

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ



**ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΥ ΦΛΟΙΟΥ  
ΝΕΟΓΝΩΝ ΕΠΙΜΥΟΣ**

ΜΠΑΛΦΟΥΣΙΑ ΗΔΥΛΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ  
Α.Μ. 207006

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2012

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ



**ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΥ ΦΛΟΙΟΥ  
ΝΕΟΓΝΩΝ ΕΠΙΜΥΟΣ**

ΜΠΑΛΦΟΥΣΙΑ ΗΔΥΛΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ  
Α.Μ. 207006

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2012

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

**ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΥ ΦΛΟΙΟΥ  
ΝΕΟΓΝΩΝ ΕΠΙΜΥΟΣ**

ΜΠΑΛΦΟΥΣΙΑ ΗΔΥΛΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

A.M. 207006

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

ΣΤΥΛΙΑΝΟΠΟΥΛΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΣΤΑΜΑΤΑΚΗΣ ΑΝΤΩΝΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΥΘΥΜΙΟΠΟΥΛΟΣ ΣΠΥΡΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

*Στην μητέρα μου...*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών και συγκεκριμένα στο Κέντρο Βασικής Έρευνας – Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας καθώς και στο Τμήμα της Νοσηλευτικής στο εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας υπό την επίβλεψη και την καθοδήγηση της Καθηγήτριας κ. Φωτεινής Στυλιανοπούλου. Επιβλέποντες του πειραματικού σχεδιασμού υπήρξαν η Καθηγήτρια κ. Φωτεινή Στυλιανοπούλου και ο Επίκουρος Καθηγητής κ. Αντώνης Σταματάκης, τους οποίους και θα ήθελα να ευχαριστήσω για την βοήθειά τους και τις πολύτιμες υποδείξεις τους. Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κυρία Φωτεινή Στυλιανοπούλου για την ευκαιρία που μου έδωσε να διεξάγω την έρευνα για τη διπλωματική μου στο εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας του Τμήματος Νοσηλευτικής και για τη συνολική επίβλεψη του πειράματος καθώς και τον επίκουρο καθηγητή κύριο Αντώνιο Σταματάκη για την καθοδήγηση, την επίβλεψη, τη βοήθεια και τη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων και της συγγραφής της Διπλωματικής μου εργασίας. Εξίσου θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σπύρο Ευθυμιόπουλο ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για τις υποδείξεις του στην ολοκλήρωση της διπλωματικής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Γεώργιο Τσάγκαρη για τη βοήθεια και την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της περάτωσης τμήματος της εργασίας στο εργαστήριο της Βιοτεχνολογίας στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, την κ. Αγγελική Παπαδοπούλου που ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει και τον Δρ. Κωνσταντίνο Βουγά για την πολύτιμη βοήθειά του στη φασματομετρία μάζας. Ακόμη να ευχαριστήσω τη Νίκη Ραυτογιάννη για την εκπαίδευση σε διάφορες τεχνικές του εργαστηρίου.

Επίσης, οφείλω ένα ευχαριστώ στα παιδιά του μεταπτυχιακού, τα οποία εκτός από συμφοιτητές μου υπήρξαν και πολύ καλοί φίλοι αυτά τα 2-3 χρόνια που ήμασταν μαζί.

Τέλος, δεν έχω λόγια για να ευχαριστήσω τον πατέρα μου και την αδερφή μου καθώς και το παππού και τη γιαγιά μου, διότι χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση και υπομονή τους, δεν θα είχα καταφέρει να προσπαθώ για το καλύτερο δυνατό

αποτέλεσμα αλλά και να έχω τη χαρά να αισθάνομαι πλήρης σε κάθε στιγμή της ζωής μου.

ΑΘΗΝΑ, 2012

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΣ ΦΛΟΙΟΣ .....	1
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ .....	1
1.2. Ο ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΣ ΦΛΟΙΟΣ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ .....	1
1.3 ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΕΙΣ.....	4
1.4 ΕΠΙΤΕΛΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ.....	6
1.5 ΜΝΗΜΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	7
2. ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ «ΠΛΑΓΙΩΣΗ» .....	14
2.1 ΑΡΙΣΤΕΡΟ – ΔΕΞΙ .....	15
2.2 ΙΣΤΟΡΙΚΑ.....	17
2.2.1 Λόγος και γλώσσα .....	17
2.2.2 Κίνηση και αίσθηση .....	17
2.2.3 Ασθενείς με διαιρεμένο εγκέφαλο (Split-brain).....	17
2.3 ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΠΛΑΓΙΩΣΗ ΣΕ ΑΛΛΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ .....	18
2.4 ΠΛΕΥΡΙΚΗ ΑΣΥΜΜΕΤΡΙΑ.....	18
3. ΠΡΩΙΜΕΣ ΕΜΠΕΙΡΙΕΣ.....	21
3.1 ΜΗΤΡΙΚΗ ΑΠΟΣΤΕΡΗΣΗ .....	23
3.2 ΝΕΟΓΝΙΚΟΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ.....	24
3.3 ΑΝΑΤΡΟΦΗ ΑΠΟ «ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΕΣ» ΜΗΤΕΡΕΣ ΠΟΥ ΔΕΙΧΝΟΥΝ ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΚΑΛΗ ΜΗΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ .....	25
3.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΕ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ .....	26
4. ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ.....	28
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	28
4.2 ΠΡΩΤΕΩΜΑ ΚΑΙ ΓΕΝΩΜΑ .....	29
4.3 ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ.....	31
4.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ [117, 120].....	31
4.5 ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ.....	32
4.6 ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ - PTMS (POST- TRANSLATIONAL MODIFICATIONS) ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	34

4.7 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ .....	35
4.8 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΔΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (2D-PAGE) .....	37
4.8.1 Πρώτη Διάσταση: Ισοηλεκτρική Εστίαση (IEF).....	38
4.8.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου – 2 <sup>η</sup> Διάσταση.....	40
4.9 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	43
4.10 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ .....	45
5. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ.....	47
5.1 ΓΕΝΙΚΑ .....	47
5.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ .....	49
5.3 ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΕΚΡΟΦΗΣΗ ΑΠΟ ΜΗΤΡΑ ΜΕΣΩ ΛΕΙΖΕΡ – MALDI (MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION) .....	55
5.3.1 Αναλυτής μαζών μαγνητικού πεδίου .....	57
5.4. ΑΠΟΔΟΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ .....	58
6. ΣΚΟΠΟΣ .....	60
7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	62
7.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ .....	62
7.2 ΔΙΑΤΑΞΗ ΧΩΡΙΚΗΣ ΜΑΘΗΣΗΣ .....	62
7.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ .....	63
7.3.1 Εκπαίδευση – Πρόσληψη .....	63
7.3.2 Προετοιμασία ιστού.....	66
7.3.3 Ομογενοποίηση του προμετωπιαίου λοβού.....	66
7.3.4 Προσδιορισμός πρωτεΐνης (Μέθοδος Bradford) .....	68
7.3.5 Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2 Dimensional Electrophoresis) .....	69
7.3.5.1 Ενυδάτωση της ταινίας (strip) .....	69
7.3.5.2 Ισοηλεκτρική Εστίαση (Isoelectric focusing, IEF) .....	70
7.3.5.3 Εξισορρόπηση των ταινιών (Strip Equilibration).....	72
7.3.5.4 Δεύτερη διάσταση (SDS-PAGE).....	73
7.3.6 Εξαγωγή και επεξεργασία των πρωτεϊνικών κηλίδων από το πήκτωμα (Spot picking) .....	77
7.3.7 Αποχρωματισμός των κηλίδων και εγχύλιση των πρωτεϊνών τους .....	78



7.3.8	Επεξεργασία των πρωτεϊνικών κηλίδων πριν την εισαγωγή στο φασματογράφο μάζας και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών.....	79
7.3.9	Ανοσοαποτύπωση (Western Blot).....	79
8.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	87
9.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	106
9.1	ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	109
9.1.1	Ακτίνη και μικροϊνίδια .....	109
9.1.2	Νευροϊνίδια.....	110
9.1.3	Κυτταροσκελετικοί Μικροσωληνίσκοι .....	111
9.2	ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ .....	112
9.2.1	Πρωτεΐνες συνοδοί .....	113
9.3	ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ .....	114
9.4	ΠΛΑΓΙΩΣΗ .....	117
9.5	ΠΛΑΓΙΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΩΙΜΕΣ ΕΜΠΕΙΡΙΕΣ.....	117
10.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	120
11.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	124

## **Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 1. ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΣ ΦΛΟΙΟΣ

### 1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Οι τρεις πιθανοί τρόποι για να ορίσει κανείς τον προμετωπιαίο φλοιό είναι:

- \* ως τον κοκκιώδη μετωπιαίο φλοιό
- \* ως τη ζώνη προβολής του έσω ραχιαίου πυρήνα του θαλάμου
- \* ως εκείνο το τμήμα του μετωπιαίου φλοιού του οποίου η ηλεκτρική διέγερση δεν προκαλεί κινήσεις

Βάση της κυτταροαρχιτεκτονικής, ο προμετωπιαίος φλοιός έχει οριστεί από τη παρουσία μιας κοκκιώδους τέταρτης (IV) φλοιϊκής στοιβάδας. Ιστορικά, το 1935 ο Jacobsen χρησιμοποίησε τον όρο «προμετωπιαίος» για να διαχωρίσει κοκκιώδεις προμετωπιαίες περιοχές από μη κοκκιώδεις κινητικές και προκινητικές περιοχές [1]. Αργότερα, οι Rose και Woolsey όρισαν τον προμετωπιαίο φλοιό ως ζώνη προβολής του έσω ραχιαίου πυρήνα του θαλάμου καθώς απέδειξαν ότι ο πυρήνας αυτός προβάλλει σε πρόσθιες και κοιλιακές περιοχές του εγκεφάλου σε μη θηλαστικά [2]. Οι Rose και Woolsey όρισαν αυτή τη ζώνη προβολής ως «κογχοπρόσθια». Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι προβολές του έσω ραχιαίου πυρήνα του θαλάμου δεν περιορίζονται στον κοκκιώδη πρόσθιο φλοιό των θηλαστικών. Συνεπώς, προτάθηκε να οριστεί ο προμετωπιαίος φλοιός ως η περιοχή του φλοιού που έχει ισχυρότερους αμοιβαίους δεσμούς με τον έσω ραχιαίο πυρήνα από ότι με οποιονδήποτε άλλο πυρήνα του θαλάμου [3]. Τέλος, ο προμετωπιαίος φλοιός έχει οριστεί και ως η περιοχή του μετωπιαίου φλοιού του οποίου η ηλεκτρική διέγερση δεν οδηγεί σε αισθητές κινήσεις. Η επιλοκή με αυτό τον ορισμό είναι ότι ο ηλεκτρικά «ήσυχος» μετωπιαίος φλοιός περιλαμβάνει τόσο κοκκιώδεις όσο και μη κοκκιώδεις περιοχές [4].

### 1.2. Ο ΠΡΟΜΕΤΩΠΙΑΙΟΣ ΦΛΟΙΟΣ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΠΕΡΙΟΧΕΣ ΤΟΥ

Κατά τη φυλογενετική εξέλιξη οι μετωπιαίοι λοβοί υφίστανται αξιοσημείωτη επέκταση. Με λειτουργικά κριτήρια, οι μετωπιαίοι λοβοί διακρίνονται σε τρεις τομείς:

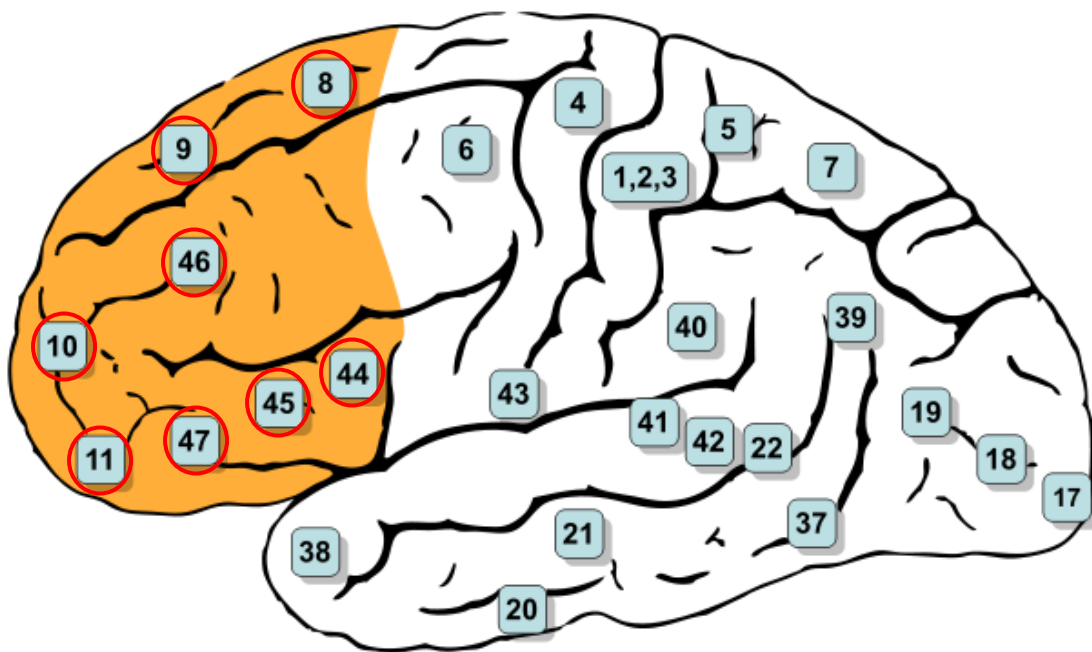
1. Τον «κινητικό-προκινητικό» τομέα

2. Τον «παραμεταιχμιακό» τομέα
3. Τον «ετεροτροπικό» τομέα

Ο *πρώτος* τομέας περιλαμβάνει την παραπληρωματική/συμπληρωματική κινητική περιοχή (έσω πλευρά του πεδίου 6 κατά Broadmann), τα μετωπιαία οφθαλμικά πεδία, τα συμπληρωματικά οφθαλμικά πεδία (πεδίο 6 κατά Broadmann) καθώς και τμήματα της περιοχής Broca (πεδίο 44 κατά Broadmann).

Ο *δεύτερος* τομέας, που βρίσκεται στο κοιλιακό έσω τμήμα του μετωπιαίου λοβού εμπεριέχει τους φλοιούς του πρόσθιου συμπλέγματος του προσαγωγίου (πεδία 23, 32 κατά Broadmann), την παραοσφρητική έλικα (πεδίο 25 κατά Broadmann βρίσκεται στην έσω επιφάνεια του ημισφαιρίου) και τις οπίσθιες κογχομετωπιαίες περιοχές (πεδία 11-13 κατά Broadmann).

Ο *τρίτος* τομέας είναι εκτενής καθώς περιλαμβάνει τα πεδία 9-10, τα πρόσθια πεδία 11-12 και τα πεδία 45-47 κατά Broadmann.[5]



**Εικόνα 1.1:** Πεδία του Broadmann της εξωτερικής επιφάνειας του εγκεφαλικού φλοιού.

Ο όρος «προμετωπιαίος φλοιός» αναφέρεται μόνο στον παραμεταιχμιακό και στους ετεροτροπικούς τομείς του μετωπιαίου λοβού, δηλαδή στον δεύτερο και τον τρίτο τομέα. Ο προμετωπιαίος φλοιός είναι το πρόσθιο τμήμα των εμπρόσθιων

λοβών του εγκεφάλου και εντοπίζεται μπροστά από τις κινητικές και προκινητικές περιοχές. Στο πίνακα που ακολουθεί, απεικονίζονται οι διαφορετικοί τρόποι υποδιαίρεσης των διαφορετικών πεδίων του Broadmann του προμετωπιαίου φλοιού.

**Πίνακας 1.1:** Διαφορετικοί τρόποι υποδιαίρεσης των διαφορετικών πεδίων του Broadmann του προμετωπιαίου φλοιού

8	9	46	44	45	47	47	11	10
					Έξω τμήμα	Κογχικό (κοιλιακό)		
Έξω ραχιαίο						Κογχομετωπιαίο, Έσω κοιλιακό, Βασικό, Κογχικό	Προσθιοπολικό, Πρόσθιο, Ρυγχαίο	
Έξω ραχιαίο			Έξω κοιλιακό					
Οπίσθιο Έξω ραχιαίο	Ενδιάμεσο Έξω Ραχιαίο							

Ο έξω ραχιαίος προμετωπιαίος φλοιός εντοπίζεται εντός και περίξ του πεδίου 9 και είναι ιδιαίτερα ενεργός και στα δύο ημισφαίρια στη φάση εγρήγορσης. Ονομάζεται και επιβλέπον σύστημα εγρήγορσης. Συμμετέχει σε όλες τις γνωσιακές λειτουργίες και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη συνειδητή μάθηση. Κατά τη συνειδητή μάθηση επεξεργάζεται τη μνήμη και ανακαλεί τα κατάλληλα εγγράμματα τα οποία σχετίζονται με την εκάστοτε υπό εκτέλεση ενέργεια. Εστιάζει την προσοχή στα σημαντικά στοιχεία των ερεθισμάτων αγνοώντας τα ασήμαντα ενώ είναι επίσης σημαντικός για την επιλογή στόχων [6]. Το κύκλωμά του έξω ραχιαίου προμετωπιαίου φλοιού παίζει ρόλο σε συνιστώσες της επιτελικής λειτουργίας, συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου της προσοχής και της συνεχούς οργάνωσης της συμπεριφοράς, για την επίλυση σύνθετων προβλημάτων [7, 8]. Φαίνεται να ρυθμίζει κυρίως τις γνωστικές λειτουργίες σε σχέση με προβλήματα ουδέτερης συναισθηματικής χροιάς [9].

Ο έσω προμετωπιαίος φλοιός σχετίζεται με την ακοή και τον προφορικό λόγο. Ο έσω προμετωπιαίος φλοιός και ο φλοιός της έλικας του προσαγωγίου σχετίζονται με την παρακολούθηση της ανατροφοδότησης της συμπεριφοράς και τα κίνητρά της. Αν πάθει βλάβη αυτή η περιοχή προκαλείται απάθεια [10].

Ο κογχομετωπιαίος φλοιός περιγράφεται και ως νεοφλοιώδης αντιπρόσωπος του μεταχιακού συστήματος επειδή συνδέεται με την αμυγδαλή, την περιοχή του

διαφράγματος και το φλοιό του κροταφικού πόλου [11]. Οποιαδήποτε βλάβη σε αυτόν μπορεί να προκαλέσει απώλεια της δυνατότητας του ατόμου να καθορίζει τη συμπεριφορά του και να οδηγήσει σε εμφάνιση προβλημάτων με τον αυτοέλεγχο. Μια από τις βασικές λειτουργίες του κογχομετωπιαίου φλοιού είναι η ευελιξία του να αξιολογεί τη σημαντικότητα των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, ορίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο πώς το περιβάλλον επηρεάζει και επηρεάζεται από τις ενέργειές μας [12]. Έπειτα από πειράματα σε πρωτεύοντα θηλαστικά και τρωκτικά [12, 13] έχει αποδειχθεί ότι αλλοιώσεις στον κογχομετωπιαίο φλοιό οδηγούν σε εθιστικές, καταναγκαστικές και παρορμητικές συμπεριφορές. Μαζί με τον έξω ραχιαίο σχετίζονται με τη συνολική ρύθμιση της συμπεριφοράς λόγω της μοναδικής τους ιδιότητας να συλλέγουν στοιχεία αισθητηριακών, συναιθηματικών και συνειρμικών πληροφοριών και μνημών [14, 15].

Η κοιλιακή περιοχή του προμετωπιαίου φαίνεται να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην συναιθηματική ρύθμιση, τον αυτοέλεγχο και την λήψη αποφάσεων συναιθηματικής χροιάς [16].

Συνοψίζοντας, όταν το άτομο προσπαθεί να ελέγξει τη συναιθηματική φόρτιση [17, 18] και τις ήδη μαθημένες ή «παρορμητικές» αντιδράσεις [19, 20, 21] ενεργοποιούνται ο κογχομετωπιαίος φλοιός και ο έξω κοιλιακός προμετωπιαίος φλοιός. Όταν πάλι οι αντιδράσεις του ατόμου καθορίζονται από ήδη μαθημένες συμπεριφορές ή ως συνέπεια των πεποιθήσεών του [22] τότε ενεργοποιείται ο έσω κοιλιακός προμετωπιαίος φλοιός. Τέλος, με βάση ένα άρθρο του Hornak το 2004, [23] ο έξω ραχιαίος προμετωπιαίος φλοιός εμπλέκεται στη μετατόπιση του κανόνα για τη ρύθμιση της συμπεριφοράς [11].

Σε γενικές γραμμές, ο αριστερός προμετωπιαίος φλοιός έχει «προσεγγιστικό» ρόλο αφού συμμετέχει σε όλες τις δραστηριότητες που έχουν σχέση με την ομιλία και την εσωτερική ομιλία που συνοδεύει όλες τις διερευνητικές δραστηριότητες. Ενώ, ο δεξιός προμετωπιαίος φλοιός ενεργοποιείται ιδιαίτερα από τρομακτικές εμπειρίες είτε είναι πραγματικές είτε είναι εικονικές και έχει ρόλο «απόσυρσης».[24]

### 1.3 ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΕΙΣ

Ο προμετωπιαίος φλοιός είναι γνωστός και ως το συνειρμικό κέντρο του μετωπιαίου φλοιού, περιλαμβάνει ένα σημαντικό μέρος του μετωπιαίου λοβού, όπως

προαναφέρθηκε παραπάνω, και αποτελεί ένα από τα πιο αξιοσημείωτα αναπτυγμένα μέρη του ανθρώπινου εγκεφάλου. Ο προμετωπιαίος φλοιός (πεδία 9, 10, 11, 12, 46 και 47), από τον οποίο δεν μπορούμε να προκαλέσουμε κινητικές απαντήσεις με ερεθισμό, έχει υποστεί μια εξαιρετική μεγέθυνση στα πρωτεύοντα θηλαστικά και ιδιαίτερα στον άνθρωπο. Για το λόγο αυτό ήδη από νωρίς υπέθεταν ότι πρόκειται για περιοχή ανώτερων ψυχικών λειτουργιών, ακόμα περισσότερο επειδή σε παθήσεις, (π.χ. τραυματισμοί και όγκοι του μετωπιαίου εγκεφάλου, ιδιαίτερα όγκοι της κογχικής περιοχής) που έβλαπταν κυρίως το μετωπιαίο φλοιό, παρατηρήθηκαν ψυχικές ανωμαλίες.[25]

Ο προμετωπιαίος φλοιός έχει την έννοια του σημείου σύγκλισης δύο λειτουργικών αξόνων:

- i. ενός για τη μνήμη εργασίας, την επιτελική λειτουργία, την προσήλωση με διασυνδεδετικά επίκεντρα στον προμετωπιαίο και τον οπίσθιο βρεγματικό φλοιό
- ii. και ενός για τον έλεγχο της συμπεριφοράς με διασυνδεδετικά επίκεντρα στον προμετωπιαίο και κογχομετωπιαίο παραμεταιχμιακό φλοιό.

Σημαντικά υποφλοιώδη τμήματα των δύο αυτών λειτουργικών αξόνων είναι η κεφαλή του κερκοφόρου πυρήνα και ο έσω ραχιαίος πυρήνας του θαλάμου.[5]

Ο πιο τυπικός ψυχολογικός ορισμός για τις λειτουργίες που εκτελούνται από τον προμετωπιαίο φλοιό είναι η επιτελική λειτουργία. Η επιτελική λειτουργία σχετίζεται με ικανότητες που διαφοροποιούν αντικρουόμενες σκέψεις, καθορίζουν το καλό και το κακό, το καλύτερο και το κάλλιστο, το ίδιο και το διαφορετικό, τις μελλοντικές συνέπειες από τωρινές δραστηριότητες, το συγκεκριμένο στόχο που έχουμε θέσει, την προσδοκία που βασίζεται σε ενέργειες και τον κοινωνικό «έλεγχο» (η ικανότητα να περιορίζουμε ανάγκες, που αν δεν περιοριστούν, θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε κοινωνικά μη αποδεκτές εκβάσεις). [26]

Από λειτουργικής άποψης, η εξωτερική επιφάνεια του μετωπιαίου λοβού, ο ραχιαίος προμετωπιαίος φλοιός, φαίνεται να έχει σχέση με την «πνευματική δραστηριότητα» καθώς συνδέεται ιδιαίτερα με περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με την προσοχή, τη γνώση, και τη δράση [27]. Ο κοιλιακός προμετωπιαίος φλοιός από την άλλη, δηλαδή η έσω και η κογχική επιφάνεια έχουν σχέση με τη συναισθηματική συμπεριφορά [28] και με τον έλεγχο της δραστηριότητας του αυτόνομου νευρικού συστήματος αφού αλληλεπιδρούν με περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με το συναίσθημα [25].

Ο προμετωπιαίος φλοιός διαθέτει αμφίδρομες συνδέσεις με όλα τα μέρη του νεοφλοιού εκτός από τον πρωτοταγή κινητικό και αισθητικό φλοιό, με ομόλογες περιοχές του ετερόπλευρου ημισφαιρίου μέσω του γόνατος του μεσολοβίου και με τον έσω ραχιαίο πυρήνα του θαλάμου. Τα μετωπιαία πεδία του φλοιού συνδέονται αμφίδρομα με τον έσω πυρήνα του θαλάμου και δέχονται έτσι επιδράσεις από τον υποθάλαμο. Συνοπτικά, δέχεται προσαγωγές ίνες που προέρχονται από το θάλαμο και από άλλες φλοιώδεις περιοχές, ενώ χορηγεί επίσης απαγωγές ίνες στο θάλαμο και στον υποθάλαμο.[29]

#### 1.4 ΕΠΙΤΕΛΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

Όταν αναφερόμαστε στον όρο επιτελική λειτουργία εννοούμε την επιλογή πληροφοριών, γνώσεων, ή ερεθισμάτων που σχετίζονται μεταξύ τους, τη συγκράτηση και την επεξεργασία τους καθώς και το σχεδιασμό της περαιτέρω χρήσης τους. Συνεπώς, η επιτελική λειτουργία είναι κατά βάση ο σχεδιασμός και η οργάνωση. Είναι, επίσης, η ικανότητα να αναγνωρίζει κανείς και να μαθαίνει μοτίβα αλλά συγχρόνως να έχει και την ικανότητα να ανταποκρίνεται σε αλλαγές. Επιπλέον, αφορά την δυνατότητα και την ικανότητα που έχει κανείς να επιλέγει την κατάλληλη ανταπόκριση ή συμπεριφορά, ενώ την ίδια στιγμή μπορεί να αναστείλει ακατάλληλες ανταποκρίσεις ή συμπεριφορές. Σύμφωνα με τον Shimamura, A.P. το 2000 [30] ο προμετωπιαίος φλοιός θεωρείται ότι δρα ως ένας μηχανισμός φιλτραρίσματος υψηλού επιπέδου που ενισχύει στοχευμένες ενέργειες και αναστέλλει τις άσχετες. Αυτός ο μηχανισμός επιτρέπει τον έλεγχο της εκτέλεσης σε πολλαπλά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης της επιλογής, της διατήρησης, της αναβάθμισης και της αναδρομολόγησης των ενεργειών. Έχει χρησιμοποιηθεί μάλιστα, για να περιγράψει την συναισθηματική ρύθμιση.

Με βάση τους Miller και Cohen το 2001 [31], ο γνωστικός έλεγχος απορρέει από την ενεργή διατήρηση των μοτίβων δραστηριότητας στον προμετωπιαίο φλοιό. Με άλλα λόγια, ο γνωστικός έλεγχος αντιπροσωπεύει τους στόχους και τα μέσα για την επίτευξή τους. Παρέχει σήματα σε άλλες δομές του εγκεφάλου, των οποίων ο στόχος είναι να κατευθύνουν τη ροή της δραστηριότητας κατά μήκος νευρικών οδών που διαμορφώνουν τις κατάλληλες αντιστοιχίσεις ανάμεσα στις εισροές, τις εσωτερικές καταστάσεις και τις εκροές που απαιτούνται για να εκτελεστεί ένα



συγκεκριμένο έργο. Ουσιαστικά, οι Miller και Cohen πιστεύουν ότι ο προμετωπιαίος φλοιός κατευθύνει τις εισροές και τις συνδέσεις που επιτρέπουν τον γνωστικό έλεγχο των ενεργειών μας.

Ο προμετωπιαίος φλοιός είναι εξέχουσας σημασίας όταν υπάρχει ανάγκη για top-down επεξεργασία. Εξ ορισμού η top-down επεξεργασία είναι όταν η συμπεριφορά κατευθύνεται από εσωτερικές καταστάσεις ή προθέσεις. Ο προμετωπιαίος φλοιός είναι κρίσιμος και ιδιαίτερα σημαντικός σε καταστάσεις όπου οι αντιστοιχίες μεταξύ αισθητήριων εισροών, σκέψεων και ενεργειών είτε είναι ασθενώς εγκατεστημένες σε σχέση με άλλες, είτε εξελίσσονται με γρήγορους ρυθμούς.[32]

## 1.5 ΜΝΗΜΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Μνήμη εργασίας είναι η ικανότητα που διαθέτει καθένας να κρατάει ενεργές πληροφορίες στον εγκέφαλο προκειμένου να εκτελεί πολύπλοκες εργασίες όπως είναι η λογική, η κατανόηση και η μάθηση. [33] Εργασιακά καθήκοντα μνήμης είναι αυτά που απαιτούν κατευθυνόμενη από το στόχο ενεργή παρακολούθηση ή χειραγώγηση των πληροφοριών ή συμπεριφορών απέναντι σε παρεμβαλλόμενες διαδικασίες ή αντιπερισπασμούς. Οι εμπλεκόμενες γνωστικές διεργασίες περιλαμβάνουν τον επιτελικό έλεγχο και τον έλεγχο της προσοχής της βραχυπρόθεσμης μνήμης, ώστε να παρέχουν την προσωρινή ολοκλήρωση, επεξεργασία, διάθεση και ανάκτηση πληροφοριών.

Υπάρχουν θεωρίες που αφορούν τόσο τη θεωρητική δομή της μνήμης εργασίας όσο και το ρόλο συγκεκριμένων περιοχών του εγκεφάλου που εμπλέκονται στη μνήμη εργασίας. Με βάση την έρευνα, ως κρίσιμα προσδιορίζονται ο μετωπιαίος φλοιός, ο βρεγματικός φλοιός, ο πρόσθιος φλοιός του προσαγωγίου και μέρη των βασικών γαγγλίων. Η νευρωνική βάση της μνήμης εργασίας έχει προσδιοριστεί με πειράματα βλάβης σε ζώα καθώς και από την λειτουργική απεικόνιση σε ανθρώπους.

Το 1974 οι Baddeley και Hitch [34] εισήγαγαν και έκαναν δημοφιλές το πολυσύνθετο μοντέλο της μνήμης εργασίας. Με βάση τη θεωρία αυτή προτείνεται ότι δύο «συστήματα σκλάβοι» είναι υπεύθυνα για τη βραχυπρόθεσμη διατήρηση πληροφοριών καθώς και ένα «κεντρικό επιτελικό» σύστημα που ευθύνεται για την εποπτεία ενσωμάτωσης της πληροφορίας και για το συντονισμό των «συστημάτων

σκλάβων». Το ένα «σύστημα σκλάβος» είναι ο φωνητικός βρόγχος, που αποθηκεύει φωνητικές πληροφορίες (δηλαδή, τον ήχο της γλώσσας) και αποτρέπει τη φθορά του με τη συνεχή άρθρωση του περιεχομένου του, κατορθώνοντας να ανανεώνει συνεχώς τις πληροφορίες που φέρει. Το άλλο «σύστημα σκλάβος» είναι η οπτικοχωρική απεικόνιση, δηλαδή η αποθήκευση οπτικών και χωρικών πληροφοριών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παράδειγμα, για την κατασκευή και τον χειρισμό οπτικών εικόνων και για την αναπαράσταση νοητικών χαρτών. Το κεντρικό επιτελικό σύστημα είναι, μεταξύ άλλων όπως προαναφέραμε, για τη κατεύθυνση της προσοχής σε χρήσιμες πληροφορίες, την καταστολή άσχετων πληροφοριών και μη επιτρεπών ενεργειών και για το συντονισμό των γνωστικών διεργασιών, όταν περισσότερες από μία εργασίες πρέπει να γίνουν ταυτόχρονα. Ο Baddeley (2000) [35] επέκτεινε το μοντέλο με τη προσθήκη μίας τέταρτης συνιστώσας, το «επεισοδιακό» ρυθμιστικό σύστημα (buffer) που φέρει αναπαραστάσεις που ενσωματώνουν φωνητικές, οπτικές και χωρικές πληροφορίες, και ενδεχομένως, πληροφορίες που δεν καλύπτονται από αυτά τα συστήματα (π.χ. σημασιολογικές πληροφορίες, μουσικές πληροφορίες). Η καινούρια συνιστώσα θεωρείται «απαρτιωτική», δηλαδή δεσμεύει όλες τις πληροφορίες σε ένα ενιαίο σύνολο που αφορούν ένα συγκεκριμένο επεισόδιο.

Από την άλλη ο Cowan με δημοσιεύσεις του το 1995 και το 2005 [36, 37] θεωρεί τη μνήμη εργασίας ως τμήμα της μακροχρόνιας μνήμης και όχι ως ένα χωριστό σύστημα. Η μνήμη εργασίας είναι οργανωμένη σε δύο ενσωματωμένα επίπεδα. Το πρώτο επίπεδο αποτελείται από ενεργοποιημένες αναπαραστάσεις μακροχρόνιας μνήμης. Μάλιστα μπορεί να υπάρχουν πολλές από αυτές, καθώς δεν υπάρχει όριο όσον αφορά την ενεργοποίηση αναπαραστάσεων στη μακροπρόθεσμη μνήμη. Το δεύτερο επίπεδο ονομάζεται επίκεντρο της προσοχής. Η εστίαση θεωρείται χωρητικά περιορισμένη, αφού μπορεί να συγκρατήσει έως και τέσσερις από τις ενεργοποιημένες απεικονίσεις. Ο Oberauer (2002) [38] έχει επεκτείνει το μοντέλο Cowan με την προσθήκη ενός τρίτου στοιχείου, μια πιο στενή εστίαση της προσοχής, το οποίο κρατά ένα μόνο κομμάτι κάθε φορά.

Το 1995 οι Ericsson και Kintsch υποστήριξαν ότι χρησιμοποιούμε εξειδικευμένη μνήμη στις περισσότερες καθημερινές εργασίες. Οφείλουμε να συγκρατούμε μόνο μερικές έννοιες στη μνήμη εργασίας, που χρησιμεύουν ως συνθήματα για να ανακτούμε τα πάντα που συνδέονται με αυτά μέσω διαφόρων δομών ανάκτησης. Οι Anders Ericsson και Walter Kintsch (1999) [39] αναφέρονται σε αυτό το σύνολο διεργασιών ως «μακροπρόθεσμη μνήμη εργασίας». Οι δομές

ανάκτησης ποικίλουν ανάλογα με τον τομέα εξειδίκευσης, αλλά με βάση τον Gobet, το 2000 [40], μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις τυπολογίες: δομές γενικής ανάκτησης, δομές ανάκτησης γνώσης και τέλος δομές ανάκτησης γλωσσικών επεισοδίων (π.χ. με το διάβασμα).

Γενικά θεωρείται ότι η μνήμη εργασίας έχει περιορισμένη χωρητικότητα. Το 1956 ο Miller [41] παρατήρησε ότι το εύρος της μνήμης των νεαρών ενηλίκων περιοριζόταν σε επτά στοιχεία, ή αλλιώς κομμάτια, ανεξάρτητα από το αν τα στοιχεία ήταν ψηφία, γράμματα, λέξεις ή άλλες μονάδες. Αργότερα, η έρευνα αποκάλυψε ότι το εύρος πράγματι εξαρτάται από την κατηγορία στην οποία ανήκουν τα στοιχεία ακόμα και από τα χαρακτηριστικά των στοιχείων που ανήκουν σε μια κατηγορία (π.χ. όσον αφορά ψηφία το εύρος της μνήμης ανέρχεται στα 7 στοιχεία, όσο αφορά τα γράμματα ανέρχεται στα 6, ενώ όσο αφορά τις λέξεις ανέρχεται στις 5). Είναι σημαντικό να σημειωθεί σε αυτό το σημείο, ότι η εξάσκηση των δεξιοτήτων της μνήμης δεν επεκτείνει το εύρος της μνήμης εργασίας.

Η χωρητικότητα της μνήμης εργασίας μπορεί να ελεγχθεί μέσα από μια ποικιλία εργασιών. Οι μετρήσεις της χωρητικότητας της μνήμης εργασίας συνδέονται στενά με τις επιδόσεις σε άλλες σύνθετες γνωστικές εργασίες, όπως είναι η κατανόηση του γραπτού λόγου, η επίλυση προβλημάτων καθώς και με οποιεσδήποτε άλλες επιδόσεις που αφορούν τον δείκτη νοημοσύνης. Άλλοι, πάλι, υποστηρίζουν ότι η χωρητικότητα της μνήμης εργασίας χαρακτηρίζεται καλύτερα ως η ικανότητα να σχηματίζει κανείς νοητικές σχέσεις μεταξύ των στοιχείων ή να κατανοεί τις σχέσεις στην παρεχόμενη πληροφορία.

Υπάρχουν διάφορες θεωρίες σχετικά με τη φύση του ορίου χωρητικότητας. Η μια θεωρία υποστηρίζει ότι υπάρχει μια περιορισμένη ομάδα γνωστικών πόρων για να κρατάει παραστάσεις ενεργές και ως εκ τούτου διαθέσιμες για την επεξεργασία και την εκτέλεση διαδικασιών. Μια άλλη υπόθεση ισχυρίζεται ότι τα ίχνη μνήμης στη μνήμη εργασίας εκφυλίζονται μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα, εκτός εάν ανανεώνονται μέσω της επανάληψης, και επειδή η ταχύτητα της επανάληψης είναι περιορισμένη, μπορεί κανείς να διατηρήσει μόνο έναν περιορισμένο αριθμό πληροφοριών. Ενώ, μια τρίτη θεωρία υποστηρίζει ότι αναπαραστάσεις που βρίσκονται στη μνήμη εργασίας λόγω της χωρητικότητας της αναγκάζονται να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Μάλιστα, με βάση μια από τις παλαιότερες ιδέες, όσον αφορά την τελευταία θεωρία, νέα στοιχεία αντικαθιστούν παλαιότερα στη μνήμη εργασίας, ενώ μια άλλη μορφή παρέμβασης αποτελεί ο ανταγωνισμός ανάκτησης. Μια τρίτη μορφή παρέμβασης

που υποστηρίζεται από ορισμένους συγγραφείς είναι η αντικατάσταση χαρακτηριστικών. Με βάση αυτή την άποψη κάθε λέξη, ψηφίο ή άλλο στοιχείο στην μνήμη εργασίας παρουσιάζεται ως ένα σύνολο στοιχείων και όταν δύο στοιχεία έχουν κοινά χαρακτηριστικά, το ένα από τα δύο κλέβει τα χαρακτηριστικά από το άλλο. Όσα περισσότερα στοιχεία συγκρατούνται στη μνήμη εργασίας, τόσα περισσότερα χαρακτηριστικά αλληλεπικαλύπτονται και τόσο περισσότερο το καθένα από αυτά υποβαθμίζεται εξαιτίας της απώλειας ορισμένων χαρακτηριστικών.

Επιπλέον, όσες περισσότερες πληροφορίες πρέπει να διατηρούνται στη μνήμη εργασίας, τόσο πιο αργές και επιρρεπείς σε λάθη είναι οι ταυτόχρονες διαδικασίες, με αποτέλεσμα μια υψηλότερη ζήτηση στην παράλληλη επεξεργασία να κάνει τη μνήμη να υποφέρει. Η φθορά των παραστάσεων της μνήμης πρέπει να εξαρτάται μόνο από το πόσο καθυστερεί η διαδικασία της επανάληψης ή της ανάκτησης κι όχι από το περιεχόμενο της διαδικασίας επεξεργασίας. Υλικά που μοιάζουν περισσότερο μεταξύ τους είναι πιο πιθανό να δημιουργήσουν σύγχυση, οδηγώντας σε ανταγωνισμό ανάκτησης αφού έχουν περισσότερα χαρακτηριστικά που αλληλεπικαλύπτονται και συμβάλλουν σε μεγαλύτερη αντικατάστασή τους.

Η χωρητικότητα της μνήμης εργασίας αυξάνεται σταδιακά κατά την παιδική ηλικία και μειώνεται σταδιακά κατά το γήρας. Η απόδοση σε τεστ μνήμης εργασίας αυξάνει συνεχώς μεταξύ της πρώιμης παιδικής ηλικίας και της εφηβείας, ενώ οι συσχετισμοί μεταξύ διαφορετικών δομών παραμένουν σε μεγάλο βαθμό σταθεροί. Έτσι, η ανάπτυξη της μνήμης εργασίας μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια ποσοτική αύξηση και όχι ως μια ποιοτική αλλαγή.

Η μνήμη εργασίας είναι από τις πιο ευαίσθητες γνωστικές λειτουργίες στην ύφεση κατά το γήρας. Στην ψυχολογία έχουν προσφερθεί πολλές εξηγήσεις για αυτή την ύφεση. Ο Tim Salthouse (1994, 1996) [42, 43] ανέπτυξε τη θεωρία της γνωστικής γήρανσης με βάση την οποία, η πιο αργή επεξεργασία αφήνει περισσότερο χρόνο για τη φθορά του περιεχομένου της μνήμης εργασίας μειώνοντας κατ'αυτόν τον τρόπο την πραγματική παραγωγική χωρητικότητα. Η μείωση της χωρητικότητας της μνήμης εργασίας δεν μπορεί να αποδοθεί εξ ολοκλήρου στην επιβράδυνση αφού σε μεγάλη ηλικία μειώνεται περισσότερο η χωρητικότητα από την ταχύτητα.

Μια άλλη πρόταση είναι η υπόθεση αναστολής, όπου στην τρίτη ηλικία παρουσιάζεται μειωμένη ικανότητα αναστολής άσχετων ή πλέον μη επίκαιρων πληροφοριών. Ως εκ τούτου η μνήμη εργασίας τείνει να παραγεμίζει με άσχετο περιεχόμενο που μειώνει τη πραγματική της χωρητικότητα.

Ο West (1996) [44] πρότεινε ότι η μνήμη εργασίας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον προμετωπιαίο φλοιό ο οποίος, κατά τη γήρανση, αλλοιώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό από ό,τι άλλες περιοχές του εγκεφάλου.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η βέλτιστη απόδοση της μνήμης εργασίας συνδέεται με τη νευρωνική ικανότητα εστίασης της προσοχής σε πληροφορίες σχετικές με την εργασία, ενώ αγνοεί αντιπερισπασμούς και ότι η βελτίωση της μνήμης εργασίας που σχετίζεται με την επανάληψη, οφείλεται στην αύξηση αυτών των ικανοτήτων.

Απεικονίσεις του εγκεφάλου έχουν αποδείξει ότι η μνήμη εργασίας δεν περιορίζεται στον προμετωπιαίο φλοιό [45]. Μια ανασκόπηση από πολυάριθμες μελέτες έχει δείξει ότι περιοχές που λειτουργούν/δραστηριοποιούνται κατά την ενεργοποίηση της μνήμης εργασίας εντοπίζονται διασκορπισμένες σε ένα μεγάλο μέρος του φλοιού. Κατά γενική παραδοχή οι περισσότερες λειτουργίες της μνήμης εργασίας αφορούν τον προμετωπιαίο φλοιό και περιοχές του βρεγματικού φλοιού. Μάλιστα μια μελέτη έχει δείξει ότι κατά την ενεργοποίηση μιας λειτουργίας της μνήμης εργασίας αυξάνεται η συνδεσιμότητα ανάμεσα σε αυτές τις περιοχές [46]. Ενώ, μια άλλη μελέτη έδειξε ότι αυτές οι περιοχές είναι απαραίτητες για την λειτουργία της μνήμης εργασίας [47]. Μερικοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι ο ρόλος του προμετωπιαίου φλοιού στη μνήμη εργασίας αφορά στον έλεγχο της προσοχής, στην επιλογή των στρατηγικών και στη χειραγώγηση των πληροφοριών της μνήμης εργασίας, αλλά όχι στην διατήρηση των πληροφοριών [48]. Η τελευταία αυτή λειτουργία αποδίδεται στις οπίσθιες περιοχές του εγκεφάλου, όπως είναι ο βρεγματικός φλοιός [49, 50]. Η μνήμη εργασίας έχει προταθεί ότι εμπλέκεται σε δύο διαδικασίες με διαφορετικές νευροανατομικές θέσεις στο μετωπιαίο λοβό και στο βρεγματικό λοβό. Η πρώτη διαδικασία αφορά μια πράξη επιλογής, η οποία ανακτά το πιο σημαντικό στοιχείο και η δεύτερη μια λειτουργία ενημέρωσης που αφορά την αλλαγή του επίκεντρου προσοχής [51].

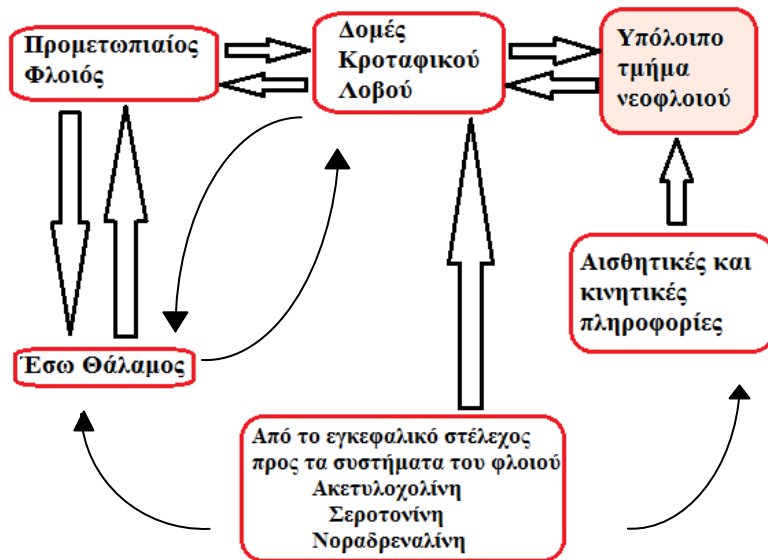
Ο Arnsten και οι συνεργάτες του (2010) [52] απέδειξαν με πειράματα σε ζώα ότι η μνήμη εργασίας μειώνεται με το οξύ και χρόνια ψυχολογικό στρες καθώς η απελευθέρωση των κατεχολαμινών στον προμετωπιαίο φλοιό, που προκαλείται από το στρες, μειώνει ταχέως τη νευρωνική του πυροδότηση και εξασθενεί την απόδοση της μνήμης εργασίας μέσω feedforward ενδοκυττάρων οδών σηματοδότησης. Οι ισχυρές επιδράσεις του στρες στη δομή και τη λειτουργία του προμετωπιαίου φλοιού μπορεί να βοηθήσουν στην επεξήγηση του πώς το στρες μπορεί να προκαλέσει ή να επιδεινώσει μια ψυχική ασθένεια.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν γίνει γνωστά πολλά σχετικά με το πού, δηλαδή σε ποιες περιοχές του εγκεφάλου, εκτελούνται λειτουργίες της μνήμης εργασίας. Ωστόσο, οι γνώσεις μας παραμένουν ελάχιστες όσον αφορά το πώς ο εγκέφαλος συντηρεί βραχυπρόθεσμα και εκμεταλλεύεται ελεγχόμενα, ανάλογα με το στόχο, την πληροφορία. Ο εγκέφαλος έχει έναν μηχανισμό να διατηρεί αναπαραστάσεις ενεργές χωρίς να έχει ανάγκη από εξωτερικό ερέθισμα και αυτό φαίνεται από την επίμονη ενεργότητα ορισμένων νευρώνων κατά τη περίοδο καθυστέρησης των λειτουργιών της μνήμης εργασίας.[53]

Η έρευνα προτείνει ότι υπάρχει ένας στενός δεσμός ανάμεσα στη χωρητικότητα της μνήμης εργασίας ενός ατόμου και την ικανότητά της να ελέγχει ποιες πληροφορίες από το περιβάλλον μπορεί να ενισχύσει ή να αγνοήσει επιλεκτικά [54]. Η ικανότητα που έχει κανείς να επιβληθεί στην απόσπαση της προσοχής του διαφέρει από άτομο σε άτομο και αυτή η διαφορά συνδέεται στενά με την χωρητικότητα της μνήμης εργασίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η χωρητικότητα της μνήμης εργασίας ενός ατόμου τόσο μεγαλύτερη είναι και η ικανότητά του να αντιστέκεται σε αισθητηριακές αποσπάσεις. Η μειωμένη ικανότητα ενός να αντιπαρέρχεται στην απόσπαση της προσοχής του είναι πιθανό να οδηγεί σε αποθήκευση περιττών πληροφοριών στη μνήμη εργασίας κατορθώνοντας έτσι η φτωχή μνήμη εργασίας να επηρεάζει την προσοχή και συγχρόνως να περιορίζει ακόμη περισσότερο τη χωρητικότητά της. [31]

Σήμερα υπάρχουν εκατοντάδες ερευνητικά κέντρα ανά τον κόσμο που μελετούν διάφορες πτυχές της μνήμης εργασίας. Ειδικότερα υπάρχουν πολυάριθμες εφαρμογές της μνήμης εργασίας, όπως είναι η χρήση της χωρητικότητας της μνήμης εργασίας για να εξηγηθεί η νοημοσύνη, η επιτυχία στον έλεγχο των συναισθημάτων, και άλλες γνωστικές ικανότητες, όπως είναι η περαιτέρω κατανόηση διαταραχών του φάσματος του αυτισμού, του ADHD, της κινητήριας δυσπραξίας καθώς και η βελτίωση μεθόδων διδασκαλίας, του μορφωτικού επιπέδου και η δημιουργία τεχνητής νοημοσύνης με βάση τον ανθρώπινο εγκέφαλο.[32]

Γενικά, ο προμετωπιαίος φλοιός είναι κεντρικής σημασίας τόσο για τη διατήρηση της προσωρινής (βραχύχρονης) έκδηλης μνήμης, όσο και για τη μνήμη πρόσφατων γεγονότων (δηλαδή τη χρονολογική σειρά) της έκδηλης μνήμης.



**Εικόνα 1.2:** Διάγραμμα κυκλώματος που δείχνει τη ροή της πληροφορίας, ξεκινώντας με εισροές από τα αισθητηριακά και κινητικά συστήματα, τα οποία δεν θεωρούνται μέρος του κυκλώματος.

## 2. ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ «ΠΛΑΓΙΩΣΗ»

Μια διαμήκης σχισμή διαχωρίζει τον ανθρώπινο εγκέφαλο σε δύο διακριτά εγκεφαλικά ημισφαίρια, που συνδέονται με το μεσολόβιο. Οι δύο πλευρές μοιάζουν μεταξύ τους και η δομή κάθε ημισφαιρίου αντικατοπτρίζει τη δομή του άλλου. Ωστόσο, παρά τις σημαντικές ανατομικές ομοιότητες, υπάρχουν ανατομικές και λειτουργικές διαφορές μεταξύ των δύο φλοιϊκών ημισφαιρίων. Για παράδειγμα η πλευρική αύλακα είναι μακρύτερη στο αριστερό ημισφαίριο από ό,τι στο δεξιό.

