



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Μελέτη της έκκρισης της λιπάσης των
μονοακυλογλυκερολών και της αμιδοϋδρολάσης των
λιπαρών οξέων από το πρωτόζωο *Tetrahymena***

**ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΣΤΑΜΟΓΙΑΝΝΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2012

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη της έκκρισης της λιπάσης των μονοακυλογλυκερολών και της αμιδοϋδρολάσης των λιπαρών οξέων από το πρωτόζωο *Tetrahymena*

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΣΤΑΜΟΓΙΑΝΝΟΣ

A.M.: 61022

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Αθανασία Σιαφάκα, Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Αθανασία Σιαφάκα
Καθηγήτρια
Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Μαίρη Μαυρή-Βαβαγιάννη
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Ντία Γαλανοπούλου
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 25/10/2012

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκκριση των κυρίων καταβολικών ενζύμων του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος, της αμιδοϋδρολάσης των λιπαρών οξέων (FAAH) και της λιπάσης των μονοακυλογλυκερολών (MAGL) στο πρωτόζωο *Tetrahymena thermophila*. Η *Tetrahymena* έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως οργανισμός-μοντέλο της έκκρισης και διαθέτει δύο καλά χαρακτηρισμένες πορείες: την ιδιοσυστατική έκκριση λυσοσωματικών ενζύμων και ρυθμιζόμενη εξωκύτωση βλεννοκυστών. Αρχικά, μελετήθηκε η έκκριση των ενζύμων σε μέσο ασιτίας με χρήση ως υποστρώματος της [³H]2-ελαϋλογλυκερόλης ([³H]2-OG) και παρουσία ή απουσία του ειδικού αναστολέα της FAAH AM374. Διαπιστώθηκε η έκκριση και των δύο ενζύμων σε μέσο ασιτίας, της οποίας η έκταση εξαρτάται από το χρόνο παραμονής στο μέσο και βρέθηκε ότι η μέγιστη έκκριση ~5% παρατηρείται μετά από 4 ώρες επώασης και μειώνεται γρήγορα στη συνέχεια. Η έκκριση αυτή οφείλεται σε λυσοσωματικές και μη λυσοσωματικές πηγές, όπου στην περίπτωση της FAAH η μη λυσοσωματική πηγή έκκρισης δείχνει μία εξειδίκευση προς αυτή. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η έκκριση των δύο ενζύμων από τις βλεννοκύστες της *Tetrahymena*, ύστερα από διέγερση της εξωκύτωσης τους με διβουκαΐνη. Στη βλέννα που απομονώθηκε ανιχνεύτηκαν δραστικότητατες MAGL και FAAH, με χρήση ως υποστρώματος [³H]2-OG και παρουσία ή απουσία του αναστολέα AM374, ή του ειδικού αναστολέα της MAGL JZL184. Μάλιστα, στη περίπτωση της MAGL η δραστικότητα της βλέννας ήταν παρόμοια με αυτή του ομογενοποιημένου των κυττάρων. Η FAAH βρέθηκε εμπλουτισμένη στο υπερκείμενο της έκκρισης, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη ενός εξειδικευμένου μη λυσοσωματικού μηχανισμού συνεχούς έκκρισης. Η χρήση της ανοσοαποτύπωσης με αντίσωμα έναντι MAGL αποκάλυψε την ύπαρξη μίας ανοσοδραστικής πρωτεΐνης στα ~45 kDa στο κλάσμα της βλέννας, καθώς και στο υπερκείμενο και το ομογενοποίημα. Τέλος, η συνεστιακή μικροσκοπία ανοσοφθορισμού έδειξε τον περικυτταρικό εντοπισμό της MAGL, συμβάλλοντας στις ενδείξεις για παρουσία της στις βλεννοκύστες.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: ενδοκανναβινοειδές σύστημα

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: MAGL, FAAH, *Tetrahymena*, έκκριση λυσοσωμάτων, έκκριση βλεννοκυστών

ABSTRACT

In the present study, the secretion of the two main degradative enzymes of the endocannabinoid system, the fatty acid amide hydrolase (FAAH) and the monoacylglycerol lipase (MAGL), in the protozoan *Tetrahymena thermophila* was investigated. *Tetrahymena* has been regularly used as a model organism for the study of secretion and has two well characterized routes of secretion: the constitutive secretion of lysosomal enzymes and the regulated secretion of mucocysts. At first, the secretion of both enzymes in starvation medium was investigated, using [³H]2-oleoylglycerol (2-OG) as substrate and in the presence or absence of FAAH specific inhibitor AM374. Both enzymes were secreted in the starvation medium, in a time dependent manner. The maximum secretion was ~5 % after 4 hours of incubation and steadily declined afterwards. The secretion of these enzymes is a combined result of two different sources of constitutive secretion: a lysosomal and a non-lysosomal pathway and, in the case of FAAH, the non-lysosomal pathway seems to have a specificity for it. Subsequently, stimulation of secretion with dibucaine leads to exocytosis of the mucocysts of *Tetrahymena*. In the isolated mucus the activity of MAGL and FAAH was determined, using [³H]2-OG as a substrate in the presence of AM374 or MAGL specific inhibitor JZL184. In the case of MAGL, the activity measured was equivalent with that of the cell homogenate. Supernatant was enriched in FAAH activity, confirming our results about the existence of a non-lysosomal specific secretion pathway for this enzyme. Immunoblot analysis using anti-MAGL antibody revealed the presence of an immunoreactive protein at ~45kDa in the mucus fraction, the supernatant and homogenate. Finally, confocal fluorescence microscopy showed the pericellular localization of MAGL, around the plasma membrane, suggesting its existence in the mucocysts.

SUBJECT AREA: endocannabinoid system

KEYWORDS: MAGL, FAAH, *Tetrahymena*, lysosomal secretion, mucocyst secretion

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	15
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: <i>Tetrahymena</i>	17
1.1. Εισαγωγή	17
1.2. Μορφολογία και φυσιολογία	21
1.3. Γενετικά χαρακτηριστικά της <i>Tetrahymena</i>	29
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Έκκριση	32
2.1. Η ενδοκυτταρική κυκλοφορία κυστιδίων στα ευκαρυωτικά	32
2.2. Τα λυσοσώματα και η εμπλοκή τους με το εκκριτικό μονοπάτι	34
2.3. Το εκκριτικό μονοπάτι και η έκκριση πρωτεϊνών	36
2.4. Πορείες έκκρισης στην <i>Tetrahymena</i>	38
2.4.1. Ιδιοσυστατική έκκριση λυσοσωματικών ενζύμων	38
2.4.2. Ρυθμιζόμενη έκκριση βλεννοκυστών	41
2.4.3. Άλλες μορφές έκκρισης στη <i>Tetrahymena</i>	45
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα	47
3.1. Εισαγωγή	47
3.2. Τα ενδοκανναβινοειδή	48
3.3. Οι υποδοχείς στόχοι των ενδοκανναβινοειδών	50
3.3.1. Οι κανναβινοειδείς υποδοχείς	50
3.3.2. Ο βανιλοειδής υποδοχέας TRPV1	51
3.3.3. Ο υποδοχέας GRP55	52
3.3.4. Οι πυρηνικοί υποδοχείς PPAR	52
3.4. Βιοσύνθεση των ενδοκανναβινοειδών	52
3.4.1. Βιοσύνθεση του ανανταμιδίου και άλλων N-ακυλοαιθανολαμινών	52
3.4.2. Βιοσύνθεση της 2-AG και άλλων μονοακυλογλυκερολών	54
3.5. Πρόσληψη και μεταφορά ενδοκανναβινοειδών	56
3.6. Καταβολισμός ενδοκανναβινοειδών	57
3.6.1. Αμιδοϋδρολάση των λιπαρών οξέων (FAAH)	57
3.6.2. Άλλα αποικοδομητικά ένζυμα του ανανταμιδίου	62
3.6.3. Λιπάση των μονοακυλογλυκερολών (MAGL)	63
3.6.4. Άλλα αποικοδομητικά ένζυμα της 2-αραχιδονυλογλυκερόλης	67
3.7. Μεταγωγή σήματος στον εγκέφαλο μέσω CB1 υποδοχέων	68
3.8. Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα στην <i>Tetrahymena</i>	69

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Σκοπός της εργασίας	72
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Μέθοδοι-υλικά	73
5.1. Καλλιέργεια <i>Tetrahymena</i>	73
5.2. Η έκκριση των ενζύμων όξινη φωσφατάση, MAGL και FAAH σε ανόργανο μέσο από κύτταρα <i>T. thermophila</i> σε διάφορους χρόνους	75
5.3. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry	76
5.4. Προσδιορισμός δραστηριότητας όξινης φωσφατάσης	78
5.5. Προσδιορισμός δραστηριότητας MAGL και FAAH	79
5.6. Μέτρηση της ραδιενέργειας	83
5.7. Απομόνωση εκκρινόμενων συστατικών των βλεννοκυστών της <i>Tetrahymena</i>	84
5.8. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford	87
5.9. Μελέτη της επίδρασης της διβουκαΐνης στο μεταβολισμό της 2-OG	89
5.10. Μελέτη της επίδρασης του JZL184 στο μεταβολισμό της 2-OG	90
5.11. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS-PAGE)	91
5.12. Ανοσοαποτύπωση (Western blot)	97
5.13. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	99
5.14. Συνεστιακή μικροσκοπία ανοσοφθορισμού	100
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Αποτελέσματα	103
6.1. Έκκριση MAGL και FAAH σε μέσο ασιτίας κυττάρων <i>Tetrahymena</i> <i>thermophila</i>	103
6.1.1. Έκκριση της όξινης φωσφατάσης σε μέσο ασιτίας κυττάρων <i>T.</i> <i>thermophila</i>	104
6.1.2. Έκκριση MAGL και FAAH σε μέσο ασιτίας κυττάρων <i>T.</i> <i>thermophila</i> . Επίδραση του χρόνου.	106
6.2. Η έκκριση της MAGL και FAAH από τις βλεννοκύστες της <i>Tetrahymena thermophila</i>	111
6.2.1. Παρεμπόδιση του Hesper στη μέθοδο Lowry	114
6.2.2. Επίδραση διβουκαΐνης στο μεταβολισμό της 2-OG σε καλλιέργειες κυττάρων <i>T. thermophila</i>	114
6.2.3. Η έκκριση της όξινης φωσφατάσης κατά την επίδραση με διβουκαΐνη σε κύτταρα <i>T. Thermophila</i>	116

6.2.4. Η έκκριση της MAGL και FAAH κατά την επίδραση με διβουκαΐνη σε κύτταρα <i>T. thermophila</i>	118
6.2.5. Έλεγχος καθαρότητας της μεσόφασης που προκύπτει από διέγερση έκκρισης βλεννοκυστών	124
6.2.6. Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα της MAGL JZL184 στο μεταβολισμό της 2-OG σε κλάσματα καλλιιεργειών <i>T. thermophila</i> που παραλήφθηκαν μετά από διέγερση με διβουκαΐνη	129
6.2.7. Ταυτοποίηση FAAH και MAGL στα κλάσματα που παραλήφθηκαν με επίδραση διβουκαΐνης με χρήση αντισωμάτων	133
6.3. Υποκυτταρικός εντοπισμός της MAGL με χρήση μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού	135
6.3.1. Έλεγχος της μεθόδου	136
6.3.2. Ανίχνευση της MAGL	137
7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Συζήτηση-συμπεράσματα	140
Συντμήσεις	148
Βιβλιογραφία	150

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα	Τίτλος	Σελίδα
1.1	Συστηματική κατάταξη της <i>Tetrahymena</i> και η θέση της σε φυλογενετικό δέντρο σε σχέση με άλλους οργανισμούς	18
1.2	Φωτογραφία <i>Tetrahymena</i>	21
1.3	Σχηματική αναπαράσταση της <i>Tetrahymena</i>	22
1.4	Πορεία σχηματισμού τροφικών κενοτοπίων στη <i>Tetrahymena</i>	23
1.5	Το συσταλλτό κενοτόπιο και ο μηχανισμός λειτουργίας του	24
1.6	Εγκάρσια τομή του κυτταρικού φλοιού της <i>Tetrahymena</i>	25
1.7	Δομικά στοιχεία της βλεφαρίδας της <i>Tetrahymena</i>	27
1.8	Αμφιγονικός πολλαπλασιασμός της <i>Tetrahymena</i>	31
2.1	Διάγραμμα επικοινωνίας διαμερισμάτων που συμμετέχουν στην κυκλοφορία κυστιδίων	33
2.2	Τρία μονοπάτια αποικοδόμησης στα λυσοσώματα	35
2.3	Τα μονοπάτια συνεχούς και ρυθμιζόμενης έκκρισης	36
2.4	Σχηματική αναπαράσταση πορείας λυσοσωμάτων στη <i>Tetrahymena</i>	40
2.5	Αγκυροβολημένα εκκριτικά κοκκία στη <i>T. thermophila</i>	42
2.6	Τομές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας από αγκυροβολημένα εκκριτικά κοκκία	43
3.1	Δομή της Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλης	47
3.2	Δομή των ενδοκανναβινοειδών υποδοχέων	51
3.3	Οι βιοσυνθετικοί δρόμοι των NAEs	53
3.4	Οι βιοσυνθετικοί δρόμοι της 2-AG	55
3.5	Πιθανοί δρόμοι μεταφοράς 2-AG	56
3.6	Υδρόλυση ανανταμιδίου από τη FAAH	57
3.7	Δομικά χαρακτηριστικά της FAAH	58
3.8	Προτεινόμενος μηχανισμός υδρόλυσης αμιδίων από τη FAAH	60
3.9	Δομές ορισμένων αναστολέων της FAAH	61
3.10	Υδρόλυση της 2-AG από τη MAGL και άλλες υδρολάσες	63
3.11	Γενική δομή της hMAGL	64
3.12	Μηχανισμός αντίδρασης της καταλυτικής Ser και της 2-AG	66

3.13	Δομές των κυριότερων αναστολέων της MAGL	67
3.13	Διάγραμμα ανάδρομης σηματοδότησης ενδοκανναβινοειδών	69
5.1	Πορεία προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας MAGL και FAAH	82
5.2	Δομή διβουκαΐνης	85
5.3	Η ισορροπία μεταξύ των τριών μορφών της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250	88
6.1	Έκκριση όξινης φωσφατάσης σε μέσο ασιτίας <i>T. thermophila</i> και <i>T. MS-1</i>	104
6.2	Ειδική δραστηριότητα όξινης φωσφατάσης σε ομογενοποίημα και υπερκείμενο καλλιεργειών <i>T. thermophila</i> , ύστερα από επώαση σε ανόργανο μέσο	105
6.3	Έκκριση MAGL σε μέσο ασιτίας καλλιεργειών <i>T. thermophila</i> και MS-1	106
6.4	Έκκριση MAGL και FAAH σε μέσο ασιτίας καλλιεργειών <i>T. thermophila</i> και MS-1	108
6.5	Έκκριση FAAH σε μέσο ασιτίας καλλιεργειών <i>T. thermophila</i> και MS-1	108
6.6	Ποσοστιαίες υδρολύσεις 2-OG ομογενοποιημάτων και υπερκειμένων <i>T. thermophila</i> και <i>T. thermophila</i> MS-1 μετά από επώαση σε ανόργανο μέσο, οφειλόμενες στη δράση της MAGL ή της FAAH	110
6.7	Ποσοστιαία υδρόλυση 2-OG σε ομογενοποίημα <i>T. Thermophila</i> παρουσία PMSF και διβουκαΐνης διάφορων συγκεντρώσεων	115
6.8	Ποσοστό ολικής δραστηριότητας όξινης φωσφατάσης σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιεργειών <i>T. thermophila</i> και <i>T. MS-1</i> μετά από επαγωγή έκκρισης με χρήση διβουκαΐνης	116
6.9	Ειδική δραστηριότητα όξινης φωσφατάσης σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιεργειών <i>T. Thermophila</i> και <i>T. MS-1</i> μετά από επαγωγή έκκρισης με χρήση διβουκαΐνης	118
6.10	Ποσοστό ολικής δραστηριότητας MAGL σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιεργειών <i>T. thermophila</i> και <i>T. MS-1</i> μετά από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη.	119

6.11	Ποσοστό ολικής δραστηριότητας MAGL και FAAH σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιέργειών <i>T. thermophila</i> και <i>T. MS-1</i> μετά από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη.	120
6.12	Ποσοστό ολικής δραστηριότητας FAAH σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιέργειών <i>T. thermophila</i> και <i>T. MS-1</i> , μετά από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη.	121
6.13	Ειδική δραστηριότητα MAGL σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιέργειών <i>T. thermophila</i> και <i>T. MS-1</i> μετά από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη.	123
6.14	Ειδική δραστηριότητα FAAH σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιέργειών <i>T. thermophila</i> και <i>T. MS-1</i> μετά από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη.	123
6.15	Ηλεκτροφόρημα SDS-PAGE σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιέργειών <i>T. thermophila</i> και <i>T. MS-1</i> μετά από επαγωγή έκκρισης με χρήση διβουκαΐνης.	125
6.16	Ηλεκτροφόρημα SDS-PAGE σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιέργειας <i>T. thermophila</i> μετά από επαγωγή έκκρισης με χρήση διβουκαΐνης.	127
6.17	Ειδική δραστηριότητα MAGL σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιέργειας <i>T. thermophila</i> μετά από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη.	128
6.18	Ειδική δραστηριότητα όξινης φωσφατάσης σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιέργειας <i>T. thermophila</i> μετά από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη.	129
6.19	Καμπύλη αναστολής υδρόλυσης 2-OG, συναρτήσει διαφόρων συγκεντρώσεων του JZL184 (5 nM – 20 μM) σε ομογενοποίημα κυττάρων <i>T. thermophila</i> .	131
6.20	Καμπύλη αναστολής υδρόλυσης 2-OG, συναρτήσει διαφόρων συγκεντρώσεων του JZL184 (5 nM – 115 μM) σε ομογενοποίημα κυττάρων <i>T. thermophila</i> .	132

6.21	Ποσοστιαία αναστολή υδρόλυσης 2-OG, από JZL184 σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιιεργειών <i>T. thermophila</i> και <i>T. MS-1</i> μετά από επίδραση με διβουκαΐνη.	133
6.22	Ανοσοαποτύπωμα της MAGL σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιιεργειών <i>T. thermophila</i> και <i>T. MS-1</i> μετά από επαγωγή έκκρισης με χρήση διβουκαΐνης.	135
6.23	Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας κυττάρων <i>T. thermophila</i> με χρήση αντισώματος έναντι β-τουμπουλίνης.	136
6.24	Φωτογραφίες σενεστιακής μικροσκοπίας κυττάρων <i>T. thermophila</i> ύστερα από επώαση με δεύτερο αντίσωμα ανεπτυγμένο σε κασίκκα έναντι των IgYs του κοτόπουλου, απουσία αντισώματος έναντι MAGL.	138
6.25	Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας κυττάρων <i>T. thermophila</i> με χρήση αντισώματος έναντι MAGL.	139

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας	Τίτλος	Σελίδα
3.1	Τα ενδοκανναβινοειδή και οι δομές τους	49
5.1	Μοριακά βάρη προτύπων πρωτεϊνών ηλεκτροφόρησης	93
6.1	Ποσοστά έκκρισης MAGL από λυσοσωματικές ή άλλες πηγές.	107
6.2	Ποσοστά έκκρισης FAAH από λυσοσωματικές ή άλλες πηγές.	109
6.3	Πρωτεΐνη σε mg/ml όπως προέκυψε από τις δύο μεθόδους προσδιορισμού πρωτεΐνης για παρόμοια κλάσματα <i>T. thermophila</i> , ύστερα από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη.	114
6.4	Ποσοστιαία κατανομή έκκρισης όξινης φωσφατάσης σε υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιιεργειών <i>T. thermophila</i> και <i>T. MS-1</i> που έχουν υποστεί διέγερση με διβουκαΐνη.	117
6.5	Ποσοστιαία κατανομή έκκρισης MAGL σε υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιιεργειών <i>T. thermophila</i> και <i>T. MS-1</i> που έχουν υποστεί διέγερση με διβουκαΐνη.	120
6.6	Ποσοστιαία κατανομή έκκρισης FAAH σε υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιιεργειών <i>T. thermophila</i> και <i>T. MS-1</i> που έχουν υποστεί διέγερση με διβουκαΐνη.	122

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε κατά την περίοδο 2010-2012, στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδοστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Αθανασίας Σιαφάκα-Καπάδα, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για τη καθοδήγηση που μου παρείχε. Με την όρεξη και τη ζωντάνια της αποτέλεσε έμπνευση για εμένα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη φίλη μου και συνεργάτη Ελένη Γκίνη που με βοήθησε σε όλα τα στάδια της εργασίας, όπως και όλους τους υπόλοιπους μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου Βιοχημείας. Όλοι τους ήταν δίπλα μου σε ότι και αν χρειάστηκα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον A. Tiedtke από το πανεπιστήμιο Muenster στη Γερμανία, καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ντία Γαλανοπούλου, για την προσφορά του μεταλλαγμένου στελέχους της *T. thermophila* MS-1.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Βιολογίας Ισιδώρα Παπασιδέρη, και στη Λέκτορα Μαριάννα Αντωνέλου, στο εργαστήριο των οποίων πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα ανοσοφθορισμού υπό την πολύτιμη καθοδήγηση και συμβολή του Δρ. Αθανάσιου Βελέντζα.

Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Θανάση Γκιμήση, Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Χημείας, στο εργαστήριο του οποίου δούλεψα για περίπου δύο μήνες, καθώς και στους υποψήφιους διδάκτορες Μιχάλη Μαμάη και Μανώλη Ψυκαράκη για την συνεργασία τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

TETRAHYMENA

1.1 Εισαγωγή

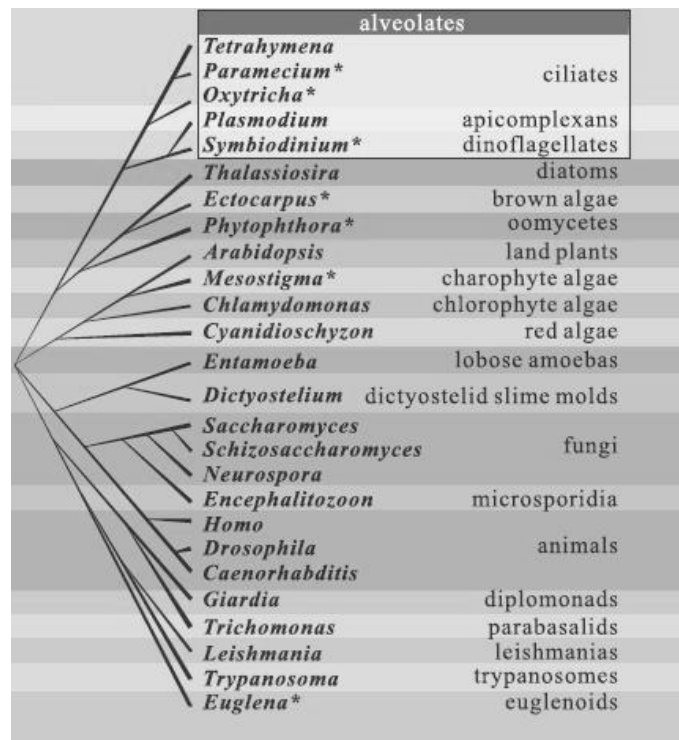
Η *Tetrahymena* είναι ένας μονοκύτταρος ευκαρυωτικός οργανισμός που ανήκει στην οικογένεια των βλεφαριδωτών, του βασιλείου των πρωτίστων. Ανακαλύφθηκε από τον Andre Lwoff, το 1923, ο οποίος απομόνωσε και καλλιέργησε υπό αξενικές συνθήκες ένα στέλεχος που δεν διέθετε μικροπυρήνα [1]. Είναι ένα μη παθογόνο, αερόβιο πρωτόζωο το οποίο ζει σε υδατικά περιβάλλοντα, κυρίως όμως σε πηγές, ποτάμια, λίμνες, αλλά όχι σε αλμυρό νερό και μπορεί να αναπτύσσεται σε μία μεγάλη περιοχή pH, από 5,0 μέχρι 8,6 [2]. Κυρίως τρέφεται με βακτήρια και ιστούς, ενώ απουσία άλλης τροφής τρέφεται και με τα ίδια τα πρωτόζωα της καλλιέργειας. Ο μικρός κύκλος ζωής της επιτρέπει την εύκολη καλλιέργεια της στο εργαστήριο, καθώς διπλασιάζεται κάθε 2,5 ώρες στους 30 °C, δημιουργώντας ομοιογενείς καλλιέργειες με ελάχιστο κόστος διατήρησης.

Στο σχήμα 1.1 φαίνεται η συστηματική κατάταξη της *Tetrahymena*, καθώς και η θέση της στο φυλογενετικό δέντρο σε σχέση με άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η *Tetrahymena* ανήκει στα κυψελιδωτά (alveolates), ένα μεγάλο εξελικτικό παρακλάδι των ευκαρυωτικών πρωτίστων, που περιλαμβάνουν εκτός από τα βλεφαριδωτά (με κυριότερους εκπροσώπους την *Tetrahymena* και το *Paramecium*), τα δινομαστιγωτά και τα κορυφόπλεκτα [2]. Φυλογενετικές μελέτες απέδειξαν ότι τα βλεφαριδωτά δεν είναι οι κοντινότεροι συγγενείς των ζωικών κυττάρων [3, 4]. Παραταύτα, έχει καθιερωθεί ως οργανισμός-μοντέλο σε πειράματα κυτταρικής βιολογίας και μαζί με το γένος *Paramecium* αποτελούν τους περισσότερο μελετημένους αντιπροσώπους των ~ 6000 ειδών βλεφαριδοφόρων.

Το γένος *Tetrahymena* αποτελείται από περισσότερα από 37 είδη, από τα οποία τα περισσότερα μελετημένα είναι η *Tetrahymena thermophila* και η *Tetrahymena pyriformis*. Η *T. pyriformis* ήταν το πρώτο είδος που χρησιμοποιήθηκε σε βιοχημικές και μοριακές μελέτες, καθώς και έρευνες κυτταρικής φυσιολογίας [2]. Η *T. pyriformis* δεν διαθέτει μικροπυρήνα, και συνεπώς, δεν μπορεί να αναπαραχθεί σεξουαλικά με σύζευξη. Σήμερα οι ερευνητές κυρίως δουλεύουν με την *Tetrahymena thermophila*, λόγω της ευκολίας με την οποία μπορούν να πάρουν

μεταλλαγμένα στελέχη και λόγω του πυρηνικού διμορφισμού, δηλαδή της παρουσίας μικροπυρήνα και μακροπυρήνα, που της επιτρέπουν να αναπαραχθεί σεξουαλικά [2]. Ακόμη, έχει χαρτογραφηθεί το γονιδίωμα του μακροπυρήνα της, κάτι που διευκολύνει πολύ τις μελέτες μοριακής βιολογίας [5]. Η *Tetrahymena pyriformis* χρησιμοποιείται σήμερα λόγω της ευκολίας συγχρονισμού των καλλιιεργειών της.

Συνομοταξία:	Πρωτόζωα
Υπερομοταξία:	Βλεφαριδοφόρα ή Εγχυματόζωα
Ομοταξία:	Βλεφαριδωτά
Υφομοταξία:	Ολότριχα
Τάξη:	Υμενόστομα
Υπόταξη:	Τετραϋμένια
Οικογένεια:	Τετραϋμανίδες
Γένος:	<i>Tetrahymena</i>
Είδη:	<i>T. pyriformis</i> , <i>T. vorax</i> , <i>T. paravorax</i> , <i>T. pigmentosa</i> , <i>T. thermophila</i> , <i>T. hegewischi</i> , <i>T. hyperangularis</i> , <i>T. malaccensis</i>



Σχήμα 1.1: (αριστερά) Συστηματική κατάταξη *Tetrahymena* καθώς και τα διάφορα είδη της. (δεξιά) Η φυλογενετική θέση της *Tetrahymena* σε σχέση με άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Από [2, 5].

Η *Tetrahymena* επικράτησε ως οργανισμός-μοντέλο των ευκαρυωτικών κυττάρων για ποικίλους λόγους. Καταρχήν, είναι μη παθογόνος μικροοργανισμός, οπότε δεν ενέχει κινδύνους για τον ερευνητή και λόγω του μεγάλου μεγέθους της μπορεί να παρατηρηθεί εύκολα στο οπτικό μικροσκόπιο. Μπορεί να αναπτυχθεί εύκολα σε αξενικές συνθήκες, ενώ λόγω της μεγάλης ταχύτητας διπλασιασμού της, που μπορεί να φτάσει και τις 2 ώρες σε βέλτιστες συνθήκες, φτάνει σε κυτταρικές

πυκνότητες της τάξης 10^6 κύτταρα/ml. Αυτή η κυτταρική πυκνότητα είναι αρκετή για να δώσει ικανοποιητικές ποσότητες βιομορίων για ανάλυση. Η *Tetrahymena* διαθέτει δομική και λειτουργική πολυπλοκότητα, ανάλογη με αυτή των κυττάρων του ανθρώπου και άλλων μεταζώων [6]. Συγκεκριμένα, διαθέτει όλα τα υποκυτταρικά οργανίδια και τις δομές που χαρακτηρίζουν τα ανώτερα ζωικά κύτταρα, αλλά λόγω της εξελικτικής απόστασης από αυτά παρουσιάζει και μοναδικά χαρακτηριστικά [2]. Για παράδειγμα, δεν μπορεί να συνθέσει στερόλες, όπως χοληστερόλη, αλλά βιοσυνθέτει το δικό της ανάλογο για την ρευστότητα της μεμβράνης, την τετραϋμανόλη. Είναι φτωχή σε περιεκτικότητα ακτίνης και δεν διαθέτει ενδιάμεσα ινίδια, ενώ η πλασματική μεμβράνη της φέρει εξαιρετικά μεγάλο ποσοστό φωσφονολιπιδίων. Επίσης, ο μακροπυρήνας της διαιρείται αμιπτωτικά, μιας και τα χρωμοσώματά του δεν διαθέτουν κεντρομερίδιο. Ακόμη, διαθέτει ενδοκυτταρικές αποθήκες Ca^{2+} τους φατνιακούς σάκους, χαρακτηριστικούς μόνο στη γενεαλογική σειρά των κυψελιδωτών. Το πιο σημαντικό, ίσως, χαρακτηριστικό της *Tetrahymena* είναι ότι έχουν αναπτυχθεί όλα τα πειραματικά εργαλεία με τα οποία μπορεί να γίνει εύκολη η μελέτη της. Αν και ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae* είναι πιο κοντά εξελικτικά στον άνθρωπο από την *Tetrahymena*, έχει χάσει δομές και λειτουργίες που διατηρήθηκαν στα βλεφαριδωτά και στα ζωικά κύτταρα, όπως την ρυθμιζόμενη έκκριση αποθηκευμένων προϊόντων. Μελέτες παράλληλης εξέλιξης σε αυτούς τους οργανισμούς, μπορούν να δείξουν τι λειτουργίες και δομές είναι αναγκαίες για διατήρηση της ζωής και ποιες μπορούν να αντικατασταθούν από άλλες στη διάρκεια της εξέλιξης. Συγκεντρωτικά, η *Tetrahymena* χρησιμοποιείται σε μελέτες πρωτεωμικής [5], λόγω του μεγάλου αριθμού γονιδίων που κωδικεύουν πρωτεΐνες, σε μελέτες γενετικής [7], λόγω της παρουσίας μικροπυρήνα σε ορισμένα στελέχη όπως η *T. thermophila* και σε μελέτες μοριακής βιολογίας [5], λόγω της πρόσφατης αλληλούχησης του γονιδιώματος του μακροπυρήνα της *T. thermophila*. Τα γενικότερα πλεονεκτήματα του οργανισμού σε συνδυασμό με τη συμπεριφορά της παρουσία ρύπων, την καθιστούν ιδανική σε τοξικολογικές μελέτες [8]. Η *Tetrahymena* αποτελεί χρήσιμο βιοτεχνολογικό εργαλείο, αφού με αυτή έχει επιτευχθεί η βελτιστοποίηση της σύστασης των λιπαρών οξέων του γάλακτος [9, 10] και επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σύστημα ετερόλογης έκφρασης, αφού σε αυτή έχει επιτευχθεί η έκφραση και έκκριση ανθρώπινων ενζύμων [11].

Η *Tetrahymena* ως οργανισμός-μοντέλο οδήγησε σε πολλές και σημαντικές επιστημονικές ανακαλύψεις. Αποτέλεσε το πρώτο πρωτόζωο που καλλιεργήθηκε αξενικά σε χημικώς καθορισμένο μέσο [12]. Ήταν το πρώτο κύτταρο στο οποίο επετεύχθη συγχρονισμός κυτταρικής διαίρεσης, οδηγώντας στην ανακάλυψη των μηχανισμών ελέγχου του κυτταρικού κύκλου [13, 14]. Αναγνωρίστηκε και απομονώθηκε η πρώτη πρωτεΐνη μοριακός κινητήρας του κυτοσκελετού, η δυνεΐνη [15]. Συμμετείχε στην ανακάλυψη των λυσοσωμάτων [16] και των υπεροξεισωμάτων [17], ενώ σε αυτή ανακαλύφθηκαν οι καταλυτικές ιδιότητες του RNA [18], που βραβεύτηκε με βραβείο Nobel χημείας το 1989. Ακόμη, η μοριακή δομή των τελομερών [19], της τελομεράσης και ο ρόλος του RNA σε αυτό το ριβοένζυμο [20, 21] διασαφηνίστηκε στη *Tetrahymena*, και η ανακάλυψη αυτή τιμήθηκε με βραβείο Nobel ιατρικής και φυσιολογίας το 2009. Η ανακάλυψη του ρόλου της ακετυλίωσης των ιστονών στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης [7], έγινε επίσης στην *Tetrahymena*. Η *Tetrahymena* αποτέλεσε και το πρώτο πρωτόιστο στο οποίο ανιχνεύτηκε μιτοχονδριακό DNA [22].

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω η διατήρηση και η ανάπτυξη καλλιεργειών *Tetrahymena* είναι μία εύκολη και σχετικά ανέξοδη υπόθεση. Τα στελέχη διατηρούνται υπό αξενικές συνθήκες σε 2 % πρωτεόζη-πεπτόνη, ένα προϊόν πεπτιδικής πέψης εκχυλίσματος βοοειδούς [23] ή σε περίπτωση μεταλλαγμένων στελεχών με ιδιαίτερες διατροφικές ανάγκες σε θρεπτικό υλικό τύπου Neffs που περιέχει εκτός από πρωτεόζη-πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης, γλυκόζη και συμπλοκοποιημένο σίδηρο. Η *Tetrahymena* μπορεί να αναπτυχθεί σε στερεές και υγρές καλλιέργειες υπό αξενικές συνθήκες [24]. Οι υγρές καλλιέργειες είναι πιο διαδεδομένες και μπορεί να γίνουν σε μη χημικώς καθορισμένα θρεπτικά υλικά ή σε χημικώς καθορισμένα. Ένα δημοφιλές μη χημικώς καθορισμένο μέσο περιλαμβάνει πρωτεόζη-πεπτόνη ως πηγή αμινοξέων, εκχύλισμα ζύμης για πηγή ιχνοστοιχείων και βιταμινών, γλυκόζη ως πηγή ενέργειας του κυτάρου και, τέλος, σύμπλοκο σιδήρου (II)-EDTA, ο οποίος δεν είναι απαραίτητος αλλά βοηθάει στην ανάπτυξη των καλλιεργειών. Η ανάπτυξη σε τέτοιου είδους θρεπτικό υλικό επιφέρει μέγιστη ανάπτυξη κυτάρων, με χρόνους διπλασιασμού ~2,5 ώρες και τελική κυτταρική πυκνότητα πάνω από 10^6 κύτταρα / ml καλλιέργειας. Τα χημικώς καθορισμένα θρεπτικά υλικά χρησιμοποιούνται όταν είναι αναγκαίο να ελέγξει κάποιος για πειραματικούς σκοπούς την σύσταση του μέσου. Τα μέσα αυτά, όπως

και τα μη χημικώς καθορισμένα οδηγούν σε κυτταρικές πυκνότητες 10^6 κύτταρα / ml καλλιέργειας [25]. Τέλος, υπάρχουν και τα βακτηριακά θρεπτικά μέσα, με πιο διαδεδομένο απ' αυτά το θρεπτικό πρωτεόζης-πεπτόνης εμπλουτισμένο με βακτήρια *Klebsiella pneumoniae* [26]. Τα βακτηριακά μέσα χρησιμοποιούνται όταν είναι αναγκαίο να αναπτυχθούν τα κύτταρα, και χωρίς άλλες διεργασίες να έρθουν σε κατάσταση νηστείας και να αποκτήσουν ικανότητα σύζευξης. Οι τελικές πυκνότητες με αυτά είναι μικρότερες σε σχέση με τα χημικώς και μη χημικώς καθορισμένα και φτάνουν τα 10^4 κύτταρα / ml. Το pH του θρεπτικού μέσου δεν είναι αναγκαίο να ρυθμίζεται, και μόνο σε ακραίες τιμές (< 5 και > 8,6) επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη των κυττάρων.

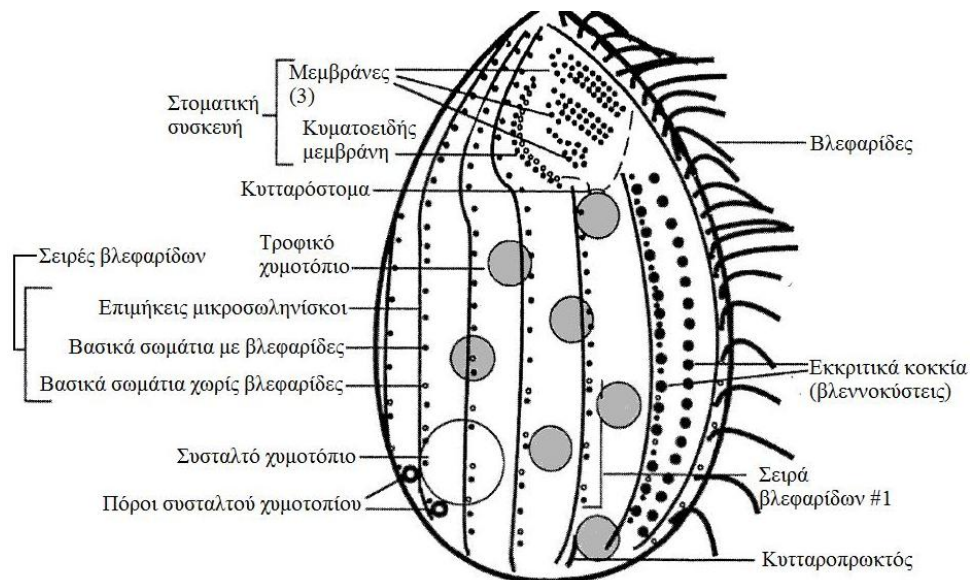
1.2 Μορφολογία και φυσιολογία [2]



Σχήμα 1.2: Φωτογραφία *Tetrahymena*. Από [27].

Η *Tetrahymena* είναι ένα μεγάλο και πολύπλοκο κύτταρο, ταυτόχρονα όμως, ένα σχετικά μικρό και απλό βλεφαριδωτό. Το σχήμα της είναι απιοειδές (βλέπε σχήμα 1.2), χαρακτηριστικό που έδωσε το όνομα στο στέλεχος *Tetrahymena pyriformis*, αν και δεν είναι ξεκαθαρισμένο κατά πόσο το *pyriformis* προέρχεται από το *pear* (δηλαδή αχλάδι) ή από την πυρά (*pyre*). Οι κανονικές του διαστάσεις είναι 50 μm σε μήκος και 20 μm σε μέγιστο πλάτος, αν και αυτές ποικίλλουν ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης, όπως την θερμοκρασία [28], το pH [29] και τη σύσταση του θρεπτικού μέσου [30]. Η εντύπωση ότι ομοιάζει με τα ζωικά κύτταρα ενισχύθηκε με το ότι έχει όλα τα βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των ζωικών κυττάρων, με

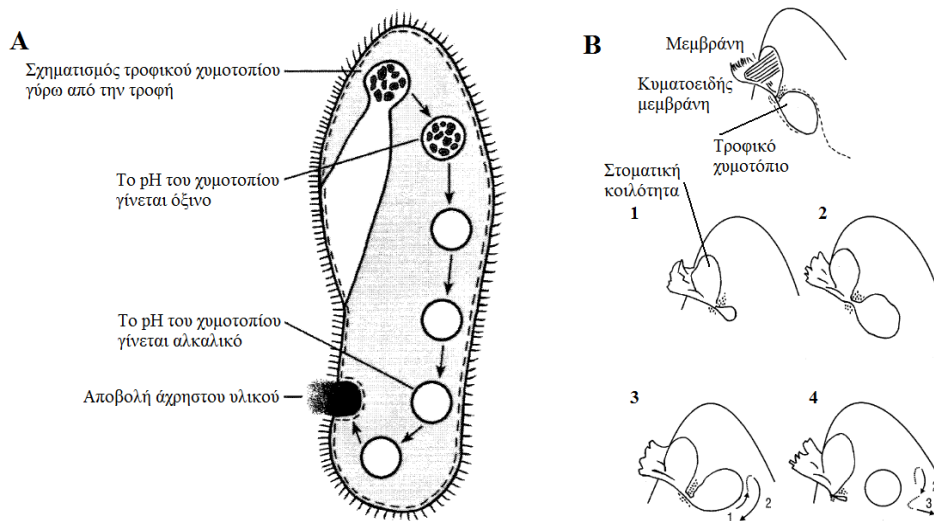
εξαίρεση τα ενδιάμεσα ινίδια, και από το ότι δεν έχει τα χαρακτηριστικά των φυτικών κυττάρων όπως κυτταρικό τοίχωμα, κενοτόπιο (vacuole) και χλωροπλάστες. Παραταύτα, η *Tetrahymena* βιοχημικά είναι το ίδιο μακριά και από τα δύο είδη κυττάρων.



Σχήμα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση της *Tetrahymena*. Διακρίνονται οι 7 από τις 18 - 21 σειρές βλεφαρίδων και οι βλεφαρίδες φαίνονται σε μία από αυτές τις σειρές. Επίσης, φαίνεται η διάταξη των βλεννοκυστών καθώς και οι εξειδικευμένες δομές της μεμβράνης: το κυτόστομα, ο κυτοπρωκτός και το συσταλό κενοτόπιο. Ακόμη, διακρίνεται η πορεία των τροφικών κενοτοπίων (χυμοτοπίων) από το κυτόστομα προς τον κυτοπρωκτό. [31] Αναπροσαρμοσμένο από [2].

Αυτό που είναι χαρακτηριστικό με τα βλεφαριδωτά, συμπεριλαμβανομένης και της *Tetrahymena*, είναι ο πυρηνικός διμορφισμός, η διάταξη περίπλοκων δομών στον κυτταρικό φλοιό και φυσικά το χαρακτηριστικό από το οποίο πήραν το όνομα τους, οι βλεφαρίδες (βλ. σχήμα 1.3). Η *Tetrahymena* διαθέτει 18-21 σειρές βλεφαρίδων που είναι διατεταγμένες παράλληλα στον επιμήκη άξονα του κυττάρου. Οι βλεφαρίδες αυτές, είναι υπεύθυνες για την κίνηση του κυττάρου και την πρόσληψη τροφής. Ο πυρηνικός δυϊσμός δεν είναι χαρακτηριστικός για όλα τα είδη της *Tetrahymena*, καθώς, για παράδειγμα, η *T. thermophila* διαθέτει δύο πυρήνες, ενώ η *T. pyriformis* μόνο μακροπυρήνα. Η κυτταροπλασματική οργάνωσή της δεν έχει κάτι αξιοπρόσεκτο σε σχέση με άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, με εξαίρεση ένα σύστημα ρύθμισης της οσμωτικής ισορροπίας του κυττάρου που λέγεται συσταλό κενοτόπιο, και τα τροφικά κενοτόπια που αποτελούν κομμάτι του

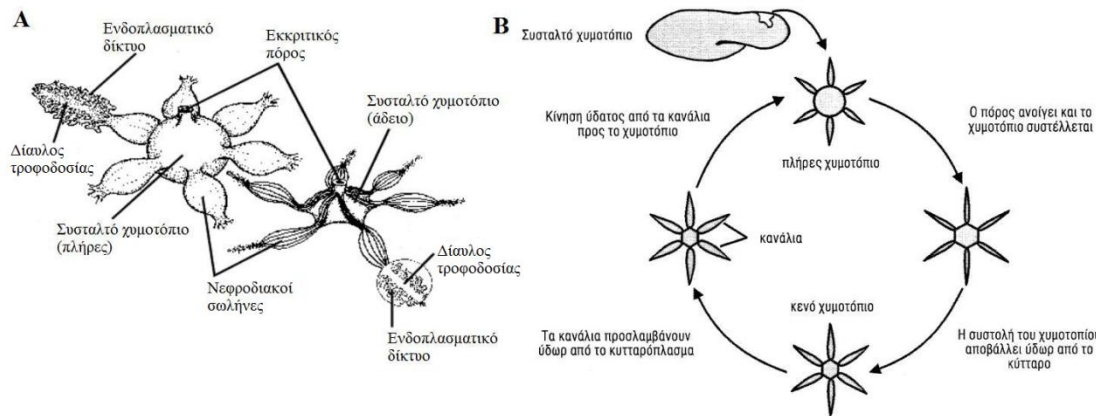
συστήματος φαγοκύτωσης. Διαθέτει επίσης, όλα τα οργανίδια χαρακτηριστικά των ζωικών κυττάρων, όπως μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο, συσκευή Golgi, λυσοσώματα και υπεροξεισώματα.



Σχήμα 1.4: Πορεία σχηματισμού τροφικών κενοτοπίων στην *Tetrahymena*. (A) Κυκλοφορία από το κυτόστομα στον κυτοπρωκτό, (B) 1: αύξηση μεγέθους κενοτοπίου, 2: πλήρωση του κενοτοπίου με τροφή, 3: κλείσιμο του κενοτοπίου και 4: απομάκρυνση του κενοτοπίου από το κυτόστομα. Από [32].

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, η *Tetrahymena* διαθέτει τρεις εξειδικευμένες μεμβρανικές δομές [2]. Μία από αυτές το κυτταρόστομα ή κυτόστομα χρησιμεύει ως στοματική κοιλότητα. Το κυτόστομα εντοπίζεται στο οξύ (μπροστινό) άκρο του κυττάρου και αποτελείται από τέσσερις μεμβράνες προερχόμενες από σύντηξη βλεφαριδών (βλ. σχήμα 1.4). Αυτό το χαρακτηριστικό έδωσε το όνομα στο γένος *Tetrahymena*, από το τετρα-υμένιο. Από τις τέσσερις εξειδικευμένες μεμβρανικές δομές, η μία η μεγαλύτερη, βρίσκεται κάτω από τις άλλες τρεις, είναι κυματοειδής και με την κίνησή της μπορεί να τις επικαλύπτει, δεσμεύοντας έτσι τροφή. Όταν η τροφή εισέλθει στο κυτόστομα, μέσω του κυτοφάρυγγα μεταφέρεται στο τροφικό κενοτόπιο, το οποίο όταν γεμίσει απομακρύνεται και σχηματίζεται ένα καινούριο. Τα απομακρυσμένα τροφικά κενοτόπια, αρχικά, οξινίζονται και στη συνέχεια συντήκονται με λυσοσώματα, δημιουργώντας τα φαγολυσοσώματα ή φαγοσώματα, στα οποία γίνεται η πέψη της τροφής με τη βοήθεια ενζύμων. Τα φαγολυσοσώματα, με τη σειρά τους, κατευθύνονται με τη βοήθεια μικροσωλινίσκων προς τη δεύτερη εξειδικευμένη μεμβρανική δομή της *Tetrahymena*, τον κυτταροπρωκτό ή κυτοπρωκτό, ο οποίος βρίσκεται στο αμβλύ

(οπίσθιο) τμήμα του κυττάρου και στην ίδια σχετική θέση με το κυτόστωμα, η οποία ορίζεται από την ίδια βλεφαριδική σειρά. Όταν το φαγόσωμα πλησιάσει τον κυτοπρωκτό, αυτός κοιλώνεται και συντήκονται οι μεμβράνες τους, με αποτέλεσμα την εκκένωση των άπεπτων συστατικών της τροφής στον εξωκυττάριο χώρο. Τέλος, ο κυτοπρωκτός επανέρχεται στο κανονικό του μέγεθος και το τροφικό κενोटόπιο καταρρέει σε μικρά κυστίδια.



Σχήμα 1.5: (A) Το συσταλό κενोटόπιο, πλήρες (αριστερά) και άδειο (δεξιά), (B) μηχανισμός λειτουργίας του συσταλού κενοτοπίου. Από [32].

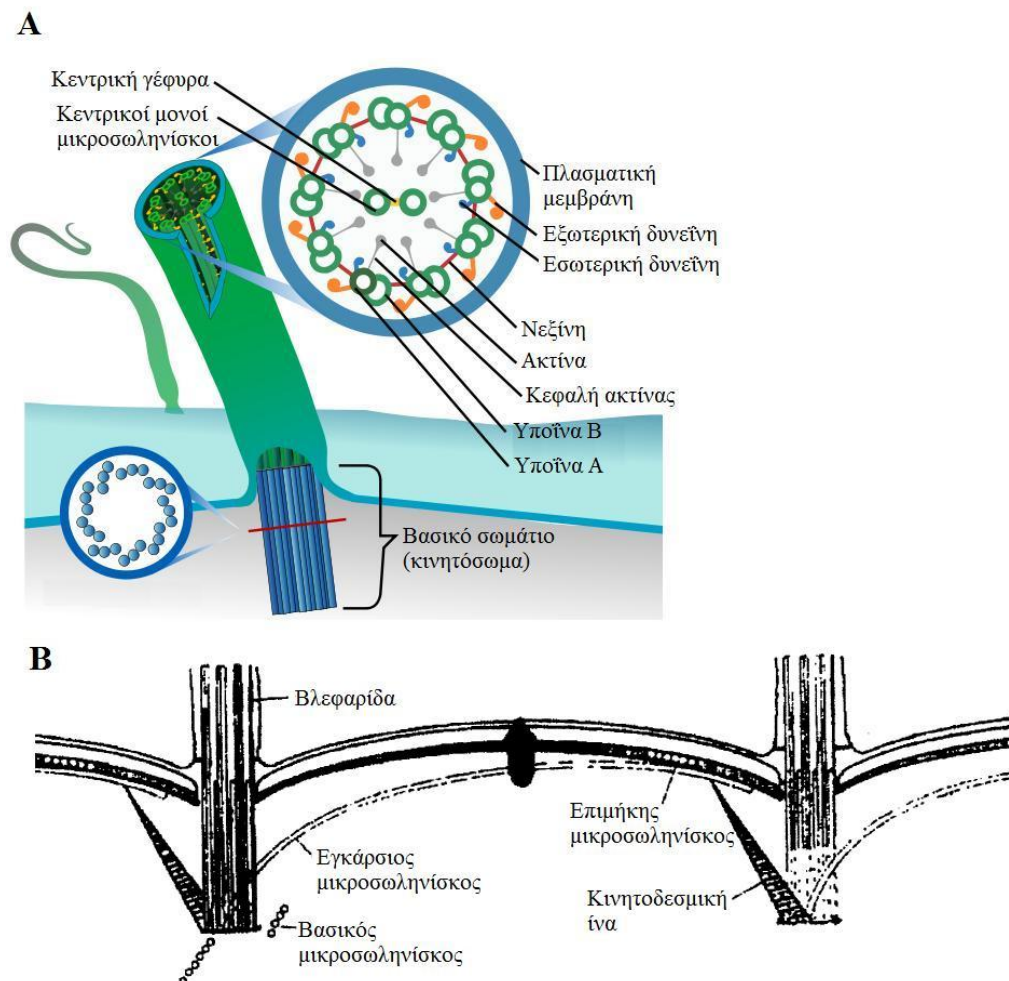
Η τρίτη εξειδικευμένη δομή της μεμβράνης της *Tetrahymena*, είναι το συσταλό κενोटόπιο [2]. Ανατομικά, το συσταλό κενोटόπιο είναι τμήμα ενός συστήματος με τρία συστατικά: το ίδιο το κενोटόπιο, τους πόρους του κενοτοπίου που συνήθως είναι δύο και ένα σύστημα από περιφερειακά ινίδια, που λέγονται νεφριδιακοί σωλήνες (βλ. σχήμα 1.5). Οι πόροι έρχονται σε επαφή με την πλασματική μεμβράνη, και από αυτούς αποβάλλεται το περιεχόμενο του κενοτοπίου στον εξωκυττάριο χώρο ύστερα από συστολή του, ενώ οι νεφριδιακοί σωλήνες συνδέουν το κενोटόπιο με το κυτταρόπλασμα και το εφοδιάζουν με υγρά. Ο ρόλος του συσταλού κενοτοπίου είναι διπλός: καταρχήν, διατηρεί το ισοζύγιο νερού, ρυθμίζοντας έτσι την οσμωτική ισορροπία του κυττάρου και δεύτερον, συμμετέχει στη ρύθμιση της ιοντικής σύστασης του μέσω αποβολής Na^+ . Έχει βρεθεί η ύπαρξη ενός συστήματος ATPάσης στην μεμβράνη των νεφριδιακών σωλήνων, που έχει το ρόλο μιας αντλίας H^+ [33]. Ο προσανατολισμός της αντλίας είναι τέτοιος που εισάγει πρωτόνια στον αυλό των σωλήνων, δημιουργώντας έτσι ένα θετικό μεμβρανικό δυναμικό στο εσωτερικό του οργανιδίου. Η πρωτονιοκίνητη δύναμη που δημιουργείται εικάζεται ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μετακίνηση ιόντων

πυκνά κοκκία (DCGs-Dense Core Granules) ή αλλιώς βλεννοκύστες (mucocysts), (6) σειρές μιτοχονδρίων διαταγμένες παράλληλα στις σειρές των βασικών σωματίων και των βλεννοκυστών, (7) οι πεπλατυσμένες μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (lamellae), που βρίσκονται κάτω από τα μιτοχόνδρια και (8) σειρές μικρών στοιχείων Golgi, που και αυτές βρίσκονται κάτω από τα μιτοχόνδρια.

Οι φατνιακοί σάκοι της *T. thermophila* βρίσκονται εντοπισμένοι ακριβώς κάτω από την πλασματική μεμβράνη (βλ. σχήμα 1.6), εκτείνονται κατά μήκος από το οξύ (εμπρόσθιο) προς το αμβλύ (οπίσθιο) άκρο του κυττάρου και κατά πλάτος από τη μία σειρά βλεφαρίδων μέχρι το μέσο της ευθείας που ενώνει δύο διαδοχικές παράλληλες σειρές βλεφαρίδων [35]. Έτσι, ένα κύτταρο που έχει 20 σειρές βλεφαρίδων, θα διαθέτει 40 μακριούς φατνιακούς σάκους που θα γεινιάζουν μεταξύ τους. Δύο γεινιάζοντες σάκοι διαχωρίζονται από τις σειρές των βλεφαρίδων ή τις άκρες των βλεννοκυστών ή από καλυμμένες κοιλότητες (coated pits), ενώ φέρουν και ενώσεις μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να θεωρούνται ενιαίο υποκυτταρικό διαμέρισμα. Οι φατνιακοί σάκοι εκτός από μηχανική στήριξη, φαίνεται να παρέχουν στην *Tetrahymena* και βιολογικές λειτουργίες ως ενδοκυτταρικές αποθήκες ασβεστίου [35], οι οποίες όμως είναι ανεξάρτητες του ενδοπλασματικού δικτύου του κυττάρου και ως αποθήκες πρόδρομων βιομορίων για την πλασματική μεμβράνη [36].

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, η *Tetrahymena* διαθέτει 18-21 σειρές βλεφαρίδων διατεταγμένες παράλληλα στον επιμήκη άξονα του κυττάρου. Από αυτές τις σειρές εκβλαστάνουν πάνω από 600 βλεφαρίδες που είναι κυρίως υπεύθυνες για την κίνηση του αλλά και την πρόσληψη τροφής. Οι βλεφαρίδες [32] έχουν διάμετρο 0,2 μm και μήκος 2-10 μm και είναι καλυμμένες με μεμβράνη, η οποία είναι συνεχής με την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου, ενώ μπορούν να κινηθούν συντονισμένα με κατανάλωση ATP. Οι βλεφαρίδες της *Tetrahymena* έχουν παρόμοια δομή με αυτές άλλων ευκαρυωτικών οργανισμών και αποτελούνται από μικροσωληνίσκους, οι οποίοι σχηματίζονται από διμερή α- και β-τουμπουλίνης (βλ. σχήμα 1.7). Διαθέτουν 9 περιφερειακά ζεύγη μικροσωληνίσκων και ένα ζεύγος κεντρικών μικροσωληνίσκων, σχηματίζοντας έτσι την δομή 9 + 2 που αποτελεί το αξόνημα της βλεφαρίδας. Στο εσωτερικό της βλεφαρίδας υπάρχουν, επίσης, άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη δομή και την κίνηση

της, όπως η δυνεΐνη, μια ΑΤΡάση με ρόλο μοριακού κινητήρα που επάγει την κίνηση των βλεφαρίδων. Οι βλεφαρίδες εκβλαστάνουν από τα βασικά σωμάτια, τα οποία αποτελούνται από 9 τριπλέτες περιφερειακά διευθετημένων μικροσωληνίσκων, πάνω σε αυτές βρίσκονται πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τα αξονήματα. Τα βασικά σωμάτια συνδέονται μεταξύ τους με δομές, όπως ίνες και μικροσωληνίσκους, που λέγονται συνολικά κινητοδέσματα, με αποτέλεσμα να μπορεί να επιτευχθεί συγχρονισμένη κίνηση των βλεφαρίδων.



Σχήμα 1.7: (Α) Δομικά στοιχεία της βλεφαρίδας, (Β) εγκάρσια τομή του κυτταρικού φλοιού της *Tetrahymena*, όπου διακρίνονται οι βλεφαρίδες, τα βασικά σωμάτια και τα κινητοδέσματα. Από [32].

