M) και της MSK1 H89 (10 $\mu$ M) στη θραύση της PARP. Συγκεκριμένα, τα καρδιακά μυοκύτταρα επωάστηκαν για 6 ώρες παρουσία μόνο των αναστολέων ή του συνδυασμού αναστολείς- $H_2O_2$  400 $\mu$ M, ώστε να ελεγχθεί αν παρεμποδίζεται η θραύση της PARP που παρατηρείται κατά την επίδραση μόνο με το  $H_2O_2$ . Στην εικόνα III.6.B φαίνονται τα επίπεδα του θραύσματος της PARP, αν από την τιμή που προκύπτει από τη συνδυαστική δράση αναστολέα- $H_2O_2$ , αφαιρεθεί η τιμή παρουσία μόνο του αναστολέα. Ως control χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που επωάστηκαν με τον διαλύτη των αναστολέων, DMSO. Οι τιμές των επιπέδων του cPARP, τόσο κατά την επώαση με PD98059, όσο και με H89 εμφανίζουν αρνητικές τιμές (-0,6601 φορές σε σχέση με το control για τον PD98059 και -0,9301 φορές σε σχέση με το control για τον H89), οι οποίες υποδηλώνουν πλήρη αναστολή. Η παρεμπόδιση της θραύσης επιβεβαιώνεται και μέσω του % ποσοστού θραύσης της PARP, το οποίο λαμβάνει αρνητικές τιμές (-30,61% για τον PD98059 και -105,66% για τον H89). Ως 100% στην προκειμένη περίπτωση λαμβάνεται η θραύση που προκαλείται μόνο παρουσία  $H_2O_2$ .

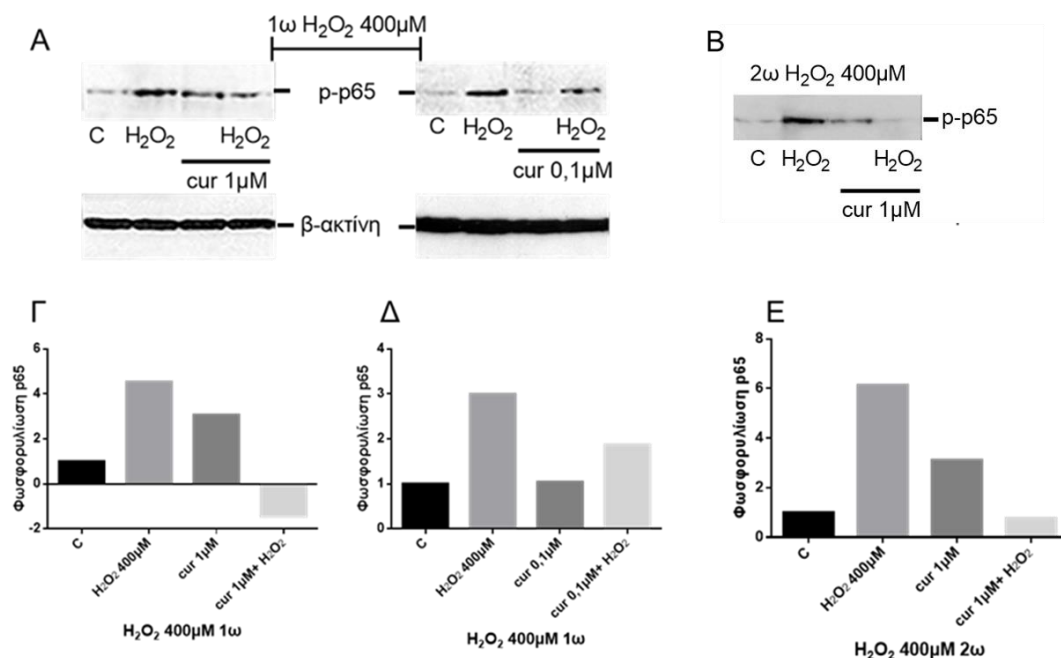


**Εικόνα III.6** Επίδραση καθιερωμένων αναστολέων PD98059 και H89 στη θραύση της PARP. 40  $\mu$ g ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από δείγματα κυττάρων που επωάστηκαν για 6 ώρες παρουσία μόνο των αναστολέων ή του συνδυασμού αναστολείς- $H_2O_2$  400 $\mu$ M, αναλύθηκαν κατά Western ως προς τη θραύση της PARP. Ως control χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία έγινε επίδραση με το διαλύτη των αναστολέων, DMSO. Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ανάλυση Western. Β) Γράφημα μεταβολών των επιπέδων του θραύσματος της PARP. Γ) Γράφημα του % ποσοστού θραύσης της PARP, όπου ως 100% θραύση έχει θεωρηθεί η θραύση

που προκαλείται από το  $H_2O_2$ . Οι αρνητικές τιμές υποδηλώνουν πλήρη αναστολή. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για να εξασφαλιστεί το σωστό φόρτωμα των δειγμάτων.

### III.7 Η κουρκουμίνη αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του NF- $\kappa$ B και τη θραύση της PARP που επάγονται από το $H_2O_2$

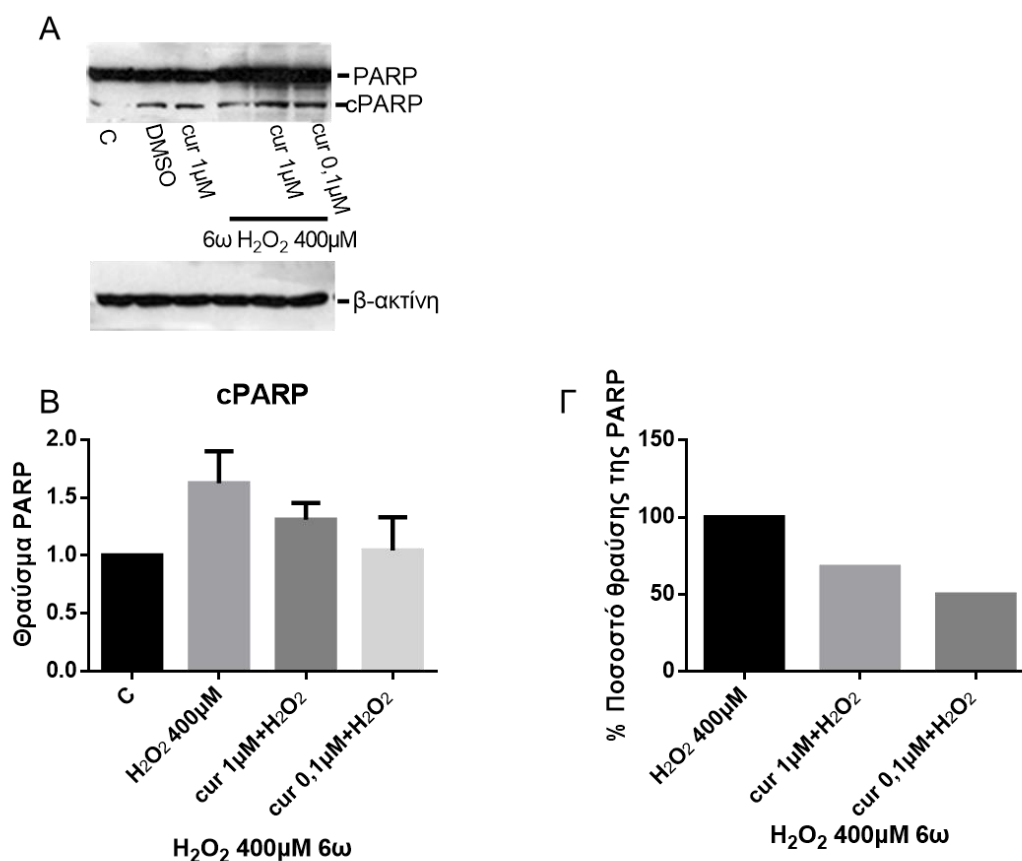
Οι δράσεις της κουρκουμίνης είναι ιδιαίτερα πολύπλοκες και εξαρτώνται από τον κυτταρικό τύπο και τον εκάστοτε πειραματικό σχεδιασμό. Γενικώς όμως, έχει βρεθεί να αποτελεί αναστολέα του μεταγραφικού παράγοντα NF- $\kappa$ B. Στην παρούσα εργασία διερευνήσαμε την επίδραση της κουρκουμίνης συγκέντρωσης 0,1  $\mu$ M και 1  $\mu$ M στη φωσφορυλίωση της υπομονάδας p65, σε κύτταρα που επωάζονται με 400  $\mu$ M  $H_2O_2$  για 1 και 2 ώρες. Έτσι, έγινε προ-επώαση με την κουρκουμίνη διαφορετικών συγκεντρώσεων για 30 λεπτά κι ακολούθησε επίδραση με το  $H_2O_2$  για 1 και 2 ώρες. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι στη 1 ώρα, το  $H_2O_2$  επάγει σημαντική φωσφορυλίωση της p65 (4,5368 φορές σε σχέση με το control), η οποία αναστέλλεται κατά την προ-επώαση με την κουρκουμίνη (-1,4436 φορές σε σχέση με το control). Φαίνεται ότι η συγκέντρωση της κουρκουμίνης παίζει ρόλο στην αναστολή της φωσφορυλίωσης της p65, καθώς στα 0,1  $\mu$ M αν και παρατηρείται αναστολή σε σχέση με το  $H_2O_2$ , είναι μικρότερη συγκριτικά με το 1  $\mu$ M κουρκουμίνης, όπου διαπιστώθηκε πλήρης αναστολή της φωσφορυλίωσης (-1,8657 φορές σε σχέση με το control). Ομοίως, στις 2 ώρες, η κουρκουμίνη 1  $\mu$ M συντελεί στην πλήρη αναστολή της φωσφορυλίωσης της p65 που επάγεται από το  $H_2O_2$  (0,7633 φορές σε σχέση με το control).



**Εικόνα III.7** Επίδραση της κουρκουμίνης στην φωσφορυλίωση της p65 υπομονάδας του NF- $\kappa$ B. Οι καρδιακοί μυοβλάστες επωάστηκαν με  $H_2O_2$  400  $\mu$ M για 1 και 2 ώρες, είτε παρουσία είτε απουσία κουρκουμίνης (0,1  $\mu$ M και 1  $\mu$ M) και 60  $\mu$ g ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αναλύθηκαν κατά Western ως προς τη φωσφορυλίωση της p65. A και B) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ανάλυση Western από τη 1 ώρα (A) και 2 ώρες (B) επίδρασης με  $H_2O_2$ . Γ και Δ) Γραφήματα μεταβολών της φωσφορυλίωσης της p65 στη μία ώρα επίδρασης με  $H_2O_2$  και

προ-επώασης με κουρκουμίνη 1 $\mu$ M (Γ) και 0,1 $\mu$ M (Δ). Ε) Γράφημα μεταβολών της p-p65 στις 2 ώρες επίδρασης με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και προ-επώασης με 1 $\mu$ M κουρκουμίνης. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για να εξασφαλιστεί το σωστό φόρτωμα των δειγμάτων. Cur: κουρκουμίνη

Στη συνέχεια, μελετήσαμε το ρόλο της κουρκουμίνης 0,1 $\mu$ M και 1 $\mu$ M στη θραύση της PARP, κατά την επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 6 ώρες. Η προ-επώαση με κουρκουμίνη έχει ως αποτέλεσμα μικρή μείωση του θραύσματος της PARP που πλησιάζει τα επίπεδα του control (1,309  $\pm$  0,1026 φορές σε σχέση με το control για την κουρκουμίνη 1 $\mu$ M και 1,044  $\pm$  0,2037 για την κουρκουμίνη 0,1 $\mu$ M). Η μείωση αυτή φαίνεται πιο έντονα στο ποσοστό θραύσματος της PARP ως προς την ακέραιη PARP και μάλιστα η μικρότερη συγκέντρωση κουρκουμίνης συντελεί σε σχετικά μεγαλύτερη αναστολή της θραύσης (67,81% για την κουρκουμίνη 1 $\mu$ M και 49,96% για την κουρκουμίνη 0,1 $\mu$ M). Ως 100% θραύση χρησιμοποιήθηκε η θραύση που προέκυψε κατά την επίδραση μόνο με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Εικόνα III.8** Επίδραση κουρκουμίνης στη θραύση της PARP. 40 $\mu$ g ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα που επώαστηκαν για 6 ώρες με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400 $\mu$ M, είτε παρουσία, είτε απουσία κουρκουμίνης 0,1 $\mu$ M και 1 $\mu$ M αναλύθηκαν κατά Western, ως προς τα επίπεδα θραύσης της PARP. Ως control χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα στα οποία δεν έγινε καμία επίδραση, ή έγινε επίδραση με το διαλύτη της κουρκουμίνης, το DMSO. Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ανάλυση κατά Western. Β) Γράφημα μεταβολής των επιπέδων της ακέραιης PARP. Γ) Γράφημα του % ποσοστού θραύσης της PARP, με 100% θραύση να αντιστοιχεί σε αυτή που προκαλείται από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

---

## IV. Συζήτηση

---

### IV.1 Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επάγει την φωσφορυλίωση της p65 υπομονάδας του NF-κB στη σερίνη 536 και την μετατόπιση της στον πυρήνα

Ο NF-κB αποτελεί έναν από τους πρώτους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι βρέθηκε να ρυθμίζονται βάσει του οξειδωτικού φορτίου του κυττάρου στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Finkel, 2000). Τα οξειδοαναγωγικά συμβάντα που λαμβάνουν χώρα στο ευκαρυωτικό κύτταρο, επηρεάζουν τόσο κυτταροπλασματικές όσο και πυρηνικές διαδικασίες που συμβαίνουν κατά την πορεία ενεργοποίησης του μεταγραφικού αυτού παράγοντα (Hoffmann et al., 2003). Επομένως, πληθώρα εργασιών επικεντρώνεται στην μελέτη του ρόλου του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στη ρύθμιση του NF-κB, με τα αποτελέσματα να είναι ιδιαίτερα αντικρουόμενα, καθώς φαίνεται το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> να έχει ποικίλες δράσεις ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, τη φάση του κυττάρου και τις εκάστοτε πειραματικές συνθήκες. Γενικά, πληθώρα αναφορών τονίζουν την ενεργοποίηση του NF-κB από αντιοξειδωτικές ουσίες. Ωστόσο, ολοένα και αυξανόμενες εργασίες επιβεβαιώνουν τον κυρίαρχο ρόλο πολλών οξειδωτικών μορίων στην επαγωγή του NF-κB, γεγονότα που σχετίζονται και με διάφορες ασθένειες (Indo et al., 2017).

Σε προηγούμενη μελέτη που διεξήχθη στο εργαστήριο μας σε σκελετικούς μυοβλάστες ποντικού, βρέθηκε ότι παρουσία 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επάγονταν σημαντική φωσφορυλίωση του NF-κB σε δύο κατάλοιπα, τη σερίνη 536 και τη σερίνη 279, ήδη από τα 15 λεπτά, με μέγιστο τη 1 και τις 2 ώρες. Στην εργασία αυτή, ενώ η φωσφορυλίωση στη σερίνη 279 φάνηκε να σχετίζεται άμεσα με τις MAPKs, δεν υπήρχε ξεκάθαρη εικόνα για την αντίστοιχη στη σερίνη 536 (Kefaloyianni et al., 2006). Στην παρούσα εργασία, επικεντρωθήκαμε στη μελέτη της συμπεριφοράς του NF-κB υπό την επίδραση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 400μM σε καρδιακούς μυοβλάστες της κυτταρικής σειράς H9c2. Από τα αποτελέσματα, διαπιστώθηκε ότι ήδη από τα 30 λεπτά επίδρασης, υπάρχει φωσφορυλίωση της p65 υπομονάδας του μεταγραφικού παράγοντα στη σερίνη 536 και μετατόπιση της στον πυρήνα. Η φωσφορυλίωση αυτή δε μεγιστοποιείται στη 1 και παραμένει σε υψηλά επίπεδα και στις 2 ώρες επίδρασης. Ομοίως, άλλες μελέτες σε ανθρώπινα φυσιολογικά κύτταρα πνεύμονα και σε επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα πνεύμονα της κυτταρικής σειράς A549, συμφωνούν με τις παρατηρήσεις μας, καθώς διαπίστωσαν ότι με αύξηση της συγκέντρωσης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μεταξύ 200μM-1mM για 2 ώρες, αυξάνονταν και η μετατόπιση της φωσφορυλιωμένης υπομονάδας p65 στη σερίνη 536, στον πυρήνα (Sfikas et al., 2012). Επιπλέον, μια πιο πρόσφατη εργασία αναφέρει ότι, η επίδραση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400μM σε επιθηλιακά κύτταρα κερατοειδούς επάγει την μετατόπιση της p65<sub>(Ser536)</sub> στον πυρήνα σε διαστήματα 3, 6 και 12 ωρών (Song et al., 2017).

Βάσει της ευρύτερης βιβλιογραφίας, δεν έχει ξεκαθαριστεί εάν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συντελεί στην επαγωγή ή στην αναστολή του NF-κB, καθώς σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και πειραματικά μοντέλα παρατηρούνται και διαφορετικές δράσεις τόσο αναρροϊκά όσο και καταρροϊκά στο μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα μας διαφωνούν με τα αντίστοιχα των Hino και συνεργατών του, οι οποίοι παρατήρησαν ότι αυξανόμενης της συγκέντρωσης του

εξωγενούς  $H_2O_2$  μεταξύ  $100\mu M$  και  $1mM$ , υπήρχε αναστολή του NF- $\kappa B$  σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα της κυτταρικής σειράς A549, η οποία ήταν αποτέλεσμα της αποσταθεροποίησης του TNFR1 από το  $H_2O_2$  (Hino et al., 1999). Αντίστοιχα αποτελέσματα, δηλαδή αναστολή της ενεργοποίησης του NF- $\kappa B$  κατά την επίδραση με  $H_2O_2$   $300\mu M$ , προέκυψαν και στην κυτταρική σειρά C10, που αποτελείται από πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα τύπου II ποντικού. Στην περίπτωση αυτή, διαπιστώθηκε αυξημένη αποικοδόμηση της πρωτεΐνης RIP, η οποία είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της IKK (Pantano, Shrivastava, McElhinney, & Janssen-Heininger, 2003). Ακόμη, σε πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα ποντικού,  $200\mu M$   $H_2O_2$  δεν είχαν κάποια επίδραση στην ενεργοποίηση της IKK και του NF- $\kappa B$ , ωστόσο, κατά την προσθήκη εξωγενούς TNF- $\alpha$ , το  $H_2O_2$  παρεμπόδισε σε σημαντικό βαθμό την αποικοδόμηση του I $\kappa B$ - $\alpha$  και την επακόλουθη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα. Μάλιστα, η αναστολή της IKK συσχετίστηκε με άμεση οξείδωση της κυστεΐνης 179 της  $\beta$  υπομονάδας της (IKK $\beta$ ) (Korn, Wouters, Vos, & Janssen-Heininger, 2001). Αναστολή του NF- $\kappa B$  από το  $H_2O_2$  αναφέρουν και οι Jaspers και συνεργάτες, οι οποίοι παρατήρησαν ότι, κατά την επίδραση με  $H_2O_2$   $500\mu M$  σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα βρόγχου, ενώ αυξήθηκε η δραστηριότητα της IKK και η φωσφορυλίωση του I $\kappa B$  $\alpha$ , δεν πραγματοποιήθηκε αποικοδόμηση του τελευταίου (Jaspers, Zhang, Fraser, Samet, & Reed, 2001). Συνεπώς, το  $H_2O_2$  σε αυτήν την περίπτωση φάνηκε να αναστέλλει το πρωτεάσωμα. Σε αυτό το συμπέρασμα κατέληξαν και δύο ανεξάρτητες μελέτες σε επαγόμενα από LPS βασιόφιλα, στα οποία η επίδραση με  $H_2O_2$  συγκέντρωσης  $250\mu M$  και  $500\mu M$  μείωσαν τη δράση του NF- $\kappa B$  εξαιτίας της παρεμπόδισης της αποικοδόμησης του I $\kappa B$  $\alpha$  (Strassheim et al., 2004; Zmijewski et al., 2007).

Από την άλλη, σε κύτταρα HeLa, φάνηκε να επάγεται η IKK υπό την επίδραση  $3mM$   $H_2O_2$ . Βέβαια, η επαγωγή αυτή καθυστέρησε σε σχέση με την προσθήκη εξωγενούς TNF- $\alpha$ , ενώ, ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε παρατεταμένη ενεργοποίηση του NF- $\kappa B$ , ιδιαίτερα κατά τη συνδυασμένη δράση TNF- $\alpha$  και  $H_2O_2$  (Kamata et al., 2002). Η IKK $\gamma$  ή NEMO, είναι μια υπομονάδα του συμπλόκου της κινάσης του I $\kappa B$  που συμμετέχει στην ενεργοποίηση του NF- $\kappa B$ , όταν βρίσκεται σε διμερή μορφή που συγκρατείται μέσω δισουλφυδικού δεσμού. Ο σχηματισμός των δισουλφυδικών αυτών δεσμών απαιτεί τα κατάλοιπα κυστεΐνη 54 και κυστεΐνη 347 και έχει φανεί ότι επίδραση των κυττάρων με  $H_2O_2$  ενισχύει τον σχηματισμό των διμερών NEMO. Με αυτόν τον τρόπο υποδεικνύεται ένας μηχανισμός μέσω του οποίου τα οξειδωτικά μόρια μπορούν και ενεργοποιούν το μονοπάτι του NF- $\kappa B$  (Indo et al., 2017). Οι Herscovitch και συνεργάτες αναφέρουν ότι σε ινοβλάστες ποντικού, το  $H_2O_2$  σε συγκεντρώσεις  $50\mu M$  με  $500\mu M$  επάγει αυτόν το διμερισμό και άρα την ενεργοποίηση. Ωστόσο, η επίδραση με  $H_2O_2$   $200\mu M$ , πριν την προσθήκη του TNF- $\alpha$  αναστέλλει την IKK πιθανώς διαταράσσοντας την υπομονάδα IKK $\beta$  (Herscovitch et al., 2008). Η επίδραση με  $1mM$   $H_2O_2$  σε ενεργοποιημένα, από IL-1 $\beta$ , MCF-7 κύτταρα επάγει τον NF- $\kappa B$  μέσω της ενεργοποίησης της NIK κινάσης (Li & Engelhardt, 2006).

Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, η σύγκριση μεταξύ των κυτταρικών σειρών HeLa και MCF-7 ως προς την απόκριση του NF- $\kappa B$  των κυττάρων αυτών κατά την επίδραση με  $H_2O_2$ , έδειξε ότι στα MCF-7 υπάρχει ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα στη 1 και 2 ώρες επίδρασης με  $H_2O_2$   $25\mu M$  απουσία TNF- $\alpha$ , ενώ στα HeLa όχι. Στην

ίδια μελέτη, η συνδυαστική δράση του  $H_2O_2$  με τον TNF- $\alpha$  τετραπλασίασε την μετατόπιση της p65 στον πυρήνα στα MCF-7, ενώ στα κύτταρα HeLa το  $H_2O_2$  έδρασε ανταγωνιστικά με τον TNF- $\alpha$  μειώνοντας τη δράση του (Oliveira-Marques et al., 2013). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί, ότι διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι αντιοξειδωτικά μόρια όπως η NAC, αναστέλλουν τον NF- $\kappa$ B, παρεμποδίζοντας την μετατόπιση του στον πυρήνα (Dirsch et al., 1998).