Συχνά στη ψυχολογία χρησιμοποιούνται γενικεύσεις για τη μία ή την άλλη πλευρά του εγκεφάλου, χαρακτηρισμοί όπως «λογικό ημισφαίριο» ή «δημιουργικό ημισφαίριο». Αυτοί οι χαρακτηρισμοί πρέπει να αντιμετωπίζονται με προσοχή καθώς ενώ η πλαγίωση είναι μετρήσιμη, αυτά τα χαρακτηριστικά στη πραγματικότητα υπάρχουν και στα δύο ημισφαίρια, αφού και τα πειραματικά δεδομένα παρέχουν ελάχιστη υποστήριξη για τη συσχέτιση των δομικών διαφορών ανάμεσα στις λειτουργικά διαφορετικές δομές.[56]

Εάν μια συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου ή ακόμη και ένα ολόκληρο ημισφαίριο τραυματιστεί ή καταστραφεί, οι λειτουργίες μπορεί να αναληφθούν από μια γειτονική περιοχή, ακόμα και από το αντίθετο ημισφαίριο, ανάλογα με τη περιοχή που έχει καταστραφεί και την ηλικία του ασθενούς [57]. Όταν ο τραυματισμός εμπλέκει μονοπάτια που συνδέουν το ένα ημισφαίριο με το άλλο τότε μπορούν να προκύψουν εναλλακτικές συνδέσεις για τη μεταφορά πληροφοριών σε περιοχές που έχουν διαχωριστεί.[58]

Γενικά πάντως τα δύο εγκεφαλικά ημισφαίρια δεν είναι ταυτόσημα στις λειτουργίες τους. Καταρχήν, κινούμε το δεξί χέρι χάρη στο αριστερό ημισφαίριο, και το αριστερό χέρι χάρη στο δεξί ημισφαίριο. Το ίδιο ακριβώς ισχύει και για τα δυο πόδια. Έτσι, αν συμβεί εγκεφαλικό επεισόδιο στο δεξί ημισφαίριο τότε παραλύει η αριστερή πλευρά του σώματος, και αντίστροφα. Η συμμετρία όμως αυτή δεν ισχύει όταν πρόκειται για κέντρα άλλων λειτουργιών. Π.χ. το γλωσσικό κέντρο βρίσκεται σχεδόν πάντα στο αριστερό ημισφαίριο. Έτσι, λέμε ότι υπάρχει πλαγίωση (lateralization) σε ορισμένες λειτουργίες του εγκεφάλου. [59]

Για την πλειοψηφία των ανθρώπων ισχύουν τα εξής:

- Το αριστερό ημισφαίριο επεξεργάζεται πληροφορίες σχετικά με τη λογική, τους κανόνες, τις λέξεις και τη γλώσσα, τα μαθηματικά και την επιστήμη,



την αίσθηση του παρελθόντος και μέλλοντος, με στρατηγικές και σχέδια, με εστίαση στις λεπτομέρειες, κ.ά.

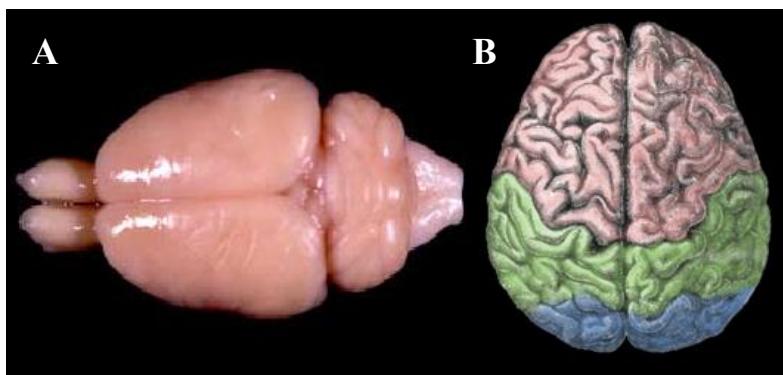
- Το δεξί ημισφαίριο επεξεργάζεται πληροφορίες σχετικά με το συναίσθημα, τη φαντασία, τα σύμβολα και τις εικόνες, τις πίστεις, τη “γενική εικόνα” (χωρίς εστίαση στις λεπτομέρειες), αντιλαμβάνεται καλύτερα τη φιλοσοφία και τη θρησκεία, σχετίζεται περισσότερο με την αίσθηση του χώρου, αντιλαμβάνεται τη λειτουργία των αντικειμένων, ενέχεται στη λήψη ρίσκων, κ.ά.

Τα παραπάνω δίνουν μια προσεγγιστική εικόνα του χαρακτήρα μερικών ανθρώπων. Σε κάποιους ανθρώπους επικρατούν οι λειτουργίες του αριστερού ημισφαιρίου, ενώ σε άλλους του δεξιού, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν έντονα κάποια χαρακτηριστικά της προσωπικότητάς τους, ενώ κάποια άλλα χαρακτηριστικά παίζουν λιγότερο σημαντικό ρόλο.[59]

## 2.1 ΑΡΙΣΤΕΡΟ – ΔΕΞΙ

Η τετράγωνη λογική και οι γλωσσικές λειτουργίες, όπως η γραμματική και το λεξιλόγιο συχνά εντοπίζονται στο αριστερό ημισφαίριο του εγκεφάλου. Αντίθετα, προσωδιακές γλωσσικές λειτουργίες, όπως είναι ο τονισμός, ο τόνος και η έμφαση της φωνής εδράζουν στο δεξί ημισφαίριο του εγκεφάλου.[57, 60] Η επεξεργασία των

οπτικοακουστικών ερεθισμάτων, η χωρική αίσθηση, η αντίληψη του προσώπου και η καλλιτεχνική ικανότητα είναι όλες λειτουργίες του δεξιού ημισφαιρίου. Η κατάθλιψη συνδέεται



**Εικόνα 2.1:** Ο εγκέφαλος του επίμου (A) και ο ανθρώπινος εγκέφαλος (B) χωρίζονται σε δύο ημισφαίρια

και αυτή με την υπερδραστηριότητα του δεξιού ημισφαιρίου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το δεξί ημισφαίριο εμπλέκεται περισσότερο στην επεξεργασία νέων καταστάσεων ενώ το αριστερό ημισφαίριο εμπλέκεται περισσότερο στον προγραμματισμό και στη

ρουτίνα [61]. Άλλες λειτουργίες όπως είναι τα μαθηματικά και τα συναισθήματα φαίνεται ότι ελέγχονται και από τα δύο ημισφαίρια.(βλέπε πίνακα που ακολουθεί) [62, 63]

**Πίνακας 2.1:** Λειτουργίες δεξιού και αριστερού ημισφαιρίου του εγκεφάλου.

	Λειτουργίες Δεξιού Ημισφαιρίου	Λειτουργίες Αριστερού Ημισφαιρίου
1	Οπτική αντίληψη του χώρου	Αντίληψη του χρόνου
2	Κατανόηση των μεταφορικών εννοιών και του χιούμορ	Ομιλία
3	Συσχέτιση, σύνθεση λεγομένων	Γραφή
4	Συναισθηματική φόρτιση και μελωδία λόγου	Αντίληψη του λόγου
5	Οπτική μνήμη	Συμβολισμό
6	Επικοινωνία, τόσο με τόνο φωνής όσο και με εκφράσεις του προσώπου και εξωλεκτική κινησιολογία («γλώσσα του σώματος»)	Λεκτική μνήμη
7	Προσοχή	Αναλυτική σκέψη
8	Διάκριση πολύπλοκων ακουστικών τόνων	Επικοινωνία με λέξεις κατά κυριολεξία
9	Πρόκληση παρορμητικής συμπεριφοράς	Επεξεργασία των ακουστικών ερεθισμάτων και της αφηρημένης πληροφορίας
10	Αισθήματα	Πρόκληση ελεγχόμενης συμπεριφοράς
11	Συγκινήσεις	Δευτερογενής ερμηνεία συμπεριφοράς
12	Δημιουργικότητα	Εκτελούνται διαδικασίες σχετικές με τα μαθηματικά και τη γραμματική
13	Φαντασία	
14	Καλλιτεχνική έκφραση	

## 2.2 ΙΣΤΟΡΙΚΑ

### 2.2.1 Λόγος και γλώσσα

Μια από τις πρώτες μελέτες που αφορά την εγκεφαλική πλαγίωση διεξήχθη από το Γάλλο ιατρό Pierre Paul Broca το 1861. Η οπίσθια περιοχή του μετωπιαίου λοβού αριστερά ονομάστηκε περιοχή Broca προς τιμήν του και αποτελεί μια σημαντική περιοχή για τη παραγωγή της ομιλίας. Σε περίπτωση βλάβης στην περιοχή του Broca δημιουργούνται ελλείμματα κατά τη παραγωγή του λόγου και ο ασθενής δεν μπορεί να αρθρώσει με ευκρίνεια και σαφήνεια τη γλώσσα που χρησιμοποιεί. Στη περίπτωση αυτή ο ασθενής πάσχει από την αφασία του Broca.

Αργότερα ο Wernicke παρατήρησε ότι δεν προκαλούνταν μόνο ελλείμματα κατά τη παραγωγή του λόγου αλλά και στη κατανόηση του λόγου όταν δημιουργούνταν βλάβη και στην αριστερή άνω οπίσθια κροταφική έλικα (γνωστή σήμερα ως περιοχή του Wernicke). Πλέον το σύνδρομο είναι γνωστό ως αφασία του Wernicke.[58]

### 2.2.2 Κίνηση και αίσθηση

Το 1940 ο Αμερικανός νευροχειρουργός Wilder Penfield και ο συνάδελφός του Herbert Jasper ανέπτυξαν μια τεχνική χαρτογράφησης του εγκεφάλου για να συμβάλλουν στη μείωση ανεπιθύμητων παρενεργειών που προκαλούνται μετά από χειρουργική επέμβαση για τη θεραπεία της επιληψίας. Οι δύο νευροχειρουργοί ανακάλυψαν ότι η διέγερση του κινητικού φλοιού του ενός ημισφαιρίου του εγκεφάλου προκαλεί σύσπαση των μυών που βρίσκονται στην άλλη πλευρά του σώματος.[58]

### 2.2.3 Ασθενείς με διαιρεμένο εγκέφαλο (Split-brain)

Το 1960 οι Michael Gazzaniga και Roger Wolcott Sperry συνεισέφεραν στη καλύτερη κατανόηση της λειτουργικής πλαγίωσης του εγκεφάλου με έρευνες που εκτέλεσαν σε ασθενείς με «χωρισμένο εγκέφαλο». Οι ασθενείς αυτοί είχαν υποβληθεί σε διατομή ενός μεγάλου μέρους του μεσολόβιου (ως θεραπεία για την

επιληψία), το οποίο συνδέει τα δύο ημισφαίρια του εγκεφάλου και επιτρέπει τη μεταξύ τους επικοινωνία. Συνεπώς, όταν κόβονται οι συνδέσεις αυτές, τα δύο ημισφαίρια έχουν μειωμένη ικανότητα να επικοινωνούν μεταξύ τους. Αυτό οδήγησε σε πολλά ενδιαφέροντα φαινόμενα συμπεριφοράς που επέτρεψαν στους Gazzaniga και Sperry να μελετήσουν τις λειτουργίες κάθε ημισφαιρίου. Ένα από τα βασικά συμπεράσματα στα οποία κατέληξαν ήταν ότι το δεξί ημισφαίριο είναι ικανό για την υποτυπώδη επεξεργασία της γλώσσας αλλά συχνά δεν έχει καθόλου λεξικές και γραμματικές ικανότητες [64]. Ωστόσο ο Eran Zaidel που μελέτησε ίδιους ασθενείς βρήκε ότι το δεξί ημισφαίριο έχει κάποιες συντακτικές ικανότητες.[58]

### 2.3 ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΠΛΑΓΙΩΣΗ ΣΕ ΑΛΛΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Η εξειδίκευση των δύο ημισφαιρίων είναι γενικότερα η ίδια στα σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών, των βατράχων, των ερπετών, των πουλιών και των θηλαστικών. Το αριστερό ημισφαίριο εξειδικεύεται στη κατηγοριοποίηση των πληροφοριών και στον έλεγχο της καθημερινής συμπεριφοράς, της ρουτίνας, ενώ το δεξί ημισφαίριο ευθύνεται για απαντήσεις σε νέα γεγονότα και συμπεριφορές σε καταστάσεις εκτάκτου ανάγκης, στις οποίες περιλαμβάνεται η έκφραση έντονων συναισθημάτων. Ένα παράδειγμα συμπεριφοράς ρουτίνας του αριστερού ημισφαιρίου αποτελεί η διατροφική συμπεριφορά ενώ χαρακτηριστικό παράδειγμα λειτουργίας του δεξιού ημισφαιρίου αποτελεί η απόδραση από θηρευτές.[65]

### 2.4 ΠΛΕΥΡΙΚΗ ΑΣΥΜΜΕΤΡΙΑ

Η εγκεφαλική πλαγίωση στους ανθρώπους έχει μελετηθεί εκτενώς από τότε που ανακαλύφθηκε η επικράτηση του αριστερού ημισφαιρίου, που ευθύνεται για τις γλωσσικές ικανότητες (ομιλία). [58] Μάλιστα μια μελέτη σε μεταθανάτιο ανθρώπινο εγκέφαλο έδειξε ότι η αριστερή κροταφική επιφάνεια (planum temporale - η εμβυθισμένη περιοχή στα πλάγια του κρανίου, κάτωθεν της κάτω κροταφικής γραμμής) ήταν μεγαλύτερη από τη δεξιά [66].

Οι αριστερές – δεξιές ασυμμετρίες είναι γνωστό πλέον ότι υπάρχουν σε μια ποικιλία ειδών, ανάμεσα στα οποία συγκαταλέγονται οι αρουραίοι και μη

ανθρωποειδή πρωτεύοντα, προτείνοντας με αυτό τον τρόπο την εξελικτική προέλευση όσον αφορά τη πλαγίωση που παρατηρείται στον ανθρώπινο εγκέφαλο [67, 68]. Η εγκεφαλική λειτουργική ασυμμετρία είναι επίσης γνωστή για τις εξειδικεύσεις των ημισφαιρίων όσον αφορά τη γλώσσα και την επιλεκτική χρησιμοποίηση του ενός χεριού στις εκούσιες κινήσεις [69]. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας της απεικόνισης βοήθησε περαιτέρω τις in vivo μελέτες όσον αφορά τη μέτρηση της ασυμμετρίας. Έτσι, με τις τεχνικές της μαγνητικής τομογραφίας (MRI), της τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (PET) και με τη βοήθεια της υπολογιστικής τομογραφίας (CT) μπορεί πλέον να μετρηθεί και να ποσοτικοποιηθεί η κανονική και η παθολογική ασυμμετρία του εγκεφάλου. Τα αποτελέσματα αυτού του τύπου μετρήσεων υποδεικνύουν διαφορές στον όγκο και την επιφάνεια καθώς και διαφορές στο μήκος των ημισφαιρίων επισημαίνοντας κατά αυτό τον τρόπο την εγκεφαλική πλευρική ασυμμετρία. Επιπλέον, η ασυμμετρία ενός υγιούς εγκεφάλου πρέπει να είναι πλήρως κατανοητή προκειμένου να κατανοήσει κανείς τις αναπτυξιακές αλλαγές και τα παθολογικά ευρήματα, όπως είναι η διπολική διαταραχή, η επιληψία, η σχιζοφρένεια, η διαταραχή του μετατραυματικού στρες, η νόσος του Πάρκινσον, η νόσος του Alzheimer καθώς και άλλες διαταραχές του εγκεφάλου.[70]

Παρόλο που είναι φυσιολογικό να υποθέσει κανείς ότι μέσω της αναπτυξιακής ρύθμισης, η διαφορετική γονιδιακή έκφραση παρέχει τη βάση για την πλαγίωση των εγκεφαλικών λειτουργιών, μόνο ορισμένες έρευνες έχουν μελετήσει αυτή την πιθανότητα. Οι Sun et al. το 2005 [71] παρουσίασαν την ύπαρξη ασύμμετρης γονιδιακής έκφρασης ανάμεσα στο δεξιό και το αριστερό ανθρώπινο εμβρυϊκό εγκεφαλικό φλοιό, προτείνοντας κατά αυτό τον τρόπο ότι μπορεί η πλαγίωση να δημιουργείται στους ανθρώπους στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξής τους. Αν και δεν έχουν γίνει μελέτες πλαγίωσης σε τρωκτικά κατά την εμβρυϊκή ζωή, έχει δειχθεί ότι η γονιδιακή έκφραση τροποποιείται δραματικά κατά τις πρώτες μεταγεννητικές εβδομάδες [72, 73].

Στους ανθρώπους παρατηρείται ανάπτυξη του δεξιού φλοιού πριν από τον αριστερό [74]. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι οι γλωσσικές ικανότητες καθώς και αυτές που αφορούν την αντίληψη του χώρου (χωρικές) εντοπίζονται αρχικά στο δεξιό ημισφαίριο στα παιδιά και έπειτα μεταφέρονται στο αριστερό στους ενήλικες [75]. Ο Moskal et al το 2006 πρότειναν ότι μια παρόμοια μετατόπιση από τα δεξιά στα αριστερά μπορεί να προκύψει κατά την ανάπτυξη και την ωρίμανση του εγκεφάλου. Επιπλέον, η αναγνώριση αυτής της μεταφοράς μπορεί να σχετίζεται με τη

σχιζοφρένεια και τον αυτισμό, ασθένειες που συνδέονται με αναπτυξιακές ανωμαλίες κατά τη δημιουργία του ιπποκάμπου και σχετιζόμενων δομών [76, 77]. Πιθανά ένα σημαντικό συστατικό που ρυθμίζει την εμφάνιση του σχιζοφρενούς φαινοτύπου να είναι η διαταραχή της φυσιολογικής ασύμμετρης γονιδιακής έκφρασης που εκδηλώνεται νωρίς κατά την ανάπτυξη.

Η εγκεφαλική ασυμμετρία και πλαγίωση έχουν επίσης μελετηθεί και σε βιοχημικό επίπεδο. Παραδείγματα σε αυτό το σημείο μπορούν να αναφερθούν πολλά [78]:

- Η ασύμμετρη κατανομή των θέσεων δέσμευσης του GABA στο φλοιό του εγκεφάλου, στον ιππόκαμπο, στα ημισφαίρια της παρεγκεφαλίδας, στο ραβδωτό σώμα, και στο θάλαμο.
- Το σύστημα οξειδίου του αζώτου στον ιππόκαμπο με την ασύμμετρη κατανομή του.
- Ο ντοπαμινεργικός εμπλουτισμός του δεξιού τμήματος του εγκεφάλου.
- Η αυξημένη έκφραση των υποδοχέων D2 στο αριστερό ραβδωτό σώμα.
- Επιπλέον, μπορεί να αναφερθεί και η ασύμμετρη κατανομή των ενδογενών διακυλογλυκερολών στα εγκεφαλικά ημισφαίρια των αρουραίων, με την απακυλίωση και την επανακυλίωση πολύπλοκων λιπιδίων να είναι πιο ενεργή στο δεξιό από ό,τι στο αριστερό ημισφαίριο.

### 3. ΠΡΩΙΜΕΣ ΕΜΠΕΙΡΙΕΣ

Στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, άρχισε πρώτη η ψυχανάλυση να μελετά τις επιπτώσεις των πρώιμων εμπειριών, ενώ ακολούθησαν και δεκαετίες έρευνας της Νευροβιολογίας που έχουν καταστήσει κατανοητό ότι οι πρώιμες εμπειρίες διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και ως εκ τούτου και στη διαμόρφωση της συμπεριφοράς του οργανισμού κατά την ενήλικη ζωή. Αυτή η ισχυρή και ανθεκτική στο χρόνο επίδραση των πρώιμων εμπειριών διαφορετικού τύπου κατά τη νεογνική ηλικία έχειδειχθεί ότι οδηγεί στη διαμόρφωση διαφορετικών συμπεριφορικών αποκρίσεων κατά την ενήλικη ζωή. Οι επιπτώσεις των πρώιμων εμπειριών διερευνήθηκαν αρχικά χρησιμοποιώντας ένα ζωικό μοντέλο που περιελάμβανε πειράματα με τρωκτικά [79, 80, 81].

Στα τρωκτικά, δηλαδή ποντίκια και επίμυς, η επίδραση του πρώιμου περιβάλλοντος στη λειτουργία του εγκεφάλου έχει μελετηθεί εκτενώς. Παρόλο που ο σημαντικός ρόλος των πρώιμων εμπειριών στη διαμόρφωση της εγκεφαλικής λειτουργίας έχει αναγνωριστεί, οι ακριβείς μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Συγκεκριμένα, έχουν χρησιμοποιηθεί πέντε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα προκειμένου να καθοριστεί η μελλοντική, μακροπρόθεσμη προσαρμοστική ικανότητα του οργανισμού στις απαιτήσεις του περιβάλλοντος του, καθώς και η προδιάθεσή του για ψυχικές και σωματικές ασθένειες. Τα πειραματικά μοντέλα ειδικότερα είναι τα ακόλουθα:

- i. Προγεννητικό stress
- ii. Μητρική αποστέρηση
- iii. Νεογνικός χειρισμός
- iv. Ανατροφή από «επιλεγμένες» μητέρες που δείχνουν ιδιαίτερα καλή μητρική συμπεριφορά
- v. Ανάπτυξη σε εμπλουτισμένο περιβάλλον

Τα παραπάνω πειράματα εκτελέστηκαν στηριζόμενα σε δύο σημαντικές θεωρητικές παραδοχές:

- Η πρώτη υποστηρίζει ότι τα πρώιμα γεγονότα και οι εμπειρίες καθιστούν το νεογνό ικανό να δημιουργήσει ένα σύνολο χαρακτηριστικών συμπεριφοράς και στρατηγικών αντιμετώπισης καταστάσεων προκειμένου να προσαρμοστεί κατάλληλα σε ένα δεδομένο περιβάλλον.
- Ενώ, με βάση τη δεύτερη παραδοχή τα γονίδια και το περιβάλλον αλληλεπιδρούν σε όλη τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού. Πιο αναλυτικά, κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων χρονικών περιόδων ο οργανισμός είναι ιδιαίτερα ευάλωτος στην αλληλεπίδραση μεταξύ γονιδιώματος και περιβαλλοντικών ερεθισμάτων σε βαθμό που μπορεί να επέλθουν μόνιμες αλλαγές στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και συνεπώς στη συμπεριφορά του οργανισμού. Ανάλογα με την έντασή τους, οι αλλαγές αυτές μπορούν να αυξήσουν τη πιθανότητα εμφάνισης ασθενειών οι οποίες δεν είναι προσαρμοστικές, να καταστήσουν τον οργανισμό ευάλωτο και ευπαθή σε ψυχιατρικές διαταραχές (π.χ. κατάθλιψη, σχιζοφρένεια, μετατραυματικό στρες, διάφορα είδη ψυχώσεων) καθώς και σε σωματικές ασθένειες (π.χ. ορμονική απορρύθμιση, καρδιαγγειακά προβλήματα). Αυτές οι περιόδους που μπορεί να διαταραχθεί η ανάπτυξη του νεογνού με αποτέλεσμα μια μη φυσιολογική ενήλικη ζωή είναι γνωστές ως *κρίσιμοι περίοδοι* και διαφέρουν από είδος σε είδος.

Ένα σημαντικό μέρος των σύγχρονων μελετών αποβλέπει στη διερεύνηση της επιρροής των πρώιμων εμπειριών στην ενήλικη ζωή. Οι πρώιμες εμπειρίες μπορεί να είναι είτε προγεννητικές, είτε μεταγεννητικές.

Οι προγεννητικές αφορούν τις εμπειρίες και τον τρόπο ζωής της εγκύου και μπορούν να επηρεάσουν είτε θετικά είτε αρνητικά την ανάπτυξη του εμβρύου καθώς το νευρικό του σύστημα αναπτύσσεται ταχύτατα. Για παράδειγμα, αν η μητέρα μολυνθεί από ιό ή βακτήριο κατά τη περίοδο της κύησης τότε υπάρχει αυξημένος κίνδυνος το νεογνό να εμφανίσει αργότερα κάποια νευροψυχιατρική ασθένεια όπως είναι η σχιζοφρένεια [82, 83], ο αυτισμός [84] και η νοητική υστέρηση [85].

Ενώ, οι μεταγεννητικές εμπειρίες αφορούν τις εμπειρίες που βιώνει ένας οργανισμός μετά τη γέννησή του και εξαρτώνται κατά κύριο λόγο από τη σχέση του με τον/την τροφό, όπως για παράδειγμα η παραμέληση, η κακοποίηση, η ανατροφή



χωρίς τους γονείς. Ακολουθώντας, στα επόμενα υποκεφάλαια, αναλύονται τα πιο γνωστά ζωικά μοντέλα πρώιμων μεταγεννητικών εμπειριών.

### 3.1 ΜΗΤΡΙΚΗ ΑΠΟΣΤΕΡΗΣΗ

Με τον όρο μητρική αποστέρηση (maternal deprivation) εννοούμε την απομάκρυνση των νεογνών από τη μητέρα, καθημερινά κατά την περίοδο της γαλουχίας, για τουλάχιστον δύο ώρες ημερησίως με σκοπό την παρατήρηση των επιπτώσεων αυτού του αποχωρισμού τόσο κατά την πρώιμη περίοδο όσο και κατά την υπόλοιπη ζωή του πειραματόζωου [86]. Ο αριθμός των επεισοδίων αποστέρησης και η διάρκεια κάθε επεισοδίου μέσα στις πρώτες δύο βδομάδες μετά τη γέννηση ποικίλλουν ανάλογα με το εργαστήριο [87]. Γενικά, έχει βρεθεί ότι τα ζώα τα οποία ως νεογνά είχαν βιώσει παρατεταμένες ή επαναλαμβανόμενες περιόδους κοινωνικής απομόνωσης παρουσιάζουν επιβράδυνση της λειτουργίας των σχετιζόμενων με την ανάπτυξη ενζύμων, μειώσεις του καρδιακού ρυθμού και αυξημένα επίπεδα CRH, ACTH και κορτικοστερόνης λόγω αυξημένης δραστηριότητας του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση – επινεφρίδια [88]. Αυτή η γενικά αυξημένη αντίδραση σε στρεσογόνα ερεθίσματα και η υπερδραστηριότητα διαρκεί εφόρου ζωής [89]. Επίσης, εμφανίζουν μια γενικευμένη συμπεριφορική καταστολή ανάλογη με αυτή που εμφανίζεται όταν κάποιος πάσχει από κατάθλιψη.

Η μητρική αποστέρηση έχει μεγαλύτερες επιπτώσεις στη συμπεριφορά των αρσενικών απογόνων από ό,τι στους θηλυκούς απογόνους, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με τη μεγαλύτερη μητρική φροντίδα που δέχονται τα αρσενικά σε σχέση με τα θηλυκά [86]. Σε πειράματα επανειλημμένης μητρικής αποστέρησης σε επίμυες παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της σεροτονίνης στο ραχιαίο υπόκαμπο και στα δύο φύλα, ενώ στο μέσο προμετωπιαίο φλοιό (mPFC) εμφανίσθηκε μείωση μόνο στους αρσενικούς. Απ'την άλλη οι θηλυκοί επίμυες παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα νοραδρεναλίνης στον κοιλιακό υπόκαμπο. Τα πειράματα της μητρικής αποστέρησης απέδειξαν ότι οι μεταβολές στις ενδογενείς αμίνες διαφέρουν συναρτήσει του φύλου και της περιοχής του εγκεφάλου [90].

Σύμφωνα με τους Levy et al. (2003) [91] κάτω από συνθήκες απόλυτης αποστέρησης (από τη μητέρα και από τα υπόλοιπα νεογνά της γέννας) τα νεογνά παρουσιάζουν μειωμένη κοινωνική μάθηση και ελαττωμένη ικανότητα να

αναγνωρίσουν μέλη του ίδιου είδους, εξαιτίας των ελλιπών οσφρητικών ερεθισμάτων κατά την ανάπτυξη. Οι επιδράσεις που δέχονται στα πρώιμα στάδια της ζωής τους έχουν επιπτώσεις στην συγκινησιακή κατάσταση των ζώων και στην αντίδρασή τους στο στρες. Παρατηρείται ότι η μακρόχρονη απομάκρυνση των νεογνών από τη μητέρα οδηγεί σε παθολογικά διαταραγμένα απόκριση στο στρες κατά την ενηλικίωση, καθώς και σε σταθερή αύξηση των αγχωδών και φοβικών συμπεριφορών τους [87, 92], και σε ελλείμματα σε μια σειρά συμπεριφορικών μελετών μάθησης και μνήμης [92]. Αυτά τα γνωστικά ελλείμματα που εμφανίζονται στην ενήλικη ζωή οφείλονται πιθανά στη μόνιμη μείωση στη νευρογένεση του ιππόκαμπου εξαιτίας της υπερέκκρισης των γλυκοκορτικοειδών [87, 92].

Οι επιπτώσεις της μητρικής αποστέρησης είναι πολλαπλές. Αρχικά, αποτελεί εμπόδιο για τη παραγωγή ορμονών στα νεογνά, ενώ οι μακρές περιόδους μητρικού αποχωρισμού οδηγούν σε αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών και χαμηλά επίπεδα αυξητικής ορμόνης [87]. Επιπλέον, στο πειραματικό αυτό μοντέλο παρατηρείται μείωση της έκκρισης του νευροτροφικού παράγοντα που προέρχεται από τον εγκέφαλο (BDNF) [93].

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μητρική αποστέρηση για παρατεταμένο χρονικό διάστημα έχει προταθεί ως πιθανό ζωικό μοντέλο σχιζοφρένειας, καθώς γνωρίζουμε ότι η δυσλειτουργία των συστημάτων ενδογενών αμινών (σεροτονίνης, νοραδρεναλίνης και ντοπαμίνης) σχετίζεται με την εμφάνιση ψυχικών διαταραχών στην ενήλικη ζωή.

### 3.2 ΝΕΟΓΝΙΚΟΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ

Το πειραματικό μοντέλο του πρώιμου ή νεογνικού χειρισμού (neonatal or early handling) με βάση τον Levine (1957) [94] συνίσταται στη βραχύχρονη απομάκρυνση (3-15 λεπτά) των νεογνών από τη μητέρα τους σε καθημερινή βάση, από την ημέρα της γέννησης έως τον απογαλακτισμό τους. Ο νεογνικός χειρισμός αυξάνει τη δραστηριότητα, τη συμπεριφορά αναζήτησης και οδηγεί σε μείωση της αντίδρασης και απαντητικότητας σε στρεσογόνα ερεθίσματα κατά την ενήλικη ζωή. Τα νεογνά που έχουν εκτεθεί σε νεογνικό χειρισμό παρουσιάζουν μια αυξημένη ικανότητα να προσαρμόζονται και να τα καταφέρνουν σε απαιτητικές και

στρεσογόνες περιβαλλοντικές συνθήκες, εν ολίγοις να ανταπεξέρχονται σε καινούριες καταστάσεις. [95]

Γενικά, όταν το νεογνό υποστεί το συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο υφίσταται μια περίοδο συμπεριφορικής ενεργοποίησης που χαρακτηρίζεται από αυξημένη κινητικότητα, καρδιακό και αναπνευστικό ρυθμό και έκκριση κορτικοστερόνης. Αυτό το μοτίβο συμπεριφοράς αντιπροσωπεύει μια γενικευμένη έκφραση του άγχους αποχωρισμού (separation distress). Από την άλλη έχει βρεθεί ότι τα ζώα που ως νεογνά είχαν αυτήν την εμπειρία της απομάκρυνσης από τη μητέρα τους, ως ενήλικα κάτω από συνθήκες έντονου στρες εμφανίζουν αυξημένη κινητικότητα και μειωμένα επίπεδα κορτικοστερόνης πιθανόν λόγω αυξημένης ευαισθησίας του συστήματος της αρνητικής ανάδρασης στα γλυκοκορτικοειδή που οδηγεί σε μειωμένη απάντηση του άξονα ΥΥΕ. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ο νεογνικός χειρισμός ευθύνεται τόσο για τη καλή μητρική συμπεριφορά των θηλυκών απογόνων όσο και για την αύξηση της σεροτονεργικής νευροδιαβίβασης στον ιππόκαμπο των νεογέννητων επίμυων. Η αύξηση αυτή παρατηρείται στον ιππόκαμπο και στον προμετωπιαίο λοβό, όπου είναι επιλεκτικά αυξημένοι και οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών. [96-99]

Επίσης, έχει βρεθεί πως η βραχύχρονη απομάκρυνση των νεογνών από τη μητέρα τους προλαμβάνει τη σχετιζόμενη με το γήρας εκφύλιση των νευρώνων του ιππόκαμπου των πειραματοζώων [95]. Αυτό το εύρημα είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον αφού σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες οι αλλαγές στη νευρογένεση στον ιππόκαμπο σχετίζονται με την παθοφυσιολογία και τη θεραπεία των συναισθηματικών διαταραχών [87].

### **3.3 ΑΝΑΤΡΟΦΗ ΑΠΟ «ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΕΣ» ΜΗΤΕΡΕΣ ΠΟΥ ΔΕΙΧΝΟΥΝ ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΚΑΛΗ ΜΗΤΡΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ**

Στο μοντέλο αυτό τα νεογνά ανατρέφονται από μητέρες που έχουν επιλεγεί με βάση τα επίπεδα μητρικής συμπεριφοράς που επιδεικνύουν [93, 100]. Ειδικότερα η «καλή» μητρική συμπεριφορά περιλαμβάνει το γλείψιμο των νεογνών, την περιποίησή τους καθώς και το θηλασμό τους με αμυδωτή ράχη, σε αντίθεση με τη «κακή» όπου η μητέρα είναι σχεδόν ξαπλωμένη πάνω στα νεογνά ώστε ο θηλασμός να γίνεται σε πιο χαλαρωμένη θέση. Και στις δύο περιπτώσεις η επαφή της μητέρας

με τα νεογνά της είναι ίδια, ο αριθμός των νεογνών είναι παρόμοιος, ενώ και οι δύο κατηγορίες μητέρων παρέχουν τις ίδιες δυνατότητες για θηλασμό αφού τα νεογνά δεν διαφέρουν ως προς το βάρος τους. Με το μοντέλο αυτό μελετάται η επιρροή της διακύμανσης της μητρικής φροντίδας εντός των φυσιολογικών ορίων, στην ανάπτυξη και τη μελλοντική λειτουργία του εγκεφάλου των νεογνών. [93, 100, 101]

Η καλή μητρική φροντίδα οδηγεί σε απογόνους με αυξημένες ικανότητες χωρικής μάθησης και μνήμης στην ενήλικη ζωή γιατί συμβάλει στην επιβίωση των νευρώνων του ιππόκαμπου και διεγείρει τη συναπτογένεση τους (στον ιππόκαμπο) στα νεογνά. Γενικά, η καλή μητρική φροντίδα αυξάνει τα επίπεδα των NMDA υποδοχέων (υποδοχείς του γλουταμικού οξέος) καταλήγοντας σε αυξημένη έκφραση του νευροτροφικού παράγοντα που προέρχεται από τον εγκέφαλο (BDNF) και σε αύξηση της συναπτογένεσης στον ιππόκαμπο. Ως αποτέλεσμα βελτιώνεται η χωρική μάθηση στην ενήλικη ζωή. [93, 102]

Τα επίπεδα της μητρικής φροντίδας προς το νεογνό μπορεί να καθορίσουν συμπεριφορικές και ενδοκρινικές απαντήσεις του απογόνου στο στρες μέσω μεταβολών που συμβαίνουν στην έκφραση γονιδίων σε περιοχές του εγκεφάλου, που είναι υπεύθυνες για την απόκριση στο στρες. Έτσι, συνεισφέρουν στην ανάπτυξη σταθερών ατομικών διαφορών όσον αφορά την απάντηση σε στρεσογόνα ερεθίσματα. [93, 100]

### 3.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΕ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Τα ζώα μετά τον απογαλακτισμό τους ζουν σε κλουβιά που περιέχουν «δραστηριότητες» (κυλιόμενες ρόδες, σκάλες, τούνελ κλπ) με στόχο τη διερεύνηση της δυνατότητας πρόκλησης μακράς διάρκειας συμπεριφορικών και νευροβιολογικών αλλαγών από το εμπλουτισμένο περιβάλλον.

Ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος έχει θετική επίδραση στη μνήμη και τη μάθηση. Μάλιστα, οι επιπτώσεις στην ικανότητα για μάθηση φαίνεται να διαρκούν εφόρου ζωής [95]. Ευνοϊκή φαίνεται να είναι και η επίδρασή της στην αυθόρμητη συμπεριφορά καθώς μειώνει τη φοβική συμπεριφορά, όπως αυτό αποδεικνύεται από τη μείωση της αφόδευσης σε δοκιμασίες ανοιχτού πεδίου [103]. Ειδικότερα, έχουν παρατηρηθεί πολλές νευροβιολογικές μεταβολές, όπως αύξηση του βάρους του εγκεφάλου λόγω αυξημένης πυκνότητας νευρώνων του ιππόκαμπου, αύξηση του

αριθμού των συνάψεων και του αριθμού των δενδριτών των νευρώνων εν αντιθέσει με τα ζώα που ζουν σε τυπικά περιβάλλοντα [104]. Κατ'αυτόν τον τρόπο, οι επίμυες προστατεύονται από τα σχετιζόμενα με το γήρας γνωσιακά ελλείμματα που αφορούν τη χωρική μάθηση και τη μνήμη, ενώ συγχρόνως παρουσιάζουν και αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών στον ιππόκαμπο.

Ανακεφαλαιώνοντας, φαίνεται πως τόσο ο νεογενικός χειρισμός όσο και ο εμπλουτισμός του περιβάλλοντος:

- i. Συμβάλλουν στη βελτιωμένη λειτουργία του υποθαλαμο-υποφυσιακού άξονα (ΥΥΑ) καθώς παρατηρείται μείωση των CRH, ACTH και της κορτικοστερόνης μετά από έκθεση σε στρεσογόνο ερέθισμα.
- ii. Βελτιώνουν τις προσαρμοστικές ικανότητες.
- iii. Ευθύνονται για τη μείωση των συγκινησιακών αντιδράσεων, όπως είναι ο φόβος και το άγχος.
- iv. Οδηγούν στη βελτίωση της μνήμης και της μάθησης.
- v. Προστατεύουν τον εγκέφαλο από την απώλεια των ιπποκάμπιων νευρώνων και από τη μείωση των γνωσιακών ικανοτήτων που συνοδεύουν το γήρας.

## 4. ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ

### 4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρωτεομική (proteomics), οφείλει την ύπαρξή της στην σύντμηση των όρων πρωτεΐνη και γενωμική, με σκοπό να περιγράψει την πλήρη ανάλυση του πρωτεϊνικού περιεχομένου ενός βιολογικού συστήματος σε μία δεδομένη χρονική στιγμή ή κατάσταση. Ο όρος αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε μία διεθνή συνάντηση στη Σιένα της Ιταλίας στα τέλη του 1994 για να τυποποιηθεί εν συνεχεία από τον Δρ Μαρκ Γουίλκινς και τους συνεργάτες του [105-107]. Η πρωτεομική ασχολείται κυρίως με τη μελέτη όλων των πρωτεϊνών που εκφράζονται σε ένα δείγμα ταυτόχρονα, παρά με την ανάλυση μιας μόνον πρωτεΐνης. Η τεχνολογία της πρωτεομικής βοηθά στην κατανόηση βιολογικών φαινομένων αλλά και την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών, πρωτεϊνών δηλαδή που σχετίζονται με μεταβολικά μονοπάτια ή ασθένειες.

Στη μελέτη των βιολογικών συστημάτων, το γονιδίωμα ενός οργανισμού είναι σταθερό, δηλαδή το γενετικό υλικό είναι το ίδιο ανά οργανισμό ή κύτταρο ενώ το πρωτέωμα διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο και αλλάζει συνεχώς μέσω των βιοχημικών αλληλεπιδράσεων του με το γονιδίωμα και το περιβάλλον και για αυτό το λόγο η πρωτεομική ανάλυση (proteomics) θεωρείται συχνά το επόμενο βήμα, μετά από την γενωμική (genomics). Ένας οργανισμός έχει ριζικά διαφορετική πρωτεϊνική έκφραση στα διάφορα κύτταρα του, στα διαφορετικά στάδια του κύκλου ζωής του και στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Έτσι το πρωτέωμα του ανθρώπινου πλάσματος διαφέρει από αυτό των ηπατικών επιθηλιακών κυττάρων, όπως και των επιθηλιακών κυττάρων από το πυρηνικό τους πρωτέωμα (δηλαδή το σύνολο των πρωτεϊνών που βρίσκονται στον πυρήνα των τελευταίων).

Με την πρωτεομική μπορεί να γίνει ποιοτική και ποσοτική σύγκριση των πρωτεωμάτων του συνόλου, δηλαδή των πρωτεϊνών ενός οργανισμού, κάτω από διαφορετικές συνθήκες, για την διαλεύκανση βιολογικών διαδικασιών. Η πρωτεομική είναι μια τεχνολογία διεπιστημονική, αφού για να πραγματοποιηθεί, προϋποθέτει το συνδυασμό διάφορων πεδίων, όπως είναι η επιστήμη διαχωρισμού πρωτεϊνών με την τεχνική της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης πηκτώματος ακρυλαμίδης (2D polyacrylamide gel electrophoresis, 2D-PAGE), η φασματομετρία μάζας και η βιοπληροφορική [108]. Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας και τα τεχνολογικά επιτεύγματα στην επιστήμη του διαχωρισμού πρωτεϊνών, η πρωτεομική διαδόθηκε

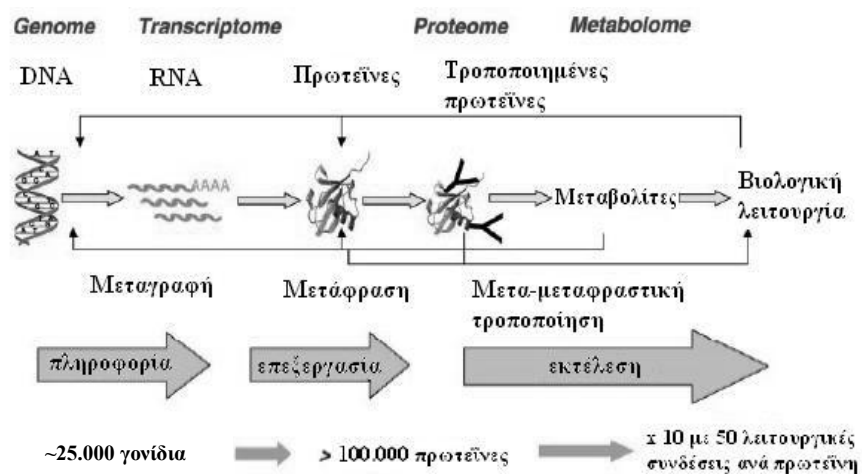
ευρέως τόσο σε ακαδημαϊκό επίπεδο όσο και στην φαρμακευτική βιομηχανία, κυρίως λόγω της πεποιθήσεως ότι θα παίξει κυρίαρχο ρόλο στην μετα-γενωμική έρευνα.

## 4.2 ΠΡΩΤΕΩΜΑ ΚΑΙ ΓΕΝΩΜΑ

Δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη ζωή ενός οργανισμού, η πρωτεομική ανάλυση συμβάλλει στην ανακάλυψη βιοδεικτών (biomarkers), όπως οι δείκτες που υποδεικνύουν μια συγκεκριμένη ασθένεια για περαιτέρω έρευνα για την ανακάλυψη φαρμάκων [109]. Μια εκπληκτική διαπίστωση είναι ότι υπάρχουν πολύ λιγότερα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες στο ανθρώπινο γονιδίωμα από ό,τι πρωτεΐνες στο ανθρώπινο πρωτέωμα (20 με 25.000 γονίδια έναντι περίπου 1.000.000 πρωτεϊνών). Η ανάλυση του πρωτεώματος φαίνεται ότι είναι δυσκολότερη και πιο πολύπλοκη από την ανάλυση του γονιδιώματος επειδή οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια και είναι σύνηθες από ένα γονίδιο να παράγονται πλέον της μιας πρωτεΐνης. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να μεταβάλλονται υπό την επίδραση εξωκυτταρικών ή/και ενδοκυτταρικών παραγόντων.

Το καταλυτικό σημείο στην εξέλιξη της βιολογίας όμως, ήταν τα μεγάλα προγράμματα για τη χαρτογράφηση του γονιδιώματος πλήθους οργανισμών αφού κατορθώθηκε να επαναπροσδιοριστεί ο τρόπος σκέψης στη βιολογία και τη βιοχημεία [110]. Ένα στοιχείο που διευκόλυνε αυτή τη μετάβαση είναι η εξέλιξη εργαλείων της πληροφορικής που μας επιτρέπουν να εξάγουμε ειδικές πληροφορίες από αυτές τις βάσεις δεδομένων. Είναι πλέον δυνατό ολόκληρα γονιδιώματα και πρωτέωμα να διερευνώνται για συγκεκριμένες ακολουθίες αλληλουχιών (νουκλεϊνικών οξέων ή αμινοξέων) μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα. Κατά δεύτερον, η πρόοδος που περιγράφεται βασίστηκε στις αλματώδεις τεχνολογικές εξελίξεις στην ανάλυση των βιομορίων. Όσον αφορά το DNA, τις αυτοματοποιημένες τεχνικές αλληλούχισης και τις μικροσυστοιχίες, στη δε περίπτωση των πρωτεϊνών την εισαγωγή τεχνικών διαχωρισμού με πολύ υψηλή διακριτική ικανότητα και τη χρήση της φασματομετρίας μάζας. Το πλέον σημαντικό στοιχείο κατά τη χρήση τέτοιου είδους τεχνολογιών είναι η χαρτογράφηση του γενετικού υλικού που έθεσε και το ερώτημα πόσα γονίδια υπάρχουν σε κάθε οργανισμό και, κατά συνέπεια, πόσες πρωτεΐνες κωδικεύουν [110].

Η πρωτεομική ανάλυση δίνει μια πολύ καλύτερη εικόνα ενός οργανισμού από ότι η γενωμική αφού οι πρωτεΐνες είναι λειτουργικά μόρια και αντικατοπτρίζουν τις μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης [111]. Επιπλέον, πολλές πρωτεΐνες υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις με επιπτώσεις στις δραστηριότητές τους, π.χ. ορισμένες πρωτεΐνες δεν είναι ενεργές παρά μόνο όταν φωσφορυλιωθούν. Για τη μελέτη των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων χρησιμοποιούνται μέθοδοι όπως η φωσφοπρωτεομική και η γλυκοπρωτεομική. Πολλά μεταγραφήματα επίσης δίνουν περισσότερες από μια πρωτεΐνες, μέσω εναλλακτικού ματίσματος (alternative splicing) ή εναλλακτικών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων [112, 113]. Πολλές πρωτεΐνες διαμορφώνουν σύμπλοκα με άλλες πρωτεΐνες ή μόρια RNA, και λειτουργούν μόνο παρουσία αυτών των άλλων μορίων [114, 115]. Σε αντίθεση με τα νουκλεϊκά οξέα, οι πρωτεΐνες δεν υβριδοποιούνται ειδικά με συμπληρωματικές αλληλουχίες αμινοξέων. Επιπρόσθετα, στην περίπτωση των πρωτεϊνών δεν υπάρχει κάποια τεχνική ενίσχυσης της συγκέντρωσής τους (όπως η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, PCR, στην περίπτωση του DNA) όπως, επίσης, και πλήθος «τεχνικών» προβλημάτων που έχουν να κάνουν με τη διαλυτότητα ή την αστάθειά τους. Ακόμη και ειδικού τύπου αλληλεπιδράσεις, όπως αυτή επιτόπου – αντισώματος δεν προσφέρουν μονοσήμαντα τον καθορισμό της αλληλουχίας όπως στην υβριδοποίηση των νουκλεϊκών οξέων. Συνεπώς, η ανάλυση του πρωτεώματος απαιτεί ένα πολύ διαφορετικό και πιο ευρύ πεδίο εργαλείων και τεχνικών από αυτά για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων. Όλες αυτές οι δυσκολίες μελετώνται με την εφαρμογή της πρωτεομικής.



**Εικόνα 4.1:** Μετασχηματισμός της γενετικής πληροφορίας σε βιολογική λειτουργία



### 4.3 ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ

Η ανάπτυξη της πρωτεομικής έχει στηριχτεί σε τέσσερα πολύ σημαντικά εργαλεία που συνεισφέρουν στον προσδιορισμό χιλιάδων αναλυτών και τον χαρακτηρισμό πρωτεϊνών [107]:

- i. Το πρώτο εργαλείο είναι οι βάσεις δεδομένων που περιέχουν όλες τις πληροφορίες για την αλληλουχία χιλιάδων πρωτεϊνών ανά οργανισμό [116, 117].
- ii. Το δεύτερο εργαλείο είναι η εξέλιξη της φασματομετρίας μάζας [118]. Για την ταυτοποίηση μίας πρωτεΐνης δεν αρκεί μία τόσο γενική φυσικοχημική παράμετρος όπως το μοριακό βάρος γι' αυτό και ακολούθησε η χρήση πρωτεασών, οι οποίες επιτρέπουν την πέψη μίας πρωτεΐνης μόνο όταν υπάρχουν συγκεκριμένες αλληλουχίες αμινοξέων. Έτσι, είναι δυνατή η αλληλούχιση των πεπτιδίων προσφέροντας από σαφή έως ακλόνητα στοιχεία για την αλληλουχία των αναλυόμενων πρωτεϊνών και τη συνεπαγόμενη ταυτοποίησή τους.
- iii. Το τρίτο βασικό εργαλείο ήταν η εξέλιξη της βιοπληροφορικής [119] στον τομέα της ανάλυσης του πλήθους των δεδομένων που προκύπτουν από πρωτεομικά πειράματα. Με την εξέλιξη αυτή τεράστιες ποσότητες τέτοιων δεδομένων μπορούν να αναλύονται μέσα σε λίγες μόνον ώρες.
- iv. Ενώ τέλος, το τέταρτο κρίσιμο εργαλείο (ίσως και το κρίσιμότερο) της πρωτεομικής είναι η επιστήμη του διαχωρισμού που εξυπηρετεί δύο στόχους:
  - a. Τον διαχωρισμό εξαιρετικά περίπλοκων μειγμάτων ανά πρωτεΐνη ή ανά μικρές ομάδες βιομορίων για τη διευκόλυνση της περαιτέρω ταυτοποίησής τους.
  - b. Την εύρεση εμφανών διαφορών στο πρωτέωμα.Οι δύο βασικές πλέον τεχνικές διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται στην πρωτεομική είναι η ηλεκτροφόρηση και η υγρή χρωματογραφία.

### 4.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ [117, 120]

Η πρωτεομική είναι ένας καινούριος τομέας της βιολογίας που αναπτύσσεται ακόμη ταχέως. Το ερώτημα που γενάται όμως είναι ποια η χρησιμότητα του

χαρακτηρισμού ενός ολόκληρου πρωτεώματος. Η πρωτεομική έχει μακροπρόθεσμες βλέψεις καθώς αποβλέπει:

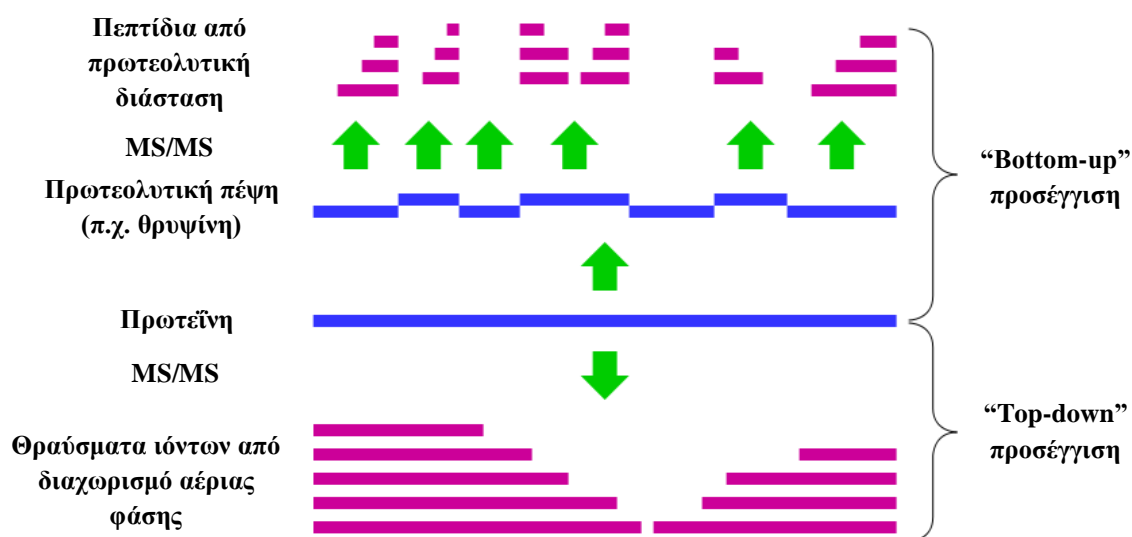
- i. στην εύρεση ή διερεύνηση του πρωτεώματος βιολογικών υγρών, οργάνων και οργανισμών με στόχο τη συμπλήρωση της πληροφορίας που προέρχεται από τη γενωμική με σκοπό τη χαρτογράφηση όλων των πρωτεϊνών που εκφράζονται σε ένα βιολογικό σύστημα.
- ii. στην εξόρυξη (mining) πρωτεϊνικής πληροφορίας σε πρωτεομικό επίπεδο με ανάλυση του «προφίλ» έκφρασης πρωτεϊνών για να καταλήξει σε ειδικούς τομείς όπως η φαρμακοπρωτεομική.
- iii. στη λειτουργική πρωτεομική για τη μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων και γενικά της βιολογίας του κυττάρου σε μοριακό επίπεδο.
- iv. και τέλος στην κλινική πρωτεομική, όπου γίνεται προσπάθεια εφαρμογής τεχνικών υψηλής προσπελασιμότητας στην κλινική πρακτική και βελτίωση της διάγνωσης με τη βοήθεια βιοδεικτών.