Άλλο χαρακτηριστικό του κυτταρικού φλοιού της *Tetrahymena* είναι η παρουσία εκκριτικών κοκκίων υψηλής πυκνότητας, ελλιμενισμένων στην πλασματική μεμβράνη κατά σειρές παράλληλες στις βλεφαρίδες, που ονομάζονται βλενοκύστες, όπως είδη αναφέρθηκε (βλ. σχήμα 1.6). Αυτές απελευθερώνουν το

περιεχόμενο τους στον εξωκυττάριο χώρο συγχρονισμένα, ύστερα από διέγερση με ασβεστιοεξαρτώμενο τρόπο. Όταν το περιεχόμενο απελευθερωθεί, δημιουργεί ένα παχύρρευστο στρώμα γύρω από το κύτταρο, το οποίο εικάζεται ότι έχει προστατευτικό ρόλο από τους θηρευτές. Οι βλεννοκύστες και ο ρόλος τους θα περιγραφούν εκτενέστερα στην παράγραφο 2.4.2.

Τα κυριότερα ενδοπλασματικά οργανίδια της *T. thermophila* είναι ο μικροπυρήνας, ο μακροπυρήνας (βλέπε παρ. 1.3), τα μιτοχόνδρια, τα λυσοσώματα, τα υπεροξεισώματα, το ενδοπλασματικό δίκτυο, η συσκευή Golgi και τα τροφικά κενοτόπια [2].

Στα μιτοχόνδρια γίνεται ο αερόβιος μεταβολισμός της *Tetrahymena*, όπου και παράγεται το μεγαλύτερο μέρος ενέργειας του κυττάρου. Βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, αλλά εντοπίζονται κυρίως στο μεμβρανικό φλοιό, ακριβώς κάτω από το επιπλάσμιο και έχουν αυστηρά καθορισμένη διευθέτηση (βλ. σχήμα 1.6). Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν δικό τους γενετικό υλικό, το οποίο είναι γραμμικό, δεν διαθέτει ιντρόνια και φέρει τελομερικές επαναλήψεις. Αυτό το γενετικό υλικό κωδικοποιεί μιτοχονδριακό rRNA, 7 διαφορετικά tRNAs, ενώ φέρει 12 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας και 8 γονίδια για μιτοχονδριακές ριβοσωμικές πρωτεΐνες [2].

Τα λυσοσώματα της *Tetrahymena thermophila* [2] είναι μία ετερογενής τάξη οργανιδίων, που ως βασικό χαρακτηριστικό έχουν το όξινο pH και την παρουσία όξινων υδρολασών, πολλές από τις οποίες εκκρίνονται ιδιοσυστατικά στο θρεπτικό μέσο, βοηθώντας την πέψη θρεπτικών συστατικών και την εύκολη πρόσληψη τους από το κύτταρο (βλ. σχήμα 2.4). Ακόμη τα λυσοσώματα, όπως είδαμε και πριν, συντήκονται με τα τροφικά κενοτόπια, δημιουργώντας τα φαγολυσοσώματα, στα οποία οι όξινες υδρολάσες πέπτουν τα προσλαμβανόμενα βιομόρια σε μικρότερα (βλ. σχήματα 1.4 και 2.4). Ένας άλλος ρόλος των λυσοσωμάτων είναι η σύντηξη τους με οργανίδια στα οποία έχουν συσσωρευτεί βλάβες, δημιουργώντας τα αυτοφαγικά κενοτόπια ή αυτοφαγοσώματα. Αυτά παρατηρούνται στην *Tetrahymena* μόνο σε συνθήκες νηστείας.

Τα υπεροξεισώματα [2] της *Tetrahymena* είναι οργανίδια στα οποία συμβαίνει η β-οξειδωση των λιπαρών οξέων και ο κύκλος του γλυοξυλικού οξέος και είναι περισσότερο γνωστά για την παρουσία καταλάσης και οξειδάσης των D αμινοξέων,

τα οποία αποτελούν και οδηγία ένζυμα για το διαμέρισμα αυτό. Η παρουσία του γλυκοξυλικού κύκλου επιτρέπει στην *Tetrahymena* την αποτελεσματική μετατροπή λιπιδίων σε γλυκογόνο, μία ικανότητα που είναι συνηθισμένη στα φυτά, αλλά περιορισμένη στα ανώτερα ζωικά κύτταρα.

Το ενδοπλασματικό δίκτυο [2] της *Tetrahymena* διαθέτει όλες τις συνηθισμένες διαμορφώσεις: αδρό με συνδεδεμένα ριβοσώματα, λείο, καθώς και ένα 'διφασικό' με την μία πλευρά αδρή και την άλλη λεία. Το αδρό Ε.Δ. εντοπίζεται κυρίως κάτω από τα μιτοχόνδρια του φλοιού ή ακριβώς κάτω από τους φατνιακούς σάκους. Το Ε.Δ. αποτελεί την θέση σύνθεσης φωσφολιπιδίων, μεμβρανικών και εκκρινόμενων πρωτεϊνών καθώς και τη βασικότερη ενδοκυτταρική αποθήκη ιόντων ασβεστίου.

1.3 Γενετικά χαρακτηριστικά της *Tetrahymena*

Η *Tetrahymena* παρουσιάζει ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το γενετικό υλικό της. Αυτά είναι ο πυρηνικός διμορφισμός ή δυϊσμός, η ικανότητα αναπαραγωγής τόσο μονογονικά όσο και αμφιγονικά και οι διαφορές που παρουσιάζει στον γενετικό της κώδικα.

Ο πυρηνικός διμορφισμός [37] είναι ένα αξιοσημείωτο, σχεδόν μοναδικό χαρακτηριστικό των βλεφαριδωτών και συνίσταται στην ύπαρξη δύο διαφορετικών πυρήνων στο ίδιο κύτταρο, έναν που φέρει το σωματικό γονιδίωμα (μακροπυρήνας ή MAC) και έναν με το γαμετικό γονιδίωμα (μικροπυρήνας ή MIC). Οι δύο πυρήνες δεν εμφανίζονται σε όλα τα είδη της *Tetrahymena*. Η *T. pyriformis* διαθέτει μόνο μακροπυρήνα, ενώ η *T. thermophila* φέρει και τα δύο είδη πυρήνων. Ο μικροπυρήνας είναι διπλοειδής, φέρει 5 ζεύγη μετακεντρικών χρωμοσωμάτων και παρουσιάζει ~15% μεγαλύτερη πολυπλοκότητα στην νουκλεοτιδική αλληλουχία από τον μακροπυρήνα, με θεωρητικό μέγεθος τουλάχιστον $120 \cdot 10^6$ ζευγών βάσεων. Επίσης, είναι μεταγραφικά ανενεργός, διαιρείται μιτωτικά και μειωτικά ενώ φέρει την γενετική πληροφορία που θα μεταβιβαστεί στους απογόνους, ύστερα από αμφιγονική αναπαραγωγή (σύζευξη). Ο μακροπυρήνας της *T. thermophila* (του οποίου το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί) είναι πολυπλοειδής, διαθέτει ~180 χρωμοσώματα, ενώ το γονιδίωμα του περιέχει $\sim 104 \cdot 10^6$ ζεύγη βάσεων, είναι δηλαδή μικρότερο από τον μικροπυρήνα. Αποτελεί τον μεταφραστικά ενεργό πυρήνα και διαθέτει ~25000 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Ο πυρήνας

αυτός διαιρείται αμιτωτικά καθώς τα χρωμοσώματα του δεν διαθέτουν κεντρομερίδια.

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω η *Tetrahymena* πολλαπλασιάζεται μονογονικά (βλαστικά) και αμφιγονικά (σεξουαλικά) [38]. Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται βλαστικά όσο διατηρούνται σε πλούσιο θρεπτικό μέσο. Σε αυτές τις συνθήκες ο μικροπυρήνας διαιρείται μιτωτικά ενώ ο μακροπυρήνας αμιτωτικά και το μοίρασμα των χρωμοσωμάτων του είναι τυχαίο. Με αυτό το είδος αναπαραγωγής μειώνεται συνεχώς το γενετικό υλικό του μακροπυρήνα, όμως όταν αυτό μειωθεί πολύ αυτός μπορεί να πολλαπλασιαστεί χωρίς τον διπλασιασμό του κυττάρου [2].

Ο αμφιγονικός πολλαπλασιασμός (βλ. σχήμα 1.8) συμβαίνει όταν κύτταρα *Tetrahymena* βρεθούν σε κατάσταση νηστείας για πολλές ώρες [38]. Αυτά, όμως, πρέπει να καλύπτουν και άλλες δύο προϋποθέσεις: (α) πρέπει να βρίσκονται μαζί κύτταρα με δύο διαφορετικούς πρωτεϊνικούς παράγοντες, τους 'συζευτικούς τύπους' (mating types), (β) και τα δύο είδη κυττάρων να έχουν πετύχει σεξουαλική ωριμότητα, δηλαδή να έχουν συμπληρώσει τουλάχιστον 80 μονογονικές διαιρέσεις. Μισή ώρα μετά την ανάμιξη τους, τα κύτταρα αρχίζουν να σχηματίζουν ζευγάρια και ξεκινάει ο αμφιγονικός πολλαπλασιασμός [38]. Αρχικά, τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται και οι μικροπυρήνες και στα δύο είδη κυττάρων ολοκληρώνουν δύο μιτωτικούς διαχωρισμούς. Από τους τέσσερις (πανομοιότυπους) μικροπυρήνες, ο ένας επιλέγεται, ενώ οι υπόλοιποι τρεις καταστρέφονται. Ο επιλεγμένος μικροπυρήνας διαιρείται μιτωτικά και προκύπτουν δύο πανομοιότυποι προπυρήνες. Ο ένας παραμένει στο μητρικό κύτταρο και ο άλλος μεταναστεύει στο συζευγμένο κύτταρο, με αποτέλεσμα την παρουσία δύο διαφορετικών προπυρήνων σε κάθε κύτταρο. Οι δύο προπυρήνες συντήκονται με αποτέλεσμα τη δημιουργία του συγκάρυου ή αλλιώς, γονιμοποιημένου πυρήνα. Το συγκάρυο, που αποτελεί τον πρόγονο τόσο του μικροπυρήνα, όσο και του μακροπυρήνα του αναπτυσσόμενου κυττάρου, διαιρείται μιτωτικά δύο φορές, παράγοντας τέσσερις διπλοειδείς πυρήνες οργανωμένους σε δύο ζευγάρια. Οι δύο από τους τέσσερις πυρήνες διαφοροποιούνται σε μακροπυρήνες, ενώ οι άλλοι δύο σε μικροπυρήνες, μέσω πολύπλοκων διαδικασιών. Καθώς τα κύτταρα διαχωρίζονται, καταστρέφεται ο παλαιός μακροπυρήνας και ένας εκ των δύο μικροπυρήνων. Σε αυτό το στάδιο, κάθε κύτταρο έχει δύο μακροπυρήνες και δύο μικροπυρήνες και κάτω από

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΕΚΚΡΙΣΗ

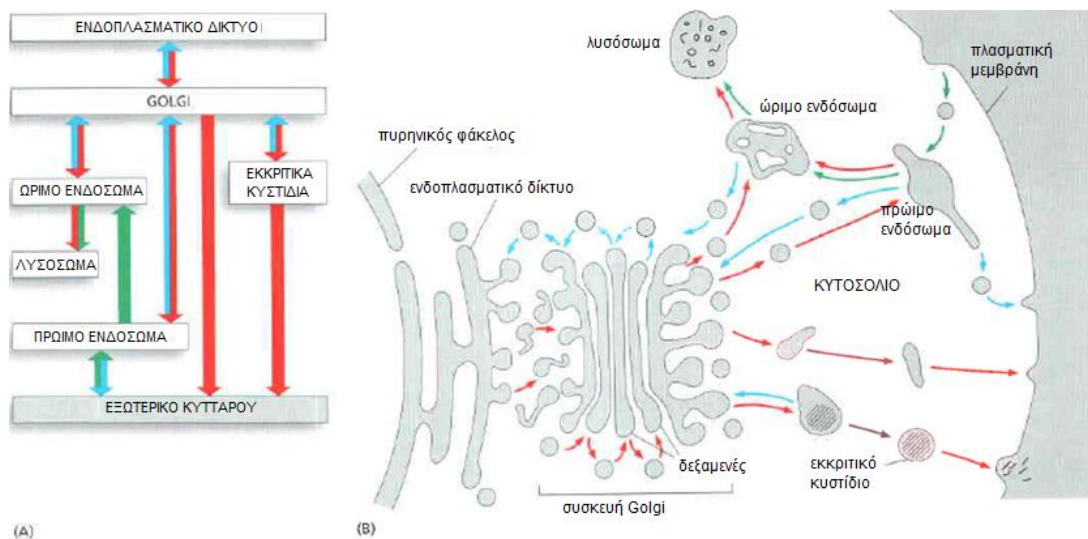
2.1 Η ενδοκυτταρική κυκλοφορία κυστιδίων στα ευκαρυωτικά [40]

Κάθε κύτταρο πρέπει να προμηθευτεί θρεπτικές ουσίες, να επικοινωνήσει με το περιβάλλον γύρω του και να αποκριθεί γρήγορα σε αλλαγές του. Για να επιτύχουν αυτούς τους στόχους, τα κύτταρα προσαρμόζουν την σύσταση της πλασματικής τους μεμβράνης αναλόγως τις ανάγκες. Χρησιμοποιούν ένα πολύπλοκο εσωτερικό μεμβρανικό σύστημα (βλ. σχήμα 2.1) για να προσθέτουν και να αφαιρούν επιφανειακές πρωτεΐνες προσδεμένες στη μεμβράνη, όπως υποδοχείς, κανάλια ιόντων και μεταφορείς. Μέσω της εξωκύτωσης, το βιοσυνθετικό – εκκριτικό μονοπάτι παραδίδει νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια στην πλασματική μεμβράνη και στον εξωκυττάριο χώρο. Μέσω της αντίστροφης διεργασίας, της ενδοκύτωσης, τα κύτταρα αφαιρούν συστατικά της πλασματικής μεμβράνης και τα παραδίδουν σε εσωτερικά διαμερίσματα που λέγονται ενδοσώματα, απ' όπου μπορούν να ανακυκλωθούν πίσω στη μεμβράνη ή να παραδοθούν στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Τα κύτταρα χρησιμοποιούν ακόμη την ενδοκύτωση για να συλλάβουν σημαντικά θρεπτικά συστατικά, όπως βιταμίνες και λιπίδια. Αυτά παραλαμβάνονται μαζί με τα μακρομόρια στα οποία προσδένονται και απελευθερώνονται στα ενδοσώματα ή τα λυσοσώματα, απ' όπου και μεταφέρονται στο κυτοσόλιο για βιοσυνθετικές διεργασίες.

Ο εσωτερικός χώρος, ή αυλός, κάθε οργανιδίου που ανήκει στα εκκριτικά και ενδοκυτταρικά μονοπάτια είναι τοπολογικά ισοδύναμος με τον αυλό των περισσοτέρων άλλων περιβεβλημένων με μεμβράνη διαμερισμάτων και με τον εξωκυττάριο χώρο. Οι πρωτεΐνες μπορούν να ταξιδέψουν σε αυτούς τους χώρους, χωρίς να πρέπει να διασχίσουν τη μεμβράνη, καθώς μεταφέρονται από το ένα διαμέρισμα στο άλλο μέσω μεταφορικών κυστιδίων.

Μέσα στο ευκαρυωτικό κύτταρο, τα μεταφορικά κυστίδια συνεχώς εκβλαστάνουν από μία μεμβράνη και συντήκονται με άλλη, μεταφέροντας μεμβρανικά συστατικά και διαλυτά μόρια, που αναφέρονται συνολικά φορτίο (βλ. σχήμα 2.1). Τα μεταφορικά κυστίδια είναι επιλεκτικά, καθώς μεταφέρουν μόνο τα κατάλληλα μόρια και συντήκονται μόνο με τη μεμβράνη – στόχο. Αυτή η μεμβρανική κυκλοφορία

χρησιμοποιεί υψηλά οργανωμένους, κατευθυνόμενους δρόμους, που επιτρέπουν στο κύτταρο να εκκρίνει, να φάει και να αναδιαμορφώσει την πλασματική του μεμβράνη. Το βιοσυνθετικό – εκκριτικό μονοπάτι οδηγεί από το ενδοπλασματικό δίκτυο στη συσκευή Golgi, και στη συνέχεια στην κυτταρική επιφάνεια ή με ένα παράδρομο του στα λυσοσώματα. Αντίθετα, το ενδοκυτταρικό μονοπάτι οδηγεί από την πλασματική μεμβράνη στο εσωτερικό του κυττάρου, συγκεκριμένα στα ενδοσώματα και τα λυσοσώματα. Σε κάθε περίπτωση, μονοπάτια επαναπρόσληψης ρυθμίζουν την ροή προς την αντίθετη κατεύθυνση, επιστρέφοντας μεμβρανικά τμήματα και πρωτεΐνες πίσω στο διαμέρισμα απ’ όπου προήλθαν.



Σχήμα 2.1: (Α) Διάγραμμα επικοινωνίας διαμερισμάτων που συμμετέχουν στη κυκλοφορία κυστιδίων. Με κόκκινο είναι το βιοσυνθετικό - εκκριτικό μονοπάτι, πράσινο το ενδοκυτταρικό, ενώ μπλε τα μονοπάτια επαναπρόσληψης. (Β) Τα διαμερίσματα που συμμετέχουν στη μεταφορά κυστιδίων. Ο χρωματισμός είναι όπως στο (Α). Από [40].

Στη συνέχεια (βλ. παράγραφο 2.2 και 2.3), θα περιγραφούν συνοπτικά κάποια στάδια του εκκριτικού μονοπατιού στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αυτά είναι η μεταφορά συστατικών από το Trans Golgi Network (TGN) στα λυσοσώματα, καθώς και οι λειτουργίες αυτών των οργανιδίων και πώς σχετίζονται με την έκκριση και η μεταφορά από το TGN στον εξωκυτταρικό χώρο, δηλαδή η εξωκύτωση πρωτεϊνών. Η εξωκύτωση ή έκκριση χωρίζεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, την συνεχή (ή ιδιοσυστατική) και την ρυθμιζόμενη.

2.2 Τα λυσοσώματα και η εμπλοκή τους με το εκκριτικό μονοπάτι [40, 41]

Τα λυσοσώματα, όπως περιγράφηκε και πιο πάνω για την *Tetrahymena* (βλ. παρ. 1.2), είναι οργανίδια γεμάτα με διαλυτά υδρολυτικά ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την ενδοκυτταρική πέψη βιομορίων. Περιέχουν περίπου 40 είδη υδρολυτικών ενζύμων, που περιλαμβάνουν πρωτεάσες, νουκλεάσες, γλυκοζιδάσες, λιπάσες, φωσφατάσες. Όλα είναι όξινες υδρολάσες και για βέλτιστη δραστικότητα χρειάζονται pH 4,5-5, όσο δηλαδή το εσωτερικό των λυσοσωμάτων. Αυτό το pH διατηρείται με την παρουσία μίας αντλίας πρωτονίων στη μεμβράνη των λυσοσωμάτων, η οποία αντλεί H^+ στο εσωτερικό των οργανιδίων.

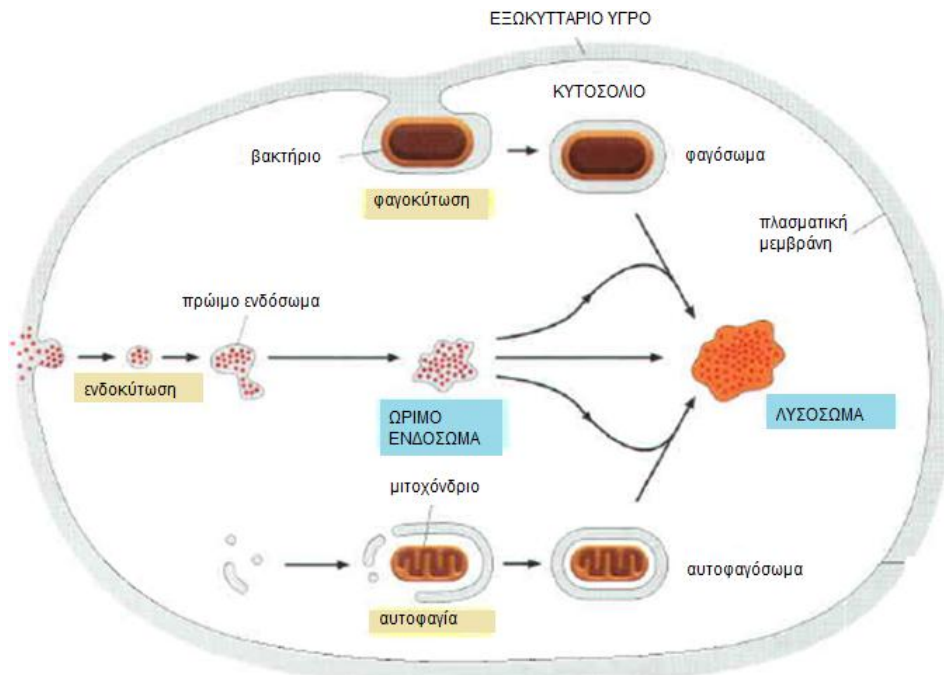
Τα λυσοσώματα αποτελούν σημείο συνάντησης διαφορετικών οδών ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας. Μία οδός που περνάει από το ενδοπλασματικό δίκτυο στη συσκευή Golgi παραδίδει τα υδρολυτικά ένζυμα, ενώ τρεις διαφορετικοί δρόμοι, τουλάχιστον, προμηθεύουν τα λυσοσώματα συστατικά για αποικοδόμηση. Αυτοί είναι η ενδοκύτωση, η αυτοφαγία και η φαγοκύτωση (βλ. σχήμα 2.2).

Η ενδοκύτωση ξεκινά σε εξειδικευμένες περιοχές της μεμβράνης που ονομάζονται καλυμμένες εσοχές (coated pits), από τις οποίες εκβλαστάνουν κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη. Τα κυστίδια αυτά, στη συνέχεια, συντήκονται με τα ενδοσώματα, οργανίδια που αποτελούν τον κύριο σταθμό διαλογής στο ενδοκυτταρικό μονοπάτι. Από το σημείο αυτό, το φορτίο μπορεί να ανακυκλωθεί στη μεμβράνη ή να προωθηθεί στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση.

Η αυτοφαγία αποτελεί τη διαδικασία κατά την οποία ολόκληρα οργανίδια του κυττάρου συντήκονται με λυσοσώματα με σκοπό την καταστροφή τους. Η διαδικασία αρχίζει μέσω εγκόλπωσης του προς αποικοδόμηση οργανιδίου από ένα δίκτυο μεμβρανών, που πιθανώς προέρχονται από το Ε.Δ., δημιουργώντας έτσι ένα αυτοφαγόσωμα. Η σύντηξη των αυτοφαγοσωμάτων με λυσοσώματα δημιουργεί δευτερογενή λυσοσώματα, στα οποία ολοκληρώνεται η αποικοδόμηση των συστατικών του οργανιδίου. Η αυτοφαγία είναι ένα μονοπάτι που υπάρχει σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και είναι αναγκαία για καταστροφή προβληματικών οργανιδίων και επίσης έχει ρόλο στη διαφοροποίηση των κυττάρων.

Η τρίτη πορεία που προμηθεύει στα λυσοσώματα υλικά για αποικοδόμηση είναι η φαγοκύτωση και συμβαίνει μόνο από εξειδικευμένα κύτταρα, όπως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα στα σπονδυλωτά. Τέτοια κύτταρα μπορούν να εγκολπώσουν

μεγάλα σωματίδια και μικροοργανισμούς σχηματίζοντας το φαγόσωμα, το οποίο μπορεί να συντηχθεί με λυσόσωμα.



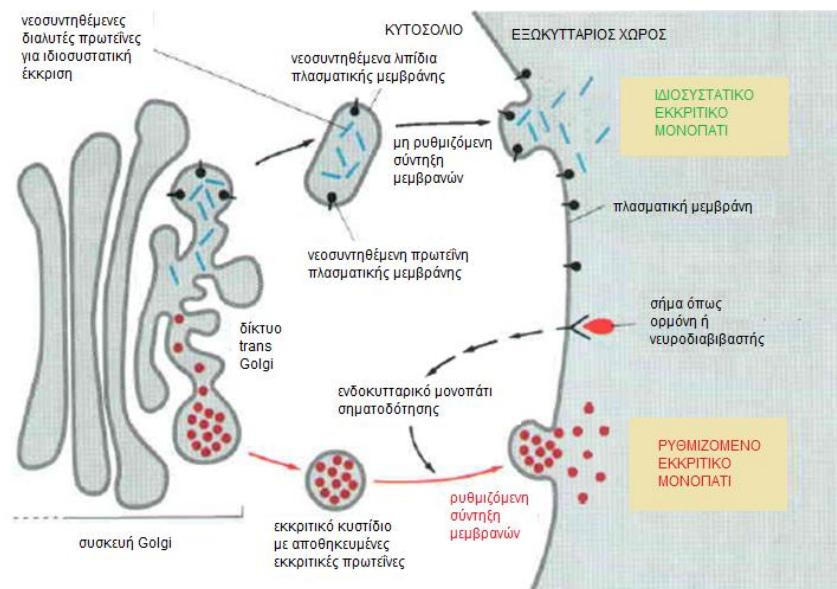
Σχήμα 2.2: Τρία μονοπάτια αποικοδόμησης στα λυσοσώματα. Από [40].

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, τα υδρολυτικά ένζυμα των λυσοσωμάτων προέρχονται από ένα μονοπάτι που περνάει από το Ε.Δ. στη συσκευή Golgi. Πώς όμως οι πρωτεΐνες αυτές αναγνωρίζονται και ξεδιαλέγονται από τις υπόλοιπες που φτάνουν στο TGN; Η απάντηση είναι ότι φέρουν ένα μοναδικό δείκτη 6-φωσφορικής μαννόζης (M6P), που προστίθεται αποκλειστικά στους N-συνδεδεμένους ολιγοσακχαρίτες αυτών των ενζύμων πιθανότατα καθώς εισέρχονται στο cis-Golgi. Ο δείκτης αυτός αναγνωρίζεται από έναν ειδικό M6P διαμεμβρανικό υποδοχέα του TGN, ο οποίος προσδένει τις λυσοσωμικές υδρολάσες και τις βοηθά να πακεταριστούν σε ειδικά μεταφορικά κυστίδια. Τέλος, τα κυστίδια αυτά συντήκονται με λυσοσώματα.

Ένα σημαντικό σημείο σύνδεσης των λυσοσωμάτων με την έκκριση, είναι ότι κατά την κυτταροφαγία και αυτοφαγία τα δευτερογενή λυσοσώματα συνήθως εκκρίνουν τα προϊόντα της πέψης στον εξωκυττάριο χώρο. Ακόμη, κάποια κύτταρα διαθέτουν εξειδικευμένα λυσοσώματα, τα οποία μπορούν να εκκρίνουν τα λυσοσωμικά τους ένζυμα στον εξωκυττάριο χώρο μέσω εξωκύτωσης. Τέτοια κύτταρα είναι τα μελανοκύτταρα και τα κύτταρα της *Tetrahymena* (βλ. παρ. 2.4.1).

2.3 Το εκκριτικό μονοπάτι και η έκκριση πρωτεϊνών [40, 41]

Η πορεία των προς έκκριση πρωτεϊνών ξεκινάει από το Ε.Δ., περνά από τις δεξαμενές του Golgi και καταλήγει στο TGN. Το σημείο αυτό, αποτελεί σταθμό διαλογής και οι πρωτεΐνες από δω μέσω κυστιδιακής μεταφοράς είτε κατευθύνονται προς τα λυσοσώματα, είτε προωθούνται για έκκριση. Δύο είναι τα μονοπάτια που αφορούν την έκκριση μορίων στον εξωκυττάριο χώρο. Αυτό της συνεχούς ή ιδιοσυστατικής (constitutive) και αυτό της ρυθμιζόμενης (regulated) έκκρισης (βλ. σχήμα 2.3).



Σχήμα 2.3: Τα μονοπάτια συνεχούς και ρυθμιζόμενης έκκρισης. Από [40].

Στο μονοπάτι της συνεχούς έκκρισης πρωτεϊνών, τα κυστίδια μεταφοράς που προορίζονται για την πλασματική μεμβράνη εκβλαστάνουν από το TGN μέσω μιας σταθερής συνεχόμενης ροής και συντήκονται αυθόρμητα με την πλασματική μεμβράνη, όταν έρθουν σε επαφή με αυτή. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και τα λιπίδια των κυστιδίων αυτών προμηθεύουν την πλασματική μεμβράνη με νέα δομικά συστατικά (πχ υποδοχείς), ενώ οι διαλυτές τους πρωτεΐνες εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο (πχ αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες). Ακόμη, μέσω του μονοπατιού αυτού τα κύτταρα του συνδετικού ιστού εκκρίνουν τις πιο πολλές πρωτεογλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας. Το μονοπάτι αυτό, λοιπόν, πρέπει να είναι λειτουργικό σε όλα τα κύτταρα. Σε μη πολωμένα κύτταρα, όλες οι πρωτεΐνες με μη ειδικά πεπτιδικά σήματα διαλογής αποδίδονται στη κυτταρική επιφάνεια μέσω του μονοπατιού της συνεχούς έκκρισης.

Η ρυθμιζόμενη έκκριση χρησιμοποιείται από εξειδικευμένα κύτταρα, τα οποία πρέπει να εκκρίνουν άμεσα κάποια από τα προϊόντα τους, σε απόκριση σε ειδικό εξωκυττάριο σήμα. Τα προϊόντα αυτά είναι αποθηκευμένα σε συμπυκνωμένη μορφή σε ειδικά εκκριτικά κυστίδια, που λέγονται εκκριτικά κοκκία (secretory granules) ή κυστίδια πυκνού πυρήνα (dense core vesicles). Τα κυστίδια αυτά παραμένουν στο κυτταρόπλασμα μέχρι να επαχθεί η σύντηξη τους με την πλασματική μεμβράνη που πυροδοτείται από ένα ειδικό εξωκυττάριο σήμα. Με τον τρόπο αυτό, το κύτταρο μπορεί να εκκρίνει μαζικά μεγάλες ποσότητες είτε μικρών μορίων (πχ ισταμίνη), είτε πρωτεϊνών (πχ ορμόνη ή πεπτικό ένζυμο).

Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για εκκριτικά κοκκία πακετάρονται στο TGN σε κατάλληλα κυστίδια μέσω επιλεκτικής συσσωμάτωσης, λόγω αλλαγής στο pH (οξίνιση) του αυλού του TGN. Για να σχηματιστούν αυτά τα συσσωματώματα πρέπει να υπάρχουν κατάλληλα πεπτιδικά σήματα στις πρωτεΐνες αυτές, που πιστεύεται ότι είναι σηματοδοτικές περιοχές. Τα κυστίδια αυτά καλύπτονται με κλαθρίνη, αποκόπτονται από το TGN, αποβάλλουν το κάλλυμά τους και το υλικό τους συμπυκνώνεται περαιτέρω, μέχρι και 200 φορές περισσότερο σε σχέση με τη συγκέντρωσή τους στο TGN. Η συμπύκνωση αυτή λαμβάνει χώρα ταχύτατα, πιθανότατα ως αποτέλεσμα της περαιτέρω οξίνισης του αυλού του κυστιδίου.

Εκτός από την συμπύκνωση, πολλές πρωτεΐνες υπόκεινται σε πρωτεόλυση. Για παράδειγμα, πολλές πολυπεπτιδικές ορμόνες και νευροπεπτίδια, καθώς και εκκρινόμενα υδρολυτικά ένζυμα συντίθεται ως αδρανή πρόδρομα μόρια. Η πρωτεόλυση είναι αναγκαία για να απελευθερωθούν τα δραστικά μόρια. Η πρωτεολυτική διάσπαση ξεκινά στο TGN, συνεχίζεται στα εκκριτικά κοκκία και, μερικές φορές, στο εξωκυττάριο υγρό μετά την έκκριση.

Αφότου τα κυστίδια γεμίσουν και ωριμάσουν, πρέπει να φτάσουν στο μέρος της έκκρισης, όπου για μερικά κύτταρα (πχ νευρικά) είναι πολύ μακριά από την συσκευή Golgi. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της κίνησης πάνω σε μικροσωληνίσκους. Όταν φτάσουν τα κυστίδια στην πλασματική μεμβράνη, περιμένουν εκεί, μέχρι το κύτταρο να λάβει το σήμα για έκκριση, και μετά συντήκονται με αυτή. Το σήμα αυτό είναι συνήθως μία ορμόνη που προσδένεται σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και επάγει ενδοκυττάρια μηνύματα, που συχνά περιλαμβάνουν την παροδική αύξηση στη συγκέντρωση του ελεύθερου Ca^{2+} στο κυτοσόλιο. Η πρόσδεση Ca^{2+} σε ειδικούς αισθητήρες επάγει την σύντηξη των εκκριτικών κοκκίων

με τη μεμβράνη. Τέλος, τα συστατικά της μεμβράνης των εκκριτικών κυστιδίων ανακυκλώνονται, μετά τη σύντηξη τους, μέσω ενδοκύτωσης και ενδοσωμάτων προς το TGN, όπου μπορούν και πάλι να χρησιμοποιηθούν. Η ανακύκλωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα να παραμένει σταθερή η κατανομή των μεμβρανικών συστατικών στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα.

2.4 Πορείες έκκρισης στην *Tetrahymena*

Η *Tetrahymena* διαθέτει δύο καλά χαρακτηρισμένες πορείες έκκρισης πρωτεϊνών, την ιδιοσυστατική έκκριση λυσοσωματικών ενζύμων και την ρυθμιζόμενη έκκριση βλεννοκυστών. Ακόμη, υπάρχουν και λιγότερο καλά μελετημένες πορείες για τις οποίες θα αναφερθούμε στη συνέχεια.

2.4.1 Ιδιοσυστατική έκκριση λυσοσωματικών ενζύμων

Είναι γνωστό εδώ και πολλά χρόνια ότι η *Tetrahymena* μπορεί να εκκρίνει όξινες υδρολάσες στο εξωκυττάριο μέσο με ιδιοσυστατικό τρόπο, τόσο σε θρεπτικό υλικό, όσο και σε μέσο ασιτίας. Ανάμεσα στα εκκρινόμενα ένζυμα που έχουν ανιχνευθεί είναι όξινες φωσφατάσες, νουκλεάσες, πρωτεάσες, λιπάσες, γλυκοζιδάσες και φωσφολιπάσες [42].

Ο μηχανισμός της έκκρισης των λυσοσωματικών ενζύμων στη *Tetrahymena* αποτέλεσε για πολλά χρόνια αντικείμενο μελέτης, καθώς οι ερευνητές δυσκολεύονταν να προσδιορίσουν την ενδοκυτταρική πηγή των ενζύμων αυτών, καθώς και την περιοχή της έκκρισης. Αρχικά, ο Muller [43] μελέτησε την κινητική της έκκρισης των ενζύμων αυτών, και αποφάνθηκε ότι δεν προέρχονται από λύση των κυττάρων. Χρησιμοποιώντας, ακόμη, φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση συγκέντρωσης, διαχώρισε δύο κλάσματα στα οποία περιέχονται όξινες υδρολάσες και συμπέρανε ότι τα εκκρινόμενα ένζυμα προέρχονταν από το πιο πυκνό από τα δύο κλάσματα. Ακόλουθες μελέτες του Blum και των συνεργατών του [44] επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα του Muller και πρότειναν ότι οι υδρολάσες εκκρίνονταν από τον κυτοπρωκτό κατά τη διαδικασία της φαγοκύτωσης. Άλλες υποθέσεις της εποχής ήταν ότι τα ένζυμα ενσωματώνονταν στις μεμβράνες των βλεννοκυστών και απελευθερώνονταν από κει.

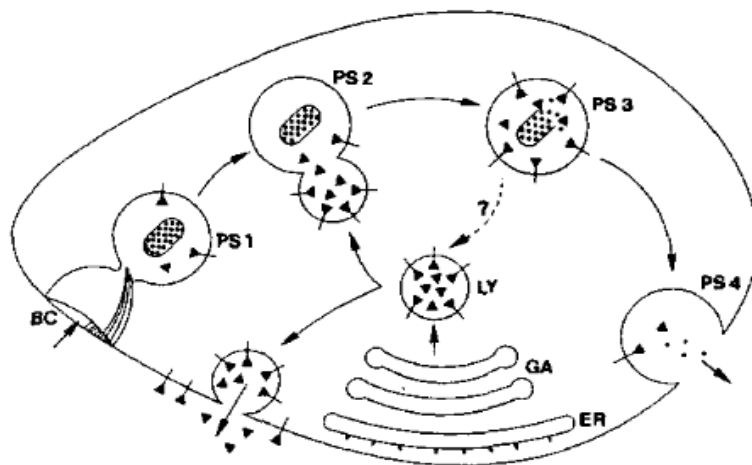
Όταν η ομάδα του Banno [45] μελέτησε την κινητική της έκκρισης των λυσοσωματικών ενζύμων στην *Tetrahymena pyriformis*, σε συνθήκες αστίας, μπόρεσε να τα κατατάξει σε τρεις κατηγορίες βάσει της ταχύτητας έκκρισης τους. Στην πρώτη κατηγορία, που περιλαμβάνει την όξινη φωσφατάση, τη β-γλυκοζιδάση και την α-γαλακτοζιδάση, τα ένζυμα εκκρίνονται αργά, με ~4% της κυτταρικής τους δραστηριότητας να εκκρίνεται κάθε ώρα. Η δεύτερη κατηγορία ενζύμων εκκρίνεται με ενδιάμεση ταχύτητα, ~11-15% την ώρα, και περιλαμβάνει την α-γλυκοζιδάση, την α-μαννοζιδάση και την β-γαλακτοζιδάση. Τέλος, η τρίτη ομάδα αποτελείται από την N-ακετυλο-β-εξοζαμινιδάση, η οποία εκκρίνεται με ταχύ ρυθμό (~22% κυτταρικής δραστηριότητας την ώρα). Σύμφωνα με την ομάδα του Banno, τα αποτελέσματα αυτά δεν θα μπορούσαν να εξηγηθούν με την ύπαρξη ενός μόνο υποπληθυσμού λυσοσωματικών κυστιδίων, κάτι που υποστήριξε ο Muller.

Η ανακάλυψη και η χρήση μεταλλαγμένων στελεχών *T. thermophila* έδωσε απαντήσεις σε αρκετά ερωτήματα [2]. Ένα θερμοευαίσθητο στέλεχος ανίκανο να σχηματίσει και, συνεπώς, να εκκενώσει τροφικά κενοτόπια, βρέθηκε να εκκρίνει μεγάλες ποσότητες όξινων υδρολασών σε περιοριστική θερμοκρασία. Ένα δεύτερο μεταλλαγμένο στέλεχος, το MS-1 [46, 47], το οποίο δεν μπορεί να εκκρίνει λυσοσωματικά ένζυμα, βρέθηκε να περιέχει όξινες υδρολάσες στα τροφικά κενοτόπιά του. Αυτές οι δύο παρατηρήσεις αποδεικνύουν ότι τα λυσοσωματικά ένζυμα δεν εκκρίνονται μέσω της εκκένωσης τροφικών κενοτοπίων, συνεπώς τα ένζυμα των φαγολυσοσωμάτων αποικοδομούνται ή ανακυκλώνονται πριν την εκκένωση. Ακόμη, στελέχη ανίκανα να απελευθερώσουν τα περιεχόμενα των βλεννοκυστών, μπορούν να εκκρίνουν κανονικά όξινες υδρολάσες. Αυτό αφήνει μόνο τον υποπληθυσμό που παρατήρησε ο Muller ως πηγή της έκκρισης.

Πώς όμως ο υποπληθυσμός αυτός μπορούσε να συνδυαστεί με τις κινητικές μελέτες της ομάδας του Banno; Η απάντηση δόθηκε το 1993, από την ομάδα του Kiy [48]. Αυτός απέδειξε ότι ο ελαφρύτερος υποπληθυσμός που εντόπισε ο Muller με δραστηριότητα λυσοσωματικών ενζύμων ήταν, στην πραγματικότητα, τμήματα επιφανειακών μεμβρανών στα οποία η δραστηριότητα εντοπιζόταν στην εξωτερική μεριά των μεμβρανών. Ακόμη, με χρήση μαγνητικών σωματιδίων διαχώρισε τον πυκνότερο υποπληθυσμό σε δύο κλάσματα, ένα που περιέχει τα φαγοσώματα και φαγολυσοσώματα και ένα ξεχωριστό κλάσμα που περιείχε κυστίδια με

δραστικότητα λυσοσωματικών ενζύμων. Αφού ο ελαφρύτερος υποπληθυσμός, καθώς και τα φαγολυσοσώματα δεν ήταν οι πηγές των εκκρινόμενων λυσοσωματικών ενζύμων, υπέθεσαν ότι τα κυστίδια ήταν λυσοσώματα, τα οποία μπορούσαν να συντηχθούν με φαγοσώματα καθώς και με την πλασματική μεμβράνη. Η εύρεση ότι υπάρχουν μεμβρανικές όξινες υδρολάσες έλυσε το πρόβλημα της κινητικής, καθώς τα κυστίδια που συντήκονται με τη μεμβράνη παραδίδουν τόσο μεμβρανικά όσο και διαλυτά ένζυμα. Τα μεμβρανικά μπορούν να ενσωματωθούν με τη μεμβράνη ή να ανακυκλωθούν, ενώ τα διαλυτά, όπως η N-ακετυλο-β-εξοζαμινιδάση, εκκρίνονται συνέχεια.

Σύγχρονες μελέτες του εργαστηρίου μας αποκάλυψαν την εμπλοκή των φωσφοϊνοσιτιδίων στη ρύθμιση της έκκρισης των λυσοσωματικών ενζύμων, καθώς και στην κυκλοφορία των λυσοσωμάτων και φαγολυσοσωμάτων [49, 50].



Σχήμα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση πορείας λυσοσωμάτων στη *Tetrahymena*. Τα λυσοσωματικά ένζυμα συντίθενται στο Ε.Δ., περνάνε από την συσκευή Golgi και στοχεύονται από, μέχρι στιγμής, άγνωστα σήματα στα λυσοσώματα (LY). Τα λυσοσώματα μπορούν να συντηχθούν με τα φαγοσώματα (PS1), σχηματίζοντας φαγολυσοσώματα (PS2, PS3) και τα άπεπτα συστατικά εκκινούνται από τον κυτοπρωκτό (PS4). Επίσης, τα λυσοσώματα μπορούν να συντηχθούν με την πλασματική μεμβράνη, σε άγνωστους τρόπους, ενσωματώνοντας μεμβρανικές μορφές λυσοσωματικών ενζύμων σε αυτή, και ελευθερώνοντας διαλυτά ένζυμα στο μέσο. (?) Τα λυσοσωματικά ένζυμα εκκρίνονται, σε πολύ μικρές ποσότητες, από το κυτοπρωκτό. Αυτό σημαίνει ότι είτε αποικοδομούνται είτε ανακυκλώνονται πριν την εκκένωση. Από [48].

Τα λυσοσωματικά ένζυμα της *Tetrahymena* συντίθενται σαν προπρωτεΐνες και εκκρίνονται στη δραστική τους μορφή, περιέχουν ένα N-συνδεδεμένο

πολυσακχαρίτη, όμως αυτός δεν διαθέτει τα κατάλοιπα 6-φωσφορικής μαννόζης [2] που, όπως είδαμε και πιο πάνω, είναι αναγκαία για την στόχευση των ενζύμων στα λυσοσώματα στα κύτταρα των θηλαστικών [40]. Ακόμα δεν έχει βρεθεί η περιοχή σύντηξης των λυσοσωμάτων με την πλασματική μεμβράνη, εικάζεται όμως ότι γίνεται από την περιοχή των παρασωματικών σάκων, τις μόνες θέσεις, δηλαδή, που έρχεται σε επαφή η πλασματική μεμβράνη με το κυτταρόπλασμα, χωρίς την παρεμβολή του επιπλασμίου ή άλλων δομών [2].

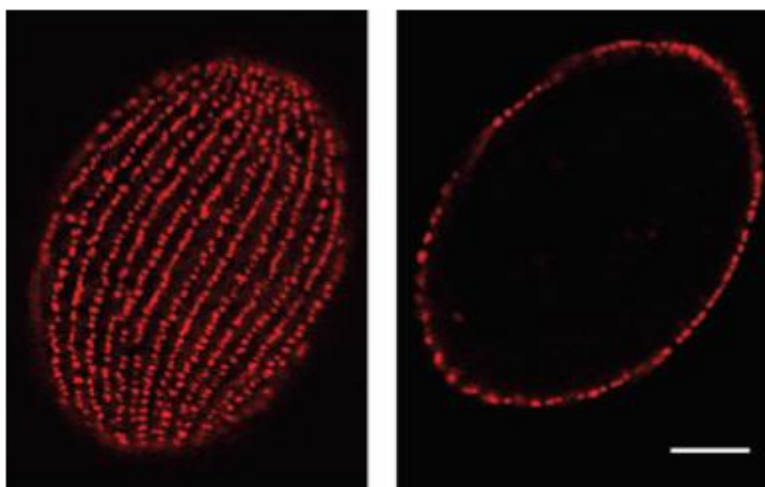
Συνολικά, φαίνεται ότι η έκκριση των όξινων υδρολασών στη *Tetrahymena* είναι μια εξελικτική προσαρμογή με μεγάλη βιολογική σημασία [42]. Καταρχήν, είναι αναγκαία για την επιβίωση, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό της, καθώς της επιτρέπει την εξωκυττάρια πέψη ζωντανών ή νεκρών ιστών με αποτέλεσμα την εύκολη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών. Παράλληλα, η έκκριση των φωσφολιπασών A₁ και C, επιτρέπει στη *Tetrahymena* να αμυνθεί ή να επιτεθεί σε ανταγωνιστές της, ενώ η ίδια δεν κινδυνεύει από την δράση αυτών των ενζύμων λόγω της παρουσίας μεγάλου αριθμού φωσφονολιπιδίων στη πλασματική μεμβράνη της. Είναι αξιοσημείωτο ότι η *Tetrahymena* όχι μόνο ανέχεται, αλλά και αναπτύσσεται με ευκολία σε περιβάλλοντα με χαμηλά pH (μέχρι 4,5), που συνήθως αποτελούν αποικίες για μύκητες και ζύμες.

2.4.2 Ρυθμιζόμενη έκκριση βλεννοκυστών

Η απελευθέρωση πολυπεπτιδίων ως απόκριση σε εξωκυττάρια σήματα είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των ενδοκρινών, εξωκρινών και νευρικών κυττάρων και βασίζεται στη ρυθμιζόμενη εξωκύτωση εκκριτικών πυκνών κοκκίων. Υπάρχει ενδιαφέρον σε αυτό τον τρόπο έκκρισης, καθώς είναι σημαντικός για την ανθρώπινη φυσιολογία και, επίσης, αποτελεί ένα πολύπλοκο μονοπάτι μεμβρανικής κυκλοφορίας που περιλαμβάνει: (1) αντιστρεπτές συγκροτήσεις μακρομορίων, εξειδικευμένες για συγκεκριμένα κυτταρικά διαμερίσματα, (2) την εκβλάστηση μη καλλυμένων κυστιδίων, (3) την ωρίμανση και αναδιαμόρφωση συστατικών του αυλού και της μεμβράνης και (4) την εξαρτώμενη από ερέθισμα σύντηξη μεμβρανών. Τα εκκριτικά κοκκία είναι απόντα στους περισσότερους μονοκύτταρους οργανισμούς, αλλά εξαιρετικά ανεπτυγμένα στα βλεφαριδωτά, τα οποία αποτελούν ελκυστικά μοντέλα για την μελέτη τους [51].

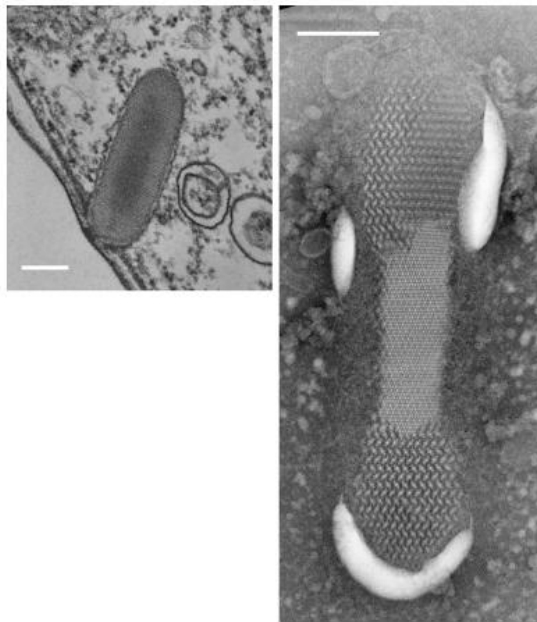
Οι βλεννοκύστες ή DCG (Dense core granules) της *Tetrahymena* είναι ελλειψοειδείς, μεμβρανικά περιβαλλόμενες δομές, με μήκος 1 μm πλάτος 0,2 μm [51], που διαθέτουν ένα κρυσταλλικό περιεχόμενο. Βρίσκονται αγκυροβολημένες κάθετα στη μεμβράνη, ανάμεσα στους φατνιακούς σάκους με τις άκρες τους (tips) να αποτελεί το μόνο σημείο επαφής με τη μεμβράνη (βλ. σχήματα 1.6 και 2.6). Ένα κύτταρο *Tetrahymena* διαθέτει περίπου 4500 βλεννοκύστες, διατεταγμένες σε 40 σειρές παράλληλα στις σειρές των βλεφαρίδων (βλ. σχήμα 2.5). Η μία σειρά βρίσκεται ακριβώς δίπλα από τις βλεφαρίδες, ενώ η επόμενη της βρίσκεται στο χάρισμα των φατνιακών σάκων, ανάμεσα σε δύο σειρές βλεφαρίδων [2].

Η *Tetrahymena* μπορεί να εξωκυτώσει ύστερα από κατάλληλο ερέθισμα συγχρονισμένα τις βλεννοκύστες της, οι οποίες αφού συντηχθούν με την πλασματική μεμβράνη, απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους, το οποίο από κρυσταλλική μορφή παίρνει τη μορφή ενός παχύρευστου τρισδιάστατου πλέγματος νημάτων που περιβάλλει το κύτταρο (βλ. σχήμα 2.6). Τα φυσικά σήματα που προκαλούν συγχρονισμένη εξωκύτωση στη *Tetrahymena* δεν είναι γνωστά και μπορεί να παράγονται από περιβαλλοντικές διακυμάνσεις, όπως διακυμάνσεις στη θερμοκρασία και την οσμωτική ισχύ ή ύστερα από αλληλεπιδράσεις με άλλους οργανισμούς. Σε κάθε περίπτωση, όμως, προκαλείται αύξηση της συγκέντρωσης του κυτοσολικού Ca^{2+} , η οποία είναι αναγκαία τόσο για την εξωκύτωση των βλεννοκυστεών, όσο και για την αναδιαμόρφωση του περιεχομένου τους από κρυσταλλικό σε παχύρευστο πλέγμα [2].



Σχήμα 2.5: Αγκυροβολημένα εκκριτικά κοκκία στη *T. thermophila* όπως φαίνονται με χρήση έμμεσου ανοσοφθορισμού. Αριστερά, επιφανειακή τομή. Δεξιά, οπτική εγκάρσια τομή. Από [51].

Ο ρόλος του σχηματιζόμενου πλέγματος είναι ακόμη άγνωστος, εικάζεται όμως ότι χρησιμοποιείται ως μηχανισμός άμυνας για τους θηρευτές ή ως μηχανισμός επίθεσης απέναντι σε άλλους μικροοργανισμούς, καθώς λόγω της κολλώδους και παχύρρευστης φύσης του μπορεί να τους ακινητοποιεί. Οι μεταλλάξεις στο μονοπάτι της ρυθμιζόμενης έκκρισης είναι θανατηφόρες για τους ανώτερους πολυκύτταρους οργανισμούς. Κάτι τέτοιο, όμως, δεν συμβαίνει και στους μονοκύτταρους, όπως φαίνεται από την ανάπτυξη μεταλλαγμένων στελεχών *T. thermophila*. Αυτό δείχνει ότι το μονοπάτι ρυθμιζόμενης έκκρισης, σε αντίθεση με αυτό της συνεχούς, δεν είναι αναγκαίο για τη βασική κυτταρική ανάπτυξη [51].



Σχήμα 2.6: Αριστερά: Τομή ηλεκτρονικής μικροσκοπίας από ένα αγκυροβολημένο εκκριτικό κοκκίο, στο οποίο φαίνεται η κρυσταλλική οργάνωση του πυρήνα. Δεξιά: ένα απομονωμένο εκκριτικό κοκκίο στο οποίο ο πυρήνας έχει αρχίσει να εξαπλώνεται και από τα δύο άκρα. Από [51].

Τα εκκριτικά κοκκία της *Tetrahymena* περιέχουν δύο διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών, με διακριτούς ρόλους και ανεξάρτητο τρόπο μεταφοράς κατά τη βιοσύνθεση των κοκκίων. Ο πυρήνας αποτελείται κυρίως από μία οικογένεια 6 πρωτεϊνών, τις GRL (granule lattice) 1, 3, 4, 5, 7, 8. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι όξινες, με βάρος 40 kDa, μπορούν να προσδένουν Ca^{2+} , εμφανίζουν μικρή αμινοξική ομολογία αλλά μεγάλη δομική ομοιότητα [51, 52]. Η ομάδα αυτή είναι απαραίτητη τόσο για το σχηματισμό του 'πυρήνα', όσο και για την άμεση εξάπλωση του

περιεχομένου του κατά την έκκριση. Κάθε μία από αυτές είναι ομοιόμορφα κατανομημένη στο πλέγμα, και πιθανώς οι 6 GRL αλληλοσυνδέονται για να σχηματίσουν μια επαναλαμβανόμενη υπομονάδα του πλέγματος. Η συναρμολόγηση του πυρήνα ξεκινά στο ενδοπλασματικό δίκτυο, με το σχηματισμό ειδικών ετερο-ολιγομερών συμπλόκων προ-πεπτιδίων GRL, ενώ η προτεολυτική επεξεργασία τους οδηγεί στο σχηματισμό ώριμων βλεννοκυστών. Επίσης, έχουν βρεθεί άλλα τέσσερα μέλη της οικογένειας των GRL, τα 2, 6, 9, και 10, τα οποία βρίσκονται σε πολύ μικρότερη ποσότητα και δεν είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό του πυρήνα. Ο ρόλος αυτών των πρωτεϊνών είναι, μάλλον, η αλληλεπίδρασή τους με πρωτεΐνες που δεν ανήκουν στο πλέγμα [52].

Η δεύτερη οικογένεια πρωτεϊνών των βλεννοκυστών της *Tetrahymena* χαρακτηρίζεται από μία καρβοξυ-τελική δομική περιοχή β/γ - κρυσταλλίνης. Ανάλυση του γονιδιώματος της *Tetrahymena* έδειξε ότι υπάρχουν 13 υποθετικές πρωτεΐνες με αυτή τη περιοχή, από τις οποίες έχουν αναγνωριστεί οι δύο, η IGR1 (induced upon granule regeneration 1) και η GRT1 (granule tip 1). Οι πρωτεΐνες αυτές δεν είναι απαραίτητες ούτε για τον σχηματισμό του 'πυρήνα', ούτε για την εξάπλωση του περιεχομένου του, ενώ είναι διαλυτές μετά την έκκριση και δεν υπόκεινται σε προτεολυτική επεξεργασία. Επίσης, εντοπίζονται στην άκρη της βλεννοκύστης που έρχεται σε επαφή με την πλασματική μεμβράνη. Θεωρείται ότι έχουν, μάλλον, κάποια λειτουργία μετά την έκκριση [53, 54].

Ακόμη, σε παλαιότερες μελέτες είχε ανιχνευτεί δραστικότητα όξινης φωσφατάσης στις βλεννοκύστες, πιθανώς ως μεμβρανική μορφή προσδεμένη στις μεμβράνες τους [55].

Ο μηχανισμός του σχηματισμού και έκκρισης των βλεννοκυστών στην *Tetrahymena* που προτείνεται είναι ο εξής [53, 54, 56]: (1) στον αυλό του Ε.Δ. συντίθενται οι πρωτεΐνες (κάποιες με τη μορφή προ-πεπτιδίων) που προορίζονται για τις βλεννοκύστες από όπου και κατευθύνονται στη συσκευή Golgi, (2) εκεί οι πρωτεΐνες της οικογένειας των GRLs οργανώνονται σε ετερο-ολιγομερή σύμπλοκα προ-πρωτεϊνών, (3) τα κυστίδια με αυτές τις πρωτεΐνες αποκόπτονται από το TGN, συμπυκνώνονται και αρχίζουν να σχηματίζουν συσσωματώματα, (4) οι πρωτεΐνες της οικογένειας με δομική περιοχή β/γ-κρυσταλλίνης κατευθύνονται με άλλα κυστίδια προς τις βλεννοκύστες, (5) η προτεολυτική τροποποίηση των πρωτεϊνών των βλεννοκυστών επιτρέπει την περεταίρω κρυστάλλωση του φορτίου τους και

την ωρίμανσή τους, (6) οι ώριμες βλεννοκύστες αγκυροβολούν στη μεμβράνη, (7) κατάλληλο εξωκυττάριο σήμα που αυξάνει την κυτοσολική συγκέντρωση Ca^{2+} δίνει σήμα για την συγχρονισμένη εξωκύτωση των βλεννοκυστών, (8) η σύντηξη της μεμβράνης με τη βλεννοκύστη διευκολύνεται από ένα διαμεμβρανικό σωματίδιο που λέγεται ροζέτα. Η ροζέτα αποτελείται από 11P και E διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, από τις οποίες οι P συνδέονται με την κυτταροπλασματική μεριά της πλασματικής μεμβράνης και οι E με την εξωτερική της. Η επαφή της βλεννοκύστης με τη ροζέτα σχηματίζει έναν πόρο, ο οποίος μεγαλώνει και από εκεί απελευθερώνεται το περιεχόμενο της, (9) αλλαγές στις διαμορφώσεις των GRLs επιτρέπουν την απότομη εξάπλωση τους σε ένα πλέγμα γύρω από το κύτταρο, ενώ οι διαλυτές πρωτεΐνες των βλεννοκυστών απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο και (10) τα τελευταία βήματα της έκκρισης επάγουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων τα οποία θα παράγουν καινούριο υλικό για τις βλεννοκύστες.

