



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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μηχανισμοί απόπτωσης που επάγονται από το οξειδωτικό στρες σε
καρδιακά κύτταρα θηλαστικών

Δανάη-Δήμητρα Αγγελιδάκη
Α.Μ. 201300002

Επιβλέπουσα: Αικατερίνη Γαϊτανάκη, Καθηγήτρια

ΣΟΦ

ΑΘΗΝΑ 2017

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ενότητα	Αρ. σελίδας
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	ii
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	iii
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Σχετικά με το οξειδωτικό στρες	1
1.2 Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος: η απόπτωση	6
1.3 Σχετικά με τις MAP κινάσες.....	15
1.4 Ο ρόλος της PARP-1 στην τύχη του κυττάρου	19
1.5 Οξειδωτικό στρες και απόπτωση στην καρδιά	21
1.6 Η κουρκουμίνη	23
2. ΣΤΟΧΟΙ	26
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	27
3.1 ΥΛΙΚΑ	27
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
3.2.1 Σχετικά με τις κυτταροκαλλιέργειες.....	30
3.2.2 Ομογενοποίηση των κυττάρων και απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης.....	34
3.2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	35
3.2.4 Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.....	36
3.2.5 Ημι-στεγνή μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	37
3.2.6 Χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με τη χρωστική Ponceau.....	39
3.2.7 Ανάλυση κατά Western	39
3.2.8 Η μέθοδος MTT.....	41
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
4.1 Βελτιστοποίηση μεθόδου	42
4.2 Αποτελέσματα από τη μέθοδο MTT	44
4.3 Αποτελέσματα από την ανάλυση κατά Western	46
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απόπτωση, μία πολύ καλά μελετημένη μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, που επάγεται από το οξειδωτικό στρες στα καρδιακά μυοκύτταρα, φέρεται να είναι αιτία δυσλειτουργιών που οδηγούν σε παθολογία της καρδιάς. Το οξειδωτικό στρες στην καρδιά μπορεί να οφείλεται τόσο σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όσο και σε χημικούς, όπως είναι διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διερευνήσει τα σηματοδοτικά μονοπάτια της απόπτωσης που επάγονται από το οξειδωτικό στρες σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2, αλλά και πιθανούς τρόπους αναστολής τους. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ως οξειδωτικός παράγοντας η κουρκουμίνη, η οποία, όπως βρέθηκε στο παρελθόν και επιβεβαιώθηκε ξανά από τα αποτελέσματα των πειραμάτων που περιλαμβάνονται εδώ, σε μεγάλες συγκεντρώσεις οδηγεί σε οξειδωτική βλάβη και θάνατο των κυττάρων μέσω της απόπτωσης. Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας της κουρκουμίνης 50μΜ στους καρδιακούς μυοβλάστες έγινε με τη μέθοδο MTT, ενώ η διερεύνηση της μεταβολής των επιπέδων των πρωτεϊνών p-Bcl-2 και Bax που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια της απόπτωσης, αλλά και της θραύσης της πρωτεΐνης PARP, πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση κατά Western. Τα αποτελέσματα αυτών των δύο μεθόδων συνάδουν σε μεγάλο βαθμό με άλλα παλαιότερα που προέκυψαν μετά από έκθεση των καρδιακών μυοβλαστών σε μεγάλες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης. Στη συνέχεια, έγινε χρήση αναστολέων καναλιών Ca^{2+} , άλλων καναλιών ιόντων και μορίων που συμμετέχουν στη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, καθώς και αναστολέων των MAPKs, προκειμένου να εξακριβωθεί εάν αυτά τα κυτταρικά συστατικά εμπλέκονται στην απόπτωση που επάγεται από την κουρκουμίνη 50μΜ, κάτι που δεν είχε διερευνηθεί στο παρελθόν. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση κατά Western ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά και μας οδήγησαν στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην απόπτωση που επάγεται από το οξειδωτικό στρες της κουρκουμίνης.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε κατά το 4ο και τελευταίο έτος των προπτυχιακών σπουδών μου στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Ο κυτταρικός θάνατος, και ειδικότερα τα σηματοδοτικά μονοπάτια της απόπτωσης, αλλά και εν γένει η μελέτη σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες, και επηρεάζουν κατά συνέπεια την φυσιολογία του οργανισμού, είναι κομμάτια της βιολογίας που με συναρπάζουν και θεωρώ ότι και τα επόμενα χρόνια θα μου ασκούν την ίδια γοητεία.

Η ερευνητική πτυχιακή εργασία είναι ίσως ένα από τα σημαντικότερα και ουσιαστικότερα μαθήματα αυτής της σχολής, καθώς ο φοιτητής καλείται να εφαρμόσει την γνώση των προηγούμενων ετών, αλλά και να αναζητήσει νέα και πιο εξειδικευμένα σε σύγχρονες πηγές, πέρα από την βασική ύλη του προγράμματος σπουδών. Θεωρώ ότι αυτή η εργασία με βοήθησε να μάθω πώς να αναζητώ αποτελεσματικότερα αυτή τη γνώση και πώς να αξιολογώ την ποιότητα των αποτελεσμάτων που δημοσιεύονται ανά διαστήματα, όπως και την ποιότητα των δικών μου αποτελεσμάτων. Επιπλέον, το εργαστηριακό κομμάτι συνέβαλε στο να αποκτήσω πολύτιμη εμπειρία αλλά και να βελτιωθώ στην ομαδική δουλειά, αποκτώντας περισσότερη αυτοπεποίθηση για τις ικανότητές μου. Τέλος, έμαθα να είμαι πιο προσεκτική και πειθαρχημένη στην εκτέλεση των πειραμάτων. Όλα αυτά, πέραν του ότι ήταν καθοριστικά στην εξέλιξή μου ως άτομο και υποψήφια επιστήμονα, θεωρώ ότι θα είναι ιδιαίτερα χρήσιμα σε όποιον χώρο εργασίας και να βρεθώ στο μέλλον.

Στο τέλος αυτών των δημιουργικών μηνών, κατά τους οποίους εκπόνησα την παρούσα εργασία, θέλω να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κ. Αικατερίνη Γαϊτανάκη που με εμπιστεύθηκε ώστε να μου αναθέσει αυτό το θέμα, με καθοδηγούσε διαρκώς καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων και αξιολογούσε δίκαια την πρόοδό μου. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω την επίκουρη καθηγήτρια κ. Ιωάννα Αγγελή, η οποία από την αρχή στάθηκε κοντά μου και μου έμαθε όσα χρειαζόμουν, ενώ με αμέριστη προσοχή και υπομονή δεχόταν όλα τα λάθη, τις ανασφάλειες και τους προβληματισμούς μου. Επιπλέον, πρέπει να ευχαριστήσω τα κορίτσια με τα οποία μοιραστήκαμε αυτόν τον καιρό το ίδιο εργαστήριο, χωρίς τη συντροφιά τους και την υποστήριξη των οποίων θα ήταν όλα πιο δύσκολα. Τέλος, ευχαριστώ όλους τους ανθρώπους του τομέα φυσιολογίας ζώων και ανθρώπου που συνέβαλλαν περισσότερο ή λιγότερο με οτιδήποτε χρειαζόμουν για φέρω εις πέρας αυτήν την εργασία.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

(d)ATP	(Deoxy)Adenosine TriPhosphate	τριφωσφορική (δεοξυ)αδενοσίνη
(A)MI	(Acute) Myocardial Infarction	(οξύ) έμφραγμα του μυοκαρδίου
ADP	Adenosine DiPhosphate	διφωσφορική αδενοσίνη
AIF	Apoptosis Inducing Factor	παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης
AMP	Adenosine MonoPhosphate	μονοφωσφορική αδενοσίνη
AP-1	Activator Protein 1	ενεργοποιός πρωτεΐνη 1
Apaf1	Apoptotic Protease Activating Factor 1	παράγοντας ενεργοποίησης αποπτωτικών πρωτεασών
Bak	Bcl-2 homologous Antagonist/Killer	ομόλογη της Bcl-2 ανταγωνιστική/φονική πρωτεΐνη
Bax	Bcl-2-Associated X protein	πρωτεΐνη X που σχετίζεται με την Bcl-2
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	λέμφωμα 2 των B κυττάρων
BDMC	methoxycurcumin	μεθοξικουρκουμίνη
Bid	BH3 interacting-domain death agonist	αγωνιστής θανάτου με περιοχή που αλληλεπιδρά με BH3
CAD	caspase-activated nuclease	νουκλεάση ενεργοποιούμενη από τις κασπάσες
CARD	CAspase-Recruitment Domain	δομική περιοχή στρατολόγησης κασπασών
cGMP	cyclic Guanosine MonoPhosphate	κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη
DD	Death Domain	αυτοτελής δομική περιοχή θανάτου
DED	death-effector domain	περιοχή τελεστή θανάτου
Diablo	Direct IAP Binding protein with LOw pI	πρωτεΐνη που προσδέεται άμεσα στο IAP με χαμηλό pI
DISC	Death-Inducing Signaling Complex	θανατο - επαγόμενο σύμπλοκο σηματοδότησης
DMC	demethoxycurcumin	διμεθοξικουρκουμίνη
DNA	DeoxyriboNucleic Acid	δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DR5	Death Receptor 5	υποδοχέας θανάτου 5
EGF	Epidermal Growth Factor	επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase	πρωτεϊνική κινάση που ρυθμίζεται από εξωκυτταρικά σήματα
ETC	Electron Transport Chain	αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων
FADD	Fas-associated protein with death domain	σχετιζόμενη με τον Fas πρωτεΐνη με DD
Fas	apoptosis-stimulating fragment	θραύσμα που διεγείρει την απόπτωση
FLICE	FADD-like IL-1beta-converting enzyme	ένζυμο βήτα μετατροπής της ιντερλευκίνης 1 σαν τον FADD
FLIP	FLICE-like Inhibitory Protein	ανασταλτική πρωτεΐνη σαν τη FLICE
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2	υποδοχέας 2 ανθρώπινου αυξητικού παράγοντα
HIF-1 α	hypoxia inducible factor 1 α	παράγοντας 1 α που επάγεται από υποξία
HtrA2	High temperature requirement protein A2	πρωτεΐνη A2 που απαιτεί υψηλή θερμοκρασία
IHD	Ischemic Heart Disease	ισχαιμική καρδιοπάθεια
IRI	ischemia/reperfusion injury	βλάβη από ισχαιμία/επαναιμάτωση
JAK	Janus Kinase	κινάση του Ιανού

JNK	c-Jun N-terminal kinase	κινάση του αμινοτελικού άκρου της c-Jun
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase	πρωτεϊνικές κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα
MDA	malondialdehyde	μαλονδιαλδεΐδη
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization	αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης
MPT	Mitochondrial Permeability Transition	μιτοχονδριακή μετάπτωση διαπερατότητας
NAD(P)	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate)	νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	πυρηνικός παράγοντας ενισχυτής της κ-ελαφριάς αλυσίδας των ενεργοποιημένων B κυττάρων
PARG	poly(ADP-ribose) glycohydrolase	γλυκοϋδρολάση της πολυ(ADP-ριβόζης)
PARP	poly(ADP-ribose) polymerase	πολυμεράση πολυ(ADP-ριβόζης)
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	κινάση των φωσφοϊνοσιτιδίων 3
PKA/C	Protein Kinase A/C	πρωτεϊνική κινάση A/C
PTP	Permeability Transision Pore	πόρος μετάπτωσης διαπερατότητας
ROS	Reactive Oxygen Species	δραστικές μορφές οξυγόνου
SFKs	Src family of protein tyrosine kinases	Src οικογένεια κινασών τυροσίνης
Smac	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases	δεύτερος ενεργοποιητής των κασπασών προερχόμενος από τα μιτοχόνδρια
SOD	SuperOxide Dismutase	σουπεροξειδική δισμουτάση
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription	μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής
TCGF	T-cell Growth Factor	αυξητικός παράγοντας T κυττάρων
TNF(R)	Tumor Necrosis Factor Receptor	(υποδοχέας) παράγοντα νέκρωσης όγκων
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand	σχετιζόμενος με τον TNF προσδέτης που επάγει την απόπτωση
UV	Ultraviolet	υπεριώδης
VDAC-ANT-CyP-D	voltage-dependent anion channel-adenine nucleotide translocase-cyclophilin D	εξαρτώμενο από το δυναμικό κανάλι ανιόντων- μεταφοράση νουκλεοτιδίου αδενίνης- κυκλοφιλίνη D
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis	X-συνδεδεμένος αναστολέας της απόπτωσης

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

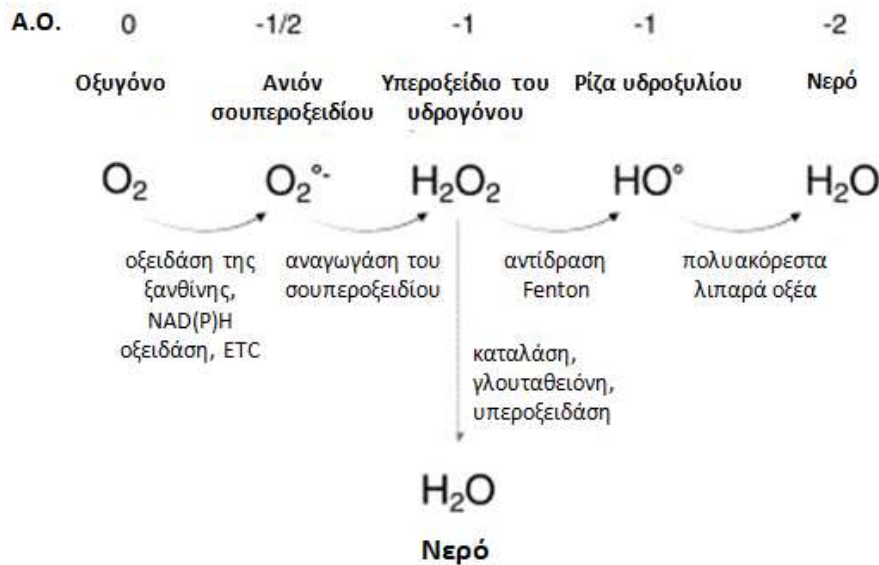
1.1 Σχετικά με το οξειδωτικό στρες

Ο όρος «ελεύθερες ρίζες» (free radicals) αναφέρεται σε οποιοδήποτε χημικό στοιχείο περιέχει αζευγάρωτα ηλεκτρόνια, τα οποία αυξάνουν την χημική αντιδραστικότητα του. Κοινά παραδείγματα ελεύθερων ριζών οξυγόνου, ή δραστικών μορφών οξυγόνου [ROS, Reactive Oxygen Species], αποτελούν η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) και το ανιόν του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2\cdot^-$, Εικόνα 1.1), ενώ το μονοξειδίο του αζώτου ($\text{NO}\cdot$) είναι αντίστοιχα μία δραστική ελεύθερη ρίζα αζώτου. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από πολλές διαφορετικές βιοχημικές διαδικασίες στο σώμα. Επίσης, μπορεί να αποτελούν παραπροϊόντα χημικών αντιδράσεων, όπως είναι η οξείδωση των κατεχολαμινών και η ενεργοποίηση των ηλεκτρονίων που αποτελούν προϊόντα του καταρράκτη οξείδωσης του αραχιδονικού οξέος, τα οποία ανάγουν το μοριακό οξυγόνο σε σουπεροξειδίο. Το σουπεροξειδίο και το υποχλωριώδες οξύ παράγονται κατά την ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων, το μονοξειδίο του αζώτου παράγεται από το αγγειακό ενδοθήλιο και άλλα κύτταρα. Εκτός αυτών, ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν ως απόκριση στην ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, όπως είναι οι ακτίνες γάμμα, οι οποίες μπορούν να διασπάσουν το νερό για να δώσουν ρίζες υδροξυλίου (Betteridge 2000).

Ο όρος «ελεύθερες ρίζες» χρησιμοποιείται συχνά με πολύ ευρεία έννοια και περιλαμβάνει επίσης συγγενείς δραστικές μορφές, όπως διεγερμένες καταστάσεις που οδηγούν σε γένεση ελεύθερων ριζών ή αυτές τις μορφές που προκύπτουν από αντιδράσεις μεταξύ ελεύθερων ριζών (Devasagayam και συν. 2004). Όταν δύο ελεύθερες ρίζες συναντηθούν, τα αζευγάρωτα ηλεκτρόνιά τους μπορούν να έρθουν κοντά και να φτιάξουν έναν ομοιοπολικό δεσμό. Έτσι, το σουπεροξειδίο και το νιτρικό οξύ μπορούν να συνδυαστούν: $\text{O}_2\cdot^- + \text{NO}\cdot \rightarrow \text{ONOO}^-$. Σε φυσιολογικό pH, το υπεροξυνιτρικό ανιόν (ONOO^-) προκαλεί άμεση βλάβη στις πρωτεΐνες και διασπάται σε τοξικά προϊόντα που περιλαμβάνουν το αέριο διοξειδίο του αζώτου ($\text{NO}_2\cdot$) και την ρίζα υδροξυλίου (Halliwell 1994).

Στους ζωντανούς οργανισμούς, κάτω από αερόβιες συνθήκες, περισσότερο από το 90% του οξυγόνου που καταναλώνεται ανάγεται απευθείας σε νερό από την κυτοχρωμική οξειδάση στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων [ETC, Electron Transport Chain], μέσω μηχανισμών μεταφοράς τεσσάρων ηλεκτρονίων και χωρίς έκλυση δραστικών ριζών οξυγόνου. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, το σύστημα αντιπροσωπεύεται από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων που τοποθετείται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η λειτουργία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι συζευγμένη με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, προκειμένου να παραχθεί ενέργεια με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης [ATP, adenosine

triphosphate]. Λιγότερο από το 10% του οξυγόνου που καταναλώνεται ανάγεται μέσω διαδοχικών μονοπατιών ενός ηλεκτρονίου, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή του μοριακού οξυγόνου σε ρίζα σουπεροξειδίου, που ακολουθείται από την αναγωγή του κατά ένα ηλεκτρόνιο και την επακόλουθη πρόσληψη δύο πρωτονίων, ώστε να αποδώσει υπεροξείδιο του υδρογόνου (Lushchak 2014). Η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα είναι η κύρια πηγή ενδοκυτταρικής παραγωγής ROS (βλ. Εικόνα 1.2) και, την ίδια στιγμή, ένας σημαντικός στόχος των καταστροφικών δράσεων των δραστικών μορφών οξυγόνου (Ott και συν. 2007).



Εικόνα 1.1 Η διαδοχική αναγωγή του μοριακού οξυγόνου αποδίδει δραστικές μορφές. Στο πρώτο βήμα, η μετατροπή του μοριακού οξυγόνου σε σουπεροξειδίου είναι ενδόθερμη. Τα επόμενα βήματα είναι εξώθερμα. Τα ένζυμα για την μετατροπή του οξυγόνου σε ρίζα σουπεροξειδίου και η περαιτέρω μετατροπή σε υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι γνωστές. Οι ελεύθερες ρίζες του υδροξυλίου είναι δυνατόν να σχηματιστούν μόνο με την παρουσία ιόντων μετάλλων, κυρίως σιδήρου (αντίδραση Fenton). Η αναγωγή της ρίζας υδροξυλίου προς νερό γίνεται χωρίς ένζυμα. AO, αριθμός οξειδωσίας του οξυγόνου, ETC, αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. (Προσαρμογή από Bienert και συν. 2006)

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) ανήκει στις δραστικές μορφές οξυγόνου που δεν είναι ρίζες και λόγω της ομοιότητας των χημικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων του με αυτές του νερού (H_2O), φαίνεται ότι μπορεί να χρησιμοποιεί τα κανάλια νερού-ακουαπορίνες, προκειμένου να διασχίζει την κυτταρική μεμβράνη γρηγορότερα σε σχέση με την απλή διάχυση. Συγκεκριμένες ακουαπορίνες, που αναφέρονται ως υπεροξειπορίνες, διευκολύνουν την διάχυση του H_2O_2 διαμέσου των μεμβρανών (Sies 2014). Αποτελεί ένα ισχυρό οξειδωτικό ως δέκτης δύο ηλεκτρονίων. Παρόλο αυτά, σε αντίθεση με τις δύο αυτές δραστικές μορφές, το H_2O_2 αντιδρά ασθενώς ή καθόλου με τα περισσότερα βιολογικά μόρια, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών μικρού μοριακού βάρους. Αυτό συμβαίνει διότι οι αντιδράσεις του H_2O_2 είναι περισσότερο κινητικά παρά θερμοδυναμικά υποκινούμενες (Winterbourn 2013). Είναι

ασθενές οξειδωτικό ενός ηλεκτρονίου, ωστόσο μπορεί να μετατραπεί σε άλλες πιο δραστικές μορφές με διάφορους τρόπους. Επηρεάζοντας άμεσα άλλα οξειδοαναγωγικά συστήματα, όπως τα NAD(P)H/ NAD(P)⁺, ασκορβικό/ διυδροασκορβικό, γλουταθειόνη/ οξειδωμένη γλουταθειόνη,θειορεδοξίνη/ οξειδωμένη θειορεδοξίνη και πρωτεΐνη-SH/ πρωτεΐνη-SS-R, το υπεροξείδιο του υδρογόνου θεωρείται ότι ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη, τον κυτταρικό θάνατο και την μεταγωγή σήματος (Bienert και συν. 2006).

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στο παρελθόν είχαν χαρακτηριστεί ως οι κύριοι παράγοντες για την πρόκληση μεγάλης καταστροφής στα κύτταρα, μεταλλαξογένεσης, καρκίνου, αλλά και της εκφυλιστικής διαδικασίας της ανθρώπινης γήρανσης (Dröge 2002). Ωστόσο, στη συνέχεια έγινε γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες παίζουν ρόλο και στην ενδοκυτταρική σηματοδότη, καθώς μπορούν να επάγουν τη σύνθεση άλλων σηματοδοτικών μορίων, όπως του δεύτερου αγγελιαφόρου κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης [cGMP, cyclic guanosine monophosphate], από τη σουπεροξειδική δισμουτάση και τη ρίζα υδροξυλίου, ή του αυξητικού παράγοντα των T κυττάρων [TCGF, T-cell Growth Factor] από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Mittal και Murad 1977· Roth και Dröge 1987).

Το οξειδωτικό στρες (oxidative stress) έχει προσδιορισθεί ως η διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών άμυνας των κυττάρων (Betteridge 2000). Εάν η άμυνα είναι ανεπαρκής, τότε μπορεί να προκληθεί βλάβη σε πλήθος ιστών. Δεδομένης της μεγάλης ποικιλίας των προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ενζύμων και ενώσεων, έχουν γίνει προσπάθειες ταξινόμησης των υπομορφών του οξειδωτικού στρες, καθώς και εισαγωγής κλιμάκων έντασης, οι οποίες κυμαίνονται από το φυσιολογικό οξειδωτικό στρες, στο εκτεταμένο και τοξικό οξειδωτικό φορτίο (Sies 2015). Ο επικαιροποιημένος ορισμός του οξειδωτικού στρες είναι «η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών, η οποία οδηγεί σε αποδιοργάνωση της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου και/ή σε μοριακή βλάβη» (Sies και Jones 2007).

Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες στα κυτταρικά συστατικά είναι ποικίλες. Καταρχάς, τα μιτοχόνδρια αποτελούν ταυτόχρονα και τα κύρια σημεία παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου ενδοκυτταρικά, αλλά και πολύ καλοί στόχοι της ζημιογόνου οξειδωτικής δράσης αυτών. Όσον αφορά στο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ [DNA, Deoxyribonucleic Acid], η οξειδωτική βλάβη προκαλεί τροποποιήσεις των βάσεων πουρινών και πυριμιδινών, καθώς και του σκελετού της δεοξυριβόζης, θραύση του ενός ή και των δύο αλυσίδων όπως και διασυνδέσεις με άλλα μόρια (Ott και συν. 2007). Σαφώς, ένας σημαντικός για την φυσιολογία του κυττάρου στόχος των ROS είναι το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), το οποίο κωδικοποιεί για μόρια RNA που παίζουν κρίσιμο ρόλο στη σύνθεση των ενζύμων που ευθύνονται για την

μεταφορά ηλεκτρονίων και την σύνθεση ATP κατά την οξειδωτική φωσφορλίωση.

Εκτός από το DNA, το οξειδωτικό στρες αποδεικνύεται βλαβερό και για μία σειρά άλλων μορίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα σάκχαρα, όπως το υαλουρονικό οξύ (Sies 1986). Ένας σημαντικός μηχανισμός της τοξικότητας του $O_2^{\bullet-}$ είναι η άμεση οξείδωση και η απενεργοποίηση των πρωτεϊνών σιδήρου-θείου (Fe-S), όπως οι ακονιτάσες (aconitases), και η σχετιζόμενη με αυτήν απελευθέρωση σιδήρου (Fridovich 1997). Η απενεργοποίηση της μιτοχονδριακής ακονιτάσης μπορεί να έχει τουλάχιστον δύο βασικές συνέπειες. Πρώτον, ο σχηματισμός ενός ανενεργού συμπλόκου $[3Fe-4S]^+$ έχει ως αποτέλεσμα την ταυτόχρονη απελευθέρωση Fe^{2+} και H_2O_2 . Στην πράξη, η μεσολαβούμενη από το $O_2^{\bullet-}$ απενεργοποίηση των ενζύμων που περιέχουν Fe-S μπορεί να αποτελεί ένα σημαντικό οξειδωτικό βάρος, καθώς παρέχει ισομοριακές ποσότητες H_2O_2 ανά mole του $O_2^{\bullet-}$ (Merenyi και Lind 1998). Η απελευθέρωση των Fe^{2+} και H_2O_2 , συστατικών των αντιδράσεων Haber-Weiss και Fenton, μπορεί επίσης να έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία του ισχυρού ανιόντος υδροξυλίου, το οποίο μπορεί να οξειδώσει τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, το DNA και λιπίδια, και ως εκ τούτου να ενισχύσει την οξειδωτική βλάβη που ξεκίνησε το $O_2^{\bullet-}$. Το εάν η απενεργοποίηση της ακονιτάσης έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ελεύθερων ριζών και τοξικότητα *in vivo*, παραμένει άγνωστο.

Η μιτοχονδριακή ακονιτάση παίζει κομβικό ρόλο στον κύκλο του Krebs, καταλύοντας τη μετατροπή του κιτρικού σε ισοκιτρικό. Αναστολή της μιτοχονδριακής ακονιτάσης, ακόμη και μερική, θα μπορούσε να προκαλέσει δυσλειτουργία του κύκλου του Krebs και να έχει επίδραση στην παραγωγή ενέργειας και τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Έχει βρεθεί περαιτέρω ότι η μιτοχονδριακή ακονιτάση σχετίζεται με συγκεκριμένα σύμπλοκα πρωτεϊνών-mtDNA, τα οποία καλούνται νουκλεοειδή. Σε αυτή την περίπτωση, η ακονιτάση λειτουργεί έτσι ώστε να σταθεροποιεί το mtDNA, πιθανόν με αναστρεπτή αναδιαμόρφωση των νουκλεοειδών, ώστε να επηρεάζουν άμεσα την έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων σε απόκριση των αλλαγών στον κυτταρικό μεταβολισμό (Chen και συν. 2005). Επιπροσθέτως, το $O_2^{\bullet-}$ μπορεί να απενεργοποιήσει αρκετές ακόμη πρωτεΐνες σιδήρου-θείου, όπως το Σύμπλοκο I αφυδρογονάση του ανηγμένου νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου [NAD, Nicotinamide adenine dinucleotide] (NADH dehydrogenase) –έχει αποκαλυφθεί μία ήπια δραστηριότητα έναντι της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (Cadenas και Davies 2000). Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αναγνωρίζονται από τις πρωτεάσες και αποικοδομούνται, ενώ τα πρωτεϊνικά μόρια που θα τις αντικαταστήσουν πρέπει να συντεθούν *de novo*.

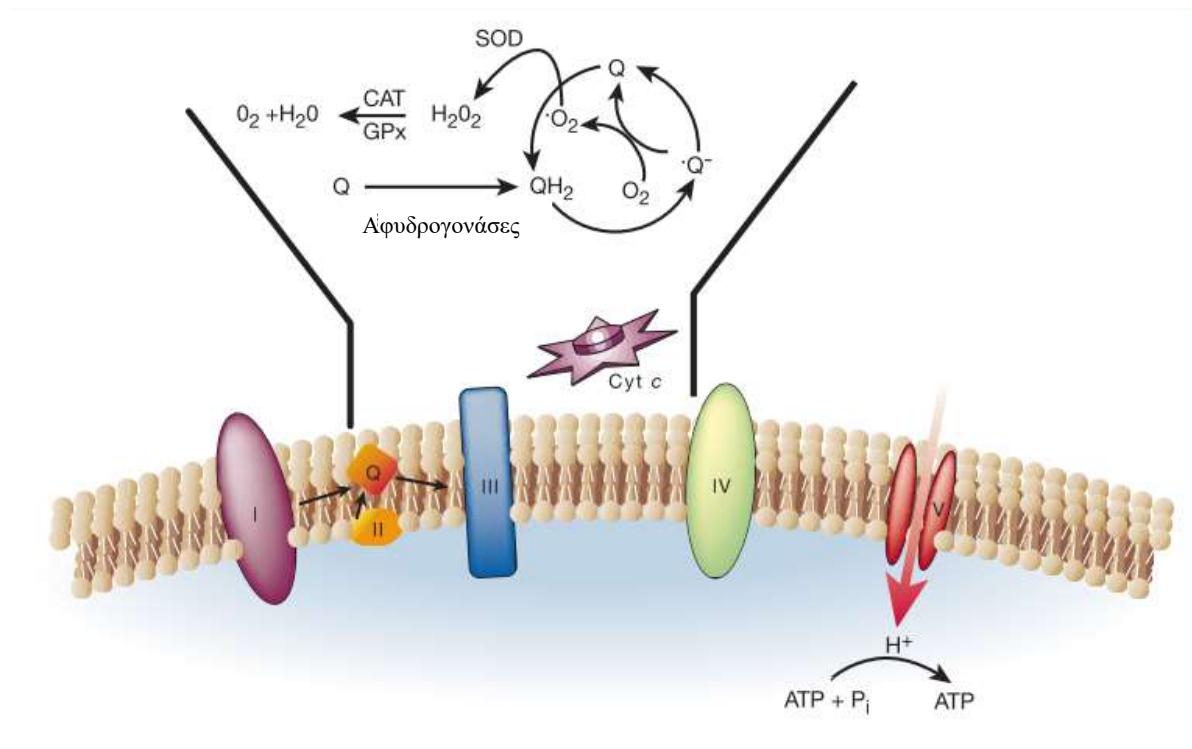
Ο σχηματισμός των ROS και η διέγερση της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων στα μιτοχόνδρια μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή του μιτοχονδριακού μεταβολισμού. Η υπεροξειδωσία των λιπιδίων επηρεάζει ζωτικές μιτοχονδριακές λειτουργίες, όπως η αναπνοή και η οξειδωτική

φωσφορλίωση, οι ιδιότητες φραγμού της εσωτερικής μεμβράνης, η διατήρηση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού ($\Delta\psi$) και η ρυθμιστική ικανότητα των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) στο μιτοχόνδριο (Zhang και συν. 1990· Bacon και συν. 1993· Albano και συν. 1991). Η υπεροξειδωση των μιτοχονδριακών λιπιδίων μπορεί να βλάψει την λειτουργία των μεμβρανών ως φραγμών, μέσω αλληλεπίδρασης είτε απευθείας με τις πρωτεΐνες και/ή έμμεσα με τις λιπιδικές ομάδες της μεμβράνης (Chen και συν. 1995).

Μία πιθανόν δηλητηριώδης επίδραση της παραγωγής των ROS στα μιτοχόνδρια είναι η διευκόλυνση της εξαρτώμενης από τα Ca^{2+} μιτοχονδριακής μετάπτωσης διαπερατότητας [MPT, mitochondrial permeability transition], η οποία παίζει κομβικό ρόλο σε συγκεκριμένους τύπους κυτταρικού θανάτου. Πέραν της παραγωγής ATP στα αερόβια κύτταρα, τα μιτοχόνδρια παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ρύθμιση της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης του Ca^{2+} . Τα μιτοχόνδρια μπορούν να προσλάβουν και να διατηρήσουν το Ca^{2+} , όμως η χωρητικότητά τους είναι περιορισμένη. Εάν το συσσωρευμένο Ca^{2+} ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο όριο, τότε απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια με άνοιγμα ενός πρωτεϊνικού καναλιού, το οποίο είναι γνωστό ως πόρος μετάπτωσης διαπερατότητας [PTP, permeability transition pore]. Η εκροή των Ca^{2+} , σε συνδυασμό με άλλα συστατικά της μήτρας, διαταράσσει την ομοιόσταση της διαλυμένης ουσίας και προκαλεί δραστικές αλλαγές στην μιτοχονδριακή υπερδομή και λειτουργική δραστηριότητα (Orrenius και συν. 2003). Το κατώφλι των Ca^{2+} για την MPT μειώνεται όταν η απομόνωση των Ca^{2+} συνοδεύεται από οξειδωτικό στρες και εξάντληση των νουκλεοτιδίων αδενίνης. Καθώς το οξειδωτικό στρες ευαισθητοποιεί αξιοσημείωτα τα μιτοχόνδρια προς την επαγωγή MPT, έχει προταθεί ότι οι μιτοχονδριακά δημιουργούμενες ROS εμπλέκονται άμεσα στην επαγωγή MPT (Kowaltowski και συν. 1996). Η επικρατούσα υπόθεση είναι ότι ο πόρος MPT είναι ένα σύμπλεγμα πολυμερών, που αποτελείται από κανάλι εξαρτώμενο από το δυναμικό- μεταφοράση νουκλεοτιδίου αδενίνης- κυκλοφιλίνη D [VDAC-ANT-CyP-D, voltage-dependent anion channel- adenine nucleotide translocase- cyclophilin D]. Αυτό το σύμπλοκο εντοπίζεται σε περιοχές που βρίσκονται σε επαφή ανάμεσα στην εσωτερική και την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Beutner και συν. 1996). Επιπλέον, άλλες πρωτεΐνες μπορεί να προσδένονται στο σύμπλοκο του πόρου, κυρίως κινάσες (π.χ. η κινάση της κρεατίνης). Ο ρόλος του VDAC ως στόχος των ROS είναι ασαφής, αν και έχει φανεί ότι τα $\text{O}_2\cdot^-$ ελέγχουν το άνοιγμα του VDAC που έχει ανασυσταθεί σε λιποσώματα, προκαλώντας απελευθέρωση του παγιδευμένου κυτοχρώματος c (cytochrome c) (Madesh και Hajnóczky 2001 -ο ρόλος του κυτοχρώματος c στον κυτταρικό θάνατο αναλύεται παρακάτω).

Έτσι, το οξειδωτικό στρες και η κατεστραμμένη ομοιόσταση των Ca^{2+} συνεισφέρουν στη μεσολαβούμενη από τα μιτοχόνδρια κυτταρική βλάβη. Η MPT έχει ως αποτέλεσμα την μιτοχονδριακή βλάβη, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε νέκρωση μέσω εξάντλησης των

αποθεμάτων του ATP, ή σε μεσολαβούμενη από τις κασπάσες απόπτωση, εάν η επαγωγή της MTP συμβεί σε έναν υποπληθυσμό των μιτοχονδρίων και τα οργανίδια που απομένουν είναι ακόμη ικανά να διατηρήσουν το μεμβρανικό τους δυναμικό και να παράγουν ATP, ώστε να υποστηρίξουν την αποπτωτική διαδικασία.



Εικόνα 1.2 Το σύμπλεγμα III είναι η κύρια πηγή της μιτοχονδριακής παραγωγής ROS. Τα ηλεκτρόνια από το σύμπλοκο I ή II αφυδρογονασών μεταφέρονται στο συνένζυμο Q, γνωστό και ως ουβικινόνη (ubiquinone). Η ανηγμένη μορφή που προκύπτει (QH₂) του συνενζύμου Q υφίσταται δύο διαδοχικές αναγωγές του ενός ηλεκτρονίου (τον κύκλο Q), χρησιμοποιώντας οξειδωμένες και ανηγμένες μορφές του κυτοχρώματος b και του κυτοχρώματος c. Το ασταθές ενδιάμεσο του κύκλου Q μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό σουπεροξειδίου με απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο. Άπαξ και δημιουργηθεί, το σουπεροξειδίου μπορεί να οξειδοαναχθεί ενζυματικά από την οξειδοαναγωγή του σουπεροξειδίου (SOD) ώστε να σχηματίσει υπεροξειδίου του υδρογόνου που, με τη σειρά του, μεταβολίζεται από ένζυμα όπως η καταλάση (CAT) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (GPx), παράγοντας νερό και μοριακό οξυγόνο. Η παραγωγή του σουπεροξειδίου δεν είναι ενζυμική κι έτσι όσο μεγαλύτερος είναι ο ρυθμός μεταβολισμού, τόσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή των ROS. [ROS, reactive oxygen species, SOD, superoxide dismutase, CAT, catalase, GPx, glutathione reductase] (Προσαρμογή από Finkel και Holbrook 2000)

1.2 Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος: η απόπτωση

Το φαινόμενο του κυτταρικού θανάτου είναι αντικείμενο έντονης έρευνας. Η σχετική ονοματολογία ολοένα και αυξάνεται, καθώς περισσότερα στοιχεία έρχονται στο φως σχετικά με τις πολλαπλές και διακριτές πορείες, μέσω των οποίων μπορεί να πεθάνει ένα κύτταρο (Fotokun και συν. 2014). Προκειμένου να γίνει προσδιορισμός του τύπου του κυτταρικού θανάτου χρησιμοποιούνται μορφολογικά, ενζυμολογικά, λειτουργικά, βιοχημικά και

ανοσολογικά χαρακτηριστικά (Galluzzi και συν. 2012· Kroemer και συν. 2009). Με βάση την μορφολογική εμφάνιση, η απόπτωση (apoptosis) και η νέκρωση (necrosis) περιγράφηκαν ως δύο διαφορετικά μονοπάτια κυτταρικού θανάτου. Η απόπτωση είναι μία ενεργός μορφή κυτταρικού θανάτου. Είναι σε μεγάλο βαθμό προγραμματισμένη και, με κάποιες εξαιρέσεις, ιδιαίτερα συντηρημένη ανάμεσα στους οργανισμούς (Chew και συν. 2009), αλλά και απαραίτητη για την σωστή ανάπτυξη του οργανισμού. Η νέκρωση είναι συνήθως μία παθητική διεργασία, αρχικά μάλιστα θεωρούνταν μη ρυθμιζόμενη και τυχαία, αλλά φαίνεται ότι περιλαμβάνει προγραμματιζόμενα στοιχεία σε κάποιες περιπτώσεις (π.χ. νεκρόπτωση - necroptosis) (Lorenzo and Susin 2007).