Από την άλλη, η μετατόπιση του NF- $\kappa$ B στον πυρήνα, δεν σημαίνει απαραίτητα και επαγωγή της έκφρασης γονιδίων στόχων. Ο Jornot και συνεργάτες έδειξαν ότι 1mM  $H_2O_2$  επάγει την μετατόπιση του NF- $\kappa$ B στον πυρήνα ανθρωπίνων ενδοθηλιακών κυττάρων, χωρίς όμως την επακόλουθη ενεργοποίηση της μεταγραφής (Jornot, Petersen, & Junod, 1997). Αυτό, πιθανώς οφείλεται στην οξείδωση της κυστεΐνης 62 της υπομονάδας p50 του NF- $\kappa$ B, γεγονός που παρεμποδίζει την πρόσδεση στο DNA (Pineda-Molina et al., 2001). Συνεπώς, φαίνεται να απαιτούνται διαφορετικές οξειδοαναγωγικές συνθήκες μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα ώστε να επιτευχθεί η σωστή ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B. Συγκεκριμένα, ένα προ-οξειδωτικό μήνυμα στο κυτταρόπλασμα μπορεί να επάγει την μετατόπιση του NF- $\kappa$ B στον πυρήνα, ωστόσο για να μπορέσει να γίνει η πρόσδεση στο DNA απαιτείται οι πρωτεΐνες να είναι ανηγμένες (Hirota et al., 1999). Παρόλα αυτά, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, μελέτες υποστηρίζουν την πλήρη ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B από το  $H_2O_2$  (Oliveira-Marques et al., 2007; Janssen-Heininger et al., 1999).

Τέλος, η διαφορετική ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων του NF- $\kappa$ B παρουσία  $H_2O_2$ , είναι πιθανό να εξαρτάται κι από τη διαφορετική συγγένεια του μεταγραφικού παράγοντα με τις συντηρημένες κB αλληλουχίες αναγνώρισης στον υποκινητή των γονιδίων αυτών. Γενικώς, γονίδια με αλληλουχίες υψηλής συγγένειας παρουσιάζουν μικρότερη ευαισθησία στην επίδραση του  $H_2O_2$  σε σχέση με γονίδια που έχουν αλληλουχίες χαμηλότερης συγγένειας με το μεταγραφικό παράγοντα (Oliveira-Marques et al., 2009a). Επιπλέον, σε συνθήκες όπου υπάρχει μεγάλη ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B από τον TNF- $\alpha$ , η επίδραση του  $H_2O_2$  είναι αμελητέα. Επομένως, σε περιπτώσεις αυξημένης συγκέντρωσης ενεργοποιητών του NF- $\kappa$ B, όπως ο TNF- $\alpha$ , ή υψηλής συγγένειας με την αλληλουχία κB του γονιδίου στόχου, τα γονίδια παρουσιάζονται απευαισθητοποιημένα στην παρουσία του  $H_2O_2$ , ενώ σε αντίθετη περίπτωση παρατηρείται θετική ρύθμιση τους (Oliveira-Marques et al., 2009b).

#### IV.2 Το $H_2O_2$ επάγει τη φωσφορυλίωση των MAPKs

Οι συνθήκες οξειδωτικού στρες στα κύτταρα, επάγουν μια σειρά από μονοπάτια που μπορεί να σχετίζονται είτε με αντι-οξειδωτικούς μηχανισμούς για την εξουδετέρωση των δραστικών ριζών, είτε με την πρόκληση της απόπτωσης όταν το επιβαλλόμενο οξειδωτικό φορτίο είναι μεγαλύτερο από αυτό που μπορεί να αντέξει το κύτταρο. Τα μέλη της οικογένειας των MAPKs συμμετέχουν σε κρίσιμους σηματοδοτικούς καταρράκτες με ποικίλες δράσεις ανάλογα με το ερέθισμα και τις συνθήκες που καλείται να αντιμετωπίσει το κύτταρο και το  $H_2O_2$  αποτελεί έναν από τους κυρίαρχους παράγοντες που έχει φανεί επανειλημμένα να επηρεάζει τα μονοπάτια των MAPKs. Στην παρούσα μελέτη θέλαμε να διαπιστώσουμε σε ποιες συγκεντρώσεις του οξειδωτικού παράγοντα και σε ποια χρονικά διαστήματα παρατηρείται μέγιστη



ενεργοποίηση των τριών βασικών μελών των MAPKs, ERKs, JNKs και p38 MAPK. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι το  $H_2O_2$  συγκέντρωσης 400 $\mu$ M ενεργοποιεί τα μονοπάτια των JNKs και p38 MAPK στη 1 και 2 ώρες επίδρασης, ενώ οι ERKs φωσφορυλιώνονται πολύ πιο νωρίς, ήδη από τα πρώτα 15 λεπτά επίδρασης, με μέγιστο τα 30 λεπτά. Η γρήγορη απόκριση των ERKs παρουσία  $H_2O_2$  έχειδειχθεί και στο παρελθόν σε μελέτη στο εργαστήριο μας, στην οποία φάνηκε ότι στη 1 ώρα, οι p-ERKs προσομοιάζουν στα επίπεδα του control. Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη αυτή είχε διαπιστωθεί ότι οι ERKs ανταποκρίνονται πολύ άμεσα κατά την επίδραση των  $H_9c_2$  με 100 $\mu$ M  $H_2O_2$ , καθώς εμφάνισαν μέγιστο στα 15 λεπτά επίδρασης, ενώ στη 1 ώρα είχαν ήδη επιστρέψει στα επίπεδα του control (Kefaloyianni et al., 2006). Επιπλέον σε παλαιότερη μελέτη σε απομονωμένη καρδιά βατράχου, η επίδραση με  $H_2O_2$  (100 $\mu$ M/L) φάνηκε να συσχετίζεται με την ταχεία επαγωγή της φωσφορυλίωσης των MAPKs, μετά τα δύο πρώτα λεπτά, με τα επίπεδα τους να επιστρέφουν στα επίπεδα του control γύρω στα 30 λεπτά για τις ERKs και JNKs και στα 45 λεπτά για την p38 MAPK (Gaitanaki et al., 2003).

Τα αποτελέσματα μας φαίνεται να συνηγορούν με μελέτες που έχουν γίνει σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και πειραματικά μοντέλα. Οι ROS, αποτελούν τους πιο ισχυρούς ενεργοποιητές της ASK1 η οποία, παίζει κυρίαρχο ρόλο στη σηματοδότηση λόγω του οξειδωτικού στρες. Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι σε μεταλλάγματα που έχουν ανενεργή την ASK1, αναστέλλεται η μεσολαβούμενη από οξειδωτικό στρες απόπτωση, ενώ το αντίθετο συμβαίνει σε μεταλλάγματα με συνεχώς ενεργό το μόριο αυτό (Shiizaki et al., 2013). Η ASK1, αποτελεί MAPKKK, η οποία φωσφορυλιώνει διάφορες MAPKKs που με τη σειρά τους επάγουν την p38 MAPK και τις JNKs. Πρέπει να τονιστεί ότι η ένταση και η διάρκεια της ενεργοποίησης των MAPKs καθορίζει την πορεία που θα ακολουθήσει το κύτταρο, προς τη ζωή ή το θάνατο (Matsuzawa et al., 2002) Ορισμένες αναφορές υποστηρίζουν ότι η προσωρινή επαγωγή των JNKs από το οξειδωτικό στρες και τον TNF- $\alpha$ , οδηγεί σε επιβίωση, μέσω την έκφρασης αντι-αποπτωτικών γονιδίων η οποία μεσολαβείται από τον μεταγραφικό παράγοντα NF- $\kappa$ B. Αντιθέτως, παρατεταμένη ενεργοποίηση των JNKs επάγει την απόπτωση, είτε μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης προ ή/και αντι-αποπτωτικών μορίων, είτε μέσω μετατόπισης στον πυρήνα, όπου ενεργοποιείται ο c-Jun (Matsuzawa & Ichijo, 2001). Αντίστοιχα, το χρονικό πρότυπο της επίδρασης με το  $H_2O_2$  παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των μονοπατιών των MAPKs και την επακόλουθη επαγωγή της απόπτωσης ή την επιβίωση. Το εργαστήριο μας έδειξε στο παρελθόν, ότι η παρατεταμένη επίδραση με  $H_2O_2$  έχει διαφορετική επίδραση στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των JNKs σε σχέση με την παροδική επίδραση με αυτό. Και οι 2 τύποι επίδρασης συντέλεσαν στη μέγιστη φωσφορυλίωση των JNKs στις 2 ώρες, ωστόσο κατά τη συνεχόμενη επώαση με  $H_2O_2$  τα επίπεδα τους παρέμειναν υψηλά μέχρι και τις 6 ώρες, ενώ στην παροδική επώαση αυτές αποφωσφορυλιώθηκαν στις 4 ώρες μετά την αφαίρεση του  $H_2O_2$ . Τα παραπάνω συσχετίστηκαν με τη απόπτωση που προκαλείται εξαιτίας του οξειδωτικού στρες, καθώς η παρατεταμένη φωσφορυλίωση των JNKs συντέλεσε στην επαγωγή της απόπτωσης, ενώ η γρήγορη απόκριση και άμεση απενεργοποίηση τους είχε προστατευτικό ρόλο (Pechtelidou et al., 2008).

Η χρήση του  $H_2O_2$  σε πολλές πειραματικές μελέτες, έχει συσχετίσει έντονα το συγκεκριμένο οξειδωτικό παράγοντα με τα μονοπάτια των MAPKs. Έρευνα που



διεξήχθη σε ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y, έδειξε ότι η επίδραση με  $H_2O_2$  100 $\mu$ M επάγει τη φωσφορυλίωση και των τριών μελών των MAPKs ήδη από τα 5 πρώτα λεπτά επίδρασης και συντελεί στην απόπτωση των νευρικών κυττάρων. Στην ίδια μελέτη η χρήση της γερανυλ-γερανυλο-ακετόνης (geranylgeranylacetone, GGA) είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της επαγόμενης από το  $H_2O_2$  φωσφορυλίωσης των ERKs, ενώ αντίθετα την αύξηση της φωσφορυλίωσης των p38 MAPK και JNKs. Τα αποτελέσματα αυτά συσχετίστηκαν με την ενεργοποίηση της διαδικασίας της αυτοφαγίας ως προστατευτικού μηχανισμού έναντι της απόπτωσης λόγω της νευροτοξικότητας. Μάλιστα, ο μηχανισμός αυτός συσχετίστηκε με την επαγωγή των p38 MAPK και JNKs και όχι με τις ERKs (Kim et al., 2015). Από την άλλη, στα ίδια κύτταρα, SH-SY5Y, επίδραση με  $H_2O_2$  συγκέντρωσης 1mM για 24 ώρες, είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση, επίσης, και των τριών μελών των MAPKs, JNKs, p38 MAPK και ERKs, όπως φάνηκε από τα υψηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης τους. Ωστόσο, μόνο η αναστολή των ERKs συντέλεσε στη μείωση των επιπέδων του αποπτωτικού θανάτου, υποδεικνύοντας τον προστατευτικό τους ρόλο έναντι του  $H_2O_2$  (Gu et al., 2013). Τέλος, σε μη διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα της σειράς PC12, η επίδραση με  $H_2O_2$  συγκέντρωσης 400 $\mu$ M για 1 ώρα, προκάλεσε τη φωσφορυλίωση των p38 MAPK και JNKs, που συσχετίστηκε με την επαγωγή της απόπτωσης. Η επίδραση με μια πιθανή αντιοξειδωτική ουσία, την icariin, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της προαναφερθείσας φωσφορυλίωσης και την προστασία των κυττάρων από την απόπτωση (Li et al., 2011).

Η αναστολή των JNKs, έχει φανεί να αποτρέπει την απόπτωση που επάγεται από ισχαμία/επανοξυγόνωση τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*. Η μιτοχονδριακή JNK και όχι η κυτταροπλασματική, φωσφορυλιώνεται κατά την επίδραση με  $H_2O_2$ , οδηγώντας σε αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και άρα απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Θεωρείται ότι η εξαρτώμενη από την JNK επαγωγή της μιτοχονδριακής απόπτωσης σχετίζεται με την μειωμένη φωσφορυλίωση του Bcl-2-σχετιζόμενου επαγωγέα της απόπτωσης (Bcl-2-associated death promoter, BAD) στη Ser112 (Kim et al., 2017). Βέβαια, και οι JNKs φαίνεται να έχουν αντικρουόμενους ρόλους, καθώς άλλες μελέτες υποδεικνύουν πως μπορεί να δρουν προστατευτικά κατά την επαγόμενη από I/R απόπτωση, πιθανώς μέσω της φωσφορυλίωσης της Akt, ή της παρεμπόδισης σχηματισμού του αποπτωσώματος (Engelbrecht et al., 2004). Ομοίως, σε πολύ πρόσφατη έρευνα του, ο Park διαπίστωσε ότι κατά την 24ωρη επίδραση με  $H_2O_2$  σε ενδοθηλιακά κύτταρα πνευμονικής αρτηρίας, επάγονταν απόπτωση η οποία αυξήθηκε κατά την προ-επώαση με τον αναστολέα των JNKs, ενώ παρεμποδίστηκε με τον αναστολέα της p38 MAPK. Επομένως, στην επαγωγή της απόπτωσης από το  $H_2O_2$  φαίνεται να εμπλέκονται οι p38 MAPK και οι JNKs, με την πρώτη να δρα προ-αποπτωτικά, ενώ τη δεύτερη αντι-αποπτωτικά (Park, 2017). Επομένως, βάσει των ανωτέρω, ο ρόλος των JNKs στο οξειδωτικό στρες, είναι ιδιαίτερα περίπλοκος και το πιο πιθανό είναι να σχετίζεται με το κυτταρικό τύπο και τις δεδομένες συνθήκες.

Η p38 MAPK, όπως και οι JNKs, έχει συσχετιστεί με την απόπτωση. Γενετικές προσεγγίσεις με διαγονιδιακά ποντίκια που έχουν ανενεργή την κινάση αυτή στην καρδιά, έδειξαν ότι η απόπτωση των καρδιακών κυττάρων και η δυσλειτουργία της καρδιάς μειώθηκαν κατά την επαγωγή οξειδωτικού στρες εξαιτίας I/R. Επιπροσθέτως,

η χρήση του αναστολέα της p38 MAPK, SB203580, φαίνεται να είχε ως αποτέλεσμα την αποτροπή της απόπτωσης των μυοκυττάρων, *in vivo* και *in vitro*. Η προστασία της καρδιάς, μέσω της αναστολής της p38 MAPK, φαίνεται να μεσολαβείται από την αύξηση της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών μορίων Bcl-2/Bcl-xl (Yokota & Wang, 2016). Από την άλλη, οι ERK1/2 μπορούν να ενεργοποιηθούν από τις ρίζες υδροξυλίου, μέσω του μονοπατιού Ras/Raf-1 MAPKKK, και η επαγωγή τους και σε αυτήν την περίπτωση έχει προστατευτικό ρόλο (Aikawa et al., 1997). Αυτό φαίνεται από το γεγονός ότι, ενώ το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επάγει και τις τρεις οικογένειες των MAPKs, μόνο η επίδραση με τον αναστολέα των ERKs, PD98059, επάγει την απόπτωση (Zhu et al., 1999). Ακόμη, ο αντι-αποπτωτικός ρόλος των ERKs διαπιστώθηκε και από μελέτη σε καρδιακούς μυοβλάστες, στην οποία η αναστολή τους κατά την υποξία/επανοξυγόνωση αυξάνει την απόπτωση των κυττάρων (Yue et al., 2000). Από την άλλη, βέβαια, σε ορισμένες περιπτώσεις, η επαγωγή του μονοπατιού των ERKs, είχε ως αποτέλεσμα την απόπτωση των κυττάρων. Σε μελέτη που έγινε σε εμβρυϊκά κύτταρα αρουραίου και σε κύτταρα της σειράς H9c2, μετά από επίδραση με δοξορουβικίνη, η παρατεταμένη ενεργοποίηση των ERKs φάνηκε να οδηγεί σε απόπτωση (Liu et al., 2008).

#### IV.3 Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> επάγει την μεσολαβούμενη από τον NF-κΒ απόπτωση των καρδιακών μυοβλαστών

Ο ρόλος του NF-κΒ, αρχικά, θεωρούνταν προστατευτικός έναντι της απόπτωσης, καθώς πολλά από τα γονίδια-στόχους του έχουν χαρακτηριστεί ως αντι-αποπτωτικά, δηλαδή αναστέλλουν την απόπτωση και συντελούν στην επιβίωση των κυττάρων. Ωστόσο, πληθώρα αναφορών, υποστηρίζει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού αυτού παράγοντα παράλληλα με την επαγωγή αποπτωτικών μονοπατιών, υποδεικνύοντας έναν προ-αποπτωτικό ρόλο του, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις παθολογικών καταστάσεων. Από προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριο μας, διαπιστώσαμε επαγωγή του μεταγραφικού παράγοντα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2, ωστόσο δεν κατέστη ξεκάθαρος ο ρόλος του NF-κΒ στην απόπτωση (Kefaloyianni et al., 2006). Στην παρούσα εργασία, παρατηρήσαμε ότι υπό την επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 400μM, επάγεται απόπτωση ήδη από τις 4 ώρες, γεγονός που το επιβεβαιώσαμε μέσω ελέγχου της θραύσης της PARP. Ταυτόχρονα, είδαμε ότι σε αυτές τις συνθήκες, ενεργοποιείται ο NF-κΒ, στη 1 και 2 ώρες, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω. Μάλιστα, παρεμπόδιση του NF-κΒ, μέσω ενός καθιερωμένου αναστολέα του, της κουρκουμίνης, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της παρατηρούμενης θραύσης της PARP. Τα ανωτέρω, μας οδήγησαν στην υπόθεση ότι ο NF-κΒ στις δεδομένες συνθήκες λειτουργεί προ-αποπτωτικά.

Τα αποτελέσματα μας συνηγορούν με μια σειρά από μελέτες στις οποίες αναφέρεται ο προ-αποπτωτικός ρόλος του μεταγραφικού αυτού παράγοντα. Πιο συγκεκριμένα, κατά την 24ωρη επίδραση με διαφορετικές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100μM έως 1 mM σε οστεοβλάστες διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση του NF-κΒ που συσχετίστηκε με την παραγωγή προ-φλεγμονωδών παραγόντων αλλά και με την μετέπειτα επαγωγή της απόπτωσης. Ταυτόχρονα, η χρήση της μονοτροπεΐνης ως πιθανή αντιφλεγμονώδη και αντι-αποπτωτική ουσία, κατέστειλε τον NF-κΒ και την απόπτωση, συσχετίζοντας τα δύο αυτά μονοπάτια (Zhu et al., 2016).

Σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα φακού, SRA 01-04, η επίδραση με  $H_2O_2$  50 $\mu$ M για 24 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης, την ενεργοποίηση των μονοπατιών των MAPKs, καθώς και τη φωσφορυλίωση της υπομονάδας p65 και τη μετέπειτα μετατόπιση της στον πυρήνα. Στην ίδια μελέτη, η χρήση της αντιοξειδωτικής ουσίας, honokiol, ανέστειλε όλα τα παραπάνω μονοπάτια αυξάνοντας τελικά την επιβίωση των κυττάρων. Επομένως, διαπιστώθηκε ότι ο ρόλος του NF- $\kappa$ B σε αυτές τις συνθήκες είναι προ-αποπτωτικός, μεσολαβείται από τα μονοπάτια των MAPKs και η honokiol ασκεί την προστατευτική δράση της επιδρώντας στα συγκεκριμένα μονοπάτια (Tang et al., 2011).

Επιπλέον, οι Lee και συνεργάτες, αναφέρουν ότι το  $H_2O_2$  συγκέντρωσης 500 $\mu$ M, σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλίου λώρου, μπορεί και επάγει αποπτωτικό φαινότυπο στα κύτταρα, ήδη από τα 30 λεπτά επίδρασης. Στις συνθήκες αυτές, παρατηρήθηκε αυξημένη μετατόπιση της φωσφορυλιωμένης p65 υπομονάδας στον πυρήνα, αύξηση της φωσφορυλίωσης της p38 MAPK, ενώ δε φάνηκε να ενεργοποιούνται οι ERKs. Από την άλλη, όταν στα κύτταρα αυτά, έγινε προ-επώαση με 10 $\mu$ M πυροσταφυλικού οξέος πριν από την προσθήκη του  $H_2O_2$ , τα παραπάνω αποτελέσματα αντιστράφηκαν και ταυτόχρονα προέκυψε αναστολή της απόπτωσης. Συνεπώς, διαπιστώθηκε ότι το πυροσταφυλικό οξύ λειτουργεί προστατευτικά έναντι της απόπτωσης επεμβαίνοντας στα μονοπάτια p38 MAPK/NF- $\kappa$ B και ERKs, με το πρώτο να αναστέλλεται και το δεύτερο να ενεργοποιείται ώστε να προαχθεί η επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Lee et al., 2004).

Ακόμη μια έρευνα η οποία αναφέρει τον προ-αποπτωτικό ρόλο του NF- $\kappa$ B σε οξειδωτικές συνθήκες, δεν χρησιμοποιεί ως οξειδωτικό παράγοντα εξωγενές  $H_2O_2$ , αλλά μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αντι-καρκινική ουσία, τη δοξορουβικίνη. Στην εργασία αυτή, η οποία διεξήχθη σε δύο διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους- καρδιακά μυοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής-φάνηκε ότι η οξειδωτική και προ-αποπτωτική δράση της δοξορουβικίνης μεσολαβείται από την παραγωγή ενδογενούς  $H_2O_2$ . Μάλιστα, η επίδραση με δοξορουβικίνη συντέλεσε σε ισχυρή ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B, ο οποίος φωσφορυλιώθηκε και μετατοπίστηκε στον πυρήνα. Στην ίδια μελέτη, η χρήση της μεταλλοπορφυρίνης Fe(III)τετρακίς-4-βενζοϊκό οξύ-πορφυρίνη (Fe(III)tetrakis-4-benzoic acid-porphyrin, FeTBAP), που αποτελεί αναστολέα του ανιόντος  $O_2^{\cdot-}$  και του  $H_2O_2$ , παρεμπόδισε τόσο την ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B όσο και την επαγωγή της απόπτωσης και στους δύο κυτταρικούς τύπους. Τα αποτελέσματα αυτά συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι κατά την επίδραση με δοξορουβικίνη, το  $H_2O_2$  που παράγεται επάγει τον NF- $\kappa$ B, ο οποίος λειτουργεί προ-αποπτωτικά σε καρδιακά μυοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής (Wang et al., 2002).

Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη σε εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού, αναφέρεται ένα εναλλακτικό μονοπάτι επαγωγής του κυτταρικού θανάτου, το οποίο είναι ανεξάρτητο των κασπασών και μεσολαβείται από την PARP. Στο μοντέλο αυτό, ο κυτταρικός θάνατος, ενεργοποιήθηκε λόγω της χρόνιας επίδρασης με  $H_2O_2$  και σε αυτό, κυρίαρχο ρόλο έπαιξε ο NF- $\kappa$ B. Πιο συγκεκριμένα, η παρατεταμένη παραγωγή  $H_2O_2$  επιτεύχθηκε μέσω της οξειδάσης της γλυκόζης (Glucose oxidase, GO), η οποία προκάλεσε ενδογενή επίπεδα  $H_2O_2$  συγκεντρώσεων 50 $\mu$ M-100 $\mu$ M. Στην εργασία αυτή, διαπιστώθηκε ότι το χρόνιο οξειδωτικό στρες, προκάλεσε ισχυρή ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B, ο οποίος συντέλεσε στην αύξηση της έκφρασης των προ-αποπτωτικών TNF- $\alpha$

και FasL, με ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης των γονιδίων επιβίωσης Bcl-2 και XIAP. Ο προ-αποπτωτικός ρόλος του NF-κΒ επιβεβαιώθηκε μέσω της χρήσης μεταλλαγμάτων στα οποία απουσίαζε ο μεταγραφικός παράγοντας και τα οποία εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην χρόνια επίδραση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, δηλαδή μείωση στο ποσοστό του κυτταρικού θανάτου (Ho et al., 2011).

Σε ηπατοκύτταρα αρουραίου, η επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 1,25μM ανά 10<sup>6</sup> κύτταρα, είχε ως συνέπεια αυξημένο ποσοστό αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου στις 4, 6 και 8 ώρες. Ο NF-κΒ φάνηκε, επίσης αυξημένος στις συνθήκες αυτές, ήδη από τις 2 πρώτες ώρες επίδρασης, με μέγιστο στις 2 και 4 ώρες, και διατηρήθηκε μέχρι και τις 8. Ο προ-αποπτωτικός ρόλος του NF-κΒ επιβεβαιώθηκε μέσω της παρεμπόδισης του με μεταλλαγμένο αναστολέα που δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί και να αποδεσμεύσει το μεταγραφικό παράγοντα. Συγκεκριμένα, σε κύτταρα με το μεταλλαγμένο αναστολέα, η μη αναστρέψιμη δέσμευση του στον NF-κΒ, διαπιστώθηκε να μειώνει τα επίπεδα κυτταρικού θανάτου, υποδηλώνοντας ότι η ενεργοποίηση του εν λόγω μεταγραφικού παράγοντα δεν αναστέλλει, αλλά επάγει την απόπτωση (Jones et al., 2000).