2.4.3 Άλλες μορφές έκκρισης στη *Tetrahymena*

Όπως είδαμε η *Tetrahymena* διαθέτει δύο καλά χαρακτηρισμένες πορείες έκκρισης, την ιδιοσυστατική έκκριση λυσοσωματικών ενζύμων και την ρυθμιζόμενη εξωκύτωση των βλεννοκυστών (βλ. παρ. 2.4.1 και 2.4.2). Όμως η *Tetrahymena* θα πρέπει με κάποιο τρόπο να προμηθεύει τη πλασματική μεμβράνη της με λιπίδια και πρωτεΐνες, απαραίτητα συστατικά για την επιβίωση και την ανάπτυξη της [2]. Χρήση μεταλλαγμένων στελεχών που δεν μπορούν να σχηματίσουν και να εκκενώσουν τροφικά κενοτόπια, απέδειξε ότι αυτά τα οργανίδια δεν είναι απαραίτητα για την διατήρηση της ζωής, καθώς τα κύτταρα αναπτύσσονταν κανονικά σε πλούσιο θρεπτικό μέσο. Το ίδιο συνέβη και με κύτταρα που δεν μπορούσαν να εκκρίνουν λυσοσωματικά ένζυμα, καθώς και με κύτταρα ανίκανα να σχηματίζουν ή να απελευθερώνουν βλεννοκύστες. Άρα, θα πρέπει να υπάρχει ένας άλλος μηχανισμός παράδοσης πρωτεϊνών και λιπιδίων της μεμβράνης, αναγκαίος για την διατήρηση της ζωής. Τα ευκαρυωτικά, γενικά, χρησιμοποιούν το μονοπάτι της συνεχούς έκκρισης για αυτή τη λειτουργία, με κυστίδια τα οποία συντήκονται συνεχώς με την πλασματική μεμβράνη, χωρίς την ανάγκη εξωκυτταρίου σήματος. Ακόμη, το μονοπάτι αυτό είναι αναγκαίο για έκκριση πρωτεϊνών με θεμελιώδεις κυτταρικούς ρόλους όπως σήματα για διαφοροποίηση,

επιβίωση, κινητικότητα και πολλαπλασιασμό, ή ακόμα για αναχαίτιση ανάπτυξης ανταγωνιστών και ευκολότερη πρόσβαση τροφής [57]. Δεν θα μπορούσαν να απουσιάζουν αυτές οι λειτουργίες από την *Tetrahymena*.

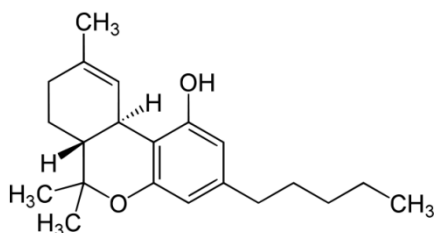
Μέχρι στιγμής δεν γνωρίζαμε τίποτα για το μονοπάτι αυτό στη *Tetrahymena*, ούτε τι πρωτεΐνες εκκρίνονται μέσω αυτού, ούτε κάτι σε επίπεδο στόχευσης και διαλογής στα κυστίδια, παρά μόνο με σύγκριση με άλλα ευκαρυωτικά κύτταρα [58]. Πρόσφατα, όμως, δημοσιεύτηκε μια μελέτη [57] στην οποία αναλύθηκαν οι πρωτεΐνες του εκκριτώματος της *T. thermophila* με χρήση LC-MS-MS, τόσο σε πλούσιο θρεπτικό μέσο, όσο και σε μέσο ασιτίας. Η ανάλυση αποκάλυψε την ύπαρξη 207 εκκρινόμενων πρωτεϊνών, από τις οποίες κάποιες εκκρίνονταν εξειδικευμένα στο θρεπτικό υλικό και άλλες στο ανόργανο μέσο. Ανάμεσα σε αυτές βρέθηκαν υδρολάσες όπως πρωτεάσες και γλυκοζυλο-υδρολάσες. Ακόμη, βρέθηκαν πρωτεΐνες με δομικό, σηματοδοτικό ή αμυντικό ρόλο, πρωτεΐνες υπεύθυνες για αναδίπλωση πρωτεϊνών ή και πρωτεΐνες απόκρισης σε στρες, ενώ πολλές έχουν άγνωστο ρόλο. Από τις 207 οι 134 διέθεταν μία αμινο-τελική σηματοδοτική αλληλουχία, απαραίτητη για την στόχευση των πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, κάτι που υποδηλώνει την έκκριση τους μέσω του κανονικού μονοπατιού συνεχούς έκκρισης. Επίσης, βρέθηκαν ενδείξεις για τη χρήση ενός μη κανονικού μονοπατιού συνεχούς έκκρισης από την *Tetrahymena*, καθώς στο μέσο ασιτίας βρέθηκαν κυτοσολικές πρωτεΐνες χωρίς σηματοδοτικό πεπτιδίο. Αυτό το μονοπάτι, πιθανώς, χρησιμοποιεί εξωσώματα για την έκκριση, τα οποία παρουσιάζονται σε συνθήκες νηστείας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΤΟ ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑ

3.1 Εισαγωγή

Η μαριχουάνα και άλλα παράγωγα του φυτού *Cannabis sativa* χρησιμοποιούνται εδώ και χιλιάδες χρόνια για τις θεραπευτικές ιδιότητες τους και για την ικανότητά τους να αλλάζουν τη ψυχική διάθεση. Οι ψυχοδραστικές ιδιότητές τους περιλαμβάνουν την πρόκληση ευφορίας, διέγερση της όρεξης, νάρκωση, αλλοιωμένη αντίληψη και παρεμπόδιση των λειτουργιών της μνήμης και του ελέγχου της κίνησης [59]. Οι δράσεις αυτές μπορούν να αποδοθούν στο κυριότερο ψυχοδραστικό συστατικό της κάνναβης (βλ. σχήμα 3.1), την Δ⁹-τετραυδροκανναβινόλη (Δ⁹-THC), η οποία ανακαλύφθηκε το 1964 [60]. Από τότε έχει συντεθεί ένας μεγάλος αριθμός βιολογικά δραστικών αναλόγων της, που ονομάζονται συνολικά κανναβινοειδή.



Σχήμα 3.1: Δομή της Δ⁹-τετραυδροκανναβινόλης.

Αρχικά υποτέθηκε ότι η Δ⁹-THC ασκούσε την πλειοτροπική δράση της μέσω του υδροφοβικού χαρακτήρα της και, συγκεκριμένα, λόγω αποδιοργάνωσης των κυτταρικών μεμβρανών και όχι μέσω ειδικής σύνδεσης με περιοχές πρόσδεσης. Στη συνέχεια, όμως, εντοπίστηκαν οι υποδοχείς στους οποίους προσδένεται η Δ⁹-THC στα ζωικά κύτταρα. Ο πρώτος κανναβινοειδής υποδοχέας (CB1) κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε το 1991 [61], ενώ το δεύτερος (CB2) το 1993 [62].

Η ανακάλυψη των υποδοχέων αυτών, οδήγησε στην ανακάλυψη ενός άγνωστου, μέχρι τότε, ενδογενούς σηματοδοτικού συστήματος, του ενδοκανναβινοειδούς. Είναι σήμερα γνωστό ότι το σύστημα περιλαμβάνει εκτός από τους κανναβινοειδείς

υποδοχείς, ένα πλήθος ενδογενών σηματοδοτικών μορίων που αποτελούν τους αγωνιστές των υποδοχέων, των ενδοκανναβινοειδών, με πιο γνωστά από αυτά το ανανταμίδιο (AEA) και την 2-αραχιδονυλογλυκερόλη (2-AG). Ακόμη, περιλαμβάνει πρωτεΐνες μεταφορείς, καθώς και ένζυμα υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση και τον καταβολισμό των ενδοκανναβινοειδών.

3.2 Τα ενδοκανναβινοειδή

Τα ενδοκανναβινοειδή αποτελούν τους ενδογενείς αγωνιστές των κανναβινοειδών υποδοχέων. Αποτελούν εστέρες και αμίδια πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακριάς αλυσίδας και ανήκουν σε δύο μεγάλες οικογένειες, τις N-ακυλοαιθανολαμίνες (NAE) και τις μονοακυλογλυκερόλες (AcG). Οι κυριότεροι εκπρόσωποι των οικογενειών αυτών (βλ. πίνακα 3.1), που δρουν ως ενδοκανναβινοειδή, είναι η N-αραχιδονυλοαιθανολαμίνη ή ανανταμίδιο (AEA) και η 2-αραχιδονυλογλυκερόλη (2-AG).

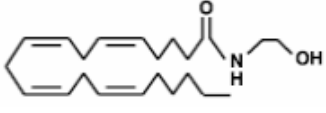
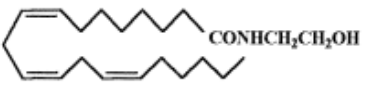

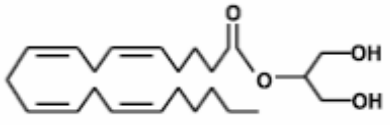

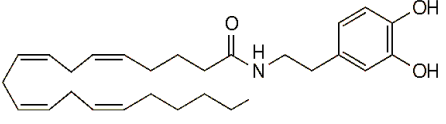
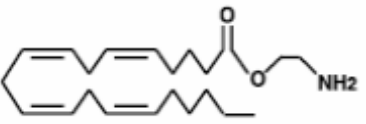
Το πρώτο ενδοκανναβινοειδές μόριο που ανακαλύφθηκε ήταν το ανανταμίδιο που ανήκει στην οικογένεια των N-ακυλοαιθανολαμινών [63]. Το ανανταμίδιο δρα ως μερικός αγωνιστής των CB1 και CB2 υποδοχέων, με μεγαλύτερη συγγένεια για τον CB1 ($K_i = 89 \text{ nM}$) από ότι για τον CB2 ($K_i = 371 \text{ nM}$). Ακόμη, λειτουργεί ως ενδογενής υποκαταστάτης ενός υποδοχέα του βανιλοειδούς συστήματος, τον TRV1 [64].

Το δεύτερο ενδοκανναβινοειδές που ανακαλύφθηκε είναι η 2-αραχιδονυλογλυκερόλη [65]. Ανήκει στην οικογένεια των μονοακυλογλυκερολών, αποτελεί ισχυρό αγωνιστή και των δύο κανναβινοειδών υποδοχέων με μεγαλύτερη συγγένεια για τον CB1 ($K_i = 472 \text{ nM}$) σε σχέση με τον CB2 ($K_i = 1400 \text{ nM}$) [66]. Η 2-AG βρίσκεται σε πολλαπλάσια συγκέντρωση στον εγκέφαλο σε σχέση με αυτή του AEA.

Εκτός από το AEA και την 2-AG, έχουν βρεθεί και άλλα ενδογενή δομικά ανάλογά τους που μπορούν να συνδεθούν με τους κανναβινοειδείς υποδοχείς. Ανάμεσα σε αυτά είναι ο αιθέρας της νολαδίνης [67], που παρουσιάζει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με τον CB1, η βιρονταμίνη [68], που αποτελεί πλήρη αγωνιστή του CB2, η N-αραχιδονυλοντοπαμίνη (NADA) [69], και από την οικογένεια των N-

ακυλοαιθανολαμινών η N- $\Delta^8, \Delta^{11}, \Delta^{14}$ -εικοσιτριενυλοαιθανολαμίνη και η N- $\Delta^7, \Delta^{10}, \Delta^{13}, \Delta^{16}$ -εικοσιδυοτετραενυλοαιθανολαμίνη [70].

Πίνακας 3.1: Τα ενδοκανναβινοειδή και οι δομές τους. Από [27].

N-αραχιδονυλοαιθανολαμίνη (ΑΕΑ, ή ανανταμίδιο)	
N- $\Delta^8, \Delta^{11}, \Delta^{14}$ - εικοσιτριενυλοαιθανολαμίνη	
N- $\Delta^7, \Delta^{10}, \Delta^{13}, \Delta^{16}$ - εικοσιδυοτετραενυλοαιθανολαμίνη	
2-αραχιδονυλογλυκερόλη	
2-αραχιδονυλογλυκεριναιθέρας (αιθέρας νολαδίνης)	
N-αραχιδονυλοντοπαμίνη	
Αραχιδονικός 2-αμινοαιθυλέστερας (βιρονταμίνη)	

Ακόμη, υπάρχουν ενδογενή ανάλογα των ενδοκανναβινοειδών, τα οποία δεν αποτελούν αγωνιστές των κανναβινοειδών υποδοχέων, αλλά παρουσιάζουν κανναβινομιμητικές ιδιότητες. Αυτά ασκούν τη δράση τους, είτε μέσω σύνδεσης με μη κανναβινοειδείς υποδοχείς, είτε μέσω ‘περιβάλλουσας επίδρασης’ (entourage effect). Κανναβινομιμητικά μόρια που δρουν μέσω μη κανναβινοειδών υποδοχέων είναι οι N-ακυλοταυρίνες που είναι αγωνιστές των βανιλοειδών υποδοχέων [71], η N-παλμιτυλοαιθανολαμίνη [72], που συνδέεται με τον GPR55 και η ελαύλοαιθανολαμίνη, που ενεργοποιεί τον πυρηνικό υποδοχέα PPAR- γ [73]. Ως περιβάλλουσα επίδραση μπορεί να χαρακτηριστεί η αύξηση της συγγένειας

πρόσδεσης των ενδοκανναβινοειδών στους υποδοχείς τους, ως αποτέλεσμα της παρουσίας κάποιων κανναβινομιμητικών μορίων. Τέτοια μόρια είναι η 2-λινελαϋλογλυκερόλη και η 2-παλμιτιτυλογλυκερόλη [74], οι οποίες αυξάνουν την πρόσδεση της 2-AG στους CB. Παρόμοια δράση έχει και η στεατυλοαιθανολαμίνη [75].

3.3 Οι υποδοχείς στόχοι των ενδοκανναβινοειδών

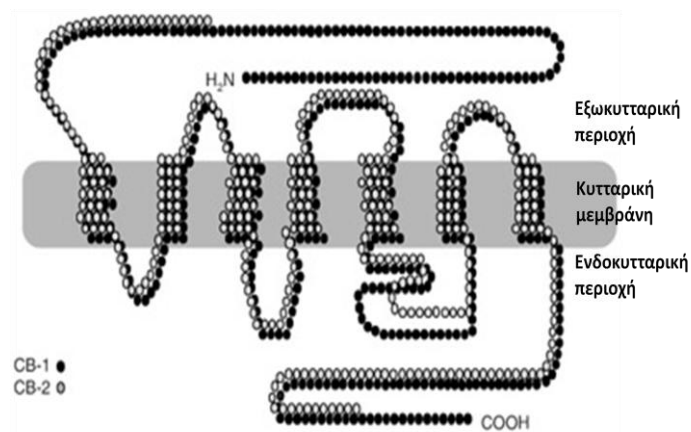
Τα ενδοκανναβινοειδή ασκούν τη δράση τους μέσω των κανναβινοειδών υποδοχέων CB1 και CB2, οι οποίοι παρουσιάζουν παρόμοιο μηχανισμό δράσης, αλλά έχουν διαφορετική κατανομή σε ιστούς. Ακόμη, τα ενδοκανναβινοειδή αλληλεπιδρούν και με το διαμεμβρανικό υποδοχέα GRP55, με τον βανιλλοειδή υποδοχέα TRV1, που αποτελεί ένα κανάλι ιόντων και, τέλος, με τους πυρηνικούς υποδοχείς PPAR.

3.3.1 Οι κανναβινοειδείς υποδοχείς

Οι υποδοχείς CB1 και CB2 αποτελούν μέλη της οικογένειας των επτα-διαμεμβρανικών υποδοχέων και ασκούν τη δράση τους μέσω σύνδεσης με ετεροτριμερείς GTP-πρωτεΐνες. Παρουσιάζουν 44% ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων τους (βλ. σχήμα 3.2), ενώ οι διαμεμβρανικές τους περιοχές ταυτίζονται κατά 66% [61, 62]. Ο CB1 εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο με ετερογενή, όμως, κατανομή. Για παράδειγμα, στον εγκεφαλικό φλοιό, τον ιππόκαμπο και την αμυγδαλή εντοπίζεται, κυρίως, σε ανασταλτικούς νευρώνες. Υποκυτταρικά εντοπίζεται στο περισυναπτικό τμήμα νευραξόνων προσυναπτικών κυττάρων [76]. Ο CB2 έχει εντοπιστεί σε περιφερειακούς ιστούς και, κυρίως, σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως τα μακροφάγα. Πρόσφατα, όμως, εντοπίστηκε και σε περιοχές του εγκεφάλου σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση από την αντίστοιχη του ανοσοποιητικού, καταρρίπτοντας έτσι την αποκλειστικότητα του CB1 για τον εγκέφαλο [77].

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, οι κύριοι ενδογενείς αγωνιστές των CB1 και CB2 είναι το ανανταμίδιο και η 2-αραχιδονυλογλυκερόλη. Το AEA είναι μερικός αγωνιστής των υποδοχέων αυτών, ενώ η 2-AG πλήρης. Παράλληλα, η 2-AG έχει μικρότερη συγγένεια σύνδεσης και με τους δύο υποδοχείς από το AEA. Η

ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών από τους αγωνιστές τους προκαλεί την κινητοποίηση μηχανισμών μεταγωγής σήματος, μέσω της σύνδεσης τους με $G_{i/o}$ πρωτεΐνες, που ανήκουν στην οικογένεια των G πρωτεϊνών [76]. Αυτές αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση, οδηγώντας στη μείωση των κυτοσολικών επιπέδων cAMP. Αυτό οδηγεί, στη περίπτωση του CB1, στη μείωση της δραστηριότητας της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA), στην αναστολή τασοεξαρτώμενων καναλιών Ca^{2+} , στην ενεργοποίηση αρκετών τύπων καναλιών K^+ και τέλος, στην αναστολή της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών. Άλλα ένζυμα που επηρεάζονται από την ενεργοποίηση των CB1 και CB2 είναι η MAPK (mitogen-activated protein kinase) [78] και η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) [79].



Σχήμα 3.2: Η δομή των ενδοκανναβινοειδών υποδοχέων. Από [27].

3.3.2 Ο βανιλλοειδής υποδοχέας TRPV1

Ο TRPV1 αποτελεί ένα μη ειδικό κανάλι κατιόντων, διαπερατό από ιόντα Ca^{2+} που ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων παροδικού δυναμικού (transient receptor potential-TRP). Εκφράζεται σε αρκετούς ιστούς και είδη κυττάρων, κυρίως όμως, σε αισθητικούς νευρώνες και εμπλέκεται σε αποκρίσεις στην αίσθηση πόνου που προκαλείται από αλλαγές στο pH, στη θερμοκρασία ή από φλεγμονώδεις παράγοντες. Έχει βρεθεί ότι διάφορα ενδοκανναβινοειδή μπορούν να ενεργοποιήσουν τον υποδοχέα αυτό στον εγκέφαλο, ανάμεσά τους το αναναμίδιο και η N-αραχιδονυλοντοπαμίνη, αλλά όχι η 2-αραχιδονυλογλυκερόλη [80].

3.3.3 Ο υποδοχέας GRP55

Ο υποδοχέας GRP55 αποτελούσε μέχρι πρόσφατα έναν ορφανό υποδοχέα, καθώς δεν είχαν αναγνωρισθεί ενδογενείς αγωνιστές του. Ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων συνδεδεμένων με G πρωτεΐνες και το mRNA του έχει εντοπιστεί στα επινεφρίδια, στο έντερο, στη σπλήνα και στον εγκέφαλο. Στον εγκέφαλο είναι ευρέως καταμετρημένο, αν και σε πολύ μικρότερα επίπεδα από το mRNA του CB1. Ο GRP55 μπορεί να ενεργοποιηθεί, οδηγώντας στην ενεργοποίηση καναλιών Ca^{2+} , από τη Δ^9 -THC και από ενδοκανναβινοειδή. Αυτά είναι το ανανταμίδιο, η 2-αραχιδονυλογλυκερόλη, η βιρονταμίνη και ο αιθέρας της νολαδίνης [80].

3.3.4 Οι πυρηνικοί υποδοχείς PPAR

Οι PPAR αποτελούν μια οικογένεια πυρηνικών υποδοχέων, που μπορούν να ρυθμίσουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων και τον μεταβολισμό των λιπιδίων. Τα ενδοκανναβινοειδή έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιήσουν ορισμένες ισομορφές των PPAR. Για παράδειγμα, το AEA μπορεί να ενεργοποιήσει τον PPAR γ , προκαλώντας τη διαφοροποίηση προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα σε καλλιέργειες προλιποκυττάρων [81]. Ακόμη, με τον PPAR α μπορούν να αλληλεπιδράσουν το AEA, ο αιθέρας της νολαδίνης και η βιρονταμίνη [82].

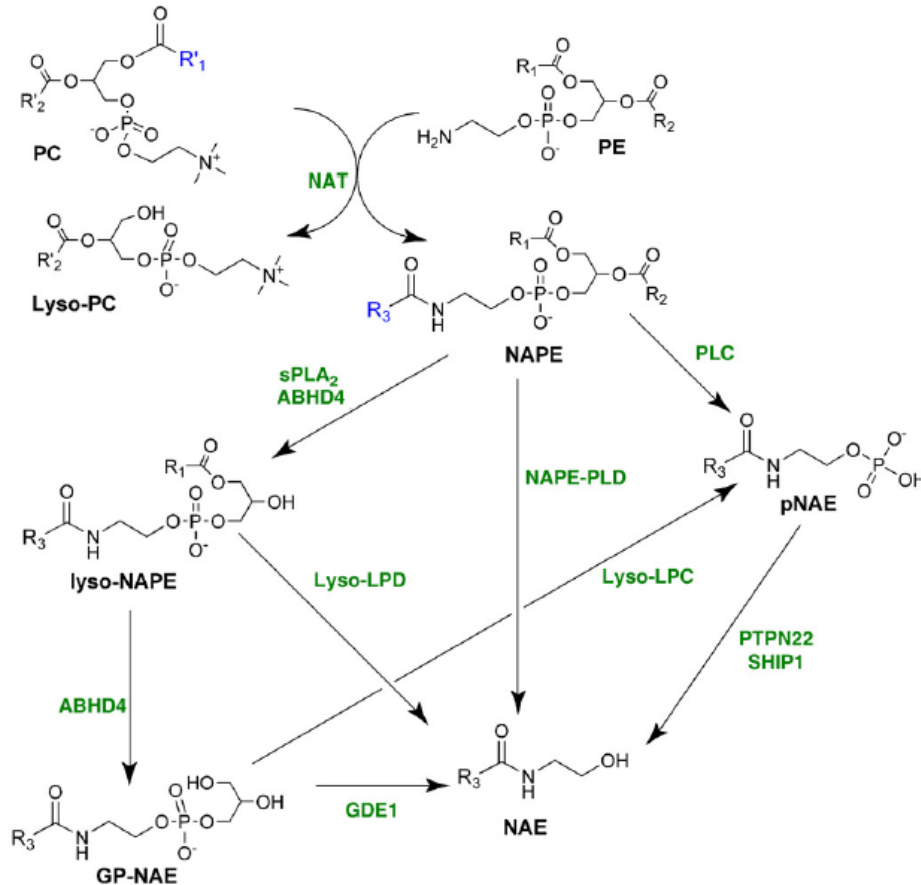
3.4 Βιοσύνθεση των ενδοκανναβινοειδών

Τα ενδοκανναβινοειδή δεν αποθηκεύονται σε εκκριτικά κυστίδια, αλλά βιοσυντίθενται ενζυμικά από μεμβρανικά φωσφολιπίδια κατ' απαίτηση, δηλαδή ως απόκριση σε κάποιο ερέθισμα. Επομένως, τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την βιοσύνθεση και την αποικοδόμησή τους, είναι καθοριστικά για τη ρύθμιση των ενδογενών επιπέδων των ενδοκανναβινοειδών [83].

3.4.1 Βιοσύνθεση του ανανταμιδίου και άλλων N-ακυλοαιθανολαμινών

Η βιοσύνθεση των N-ακυλοαιθανολαμινών μπορεί να γίνει με διάφορες πορείες (βλ. σχήμα 3.3). Σε κάθε περίπτωση, το πρώτο βήμα βιοσύνθεσής τους είναι η μία αντίδραση τρανσακετυλίωσης, δηλαδή η μεταφορά μιας λιπαρής ακυλο-αλυσίδας από την sn-1 θέση ενός γλυκεροφωσφολιπιδίου στην αμινομάδα της

αιθανολαμίνης της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE), οδηγώντας στο σχηματισμό μιας N-ακυλο-PE (NAPE) και ενός λυσοφωσfolιπιδίου. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο N-ακυλοτρανφεράση ή αλλιώς NAT [80].



Σχήμα 3.3: Οι βιοσυνθετικοί δρόμοι των NAEs. NAT: N-ακυλοτρανφεράση, NAPE-PLD: φωσfolιπάση D των N-ακυλοφωσφατιδυλοαιθανολαμινών, PLC: φωσfolιπάση C, GDE1: γλυκεροφωσφοδιεστεράση 1 . Από [84].

Η NAT ενεργοποιείται με Ca^{2+} -εξαρτώμενο τρόπο, είναι μεμβρανοσύνδετη, ενώ εντοπίζεται κυρίως στον εγκέφαλο σε περιοχές του εγκεφαλικού φλοιού, του ιππόκαμπου και του εγκεφαλικού στελέχους. Μπορεί να χρησιμοποιήσει σαν δότες λιπαρών οξέων φωσφατιδυλοχολίνη (PC), λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και καρδιολιπίνη, με απόλυτη εξειδίκευση ως προς τη sn-1 θέση, ενώ δεν παρουσιάζει εξειδίκευση ως προς το είδος της λιπαρής αλυσίδας [83]. Πρόσφατα, εντοπίστηκε μία άλλη NAT, η οποία δεν εξαρτάται από Ca^{2+} για την ενεργοποίησή της και ονομάστηκε iNAT. Η iNAT διαφέρει από την NAT σε αρκετά σημεία, καθώς έχει μεγαλύτερη δραστηριότητα σε κυτοσολικά

κλάσματα, δεν παρουσιάζει εξειδίκευση ως προς sn-1 ή sn-2 θέση, ενώ εντοπίζεται κυρίως στους όρχεις. Δεν είναι ακόμη ξεκαθαρισμένο αν η iNAT συνεισφέρει στον *in vivo* σχηματισμό NAPE [83].

Ο κύριος δρόμος σχηματισμού NAE από μία N-ακυλο-NAE είναι μέσω της NAPE-PLD, η οποία καταλύει την υδρόλυση των NAPEs σε φωσφατιδικό οξύ και NAE. Το ένζυμο αυτό διαφέρει δομικά από τις άλλες PLD, είναι μεμβρανικά συνδεδεμένο, ενώ διατηρείται συνεχώς σε ενεργή μορφή, ανεξαρτήτως της κυτοσολικής συγκέντρωσης Ca^{2+} . Η NAPE-PLD δεν διακρίνει τις αλυσίδες της ακυλομάδας της NAPE, όταν αυτές έχουν μήκος από 4 μέχρι 20 άτομα άνθρακα, οπότε είναι ικανή να σχηματίσει όλα τις βιοδραστικές NAE και εντοπίζεται κυρίως στον εγκέφαλο, τα νεφρά και τους όρχεις [83].

Η αποσιώπηση της NAPE-PLD σε ποντίκια έδειξε την ύπαρξη ενός άλλου μονοπατιού σύνθεσης NAE από NAPE [84]. Το μονοπάτι αυτό χρησιμοποιεί ως ενδιάμεσα γλυκεροφωσφο-N-ακυλοαιθανολαμίνες (GP-NAE), οι οποίες παράγονται με διαδοχική απακυλίωση των λιπαρών οξέων στη sn-1 και sn-2 θέση παρουσία μιας σερινο-υδρολάσης, της ABHD4. Μία γλυκεροφωσφοδιεστεράση 1 (GDE1) υδρολύει τις ενώσεις αυτές για παραγωγή NAE. Σε ένα άλλο μονοπάτι [84], κυρίως χαρακτηρισμένο σε μακροφάγα, μία PLC υδρολύει τις NAPE σε φωσφο-N-ακυλοαιθανολαμίνες (pNAE) και μία φωσφατάση, όπως η PTPN22 ολοκληρώνει την υδρόλυσή τους σε NAE. Τελικά, η πορεία που θα προτιμηθεί εξαρτάται από τη φύση της ακυλομάδας, τη φωσφολιπιδική σύσταση της μεμβράνης στην περιοχή της σύνθεσης, ή αναλόγως του ιστού.

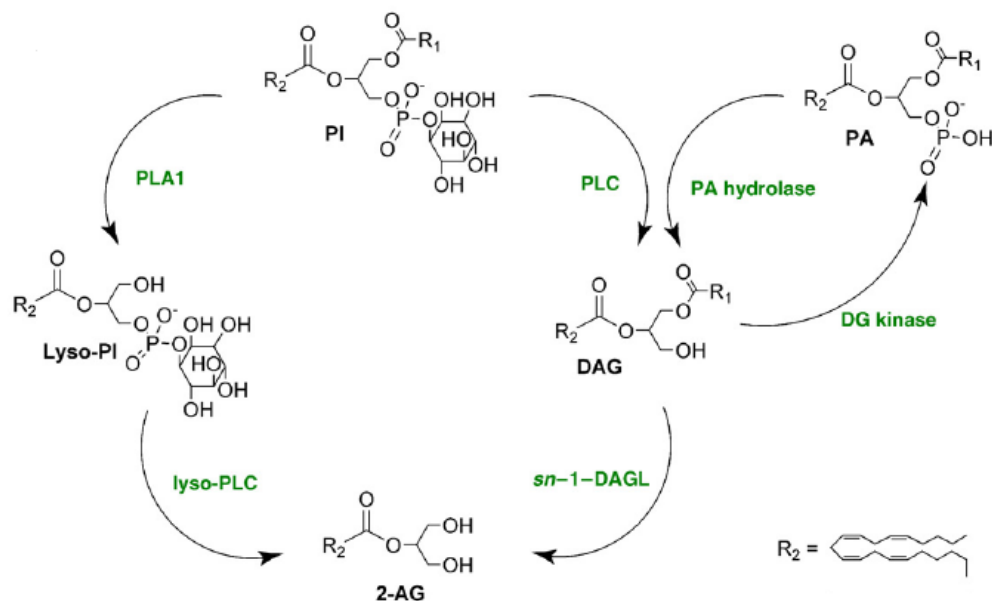
3.4.2 Βιοσύνθεση της 2-AG και άλλων μονοακυλογλυκερών

Η 2-αραχιδονυλογλυκερόλη παράγεται στο ΚΝΣ και τους περιφερειακούς ιστούς ως απόκριση σε σήμα. Το σήμα μπορεί να είναι η αποπόλωση της πλασματικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την είσοδο ιόντων Ca^{2+} στο κυττάρωμα, ή η ενεργοποίηση υποδοχέων συζευγμένων με $G_{\alpha 11}$ πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα οι μεταβοτροπικοί υποδοχείς γλουταμινικού, ή με συνδυασμό και των δύο μηχανισμών [84].

Το κύριο μονοπάτι σχηματισμού 2-AG (βλ. σχήμα 3.4) περιλαμβάνει το σχηματισμό 1-ακυλο-2-αραχιδονυλογλυκερόλης (διακυλογλυκερόλη, DAG) ύστερα από την

υδρόλυση μιας μεμβρανικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης από μία ειδική PLCβ. Στη συνέχεια, η διακυλογλυκερόλη μπορεί να υδρολυθεί από μία ειδική για sn-1 θέση λιπάση των διακυλογλυκερολών (DAGL), παράγοντας 2-AG και ελεύθερο λιπαρό οξύ. Έχουν βρεθεί δύο ισομορφές αυτού του ενζύμου, η DAGLa και η DAGLβ, όπου και οι δύο είναι μεμβρανοσύνδετες και ενεργοποιούνται από Ca^{2+} , ενώ εντοπίζονται κυρίως στις μετασυναπτικές απολήξεις των νευρικών κυττάρων [85]. Αυτό το μονοπάτι βιοσύνθεσης μέσω PLCβ-DAGL φαίνεται να είναι το υπεύθυνο για την παραγωγή 2-AG, η οποία εμπλέκεται στην ανάδρομη ρύθμιση νευροδιαβιβαστών μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνες $G_{q/11}$ [84].

Ένας εναλλακτικός τρόπος σύνθεσης διακυλογλυκερόλης, ανεξάρτητος της PLC, είναι μέσω της λιπάσης του φωσφατιδικού οξέος (βλ. σχήμα 3.4). Ακόμη, ένα ενδιάμεσο 2-αραχιδονυλο-λυσοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης μπορεί να προκύψει με τη δράση μιας ειδικής για PI φωσφολιπάσης A1, και στη συνέχεια, μέσω μιας ειδικής για λυσο-PI PLC, να μετατραπεί σε 2-AG. Πρέπει να έχουμε υπόψη μας, όμως, ότι τα περισσότερα από αυτά τα μόρια, συμπεριλαμβανομένων της DAG και της 2-AG, είναι ενδιάμεσα σε πολλά άλλα μονοπάτια, με πιο χαρακτηριστικό αυτό της απελευθέρωσης αραχιδονικού. Άρα, είναι πιθανό αυτά τα εναλλακτικά μονοπάτια να μην συμμετέχουν στη φυσιολογική σηματοδότηση μέσω ενδοκανναβινοειδών [84].

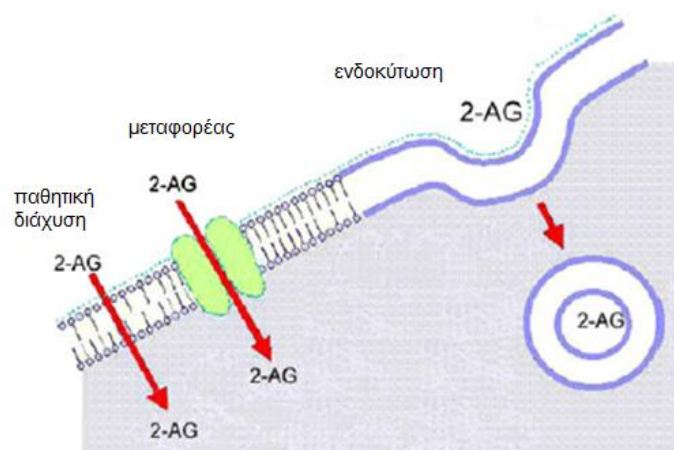


Σχήμα 3.4: Οι βιοσυνθετικοί δρόμοι της 2-AG. DAGL: λιπάση των διακυλογλυκερολών. Από [84].

3.5 Πρόσληψη και μεταφορά ενδοκανναβινοειδών

Τα ενδοκανναβινοειδή παράγονται όταν είναι απαραίτητο και απελευθερώνονται στον εξωκυττάριο χώρο, όπου μπορούν να προσδεθούν και να ενεργοποιήσουν τους CB1 και CB2 υποδοχείς. Όμως η υδρόλυσή τους, που οδηγεί στον τερματισμό της σηματοδότησης μέσω ενδοκανναβινοειδών, είναι μία ενδοκυτταρική λειτουργία. Επίσης, είναι αναμενόμενο ο λιπόφιλος χαρακτήρας των ενδοκανναβινοειδών να εμποδίζει την κυτσοσολική μεταφορά τους προς τον τόπο της υδρόλυσης [84].

Έχουν προταθεί τουλάχιστον τρία μοντέλα για την πρόσληψη του ανανταμιδίου από τα κύτταρα. Το AEA μπορεί να μπει στα κύτταρα με τη βοήθεια ενός μεταφορέα [80]. Ο μεμβρανικός μεταφορέας ανανταμιδίου (anandamide membrane transporter-AMT) είναι ένας ειδικός μεταφορέας, που έχει εντοπιστεί στα περισσότερα κύτταρα που έχουν μελετηθεί ως τώρα. Έχει βρεθεί ότι είναι αναγκαίο να υπάρχουν ένας μέχρι τέσσερις *cis* διπλοί δεσμοί στη λιπαρή αλυσίδα, για σύνδεση του μορίου με τον AMT ή τη μεταφορά του μέσα στο κύτταρο [85]. Ένας άλλος μηχανισμός που έχει προταθεί είναι η μεταφορά του AEA με απλή παθητική διάχυση, η οποία διευκολύνεται από τη βαθμίδωση συγκέντρωσης που παράγεται από την ενζυμική ενδοκυτταρική αποικοδόμηση [86]. Τέλος, εικάζεται ότι το AEA μπορεί να εισαχθεί με ενδοκύτωση, μέσω μιας διαδικασίας πρόσληψης με ενδοκύτωση εγκολπώσεων.



Σχήμα 3.5: πιθανοί δρόμοι μεταφοράς 2-AG. Αναπροσαρμοσμένο από [87].

Η 2-AG πιθανολογείται ότι εισάγεται στα κύτταρα κατά παρόμοιο τρόπο με το ανανταμίδιο (βλ. σχήμα 3.5). Δηλαδή, είτε με παθητική διάχυση, είτε με πρόσληψη μέσω κάποιου μεμβρανικού μεταφορέα, είτε με ενδοκύτωση από λιπιδικές σχεδίες,

αναλόγως του τύπου κυττάρου. Ο μεταφορέας μπορεί να είναι ο ίδιος με του AEA AMT, ή ένας ξεχωριστός, κάτι που δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής. Αν δεν είναι ο AMT, πιθανώς θα είναι ένας συμεταφορέας για 2-AG και AEA[87].

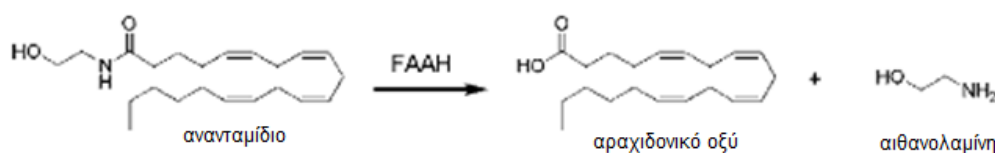
Πρόσφατα αναγνωρίστηκαν ως ενδοκυτταρικοί μεταφορείς του ανανταμιδίου, οι προσδένουσες λιπαρά οξέα πρωτεΐνες 5 και 7 (fatty acid binding proteins), οι οποίες όταν υπερεκφράζονται οδηγούν σε αύξηση της ταχύτητας υδρόλυσης του AEA [88]. Ανάλογα μόρια θα πρέπει να υπάρχουν και για την ενδοκυτταρική κυκλοφορία της 2-AG.

3.6 Καταβολισμός ενδοκανναβινοειδών

Τα ενδοκανναβινοειδή μπορούν να αποικοδομηθούν μέσω δύο διαφορετικών δρόμων: μέσω υδρόλυσης και μέσω οξειδωσης [80]. Τα βασικά υδρολυτικά ένζυμα είναι η αμιδοϋδρολάση των λιπαρών οξέων (fatty acid amide hydrolase-FAAH) για το ανανταμίδιο, και η λιπάση των μονοακυλογλυκερολών (monoacylglycerol lipase-MAGL) για τη 2-αραχιδονυλογλυκερόλη. Το δεύτερο μονοπάτι περιλαμβάνει την κυκλοξυγονάση (COX) και την λιποξυγονάση (LOX), που προκαλούν οξειδωση στο αραχιδονικό των ενδοκανναβινοειδών.

3.6.1 Αμιδοϋδρολάση των λιπαρών οξέων (FAAH)

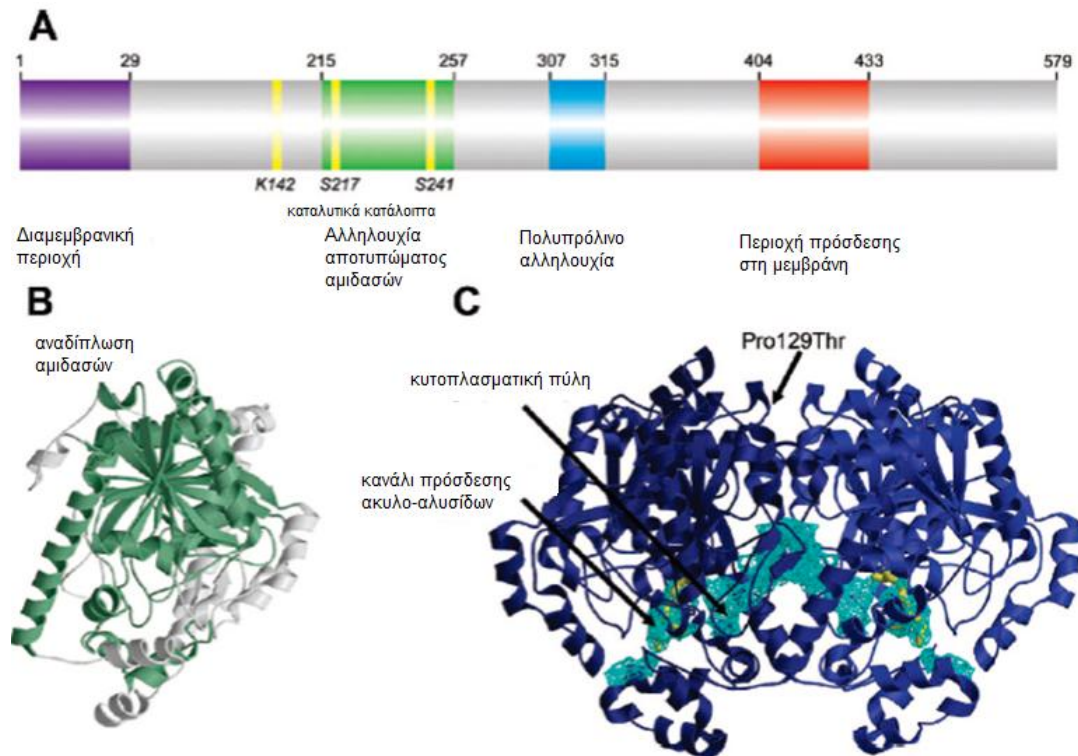
Το κύριο καταβολικό ένζυμο τερματισμού της σηματοδότησης μέσω ανανταμιδίου είναι η FAAH. Το ανανταμίδιο αφού προσληφθεί από τον εξωκυττάριο χώρο που έδρασε μεταφέρεται στα διαμερίσματα που εντοπίζεται η FAAH και υδρολύεται σε αραχιδονικό οξύ και αιθανολαμίνη (βλ. σχήμα 3.6).



Σχήμα 3.6: Υδρόλυση ανανταμιδίου από τη FAAH. Αναπροσαρμοσμένο από [89].

Το 1985, για πρώτη φορά, εντοπίστηκε μία ενζυμική δραστηριότητα στο συκώτι αρουραίων που μπορούσε να υδρολύει NAE από τον Schmid. Στη συνέχεια, το 1996 ο Cravatt και οι συνεργάτες του κατάφεραν να καθαρίσουν αυτή τη

δραστικότητα αμιδοϋδρολάσης από μεμβράνες συκωτιού αρουραίων. Ακολούθως, η κλωνοποίηση και η έκφραση του αντίστοιχου cDNA επιβεβαίωσε ότι το ένζυμο αυτό παρουσιάζει ισχυρή υδρολυτική ικανότητα για πολλά αμίδια λιπαρών οξέων, συμπεριλαμβανομένου του ανανταμιδίου. Το ένζυμο, επομένως, ονομάστηκε αμιδοϋδρολάση των λιπαρών οξέων (FAAH). Από τότε χαρακτηρίστηκαν τα γονίδια της FAAH του ανθρώπου, του ποντικού και του γουρουνιού και βρέθηκε ότι οι αντίστοιχες πρωτεΐνες έχουν υψηλά συντηρημένη πρωτοταγή δομή [89].



Σχήμα 3.7: Δομικά χαρακτηριστικά της FAAH: (Α) η πρωτοταγής δομή: αμινοτελική διαμεμβρανική περιοχή (μωβ), δακτυλικό αποτύπωμα αμιδασών (πράσινο), αλληλουχία πλούσια σε προλίνες (μπλε), δεύτερη περιοχή δέσμευσης στη μεμβράνη (κόκκινο). (Β) το μονομερές της FAAH και με πράσινο η κοινή αναδίπλωση της οικογένειας των αμιδασών. (Γ) η κρυσταλλική δομή της FAAH (διμερές) με επισημασμένες τη κοιλότητα δέσμευσης του υποστώματος (κανάλι πρόσδεσης ακυλο-αλυσίδων) και το κανάλι απελευθέρωσης προϊόντων (κυτοπλασματική πύλη). Αναπροσαρμοσμένο από [89].

Κάθε ένζυμο διαθέτει διατηρημένα (βλ. σχήμα 3.7), μία αμινοτελική διαμεμβρανική περιοχή, μία περιοχή δακτυλικό αποτύπωμα των αμιδασών (AS) και μία αλληλουχία πλούσια σε προλίνες που προβλέπεται να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες που διαθέτουν δομικές περιοχές Homer και SH3. Η FAAH ήταν το πρώτο χαρακτηρισμένο ένζυμο θηλαστικών που αποτέλεσε μέλος της οικογένειας με

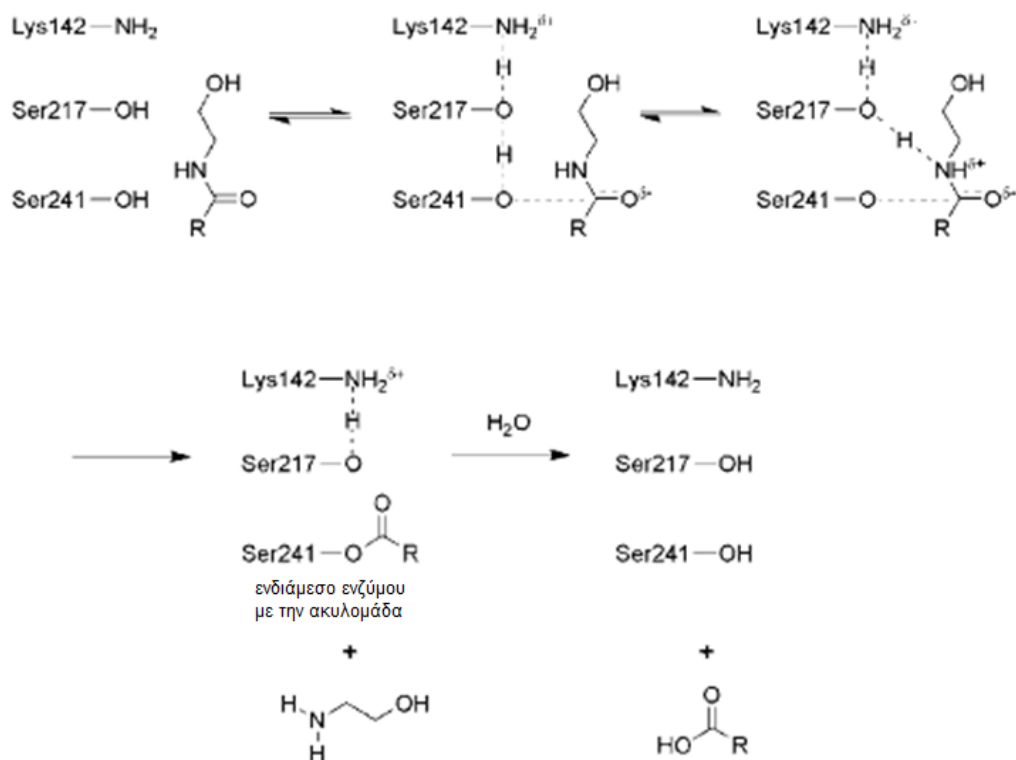
δακτυλικό αποτύπωμα αμιδασών (AS). Η οικογένεια αυτή χαρακτηρίζεται από μία υψηλά συντηρημένη περιοχή που αποτελείται από ~130 αμινοξέα και είναι πλούσια σε σερίνη, γλυκίνη και αλανίνη. Υπάρχουν πάνω από 100 μέλη αυτής της οικογένειας, κυρίως βακτηριακής και μυκητιακής προέλευσης. Σε αντίθεση με τα περισσότερα μέλη της οικογένειας AS, η FAAH είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη, κάτι αρχικά αποδόθηκε στην ύπαρξη της N-τελικής διαμεμβρανικής περιοχής, στη συνέχεια όμως, αποδείχθηκε ότι διαθέτει πολλαπλές περιοχές πρόσδεσης στη μεμβράνη [89].

Ανοσοϊστοχημικές έρευνες καθώς και χρήση ανοσο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έδειξαν ότι η FAAH εκφράζεται ευρέως στο νευρικό σύστημα, όπου και εντοπίζεται κυρίως στις ενδοκυτταρικές μεμβράνες (π.χ. στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο και στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη), στο σωματοδενδριτικό διαμέρισμα των νευρώνων [89]. Στον εγκέφαλο η FAAH εντοπίζεται, κυρίως, στον ιππόκαμπο, στο ραβδωτό σώμα, στο εγκεφαλικό φλοιό, στην παρεγκεφαλίδα και λιγότερο, στον υποθάλαμο, στο στέλεχος, στον οσφρητικό βολβό και την υπόφυση [85]. Η FAAH έχει συμπληρωματική κατανομή με τους CB1 υποδοχείς στα περισσότερα τμήματα του εγκεφάλου, εντοπίζεται όμως και σε περιοχές που δεν εκφράζεται ο CB1. Αυτό δείχνει ότι μπορεί να υπάρχουν και άλλοι στόχοι για το ανανταμίδιο, διαφορετικοί από το CB1, όπως για παράδειγμα ο TRPV1 [85]. Τέλος, η FAAH έχει εντοπιστεί σε ένα πλήθος άλλων ιστών και οργάνων, όπως το συκώτι, τα νεφρά και οι όρχεις.

Η FAAH έχει ένα αλκαλικό βέλτιστο pH και είναι ικανή να αναγνωρίζει μια ποικιλία αμιδίων λιπαρών οξέων, αλλά το προτιμώμενο υπόστρωμα της είναι το ανανταμίδιο [84]. Ακόμη, μπορεί να υδρολύσει με μικρότερη όμως εξειδίκευση από τη MAGL εστέρες λιπαρών οξέων με γλυκερόλη, όπως τη 2-AG και τη 2-OG.

Το 2002 προσδιορίστηκε η κρυσταλλική δομή της FAAH αρουραίου με χρήση ακτίνων-X [89]. Η FAAH είναι ένα διμερές ένζυμο στο οποίο υπάρχουν πολλαπλά κανάλια, τα οποία επιτρέπουν την ταυτόχρονη πρόσβαση στη μεμβράνη και τα κυτοσολικά διαμερίσματα του κυττάρου (βλ. σχήμα 3.7). Το ένα κανάλι οδηγεί από τη μεμβρανοσύνδετη επιφάνεια της πρωτεΐνης στο ενζυμικό καταλυτικό κέντρο. Αυτό το κανάλι, που ονομάστηκε κανάλι πρόσδεσης ακυλο-αλυσίδων αποτελείται σχεδόν εξολοκλήρου από υδρόφοβα κατάλοιπα και πιστεύεται ότι συμμετέχει στην αναγνώριση του υποστρώματος. Ένα δεύτερο κανάλι προεκβάλλει από το καταλυτικό κέντρο σε γωνία 80° από την κοιλότητα δέσμευσης υποστρώματος και

δημιουργεί μία κυτταροπλασματική πύλη που εκτίθεται στο διαλύτη. Η γενική αρχιτεκτονική της FAAH προτείνει ένα μοντέλο όπου τα υποστρώματα αποκτούν πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο, αφού πρώτα εισέλθουν στη μεμβράνη. Μετά την υδρόλυση, το υδρόφοβο λιπαρό οξύ θα βγει μέσω του καναλιού που έχει πρόσβαση στη μεμβράνη, ενώ η υδρόφιλη αμίνη μέσω του καναλιού με πρόσβαση στο κυτοσόλιο. Η κυτταροπλασματική πύλη μπορεί να έχει έναν επιπρόσθετο ρόλο με το να επιτρέπει την είσοδο ενός μορίου νερού που απαιτείται για την υδρόλυση του ενδιάμεσου της αντίδρασης ακυλο-ενζύμου.

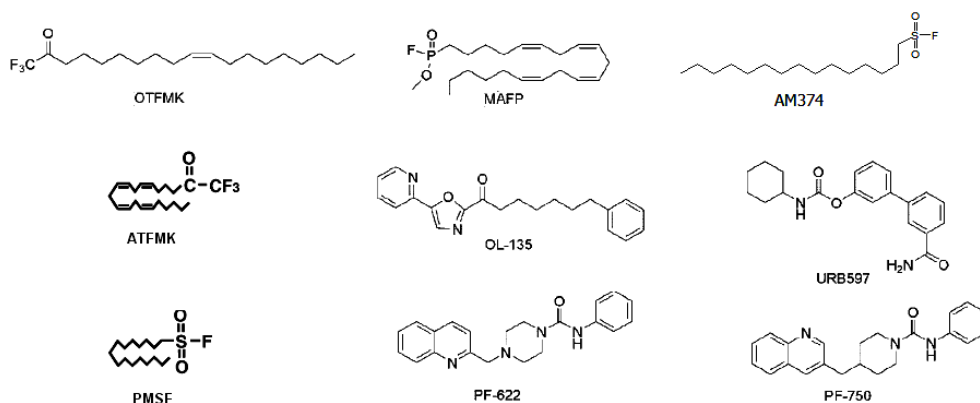


Σχήμα 3.8: Προτεινόμενος μηχανισμός υδρόλυσης αμιδίων από τη FAAH. Από [89].

Η δομή της FAAH αποκάλυψε επίσης ότι αυτό το ένζυμο διαθέτει μία ασυνήθιστη καταλυτική τριάδα σερίνης-σερίνης-λυσίνης (Ser241-Ser217-Lys142) που είναι συντηρημένη στα ένζυμα της AS οικογένειας, αλλά είναι διαφορετική από την τυπική τριάδα των σερίνο-υδρολασών Ser-His-Asp. Βρέθηκε ότι η Ser 241 είναι το πυρηνόφιλο της FAAH, η Lys 142 δρα σαν γενικός οξεοβασικός καταλύτης, ενώ η Ser 217 δρα σαν γέφυρα μεταξύ της Lys 142 και της Ser 241. Στον προτεινόμενο μηχανισμό κατάλυσης (βλ. σχήμα 3.8) [89] η Lys 142 αποσπά ένα πρωτόνιο από τη Ser 217, η οποία με τη σειρά της αποσπά ένα πρωτόνιο από τη Ser 241, δημιουργώντας έτσι ένα ισχυρό πυρηνόφιλο. Η πυρηνόφιλη Ser 241 επιτίθεται στο

καρβονύλιο του υποστρώματος και ταυτόχρονα η Ser 217 προσφέρει ένα πρωτόνιο στο N του αμιδίου του υποστρώματος. Το τελευταίο βήμα απαιτεί την ταυτόχρονη προσφορά ενός πρωτονίου από τη Lys 142 στη Ser 217 και έτσι και οι δύο επιστρέφουν στην αρχική δομή τους, ενώ σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο ακυλο-ένζυμο. Τέλος, η Ser 241 απακυλιώνεται με την εισαγωγή ενός μορίου νερού, οπότε και απελευθερώνεται το παραγόμενο λιπαρό οξύ.

Η ανακάλυψη αναστολέων για τη FAAH επέτρεψε την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών λειτουργίας του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος (βλ. σχήμα 3.9). Η πρώτη γενιά αναστολέων της FAAH βασίστηκε στις δομές των υποστρωμάτων του ενζύμου [89]. Αυτά περιλαμβάνουν ελαΐλο και αραχιδονύλο παράγωγα τριφθορομεθυλοκετονών, φθοροφωσφονικών και σουλφονυλοφθοριδίων. Από αυτά, τα παράγωγα των τριφθορομεθυλοκετονών αποδείχθηκαν αντιστρεπτοί αναστολείς, ενώ τα υπόλοιπα μη αντιστρεπτοί. Χαρακτηριστικοί από αυτούς τους αναστολείς είναι η ελαΐλοτριφθορομεθυλοκετόνη (OTMFMK), το μεθοξυαραχιδονυλοφθοροφωσφονικό (MAFP) και το παλμιτυλοσουλφονυλοφθοριδίο (AM374), που χρησιμοποιήθηκε και στη παρούσα εργασία. Δυστυχώς, αυτή η γενιά αναστολέων δεν ήταν ειδική, αφού βρέθηκε ότι ανέστειλαν και άλλες σερίνο-υδρολάσες.



Σχήμα 3.9: Δομές ορισμένων αναστολέων της FAAH. Από [27].

Ο AM374 αποτελεί ισχυρό αναστολέα της FAAH με $IC_{50} = 13$ nM σε ομογενοποίημα εγκεφάλου αρουραίου με υποστρώμα AEA και έχει βρεθεί ότι δρα σχηματίζοντας ομοιοπολικό δεσμό με υδροξύλια σερινών του καταλυτικού κέντρου [90].

Μία μεγάλη ομάδα α-κετοετεροκυκλικών ενώσεων αποτελούν ισχυρούς αντιστρεπτούς αναστολείς της FAAH, χωρίς να μοιάζουν δομικά με τα υποστρώματα [89]. Μερικές από αυτές τις ενώσεις, όπως ο OL-135 έχουν και *in vivo* δραστικότητα. Μία δεύτερη κατηγορία αναστολέων της FAAH που επιδεικνύουν άριστη *in vivo* δραστικότητα είναι τα καρβαμικά παράγωγα, όπως ο URB597 [89].

3.6.2 Άλλα αποικοδομητικά ένζυμα του ανανταμιδίου

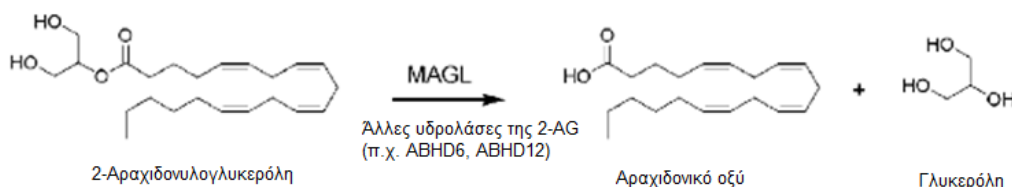
Εκτός από τη FAAH, υπάρχουν και άλλα ένζυμα που, πιθανώς, μεταβολίζουν το AEA *in vivo*. Στον άνθρωπο έχει βρεθεί ένα δεύτερο ένζυμο που ανήκει στην οικογένεια AS, η FAAH-2 [84]. Αν και έχει την ίδια καταλυτική τριάδα με τη FAAH, έχει μόλις ~20% ομολογία με αυτή. Επίσης, δεν εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως η FAAH, αλλά σε λιποσταγόνες στο κυτοσόλιο. Η FAAH-2 εκφράζεται κυρίως σε περιφερειακούς ιστούς, όπως τα νεφρά, το συκώτι, τον πνεύμονα και την καρδιά [80]. Επίσης, η FAAH-2 δείχνει μεγαλύτερη εξειδίκευση για μονοακόρεστα υποστρώματα, όπως την ελαύλοαιθανολαμίνη παρά για πολυακόρεστα [85].