Υπάρχουν επίσης πολύ περισσότερο λεπτομερείς όροι για την περιγραφή των μορφών του κυτταρικού θανάτου, συμπεριλαμβανομένης της ανοικίας (anoikis, Frisch και Ruoslahti 1997), του αυτοφαγικού κυτταρικού θανάτου, του εσωτερικού μονοπατιού της εξαρτώμενης από τις κασπάσες απόπτωσης, του εσωτερικού μονοπατιού της ανεξάρτητης από τις κασπάσες απόπτωσης, της ρυθμιζόμενης νέκρωσης, την κερατινοποίησης (cornification), της έντοσης (entosis) (Mormone και συν. 2006), του εξωτερικού μονοπατιού απόπτωσης μέσω υποδοχέων θανάτου, του εξωτερικού μονοπατιού απόπτωσης από εξαρτώμενους υποδοχείς, της μιτωτικής καταστροφής, της νέτωσης (netosis), της πυρόπτωσης (pyroptosis) και του παρθάνατου (parthanatos). Άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου μπορούν επίσης να υπάρχουν, όπως η σιδηρόπτωση (ferroptosis), μία σιδηρο-εξαρτώμενη μορφή μη αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου (Dixon και συν. 2012).

Η μικροαυτοφαγία, η οποία αναφέρεται απλά ως αυτοφαγία, είναι μία κυτταρική διαδικασία πολύ συντηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Είναι μία καταβολική διαδικασία που ακολουθεί το μεταβολικό στρες –όπως την στέρηση θρεπτικών και την βιοενεργητική αποτυχία- ώστε να εξασφαλίσει την διαθεσιμότητα κρίσιμων μεταβολικών ενδιάμεσων. Είναι επίσης σημαντική για την απομάκρυνση οργανιδίων που έχουν υποστεί βλάβη (συμπεριλαμβανομένων των μιτοχονδρίων), πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και μολυσματικών οργανισμών (Levine και Kroemer 2008). Η αυτοφαγία γενικά είναι μία διαδικασία επιβίωσης. Η παρουσία του αυτοφαγικού θανάτου (ή τύπου II) συνήθως αντιπροσωπεύει μία αποτυχημένη προσπάθεια να ξεπεραστεί το θανατηφόρο στρες, και η διαταραχή αυτής της διαδικασίας προωθεί μάλλον παρά εμποδίζει τον κυτταρικό θάνατο σε πολλές περιπτώσεις. Αυτός ο τύπος κυτταρικού θανάτου συχνά αναφέρεται ως κασπασο-ανεξάρτητος κυτταρικός θάνατος που συνοδεύεται από την αυτοφαγία (Shen και συν. 2012).

Η απόπτωση είναι μία πολύ καλά μελετημένη μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Σε αντίθεση με την νέκρωση, όπου ο θάνατος είναι άμεσος και το κυτταρικό περιεχόμενο απελευθερώνεται κατά την λύση του κυττάρου στους ιστούς, με αποτέλεσμα να

προκαλείται φλεγμονή, στην απόπτωση το χρωμοσωμικό DNA θραύεται, η χρωματίνη συρρικνώνεται και ο πυρήνας κατακερματίζεται, ενώ τελικά το κύτταρο σπάει σε μικρότερα κομμάτια που περικλείονται σε μεμβράνες, τα αποπτωτικά σωμάτια (apoptotic bodies). Έτσι, το κυτταρικό περιεχόμενο μένει περιορισμένο στα ειδικά αυτά κυστίδια μέχρι να πραγματοποιηθεί η φαγοκυττάρωσή τους από τα μακροφάγα ή από γειτονικά κύτταρα. Ωστόσο, δεν αποκλείεται και σε αυτή την περίπτωση να εμφανισθεί νεκρωτική μορφολογία – δηλαδή ρήξη της πλασματικής μεμβράνης, σε πολύ προχωρημένα στάδια της απόπτωσης, εάν αποτύχει η απομάκρυνση των αποπτωτικών σωματίων και κυττάρων από τα φαγοκύτταρα. Τα αποπτωτικά κύτταρα εμφανίζουν στην επιφάνειά τους σήματα που υποδεικνύουν ότι πρέπει να «φαγωθούν». Ένα τέτοιο σήμα είναι η εμφάνιση της φωσφατιδυλοσερίνης στην εξωκυτταρική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Σε μη αποπτωτικά κύτταρα, η φωσφατιδυλοσερίνη εντοπίζεται στην ενδοκυτταρική πλευρά της διπλοστοιβάδας. Όταν μετακινείται στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου, αναγνωρίζεται από ειδικούς υποδοχείς των φαγοκυττάρων. Αυτή η μετακίνηση λειτουργεί και ως διαγνωστικός παράγοντας της απόπτωσης (Lauber και συν. 2004).

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στην πορεία της απόπτωσης κατά την ανάπτυξη του *C. elegans*, έδειξαν ότι υπάρχουν τρία γονίδια που παίζουν βασικό ρόλο στην ρύθμιση και εκτέλεση της απόπτωσης. Τα γονίδια *ced-1* και *ced-4* είναι απαραίτητα, καθώς με απενεργοποίηση αυτών δεν υπάρχει απόπτωση. Ένα τρίτο γονίδιο, το *ced-9*, λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της απόπτωσης, αφού η απενεργοποίησή του με μετάλλαξη οδηγεί στην απόπτωση των κυττάρων που θα έπρεπε κανονικά να επιβιώσουν (Ellis και Horvitz 1986). Γονίδια που παρουσιάζουν ομολογία με τα *ced-3*, *ced-4* και *ced-9* εντοπίστηκαν και στα θηλαστικά.

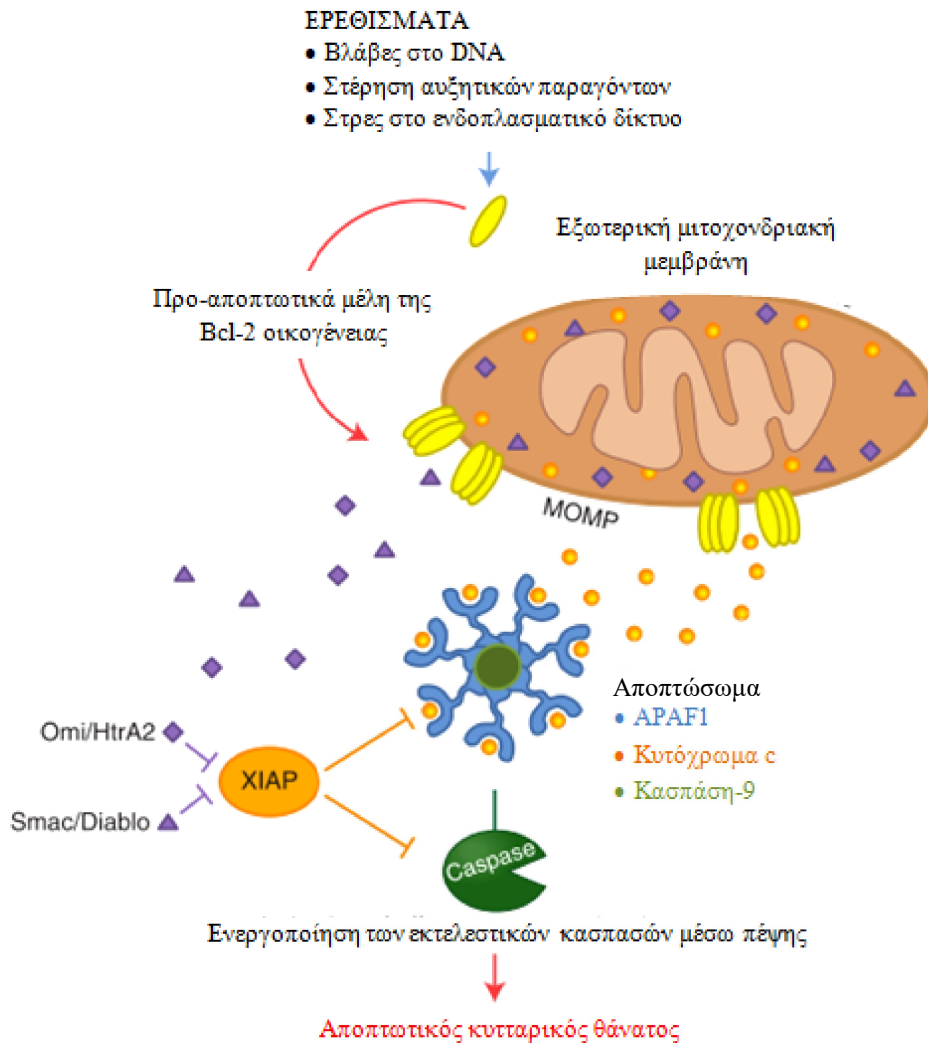
Το γονίδιο *ced-3* κωδικοποιεί μία πρωτεάση και η πρωτεΐνη Ced-3 αναγνωρίζεται ως το πρότυπο μιας οικογένειας 17 κυστεϊνοπρωτεασών, που είναι γνωστές ως κασπάσες (caspases) γιατί φέρουν κατάλοιπα κυστεΐνης στο ενεργό τους κέντρο (C) και πρωτεολύουν τις πρωτεΐνες-υποστρώματα μετά από κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος (Asp). Ωστόσο, δεν είναι γνωστές οι λειτουργίες όλων, ούτε εάν παίζουν κάποιο ρόλο στην απόπτωση. Οι εκτελεστικές κασπάσες (executioner caspases, κασπάση-3, κασπάση-6 και κασπάση-7) είναι αυτές που παίζουν ενεργό ρόλο στα αποπτωτικά μονοπάτια και παράγονται σαν ανενεργά διμερή που δεν διαθέτουν τις αυτοτελείς δομικές περιοχές για αλληλεπίδραση πρωτεϊνών. Η ενεργοποίησή τους οφείλεται στην πέψη τους μεταξύ των περιοχών που θα αποτελέσουν την μεγάλη και την μικρή υπομονάδα του ώριμου ενζύμου (Salvesen και Riedl 2008). Κατά την πρωτεόλυση, τα νέα άκρα διπλώνουν μέσα στην αντικριστή επιφάνεια των διμερών και προάγουν δομικές αλλαγές ώστε να δημιουργήσουν δύο ενεργές περιοχές στην ώριμη πρωτεάση.

Η πέψη της κασπάσης-6 μεσολαβείται από την κασπάση-3 και την κασπάση-7 (Slee και συν. 1999), ενώ η ενεργοποίηση των δύο τελευταίων είναι λειτουργία των εναρκτήριων (initiator) κασπασών. Αυτές οι εναρκτήριες κασπάσες και η ενεργοποίησή τους καθορίζουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια της απόπτωσης. Μετά την ενεργοποίησή τους, οι εκτελεστικές κασπάσες, ειδικά η κασπάση-3 και η κασπάση-7, μπορούν να πέπτουν τουλάχιστον 1000 πρωτεΐνες (Crawford και Wells 2011). Η πρωτεόλυση αυτών των υποστρωμάτων των κασπασών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα, είτε την απόκτηση, είτε την απώλεια λειτουργίας τους και ακολούθως να οδηγήσει σε κυτταρικές αλλαγές σχετιζόμενες με την απόπτωση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρωτεόλυση από τις κασπάσες απενεργοποιεί στοιχεία σημαντικών φυσιολογικών διαδικασιών. Για παράδειγμα, η θραύση από τις κασπάσες της p75 υπομονάδας του συμπλόκου I της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, διαταράσσει το διαμεμβρανικό δυναμικό του μιτοχονδρίου, την μεταφορά ηλεκτρονίων και την παραγωγή ATP κατά την πορεία της απόπτωσης (Ricci και συν. 2004). Αντιστρόφως, η πρωτεόλυση από κασπάσες μπορεί να ενεργοποιήσει συγκεκριμένα μονοπάτια, όπως στην περίπτωση της ενεργοποιούμενης από τις κασπάσες νουκλεάσης [CAD, caspase-activated nuclease], μίας DNAάσης που κόβει τη χρωματίνη ανάμεσα στα νουκλεοσώματα, ενώ ο αναστολέας της, ο iCAD, πέπτεται από την κασπάση-3 (Sakahira και συν. 1998). Επιπλέον, οι κασπάσες μπορούν να καταλάβουν μονοπάτια της απόπτωσης μέσω της ενεργοποίησης μερικών από τα συστατικά τους. Για παράδειγμα, η χαρακτηριστική μορφολογία των αποπτωτικών κυττάρων προκαλείται από την μεσολαβούμενη από κασπάσες ενεργοποίηση διαφόρων τροποποιητών του κυτταροσκελετού, όπως είναι η πηκτωλυματίνη (gelsolin), μία ασβεστιο-ρυθμιζόμενη πρωτεΐνη ακτίνης-σεβερίνης, η οποία γίνεται ενεργή μετά από κατεργασία με κασπάσες (Kothakota και συν. 1997).

Αντίθετα από τις εκτελεστικές κασπάσες, οι εναρκτήριες κασπάσες υπάρχουν ως ανενεργά μονομερή στα κύτταρα και δεν ενεργοποιούνται μέσω πέψης. Σε αυτή την περίπτωση, μόρια-προσαρμοστές που συναθροίζονται σε πλατφόρμες ενεργοποίησης κασπασών, στρατολογούν αυτές τις εναρκτήριες κασπάσες, εξαναγκάζοντας τα μονομερή να πλησιάσουν αρκετά και προκαλώντας δομικές αλλαγές που έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενεργών περιοχών. Σε κάποιες περιπτώσεις, η επακόλουθη αυτοπρωτεόλυση της κασπάσης είναι απαραίτητη ώστε να σταθεροποιήσει το ώριμο, ενεργό ένζυμο (Oberst και συν. 2010).

Οι κασπάσες συμμετέχουν τόσο στο εσωτερικό όσο και στο εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης. Το **μιτοχονδριακό ή εσωτερικό μονοπάτι** (mitochondrial/intrinsic pathway) της απόπτωσης είναι ο πιο κοινός μηχανισμός απόπτωσης στα σπονδυλωτά. Ενεργοποιείται ως απόκριση σε μία ποικιλία κυτταρικών καταπονήσεων, όπως οι βλάβες του DNA, η στέρηση αυξητικών παραγόντων, το στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τα αναπτυξιακά σήματα. Σε

αυτό το μονοπάτι, οι εκτελεστικές κασπάσες πέπτονται και ενεργοποιούνται από την κασπάση-9, η οποία ενεργοποιείται από μία πλατφόρμα ενεργοποίησης κασπασών που ονομάζεται αποπτώσωμα (apoptosome) (Bratton και Salvesen 2010). Στην Εικόνα 1.3 παρουσιάζονται συνοπτικά τα βασικά σημεία του μονοπατιού, το οποίο αναλύεται στη συνέχεια.



Εικόνα 1.3 Το μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης. Σε απόκριση διαφόρων κυτταρικών καταπονήσεων, τα προ-αποπτωτικά μέλη της Bcl2 οικογένειας προάγουν την αύξησης της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, επιτρέποντας την απελευθέρωση στο κυτταρόπλασμα των προ-αποπτωτικών παραγόντων (συμπεριλαμβανομένων των κυτόχρωμα c, Smac, Omi) που φυσιολογικά βρίσκονται στην περιοχή μεταξύ των δύο μεμβρανών του μιτοχονδρίου. Στο κυτταρόπλασμα, το κυτόχρωμα c συνδέεται στην APAF1 και πυροδοτεί τον ολιγομερισμό του. Η κασπάση-9 στη συνέχεια στρατολογείται και ενεργοποιείται από αυτή την πλατφόρμα, γνωστή ως αποπτώσωμα. Η καταλυτικά ενεργή κασπάση-9 πέπτει και ενεργοποιεί τις εκτελεστικές κασπάσες-3 και -7. Με την απελευθέρωσή τους στο κυτταρόπλασμα, οι Smac και Omi προσδένονται και καταστέλλουν τον καταστολέα κασπασών XIAP. [APAF1, Apoptotic Protease-Activating Factor 1, XIAP, X-linked Inhibitor of Apoptosis, MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization, Diablo, direct IAP binding protein with low pI, HtrA2, high temperature requirement protein A2] (Προσαρμογή από Green και Llambi 2015)

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αποπτωτικών πρωτεασών [Araf1, Apoptotic Protease-Activating Factor 1] αποτελεί το ικρίωμα γύρω από το οποίο σχηματίζεται το αποπτώσωμα. Η Araf1 είναι ορθόλογη της Ced-4 του *C.elegans*. Κατά την εσωτερική απόπτωση (βλ. και εικόνα 1.3), το κυτόχρωμα c -που έχει διπλό ρόλο, καθώς λειτουργεί ως μεταφορέας ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα, αλλά και ως συμπαράγοντας για την ενεργοποίηση των κασπασών στην πορεία της απόπτωσης- απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια μέσα στο κυτταρόπλασμα και προσδένεται στην Araf1 (Zou και συν. 1997). Αυτή η αλληλεπίδραση δίνει το έναυσμα για την υδρόλυση του συμπαράγοντα της Araf1, του dATP σε dADP (Kim και συν. 2005). Η επακόλουθη αλλαγή του dADP με εξωγενές dATP επιτρέπει τον ολιγομερισμό των επτά APAF1-dATP-κυτόχρωμα-c μονάδων σε ένα ενεργό αποπτώσωμα. Στο κέντρο του αποπτωσώματος, οι εκτεθειμένες δομικές περιοχές στρατολόγησης κασπασών [CARDs, caspase-recruitment domains] της Araf1 προσδένονται στην CARD της κασπάσης-9, κι έτσι φέρνουν κοντά τα ανενεργά μονομερή της ώστε να γίνει ενεργοποίηση και αυτό-επεξεργασία (Yuan και συν. 2010). Λόγω της μεγαλύτερης συγγένειάς της για το αποπτώσωμα, η ολόκληρη κασπάση-9 αντικαθιστά την επεξεργασμένη μορφή, δημιουργώντας έναν συνεχή κύκλο στρατολόγησης κασπάσης-9, ενεργοποίησης, επεξεργασίας και απελευθέρωσης (Malladi και συν. 2009). Η κασπάση-9 διατηρεί καταλυτική ενεργότητα μόνο στην προσδεδεμένη της μορφή, οπότε το αποπτώσωμα λειτουργεί ως μοριακός διακόπτης στον οποίο η διάρκεια ζωής είναι άμεσα ανάλογη της ποσότητας της μη επεξεργασμένης κασπάσης που είναι παρούσα.

Στα υγιή κύτταρα, το κυτόχρωμα c εντοπίζεται μόνο στον χώρο μεταξύ των δύο μιτοχονδριακών μεμβρανών. Για να αλληλεπιδράσει με την Araf1, πρέπει να προκύψει αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου [MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization], πυροδοτούμενη από αποπτωτικό ερέθισμα (Tait και Green 2010). Η MOMP επάγει την απελευθέρωση όλων των διαλυτών πρωτεϊνών του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού χώρου στο κυτταρόπλασμα. Πέραν του κυτοχρώματος c, απελευθερώνονται και δύο άλλες προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες με αυτή την διαδικασία: ο δεύτερος ενεργοποιητής των κασπαρών προερχόμενος από τα μιτοχόνδρια [Smac, Second Mitochondria-derived Activator of Caspases], γνωστή και ως πρωτεΐνη που προσδένεται άμεσα στην IAP με χαμηλό pI [Diablo, direct IAP binding protein with low pI], και η Omi, γνωστή και ως πρωτεΐνη A2 που απαιτεί υψηλή θερμοκρασία [HtrA2, High temperature requirement protein A2]. Η Smac και η Omi ενισχύουν την δραστηριότητα του αποπτωσώματος, ανταγωνιζόμενες τον X-συνδεόμενο αναστολέα της απόπτωσης [XIAP, X-linked Inhibitor of Apoptosis], ο οποίος είναι αναστολέας των κασπασών. Ο XIAP, εκτός των άλλων, καθυστερεί το εσωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης μέσω άμεσης ουβικιτίνωσης και πρωτεασωμικής αποικοδόμησης των ενεργών κασπασών (Eckelman και συν. 2006).

Η MOMP είναι ένα αυστηρά ρυθμιζόμενο γεγονός που ελέγχεται από μέλη της οικογένειας του λεμφώματος 2 των B κυττάρων [Bcl-2, B-cell lymphoma 2]. Αυτά μοιράζονται μία ή περισσότερες περιοχές ομολογίας Bcl-2 (BH), οι οποίες καθορίζονται από την αλληλουχία, τη δομή και τη λειτουργία. Υπάρχουν τρεις ευρείες τάξεις των Bcl-2 πρωτεϊνών: οι προ-αποπτωτικές εκτελεστικές πρωτεΐνες Bax [Bcl-2-associated X protein, πρωτεΐνη X που σχετίζεται με την Bcl-2] και Bak [Bcl-2 homologous antagonist/killer, ομόλογη της Bcl-2 ανταγωνιστική/φονική πρωτεΐνη], οι οποίες είναι απαραίτητες και επαρκείς για την MOMP· οι αντιαποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες (π.χ. Bcl-2, Bcl-xL και Mcl1), οι οποίες εμποδίζουν την MOMP, και οι BH3-μόνο πρωτεΐνες (π.χ. Bid, Bim, Bad και Noxa), οι οποίες ενεργοποιούν τους προ-αποπτωτικούς εκτελεστές και/ή ουδετεροποιούν τις αντιαποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες. Οι Bcl-2 επίσης ελέγχουν πολλές άλλες κυτταρικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της μιτοχονδριακής σύντηξης, της αυτοφαγίας και της εκροής ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο (Chiruk και συν. 2010). Η Bcl-2 έχει παρόμοια λειτουργία με την Ced-9 του *C. elegans*.

Η Bax και η Bak είναι άμεσα υπεύθυνες για την απώλεια της ακεραιότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Με την ενεργοποίησή τους, σχηματίζουν μεγάλα ολιγομερή που εισέρχονται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, διαταράσσοντάς την (Dewson και συν. 2008). Η ακριβής φύση της διαταραχής αυτής παραμένει ασαφής, αλλά επιτρέπει την σχεδόν αυθόρμητη απελευθέρωση όλων των πρωτεϊνών του διαμεμβρανικού χώρου (Ricci και συν. 2004). Η Bax και η Bak δρουν πλεονασματικά στην MOMP και τουλάχιστον μία από αυτές απαιτείται για να γίνουν διαπερατά τα μιτοχόνδρια. Στα ζωντανά κύτταρα, αυτές οι πρωτεΐνες γενικά είναι ανενεργές, αλλά ενεργοποιούνται ως απόκριση σε ανοδικά γεγονότα. Τουλάχιστον δύο από τις BH3-μόνο πρωτεΐνες (η Bim και η ενεργή Bid), ενεργοποιούν την Bax και την Bak μέσω παροδικής αλληλεπίδρασης, παρόλο που άλλες συνθήκες, όπως η ζέστη, η αλλαγές στο pH και αλλαγές στο λιπιδικό περιβάλλον) μπορεί να ενεργοποιήσουν τους εκτελεστές ανεξάρτητα από τις BH3-μόνο πρωτεΐνες (Kuwana και συν. 2002).

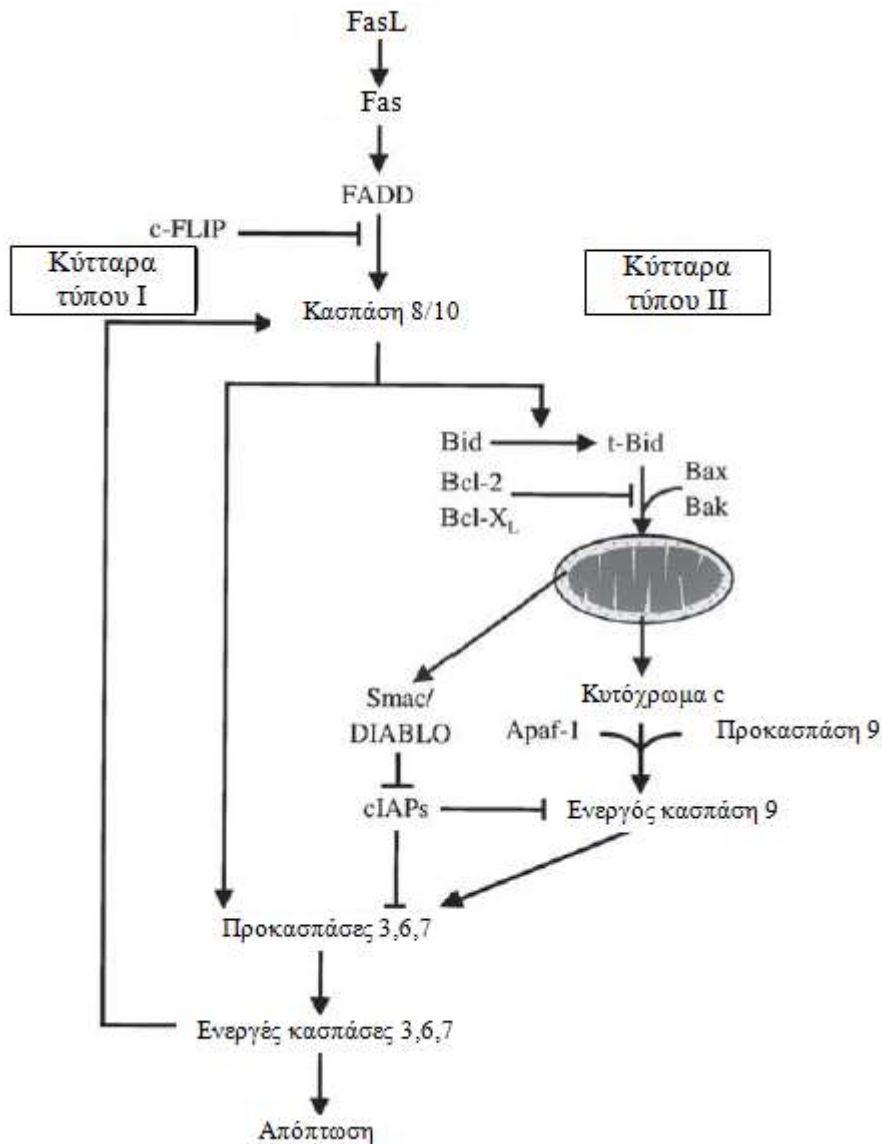
Η MOMP δέχεται ανταγωνισμό από τις αντι-αποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες, οι οποίες προσδένονται και παρεμποδίζουν αμφότερες τις Bax/Bak και τις BH3-μόνο πρωτεΐνες αλληλεπιδρώντας με τις BH3 αυτοτελείς δομικές περιοχές τους (Llambi και συν. 2011). Οι αντι-αποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες επίσης ρυθμίζονται και στο επίπεδο της μεταγραφής αλλά και στο μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Οι πρωτεΐνες της Bcl-2 οικογένειας, λοιπόν, ενσωματώνουν προ- και αντι-αποπτωτικά σήματα σε υγιή και καταπονημένα κύτταρα και ως εκ τούτου αποτελούν έναν από τους κύριους σηματοδοτικούς κόμβους στην απόφαση ζωής ή θανάτου.

Η κασπάση-8 ενεργοποιείται κυρίως από το **μονοπάτι των υποδοχέων θανάτου** (Death

Receptor pathway) ή **εξωτερικό μονοπάτι** (extrinsic pathway) της απόπτωσης των χορδωτών. Οι υποδοχείς θανάτου είναι μία υποομάδα της υπερικογενείας των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων [TNFR, tumore necrosis factor receptor] και περιλαμβάνουν τον TNFR, τον Fas [apoptosis-stimulating fragment, φράγμα που διεγείρει την απόπτωση] και τον υποδοχέα 1/2 του σχετιζόμενου με τον TNF προσδέτη που επάγει την απόπτωση [TRAIL-R1/2, TNF-related apoptosis-inducing ligand] (Dickens και συν. 2012). Περιέχουν μία αυτοτελή δομική περιοχή διπλώματος θανάτου (DD, Death Domain) στις ενδοκυτταρικές τους περιοχές. Μέσω μίας σειράς ομοτυπικών αλληλεπιδράσεων, αυτοί ξεκινούν τη συνάθροιση μεγάλων μεγαλομοριακών συμπλόκων που στρατολογούν και ενεργοποιούν την κασπάση-8 για αποπτωτική σηματοδότηση, καθώς και άλλα σηματοδοτικά μόρια που ελέγχουν διαδικασίες όπως η φλεγμονή και η κυτταρική προσκόλληση (Newton και Dixit 2012).

Απαξ και διεγερθούν, οι υποδοχείς θανάτου στρατολογούν ένα μόριο-προσαρμοστή που διαθέτει DD δομική περιοχή, την σχετιζόμενη με τον Fas πρωτεΐνη με δομική περιοχή θανάτου [FADD, Fas-associated protein with death domain], μέσω ομοτυπικών αλληλεπιδράσεων των περιοχών DD που υπάρχουν και στις δύο πρωτεΐνες. Μετά την στρατολόγησή του από τον υποδοχέα, ο FADD χρησιμοποιεί την περιοχή τελεστή θανάτου [DED, death-effector domain] που διαθέτει ώστε να στρατολογήσει με τη σειρά του διαδοχικές DED πρωτεΐνες. Το σύμπλοκο που δημιουργείται αντιπροσωπεύει μία πλατφόρμα ενεργοποίησης κασπασών, που αποκαλείται θανατο-επαγόμενο σύμπλοκο σηματοδότησης [DISC, death-inducing signaling complex], καθώς οι επικράτειες DED του FADD προσδέονται σε αυτές της προ-επικράτειας της κασπάσης-8. Αυτό φέρνει κοντά τα μονομερή της κασπάσης-8, με αποτέλεσμα την πυροδότηση της ενεργότητας πρωτεάσης. Η κασπάση-8 τότε υφίσταται αυτο-πρωτεόλυση, τόσο μεταξύ της μεγάλης και της μικρής υπομονάδας, όσο και μεταξύ της μεγάλης υπομονάδας και της προ-επικράτειάς της. Η πρώτη διάσπαση σταθεροποιεί το ενεργοποιημένο διμερές (και απαιτείται για την δραστηριότητα του ομοδιμερούς σε αυτό το μονοπάτι), ενώ η δεύτερη πέψη την απελευθερώνει από την DISC (Dickens και συν. 2012).

Σε κάποια κύτταρα, τα κύτταρα τύπου I, η ενεργός κασπάση-8 στη συνέχεια προωθεί την απόπτωση με πέψη και ενεργοποίηση των κασπασών-3 και -7. Ωστόσο, σε πολλούς κυτταρικούς τύπους (κύτταρα τύπου II), οι ενεργές εκτελεστικές κασπάσες αναστέλλονται από τον XIAP και έτσι η απόπτωση εμποδίζεται (Jost και συν. 2009). Σε αυτές τις περιπτώσεις, ένα άλλο υπόστρωμα της κασπάσης-8 μπαίνει στο παιχνίδι, η BH3-μόνο πρωτεΐνη Bid. Η πέψη από την κασπάση-8 ενεργοποιεί την Bid, η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί τις Bax και Bak για να προωθήσουν την MOMP. Οι ανταγωνιστές του IAP, Smac και Omi τότε απελευθερώνονται και ουδετεροποιούν τον XIAP για να επιτρέψουν την πρόοδο της απόπτωσης.



Εικόνα 1.4 Δύο ταξινομήσεις, η τύπου I και η τύπου II, της μεσολαβούμενης από το Fas μεταγωγής σήματος της απόπτωσης έχουν περιγραφεί. Στα κύτταρα τύπου I, μεγάλες ποσότητες της κασπάσης-8 ενεργοποιούνται στο DISC και ακολουθούνται στενά από γρήγορη πρωτεόλυση της κασπάσης-3. Η υπερέκφραση των Bcl-2 ή Bcl-X_L δεν αποτρέπει ενεργοποίηση της κασπάσης-8 ή της κασπάσης-3 σε αυτά τα κύτταρα, ούτε αναστέλλει την απόπτωση, υποδεικνύοντας μία ανεξάρτητη του μιτοχονδρίου ενεργοποίηση του καταρράκτη των κασπασών. Αντίθετα, ο σχηματισμός του DISC στα κύτταρα τύπου II μειώνεται σημαντικά και η ενεργοποίηση των κασπασών, συμπεριλαμβανομένης της κασπάσης -8, συμβαίνει κυρίως καθοδικά των μιτοχονδρίων, καθώς τόσο η ενεργοποίηση των κασπασών, όσο και της απόπτωσης μπορούν να εμποδισθούν από την υπερέκφραση του Bcl-2 ή του Bcl-X_L. Για περισσότερες λεπτομέρειες βλ. το κείμενο. [DISC, death-inducing signaling complex, Bcl-2, B-cell lymphoma 2] (Προσαρμογή από Yin και Dong 2009)

Προκειμένου να αποφευχθεί η πυροδότηση του κυτταρικού θανάτου χωρίς να είναι απαραίτητο και να εξασφαλισθεί η σωστή λειτουργία του αποπτωτικού μηχανισμού, είναι απαραίτητη η πολύ καλή ρύθμιση της Fas σηματοδότησης. Σχετικά πρόσφατα, μία οικογένεια πρωτεϊνών ιικής προέλευσης με αντιαποπτωτική δραστηριότητα ανιχνεύθηκαν και ονομάστηκαν ικές πρωτεΐνες FLICE αναστολής [*v*-FLIPs, viral FLICE-like inhibitory proteins]. Οι *v*-FLIP διαθέτουν δύο DED περιοχές που τους επιτρέπουν να προσδένονται στο

DISC του Fas, όπως και σε αρκετούς άλλους υποδοχείς θανάτου, και να εμποδίζουν την ενεργοποίηση της κασπάσης-8 (Meinl και συν. 1998). Ένα ανθρώπινο ομόλογο έχει επίσης ανιχνευθεί και ονομάζεται c-FLIP (Tschopp και συν. 1998). Το c-FLIP υπάρχει σε μία βραχεία και μία μακρά ισομορφή, ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος. Και οι δύο μορφές στρατολογούνται και προσδένονται στο DISC μετά από το κατάλληλο ερέθισμα (Scaffidi και συν. 1999). Ενώ η βραχεία μορφή της c-FLIP μπορεί ανταγωνιστικά να εμποδίζει την στρατολόγηση της προκασπάσης-8 στο DISC, η μακρά μορφή επιτρέπει στην προκασπάση-8 να στρατολογηθεί στο DISC και ακόμη και να πρωτεολυθεί μερικώς από μία προ-μορφή των 55 kDa σε πολυπεπίδια των 41 kDa και των 43 kDa. Παρόλο αυτά, μέσω ασαφών μηχανισμών, η μακρά c-FLIP εμποδίζει την περαιτέρω πρωτεολυτική επεξεργασία της κασπάσης-8 ώστε να δημιουργηθούν οι ενεργές υπομονάδες των 18 kDa και των 10 kDa (Krueger και συν. 2001).

1.3 Σχετικά με τις MAP κινάσες

Αν και δεν αποτελούν καθαυτές αντικείμενο της παρούσας εργασίας, είναι πολύ σημαντικό να αναφερθούμε και στις πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα [MAPKs, mitogen-activated protein kinases], καθώς εμπλέκονται σε πολύ μεγάλο βαθμό και στην απόπτωση. Οι MAPKs είναι μία οικογένεια κινασών σερίνης/θρεονίνης που παίζουν έναν βασικό ρόλο στην μεταγωγή σήματος μέσω ρύθμισης της μεταγραφής των γονιδίων στον πυρήνα, ως απόκριση σε αλλαγές στο κυτταρικό περιβάλλον (Εικόνα 1.5). Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζονται από εξωκυτταρικά σήματα [ERKs, extracellular signal-regulated protein kinases], όπως είναι η ERK1 και η ERK2, οι κινάσες του αμινοτελικού άκρου της c-Jun [JNKs, c-Jun N-terminal kinases] JNK1, JNK2, JNK3, οι p38 MAPKs (p38a, p38β, p38γ, p38δ) και η ERK5. Τα μοριακά γεγονότα στα οποία λειτουργούν οι MAPKs μπορούν να χωριστούν σε διακριτά αλλά και συσχετιζόμενα βήματα: ενεργοποίηση της MAPK από ανοδικές κινάσες, αλλαγές στον υποκυτταρικό εντοπισμό των MAPKs, και αναγνώριση, πρόσδεση και φωσφορυλίωση των καθοδικών στόχων της MAPK. Το μοτίβο της κυτταρικής έκφρασης που προκύπτει θα εξαρτάται ολοκληρωτικά από την ενσωμάτωση των συνδυαστικών σημάτων που παρέχονται από την προσωρινή ενεργοποίηση κάθε ομάδας των MAPKs (Turjanski και συν. 2007).