#### 4.5 ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗΣ

Όταν δεν υπάρχει κανένα στοιχείο για το υπό εξέταση βιολογικό σύστημα η προσέγγιση που ακολουθείται είναι η σφαιρική πρωτεομική, δηλαδή η ανάλυση ολόκληρου του πρωτεϊνικού περιεχομένου κατά τη διάρκεια σειράς αλλαγών στο κυτταρικό σύστημα, ενώ όταν είναι γνωστό ένα μοριακό σημείο έναρξης, δηλαδή η πρωτεΐνη συμμετέχει σε μια καθορισμένη βιοχημική διαδικασία ακολουθείται η στοχευμένη πρωτεομική η οποία διερευνά την λειτουργία συγκεκριμένων πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της μελέτης των φυσιολογικών αλληλεπιδράσεών τους με άλλες πρωτεΐνες.

Στην πρωτεομική έχουν καθιερωθεί δύο πορείες εργασίας: Η πρώτη και πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στρατηγική που ακολουθείται για την πρωτεομική ανάλυση είναι η **“bottom-up”** προσέγγιση στην οποία οι υπό ανάλυση πρωτεΐνες υπόκεινται σε πέψη και εν συνεχεία τα πεπτίδια αναλύονται με φασματομετρία μάζας. Συγκεκριμένα, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2-DE) ή άλλα μέσα όπως είναι η χρωματογραφία, ακολουθεί πρωτεόλυση, ταυτοποίηση των παραγόμενων πεπτιδίων με χρήση φασματομετρίας μάζας και

ταυτοποίηση των πρωτεϊνών με αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων όπου η αναγνώριση γίνεται βάσει του δακτυλικού αποτυπώματος μάζας, του peptide mass fingerprinting (PMF). Δεύτερη κύρια στρατηγική είναι η “**top-down**” προσέγγιση κατά την οποία ο σχεδιασμός του πειράματος γίνεται με γνώμονα το διαχωρισμό των πρωτεϊνών σε ένα ή περισσότερα στάδια. Ακέραια πρωτεϊνικά ιόντα ή μεγάλα θραύσματα πρωτεϊνών υποβάλλονται σε θραυσματοποίηση αέριας φάσης για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας της πρωτεΐνης με MS ανάλυση και την τελική παραγωγή ενός συμπληρωματικού συνόλου θραυσμάτων που συνθέτουν ολόκληρη την πρωτεΐνη [121] (Εικόνα 4.2).



**Εικόνα 4.2:** Σχηματική αναπαράσταση των διαφορών στη μεθοδολογία των «bottom up» και «top down» προσεγγίσεων στην πρωτεομική. Στην «bottom up» οι πρωτεΐνες πρώτα πέπτονται και μετά ακολουθεί φασματομετρία μάζας, ενώ στην «top down» υποβάλλονται απ' ευθείας σε φασματομετρία μάζας

Η τεχνική η οποία χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο στην πρωτεομική ανάλυση είναι η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2-DE). Η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2-DE) αναπτύχθηκε το 1975 από τους Klose και O'Farrell, ανεξάρτητα, και είναι πολύ βασικό στάδιο για την πρωτεομική ανάλυση, αφού με 2-DE μπορούν να διαχωριστούν ακόμα και 1800 πρωτεΐνες [122]. Η τεχνική περιλαμβάνει δύο βήματα: α) διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση τις διαφορές που

παρουσιάζουν ως προς το ισοηλεκτρικό σημείο τους (IEF), και β) διαχωρισμό των καθηλωμένων πρωτεϊνών με βάση τις διαφορές στο μοριακό βάρος τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης δωδεκυλθειϊκού νατρίου (SDS polyacrylamide gels) [123, 124].

Η μέθοδος αυτή ανιχνεύει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ακόμα και σε πολύπλοκα μίγματα με τη βοήθεια της διαδοχικής φασματομετρίας μάζας, MS/MS. Προβλέπεται πέψη της πρωτεΐνης σε κάποιο στάδιο της ανάλυσης με μία πρωτεάση. Η ειδική ως προς την αλληλουχία ενζυμική πέψη επιτρέπει τη θεωρητική πρόβλεψη των προϊόντων της πρωτεόλυσης και η σύγκριση αυτών με τα πειραματικά δεδομένα επιτρέπει την ταυτοποίηση του μορίου. Ωστόσο παρουσιάζει μικρή ευαισθησία και δυσκολία στο να αναλυθούν πρωτεΐνες μικρής περιεκτικότητας (low abundance) και πρωτεΐνες πολύ μεγάλου μοριακού βάρους (πάνω από 200kDa) και ακραίων pI [125]. Επίσης, οι υδρόφοβες μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι δύσκολο να διαλυτοποιηθούν και έτσι δεν μπορούν να ανιχνευθούν με την τεχνική αυτή [126]. Η ταυτότητα ενός πεπτιδίου πόσο μάλλον μίας πρωτεΐνης δεν είναι απλή υπόθεση.

Παρά το πλήθος των εναλλακτικών ή συμπληρωματικών τεχνικών που έχουν αναπτυχθεί, προς το παρόν η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση είναι η μόνη τεχνική που μπορεί να εφαρμοστεί σε επίπεδο ρουτίνας για παράλληλη ποσοτική καταγραφή της έκφρασης (expression profiling) μεγάλων συνόλων σύνθετων πρωτεϊνικών μιγμάτων όπως ολόκληρο το ομογενοποίημα κυττάρων, με το επιπλέον πλεονέκτημα της παράδοσης του χάρτη των άθικτων πρωτεϊνών, που απεικονίζει τις αλλαγές στο πρωτεϊνικό επίπεδο έκφρασης, τις ισομορφές ή τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις [127].

#### **4.6 ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ - PTMS (POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS) ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι οι χημικές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα σε μια πρωτεΐνη έπειτα από το στάδιο της μετάφρασης. Ο προσδιορισμός τους είναι ουσιαστικός καθώς οδηγεί σε πληροφορίες για τη λειτουργία και το ρόλο των πρωτεϊνών στο βιολογικό σύστημα. Υπάρχουν περισσότερες από 200 μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που είναι γνωστό ότι μεταβάλλουν τη δομή των πρωτεϊνών, ρυθμίζουν τις λειτουργίες τους καθορίζοντας

την δραστικότητα τους και τον κυτταρικό εντοπισμό τους [128]. Επίσης, επηρεάζουν ποικίλες πρωτεϊνικές λειτουργίες όπως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ νουκλεϊκών οξέων-πρωτεϊνών, η σταθερότητα, ο εντοπισμός και ο χρόνος ημιζωής των πρωτεϊνών. Συνηθέστερες PTMs είναι η φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση, η μεθυλίωση, η οξειδωση, η γλυκοζυλίωση, η ουβικυτινυλίωση, η φαρνεσυλίωση και η σουλφονυλίωση [129].

Η ανάλυση των πρωτεϊνών και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεών τους είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη μελέτη πολλών ασθενειών όπως παραδείγματος χάρη του καρκίνου. Οι PTMs-βασισμένοι βιοδείκτες είναι πρωτεΐνες ή πεπτίδια, τροποποιημένα σε ένα ή περισσότερα συγκεκριμένα αμινοξέα, που εμπλέκονται σε μια συγκεκριμένη πορεία ή ένα βιολογικό δίκτυο, οδηγώντας στην έναρξη ή την προώθηση μιας ασθένειας, όπως για παράδειγμα, η καρδιακή τροπονίνη I (cTnI), η οποία μαζί με διάφορα προϊόντα αποικοδόμησης απελευθερώνεται κατά την μυοκαρδιακή ισχαιμία από τα κύτταρα της καρδιάς στο αίμα όπου και μπορούν να ανιχνευθούν.

Ο προσδιορισμός και ο χαρακτηρισμός των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών είναι ουσιαστικός για την κατανόηση των μηχανισμών των βιολογικών διαδικασιών σε μοριακό επίπεδο καθώς διαδραματίζουν κρίσιμους ρόλους σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, η μεταγωγή σήματος και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος [130]. Μέσω των μελετών αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, η πρωτεομική παρέχει έναν λεπτομερή χάρτη όλων των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στα υγιή και ασθενή κύτταρα και διευκολύνει έτσι την ανάπτυξη φαρμάκων που στοχεύουν επιλεκτικά στις πορείες που συνδέονται με την ασθένεια ενώ ελαχιστοποιούν τις ανεπιθύμητες παρενέργειες [129]. Αυτό, θα επιταχύνει την πρόοδο της γονιδιακής θεραπείας και της εξατομικευμένης ιατρικής γενικά.

#### 4.7 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ο ιστός, στη περίπτωση μας ο προμετωπιαίος φλοιός επίμυων, αποτελεί την πιο προβληματική κατηγορία δειγμάτων αφού η ανομοιογένεια του δείγματος ενέχει κινδύνους τόσο για την αποτελεσματική παραλαβή πρωτεϊνών όσο και ζητήματα επαναληψιμότητας της δειγματοληψίας. Επιπροσθέτως, οι συνθήκες φύλαξης και

επεξεργασίας δειγμάτων τόσο εντός όσο και εκτός αναλυτικού εργαστηρίου συνιστούν σοβαρά προβλήματα, ενώ επίσης οι ιστοί παρουσιάζουν διάφορες ιδιαιτερότητες, π.χ. παρουσία μεγάλων ποσοτήτων λιπιδίων στον εγκεφαλικό ιστό τα οποία πρέπει να απομακρυνθούν καθώς παρεμποδίζουν την περαιτέρω ανάλυση.

Στην περίπτωση βιολογικών υλικών σε στερεή κατάσταση για την απομόνωση των πρωτεϊνών, το υλικό σε πρώτη φάση μπορεί να ομογενοποιηθεί (μηχανικά, με υπερήχους κ.ά.) με μικρό όγκο είτε ρυθμιστικού διαλύματος αποδιάταξης που περιέχει κατά κύριο λόγο ουρία (έως 8M) και επιπλέον μπορεί να περιέχει θειουρία, CHAPS, 1,4-διθειοερυθρίτολη, Tris, EDTA, και αναστολείς πρωτεασών [131] είτε νερού και στην συνέχεια μετά την απομάκρυνση με φυγοκέντρηση των άσπαστων κυττάρων, να αραιωθεί με κατάλληλο όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος πριν την περαιτέρω ανάλυση. Η ομογενοποίηση στη προκειμένη περίπτωση επιτυγχάνεται με υπέρηχους προκειμένου να επιτευχθεί αποκατάσταση της ομοιογένειας του δείγματος και μεταφορά του σε διαλυτή μορφή.

Κατά την κυτταρική διάσπαση πολλές φορές απελευθερώνονται πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία περιπλέκουν την περαιτέρω ανάλυση. Η παρουσία αποδιατακτικών, όπως το SDS (2%), η ουρία (8M), οι χαμηλές θερμοκρασίες και βασικό pH συχνά επαρκούν για την προστασία ενάντια στην πρωτεόλυση, ωστόσο συνήθως προστίθεται στο δείγμα μίγμα αναστολέων πρωτεασών.

Πολλά συστατικά του προς ανάλυση δείγματος μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα, όπως οριζόντιες ή κάθετες γραμμές στην πηκτή (streaking), μεγαλύτερους χρόνους ανάλυσης, κακή εστίαση, μεγάλη αγωγιμότητα και τροποποιήσεις των πρωτεϊνών [132]. Για την καλή διακριτική ικανότητα (resolution), πρέπει να απομακρύνονται τα συστατικά αυτά πριν την πρώτη διάσταση. Τα συνηθέστερα παρεμποδίζοντα συστατικά είναι τα ακόλουθα:

- ✓ **Φορτισμένα σωματίδια**, όπως άλατα (NaCl, KCl), συστατικά των διαλυμάτων (Tris, PBS), και μικρά ενδογενή φορτισμένα σωματίδια (όπως νουκλεοτίδια), τα οποία είναι η κύρια αιτία της κακής εστίασης στην IEF. Αν τα άλατα δεν μετακινηθούν στην άκρη των λωρίδων πηκτώματος, δεν μπορεί να γίνει εστίαση των πρωτεϊνών. Για την απομάκρυνση των αλάτων συνίσταται, διήθηση σε πήκτωμα ή καταβύθιση.[132]
- ✓ **SDS**, το οποίο δημιουργεί προβλήματα κυρίως με την ισοηλεκτρική εστίαση διότι δημιουργεί συσσωματώματα με τις πρωτεΐνες, τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα και κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Για την απομάκρυνση

πραγματοποιείται καταβύθιση με ακετόνη, η οποία μειώνει τη συγκέντρωση του SDS στο δείγμα. [132]

- ✓ **Νουκλεϊκά οξέα και πολυσακχαρίτες**, τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα μόρια και προσδένονται στις πρωτεΐνες μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και αποτρέπουν την εστίαση. Επειδή τα νουκλεϊκά οξέα είναι υψηλού μοριακού βάρους, μειώνουν την κινητικότητα των πρωτεϊνών στην πηκτή κατά το στάδιο της ενυδάτωσης φράσσοντας τους πόρους της πηκτής. Τα νουκλεϊκά οξέα απομακρύνονται από το δείγμα χρησιμοποιώντας DNAση/RNAση ή υπέρηχους. Η κηλίδα της DNAσης ή RNAσης θα εμφανιστεί και αυτή στην πηκτή.[132]
- ✓ **Λιπίδια**, τα οποία συχνά ενώνονται με τις μεμβρανικές συνήθως πρωτεΐνες και προκαλούν αλλαγές στο ισοηλεκτρικό σημείο ή το μοριακό βάρος τους διότι επηρεάζεται η διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Απομακρύνονται με απορρυπαντικά τα οποία προκαλούν μετουσίωση.[132]
- ✓ **Πρωτεΐνες του ορού**, όπως η αλβουμίνη και οι ανοσοσφαιρίνες (ειδικότερα η IgG) που αποτελούν περί το 75% των ολικών πρωτεϊνών του ορού. Ειδικότερα, η αλβουμίνη είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος (60-70%). Η απομάκρυνσή τους ευνοεί την ανίχνευση άλλων πρωτεϊνών που είναι ιδιαίτερα δύσκολη καθώς βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Η αλβουμίνη και οι ανοσοσφαιρίνες απομακρύνονται με χρωματογραφία συγγενείας.[132]
- ✓ **Αιωρούμενα σωματίδια** πρέπει να απομακρύνονται με φυγοκέντρηση για να μη φράσουν οι πόροι των λωρίδων πηκτώματος (strip).[132]

#### **4.8 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΔΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (2D-PAGE)**

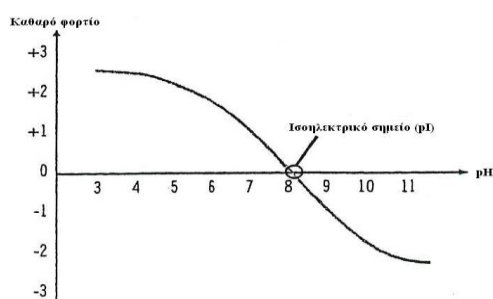
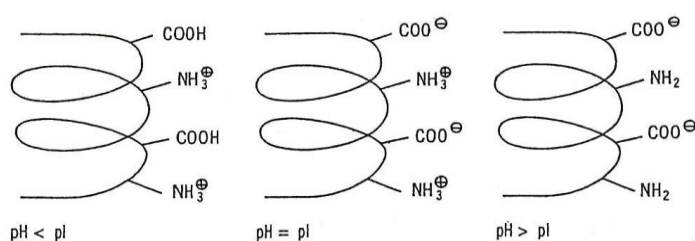
Η καθιερωμένη και γενικευμένη προσέγγιση της πρωτεομικής ανάλυσης, περιλαμβάνει τέσσερα βήματα: την προετοιμασία του δείγματος και την απομόνωση των πρωτεϊνών από το δείγμα, τον διαχωρισμό τους, την ανίχνευση τους και τέλος την ταυτοποίηση της κάθε μίας εκ των απομονωθεισών πρωτεϊνών.

Η γενικευμένη και κλασική μέθοδος για τον διαχωρισμό και την ανίχνευση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται σήμερα στην πρωτεομική είναι η ηλεκτροφόρηση

δύο διαστάσεων. Η μέθοδος βασίζεται στον ταυτόχρονο διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το ηλεκτρικό φορτίο και το μοριακό βάρος με αποτέλεσμα την εμφάνιση εκατοντάδων πρωτεϊνών που καμία άλλη από τις υπάρχουσες μεθόδους δεν μπορεί να επιτύχει. Η μελέτη περιλαμβάνει σε πρώτη φάση την ισοηλεκτρική εστίαση των πρωτεϊνών (isoelectric focusing, IEF), δηλαδή τον διαχωρισμό τους με βάση το ηλεκτρικό τους φορτίο και σε δεύτερη φάση τον διαχωρισμό τους με βάση το μοριακό τους βάρος.

#### 4.8.1 Πρώτη Διάσταση: Ισοηλεκτρική Εστίαση (IEF)

Οι πρωτεΐνες είναι αμφοτερικά μόρια, φέρουν δηλαδή θετικό, αρνητικό ή ουδέτερο φορτίο ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος τους. Ισοηλεκτρικό σημείο είναι η τιμή του pH όπου το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης, το άθροισμα δηλαδή όλων των αρνητικών και θετικών φορτίων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, καθώς και των αμινο- και καρβοξυ- άκρων, είναι μηδέν (Εικόνα 4.3).

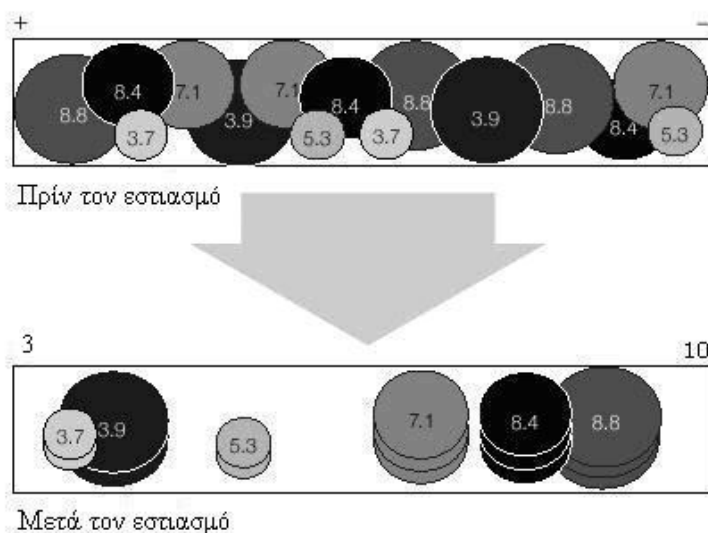


**Εικόνα 4.3 :** Οι πρωτεΐνες είναι θετικά φορτισμένες σε τιμές pH κάτω από το pI τους και αντίστοιχα αρνητικά φορτισμένες σε pH πάνω από το pI τους.

Η πρώτη διάσταση (IEF) είναι ουσιαστικά μία διαδικασία εξισορρόπησης, κατά τη διάρκεια της οποίας με την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου υψηλού δυναμικού, οι πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος ταινίας (strip) φέρουσας πήκτωμα παραγωγών ακρυλαμίδης (immobilines) διαφορετικού pH (IPG strip). Η παρουσία



αυτής της διαβάθμισης pH είναι απαραίτητη για την IEF, καθώς μία φορτισμένη πρωτεΐνη, υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου, θα κινείται προς τον ένα ή τον άλλο πόλο του πεδίου. Όταν η κίνηση αυτή πραγματοποιείται σε ένα μέσο βαθμίδωσης του pH τότε η πρωτεΐνη ακινητοποιείται όταν φτάσει στο ισοηλεκτρικό της σημείο οπότε και το καθαρό της φορτίο γίνεται μηδέν. Έτσι μια πρωτεΐνη με θετικό καθαρό φορτίο μετακινείται προς την κάθοδο, και γίνεται σταδιακά λιγότερο θετικά φορτισμένη, μέχρι να φτάσει στο σημείο της διαβάθμισης που έχει pH ίσο με το pI της. Αναλόγως μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη μετακινείται σταδιακά προς την άνοδο (Εικόνα 4.4). Σε περίπτωση που η πρωτεΐνη απομακρυνθεί από το pI της, αμέσως ανακτά το φορτίο της και μεταναστεύει πίσω. Αυτό είναι το φαινόμενο της εστίασης (focusing effect) της IEF, η οποία συγκεντρώνει τις πρωτεΐνες στα pI τους και τις διαχωρίζει βάσει πολύ μικρών διαφορών στα φορτία τους. Σήμερα υπάρχουν IPG ταινίες για κάθε περιοχή pH, είναι διαθέσιμες σε αρκετά μεγάλο εύρος pH (pH 3-10 και μήκος 7-24 cm) και φθάνουν έως και συγκεκριμένα διαφορικά pH (π.χ. 4,5-5,5).



**Εικόνα 4.4:** Ισοηλεκτρική εστίαση. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα με το pI τους πάνω σε μια ταινία φέρουσα πήκτωμα παραγώγων ακρυλαμίδης διαφορετικού pH

Σε γενικές γραμμές η IEF δεν είναι απαλλαγμένη προβλημάτων καθώς είναι μία τεχνική χωρίς ανοχή σε προσμίξεις ή άλατα. Απαιτείται ειδική και υψηλού κόστους οργανολογία και αντιδραστήρια. Είναι ιδιαιτέρως χρονοβόρα και απαιτείται εμπειρία στην εκτέλεσή της. Παρόλα αυτά αποτελεί το πρώτο βήμα της δισδιάστατης

ηλεκτροφόρησης, που προσφέρει μοναδική διακριτική ικανότητα με το διαχωρισμό χιλιάδων πρωτεϊνικών μορίων. Ένα από τα πλεονεκτήματα των ταινιών αυτών είναι η σχετικά μεγάλη ποσότητα δείγματος πρωτεϊνών που μπορεί να αναλυθεί. Οι συνθήκες της IEF εξαρτώνται από την ποσότητα του προς ανάλυση δείγματος, τη μέθοδο της εφαρμογής του δείγματος στην ταινία, το ηλεκτρικό δυναμικό και τον χρόνο εστίασης.

Μετά την ολοκλήρωση του διαχωρισμού, η ταινία είτε εξισορροπείται ως προς τη σύσταση των διαλυμάτων της 2<sup>ης</sup> διάστασης (pH, ρυθμιστικό, SDS) είτε μπορεί να φυλαχθεί στην κατάψυξη επί μακρόν.

#### 4.8.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου – 2<sup>η</sup> Διάσταση

Σε ένα 2-DE πήκτωμα μπορούν να διαχωριστούν περίπου 1.000-2.000 πρωτεϊνικές κηλίδες (spots) [130]. Γενικά πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι για μια επιτυχή πρωτεομική ανάλυση είναι σημαντικό να πληρούνται οι εξής προϋποθέσεις:

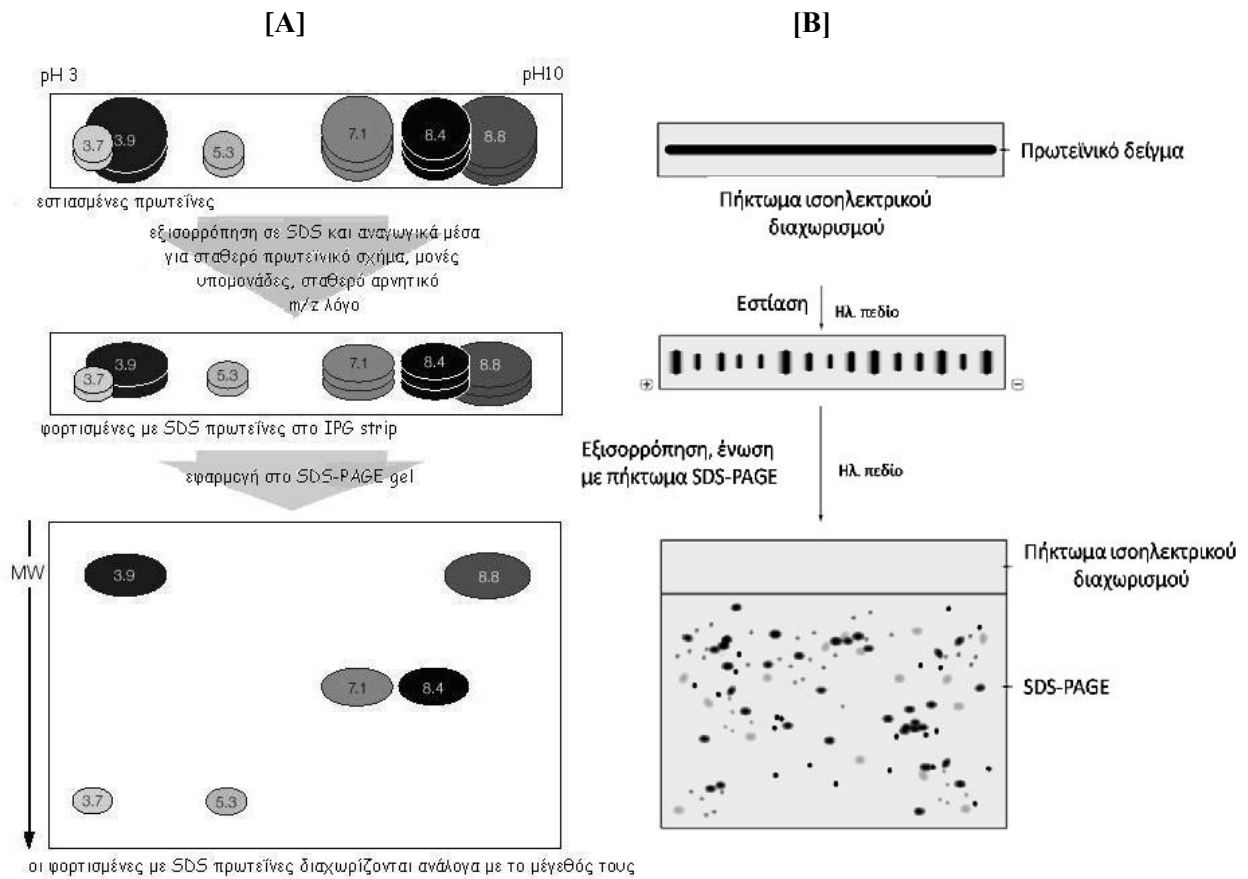
- i. Η πρωτεΐνη πρέπει να βρίσκεται διαλυμένη καθ' όλη τη διαδικασία διαχωρισμού των δυο διαστάσεων.
- ii. Οι πρωτεΐνες πρέπει να μπορούν να διαχωριστούν στα 2-D gels, δηλαδή να έχουν μέσες τιμές pI (συνήθως μεταξύ pH 4 και 10) και μοριακής μάζας (μεταξύ 10 και 120 kDa). Βασικές (pH μεγαλύτερο του 8) και υδρόφοβες πρωτεΐνες δεν μπορούν να εστιαστούν.
- iii. Πρέπει να βρίσκονται σε μια ελάχιστη συγκέντρωση όπου οι αντίστοιχες πρωτεϊνικές κηλίδες να είναι ορατές στα πηκτώματα που βάφονται με Coomassie blue και να μπορεί να γίνει αναγνώριση με φασματομετρία μάζας [131, 132]. Οι πρωτεΐνες μικρής συγκέντρωσης, αλλά μεγάλης λειτουργικής σημασίας όπως ρυθμιστικές ή σηματοδοτικές πρωτεΐνες είναι δύσκολο να ανιχνευτούν.

Με τη δεύτερη διάσταση του 2DE διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες με βάση το φαινομενικό μοριακό τους βάρος κατά την κίνηση των αρνητικά φορτισμένων μικκυλίων που σχηματίζουν με το SDS. Το μέγεθος του μικκυλίου (και συνεπώς ο αριθμός μορίων του απορρυπαντικού άρα και των αρνητικών φορτίων) είναι ανάλογος του μεγέθους της πρωτεΐνης. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών κατά τη δεύτερη διάσταση, με βάση το μοριακό βάρος, γίνεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Τα

πλέον χρησιμοποιούμενα πηκτώματα είναι το σταθερής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδα 12% και το γραμμικά διαφορικό πήκτωμα ακρυλαμίδης 9-16% για διαχωρισμό πρωτεϊνών μεγέθους 10-200kDa. Με τη χρησιμοποίηση δεικτών μοριακής μάζας και τον υπολογισμό της σχετικής κινητικότητάς τους στο πήκτωμα είναι δυνατή η εκτίμηση της μοριακής μάζας μιας άγνωστης πρωτεΐνης.

Η τεχνολογία της SDS-PAGE είναι μια ηλεκτροφορητική μέθοδος με την οποία γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη διαφορετική μοριακή τους μάζα. Η τεχνική εκτελείται σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου που περιέχουν δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS). 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, όλα τα σύμπλοκα αποκτούν αρνητικό φορτίο και η κινητικότητά τους στο πήκτωμα εξαρτάται μόνο από το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών. Πρωτεΐνες μικρής μοριακής μάζας κινούνται γρηγορότερα δια μέσων των πόρων του πηκτώματος σε σχέση με πρωτεΐνες μεγαλύτερης μοριακής μάζας. Συνήθως, γίνεται και περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών με τη χρησιμοποίηση αντιδραστηρίων που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, π.χ. 2-μερκαπτοαιθανόλη ή DTT, για το διαχωρισμό όλων των υπομονάδων.

Τα μεγέθη του 2DE ακολουθούν μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση όσον αφορά το χρόνο εκτέλεσης και τη διαχωριστική τους ικανότητα (όσο μεγαλύτερες οι διαστάσεις του πηκτώματος τόσο καλύτερες οι συνθήκες διαχωρισμού, εις βάρος όμως του χρόνου εκτέλεσης). Σε συνθήκες ρουτίνας με ένα 2DE πείραμα μπορεί να διαχωριστούν περίπου 2.000 πρωτεΐνες με τη θεωρητική δυνατότητά του να εκτείνεται στις 10.000 περίπου.



**Εικόνα 4.5:** Δεύτερη διάσταση διαχωρισμού. Μετά τον οριζόντιο διαχωρισμό με βάση τις διαφορές του pI των πρωτεϊνών ακολουθεί κάθετος διαχωρισμός βάσει του μοριακού τους βάρους. Το [A] απεικονίζει εικονικά τι γίνεται ενώ το [B] απεικονίζει αυτό που πραγματικά βλέπουμε ως τελική εικόνα στην 2<sup>η</sup> διάσταση.

Η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση, παρά τα προβλήματα που τη συνοδεύουν, αποτελεί την κορυφαία μέθοδο διαχωρισμού πρωτεϊνών. Η διαχωριστική της ικανότητα, όπως αναφέρθηκε, αγγίζει την τάξη των χιλιάδων μορίων σε συνδυασμό με το γεγονός ότι δίνει την δυνατότητα εξαγωγής ακριβούς πληροφορίας για κάθε αναλυόμενο μόριο (μοριακό βάρος και ισοηλεκτρικό σημείο), καθώς και σαφή εικόνα για την ύπαρξη μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως φωσφορυλίωση ή γλυκοζυλίωση. Από την άλλη όμως είναι μία τεχνική εξαιρετικά υψηλού κόστους τόσο σε οργανολογία όσο και σε αναλώσιμα. Δυστυχώς, υπόκειται σε ελάχιστη αυτοματοποίηση με το μεγαλύτερο μέρος της εργασίας να εξαρτάται από τον αναλυτή και την εμπειρία του. Επίσης, η δυναμική περιοχή ανάλυσης του 2DE εξαρτάται από την διαχωριστικότητα στην πρώτη διάσταση. Συχνά αναφέρεται πως

το 2DE είναι η 1<sup>η</sup> διάσταση και μόνο, καθώς αποτελεί το πιο χρονοβόρο κομμάτι, με μία τεχνική ελάχιστα ανεκτική σε μη καθαρά δείγματα. Έτσι, η ύπαρξη ορίου φόρτωσης σε μάζα πρωτεΐνης στην 1<sup>η</sup> διάσταση περιορίζει σημαντικά τη δυναμική περιοχή του 2DE (3-4 τάξεις μεγέθους). Επίσης, και παρά την εξέλιξη της οργανολογίας, υπάρχει κακή επαναληψιμότητα από πείραμα σε πείραμα. Τέλος, υπάρχουν και κάποια τεχνικά ζητήματα που έχουν να κάνουν με αδυναμίες της μεθόδου:

1. την ανάλυση πολύ βασικών πρωτεϊνών (λόγω μη αποτελεσματικών αμφολυτών για περιοχές pH>8)
2. την ανάλυση πολύ υδρόφοβων πρωτεϊνών (εξαιτίας κακής διαλυτότητας τόσο στα διαλύματα λύσης όσο και στα υλικά των πηκτωμάτων 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> διάστασης)
3. την ανάλυση πολύ μεγάλων (>250 kDa) ή πολύ μικρών πρωτεϊνών (<15 kDa). Στην πρώτη περίπτωση, τα μόρια πολύ μεγάλων διαστάσεων δεν εισέρχονται στους πόρους είτε της 1<sup>ης</sup> αλλά κυρίως της 2<sup>ης</sup> διάστασης. Στη δεύτερη, οι μικρές πρωτεΐνες δεν διαχωρίζονται ικανοποιητικά στο σύστημα της δεύτερης διάστασης.

#### 4.9 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Μετά το πέρας του 2DE οι διαχωρισθείσες πρωτεΐνες ανιχνεύονται με βάση τη χρώση τους με μεθόδους ποικίλης ευαισθησίας. Το κύριο μέλημα στην πρωτεομική, μεγαλύτερο ακόμη και από την ευαισθησία και την ειδικότητα της χρώσης είναι η συμβατότητά της με το MS. Κι αυτό διότι το MS αποτελεί τη βασική μέθοδο ταυτοποίησης των διαχωρισμένων πρωτεϊνών. Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών στο πήκτωμα της ακρυλαμίδης η ανίχνευσή τους επιτυγχάνεται μέσω χρώσης με ευαίσθητες χρωστικές [133] η επιλογή των οποίων εξαρτάται από τη μέθοδο ταυτοποίησης που ακολουθεί. Στην πράξη, από τα πρωτεομικά εργαστήρια χρησιμοποιούνται τρεις χρώσεις, η χρώση με κolloειδές Coomassie Brilliant Blue (CBB), η χρώση αργύρου και η χρώση με φθορίζουσες ενώσεις. Η προτίμηση στη χρήση ακολουθεί και τη σειρά με την οποία αναφέρθηκαν οι χρωστικές.

Η ραδιενεργός επισήμανση (radiolabelling) είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος, ωστόσο είναι επικίνδυνη και ακριβή [134]. Πραγματοποιείται, με ενσωμάτωση στις

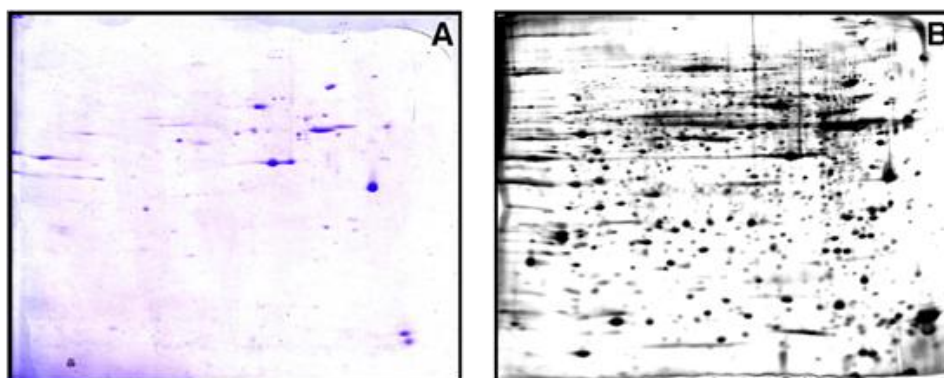
πρωτεΐνες, των στοιχείων  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$  ή  $^{125}\text{I}$  [135]. Η ανίχνευση γίνεται με φιλμ, με αυτοραδιογραφία ή με φθορισμομετρία.

Συνήθως χρησιμοποιείται η πιο ευαίσθητη μη ραδιενεργός μέθοδος ανίχνευσης του νιτρικού αργύρου (silver staining) [136, 137]. Ο άργυρος δίνει όμως εικόνες που περιέχουν πολλές ψευδώς θετικές κηλίδες. Παρουσιάζει, επίσης, το πρόβλημα του κορεσμού στη χρώση των κηλίδων, με συνέπεια να είναι δύσκολη η ποσοτικοποίηση του στις έντονες κηλίδες (γραμμικότητα CBB 0,5-20 ng/mm<sup>2</sup>, αργύρου 0,02-0,8 ng/mm<sup>2</sup>). Επιπρόσθετα, η χρώση με άργυρο είναι συμβατή [138] υπό συνθήκες με το MS και η χρήση της έχει σημαντικά προβλήματα επαναληψιμότητας, ακόμη και με εμπορικά διαθέσιμα kits.

Όταν η συνεπακόλουθη ταυτοποίηση των πρωτεϊνών πρόκειται να γίνει με φασματομετρία μάζας, όπως στη προκειμένη περίπτωση, επιλέγεται η λιγότερο ευαίσθητη, αλλά πολύ πιο οικονομική και γρήγορη μέθοδος χρώσης με κολλοειδές κυανού της κουμασίνης (Colloidal Coomassie blue staining). Το CBB καλύπτει το 90% των περιπτώσεων καθώς έχει υψηλή ευαισθησία κυρίως λόγω επίτευξης μεγάλου λόγου έντασης σήματος προς υπόβαθρο (δεν «βάφει» το πήκτωμα που είναι ελεύθερο πρωτεΐνης) και είναι εύκολο στην παρασκευή, την αποθήκευση και τη χρήση του. Η διαφορά με την κλασική χρωστική του Coomassie Brilliant Blue έγκειται στον κολλοειδή χαρακτήρα του διαλύματος βαφής που διευκολύνει την ειδική χρώση και όχι όλου του πηκτώματος, καθώς και την εύκολη απομάκρυνσή του προ του MS. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται και για την ποσοτική σύγκριση μεταξύ δυο πηκτωμάτων. [139]

Τέλος, παρά το υψηλό κόστος της η μέθοδος ανίχνευσης με χρωστικές φθορισμού (fluorescent detection), όπως οι SUPRO dyes, κερδίζει συνεχώς έδαφος λόγω της υψηλής ευαισθησίας [140, 141]. Οι φθορίζουσες χρωστικές υψηλής ευαισθησίας συνδέονται μη ομοιοπολικά με τις πρωτεΐνες και βάφουν γενικά ή ειδικά κάποιες τάξεις βιομορίων, όπως φωσφο- ή γλυκοπρωτεΐνες. Αυτές οι χρωστικές προσδένονται στο SDS και όχι στις πρωτεΐνες οπότε παραλείπεται το στάδιο του αποχρωματισμού. Εναλλακτικά, αν παραλειφθεί το στάδιο της χρώσης οι πηκτές μπορούν να υποβληθούν σε ανοσοαποτύπωση με αντισώματα ειδικά για μεμονωμένες πρωτεΐνες. Μεταξύ των μεγάλων πλεονεκτημάτων αυτών των ανοσοχρωστικών συγκαταλέγονται η αυξημένη ευαισθησία και η δυνατότητα χρήσης τους για εξειδικευμένη χρώση. Από την άλλη όμως έχουν πολύ υψηλό κόστος, απαιτούν ειδική και υψηλού κόστους οργανολογία, αρκετές εξ αυτών δεν είναι συμβατές με

MS και τέλος δεν είναι ορατές με το μάτι δυσχεραίνοντας την παραλαβή των πρωτεϊνικών κηλίδων. [142, 143]



**Εικόνα 4.6:** Σχετική ευαισθησία των 2 δημοφιλέστερων χρωστικών, κολλοειδούς CBB (A) και αργύρου (B). Η αυξημένη ευαισθησία του αργύρου είναι εμφανής.

#### 4.10 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

Η μαζική και ταχεία ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που διαχωρίζονται και ανιχνεύονται στα πηκτώματα δύο διαστάσεων γίνεται με φασματομετρία μάζας. Συγκεκριμένα, οι κηλίδες των πρωτεϊνών αποκόπτονται μηχανικά από το πήκτωμα της ακρυλαμίδης και ακολουθεί αποχρωματισμός τους, επώαση με θρυψίνη και εκχύλιση των παραγόμενων πεπτιδίων από τα αποκοπέντα τμήματα του πηκτώματος. Όταν ο στόχος της ανάλυσης είναι η ταυτοποίηση πρωτεϊνών, το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ένζυμο για την εκτέλεση της πέψης είναι η θρυψίνη, μια σερινοπρωτεάση, επειδή είναι μια πολύ σταθερή πρωτεάση που κόβει αποκλειστικά ύστερα από το C-τελικό άκρο των καταλοίπων αργινίνης και λυσίνης, τα οποία είναι παρόντα στις πρωτεΐνες σε ποσοστό περίπου ένα κάθε 10-12 αμινοξέα. Έτσι παράγονται πεπτίδια με ένα βασικό κατάλοιπο στο C-τελικό άκρο τους και με μέγεθος 800–2000 Da, κατάλληλο για MS ανάλυση. Τα εκχυλισθέντα πεπτίδια αναλύονται στη συνέχεια τόσο για τον προσδιορισμό της μάζας τους όσο και περαιτέρω της αμινοξικής τους αλληλουχίας με φασματομετρία μάζας.

Η φασματομετρία μάζας, όπως θα περιγραφεί αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο, περιλαμβάνει σε πρώτο στάδιο τον ιοντισμό των πεπτιδίων, την

απελευθέρωση τους στην αέρια φάση και στη συνέχεια την μέτρηση της μάζας τους. Ο προσδιορισμός της μάζας των πεπτιδίων γίνεται με βάση το χρόνο της πτήσης τους σε κατάλληλους σωλήνες υψηλού κενού, ενώ περαιτέρω ανάλυση με τους φασματογράφους μάζας περιλαμβάνει την ανάλυση της αλληλουχίας των πεπτιδίων αυτών.

Η αναγνώριση των πρωτεϊνών βασίζεται σε μια αναλυτική τεχνική που ονομάζεται Peptide mass fingerprinting, PMF [133], όπου το σύνολο των πεπτιδίων που προέρχονται από τη θρυψινοποίηση δίνει ένα μοναδικό αποτύπωμα της άγνωστης πρωτεΐνης. Η αρχή της τεχνικής αυτής είναι ότι κάθε μοναδική πρωτεΐνη θα έχει ένα μοναδικό σύνολο πεπτιδίων και συνεπώς μοναδικές μάζες πεπτιδίων. Τα φάσματα συγκρίνονται με αναγνωρισμένα φάσματα πεπτιδίων διάφορων πρωτεϊνών που υπάρχουν καταχωρημένα σε προγράμματα υπολογιστών, όπως τα MASCOT, PROFOUND, MS-FIT, τα οποία βρίσκονται σε βάσεις δεδομένων όπως οι Swiss-Prot, TrEMBL, NCBI, όπου κάθε καταχωρημένο πεπτίδιο έχει υποστεί θεωρητικά πέψη με τρυψίνη *in silico* και η πρωτεΐνη με τη μεγαλύτερη αντιστοιχία πεπτιδίων προτείνεται ως η πιο πιθανή. Το αποτέλεσμα γίνεται αποδεκτό, αν τα δεδομένα ξεπεράσουν ένα στατιστικά αποδεκτό κατώφλι αντιστοιχίας [144].

Το μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι πρέπει να είναι γνωστές μόνο οι μάζες των πεπτιδίων (έτσι δεν είναι απαραίτητη η *de novo* αλληλούχιση των πρωτεϊνών). Μειονέκτημά της ότι οι περισσότεροι αλγόριθμοι PMF υποθέτουν ότι τα πεπτίδια προέρχονται από μια ενιαία πρωτεΐνη. Η παρουσία ενός μίγματος μπορεί να περιπλέξει σημαντικά την ανάλυση και ενδεχομένως να δώσει ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα.



## 5. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

### 5.1 ΓΕΝΙΚΑ [118]

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί μία από τις σημαντικότερες τεχνικές, οι οποίες συγκαταλέγονται στα εργαλεία της αναλυτικής χημείας. Αν και αποτελεί μία από τις πιο ραγδαία αναπτυσσόμενες τεχνολογίες με εφαρμογές σε όλα τα πεδία ανάλυσης αποτελεί ταυτόχρονα και μία από τις παλαιότερες τεχνικές ενόργανης ανάλυσης με ηλικία τουλάχιστον 100 ετών. Η πρώτη εφαρμογή της αποδίδεται στον Δρ Τζ. Τόμσον ο οποίος κατασκεύασε τον πρώτο φασματογράφο μάζας με σκοπό την ποσοτική μέτρηση της μάζας και του φορτίου των καθοδικών ακτινών (δέσμες ηλεκτρονίων) και για αυτή του την εφεύρεση τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1906 [145]. Η πρώτη αυτή εφαρμογή καταδεικνύει και την αρχή της μεθόδου της φασματομετρίας μάζας. Η ανάλυση περιλαμβάνει τα στάδια της ατομοποίησης, της μετατροπής ενός σημαντικού κλάσματος των ατόμων αυτών σε ρεύμα ιόντων (συνήθως μονοφορτισμένα θετικά ιόντα), στη συνέχεια το διαχωρισμό των ιόντων με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο (mass-to-charge ratio,  $m/z$ ) και τέλος την απαρίθμηση των ιόντων της κάθε κατηγορίας ή τη μέτρηση του ρεύματος που παράγεται όταν τα σχηματιζόμενα από το δείγμα ιόντα προσπίπτουν σε κατάλληλο μεταλλάκτη.

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) είναι μια αναλυτική τεχνική η οποία παρέχει πληροφορίες σχετικά με 1) τη στοιχειακή σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος, 2) τις δομές ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων, 3) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μιγμάτων, 4) τη δομή και τη σύσταση στερεών επιφανειών και 5) την αναλογία ισοτόπων ατόμων σε δείγματα. Τα όργανα που χρησιμοποιούνται σε αυτή την τεχνική ονομάζονται φασματόμετρα μάζας.

Τα φασματόμετρα μαζών (mass spectrometer, MS) είναι τα όργανα τα οποία παράγουν μια δέσμη ιόντων αέριας φάσης από το προς ανάλυση δείγμα και εν συνεχεία διαχωρίζουν τα ταχέως κινούμενα ιόντα με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο ( $m/z$ ). Τα φασματόμετρα μάζας μετρούν το λόγο  $m/z$ , όπου  $m$  η μάζα του ιόντος και  $z$  ο αριθμός των φορτίων που αποκτήθηκαν κατά την διάρκεια του ιοντισμού και όχι απευθείας τη μάζα του ιόντος. Η μάζα ενός σωματιδίου είναι το άθροισμα των ατομικών μαζών (σε Daltons) όλων των ατόμων των στοιχείων από τα οποία

αποτελείται. Τα μόρια του αναλύτη πρέπει να ιοντιστούν και τα ιόντα πρέπει να είναι στην αέρια φάση. Ως αναλύτης ορίζεται η προς ανάλυση ουσία. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5.1) [1] παρουσιάζονται οι διάφοροι μηχανισμοί ιοντισμού και οι διάφοροι τύποι ιόντων.

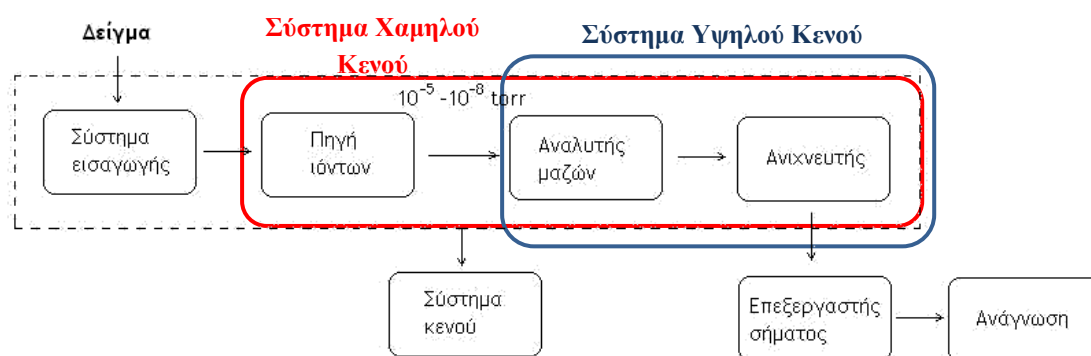
**Πίνακας 5.1:** Μηχανισμοί ιοντισμού στην φασματομετρία μάζας (Skoog et al., "Principles of instrumental analysis, 5<sup>th</sup> ed, 1998)

<b>ΟΥΔΕΤΕΡΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΣΤΗΝ ΑΕΡΙΑ ΦΑΣΗ</b>	
Απώλεια ενός ηλεκτρονίου	Παραγωγή ιόντος με ένα θετικό φορτίο.
Σύλληψη ενός ηλεκτρονίου	Παραγωγή ιόντος με ένα αρνητικό φορτίο.
Πρωτονίωση	Ένα θετικό φορτίο για κάθε πρωτόνιο που προστίθεται.
Αποπρωτονίωση	Ένα αρνητικό φορτίο για κάθε απώλεια πρωτονίου.
Κατιοντισμός/Ανιοντισμός	Μη ομοιοπολική σύνδεση ιόντων με ουδέτερα μόρια αναλύτη (π.χ. $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{HCOO}^-$ ).
<b>ΙΟΝΤΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΣΤΗΝ ΑΕΡΙΑ ΦΑΣΗ</b>	
Διάσπαση με σύγκρουση (Collisionally Induced Dissociation, CID)	Ιοντικά θραύσματα που σχηματίζονται από ελεγχόμενες συγκρούσεις μεταξύ επιλεγμένων και επιταχυνόμενων ιόντων αναλυτή και ουδέτερων αέριων μορίων που εισάγονται στην κυψελίδα σύγκρουσης.
<b>ΙΟΝΤΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΣΤΗ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΗ ΦΑΣΗ</b>	
ESI και MALDI	Μεταφορά των ιόντων του αναλύτη στην αέρια φάση.

Στο MS το μετρικό στοιχείο είναι ο λόγος μάζα προς φορτίο του αναλύτη, ο οποίος προσφέρει και την πλήρη ταυτοποίηση του αναλύτη. Το ίδιο ισχύει ακόμη και στις περιπτώσεις ισομερών αφού οι σύγχρονοι φασματογράφοι μάζας δίνουν πληθώρα πληροφοριών. Στην περίπτωση όμως των μεγαλομορίων, όπως οι πρωτεΐνες, η ταυτοποίησή τους δεν στηρίζεται στον απευθείας ιοντισμό τους αλλά στη χρήση ειδικών ενζύμων (πρωτεάσες) που καθιστούν δυνατή την πέψη της πρωτεΐνης με απόλυτα ειδικό τρόπο που έχει να κάνει με την πρωτοταγή δομή του βιομορίου. Έτσι, από την πέψη μίας πρωτεΐνης προκύπτει μία ομάδα πεπτιδίων με αλληλουχίες (άρα και μάζες) σχεδόν μοναδικές για την πρωτεΐνη από την οποία προήλθαν. Η ταυτοποίηση των ειδικών προϊόντων πέψης και η επακόλουθη αναγνώριση της πρωτεΐνης από την οποία προήλθαν είναι το τελικό αναλυτικό αντικείμενο της φασματομετρίας μάζας στην πρωτεωμική.