Ένα άλλο υδρολυτικό ένζυμο των NAE, είναι η όξινη αμιδάση των N-ακυλοαιθανολαμινών (NAAA) [84]. Αυτή εκφράζεται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού και κυρίως στα μακροφάγα, και εντοπίζεται στα λυσοσώματα, όπου και ενεργοποιείται με αυτοπρωτεολυτική τροποποίηση. Η NAAA, σε αντίθεση με τη FAAH, δεν ανήκει στην οικογένεια των AS και είναι πιο δραστική σε όξινο pH, ενώ το προτιμώμενο υπόστρωμα της είναι η N-παλμιτυλοαιθανολαμίνη.

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, τα NAE μπορούν να οξειδωθούν αντί της υδρόλυσης, ως εναλλακτικό μονοπάτι καταβολισμού [91]. Υπεύθυνα για αυτή τη δουλειά είναι τα ένζυμα του καταρράκτη του αραχιδονικού, όπως η κυκλοξυγενάση-2, που έχει βρεθεί ότι δρα στο ανανταμίδιο μετατρέποντας το σε αιθανολαμίδια προσταγλαδινών. *In vitro* οξείδωση του AEA έχει παρατηρηθεί και από λιποξυγενάσες και οξυγενάσες του κυτοχρώματος p450.

3.6.3 Λιπάση των μονοακυλογλυκερολών (MAGL)

Η λιπάση των μονοακυλογλυκερολών είναι το κύριο καταβολικό ένζυμο της 2-AG και των άλλων μονοακυλογλυκερολών. Το ένζυμο αυτό είναι μια σερινο-υδρολάση που ανήκει στην οικογένεια των α/β υδρολασών, έχει μήκος ~300 αμινοξέα και βάρος 33 kDa [85]. Η MAGL καταλύει την αντίδραση υδρόλυσης της 2-AG σε αραχιδονικό οξύ και γλυκερόλη (βλ. σχήμα 3.10).



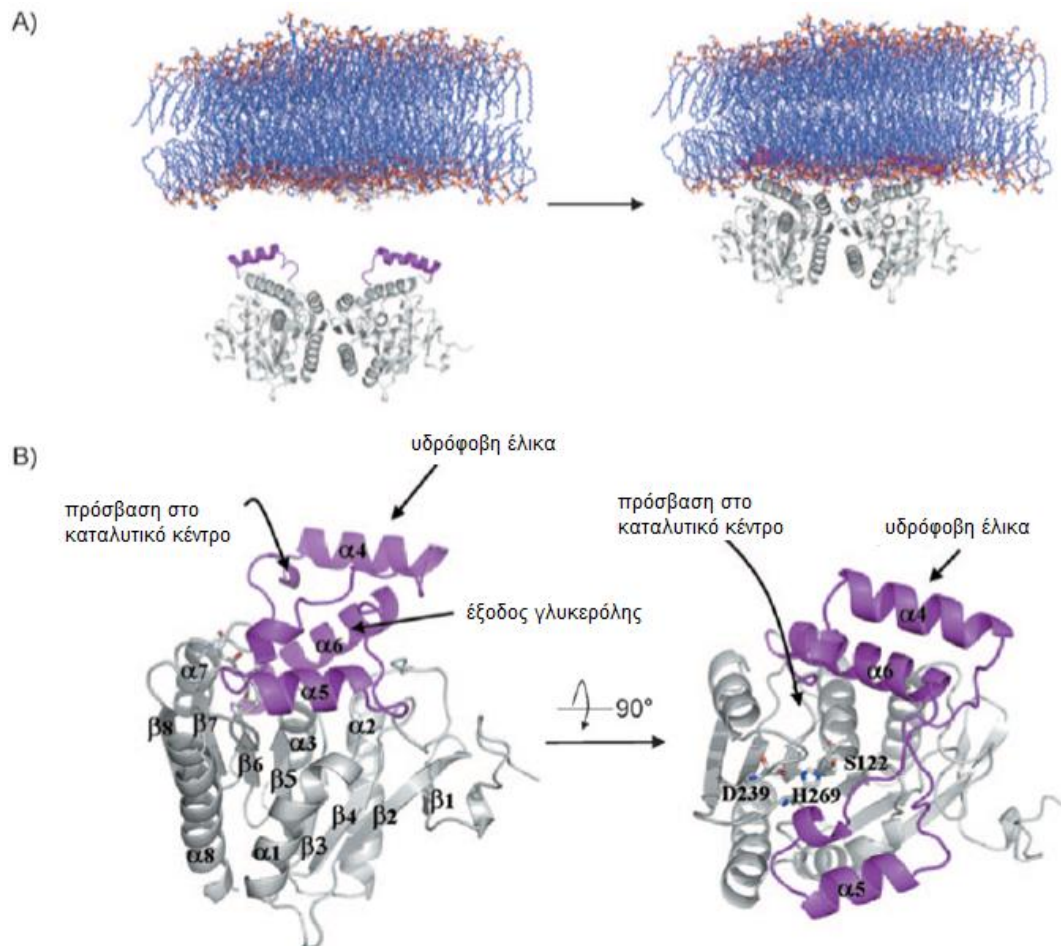
Σχήμα 3.10: Υδρόλυση της 2-AG από τη MAGL και άλλες υδρολάσες. Αναπροσαρμοσμένο από [89].

Το 1976 ανιχνεύτηκε πρώτη φορά δραστικότητα MAGL, ενώ το 1999 απομονώθηκε και, στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε από λιποκύτταρα ποντικίου, όπου και θεωρήθηκε ότι καταλύει τα τελευταία στάδια του μεταβολισμού των τριγλυκεριδίων [89]. Μόνο μετά την ανακάλυψη των κανναβινοειδών υποδοχέων και των ενδογενών υποστρωμάτων τους η MAGL συνδέθηκε με το ενδοκανναβινοειδές σύστημα [92]. Συγκεκριμένα, το 2002, ο Dinh και οι συνεργάτες του αναγνώρισαν τη MAGL ως την πρώτη υδρολάση του αποικοδομεί την 2-AG *in vivo* και *in vitro*, και απέδειξαν ότι η MAGL εκφράζεται ευρέως στο νευρικό σύστημα, όπου και εντοπίζεται στα προσυναπτικά άκρα των νευρώνων, τα οποία συχνά εκφράζουν CB1 υποδοχείς [89]. Τέλος, σύγχρονες μελέτες αποκάλυψαν την κρυσταλλική δομή της MAGL και έδωσαν απαντήσεις για τη λειτουργία της [93, 94].

Η MAGL εντοπίζεται σε πολλούς ιστούς και κυτταρικούς τύπους, τόσο σε κυτοσολικά, όσο και σε μεμβρανικά κλάσματα [92]. Για παράδειγμα, στο ποντίκι έχει εντοπιστεί σε όλα τα όργανα, ενώ στον εγκέφαλο έχει ετερογενή κατανομή, με τα υψηλότερα επίπεδα δραστικότητας να βρίσκονται σε περιοχές όπου ο CB1 είναι άφθονος, όπως τον ιππόκαμπο, τον εγκεφαλικό φλοιό και την παρεγκεφαλίδα [85]. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, η MAGL εκφράζεται στα προσυναπτικά άκρα των νευρικών κυττάρων, κάτι που δείχνει την ιδιότητα της να τερματίζει την ανάδρομη ρύθμιση των ενδοκανναβινοειδών στην έκκριση νευροδιαβιβαστών.

Εκτός από τη 2-AG η MAGL υδρολύει και άλλες μονοακυλογλυκερόλες, όπως η ελαϋλογλυκερόλη και η παλμιτυλογλυκερόλη, οι οποίες δεν συμμετέχουν στη σηματοδότηση μέσω ενδοκανναβινοειδών [84]. Επίσης, έχει βρεθεί ότι μπορεί να υδρολύει τη 1-OG (ελαϋλογλυκερόλη) και τη 2-OG με την ίδια ταχύτητα, οπότε δεν δείχνει εξειδίκευση ως προς sn-1 ή sn-2 θέση [94].

Διάθλαση ακτινών-Χ αποκάλυψε τη δομή της MAGL (βλ. σχήμα 3.11). Η πρωτεΐνη κρυσταλλώθηκε σαν διμερές, με δύο μόρια για κάθε ασύμμετρη μονάδα. Τα δύο μονομερή εφάπτονται σε ποσοστό 7% της επιφάνειας ενός μονομερούς, ενώ οι είσοδοι των καταλυτικών κέντρων είναι προσανατολισμένες κατά την ίδια φορά, και άρα σωστά διευθετημένες να αλληλεπιδρούν με τη μεμβράνη, ώστε να προσλαμβάνουν υποστρώματα. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η MAGL οργανώνεται ως διμερές μες στα κύτταρα [94].



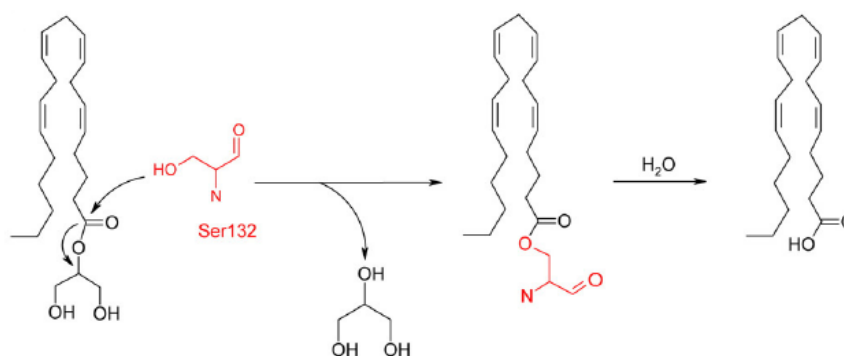
Σχήμα 3.11: Γενική δομή της hMAGL. (A) Το διμερές της MAGL και η αλληλεπίδραση του με τη μεμβράνη μέσω της υδρόφοβης έλικας α4 (μωβ). (B) Αριστερά: πλευρική όψη του μονομερούς της MAGL. Διακρίνεται η δομική περιοχή καλύμματος (μωβ) και η καταλυτική τριάδα. Δεξιά: Πάνω όψη (90°) του ίδιου μονομερούς. Αναπροσαρμοσμένο από [94].

Σύμφωνα με τη πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής [94], η MAGL παρουσιάζει το χαρακτηριστικό γνώρισμα της υπεροικογένειας των α/β υδρολασών, δηλαδή το κεντρικό β -φύλλο που αποτελείται από 7 παράλληλες και μία αντιπαράλληλη πτυχή και περιβάλλεται από 6 α -έλικες (βλ. σχήμα 3.11). Μία δομική περιοχή καλύμματος (cap), που διαφέρει αρκετά μεταξύ των μελών αυτής της υπεροικογένειας, καλύπτει το δομικά συντηρημένο β -φύλλο και το καταλυτικό κέντρο. Βαθιά κάτω από το κάλυμμα βρίσκεται η καταλυτική τριάδα, χαρακτηριστική για τις σερινο-υδρολάσες, Ser122, Asp239 και His269. Η Ser122, που αποτελεί το πυρηνόφιλο της αντίδρασης, βρίσκεται σε μία ομόφωνη αλληλουχία GX SXG, ανάμεσα στην $\alpha 3$ έλικα και την πτύχωση $\beta 5$. Τα αμινοξέα Ala51 και Met123 δημιουργούν μία τρύπα οξυανιόντος, η οποία σταθεροποιεί το τετραεδρικό ανιοντικό ενδιάμεσο κατά την υδρόλυση.

Η MAGL έχει εντοπιστεί τόσο σε μεμβρανικά, όσο και σε κυτοσολικά κλάσματα. Αυτό γίνεται εξαιτίας της ύπαρξης στη περιοχή του καλύμματος, της $\alpha 4$ έλικας που είναι εξαιρετικά λιπόφιλη και επιτρέπει σε αυτή τη διαλυτή πρωτεΐνη, είτε να έρθει πολύ κοντά στη μεμβράνη, είτε να αγκυροβολήσει σε αυτή για να έχει πρόσβαση στα λιπόφιλα υποστρώματα της [94]. Επίσης, στη περιοχή του καλύμματος σχηματίζεται ένα υδρόφοβο στεφάνι που αποτελεί την είσοδο στη κοιλότητα που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Σε άλλες α/β υδρολάσες η περιοχή καλύμματος μπορεί να υπάρξει σε δύο διαμορφώσεις: ανοιχτή και κλειστή. Η MAGL πιστεύεται ότι υιοθετεί την ανοιχτή διαμόρφωση στο διάλυμα [94].

Με υπολογιστικές προσομοιώσεις [94] βρέθηκε η κοιλότητα πρόσδεσης των υποστρωμάτων. Η κοιλότητα αυτή γίνεται ευρύτερη όσο απομακρύνεται κάποιος από το περιβάλλον της καταλυτικής τριάδας, που βρίσκεται βαθιά στη πρωτεΐνη και κινείται προς την επιφάνεια της. Αρκετά υδρόφοβα κατάλοιπα καλύπτουν το κανάλι που οδηγεί από την επιφάνεια στη πυρηνόφιλη σερίνη. Πράγματι, οι πλευρικές ομάδες των Leu148, Ala164, Leu176, Ile179, Ley205, Val207 είναι σωστά διευθετημένες ώστε να αλληλεπιδρούν με το αραχιδονύλο τμήμα της 2-AG και προσδίδουν στη MAGL την εξειδίκευση για λιπιδικά υποστρώματα. Η περιοχή κοντά στο καταλυτικό κέντρο είναι πιο υδρόφιλη από το κανάλι που οδηγεί στην επιφάνεια και αρκετά αμινοξέα δημιουργούν μία πολική κοιλότητα που μπορεί να δεχθεί τη γλυκερόλη της 2-AG, ανάμεσα τους η Ala51 και η Met123 που δημιουργούν τη τρύπα οξυανιόντος.

Ακόμη, έχει βρεθεί ένα μικρό άνοιγμα διαμέτρου 5 Å που ενώνει το καταλυτικό κέντρο και το εξωτερικό της πρωτεΐνης. Αυτό το άνοιγμα σχηματίζεται χάρη στην αρχιτεκτονική της περιοχής καλύμματος της MAGL, και συγκεκριμένα τις θηλιές που ενώνουν την α4 με την α5 και την α5 με την α6 έλικα, καθώς και το τελευταίο τμήμα της α5. Αυτό το μικρό κανάλι, μπορεί να αποτελεί ένα βέλτιστο τρόπο εξόδου της γλυκερόλης, που παράγεται από την υδρόλυση της 2-AG [94].

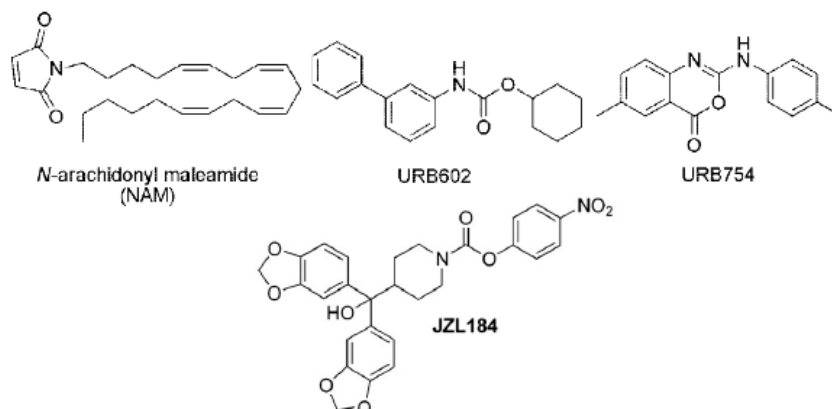


Σχήμα 3.12: Μηχανισμός αντίδρασης της καταλυτικής Ser και της 2-AG. Από [93].

Συνοπτικά μπορεί να περιγραφεί ο καταλυτικός μηχανισμός [93]. Η καταλυτική τριάδα προκαλεί ενεργοποίηση της πυρηνόφιλης σερίνης, η οποία κόβει τον εστερικό δεσμό της 2-AG (βλ. σχήμα 3.12), όταν αυτή σταθεροποιηθεί μέσω της καρβονυλομάδας της στην οπή οξυανιόντος που σχηματίζεται από τα άζωτα των πεπτιδικών δεσμών της Ala51 και Met123. Η γλυκερόλη, στη συνέχεια, θα απελευθερωθεί μέσω του στενού καναλιού, ενώ το αραχιδονικό θα διαχυθεί προς τη μεμβράνη μέσω του καναλιού που εισήλθε η 2-AG.

Μέχρι στιγμής τρεις μεγάλες τάξεις αναστολέων έχουν βρεθεί για τη MAGL [93]. Η πρώτη τάξη περιλαμβάνει μη ανταγωνιστικούς, μερικώς αντιστρεπτούς αναστολείς, όπως ο URB602, αν και δεν παρουσιάζουν καλή δραστηριότητα και εξειδίκευση για τη MAGL. Η δεύτερη τάξη περιλαμβάνει μόρια που αντιδρούν με σερίνες, τα οποία υποθετικά, σχηματίζουν μη αντιστρεπτό ομοιοπολικό δεσμό με τη καταλυτική σερίνη. Σε αυτή ανήκει το 4-νιτροφαινυλο-καρβαμικό παράγωγο JZL184 που χρησιμοποιήθηκε και στη παρούσα εργασία. Ο JZL184 αποτελεί έναν υψηλά δραστικό και εξειδικευμένο αναστολέα της MAGL και την αναστέλλει χωρίς να επηρεάζει τη δραστηριότητα των ABHD6 και ABHD12 [84], δύο άλλων υδρολυτικών ενζύμων της 2-AG, όπως θα δούμε και στη συνέχεια. Ο JZL184 αναστέλλει τη FAAH, αν και σε συγκεντρώσεις πολύ μεγαλύτερες από αυτές για τη MAGL [95]. Η

τρίτη τάξη αναστολέων αποτελούνται από παράγοντες που αλληλεπιδρούν με κυστεΐνες και συγκεκριμένα, στη περίπτωση της MAGL, σχηματίζοντας ομοιοπολικό δεσμό με τη Cys242. Σε αυτούς ανήκει το N-αραχιδονυλομαλεαμίδιο (NAM), που έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τη δραστηριότητα της MAGL *in vitro* και έχει κάποια εξειδίκευση ως προς αυτή σε σχέση με τη FAAH.



Σχήμα 3.13: Δομές των κυριότερων αναστολέων της MAGL. Από [89] και [84].

3.6.4 Άλλα αποικοδομητικά ένζυμα της 2-αραχιδονυλογλυκερόλης

Η MAGL μαζί με άλλες δύο μη χαρακτηρισμένες σερίνο-υδρολάσες αποτελούν το 99% της υδρολυτικής δραστηριότητας της 2-AG που εμφανίζεται στον εγκέφαλο. Συγκεκριμένα, η MAGL είναι υπεύθυνη για το ~85% της υδρόλυσης της 2-AG, ενώ οι άλλες δύο ABHD6 και ABHD12 για το υπόλοιπο 14% [92]. Η ABHD6 [92] ανήκει στην οικογένεια των α/β υδρολασών, διαθέτει τη συντηρημένη καταλυτική τριάδα S246-D333-H372, είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη και το ενεργό της κέντρο προσανατολίζεται προς το κυτοσόλιο. Εντοπίζεται στη μετασυναπτική μεμβράνη των νευρικών κυττάρων, στα οποία βιοσυντήθεται η 2-AG και βρίσκεται απέναντι από CB1 υποδοχείς. Η θέση της αυτή δείχνει το ρόλο της, ως ελεγκτής της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης 2-AG. Η ABHD12 [92] συμβάλει κατά ~9% στην υδρόλυση της 2-AG. Ανήκει και αυτή στη οικογένεια των α/β υδρολασών με συντηρημένες δομές το μοτίβο λιπάσης (GTSMG) και την καταλυτική τριάδα (S148-D278-H306). Είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, με το καταλυτικό της κέντρο να προσανατολίζεται προς τον αυλό/εξωκυττάριο χώρο και εντοπίζεται σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, κυρίως στα μικρογλιακά κύτταρα και σε άλλους σχετιζόμενους κυτταρικούς τύπους, όπως τα μακροφάγα και οι οστεοκλάστες. Η

λειτουργία της σχετίζεται με τη σηματοδότηση μέσω CB2 υποδοχέων στον εγκέφαλο και σε άλλους περιφερειακούς ιστούς.

Η FAAH έχει βρεθεί ότι μπορεί να υδρολύσει τη 2-AG *in vitro*, αν και πιστεύεται ότι έχει και κάποιο *in vivo* ρόλο στο μεταβολισμό της, ίσως σε παθολογικές καταστάσεις [96].

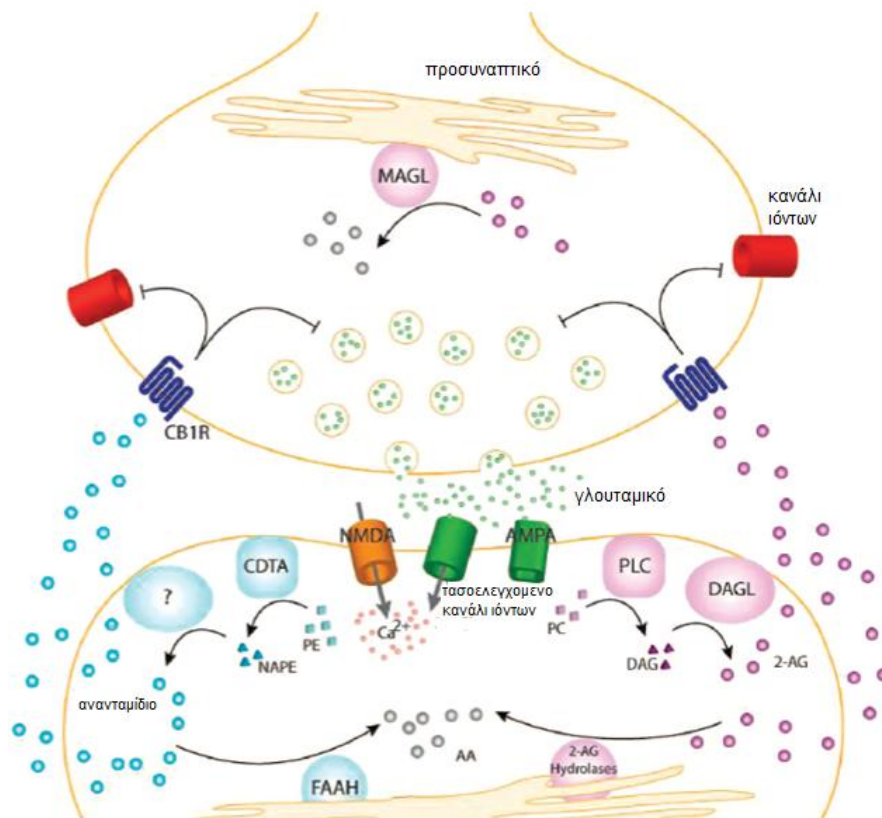
Εκτός από υδρόλυση, ένα άλλο καταβολικό μονοπάτι για τη 2-AG είναι η οξειδωση [91], όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω. Για παράδειγμα, η 2-AG είναι τόσο αποτελεσματική ως υπόστρωμα όσο το αραχιδονικό οξύ για τη COX-2, με τη δράση της οποίας σχηματίζονται γλυκερυλο-προσταγλαδίνες. Ακόμη, η 2-AG μπορεί να οξειδωθεί από λιποξυγενάσες και οξυγενάσες του κυτοχρώματος p450 *in vitro*.

3.7 Μεταγωγή σήματος στον εγκέφαλο μέσω CB1 υποδοχέων

Έχοντας εξετάσει όλα τα συστατικά του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος, δηλαδή τους υποδοχείς, τα υποστρώματα και τα ένζυμα που ελέγχουν το μεταβολισμό τους, είναι χρήσιμο να δούμε ένα γενικό παράδειγμα σηματοδότησης μέσω ενδοκανναβινοειδών στον εγκέφαλο, και συγκεκριμένα, μέσω του CB1 υποδοχέα [89].

Ηλεκτρική διέγερση του προσυναπτικού κυττάρου οδηγεί στην απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών στον εξωκυττάριο χώρο, όπως για παράδειγμα το γλουταμινικό (βλ. σχήμα 3.14). Η πρόσδεση των νευροδιαβιβαστών σε ειδικούς υποδοχείς του μετασυναπτικού νευρικού κυττάρου, μπορεί να προκαλέσει είτε αποπόλωση της μεμβράνης, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση τασοελεγχόμενων καναλιών Ca^{2+} (όπως τύπου NMDA), είτε την ενεργοποίηση διαμεμβρανικών υποδοχέων συνδεδεμένων με $G_{q/11}$ πρωτεΐνες [97]. Τελικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση των κυτοσολικών επιπέδων Ca^{2+} και η ενεργοποίηση των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση των ενδοκανναβινοειδών. Το ανανταμιδίο βιοσυντίθεται από φωσφολιπίδια της μεμβράνης από μία ασβεστιοεξαρτόμενη τρανσακετυλάση (Ca^{2+} -NAT ή CDTA) και τη NAPE-PLD, ενώ η 2-AG από τη δράση της PLC και της DAGL. Τα ενδοκανναβινοειδή, μέσω του μη χαρακτηρισμένου μέχρι στιγμής συστήματος μεταφοράς και πρόσληψης τους, διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη και εξέρχονται στο συναπτικό χώρο. Εκεί, αλληλεπιδρούν με τους CB1

υποδοχείς των προσυναπτικών νευρικών κυττάρων και τους ενεργοποιούν. Μόλις ενεργοποιηθούν, οι CB1R συνδέονται με τις τάξεις των G πρωτεϊνών $G_{i/o}$, και μέσω ρύθμισης καναλιών ιόντων αναστέλλουν την απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών. Η ανάδρομη ρύθμιση των ενδοκανναβινοειδών τερματίζεται από τη δράση αποικοδομητικών ενζύμων. Το αντανταμίδιο υδρολύεται κυρίως από τη FAAH, που εντοπίζεται στο μετασυναπτικό νευρώνα, ενώ η 2-AG από τη MAGL που εντοπίζεται στο προσυναπτικό κύτταρο.



Σχήμα 3.14: Διάγραμμα ανάδρομης σηματοδότησης ενδοκανναβινοειδών. Από [89].

3.8 Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα στη *Tetrahymena*

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη ενδοκανναβινοειδούς συστήματος στη *Tetrahymena* εμφανίστηκαν τη δεκαετία του 70, πολύ πριν την ανακάλυψη του συστήματος, όταν διαπιστώθηκε ότι η Δ^9 -THC επιδρούσε στην ανάπτυξη, την κίνηση και τη διαίρεση της *T. pyriformis* [98, 99]. Μία δεκαετία αργότερα, διαπιστώθηκε η βιοσύνθεση των 2-μονοακυλογλυκερολών στη *Tetrahymena* από τη συνδυασμένη δράση μεμβρανοσύνδετων PLA1 και PLC, όπως συμβαίνει και σε ανώτερους οργανισμούς [100].

Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν την ερευνητική ομάδα μας στην υπόθεση ότι η *Tetrahymena* διαθέτει ενδοκανναβινοειδές σύστημα, και συνεπώς ενδοκανναβινοειδή. Η πρώτη απόδειξη ήρθε το 2001 [101], όταν βρέθηκε ότι η *T. pyriformis* μπορεί να υδρολύει το ανανταμίδιο *in vivo* και να απελευθερώνει δραστικότητα αμιδοϋδρολάσης σε μέσο ασιτίας. Το εκκρινόμενο ένζυμο προκαλεί την υδρόλυση του ανανταμιδίου σε αραχιδονικό οξύ και αιθανολαμίνη, σε εξάρτηση από το χρόνο και τη συγκέντρωση. Επιπλέον, βρέθηκε ότι έχει βέλτιστο pH 9-10, φαινόμενο $K_M=3,7 \mu\text{M}$ και $V_{\text{max}}=278 \text{ pmol/min}\cdot\text{mg}$.

Το 2005 χαρακτηρίστηκε η FAAH της *T. pyriformis* από την ερευνητική ομάδα μας [102]. *In vitro* πειράματα έδειξαν το μεταβολισμό του ανανταμιδίου από ομογενοποίημα *T. pyriformis* μέσω της δράσης ενός ενζύμου με δραστικότητα ανάλογη της FAAH. Η υδρόλυση εξαρτάται από το χρόνο της αντίδρασης και τη συγκέντρωση του ενζύμου και του υποστρώματος, ενώ τα κύρια μεταβολικά προϊόντα ήταν το αραχιδονικό οξύ και η αιθανολαμίνη. Η δραστικότητα αμιδοϋδρολάσης είναι βέλτιστη για pH 9-10, με φαινόμενο $K_m=2,5 \mu\text{M}$ και αναστελλέται από PMSF, οπότε επρόκειται για σερινο-υδρολάση, ενώ δεν εξαρτάται από Ca^{2+} και Mg^{2+} . Υποκυτταρική κλασμάτωση του ομογενοποιηήματος έδειξε ότι η μέγιστη ειδική δραστικότητα εντοπίζεται στο μικροσωμικό και το μη-μικροσωμικό μεμβρανικό κλάσμα. Τέλος, πειράματα ανοσοαποτύπωσης έδειξαν την ύπαρξη μίας ανοσοδραστικής μπάντας στο μη-μικροσωμικό μεμβρανικό κλάσμα με παρόμοιο μοριακό βάρος με τη FAAH των θηλαστικών, και συγκεκριμένα στα 66 kDa.

Στη συνέχεια, το 2010, ήρθε και ο χαρακτηρισμός του ενζύμου της MAGL [103] στη *T. thermophila*. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι το ομογενοποίημα της μπορεί να υδρολύει τη 2-AG και τη 2-OG μέσω των συνδυασμένων δράσεων της MAGL και FAAH. Μελετήθηκε η εμπλοκή της MAGL στην υδρόλυση της 2-AG, μέσω των ειδικών αναστολέων της FAAH URB597 και AM374, και βρέθηκε ότι ακολουθείται κινητική Michaelis-Menten με φαινόμενο $K_M=14,1 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}}=5,8 \text{ nmol/min}\cdot\text{mg}$, και βέλτιστο pH 8-9. Επίσης, αποδείχθηκε η συμμετοχή της FAAH στην υδρόλυση της 2-OG και μάλιστα, κατά 40%. Ακολούθως, υποκυτταρική κλασμάτωση του ομογενοποιηήματος έδειξε ότι η MAGL εντοπίζεται στο κυτοσολικό και μεμβρανικό κλάσμα, με διαφορετικά βέλτιστα pH, κάτι που εξηγείται με την ύπαρξη δύο ισομορφών του ενζύμου. Αυτό επιβεβαιώθηκε με την ύπαρξη μίας ανοσοδραστικής

μπάντας στα 45 kDa τόσο στο κυτοσολικό, όσο και στο μεμβρανικό κλάσμα, και μίας δεύτερης στα 40 kDa που εμφανίστηκε μόνο στο κυτοσολικό.

Μία παράλληλη μελέτη [104], το 2010, απέδειξε την ύπαρξη ενδοκανναβινοειδών υποστρωμάτων στη *T. thermophila*. Συγκεκριμένα, με χρήση LC-MS/MS ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι εξής N-ακυλοαιθανολαμίνες: N-γ-λινολενιλο, -N-εικοσενυλο, -N-λινελαύλο, -N-παλιτυλο, -N-στεατυλο και N-ελαύλο-αιθανολαμίνες, καθώς και οι αντίστοιχες τους 2-ακυλογλυκερόλες. Τα επίπεδα των 2-μονοακυλογλυκερολών ήταν πολύ μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα των N-ακυλοαιθανολαμινών, κατ' αναλογία με τα θηλαστικά. Το ανανταμίδιο και η 2-AG ανιχνεύτηκαν σε ιχνοποσότητες. Τέλος, οι N-ακυλοαιθανολαμίνες που εντοπίστηκαν δοκιμάστηκαν σαν υποστρώματα στη FAAH της *Tetrahymena*, και βρέθηκε ότι όλα είναι ενδογενή υποστρώματα της με καλύτερο από αυτά το AEA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα αποτελεί σημαντικό λιπιδικό σηματοδοτικό σύστημα των θηλαστικών. Τα κυριότερα ενδοκανναβινοειδή είναι η Ν-αραχιδονυλοαιθανολαμίνη ή ανανταμίδιο (ΑΕΑ) και η 2-αραχιδονυλογλυκερόλη (2-AG). Τα ενδοκανναβινοειδή βιοσυντίθενται ανάλογα με τις ανάγκες ως απόκριση σε εξωκυττάριο σήμα. Αφού δράσουν αποσύρονται από την κυκλοφορία και αποικοδομούνται.

Προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας απέδειξαν την ύπαρξη των σημαντικότερων συστατικών του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος στο μονοκύτταρο οργανισμό *Tetrahymena*. Έτσι, διαπιστώθηκε ότι η *Tetrahymena* περιέχει Ν-ακυλοαιθανολαμίνες (ΝΑΕ, ΝΟΕ κλπ.) και 2-ακυλογλυκερόλες (2-AG, 2-OG κλπ.). Επίσης, από την ομάδα μας έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί τα αποικοδομητικά ένζυμα MAGL και FAAH, ενώ πρώτα πειράματα έδειξαν ότι εκκρίνεται δραστηριότητα FAAH σε μέσο ασιτίας. Τα ένζυμα αυτά στα θηλαστικά είναι ενδοκυτταρικά.

Με δεδομένο ότι η *Tetrahymena* εκκρίνει σημαντικό αριθμό ενζύμων, κυρίως υδρολυτικών, το πρωτόζωο αυτό αποτελεί μοντέλο για τη μελέτη της έκκρισης. Μάλιστα, διαθέτει δύο καλά χαρακτηρισμένες πορείες έκκρισης, την ιδιοσυστατική έκκριση λυσοσωματικών ενζύμων και τη ρυθμιζόμενη εξωκύτωση βλεννοκυστών.

Γνωρίζοντας, λοιπόν, το περίπλοκο σύστημα έκκρισης της *Tetrahymena*, καθώς και την έκκριση της FAAH στο μέσο ασιτίας, αντικείμενο της παρούσας εργασίας ορίστηκε η μελέτη της έκκρισης των αποικοδομητικών ενζύμων MAGL και FAAH, και η προέλευση της πηγής έκκρισης τους. Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η *T. thermophila*, της οποίας το γονιδίωμα έχει χαρτογραφηθεί, καθώς και το μεταλλαγμένο στέλεχος *T. thermophila* MS-1, που αδυνατεί να εκκρίνει λυσοσωματικά ένζυμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΕΘΟΔΟΙ-ΥΛΙΚΑ

5.1 Καλλιέργεια *Tetrahymena*

Υλικά

1. Καλλιέργεια παρακαταθήκης *Tetrahymena thermophila* στελέχους B2086 (από *Tetrahymena* Stock Center, Department of Microbiology and Immunology, C5 152 Veterinary Medical Center, Cornell University, Ithaca, New York 14853). Η καλλιέργεια διατηρείται σε αποστειρωμένο διάλυμα 2% (w/v) πρωτεόζης-πεπτόνης, χωρίς ανάδευση σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας και ανανεώνεται με εμβολιασμό ανά δύο εβδομάδες.
2. Καλλιέργεια παρακαταθήκης του μεταλλαγμένου στελέχους της *Tetrahymena thermophila* MS-1 (προσφορά του A. Tiedtke, Πανεπιστήμιο του Muenster, Γερμανία και της Δρ. Ντίας Γαλανοπούλου, Τμήμα Χημείας, Βιοχημεία, ΕΚΠΑ). Η καλλιέργεια διατηρείται σε αποστειρωμένο διάλυμα 0,25% (w/v) πρωτεόζης-πεπτόνης, εκχύλισμα ζύμης 0,25% (w/v), γλυκόζη 0,5% (w/v) και 1% (v/v) 9 mM Fe²⁺-EDTA, χωρίς ανάδευση σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας και ανανεώνεται με εμβολιασμό ανά δύο εβδομάδες.
3. Πρωτεόζη-πεπτόνη (Sigma)
4. Εκχύλισμα ζύμης (Sigma)
5. Γλυκόζη (Merck)
6. Διάλυμα του συμπλόκου Fe²⁺-EDTA 9 mM (100X, Merck)
7. Φορμόλη 1%

Όργανα

1. Αυτόκαυστο Autoclave 760
2. Αιματοκυτόμετρο Neubauer
3. Μικροσκόπιο
4. Απαγωγός νηματικής ροής (laminar flow)
5. Δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας
6. Λύχνος Bunsen
7. Αναδευόμενη πλατφόρμα καλλιιεργειών

Αρχή της μεθόδου

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό που περιλαμβάνει πηγή αμινοξέων (πρωτεόζη-πεπτόνη), βέλτιστη πηγή ενέργειας (γλυκόζη), πηγή ιχνοστοιχείων και βιταμινών (εκχύλισμα ζύμης) και σίδηρο. Η σύσταση αυτή επιτρέπει την ταχεία διαίρεση των κυττάρων, με αποτέλεσμα να λαμβάνεται καλλιέργεια με ιδιαίτερα υψηλή κυτταρική πυκνότητα σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα.

Πορεία εργασίας

Αρχικά παρασκευάζεται το θρεπτικό υλικό, που περιέχει 2% w/v πρωτεόζη-πεπτόνη, 0,5% w/v γλυκόζη, 0,2% w/v εκχύλισμα ζύμης και 1% v/v διάλυμα του συμπλόκου Fe^{2+} -EDTA 9 mM σε απεσταγμένο νερό. Για τις ανάγκες των πειραμάτων μας παρασκευάστηκαν 100 mL θρεπτικού υλικού, που μεταφέρονταν σε κωνική φιάλη πενταπλάσιου όγκου (500 mL). Οι φιάλες πωματίζονται με πώμα από γάζα και ανυδρόφιλο βαμβάκι και ακολουθεί αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 120 °C, υπό πίεση για 20 λεπτά.

Μετά το τέλος της αποστείρωσης και αφού το θρεπτικό υλικό επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, εμβολιάζεται με καλλιέργεια παρακαταθήκης, ηλικίας 6-10 ημερών, υπό αξενικές συνθήκες, δηλαδή εντός απαγωγού νηματικής ροής με αναμμένο λύχνο. Συνήθως απαιτείται για 100 mL θρεπτικού υλικού 1,0 ml καλλιέργειας παρακαταθήκης. Οι καλλιέργειες αφήνονται να αναπτυχθούν εντός θαλάμου σταθερής θερμοκρασίας (25 °C), υπό ανάδευση (50 περιστροφές ανά λεπτό), στο φως.

Για την κατασκευή της καμπύλης ανάπτυξης, λαμβάνεται ανά τακτές χρονικές περιόδους δείγμα 1 mL υπό αξενικές συνθήκες. Αυτό αραιώνεται με φυσιολογικό ορό αν είναι αναγκαίο (σε περίπτωση πυκνής καλλιέργειας) και προστίθεται μία σταγόνα φορμόλης 1% για να ακινητοποιηθούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια, τοποθετείται στο αιματοκυτόμετρο η ειδική καλυπτρίδα και στο χώρο που σχηματίζεται ανάμεσα τους προστίθεται κατάλληλη ποσότητα δείγματος (16 μ L) προς μέτρηση και το σύστημα φέρεται στο μικροσκόπιο. Εκεί, εστιάζουμε στις γραμμώσεις του αιματοκυτόμετρου και μετρούνται τα κύτταρα που βρίσκονται σε ορισμένα τετράγωνα με όγκο $1*1*0,1 \text{ mm}^3=1*10^{-4} \text{ mL}$. Λαμβάνονται πολλαπλές μετρήσεις για τον υπολογισμό της κυτταρικής πυκνότητας της καλλιέργειας σε cells/mL.

Για όλα τα πειράματα που ακλούθησαν, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες στο τέλος της λογαριθμικής φάσης και στην αρχή της στάσιμης. Συγκεκριμένα, για τα κύτταρα της *T. thermophila* στις ~90 ώρες με κυτταρική πυκνότητα $\sim 1,5 \cdot 10^6$ κυττ./mL και για την *T. Therm.* MS-1 στις ~120 ώρες με $\sim 0,7 \cdot 10^6$ κυττ./mL.

5.2 Η έκκριση των ενζύμων όξινη φωσφατάση, MAGL και FAAH σε ανόργανο μέσο από κύτταρα *T. thermophila* σε διάφορους χρόνους

Υλικά

1. Καλλιέργειες κυττάρων *Tetrahymena thermophila*
2. Καλλιέργειες κυττάρων μεταλλαγμένου στελέχους *Tetrahymena thermophila* MS-1
3. Ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM tris-HCl pH 7,5

Όργανα

1. Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B ψυχόμενη, Du Pont
2. Δονητής υπερήχων
3. Μικροσκόπιο
4. Αιματοκυτόμετρο Neubauer

Πορεία εργασίας

Καλλιέργειες κυττάρων *T. thermophila* και *T. thermophila* MS-1, όγκου 100 mL, στο τέλος της λογαριθμικής φάσης, μεταφέρονται σε falcon των 50 mL και φυγοκεντρώνονται στα 500xg, στους 4°C, για 10 λεπτά για την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο των δύο falcon για κάθε καλλιέργεια, ενώνεται σε ένα και αναδιασπείρεται σε 50 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM tris-HCl pH 7,5. Η αναδιασπορά των κυττάρων γίνεται προσεκτικά ώστε να εξασφαλιστεί η ακεραιότητα τους. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις των κυττάρων στις αρχικές συνθήκες φυγοκέντρωσης.

Μετά το τέλος της δεύτερης έκπλυσης και αφού αποχυθεί το υπερκείμενο, τα κύτταρα αναδιασπείρονται σε όγκο 25 mL με το ίδιο ανόργανο μέσο, ελέγχεται η βιωσιμότητά τους με παρατήρηση στο μικροσκόπιο και ακολουθεί μέτρηση της κυτταρικής πυκνότητας. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε κωνικές φιάλες των 100 mL,

και τοποθετούνται στο θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας (25°C), υπό ανάδευση, για επώαση σε διαφορετικές χρονικές περιόδους.

Η επώαση σταματάει μετά από παραμονή για χρονικό διάστημα 1, 2, 4 και 6 ωρών και το μίγμα φυγοκεντρείται στα 500xg, στους 4°C, για 10 λεπτά, όπου και διαχωρίζεται το ίζημα των κυττάρων από το υπερκείμενο, δηλαδή το μέσο ασιτίας. Πολύ προσεχτικά και χωρίς διατάραξη, παραλαμβάνεται το υπερκείμενο και συγκεκριμένα, μόνο το πιο πάνω τμήμα του, για να αποφευχθεί η επιμόλυνση από τα κύτταρα του ιζήματος. Παραλαμβάνεται και το υπόλοιπο, το οποίο όμως μετά από τη μέτρηση του όγκου του θα πεταχτεί. Το ανώτερο τμήμα του υπερκειμένου ελέγχεται στο μικροσκόπιο για πιθανή παρουσία κυττάρων, ενώ το ίζημα των κυττάρων αναδιασπείρεται σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM tris-HCl pH 7,5 όγκου ~35 mL, ελέγχεται για τη βιωσιμότητα των κυττάρων και ομογενοποιείται για 4x30s με ομογενοποιητή υπερήχων σε πάγο.

Στο ομογενοποίημα, καθώς και στο ανώτερο τμήμα του υπερκειμένου γίνεται προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry, προσδιορισμός όξινης φωσφατάσης, προσδιορισμός δραστηριότητας MAGL και έμμεσος προσδιορισμός δραστηριότητας FAAH. Τα αποτελέσματα του ανώτερου τμήματος του υπερκειμένου ανάγονται στον συνολικό όγκο του μέσου ασιτίας.

Υπολογισμός έκκρισης

Η ειδική ενζυμική δραστηριότητα στο μέσο ασιτίας και το ομογενοποίημα εκφράζεται ως $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ πρωτεΐνης για την όξινη φωσφατάση και ως $\text{nmol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ πρωτεΐνης για τη MAGL και τη FAAH. Η δραστηριότητα του ομογενοποιήματος και του μέσου ασιτίας υπολογίζεται από τον πολλαπλασιασμό της δραστηριότητας σε $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ή σε nmol/ml με τον όγκο της κάθε φάσης. Το άθροισμα των δραστηριοτήτων του μέσου ασιτίας και του ομογενοποιήματος δίνει τη συνολική δραστηριότητα και, τέλος, η % έκκριση του ενζύμου ορίζεται από το λόγο της δραστηριότητας του μέσου ασιτίας ως προς τη συνολική δραστηριότητα και τον πολλαπλασιασμό επί 100.

5.3 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry

Υλικά

1. Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Merck)

2. Διάλυμα 2% w/v Na_2CO_3 , 0,1 M NaOH σε απεσταγμένο νερό (Διάλυμα A)
3. Διάλυμα 0,5% w/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1% w/v τρυγικό καλιονάτριο σε απεσταγμένο νερό (Διάλυμα B)
4. Διάλυμα Γ: Παρασκευάζεται με ανάμιξη 50 όγκων διαλύματος A με 1 όγκο διαλύματος B λίγο πριν τον προσδιορισμό.
5. Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης βοδινού ορού (BSA) 0,33 mg/mL σε απεσταγμένο νερό
6. Απεσταγμένο νερό

Όργανα

1. Πλαστικοί σωλήνες
2. Πλαστικές οπτικές κυψελίδες των 3 mL (μιας χρήσης)
3. Φωτόμετρο HELIOS β, UNICAM
4. Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
5. Αυτόματες πιπέτες

Αρχή μεθόδου [105]

Η προσθήκη του διαλύματος Γ στο βιολογικό παρασκεύασμα οδηγεί στο σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ του χαλκού II και των πεπτιδικών δεσμών, και στην αναγωγή του χαλκού II σε I στο αλκαλικό περιβάλλον που εξασφαλίζεται από το NaOH και το Na_2CO_3 . Η αντίδραση αυτή οδηγεί στη παραγωγή ελαφρώς ιώδους χρώματος. Στη συνέχεια, προστίθεται το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu που περιέχει, μεταξύ άλλων, μολυβδαινικά και βολφραμικά ιόντα. Αυτά ανάγονται από τον χαλκό I που σχηματίστηκε κατά το προηγούμενο βήμα, καθώς και από ορισμένα αμινοξέα των πρωτεϊνών (τυροσίνη, θρυπτοφάνη, κυστεΐνη, ιστιδίνη), εμφανίζοντας και αυτά μπλε χρώμα. Τελικώς, το χρώμα που φωτομετρήται στα 500 nm είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού των χρωμάτων που εμφανίστηκαν πιο πάνω.

Πορεία εργασίας

Αρχικά, τα δείγματα στα οποία πρόκειται να γίνει προσδιορισμός πρωτεΐνης αφήνονται να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προετοιμάζεται τυφλό δείγμα (600 μL απεσταγμένου νερού) καθώς και δείγματα για την καμπύλη αναφοράς, που περιέχουν BSA σε διάφορες συγκεντρώσεις (100, 200 και 600 μL από BSA 0,33 mg/mL) και συμπληρώνονται με απεσταγμένο νερό

μέχρι τα 600 μL . Ακόμη, προετοιμάζονται τα δείγματα χρησιμοποιώντας κατάλληλες ποσότητες δείγματος και απεσταγμένου νερού, ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 600 μL . Παίρνουμε διάφορες ποσότητες δειγμάτων (π.χ. 50, 100, 200, 400 μL) ώστε να πάρουμε κάποιες τιμές μέσα στα όρια της πρότυπης καμπύλης.

Μόλις ετοιμαστούν τα πρότυπα και τα δείγματα, ετοιμάζεται και το διάλυμα Γ. Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 3 mL αυτού του διαλύματος και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με κυκλοαναδευτήρα. Μετά από 10 λεπτά, ακολουθεί προσθήκη 300 μL αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu και ισχυρή ανάδευση. Τέλος, τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, μεταφέρονται σε κυψελίδες και φωτομετρούνται στα 500 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα γίνεται με βάση την καμπύλη αναφοράς.

5.4 Προσδιορισμός δραστηριότητας όξινης φωσφατάσης

Υλικά

1. Δινάτριο άλας π-νιτροφαινυλοφωσφορικού οξέος (Merck)
2. π-νιτροφαινόλη (Sigma)
3. κιτρικό νάτριο
4. νατραζίδιο NaN_3 (Merck)
5. BSA (Serva)
6. Γλυκίνη (Biorad)
7. Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών 0,1 M, 0,04% w/v NaN_3 , BSA 0,2% w/v, pH 4,6
8. Διάλυμα υποστρώματος: διάλυμα π-νιτροφαινυλοφωσφορικού οξέος 10 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών
9. Ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης-NaOH 0,4 M, pH 10,4
10. Διάλυμα π-νιτροφαινόλης 28 mg/100 mL
11. Ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl pH 7,5
12. Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM HEPES pH 7

Όργανα

1. pHμετρο
2. Υδρόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας
3. Κυκλοαναδευτήρας (vortex)

4. Φωτόμετρο HELIOS β UNICAM

5. Αυτόματες πιπέττες

Αρχή μεθόδου [48]

Η όξινη φωσφατάση μπορεί να υδρολύει το π-νιτροφαινυλοφωσφορικό οξύ προς π-νιτροφαινόλη και φωσφορικό οξύ. Η π-νιτροφαινόλη που σχηματίζεται, μετατρέπεται σε ισχυρά αλκαλικό περιβάλλον (pH>9) στην ιονισμένη μορφή της, που απορροφά στα 405 nm λόγω συντονισμού.

Πορεία εργασίας

Αρχικά, προετοιμάζεται το τυφλό και τα δείγματα αναφοράς. Το τυφλό περιέχει 100 μL 50 mM Tris-HCl pH 7,5 ή 100 μL 10 mM HEPES pH 7, αναλόγως του πειράματος προετοιμασίας του δείγματος. Τα πρότυπα περιέχουν π-νιτροφαινόλη σε διάφορες συγκεντρώσεις (5, 20, 30, 40 μl από το διάλυμα π-νιτροφαινόλης 28 mg/100 mL και συμπληρώνεται ο όγκος τους με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι τα 100 μL . Αντίστοιχα, προετοιμάζονται δύο διπλά δείγματα για κάθε προσδιοριζόμενο κλάσμα, στο καθένα από τα οποία περιέχονται 3 μg πρωτεΐνης, όπως έχει προσδιοριστεί από τη μέθοδο Lowry ή τη Bradford, αναλόγως του πειράματος και συμπληρώνεται ο όγκος τους με το ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα ως τα 100 μL .

Στη συνέχεια, το τυφλό, τα πρότυπα και τα δείγματα μεταφέρονται σε υδρόλουτρο στους 37°C, επωάζονται για 3 λεπτά, και, ακολούθως, προστίθενται 100 μL θερμοστατούμενου στους 37°C διαλύματος υποστρώματος (διάλυμα π-νιτροφαινυλοφωσφορικού οξέος 10 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών) και αφήνονται να επωαστούν για 20 λεπτά. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη 1,0 mL παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος γλυκίνης-NaOH 0,4 M, pH 10,4. Όταν τα δείγματα επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου φωτομετρούνται στα 405 nm. Η τιμή της παραγόμενης π-νιτροφαινόλης υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

5.5 Προσδιορισμός δραστηριότητας MAGL και FAAH

Υλικά

1. Ενζυμικό παρασκεύασμα

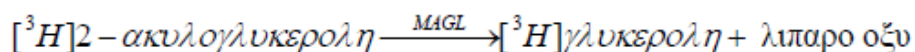
2. [³H] 2-ελαϋλογλυκερόλη, [³H]2-OG (1,0 mCi/mL, 20 Ci/mmol, ARC)
3. 50 mM Tris-HCl pH 7,5
4. 10 mM HEPES pH 7
5. BSA 1,38% (w/v)
6. Τριχλωροξικό οξύ (TCA) 40% (w/v)
7. AM374 σε διαλύτη DMSO
8. JZL184 σε διαλύτη DMSO

Όργανα

1. Υδρόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας
2. Μετρητής σπινθηρισμού υγρών Wallac 1209 Rackbeta της Pharmacia
3. Κυκλοαναδευτήρας Whilimixer της Fisons
4. Φυγόκεντρος (Micro 2000 Hettich Zentrifugen)
5. Αυτόματες πιπέτες
6. Παγόλουτρο

Αρχή μεθόδου

Η αντίδραση που περιγράφει την αποικοδόμηση των ραδιενεργά επισημασμένων 2-ακυλογλυκερόλων που χρησιμοποιήσαμε από το ένζυμο της MAGL είναι η εξής:



Η δραστηριότητα της MAGL προσδιορίζεται με τη χρήση ραδιενεργής 2-ελαϋλογλυκερόλης (2-OG) επισημασμένης στη γλυκερόλη. Όπως φαίνεται και στην αντίδραση, τα προϊόντα που προκύπτουν από τη δράση του ενζύμου της MAGL είναι ραδιενεργή γλυκερόλη, η οποία είναι υδατοδιαλυτή και το αντίστοιχο λιπαρό οξύ (FA). Η BSA έχει, ως γνωστό, τη δυνατότητα να δεσμεύει λιπίδια και επομένως με την προσθήκη της, μετά την επώαση του μίγματος της αντίδρασης, δεσμεύει το λιπαρό οξύ που έχει απελευθερωθεί από τη δράση του ενζύμου, καθώς και όση ποσότητα ραδιενεργής 2-ακυλογλυκερόλης δεν έχει αντιδράσει. Η επισημασμένη γλυκερόλη, αντίθετα, παραμένει στο διάλυμα. Με την προσθήκη TCA, οι πρωτεΐνες (και άρα και η BSA) μετουσιώνονται και κατακρημνίζονται και μετά από φυγοκέντρηση προκύπτει ίζημα που περιέχει το λιπαρό οξύ και το ραδιοεπισημασμένο υπόστρωμα που δεν αντέδρασε και υπερκείμενο που περιέχει τη ραδιοεπισημασμένη γλυκερόλη.

Είναι γνωστό ότι οι 2-ακυλογλυκερόλες αποτελούν υπόστρωμα και για το ένζυμο της FAAH, έτσι στη περίπτωση που θέλουμε να μελετήσουμε τη δράση της MAGL, αποκλείοντας τη συμμετοχή της FAAH, προστίθεται ο ειδικός αναστολέας της FAAH AM374, σε τελική συγκέντρωση 100 nM, που έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τη δράση της FAAH, χωρίς να επηρεάζει αυτή της MAGL. Η προσθήκη του αναστολέα της FAAH και ο προσδιορισμός της αναστολής που προκαλεί αποτελεί, επίσης, και ένα έμμεσο τρόπο υπολογισμού της δραστηριότητας της FAAH, συγκρίνοντας τη δραστηριότητα με και χωρίς τον αναστολέα. Ακόμη, μπορεί να μελετηθεί η αναστολή που προκαλεί ο αναστολέας της MAGL JZL184 στο ένζυμο της MAGL, χρησιμοποιώντας τον σε τελική συγκέντρωση 10 μM.

Η παραπάνω μέθοδος διαμορφώθηκε στο εργαστήριο μας στα πλαίσια της εργασίας για την απόκτηση διπλώματος ειδίκευσης της Έλενας Φαρμάκη [77] και έχει παρουσιαστεί στο συνέδριο ICRS του 2006.

Πορεία εργασίας

Αρχικά, προετοιμάζονται δύο σειρές δειγμάτων σε erpendorf των 2,0 mL. Σε κάθε δείγμα τοποθετούνται 50 μg κατάλληλου ενζυμικού παρασκευάσματος και συμπληρώνεται ο όγκος τους μέχρι το 1,0 ml με 50 mM Tris-HCl pH 7,5 ή 10 mM Hepes pH 7, αναλόγως της μεθόδου προετοιμασίας του ενζυμικού παρασκευάσματος. Στη μια από τις δύο σειρές δειγμάτων, θα τοποθετηθεί επίσης κατάλληλος αναστολέας, είτε AM374 τελικής συγκέντρωσης στο 1,0 mL 100 nM, είτε JZL184 10 μM, ενώ η άλλη σειρά δειγμάτων θα μείνει χωρίς αναστολέα. Επίσης, φτιάχνονται και αντίστοιχα τυφλά, ένα με αναστολέα και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και ένα χωρίς αναστολέα. Κάθε δείγμα με αναστολέα ή χωρίς προετοιμάζεται δύο φορές.

Τα δείγματα μεταφέρονται στο υδρόλουτρο στους 37°C και προεπεωάζονται, όπου χρειάζεται, με τον αναστολέα για 5 λεπτά, πριν τοποθετηθεί το ραδιενεργά επισημασμένο υπόστρωμα [³H]2-OG σε όλα τα δείγματα (και τα τυφλά), τελικής συγκέντρωσης 2 μM στο 1 mL της αντίδρασης και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά. Μετά το πέρας των 15 λεπτών ακολουθεί προσθήκη 0,1 mL BSA 1,38% (w/v) και μεταφορά του δείγματος σε παγόλουτρο και η αντίδραση τερματίζεται. Μετά από 1,5 λεπτά προστίθενται σε κάθε δείγμα 0,4 ml παγωμένου TCA 40% (w/v). Το ίζημα που προκύπτει διαχωρίζεται από το υπερκείμενο με φυγοκέντρηση στα

13000xg για 5 λεπτά και το υπερκείμενο παραλαμβάνεται σε καινούριο erpendorf με γυάλινο Pasteur. Το ίζημα αναδιασπείρεται σε 0,2 ml 0 mM Tris-HCl pH 7,5 ή 10 mM HEPES pH 7, αναλόγως του τι χρησιμοποιήθηκε πριν και μετράται η ραδιενέργεια στο ίζημα και στο υπερκείμενο. Αφού αφαιρεθεί η ραδιενέργεια των τυφλών από τα αντίστοιχα δείγματα υπολογίζεται στο συνολικό ποσό ραδιενέργειας και υπολογίζεται η % υδρόλυση ή % μεταβολισμός. Ως % υδρόλυση ορίζεται το κλάσμα:

$$\frac{P.Y. \times A}{P.Y. \times A + P.I.} \times 100$$

Όπου:

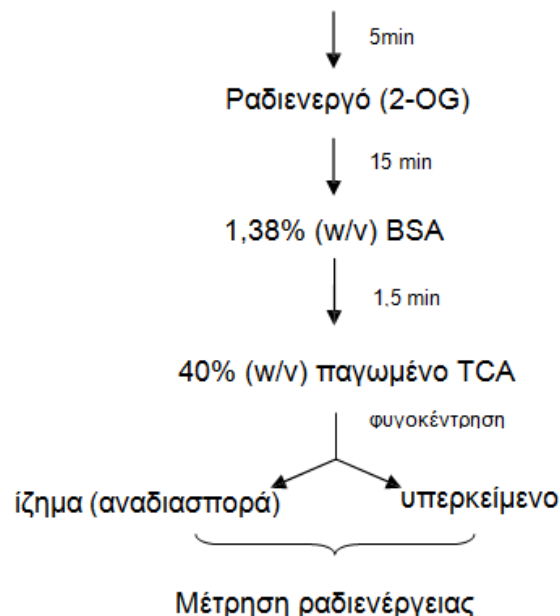
P.Y.: ραδιενέργεια υπερκειμένου δείγματος – ραδιενέργεια υπερκειμένου τυφλού δείγματος.

