



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας
Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΣΥΝΑΠΤΙΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΛΙΑΡΟΠΟΥΛΟΥ ΔΑΝΑΗ
A.M.: 1113 2013 00070



Επιβλέπουσα: Παπαζαφείρη Παναγιώτα
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Συνεπιβλέπων: Σπύρος Ευθυμιόπουλος
Καθηγητής

Αθήνα, Νοέμβριος 2018



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας
Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΔΡΟΜΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΣΥΝΑΠΤΙΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

**ΛΙΑΡΟΠΟΥΛΟΥ ΔΑΝΑΗ
Α.Μ.: 1113 2013 00070**

**Επιβλέπουσα
Παπαζαφείρη Παναγιώτα
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια**

**Συνεπιβλέπων
Σπύρος Ευθυμιόπουλος
Καθηγητής**

Αθήνα, Νοέμβριος 2018

***“I have not failed. I have successfully discovered 10.000 ways
that won’t work.”***

-Thomas Edison

Πρόλογος – Ευχαριστίες

Η διπλωματική μου εργασία πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2017-2018, υπό την επίβλεψη της κυρίας Παπαζαφείρη Παναγιώτας, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του Τμήματος Βιολογίας, την οποία και θέλω να ευχαριστήσω θερμά. Μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω στο εργαστήριο και να κάνω μία πρώτη, αρχική γνωριμία με την έρευνα. Παρά τις πολλές υποχρεώσεις της ως καθηγήτρια, δεν θα μπορούσα να μην αναγνωρίσω ότι μου παρείχε πρακτική και θεωρητική καθοδήγηση όποτε την χρειάστηκα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτωρ Πάσχου Μαρία για τις συμβουλές της, την βοήθειά της όποτε και αν την χρειαζόμουν, παρά το δικό της πολύ επιβαρυσμένο πρόγραμμα, την υπομονή της να με διδάξει κάθε τεχνική αλλά και την προθυμία της να μας βοηθήσει σε οποιαδήποτε πρόκληση και αν βρίσκαμε με το θέμα της διπλωματικής μου. Χωρίς εκείνη πολλά από τα πειράματα που θα παρουσιασθούν στην εργασία μου δεν θα είχαν γίνει. Από τις ευχαριστίες μου δεν θα μπορούσαν να λείπουν οι προπτυχιακές φοιτήτριες Ηλιοπούλου Εύα, Καληθινού Μαρίνα και Μαρίνη Φωτούλα, οι οποίες βρίσκονταν πάντοτε δίπλα μου για να με στηρίξουν ή και να μου δώσουν πολύτιμες ιδέες για τα πειράματά μου. Μαζί με την Μαρία, οι πέντε μας δημιουργήσαμε ένα άψογο κλίμα καθ'όλη τη διάρκεια της χρονιάς, χωρίς το οποίο πιστεύω πως δεν θα μπορούσαμε να πραγματοποιούμε τα πειράματά μας με την ίδια ευθυμία. Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα υπόλοιπα μέλη του Τομέα, που συνέβαλαν στο εξαιρετικό εργαστηριακό κλίμα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου, που με στήριξαν και με στηρίζουν εδώ και πολλά χρόνια. Τους ευχαριστώ για την κατανόηση που δείχνουν στο άγχος μου και στο πάντοτε φορτωμένο από διάβασμα και δραστηριότητες πρόγραμμά μου.

Περιεχόμενα

I. Εισαγωγή.....	8
1. Νευροεκφυλισμός.....	8
1.1. Γενικά.....	8
1.2. Κατηγοριοποίηση των νευροεκφυλιστικών νόσων.....	8
1.3. Αιτίες πρόκλησης νευροεκφυλιστικών παθήσεων.....	9
1.4. Η νόσος του Alzheimer.....	10
1.4.1. Γενικές πληροφορίες.....	10
1.4.2. Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου.....	12
1.5. Η πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (APP).....	14
1.5.1. Δομή.....	14
1.5.2. Λειτουργία της APP.....	15
1.5.3. Επεξεργασία της APP.....	16
1.6. Η πρωτεΐνη tau.....	19
1.6.1. Δομή.....	19
1.6.2. Λειτουργία.....	20
1.6.3. Φωσφορυλίωση της tau.....	21
2. Γλυκόζη.....	22
2.1. Γενικά στοιχεία και μεταβολισμός.....	22
2.2. Ρόλος της γλυκόζης στον εγκέφαλο.....	22
2.3. Ρόλος της γλυκόζης σε μηχανισμούς ασθενειών.....	23
2.4. 2-Δεοξυγλυκόζη (2-deoxyglucose, 2-DG).....	23
2.5. Ρυθμιστικές ορμόνες.....	24
2.5.1. Ινσουλίνη.....	24
2.5.2. Γλουκαγόνη.....	26
2.5.3. Αντίσταση στην ινσουλίνη.....	26
2.6. Κρεατίνη και διαχείριση ενέργειας.....	27
3. Ασβέστιο.....	30
3.1. Ομοίωση ασβεστίου στο κεντρικό νευρικό σύστημα.....	30
3.2. Η ομοίωση ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο.....	33

3.3. Δυσλειτουργία της σηματοδότησης μέσω Ca ²⁺ και η νόσος του Alzheimer.....	35
4. Σηματοδοτικά μονοπάτια.....	38
4.1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt.....	38
4.2. Ρύθμιση της ενεργοποίησης της PKB/Akt.....	39
II. Σκοπός	44
III. Υλικά και Μέθοδοι	46
1. Κυτταροκαλλιέργειες	46
1.1. Περιγραφή της κυτταρικής σειράς SK-N-SH.....	46
1.2. Περιγραφή της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y.....	47
1.3. Περιγραφή της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y/APP-	47
1.4. Διατήρηση στεύρων συνθηκών.....	48
1.5. Υλικά κυτταροκαλλιεργειών.....	48
1.6. Διατήρηση κυττάρων	49
1.7. Ανακαλλιέργεια κυττάρων	50
1.8. Διαδικασία κατάψυξης και κρυσοσυντήρηση των κυττάρων.....	50
1.9. Απόψυξη και ανάκτηση των κυττάρων.....	51
1.10. Μέτρηση αριθμού κυττάρων	51
1.11. Λύση κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνών	52
1.12. Διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y/APP ⁻	53
1.12.1. Μετασχηματισμός κυττάρων E. coli DH5A	53
1.12.2. Καλλιέργεια βακτηρίων.....	54
1.12.3. Μεσαίας κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακών φορέων (midiprep).....	54
1.12.4. Διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y/APP ⁻	55
1.13. Ανοσοκυτταροχημική ανάλυση.....	56
1.13.1. Προετοιμασία των καλυπτρίδων	56
1.13.2. Μονιμοποίηση	57
1.13.3. Κάλυψη μη ειδικών θέσεων.....	57
1.13.4. Επώαση των κυττάρων με τα αντισώματα	57
1.13.5. Παρατήρηση και φωτογράφιση των κυττάρων στο μικροσκόπιο φθορισμού	58
1.14. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας – MTT	58
2. Επίδραση παραγόντων στις κυτταρικές καλλιέργειες	60
2.1. Ινσουλίνη	60
2.2. Thapsigargin	61

2.3. 2-δεόξυ-D-γλυκόζη (2-DG)	61
2.4. Κρεατίνη	61
2.5. Χλωριούχο κοβάλτιο (CoCl ₂)	61
2.6. Γλουταμινικό οξύ.....	62
3. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με την Μέθοδο Bradford	62
4. Διάλυμα φόρτωσης (Sample Buffer).....	64
5. Δοκιμασία Ανοσοσύτωσης κατά Western (Western blot).....	65
5.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE electrophoresis).....	65
5.2. Υγρή ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Transfer)	69
5.3. Χρώση της νιτροκυτταρίνης με την χρωστική Ponceau S	70
5.4. Ανοσοδοκιμασία.....	71
5.5. Εμφάνιση.....	72
IV. Αποτελέσματα.....	74
1. Σύγκριση βασικών επιπέδων πρωτεϊνών σε κύτταρα SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP ⁻	74
1.1. Επιβεβαίωση σίγησης APP	74
1.2. Πρωτεΐνες pAkt και STIM	74
2. Σύγκριση επιπέδων πρωτεϊνών στις κυτταρικές σειρές SK-N-SH, SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP ⁻ υπό την επίδραση παραγόντων.....	76
2.1. Μελέτη επίδρασης ινσουλίνης	76
2.2. Μελέτη επίδρασης προσομοίωσης συνθηκών στέρησης γλυκόζης και εκκένωσης του ενδοπλασματικού δικτύου από Ca ²⁺	78
2.3. Μελέτη επίδρασης της κρεατίνης.....	81
2.4. Μελέτη επίδρασης της κρεατίνης σε προσομοίωση συνθηκών στέρησης γλυκόζης ή εκκένωση του ενδοπλασματικού δικτύου από Ca ²⁺	82
2.5. Μελέτη επίδρασης προσομοίωσης συνθηκών στέρησης γλυκόζης και υποξίας	84
2.6. Διαμόλυνση SH-SY5Y/APP ⁻ κυττάρων	86
3. Μελέτες ανοσοκυτταροχημίας σε διαμολυσμένα κύτταρα	88
3.1. Έλεγχος διαμόλυνσης των κυττάρων SH-SY5Y/APP ⁻	88
3.2. Μελέτη της πρωτεΐνης STIM σε διαμολυσμένα SH-SY5Y/APP ⁻ κύτταρα	89
3.4. Μελέτη της πρωτεΐνης STIM σε διαμολυσμένα SH-SY5Y/APP ⁻ κύτταρα με πράσινη χρωστική.....	91
4. Μελέτη κυτταροτοξικότητας – MTT.....	92
4.1. Γλουταμινικό οξύ.....	92

4.2. Συνθήκες στέρση Γλυκόζης	93
4.3. Εκκένωση του ενδοπλασματικού δικτύου από Ca^{2+}	94
4.4. Συνθήκες υποξίας.....	96
V. Συζήτηση	97
VI. Βιβλιογραφία	103

I. Εισαγωγή

1. Νευροεκφυλισμός

1.1. Γενικά

Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι αφορούν καταστάσεις, οι οποίες πρωτίστως επηρεάζουν τους νευρώνες στον ανθρώπινο εγκέφαλο και εμφανίζονται για λόγους άγνωστους ακόμη σε βάθος. Επιφέρουν ετερογενή κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν συγκεκριμένους πλυθησμούς νευρώνων σε συγκεκριμένα λειτουργικά ανατομικά συστήματα. Οι νευρώνες αποτελούν τους δομικούς λίθους του νευρικού συστήματος, το οποίο περιλαμβάνει τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Οι νευρώνες κανονικά δεν αναπαράγονται, με αποτέλεσμα όταν καταστρέφονται ή πεθαίνουν να μην μπορούν να αντικατασταθούν από το ανθρώπινο σώμα. Παραδείγματα νευροεκφυλιστικών νόσων περιλαμβάνουν τη νόσο του Alzheimer, τη νόσο του Parkinson και την νόσο του Huntington. Όλες οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις εξελίσσονται με την πάροδο του χρόνου, και πολλές φορές χρειάζονται χρόνια μέχρι να προχωρήσουν στο τελευταίο στάδιο. Το γεγονός αυτό ίσως να οφείλεται εν μέρει στο ότι ο νευρωνικός εκφυλισμός χαρακτηρίζεται από ασύγχρονο θάνατο, δηλαδή οι νευρώνες σε έναν δεδομένο πληθυσμό πεθαίνουν σε πολύ διαφορετικούς χρόνους.^[2]

Οι νευροεκφυλιστικές νόσοι παραμένουν ανίατες και προκαλούν αναπηρία, καθώς οδηγούν σε προοδευτικό εκφυλισμό και/ή θάνατο των νευρώνων. Το γεγονός αυτό προκαλεί προβλήματα στην κίνηση (αταξίες), ή στη νοητική λειτουργία (άνοια). Οι άνοιες αποτελούν μεγάλο κομμάτι του νευροεκφυλισμού, με την νόσο του Alzheimer να αντιπροσωπεύει περίπου το 60-70% των περιπτώσεων άνοιας.^[1, 2] Ο πιο σταθερός παράγοντας ανάπτυξης νευροεκφυλιστικών διαταραχών, ειδικά των νόσων Alzheimer και Parkinson, είναι η αύξηση της ηλικίας. Τον τελευταίο αιώνα ο ρυθμός αύξησης ατόμων ένω των 65 ετών στις βιομηχανοποιημένες χώρες έχει αυξηθεί σε σχέση με τον ρυθμό αύξησης του συνολικού πληθυσμού. Αυτό σημαίνει πως είναι ανεμνόμενο τα επόμενα χρόνια να αυξηθούν τα ποσοστά των ατόμων που πάσχουν από κάποια νευροεκφυλιστική νόσο.^[2]

1.2. Κατηγοριοποίηση των νευροεκφυλιστικών νόσων

Αυτή τη στιγμή ο αριθμός των νευροεκφυλιστικών νόσων εκτιμάται σε μερικές εκατοντάδες, και ανάμεσα σε αυτές πολλές εμφανίζονται να αλληλοεπικαλύπτονται ως προς τα κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά, πράγμα που δυσχεραίνει την κατηγοριοποίησή τους. Η πιο συνήθης κατηγοριοποίηση, ακόμη και σήμερα, είναι με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά και την επηρεαζόμενη περιοχή του νευρικού συστήματος. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η νόσος του Alzheimer, η οποία τοποθετείται στην κατηγορία που αφορά τον φλοιό του εγκεφάλου, και η νόσος του Parkinson που τοποθετείται στην κατηγορία όπου το επηρεαζόμενο μέρος του

νευρικού συστήματος είναι τα βασικά γάγγλια. Πλέον, με βάση τις νεότερες τεχνολογίες, ευνοείται η κατηγοριοποίηση σύμφωνα με τα μοριακά χαρακτηριστικά των νόσων. Το πρότυπο αυτό της κατηγοριοποίησης πιστεύεται ότι θα είναι κλινικά και θεραπευτικά πιο πρακτικό σε σχέση με το προγενέστερο. Δύο βασικές τέτοιες κατηγορίες είναι οι:

- Ταυ-πάθειες με πιο χαρακτηριστική τη νόσο του Alzheimer. Οφείλονται στην εναπόθεση συσσωματωμάτων προς σχηματισμό πλακών της σχετιζόμενης με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνης ταυ.
- Συνουκλεοπάθειες με χαρακτηριστική τη νόσο του Parkinson και οι άνοιες σωμάτων Lewy. Οφείλονται σε συσσωματώματα της αδιάλυτης πρωτεΐνης συνουκλεΐνης
- Νόσοι τρινουκλεοτιδικών επαναλήψεων, όπως η νόσος του Huntington και η μυοτονική δυστροφία. Οφείλονται σε ασταθείς, πολυμορφικές επαναλήψεις τρινουκλεοτιδίων, οι οποίες υπερβαίνουν το φυσιολογικό όριο.
- Νόσοι Prion, όπως η νόσος Creutzfeldt-Jakob και το σύνδρομο Gerstmann-Straussler-Scheinker. Οφείλονται σε μετατροπή της φυσιολογικής πρωτεΐνης PrP στην μολυσματική της μορφή, η οποία έχει ικανότητα συσσώρευσης, προς σχηματισμό ινιδίων και πλακών.^[2]

Ακόμη, ένας γενικός τρόπος κατηγοριοποίησης των νευροεκφυλιστικών παθήσεων είναι αυτός που τις διαχωρίζει ανάμεσα στις οικογενείς και σποραδικές μορφές. Οι οικογενείς μορφές έχουν γενετικό υπόβαθρο για την πρόκληση της διαταραχής, εμφανίζονται σε πιο νεαρά συνήθως άτομα με αυξημένες περιπτώσεις ανάμεσα σε άτομα στην ίδια οικογένεια, και αφορούν μικρό ποσοστό (5-10%) των περιπτώσεων. Αντίθετα, οι σποραδικές μορφές εμφανίζονται σε γηραιότερα συνήθως άτομα και αποτελούν την συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, με άγνωστα συνήθως αίτια, όπως αναλύεται παρακάτω.

1.3. Αιτίες πρόκλησης νευροεκφυλιστικών παθήσεων

Με λίγες εξαιρέσεις, τα αίτια των νευροεκφυλιστικών νόσων είναι ουσιαστικά άγνωστα, και ακόμη και σε αυτά που έχουν ταυτοποιηθεί, οι μηχανισμοί που πυροδοτούν την ασθένεια αποτελούν στην καλύτερη περίπτωση υποθέσεις. Μεγάλη συζήτηση σχετικά με την αιτιολογία αφορά τους ρόλους γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Κάποιες διαταραχές έχουν καθαρές οικογενείς μορφές, οι οποίες υποδηλώνουν γενετική βάση, όπως η νόσος του Huntington. Κάποιες άλλες ασθένειες είναι ουσιαστικά σποραδικές, αλλά εμφανίζουν και κληρονομούμενες μορφές όπως οι νόσοι του Alzheimer και Parkinson. Οι οικογενείς αυτές μορφές παίζουν βασικό ρόλο στην αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών, που διέπουν και τις αντίστοιχες σποραδικές μορφές.

Για την μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών που αποτελούν τις σποραδικές μορφές, κύριο ρόλο παίζουν τοξικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες. Την άποψη αυτή

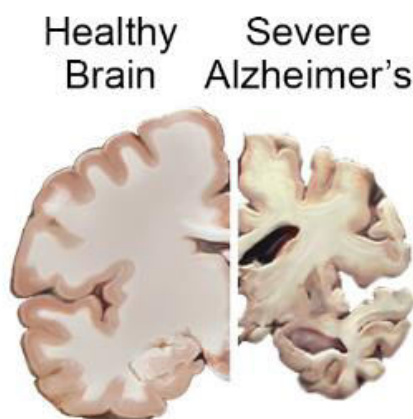
υποστηρίζει η παρατήρηση ότι κάποιες νευροεκφυλιστικές παθήσεις εμφανίζονται σε συγκεκριμένα γεωγραφικά, κοινωνικά ή επαγγελματικά πρότυπα. Σαφώς, από τους βασικότερους ρόλους παίζει η αύξηση της ηλικίας. Ακόμη και ηλικιωμένα άτομα που δεν πάσχουν από κάποια νευροεκφυλιστική πάθηση, εμφανίζουν ήπια συμπτώματα που θυμίζουν νευροεκφυλισμό. Αυτή η παρατήρηση αρχικά έδωσε γέννηση στην ιδέα ότι η γήρανση ίσως να είναι μία «καλοήθης» μορφή νευροεκφυλισμού, καθώς τόσο η γήρανση όσο και οι παθήσεις αυτές οδηγούν αναπόφευκτα σε νευρωνικό θάνατο. Μειωμένος αριθμός νευρώνων σε διάφορες περιοχές, μειωμένο βάρος εγκεφάλου, νοητική εξασθένηση, απώλεια κατά εκτίμηση 100.000 νευρώνων καθημερινά, ακόμη και ύπαρξη σωματίων Lewy ή νευροϊνιδιακών δεματίων και πλακών αμυλοειδούς παρατηρούνται σε γηράσκοντα άτομα που δεν πάσχουν από κάποια εμφανή νευροεκφυλιστική νόσο.^[2] Στην γήρανση αποδίδονται και οι αποκλίσεις από την φυσιολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων. Τα μιτοχόνδρια επιτελούν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες ενδιάμεσου μεταβολισμού αλλά και μεταβολισμού οξειδωτικής ενέργειας.^[2, 3] Τα οργανίδια αυτά παράγουν το μεγαλύτερο ποσοστό ATP. Βλάβες ή αποκλίσεις από την φυσιολογική λειτουργία οδηγούν τελικώς σε μείωση της διαθέσιμης ενέργειας (ATP) καθώς και στην παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS).^[3] Η μειωμένη παραγωγή ATP λόγω βλαβών στα μιτοχόνδρια, καθώς και η κακή διαχείριση αυτής της ενέργειας, είναι από τους βασικούς παράγοντες που αυξάνουν το οξειδωτικό φορτίο των νευρώνων. Άλλωστε, κατηγορούμενες για νευροεκφυλισμό είναι και οι οξειδωτικές διαδικασίες, από διάφορα κυτταρικά μονοπάτια.^[2] Η επέκταση της νόσου φαίνεται να οφείλεται και στην φλεγμονή που προκαλείται από τους νεκρούς νευρώνες, και όχι μόνο από τον νευρωνικό θάνατο αυτόν καθ' αυτόν. Παρά τους διάφορους εναρκτήριους παράγοντες, ένα σύνηθες χαρακτηριστικό είναι η χρόνια ανοσολογική ενεργοποίηση, ειδικά της μικρογλοίας, των μακροφάγων δηλαδή του κεντρικού νευρικού συστήματος.^[4]

1.4. Η νόσος του Alzheimer

1.4.1. Γενικές πληροφορίες

Η νόσος του Alzheimer είναι μία μη αναστρέψιμη, προοδευτική εγκεφαλική διαταραχή, η οποία σταδιακά καταστρέφει την μνήμη και τις νοητικές ικανότητες, λόγω εκφυλισμού των νευρώνων και τελικώς οδηγεί σε αδυναμία εκτέλεσης ακόμη και απλών εργασιών. Στα περισσότερα άτομα, τα συμπτώματα εμφανίζονται περί τα 65 έτη.^[5] Σύμφωνα με εκτιμήσεις, κοντά στα 50 εκατομύρια άτομα παγκοσμίως πάσχουν από τη νόσο (2017) και αυτός ο αριθμός θα διπλασιάζεται περίπου κάθε 20 έτη, φτάνοντας τα 75 εκατομύρια το 2030. ^[6] Αυτή τη στιγμή η νόσος κατατάσσεται ως η 6^η αιτία θανάτου στις Η.Π.Α., αλλά πρόσφατες εκτιμήσεις δείχνουν πως η διαταραχή ίσως να ανέρχεται ως 3^η αιτία θανάτου, μετά την καρδιοπάθεια και τον καρκίνο. Αποτελεί τη συχνότερη μορφή άνοιας στους ηλικιωμένους.^[5]

Η νόσος περιγράφηκε από τον Alois Alzheimer το 1906, ο οποίος παρατήρησε αλλαγές στον εγκεφαλικό ιστό μίας γυναίκας η οποία απεβίωσε από μία ασυνήθιστη διανοητική διαταραχή. Αφού πέθανε, παρατηρήθηκαν ανώμαλες μάζες (τώρα γνωστές ως πλάκες αμυλοειδούς) και περιπλεγμένα ινίδια (τώρα γνωστά ως νευροϊνιδιακά δεμάτια). Τα χαρακτηριστικά αυτά θεωρούνται ακόμη τα βασικότερα της νόσου. Άλλο ένα χαρακτηριστικό είναι η απώλεια συνδέσεων μεταξύ νευρώνων στον εγκέφαλο που συνεπάγεται απώλεια επικοινωνίας μεταξύ τους.^[5]



Εικόνα 1: Μείωση εγκεφαλικού όγκου σε βαριά περίπτωση της νόσου Alzheimer (πηγή: <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-fact-sheet>)

Φαίνεται πιθανό ότι οι βλάβες στον εγκέφαλο, οι εναποθέσεις δηλαδή των πλακών και νευροϊνιδιακών δεματίων, εκκινούν περίπου μία δεκαετία πριν εμφανισθεί η απώλεια μνήμης, περίοδος στην οποία τα άτομα δεν εμφανίζουν συμπτώματα. Οι βλάβες αρχικά φαίνεται να λαμβάνουν χώρα στον ιππόκαμπο, το μέρος του εγκεφάλου που είναι απαραίτητο στην μνήμη. Καθώς περισσότεροι νευρώνες νεκρώνονται, επιπλέον μέρη του εγκεφάλου πλήττονται, και σταδιακά συρρικνώνονται.^[5] Η νόσος γενικά διαιρείται σε δύο κατηγορίες:

- Την πρώιμη οικογενή μορφή (Early Onset Familial Alzheimer's Disease, EOFAD ή απλώς Familial Alzheimer's Disease, **FAD**). Αυτή η μορφή της νόσου εμφανίζεται από τα 30 έως περίπου τα 65 έτη, και αφορά λιγότερο του 10% όλων των περιπτώσεων νόσου Alzheimer. Μερικοί τύπου της νόσου, οφείλονται σε μεταλλάξεις σε ένα από τα 3 γονίδια: πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP, Alzheimer's disease τύπου 1 ή AD1), πρεσινελίνης 1 (PSEN1, Alzheimer's disease τύπου 3 ή AD3), και πρεσινελίνης 2 (PSEN2, Alzheimer's disease τύπου 4 ή AD4). Τα γονίδια κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο.^[5, 7] Συγκεκριμένες μεταλλάξεις αναλύονται και παρακάτω.

- Τη σποραδική ή μη οικογενή μορφή (Late Onset Alzheimer's Disease, LOAD ή Sporadic Alzheimer's Disease, **SAD**). Αφορά την συντηρητική πλειοψηφία ατόμων με τη νόσο και έχει βρεθεί ένα γονίδιο, με πολλές μορφές, το οποίο εμπλέκεται με τη νόσο. Πρόκειται για το γονίδιο APOE (Apolipoprotein E ή απολιποπρωτεΐνη E) και συγκεκριμένα για την μορφή ε4, το οποίο αυξάνει την πιθανότητα του ατόμου να νοσήσει και μάλιστα χαμηλώνει το όριο ηλικίας εμφάνισης συμπτωμάτων. Μαζί με αυτό το γονίδιο, έχουν χαρακτηριστεί και περιοχές του DNA που αυξάνουν τον κίνδυνο νόσου.^[5]

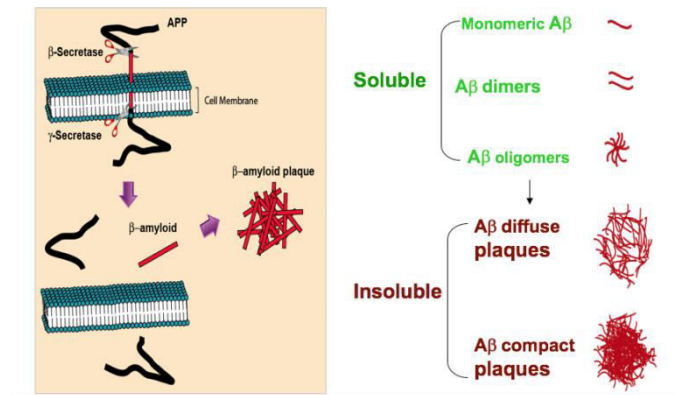
1.4.2. Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου

Μακροσκοπικά, παρατηρείται ατροφία του εγκεφαλικού φλοιού και μείωση του εγκεφαλικού βάρους, η οποία όμως παρατηρείται γενικά σε γηραιά άτομα. Έτσι, τα ευρήματα της νεκροψίας δεν μπορούν να θεωρηθούν διαγνωστικά για την νόσο. Αντιθέτως, η διάγνωση γίνεται σε ιστολογικό επίπεδο. Η διάγνωση αυτή στηρίζεται σε μία σειρά μορφολογικών ανωμαλιών, οι οποίες έχουν στερεοτυπικό πρότυπο εμφάνισης.^[8] Τα δύο κύρια ιστοπαθολογικά ευρήματα της νόσου είναι οι πλάκες του αμυλοειδούς και τα νευροϊνιδιακά δεμάτια. Άλλα ιστοπαθολογικά ευρήματα, λιγότερο κατανοητά είναι τα σώματα Hirano και η απώλεια συναπτικών στοιχείων^[8] καθώς και απόπτωση αυξημένου αριθμού χολινεργικών νευρώνων.

Οι πλάκες του αμυλοειδούς (Senile plaques) αποτελούνται από έναν κεντρικό πυρήνα από β-αμυλοειδές, ένα πεπτίδιο 4 kD, περιβαλλόμενο από ανώμαλα διαμορφωμένους νευρίτες. Φαίνεται να σχηματίζονται αρχικά σε περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με τη γνωστική λειτουργία και εξαπλώνονται σε άλλες περιοχές του φλοιού ενώ η νόσος προοδεύει.^[9] Οι πλάκες αυτές έχουν περίπλοκη δομή, η οποία καθορίζεται από την παρουσία διαμορφώσεων β πτυχωτών φύλλων, αποκαλούμενες βA4. Τα αδιάλυτα πεπτίδια, καλούμενα και απλώς Αβ, προέρχονται από μία μεγαλύτερη πρόδρομο πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (APP), μία ιδιαίτερος συντηρημένη διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη.^[8, 9] Το πεπτίδιο Αβ παράγεται από την APP με δύο διαδοχικές πρωτεολύσεις: η πρωτεολυτική δραστηριότητα της β-σεκρετάσης (ή β-εκκριτάσης) έχει ως αποτέλεσμα το ένα άκρο του Αβ πεπτιδίου, ενώ η δράση της γ-σεκρετάσης έχει ως αποτέλεσμα το άλλο άκρο (αναλύονται περαιτέρω παρακάτω). Φαίνεται να υπάρχουν δύο τύποι πεπτιδίου Αβ, ένα μεγαλύτερο είδος, Αβ42, και ένα κοντότερο, Αβ40. Το Αβ42 φαίνεται να είναι αυτό που εναποτίθεται αρχικά και ίσως να παίζει ρόλο στην εκκίνηση των γεγονότων που οδηγούν στην συσσωμάτωση αμυλοειδούς. Ακόμη δεν είναι ξεκάθαρο αν οι πλάκες αμυλοειδούς είναι η αιτία ή παραπροϊόν της ασθένειας του Alzheimer, αν και αυξανόμενα δεδομένα υποστηρίζουν πως λανθασμένος μεταβολισμός της APP που οδηγεί σε αύξηση των αδιάλυτων πεπτιδίων Αβ είναι υπεύθυνος για τη νόσο. Οι αμυλοειδείς πλάκες που εντοπίζονται στον εγκέφαλο ασθενών ξεπερνάει κατά πολύ αυτές που εντοπίζεται σε υγιή γηραιά άτομα. Η

ποσότητα, αλλά και ο εντοπισμός των πλακών σχετίζεται με τον βαθμό της νοητικής βλάβης.^[9]

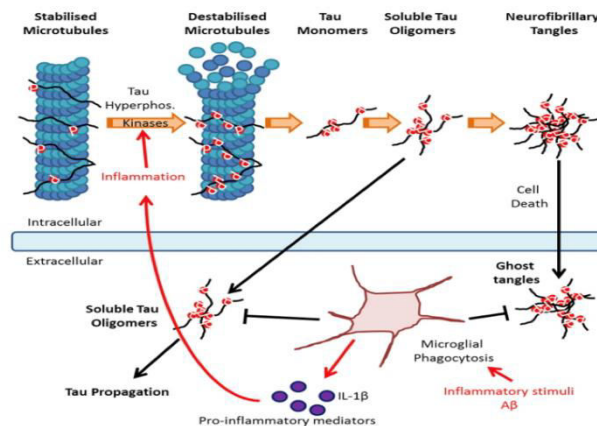
Aβ generation and plaque formation



Εικόνα 2: Ο σχηματισμός των πλακών αμυλοειδούς από συσσώρευση Αβ πεπτιδίων (πηγή: <https://hyalolex.com/alzheimer-disease/>)

Τα νευροϊνιδιακά δεμάτια (Neurofibrillary tangles, NFTs), αποτελούνται από ανώμαλες εναποθέσεις υπερφωσφορυλιωμένης και λανθασμένα πτυχωμένης πρωτεΐνης tau, εσωτερικά της πλασματικής μεμβράνης.^[8] Η πρωτεΐνη tau καλείται και σχετιζόμενη με μικροσωληνίσκους, καθώς συμμετέχει στον σχηματισμό και στην σταθεροποίησή τους, ως μέρος του κυτταροσκελετού. Ο αριθμός των νευροϊνιδιακών δεματίων σχετίζεται αναλογικά με το στάδιο της ασθένειας.^[9] Τα ινίδια που παρατηρούνται σε αυτά, απαντώνται σε ζεύγη και περιελίσσονται μεταξύ τους. Στα δεμάτια αυτά παρατηρούνται και άλλα πρωτεϊνικά στοιχεία, όπως η ουβικουιλίνη, χολινεστεράσες και β-Αμυλοειδές 4 (βΑ4), αλλά η πρωτεΐνη tau θεωρείται το βασικό δομικό συστατικό.^[8]

Role of tau hyperphosphorylation in NFTs

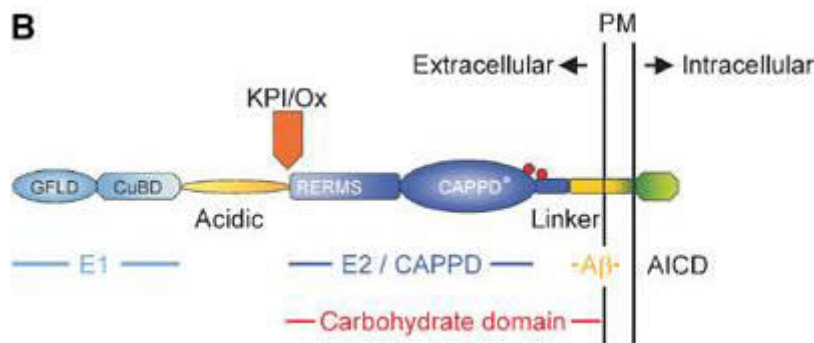


Εικόνα 3: Ο σχηματισμός νευροϊνιδιακών δεματίων από την συσσώρευση υπερφωσφορυλιωμένης tau πρωτεΐνης (πηγή: <https://hyalolex.com/alzheimer-disease/>)

1.5. Η πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (APP)

1.5.1. Δομή

Η πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς είναι μέλος μιας οικογένειας σχετιζόμενων πρωτεϊνών, που περιλαμβάνει τις Amyloid precursor-like proteins, APLP1 και APLP2 στα θηλαστικά και APPL στην *Drosophila*. Όλες οι σχετικές πρωτεΐνες διαπερνούν μία φορά την πλασματική μεμβράνη (τύπου I διαμεμβρανικές πρωτεΐνες), με μεγάλες εξωκυττάριας περιοχές, και όλες υφίστανται την ίδια επεξεργασία με την APP. Μόνο η APP παράγει ένα αμυλοειδογονικό θραύσμα λόγω της διαφοράς στην αλληλουχία της εσωτερικής περιοχής του Αβ.^[10, 11] Η εξωκυττάρια περιοχή της APP μπορεί να θεωρηθεί ως αλληλουχία αρκετών μεμονωμένων περιοχών, οι περισσότερες από τις οποίες αντιπροσωπεύουν και υπομονάδες ανεξάρτητης πύκνωσης.^[11] Η εναλλακτική συρραφή του APP μετάγραφου παρέχει 8 ισομορφές, από τις οποίες 3 είναι οι πιο συνήθεις: η μορφή των 695 αμινοξέων, η οποία εκφράζεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα, και οι μορφές των 751 και 770 αμινοξέων, οι οποίες είναι ευρέως καταναμημένες.^[10]

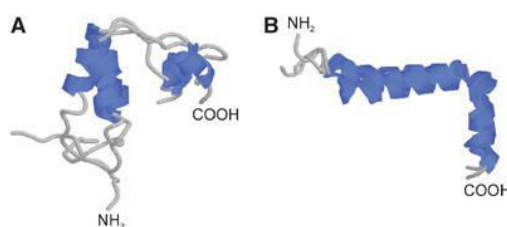


Εικόνα 4: Η δομή της APP (πηγή: Thinakaran G and Koo EH., 2008)

Η εξωκυττάρια περιοχή χωρίζεται στις επιμέρους E1, E2/CAPPD και μία όξινη περιοχή, και φέρει θέσεις πρόσδεσης ηπαρίνη, ψευδάργυρο, χαλκό (CuBD), OX-2 και τον αναστολέα πρωτεάσης KPI. Η μικρή ενδοκυττάρια περιοχή, ονομάζεται AICD (APP Intracellular C-terminal Domain ή ΑβPP Intracellular Domain) και περιέχει το μοτίβο YENPTY (κατάλοιπα 682-687), το οποίο είναι πλήρως συντηρημένο από τον *C. elegans* έως τον άνθρωπο. Αυτό το μοτίβο είναι σημαντικό για την διαμεσολαβούμενη από κλαθρίνη ενδοκυττάρωση και προσδένεται σε αρκετές πρωτεΐνες, όπως η Fe65, JIP και X11/Mint. Σε δομικό επίπεδο, η περιοχή AICD δεν υιοθετεί καμία σταθερή διαμόρφωση σε διάλυμα. Αρκετές μεταβατικές δομές παρατηρήθηκαν σε ένα εύρος τιμών pH, αν και δεν παρουσιάσθηκαν καθόλου 4^ο γενείς δομές. Η σταθερότητα του AICD με τους προσδέτες του εξαρτάται από την φωσφορυλίωση. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση της θρεονίνης 668 είναι άκρως

σημαντική για την πρόσδεση στην πρωτεΐνη Fe65, αλλά έχει μικρή ή καθόλου επίπτωση στην αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη X11. Το AICD πιστεύεται ότι συμμετέχει σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία εκτείνονται σε εύρος από φωσφατιδύλο-διαμεσολαβούμενη σηματοδότηση ασβεστίου στον πυρήνα έως απόπτωση και ρύθμιση μεταγραφής γονιδίων. Ιδιαίτερη σημασία δίνεται στον ρόλο του ως ρυθμιστής μεταγραφής γονιδίων, καθώς συνεχώς περισσότερα δεδομένα υποστηρίζουν αυτήν την ιδέα. Γονίδια τέτοια είναι η ίδια η APP, νεπριλυσίνη, Tip60, GSK3β, KAI1 και άλλα. Αρκετά ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι πρωτεόλυση από γ-σεκρετάση που απελευθερώνει Αβ αλλά και AICD, επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης νεπριλυσίνης μέσω του AICD που αποικοδομεί το Αβ, παρέχοντας έναν έλεγχο αρνητικής ανάδρασης.^[11] Η εμπλοκή του AICD στους μηχανισμούς του ασβεστίου αναλύεται παρακάτω.

Οι περισσότερες μελέτες για την δομή της APP επικεντρώνονται στην δομή του Αβ πεπτιδίου, και κυρίως στην μετατροπή τους από διαλυτά πεπτιδία σε αδιάλυτα ινίδια, τα οποία συνδέονται με τις δευτεροταγείς δομές β-πτυχωτών επιφανειών. Αντίθετα, τα διαλυτά Αβ40 και Αβ42 πεπτιδία αποτελούνται από 2 α-έλικες που ενώνονται με μία θηλιά. Η μετάπτωση αυτή στην δευτεροταγή δομή, από α-έλικες σε β-πτυχωτά φύλλα είναι θεμελιώδης στην απόκτηση αδιάλυτου χαρακτήρα και στην συσσωμάτωση. Οι μηχανισμοί της μετάπτωσης δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί, αλλά έχουν εντοπιστεί μεταλλαγές, όπως οι Dutch και Arctic mutations, οι οποίες εδράζονται στην πρώτη α-έλικα και ευνοούν τον σχηματισμό β-φύλλων.^[11]



Εικόνα 5: Η αδιάλυτη μορφή β-φύλλων σε αντίθεση με τη διαλυτή μορφή των α-ελίκων στο Αβ πεπτιδίο (πηγή: Thinakaran G and Koo EH., 2008)

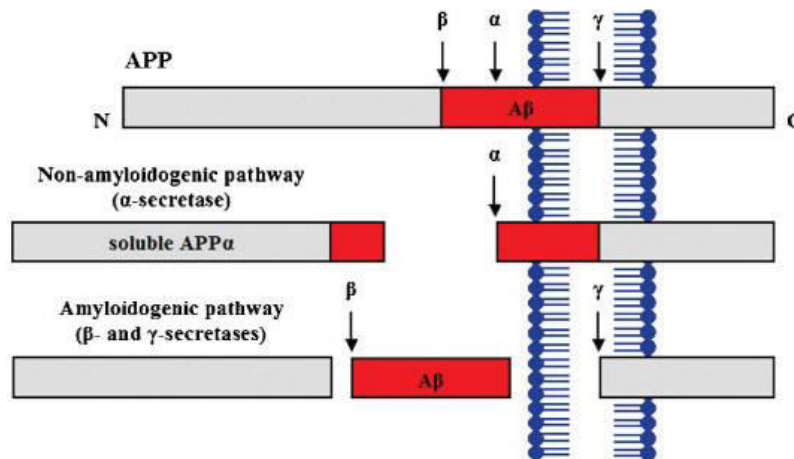
1.5.2. Λειτουργία της APP

Η εξελικτική εμφάνιση της APP συμπίπτει με την εμφάνιση των πρώτων νευρικών συστημάτων, λειτουργικών συνάψεων αλλά και με άλλα γεγονότα, όπως την εμφάνιση υποδοχέων απολιποπρωτεϊνών. Σημαντικά στοιχεία για την λειτουργία της APP προέρχονται από γενετική ανάλυση οργανισμών που έχουν μόνο ένα μέλος της οικογένειας APP. Στα θηλαστικά ο ρόλος της πρωτεΐνης ξεκινάει μετά την γέννηση, το ίδιο χρονικό διάστημα με την ωρίμανση του εγκεφάλου και ολοκλήρωση του σχηματισμού συνάψεων. Η επεξεργασία της πρωτεΐνης εξαρτάται από την συναπτική λειτουργία. Για την συναπτογένεση απαραίτητη είναι και η χοληστερόλη. Κατά την ανάπτυξη οι νευρώνες παράγουν οι ίδιοι την χοληστερόλη, στους ενήλικες όμως, οι νευρώνες εξαρτώνται από την χοληστερόλη που

προέρχεται από τις ενδογενείς λιποπρωτεΐνες. Μία ενδιαφέρουσα πιθανότητα είναι ότι η APP ελέγχει τον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, μέσω υποδοχέων που επίσης αποτελούν υποστρώματα για την γ-σεκρετάση. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι αυτοί οι υποδοχείς θα μπορούσαν να ρυθμίζουν την επεξεργασία και την στόχευση της APP, υποδεικνύοντας ότι η APP ίσως να συνδυάζει την συναπτική λειτουργία με την εισροή λιπιδίων, υποστηρίζοντας την αναδιοργάνωση της μεμβράνης. Η APP μπορεί επίσης να προσδένει απευθείας χοληστερόλη, που ίσως δείχνει ότι τα θραύσματα της APP ίσως να ρυθμίζουν απευθείας το μονοπάτι της χοληστερόλης.^[12] Η υπερέκφραση της APP αγρίου τύπου δείχνει να συνδέεται με αυξημένη κυτταρική επιβίωση, ανάπτυξη και λειτουργία.^[13] Παρατηρείται ανώμαλη μετανάστευση νευρώνων σε έμβρυα ποντικών που εμβολιάστηκαν με APP RNAi προς σίγησή της. Ο εμβολιασμός της εξωκυτταρικής επικράτειας της APP, καθώς φέρει τις επικράτειες πρόσδεσης ηπαρίνης, μπορεί να βελτιώσει την νοητική λειτουργία και την πυκνότητα των συνάψεων στις περιοχές αυτές.^[14] Η APP εμφανίζει παρόμοια δομή με το αναπτυξιακό σηματοδοτικό μόριο Notch. Η πρωτεόλυση του Notch έχει δείχθει ότι πραγματοποιείται από τις ίδιες σεκρετάσες που επεξεργάζονται και την APP, απελευθερώνοντας μία αντίστοιχη εξωκυτταρική και ενδοκυτταρική επικράτεια, που εμπλέκεται στη ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης. Επίσης, φαίνεται πως σε κύτταρα θηλαστικών η APP και το μόριο Notch συνεντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη και αλληλεπιδρούν ώστε να ρυθμίσουν κυτταρικές λειτουργίες.^[15] Ακόμη, έχει βρεθεί πως η απώλεια αυξητικών παραγόντων οδηγεί σε θραύση της APP, απελευθερώνοντας την εξωκυτταρική επικράτεια, η οποία προσδενόμενη σε υποδοχείς ενεργοποιεί τις κασπάσες 3 και 6. Ακολούθως το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. Τα γεγονότα αυτά μπορεί να αποτελούν μέρος της φυσιολογικής απομάκρυνσης των νευρικών αξόνων αλλά και/ή μέρος του νευροεκφυλισμού.^[16] Άλλοι ρόλοι της APP περιλαμβάνουν διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα, συμμετοχή της στην ομοιόσταση σιδήρου, ορθή μετανάστευση των νευρικών κυττάρων στον φλοιό, διατήρηση της ομοιόστασης ασβεστίου καθώς και νευρωνική δικτύωση.