Οι MAPKs ελέγχουν κομβικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση και η απόπτωση, ενώ συμμετέχουν σε έναν αριθμό παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι η φλεγμονή και ο καρκίνος (Pearson και συν. 2001· Zagubin και Han 2005). Στον άνθρωπο υπάρχουν τουλάχιστον 11 μέλη της

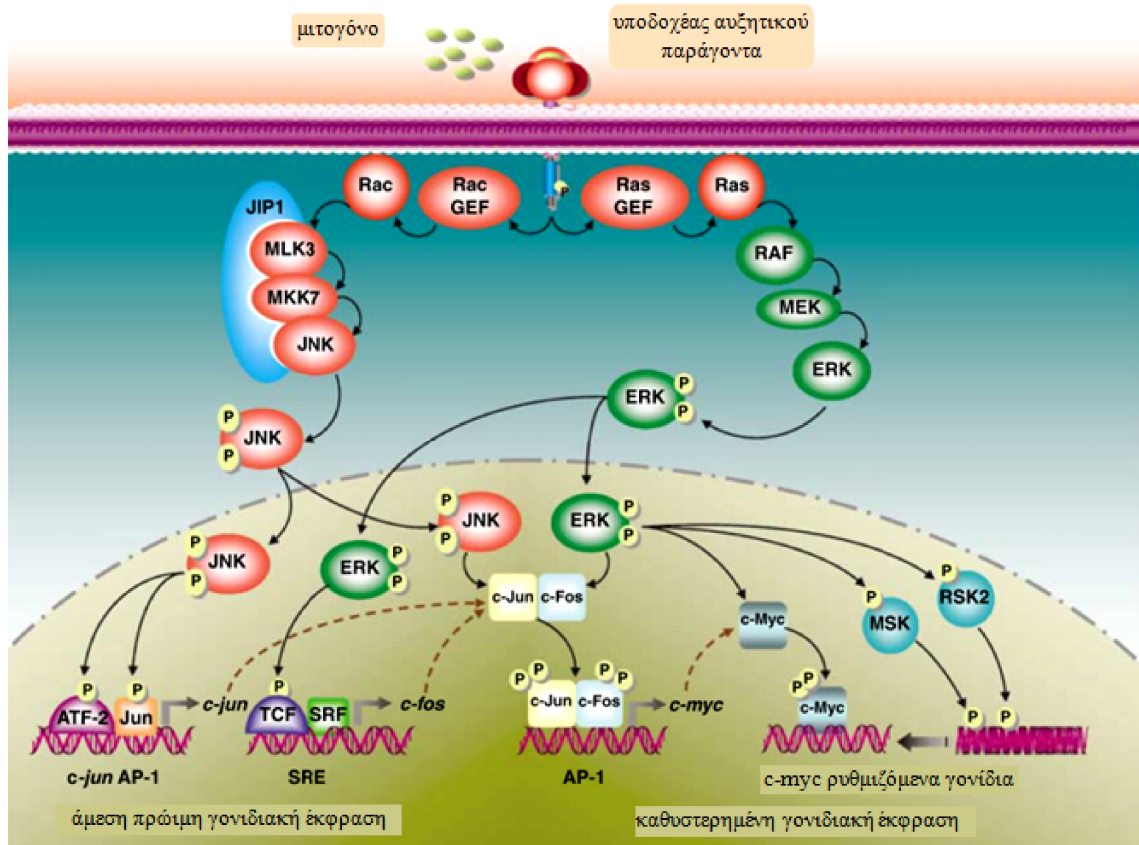
υπεροικογένειας των MAPKs, τα οποία μπορούν να μοιραστούν σε έξι ομάδες με βάση την ομολογία στην αλληλουχία τους. Κάθε ομάδα των MAPKs μπορεί να διεγερθεί από ξεχωριστό καταρράκτη μεταγωγής σήματος που εμπεριέχει την ενεργοποίηση μίας συγκεκριμένης MAP κινάσης κινάσης κινάσης (MAPKKK) και μία MAP κινάση κινάση (MAPKK), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις καθοδικές MAPKs (Pearson και συν. 2001).

Αυτές οι σηματοδοτικές ενότητες έχουν συντηρηθεί κατά την εξέλιξη από τα φυτά, τους μύκητες, τους νηματώδεις, τα έντομα μέχρι τα θηλαστικά (Widmann και συν. 1999). Ανάμεσα στα μονοπάτια των MAPKs, οι μηχανισμοί που κυριαρχούν στην ενεργοποίηση των ERKs είναι οι πιο εκτεταμένα μελετημένοι, καθώς η παρεμπόδιση της λειτουργίας των ERKs αποτρέπει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ως απόκριση σε ένα εύρος αυξητικών παραγόντων και η υπερλειτουργία της είναι επαρκής ώστε να μεταμορφώσει τα κύτταρα σε καλλιέργεια (Mansour και συν. 1994).

Οι MAPKs απαιτούν διπλή φωσφορυλίωση σε δύο συντηρημένα κατάλοιπα θρεονίνης (Thr) και τυροσίνης (Tyr) μέσα στην θηλιά ενεργοποίησής τους, προκειμένου να ενεργοποιηθούν πλήρως (Pearson και συν. 2001). Αυτές οι περιοχές φωσφορυλίωσης διαχωρίζονται μόνο από ένα αμινοξύ, και ως εκ τούτου ορίζουν ένα μοτίβο τριών πεπτιδίων, Thr-X-Tyr. Ιστορικά, το αμινοξύ που βρίσκεται μεταξύ των δύο καταλοίπων που δέχονται την φωσφορυλίωση έχει χαρακτηρίσει τις διάφορες ομάδες των MAPKs. Η ικανότητα συγκεκριμένων MAPKKs να αναγνωρίζουν διαφορετικές MAPKs εξαρτάται εν μέρει από αυτά τα διαφορετικά μοτίβα τριπεπτιδίων, που έτσι συνεισφέρουν στην ειδικότητα των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων κάθε μέλος της οικογένειας των MAPKs μπορεί να ενεργοποιηθεί. Μετά τη φωσφορυλίωσή τους, οι MAPKs φωσφορυλιώνουν και ελέγχουν τη δραστηριότητα κομβικών κυτταροπλασματικών μορίων και πυρηνικών πρωτεϊνών, που στη συνέχεια μπορούν να ρυθμίσουν την κυτταρική έκφραση. Τελικά, το πρόγραμμα γονιδιακής έκφρασης που προκύπτει θα εξαρτάται από την σύντηξη των συνδυαστικών σημάτων που παρέχονται από την προσωρινή ενεργοποίηση κάθε μίας από τις οικογένειες των MAPKs.

Οι JNKs, επίσης γνωστές ως κινάσες που ενεργοποιούνται από το στρες, χαρακτηρίζονται από το διπλό μοτίβο φωσφορυλίωσης Thr-Pro-Tyr μέσα στην θηλιά ενεργοποίησής τους. Η JNK αρχικά ανακαλύφθηκε από την ικανότητά της να φωσφορυλιώνει την αμινοτελική δομική περιοχή της c-Jun στις σερίνες-63 και -73. Οι JNKs εμπλέκονται σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης (Davis 2000). Οι JNKs παίζουν κρίσιμο ρόλο τόσο στο εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης που επάγεται από τους υποδοχείς θανάτου, όσο και στο μιτοχονδριακό εσωτερικό αποπτωτικό μονοπάτι. Οι JNKs ενεργοποιούν το αποπτωτικό σήμα, τόσο με ανοδική ρύθμιση προ-αποπτωτικών γονιδίων μέσω της δια-ενεργοποίησης συγκεκριμένων

μεταγραφικών παραγόντων ή με απευθείας τροποποίηση της ενεργότητας των μιτοχondριακών προ- και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών μέσω διακριτών γεγονότων φωσφορυλίωσης (Dhanasekaran και Reddy 2008).



Εικόνα 1.5 Χωροχρονική τοποθέτηση της σηματοδότησης των MAPKs. Κατά την διέγερση από μιτογόνα, οι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων κινάσης τυροσίνης, όπως ο υποδοχέας του EGF, ενεργοποιούν μικρές GTPάσες των οικογενειών Ras και Rho μέσω συγκεκριμένων παραγόντων ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης. Οι Ras και Rho GTPάσες, με την σειρά τους, ελέγχουν τη δραστηριότητα των ανεξάρτητων καταρρακτών των MAP κινασών. Η ειδικότητα της μεταγωγής σήματος μπορεί να επιτευχθεί από αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και πρωτεΐνες-σκαλωσιές που οργανώνουν κομβικά συστατικά των σηματοδοτικών μονοπατιών σε λειτουργικές μονάδες. Οι ενεργοποιημένες-φωσφορυλιωμένες MAP κινάσες στη συνέχεια μεταφέρονται στον πυρήνα όπου ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση. Όπως φαίνεται, οι MAP κινάσες μπορούν να φωσφορυλιώσουν μπορούν να φωσφορυλιώσουν τις διενεργοποιούμενες δομικές περιοχές των μεταγραφικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών Jun, που προσδένονται στα στοιχεία απόκρισης τους μέσα στην περιοχή του υποκινητή στα γονίδια πρώιμης απόκρισης, όπως είναι το *c-jun*. Οι MAP κινάσες ακολούθως τροποποιούν την δραστηριότητα των νεοσυντιθέμενων c-Jun και c-Fos, οι οποίες μπορούν να διμεριστούν ώστε να σχηματίσουν AP-1 σύμπλοκα, τα οποία προσδένονται στην περιοχή του υποκινητή. [EGF, epidermal growth factor, GTP, guanosine triphosphate, MAPK, mitogen-activated protein kinase, AP-1, activator protein] (Προσαρμογή από Turjanski και συν. 2007)

Και οι τρεις JNKs έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην διέγερση της αποπτωτικής σηματοδότησης. Μετά από ενεργοποίηση από τις ανοδικές MAP2 κινάσες, η φωσφορυλιωμένη JNK μετακινείται στον πυρήνα όπου φωσφορυλιώνει και διενεργοποιεί τον c-Jun (Davis 2000· Chang και Karin 2001). Η φωσφορυλίωση αυτού οδηγεί στον σχηματισμό της ενεργοποιού

πρωτεΐνης -1 [AP-1, activator protein], η οποία εμπλέκεται στην μεταγραφή ενός μεγάλου εύρους πρωτεϊνών, κάποιες από τις οποίες είναι οι γνωστοί αποπτωτικοί παράγοντες (Turjanski και συν. 2007). Έχει παρατηρηθεί ότι το μονοπάτι JNK-AP-1 εμπλέκεται στην αύξηση της έκφρασης προ-αποπτωτικών γονιδίων, όπως ο TNF- α , ο Fas-L και η Bak (Fan και Chambers 2001). Επιπλέον, όσον αφορά στην μιτοχονδριακή σηματοδότηση στην απόπτωση, οι JNK έχουν έναν βασικό ρόλο στην ρύθμιση της λειτουργίας των προ- και αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών που εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια (Aoki και συν. 2002). Αναλόγως, μετά την ενεργοποίηση από το αποπτωτικό σήμα, η JNK μετακινείται στα μιτοχόνδρια, όπου έχει φανεί ότι οδηγεί σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος c υπό συνθήκες επαγωγής της απόπτωσης από υπεριώδεις ακτινοβολίες (UV), χωρίς όμως να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός.

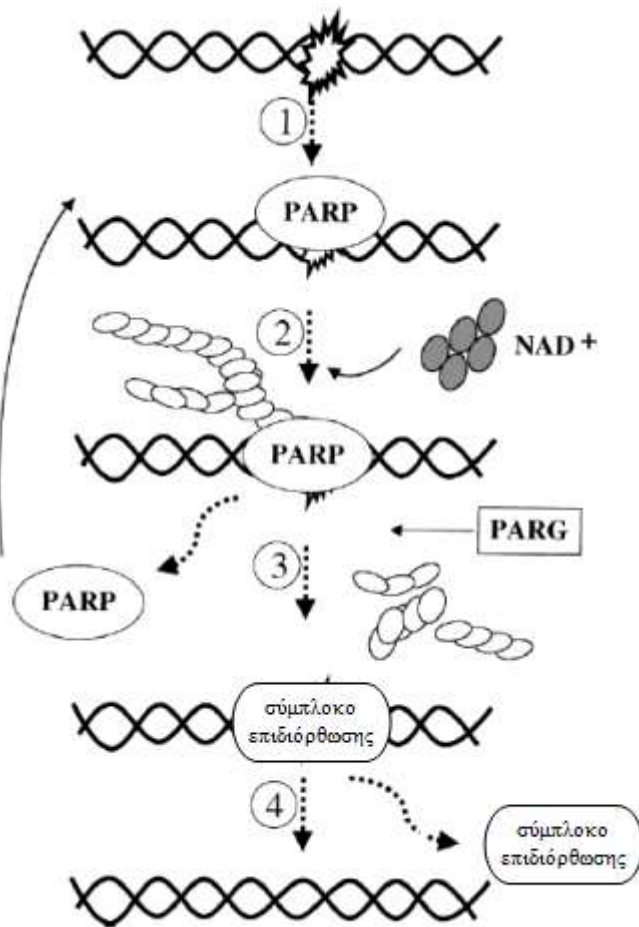
Σήματα που επάγονται από την αύξηση και μεταφέρονται από εξωκυτταρικά μιτογόνα ενεργοποιούν έναν καταρράκτη που περιλαμβάνει την Ras πρωτεΐνη που προσδένει νουκλεοτίδια γουανίνης, την Raf-1 πρωτεϊνική κινάση σερίνης και τις κινάσες ERK1 και ERK2. Οι ενεργοποιημένες ERK1 και ERK2 επάγουν την παραγωγή πρωτεϊνών που απαιτούνται για την κυτταρική αύξηση μέσω φωσφορυλίωσης μεταγραφικών και μεταφραστικών παραγόντων. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras/Raf/MKK/ERK είναι δεμένο με ένα εύρος μιτογόνων υποδοχέων, ειδικότερα με αυτούς των οποίων οι κυτταροπλασματικές περιοχές είναι κινάσες τυροσίνης -π.χ. ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας [EGF, epidermal growth factor], ο υποδοχέας της ινσουλίνης και παρόμοιοι υποδοχείς (Cano και Mahadevan 1995). Σε όλες τις περιπτώσεις, η ενεργοποίηση των κινάσων τυροσίνης έχει ως αποτέλεσμα την στρατολόγηση των παραγόντων ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης που απαιτούνται για την ενεργοποίηση του Ras. Το Bcl-2, που όπως αναφέρθηκε είναι μία αντιαποπτωτική πρωτεΐνη, έχει αναφερθεί ότι αλληλεπιδρά και με το R-Ras και με το Raf-1 (Fernandez-Sarabia και Bischoff 1993, Wang και συν. 1994), κάτι που υποδεικνύει ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μελών της οικογένειας του Bcl-2 και τον καταρράκτη σηματοδότησης Ras/Raf/MKK/ERK επηρεάζει την ευαισθησία στην απόπτωση. Η αυξημένη φωσφορυλίωση των ERK αναμένεται να αναστέλλει την απόπτωση.

1.4 Ο ρόλος της PARP-1 στην τύχη του κυττάρου

Παρόλο που η οικογένεια των πολυμερασών πολυ(ADP-ριβόζης) [PARP, poly(ADP-ribose) polymerase] πρωτεϊνών αποτελείται από 17 μέλη, το πιο σημαντικό είναι η PARP-1, η οποία ευθύνεται για το 85-90% της συνολικής ενεργότητας των PARP (Kulcsar και συν. 2003). Η PARP-1 είναι μία πρωτεΐνη 116 kDa με τρεις κύριες αυτοτελείς δομικές περιοχές: μία αμινοτελική περιοχή (42kDa) που διαθέτει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου και μία αλληλουχία τοποθέτησης στον πυρήνα που χρησιμοποιείται για πρόσδεση του DNA, μία κεντρική περιοχή αυτό-τροποποίησης (16kDa) και μία καρβοξυτελική καταλυτική περιοχή (55kDa), η οποία φιλοξενεί την περιοχή πρόσδεσης NAD και την περιοχή PAR σύνθεσης ADP-ριβόζης (Fatokun και συν. 2014). Η PARP-1 εμπλέκεται στην διόρθωση του DNA, στην διαφοροποίηση και στην διατήρηση της γενωμικής σταθερότητας υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η πολύ(ADP-ριβοζυλ)ίωση είναι ένας σημαντικός μηχανισμός για την διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος, ως απόκριση στη βλάβη που υφίσταται το DNA. Η PARP-1 ενεργοποιείται σε απόκριση της θραύσης της μίας αλυσίδας του DNA (βλ. Εικόνα 1.6), η οποία μπορεί να είναι εκτεταμένη σε οξειδωτική βλάβη. Είναι ένα ένζυμο που καταναλώνει ενέργεια –χρησιμοποιεί το βNAD^+ ως υπόστρωμα – για να μεταφέρει μονάδες ADP-ριβόζης σε ποικίλες πρωτεΐνες του πυρήνα, μεταξύ άλλων και σε ιστόνες, τοποϊσομεράσες, DNA πολυμεράσες, DNA λιγάσες και μεταγραφικούς παράγοντες, όπως επίσης και στον εαυτό της. Με τον ίδιο τρόπο ανοίγει και τη δομή της χρωματίνης, ώστε να είναι προσβάσιμη σε επιδιορθωτικά ένζυμα (Curtin 2005).

Ανάλογα με τον βαθμό ενεργοποίησής της, η PARP-1, μπορεί να ωθήσει το κύτταρο προς ανάκαμψη ή θάνατο. Η υπερ-ενεργοποίηση της PARP-1 μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση των ενεργειακών επιπέδων του κυττάρου, οπότε εμπλέκεται σε δύο διακριτές μορφές κυτταρικού θανάτου που επάγονται από βλάβη στο DNA, στην απόπτωση και τη νέκρωση. Λόγω του μεγάλου αριθμού αντιγράφων, η υπερ-ενεργοποίηση του ενζύμου μπορεί να επάγει εξάντληση των αποθεμάτων του NAD^+ , και ως εκ τούτου του ATP, οδηγώντας σε νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο. Μπορεί επίσης να πυροδοτήσει την απόπτωση μέσω προώθησης της απελευθέρωσης προ-αποπτωτικών ενζύμων από το μιτοχόνδριο, όπως είναι ο παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης [AIF, apoptosis inducing factor] και η ενδονουκλεάση G. Πέραν αυτού, η ενεργοποίηση της PARP-1 μπορεί να επάγει την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, να αυξήσει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) και να αποσταθεροποιήσει το μεμβρανικό σύστημα του μιτοχονδρίου, οδηγώντας σε αύξηση της διαπερατότητας και κυτταρικό θάνατο. Συν τοις άλλοις, η ενεργοποίηση της PARP μπορεί να επάγει τις MAPK, τον πυρηνικό παράγοντα ενισχυτή της κ-ελαφριάς αλυσίδας των

ενεργοποιημένων B κυττάρων [NF-κB, Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells] και την AP-1 (Halmosi και συν. 2016).



Εικόνα 1.6 Το βιοχημικό μονοπάτι της πολύ(ADP-ριβοζυλ)ίωσης. Η PARP ανιχνεύει και γρήγορα προσδένεται στα σπασίματα του DNA [1] και καταλύει την πολυ(ριβοζυλ)ίωση κυρίως της ίδιας χρησιμοποιώντας το NAD⁺ ως υπόστρωμα [2]. Όταν δημιουργηθούν μακριά διακλαδιζόμενα πολυμερή, η PARP απελευθερώνεται από το DNA και τα πολυμερή αποικοδομούνται από το ένζυμο γλυκοϋδρολάση της (ADP-ριβόζης) [PARG, poly(ADP-ribose) glycohydrolase], επιτρέποντας την πρόσβαση των συμπλόκων επιδιόρθωσης του DNA στη βλάβη και την επακόλουθη επιδιόρθωσή της [3,4]. (Προσαρμογή από Herceg και Wang 2001)

Η PARP-1 μπορεί *in vitro* να πρωτεολυθεί από όλες σχεδόν τις κασπάσες, ενώ *in vivo* είναι στόχος των κασπασών-3 και -7. Υπάρχουν τέσσερα πιθανά μοτίβα αναγνώρισης από την κασπάση-3 στην ανθρώπινη PARP, τα οποία είναι τα DEVD (210-213), DGVC (213-216), DPID (787-790) και DGVD (964-967). Από αυτά, πιο προσφιλές είναι το DEVD (Ασπαρτικό-Γλουταμικό- Βαλίνη- Ασπαρτικό). Παρόλο αυτά, η PARP-1 πρωτεολύεται ακόμη και απουσία της κασπάσης-3. Επιπλέον, η κασπάση-7, αλλά όχι η κασπάση-3, διασπά την πολυ(ADP-ριβοζυλιωμένη) PARP-1 πιο αποτελεσματικά από το μη τροποποιημένο ένζυμο. Η διάσπαση της PARP-1 παράγει ένα καρβοξυτελικό θραύσμα 89kDa (το οποίο περιέχει την καταλυτική περιοχή) και ένα αμινοτελικό θραύσμα 24kDa με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA. Το θραύσμα των 89kDa διατηρεί την βασική ενζυμική του δραστηριότητα χάρη στην παρουσία της καταλυτικής περιοχής, ωστόσο δεν έχει την ικανότητα προσέλκυσης από τα σπασίματα στους κλώνους του DNA. Μετά την πρωτεόλυση, η PARP-1 χάνει την λειτουργία αναγνώρισης

τομών και είναι ανενεργή απέναντι στις βλάβες του DNA. Ως εκ τούτου, προλαμβάνεται η κατανάλωση NAD^+ (Soldani and Scovassi 2002).

Το αμινοτελικό p24 θραύσμα διατηρεί την ισχυρή ικανότητα πρόσδεσης στο DNA μετά την πρωτεόλυση από τις κασπάσες και εμποδίζει πλήρως την καταλυτική δραστηριότητα της άθραυστης PARP-1, δημιουργώντας έτσι μία νέα λειτουργία στο αποπτωτικό θραύσμα που περιέχει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την ισχυρή παρεμπόδιση της σύνθεσης πολυ(ADP-ριβόζης) όπως επίσης και την πλήρη κατάργηση της επιδιόρθωσης μέσω εκτομής βάσης. Τέλος, μπορεί να βγει το συμπέρασμα ότι το αποπτωτικό θραύσμα με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA έρχεται σε συμφωνία με την πρωτεολυτική διάσπαση ώστε να παρεμποδίσουν από κοινού την υδρόλυση του NAD^+ και να διατηρήσουν τα ενεργειακά επίπεδα του κυττάρου. Από αυτή την άποψη, η θραύση της PARP-1 προωθεί την απόπτωση αποτρέποντας την επιβίωση μέσω επιδιόρθωσης του DNA και εμποδίζοντας την νέκρωση που θα ήταν αποτέλεσμα της εξάντλησης της ενέργειας (D'Amours και συν. 2001· Soldani & Scovassi 2002).

Όσον αφορά στο p89 κομμάτι, η παρουσία του μπορεί να εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και το ερέθισμα της απόπτωσης και συμβαίνει ανεξάρτητα από την αποσύνθεση του μιτοχονδριακού δυναμικού (Li και συν. 2000). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η αποκωδόμηση της PARP-1 στην απόπτωση μπορεί να προηγείται της θραύσης του DNA (Soldani και συν. 2001). Πέραν αυτού, φαίνεται ότι το p89 θραύσμα μεταναστεύει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα στα κύτταρα που βρίσκονται σε όψιμη απόπτωση με προχωρημένο πυρηνικό θρυμματισμό. Επίσης, η πολυ(ADP-ριβόζη) αφαιρείται από το p89 σε προχωρημένα αποπτωτικά στάδια από την γλυκοϋδρολάση της πολυ(ADP-ριβόζης) (Soldani και συν. 2001). Η θραύση της PARP είναι, λοιπόν, ένα από τα πιο πρώιμα ανιχνεύσιμα γεγονότα της απόπτωσης.

1.5 Οξειδωτικό στρες και απόπτωση στην καρδιά

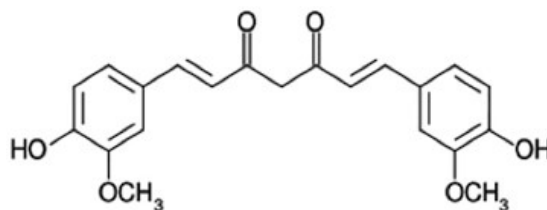
Οι ασθένειες της καρδιάς είναι μία σημαντική και σοβαρή αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας λόγω της σύνθετης παθογένεσής τους. Απώλεια των καρδιομυοκυττάρων μέσω απόπτωσης έχει αναφερθεί σε πληθώρα καρδιοαγγειακών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του εμφράγματος του μυοκαρδίου (MI, myocardial infarction -θάνατος ενός τμήματος της καρδιάς λόγω ανεπαρκούς αιμάτωσης), της βλάβης από ισχαιμία -δηλαδή ανεπαρκή παροχή αίματος στην καρδιά- και επαναιμάτωση [IRI, ischemia/reperfusion injury], των τελευταίων σταδίων της καρδιακής ανεπάρκειας και την καρδιομυοπάθεια από την δοξορουβικίνη (Kumar και συν. 2002).

Αν και έχει υποστηριχθεί ότι η απόπτωση των κυττάρων της καρδιάς που δεν είναι μυοκύτταρα, όπως είναι μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα ενδοθηλιακά και αγγειακά λεία μυικά κύτταρα, οι ινοβλάστες και οι μυοϊνοβλάστες καθώς και τα ουδετερόφιλα/λευκοκύτταρα, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο έμφραγμα του μυοκαρδίου και την καρδιακή ανεπάρκεια (Corbalan και συν. 2016), ο ρόλος της απώλειας των καρδιομυοκυττάρων είναι καθοριστικός και περίπλοκος, και γι αυτό έχει μελετηθεί εκτενώς και συνεχίζει να μελετάται προκειμένου να αποσαφηνιστεί πλήρως. Στα καρδιακά μυοκύτταρα, η ενεργοποίηση των ERKs είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη της υπερτροφίας και την ειδική γονιδιακή έκφραση. Η ενεργοποίηση της Src οικογένειας κινασών τυροσίνης [SFKs, Src family of protein tyrosine kinases] και της Ras απαιτείται για την ενεργοποίηση των ERKs στα λεία μυικά κύτταρα, ενώ η πρωτεϊνική κινάση C [PKC, Protein Kinase C], αλλά όχι οι SFKs ή η Ras, είναι κρίσιμη για την ενεργοποίηση των ERKs στα καρδιακά μυοκύτταρα (Zou και συν. 1996). Οι SFKs είναι μία οικογένεια κινασών που παίζουν κομβικό ρόλο στην ρύθμιση της μεταγωγής σήματος από ένα εύρος υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας. Οι JNKs και η p38 MAPK ενεργοποιούνται από ερεθίσματα όπως οι προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, η υπερϊώδης ακτινοβολία, οι ROS και το κυτταρικό στρες, συμπεριλαμβανομένου του θερμικού σοκ και του οσμωτικού στρες (Kyriakis και Avruch 2001). Είναι γνωστό ότι οι SFKs, η Ras και η Raf-1 είναι πολύ σημαντικές για την ενεργοποίηση των ERKs από το H₂O₂ και ότι η ενεργοποίηση των ERKs παίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία των καρδιακών μυοκυττάρων από τον αποπτωτικό θάνατο που ακολουθεί το οξειδωτικό στρες (Aikawa και συν. 1997).

Η ισχαιμική καρδιοπάθεια [IHD, ischemic heart disease] είναι μία κυρίαρχη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου [AMI, acute myocardial infarction] είναι η πιο κοινή εκδήλωση της IHD και εκπροσωπεί μία κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας. Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η απόπτωση παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην ισχαιμική καρδιοπάθεια. Η απόπτωση συνεισφέρει σημαντικά στον θάνατο των μυοκυττάρων στο AMI και συμβαίνει κυρίως στην περιοχή γύρω από το έμφραγμα (Saraste και συν. 1997· Olivetti και συν. 1996). Ασθενείς που ανέπτυξαν συμπτωματική καρδιακή ανεπάρκεια σύντομα μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου, συσχετίστηκαν με σημαντικά αυξημένους ρυθμούς απόπτωσης (Lee και συν. 2003).

1.6 Η κουρκουμίνη

Η κουρκουμίνη (curcumin) είναι ένα σύγχρονο «φάρμακο», η χρήση του οποίου έχει τις ρίζες της στην παραδοσιακή Ινδική ιατρική. Η κουρκουμίνη είναι μία φυσική χρωστική ουσία που εμπεριέχεται στο Ινδικό κύπειρο ή κουρκουμά (*Curcuma longa*), το οποίο ανήκει



Εικόνα 1.7 Η δομή της κουρκουμίνης

στην οικογένεια του τζίντζερ (Ζιγγιβεριίδες, Zingiberaceae). Στην παραδοσιακή ιατρική, η κουρκουμίνη χρησιμοποιούνταν για να θεραπεύσει διάφορες κοινές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένων των στομαχικών προβλημάτων, του φουσκώματος, της δυσεντερίας, του έλκους, του ίκτερου, της αρθρίτιδας, διαστρεμμάτων, πληγών, αμυχών και μολύνσεων του δέρματος και των ματιών. Χημικά, η κουρκουμίνη είναι χημική ουσία διφαιρλουϊμεθάνιο [diferuloylmethane/1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3, 5 dione], αλλά η κουρκουμίνη του εμπορίου περιέχει επίσης ~17% και 3% διμεθοξικουρκουμίνη [DMC, demethoxycurcumin] και μεθοξικουρκουμίνη [BDMC, methoxycurcumin] αντίστοιχα. Η κουρκουμίνη, ωστόσο, είναι η πιο ενεργή από τις τρεις ενώσεις (Aggarwal και Sung 2009).

Έχει βρεθεί εδώ και χρόνια ότι μπορεί να δημιουργήσει ρίζες υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton, ανάγοντας τον Fe^{3+} σε Fe^{2+} (Kunchandy και Rao 1989). Είναι ένας πιθανός αντιφλεγμονώδης παράγοντας και πολλοί αντιφλεγμονώδεις παράγοντες είναι γνωστό ότι δρουν μέσω του καθαρισμού των ριζών οξυγόνου. Επίσης, η κουρκουμίνη έχει φανεί ότι προσδένει συγκεκριμένα δισθενή μεταλλικά ιόντα, όπως Fe, Cu, VO^{2+} , Mn και Zn, έχοντας μεγάλη συγγένεια για τον σίδηρο και τον χαλκό. Η μεταλλική σύνδεση είναι δυνατή μέσω της περιοχής της β-δικετόνης της κουρκουμίνης (βλ. Εικόνα 1.7).

Οι μοριακοί στόχοι που επηρεάζονται έμμεσα από την κουρκουμίνη μπορεί να επαχθούν ή να ανασταλούν, ανάλογα με τον στόχο. Η κουρκουμίνη έχει βρεθεί ότι επάγει την έκφραση του υποδοχέα θανάτου 5 [DR5, Death Receptor 5], της αναγωγάσης της γλουταθειόνης, του υποδοχέα 1 της τρανσφερρίνης και της φερριτίνης Η και L, με έναν μηχανισμό που δεν είναι πλήρως κατανοητός ακόμα. Επίσης, ρυθμίζει αρνητικά διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο NF-κB, ο παράγοντας 1α που επάγεται από την υποξία [HIF-1α, hypoxia inducible factor], η AP-1, πρωτεϊνικές κινάσες, υποδοχείς αυξητικών παραγόντων –όπως ο EGFR και ο υποδοχέας 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα [HER2, human epidermal growth factor receptor 2], αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως η κυτταρική cFLIP, η πρωτεΐνη-αναστολέας της απόπτωσης [IAP, inhibitor of apoptosis protein], η Bcl-2 και η Bcl-xL (Bech-Otschir και συν. 2001).

Οι προστατευτικές δράσεις της κουρκουμίνης εναντίον του οξειδωτικού στρες έχουν προταθεί ως εξής: 1) Ρυθμίζει ανοδικά τα ενδογενή αντιοξειδωτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένης της SOD, της γλουταθειόνης και της καταλάσης, 2) Αναστέλλει την παραγωγή των ROS και εξαλείφει τις ROS, 3) Διατηρεί την λειτουργία των μιτοχονδρίων, ειδικότερα διατηρώντας το μιτοχονδριακό αναγωγικό δυναμικό (C. Yang και συν. 2013· Y. Yang και συν. 2013). Στην πρώτη περίπτωση, πέραν από την αύξηση της έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων, η παραγωγή δεικτών του οξειδωτικού στρες, όπως είναι η μαλονδιαλδεϋδη [MDA, malondialdehyde], το σουπεροξειδίο, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, εξασθενεί. Επιπλέον, η κουρκουμίνη καταστέλλει τις καταλυτικές υπομονάδες της οξειδάσης του NADPH και ως εκ τούτου καταστέλλει την παραγωγή των ROS και τα οξειδωτικά επίπεδα (Soetikno και συν. 2012· Yu και συν. 2012). Τα μιτοχόνδρια ελέγχουν την κυτταρική αναπνοή και την παραγωγή ενέργειας, οι οποίες είναι αμφοτέρως στενά συνδεδεμένες με το οξειδωτικό στρες. Η μείωση του οξειδωτικού στρες μέσω της στόχευσης των μιτοχονδρίων έχει επιβεβαιωθεί ως μία πιθανή θεραπευτική προσέγγιση ώστε να περιορισθεί η καρδιακή βλάβη από την ισχαιμία και επαναιμάτωση. Έχει φανεί λοιπόν ότι η μιτοχονδριακή οξειδωτική βλάβη που επάγεται από την ισχαιμία και επαναιμάτωση εξασθενεί σημαντικά μετά από προεπώαση με κουρκουμίνη.

Πέραν των παραπάνω, η κουρκουμίνη φαίνεται να έχει αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα στα καρδιομυοκύτταρα των θηλαστικών. Έχει αποδειχτεί ότι η κουρκουμίνη ενεργοποιεί αρκετές κινάσες που οδηγούν σε επιβίωση και μεταγραφικούς παράγοντες όπως η κινάση των φωσφοϊνοσιτιδίων 3 [PI3K, phosphoinositide 3-kinase], η Akt και οι ERK1/2, αλλά αναστέλλει την δραστηριότητα της JNK. Στο μεταξύ, η έκφραση του Bcl-2 προωθείται, κι έτσι αναστέλλεται το αποπτωτικό μονοπάτι και ο κυτταρικός θάνατος (Jeong και συν. 2012).

Η καταστολή της απόπτωσης έχει και ως αποτέλεσμα την μείωση της βλάβης από την ισχαιμία και επαναιμάτωση του μυοκαρδίου. Η κουρκουμίνη ρυθμίζει ανοδικά την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 και ρυθμίζει καθοδικά την προ-αποπτωτική κασπάση-3 μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της κινάσης του Ιανού [JAK, Janus kinase] /των πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος και ενεργοποιητών της μεταγραφής [STAT, Signal Transducers and Activators of Transcription – JAK/STAT pathway], το οποίο είναι αποδεδειγμένο ότι βελτίωσε την μετα-ισχαιμική καρδιακή λειτουργία και μείωσε το μέγεθος του εμφράγματος του μυοκαρδίου και την απελευθέρωση της γαλακτικής αφυδρογονάσης στην ροή της στεφανιαίας αρτηρίας (Duan και συν. 2012). Σε κουνέλια που υπέστησαν καρδιοπνευμονικό bypass, η κουρκουμίνη περιορίζει την αύξηση της κασπάσης-3 και της PARP, ώστε να αναστείλει την απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων στο σκηνικό της βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση, κάτι που είναι συνακόλουθο των βελτιωμένων αποπτωτικών επιπέδων και μυοκαρδιακής βλάβης

(Yeh και συν. 2005). Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι η κουρκουμίνη είναι ικανή να διατηρεί την ενδοκυτταρική ακεραιότητα των καρδιομυοκυττάρων στην IRI, καθώς σταθεροποιεί το πλασμαλήμμα καταστέλλοντας την απελευθέρωση ενζύμων από τον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια, τα λυσοσώματα και τα μιτοχόνδρια (Nirmala και Puvanakrishnan 1996).

Τα παραπάνω συνηγορούν στο ότι η κουρκουμίνη μπορεί να αποτελέσει έναν παράγοντα που μπορεί να προστατεύει την καρδιά από σχετιζόμενες με την απόπτωση ασθένειες. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις έχει αναφερθεί και αύξηση της βλάβης που επάγεται από το οξειδωτικό στρες, μετά την επίδραση με κουρκουμίνη. Όσον αφορά στα καρκινικά κύτταρα, η κουρκουμίνη έχει επανειλημμένα αποδειχτεί ότι επάγει την απόπτωση σε διάφορους κυτταρικούς τύπους (Ravindran και συν. 2009), με πιο πρόσφατο παράδειγμα την περίπτωση ποντικών στα οποία είχε γίνει ενδοπεριτονεϊκή μεταμόσχευση κακοήθους μεσοθηλιώματος. Εκεί, η απόπτωση αξιολογήθηκε με αύξηση του λόγου του Bax/Bcl-2, αύξηση της δραστηριότητας των κασπασών 3, 8 και 9, σε συνδυασμό με πρωτεόλυση της PARP-1 (Masuelli και συν. 2017). Ενώ έχει υποστηριχθεί ότι η κουρκουμίνη είναι τοξική για τα καρκινικά αλλά όχι για τα φυσιολογικά κύτταρα, επηρεάζοντάς τα διαφορετικά (Ravindran και συν. 2009), πριν από μερικά χρόνια φάνηκε ότι η προεπάωση υγιών καρδιομυοκυττάρων H9c2 με κουρκουμίνη πριν την επίδραση με την δοξορουβικίνη, η οποία είναι ένα πολύ συχνά χρησιμοποιούμενο -αλλά και με ισχυρές παρενέργειες στην καρδιά- χημειοθεραπευτικό, οδηγεί σε αύξηση της κυτταροτοξικότητας της δοξορουβικίνης και σε επακόλουθη απόπτωση των κυττάρων (Hosseinzadeh και συν. 2011). Ακόμα πιο πρόσφατα, αποδείχτηκε στο δικό μας εργαστήριο ότι η επίδραση με αυξανόμενη συγκέντρωση κουρκουμίνης, αλλά και η επίδραση για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε H9c2 καρδιομυοκύτταρα, μπορεί να έχει κυτταροτοξική δράση και να οδηγεί σε απόπτωση μέσω επαγωγής της φωσφορυλίωσης των p38-MAPK και JNK κινασών, ενεργοποίησης της κασπάσης-3 αλλά θραύσης της PARP (Zikaki και συν. 2014).