## 5.2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ [118]

Η φασματομετρία μάζας είναι μία πολύ ευαίσθητη αναλυτική τεχνική της οποίας βασική προϋπόθεση είναι η μετατροπή των αναλυτών σε αέρια ιόντα με σκοπό τη μέτρηση της τιμής του λόγου μάζα προς φορτίο. Σήμερα διατίθεται μεγάλη ποικιλία τύπων φασματομέτρων μάζας ωστόσο όλα αποτελούνται από τα έξι βασικά λειτουργικά στοιχεία που φαίνονται στην εικόνα 5.1 και συνοψίζονται στον πίνακα 5.2:



**Εικόνα 5.1:** Σχηματικό διάγραμμα ενός φασματομέτρου μάζας

- i. το σύστημα εισαγωγής του δείγματος (interface) [118], μεταξύ διάταξης διαχωρισμού ή δειγματολήπτη και φασματογράφου μάζας για την εξάχνωση ή εξαέρωση του δείγματος. Ο ρόλος του συστήματος εισαγωγής δείγματος είναι η εισαγωγή αντιπροσωπευτικής μικροποσότητας δείγματος στην πηγή ιόντων, με ελάχιστη απώλεια κενού και μετατροπή του σε ιόντα στην αέρια κατάσταση. Τέτοιες διατάξεις περιλαμβάνουν τριχοειδή ακροφύσια και μεταλλικές επιφάνειες ή άλλες πιο περίπλοκες κατασκευές ανάλογα με την εργαστηριακή διάταξη. Σημειώνεται ότι στις δύο πιο σημαντικές μεθόδους ιοντισμού, τον ηλεκτροψεκασμό (ESI) και την εκρόφηση με λέιζερ με βοήθεια υποστρώματος (Matrix assisted laser desorption ionization, MALDI), η εισαγωγή του δείγματος και ο σχηματισμός των ιόντων πραγματοποιούνται ταυτόχρονα.
- ii. την πηγή ιοντισμού (ion source) [118, 146], έχει δύο κύριες λειτουργίες: να παράγει δέσμη ιόντων αντιπροσωπευτική του δείγματος και ανάλογα με τις απαιτήσεις του οργάνου να σχηματίζει, να διαμορφώνει και να επιταχύνει την ιοντική δέσμη εντός του αναλυτή μαζών κατάλληλα για την περαιτέρω ανάλυσή της. Υπάρχουν περισσότερες από δώδεκα διαφορετικές μέθοδοι ιοντισμού και η σχετική σημαντικότητα αυτών των τεχνικών αλλάζει συνεχώς καθώς νέες μέθοδοι αναπτύσσονται και οι παλιές ανανεώνονται. Το κύριο κριτήριο επιλογής μιας πηγής ιόντων σχετίζεται με την πτητικότητα και την θερμική σταθερότητα του αναλύτη καθώς επίσης και με το είδος της πληροφορίας που επιζητείται. Άλλες σημαντικές ιδιότητες του δείγματος περιλαμβάνουν το είδος του υποστρώματος (καθαρός αναλύτης, βιολογικό υγρό, ιστός) και την διαθέσιμη ποσότητα. Τα σημερινά μέσα που είναι ικανά να προκαλέσουν ιοντισμό συμπεριλαμβάνουν ηλεκτρόδια, ιόντα, ταχέως κινούμενα ενεργητικά άτομα και ιόντα, ηλεκτρικά πεδία με ψεκασμό, φωτόνια και επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Inductively Coupled Plasma, ICP). Οι τεχνικές παραγωγής ιόντων μπορεί να διαχωριστούν σε δύο κύριες ομάδες: α) ιοντισμός στην αέρια φάση, όπου το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται και β) μερική εκρόφηση από την συμπυκνωμένη φάση, όπου το δείγμα σε στερεή ή υγρή φάση μετατρέπεται απευθείας σε πτητικά ιόντα (πίνακας 5.3). Οι πηγές ιόντων μπορούν να διαχωριστούν και με βάση την ενέργεια που μεταδίδουν στον αναλύτη. Πηγές οι οποίες μεταδίδουν στα μόρια του αναλύτη αρκετή ενέργεια για να παραμείνουν σε έντονα διεγερμένη

ενεργειακή κατάσταση ονομάζονται σκληρές πηγές. Το φάσμα περιέχει πολλές κορυφές οι οποίες δίνουν πληροφορίες για τα είδη των δραστικών ομάδων και τη δομή των αναλυτών. Οι μαλακές πηγές, από την άλλη, προκαλούν περιορισμένη θραύση οπότε το λαμβανόμενο φάσμα μαζών αποτελείται από την κορυφή του μοριακού ιόντος και λίγες μόνο επιπλέον κορυφές οι οποίες παρέχουν πληροφορίες για το μοριακό βάρος των μορίων του αναλύτη.

- iii. τον αναλυτή μάζας (mass analyzer) [118, 146], που αποτελεί και την καρδιά του φασματογράφου μάζας, καθώς ευθύνεται για το διαχωρισμό ιόντων με διαφορετικούς λόγους  $m/z$ . Ένας ιδανικός αναλυτής θα πρέπει να διαχωρίζει ιόντα με ελάχιστη διαφορά στο λόγο  $m/z$  τους, να έχει δηλαδή μεγάλη διακριτική ικανότητα. Υπάρχουν πολλοί τύποι αναλυτών μαζών, που χρησιμοποιούν είτε στατικά ή δυναμικά πεδία είτε μαγνητικά ή ηλεκτρικά πεδία, όμως όλοι λειτουργούν υπό τους ίδιους νόμους. Οι αναλυτές μάζας χωρίζονται κατά βάση σε δύο κατηγορίες: συνεχούς ανάλυσης (continuous mode), όπου η τροφοδοσία γίνεται με αδιάκοπο τρόπο μέχρι την εξάντληση του δείγματος και τύπου παγίδας ιόντων (ion-trapping), όπου τα μόρια παγιδεύονται κατά βούληση από τον χειριστή. Η διαφοροποίηση αυτή έγκειται στον τρόπο με τον οποίο παρέχονται και κινούνται τα αναλυόμενα αέρια ιόντα. Οι τύποι αναλυτών που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι οι παγίδες ιόντων (γραμμικοί ή τρισδιάστατοι, ion traps), τα τετράπολα (Quadrupoles), τα κυκλοτρόνια μετασχηματισμού Fourier (Fourier transform cyclotrons) και το TOF (time of flight). Πολλά φασματομέτρα μαζών χρησιμοποιούν δυο ή περισσότερους αναλυτές μαζών για διαδοχική φασματομετρία μάζας (tandem mass spectrometry, MS/MS).
- iv. τον ανιχνευτή ιόντων (ion detector) [146], που αποτελεί το τελικό στοιχείο στη διάταξη του φασματομέτρου μάζας και ευθύνεται για τη μετατροπή του ιοντικού σήματος σε ηλεκτρικό/ψηφιακό σήμα. Ο ανιχνευτής καταγράφει το ρεύμα που παράγεται όταν ένα ιόν περνά ή χτυπά μια επιφάνεια. Η ακρίβεια της μέτρησης του ρεύματος των ιόντων εξαρτάται από τον συνολικό αριθμό των ιόντων που καταφτάνουν στον ανιχνευτή. Όταν ο αριθμός των ιόντων που εξέρχονται από τον αναλυτή μαζών σε μια συγκεκριμένη στιγμή είναι αρκετά μικρός, το ρεύμα των ιόντων είναι πολύ χαμηλό, οπότε είναι απαραίτητη η ενίσχυση του σήματος του.

- v. το σύστημα κενού (vacuum system) [118]. Αν και το σύστημα κενού αναφέρεται τελευταίο είναι το πλέον βασικό καθώς οι φασματογράφοι μάζας λειτουργούν μόνο υπό συνθήκες χαμηλού ή υψηλού κενού ούτως ώστε να αποφεύγεται η σύγκρουση των αέριων ιόντων – αναλυτών με μόρια του αέρα που καθιστά αδύνατη την ανάλυσή τους. Εάν γίνονταν τέτοιες συγκρούσεις, το όργανο θα εμφάνιζε μειωμένη ανάλυση και ευαισθησία [118]. Οι υψηλές πιέσεις μπορούν επίσης να προκαλέσουν αέριες εκκενώσεις από τα υψηλά δυναμικά που χρησιμοποιούνται για να επιταχύνουν τα ιόντα, κάτι που μπορεί να βλάψει το όργανο και τα ηλεκτρονικά του μέρη. Τα διάφορα μέρη ενός φασματομέτρου μαζών απαιτούν διαφορετικά επίπεδα κενού για την αποφυγή της διασποράς των ιόντων. Γενικά, η διατήρηση ενός καλού κενού είναι κρίσιμη για τη λήψη φασμάτων υψηλής ποιότητας.
- vi. έναν υπολογιστή.

**Πίνακας 5.2 :** Λειτουργίες των στοιχείων του φασματομέτρου μάζας

Στοιχείο	Λειτουργία
Εισαγωγή δείγματος	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ελάττωση πίεσης αέριων δειγμάτων</li> <li>2. Παραγωγή ατμών από στερεά ή υγρά δείγματα</li> <li>3. Εισαγωγή εκλουσμάτων απευθείας από GC, HPLC, CE</li> </ol>
Πηγή ιόντων	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Παραγωγή ιόντων αναλύτη</li> <li>2. Δημιουργία, μορφοποίηση και εκτόξευση κατάλληλης δέσμης ιόντων στον αναλύτη</li> <li>3. Παραγωγή θραυσμάτων ιόντων σε ειδικές κυψελίδες σύγκρουσης που χρησιμοποιούνται σε MS/MS χειρισμούς</li> </ol>
m/z αναλυτής	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Διαχωρισμός ιόντων με το ίδιο m/z από όλα τα άλλα υπάρχοντα ιόντα</li> <li>2. Εστίαση των ιοντικών ακτίνων στον ανιχνευτή</li> <li>3. Διαχωρισμός των ιόντων που λαμβάνονται από διάσπαση με σύγκρουση σε MS/MS λειτουργία</li> </ol>
Ανιχνευτής ιόντων	Μέτρηση της αφθονίας των ιόντων σε κάθε ξεχωριστή ακτίνα ιόντων.
Σύστημα κενού	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Αποτροπή ανεπιθύμητων επιδράσεων λόγω συγκρούσεων με ουδέτερα σωματίδια</li> <li>2. Αποτροπή αέριας εκκένωσης από υψηλές τάσεις</li> </ol>
Υπολογιστικό σύστημα	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Έλεγχος λειτουργιών του οργάνου</li> <li>2. Λήψη, επεξεργασία, αποθήκευση δεδομένων</li> <li>3. Αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων και στο διαδίκτυο για ταυτοποίηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων</li> </ol>

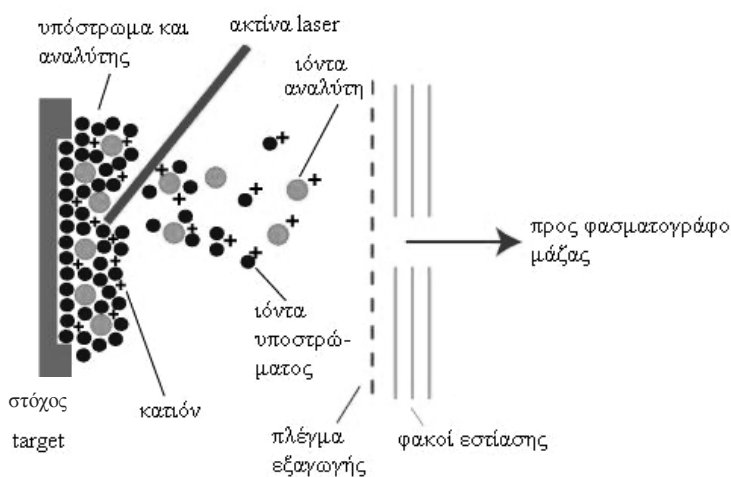
**Πίνακας 5.3 :** Πηγές ιόντων στη φασματομετρία μάζας

Τύπος πηγής	Όνομα	Παράγοντας ιοντισμού
Αέριας φάσης	Πρόσκρουση ηλεκτρονίων (electron impact, EI)	Ηλεκτρόνια μεγάλης ενέργειας
	Χημικού ιοντισμού (Chemical Ionization, CI)	Αντιδραστήρια-ιόντα σε αέρια κατάσταση
Εκρόφησης	Ιοντισμού πεδίου (field ionization, FI)	Ηλεκτρόδιο υψηλού δυναμικού
	Εκρόφησης πεδίου (field desorption, FD)	Ηλεκτρόδιο υψηλού δυναμικού
	Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI)	Ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο
	Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια μήτρας (matrix assisted laser desorption ionization, MALDI)	Ακτίνα λέιζερ
	Εκρόφηση πλάσματος (plasma , PD)	Θραύσματα σχάσης <sup>252</sup> Cf
	Βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας (fast atom bombardment, FAB)	Δέσμη ατόμων μεγάλης ενέργειας
	Φασματομετρία μαζών δευτερογενούς ιόντος (secondary ion mass spectroscopy, SIMS)	Δέσμη ιόντων μεγάλης ενέργειας
	Ιοντισμός με θερμοψεκασμό (thermospray ionization, TS)	Υψηλή θερμοκρασία



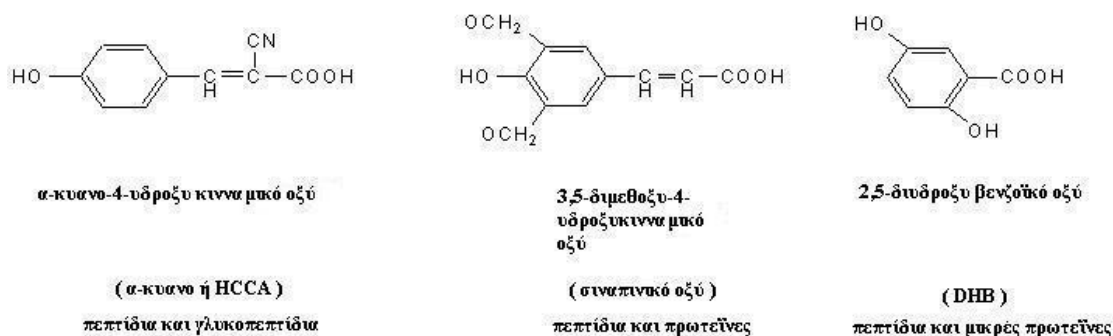
### 5.3 ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΕΚΡΟΦΗΣΗ ΑΠΟ ΜΗΤΡΑ ΜΕΣΩ ΛΕΙΖΕΡ – MALDI (MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION) [118, 146, 147]

Το MALDI εφευρέθηκε εξολοκλήρου από την αναγκαιότητα για τον ιοντισμό μακρομορίων και την ανάλυσή τους με φασματομετρία μάζας. Αποτελεί μια τεχνική στην οποία η εκρόφηση και ο ιοντισμός, συνήθως μη πτητικών αναλυτών, γίνεται σε ένα ενιαίο βήμα με τη βοήθεια ενός υλικού υποστρώματος. Στην εικόνα 5.2 παρουσιάζεται ο μηχανισμός ιοντισμού στο MALDI. Ένας μικρός όγκος διαλύματος υποστρώματος και δείγματος (μερικά  $\mu\text{L}$ ) εναποτίθεται σε μία μεταλλική συνήθως επιφάνεια που καλείται πλακίδιο ανάλυσης, κρυσταλλώνεται κατά την ξήρανσή του [148] και στη συνέχεια εκτίθενται σε μια έντονη δέσμη λέιζερ (Εικόνα 5.2). Το πλακίδιο εισέρχεται στο φασματογράφο και τίθεται υπό κενό. Η ακτινοβολία των παλμών λέιζερ, συνήθως λέιζερ αζώτου (απόδοση μήκους κύματος 337 nm) χρησιμοποιείται για να ξεκινήσει η εκρόφηση/ιοντισμός και συγχρόνως να δημιουργήσει μια δέσμη ιόντων με διαφορετικές τιμές  $m/z$ . Κάθε παλμός αφήνει έναν μικρό κρατήρα στην περιοχή του στόχου. Καθώς η ακτινοβολία του λέιζερ αυξάνεται, ξεπερνιέται ένα όριο στο οποίο εμφανίζονται ξαφνικά ιόντα του αναλύτη. Το υπόστρωμα απορροφά την ενέργεια του λέιζερ και οι κρύσταλλοί του εξαχνώνονται μεταφέροντας τα πεπτιδικά και πρωτεϊνικά ιόντα στην αέρια φάση.



**Εικόνα 5.2:** Αρχή του ιοντισμού με MALDI. Το δείγμα αναμιγνύεται με μια περίσσεια υποστρώματος που απορροφά στο μήκος κύματος του λέιζερ. Υπό την επίδραση του λέιζερ γίνεται εκρόφηση της δέσμης ουδετέρων μορίων και ιόντων. Η ακτίνα του λέιζερ εξαχνώνει το υπόστρωμα και τον αναλύτη μεταφέροντας στην αέρια φάση τα ιόντα που επιταχύνονται προς τον αναλυτή μάζας και στον ανιχνευτή μέσω ηλεκτροστατικών φακών.

Το υλικό της μήτρας [147, 148] είναι τυπικά ένα μικρό οργανικό μόριο το οποίο απορροφά ακτινοβολία στο μήκος κύματος του λέιζερ. Το υλικό αυτό συνήθως παρασκευάζεται με μορφή διαλύματος και στη συνέχεια εφαρμόζεται πάνω στο δείγμα, όπου συν-κρυσταλλοποιείται με τον αναλύτη. Η χρήση της μητρικής ουσίας είναι βασική για τον μηχανισμό του MALDI, διότι η μεταφορά ενέργειας μέσω αυτής προστατεύει τον αναλύτη από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία και εξασφαλίζει τη σταθερότητά του κατά την εξέλιξη του φαινομένου. Η επιλογή της μητρικής ουσίας γίνεται με βάση τις εγγενείς ιδιότητές της και το είδος των μορίων που αναλύονται. Για αποτελεσματική ανάλυση το υλικό της μήτρας πρέπει: (1) να εξάγει τον αναλύτη από το δείγμα, (2) να συν-κρυσταλλοποιείται επιτυχώς με τον αναλύτη, (3) να σχηματίζει κρυστάλλους σε όλη την επιφάνεια του δείγματος, και (4) να προωθεί τον ιοντισμό του αναλύτη. [149] Εμπορικά κυκλοφορούν περί τα 20 MALDI υλικά υποστρώματος (3 από τα συνηθέστερα παρατίθενται στο σχήμα 5.3) και θεωρητικά μπορούν να γίνουν άπειροι συνδυασμοί υλικού υποστρώματος, μείγματος διαλύτη, συγκέντρωσης και προσθέτων (π.χ. οξύ) για την παραλαβή φάσματος MALDI. Στην πράξη, η χρησιμοποίηση σιναπινικού οξέος (20 mg/mL σε 50:50 ακετονιτρίλιο:0,1% TFA σε νερό) τείνει να δίνει τον καλύτερο συνδυασμό κρυσταλλικής κάλυψης και ποιότητας σήματος για ανάλυση πρωτεϊνών [150].



το στερεό υπόστρωμα του MALDI περιέχει μικροκρυστάλλους του υποστρώματος μαζί με το δείγμα

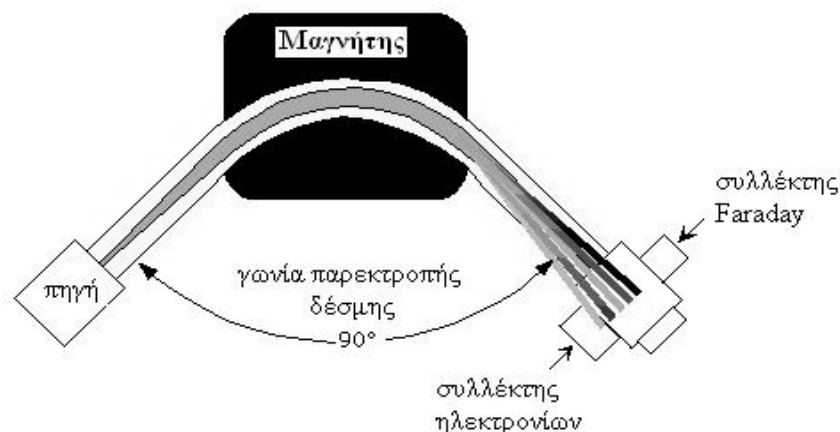
**Εικόνα 5.3:** Συνήθη υλικά υποστρώματος της τεχνικής MALDI

Το μεγάλο πλεονέκτημα του MALDI είναι η σχεδόν αποκλειστική παραγωγή κατιόντων με ένα θετικό φορτίο και με ελάχιστη θραύση των ιοντιζόμενων βιομορίων. Συνέπεια τούτου είναι ότι τα φάσματα μάζας με MALDI είναι εξαιρετικά απλά τόσο στην εμφάνιση όσο και την ερμηνεία τους. Το MALDI παρουσιάζει επίσης αποσύνδεση της προετοιμασίας του δείγματος από την ανάλυση με το MS, σταθερότητα του δείγματος στη στερεά φάση και μπορεί να διατηρηθεί επί του πλακιδίου επί μακρόν, ενώ γενικότερα θεωρείται και η πιο ευαίσθητη μέθοδος ιοντισμού. Μεταξύ των μειονεκτημάτων της τεχνικής συγκαταλέγονται η δυσκολία στην ανάλυση ενώσεων χαμηλότερου μοριακού βάρους (<800 Da) λόγω παρεμπόδισης από την ιοντιζόμενη μητρική ουσία και παράγωγά της [151] καθώς και η αναγκαιότητα σύζευξης του MALDI με αναλυτές μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας για τον διαχωρισμό και την ανίχνευση των μονά φορτισμένων ιόντων.

Για το MALDI, η διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος είναι πολύ κρίσιμη καθώς ο πληθυσμός των ιόντων εξαρτάται από τον τύπο του υποστρώματος και την παρουσία ακαθαρσιών [148]. Με την τεχνική του MALDI μπορούν να καθοριστούν μοριακά βάρη έως και 500 kDa (πολυμερή, βιομόρια, σύμπλοκα, ένζυμα), ανάλογα με τον αναλυτή.

### 5.3.1 Αναλυτής μαζών μαγνητικού πεδίου [118]

Στο MALDI ο διαχωρισμός των ιόντων γίνεται εντός ενός μαγνητικού πεδίου σύμφωνα με την ορμή και το φορτίο τους. Ο αναλυτής μαζών μαγνητικού πεδίου χρησιμοποιεί μαγνητικό πεδίο για να επηρεάσει την πορεία των φορτισμένων σωματιδίων που εξέρχονται από την πηγή και να τα διαχωρίσει έτσι ανάλογα με την ορμή και το φορτίο τους. Τα ιόντα εισέρχονται σε ένα μαγνητικό πεδίο, το οποίο τα επιταχύνει. Δεδομένου ότι τα ιόντα φέρουν φορτίο, οι τροχιές τους κάμπτονται ανάλογα με το λόγο  $m/z$ . Έτσι τα πιο φορτισμένα και πιο γρήγορα ελαφριά ιόντα εκτρέπονται περισσότερο, ενώ τα λιγότερο φορτισμένα και βαριά ιόντα λιγότερο (Εικόνα 5.4). Τα ιόντα τελικά φτάνουν στον ανιχνευτή όπου μετράται η σχετική αφθονία τους.



**Εικόνα 5.4 :** Διαχωρισμός ιόντων με βάση την ορμή τους υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου.

#### 5.4. ΑΠΟΔΟΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ

Η μέτρηση των χαρακτηριστικών ποιότητας ή αλλιώς της απόδοσης ενός οργάνου φασματομετρίας μάζας βασίζεται ως επί το πλείστον στον αναλυτή μάζας. Όλα τα χαρακτηριστικά προκύπτουν από το φάσμα μάζας που παρέχει κάθε φασματογράφος, από την ανάλυση προτύπων ουσιών, αλλά και υπό συνθήκες ανάλυσης ρουτίνας. Το φάσμα μάζας, μετά την επεξεργασία του πρέπει να παρέχει μία πειραματική εκτίμηση της μάζας ή ακριβέστερα του μοριακού βάρους των ιόντων που αναλύθηκαν. Κατά την ανάλυση ενός ατόμου και φυσικά ενός μορίου με φασματομετρία μάζας ταυτόχρονα ανιχνεύονται και τα ισότοπά του. Θεωρητικά, το φάσμα μάζας ενός ιόντος πρέπει να περιέχει μία κορυφή μεγάλης έντασης που αντιστοιχεί στο πρωτονιωμένο μοριακό ιόν ακολουθούμενη από κορυφές που αντιστοιχούν στα βαρύτερα ισότοπα.

Το φάσμα μάζας μιας ουσίας παρέχει με μορφή γραφήματος τις εντάσεις όλων των ληφθέντων  $m/z$  τιμών από τα είδη ιόντων που σχηματίστηκαν. Οι κορυφές των φασμάτων μαζών παρατηρούνται σε αναλογική μορφή (κάθε κορυφή με ύψος και εύρος) ή ψηφιακή μορφή (κάθε κορυφή μια απλή γραμμή). Οι εντάσεις των ιόντων συνήθως λαμβάνονται σε αυθαίρετες μονάδες, ως ύψη ή εμβαδά των κορυφών. Παρόλα αυτά, είναι πιο συνηθισμένο να παρουσιάζονται οι κανονικοποιημένες

εντάσεις σύμφωνα με την κορυφή με την μεγαλύτερη ένταση (λαμβάνεται ως 100%).  
[118]

Συνήθως τα ιόντα φέρουν μονό φορτίο. Το μετρούμενο  $m/z$  συνεπώς είναι ισοδύναμο με την μάζα. Η παρουσία ενός δεύτερου φορτίου μετακινεί την κορυφή του φάσματος σχεδόν στο μισό της τιμής του μονά φορτισμένου ιόντος. Για τον υπολογισμό των μαζών των ιόντων του αναλύτη χρησιμοποιούνται ειδικοί αλγόριθμοι.

Στα συμβατικά όργανα κάτω από συνθήκες ρουτίνας, οι μάζες συνήθως προσδιορίζονται με ακρίβεια  $\pm 0,5$  Da [146]. Στα υψηλής διακριτικής ικανότητας όργανα επιτρέπεται ο διακριτός προσδιορισμός της μάζας ενός ιόντος συνήθως με ακρίβεια 0,001 Da. Οι τελικά μετρούμενες ακριβείς μάζες των ιόντων και ριζών του αναλύτη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της στοιχειακής σύνθεσης και του εμπειρικού τύπου του ιόντος του αναλύτη.

## 6. ΣΚΟΠΟΣ

Ο εγκέφαλος των θηλαστικών συνεχίζει να αναπτύσσεται και μετά τη γέννηση και συγκεκριμένα στην πρώιμη νεογνική ηλικία εξελίσσονται και ωριμάζουν οι πιο πρόσφατες εξελικτικά περιοχές [152]. Μεταξύ αυτών και οι περιοχές του προμετωπιαίου φλοιού που θεωρούνται υπεύθυνες για τις ανώτερες γνωστικές λειτουργίες [153]. Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζει την ανάπτυξη του νεογνικού εγκεφάλου αλλά και όλη τη μετέπειτα εξέλιξη του αποτελεί η μητρική επαφή.

Στην προσπάθεια μελέτης των επιπτώσεων της ενίσχυσης ή της ματαίωσης μέσω της μητρικής επαφής κατά τη νεογνική ηλικία, αναπτύχθηκε ένα μοντέλο βασισμένο στην εκπαίδευση νεογνών επίμυων (ηλικίας 10-13 ημερών) σε ένα λαβύρινθο σχήματος T (T-maze), στην άκρη του ενός βραχίονα του οποίου βρίσκεται το κλουβί με την μητέρα και στην άκρη του άλλου βραχίονα ένα κλουβί με ένα άσχετο, παρθένο θηλυκό. Σκοπός της εκπαίδευσης είναι να μάθουν τα ζώα τη διαδρομή προσέγγισης της εισόδου του κλουβιού της μητέρας. Τα νεογνά εκπαιδεύονται είτε σε συνθήκες συνεχόμενης ματαίωσης (παρεμπόδιση επαφής με τη μητέρα στο τέλος κάθε δοκιμασίας) είτε σε συνθήκες συνεχόμενης ενίσχυσης (επαφή με τη μητέρα στο τέλος κάθε δοκιμασίας). Από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έχει προκύψει ότι η νεογνική εκπαίδευση επηρεάζει τη νευροχημεία και τη λειτουργία εγκεφαλικών περιοχών όπως του ιππόκαμπου και του προμετωπιαίου φλοιού [154, 155].

Η παρούσα μελέτη προσπάθησε να διερευνήσει την επίδραση της νεογνικής εκπαίδευσης επίμυων στον λαβύρινθο σχήματος «T», είτε υπό συνθήκες επιβράβευσης είτε υπό συνθήκες ματαίωσης, στο πρωτέωμα του προμετωπιαίου φλοιού. Αφενός, έγινε σύγκριση στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών μεταξύ των πειραματικών ομάδων (ματαιωμένα, επιβραβευμένα και ζώα μάρτυρες) χωριστά για το δεξιό και τον αριστερό προμετωπιαίο φλοιό. Αφετέρου, έγινε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών μεταξύ του δεξιού και του αριστερού ημισφαιρίου του προμετωπιαίου φλοιού κάθε κατηγορίας επίμυων χωριστά (πλαγίωση).

## **Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

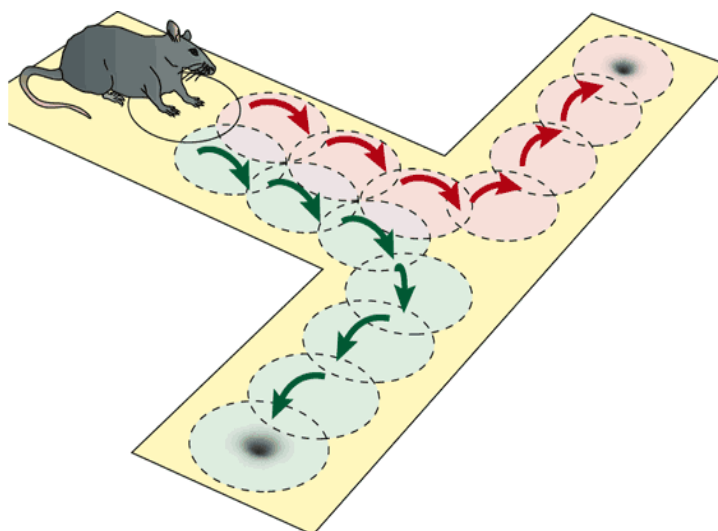
### 7.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Στη πειραματική διαδικασία που ακολουθείται χρησιμοποιούνται ως πειραματόζωα, θηλυκοί και αρσενικοί επίμυες ράτσας Wistar, ηλικίας 13 ημερών (P13, P: postnatal) που ανατρέφονται στο εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας του Τμήματος Νοσηλευτικής υπό σταθερές και ελεγχόμενες συνθήκες διαβίωσης (θερμοκρασία 24°C και κύκλος φωτισμού 8:00-20:00 φως, 20:00-8:00 σκοτάδι). Προκειμένου να αποκτηθούν νεογνά, τοποθετούνται αρσενικοί και θηλυκοί επίμυες, σε αναλογία 1:1, σε κοινά κλουβιά για περίπου 10 ημέρες. Εν συνεχεία, γίνεται απομάκρυνση των αρσενικών επίμυων, ενώ κάθε μητέρα τοποθετείται σε ξεχωριστό κλουβί, όπου και παραμένει μόνη της για το υπόλοιπο της κύησης (διάρκειας 22 ημερών). Ως ημέρα 0 (P<sub>0</sub>) θεωρείται η ημέρα του τοκετού. Στις πρώτες 13 ημέρες (P<sub>0</sub>-P<sub>13</sub>) μειώνεται η οποιαδήποτε επαφή με τα ζώα στο ελάχιστο δυνατό για να αποφευχθεί η δημιουργία στρεσογόνων συνθηκών που θα επεμβαίνουν στην πειραματική διαδικασία.

### 7.2 ΔΙΑΤΑΞΗ ΧΩΡΙΚΗΣ ΜΑΘΗΣΗΣ

Για την εκπαίδευση των νεογνών επίμυων χρησιμοποιείται ένας ξύλινος λαβύρινθος σχήματος T (T-maze), ο οποίος χρησιμοποιείται και στην δοκιμασία της μεσοπρόθεσμης μνήμης.

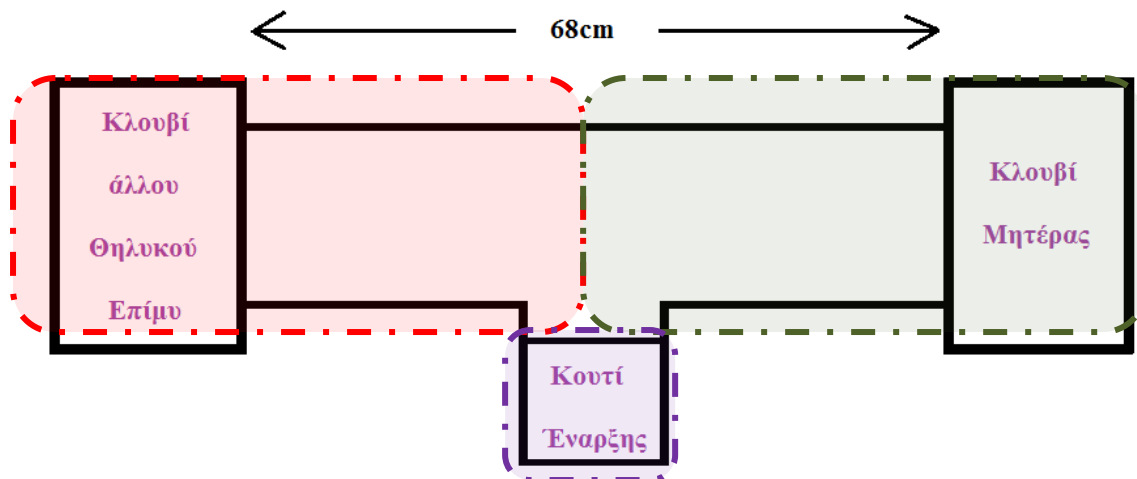
Ο επίμυς P13 ξεκινάει την εκπαίδευσή του από το κουτί έναρξης (start box) του λαβυρίνθου, το οποίο έχει διαστάσεις 8cm πλάτος × 6cm μήκος × 6cm ύψος σε αντίθεση με τους δύο βραχίονες που έχουν διαστάσεις 30 cm μήκος × 7 cm πλάτος × 6 cm ύψος. Αν συμπεριλάβουμε και τη



**Εικόνα 7.1:** Λαβύρινθος σχήματος T (γνωστός και ως T maze)



προέκταση του κουτιού έναρξης μήκους 8 cm τότε το συνολικό μήκος του λαβυρίνθου ήταν 68 cm. Κατά τη διάρκεια της εκπαίδευσης στην άκρη καθενός από τους δύο βραχίονες, δεξιού και αριστερού, υπήρχε από ένα κλουβί διαστάσεων 30cm πλάτος × 22cm μήκος × 30cm ύψος, στρωμένο με ροκανίδι στα οποία βρίσκονταν η μητέρα των νεογνών (δεξιός βραχίονας) και ένα άλλο ενήλικο παρθένο θηλυκό ζώο (αριστερός βραχίονας). Η είσοδος του κλουβιού της μητέρας αποτελούνταν από μία μικρή συρόμενη θυρίδα διαστάσεων (9×11 cm), στην οποία κατέληγε ο δεξιός βραχίονας. Συνεπώς, με βάση αυτή τη διάταξη, ο λαβύρινθος χωρίστηκε σε τρεις ζώνες: α) η ζώνη στόχος / target (δεξιός βραχίονας), β) η αντίθετη / opposite ζώνη (αριστερός βραχίονας) και γ) η αφετηρία / start [εικόνα 7.2].[154]



**Εικόνα 7.2:** Σχηματική κάτοψη της πειραματικής διάταξης για τη μελέτη της μάθησης και της μνήμης κατά τη νεογνική ηλικία.

## 7.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### 7.3.1 Εκπαίδευση – Πρόσληψη

Για την εκπαίδευση χρησιμοποιούνται αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα ηλικίας 10-13 ημερών. Ως πρώτη μεταγεννητική ημέρα (postnatal day 1, P1) ορίζεται η πρώτη ημέρα μετά τη γέννηση των ζώων. Πριν από τη γέννησή τους, όλα τα πειραματόζωα κάθε γέννας, κατατάσσονται τυχαία σε μία από τις τρεις κατηγορίες (ματαίωση ή ενίσχυση ή ζώα μάρτυρες).

Τα πειραματόζωα που εκτίθενται στη συνεχόμενη ενίσχυση, υποβάλλονται σε δέκα δοκιμασίες καθημερινά (σύνολο 40 δοκιμασίες για τέσσερις ημέρες εκπαίδευσης). Αρχικά, η μητέρα των πειραματοζώων απομακρύνεται από το κλουβί μέσα στο οποίο διαβιώνει με τα νεογνά και τοποθετείται στο δεξιό κλουβί της πειραματικής διάταξης του λαβυρίνθου σχήματος T. Στη συνέχεια, όλα τα ζώα της γέννας τοποθετούνται επίσης στο δεξιό κλουβί της πειραματικής διάταξης. Έπειτα, με τη σειρά, κάθε νεογνό τοποθετείται στο κουτί έναρξης του λαβυρίνθου και παραμένει σε αυτόν για 60 δευτερόλεπτα. Όταν το πειραματόζωο βρίσκει το κλουβί της μητέρας, η θυρίδα του κλουβιού ανοίγει και το πειραματόζωο μπαίνει μέσα στο κλουβί. Τη χρονική στιγμή εύρεσης του κλουβιού της μητέρας η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων σταματά. Σε κάθε άλλη περίπτωση μη εύρεσης του κλουβιού, η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων σταματά αμέσως μετά την ολοκλήρωση των 60 δευτερολέπτων και ο πειραματιστής οδηγεί με απαλές κινήσεις το πειραματόζωο στην είσοδο του κλουβιού της μητέρας. Εκεί η θυρίδα ανοίγει και το ζώο μπαίνει μέσα στο κλουβί. Στη συνέχεια, ο πειραματιστής παίρνει το επόμενο πειραματόζωο από το κλουβί της διάταξης και το τοποθετεί στο κουτί της έναρξης. Μετά το τέλος κάθε δοκιμασίας ο λαβύρινθος καθαρίζεται με διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης προκειμένου να απομακρυνθούν οσμές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν από τα πειραματόζωα προκειμένου να προσανατολιστούν στο χώρο. Όταν όλα τα πειραματόζωα έχουν εκτεθεί στη πρώτη διαδικασία με τον ίδιο τρόπο εκτίθενται και στη δεύτερη κ.ο.κ. Στο τέλος των δέκα δοκιμασιών, η μητέρα των πειραματοζώων και αμέσως μετά τα πειραματόζωα, επιστρέφουν στο κλουβί δαιβίωσης τους και στο δωμάτιο των πειραματοζώων. Αυτά τα ζώα χαρακτηρίστηκαν ως **επιβραβευμένα**.

Τα πειραματόζωα που εκτίθενται στη συνεχόμενη ματαίωση υποβάλλονται σε 10 δοκιμασίες καθημερινά (σύνολο 40 δοκιμασίες για τις 4 ημέρες εκπαίδευσης). Όπως στη συνθήκη της συνεχόμενης ενίσχυσης, αρχικά η μητέρα των πειραματοζώων και στη συνέχεια τα νεογνά τοποθετούνται στο κλουβί της πειραματικής διάταξης. Στη συνέχεια, κάθε πειραματόζωο τοποθετείται στο κουτί έναρξης του λαβυρίνθου και υποβάλλεται σε δέκα συνεχόμενες δοκιμασίες. Όταν το πειραματόζωο βρίσκει το κλουβί της μητέρας, η θυρίδα που οδηγεί στο κλουβί παραμένει κλειστή και το νεογνό παραμένει σε αυτό το σημείο για 20 δευτερόλεπτα. Αμέσως μετά, ο πειραματιστής επιστρέφει το πειραματόζωο στο κουτί έναρξης του λαβυρίνθου όπου υποβάλλεται στην επόμενη δοκιμασία. Όπως και στη συνθήκη της

συνεχόμενης ενίσχυσης, η διάρκεια της δοκιμασίας είναι 60 δευτερόλεπτα. Όταν το πειραματόζωο βρίσκει το κλουβί, η καταγραφή των συμπεριφορικών δεδομένων σταματά και αρχίζει η περίοδος των 20 δευτερολέπτων. Σε κάθε περίπτωση αν το πειραματόζωο δεν καταφέρει να βρει το στόχο (κλουβί της μητέρας) μέσα στο διαθέσιμο χρόνο των 60 δευτερολέπτων, οδηγείται μέχρι εκεί από τον πειραματιστή. Στο τέλος των δέκα συνεχόμενων δοκιμασιών ο πειραματιστής απομακρύνει το ζώο από τον λαβύρινθο και το επιστρέφει στο κλουβί της μητέρας μέσα στη πειραματική διάταξη. Μετά την ολοκλήρωση της εκπαίδευσης όλων των πειραματόζωων, η μητέρα και στη συνέχεια τα νεογνά της επιστρέφουν στο κλουβί της διαβίωσής τους. Αυτά τα νεογνά χαρακτηρίζονταν ως **ματαιωμένα**.

Σημειώνεται ότι στη συνθήκη της ματαίωσης, η θυρίδα παραμένει κλειστή, ενώ παράλληλα υπάρχει η προσθήκη ενός δεύτερου συρμάτινου πλέγματος, μπροστά από αυτή. Η τροποποίηση αυτή γίνεται προκειμένου να αυξηθεί η απόσταση μεταξύ κλουβιού και πειραματόζωου στην άκρη του βραχίονα (2 εκατοστά), με σκοπό την απουσία απτικών ερεθισμάτων από τη μητέρα προς το νεογνό. Γίνεται αντιληπτό ότι το πειραματόζωο κατά τη διάρκεια της έκθεσής στο λαβύρινθο δεν έχει οπτικά ή απτικά ερεθίσματα από τη μητέρα που να το οδηγούν προς το κλουβί. Τα οπτικά ερεθίσματα απουσιάζουν καθώς οι επίμυς στελέχους Wistar έχουν τα μάτια τους κλειστά έως και τη 13<sup>η</sup> μεταγεννητική ημέρα (ανοίγουν τα μάτια τους κατά την 14<sup>η</sup> μεταγεννητική ημέρα). Αν και δεν υπάρχει δυνατότητα ελέγχου της συμβολής των εξωτερικών ερεθισμάτων στη συμπεριφορά του πειραματόζωου, φαίνεται ότι ο προσανατολισμός γίνεται βάσει ιδιοδεκτικών ερεθισμάτων, πιθανόν από τα τοιχώματα του λαβυρίνθου καθώς και μέσω οσφρητικών και ακουστικών ερεθισμάτων από τη μητέρα.

Με βάση τη συμπεριφορά τους στη πειραματική διαδικασία τα πειραματόζωα χωρίζονται σε δύο ομάδες βασιζόμενοι στα όσα προαναφέρθηκαν:

- α) τα **επιβραβευμένα** (rewarded) / λαμβάνοντα την αναμενόμενη ανταμοιβή (Receiving Expected Reward) - **RER** και
- β) τα **ματαιωμένα** (frustrated) / αρνούμενα την αναμενόμενη ανταμοιβή (Denied Expected Reward) - **DER**

Οι δύο αυτές ομάδες νεογνών έχουν ως μέτρο σύγκρισης μια άλλη ομάδα νεογνών που χαρακτηρίζονται ως μάρτυρες (control), καθώς αυτά δεν εκτίθενται στην πειραματική διάταξη αλλά παραμένουν συνεχώς κοντά στη μητέρα τους.[156]

### 7.3.2 Προετοιμασία ιστού

Γίνεται αναισθητοποίηση των νεογνών, ακολουθείται απομόνωση των εγκεφάλων και τεμαχισμός τους με αμφίπλευρη απομάκρυνση του αριστερού και του δεξιού προμετωπιαίου λοβού. Οι απομονωμένοι προμετωπιαίοι λοβοί πλένονται με φυσιολογικό ορό, εμβαπτίζονται σε ισοπεντάνιο (-30°C) και διατηρούνται στους -80°C μέχρι οποιαδήποτε περαιτέρω επεξεργασία.[70]

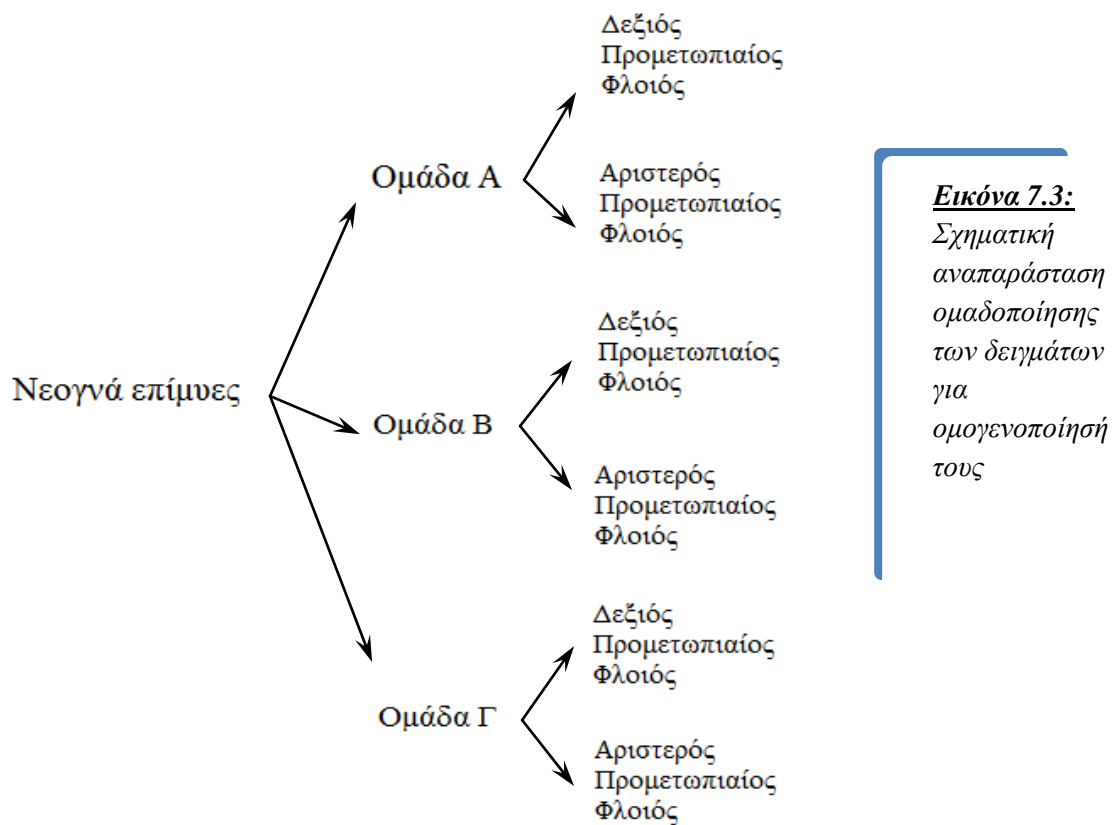
### 7.3.3 Ομογενοποίηση του προμετωπιαίου λοβού

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα πειραματόζωα χωρίζονται σε τρεις ομάδες:

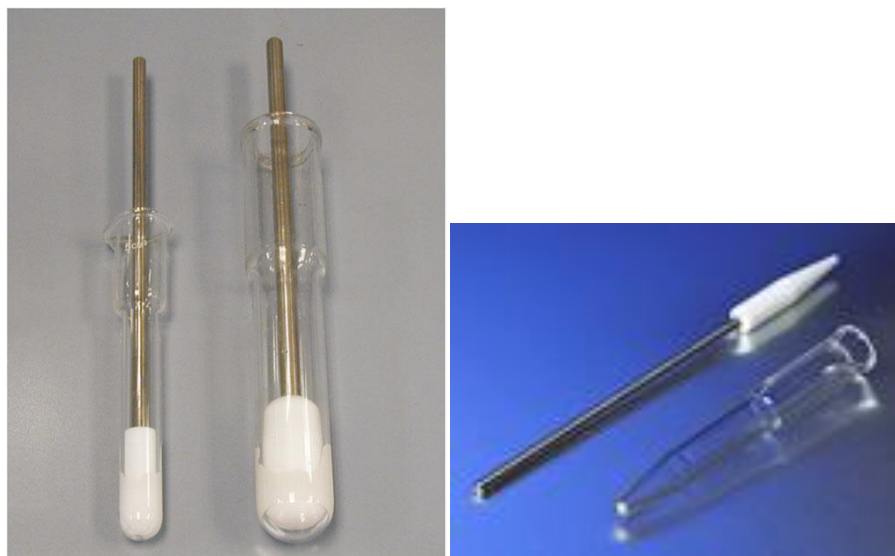
1. Ομάδα Α = RER
2. Ομάδα Β = DER
3. Ομάδα Γ = CTR (control)

Σε κάθε ομάδα περιλαμβάνονται πέντε ζώα, από το καθένα από τα οποία λαμβάνονται ο αριστερός και ο δεξιός προμετωπιαίος φλοιός και φυλάσσονται χωριστά στους -80°C. Ακολουθείται απόψυξη των δειγμάτων και ομαδοποίηση τους σε δεξιούς και αριστερούς για κάθε ομάδα χωριστά [εικόνα 7.3] προκειμένου να ακολουθήσει η διαδικασία της ομογενοποίησης.

Για παράδειγμα αποψύχονται όλοι οι δεξιοί προμετωπιαίοι φλοιοί των ζώων της ομάδας Α και τοποθετούνται στον ομογενοποιητή. Ακολουθεί προσθήκη 200μl Διαλύματος Ομογενοποίησης και με τη βοήθεια του εμβόλου, της γυάλινης ράβδου [εικόνα 7.4], ομογενοποιείται το δείγμα.



Το ομογενοποιημένο πλέον δείγμα, όγκου περίπου 300μl, τοποθετείται σε νέο φιαλίδιο και αυτό με τη σειρά του σε υδατόλουτρο, όπου με τη βοήθεια υπερήχων υπόκειται σε περαιτέρω ομογενοποίηση για 20 λεπτά. Αν μετά το εικοσάλεπτο το αποτέλεσμα δεν είναι ικανοποιητικό επανατοποθετείται το δείγμα στο υδατόλουτρο για ένα ακόμη εικοσάλεπτο. Στη προκειμένη περίπτωση δεν χρειάστηκε, οπότε αμέσως μετά το πρώτο εικοσάλεπτο ακολούθησε μια σύντομη ανάδευση και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στους 14°C στις 13.000 στροφές το λεπτό (rpm). Απομονώνεται εν συνεχεία το ίζημα και φυλάσσεται στους -20°C, ενώ το υπερκείμενο υποβάλλεται σε ανάλυση Bradford για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών.



**Εικόνα 7.4:** Διάφορα είδη ομογενοποιητών. Στη προκειμένη περίπτωση έγινε χρήση του ομογενοποιητή που απεικονίζεται στη δεξιά εικόνα καθώς οι ποσότητες που χειριστήκαμε ήταν μικρές.

#### 7.3.4 Προσδιορισμός πρωτεΐνης (Μέθοδος Bradford) [157]

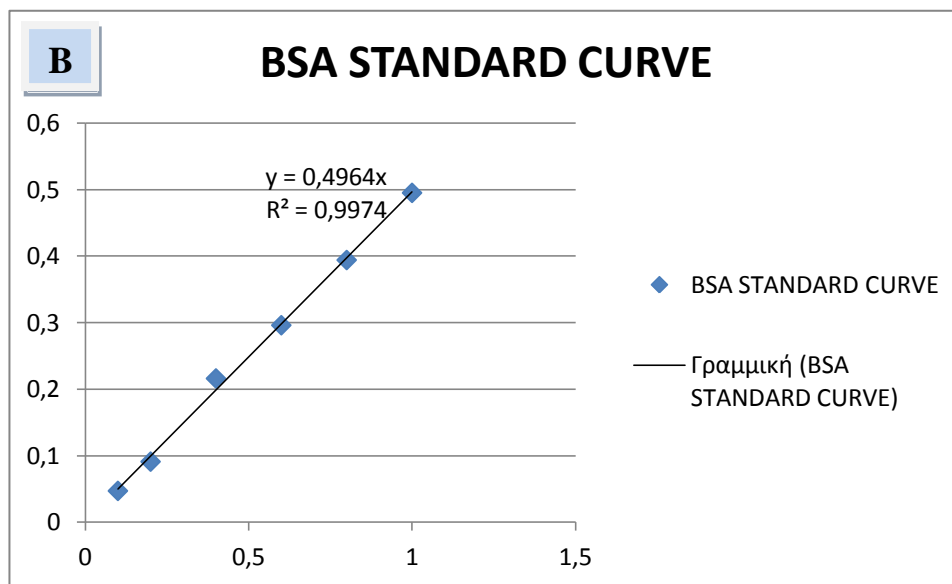
Αραιώνεται το έτοιμο αντιδραστήριο Bradford 5x σε 1x με  $H_2O$ , ενώ παρασκευάζονται αραιώσεις 1/50 και 1/100 από τα δείγματα. Σε 1mL αντιδραστηρίου Bradford προστίθενται 10μL κάθε αραιώσης και αναδεύονται. Μετά από 5-60 λεπτά τα διαλύματα φωτομετρούνται στα 595nm και για κάθε δείγμα λαμβάνεται ο μέσος όρος της συγκέντρωσης που προέκυψε από τις δύο αραιώσεις.