Επιπλέον, σε μια πρόσφατη εργασία έγινε προσπάθεια σύγκρισης του αντιοξειδωτικού ρόλου δύο δραστικών πεπτιδίων· του πεπτιδίου T του βοδιού, ενός νέου πεπτιδίου και του MPG, ενός ευρείας χρήσης πεπτιδίου. Η μελέτη διεξήχθη σε μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12, στα οποία διαπιστώθηκε ότι η επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 4 ώρες, αύξανε σημαντικά το ποσοστό της απόπτωσης, το οποίο, όμως, μειώθηκε κατά την προ-επώαση με τα δραστικά πεπτίδια. Τα πεπτίδια αυτά, μάλιστα, φάνηκε να αναστέλλουν την ενεργοποίηση του NF-κΒ και του γονιδίου-στόχου του, TNF-α, υποδηλώνοντας ότι ο αντιοξειδωτικός τους ρόλος μεσολαβείται από την απενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος και σε αυτήν την περίπτωση δρα προ-αποπτωτικά (Sivakumar et al., 2014).

Ακόμη, σε μελέτη που έγινε σε ανθρώπινα κύτταρα νεφρικών σωληναρίων, για να διαπιστωθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης ενεργοποιητή των μακροφάγων (Macrophage stimulating protein, MSP) κατά την επαγόμενη από H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> απόπτωση των κυττάρων, διαπιστώθηκε ο προ-αποπτωτικός ρόλος του NF-κΒ και της p38 MAPK. Συγκεκριμένα, η επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500μM οδήγησε σε αύξηση του p-NF-κΒ, της p-p38 MAPK και φυσικά, σε εμφάνιση του αποπτωτικού φαινοτύπου των κυττάρων. Μάλιστα, η αναστολή της p38 MAPK μέσω του SB203580, κατέστειλε και την ανωτέρω ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα, υποδηλώνοντας συσχέτιση των δύο αυτών μορίων. Στη συνέχεια, η MSP φάνηκε να παρεμποδίζει το μονοπάτι p38 MAPK/NF-κΒ και να αναστέλλει την απόπτωση, αντικατοπτρίζοντας ένα πιθανό μονοπάτι δράσης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης για την προστασία από το οξειδωτικό στρες (Lee et al., 2013).

Τέλος, έρευνα που έχει διεξαχθεί σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2, τους οποίους χρησιμοποιήσαμε και στη δική μας εργασία, αναφέρει ότι με αυξανόμενες συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μεταξύ 400μM και 2mM για 18 ώρες, αυξάνεται και το ποσοστό απόπτωσης των κυττάρων. Ακόμη, με επίδραση 500μM υπεροξειδίου, παρατηρήθηκε και αύξηση της φωσφορυλιωμένης p65 υπομονάδας του NF-κΒ. Τέλος, η προ-επώαση με την αντιοξειδωτική ουσία, ghrelin, είχε ως συνέπεια αφενός τη μείωση του

ποσοστού της απόπτωσης και αφετέρου την αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα και άλλων μορίων που σχετίζονται με το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης. Συνεπώς, από τα παραπάνω, διαφαίνεται ο προ-αποπτωτικός ρόλος του NF-κΒ στο μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης που επάγεται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες στην καρδιά (Zhang et al., 2011).

Στον αντίποδα, υπάρχει πληθώρα αναφορών που διαφωνούν με τα αποτελέσματα μας και προβάλλουν τον αντι-αποπτωτικό ρόλο του NF-κΒ. Σε πειραματικό μοντέλο, στο οποίο έγινε προσπάθεια απευαισθητοποίησης νεογνικών καρδιακών μυοκυττάρων κοιλίας στο  $H_2O_2$ , φάνηκε ότι τα κύτταρα που επιβίωσαν μετά τον πρώτο κύκλο απόπτωσης, είχαν ιδιαίτερα αυξημένα τα επίπεδα του NF-κΒ. Μάλιστα, τα κύτταρα αυτά εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην επίδραση με μεγαλύτερη συγκέντρωση  $H_2O_2$ , με τα επίπεδα του NF-κΒ παραμένουν υψηλά. Στη συγκεκριμένη εργασία, η ενεργοποίηση του NF-κΒ συσχετίστηκε με τα μονοπάτια επιβίωσης JAK/STAT και PI3K/AKT και όχι με τις MAPKs (Lu et al., 2008). Σε μια παρόμοια μελέτη, έγινε προσπάθεια απευαισθητοποίησης κυττάρων PC12 σε  $H_2O_2$ , μέσω της επίδρασης με συγκέντρωση  $100\mu M$   $H_2O_2$  για 90 λεπτά, ακολουθούμενη από 24 ώρες επαναφορά και δεύτερο κύκλο επίδρασης, με «θανάσιμη» δόση  $H_2O_2$   $300\mu M$  για 12 ώρες. Από τα αποτελέσματα, φάνηκε ότι κατά τον πρώτο κύκλο επίδρασης υπάρχει υπερέκφραση του NF-κΒ, η οποία παραμένει και στα πλέον ανθεκτικά κύτταρα. Μάλιστα, η αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα, μειώνει την ικανότητα των κυττάρων να αποκτήσουν ανθεκτικότητα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις  $H_2O_2$ , οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η παρατεταμένη ενεργοποίηση του NF-κΒ παίζει κυρίαρχο ρόλο στην προσαρμοστική ανθεκτικότητα των PC12 στο  $H_2O_2$  (Zhang et al., 2009).

Ο NF-κΒ έχει συσχετιστεί εκτενώς με την επαγωγή μηνυμάτων επιβίωσης και φαίνεται να παίζει κρίσιμο ρόλο στην ανοχή στο χρόνιο οξειδωτικό στρες που παρατηρείται στην παθογένεση του καρκίνου του προστάτη. Οι Cavazos και συνεργάτες, διεξήγαγαν μια μελέτη σε τρεις κυτταρικές σειρές· δύο από αυτές με ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος προστάτη (LNCaP και PacMetUT1) και μία με φυσιολογικά κύτταρα προστάτη (PrEC). Στα κύτταρα αυτά, επέδρασαν με  $32\mu M$   $H_2O_2$  και παρατήρησαν ότι υπήρχε μεγαλύτερη επιβίωση στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά και ότι αυτή η επιβίωση σχετιζόταν με αυξημένη μετατόπιση του ενεργού NF-κΒ στον πυρήνα. Επιπλέον, όταν έγινε προ-επώαση με δοκοσαεξανοϊκό (DHA), ένα λιπαρό οξύ από το ιχθυέλαιο με αντιοξειδωτική δράση, διαπιστώθηκε μειωμένη μετατόπιση του NF-κΒ στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων και κατ' επέκταση μειωμένη επιβίωση τους (Cavazos et al., 2011).

Επιπροσθέτως, σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος της κυτταρικής σειράς HuH7, αναφέρεται ότι ο NF-κΒ έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της απόπτωσης που επάχθηκε από  $500\mu M$   $H_2O_2$ . Αυτό επιβεβαιώθηκε μέσω της αναστολής του μεταγραφικού παράγοντα όταν τα κύτταρα μολύνθηκαν με αδενοϊό που έφερε το γονίδιο του αναστολέα IκΒα. Η υπερέκφραση του αναστολέα, παρεμπόδισε την ενεργοποίηση του NF-κΒ και συντέλεσε τόσο στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των HuH7, όσο και στη μείωση της βιωσιμότητάς τους, υποδηλώνοντας το ρόλο του NF-κΒ ως παράγοντα επιβίωσης (Qiao et al., 1999). Σε αντίστοιχη μελέτη, σε καλλιέργεια ηπατοκυτταρικού καρκινώματος αρουραίου, ARL-6, διαπιστώθηκε για

ακόμη μια φορά ο αντι-αποπτωτικός ρόλος του NF-κB. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα αυτά εμφάνισαν αυξημένη ανοχή στην επίδραση οξειδωτικών συγκεντρώσεων  $H_2O_2$ , καθώς το ποσοστό της απόπτωσης ήταν πολύ μικρότερο σε σχέση με το αντίστοιχο των φυσιολογικών κυττάρων. Ταυτόχρονα, στις συνθήκες αυτές διαπιστώθηκε αυξημένη ενεργοποίηση του NF-κB ήδη από τις 2 πρώτες ώρες επίδρασης, η οποία διατηρήθηκε πάνω από τα επίπεδα του control για 36 ώρες. Μάλιστα, όταν έγινε επιμόλυνση με αδενοϊό που έφερε μεταλλαγμένο αναστολέα που προσδένεται μη αντιστρεπτά στον NF-κB, διαπιστώθηκε μεγαλύτερη ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στην επαγόμενη από το  $H_2O_2$  απόπτωση, επιβεβαιώνοντας το ρόλο του NF-κB ως παράγοντα επιβίωσης (Qiao et al., 2005).

Ακόμη, σε μελέτη που έγινε σε πνευμονικούς ινοβλάστες ινδικού χοιριδίου, V79-4, η επίδραση με  $H_2O_2$  1mM είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά περίπου 50%. Στην εργασία αυτή διερευνήθηκε η επίδραση εκχύλισματος *Castanopsis cuspidate* σε κύτταρα που υπόκεινται σε οξειδωτικές συνθήκες  $H_2O_2$ , καθώς και ο υποκείμενος μηχανισμός που ενεργοποιείται. Διαπιστώθηκε ότι το εκχύλισμα επάγει ένα μονοπάτι επιβίωσης p-ERKs/NF-κB, το οποίο μειώνει δραστικά την κυτταρική απόπτωση (Kang et al., 2007).

Σε καρδιακούς ινοβλάστες αρουραίου διερευνήθηκε η επαγωγή της απόπτωσης υπό την επίδραση 50μM  $H_2O_2$  για 3 ώρες και φάνηκε ότι υπάρχει ένα μικρό ποσοστό απόπτωσης, της τάξης του 10%. Έπειτα, μελετήθηκε η ενεργοποίηση του NF-κB, η οποία διαπιστώθηκε ιδιαίτερα αυξημένη στη 1 και 2 ώρες επίδρασης. Όταν δε, χρησιμοποιήθηκε ένας αναστολέας του NF-κB, ο Bay11-7085, το ποσοστό της απόπτωσης αυξήθηκε. Όλα τα παραπάνω συγκλίνουν στην ιδέα ότι ο ρόλος του NF-κB είναι προστατευτικός έναντι της απόπτωσης και μάλιστα, συσχετίστηκε με την επαγωγή της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης cIAP2 (Philip & Shivakumar, 2013). Παρομοίως, έρευνα που έγινε σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2, αναφέρει ότι αυξανόμενη της συγκέντρωσης του  $H_2O_2$  μεταξύ 50μM και 500μM, αυξάνεται και το ποσοστό της απόπτωσης για χρόνο επίδρασης 6h, με το 45-50% της απόπτωσης να συμβαίνει στα 200μM. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι στις ίδιες συνθήκες ενεργοποιείται και ο NF-κB, η αναστολή του οποίου συντελεί σε ακόμη πιο αυξημένο κυτταρικό θάνατο. Τέλος, η χρήση τεστοστερόνης στην ίδια μελέτη, φάνηκε να λειτουργεί προστατευτικά οδηγώντας σε ισχυρότερη ενεργοποίηση του NF-κB με ταυτόχρονη μείωση του κυτταρικού θανάτου. Επομένως, η εξαρτώμενη από την ορμόνη-επιβίωση των μυοκυττάρων, μεσολαβείται από το κλασικό μονοπάτι του NF-κB (Xiao et al., 2015).

#### IV.4 Οι MAPKs και η MSK1 σχετίζονται με τη φωσφορύλιωση του NF-κB και την απόπτωση που επάγεται από το $H_2O_2$

Οι MAPKs αποτελούν κινάσες οι οποίες ενεργοποιούνται από πληθώρα ερεθισμάτων, όπως είναι τα μιτογόνα και οι αυξητικοί παράγοντες, αλλά και διάφορα στρεσογόνα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως είναι η υποξία, η θερμότητα, οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες καθώς και παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA. Στην περίπτωση του οξειδωτικού στρες, η ανισορροπία μεταξύ των επιπέδων των δραστικών ριζών οξυγόνου και των ενδογενών αντιοξειδωτικών, οδηγεί στην

εκδήλωση του φαινομένου αυτού, το οποίο αν δεν αντιμετωπιστεί, τελικώς επάγει την απόπτωση (Kim & Choi, 2015).

Στην παρούσα εργασία διαπιστώσαμε ότι στις δεδομένες συνθήκες  $H_2O_2$  υπάρχει ενεργοποίηση της απόπτωσης, που επιβεβαιώθηκε μέσω της θραύσης της PARP, ενεργοποίηση του NF-κB και μετατόπιση του στον πυρήνα, αλλά και ενεργοποίηση των MAPKs. Τα ανωτέρω μας ώθησαν να διερευνήσουμε πιθανές συσχετίσεις μεταξύ τους. Αρχικά, δοκιμάσαμε τη δράση των αναστολέων PD98059 για τις ERKs, SB203580 για την p38 MAPK και SP600125 για τις JNKs, στη φωσφορυλίωση του NF-κB στη 1 και 2 ώρες επίδρασης με  $H_2O_2$  400μM. Διαπιστώσαμε ότι και οι τρεις αναστολείς παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα, υποδηλώνοντας συσχέτιση όλων των MAPKs με αυτόν. Έπειτα, θέλαμε να εξακριβώσουμε τον ρόλο των ERKs στην απόπτωση, καθώς έχει φανεί επανειλημμένα να αποτελεί αναστολέα της. Διαπιστώσαμε ότι παρουσία του PD98059, αναστέλλεται η θραύση της PARP, γεγονός που συσχετίζει το μονοπάτι των ERKs και με την απόπτωση, εκτός από τον NF-κB. Συνδυαστικά, τα ανωτέρω αποτελέσματα οδηγούν στην υπόθεση ότι το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το  $H_2O_2$ , στρατολογεί τα μονοπάτια των MAPKs και του NF-κB, μέσω των οποίων επάγεται η απόπτωση των καρδιακών μυοβλαστών H9c2.

Πληθώρα μελετών συσχετίζει τον NF-κB με τα μονοπάτια των MAPKs και την απόπτωση, ωστόσο, οι τρόποι αλληλεπίδρασής τους είναι τόσο πολύπλοκοι, που εμφανίζουν μοναδικό πρότυπο ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, τις δεδομένες συνθήκες και φυσικά τον εκάστοτε πειραματικό σχεδιασμό. Οι ROS, έχουν συσχετιστεί εκτενώς με την παθολογία πληθώρας ασθενειών, στις οποίες το οξειδωτικό στρες επάγει την απόπτωση των εκάστοτε κυττάρων. Μάλιστα, έχει διαπιστωθεί, επανειλημμένα η συσχέτιση των ROS με τα μονοπάτια των MAPKs και του NF-κB.

Οι παρατηρήσεις μας συνηγορούν με μια σειρά από έρευνες που έχουν διεξαχθεί σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και πειραματικά μοντέλα, στις οποίες, το  $H_2O_2$  χρησιμοποιείται ως οξειδωτικός παράγοντας για την επαγωγή της απόπτωσης. Ο Lee και συνεργάτες, προκάλεσαν απόπτωση σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα στομάχου, κυτταρικής σειράς AGS, μέσω της επίδρασης με 300μM  $H_2O_2$  για 4 ώρες και 8 ώρες. Στις ίδιες συνθήκες διαπίστωσαν ότι ενεργοποιούνται και τα μονοπάτια των MAPKs, ERKs και JNKs και όχι της p38 MAPK, με μέγιστο στη 1 ώρα, καθώς και πραγματοποιείται μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα με μέγιστο στις 2 ώρες. Στη συνέχεια, χρησιμοποίησαν μια αντιοξειδωτική ουσία, την eupalitin, η οποία φάνηκε να αναστέλλει τόσο την απόπτωση, όσο και τα μονοπάτια των MAPKs και NF-κB, υποδεικνύοντας τον προ-αποπτωτικό ρόλο που έχουν στις συγκεκριμένες συνθήκες (Lee, & Kim, 2008).

Επιπλέον, ο Tang και συνεργάτες, αναφέρουν ότι κατά την επίδραση με  $H_2O_2$  50μM για 24 ώρες σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα φακού (Human Lens Epithelial cells, HLE), επάγεται απόπτωση. Στις ίδιες συνθήκες, παρατηρείται αυξημένη μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα και συμμετοχή όλων των MAPKs στην επαγωγή της απόπτωσης. Στη μελέτη αυτή, η χρήση μιας αντιοξειδωτικής ουσίας, της honokiol, επιβεβαίωσε τον προ-αποπτωτικό ρόλο του NF-κB, καθώς παρεμπόδισε την μετατόπιση του στον πυρήνα, μείωσε τη δράση των MAPKs και αύξησε το ποσοστό



επιβίωσης των κυττάρων (Tang et al., 2011). Ομοίως, σε αντίστοιχη μελέτη με αντιοξειδωτική ουσία μια προανθοκυανιδίνη από το εκχύλισμα σπέρματος σταφυλιού, φάνηκε ότι η επίδραση με 100μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 24 ώρες, αύξανε τη φωσφορυλίωση των p38 MAPK και JNK-MAPKs, τη μεσολαβούμενη από αυτές ενεργοποίηση και μετατόπιση του p-NF-κB/p65 στον πυρήνα και την απόπτωση των κυττάρων. Στην εργασία αυτή, η επίδραση με την αντιοξειδωτική ουσία, πριν από την προσθήκη του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στην καλλιέργεια, είχε ως συνέπεια την αναίρεση των ανωτέρω (Jia et al., 2011).

Σε μελέτη που έγινε σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς της σειράς ARPE-19, βρέθηκε ότι το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε συγκεντρώσεις 30-100μM είναι υποτοξικό, δηλαδή δεν προκαλούσε μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Ωστόσο, διαπιστώθηκε αύξηση στα πυρηνικά επίπεδα του φωσφορυλιωμένου NF-κB, η οποία φάνηκε να μεσολαβείται από την ενεργοποίηση της p38 MAPK (Wu et al., 2010).

Εκτός από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, οι ROS που παράγονται κατά την επίδραση με αρσενικό νάτριο (Sodium arsenite, NaAsO<sub>2</sub>) σε ηπατοκύτταρα, ενεργοποιούν το μονοπάτι PKCδ-JNK, επάγοντας την απόπτωση. Το NaAsO<sub>2</sub>, φαίνεται να προκαλεί και καρδιαγγειακές παθήσεις, καθώς οι ROS επάγουν την απόπτωση μέσω του μονοπατιού NF-κB-MAPKs (Hou et al., 2014). Επιπλέον, μελέτες δείχνουν ότι ο υδράργυρος και το κάδμιο, επάγουν οξειδωτικό στρες σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, το οποίο προκαλεί την μεσολαβούμενη από μιτοχόνδρια απόπτωση. Μάλιστα, τα ιόντα αυτά, φαίνεται να δρουν μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που συσχετίζουν τις MAPKs με τον NF-κB (Hao et al., 2009).

Βέβαια, το οξειδωτικό στρες που επάγεται κατά την επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, δεν προκαλεί απαραίτητα την απόπτωση των κυττάρων. Σε μελέτη των Bai και συνεργατών σε οστεοβλάστες, αναφέρεται ότι κατά την επίδραση με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100μM και 200μM, αναστέλλονταν η διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Μάλιστα, ο μοριακός μηχανισμός στον οποίο βασίζονταν η συγκεκριμένη διαδικασία περιλάμβανε την μεσολαβούμενη από τις ERKs ενεργοποίηση του NF-κB, υποδεικνύοντας το ρόλο των μονοπατιών αυτών στην κυτταρική διαφοροποίηση (Bai et al., 2004). Επιπλέον, σε μελέτη που έγινε σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2, διαπιστώθηκε ότι το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 200μM, αν και προκαλεί μια μικρή μετατόπιση του NF-κB/p65 στον πυρήνα, δε μπορεί να θεωρηθεί ισχυρός ενεργοποιητής του, καθώς φαίνεται ότι απαιτείται συνδυασμός ερεθισμάτων για την επαγωγή του και όχι μόνο η ύπαρξη των ROS (Gupta et al., 2006). Τα συμπεράσματα αυτά προέκυψαν μέσω της σύγκρισης των επιπέδων του μετατοπισμένου NF-κB παρουσία του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, από τη μία, και TNF-α από την άλλη, ο οποίος είναι γνωστό ότι αποτελεί τον κυριότερο επαγωγέα του (Frantz et al., 2001).

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα μας, πληθώρα μελετών αναδεικνύει τον προστατευτικό ρόλο του NF-κB στην επαγόμενη από το οξειδωτικό στρες απόπτωση των κυττάρων. Σε εργασία που αφορούσε στη μελέτη των μοριακών μηχανισμών που ενεργοποιούνται κατά την επαγωγή οξειδωτικού στρες σε καρδιακούς ινοβλάστες, διαπιστώθηκε ότι η επίδραση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25μM για 30 και 60 λεπτά, είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και την μετατόπιση του στον πυρήνα. Μάλιστα, η αναστολή αυτής της μετατόπισης συνδέθηκε με την επαγωγή της απόπτωσης, υποδεικνύοντας έναν προστατευτικό ρόλο του εν λόγω μεταγραφικού

παράγοντα έναντι του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη, το  $H_2O_2$  φάνηκε να επάγει και το μονοπάτι των ERKs, ήδη από τα 15 λεπτά επίδρασης, το οποίο συσχετίστηκε με την ενεργοποίηση του NF-κB. Το συμπέρασμα ήταν ότι η επιβίωση των καρδιακών ινοβλαστών κατά το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με την, μεσολαβούμενη από τις ERKs, ενεργοποίηση του NF-κB (Philip & Shivakumar, 2013).

Μελέτες σε εντερικά κύτταρα αρουραίου, υποστηρίζουν ότι η επίδραση με  $H_2O_2$  επάγει τόσο την δοσο-εξαρτώμενη όσο και την χρονο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών των τριών μελών των MAPKs, ERKs, p38 MAPK και JNKs και μάλιστα, η ενεργοποίηση φαίνεται να λειτουργεί προ-αποπτωτικά (Zhou et al., 2005). Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα στην ίδια κυτταρική σειρά, διαπιστώθηκε ότι κατά την επίδραση με  $H_2O_2$  500μM, επάγεται το κλασικό μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB και η μετέπειτα μετατόπιση του στον πυρήνα, μια διαδικασία μεσολαβούμενη από την πρωτεϊνική κινάση D (Protein kinase D, PKD1). Επιπλέον, στην ίδια μελέτη, φάνηκε ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του μονοπατιού της PKD1 και αυτού της p38 MAPK, με το πρώτο να δρα ανασταλτικά στο δεύτερο. Τα αποτελέσματα αυτά, συγκλίνουν στην υπόθεση ότι κατά το οξειδωτικό στρες σε εντερικά κύτταρα αρουραίου, η ενεργοποίηση του NF-κB λειτουργεί προστατευτικά έναντι της απόπτωσης, ενώ η p38 MAPK συντελεί στην επαγωγή της. Αναμφιβόλως, τα δύο αυτά μονοπάτια είναι αλληλένδετα και η ισορροπία μεταξύ τους καθορίζει την πορεία των κυττάρων προς το θάνατο ή την επιβίωση (Song et al., 2009). Αντίθετα, μελέτη σε νευρικά κύτταρα αρουραίου που έχουν υποστεί ισχαιμία/επανοξυγόνωση (I/R), επιβεβαίωσε τον νευροπροστατευτικό ρόλο του NF-κB και συσχέτισε το μονοπάτι ενεργοποίησης του μεταγραφικού αυτού παράγοντα με την p38 MAPK. Στο μοντέλο όμως αυτό, η ενεργοποίηση της p38 λειτούργησε θετικά στην επαγωγή του NF-κB, υποστηρίζοντας ένα αντι-αποπτωτικό μονοπάτι p38 MAPK/NF-κB ως απόκριση στην I/R (Jiang et al., 2012).