A: κατάλληλος συντελεστής ο οποίος όταν πολλαπλασιαστεί με τον όγκο του υπερκειμένου που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της ραδιενέργειας δίνει το συνολικό όγκο του υπερκειμένου του δείγματος.

P.I.: ραδιενέργεια ιζήματος δείγματος – ραδιενέργεια ιζήματος τυφλού δείγματος.

Σχηματικά η παραπάνω μέθοδος αποδίδεται ως εξής:

Ενζυμικό παρασκεύασμα + αναστολέας (όπου απαιτείται)



Σχήμα 5.1: Πορεία προσδιορισμού ενζυμικής δραστηριότητας MAGL και FAAH.

5.6 Μέτρηση της ραδιενέργειας

Υλικά

1. 1,4-διοξάνιο (dioxane)
2. 2,5-διφαινυλοξαζόλιο (PPO)
3. 1,4-δι-[2-(5-φαινυλοξαζολυλο)]-βενζόλιο (POPOP)
4. Ναφθαλίνιο
5. Υγρό σπινθηρισμού Dioxan-Water Base, κατάλληλο για υδατικά διαλύματα. Σε 1,0 L διοξάνιου διαλύονται 7,0 g POP, 0,3 g POPOP και 100 g ναφθαλινίου. Αφού διαλυτοποιηθούν πλήρως τα στερεά προστίθενται 200 ml απεσταγμένου νερού.

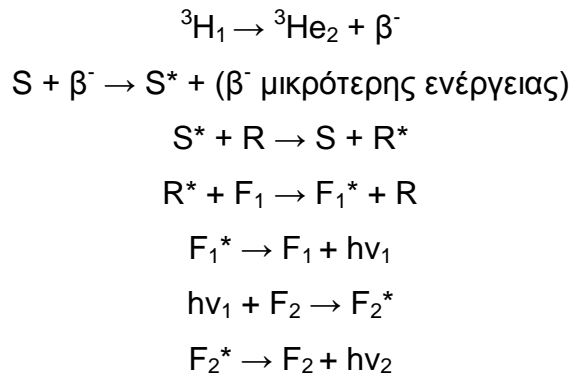
Όργανα

1. Μετρητής σπινθηρισμού υγρών Wallec 1209 Rackbeta της Pharmacia
2. Καταγραφέας Facit B3100
3. Κυκλοαναδευτήρας Whilimixer της Fisons
4. Αυτόματες πιπέττες
5. Πλαστικά φιαλίδια σπινθηρισμού
6. Ειδικοί υποδοχείς (racks)

Αρχή μεθόδου

Η μέτρηση της ραδιενέργειας γίνεται με την τεχνική του σπινθηρισμού υγρών, στην οποία η ραδιενεργή ακτινοβολία μετράται δευτερογενώς. Το ραδιενεργό δείγμα περιέχει κάποιο ισότοπο, στη προκειμένη περίπτωση τρίτιο (^3H), το οποίο εκπέμπει β^- σωματίδια (ηλεκτρόνια) όταν διασπάται μέσω β^- διάσπασης σε ήλιο ($^3\text{He}_2$). Το δείγμα αυτό τοποθετείται σε 'κοκτέιλ' σπινθηρισμού, που περιέχει: α) το διαλύτη (S, εδώ διοξάνιο) που απορροφά μέρος της β^- ακτινοβολίας και διεγείρεται, β) τον πρωταρχικό σπινθηριστή, που είναι μία φθορίζουσα ουσία (F_1 , εδώ PPO) που απορροφά την ακτινοβολία από το διεγερμένο διαλύτη και διεγείρεται ο ίδιος, γ) τον δευτερογενή σπινθηριστή (F_2 , εδώ POPOP), ο οποίος απορροφά την ακτινοβολία που εκπέμπει ο πρωταρχικός σπινθηριστής και εκπέμπει ακτινοβολία σε μεγαλύτερο μήκος κύματος το οποίο και ανιχνεύεται καλύτερα από το φωτοπολλαπλασιαστή του ειδικού θαλάμου μέτρησης ραδιενέργειας. Στην περίπτωση μέτρησης ραδιενέργειας υδατικών διαλυμάτων χρησιμοποιείται και μία

άλλη ουσία (R, εδώ ναφθαλίνιο), η οποία μεταφέρει στον σπινθηριστή πιο αποτελεσματικά την ακτινοβολία που μεταφέρθηκε από το διαλύτη. Η σειρά των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα είναι η εξής:



Τελικά, η ακτινοβολία αποδιέγερσης των φθορίζουσών ουσιών που ανιχνεύεται και η οποία είναι ανάλογη προς την ενέργεια των β^- σωματιδίων που απορροφήθηκε, καταγράφεται ως αριθμός κρούσεων ανά λεπτό (counts per minute-cpm).

Πορεία εργασίας

Αρχικά, τοποθετούνται 10 mL διαλύματος υγρού σπινθηρισμού Dioxane-Water Base σε ειδικά πλαστικά φιαλίδια σπινθηρισμού (scintillation vials). Μετά, προστίθενται σε αυτά τα vials τα δείγματα των οποίων η ραδιενέργεια πρόκειται να μετρηθεί. Συγκεκριμένα, τοποθετούνται τα 200 μL του αναδιασπαρμένου ιζήματος και 500 μL του υπερκειμένου, δηλαδή όλο το ίζημα και το 1/3 του όγκου του υπερκειμένου. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται σε ειδικούς υποδοχείς (racks) και το σύστημα εισέρχεται στο μετρητή σπινθηρισμού υγρών. Εκεί, γίνεται λήψη πεντάλεπτων μετρήσεων των κρούσεων (cpm) του κάθε δείγματος. Παράλληλα, πραγματοποιείται μέτρηση των κρούσεων ενός φιαλιδίου που περιέχει μόνο υγρό σπινθηρισμού και οι κρούσεις του αφαιρούνται από τις κρούσεις όλων των δειγμάτων προς μέτρηση συμπεριλαμβανομένων των τυφλών, για να προκύψει η πραγματική τιμή κρούσεων κάθε δείγματος. Αυτή η τιμή χρησιμοποιείται για τους υπολογισμούς που αναφέρθηκαν πιο πάνω.

5.7 Απομόνωση εκκρινόμενων συστατικών των βλεννοκυστών της *Tetrahymena*

Υλικά

1. Καλλιέργειες κυττάρων *Tetrahymena thermophila*

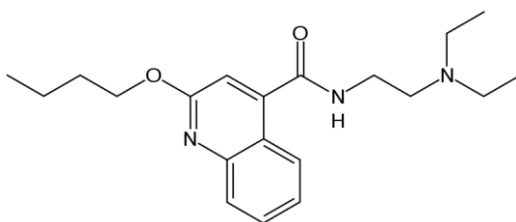
2. Καλλιέργειες κυττάρων μεταλλαγμένου στελέχους *Tetrahymena thermophila* MS-1
3. Ρυθμιστικό διάλυμα διέγερσης: 10 mM HEPES pH 7, 0,5 mM CaCl₂
4. Υδροχλωρική διβουκαΐνη (Sigma) 25 mM σε απεσταγμένο νερό
5. Υδατικό διάλυμα σακχαρόζης 0,25 M

Όργανα

1. Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B ψυχόμενη, Du Pont
2. Δονητής υπερήχων
3. Μικροσκόπιο
4. Αιματοκυτόμετρο Neubauer
5. Αυτόματες πιπέτες

Αρχή της μεθόδου [58]

Το σύνολο των βλεννοκυστών της *Tetrahymena*, που βρίσκονται ελλιμενισμένες στη πλασματική μεμβράνη, μπορούν να εξωκυτωθούν γρήγορα και μαζικά με τη χρήση ενός τοπικού αναισθητικού, της διβουκαΐνης. Η διβουκαΐνη αλληλεπιδρά με τις πλασματικές μεμβράνες, προκαλώντας αύξηση της κυτοσολικής συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου, που αποτελεί το σήμα για την έκκριση του περιεχομένου των βλεννοκυστών. Η βλέννα που εκκρίνεται μπορεί να απομονωθεί από την υπόλοιπη καλλιέργεια μέσω μίας σειράς φυγοκεντρήσεων.



Σχήμα 5.2: Δομή δικουκαΐνης.

Μεγάλη προσοχή πρέπει να δίνεται στη χρήση της διβουκαΐνης, καθώς προκαλεί κάτω από διαφορετικές συνθήκες και αποβλεφαρίδωση. Επίσης, είναι θανατηφόρα για τα κύτταρα εκτός και αν η διάρκεια της επίδρασης είναι πολύ μικρή. Ακόμη και έτσι, όμως, προκαλείται διόγκωση των κυττάρων. Τα κύτταρα της *Tetrahymena* είναι, επίσης, αρκετά ευαίσθητα σε παράγοντες που προκαλούν στρες όπως μεταβολές στην όσμωση, στη θερμοκρασία ή στο μηχανικό στρες, και μπορεί να

προκληθεί μερική εξωκύτωση σε τέτοιες συνθήκες. Γι' αυτό πρέπει να είναι πολύ προσεκτικός ο χειρισμός των κυτταρικών καλλιιεργειών.

Πορεία εργασίας

Καλλιέργειες κυτάρων *T. thermophila* και *T. thermophila* MS-1, όγκου 100 mL, στο τέλος της λογαριθμικής φάσης, μεταφέρονται σε falcon των 50 mL και τοποθετούνται σε παγόλουτρο για 5 λεπτά. Από την καλλιέργεια της *T. thermophila* χρησιμοποιείται μόνο ο μισός όγκος (50 mL), ενώ από τη *T. thermophila* MS-1 όλος, ώστε να έχουμε παρόμοια κυτταρική πυκνότητα. Ακολούθως, φυγοκεντρώνονται στα 630xg, στους 4°C, για 3 λεπτά για την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου. Μετά την απόχυση του υπερκειμένου τα ιζήματα της MS-1 αναδιασπείρονται σε κοινό falcon με κρύο ρυθμιστικό διάλυμα διέγερσης, σε τελικό όγκο 50 mL. Αντίστοιχα, η μισή καλλιέργεια της *T. Thermophila* αναδιασπείρεται και αυτή σε τελικό όγκο 50 mL. Τα κύτταρα ελέγχονται στο μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί η βιωσιμότητα τους και ξαναφυγοκεντρώνονται στις ίδιες συνθήκες. Αν κατά τη φυγοκέντρωση αυτή σχηματιστεί μικρή μεσόφαση, σημαίνει ότι έχει γίνει μερική εξωκύτωση βλεννοκυστών και το πείραμα επαναλαμβάνεται από την αρχή. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρωσης, τα ιζήματα αναδιασπείρονται με ρυθμιστικό διάλυμα διέγερσης και είναι έτοιμα να υποστούν επίδραση με διβουκαΐνη.

Προστίθενται, λοιπόν, υπό ανάδευση 500 μ L διβουκαΐνης 25 mM στα 4,5 ml των καλλιιεργειών, και ακριβώς 30 sec μετά, προστίθενται 45 mL κρύου ρυθμιστικού διαλύματος διέγερσης, που αραιώνουν τη διβουκαΐνη σε τελική συγκέντρωση 0,25 mM και σταματούν την επίδραση. Ακολούθως, λαμβάνεται δείγμα για μικροσκοπικό έλεγχο, ώστε να ελέγξουμε τη βιωσιμότητα και ακεραιότητα των κυτάρων και πραγματοποιείται μία φυγοκέντρωση στα 500xg, στους 4°C, για 5 λεπτά. Η φυγοκέντρωση αυτή διαχωρίζει το περιεχόμενο των βλεννοκυστών που εμφανίζεται με τη μορφή μιας παχύρρευστης μεσόφασης ανάμεσα στο ίζημα των κυτάρων και το διαλυτό υπερκείμενο. Η μεσόφαση αυτή μπορεί να είναι παρόμοια σε όγκο με το ίζημα των κυτάρων. Αν σε αυτή τη φυγοκέντρωση το υπερκείμενο είναι θολό και δεν διακρίνεται με ευκολία από τη μεσόφαση, έχει σπάσει μεγάλο μέρος των κυτάρων και το πείραμα πρέπει να επαναληφθεί από την αρχή.

Πολύ προσεκτικά, ώστε να μην διαταραχθεί η μεσόφαση και το ίζημα, παραλαμβάνεται με σιφόνι το ανώτερο τμήμα του υπερκειμένου και μετράται ο όγκος του. Επίσης, παραλαμβάνεται το υπόλοιπο υπερκείμενο σε ξεχωριστό falcon και υπολογίζεται ο όγκος του και γίνεται μικροσκοπικός έλεγχος και στα δύο τμήματα για να διαπιστωθεί η απουσία κυττάρων από αυτά. Με νέο σιφόνι παραλαμβάνεται η μεσόφαση με προσοχή, ώστε να μην αναδιασπαρεί το ίζημα και επιμολυνθεί αυτή με κύτταρα και γίνεται πάλι μικροσκοπικός έλεγχος για παρουσία κυττάρων. Επειδή το ίζημα έρχεται σε επαφή με τη μεσόφαση είναι σχεδόν αδύνατο να μην πάρουμε κάποιο κύτταρο μαζί της, οπότε την αραιώνουμε στα 40 mL με ρυθμιστικό διάλυμα διέγερσης, προσθέτουμε στο κάτω μέρος 5 mL σακχαρόζης 0,25 M και φυγοκεντρούμε στα 2500xg, για 10 λεπτά, στους 4°C. Το στρώμα της σακχαρόζης παγιδεύει τα κύτταρα και τα διαχωρίζει από τη μεσόφαση, την οποία μπορούμε να πάρουμε πλέον εύκολα. Τέλος, το ίζημα των κυττάρων αναδιασπείρεται σε $V_i=35$ mL με ρυθμιστικό διάλυμα διέγερσης, ελέγχεται στο μικροσκόπιο για τη βιωσιμότητα των κυττάρων και ομογενοποιείται για 4x30s σε πάγο με δονητή υπερήχων. Τα κλάσματα που παραλάβαμε (ομογενοποίηση κυττάρων, μεσόφαση και ανώτερο τμήμα του υπερκειμένου) τοποθετούνται στην κατάψυξη.

Στα κλάσματα αυτά, τελικά, γίνεται προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford, καθώς το HEPES του ρυθμιστικού διαλύματος διέγερσης προκαλεί παρεμπόδιση στη μέθοδο Lowry [106], προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας MAGL και FAAH και προσδιορισμός δραστηριότητας όξινης φωσφατάσης. Σε όλους τους παραπάνω προσδιορισμούς, τα αποτελέσματα για το ανώτερο τμήμα του υπερκειμένου ανάγονται στο συνολικό του όγκο, όπως υπολογίστηκε από την πρόσθεση του όγκου του ανώτερου τμήματος με το κατώτερο τμήμα. Επίσης, στα κλάσματα αυτά, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτική SDS-πολυακρυλαμίδιου και ανοσοαποτύπωση.

5.8 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Υλικά

1. Αντιδραστήριο Bradford 1x (Sigma)
2. Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης βοδινού ορού (1 mg/ml) σε απεσταγμένο νερό

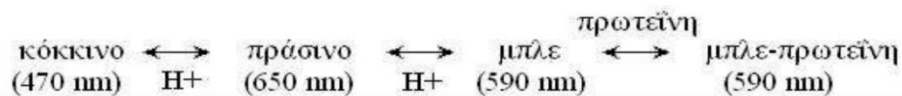
3. Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 10 mM, pH 7,0

Όργανα

1. Φωτόμετρο ορατού-υπεριώδους HELIOS β, UNICAM
2. Κυκλοαναδευτήρας
3. Αυτόματες πιπέττες
4. Πλαστικές κυψελίδες

Αρχή μεθόδου [107]

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην ισορροπία μεταξύ τριών μορφών της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Κάτω από ισχυρά όξινες συνθήκες, η χρωστική είναι σταθερότερη στη διπλά πρωτονιωμένη κόκκινη μορφή της. Όταν, όμως, προστίθεται διάλυμα πρωτεΐνης, η χρωστική προσδένεται κυρίως στα βασικά αμινοξέα αργινίνη και λυσίνη, καθώς και στα υδρόφοβα και αρωματικά κατάλοιπα αμινοξέων των πρωτεϊνών, και εμφανίζεται με τη μη πρωτονιωμένη μπλε μορφή της, η οποία έχει ένα μέγιστο φάσμα απορρόφησης στα 595 nm. Η αύξηση της απορρόφησης στα 595 nm είναι ανάλογη της ποσότητας της δεσμευμένης/ανιοντικής χρωστικής, συνεπώς και της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο δείγμα. Η διαδικασία είναι ταχύτατη, καθώς η αλλαγή χρώματος γίνεται πολύ γρήγορα και το χρώμα είναι σταθερό για μία ώρα.



Σχήμα 5.3: Η ισορροπία μεταξύ των τριών μορφών της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 και η δέσμευση της με τις πρωτεΐνες του διαλύματος, καθώς και η απορρόφηση της κάθε μίας.

Πορεία εργασίας

Αρχικά, ετοιμάζεται το τυφλό και τα πρότυπα. Το τυφλό περιέχει 800 μL Hepes 10 mM pH 7,0, ενώ τα πρότυπα BSA σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1, 2, 4, 6, 8 μL από το διάλυμα 1mg/ml) και συμπληρώνονται με ρυθμιστικό διάλυμα στα 800 μL . Αντιστοίχως, ετοιμάζονται και τα δείγματα. Για κάθε διαφορετικό ενζυμικό παρασκεύασμα φτιάχνονται διάφορες συγκεντρώσεις, ώστε τουλάχιστον δύο να συμπίπτουν με τα όρια της καμπύλης αναφοράς και συμπληρώνεται ο όγκος τους μέχρι τα 800 μL . Σε όλους τους σωλήνες μετά τοποθετούνται 300 μL αντιδραστήριου Bradford 1x και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με κυκλοαναδευτήρα.

Μετά από 5 λεπτά τα δείγματα είναι έτοιμα να φωτομετρηθούν στα 595 nm. Από τις τιμές απορρόφησης των προτύπων κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς και βάσει αυτής υπολογίζεται η ποσότητα πρωτεΐνης που περιέχουν τα άγνωστα δείγματα.

5.9 Μελέτη της επίδρασης της διβουκαΐνης στο μεταβολισμό της 2-OG

Υλικά

1. Καλλιέργειες κυττάρων *Tetrahymena thermophila*
2. Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 10 mM, pH 7,0
3. [³H] 2-ελαϋλογλυκερόλη, [³H]2-OG (1,0 mCi/mL, 20 Ci/mmol, ARC)
4. BSA 1,38% (w/v)
5. Τριχλωροξικό οξύ (TCA) 40% (w/v)
6. Διαλύματα διβουκαΐνης σε διαλύτη DMSO
7. Διάλυμα PMSF σε διαλύτη DMSO

Όργανα

1. Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B ψυχόμενη, Du Pont
2. Δονητής υπερήχων
3. Μικροσκόπιο
4. Αυτόματες πιπέττες
5. Υδρόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας
6. Κυκλοαναδευτήρας
7. Φυγόκεντρος (Micro 2000 Hettich Zentrifugen)
8. Μετρητής σπινθηρισμού υγρών Wallac 1209 Rackbeta της Pharmacia

Αρχή μεθόδου

Η διβουκαΐνη ασκεί τη δράση της αλληλεπιδρώντας άμεσα με την πλασματική μεμβράνη. Καθώς η MAGL και η FAAH είναι κυρίως μεμβρανοσύνδετα ένζυμα, υποθέσαμε ότι αν η διβουκαΐνη αλληλεπιδρούσε με αυτές θα μπορούσε, πιθανώς, να επηρεάζει τη δραστηριότητα τους. Για να ελέγξουμε την επίδραση της διβουκαΐνης στην υδρόλυση της 2-OG θα χρησιμοποιήσουμε ομογενοποίημα *T. thermophila* που έχει απλώς παραλειφθεί και καθαριστεί από το θρεπτικό υλικό, χωρίς να υποστεί επίδραση με διβουκαΐνη. Η συγκέντρωση της διβουκαΐνης, στο πείραμα της έκκρισης είναι 250 μM μετά την αραίωση με το ρυθμιστικό διάλυμα

διέγερσης. Επίσης, η μεσόφαση που παραλαμβάνεται και ξαναραιώνεται, έχει συγκέντρωση διβουκαΐνης 25 μM . Άρα αν η διβουκαΐνη επιδρά στην υδρόλυση της 2-OG θα είναι μεταξύ αυτών των τιμών. Ακόμη, στο πείραμα χρησιμοποιήται ο PMSF που έχει βρεθεί ότι αναστέλλει μη ειδικά τη MAGL και τη FAAH.

Πορεία εργασίας

Καλλιέργεια κυττάρων *T. thermophila* παραλαμβάνεται στο τέλος της λογαριθμικής φάσης και απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό της με μία φυγοκέντρηση στα 500xg, 4°C, για 5 λεπτά. Το ίζημα αναδιασπείρεται σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 10 mM pH 7,0 και ελέγχονται τα κύτταρα με μικροσκόπιο ως προς τη βιωσιμότητά τους. Ακολουθεί μία δεύτερη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, απόχυση του υπερκειμένου, αναδιάλυση του ιζήματος σε μικρότερο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος και ομογενοποίηση των κυττάρων.

Στο ομογενοποίημα που παραλάβαμε γίνεται προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και, ακολούθως, προσδιορισμός δραστηριότητας MAGL, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.5. και 5.6. Για κάθε δείγμα θα χρησιμοποιηθούν 50 μg πρωτεΐνης, και θα συμπληρωθεί ο όγκος τους μέχρι το 1 mL (συνυπολογιζόμενου του όγκου του αναστολέα ή της διβουκαΐνης) με Hepes 10 mM pH 7,0. Τα δείγματα προεπώζονται, όπου χρειάζεται, για 5 λεπτά με διβουκαΐνη τελικής συγκέντρωσης στο 1 mL 100 μM , 250 μM και 1 mM, ή με PMSF τελικής συγκέντρωσης 1 mM. Η υπόλοιπη διαδικασία είναι όπως περιγράφηκε πιο πάνω.

5.10 Μελέτη της επίδρασης του JZL184 στον μεταβολισμό της 2-OG

Υλικά

1. Καλλιέργειες κυττάρων *Tetrahymena thermophila*
2. Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 10 mM, pH 7,0
3. [^3H] 2-ελαϋλογλυκερόλη, [^3H]2-OG (1,0 mCi/mL, 20 Ci/mmol, ARC)
4. BSA 1,38% (w/v)
5. Τριχλωροξικό οξύ (TCA) 40% (w/v)
6. Διαλύματα JZL184 σε διαλύτη DMSO

Όργανα

1. Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B ψυχόμενη, Du Pont
2. Δονητής υπερήχων
3. Μικροσκόπιο
4. Αυτόματες πιπέττες
5. Υδρόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας
6. Κυκλοαναδευτήρας
7. Φυγόκεντρος (Micro 2000 Hettich Zentrifugen)
8. Μετρητής σπινθηρισμού υγρών Wallac 1209 Rackbeta της Pharmacia

Πορεία εργασίας

Καλλιέργεια κυττάρων *T. thermophila* παραλαμβάνεται στο τέλος της λογαριθμικής φάσης και απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό της με μία φυγοκέντρηση στα 500xg, 4°C, για 5 λεπτά. Το ίζημα αναδιασπείρεται σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 10 mM pH 7,0 και ελέγχονται τα κύτταρα με μικροσκόπιο ως προς τη βιωσιμότητά τους. Ακολουθεί μία δεύτερη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, απόχυση του υπερκείμενου, αναδιάλυση του ιζήματος σε μικρότερο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος και ομογενοποίηση των κυττάρων.

Στο ομογενοποίημα που παραλάβαμε γίνεται προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και, ακολούθως, προσδιορισμός δραστηριότητας MAGL, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.5. και 5.6. Για κάθε δείγμα θα χρησιμοποιηθούν 50 µg πρωτεΐνης, και θα συμπληρωθεί ο όγκος τους μέχρι το 1 mL (συνυπολογιζόμενου του όγκου του αναστολέα) με HEPES 10 mM pH 7,0. Τα δείγματα προεπωάζονται, όπου χρειάζεται, για 5 λεπτά με JZL184 τελικής συγκέντρωσης στο 1 mL: 5, 10, 20, 40, 80, 150, 240, 500 nM, 1, 5, 10, 20, 40, 58 και 115 µM. Η υπόλοιπη διαδικασία είναι όπως περιγράφηκε πιο πάνω.

5.11 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS-PAGE).

Υλικά

1. Υδατικό διάλυμα ακρυλαμιδίου / N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (bis-acrylamide): 30%T, 2,67%C

$$\%T = [(g \text{ ακρυλαμιδίου} + g \text{ bis-ακρυλαμιδίου}) / \text{ολικό όγκο}] \times 100$$

$$\%C = [g \text{ bis-ακρυλαμιδίου} / (g \text{ ακρυλαμιδίου} + g \text{ bis-ακρυλαμιδίου})] \times 100$$

29,2 g ακρυλαμιδίου και 0,8 g N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου διαλύονται σε απεσταγμένο νερό και συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 mL σε ογκομετρική φιάλη. Το διάλυμα δεν πρέπει να είναι παλαιότερο των 30 ημερών.

2. Υδατικό διάλυμα 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
3. Υδατικό διάλυμα 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
4. Υδατικό διάλυμα δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS) 10% (w/v)
5. Υδατικό διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS) 10% (w/v) (παρασκευάζεται τη μέρα του πειράματος)
6. Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (sample buffer): 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% γλυκερόλη, 2,0% SDS, 5,0% β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,05% (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης
Αναμιγνύονται 3,8 ml νερού με 1,0 ml διαλύματος 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,8 mL γλυκερόλης, 1,6 mL διαλύματος 10% (w/v) SDS, 0,4 ml β-μερκαπτοαιθανόλης και 0,4 mL 1% (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης.
7. 5x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (electrode running buffer): 25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0,1% SDS σε pH 8,3
15 g Tris, 72 g γλυκίνης (Biorad) και 5,0 g SDS διαλύονται σε απεσταγμένο νερό, αναμιγνύονται και ρυθμίζεται το pH με οξύ ή βάση. Ο όγκος συμπληρώνεται στο 1,0 L σε ογκομετρική φιάλη.
Πριν την ηλεκτροφόρηση αραιώνονται 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 5x με 800 mL νερού, ώστε να προκύψει ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x.
8. Διάλυμα χρωστικής (staining solution): 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 σε 40% CH₃OH και 10% CH₃COOH
9. Διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution): 40% CH₃OH και 10% CH₃COOH
10. Προκαθορισμένο δείγμα (kit) προτύπων πρωτεϊνών σε λυοφιλιωμένη μορφή (περιέχει 400 μg από κάθε πρωτεΐνη), Biorad
11. Τετραμεθυλενοδιαμίνη (TEMED)
12. TCA 40%
13. 50 mM Tris-HCl pH 9
14. Ακετόνη

Πίνακας 5.1: Μοριακά βάρη προτύπων πρωτεϊνών ηλεκτροφόρησης

	ΠΡΟΤΥΠΑ I (kDa)	ΠΡΟΤΥΠΑ II (kDa)
Μυοσίνη	200	
B-Γαλακτοζιδάση	116.25	
Φωσφορυλάση-β	97.4	97.4
BSA	66.2	66.2
Αλβουμίνη αυγού	45	45
Ανθρακική ανυδράση		31
Αναστολέας θρυψίνης		21.5

Όργανα

1. Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-PROTEAN Tetra Cell (Biorad)
2. Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 7,3 cm x 10,2 cm και 8,3 cm x 10,2 cm
3. Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 8,3 cm x 10,2 cm με ενσωματωμένες ειδικές διαχωριστικές ταινίες (spacers) για τη ρύθμιση του πάχους της πηκτής
4. Ειδικές κτένες για το σχηματισμό των θέσεων τοποθέτησης δείγματος στην πηκτή
5. Αυτόματες πιπέττες
6. Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B ψυχόμενη, Du Pont
7. Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο

Αρχή μεθόδου

Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου τόσο μικρότερο είναι το μέγεθος των πόρων της πηκτής. Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία μίας ουσίας που περιέχει ελεύθερες ρίζες, όπως το υπερθειικό αμμώνιο (απαρχητής) και ενός καταλύτη όπως είναι ο TEMED που καταλύει την αντίδραση σχηματισμού ελεύθερων ριζών. Τελικά οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού. Η όλη αντίδραση πολυμερισμού πρέπει να γίνεται απουσία O₂, αφού αυτό δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα να σταματάει η δημιουργία πηκτής.

Η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοιβασής και την πηκτή

διαχωρισμού, οι οποίες έχουν διαφορετικό μέγεθος πόρων, pH και ιοντική ισχύ. Ο ρόλος της πηκτικής επιστοίβασης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH είναι να συσσωρεύσει τις πρωτεΐνες σε μία στενή περιοχή, ώστε να εισέλθουν στην πηκτική διαχωρισμού ως μία λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός και σύγκριση της κινητικότητας των πρωτεϊνών.

Με τη μέθοδο SDS-PAGE γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη διαφορετική μοριακή τους μάζα. Το SDS συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται, διαχωρίζονται στις υπομονάδες τους και δημιουργούνται σύμπλοκα πρωτεΐνης-SDS. Στα σύμπλοκα αυτά, ο λόγος της ποσότητας του SDS που συνδέεται ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης είναι σταθερός, με αποτέλεσμα όλα τα σύμπλοκα να αποκτούν αρνητικό φορτίο και η κινητικότητα τους στην πηκτική να εξαρτάται μόνο από το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες μικρής μοριακής μάζας κινούνται γρηγορότερα δια μέσου των πόρων της πηκτικής από τις πρωτεΐνες μεγαλύτερης μοριακής μάζας. Συνήθως, γίνεται και περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών με τη χρήση αντιδραστηρίων που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, π.χ. β-μερκαπτοαιθανόλη ή DTT, για το διαχωρισμό όλων των υπομονάδων.

Γενικά, η μετακίνηση των πρωτεϊνών προς την άνοδο κατά την SDS-PAGE είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου της μοριακής τους μάζας. Έτσι, με τη χρησιμοποίηση δεικτών μοριακής μάζας και τον υπολογισμό της σχετικής κινητικότητάς τους στην πηκτική, είναι δυνατή η εκτίμηση της μοριακής μάζας μίας άγνωστης πρωτεΐνης. Μετά την ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει ανίχνευση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών με χρώση με διάφορες χρωστικές όπως το Coomassie Blue. Η χρώση αυτή γίνεται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, που ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη χρωστική και τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, ενώ γίνονται και αλληλεπιδράσεις χρωστικής-πρωτεϊνών μέσω δυνάμεων Van Der Waals. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται μέχρι και 0,5 μg πρωτεΐνης ανά ταινία.

Πορεία εργασίας

Αρχικά, συναρμολογείται το sandwich που θα πολυμεριστεί η πηκτική,

χρησιμοποιώντας δύο γυάλινες πλάκες, μία απλή και μία με ενσωματωμένη διαχωριστική ταινία, που τοποθετούνται στο κατάλληλο πλαίσιο που τα κρατάει σταθερά και όλο μαζί σε ένα στατώ που θα αποτρέψει τις διαρροές του ακρυλαμιδίου κατά τον πολυμερισμό του. Ακολούθως, τοποθετείται ανάμεσα στις δύο πλάκες, η ειδική κτένα και σημειώνεται μία γραμμή ~ 1,0 cm κάτω από το άκρο των δοντιών της κτένας, η οποία καθορίζει τη στάθμη μέχρι την οποία θα ανέλθει η πηκτή διαχωρισμού. Η συσκευή γεμίζεται με νερό, για να βεβαιωθούμε ότι δεν υπάρχουν διαρροές και σκουπίζεται καλά.

Για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού 12% ως προς μονομερές ακρυλαμίδιο, αναμιγνύονται 4,0 mL διαλύματος ακρυλαμιδίου/bis (30%T, 2,67%C) με 2,5 mL διαλύματος Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 100 μL διαλύματος SDS 10% (w/v) και 3,35 mL νερού. Η ποσότητα αυτή είναι αρκετή για δύο πηκτές. Το διάλυμα του μονομερούς απαερώνεται για τουλάχιστον 15 min ώστε να απομακρυνθεί το οξυγόνο και, στη συνέχεια, αφού προστεθούν σε αυτό 60 μL διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου (APS) 10% (w/v) και 10 μL TEMED, τοποθετείται αμέσως με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur, στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ των δύο πλακών του sandwich, γεμίζοντας μέχρι τη χαραγή που έχουμε σημειώσει. Ο πάνω χώρος γεμίζεται με νερό που θα βοηθήσει στη συμπίεση της πηκτής και αφήνεται να πολυμεριστεί για περίπου μία ώρα.

Για την παρασκευή της πηκτής επιστοίβασης αναμιγνύονται 1,33 mL διαλύματος bis- ακρυλαμιδίου (30%T, 2,67%C) με 2,5 mL διαλύματος Tris-HCl 0,5M pH 6,8, 100 μL διαλύματος SDS 10% (w/v) και 6,1 mL νερού. Η ποσότητα αυτή είναι αρκετή για δύο πηκτές. Το διάλυμα του μονομερούς απαερώνεται για τουλάχιστον 15 min ώστε να απομακρυνθεί το οξυγόνο. Εν τω μεταξύ, αδειάζεται το νερό πάνω από την πηκτή διαχωρισμού και τοποθετείται η κτένα, χωρίς να πιεστεί μέσα. Μετά την απαέρωση προστίθενται στο διάλυμα του μονομερούς 60 μL διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου (APS) 10% (w/v) και 20 μL TEMED και αυτό τοποθετείται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur πάνω από την πηκτή διαχωρισμού. Μόλις η στάθμη του διαλύματος ξεχειλίσει από τις γυάλινες πλάκες, η ειδική κτένα πιέζεται ανάμεσα τους. Αφού πολυμεριστεί η πηκτή επιστοίβασης για ~1,5 ώρες, απομακρύνεται η κτένα και εκπλένονται τα πηγαδάκια που έχουν σχηματιστεί από τα δόντια της με νερό. Τα πηγαδάκια αυτά είναι τα σημεία στα οποία θα τοποθετηθούν στη συνέχεια τα δείγματα.

Ποσότητα δείγματος που έχει υπολογιστεί να περιέχει 50 µg συνολικής πρωτεΐνης, εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά, υφίσταται κατεργασία με TCA 40%, ώστε να κατακρυστοποιούνται οι πρωτεΐνες και φυγοκεντρείται. Το ίζημα εκπλένεται τουλάχιστον δυο φορές με παγωμένη ακετόνη και αφού στεγνώσει εντελώς αναδιασπείρεται σε 5 µL Tris-HCl pH 9 και αραιώνεται ως τα 25 µL με sample buffer. Για σύγκριση, 0,5 µL διαλύματος πρότυπων πρωτεϊνών αραιώνονται με 10 µL sample buffer. Τόσο τα πρότυπα όσο και τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 4 min, για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

Η συσκευή της ηλεκτροφόρησης συναρμολογείται και γεμίζεται ο εσωτερικός χώρος της άνω και κάτω μονάδας της συσκευής με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Με το ίδιο διάλυμα γεμίζεται και ο χώρος της δεξαμενής μέσα στην οποία τοποθετούνται οι μονάδες της συσκευής. Στη συνέχεια, τοποθετούνται 20 µL δείγματος ή 10 µL προτύπου σε κάθε πηγαδάκι με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας. Ακολουθεί σύνδεση της άνω μονάδας της συσκευής με την κάθοδο και με την άνοδο κατάλληλης πηγής ρεύματος. Στην πηγή αυτή ρυθμίζεται η μέγιστη τάση στα 200V και η ένταση του ρεύματος στα 60 mA/συσκευή. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης η τάση ανεβαίνει σταδιακά. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης (μόλις η χρωστική αρχίσει να βγαίνει από το κάτω μέρος του sandwich), διαχωρίζονται οι πλάκες και αποκολλάται η πηκτή. Κανονικά, η πηκτή τοποθετείται στο διάλυμα της χρωστικής (staining solution) για 30 min υπό ανακίνηση και μετά γίνεται αποχρωματισμός του υποβάθρου της πηκτής, με δύο τουλάχιστον εκπλύσεις υπό ανακίνηση με διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution), μέχρι την εξαφάνιση του χρώματος στις θέσεις της πηκτής που δεν υπάρχει πρωτεΐνη. Ακολούθως, η πηκτή μπορεί να τοποθετηθεί σε σακούλα για μακρόχρονη παραμονή σε ψυγείο. Αν όμως πρόκειται να ακολουθήσει μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για πειράματα ανοσοαποτύπωσης, η πηκτή δεν υφίσταται καμία επεξεργασία μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, αλλά τοποθετείται κατευθείαν στη συσκευή μεταφοράς, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.12.

5.12 Ανοσοαποτύπωση (Western blot) [108]

Υλικά

1. Χαρτί Watman (biorad)
2. Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης
3. Διαλύματα μπλοκαρίσματος:
5% άπαχο γάλα, 0,1% Tween-20 σε TBS 1x
0,3% BSA σε TBS 1x
0,1% Tween-20 σε TBS 1x
4. Διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer): 3,03 g Tris, 14,4 g γλυκερόλης, 200 mL μεθανόλης και 1 mL διαλύματος 10% SDS αραιώνονται στα 1000 ml με νερό. Ελέγχουμε το pH να είναι πάνω από 8,3.
5. Διάλυμα TBS 10x: 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl και 3,0 g Tris διαλύονται σε 1000 mL νερού
6. Πολυκλωνικό αντίσωμα (anti-FAAH) που αναπτύχθηκε σε ποντικό έναντι της αμινοξικής αλληλουχίας 480-580 της FAAH από άνθρωπο (Abcam).
7. Πολυκλωνικό αντίσωμα (anti-MAGL) που αναπτύχθηκε σε κοτόπουλο έναντι της αμινοξικής αλληλουχίας 1-121 της MAGL του ανθρώπου (Abcam).
8. 2^ο αντίσωμα: Goat polyclonal to mouse IgG horseradish peroxidase (Abcam)
9. 2^ο αντίσωμα: Goat polyclonal to chicken IgY horseradish peroxidase (Abcam)
10. Kit χημειοφωταύγειας ECL (Chemicon International)
11. Film KODAK X OMAT LS
12. Υγρά εμφάνισης film, developer και fixer (KODAK)
13. Ponceau S (Chembiotin)
14. Tween-20 (Merck)

Όργανα

1. Συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-PROTEAN Tetra Cell (Biorad)
2. Συσκευή μεταφοράς Semidry Transfer Blot 'Pegasus' (PHASE)
3. Τροφοδοτικό Laboratory DC power supply, GPS-3030D (PHASE)
4. Κασέτες έκθεσης film

Πορεία εργασίας

Σε πρώτο στάδιο, οι πρωτεΐνες του βιολογικού υλικού ηλεκτροφορούνται σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.11.

Αμέσως μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Για το σκοπό αυτό 3 κομμάτια χαρτιού Watman, κομμένα ακριβώς στο μέγεθος της πηκτής, τοποθετούνται στην ειδική συσκευή μεταφοράς, αφού πρώτα διαβραχούν με το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Πάνω τους τοποθετείται η πηκτή και πάνω από αυτή η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, αφού διαβραχεί και αυτή με το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Τέλος, τοποθετούνται άλλα 3 διαβρεγμένα κομμάτια χαρτιού Watman, και αφαιρούνται με προσοχή οι φυσαλίδες και η περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς μεταξύ των στρώσεων, αφού όπου υπάρχουν φυσαλίδες δεν θα γίνει επιτυχής μεταφορά πρωτεϊνών. Η συσκευή κλείνει και αφήνεται σε λειτουργία υπό σταθερό ρεύμα 50 mA και μέγιστη τάση 6,5 V, για περίπου 1 ώρα και 40 λεπτά στους 4°C. Όταν τελειώσει η μεταφορά, η πηκτή χρωματίζεται με διάλυμα χρωστικής, ώστε να διαπιστωθεί αν έγινε η μεταφορά των πρωτεϊνών, ενώ οι πρωτεΐνες της μεμβράνης εμφανίζονται με Ponceau S, για ~2 λεπτά. Στη συνέχεια, η μεμβράνη τοποθετείται σε κατάλληλο πλαστικό δοχείο και εκπλένεται με διάλυμα TBS 1x, ώστε να φύγει τελείως το χρώμα και τα υπολείμματα του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς. Ακολουθεί μπλοκάρισμα των κενών θέσεων της μεμβράνης, ώστε να μην αποτελέσουν αυτές μη ειδικές θέσεις σύνδεσης για τα αντισώματα, με 5% άπαχο γάλα, 0,1% Tween-20 σε TBS 1x στους 4°C για όλο το βράδυ.

Την επόμενη μέρα, η μεμβράνη εκπλένεται με 0,3% BSA σε TBS 1x 4 φορές για 10 λεπτά και, μετά, τοποθετείται σε ειδικό σακουλάκι στο οποίο προστίθεται το πολυκλωνικό αντίσωμα, σε αναλογία που εξαρτάται από το αντίσωμα που χρησιμοποιείται κάθε φορά, σε διάλυμα 5% άπαχο γάλα, 0,1% Tween-20 σε TBS 1x. Πριν σφραγιστεί το σακουλάκι απομακρύνονται με προσοχή όλες οι φυσαλίδες, ούτως ώστε το αντίσωμα να έρχεται σε επαφή με όλη την επιφάνεια της μεμβράνης. Το σακουλάκι τεντώνεται καλά πάνω σε γυάλινη πλάκα με τη βοήθεια ταινίας, ώστε να κυκλοφορεί το διάλυμα ελεύθερο και αφήνεται για 1 ώρα και 30 λεπτά, υπό ανακίνηση. Στη συνέχεια, η μεμβράνη εκπλένεται με 0,1% Tween-20 σε TBS 1x 4 φορές για 10 λεπτά και ακολούθως τοποθετείται σε καθαρό σακουλάκι και προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με την υπεροξειδάση HRP, στην αναλογία που χρειάζεται, σε διάλυμα 5% άπαχο γάλα, 0,1% Tween-20 σε TBS 1x. Το αντίσωμα αφήνεται για επώαση σε θερμοκρασία

δωματίου, για 1 ώρα και 30 λεπτά, υπό ανακίνηση. Τέλος, η μεμβράνη εκπλένεται με 0,1% Tween-20 σε TBS 1x, 4 φορές για 10 λεπτά και αν χρειαστεί, παραμένει μέχρι την εμφάνιση στο ίδιο διάλυμα.

Ακολουθεί εμφάνιση των ανοσοεπισημασμένων πρωτεϊνικών περιοχών με χημειοφωταύγεια. Σε πλαστικό σωλήνα, ερμητικά κλειστό, ώστε να μην εισέρχεται ακτινοβολία, τοποθετείται το μίγμα του διαλύματος του kit χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης τοποθετείται μέσα στην κασετίνα εμφάνισης και περιχύνεται με το μίγμα ώστε να καλυφθεί πλήρως. Μετά από ένα λεπτό, απομακρύνεται η περίσσεια του μίγματος, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετείται και καλύπτεται ανάμεσα σε διαφανή μεμβράνη στην κασετίνα και αφού τοποθετηθεί από πάνω το film, η κασετίνα κλείνει ώστε να ληφθεί η φωτογραφία. Μετά την έκθεση του film για κατάλληλο χρονικό διάστημα, αυτό εμφανίζεται σταδιακά στα υγρά εμφάνισης με τη σειρά: fixer, developer και νερό βρύσης. Όλη η διαδικασία της εμφάνισης πραγματοποιείται σε σκοτεινό θάλαμο.

5.13 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Εξοπλισμός

1. Ηλεκτρονικός υπολογιστής
2. Λογισμικό GraphPad Prism 5 Demo

Πορεία εργασίας

Συγκεκριμένες παράμετροι από πειράματα όπου διαφοροποιείται κάποια μεταβλητή συγκρίθηκαν μεταξύ τους με ανάλυση της διαφοράς (Analysis of variance, ANOVA) και χρησιμοποιήθηκε το τεστ του Turkey για τον υπολογισμό της παραμέτρου P ($0 \leq P \leq 1$), η οποία παρέχει την πιθανότητα οι παρατηρούμενες διαφορές να οφείλονται σε τυχαία σφάλματα. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές για $P < 0,05$, δηλαδή σε στάθμη εμπιστοσύνης 95% (σημειώνονται με *). Στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε υψηλότερες στάθμες εμπιστοσύνης σημειώνονται με περισσότερους αστερίσκους (**: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$).

5.14 Συνεστιακή μικροσκοπία ανοσοφθορισμού [109]

Υλικά

1. Καλλιέργειες κυττάρων *Tetrahymena thermophila*
2. Ρυθμιστικό διάλυμα PHEM pH 6,9: 60 mM Pipes, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂
3. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε φυσιολογικό ορό (phosphate-buffered saline-PBS) pH 6,9: Ζυγίζονται 9 g NaCl, 1,66 g Na₂HPO₄·7H₂O και 820 mg NaH₂PO₄·H₂O, διαλυτοποιούνται σε 1 L απεσταγμένου νερού και ρυθμίζεται το pH στο 6,9 με 5 M NaOH.
4. Διάλυμα μονιμοποίησης: 3% φορμαλδεΰδη (βαθμίδα μικροσκοπίας χωρίς MeOH), 0,2-0,5% Triton X-100 σε ρυθμιστικό διάλυμα PHEM.
5. Διάλυμα 16% φορμαλδεΰδης χωρίς MeOH (Polysciences inc)
6. Διάλυμα 1% αλβουμίνης βοδινού ορού (BSA) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS
7. Διάλυμα 0,1% BSA-PBS
8. Μονοκλωνικό (anti-β-tubulin) αντίσωμα ανεπτυγμένο σε ποντίκι έναντι τουμπουλίνης εγκέφαλου αρουραίου (T4026-Sigma).
9. Πολυκλωνικό (anti-β-tubulin) αντίσωμα ανεπτυγμένο σε κουνέλι έναντι τουμπουλίνης κοτόπουλου (T3526-Sigma).
10. Πολυκλωνικό (anti-MAGL) αντίσωμα που αναπτύχθηκε σε κοτόπουλο έναντι της αμινοξικής αλληλουχίας 1-121 της MAGL του ανθρώπου (Abcam).
11. 2^ο αντίσωμα: ανεπτυγμένο σε κασικά έναντι των IgG του ποντικιού, επισημασμένο με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (IgG-FITC sc-2010, Santa Cruz biotechnology).
12. 2^ο αντίσωμα: ανεπτυγμένο σε κασικά έναντι των IgG του κουνελιού, επισημασμένο με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (IgG-FITC sc-2012, Santa Cruz biotechnology).
13. 2^ο αντίσωμα: ανεπτυγμένο σε κασικά έναντι των IgY του κοτόπουλου, επισημασμένο με την πράσινη (ανάλογη φλουορεσκεΐνης) φθορίζουσα χρωστική CF488A (20020, Biotium).

Όργανα

1. Αυτόματες πιπέτες
2. Θερμοστατούμενος θάλαμος

3. Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B, ψυχόμενη, Du Pont
4. Συνεστιακό μικροσκόπιο Nikon Eclipse EZ-C1

Αρχή μεθόδου

Η χρήση διαλύματος μονιμοποίησης σε κύτταρα καθαρισμένα από το θρεπτικό μέσο τους επιφέρει την ακινητοποίησή τους, την παύση του μεταβολισμού τους, καθώς και την διάτρηση της πλασματικής και των εσωτερικών μεμβρανών του κυττάρου. Έτσι, ένα κατάλληλα ανεπτυγμένο αντίσωμα μπορεί να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου, το οποίο διατηρεί τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά, και να συνδεθεί εκλεκτικά με τον ενδοκυτταρικό στόχο του. Ένα δεύτερο αντίσωμα, φτιαγμένο κατάλληλα για να αλληλεπιδρά με το πρώτο, είναι επισημασμένο με μία φθορίζουσα χρωστική. Η χρωστική διεγείρεται από υπεριώδες φως και επανεκπέμπει στο ορατό και ο φθορισμός που παράγεται ανιχνεύεται από συνεστιακό μικροσκόπιο, δίνοντας στοιχεία για τον υποκυτταρικό εντοπισμό του στόχου.

Πορεία εργασίας

Καλλιέργεια κυττάρων *T. thermophila* παραλαμβάνεται στο τέλος της λογαριθμικής της φάσης και απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό της με μία φυγοκέντρηση στα 500xg, 25°C, για 5 λεπτά. Το ίζημα αναδιασπείρεται σε ρυθμιστικό διάλυμα PHEM 1 pH 6,9 και ελέγχονται τα κύτταρα με μικροσκόπιο ως προς τη βιωσιμότητά τους. Στη συνέχεια, αραιώνονται κατάλληλα ώστε να έχουμε κυτταρική πυκνότητα 2×10^5 κύτταρα/mL και τοποθετούνται 4-5 ml σε falcon των 15 ml. Ακολουθεί μία φυγοκέντρηση στα 500xg, 25°C, για 5 λεπτά, το ίζημα αναδιαλύεται σε 5 ml PHEM, και πραγματοποιείται μία δεύτερη έκπλυση στις ίδιες συνθήκες. Στο ίζημα που απομένει προστίθεται 1 ml διαλύματος μονιμοποίησης και αφήνεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά το πέρας των 30 λεπτών μία φυγοκέντρηση απομακρύνει τον μονιμοποιητή, το ίζημα αναδιασπείρεται σε 5 mL 0,1% BSA-PBS και ακολουθούν δύο εκπλύσεις στις ίδιες συνθήκες. Τελικά, το ίζημα αναδιαλύεται σε 1 ml 0,1% BSA-PBS, μεταφέρεται σε erpendorf των 2 mL και φυγοκεντρείται. Παράλληλα, παρασκευάζεται κατάλληλη ποσότητα πρώτου αντισώματος σε 1% BSA-PBS (200-500 μ L), στην αραιώση που ορίζεται από τον κατασκευαστή. Ορισμένα δείγματα επωάζονται με το αντίσωμα, ενώ άλλα που θα αποτελέσουν τα δείγματα ελέγχου,

όχι. Η επώαση κρατάει για 1 ώρα στους 31 °C.

Με το πέρας της πρώτης επώασης τα δείγματα φυγοκεντρούνται, αναδιαλύονται σε 1 mL 0,1% BSA-PBS και εκπλένονται 2 φορές. Αντίστοιχα, παρασκευάζεται κατάλληλη ποσότητα 2ου αντισώματος σε 1% BSA-TBS (250 μL), στη σωστή αραίωση και προστίθεται σε όλα τα δείγματα. Δηλαδή, τα δείγματα ελέγχου έχουν μόνο το δεύτερο αντίσωμα για να ελεγχθεί περίπτωση μη ειδικής σύνδεσης. Η επώαση κρατάει 1 ώρα, στους 31 °C και τα δείγματα πρέπει να παραμείνουν προστατευμένα από το φως κατά τη διάρκεια της.

Τελειώνοντας και τη δεύτερη επώαση, φυγοκεντρούμε τα δείγματα, αναδιαλύουμε το ίζημα σε 0,1% BSA-PBS και τα εκπλένουμε δύο φορές. Τελικά, το ίζημα αναδιαλύεται σε 100 μL 0,1% BSA-PBS, προστίθεται μικρός όγκος σε αντικειμενοφόρο πλάκα (~7 μL) και τοποθετείται καλυπτρίδα από πάνω, που σταθεροποιείται με τη χρήση ειδικού βερνικιού. Η αντικειμενοφόρος πλάκα φέρεται στο συνεστιακό μικροσκόπιο και, με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή, εμφανίζεται ο φθορισμός του κυττάρου. Με χρήση κατάλληλου λογισμικού μπορούμε να εστιάσουμε σε διαφορετικές τομές στο κύτταρο και να τις φωτογραφίσουμε.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Έκκριση MAGL και FAAH σε μέσο ασιτίας κυττάρων *Tetrahymena thermophila*

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η *Tetrahymena* εκκρίνει όξινες υδρολάσες και συγκεκριμένα πρωτεάσες, λιπάσες, φωσφολιπάσες, φωσφοδιεστεράσες, τόσο σε θρεπτικό υλικό, όσο και σε μέσο ασιτίας [42].

Παλαιότερα πειράματα της ομάδας μας διαπίστωσαν την έκκριση αμιδοϋδρολάσης στον εξωκυττάριο χώρο της καλλιέργειας *Tetrahymena pyriformis* [101]. Ακόμη, αδημοσίευτα προπαρασκευαστικά πειράματα της ομάδας μας έδειξαν την έκκριση της FAAH σε μέσο ασιτίας κυττάρων *Tetrahymena thermophila*, η οποία μάλιστα παρουσιάζει χρονική εξάρτηση [110]. Συγκεκριμένα, επώαση σε ανόργανο μέσο για 0, 30, 60, 120 και 180 λεπτά κυττάρων *T. thermophila* και μετά προσδιορισμός δραστηριότητας FAAH με χρήση [³H]ΑΕΑ έδειξε ~20% έκκριση από 0 έως 60 λεπτά και πολύ απότομη μείωση στη συνέχεια. Αυτό κατατάσσει τη FAAH ως ένα ταχέως εκκρινόμενο ένζυμο. Αντίστοιχα, παλαιότερα προκαταρκτικά πειράματα [110] έγιναν και για την έκκριση της MAGL σε Tris-HCl 10 mM pH 7.5 σε κύτταρα *T. thermophila*, με χρήση [³H]2-OG και βρέθηκε ότι η δραστηριότητα MAGL εκκρίνεται και αυτή στο ανόργανο μέσο κατά ποσοστό 20% της ολικής δραστηριότητας της, χωρίς να εξαρτάται από το χρόνο της επώασης (μέχρι τα 180 λεπτά που μελετήθηκε).

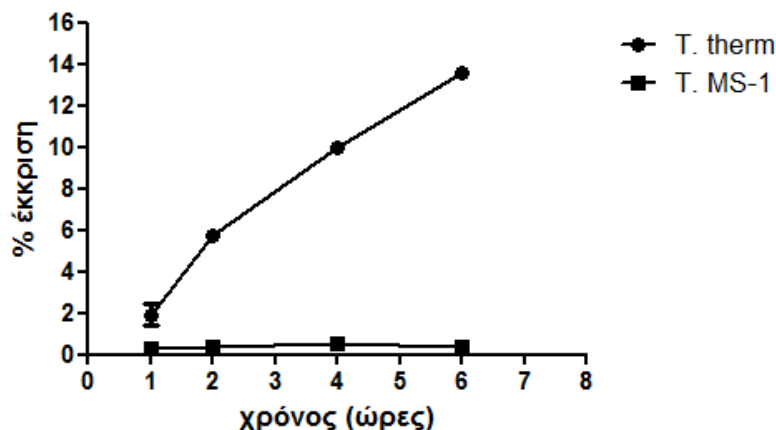
Έχοντας ενδείξεις για την έκκριση της MAGL και της FAAH από κύτταρα *T. thermophila* σε ανόργανο μέσο, θέλαμε να επιβεβαιώσουμε αυτά τα αποτελέσματα και να εξετάσουμε την έκκριση ως απόκριση σε επώαση με μέσο ασιτίας σε μεγαλύτερους χρόνους.

Για να μπορέσουμε να εξετάσουμε το μηχανισμό της έκκρισης, ή έστω, την πηγή προέλευσης της, εκτός από κύτταρα *T. thermophila* χρησιμοποιούμε και κύτταρα του μεταλλαγμένου στελέχους *T. thermophila* MS-1, που ως γνωστό δεν εκκρίνουν λυσοσωματικά ένζυμα στο μέσο καλλιέργειας, τόσο σε συνθήκες ασιτίας, όσο και σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης [46, 47].

6.1.1. Έκκριση της όξινης φωσφατάσης σε μέσο ασιτίας κυττάρων *T. thermophila*

Πριν χρησιμοποιήσουμε τα κύτταρα του μεταλλαγμένου στελέχους *T. thermophila* MS-1, ως κύτταρα ελέγχου για να επιβεβαιώσουμε την πορεία της έκκρισης, πρέπει πρώτα να επαληθεύσουμε το μεταλλαγμένο χαρακτηριστικό τους, δηλαδή να μην μπορούν να εκκρίνουν λυσοσωματικά ένζυμα. Γι' αυτό γίνεται προσδιορισμός ενός τυπικά εκκρινόμενου λυσοσωματικού ενζύμου, της όξινης φωσφατάσης και υπολογίζεται η ολική δραστηριότητα στο ομογενοποίημα και στο μέσο ασιτίας (υπερκείμενο), καθώς και η ειδική δραστηριότητα σε κάθε κλάσμα. Οι προσδιορισμοί γίνονται τόσο σε κύτταρα *T. thermophila* MS-1, όσο και σε κύτταρα *T. thermophila* που αναμένεται να εκκρίνουν κανονικά αυτό το ένζυμο.

Η πορεία που ακολουθήθηκε για την παραλαβή των κυττάρων περιγράφηκε αναλυτικά στην παράγραφο 5.2, και στα κλάσματα που παραλήφθηκαν (ομογενοποίημα, υπερκείμενο) προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry (βλ. παρ. 5.3). Ο προσδιορισμός της όξινης φωσφατάσης πραγματοποιείται σύμφωνα με τη μέθοδο που προτείνει ο Kiy et al, με πινοφαινυλοφωσφορικό οξύ ως υπόστρωμα, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.4 [48].