Παράλληλα η πρότυπη καμπύλη αναφοράς προσδιορίστηκε με βάση διαλύματα BSA σε διάφορες συγκεντρώσεις (0,0mg/mL, 0,2mg/mL, 0,4mg/mL, 0,6mg/mL, 0,8mg/mL και 1mg/mL από αρχικό διάλυμα 10mg/mL). Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε πρωτεΐνη γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Θα πρέπει να σημειωθεί πως η γραμμική περιοχή της καμπύλης ήταν από 0,2 έως 0,9 mg/ml.

**Εικόνα 7.5:**

**A]** Φωτομετρητής Bradford

**B]** Τυπική καμπύλη αναφοράς για την Bio-Rad Protein Assay με BSA (bovine serum albumin). O.D.595 διορθωμένο για τυφλό 200-1.400  $\mu\text{g/ml} \times 0.1 \text{ ml} = 20\text{-}140 \mu\text{g}$  πρωτεΐνης.



### 7.3.5 Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2 Dimensional Electrophoresis)

#### 7.3.5.1 Ενυδάτωση της ταινίας (strip)

Για κάθε ταινία με ακινητοποιημένη κλίση pH 3-10 (immobilised pH Gradient strips), 17 cm (Bio-Rad) ετοιμάζεται διάλυμα ενυδάτωσης, το οποίο με τη βοήθεια πιπέττας απλώνεται κατά μήκος του διαδρόμου του δίσκου ενυδάτωσης (Immobiline DryStrip reswelling tray).

Με τη βοήθεια μιας λαβίδας απομακρύνεται η προστατευτική μεμβράνη της ταινίας και κρατώντας την ταινία από την (+) πλευρά, την ακουμπάμε πάνω στο διάλυμα ενυδάτωσης με την πλευρά που προστατευόταν από τη ζελατίνη να βρίσκεται προς τα κάτω (face down). Τέλος, καλύπτεται όλη τη ταινία με παραφινέλαιο (Bio-Rad) για να μην αφυδατωθεί και μένει σε θερμοκρασία δωματίου για 12-18h.



**Εικόνα 7.6:** Δίσκος ενυδάτωσης (Immobiline DryStrip reswelling tray)

### 7.3.5.2 Ισοηλεκτρική Εστίαση (Isoelectric focusing, IEF)

Αρχικά ετοιμάζεται το διάλυμα με το δείγμα μας. Προετοιμάζονται συνολικά 250μl διαλύματος, τα οποία συνίστανται από : x μl δείγματος (=1mg ολική πρωτεΐνη ανά ταινία), 9 μl μίγμα αναστολέων πρωτεασών, 0,5 μl IPG (Immobilized pH Gradient) (0,2%) και τόσο διάλυμα αποδιάταξης (sample buffer) ώστε ο τελικός όγκος να είναι 250μl.

Η ταινία, που είχε προηγουμένως ενυδατωθεί, στραγγίζεται και τοποθετείται στο δίσκο της συσκευής της IEF με την πλευρά του πηκτώματος προς τα πάνω (face up) και με τη σωστή πολικότητα. Στις άκρες της ταινίας τοποθετούνται βρεγμένα χαρτάκια (electrode wicks για το Protein IEF System της Bio-Rad) και από πάνω στερεώνονται ηλεκτρόδια. Δίπλα στα ηλεκτρόδια σφηνώνονται πλαστικά πηγαδάκια (caps). Το πηγαδάκι των 150 μl στον αρνητικό (-) πόλο, ενώ των 100 μl στον θετικό (+). Από πάνω προστίθεται ορυκτέλαιο (Bio-Rad) έτσι ώστε να καλυφθεί όλος ο διάδρομος. Εν συνεχεία, τοποθετείται ο IEF (IsoElectric Focusing) δίσκος στη



συσσκευή ηλεκτροφόρησης PROTEAN IEF system (Bio-Rad) και προστίθεται με πιπέττα το διάλυμα του δείγματος πρώτα στο πηγαδάκι των 150μl και έπειτα σε αυτό των 100μl.

Ανοίγεται η συσκευή ηλεκτροφόρησης και ρυθμίζεται το πρόγραμμα :

Step 1 : rapid, 250V, 30min

Step 2 : linear, 5000V, 12h

Step 3 : rapid, 5000V, 16h

Step 4 : rapid, 500V, 10h

Η ένταση του ρεύματος ρυθμίζεται στα 55 mA/strip.

**Εικόνα 7.7:** Δίσκος ισοηλεκτρικής εστίασης και συσκευή ηλεκτροφόρησης ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF)



Με την ισοηλεκτρική εστίαση, η οποία είναι μια ηλεκτροφορητική μέθοδος, διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες ανάλογα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI). Με τον όρο ισοηλεκτρικό σημείο εννοούμε την τιμή του pH όπου το καθαρό φορτίο της κάθε πρωτεΐνης είναι μηδέν. Όταν οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε τιμές pH κάτω από το pI τους τότε είναι θετικά φορτισμένες, ενώ στην αντίθετη περίπτωση, σε τιμές pH πάνω από το pI τους είναι αρνητικά φορτισμένες.

Σε συνθήκες διαβαθμισμένου pH, όπως πάνω σε μια ταινία με ακινητοποιημένη κλίση pH 3-10, που περιέχει φορείς αμφολυτών, κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, οι πρωτεΐνες κατευθύνονται προς τη θέση εκείνη που το καθαρό φορτίο τους είναι μηδέν. Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως οι αμφολύτες διατάσσονται σε σειρά αυξανόμενου pI από την άνοδο προς την κάθοδο. Όταν κάθε

αμφολύτης δημιουργεί γύρω του μια περιοχή με τοπικό pH που αντιστοιχεί στο pI του, στο σύνολο της ταινίας δημιουργείται μια σταθερή διαβάθμιση pH. Έτσι, μια πρωτεΐνη με θετικό καθαρό φορτίο θα μετακινηθεί προς την κάθοδο και θα γίνεται σταδιακά λιγότερο θετικά φορτισμένη καθώς προχωρά μέσα στην κλίση pH μέχρι να φτάσει στο pI της. Ανάλογα μια πρωτεΐνη με αρνητικό φορτίο θα μετακινηθεί προς την άνοδο. Εάν μια πρωτεΐνη απομακρυνθεί από το pI της, θα αποκτήσει ξανά φορτίο οπότε με τον ίδιο τρόπο θα επιστρέψει στη σωστή της θέση. Με αυτόν το τρόπο οι πρωτεΐνες «παγιδεύονται» στο pH που το φορτίο τους είναι μηδέν. Οι πρωτεΐνες συνεπώς διαχωρίζονται ακόμα και βάσει πολύ μικρών διαφορών του φορτίου τους.

Όταν πλέον ολοκληρωθεί η πρώτη διάσταση οι ταινίες μπαίνουν σε τρυβλία και παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου αν ακολουθήσει κατευθείαν η προετοιμασία για τη δεύτερη διάσταση, ειδάλως, στην περίπτωση που διακοπεί το πείραμα σε αυτό το σημείο, αποθηκεύονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 7.3.5.3 Εξισορρόπηση των ταινιών (Strip Equilibration)

Σε αυτό το στάδιο προετοιμάζονται τα ρυθμιστικά διαλύματα εξισορρόπησης I (Equilibration buffer I) και II (Equilibration buffer II), δηλαδή ένα σύστημα απορρυπαντικών και αποδιατακτικών παραγόντων που συμβάλουν στο πλήρες ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών και στο διαχωρισμό τους με βάση το μοριακό τους βάρος.

Συγκεκριμένα, οι αναγωγικοί παράγοντες συνήθως χρησιμοποιούνται κατά την προετοιμασία του δείγματος για τη διάσπαση δισουλφιδικών δεσμών που δημιουργούνται εντός μιας πρωτεΐνης καθώς και ανάμεσα σε πρωτεϊνικές υπομονάδες [158]. Οι πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται εντελώς με την προσθήκη αναγωγικών παραγόντων όπως η διθειοερυθριτόλη (ή μερκαπτοαιθανόλη / τριβουτυλφωσφίνη), η οποία διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης, και το ιωδοακεταμίδιο, το οποίο ακετυλιώνει αυτές τις θέσεις αποτρέποντας τον επανασηματισμό των δεσμών αυτών. Ενώ, το SDS από την άλλη είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό, το οποίο αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και κρύβει το φορτίο τους, δημιουργώντας καθ'αυτόν τον τρόπο ανιοντικά συμπλέγματα με σταθερό αρνητικό καθαρό φορτίο ανά μονάδα μάζας.

Έπειτα από την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων εξισορρόπησης, ακολουθεί επώαση της ταινίας δέκα λεπτά με το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης I και έπειτα δέκα λεπτά με το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης II. Με την ολοκλήρωση αυτού του βήματος η ταινία εφαρμόζεται κατευθείαν πάνω στο πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης.

#### 7.3.5.4 Δεύτερη διάσταση (SDS-PAGE)

Με τη δεύτερη διάσταση διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες με βάση το φαινομενικό μοριακό τους βάρος. Συγκεκριμένα, το δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (SDS) 20% (w/v) υπάρχει τόσο στο δείγμα όσο και στο πήκτωμα, με αποτέλεσμα το ηλεκτρικό φορτίο των πρωτεϊνών να μην συνεισφέρει στο διαχωρισμό τους καθώς το SDS είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες σχηματίζοντας ανιοντικά συμπλέγματα με σταθερό αρνητικό καθαρό φορτίο ανά μονάδα μάζας κρύβοντας κατ'αυτό τον τρόπο το φορτίο των πρωτεϊνών. Ειδικότερα, σχηματίζονται αρνητικά φορτισμένα μικκύλια. Το μέγεθος του μικκυλίου (και συνεπώς ο αριθμός μορίων του απορρυπαντικού άρα και των αρνητικών φορτίων) είναι ανάλογος του μεγέθους της πρωτεΐνης. Επίσης, το δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (SDS) διασπά τους δεσμούς υδρογόνου, παρεμποδίζει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, και ξεδιπλώνει μερικώς τα πρωτεϊνικά μόρια. Με την προσθήκη αναγωγικών παραγόντων, όπως το DTT, οι πρωτεΐνες ξεδιπλώνονται πλήρως. Συνεπώς, όλα τα συμπλέγματα του SDS με τις πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό φορτίο και η κινητικότητά τους στο πήκτωμα εξαρτάται μόνο από το μοριακό μέγεθος των πρωτεϊνών. Όπως είναι αναμενόμενο οι πρωτεΐνες μικρής μοριακής μάζας κινούνται γρηγορότερα δια μέσω των πόρων του πηκτώματος από ό,τι οι πρωτεΐνες μεγαλύτερης μοριακής μάζας. Η τεχνολογία της SDS-PAGE δεν άλλαξε καθόλου τα τελευταία 40 χρόνια, με εξαίρεση κάποιες τεχνικές βελτιώσεις, κυρίως ως προς τη διευκόλυνση της εκτέλεσης του διαχωρισμού, τη δυνατότητα παρασκευής και διαχωρισμού πολλών πηκτωμάτων ταυτόχρονα ή την παροχή βιομηχανικά κατασκευασμένων πηκτωμάτων. Σε συνθήκες ρουτίνας με ένα πείραμα δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης μπορεί να διαχωριστούν περίπου 2000 πρωτεΐνες, με το θεωρητικό μέγιστο στις 10.000 περίπου.

Αρχικά χρειάζονται δύο γυάλινες πλάκες διαστάσεων 18,3cm x 19,3cm που χωρίζονται μεταξύ τους από ειδικά διαχωριστικά (spacers), τα οποία είναι υπεύθυνα

για τη ρύθμιση του πάχους του πηκτώματος, στην περίπτωση μας 1,5mm. Γενικότερα, το πάχος των πηκτωμάτων της δεύτερης διάστασης κυμαίνεται μεταξύ 0,75-1,5 mm και το μέγεθός τους (που πάντα είναι σε συνάρτηση με το IPG) κυμαίνεται από 8x8 cm έως 20x20 cm. Τα διαχωριστικά σταθεροποιούνται πάνω σε ειδικά λάστιχα στη βάση στήριξης με τους σφιχτήρες (clamps). Προκειμένου να καθοριστεί η στάθμη μέχρι την οποία θα ανέλθει η πηκτή διαχωρισμού σημειώνεται μία γραμμή 1,5cm κάτω από το επίπεδο του μικρού τζαμιού.

Η πηκτή διαχωρισμού 12,5% ως προς το μονομερές ακρυλαμίδιο, αποτελείται από μείγμα:

- \* 20mL διαλύματος ακρυλαμιδίου/πιπεραζίνης δισακρυλαμιδίου 37,5:1 (Biosolve)
- \* 12,5mL διαλύματος 1,5M Tris-HCl pH 8,8 (BioRad), pH 8,8,
- \* 250μL διαλύματος SDS 20% (w/v)
- \* και 17mL ύδατος.

Το διάλυμα του μονομερούς απαερώνεται για 15min και στη συνέχεια, αφού προστεθούν σε αυτό:

- \* 250μL διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου (APS, πρέπει να είναι πρόσφατο) 10% (w/v)
- \* και 25μl TEMED

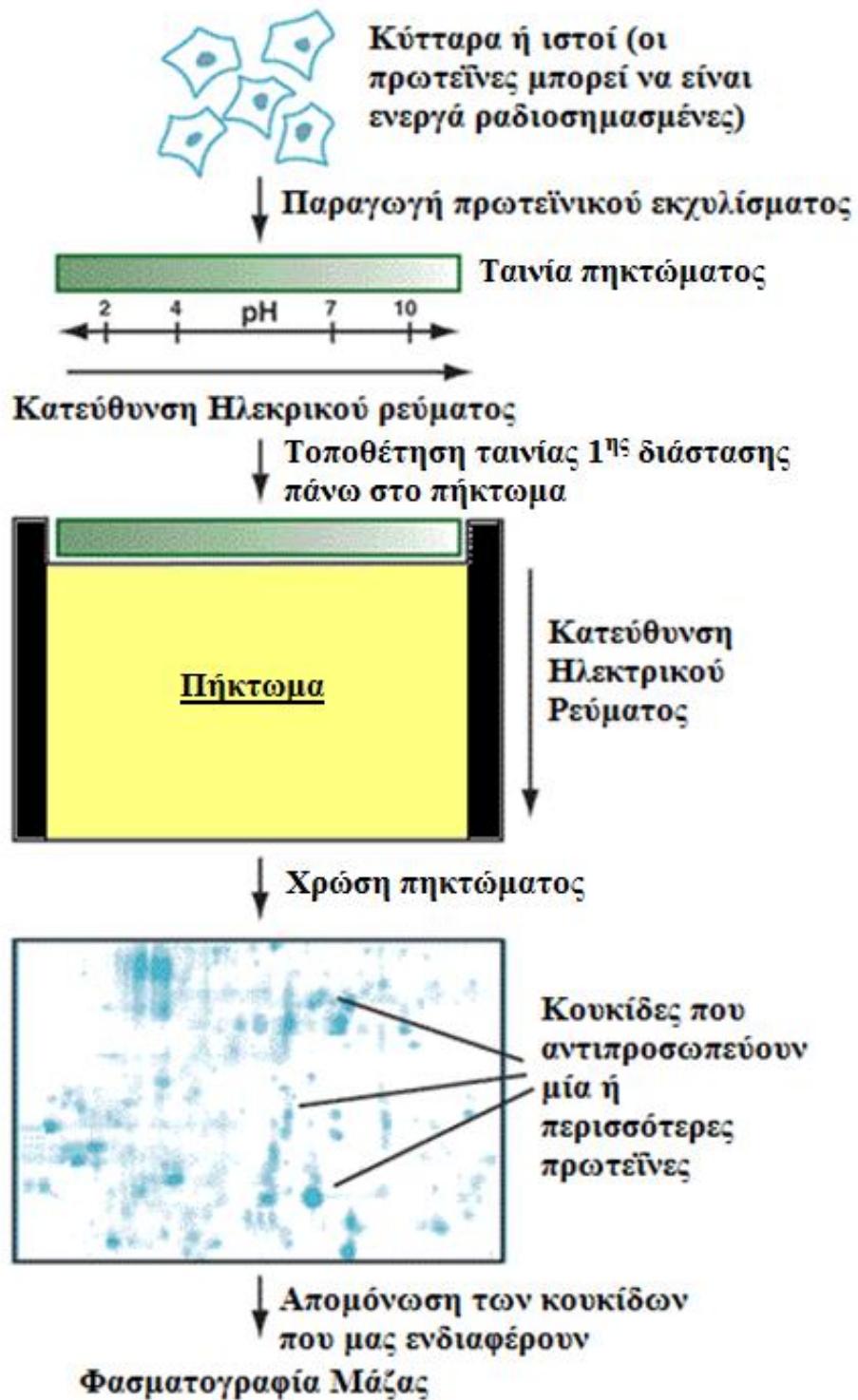
τοποθετείται αμέσως με ηλεκτρονική πιπέτα, στο χώρο μεταξύ των δύο γυάλινων πλακών μέχρι τη γραμμή που έχει σημειωθεί. Στη συνέχεια, πάνω από τη πηκτή διαχωρισμού, προστίθεται περίπου 1mL κορεσμένου με απεσταγμένο νερό διαλύματος ισοβουτανόλης για να μην ξεραθεί το πήκτωμα. Ακολουθεί αναμονή τουλάχιστον μιας ώρας προκειμένου να επέλθει πολυμερισμός του πηκτώματος.

Στη συνέχεια, ακολουθεί απομάκρυνση της ισοβουτανόλης με έκπλυση με νερό. Στην πράξη, η ταινία της ισοηλεκτρικής εστίασης, που μόλις έχει βγει από το δεύτερο διάλυμα εξισορρόπησης, τοποθετείται στην άνω επιφάνεια του πηκτώματος με την θετική (+) πλευρά από αριστερά και καλύπτεται με 1mL διαλύματος ζεστής αγαρόζης 0,5%, η οποία με την ψύξη της στερεοποιείται και διασφαλίζει την πλήρη επαφή των δύο διαστάσεων προκειμένου να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες.

Τα πηκτώματα (μια κασέτα φέρει δύο πηκτώματα) εισάγονται στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης PROTEAN II XL cell (Bio-Rad), στην οποία τοποθετούνται περίπου 1500mL ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1x TGS (electrode

running buffer) στην άνω και κάτω μονάδα της συσκευής/κασέτας, αφού πρώτα έχει συναρμολογηθεί αυτή. Έχει προηγηθεί αραιώση 1:10 του αρχικού ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης 10x TGS (electrode running buffer). Η συσκευή συνδέεται με κυκλοφορητή απεσταγμένου νερού που είναι ρυθμισμένος στους 12°C για τη διατήρηση της θερμοκρασίας. Η ένταση του ρεύματος ρυθμίζεται στα 40mA για κάθε πήκτωμα.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης (διάρκειας~4h) οι πλάκες διαχωρίζονται και απομακρύνονται προκειμένου να αποκολληθεί το πήκτωμα. Με τη σειρά του αυτό τοποθετείται στο διάλυμα της σταθεροποίησης (100 mL για κάθε πήκτωμα) για δύο ώρες υπό ανακίνηση. Με την ολοκλήρωση αυτού του βήματος ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύματος και προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος χρωστικής Colloidal Blue για εικοσιτέσσερις ώρες. Μετά το πέρας των εικοσιτεσσάρων ωρών το υπόβαθρό του πηκτώματος αποχρωματίζεται με εκπλύσεις υπό ανακίνηση με νερό. Για να ολοκληρωθεί το στάδιο της δεύτερης διάστασης, το πήκτωμα σαρώνεται στο Scanner-densitometer GS-800 της BioRad και τοποθετείται σε διάφανη μεμβράνη η οποία σφραγίζεται χωρίς αέρα, με λίγο νερό, μέχρι να χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή των πρωτεϊνικών κηλίδων.



**Εικόνα 7.8:** Συνοπτική απεικόνιση διαδικασίας δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης.

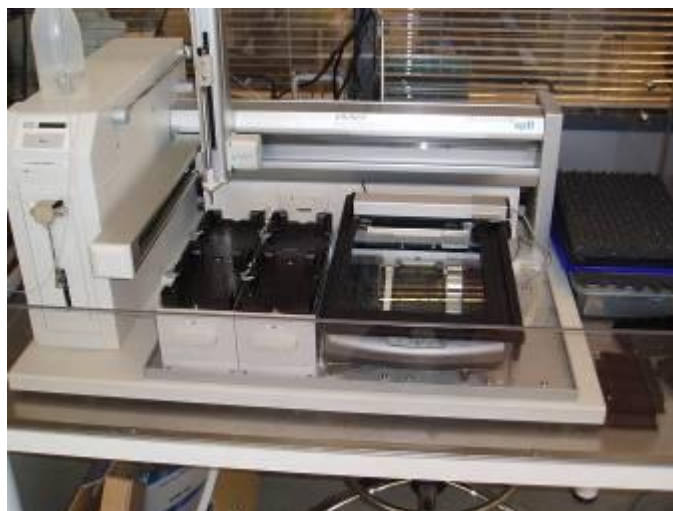
### 7.3.6 Εξαγωγή και επεξεργασία των πρωτεϊνικών κηλίδων από το πήκτωμα (Spot picking)

Προκειμένου να μπορέσει να ακολουθήσει εξαγωγή και επεξεργασία των πρωτεϊνικών κηλίδων προηγείται η σύγκριση των πηκτωμάτων με ειδικό λογισμικό, το PDQuest. Το πρόγραμμα συγκρίνει τις σαρωμένες εικόνες των πηκτωμάτων μας υπολογίζοντας την πυκνότητα των πρωτεϊνικών κηλίδων κάθε πηκτώματος. Με αυτό τον τρόπο εντοπίζει τις πρωτεϊνικές κηλίδες που συνεντοπίζονται στα πηκτώματα που μελετώνται και τις συγκρίνει μεταξύ τους, έτσι ώστε να προσδιοριστούν ποιες πρωτεΐνες υπερεκφράζονται και ποιες υποεκφράζονται σε κάθε πηκτώμα που μελετάμε.

Τα πηκτώματα εμβαπτίζονται σε νερό και αφήνονται στον πάγκο σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον τέσσερις ώρες χωρίς ανακίνηση για ενυδάτωση. Στη συνέχεια, το πήκτωμα τοποθετείται πάνω στη γυάλινη πλάκα, ειδικού πλαισίου, διαστάσεων 18,3cm x 19,3cm και από πάνω σταθεροποιείται με μαύρο πλαίσιο ιδίων διαστάσεων, ενώ το όλο σύστημα σταθεροποιείται με μεταλλικά άγκιστρα. Το πλαίσιο τίθεται εντός της ρομποτικής διάταξης Proteineer Sp-II, αφού έχει πρώτα διαβραχεί η γυάλινη επιφάνεια του σαρωτή του δειγματολήπτη (picker) μοντέλο Brucker proteineer SP II, όπου επανασαρώνεται αλλά αυτή τη φορά με το πρόγραμμα SPcontrol3. Η εικόνα μεταφέρεται στο Melanie 5, λογισμικό με το οποίο ο χρήστης ανιχνεύει τις πρωτεϊνικές κηλίδες που τον ενδιαφέρουν (τις είχε εντοπίσει προηγουμένως μέσω του προγράμματος PDQuest) και ορίζει τις συντεταγμένες τους προκειμένου εξαχθούν αυτόματα από τον picker. Ο έλεγχος της ρομποτικής διάταξης γίνεται με το λογισμικό SpControl 3.0 και επιτρέπει την εξαγωγή των κηλίδων και την τοποθέτησή τους με τη σειρά που αποκόπτονται από το πήκτωμα σε αριθμημένα πλακίδια μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων. Η χρήση της διάταξης διευκολύνει σε τεράστιο βαθμό την οργάνωση και επεξεργασία χιλιάδων κηλίδων, καθώς η σειρά με την οποία αποκόπτεται κάθε κηλίδα από το πήκτωμα αποθηκεύεται στη μνήμη του υπολογιστή έτσι ώστε να είναι δυνατή η πλήρης συσχέτιση μεταξύ της εικόνας του πηκτώματος, των ανιχνευμένων κηλίδων που εξάγονται και, εν συνεχεία, η ανάλυση και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών στο MALDI. Τα πιατάκια με τις πρωτεϊνικές κηλίδες φυλάσσονται στους 4°C.

### 7.3.7 Αποχρωματισμός των κηλίδων και εκκύλιση των πρωτεϊνών τους

Για αυτό το στάδιο τα πιατάκια με τις πρωτεϊνικές κηλίδες απομακρύνονται από τους 4°C και με τη χρησιμοποίηση του dispenser CyBi-Well96/384 apparatus (CyBio) προστίθενται σε κάθε πρωτεϊνική κηλίδα 150μL διαλύματος αποχρωματισμού. Τα πλακίδια ανακινούνται για 20 λεπτά και έπειτα απομακρύνεται το διάλυμα με τη βοήθεια πολυκάναλης πιπέττας. Ακολουθούν διαδοχικές εκπλύσεις με 150 μL διαλύματος αποχρωματισμού και επώαση περίπου 30 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση. Για τον πλήρη αποχρωματισμό απαιτούνται 5-10 επαναλήψεις. Όταν πλέον έχει ολοκληρωθεί ο αποχρωματισμός όλων των πρωτεϊνικών κηλίδων και έχει απομακρυνθεί το διάλυμα αποχρωματισμού τότε γίνονται δυο εκπλύσεις με 150μL νερού κάθε φορά ενώ ακολουθεί και ανακίνηση για 20min. Εν συνεχεία οι κηλίδες τοποθετούνται σε κενό αέρος στο SpeedVac evaporator για 1-1,5 ώρα προκειμένου να απομακρυνθεί το νερό και να εξατμιστεί μέχρι ξηρού για να αφυδατωθούν.



**Εικόνα 7.9:**

Picker  
μοντέλο  
Brucker  
Proteiner SP II

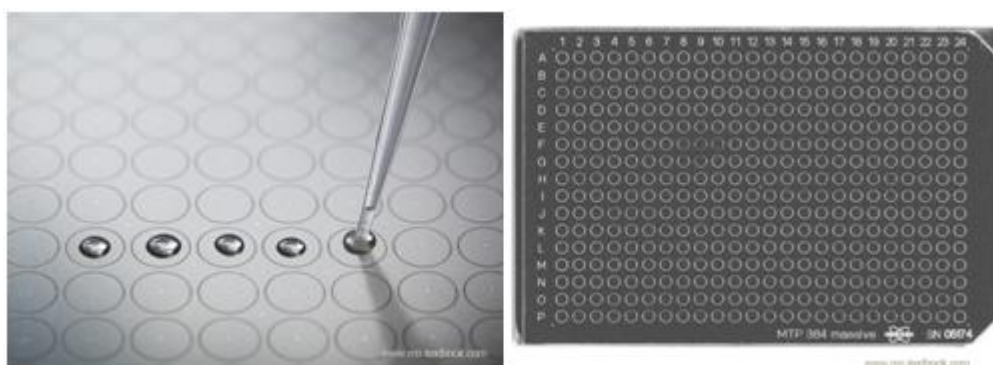
Αφού αποξηρανθούν οι κηλίδες σε κάθε μια προστίθενται 3μL διαλύματος θρυψίνης, μια πρωτεάση η οποία καταλύει την υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών. Τα πλακίδια καλύπτονται αεροστεγώς και τοποθετούνται σε σκοτεινό χώρο σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνθήκες υψηλής υγρασίας. Η πέψη πραγματοποιείται για τουλάχιστον 12 ώρες (μέγιστο 14-16 ώρες). Έτσι οι πρωτεΐνες διασπώνται σε πεπτίδια. Η θρυψίνη διασπά πρωτεΐνες στο καρβοξυτελικό άκρο των αμινοξέων αργινίνη και λυσίνη (εκτός από όταν ακολουθούνται από προλίνη, λόγω



στερεοχημικής παρεμπόδισης). Η εξαγωγή των πεπτιδίων γίνεται με διάχυση τους από τους πόρους του πηκτώματος με προσθήκη 10  $\mu\text{L}$  διαλύματος εκχύλισης και έντονη ανακίνηση για τουλάχιστον 20 λεπτά.

### 7.3.8 Επεξεργασία των πρωτεϊνικών κηλίδων πριν την εισαγωγή στο φασματογράφο μάζας και ταυτοποίηση των πρωτεϊνών

Από το πρωτεϊνικό μίγμα εφαρμόζονται 1,5 $\mu\text{l}$  πάνω στη μεταλλική πλακέτα (target) 384 θέσεων ταυτόχρονα με 1 $\mu\text{l}$  υλικού μήτρας καθώς και διάλυμα βραδυκινίνης με ACTH προκειμένου να βαθμονομηθεί ο φασματογράφος. Το δείγμα αναμιγνύεται με περίσσεια υποστρώματος που απορροφά στο μήκος κύματος του χρησιμοποιούμενου λέιζερ. Η μεταλλική πλακέτα ωστόσο στεγνώνει παραμένει στο σκοτάδι και έπειτα εισάγεται στο φασματογράφο μάζας MALDI-TOF (Ultraflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany).



**Εικόνα 7.10:** Εναποτεθέντα δείγματα και πλακίδιο ανάλυσης (target).

### 7.3.9 Ανοσοαποτύπωση (Western Blot)

Για κάθε ομάδα νεογνών επίμυων (RER, DER και CTR) έγινε απομόνωση του δεξιού και του αριστερού προμετωπιαίου φλοιού από τρία διαφορετικά ζώα. Κάθε δείγμα (π.χ. δεξιό τμήμα προμετωπιαίου φλοιού από ένα RER επίμυ) υπόκειται σε ομογενοποίηση με υπερήχους σε 100μl ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 15 λεπτά στους 8°C για να μην κρυσταλλωθεί το δωδεκυλο-θειικό νάτριο (SDS). Απομονώνεται το υπερκείμενο από κάθε μας δείγμα και χρησιμοποιείται για ανάλυση Western Blot. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα καθορίζεται με τη μέθοδο Bradford. Τα δείγματά μας, αφού προστεθεί σε αυτά ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης, τοποθετούνται σε υδατόλουτρο για 20 λεπτά στους 70°C. Πρέπει να σημειωθεί πως μετά το πέρας των 20 λεπτών γίνεται πάντοτε αποσύνδεση του υδατόλουτρο αλλά παραμένουν τα δείγματα σε αυτό έως ότου φορτωθούν προκειμένου να μην πήξουν σε θερμοκρασία δωματίου. Φορτώνονται 35μg συνολικής πρωτεΐνης από κάθε δείγμα σε προκατασκευασμένο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 4-12% NuPAGE® Bis-Tris (Invitrogen). Το πήκτωμα τρέχει στα 200V (σταθερή διαφορά δυναμικού) για 60 λεπτά. Εν συνεχεία, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης διαμέτρου 0,45μm (Whatman, Schleicher and Schuel; Dassel, Germany) και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες σε διάλυμα 5% σκόνης γάλατος δίχως λιπαρά, TBS και 0,05% Tween-20 προκειμένου να μειωθεί η μη ειδική σύνδεση των αντισωμάτων. Από κάθε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αποκόπτονται τα τμήματα που περιέχουν τη ζώνη των 17kDa και επωάζονται με αντίσωμα για την α-συνουκλεΐνη (rabbit C-20)-R: sc-7011-R της Santa Cruz με αραιώση 1:1000. Επιπλέον, τα τμήματα με τις ζώνες των 30kDa και των 50kDa επωάζονται αντίστοιχα με αντισώματα για την δεϋδρογενάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεϋδης (GAPDH) της Millipore και για την ινώδη όξινη πρωτεΐνη της γλοίας (GFAP) της Dakocytomation με αραιώση, 1:1000 για καθένα από τα αντισώματα. Επίσης, έγιναν western blot στα οποία όμως φορτώθηκαν, αντί για 35μg συνολικής πρωτεΐνης για κάθε δείγμα, 20μg προκειμένου να ελεγχθούν οι ακτίνες και οι τουμπουλίνες, οι οποίες εν αντιθέσει με τις παρακάτω ανιχνευθήσες πρωτεΐνες εμφανίζονται σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση. Ως αντίσωμα για τις τουμπουλίνες χρησιμοποιήθηκε η αντι-Neuronal Class III β-Tubulin (TUJ1) της Covance και για τις ακτίνες η αντι-β-Actin (C4): sc-47778 της Santa Cruz. Και στις δύο περιπτώσεις τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν με αραιώση 1:1.000 και ως

δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε goat anti-mouse με αραίωση 1:5.000. Και σε αυτές τις μεμβράνες έγινε ανοσοαποτύπωση για την  $\alpha$ -συνουκλείνη. Η επώαση με το πρώτο αντίσωμα γίνεται O/N (overnight) στους 4°C υπό συνεχή ανακίνηση. Την επόμενη μέρα οι μεμβράνες ξεπλένονται με TBS και 0,05% Tween-20. Ακολουθεί επώαση για 2 ώρες με το δεύτερο αντίσωμα. Στη περίπτωση της  $\alpha$ -synuclein ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε goat anti-rabbit με αραίωση 1:10.000, στη περίπτωση της GAPDH goat anti-mouse με αραίωση 1:5.000 ενώ στη περίπτωση της GFAP goat anti-rabbit με αραίωση 1:10.000. Οι μεμβράνες ξεπλένονται δύο δεκάλεπτα με TBS και 0,05% Tween-20 και ακολούθως τρία δεκάλεπτα με TBS  $\times$ 1. Οι μεμβράνες επιάζονται με το σύστημα χημειοφωταύγειας λουμινόλης-ενισχυτή. Το σήμα που παίρνουμε γίνεται ορατό με φίλμ αυτοραδιογραφίας (KODAK XAR). Τα φίλμ σαρώνονται και η οπτική πυκνότητα κάθε ζώνης καθορίζεται με το λογισμικό Image J (Image J Analysis method). Η οπτική πυκνότητα κάθε ζώνης διαιρέθηκε με την αντίστοιχη πυκνότητα που ελήφθει για την  $\alpha$ -synuclein (σχετική αναλογία οπτικής πυκνότητας).

**ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ:**▪ Διάλυμα Ομογενοποίησης:

- ✓ 200μl ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης
- ✓ 7,2 μl αναστολείς πρωτεασών

Γίνεται ανάδευση των αναστολέων των πρωτεασών στο ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης.

▪ Ρυθμιστικό διάλυμα ενυδάτωσης (Rehydration stock solution) :

- ✓ 8M Ουρία
- ✓ 2% CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)
- ✓ 0,4% Διθειοερυθριτόλη (DTE)
- ✓ Κυανούν της βρωμοφαινόλης

Διαλύονται 12g ουρίας σε 16 mL νερού ( $\theta < 30^{\circ}\text{C}$ ), στα οποία προστίθεται λίγη ρητίνη και αναδεύονται. Στη συνέχεια γίνεται διήθηση με πτυχωτό ηθμό και στο διήθημα προστίθενται 0,5g CHAPS, 0,1g DTE και λίγες σταγόνες κυανούν της βρωμοφαινόλης. Το διάλυμα συμπληρώνεται με νερό μέχρι τα 25 mL και φυλάσσεται σε σωληνάρια των 2 mL στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

▪ Ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης (sample buffer) :

- ✓ 7M Ουρία
- ✓ 2M Θειουρία
- ✓ 2% CHAPS
- ✓ 0,4% Διθειοερυθριτόλη (DTE)
- ✓ 0,5M Tris-HCl pH 6,8

Διαλύονται 42g ουρίας σε 50 mL νερού ( $\theta < 30^{\circ}\text{C}$ ), στα οποία προστίθεται λίγη ρητίνη και αναδεύονται. Στη συνέχεια γίνεται διήθηση με πτυχωτό ηθμό και στο διήθημα προστίθενται 19,4g θειουρίας, 2g CHAPS, 0,4g DTE και 10mL Tris-HCl 0,5M, pH 6,8. Το διάλυμα συμπληρώνεται με νερό μέχρι τα 100 mL και φυλάσσεται σε σωληνάρια των 2 mL στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

▪ Μίγμα αναστολέων πρωτεασών:

Διαλύεται μια ταμπλέτα αναστολέων πρωτεασών (protease inhibitors, PI) σε 2mL υπερκίθαρου ύδατος και το διάλυμα φυλάσσεται σε κλάσματα των 100μL στους -20°C.

▪ Διάλυμα εξισορρόπησης (equilibration stock solution) :

- ✓ 6M Ουρία
- ✓ 30% Γλυκερόλη
- ✓ 2%(w/v) Δωδεκυλο-θειικό νάτριο (SDS)
- ✓ 1,5M Tris-HCl pH 8.8

Σε 300ml νερού ( $\theta < 30^{\circ}\text{C}$ ) διαλύονται 360g ουρίας. Ακολούθως, προστίθεται λίγη ρητίνη και το διάλυμα αναδεύεται. Διηθείται με πτυχωτό ηθμό και στο διήθημα προστίθενται 33,3 ml Tris 1,5M pH 8,8, 300 ml γλυκερόλη, 100 ml SDS 20% (w/v) και συμπληρώνεται με νερό μέχρι τα 1000 ml. Το διάλυμα φυλάσσεται σε σωλήνες των 50ml στους -20°C.

▪ Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης I (Equilibration buffer I) :

- ✓ 0,05g Διθειοερυθριτόλη (DTE)
- ✓ 10ml Διάλυμα εξισορρόπησης (equilibration stock solution)

Για κάθε ταινία διαλύονται σε 10ml διαλύματος εξισορρόπησης 0,05g Διθειοερυθριτόλη, DTE (Fluca).

▪ Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης II (Equilibration buffer II) :

- ✓ 0,433g Ιωδοακεταμίδιου (Fluca)
- ✓ 10ml Διάλυμα εξισορρόπησης (equilibration stock solution)
- ✓ 1-2 σταγόνες κυανού της βρωμοφαινόλης

Για κάθε ταινία διαλύονται σε 10ml διαλύματος εξισορρόπησης 0,433g Ιωδοακεταμίδιο (Fluca) και προστίθενται μια με δύο σταγόνες κυανού της βρωμοφαινόλης.

▪ Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10x TGS (electrophoresis running buffer):

- ✓ 25mM Tris HCl
- ✓ 192mM γλυκίνη
- ✓ 0,1% SDS, pH 8,3

- Αγαρόζη 0,5%
  - ✓ 0,75g αγαρόζης
  - ✓ 150mL TGS 1x (Tris-Glycine-SDS)
  - ✓ σταγόνες κυανού της βρωμοφαινόλης

Διαλύονται 0,75g αγαρόζης σε 150mL TGS 1x (Tris-Glycine-SDS) και προστίθενται σταγόνες κυανού της βρωμοφαινόλης.
  
- Διάλυμα σταθεροποίησης των πρωτεϊνικών κηλίδων (fixation solution) :
  - ✓ υδατικό δ/μα μεθανόλης (50% v/v)
  - ✓ φωσφορικού οξέος (5,88% v/v)
  
- Διάλυμα χρωστικής (staining solution) Colloidal stain:
  - ✓ 55mL H<sub>2</sub>O
  - ✓ 20mL μεθανόλης
  - ✓ 20mL stainer A (stainer kit της invitrogen)
  - ✓ 5mL stainer B (stainer kit της invitrogen)
  
- Διάλυμα αποχρωματισμού :
  - ✓ 50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>
  - ✓ 30% (v/v) ACN (acetonitrile – ακετονιτρίλιο)
  
- Διάλυμα θρυψίνης:
  - ✓ 100 μg θρυψίνης διαλυμένα σε 1ml NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (ammonium bicarbonate)
  - ✓ 100mM και 9ml H<sub>2</sub>O
  
- Διάλυμα εκχύλισης (extraction solution):
  - ✓ 50% (v/v) ACN (acetonitrile – ακετονιτρίλιο)
  - ✓ 0,1% TFA (trifluoroacetic acid - τριφθοροξικό οξύ)
  
- Διάλυμα μήτρας/υποστρώματος (matrix):
  - ✓ Κορεσμένο διάλυμα α-κυανο-4-υδροξυκινναμικού οξέος (Sigma)
  - ✓ 50% ACN (ακετονιτρίλιο) που περιέχει 0,1% τριφθοροοξικό οξύ

- Διάλυμα Βαθμονόμησης Φασματογράφου:
  - ✓ 10μl διαλύματος βραδυκινίνης
  - ✓ 5μl ACTH με 10ml του διαλύματος της μήτρας
  
- Ρυθμιστικό Διάλυμα Ομογενοποίησης (homogenization buffer) για Western:
  - ✓ 685 μl NaCl 1M
  - ✓ 1mL Tris-HCl (από 100Mm Tris-HCl)
  - ✓ 500μL SDS (από 10% SDS)
  - ✓ 240μL NaF (από 1M NaF)
  - ✓ 100μl Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (από 100mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)
  - ✓ 500μl γλυκερόλη (από 100%)
  - ✓ 1975μl ddH<sub>2</sub>O ως τον τελικό όγκο 5ml
  - ✓ 1:250 Protease Inhibitors (pI) (συγκεκριμένα 20μl σε 5ml)

Προσοχή πάντα να διαλύεται πρώτα η γλυκερόλη στο νερό και έπειτα ακολουθεί η προσθήκη όλων των υπόλοιπων συστατικών.

- Transfer buffer:
  - ✓ 10mL Transfer Buffer NuPage 20×
  - ✓ 200μL NuPage Antioxidant
  - ✓ 20mL Μεθανόλη
  - ✓ 170mL ddH<sub>2</sub>O

- TBS 10× (500mL):
  - ✓ 6,07gr Tris
  - ✓ 44,9gr NaCl
  - ✓ 400mL ddH<sub>2</sub>O

Αναδεύουμε πάνω σε μαγνητική πλάκα για περίπου 15 λεπτά. Ελέγχουμε το pH να είναι 7,6. Για να ρυθμίσουμε το διάλυμά μας χρησιμοποιούμε πυκνό HCl. Συμπληρώνουμε αν χρειάζεται με απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 500mL.

- Blocking Buffer:
  - ✓ 10mL TBS 10×
  - ✓ 500μL Tween 20 (από την αραιώση 1:10 σε H<sub>2</sub>O, γιατί είναι πολύ πυκνό)

- ✓ 89mL ddH<sub>2</sub>O (απεσταγμένο νερό)

Σε 2,5gr σκόνη γάλατος χαμηλού σε λιπαρά προσθέτουμε έτοιμο διάλυμα TBS 1× και Tween 20 μέχρι τελικό όγκο 50mL.

▪ Διθειοθρεϊτόλη (DTT):

- ✓ 0,15gr DTT 1M
- ✓ ddH<sub>2</sub>O (απεσταγμένο νερό) μέχρι 1mL

Αποθηκεύουμε στους -20°C.

▪ Χρωστική Ponceau (0,1% σε 5% οξικό οξύ) :

- ✓ 0,05gr σκόνη Ponceau
- ✓ 47,5mL ddH<sub>2</sub>O (απεσταγμένο νερό)
- ✓ 2,5mL οξικό οξύ 5% (CH<sub>3</sub>COOH)

Αναμιγνύουμε το απεσταγμένο νερό με το οξικό οξύ στον απαγωγό. Διαλύουμε τη σκόνη Ponceau σε αυτό και αναμιγνύουμε καλά. Από αυτό το διάλυμα κάνουμε αραιώση 1:10 για βάψιμο της μεμβράνης για 1 λεπτό.



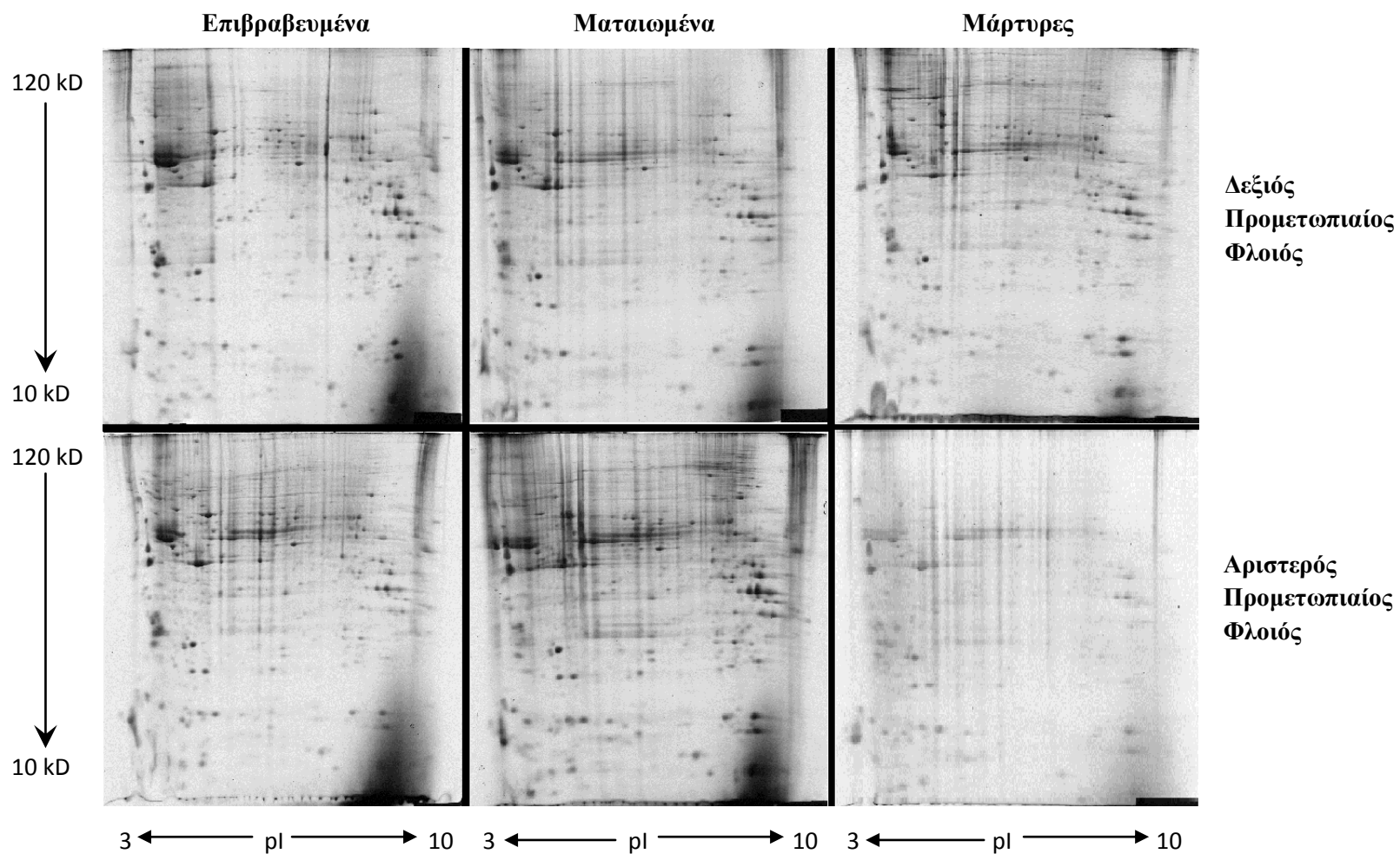
## 8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με βάση τη δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση με τη χρήση στην πρώτη διάσταση ταινίας IPG με εύρος pH 3-10 και την ανάλυση με το λογισμικό του PD Quest προέκυψε ότι εντοπίστηκαν ~550 κηλίδες κατά μέσο όρο σε κάθε πήκτωμα δεξιού και αριστερού προμετωπιαίου φλοιού (Εικόνα 8.1). Με το πρόγραμμα του PD Quest αναγνωρίστηκαν και επιλέχθηκαν οι διαφορετικά εκφρασμένες κηλίδες, οι οποίες αποκόπηκαν από τα πηκτώματα και πέμφθηκαν με θρυψίνη. Εν συνεχεία αναλύθηκαν με φασματομερία μάζας όπου και αναγνωρίστηκαν 125 πρωτεΐνες συνολικά (Εικόνα 8.1).

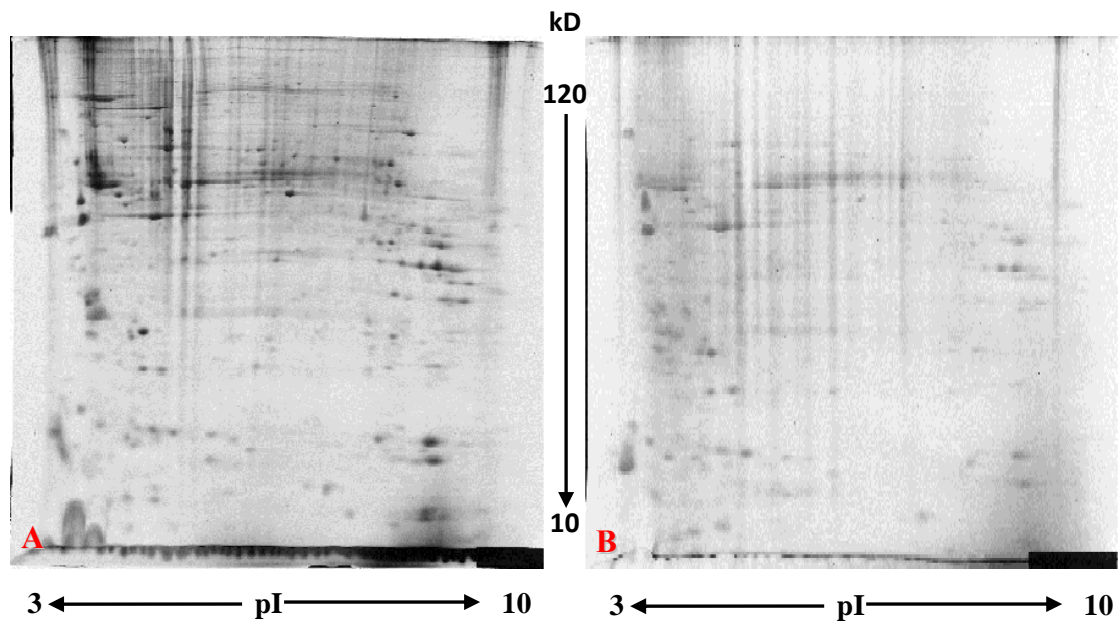
Ειδικότερα είναι αξιοσημείωτο ότι στα ζώα μάρτυρες (**control**) οι κηλίδες στο πήκτωμα της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης είναι αρκετά αγνές στο αριστερό ημισφαίριο σε σχέση με το δεξί με αποτέλεσμα να υπερεκφράζονται 34 πρωτεΐνες στο δεξί ημισφαίριο και καμία στο αριστερό σε σχέση με το δεξί (Εικόνα 8.2). Στον Πίνακα 8.1 αναγράφονται οι πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται στο δεξί ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού των πειραματόζωων που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Από την άλλη στα **επιβραβευμένα ζώα** τα πηκτώματα της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης του προμετωπιαίου φλοιού δεν παρουσίασαν ιδιαίτερες διαφορές, καθώς υπερεκφράζονταν 8 πρωτεΐνες στο δεξιό ημισφαίριο και 6 στο αριστερό (Εικόνα 8.3). Στον Πίνακα 8.2 αναγράφονται οι πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται στο δεξί ημισφαίριο και στον Πίνακα 8.3 οι πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται στο αριστερό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού στα επιβραβευμένα ζώα.