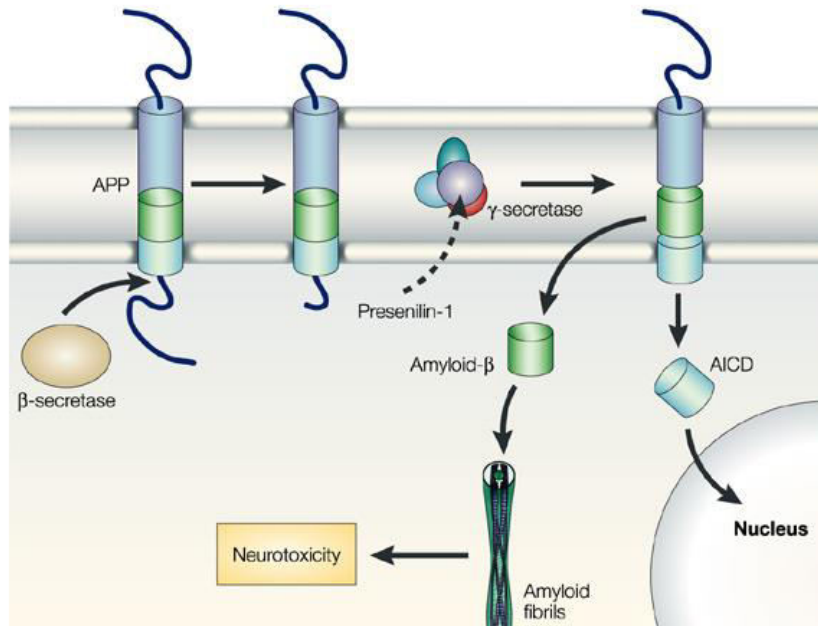
1.5.3. Επεξεργασία της APP

Η APP παράγεται σε μεγάλες ποσότητες στους νευρώνες και μεταβολίζεται πολύ γρήγορα. Πολλαπλά εναλλακτικά μονοπάτια υπάρχουν για την πρωτεόλυση της APP, μερικά εκ των οποίων οδηγούν στην παραγωγή του Αβ πεπτιδίου, ενώ κάποια άλλα όχι.^[10] Αφού η APP υποστεί διαλογή στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο δίκτυο Golgi, αποστέλλεται στον άξονα, όπου και μεταφέρεται με γρήγορη αξονική μεταφορά σε συναπτικούς προορισμούς.^[17]



Εικόνα 6: Επεξεργασία της APP στην πλασματική μεμβράνη (πηγή: προσαρμογή από Schaeffer EL, Figueiro M, Gattaz WF, 2011)

- **Μη-αμυλοειδογονικό** μονοπάτι: Στην επιφάνεια του κυττάρου, η APP μπορεί να πρωτεολύεται απευθείας από την α-σεκρετάση, ένα μονοπάτι που δεν καταλήγει σε παραγωγή Αβ, αλλά στην παραγωγή του διαλυτού sAPPα. Το μονοπάτι αυτό θεωρείται αρκετά ωφέλιμο, και εμπλέκεται σε αρκετές φυσιολογικές διεργασίες ανάπτυξης και επιβίωσης.
- **Αμυλοειδογονικό** μονοπάτι: Στο αμυλοειδογονικό μονοπάτι η APP κόβεται διαδοχικά από 2 διαφορετικές σεκρετάσες, την β και την γ. Η ασπαρτική πρωτεάση BACE1, η οποία είναι η νευρωνική β-σεκρετάση, πρωτεολύει την APP στις θέσεις +1 (πριν το αμινοξύ 1) και +11 του Αβ πεπτιδίου. Μετά την πρωτεόλυση από την β-σεκρετάση αυτή, απελευθερώνεται το εξωκυτταρικό τμήμα sAPPβ (soluble APPβ) και το καρβοξυτελικό διαμεμβρανικό β-CTEF. Ακολούθως, αυτό πρωτεολύεται από το σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης σε μία από τις αρκετές δυνατές θέσεις, από το +40 έως το +44, προς παραγωγή Αβ πεπτιδίων (πιο συνήθη τα 1-40 και 1-42) και του ενδοκυτταρικού θραύσματος AICD.^[10] Στη συνέχεια, το Αβ συσσωματώνεται προς σχηματισμό των ινιδίων, πυκνά συσσωρευμένων πρωτεϊνών με β-πτυχωτές επιφάνειες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.



Εικόνα 7: Επεξεργασία της APP και προορισμοί των θραυσμάτων (πηγή: https://www.nature.com/horizon/proteases/background/figs/ripping_f3.html)

Η γ-σεκρετάση είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα, αποτελούμενο από την πρεσινελίνη 1 (PS1) ή πρεσινελίνη 2 (PS2), την νικαστρίνη (Nct, nicastrin), μία τύπου I διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη και τις Aph-1 και Pen-2, δύο επίσης διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με πολλές διαμεμβρανικές επικράτειες. Το σύμπλεγμα αυτό είναι απαραίτητο για την ενδομεμβρανική πρωτεόλυση, η οποία συμβαίνει μέσα στην λιπιδική διπλοστιβάδα της πλασματικής μεμβράνης. Για τον σκοπό αυτό, μεγάλο ρόλο παίζουν τα κατάλοιπα ασπαρτικού των PS1 και PS2. Μεταλλάξεις αυτών των καταλοίπων οδηγούν σε μειωμένη πρωτεόλυση τόσο της APP όσο και του Notch1.^[19] Οι ρόλοι των διάφορων πρωτεϊνών του συμπλόκου γ-σεκρετάσης και των αλληλεπιδράσεών τους δεν έχουν πλήρως περιγραφεί, αλλά έχει προταθεί ότι η εξωκυτταρική περιοχή της νικαστρίνης αναγνωρίζει και προσδένεται στα αμινοτελικά τμήματα προηγουμένως πρωτεολυμμένων πρωτεϊνών. Η Aph-1 βοηθά στον σχηματισμό ενός προ-συμπλόκου, το οποίο αλληλεπιδρά με τις PS1 ή PS2, ενώ η Pen-2 εισέρχεται στο σύμπλοκο ώστε να εκκινήσει το κόψιμο των PS1 ή PS2 προς σχηματισμό ενός αμινοτελικού θραύσματος 28 kD και ενός καρβοξυτελικού 18 kD. Και τα δύο αυτά θραύσματα είναι πρωταρχικής σημασίας για το σύμπλοκο της γ-σεκρετάσης.^[20]

Στην APP, οι μεταλλάξεις συσσωρεύονται γύρω από τις θέσεις δράσης της γ-σεκρετάσης, αν και η πιο διαδεδομένη μετάλλαξη της APP είναι η APP-swe (APP Swedish mutation) και προκαλεί αλλαγή των αμινοξέων στα οποία δρα η β-σεκρετάση. Μεταλλάξεις στο γονίδιο PSEN (οι οποίες αυξάνουν τα προϊόντα PS1 PS2) κυρίως μεταλλάσσουν τις διαμεμβρανικές περιοχές τους. Ο κοινός παράγοντας όλων αυτών των μεταλλάξεων είναι πως αυξάνουν την παραγωγή του λιγότερο

διαλυτού Αβ42 σε σχέση με το Αβ40.^[21] Γενικώς, θεωρείται ότι το Αβ42 είναι περισσότερο τοξικό από το Αβ40, ακριβώς λόγω της μειωμένης διαλυτότητάς του και επομένως της αυξημένης ικανότητάς του να συσσωματώνεται. Έχουν βρεθεί αυξημένες περιοχές υδροφοβικότητας στο καρβοξυτελικό άκρο του Αβ42, και η ίδια η ύπαρξη της υδροφοβικότητας είναι αρκετή για την συσσωμάτωση. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως οι σχετικές θέσεις των υδροφοβικών καταλοίπων ήταν πιο σημαντικές από την ακριβή ταυτότητά τους.^[23] Εντούτοις, η *in vivo* αμυλοειδογένεση δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο στην συγκέντρωση Αβ και/ή την αναλογία Αβ40/42. Η διαδικασία περιλαμβάνει και επιπλέον παράγοντες, όπως ιόντα μετάλλων, γλυκοζαμινογλυκάνες και άλλα εξωκυττάρια συστατικά. Έχει προταθεί η λειτουργία του Αβ ως ρυθμιστή καναλιών ιόντων, απαραίτητο για την υγεία του νευρικού συστήματος. Έχει παρατηρηθεί μάλιστα η έκκριση του Αβ ως αποτέλεσμα συναπτικής λειτουργίας και πως το Αβ ως απόκριση, μειώνει τις συναπτικά σήματα. Αυτός ο μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης θα μπορούσε να λειτουργεί ως ομοιοστατικός μηχανισμός ώστε να παραμένει υπό έλεγχο η νευρική λειτουργία. Αντίλογος σε αυτήν την ιδέα θα μπορούσε να αποτελεί το ότι το Αβ πεπτιδίο είναι το λιγότερο συντηρημένο μέρος της APP.^[11]

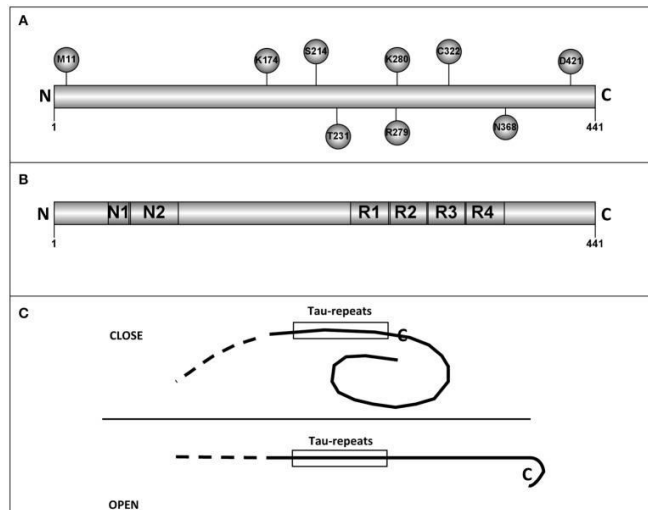
1.6. Η πρωτεΐνη tau

Η πρωτεΐνη tau είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών σχετιζόμενες με τους μικροσωληνίσκους (Microtubule-Associated proteins, MAPs), και βοηθούν στην συναρμολόγηση, πολυμερισμό και σταθεροποίηση της τουμπουλίνης σε μικροσωληνίσκους. Η πρωτεΐνη tau δείχνει να είναι πιο άφθονη στην λευκή ουσία παρά στην φαιά, η παρουσία της περιορίζεται στους άξονες, ενώ δεν εντοπίζεται στην γλοία, γεγονός που υποδηλώνει πως είναι νευρωνο-ειδική, τουλάχιστον στον εγκέφαλο, και η δράση της στους μικροσωληνίσκους περιορίζεται στους άξονες.^[24]

1.6.1. Δομή

Η πρωτεΐνη (ή οι πρωτεΐνες) tau, κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο, το MAPT, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 στον άνθρωπο. Το παραγόμενο mRNA παράγει 6 ισομορφές με εναλλακτική συρραφή, περιέχοντας ή μη τα εξώνια 2,3 και 10. Η μεγαλύτερη ανθρώπινη ισομορφή είναι εκείνη με 441 αμινοξικά κατάλοιπα. Μέσα σε αυτήν περιέχονται 80 αμινοξικά κατάλοιπα που υπόκεινται σε φωσφορυλίωση (σερίνη και θρεονίνη), και μικρό μόνο ποσό υδροφοβικών αμινοξέων. Η πρωτοταγής δομή της μπορεί να υποδιαιρεθεί σε 4 περιοχές, την καρβοξυτελική, την επικράτεια πρόσδεσης στους μικροσωληνίσκους (Microtubule-binding domain, MBD), μία περιοχή πλούσια σε προλίνη και την αμινοτελική περιοχή.

Οι καρβοξυτελικές περιοχές δείχνουν μικρότερη ποικιλομορφία στα διάφορα είδη, και ίσως κάποια από αυτά τα συντηρημένα κατάλοιπα να έχουν σημαντικούς ρόλους στις λειτουργίες της πρωτεΐνης, όπως τα M11, S409, D421 και άλλα. Για παράδειγμα η A152, ενδέχεται να αλληλεπιδρά με τους NMDA υποδοχείς.^[25]



Εικόνα 8: Συντηρημένα κατάλοιπα στην πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης tau (πηγή: Avila J, Jiménez JS, Sayas CL, Bolós M, Zabala JC, Rivas G, Hernández F, 2016)

Η περιοχή MBD καθορίζει την ικανότητά της να προσδένεται σε μικροσωληνίσκους, και σχετίζεται επίσης με την συσσωμάτωσή της που οδηγεί σε νόσους. Φωσφορυλίωση μέσα ή γύρω από την MBD ενδέχεται να εξουδετερώσει το θετικό φορτίο και να αλλάξει την διαμόρφωσή της, αποκολλώντας την tau από τους μικροσωληνίσκους. Η αποκολλημένη tau συσσωρεύεται στα σώματα των νευρώνων και στους νευρίτες, σχηματίζοντας αδιάλυτα ινίδια και τελικώς νευρινιδιακά δεμάτια. Η MBD περιέχει επίσης και δομές απαραίτητες για τον σχηματισμό β-πτυχωτών επιφανειών που συμμετέχουν στην συσσωμάτωση.

Η περιοχή πλούσια σε προλίνη περιλαμβάνει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης και μπορεί να προσδένεται σε περιοχές SH3 άλλων πρωτεϊνών, όπως και τυροσινικές κινάσες. Οι αμινοτελικές περιοχές της tau έχουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την πλασματική μεμβράνη και ρυθμίζουν τον χώρο μεταξύ μικροσωληνίσκων.^[26]

1.6.2. Λειτουργία

Αν και η πρωτεΐνη tau έχει μελετηθεί εκτενέστατα τα τελευταία χρόνια, οι ακριβείς μηχανισμοί και ρόλοι που της αποδίδονται δεν είναι ξεκάθαροι. Στην tau έχουν αποδοθεί πλέον πολλοί ρόλοι, εκτός από αυτόν της σταθεροποίησης μικροσωληνίσκων, με πολλά αλληλεπιδρώντα σηματοδοτικά μονοπάτια και ρυθμιστές της διακίνησης μορίων ή ακόμη και οργανιδίων, τόσο στην προ- όσο και στην μετα-συναπτική μεμβράνη.^[26] Ένα μεγάλο προσόν των μοντέλων διαγραφής γονιδίων (knockout models) είναι ότι εμφανίζουν λειτουργίες οι οποίες δεν είναι εφεδρικές λειτουργιών άλλων πρωτεϊνών. Για παράδειγμα η μείωση της tau αποτρέπει συμπεριφορικά ελλείμματα σε διάφορα μοντέλα της νόσου Alzheimer, υποδηλώνοντας ότι μεμονωμένες λειτουργίες της tau είναι σημαντικές για την παθογένεση της ασθένειας.

Το μεγαλύτερο ποσοστό του μέσα στο κύτταρο προσδένεται σε μικροσωληνίσκους. Σε in-vitro συστήματα αυτή η δραστηριότητα πρόσδεσης σε μικροσωληνίσκους οδηγεί σε συναρμολόγηση και σταθεροποίηση αυτών.^[27] Σε κυτταρικές καλλιέργειες όμως η tau συνεντοπίζεται με αυτούς τους μικροσωληνίσκους που είναι πιο δυναμικοί και πιο ευαίσθητοι σε επαγόμενο από ουσίες αποπολυμερισμό.^[28] In vivo, οι λειτουργίες της tau φαίνεται να αλληλοεπικαλύπτονται με αυτές της MAP1B, ακόμη μια σχετιζόμενη με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνη που ευρίσκεται στους άξονες.^[29] Επίσης η tau έχει βρεθεί ότι ευρίσκεται στους ολιγοδενδρίτες, τα κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος που παράγουν μυελίνη. Τα αποτελέσματα αυτά ίσως δείχνουν ότι η tau συμμετέχει σε κάποια στάδια της μυελινοποίησης.^[30] Ένας ακόμη πιθανός ρόλος που αποδίδεται στην tau είναι αυτός της συμμετοχής της σε σηματοδοτικά μονοπάτια εγγενή στον νευροεκφυλισμό, και μάλιστα από την εξωκυτταρική tau.^[31] Ακόμη, έχει βρεθεί πως η καρβοξυτελική περιοχή της προδρομου πρωτεΐνης του Αβ αλληλεπιδρά με την tau. Συγκεκριμένες περιοχές μεταξύ των αμινοξέων 1-28 του Αβ προσδένονται απευθείας με τη τουμπουλίνη, και ακόμη μία περιοχή προσδένεται στην tau και στην τουμπουλίνη.^[32]

1.6.3. Φωσφορυλίωση της tau

Αλλαγές στην διαλυτή μορφή της tau και η υπερβάουσα φωσφορυλίωσή της οδηγούν σε νευροεκφυλισμό, καθώς παραλλάσσουν την δομή, την κατανομή και την λειτουργία της στους νευρώνες. Περιέχει 85 δυνατές θέσεις φωσφορυλίωσης σερίνης (S), θρεονίνης (T), και τυροσίνης (Y). Πολλές από αυτές τις θέσεις ευρίσκονται στην περιοχή πλούσια σε προλίνη. Η κατάσταση φωσφορυλίωσης και η εκφραζόμενη ισομορφή ρυθμίζονται αναπτυξιακά και είναι βασικοί παράγοντες για την πλαστικότητα του κυτταροσκελετού κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και πρώιμης ανάπτυξης. Περίπου 10 κατάλοιπα βρίσκονται σε φωσφορυλιωμένη μορφή στη διαλυτή πρωτεΐνη. Αντιθέτως, η tau που συναντάται σε συσσωματώματα βρίσκεται να έχει τουλάχιστον 16 διαφορετικά κατάλοιπα φωσφορυλιωμένα, και περίπου 45 διαφορετικές θέσεις φωσφορυλίωσης σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης, αντιπροσωπεύοντας το 50% όλων των ικανών για φωσφορυλίωση καταλοίπων, έχουν βρεθεί σε εγκέφαλο με νόσο του Alzheimer. Φαίνεται να εμπλέκεται μεγάλος αριθμός κινασών και φωσφατασών στις ανισορροπίες αυτές, όπως οι κινάσες GSK-3, οι MAPKs, η CaMKII και η κυκλίνη cdk5.^[31] Αποφωσφορυλίωση της διαλυτής tau από εγκέφαλο με Alzheimer's αποτρέπει τον πολυμερισμό της και επαναφέρει την ικανότητα της tau να σταθεροποιεί μικροσωληνίσκους.^[33] Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η υπερφωσφορυλίωση που θα οδηγήσει σε συσσωμάτωση σχετίζεται και με τις θέσεις της MBD, καθώς θα διαμορφώσουν τις β-πτυχωτές επιφάνειες.

2. Γλυκόζη

2.1. Γενικά στοιχεία και μεταβολισμός

Η γλυκόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης, με 6 άτομα άνθρακα. Η οξείδωσή της αποτελεί πηγή ενέργειας για τους περισσότερους οργανισμούς και είναι το μόνο καύσιμο που χρησιμοποιείται από τον εγκέφαλο των θηλαστικών, υπό φυσιολογικές συνθήκες και όχι στέρησης τροφής, και τα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλά, ως εναλλακτικό ενεργειακό απόθεμα χρησιμοποιείται το γλυκογόνο, το οποίο έχει αποθηκευθεί στους σκελετικούς μύες και το ήπαρ, και με την διάσπασή του στα μονομερή του, παράγεται 6-φωσφορική-γλυκόζη. Πρόκειται για σύνθετο πολυσακχαρίτη, ο οποίος σχηματίζεται σε συνθήκες περίσσειας γλυκόζης στο αίμα, μέσω σηματοδότησης από ορμόνες, ενώ ταυτόχρονα καταστέλλεται η κατανάλωσή του. Ακόμη ένας τρόπος σχηματισμού γλυκόζης είναι η γλυκονεογένεση, κυρίως από το πυροσταφυλικό οξύ ή και ενδιάμεσα της γλυκόλυσης ή αμινοξέα.

2.2. Ρόλος της γλυκόζης στον εγκέφαλο

Διαταραχή του φυσιολογικού μεταβολισμού της γλυκόζης ή της αλληλοεξάρτησής της με μονοπάτια κυτταρικού θανάτου σχηματίζουν τη βάση για πολλές ασθένειες του εγκεφάλου. Στον ενήλικο εγκέφαλο, οι νευρώνες (και τα αστροκύτταρα) έχουν την υψηλότερη ενεργειακή απαίτηση και χρειάζονται συνεχή τροφοδότηση γλυκόζης από το αίμα. Ο μεταβολισμός της γλυκόζης παρέχει καύσιμα για την φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου μέσω της παραγωγής ATP, της βάσης για την κυτταρική συντήρηση και την παραγωγή νευροδιαβιβαστών. Σε έναν εγκέφαλο σε ηρεμία, σχεδόν όλη η γλυκόζη οξειδώνεται προς παραγωγή CO₂, και νερού, μέσω της γλυκόλυσης και του κύκλου του κιτρικού οξέος. Η εξάρτηση του εγκεφάλου από την γλυκόζη ως το απαραίτητο καύσιμο προέρχεται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (blood-brain barrier, BBB) και την επιλεκτική διαπερατότητά του στην γλυκόζη.^[34] Η γλυκόζη δεν μπορεί να αντικατασταθεί, μπορεί όμως να συμπληρωθεί από γαλακτικό οξύ κατά τη διάρκεια έντονης φυσικής άσκησης, όπου η περιεκτικότητα του αίματος σε αυτό είναι υψηλή,^[35] ή μακράς νηστείας όπου στο αίμα αυξάνονται τα ποσοστά κετονοσωμάτων.^[36] Η γλυκόζη μεταφέρεται μέσω των GLUT1 υποδοχέων δια μέσου των ενδοθηλιακών μεμβρανών στο εξωκυττάριο υγρό, και από εκεί στα αστροκύτταρα, στην ολιγοδενδρογλοία και μικρογλοία, ενώ μέσω των GLUT3, οι οποίοι έχουν πολύ υψηλότερο μεταφορικό ρυθμό από τους GLUT1, μέσα στους νευρώνες. Φαίνεται πως η περισσότερη γλυκόζη διαχέεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω κενών και ανάμεσα από τα περιβάλλοντα αστροκύτταρα, σε όλο το εξωκυττάριο υγρό προς τα πιο μακρινά κύτταρα, συνδράμοντας στην απορρόφησή της από τους νευρώνες μέσω των GLUT3.^[37] Σύμφωνα με μία άποψη, η νευροδιαβίβαση γλουταμινικού οξέος πυροδοτεί παραγωγή γαλακτικού από τα αστροκύτταρα, τα οποία γενικώς θεωρείται πως

συμμετέχουν στην τροφοδότηση των νευρώνων και πως βοηθούν στην διανομή της γλυκόζης. Το γαλακτικό αυτό θεωρείται πως λειτουργεί ως σημαντική πηγή καυσίμου κατά τη διάρκεια της γλουταματεργικής ενεργοποίησης, αλλά ακόμη το θέμα παραμένει υπό συζήτηση.^[38]

2.3. Ρόλος της γλυκόζης σε μηχανισμούς ασθενειών

Ο μεταβολισμός της γλυκόζης έχει εξελικτικά συνδεθεί με την ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου, σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Μία ισομορφή της εξοκινάσης (βασικό ένζυμο της γλυκόλυσης), η HKII (εξοκινάση τύπου II, ρυθμιζόμενη από την υποξία), ελέγχει την επιβίωση των κυττάρων αναλόγως με την μεταβολική κατάσταση. Η HKII περιορίζει ή εμποδίζει την απόπτωση αναλόγως εάν βρίσκεται ή όχι σε σύνδεση με τα μιτοχόνδρια αντίστοιχα, και επίσης με βάση την διαθεσιμότητα γλυκόζης. Επίσης προστατεύει το κύτταρο έναντι απόπτωσης μετά από επίδραση υποξίας και παρουσία οξειδωτικών παραγόντων. Αντιθέτως όμως, επάγει την απόπτωση σε συνθήκες στέρησης γλυκόζης.^[39]

Οι νευρώνες δεν είναι καθόλου ανθεκτικοί σε μη επαρκή τροφοδότηση ενέργειας. Ένα από τα πιο πρώιμα σημάδια της νόσου του Alzheimer είναι η μείωση του μεταβολισμού της γλυκόζης στον φλοιό, και φαίνεται να σχετίζεται και με την πρόοδο της νόσου.^[40] Σε μοντέλα ποντικών με Alzheimer's, η έκφραση των GLUT1 υποδοχέων είναι μειωμένη τόσο στον BBB, όσο και στα αστροκύτταρα, γεγονός που συνοδεύεται από προβληματική μεταφορά γλυκόζης και μειωμένη απελευθέρωση γαλακτικού οξέος από τον φλοιό κατά την νευρωνική ενεργοποίηση.^[41] Ενδιαφέρον είναι επίσης το γεγονός ότι κακώς ρυθμιζόμενος μεταβολισμός γλυκόζης σε μεταβολικές διαταραχές όπως η παχυσαρκία ή ο τύπου II διαβήτης έχει συνδεθεί με την πρόοδο της νόσου Alzheimer και με την νοητική βλάβη.^[40] Η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στον εγκέφαλο, μειωμένη εισροή μέσα στους νευρώνες και χαμηλό ποσό GLUT3 υποδοχέων σχετίζονται με την βαρύτητα της νόσου και των συμπτωμάτων της. Ίσως αυτός ο προβληματικός μεταβολισμός της γλυκόζης να είναι εγγενές χαρακτηριστικό της νόσου, και ίσως να ξεκινά αρκετά χρόνια πριν την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων.^[42]

2.4. 2-Δεοξυγλυκόζη (2-deoxyglucose, 2-DG)

Η 2-DG αποτελεί ένα δομικό ανάλογο της γλυκόζης, που όμως η υδροξυλομάδα που βρίσκεται στη θέση 2 της γλυκόζης έχει αντικατασταθεί με ένα υδρογόνο. Χρησιμοποιείται για προσομοίωση συνθηκών στέρησης γλυκόζης, καθώς ενώ μπορεί να εισαχθεί μέσα στο εσωτερικό των κυττάρων με τους μεταφορείς γλυκόζης GLUT, δεν μπορεί να οξειδωθεί μέσω γλυκόλυσης, εμποδίζοντας αυτήν την πορεία. Φωσφορυλιώνεται αρχικά από την εξοκινάση, αλλά δεν μπορεί να μεταβολισθεί περαιτέρω, και ανταγωνιστικά εμποδίζει την μετατροπή της 6P-γλυκόζης σε 6P-φρουκτόζη. Προκαλεί τελικώς συνθήκες όμοιες με αυτές που επικρατούν στην στέρηση γλυκόζης και οξειδωτικό στρες, καθώς μειώνει την

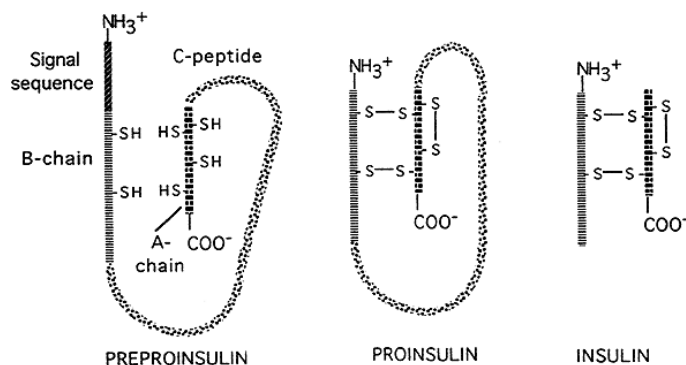
παραγωγή του ATP και βοηθά την συσσώρευση του AMP. Η δράση της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από την ποσότητα της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο, καθώς με ταυτόχρονη πρόσθεση ίσων ποσοτήτων γλυκόζης και 2-DG, η γλυκόλυση αναστέλλεται. Συμπέρασμα είναι πως προσδένεται με μεγαλύτερη συγγένεια είτε εξ αρχής στους μεταφορείς γλυκόζης GLUT είτε στα ίδια τα ένζυμα της γλυκολυτικής οδού, κυρίως στην εξοκινάση. Εκτός από την καθυστερημένη ανάπτυξη που παρατηρείται, ένεση μεγάλων ποσοτήτων 2-DG προκαλεί αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης και ελεύθερων λιπαρών οξέων στο πλάσμα, ίσως και λόγω αυξημένης έκκρισης αδρεναλίνης.^[43] Σε μελέτες κυτταρικών σειρών και μοντέλων ζώων όπου η 2-DG χρησιμοποιήθηκε ως θεραπευτική για τον καρκίνο, βρέθηκε πως η 2-DG αυξάνει την φωσφορυλίωση της Akt, της οποίας το σηματοδοτικό μονοπάτι θα αναλυθεί αργότερα και γενικώς επάγει την κυτταρική επιβίωση. Από τα 15 πρώτα λεπτά της θεραπείας με 2-DG στα μοντέλα, φαίνεται να αυξάνεται η φωσφορυλίωση στα κατάλοιπα Ser473 και Thr308 της Akt, μέσω της πρωτεΐνης PI3K. Επίσης, αυξημένη ήταν και η φωσφορυλίωση στόχων καταροϊκά της Akt στο σηματοδοτικό μονοπάτι, όπως η FoxO3a, GSK3beta, που σχετίζεται με τον μεταβολισμό, και η Ch1.^[44]

2.5. Ρυθμιστικές ορμόνες

Οι ορμόνες που ρυθμίζουν την ομοιοστασία της γλυκόζης στο αίμα και τον μεταβολισμό και αποθήκευσή της, είναι κυρίως η ινσουλίνη και η γλουκαγόνη (ή γλυκογόνο, ή γλουκαγόνο). Θα γίνει περισσότερος λόγος για την ινσουλίνη, καθώς αφορά την παρούσα διπλωματική εργασία.

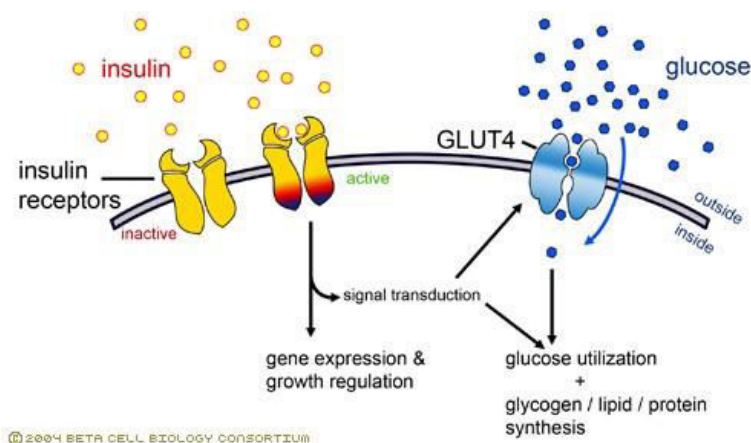
2.5.1. Ινσουλίνη

Η ινσουλίνη παίζει τον κύριο ρόλο για τον μεταβολισμό και απορρόφηση της γλυκόζης. Αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, την α και την β, οι οποίες προέρχονται από το ίδιο προένζυμο, υφίστανται πέψη ώστε να δημιουργήσουν δύο αλυσίδες και επεξεργασία ώστε να συνδεθούν μεταξύ τους με δύο δισουλφιδικές γέφυρες.



Εικόνα 9: Η σύνθεση και δομή της ινσουλίνης (πηγή: http://www2.csudh.edu/nsturm/CHE450/19_InsulinGlucagon.htm)

Η μεταγευματική κατάσταση, αφού τα λιπίδια και οι υδατάνθρακες απορροφηθούν στην κυκλοφορία του αίματος, πυροδοτούν την έκκριση της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος. Για την πυροδότηση αυτή ευθύνεται η γλυκόζη και το παρασυμπαθητικό σύστημα, συγκεκριμένα η αυτόνομη παρασυμπαθητική νεύρωση των νησίδων Langerhans. Αντίθετα, διέγερση των συμπαθητικών νευρώνων ή αύξηση της επινεφρίνης αναστέλλουν την έκκρισή της. ^[45, 46] Οι υποδοχείς ινσουλίνης ανήκουν στην οικογένεια υποδοχέων που ενεργοποιούνται με προσδέτη, καθώς και στην οικογένεια υποδοχέων τυροσινικής κινάσης. Οι τυροσινικές κινάσες ρυθμίζονται αλλοστερικά από τον συνδέτη τους (ινσουλίνη) και λειτουργούν ως διμερή, με το κάθε μονομερές να φωσφορυλιώνει το άλλο. ^[47]



Εικόνα 10: Ενεργοποίηση των υποδοχέων ινσουλίνης και η σηματοδότηση αυτής (οι υποδοχείς εισροής γλυκόζης GLUT4 εκφράζονται πρωταρχικά από τον λιπώδη ιστό, σκελετικό και καρδιακό μυ) (πηγή: <https://medium.com/@neurocontributors/week-2-3-insulin-receptors-leptin-71e49db98554>)

Η ινσουλίνη διεγείρει την κατάσταση επάρκειας: την αποθήκευση δηλαδή των καυσίμων και την σύνθεση των πρωτεϊνών. Το επίπεδο της γλυκόζης στο ήπαρ αυξάνεται μέσω των υποδοχέων GLUT2 και επάγεται και η σύνθεση γλυκογόνου, ως αποθηκευτικό μέσο. Επιταχύνει επίσης την γλυκόλυση στο ήπαρ, η οποία με τη σειρά της αυξάνει την σύνθεση λιπαρών οξέων. Το υψηλό επίπεδο ινσουλίνης επάγει επίσης την είσοδο γλυκόζης στο μυϊκό και λιπώδη ιστό. ^[45] Η μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα καθώς και η έκκριση της γλουκαγόνης, μειώνουν και τα επίπεδα έκκρισης ινσουλίνης. Έτσι φαίνεται πως το σύστημα είναι αρνητικώς ανατροφοδοτούμενο, επομένως και αυτορυθμιζόμενο.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη του mRNA της ινσουλίνης στον εγκέφαλο, και μάλιστα ορισμένες περιοχές όπως ο υποθάλαμος, ίσως λειτουργούν ως μία θέση για πιο ταχεία είσοδο της ινσουλίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Στο νευρικό σύστημα ο κύριος υποδοχέας ινσουλίνης είναι ο IR-A, ο οποίος έχει μεγαλύτερη συγγένεια από τον IR-B. Αλλά, μελέτες δείχνουν πως στον IR-A μπορεί να προσδεθεί εκτός από την ινσουλίνη, και ο αυξητικός παράγοντας όμοιος με ινσουλίνη (Insulin-like growth factor, IGF-1 και IIGF-2). Μόλις ο προσδέτης συνδεθεί στον υποδοχέα, τα τυροσινικά κατάλοιπα αυτού αυτοφωσφορυλιώνονται

οδηγώντας στην επιστράτευση πρωτεϊνών σκελετού, κυρίως υποστρώματα IR (IR Substrates, IRS-1 και IRS-2). Τελικώς η ινσουλίνη συνδέεται με δύο πολύ βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια, το PI3K/Akt, το οποίο ευθύνεται για μεταβολικές αποκρίσεις και σύνθεση λιπιδίων/πρωτεϊνών και το Ras/ERK, το οποίο ευθύνεται για κυτταρική επιβίωση και γονιδιακή έκφραση.^[48 NETH] Τα IRS στοιχεία ενεργοποιούν την πρωτεΐνη PI3K, η οποία τελικώς αυξάνει την φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της Akt. Μάλιστα η Akt μεσολαβεί τις περισσότερες μεταβολικές επιδράσεις της Akt. Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt θα αναλυθεί παρακάτω.

2.5.2. Γλουκαγόνη

Η γλουκαγόνη εκκρίνεται από τα α-κύτταρα του παγκρέατος, αρκετές ώρες μετά από ένα γεύμα, και όταν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα έχουν πέσει. Έτσι σηματοδοτεί την περίοδο ασιτίας, όπως ακριβώς η ινσουλίνη σηματοδοτεί την περίοδο σίτισης. Κινητοποιεί τα αποθέματα γλυκογόνου όταν δεν υπάρχει πρόσληψη γλυκόζης από την τροφή και κύριο όργανο – στόχος της είναι το ήπαρ.^[45]

2.5.3. Αντίσταση στην ινσουλίνη

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι μεταβολικές διαταραχές είναι συχνές στη νόσο του Alzheimer, πιθανόν υποβόσκουσες χρόνια πριν την εκδήλωση της ασθένειας. Στις μεταβολικές διαταραχές που αναφέρθηκαν όπως διαβήτης τύπου II, παχυσαρκία, υπερλιπιδαιμία, αλλά και στην αντίσταση ινσουλίνης, υπάρχει συστηματική δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, και τα πάσχοντα άτομα έχουν αυξημένες πιθανότητες να ασθενήσουν από Alzheimer's. Όπως και στη γήρανση, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων σχετίζεται στενά με την νόσο του Alzheimer. Επίσης, στη νόσο του Alzheimer, έχει βρεθεί πως το Αβ καταστρέφει την ομοιόσταση ασβεστίου στα μιτοχόνδρια, ακριβώς όπως και η ινσουλίνη. Αποτέλεσμα αυτού είναι η πυροδότηση έναρξης φλεγμονής, και παραγόντων όπως κυτταροκίνες, TNF, και C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, μηχανισμοί που επίσης πυροδοτούν νευροεκφυλιστικές καταστάσεις.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη συμβαίνει όταν η ινσουλίνη, ενώ προσδέεται στους υποδοχείς της, έχει μειωμένη δράση. Αν και αυτός ο όρος εφαρμόζεται συνήθως στην μείωση της γλυκόζης που εισέρχεται από το αίμα στους ιστούς, αναφέρεται και στην ικανότητα της ινσουλίνης να εκτελέσει τον σηματοδοτικό της ρόλο.^[48 NETH]

Στην περιφέρεια, το γεγονός αυτό οδηγεί σε αύξηση της ινσουλίνης που εκκρίνεται από το πάγκρεας για να ανταπεξέλθει στην χρόνια αυξημένη γλυκόζη που υπάρχει στο αίμα λόγω της διαταραχής.^[48, 49] Υπό κανονικές συνθήκες, απότομη αύξηση της ινσουλίνης στην περιφέρεια οδηγεί και σε αυξημένη παροχή ινσουλίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Όμως η χρόνια αύξησή της στο αίμα μειώνει τους μεταφορείς της στον BBB, γεγονός που μειώνει τελικώς την ινσουλίνη που εισέρχεται στον εγκέφαλο. Αυτή η μείωση στην παροχή ινσουλίνης, αλλά καθώς φαίνεται και στους IGF-1 και IGF-2, μπορεί να οδηγήσει σε γνωστικές

δυσλειτουργίες, επιβάρυνση της μνήμης, μείωση νευροπροστατευτικών παραγόντων, ακόμη και να συνεισφέρει στην ανάπτυξη νευροεκφυλισμού και άνοιας.^[48 NETH] Η αντίσταση στην ινσουλίνη επίσης οδηγεί σε αλλαγές στην δομή του εγκεφάλου και στην λειτουργία του, σε ότι αφορά τον όγκο του (για παράδειγμα μείωση του όγκου του υπόκαμπου^[50]) και τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Εξαιρετικά ενδιαφέροντα ευρήματα δείχνουν πως οι επηρεαζόμενες περιοχές του εγκεφάλου σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη είναι παρόμοιες με τις αντίστοιχες επηρεαζόμενες περιοχές σε εγκεφάλους ασθενών με Alzheimer's. Το γεγονός αυτό σαφώς υποστηρίζει ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη ίσως προωθεί τον νευροεκφυλισμό.^[51] Ακόμη ένα εύρημα που υποστηρίζει την στενή σχέση αντίστασης στην ινσουλίνη, τύπου II διαβήτη και Alzheimer's είναι πως τόσο η νόσος του Alzheimer όσο και ο τύπου II διαβήτης είναι αμυλοειδογονικές καταστάσεις. Στην νόσο του Alzheimer η αναφορά γίνεται για το Αβ40 και Αβ42, ενώ στον διαβήτη για την αμυλίνη, η οποία βρίσκεται αυξημένη σε καταστάσεις αντίστασης ινσουλίνης, γενικώς. Η αμυλίνη βρίσκεται σε εναποθέσεις σε περιπτώσεις Alzheimer's στα εγκεφαλικά αγγεία, και στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, ακόμη και απουσία διαβήτη τύπου II.^[52] Επιπροσθέτως η ινσουλίνη βρίσκεται πως επηρεάζει την παραγωγή Αβ, καθώς επάγει την έκφραση της β-σεκρετάσης του αμυλοειδογονικού μονοπατιού.^[53] Γενικώς, οι εναποθέσεις αμυλοειδούς αυξάνουν την αντίσταση στην ινσουλίνη, που είναι και εν μέρει ο λόγος της μείωσης εισροής ινσουλίνης σε καταστάσεις χρόνιας αύξησής της στην περιφέρεια.^[48] Έχει επίσης προταθεί πως η ινσουλίνη επηρεάζει το ένζυμο αποικοδόμησης ινσουλίνης (Insulin-degrading enzyme, IDE) προς τον καθαρισμό από Αβ στον εγκέφαλο ασθενών με νόσο του Alzheimer. Η IDE είναι η κύρια μεταλλοπρωτεάση που σχετίζεται με την αποικοδόμηση του Αβ, ινσουλίνης και άλλων πεπτιδίων εξωκυτταρικά.