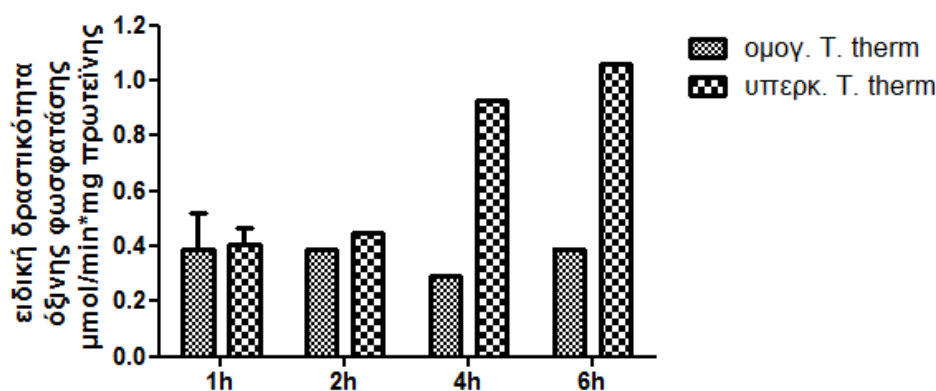


Σχήμα 6.1: Έκκριση όξινης φωσφατάσης σε μέσο ασιτίας *T. thermophila* και *T. MS-1* μετά από επώαση για 1, 2, 4, 6 ώρες. Τα αποτελέσματα αποτελούν τον μέσο όρο διπλών δειγμάτων από τρία διαφορετικά πειράματα.

Προηγούμενα αποτελέσματα της ομάδας μας [110] σε μικρότερους χρόνους (έως 180 λεπτά) έδειξαν ότι στα κύτταρα της *T. thermophila* η έκκριση της όξινης

φωσφατάσης αυξάνεται συναρτήσει του χρόνου, ενώ σε αντίθεση, τα κύτταρα της MS-1 παρουσιάζουν ελάχιστη έκκριση, η οποία δεν εξαρτάται από το χρόνο. Το μικρό ποσοστό της έκκρισης των κυττάρων της MS-1 που βρέθηκε, μάλλον οφείλεται στην ύπαρξη σπασμένων κυττάρων και συμφωνεί με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας [46]. Τα αποτελέσματα του σχήματος 6.1 επιβεβαιώνουν αυτά τα ευρήματα και σε μεγαλύτερους χρόνους. Συγκεκριμένα, η έκκριση της όξινης φωσφατάσης στα κύτταρα της MS-1 δεν είναι πάνω από 0,5% για καμία χρονική περίοδο από 1 μέχρι 6 ώρες, ενώ η έκκριση της *T. thermophila* αυξάνεται συναρτήσει του χρόνου της επώασης, με μέγιστη έκκριση 14% για επώαση σε ανόργανο μέσο για 6 ώρες.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η ειδική δραστηριότητα της όξινης φωσφατάσης στη *T. Thermophila*, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 6.2. Συγκεκριμένα, φαίνεται να υπάρχει εμπλουτισμός του υπερκείμενου από τις 4 ώρες και μετά σε δραστηριότητα όξινης φωσφατάσης, που υποδεικνύει έναν εκλεκτικό μηχανισμό έκκρισης για αυτό το ένζυμο. Η ειδική δραστηριότητα στις 4 και τις 6 ώρες είναι πάνω από διπλάσια από την αντίστοιχη του ομογενοποιημένου.



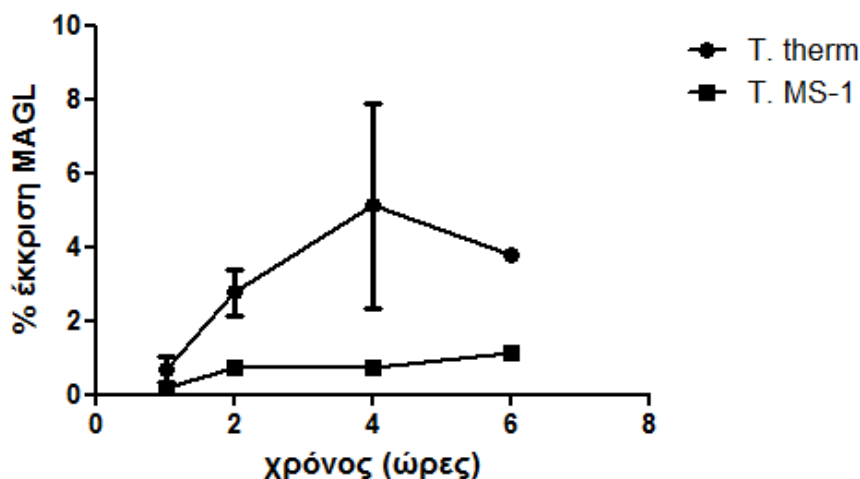
Σχήμα 6.2: Ειδική δραστηριότητα όξινης φωσφατάσης σε ομογενοποίηση και υπερκείμενο καλλιεργειών *T. thermophila*, ύστερα από επώαση σε ανόργανο μέσο για 1, 2, 4, 6 ώρες. Τα αποτελέσματα αποτελούν τον μέσο όρο διπλών δειγμάτων από τρία διαφορετικά πειράματα.

Έτσι, επιβεβαιώνεται ότι τα κύτταρα *T. thermophila* MS-1 δεν εκκρίνουν λυσοσωματικές όξινες υδρολάσες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κύτταρα ελέγχου για την μελέτη της προέλευσης της έκκρισης των ενζύμων της MAGL και της FAAH.

6.1.2 Έκκριση MAGL και FAAH σε μέσο ασιτίας κυττάρων *T. thermophila*.

Επίδραση του χρόνου

Η μελέτη της έκκρισης της MAGL και της FAAH έγινε κατ' ανάλογο τρόπο με αυτή της όξινης φωσφατάσης, ύστερα από παραλαβή των κυττάρων σύμφωνα με την παράγραφο 5.2. Ακολουθεί προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry (βλ. παρ. 5.3) και προσδιορισμός δραστηριότητας όξινης φωσφατάσης ως ενδεικτικό ένζυμο ελέγχου της διαδικασίας της έκκρισης (βλέπε σχήμα 6.1). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός δραστηριότητας της MAGL με χρήση [³H]2-OG 2 μM, τόσο στο μέσο ασιτίας όσο και στο ομογενοποίημα των κυττάρων, απουσία και παρουσία του ειδικού αναστολέα της FAAH, AM374 σε συγκέντρωση 100 nM. Καθώς η FAAH, όπως είδαμε και πιο πριν συμμετέχει στην *in vitro* υδρόλυση των 2-ακυλογλυκερολών [96] και αυτό έχει επιβεβαιωθεί και από την ομάδα μας [103], η άνω μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως ένας έμμεσος τρόπος προσδιορισμού δραστηριότητας της FAAH. Εναλλακτικός τρόπος προσδιορισμού της δραστηριότητας της θα ήταν με τη χρήση του ενδογενούς υποστρώματος της, του ανανταμιδίου, ραδιενεργά επισημασμένου. Αυτό όμως δεν κρίθηκε απαραίτητο για τον σκοπό της μελέτης. Πιο αναλυτικά, η πορεία περιγράφεται στην παράγραφο 5.5.



Σχήμα 6.3: Έκκριση MAGL σε μέσο ασιτίας καλλιεργειών *T. thermophila* και MS-1 (παρουσία αναστολέα AM374) μετά από επώαση σε ανόργανο μέσο για 1, 2, 4, 6 ώρες. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο διπλών δειγμάτων από 2-3 διαφορετικά πειράματα.

Τα αποτελέσματα του σχήματος 6.3 δείχνουν χρονική εξάρτηση για την έκκριση της MAGL από τη *T. thermophila* στο ανόργανο μέσο, όπως αυτή προκύπτει από τη

μέτρηση υδρόλυσης 2-OG παρουσία αναστολέα AM374. Συγκεκριμένα, δείχνει να ξεκινάει από πολύ μικρό ποσοστό, 0,69% για την επώαση για 1 ώρα, ανεβαίνει στις δύο ώρες σε ποσοστό 2,78%, δείχνει να πιάνει μέγιστο στο 5,12% στις 4 ώρες, και από τις 6 ώρες και μετά φαίνεται να μειώνεται σε ποσοστό 3,8%, πιθανότατα λόγω απενεργοποίησης του ενζύμου. Αντίθετα, η έκκριση της MAGL στην MS-1 είναι πολύ μικρότερη από αυτή στη *T. thermophila*, και πιάνει το μέγιστο της στις 6 ώρες με ποσοστό 1,15%.

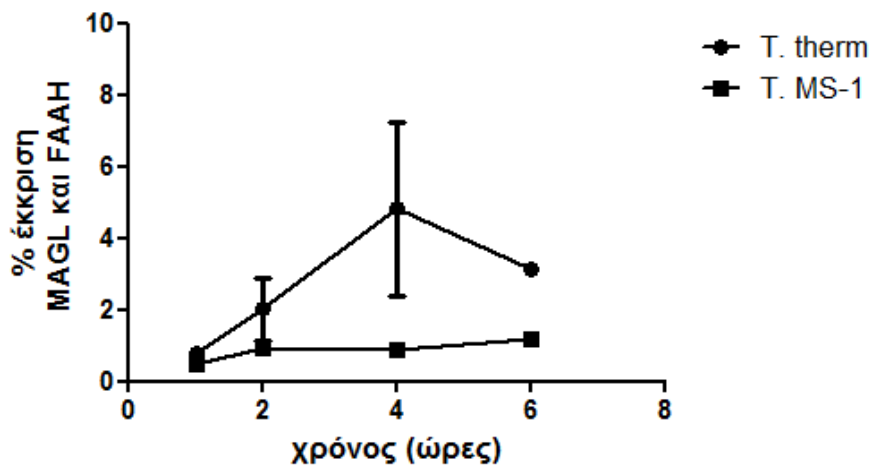
Θεωρώντας ότι η μόνη διαφορά των δύο στελεχών είναι η ανικανότητα έκκρισης λυσοσωματικών ενζύμων από τη MS-1, μπορούμε με χρήση των ποσοστών της έκκρισης της MAGL από το σχήμα 6.3, να βγάλουμε το ποσοστό της έκκρισης που προέρχεται από μη λυσοσωματικές πηγές, καθώς είδαμε ότι η *Tetrahymena* διαθέτει και άλλες λιγότερο καλά χαρακτηρισμένες πορείες ιδιοσυστατικής έκκρισης, πέραν των λυσοσωμάτων. Ο πίνακας 6.1 δείχνει ότι το ~20-30% της έκκρισης της MAGL για όλες τις χρονικές στιγμές προέρχεται από πηγές εκτός λυσοσωμάτων.

Πίνακας 6.1: ποσοστά έκκρισης MAGL από λυσοσωματικές ή άλλες πηγές.

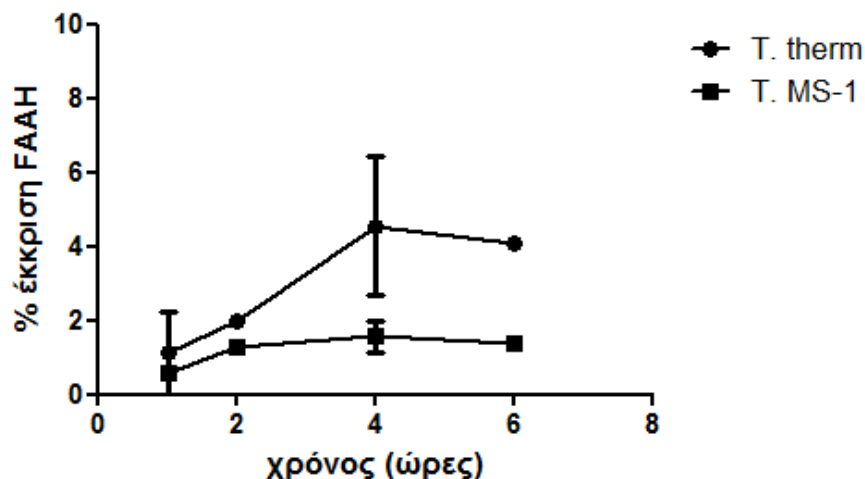
Επώαση (ώρες)	% έκκρισης μη λυσοσωματικών πηγών	% έκκρισης από λυσοσώματα
1	29%	71%
2	26%	74%
4	18%	82%
6	30%	70%

Πραγματοποιώντας το παραπάνω πείραμα απουσία του ειδικού αναστολέα της FAAH AM374, μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα για τη συνολική δράση των δύο ενζύμων στον μεταβολισμό της 2-ελαϋλογλυκερόλης. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται από το σχήμα 6.4, η έκκριση των δύο ενζύμων στη *T. thermophila* παρουσιάζει χρονική εξάρτηση. Ξεκινώντας από 0,8% στη μία ώρα, ανεβαίνει στο 2% στις 2 ώρες, πιάνει ένα μέγιστο 4,8% στις 4 ώρες, και μετά μειώνεται μέχρι το 3,1% στις 6 ώρες, πιθανώς λόγω απενεργοποίησης των ενζύμων. Αντίθετα, η

έκκριση των δύο ενζύμων στην MS-1 είναι αμετάβλητη μετά τις 2 ώρες και δεν ξεπερνάει το 1%.



Σχήμα 6.4: Έκκριση MAGL και FAAH σε μέσο ασιτίας καλλιιεργειών *T. thermophila* και MS-1 (απουσία αναστολέα AM374) μετά από επώαση σε ανόργανο μέσο για 1 ,2, 4, 6 ώρες. Τα αποτελέσματα αποτελούν τον μέσο όρο διπλών δειγμάτων από 2-3 διαφορετικά πειράματα.



Σχήμα 6.5: Έκκριση FAAH σε μέσο ασιτίας καλλιιεργειών *T. thermophila* και MS-1 μετά από επώαση σε ανόργανο μέσο για 1, 2, 4, 6 ώρες, όπως αυτή προκύπτει από την υδρόλυση της [^3H]2-OG παρουσία και απουσία του ειδικού αναστολέα της FAAH AM374. Τα αποτελέσματα αποτελούν τον μέσο όρο διπλών δειγμάτων από 2-3 διαφορετικά πειράματα.

Χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρουσία και απουσία του αναστολέα AM374, μπορούμε να εξαγάγουμε έμμεσα συμπεράσματα για την έκκριση της FAAH στο ανόργανο μέσο, αφαιρώντας τις δραστηριότητες με και χωρίς τον αναστολέα για τα ομογενοποιημένα και τα υπερκείμενα και βρίσκοντας τα νέα ποσοστά δραστηριότητας. Έτσι, προκύπτει το σχήμα 6.5, στο οποίο βλέπουμε ότι

και η FAAH ακολουθεί παρόμοια ποσοστά έκκρισης με τη MAGL στη *T. thermophila*. Συγκεκριμένα, η έκκριση της εξαρτάται του χρόνου της επώασης στο ανόργανο μέσο και είναι 1,1% για 1 ώρα, 1,97% για 2 ώρες, πιάνει το μέγιστο στις 4 ώρες με ποσοστό 4,6% και δείχνει να μειώνεται μέχρι τις 6 ώρες , όπου φτάνει στο 4,1%. Ένα αξιοσημείωτο αποτέλεσμα είναι ότι τόσο η MAGL, όσο και η FAAH παρουσιάζουν το μέγιστο της έκκρισης τους στις 4 ώρες. Μικρή χρονική εξάρτηση δείχνει να έχει η έκκριση της FAAH και στα κύτταρα της MS-1, όπου φθάνει το μέγιστο της στις 2 ώρες και διατηρείται σε αυτό το ποσοστό (~1,3%) μέχρι τις 6 ώρες.

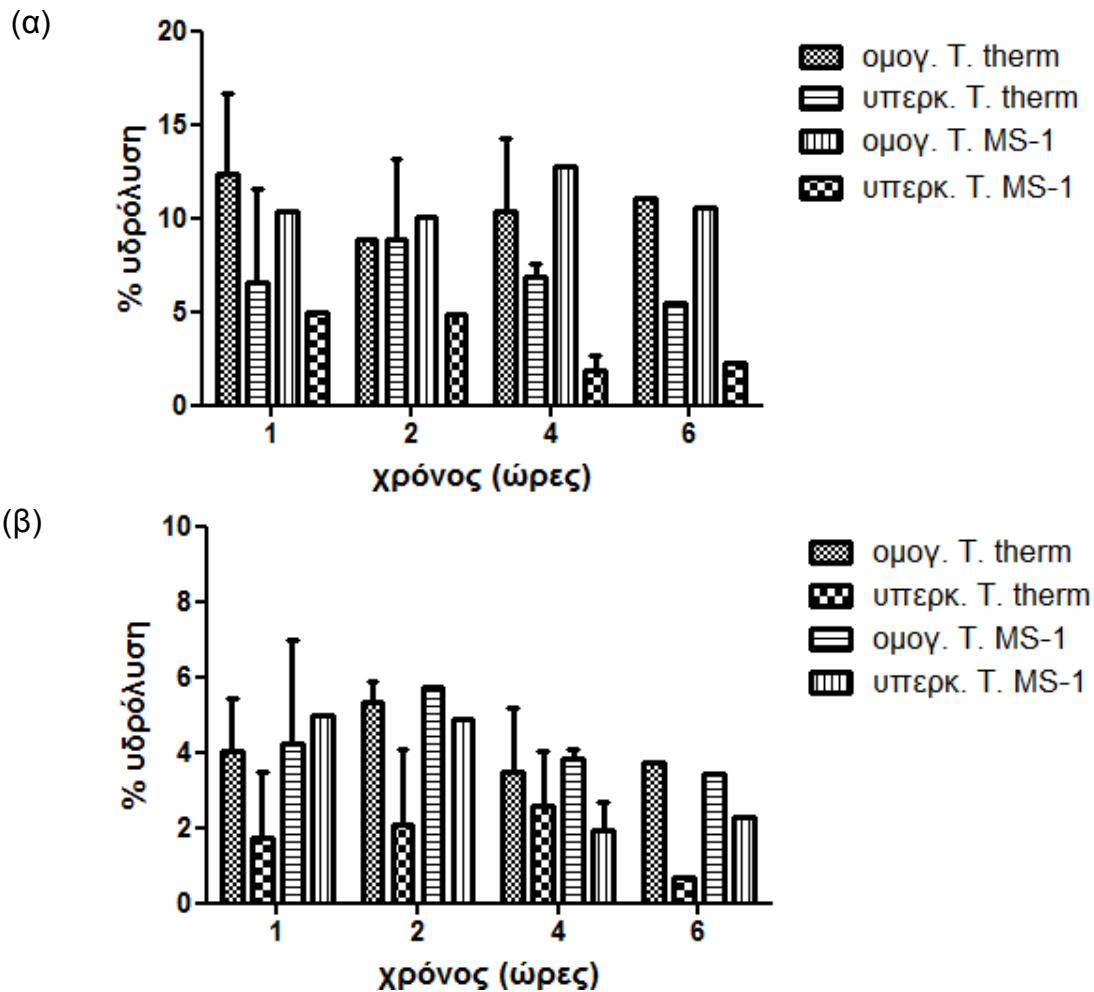
Αντίστοιχα της MAGL, χρησιμοποιώντας τα δεδομένα του σχήματος 6.5, καταλήγουμε στον πίνακα 6.2 που δείχνει πως κατανέμεται η έκκριση της FAAH από λυσοσωματικές ή άλλες πηγές. Αυτό που είναι ενδιαφέρον είναι ότι ενώ στη MAGL το ποσοστό της έκκρισης εκτός λυσοσωμάτων ήταν περίπου σταθερό για όλες τις χρονικές περιόδους επώασης, η FAAH επίσης δείχνει να προέρχεται από δύο διαφορετικές πηγές και μάλιστα με τη μη λυσοσωματική να είναι κυρίαρχη στη 1 και τις 2 ώρες, ενώ η έκκριση από τα λυσοσώματα είναι πιο έντονη στις 4 και τις 6 ώρες.

Πίνακας 6.2: Ποσοστά έκκρισης FAAH από λυσοσωματικές ή άλλες πηγές.

Επώαση (ώρες)	% έκκρισης μη λυσοσωματικών πηγών	% έκκρισης από λυσοσώματα
1	53%	47%
2	64%	36%
4	30%	70%
6	33%	67%

Τέλος, μπορούμε να δούμε πως επηρεάζεται η ειδική δραστηριότητα κάθε ενζύμου στο ομογενοποίημα και το υπερκείμενο για τους διάφορους χρόνους επώασης. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να δειχθεί άμεσα με σύγκριση της ειδικής δραστηριότητας με και χωρίς αναστολέα AM374 καθώς η αφαίρεση τους δίνει την

ειδική δραστηριότητα της FAAH ή και έμμεσα με ίδια επεξεργασία των υδρολύσεων % που είναι ανάλογο μέγεθος της ειδικής δραστηριότητας.



Σχήμα 6.6: Ποσοστιαίες υδρολύσεις 2-ελαϋλογλυκερόλης ομογενοποιημάτων και υπερκειμένων *T. thermophila* και *T. thermophila* MS-1 μετά από επώαση σε ανόργανο μέσο για 1, 2, 4, 6 ώρες. Οι υδρολύσεις οφείλονται στη δράση (α) της MAGL και (β) της FAAH, και είναι για 50 μg δείγματος πρωτεΐνης δείγματος σε 15 λεπτά χρόνο ενζυμικής αντίδρασης. Τα αποτελέσματα αποτελούν τον μέσο όρο διπλών δειγμάτων από 2-3 διαφορετικά πειράματα.

Από παρατήρηση των διαγραμμάτων (α) και (β) του σχήματος 6.6 βλέπουμε ότι η 2-ελαϋλογλυκερόλη υδρολύεται κυρίως από τη δράση της MAGL, καθώς μόνο το ~30% της υδρόλυσης των ομογενοποιημάτων και για τα δύο στελέχη οφείλεται στη δράση της FAAH, με το υπόλοιπο να ανάγεται στη MAGL, κάτι που είναι φυσικό μιας και είναι το κύριο αποικοδομητικό ένζυμο των μονοακυλογλυκερολών. Ακόμη, το ~25% της υδρόλυσης των υπερκειμένων της *T. thermophila* προέρχεται από δράση της FAAH, ενώ στα υπερκείμενα της MS-1 η FAAH δείχνει να συνεισφέρει

σε παρόμοιο ποσοστό στην υδρόλυση της 2-ελαϋλογλυκερόλης, κατά ~50%. Η διαφορά αυτή μπορεί να εξηγηθεί με το ότι η FAAH εκκρίνεται και από μη λυσοσωματική πηγή σε μεγαλύτερο ποσοστό από αυτό της MAGL, όπως είδαμε και στον πίνακα 6.2.

Μία άλλη παρατήρηση που προκύπτει από το σχήμα 6.6, είναι ότι η FAAH φαίνεται να εκκρίνεται επιλεκτικά σε σχέση με άλλες πρωτεΐνες, αφού το υπερκείμενο της MS-1 για 1 και 2 ώρες επώασης είναι εμπλουτισμένο σε δραστικότητα FAAH, σε σχέση με τα αντίστοιχα της *T. thermophila*, που σημαίνει ότι η μη λυσοσωματική πηγή προέλευσης της FAAH είναι επιλεκτική προς αυτή. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται για τη MAGL, καθώς τα υπερκείμενα της MS-1 είναι για όλες τις χρονικές περιόδους επώασης λιγότερο δραστικά από τα αντίστοιχα της *T. thermophila*, επομένως η μη λυσοσωματική πηγή έκκρισης της MAGL, δεν φαίνεται να έχει κάποια εξειδίκευση προς αυτή.

6.2 Η έκκριση της MAGL και FAAH από τις βλεννοκύστεις της *Tetrahymena thermophila*.

Όπως αναφέρθηκε εκτενώς στο θεωρητικό μέρος, η *Tetrahymena* διαθέτει ένα σύνολο εξειδικευμένων εκκριτικών κοκκίων, ελλιμενισμένων στη πλασματική μεμβράνη, ικανών να εξωκυτωθούν άμεσα ως απόκριση σε κάποιο, άγνωστο μέχρι στιγμής, εξωκυττάριο σήμα. Αυτά τα κοκκία ονομάζονται βλεννοκύστεις λόγω της ιδιότητας τους να σχηματίζουν ένα δίκτυο βλέννας που περικυκλώνει το κύτταρο, όταν εξωκυτωθούν όλες μαζί, και η αυτή η πορεία έκκρισης ονομάζεται ρυθμιζόμενη έκκριση βλεννοκυστεών και έχει πολλές αναλογίες με την έκκριση με κοκκία που περιέχουν νευροδιαβιβαστές στους ανώτερους πολυκύτταρους ζωικούς οργανισμούς.

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των καλλιέργειων *T. thermophila* είναι ότι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες σε συνθήκες που προκαλούν στρες, όπως μεταβολές στη θερμοκρασία ή βίαιες κινήσεις κατά την παραλαβή τους και υπό αυτές τις συνθήκες μπορεί να προκληθεί μερική έκκριση του περιεχομένου των βλεννοκυστεών [58]. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει τη διαφορά στα ποσοστά της έκκρισης μεταξύ των παλαιότερων πειραμάτων και των πειραμάτων παρόντων σε αυτή την εργασία, αν τα ένζυμα αυτά περιείχονταν στις βλεννοκύστεις, είτε ως συστατικά του αυλού τους,

είτε προσδεμένα στη μεμβράνη τους και οι συνθήκες παραλαβής των καλλιιεργειών δεν ήταν οι βέλτιστες. Έτσι, η δραστικότητα του υπερκείμενου θα μπορούσε να προέλθει ως συνδυασμός της έκκρισης από λυσοσωματικές ή άλλες πηγές συνεχούς έκκρισης ή από μερική εξωκύτωση βλεννοκυστών.

Με αυτά στο μυαλό μας, αποφασίσαμε να απομονώσουμε το εκκρινόμενο περιεχόμενο των βλεννοκυστών από καλλιέργειες κυτάρων *T. thermophila* και *T. thermophila* MS-1, που χρησιμοποιήθηκαν και πιο πάνω, και να το μελετήσουμε ως προς τη δραστικότητα MAGL και FAAH. Το στέλεχος της MS-1 χρησιμοποιήθηκε πάλι με τη λογική ότι λόγω της μετάλλαξής του, μπορεί να βοηθήσει στη κατανόηση των μηχανισμών έκκρισης. Ακόμη, μελετούμε τη δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης στις βλεννοκύστες, καθώς σε παλαιότερη εργασία είχε εντοπιστεί δραστικότητα όξινης φωσφατάσης στο ινώδες δίκτυο που σχηματίζεται από την εξωκύτωση των βλεννοκυστών [55].

Για την απομόνωση των απελευθερωμένων συστατικών των βλεννοκυστών από καλλιέργειες *T. thermophila* μετά από την εξωκύτωση τους, χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο των Turkewitz et al, που περιλαμβάνει επίδραση με διβουκαΐνη [58]. Σύμφωνα με αυτό, όταν η διβουκαΐνη έρχεται σε επαφή με την πλασματική μεμβράνη της *T. thermophila* προκαλεί άμεση και πλήρη έκκριση του συνόλου του περιεχομένου των βλεννοκυστών και σχηματίζεται ένα προστατευτικό στρώμα βλέννας γύρω από αυτή. Η βλέννα αυτή μπορεί, στη συνέχεια, να απομονωθεί από την υπόλοιπη καλλιέργεια με μία σειρά φυγοκεντρήσεων, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στη παράγραφο 5.7.

Συνοπτικά όμως, η πορεία (βλ. παράγραφο 5.7) περιλαμβάνει μία σειρά φυγοκεντρήσεων για απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού των καλλιιεργειών και έκπλυση τους, επίδραση με διβουκαΐνη που προκαλεί την έκκριση των βλεννοκυστών, μια φυγοκέντρηση που διαχωρίζει την καλλιέργεια σε 3 φάσεις: διαλυτό υπερκείμενο, μεσόφαση και ίζημα κυτάρων και μία νέα σειρά φυγοκεντρήσεων για απομόνωση αυτών των κλασμάτων. Το σύνολο σχεδόν της βλέννας που σχηματίζεται με την έκκριση των βλεννοκυστών και περιλαμβάνει κυρίως τις πρωτεΐνες που βρίσκονται σε κρυσταλλική μορφή στο εσωτερικό τους (βλέπε παράγραφο 2.4.2), παραλαμβάνεται με τη μεσόφαση. Αντίστοιχα, στο υπερκείμενο μπορούν να εντοπιστούν υδατοδιαλυτά συστατικά των βλεννοκυστών που διαφεύγουν από τη βλέννα και πρωτεΐνες από άλλα μονοπάτια

λυσσοσωματικής, ή άλλης μορφής, συνεχούς έκκρισης που λειτουργούν παράλληλα, κατά τη διάρκεια του πειράματος. Στα κλάσματα που παραλαμβάνονται γίνεται προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford, προσδιορισμός δραστηριότητας όξινης φωσφατάσης και προσδιορισμός δραστηριότητας MAGL και FAAH, όπως περιγράφηκε στην ενότητα των μεθόδων-υλικών. Ακόμη, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS, καθώς και ανοσοαποτύπωση.

Τονίζεται ότι μεγάλη προσοχή δόθηκε σε όλα τα στάδια για να μη συμβεί πρόωμη εξωκύτωση βλεννοκυστών ή μεγάλη καταστροφή κυττάρων κατά την επίδραση με διβουκαΐνη. Παραταύτα, δεν μπορούσαμε να αποφύγουμε την λύση των κυττάρων κατά ένα μικρό ποσοστό, στις συνθήκες του πειράματος. Όπως αναφέρθηκε και στη παράγραφο 5.7 μεγάλη προσοχή δόθηκε και κατά τον διαχωρισμό των φάσεων για αποφυγή επιμόλυνσης.

Πριν περάσουμε στην ανάλυση των αποτελεσμάτων, είναι σημαντικό να αναφερθεί μία παρατήρηση σε σχέση με τη πειραματική πορεία στα κύτταρα της MS-1. Κατά το στάδιο της επίδρασης με διβουκαΐνη στη MS-1, αυτή έδινε συστηματικά πολύ μικρότερη μεσόφαση από την αντίστοιχη καλλιέργεια της *T. thermophila*. Για τα κύτταρα της MS-1 έχει αναφερθεί ότι συμπεριφέρονται ως κύτταρα άγριου τύπου ως προς τη ρυθμιζόμενη έκκριση βλεννοκυστών [46], καθώς ύστερα από επίδραση με το εκκριτογόνο Alcian Blue εμφανίζονται παγιδευμένα σε ένα περιβάλλον βλέννας χρωματισμένου με μπλε χρώμα (εξαιτίας του Alcian Blue που καθιστά εύκολη την παρατήρηση της εξωκύτωσης σε μικροσκόπιο) και, επίσης, αποκρίνονται κανονικά στη διβουκαΐνη. Τα κύτταρα όμως αυτά έχουν μικρότερο μέγεθος από τα κύτταρα άγριου τύπου της *T. thermophila* και λιγότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο [46], κάτι που μπορεί να εξηγήσει τη μικρότερου πάχους μεσόφαση που σχηματιζόταν.

6.2.1. Παρεμπόδιση του Hapes στη μέθοδο Lowry

Τα πειράματα της επίδρασης με διβουκαΐνη σε καλλιέργειες κυττάρων *T. thermophila* απαιτούσαν τη χρησιμοποίηση του ανόργανου μέσου 10 mM Hapes pH 7, 0,5 mM CaCl₂. Όμως, κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry στα κλάσματα που παραλαβήναμε, οι τιμές που παίρναμε ήταν πολύ μεγαλύτερες από τις αναμενόμενες. Τα μεγάλα θετικά σφάλματα που συναντήσαμε οφείλονται στην παρεμπόδιση που προκαλεί το Hapes στη Lowry,

κάτι που είναι τεκμηριωμένο βιβλιογραφικά εδώ και πολλά χρόνια [106]. Έτσι, για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο Bradford και στον πίνακα 6.3 μπορούμε να δούμε τις διαφορές στη συγκέντρωση που προκύπτουν από τις δύο μεθόδους σε ίδια δείγματα.

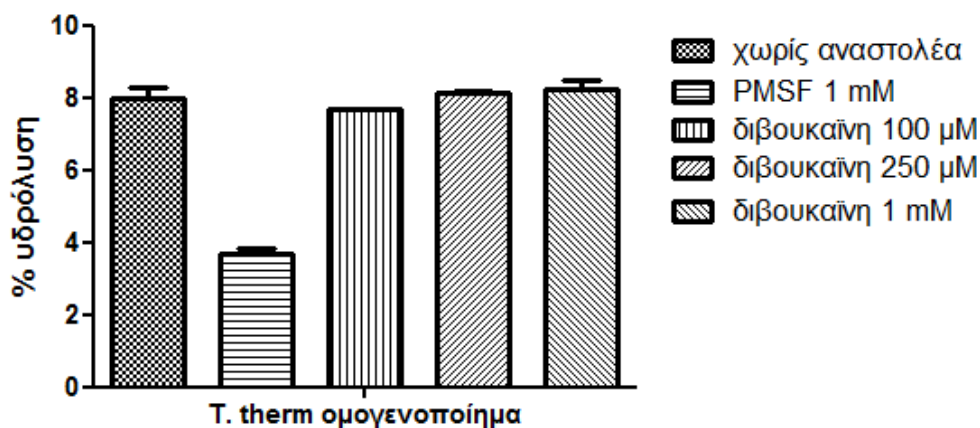
Πίνακας 6.3: Πρωτεΐνη σε mg/ml όπως προέκυψε από τις δύο μεθόδους προσδιορισμού πρωτεΐνης για παρόμοια κλάσματα *T. thermophila*, ύστερα από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη. Τα αποτελέσματα είναι από ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα.

	ομογενοποίηση	υπερκείμενο	μεσόφαση
Lowry	8,4	7,1	7,2
Bradford	0,96	0,13	0,56

6.2.2 Επίδραση διβουκαΐνης στο μεταβολισμό της 2-OG σε καλλιέργειες κυττάρων *T. thermophila*.

Η διβουκαΐνη, όπως αναφέρθηκε και στη παράγραφο 5.7, ασκεί τη δράση της αλληλεπιδρώντας με τις πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων και, συγκεκριμένα, διαταράσσοντας τη δομή τους, επιτρέπει την είσοδο εξωκυτταρικού ασβεστίου στο κυτοσόλιο [58]. Η FAAH και η MAGL, όμως, εντοπίζονται κυρίως σε μεμβρανικά κλάσματα της *T. thermophila* (βλέπε παρ. 3.8), και έτσι αν περιέχονται στη πλασματική μεμβράνη θα μπορούσε η διβουκαΐνη να επηρεάσει τη δραστηριότητα τους.

Αποφασίσαμε, λοιπόν, να εξετάσουμε την επίδραση της διβουκαΐνης στην υδρόλυση της 2-ελαϋλογλυκερόλης σε ομογενοποιημένα καλλιέργειας κυττάρων *T. thermophila*. Τα κύτταρα αυτά καθαρίζονται από το θρεπτικό υλικό τους, χωρίς να υποστούν διέγερση με διβουκαΐνη. Στη συνέχεια, έγινε ενζυμικός προσδιορισμός δραστηριότητας MAGL και FAAH ταυτόχρονα, παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων διβουκαΐνης, που επιλεγθήκαν βάσει της συγκέντρωσης της στο πείραμα της διέγερσης. Ως αναστολέας ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ο PMSF, ένας μη ειδικός αναστολέας σερινοπρωτεασών που έχει βρεθεί από παλαιότερα πειράματα ότι αναστέλλει την υδρόλυση της 2-OG κατά ~55%, όταν χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1 mM στην ενζυμική αντίδραση [110]. Αναλυτικά η πορεία περιγράφεται στη παράγραφο 5.9.



Σχήμα 6.7: Ποσοστιαία υδρόλυση 2-ελαϋλογλυκερόλης 2 μM σε ομογενοποίηση *T. thermophila* (απουσία επίδρασης με διβουκαΐνη), παρουσία, PMSF 1 mM, διβουκαΐνης 100 μM , 250 μM , 1 mM καθώς και απουσία τους. Η αντίδραση έγινε με 50 μg δείγματος, σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 10 mM pH 7, στους 37°C για 15 λεπτά. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο διπλών δειγμάτων από ένα πείραμα.

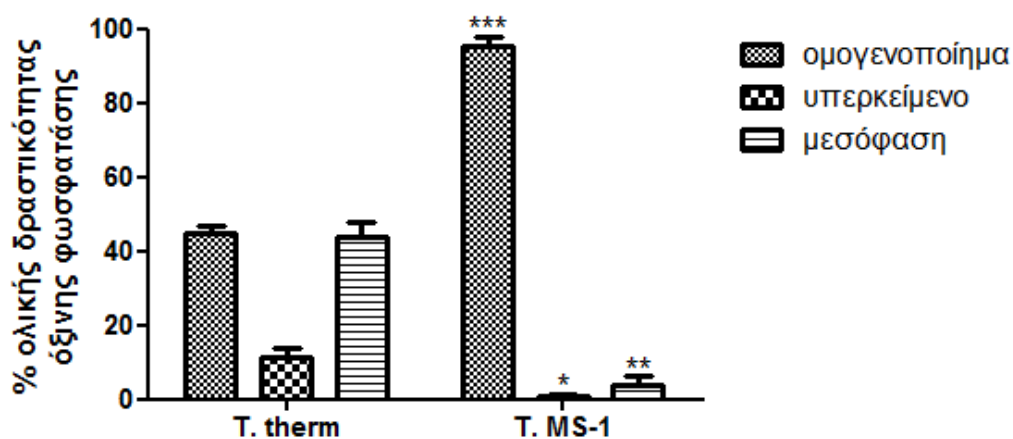
Στο σχήμα 6.7 βλέπουμε την ποσοστιαία υδρόλυση της 2-OG που οφείλεται στη δράση του ομογενοποιημένου της *T. thermophila* απουσία ή παρουσία PMSF και διβουκαΐνης σε διάφορες συγκεντρώσεις. Καταρχήν, ο PMSF σε συγκέντρωση 1 mM αναστέλλει κατά ~54% την υδρόλυση της 2-OG, επιβεβαιώνοντας έτσι τα παλαιότερα πειράματα. Αντίθετα, η διβουκαΐνη ακόμα και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτές που εκτίθενται τα ένζυμα κατά τη διάρκεια του πειράματος της διέγερσης δεν δείχνει να παρουσιάζει κάποια ανασταλτική δράση. Άρα, μπορούμε να προχωρήσουμε κανονικά στο πείραμα της έκκρισης βλεννοκυστών με επίδραση διβουκαΐνης.

6.2.3. Η έκκριση της όξινης φωσφατάσης κατά την επίδραση με διβουκαΐνη σε κύτταρα *T. thermophila*.

Η όξινη φωσφατάση αποτελεί ένα κυρίως λυσοσωμικό ένζυμο που εκκρίνεται ύστερα από επώαση των κυττάρων σε ανόργανο μέσο, όπως βρέθηκε από τα πειράματα αυτής της εργασίας (βλέπε παρ. 6.1.1.), καθώς και από παλαιότερα πειράματα της ομάδας μας και επίσης βρέθηκε ότι τα μεταλλαγμένα κύτταρα της MS-1 αδυνατούν να κάνουν έκκριση αυτού του ενζύμου στις ίδιες συνθήκες με τη *T. thermophila*. Ακόμη, παλαιότερη εργασία είχε δείξει εντοπισμό δραστηριότητας

όξινης φωσφατάσης στο ινώδες δίκτυο που σχηματίζεται μετά την εξωκύτωση των βλεννοκυστών [55], ύστερα από επίδραση με διβουκαΐνη. Επίσης, έχει βρεθεί να υπάρχει σε δύο ισομορφές, μία μεμβρανική και μία διαλυτή με διαφορετική κατανομή στα υποκυτταρικά οργανίδια [48]. Για παράδειγμα, στα φαγολυσοσώματα της *Tetrahymena* βρίσκεται κατά 80% σε μεμβρανοσύνδετη μορφή, ενώ στα λυσοσώματα κατά 40%.

Έτσι, αποφασίσαμε να μελετήσουμε πως εμπλέκεται η δραστικότητα της με τη διέγερση των βλεννοκυστών. Συνοπτικά, κύτταρα που έχουν καθαριστεί από το θρεπτικό τους μέσο υφίστανται επίδραση με διβουκαΐνη και παραλαμβάνονται 3 φάσεις: ίζημα κυττάρων, μεσόφαση και υπερκείμενο και ακολουθεί προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και προσδιορισμός δραστικότητας όξινης φωσφατάσης. Η πορεία περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 5.7.



Σχήμα 6.8: Ποσοστό ολικής δραστικότητας όξινης φωσφατάσης σε ομογενοποίηση, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιεργειών *T. thermophila* και *T. MS-1* μετά από επαγωγή έκκρισης με χρήση διβουκαΐνης. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ ίδιων κλασμάτων των δύο στελεχών (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο διπλών δειγμάτων από 3 διαφορετικά πειράματα.

Στο σχήμα 6.8 βλέπουμε ότι η δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης στη *T. thermophila* μοιράζεται μεταξύ του ομογενοποιημένου και της μεσόφασης, με ποσοστό ~44% και στα δύο, ενώ ένα ~11% βρίσκεται στο υπερκείμενο. Αντίθετα, στην MS-1 η δραστικότητα εντοπίζεται σχεδόν πλήρως στο ομογενοποίημα (95%), με ~3,7% στη μεσόφαση και ~1,2% στο υπερκείμενο. Η διαφορά στη μεσόφαση

μεταξύ των δύο στελεχών, μάλλον είναι συνδυασμός της αδυναμίας έκκρισης λυσοσωματικών ενζύμων, καθώς και του σχηματισμού αρκετά μικρότερης μεσόφασης κατά την επίδραση με διβουκαΐνη από τη μεριά της MS-1. Εκεί ανάγονται και οι διαφορές στη δραστικότητα των υπερκειμένων. Η δραστικότητα της μεσόφασης εικάζεται ότι προέρχεται από το κρυσταλλικό περιεχόμενο των βλεννοκυστών, ενώ του υπερκειμένου είναι συνδυασμός των διαλυτών συστατικών των βλεννοκυστων και της έκκρισης από λυσοσώματα ή πηγών άλλης συνεχούς έκκρισης.

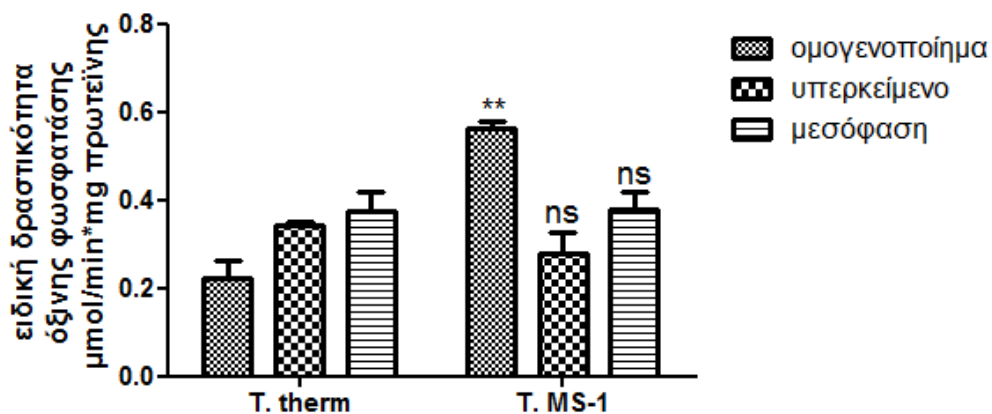
Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα του σχήματος 6.8 κατασκευάζουμε ένα πίνακα που δείχνει πως κατανέμεται η έκκριση μεταξύ της μεσόφασης και του υπερκειμένου στα δύο στελέχη, θεωρώντας ότι το άθροισμα της δραστικότητας των δύο αυτών κλασμάτων είναι το σύνολο της έκκρισης. Και στα δύο στελέχη βλέπουμε ότι το ~20-25% της έκκρισης είναι στο υπερκείμενο και το υπόλοιπο ~75-80% στη μεσόφαση.

Πίνακας 6.4: Ποσοστιαία κατανομή έκκρισης όξινης φωσφατάσης σε υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιεργειών *T. thermophila* και *T. MS-1* που έχουν υποστεί διέγερση με διβουκαΐνη.

<i>T. thermophila</i>		<i>T. MS-1</i>	
υπερκείμενο	βλεννοκύστες	υπερκείμενο	βλεννοκύστες
20,6%	79,4%	24,5%	75,5%

Ακόμη, μπορούμε να συγκρίνουμε τις ειδικές δραστικότητες της όξινης φωσφατάσης στα δύο στελέχη, όπως φαίνεται στο σχήμα 6.9. Συγκεκριμένα, στη *T. thermophila* φαίνεται να υπάρχει εμπλουτισμός του υπερκειμένου και της μεσόφασης σε δραστικότητα όξινης φωσφατάσης σε σχέση με το ομογενοποίημα, ενώ στη MS-1 δεν παρατηρείται κάτι αντίστοιχο, καθώς η μεγαλύτερη της ειδική δραστικότητα βρίσκεται στο ομογενοποίημα και μάλιστα είναι τρεις φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της *T. thermophila*. Δηλαδή, η MS-1 δείχνει να 'κρατάει' το ένζυμο στο εσωτερικό της, προφανώς λόγω αδυναμίας έκκρισης λυσοσωματικών ενζύμων. Ακόμη, η ειδική δραστικότητα μεταξύ των υπερκειμένων και των μεσοφάσεων των δύο στελεχών δεν δείχνει να έχει διαφορά, κάτι που

επιβεβαιώνει την υπόθεση μας ότι σημαντικό ρόλο στα ποσοστά του σχήματος 6.8 έχει η διαφορά του μεγέθους των μεσοφάσεων μεταξύ των δύο στελεχών.



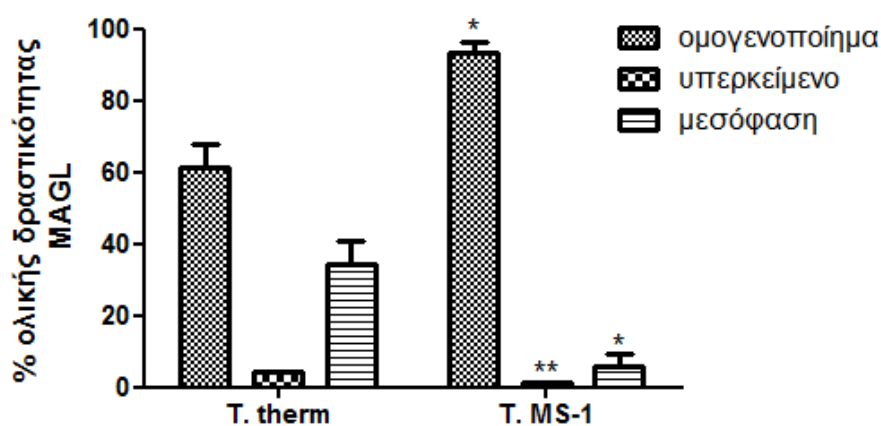
Σχήμα 6.9: Ειδική δραστηριότητα όξινης φωσφατάσης σε ομογενοποίηση, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιιεργειών *T. Thermophila* και *T. MS-1* μετά από επαγωγή έκκρισης με χρήση διβουκαΐνης. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ ίδιων κλασμάτων των δύο στελεχών (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$, ns: μη στατιστικώς σημαντική διαφορά). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο διπλών δειγμάτων από 3 διαφορετικά πειράματα.

6.2.4. Η έκκριση της MAGL και της FAAH κατά την επίδραση με διβουκαΐνη σε κύτταρα *T. thermophila*.

Στα κλάσματα που παραλήφθηκαν από τις καλλιέργειες κυττάρων *T. thermophila* και *T. thermophila* MS-1, ύστερα από την διέγερσή τους με διβουκαΐνη, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.7, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός δραστηριότητας MAGL και FAAH, σύμφωνα με την παράγραφο 5.5. Καθώς η υδρόλυση της 2-ελαϋλογλυκερόλης οφείλεται στη δράση και των δύο ενζύμων στην *Tetrahymena* [103], η χρήση του ειδικού αναστολέα της FAAH, AM374 μας επιτρέπει να βρούμε το ποσοστό της υδρόλυσης που οφείλεται στη δράση της MAGL. Ακόμη, συγκρίνοντας τις δραστηριότητες με και χωρίς αναστολέα, μπορούμε να εξάγουμε έμμεσα συμπεράσματα για τη συμμετοχή της FAAH στην υδρόλυση της 2-OG, κατά τρόπο ανάλογο με τη μελέτη της έκκρισης σε μέσο ασιτίας.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 6.10, η δραστηριότητα της MAGL στην *T. thermophila* μοιράζεται κυρίως μεταξύ του ομογενοποιημένου και της μεσόφασης, με ποσοστά ~61% και ~34% αντίστοιχα, ενώ το υπερκείμενο έχει μόνο ένα ~4% της συνολικής

δραστικότητα. Αντίθετα, στην MS-1 το σύνολο σχεδόν της δραστικότητας της MAGL εντοπίζεται στο ομογενοποίημα με ποσοστό ~93%, ένα ~6% βρίσκεται στη μεσόφαση, ενώ το υπερκείμενο έχει μόλις το 1,1% της συνολικής δραστικότητας. Η διαφορά της δραστικότητας των μεσοφάσεων μεταξύ των δύο στελεχών οφείλεται μάλλον στην πολύ μικρότερη μεσόφαση που σχηματιζόταν από τα κύτταρα της MS-1 κατά την επίδραση με διβουκαΐνη, σε σχέση με τη μεσόφαση της *T. thermophila*. Αντίστοιχο αποτέλεσμα βρέθηκε και κατά τον προσδιορισμό της όξινης φωσφατάσης (βλέπε παράγραφο 6.2.3). Για να απαντήσει κανείς με σιγουριά στο ερώτημα αυτό, πρέπει να υπολογίσει την ειδική δραστικότητα MAGL στα κλάσματα της έκκρισης, κάτι που θα περιγραφεί πιο κάτω.



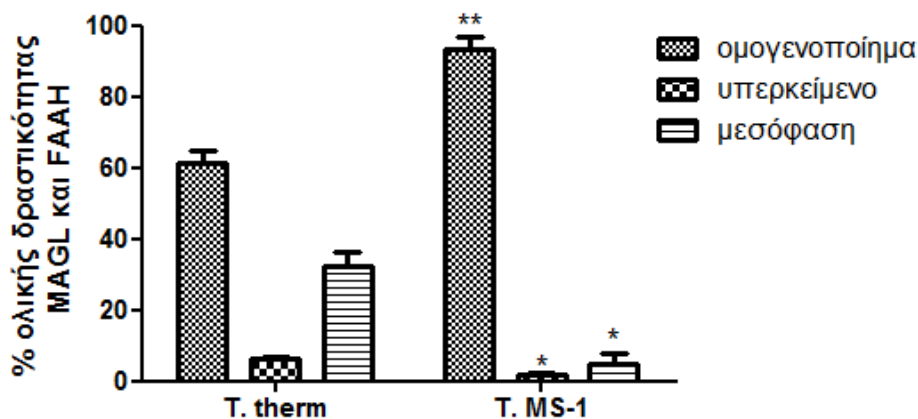
Σχήμα 6.10: Ποσοστό ολικής δραστικότητας MAGL σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιεργειών *T. thermophila* και *T. MS-1* (παρουσία αναστολέα AM374) μετά από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ ίδιων κλασμάτων των δύο στελεχών (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο διπλών δειγμάτων από τρία διαφορετικά πειράματα.

Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα του σχήματος 6.10 κατασκευάζουμε τον πίνακα 6.5 που δείχνει πως κατανέμεται η έκκριση μεταξύ της μεσόφασης και του υπερκειμένου στα δύο στελέχη, θεωρώντας ότι το άθροισμα της δραστικότητας των δύο αυτών κλασμάτων είναι το σύνολο της έκκρισης. Και στα δύο στελέχη φαίνεται ότι η εκκρινόμενη MAGL προέρχεται κυρίως από τη μεσόφαση και, συγκεκριμένα, κατά ~89% στη *T. thermophila* και κατά ~84% στη MS-1. Ξαναθυμίζεται ότι η μεσόφαση περιέχει το σύνολο του εκκρινόμενου περιεχομένου των βλεννοκυστών, που είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό της βλέννας, ενώ στο υπερκείμενο μπορεί να έχουν διαφύγει υδατοδιαλυτά συστατικά των βλεννοκυστών, καθώς και

προϊόντα ιδιοσυστατικής έκκρισης λυσοσωμάτων ή άλλων πηγών έκκρισης, που λειτουργούν παράλληλα κατά την διαδικασία της επίδρασης με διβουκαΐνη.

Πίνακας 6.5: Ποσοστιαία κατανομή έκκρισης MAGL σε υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιεργειών *T. thermophila* και *T. MS-1* που έχουν υποστεί διέγερση με διβουκαΐνη.

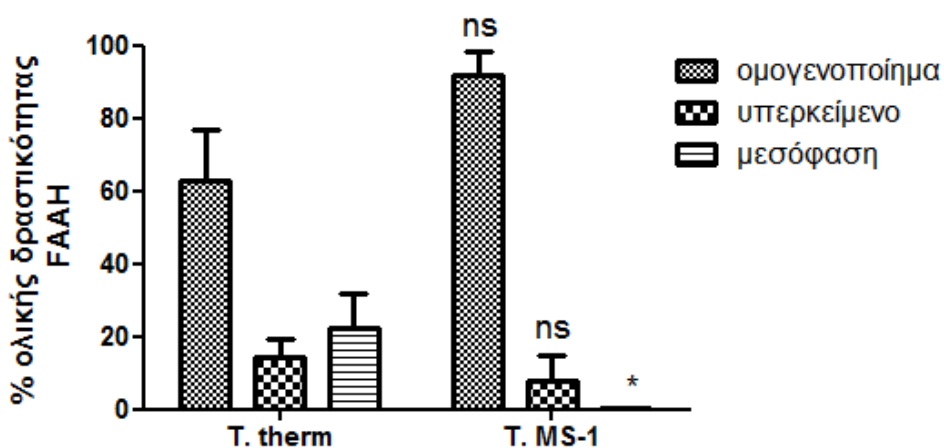
<i>T. thermophila</i>		<i>T. MS-1</i>	
υπερκείμενο	βλεννοκύστες	υπερκείμενο	βλεννοκύστες
10,9%	89,1%	16,5%	83,5%



Σχήμα 6.11: Ποσοστό ολικής δραστηριότητας MAGL και FAAH σε ομογενοποίηση, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιεργειών *T. thermophila* και *T. MS-1* (απουσία αναστολέα AM374), μετά από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ ίδιων κλασμάτων των δύο στελεχών (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο διπλών δειγμάτων από τρία διαφορετικά πειράματα.

Στο σχήμα 6.11 φαίνεται η κατανομή της δραστηριότητας της MAGL και FAAH στα κλάσματα της έκκρισης, όπως αυτή υπολογίζεται από την υδρόλυση της 2-ελαϋλογλυκερόλης. Συγκεκριμένα, στη *T. thermophila* το 61,3% της δραστηριότητας βρίσκεται στο ομογενοποίηση, το 32,6% στη μεσόφαση και το υπόλοιπο 6,1% στο υπερκείμενο. Αντίθετα, στην MS-1 η δραστηριότητα βρίσκεται συγκεντρωμένη στο ομογενοποίηση σε ποσοστό 93,2%, 4,8% βρίσκεται στη μεσόφαση και μόλις 1,8% στο υπερκείμενο. Η κατανομή της δραστηριότητας και στα δύο στελέχη είναι σχεδόν παρόμοια με αυτή της MAGL, όπως φαίνεται από το σχήμα 6.10.

Χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα των σχημάτων 6.10 και 6.11, υπολογίζουμε τη δραστικότητα της FAAH στα διάφορα κλάσματα αφαιρώντας τις δραστικότητες με αναστολέα από τις αντίστοιχες χωρίς αναστολέα και υπολογίζοντας τα νέα ποσοστά ολικής δραστικότητας. Έτσι προκύπτει το σχήμα 6.12, σύμφωνα με το οποίο, η κατανομή δραστικότητας της FAAH ως προς την υδρόλυση της 2-OG είναι 63% στο ομογενοποίημα, 22,5% στη μεσόφαση και 14,5% στο υπερκείμενο. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις (σχήματα 6.10 και 6.11) στην MS-1 το σύνολο της δραστικότητας της FAAH εντοπίζεται κυρίως στο ομογενοποίημα με ποσοστό 91,9%, 8% βρίσκεται στο υπερκείμενο, ενώ καθόλου δραστικότητα δεν ανιχνεύτηκε στη μεσόφαση. Η διαφορά στις δραστικότητες των μεσοφάσεων των δύο στελεχών δεν φαίνεται να καθορίζονται μόνο από τις διαφορές στο μέγεθος τους, αλλά και από διαφορές στη σύσταση των ίδιων των βλεννοκυστών.



Σχήμα 6.12: Ποσοστό ολικής δραστικότητας FAAH σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιεργειών *T. thermophila* και *T. MS-1*, μετά από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ ίδιων κλασμάτων των δύο στελεχών (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο διπλών δειγμάτων από τρία διαφορετικά πειράματα.