Τέλος, στα **ματαιωμένα ζώα** τα πηκτώματα της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης του προμετωπιαίου φλοιού παρουσίασαν αντεστραμμένα αποτελέσματα από αυτά των μαρτύρων, καθώς βρέθηκε υπερέκφραση 18 πρωτεϊνών στο αριστερό ημισφαίριο και 9 μόνο πρωτεϊνών στο δεξί (Εικόνα 8.4). Στον Πίνακα 8.4 αναγράφονται οι πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται στο δεξί ημισφαίριο και στον Πίνακα 8.5 οι πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται στο αριστερό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού στα ματαιωμένα ζώα.



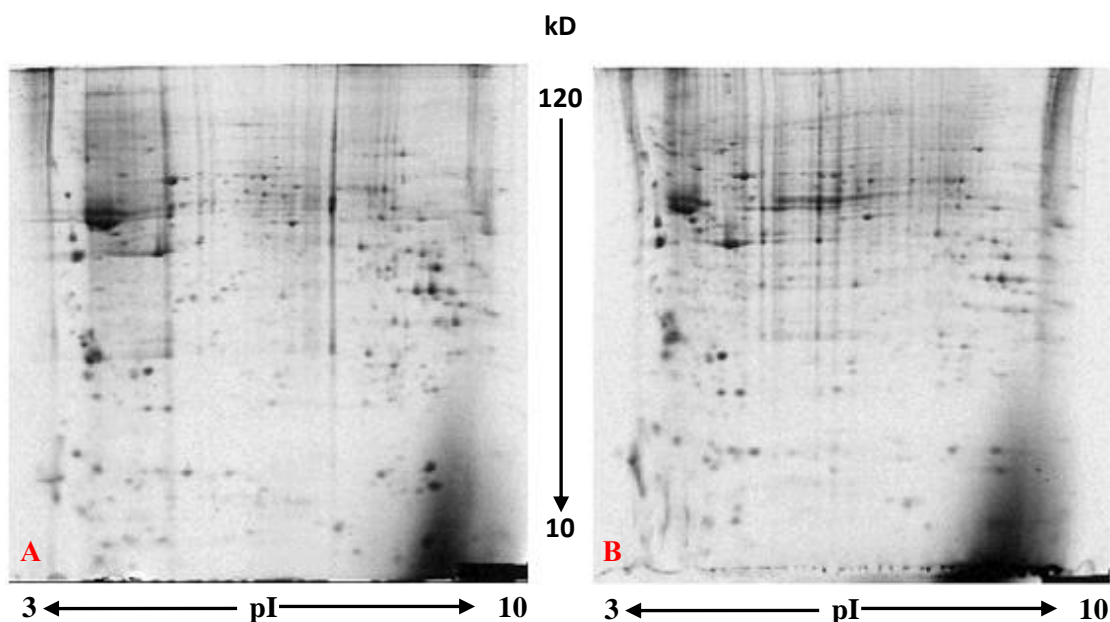
**Εικόνα 8.1:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες πηκτωμάτων ηλεκτροφόρησης από κάθε ομάδα νεογνών πειραματόζωων ηλικίας 13 ημερών από τις οποίες αναγνωρίστηκαν 125 πρωτεΐνες συνολικά.



**Εικόνα 8.2:** (A) Δεξιό ημισφαίριο προμετωπιαίου φλοιού από ζώα μάρτυρες, (B) Αριστερό ημισφαίριο προμετωπιαίου φλοιού από ζώα μάρτυρες. Παρουσιάζεται υπερέκφραση των πρωτεϊνικών κηλίδων στο δεξιό ημισφαίριο σε σχέση με το αριστερό.

**Πίνακας 8.1:** Οι πρωτεΐνες του προμετωπιαίου φλοιού που υπερεκφράζονται στο δεξί ημισφαίριο σε σχέση με το αριστερό στα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
P62260	1433E_RAT	14-3-3 protein epsilon OS=Rattus norvegicus GN=Ywhae PE=1 SV	29326.00	4.50	113	842,4	123,8	6,80	0,000155685
P06761	GRP78_RAT	78 kDa glucose-regulated protein OS=Rattus norvegicus GN=Hsp	72473.00	4.90	144	305,2	80,4	3,80	0,003679962
Q9ER34	ACON_RAT	Aconitate hydratase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=A	86121.00	8.70	113	561,9	0,57	985,79	0
P60711	ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1	42052	5.18	76	313,3	21,6	14,50	7.70134671368439e-07
P63259	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2 OS=Rattus norvegicus GN=Actg1 PE=1 SV=1	42108	5.20	76	313,3	21,6	14,50	7.70134671368439e-07
P39069	KAD1_RAT	Adenylate kinase isoenzyme 1 OS=Rattus norvegicus GN=Ak1 PE=	21684.00	8.80	103	191,9	0,83	231,20	0
P04764	ENOA_RAT	Alpha-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno1 PE=1 SV=4	47440.00	6.20	208	1047,6	29,7	35,27	2.56331844639135e-10
P29147	BDH_RAT	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattu	38576.00	9.70	66	74,1	0,46	161,09	0
P47942	DPYL2_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Rattus norvegicus G	62638.00	5.90	133	132,2	0,31	426,45	0
Q9JHU0	DPYL5_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 5 OS=Rattus norvegicus G	62071.00	6.70	147	386,6	0,73	529,59	0
Q99PF5	FUBP2_RAT	Far upstream element-binding protein 2 OS=Rattus norvegicus	74466.00	6.40	65	87,1	0,48	181,46	0
P10860	DHE3_RAT	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus	61719.00	8.80	140	170,3	0,72	236,53	0
P04797	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus	36090.00	9.00	72	290,9	0,34	855,59	0
P63245	GBLP_RAT	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 OS=	35511.00	8.90	172	211,5	54,5	3,88	0,003312734
P34058	HS90B_RAT	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90	83571.00	4.80	60	75,5	0,17	444,12	0
Q8VHV7	HNRH1_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Rattus norvegicus	49442.00	5.70	124	198,4	58,2	3,41	0,006044384
Q6AY09	HNRH2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 OS=Rattus norvegicus	49547.00	5.90	66	171,8	5,6	30,68	1.02444963623327e-09
A7VJC2	ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Rattus norvegicus	37512.00	9.30	114	488,8	33,2	14,72	6.83954260116693e-07
P04642	LDHA_RAT	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Rattus norvegicus GN=Ldha	36712.00	9.30	91	221,8	0,26	853,08	0
O88989	MDHC_RAT	Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Rattus norvegicus GN=Md	36631.00	6.20	57	464,7	112,1	4,15	0,00240318
P11980	KPYM_RAT	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 OS=Rattus norvegicus GN=Pkm2	58294.00	6.70	93	109,2	0,68	160,59	0
P12346	TRFE_RAT	Serotransferrin OS=Rattus norvegicus GN=Tf PE=1 SV=3	78512.00	7.80	60	105,8	0,76	139,21	0
P02770	ALBU_RAT	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2	70682.00	6.10	118	100	0,45	222,22	0
P46462	TERA_RAT	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Rattus norvegicus	89977.00	5.00	146	327,2	0,16	2045,00	0
P48500	TPIS_RAT	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1	27345.00	7.70	88	197,7	0,82	241,10	0
P68370	TBA1A_RAT	Tubulin alpha-1A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba1a PE=1 S	50788	4.81	131	775,8	240	3,23	0,007648611
Q6P9V9	TBA1B_RAT	Tubulin alpha-1B chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba1b PE=1 S	50804.00	4.80	131	775,8	240	3,23	0,007648611
Q6AYZ1	TBA1C_RAT	Tubulin alpha-1C chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba1c PE=1 S	50590	4.83	119	775,8	240	3,23	0,007648611
Q68FR8	TBA3_RAT	Tubulin alpha-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba3a PE=2 SV	50612	4.84	120	775,8	240	3,23	0,007648611
Q5XIF6	TBA4A_RAT	Tubulin alpha-4A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba4a PE=2 S	50634	4.79	108	775,8	240	3,23	0,007648611
P85108	TBB2A_RAT	Tubulin beta-2A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb2a PE=1 SV	50274.00	4.60	79	313,3	21,6	14,50	7.70134671368439e-07
Q3KRE8	TBB2B_RAT	Tubulin beta-2B chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb2b PE=1 SV	50377	4.64	70	313,3	21,6	14,50	7.70134671368439e-07
P69897	TBB5_RAT	Tubulin beta-5 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb5 PE=1 SV=1	50095	4.64	70	313,3	21,6	14,50	7.70134671368439e-07
P81155	VDAC2_RAT	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 OS=Rattu	32353.00	8.70	76	437,7	0,3	1459,00	0



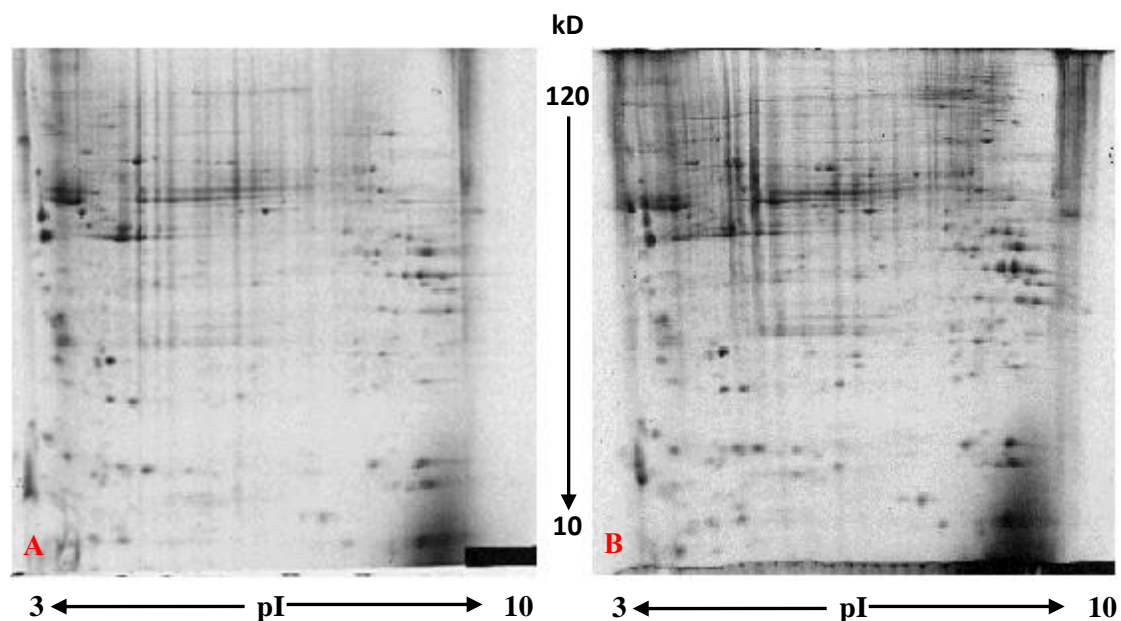
**Εικόνα 8.3:** (A) Δεξίο ημισφαίριο προμετωπιαίου φλοιού από επιβραβευμένα ζώα, (B) Αριστερό ημισφαίριο προμετωπιαίου φλοιού από επιβραβευμένα ζώα. Παρουσιάζεται παρόμοια έκφραση των πρωτεϊνικών κηλίδων στο δεξί και στο αριστερό ημισφαίριο.

**Πίνακας 8.2:** Οι πρωτεΐνες του προμετωπιαίου φλοιού που υπερεκφράζονται στο δεξί ημισφαίριο στα επιβραβευμένα ζώα.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
P13221	AATC_RAT	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic OS=Rattus norvegicus	46628.00	6.90	52	258,9	0,61	424,43	0
Q64559	BACH_RAT	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase OS=Rattus norv	43164.00	9.60	118	163,7	56,8	2,88	0,01243939
P31977	EZRI_RAT	Ezrin OS=Rattus norvegicus GN=Ezr PE=1 SV=3	69462.00	5.80	68	15,7	0,59	26,61	0
P18421	PSB1_RAT	Proteasome subunit beta type-1 OS=Rattus norvegicus GN=Psb1	26690.00	7.70	64	128,1	14,7	8,71	3.19467809318796e-05
Q5X73	GDIR1_RAT	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Rattus norvegicus GN=Arh	23450.00	5.00	64	448	196,7	2,28	0,030742113
Q9JMM9	SEPT5_RAT	Septin-5 OS=Rattus norvegicus GN=Sept5 PE=1 SV=2	43281.00	6.40	53	140,2	31,9	4,39	0,00179305
P07895	SODM_RAT	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial OS=Rattus norvegicus	24887.00	9.60	56	183,3	54,8	3,34	0,006578969
P24329	THTR_RAT	Thiosulfate sulfurtransferase OS=Rattus norvegicus GN=Tst PE	33614.00	8.80	119	152,9	48,9	3,13	0,00883319

**Πίνακας 8.3:** Οι πρωτεΐνες του προμετωπιαίου φλοιού που υπερεκφράζονται στο αριστερό ημισφαίριο στα επιβραβευμένα ζώα.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
P60711	ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1	42052	5.18	70	1428,3	74,4	19,20	7.58540269485408e-08
P63259	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2 OS=Rattus norvegicus GN=Actg1 PE=1 SV=1	42108.00	5.20	70	1428,3	74,4	19,20	7.58540269485408e-08
P47942	DPYL2_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Rattus norvegicus G	62638.00	5.90	125	414,5	130,8	3,17	0,008337819
P43244	MATR3_RAT	Matrin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Matr3 PE=1 SV=2	94902.00	5.80	100	183,4	0,76	241,32	0
P02770	ALBU_RAT	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2	70682	6.08	84	414,5	130,8	3,17	0,008337819
Q9QUL6	NSF_RAT	Vesicle-fusing ATPase OS=Rattus norvegicus GN=Nsf PE=1 SV=1	83170.00	6.60	75	87,3	0,61	143,11	0



**Εικόνα 8.4:** (A) Δεξιό ημισφαίριο προμετωπιαίου φλοιού από ματαιωμένα ζώα, (B) Αριστερό ημισφαίριο προμετωπιαίου φλοιού από ματαιωμένα ζώα. Παρουσιάζεται μεγαλύτερη υπερέκφραση των πρωτεϊνικών κηλίδων στο αριστερό από ό,τι στο δεξί ημισφαίριο .

**Πίνακας 8.4:** Οι πρωτεΐνες του προμετωπιαίου φλοιού που υπερεκφράζονται στο δεξί ημισφαίριο στα ματαιωμένα ζώα.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
Q62952	DPYL3_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 3 OS=Rattus norvegicus G	62327.00	6.00	136	1776,6	927,4	1,92	0,045291139
Q9JHU0	DPYL5_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 5 OS=Rattus norvegicus G	62071.00	6.70	160	559,9	277,5	2,02	0,046689992
P85834	EFTU_RAT	Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=	49890.00	7.90	65	158,7	83,6	1,90	0,046921767
P05065	ALDOA_RAT	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Ald	39783.00	9.20	81	299,5	33	9,08	2.42850807807837e-05
P04636	MDHM_RAT	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=	36117	9.83	55	781,7	202,3	3,86	0,003381663
P10111	PPIA_RAT	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Rattus norvegicus G	18091.00	9.40	59	1246,2	648,3	1,92	0,044686343
P68370	TBA1A_RAT	Tubulin alpha-1A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba1a PE=1 S	50788	4.81	56	447,6	81,7	5,48	0,000553271
P31000	VIME_RAT	Vimentin OS=Rattus norvegicus GN=Vim PE=1 SV=2	53757.00	4.90	122	447,6	81,7	5,48	0,000553271
Q9Z2L0	VDAC1_RAT	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Rattu	30851.00	9.20	97	753,4	431,8	1,74	0,043891864



**Πίνακας 8.5:** Οι πρωτεΐνες του προμετωπιαίου φλοιού που υπερεκφράζονται στο αριστερό ημισφαίριο στα ματαιωμένα ζώα.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
P06761	GRP78_RAT	78 kDa glucose-regulated protein OS=Rattus norvegicus GN=Hsp	72473.00	4.90	115	452,7	172,8	2,62	0,018219963
P68035	ACTC_RAT	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actc1	42334	5.11	57	771,6	64,2	12,02	3.27525078203106e-06
P68136	ACTS_RAT	Actin, alpha skeletal muscle OS=Rattus norvegicus GN=Acta1 P	42366	5.11	57	771,6	64,2	12,02	3.27525078203106e-06
P60711	ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1	42052.00	5.20	133	771,6	64,2	12,02	3.27525078203106e-06
P63259	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2 OS=Rattus norvegicus GN=Actg1 PE=1 SV=1	42108	5.20	133	771,6	64,2	12,02	3.27525078203106e-06
P04764	ENOA_RAT	Alpha-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno1 PE=1 SV=4	47440.00	6.20	176	302,5	0,87	347,70	0
Q5M7A7	CNRP1_RAT	CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1 OS=Rattus nor	18818.00	8.90	60	187,5	19	9,87	1.36321734107714e-05
P47942	DPYL2_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Rattus norvegicus G	62638.00	5.90	154	42,7	0,49	87,14	0
Q6AYH5	DCTN2_RAT	Dynactin subunit 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dctn2 PE=1 SV=1	44235.00	5.00	136	208,9	0,67	311,79	0
P04797	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicu	36090.00	9.00	89	171,6	0,34	504,71	0
P63245	GBLP_RAT	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 OS=	35511.00	8.90	157	155,3	0,15	1035,33	0
P63018	HSP7C_RAT	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hs	71055.00	5.20	54	227,1	0,23	987,39	0
P34058	HS90B_RAT	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90	83571.00	4.80	65	185	0,84	220,24	0
P04642	LDHA_RAT	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Rattus norvegicus GN=Ldha	36712.00	9.30	67	35,3	0,76	46,45	0
Q05982	NDKA_RAT	Nucleoside diphosphate kinase A OS=Rattus norvegicus GN=Nme1	17296.00	5.90	65	171,1	19,5	8,77	3.05083215610402e-05
Q9R063	PRDX5_RAT	Peroxiredoxin-5, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Prdx5	22507.00	10.10	62	131,5	13,7	9,60	1.65356587058518e-05
Q925G0	RBM3_RAT	Putative RNA-binding protein 3 OS=Rattus norvegicus GN=Rbm3	16845.00	7.70	56	98,4	17,8	5,53	0,000526066
P50398	GDIA_RAT	Rab GDP dissociation inhibitor alpha OS=Rattus norvegicus GN	51074.00	4.90	60	259,9	0,91	285,60	0

Εκτός των προαναφερθέντων συγκρίσεων, που αφορούν την πλαγίωση, έγιναν και άλλες επιπλέον συγκρίσεις ανάμεσα στα πηκτώματα της ίδιας πλευράς του εγκεφάλου των πειραματόζων των διαφορετικών πειραματικών ομάδων. Με βάση τις συγκρίσεις αυτές προέκυψαν οι ακόλουθοι πίνακες στους οποίους αναγράφονται οι πρωτεΐνες που υπερεκφράζονται κάθε φορά ανάλογα με τη σύγκριση που έγινε. Οι πίνακες 8.6-8.11 αφορούν συγκρίσεις των πρωτεϊνών στο δεξιό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού μεταξύ των ομάδων, ενώ οι πίνακες 8.12-8.16 αφορούν τις αντίστοιχες συγκρίσεις για το αριστερό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού. Πρέπει να σημειωθεί ότι στο αριστερό ημισφαίριο των ζώων μαρτύρων δεν υπερεκφράστηκε καμία πρωτεΐνη σε σχέση με το αριστερό ημισφαίριο των επιβραβευμένων ζώων.

**Πίνακας 8.6:** Στο δεξί ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού των ζώων μαρτύρων υπερεκφράζονται 10 πρωτεΐνες σε σχέση με αυτό των επιβραβευμένων ζώων.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
P68035	ACTC_RAT	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actc1	42334	5.11	63	932,5	0,87	1071,84	0
P68136	ACTS_RAT	Actin, alpha skeletal muscle OS=Rattus norvegicus GN=Acta1 P	42366	5.11	63	932,5	0,87	1071,84	0
P60711	ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1	42052.00	5.20	129	932,5	0,87	1071,84	0
P63259	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2 OS=Rattus norvegicus GN=Actg1 PE=1 SV=1	42108	5.20	129	932,5	0,87	1071,84	0
P63269	ACTH_RAT	Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Rattus norvegicus GN=A	42249	5.20	54	932,5	0,87	1071,84	0
P07335	KCRB_RAT	Creatine kinase B-type OS=Rattus norvegicus GN=Ckb PE=1 SV=2	42983.00	5.30	134	453,8	0,19	2,28	0
P04797	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus	36090.00	9.00	72	290,9	40,8	7,13	0,000116742
P11598	PDIA3_RAT	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia3	57044.00	5.80	146	517,3	260,8	1,98	0,049393349
P46462	TERA_RAT	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Rattus norvegicus	89977.00	5.00	146	327,2	50,5	6,48	0,000209385
P68370	TBA1A_RAT	Tubulin alpha-1A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba1a PE=1 S	50788	4.81	65	517,3	260,8	1,98	0,049393349

**Πίνακας 8.7:** Στο δεξί ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού των επιβραβευμένων ζώων υπερεκφράζονται 20 πρωτεΐνες σε σχέση με αυτό των ζώων μαρτύρων.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
P62260	1433E_RAT	14-3-3 protein epsilon OS=Rattus norvegicus GN=Ywhae PE=1 SV	29326.00	4.50	132	1680,9	842,4	2,00	0,048435424
P68511	1433F_RAT	14-3-3 protein eta OS=Rattus norvegicus GN=Ywhah PE=1 SV=2	28365.00	4.70	71	1385,5	397,1	3,49	0,005442349
P38983	RSSA_RAT	40S ribosomal protein SA OS=Rattus norvegicus GN=Rpsa PE=1 S	32917.00	4.60	80	556,7	97,5	5,71	0,000438184
P50554	GABT_RAT	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial OS=Rattus no	57161.00	9.20	69	229,6	0,75	306,13	0
P17764	THIL_RAT	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Rattus norveg	45009.00	9.60	102	74,7	14,4	5,19	0,000748258
P29147	BDH_RAT	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattu	38576.00	9.70	54	193,5	74,1	2,61	0,018450508
Q62952	DPYL3_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 3 OS=Rattus norvegicus G	62327.00	6.00	158	159,4	37,2	4,28	0,002037894
P31977	EZRI_RAT	Ezrin OS=Rattus norvegicus GN=Ezr PE=1 SV=3	69462.00	5.80	68	15,7	0,85	18,47	0
P47819	GFAP_RAT	Glial fibrillary acidic protein OS=Rattus norvegicus GN=Gfap	49984.00	5.20	120	329,1	0,92	357,72	0
P04906	GSTP1_RAT	Glutathione S-transferase P OS=Rattus norvegicus GN=Gstp1 PE	23652.00	7.70	53	111,6	30,8	3,62	0,004576463
P04636	MDHM_RAT	Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=	36117.00	9.80	166	1415,8	274,2	5,16	0,000767539
P25113	PGAM1_RAT	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgam1 PE=1	28928.00	6.80	95	785,5	287	2,74	0,015333998
P60892	PRPS1_RAT	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1 OS=Rattus norvegicus GN	35325.00	6.60	57	160,5	28	5,73	0,000428519
Q9JMM9	SEPT5_RAT	Septin-5 OS=Rattus norvegicus GN=Sept5 PE=1 SV=2	43281.00	6.40	53	140,2	58,2	2,41	0,025061279
P48721	GRP75_RAT	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hsp	74097.00	5.90	90	229,7	0,71	323,52	0
P85108	TBB2A_RAT	Tubulin beta-2A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb2a PE=1 SV	50274	4.64	156	1663,4	683,5	2,43	0,024128157
Q3KRE8	TBB2B_RAT	Tubulin beta-2B chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb2b PE=1 SV	50377.00	4.60	168	1663,4	683,5	2,43	0,024128157
Q6P9T8	TBB2C_RAT	Tubulin beta-2C chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb2c PE=1 SV	50225	4.65	94	1663,4	683,5	2,43	0,024128157
Q4QRB4	TBB3_RAT	Tubulin beta-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb3 PE=1 SV=1	50842	4.68	96	1663,4	683,5	2,43	0,024128157
P69897	TBB5_RAT	Tubulin beta-5 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb5 PE=1 SV=1	50095	4.64	107	1663,4	683,5	2,43	0,024128157



**Πίνακας 8.8:** Στο δεξιό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού των ζώων μαρτύρων υπερεκφράζονται 13 πρωτεΐνες σε σχέση με αυτό των ματαιωμένων ζώων.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
P62260	1433E_RAT	14-3-3 protein epsilon OS=Rattus norvegicus GN=Ywhae PE=1 SV	29326.00	4.50	113	842,4	414,7	2,03	0,045652321
P47942	DPYL2_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Rattus norvegicus G	62638.00	5.90	133	132,2	57,5	2,30	0,029719536
P10860	DHE3_RAT	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus	61719.00	8.80	140	170,3	0,49	347,55	0
P04797	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus	36090.00	9.00	72	290,9	52,8	5,51	0,00053612
Q05982	NDKA_RAT	Nucleoside diphosphate kinase A OS=Rattus norvegicus GN=Nme1	17296.00	5.90	57	188,6	19,5	9,67	1.56858869424514e-05
P25113	PGAM1_RAT	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgam1 PE=1	28928.00	6.80	71	59,5	0,94	63,30	0
Q5X173	GDIR1_RAT	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Rattus norvegicus GN=Arh	23450.00	5.00	50	110,1	0,38	289,74	0
P02770	ALBU_RAT	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2	70682.00	6.10	118	100	30,2	3,31	0,006880551
P68370	TBA1A_RAT	Tubulin alpha-1A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba1a PE=1 S	50788.00	4.80	89	152,8	0,67	228,06	0
Q6P9V9	TBA1B_RAT	Tubulin alpha-1B chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba1b PE=1 S	50804	4.81	73	152,8	0,67	228,06	0
Q6AYZ1	TBA1C_RAT	Tubulin alpha-1C chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba1c PE=1 S	50590	4.83	73	152,8	0,67	228,06	0
Q68FR8	TBA3_RAT	Tubulin alpha-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba3a PE=2 SV	50612	4.84	59	152,8	0,67	228,06	0
Q5XIF6	TBA4A_RAT	Tubulin alpha-4A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba4a PE=2 S	50634	4.79	73	152,8	0,67	228,06	0

**Πίνακας 8.9:** Στο δεξιό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού των ματαιωμένων ζώων υπερεκφράζονται 8 πρωτεΐνες σε σχέση με αυτό των ζώων μαρτύρων.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
P63269	ACTH_RAT	Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Rattus norvegicus GN=A	42249	5.20	61	952,6	51,9	18,35	1.11385267453912e-07
P13668	STMN1_RAT	Stathmin OS=Rattus norvegicus GN=Stmn1 PE=1 SV=2	17278.00	5.70	72	1352,5	680,5	1,99	0,049068154
P85108	TBB2A_RAT	Tubulin beta-2A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb2a PE=1 SV	50274.00	4.60	182	1893,8	0,34	5570,00	0
Q3KRE8	TBB2B_RAT	Tubulin beta-2B chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb2b PE=1 SV	50377	4.64	169	1893,8	0,34	5570,00	0
Q6P9T8	TBB2C_RAT	Tubulin beta-2C chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb2c PE=1 SV	50225	4.65	128	1893,8	0,34	5570,00	0
Q4QRB4	TBB3_RAT	Tubulin beta-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb3 PE=1 SV=1	50842	4.68	103	1893,8	0,34	5570,00	0
P69897	TBB5_RAT	Tubulin beta-5 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb5 PE=1 SV=1	50095	4.64	155	1893,8	0,34	5570,00	0
P31000	VIME_RAT	Vimentin OS=Rattus norvegicus GN=Vim PE=1 SV=2	53757.00	4.90	122	447,6	216,8	2,06	0,043238119

**Πίνακας 8.10:** Στο δεξιό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού των επιβραβευμένων ζώων υπερεκφράζονται 6 πρωτεΐνες σε σχέση με αυτό των ματαιωμένων ζώων.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
P62260	1433E_RAT	14-3-3 protein epsilon OS=Rattus norvegicus GN=Ywhae PE=1 SV	29326.00	4.50	132	1680,9	414,7	4,05	0,002683848
P29147	BDH_RAT	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial OS=Rattus	38576.00	9.70	54	193,5	63,4	3,05	0,009793383
Q62952	DPYL3_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 3 OS=Rattus norvegicus G	62327.00	6.00	158	159,4	0,89	179,10	0
P82995	HS90A_RAT	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Rattus norvegicus GN=Hsp9	85161.00	4.80	65	1438,1	306,8	4,69	0,001286581
P34058	HS90B_RAT	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90	83571	4.82	61	1438,1	306,8	4,69	0,001286581
P25113	PGAM1_RAT	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgam1 PE=1	28928.00	6.80	95	785,5	308,2	2,55	0,0202635

**Πίνακας 8.11:** Στο δεξιό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού των ματαιωμένων ζώων υπερεκφράζονται 10 πρωτεΐνες σε σχέση με αυτό των επιβραβευμένων ζώων.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
P35213	1433B_RAT	14-3-3 protein beta/alpha OS=Rattus norvegicus GN=Ywhab PE=1	28151	4.66	51	3631	716,7	5,07	0,000850931
P61983	1433G_RAT	14-3-3 protein gamma OS=Rattus norvegicus GN=Ywhag PE=1 SV=2	28456.00	4.70	113	3631	716,7	5,07	0,000850931
P68035	ACTC_RAT	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actc1	42334	5.11	71	952,6	209,7	4,54	0,001514089
P68136	ACTS_RAT	Actin, alpha skeletal muscle OS=Rattus norvegicus GN=Acta1 P	42366	5.11	71	952,6	209,7	4,54	0,001514089
P62738	ACTA_RAT	Actin, aortic smooth muscle OS=Rattus norvegicus GN=Acta2 PE	42381	5.12	66	4821,7	1454	3,32	0,006835636
P60711	ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1	42052.00	5.20	136	952,6	209,7	4,54	0,001514089
P63259	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2 OS=Rattus norvegicus GN=Actg1 PE=1 SV=1	42108	5.20	136	952,6	209,7	4,54	0,001514089
P63269	ACTH_RAT	Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Rattus norvegicus GN=A	42249	5.20	61	952,6	209,7	4,54	0,001514089
P51635	AK1A1_RAT	Alcohol dehydrogenase [NADP+] OS=Rattus norvegicus GN=Akr1a1	36711.00	7.00	89	123	48,5	2,54	0,020650999
B2GV06	SCOT1_RAT	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondr	56624.00	9.50	74	281,4	86,2	3,26	0,007325616

**Πίνακας 8.12:** Στο αριστερό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού των επιβραβευμένων ζώων υπερεκφράζονται 36 πρωτεΐνες σε σχέση με αυτό των ζώων μαρτύρων.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
P62260	1433E_RAT	14-3-3 protein epsilon OS=Rattus norvegicus GN=Ywhae PE=1 SV	29326.00	4.50	80	894,8	123,8	7,23	0,000107228
P63039	CH60_RAT	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus	61088.00	5.80	133	423,4	0,16	2646,25	0
Q5X122	THIC_RAT	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic OS=Rattus norvegicus	41538.00	7.10	78	186,5	0,53	351,89	0
P17764	THIL_RAT	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Rattus norveg	45009.00	9.60	95	169,4	0,32	529,38	0
Q9ER34	ACON_RAT	Aconitate hydratase, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=A	86121.00	8.70	198	402,9	0,28	1438,93	0
P68035	ACTC_RAT	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actc1	42334	5.11	63	333,3	0,49	680,20	0
P68136	ACTS_RAT	Actin, alpha skeletal muscle OS=Rattus norvegicus GN=Acta1 P	42366	5.11	75	333,3	0,49	680,20	0
P60711	ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1	42052.00	5.20	111	333,3	0,49	680,20	0
P63259	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2 OS=Rattus norvegicus GN=Actg1 PE=1 SV=1	42108	5.20	111	333,3	0,49	680,20	0
P63269	ACTH_RAT	Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Rattus norvegicus GN=A	42249	5.20	54	333,3	0,49	680,20	0
P23565	AINX_RAT	Alpha-internexin OS=Rattus norvegicus GN=Ina PE=1 SV=2	56253.00	5.10	113	233	25,8	9,03	2.51139224747288e-05
P15999	ATPA_RAT	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Rattus norvegicus	59831.00	9.70	133	118,9	3,9	30,49	1.08889952610269e-09
P07335	KCRB_RAT	Creatine kinase B-type OS=Rattus norvegicus GN=Ckb PE=1 SV=2	42983.00	5.30	158	427,7	6,6	64,80	3.49165141244612e-13
Q68FY0	QCR1_RAT	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial OS=Rattus n	53500.00	5.50	101	125,1	0,63	198,57	0
Q6AYH5	DCTN2_RAT	Dynactin subunit 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dctn2 PE=1 SV=1	44235.00	5.00	66	74,2	0,71	104,51	0
P05065	ALDOA_RAT	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Ald	39783.00	9.20	103	856,9	130,8	6,55	0,00019594
P07323	ENOG_RAT	Gamma-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno2 PE=1 SV=2	47510.00	4.90	164	269,8	123	2,19	0,035121318
P47819	GFAP_RAT	Glial fibrillary acidic protein OS=Rattus norvegicus GN=Gfap	49984.00	5.20	77	89,9	0,17	528,82	0
P10860	DHE3_RAT	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Rattus norvegicus	61719	8.84	90	181,4	0,39	465,13	0
P63018	HSP7C_RAT	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hs	71055.00	5.20	82	365,7	0,61	599,51	0
Q66HA8	HS105_RAT	Heat shock protein 105 kDa OS=Rattus norvegicus GN=Hsph1 PE=	97327.00	5.30	55	27,2	0,29	93,79	0
Q3SWU3	HNRDL_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like OS=Rattus nor	35500.00	9.60	66	140,4	0,19	738,95	0
P61980	HNRPK_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Rattus norvegicus	51230.00	5.30	68	149,5	48,3	3,10	0,009225178
A7VJC2	ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Rattus nor	37512.00	9.30	96	191,6	33,2	5,77	0,000412272
P04642	LDHA_RAT	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Rattus norvegicus GN=Ldha	36712.00	9.30	68	147,6	0,4	369,00	0
O88989	MDHC_RAT	Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Rattus norvegicus GN=Md	36631.00	6.20	53	579,8	112,1	5,17	0,000760454
Q3KR86	IMMT_RAT	Mitochondrial inner membrane protein (Fragment) OS=Rattus no	67477.00	5.50	58	27,8	0,52	53,46	0
P25113	PGAM1_RAT	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Pgam1 PE=1	28928.00	6.80	93	263,3	0,26	1012,69	0
Q63081	PDIA6_RAT	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Rattus norvegicus GN=Pdia6	48542.00	4.90	60	67,6	0,75	90,13	0
O88767	PARK7_RAT	Protein DJ-1 OS=Rattus norvegicus GN=Park7 PE=1 SV=1	20190.00	6.40	82	127	0,7	181,43	0
P11980	KPYM_RAT	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 OS=Rattus norvegicus GN=Pkm2	58294.00	6.70	122	139,9	5,9	23,71	1.16589013998691e-08
P61589	RHOA_RAT	Transforming protein RhoA OS=Rattus norvegicus GN=Rhoa PE=1	22110.00	5.80	63	205	4,6	44,57	2.25892637928382e-11
P46462	TERA_RAT	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Rattus norvegicus	89977.00	5.00	191	207,4	0,53	391,32	0
P48500	TPIS_RAT	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1	27345.00	7.70	159	315,3	5,7	55,32	2.12330153459561e-12
Q9Z2L0	VDAC1_RAT	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Rattus	30851.00	9.20	123	454	60,9	7,45	8.82759070006678e-05
P81155	VDAC2_RAT	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 OS=Rattus	32353.00	8.70	76	197,6	0,3	658,67	0

**Πίνακας 8.13:** Στο αριστερό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού των ζώων μαρτύρων υπερεκφράζονται 5 πρωτεΐνες σε σχέση με αυτό των ματαιωμένων ζώων.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
P68370	TBA1A_RAT	Tubulin alpha-1A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba1a PE=1 S	50788	4.81	131	240	62,6	3,83	0,003510606
Q6P9V9	TBA1B_RAT	Tubulin alpha-1B chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba1b PE=1 S	50804.00	4.80	131	240	62,6	3,83	0,003510606
Q6AYZ1	TBA1C_RAT	Tubulin alpha-1C chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba1c PE=1 S	50590	4.83	119	240	62,6	3,83	0,003510606
Q68FR8	TBA3_RAT	Tubulin alpha-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba3a PE=2 SV	50612	4.84	120	240	62,6	3,83	0,003510606
Q5XIF6	TBA4A_RAT	Tubulin alpha-4A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tuba4a PE=2 S	50634	4.79	108	240	62,6	3,83	0,003510606

**Πίνακας 8.14:** Στο αριστερό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού των ματαιωμένων ζώων υπερεκφράζονται 47 πρωτεΐνες σε σχέση με αυτό των ζώων μαρτύρων.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
P63102	1433Z_RAT	14-3-3 protein zeta/delta OS=Rattus norvegicus	27925	4.57	51	367	4,5	81,56	2.27595720048157e-14
Q5XJ22	THIC_RAT	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic OS=Rattus norvegicus	41538	7.06	51	432,8	0,31	1396,13	0
P68035	ACTC_RAT	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actc1	42334	5.11	66	1032	0,17	6070,59	0
P68136	ACTS_RAT	Actin, alpha skeletal muscle OS=Rattus norvegicus GN=Acta1 P	42366	5.11	66	1032	0,17	6070,59	0
P60711	ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actb PE=1 SV=1	42052.00	5.20	122	1032	0,17	6070,59	0
P63259	ACTG_RAT	Actin, cytoplasmic 2 OS=Rattus norvegicus GN=Actg1 PE=1 SV=1	42108	5.20	122	1032	0,17	6070,59	0
P63269	ACTH_RAT	Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Rattus norvegicus GN=A	42249	5.20	55	1032	0,17	6070,59	0
P39069	KAD1_RAT	Adenylate kinase isoenzyme 1 OS=Rattus norvegicus GN=Ak1 PE=	21684.00	8.80	100	332,5	0,99	335,86	0
P51635	AK1A1_RAT	Alcohol dehydrogenase [NADP+] OS=Rattus norvegicus GN=Akr1a1	36711.00	7.00	82	204	10,6	19,25	7.42498967865046e-08
P04764	ENOA_RAT	Alpha-enolase OS=Rattus norvegicus GN=Eno1 PE=1 SV=4	47440.00	6.20	176	302,5	0,2	1512,50	0
P18418	CALR_RAT	Calreticulin OS=Rattus norvegicus GN=Calr PE=1 SV=1	48137.00	4.20	84	397,2	0,35	1134,86	0
Q5M7A7	CNRP1_RAT	CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1 OS=Rattus nor	18818.00	8.90	60	187,5	0,48	390,63	0
P25809	KCRU_RAT	Creatine kinase U-type, mitochondrial OS=Rattus norvegicus G	47398.00	9.50	105	284,7	0,13	2190,00	0
P47942	DPYL2_RAT	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Rattus norvegicus G	62638.00	5.90	158	443,3	0,37	1198,11	0
Q6AYH5	DCTN2_RAT	Dynactin subunit 2 OS=Rattus norvegicus GN=Dctn2 PE=1 SV=1	44235.00	5.00	117	208,9	0,71	294,23	0
P52555	ERP29_RAT	Endoplasmic reticulum resident protein 29 OS=Rattus norvegicus	28614.00	6.30	68	367	4,5	81,56	2.27595720048157e-14
P05065	ALDOA_RAT	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Rattus norvegicus GN=Ald	39783.00	9.20	81	33	13,6	2,43	0,024395193
P09117	ALDOC_RAT	Fructose-bisphosphate aldolase C OS=Rattus norvegicus GN=Ald	39658.00	6.80	71	230,7	0,95	242,84	0
P09606	GLNA_RAT	Glutamine synthetase OS=Rattus norvegicus GN=Glul PE=1 SV=3	42982.00	6.70	94	218,4	0,67	325,97	0
P04797	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Rattus norvegicus	36090.00	9.00	53	545,8	2,1	259,90	0
P62994	GRB2_RAT	Growth factor receptor-bound protein 2 OS=Rattus norvegicus	25304	5.87	54	175,5	0,59	297,46	0
P82995	HS90A_RAT	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Rattus norvegicus GN=Hsp9	85161	4.78	67	83,7	0,44	190,23	0
P34058	HS90B_RAT	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Rattus norvegicus GN=Hsp90	83571.00	4.80	67	83,7	0,79	105,95	0
Q8VHV7	HNRH1_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Rattus norvegicus	49442.00	5.70	119	150,4	58,2	2,58	0,019212726
Q6AY09	HNRH2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 OS=Rattus norvegicus	49547.00	5.90	61	163	5,6	29,11	1.70537872712373e-09
P61980	HNRPK_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Rattus norvegicus	51230.00	5.30	74	160,3	65,1	2,46	0,023092073
A7VJC2	ROA2_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Rattus nor	37512.00	9.30	134	426,2	33,2	12,84	1.99124423494457e-06
Q99NA5	IDH3A_RAT	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	40044.00	6.50	89	218,5	106,7	2,05	0,044439047
P04642	LDHA_RAT	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Rattus norvegicus GN=Ldha	36712.00	9.30	130	331,1	0,31	1068,06	0
P42123	LDHB_RAT	L-lactate dehydrogenase B chain OS=Rattus norvegicus GN=Ldhb	36874.00	5.60	104	245,2	88,7	2,76	0,014733775
O88989	MDHC_RAT	Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Rattus norvegicus GN=Md	36631.00	6.20	59	503,6	112,1	4,49	0,001603231
O08557	DDAH1_RAT	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 OS=Rattus	31805.00	5.70	79	116,1	0,24	483,75	0
Q05982	NDKA_RAT	Nucleoside diphosphate kinase A OS=Rattus norvegicus GN=Nme1	17296.00	5.90	65	171,1	69,2	2,47	0,022736762
Q63716	PRDX1_RAT	Peroxiredoxin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Prdx1 PE=1 SV=1	22323.00	9.20	83	462,9	3,3	140,27	0
O35244	PRDX6_RAT	Peroxiredoxin-6 OS=Rattus norvegicus GN=Prdx6 PE=1 SV=3	24860.00	5.60	71	175,5	0,76	230,92	0
P18421	PSB1_RAT	Proteasome subunit beta type-1 OS=Rattus norvegicus GN=Psb1	26690.00	7.70	70	77,7	0,61	127,38	0
P50399	GDIB_RAT	Rab GDP dissociation inhibitor beta OS=Rattus norvegicus GN=	51018.00	5.90	132	130	0,12	1083,33	0
P09527	RAB7A_RAT	Ras-related protein Rab-7a OS=Rattus norvegicus GN=Rab7a PE=	23774.00	7.20	89	101,9	0,38	268,16	0
P02770	ALBU_RAT	Serum albumin OS=Rattus norvegicus GN=Alb PE=1 SV=2	70682.00	6.10	172	1186,9	139,1	8,53	3.67661622457938e-05
O35814	STIP1_RAT	Stress-induced-phosphoprotein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Stip	63158.00	6.40	83	501,9	21,6	23,24	1.40205600462906e-08
P07632	SODC_RAT	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Rattus norvegicus GN=Sod1 PE	16073.00	5.90	53	428	98	4,37	0,001851327
Q5XIM9	TCPB_RAT	T-complex protein 1 subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Cct	57764.00	6.00	74	66,4	0,64	103,75	0
P24329	THTR_RAT	Thiosulfate sulfurtransferase OS=Rattus norvegicus GN=Tst PE	33614.00	8.80	65	90,1	0,75	120,13	0
P37805	TAGL3_RAT	Transgelin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Tagln3 PE=1 SV=2	22657.00	7.70	124	262,5	0,49	535,71	0
P48500	TPIS_RAT	Triosephosphate isomerase OS=Rattus norvegicus GN=Tpi1 PE=1	27345.00	7.70	121	245,9	0,86	285,93	0
Q00981	UCHL1_RAT	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 OS=Rattus n	25165.00	5.00	109	1789,4	208,6	8,58	3.54897976714286e-05
P81155	VDAC2_RAT	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 OS=Rattus	32353.00	8.70	62	514,7	0,3	1715,67	0

**Πίνακας 8.15:** Στο αριστερό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού των επιβραβευμένων ζώων υπερεκφράζονται 8 πρωτεΐνες σε σχέση με αυτό των ματαιωμένων ζώων.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
P35213	1433B_RAT	14-3-3 protein beta/alpha OS=Rattus norvegicus GN=Ywhab PE=1	28151	4.66	58	1491	314,9	4,73	0,001220486
P62260	1433E_RAT	14-3-3 protein epsilon OS=Rattus norvegicus GN=Ywhae PE=1 SV	29326.00	4.50	80	894,8	175,3	5,10	0,000817061
P61983	1433G_RAT	14-3-3 protein gamma OS=Rattus norvegicus GN=Ywhag PE=1 SV=2	28456.00	4.70	102	1491	314,9	4,73	0,001220486
P63102	1433Z_RAT	14-3-3 protein zeta/delta OS=Rattus norvegicus GN=Ywhaz PE=1	27925.00	4.60	85	2080,1	146	14,25	8.87231590751547e-07
P59215	GNAO_RAT	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha OS=Rat	40613.00	5.20	58	257,5	127,6	2,02	0,046661805
P63018	HSP7C_RAT	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hs	71055.00	5.20	69	684,2	65,6	10,43	9.22194359942452e-06
P19527	NFL_RAT	Neurofilament light polypeptide OS=Rattus norvegicus GN=Nefl	61355.00	4.50	71	114	0,29	393,10	0
Q6AYM2	TEKT2_RAT	Tektin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Tekt2 PE=2 SV=1	50721	5.67	56	684,2	65,6	10,43	9.22194359942452e-06

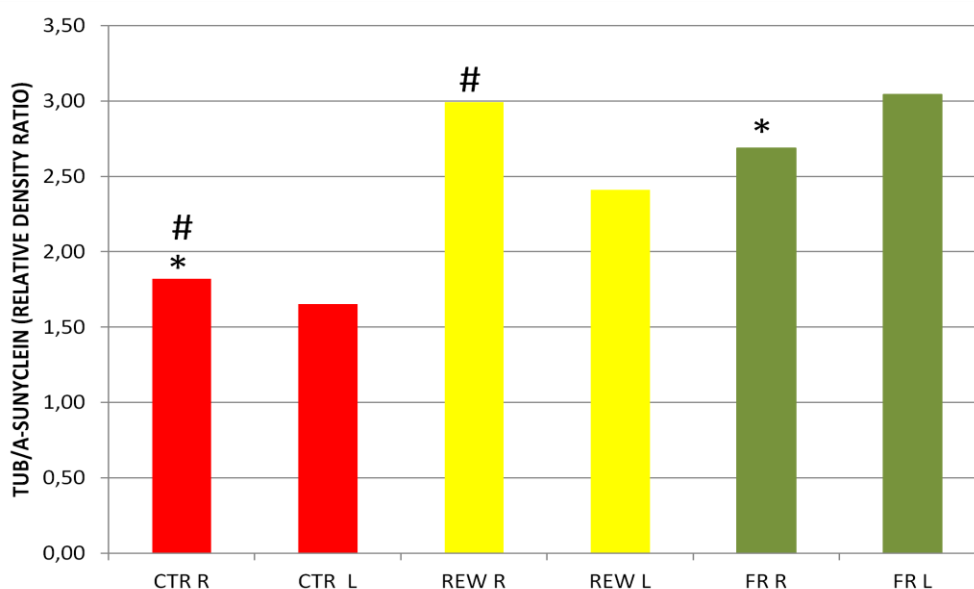
**Πίνακας 8.16:** Στο αριστερό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού των ματαιωμένων ζώων υπερεκφράζονται 14 πρωτεΐνες σε σχέση με αυτό των επιβραβευμένων ζώων.

Accession number	Protein ID from Swiss prot	Protein name	Protein MW	pI-Value	Score	Mean spot volume (CR)	Mean spot volume (CL)	Expression level	P-value
Q5X22	THIC_RAT	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic OS=Rattus norvegicus	41538	7.06	51	432,8	215,7	2,01	0,047555712
P68035	ACTC_RAT	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Rattus norvegicus GN=Actc1	42334	5.11	63	1032	333,3	3,10	0,009211553
P68136	ACTS_RAT	Actin, alpha skeletal muscle OS=Rattus norvegicus GN=Acta1 P	42366	5.11	75	1032	333,3	3,10	0,009211553
P63269	ACTH_RAT	Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Rattus norvegicus GN=A	42249	5.20	54	1032	333,3	3,10	0,009211553
Q5M7A7	CNRP1_RAT	CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1 OS=Rattus nor	18818.00	8.90	60	187,5	0,8	234,38	0
P09117	ALDOC_RAT	Fructose-bisphosphate aldolase C OS=Rattus norvegicus GN=Ald	39658.00	6.80	55	432,8	215,7	2,01	0,047555712
P47819	GFAP_RAT	Glial fibrillary acidic protein OS=Rattus norvegicus GN=Gfap	49984.00	5.20	77	218,1	89,9	2,43	0,024411726
P09606	GLNA_RAT	Glutamine synthetase OS=Rattus norvegicus GN=Glul PE=1 SV=3	42982.00	6.70	94	218,4	0,17	1284,71	0
Q99NA5	IDH3A_RAT	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	40044.00	6.50	89	218,5	51,5	4,24	0,002141497
P04642	LDHA_RAT	L-lactate dehydrogenase A chain OS=Rattus norvegicus GN=Ldha	36712.00	9.30	130	331,1	147,6	2,24	0,032453799
O08557	DDAH1_RAT	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 OS=Rattu	31805.00	5.70	79	116,1	0,22	527,73	0
Q497B0	NIT2_RAT	Omega-amidase NIT2 OS=Rattus norvegicus GN=Nit2 PE=1 SV=1	31024.00	7.70	61	48,1	23,2	2,07	0,042629531
Q63716	PRDX1_RAT	Peroxisome oxidoreductin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Prdx1 PE=1 SV=1	22323.00	9.20	83	462,9	158,4	2,92	0,011747
P18421	PSB1_RAT	Proteasome subunit beta type-1 OS=Rattus norvegicus GN=Psbm1	26690.00	7.70	70	77,7	14,7	5,29	0,000675073

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι διαφορές ανάμεσα στις ομάδες, που βρέθηκαν στη πρωτεϊνική έκφραση μέσω των τεχνικών της πρωτεομικής καταφύγαμε και στην ανοσοαποτύπωση (Western Blot). Επιλέχθηκαν ορισμένες πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση ήταν πιο έντονη στα πηκτώματα της πρωτεομικής, και οι διαφορές στην έκφρασή τους είτε σε σχέση με τη πλαγίωση είτε μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών ομάδων ήταν πιο σαφείς. Ακολούθως, παρουσιάζονται κάποια γραφήματα με τα στατιστικά αποτελέσματα που προέκυψαν από αναλύσεις Western blot που έγιναν για τις ακόλουθες πρωτεΐνες: τουμπουλίνη (Tubulin), ακτίνη (Actin),

δεϋδρογενάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεϋδης (GAPDH) και ινώδης όξινη πρωτεΐνη της γλοίας (GFAP). Ως πρωτεΐνη αναφοράς στα Western χρησιμοποιήθηκε η  $\alpha$ -synuclein αφού με βάση την πρωτεομική ανάλυση εντοπίστηκαν ίδια επίπεδα έκφρασης της σε όλες τις ομάδες και στις δύο πλευρές του προμετωπιαίου φλοιού που αναλύθηκαν. Να σημειωθεί ότι στα γραφήματα που ακολουθούν ισχύουν οι ακόλουθοι συμβολισμοί:

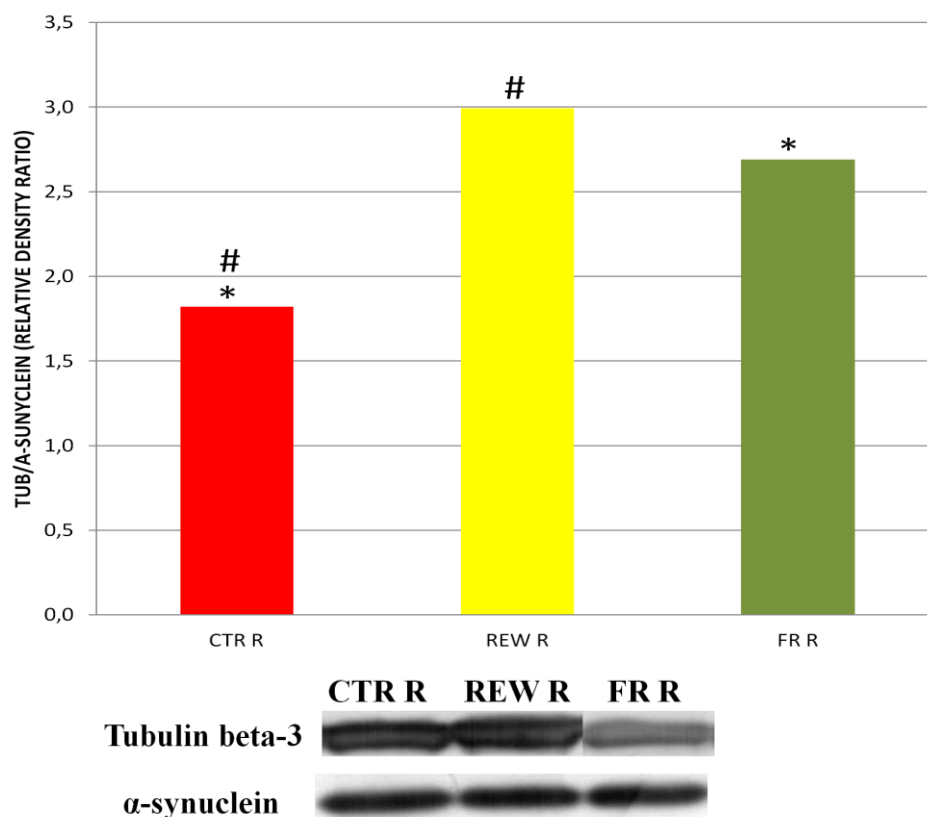
- (\*) που συμβολίζει τη διαφορά ανάμεσα στα ζώα μάρτυρες (CTR) και στα ματαιωμένα ζώα (FR)
- (#) που συμβολίζει τη διαφορά ανάμεσα στα ζώα μάρτυρες (CTR) και στα επιβραβευμένα ζώα (REW)
- (+) που συμβολίζει τη διαφορά ανάμεσα στα ματαιωμένα ζώα (FR) και στα επιβραβευμένα ζώα (REW)
- (♦) που συμβολίζει τη διαφορά ανάμεσα στο δεξί (R) και το αριστερό (L) ημισφαίριο του εγκεφάλου



**Γράφημα 8.1:** Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο λόγο της αμαύρωσης της ζώνης που αντιστοιχεί στην Tubulin προς αυτήν της  $\alpha$ -synuclein. Οι κόκκινες ράβδοι αντιστοιχούν στα ζώα μάρτυρες (CTR), οι κίτρινες στα επιβραβευμένα ζώα (REW) και οι πράσινες στα ματαιωμένα (FR). Όπου R δηλώνεται το δεξί ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού και L το αριστερό.