Για όλους τους παραπάνω λόγους, καθώς και για την σχέση που έχει η αντίσταση στην ινσουλίνη με τον διαβήτη, έχει προταθεί πως η νόσος του Alzheimer αποτελεί έναν διαβήτη τύπου III. Τα παραπάνω συμπεράσματα στηρίζονται και σε μελέτες που αποκρυπτογραφούν την επίδραση της ινσουλίνης στην παθολογία της νόσου του Alzheimer, μέσω κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών.^[54] Για παράδειγμα, εκτός από την συμμετοχή της στον σχηματισμό αμυλοειδών πλακών, η ινσουλίνη σχετίζεται με την ενεργοποίηση της κινάσης – συνθάσης του γλυκογόνου 3β (GSK-3β), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την tau. Η δράση αυτή είναι άκρως σημαντική, τόσο για την νευρωνική πλαστικότητα, όσο και για νευροτροφικές και νευροενδοκρινείς λειτουργίες.^[55]

2.6. Κρεατίνη και διαχείριση ενέργειας

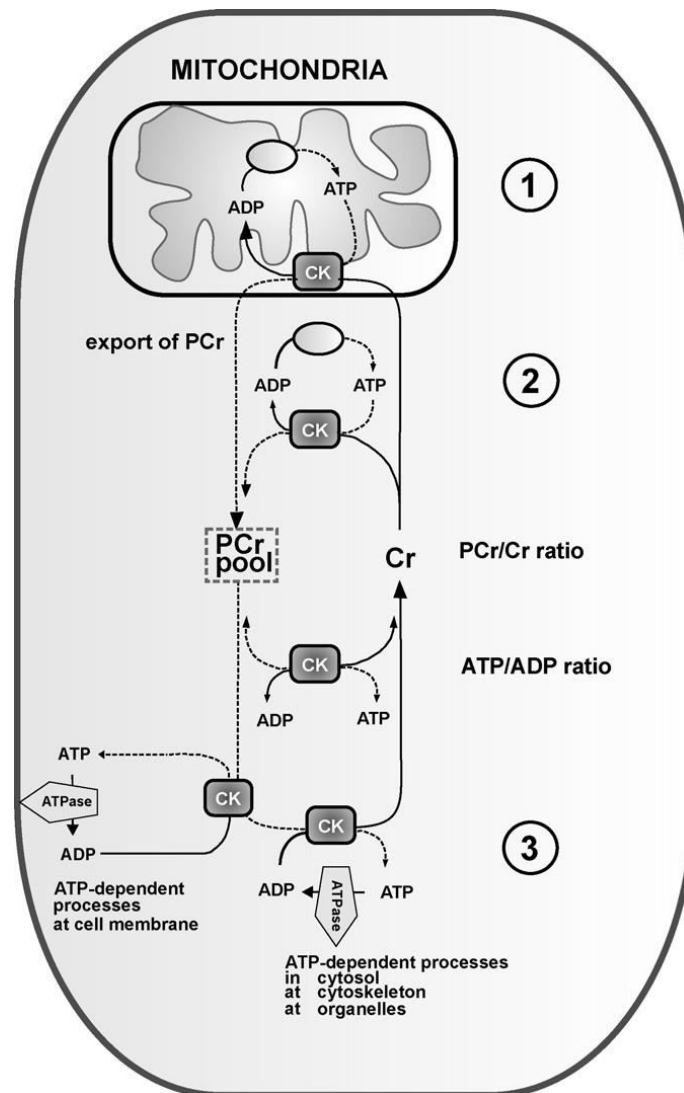
Η κρεατίνη (1-μεθυλ-γουανιδινο οξικό οξύ, Cr) φωσφορυλιώνεται αντιστρεπτά από την κρεατινική κινάση (CK), δεχόμενη μίας φωσφορικής ομάδας από το ATP (τελική κατάσταση φωσφορυλιωμένης κρεατίνης PCr). Όλα τα ισοένζυμα CK στο κύτταρο είναι γενικά συγκεντρωμένα σε στρατηγικά σημεία, όπου η κατανάλωση ATP είναι

υψηλή, ώστε να είναι αποτελεσματική η *in situ* ανατροφοδότηση σε ATP μέσω της φωσφοκρεατίνης (PCr) ή σε σημεία παραγωγής ATP ώστε να σχηματίζεται μία δεξαμενή PCr. Έτσι, είναι εμφανές ότι η κρεατίνη παίζει σημαντικό ρόλο ως φωσφογόνο, ως ρυθμιστής ουσιαστικά της κυτταρικής ενέργειας.^[56]

Η κρεατίνη έχει δειχθεί να είναι νευροπροστατευτική στη γήρανση, σε νευροεκφυλιστικές καταστάσεις καθώς και σε τραυματισμούς του εγκεφάλου. Ως κοινό μοριακό υπόβαθρο σε αυτές τις καταστάσεις βρίσκεται το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, βλάβη του μιτοχονδριακού DNA και διαταραγμένη ομοιόσταση της κυτταρικής ενέργειας. Στους νευρώνες, η αερόβια γλυκόλυση είναι η πρώτη πηγή σύνθεσης ATP. Καθώς όμως οι αποθήκες γλυκόζης, γλυκογόνου αλλά και οξυγόνου είναι περιορισμένες στον εγκέφαλο, το σύστημα κρεατινικής κινάσης/φωσφοκρεατίνης (CK/PCr) ίσως να δρα ως σημαντική ενεργειακή εναλλακτική σε ιστούς ή κύτταρα με αυξημένες, ταχέως εναλλασόμενες ενεργειακές απαιτήσεις, όπως είναι οι νευρώνες. Χαρακτηριστικό είναι ότι ο εγκεφαλικός ιστός καταλαμβάνει μόνο το 2% της σωματικής μάζας, αλλά καταναλώνει περίπου το 20% της συνολικής καταναλισκόμενης ενέργειας στο σώμα. Βασιζόμενες στην φωσφορυλίωση του υποστρώματος της αδενίνης με το CK/PCr σύστημα, οι αποθήκες ATP μπορούν να ανεφοδιάζονται γρήγορα, μέσα σε κάποια όρια, τα οποία τίθενται από τις συγκεντρώσεις της κρεατίνης/CPK του ιστού. Λαμβάνοντας υπόψη τις σχετικές υψηλές ενεργότητες κρεατινικής κινάσης CK στον εγκέφαλο, συμπεραίνεται ότι το ένζυμο αυτό συνεισφέρει σημαντικά στον ενεργειακό μεταβολισμό του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η ενεργότητα της CK έχει επίσης βρεθεί να παίζει ρόλο στην απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών, στην διατήρηση του δυναμικού της μεμβράνης και της αποκατάστασης των κλίσεων ιόντων κατά μήκος της μεμβράνης μετά την εκπόλωση.^[57] Επίσης, έχει δειχθεί ότι η κρεατίνη προάγει την διαφοροποίηση προδρόμων κυττάρων στο νευρικό σύστημα, που θα μπορούσε να παίζει ρόλο σε στρατηγικές κυτταρικής αντικατάστασης.

Η κρεατίνη συντίθεται σε έναν μηχανισμό δύο βημάτων: μέσω της AGAT (αμινοτρανσφεράση αργινίνης-γλυκίνης) στους νεφρούς και το πάγκρεας, από όπου το γουανιδινοοξικό μεταφέρεται στο ήπαρ, όπου και μεθυλιώνεται από την GAMT (μεθυλοτρανσφεράση του γουανιδινοοξικού) για να προκύψει κρεατίνη. Από εκεί η κρεατίνη μεταφέρεται ενεργώς σε ιστούς που απαιτείται ενεργειακά. Απώλεια της λειτουργίας της GAMT οδηγεί σε σύνδρομο έλλειψης κρεατίνης, αναπτυξιακές υστερήσεις, νευρολογικές διαταραχές και δυσλειτουργίες καθώς και νοητική υστέρηση. Στη νόσο του Huntigton μάλιστα, είναι μειωμένη η έκφραση της εγκεφαλικού τύπου CK, που ίσως οδηγεί σε βλάβες ενεργειακά απαιτητικών ιστών όπως ο εγκέφαλος και ο κοχλίας. Στη νόσο του Alzheimer η CK έχει βρεθεί να είναι σημαντικά απενεργοποιημένη λόγω της οξείδωσης.

Η ενδογενής de novo σύνθεση της κρεατίνης στον εγκέφαλο είναι χαμηλή, και είναι ενδιαφέρουσα η παρατήρηση πως η GAMT έχει ταυτοποιηθεί ως στόχος του p53, ως περαιτέρω μηχανισμός μεταβολικής καταπόνησης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, περίπου το 50% της συνολικής κρεατίνης εισέρχεται στον οργανισμό μέσω της διατροφής, και ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός επιτρέπει τη διέλευσή της από την συστηματική κυκλοφορία στον εγκέφαλο. Φθάνει στο νευρωνικό κυτταρόπλασμα μέσω ειδικών διαμεμβρανικών μεταφορέων εξαρτώμενων από Na^+ και Cl^- (CRT), που λειτουργούν ενάντια στην κλίση συγκέντρωσης.



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος CK/PCr (πηγή: Andres, Ducray, Schlattner, Wallimann, Widmer, 2008)

Σε πρόσφατες αναφορές επιχειρήθηκε να αναδειχθεί το δυναμικό της κρεατίνης ως ενισχυτής της υγείας και επιβίωσης των νευρώνων, μετά από πρόκληση καταπόνησης μέσω γλουταμινικού και H_2O_2 . Ο νευροπροστατευτικός ρόλος της κρεατίνης αναδείχθηκε δε περισσότερο σε ελέγχους μνήμης (memory tests). Προτάθηκε επίσης πως μία συγκεκριμένη διατροφή μπορεί να δράσει ως αποτελεσματική στρατηγική για την ενίσχυση της κρεατίνης του εγκεφαλικού ιστού

και την εγκαθίδρυση ενός ενεργειακού ρυθμιστή (energy buffer). Τα τελικά ευρήματα έδειξαν ότι παρόλο που η κρεατίνη δεν δρα ως αντιοξειδωτικός παράγοντας ούτε προστατεύει ενάντια στο οξειδωτικό στρες του H_2O_2 , ενισχύει το φορτίο κυτταρικής ενέργειας και προστατεύει ενάντια στην διεγερσιμοτοξικότητα, επώαση με αυτήν για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα δεν επάγει την κυτταροτοξικότητα, και περιορίζει την απόκριση του ασβεστίου, που ακολουθεί μετά από διέγερση των NMDA υποδοχέων (ο μηχανισμός αναλύεται παρακάτω). Ως δείκτης της κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε η διαρροή της γαλακτικής αφυδρογονάσης LDH κάτω από καταπόνηση με γλουταμινικό. Η τοξικότητα μετρίαζόταν σημαντικά σε κύτταρα που είχαν συνεπασθεί με κρεατίνη, εκτός από γλουταμινικό, που προκαλεί διεγερσιμοτοξικότητα (αναλύεται παρακάτω).^[57] Ως συμπέρασμα, ίσως η εξωγενής χορήγηση κρεατίνης σε αρχικά στάδια της νόσου, μετά από περαιτέρω *in vivo* μελέτες και κλινικές δοκιμές, να μειώσει ή να καθυστερήσει την σταδιακή πρόοδο της νόσου.

3. Ασβέστιο

3.1. Ομοίωση ασβεστίου στο κεντρικό νευρικό σύστημα

Στους νευρώνες το ασβέστιο παίζει κεντρικό ρόλο, τόσο ως μεταφορέας φορτίου, ικανό για αναγεννητική ηλεκτρική αντίδραση, όσο και ως δεύτερο μήνυμα σε κυτταρικές και πυρηνικές διεργασίες. Ως δεύτερο μήνυμα, μεταφέρει σήματα διαμέσου της αλληλεπίδρασής του με συγκεκριμένες πρωτεΐνες, επάγοντας διαμορφωτικές αλλαγές που οδηγούν σε ρύθμιση φαινομένων κυτταρικής πλαστικότητας και επιβίωσης. Η νευρωνική λειτουργία επομένως εξαρτάται από μία λεπτή ρύθμιση χρονικά και χωρικά των ιόντων ασβεστίου, της κλίσης συγκέντρωσής τους και των σχετιζόμενων πρωτεϊνών. Κατ' επέκταση, δυσλειτουργία της ομοίωσης ασβεστίου παραλλάσει την γρήγορη και σαφή ενεργοποίηση των νευρώνων, προκαλώντας έτσι προβλήματα στην λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος. Για παράδειγμα, αυξημένος ρυθμός της διαμεσολαβούμενης από ασβέστιο απόπτωσης μπορεί να προκαλέσει νευρωνικό θάνατο, υπογραμμίζοντας την αιτία για χρόνια νευροεκφυλιστικά νοσήματα.

Η έναρξη της σηματοδότησης από ασβέστιο ελέγχεται από δύο τύπους μέσων: την πλασματική μεμβράνη και ειδικευμένα ενδοκυτταρικά οργανίδια ή χώρους. Οι κινήσεις του ασβεστίου συμβαίνουν σε 4 διαμερίσματα: το συναπτικό χάσμα, το κυτταρόπλασμα, το ενδοπλασματικό δίκτυο (κυρίως το λείο), πυρηνικό φάκελο, εκκριτικά κυστίδια και τα μιτοχόνδρια. Αυτά τα διαμερίσματα οριοθετούν 3 φραγμούς οι οποίοι έχουν συγκεκριμένες πύλες που συσσωρεύουν ιόντα ασβεστίου, τα διατηρούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα και τα απελευθερώνουν μετά από ερέθισμα.^[58] Αυτοί οι 3 φραγμοί αντιστοιχούν:

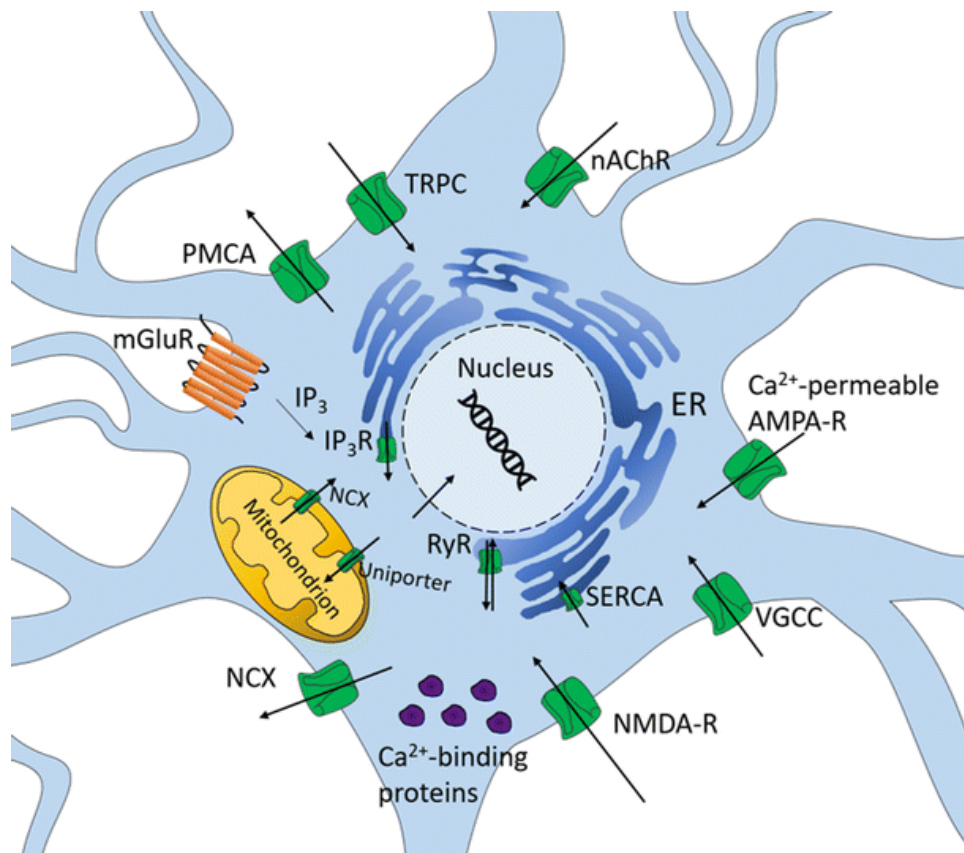
- 1) στην πλασματική μεμβράνη, όπου η είσοδος ασβεστίου καθορίζεται από ειδικούς συνδεσμο-εξαρτώμενους και τασεο-εξαρτώμενους διαύλους (ROCCs και VOCCs αντίστοιχα), μία Ca^{2+} ATPase (PMCA) και έναν αντιμεταφορέα $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (NCX). Στα νευρικά κύτταρα η είσοδος εξωκυτταρικού ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα εξαρτάται από τους διαύλους ROCC και VOCC. Οι διάυλοι ROCC εμπεριέχουν δύο υποτύπους ιονοτροπικών γλουταμινεργικών υποδοχέων, τον τύπο α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole προπιονικό οξύ ή AMPA υποδοχείς χωρίς την υπομονάδα GluR2 και τον τύπο N-methyl-D-aspartate ή NMDA. Η συναπτική απελευθέρωση γλουταμινικού οξέος ενεργοποιεί τους ιονοτροπικούς NMDA ή AMPA και το κύμα εισροής ασβεστίου αυξάνεται. Οι τασεοεξαρτώμενοι υποδοχείς είναι πολύ εξειδικευμένοι ώστε να επιτρέπουν μόνο είσοδο ιόντων ασβεστίου σε αλλαγές του μεμβρανικού δυναμικού.

Στην πλασματική μεμβράνη συναντώνται και οι NCX υποδοχείς, με 9 διαμεμβρανικές περιοχές, και οι οποίοι συζεύγνουν την εισροή/εκροή Ca^{2+} με την εκροή/εισροή Na^+ . Λειτουργούν και προς τις δύο κατευθύνσεις, και οι 3 εκφραζόμενες ισομορφές έχουν χαρακτηριστικό πρότυπο κατανομής στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Αποτελούν κύριο ρυθμιστή της ομοιοστασίας και των 2 αυτών ιόντων, και ο κύριος διεγέρτης τους ίσως να είναι η εκπόλωση ή η αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, μαζί με κάποιο ερέθισμα εξαρτώμενο από προσδέτη.^[59]

Οι PMCAs αποτελούν ακόμη έναν τρόπο διακίνησης ασβεστίου στο κύτταρο (Plasma membrane Ca^{2+} ATPases). Ενεργοποιούνται γρήγορα με την αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) και επηρεάζονται από την πρόσδεση Ca^{2+} - καλμοδουλίνης. Η καλμοδουλίνη είναι μία πρωτεΐνη εξαρτώμενη από το ασβέστιο, και προσδέεται σε αυτό.^[59, 60]

- 2) στα τοπολογικά συσχετιζόμενα ενδοπλασματικό δίκτυο-εκκριτικά κυστίδια-πυρηνικός φάκελος, που δημιουργούν ένα συνεχές μεμβρανών μέσα στο κύτταρο και έχουν κανάλια ασβεστίου που χειρίζονται από υποδοχείς τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3) και ρυανοδίνης, καθώς και μία Ca^{2+} ATPase (SERCA, θα αναλυθούν παρακάτω).
- 3) στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, η οποία έχει μονομεταφορέα Ca^{2+} , αντιμεταφορέα $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (NCX, συγκεκριμένα η ισομορφή NCX_{mito}) καθώς και διαπερατό πόρο. Οι ρόλοι αυτών είναι η ρύθμιση της συγκέντρωσης του ασβεστίου καθώς και των ενζύμων ευαίσθητα σε ασβέστιο, όπως η πυροσταφυλική και ισοκιτρική αφυδρογονάση. Γενικότερα τα μιτοχόνδρια λειτουργούν ως ρυθμιστές της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ασβεστίου,

καθώς και ως διαβιβαστές μηνύματος, με εκκίνηση το ασβέστιο, για απόπτωση.



Εικόνα 12: Τα συστατικά ομοίωσης ασβεστίου στα διάφορα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα (πηγή: Britzolaki, Saurine, Flaherty, Thelen, Pitychoutis, 2018)

Σε κάθε διαμέρισμα, μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών που προσδέουν ασβέστιο, με $K_d < 1 \mu M$, επιτρέπουν την αποθήκευση του ασβεστίου στον αυλό, αφήνοντας λιγότερο από 1% αυτού στην ελεύθερη ιονική μορφή του. Σε κατάσταση ηρεμίας υπό φυσιολογικές συνθήκες, η συγκέντρωση ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα είναι περίπου 100 nM σε σύγκριση με τον εξωκυττάριο χώρο όπου είναι της τάξης των 1-2 mM. Το γεγονός αυτό εξασφαλίζει υψηλή απόδοση στην ταχύτητα σηματοδότησης, λόγω της μεγάλης κλίσης συγκέντρωσης (περίπου 10.000 - 20.000 φορές μεγαλύτερη εξωκυτταρική από ενδοκυτταρική συγκέντρωση).^[59] Για να ξεκινήσει ένα σηματοδοτικό μονοπάτι ασβεστίου στο κύτταρο πρέπει η ενδοκυτταρική συγκέντρωση να φτάσει περίπου το 1 μM .

Μη κατάλληλα επίπεδα εισροής ιόντων ασβεστίου μέσω των υποδοχέων (για παράδειγμα των NMDA) μπορεί να συνδράμει στον θάνατο τον νευρώνων και σε παθολογικές καταστάσεις. Τέτοιες περιπτώσεις χαρακτηρίζονται ως διεγερσιμοτοξικότητα (excitotoxicity). Φαίνεται να οφείλεται σε απελευθέρωση γλουταμινικού, ενώ η διεγερσιμοτοξικότητα μέσω των AMPA υποδοχέων οφείλεται στην υπομονάδα GluR2, η οποία κανονικά εκλείπει.^[61] Η κατανόηση της μοριακής

βάσης αυτών των μηχανισμών θα οδηγήσει σε κατανόηση της ισορροπίας μεταξύ νευροπροστατευτικών και νευροκαταστρεπτικών ρόλων των NMDA υποδοχέων.^[59]

Ακόμη ένας τύπος υποδοχέων, είναι οι TRP υποδοχείς (transient receptor potential ion channel). Αυτοί ενεργοποιούνται από ένα εύρος ερεθισμάτων, όπως ενδο- και εξω-κυτταρικά σήματα, χημική, μηχανική ή ωσμωτική καταπόνηση και μερικοί από την κατάσταση κορεσμού στην οποία βρίσκονται ενδοκυτταρικές αποθήκες Ca^{2+} . Μέλος αυτής της υπερικογένειας είναι και η πρωτεΐνη Orai, η οποία θα συζητηθεί αργότερα. Οι υποδοχείς αυτοί παρέχουν οδούς στα Ca^{2+} ρυθμίζοντας την ωθούσα δύναμη για την είσοδό τους.^[59] Η δράση τους φέρει κοινά χαρακτηριστικά με τους μεταβολοτρόπους υποδοχείς mGluR, των οποίων η δράση επιτυγχάνεται μέσω της PLC (φωσφολιπάση C), η οποία ενεργοποιείται μέσω υποδοχέων συζευγμένων με G πρωτεΐνες ή μέσω υποδοχέων τυροσινικής κινάσης με αρχικό ερέθισμα το γλουταμινικό. Η διασύνδεση με την φωσφολιπάση γίνεται μέσω της διάσπασης του διφωσφορικού (PIP_2) σε διακυλογλυκερόλη και IP_3 . Η δράση αυτή ενεργοποιεί τους εξαρτώμενους από συνδέτη υποδοχείς του ενδοπλασματικού δικτύου IP_3R , οι οποίοι με τη σειρά τους μεσολαβούν στην απελευθέρωση ασβεστίου στον ενδοκυτταρικό χώρο, καταλήγουν δηλαδή και αυτοί σε αύξηση της $[Ca^{2+}]_i$. Αυτοί οι μηχανισμοί, επειδή αφορούν το ενδοπλασματικό δίκτυο, θα αναλυθούν περαιτέρω παρακάτω.^[60, 59]

3.2. Η ομοιόσταση ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Το ενδοπλασματικό δίκτυο λειτουργεί ως μία δυναμική δεξαμενή ιόντων ασβεστίου, και έτσι σχετίζεται με ταχεία γεγονότα σηματοδότησης από ερεθίσματα είτε ηλεκτρικά είτε χημικά. Αυτή η λειτουργία υποστηρίζεται από κανάλια απελευθέρωσης Ca^{2+} (IP_3R και RyR) καθώς και Ca^{2+} -ATPases, τα οποία εδράζονται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου.^[62] Επιπροσθέτως, το ενδοπλασματικό δίκτυο παρέχει ένα «τούνελ» μεταφοράς του ασβεστίου, έτσι ώστε αυτό να αποφύγει κυτταροπλασματικές οδούς.^[59] Η είσοδος των ιόντων ασβεστίου μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο πραγματοποιείται μέσω των Sarco-/ER Ca^{2+} ATPase (SERCA, συγκεκριμένα SERCA2 στο νευρικό σύστημα^[63]), ενάντια στην ηλεκτροχημική τους διαβάθμιση και μέσω υδρόλυσης ATP, μειώνοντας έτσι περαιτέρω την $[Ca^{2+}]_i$. Αντίθετα, η έξοδος γίνεται από τους υποδοχείς της 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3R) και τους υποδοχείς ρυανοδίνης (RyR). Οι IP_3R ενεργοποιούνται μέσω της πρόσδεσης της IP_3 , η οποία έχει προέλθει από την διάσπαση του διφωσφορικού, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί σε έξοδο Ca^{2+} από την αποθήκη του ενδοπλασματικού δικτύου μέσα στο κυτταρόπλασμα, αυξάνοντας την $[Ca^{2+}]_i$. Οι υποδοχείς ρυανοδίνης ενεργοποιούνται από την υψηλή $[Ca^{2+}]_i$ ώστε να απελευθερώσουν περισσότερα Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα, και αναστέλλονται από την ίδια την ρυανοδίνη. Όταν η συγκέντρωση στο κυτταρόπλασμα υπερβεί κάποια επίπεδα, είτε μεταφέρεται εκτός

νευρώνα μέσω PCMA και NCX, ή αντλείται πάλι μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο.^[63]

Οι SERCAs είναι τύπου-P ATPάσες, μεταφέροντας δύο Ca^{2+} από το κυτταρόπλασμα στον αυλό του λείου ενδοπλασματικού δικτύου για σχηματισμό ενός μορίου ATP.^[60, 63] Υπάρχει πληθώρα ισομορφών, ωστόσο η αλληλουχία τους είναι αρκετά συντηρημένη και εξαρτάται από την εναλλακτική συρραφή 3 γονιδίων με χαρακτηριστικά πρότυπα έκφρασης. Τα ιόντα ασβεστίου διαπερνούν την μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω μετάπτωσης των SERCAs σε μορφή υψηλής και χαμηλής συγγένειας με αυτά.

Στην ομοιοστασία του ασβεστίου σχετικά με το ενδοπλασματικό δίκτυο, σημαντικό ρόλο παίζει ακόμη μία ομάδα πρωτεϊνών. Πρόκειται για τα κανάλια SOC (Store-operated channels), που ανοίκουν στην υπεροικογένεια των TRPs. Αυτοί οι διάυλοι ενεργοποιούνται από τα χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης ασβεστίου στις αποθήκες. Η αύξηση της εισροής Ca^{2+} μέσα σε αυτές τις αποθήκες μέσω των SOC που έπεται, επαναφέρει στο φυσιολογικό τα επίπεδα συγκέντρωσης Ca^{2+} .^[61] Ένας τέτοιος διάυλος SOC στην πλασματική μεμβράνη είναι ο **Orai1**, και η υπεύθυνη πρωτεΐνη για την ανίχνευση των χαμηλών επιπέδων ασβεστίου είναι η **STIM** (Stromal interaction molecule). Συγκεκριμένα, η μείωση της συγκέντρωσης ασβεστίου μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο ευνοεί την αποσύνδεση του ασβεστίου από την πρωτεΐνη-αισθητήρα STIM, η οποία συσσωματώνεται και μεταφέρεται σε περιοχές του ενδοπλασματικού κοντά στην πλασματική μεμβράνη. Εκεί, η STIM και η Orai της πλασματικής μεμβράνης αλληλεπιδρούν, σε ομάδες ορατές στο οπτικό μικροσκόπιο, και από εκείνα τα σημεία θα εισέλθει ασβέστιο μέσα στο κυτταρόπλασμα ώστε η ενδοκυτταρική συγκέντρωσή του να επανέλθει στα φυσιολογικά επίπεδα. Έχει βρεθεί επίσης, πως οι SERCA συνεντοπίζονται στα ίδια σημεία με την STIM, έτσι ώστε να ευνοηθεί η απευθείας μεταφορά του νεοεισαχθέντος ασβεστίου μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, καθώς αυτός είναι ούτως ή άλλως ο τελικός του προορισμός.^[64] Όσον αφορά μεταβολικές διαταραχές, έχει βρεθεί ότι χρόνια υψηλή γλυκόζη αυξάνει την έκφραση των STIM και Orai μέσω του μονοπατιού Ca^{2+} -καλσινευρίνη-NFAT, που ακολουθείται από ενισχυμένη εισροή Ca^{2+} .^[65]

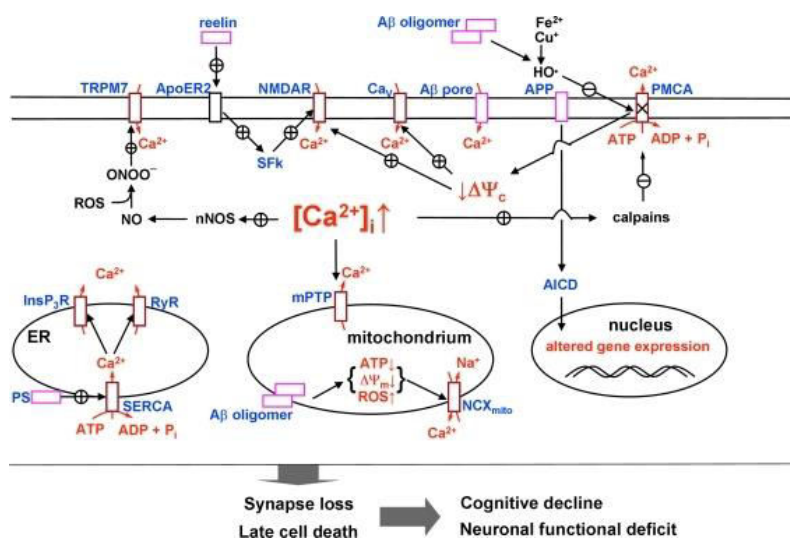
Η πρωτεΐνη STIM είναι εξαιρετικά συντηρημένη, σε όλες τις ισομορφές της, από την *Drosophila* μέχρι τα θηλαστικά.^[66] Είναι διαμεμβρανική τύπου I, με μία μικρή διαμεμβρανική περιοχή, μία περιοχή 22 kD προς τον αυλό του ενδοπλασματικού και μία 51 kD προς το κυτταρόπλασμα. Η επικράτεια που αλληλεπιδρά με το ασβέστιο υπό φυσιολογικές συνθήκες ανήκει στην περιοχή που ευρίσκεται προς την πλευρά του αυλού και ονομάζεται cEF (canonical EF-hand), και είναι αυτή που ουσιαστικά λειτουργεί ως αισθητήρας ιόντων ασβεστίου.^[67] Η πρωτεΐνη Orai1 έχει μοριακό βάρος 33 kD, και διαθέτει 4 διαμεμβρανικές περιοχές. Η ενεργοποίησή της

πραγματοποιείται μέσω των κυτταροπλασματικών αμινοτελικών ουρών της (επικράτεια TM1) μέσω αλληλεπίδρασης με την καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης STIM.^[66]

Ένας παράγοντας που διαταράσσει την ομοιόσταση ασβεστίου είναι η Thapsigargin ή θαψιγκαργκίνη. Πρόκειται για ένα μεταβολικό προϊόν του φυτού *Thapsia garganica*. Γενικότερα έχει τοξική δράση, και δείχνει να επάγει την καρκινογένεση στα κύτταρα θηλαστικών.^[68] Η thapsigargin αυξάνει άμεσα την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου μέσω αναστολής των SERCA αντλιών.^[69] Η δράση του χαρακτηρίζεται ως όμοια ορμονών (hormone-like) και αναστέλλει όλες τις ισομορφές της οικογένειας αντλιών SERCA με ίση αποτελεσματικότητα, αδειάζοντας όλη την ενδοκυττάρια αποθήκη ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα. Επίσης, καταργεί την εισροή ασβεστίου και την ενεργότητα ATPάσης του σαρκοπλασματικού δικτύου αλλά δεν έχει καμία δράση στις αντίστοιχες ATPάσες την πλασματικής μεμβράνης ή τις Na/K – ATPάσες. Η αλληλεπίδραση της thapsigargin με τις SERCA ισομορφές είναι ταχεία, στοιχειομετρική και κυρίως μη αντιστρεπτή, επομένως αλληλεπιδρά με συγκεκριμένη περιοχή που ευρίσκεται μόνο σε αυτήν την οικογένεια αντλιών.^[70]

3.3. Δυσλειτουργία της σηματοδότησης μέσω Ca^{2+} και η νόσος του Alzheimer

Ένας συνδετικός κρίκος ανάμεσα στην σηματοδότηση μέσω Ca^{2+} και του σχηματισμού Αβ είναι η γ -σεκρετάση, καθώς συμμετέχει τόσο στο σχηματισμό του Αβ όσο και στην προσυναπτική απελευθέρωση νευροδιαβιβαστή και την ρύθμιση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} . Κεντρικό ρόλο στην νευροεκφυλιστική νόσο παίζει η ικανότητα των νευρώνων να ρυθμίζουν ορθά την ενδοκυτταρική συγκέντρωση Ca^{2+} .



Εικόνα 13: Διασύνδεση Αβ και δυσλειτουργίας Ca^{2+} (πηγή: Zündorf, Reiser, 2011)

Έτσι, τοξικές μορφές Αβ ίσως να επάγουν την εισροή ασβεστίου μέσω του σχηματισμού ολιγομερούς πόρου στην πλασματική μεμβράνη (ίσως με τη βοήθεια φωσφατιδυλοσερίνης), καθιστώντας τον νευρώνα ευαίσθητο στην

διεγερσιμοτοξικότητα και την απόπτωση, διαμεσολαβούμενη από το ασβέστιο. Αυτή η ικανότητα σχηματισμού πόρων είναι όμοια με τον αντίστοιχο μηχανισμό βακτηριακών τοξινών αλλά και την λεμφοκυτταρική περφορίνη.^[71] Το Αβ αλληλεπιδρά με ιόντα σιδήρου και χαλκού προς παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και υδροξυλικών ριζών, έχοντας ως αποτέλεσμα την υπεροξειδωση λιπιδίων της μεμβράνης, την εκπόλωση της μεμβράνης και την απορύθμιση των PMCA και των NMDA, οδηγώντας έτσι σε αυξημένη εισροή ασβεστίου. Επιπροσθέτως, το Αβ αλληλεπιδρά και με τα μιτοχόνδρια, τα οποία παίζουν κρίσιμους ρόλους στην ομοιοστασία του ασβεστίου^[59], και υπάρχουν ενδείξεις ότι οι πρεσινελίνες ρυθμίζουν την ΑΤΡάση SERCA, αυξάνοντας την απελευθέρωση ασβεστίου μέσα στο ενδοπλασματικό, και ακολούθως την απελευθέρωση ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα μέσω των RyR.^[71] Έτσι, ενδιαφέρον είναι ότι η πρώτη κλινική ένδειξη μεταλλαγών των πρεσινελινών είναι η υπερδιοχέτευση του ενδοπλασματικού με ιόντα ασβεστίου, γεγονός που θα μπορούσε να οφείλεται είτε στις SERCA είτε σε εξασθένιση διαρρών. Εκτός αυτού, έχει βρεθεί ότι ίσως οι SERCA να ευθύνονται εν μέρει για τον σχηματισμό του Αβ από την APP, καθώς μέρος της πέψης αυτής συμβαίνει στο ενδοπλασματικό δίκτυο.^[63] Έχει μελετηθεί όμως και η εμπλοκή της APP στην λειτουργία της πρωτεΐνης STIM, του αισθητήρα του ενδοπλασματικού για ιόντα ασβεστίου. Συγκεκριμένα, σε κύτταρα μετά από σίγηση της APP, βρέθηκε καθυστέρηση της μετάβασης της STIM1 στην Orai1 κατά την εξάντληση του ενδοπλασματικού από ασβέστιο, μέσω αναστολής των SERCA. Ως αποτέλεσμα, τα επίπεδα συγκέντρωσης ασβεστίου στο ενδοπλασματικό σε κατάσταση ηρεμίας ήταν αυξημένα, ακόμη ένα εύρημα που υποδεικνύει έναν ρυθμιστικό ρόλο της APP στην ομοιόσταση ασβεστίου.^[72] Ταυτόχρονα, έχει βρεθεί και το ακριβώς αντίστροφο, δηλαδή έκφραση μεταλλαγμάτων της STIM1 που συστηματικά υπερενεργοποιούν την είσοδο ασβεστίου λόγω εξάντλησης των δεξαμενών του ενδοπλασματικού, μειώνουν τον σχηματισμό του Αβ από την APP.^[73]

του ATP διασυνδέεται με τις αντλίες SERCA, καθώς αυτές έχουν λιγότερο υπόστρωμα (ATP), ώστε να μπορέσουν να αντλήσουν Ca^{2+} μέσα στο ενδοπλασματικό, το οποίο συνεισφέρει περαιτέρω στην συσσώρευση Ca^{2+} στο κυτοσόλιο και εξηγεί την χαμηλή συγκέντρωσή του στο ενδοπλασματικό.^[76]

4. Σηματοδοτικά μονοπάτια

Ο όρος μεταγωγή σήματος προσδιορίζει τις κυτταρικές διεργασίες με τις οποίες τα φυσικά ή χημικά ερεθίσματα επάγουν συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες, δια μέσου ενεργοποίησης επιλεγμένων μοριακών μηχανισμών. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι ικανά να ανταποκρίνονται σε πολλές εξωγενείς πληροφορίες, με πιο χαρακτηριστικές τις στεροειδείς ορμόνες, τις πολυπεπτιδικές ορμόνες και τις κυτταροκίνες. Ο μηχανισμός μεταγωγής σήματος περιλαμβάνει συνήθως πέντε διακριτά βήματα, τα οποία ρυθμίζουν λειτουργίες όπως η επιβίωση, η διαίρεση και η διαφοροποίηση. Τα στάδια αυτά είναι η σύνδεση του σήματος με τον κατάλληλο υποδοχέα, η ενεργοποίηση του υποδοχέα, η μεταγωγή του σήματος, η ενεργοποίηση τελεστών και ενίσχυση του σήματος και τέλος η κυτταρική απόκριση. Η ειδικότητα της κυτταρικής απόκρισης στο τέλος του μονοπατιού εξαρτάται κυρίως από το είδος του υποδοχέα που αρχικά θα ενεργοποιηθεί από το ερέθισμα, το οποίο πολύ συχνά είναι ένας προσδέτης. Οι υποδοχείς μπορεί να είναι τόσο διαμεμβρανικές όσο και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (πχ οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών). Όταν πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, αυτές μπορεί να είναι είτε ιοντικοί υποδοχείς, είτε υποδοχείς που αλληλεπιδρούν με G-πρωτεΐνες ή υποδοχείς με ενεργότητα ενζύμου. Μετά την ενεργοποίηση, ο υποδοχέας πυροδοτεί την διάδοση δευτέρων μηνυμάτων, όπως το ασβέστιο, η φωσφολιπάση C, η διάσπαση του διφωσφορικού (PIP_2) σε διακυλογλυκερόλη (DAG) και IP_3 , το cAMP. Η ενεργοποίηση αυτή μεταδίδει την πληροφορία προς το εσωτερικό του κυττάρου, ενεργοποιώντας διαδοχικά κινήσεις, από τις οποίες συχνά η κάθε μία έχει ως υπόστρωμα την ανενεργή μορφή της επόμενης στο μονοπάτι κίνησης, την οποία και φωσφορυλιώνει ώστε να την καταστήσει ενεργή κίνηση. Ένα πολύ σημαντικό σηματοδοτικό μονοπάτι είναι το PI3K/Akt.^[78]

4.1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt

Η Akt ή πρωτεϊνική κινάση B (PKB), είναι μία κινάση σερίνης θρεονίνης που παίζει βασικό ρόλο στην επιβίωση, μεταβολισμό, μεταγραφική ρύθμιση και πολλαπλασιασμό του κυττάρου, ειδικά στα σηματοδοτικά μονοπάτια που έχουν ως ερέθισμα αυξητικούς παράγοντες ή ινσουλίνη. Εξαρτάται από το cAMP ανήκοντας στην οικογένεια AGC κινασών, οι οποίες έχουν ομόλογη καταλυτική επικράτεια. Η Akt και το μονοπάτι PI3K/Akt ξεκίνησε αρχικά να μελετάται έντονα λόγω του ρόλου του στον καρκίνο, αλλά και στον διαβήτη. Σε πολλούς τύπους καρκίνου παρατηρείται υπερενεργοποιημένη Akt, καθώς ταυτόχρονα αυξάνονται η κυτταρική

επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός, και η κινάση αυτή ευθύνεται αρκετά για την εξέλιξη ενός όγκου.^[68]

Έχουν βρεθεί 3 ισομορφές (PKBα/Akt1, PKBβ/Akt2 και PKBγ/Akt3) με συντηρημένη δομή: μία αμινοτελική επικράτεια ομολογίας πλεκστρίνης (Pleckstrin homology, PH), μία κεντρική επικράτεια με δράση κινάσης, όμοιο με αυτό των PKA και PKC, και μία καρβοξυτελική επικράτεια των περίπου 40 αμινοξέων (και στις 3 ισομορφές) που περιέχει ένα υδροφοβικό μοτίβο, χαρακτηριστικό των AGC κινασών.