Ακόμη ένα παράδειγμα του προστατευτικού ρόλου του NF-κB κατά το οξειδωτικό στρες εντοπίζεται στο μονοπάτι που ενεργοποιείται από τον TNF-α, όταν αυτός προσδένεται στον υποδοχέα του TNFR1. Πιο συγκεκριμένα, η επαγωγή του συγκεκριμένου μονοπατιού έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου η οποία συντελεί στην ενεργοποίηση των JNKs και την επακόλουθη πρόκληση κυτταρικού θανάτου. Ωστόσο, ταυτόχρονα, ο TNFR1 ενεργοποιεί και το κλασικό μονοπάτι του NF-κB, με αποτέλεσμα ο τελευταίος να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που αναστέλλουν άμεσα ή έμμεσα το μονοπάτι των JNKs. Επομένως, η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών παράλληλων μονοπατιών είναι αυτή που θα καθορίσει τη μοίρα του κυττάρου, με τον NF-κB να λειτουργεί αντι-αποπτωτικά και τις JNKs, προ-αποπτωτικά (Para et al., 2006).

Τέλος, ο ρόλος του  $H_2O_2$  ως επαγωγέα της απόπτωσης και όχι της νέκρωσης, καθώς και η συμπλοκή των μονοπατιών των MAPKs και του NF-κB στη διαδικασία, επιβεβαιώνεται από πληθώρα μελετών σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Έρευνα σε μακροφάγα της κυτταρικής σειράς RAW 264.7, αναφέρει ότι σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις  $H_2O_2$  100μM-500μM για 4 ώρες, υπάρχει και αντίστοιχη αύξηση τόσο στο ποσοστό της απόπτωσης, όσο και σε αυτό της νέκρωσης. Όμως, η επίδραση με  $H_2O_2$  για 6 ώρες, έχει ως αποτέλεσμα μεταβολές σε αυτά τα ποσοστά, αφού

παρατηρήθηκε ακόμη μεγαλύτερη αύξηση στον αριθμό των αποπίπτοντων κυττάρων, και μείωση αυτών που υπόκεινται σε νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Στην ίδια μελέτη, διερευνήθηκε και ο ρόλος των MAPKs και του NF-κB στη μετάπτωση από τον νεκρωτικό στον αποπτωτικό θάνατο. Διαπιστώθηκε, λοιπόν, ότι και τα τρία μέλη, ERKs, JNKs και p38 MAPK ενεργοποιούνται άμεσα, με τις δύο πρώτες να εμφανίζουν μέγιστο στη 1 και 2 ώρες, ενώ την τελευταία να έχει πιο γρήγορη απόκριση με μέγιστο στα 30 λεπτά επίδρασης και επανενεργοποίηση στις 4 ώρες. Ταυτόχρονα, ο NF-κB εμφανίστηκε ενεργοποιημένος στις 2 και 4 ώρες επίδρασης με 500μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Βάσει αυτών, προτάθηκε ένα μοντέλο στο οποίο, σε αρχικό χρόνο οι p38 MAPK και οι JNKs συνδυαστικά ενεργοποιούν την απόπτωση, ενώ οι JNKs μόνες τους συντελούν στην νέκρωση. Ταυτόχρονα, στο ίδιο μοντέλο, ο NF-κB και οι ERKs αναστέλλουν τα μονοπάτια κυτταρικού θανάτου και προάγουν την επιβίωση. Τέλος, η επανενεργοποίηση της p38 MAPK είναι αυτή που συντελεί σε αύξηση του αποπτωτικού και όχι νεκρωτικού θανάτου (Lin et al., 2010).

Σε συνέχεια της προσπάθειας διαλεύκανσης του μηχανισμού μέσω του οποίου ο NF-κB σχετίζεται με την απόπτωση, διερευνήσαμε την συσχέτιση του με την επαγόμενη από μιτογόνα και στρες κινάση 1 (Mitogen-stress activated kinase 1, MSK-1). Είναι γνωστό ότι η υπομονάδα p65 του NF-κB φωσφορυλιώνεται μεταμεταφραστικά από την MSK1, στη σερίνη 276 (Peng et al., 2012). Μάλιστα, σε προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριο μας σε σκελετικούς μυοβλάστες, βρέθηκε ότι η MSK-1 αποτελεί καταρροϊκό στόχο τόσο των ERKs όσο και της p38 MAPK (Kefaloyianni et al., 2006). Από την άλλη, η φωσφορυλίωση της p65 στη σερίνη 536, έχει φανεί να σχετίζεται με διάφορες κινάσες και κυρίως με την IKKβ (Buss et al., 2004; Jijon et al., 2004; Madrid et al., 2001). Παρόλο που στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p65 στη σερίνη 536, θέλαμε να δούμε ποια ήταν η επίδραση του αναστολέα της συγκεκριμένης κινάσης, H89. Από τα αποτελέσματα, διαπιστώσαμε ότι παρουσία του H89, μειώνονται τόσο τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης p65 στη σερίνη 536, όσο και το θραύσμα της PARP. Η υπόθεση που μπορούμε να κάνουμε για την ερμηνεία του συγκεκριμένου αποτελέσματος, σχετίζεται με την ακολουθία των γεγονότων φωσφορυλίωσης που είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση του NF-κB στην καρδιά. Όπως φαίνεται, αφού η αναστολή της φωσφορυλίωσης στη σερίνη 276, συντελεί σε μειωμένα επίπεδα της φωσφορυλίωσης και στη σερίνη 536, είναι πιθανό τα δύο αυτά γεγονότα να σχετίζονται μεταξύ τους και η πρώτη φωσφορυλίωση να διευκολύνει τη δεύτερη. Επομένως, αφού δεν μπορεί να γίνει η φωσφορυλίωση της σερίνης 276, δεν μπορεί να φωσφορυλιωθεί ούτε η 536, με αποτέλεσμα ο NF-κB να μην ενεργοποιείται ώστε να επάγει την απόπτωση των H9c2. Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω μελέτη για να διαλευκανθεί ο ρόλος της φωσφορυλίωσης στα δυο αυτά κατάλοιπα και το πώς αυτά συσχετίζονται.

Γενικώς, πρόσφατες μελέτες που διερευνούν το ρόλο της φωσφορυλίωσης του NF-κB σε διαφορετικές θέσεις, συσχετίζουν τη διαφορική φωσφορυλίωση του με την εξειδικευμένη δράση του. Σε καρκινικά κύτταρα μαστού, προστάτη και παχέος εντέρου, έγινε επιμόλυνση με μεταλλαγμένη p65 υπομονάδα που μιμούνταν την φωσφορυλιωμένη p65 στη σερίνη 536. Τα κύτταρα αυτά, εμφάνισαν ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα αποπτωτικού θανάτου, υποδηλώνοντας έναν ογκοκατασταλτικό ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα, όταν αυτός είναι φωσφορυλιωμένος στην σερίνη

536 (Bu et al., 2016). Ομοίως, οι Bu και συνεργάτες, συσχέτισαν την ευαισθησία του όγκου στη χημειοθεραπεία, με τη θέση φωσφορυλίωσης του NF-κΒ. Συγκεκριμένα, τα ευαίσθητα αποπύπτοντα καρκινικά κύτταρα εμφάνισαν αυξημένη φωσφορυλίωση στην σερίνη 536 και μειωμένη p-p65 στη σερίνη 276, ενώ το αντίστροφο συνέβη στα ανθεκτικά καρκινικά κύτταρα (Bu et al., 2016).

#### IV.5 Η κουρκουμίνη αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της p65 και την απόπτωση που επάγεται από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Η κουρκουμίνη, μια φυσική πολυφαινόλη του φυτού *Curcuma longa*, έχει διαπιστωθεί επανειλημμένα ότι συμμετέχει σε πολλαπλά μονοπάτια στα οποία συμπεριλαμβάνονται αυτά των MAPKs, του NF-κΒ, της Akt και άλλα (Shanmugam et al., 2015). Επιπλέον, έχει επιβεβαιωθεί από πληθώρα ερευνών ότι αποτελεί αναστολέα του NF-κΒ, είτε άμεσα, καθώς φαίνεται να αναστέλλει το σύμπλοκο κινάση επαγωγή του NF-κΒ, NIK/IKK, πιθανώς δρώντας στις υπομονάδες IKKα/β (Hayden & Ghosh, 2004; Shin et al., 2010), είτε έμμεσα αναστέλλοντας μονοπάτια που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα, όπως Ras/MAPKs και PI3K/Akt (Zeng et al., 2015). Ακόμη, η κουρκουμίνη εμπλέκεται στα μονοπάτια των MAPKs, παρεμποδίζοντας την προστατευτική ενεργοποίησή τους, συντελώντας έτσι στην επαγωγή της απόπτωσης (Shehzad et al., 2010). Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο μας, αφορούσαν στη διερεύνηση του ρόλου της κουρκουμίνης σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα. Συγκεκριμένα, μελέτη που έγινε σε εμποτισμένη καρδιά του αμφιβίου *Rana ridibunda*, υπέδειξε τον προ-οξειδωτικό και προ-αποπτωτικό ρόλο 20μΜ κουρκουμίνης και συσχέτισε το μηχανισμό δράσης της με το μονοπάτι των JNKs (Aggeli et al., 2013). Σε επόμενη μελέτη, η οποία έγινε σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2, διαπιστώθηκε ο προ-αποπτωτικός ρόλος της κουρκουμίνης όταν αυτή βρισκόταν, επίσης, σε συγκέντρωση 20μΜ. Ωστόσο, στην εργασία αυτή, βρέθηκε ότι η κουρκουμίνη επάγει το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης και ο μηχανισμός δράσης της συσχετίστηκε με το μονοπάτι της p38 MAP κινάσης (Zikaki et al., 2014). Τέλος, σε μελέτη σε C2 σκελετικούς μυοβλάστες έγινε προσπάθεια αξιολόγησης δύο νέων αντι-οξειδωτικών ουσιών, των AK1 και AK2, ώστε να διαπιστωθεί η δράση τους έναντι στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ή κουρκουμίνης. Και σε αυτήν την περίπτωση, διαπιστώθηκε ο προ-οξειδωτικός και προ-αποπτωτικός ρόλος της (Peleli et al., 2015).

Συνεπώς, έχοντας διερευνήσει την προ-αποπτωτική επίδραση της κουρκουμίνης, αποφασίσαμε, βασιζόμενοι και σε άλλες έρευνες που την αναφέρουν ως αντι-οξειδωτική ουσία, να μελετήσουμε τον προστατευτικό της ρόλο. Στην παρούσα εργασία, λοιπόν, υποθέσαμε ότι ο ρόλος του NF-κΒ παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400μΜ είναι προ-αποπτωτικός. Γι' αυτό το λόγο θέλαμε να δούμε αν η κουρκουμίνη μπορεί να τον αναστείλει σε χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης του 1μΜ και 0,1 μΜ κι αν αυτή η αναστολή συνδέεται με την παρεμπόδιση της απόπτωσης. Από τα αποτελέσματα διαπιστώσαμε ότι η κουρκουμίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί και αναστέλλει τον NF-κΒ στη 1 και 2 ώρες επίδρασης με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400μΜ. Στη συνέχεια, για να δούμε το ρόλο της στην επαγωγή της απόπτωσης, μελετήσαμε τη θραύση της PARP στις 6 ώρες επίδρασης με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Διαπιστώσαμε, λοιπόν, ότι το θραύσμα της PARP μειώνεται, κυρίως, παρουσία της κουρκουμίνης 1μΜ, αλλά και της μικρότερης συγκέντρωσής της,

υποδεικνύοντας έναν αντι-αποπτωτικό ρόλο. Συνδυαστικά, αυτά τα αποτελέσματα μας οδήγησαν, για πρώτη φορά, στην υπόθεση ότι το  $H_2O_2$  400 $\mu$ M επάγει την απόπτωση των καρδιακών μυοβλαστών H9c2, μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει και την ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B, ενώ η αναστολή αυτού από την κουρκουμίνη συντελεί στην προστασία των κυττάρων από τον αποπτωτικό θάνατο.

Τα αποτελέσματα μας, συνηγορούν με ορισμένες εργασίες, στις οποίες η κουρκουμίνη φαίνεται να προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που επάγεται σε συνθήκες οξειδωτικού ή άλλου τύπου στρες. Σε μελέτη που έγινε σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2, φάνηκε ότι η κουρκουμίνη σε συγκέντρωση 20 $\mu$ M δρα προστατευτικά έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το παλμιτικό οξύ. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε ότι προ-επώαση με κουρκουμίνη, μείωσε τα επίπεδα των δραστικών ριζών οξυγόνου, αναστέλλοντας το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το παλμιτικό. Ακόμη, ανέστειλε τον NF- $\kappa$ B και κατ' επέκταση τα προ-φλεγμονώδη γονίδια στόχους του, TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  και IL6, και περιόρισε το ποσοστό της απόπτωσης που επάγονταν από το λιπαρό οξύ. Συνεπώς, φάνηκε ο αντι-οξειδωτικός, αντι-αποπτωτικός και αντι-φλεγμονώδης ρόλος της κουρκουμίνης, κάνοντάς την ένα πιθανό καρδιοπροστατευτικό μόριο (Zeng et al., 2015). Ομοίως, άλλη έρευνα στα ίδια κύτταρα, H9c2, έδειξε ότι 400 $\mu$ M  $H_2O_2$  επάγουν αυξημένη απόπτωση, η οποία αναστέλλεται με την επίδραση 15 $\mu$ M κουρκουμίνης. Η αντι-αποπτωτική δράσης της σε αυτές τις συνθήκες εκδηλώθηκε μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/Akt και της επακόλουθης αύξησης στα επίπεδα της οξυγενάσης-1 της αίμης (Heme oxygenase, HO-1) (Yang et al., 2017).

Επιπλέον, οι Dai και συνεργάτες, αναφέρουν ότι 20 $\mu$ M κουρκουμίνης είναι ικανά να αναστείλουν την επαγόμενη, από 250 $\mu$ M υπεροξειδίου, απόπτωση σε οστεοβλάστες της κυτταρικής σειράς Saos-2. Στο μοντέλο αυτό, η δράση της κουρκουμίνης εκδηλώθηκε μέσω της επαναφοράς της σωστής λειτουργίας των μιτοχονδρίων και του μονοπατιού Akt/GSK3 $\beta$  (Dai et al., 2017). Ακόμη, στο ήπαρ, η καταστροφή που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες, αναστέλλεται υπό τη δράση της κουρκουμίνης, μέσω παρεμπόδισης της φλεγμονώδους απόκρισης που μεσολαβείται από τον NF- $\kappa$ B. Ταυτόχρονα, ο προστατευτικός της ρόλος εκδηλώνεται και μέσω της αύξησης των αντιοξειδωτικών ενζύμων, που συντελούν στη σταθεροποίηση του οξειδωτικού φορτίου των κυττάρων (Reyes-Gordillo et al., 2007). Ο ρόλος της κουρκουμίνης, ως αντι-οξειδωτικού και αντι-φλεγμονώδους παράγοντα, φαίνεται σε μελέτη που έγινε για να διαπιστωθεί ο κυτταροτοξικός ρόλος της κουινοκετόνης, ενός πιθανού αντικαρκινικού φαρμάκου. Η επίδραση με το φάρμακο αυτό, μείωσε σημαντικά τη βιωσιμότητα ηπατοκυττάρων L02, λόγω του επαγόμενου οξειδωτικού στρες. Ωστόσο, όταν η ουσία επέδρασε συνδυαστικά με 1,25 $\mu$ M, 2,5 $\mu$ M και 5 $\mu$ M κουρκουμίνης, υπήρξε αναστολή της απόπτωσης ανάλογη της συγκέντρωσης της κουρκουμίνης. Η προστατευτική δράση της κουρκουμίνης συσχετίστηκε με την αναστολή του μονοπατιού του NF- $\kappa$ B που οδηγεί στη φλεγμονή, και την ενεργοποίηση της HO-1 που συντελεί στην επιβίωση των κυττάρων (Dai et al., 2016).

Επιπροσθέτως, σε ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλίου λώρου, όπου διερευνήθηκε ο ρόλος του  $H_2O_2$  και της κουρκουμίνης στην κυτταρική γήρανση, διαπιστώθηκε ότι ενώ το  $H_2O_2$  ανεξάρτητα οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού των αποπίπτοντων κυττάρων, η προ-επώαση με 25 $\mu$ M κουρκουμίνης ανέστειλε την αποπτωτική δράση

του, υποδεικνύοντας τον προστατευτικό της ρόλο έναντι του οξειδωτικού στρες (Sun et al., 2015).

Ο προστατευτικός και αντι-οξειδωτικός ρόλος της κουρκουμίνης έχει φανεί επανειλημμένα και σε διάφορες μελέτες του νευρικού συστήματος. Σε κυτταρική σειρά αστροκυττάρων γλοιοβλαστώματος, A172, η επίδραση με  $H_2O_2$  150 $\mu$ M είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή οξειδωτικού στρες, διαταραχή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων και επαγωγή της απόπτωσης. Αντίθετα, όταν έγινε προ-επώαση με κουρκουμίνη συγκέντρωσης 1 $\mu$ M, τα παραπάνω γεγονότα αντιστράφηκαν, υποδεικνύοντας τον νευροπροστατευτικό ρόλο της ουσίας αυτής (Daveray & Agrawal, 2016). Σε αντίστοιχη μελέτη σε νευρώνες του φλοιού του εγκεφάλου αρουραίων, διερευνήθηκε ο ρόλος της κουρκουμίνης κατά την βλάβη εξαιτίας του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από την στέρηση οξυγόνου-γλυκόζης και την επανοξυγόνωση (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R). Βρέθηκε, λοιπόν, ότι τα 10 $\mu$ M κουρκουμίνης, οδήγησαν σε αύξηση της βιωσιμότητας των νευρώνων, καθώς ανέστειλαν το μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης και την ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B (Liu et al., 2014). Επιπλέον, σε κύτταρα ιππόκαμπου ποντικού, HT22, η κουρκουμίνη φάνηκε να δρα προστατευτικά και στην περίπτωση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται κατά την υποξία. Στις υποξικές συνθήκες, παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή ROS και ενεργοποίηση του NF- $\kappa$ B, γεγονότα που ανεστάλησαν κατά την επίδραση με 2  $\mu$ M κουρκουμίνης, συντελώντας στην αύξηση της κυτταρικής επιβίωσης (Chhunchha et al., 2013). Ακόμη, σε μικρογλοιακά κύτταρα BV-2, η κουρκουμίνη σε συγκεντρώσεις 10 $\mu$ M, 1 $\mu$ M και 0,1 $\mu$ M, ανέστειλε την αποπτωτική δράση του  $H_2O_2$  συγκέντρωσης 200 $\mu$ M και μείωσε σημαντικά το ποσοστό των δραστικών ριζών οξυγόνου που προκαλούσαν την οξειδωτική βλάβη (Yue et al., 2014). Τέλος, σε νευρικά κύτταρα της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y, η επίδραση με  $H_2O_2$  100 $\mu$ M είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης, η οποία ωστόσο ανεστάλη όταν έγινε προ-επώαση με 5 $\mu$ M κουρκουμίνης. Μάλιστα, στην εν λόγω μελέτη ο αντι-αποπτωτικός μηχανισμός δράσης της κουρκουμίνης συσχετίστηκε και με την τροποποίηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων  $Ca^{2+}$  τα οποία μειώθηκαν σε σχέση με τα επίπεδα τους παρουσία  $H_2O_2$  (Uguz et al., 2016).

Είναι ενδιαφέρον ότι, σε ξεχωριστή έρευνα που έγινε σε νευρικά κύτταρα αρουραίου της κυτταρικής σειράς PC12, διαπιστώθηκε για ακόμη μια φορά ο αντι-αποπτωτικός ρόλος της κουρκουμίνης, παρόλο που σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις της ουσίας (50 $\mu$ M και 100 $\mu$ M). Φάνηκε, λοιπόν, ότι παρουσία 500 $\mu$ M  $H_2O_2$  υπήρξε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων η οποία αντιστράφηκε κατά τη συνδυαστική επίδραση με κουρκουμίνη και  $H_2O_2$ . Στην ίδια μελέτη, το  $H_2O_2$  προκάλεσε την αύξηση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της p38 MAPK και των JNKs, ενώ ανέστειλε τη ενεργοποίηση των ERKs και Akt. Όταν όμως έγινε προ-επώαση με κουρκουμίνη, τα ανωτέρω αντιστράφηκαν, υποδεικνύοντας ένα πιθανό μηχανισμό δράσης της έναντι του οξειδωτικού στρες στο συγκεκριμένο μοντέλο (Fu et al., 2016).

Επιπλέον, σε κύτταρα γλαυκώματος στα οποία έγινε επαγωγή οξειδωτικού στρες με  $H_2O_2$ , η επώαση με κουρκουμίνη σε συγκεντρώσεις 1-20  $\mu$ M, φάνηκε να αναχαιτίζει την παραγωγή προ-φλεγμονωδών παραγόντων και τον αριθμό των αποπίπτοντων κυττάρων, δίνοντάς της θεραπευτικές προεκτάσεις στην περίπτωση της

συγκεκριμένης ασθένειας (Lin & Wu, 2016). Ομοίως, σε ασθένειες του αμφιβληστροειδούς χιτώνα, το οξειδωτικό στρες παίζει κυρίαρχο ρόλο στην παθογένεια τους. Ο Mandal και συνεργάτες είδαν ότι σε κυτταρικές σειρές προερχόμενες από τον αμφιβληστροειδή, η επώαση με κουρκουμίνη 10-20μM, αναστέλλει τις οξειδωτικές δράσεις του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, μέσω της στρατολόγησης ενός ενδογενούς αντι-οξειδωτικού μηχανισμού. Η αναστολή του NF-κB και η επαγωγή προστατευτικών ενζύμων, όπως η HO-1 και η θειορεδοξίνη, μέσω της κουρκουμίνης, ανέτρεψαν τον επαγόμενο από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> κυτταρικό θάνατο, προτείνοντας την ως θεραπευτική ουσία για τις ασθένειες του οφθαλμού (Mandal et al., 2009).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί μια μελέτη που έγινε σε καρκινικά γεννητικά κύτταρα όρχεων, στην οποία έγινε επίδραση με τρεις διαφορετικούς οξειδωτικούς και προ-αποπτωτικούς παράγοντες: το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 400μM, την bleomycin σε συγκέντρωση 400μg/ml και την κουρκουμίνη σε συγκέντρωση 20μM. Διαπιστώθηκε, ότι καθεμία από αυτές τις ουσίες ανεξάρτητα, προκαλούσε την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, όταν έγινε συν-επώαση κουρκουμίνης με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και κουρκουμίνης με bleomycin, ενώ αναμένονταν προσθετική δράση στον αριθμό των αποπίπτοντων κυττάρων, συνέβη ακριβώς το αντίθετο, δηλαδή ο συνδυασμός των δύο ουσιών μείωσε τα ποσοστά της απόπτωσης. Συνεπώς, υποτέθηκε αφενός ότι υπάρχει ανταγωνιστική δράση των οξειδωτικών ουσιών μεταξύ τους και αφετέρου ότι η κουρκουμίνη σε αυτές τις συνθήκες λειτούργησε αντι-οξειδωτικά, καταστέλλοντας τις ROS που παράγονταν από τη bleomycin και το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα αποτελέσματα αυτά, υποδεικνύουν ότι η δράση της κουρκουμίνης στην απόπτωση δεν σχετίζεται με τις ROS, αλλά υπάρχουν άλλα υποκείμενα μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται (Cort et al., 2013).