2. ΣΤΟΧΟΙ

Οι στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν:

- I. Η διερεύνηση της πιθανής δράσης της κουρκουμίνης ως αντιοξειδωτικού παράγοντα σε μικρές συγκεντρώσεις και ως προ-οξειδωτικού σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Επίσης, η διερεύνηση της οξειδωτικής δράσης του H_2O_2 400 μM . Για την επίτευξη των στόχων αυτών μελετήθηκε το δοσοεξαρτώμενο πρότυπο της βιωσιμότητας των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης και με συγκεκριμένη συγκέντρωση H_2O_2 , καθώς και του συνδυασμού κουρκουμίνης και H_2O_2 .
- II. Η μελέτη των σηματοδοτικών μονοπατιών της απόπτωσης που επάγεται από το οξειδωτικό στρες σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2. Για την επίτευξη του στόχου αυτού μελετήθηκε το χρονοεξαρτώμενο πρότυπο θραύσης της PARP, καθώς και της μεταβολής των επιπέδων της Bax στο κυτταρόπλασμα και της φωσφορυλίωσης της Bcl-2.
- III. Η διερεύνηση της εμπλοκής των ιόντων Ca^{2+} στα μονοπάτια της απόπτωσης που επάγονται από το οξειδωτικό στρες της κουρκουμίνης 50 μM . Για την επίτευξη του στόχου αυτού, χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς νιφεδιπίνη και βεραπαμίλη, που παρεμποδίζουν τα κανάλια Ca^{2+} , καθώς και το χηλωτικό μόριο BAPTA-AM.
- IV. Η διερεύνηση της εμπλοκής του ανταλλάκτη Na^+/H^+ , της οξειδάσης του NADPH, καθώς και του συμπλόκου III της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μονοπάτια της απόπτωσης που ενεργοποιούνται από την κουρκουμίνη 50 μM . Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς καριπορίδη, αποκυνίνη και αντιμυκίνη A, αντίστοιχα, στην μελέτη του προτύπου της θραύσης της PARP και της μεταβολής των επιπέδων των p-Bcl-2, Bax.
- V. Η διερεύνηση του ρόλου των MAPKs, και συγκεκριμένα των ERKs, των JNKs και της p38 MAPK, καθώς και των MSK1 και PKA κινασών, στην επαγωγή της απόπτωσης από την κουρκουμίνη 50 μM . Για την επίτευξη του στόχου αυτού χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς PD98059, SB203580, SP600125 και H89 στην μελέτη του προτύπου θραύσης της PARP με ανάλυση κατά Western.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1 Βιολογικό υλικό

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά H9c2. Τα συγκεκριμένα κύτταρα είναι κλώνοι καρδιακών μυοβλαστών, που απομονώθηκαν από εμβρυικό καρδιακό ιστό BDIX αρουραίων (Kimes και Brandt 1976).

3.1.2 Συντήρηση κυτταροκαλλιιεργειών

- Θρεπτικό μέσο DMEM [Dubesco's modified Eagle's medium], από την εταιρεία PAA Laboratories GmbH.
- Ορός εμβρύου βοδιού [FBS, Fetal Bovine Serum], από την εταιρεία PAA Laboratories GmbH.
- Αντιβιοτικά που προστίθενται στο θρεπτικό μέσο (10x) (στρεπτομυκίνη 1000 µg/ml και πενικιλίνη 10000 units/mL), από την εταιρεία PAA Laboratories GmbH.
- Διάλυμα θρυψίνης-EDTA 0.5-0.2% σε PBS (10x), από την εταιρεία PAA Laboratories GmbH. Το διάλυμα αραιώνεται σε PBS ώστε να προκύψει τελικά διάλυμα 1x.
- Διάλυμα αιθανόλης για απολύμανση από την εταιρεία Merck.
- Διάλυμα Incuwater-Clean από την εταιρεία Applichem.

3.1.3 Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT

Για τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

- MTT [thiazolylblue-tetrazolium bromide] από την εταιρεία Applichem (#A2231.0001)
- HCl 37% w/v από την εταιρεία Applichem (#A0659.2500)
- 2-προπανόλη από την εταιρεία Merck (#1.09634.2511)

3.1.4 Ηλεκτροφόρηση και μεταφορά πρωτεϊνών

- Μίγμα δεικτών γνωστού μοριακού βάρους New England Biolabs (prestained protein marker, Broad Range, P7708S)
- Χαρτιά Whatman και μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Schleicher&Schuell

3.1.5 Αντισώματα

Για την ανοσοεντόπιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα:

- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού που αναγνωρίζει τη θέση πρωτεόλυσης της PARP από την κασπάση-3. Το αντίσωμα αυτό ανιχνεύει τόσο την πλήρη PARP (116KDa) όσο και το θραύσμα των 89kDa που προκύπτει από την πρωτεόλυσή της (#9542S από την εταιρεία Cell Signaling Technology-USA).

- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού που αναγνωρίζει κατάλοιπα από το αμινοτελικό άκρο της ανθρώπινης πρωτεΐνης Bax –ολικά επίπεδα (#2772 από την εταιρεία Cell Signaling Technology-USA).
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού που ανιχνεύει τα ολικά επίπεδα της ανθρώπινης Bcl-2. Την αναγνωρίζει μόνο όταν αυτή φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 70 (#2871S από την εταιρεία Cell Signaling Technology-USA).
- Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού που ανιχνεύει τα ενδογενή επίπεδα της ολικής β-ακτίνης (#4970S από την εταιρεία Cell Signaling Technology-USA).
- Δεύτερο αντίσωμα γίδας συζευγμένο με υπεροξειδάση που αναγνωρίζει τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G (IgGs) του κουνελιού προερχόμενο από την εταιρεία EMD Millipore Corp. (Merck).

3.1.5 Υλικά επιδράσεων

- H₂O₂ 30% w/v (#141076.1211 από την εταιρεία Panreac Quimica SA)
- Κουρκουμίνη (#81025 από την εταιρεία Cayman Chemical Company)

3.1.6 Αναστολείς

- Καναλιών ασβεστίου: Nifedipine (Sigma-Aldrich, N-7634), Verapamil (Sigma Aldrich, V-4629) & ο χηλικός παράγοντας BAPTA-AM (Sigma-Aldrich, A1076)
- MAPKs: PD98059, SB203580, SP600125 (Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, USA)
- Άλλοι: Antimycin A (Sigma-Aldrich, A8674), Cariporide ή HOE-642, Apocynin

3.1.7 Ομογενοποίηση κυττάρων

- Αναστολείς πρωτεασών: leupeptin (#L2884-5MG), DDT (#4315-1G), PMSF (#P7626-250MG) και E64 (#E3132-1MG) προερχόμενοι από την εταιρεία Sigma-Aldrich.
- Απορρυπαντικό Triton X-100 από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

3.1.8 Μέθοδος Bradford

Το αντιδραστήριο Bradford (A6932.0500) και το BSA (1391.0100) προέρχονται από την εταιρεία Appllichem.

3.1.9 Εμφάνιση των φιλμ

- Αντιδραστήριο ECL από την εταιρεία Amersham Bioscience (#RPN2106).
- Φιλμ (superRXfilm 24x18 cm, από την εταιρεία Fujifilm Europe).
- Εμφανιστής (Developer-LX24-Kodak)
- Σταθεροποιήτης (Fixer-AL4-Kodak)

3.1.10 Όργανα και συσκευές

- Κλίβανος επώασης για τις κυτταροκαλλιέργειες (SANYO, MCO 15AC).
- Οπτικό μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων (Nova, IN834)
- Θάλαμος νηματικής ροής (KB/KBM horizontal laminar airflow bench, class100, Faster)
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος (Jouan BR4i)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini Protean III cell, Biorad)
- Συσκευή μεταφοράς των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Transblot SD, Biorad).
- Τροφοδοτικό (Power Pac 1000, Biorad)
- Φασματοφωτόμετρο (Ultrospect 2000, Pharmacia Biotech)
- Φωτόμετρο ELISA (DENLEY Wellscan)
- Πολυπιπέτα Micropipeta multicanal HTL Multimate (PCE Ibérica)
- Άλλες πιπέτες: Pipetman (Gilson), DragonMed

3.1.11 Λογισμικά

- Η επεξεργασία των φιλμ, αφού σκαναρίστηκαν σε κλίμακα του γκρι σε .tif αρχεία, έγινε με το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων GIMP - GNU Image Manipulation Program, www.gimp.org.
- Η πυκνομέτρηση των ζωνών στα φιλμ πραγματοποιήθηκε με το ειδικό λογισμικό GelQuant.NET που παρέχεται από τη biochemlabsolutions.com
- Η δημιουργία των γραφημάτων και η στατιστική επεξεργασία μετά από την πυκνομέτρηση πραγματοποιήθηκαν στο GraphPad Prism, έκδοση 6.00 για Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com. Τα αποτελέσματα της μεθόδου MTT επεξεργάστηκαν στατιστικά με την εφαρμογή one-way ANOVA και του Fisher's LSD test για πολλαπλές συγκρίσεις.

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Σχετικά με τις κυτταροκαλλιέργειες

3.2.1.α Γενικά στοιχεία

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη συντήρηση των κυτταροκαλλιεργειών είναι όλοι οι χειρισμοί να γίνονται κάτω από άσηπτες συνθήκες. Για το σκοπό αυτό όλες οι εργασίες γίνονται μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής ο οποίος αποστειρώνει τον αέρα με τη μέθοδο της διήθησης. Συγκεκριμένα, ο θάλαμος διαθέτει ηθμούς υψηλής απόδοσης οι οποίοι κατακρατούν το 99,97% των σωματιδίων διαμέτρου 0,3μm και η χρήση του θεωρείται ασφαλής περίπου 20 λεπτά αφού τεθεί σε λειτουργία. Για περαιτέρω προφύλαξη ακτινοβολούμε με UV για περίπου 15 λεπτά τόσο το χώρο των κυτταροκαλλιεργειών όσο και το θάλαμο νηματικής ροής. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε καθημερινή βάση και πριν την έναρξη οποιασδήποτε εργασίας στο χώρο των κυτταροκαλλιεργειών καθώς με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται θανάτωση πολύ μεγάλου ποσοστού των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο χώρο -η υπεριώδης ακτινοβολία είναι γνωστό ότι δημιουργεί σοβαρότατες και πολλές φορές μη αναστρέψιμες βλάβες στο DNA των μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα αυτοί να νεκρώνονται άμεσα. Επιπλέον χρησιμοποιείται όσο πιο συχνά γίνεται διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v) για απολυμαντικούς σκοπούς. Όσον αφορά το θρεπτικό μέσο των κυττάρων, πραγματοποιείται θερμική απενεργοποίηση του ορού στους 56°C για 30 λεπτά και επακόλουθο φιλτράρισμα, ενώ προστίθενται και τα αντιβιοτικά στρεπτομυκίνη και πενικιλίνη αφού προηγουμένως φιλτραριστούν. Τέλος σε εβδομαδιαία βάση καθαρίζονται σχολαστικά όλο το δωμάτιο και ο κλίβανος των κυτταροκαλλιεργειών. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται απολύμανση με αιθανόλη όλων των επιφανειών του χώρου, αντικατάσταση του νερού στο δίσκο του κλιβάνου με 1L αποστειρωμένου και εμπλουτισμένου με 10mL incuwater (περιέχει αντιβιοτικό) και τέλος ακτινοβόληση με UV τόσο όλου του χώρου όσο και του θαλάμου νηματικής ροής για 20 λεπτά.

3.2.1.β Συντήρηση και ανακαλλιέργεια των κυττάρων

Τα κύτταρα διατηρούνται σε κατάλληλο επωαστικό κλίβανο στους 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ κορεσμένη σε υδρατμούς. Για την αύξηση των κυττάρων της κυτταρικής σειράς H9C2 απαιτείται η χρήση του θρεπτικού υλικού DMEM εμπλουτισμένου με: ορό βοδιού FBS 10%v/v και με τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Τα συγκεκριμένα κύτταρα έχουν την ιδιότητα να διατηρούνται προσκολλημένα σε σταθερά υποστρώματα όπως αυτά των πλαστικών φιαλών (φλάσκες) ή των τρυβλίων κυτταροκαλλιέργειας διευκολύνοντας έτσι πολύ τους

χειρισμούς. Η διατήρηση των κυττάρων σε μία κυτταροκαλλιέργεια απαιτεί την τακτική ανανέωση του θρεπτικού μέσου στο οποίο πολλαπλασιάζονται προκειμένου να αποφευχθούν φαινόμενα εκφυλισμού λόγω εξάντλησης των θρεπτικών και παραγωγής τοξικών μεταβολιτών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιούμε αλλαγή του θρεπτικού μέσου της κυτταροκαλλιέργειας κάθε 2-3 ημέρες και διαίρεση αυτής όταν η πυκνότητα φθάνει σε ποσοστό κάλυψης ~70%. Συνοπτικά, η διαδικασία ανακαλλιέργειας έχει ως εξής:

- Απομάκρυνση και απόρριψη του παλιού θρεπτικού μέσου
- Ξέπλυμα με την προσθήκη 3mL (για τις μεγαλύτερου μεγέθους φιάλες καλλιέργειας) ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών-PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.7mM KH₂PO₄, pH 7.4). Συγκεκριμένα, με την προσθήκη του PBS γίνεται απομάκρυνση των υπολειμμάτων του παλιού θρεπτικού και των χαλαρά προσκολλημένων νεκρών κυττάρων, που πιθανόν έχουν απομείνει στη φιάλη καλλιέργειας
- Αφαίρεση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS και προσθήκη 1,5mL διαλύματος θρυψίνης-EDTA προσπαθώντας με ήπια ανακίνηση να καλυφθούν με αυτό όλα τα προσκολλημένα κύτταρα. Η προσθήκη αυτού του διαλύματος στοχεύει στην πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών κυτταρικής προσκόλλησης ώστε να αποκολληθούν όλα τα κύτταρα από το στερεό υπόστρωμα της φιάλης καλλιέργειας. Ο χειρισμός του διαλύματος θρυψίνης πρέπει να γίνεται με πολύ μεγάλη προσοχή διότι η θρυψίνη ως πρωτεολυτικό ένζυμο διασπά και τον εαυτό της. Γι αυτό τον λόγο φυλάσσεται συνεχώς στο ψυγείο και επανατοποθετείται σε αυτό αμέσως μόλις χρησιμοποιηθεί.
- Επώαση για 2-3 λεπτά των κυττάρων με το διάλυμα της θρυψίνης στον κλίβανο στους 37°C και εν συνεχεία παρατήρηση της φιάλης καλλιέργειας στο οπτικό μικροσκόπιο για να επιβεβαιώσουμε ότι όντως πραγματοποιήθηκε η αποκόλληση των κυττάρων.
- Τερματισμός της αντίδρασης της θρυψίνης με την προσθήκη 3,5mL πλήρους θρεπτικού μέσου (DMEM+FBS). Ακολουθεί ανάδευση με τη βοήθεια πιπέτας ώστε να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα κυττάρων, που δημιουργήθηκαν κατά τη διάρκεια της επώασης με το διάλυμα θρυψίνης, κι έπειτα το εναιώρημα μοιράζεται σε νέες φλάσκες ή και σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας.

2.2.1.γ Ψύξη και απόψυξη των κυττάρων

Για τη διατήρηση μίας κυτταρικής σειράς για μεγάλα χρονικά διαστήματα είναι απαραίτητο να υπάρχει διαθέσιμο απόθεμα κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη επειδή η πολλαπλασιαστική τους ικανότητα φθίνει με το πέρασμα του χρόνου. Με αυτόν τον τρόπο, έχουμε ανά πάσα στιγμή διαθέσιμα κύτταρα νεαρής γενιάς, τα οποία και αποψύχουμε κατά βούληση για την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Η διαδικασία της ψύξης έχει ως εξής: τα κύτταρα αποκολλώνται από τη φλάσκα με την προσθήκη διαλύματος θρυψίνης-EDTA, ακριβώς όπως και στην ανακαλλιέργεια των κυττάρων, και στη συνέχεια, αφού τερματιστεί η αντίδραση της θρυψίνης με την προσθήκη πλήρους θρεπτικού μέσου, το εναίωρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται στις 12000 rpm (στροφές/λεπτό). Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο, τα κύτταρα επανεναιωρούνται σε 1 mL μέσου κατάψυξης (90% (v/v) FBS + 10% (v/v) DMSO) και τοποθετούνται σε ειδικές αμπούλες, ανθεκτικές στις χαμηλές θερμοκρασίες. Η παρουσία του DMSO, που αποτελεί κρυοπροστατευτικό, και η σταδιακή ψύξη (-20,-80,-196°C, δηλ. θερμοκρασία υγρού αζώτου) εξασφαλίζουν τον περιορισμό του σχηματισμού κρυστάλλων πάγου και τη διατήρηση των κυττάρων στο υγρό άζωτο για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Η διαδικασία της απόψυξης, αντίθετα με τη ψύξη, πρέπει να γίνει γρήγορα ώστε να περιορισθούν οι βλάβες στα κύτταρα από τους κρυστάλλους πάγου που πιθανόν έχουν σχηματιστεί μέσα τους. Έτσι, η αμπούλα με τα παγωμένα κύτταρα τοποθετείται άμεσα στους 37°C (στο υδατόλουτρο ή στον κλίβανο) και στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρονται σε φιάλη καλλιέργειας με πλήρες θρεπτικό μέσο και τοποθετούνται στον κλίβανο. Συνήθως το ποσοστό θνησιμότητας σε αυτήν τη φάση είναι πολύ υψηλό αφενός λόγω του στρες που υφίστανται τα κύτταρα κατά τη διαδικασία της ψύξης και αφετέρου λόγω της παρουσίας του DMSO που είναι πολύ τοξικό. Για τον λόγο αυτό, την επόμενη ημέρα γίνεται απαραίτητως αλλαγή του θρεπτικού μέσου.

3.2.1.δ Προετοιμασία τρυβλίων για επιδράσεις

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται όταν θέλουμε να πραγματοποιήσουμε ένα πείραμα, δηλαδή όταν θέλουμε να μελετήσουμε την επίδραση διαφόρων παραγόντων στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Ειδικότερα, την προηγούμενη ημέρα απ' αυτήν του πειράματος πραγματοποιούμε την ίδια διαδικασία με αυτήν της ανακαλλιέργειας των κυττάρων αλλά, αφού τερματίσουμε την αντίδραση της θρυψίνης με πλήρες θρεπτικό μέσο, ακολουθεί καταμέτρηση των κυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer. Συγκεκριμένα μετράμε τον αριθμό των κυττάρων στα 8 μεγάλα τετράγωνα της πλάκας, υπολογίζουμε το μέσο όρο και στη συνέχεια

πολλαπλασιάζουμε επί 104 προκειμένου να βρούμε τον αριθμό των κυττάρων/ml. Το κατάλληλο μέγεθος τρυβλίου επιλέγεται κάθε φορά ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων που χρειάζεται να χρησιμοποιήσουμε. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία διαμέτρου 35mm και χωρητικότητας 2mL στα οποία τοποθετούσαμε ~800.000 κύτταρα προκειμένου να είναι η επιφάνεια τους καλυμμένη σε ποσοστό 70-80% την επόμενη ημέρα. Το κάθε τρυβλίο συμπληρώνεται τελικά με πλήρες θρεπτικό μέσο ώστε ο τελικός όγκος να είναι 2mL και αναδεύεται με ήπιες κυκλικές κινήσεις ώστε να έχουμε ομοιόμορφη επίστρωση των κυττάρων στην επιφάνειά του. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετούνται στον κλίβανο για επώαση.

3.2.1.ε Πριν και κατά τη διάρκεια του πειράματος

Την επόμενη ημέρα, και εφόσον η επιφάνεια των τρυβλίων είναι καλυμμένη από κύτταρα σε ποσοστό 70-80%, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο από τα τρυβλία και ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Προσεκτική αφαίρεση όλου του θρεπτικού υλικού από τα τρυβλία.
- Πλήρωση του τρυβλίου με 2 ml (για τα τρυβλία διαμέτρου 35mm) θρεπτικού μέσου χωρίς ορό.
- Επώαση των τρυβλίων με το θρεπτικό χωρίς ορό για ~24 ώρες (overnight) στον κλίβανο χωρίς να κάνουμε κανένα χειρισμό. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται στέρηση και είναι απαραίτητη προκειμένου να είμαστε βέβαιοι ότι η παρατηρούμενη κυτταρική απόκριση, μετά το τέλος του πειράματος οφείλεται στους παράγοντες με τους οποίους επιδράσαμε και όχι σε πιθανή επίδραση συστατικών του ορού. Επίσης, λίγες ώρες μετά την στέρηση τα κύτταρα σταματούν να πολλαπλασιάζονται, κι έτσι την επόμενη βρίσκονται πάνω-κάτω στην ίδια φάση του κυτταρικού κύκλου. Στην περίπτωση που η επίδραση που θέλουμε να κάνουμε έχει μεγάλη διάρκεια (π.χ. 16 ή 24 ώρες), η στέρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί και για 3-4 ώρες, χωρίς να επηρεάζεται το πείραμα.
- Μετά την παρέλευση των 3-4 ωρών ή την επόμενη μέρα είναι δυνατή η επίδραση με τους επιθυμητούς παράγοντες, οι οποίοι διαλύονται στο θρεπτικό μέσο του τρυβλίου που δεν περιέχει ορό. Στην περίπτωση χρήσης αναστολέων, είναι απαραίτητο να γίνει προεπώαση των κυττάρων με τον κατάλληλο αναστολέα για 30 λεπτά και μετά να ακολουθήσει η προσθήκη του παράγοντα επίδρασης.

3.2.2 Ομογενοποίηση των κυττάρων και απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης

Όταν ολοκληρωθεί ο χρόνος των επιδράσεων, τα τρυβλία μεταφέρονται στον πάγο και ακολουθεί η παρακάτω διαδικασία:

- Απόρριψη του θρεπτικού υλικού και προσθήκη παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος PBS.
- Δεύτερο ξέπλυμα με παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS και καλή απομάκρυνση αυτού (τίναγμα του τρυβλίου)
- Προσθήκη στο κάθε τρυβλίο 150μL διαλύματος λύσης Buffer G με αναστολείς πρωτεασών και φωσφατάσων (200μM leupeptin, 10 μM E-64, 5μM DTT, 300 μM PMSF), καθώς και Triton X-100 0.5% (v/v) για καλύτερη θραύση των κυτταρικών μεμβρανών. Οι αναστολείς προστίθενται διότι με την ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών και την απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού περιεχομένου, απελευθερώνονται και πρωτεάσες και φωσφατάσες, οι οποίες μπορεί να τροποποιήσουν τα επίπεδα ή και την ενεργότητα των μελετώμενων πρωτεϊνών.
- Αποκόλληση των κυττάρων από το τρυβλίο με χρήση κατάλληλου εργαλείου απόξεσης των κυττάρων (cell scraper) και μεταφορά σε πλαστικά σωληνάκια τύπου erpendorf.
- Επώαση στον πάγο για 10 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση σε 10000rpm (στροφές/λεπτό) για 5 λεπτά στους 4°C.
- Συλλογή από κάθε δείγμα 120 μL υπερκειμένου σε νέα σωληνάκια τύπου erpendorf, αφού προηγουμένως κρατηθούν 2μl για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών κάθε δείγματος με τη μέθοδο Bradford, σε σωληνάκια τύπου erpendorf που ήδη περιέχουν 98μL νερό.
- Έπειτα από τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (βλ. 2.2.3), ακολουθεί προσθήκη στα σωληνάκια φυγοκέντρησης 1/3 του όγκου των δειγμάτων Sample Buffer 4x (διάλυμα κατεργασίας-loading buffer: 300mM Tris/HCl pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 13% (v/v) γλυκερόλη, 20% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.2% (w/v) κυανό της βρωμοφαινόλης), δηλαδή στην παρούσα εργασία 40λ. Το διάλυμα κατεργασίας είναι απαραίτητο αφενός για τη δημιουργία αποδιατακτικών συνθηκών και αφετέρου για να είναι ορατά τα πρωτεϊνικά δείγματα κατά την ηλεκτροφόρηση.

- Βρασμός των δειγμάτων για 3 λεπτά και φύλαξη τους στην κατάψυξη μέχρι την στιγμή της ηλεκτροφόρησης.

3.2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών που περιέχονται στα δείγματά μας, είναι απαραίτητη προϋπόθεση πριν την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης, καθώς σε κάθε πηγαδάκι στο πήκτωμα πρέπει να φορτώσουμε ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης προκειμένου να έχουμε συγκρίσιμα και αξιόπιστα αποτελέσματα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται η μέθοδος Bradford (Bradford 1976).

Το αντιδραστήριο Bradford περιέχει όξινο διάλυμα της χρωστικής Coomassie brilliant blue G-250, η οποία συνδέεται με τις ελεύθερες αμινομάδες των πρωτεϊνών του δείγματος. Κατά τη σύνδεση αυτή έχουμε μετατόπιση του μεγίστου απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 στα 595nm, λόγω σταθεροποίησης της ανιονικής μορφής της. Έτσι, η οπτική πυκνότητα της απορρόφησης στα 595nm είναι ευθέως ανάλογη της περιεχόμενης στα δείγματα πρωτεΐνης. Για τον σκοπό αυτό, κατασκευάζεται αρχικά πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης προερχόμενης από διάλυμα αλβουμίνης ορού του βοδιού [BSA, Bovine Serum Albumin]. Ο όγκος συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι τα 100μL και στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 1mL αντιδραστηρίου Bradford σε κάθε σωληνάκι τύπου eppendorf της πρότυπης καμπύλης, καθώς και στα δείγματα στα οποία θα προσδιορίσουμε τα ολικά επίπεδα των πρωτεϊνών. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση όλων των δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένων και αυτών της πρότυπης, και φωτομέτρησή τους στα 595nm. Τελικά, μετά την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης και τον υπολογισμό της εξίσωσης της αντίστοιχης ευθείας, υπολογίζονται τα μg της πρωτεΐνης που περιέχονται στα μl του δείγματος στα οποία προστέθηκε το αντιδραστήριο Bradford. Μετά τις κατάλληλες αναγωγές και ανάλογα με την επιθυμητή ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης που θέλουμε κατά την ηλεκτροφόρηση (συνήθως 40μg), υπολογίζονται τα μL του δείγματος που θα φορτώσουμε, ώστε σε κάθε θέση στο πήκτωμα να φορτωθεί η ίδια ποσότητα πρωτεϊνών.

3.2.4 Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE/Poly-Acrylamide-Gel-Electrophoresis, Laemmli 1970). Βασική αρχή αυτής της μεθόδου είναι η δημιουργία αποδιατακτικών συνθηκών με χρήση SDS (καταστροφή ομοιοπολικών δεσμών και απόδοση αρνητικού φορτίου σε όλες τις πρωτεΐνες) και β-μερκαπτοαιθανόλης (αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών και καταστροφή της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών) τα οποία περιέχονται στο διάλυμα κατεργασίας των δειγμάτων (Laemmli sample buffer). Με αυτόν τον τρόπο όλες οι πρωτεΐνες είναι αποδιαταγμένες και έχουν μόνο αρνητικό φορτίο. Έτσι, πραγματοποιείται διαχωρισμός αποκλειστικά και μόνο με βάση το μοριακό τους βάρος, δηλαδή πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους κινούνται ταχύτερα κατά μήκος του πηκτώματος και εντοπίζονται πιο χαμηλά σε αυτό, ενώ πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους κινούνται πιο αργά και εντοπίζονται πιο ψηλά στο πήκτωμα ηλεκτροφόρησης.

Για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κατά Laemmli σε κάθετη συσκευή, δημιουργούμε 2 είδη πηκτώματος: το πήκτωμα διαχωρισμού και το πήκτωμα επιστοίβαξης, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης και το pH. Οι πρωτεΐνες εισέρχονται πρώτα στο πήκτωμα επιστοίβαξης, ώστε να εξασφαλισθεί ότι στη θα υπάρχει στην πορεία ομοιόμορφη και ταυτόχρονη είσοδός τους στο πήκτωμα διαχωρισμού, στο οποίο και επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους με βάση το μοριακό τους βάρος. Και τα δύο είδη πηκτωμάτων σχηματίζονται με πολυμερισμό των μονομερών του ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) που συνδέονται μεταξύ τους με μόρια δις-ακρυλαμιδίου ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται παρουσία υπερθεϊκού αμμωνίου (APS) και N,N,N',N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TEMED). Το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου και του δις-ακρυλαμιδίου. Παράλληλα με τα δείγματα, ηλεκτροφορείται και μίγμα πρωτεϊνών με γνωστά μοριακά βάρη που χρησιμεύει αφενός για να παρακολουθείται η πορεία της ηλεκτροφόρησης και αφετέρου για τον προσδιορισμό (κατά προσέγγιση) του μοριακού βάρους των μελετούμενων πρωτεϊνών.

Συνοπτικά, τα στάδια της ηλεκτροφόρησης είναι τα παρακάτω:

- Καθαρισμός των δύο γυάλινων πλακών -ανάμεσα στις οποίες θα τοποθετηθεί αρχικά το πήκτωμα διαχωρισμού και στη συνέχεια το πήκτωμα επιστοίβαξης- με μεθανόλη.
- Προσθήκη του πηκτώματος διαχωρισμού (375mM Tris/HCl, pH 8.8, 8%, 10% ή 12% (w/v) ακρυλαμίδη, 0.275% (w/v) δις-ακρυλαμίδη, 0.1% (w/v) SDS ,0.1% (w/v) APS & 0.07% (v/v) TEMED). Ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θέλουμε να μελετήσουμε, χρησιμοποιούμε διαφορετική περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδη. Για

πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους χρησιμοποιούμε πηκτώματα διαχωρισμού 8% ή 10% (w/v) ακρυλαμίδη, ώστε να έχουμε μεγάλους πόρους και οι πρωτεΐνες να κινηθούν πιο εύκολα προς τα κάτω. Αντίθετα, για μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες χρησιμοποιούμε 12% (w/v) ακρυλαμίδη, ώστε να είναι μικροί οι πόροι του πηκτώματος και να μη «χάσουμε» τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν.

- Πριν προλάβει να πολυμερισθεί το πηκτώμα διαχωρισμού προσθέτουμε στην κορυφή του απεσταγμένο νερό, ώστε να ευθυγραμμιστεί η επιφάνειά του.
- Αφαίρεση του νερού και προσθήκη του πηκτώματος επιστοίβαξης (125mM Tris/HCl, pH 6.8, 5% (w/v) ακρυλαμίδη, 0.165% (w/v) δις-ακρυλαμίδη), 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) APS & 0.07% (v/v) TEMED)) με ταυτόχρονη τοποθέτηση ειδικής «χτένας», προκειμένου να δημιουργηθούν οι θέσεις (πηγαδάκια) όπου θα τοποθετηθούν τα δείγματα που θα ηλεκτροφορηθούν.
- Τοποθέτηση των γυάλινων πλακών -μόλις ολοκληρωθεί και ο πολυμερισμός του πηκτώματος επιστοίβαξης- στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (Running buffer: 25mM Tris, 192mM γλυκίνη, 0.1% (w/v) SDS). Η συσκευή ηλεκτροφόρησης έχει θέσεις για δύο σετ πηκτωμάτων, ενώ στην περίπτωση που θέλουμε να ηλεκτροφορήσουμε μόνο ένα, βάζουμε στη θέση του δεύτερου ένα ειδικό πλαστικό πλακάκι.
- Βρασμός των δειγμάτων για 3 λεπτά και τοποθέτησή τους στα πηγαδάκια του πηκτώματος με τη βοήθεια μικροσύριγγας των 50μL.
- Ηλεκτροφόρηση σε σταθερή τάση (190 Volt όταν έχουμε ένα σετ πηκτωμάτων, 200 Volt όταν έχουμε δύο) για περίπου 1 ώρα. Ειδικότερα, η πορεία της ηλεκτροφόρησης παρακολουθείται με τη βοήθεια του διαλύματος κατεργασίας (sample buffer) και τερματίζεται όταν η χρωστική εξέλθει από το πηκτώμα διαχωρισμού.

3.2.5 Ημι-στεγνή μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

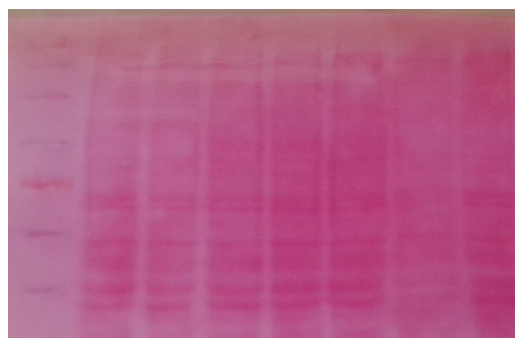
Στη συνέχεια πραγματοποιούμε μεταφορά των πρωτεϊνών από το πηκτώμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου. Με αυτό τον τρόπο, πραγματοποιείται αποτύπωση των πρωτεϊνικών ζωνών (με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις) όπως ακριβώς διαχωρίστηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση. Πρέπει να σημειωθεί ότι η διαδικασία της ημι-στεγνή (semi-dry) μεταφοράς είναι απαραίτητη, καθώς είναι αδύνατον να γίνει ο

ανοσοεντοπισμός μέσα στο τρισδιάστατο πλέγμα του πηκτώματος. Τα βασικά στάδια της μεταφοράς έχουν ως εξής:

- Διαβρέχουμε 8 κομμάτια χαρτί Whatman No.3 και 1 μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, με διαστάσεις 9×5cm, για τουλάχιστον 15 λεπτά υπό ανάδευση σε διάλυμα μεταφοράς [Transfer buffer]. Ανάλογα με το αν μας ενδιαφέρει να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες μεγάλου ή οι πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους, χρησιμοποιούμε διαφορετικό διάλυμα μεταφοράς. Για τις πρωτεΐνες μικρού-μεσαίου μοριακού βάρους (p-Bcl-2, Bax), η σύσταση του διαλύματος μεταφοράς που χρησιμοποιήθηκε είναι 25mM Tris, 192mM γλυκίνη, 20% (v/v) μεθανόλη pH 8.3. Για τις μεγαλομοριακές πρωτεΐνες (PARP), χρησιμοποιήθηκε ένα διάλυμα μεταφοράς γνωστό ως Bjerrum Schafer-Nielsen buffer, με σύσταση: 40mM Tris, 39mM γλυκίνη, 20% (v/v) μεθανόλη, 1.3mM SDS pH 9.2.
- Διαβρέχουμε το πήκτωμα διαχωρισμού -έχουμε προηγουμένως διαχωρίσει τις δύο πλάκες στις οποίες το είχαμε τοποθετήσει και έχουμε απορρίψει το πήκτωμα επιστοιβαξης- για περίπου 5 λεπτά σε διάλυμα μεταφοράς.
- Διαβρέχουμε την κάτω επιφάνεια της συσκευής ημίξηρης μεταφοράς με λίγο διάλυμα μεταφοράς και τοποθετούμε 4 κομμάτια χαρτί Whatman το ένα πάνω από το άλλο, αφαιρώντας τυχόν φυσαλίδες με ένα γυάλινο σωληνάκι.
- Τοποθετούμε την μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης πιάνοντάς την με μία λαβίδα –ποτέ δεν την αγγίζουμε με το χέρι ή το γάντι, καθώς υπάρχει κίνδυνος να κολλήσει πάνω της οποιοδήποτε πεπτίδιο μπορεί να φέρουμε εκεί.
- Τοποθετούμε το πήκτωμα.
- Τοποθετούμε τα άλλα 4 χαρτιά Whatman με τον ίδιο τρόπο και απομακρύνοντας τις φυσαλίδες με το σωληνάκι.
- Κλείνουμε τη συσκευή και αφήνουμε να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες για 1 ώρα –εάν πρόκειται για μεταφορά πρωτεϊνών μικρού ή μεσαίου μοριακού βάρους- ή για 2 ώρες –εάν θέλουμε να μεταφέρουμε πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους- στα 12 ή 14 Volt –ανάλογα με το αν έχουμε ένα ή περισσότερα σετ πηκτώματος και νιτροκυτταρίνης, αντίστοιχα.

3.2.6 Χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με τη χρωστική Ponceau.

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, προκειμένου αφενός να επιβεβαιώσουμε ότι όντως έγινε η μεταφορά και αφετέρου να εκτιμήσουμε με έναν αδρό τρόπο κατά πόσον έγινε ισοφόρτωση των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση που προηγήθηκε. Η μεθοδολογία αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Ponceau (0.4% (w/v) Ponceau, 7.5% TCA (w/v)



Εικόνα 3.2 Ενδεικτική εικόνα μεμβράνης νιτροκυτταρίνης στην οποία έχει γίνει χρώση με Ponceu.

(τριχλωροξικό οξύ)) να προσδένεται σε πολυπεπτίδια. Ωστόσο δεν προκαλεί προβλήματα στην ανάλυση κατά Western γιατί η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μπορεί να αποχρωματιστεί ύστερα από εκπλύσεις σε TBS-T (20mM Tris/HCl pH 7.6, 137 mM NaCl και 0.05% (v/v) Tween-20).