Τα γραφήματα επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα που βρέθηκαν από τις αναλύσεις της πρωτεομικής. Συγκεκριμένα η Tubulin beta-3, για την οποία έγιναν και τα Western, είναι υπερεκφρασμένη στο δεξιό ημισφαίριο τόσο των επιβραβευμένων ζώων όσο και των ματαιωμένων ζώων σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες. (Γραφήματα 8.1 και 8.2)

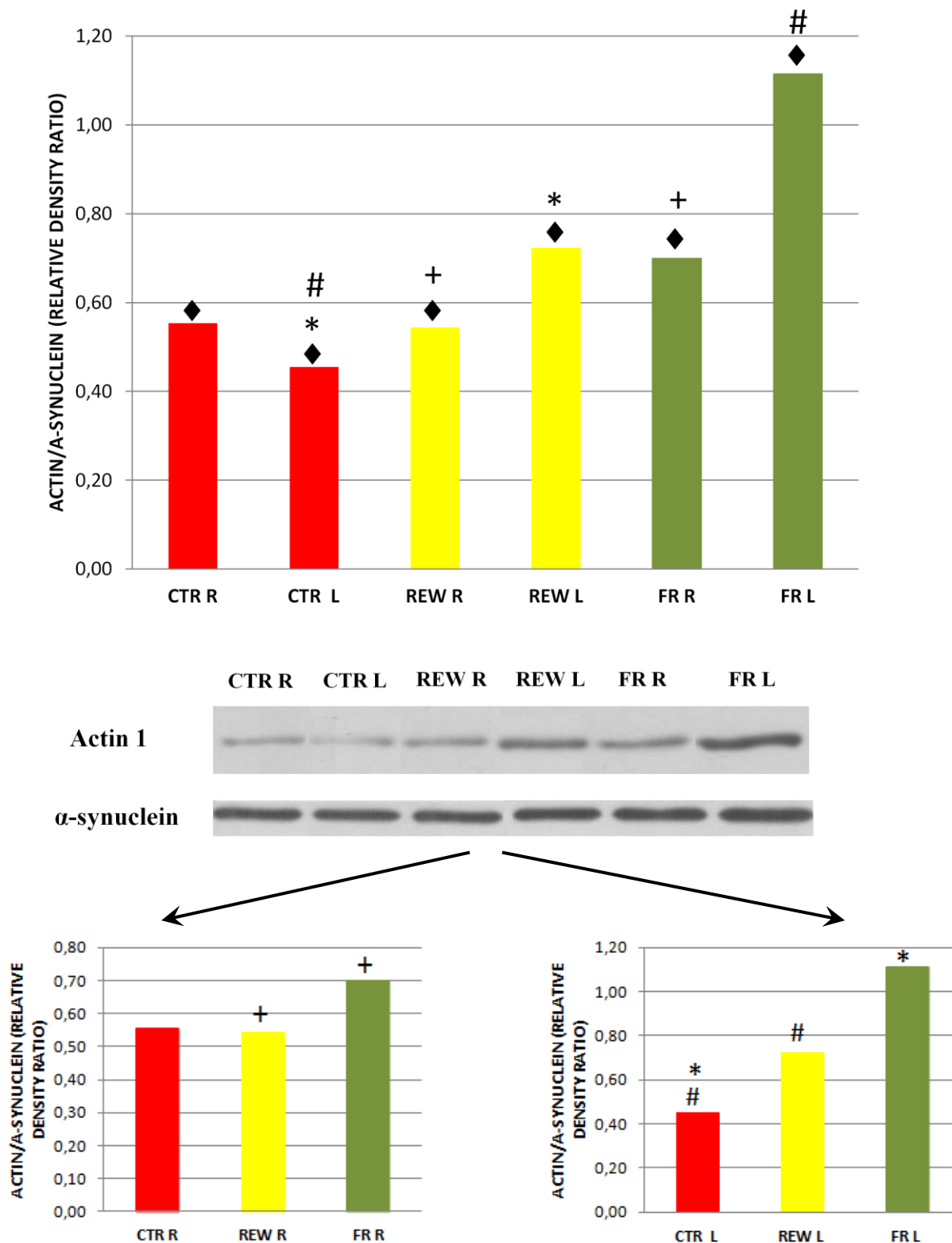


**Γράφημα 8.2:** Οι ράβδοι αντιστοιχούν στη σχετική ποσοτικοποίηση της Tubulin με  $\alpha$ -synuclein. Οι κόκκινες ράβδοι αντιστοιχούν στα ζώα μάρτυρες (CTR), οι κίτρινες στα επιβραβευμένα ζώα (REW) και οι πράσινες στα ματαιωμένα (FR). Όπου R δηλώνεται το δεξιό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού. Κάτω από το γράφημα απεικονίζεται και η ανοσοαποτύπωση (Western blot).

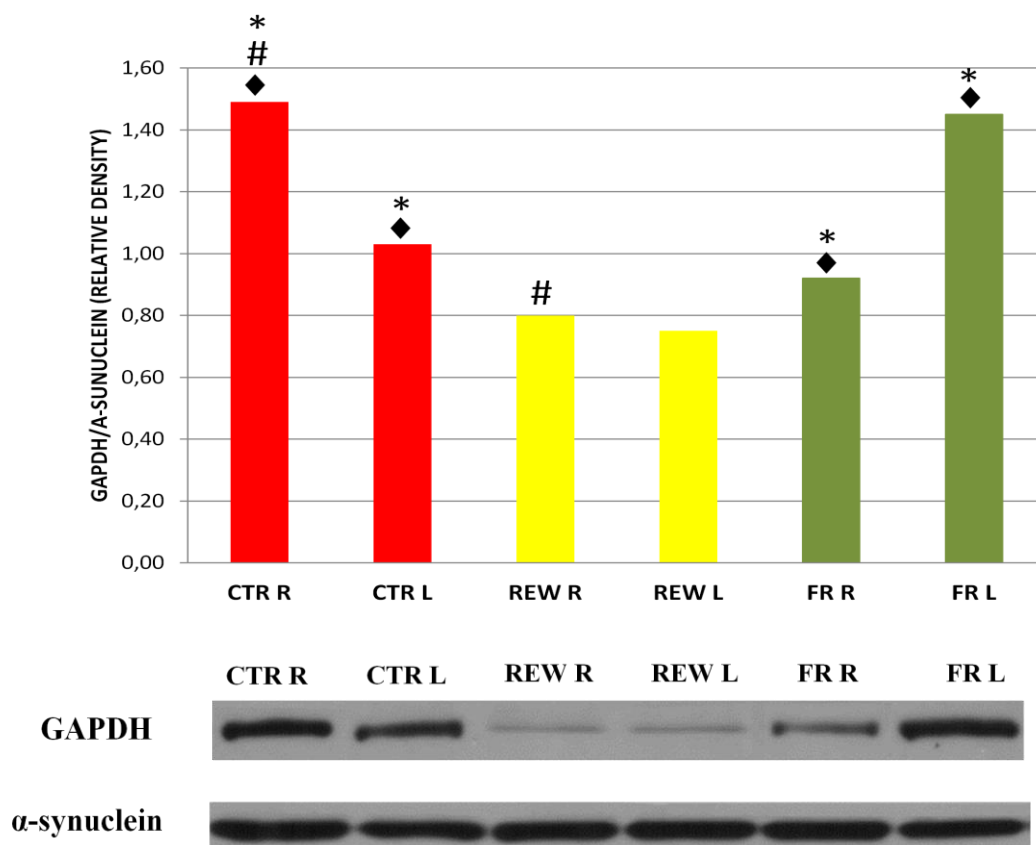
Όσον αφορά την Actin 1 είναι υπερεκφρασμένη στο δεξιό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού σε σχέση με το αριστερό στα ζώα μάρτυρες εν αντιθέσει με τα επιβραβευμένα και τα ματαιωμένα για τα οποία ισχύει το αντίστροφο, δηλαδή είναι υπερεκφρασμένη στο αριστερό ημισφαίριο του προμετωπιαίου. Επιπλέον, η Actin υπερεκφράζεται στο αριστερό ημισφαίριο τόσο των επιβραβευμένων ζώων όσο και των ματαιωμένων ζώων σε σχέση με εκείνο των ζώων μαρτύρων. Τέλος, η έκφραση της Actin1 είναι χαμηλότερη στο δεξιό ημισφαίριο των επιβραβευμένων ζώων σε



σχέση με την έκφρασή της στο δεξί ημισφαίριο των ματαιωμένων ζώων. (Γράφημα 8.3)

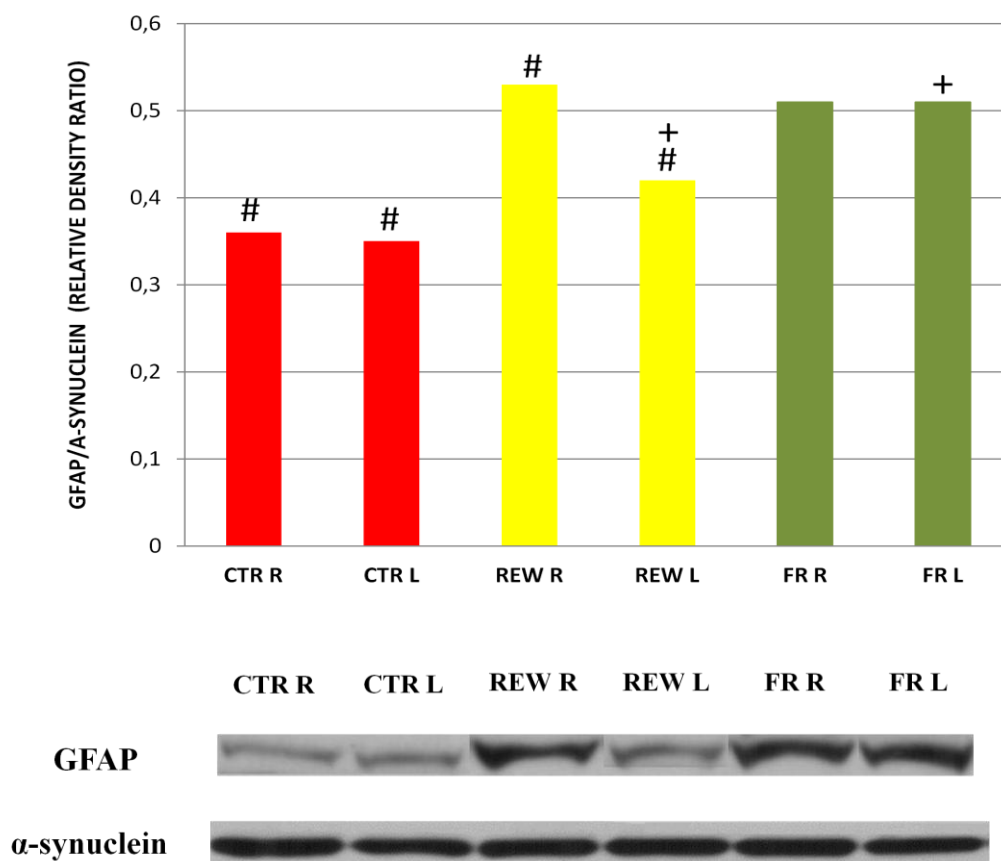


**Γράφημα 8.3:** Οι ράβδοι αντιστοιχούν στη σχετική ποσοτικοποίηση της Actin με α-synuclein. Οι κόκκινες ράβδοι αντιστοιχούν στα ζώα μάρτυρες (CTR), οι κίτρινες στα επιβραβευμένα ζώα (REW) και οι πράσινες στα ματαιωμένα (FR). Όπου R δηλώνεται το δεξί ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού και L το αριστερό. Κάτω από το γράφημα απεικονίζεται και η ανοσοαποτύπωση (Western blot).



**Γράφημα 8.4:** Οι ράβδοι αντιστοιχούν στη σχετική ποσοτικοποίηση της GAPDH με  $\alpha$ -synuclein. Οι κόκκινες ράβδοι αντιστοιχούν στα ζώα μάρτυρες (CTR), οι κίτρινες στα επιβραβευμένα ζώα (REW) και οι πράσινες στα ματαιωμένα (FR). Όπου R δηλώνεται το δεξιό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού και L το αριστερό. Κάτω από το γράφημα απεικονίζεται και η ανοσοαποτύπωση (Western blot).

Η GAPDH, δηλαδή η δεϋδρογενάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεϋδης, παρουσιάζεται υπερεκφρασμένη στο δεξιό σε σχέση με το αριστερό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού στα ζώα μάρτυρες εν αντιθέσει με τα ματαιωμένα ζώα όπου παρουσιάζεται υπερεκφρασμένη στο αριστερό ημισφαίριο (Γράφημα 8.4). Η GAPDH είναι υπερεκφρασμένη στο δεξί ημισφαίριο του προμετωπιαίου των μαρτύρων σε σύγκριση με το δεξί ημισφαίριο των επιβραβευμένων και των ματαιωμένων ζώων. Ενώ, είναι υπερεκφρασμένη στο αριστερό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού στα ματαιωμένα ζώα σε σχέση με την αντίστοιχη έκφρασή της στα ζώα μάρτυρες. (Γράφημα 8.4)



**Γράφημα 8.5:** Οι ράβδοι αντιστοιχούν στη σχετική ποσοτικοποίηση της GFAP με  $\alpha$ -synuclein. Οι κόκκινες ράβδοι αντιστοιχούν στα ζώα μάρτυρες (CTR), οι κίτρινες στα επιβραβευμένα ζώα (REW) και οι πράσινες στα ματαιωμένα (FR). Όπου R δηλώνεται το δεξιό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού και L το αριστερό. Κάτω από το γράφημα απεικονίζεται και η ανοσοαποτύπωση (Western blot).

Όσον αφορά τέλος την GFAP, την ινώδη όξινη πρωτεΐνη της γλοίας, υπερεκφράζεται στο δεξιό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού στα επιβραβευμένα ζώα σε σχέση με αυτό των μαρτύρων. Επίσης, παρουσιάζεται υποεκφρασμένη στο αριστερό ημισφαίριο των μαρτύρων σε σχέση με το αριστερό ημισφαίριο των επιβραβευμένων ζώων και στο αριστερό ημισφαίριο των επιβραβευμένων ζώων σε σχέση με το αντίστοιχο ημισφαίριο των ματαιωμένων ζώων. (Γράφημα 8.5)

## 9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια του κρίσιμου σταδίου ανάπτυξης του εγκεφάλου οι στρεσογόνες εμπειρίες μπορούν να προκαλέσουν ποικίλες αλλαγές στον άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης - επινεφριδίων (HPA axis) καθώς και στα επίπεδα νευροδιαβιβαστών και νευροτροφινών.

Σε πολλά εργαστήρια έχει γίνει και γίνεται χρήση του επίμου ως πειραματόζωο για τη μελέτη των πρώιμων εμπειριών και ειδικότερα του στρες στα αρχικά στάδια της ζωής, όπως είναι για παράδειγμα η μητρική αποστέρηση (Maternal Separation), προκειμένου να μελετηθούν τα αποτελέσματα στρεσογόνων εμπειριών στον εγκέφαλο κατά τη νεογνική ηλικία. Αυτό το μοντέλο του επίμου έχει επίσης χρησιμοποιηθεί επιτυχώς και για τη μελέτη της δυσλειτουργίας του άξονα – υποθαλάμου - υπόφυσης [159, 160], που μπορεί να σχετίζεται με την κατανόηση της κατάθλιψης στον άνθρωπο όσον αφορά αλλαγές σε νευροβιολογικά συστήματα. Γενικότερα το πρωτόκολλο της μητρικής αποστέρησης είναι γνωστό ότι έχει μακροχρόνιες συμπεριφορικές, ορμονικές και νευροχημικές επιπτώσεις [87, 161].

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα καινούριο μοντέλο πρώιμων εμπειριών που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο μας. Στο μοντέλο αυτό νεογνά επίμου ηλικίας 10 έως 13 ημερών εκπαιδεύονται σε έναν λαβύρινθο σχήματος Ταυ, στο άκρο του ενός βραχίονα του οποίου βρίσκεται η μητέρα ενώ στο άκρο του άλλου ένα μη-συγγενικό ενήλικο παρθένο θηλυκό. Τα νεογνά της μίας πειραματικής ομάδας λαμβάνουν την ανταμοιβή που προσφέρει η επαφή με τη μητέρα όταν φτάσουν στο άκρο του βραχίονα όπου αυτή βρίσκεται (επιβραβευμένα). Αντίθετα, τα νεογνά της άλλης πειραματικής ομάδας στερούνται την ανταμοιβή αυτή καθώς η θυρίδα που οδηγεί στο κλουβί της μητέρας παραμένει κλειστή (ματαιωμένα).

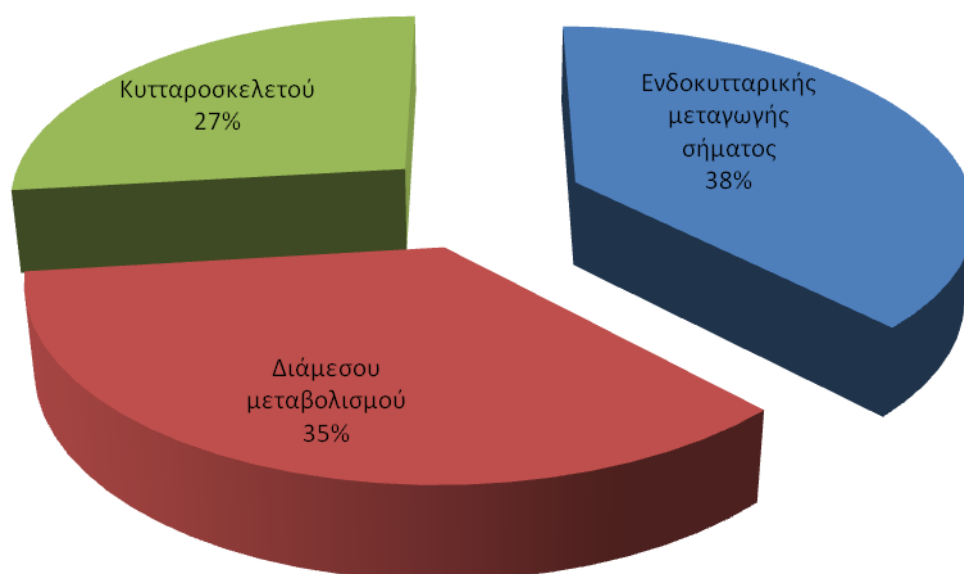
Διερευνήθηκε η επίπτωση των δύο παραπάνω πρώιμων εμπειριών σε σχέση με ζώα μάρτυρες, στο πρωτόμα του προμετωπιαίου φλοιού, μια περιοχή που έχειδειχθεί ότι επηρεάζεται από αυτές τις συγκεκριμένες πρώιμες εμπειρίες [154] και είναι πολύ σημαντική για την μνήμη εργασίας και τη συμπεριφορά, όπως ήδη προαναφέρθηκε στην εισαγωγή της συγκεκριμένης εργασίας. Διερευνήσαμε επίσης, την υπόθεση της πλαγίωσης και μελετήσαμε την έκφραση πρωτεϊνών τόσο στο δεξί όσο και στο αριστερό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού σε κάθε ομάδα χωριστά (μάρτυρες, επιβραβευμένα και ματαιωμένα) χρησιμοποιώντας μια τεχνική υψηλής απόδοσης. Ειδικότερα, η πρωτεομική ανάλυση βασίστηκε στα συνδυασμένα αποτελέσματα της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης

και της φασματομετρίας μάζας, προκειμένου να μελετηθεί η διαφορετική πρωτεϊνική έκφραση στον αριστερό και στο δεξιό προμετωπιαίο φλοιό σε νεογέννητους επίμυες.

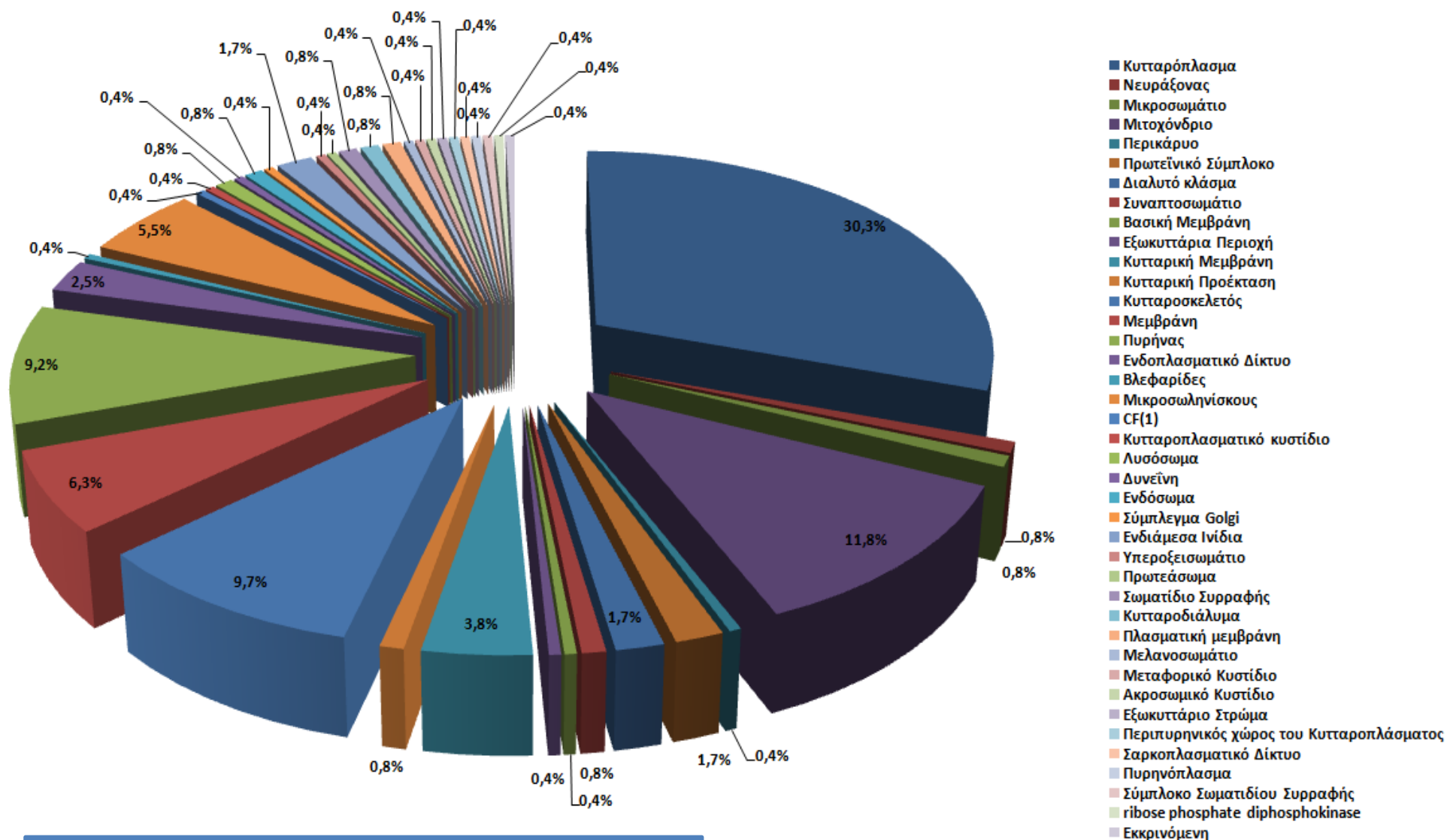
Οι πρώιμες εμπειρίες του πειραματικού μοντέλου που χρησιμοποιήσαμε επηρέασαν στον προμετωπιαίο φλοιό των νεογνών επίμυων την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την παραγωγή ενέργειας και τον διάμεσο μεταβολισμό, την ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος, την κυτταροσκελετική οργάνωση καθώς και την απόπτωση. Το σύνολο των πρωτεϊνών που διέφεραν μεταξύ των ομάδων κατατάχθηκε στις ακόλουθες τρεις κατηγορίες:

- i. Κυτταροσκελετού (π.χ. actins, tubulins, dynactins)
- ii. Διάμεσου μεταβολισμού (π.χ. GAPDH, pyruvate dehydrogenase)
- iii. Ενδοκυτταρικής μεταγωγής σήματος (π.χ. 14-3-3 protein)

Συνολικά, ταυτοποιήθηκαν 117 πρωτεΐνες που επηρεάστηκαν από τις πρώιμες εμπειρίες του μοντέλου. Για τις πρωτεΐνες αυτές βρέθηκαν μέσω της βάσης δεδομένων της Swiss Prot τα κυτταρικά διαμερίσματα στα οποία εντοπίζονται καθώς και οι κυτταρικές λειτουργίες που εκτελούν (βλέπε γραφήματα 9.1 και 9.2). Η πλειονότητα των πρωτεϊνών, συγκεκριμένα 72 από τις 117 ταυτοποιημένες πρωτεΐνες, βρέθηκε να προέρχεται από το κυτταρόπλασμα. Το εύρημά μας αυτό συμφωνεί με τη βιβλιογραφία και ειδικότερα με τη μελέτη των Manus et al. που δημοσιεύτηκε στο περιοδικό Proteomics το 2010.[162]



**Γράφημα 9.1:** Ομαδοποίηση των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών με βάση τη λειτουργία τους στο κύτταρο.



**Γράφημα 9.2:** Κυτταρικός εντοπισμός των αναγνωρισμένων πρωτεϊνών.

Αντίστοιχα ευρήματα όσον αφορά πρωτεΐνες με τις παραπάνω λειτουργίες έχουν βρει οι Piubelli et al. [163] τόσο στον ιππόκαμπο όσο και στον προμετωπιαίο φλοιό του ενήλικου επίμου. Επίσης οι Martins-de-Souza et al [164], στην τελευταία τους δημοσίευση στο περιοδικό Proteomics το 2011, αναγνώρισαν σε ανθρώπινο έξω-ραχιαίο προμετωπιαίο φλοιό πρωτεΐνες με παρόμοιες λειτουργίες μετά από τη συνδυασμένη χρήση δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης και shotgun φασματομετρίας μάζας.

## 9.1 ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Όσον αφορά τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες βρέθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των ομάδων στην έκφραση των ισομορφών της ακτίνης και της τουμπουλίνης.

### 9.1.1 Ακτίνη και μικροϊνίδια

Η ακτίνη είναι μια πρωτεΐνη 42kDa, πολύ άφθονη στα ευκαρυωτικά κύτταρα (οι ακτίνες αποτελούν το 8-14% του συνόλου των πρωτεϊνών του κυττάρου) και ένα από τα κύρια συστατικά του «κινητήρα» της ακτομυοσίνης και του φλοιώδους δικτύου των μικροϊνιδίων. Πρώτα απομονώθηκε από τους γραμμωτούς μυς και συχνά αναφέρεται ως μία από τις πρωτεΐνες των μυών. Στα σπονδυλόζωα εμφανίζονται τρεις ισομορφές η  $\alpha$ -, η  $\beta$ - και η  $\gamma$ -. Η  $\alpha$ -ακτίνη εντοπίζεται στον μυϊκό ιστό και είναι πολύ σημαντική για τη διαδικασία της συστολής. Ενώ, οι  $\beta$ - και  $\gamma$ -ακτίνες συνυπάρχουν στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους ως συστατικά του κυτταροσκελετού και ως μεσολαβητές της ενδοκυττάριας κινητικότητας. Στη συγκεκριμένη μελέτη βρέθηκαν αλλαγές στο επίπεδο έκφρασης σε ποικίλες υπομονάδες της ακτίνης σε όλες σχεδόν τις συγκρίσεις που έγιναν (βλέπε πίνακες 8.1-8.16 από αποτελέσματα) γεγονός που υποδηλώνει ότι η συναρμολόγηση των μικροϊνιδίων είναι ευαίσθητη στις καταστάσεις άγχους και στρες [163]. Συνεχώς αυξανόμενος όγκος στοιχείων υποστηρίζει την εμπλοκή της ακτίνης σε νευροβιολογικές διαδικασίες, που σχετίζονται με το άγχος και διαταραχές της διάθεσης, εξαιτίας του εξειδικευμένου ρόλου της και του ρυθμιστικού της χαρακτήρα σε διαδικασίες πλαστικότητας [165]. Επιπρόσθετα στοιχεία, που υποστηρίζουν τη κυτταροσκελετική αναδιαμόρφωση, προέρχονται από μια γονιδιωματική έρευνα σε ποντίκια [166] όπου ένας επιπρόσθετος αριθμός ρυθμιστών

της ακτίνης βρέθηκε να παρουσιάζει μεταβλητή έκφραση σε στελέχη ποντικών που εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά κατάθλιψης, υποστηρίζοντας έτσι περαιτέρω τη θεωρία εμπλοκής του διαταραγμένου κυτταροσκελετού σε διαταραχές της διάθεσης. Ένας αριθμός στοιχείων υποδεικνύει ότι η μη ισορροπημένη λειτουργία του ρυθμιστικού μηχανισμού της ακτίνης έχει ως συνέπεια τη συναπτική δυσλειτουργία, η οποία αποτελεί τη βάση για τη μείωση των γνωστικών ικανοτήτων στον άνθρωπο [167]. Στη μελέτη μας βρέθηκε ότι η έκφραση της ακτίνης ήταν αυξημένη ως αποτέλεσμα και των δύο πρώιμων εμπειριών (επιβράβευση, ματαίωση) ιδιαίτερα στο αριστερό ημισφαίριο, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει αυξημένη πλαστικότητα.

### 9.1.2 Νευροϊνίδια

Η α-ιντερνεξίνη είναι μια πρωτεΐνη συναρμολόγησης νευροϊνιδίων [168] που εντοπίζεται στα σώματα, στους δενδρίτες και στις δενδριτικές άκανθες των νευρώνων σε μικρή απόσταση από τη μετασυναπτική πύκνωση [169]. Στοιχεία υποδεικνύουν μείωση και αποσυναρμολόγηση των νευροϊνιδίων κατά τη δημιουργία μιας νέας σύναψης, λόγω της δυναμικής κυτταροσκελετικής αναδιαμόρφωσης στην οποία συμμετέχουν [170]. Η αύξηση της έκφρασης της α-ιντερνεξίνης που παρατηρήθηκε ύστερα από την πρώιμη εμπειρία της επιβράβευσης στο αριστερό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού, μπορεί να σχετίζεται με την αναδιαμόρφωση των συνάψεων, όπως υποστηρίζουν και οι Piubelli et al [163] με πρόσφατη δημοσίευσή τους στο *Neuroscience* το 2011.

Άλλη εξίσου σημαντική πρωτεΐνη είναι η ινώδης όξινη πρωτεΐνη της γλοίας (GFAP), ένας κυτταροειδικός δείκτης των αστροκυττάρων, που κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του κεντρικού νευρικού συστήματος εκφράζεται στην ακτινωτή γλοία, που αντιπροσωπεύει νευρικά βλαστοκύτταρα. Παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη συναπτική πλαστικότητα και η υπερέκφρασή της στο δεξί ημισφαίριο τόσο των επιβραβευμένων όσο και των ματαιωμένων σε σχέση με το δεξί ημισφαίριο των μαρτύρων μπορεί να υποδηλώνει αυξημένη παρουσία αστροκυττάρων ή νευρικών βλαστοκυττάρων ως αποτέλεσμα της έκθεσης στις δύο πρώιμες εμπειρίες. Η δεύτερη άποψη πιθανόν να αντικατοπτρίζει μια καθυστέρηση στην ανάπτυξη του δεξιού προμετωπιαίου λοβού λόγω της πρώιμης εμπειρίας.



### 9.1.3 Κυτταροσκελετικοί Μικροσωληνίσκοι

Η τουμπουλίνη με τη σειρά της αποτελεί και αυτή μια άφθονη κυτταροπλασματική πρωτεΐνη (55kDa), που υπάρχει κυρίως σε δύο μορφές, την α και τη β. Ένα ετεροδιμερές τουμπουλίνης αποτελεί το δομικό λίθο για τη συναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων. Στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα υπάρχουν πολλά αντίγραφα γονιδίων ισομορφών τουμπουλίνης. Η ετερογένεια αυτή οφείλεται στη μεγάλη γονιδιακή οικογένεια της τουμπουλίνης που κωδικοποιεί πολλαπλές ισομορφές της πρωτεΐνης και στις πολλαπλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις [171]. Στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της τουμπουλίνης περιλαμβάνονται η ακετυλίωση, η φωσφορυλίωση, η τυροσυνίωση, η πολυγλουταμυλίωση και η πολυγλυκοζυλίωση [172, 173]. Στη παρούσα μελέτη πραγματοποιήσαμε ανοσοαποτύπωση (western blot) με το αντίσωμα αντι-β III –τουμπουλίνη, το οποίο έδειξε υπερέκφραση στον προμετωπιαίο φλοιό στα ζώα που είχαν υποστεί την πρώιμη εμπειρία (επιβράβευση ή ματαίωση) σε σχέση με τους μάρτυρες. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν να σχετίζεται με αυξημένη πλαστικότητα λόγω της έκθεσης στις δύο πρώιμες εμπειρίες.

Οι διϋδροπυριμιδινάσες από την άλλη, είναι απαραίτητες για την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού. Συγχρόνως, παίζουν σημαντικό ρόλο στη νευρωνική διαφοροποίηση καθώς και στην ανάπτυξη των νευραξόνων. Ιδιαίτερα για την σχετιζόμενη με την διϋδροπυριμιδινάση πρωτεΐνη 2 (DRP-2) αξίζει να αναφερθεί ότι έχει βρεθεί σε μία σειρά ερευνών πρωτεομικής, ότι αλλάζει η έκφραση της σε διαταραχές που σχετίζονται με τη νευροψυχιατρική [124, 174]. Τα δικά μας αποτελέσματα έδειξαν ότι η νεογνική εμπειρία της ματαίωσης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης της DRP-2 στον αριστερό προμετωπιαίο φλοιό, ενώ στον δεξιό είχε το αντίθετο αποτέλεσμα. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε μελέτες που αφορούν την επίδραση του στρες της μητρική αποστέρηση στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης, βρέθηκε ότι μεταβάλλεται η DRP-2, γεγονός που υποδηλώνει ότι το στρες επηρεάζει την έκφραση της και έχει διαφορετικές επιπτώσεις ανάλογα με το γενετικό υπόβαθρο [163].

Οι πρωτεΐνες νευροϊνιδίων, μεταξύ των οποίων η ελαφριά αλυσίδα των νευροϊνιδίων (Neurofilament Light Polypeptide- NFL), η οποία βρέθηκε αυξημένη στον αριστερό προμετωπιαίο φλοιό των επιβραβευμένων ζώων, είναι σημαντικοί παράγοντες στην διατήρηση και την αναδιαμόρφωση του νευρωνικού κυτταροσκελετού και έχει προταθεί ότι οι αλλαγές τους αντιστοιχούν σε μεταβολές στη νευρωνική αρχιτεκτονική [70].



**Γράφημα 9.3:** Υπερέκφραση κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών στον προμετωπιαίο φλοιό των νεογνών επίμυων.

## 9.2 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ

Ένας αριθμός πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην κυτταρική μορφογένεση, νευρογένεση και την απόπτωση έχει βρεθεί ότι εκφράζονται διαφορετικά μεταξύ των τριών κατηγοριών επίμυων που μελετήθηκαν.

Ανάμεσα στις πρωτεΐνες αυτές σημαντική θέση έχουν οι πρωτεΐνες 14-3-3. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 αποτελούν πρωτεΐνες προσαρμογείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση ενός ευρέος φάσματος γενικών και εξειδικευμένων μονοπατιών σηματοδότησης. Προσδένονται σε ένα μεγάλο αριθμό μορίων, έπειτα από αναγνώριση του μοτίβου φωσφοσερίνης ή φωσφοθρεονίνης, τροποποιώντας καταυτόν τον τρόπο τη δραστηριότητα του μορίου που δεσμεύει. Οι 14-3-3 πρωτεΐνες είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διαίρεση, διαφοροποίηση και απόπτωση

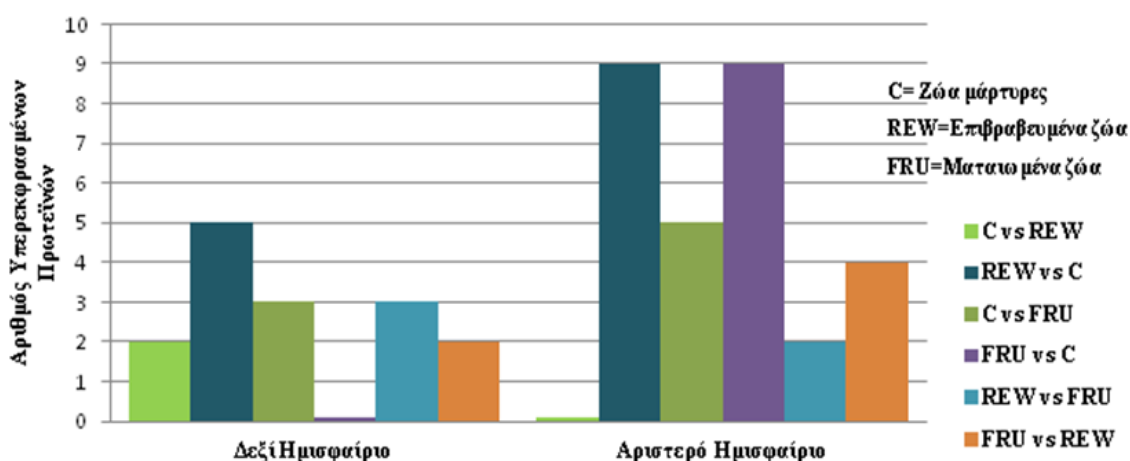
μέσω της σημαντικής τους λειτουργίας στη μεταγωγή σήματος [175], και μπορούν να ρυθμίσουν την νευρωνική πλαστικότητα αλληλεπιδρώντας με στοιχεία του κυτταροσκελετού [176]. Υπάρχουν στοιχεία από μελέτες με την χρήση μικροσυστοιχιών [177] ή της πρωτεομικής [178] που δείχνουν την απορρύθμιση στην έκφραση των πρωτεϊνών 14-3-3 σε ιστούς αποθανόντων σχιζοφρενών. Επίσης, στον ιππόκαμπο καθώς και στον φλοιό αρουραίων που είχαν υποβληθεί σε χρόνια θεραπεία με αντικαταθλιπτικά παρατηρήθηκε τροποποίηση των 14-3-3 ισομορφών [179]. Οι παραπάνω διαπιστώσεις παρέχουν ενδείξεις για τον πιθανό ρόλο αυτών των πρωτεϊνών σε μηχανισμούς που ενέχονται στην κατάθλιψη, το άγχος ή άλλες διαταραχές της διάθεσης. Με βάση τα παραπάνω, τα αποτελέσματά μας που δείχνουν μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης 14-3-3 έψιλον στον προμετωπιαίο φλοιό των ζώων που είχαν υποστεί τη νεογνική ματαίωση, υποδηλώνουν ότι η εμπειρία αυτή μπορεί να επάγει αλλαγές στον εγκέφαλο που μπορεί να οδηγήσουν σε «καταθλιπτικόμορφη» συμπεριφορά. Πράγματι άλλες μελέτες από το εργαστήριο μας έχουν επιβεβαιώσει ότι η νεογνική ματαίωση οδηγεί σε «καταθλιπτικόμορφη» συμπεριφορά κατά την ενήλικη ζωή [180]. Είναι δε ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η μητρική αποστέρηση, που είναι γνωστό ότι οδηγεί σε «καταθλιπτικόμορφη» συμπεριφορά κατά την ενήλικη ζωή, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των πρωτεϊνών 14-3-3 στον ιππόκαμπο και τον προμετωπιαίο φλοιό [163].

### 9.2.1 Πρωτεΐνες συνοδοί

Στις πρωτεΐνες που ανήκουν σε αυτή τη κατηγορία και αυξάνονται ως απόκριση στη μητρική αποστέρηση [163] περιλαμβάνονται αρκετές πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins- HSP) που είναι γνωστό ότι η έκφραση τους αυξάνει από το κυτταρικό στρες. Αυτές οι πρωτεΐνες συνοδοί συνήθως λειτουργούν μεταφέροντας πρωτεΐνες εντός του κυττάρου και αποτρέπουν την λανθασμένη αναδίπλωσή τους, όπως επίσης και τη συσσωμάτωση των παλιών και νέων πρωτεϊνών κάτω από συνθήκες στρες [181]. Οι πρωτεΐνες συνοδοί δεν προσδέονται ομοιοπολικά στους στόχους τους και δεν αποτελούν τμήμα του τελικού προϊόντος. Οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ αποτελούν ένα σημαντικό υποσύνολό τους. Αναγνωρίζονται τρεις κύριες οικογένειες: οι σαπερονίνες (groEL και hsp60), η οικογένεια hsp70 και η οικογένεια hsp90. Στη μελέτη μας βρέθηκε ότι αυξάνονται στον προμετωπιαίο φλοιό ως αποτέλεσμα των δύο πρώιμων εμπειριών (είτε

επιβράβευση είτε ματαίωση) πρωτεΐνες θερμικού σοκ από τις οικογένειες hsp70 και hsp90. Οι hsp70 έχουν περιοχές πρόσδεσης του ATP και μπορεί να εμπλέκονται στην πτύχωση ή στην εξαγωγή των πρωτεϊνών. Ενώ για τις hsp90 παραμένει άγνωστη η ακριβής λειτουργία τους, όμως γνωρίζουμε ότι αλληλεπιδρούν με υποδοχείς στεροειδών και προϊόντα ογκογονιδίων με δράση κινάση της τυροσίνης. Μπορεί επίσης να προσδέουν ακτίνη και τουμπουλίνη [182].

### Πρωτεΐνες Ενδοκυτταρικής Μεταγωγής Σήματος



**Γράφημα 9.4:** Υπερέκφραση πρωτεϊνών Ενδοκυτταρικής Μεταγωγής που υπερεκφράζονται στον προμετωπιαίο φλοιό των νεογνών επίμυων.

### 9.3 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ

Ένα μεγάλο μέρος των αλλαγών που παρατηρήθηκαν ως αποτέλεσμα των πρώιμων εμπειριών στη μελέτη μας σημειώθηκε σε πρωτεΐνες διάμεσου μεταβολισμού. Αξίζει να αναφερθεί ότι και άλλοι ερευνητές έχουν δείξει χρησιμοποιώντας ένα άλλο μοντέλο πρώιμης εμπειρίας, τη μητρική αποστέρηση, ότι ένας αριθμός πρωτεϊνών που υπερεκφράζεται στον προμετωπιαίο φλοιό εμπλέκεται στον ενδιάμεσο μεταβολισμό [163].

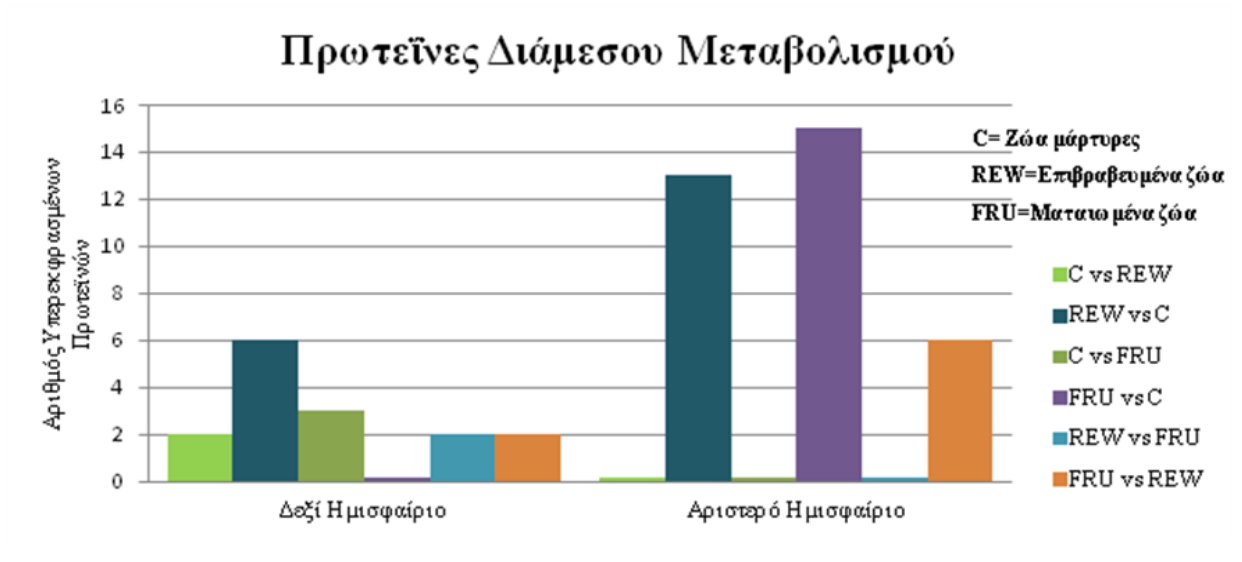
Για παράδειγμα μία σημαντική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στον ενεργειακό μεταβολισμό είναι το ενζυμικό σύμπλοκο της συνθάσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης, του οποίου η υπομονάδα άλφα βρέθηκε αυξημένη στον αριστερό προμετωπιαίο φλοιό των επιβραβευμένων νεογνών επίμυων σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα στα ζώα μάρτυρες. Αξίζει να αναφερθεί ότι αύξηση της υπομονάδας άλφα

καθώς και της d της συνθάσης του ATP έχει παρατηρηθεί στον ιππόκαμπο μετά από μητρική αποστέρηση [183]. Φαίνεται ότι οι πρώιμες εμπειρίες αυξάνουν την παραγωγή ATP.

Οι πρώιμες εμπειρίες του μοντέλου μας τροποποίησαν τα επίπεδα και μίας άλλης πρωτεΐνης, της δεϋδρογενάσης της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης (GAPDH), που παίζει ρόλο στον ενεργειακό μεταβολισμό, καταλύοντας το 6<sup>ο</sup> βήμα της γλυκόλυσης, δηλαδή τη μετατροπή της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης σε 1,3-διφωφο-γλυκερινικό οξύ. Η πρωτεΐνη αυτή εκτός από τη δράση της ως δεϋδρογενάση στο κυτταρόπλασμα, δρα και στον πυρήνα σε διαδικασίες όπως είναι η αντιγραφή και η μεταγραφή του DNA [184]. Έχει δε αναφερθεί ότι συμμετέχει και στη ρύθμιση της απόπτωσης [185], διαδικασία σημαντική κατά την ανάπτυξη του εγκεφάλου.

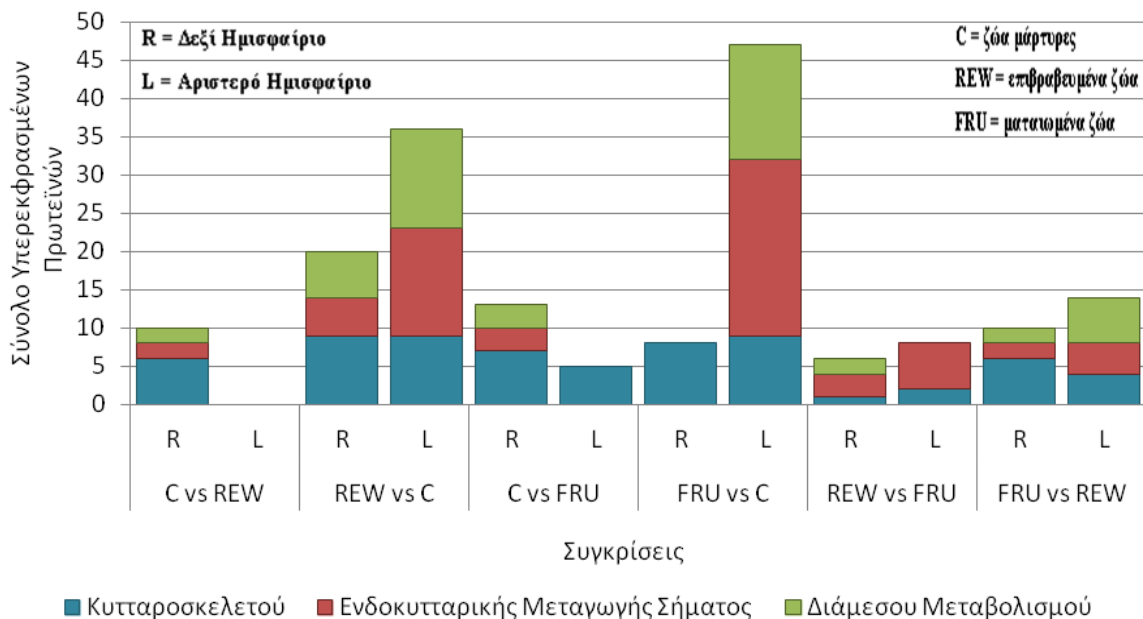
Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η πρωτεΐνη μούταση 1 του φωσφογλυκερικού (Phosphoglycerate mutase 1) που εμφανίζεται μειωμένη στο δεξιό προμετωπιαίο ως αποτέλεσμα της νεογνική ματαίωσης. Έχει δε βρεθεί ότι μειώνεται και από τη μητρική αποστέρηση στον προμετωπιαίο φλοιό και τον ιππόκαμπο [183, 163].

Μία άλλη πρωτεΐνη που συμμετέχει στη γλυκόλυση και έχει αναφερθεί να επηρεάζεται στον ιππόκαμπο από τη μητρική αποστέρηση είναι η ισομεράση των φωσφορικών τριοζών (Triosephosphate isomerase) [183]. Στη μελέτη μας βρέθηκε να αυξάνονται τα επίπεδα αυτής της πρωτεΐνης ως αποτέλεσμα και των δύο πρώιμων εμπειριών (επιβράβευση, ματαίωση). Το ένζυμο αυτό αλληλομετατρέπει την φωσφορική δι-υδροξυ-ακετόνη σε φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη και αντιστρόφως. Αυξημένη δράση της ισομεράσης των φωσφορικών τριοζών συνεπάγεται μείωση της συγκέντρωσης της φωσφορικής διϋδροξυακετόνης, η οποία θα μετατρέποταν αυθόρμητα σε methylglyoxal. Η methylglyoxal με τη σειρά της μπορεί και τροποποιεί το DNA αυξάνοντας τον νευρωνικό θάνατο [183]. Φαίνεται λοιπόν ότι οι πρώιμες εμπειρίες έχουν μία νευροπροστατευτική δράση.