Από την άλλη, ο προ-αποπτωτικός ρόλος της κουρκουμίνης είναι, πλέον, αδιαμφισβήτητος και αποτελεί βασικό αντικείμενο έρευνας ιδιαίτερα όταν συσχετίζεται με τη θεραπεία των καρκινικών όγκων. Στις δράσεις της συμπεριλαμβάνονται η αναστολή του κυτταρικού μετασχηματισμού, του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, της διείσδυσης των όγκων, της αγγειογένεσης και της μετάστασης, χωρίς όμως να έχουν διαλευκανθεί πλήρως οι μηχανισμοί μέσω των οποίων εκδηλώνονται οι δράσεις αυτές (Kunnumakkara et al., 2017). Ένας εμπεριστατωμένος μηχανισμός μέσω του οποίου δρα, είναι η αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση πολλαπλών γονιδίων που σχετίζονται με την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη φλεγμονή, την απόπτωση και πολλές άλλες διαδικασίες. Η αναστολή αυτή έχει βρεθεί να γίνεται αφενός άμεσα με την παρεμπόδιση της δράσης της IKK και αφετέρου έμμεσα, μέσω του μονοπατιού της Akt (Aggarwal et al., 2006).

Σε κύτταρα μελανώματος έγινε επίδραση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης 5-50μM και διαπιστώθηκε ότι συγκέντρωση ίση ή μεγαλύτερη των 10μM μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι η κουρκουμίνη επάγει παράλληλα το εξωγενές και το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης, αναστέλλει διάφορα αντι-αποπτωτικά μόρια συμπεριλαμβανομένου του NF-κB και παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του μονοπατιού της p38 MAP κινάσης. Επομένως, στην περίπτωση αυτή, η υψηλή συγκέντρωση κουρκουμίνης δρα αποπτωτικά και παρεμποδίζει το μονοπάτι επιβίωσης που



ρυθμίζεται από τον NF-κB (Jiang et al., 2015). Άλλη μια μελέτη στην οποία η επίδραση με κουρκουμίνη προκάλεσε την παράλληλη ενεργοποίηση των δύο μονοπατιών της απόπτωσης, αφορούσε σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος T98G. Στα κύτταρα αυτά, η κουρκουμίνη σε συγκέντρωση 25-50μM κατέστειλε το μονοπάτι επιβίωσης που μεσολαβείται από τις πρωτεΐνες-αναστολείς της απόπτωσης, IAPs, και τον NF-κB, ενώ ενεργοποίησε τους αποπτωτικούς παράγοντες και του μιτοχονδριακού και του μεσολαβούμενου από υποδοχέα μονοπατιού (Karmakar et al., 2006).

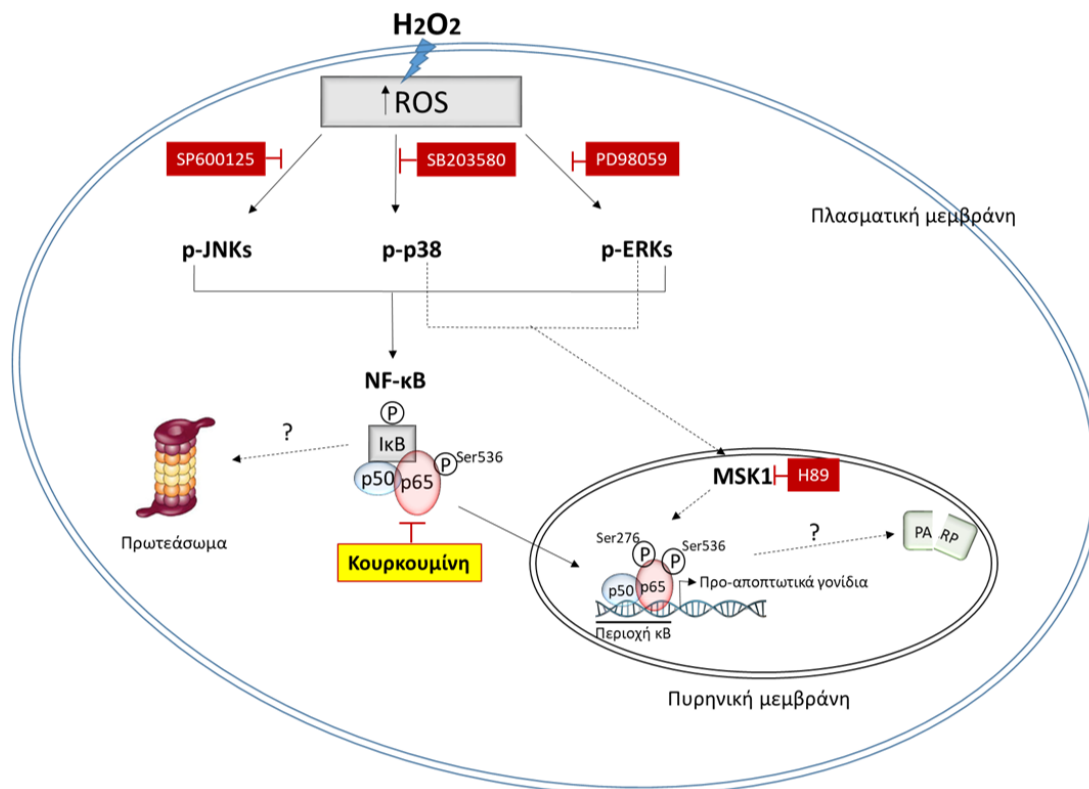
Ομοίως, σε καρκινικά κύτταρα παγκρέατος, έχει διαπιστωθεί ότι η επίδραση με  $H_2O_2$  σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 200μM επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μεταστατική δράση τους, ενώ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι κυτταροτοξικές (Li et al., 2015). Παρουσία κουρκουμίνης στις παραπάνω συνθήκες, φάνηκε να αναστέλλονται οι μεταστατικές δράσεις εξαιτίας του  $H_2O_2$ , μέσω παρεμπόδισης του μονοπατιού των p-ERKs/p-NF-κB (Cao et al., 2016). Ακόμη, ο αντικαρκινικός ρόλος της κουρκουμίνης διερευνήθηκε και στον καρκίνο του προστάτη. Στην συγκεκριμένη μελέτη, αυξανόμενες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση και του ποσοστού της απόπτωσης, γεγονός που συσχετίστηκε με την αναστολή του μονοπατιού επιβίωσης που μεσολαβείται από τον NF-κB (Guo et al., 2013).

Επιπλέον, σε επιθηλιακά κυψελιδικά κύτταρα της κυτταρικής σειράς A549, η κουρκουμίνη σε συγκέντρωση 10μM κατάφερε να αναστείλει την επαγωγή του NF-κB τόσο από το  $H_2O_2$  (100μM), όσο και από τον TNF-α (10ng/ml). Ταυτόχρονα, προκάλεσε την αύξηση αντιοξειδωτικών ενζύμων και την μείωση των επιπέδων των δραστικών ριζών οξυγόνου, υποδεικνύοντας τον αντι-οξειδωτικό της ρόλο (Biswas et al., 2005). Ομοίως, μια πιο πρόσφατη μελέτη σε καρκινικά κύτταρα λεμφώματος, έδειξε ότι η ύπαρξη  $H_2O_2$  στο μικροπεριβάλλον του όγκου, επάγει την ενεργοποίηση του NF-κB και την περαιτέρω επιβίωση και πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Στις δεδομένες συνθήκες, η επίδραση με κουρκουμίνη είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή αντι-οξειδωτικών ενζύμων που τροποποίησαν το οξειδωτικό φορτίο των κυττάρων αναστέλλοντας, έτσι, την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα. Συνεπώς, η παρεμπόδιση της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου από την κουρκουμίνη, ανέστειλε τον NF-κB και συντέλεσε στο περιορισμό της ανάπτυξης του όγκου (Das & Vinayak, 2012).

Τέλος, σε καλλιέργεια κυττάρων μονοκυτταρικής λευχαιμίας, SHI-1, διαπιστώθηκε ότι σε συγκέντρωση κουρκουμίνης μεγαλύτερη των 6,5μM, επάγεται απόπτωση, και μάλιστα συμβαίνουν ταυτόχρονα και τα δύο μονοπάτια, το εξωγενές και το μιτοχονδριακό. Στη μελέτη αυτή διερευνήθηκαν και τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των MAPKs και του NF-κB, και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κουρκουμίνη μεσολαβεί στην αύξηση των p-p38 και p-JNKs που προάγουν την απόπτωση και στην αναστολή των p-ERKs και p-NF-κB που δρουν σε μονοπάτια επιβίωσης (Zhu et al., 2016). Ομοίως, κύτταρα οστεοκλαστώματος εμφάνισαν μειωμένη βιωσιμότητα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης 10-40μM, με ταυτόχρονη αναστολή του NF-κB και ενεργοποίηση των JNKs (Cao et al., 2015).

#### IV.6 Προτεινόμενο μονοπάτι εμπλοκής του NF-κB στην επαγωγή της απόπτωσης από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στα H9c2

Η εικόνα IV.1 αποτελεί μια συνοπτική σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού μέσω του οποίου το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 400μM επάγει την μεσολαβούμενη από τον NF-κB απόπτωση των καρδιακών μυοβλαστών H9c2. Η εξωγενής επίδραση με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συντελεί στην ενεργοποίηση των τριών μελών των MAPKs, JNKs, ERKs και p38 MAPK, γεγονός που υποδηλώνεται από την αύξηση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης τους. Πρώτες φαίνεται να ενεργοποιούνται οι p-ERKs, ήδη από τα 15 πρώτα λεπτά επίδρασης, με μέγιστο στα 30 λεπτά, ενώ ακολουθούν οι p-38 MAPK και οι p-JNKs με μέγιστο στη 1 ώρα. Οι κινάσες αυτές συγκλίνουν στην επαγωγή της φωσφορυλίωσης της υπομονάδας p65 του NF-κB στη σερίνη 536 και στην επακόλουθη μετατόπιση της στον πυρήνα. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου το διμερές σύμπλοκο του NF-κB απελευθερώνεται από τον αναστολέα του IκB, δεν διαλευκάνθηκε, επομένως δεν γνωρίζουμε αν συντελείται μόνο φωσφορυλίωση ή/και αποικοδόμηση του στο πρωτεάσωμα (διακεκομμένα βέλη). Η φωσφορυλίωση της p65 στη σερίνη 536 φαίνεται να επηρεάζεται, επίσης, από μια πυρηνική κινάση, την MSK1, η οποία είχε βρεθεί σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας ότι επάγει τη φωσφορυλίωση της p65 στη σερίνη 276, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί καταρροϊκό στόχο των p-ERKs και p-38 MAPK (Kefaloyianni et al., 2006). Ωστόσο, το χρονικό πρότυπο αυτών των γεγονότων φωσφορυλίωσης δεν έχει εξακριβωθεί, παρόλο που στην παρούσα εργασία είδαμε ότι η αναστολή της MSK1 από τον H89, αναστέλλει και την φωσφορυλίωση της p65 στη σερίνη 536, υποδεικνύοντας αλληλοεξάρτηση των μεταμεταφραστικών αυτών τροποποιήσεων. Η μετατόπιση του NF-κB στον πυρήνα οδηγεί, τελικά, στην επαγωγή της απόπτωσης, καθώς ανιχνεύεται το θραύσμα της πολυμεράσης πολυ-ADP-ριβόζης. Οι καθιερωμένοι αναστολείς των MAPKs, PD98059 για τις ERKs, SB203580 για τις JNKs και SP600125 για την p38 MAPK, παρεμποδίζουν τη φωσφορυλίωση της p65 και την τελική θραύση της PARP, γεγονός που επιβεβαιώνει τη συσχέτιση των μονοπατιών αυτών. Ιδιαίτερα, η κουρκουμίνη, αποτελώντας γνωστό αναστολέα του NF-κB, διαπιστώθηκε ότι εκτός από την παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης του, συντελεί και στην αναστολή της θραύσης της PARP. Το αποτέλεσμα αυτό προσδίδει στην κουρκουμίνη αντι-αποπτωτικές δράσεις, οι οποίες απαιτούν περαιτέρω μελέτη για τη διαλεύκανση του προστατευτικού της ρόλου κατά το οξειδωτικό στρες.



**Εικόνα IV.1** Σχηματική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας. Απεικονίζεται ο προτεινόμενος μηχανισμός, μέσω του οποίου το  $H_2O_2$  επάγει τη μεσολαβούμενη από τον NF-κB απόπτωση των καρδιακών μυοβλαστών.

### Συμπεράσματα

Η παρούσα διπλωματική εργασία μας έδωσε τη δυνατότητα να διαπιστώσουμε τον προ-αποπτωτικό ρόλο του NF-κB στις οξειδωτικές συνθήκες που επάγονται από το  $H_2O_2$ . Στην εικόνα IV.1 απεικονίζονται συνοπτικά τα αποτελέσματά μας. Συγκεκριμένα, ανιχνεύσαμε ότι στο μονοπάτι ενεργοποίησης του NF-κB από το  $H_2O_2$ , σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα τρία μέλη της οικογένειας των MAPKs, JNKs, ERKs και p38 MAPK. Οι κινάσες αυτές, φαίνεται να δρουν συνδυαστικά ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες και να ωθούν τα κύτταρα προς την απόπτωση. Επιπλέον, για πρώτη φορά, δείξαμε ότι η κουρκουμίνη σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση της τάξης του  $1\mu M$ , αναστέλλει το μονοπάτι της απόπτωσης και δρα αντι-οξειδωτικά, μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει και την αναστολή του προ-αποπτωτικού NF-κB.

Φυσικά, απαιτούνται επιπλέον μελέτες για να διαπιστωθεί το ακριβές μονοπάτι μέσω του οποίου ο NF-κB μεσολαβεί στην απόπτωση, ώστε να μπορέσει να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο. Τα αποτελέσματά μας, πάντως, έδειξαν ότι η κουρκουμίνη, ως αναστολέας του, παρεμποδίζει την απόπτωση των H9c2, καθιστώντας την πιθανό καρδιοπροστατευτικό μόριο.

## Βιβλιογραφία

- Abend, M. (2003). Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy. *International Journal of Radiation Biology*, 79(12), 927–941. <https://doi.org/10.1080/09553000310001632958>
- Aggarwal, B. B., & Harikumar, K. B. (2009). Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(1), 40–59. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.06.010>
- Aggarwal, S., Ichikawa, H., Takada, Y., Sandur, S. K., Shishodia, S., & Aggarwal, B. B. (2006). Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of IkappaBalpha kinase and Akt activation. *Molecular Pharmacology*, 69(1), 195–206. <https://doi.org/10.1124/mol.105.017400>
- Aggeli, I.-K., Koustas, E., Gaitanaki, C., & Beis, I. (2013). Curcumin acts as a pro-oxidant inducing apoptosis via JNKs in the isolated perfused Rana ridibunda heart. *Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology*, 319(6), 328–339. <https://doi.org/10.1002/jez.1797>
- Aikawa, R., Komuro, I., Yamazaki, T., Zou, Y., Kudoh, S., Tanaka, M., ... Yazaki, Y. (1997). Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 100(7), 1813–1821. <https://doi.org/10.1172/JCI119709>
- Akopova, O. V., Kolchinskaya, L. I., Nosar, V. I., Bouryi, V. A., Mankovska, I. N., & Sagach, V. F. (2012). Cytochrome C as an amplifier of ROS release in mitochondria. *Fiziologichnyi Zhurnal (Kiev, Ukraine : 1994)*, 58(1), 3–12.
- Andrabi, S. A., Umanah, G. K. E., Chang, C., Stevens, D. A., Karuppagounder, S. S., Gagne, J.-P., ... Dawson, T. M. (2014). Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(28), 10209–10214. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405158111>
- Appukuttan, A., Kasseckert, S. A., Micoogullari, M., Flacke, J.-P., Kumar, S., Woste, A., ... Ladilov, Y. (2012). Type 10 adenylyl cyclase mediates mitochondrial Bax translocation and apoptosis of adult rat cardiomyocytes under simulated ischaemia/reperfusion. *Cardiovascular Research*, 93(2), 340–349. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr306>
- Arandjelovic, S., & Ravichandran, K. S. (2015). Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nature Immunology*, 16(9), 907–917. <https://doi.org/10.1038/ni.3253>
- Ashburner, B. P., Westerheide, S. D., & Baldwin, A. S. J. (2001). The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 21(20), 7065–7077. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.20.7065-7077.2001>
- Baetz, D., Regula, K. M., Ens, K., Shaw, J., Kothari, S., Yurkova, N., & Kirshenbaum, L. A. (2005). Nuclear factor-kappaB-mediated cell survival involves transcriptional silencing of the mitochondrial death gene BNIP3 in ventricular myocytes. *Circulation*, 112(24), 3777–3785. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.573899>
- Bai, X., Lu, D., Bai, J., Zheng, H., Ke, Z., Li, X., & Luo, S. (2004). Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(1), 197–207.
- Baker, R. G., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2011). NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metabolism*, 13(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.12.008>
- Baldo, B. A., Tovey, E. R., & Ford, S. A. (1986). Comparison of different blocking agents and nitrocelluloses in the solid phase detection of proteins by labelled antisera and protein A. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 12(5–6), 271–279.

- Banan, A., Fields, J. Z., Zhang, Y., & Keshavarzian, A. (2001). Phospholipase C-gamma inhibition prevents EGF protection of intestinal cytoskeleton and barrier against oxidants. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(2), G412-23.
- Barzegar, A., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2011). Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. *PloS One*, 6(10), e26012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026012>
- Basak, S., Kim, H., Kearns, J. D., Tergaonkar, V., O'Dea, E., Werner, S. L., ... Hoffmann, A. (2007). A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell*, 128(2), 369–381. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.033>
- Bauer, P. I., Chen, H. J., Kenesi, E., Kenessey, I., Buki, K. G., Kirsten, E., ... Kun, E. (2001). Molecular interactions between poly(ADP-ribose) polymerase (PARP I) and topoisomerase I (Topo I): identification of topology of binding. *FEBS Letters*, 506(3), 239–242.
- Ben-Neriah, Y. (2002). Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nature Immunology*, 3(1), 20–26. <https://doi.org/10.1038/ni0102-20>
- Bernard, D., Monte, D., Vandenbunder, B., & Abbadie, C. (2002). The c-Rel transcription factor can both induce and inhibit apoptosis in the same cells via the upregulation of MnSOD. *Oncogene*, 21(28), 4392–4402. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205536>
- Bhatt, D., & Ghosh, S. (2014). Regulation of the NF-kappaB-Mediated Transcription of Inflammatory Genes. *Frontiers in Immunology*, 5, 71. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00071>
- Bird, T. A., Schooley, K., Dower, S. K., Hagen, H., & Virca, G. D. (1997). Activation of nuclear transcription factor NF-kappaB by interleukin-1 is accompanied by casein kinase II-mediated phosphorylation of the p65 subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32606–32612.
- Biswas, S. K., McClure, D., Jimenez, L. A., Megson, I. L., & Rahman, I. (2005). Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(1–2), 32–41. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.32>
- Blackwell, K., Zhang, L., Workman, L. M., Ting, A. T., Iwai, K., & Habelhah, H. (2013). Two coordinated mechanisms underlie tumor necrosis factor alpha-induced immediate and delayed IkappaB kinase activation. *Molecular and Cellular Biology*, 33(10), 1901–1915. <https://doi.org/10.1128/MCB.01416-12>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Branco, A. F., Pereira, S. L., Moreira, A. C., Holy, J., Sardao, V. A., & Oliveira, P. J. (2011). Isoproterenol cytotoxicity is dependent on the differentiation state of the cardiomyoblast H9c2 cell line. *Cardiovascular Toxicology*, 11(3), 191–203. <https://doi.org/10.1007/s12012-011-9111-5>
- Branco, A. F., Pereira, S. P., Gonzalez, S., Gusev, O., Rizvanov, A. A., & Oliveira, P. J. (2015). Gene expression profiling of H9c2 myoblast differentiation towards a cardiac-like phenotype. *PLoS ONE*, 10(6), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129303>
- Branco, A. F., Sampaio, S. F., Moreira, A. C., Holy, J., Wallace, K. B., Baldeiras, I., ... Sardao, V. A. (2012). Differentiation-dependent doxorubicin toxicity on H9c2 cardiomyoblasts. *Cardiovascular Toxicology*, 12(4), 326–340. <https://doi.org/10.1007/s12012-012-9177-8>
- Bu, Y., Cai, G., Shen, Y., Huang, C., Zeng, X., Cao, Y., ... Cao, D. (2016). Targeting NF-kappaB RelA/p65 phosphorylation overcomes RITA resistance. *Cancer Letters*, 383(2), 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.10.006>
- Bu, Y., Li, X., He, Y., Huang, C., Shen, Y., Cao, Y., ... Cao, D. (2016). A phosphomimetic mutant of RelA/p65 at Ser536 induces apoptosis and senescence: An implication for tumor-suppressive role of Ser536 phosphorylation. *International Journal of Cancer*, 138(5), 1186–1198. <https://doi.org/10.1002/ijc.29852>

- Burgoyne, J. R., Mongue-Din, H., Eaton, P., & Shah, A. M. (2012). Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circulation Research*, 111(8), 1091–1106. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.255216>
- Burgoyne, J. R., Rudyk, O., Cho, H., Prysyazhna, O., Hathaway, N., Weeks, A., ... Eaton, P. (2015). Deficient angiogenesis in redox-dead Cys17Ser PKARI $\alpha$  knock-in mice. *Nature Communications*, 6, 7920. <https://doi.org/10.1038/ncomms8920>
- Burnette, W. N. (1981). “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195–203.
- Buss, H., Dorrie, A., Schmitz, M. L., Frank, R., Livingstone, M., Resch, K., & Kracht, M. (2004). Phosphorylation of serine 468 by GSK-3 $\beta$  negatively regulates basal p65 NF- $\kappa$ B activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 49571–49574. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400442200>
- Buss, H., Dorrie, A., Schmitz, M. L., Hoffmann, E., Resch, K., & Kracht, M. (2004). Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- $\kappa$ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I $\kappa$ B kinase (IKK)- $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\epsilon$ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55633–55643. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409825200>
- Campbell, K. J., Witty, J. M., Rocha, S., & Perkins, N. D. (2006). Cisplatin mimics ARF tumor suppressor regulation of RelA (p65) nuclear factor- $\kappa$ B transactivation. *Cancer Research*, 66(2), 929–935. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2234>
- Cao, F., Liu, T., Xu, Y., Xu, D., & Feng, S. (2015). Curcumin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in human osteoclastoma cell through MMP-9, NF- $\kappa$ B and JNK signaling pathways. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(6), 6037–6045.
- Cao, L., Liu, J., Zhang, L., Xiao, X., & Li, W. (2016). Curcumin inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced invasion and migration of human pancreatic cancer via suppression of the ERK/NF- $\kappa$ B pathway. *Oncology Reports*, 36(4), 2245–2251. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5044>
- Carmody, R. J., Ruan, Q., Palmer, S., Hilliard, B., & Chen, Y. H. (2007). Negative regulation of toll-like receptor signaling by NF- $\kappa$ B p50 ubiquitination blockade. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5838), 675–678. <https://doi.org/10.1126/science.1142953>
- Castro-Caldas, M., Carvalho, A. N., Rodrigues, E., Henderson, C., Wolf, C. R., & Gama, M. J. (2012). Glutathione S-transferase pi mediates MPTP-induced c-Jun N-terminal kinase activation in the nigrostriatal pathway. *Molecular Neurobiology*, 45(3), 466–477. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8266-9>
- Cavazos, D. A., Price, R. S., Apte, S. S., & deGraffenried, L. A. (2011). Docosahexaenoic acid selectively induces human prostate cancer cell sensitivity to oxidative stress through modulation of NF- $\kappa$ B. *The Prostate*, 71(13), 1420–1428. <https://doi.org/10.1002/pros.21359>
- Chandrasekar, B., Smith, J. B., & Freeman, G. L. (2001). Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-KappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. *Circulation*, 103(18), 2296–2302.
- Chen, L.-F., & Greene, W. C. (2004). Shaping the nuclear action of NF- $\kappa$ B. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(5), 392–401. <https://doi.org/10.1038/nrm1368>
- Chen, L.-F., Williams, S. A., Mu, Y., Nakano, H., Duerr, J. M., Buckbinder, L., & Greene, W. C. (2005). NF- $\kappa$ B RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Molecular and Cellular Biology*, 25(18), 7966–7975. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.18.7966-7975.2005>
- Chen, Z., Chua, C. C., Ho, Y. S., Hamdy, R. C., & Chua, B. H. (2001). Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 280(5), H2313–20.
- Chen, Z. J., Parent, L., & Maniatis, T. (1996). Site-specific phosphorylation of IkappaB $\alpha$  by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*, 84(6), 853–862.