3.2.7 Ανάλυση κατά Western

Η ανάλυση κατά Western πραγματοποιείται προκειμένου να εντοπίσουμε μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη μέσω ανοσοανίχνευσης. Τα βασικά στάδια αυτής της τεχνικής αυτής παρουσιάζονται παρακάτω:

- Αμέσως μετά τον τερματισμό της μεταφοράς, η μεμβράνη σημαδεύεται με νυστέρι στις θέσεις των δεικτών, κόβεται στο μέγεθος που θέλουμε, γίνεται χρώση της με Ponceau όπως προαναφέρθηκε και –αφού ξεπλυθεί με TBS-T ώστε να ξαναγίνει λευκή- τοποθετείται σε δοχείο με 50ml διαλύματος κάλυψης (Blocking solution: 5% (w/v) γάλα Regilait σε TBS-T) υπό ανάδευση για 30 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται κάλυψη των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων, προκειμένου να έχουμε στη συνέχεια όσο το δυνατό πιο ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος.
- Μετά το πέρας των 30 λεπτών, πραγματοποιούνται 3 ξεπλύματα × 5 λεπτά, με TBS-T.
- Η μεμβράνη τοποθετείται σε πλαστικό διαυγές σακουλάκι με προσθήκη 2mL –ή λιγότερων, ανάλογα με το μέγεθος της μεμβράνης- πρώτου αντισώματος αραιωμένου 1:1000 (αντι-PARP, p-Bcl-2) ή 1:500 (αντι-Bax) σε διάλυμα 5% (w/v) BSA σε TBS-T. Το πρώτο αντίσωμα είναι αυτό που αναγνωρίζει ειδικά ένα ή περισσότερους συγκεκριμένους αντιγονικούς επιτόπους της πρωτεΐνης που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε.

- Ολονύχτια επώαση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με το πρώτο αντίσωμα στους 4°C. Όταν η νιτροκυτταρίνη περιέχει πολλά δείγματα, τοποθετείται στους 4°C ολονύχτια υπό ανάδευση.
- Την επόμενη μέρα γίνεται αφαίρεση του πρώτου αντισώματος, και μετά από 4 ξεπλύματα των 5 λεπτών με TBS-T για αφαίρεση της περίσσειάς του, γίνεται επώαση σε 5mL δεύτερου αντισώματος αραιωμένου 1:7500 σε διάλυμα κάλυψης 1% (w/v) γάλα σε TBS-T. Το δεύτερο αντίσωμα αναγνωρίζει το Fc τμήμα του πρώτου και είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου. Η επώαση γίνεται επίσης σε διαυγές σακουλάκι, για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά το πέρας της μίας ώρας, το δεύτερο αντίσωμα απορρίπτεται και ακολουθεί μία σειρά ξεπλυμάτων με TBS-T για 30 λεπτά ($2 \times 10'$, $2 \times 5'$), προκειμένου να αφαιρεθεί η περίσσεια του αντισώματος και να ελαχιστοποιήσουμε το σήμα υποβάθρου (background).

Η εμφάνιση στην συνέχεια πραγματοποιείται με την μεθοδολογία της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας [ECL-enhanced chemiluminescence]. Το διάλυμα ECL περιέχει H₂O₂ – δηλαδή το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης, λουμινόλη και ενισχυτές σήματος. Τα αντιδραστήρια αναμειγνύονται κατάλληλα αμέσως πριν από την χρήση τους, η μεμβράνη επώζεται για 1 λεπτό με το ECL στο σκοτάδι, σκουπίζεται και τοποθετείται στην ειδική κασετίνα εμφάνισης. Στη συνέχεια, σε σκοτεινό θάλαμο τοποθετείται το αυτοραδιογραφίας πάνω από την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η κασετίνα κλείνει ερμητικά και παραμένει στο σκοτάδι για όση ώρα εκτίθεται το φιλμ. Ο χρόνος έκθεσης εξαρτάται από την προς ανίχνευσης πρωτεΐνη και το αντίστοιχο πρώτο αντίσωμα. Ακολουθεί εμφάνιση του φιλμ στο διάλυμα του εμφανιστή (Developer) μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν. Ξεπλένουμε στιγμιαία με νερό και στη συνέχεια εμβαπτίζουμε το φιλμ στο διάλυμα του σταθεροποιητή (Fixer). Μετά από αυτή τη διαδικασία σκανάρουμε το φιλμ και το επεξεργαζόμαστε με τα κατάλληλα λογισμικά στον H/Y.

3.2.8 Η μέθοδος MTT

Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των μιτοχονδριακών αφυδρογονασών των ζώντων κυττάρων να ανάγουν τους δακτυλίους του τετραζολίου της κίτρινης χρωστικής MTT προς κρυστάλλους φορμαζανίου. Τα βήματα αυτής της μεθόδου έχουν ως εξής:

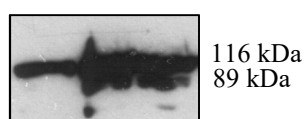
- Τοποθετούμε 5×10^4 κύτταρα/πηγαδάκι σε μία πλάκα MTT 96 θέσεων με επίπεδα πηγαδάκια, φροντίζοντας ώστε σε κάθε πηγαδάκι να περιέχονται 100μL θρεπτικού υλικού (DMEM + FBS 10%).
- Την επόμενη μέρα και εφόσον η κάλυψη στην επιφάνεια κάθε πηγαδιού είναι περίπου 70%, απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιούμε στέρηση ορού με προσθήκη 100μL σκέτου DMEM σε κάθε πηγαδάκι. Αφήνουμε την πλάκα στον κλίβανο για ~24 ώρες.
- Σε σωληνάκια τύπου erpendorf παρασκευάζουμε τα διαλύματα των επιδράσεων, με τους με τους αντιοξειδωτικούς και τους προ-οξειδωτικούς παράγοντες σε DMEM.
- Την επόμενη μέρα γίνεται προεπάση των κυττάρων για 30 λεπτά με τα διαλύματα των αντιοξειδωτικών κατάλληλης συγκέντρωσης (100μL διαλύματος/πηγαδάκι).
- Στη συνέχεια, απομακρύνονται τα προεπαστικά διαλύματα και γίνεται προσθήκη νέων διαλυμάτων που, εκτός από τα αντιοξειδωτικά, περιέχουν και την κατάλληλη συγκέντρωση του κάθε προ-οξειδωτικού παράγοντα (100μL διαλύματος/πηγαδάκι). Η επάση γίνεται για 24 ώρες.
- Την επόμενη μέρα γίνεται προσθήκη 20μL διαλύματος MTT (2,5 mg MTT/mL PBS) σε κάθε πηγαδάκι, χωρίς την απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος, 3 ώρες πριν από τη λήξη των επιδράσεων.
- Μετά το πέρας των επιδράσεων, απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε σε κάθε πηγαδάκι 100μL διαλύματος 0.1M HCl σε ισοπροπανόλη. Επάση για 1 ώρα υπό ανάδευση μέχρι να διαλυθούν πλήρως οι κρύσταλλοι. Εάν διαπιστώσουμε σχηματισμό συσσωματωμάτων, χτυπάμε την πλάκα στα πλάγια.
- Τέλος, φωτομετρούμε στα 545nm σε φωτόμετρο ELISA.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Βελτιστοποίηση μεθόδου

Η μέθοδος της ανάλυσης κατά Western είναι μία μέθοδος που μπορεί να προσαρμοστεί κατάλληλα ανάλογα με το είδος της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε. Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ακρυλαμίδης στο πήκτωμα διαχωρισμού και διαφορετικά διαλύματα μεταφοράς για την ηλεκτροφόρηση και την μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πρωτεϊνών διαφορετικού μοριακού βάρους, αλλά προσαρμόστηκαν ανάλογα και άλλες παράμετροι, όπως ο χρόνος εμφάνισης των φιλμ σε κάθε περίπτωση. Έτσι, τελικά, για κάθε πρωτεΐνη που μελετήθηκε χρησιμοποιήθηκαν εξατομικευμένες παράμετροι στο πρωτόκολλο.

Καταρχάς, το διάλυμα ομογενοποίησης που χρησιμοποιήθηκε εν τέλει ήταν το Buffer G, όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα των μεθόδων. Αν και αρχικά έγιναν κάποιες απόπειρες ομογενοποίησης με Sample Buffer 1×, αυτές απέτυχαν τόσο λόγω της δυσκολίας που παρουσιαζόταν κατά τη φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα επιστοιβάξης, όσο και λόγω του όχι τόσο «καθαρού» αποτελέσματος που παίρναμε κατά την εμφάνιση (βλ. εικόνα 4.0).



Εικόνα 4.0 Φιλμ όπου έχουν αποτυπωθεί οι ζώνες της PARP. Η ομογενοποίηση των κυττάρων έγινε με Sample Buffer. Τα δείγματα είναι από αριστερά: control, 200μM H₂O₂ 2ώρες, 200μM H₂O₂ 4 ώρες.

Όσον αφορά στο κομμάτι της πυκνότητας των πηκτωμάτων διαχωρισμού σε ακρυλαμίδη, προκειμένου να έχουμε σωστό διαχωρισμό των ζωνών στην περίπτωση της PARP, οι οποίες μάλιστα είναι και σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους (116 kDa & 89 kDa), χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα διαχωρισμού με περιεκτικότητα ακρυλαμίδης 8%. Αντίθετα, προκειμένου να μην χαθούν οι ζώνες χαμηλού μοριακού βάρους ώστε να μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε αντισώματα για p-Bcl-2 και Bax, χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα διαχωρισμού με περιεκτικότητα 12% σε ακρυλαμίδη. Με χρήση πηκτωμάτων 10% δεν ήταν σε καμία από τις δύο περιπτώσεις αρκετά ικανοποιητικά τα αποτελέσματα.

Το μεγαλύτερο πρόβλημα, ωστόσο, ήταν η υπερέκθεση των φιλμ στην νιτροκυτταρίνη που είχε επωαστεί με το ECL. Αυτό το πρόβλημα σχεδόν δεν λύθηκε μέχρι το τέλος, καθώς, αν και είχα καταλήξει στα 10 λεπτά έκθεσης για την PARP, 5 λεπτά ή λιγότερα για το Bax, ~20 λεπτά για το p-Bcl-2 και 1 λεπτό ή μερικά δευτερόλεπτα για την ακτίνη, πολλές φορές το σήμα ήταν περισσότερο από όσο έπρεπε. Ωστόσο, αυτό περιορίστηκε σε μεγάλο βαθμό.

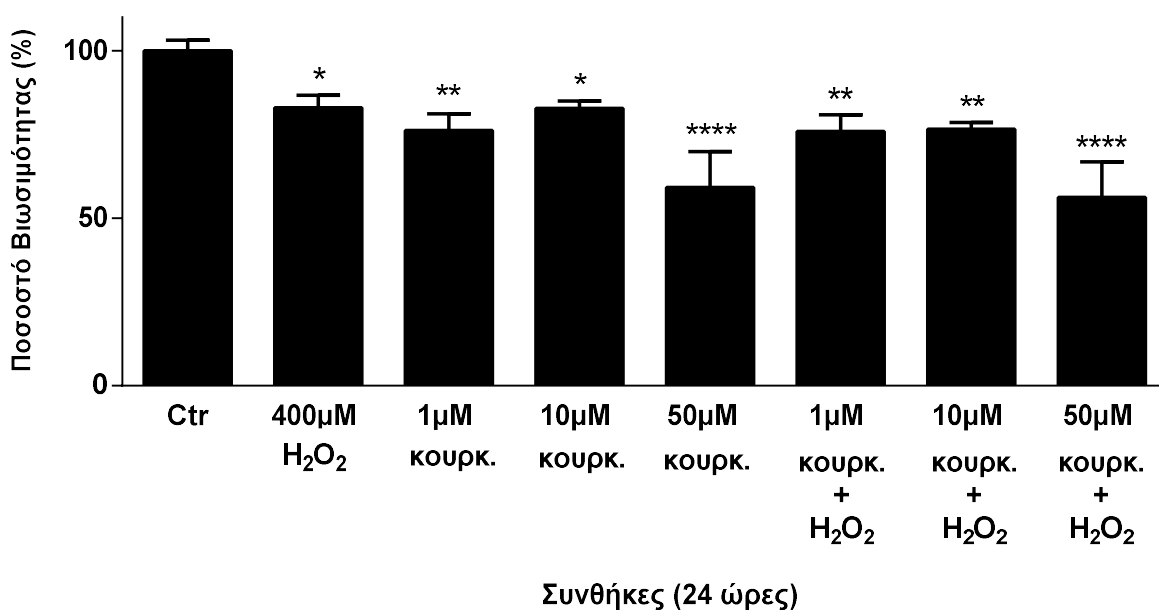
Τέλος, προκειμένου να έχουμε καλό σήμα με το δευτερογενές αντίσωμα, το αραιώναμε σε 1% γάλα σε TBS-T 1:7500 αντί για 1:10000, που ήταν η αρχική αραιώση. Στη δεύτερη περίπτωση το σήμα δεν ήταν αρκετό και τα αποτελέσματα αμφιλεγόμενα.

Συνοπτικά, για την μελέτη της κάθε μίας από τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την απόπτωση και μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, θεωρήθηκαν καταλληλότερα τα παρακάτω διαλύματα και συνθήκες για την μελέτη τους με ανάλυση κατά Western (αναλυτικότερα στην ενότητα των μεθόδων):

<i>Πρωτεΐνη</i>	<i>% ακρυλαμίδης σε πήκτωμα διαχωρισμού</i>	<i>transfer buffer / χρόνος μεταφοράς</i>	<i>Αραίωση α' αντισώματος</i>	<i>Χρόνος έκθεσης του φιλμ</i>
PARP	8	Schafer-Nielsen	1:1000	6-10'
p-Bcl-2	12	Απλό		20'
Bax				

4.2 Αποτελέσματα από τη μέθοδο MTT

Η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT διεκπεραιώθηκε προκειμένου να γίνει κατανοητό το ποιες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης λειτουργούν αντιοξειδωτικά, καθώς και σε ποια συγκέντρωση θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε την κουρκουμίνη ως οξειδωτικό. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.2, η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνεται στατιστικά σημαντικά τόσο με προσθήκη 400μM H₂O₂, όσο και με προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης κουρκουμίνης. Επιπλέον, δεν υπάρχει σημαντικά στατιστική διαφορά στη βιωσιμότητα των κυττάρων με προσθήκη μικρών συγκεντρώσεων κουρκουμίνης ως αντιοξειδωτικό μαζί με το H₂O₂, σε σχέση με τη βιωσιμότητα που παρατηρείται με το H₂O₂ μόνο. Παρατηρείται όμως στατιστικά σημαντική διαφορά στη μεταξύ της βιωσιμότητας των κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε 400μM H₂O₂ και των κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε 50μM κουρκουμίνη, ανεξαρτήτως της μετέπειτα έκθεσης σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Συνεπώς, η μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων που παρατηρείται μετά από έκθεση σε 50μM κουρκουμίνη για 24 ώρες είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή που παρατηρείται μετά από έκθεση σε H₂O₂ για το ίδιο χρονικό διάστημα, καθώς στην πρώτη περίπτωση πεθαίνει περίπου το 40% των κυττάρων, ενώ στη δεύτερη μόνο το 20% (βλ. και Πίνακα 4.1).



Εικόνα 4.2 Σε σχέση με το control (καμία επίδραση), είναι στατιστικά σημαντική η μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά από έκθεση 24 ωρών σε όλους τους παράγοντες που αναφέρθηκαν. Το πείραμα επαναλήφθηκε σε τρεις διαφορετικές χρονικές περιόδους, σε κάθε μία από τις οποίες οι επιδράσεις πραγματοποιήθηκαν τέσσερις φορές, οπότε τελικά είχαμε 12 τιμές βιωσιμότητας για κάθε επίδραση. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με εφαρμογή one-way ANOVA, καθώς και του Fisher's LSD test για πολλαπλές συγκρίσεις (P <0,05 για * ή ** και P <0,0001 για ****).

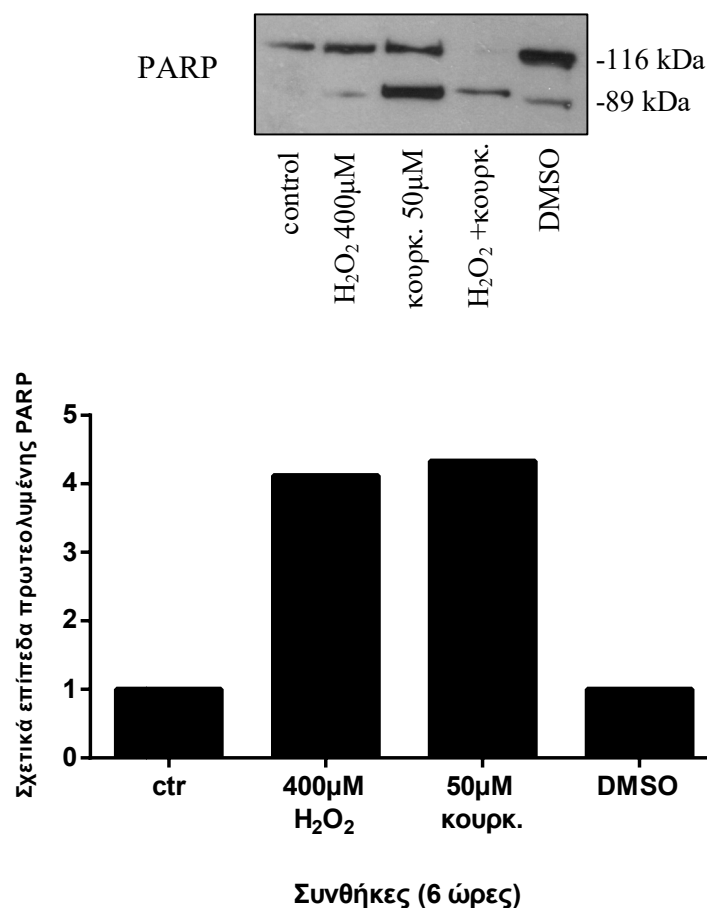
Συνθήκες	Ποσοστό βιωσιμότητας (%) [Μέση τιμή ± Τυπικό σφάλμα του μέσου]
Control	100.0 ± 3.2
400μM H ₂ O ₂	83.02 ± 3.67
1μM κουρκουμίνη	76.22 ± 4.93
10μM κουρκουμίνη	82.85 ± 2.15
50μM κουρκουμίνη	59.18 ± 10.72
1μM κουρκουμίνη + H ₂ O ₂	75.92 ± 4.95
10μM κουρκουμίνη + H ₂ O ₂	76.61 ± 2.00
50μM κουρκουμίνη + H ₂ O ₂	56.28 ± 10.53

Πίνακας 4.1 Αποτελέσματα της βιωσιμότητας των κυττάρων στις διαφορετικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Οι επιδράσεις πραγματοποιήθηκαν για 24 ώρες, αφού πρώτα έγινε προεπώαση με κουρκουμίνη για 30 λεπτά σε κάθε περίπτωση.

4.3 Αποτελέσματα από την ανάλυση κατά Western

4.3.1 Η κουρκουμίνη 50μM επάγει τη θραύση της PARP

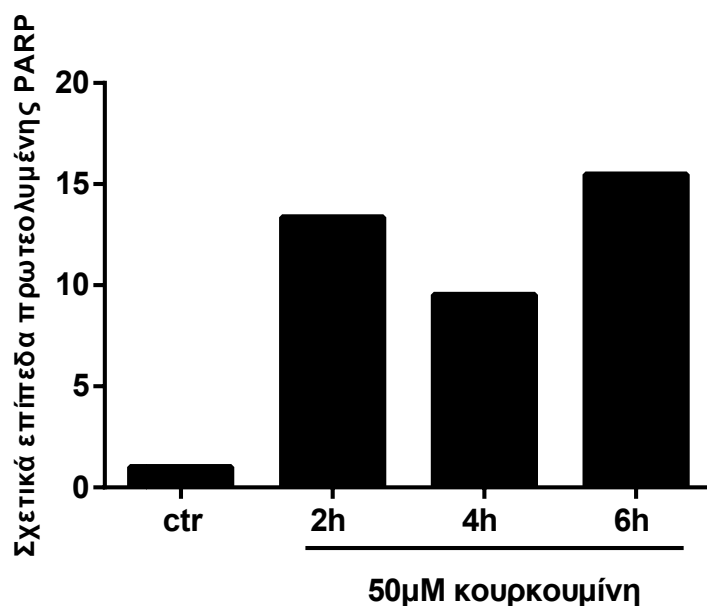
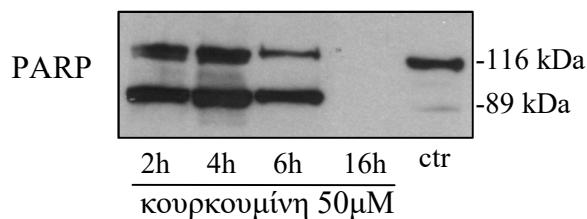
Μετά από τα αποτελέσματα του MTT, θεωρήθηκε αναγκαίο να διερευνηθεί εάν επάγεται η απόπτωση των κυττάρων, τόσο μετά από έκθεση σε 400μM H₂O₂, όσο και μετά από έκθεση σε 50μM κουρκουμίνη, καθώς και μέσω ποιων μονοπατιών γίνεται αυτό. Ως δείκτης σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκε η PARP. Όπως φαίνεται από την εικόνα του φιλμ, αλλά και από το σχετικό διάγραμμα που προκύπτει από την πυκνομέτρησή του (Εικόνα 4.2), η επίδραση των H9c2 κυττάρων για 6 ώρες και με τα δύο οξειδωτικά οδηγεί σε πρωτεόλυση της PARP. Ο συνδυασμός της κουρκουμίνης με το υπεροξείδιο του υδρογόνου αποδεικνύεται ξανά θανατηφόρος για τα κύτταρα, καθώς στις 6 ώρες πεθαίνει μεγάλο ποσοστό τους (μικροσκοπική παρατήρηση του τρυβλίου σε ανάστροφο μικροσκόπιο). Ως control της κουρκουμίνης χρησιμοποιήθηκε DMSO (διαλύτης της κουρκουμίνης), ενώ αυτό που αναφέρεται ως ctr στην Εικόνα 4.2 είναι το control του H₂O₂.



Εικόνα 4.2 Τόσο η κουρκουμίνη όσο και το υπεροξείδιο του υδρογόνου επάγουν την πρωτεόλυση της PARP μετά από έκθεση των κυττάρων για 6 ώρες. Το DMSO αποτελεί το control της κουρκουμίνης, ενώ το control στο διάγραμμα αναφέρεται στο H₂O₂.

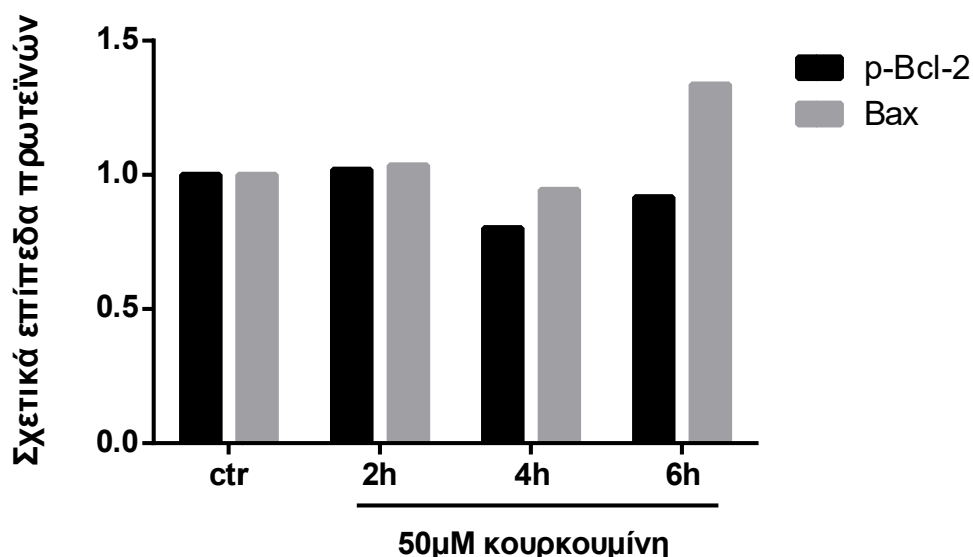
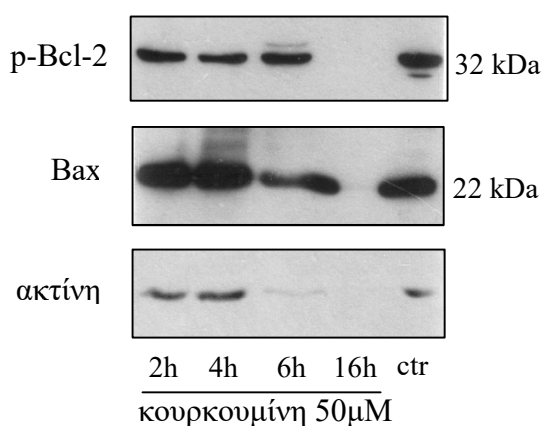
4.3.2 Η επίδραση με 50μM κουρκουμίνης προκαλεί θραύση της PARP και σε μικρότερους χρόνους, ενώ επηρεάζει τα επίπεδα της Bax και της φωσφορύλιωσης της Bcl-2.

Ήδη στις 2 ώρες επίδρασης με κουρκουμίνη 50μM παρατηρείται θραύση της PARP, όπως φαίνεται παρακάτω. Στις 16 ώρες σχεδόν όλα τα κύτταρα έχουν πεθάνει (συμπέρασμα από μικροσκοπική παρατήρηση και χρώση με Ponceau), και γι αυτό δεν παίρνουμε καθόλου σήμα στο φιλμ (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3 Τα 50μM κουρκουμίνη επάγουν τη θραύση της PARP στις 2, 4 και 6 ώρες. Στο συγκεκριμένο διάγραμμα δεν έχει γίνει κανονικοποίηση με ακτίνη.

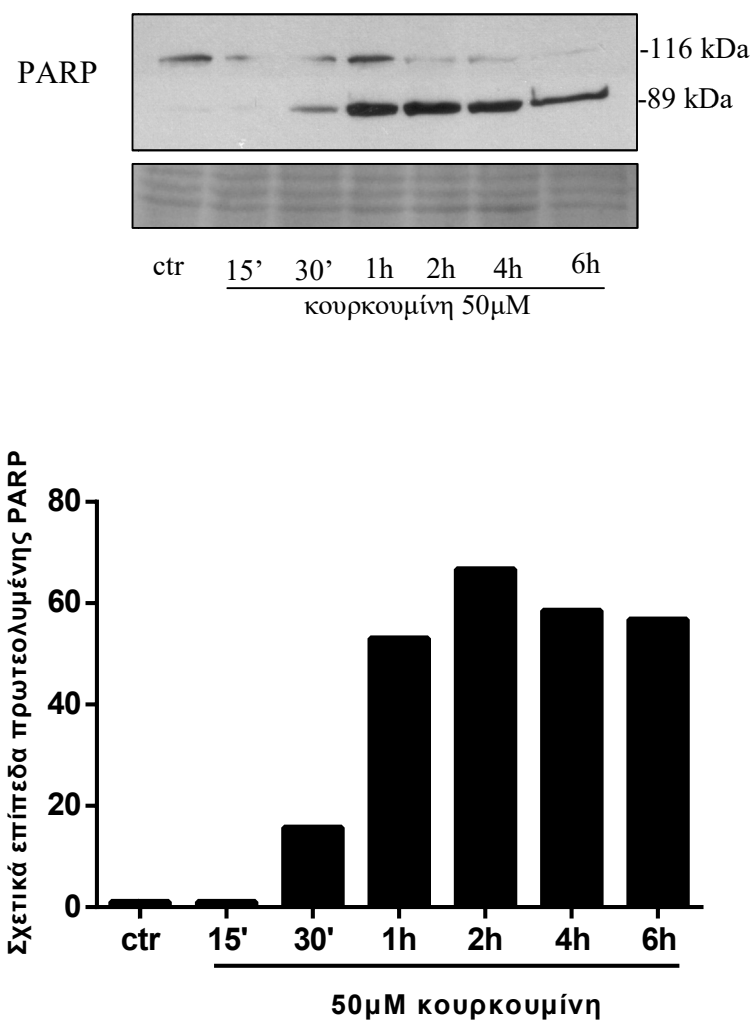
Επίσης, σε αυτό το πείραμα έγινε χρήση αντισωμάτων και για δύο άλλους δείκτες της απόπτωσης, την φωσφορυλιωμένη μορφή της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και της αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax. Μετά από πυκνομέτρηση του φιλμ (Εικόνα 4.4) φαίνεται ότι τελικά υπάρχει μία μείωση στη φωσφορυλίωση της Bcl-2 και μία αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Bax όσο αυξάνει ο χρόνος επώασης με κουρκουμίνη 50μΜ. Να σημειωθεί ότι τα δείγματα για τη φωσφορυλιωμένη Bcl-2 βγαίνουν λίγο πιο ψηλά από το αναμενόμενο μοριακό βάρος (32 kDa). Κι εδώ, στις 16 ώρες έχουν πεθάνει σχεδόν όλα τα κύτταρα. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ίδια με παραπάνω.



Εικόνα 4.4 Η κουρκουμίνη οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης Bcl-2 και αύξηση των επιπέδων του Bax σε σχέση με το control στις 4 και 6 ώρες. Για το διάγραμμα δεν έχει γίνει κανονικοποίηση με ακτίνη.

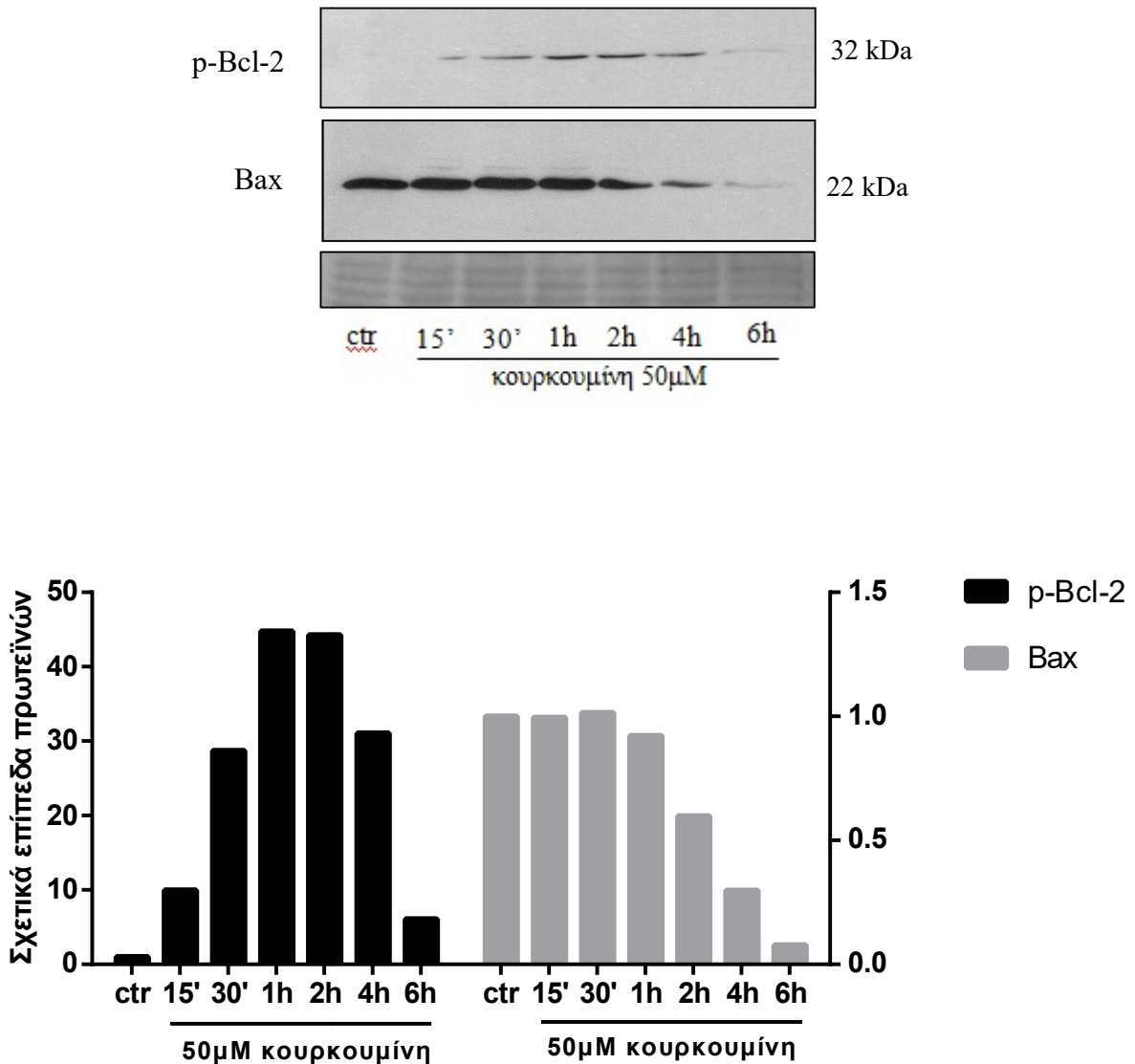
4.3.3 Η πρωτεόλυση της PARP πραγματοποιείται για πρώτη φορά στη 1 ώρα μετά από επίδραση με 50μM κουρκουμίνη

Το επόμενο βήμα ήταν να επικεντρωθούμε στην PARP ως δείκτη της απόπτωσης και να προσπαθήσουμε να εντοπίσουμε σε ποιο ακριβώς χρονικό σημείο λαμβάνει χώρα η θραύση της κατά την επώαση με 50μM κουρκουμίνη. Μετά από επίδραση για αυξανόμενα χρονικά διαστήματα (time course), διαπιστώθηκε ότι έχουμε θραύση της PARP για πρώτη φορά στη 1 ώρα επίδρασης με 50μM κουρκουμίνη, όπως φαίνεται το φιλμ και στο διάγραμμα που προκύπτει από την πυκνομέτρηση (Εικόνα 4.5)



Εικόνα 4.5 Τα 50μM κουρκουμίνη στο θρεπτικό μέσο οδηγούν σε θραύση της PARP ήδη από την πρώτη ώρα. Δεδομένου ότι εκεί είναι πιο ξεκάθαρη η επαγωγή της απόπτωσης, στα επόμενα πειράματα θα χρησιμοποιείται ως προ-οξειδωτικό μέσο η κουρκουμίνη 50μM, με την οποία τα κύτταρα θα επωάζονται για 1 ώρα. Η χρώση με Ponceau δείχνει ότι σε κάθε δείγμα έχουμε την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης.

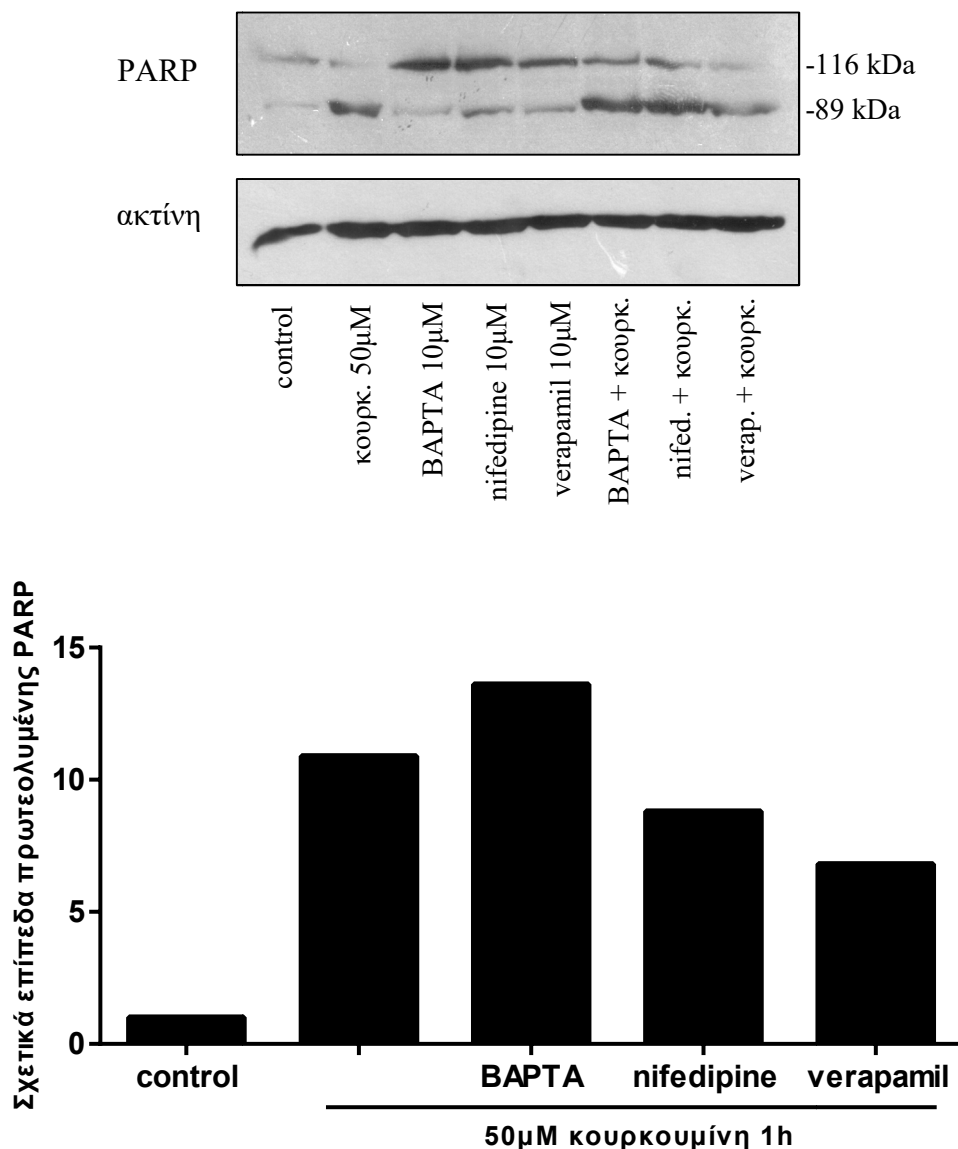
Το ίδιο πείραμα έλαβε χώρα και για να γίνει έλεγχος των επιπέδων της φωσφορυλίωσης της Bcl-2 και των επιπέδων της ολικής Bax στα κύτταρα που έχουν επωαστεί με κουρκουμίνη. Παρατηρείται μία μείωση των επιπέδων των δύο πρωτεϊνών σε αυξανόμενους χρόνους έκθεσης των κυττάρων σε κουρκουμίνη 50μM (Εικόνα 4.6).