Οι κινάσες της 3-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (PI3K), σχηματίζουν ετεροδιμερικά ένζυμα, που περιέχουν μία καταλυτική και μία ρυθμιστική υπομονάδα. Οι καταλυτικές υπομονάδες αυτής της τάξης ενζύμων χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες, την Ia και την Ib. Κάθε καταλυτική υπομονάδα κατέχει μία αμινοτελική επικράτεια που προσδένεται σε πρωτεΐνες Ras και μία καρβοξυτελική επικράτεια με ενεργότητα κινάσης φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, ώστε να καταλύει την μετατροπή του PIP₂ σε PIP₃.^[79]

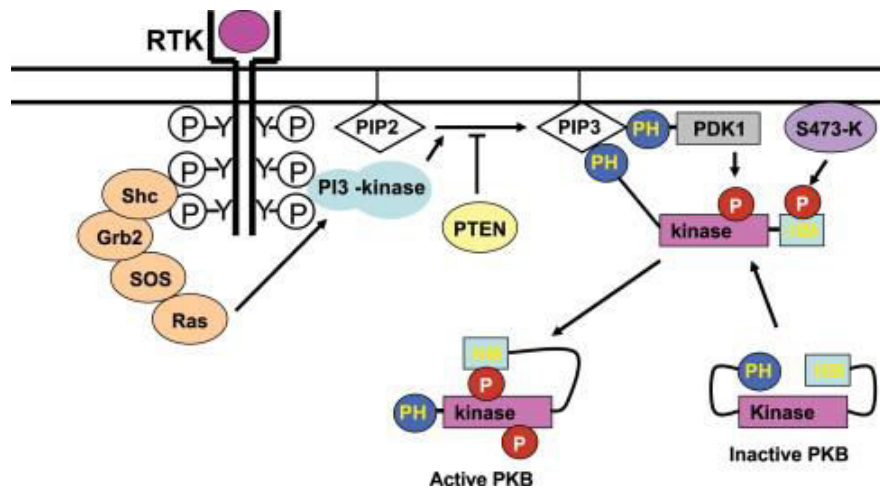
4.2. Ρύθμιση της ενεργοποίησης της PKB/Akt

Η PH περιοχή αλληλεπιδρά με προϊόντα λιπιδίων της μεμβράνης, όπως η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη που παράγεται από την PI3K. Η κεντρική περιοχή με δράση κινάσης της Akt μοιράζεται μεγάλη ομοιότητα με άλλες AGC κινάσες, όπως η PKA. Η ενζυμική αυτή δράση κινάσης ενεργοποιείται μετά από φωσφορυλίωση ενός συντηρημένου καταλοίπου θρεονίνης. Για πλήρη ενεργοποίηση της δράσης κινάσης είναι απαραίτητη και η φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα σερίνης (Ser473) ή θρεονίνης (Thr308) στο υδροφοβικό μοτίβο της καρβοξυτελικής περιοχής. Στις ισομορφές θηλαστικών αυτό το μοτίβο είναι ακριβώς ταυτόσημο, και θεωρείται πολύ σημαντικό, καθώς μεταλλάγματα διαγραφής στο μοτίβο καταστρέφουν τελείως την ενζυμική λειτουργία. Ενδιαφέρον είναι ότι η ισομορφή PKBγ/Akt3 στον ποντικό και η PKBγ-1 μορφή από εναλλακτική συρραφή στον άνθρωπο, δεν περιέχουν το μοτίβο, γεγονός που υποδεικνύει ότι η Akt μπορεί να ενεργοποιείται με μηχανισμό ανεξάρτητο της φωσφορυλίωσης.

Η πλήρης ενεργοποίηση της Akt είναι μία διαδικασία με πολλά βήματα και αρκετές εμπλεκόμενες πρωτεΐνες. Αρκετά ερεθίσματα μπορούν να επάγουν την ενεργοποίηση, μέσω πρόσδεσης σε υποδοχείς τυροσινικών κινάσεων, όπως οι υποδοχείς αυξητικού παράγοντα αιμοπεταλίων (PDGF-R), ινσουλίνης, επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF-R), βασικού αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (bFGF-R), καθώς και αυξητικού παράγοντα όμοιου με ινσουλίνη (insulin-like growth factor, IGF-I). Από τους πιο σημαντικούς ενεργοποιητές της είναι η πρωτεΐνη PI3K, της οποίας η ρυθμιστική υπομονάδα προσδένεται σε φωσφοτυροσινικά μοτίβα, τα οποία βρίσκονται σε ενεργοποιημένους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης, όπως και στα υποστρώματά τους, για παράδειγμα το υπόστρωμα του υποδοχέα ινσουλίνης (Insulin receptor substrate, IRS-1). Άλλες ισομορφές ρυθμιστικών υπομονάδων PI3K

προσδένονται μόνο σε πρωτεΐνες G. Η μικρή GTP-προσδένουσα πρωτεΐνη Ras μπορεί να αλληλεπιδράσει στην καταλυτική υπομονάδα της PI3K μέσω του προσαρμοστικού συμπλόκου Shc-Grb2-SOS. Ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησής της, η PI3K καταλύει την μετατροπή του PIP₂ σε PIP₃. Ένας ανεξάρτητος από την PI3K τρόπος ενεργοποίησης της Akt είναι μέσω του ασβεστίου. Τα Ca²⁺ συνδεόμενα με μόρια καλμοδουλίνης, ενεργοποιούν την κινάση της εξαρτώμενης από Ca²⁺/καλμοδουλίνη κινάσης (CaMKK), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την Akt στην Thr308.^[68]

Η ενεργοποίηση της Akt από αυτούς τους προσδέτες εμποδίζεται από αναστολείς της PI3K, όπως η βορτμαννίνη, η οποία εμποδίζει την φωσφορυλίωση στην Ser473 και την Thr308. Επίσης, η παραγωγή φωσφοϊνσιτιδίων (PIP₃) από την κινάση του PI3 αναιρείται από φωσφατάσες των φωσφοϊνσιτιδίων. Η δεύτερη πιο συχνά μεταλλαγμένη ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, ομόλογη φωσφατάσης και τενσίνης, που είναι διεγραμμένη από το χρωμόσωμα 10, (PTEN), έχει ενεργότητα φωσφατάσης 3'-φωσφοϊνσιτιδίων. Ενεργοποίηση της PTEN οδηγεί σε μη ενεργοποίηση της PKB, καθώς αναιρεί την δράση της PI3K.



Εικόνα 15: Η ενεργοποίηση της Akt/PKB (πηγή: Hanada, Feng, Hemmings, 2004)

Το σχηματιζόμενο PIP₃ οργανώνει την Akt/PKB, την PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) και πιθανόν την κινάση σερίνης 473 κοντά στην πλασματική μεμβράνη. Η PDK1 καθορίστηκε και ταυτοποιήθηκε ως υπεύθυνη για την φωσφορυλίωση της Thr308, μέσω μίας σχηματιζόμενης θηλιάς.^[79, 80] Η πρωτοταγής δομή της ως κινάση είναι παρόμοια με την δομή άλλων κινασών της οικογένειας των AGC και έχει και αυτή, όπως η Akt, PH επικράτεια στην καρβοξυτελική της περιοχή. Έχει προταθεί ότι ίσως η PH επικράτεια της Akt να κρύβει το κατάλοιπο της θρεονίνης από την PDK1, ως αναστολέας της φωσφορυλίωσης. Ο συνεντοπισμός των δύο κινασών είναι απαραίτητος για την δράση της PDK1 πάνω στην Akt. Το επόμενο κατάλοιπο που πρέπει να

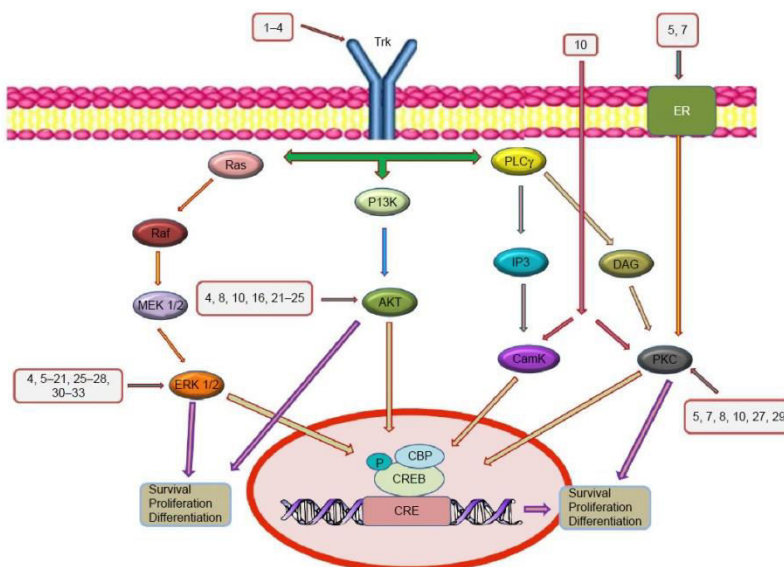
φωσφορυλιωθεί για την πλήρη ενεργοποίηση της Akt είναι η Ser473, δράση που αναλαμβάνει η κινάση της. Ίσως η PDK1 να εμπλέκεται εμμέσως σε αυτήν την διαδικασία, και υπό συνθήκες φαίνεται ακόμη και η ίδια η Akt να αυτοφωσφορυλιώνεται.^[79]

Μόνο η πρώτη φωσφορυλίωση, δηλαδή αυτή της Thr308, είναι αρκετή για να ενεργοποιήσει αρκετά την Akt, ώστε αυτή να φωσφορυλιώσει με τη σειρά της την TSC-2 (Tuberous sclerosis complex protein 2), ώστε να οδηγήσει σε αποικοδόμηση του ογκοκατασταλτικού συμπλόκου TSC-2 – TSC-1. Το γεγονός αυτό ενεργοποιεί με την σειρά του τον mTORC1 (ο στόχος της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά, mammalian target of rapamycin, ρυθμιστής της μετάφρασης) μέσω απευθείας φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης της περιοχής του πλούσιας σε προλίνη (proline-rich Akt substrate of 40 kD, PRAS40). Τα υποστρώματα του mTORC1 περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη που προσδένεται στον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης στα ευκαρυωτικά (4EBP1) και κινάσες ριβοσωμικών πρωτεϊνών που επάγουν την μετάφραση και την κυτταρική διαίρεση.^[80] Επομένως, είναι ξεκάθαρο πως ακόμη και μερική ενεργοποίηση της Akt επάγει την κυτταρική διαίρεση. Αντίθετα, ο mTORC2 μπορεί να εμπλέκεται στην φωσφορυλίωση του καταλοίπου Ser473 της Akt. Η πλήρης ενεργοποίηση της Akt, μέσω φωσφορυλίωσης της Ser473, οδηγεί σε περαιτέρω γεγονότα φωσφορυλίωσης, τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα, προς διαδικασίες επιβίωσης, αγγειογένεσης, μεταβολισμού, αύξησης, διαίρεσης, πρωτεϊνοσύνθεσης, μεταγραφής και απόπρωσης. Τα γεγονότα αυτά περιλαμβάνουν και την απενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών FoxO (Forkhead)^[80], των κασπασών ως εναύσματα της απόπτωσης, καθώς και των BAD (Bcl-2/Bcl-X antagonist), οι οποίες προσδένονται στις Bcl και εμποδίζουν την αντι-αποπτωτική τους δράση. Ένας ακόμη από τους κύριους στόχους, και εμπλοκή της Akt στον μεταβολισμό της γλυκόζης, είναι η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3 (GSK3), η οποία όταν απενεργοποιείται δεν φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την συνθάση του γλυκογόνου ως απόκριση στην ινσουλίνη. Η Akt όμως εμπλέκεται και στην αναστολή της απόπτωσης διαμεσολαβούμενης από το Ca²⁺ όταν αυτό μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια και πυροδοτεί προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η Akt δείχθηκε πως μπορεί να φωσφορυλιώνει όλες τις ισομορφές IP₃R, και έτσι να μειώνει την ποσότητα Ca²⁺ που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, προστατεύοντας το κύτταρο από αυτόν τον τύπο απόπτωσης. Σε κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y που εκφράζουν μόνο τον τύπο III των IP₃R η Akt αναλαμβάνει τον προαναφερθέντα ρόλο, με ταυτόχρονη διατήρηση της ακεραιότητας των μιτοχονδρίων.^[81]

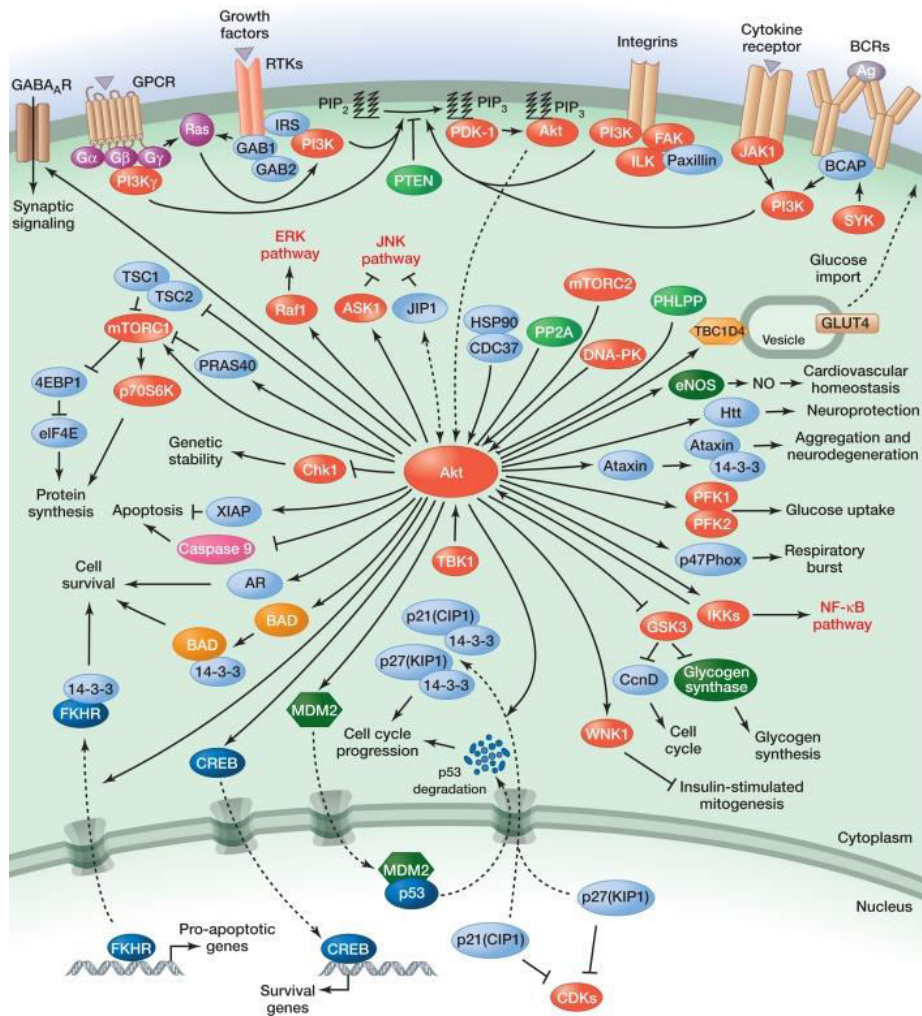
Άλλα υποστρώματα της PKB/Akt είναι διάφορες HSP, ιδιαίτερα η HSP27, πρωτεΐνες θερμικού σοκ αλλά και μοριακοί συνοδοί, η Grb10 που προσδένονται σε κατάλοιπα τυροσίνης σε υποδοχείς EGF, η κερατίνη K10 του κυτταροσκελετού, η Tcl1 σε στάδια αιμοποίησης T και B λεμφοκυττάρων και πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον

κυτταρικό κύκλο, όπως στόχοι του p53 (p21/cip1/waf1 και η λιγάση E3 της ουβικουΐτινης) και η Trb3 που προσδένεται στην cdc25. Πολύ ενδιαφέρον είναι ότι στόχος της PKB/Akt είναι και η χαντιγκτίνη, το γονίδιο υπεύθυνο για την νευροεκφυλιστική νόσο του Huntigton. Φωσφορύλιωση αυτού μειώνει την συσσωμάτωση της πρωτεΐνης χαντιγκτίνης που περιέχει πολυγλουταμίνη, αναστέλλοντας την απόπτωση. Το ακριβώς αντίθετο αποτέλεσμα έχει στην πρωτεΐνη αταξίνη-1, της οποίας το γονίδιο με τις αντίστοιχες επαναλήψεις τρινουκλεοτιδίου ευθύνεται για την ασθένεια νωτιαιοπαρεγκεφαλιδική αταξία τύπου 1 (Spinocerebellar ataxia type 1, SCA1). Φωσφορύλιωσή της από την PKB σταθεροποιεί τα συσσωματώματα, επάγοντας κυτταρικό θάνατο.

Η δράση της Akt επεκτείνεται και στον πυρήνα, ενεργοποιώντας τους μεταγραφικούς παράγοντες NFκB και CREB. Ο NFκB είναι παράγοντας-κλειδί στην ρύθμιση της ανοσολογικής απόκριση και απορύθμισή του οδηγεί σε ασθένειες όπως αυτοάνοσα και καρκίνος. Τις περισσότερες φορές η ενεργοποίησή του εξαρτάται από την φωσφορύλιωση και αποικοδόμηση του IκB, ενός αναστολέα του NFκB, από το σύμπλοκο κινασών IκB. Η Akt ρυθμίζει την ενεργότητα αυτού του συμπλόκου οδηγώντας τελικώς σε ενεργοποίηση του NFκB και παρεμπόδιση της απόπτωσης, μέσω γονιδίων επιβίωσης που μεταγράφονται από αυτόν. Ο μεταγραφικός παράγοντας CREB (cyclic AMP-response element binding protein), φωσφορυλιώνεται επίσης από την Akt, και το γεγονός αυτό οδηγεί σε αυξημένη συγγένεια του CREB με τον συνενεργοποιητή του CRB, και ακολούθως αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα. Ωστόσο, ακόμη δεν έχει αποδειχθεί ένας συγκεκριμένος μηχανισμός που η δράση αυτή οδηγεί σε αυξημένη κυτταρική επιβίωση.



Εικόνα 16: Η ενεργοποίηση του CREB από την Akt



Εικόνα 17: Γεγονότα ενεργοποίησης της PKB/Akt και οι κυτταρικές λειτουργίες που ρυθμίζει (πηγή: Hemmings, Restuccia, 2012)

Αρνητικοί ρυθμιστές είναι η πρωτεϊνική φωσφατάση 2 (PP2A) και οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες που περιέχουν επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη και PH επικράτεια (PH-domain leucine-rich-repeat-containing protein phosphatases, PHLPP1/2).^[80] Μάλιστα, ακριβώς επειδή η PP2A αναστέλει την δράση του μονοπατιού σηματοδότης PI3K/Akt που μπορεί να έχει ως έναρξη την ινσουλίνη, βρίσκεται πως είναι υπερενεργοποιημένη σε περιπτώσεις διαβήτη, όπου επικρατεί μία κατάσταση αντίστασης στην ινσουλίνη. Το γεγονός αυτό δείχνει πως το ερέθισμα που εκκινεί η προσδεδεμένη στους υποδοχείς της ινσουλίνης, διακόπτεται κατά την μετάδοση του σήματός του, λόγω της υπερενεργοποίησης του φυσικού αναστολέα του μονοπατιού. Παρόμοια ευρήματα αφορούν και τον παράγοντα PHLPP1 και 2, ο οποίος αποφωσφορυλιώνει την Akt, καθώς και ανωμαλίες στον PTEN που αναφέρθηκε νωρίτερα.^[82 BOUCHER] Η απενεργοποίηση του μονοπατιού από οποιονδήποτε από τους δύο παράγοντες έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ενεργότητας της κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου GSK3. Αυτό οδηγεί σε μειωμένη σύνθεση γλυκογόνου και μεταφοράς γλυκόζης.^[80]

II. Σκοπός

Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, και στην προκειμένη περίπτωση η νόσος του Alzheimer, είναι από τις πιο ενδιαφέρουσες και είναι ευρέως αποδεκτή η άποψη πως στο μέλλον θα προσβάλουν όλο και περισσότερους ανθρώπους. Μαζί με τον καρκίνο και τα καρδιαγγειακά νοσήματα, είναι από τις πιο συχνές νόσους στον ανθρώπινο πληθυσμό, και αποτελεί μεγάλη πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα η διερεύνηση των μηχανισμών εμφάνισής τους. Εξίσου μεγάλο επίτευγμα θα είναι η εύρεση αποτελεσματικών θεραπευτικών ή και προληπτικών προσεγγίσεων, καθώς και βιοδείκτες για την έγκαιρη διάγνωσή τους.

Από τους πιο κρίσιμους παράγοντες που παίζουν ρόλο στην εκδήλωση νευροεκφυλισμού είναι η γήρανση, με τις άμεσες συνέπειες αυτής. Σε ηλικιωμένα άτομα με νόσο του Alzheimer παρατηρείται μία σειρά συμπτωμάτων που σχετίζεται με την ηλικία, όπως η μειωμένη παροχή γλυκόζης αλλά και υποοξυγόνωση του εγκεφάλου. Μείωση της παρεχόμενης γλυκόζης συνεπάγεται και μειωμένη παραγωγή και ελαττωματική διαχείριση του ATP, επομένως και περιορισμό της διαθέσιμης ενέργειας στον εγκέφαλο, έναν από τους ιστούς με τις μεγαλύτερες ενεργειακές απαιτήσεις. Για όλους τους παραπάνω λόγους, η νόσος του Alzheimer έχει αποκαλεσθεί απο πολλούς ως διαβήτη τύπου III, καθώς η γενική μείωση διαθέσιμης ενέργειας ομοιάζει αρκετά τις συνθήκες αντίστασης στην ινσουλίνη. Γι'αυτούς τους λόγους, θελήσαμε στην παρούσα διπλωματική εργασία να μελετήσουμε την απόκριση νευρικών κυττάρων μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών σε αυτούς ακριβώς τους παράγοντες, δηλαδή την ινσουλίνη, την υποξία αλλά και την στέρση γλυκόζης.

Ταυτόχρονα, τα ιόντα Ca^{2+} φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον νευροεκφυλισμό, καθώς συμμετέχουν σε έναν μεγάλο αριθμό βιολογικών κυτταρικών λειτουργιών. Ο ανώμαλος εντοπισμός τους ή οι μη φυσιολογικές συγκεντρώσεις τους είναι από τα πιο κοινά ευρήματα σε νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Ο ρόλος των ιόντων Ca^{2+} κατά τις διαδικασίες στέρσης γλυκόζης ή αντίστασης στην ινσουλίνη σε νευρικά κύτταρα ακόμη διερευνάται, αλλά σίγουρα συμμετέχει στη δημιουργούμενη τοξικότητα. Αυτός ήταν και ο λόγος που στην εργασία αυτή μελετήθηκε η πρωτεΐνη STIM, ο αισθητήρας του κυττάρου για ιόντα ασβεστίου. Μεταβολές στις ποσότητες ή στη διανομή του ασβεστίου επηρεάζουν επίσης σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το PI3K/Akt που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, το οποίο ταυτόχρονα ενεργοποιείται και από την ινσουλίνη. Το μονοπάτι αυτό σχετίζεται στενά με την κυτταρική επιβίωση, και γι'αυτόν το λόγο μελετήθηκαν οι διακυμάνσεις της φωσφορυλιωμένης μορφής της Akt (pAkt), ενός από τα πρώτα βήματα στην ενεργοποίηση του μονοπατιού. Η μελέτη αυτής της πρωτεΐνης, αλλά και του μεταγραφικού παράγοντα pCREB, υπεύθυνου για τη μεταγραφή γονιδίων σχετιζόμενων με το ασβέστιο, έγινε υπό συνθήκες που είναι γνωστό ότι

διαδραματίζουν κάποιον ρόλο στον νευροεκφυλισμό, όπως η στέρση γλυκόζης, η ινσουλίνη, οι διακυμάνσεις του ενδοκυτταρικού ασβεστίου μέσω εκκένωσης του ενδοπλασματικού δικτύου από τα ιόντα αυτά καθώς και η υποξία.

Δεν θα μπορούσε να παραβλεφθεί ο τεράστιος ρόλος της προδρόμου πρωτεΐνης του αμυλοειδούς, APP. Γι' αυτόν τον σκοπό, τα παραπάνω πειράματα πραγματοποιήθηκαν τόσο σε κύτταρα νευροβλαστώματος που εκφράζουν κανονικά την APP όσο και σε αντίστοιχα κύτταρα στα οποία η έκφρασή της έχει σιγηθεί με shRNA. Έτσι, θελήσαμε να συγκρίνουμε τις αποκρίσεις των διαφορετικών κυτταρικών σειρών στους προαναφερθέντες παράγοντες, και να διερευνήσουμε πιθανές διαφορές ανάμεσα σε κύτταρα που εκφράζουν ή όχι την APP. Απώτερος σκοπός των πειραμάτων αυτών, ήταν να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για το εάν η APP διαμεσολαβεί κάποιες από τις διαδικασίες σηματοδότησης τόσο όσον αφορά τις σχετιζόμενες με διαβήτη συνθήκες, δηλαδή στέρση γλυκόζης και ινσουλίνη, όσο και τις σχετιζόμενες με τα ιόντα Ca^{2+} . Ταυτόχρονα διερευνήθηκε ο πιθανός νευροπροστατευτικός ρόλος της κρεατίνης. Στα πλαίσια αυτής της σύγκρισης, έγιναν και πειράματα κυτταροτοξικότητας, ώστε να βρεθεί ο πιθανός ρόλος της APP στην βιωσιμότητα των κυττάρων υπό διάφορους τοξικούς παράγοντες.

Τέλος, στην προσπάθεια διερεύνησης του ρόλου των διαφορετικών επικρατειών της APP, έγινε διαμόλυνση μέσω πλασμιδιακού φορέα κυττάρων στα οποία η έκφρασή της έχει σιγηθεί (SH-SY5Y/APP⁻), με την ενδοκυτταρική περιοχή αυτής, την AICD. Σκοπός αυτών των πειραμάτων ήταν να βρεθεί εάν ή σε ποιο ποσοστό αντιστρέφεται ο φαινότυπος κυττάρων στα οποία έχει σιγηθεί η έκφραση της APP. Με βάση αυτήν την αντιστροφή, ίσως να μπορούν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα για τον ρόλο που παίζει η AICD περιοχή της APP στη μελετώμενη σηματοδότηση.

III. Υλικά και Μέθοδοι

Πειραματικό πρότυπο

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματικό πρότυπο οι κυτταροκαλλιέργειες. Ως κυτταροκαλλιέργεια ορίζουμε την ανάπτυξη και διατήρηση μεμονωμένων κυττάρων σε *in vitro* συνθήκες για περισσότερες των 24 ωρών. Πρώτη φορά αναφέρθηκαν το 1907, και τα πρώτα κύτταρα που επιτυχώς αναπτύχθηκαν ήταν η κυτταρική σειρά HeLa (1952). Πρωτογενείς είναι οι αρχικές καλλιέργειες, προερχόμενες από ιστούς ή όργανα ζώων μέσω θρυψινοποίησης, και εξ αιτίας της προέλευσής τους περιέχουν περισσότερους του ενός τύπου κυττάρων. Κατόπιν απομόνωσης και συνεχούς αντιγραφής και διαίρεσης ενός μιτωτικά ενεργού προγονικού κυττάρου, δημιουργείται ένας μεγάλος πληθυσμός κυττάρων. Είναι απαραίτητο να πληρούνται δύο βασικά χαρακτηριστικά: α) να είναι όμοια φαινοτυπικά με τα προγονικά κύτταρα και β) να είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται για πολλούς κυτταρικούς κύκλους έτσι ώστε να διατηρείται ένας μεγάλος πληθυσμός.

Σήμερα οι κυτταροκαλλιέργειες είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος καλλιέργειας, λόγω του πλεονεκτήματος των ελεγχόμενων συνθηκών και επομένως της εφαρμογής των επιθυμητών πειραματικών χειρισμών. Έτσι είναι εφικτή η μελέτη του μεταβολισμού, του κυτταρικού κύκλου, της διαίρεσης, της κυτταρικής επικοινωνίας και της μεταγωγής σήματος. Από τα κύτταρα μπορούμε να απομονώσουμε νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, άλλα βιομόρια και να μελετήσουμε την επίδραση παραγόντων και χημικών ουσιών στην φυσιολογία και λειτουργία τους. Τέλος, μέσω της τεχνικής διαμόλυνσης (*transfection*) μπορούμε να μεταφέρουμε συγκεκριμένα γονίδια σε ευκαρυωτικά κύτταρα για την μελέτη της λειτουργίας και των αλληλεπιδράσεών τους.

1. Κυτταροκαλλιέργειες

1.1. Περιγραφή της κυτταρικής σειράς SK-N-SH

Η κυτταρική σειρά SK-N-SH αντιπροσωπεύει κύτταρα νευροβλαστώματος που επιδεικνύουν επιθηλιακή μορφολογία. Επώαση με all-trans-ρετινοϊκό οξύ οδηγεί τα κύτταρα στη διαφοροποίηση και στην υιοθέτηση νευρωνικού φαινοτύπου, ο οποίος χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες νευριτικές απολήξεις. Το γεγονός αυτό τα κάνει ιδιαίτερως χρήσιμα στην μελέτη σηματοδοτικών μονοπατιών εμπλεκόμενα στην νευρωνική διαφοροποίηση. Αυτή η κυτταρική σειρά απομονώθηκε το 1970 από τους June L. Biedler και Barbara A. Spengler, από τον μυελό των οστών ενός τετράχρονου κοριτσιού άγνωστης εθνικότητας, το οποίο έπασχε από μεταστατικό νευροβλάστωμα με αρχική εστία τους πνεύμονες. Στο τμήμα του όγκου που απομονώθηκε εντοπίστηκε ένα μικρό μέρος πρόδρομων επιθηλιακών κυττάρων και

ένα μεγαλύτερο μέρος πρόδρομων νευρικών κυττάρων, με τριπλοειδία στο 1^ο χρωμόσωμα εφόσον έφεραν ένα επιπλέον τμήμα αυτού (τμήμα του 1q). Αφού απομονώθηκε το σύνολο αυτών των προδρόμων κυττάρων, διατηρήθηκε σε *in vitro* καλλιέργεια για 1 – 2 χρόνια, και αυτή η σειρά αποτέλεσε την SK-N-SH.^[83]

1.2. Περιγραφή της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y

Πρόκειται για τριπλά κλωνοποιημένα κύτταρα νευροβλαστώματος από αρχικό πληθυσμό SK-N-SH κυττάρων. Από τον αρχικό αυτό πληθυσμό προέκυψαν αρχικά ο υποκλώνος SH-SY, έπειτα ο υποκλώνος SH-SY5, και τελικώς ο υποκλώνος SH-SY5Y. Η κυτταρική αυτή σειρά χρησιμοποιείται συχνά σε *in vitro* μοντέλα για την περιγραφή και διαλεύκανση της νευρωνικής λειτουργίας και διαφοροποίησης, καθώς και την μελέτη νευροεκφυλιστικών νόσων όπως η νόσος του Alzheimer. Χαρακτηρίζονται ως ακετυλοχολινεργικά, γλουταμινεργικά και αδενোসινεργικά κύτταρα, τα οποία πολλαπλασιάζονται με γρήγορους ρυθμούς υπό βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας, ενώ παραμένουν προσκολλημένα στην επιφάνεια των τρυβλίων, συχνά σχηματίζοντας συναθροίσεις με λεπτές απολήξεις (νευρίτες). Χαρακτηριστικό τόσο αυτής της κυτταρικής σειράς όσο και των SK-N-SH είναι πως αποτελούν εξαίρεση στον κανόνα, καθώς δεν έχουν ενισχυμένο το γονίδιο MYCN, σε αντίθεση με την πλειοψηφία των κυτταρικών σειρών νευροβλαστώματος.

1.3. Περιγραφή της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y/APP-

Πρόκειται για κυτταρική σειρά SH-SY5Y στην οποία έχει πραγματοποιηθεί σίγηση της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP), με αποτέλεσμα την μείωσή της. Η αποσιώπηση αυτή έχει ως σκοπό να προσδιορισθεί κατά πόσο η απουσία της APP έχει επίδραση στα σηματοδοτικά μονοπάτια των κυττάρων. Η σίγηση επιτεύχθηκε με διαμόλυνση κυττάρων SH-SY5Y με λεντοϊό, ο οποίος φέρει shRNA ειδικό για το mRNA του γονιδίου της APP [152] (Chatzistauraki et al., 2013). Το antisense RNA που προκύπτει από το shRNA συνδέεται λόγω συμπληρωματικότητας με το mRNA προερχόμενο από το γονίδιο της APP, πυροδοτώντας έτσι τον ενδογενή μηχανισμό αποικοδόμησης mRNA μέσω του συμπλέγματος RISC (RNAi). Ως αποτέλεσμα, καταστέλλεται η μετάφραση των mRNA της APP και δημιουργούνται κύτταρα SH-SY5Y/APP⁻. Για να διατηρείται ομοιογενής πληθυσμός κυττάρων SH-SY5Y/APP⁻, κάθε φορά στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας προστίθεται το αντιβιοτικό πουρομυκίνη (25% v/v). Αυτή η προσθήκη γίνεται διότι το τμήμα DNA που έχει εισέλθει στα κύτταρα μέσω του λεντοϊού φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη. Επομένως τα κύτταρα που έχουν λάβει τον λεντοϊό, άρα και το shRNA το οποίο φέρει, έχουν όλα λάβει και το γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη. Ως αποτέλεσμα, τα μετασηματισμένα αυτά κύτταρα θα μπορούν να επιβιώσουν παρουσία πουρομυκίνης, ενώ όσα δεν έχουν λάβει τον λεντοϊό πεθαίνουν. Όπως η κυτταρική σειρά SH-SY5Y, έτσι και η SH-SY5Y/APP⁻ πολλαπλασιάζεται με γρήγορους ρυθμούς και τα κύτταρα παραμένουν προσκολλημένα στην επιφάνεια των τρυβλίων.

Σε μία άλλη κυτταρική σειρά, την La-N-1, που έγινε παρόμοια σίγηση της APP, βρέθηκε πως τα κύτταρα είχαν 30% μείωση του πολλαπλασιασμού τους, μειωμένη προσκόλληση στο υπόστρωμα που μπορούσε να αντιστραφεί αν στο θρεπτικό μεσο προστεθεί πηγή εκκρινόμενης APP, και αύξηση 3 με 4 φορές κυττάρων που φέρουν νευρίτες, υποδηλώνοντας ότι η APP έχει κάποιο ρόλο στην επέκταση των νευριτών.

1.4. Διατήρηση στείρων συνθηκών

Για την διατήρηση υγιών, χωρίς μολύνσεις, κυτταροκαλλιιεργειών είναι απαραίτητη η διατήρηση στείρων συνθηκών. Οι μικροοργανισμοί, μύκητες ή βακτήρια, δρουν ως μολυσματικοί παράγοντες και δυσχεραίνουν την διατήρηση των κυτταροκαλλιιεργειών, καταστρέφοντας τη σύσταση του θρεπτικού μέσου, εξαντλώντας το και παράγοντας τοξικά για τα κύτταρα προϊόντα. Για την διατήρηση των στείρων συνθηκών, όλοι οι χειρισμοί των κυτταροκαλλιιεργειών πραγματοποιήθηκαν σε στείρο χώρο που δημιουργείται μέσα σε ειδική εστία με συνεχή ροή και διήθηση του αέρα (hood). Επιπλέον, πριν από κάθε πειραματική διαδικασία, ο χώρος των κυτταροκαλλιιεργειών αποστειρωνόταν με υπεριώδη ακτινοβολία (UV) για 30 λεπτά, καθώς η UV προκαλεί θάνατο λόγω βλάβης σε επίπεδο DNA στους μικροοργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, προκαλεί τον σχηματισμό διμερών πυριμιδίνης σε γειτονικές θέσεις στο DNA (πιο συνήθη τα διμερή θυμίνης όπως και είναι γνωστά), γεγονός που εμποδίζει τον ορθό διπλασιασμό του γενετικού υλικού. Ο θάλαμος νηματικής ροής καθώς και κάθε υλικό που εισερχόταν σε αυτόν απολυμαίνονταν πριν και μετά από κάθε ενέργεια με 70% αιθανόλη. Όσο αφορά τα χρησιμοποιούμενα στις κυτταροκαλλιιεργειες υλικά, όσα παραλαμβάνονταν αποστειρωμένα μέσα σε αεροστεγώς κλεισμένα δοχεία, ανοίγονταν μόνο μέσα στον θάλαμο νηματικής ροής, αφού είχε απολυμανθεί εξωτερικά με 70% αιθανόλη το δοχείο. Όσα δεν παραλαμβάνονταν αποστειρωμένα (για παράδειγμα το νερό), η αποστείρωση πραγματοποιούνταν σε ειδικό κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκαυστο) στους 121° C για περίπου 20-25 λεπτά, υπό πίεση 2 Atm. Η αποστείρωση με υγρή θερμότητα καταστρέφει όλων των ειδών μικρόβια και σπόρια, λόγω της αποδιάταξης των πρωτεϊνών τους. Όσα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν που είναι ευαίσθητα σε υψηλές θερμοκρασίες, διηθούνταν μέσα από πόρους διαμέτρου 0,22 ή 0,45 μm.

1.5. Υλικά κυτταροκαλλιιεργειών

Για την επιβίωση και αναπαραγωγή των κυττάρων μέσα στα τρυβλία καλλιιεργειας είναι απαραίτητη η συνεχής τροφοδότησή τους με θρεπτικό υλικό, το οποίο θα περιέχει τόσο τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά όσο και αυξητικούς παράγοντες. Ταυτόχρονα, για την αποφυγή επιμόλυνσής του με μικροοργανισμούς, προστίθεται στο θρεπτικό υλικό αντιβιοτικό, με συγκεκριμένη συγκέντρωση αναλόγως του είδους κυττάρων, συνήθως πενικιλίνη ως αναστολέας των Gram θετικών και στρεπτομυκίνη ως αναστολέας των Gram αρνητικών βακτηρίων.

Συγκεκριμένα, και για τις τρεις κυτταρικές σειρές (SK-N-SH, SH-SY5Y, SH-SY5Y/APP⁻) χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), το οποίο διατηρούταν στους 4° C. Για την παρασκευή του πλήρους θρεπτικού υλικού DMEM, προστίθενται επίσης: α) συμπληρωματικός ορός ανάπτυξης με υψηλή περιεκτικότητα εμβρυϊκών αυξητικών παραγόντων (Fetal Bovine Serum – FBS) 10% v/v, β) μείγμα αντιβιοτικών πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης: 100 U/ml πενικιλίνη, δηλαδή β-λακτάμη που αναστέλλει το σχηματισμό των πεπτιδογλυκανών του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη, δηλαδή αμινογλυκοσίδη που αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω πρόσδεσης στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα και παρεμποδίζοντας έτσι τον σχηματισμό του συμπλόκου του ριβοσώματος γ) μόνο για την κυτταρική σειρά SH-SY5Y/APP⁻ προστίθενται εκτός από τα α) και β), επιπλέον αντιβιοτικό, η πουρομυκίνη (25 ⁰/₁₀₀ v/v). Η ακριβής δράση της πουρομυκίνης εντοπίζεται στην δέσμευση της Α θέσης του ριβοσώματος και μιμούμενη το 3' άκρο του αμινοάκυλο – tRNA δρα εκείνη ως αποδέκτης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, οδηγώντας σε απελευθέρωσή της από το ριβόσωμα και διακόπτοντας έτσι την πρωτεϊνοσύνθεση. Τόσο τα αντιβιοτικά όσο και ο ορός διατηρούνταν στους -20° C. Ο ορός πριν προστεθεί το θρεπτικό υλικό, αφηνόταν να ξεπαγώσει σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα υφίσταντο heat inactivation (απενεργοποίηση μέσω θερμότητας), δηλαδή θέρμανση στους 56° C για 45 λεπτά έτσι ώστε να απενεργοποιηθούν τα συστατικά του συμπληρώματος. Έπειτα μοιραζόταν σε falcons των 50 ml.

Για τις πλύσεις των κυττάρων χρησιμοποιούταν ισότονο διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS (Phosphate Buffered Saline), το οποίο αραιωνόταν έως τελικής πυκνότητας 1X (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄*2H₂O, 0,24 g/l KH₂PO₄) μέσα σε αποστειρωμένο νερό και διατηρούταν στους 4° C αφού είχε αποστειρωθεί.

Η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια των τρυβλίων γινόταν με ενζυμική δράση, μέσω του διαλύματος θρυψίνης – EDTA (0,5 g/l θρυψίνη, 0,2 g/l EDTA), η οποία επίσης αραιωνόταν έως τελικής πυκνότητας 1X μέσα σε διάλυμα PBS.

Σημειώνεται, ότι πριν από την επαφή των κυττάρων με οποιοδήποτε διάλυμα, προηγείται η θέρμανσή του σε υδατόλουτρο των 37° C, πλην της θρυψίνης, η οποία λαμβανόταν απευθείας από τους 4° C καθώς πρέπει να αποφεύγεται η θέρμηση του ενζύμου.

1.6. Διατήρηση κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο (incubator) στους 37° C, σε ατμόσφαιρα με 5% CO₂ και σχετική υγρασία 95%, η οποία επιτυγχάνεται από ειδικό δοχείο με περίπου 2,5 l αποστειρωμένο νερό. Ο επωαστικός κλίβανος καθαρίζεται συχνά και το νερό του δοχείου αλλάζεται 1 φορά κάθε εβδομάδα. Τα κύτταρα διατηρούνταν συνήθως σε τρυβλία Petri 100 cc, στα οποία προστίθενται 7-8 ml θρεπτικού. Εφόσον δεν απαιτούνταν ανακαλλιέργεια των κυττάρων,

πραγματοποιούνται αλλαγή του θρεπτικού υλικού κάθε 2 ημέρες. Κατά την διαδικασία αυτή αφαιρούνταν το παλαιό θρεπτικό υλικό και προσθήκη νέου.