- Chhunchha, B., Fatma, N., Kubo, E., Rai, P., Singh, S. P., & Singh, D. P. (2013). Curcumin abates hypoxia-induced oxidative stress based-ER stress-mediated cell death in mouse hippocampal cells (HT22) by controlling Prdx6 and NF-kappaB regulation. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 304(7), C636-55. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00345.2012>
- Chiarugi, A., & Moskowitz, M. A. (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-kappaB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. *Journal of Neurochemistry*, 85(2), 306–317.
- Choi, J.-J., Choi, J., Kang, C.-D., Chen, X., Wu, C.-F., Ko, K. H., & Kim, W.-K. (2007). Hydrogen peroxide induces the death of astrocytes through the down-regulation of the constitutive nuclear factor-kappaB activity. *Free Radical Research*, 41(5), 555–562. <https://doi.org/10.1080/10715760601173010>
- Cohen-Armon, M., Visochek, L., Rozensal, D., Kalal, A., Geistrikh, I., Klein, R., ... Seger, R. (2007). DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Molecular Cell*, 25(2), 297–308. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.12.012>
- Cohen, S., Orian, A., & Ciechanover, A. (2001). Processing of p105 is inhibited by docking of p50 active subunits to the ankyrin repeat domain, and inhibition is alleviated by signaling via the carboxyl-terminal phosphorylation/ ubiquitin-ligase binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(29), 26769–26776. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102448200>
- Constantine, N. T., Bansal, J., Zhang, X., Hyams, K. C., & Hayes, C. (1994). Enhanced chemiluminescence as a means of increasing the sensitivity of western blot assays for HIV antibody. *Journal of Virological Methods*, 47(1–2), 153–164.
- Cook, S. A., Novikov, M. S., Ahn, Y., Matsui, T., & Rosenzweig, A. (2003). A20 is dynamically regulated in the heart and inhibits the hypertrophic response. *Circulation*, 108(6), 664–667. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000086978.95976.41>
- Cort, A., Timur, M., Ozdemir, E., & Ozben, T. (2013). Effects of curcumin on bleomycin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cells. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(2), 289–296. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0211-x>
- Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical Journal*, 429(3), 403–417. <https://doi.org/10.1042/BJ20100323>
- Dai, C., Li, B., Zhou, Y., Li, D., Zhang, S., Li, H., ... Tang, S. (2016). Curcumin attenuates quinocetone induced apoptosis and inflammation via the opposite modulation of Nrf2/HO-1 and NF-kB pathway in human hepatocyte L02 cells. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 95, 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.025>
- Dai, P., Mao, Y., Sun, X., Li, X., Muhammad, I., Gu, W., ... Huang, S. (2017). Attenuation of Oxidative Stress-Induced Osteoblast Apoptosis by Curcumin is Associated with Preservation of Mitochondrial Functions and Increased Akt-GSK3beta Signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 41(2), 661–677. <https://doi.org/10.1159/000457945>
- Dan Dunn, J., Alvarez, L. A., Zhang, X., & Soldati, T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biology*, 6, 472–485. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.09.005>
- Daniell, H. (2012). NIH Public Access, 76(October 2009), 211–220. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9767-z>.Plastid
- Das, L., & Vinayak, M. (2012). Anti-carcinogenic action of curcumin by activation of antioxidant defence system and inhibition of NF-kappaB signalling in lymphoma-bearing mice. *Bioscience Reports*, 32(2), 161–170. <https://doi.org/10.1042/BSR20110043>
- Daverey, A., & Agrawal, S. K. (2016). Curcumin alleviates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in astrocytes. *Neuroscience*, 333, 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.012>



- Davies, C., & Tournier, C. (2012). Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. *Biochemical Society Transactions*, 40(1), 85–89. <https://doi.org/10.1042/BST20110641>
- Dawn, B., Xuan, Y. T., Marian, M., Flaherty, M. P., Murphree, S. S., Smith, T. L., ... Jones, W. K. (2001). Cardiac-specific abrogation of NF- $\kappa$ B activation in mice by transdominant expression of a mutant I $\kappa$ B $\alpha$ . *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(1), 161–173. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1291>
- de Oliveira-Marques, V., Cyrne, L., Marinho, H. S., & Antunes, F. (2007). A quantitative study of NF- $\kappa$ B activation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: relevance in inflammation and synergy with TNF- $\alpha$ . *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(6), 3893–3902.
- Delhase, M., Hayakawa, M., Chen, Y., & Karin, M. (1999). Positive and negative regulation of I $\kappa$ B kinase activity through IKK $\beta$  subunit phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5412), 309–313.
- Devassy, J. G., Nwachukwu, I. D., & Jones, P. J. H. (2015). Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim. *Nutrition Reviews*, 73(3), 155–165. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuu064>
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., & Liu, Z. (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*, 12(4), 419–429.
- Devin, A., Lin, Y., Yamaoka, S., Li, Z., Karin, M., & Zg, L. (2001). The  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of I $\kappa$ B kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Molecular and Cellular Biology*, 21(12), 3986–3994. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.12.3986-3994.2001>
- Dhingra, R., Shaw, J. A., Aviv, Y., & Kirshenbaum, L. A. (2010). Dichotomous actions of NF- $\kappa$ B signaling pathways in heart. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 3(4), 344–354. <https://doi.org/10.1007/s12265-010-9195-5>
- DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., & Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature*, 388(6642), 548–554. <https://doi.org/10.1038/41493>
- DiDonato, J. A., Mercurio, F., & Karin, M. (2012). NF- $\kappa$ B and the link between inflammation and cancer. *Immunological Reviews*, 246(1), 379–400. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01099.x>
- Dirsch, V. M., Gerbes, A. L., & Vollmar, A. M. (1998). Ajoene, a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor  $\kappa$ B. *Molecular Pharmacology*, 53(3), 402–407.
- Donzelli, M., Negri, C., Mandarino, A., Rossi, L., Prosperi, E., Frouin, I., ... Scovassi, A. I. (1997). Poly(ADP-ribose) synthesis: a useful parameter for identifying apoptotic cells. *The Histochemical Journal*, 29(11–12), 831–837.
- Duran, A., Diaz-Meco, M. T., & Moscat, J. (2003). Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF- $\kappa$ B transcriptional activation. *The EMBO Journal*, 22(15), 3910–3918. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg370>
- Duyao, M. P., Kessler, D. J., Spicer, D. B., Bartholomew, C., Cleveland, J. L., Siekevitz, M., & Sonenshein, G. E. (1992). Transactivation of the c-myc promoter by human T cell leukemia virus type 1 tax is mediated by NF  $\kappa$ B. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(23), 16288–16291.
- Ea, C.-K., Deng, L., Xia, Z.-P., Pineda, G., & Chen, Z. J. (2006). Activation of IKK by TNF $\alpha$  requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Molecular Cell*, 22(2), 245–257. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.026>
- Elmore, S. (2007a). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

- Elmore, S. (2007b). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Engelbrecht, A.-M., Niesler, C., Page, C., & Lochner, A. (2004). p38 and JNK have distinct regulatory functions on the development of apoptosis during simulated ischaemia and reperfusion in neonatal cardiomyocytes. *Basic Research in Cardiology*, 99(5), 338–350. <https://doi.org/10.1007/s00395-004-0478-3>
- Erickson, J. R., Joiner, M. A., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C. V., ... Anderson, M. E. (2008). A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*, 133(3), 462–474. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.048>
- Estaquier, J., Rodrigues, V., Silvestre, R., Estaquier, R., Krust, B., & Laforge, M. (2013, December). [Apoptosis and AIDS, a question of integration?]. *Medecine sciences : M/S. France*. <https://doi.org/10.1051/medsci/20132912011>
- Ethell, D. W., & Buhler, L. A. (2003). Fas ligand-mediated apoptosis in degenerative disorders of the brain. *Journal of Clinical Immunology*, 23(6), 439–446.
- Eustermann, S., Wu, W.-F., Langelier, M.-F., Yang, J.-C., Easton, L. E., Riccio, A. A., ... Neuhaus, D. (2015). Structural Basis of Detection and Signaling of DNA Single-Strand Breaks by Human PARP-1. *Molecular Cell*, 60(5), 742–754. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.032>
- Fatokun, A. A., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2014). Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *British Journal of Pharmacology*, 171(8), 2000–2016. <https://doi.org/10.1111/bph.12416>
- Finkel, T. (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS Letters*, 476(1–2), 52–54.
- Franklin, R. A., Atherfold, P. A., & McCubrey, J. A. (2000). Calcium-induced ERK activation in human T lymphocytes occurs via p56(Lck) and CaM-kinase. *Molecular Immunology*, 37(11), 675–683.
- Frantz, S., Hu, K., Bayer, B., Gerondakis, S., Strotmann, J., Adamek, A., ... Bauersachs, J. (2006). Absence of NF-kappaB subunit p50 improves heart failure after myocardial infarction. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(11), 1918–1920. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5133fje>
- Frantz, S., Kelly, R. A., & Bourcier, T. (2001). Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(7), 5197–5203. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009160200>
- Freude, B., Masters, T. N., Robicsek, F., Fokin, A., Kostin, S., Zimmermann, R., ... Schaper, J. (2000). Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(2), 197–208. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1999.1066>
- Freund, C., Schmidt-Ullrich, R., Baurand, A., Dunger, S., Schneider, W., Loser, P., ... Bergmann, M. W. (2005). Requirement of nuclear factor-kappaB in angiotensin II- and isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in vivo. *Circulation*, 111(18), 2319–2325. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000164237.58200.5A>
- Fu, X.-Y., Yang, M.-F., Cao, M.-Z., Li, D.-W., Yang, X.-Y., Sun, J.-Y., ... Sun, B.-L. (2016). Strategy to Suppress Oxidative Damage-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells by Curcumin: the Role of ROS-Mediated DNA Damage and the MAPK and AKT Pathways. *Molecular Neurobiology*, 53(1), 369–378. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9021-1>
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., ... Kroemer, G. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*, 22(1), 58–73. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>
- Gardam, S., Sierro, F., Basten, A., Mackay, F., & Brink, R. (2008). TRAF2 and TRAF3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to B cells by the BAFF receptor. *Immunity*, 28(3), 391–401. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.01.009>
- Gasparov, V. S., & Degtiar', V. G. (1994). [Protein determination by binding with the dye Coomassie brilliant blue G-250]. *Biokhimiia (Moscow, Russia)*, 59(6), 763–777.

- Gero, D., Szoleczky, P., Chatzianastasiou, A., Papapetropoulos, A., & Szabo, C. (2014). Modulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)-mediated oxidative cell injury by ring finger protein 146 (RNF146) in cardiac myocytes. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 20, 313–328. <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00102>
- Gerondakis, S., Grumont, R., Gugasyan, R., Wong, L., Isomura, I., Ho, W., & Banerjee, A. (2006). Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene*, 25(51), 6781–6799. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209944>
- Ghosh, S., Banerjee, S., & Sil, P. C. (2015). The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 83, 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.05.022>
- Ghosh, S., May, M. J., & Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 16, 225–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.225>
- Gilles, S., Zahler, S., Welsch, U., Sommerhoff, C. P., & Becker, B. F. (2003). Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers. *Cardiovascular Research*, 60(3), 608–616.
- Gilmore, T. D. (1990). NF-kappa B, KBF1, dorsal, and related matters. *Cell*, 62(5), 841–843.
- Gloire, G., & Piette, J. (2009). Redox regulation of nuclear post-translational modifications during NF-kappaB activation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(9), 2209–2222. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2463>
- Gottlieb, R. A., Burleson, K. O., Kloner, R. A., Babior, B. M., & Engler, R. L. (1994). Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 94(4), 1621–1628. <https://doi.org/10.1172/JCI117504>
- Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>
- Greenhalgh, D. G. (1998). The role of apoptosis in wound healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(9), 1019–1030.
- Guo, H., Xu, Y.-M., Ye, Z.-Q., Yu, J.-H., & Hu, X.-Y. (2013). Curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis of prostate cancer cells by regulating the expression of IkappaBalpha, c-Jun and androgen receptor. *Die Pharmazie*, 68(6), 431–434.
- Gupta, M. K., Neelakantan, T. V., Sanghamitra, M., Tyagi, R. K., Dinda, A., Maulik, S., ... Goswami, S. K. (2006). An assessment of the role of reactive oxygen species and redox signaling in norepinephrine-induced apoptosis and hypertrophy of H9c2 cardiac myoblasts. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(5–6), 1081–1093. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1081>
- Gupta, S. C., Kismali, G., & Aggarwal, B. B. (2013). Curcumin, a component of turmeric: from farm to pharmacy. *BioFactors (Oxford, England)*, 39(1), 2–13. <https://doi.org/10.1002/biof.1079>
- Gupta, S. C., Sung, B., Kim, J. H., Prasad, S., Li, S., & Aggarwal, B. B. (2013). Multitargeting by turmeric, the golden spice: From kitchen to clinic. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(9), 1510–1528. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100741>
- Gustafsson, A. B., & Gottlieb, R. A. (2007). Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 292(1), C45–51. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00229.2006>
- Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G., & Baldwin, A. S. J. (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8), 5785–5799.
- Ha, H. C., & Snyder, S. H. (2000). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the nervous system. *Neurobiology of Disease*, 7(4), 225–239. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2000.0324>

- Hacker, H., & Karin, M. (2006). Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, 2006(357), re13. <https://doi.org/10.1126/stke.3572006re13>
- Hall, J. L., Wang, X., Van, A., Zhao, Y., & Gibbons, G. H. (2001). Overexpression of Ref-1 inhibits hypoxia and tumor necrosis factor- induced endothelial cell apoptosis through nuclear factor-kappab- independent and -dependent pathways. *Circ Res*, 88(12), 1247–53. <https://doi.org/10.1161/hh1201.091796>
- Halliwell, B., Clement, M. V., & Long, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 486(1), 10–13.
- Hamacher-Brady, A., Brady, N. R., Logue, S. E., Sayen, M. R., Jinno, M., Kirshenbaum, L. A., ... Gustafsson, A. B. (2007). Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 14(1), 146–157. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401936>
- Hao, C., Hao, W., Wei, X., Xing, L., Jiang, J., & Shang, L. (2009). The role of MAPK in the biphasic dose-response phenomenon induced by cadmium and mercury in HEK293 cells. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with IBRA*, 23(4), 660–666. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.03.005>
- Harhaj, E. W., & Sun, S. C. (1999). Regulation of RelA subcellular localization by a putative nuclear export signal and p50. *Molecular and Cellular Biology*, 19(10), 7088–7095.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes & Development*, 18(18), 2195–2224. <https://doi.org/10.1101/gad.1228704>
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 132(3), 344–362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2014). Regulation of NF-kappaB by TNF family cytokines. *Seminars in Immunology*, 26(3), 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.05.004>
- Helson, L. (2013). Curcumin (diferuloylmethane) delivery methods: a review. *BioFactors (Oxford, England)*, 39(1), 21–26. <https://doi.org/10.1002/biof.1080>
- Herscovitch, M., Comb, W., Ennis, T., Coleman, K., Yong, S., Armstead, B., ... Gilmore, T. D. (2008). Intermolecular disulfide bond formation in the NEMO dimer requires Cys54 and Cys347. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(1), 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.123>
- Hescheler, J., Meyer, R., Plant, S., Krautwurst, D., Rosenthal, W., & Schultz, G. (1991). Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circulation Research*, 69(6), 1476–1486.
- Higuchi, Y., Otsu, K., Nishida, K., Hirotani, S., Nakayama, H., Yamaguchi, O., ... Hori, M. (2002). Involvement of reactive oxygen species-mediated NF-kappa B activation in TNF-alpha-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(2), 233–240. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1505>
- Hino, T., Nakamura, H., Abe, S., Saito, H., Inage, M., Terashita, K., ... Tomoike, H. (1999). Hydrogen peroxide enhances shedding of type I soluble tumor necrosis factor receptor from pulmonary epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 20(1), 122–128. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.20.1.3217>
- Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J., Mori, K., & Yodoi, J. (1999). Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27891–27897.
- Ho, J. Q., Asagiri, M., Hoffmann, A., & Ghosh, G. (2011). NF-kappaB potentiates caspase independent hydrogen peroxide induced cell death. *PloS One*, 6(2), e16815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016815>
- Ho, P. D., Zechner, D. K., He, H., Dillmann, W. H., Glembotski, C. C., & McDonough, P. M. (1998).

- The Raf-MEK-ERK cascade represents a common pathway for alteration of intracellular calcium by Ras and protein kinase C in cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 21730–21735.
- Hochhauser, E., Kivity, S., Offen, D., Maulik, N., Otani, H., Barhum, Y., ... Vidne, B. A. (2003). Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 284(6), H2351-9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00783.2002>
- Hoffmann, A., & Baltimore, D. (2006). Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunological Reviews*, 210, 171–186. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00375.x>
- Hoffmann, A., Leung, T. H., & Baltimore, D. (2003). Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. *The EMBO Journal*, 22(20), 5530–5539. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg534>
- Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M. L., & Baltimore, D. (2002). The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5596), 1241–1245. <https://doi.org/10.1126/science.1071914>
- Hoffmann, A., Natoli, G., & Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*, 25(51), 6706–6716. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209933>
- Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., & Swanson, P. E. (2009). Cell death. *The New England Journal of Medicine*, 361(16), 1570–1583. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0901217>
- Hou, Y., Wang, Y., Wang, H., & Xu, Y. (2014). Induction of glutathione synthesis in human hepatocytes by acute and chronic arsenic exposure: differential roles of mitogen-activated protein kinases. *Toxicology*, 325, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.09.002>
- Hsu, H., Huang, J., Shu, H. B., Baichwal, V., & Goeddel, D. V. (1996). TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*, 4(4), 387–396.
- Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G., & Goeddel, D. V. (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, 84(2), 299–308.
- Hsu, H., Xiong, J., & Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*, 81(4), 495–504.
- Huang, B., Yang, X.-D., Lamb, A., & Chen, L.-F. (2010). Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway. *Cellular Signalling*, 22(9), 1282–1290. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.03.017>
- Huang, H., Tang, Q.-Z., Wang, A.-B., Chen, M., Yan, L., Liu, C., ... Li, H. (2010). Tumor suppressor A20 protects against cardiac hypertrophy and fibrosis by blocking transforming growth factor-beta-activated kinase 1-dependent signaling. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 56(2), 232–239. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.149963>
- Huang, T. T., Kudo, N., Yoshida, M., & Miyamoto, S. (2000). A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3), 1014–1019.
- Indo, H. P., Hawkins, C. L., Nakanishi, I., Matsumoto, K.-I., Matsui, H., Suenaga, S., ... Majima, H. J. (2017). Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Activation of Cellular Signals, Molecules, and Function. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 240, 439–456. [https://doi.org/10.1007/164\\_2016\\_117](https://doi.org/10.1007/164_2016_117)
- Inohara, N., Koseki, T., Lin, J., del Peso, L., Lucas, P. C., Chen, F. F., ... Nunez, G. (2000). An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 27823–27831. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003415200>
- Ishimaru, N., Kishimoto, H., Hayashi, Y., & Sprent, J. (2006). Regulation of naive T cell function by the NF-kappaB2 pathway. *Nature Immunology*, 7(7), 763–772. <https://doi.org/10.1038/ni1351>

- Ivana Scovassi, A., & Diederich, M. (2004). Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells. *Biochemical Pharmacology*, 68(6), 1041–1047. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.04.023>
- Jamaluddin, M., Wang, S., Boldogh, I., Tian, B., & Brasier, A. R. (2007). TNF-alpha-induced NF-kappaB/RelA Ser(276) phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway. *Cellular Signalling*, 19(7), 1419–1433. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.01.020>
- Jann, B., Reske, K., & Jann, K. (1975). Heterogeneity of lipopolysaccharides. Analysis of polysaccharide chain lengths by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *European Journal of Biochemistry*, 60(1), 239–246.
- Janssen-Heininger, Y. M., Macara, I., & Mossman, B. T. (1999). Cooperativity between oxidants and tumor necrosis factor in the activation of nuclear factor (NF)-kappaB: requirement of Ras/mitogen-activated protein kinases in the activation of NF-kappaB by oxidants. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 20(5), 942–952. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.20.5.3452>
- Jaspers, I., Zhang, W., Fraser, A., Samet, J. M., & Reed, W. (2001). Hydrogen peroxide has opposing effects on IKK activity and IkappaBalpha breakdown in airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24(6), 769–777. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.24.6.4344>
- JENSEN, K. (1965). A SIMPLE METHOD FOR PROTEIN ELECTROPHORESIS IN POLYACRYLAMIDE GEL. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 17, 192–194.
- Jeong, C.-W., Yoo, K. Y., Lee, S. H., Jeong, H. J., Lee, C. S., & Kim, S. J. (2012). Curcumin protects against regional myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of RISK/GSK-3beta and inhibition of p38 MAPK and JNK. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 17(4), 387–394. <https://doi.org/10.1177/1074248412438102>
- Jia, Z., Song, Z., Zhao, Y., Wang, X., & Liu, P. (2011). Grape seed proanthocyanidin extract protects human lens epithelial cells from oxidative stress via reducing NF-small ka, CyrillicB and MAPK protein expression. *Molecular Vision*, 17, 210–217.
- Jiang, A.-J., Jiang, G., Li, L.-T., & Zheng, J.-N. (2015). Curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway and caspases activation in human melanoma cells. *Molecular Biology Reports*, 42(1), 267–275. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3769-2>
- Jiang, S.-Y., Zou, Y.-Y., & Wang, J.-T. (2012). p38 mitogen-activated protein kinase-induced nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell activity is required for neuroprotection in retinal ischemia/reperfusion injury. *Molecular Vision*, 18, 2096–2106.
- Jiang, S., Han, J., Li, T., Xin, Z., Ma, Z., Di, W., ... Yang, Y. (2017). Curcumin as a potential protective compound against cardiac diseases. *Pharmacological Research*, 119, 373–383. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.03.001>
- Jijon, H., Allard, B., & Jobin, C. (2004). NF-kappaB inducing kinase activates NF-kappaB transcriptional activity independently of IkappaB kinase gamma through a p38 MAPK-dependent RelA phosphorylation pathway. *Cellular Signalling*, 16(9), 1023–1032. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.02.005>
- Johnson, C., Van Antwerp, D., & Hope, T. J. (1999). An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha. *The EMBO Journal*, 18(23), 6682–6693. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.23.6682>
- Jones, B. E., Lo, C. R., Liu, H., Pradhan, Z., Garcia, L., Srinivasan, A., ... Czaja, M. J. (2000). Role of caspases and NF-kappaB signaling in hydrogen peroxide- and superoxide-induced hepatocyte apoptosis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 278(5), G693–9.
- Jornot, L., Petersen, H., & Junod, A. F. (1997). Modulation of the DNA binding activity of transcription factors CREB, NFkappaB and HSF by H2O2 and TNF alpha. Differences between in vivo and in