**Γράφημα 9.5:** Υπερέκφραση πρωτεϊνών Διάμεσου Μεταβολισμού στον προμετωπιαίο φλοιό των νεογνών επίμων.

Ακολούθως στο γράφημα 9.6 απεικονίζονται οι διαφορές έκφρασης των πρωτεϊνών όπως κατηγοριοποιήθηκαν σε ομάδες (κυτταροσκελετού, ενδοκυτταρικής μεταγωγής σήματος και διάμεσου μεταβολισμού) για κάθε ημισφαίριο.



**Γράφημα 9.6:** Ομάδες υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών στο προμετωπιαίο φλοιό των νεογνών επίμων.

## 9.4 ΠΛΑΓΙΩΣΗ

Οι Sun et al (2005) [71] παρουσίασαν την ύπαρξη ασύμμετρης γονιδιακής έκφρασης ανάμεσα στο δεξί και αριστερό ανθρώπινο εμβρυϊκό εγκεφαλικό φλοιό, προτείνοντας κατά αυτόν τον τρόπο ότι μπορεί η πλαγίωση να δημιουργείται στους ανθρώπους στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξής τους. Δεν είναι πολλές οι μελέτες δεξιάς και αριστερής πλαγίωσης που έχουν γίνει σε αναπτυσσόμενα τρωκτικά, αλλά παρόλα αυτά έχουν δείξει ότι η γονιδιακή έκφραση τροποποιείται δραματικά κατά τις πρώτες μεταγεννητικές εβδομάδες [72, 73].

Το 2006 οι Moskal et al [78] βρήκαν ότι η διαφορετική γονιδιακή έκφραση, όσον αφορά τη δομή του φλοιού κατά την ανάπτυξη, παρουσιάζει πλαγίωση στους επίμυς ηλικίας 6 ημερών (P6) κατά τη δημιουργία του ιππόκαμπου του αρουραίου και ξεκινά να αντιστρέφεται η επικράτεια από τα δεξιά στα αριστερά στους επίμυς ηλικίας 9 ημερών (P9). Η μετατόπιση της υπερέκφρασης των γονιδίων διακίνησης συναπτικών κυστιδίων από τα δεξιά στα αριστερά, που παρατηρείται ανάμεσα στα στάδια P6 και P9, υποδεικνύει ότι η συναπτική λειτουργία παρουσιάζει πλαγίωση ωρίς κατά την περίοδο της λειτουργικής ανάπτυξης.

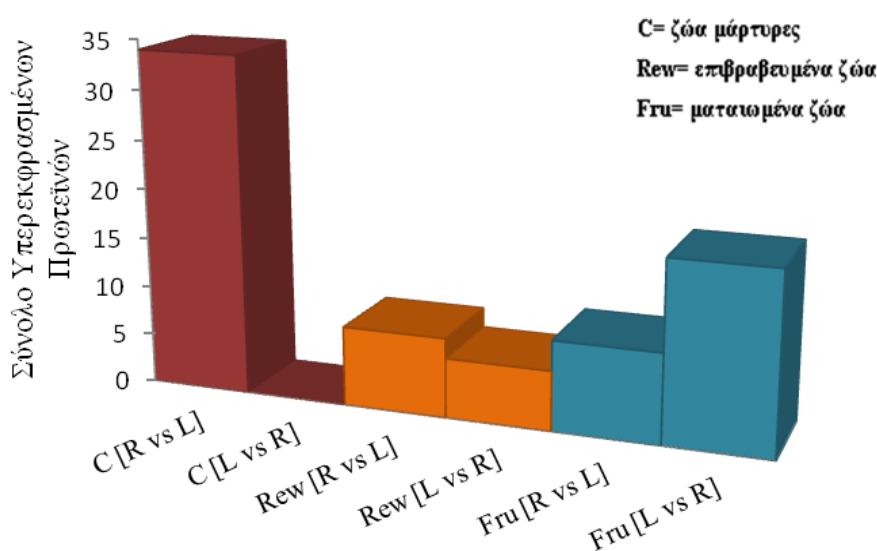
Στις αναλύσεις που έγιναν στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι στο μεν αριστερό ημισφαίριο υπήρχε υπερέκφραση κυρίως στις πρωτεΐνες ενδοκυτταρικής μεταγωγής σήματος, ενώ στο δεξί ημισφαίριο παρουσιάστηκε μια υπερέκφραση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο διάμεσο μεταβολισμό. (βλέπε γράφημα 9.7).

Στα ζώα μάρτυρες παρατηρήθηκε υπερέκφραση πρωτεϊνών στον δεξιό σε σχέση με τον αριστερό προμετωπιαίο φλοιό. Τα αποτελέσματά μας αυτά συμφωνούν με αυτά σχετικά με τον ιππόκαμπο ενήλικου επίμου που μελετήθηκε από τους Samara et al. το 2010 [70], όπου παρατηρήθηκε ότι υπάρχει εγκεφαλική ασυμμετρία με υπερέκφραση πρωτεϊνών στο δεξί ημισφαίριο του ιππόκαμπου.

## 9.5 ΠΛΑΓΙΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΩΙΜΕΣ ΕΜΠΕΙΡΙΕΣ

Από τις αναλύσεις που έγιναν φάνηκε πως οι πρώιμες νεογνικές εμπειρίες επηρεάζουν την πλαγίωση. Όπως φαίνεται από το ακόλουθο γράφημα, στα ζώα μάρτυρες παρουσιάστηκε υπερέκφραση των πρωτεϊνών στο δεξί ημισφαίριο. Στα επιβραβευμένα πειραματόζωα ο αριθμός των πρωτεϊνών που υπερεκφράστηκε σε

καθένα από τα δύο ημισφαίρια δεν διέφερε ουσιαστικά, ενώ αντίθετα στα ματαιωμένα ζώα περισσότερες πρωτεΐνες υπερέκφραστηκαν στο αριστερό ημισφαίριο.



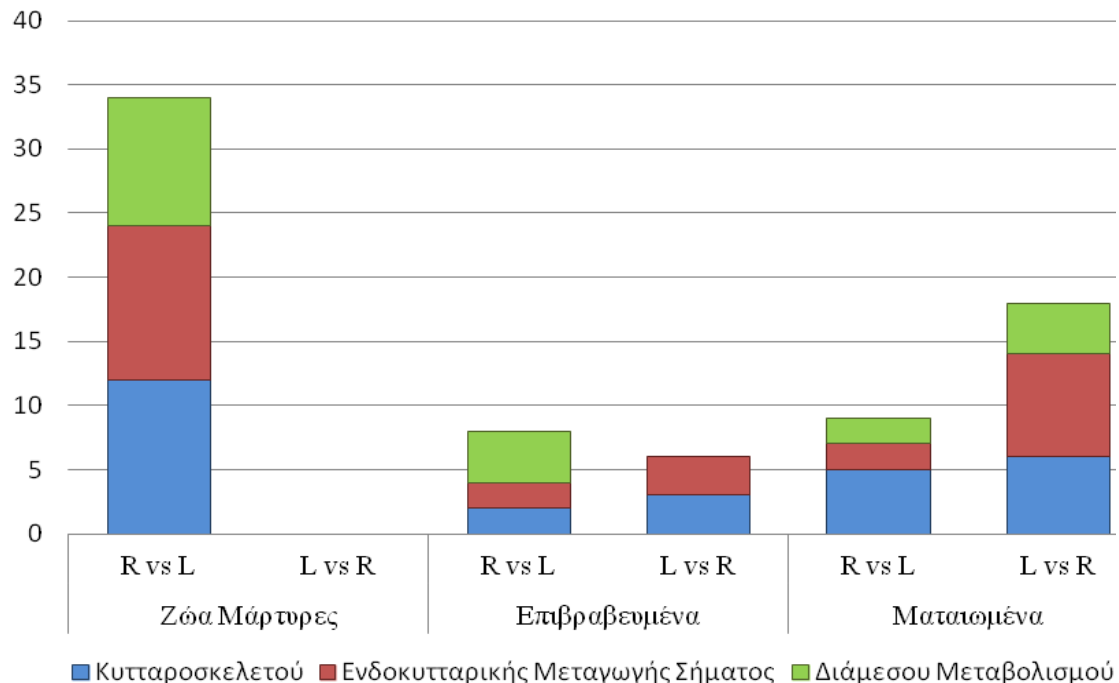
**Γράφημα 9.7:** Σύνολο υπερέκφρασμένων πρωτεϊνών στον προμετωπιαίο φλοιό των νεογνών επίμων.

Ειδικότερα εμφανίστηκε μεγαλύτερη υπερέκφραση πρωτεϊνών στο **δεξί ημισφαίριο** του προμετωπιαίου φλοιού στα ζώα μάρτυρες από ό,τι στα ζώα που υπέστησαν την πρώιμη εμπειρία (επιβράβευση ή ματαίωση). Η έκθεση στην πρώιμη εμπειρία φάνηκε να επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών στη συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου, η οποία ευθύνεται για απαντήσεις σε νέα γεγονότα και συμπεριφορές σε καταστάσεις εκτάκτου ανάγκης ενώ έχει και ρόλο «απόσυρσης» [186].

Από την άλλη, στο **αριστερό ημισφαίριο** μεγαλύτερη υπερέκφραση πρωτεϊνών εμφάνισαν τα ματαιωμένα νεογνά, έπειτα τα επιβραβευμένα και τέλος τα ζώα μάρτυρες τα οποία δεν εμφάνισαν καμία υπερέκφραση πρωτεϊνών. Όπως προαναφέραμε στην εισαγωγή, το αριστερό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού, τουλάχιστον στους ανθρώπους, εξειδικεύεται στη κατηγοριοποίηση των πληροφοριών και στον έλεγχο της καθημερινής συμπεριφοράς, της ρουτίνας αφού έχει «προσεγγιστικό» ρόλο [186]. Στη μελέτη μας, η νεογνική εμπειρία φάνηκε να συνεισφέρει στην αύξηση της δραστηριότητας του αριστερού τμήματος του προμετωπιαίου φλοιού των νεογνών επίμων που δεν τους επιτρεπόταν η επαφή με τη μητέρα τους παρόλο που την είχαν προσεγγίσει στο λαβύρινθο.



Αναλυτικότερα η κατανομή των τριών ομάδων πρωτεϊνών που αναφέραμε παραπάνω (κυτταροσκελετού, ενδοκυτταρικής μεταγωγής σήματος και διάμεσου μεταβολισμού) στο δεξί και αριστερό προμετωπιαίο φλοιό των επιβραβευμένων και ματαιωμένων καθώς και των ζώων μαρτύρων απεικονίζεται ακολούθως στο γράφημα 9.8.



**Γράφημα 9.8:** Συνολική απεικόνιση ομάδων πρωτεϊνών που υπερεκφράζονται στο προμετωπιαίο φλοιό των νεογνών επίμυων.

Το γεγονός ότι πρωτεΐνες αντιπροσωπευτικές διαφόρων λειτουργικών κατηγοριών ήταν διαφορετικά εκφρασμένες στα δύο ημισφαίρια, εμφανίζοντας ένα ασύμμετρο πρότυπο έκφρασης, προτείνει ότι η πλαγίωση μπορεί να είναι ένα καθολικό φαινόμενο αυτής της περιοχής κατά την πρώιμη ανάπτυξη. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν μια σημαντική επιρροή των πρώιμων εμπειριών σε μια σειρά από μονοπάτια, όπως είναι ο ενεργειακός μεταβολισμός, ο μηχανισμός κυτταροσκελετικής οργάνωσης και οι νευρογενετικοί και αποπτωτικοί μηχανισμοί.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης προτείνουν ότι οι αλλαγές στη νευρωνική πλαστικότητα που προκαλούνται από τις πρώιμες εμπειρίες μπορεί να θεωρηθούν ως το τελικό αποτέλεσμα ενεργοποίησης και/ή αναστολής μοριακών καταρρακτών όπως αυτοί που ρυθμίζουν τη δυναμική του κυτταροσκελετού, την ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος και το διάμεσο μεταβολισμό.

## 10. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γνωστική ανάπτυξη του νεογνού καθορίζεται από την αλληλεπίδρασή του με τη μητέρα του. Χρησιμοποιώντας τη μητρική επαφή ως θετικό ή ως αρνητικό ενισχυτή, νεογνά επίμυος, στα οποία είτε αποτράπηκε η επαφή με τη μητέρα (ομάδα συνεχόμενης ματαιώσης), είτε δόθηκε ως ανταμοιβή (ομάδα συνεχόμενης ενίσχυσης), βελτίωσαν σταδιακά τις επιδόσεις του, μετά από εκπαίδευση τεσσάρων ημερών (μεταγεννητικές ημέρες 10-13, P10-13) σε ένα λαβύρινθο σχήματος T. Μάλιστα, τα «επιβραβευμένα» νεογνά εντόπιζαν τη μητέρα τους ταχύτερα από τα «ματαιωμένα».

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η επίπτωση των δύο παραπάνω πρώιμων εμπειριών σε σχέση με ζώα μάρτυρες, στο πρωτέωμα του προμετωπιαίου φλοιού, μια περιοχή που έχει δείχθει ότι επηρεάζεται από αυτές τις συγκεκριμένες πρώιμες εμπειρίες και είναι πολύ σημαντική για την μνήμη εργασίας και τη συμπεριφορά. Διερευνήθηκε επίσης, η υπόθεση της πλαγίωσης και μελετήθηκε η έκφραση πρωτεϊνών τόσο στο δεξί όσο και στο αριστερό ημισφαίριο του προμετωπιαίου φλοιού σε κάθε ομάδα χωριστά (μάρτυρες, επιβραβευμένα και ματαιωμένα) χρησιμοποιώντας μια τεχνική υψηλής απόδοσης. Ειδικότερα, η πρωτεομική ανάλυση βασίστηκε στα συνδυασμένα αποτελέσματα της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης και της φασματομετρίας μάζας.

Συνολικά, ταυτοποιήθηκαν 117 πρωτεΐνες που επηρεάστηκαν από τις πρώιμες εμπειρίες του μοντέλου. Η πλειονότητα των πρωτεϊνών, συγκεκριμένα 72 από τις 117 ταυτοποιημένες πρωτεΐνες, βρέθηκε να προέρχεται από το κυτταρόπλασμα. Όσον αφορά τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες βρέθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των ομάδων στην έκφραση των ισομορφών της ακτίνης και της τουμπουλίνης. Ενώ, παρατηρήθηκαν και σημαντικές διαφορές στην έκφραση της α-ιντερνεξίνης, της ινώδους όξινης πρωτεΐνης της γλοίας (GFAP) καθώς και της DRP-2 στον αριστερό προμετωπιαίο φλοιό. Ένας αριθμός πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην κυτταρική μορφογένεση, νευρογένεση και την απόπτωση, όπως είναι οι πρωτεΐνες 14-3-3 και αρκετές πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins- HSP), βρέθηκε ότι εκφράζονται διαφορετικά μεταξύ των τριών κατηγοριών επίμυων που μελετήθηκαν. Επίσης, ένα μεγάλο μέρος των αλλαγών που παρατηρήθηκαν ως αποτέλεσμα των πρώιμων εμπειριών στη μελέτη μας σημειώθηκε σε πρωτεΐνες διάμεσου μεταβολισμού, όπως είναι το ενζυμικό σύμπλοκο της συνθάσης της τριφωσφορικής

αδενοσίνης, η δεϋδρογενάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεϋδης (GAPDH), η μουτάση 1 του φωσφογλυκερικού (Phosphoglycerate mutase 1) καθώς και η ισομεράση των φωσφορικών τριοζών (Triosephosphate isomerase).

Στο επίπεδο μελέτης δεξιάς και αριστερής πλαγίωσης που έγινε στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι στα ζώα μάρτυρες παρατηρήθηκε υπερέκφραση πρωτεϊνών στον δεξιό σε σχέση με τον αριστερό προμετωπιαίο φλοιό, στα επιβραβευμένα δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στον αριθμό υπερεκφραζόμενων πρωτεϊνών μεταξύ των 2 ημισφαιρίων, ενώ στα ματαιωμένα διαπιστώθηκε υπερέκφραση πρωτεϊνών στον αριστερό σε σχέση με τον δεξιό προμετωπιαίο φλοιό.

Το γεγονός ότι πρωτεΐνες αντιπροσωπευτικές διαφόρων λειτουργικών κατηγοριών ήταν διαφορετικά εκφρασμένες στα δύο ημισφαίρια του προμετωπιαίου φλοιού, εμφανίζοντας ένα ασύμμετρο πρότυπο έκφρασης, προτείνει ότι η πλαγίωση μπορεί να είναι ένα καθολικό φαινόμενο αυτής της περιοχής κατά την πρόιμη ανάπτυξη. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν μια σημαντική επιρροή των πρώιμων εμπειριών στην εγκεφαλική πλαγίωση και σε μια σειρά από μονοπάτια, όπως είναι ο ενεργειακός μεταβολισμός, ο μηχανισμός κυτταροσκελετικής οργάνωσης και οι νευρογενετικοί και αποπτωτικοί μηχανισμοί.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης προτείνουν ότι οι αλλαγές στη νευρωνική πλαστικότητα που προκαλούνται από τις πρώιμες εμπειρίες μπορεί να θεωρηθούν ως το τελικό αποτέλεσμα ενεργοποίησης και/ή αναστολής μοριακών καταρρακτών όπως αυτοί που ρυθμίζουν τη δυναμική του κυτταροσκελετού, την ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος και το διάμεσο μεταβολισμό.

## ABSTRACT

During the neonatal period of rodents, mother-infant interaction mediates environmental stimulation of the pups and cognitive and emotional development. When mother contact is used as either a positive or a negative reinforcement, rat pups, both those denied contact (frustrated) and those allowed contact as continuous reward (rewarded), improve their performance in a T maze after four days of training (postnatal day 10-13). Rewarded pups however, are able to locate their mother faster than frustrated ones.

In this research we investigate the effect of these early experiences on the proteome of the prefrontal cortex, an area crucial for working memory and behavior, which is affected in our model as shown by previous results and. We also investigate the hypothesis of laterality and explore the expression of proteins in both the right and left hemispheres of the prefrontal cortex in each group separately (control, rewarded and frustrated) by using a high performance technique: Combined results of two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry are used for proteomic analysis.

Using this analysis, a total of 117 proteins, affected by early experiences, were identified. The majority of the proteins, specifically 72 out of 117, originated from the cytoplasm. Regarding the cytoskeletal proteins, significant differences were found between the three groups in terms of the expression of actin and tubulin isoforms. Significant differences were also observed in the left prefrontal cortex in the expression of alpha-internexin, of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and of the dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2). A number of proteins involved in cell morphogenesis, neurogenesis and apoptosis, such as 14-3-3 proteins, and several heat shock proteins (HSP) were found to be differently expressed among the three groups studied. Also, a large number of changes in intermediate metabolism proteins, such as the enzyme complex of adenosine triphosphate synthase, the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), the phosphoglycerate mutase 1 and the triosephosphate isomerase were observed.

Regarding laterality an overexpression of proteins in the right hemisphere of the prefrontal cortex of control animals was observed. No significant difference was observed in the number of overexpressed proteins in the two hemispheres in the

rewarded rat pups. In contrast, in frustrated pups there was an increase in the number of overexpressed proteins in the left hemisphere of their prefrontal cortex.

Differential and asymmetric over-expression in the two hemispheres of the prefrontal cortex of proteins from different functional categories suggests that laterality may be a universal phenomenon in this brain region during early development. The results from our study indicate a significant influence of early experiences on brain laterality and on a series of paths, such as energy metabolism, the mechanism of cytoskeletal organization and neurogenic and apoptotic mechanisms.

Our findings suggest that changes in neuronal plasticity induced by early experiences may represent the final result of activation and/or suppression of molecular cascades involved in the regulation of cytoskeletal dynamics, intracellular signal transduction as well as of intermediate metabolism.

## 11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Finger and Stanley, *Origins of neuroscience: a history of explorations into brain function*, 1st ed, Oxford University Press, Oxford Oxfordshire, 1994
2. Rose, J.E. and Woolsey, C.N., 1948, The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. *Research Publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease*, **27**, 210–32.
3. Uylings, H.B., Groenewegen, H.J. and Kolb, B., 2003, Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*, **146**, 3–17.
4. Preuss, T.M., 1995, Do rats have prefrontal cortex? The Rose-Woolsey-Akert program reconsidered. *The Journal of Cognitive Neuroscience*, **7**, 1–24.
5. Mesulam, M.M., *Αρχές Συμπεριφορικής και Γνωσιακής Νευρολογίας*, 2η Έκδοση, Εκδόσεις «Πασχαλίδης», Αθήνα, 2011, σελ. 44-45.
6. Abe, M. and Hanakawa, T., 2009, Functional coupling underlying motor and cognitive functions of the dorsal premotor cortex. *Behav Brain Res*, **198**, 13-23.
7. Cummings, J.L., 1993, Frontal-subcortical circuits and human behavior. *Arch Neurol*, **50**, 873-880.
8. Stuss, D.T. and Alexander, M.P., 2000, Executive functions and the frontal lobes: a conceptual view. *Psychol Res*, **63**, 289-298.
9. Zelazo, P.D. and Muller, U., in *Handbook of child cognitive development*, U.Goswami, 2nd ed., Oxford Blackwell, Oxford, 2002, ch.22, pp?
10. Bonelli, R.M. and Cummings, J.L., 2007, Frontal-subcortical circuitry and behavior. *Dialogues Clin Neurosci*, **9**, 141-151.
11. FitzGerald, M.J.T., Gruener, G. and Mtui, E., *Κλινική Νευροανατομία και Νευροεπιστήμες*, 5η Έκδοση, Εκδόσεις «Πασχαλίδης», Αθήνα, 2009, σελ. 381-382.
12. Schoenbaum, G., Roesch, M.R. and Stalnaker, T.A., 2006, Orbitofrontal cortex, decision-making and drug addiction. *Trends Neurosci*, **29**, 116-124.
13. Bechara, A., 2005, Decision making, impulse control and loss of willpower to resist drugs: a neurocognitive perspective. *Nat Neurosci*, **8**, 1458-1463.
14. Carmichael, S.T. and Price, J.L., 1995a, Limbic connections of the orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. *J. Comp Neurol*, **363**, 615-641.

15. Carmichael, S.T. and Price, J.L., 1995b, Sensory and premotor connections of the orbital and medial prefrontal cortex of macaque monkeys. *J. Comp Neurol*, **363**, 642-664.
16. Damasio, A.R., *Descartes' error*, 1st ed., Harper&Collins, New York, 1994.
17. Levesque, J., Eugene, F., Joanette, Y., Paquette, V., Mensour, B. and Beaudoin, G. et al., 2003, Neural circuitry underlying voluntary suppression of sadness. *Biological Psychiatry*, **53**, 502–510.
18. Beauregard, M., Levesque, J., & Bourgouin, P., 2001, Neural correlates of conscious self-regulation of emotion. *Journal of Neuroscience*, **21**, RC16.
19. Bechara, A., Damasio, A.R., Damasio, H. and Anderson, S.W., 1994, Insensitivity to future consequences following damage to human prefrontal cortex. *Cognition*, **50**, 7-15.
20. Berlin, H.A., Rolls, E.T. and Kischka, U., 2004, Impulsivity, time perception, emotion and reinforcement sensitivity in patients with orbitofrontal cortex lesions. *Brain*, **127**, 1108-1126.
21. Rolls, E.T., Hornak, J., Wade, D. and McGrath, J., 1994, Emotion-related learning in patients with social and emotional changes associated with frontal lobe damage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **57**, 1518-1524.
22. Goela, V. and Dolan, R.J., 2003, Explaining modulation of reasoning by belief. *Cognition*, **87**, B11-22.
23. Hornak, J., O'Doherty, J., Bramham, J., Rolls, E.T., Morris, R.G., Bullock, P.R. and Polkey, C.E., 2004, Reward-related reversal learning after surgical excisions in orbito-frontal or dorsolateral prefrontal cortex in humans. *J Cogn Neurosci.*, **16**, 463-78.
24. Ellis, H., Κλινική Ανατομική-Μια αναθεωρημένη και εφαρμοσμένη ανατομική για φοιτητές της ιατρικής, 9η Έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις «Γρ. Παρισιάνος», Αθήνα, 2000, σελ. 392.
25. [http://en.wikipedia.org/wiki/Prefrontal\\_cortex](http://en.wikipedia.org/wiki/Prefrontal_cortex) (τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
26. Goldman-Rakic, P.S., 1988, Topography of cognition: parallel distributed networks in primate association cortex. *Annu Rev Neurosc*, **11**, 137–56.
27. Price, J.L., 1999, Prefrontal cortical networks related to visceral function and mood. *Ann N Y Acad Sci*, **877**, 383–96.

28. Duus, P., Νευρολογική Τοπογραφική Διαγνωστική, Ανατομία-Φυσιολογία-Κλινική, 5η Έκδοση, Εκδόσεις «Γρηγόριος Κ. Παρισιάνος», Αθήνα, 1992, σελ. 416.
29. Shimamura, A. P., 2000, The role of the prefrontal cortex in dynamic filtering. *Psychobiology*, **28**, 207–218.
30. Miller, E.K. and Cohen, J.D., 2001, An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 167–202.
31. <http://www.brainybehavior.com/blog/2009/07/what-is-executive-function/>  
(τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
32. Becker, J. T. and Morris, R. G., 1999, Working Memory. *Brain and Cognition*, **41**, 1–8.
33. Baddeley, A.D. and Hitch, G.J.L., in *The psychology of learning and motivation*, ed Bower G.H., Academic Press, New York, 1974, vol. 8, Working memory, pp.47-87.
34. Baddeley, A., 2000, The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends Cogn Sci*, **4**, 417-423.
35. Cowan, N., *Attention and memory: An integrated framework*, 1st ed., Oxford University Press, New York, 1995.
36. Cowan, N., *Working memory capacity*, 1st ed., Psychology Press, New York, 2005.
37. Oberauer, K., 2002, Access to information in working memory: exploring the focus of attention. *Journal of Experimental Psychology. Learning, Memory, and Cognition*, **28**, 411–21.
38. Kintsch, W.; Patel, V.L. and Ericsson, K. A., 1999, The role of long-term working memory in text comprehension. *Psychologia*, **42**, 186–98.
39. Gobet, F., 2000, Some shortcomings of long-term working memory. *British Journal of Psychology*, **91**, 551–70.
40. Miller, G.A., 1956, The magical number seven plus or minus two: some limits on our capacity for processing information. *Psychological Review*, **63**, 81–97.
41. Salthouse, T.A., 1994, The aging of working memory. *Neuropsychology*, **8**, 535–543.
42. Salthouse, T.A., 1996, The processing speed theory of adult age differences in cognition. *Psychological Review*, **103**, 403–428.



43. West, R.L., 1996, An application of prefrontal cortex function theory to cognitive aging. *Psychological Bulletin*, **120**, 272–292.
44. Sherry, D. F. and Schacter, D. L., 1987, The evolution of multiple memory systems. *Psychological Review*, **94**, 439–454.
45. Honey, G.D., Fu, C.H. and Kim, J., 2002, Effects of verbal working memory load on corticocortical connectivity modeled by path analysis of functional magnetic resonance imaging data. *NeuroImage*, **17**, 573–82.
46. Mottaghy, F.M., 2006, Interfering with working memory in humans. *Neuroscience*, **139**, 85–90.
47. Kane, M.J. and Engle, R.W., 2002, The role of prefrontal cortex in working-memory capacity, executive attention, and general fluid intelligence: an individual-differences perspective. *Psychonomic Bulletin & Review*, **9**, 637–71.
48. Curtis, C.E. and D'Esposito, M., 2003, Persistent activity in the prefrontal cortex during working memory. *Trends in Cognitive Sciences*, **7**, 415–423.
49. Postle, B.R., 2006, Working memory as an emergent property of the mind and brain. *Neuroscience*, **139**, 23–38.
50. Bledowski, C., Rahm, B. and Rowe, J.B., 2009, What 'works' in working memory Separate systems for selection and updating of critical information. *The Journal of Neuroscience*, **29**, 13735–41.
51. Arnsten, A.F.T., Paspalas, C.D., Gamo NJ, Y.Y. and Wang, M., 2010, Dynamic Network Connectivity: A new form of neuroplasticity. *Trends Cognitive Sci*, **14**, 365–375.
52. O'Reilly, R.C., Busby, R.S. and Soto, R., in *The unity of consciousness: Binding, integration, and dissociation*, ed Cleeremans, A., Oxford University Press, Oxford, 2003, pt. 2, ch. 2.5, pp. 168–90.
53. Cowan, N. and Alloway, T.P., in *Development of Memory in Childhood*, ed Cowan N., 2nd ed., Psychology Press, Hove, England, 2008, ch.12, pp. 303–342.
54. Fukuda, K. and Vogel, E.K., 2009, Human variation in overriding attentional capture. *The Journal of Neuroscience*, **29**, 8726–33.
55. [http://en.wikipedia.org/wiki/Working\\_memory#cite\\_note-18](http://en.wikipedia.org/wiki/Working_memory#cite_note-18) (τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
56. Toga, A.W. and Thompson P.M., 2003, Mapping brain asymmetry. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 37–48.

57. Ross, E.D. and Monnot, M., 2008, Neurology of affective prosody and its functional-anatomic organization in right hemisphere. *Brain Lang.*, **104**, 51–74.
58. [http://en.wikipedia.org/wiki/Lateralization\\_of\\_brain\\_function#cite\\_note-16](http://en.wikipedia.org/wiki/Lateralization_of_brain_function#cite_note-16) (τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
59. [http://www.foundalis.com/dep/cog/N4\\_gr.htm](http://www.foundalis.com/dep/cog/N4_gr.htm) (τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
60. George, M.S., Parekh, P.I., Rosinsky, N., Ketter, T.A., Kimbrell, T.A., Heilman, K.M., Herscovitch, P. and Post, R.M., 1996, Understanding Emotional Prosody Activates Right Hemisphere Regions. *Arch Neurol.*, **53**, 665–670.
61. Goldberg, E., *The New Executive Brain: Frontal Lobes in a Complex World*, 1st ed., Oxford University Press, New York, 2009
62. Dehaene, S., Spelke, E., Pinel, P., Stanescu, R. and Tsivkin S, 1999, Sources of mathematical thinking: behavioral and brain-imaging evidence. *Science*, **284**, 970–4.
63. Dehaene, S., Piazza, M., Pinel, P. and Cohen, L., 2003, Three parietal circuits for number processing. *Cognitive Neuropsychology*, **20**, 487–506.
64. Kandel, E., Schwartz, J. and Jessel, T., *Principles of Neural Science*, 4th ed., McGraw–Hill, New York, 2000, pp.1182.
65. Vallortigara, G. and Rogers, L.J., 2005, Survival with an asymmetrical brain: advantages and disadvantages of cerebral lateralization. *Behav Brain Sci*, **28**, 575–89.
66. Geschwind, N. and Levitsky, W., 1968, Human Brain: Left-Right Asymmetries in Temporal Speech Region. *Science*, **161**, 186-187
67. Bianki, V.L., 1981, Lateralization of functions in the animal brain. *Int J Neurosci*, **15**, 37–47.
68. Gannon, P.J., Holloway, R.L., Broadfield, D.C. and Braun, A.R., 1998, Asymmetry of chimpanzee planum temporale: Humanlike pattern of Wernicke’s brain language area homolog. *Science*, **279**, 220–222.
69. Toga, A.W. and Thompson, P.M., 2003, Mapping brain asymmetry. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 37–48.
70. Samara, A., Vougas, K., Papadopoulou, A., Anastasiadou, E., Baloyanni, N., Paronis, E., Chrousos, G.P., Tsangaris, G.Th., 2010, Proteomics reveal rat hippocampal lateral asymmetry. *Hippocampus*, **00**, 000-000.

71. Sun, T., Patoine, C., Abu-Khalil, A., Visvader, J., Sum, E., Cherry, T.J., Orkin, S.H., Geschwind, D.H. and Walsh, C.A., 2005, Early asymmetry of gene transcription in embryonic human left and right cerebral cortex. *Science*, **308**, 1794–1798.
72. Mody, M., Cao, Y., Cui, Z., Tay, K.Y., Shyong, A., Shimizu, E., Pham, K., Schultz, P., Welsh, D. and Tsien, J.Z., 2001, Genome-wide gene expression profiles of the developing mouse hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 8862–8867.
73. Stead, J.D., Neal, C., Meng, F., Wang, Y., Evans, S., Vazquez, D.M., Watson, S.J. and Akil, H., 2006, Transcriptional profiling of the developing rat brain reveals that the most dramatic regional differentiation in gene expression occurs postpartum. *J Neurosci*, **26**, 345–353.
74. Geschwind, N. and Galaburda, A.M., 1985, Cerebral lateralization. *Arch Neurol*, **42**, 428–459.
75. Chiron, C., Leboyer, M., Leon, F., Jambaque, I., Nuttin, C. and Syrota, A., 1995, SPECT of the brain in childhood autism: Evidence for a lack of normal hemispheric asymmetry. *Dev Med Child Neurol*, **37**, 849–860.
76. Schumann, C.M., Hamstra, J., Goodlin-Jones, B.L., Lotspeich, L.J., Kwon, H., Buonocore, M.H., Lammers, C.R., Reiss, A.L. and Amaral, D.G., 2004, The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. *J Neurosci*, **24**, 6392–6401.
77. Hanlon, F.M., Weisend, M.P., Yeo, R.A., Huang, M., Lee, R.R., Thoma, R.J., Moses, S.N., Paulson, K.M., Miller, G.A. and Canive, J.M., 2005, A specific test of hippocampal deficit in schizophrenia. *Behav Neurosci*, **119**, 863–875.
78. Moskal, R.J., Kroes, A.R., Otto, J.N., Rahimi, O. and Claiborne, J.B., 2006, Distinct patterns of gene expression in the left and right hippocampal formation of developing rats. *Hippocampus*, **16**, 629–634.
79. Denenberg, V.H., 1963, Early experience and emotional development. *Scientific American*, **208**, 138–146.
80. Levine, S., 1962, Plasma-free corticosterone response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science*, **135**, 795–796.
81. Greenbough, W.T., 1975, Experiential modification of the developing brain. *American Scientist*, **63**, 37–46.

82. Brown, A.S., Begg, M.D., Gravenstein, S., Schaefer, C.A., Wyatt, R.J., Bresnahan M., Babulas, V.P. and Susser, E.S., 2004, Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, **61**, 774–780.
83. Mednick, S.A., Machon, R.A., Huttunen, M.O. and Bonett, D., 1988, Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic. *Archives of General Psychiatry*, **45**, 189–192.
84. Miller, M.T., Stromland, K., Ventura, L., Johansson, M., Bandim, J.M. and Gillberg, C., 2005, Autism associated with conditions characterized by developmental errors in early embryogenesis: A mini review. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **23**, 201–219.
85. Revello, M.G. and Gerna, G., 2004, Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *Journal of Clinical Virology*, **29**, 71–83.
86. Lehmann J., Pryce C.R., Bettschen D. and Feldon J., 1999, The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **64**, 705–715.
87. Holmes, A., le Guisquet, A.M., Vogel, E., Millstein, R.A., Leman, S. and Belzung, C., 2005, Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **29**, 1335–1346.
88. Rosenfeld, P. Wetmore, J.B. and Levine, S., 1992, Effects of repeated maternal separations of the adrenocortical response to stress of preweanling rats. *Physiol. Behav.*, **52**, 787-791.
89. Dent, G.W., Okimoto, D.K., Smith, M.S. and Levine, S., 2000, Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny. *Neuroendocrinology*, **71**, 333-342.
90. Matthews, K., Dalley, J.W., Matthews, C., Tsai, T.H. and Robbins, T.W., 2001, Periodic maternal separation of neonatal rats produces region- and gender-specific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain. *Synapse*, **40**, 1-10.
91. Levy, F., Malo, A.I., Galef, B.C., Madden, S. and Fleming, A.S., 2003, Complete maternal deprivation affects social, but not spatial learning in adult rats. *Developmental Psychobiology*, **43**, 177 – 191.

92. Champagne, F.A. and Curley, J.P., 2005, How social experiences influence the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, **15**, 704–709.
93. Fish E.W., Shahrokh D., Bagot R., Caldji C., Bredy T., Szyf M. and Meaney M.J., 2004, Epigenetic Programming of Stress Responses through Variations in Maternal Care. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1036**, 167–180.
94. Levine, S., 1957, Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science*, **126**, 405.
95. Fernandez-Teruel, A., Gimenez-Llorta, L., Escorihuelaa, R. M., Gila, L., Aguilera, R. , Steimerb, T. and Tobena, A., 2002, Early-life handling stimulation and environmental enrichment. Are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **73**, 233–245.
96. Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P.M. and Meaney, M.J., 1998, Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 5335–5340.
97. Francis, D., Diorio, J., Liu, D. and Meaney, M.J., 1999, Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science*, **286**, 1155–1158.
98. Levine, S., 1994, The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann. NY Acad. Sci.*, **746**, 275–288.
99. Stern, J.M., 1997, Offspring-induced nurturance: animal–human parallels. *Dev. Psychobiol*, **31**, 19–37.
100. Cameron, N.M., Champagne, F.A., Parent, C., Fish, E.W., Ozaki-Kuroda, K. and Meaney, M. J., 2005, The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **29**, 843–865.
101. Szyf, M., Weaver I.C.G., Champagne F. A., Diorio J. and Meaney M.J., 2005, Maternal programming of steroid receptor expression and phenotype through DNA methylation in the rat. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **26**, 139–162.
102. Kandel, E.R., Schwartz, J.H. and Jessell, T.M., *Νευροεπιστήμη και Συμπεριφορά*, 3η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2005
103. Santucci, L.B., Daud, M.M., Almeida, S.S. and Oliveira, L.M., 1994, Effects of early protein malnutrition and environmental stimulation upon the reactivity to

- diazepam in two animal models of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, **49**, 393–8.
104. Chapillon P., Patin V., Roy, V., Vincent A. and Caston J., 2002, Effects of Pre- and Post-natal Stimulation on Developmental, Emotional, and Cognitive Aspects in Rodents: A Review. *Developmental Psychobiology*, **41**, 373 – 387.
105. Wasinger, V.C., 1995, Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, **16**, 1090-4.
106. Wilkins, M.R., 1996, From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (NY)*, **14**, 61-5.
107. Wilkins, M.R., 1996, Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*, **13**, 19-50.
108. Tyers, M. and Mann, M., 2003, From genomics to proteomics. *Nature*, **422**, 193-7.
109. Mallick, P. and Kuster, B., 2010, Proteomics: a pragmatic perspective. *Nat Biotechnol*, **28**, 695-709.
110. Collins, F., 2010, Has the revolution arrived? *Nature*, **464**, 674-5.
111. Lefkovits, I., Kettman, J.R. and Frey, J.R., 2000, Global analysis of gene expression in cells of the immune system I. Analytical limitations in obtaining sequence information on polypeptides in two-dimensional gel spots. *Electrophoresis*, **21**, 2688-2693.
112. Krishna, R.G. and Wold, F., 1993, Post-translational modification of proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **67**, 265-98.
113. Aebersold, R. and Mann, M., 2003, Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, **13**, 198-207.
114. Rubin, G.M., 2000, Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*, **287**, 2204-15.
115. Gygi, S.P., 1999, Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, **19**, 1720-30.
116. Lander, E.S., 2001, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921.
117. Fields, S., 2001, Proteomics in genomeland. *Science. Proteomics*, **291**, 1221-4.

- 118.Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A., Principles of instrumental analysis, 5th ed., Saunders College Publishing, Philadelphia, 1998.
- 119.Perkins, D.N., 1999, Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, **20**, 3551-67.
- 120.Hortin, G.L., 2006, Proteomics: a new diagnostic frontier. *Clin Chem*, **52**, 1218-22.
- 121.Pisitkun, T., Johnstone R. and Knepper, M.A., 2006, Discovery of urinary biomarkers. *Mol. Cell Proteomics*, **5**, 1760-1771.
- 122.Choe, L.H. and Lee, K.H., 2000, A comparison of three commercially available isoelectric focusing units for proteome analysis: the multiphor, the IPGphor and the protean IEF cell. *Electrophoresis*, **21**, 993-1000.
- 123.Klose, J. and Kobalz, U., 1995, Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, **16**, 1034-59.
- 124.Fountoulakis, M., 2004, Application of proteomics technologies in the investigation of the brain. *Mass Spectrom Rev.*, **23**, 231-58.
- 125.Renzone, G., D'Ambrosio, C., Arena, S., Rullo, R., Ledda, L., Ferrara, L. and Scaloni, A., 2005, Differential proteomic analysis in the study of prokaryotes stress resistance. *Ann. Ist. Super. Sanita*, **41**, 459-468.
- 126.Ong S.E. and Mann. M., 2005, Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 252-262.
- 127.Gorg, A., Weiss, W. and Dunn. M.J., 2004, Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, **4**, 3665-3685.
- 128.Salzano, A.M. and Crescenzi, M., 2005, Mass spectrometry for protein identification and the study of post translational modifications. *Ann. Ist. Super. Sanita*, **41**, 443-450.
- 129.Guo, Y., Fu, Z. and Van Eyk, J.E., 2007, A proteomic primer for the clinician. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, **4**, 9-17.
- 130.Fletcher, S. and Hamilton, A.D., 2006, Targeting protein-protein interactions by rational design: mimicry of protein surfaces. *J. R. Soc. Interface*, **3**, 215-233.
- 131.Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. and Weiss, W., 2000, The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **21**, 1037-1053.

132. Berkelman, T. and Stenstedt, T., 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradient – Principles and methods, Amersham Biosciences, Edition AB, 2007
133. Monteoliva, L. and Albar, J.P., 2004, Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic*, **3**, 220-239.
134. Hofer, K.G. and Hughes, W.L., 1971, Radiotoxicity of intranuclear tritium, 125 iodine and 131 iodine. *Radiat Res.*, **47**, 94-101.
135. Link, A.J., 1999, Autoradiography of 2-D gels. *Methods Mol Biol.*, **112**, 285-90.
136. Switzer, R.C., Merril, C.R. and Shifrin, S., 1979, A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, **98**, 231-7.
137. Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A. and Ebert, M.H., 1981, Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, **211**, 1437-8.
138. Shevchenko, A., 1996, Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, **68**, 850-8.
139. Riederer BM (2008) Non-covalent and covalent protein labeling in two-dimensional gel electrophoresis. *J Proteomics*. **71**, 231-44.
140. Patton, W.F., 2002, Detection technologies in proteome analysis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **771**, 3-31.
141. Steinberg, T.H., Haugland, R.P. and Singer, V.L., 1996, Applications of SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains. *Anal Biochem*, **239**, 238-45.
142. Steinberg, T.H., Jones, L.J., Haugland, R.P. and Singer, V.L., 1996, SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Anal Biochem*, **239**, 223-37.
143. Steinberg, T.H., White, H.M. and Singer, V.L., 1997, Optimal filter combinations for photographing SYPRO orange or SYPRO red dye-stained gels. *Anal Biochem*, **248**, 168-72.
144. Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M. and Cottrell, J.S., 1999, Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, **20**, 3551-67.
145. Thomson, J.J., 1913, Rays of positive electricity. *Proc R Soc*, **89**, 1-20.
146. J. Roboz, Mass spectrometry in cancer research, CRC PRESS, New York, 2002.



147. Mano, N. and Goto, J., 2003, Biomedical and biological mass spectrometry. *Analytical Sciences*, **19**, 3-14.
148. Bakhtiar, R. and Nelson, R.W., 2001, Mass spectrometry of the proteome. *Mol. Pharmacol.* **60**, 405-415.
149. Reyzer, M.L. and Caprioli, R.M., 2005, MALDI mass spectrometry for direct tissue analysis: a new tool for biomarker discovery. *J. Proteome. Res.*, **4**, 1138-1142.
150. Botting, C.H., 2003, Improved detection of higher molecular weight proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on polytetrafluoroethylene surfaces. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 598-602.
151. McCombie, G. and Knochenmuss, R., 2004, Small-molecule MALDI using the matrix suppression effect to reduce or eliminate matrix background interferences. *Anal Chem.*, **76**, 4990-7.
152. Pechtel, P. and Pizzagalli, D. A., 2011, Effects of early life stress on cognitive and affective function: an integrated review of human literature. *Psychopharmacology (Berl)*, **214**, 55-70.
153. Leh, S.E., Petrides, M. and Strafella, A.P., 2010, The neural circuitry of executive functions in healthy subjects and Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology*, **35**, 70-85.
154. Panagiotaropoulos, T., Diamantopoulou, A., Stamatakis, A., Dimitropoulou, M., and Stylianopoulou, F., 2009, Learning of a T-maze by rat pups when contact with the mother is either permitted or denied. *Neurobiology of Learning and Memory*, **91**, 2-12.
155. Diamantopoulou, A., Stamatakis, A., Panagiotaropoulos, T and Stylianopoulou, F., 2011, Reward or its denial during the neonatal period affects adult spatial memory and hippocampal phosphorylated cAMP response element-binding protein levels of both the neonatal and adult rat. *Neuroscience*, **181**, 89-99.
156. Δημητροπούλου, Μ., Συνεισφορά του ερεθίσματος ανταμοιβής και της αναπαράστασής του στις διαδικασίες χωρικής μάθησης – μνήμης κατά τη νεογνική ηλικία: πειραματική μελέτη σε επίμυς. Αθήνα, 2007, σελ.73-76
157. Bradford, M. M, 1976, 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.

- 158.[http://www3.bio-rad.com/LifeScience/pdf/important\\_factors.pdf](http://www3.bio-rad.com/LifeScience/pdf/important_factors.pdf) (τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
- 159.Daniels, W.M., Pietersen, C.Y., Carstens, M.E. and Stein, D.J., 2004, Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab Brain Dis.*, **19**, 3–14.
- 160.Marais, L., van Rensburg, S.J., van Zyl, J.M., Stein, D.J. and Daniels, W.M., 2008, Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res.*, **61**, 106–12
- 161.Pryce, C.R., Ruedi-Bettschen, D., Dettling, A.C., Weston, A., Russig, H., Ferger, B. and Feldon, J., 2005, Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: potential animal models in depression research. *Neurosci Biobehav.*, **29**, 649–674.
- 162.McManus, C.A., Polden, J., Cotter, D.R., and Dunn, M.J., 2010, Two-dimensional reference map for the basic proteome of the human dorsolateral prefrontal cortex (dlPFC) of the prefrontal lobe region of the brain. *Proteomics*, **10**, 2551-5.
- 163.Piubelli, C., Carboni, L., Becchi, S., Mathé, A.A. and Domenici, E., 2011, Regulation of cytoskeleton machinery, neurogenesis and energy metabolism pathways in a rat gene-environment model of depression revealed by proteomic analysis. *Neuroscience*, **10**, 349-80.
- 164.Martins-de-Souza, D., Guest, P.C., Steeb, H., Pietsch, S., Rahmoune, H., Harris, L.W. and Bahn, S., 2011, Characterizing the proteome of the human dorsolateral prefrontal cortex by shotgun mass spectrometry. *Proteomics*, **11**, 2347-53.
- 165.Schubert, V. and Dotti, C.G., 2007, Transmitting on actin: synaptic control of dendritic architecture. *J Cell Sci*, **120**, 205–212.
- 166.Nakatani, N., Ohnishi, T., Iwamoto, K., Watanabe, A., Iwayama, Y., Yamashita, S., Ishitsuka, Y., Moriyama, K., Nakajima, M., Tatebayashi, Y., Akiyama, H., Higuchi, T., Kato, T. and Yoshikawa, T., 2007, Expression analysis of actin-related genes as an underlying mechanism formood disorders. *Biochem Biophys Res Commun.*, **352**, 780–786.

167. Kojima, N. and Shirao, T., 2007, Synaptic dysfunction and disruption of postsynaptic drebrin-actin complex: a study of neurological disorders accompanied by cognitive deficits. *Neurosci Res.*, **58**, 1–5.
168. Yuan, A., Rao, M.V., Sasaki, T., Chen, Y., Kumar, A., Veeranna, Liem, R.K., Eyer, J., Peterson, A.C., Julien, J.P. and Nixon, R.A., 2006, Alpha-internexin is structurally and functionally associated with the neurofilament triplet proteins in the mature CNS. *J Neurosci.*, **26**, 10006–10019.
169. Suzuki, T., Tian, Q.B., Kuromitsu, J., Kawai, T. and Endo, S., 2007, Characterization of mRNA species that are associated with postsynaptic density fraction by gene chip microarray analysis. *Neurosci Res*, **57**, 61–85.
170. Guest, P.C., Knowles, M.R., Molon-Noblot, S., Salim, K., Smith, D., Murray, F., Laroque, P., Hunt, S.P., De Felipe, C., Rupniak, N.M. and McAllister, G., 2004, Mechanisms of action of the antidepressants fluoxetine and the substance P antagonist L-000760735 are associated with altered neurofilaments and synaptic remodeling. *Brain Res.*, **1002**, 1–10.
171. MacRae, T.H., 1997, Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem.*, **244**, 265-78.
172. Diaz-Nido, J., Serrano, L., Hernández, M. A. and Avila, J., 1990, Phosphorylation of microtubule protein in rat brain at different development stages: Comparison with that found in neuronal cultures. *J. Neurochem.*, **54**, 211 -222.
173. Panda, D., Miller, H.P., Banerjee, A., Luduena, R.F. and Wilson, L., 1994, Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11358–11362.
174. Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Zivny, J. and Vulpe, C.D., 2008, A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics. Déjà vu in proteomics*, **8**, 1744–1749.
175. Berg, D., Holzmann, C. and Riess, O., 2003, 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.*, **4**, 752–762.
176. Sun, L., Bittner, M.A. and Holz, R.W., 2003, Rim, a component of the presynaptic active zone and modulator of exocytosis, binds 14-3-3 through its N terminus. *J Biol Chem.*, **278**, 38301–38309.
177. Altar, C.A., Vawter, M.P. and Ginsberg, S.D., 2009, Target identification for CNS diseases by transcriptional profiling. *Neuropsychopharmacology*, **34**, 18–54.

- 178.English, J.A., Dicker, P., Focking, M., Dunn, M.J. and Cotter, D.R., 2009, 2-  
DDIGE analysis implicates cytoskeletal abnormalities in psychiatric disease.  
*Proteomics*, **9**, 3368–3382.
- 179.Carboni, L., Vighini, M., Piubelli, C., Castelletti, L., Milli, A. and Domenici, E.,  
2006, Proteomic analysis of rat hippocampus and frontal cortex after chronic  
treatment with fluoxetine or putative novel antidepressants: CRF1 and NK1  
receptor antagonists. *Eur Neuropsychopharmacol.*, **116**, 521–537.
- 180.Raftogianni, A., Diamantopoulou, A., Alikaridis, F., Stamatakis, A. and  
Stylianopoulou, F., 2012, Effects of interaction of an early experience of reward  
through maternal contact or its denial with social stress during adolescence on the  
serotonergic system and the stress responsiveness of adult female rats.  
*Neuroscience*, in press.
- 181.Walter, S. and Buchner, J., 2002, Molecular chaperones--cellular machines for  
protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl.*, **41**, 1098-1113.
- 182.Lackie, J.M. and Dow, J.A.T., Λεξικό κυτταρικής και μοριακής βιολογίας, 3η  
Έκδοση Ιατρικές εκδόσεις πασχαλίδης, Αθήνα, 2002, σελ.6-439.
- 183.Marais, L., Hattingh, S.M., Stein, D.J. and Daniels, W.M., 2009, A proteomic  
analysis of the ventral hippocampus of rats subjected to maternal separation and  
escitalopram treatment. *Metab Brain Dis.*, **24**, 569-86.
- 184.Zheng, L., Roeder, R.G. and Luo, Y., 2003, S phase activation of the histone H2B  
promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key  
component. *Cell*, **114**, 255–66.
- 185.Hara, M.R., Agrawal, N. and Kim, S.F., 2005, S-nitrosylated GAPDH initiates  
apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell  
Biol.*, **7**, 665–74.
- 186.Elkhonon, G., *The New Executive Brain: Frontal Lobes in a Complex World*, 1st  
ed., Oxford University Press, New York, 2009.