1.7. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Κάθε φορά που η κάλυψη της επιφάνειας του τρυβλίου φτάσει στο 80-85% είναι απαραίτητο να γίνεται ανακαλλιέργεια των κυττάρων, καθώς η έλλειψη χώρου μπορεί να οδηγήσει στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και στην παραγωγή τοξικών παραπροϊόντων. Κατά την διαδικασία αυτή:

- αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο,
- ακολουθείται έκπλυση με 1 ml PBS για την απομάκρυνση υπολειμμάτων θρεπτικού υλικού, νεκρών κυττάρων καθώς και την απενεργοποίηση του ορού,
- πρόσθεση 1 ml θρυψίνης 1X και επώαση των τρυβλίων για 1,5 λεπτά στον κλίβανο,
- επιβεβαίωση της αποκόλλησης των κυττάρων από την επιφάνεια των τρυβλίων με παρατήρηση στο φωτονικό μικροσκόπιο,
- τερματισμός της ενζυμικής δράσης της θρυψίνης με πρόσθεση 2 ml θρεπτικού υλικού και διαλυτοποίηση των συσσωματωμάτων των κυττάρων με την βοήθεια πιπέτας,
- τοποθέτηση όλου του περιεχομένου των τρυβλίων σε falcon των 15 ml,
- φυγοκέντρηση αυτού στις 1.000 – 2.000 rpm για 2-3 λεπτά,
- αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και επαναιώρηση του pellet κυττάρων σε 1 ml νέου θρεπτικού υλικού και τέλος έγχυση σε νέο τρυβλίο, με τον κατάλληλο όγκο θρεπτικού, της επιθυμητής ποσότητας κυττάρων. Τα νέα αυτά τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο για διατήρηση.

1.8. Διαδικασία κατάψυξης και κρυοσυντήρηση των κυττάρων

Για την μακροχρόνια συντήρηση των κυττάρων, απαιτείται η κατάψυξή τους έτσι ώστε να μειωθεί ο μεταβολισμός τους στο ελάχιστο δυνατό. Η διαδικασία κατάψυξης τους περιλαμβάνει αρχικά τα βήματα της θρυψινοποίησης όπως περιγράφησαν παραπάνω έως και την φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού στο υπερκείμενο. Η επαναιώρηση του ιζήματος με τα κύτταρα γίνεται σε 1 ml freezing buffer, το οποίο περιέχει 90% FBS και 10% DMSO. Το DMSO αποτρέπει την δημιουργία κρυστάλλων καταστρεπτικών για τα κύτταρα, δρώντας έτσι ως κρυοπροστατευτικό. Έπειτα όλος ο όγκος τοποθετείται σε cryovials στα οποία αναγράφονται τα επιθυμητά στοιχεία, όπως τύπος κυττάρων, ημερομηνία και γενιά της κυτταρικής σειράς. Στη συνέχεια, γίνεται αρχική αποθήκευση για 2 ώρες του cryovial στους -20°C , έπειτα στους -80°C για 24 ώρες και τέλος μεταφορά του στο υγρό άζωτο για μακρά περίοδο. Αυτή η σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας αποθήκευσης είναι μεγάλης σημασίας ώστε να αποφευχθεί ο θάνατος όσο

περισσότερων κυττάρων γίνεται. Το ειδικό δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο (-196° C) ανεφοδιάζεται κάθε εβδομάδα.

1.9. Απόψυξη και ανάκτηση των κυττάρων

Η διαδικασία απόψυξης των κρυοσυντηρημένων κυττάρων είναι η ακριβώς αντίστροφη της κατάψυξης, και πρέπει να γίνει σχετικά γρήγορα καθώς το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα στους 37° C κατά την απόψυξη των κρυστάλλων. Η μετάβαση τώρα είναι αντίθετη, δηλαδή από τις πολύ ψυχρές συνθήκες του υγρού αζώτου (-196° C) στις θερμές των 37° C του κλίβανου. Η διαδικασία περιλαμβάνει:

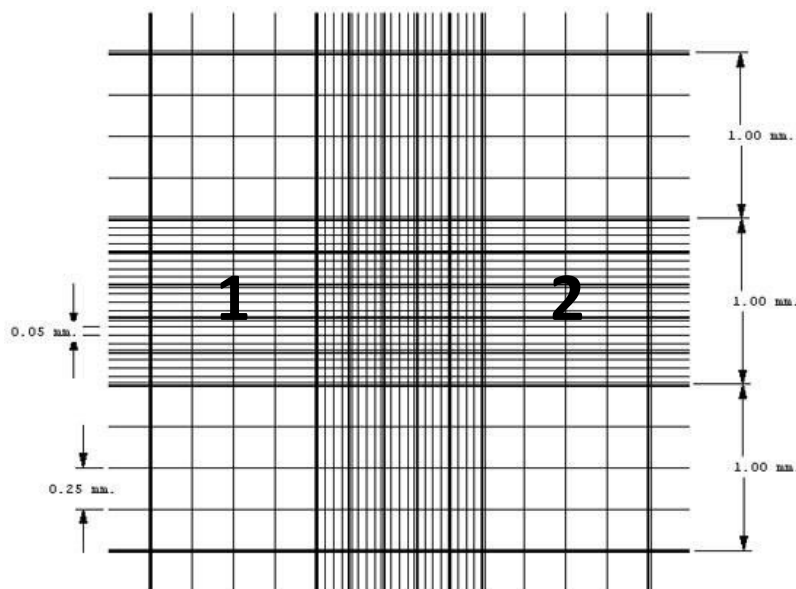
- ταχεία μεταφορά του cryovial από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο των 37° C για 1-2 λεπτά ή μέχρι να ρευστοποιηθεί πλήρως το περιεχόμενο,
- μεταφορά του κυτταρικού διαλύματος σε falcons των 15 ml,
- πρόσθεση 5 ml θρεπτικού υλικού,
- φυγοκέντρηση στα 2.000 rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να απομακρυνθεί όλο το DMSO,
- απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναιρώση σε 1 ml φρέσκο θρεπτικό υλικό,
- μεταφορά όλου του όγκου σε τρυβλίο καλλιέργειας με τον κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού και τέλος τοποθέτηση στον επωαστικό κλίβανο.

1.10. Μέτρηση αριθμού κυττάρων

Η καταμέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται με την χρήση της πλάκας Neubauer. Η διαδικασία της καταμέτρησης ξεκινάει με τα βήματα της θρυψινοποίησης όπως περιγράψαμε παραπάνω έως και την επαναιώρηση του pellet κυττάρων σε 1 ml θρεπτικό υλικό. Έπειτα, μεταφέρονται 10 μl εναιωρήματος στην πλάκα Neubauer η οποία επικαλύπτεται με καλυπτρίδα. Ο αριθμός κυττάρων μετράται σε 4 στήλες από τα 2 μεγάλα τετράγωνα (αναγράφονται ως 1 και 2 στην εικόνα). Υπολογίζεται ο μέσος όρος αριθμού κυττάρων που περιέχεται σε κάθε στήλη, και έπειτα αυτός ο αριθμός πολλαπλασιάζεται 4 φορές (καθώς κάθε μεγάλο περιφερειακό τετράγωνο περιέχει 4 στήλες). Το κάθε τετράγωνο εγκλείει όγκο 0,1 μl, και γι' αυτό ο αριθμός που έχουμε βρει πρέπει να πολλαπλασιαστεί $\times 10^4$. Αυτή η τιμή είναι και ο αριθμός κυττάρων που περιέχονται ανά ml εναιωρήματος. Εάν τα κύτταρα μετά την φυγοκέντρηση κριθεί ότι είναι πολλά, μπορεί η επαναιώρηση να γίνει σε 2 ml θρεπτικού υλικού, ώστε η καταμέτρηση να γίνει ευκολότερη και τελικώς να βρεθεί ο μισός αριθμός κυττάρων ανά ml. Οι πράξεις που ακολουθήθηκαν είναι:

Αριθμός κυττάρων στήλης 1
Αριθμός κυττάρων στήλης 2
Αριθμός κυττάρων στήλης 3
Αριθμός κυττάρων στήλης 4
Αριθμός κυττάρων στήλης 5

Μέσος όρος κυττάρων ανά στήλη $\times 4 \times 10^4 =$
Αριθμός κυττάρων /ml εναιωρήματος



Εικόνα 18: Αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer (πηγή:

<https://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/63511.aspx>)

1.11. Λύση κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνών

Η απομόνωση των πρωτεϊνών είναι εφικτή αφού τα κύτταρα επωαστούν σε διάλυμα λύσης, ώστε να διασπαστεί η πλασματική τους μεμβράνη και να απελευθερωθούν τα κυτταρικά περιεχόμενά τους, μεταξύ των οποίων βρίσκονται και οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Τα συστατικά του διαλύματος λύσης (RIPA) είναι:

- Tris – HCl 50 mM, pH 7,5 (από stock 1 M, pH 7,5): ρυθμιστικό διάλυμα για τον έλεγχο του pH και της ιονικής ισχύος του διαλύματος.
- NaCl 150 mM (από stock 2,5 M): έτσι ώστε να επιτευχθεί συγκεκριμένη ιονική ισχύς στο διάλυμα.
- 1% Triton X – 100: μη – ιοντικό απορρυπαντικό που απομακρύνει λιποειδή μόρια και έτσι προκαλεί ρήξεις στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων.
- 0,1% SDS (από stock 10%): ιοντικό απορρυπαντικό, που λόγω της αμφιφιλικής δομής του έχει διαλυτοποιητική δράση. Το υδροφοβικό του

μέρος προσδένεται στο υδροφοβικό μέρος των πρωτεϊνών και το υδροφιλικό αλληλεπιδρά με το νερό, διαλυτοποιώντας έτσι τις πρωτεΐνες.

- 4% Pi και PPi (από stock που παρασκευάζεται από 1 tablet διαλυόμενο σε 1 για το Pi και σε 0,5 για το PPi ml H₂O): αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών αντιστοίχως, και προστίθενται ώστε να αποφευχθεί η αποδόμηση των πρωτεϊνών από τα ενδογενή ένζυμα.
- ddH₂O έως τον επιθυμητό όγκο.

Όλα τα στάδια της λύσης πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία 4° C (πάνω σε πάγο) έτσι ώστε να μειωθεί η πιθανότητα πρωτεόλυσης των πρωτεϊνών. Αρχικά τα τρυβλία με τα κύτταρα, τα οποία έχουν επωαστεί στους επιθυμητούς, υπό μελέτη παράγοντες για δεδομένο χρόνο, μεταφέρονται από τον επωαστικό κλίβανο στον πάγο, στον πάγκο εργασίας. Το θρεπτικό υλικό αφαιρείται υπό γωνία, τα τρυβλία ξεπλένονται 2 φορές με 1 ml διαλύματος PBS όπως στην θρυψινοποίηση, και προσέχοντας ώστε την 2^η φορά να αφαιρεθεί όλος ο όγκος PBS. Έπειτα, προστίθεται διάλυμα λύσης, συνήθως 360 μl όταν αφορά τρυβλία ή 120-150 μl σε φρέατια των 6 well plates. Τα κύτταρα αμέσως μετά αποκολλώνται από το τρυβλίο με τη βοήθεια scraper (ξύστρου) και το κυτταρικό αυτό διάλυμα μεταφέρεται σε σωληνάρια τύπου Eppendorf. Τα σωληνάρια αυτά διατηρούνται στον πάγο για 30 λεπτά, και ανά 10 λεπτά αναδεύονται στην συσκευή vortex. Στο πέρας των 30 λεπτών τα σωληνάρια φυγοκεντρούνται σε 13.900 rpm για 25 λεπτά και στους 4° C. Αφού ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο (που περιέχει τις πρωτεΐνες) μεταφέρεται σε καθαρά σωληνάρια τύπου Eppendorf και το ίζημα (που περιέχει μεμβρανικά συστατικά) απορρίπτεται. Έπειτα ακολουθεί η διαδικασία ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών από το υπερκείμενο αυτό. Τα σωληνάρια με το πρωτεϊνικό διάλυμα μπορούν να φυλαχθούν για μικρό χρονικό διάστημα στους -20° C ή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στους -80° C.

1.12. Διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y/APP⁻

Ως διαμόλυνση (transfection) χαρακτηρίζεται η εισαγωγή ξένων νουκλεικών οξέων (DNA) στα κύτταρα. Αρχικά, πραγματοποιείται μετασχηματισμός βακτηρίων και καλλιέργειά τους ώστε να απομονωθεί ο πλασμιδιακός φορέας. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y/APP⁻ με πλασμίδιο που έφερε την κωδική περιοχή για την ενδοκυτταρική περιοχή της APP, AICD, καθώς και φθορίζουσα ανιχνεύσιμη χρωστική, την citrine, με τη μέθοδο των λιπιδίων.

1.12.1. Μετασχηματισμός κυττάρων E. coli DH5A

Αρχικά, τοποθετήθηκε eppendorf με το αιώρημα βακτηριακών κυττάρων E. coli DH5A, δεκτικά σε πλασμίδια, από τους -80° C σε πάγο, ώστε η απόψυξη των κυττάρων να γίνει ομαλώς. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 ng πλασμιδιακού φορέα pUKBK που έφερε την κωδική αλληλουχία του Citrine-AICD^[84] μέσα στο eppendorf

με τα βακτήρια DH5A και επώαση σε πάγο για 30 λεπτά και ανά 10 λεπτά γινόταν ήπια ανακίνηση. Ακολούθως, έγινε επώαση για 1,5 λεπτό στους 42° C και αμέσως μετά για 5 λεπτά και πάλι στον πάγο, ώστε να διευκολυνθεί η είσοδος του πλασμιδιακού φορέα μέσα στα βακτήρια (heatshock). Έπειτα, έγινε προσθήκη στα κύτταρα 1 ml θρεπτικού υλικού LB (Luria-Bertani) Broth που δεν περιείχε αντιβιοτικά και επώασή τους στους 37° C για 1 ώρα, ώστε να εκφραστεί το γονίδιο ανθεκτικότητας για το αντιβιοτικό καναμυκίνη. Μετά το πέρας της 1 ώρας τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Έγινε επαναιώρηση του ιζήματος που προέκυψε σε 100 ml LB Broth και μεταφορά τους σε τρυβλία 10 cm επιστρωμένα με θρεπτικό υλικό LB άγαρ, που περιείχε το αντιβιοτικό καναμυκίνη για την επιλογή των κατάλληλων αποικιών των βακτηρίων. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο για την ανάπτυξη των αποικιών στους 37° C για 16 ώρες.

1.12.2. Καλλιέργεια βακτηρίων

Για την καλλιέργεια βακτηρίων που φέρουν το σωστό πλασμιδιακό φορέα, έγινε λήψη μιας διακριτής αποικίας από την στερεή καλλιέργεια και ακολούθησε επιμόλυνση κωνικής φιάλης καλλιέργειας που περιείχε 100 ml θρεπτικό υλικό LB Broth, παρουσία του αντιβιοτικού καναμυκίνης. Στη συνέχεια, η υγρή καλλιέργεια επώαστηκε σε κλίβανο στους 37° C για 16 ώρες υπό ανάδευση.

1.12.3. Μεσαίας κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακών φορέων (midiprep)

Η απομόνωση των πλασμιδιακών φορέων pUKBK-Citrine-AICD, έγινε με τη χρήση του Purelink HiPure Plasmid DNA Purification Kit (Invitrogen). Αρχικά, από τα 100 ml υγρής καλλιέργειας έγινε συλλογή όλων των βακτηρίων με φυγοκέντρηση στα 3200g για 10 λεπτά και στη συνέχεια απόρριψη του υπερκειμένου. Κατόπιν, προστέθηκαν στο ίζημα 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης (Resuspension Buffer R3) και έγινε επαναιώρηση αυτού μέχρι ομογενοποίησης. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (Lysis Buffer, L7), έγινε ήπια ανάμειξη με αναστροφή, και το μείγμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 4 ml ρυθμιστικού διαλύματος κατακρήμνισης (Precipitation Buffer, N3) και το μείγμα αναδεύτηκε ήπια με αναστροφή μέχρι ομογενοποίησης. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε για 15 λεπτά στα 3200g. Ακολούθησε προετοιμασία της στήλης με το φίλτρο με την προσθήκη 10 ml Equilibration Buffer (EQ1). Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο που προέκυψε τοποθετήθηκε στην ενυδατωμένη στήλη και το διάλυμα αφέθηκε μέχρι να διέλθει πλήρως από τη στήλη με την επίδραση της βαρύτητας. Μετά τη διέλευση του διαλύματος από τη στήλη ακολούθησαν δυο πλύσεις αυτής με 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (Wash Buffer, W8) στη κάθε πλύση, και αφέθηκαν ώστε να διέλθει το διάλυμα από τη στήλη. Αργότερα, τοποθετήθηκε κάτω από τη στήλη νέος αποστειρωμένος σωλήνας τύπου falcon των 15 ml, προστέθηκαν 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης (Elution Buffer, E4) στη στήλη και το διάλυμα αφέθηκε να

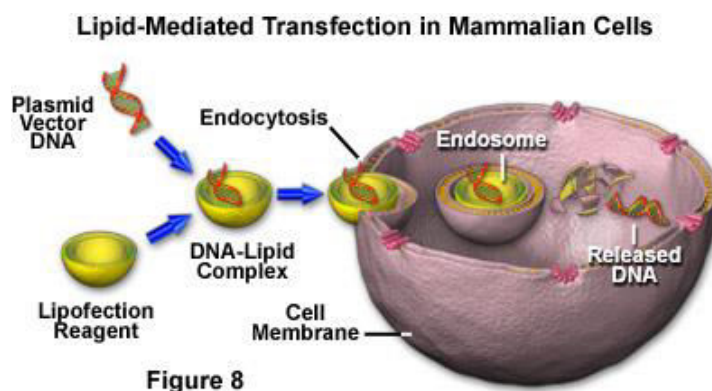
διέλθει από τη στήλη με την επίδραση της βαρύτητας. Στο falcon προστέθηκαν 3,5 ml ισοπροπανόλης και το μείγμα επώαστηκε όλη τη νύχτα στους -20°C . Την επόμενη μέρα, έγινε μεταφορά του μείγματος σε errendorf και φυγοκέντρωση στα 13000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C . Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 200 μl αιθανόλης 70%. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 13000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C , το υπερκείμενο απορρίφτηκε και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει για να απομακρυνθεί όλη η αιθανόλη. Τέλος, το ίζημα επαναιωρήθηκε με 200 μl RNase & DNase free ddH₂O. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA έγινε με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (optical density, OD) σε φασματοφωτόμετρο σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 260 nm, στο οποίο τα νουκλεϊκά οξέα έχουν μέγιστο απορρόφησης. Η συγκέντρωση του πλασμιδίου υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

$$\text{Συγκέντρωση DNA (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 100 \times 50\mu\text{g/ml}$$

όπου 100 είναι ο συντελεστής αραιώσης του αρχικού δείγματος (1:100 αραιώση). Βρέθηκε έτσι, πως η συγκέντρωση του DNA ήταν 1,075 μg/ml.

1.12.4. Διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y/APP⁻

Ως λιπίδιο χρησιμοποιήθηκε η λιποφεκταμίνη (Lipofectamine 2000, LP-2000, Invitrogen), ώστε να αυξήσει την απόδοση της διαμόλυνσης. Η λιποφεκταμίνη περιέχει υπομονάδες κατιοντικών λιπιδίων, οι οποίες έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν λιποσώματα σε υδατικό περιβάλλον, τα οποία παγιδεύουν τα μεταφερόμενα νουκλεϊκά οξέα. Τα λιποσώματα αυτά μπορούν ευκολότερα να ενσωματωθούν στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων, η οποία φέρει επιφανειακά αρνητικά φορτία, και να μεταφέρουν μέσα στο κύτταρο το νουκλεϊκό οξύ.^[85, 86]



Εικόνα 19: Μηχανισμός διαμόλυνσης κυττάρων (πηγή: <https://igtrcn.org/delivering-gene-editing-proteins-in-vivo-using-a-new-strategy/>)

Αναφορικά με την διαδικασία που ακολουθήθηκε, η διαμόλυνση λάμβανε χώρα την ίδια μέρα με την θρυψινοποίηση και ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Αρχικά αναμείχθηκαν 50 μl διαλύματος OPTIMEM με 1,6 μl λιποφεκταμίνης και ακολούθησε επώαση 5 λεπτών σε συνθήκες δωματίου. Στα 5 λεπτά αναμονής αναμειγνύονται 50 μl OPTIMEM με 1,12 μl του διαλύματος που περιέχει το πλασμίδιο. Ο υπολογισμός αυτής της ποσότητας έγινε με βάση την συγκέντρωση του DNA που είχε υπολογισθεί στο εν λόγω διάλυμα (1,075 μg/ml), ώστε η τελική ποσότητα DNA στο σωληνάριο να ισούται με 0,6 μg. Στο πέρας των 5 λεπτών το μείγμα OPTIMEM – λιποφεκταμίνης προστίθεται στο μείγμα OPTIMEM – πλασμίδιο και ακολουθεί 20-λεπτη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς ανάδευση. Έπειτα, σε αυτό το σωληνάριο αλλά και σε ένα ακόμη που περιέχει μόνο 100 μl OPTIMEM, το οποίο θα προορίζεται για τα μη-διαμολυσμένα κύτταρα, προστίθενται 50 μl από τα θρυψινοποιημένα κύτταρα που είναι επαναιωρημένα μετά τη φυγοκέντρηση σε 1 ml θρεπτικό υλικό, και ακολουθεί επώαση των 15 λεπτών, με μία ανάδευση στα 7,5 λεπτά. Σε αυτό το σημείο δηλαδή υπάρχουν 2 σωληνάρια, ένα για τον μάρτυρα των μη διαμολυσμένων κυττάρων περιέχοντας κύτταρα, θρεπτικό και 100 μl OPTIMEM) και ένα για τα διαμολυζόμενα κύτταρα (περιέχοντας κύτταρα, θρεπτικό, 50+50=100 μl OPTIMEM, 1,6 μl λιποφεκταμίνη και 1,12 μl πλασμιδίου). Ακολουθεί έγχυση όλου του περιεχομένου των 2 σωληναρίων σε 2 φρεάτια μίας 12 well plate, στα οποία έχει από νωρίτερα προστεθεί 1 ml θρεπτικό. Τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν για 48 ώρες στον επωαστικό κλίβανο. Έπειτα ακολουθεί λύση τους και εκχύλιση των πρωτεϊνών του, προς προσδιορισμό με ανοσοσύτρωμα κατά Western των διαφορών που παρατηρούνται στις μελετώμενες πρωτεΐνες μεταξύ των transfected, στα οποία θα εκφράζεται η ενδοκυτταρική περιοχή της APP λόγω της εισαγωγής του πλασμιδίου, και untransfected κυττάρων.

1.13. Ανοσοκυτταροχημική ανάλυση

1.13.1. Προετοιμασία των καλυπτρίδων

Οι χρησιμοποιούμενες καλυπτρίδες αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο τυλιγμένες μέσα σε αλουμινόχαρτο και μετά το πέρας της αποστείρωσης αφήνονται έως ότου εξατμισθεί όλο το νερό. 1 ώρα πριν την διαμόλυνση των κυττάρων, ο επιθυμητός αριθμός καλυπτρίδων μεταφέρθηκε με προσοχή στο πιάτο 12 φρεατίων μέσα στον θάλαμο νηματικής ροής, που περιείχε 500 μl πολυ-L-λυσίνη και αφέθηκαν έτσι σε συνθήκες δωματίου. Έπειτα αφαιρέθηκε η πολυ-L-λυσίνη και έγιναν τρεις 5-λεπτες διαδοχικές πλύσεις με αποστειρωμένο H₂O. Τέλος, προστέθηκε ο κατάλληλος αριθμός διαμολυσμένων κυττάρων στο κάθε φρεάτιο με καλυπτρίδα, μαζί με κατάλληλο θρεπτικό μέσο Neurobasal και τα κύτταρα επώασθηκαν στους 37° C για 48 ώρες μέχρι να μονιμοποιηθούν.

1.13.2. Μονιμοποίηση

Η μονιμοποίηση των κυττάρων έγινε 48 ώρες μετά την διαμόλυνση και τον διαμοιρασμό τους στα φρεάτια με τις καλυπτρίδες. Σε αυτό το σημείο μπορεί να γίνει και έλεγχος της διαμόλυνσης των κυττάρων στο μικροσκόπιο φθορισμού, με βάση το σήμα από την χρωστική citrine. Στη συνέχεια απορρίφθηκε το θρεπτικό μέσο και έγινε πλύση με PBS. Σε κάθε φρεάτιο προστέθηκαν 350 μl 4% παραφορμαλδεΐδης (paraformaldehyde, PFA), και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 22 λεπτά. Μετά την επώαση με PFA, αυτή απορρίφθηκε και ακολούθησαν ακόμη 2 πλύσεις με ρυθμιστικό PBS διάλυμα.

1.13.3. Κάλυψη μη ειδικών θέσεων

Η κάλυψη μη ειδικών θέσεων πραγματοποιήθηκε αρχικά με 10-λεπτη πλύση με PBS, το οποίο περιείχε 0,5% Triton X-100. Το Triton διατρυπά τις κυτταρικές μεμβράνες των κυττάρων ώστε να διευκολυνθεί η επακόλουθη είσοδος των αντισωμάτων. Ακολούθησαν δύο 5-λεπτες πλύσεις με PBS και επώαση των κυττάρων για 1 ώρα με διάλυμα Blocking Buffer σε θερμοκρασία δωματίου, το οποίο περιείχε 3% BSA (Bovine Serum Albumin), 0,1% Triton X-100 μέσα σε PBS, ώστε να γίνει η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων.

1.13.4. Επώαση των κυττάρων με τα αντισώματα

Η ανοσοεντόπιση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν έναντι της πρωτεΐνης STIM. Μετά από 1 ώρα επώασης σε BSA, οι καλυπτρίδες με τα μονιμοποιημένα κύτταρα αποστραγγίσθηκαν από την περίσσεια αυτού με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος σε αραιώση 1:100, που περιείχε σε PBS 0,1% Triton X-100 και 3% BSA. Η επώαση πραγματοποιήθηκε για όλη τη νύχτα στους 4° C.

Ως δευτερογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό goat anti-rabbit Tritc (Tetramethylrhodamine), συζευγμένο με χρωστική που εκπέμπει φως στα 532 nm, δηλαδή στο φάσμα του κόκκινου φωτός. Την επόμενη ημέρα, το πρωτογενές αντίσωμα αφαιρέθηκε, ακολούθησαν τρεις 5-λεπτες πλύσεις με PBS και σε κάθε καλυπτρίδα έπειτα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος σε αραιώση 1:100, που περιείχε PBS 0,1% Triton X-100 και 3% BSA. Η επώαση έγινε σε θερμοκρασία δωματίου και προστασίας από το φως για 90 λεπτά. Ακολούθησε μία 5-λεπτη πλύση με PBS. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρώση των πυρήνων για 5 λεπτά με διάλυμα PBS, που περιείχε την χρωστική DAPI, σε αραιώση 1:1000. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS και τέλος οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε σταγόνα υγρού κάλυψης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, με τα κύτταρα προς την πλευρά της πλάκας.

1.13.5. Παρατήρηση και φωτογράφιση των κυττάρων στο μικροσκόπιο φθορισμού

Η παρατήρηση των καλυπτρίδων και η φωτογράφιση των κυττάρων έγινε με το μικροσκόπιο ZEISS Axio Observer και με το λογισμικό ZEN, σε μεγέθυνση 60X. Τα επίπεδα του AICD στα διαμολυσμένα κύτταρα και τα επίπεδα της πρωτεΐνης STIM προσδιορίστηκαν στο κίτρινο και κόκκινο φίλτρο αντίστοιχα, από την σύγκριση της έντασης φωτισμού των γειτονικών πιο φωτεινών μη διαμολυσμένων κυττάρων, με την ένταση του φωτισμού των εκάστοτε διαμολυσμένων κυττάρων.

Αρχικά η αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης των κυττάρων ελέγχθηκε χωρίς την χρήση αντισωμάτων, λόγω της ενσωματωμένης χρωστικής citrine. Εν συνεχεία, εκτελέσθηκε ανοσοκυτταροχημία για τον έλεγχο της πρωτεΐνης STIM στο κόκκινο φάσμα, και παράλληλη παρατήρηση του πλασμιδίου με την χρωστική citrine.

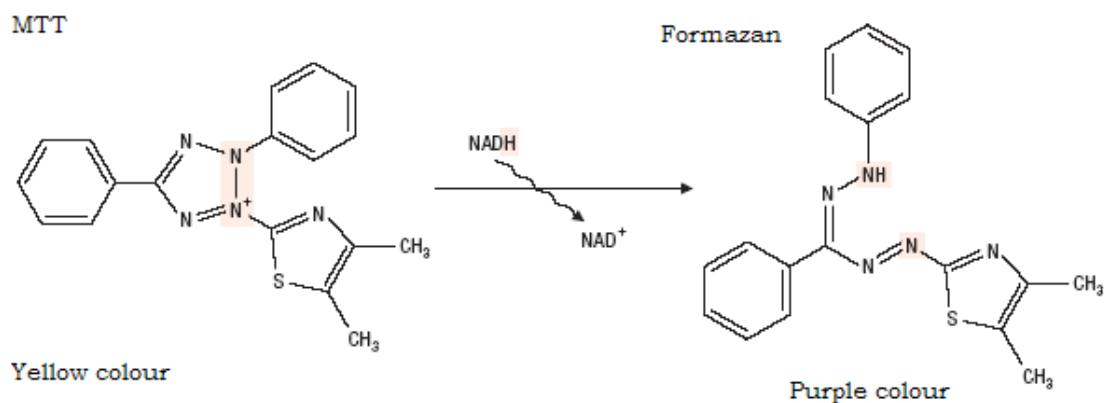
1.14. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας – MTT

Η δοκιμασία κυτταροτοξικότητας πραγματοποιήθηκε με χρωματομετρική μέθοδο, κατά την οποία μετράται η μετατροπή του MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. Το MTT ανάγεται σε ένα αδιάλυτο, έγχρωμο προϊόν φορμαζανίου, αντίδραση που εξαρτάται από τα μιτοχόνδρια. Συγκεκριμένα, τα ενεργά μιτοχόνδρια ζωντανών κυττάρων μεταβολίζουν με τη βοήθεια αφυδρογονασών τον τετραζολικό δακτύλιο, μετατρέποντας το κίτρινο χρώμα σε πορφυρούς κρυστάλλους. Αυτοί με την διάλυση σε ισοπροπανόλη ή διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) δίνουν ένα ιώδες χρώμα. Έτσι τα ζωντανά κύτταρα με ενεργά μιτοχόνδρια βάφονται ενώ τα νεκρά παραμένουν άχρωμα, υποδεικνύοντας ότι η συγκέντρωση του τετραζολίου που μετατράπηκε σε κρυστάλλους είναι ανάλογη της δραστηριότητας και επομένως της βιωσιμότητας των κυττάρων.

Τα συστατικά της χρωστικής MTT είναι:

- 25 mg σκόνης χρωστικής MTT
- 10 ml PBS

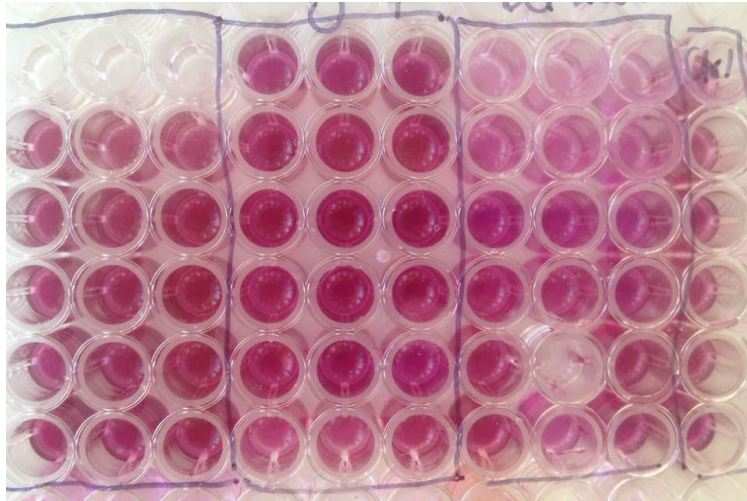
και διατηρείται στο σκοτάδι, στους 4° C.



Εικόνα 20: Χημική μετατροπή του MTT (πηγή: https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-MTT-assay_fig2_279778205)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι: σε μικροπλάκα καλλιέργειας των 96 φρεατίων (96 well plate) διαμοιράζονται 30.000 κύτταρα SH-SY5Y ανά φρεάτιο ή 20.000-25.000 κύτταρα SK-N-SH ή SH-SY5Y/APP⁻ ανά φρεάτιο. Στο κάθε φρεάτιο τα κύτταρα επωάζονται με 100 μl του αντίστοιχου θρεπτικού υλικού για 24 ώρες, και προστίθεται η ίδια ποσότητα θρεπτικού και σε μία σειρά κενών φρεατίων, ως αρνητικός μάρτυρας. Έπειτα στα φρεάτια με τα κύτταρα προστίθενται οι παράγοντες, την επίδραση των οποίων στη βιωσιμότητα των κυττάρων επιθυμούμε να μελετήσουμε, σε μειούμενες κατά δεκαδικό τρόπο συγκεντρώσεις και η επώαση πραγματοποιείται για 24 ακόμη ώρες. 4 ώρες πριν το πέρας των 24 ωρών της επώασης προστίθεται η χρωστική MTT.

Στο πέρας των 4 ωρών το υπερκείμενο απορρίπτεται αναστρέφοντας την πλάκα. Στα κύτταρα καθώς και στη σειρά που είχε προστεθεί μόνο θρεπτικό υλικό προστίθενται 100 μl DMSO και η πλάκα ανακινείται ελαφρά για διαλυτοποίηση των κρυστάλλων που έχουν σχηματισθεί. Η πλάκα στη συνέχεια φωτομετρείται σε φωτόμετρο τύπου ELISA στα 545 nm. Οι τιμές των απορροφήσεων συγκρίνονται με τον αρνητικό μάρτυρα (που θα δίνει την ελάχιστη απορρόφηση καθώς απουσία κυττάρων οι κρύσταλλοι δεν μπορούν να σχηματισθούν) και έτσι μπορεί να υπολογιστεί το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων παρουσία παραγόντων. Συγκεκριμένα, υπολογίζεται το IC₅₀ που χαρακτηρίζει την συγκέντρωση του παράγοντα στην οποία επιβιώνει μόνο το 50% των κυττάρων.^[61]



Εικόνα 21: Παράδειγμα μικροπλάκας καλλιέργειας των 96 φρεατίων μετά από την διαδικασία MTT

2. Επίδραση παραγόντων στις κυτταρικές καλλιέργειες

Για να μελετηθεί η επίδραση διαφόρων παραγόντων στις κυτταρικές καλλιέργειες γίνεται επώαση των κυττάρων μετά από προσθήκη κάποιας ουσίας στο θρεπτικό υλικό. Οι επώσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο σε τρυβλία όσο και σε πλάκες 6 φρεατίων (6 well plate). Ο χρόνος και οι συγκεντρώσεις των παραγόντων υποδεικνύονταν από την βιβλιογραφία και πολλές φορές προσαρμόζονταν στα επιμέρους πειράματα ή τύπους κυττάρων. Η θερμοκρασία επώασης ήταν ίδια με την θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων, δηλαδή 37° C στον επωαστικό κλίβανο. Παρακάτω αναλύονται οι επιμέρους παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν. Οι ουσίες με τις οποίες επώασθηκαν τα κύτταρα αναλύονται περεταιίρω στην Εισαγωγή.

2.1. Ινσουλίνη

Η ινσουλίνη είναι μία ορμόνη που παράγεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος (νησίδες Langerhans). Αποτελεί μικρή πρωτεΐνη, με 2 πολυπεπτιδικές αλυσίδες που προέρχονται από το ίδιο προ-μόριο. Η έκκρισή της επάγεται ως απόκριση σε δεδομένες συγκεντρώσεις γλυκόζης στο αίμα μετά από την κατανάλωση γεύματος. Η ινσουλίνη, μέσω σύνδεσης στους υποδοχείς της, δρα σε όλους τους περιφερικούς ιστούς επάγοντας την πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα, μειώνοντας έτσι τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Ταυτόχρονα, η δράση της στο ήπαρ επεκτείνεται και στην αποθήκευση της γλυκόζης ως γλυκογόνο ή λίπος, απελευθερώνοντας επίσης λιπαρά οξέα στην κυκλοφορία.

Για τις επώσεις των κυττάρων με ινσουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως stock ινσουλίνη 100 IU/ml και ενύονταν 2 μl από αυτό σε 2 ml θρεπτικού σε 6 well plate. Η τελική συγκέντρωση σε κάθε περίπτωση ήταν 3,47 μg/ml θρεπτικού. Η επώαση πραγματοποιήθηκε για 4 ώρες.

2.2. Thapsigargin

Η thapsigargin, τοξική ένωση, δρα ως ισχυρός αναστολέας των ασβεστοεξαρτώμενων ΑΤΡακών SERCA που εδράζονται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου, στις οποίες και προσδέεται αντιστρεπτά. Η πρόσδεση αυτή προκαλεί απελευθέρωση ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο, γεγονός που έχει συνδεθεί και με απόπτωση. Η επίδραση της thapsigargin μελετήθηκε τόσο σε 4-ωρες επωάσεις με επακόλουθη λύση των κυττάρων και λήψη των πρωτεϊνών για μελέτη τους με ανοσοσύτρωμα κατά Western, όσο και στην δοκιμασία κυτταροτοξικότητας, με 24-ωρες. Στις επωάσεις των κυττάρων που προορίζονταν για λύση χρησιμοποιήθηκε thapsigargin τελικής συγκεντρώσεως 250 nM (πρόσθεση 0,5 μl thapsigargin σε 2 ml θρεπτικού υλικού σε 1 φρεάτιο 6 well plate από stock 1mM). Για την δοκιμασία κυτταροτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη, μέγιστη συγκέντρωση τόσο τα 5μM όσο και τα 2μM από το ίδιο stock, και έπειτα ακολουθούσαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις για τον προσδιορισμό του IC₅₀.^[68]

2.3. 2-δεόξυ-D-γλυκόζη (2-DG)

Η 2-δεοξυγλυκόζη (2-deoxy-D-glucose, 2-DG) είναι ένα ανάλογο σάκχαρο της γλυκόζης που χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση συνθηκών στέρσης γλυκόζης στα κύτταρα. Η δράση της εντοπίζεται στην επιτυχή μεταφορά της μέσα στο κύτταρο από τους μεταφορείς γλυκόζης αλλά ανεπιτυχή γλυκόλυση, οδηγώντας σε εξάντληση του ATP και οξειδωτικό στρες. Η 2-DG χρησιμοποιήθηκε τόσο σε 4-ωρες επωάσεις κυττάρων για λήψη του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος όσο και με 24-ωρες επωάσεις για τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας. Στις επωάσεις κυττάρων που προορίζονταν για λύση χρησιμοποιήθηκε 2-DG τελικής συγκέντρωσης 1mM, 2,5 mM και 5 mM (από stock 1M). Στην δοκιμασία κυτταροτοξικότητας η μέγιστη συγκέντρωση υπήρξε τόσο 200 μM όσο και 100μM (από το ίδιο stock) από την οποία και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις για τον προσδιορισμό του IC₅₀.

2.4. Κρεατίνη

Η κρεατίνη συντίθεται από τα αμινοξέα αργινίνη, γλυκίνη, μεθειονίνη και ο ρόλος της ως αζωτούχο οργανικό μόριο είναι αυτός του φωσφογόνου, βοηθώντας στην ανακύκλωση του ATP κυρίως στον εγκέφαλο και στους μύες. Για την μελέτη της επίδρασής της στη φυσιολογία των κυττάρων και στις μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων, χρησιμοποιήθηκε σε επωάσεις. Η τελική συγκέντρωση των επωάσεων ήταν 5 mM (stock 87 mM). Οι επωάσεις της κρεατίνης ήταν 4-ωρες, ή γινόταν προεπάση των κυττάρων με αυτήν από την προηγούμενη ημέρα (16 ώρες) πριν την πρόσθεση άλλου παράγοντα.

2.5. Χλωριούχο κοβάλτιο (CoCl₂)

Το χλωριούχο κοβάλτιο (Cobalt(II) Chloride, CoCl₂) χρησιμοποιήθηκε στην εξαένυδρη μορφή του για την προσομοίωση συνθηκών υποξίας. Είναι χημικός

επαγωγέας του Hypoxia-inducible factor 1a (HIF-1a) και χρησιμοποιήθηκε τόσο σε πειράματα 4-ωρων επωάσεων για εκχύλιση πρωτεϊνών όσο και σε 24-ωρες επωάσεις για δοκιμασία κυτταροτοξικότητας. Η τελική συγκέντρωση στις επωάσεις υπήρξε τόσο 400 μM όσο και 200 μM ενώ η μέγιστη συγκέντρωση στην δοκιμασία κυτταροτοξικότητας ήταν 800 μM , από την οποία και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις για την εύρεση του IC_{50} .

2.6. Γλουταμινικό οξύ

Το γλουταμινικό οξύ (L-Glutamate) αποτελεί απαραίτητο αμινοξύ αλλά και νευροδιαβιβαστή του νευρικού συστήματος. Αποτελεί επίσης το πρόδρομο μόριο για τον νευροδιαβιβαστή GABA, ο οποίος έχει ανασταλτική δράση και για την γλουταμίνη. Το γλουταμινικό οξύ χρησιμοποιήθηκε σε 24-ωρες επωάσεις για δοκιμασία κυτταροτοξικότητας, σε μέγιστη αρχική συγκέντρωση 50 μM . Να σημειωθεί ότι αυτή η συγκέντρωση δεν ήταν πρακτικά εφικτό να επιτευχθεί με γλουταμινικό οξύ διαλυόμενο σε θρεπτικό υλικό (100 μM ανά φρεάτιο στην 96 well plate). Γι' αυτόν τον λόγο η πρώτη αυτή συγκέντρωση επιτεύχθηκε με αφαίρεση του θρεπτικού υλικού των κυττάρων και πρόσθεση απευθείας σε αυτά διαλύματος γλουταμινικού οξέος συγκέντρωσης 50 μM . Οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν από το επόμενο φρεάτιο στο οποίο είχε προστεθεί γλουταμινικό οξύ στο θρεπτικό υλικό, με τελική συγκέντρωση 25 μM (ώστε και αυτό να αποτελεί τελικώς δεκαδική αραιώση του προηγούμενου φρεατίου, των 50 μM).

3. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με την Μέθοδο Bradford

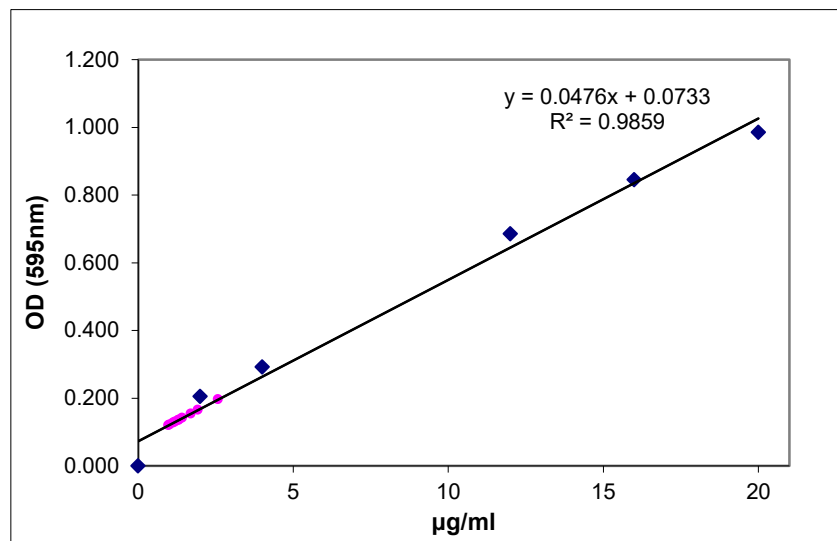
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών του δείγματος που συλλέγεται ως υπερκείμενο μετά τη λύση και φυγοκέντρωση των κυττάρων επιτυγχάνεται με την μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο ότι οι πρωτεΐνες, σε όξινο περιβάλλον, αντιδρούν με τη χρησιμοποιούμενη χρωστική Coomassie Brilliant Blue. Προϊόν της αντίδρασης είναι ένα χαρακτηριστικό κυανό χρώμα, σταθερό για περίπου μία ώρα και επηρεαζόμενο ελάχιστα ή καθόλου από άλλα συστατικά του διαλύματος, με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm.

Για τον υπολογισμό συγκέντρωσης σε πρωτεΐνη αγνώστων διαλυμάτων, είναι πρώτα απαραίτητη η δημιουργία μίας πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Η πρότυπη καμπύλη προκύπτει από την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) διαλυμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης από πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης (Bovine Serum Albumin, BSA, 1 mg/ml σε νερό). Διαφορετικές, γνωστές ποσότητες διαλύματος αλβουμίνης αραιώνονται σε νερό και αυτά τα δείγματα αντιδρούν με 1 ml αντιδραστήριου Bradford για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτάδι. Έπειτα, τα διαλύματα αυτά φωτομετρούνται στα 595 nm. Οι ποσότητες των χρησιμοποιούμενων όγκων των διαλυμάτων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Ποσότητες των αντιδραστηρίων για την πρότυπη καμπύλη της μεθόδου Bradford

Σωλήνας	H ₂ O (μl)	BSA (μl)	BSA (αντιστοίχιση σε μg)	Αντιδραστήριο Bradford (ml)
1 (τυφλό)	100	0	0	1
2	98	2	2	1
3	96	4	4	1
4	92	8	8	1
5	88	12	12	1
6	84	16	16	1
7	80	20	20	1

Οι οπτικές πυκνότητες που προκύπτουν από αυτούς τους σωλήνες τοποθετούνται στην πρότυπη καμπύλη στις αντίστοιχες γνωστές συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών. Ένα παράδειγμα πρότυπης καμπύλης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία παρατίθεται παρακάτω. Στον άξονα των x βρίσκεται η συγκέντρωση πρωτεΐνης και στον άξονα των y η OD.



Εικόνα 22: Ενδεικτική πρότυπη καμπύλη ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών.

Πίνακας 2: Ενδεικτικές τιμές οπτικής πυκνότητας των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την πρότυπη καμπύλη.

BSA (μl)	OD(595)
0	0,000
2	0,205
4	0,292
8	0,513
12	0,685
16	0,845
20	0,985

Να σημειωθεί ότι μπορεί να απορριφθεί έως μία τιμή από τις ληφθείσες έτσι ώστε το R^2 να μπορεί να πάρει αξιόπιστη τιμή, δηλαδή μεγαλύτερη του 0,985, όπως και έγινε στο συγκεκριμένο παράδειγμα (απόρριψη της τιμής OD που λήφθηκε από τον σωλήνα με τα 8 μl BSA).

Η ίδια διαδικασία, αλλά με πρόσθεση 1 μl δείγματος υπό μελέτη σε 99 μl απιονισμένο νερό και 1 ml αντιδραστηρίου Bradford, ακολουθείται σε αυτήν την μέθοδο για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο δείγμα. Η οπτική πυκνότητα που λαμβάνεται από τον σωλήνα του δείγματος τοποθετείται στην πρότυπη καμπύλη και αντιστοιχείται με βάση αυτήν στην αντίστοιχη υπολογιζόμενη συγκέντρωση των πρωτεϊνών που περιέχει. Ακολουθεί υπολογισμός του όγκου του δείγματος που πρέπει να προστεθεί σε ένα σωληνάριο τύπου Eppendorf, καθώς και οι αντίστοιχοι όγκοι του νερού και διάλυμα φόρτωσης, ώστε να έχουμε την επιθυμητή τελική περιεκτικότητα πρωτεϊνών σε ένα δείγμα που προορίζεται για Western Blotting.

4. Διάλυμα φόρτωσης (Sample Buffer)

Στους υπολογιζόμενους όγκους δειγμάτων των πρωτεϊνών προστίθεται διάλυμα sample buffer, το οποίο θα φέρει όγκο ίσο με το $\frac{1}{4}$ του όγκου του τελικού διαλύματος, και έπειτα φυλάσσεται στους -20°C . Τα συστατικά του sample buffer αναγράφονται και εξηγούνται παρακάτω:

- Tris – HCl 250 mM, pH 6,8: χρησιμοποιείται ως ρυθμιστικό διάλυμα για την διατήρηση του σωστού pH στο δείγμα.
- SDS 8% w/v: ιοντικό απορρυπαντικό που διαλυτοποιεί τις πρωτεΐνες και εξασφαλίζει την κάλυψή τους από σύννεφο αρνητικών φορτίων τα οποία προσδέονται στις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων σχετικά ομοιόμορφα. Έτσι, στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης θα διαχωρίζονται μόνο με βάση το μοριακό τους βάρος, καθώς όλες οι πρωτεΐνες θα έλκονται από τον θετικό πόλο.

- Γλυκερόλη 40% v/v: χρησιμεύει στο να αυξήσει την πυκνότητα του δείγματος σε σχέση με το περιβάλλον διάλυμα ηλεκτροφόρησης και έτσι η φόρτωσή τους θα είναι ευκολότερη
- β-μερκαπτοαιθανόλη 20% v/v: πρόκειται για αναγωγικό, αποδιατακτικό παράγοντα, που εξασφαλίζει την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών από τις τεταρτοταγείς και τριτοταγείς δομές τους και διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών. Η διαδικασία αυτή φέρνει τις πρωτεΐνες σε γραμμική μορφή. Η δράση της ενισχύεται από τον βρασμό των δειγμάτων για 4 λεπτά στους 100° C.
- Κυανούν της βρωμοφαινόλης 0,008 % w/v: είναι απαραίτητο για την παρακολούθηση του μετώπου των πρωτεϊνών όταν αυτές διαχωρίζονται στο πήκτωμα με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης.
- ddH₂O έως τον επιθυμητό όγκο.

5. Δοκιμασία Ανοσοσύπωσης κατά Western (Western blot)

Με τη δοκιμασία Ανοσοσύπωσης κατά Western ή αλλιώς Western blot μπορούμε να επιτύχουμε τον διαχωρισμό και την ανίχνευση μιας πρωτεΐνης από ένα πολύπλοκο μείγμα πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αρχικά διαχωρίζονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με βάση το μοριακό τους βάρος, έπειτα μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, επώάζονται με αντίσωμα ειδικό για πρόσδεση σε συγκεκριμένη πρωτεΐνη, προστίθεται δεύτερο αντίσωμα ειδικό για την σταθερή περιοχή του πρώτου αντισώματος (Fc) και συζευγμένο με ενεργό ένζυμο το οποίο αντιδρώντας με το υπόστρωμά του δίνει φως.

5.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE electrophoresis)

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες όταν βρίσκονται σε διαφορετικό pH από το ισοηλεκτρικό τους σημείο και υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου μετακινούνται κατά μήκος του πηκτώματος. Η μετακίνηση των πρωτεϊνών εξαρτάται κανονικά από το φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα των μορίων. Όμως επειδή τα μόρια διαχωρίζονται υπό την επίδραση μετουσιωτικών συνθηκών που εξομοιώνουν τα διαφορετικά σχήματά τους (διάσπαση δισουλφιδικών δεσμών από την β-μερκαπτοαιθανόλη και ενίσχυση με βρασμό) και καθώς το SDS τις φορτίζει αρνητικά, έχουν παρόμοιες αναλογίες φορτίου-βάρους (περίπου 1,4 g SDS αντιστοιχεί σε 1 g πρωτεΐνη). Αποτέλεσμα αυτού είναι ότι όταν οι πρωτεΐνες τοποθετηθούν σε ηλεκτρικό πεδίο ο διαχωρισμός τους θα εξαρτάται αποκλειστικά από το μέγεθος (μοριακό βάρος) και όχι από το φορτίο ή σχήμα τους. Τα διαφορετικά μεγέθη των μορίων θα επιδρούν πάνω στην ταχύτητα που αυτά ταξιδεύουν προς τον θετικό πόλο, με τις μεγαλύτερες πρωτεΐνες να μετακινούνται με μικρότερη ταχύτητα λόγω της αντίστασης που βρίσκουν από τα

μόρια του πηκτώματος. Αντίθετα, στα μικρότερα μόρια προβάλλεται μικρότερη αντίσταση από την πολυακρυλαμίδη, και έτσι μπορούν να μετακινούνται με μεγαλύτερες ταχυτητες.

Καθώς η μήτρα του πηκτώματος είναι η πολυακρυλαμίδη, αυτό μπορεί να κατασκευαστεί με διαφορετικές περιεκτικότητες σε ακρυλαμίδη ώστε να σχηματίζονται διαφορετικών μεγεθών πόροι από τους οποίους θα διέλθουν οι πρωτεΐνες. Τα διάφορα μεγέθη πόρων κάνουν διαθέσιμη μία μεγάλη ποικιλία συνθηκών διαχωρισμού, έτσι ώστε κάθε φορά να επιλέγονται οι κατάλληλες, αναλόγως με τα σχετικά μεγέθη των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Για την μελέτη κυρίως μεγαλύτερων πρωτεϊνών επιλέγονται μικρότερες περιεκτικότητες του πηκτώματος σε πολυακρυλαμίδη ώστε αυτές να μπορούν να μετακινηθούν στο πήκτωμα και να γίνονται εμφανείς οι διαφορές τους. Αντίθετα για μικρότερες πρωτεΐνες επιλέγονται μεγαλύτερες περιεκτικότητες σε πολυακρυλαμίδη ώστε αυτές να βρίσκουν ανίσταση κατά την μετακίνησή τους και να συγκρατώνται στο πήκτωμα ενώ διαχωρίζονται. Στα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα 10% περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδη για την ανίχνευση των μελετώμενων πρωτεϊνών.

Για την επίτευξη της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν 2 πηκτώματα: το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) και πάνω του το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel) για την φόρτωση των δειγμάτων. Το stacking gel έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε πολυακρυλαμίδη ώστε να βοηθά στη γρήγορη, ταυτόχρονη μεταφορά όλων των πρωτεϊνών στην άκρη του separating, ενώ το separating μεγαλύτερη περιεκτικότητα ώστε να επιβραδύνει την μετακίνηση των πρωτεϊνών. Για τον σχηματισμό των φρεατίων στο stacking gel χρησιμοποιήθηκαν χτένια των 10 ή 15 θέσεων, τα οποία τοποθετούνται πριν λάβει χώρα ο πολυμερισμός του stacking gel. Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τα separating και stacking gel:

Πίνακας 3: Υλικά πηκτώματος διαχωρισμού 10% (Separating gel)

Αντιδραστήρια	Όγκος (ml) για την παρασκευή 10 ml separating gel που απαιτείται για ένα gel
dH₂O	4
30% μείγμα ακρυλαμίδης	3,3
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5
10% SDS	0,1
10% APS	0,1
TEMED	0,004

Πίνακας 4: Υλικά πηκτώματος επιστοιβάξης (Stacking gel)

Αντιδραστήρια	Όγκος (ml) για την παρασκευή 3 ml separating gel που απαιτείται για ένα gel
dH ₂ O	2,1
30% μείγμα ακρυλαμίδης	0,5
1,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,38
10% SDS	0,03
10% APS	0,03
TEMED	0,003

Να σημειωθεί ότι το APS (Ammonium Persulfate) και το TEMED (N,N,N',N'-tetramethylene diamine) προστίθενται στο separating gel ακριβώς πριν από την τοποθέτηση του στη γυάλινη συσκευή, στην οποία σχηματίζονται, αλλά και στο stacking gel ακριβώς πριν την επιστοιβάξή του στο separating.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία παρασκευής των πηκτωμάτων, τα δείγματα θερμαίνονται στους 100° C για 4 λεπτά. Σε κάθε φρεάτιο τοποθετούνται 30 μl δείγματος όταν πρόκειται για πηκτώματα με 10 φρεάτια, ενώ 20 μl όταν πρόκειται για πηκτώματα με 15 φρεάτια. Αντιστοίχως μέσα σε αυτόν τον όγκο περιέχονται τα επιθυμητά μg πρωτεΐνης. Στο πρώτο συνήθως φρεάτιο φορτώνονται 3-5 μl πρωτεϊνικού δείκτη γνωστού μοριακού βάρους (protein markers, Nippon Genetics Europe, Blue Star Extra). Έπειτα τα πηκτώματα βυθίζονται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X (Running buffer) και εφαρμόζεται αρχικά τάση 100-110 V έως να γίνουν εμφανείς οι διαφορετικές ζώνες του marker και στη συνέχεια η τάση αυξάνεται στα 130-150 V μέχρι τον επιθυμητό διαχωρισμό των διάφορων μοριακών βαρών, με βάση τον marker. Τα συστατικά του Running buffer 5X είναι:

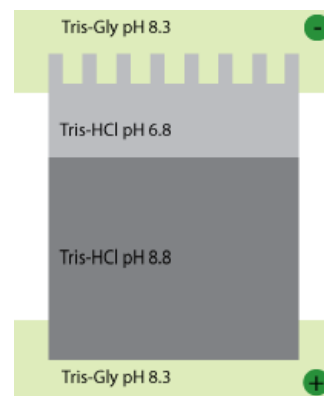
- Tris-Base 125 mM (15,1 gr/l): διατηρεί το pH στο 8,3
- Γλυκίνη 960 mM (72 gr/l)
- SDS 0,5% (5gr ή 50 ml από stock 10% SDS)
- dH₂O έως τον επιθυμητό όγκο

Το 5X Running buffer, το οποίο φυλάσσεται στους 4° C, στη συνέχεια αραιώνεται με dH₂O έως σχηματισμού της επιθυμητής ποσότητας (σύννηθος διάλυση 200 ml 5X Running buffer σε 800 ml H₂O για σχηματισμό 1 l) 1X διαλύματος. Το 1X Running buffer μπορεί να χρησιμοποιηθεί έως 2 φορές για ηλεκτροφόρηση.

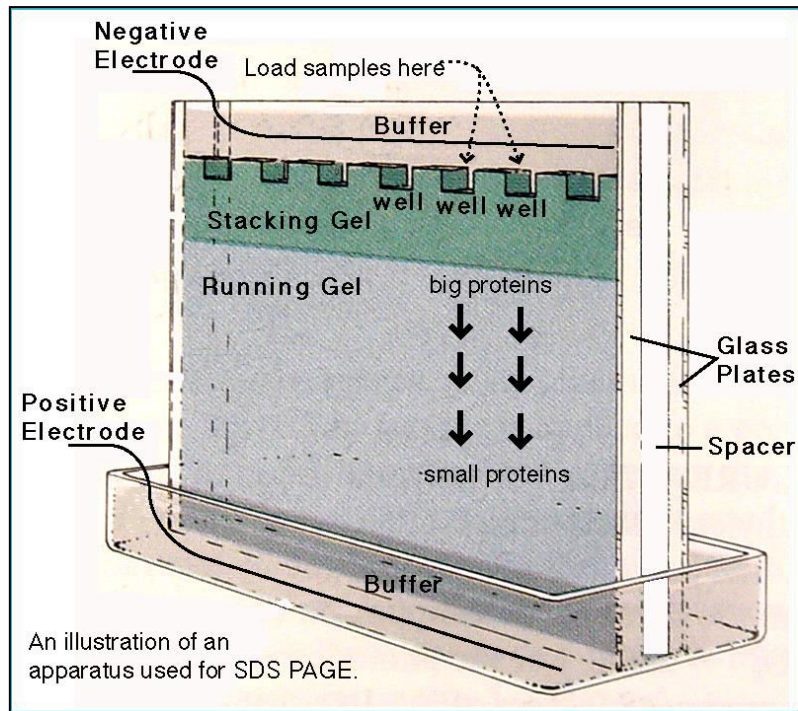
Τα διαφορετικά pH στο σύστημα της ηλεκτροφόρησης της μεθόδου υπάρχουν για τους εξής λόγους. Η γλυκίνη του Running buffer μπορεί να υπάρχει σε 3 διαφορετικές μορφές σχετικά με το φορτίο της, την ουδέτερη, την θετικά και την

αρνητικά φορτισμένη, αναλόγως με το pH. Όταν ξεκινάει η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου, η γλυκίνη στην αρνητικά φορτισμένη της μορφή που υπάρχει στο pH 8,3 του Running buffer εξαναγκάζεται να εισέλθει στο stacking gel, όπου όμως το pH είναι 6,8. Σε αυτό το περιβάλλον η γλυκίνη μεταπίπτει κυρίως στην ουδέτερη μορφή της, και αυτή η απώλεια φορτίου προκαλεί την πολύ αργή μετακίνησή της στο ηλεκτρικό πεδίο. Αντίθετα, τα ιόντα Cl⁻ (από το Tris-HCl) μετακινούνται πολύ γρηγορότερα στο ηλεκτρικό πεδίο καθώς είναι φορτισμένα και σχηματίζουν ένα ιονικό μέτωπο που μετακινείται έμπροσθεν της γλυκίνης. Ο διαχωρισμός των Cl⁻ από το Tris (το οποίο, καθώς είναι θετικά φορτισμένο, μετακινείται αντιθέτως προς την άνοδο) σχηματίζει μία στενή ζώνη με απότομη διαβάθμιση τάσης η οποία έλκει την γλυκίνη πίσω της. Αυτά τα γεγονότα έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό δύο στενά διαχωρισμένων ιοντικών μετώπων: τα αυξημένης κινητικότητας Cl⁻ ακολουθούμενα από τα βραδείας κίνησης, κυρίως ουδέτερα μόρια γλυκίνης. Όλες οι πρωτεΐνες των δειγμάτων έχουν μία κινητικότητα που είναι ενδιάμεση αυτών των δύο ακραίων μετώπων, και έτσι ενώ αυτά τα δύο διέρχονται από τα φρεάτια, οι πρωτεΐνες συμπαρασύρονται στον στενό χώρο μεταξύ τους που τα διαχωρίζει.

Αυτή η πορεία συνεχίζει μέχρι να φθάσουν στο separating gel. Εκεί καθώς το pH είναι 8,8, η γλυκίνη παίρνει κυρίως την αρνητική μορφή και μπορεί να μετακινείται πολύ γρηγορότερα από τις πρωτεΐνες, προσπερνώντας τις και αφήνοντάς τις σε μία πολύ στενή ζώνη ανάμεσα στο stacking και separating gel. Ο διαχωρισμός ξεκινάει από αυτό το σημείο, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης ακρυλαμίδης.^[87]



Εικόνα 23: Τα διαφορετικά pH στα πηκτώματα και στο διάλυμα τρεξίματος (πηγή: <https://bitesizebio.com/580/how-sds-page-works/>)



Εικόνα 24: Η συσκευή ηλεκτροφόρησης (πηγή:

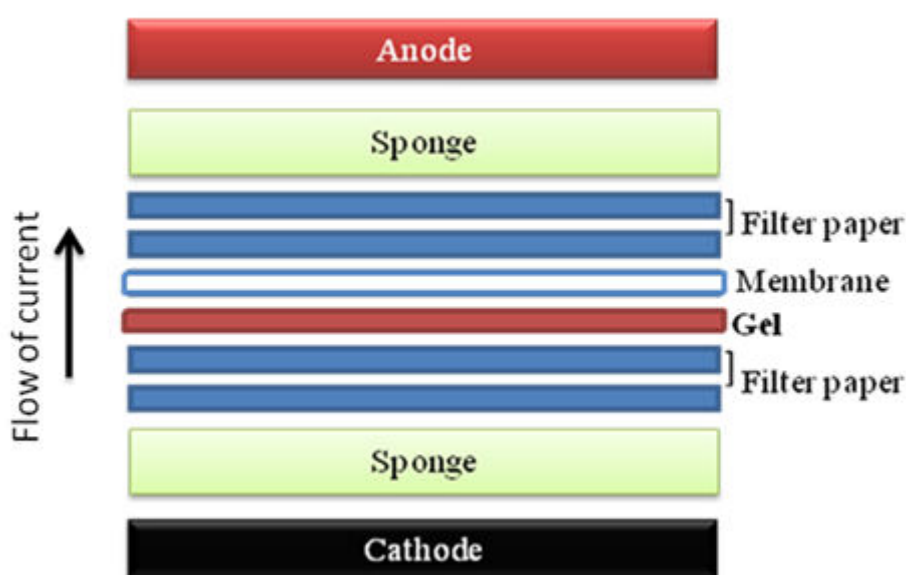
https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/course_information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.htm)

5.2. Υγρή ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Transfer)

Μετά τον διαχωρισμό τους στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πόρων 0,45 μm και πάλι με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, με σκοπό να μπορούν να προσδεθούν σε αυτές αντισώματα. Η νιτροκυτταρίνη, μία θετικά φορτισμένη μεμβράνη, μπορεί να προσδέσει μη ειδικά οποιαδήποτε πρωτεΐνη. Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκε να γίνεται υγρή ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών (transfer), η οποία γίνεται με ειδική συσκευή transfer και με τη χρήση ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς (Transfer buffer). Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το separating gel, 2 απορροφητικά υλικά (σφουγγάρια), 4 ή 6 χαρτιά Whatman και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετούνται μέσα στις κασέτες της συσκευής με την εξής σειρά: απορροφητικό υλικό – 2 ή 3 χαρτιά Whatman – μεμβράνη νιτροκυτταρίνης – separating gel – 2 ή 3 χαρτιά Whatman – απορροφητικό υλικό. Έπειτα, η κασέτα κλείνεται σφιχτά και όλες οι κασέτες τοποθετούνται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην τοποθέτηση νιτροκυτταρίνης και πηκτώματος έτσι ώστε να μην παγιδευθούν φυσαλίδες αέρα μεταξύ των δύο. Επίσης προσοχή πρέπει να δοθεί ώστε η πλευρά της κασέτας που βρίσκεται πλησιέστερα στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης να τοποθετηθεί προς το θετικό πόλο και η πλευρά πλησιέστερα στο gel προς τον αρνητικό, έτσι ώστε το ρεύμα να διέρχεται με φορά από το gel προς την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, και

έτσι να συμπαρασύρει τις πρωτεΐνες (από τον αρνητικό στον θετικό πόλο). Στην συσκευή προστίθεται επίσης το διάλυμα μεταφοράς καθώς και μία παγοκύστη, ώστε να αποφεύγεται η ανάπτυξη μεγάλων θερμοκρασιών κατά την διάρκεια της διαδικασίας. Σε αυτόν τον σκοπό συνδράμει και η τοποθέτηση όλης της συσκευής σε δοχείο με πάγο. Στη συνέχεια εφαρμόζεται ρεύμα 390 mA, για 90-100 λεπτά. Τα συστατικά του Transfer buffer είναι:

- Tris-HCl 25mM, pH 8,3 (3,03 gr/l): ρυθμιστικό διάλυμα για την διατήρηση του pH
- Γλυκίνη 192 mM (14,4 gr/l)
- 20% μεθανόλη (200 ml/l): βοηθάει στην προσκόλληση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη και αποφεύγεται η διάχυσή τους.



Εικόνα 25: Η συσκευή μεταφοράς (πηγή: <https://nptel.ac.in/courses/102103013/module3/lec4/3.html>)

5.3. Χρώση της νιτροκυτταρίνης με την χρωστική Ponceau S

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, αυτή εμποτίζεται μέσα σε διάλυμα χρωστικής Ponceau S ώστε να ελεγχθεί η επιτυχής μεταφορά. Μέσα από αυτήν την διαδικασία επίσης επιτυγχάνεται ο έλεγχος της ισόποσης φόρτωσης πρωτεΐνης στα φρεάτια, καθώς η χρωστική βάφει μη ειδικά όλες τις πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα. Σε αυτό το σημείο, ακριβώς επειδή οι ζωνώσεις των πρωτεϊνών είναι εμφανείς, μπορεί να γίνει και το κόψιμο της μεμβράνης με σκοπό την επώαση σε διαφορετικά αντισώματα, ειδικά για διαφορετικές πρωτεΐνες. Η σύνθεση του διαλύματος χρωστικής Ponceau S είναι:

- Οξικό οξύ 5% v/v
- Ponceau S 0,1% w/v

Η πρόσδεση της χρωστικής είναι αντιστρεπτή με αποχρωματισμό, ώστε η ανοσοδοκιμασία που ακολουθεί να μπορεί να διεξαχθεί χωρίς πρόβλημα. Ο αποχρωματισμός της μεμβράνης γίνεται με εμπότισμό της σε διάλυμα TBST, στο οποίο διάλυμα λαμβάνουν χώρα και 2-3 διαδοχικές πεντάλεπτες πλύσεις. Η σύνθεση του διαλύματος πλύσεων TBST είναι:

- Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (από stock Tris-HCl 1M, pH 7,5)
- NaCl 150 mM (από stock NaCl 2,5 mM)
- Tween-20 0,1% v/v

5.4. Ανοσοδοκιμασία

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πραγματοποιείται με την χρήση αντισωμάτων. Η πρωτεΐνη λειτουργεί ως αντιγονικός επίτοπος για το πρωτογενές αντίσωμα, και στη συνέχεια η σταθερή Fc περιοχή του πρωτογενούς αντισώματος λειτουργεί ως επίτοπος για το δευτερογενές αντίσωμα. Πριν την χρήση των αντισωμάτων πρέπει να πραγματοποιηθεί η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης, στις οποίες δεν υπάρχουν πρωτεΐνες, έτσι ώστε να αυξάνεται η ειδικότητα πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος πάνω στην επιθυμητή πρωτεΐνη. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται Blocking, και πραγματοποιείται με αδρανοποιημένες πρωτεΐνες ή μη-ιοντικό απορροπαντικό. Τα blocking buffers θα πρέπει να καλύπτουν όλες τις μη ειδικές θέσεις, δεν θα πρέπει να αντικαθιστούν τις πρωτεΐνες – στόχους των αντισωμάτων ή να δεσμεύονται στις θέσεις που θα λειτουργήσουν ως επίτοποι, καθώς και να μην αντιδρούν με τα αντισώματα ή τα ανιχνευτικά αντιδραστήρια.^[88] Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε ως blocking διάλυμα σκόνη γάλακτος 5% w/v σε TBST, και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωαζόταν σε αυτό για 60-90 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσαν 3 πλύσεις των 5-10 λεπτών υπό ανάδευση μέσα σε TBST.

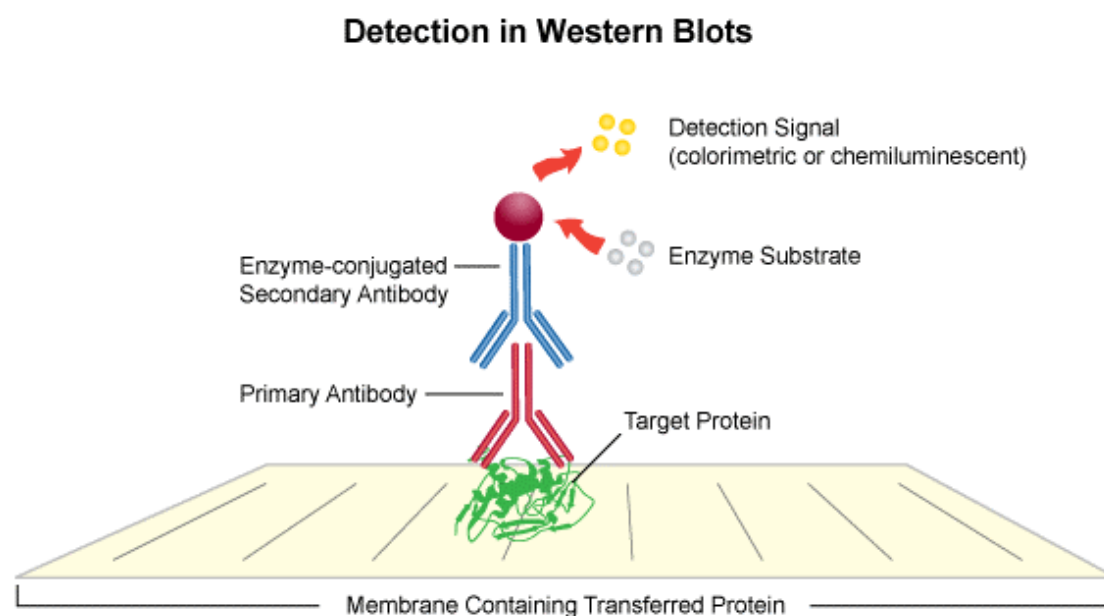
Στη συνέχεια η νιτροκυτταρίνη επωαζόταν με το πρωτογενές αντίσωμα υπό συνεχή ανάδευση στους 4° C και για 14-16 ώρες. Το πρωτογενές αντίσωμα βρισκόταν διαλυμένο σε διάλυμα 5% w/v BSA μέσα σε TBST, σε αραιώση 1:1.000 ή 1: 2.500 για το αντίσωμα της adaptin, όπως υποδεικνυόταν από τα αντίστοιχα data sheets. Μετά το πέρας αυτών των ωρών, αφαιρούνταν η περίσσεια διαλύματος αντισώματος και ακολουθούσαν 3 πλύσεις των 5-10 λεπτών σε TBST υπό συνεχή ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούσε επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, διαλυμένο σε διάλυμα 5% w/v BSA μέσα σε TBST σε αραιώση 1:1.000, υπό συνεχή ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου για 90 λεπτά. Τα δευτερογενή αντισώματα ήταν όλα anti-rabbit, εκτός της adaptin, το οποίο ήταν anti-goat.

Τόσο τα πολυκλωνικά όσο και τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι κατάλληλα ως πρωτογενή για την ανοσοδοκιμασία κατά Western. Τα μονοκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν μοναδικούς, συγκεκριμένους αντιγονικούς επιτόπους, και γι' αυτό

τον λόγο χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ειδικότητα και χαμηλότερο σήμα θορύβου. Τα πολυκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν περισσότερους επιτόπους και συχνά έχουν μεγαλύτερη συγγένεια. Η επιλογή του δευτερογενούς αντισώματος στηρίζεται στο είδος ζώου που παράχθηκε το πρωτογενές αντίσωμα (ειδοειδικότητα).^[88]

5.5. Εμφάνιση

Η εμφάνιση πραγματοποιούνται με την χρήση του εμφανιστικού μηχανήματος Transilluminator Imaging System FluorChem 8800 Light Cabinet και του λογισμικού FluorChem 8900 (Alpha Innotec, Γερμανία). Η κάμερα μέσα στο μηχάνημα λαμβάνει φωτογραφίες οι οποίες και μεταφέρονται στο λογισμικό σε ηλεκτρονική μορφή. Η εμφάνιση στηρίζεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας. Το δευτερογενές αντίσωμα που έχει προσδεθεί στο πρωτογενές, είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (Horse Radish Protein), το οποίο καταλύοντας μία αντίδραση χημειοφωταύγειας όταν έρχεται σε επαφή με το υπόστρωμά του παράγει φως, το οποίο και ανιχνεύουμε. Η αντίδραση αυτή είναι η οξείδωση της λουμινόλης με το H_2O_2 με την ταυτόχρονη παραγωγή φωτός, η οποία ενισχύεται έως και 1000 φορές σε ένταση μέσω ενισχυτών. Το υπόστρωμα για την HRP περιέχεται μέσα στο αντιδραστήριο Luminata (Immobilon Crescendo Western HRP substrate). Το φως ανιχνεύεται από το μηχάνημα μόνο στις περιοχές που υπάρχουν τα υπό μελέτη σύμπλοκα πρωτεΐνης – πρωτογενές αντίσωμα – δευτερογενές αντίσωμα.



Εικόνα 26: Η δράση και διαδοχή των αντισωμάτων στην ανοσοδοκιμασία (πηγή: <https://microbeonline.com/western-blot-technique-principle-procedures-advantages-and-disadvantages/>)

Σε κάθε ανοσοδοκιμασία κατά Western είναι απαραίτητο να χρησιμοποιείται και ένας μάρτυρας φορτώματος, δηλαδή house-keeping πρωτεΐνες, οι οποίες ανιχνεύονται με τα αντίστοιχα αντισώματα. Επειδή τα επίπεδά τους είναι παρόμοια

σε σχεδόν όλους τους ιστούς και κύτταρα, χρησιμεύουν στον έλεγχο ότι έχει γίνει φόρτωμα ίσης ποσότητας πρωτεΐνης ανά φρεάτιο των πηκτωμάτων. Με αυτόν τον τρόπο κανονικοποιείται και ποσοτικοποιείται το σήμα που λαμβάνεται από την ανίχνευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών, ώστε να μπορούν να συγκριθούν αξιόπιστα τα επίπεδα έκφρασής τους. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως house-keeping πρωτεΐνες, για τους παραπάνω ρόλους, οι πρωτεΐνες β-actin (42 kDa) και adaptin (106 kDa).

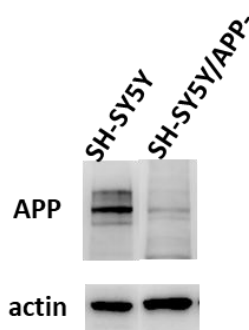
Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται μέσω της διαδικασίας της πυκνομέτρησης, η οποία στηρίζεται στην ένταση του φωτός που ανιχνεύεται σε κάθε ζώνη με την διαδικασία της εμφάνισης. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Image J, μέσω του οποίου ποσοτικοποιήθηκαν οι ζώνες πρωτεϊνών και σχηματίστηκαν τα αντίστοιχα ιστογράμματα. Για την σύγκριση των ποσοστών των διαφόρων πρωτεϊνών στα δείγματα σε σχέση με τα control χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Student's T-test. Στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε η τιμή $P < 0,05$. Η επεξεργασία των εικόνων έγινε με το πρόγραμμα Adobe Photoshop CS5.

IV. Αποτελέσματα

1. Σύγκριση βασικών επιπέδων πρωτεϊνών σε κύτταρα SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻

1.1. Επιβεβαίωση σίγησης APP

Αρχικά θελήσαμε να ελέγξουμε τα SH-SY5Y/APP⁻ ως προς το εάν η σίγηση της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς, APP, ήταν επιτυχής. Ο έλεγχος έγινε με βάση τα κύτταρα SK-N-SH, προγονικά των SH-SY5Y από τα οποία έχει σιγηθεί η APP, τα οποία εκφράζουν φυσιολογικά την APP. Βρέθηκε πως τα επίπεδα της APP όντως είναι μειωμένα στο ελάχιστο μετά από την εισαγωγή στα SH-SY5Y siRNA για την σίγησή της.



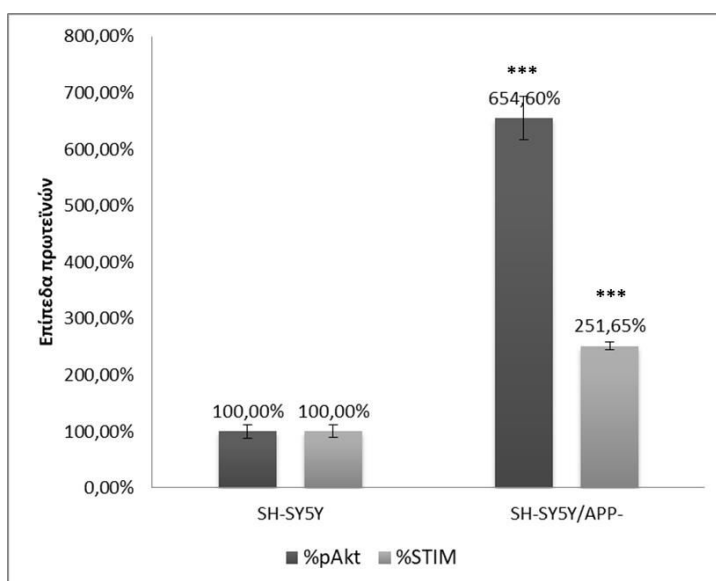
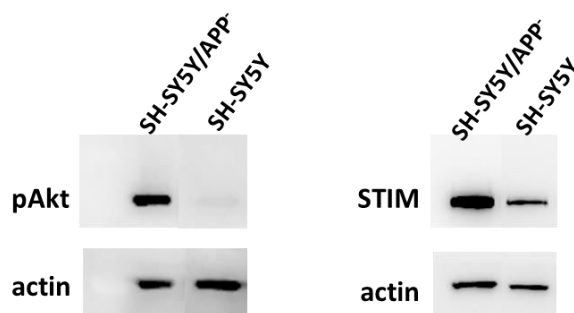
Εικόνα 27: Σύγκριση βασικών επιπέδων της APP σε κύτταρα SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻, από τα οποία έχει σιγηθεί η APP. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των APP και actin (για έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων) έγινε με ανοσοδοκιμασία κατά Western.

1.2. Πρωτεΐνες pAkt και STIM

Στόχο μελέτης σε αυτά τα πειράματα αποτέλεσαν τα επίπεδα των πρωτεϊνών pAkt (φωσφορυλιωμένη μορφή της pAkt στην Ser473) και STIM. Συγκεκριμένα έγινε η σύγκριση των επιπέδων αυτών των πρωτεϊνών σε κατάσταση ηρεμίας στις δύο κυτταρικές σειρές. Σκοπός ήταν να βρεθεί εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της σίγησης έκφρασης της APP στα SH-SY5Y κύτταρα και των βασικών επιπέδων των δύο αυτών πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων λήφθηκαν στις 48 ώρες μετά από ανακαλλιέργεια.

Πράγματι, όπως φαίνεται στην Εικόνα 28, τα επίπεδα των πρωτεϊνών STIM και pAkt εμφανίζουν σημαντική αύξηση στα κύτταρα SH-SY5Y/APP⁻. Ιδιαίτερως η πρωτεΐνη pAkt εμφανίζει εξαιρετικά μεγάλη αύξηση στα κύτταρα που έχει σιγηθεί η έκφραση της APP, τα SH-SY5Y/APP⁻, της τάξης του περίπου 550%. Όμως και η πρωτεΐνη STIM εμφανίζει σημαντική αύξηση, κατά περίπου 150%. Και οι δύο αυτές μεταβολές που παρατηρούνται στα επίπεδα των δύο πρωτεϊνών αποδεικνύονται ως στατιστικά

σημαντικές, με 3 βαθμούς στατιστικής σημαντικότητας. Ως αρχικά, άρα και ως κύτταρα ελέγχου, θεωρείται η μητρική σειρά SH-SY5Y, θέτοντας δηλαδή ως 100% τα επίπεδα των πρωτεϊνών στα κύτταρα αυτά. Μία εξίσου σημαντική διαφορά που έχει βρεθεί από παλαιότερα πειράματα του εργαστηρίου, μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών, είναι και η αδυναμία των SH-SY5Y/APP⁻ κυττάρων να διαφοροποιηθούν, σε αντίθεση με τα προγονικά SH-SY5Y κύτταρα.

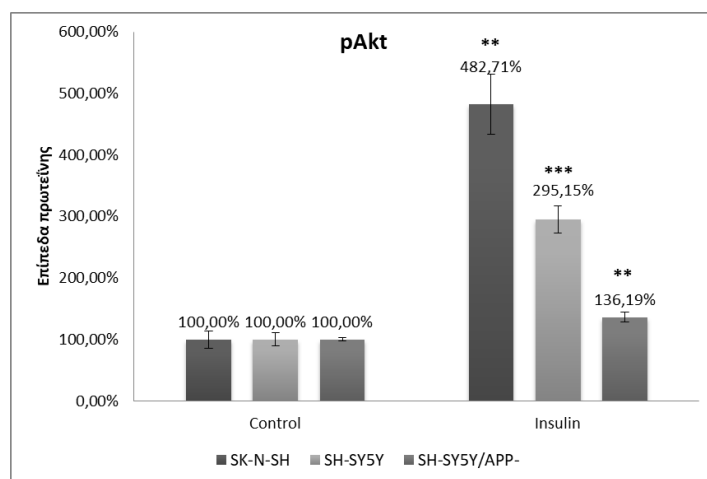
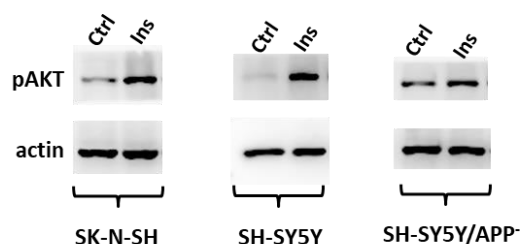


Εικόνα 28: Σύγκριση βασικών επιπέδων πρωτεϊνών σε SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των pAkt, STIM και actin (για έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων) έγινε με ανοσοδοκιμασία κατά Western. Οι τιμές στα διαγράμματα προέκυψαν μετά από πυκνομετρήσεις ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν την τιμή p σχετικά με το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας των τιμών. * : 0,01<p<0,05, **: 0,001<p<0,01, ***: p<0,001.