Αντίστοιχα του πίνακα 6.5 για την κατανομή της εκκρινόμενης MAGL, κατασκευάζεται ο πίνακας 6.6, όπου φαίνεται πως κατανέμεται η εκκρινόμενη FAAH μεταξύ της μεσόφασης και του υπερκειμένου των δύο στελεχών. Στη *T. thermophila* η εκκρινόμενη FAAH μοιράζεται μεταξύ υπερκειμένου και μεσόφασης, με ποσοστά ~39% και ~61% αντίστοιχα, ενώ στη MS-1 το σύνολο της εκκρινόμενης FAAH εντοπίζεται στο υπερκείμενο. Η διαφορά αυτή μεταξύ των δύο στελεχών, σε αντίθεση με την εκκρινόμενη MAGL, που όπως είδαμε στον πίνακα

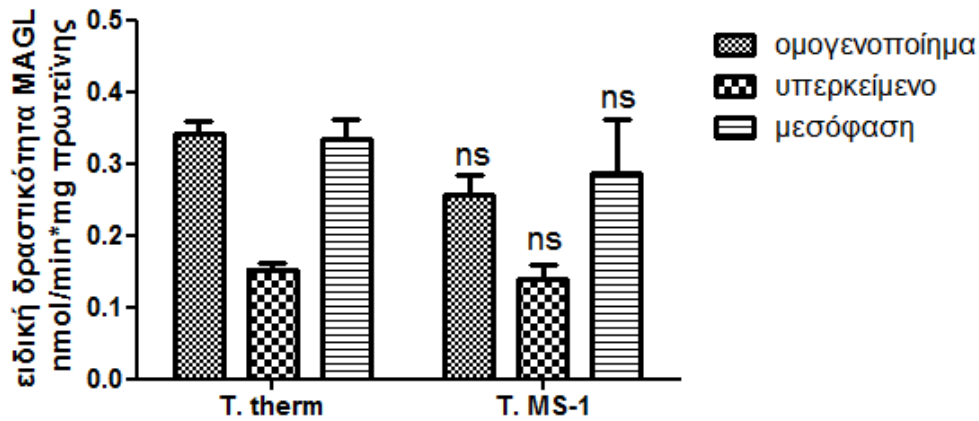
6.5 έχει παρόμοια συμπεριφορά στη *T. thermophila* και *T. MS-1*, ενισχύει τις ενδείξεις μας για διαφορές στη σύσταση των βλεννοκυστών των δύο στελεχών ως προς τη FAAH.

Πίνακας 6.6: Ποσοστιαία κατανομή έκκρισης FAAH σε υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιιεργειών *T. thermophila* και *T. MS-1* που έχουν υποστεί διέγερση με διβουκαΐνη.

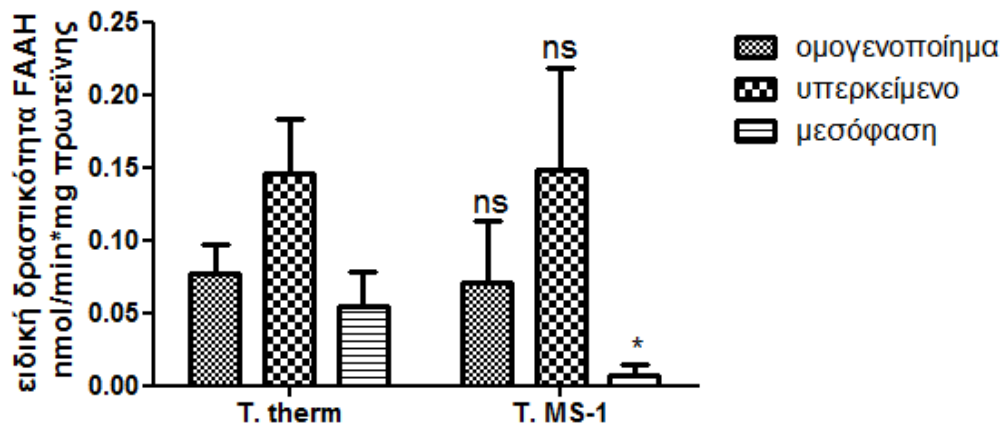
<i>T. thermophila</i>		<i>T. MS-1</i>	
υπερκείμενο	βλεννοκύστες	υπερκείμενο	βλεννοκύστες
39,2%	60,8%	98,8%	1,2%

Οι διαφορές που παρατηρούνται στα παραπάνω σχήματα μεταξύ των μεσοφάσεων των δύο στελεχών, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μπορεί να οφείλονται στο μέγεθος των μεσοφάσεων που σχηματίζονται κατά την επίδραση με διβουκαΐνη. Ένας χρήσιμος τρόπος για να μελετήσουμε αυτή την πιθανότητα είναι μέσω σύγκρισης της ειδικής δραστηριότητας των δύο ενζύμων στα διάφορα κλάσματα. Αν οι ειδικές δραστηριότητες είναι παρόμοιες σε ίδια κλάσματα για τα δύο στελέχη, τότε οι παρατηρούμενες διαφορές οφείλονται στα μεγέθη των μεσοφάσεων. Επίσης, με σύγκριση των ειδικών δραστηριοτήτων μπορούμε να δούμε αν είναι εξειδικευμένος ο μηχανισμός της έκκρισης για τα δύο αυτά ένζυμα.

Μελετώντας το σχήμα 6.13, βλέπουμε ότι η MAGL είναι πιο δραστική και στα δύο στελέχη στο ομογενοποίημα και τη μεσόφαση και μάλιστα με περίπου παρόμοια ειδική δραστηριότητα, κοντά στο 0,34 nmol/min*mg πρωτεΐνης για τη *T. thermophila* και 0,26 nmol/min*mg πρωτεΐνης για την *T. MS-1*. Το υπερκείμενο και στα δύο στελέχη έχει περίπου τη μισή ειδική δραστηριότητα από τα αντίστοιχα ομογενοποιήματα και μεσοφάσεις. Ο εμπλουτισμός της δραστηριότητας στη μεσόφαση σε σχέση με το υπερκείμενο ενισχύει το συμπέρασμα της έκκρισης MAGL από τις βλεννοκύστες, ενώ οι διαφορές στα ποσοστά ολικής δραστηριότητας των μεσοφάσεων του σχήματος 6.11 μπορούν να αποδοθούν στις διαφορές των μεγεθών τους καθώς οι ειδικές δραστηριότητες είναι παρόμοιες στα δύο στελέχη για τα ίδια κλάσματα.



Σχήμα 6.13: Ειδική δραστικότητα MAGL σε ομογενοποίηση, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιεργειών *T. thermophila* και *T. MS-1* μετά από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη (παρουσία αναστολέα AM374). Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ ίδιων κλασμάτων των δύο στελεχών (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$, ns: μη στατιστικώς σημαντική διαφορά). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο διπλών δειγμάτων από τρία διαφορετικά πειράματα.



Σχήμα 6.14: Ειδική δραστικότητα FAAH σε ομογενοποίηση, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιεργειών *T. thermophila* και *T. MS-1* μετά από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ ίδιων κλασμάτων των δύο στελεχών (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$, ns: μη στατιστικώς σημαντική διαφορά). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο διπλών δειγμάτων από τρία διαφορετικά πειράματα.

Στο σχήμα 6.14 βλέπουμε την ειδική δραστικότητα της FAAH, ως προς την υδρόλυση της 2-OG, στα κλάσματα που παίρνουμε μετά από επίδραση με διβουκαΐνη σε καλλιέργειες *T. thermophila* και *T. MS-1*. Συγκεκριμένα, φαίνεται ο εμπλουτισμός της δραστικότητας της FAAH στο υπερκείμενο σε σχέση με το ομογενοποίηση και στα δύο στελέχη και μάλιστα η ειδική δραστικότητα

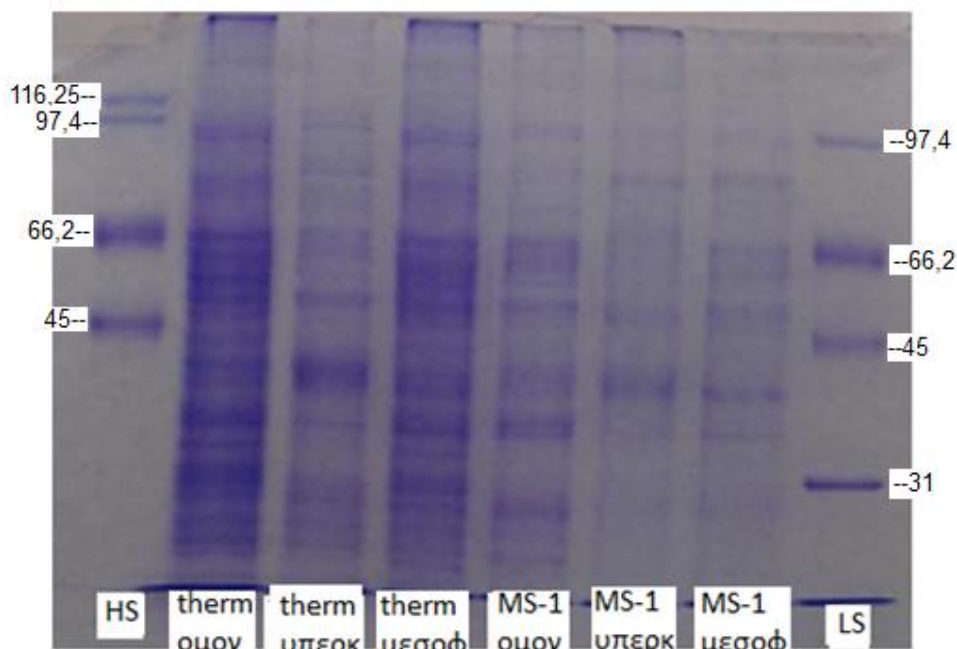
διπλασιάζεται σε σχέση με το ομογενοποίημα (από ~0,07 nmol/min*mg πρωτεΐνης και στα δύο ομογενοποίηματα σε ~0,15 nmol/min*mg πρωτεΐνης). Αυτό δείχνει την ύπαρξη μιας διαλυτής μορφής FAAH, που εκκρίνεται εξειδικευμένα από ένα μονοπάτι μη λυσοσωματικής συνεχούς έκκρισης που είναι ενεργό κατά τη διαδικασία επίδρασης με διβουκαΐνη, κάτι που είχε παρατηρηθεί και στη μελέτη έκκρισης της FAAH σε μέσο ασιτίας (βλέπε παράγραφο 6.1.2). Ένα δεύτερο συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι οι διαφορές στα ποσοστά ολικής δραστηριότητας των μεσοφάσεων του σχήματος 6.12 δεν οφείλονται αποκλειστικά στο μέγεθος των μεσοφάσεων και ότι υπάρχει κάποια διαφοροποίηση των δύο στελεχών ως προς την περιεκτικότητα FAAH στις βλεννοκύστες τους.

Τέλος, με σύγκριση των σχημάτων 6.13 και 6.14 μπορούμε να υπολογίσουμε τα ποσοστά συμμετοχής της FAAH και της MAGL στην υδρόλυση της 2-ελαΰλογλυκερόλης. Στα ομογενοποίηματα των δύο στελεχών η FAAH συμμετέχει κατά ~20% στην υδρόλυση της 2-OG, ενώ στα υπερκείμενα η συμμετοχή της ανεβαίνει στο ~50%, κάτι που επιβεβαιώνει για άλλη μία φορά την ύπαρξη ενός εξειδικευμένου συστήματος μη λυσοσωμικής συνεχούς έκκρισης για τη FAAH. Στις μεσοφάσεις υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο στελεχών καθώς στη *T. thermophila* η FAAH είναι υπεύθυνη για το ~14% του μεταβολισμού της 2-OG, ενώ στη *T. MS-1* η συμμετοχή της είναι σχεδόν μηδενική (~2,5%). Και στην περίπτωση της έκκρισης των βλεννοκυστών η MAGL επιβεβαιώνει το ρόλο της ως το κύριο καταβολικό ένζυμο των 2-μονοακυλογλυκερολών.

6.2.5 Έλεγχος καθαρότητας της μεσόφασης που προκύπτει από διέγερση έκκρισης βλεννοκυστών.

Έχοντας ανιχνεύσει δραστηριότητα όξινης φωσφατάσης, MAGL και FAAH στα κλάσματα που πήραμε με επίδραση με διβουκαΐνη σε καλλιέργειες κυττάρων *T. thermophila* και *T. thermophila* MS-1, επόμενο βήμα ήταν να αναλύσουμε αυτά τα κλάσματα σε SDS-PAGE για μία ποιοτική σύγκριση της πρωτεϊνικής σύστασης των διαφόρων κλασμάτων. Αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει και ένα ποιοτικό κριτήριο καλού διαχωρισμού των φάσεων, σε περίπτωση που υπάρχουν σημαντικές διαφορές στην κατανομή και την πυκνότητα των ζωνών.

Συνοπτικά, η πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: διέγερση καλλιεργειών *T. thermophila* και *T. thermophila* MS-1 με διβουκαΐνη και διαχωρισμός των κλασμάτων που προκύπτουν, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στη παράγραφο 5.7, στη συνέχεια προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και, τέλος, ηλεκτροφόρηση αυτών των κλασμάτων σύμφωνα με την τεχνική SDS-PAGE (παράγραφος 5.11). Αρχικά, ηλεκτροφορήθηκαν δείγματα που περιείχαν 50 ή 100 µg πρωτεΐνης ανά θέση, όμως, μάλλον λόγω του μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών, τα ηλεκτροφορήματα που προέκυπταν δεν ήταν αρκετά καθαρά ώστε να διαπιστωθούν μικροδιαφορές στη σύσταση των κλασμάτων. Έτσι, επιλέγηκαν δείγματα με 25 µg πρωτεΐνης ανά θέση που έδωσαν πολύ καθαρά ηλεκτροφορήματα.



Σχήμα 6.15: Ηλεκτροφόρημα SDS-PAGE σε ομογενοποίηση, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιεργειών *T. thermophila* και *T. MS-1* μετά από επαγωγή έκκρισης με χρήση διβουκαΐνης. Φαίνονται σημειωμένα τα μοριακά βάρη των προτύπων πρωτεϊνών σε kDa. Σε κάθε θέση βρίσκονται 25 µg πρωτεΐνης.

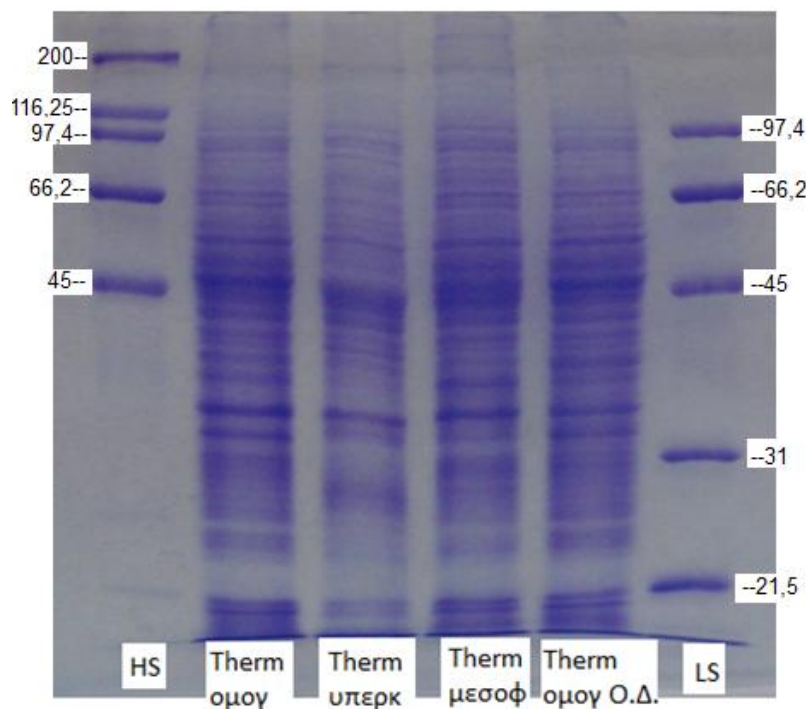
Από το ηλεκτροφόρημα του σχήματος 6.15, παρατηρούμε ότι όλα τα κλάσματα και στα δύο στελέχη έχουν χαρακτηριστικές ζώνες πρωτεϊνών, με πιο έντονη την ομάδα ζωνών μεταξύ 45 και 66 kDa. Επίσης, άλλη μία χαρακτηριστική ομάδα βρίσκεται κάτω από τα 31 kDa και αφορά κυρίως τη *T. thermophila*. Η κατανομή των πρωτεϊνών των υπερκειμένων μοιάζουν αρκετά μεταξύ τους, με μία χαρακτηριστική

κοινή μπάντα μεταξύ 45 και 31 kDa. Ακόμη, τα υπερκείμενα φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά από τα αντίστοιχα ομογενοποιημένα και μεσοφάσεις και στα δύο στελέχη. Αντίθετα, οι μεσοφάσεις μοιάζει να έχουν ίδια κατανομή μπαντών με τα αντίστοιχα ομογενοποιημένα, κάτι που είναι πιο φανερό για την *T. Thermophila*. Τέλος, τα ομογενοποιημένα μεταξύ τους είναι παρόμοια, κάτι που αναμενόταν.

Το ότι οι μεσοφάσεις παρουσίαζαν ίδια εικόνα με τα ομογενοποιημένα, μας προβλημάτισε έντονα, καθώς περιμέναμε να δούμε διαφορές, κυρίως λόγω του σίγουρα μικρότερου (τόσο σε ποσότητα, όσο και σε πολυπλοκότητα) πρωτεϊνικού περιεχομένου της μεσόφασης. Άλλωστε, εικόνες ηλεκτροφορημάτων του πρωτεϊνικού περιεχομένου απομονωμένων βλεννοκυστών από το μεταλλαγμένο στέλεχος MN173 [111], που διαθέτει κανονικά βλεννοκύστες αλλά δεν μπορεί να τις προσδέσει στη μεμβράνη, έδειχναν την ύπαρξη σχετικά λίγων ζωνών κυρίως χαμηλού μοριακού βάρους (κάτω από 40 kDa). Έτσι, γεννήθηκε η απορία μήπως αυτό που συμβαίνει είναι η επιμόλυνση της μεσόφασης, κατά τη διαδικασία παραλαβής της από την επιφάνεια επαφής με τα ιζηματοποιημένα κύτταρα, ή ακόμη χειρότερα, λύση των κυττάρων κατά την επίδραση με διβουκαΐνη και στη συνέχεια, ανάμιξη του περιεχομένου τους με την μεσόφαση. Βέβαια, αυτό απλώς ήταν μία σκέψη, καθώς είχαμε δει ότι αν τα κύτταρα σπασούν με την επίδραση διβουκαΐνης, το υπερκείμενο είναι τελείως θολό και δεν μπορούμε να το διαχωρίσουμε από την μεσόφαση. Ακόμη, από το σχήμα 6.9 μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι η όξινη φωσφατάση δεν έχει σε όλα τα κλάσματα την ίδια ειδική δραστηριότητα, κάτι που θα συνέβαινε αν τα κύτταρα έσπαγαν ή επιμολυνόταν η μεσόφαση με ίζημα κυττάρων. Επίσης, οι μπάντες οι οποίες βλέπουμε στο ηλεκτροφόρημα αποτελούν τις κυριότερες σε περιεκτικότητα πρωτεΐνες της *Tetrahymena*, οπότε ίσως οι πρωτεΐνες με μικρότερη περιεκτικότητα επικαλύπτονται.

Έχοντας, λοιπόν, αυτούς τους προβληματισμούς υπόψη έπρεπε να ελέγξουμε την καθαρότητα της μεσόφασης επαναλαμβάνοντας το πείραμα της έκκρισης. Σκεφτήκαμε, βάσει προηγούμενων προκαταρκτικών πειραμάτων, ότι ένας από τους λόγους που θα μπορούσαν να σπάνε τα κύτταρα (ακόμη και σε μικρό ποσοστό) κατά την επίδραση με διβουκαΐνη, ήταν λόγω μικρής συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος διέγερσης. Το Hepes έχει βέλτιστη συγκέντρωση ως ρυθμιστικό διάλυμα σε βιολογικά δείγματα από 10 έως 25 mM και παρουσιάζει

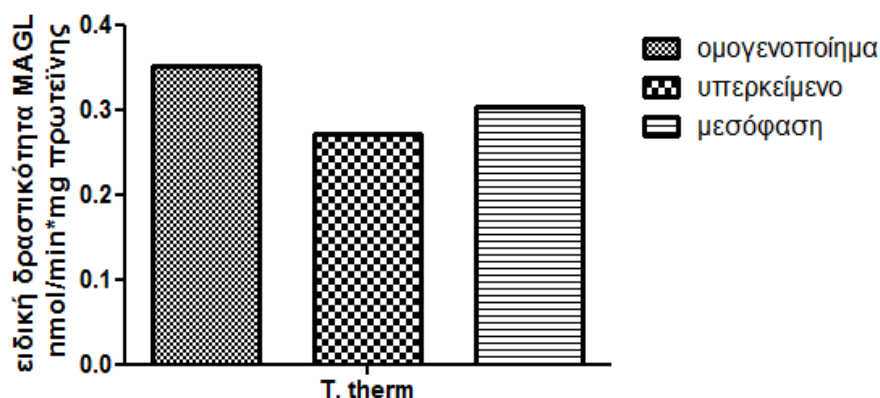
τοξικότητα άνω των 50 mM. Εμείς χρησιμοποιούσαμε το 10 mM και αποφασίσαμε να αυξήσουμε τη συγκέντρωση του στα 20 mM. Επίσης, αυτή τη φορά θα παίρναμε μόνο το άνω μέρος της μεσόφασης και πολύ προσεχτικά, ώστε να είμαστε σίγουροι ότι δεν παίρνουμε και ίζημα κυττάρων μαζί. Στη συνέχεια, μία SDS-PAGE στα κλάσματα και σύγκριση της με τις παλιές θα μας έδειχνε πως διαφοροποιείται η κατανομή των πρωτεϊνών. Ακόμη, υπολογίσαμε την ειδική δραστικότητα MAGL και όξινης φωσφατάσης, μήπως και ότι είδαμε σε προηγούμενα πειράματα οφειλόταν σε πιθανή επιμόλυνση.



Σχήμα 6.16: Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε ομογενοποίηση, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιέργειας *T. thermophila* μετά από επαγωγή έκκρισης με χρήση διβουκαΐνης. Το thermομογ Ο.Δ. αντιστοιχεί σε ομογενοποίηση *T. thermophila* από καλλιέργεια που δεν έχει υποστεί επίδραση με διβουκαΐνη. Φαίνονται σημειωμένα τα μοριακά βάρη των προτύπων πρωτεϊνών σε kDa. Σε κάθε θέση βρίσκονται 25 μg πρωτεΐνης.

Βλέπουμε λοιπόν, στο σχήμα 6.16, ότι ύστερα από τις αλλαγές που πραγματοποιήσαμε στην πειραματική διαδικασία, δηλαδή αλλαγή στη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος διέγερσης και αλλαγή στον τρόπο παραλαβής της μεσόφασης, το ηλεκτροφόρημα δεν άλλαξε μορφή σε σχέση με αυτό του σχήματος 6.15. Δηλαδή, η μεσόφαση και πάλι παρουσιάζει σχεδόν ίδια κατανομή ζωνών με το ομογενοποίηση, ενώ στο υπερκείμενο υπάρχει διαφορά

στην ένταση σε αρκετές ζώνες. Ακόμη, τρέξαμε δοκιμαστικά και ένα ομογενοποίημα της *T. thermophila* στο οποίο δεν είχε γίνει επίδραση με διβουκαΐνη. Το ομογενοποίημα αυτό δεν παρουσιάζει καμία μεταβολή σε σχέση με αυτό που προήλθε μετά την έκκριση, κάτι που επιβεβαιώνει ότι με την ηλεκτροφόρηση δεν μπορούμε να δούμε μικροδιαφορές στη σύσταση των κλασμάτων.

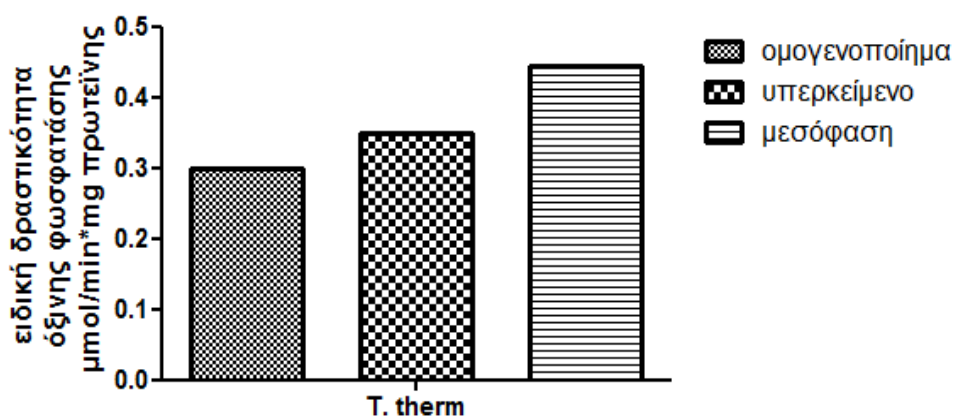


Σχήμα 6.17: Ειδική δραστηριότητα MAGL σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιέργειας *T. thermophila* μετά από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη (παρουσία αναστολέα AM374). Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο διπλών δειγμάτων από ένα πείραμα.

Υπολογίζοντας, λοιπόν, την ειδική δραστηριότητα της MAGL στα κλάσματα που παραλάβαμε μετά τις αλλαγές στη πειραματική πορεία της έκκρισης (σχήμα 6.17), βρίσκουμε τιμή παρόμοια με το ομογενοποίημα, κάτι που συμφωνεί με τα προηγούμενα πειράματα που απεικονίζονται στο σχήμα 6.13. Άρα λοιπόν, μπορούμε να πούμε ότι η δραστηριότητα της MAGL είναι χαρακτηριστική για τη μεσόφαση που σχηματίζεται κατά την έκκριση και δεν οφείλεται σε επιμόλυνση από τα κύτταρα του ιζήματος είτε λόγω της επαφής τους με αυτή, είτε λόγω λύσης τους.

Στο σχήμα 6.18 βλέπουμε ότι τα κλάσματα που πήραμε ύστερα από τις πειραματικές τροποποιήσεις, δεν παρουσιάζουν κάποια μεταβολή στην ειδική δραστηριότητα της όξινης φωσφατάσης σε σχέση με τα παλαιότερα πειραματικά (βλέπε σχήμα 6.9). Συγκεντρωτικά λοιπόν, από τα σχήματα 6.16, 6.17 και 6.18, βλέπουμε ότι οι πειραματικές τροποποιήσεις με σκοπό να πάρουμε πιο καθαρή μεσόφαση χωρίς το φόβο πιθανής επιμόλυνσης, δεν έφεραν αλλαγές ούτε στη μορφή του ηλεκτροφορήματος, ούτε στην ειδική δραστηριότητα της MAGL και της

όξινης φωσφατάσης. Άρα, η υπόθεση μας ότι τα κύτταρα σπάνε και επιμολύνουν τη μεσόφαση, μπορεί να απορριφθεί με αρκετή σιγουριά και να συνεχίσουμε κανονικά τη μεθοδολογία μας, όπως την κάναμε μέχρι τώρα.



Σχήμα 6.18: Ειδική δραστηριότητα όξινης φωσφατάσης σε ομογενοποίημα, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιέργειας *T. thermophila* μετά από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο διπλών δειγμάτων από ένα πείραμα.

6.2.6 Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα της MAGL JZL184 στο μεταβολισμό της 2-OG σε κλάσματα καλλιεργειών *T. thermophila* που παραλήφθηκαν μετά από διέγερση με διβουκαΐνη.

Στη παράγραφο 6.2.4 βρέθηκε η άμεση συμμετοχή της FAAH στην υδρόλυση της 2-ελαυλογλυκερόλης από κλάσματα καλλιεργειών *T. thermophila* που παραλάβαμε με επίδραση διβουκαΐνης, μέσω της χρήσης του ειδικού αναστολέα της AM374, οπότε και αναφέρθηκε ότι το υπόλοιπο της υδρόλυσης οφείλεται στη δράση της MAGL. Αυτό όμως, έπρεπε να πιστοποιηθεί και πειραματικά με χρήση κάποιου εξειδικευμένου αναστολέα της MAGL, ώστε να αποδειχθεί η συμμετοχή της στην υδρόλυση της 2-OG.

Η αναζήτηση κατάλληλου αναστολέα MAGL για τα πειράματά μας ήταν μία δύσκολη υπόθεση, καθώς οι περισσότεροι από τους γνωστούς αναστολείς της ανέστειλαν και τη FAAH, λόγω της παρόμοιας δομής του καταλυτικού κέντρου τους. Για παράδειγμα, ο πιο καλά χαρακτηρισμένος αναστολέας της MAGL, URB602 έχει περίπου παρόμοια εξειδίκευση για τα δύο ένζυμα, ενώ ο δεύτερος πιο γνωστός, NAM, είναι μη ειδικός και μπορεί να αλληλεπιδρά με κυστεΐνες διάφορων πρωτεϊνών [95]. Έτσι, στραφήκαμε στην αγορά ενός πρόσφατα

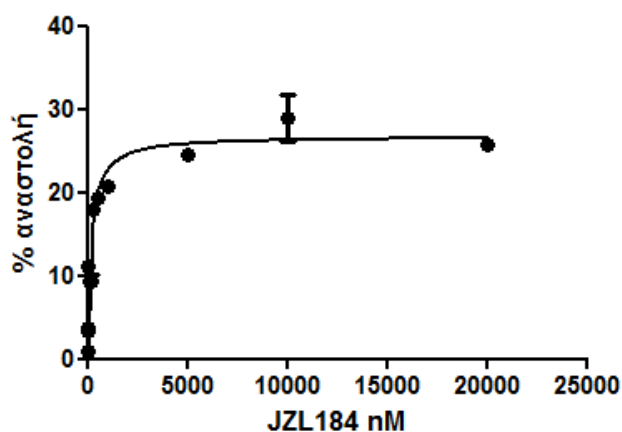
συντεθειμένου αναστολέα της MAGL, του JZL184. Για αυτόν έχει αναφερθεί, μέσω πειραμάτων σε εγκέφαλο ποντικών, μεγάλη εξειδίκευση για τη MAGL σε σχέση με τη FAAH καθώς και ισχυρή αναστολή [95]. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας υπόστρωμα 2-αραχιδονύλογλυκερόλη (το ενδογενές υπόστρωμα της MAGL) βρέθηκε αναστολή της υδρόλυσης της μέχρι 85% και IC_{50} 8 nM, ενώ για υπόστρωμα ελαυλαμίδιο (ένα από τα βασικά υποστρώματα της FAAH), η αναστολή έφτασε το 70% με IC_{50} τα 4 μ M. Δηλαδή, φαίνεται μία δεκαπλάσια προτίμηση του αναστολέα αυτού για τη MAGL σε σχέση με τη FAAH.

Ο αναστολέας JZL184 έχει χρησιμοποιηθεί και σε αιμοπετάλια κουνελιού με υπόστρωμα 2-OG (αδημοσίευτα αποτελέσματα της ομάδας μας) και βρέθηκε ότι για μικρές συγκεντρώσεις του (5 – 150 nM) η αναστολή αυξάνεται απότομα και πιάνει ένα μέγιστο 60% που διατηρείται από τα 60 έως τα 100 nM. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του (έως 10 μ M) εντοπίζεται και ένα δεύτερο πλάτω στο 80% αναστολής. Τα πρώτο μέγιστο αναστολής πιθανώς αφορά αναστολή μόνο της MAGL, ενώ το δεύτερο MAGL και FAAH ταυτόχρονα.

Προτού, όμως, δούμε πως επηρεάζει ο αναστολέας JZL184 την υδρόλυση της 2-ελαυλογλυκερόλης στα κλάσματα που πήραμε με επαγωγή έκκρισης μέσω διβουκαΐνης, πρέπει να δούμε πια η συμπεριφορά του σε ένα ομογενοποίημα *T. thermophila* το οποίο δεν έχει υποστεί άλλες κατεργασίες. Αυτό είναι σημαντικό, καθώς ο αναστολέας φτιάχτηκε με βάση την δομή της MAGL των θηλαστικών, οπότε δεν ξέρουμε ούτε αν θα δράσει ειδικά, δηλαδή αν αναστείλει μόνο την MAGL, ούτε ποια αναστολή προκαλεί. Ένα πρώτο βήμα είναι η κατασκευή καμπύλης αναστολής συναρτήσεως της συγκέντρωσης του αναστολέα. Επιλέξαμε να ξεκινήσουμε από μικρές συγκεντρώσεις (κοντά στο IC_{50} για την 2-αραχιδονυλογλυκερόλη) και πήγαμε μέχρι πολύ μεγάλες (εύρος από 5 nM μέχρι 100 μ M). Η πορεία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 5.10.

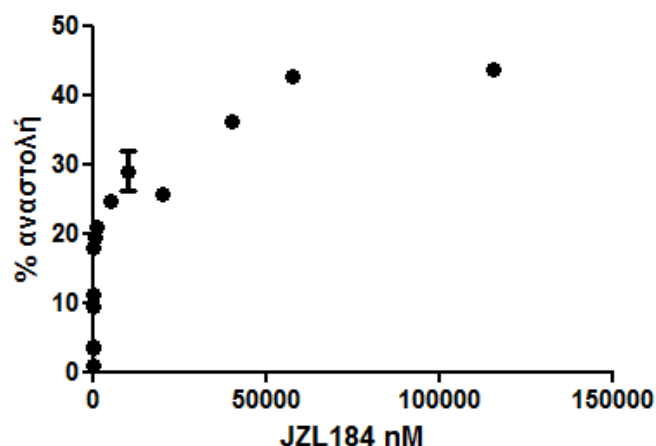
Η χρήση του αναστολέα JZL184 σε συγκεντρώσεις από 5 nM έως 20 μ M δίνει την καμπύλη αναστολής που φαίνεται στο σχήμα 6.19. Σε αυτή εμφανίζεται μέγιστη αναστολή 26,7%, με IC_{50} 33,3 nM και $R^2=0,9182$. Η μέγιστη αναστολή είναι πολύ μικρή σε σχέση με τη μέγιστη αναστολή που δινόταν βιβλιογραφικά για τη MAGL του εγκέφαλου των ποντικών (~85%). Αντίθετα, το IC_{50} πλησιάζει αυτό των θηλαστικών που είχε βρεθεί στα 8 nM. Η συμμετοχή όμως της FAAH στην

υδρόλυση της 2-OG στα ομογενοποιημένα καλλιέργειών *T. thermophila* ήταν ~30%, όπως διαπιστώθηκε με χρήση του ειδικού αναστολέα της FAAH AM374 σε παλαιότερα πειράματα της ομάδας μας, υποδεικνύοντας ότι η MAGL συμμετέχει σε ποσοστό ~70% [110]. Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη άλλου υδρολυτικού ενζύμου ή παραπάνω από ενός ισομορφών του ενζύμου της MAGL στη *Tetrahymena* που δεν αναστέλλονται όλες κατά τον ίδιο τρόπο. Η ύπαρξη ισομορφών της MAGL ενισχύεται και από τη βιοπληροφορική μελέτη του γονιδίου της [110]. Σύμφωνα με αυτή, η σύγκριση του γονιδίου της ανθρώπινης MAGL με το γονιδίωμα της *T. thermophila* αποκάλυψε την ύπαρξη τριών πιθανών γονιδίων της MAGL και βρέθηκε ότι και τα τρία μπορούν να εκφράζονται σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης.



Σχήμα 6.19: Καμπύλη αναστολής υδρόλυσης 2-OG, συναρτήσει διαφόρων συγκεντρώσεων του JZL184 (εύρος συγκεντρώσεων 5 nM – 20 μM) σε ομογενοποιημένο κυττάρων *T. thermophila*. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο διπλών δειγμάτων από τρία διαφορετικά πειράματα.

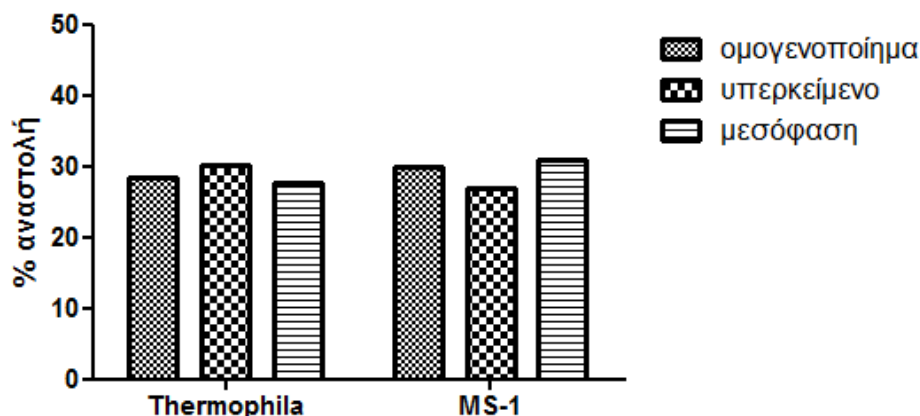
Επόμενο βήμα, ήταν να εξετάσουμε την επίδραση ακόμη μεγαλύτερων συγκεντρώσεων αναστολέα JZL184 στο μεταβολισμό της 2-OG σε ομογενοποιημένο κυττάρων *T. thermophila*. Στο σχήμα 6.20 διακρίνουμε το πρώτο πλατώ αναστολής που είδαμε και στο σχήμα 6.19 στο ~26%. Μετά τα 25 μM φαίνεται να υπάρχει μία νέα άνοδος της αναστολής, η οποία πιάνει πλατώ μετά τα 50 μM κοντά στο 42%. Η αναστολή ούτε σε αυτή την περίπτωση πλησιάζει την αντίστοιχη των θηλαστικών, ενώ η παρουσία δεύτερου πλατώ δείχνει πιθανή αναστολή της FAAH από τον αναστολέα αυτόν σε μεγάλες συγκεντρώσεις.



Σχήμα 6.20: Καμπύλη αναστολής υδρόλυσης 2-OG, συναρτήσει διαφόρων συγκεντρώσεων του JZL184 (εύρος συγκεντρώσεων 5 nM – 115 μM) σε ομογενοποίηση κυττάρων *T. thermophila*. Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο διπλών δειγμάτων από τρία διαφορετικά πειράματα.

Έχοντας δει, λοιπόν, από τα παραπάνω σχήματα την συμπεριφορά του JZL184 στην αναστολή της MAGL στο ομογενοποίημα της *T. thermophila* που είχαμε παραλάβει χωρίς διέγερση έκκρισης, θελήσαμε να εξακριβώσουμε την συμπεριφορά του στα κλάσματα που πήραμε μετά από επαγωγή έκκρισης με διβουκαΐνη, δηλαδή στο ομογενοποίημα, στο υπερκείμενο και στην μεσόφαση καλλιιεργειών *T. thermophila* και *T. MS-1*. Η χρήση του αναστολέα στα κλάσματα αυτά μπορεί να μας βοηθήσει στην εξακρίβωση του αν υπάρχουν διαφορετικές ισομορφές της MAGL με εξειδίκευση στην έκκριση. Χρησιμοποιήσαμε λοιπόν συγκέντρωση JZL184 10 μM που φαίνεται από το σχήμα 6.19 να δίνει μέγιστη αναστολή MAGL, χωρίς πιθανή αναστολή της FAAH.

Στο σχήμα 6.21 βλέπουμε ότι όλα τα κλάσματα και από τα δύο στελέχη παρουσιάζουν αναμενόμενη συμπεριφορά, παρουσία του αναστολέα JZL184 και η αναστολή είναι μεταξύ 27 και 31 %, δηλαδή στο μέγιστο της καμπύλης του σχήματος 6.19 και συμφωνεί με την τιμή που παίρναμε για αυτή την συγκέντρωση αναστολέα σε ομογενοποίημα *T. thermophila* που πήραμε χωρίς επίδραση με διβουκαΐνη. Άρα, με χρήση του αναστολέα δεν καταφέραμε να δούμε κάποια πιθανή εκλεκτική έκκριση ισομορφής της MAGL που να μην αναστέλλεται ή να αναστέλλεται ισχυρότερα.



Σχήμα 6.21: Ποσοστιαία αναστολή υδρόλυσης 2-OG 2 μM , από JZL184 10 μM σε ομογενοποίημα, υπερκειμένο και μεσόφαση καλλιεργειών *T. thermophila* και *T. MS-1* μετά από επίδραση με διβουκαΐνη. Τα αποτελέσματα αποτελούν τον μέσο όρο διπλών δειγμάτων από ένα πείραμα.

6.2.7 Ταυτοποίηση FAAH και MAGL στα κλάσματα που παραλήφθηκαν με επίδραση διβουκαΐνης με χρήση αντισωμάτων.

Όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 6.2.4, ανιχνεύσαμε δραστικότητα MAGL και FAAH στα κλάσματα που παραλάβαμε μετά από επίδραση με διβουκαΐνη, τόσο σε καλλιέργειες *T. thermophila* όσο και καλλιέργειες *T. thermophila* MS-1. Έτσι λοιπόν, αποφασίσαμε να ταυτοποιήσουμε τα ένζυμα στα ομογενοποιημένα, υπερκειμένα και μεσοφάσεις της έκκρισης με χρήση της τεχνικής της ανοσοαποτύπωσης.

Συνοπτικά, παραλαμβάνονται τα κλάσματα της έκκρισης μετά από επίδραση με διβουκαΐνη, όπως περιγράφηκε στη παράγραφο 5.7, ακολουθεί προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και προετοιμάζονται δείγματα που περιέχουν 50 μg πρωτεΐνης, τα οποία και υποβάλλονται σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (βλέπε παρ. 5.11). Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επωάζονται με πρώτο και δεύτερο αντίσωμα, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.12. Ακολουθεί εμφάνιση σε φιλμ με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

Η FAAH των θηλαστικών είναι ένα διμερές διαμεμβρανικό ένζυμο και εντοπίζεται κυρίως σε ενδοκυτταρικές μεμβράνες, όπως στα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο [89]. Το μοριακό βάρος του ενζύμου έχει προσδιοριστεί στα 63-67 kDa [112]. Παλαιότερα πειράματα της ομάδας μας έχουν δείξει ότι στη

Tetrahymena, επίσης εντοπίζεται κυρίως σε μεμβρανικά κλάσματα και πειράματα ανοσοαποτύπωσης έδειξαν την ύπαρξη μιας ανοσοδραστικής ζώνης στα 66 kDa [102].

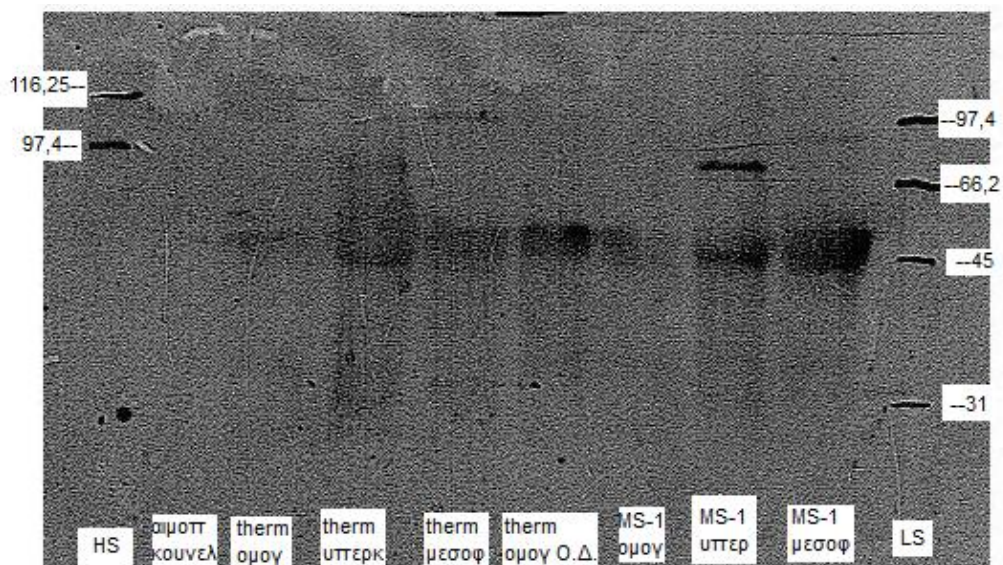
Για την ταυτοποίηση της FAAH στα κλάσματα που πήραμε μετά τη διέγερση με διβουκαΐνη, χρησιμοποιήσαμε ένα πολυκλωνικό αντίσωμα της Abcam, ανεπτυγμένο σε ποντικό έναντι της αμινοξικής αλληλουχίας 480-580 του γονιδίου του ανθρώπου, σε αναλογία 1:1000. Το δεύτερο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανεπτυγμένο σε κατσικά έναντι των IgG του ποντικού. Το πείραμα δεν αποκάλυψε την ύπαρξη κάποιας ανοσοδραστικής ζώνης, κάτι όμως που έχει διαπιστωθεί και στο παρελθόν για αυτό το αντίσωμα [110].

Η MAGL των θηλαστικών είναι, όπως και η FAAH ένα διμερές ένζυμο [94], με μοριακό βάρος 33 kDa [85], και εντοπίζεται υποκυτταρικά σε κυτοσολικά και μεμβρανικά κλάσματα [92]. Πειράματα της ομάδας μας έχουν δείξει την ύπαρξη της σε αιμοπετάλια κουνελιού με χρήση ανοσοαποτύπωσης και το μοριακό της βάρος ήταν στα 33 kDa [113]. Στην *Tetrahymena* έχει εντοπιστεί τόσο σε μεμβρανικά, όσο και σε κυτοσολικά κλάσματα [103] και μάλιστα, στο κυτοσολικό κλάσμα βρέθηκε η ύπαρξη μιας διπλής ανοσοδραστικής ζώνης με 40 και 45 kDa, υποδεικνύοντας την ύπαρξη δύο ισομορφών. Η ζώνη των 45 kDa εντοπίστηκε και στο μεμβρανικό κλάσμα. Ακόμη, η MAGL έχει εντοπιστεί και σε μέσο ασιπίας κυττάρων *T. thermophila*, δίνοντας μία ανοσοδραστική ζώνη στα ~40 kDa, ενώ η ζώνη των ~45 kDa δεν ήταν παρούσα, δείχνοντας ότι από τις δύο ισομορφές της MAGL η μία είναι αυτή που εκκρίνεται στο μέσο με ιδιосуστατικό τρόπο.

Για την ταυτοποίηση της MAGL στα κλάσματα που πήραμε μετά τη διέγερση με διβουκαΐνη, χρησιμοποιήσαμε ένα πολυκλωνικό αντίσωμα της Abcam, ανεπτυγμένο σε κοτόπουλο έναντι της αμινοξικής αλληλουχίας 1-121 του γονιδίου του ανθρώπου, σε αναλογία 1:1000 και 1:2000. Το δεύτερο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ανεπτυγμένο σε κατσικά έναντι των IgY του κοτόπουλου. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα ελέγχου τα αιμοπετάλια κουνελιού.

Το ανοσοαποτύπωμα που προέκυψε χρησιμοποιώντας το αντίσωμα σε αναλογία 1:2000 φαίνεται στο σχήμα 6.22. Σε αυτή την συγκέντρωση, τα αιμοπετάλια κουνελιού που χρησιμοποιήθηκαν σαν θετικό δείγμα ελέγχου δεν έδειξαν κάποια

σύνδεση, όμως στη μεγαλύτερη (1:1000) αποκαλύφθηκε μία διπλή ανοσοδραστική ζώνη στα ~35 kDa, που αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της MAGL των θηλαστικών. Στη πυκνή συγκέντρωση του πρώτου αντισώματος, όμως, υπήρχε πολύ θόρυβος στα κλάσματα της *Tetrahymena*, γι' αυτό μειώσαμε τη συγκέντρωση σε 1:2000. Στο ανοσοαποτύπωμα του σχήματος 6.22 φαίνεται η ύπαρξη μιας κοινής ανοσοδραστικής ζώνης, σε μοριακό βάρος ~45 kDa, σε όλα τα κλάσματα της *T. thermophila* και MS-1, που παραλήφθηκαν με επίδραση διβουκαΐνης, επιβεβαιώνοντας έτσι τα ευρήματα από τα πειράματα ενζυμικής δραστηριότητας για τις μεσοφάσεις και τα υπερκείμενα που έδειξαν την ύπαρξη δραστηριότητας MAGL σε αυτά τα κλάσματα (βλέπε παρ. 6.2.4).



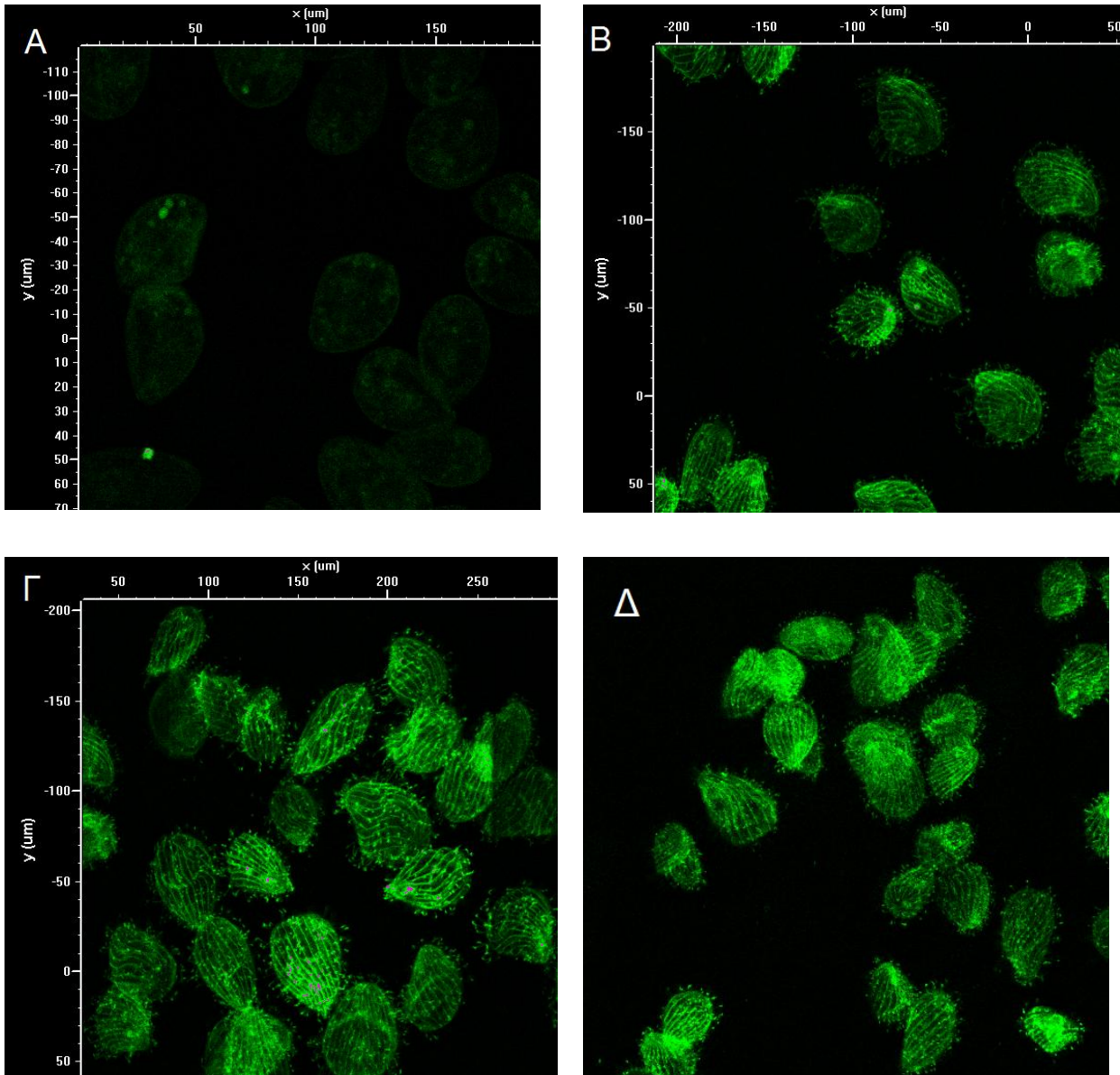
Σχήμα 6.22: Ανοσοαποτύπωμα της MAGL σε ομογενοποίηση, υπερκείμενο και μεσόφαση καλλιέργειών *T. thermophila* και *T. MS-1* μετά από επαγωγή έκκρισης με χρήση διβουκαΐνης. Το therm ομογ Ο.Δ. αντιστοιχεί σε ομογενοποίηση *T. thermophila* από καλλιέργεια που δεν έχει υποστεί επίδραση με διβουκαΐνη. Φαίνονται σημειωμένα τα μοριακά βάρη των προτύπων πρωτεϊνών σε kDa.

6.3 Υποκυτταρικός εντοπισμός της MAGL με χρήση μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού

Μέχρι στιγμής, διαπιστώσαμε την παρουσία της MAGL στο εκκρινόμενο περιεχόμενο των βλεννοκυστών με πειράματα ενζυμικής δραστηριότητας (παρ. 6.2.4), καθώς με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης (παρ. 6.2.7). Επόμενο λογικό βήμα ήταν η προσπάθεια ανίχνευσης της στο εσωτερικό του κυττάρου και, για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε η χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού.

Προτού όμως χρησιμοποιηθεί αυτή η μέθοδος για την ανίχνευση της MAGL, είναι απαραίτητο να ελεγχθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κύτταρα *T. thermophila*.

6.3.1 Έλεγχος της μεθόδου



Σχήμα 6.23: Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας κυττάρων *T. thermophila* με χρήση αντισώματος έναντι β-τουμπουλίνης (B), (Γ), (Δ). Η (A) εικόνα αποτελεί δείγμα ελέγχου με χρήση μόνο δευτέρου αντισώματος.

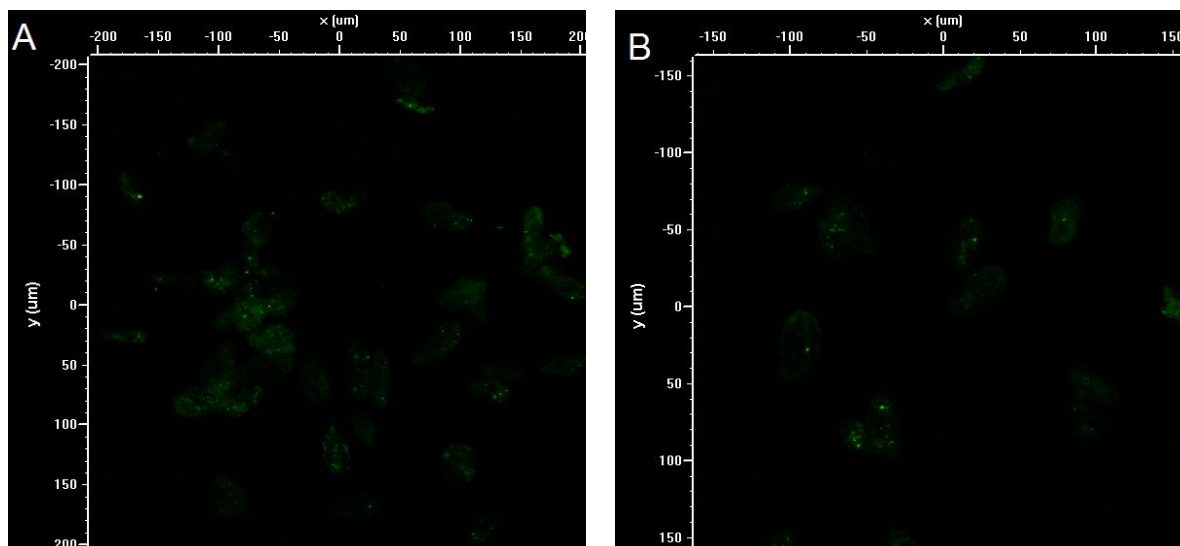
Για τον έλεγχο της μεθόδου της μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού σε κύτταρα *T. thermophila* χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη ελέγχου η β-τουμπουλίνη που αποτελεί βασικό συστατικό των μικροσωλινίσκων και βρίσκεται σε αφθονία στο κύτταρο

[114]. Η πορεία που ακολουθήθηκε περιγράφηκε αναλυτικά στην παράγραφο 5.14. Για την ανίχνευση της τουμπουλίνης χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πρώτα αντισώματα, το T4026 σε αναλογία 1:150 και το T3526 σε αναλογία 1:200, σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Τα αντίστοιχα δεύτερα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν και στις δύο περιπτώσεις σε συγκέντρωση 1:250. Το T4026, που ήταν κατασκευασμένο ειδικά για πειράματα ανοσοφθορισμού, έδωσε πολύ ωραίες εικόνες της κατανομής των μικροσωλινίσκων στην επιφάνεια του κυττάρου, όπως φαίνεται στο σχήμα 6.23. Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση των σειρών των βλεφαρίδων του κυττάρου, βασικό συστατικό των οποίων είναι και η β-τουμπουλίνη. Αντίθετα, το δείγμα ελέγχου έδειξε χαμηλά επίπεδα σήματος που ήθελαν ιδιαίτερη ενίσχυση για να ανιχνευτούν, χωρίς κάποια συγκεκριμένη κατανομή. Με αυτά τα αποτελέσματα διαπιστώσαμε ότι η τεχνική λειτουργεί καλά στα κύτταρα της *T. thermophila* και προχωρήσαμε σε χρησιμοποίηση αντισώματος έναντι MAGL.