Εικόνα 4.6 Με την πάροδο του χρόνου υπάρχει μείωση των επιπέδων της φωσφορυλίωσης της Bcl-2 αλλά και μείωση των επιπέδων της κυτταροπλασματικής Bax, κατά την έκθεση των κυττάρων σε κουρκουμίνη 50μM. Η χρώση με Ponceau δείχνει ότι σε όλα τα δείγματα υπάρχει η ίδια ποσότητα πρωτεΐνης.

4.3.4 Η αναστολή των καναλιών ασβεστίου L-τύπου και η δέσμευση των ιόντων ασβεστίου ενδοκυτταρικά δεν αναστέλλουν την πρωτεόλυση της PARP

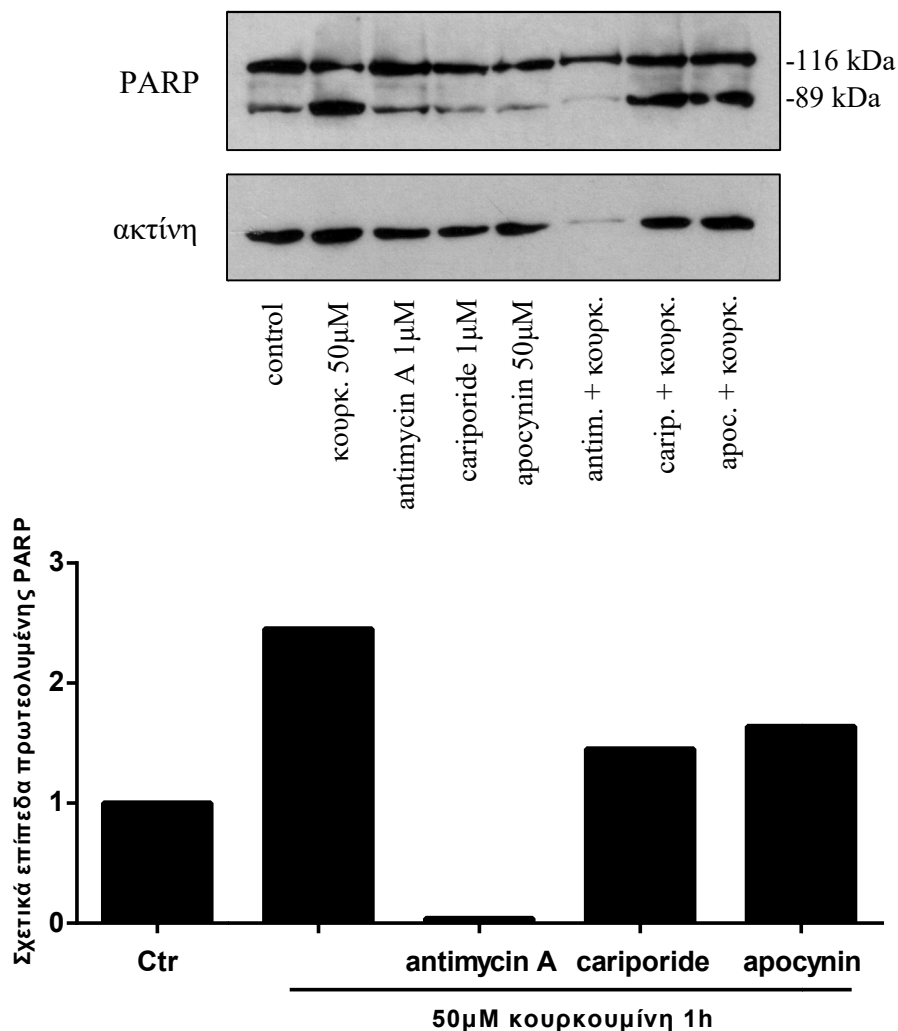
Στη συνέχεια έγινε χρήση αναστολέων ασβεστίου, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν επηρεάζουν την απόπτωση που επάγεται από το οξειδωτικό στρες. Έγινε προεπώαση των κυττάρων για 30 λεπτά με τους αναστολείς καναλιών νιφεδιπίνη (nifedipine) 10 μ M και βεραπαμίλη (verapamil) 10 μ M, καθώς και με τον χηλικό παράγοντα BAPTA 10 μ M, και στη συνέχεια επώαση για 1 ώρα με 50 μ M κουρκουμίνη. Όπως φαίνεται, τόσο από το φιλμ όσο και από το αντίστοιχο διάγραμμα (Εικόνα 4.7), δεν υπάρχει αναστολή της θραύσης της PARP.



Εικόνα 4.7 Οι αναστολείς ασβεστίου δεν φαίνεται να αναστέλλουν την πρωτεόλυση της PARP, που επάγεται από την κουρκουμίνη 50 μ M. Ωστόσο, φαίνεται μία πολύ μικρή μείωση των επιπέδων του θραύσματος με την νιφεδιπίνη και την βεραπαμίλη.

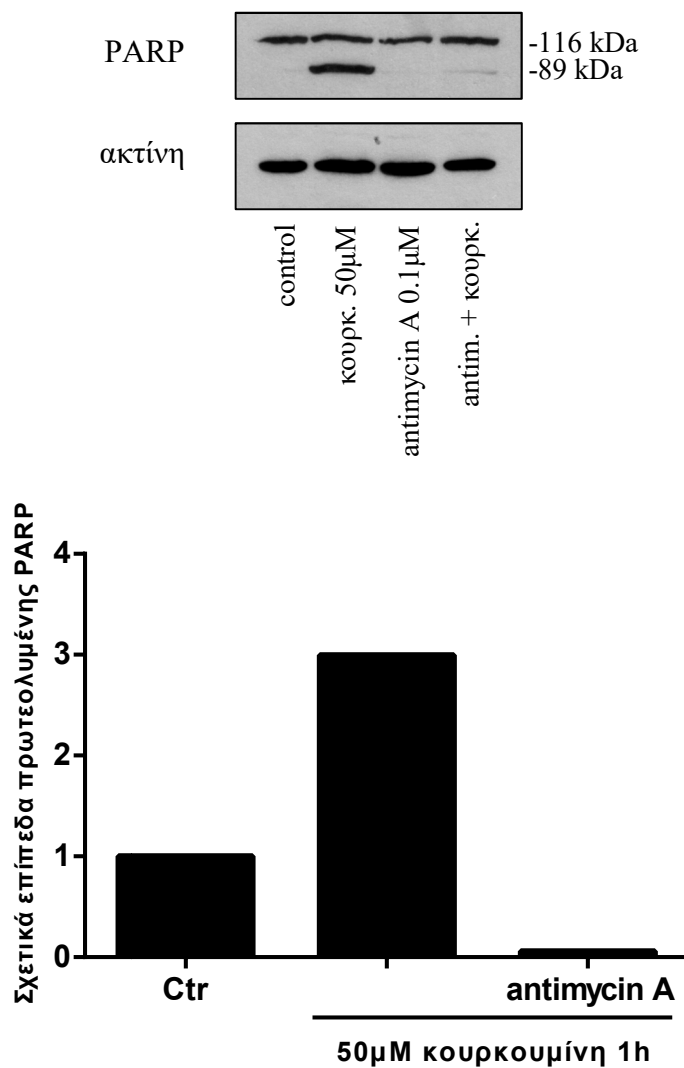
4.3.5 Με προσθήκη αντιμυκίνης A παρατηρείται αναστολή της θραύσης της PARP

Μετά από τα παραπάνω, έγινε χρήση άλλων αναστολέων προκειμένου να διαπιστωθεί εάν κάποιος από αυτούς αναστέλλει την απόπτωση. Ως δείκτης της απόπτωσης χρησιμοποιήθηκε και πάλι η PARP. Αρχικά, έγινε προεπώαση των κυττάρων ξεχωριστά με 1μM αντιμυκίνης A (antimycin A), 1μM καριπορίδης (cariporide ή HOE-642) και 50μM αποκυνίνης (apocynin) για 30 λεπτά, ενώ στη συνέχεια προστέθηκαν 50μM κουρκουμίνης για 1 ώρα. Σε πρώτη φάση, φάνηκε ότι δεν υπάρχει αναστολή της απόπτωσης με την καριπορίδη ή την αποκυνίνη, αλλά τα κύτταρα που επώαστηκαν με αντιμυκίνη A + κουρκουμίνη πέθαναν σε μεγάλο ποσοστό μετά την πάροδο της 1 ώρας (μικροσκοπική παρατήρηση του τρυβλίου). Όπως φαίνεται και από την ακτίνη (Εικόνα 4.8), στο συγκεκριμένο δείγμα δεν υπάρχει σχεδόν καθόλου πρωτεΐνη.



Εικόνα 4.8 Υπάρχει εμφανής μείωση στα επίπεδα του θραύσματος της PARP μετά από προεπώαση με 1μM αντιμυκίνης A και έκθεση στη συνέχεια με 50μM κουρκουμίνη. Όμως, αυτό δεν αρκεί για να βγάλουμε συμπεράσματα, αφού, όπως φαίνεται από την ακτίνη, υπάρχει ελάχιστη πρωτεΐνη στο δείγμα. Στο παρόν διάγραμμα δεν έχει γίνει κανονικοποίηση με την ακτίνη.

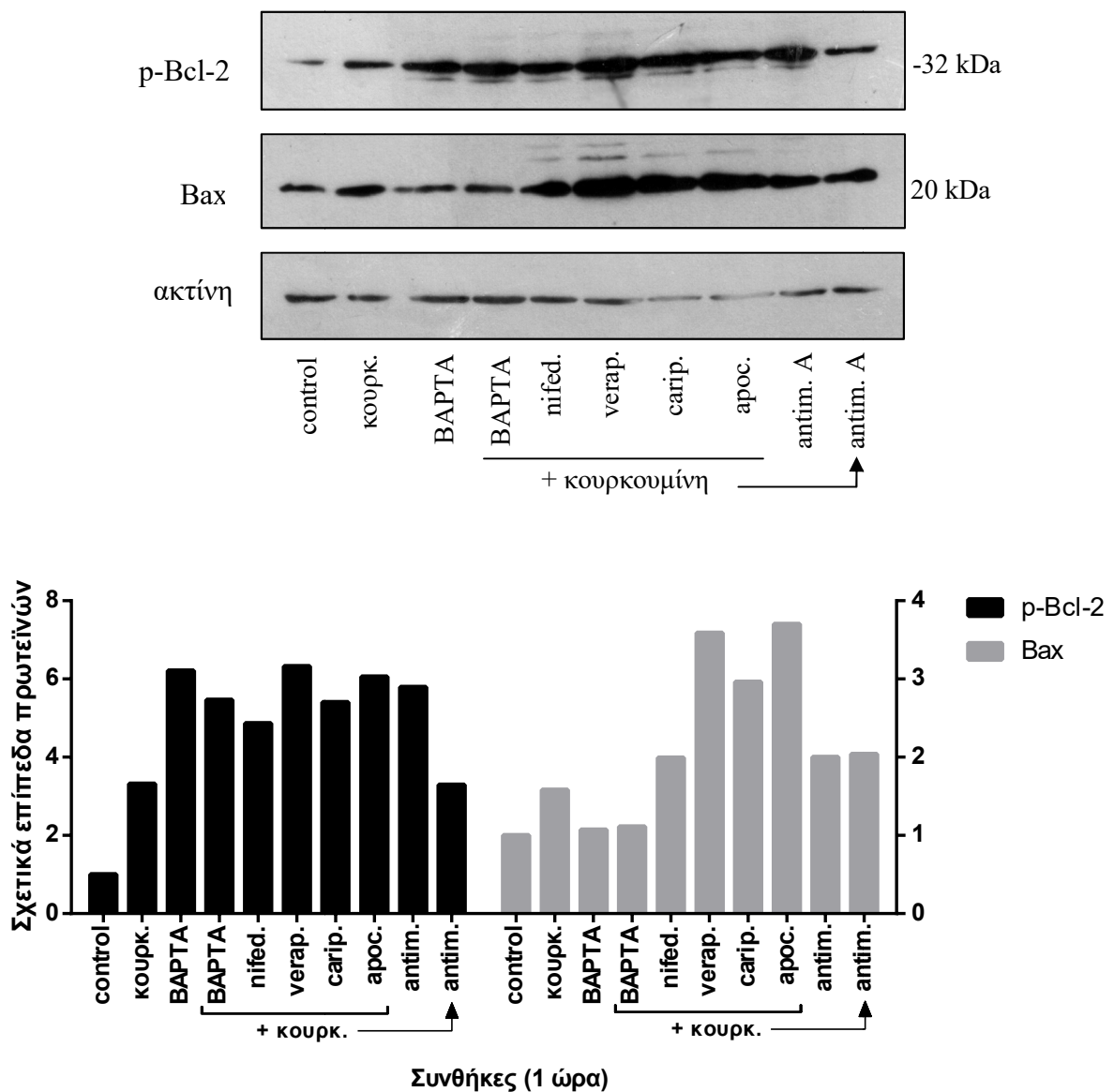
Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν όντως η αντιμυκίνη Α αναστέλλει πλήρως την θραύση της PARP και άρα την απόπτωση, έγινε επανάληψη του πειράματος με χρήση 0.1μΜ αντιμυκίνης Α, ώστε να αποφευχθεί ο θάνατος των κυττάρων. Όπως φαίνεται στο φιλμ και στο αντίστοιχο διάγραμμα, η αντιμυκίνη Α αναστέλλει πλήρως την θραύση της PARP.



Εικόνα 4.9 Γίνεται πλέον ξεκάθαρο ότι η αντιμυκίνη Α αναστέλλει τη θραύση της PARP.

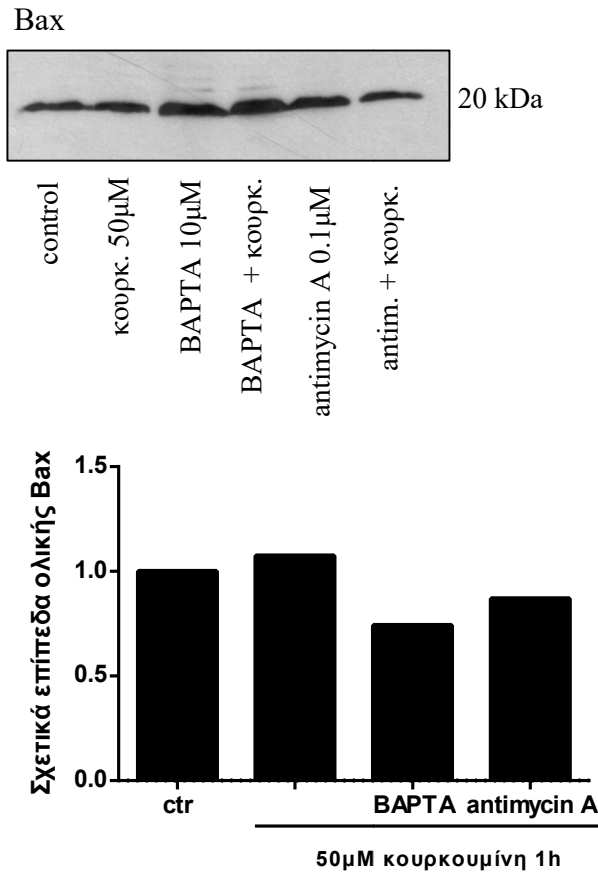
4.3.7 Τα επίπεδα της ολικής Bax φαίνεται να μειώνονται με το χηλικό μίριο ΒΑΡΤΑ και όχι με κάποιον από τους υπόλοιπους αναστολείς.

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν με τους παραπάνω αναστολείς επηρεάζονται άλλα σημαντικά για την απόπτωση μόρια, ηλεκτροφορήθηκαν ξανά κάποια από τα προηγούμενα δείγματα και χρησιμοποιήθηκαν αυτή τη φορά αντισώματα για p-Bcl-2 και Bax. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα (Εικόνα 4.10) υπάρχει πιθανή μείωση της Bax όταν γίνεται προεπάση με 10μM ΒΑΡΤΑ πριν προστεθούν τα 50μM κουρκουμίνη.

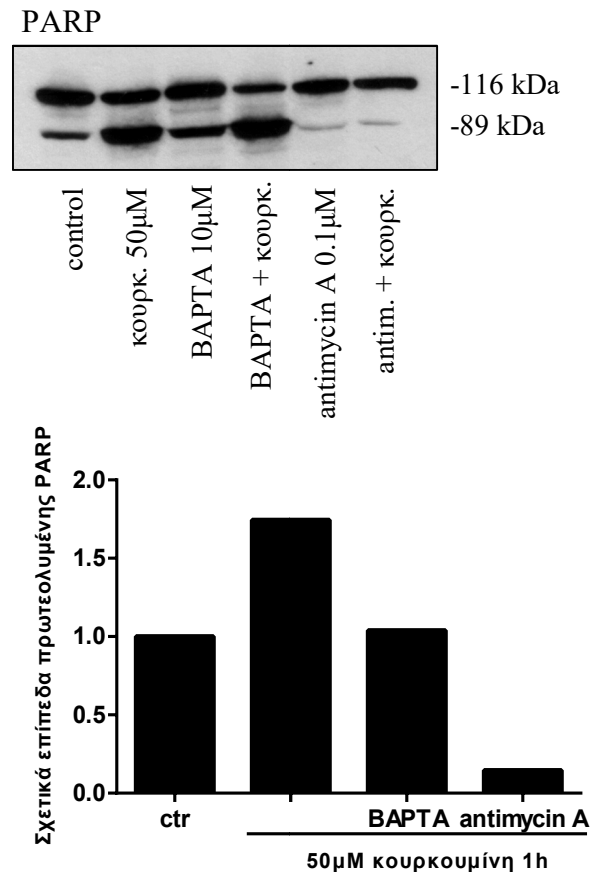


Εικόνα 4.10 Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Bcl-2 αυξάνονται σε κάθε περίπτωση, ενώ τα επίπεδα της Bax φαίνεται να μειώνονται μετά από προεπάση με ΒΑΡΤΑ 10μM. Λόγω επιφύλαξης ως προς τα control, τα δείγματα με το ΒΑΡΤΑ ηλεκτροφορήθηκαν ξανά στη συνέχεια, με χρήση των control από το συγκεκριμένο πείραμα με τους αναστολείς ασβεστίου.

Ωστόσο, λόγω του γεγονότος ότι το δείγμα του control και το δείγμα των κυττάρων που επωάστηκαν μόνο με 50μM κουρκουμίνης, προέρχονται από το δεύτερο πείραμα που αναφέρθηκε στην ενότητα 3.3.6, θεωρήθηκε σκόπιμο να γίνει ξανά ηλεκτροφόρηση των control του πειράματος όπου έγινε χρήση του χηλικού παράγοντα BAPTA, ώστε να γίνει περισσότερο ξεκάθαρο εάν υπάρχει αναστολή. Και στη δεύτερη περίπτωση φαίνεται ότι τα επίπεδα της Bax μειώνονται με προσθήκη του BAPTA (Εικόνα 4.11). Αυτό, ωστόσο, δε συμβαίνει με το θραύσμα της PARP (Εικόνα 4.12).



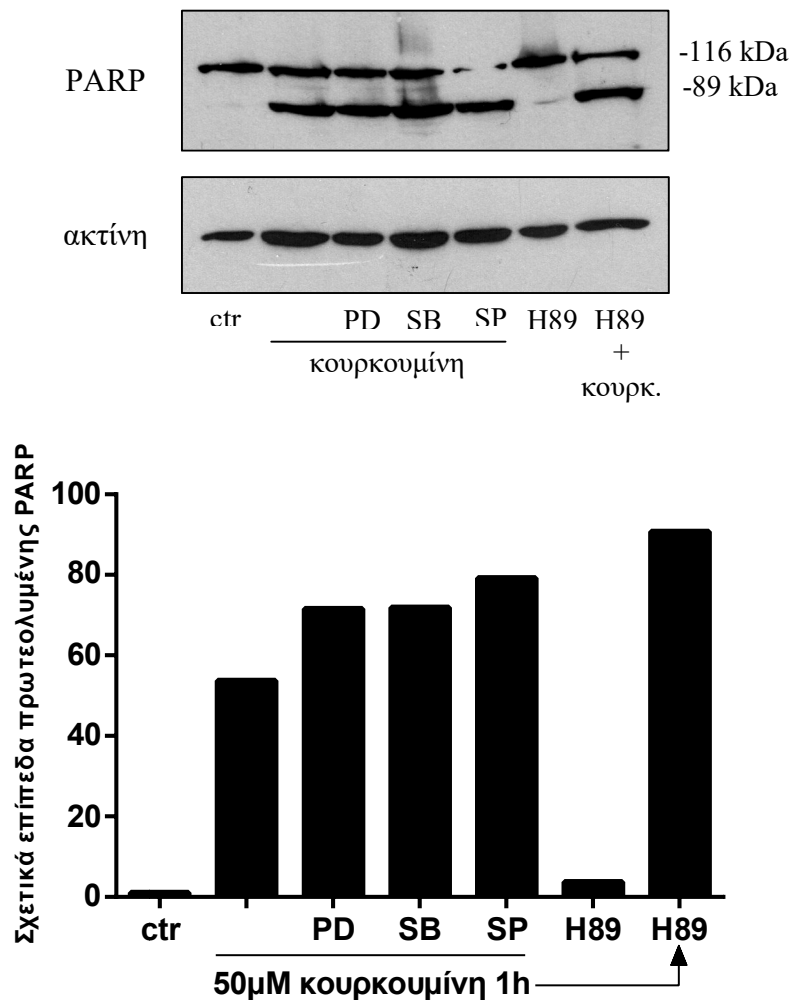
Εικόνα 4.11 Επιβεβαιώνεται ότι μειώνονται τα επίπεδα της Bax με προσθήκη BAPTA. Εδώ φαίνεται μείωση των επιπέδων της και με αντιμυκίνη Α.



Εικόνα 4.12 Τα επίπεδα του θραύσματος p89 της PARP μειώνονται ελάχιστα με τον χηλικό παράγοντα BAPTA. Επιβεβαιώνεται ξανά ότι η αντιμυκίνη Α προκαλεί πλήρη αναστολή της πρωτόλυσης της PARP. Το control, το δείγμα με την κουρκουμίνη και τα δύο δείγματα με το BAPTA προέρχονται από το πείραμα με τους αναστολείς ασβεστίου και εδώ έχουν ηλεκτροφορηθεί ξανά.

4.3.8 Οι αναστολείς των MAPKs δεν αναστέλλουν την θραύση της PARP-1.

Τέλος, αποφασίσαμε να διερευνήσουμε εάν οι MAPKs, και ποιες από αυτές, εμπλέκονται στην απόπτωση που επάγεται από την κουρκουμίνη. Οι επόμενοι αναστολείς που χρησιμοποιήσαμε, λοιπόν, ήταν οι PD98059 (25 μ M), SB203580 (10 μ M) και SP600125 (10 μ M), οι οποίοι αναστέλλουν μέλη της υπεροικογένειας των MAPKs. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και ο αναστολέας H89 (10 μ M), ο οποίος αναστέλλει τις κινάσες MSK1 και PKA. Η ανάλυση κατά Western έδειξε ότι κανένας από τους τέσσερις αναστολείς δεν επηρεάζει τη θραύση της PARP-1 που επάγεται από τα 50 μ M κουρκουμίνη για 1 ώρα, όταν γίνει προεπώαση με αυτούς για 30 λεπτά.



Εικόνα 4.3.13 Οι αναστολείς των MAPKs PD, SB και SP, όπως και ο αναστολέας των MSK1 και PKA, H89, δεν αναστέλλουν την πρωτεόλυση της PARP-1 που επάγεται από την κουρκουμίνη 50 μ M.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Η κουρκουμίνη και το H₂O₂ επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων

Όπως έγινε εμφανές με τη μέθοδο κυτταροτοξικότητας MTT, η κουρκουμίνη σε μεγάλη συγκέντρωση (50μM) προκαλεί τον θάνατο των κυττάρων σε μεγάλο ποσοστό (Εικόνα 4.1). Αυτό επιβεβαιώνεται και από προηγούμενη αντίστοιχη μελέτη που έλαβε χώρα στο εργαστήριό μας (Zikaki και συν. 2014) σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2. Η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνεται στατιστικά σημαντικά και μετά από επώαση για 24 ώρες με 400μM H₂O₂, το οποίο είναι λογικό καθώς τα κύτταρα υφίστανται έντονο οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, αυτή η μείωση της βιωσιμότητας είναι μικρότερη από εκείνη που παρατηρείται με την κουρκουμίνη 50μM. Επιπλέον, φαίνεται ότι, στα H9c2 κύτταρα, οι μικρές συγκεντρώσεις κουρκουμίνης (1μM και 10μM) δεν αρκούν ώστε να αναστρέψουν την κυτταρική βλάβη που προκαλείται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε αυτή τη συγκέντρωση, καθώς δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της βιωσιμότητας των κυττάρων που έχουν εκτεθεί μόνο σε H₂O₂ και αυτών που έχουν προεπωασθεί με κουρκουμίνη 1 και 10 μM πριν εκτεθούν σε H₂O₂ 400μM. Μάλιστα, διαπιστώνεται ότι και οι μικρές συγκεντρώσεις κουρκουμίνης από μόνες τους δρουν προ-οξειδωτικά, μειώνοντας σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με το control (Πίνακας 4.1).

Η κουρκουμίνη είναι μία φυσική ουσία, η οποία στο παρελθόν (Cui και συν. 2007) έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως εντομοκτόνο. Συγκεκριμένα, στην έρευνα των Cui και συν. 2007 έγινε αντιληπτό ότι μεγάλες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης αυξάνουν την ενδοκυττάρια παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, ενώ για το *Plasmodium falciparum*, που χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο σε εκείνη τη μελέτη, ακόμη και 1μM κουρκουμίνη είναι αρκετή για οδηγήσει σε αυξημένη παραγωγή των ROS. Ωστόσο, όπως επισημαίνεται, τα κύτταρα των εντόμων είναι πιο ευαίσθητα από των θηλαστικών. Παρόλο αυτά, η κουρκουμίνη είναι κυτταροτοξική σε συγκέντρωση 50μM ακόμη και για πιο ανθεκτικά από τα H9c2 κύτταρα, όπως είναι οι σκελετικοί μυοβλάστες C2, κάτι που αποδείχτηκε και πάλι σε παλαιότερη μελέτη του εργαστηρίου μας (Peleli και συν. 2015). Εκεί, μάλιστα, παρατηρείται ότι μόνο μία πολύ υψηλή συγκέντρωση H₂O₂, της τάξης του 1mM, είναι ικανή να μειώσει την βιωσιμότητα των κυττάρων C2 στο ίδιο ποσοστό με τα 50μM κουρκουμίνη.

Ήδη από το παρελθόν (Ahsan και συν. 1999) είναι γνωστό ότι τα κουρκουμινοειδή μπορούν να δώσουν γένεση σε ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες είναι ιδιαίτερα δραστικές και λόγω αυτού αντιδρούν μη ειδικά με οτιδήποτε βρεθεί δίπλα τους κατά τη στιγμή του σχηματισμού τους. Μπορούν έτσι να οξειδώσουν τόσο το DNA και τις πρωτεΐνες, όσο και τα λιπίδια, τα σάκχαρα και άλλα κυτταρικά συστατικά. Η πρόκληση βλαβών σε αυτά τα μόρια μπορεί να

επάγει την ενεργοποίηση κομβικών μορίων που συμμετέχουν στα μονοπάτια του κυτταρικού θανάτου.

Το H_2O_2 , από την άλλη πλευρά, αποτελεί ένα ασθενές οξειδωτικό μέσο, το οποίο όμως μπορεί να διαχέεται ελεύθερα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών ή με τη βοήθεια υπεροξειπορινών (Sies 2014). Οι περισσότερες βλάβες που προκαλεί στα κυτταρικά συστατικά είναι έμμεσες, καθώς το H_2O_2 δεν αντιδρά απευθείας με το DNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. Ωστόσο, αντιδρά ταχέως με υπεροξειδάσες της αίμης (heme peroxidases), δημιουργώντας σύμπλοκα που μπορούν να οξειδώσουν ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, ενώ παρουσία ιόντων σιδήρου μπορεί να δώσει γένεση σε ρίζες υδροξυλίου (Winterbourn 2013). Όμως, υπάρχουν πολλοί ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί εναντίον του υπεροξειδίου του υδρογόνου, καθώς πρόκειται για ένα μόριο που αποτελεί και παραπροϊόν του κυτταρικού μεταβολισμού (βλ. ενότητα 1.1). Οι καταλάσες και οι υπεροξειδάσες είναι τα κύρια ένζυμα που το εξουδετερώνουν στους περισσότερους οργανισμούς (Imlay 2008). Αυτό, λοιπόν, εξηγεί έως ένα βαθμό το γεγονός ότι με συγκεντρώσεις H_2O_2 μεγαλύτερες από της αντίστοιχες της κourκουμίνης, έχουμε μικρότερο ποσοστό θνησιμότητας των κυττάρων.

5.2 Η κourκουμίνη σε μεγάλες συγκεντρώσεις προκαλεί τη θραύση της PARP-1

Ο κυτταρικός θάνατος που ανιχνεύεται με τη δοκιμασία MTT μπορεί να είναι οποιασδήποτε μορφής –αποπτωτικός ή νεκρωτικός. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι καρδιακοί μυοβλάστες H9c2 υφίστανται απόπτωση τόσο με H_2O_2 400 μ M, όσο και με κourκουμίνη 50 μ M, έγινε ανάλυση κατά Western με αντίσωμα για την PARP (το αντίσωμα συγκεκριμένα αναγνωρίζει την PARP-1), η θραύση της οποίας αποτελεί δείκτη της απόπτωσης. Διαπιστώθηκε, λοιπόν, ότι η επώαση των κυττάρων και με τα δύο οξειδωτικά μέσα για 6 ώρες επάγει την πρωτεόλυση της PARP-1 από τις κασπάσες και άρα ξεκινάει η απόπτωση, καθώς εντοπίζεται το p89 θραύσμα στο φιλμ που παίρνουμε από την ανάλυση κατά Western (Εικόνα 4.2). Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας είχε αποδειχθεί ότι υπάρχει θραύση της PARP-1 μετά από επώαση με 20 μ M κourκουμίνη για 6 ώρες (Zikaki και συν. 2014), άρα είναι λογικό να παίρνουμε αυτό το αποτέλεσμα με τα 50 μ M. Επίσης, ο συνδυασμός των δύο οξειδωτικών στο δικό μας πείραμα (κourκουμίνη 50 μ M + H_2O_2 400 μ M) ήταν αρκετός για να προκαλέσει των θάνατο μεγάλου μέρους των κυττάρων του τρυβλίου, όπως παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο. Μετά από τα παραπάνω κρίθηκε σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί η κourκουμίνη 50 μ M ως οξειδωτικό μέσο προκειμένου να μελετηθούν τα μονοπάτια της απόπτωσης που επάγονται κάτω από συνθήκες έντονου οξειδωτικού στρες στα H9c2 κύτταρα.

Συγκεκριμένα, η επόμενη κίνηση ήταν να γίνουν επώσεις των κυττάρων με κουρκουμίνη 50μM για μικρότερους και μεγαλύτερους χρόνους από αυτόν των 6 ωρών. Και πάλι χρησιμοποιήθηκε η PARP-1 ως δείκτης της απόπτωσης στην ανάλυση κατά Western. Διαπιστώθηκε για πρώτη φορά ότι υπάρχει πρωτεόλυση της PARP-1 ήδη στις δύο ώρες επίδρασης με κουρκουμίνη 50μM (Εικόνα 4.3), ενώ στις 16 ώρες τα κύτταρα πεθαίνουν στην πλειοψηφία τους, όπως έγινε εμφανές κατά την παρατήρηση του τρυβλίου στο μικροσκόπιο. Στο παρελθόν, στην μελέτη των Zikaki και συν., είχε βρεθεί ότι η κουρκουμίνη 20μM επάγει για πρώτη φορά την πρωτεόλυση της PARP-1 από τις 6 ώρες και μετά, ενώ στις 16 ώρες τα κύτταρα παραμένουν ζωντανά (Zikaki et al. 2014). Συνεπώς, φαίνεται ότι η μεγαλύτερη κατά 2,5 φορές συγκέντρωση κουρκουμίνης επάγει την απόπτωση σε χρόνο μικρότερο κατά 3 φορές, ενώ επιβεβαιώνεται και η κυτταροτοξικότητά της σε χρόνους μικρότερους των 24 ωρών.

Το ερώτημα που απαντήθηκε στη συνέχεια είναι σε ποιον χρόνο επώσεως με κουρκουμίνη 50μM παρατηρείται για πρώτη φορά το θραύσμα της PARP-1, δηλαδή πότε αυτή πρωτεολύεται για πρώτη φορά λόγω επαγωγής της απόπτωσης. Είδαμε, λοιπόν, ότι στα 30 λεπτά επίδρασης με κουρκουμίνη 50μM αρχίζει η θραύση της PARP-1 σε χαμηλά επίπεδα, ενώ στη μία ώρα αυτό το αποτέλεσμα εδραιώνεται και έχουμε υψηλά επίπεδα της πρωτεολυμένης PARP-1 (Εικόνα 4.5). Αυτό δείχνει ότι οι μεγάλες συγκεντρώσεις κουρκουμίνης επάγουν άμεσα την απόπτωση στα H9c2 κύτταρα και άρα η κουρκουμίνη έχει πολύ ισχυρή προ-οξειδωτική και προαποπτωτική δράση. Η πρωτεόλυση της PARP-1 εδώ πραγματοποιείται πολύ νωρίτερα σε σχέση με την έκθεση σε 20μM κουρκουμίνη (Zikaki και συν. 2014), όπου το θραύσμα εμφανίζεται για πρώτη φορά στις 6 ώρες. Αυτό το αποτέλεσμα μας οδήγησε στην επιλογή της μίας ώρας ως τον κατάλληλο χρόνο επίδρασης με 50μM κουρκουμίνη, προκειμένου να γίνουν δοκιμές της αναστολής της απόπτωσης που επάγεται από το συγκεκριμένο οξειδωτικό μέσο.

5.3 Ο ρόλος των ανταγωνιστών Ca^{2+} στην απόπτωση και τη θραύση της PARP-1

Καταρχάς μελετήσαμε την επίδραση συγκεκριμένων αναστολέων ασβεστίου στην επαγωγή της απόπτωσης από την κουρκουμίνη. Συγκεκριμένα, έγινε χρήση των αναστολέων καναλιών ασβεστίου L-τύπου, νιφεδιπίνη (nifedipine) και βεραπαμίλη (verapamil), καθώς και του χηλικού μορίου BAPTA-AM. Είναι γνωστό εδώ και πολλά χρόνια ότι ένα από τα βιοχημικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι η θραύση του DNA από ενδονουκλεάσες που εξαρτώνται από ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} (Bortner και συν. 1995). Επιπλέον, τα ιόντα ασβεστίου ευθύνονται για την μετάπτωση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, η οποία οδηγεί σε βλάβες στα μιτοχόνδρια και τελικά σε επαγωγή της απόπτωσης (βλ. ενότητα 1.1). Στα καρδιακά κύτταρα έχουν βρεθεί δύο τύποι καναλιών ασβεστίου, τα κανάλια T τύπου και τα

κανάλια L τύπου. Τα κανάλια L τύπου έχουν υψηλότερη αγωγιμότητα και απαιτούν μεγαλύτερες εκπολώσεις της μεμβράνης για ενεργοποίηση. Τα καρδιακά L και T κανάλια έχουν διαφορετική δομή πόρων. Επιπλέον, έχουν διαφορετική εκλεκτικότητα ιόντων και διαφορετική ευαισθησία σε ανόργανους παρεμποδιστές. Σε όλα τα καρδιακά κύτταρα που έχουν μελετηθεί, το μεγαλύτερο μέρος του μακροσκοπικού ρεύματος των καναλιών Ca^{2+} πραγματοποιείται από L τύπου κανάλια (Bean 1989). Η νιφεδιπίνη και η βεραπαμίλη είναι δύο αναστολείς των καναλιών L τύπου. Η νιφεδιπίνη είναι ένας διϋδροπυριδινο-ανταγωνιστής, ο οποίος δρα αλλοστερικά προκειμένου να μετατοπίσει το κανάλι προς την κλειστή κατάσταση και δε φράσσει τον πόρο του καναλιού (Reid και συν. 1983). Αντίθετα, η βεραπαμίλη ανήκει στους μη διϋδροπυριδινο-αναστολείς και συγκεκριμένα στις φαινυλαλκυλαμίνες, οι οποίες αποτελούν αποκλειστές των πόρων των καναλιών και θεωρείται ότι εισέρχονται σε αυτά από την κυτταροπλασματική πλευρά και τα φράσσουν (Striessnig 1999). Σχετικά με το BAPTA, η πλήρης ονομασία του οποίου είναι 1,2-δις(β-αμινοφαινόφυ)αίθανο-N,N,N',N'-τετραοξικό οξύ, αυτό και τα παράγωγά του μοιράζονται την υψηλή εκλεκτικότητα για ιόντα ασβεστίου και είναι πολύ λίγο ευάλωτα σε αλλαγές του pH, ενώ μπορούν να προσδέσουν και να επελευθερώνουν Ca^{2+} με σχετικά μεγάλη ταχύτητα. Το BAPTA έχει την ικανότητα να διαπερνά τις μεμβράνες και να εισέρχεται στο κύτταρο, οπότε μπορεί να δεσμεύει τα κυτταροπλασματικά ιόντα Ca^{2+} (Tsien 1980, Virág και συν. 1999). Οι αναστολείς αυτοί, θεωρητικά, έχουν την ικανότητα να διατηρούν την ομοιότητα των ιόντων ασβεστίου ενδοκυτταρικά και να αναστέλλουν την απόπτωση που επάγεται από τη μεταβολή των επιπέδων αυτών σε συνδυασμό με το οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, αποτελέσματα άλλων ερευνών δείχνουν ότι η συμπλοκοποίηση του ασβεστίου με κυτταροδιαπερατούς χηλικούς παράγοντες, όπως το BAPTA-AM, το EGTA-AM και το Quin-2-AM, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της επαγόμενης από τις ROS θραύσης του DNA σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το σήμα ασβεστίου δρα ανοδικά της ενεργοποίησης της PARP-1 και της βλάβης στο DNA (Virág και συν. 1999, Bentle και συν. 2006).