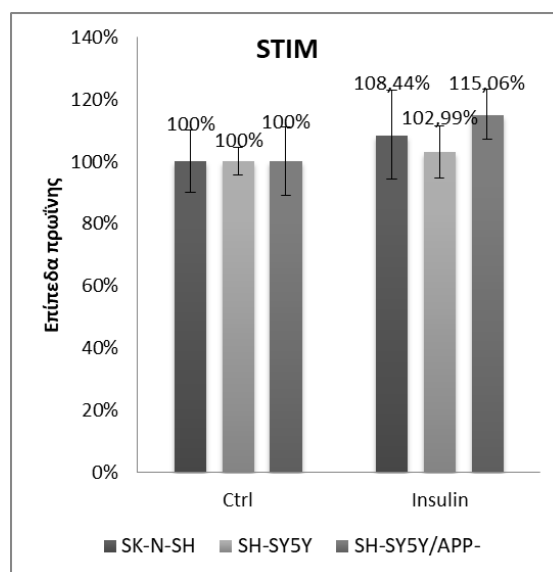
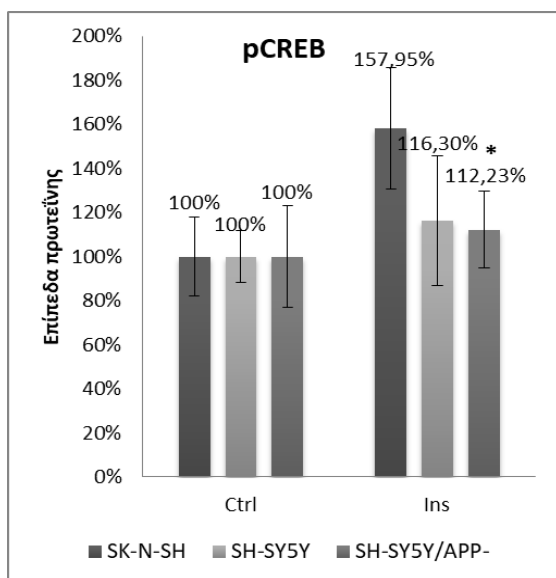
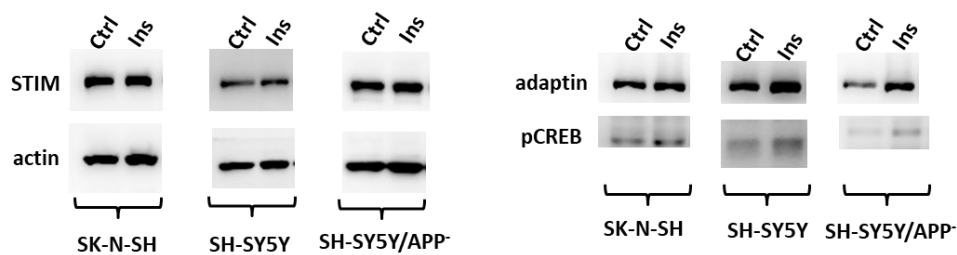
2. Σύγκριση επιπέδων πρωτεϊνών στις κυτταρικές σειρές SK-N-SH, SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻ υπό την επίδραση παραγόντων

2.1. Μελέτη επίδρασης ινσουλίνης

Επόμενο στόχο μελέτης αποτέλεσε η σύγκριση της απόκρισης των 3 κυτταρικών σειρών στην ινσουλίνη. Η ινσουλίνη αποτελεί ερέθισμα για την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, επομένως σκοπός ήταν να βρεθεί κάποια ενδεχόμενη διαφορά στο ποσοστό έκφρασης των σηματοδοτικών πρωτεϊνών ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές SK-N-SH, SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻. Τα κύτταρα έτσι επώασθησαν για 4 ώρες σε θρεπτικό μέσο προσθέτοντας ινσουλίνη (3,47 μg/ml θρεπτικού υλικού). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29, πράγματι βρίσκεται μία πολύ μεγάλη, στατιστικά σημαντική αύξηση στα ποσοστά έκφρασης της pAkt στα κύτταρα SK-N-SH και SH-SY5Y, με μέγιστη αύξηση αυτήν στα SK-N-SH κύτταρα, λόγω της ενεργοποίησης του μονοπατιού. Ωστόσο, η αύξηση στα ποσοστά έκφρασης της pAkt στα SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα είναι κατά πολύ μικρότερη. Επιπλέον δεν παρατηρείται μεγάλη ή στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά έκφρασης της πρωτεΐνης STIM ή pCREB (Εικόνα 30), σε καμία κυτταρική σειρά, πλην των κυττάρων SK-N-SH που παρουσιάζουν αύξηση στα ποσοστά pCREB, υπό την επίδραση ινσουλίνης.



Εικόνα 29: Σύγκριση επιπέδων pAkt υπό την επίδραση ινσουλίνης σε SK-N-SH, SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των pAkt, STIM και actin (για έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων) έγινε με ανοσοδοκιμασία κατά Western. Στις εικόνες της ανοσοδοκιμασίας κατά Western η ινσουλίνη αναγράφεται ως «Ins». Οι τιμές στα διαγράμματα προέκυψαν μετά από πυκνομετρήσεις ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν την τιμή p σχετικά με το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας των τιμών. * : 0,01<p<0,05, ** : 0,001<p<0,01, ***: p<0,001.

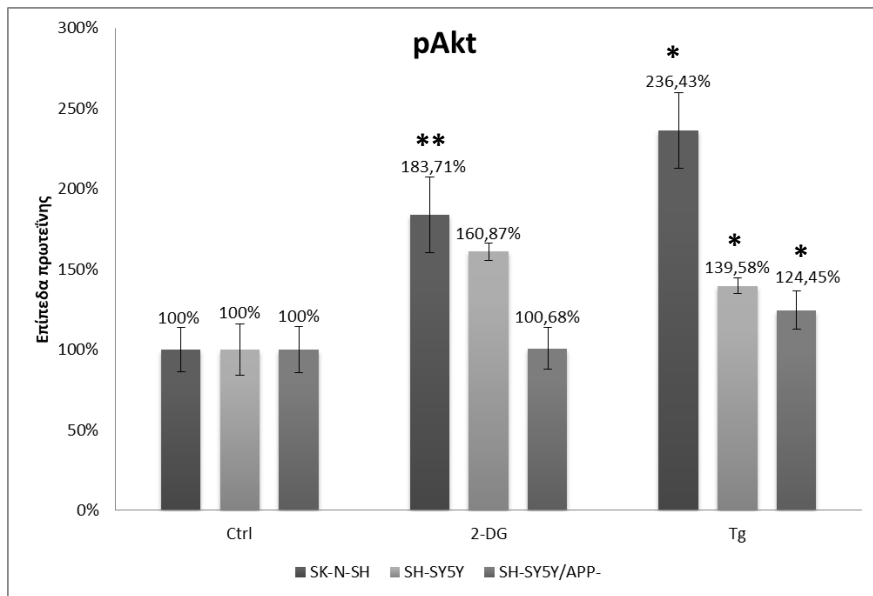
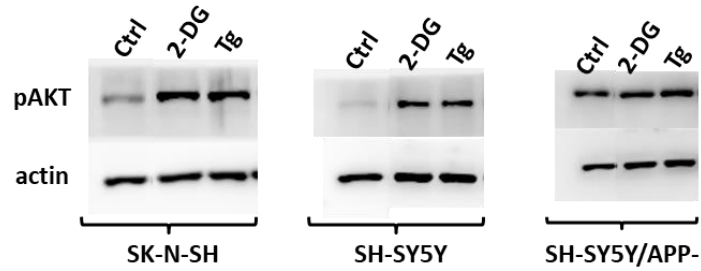


Εικόνα 30: Σύγκριση επιπέδων STIM και pCREB υπό την επίδραση ινσουλίνης σε SK-N-SH, SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των STIM, pCREB και actin, adaptin (για έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων) έγινε με ανοσοδοκιμασία κατά Western. Στις εικόνες της ανοσοδοκιμασίας κατά Western η ινσουλίνη αναγράφεται ως «Ins» και τα δείγματα Control ως «Ctrl». Οι τιμές στα διαγράμματα προέκυψαν μετά από πυκνομετρήσεις ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν την τιμή p σχετικά με το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας των τιμών. * : 0,01<p<0,05, ** : 0,001<p<0,01, *** : p<0,001.

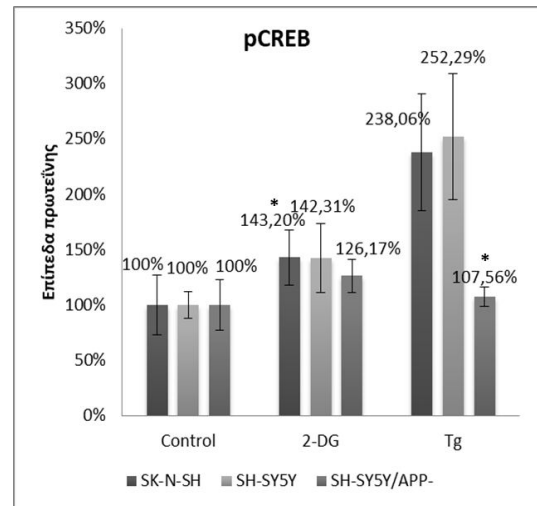
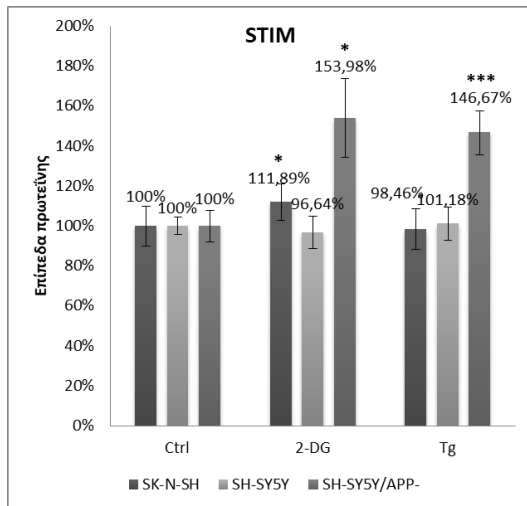
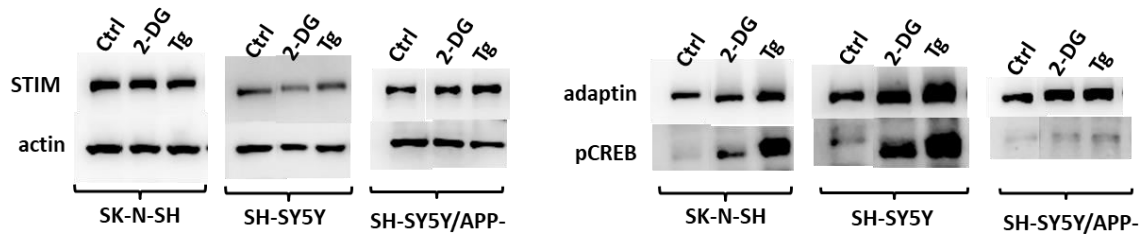
2.2. Μελέτη επίδρασης προσομοίωσης συνθηκών στέρησης γλυκόζης και εκκένωσης του ενδοπλασματικού δικτύου από Ca^{2+}

Ο στόχος μελέτης σε αυτά τα πειράματα ήταν η διερεύνηση μίας πιθανής διαφορικής απόκρισης των τριών κυτταρικών σειρών στους παράγοντες 2-δεοξυγλυκόζη (2-DG, 5 Mm), με την οποία επιτυγχάνεται προσομοίωση συνθηκών στέρησης γλυκόζης, και Thapsigargin (Tg, 250 nM), με την οποία επιτυγχάνεται μη αντιστρεπτή εκκένωση του ενδοπλασματικού δικτύου από τα ιόντα Ca^{2+} . Πράγματι (Εικόνα 31), είναι εμφανής μία σημαντική αύξηση στα ποσοστά της pAkt υπό την επίδραση των δύο παραγόντων στις δύο κυτταρικές σειρές SK-N-SH και SH-SY5Y. Και πάλι όμως, όπως και υπό την επίδραση της ινσουλίνης, η κυτταρική σειρά SH-SY5Y/APP⁻ δεν παρουσιάζει καμία αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της pAkt υπό την επίδραση της 2-DG, ή μία πολύ μικρή αύξηση στην περίπτωση της Tg. Στην περίπτωση της στέρησης γλυκόζης παρατηρείται η μεγαλύτερη διαφορά στα ποσοστά της pAkt με την προγονική σειρά SH-SY5Y. Συσχέτιση όμως θα μπορούσε να υπάρχει και με την διακίνηση του ασβεστίου, καθώς και εκεί παρατηρείται κάποια διαφορά στα ποσοστά της pAkt, κυρίως όμως σε σχέση με την SK-N-SH κυτταρική σειρά.

Οι μελέτες επεκτάθηκαν και στον προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊνών STIM και pCREB (Εικόνα 32) χωρίς όμως σαφή αποτελέσματα. Είναι εμφανής μία έντονη αύξηση της STIM πρωτεΐνης στα SH-SY5Y/APP⁻ υπό την επίδραση 2-DG και Tg, καθώς και μία ταυτόχρονη σταθερότητα του μεταγραφικού παράγοντα pCREB σε σχέση με τις άλλες δύο κυτταρικές σειρές. Το μεγάλο περιθώριο όμως που αφήνουν τα σφάλματα όπως αυτά προσδιορίστηκαν δεν μπορεί να μην ληφθεί υπόψη. Επομένως, ίσως θα ήταν δόκιμο, τα αποτελέσματα αυτά να επιβεβαιωθούν με περαιτέρω πειράματα. Ενδιαφέρον όμως εγείρει το γεγονός πως η αύξηση στην STIM στα SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα είναι στατιστικά σημαντική, ιδιαιτέρως στην περίπτωση της Tg. Η STIM, ως αισθητήρας των ιόντων Ca^{2+} στο κύτταρο, ίσως να σχετίζεται με την APP, και συγκεκριμένα με την έλλειψη αυτής στα συγκεκριμένα κύτταρα, καθώς κατά την εκκένωση του ενδοπλασματικού δικτύου από τα ιόντα ασβεστίου αυξάνεται σημαντικά περισσότερο σε σχέση με τα κύτταρα που εκφράζουν ομαλά την APP.



Εικόνα 31: Σύγκριση επιπέδων pAkt υπό την επίδραση προσομοίωσης στέρσης γλυκόζης (2-DG) και εκκένωσης του ενδοπλασματικού δικτύου από Ca^{2+} (Tg) σε SK-N-SH, SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των pAkt και actin (για έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων) έγινε με ανοσοδοκιμασία κατά Western. Η 2-δεοξυγλυκόζη συμβολίζεται ως «2-DG» και η Thapsigargin ως «Tg». Οι τιμές στα διαγράμματα προέκυψαν μετά από πυκνομετρήσεις ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν την τιμή p σχετικά με το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας των τιμών. * : $0,01 < p < 0,05$, **: $0,001 < p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

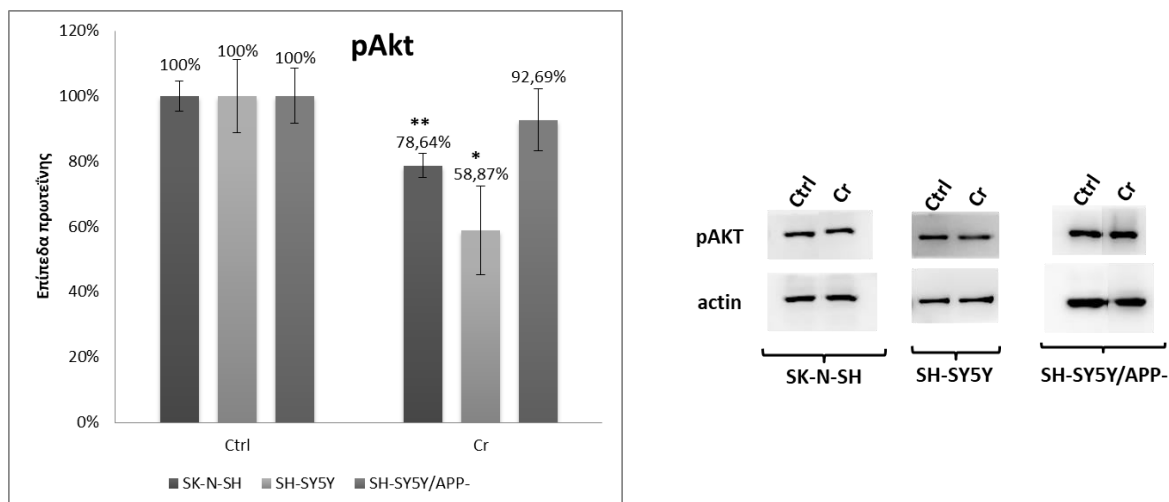


Εικόνα 32: Σύγκριση επιπέδων STIM και pCREB υπό την επίδραση προσομοίωσης στέρησης γλυκόζης (2-DG) και εκκένωσης του ενδοπλασματικού δικτύου από Ca^{2+} (Tg) σε SK-N-SH, SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα.

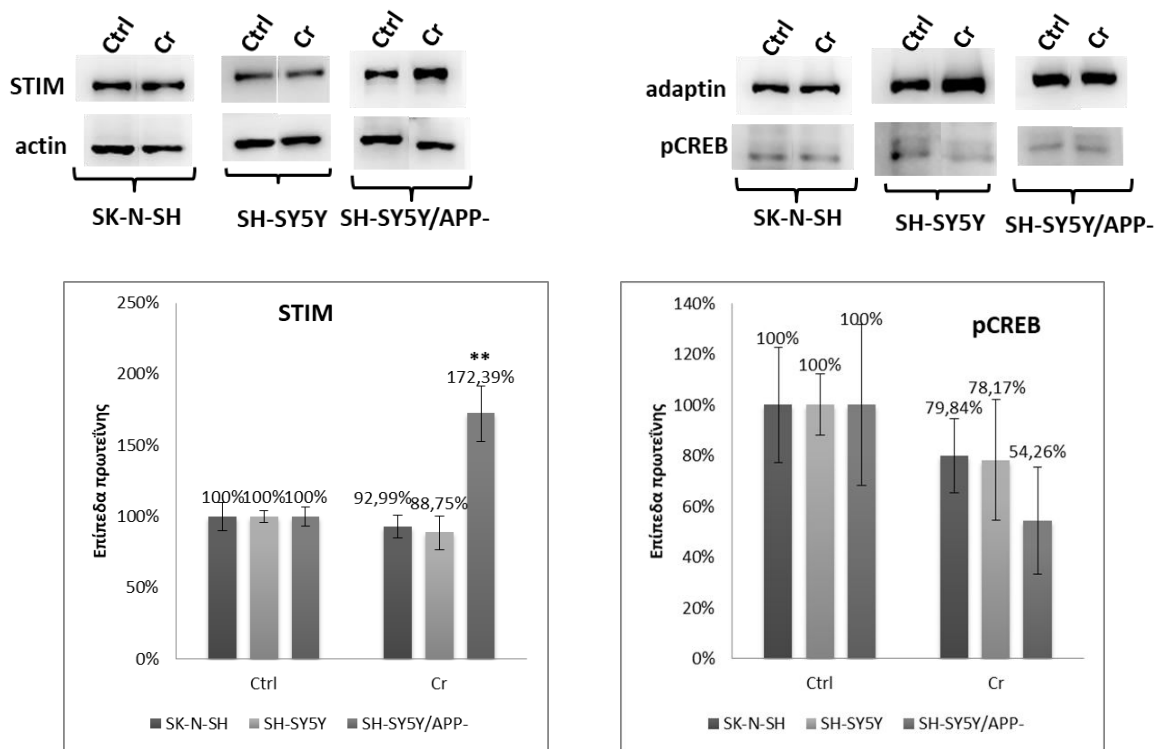
Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των STIM, pCREB και actin, adaptin (για έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων) έγινε με ανοσοδοκιμασία κατά Western. Η 2-δεοξυγλυκόζη συμβολίζεται ως «2-DG» και η Thapsigargin ως «Tg». Οι τιμές στα διαγράμματα προέκυψαν μετά από πυκνομετρήσεις ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν την τιμή p σχετικά με το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας των τιμών. * : 0,01<p<0,05, ** : 0,001<p<0,01, *** : p<0,001.

2.3. Μελέτη επίδρασης της κρεατίνης

Λόγω του νευροπροστατευτικού ρόλου που έχει αποδοθεί στην κρεατίνη, σε αυτά τα πειράματα μελετήθηκε αρχικά η επίδρασή της στις τρεις κυτταρικές σειρές (Cr, 5mM). Η pAkt βρέθηκε να μειώνεται σε σχέση με τα βασικά επίπεδα και στις τρεις κυτταρικές σειρές με τη χορήγηση κρεατίνης (Εικόνα 33). Ωστόσο και πάλι στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y/APP⁻ η μείωση αυτή είναι αισθητά μικρότερη, δηλαδή τα επίπεδα της pAkt είναι πολύ κοντά με αυτά των control δειγμάτων, παραμένοντας σχεδόν σταθερά. Αντίθετα, τα ποσοστά έκφρασης της STIM πρωτεΐνης είναι πολύ υψηλότερα σε αυτά τα κύτταρα με την χορήγηση κρεατίνης (Εικόνα 34), ενώ σταθερά παραμένουν στις άλλες δύο κυτταρικές σειρές. Ακόμη, παρατηρείται μία μείωση στον μεταγραφικό παράγοντα pCREB, αλλά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική και εμπεριέχει σχετικά μεγάλο σφάλμα. Επομένως δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για την συγκεκριμένη πρωτεΐνη.



Εικόνα 33: Σύγκριση επιπέδων pAkt υπό την επίδραση κρεατίνης σε SK-N-SH, SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των pAkt και actin (για έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων) έγινε με ανοσοδοκιμασία κατά Western. Η κρεατίνη συμβολίζεται ως «Cr». Οι τιμές στα διαγράμματα προέκυψαν μετά από πυκνομετρήσεις ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν την τιμή p σχετικά με το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας των τιμών. * : 0,01<p<0,05, **: 0,001<p<0,01, ***: p<0,001.



Εικόνα 34: Σύγκριση επιπέδων STIM και pCREB υπό την επίδραση κρεατίνης (Cr) σε SK-N-SH, SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των STIM, pCREB και actin, adaptin (για έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων) έγινε με ανοσοδοκιμασία κατά Western. Η κρεατίνη συμβολίζεται ως «Cr». Οι τιμές στα διαγράμματα προέκυψαν μετά από πυκνομετρήσεις ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν την τιμή p σχετικά με το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας των τιμών. * : $0,01 < p < 0,05$, ** : $0,001 < p < 0,01$, *** : $p < 0,001$.

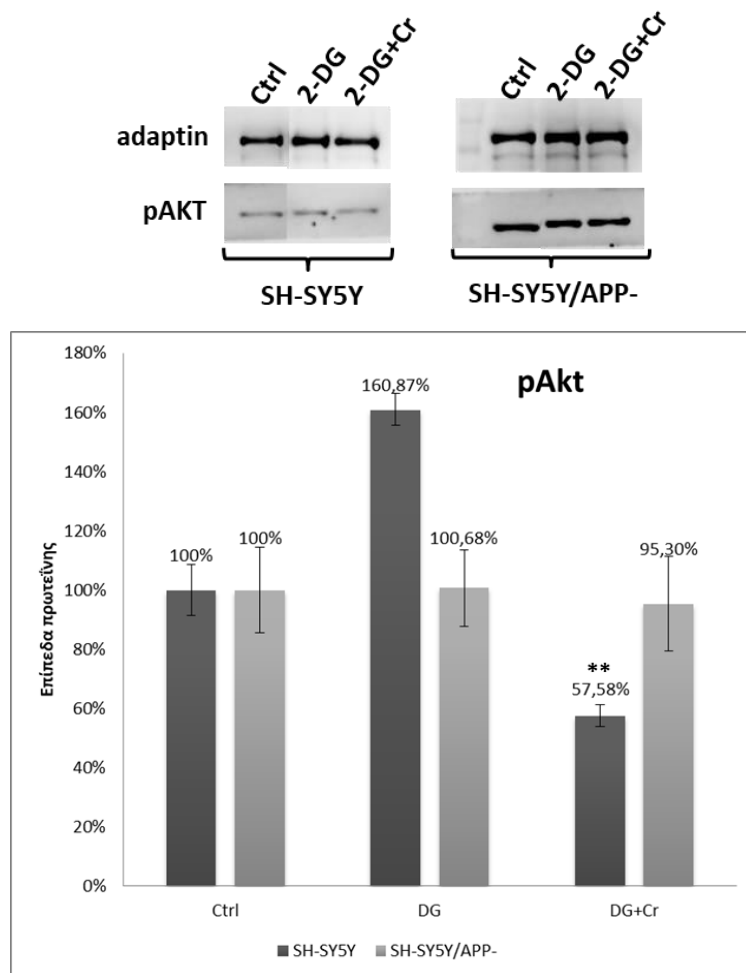
2.4. Μελέτη επίδρασης της κρεατίνης σε προσομοίωση συνθηκών στέρσης γλυκόζης ή εκκένωση του ενδοπλασματικού δικτύου από Ca^{2+}

Στη συνέχεια, στόχο μελέτης αποτέλεσε η επίδραση της προσομοίωσης συνθηκών στέρσης γλυκόζης (2-DG) ή εκκένωσης του ενδοπλασματικού δικτύου από Ca^{2+} (Tg) μετά από συνεπάωση όμως με κρεατίνη. Συγκεκριμένα, θεωρήθηκε δόκιμο να διερευνηθεί κάποια πιθανή διαφορά στα επίπεδα της pAkt μεταξύ κυττάρων που έχουν επωασθεί μόνο με τους δύο στρεσογόνους παράγοντες και αυτών που έχουν συνεπασθεί με κρεατίνη, η οποία ενδεχομένως να τους παρέχει κάποια προστασία. Στα τελευταία, η κρεατίνη προστέθηκε 16-18 ώρες πριν την πρόσθεση των στρεσογόνων παραγόντων 2-DG ή Tg. Επίσης, τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν τόσο σε SH-SY5Y όσο και σε SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα, ώστε να διαπιστωθεί κάποια πιθανή διαφοροποίηση στην απόκριση κυττάρων με ή χωρίς την APP.

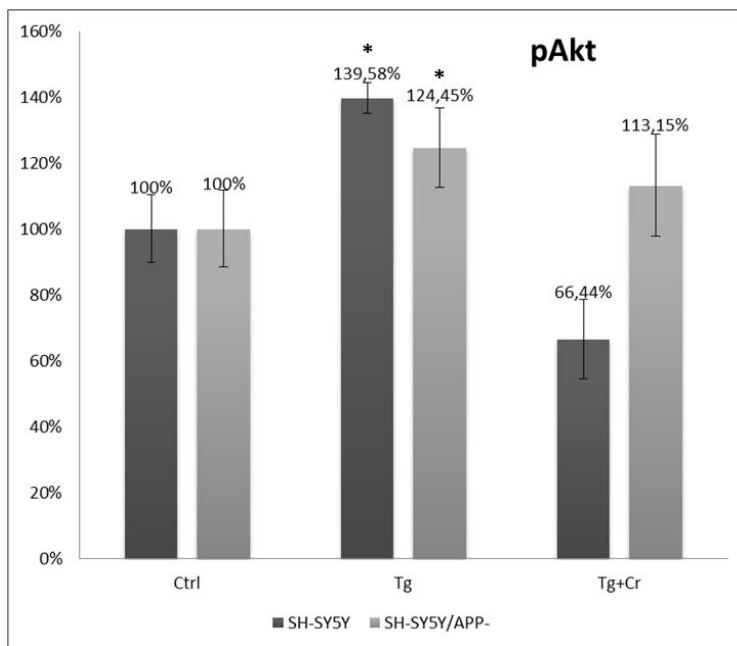
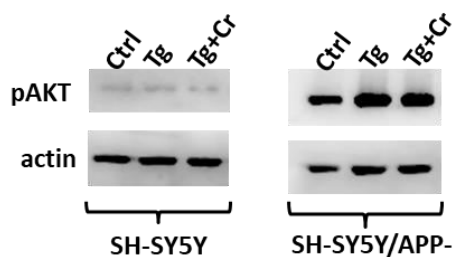
Πράγματι, η συνεπάωση με την κρεατίνη βρέθηκε να μειώνει τα επίπεδα της pAkt κοντά στα βασικά επίπεδα, σε σχέση με την επώαση μόνο με 2-DG στα SH-SY5Y

κύτταρα, ενώ τα επίπεδα και πάλι παραμένουν αρκετά σταθερά στα SH-SY5Y/APP⁻ (Εικόνα 35). Ακριβώς το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση της Tg, με την αρχική αύξηση της pAkt που παρατηρείται στα SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα υπό την επίδραση της Tg να μην αναιρείται σχεδόν καθόλου στην συνεπάωση με κρεατίνη (Εικόνα 36). Επομένως, ίσως και πάλι να υποδηλώνεται μία συσχέτιση στην απόκριση των κυττάρων αυτών και στην έλλειψη της APP.

Ο μηχανισμός ίσως να περιλαμβάνει προστασία των κυττάρων από την κρεατίνη ενάντια στην αρνητική δράση των 2-DG και Tg. Ως αποτέλεσμα, το αντι-αποπτωτικό μονοπάτι της pAkt, που προάγει την επιβίωση σε κάθε περίπτωση, να μην ενεργοποιείται στον ίδιο βαθμό. Αντίθετα, στα κύτταρα χωρίς την συνεπάωση με κρεατίνη, το μονοπάτι ενεργοποιείται εντονότερα.



Εικόνα 35: Σύγκριση επιπέδων pAkt υπό την επίδραση κρεατίνης (Cr) σε προσομοίωση συνθηκών στέρξης γλυκόζης (2-DG) σε SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των pAkt και adaptin (για έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων) έγινε με ανοσοδοκιμασία κατά Western. Οι τιμές στα διαγράμματα προέκυψαν μετά από πυκνομετρήσεις ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι αστερισκοί υποδεικνύουν την τιμή p σχετικά με το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας των τιμών. * : 0,01<p<0,05, **: 0,001<p<0,01, ***: p<0,001.



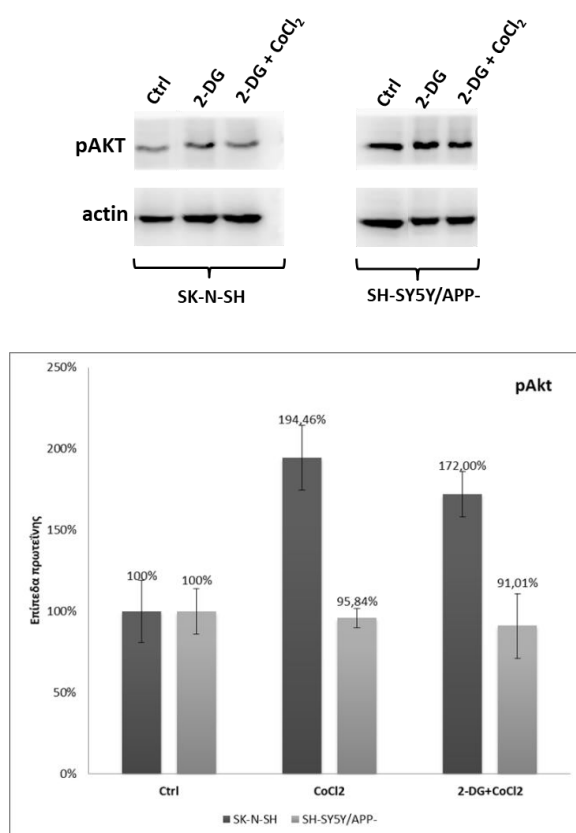
Εικόνα 36: Σύγκριση επιπέδων pAkt υπό την επίδραση κρεατίνης (Cr) σε συνθήκες εκκένωσης του ενδοπλασματικού δικτύου από Ca^{2+} (Tg) σε SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των pAkt και actin (για έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων) έγινε με ανοσοδοκιμασία κατά Western. Οι τιμές στα διαγράμματα προέκυψαν μετά από πυκνομετρήσεις ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν την τιμή p σχετικά με το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας των τιμών. * : $0,01 < p < 0,05$, ** : $0,001 < p < 0,01$, *** : $p < 0,001$.

2.5. Μελέτη επίδρασης προσομοίωσης συνθηκών στέρσης γλυκόζης και υποξίας

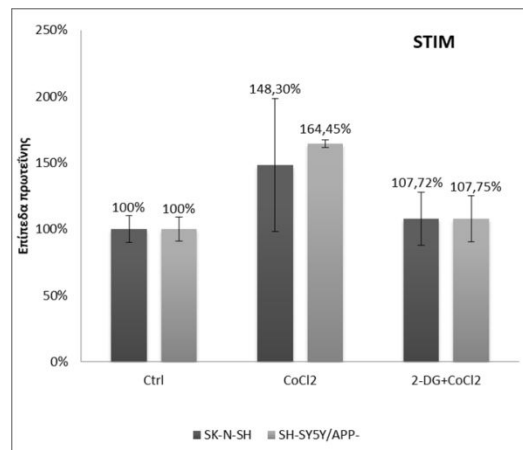
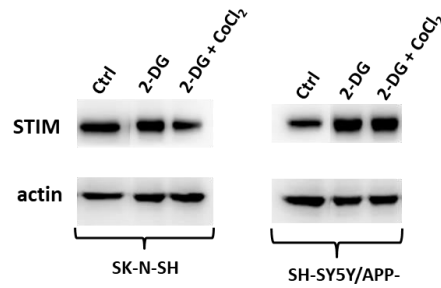
Σε αυτά τα πειράματα μελετήθηκε η συνδυαστική επίδραση προσομοίωσης συνθηκών στέρσης γλυκόζης (2-DG) και υποξίας (μέσω της χρήσης χλωριούχου κοβαλτίου $CoCl_2$). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στις κυτταρικές σειρές SK-N-SH και SH-SY5Y/APP⁻, ώστε να βρεθεί κάποια πιθανή διαφοροποίηση στην απόκριση που ενδεχομένως να σχετίζεται με την έλλειψη του APP.

Όπως και στους προηγούμενους κύκλους πειραμάτων βρέθηκε πως τα επίπεδα της pAkt παρέμεναν σχετικά σταθερά και στις δύο συνθήκες στα κύτταρα SH-SY5Y/APP⁻. Αντίθετα, στα προγονικά τους κύτταρα SK-N-SH παρατηρείται μεγαλύτερη αύξηση της pAkt υπό την επίδραση μόνο της υποξίας μέσω του CoCl₂, παρά στην συνδυαστική δράση των δύο παραγόντων, φαινόμενο που παρατηρείται και για την πρωτεΐνη STIM (Εικόνα 37). Όσον αφορά όμως την STIM, τα κύτταρα SH-SY5Y/APP⁻ ακολουθούν ένα διαφορετικό πρότυπο από την pAkt, εμφανίζοντας μία έντονη αύξηση στο CoCl₂, η οποία αναιρείται σχεδόν πλήρως με τις συνθήκες στέρησης γλυκόζης της 2-DG (Εικόνα 38).

Ωστόσο το σφάλμα που υπολογίσθηκε δεν μπορεί να παραβλεφθεί, καθώς είναι σχετικά μεγάλο. Θα χρειασθούν περαιτέρω επαναλήψεις για να εξαχθεί ένα πιο ασφαλές συμπέρασμα όσον αφορά και τις δύο πρωτεΐνες. Όμως, το σφάλμα στις συνθήκες υποξίας για τα κύτταρα SH-SY5Y/APP⁻ και για τις δύο πρωτεΐνες, δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλο, και η παρατηρούμενες διαφορές θα μπορούσαν να συνεπάγονται έντονη ενεργοποίηση του μονοπατιού της pAkt αλλά και του αισθητήρα ιόντων Ca²⁺, STIM, υπό αυτές τις συνθήκες.



Εικόνα 37: Σύγκριση επιπέδων pAkt υπό την επίδραση προσομοίωσης συνθηκών υποξίας (χλωριούχο κοβάλτιου (CoCl₂) και στέρησης γλυκόζης (2-DG) σε SK-N-SH και SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των pAkt και actin (για έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων) έγινε με ανοσοδοκιμασία κατά Western. Οι τιμές στα διαγράμματα προέκυψαν μετά από πυκνομετρήσεις ανεξάρτητων πειραμάτων.



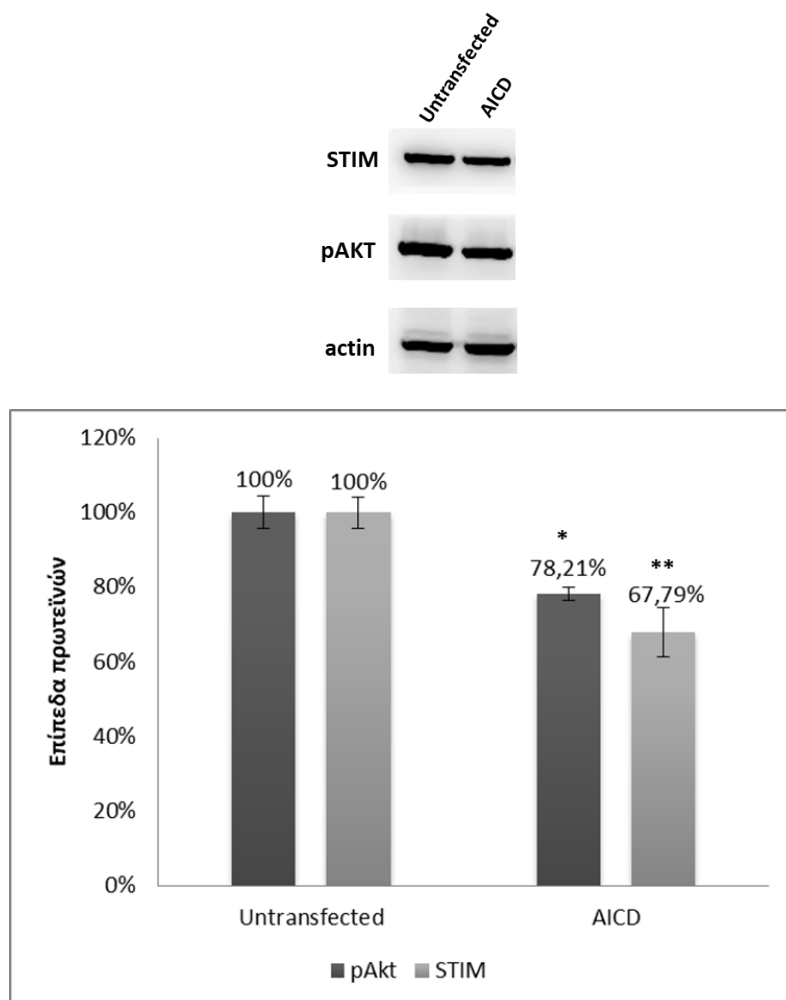
Εικόνα 38: Σύγκριση επιπέδων STIM υπό την επίδραση προσομοίωσης συνθηκών υποξίας (χλωριούχο κοβάλτιου (CoCl₂) και στέρσης γλυκόζης (2-DG) σε SK-N-SH και SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των STIM και actin (για έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων) έγινε με ανοσοδοκιμασία κατά Western. Οι τιμές στα διαγράμματα προέκυψαν μετά από πυκνομετρήσεις ανεξάρτητων πειραμάτων.

2.6. Διαμόλυνση SH-SY5Y/APP⁻ κυττάρων

Σε αυτά τα πειράματα στόχος μελέτης ήταν η διαπίστωση πιθανής αντιστροφής ορισμένων χαρακτηριστικών που είχαν βρεθεί προηγουμένως. Πιο συγκεκριμένα, έγινε διαμόλυνση των SH-SY5Y/APP⁻ κυττάρων με την ενδοκυτταρική καρβοξυτελική περιοχή της APP (APP Intracellular Carboxyterminal domain, AICD), την οποία έφερε πλασμιδιακός φορέας. Έτσι, θελήσαμε να μελετήσουμε εάν θα αντιστραφεί η πολύ μεγάλη αύξηση στις πρωτεΐνες pAkt και STIM που εμφανίζουν τα κύτταρα από τα οποία έχει σιγηθεί η APP σε σχέση με τα προγονικά τους, που την εκφράζουν φυσιολογικά.

Με την ανοσοδοκιμασία κατά Western βρέθηκε πράγματι στατιστικά σημαντική μείωση τόσο στην πρωτεΐνη STIM όσο και στην pAkt (Εικόνα 39) στα διαμολυσμένα (transfected) κύτταρα σε σχέση με τα μη-διαμολυσμένα (untransfected). Όμως αυτή η μείωση δεν μπορεί να συγκριθεί με την πολύ έντονη διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στην προγονική SH-SY5Y και στην SH-SY5Y/APP⁻. Με βάση αυτά τα δεδομένα, ίσως να μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η AICD παίζει πράγματι κάποιον ρόλο στην σηματοδότηση, γι' αυτό και όταν επανεισάγεται μέσα στα κύτταρα, από τα οποία εκλείπει ολόκληρη η APP, τα επίπεδα STIM και pAkt έρχονται πιο κοντά στα αντίστοιχα επίπεδα κυττάρων που εκφράζουν κανονικά την APP. Όμως οι άλλες περιοχές της APP, διαμεμβρανική και εξωκυτταρική που

δυναμικά αλληλεπιδρούν με έναν αριθμό άλλων μορίων και εξακολουθούν να εκλείπουν από τα transfected με AICD κύτταρα, ίσως να παίζουν μεγαλύτερο ρόλο στα επίπεδα των δύο πρωτεϊνών. Αυτός ίσως είναι ο λόγος που παρατηρείται μείωση, αλλά όχι της ίδια κλίμακας που θα αναμενόταν εάν εκκινούσε ξανά φυσιολογική έκφραση της APP.