6.3.2 Ανίχνευση της MAGL

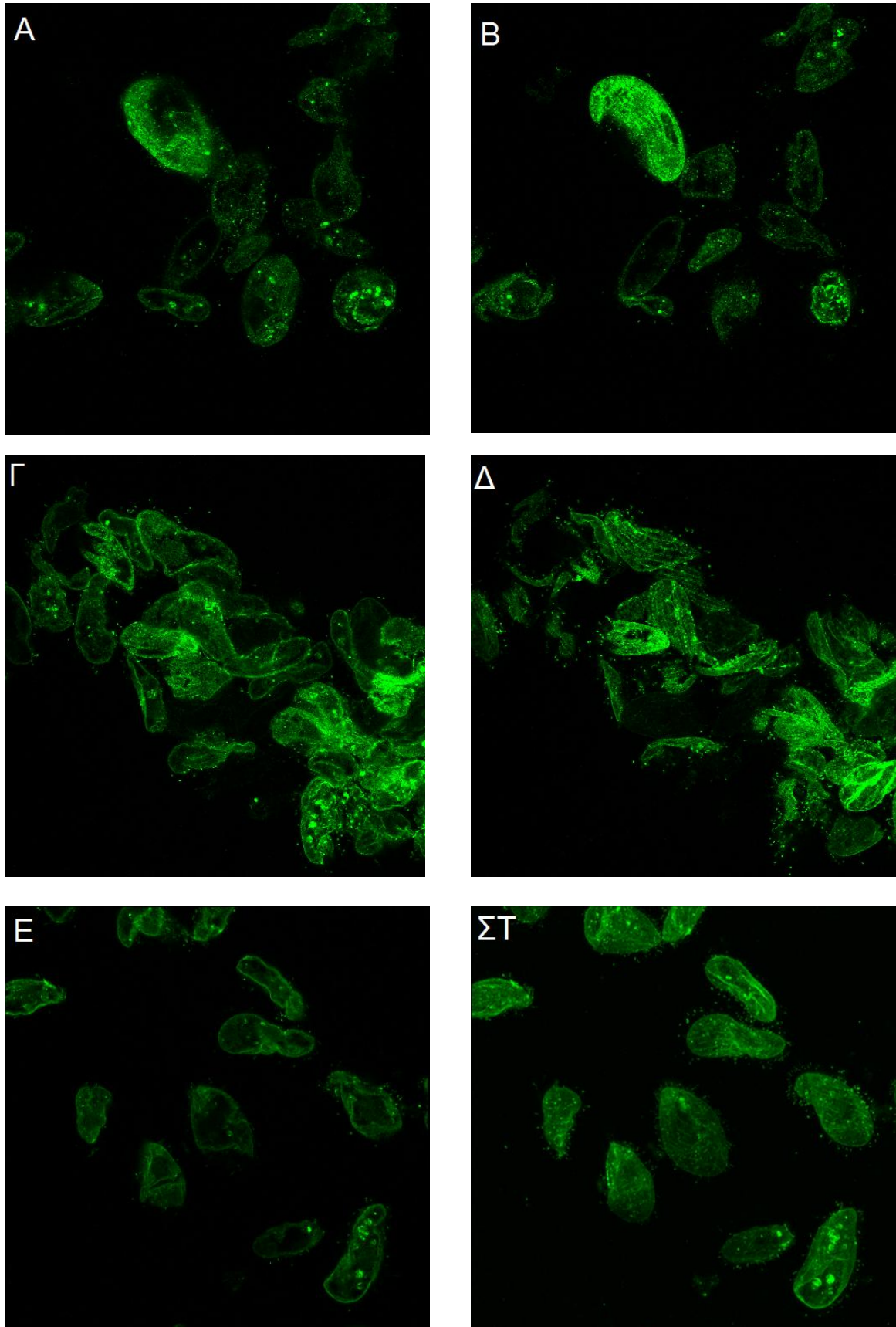
Για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της MAGL σε κύτταρα *T. thermophila* με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε η πορεία που περιγράφηκε στη παράγραφο 5.14, κατ' αντίστοιχο τρόπο με τον εντοπισμό της β-τουμπουλίνης (παρ. 6.3.1). Το αντίσωμα που επιλέχθηκε ήταν το ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της MAGL στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης και τα μονιμοποιημένα κύτταρα επωάστηκαν σε 3 διαφορετικές αναλογίες σε αυτό: 1:200, 1:100 και 1:50, ενώ το δεύτερο αντίσωμα ήταν σε όλες τις περιπτώσεις σε αναλογία 1:250. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα ελέγχου που περιείχε μόνο το δεύτερο για να εξεταστεί η περίπτωση ο φθορισμός που ανιχνεύτηκε να οφείλεται σε μη ειδική σύνδεση του δεύτερου αντισώματος.

Οι φωτογραφίες του σχήματος 6.24 δείχνουν ότι το δεύτερο αντίσωμα που επιλέχθηκε για την ανίχνευση της MAGL δίνει, απουσίας του αντισώματος έναντι MAGL, πολύ χαμηλή ένταση φθορισμού ανάλογη αυτής του δείγματος ελέγχου της β-τουμπουλίνης (σχήμα 6.23). Άρα, δεν συνδέεται μη ειδικά με τα κύτταρα, ή έστω, συνδέεται σε πολύ μικρό ποσοστό και είναι κατάλληλο περαιτέρω πειράματα.



Σχήμα 6.24: Φωτογραφίες σενεστιακής μικροσκοπίας κυττάρων *T. thermophila* ύστερα από επώαση με δεύτερο αντίσωμα ανεπτυγμένο σε κασίκα έναντι των IgY του κοτόπουλου, απουσία αντισώματος έναντι MAGL.

Η χρήση του αντισώματος της MAGL σε διάφορες αραιώσεις έδωσε τις φωτογραφίες που φαίνονται στο σχήμα 6.25. Για κάθε αραιώση επιλέχθηκε μία φωτογραφία που διακρίνεται η επιφάνεια των κυττάρων (B, Δ, ΣΤ) και μία φωτογραφία που διακρίνεται το εσωτερικό τους (A, Γ, Ε). Τα επίπεδα φθορισμού που ανιχνεύτηκαν ήταν σημαντικά μεγαλύτερα από τα δείγματα ελέγχου του σχήματος 6.24. Σε κάθε περίπτωση, η MAGL εντοπίζεται σε περιοχές κοντά στη μεμβράνη, ακολουθώντας το περίγραμμα του κυττάρου (περικυτταρικός εντοπισμός), κατά τρόπο που θυμίζει την οργάνωση των σειρών των βλεφαρίδων του. Παρόμοια κατανομή, όμως, παρουσιάζουν και οι σειρές των βλεννοκυστών που βρίσκονται κοντά αλλά κάτω από την πλασματική μεμβράνη [2], στις οποίες έχει εντοπιστεί σημαντικό ποσοστό της ολικής δραστηριότητας αυτού του ενζύμου (παρ. 6.2.4). Αραιή χρώση φαίνεται επίσης στο κυτοσόλιο του κυττάρου, ενώ το αντίσωμα δεν φαίνεται να έχει εισέλθει καθόλου στον πυρηνικό φάκελο, όπως διακρίνεται από το μεγάλο κύτταρο της φωτογραφίας A. Τα στίγματα που διακρίνονται στο εξωτερικό των κυττάρων (πιο χαρακτηριστικά στη φωτογραφία ΣΤ) εικάζεται ότι πρόκειται για MAGL προερχόμενη από εξωκυτωμένες βλεννοκύστες, το περιεχόμενο των οποίων παγιδεύτηκε κοντά στις βλεφαρίδες και δεν απομακρύνθηκε πλήρως με τις εκπλύσεις.



Σχήμα 6.25: Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας κυττάρων *T. thermophila* με χρήση αντισώματος έναντι MAGL. Αραιώσεις: (Α), (Β) 1:200, (Γ), (Δ) 1:100, (Ε), (ΣΤ) 1:50.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα είναι ένα ενδογενές σηματοδοτικό σύστημα που περιλαμβάνει τους κανναβινοειδείς υποδοχείς, τα ενδοκανναβινοειδή, δηλαδή τα ενδογενή σηματοδοτικά μόρια που αποτελούν τους αγωνιστές αυτών των υποδοχέων και ένα σύνολο πρωτεϊνών μεταφορέων, καθώς και βιοσυνθετικών και αποικοδομητικών ενζύμων. Τα κυριότερα ενδοκανναβινοειδή είναι η N-αραχιδονυλοαιθανολαμίνη ή ανανταμίδιο (AEA) [63] και 2-αραχιδονυλογλυκερόλη (2-AG) [65]. Κύριο ένζυμο αποικοδόμησης του AEA είναι η αμιδοϋδρολάση των λιπαρών οξέων (FAAH) [89] και της 2-AG η λιπάση των μονοακυλογλυκερολών (MAGL) [85], αλλά και η FAAH [84]. Το σύστημα αυτό παρουσιάζει μία πλειοτροπική δράση στον εγκέφαλο ρυθμίζοντας με παλίνδρομο τρόπο την απελευθέρωση διαφόρων νευροδιαβιβαστών [89]. Επίσης, έχει αναφερθεί η συμμετοχή του σε παθολογικές καταστάσεις.

Η *Tetrahymena* αποτελεί ένα χρήσιμο μονοκύτταρο οργανισμό-μοντέλο για μελέτη βιολογικών διεργασιών, καθώς διαθέτει δομική και λειτουργική πολυπλοκότητα, ανάλογη με αυτή των κυττάρων του ανθρώπου και άλλων μεταζώων. Διαθέτει ένα περίπλοκο σύστημα κυκλοφορίας μεμβρανών που περιλαμβάνει δύο καλά χαρακτηρισμένες πορείες έκκρισης, την ιδιοσυστατική έκκριση λυσοσωματικών ενζύμων [42] και τη ρυθμιζόμενη έκκριση βλεννοκυστών [51], ενώ υπάρχουν ενδείξεις και για άλλο μονοπάτι συνεχούς έκκρισης [57].

Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα έχει μελετηθεί εκτενώς στη *Tetrahymena* από το εργαστήριο μας. Συγκεκριμένα, έχει χαρακτηριστεί η FAAH [102], και έχει βρεθεί ότι εκκρίνεται σε μέσο ασιτίας κυττάρων *T. pyriformis* [101], ενώ επίσης έχει χαρακτηριστεί η MAGL σε κύτταρα *T. thermophila* [103]. Ακόμη, στη *T. thermophila* ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν N-ακυλοαιθανολαμίνες και 2-ακυλογλυκερόλες, ανάμεσα τους το AEA, η 2-AG και η 2-OG και πιστοποιήθηκε ότι αυτές οι N-ακυλοαιθανολαμίνες αποτελούν υποστρώματα της FAAH της *Tetrahymena* [104].

Στα θηλαστικά τα ένζυμα MAGL και FAAH είναι ενδοκυτταρικά, ενώ στην *Tetrahymena* είχαμε σοβαρές ενδείξεις ότι η FAAH κάτω από ορισμένες συνθήκες εκκρίνεται [101]. Είναι άλλωστε γνωστό ότι ο μονοκύτταρος αυτός οργανισμός

εκκρίνει σημαντικό αριθμό ενζύμων [42]. Με αυτά τα δεδομένα αντικείμενο της παρούσας εργασίας ορίστηκε η μελέτη της έκκρισης της MAGL καθώς και της FAAH σε διάφορες συνθήκες. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *T. thermophila*, στο οποίο έγινε η χαρτογράφηση του γονιδιώματος του, καθώς και το μεταλλαγμένο στέλεχος *T. thermophila* MS-1 το οποίο αδυνατεί να εκκρίνει λυσοσωματικά ένζυμα στο μέσο καλλιέργειας, τόσο σε συνθήκες ασιτίας όσο και σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης [46].

Αρχικά, μελετήθηκε η έκκριση των ενζύμων MAGL και FAAH σε μέσο ασιτίας. Ως ένζυμο ελέγχου της εκκριτικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκε η όξινη φωσφατάση και για τον έλεγχο της ακεραιότητας των κυττάρων η μικροσκοπική παρατήρηση. Από τα αποτελέσματα μας (σχήμα 6.1) διαπιστώνουμε ότι η έκκριση της όξινης φωσφατάσης από κύτταρα *T. thermophila* σε συνθήκες ασιτίας αυξάνεται με το χρόνο, με μέγιστη ~14% μετά από 6 ώρες επώαση, ενώ διαπιστώθηκε και εμπλουτισμός του μέσου ασιτίας (σχήμα 6.2). Αντιθέτως, τα κύτταρα της MS-1 παρουσιάζουν έκκριση μικρότερη του 0,5% για όλες τις χρονικές περιόδους από 1 έως 6 ώρες, χωρίς χρονική εξάρτηση. Το πολύ μικρό ποσοστό έκκρισης μπορεί να προέρχεται από σπασμένα κύτταρα ή δευτερογενείς πηγές έκκρισης. Έτσι επιβεβαιώθηκε ότι τα κύτταρα της MS-1 δεν εκκρίνουν υδρολάσες από λυσοσώματα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κύτταρα ελέγχου για τη μελέτη της έκκρισης των ενζύμων του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος.

Για τη μελέτη της δραστηριότητας MAGL χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η 2-ελαϋλογλυκερόλη, η οποία αποτελεί υπόστρωμα και για τη FAAH [110]. Με χρήση του ειδικού αναστολέα της FAAH AM374 μπορεί να προσδιοριστεί η δραστηριότητα της MAGL και επίσης, έμμεσα, και αυτή της FAAH. Τα αποτελέσματα έδειξαν την έκκριση της MAGL σε μέσο ασιτίας κυττάρων *T. thermophila* (σχήμα 6.3). Η έκκριση εξαρτάται από το χρόνο και έχει μέγιστο 5,12% στις 4 ώρες επώασης, ενώ μετά από αυτό το διάστημα η έκκριση μειώνεται πιθανώς λόγω απενεργοποίησης ή επαναπρόσληψης του ενζύμου. Αντίθετα, η έκκριση της MAGL στην MS-1 είναι πολύ μικρότερη από αυτή στη *T. thermophila*, φτάνει στο 1% και είναι πρακτικώς αμετάβλητη μετά από δύο ώρες. Θεωρώντας ότι η μόνη διαφορά μεταξύ των στελεχών είναι η ανικανότητα έκκρισης λυσοσωματικών ενζύμων από την MS-1, διαπιστώσαμε ότι η MAGL εκκρίνεται σε ποσοστό 20-30% από πηγές εκτός λυσοσωμάτων (πίνακας 6.1), χωρίς εξάρτηση από το χρόνο της επώασης και

ενισχύοντας τις υποψίες για ένα νέο ανεξάρτητο των λυσοσωμάτων μηχανισμό συνεχούς έκκρισης.

Όσον αφορά την έκκριση της FAAH σε μέσο ασιτίας κυττάρων *T. thermophila*, όπως αυτή υπολογίζεται από την υδρόλυση της 2-OG παρουσία του AM374, βλέπουμε ότι παρουσιάζει εξάρτηση από το χρόνο της επώασης (σχήμα 6.5), με μέγιστη έκκριση 4,6% στις 4 ώρες και μετά μειώνεται κατ' ανάλογο τρόπο με τη MAGL. Μικρή χρονική εξάρτηση δείχνει να έχει η έκκριση της FAAH και στα κύτταρα της MS-1, όπου φθάνει το μέγιστο της στις 2 ώρες και διατηρείται σε αυτό το ποσοστό (~1,3%) μέχρι τις 6 ώρες. Η FAAH φαίνεται να εκκρίνεται τόσο από λυσοσωμικές όσο και από μη λυσοσωμικές πηγές με διαφορετικά ποσοστά έκκρισης από την καθημία αναλόγως του χρόνου της επώασης, με τη μη λυσοσωματική πηγή να είναι πιο έντονη σε μικρότερους χρόνους επώασης (1 και 2 ώρες), ενώ την έκκριση από τα λυσοσώματα να κυριαρχεί σε μεγαλύτερους χρόνους (πίνακας 6.2).

Η συμμετοχή της FAAH στην υδρόλυση της 2-OG τόσο σε ομογενοποιημένα όσο και στα μέσα ασιτίας ήταν μεταξύ 25-30% επιβεβαιώνοντας ότι η MAGL αποτελεί το κύριο καταβολικό ένζυμο των μονοακυλογλυκερολών (σχήμα 6.6). Μόνο στην περίπτωση του μέσου ασιτίας της MS-1 η συμμετοχή της ανήλθε στο ~50%, δείχνοντας την ενισχυμένη έκκριση της FAAH από μη λυσοσωμική πηγή σε σχέση με τη MAGL. Ακόμη, το μέσο ασιτίας της MS-1 βρίσκεται εμπλουτισμένο ως προς FAAH σε σχέση με αυτό της *T. thermophila* σε μικρές χρονικές περιόδους (1 και 2 ώρες), κάτι που δείχνει ότι η μη λυσοσωματική πηγή έκκρισης της είναι εκλεκτική προς αυτή.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας μελετήθηκε η έκκριση της MAGL και της FAAH ως απόκριση στη διέγερση με διβουκαΐνη κυττάρων *T. thermophila* και *T. thermophila* MS-1. Η διέγερση αυτή προκαλεί άμεση και πλήρη εξωκύτωση των βλεννοκυστών, εκκριτικών κοκκίων υψηλής πυκνότητας ελλιμενισμένων στη μεμβράνη, με πιθανώς προστατευτικό ρόλο για το κύτταρο [58]. Το περιεχόμενό τους μπορεί να απομονωθεί, καθώς ύστερα από φυγοκέντρηση σχηματίζει μία παχύρρευστη μεσόφαση, που περιέχει κυρίως τις πρωτεΐνες που βρίσκονται σε κρυσταλλική μορφή στο εσωτερικό των βλεννοκυστών, μεταξύ του ιζήματος των κυττάρων και ενός υπερκείμενου. Σε αυτό το υπερκείμενο εντοπίζονται υδατοδιαλυτά συστατικά των βλεννοκυστών που διαφεύγουν από τη βλέννα και πρωτεΐνες από άλλα

μονοπάτια λυσοσωματικής, ή άλλης μορφής, συνεχούς έκκρισης. Για τον έλεγχο της ακεραιότητας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η παρατήρηση με μικροσκόπιο.

Μία ποιοτική παρατήρηση που προέκυψε από το πείραμα αυτό, ήταν ότι αν και τα κύτταρα της MS-1 διαθέτουν βλεννοκύστες και συμπεριφέρονται ως προς την έκκριση τους ως κύτταρα άγριου τύπου [46], εντούτοις η μεσόφαση που σχηματιζόταν ήταν πολύ μικρότερη από την αντίστοιχη των κυττάρων της *T. thermophila*. Αυτό οφείλεται πιθανώς στο μικρότερο μέγεθος και στο λιγότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο τους από τα κύτταρα άγριου τύπου [46].

Αρχικά, διαπιστώθηκε ότι η διβουκαΐνη δεν ασκεί αναστολή στην υδρόλυση της 2-OG (σχήμα 6.7), κάτι που υποτέθηκε καθώς η διβουκαΐνη ασκεί τη δράση της αλληλεπιδρώντας με τις μεμβράνες [58], και τόσο η FAAH όσο και η MAGL έχουν εντοπιστεί σε μεμβρανικά κλάσματα. Ακόμη, ελέγχθηκε η δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης στα κλάσματα που παραλήφθηκαν με επίδραση διβουκαΐνης και βρέθηκε ότι στη *T. thermophila* μοιράζεται μεταξύ του ομογενοποιημένου και της μεσόφασης (σχήμα 6.8), με ένα μικρό ποσοστό (~11%) να βρίσκεται στο υπερκείμενο, επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα παλαιότερης εργασίας που είχαν συνδέσει τη δραστικότητα της όξινης φωσφατάσης με την εξωκύτωση των βλεννοκυστεών [55]. Αντίθετα, στην MS-1 η δραστικότητα εντοπίζεται σχεδόν πλήρως στο ομογενοποίημα (95%), με ~3,7% στη μεσόφαση και ~1,2% στο υπερκείμενο. Η διαφορά της δραστικότητας των μεσοφάσεων των δύο στελεχών οφείλεται στη διαφορά στο μέγεθος τους, καθώς η ειδική δραστικότητα των δύο κλασμάτων βρέθηκε ίδια (σχήμα 6.9), ενώ οι διαφορές των υπερκειμένων μάλλον οφείλονται στην αδυναμία έκκρισης λυσοσωματικών ενζύμων της MS-1. Η μελέτη της ειδικής δραστικότητας έδειξε επίσης τον εμπλουτισμό του ομογενοποιημένου της MS-1 σε όξινη φωσφατάση ως προς το αντίστοιχο της *T. thermophila*, δείχνοντας για άλλη μία φορά την αδυναμία έκκρισης της από πορείες ιδιοσυστατικής έκκρισης. Τέλος, και στα δύο στελέχη η εκκρινόμενη όξινη φωσφατάση βρέθηκε να κατανέμεται σε ποσοστό 20-25% στο υπερκείμενο και 75-80% στη μεσόφαση (πίνακας 6.4).

Η δραστικότητα της MAGL στα κλάσματα της έκκρισης ελέγχθηκε με υπόστρωμα 2-OG, παρουσία του ειδικού αναστολέα της FAAH AM374. Τα αποτελέσματα έδειξαν το μοίρασμα της ολικής δραστικότητας μεταξύ ομογενοποιημένου και μεσόφασης της *T. thermophila*, συνδέοντας για πρώτη φορά τη MAGL με το

περιεχόμενο των βλεννοκυστών (σχήμα 6.10). Στην MS-1 το σύνολο σχεδόν της δραστηριότητας της MAGL εντοπίστηκε στο ομογενοποίημα, με μικρό ποσοστό στη μεσόφαση και το υπερκείμενο. Καθώς η ειδική δραστηριότητα των μεσοφάσεων των δύο στελεχών είναι ίδια (σχήμα 6.13), η διαφορά των ποσοστών κατανομής ολικής δραστηριότητας των μεσοφάσεων ανάγεται στο διαφορετικό μέγεθός τους και όχι σε διαφορετική σύσταση του περιεχομένου τους. Ακόμη, βρέθηκε εμπλουτισμός και στα δύο στελέχη της μεσόφασης σε σχέση με το υπερκείμενο, ενισχύοντας το συμπέρασμα της έκκρισης MAGL από τις βλεννοκύστες. Τέλος, φαίνεται ότι η εκκρινόμενη MAGL προέρχεται από τη μεσόφαση σε ποσοστό 83-89% και από το υπερκείμενο 11-17% (πίνακας 6.5).

Η FAAH, όπως αυτή υπολογίζεται από την υδρόλυση της 2-OG με χρήση του αναστολέα της AM374, βρέθηκε σε ποσοστό ~23% στη μεσόφαση κυττάρων *T. thermophila*, και συνδέεται για πρώτη φορά, όπως και η MAGL, με το περιεχόμενο των βλεννοκυστών (σχήμα 6.12). Επίσης, ένα 15% εντοπίστηκε στο υπερκείμενο. Αντίθετα, στο στέλεχος της MS-1 δεν βρέθηκε καθόλου δραστηριότητα FAAH στη μεσόφαση, η οποία δεν αποδίδεται στη διαφορά του μεγέθους των μεσοφάσεων, καθώς η ειδική δραστηριότητα της στη μεσόφαση της MS-1 είναι σχεδόν μηδενική (σχήμα 6.14) και συμπεραίνεται ότι υπάρχει κάποια διαφοροποίηση στη σύσταση των μεσοφάσεων των δύο στελεχών ως προς αυτή. Ο εμπλουτισμός των υπερκειμένων των δύο στελεχών σε δραστηριότητα FAAH σε σχέση με τα ομογενοποιημένα δείχνει την ύπαρξη μιας διαλυτής μορφής FAAH, που εκκρίνεται εξειδικευμένα από ένα μονοπάτι μη λυσοσωματικής συνεχούς έκκρισης που είναι ενεργό κατά τη διαδικασία επίδρασης με διβουκαΐνη (σχήμα 6.14). Τέλος, η εκκρινόμενη FAAH κυττάρων *T. thermophila*, εντοπίζεται κατά 40% στο υπερκείμενο και 60% στη μεσόφαση (πίνακας 6.6).

Και στην περίπτωση της έκκρισης των βλεννοκυστών η MAGL επιβεβαιώνει το ρόλο της ως το κύριο καταβολικό ένζυμο των 2-μονοακυλογλυκερολών, καθώς στα ομογενοποιημένα των δύο στελεχών η FAAH είναι υπεύθυνη για το ~20% της υδρόλυσης της 2-OG, ενώ στις μεσοφάσεις έχει ακόμη μικρότερο ποσοστό. Στα υπερκείμενα όμως, η συμμετοχή της ανεβαίνει στο ~50% επιβεβαιώνοντας για άλλη μια φορά την ύπαρξη ενός εξειδικευμένου συστήματος μη λυσοσωματικής συνεχούς έκκρισης για αυτή (σχήματα 6.13 και 6.14).

Η σύγκριση ηλεκτροφορημάτων SDS-PAGE στα κλάσματα της έκκρισης αποκάλυψε ποιοτικές διαφορές στη σύσταση του υπερκλειμένου από τα άλλα δύο κλάσματα (σχήμα 6.15), ενώ στη μεσόφαση και το ομογενοποίημα παρατηρήθηκε παρόμοια κατανομή ζωνών, πιθανώς λόγω αφθονίας συγκεκριμένων κοινών πρωτεϊνών των δύο κλασμάτων. Είναι βιβλιογραφικά γνωστό όμως, ότι το περιεχόμενο των βλεννοκυστών αποτελείται από σχετικά λίγες πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους [111]. Πειραματικές τροποποιήσεις που αποσκοπούσαν στη βελτιστοποίηση της παραλαβής της μεσόφασης, ώστε να αποφεύγεται η λύση των κυττάρων ή η επιμόλυνση της μεσόφασης από την επαφή της με το ίζημα έδωσαν ανάλογα αποτελέσματα, με τα προηγούμενα πειράματα, ειδικής δραστηριότητας MAGL και όξινης φωσφατάσης (σχήματα 6.17 και 6.18). Η μεγάλη διαφορά μεταξύ ομογενοποιήματος και μεσόφασης της ειδικής δραστηριότητας όξινης φωσφατάσης δείχνει ότι δεν συμβαίνει επιμόλυνση του ενός κλάσματος από το άλλο.

Όπως είδαμε παραπάνω, με χρήση του AM374 αποδείχθηκε η συμμετοχή της FAAH στην υδρόλυση της 2-OG. Για την άμεση απόδειξη της συμμετοχής της MAGL χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός αναστολέας της JZL184, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά σε τέτοιο είδος κυττάρων. Αν και για τον αναστολέα αυτόν έχει αναφερθεί πολύ ισχυρή αναστολή (~85%) για τη MAGL [95], τα πειράματά μας σε ομογενοποίημα *T. thermophila* έδειξαν αναστολή μέχρι ~27%, με IC_{50} 33,3 nM σε εύρος συγκεντρώσεων 5 nM – 20 μ M (σχήμα 6.19). Η συμμετοχή όμως της FAAH στην υδρόλυση της 2-OG στα ομογενοποίηματα καλλιιεργειών *T. thermophila* ήταν ~30%, όπως διαπιστώθηκε με χρήση του ειδικού αναστολέα της FAAH AM374 υποδεικνύοντας ότι η MAGL συμμετέχει σε ποσοστό ~70% [107]. Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη άλλου υδρολυτικού ενζύμου ή παραπάνω από ενός ισομορφών του ενζύμου της MAGL στη *Tetrahymena* που δεν αναστέλλονται όλες κατά τον ίδιο τρόπο. Την ύπαρξη ισομορφών δείχνουν και αποτελέσματα βιοπληροφορικής ανάλυσης του γονιδίου της MAGL που αποκάλυψαν τρία πιθανά γονίδια του ενζύμου που όλα εκφράζονται σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης [107]. Χρήση ακόμη μεγαλύτερων συγκεντρώσεων έδειξαν αύξηση της αναστολής έως ~42% που οφείλεται, μάλλον, σε ταυτόχρονη αναστολή και της FAAH (σχήμα 6.20). Η χρήση του αναστολέα αυτού σε κλάσματα *T. thermophila* και *T. thermophila* MS-1 που

παραλήφθηκαν μετά από επίδραση με διβουκαΐνη έδειξε κοινή αναστολή όλων των κλασμάτων κατά ~30% (σχήμα 6.21) και δεν αποκάλυψε κάποια διαφοροποίηση.

Η χρήση της τεχνικής της ανοσοαποτύπωσης δεν κατάφερε να δώσει κάποιο συμπέρασμα για την ύπαρξη της FAAH στο περιεχόμενο των βλεννοκυστών (παρ. 6.2.7), όμως έδειξε για την περίπτωση της MAGL την ύπαρξη μιας ανοσοδραστικής ζώνης στα ~45 kDa σε όλα τα κλάσματα που παρελήφθησαν μετά τη διέγερση με διβουκαΐνη, συμπεριλαμβανομένης της μεσόφασης που φέρει το σύνολο σχεδόν του περιεχομένου των βλεννοκυστών (σχήμα 6.22). Στο παρελθόν, με χρήση του ίδιου αντισώματος, είχε εντοπιστεί η MAGL σε μέσο ασιτίας καλλιεργειών *T. thermophila*, και μάλιστα είχε βρεθεί η ύπαρξη μόνο μίας ανοσοδραστικής ζώνης στα ~40 kDa, ενώ στο ομογενοποίημα υπήρχαν δύο, μία στα ~40 και μία στα ~45 kDa, δείχνοντας την έκκριση μίας συγκεκριμένης ισομορφής [110]. Η συγκεκριμένη ζώνη των ~40 kDa δεν ανιχνεύτηκε στα δικά μας πειράματα. Φαίνεται, ίσως, ότι αν όντως υπάρχουν δύο ισομορφές της MAGL, η μία εκκρίνεται ιδιосуστατικά, ενώ η άλλη αποθηκεύεται στις βλεννοκύστες ή δεν εκκρίνεται καθόλου.

Τέλος, η προσπάθεια υποκυτταρικού εντοπισμού της MAGL με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού (σχήμα 6.25) έδειξε μία περικυτταρική κατανομή του ενζύμου, ανάλογη της οργάνωσης των σειρών των βλεφαρίδων ή των βλεννοκυστών, επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα δραστηριότητας (παρ. 6.2.4) και τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης (παρ. 6.2.7) που έδειξαν την παρουσία της MAGL στις βλεννοκύστες. Πριν χρησιμοποιηθεί η μέθοδος αυτή για ανίχνευση της MAGL, ελέγχθηκε η καταλληλότητα της σε κύτταρα *T. thermophila* με χρώση των μικροσωληνίσκων μέσω ειδικού αντισώματος έναντι β-τουμπουλίνης (σχήμα 6.23).

Πειράματα πρωτεωμικής θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν, στη συνέχεια, για μία προσπάθεια εντοπισμού της MAGL και της FAAH στο περιεχόμενο των βλεννοκυστών. Ακόμη, η χρήση του μεταλλαγμένου στελέχους MN173, που διαθέτει βλεννοκύστες αλλά αδυνατεί να τις εξωκυτώσει θα μπορούσε να δώσει καλύτερα συμπεράσματα από την MS-1 ως κύτταρα ελέγχου του πειράματος της επίδρασης με διβουκαΐνη.

Συμπερασματικά λοιπόν, μελετήθηκε η έκκριση των ενζύμων MAGL και FAAH τόσο σε συνθήκες ασιτίας κυττάρων *T. thermophila*, όσο και σε επίπεδο ρυθμιζόμενης έκκρισης από τις βλεννοκύστες και διαπιστώθηκε η έκκριση τους και

στις δύο περιπτώσεις. Η δυνατότητα έκκρισης αυτών των ενζύμων από τη *Tetrahymena*, δείχνει το σηματοδοτικό ρόλο του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος και στους μονοκύτταρους οργανισμούς. Ο ρόλος αυτός είναι άγνωστος και μένει να διευκρινιστεί σε μελλοντικές ερευνητικές προσπάθειες.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- 2-AG:** 2-αραχιδονυλογλυκερόλη (2-arachidonoylglycerol)
- 2-OG:** 2-ελαϋλογλυκερόλη (2-oleoylglycerol)
- AcG:** ακυλογλυκερόλη (Acylglycerol)
- AEA:** N-αραχιδονυλοαιθανολαμίνη, ανανταμίδιο (N-arachidonoylethanolamine, anandamide)
- AM374:** παλμιτυλοσουλφονυλοφθορίδιο (palmitylsulfonyl fluoride)
- AMT:** μεμβρανικός μεταφορέας ανανταμιδίου (anandamide membrane transporter)
- ANOVA:** ανάλυση των διαφόρων (analysis of variance)
- APS:** υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate)
- AS:** αλληλουχία υπογραφή των αμιδασών (amidase signature)
- BSA:** αλβουμίνη βοδινού ορού (bovine serum albumin)
- cAMP:** κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cyclic adenosine monophosphate)
- CBR:** κανναβινοειδής υποδοχέας (cannabinoid receptor)
- cDNA:** συμπληρωματικό DNA (complementary DNA)
- COX:** κυκλοξυγονάση (cyclooxygenase)
- cpm:** κρούσεις ανά λεπτό (counts per minute)
- DAG:** διακυλογλυκερόλη (diacylglycerol)
- DAGL:** λιπάση των διακυλογλυκερολών (diacylglycerol lipase)
- DCG:** κοκκία πυκνού πυρήνα (Dense core granules)
- DMSO:** διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide)
- ECL:** ηλεκτροχημειοφωταύγεια (electrochemiluminescence)
- EDTA:** αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ethylenediaminetetracetic acid)
- FAAH:** αμιδοϋδρολάση των λιπαρών οξέων (fatty acid amide hydrolase)
- GP:** γλυκεροφωσφολιπίδια (glycerophospholipids)
- GP-NAE:** γλυκεροφωσφο N-ακυλοαιθανολαμίνες (glycerophospho N-acylethanolamides)
- GRL:** πρωτεΐνη κρυσταλλικού πλέγματος κοκκίων (granule lattice protein)
- grt1:** πρωτεΐνη των κοκκίων τύπου 1 (granule tip 1)
- GPR55:** υποδοχέας 55 συζευγμένος με πρωτεΐνες G (G protein-coupled receptor)
- HEPES:** 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
- Igr11:** επαγόμενη με την αναγέννηση των κοκκίων (induced upon granule regeneration 1)

JZL184: 4-nitrophenyl-4-[bis(1,3-benzodioxol-5-yl)(hydroxy)methyl]piperidine-1-carboxylate

LOX: λιποξυγονάση (lipoxygenase)

M6P: 6-φωσφορική μαννόζη (mannose 6-phosphate)

MAGL: λιπάση των μονοακυλογλυκερολών (monoacylglycerol lipase)

MAPK: πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα (Mitogen-activated protein kinase)

NAAA: όξινη αμιδάση των N-ακυλοαιθανολαμινών (N-acylethanolamine hydrolyzing acid amidase)

NAE: N-ακυλοαιθανολαμίνη (N-acylethanolamide)

NAPE: N-ακυλοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (N-acyl phosphatidyl ethanolamine)

NAT: N-ακυλο τρανφεράση (N-acyl transferase)

PAGE: ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (polyacrylamide gel electrophoresis)

PIns: φωσφοϊνοσιτόλες (phosphoinositols)

PKA: πρωτεϊνική κινάση A (protein kinase A)

PLx: φωσφολιπάση (phospholipase)

PMSF: φαινυλομεθυλοσουλφονυλοφθορίδιο (phenylmethanesulphonylfluoride)

POPOP: 1,4-δι-[2-(5-φαινυλοξαζολυλο)]-βενζολίο (1,4-bis[5-phenyloxazol-2-yl]benzene)

PPAR: παράγοντας ενεργοποίησης πολλαπλασιασμού υπεροξυσωμάτων (peroxisome proliferator activated receptor)

PPO: 2,5-διφαινυλοξαζόλιο (2,5-diphenyloxazol)

SDS: δωδεκυλοθειικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate)

TCA: τριχλωροξικό οξύ (trichloroacetic acid)

TEMED: τετραμεθυλενοδιαμίνη (tetramethylethylenediamine)

THC: (-)-Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη ((-)-D9-tetrahydrocannabinol)

Tris: τρις (υδροξυμεθυλο)-αμινο-μεθάνιο (tris (hydroxy methyl) aminomethane)

TRPV1: βανιλλοειδής υποδοχέας τύπου 1 (vanilloid receptor-type 1)

URB597: 3'-καρβαμυλο-διφαινυλο-3 εστέρας του κυκλοεξυλοκαρβαμικού οξέος (cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester)

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. M.P. Sauvant, D. Pepin, and E. Piccinni. *Tetrahymena pyriformis*: a tool for toxicological studies. A review. *Chemosphere* 38:1631-1669 (1999)
2. J. Frankel. Cell biology of *Tetrahymena thermophila*. *Methods Cell Biol.* 62:27-125 (2000)
3. B. Paquin, M.J. Laforest, L. Forget, I. Roewer, Z. Wang, J. Longcore, and B.F. Lang. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Curr. Genet.* 31:380-395 (1997)
4. P.O. Wainright, G. Hinkle, M.L. Sogin, and S.K. Stickel. Monophyletic origins of the metazoa: an evolutionary link with fungi. *Science* 260:340-342 (1993)
5. J.A. Eisen, R.S. Coyne, M. Wu, D. Wu, M. Thiagarajan, J.R. Wortman, J.H. Badger, Q. Ren, P. Amedeo, K.M. Jones, L.J. Tallon, A.L. Delcher, S.L. Salzberg, J.C. Silva, B.J. Haas, W.H. Majoros, M. Farzad, J.M. Carlton, R.K. Smith, Jr., J. Garg, R.E. Pearlman, K.M. Karrer, L. Sun, G. Manning, N.C. Elde, A.P. Turkewitz, D.J. Asai, D.E. Wilkes, Y. Wang, H. Cai, K. Collins, B.A. Stewart, S.R. Lee, K. Wilamowska, Z. Weinberg, W.L. Ruzzo, D. Wloga, J. Gaertig, J. Frankel, C.C. Tsao, M.A. Gorovsky, P.J. Keeling, R.F. Waller, N.J. Patron, J.M. Cherry, N.A. Stover, C.J. Krieger, T.C. del, H.F. Ryder, S.C. Williamson, R.A. Barbeau, E.P. Hamilton, and E. Orias. Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS. Biol.* 4:e286 (2006)
6. A.D. Nusblat, S.R. Najle, M.L. Tomazic, A.D. Uttaro, and C.B. Nudel. C-5(6) sterol desaturase from *Tetrahymena thermophila*: Gene identification and knockout, sequence analysis, and comparison to other C-5(6) sterol desaturases. *Eukaryot. Cell* 8:1287-1297 (2009)
7. A.P. Turkewitz, E. Orias, and G. Kapler. Functional genomics: the coming of age for *Tetrahymena thermophila*. *Trends Genet.* 18:35-40 (2002)
8. W. Pauli and S. Berger. Toxicological comparisons of *Tetrahymena* species, end points and growth media: supplementary investigations to the pilot ring test. *Chemosphere* 35:1043-1052 (1997)
9. D.G. Nosedá, H.G. Gentili, M.L. Nani, A. Nusblat, A. Tiedtke, J. Florin-Christensen, and C.B. Nudel. A bioreactor model system specifically designed for *Tetrahymena* growth and cholesterol removal from milk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:515-520 (2007)
10. G. Valcarce, L. Munoz, A. Nusblat, C. Nudel, and J. Florin-Christensen. The improvement of milk by cultivation with ciliates. *J. Dairy Sci.* 84:2136-2143 (2001)
11. T. Weide, L. Herrmann, U. Bockau, N. Niebur, I. Aldag, W. Laroy, R. Contreras, A. Tiedtke, and M.W. Hartmann. Secretion of functional human enzymes by *Tetrahymena thermophila*. *BMC. Biotechnol.* 6:19 (2006)
12. G.W. Kidder. Nutrition and metabolism of protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* 5:139-156 (1951)
13. O. Scherbaum and E. Zeuthen. Induction of synchronous cell division in mass cultures of *Tetrahymena piriformis*. *Exp. Cell Res.* 6:221-227 (1954)

14. O. Scherbaum. Studies on the mechanism of synchronous cell division in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell Res.* 13:11-23 **(1957)**
15. I.R. Gibbons and A.J. Rowe. Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia. *Science* 149:424-426 **(1965)**
16. A.M. Elliott. Primary lysosomes in *Tetrahymena pyriformis*. *Science* 149:640-641 **(1965)**
17. M. Muller. Peroxisomes and hydrogenosomes in protozoa. *J. Histochem. Cytochem.* 21:955-957 **(1973)**
18. K. Kruger, P.J. Grabowski, A.J. Zaug, J. Sands, D.E. Gottschling, and T.R. Cech. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31:147-157 **(1982)**
19. E.H. Blackburn and J.G. Gall. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* 120:33-53 **(1978)**
20. C.W. Greider and E.H. Blackburn. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43:405-413 **(1985)**
21. C.W. Greider and E.H. Blackburn. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337:331-337 **(1989)**
22. C.F. Brunk, L.C. Lee, A.B. Tran, and J. Li. Complete sequence of the mitochondrial genome of *Tetrahymena thermophila* and comparative methods for identifying highly divergent genes. *Nucleic Acids Res.* 31:1673-1682 **(2003)**
23. E. Orias, E.P. Hamilton, and J.D. Orias. *Tetrahymena* as a laboratory organism: useful strains, cell culture, and cell line maintenance. *Methods Cell Biol.* 62:189-211 **(2000)**
24. Ντ. Γαλανοπούλου, Κ. Δημόπουλος, Μ. Μαυρή, και Ν. Σιαφάκα. Εργαστηριακές ασκήσεις Βιοχημείας **(2001)**
25. L. Szablewski, P.H. Andreasen, A. Tiedtke, J. Florin-Christensen, M. Florin-Christensen, and L. Rasmussen. *Tetrahymena thermophila*: Growth in synthetic nutrient medium in the presence and absence of glucose **(1991)**
26. E.M. Simon and S.W. Whang. *Tetrahymena*: effect of freezing and subsequent thawing on breeding performance. *Science* 155:694-696 **(1967)**
27. Δ. Αναγνωστόπουλος. Αμιδοϋδρολάση των λιπαρών οξέων στην *Tetrahymena*. Κινητικές παράμετροι, ενδογενή υποστρώματα και προσδιορισμός του αντίστοιχου γονιδίου. Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ **(2009)**
28. J. Frankel and E.M. Nelsen. The effects of supraoptimal temperatures on population growth and cortical patterning in *Tetrahymena pyriformis* and *Tetrahymena thermophila*: a comparison. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48:135-146 **(2001)**
29. M.S. Huddleston, L. Cavalier, J. Eliassen, M. Kozak, and A. Maledon. The effect of proteose peptone concentration on cell size in *Tetrahymena pyriformis* W. *Life Sci.* 3:1181-1190 **(1964)**
30. D.N. Wheatley, S.T. Christensen, P. Schousboe, and L. Rasmussen. Signalling in cell growth and death: adequate nutrition alone may not be sufficient for ciliates. A minireview. *Cell Biol. Int.* 17:817-823 **(1993)**

31. Β. Θωμά. Μελέτη της επίδρασης οξειδωτικού στρες στην *Tetrahymena thermophila*, με έμφαση στη σύσταση των λιπαρών οξέων. Διατριβή ειδίκευσης στη βιοχημεία, ΕΚΠΑ (2010)
32. Μ. Στεφανιδου-Λουτσιδου. Το πρωτόζωο *Tetrahymena*. Ένα αξιόπιστο κυτταρικό μοντέλο. Αθήνα, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. (2007)
33. T. Tominaga, R. Allen, and Y. Naitoh. Electrophysiology of the in situ contractile vacuole complex of *Paramecium* reveals its membrane dynamics and electrogenic site during osmoregulatory activity. *J. Exp. Biol.* 201:451-460 (1998)
34. R.D. Allen. Fine structure, reconstruction and possible functions of components of the cortex of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.* 14:553-565 (1967)
35. B.H. Satir and S.L. Wissig. Alveolar sacs of *Tetrahymena*: ultrastructural characteristics and similarities to subsurface cisterns of muscle and nerve. *J. Cell Sci.* 55:13-33 (1982)
36. N.E. Williams. Surface membrane regeneration in deciliated *Tetrahymena*. *J. Cell Sci.* 62:407-417 (1983)
37. E. Orias, M.D. Cervantes, and E.P. Hamilton. *Tetrahymena thermophila*, a unicellular eukaryote with separate germline and somatic genomes. *Res. Microbiol.* 162:578-586 (2011)
38. K.M. Karrer. *Tetrahymena* genetics: two nuclei are better than one. *Methods Cell Biol.* 62:127-186 (2000)
39. W. Miao, J. Xiong, J. Bowen, W. Wang, Y. Liu, O. Braguinets, J. Grigull, R.E. Pearlman, E. Orias, and M.A. Gorovsky. Microarray analyses of gene expression during the *Tetrahymena thermophila* life cycle. *PLoS. One.* 4:e4429 (2009)
40. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walker. Molecular biology of the cell (fifth edition). Garland Science (2008)
41. Λ. Μαργαρίτης, Β. Γαλανόπουλος, Κ. Κεραμάρης, Ε. Μαρίνος, Ι. Πατσιασίδερη, Δ. Στραβοπόδης, Ι. Τρουγκάκος. Βιολογία κυτταρού (τέταρτη έκδοση). Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας (2004)
42. A. Tiedtke and L. Rasmussen. Constitutive secretion of acid hydrolases in *Tetrahymena thermophila*. *J. Protozool.* 36:378-382 (1989)
43. M. Muller. Secretion of acid hydrolases and its intracellular source in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell Biol.* 52:478-487 (1972)
44. J.J. Blum and T.L. Rothstein. Lysosomes in *Tetrahymena*. *Front Biol.* 43:33-45 (1975)
45. Y. Banno, N. Sasaki, and Y. Nozawa. Secretion heterogeneity of lysosomal enzymes in *Tetrahymena pyriformis*. *Exp. Cell Res.* 170:259-268 (1987)
46. P. Hunseler, G. Scheidgen-Kleyboldt, and A. Tiedtke. Isolation and characterization of a mutant of *Tetrahymena thermophila* blocked in secretion of lysosomal enzymes. *J. Cell Sci.* 88 (Pt 1):47-55 (1987)
47. P. Hunseler and A. Tiedtke. Genetic characterization of the secretory mutant MS-1 of *Tetrahymena thermophila*: vacuolarization and block in secretion of lysosomal hydrolases are caused by a single gene mutation. *Dev. Genet.* 13:167-173 (1992)

48. T. Kiy, C. Vosskuhler, L. Rasmussen, and A. Tiedtke. Three pools of lysosomal enzymes in *Tetrahymena thermophila*. *Exp. Cell Res.* 205:286-292 **(1993)**
49. D. Deli, G. Leondaritis, A. Tiedtke, and D. Galanopoulou. Deficiency in lysosomal enzyme secretion is associated with upregulation of phosphatidylinositol 4-phosphate in *Tetrahymena*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55:343-350 **(2008)**
50. G. Leondaritis, A. Tiedtke, and D. Galanopoulou. D-3 phosphoinositides of the ciliate *Tetrahymena*: characterization and study of their regulatory role in lysosomal enzyme secretion. *Biochim. Biophys. Acta* 1745:330-341 **(2005)**
51. A.P. Turkewitz. Out with a bang! *Tetrahymena* as a model system to study secretory granule biogenesis. *Traffic.* 5:63-68 **(2004)**
52. A.T. Cowan, G.R. Bowman, K.F. Edwards, J.J. Emerson, and A.P. Turkewitz. Genetic, genomic, and functional analysis of the granule lattice proteins in *Tetrahymena* secretory granules. *Mol. Biol. Cell* 16:4046-4060 **(2005)**
53. G.R. Bowman, D.G. Smith, K.W. Michael Siu, R.E. Pearlman, and A.P. Turkewitz. Genomic and proteomic evidence for a second family of dense core granule cargo proteins in *Tetrahymena thermophila*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52:291-297 **(2005)**
54. A. Rahaman, W. Miao, and A.P. Turkewitz. Independent transport and sorting of functionally distinct protein families in *Tetrahymena thermophila* dense core secretory granules. *Eukaryot. Cell* 8:1575-1583 **(2009)**
55. A. Tiedtke and H.D. Gortz. Acid phosphatase associated with discharging secretory vesicles (mucocysts) of *Tetrahymena thermophila*. *Eur. J. Cell Biol.* 30:254-257 **(1983)**
56. B.H. Satir and L.K. Bleyman. Use of *Tetrahymena* and *Paramecium* in studies of exocytosis. *Methods Enzymol.* 221:174-190 **(1993)**
57. C.L. Madinger, K. Collins, L.G. Fields, C.H. Taron, and J.S. Benner. Constitutive secretion in *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryot. Cell* 9:674-681 **(2010)**
58. A.P. Turkewitz, N.D. Chilcoat, A. Haddad, and J.W. Verbsky. Regulated protein secretion in *Tetrahymena thermophila*. *Methods Cell Biol.* 62:347-362 **(2000)**
59. I.B. Adams and B.R. Martin. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* 91:1585-1614 **(1996)**
60. Y. Gaoni and R. Mechoulam. The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 93:217-224 **(1971)**
61. L.A. Matsuda, S.J. Lolait, M.J. Brownstein, A.C. Young, and T.I. Bonner. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564 **(1990)**
62. S. Munro, K.L. Thomas, and M. Abu-Shaar. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-65 **(1993)**
63. W.A. Devane, L. Hanus, A. Breuer, R.G. Pertwee, L.A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger, and R. Mechoulam. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949 **(1992)**

64. V. Di Marzo, L. De Petrocellis, F. Fezza, A. Ligresti, and T. Bisogno. Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66:377-391 **(2002)**
65. T. Sugiura, S. Kondo, A. Sukagawa, S. Nakane, A. Shinoda, K. Itoh, A. Yamashita, and K. Waku. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215:89-97 **(1995)**
66. T. Sugiura. [2-Arachidonoylglycerol: an endogenous cannabinoid receptor ligand]. *Seikagaku* 79:655-668 **(2007)**
67. L. Hanus, S. Abu-Lafi, E. Frider, A. Breuer, Z. Vogel, D.E. Shalev, I. Kustanovich, and R. Mechoulam. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:3662-3665 **(2001)**
68. A.C. Porter, J.M. Sauer, M.D. Knierman, G.W. Becker, M.J. Berna, J. Bao, G.G. Nomikos, P. Carter, F.P. Bymaster, A.B. Leese, and C.C. Felder. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301:1020-1024 **(2002)**
69. S.M. Huang, T. Bisogno, M. Trevisani, A. Al-Hayani, L. De Petrocellis, F. Fezza, M. Tognetto, T.J. Petros, J.F. Krey, C.J. Chu, J.D. Miller, S.N. Davies, P. Geppetti, J.M. Walker, and V. Di Marzo. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:8400-8405 **(2002)**
70. R. Mechoulam, E. Frider, and V. Di Marzo. Endocannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.* 359:1-18 **(1998)**
71. A. Saghatelian, M.K. McKinney, M. Bandell, A. Patapoutian, and B.F. Cravatt. A FAAH-regulated class of N-acyl taurines that activates TRP ion channels. *Biochemistry* 45:9007-9015 **(2006)**
72. S. Conti, B. Costa, M. Colleoni, D. Parolaro, and G. Giagnoni. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 135:181-187 **(2002)**
73. W.T. Festuccia, S. Oztezcan, M. Laplante, M. Berthiaume, C. Michel, S. Dohgu, R.G. Denis, M.N. Brito, N.A. Brito, D.S. Miller, W.A. Banks, T.J. Bartness, D. Richard, and Y. Deshaies. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated positive energy balance in the rat is associated with reduced sympathetic drive to adipose tissues and thyroid status. *Endocrinology* 149:2121-2130 **(2008)**
74. S. Ben-Shabat, E. Frider, T. Sheskin, T. Tamiri, M.H. Rhee, Z. Vogel, T. Bisogno, L. De Petrocellis, V. Di Marzo, and R. Mechoulam. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoylglycerol cannabinoid activity. *Eur. J. Pharmacol.* 353:23-31 **(1998)**
75. M. Maccarrone, A. Cartoni, D. Parolaro, A. Margonelli, P. Massi, M. Bari, N. Battista, and A. Finazzi-Agro. Cannabimimetic activity, binding, and degradation of stearoylethanolamide within the mouse central nervous system. *Mol. Cell Neurosci.* 21:126-140 **(2002)**

76. T. Ohno-Shosaku, A. Tanimura, Y. Hashimotodani, and M. Kano. Endocannabinoids and retrograde modulation of synaptic transmission. *Neuroscientist*. 18:119-132 **(2012)**
77. Ε. Φαρμάκη. Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα στον εγκέφαλο κουνελιού. Χαρακτηρισμός της αμιδοϋδρολάσης των λιπαρών οξέων (FAAH) και της λιπάσης των μονοακυλογλυκερολών (MAGL), ταυτοποίηση των CB1 και CB2 υποδοχέων. Εργασία ειδίκευσης στη βιοχημεία, ΕΚΠΑ **(2006)**
78. M. Bouaboula, C. Poinot-Chazel, B. Bourrie, X. Canat, B. Calandra, M. Rinaldi-Carmona, F.G. Le, and P. Casellas. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem. J.* 312 (Pt 2):637-641 **(1995)**
79. V. Di Marzo. 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim. Biophys. Acta* 1392:153-175 **(1998)**
80. M. Kano, T. Ohno-Shosaku, Y. Hashimotodani, M. Uchigashima, and M. Watanabe. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev.* 89:309-380 **(2009)**
81. S. Karaliota, A. Sifaka-Kapadai, C. Gontinou, K. Psarra, and M. Mavri-Vavayanni. Anandamide increases the differentiation of rat adipocytes and causes PPARgamma and CB1 receptor upregulation. *Obesity. (Silver. Spring)* 17:1830-1838 **(2009)**
82. S.E. O'Sullivan. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br. J. Pharmacol.* 152:576-582 **(2007)**
83. Y. Okamoto, K. Tsuboi, and N. Ueda. Enzymatic formation of anandamide. *Vitam. Horm.* 81:1-24 **(2009)**
84. G.G. Muccioli. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov. Today* 15:474-483 **(2010)**
85. B.S. Basavarajappa. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept. Lett.* 14:237-246 **(2007)**
86. L. Fasia, V. Karava, and A. Sifaka-Kapadai. Uptake and metabolism of [3H]anandamide by rabbit platelets. Lack of transporter? *Eur. J. Biochem.* 270:3498-3506 **(2003)**
87. A. Hermann, M. Kaczocha, and D.G. Deutsch. 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) membrane transport: history and outlook. *AAPS. J.* 8:E409-E412 **(2006)**
88. C.J. Fowler. Anandamide uptake explained? *Trends Pharmacol. Sci.* 33:181-185 **(2012)**
89. K. Ahn, M.K. McKinney, and B.F. Cravatt. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem. Rev.* 108:1687-1707 **(2008)**
90. D.G. Deutsch, S. Lin, W.A. Hill, K.L. Morse, D. Salehani, G. Arreaza, R.L. Omeir, and A. Makriyannis. Fatty acid sulfonyl fluorides inhibit anandamide metabolism and bind to the cannabinoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231:217-221 **(1997)**
91. L. De Petrocellis and V. Di Marzo. An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab* 23:1-15 **(2009)**

92. J.R. Savinainen, S.M. Saario, and J.T. Laitinen. The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta Physiol (Oxf)* 204:267-276 **(2012)**
93. T. Bertrand, F. Auge, J. Houtmann, A. Rak, F. Vallee, V. Mikol, P.F. Berne, N. Michot, D. Cheuret, C. Hoornaert, and M. Mathieu. Structural basis for human monoglyceride lipase inhibition. *J. Mol. Biol.* 396:663-673 **(2010)**
94. G. Labar, C. Bauvois, F. Borel, J.L. Ferrer, J. Wouters, and D.M. Lambert. Crystal structure of the human monoacylglycerol lipase, a key actor in endocannabinoid signaling. *Chembiochem.* 11:218-227 **(2010)**
95. J.Z. Long, W. Li, L. Booker, J.J. Burston, S.G. Kinsey, J.E. Schlosburg, F.J. Pavon, A.M. Serrano, D.E. Selley, L.H. Parsons, A.H. Lichtman, and B.F. Cravatt. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat. Chem. Biol.* 5:37-44 **(2009)**
96. V. Di Marzo and M. Maccarrone. FAAH and anandamide: is 2-AG really the odd one out? *Trends Pharmacol. Sci.* 29:229-233 **(2008)**
97. P. Gyombolai, D. Pap, G. Turu, K.J. Catt, G. Bagdy, and L. Hunyady. Regulation of endocannabinoid release by G proteins: a paracrine mechanism of G protein-coupled receptor action. *Mol. Cell Endocrinol.* 353:29-36 **(2012)**
98. D.K. McClean and A.M. Zimmerman. Action of delta 9-tetrahydrocannabinol on cell division and macromolecular synthesis in division-synchronized protozoa. *Pharmacology* 14:307-321 **(1976)**
99. S. Zimmerman, A.M. Zimmerman, and H. Laurence. Effect of delta 9-tetrahydrocannabinol on cyclic nucleotides in synchronously dividing *Tetrahymena*. *Can. J. Biochem.* 59:489-493 **(1981)**
100. H. Arai, K. Nishikawa, K. Inoue, Y. Nozawa, and S. Nojima. Metabolism of extracellular phospholipids in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Biochem.* 101:1059-1067 **(1987)**
101. V. Karava, L. Fasia, and A. Siafaka-Kapadai. Anandamide amidohydrolase activity, released in the medium by *Tetrahymena pyriformis*. Identification and partial characterization. *FEBS Lett.* 508:327-331 **(2001)**
102. V. Karava, P.M. Zafiriou, L. Fasia, D. Anagnostopoulos, E. Boutou, C.E. Vorgias, M. Maccarrone, and A. Siafaka-Kapadai. Anandamide metabolism by *Tetrahymena pyriformis* in vitro. Characterization and identification of a 66 kDa fatty acid amidohydrolase. *Biochimie* 87:967-974 **(2005)**
103. A. Evagorou, D. Anagnostopoulos, E. Farmaki, and A. Siafaka-Kapadai. Hydrolysis of 2-arachidonoylglycerol in *Tetrahymena thermophila*. Identification and partial characterization of a Monoacylglycerol Lipase-like enzyme. *Eur. J. Protistol.* 46:289-297 **(2010)**
104. D. Anagnostopoulos, C. Rakec, J. Wood, L. Pandarinathan, N. Zvonok, A. Makriyannis, and A. Siafaka-Kapadai. Identification of endocannabinoids and related N-acylethanolamines in *Tetrahymena*. A new class of compounds for *Tetrahymena*. *Protist.* 161:452-465 **(2010)**
105. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275 **(1951)**

- 106.P.L. Lleo and G. Rebel. Interference of Good's buffers and other biological buffers with protein determination. *Anal. Biochem.* 192:215-218 **(1991)**
- 107.M.M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254 **(1976)**
- 108.W.N. Burnette. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112:195-203 **(1981)**
- 109.E.S. Cole, K.R. Stuart, T.C. Marsh, K. Aufderheide, and W. Ringlien. Confocal fluorescence microscopy for *Tetrahymena thermophila*. *Methods Cell Biol.* 70:337-359 **(2002)**
- 110.A. Ευαγόρου. Αμιδοϋδρολάση των λιπαρών οξέων και άλλα συστατικά του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος στη *Tetrahymena*. Μελέτη της έκκρισης του ενζύμου. Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ **(2009)**
- 111.J.W. Verbsky and A.P. Turkewitz. Proteolytic processing and Ca²⁺-binding activity of dense-core vesicle polypeptides in *Tetrahymena*. *Mol. Biol. Cell* 9:497-511 **(1998)**
- 112.B.F. Cravatt, D.K. Giang, S.P. Mayfield, D.L. Boger, R.A. Lerner, and N.B. Gilula. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384:83-87 **(1996)**
- 113.E. Gkini, D. Anagnostopoulos, M. Mavri-Vavayianni, and A. Sifaka-Kapadai. Metabolism of 2-acylglycerol in rabbit and human platelets. Involvement of monoacylglycerol lipase and fatty acid amide hydrolase. *Platelets.* 20:376-385 **(2009)**
114. L. Libusova and P. Draber. Multiple tubulin forms in ciliated protozoan *Tetrahymena* and *Paramecium* species. *Protoplasma* 227:65-76 **(2006)**