- vitro effects. *FEBS Letters*, 416(3), 381–386.
- Jose Corbalan, J., Vatner, D. E., & Vatner, S. F. (2016). Myocardial apoptosis in heart disease: does the emperor have clothes? *Basic Research in Cardiology*, 111(3), 31. <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0549-2>
- Ju, B.-G., Solum, D., Song, E. J., Lee, K.-J., Rose, D. W., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2004). Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase II $\delta$ -dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell*, 119(6), 815–829. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.017>
- Jubin, T., Kadam, A., Jariwala, M., Bhatt, S., Sutariya, S., Gani, A. R., ... Begum, R. (2016). The PARP family: insights into functional aspects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cell growth and survival. *Cell Proliferation*, 49(4), 421–437. <https://doi.org/10.1111/cpr.12268>
- Jurenka, J. S. (2009). Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Alternative Medicine Review : A Journal of Clinical Therapeutic*, 14(2), 141–153.
- Kaltschmidt, B., Heinrich, M., & Kaltschmidt, C. (2002). Stimulus-dependent activation of NF-kappaB specifies apoptosis or neuroprotection in cerebellar granule cells. *Neuromolecular Medicine*, 2(3), 299–309. <https://doi.org/10.1385/NMM:2:3:299>
- Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., Hofmann, T. G., Hehner, S. P., Droge, W., & Schmitz, M. L. (2000). The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *European Journal of Biochemistry*, 267(12), 3828–3835.
- Kamata, H., Manabe, T., Oka, S. ichi, Kamata, K., & Hirata, H. (2002). Hydrogen peroxide activates IkappaB kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. *FEBS Letters*, 519(1–3), 231–237.
- Kang, K. A., Lee, K. H., Zhang, R., Piao, M. J., Kang, M. Y., Kwak, Y. S., ... Hyun, J. W. (2007). Protective effects of *Castanopsis cuspidata* through activation of ERK and NF-kappaB on oxidative cell death induced by hydrogen peroxide. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 70(15–16), 1319–1328. <https://doi.org/10.1080/15287390701429315>
- Karin, M., & Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annual Review of Immunology*, 18, 621–663. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.621>
- Karlsson, A., & Dahlgren, C. (2002). Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 4(1), 49–60. <https://doi.org/10.1089/152308602753625852>
- Karmakar, S., Banik, N. L., Patel, S. J., & Ray, S. K. (2006). Curcumin activated both receptor-mediated and mitochondria-mediated proteolytic pathways for apoptosis in human glioblastoma T98G cells. *Neuroscience Letters*, 407(1), 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.08.013>
- Katagiri, K., Matsuzawa, A., & Ichijo, H. (2010). Regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in redox signaling. *Methods in Enzymology*, 474, 277–288. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)74016-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)74016-7)
- Kauppinen, T. M., Chan, W. Y., Suh, S. W., Wiggins, A. K., Huang, E. J., & Swanson, R. A. (2006). Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(18), 7136–7141. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508606103>
- Kawano, S., Kubota, T., Monden, Y., Kawamura, N., Tsutsui, H., Takeshita, A., & Sunagawa, K. (2005). Blockade of NF-kappaB ameliorates myocardial hypertrophy in response to chronic infusion of angiotensin II. *Cardiovascular Research*, 67(4), 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.04.030>
- Kay, J. G., & Grinstein, S. (2013). Phosphatidylserine-mediated cellular signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 991, 177–193. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6331-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6331-9_10)



- Kayagaki, N., Yan, M., Seshasayee, D., Wang, H., Lee, W., French, D. M., ... Dixit, V. M. (2002). BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2. *Immunity*, 17(4), 515–524.
- Kearns, J. D., Basak, S., Werner, S. L., Huang, C. S., & Hoffmann, A. (2006). IkappaBepsilon provides negative feedback to control NF-kappaB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression. *The Journal of Cell Biology*, 173(5), 659–664. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510155>
- Kefaloyianni, E., Gaitanaki, C., & Beis, I. (2006). ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cellular Signalling*, 18(12), 2238–2251. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.05.004>
- Kelliher, M. A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B. Z., & Leder, P. (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*, 8(3), 297–303.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257.
- Kim, B.-Y., Gaynor, R. B., Song, K., Dritschilo, A., & Jung, M. (2002). Constitutive activation of NF-kappaB in Ki-ras-transformed prostate epithelial cells. *Oncogene*, 21(29), 4490–4497. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205547>
- Kim, E. K., & Choi, E.-J. (2015). Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Archives of Toxicology*, 89(6), 867–882. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1472-2>
- Kim, G.-T., Chun, Y.-S., Park, J.-W., & Kim, M.-S. (2003). Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia-reperfusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(3), 619–624.
- Kim, S., Chin, Y.-W., & Cho, J. (2017). Protection of Cultured Cortical Neurons by Luteolin against Oxidative Damage through Inhibition of Apoptosis and Induction of Heme Oxygenase-1. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 40(3), 256–265. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00579>
- Kim, Y. S., Ahn, Y., Hong, M. H., Joo, S. Y., Kim, K. H., Sohn, I. S., ... Kang, J. C. (2007). Curcumin attenuates inflammatory responses of TNF-alpha-stimulated human endothelial cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 50(1), 41–49. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31805559b9>
- Kimes, B. W., & Brandt, B. L. (1976). Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Experimental Cell Research*, 98(2), 367–381.
- Kocaadam, B., & Şanlıer, N. (2017). Curcumin, an active component of turmeric ( *Curcuma longa* ), and its effects on health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2889–2895. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077195>
- Korn, S. H., Wouters, E. F., Vos, N., & Janssen-Heininger, Y. M. (2001). Cytokine-induced activation of nuclear factor-kappa B is inhibited by hydrogen peroxide through oxidative inactivation of IkappaB kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 35693–35700. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104321200>
- Krajewski, S., Zapata, J. M., & Reed, J. C. (1996). Detection of multiple antigens on western blots. *Analytical Biochemistry*, 236(2), 221–228. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0160>
- Kray, A. E., Carter, R. S., Pennington, K. N., Gomez, R. J., Sanders, L. E., Llanes, J. M., ... Wadzinski, B. E. (2005). Positive regulation of IkappaB kinase signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(43), 35974–35982. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506093200>
- Kubota, T., McTiernan, C. F., Frye, C. S., Slawson, S. E., Lemster, B. H., Koretsky, A. P., ... Feldman, A. M. (1997). Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation Research*, 81(4), 627–635.
- Kucharczak, J., Simmons, M. J., Fan, Y., & Gelinas, C. (2003). To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*, 22(56), 8961–8982. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207230>

- Kumar, G., Mittal, S., Sak, K., & Tuli, H. S. (2016). Molecular mechanisms underlying chemopreventive potential of curcumin: Current challenges and future perspectives. *Life Sciences*, 148, 313–328. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.022>
- Kunnumakkara, A. B., Bordoloi, D., Harsha, C., Banik, K., Gupta, S. C., & Aggarwal, B. B. (2017). Curcumin mediates anticancer effects by modulating multiple cell signaling pathways. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 131(15), 1781–1799. <https://doi.org/10.1042/CS20160935>
- Kurrelmeyer, K. M., Michael, L. H., Baumgarten, G., Taffet, G. E., Peschon, J. J., Sivasubramanian, N., ... Mann, D. L. (2000). Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5456–5461. <https://doi.org/10.1073/pnas.070036297>
- Kyriakis, J. M., & Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological Reviews*, 81(2), 807–869.
- Langelier, M.-F., Servent, K. M., Rogers, E. E., & Pascal, J. M. (2008). A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(7), 4105–4114. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708558200>
- Lassegue, B., San Martin, A., & Griendling, K. K. (2012). Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circulation Research*, 110(10), 1364–1390. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.243972>
- Lautier, D., Lagueux, J., Thibodeau, J., Menard, L., & Poirier, G. G. (1993). Molecular and biochemical features of poly (ADP-ribose) metabolism. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 122(2), 171–193.
- Le Page, C., Sanceau, J., Drapier, J. C., & Wietzerbin, J. (1998). Inhibitors of ADP-ribosylation impair inducible nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF kappa B activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(2), 451–457.
- Lee, K. E., Kim, E. Y., Kim, C. S., Choi, J. S., Bae, E. H., Ma, S. K., ... Kim, S. W. (2013). Macrophage-stimulating protein attenuates hydrogen peroxide-induced apoptosis in human renal HK-2 cells. *European Journal of Pharmacology*, 715(1–3), 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.05.006>
- Lee, P., Sata, M., Lefer, D. J., Factor, S. M., Walsh, K., & Kitsis, R. N. (2003). Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 284(2), H456–63. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00777.2002>
- Lee, S., Lee, M., & Kim, S.-H. (2008). Eupatilin inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptotic cell death through inhibition of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(8), 2865–2870. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.05.026>
- Lee, S. R., Kwon, K. S., Kim, S. R., & Rhee, S. G. (1998). Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(25), 15366–15372.
- Lee, T. H., Shank, J., Cusson, N., & Kelliher, M. A. (2004). The kinase activity of Rip1 is not required for tumor necrosis factor-alpha-induced IkappaB kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of Rip1 by Traf2. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33185–33191. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404206200>
- Lee, Y.-J., Kang, I.-J., Bunker, R., & Kang, Y.-H. (2004). Enhanced survival effect of pyruvate correlates MAPK and NF-kappaB activation in hydrogen peroxide-treated human endothelial cells. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 96(2), 793–801; discussion 792. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00797.2003>
- Lei, H., & Kazlauskas, A. (2009). Growth factors outside of the platelet-derived growth factor (PDGF) family employ reactive oxygen species/Src family kinases to activate PDGF receptor alpha and

- thereby promote proliferation and survival of cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(10), 6329–6336. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808426200>
- Leon-Buitimea, A., Rodriguez-Fragoso, L., Lauer, F. T., Bowles, H., Thompson, T. A., & Burchiel, S. W. (2012). Ethanol-induced oxidative stress is associated with EGF receptor phosphorylation in MCF-10A cells overexpressing CYP2E1. *Toxicology Letters*, 209(2), 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.12.009>
- Li, H., Kobayashi, M., Blonska, M., You, Y., & Lin, X. (2006). Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13636–13643. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600620200>
- Li, Q., & Engelhardt, J. F. (2006). Interleukin-1beta induction of NFkappaB is partially regulated by H2O2-mediated activation of NFkappaB-inducing kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(3), 1495–1505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511153200>
- Li, W., Ma, Z., Ma, J., Li, X., Xu, Q., Duan, W., ... Huo, X. (2015). Hydrogen peroxide mediates hyperglycemia-induced invasive activity via ERK and p38 MAPK in human pancreatic cancer. *Oncotarget*, 6(31), 31119–31133. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5045>
- Li, Y., Ha, T., Gao, X., Kelley, J., Williams, D. L., Browder, I. W., ... Li, C. (2004). NF-kappaB activation is required for the development of cardiac hypertrophy in vivo. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 287(4), H1712-20. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00124.2004>
- Liang, C., Zhang, M., & Sun, S.-C. (2006). beta-TrCP binding and processing of NF-kappaB2/p100 involve its phosphorylation at serines 866 and 870. *Cellular Signalling*, 18(8), 1309–1317. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.10.011>
- Liao, G., & Sun, S.-C. (2003). Regulation of NF-kappaB2/p100 processing by its nuclear shuttling. *Oncogene*, 22(31), 4868–4874. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206761>
- Liao, G., Zhang, M., Harhaj, E. W., & Sun, S.-C. (2004). Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26243–26250. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403286200>
- Lin, B., Williams-Skipp, C., Tao, Y., Schleicher, M. S., Cano, L. L., Duke, R. C., & Scheinman, R. I. (1999). NF-kappaB functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type. *Cell Death and Differentiation*, 6(6), 570–582. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400528>
- Lin, C., & Wu, X. (2016). Curcumin Protects Trabecular Meshwork Cells From Oxidative Stress. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(10), 4327–4332. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19883>
- Lin, X., Sun, T., Cai, M., & Shen, P. (2010). Cell-death-mode switch from necrosis to apoptosis in hydrogen peroxide treated macrophages. *Science China. Life Sciences*, 53(10), 1196–1203. <https://doi.org/10.1007/s11427-010-4075-4>
- Lin, Y., Bai, L., Chen, W., & Xu, S. (2010). The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14(1), 45–55. <https://doi.org/10.1517/14728220903431069>
- Lips, D. J., Bueno, O. F., Wilkins, B. J., Purcell, N. H., Kaiser, R. A., Lorenz, J. N., ... Molkenin, J. D. (2004). MEK1-ERK2 signaling pathway protects myocardium from ischemic injury in vivo. *Circulation*, 109(16), 1938–1941. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000127126.73759.23>
- Liu, J., Mao, W., Ding, B., & Liang, C. (2008). ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 295(5), H1956-65. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00407.2008>
- Liu, J., Yoshida, Y., & Yamashita, U. (2008). DNA-binding activity of NF-??B and phosphorylation of p65 are induced by N-acetylcysteine through phosphatidylinositol (PI) 3-kinase. *Molecular Immunology*, 45(15), 3984–3989. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.06.012>

- Liu, Z.-J., Liu, H.-Q., Xiao, C., Fan, H.-Z., Huang, Q., Liu, Y.-H., & Wang, Y. (2014). Curcumin protects neurons against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma function. *Journal of Neuroscience Research*, 92(11), 1549–1559. <https://doi.org/10.1002/jnr.23438>
- Liu, Z. G., Hsu, H., Goeddel, D. V., & Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, 87(3), 565–576.
- Love, S., Barber, R., & Wilcock, G. K. (1999). Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain : A Journal of Neurology*, 122 ( Pt 2, 247–253.
- Lu, Y., Zhou, J., Xu, C., Lin, H., Xiao, J., Wang, Z., & Yang, B. (2008). JAK/STAT and PI3K/AKT pathways form a mutual transactivation loop and afford resistance to oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 21(4), 305–314. <https://doi.org/10.1159/000129389>
- Madamanchi, N. R., & Runge, M. S. (2001). Western blotting. *Methods in Molecular Medicine*, 51, 245–256. <https://doi.org/10.1385/1-59259-087-X:245>
- Madrid, L. V., Mayo, M. W., Reuther, J. Y., & Baldwin, A. S. J. (2001). Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 18934–18940. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101103200>
- Mandal, M. N. A., Patlolla, J. M. R., Zheng, L., Agbaga, M.-P., Tran, J.-T. A., Wicker, L., ... Anderson, R. E. (2009). Curcumin protects retinal cells from light-and oxidant stress-induced cell death. *Free Radical Biology & Medicine*, 46(5), 672–679. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.006>
- Matsui, T., Li, L., MonteF, del, Fukui, Y., Franke, T. F., Hajjar, R. J., & Rosenzweig, A. (1999). Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation*, 100(23), 2373–2379.
- Matsushima, A., Kaisho, T., Rennert, P. D., Nakano, H., Kurosawa, K., Uchida, D., ... Matsumoto, M. (2001). Essential role of nuclear factor (NF)-kappaB-inducing kinase and inhibitor of kappaB (IkappaB) kinase alpha in NF-kappaB activation through lymphotoxin beta receptor, but not through tumor necrosis factor receptor I. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(5), 631–636.
- Matsuzawa, A., & Ichijo, H. (2001). Molecular mechanisms of the decision between life and death: regulation of apoptosis by apoptosis signal-regulating kinase 1. *Journal of Biochemistry*, 130(1), 1–8.
- Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Takeda, K., & Ichijo, H. (2002). Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice. *Antioxidants & Redox Signaling*, 4(3), 415–425. <https://doi.org/10.1089/15230860260196218>
- Maulik, N., Yoshida, T., & Das, D. K. (1998). Oxidative stress developed during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 24(5), 869–875.
- May, M. J., D'Acquisto, F., Madge, L. A., Glockner, J., Poher, J. S., & Ghosh, S. (2000). Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5484), 1550–1554.
- May, M. J., Marienfeld, R. B., & Ghosh, S. (2002). Characterization of the Ikappa B-kinase NEMO binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 45992–46000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206494200>
- Meldrum, D. R., Meng, X., Dinarello, C. A., Ayala, A., Cain, B. S., Shames, B. D., ... Harken, A. H. (1998). Human myocardial tissue TNFalpha expression following acute global ischemia in vivo. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 30(9), 1683–1689. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0776>

- Menard, C., Pupier, S., Mornet, D., Kitzmann, M., Nargeot, J., & Lory, P. (1999). Modulation of L-type calcium channel expression during retinoic acid-induced differentiation of H9C2 cardiac cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(41), 29063–29070.
- Menon, V. P., & Sudheer, A. R. (2007). Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 595, 105–125. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_3)
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., & Tschopp, J. (2001). NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Molecular and Cellular Biology*, 21(16), 5299–5305. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.16.5299-5305.2001>
- MILLS, G. C. (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *The Journal of Biological Chemistry*, 229(1), 189–197.
- Mishra, S., & Palanivelu, K. (2008). The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer's disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 11(1), 13–19. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.40220>
- Misra, A., Haudek, S. B., Knuefermann, P., Vallejo, J. G., Chen, Z. J., Michael, L. H., ... Mann, D. L. (2003). Nuclear factor-kappaB protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Circulation*, 108(25), 3075–3078. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000108929.93074.0B>
- Monroy, A., Lithgow, G. J., & Alavez, S. (2013). Curcumin and neurodegenerative diseases. *BioFactors (Oxford, England)*, 39(1), 122–132. <https://doi.org/10.1002/biof.1063>
- Moorthy, A. K., Savinova, O. V., Ho, J. Q., Wang, V. Y.-F., Vu, D., & Ghosh, G. (2006). The 20S proteasome processes NF-kappaB1 p105 into p50 in a translation-independent manner. *The EMBO Journal*, 25(9), 1945–1956. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601081>
- Morales, J., Li, L., Fattah, F. J., Dong, Y., Bey, E. A., Patel, M., ... Boothman, D. A. (2014). Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 24(1), 15–28.
- Morgan, M. J., & Liu, Z. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Research*, 21(1), 103–115. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>
- Moslehi, J., Minamishima, Y. A., Shi, J., Neuberg, D., Charytan, D. M., Padera, R. F., ... Kaelin, W. G. J. (2010). Loss of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in cardiomyocytes phenocopies ischemic cardiomyopathy. *Circulation*, 122(10), 1004–1016. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.922427>
- Moss, N. C., Stansfield, W. E., Willis, M. S., Tang, R.-H., & Selzman, C. H. (2007). IKKbeta inhibition attenuates myocardial injury and dysfunction following acute ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(4), H2248–53. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00776.2007>
- Motoyama, M., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K., & Muta, T. (2005). Positive and negative regulation of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by IkappaB-zeta, an inducible nuclear protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7444–7451. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412738200>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical Journal*, 417(1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Mustapha, S., Kirshner, A., De Moissac, D., & Kirshenbaum, L. A. (2000). A direct requirement of nuclear factor-kappa B for suppression of apoptosis in ventricular myocytes. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 279(3), H939–45.
- Mythri, R. B., & Bharath, M. M. S. (2012). Curcumin: a potential neuroprotective agent in Parkinson's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 18(1), 91–99.
- Nakamura, T., Ranek, M. J., Lee, D. I., Shalkey Hahn, V., Kim, C., Eaton, P., & Kass, D. A. (2015).

- Prevention of PKG1 $\alpha$  oxidation augments cardioprotection in the stressed heart. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(6), 2468–2472. <https://doi.org/10.1172/JCI80275>
- Nakayama, H., Chen, X., Baines, C. P., Klevitsky, R., Zhang, X., Zhang, H., ... Molkenstein, J. D. (2007). Ca<sup>2+</sup>- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(9), 2431–2444. <https://doi.org/10.1172/JCI31060>
- Natoli, G. (2012). NF-kappaB and chromatin: ten years on the path from basic mechanisms to candidate drugs. *Immunological Reviews*, 246(1), 183–192. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01103.x>
- Naumann, M., & Scheidereit, C. (1994). Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *The EMBO Journal*, 13(19), 4597–4607.
- Nazam Ansari, M., Bhandari, U., & Pillai, K. K. (2007). Protective role of curcumin in myocardial oxidative damage induced by isoproterenol in rats. *Human & Experimental Toxicology*, 26(12), 933–938. <https://doi.org/10.1177/0960327107085835>
- Neumann, M., Grieshammer, T., Chuvpilo, S., Kneitz, B., Lohoff, M., Schimpl, A., ... Serfling, E. (1995). RelA/p65 is a molecular target for the immunosuppressive action of protein kinase A. *The EMBO Journal*, 14(9), 1991–2004.
- Nijhawan, D., Honarpour, N., & Wang, X. (2000). Apoptosis in neural development and disease. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 73–87. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.73>
- O'Shea, J. M., & Perkins, N. D. (2010). Thr435 phosphorylation regulates RelA (p65) NF-kappaB subunit transactivation. *The Biochemical Journal*, 426(3), 345–354. <https://doi.org/10.1042/BJ20091630>
- Odqvist, L., Sanchez-Beato, M., Montes-Moreno, S., Martin-Sanchez, E., Pajares, R., Sanchez-Verde, L., ... Piris, M. A. (2013). NIK controls classical and alternative NF-kappaB activation and is necessary for the survival of human T-cell lymphoma cells. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 19(9), 2319–2330. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3151>
- Oei, S. L., Griesenbeck, J., Schweiger, M., & Ziegler, M. (1998). Regulation of RNA polymerase II-dependent transcription by poly(ADP-ribosylation) of transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(48), 31644–31647.
- Oliveira-Marques, V., Marinho, H. S., Cyrne, L., & Antunes, F. (2009a). Modulation of NF-kappaB-dependent gene expression by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: a major role for a simple chemical process in a complex biological response. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(9), 2043–2053. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2279>
- Oliveira-Marques, V., Marinho, H. S., Cyrne, L., & Antunes, F. 1. (2009b). Role of Hydrogen Peroxide in NF- $\kappa$ B Activation : From Inducer to Modulator. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(9), 2223–2243. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2601>
- Oliveira-Marques, V., Silva, T., Cunha, F., Covas, G., Marinho, H. S., Antunes, F., & Cyrne, L. (2013). A quantitative study of the cell-type specific modulation of c-Rel by hydrogen peroxide and TNF- $\alpha$ ? *Redox Biology*, 1(1), 347–352. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.05.004>
- Oliver, F. J., Menissier-de Murcia, J., Nacci, C., Decker, P., Andriantsitohaina, R., Muller, S., ... de Murcia, G. (1999). Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *The EMBO Journal*, 18(16), 4446–4454. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.16.4446>
- Opferman, J. T., & Korsmeyer, S. J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature Immunology*, 4(5), 410–415. <https://doi.org/10.1038/ni0503-410>
- Osborne, B. A. (1996). Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Current Opinion in Immunology*, 8(2), 245–254.
- Ozawa, T. (1995). Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1271(1), 177–189.