Ωστόσο, στο πείραμα που πραγματοποιήσαμε με προεπάση των κυττάρων H9c2 με τους συγκεκριμένους αναστολείς, πριν από την έκθεσή τους σε κουρκουμίνη 50μM, και επακόλουθη ανάλυση κατά Western (Εικόνα 4.7), δεν παρατηρήθηκε αναστολή της πρωτεόλυσης της PARP-1. Επομένως, κανένα από τα μόρια BAPTA-AM, νιφεδιπίνη ή βεραπαμίλη δεν επηρεάζει, υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες, τη θραύση της PARP που επάγεται από την κουρκουμίνη.

5.4 Επίδραση άλλων αναστολέων στην απόπτωση και τη θραύση της PARP-1

Εφόσον δεν παρατηρήθηκε σε αυτή τη φάση αναστολή της θραύσης της PARP-1 με τους αναστολείς ασβεστίου, αποφασίσαμε να δοκιμάσουμε άλλους τρεις φαρμακευτικούς αναστολείς με διαφορετικές δράσεις. Αυτοί ήταν η καριπορίδη (cariporide) ή HOE-642, η αποκυνίνη (apocynin) και η αντιμυκίνη A (antimycin A). Η καριπορίδη είναι ένας αναστολέας του ανταλλάκτη Na^+/H^+ [NHE, $\text{Na}^+ \text{H}^+$ exchanger –ανταλλάσσει H^+ με Na^+ , που εισέρχεται στο κύτταρο], ο οποίος εμπλέκεται στην ομοιόσταση του ενδοκυτταρικού pH σε πολλούς κυτταρικούς τύπους θηλαστικών. Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευθεί πολλές ισομορφές του ανταλλάκτη. Η NHE1 είναι η επικρατέστερη ισομορφή που εκφράζεται στην καρδιά, όπου συνεισφέρει στην ομοιόσταση του pH των καρδιομυοκυττάρων. Παρόλο που η ενεργοποίηση των NHE είναι βασική για την αποκατάσταση του φυσιολογικού pH, η υπερενεργοποίηση του NHE κατά τα επεισόδια ισχαιμίας-επαναιμάτωσης διαταράσσει την ενδοκυτταρική ισορροπία ιόντων, οδηγώντας σε καρδιακή δυσλειτουργία και βλάβη. Ο NHE1 μπορεί να ενεργοποιηθεί από αυξητικούς παράγοντες και να εκφράζεται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, κυρίως στα καρδιομυοκύτταρα των θηλαστικών, στα αιμοπετάλια και στην βασοπλευρική μεμβράνη των νεφρικών σωληναρίων. (Masereel και συν. 2003).

Η αποκυνίνη απομονώθηκε αρχικά από τις ρίζες του *Apocynum cannabinum*. Έχει χρησιμοποιηθεί ως επαρκής αναστολέας της NADPH οξειδάσης σε πολλά πειραματικά μοντέλα. Αν και ο μηχανισμός αναστολής δεν είναι εντελώς γνωστός, σίγουρα επηρεάζει την μεταφορά στην μεμβράνη του κυτταροπλασματικού συστατικού p47phox (phox όπως phagocytic oxidase, φαγοκυτταρική οξειδάση) του συμπλόκου της NADPH οξειδάσης (Stefanska και Pawliczak 2008). Η NADPH οξειδάση έχει ήδη αναφερθεί ότι δημιουργεί σουπεροξειδίο, καθώς μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADPH μες στο κύτταρο, διαμέσου της μεμβράνης, και τα συνδέει με το μοριακό οξυγόνο ώστε να παραχθούν ανιόντα σουπεροξειδίου. Η αντιμυκίνη A, ένα φυσικό αντιβιοτικό που παράγεται από τα βακτήρια στρεπτομύκητες (*Streptomyces spp.*), παρεμποδίζει ειδικά την δραστηριότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων της αναγωγάσης της ουβικινόλης-κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο III της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων) στην αναπνευστική αλυσίδα των περισσότερων οργανισμών (Kim και συν. 1999).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.8, με την καριπορίδη και την αποκυνίνη δεν παρατηρείται αναστολή της πρωτεόλυσης της PARP-1, μετά από προεπάση των κυττάρων με αυτές και επακόλουθη έκθεση σε κουρκουμίνη 50 μM . Αντίθετα, μετά από προεπάση των κυττάρων με αντιμυκίνη A δεν έχουμε εμφάνιση του θραύσματος p89 της PARP, αλλά δεν έχουμε και κύτταρα -παρατήρηση στο μικροσκόπιο, απουσία ακτίνης από το δείγμα- καθώς τα περισσότερα έχουν πεθάνει με τον συνδυασμό των δύο αυτών ουσιών (αντιμυκίνη A 1 μM και

κουρκουμίνη 50 μ M). Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η αντιμυκίνη A, λόγω του ότι αναστέλλει το σύμπλοκο III της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, οδηγεί σε καταστροφή της διαβάθμισης ηλεκτρονίων κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και κατάρρευση του μεμβρανικού δυναμικού του μιτοχονδρίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, ενώ η αύξηση του οξειδωτικού στρες και η κατάρρευση του δυναμικού της μεμβράνης «ξεκλειδώνουν» τον πόρο μετάπτωσης διαπερατότητας (βλ. ενότητα 1.1), οπότε απελευθερώνεται το κυτόχρωμα c στο κυτταρόπλασμα και έχουμε απόπτωση (Park και You 2016). Σε συνδυασμό με τη μεγάλη συγκέντρωση κουρκουμίνης, η οποία από μόνη της ευθύνεται για την επαγωγή οξειδωτικού στρες, τα κύτταρα πεθαίνουν πολύ γρήγορα. Η αύξηση των ROS στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου, μετά από επίδραση με αντιμυκίνη A, διαπιστώθηκε μάλιστα και πρόσφατα σε μελέτη που έγινε πάνω σε καρδιακά κύτταρα αρουραίων (Joseph και συν. 2016). Ο θάνατος σε αυτή την περίπτωση θα μπορούσε να είναι νεκρωτικός, αλλά αυτό απαιτεί περαιτέρω έρευνα για να εξακριβωθεί.

Μετά από αυτό το διαφορούμενο αποτέλεσμα σχετικά με το εάν η αντιμυκίνη A αναστέλλει την απόπτωση που επάγεται από την κουρκουμίνη, θεωρήθηκε σημαντικό να επαναληφθεί το πείραμα με χρήση μικρότερης συγκέντρωσης αντιμυκίνης A. Έτσι, έγινε προεπώαση των κυττάρων με 0,1 μ M αντιμυκίνη A (υποδεκαπλάσια συγκέντρωση) πριν από την έκθεση σε κουρκουμίνη 50 μ M. Στην εικόνα 4.9 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα που επιβεβαιώνει την υπόθεσή μας ότι η αντιμυκίνη A αναστέλλει την απόπτωση, καθώς υπάρχει πλήρης αναστολή της πρωτεόλυσης της PARP-1. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η ήπια αναστολή της δράσης του συμπλόκου III της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο είναι εκτός των άλλων είναι και ο κύριος υπαίτιος για την παραγωγή ROS μες στο μιτοχόνδριο (βλ. και Εικόνα 1.2), οδηγεί σε αναστολή του οξειδωτικού στρες της κουρκουμίνης και ακολούθως της απόπτωσης που επάγεται από αυτό.

5.5 Η p-Bcl-2 και η Bax συμμετέχουν στην απόπτωση που επάγεται από την κουρκουμίνη

Εκτός από την PARP-1, ως δείκτες της απόπτωσης στην ανάλυση κατά Western χρησιμοποιήθηκαν και η φωσφορυλιωμένη μορφή της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 (p-Bcl-2) αλλά και η αποπτωτική πρωτεΐνη Bax. Σε πρώτη φάση (Εικόνα 4.4) έγινε εμφανές ότι σε αυξανόμενους χρόνους επώασης των H9c2 κυττάρων με κουρκουμίνη 50 μ M, τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης της Bcl-2 μειώνονται σε σχέση με το control στις 6 ώρες, ενώ αντίθετα τα επίπεδα της Bax αυξάνονται. Η Bcl-2 πρέπει να φωσφορυλιωθεί για να δώσει το μέγιστο της αντιαποπτωτικής λειτουργίας της (Ito και συν. 1997). Η αύξηση των επιπέδων της Bax υποδηλώνει επαγωγή της απόπτωσης σε συνδυασμό με τη μείωση των επιπέδων

φωσφορυλίωσης της Bcl-2. Όμως, στο αποτέλεσμα αυτό (Εικόνα 4.4) έχουμε και ελάχιστη ποσότητα πρωτεΐνης στις 6 ώρες επίδρασης με κουρκουμίνη 50 μ M. Για να γίνει περισσότερο ξεκάθαρη η επίδραση του οξειδωτικού στρες της κουρκουμίνης στα επίπεδα αυτών των δύο κομβικών μορίων του μιτοχονδριακού μονοπατιού της απόπτωσης, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για την p-Bcl-2 και την Bax στην ανάλυση κατά Western και των δειγμάτων του πειράματος με επιδράσεις κουρκουμίνης 50 μ M για 15 λεπτά έως 6 ώρες (βλ. ενότητα 4.3.3).

Έτσι, στην Εικόνα 4.6 φαίνεται ότι τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Bcl-2 αυξάνονται και στη συνέχεια μειώνονται πολύ στις 4 ώρες επώασης με κουρκουμίνη 50 μ M, ενώ και τα επίπεδα της Bax μειώνονται μετά από τις 2 ώρες. Το αποτέλεσμα αυτό, όσον αφορά στην Bax, αντιφάσκει με αυτό της Εικόνας 4.4. Όμως, το αντίσωμα που χρησιμοποιήσαμε για την Bax εντοπίζει τα ολικά επίπεδα της πρωτεΐνης και η ομογενοποίηση των κυττάρων έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να ληφθεί το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα. Συνεπώς, θεωρώντας ότι βλέπουμε την κυτταροπλασματική Bax, το μοτίβο αυτό της μείωσης των επιπέδων της συμφωνεί με τα αποτελέσματα παλαιότερης έρευνας του εργαστηρίου μας (Zikaki και συν. 2014). Εκεί, τα επίπεδα της Bax στο κυτταρόπλασμα μειώνονται σημαντικά από τις 6 έως τις 24 ώρες επώασης των H9c2 κυττάρων με κουρκουμίνη 20 μ M, ενώ μετά τις 6 ώρες η πρωτεΐνη αρχίζει να εμφανίζεται στο μιτοχόνδριο. Επίσης, στο παρελθόν έχει αποδειχθεί πειραματικά και με εντοπισμό σε μικροσκόπιο φθορισμού, μετά από σύζευξη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη [GFP, green fluorescent protein], ότι με την επαγωγή της απόπτωσης στα H9c2 κύτταρα η Bax μετακινείται στο μιτοχόνδριο. Αυτή η μετακίνηση συσχετίστηκε και με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα και τον κατακερματισμό του πυρήνα (Hou και Hsu 2005).

Όσον αφορά στη p-Bcl-2 συγκεκριμένα, σε πρόσφατη έρευνα σε καρκινικά κύτταρα προστάτη παρουσιάζεται ότι με επίδραση κουρκουμίνης 20 μ M για 48 ώρες, υπάρχει απόλυτη πτώση των επιπέδων της φωσφορυλίωσης της Bcl-2 (Banerjee και συν. 2017). Εμείς δεν είδαμε τόσο ξεκάθαρο αποτέλεσμα, αλλά στις 16 ώρες τα κύτταρά μας, που είναι πιο ευαίσθητα από τα καρκινικά, πέθαιναν. Να σημειωθεί εδώ ότι η ζώνη της φωσφορυλιωμένης Bcl-2 που βλέπουμε εμφανίζεται υψηλότερα από το μοριακό βάρος που αναφέρεται στην περιγραφή του αντισώματος (στα 32kDa αντί για τα 28kDa), όμως υπάρχει αναφορά στο παρελθόν για εντοπισμό της p-Bcl-2 σε αυτό το μοριακό βάρος, σε εκχυλίσματα κυττάρων από κοιλίες καρδιών αρουραίων Sprague-Dawley (Cook και συν. 1999). Η Bcl-2 είναι μία σημαντική πρωτεΐνη για την απόπτωση στην καρδιά, καθώς πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ειδική για την καρδιά υπερέκφραση της Bcl-2 μειώνει σημαντικά το μέγεθος του εμφράγματος μετά από βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση. Αυτή η μείωση της I/R βλάβης έχει συσχετισθεί με τη μείωση της απόπτωσης των καρδιομυοκυττάρων (Brocheriou και συν. 2000).

5.6 Οι αναστολείς επηρεάζουν τα επίπεδα της p-Bcl-2 και της Bax

Στη συνέχεια, μελετήθηκε εάν οι αναστολείς που επιλέξαμε μεταβάλλουν τα επίπεδα της p-Bcl-2 ή της Bax. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Western των δειγμάτων που πήραμε από τα πειράματα με τους αναστολείς και με χρήση αντισωμάτων για αυτές τις δύο πρωτεΐνες. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.10, υπάρχει μείωση των επιπέδων της Bax με προεπώση των H9c2 κυττάρων με BAPTA, πριν από την έκθεσή τους σε κουρκουμίνη 50μM για 1 ώρα. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Bcl-2 φαίνεται να αυξάνονται σε κάθε περίπτωση σε σχέση με το control. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι επάγεται ο αντιαποπτωτικός μηχανισμός παρά την αύξηση των επιπέδων της Bax με τους άλλους αναστολείς πέραν του BAPTA, ενώ σε μεγαλύτερο χρόνο θα μπορούσαν να μειώνονται τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Bcl-2.

Τα δείγματα της Εικόνας 4.10 προέρχονται από διαφορετικά πειράματα. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι όντως μειώνονται τα επίπεδα της Bax με τη χρήση του αναστολέα BAPTA-AM, θεωρήθηκε σκόπιμο να γίνει ξανά ηλεκτροφόρηση των συγκεκριμένων δειγμάτων μαζί με το control και το δείγμα με τα 50μM κουρκουμίνη του πειράματος με τους αναστολείς ασβεστίου. Και πάλι, φαίνεται ότι μειώνονται τα επίπεδα της Bax με προεπώση των κυττάρων H9c2 με BAPTA πριν από την έκθεση σε κουρκουμίνη 50μM, σε σχέση με τα επίπεδα της πρωτεΐνης χωρίς τον αναστολέα. Επίσης, φάνηκε ότι τα επίπεδα της Bax μειώνονται με την αντιμυκίνη A, κάτι που ίσως αποδεικνύει για μία ακόμη φορά την αντιαποπτωτική της δράση έναντι της κουρκουμίνης στα H9c2 κύτταρα, σε συγκέντρωση 0,1μM (Εικόνα 4.11). Τέλος, με αφορμή αυτά τα αποτελέσματα, χρησιμοποιήθηκε και αντίσωμα για την PARP-1 στην ανάλυση κατά Western, προκειμένου να εξακριβωθεί και πάλι εάν ο BAPTA αναστέλλει ή όχι την θραύση της. Ξανά λοιπόν, δεν παρατηρείται αναστολή της θραύσης της PARP-1 με χρήση του BAPTA, ενώ με την αντιμυκίνη A παρατηρείται αναστολή της πρωτεόλυσής της (Εικόνα 4.12).

Η αντιμυκίνη A έχει έως τώρα χρησιμοποιηθεί ευρέως σε διάφορες μελέτες ως μόριο που επάγει την απόπτωση, τόσο καρκινικών όσο και φυσιολογικών κυτταρικών σειρών. Ωστόσο, υπάρχουν και περιπτώσεις όπου επιβεβαιώνεται η ικανότητά της να μειώνει το οξειδωτικό στρες και να αναστέλλει την απόπτωση σε φυσιολογικά κύτταρα. Σε μία παλαιότερη μελέτη, μάλιστα, όπου διερευνήθηκε ο ρόλος της αντιμυκίνης A στο οξειδωτικό στρες που επάγεται από το μονοξειδίο του αζώτου σε κυτταρική σειρά γαστρικού επιθηλίου αρουραίου, υποστηρίχθηκε ότι η αντιμυκίνη αναστέλλει το οξειδωτικό στρες εμποδίζοντας την έξοδο του κυτοχρώματος c από το μιτοχόνδριο, χωρίς όμως να μεταβάλλονται τα επίπεδα των Bcl-2 και Bax που ανιχνεύονται με ανάλυση κατά Western (Dairaku και συν. 2004). Επομένως, και στα δικά μας αποτελέσματα, μπορεί να δούμε ή να μη δούμε μείωση των επιπέδων της Bax, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι δεν έχουμε αναστολή της απόπτωσης με την αντιμυκίνη A, όπως

υποδεικνύεται με δείκτη την PARP-1.

Σχετικά με την μεταβολή των επιπέδων της Bax, είναι σημαντικό να δούμε τι ακριβώς συμβαίνει στο μιτοχόνδριο, καθώς τα κυτταροπλασματικά επίπεδά της μπορούν να μας δώσουν μία ένδειξη για το τι συμβαίνει, αλλά δεν αρκούν για να βγάλουμε ξεκάθαρα συμπεράσματα. Εάν διαπιστώσουμε ότι η μείωση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Bax, μετά από επώαση με κουρκουμίνη 50μM, ακολουθείται από αύξηση των επιπέδων της στα μιτοχόνδρια, τότε μπορούμε να επιβεβαιώσουμε ότι το μονοπάτι της απόπτωσης που επάγεται από την κουρκουμίνη περνάει από το μιτοχόνδριο, καθώς και να διερευνήσουμε την επίδραση των αναστολέων που χρησιμοποιήθηκαν και φάνηκαν προηγουμένως να έχουν αποτέλεσμα σε άλλα συστατικά αυτού του μονοπατιού (π.χ. στην ενεργοποίηση της κασπάσης-3). Ήδη, η αναστολή της θραύσης της PARP δείχνει ότι η αντιμυκίνη A λειτουργεί αντιαποπτωτικά σε συγκέντρωση 0,1μM στα H9c2 κύτταρα. Η μείωση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Bax με το BAPTA σίγουρα είναι ένα θετικό αποτέλεσμα, αλλά θα ήταν ενδιαφέρον να επιβεβαιωθεί και με τη μελέτη της Bax στο μιτοχόνδριο.

5.7 Η αναστολή των MAPKs δεν αναστέλλει την πρωτεόλυση της PARP-1

Το τελευταίο βήμα στην παρούσα εργασία ήταν να διερευνήσουμε εάν οι MAPKs εμπλέκονται στην απόπτωση που επάγεται από την κουρκουμίνη 50μM στα H9c2 κύτταρα, καθώς, όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 1.3, οι MAPKs παίζουν κρίσιμο ρόλο στα μονοπάτια σηματοδότησης που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο ή την κυτταρική επιβίωση. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.3.12, με χρήση των αναστολέων των MAPKs PD98059 -αναστολέας των MEK1/2, SB203580 -αναστολέας της p38 MAPK- και SP600125 -αναστολέας των JNKs- δεν αναστέλλεται η πρωτεόλυση της PARP-1. Επίσης, δεν παρατηρείται αναστολή της πρωτεόλυσης της PARP-1 ούτε με τον αναστολέα H89 των κινασών MSK1 και PKA. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να εξηγηθεί εάν εστιάσουμε στους ρόλους αυτών στην τύχη των καρδιακών κυττάρων.

Καταρχάς, οι MEK1 και MEK2 ρυθμίζουν με φωσφορυλίωση τις δύο ευρύτερα εκφραζόμενες μορφές των ERKs, τις ERK1 και ERK2. Συνεπώς, η αναστολή των MEK1/2 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή των ERK1/2. Στα καρδιακά κύτταρα, τα μέλη της οικογένειας των ERKs εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην επιβίωση ως απόκριση σε ισχαιμία/επαναιμάτωση, οξειδωτικό στρες, υποξία, διέγερση των β-αδρενεργικών υποδοχέων και έκθεση σε ανθρακυκλίνη. Επίσης, έχει φανεί ότι το μονοπάτι των MEK-ERK προστατεύει τα καρδιακά κύτταρα από την απόπτωση (Baines και Molkentin 2005). Επιπλέον, ένας πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου οι ERK1/2 μπορεί να ανταγωνίζονται την

απόπτωση, είναι η συμπλοκοποίηση με την PKCε στα μιτοχόνδρια και η φωσφορυλίωση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bad, της οικογένειας των Bcl-2 (Baines και συν. 2002). Μάλιστα, σε παλαιότερη μελέτη του εργαστηρίου μας αποδείχτηκε ότι οι ERKs είναι απαραίτητες για την επιβίωση των καρδιακών μυοβλαστών H9c2, όταν αυτοί υφίστανται εξωκυττάρια αλκάλωση (extracellular alkalosis), καθώς η επώασή τους με τον ίδιο αναστολέα PD98059 έδειξε αύξηση του κυτταρικού θανάτου (Stathoroulou και συν. 2008). Συνεπώς, και εδώ αποδεικνύεται ότι οι ERKs δε συμμετέχουν στην θραύση της PARP-1 που επάγεται από την κουρκουμίνη 50μM, καθώς η επώαση με τον αναστολέα τους δε μεταβάλλει τα επίπεδα πρωτεόλυσής της, που επάγεται από την υψηλή συγκέντρωση κουρκουμίνης.

Όσον αφορά στην p38 MAPK, αυτή σχετίζεται άμεσα με την επαγωγή της απόπτωσης στα περισσότερα συστήματα. Παράδειγμα αποτελούν οι περιπτώσεις νεογνικών καρδιομυοκυττάρων, όπου η υπερέκφραση της p38 MAPK οδήγησε σε μείωση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-xL (Kaiser και συν. 2004), ενώ η αναστολή της p38 μείωσε την επαγόμενη από το στρες απόπτωση σε καλλιιεργούμενα καρδιομυοκύτταρα σε άλλη μελέτη (Sharon και συν. 2003). Ωστόσο, παλαιότερη έρευνα του εργαστηρίου μας έδειξε ότι η αναστολή της p38 MAPK, με τον αντίστοιχο αναστολέα SB203580, οδηγεί και σε αύξηση του κυτταρικού θανάτου σε κύτταρα H9c2 που υφίστανται εξωκυττάρια αλκάλωση (Stathoroulou και συν. 2008). Επιπλέον, σε πιο πρόσφατη μελέτη παρατηρήθηκε ότι με προεπώαση των H9c2 κυττάρων με τον συγκεκριμένο αναστολέα SB203580 πριν από την έκθεση σε 20μM κουρκουμίνη για 6 ώρες, δεν παρατηρείται αναστολή της πρωτεόλυσης της PARP-1 που επάγεται από την κουρκουμίνη (Zikaki και συν. 2014). Ως εκ τούτου μπορούμε να συμπεράνουμε ότι στη δική μας περίπτωση, όπου το ερέθισμα είναι οξύ και σύντομο αφού επιδρούμε με 50μM κουρκουμίνη για 1 ώρα, η p38 MAPK δε συμμετέχει στον μηχανισμό της απόπτωσης αλλά δρα αντιαποπτωτικά μαζί με τις ERKs. Έτσι, η αναστολή της δεν επηρεάζει την πρωτεόλυση της PARP-1.

Από την άλλη πλευρά, οι JNKs έχουν έναν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των λειτουργιών προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια. Μάλιστα, θεωρείται ότι μεσολαβεί την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από το μιτοχόνδριο, ίσως με τη συμμετοχή της πρωτεόλυσης της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bid (Dhanasekaran και Reddy 2008). Η απενεργοποίηση των JNK σε H9c2 κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης που επάγεται από στρεσογόνα ερεθίσματα (Gabai και συν. 2000). Επιπλέον, σε έρευνα του εργαστηρίου μας φάνηκε ότι η αναστολή των JNKs με τον αναστολέα AS601245 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της πρωτεόλυσης της PARP-1 που επάγεται από το οξειδωτικό στρες της κουρκουμίνης 20μM, μετά από έκθεση των H9c2 κυττάρων σε αυτή για 6 ώρες (Zikaki και συν. 2014). Ωστόσο, η κουρκουμίνη 50μM προκαλεί πολύ πιο έντονο

οξειδωτικό στρες, όπως φάνηκε και με τον χρόνο στον οποίο βλέπουμε για πρώτη φορά το θραύσμα p89 της PARP-1 (βλ. ενότητα 5.2). Στο δικό μας πείραμα, δεν έχουμε αναστολή της θραύσης της PARP-1 στην μία ώρα επίδρασης με κουρκουμίνη 50μM, μετά από προεπώαση των κυττάρων με τον αναστολέα των JNKs SP600125 (Εικόνα 4.3.13). Αυτό σημαίνει ότι οι JNKs σε αυτή την περίπτωση ίσως λειτουργούν αντιαποπτωτικά, καθώς το ερέθισμα είναι οξύ και σύντομο και δεν προλαβαίνουν να εκδηλώσουν αποπτωτική δράση. Η αναστολή αυτών οδηγεί στο να υπερσχύσουν και πάλι οι αποπτωτικοί μηχανισμοί, οπότε επάγεται η απόπτωση από το οξειδωτικό στρες και παρατηρούμε την πρωτεόλυση της PARP-1.

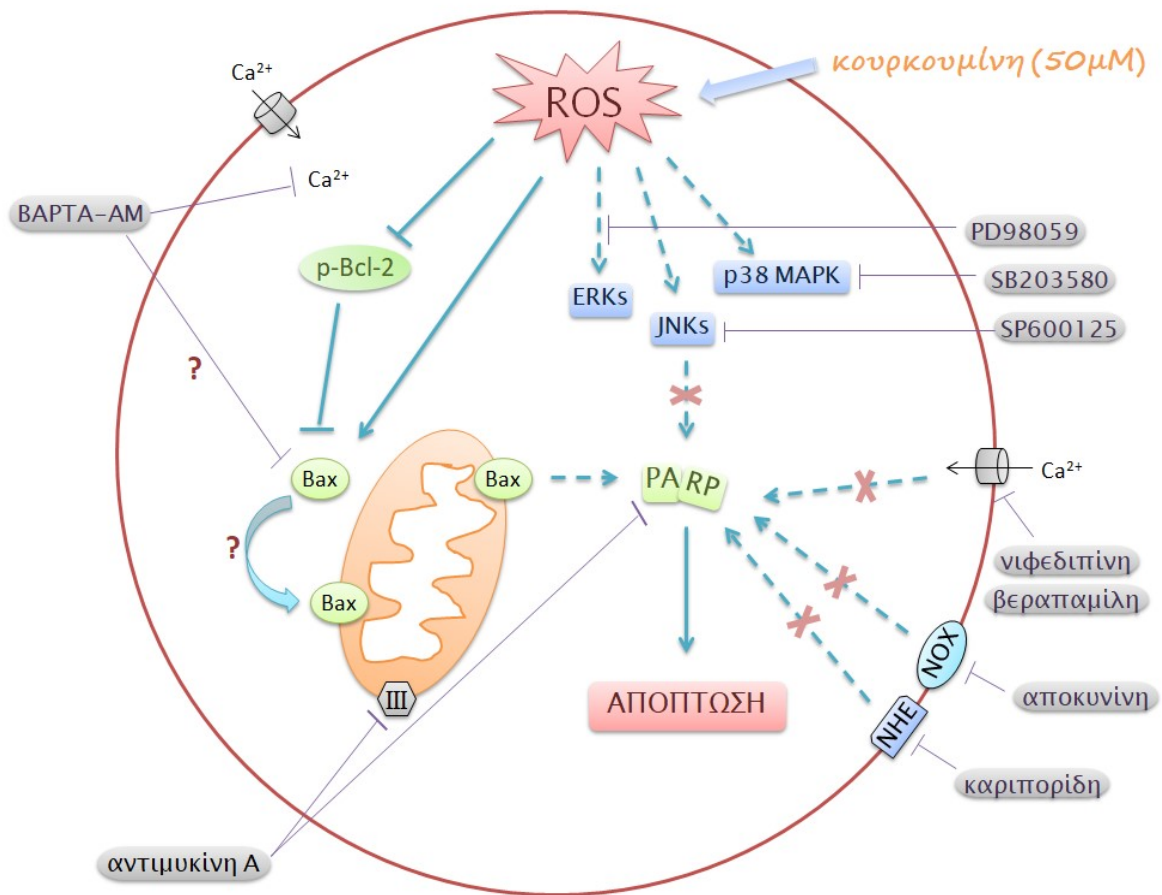
Τέλος, ούτε η αναστολή των MSK1 και PKA που προκαλείται από τον H89 25μM επηρέασε την θραύση της PARP-1 που επάγεται από την κουρκουμίνη 50μM. Ο H89 είναι ένας αναστολέας που μπορεί να αναστέλλει πολλές κινάσες (Lochner και Moolman 2006). Ωστόσο, εμάς στην παρούσα φάση μας ενδιαφέρει η επίδρασή του μόνο σε αυτές που σχετίζονται με την απόπτωση. Η MSK1 επάγει την απόπτωση που επάγεται από το στρες σε διάφορες περιπτώσεις, όπως υπό την επίδραση ιόντων Mn^{+} (Mchichi και συν. 2007). Αποτελεί όμως υπόστρωμα των p38 MAPK και ERKs, οπότε σύμφωνα με αυτά που προαναφέρθηκαν, η αναστολή της MSK1 οδηγεί στη διακοπή του μονοπατιού καθοδικά των δύο αυτών MAPKs. Η κινάση PKA ενεργοποιείται από τον δεύτερο αγγελιαφόρο cAMP και μπορεί να επάγει την απόπτωση μέσω μηχανισμών που δεν έχουν μελετηθεί ακόμη σε βάθος. Ωστόσο, έχει διπλό ρόλο, καθώς σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, όπως και στα καρδιακά κύτταρα υπό την επίδραση οξειδωτικού στρες μονοξειδίου του αζώτου (Kwak και συν. 2008), η ενεργοποίηση της PKA παρουσίασε αντιαποπτωτική δράση. Αυτή μπορεί να οφείλεται σε επιδράσεις της που αλλάζουν την ισορροπία της φωσφορυλίωσης σερίνης/θρεονίνης της Akt από άλλες κινάσες, όπως είναι η p38 MAPK (Krakstad και συν. 2004). Κι εδώ, λοιπόν, θεωρούμε ότι η PKA λειτουργεί αντιαποπτωτικά και γι αυτό η αναστολή της δεν αναστέλλει την πρωτεόλυση της PARP-1.

Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι οι κινάσες ERKs, JNKs, p38 MAPK, αλλά και η PKA και η MSK1 έχουν διττό ρόλο, οπότε ανάλογα με την ένταση και τη διάρκεια του ερεθίσματος που προκαλεί την ενεργοποίησή τους, αυτές μπορεί να λειτουργούν προ-αποπτωτικά ή αντιαποπτωτικά. Στην παρούσα μελέτη οι κινάσες αυτές φαίνεται ότι λειτούργησαν αντιαποπτωτικά ως απόκριση στο οξύ και σύντομο ερέθισμα του οξειδωτικού στρες που επάγεται από τα 50μM κουρκουμίνη, ωστόσο η αντιαποπτωτική τους δράση δεν είναι αρκετή ώστε να αντισταθμίσει το έντονο αποπτωτικό ερέθισμα της κουρκουμίνης.

5.8 Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η κουρκουμίνη σε συγκέντρωση 50μM και το H₂O₂ σε συγκέντρωση 400μM μειώνουν σημαντικά τη βιωσιμότητα των H9c2 κυττάρων μέσω της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).
- Η κουρκουμίνη σε συγκέντρωση 50μM επάγει την απόπτωση, κάτι που αποδεικνύεται με την πρωτεόλυση της PARP-1, τη μείωση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Bax και την μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της Bcl-2 στη Σερίνη 70.
- Το χηλικό μόριο BAPTA, και οι αναστολείς καναλιών ασβεστίου νιφεδιπίνη & βεραπαμίλη δεν αναστέλλουν την θραύση της PARP που προκαλείται από την κουρκουμίνη 50μM, αλλά ο BAPTA φαίνεται ότι οδηγεί σε μείωση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Bax.
- Οι αναστολείς καρποδιόδη, του ανταλλάκτη Na⁺/H⁺, και αποκινίνη, της οξειδάσης του NADPH, δεν αναστέλλουν την απόπτωση που επάγεται από την κουρκουμίνη 50μM, αλλά η αντιμυκίνη A, του συμπλόκου III της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, αναστέλλει τη θραύση της PARP.
- Οι ERKs, JNKs, η p38 MAPK, αλλά οι MSK1 και PKA δεν επάγουν την πρωτεόλυση της PARP-1, αλλά λειτουργούν αντιαποπτωτικά κατά την επαγωγή της απόπτωσης από την κουρκουμίνη 50μM στα H9c2 κύτταρα.



Εικόνα 4.1 Η κουρκουμίνη σε υψηλές συγκεντρώσεις επάγει την αύξηση της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) ενδοκυτταρικά. Η αύξηση αυτή των ROS προκαλεί οξειδωτικό στρες, το οποίο επάγει την μετακίνηση της αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax από το κυτταρόπλασμα στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Παράλληλα, μειώνονται τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Bcl-2, η οποία έχει αντιαποπτωτική δράση. Η μετακίνηση της Bax στην μιτοχονδριακή μεμβράνη και ο επακόλουθος ολιγομερισμός της έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός διαύλου που επιτρέπει την έξοδο του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα και μία πορεία που έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κασπάσων. Αυτή η πορεία εδώ παρουσιάζεται απλοποιημένη, ενώ τα διακεκομμένα βέλη υποδηλώνουν ότι μεσολαβούν και άλλες αλληλεπιδράσεις σε εκείνο του σημείο, οι οποίες δεν μελετήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, αλλά είναι γνωστές από τη βιβλιογραφία. Η πρωτεόλυση της PARP από τις κασπάσες έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της απόπτωσης. Ο χηλικός παράγοντας BAPTA-AM έχει την ικανότητα να διαπερνά την κυτταροπλασματική μεμβράνη και να συμπλοκοποιεί τα ιόντα Ca^{2+} , ενώ οδηγεί και σε μείωση των επιπέδων της Bax στο κυτταρόπλασμα. Η αντιμυκίνη A αναστέλλει τη δράση του συμπλόκου III της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων του μιτοχονδρίου, ενώ βρέθηκε ότι αναστέλλει και την πρωτεόλυση της PARP. Τέλος, οι MAPKs δεν συμμετέχουν στην απόπτωση που επάγεται από την κουρκουμίνη 50μM ως προ-αποπτωτικά μόρια, καθώς η αναστολή τους δεν έδειξε μεταβολή των επιπέδων του θραύσματος της PARP. Το ερέθισμα της κουρκουμίνης είναι τόσο ισχυρό ωστόσο, που οι MAPKs δεν προλαβαίνουν να εκδηλώσουν την πιθανή προστατευτική τους δράση, κι έτσι το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Aggarwal, Bharat B., and Bokyoung Sung. 2009. "Pharmacological Basis for the Role of Curcumin in Chronic Diseases: An Age-Old Spice with Modern Targets." *Trends in Pharmacological Sciences* 30 (2): 85–94. doi:10.1016/j.tips.2008.11.002.
- Ahsan, Haseeb, Nazneen Parveen, Nizam U. Khan, and S. M. Hadi. 1999. "Pro-Oxidant, Anti-Oxidant and Cleavage Activities on DNA of Curcumin and Its Derivatives Demethoxycurcumin and Bisdemethoxycurcumin." *Chemico-Biological Interactions* 121 (2): 161–75. doi:10.1016/S0009-2797(99)00096-4.
- Aikawa, Ryuichi, Issei Komuro, Tsutomu Yamazaki, Yunzeng Zou, Sumiyo Kudoh, Mariko Tanaka, Ichiro Shiojima, Yukio Hiroi, and Yoshio Yazaki. 1997. "Oxidative Stress Activates Extracellular Signal-Regulated Kinases through Src and Ras in Cultured Cardiac Myocytes of Neonatal Rats." *Journal of Clinical Investigation* 100 (7): 1813–21. doi:10.1172/JCI119709.
- Albano, Emanuele, Giorgio Bellomo, Maurizio Parola, Rita Carini, and Mario U. Dianzani. 1991. "Stimulation of Lipid Peroxidation Increases the Intracellular Calcium Content of Isolated Hepatocytes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1091 (3): 310–16. doi:10.1016/0167-4889(91)90194-3.
- Aoki, Hiroki, Peter M Kang, James Hampe, Koichi Yoshimura, Takafumi Noma, Masunori Matsuzaki, and Seigo Izumo. 2002. "Direct Activation of Mitochondrial Apoptosis Machinery by c-Jun N-Terminal Kinase in Adult Cardiac Myocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (12): 10244–50. doi:10.1074/jbc.M112355200.
- Bacon, B R, R O'Neill, and R S Britton. 1993. "Hepatic Mitochondrial Energy Production in Rats with Chronic Iron Overload." *Gastroenterology* 105 (4): 1134–40. doi:S0016508593003282 [pii].
- Baines, Christopher P., and Jeffery D. Molkentin. 2005. "STRESS Signaling Pathways That Modulate Cardiac Myocyte Apoptosis." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38 (1): 47–62. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.11.004.
- Baines, Christopher P., Jun Zhang, Guang Wu Wang, Yu Ting Zheng, Joanne X. Xiu, Ernest M. Cardwell, Roberto Bolli, and Peipei Ping. 2002. "Mitochondrial PKC ϵ and MAPK Form Signaling Modules in the Murine Heart: Enhanced Mitochondrial PKC ϵ -MAPK Interactions and Differential MAPK Activation in PKC ϵ -Induced Cardioprotection." *Circulation Research* 90 (4): 390–97. doi:10.1161/01.RES.0000012702.90501.8D.
- Banerjee, Saswati, Santosh K Singh, Indrajit Chowdhury, and Rajesh Singh. 2017. "Combinatorial Effect of Curcumin with Docetaxel Modulates Apoptotic and Cell Survival Molecules in Prostate Cancer." *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* 9: 235–45.
- Bean, Bruce P. 1989. "Classes of Calcium Channels in Vertebrate Cells." *Annual Review of Physiology* 51: 367–84. doi:10.1146/annurev.ph.51.030189.002055.
- Bech-Otschir, Dawadschargal, Regine Kraft, Xiaohua Huang, Peter Henklein, Barbara Kapelari, Christian Pollmann, and Wolfgang Dubiel. 2001. "COP9 Signalosome-Specific Phosphorylation Targets p53 to Degradation by the Ubiquitin System." *EMBO Journal* 20 (7): 1630–39. doi:10.1093/emboj/20.7.1630.
- Bentle, Melissa S, Kathryn E Reinicke, Erik A Bey, Douglas R Spitz, and David A Boothman.