- Palkowitsch, L., Leidner, J., Ghosh, S., & Marienfeld, R. B. (2008). Phosphorylation of serine 68 in the IkappaB kinase (IKK)-binding domain of NEMO interferes with the structure of the IKK complex and tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappaB activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 76–86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708856200>
- Pan, Y., Zhu, G., Wang, Y., Cai, L., Cai, Y., Hu, J., ... Liang, G. (2013). Attenuation of high-glucose-induced inflammatory response by a novel curcumin derivative B06 contributes to its protection from diabetic pathogenic changes in rat kidney and heart. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(1), 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.012>
- Pantano, C., Shrivastava, P., McElhinney, B., & Janssen-Heininger, Y. (2003). Hydrogen peroxide signaling through tumor necrosis factor receptor 1 leads to selective activation of c-Jun N-terminal kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44091–44096. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308487200>
- Papa, S., Bubici, C., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Kuntzen, C., Knabb, J. R., ... Franzoso, G. (2006). The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death and Differentiation*, 13(5), 712–729. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401865>
- Park, H. S., Jung, H. Y., Park, E. Y., Kim, J., Lee, W. J., & Bae, Y. S. (2004). Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(6), 3589–3593.
- Pasparakis, M., Luedde, T., & Schmidt-Supprian, M. (2006). Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death and Differentiation*, 13(5), 861–872. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401870>
- Peleli, M., Aggeli, I.-K., Matralis, A. N., Kourounakis, A. P., Beis, I., & Gaitanaki, C. (2015). Evaluation of two novel antioxidants with differential effects on curcumin-induced apoptosis in C2 skeletal myoblasts; involvement of JNKs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(3), 390–400. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.12.046>
- Peng, H., Guerau-de-Arellano, M., Mehta, V. B., Yang, Y., Huss, D. J., Papenfuss, T. L., ... Racke, M. K. (2012). Dimethyl fumarate inhibits dendritic cell maturation via nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) and mitogen stress-activated kinase 1 (MSK1) signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 287(33), 28017–28026. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.383380>
- Perkins, N. D. (2006). Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene*, 25(51), 6717–6730. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209937>
- Philip, L., & Shivakumar, K. (2013). cIAP-2 protects cardiac fibroblasts from oxidative damage: an obligate regulatory role for ERK1/2 MAPK and NF-kappaB. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 62, 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.06.009>
- Pimienta, G., & Pascual, J. (2007). Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(21), 2628–2632. <https://doi.org/10.4161/cc.6.21.4930>
- Pineda-Molina, E., Klatt, P., Vazquez, J., Marina, A., Garcia de Lacoba, M., Perez-Sala, D., & Lamas, S. (2001). Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry*, 40(47), 14134–14142.
- Polley, S., Huang, D.-B., Hauenstein, A. V., Fusco, A. J., Zhong, X., Vu, D., ... Huxford, T. (2013). A structural basis for IkappaB kinase 2 activation via oligomerization-dependent trans auto-phosphorylation. *PLoS Biology*, 11(6), e1001581. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001581>
- Poyet, J. L., Srinivasula, S. M., Lin, J. H., Fernandes-Alnemri, T., Yamaoka, S., Tsichlis, P. N., & Alnemri, E. S. (2000). Activation of the Ikappa B kinases by RIP via IKKgamma/NEMO-mediated oligomerization. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(48), 37966–37977. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006643200>
- Prajapati, S., Verma, U., Yamamoto, Y., Kwak, Y. T., & Gaynor, R. B. (2004). Protein phosphatase



- 2Cbeta association with the IkappaB kinase complex is involved in regulating NF-kappaB activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(3), 1739–1746. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306273200>
- Prasad, S., Gupta, S. C., Tyagi, A. K., & Aggarwal, B. B. (2014). Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1053–1064. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.004>
- Purcell, N. H., Tang, G., Yu, C., Mercurio, F., DiDonato, J. A., & Lin, A. (2001). Activation of NF-kappa B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6668–6673. <https://doi.org/10.1073/pnas.111155798>
- Pye, J., Ardeshirpour, F., McCain, A., Bellinger, D. A., Merricks, E., Adams, J., ... Nichols, T. C. (2003). Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 284(3), H919–26. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00851.2002>
- Qiao, L., Yu, J., Dent, P., & Farrell, G. (2005). NF-kappaB protects rat ARL-6 hepatocellular carcinoma cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Cancer Biology & Therapy*, 4(11), 1195–1202.
- Qiao, L., Zhang, H., Yu, J. U. N., Francisco, R., Dent, P., Ebert, M. P. A., ... Farrell, G. (1999). Constitutive Activation of NF- $\kappa$  B in Human Hepatocellular Carcinoma: Evidence of a Cytoprotective Role, 290(March 2006), 280–290.
- Radhakrishnan, S. K., & Kamalakaran, S. (2006). Pro-apoptotic role of NF- $\kappa$ B: Implications for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1766(1), 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.02.001>
- Ravindran, J., Prasad, S., & Aggarwal, B. B. (2009). Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *The AAPS Journal*, 11(3), 495–510. <https://doi.org/10.1208/s12248-009-9128-x>
- Ray, P. D., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Reyes-Gordillo, K., Segovia, J., Shibayama, M., Vergara, P., Moreno, M. G., & Muriel, P. (2007). Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF-kappaB, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770(6), 989–996. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.02.004>
- Ricca, A., Biroccio, A., Trisciuoglio, D., Cippitelli, M., Zupi, G., & Del Bufalo, D. (2001). relA over-expression reduces tumorigenicity and activates apoptosis in human cancer cells. *British Journal of Cancer*, 85(12), 1914–1921. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.2174>
- Rosca, A.-M., Matei, C., Dragan, E., & Burlacu, A. (2012). Cardiomyocyte apoptosis in ischaemia-reperfusion due to the exogenous oxidants at the time of reperfusion. *Cell Biology International*, 36(12), 1207–1215. <https://doi.org/10.1042/CBI20120080>
- Rothwarf, D. M., & Karin, M. (1999). The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 1999(5), RE1. <https://doi.org/10.1126/stke.1999.5.re1>
- Ryan, K. M., Ernst, M. K., Rice, N. R., & Vousden, K. H. (2000). Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature*, 404(6780), 892–897. <https://doi.org/10.1038/35009130>
- Sakurai, H., Suzuki, S., Kawasaki, N., Nakano, H., Okazaki, T., Chino, A., ... Saiki, I. (2003). Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36916–36923. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301598200>
- Salinovich, O., & Montelaro, R. C. (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 156(2), 341–347.

- Santos, C. X. C., Anilkumar, N., Zhang, M., Brewer, A. C., & Shah, A. M. (2011). Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 50(7), 777–793. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.003>
- Sardao, V. A., Oliveira, P. J., Holy, J., Oliveira, C. R., & Wallace, K. B. (2007). Vital imaging of H9c2 myoblasts exposed to tert-butylhydroperoxide--characterization of morphological features of cell death. *BMC Cell Biology*, 8, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-8-11>
- Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(11), 1191–1212.
- Schoonbroodt, S., & Piette, J. (2000). Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. *Biochemical Pharmacology*, 60(8), 1075–1083.
- Schreck, R., Meier, B., Mannel, D. N., Droge, W., & Baeuerle, P. A. (1992). Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 175(5), 1181–1194.
- Schreck, R., Rieber, P., & Baeuerle, P. A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *The EMBO Journal*, 10(8), 2247–2258.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C., & de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(7), 517–528. <https://doi.org/10.1038/nrm1963>
- Schutze, S., Tchikov, V., & Schneider-Brachert, W. (2008). Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(8), 655–662. <https://doi.org/10.1038/nrm2430>
- Sen, R., & Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 46(5), 705–716.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., ... Karin, M. (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5534), 1495–1499. <https://doi.org/10.1126/science.1062677>
- Sfikas, A., Batsi, C., Tselikou, E., Vartholomatos, G., Monokrousos, N., Pappas, P., ... Kolettas, E. (2012). The canonical NF-kappaB pathway differentially protects normal and human tumor cells from ROS-induced DNA damage. *Cellular Signalling*, 24(11), 2007–2023. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.06.010>
- Shah, A. M., & Mann, D. L. (2011). In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science. *Lancet (London, England)*, 378(9792), 704–712. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60894-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60894-5)
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation*, 22(4), 526–539. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>
- Shanmugam, M. K., Rane, G., Kanchi, M. M., Arfuso, F., Chinnathambi, A., Zayed, M. E., ... Sethi, G. (2015). The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(2), 2728–2769. <https://doi.org/10.3390/molecules20022728>
- Shehzad, A., Khan, S., Shehzad, O., & Lee, Y. S. (2010). Curcumin therapeutic promises and bioavailability in colorectal cancer. *Drugs of Today (Barcelona, Spain : 1998)*, 46(7), 523–532. <https://doi.org/10.1358/dot.2010.46.7.1509560>
- Shiizaki, S., Naguro, I., & Ichijo, H. (2013). Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling. *Advances in Biological Regulation*, 53(1), 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2012.09.006>
- Shin, H. K., Kim, J., Lee, E. J., & Kim, S. H. (2010). Inhibitory effect of curcumin on motility of human oral squamous carcinoma YD-10B cells via suppression of ERK and NF-kappaB activations. *Phytotherapy Research : PTR*, 24(4), 577–582. <https://doi.org/10.1002/ptr.2989>

- Siddiqui, W. A., Ahad, A., & Ahsan, H. (2015). The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of Toxicology*, 89(3), 289–317. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1448-7>
- Simbulan-Rosenthal, C. M., Rosenthal, D. S., Luo, R. B., Samara, R., Jung, M., Dritschilo, A., ... Smulson, M. E. (2001). Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 in vitro and in vivo modulates binding to its DNA consensus sequence. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 3(3), 179–188. <https://doi.org/10.1038/sj/neo/7900155>
- Sinha, K., Das, J., Pal, P. B., & Sil, P. C. (2013). Oxidative stress: The mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology*, 87(7), 1157–1180. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1034-4>
- Sivakumar, A. S., Ochirbat, C., Cho, S.-H., Yang, J., & Hwang, I. (2014). Antiapoptotic effect of a novel synthetic peptide from bovine muscle and MPG peptide on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced C2C12 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 50(7), 630–639. <https://doi.org/10.1007/s11626-014-9745-2>
- Skemieniė, K., Jablonskienė, G., Liobikas, J., & Borutaite, V. (2013). Protecting the heart against ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis: the effect of anthocyanins. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 49(2), 84–88.
- Sobotta, M. C., Liou, W., Stocker, S., Talwar, D., Oehler, M., Ruppert, T., ... Dick, T. P. (2015). Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling. *Nature Chemical Biology*, 11(1), 64–70. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1695>
- Soetikno, V., Sari, F. R., Sukumaran, V., Lakshmanan, A. P., Mito, S., Harima, M., ... Watanabe, K. (2012). Curcumin prevents diabetic cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetic rats: possible involvement of PKC-MAPK signaling pathway. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 47(3), 604–614. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.04.018>
- Solan, N. J., Miyoshi, H., Carmona, E. M., Bren, G. D., & Paya, C. V. (2002). RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(2), 1405–1418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109619200>
- Soldani, C., & Scovassi, A. I. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, 7(4), 321–328.
- Solt, L. A., Madge, L. A., Orange, J. S., & May, M. J. (2007). Interleukin-1-induced NF-kappaB activation is NEMO-dependent but does not require IKKbeta. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8724–8733. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609613200>
- Sompamit, K., Kukongviriyapan, U., Nakmareong, S., Pannangpetch, P., & Kukongviriyapan, V. (2009). Curcumin improves vascular function and alleviates oxidative stress in non-lethal lipopolysaccharide-induced endotoxaemia in mice. *European Journal of Pharmacology*, 616(1–3), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.014>
- Song, C., Mitter, S. K., Qi, X., Beli, E., Rao, H. V., Ding, J., ... Boulton, M. E. (2017). Oxidative stress-mediated NFkappaB phosphorylation upregulates p62/SQSTM1 and promotes retinal pigmented epithelial cell survival through increased autophagy. *PloS One*, 12(2), e0171940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171940>
- Song, J., Li, J., Qiao, J., Jain, S., Mark Evers, B., & Chung, D. H. (2009). PKD prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via NF-kappaB and p38 MAPK in RIE-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378(3), 610–614. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.106>
- Song, Y., Ge, W., Cai, H., & Zhang, H. (2013). Curcumin protects mice from coxsackievirus B3-induced myocarditis by inhibiting the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt/nuclear factor-kappaB pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 18(6), 560–569. <https://doi.org/10.1177/1074248413503044>
- Sosna, J., Voigt, S., Mathieu, S., Lange, A., Thon, L., Davarnia, P., ... Adam, D. (2014). TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell

- death. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 71(2), 331–348. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1381-6>
- Staal, F. J., Roederer, M., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. (1990). Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(24), 9943–9947.
- Stanley, B. A., Sivakumaran, V., Shi, S., McDonald, I., Lloyd, D., Watson, W. H., ... Paolucci, N. (2011). Thioredoxin reductase-2 is essential for keeping low levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission from isolated heart mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(38), 33669–33677. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.284612>
- Strassheim, D., Asehnoune, K., Park, J.-S., Kim, J.-Y., He, Q., Richter, D., ... Abraham, E. (2004). Modulation of bone marrow-derived neutrophil signaling by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: disparate effects on kinases, NF-kappaB, and cytokine expression. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 286(3), C683-92. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00296.2003>
- Sukcharoen, N., Ngeamjirawat, J., Chanprasit, Y., & Aribarg, A. (1994). A comparison of Makler counting chamber and improved Neubauer hemocytometer in sperm concentration measurement. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet Thangphaet*, 77(9), 471–476.
- Sun, S.-C. (2011). Non-canonical NF-κB signaling pathway. *Cell Research*, 21(1), 71–85. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.177>
- Sun, S. C., Ganchi, P. A., Ballard, D. W., & Greene, W. C. (1993). NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5103), 1912–1915.
- Sun, Y., Hu, X., Hu, G., Xu, C., & Jiang, H. (2015). Curcumin Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Premature Senescence via the Activation of SIRT1 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 38(8), 1134–1141. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00012>
- Supinski, G. S., Murphy, M. P., & Callahan, L. A. (2009). MitoQ administration prevents endotoxin-induced cardiac dysfunction. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 297(4), R1095-102. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90902.2008>
- Suyang, H., Phillips, R., Douglas, I., & Ghosh, S. (1996). Role of unphosphorylated, newly synthesized I kappa B beta in persistent activation of NF-kappa B. *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), 5444–5449.
- Takada, Y., Mukhopadhyay, A., Kundu, G. C., Mahabeshwar, G. H., Singh, S., & Aggarwal, B. B. (2003). Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 24233–24241. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212389200>
- Tang, X., Yao, K., Zhang, L., Yang, Y., & Yao, H. (2011). Honokiol inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in human lens epithelial cells via inhibition of the mitogen-activated protein kinase and Akt pathways. *European Journal of Pharmacology*, 650(1), 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.076>
- Tarabin, V., & Schwaninger, M. (2004). The role of NF-kappaB in 6-hydroxydopamine- and TNFalpha-induced apoptosis of PC12 cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 369(6), 563–569. <https://doi.org/10.1007/s00210-004-0938-1>
- Tegenge, M. A., Rajbhandari, L., Shrestha, S., Mithal, A., Hosmane, S., & Venkatesan, A. (2014). Curcumin protects axons from degeneration in the setting of local neuroinflammation. *Experimental Neurology*, 253, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.12.016>
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-28.
- Toth, A., Jeffers, J. R., Nickson, P., Min, J.-Y., Morgan, J. P., Zambetti, G. P., & Erhardt, P. (2006). Targeted deletion of Puma attenuates cardiomyocyte death and improves cardiac function during

- ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 291(1), H52-60. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01046.2005>
- Toth, C. R., Hostutler, R. F., Baldwin, A. S. J., & Bender, T. P. (1995). Members of the nuclear factor kappa B family transactivate the murine c-myc gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(13), 7661–7671.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354.
- Uguz, A. C., Oz, A., & Naziroglu, M. (2016). Curcumin inhibits apoptosis by regulating intracellular calcium release, reactive oxygen species and mitochondrial depolarization levels in SH-SY5Y neuronal cells. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 36(4), 395–401. <https://doi.org/10.3109/10799893.2015.1108337>
- Ullrich, O., Diestel, A., Eyupoglu, I. Y., & Nitsch, R. (2001). Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Nature Cell Biology*, 3(12), 1035–1042. <https://doi.org/10.1038/ncb1201-1035>
- Ulm, S., Liu, W., Zi, M., Tsui, H., Chowdhury, S. K., Endo, S., ... Wang, X. (2014). Targeted deletion of ERK2 in cardiomyocytes attenuates hypertrophic response but provokes pathological stress induced cardiac dysfunction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 72, 104–116. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.03.002>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Vallianou, N. G., Evangelopoulos, A., Schizas, N., & Kazazis, C. (2015). Potential anticancer properties and mechanisms of action of curcumin. *Anticancer Research*, 35(2), 645–651.
- van der Heiden, K., Cuhlmann, S., Luong, L. A., Zakkar, M., & Evans, P. C. (2010). Role of nuclear factor κB in cardiovascular health and disease. *Clinical Science*, 118(10), 593–605. <https://doi.org/10.1042/CS20090557>
- Varfolomeev, E., Blankenship, J. W., Wayson, S. M., Fedorova, A. V, Kayagaki, N., Garg, P., ... Vucic, D. (2007). IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell*, 131(4), 669–681. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.030>
- Verstrepen, L., Bekaert, T., Chau, T.-L., Tavernier, J., Chariot, A., & Beyaert, R. (2008). TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 65(19), 2964–2978. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8064-8>
- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A. (2015). Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews. Immunology*, 15(6), 388–400. <https://doi.org/10.1038/nri3839>
- Vyas, V. K., Chintla, C., & Pandya, M. R. (2013). Biology and medicinal chemistry approaches towards various apoptosis inducers. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13(3), 433–455.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V, & Baldwin, A. S. J. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5383), 1680–1683.
- Wang, S., Kotamraju, S., Konorev, E., Kalivendi, S., Joseph, J., & Kalyanaraman, B. (2002). Activation of nuclear factor-kappaB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide. *The Biochemical Journal*, 367(Pt 3), 729–740. <https://doi.org/10.1042/BJ20020752>
- Watkins, S. J., Borthwick, G. M., & Arthur, H. M. (2011). The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 47(2), 125–131. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9368-1>

- Wencker, D., Chandra, M., Nguyen, K., Miao, W., Garantziotis, S., Factor, S. M., ... Kitsis, R. N. (2003). A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(10), 1497–1504. <https://doi.org/10.1172/JCI17664>
- Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., ... Dixit, V. M. (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, 430(7000), 694–699. <https://doi.org/10.1038/nature02794>
- Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., & Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(1), 32–40.
- Woodhouse, B. C., Dianova, I. I., Parsons, J. L., & Dianov, G. L. (2008). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates DNA repair capacity and prevents formation of DNA double strand breaks. *DNA Repair*, 7(6), 932–940. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.03.017>
- Worth, A., Thrasher, A. J., & Gaspar, H. B. (2006). Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *British Journal of Haematology*, 133(2), 124–140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.05993.x>
- Wu, W.-C., Hu, D.-N., Gao, H.-X., Chen, M., Wang, D., Rosen, R., & McCormick, S. A. (2010). Subtoxic levels hydrogen peroxide-induced production of interleukin-6 by retinal pigment epithelial cells. *Molecular Vision*, 16, 1864–1873.
- Xiao, F.-Y., Nheu, L., Komesaroff, P., & Ling, S. (2015). Testosterone protects cardiac myocytes from superoxide injury via NF-kappaB signalling pathways. *Life Sciences*, 133, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.05.009>
- Xiao, G., Fong, A., & Sun, S.-C. (2004). Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30099–30105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401428200>
- Xu, X., & Colecraft, H. M. (2009). Primary culture of adult rat heart myocytes. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (28). <https://doi.org/10.3791/1308>
- Yamaguchi, O., Higuchi, Y., Hirotani, S., Kashiwase, K., Nakayama, H., Hikoso, S., ... Otsu, K. (2003). Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15883–15888. <https://doi.org/10.1073/pnas.2136717100>
- Yamaguchi, O., Watanabe, T., Nishida, K., Kashiwase, K., Higuchi, Y., Takeda, T., ... Otsu, K. (2004). Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(7), 937–943. <https://doi.org/10.1172/JCI20317>
- Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., ... Akira, S. (2004). Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta. *Nature*, 430(6996), 218–222. <https://doi.org/10.1038/nature02738>
- Yang, X., Jiang, H., & Shi, Y. (2017). Upregulation of heme oxygenase-1 expression by curcumin conferring protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts. *Cell & Bioscience*, 7, 20. <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0146-6>
- Yang, Y., Duan, W., Lin, Y., Yi, W., Liang, Z., Yan, J., ... Jin, Z. (2013). SIRT1 activation by curcumin pretreatment attenuates mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia reperfusion injury. *Free Radical Biology & Medicine*, 65, 667–679. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.007>
- Yin, Q., Lamothe, B., Darnay, B. G., & Wu, H. (2009). Structural basis for the lack of E2 interaction in the RING domain of TRAF2. *Biochemistry*, 48(44), 10558–10567. <https://doi.org/10.1021/bi901462e>
- Yokota, T., & Wang, Y. (2016). p38 MAP kinases in the heart. *Gene*, 575(2 Pt 2), 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.030>
- Yokoyama, W. M., Thompson, M. L., & Ehrhardt, R. O. (2012). Cryopreservation and thawing of cells.

- Yu, S.-W., Andrabi, S. A., Wang, H., Kim, N. S., Poirier, G. G., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2006). Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48), 18314–18319. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606528103>
- Yue, T. L., Wang, C., Gu, J. L., Ma, X. L., Kumar, S., Lee, J. C., ... Ohlstein, E. H. (2000). Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circulation Research*, 86(6), 692–699.
- Yue, Y.-K., Mo, B., Zhao, J., Yu, Y.-J., Liu, L., Yue, C.-L., & Liu, W. (2014). Neuroprotective effect of curcumin against oxidative damage in BV-2 microglia and high intraocular pressure animal model. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics : The Official Journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 30(8), 657–664. <https://doi.org/10.1089/jop.2014.0022>
- Zarnegar, B. J., Wang, Y., Mahoney, D. J., Dempsey, P. W., Herman, H., He, J., ... Cheng, G. (2009). NIH Public Access, 9(12), 1371–1378. <https://doi.org/10.1038/ni.1676>.Activation
- Zelarayan, L., Renger, A., Noack, C., Zafiriou, M.-P., Gehrke, C., van der Nagel, R., ... Bergmann, M. W. (2009). NF-kappaB activation is required for adaptive cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 84(3), 416–424. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp237>
- Zeng, C., Zhong, P., Zhao, Y., Kanchana, K., Zhang, Y., Khan, Z. A., ... Liang, G. (2015). Curcumin protects hearts from FFA-induced injury by activating Nrf2 and inactivating NF-kappaB both in vitro and in vivo. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 79, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.10.002>
- Zhang, H., Rosenberg, S., Coffey, F. J., He, Y.-W., Manser, T., Hardy, R. R., & Zhang, J. (2009). A role for cFLIP in B cell proliferation and stress MAPK regulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(1), 207–215.
- Zhang, J., Ping, P., Vondriska, T. M., Tang, X.-L., Wang, G.-W., Cardwell, E. M., & Bolli, R. (2003). Cardioprotection involves activation of NF-kappa B via PKC-dependent tyrosine and serine phosphorylation of I kappa B-alpha. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 285(4), H1753-8. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00416.2003>
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 4350965. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
- Zhang, M., Guo, R.-X., Mo, L.-Q., Liao, X.-X., Li, W., Zhi, J.-L., ... Chen, P.-X. (2009). Nuclear factor-kappaB mediates cytoprotection of hydrogen peroxide preconditioning against apoptosis induced by oxidative stress in PC12 cells. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 36(3), 304–311. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05066.x>
- Zhang, Q., Huang, W.-D., Lv, X.-Y., & Yang, Y.-M. (2011). Ghrelin protects H9c2 cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis through NF-kappaB and mitochondria-mediated signaling. *European Journal of Pharmacology*, 654(2), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.12.011>
- Zhang, S. Q., Kovalenko, A., Cantarella, G., & Wallach, D. (2000). Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity*, 12(3), 301–311.
- Zheng, L., Bidere, N., Staudt, D., Cubre, A., Orenstein, J., Chan, F. K., & Lenardo, M. (2006). Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1. *Molecular and Cellular Biology*, 26(9), 3505–3513. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.9.3505-3513.2006>
- Zhong, H., Voll, R. E., & Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Molecular Cell*, 1(5), 661–671.



- Zhou, Y., Wang, Q., Evers, B. M., & Chung, D. H. (2005). Signal transduction pathways involved in oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis. *Pediatric Research*, 58(6), 1192–1197. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000185133.65966.4e>
- Zhu, F.-B., Wang, J.-Y., Zhang, Y.-L., Hu, Y.-G., Yue, Z.-S., Zeng, L.-R., ... Quan, R.-F. (2016). Mechanisms underlying the antiapoptotic and anti-inflammatory effects of monotropein in hydrogen peroxide-treated osteoblasts. *Molecular Medicine Reports*, 14(6), 5377–5384. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5908>
- Zhu, G.-H., Dai, H.-P., Shen, Q., Ji, O., Zhang, Q., & Zhai, Y.-L. (2016). Curcumin induces apoptosis and suppresses invasion through MAPK and MMP signaling in human monocytic leukemia SHI-1 cells. *Pharmaceutical Biology*, 54(8), 1303–1311. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1060508>
- Zhu, W., Zou, Y., Aikawa, R., Harada, K., Kudoh, S., Uozumi, H., ... Komuro, I. (1999). MAPK superfamily plays an important role in daunomycin-induced apoptosis of cardiac myocytes. *Circulation*, 100(20), 2100–2107.
- Zikaki, K., Aggeli, I.-K., Gaitanaki, C., & Beis, I. (2014). Curcumin induces the apoptotic intrinsic pathway via upregulation of reactive oxygen species and JNKs in H9c2 cardiac myoblasts. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 19(6), 958–974. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-0979-y>
- Zmijewski, J. W., Zhao, X., Xu, Z., & Abraham, E. (2007). Exposure to hydrogen peroxide diminishes NF-kappaB activation, IkappaB-alpha degradation, and proteasome activity in neutrophils. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 293(1), C255–66. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00618.2006>
- Zor, T., & Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry*, 236(2), 302–308. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0171>