2006. "Calcium-Dependent Modulation of poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Alters Cellular Metabolism and DNA Repair." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (44). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 33684–96. doi:10.1074/jbc.M603678200.
- Betteridge, D J. 2000. "What Is Oxidative Stress?" *Metabolism: Clinical and Experimental* 49 (2 Suppl 1): 3–8. doi:10.1016/S0026-0495(00)80077-3.
- Beutner, Gisela, Alexander Rück, Birgit Riede, Wolfram Welte, and Dieter Brdiczka. 1996. "Complexes between Kinases, Mitochondrial Porin and Adenylate Translocator in Rat Brain Resemble the Permeability Transition Pore." *FEBS Letters* 396 (2–3): 189–95. doi:10.1016/0014-5793(96)01092-7.
- Bienert, Gerd P, Jan K Schjoerring, and Thomas P Jahn. 2006. "Membrane Transport of Hydrogen Peroxide." *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 (8): 994–1003. doi:10.1016/j.bbamem.2006.02.015.
- Bortner, Carl D., Nicklas B.E. Oldenburg, and John A. Cidlowski. 1995. "The Role of DNA Fragmentation in Apoptosis." *Trends in Cell Biology*. doi:10.1016/S0962-8924(00)88932-1.
- Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72 (1–2): 248–54. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Bratton, Shawn B, and Guy S Salvesen. 2010. "Regulation of the Apaf-1–caspase-9 Apoptosome." *Journal of Cell Science* 123 (19): 3209 LP-3214.
- Brocheriou, Valérie, Albert A Hagège, Abdou Oubenaïssa, Martine Lambert, Vincent O Mallet, Micheline Duriez, Michel Wassef, Axel Kahn, Philippe Menasché, and Hélène Gilgenkrantz. 2000. "Cardiac Functional Improvement by a Human Bcl-2 Transgene in a Mouse Model of Ischemia/reperfusion Injury." *The Journal of Gene Medicine* 2 (5). John Wiley & Sons, Ltd.: 326–33. doi:10.1002/1521-2254(200009/10)2:5<326::AID-JGM133>3.0.CO;2-1.
- Cadenas, Enrique, and Kelvin J.A. Davies. 2000. "Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, and Aging." *Free Radical Biology and Medicine* 29 (3–4): 222–30. doi:10.1016/S0891-5849(00)00317-8.
- Cano, Eva, and Louis C. Mahadevan. 1995. "Parallel Signal Processing among Mammalian MAPKs." *Trends in Biochemical Sciences*. doi:10.1016/S0968-0004(00)88978-1.
- Chang, L, and M Karin. 2001. "Mammalian MAP Kinase Signalling Cascades." *Nature* 410 (6824): 37–40. doi:10.1038/35065000.
- Chen, Juan Juan, Helen Bertrand, and Byung Pal Yu. 1995. "Inhibition of Adenine Nucleotide Translocator by Lipid Peroxidation Products." *Free Radical Biology and Medicine* 19 (5): 583–90. doi:10.1016/0891-5849(95)00066-7.
- Chen, Xin Jie, Xiaowen Wang, Brett a Kaufman, and Ronald a Butow. 2005. "Aconitase Couples Metabolic Regulation to Mitochondrial DNA Maintenance." *Science* 307 (5710): 714–17. doi:10.1126/science.1106391.
- Chew, Su Kit, Po Chen, Nichole Link, Kathleen a Galindo, Kristi Pogue, and John M Abrams.

2009. "Genome-Wide Silencing in *Drosophila* Captures Conserved Apoptotic Effectors." *Nature* 460 (7251): 123–27. doi:10.1038/nature08087.
- Chipuk, Jerry E., Tudor Moldoveanu, Fabien Llambi, Melissa J. Parsons, and Douglas R. Green. 2010. "The BCL-2 Family Reunion." *Molecular Cell*. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.025.
- Cook, Stuart A., Peter H. Sugden, and Angela Clerk. 1999. "Regulation of Bcl-2 Family Proteins During Development and in Response to Oxidative Stress in Cardiac Myocytes." *Circulation Research* 85 (10).
- Crawford, Emily D., and James A. Wells. 2011. "Caspase Substrates and Cellular Remodeling." *Annual Review of Biochemistry* 80 (1): 1055–87. doi:10.1146/annurev-biochem-061809-121639.
- Cui, Long, Jun Miao, and Liwang Cui. 2007. "Cytotoxic Effect of Curcumin on Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum*: Inhibition of Histone Acetylation and Generation of Reactive Oxygen Species." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (2): 488–94. doi:10.1128/AAC.01238-06.
- Curtin, Nicola J. 2005. "PARP Inhibitors for Cancer Therapy." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 7 (4): 1–20. doi:10.1017/S146239940500904X.
- D'Amours, D, F R Sallmann, V M Dixit, and G G Poirier. 2001. "Gain-of-Function of poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 upon Cleavage by Apoptotic Proteases: Implications for Apoptosis." *Journal of Cell Science* 114 (Pt 20): 3771–78.
- Dairaku, Naohiro, Katsuaki Kato, Kennichi Honda, Tomoyuki Koike, Katsunori Iijima, Akira Imatani, Hitoshi Sekine, Shuichi Ohara, Hiroshi Matsui, and Tooru Shimosegawa. 2004. "Oligomycin and Antimycin A Prevent Nitric Oxide-Induced Apoptosis by Blocking Cytochrome C Leakage." *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 143 (3): 143–51. doi:10.1016/j.lab.2003.11.003.
- Davis, Roger J. 2000. "Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases." *Cell* 103 (2): 239–52. doi:10.1016/S0092-8674(00)00116-1.
- Devasagayam, T P A, J C Tilak, K K Bloor, Ketaki S Sane, Saroj S Ghaskadbi, and R D Lele. 2004. "Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects." *The Journal of the Association of Physicians of India* 52 (October): 794–804.
- Dewson, Grant, Tobias Kratina, Huiyan W. Sim, Hamsa Puthalakath, Jerry M. Adams, Peter M. Colman, and Ruth M. Kluck. 2008. "To Trigger Apoptosis, Bak Exposes Its BH3 Domain and Homodimerizes via BH3:Groove Interactions." *Molecular Cell* 30 (3): 369–80. doi:10.1016/j.molcel.2008.04.005.
- Dhanasekaran, D N, and E P Reddy. 2008. "JNK Signaling in Apoptosis." *Oncogene* 27 (48): 6245–51. doi:10.1038/onc.2008.301.
- Dickens, Laura S., Ian R. Powley, Michelle A. Hughes, and Marion MacFarlane. 2012. "The 'Complexities' of Life and Death: Death Receptor Signalling Platforms." *Experimental Cell Research* 318 (11): 1269–77. doi:10.1016/j.yexcr.2012.04.005.
- Dixon, Scott J., Kathryn M. Lemberg, Michael R. Lamprecht, Rachid Skouta, Eleina M. Zaitsev, Caroline E. Gleason, Darpan N. Patel, et al. 2012. "Ferroptosis: An Iron-

- Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death.” *Cell* 149 (5): 1060–72. doi:10.1016/j.cell.2012.03.042.
- Dröge, Wulf. 2002. “Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function.” *Physiological Reviews* 82 (1): 47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001.
- Duan, Weixun, Yang Yang, Juanjuan Yan, Shiqiang Yu, Jincheng Liu, Jingjun Zhou, Jianying Zhang, Zhenxiao Jin, and Dinghua Yi. 2012. “The Effects of Curcumin Post-Treatment against Myocardial Ischemia and Reperfusion by Activation of the JAK2/STAT3 Signaling Pathway.” *Basic Research in Cardiology* 107 (3): 263. doi:10.1007/s00395-012-0263-7.
- Eckelman, Brendan P, Guy S Salvesen, and Fiona L Scott. 2006. “Human Inhibitor of Apoptosis Proteins: Why XIAP Is the Black Sheep of the Family.” *EMBO Reports* 7 (10): 988–94. doi:10.1038/sj.embor.7400795.
- El Mchichi, B, a Hadji, a Vazquez, and G Leca. 2007. “p38 MAPK and MSK1 Mediate Caspase-8 Activation in Manganese-Induced Mitochondria-Dependent Cell Death.” *Cell Death and Differentiation* 14 (10): 1826–36. doi:10.1038/sj.cdd.4402187.
- Ellis, H M, and H R Horvitz. 1986. “Genetic Control of Programmed Cell Death in the Nematode *C. Elegans*.” *Cell* 44 (6): 817–29. doi:10.1016/0092-8674(86)90004-8.
- Fan, M, and T C Chambers. 2001. “Role of Mitogen-Activated Protein Kinases in the Response of Tumor Cells to Chemotherapy.” *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 4 (4): 253–67. doi:10.1054/drup.2001.0214.
- Fatokun, Amos A, Valina L Dawson, and Ted M Dawson. 2014. “Parthanatos: Mitochondrial-Linked Mechanisms and Therapeutic Opportunities.” *British Journal of Pharmacology* 171 (8): 2000–2016. doi:10.1111/bph.12416.
- Fernandez-Sarabia, M J, and J R Bischoff. 1993. “Bcl-2 Associates with the Ras-Related Protein R-Ras p23.” *Nature* 366 (6452): 274–75. doi:10.1038/366274a0.
- Finkel, Toren, and Nikki J. Holbrook. 2000. “Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Ageing.” *Nature* 408 (6809). Nature Publishing Group: 239–47. doi:10.1038/35041687.
- Fridovich, I. 1997. “Superoxide Anion Radical, Superoxide Dismutases, and Related Matters.” *Journal of Biological Chemistry* 272 (30): 18515–17. doi:10.1074/jbc.272.30.18515.
- Frisch, Steven M., and Erkki Ruoslahti. 1997. “Integrins and Anoikis.” *Current Opinion in Cell Biology*. doi:10.1016/S0955-0674(97)80124-X.
- Gabai, Vladimir L., Anatoli B. Meriin, Julia A. Yaglom, Jeanne Y. Wei, Dick D. Mosser, and Michael Y. Sherman. 2000. “Suppression of Stress Kinase JNK Is Involved in HSP72-Mediated Protection of Myogenic Cells from Transient Energy Deprivation. HSP72 Alleviates the Stress-Induced Inhibition of JNK Dephosphorylation.” *Journal of Biological Chemistry* 275 (48): 38088–94. doi:10.1074/jbc.M006632200.
- Galluzzi L, I Vitale, JM Abrams, ES Alnemri, EH Baehrecke, MV Blagosklonny, TM Dawson, et al. 2012. “Molecular Definitions of Cell Death Subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012.” *Cell Death Differ* 19: 107–20. doi:10.1038/cdd.2008.150.

- Green, Douglas R., and Fabien Llambi. 2015. "Cell Death Signaling." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (12): a006080. doi:10.1101/cshperspect.a006080.
- Halliwell, B. 1994. "Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Curiosity, Cause, or Consequence?" *The Lancet* 344 (8924): 721–24. doi:10.1016/S0140-6736(94)92211-X.
- Halmosi, Robert, Laszlo Deres, Roland Gal, Krisztian Eros, Balazs Sumegi, and Kalman Toth. 2016. "PARP Inhibition and Postinfarction Myocardial Remodeling." *International Journal of Cardiology* 217: S52–59. doi:10.1016/j.ijcard.2016.06.223.
- Herceg, Zdenko, and Z Q Wang. 2001. "Functions of poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) in DNA Repair, Genomic Integrity and Cell Death." *Mutation Research* 477 (1–2): 97–110. doi:10.1016/S0027-5107(01)00111-7.
- Hosseinzadeh, Leila, Javad Behravan, Fatemeh Mosaffa, Gholamreza Bahrami, Ahmadreza Bahrami, and Gholamreza Karimi. 2011. "Curcumin Potentiates Doxorubicin-Induced Apoptosis in H9c2 Cardiac Muscle Cells through Generation of Reactive Oxygen Species." *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 49 (5): 1102–9. doi:10.1016/j.fct.2011.01.021.
- Hou, Qi, and Yi-Te Hsu. 2005. "Bax Translocates from Cytosol to Mitochondria in Cardiac Cells during Apoptosis: Development of a GFP-Bax-Stable H9c2 Cell Line for Apoptosis Analysis." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 289 (1): H477–87. doi:10.1152/ajpheart.00879.2004.
- Imlay, James A. 2008. "Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide." *Annual Review of Biochemistry* 77 (1). Annual Reviews : 755–76. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055.
- Ito, T, X Deng, B Carr, and W S May. 1997. "Bcl-2 Phosphorylation Required for Anti-Apoptosis Function." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (18). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 11671–73. doi:10.1074/JBC.272.18.11671.
- Jeong, C W, K Y Yoo, S H Lee, H J Jeong, C S Lee, and S J Kim. 2012. "Curcumin Protects Against Regional Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Through Activation of RISK/GSK-3beta and Inhibition of p38 MAPK and JNK." *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 17 (4): 387–94. doi:10.1177/1074248412438102\r1074248412438102 [pii].
- Jose Corbalan, J., Dorothy E. Vatner, and Stephen F. Vatner. 2016. "Myocardial Apoptosis in Heart Disease: Does the Emperor Have Clothes?" *Basic Research in Cardiology*. doi:10.1007/s00395-016-0549-2.
- Joseph, Leroy C., Emanuele Barca, Prakash Subramanyam, Michael Komrowski, Utpal Pajvani, Henry M. Colecraft, Michio Hirano, and John P. Morrow. 2016. "Inhibition of Naphthol Oxidase 2 (nox2) Prevents Oxidative Stress and Mitochondrial Abnormalities Caused by Saturated Fat in Cardiomyocytes." *PLoS ONE* 11 (1). doi:10.1371/journal.pone.0145750.
- Jost, Philipp J, Stephanie Grabow, Daniel Gray, Mark D McKenzie, Ueli Nachbur, David C S Huang, Philippe Bouillet, et al. 2009. "XIAP Discriminates between Type I and Type II FAS-Induced Apoptosis." *Nature* 460 (7258): 1035–39. doi:10.1038/nature08229.
- Kaiser, Robert A, Orlando F Bueno, Daniel J Lips, Pieter A Doevendans, Fred Jones, Thomas F

- Kimball, and Jeffery D Molkenin. 2004. "Targeted Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Antagonizes Cardiac Injury and Cell Death Following Ischemia-Reperfusion in Vivo." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (15): 15524–30. doi:10.1074/jbc.M313717200.
- Kim, H.-E., Fenghe Du, Min Fang, and Xiaodong Wang. 2005. "Formation of Apoptosome Is Initiated by Cytochrome c-Induced dATP Hydrolysis and Subsequent Nucleotide Exchange on Apaf-1." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (49): 17545–50. doi:10.1073/pnas.0507900102.
- Kim, Hoon, Lothar Esser, M Bilayet Hossain, Di Xia, Chang-An Yu, Josep Rizo, Dick van der Helm, and Johann Deisenhofer. 1999. "Structure of Antimycin A1, a Specific Electron Transfer Inhibitor of Ubiquinol–Cytochrome c Oxidoreductase." *Journal of the American Chemical Society* 121 (20): 4902–3. doi:10.1021/ja990190h.
- Kimes, B W, and B L Brandt. 1976. "Properties of a Clonal Muscle Cell Line from Rat Heart." *Experimental Cell Research* 98 (2): 367–81. doi:10.1016/0014-4827(76)90447-X.
- Kothakota, S, T Azuma, C Reinhard, a Klippel, J Tang, K Chu, T J McGarry, et al. 1997. "Caspase-3-Generated Fragment of Gelsolin: Effector of Morphological Change in Apoptosis." *Science (New York, N.Y.)* 278 (5336): 294–98. doi:10.1126/science.278.5336.294.
- Kowaltowski, Alicia J., Roger F. Castilho, and Anibal E. Vercesi. 1996. "Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore by Uncoupling or Inorganic Phosphate in the Presence of Ca²⁺ Is Dependent on Mitochondrial-Generated Reactive Oxygen Species." *FEBS Letters* 378 (2): 150–52. doi:10.1016/0014-5793(95)01449-7.
- Krakstad, Camilla, Anne Elisabeth Christensen, and Stein Ove Døskeland. 2004. "cAMP Protects Neutrophils against TNF-Alpha-Induced Apoptosis by Activation of cAMP-Dependent Protein Kinase, Independently of Exchange Protein Directly Activated by cAMP (Epac)." *Journal of Leukocyte Biology* 76 (3): 641–47. doi:10.1189/jlb.0104005.
- Kroemer, G, L Galluzzi, P Vandenabeele, J Abrams, E S Alnemri, E H Baehrecke, M V Blagosklonny, et al. 2009. "Classification of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." *Cell Death Differ* 16 (1): 3–11. doi:10.1038/cdd.2008.150.
- Kulcsar, Gyozo, Tamas Kalai, Erzsebet Osz, Cecilia P. Sar, Jozsef Jeko, Balazs Sumegi, and Kalman Hideg. 2003. "Synthesis and Study of New 4-Quinazolinone Inhibitors of the DNA Repair enzyme poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP)." *Arkivoc* 2003 (5): 121–31. doi:http://dx.doi.org/10.3998/ark.5550190.0004.512.
- Kumar, Dinender, Huiquan Lou, and Pawan K. Singal. 2002. "Oxidative Stress and Apoptosis in Heart Dysfunction." *Herz*. doi:10.1007/s00059-002-2430-3.
- Kunchandy, Elizabeth, and M.N.A. Rao. 1989. "Effect of Curcumin on Hydroxyl Radical Generation through Fenton Reaction." *International Journal of Pharmaceutics* 57 (2): 173–76. doi:10.1016/0378-5173(89)90307-4.
- Kuwana, Tomomi, Mason R. Mackey, Guy Perkins, Mark H. Ellisman, Martin Latterich, Roger Schneider, Douglas R. Green, and Donald D. Newmeyer. 2002. "Bid, Bax, and Lipids Cooperate to Form Supramolecular Openings in the Outer Mitochondrial Membrane." *Cell* 111 (3): 331–42. doi:10.1016/S0092-8674(02)01036-X.

- Kwak, Hyun Jeong, Kyoung Mi Park, Hye Eun Choi, Kyung Sook Chung, Hyun Joung Lim, and Hyun Young Park. 2008. "PDE4 Inhibitor, Roflumilast Protects Cardiomyocytes against NO-Induced Apoptosis via Activation of PKA and Epac Dual Pathways." *Cellular Signalling* 20 (5): 803–14. doi:10.1016/j.cellsig.2007.12.011.
- Kyriakis, J M, and J Avruch. 2001. "Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation." *Physiological Reviews* 81 (2): 807–69. doi:10.1152/physrev.00028.2011.
- Laemmli, U K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227 (5259): 680–85. doi:10.1038/227680a0.
- Lauber, Kirsten, Sibylle G. Blumenthal, Michaela Waibel, and Sebastian Wesselborg. 2004. "Clearance of Apoptotic Cells: Getting Rid of the Corpses." *Molecular Cell*. doi:10.1016/S1097-2765(04)00237-0.
- Lee, Peiyee, Masataka Sata, David J Lefer, Stephen M Factor, Kenneth Walsh, and Richard N Kitsis. 2003. "Fas Pathway Is a Critical Mediator of Cardiac Myocyte Death and MI during Ischemia-Reperfusion in Vivo." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 284 (2): H456–63. doi:10.1152/ajpheart.00777.2002.
- Levine, Beth, and Guido Kroemer. 2008. "Autophagy in the Pathogenesis of Disease." *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018.
- Li, X, L Du, and Z Darzynkiewicz. 2000. "During Apoptosis of HL-60 and U-937 Cells Caspases Are Activated Independently of Dissipation of Mitochondrial Electrochemical Potential." *Exp Cell Res* 257 (2): 290–97. doi:10.1006/excr.2000.4901.
- Llambi, Fabien, Tudor Moldoveanu, Stephen W G Tait, Lisa Bouchier-Hayes, Jamshid Temirov, Laura L. McCormick, Christopher P. Dillon, and Douglas R. Green. 2011. "A Unified Model of Mammalian BCL-2 Protein Family Interactions at the Mitochondria." *Molecular Cell* 44 (4): 517–31. doi:10.1016/j.molcel.2011.10.001.
- Lochner, A., and J. A. Moolman. 2006. "The Many Faces of H89: A Review." *Cardiovascular Drug Reviews* 24 (3–4): 261–74. doi:10.1111/j.1527-3466.2006.00261.x.
- Lorenzo, Hans K., and Santos A. Susin. 2007. "Therapeutic Potential of AIF-Mediated Caspase-Independent Programmed Cell Death." *Drug Resistance Updates* 10 (6): 235–55. doi:10.1016/j.drug.2007.11.001.
- Lushchak, Volodymyr I. 2014. "Free Radicals, Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress and Its Classification." *Chemico-Biological Interactions* 224 (December): 164–75. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016.
- Madesh, Muniswamy, and György Hajnóczky. 2001. "VDAC-Dependent Permeabilization of the Outer Mitochondrial Membrane by Superoxide Induces Rapid and Massive Cytochrome c Release." *Journal of Cell Biology* 155 (6): 1003–15. doi:10.1083/jcb.200105057.
- Malladi, Srinivas, Madhavi Challa-Malladi, Howard O Fearnhead, and Shawn B Bratton. 2009. "The Apaf-1 Procaspase-9 Apoptosome Complex Functions as a Proteolytic-Based Molecular Timer." *The EMBO Journal* 28 (13): 1916–25. doi:10.1038/emboj.2009.152.
- Mansour, S J, W T Matten, A S Hermann, J M Candia, S Rong, K Fukasawa, G F Vande

- Woude, and N G Ahn. 1994. "Transformation of Mammalian Cells by Constitutively Active MAP Kinase Kinase." *Science* 265 (5174): 966–70. doi:10.1126/science.8052857.
- Masereel, B, L Pochet, and D Laeckmann. 2003. "An Overview of Inhibitors of Na⁺/H⁺ Exchanger." *European Journal of Medicinal Chemistry* 38 (6): 547–54. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0223-5234(03)00100-4.
- Masuelli, Laura, Monica Benvenuto, Enrica Di Stefano, Rosanna Mattera, Massimo Fantini, Giuseppina De Feudis, Roberto Bei, et al. 2017. "Curcumin Blocks Autophagy and Activates Apoptosis of Malignant Mesothelioma Cell Lines and Increases the Survival of Mice Intraperitoneally Transplanted with a Malignant Mesothelioma Cell Line." doi:10.18632/oncotarget.14907.
- Meinl, Edgar, Helmut Fickenscher, Margot Thome, Jürg Tschopp, and Bernhard Fleckenstein. 1998. "Anti-Apoptotic Strategies of Lymphotropic Viruses." *Immunology Today*. doi:10.1016/S0167-5699(98)01309-7.
- Merenyi, G, and J Lind. 1998. "Free Radical Formation in the Peroxynitrous Acid (ONOOH)/peroxynitrite (ONOO⁻) System." *Chem Res Toxicol* 11 (4): 243–46. doi:10.1021/tx980026s.
- Mittal, C. K., and F. Murad. 1977. "Activation of Guanylate Cyclase by Superoxide Dismutase and Hydroxyl Radical: A Physiological Regulator of Guanosine 3',5'-monophosphate Formation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 4360–64.
- Mormone, Elisabetta, Paola Matarrese, Antonella Tinari, Milena Cannella, Vittorio Maglione, Maria Grazia Farrace, Mauro Piacentini, Luigi Frati, Walter Malorni, and Ferdinando Squitieri. 2006. "Genotype-Dependent Priming to Self- and Xeno-Cannibalism in Heterozygous and Homozygous Lymphoblasts from Patients with Huntington's Disease." *Journal of Neurochemistry* 98 (4): 1090–99. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03998.x.
- Newton, Kim, and Vishva M. Dixit. 2012. "Signaling in Innate Immunity and Inflammation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (3). doi:10.1101/cshperspect.a006049.
- Nirmala, Chandrasekar, and Rengarajulu Puvanakrishnan. 1996. "Protective Role of Curcumin against Isoproterenol Induced Myocardial Infarction in Rats." *Molecular and Cellular Biochemistry* 159 (2): 85–93. doi:10.1007/BF00420910.
- Oberst, Andrew, Cristina Pop, Alexandre G. Tremblay, Véronique Blais, Jean Bernard Denault, Guy S. Salvesen, and Douglas R. Green. 2010. "Inducible Dimerization and Inducible Cleavage Reveal a Requirement for Both Processes in Caspase-8 Activation." *Journal of Biological Chemistry* 285 (22): 16632–42. doi:10.1074/jbc.M109.095083.
- Olivetti, G, F Quaini, R Sala, C Lagrasta, D Corradi, E Bonacina, S R Gambert, E Cigola, and P Anversa. 1996. "Acute Myocardial Infarction in Humans Is Associated with Activation of Programmed Myocyte Cell Death in the Surviving Portion of the Heart." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 28 (9): 2005–16. doi:10.1006/jmcc.1996.0193.
- Orrenius, Sten, Boris Zhivotovsky, and Pierluigi Nicotera. 2003. "Regulation of Cell Death: The Calcium-Apoptosis Link." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (7): 552–65. doi:10.1038/nrm1150.
- Ott, Martin, Vladimir Gogvadze, Sten Orrenius, and Boris Zhivotovsky. 2007. "Mitochondria,

- Oxidative Stress and Cell Death.” *Apoptosis* 12 (5). Kluwer Academic Publishers: 913–22. doi:10.1007/s10495-007-0756-2.
- Park, Woo Hyun, and Bo Ra You. 2016. “Antimycin A Induces Death of the Human Pulmonary Fibroblast Cells via ROS Increase and GSH Depletion.” *International Journal of Oncology* 48 (2): 813–20. doi:10.3892/ijo.2015.3276.
- Pearson, G, F Robinson, T Beers Gibson, B E Xu, M Karandikar, K Berman, and M H Cobb. 2001. “Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions.” *Endocrine Reviews* 22 (January): 153–83. doi:10.1210/edrv.22.2.0428.
- Peleli, Maria, Ioanna-Katerina Aggeli, Alexios N Matralis, Angeliki P Kourounakis, Isidoros Beis, and Catherine Gaitanaki. 2015. “Evaluation of Two Novel Antioxidants with Differential Effects on Curcumin-Induced Apoptosis in C2 Skeletal Myoblasts; Involvement of JNKs.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23 (3): 390–400. doi:10.1016/j.bmc.2014.12.046.
- Ravindran, Jayaraj, Sahdeo Prasad, and Bharat B Aggarwal. 2009. “Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively?” *The AAPS Journal* 11 (3): 495–510. doi:10.1208/s12248-009-9128-x.
- Reid, J L, J A Millar, and A D Struthers. 1983. “Nifedipine--Studies on Its Mechanism of Action and Interaction with Other Circulatory Control Mechanisms in Man.” *Postgraduate Medical Journal* 59 Suppl 2: 98–103.
- Ricci, Jean Ehrland, Cristina Muñoz-Pinedo, Patrick Fitzgerald, Béatrice Bailly-Maitre, Guy A. Perkins, Nagendra Yadava, Immo E. Scheffler, Mark H. Ellisman, and Douglas R. Green. 2004. “Disruption of Mitochondrial Function during Apoptosis Is Mediated by Caspase Cleavage of the p75 Subunit of Complex I of the Electron Transport Chain.” *Cell* 117 (6): 773–86. doi:10.1016/j.cell.2004.05.008.
- Roth, S, and W Dröge. 1987. “Regulation of T-Cell Activation and T-Cell Growth Factor (TCGF) Production by Hydrogen Peroxide.” *Cellular Immunology* 108 (2): 417–24.
- Sakahira, Hideki, Masato Enari, and S Nagata. 1998. “Cleavage of CAD Inhibitor in CAD Activation and DNA Degradation during Apoptosis.” *Nature* 391 (6662): 96–99. doi:10.1038/34214.
- Salvesen, Guy S., and Stefan J. Riedl. 2008. “Caspase Mechanisms.” *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi:10.1007/978-1-4020-6554-5_2.
- Saraste, A., K. Pulkki, M. Kallajoki, K. Henriksen, M. Parvinen, and L.M. Voipio-Pulkki. 1997. “Apoptosis in Human Acute Myocardial Infarction.” *Circulation* 95 (2): 320. doi:10.1161/01.CIR.95.2.320.
- Scaffidi, Carsten, Ingo Schmitz, Peter H. Kramer, and Marcus E. Peter. 1999. “The Role of c-FLIP in Modulation of CD95-Induced Apoptosis.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (3): 1541–48. doi:10.1074/jbc.274.3.1541.
- Sharov, Victor G., Anastassia Todor, George Suzuki, Hideaki Morita, Elaine J. Tanhehco, and Hani N. Sabbah. 2003. “Hypoxia, Angiotensin-II, and Norepinephrine Mediated Apoptosis Is Stimulus Specific in Canine Failed Cardiomyocytes: A Role for p38 MAPK, Fas-L and Cyclin D1.” *European Journal of Heart Failure* 5 (2): 121–29. doi:10.1016/S1388-9842(02)00254-4.

- Shen, Shensi, Oliver Kepp, and Guido Kroemer. 2012. "The End of Autophagic Cell Death?" *Autophagy*. doi:10.4161/auto.8.1.16618.
- Sies, H. 2015. "Oxidative Stress: A Concept in Redox Biology and Medicine." *Redox Biology* 4 (April): 180–83. doi:10.1016/j.redox.2015.01.002.
- Sies, H., and D. Jones. 2007. "Oxidative Stress." In *Encyclopedia of Stress*, 45–48. doi:10.1016/B978-012373947-6.00285-3.
- Sies, Helmut. 1986. "Biochemistry of Oxidative Stress." *Angewandte Chemie International Edition in English*. doi:10.1002/anie.198610581.
- Sies, Helmut. 2014. "Role of Metabolic H₂O₂ Generation: Redox Signaling and Oxidative Stress." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (13). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 8735–41. doi:10.1074/jbc.R113.544635.
- Slee, Elizabeth A., Mary T. Harte, Ruth M. Kluck, Beni B. Wolf, Carlos A. Casiano, Donald D. Newmeyer, Hong Gang Wang, et al. 1999. "Ordering the Cytochrome c-Initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2,-3,-6,-7,-8, and -10 in a Caspase-9-Dependent Manner." *Journal of Cell Biology* 144 (2): 281–92. doi:10.1083/jcb.144.2.281.
- Soetikno, Vivian, Flori R. Sari, Vijayakumar Sukumaran, Arun Prasath Lakshmanan, Sayaka Mito, Meilei Harima, Rajarajan A. Thandavarayan, et al. 2012. "Curcumin Prevents Diabetic Cardiomyopathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Possible Involvement of PKC-MAPK Signaling Pathway." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 47 (3): 604–14. doi:10.1016/j.ejps.2012.04.018.
- Soldani, C., M. G. Bottone, C. Pellicciari, and A. I. Scovassi. 2001. "Two-Color Fluorescence Detection of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Cleavage and DNA Strand Breaks in Etoposide-Induced Apoptotic Cells." *European Journal of Histochemistry* 45 (4): 389–92.
- Soldani, C., and A. I. Scovassi. 2002. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Cleavage during Apoptosis: An Update." *APOPTOSIS* 7 (4): 321–28. doi:10.1023/A:1016119328968.
- Soldani, C, M C Lazzè, M G Bottone, G Tognon, M Biggiogera, C E Pellicciari, and A I Scovassi. 2001. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase Cleavage during Apoptosis: When and Where?" *Experimental Cell Research* 269 (2): 193–201. doi:10.1006/excr.2001.5293.
- Stathopoulou, Konstantina, Isidoros Beis, and Catherine Gaitanaki. 2008. "MAPK Signaling Pathways Are Needed for Survival of H9c2 Cardiac Myoblasts under Extracellular Alkalosis." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 295 (3): H1319–29. doi:10.1152/ajpheart.01362.2007.
- Stefanska, J., and R. Pawliczak. 2008. "Apocynin: Molecular Aptitudes." *Mediators of Inflammation*. doi:10.1155/2008/106507.
- Striessnig, J. 1999. "Pharmacology, Structure and Function of Cardiac L-Type Ca(2+) Channels." *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 9 (4–5): 242–69. doi:16320.
- Tait, Stephen W. G., and Douglas R. Green. 2010. "Mitochondria and Cell Death: Outer Membrane Permeabilization and beyond." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (9): 621–32. doi:10.1038/nrm2952.

- Tschopp, Jürg, Martin Irmeler, and Margot Thome. 1998. "Inhibition of Fas Death Signals by FLIPs." *Current Opinion in Immunology*. doi:10.1016/S0952-7915(98)80223-9.
- Tsien, Roger Y. 1980. "New Calcium Indicators and Buffers with High Selectivity Against Magnesium and Protons: Design, Synthesis, and Properties of Prototype Structures." *Biochemistry* 19 (11): 2396–2404. doi:10.1021/bi00552a018.
- Turjanski, A G, J P Vaqué, and J S Gutkind. 2007. "MAP Kinases and the Control of Nuclear Events." *Oncogene* 26 (22): 3240–53. doi:10.1038/sj.onc.1210415.
- Virág, L, G S Scott, P Antal-Szalmás, M O'Connor, H Ohshima, and C Szabó. 1999. "Requirement of Intracellular Calcium Mobilization for Peroxynitrite-Induced poly(ADP-Ribose) Synthetase Activation and Cytotoxicity." *Molecular Pharmacology* 56 (4): 824–33.
- Wang, H G, T Miyashita, S Takayama, T Sato, T Torigoe, S Krajewski, S Tanaka, et al. 1994. "Apoptosis Regulation by Interaction of Bcl-2 Protein and Raf-1 Kinase." *Oncogene* 9: 2751–56.
- Widmann, Christian, Spencer Gibson, Matthew B. Jarpe, and Gary L. Johnson. 1999. "Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human." *Physiol Rev* 79 (1): 143–80. doi:10.1074/jbc.271.28.16586.
- Winterbourn, Christine C. 2013. "The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide." *Methods in Enzymology* 528: 3–25. doi:10.1016/B978-0-12-405881-1.00001-X.
- Yang, Cheng, Keng Wu, Shang-Hai Li, and Qiong You. 2013. "Protective Effect of Curcumin against Cardiac Dysfunction in Sepsis Rats." *Pharm Biology* 51 (4): 482–87. doi:10.3109/13880209.2012.742116.
- Yang, Yang, Weixun Duan, Yan Lin, Wei Yi, Zhenxing Liang, Juanjuan Yan, Ning Wang, et al. 2013. "SIRT1 Activation by Curcumin Pretreatment Attenuates Mitochondrial Oxidative Damage Induced by Myocardial Ischemia Reperfusion Injury." *Free Radical Biology and Medicine* 65: 667–79. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.007.
- Yeh, Chi-Hsiao, Tzu-Ping Chen, Yi-Cheng Wu, Yu-Min Lin, and Pyng Jing Lin. 2005. "Inhibition of NFκB Activation with Curcumin Attenuates Plasma Inflammatory Cytokines Surge and Cardiomyocytic Apoptosis Following Cardiac Ischemia/Reperfusion1." *Journal of Surgical Research* 125 (1): 109–16. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2004.11.009.
- Yin, Xiao Ming, and Zheng Dong. 2009. *Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*. *Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research*. doi:10.1007/978-1-60327-381-7.
- Yu, Wei, Jiliang Wu, Fei Cai, Jizhou Xiang, Wenliang Zha, Dan Fan, Shuang Guo, Zhangyin Ming, and Chao Liu. 2012. "Curcumin Alleviates Diabetic Cardiomyopathy in Experimental Diabetic Rats." *PLoS ONE* 7 (12). doi:10.1371/journal.pone.0052013.
- Yuan, Shujun, Xinchao Yu, Maya Topf, Steven J. Ludtke, Xiaodong Wang, and Christopher W. Akey. 2010. "Structure of an Apoptosome-Procaspase-9 CARD Complex." *Structure* 18 (5): 571–83. doi:10.1016/j.str.2010.04.001.
- Zarubin, Tyler, and Jiahuai Han. 2005. "Activation and Signaling of the p38 MAP Kinase

Pathway.” *Cell Research* 15 (1): 11–18. doi:10.1038/sj.cr.7290257.

Zhang, Yin, Olivier Marcillat, Cecilia Giulivi, Lars Ernster, and Kelvin J A Davies. 1990. “The Oxidative Inactivation of Mitochondrial Electron Transport Chain Components and ATPase.” *Journal of Biological Chemistry* 265 (27): 16330–36. doi:10.1046/J.1471-4159.2002.01176.X.

Zikaki, Kyriaki, Ioanna-Katerina Aggeli, Catherine Gaitanaki, and Isidoros Beis. 2014. “Curcumin Induces the Apoptotic Intrinsic Pathway via Upregulation of Reactive Oxygen Species and JNKs in H9c2 Cardiac Myoblasts.” *Apoptosis* 19 (6). Springer US: 958–74. doi:10.1007/s10495-014-0979-y.

Zou, Hua, William J. Henzel, Xuesong Liu, Alexis Lutschg, and Xiaodong Wang. 1997. “Apaf-1, a Human Protein Homologous to *C. Elegans* CED-4, Participates in Cytochrome c-Dependent Activation of Caspase-3.” *Cell* 90 (3): 405–13. doi:10.1016/S0092-8674(00)80501-2.

Zou, Y, I Komuro, T Yamazaki, R Aikawa, S Kudoh, I Shiojima, Y Hiroi, T Mizuno, and Y Yazaki. 1996. “Protein Kinase C, but Not Tyrosine Kinases or Ras, Plays a Critical Role in Angiotensin II-Induced Activation of Raf-1 Kinase and Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases in Cardiac Myocytes.” *The Journal of Biological Chemistry* 271 (52): 33592–97. doi:10.1074/jbc.271.52.33592.