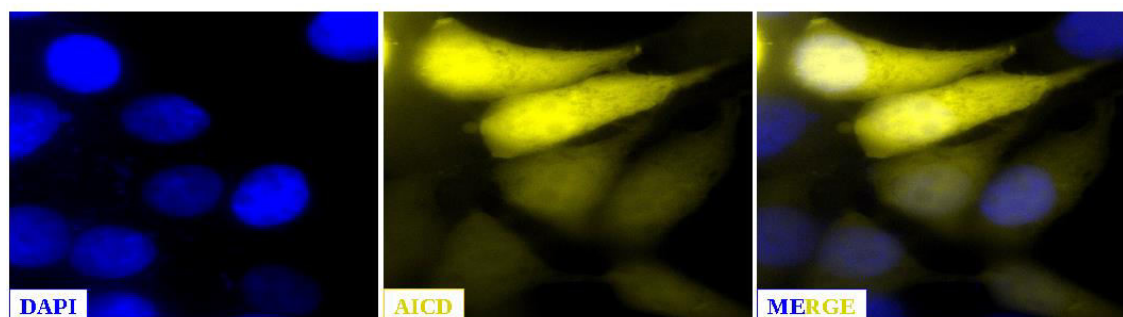
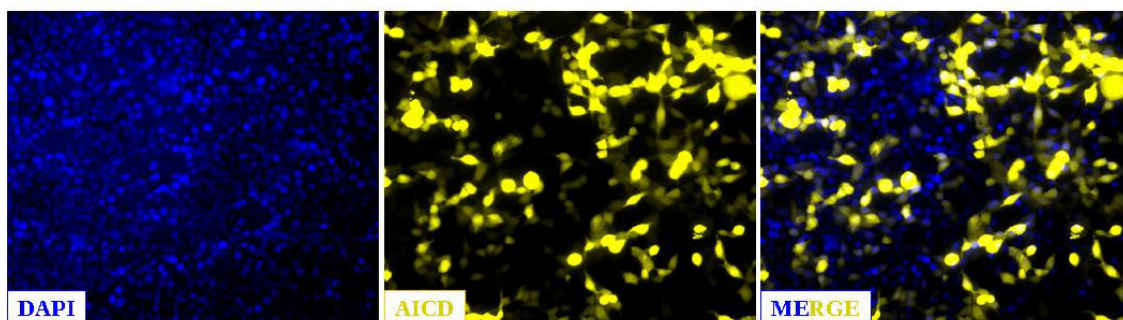


Εικόνα 39: Σύγκριση επιπέδων pAkt και STIM σε μη διαμολυσμένα (Untransfected) SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα ελέγχου και διαμολυσμένα (AICD) SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα. Ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των pAkt, STIM και actin (για έλεγχο ισοφόρτωσης των δειγμάτων) έγινε με ανοσοδοκιμασία κατά Western. Οι τιμές στα διαγράμματα προέκυψαν μετά από πυκνομετρήσεις ανεξάρτητων πειραμάτων. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν την τιμή p σχετικά με το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας των τιμών. * : 0,01<p<0,05, ** : 0,001<p<0,01, ***: p<0,001.

3. Μελέτες ανοσοκυτταροχημίας σε διαμολυσμένα κύτταρα

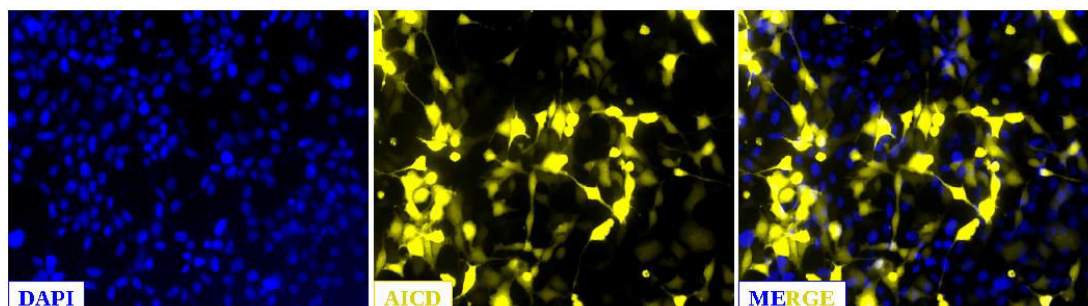
3.1. Έλεγχος διαμόλυνσης των κυττάρων SH-SY5Y/APP⁻

Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα SH-SY5Y/APP⁻ μέσω της διαμόλυνσης ελέγχθηκε με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού, καθώς το πλασμίδιο εμπεριείχε ανιχνεύσιμη χρωστική (citrine), η οποία εκπέμπει στο κίτρινο φάσμα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 40, το ποσοστό διαμόλυνσης είναι αρκετά ικανοποιητικό, περίπου 60-70%. Προκύπτει συγκρίνοντας το σήμα από το κίτρινο φάσμα που εκπέμπεται από τα διαμολυσμένα κύτταρα λόγω της χρωστικής της οποίας η αλληλουχία είναι ενσωματωμένη στον πλασμιδιακό φορέα, σε σχέση με το κυανό σήμα από την χρωστική DAPI, που εκπέμπεται από όλους τους πυρήνες, όλων των κυττάρων ανεξαιρέτως.



Εικόνα 40: Ανοσοκυτταροχημεία σε διαμολυσμένα κύτταρα SH-SY5Y/APP⁻ με πλασμιδιακό φορέα που φέρει αλληλουχία για την ενδοκυτταρική περιοχή της APP, AICD. Με την κυανή χρωστική DAPI σημαίνονται οι πυρήνες όλων των κυττάρων (DAPI). Με την κίτρινη χρωστική citrine σημαίνονται τα διαμολυσμένα μόνο κύτταρα (AICD). Με την ένδειξη MERGE συμβολίζονται οι εικόνες στις οποίες το σήμα από τις δύο χρωστικές έχει συνδυασθεί.

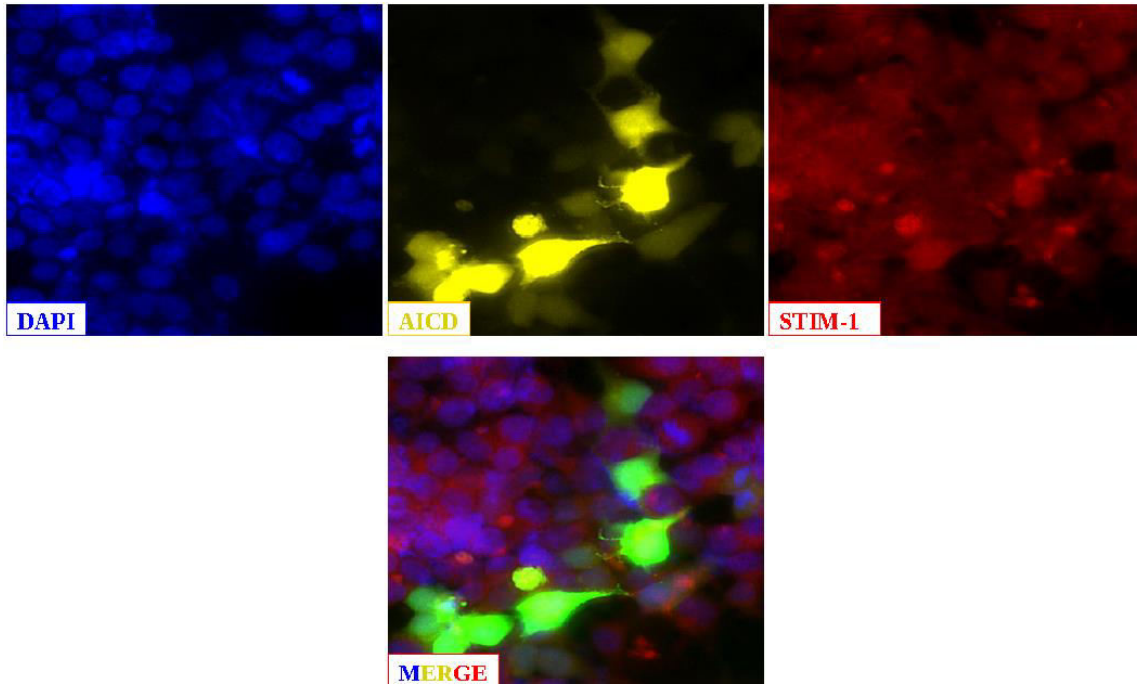
Η ίδια ακριβώς διαδικασία, διαμόλυνσης και ανοσοκυτταροχημίας, δοκιμάστηκε και σε κύτταρα SK-N-SH. Τα αποτελέσματα είναι περίπου τα ίδια, με ένα παρόμοιο ποσοστό επιτυχούς διαμόλυνσης.



Εικόνα 41: Ανοσοκυτταροχημεία σε διαμολυσμένα κύτταρα SK-N-SH με πλασμιδιακό φορέα που φέρει αλληλουχία για την ενδοκυτταρική περιοχή της APP, AICD. Με την κυανή χρωστική DAPI σημαίνονται οι πυρήνες όλων των κυττάρων (DAPI). Με την κίτρινη χρωστική citrine σημαίνονται τα διαμολυσμένα μόνο κύτταρα (AICD). Με την ένδειξη MERGE συμβολίζονται οι εικόνες στις οποίες το σήμα από τις δύο χρωστικές έχει συνδυασθεί.

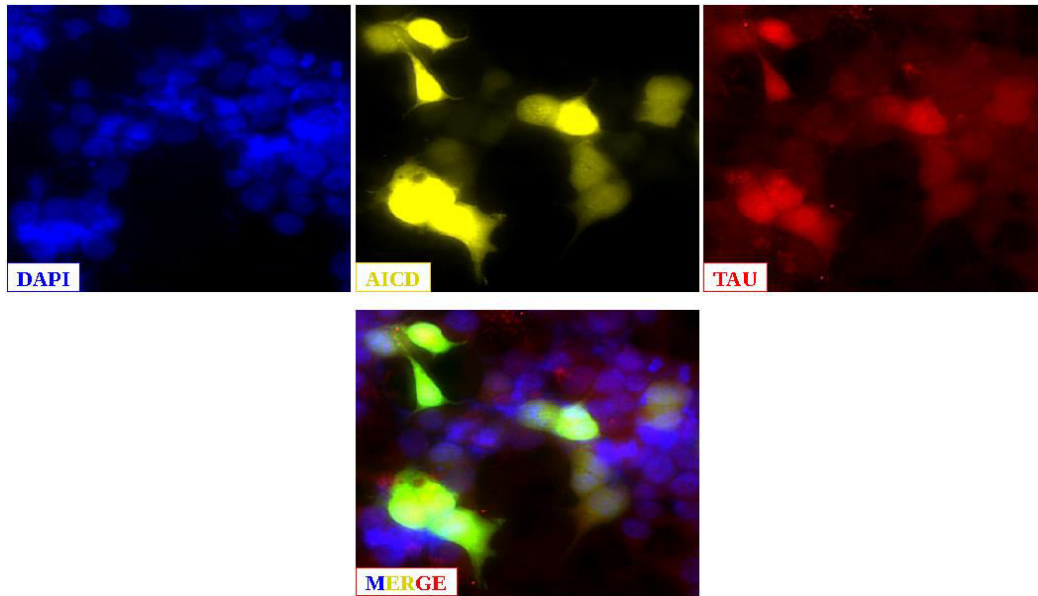
3.2. Μελέτη της πρωτεΐνης STIM σε διαμολυσμένα SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης STIM, ώστε να βρεθεί κάποιο πιθανό πρότυπο διαφοροποίησης στα διαμολυσμένα κύτταρα σε σχέση με τα μη διαμολυσμένα. Δυστυχώς, η κόκκινη χρωστική δεν ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματική, με συνέπεια το πρότυπο κατανομής της πρωτεΐνης STIM να μην φαίνεται καθαρά. Εναλλακτική σε αυτό το εμπόδιο θα μπορούσε να είναι η σημαση της πρωτεΐνης με πράσινη αντί για κόκκινη χρωστική. Πρόβλημα σε αυτήν την λύση όμως αποτελεί το γεγονός ότι η citrine του πλασμιδιακού φορέα εκπέμπει σε επικαλυπτόμενα μήκη κύματος με την πράσινη χρωστική, και αυτό δεν θα μας επέτρεπε τον σαφή διαχωρισμό του AICD από την πρωτεΐνη STIM στο μικροσκόπιο φθορισμού. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες, και πιθανή λύση θα αποτελούσε η ενσωμάτωση κάποιας εναλλακτικής χρωστικής στον πλασμιδιακό φορέα ή η σημαση της πρωτεΐνης STIM με ένα πιο δυνατό δευτερογενές αντίσωμα, ώστε το σήμα στο κόκκινο φάσμα να ανιχνεύεται σαφέστερα.



Εικόνα 42: Ανοσοκυτταροχημεία σε διαμολυσμένα κύτταρα SH-SY5Y/APP⁺ με πλασμιδιακό φορέα που φέρει αλληλουχία για την ενδοκυτταρική περιοχή της APP, AICD. Με την κυανή χρωστική DAPI σημαίνονται οι πυρήνες όλων των κυττάρων (DAPI). Με την κίτρινη χρωστική citrine σημαίνονται τα διαμολυσμένα μόνο κύτταρα (AICD). Με την κόκκινη χρωστική έχει σημειωθεί η πρωτεΐνη STIM (STIM-1). Με την ένδειξη MERGE συμβολίζονται οι εικόνες στις οποίες το σήμα από τις τρεις χρωστικές έχει συνδυασθεί.

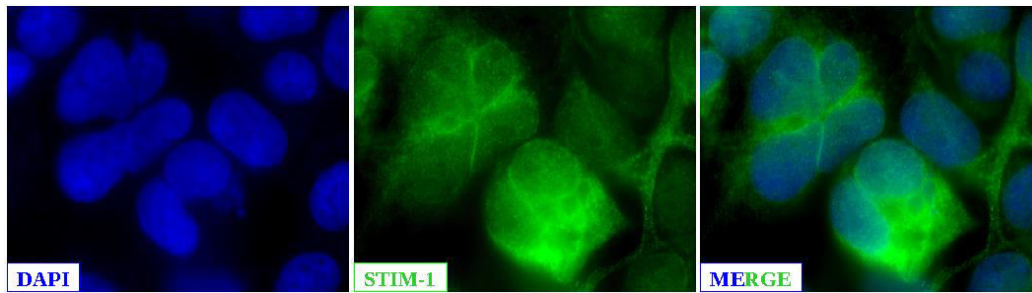
Η ίδια διαδικασία ανοσοεντοπισμού πραγματοποιήθηκε και για την πρωτεΐνη tau. Όπως και με την STIM, η σήμανση έγινε με χρωστική που εκπέμπει στο κόκκινο φάσμα. Εμφανίστηκαν τα ίδια προβλήματα, καθώς η κόκκινη χρωστική δεν είναι αρκετά ισχυρή. Ως αποτέλεσμα, ούτε σε αυτήν την πρωτεΐνη μπορούμε να διακρίνουμε κάποια διαφοροποίηση στο πρότυπο κατανομής της στα διαμολυσμένα κύτταρα.



Εικόνα 43: Ανοσοκυτταροχημεία σε διαμολυσμένα κύτταρα SH-SY5Y/APP⁻ με πλασμιδιακό φορέα που φέρει αλληλουχία για την ενδοκυτταρική περιοχή της APP, AICD. Με την κυανή χρωστική DAPI σημαίνονται οι πυρήνες όλων των κυττάρων (DAPI). Με την κίτρινη χρωστική citrine σημαίνονται τα διαμολυσμένα μόνο κύτταρα (AICD). Με την κόκκινη χρωστική έχει σημειωθεί η πρωτεΐνη tau (TAU). Με την ένδειξη MERGE συμβολίζονται οι εικόνες στις οποίες το σήμα από τις τρεις χρωστικές έχει συνδυασθεί.

3.4. Μελέτη της πρωτεΐνης STIM σε διαμολυσμένα SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα με πράσινη χρωστική

Για να ανιχνεύσουμε την πρωτεΐνη STIM αποτελεσματικά στα διαμολυσμένα κύτταρα, έγινε ανοσοεντοπισμός της με πράσινη αντί για κόκκινη χρωστική. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 44, το πρότυπο κατανομής της STIM πρωτεΐνης φαίνεται σημαντικά πιο καθαρά σε σχέση με την σήμανση με κόκκινη χρωστική. Σε αυτήν όμως την περίπτωση, μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι λόγω επικάλυψης του σήματος, δεν θα μπορούσε να διακριθεί η ενδοκυτταρική περιοχή AICD και κατ'επέκταση τα διαμολυσμένα από τα μη διαμολυσμένα κύτταρα. Λύση σε αυτό το εμπόδιο θα μπορούσε να αποτελέσει να λάβουμε ως δεδομένο το ποσοστό διαμόλυνσης, και με βάση αυτό το ποσοστό να γίνει περαιτέρω ανάλυση του σήματος της πρωτεΐνης STIM. Όμως τα αποτελέσματα σε μία τέτοια περίπτωση ίσως να μην είναι εντελώς αξιόπιστα. Επόμενος στόχος μελέτης θα μπορούσε να είναι η σαφής και αποτελεσματική διάκριση των δύο μορίων, καθώς και αποσαφήνιση τυχόν διαφοροποιήσεων στην κατανομή των πρωτεϊνών STIM και tau.



Εικόνα 44: Ανοσοκυτταροχημεία σε διαμολυσμένα κύτταρα SH-SY5Y/APP⁻ με πλασμιδιακό φορέα που φέρει αλληλουχία για την ενδοκυτταρική περιοχή της APP, AICD. Με την κυανή χρωστική DAPI σημαίνονται οι πυρήνες όλων των κυττάρων (DAPI). Με την πράσινη χρωστική έχει σημειωθεί η πρωτεΐνη STIM (STIM-1). Με την ένδειξη MERGE συμβολίζονται οι εικόνες στις οποίες το σήμα από τις δύο χρωστικές έχει συνδυασθεί.

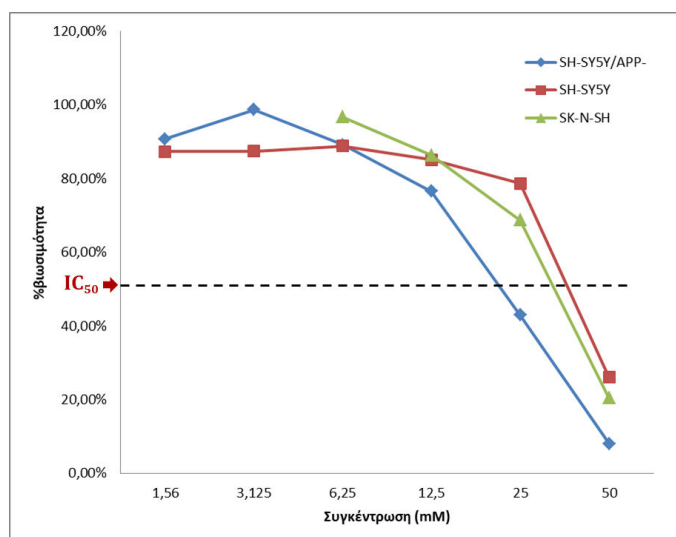
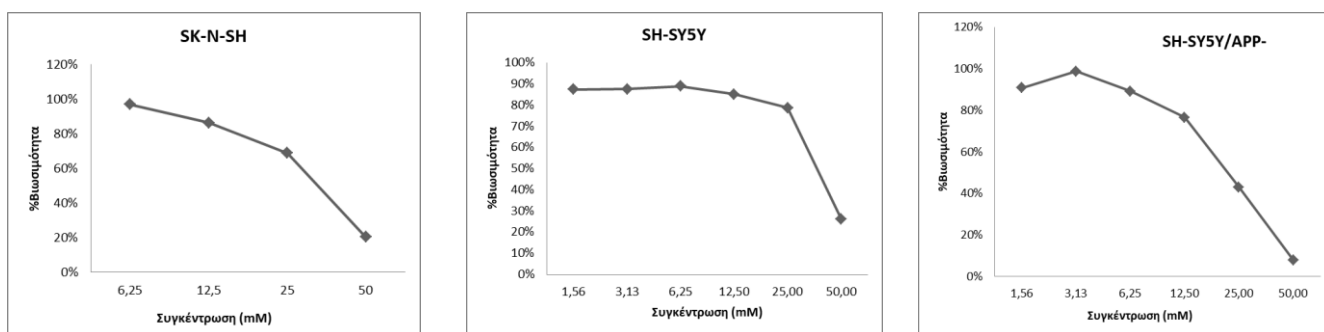
4. Μελέτη κυτταροτοξικότητας – MTT

Σε αυτό το στάδιο, μελετήθηκαν οι διαφορές στην βιωσιμότητα παρουσία διαφόρων παραγόντων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις που παρουσιάζουν οι 3 κυτταρικές σειρές. Σκοπός ήταν να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα ως προς τον ρόλο που διαδραματίζει η APP στην βιωσιμότητα των κυττάρων.

4.1. Γλουταμινικό οξύ

Σε αυτά τα πειράματα, στόχο αποτέλεσε η μελέτη του προτύπου βιωσιμότητας των τριών κυτταρικών σειρών παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων γλουταμινικού οξέος, το οποίο δρα σαν διεγερτικός νευροδιαβιβαστής.

Οι τρεις κυτταρικές σειρές δεν φαίνεται να παρουσιάζουν κάποια έντονη διαφοροποίηση ως προς το πρότυπο βιωσιμότητας. Στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y/APP⁻ η κατά περίπου 50% βιωσιμότητα των κυττάρων (IC₅₀) εμφανίζεται σε ελαφρώς μικρότερες συγκεντρώσεις γλουταμινικού οξέος. Αντίθετα, οι άλλες δύο κυτταρικές σειρές, στις ίδιες συγκεντρώσεις, φαίνεται να εμφανίζουν μεγαλύτερη βιωσιμότητα.

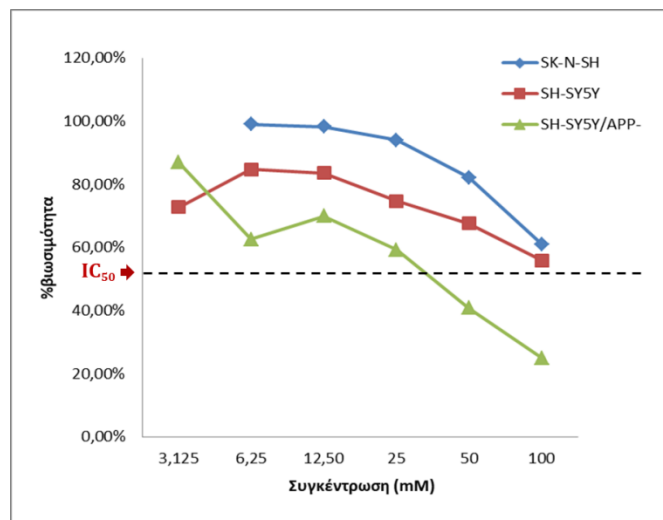
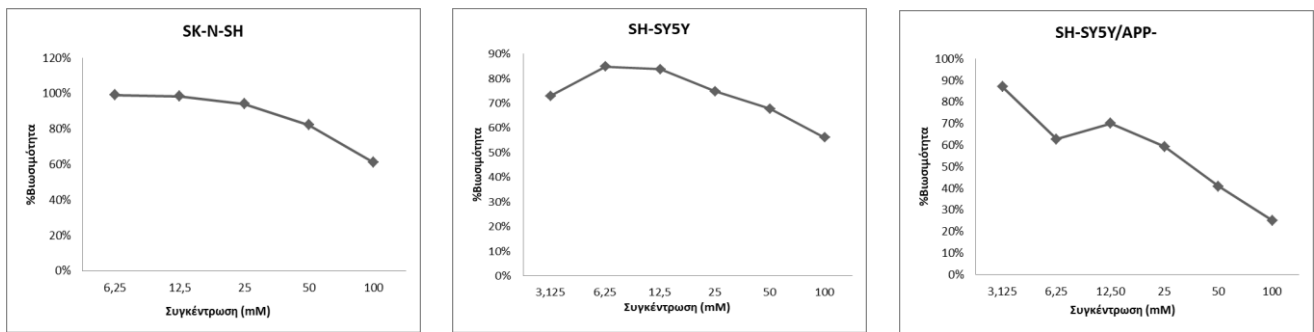


Εικόνα 45: Πρότυπο της %βιωσιμότητας των κυτταρικών σειρών SK-N-SH, SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻ υπό την επίδραση γλουταμινικού οξέος. Πάνω: διαγράμματα ξεχωριστά για κάθε κυτταρική σειρά. Κάτω: κοινό διάγραμμα βιωσιμότητας για τις τρεις κυτταρικές σειρές. Οι τιμές στα διαγράμματα προέρχονται από τη φωτομέτρηση ανεξάρτητων πειραμάτων.

4.2. Συνθήκες στέρησης Γλυκόζης

Επόμενη συνθήκη για τη μελέτη της βιωσιμότητας των τριών κυτταρικών σειρών ήταν η στέρηση γλυκόζης, η οποία επιτεύχθηκε με την χρήση 2-δεοξυγλυκόζης (2-DG).

Υπό αυτές τις συνθήκες, η κυτταρική σειρά SH-SY5Y/APP⁻ παρουσιάζει μειωμένη βιωσιμότητα σε σχέση με τις δύο προγονικές τις. Αν και το πρότυπο βιωσιμότητας δεν είναι ομοιόμορφο από τις μικρότερες προς τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, είναι εμφανές πως περίπου 50% βιωσιμότητα (IC₅₀) εμφανίζεται σε μικρότερες συγκεντρώσεις 2-DG, σε αντίθεση με τις άλλες δύο κυτταρικές σειρές που εμφανίζεται να είναι σε μεγαλύτερες περιεκτικότητες του μέσου σε 2-DG. Η έλλειψη της APP επομένως, πιθανότατα να ευθύνεται γι' αυτήν την ευαισθησία των κυττάρων.



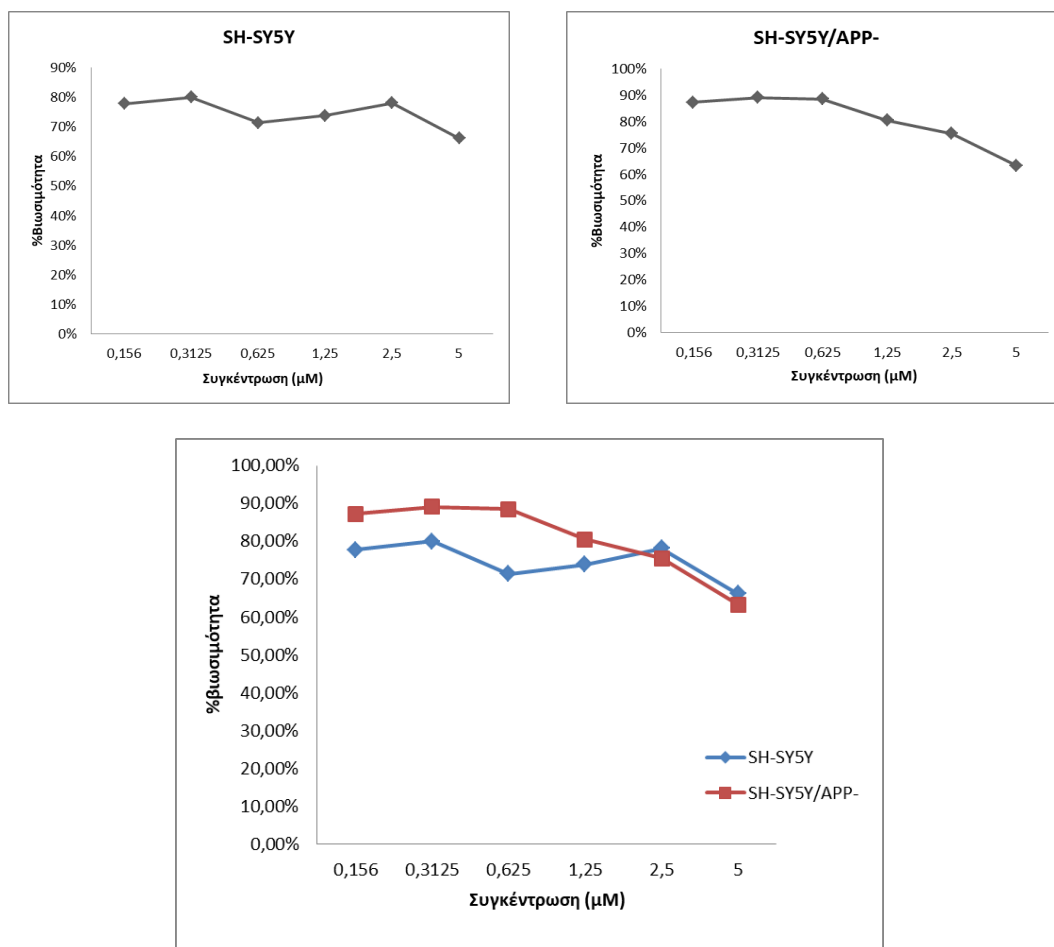
Εικόνα 46: Πρότυπο της %βιωσιμότητας των κυτταρικών σειρών SK-N-SH, SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻ υπό την επίδραση 2-DG. Πάνω: διαγράμματα ξεχωριστά για κάθε κυτταρική σειρά. Κάτω: κοινό διάγραμμα βιωσιμότητας για τις τρεις κυτταρικές σειρές. Οι τιμές στα διαγράμματα προέρχονται από τη φωτομέτρηση ανεξάρτητων πειραμάτων.

4.3. Εκκένωση του ενδοπλασματικού δικτύου από Ca²⁺

Συνθήκη γι' αυτά τα πειράματα κυτταροτοξικότητας αποτέλεσε η Thapsigargin (Tg), με την οποία επιτυγχάνεται εκκένωση του ενδοπλασματικού δικτύου από τα ιόντα Ca²⁺. Τα πειράματα έγιναν μόνο στις δύο κυτταρικές σειρές SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻.

Και σε αυτήν την συνθήκη, φαίνεται όπως και στην 2-DG, μία μειωμένη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y/APP⁻. Συγκεκριμένα, αν και πάλι το πρότυπο δεν είναι ομαλό για την προγονική της σειρά SH-SY5Y, φαίνεται πως το ποσοστό βιωσιμότητας είναι μεγαλύτερο σε σχέση με τα κύτταρα χωρίς APP, μελετώντας τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις κάθε φορά. Δυστυχώς, τα δεδομένα ποσοστά βιωσιμότητας δεν επιτρέπουν τον σαφή υπολογισμό του IC₅₀. Ίσως

χρειάζονται περαιτέρω μελέτες, ενδεχομένως με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Tg, ώστε να καθοριστεί η 50% βιωσιμότητα.

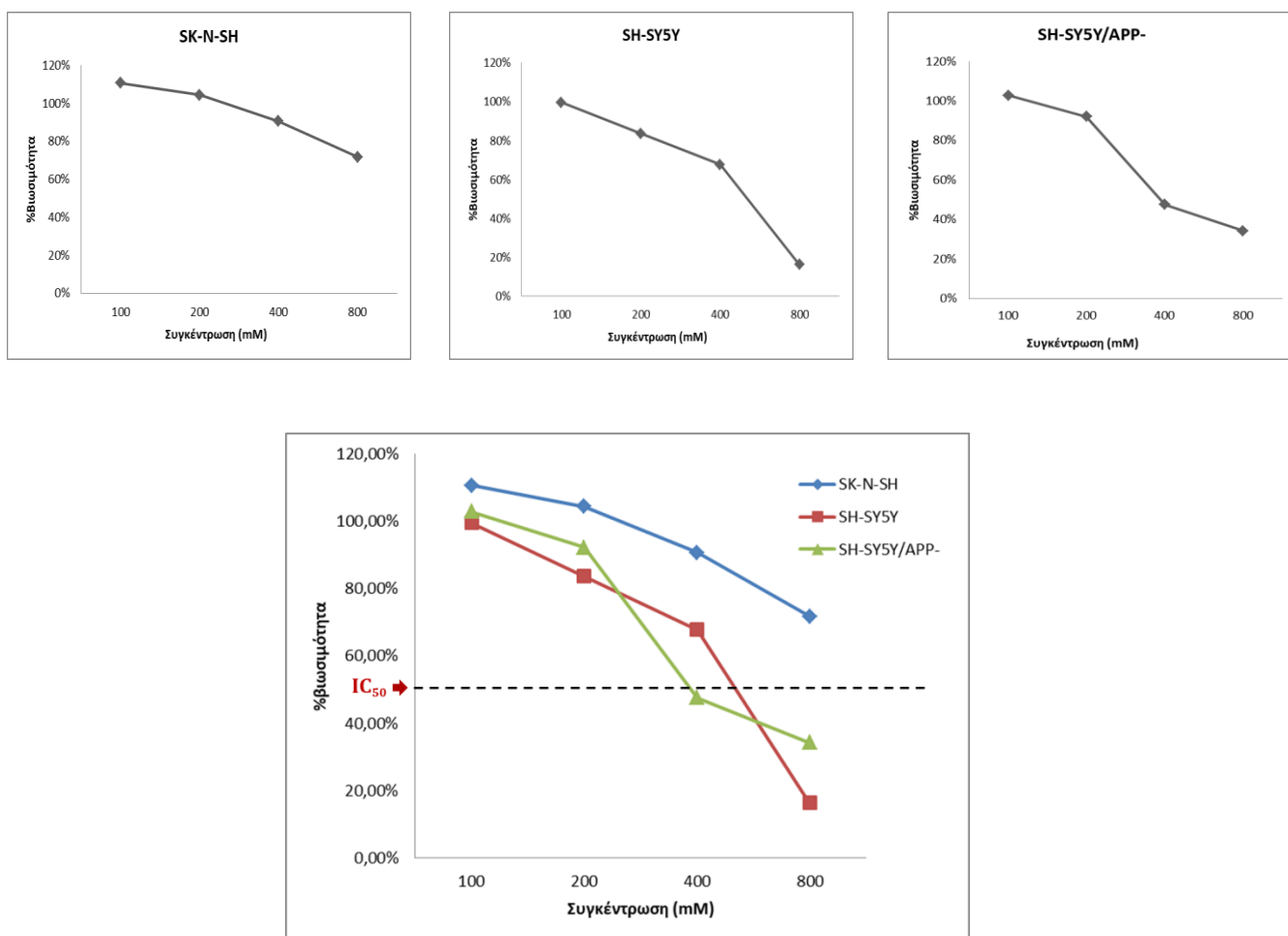


Εικόνα 47: Πρότυπο της %βιωσιμότητας των κυτταρικών σειρών SK-N-SH, SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻ υπό την επίδραση Tg. Πάνω: διαγράμματα ξεχωριστά για κάθε κυτταρική σειρά. Κάτω: κοινό διάγραμμα βιωσιμότητας για τις δύο κυτταρικές σειρές. Οι τιμές στα διαγράμματα προέρχονται από τη φωτομέτρηση ανεξάρτητων πειραμάτων.

4.4. Συνθήκες υποξίας

Ως τελευταία συνθήκη για τις μελέτες κυτταροτοξικότητας, επιλέχθηκε η προσομοίωση υποξίας, η οποία επιτυγχάνεται με το χλωριούχο κοβάλτιο (CoCl_2).

Εδώ η κυτταρική σειρά SH-SY5Y/APP⁻ παρουσιάζει τιμή IC_{50} σε μικρότερη συγκέντρωση CoCl_2 σε σχέση με την προγονική της, SH-SY5Y, όπως ακριβώς έχει δειχθεί και με τους προηγούμενους τοξικούς παράγοντες. Την μέγιστη βιωσιμότητα παρουσιάζουν τα SK-N-SH κύτταρα.



Εικόνα 48: Πρότυπο της %βιωσιμότητας των κυτταρικών σειρών SK-N-SH, SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻ υπό την επίδραση CoCl_2 . Πάνω: διαγράμματα ξεχωριστά για κάθε κυτταρική σειρά. Κάτω: κοινό διάγραμμα βιωσιμότητας για τις τρεις κυτταρικές σειρές. Οι τιμές στα διαγράμματα προέρχονται από τη φωτομέτρηση ανεξάρτητων πειραμάτων.

V. Συζήτηση

Είναι γεγονός πως οι περισσότερες μελέτες που γίνονται σε σχέση με την APP αφορούν κυρίως το θραύσμα της, Αβ, λόγω της εμπλοκής του στη νόσο του Alzheimer. Τα τελευταία μόνο χρόνια έχουν αυξηθεί σημαντικά οι έρευνες σε σχέση με τις φυσιολογικές λειτουργίες της APP, και τον ρόλο που διαδραματίζει στην υγεία των νευρώνων. Η επιβίωση, η κυτταρική προσκόλληση στο υπόστρωμα, η νευρωνική πλαστικότητα και η συναπτική λειτουργία είναι μερικές μόνο από τις πολυάριθμες διαδικασίες, στις οποίες έχει δειχθεί πως εμπλέκεται η APP. Ακόμη δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί ο ρόλος της στην κυτταρική σηματοδότηση, αν και έχει δειχθεί πολλές φορές ότι εμπλέκεται σε αυτήν, όπως και στη διακίνηση του ασβεστίου.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, σκοπός ήταν η συμβολή στη μελέτη της εμπλοκής της APP στην κυτταρική σηματοδότηση και στην επιβίωση των νευρικών κυττάρων. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά SH-SY5Y από την οποία είχε σιγηθεί η APP. Όπως πολύ συχνά συμβαίνει στην έρευνα, η αποσιώπηση μιας πρωτεΐνης μπορεί να συμβάλει στη μελέτη ή εύρεση των λειτουργιών αυτής. Ως κυτταρικές σειρές αναφοράς (controls), χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα SK-N-SH και SH-SY5Y, τα οποία εκφράζουν κανονικά την APP. Με αυτόν τον τρόπο, θα ήταν εφικτό να γίνει η σύγκριση των κυτταρικών αποκρίσεων όταν εκφράζεται ή όχι η APP. Ένα πολύ σημαντικό δεδομένο που έχει προκύψει από παλαιότερα πειράματα στο εργαστήριο, είναι πως τα SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα αδυνατούν να διαφοροποιηθούν με την χρήση ρετινοϊκού οξέος. Το γεγονός αυτό ενισχύει την θεωρία ότι η APP είναι απαραίτητη στην ομαλή ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων, καθώς από τις βασικότερες διαδικασίες, στις οποίες υπόκεινται, είναι η διαφοροποίησή τους σε ώριμους νευρώνες.

Αρχικώς, έγινε επιβεβαίωση ότι τα SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα δεν εκφράζουν την APP. Πράγματι, οι ζώνες που λήφθηκαν μέσω της τεχνικής Western blot μαρτυρούν ελάχιστη έως μηδαμινή έκφραση της APP. Λαμβάνοντας το γεγονός αυτό ως δεδομένο, προχωρήσαμε σε πειράματα σύγκρισης βασικών επιπέδων πρωτεϊνών μεταξύ των 3 κυτταρικών σειρών. Επιβεβαιώνοντας παλιότερα ευρήματα του εργαστηρίου, βρέθηκαν πολύ αυξημένα επίπεδα των πρωτεϊνών pAkt και STIM στα SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα σε σχέση τόσο με τα άμεσα προγονικά SH-SY5Y όσο και με τα SK-N-SH, από τα οποία προκύπτουν τα SH-SY5Y κύτταρα. Υποδεικνύεται έτσι, πως η APP διαδραματίζει κάποιον ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση, συγκεκριμένα στο σηματοδοτικό μονοπάτι επιβίωσης PI3K/Akt, πιθανώς διαμεσολαβώντας σε κάποιο από τα βήματα ενεργοποίησής του. Αυξημένη pAkt στα κύτταρα από τα οποία λείπει η APP συνεπάγεται αυξημένη ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού, επομένως είναι πιθανό η APP να παίζει κάποιον ρόλο στην ρύθμιση των φωσφορυλιώσεων, και κατ'επέκταση της ενεργοποίησης.

Οι αυξημένες ποσότητες του STIM στα SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα, υποδεικνύει συσχέτιση της APP με τα ιόντα Ca²⁺. Όπως γνωρίζουμε από την θεωρία, όταν η συγκέντρωση των ιόντων Ca²⁺ μειώνεται κάτω από κάποια επίπεδα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ευνοείται η αποσύνδεσή τους από την πρωτεΐνη STIM, τον αισθητήρα των ιόντων αυτών. Τότε, η STIM συσσωματώνεται και μεταφέρεται σε περιοχές του ενδοπλασματικού δικτύου πλησίον της πλασματικής μεμβράνης, όπου και αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Orai. Από εκείνα τα σημεία θα εισέλθουν ιόντα Ca²⁺ μέσα στο κύτταρο από τον εξωκυττάριο χώρο, ώστε τελικώς να διοχετευθούν μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο από τις SERCA. Αύξηση της STIM υποδηλώνει επομένως μείωση των ιόντων Ca²⁺ μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Το δεδομένο αυτό στηρίζει την θεωρία, καθώς μετά από σίγηση της APP, έχει βρεθεί πως η STIM καθυστερεί να μεταβεί στην Orai, επομένως καθυστερεί η είσοδος ιόντων Ca²⁺ μέσα στο κύτταρο και επακολούθως στο ενδοπλασματικό. Προκύπτει, έτσι, το συμπέρασμα ότι η APP συμμετέχει στην ομοιόσταση ασβεστίου, και συγκεκριμένα στην διακίνησή του ίσως μεταξύ ενδοπλασματικού δικτύου και κυτταροπλάσματος. Γ' αυτόν τον λόγο ίσως στην νευροεκφυλιστική νόσο του Alzheimer, όπου η APP και συγκεκριμένα το Αβ παίζουν τόσο κρίσιμο ρόλο, απορρυθμίζεται η ομοιόσταση ασβεστίου. Ένας πιθανός τρόπος, με τον οποίο η APP να εμπλέκεται στην ομοιόσταση και διακίνηση του ασβεστίου, είναι ίσως οι SERCA, πιθανώς μέσω αναστολής αυτών. ^[72]

Σε επόμενο στάδιο, μελετήθηκε η απόκριση των 3 κυτταρικών σειρών στην επίδραση της ινσουλίνης. Η ινσουλίνη, καθώς οι υποδοχείς της ενδοκυτταρικά εμπεριέχουν τυροσινική κινάση, είναι βασικός ενεργοποιητής του μονοπατιού PI3K/Akt, όπως και γενικώς οι αυξητικοί παράγοντες. Επομένως, αναμενόταν αύξηση της pAkt, δηλαδή της ενεργοποιημένης μορφής της Akt, μετά από επώαση των κυττάρων με την ινσουλίνη. Πράγματι, επιβεβαιώθηκαν παλαιότερα πειράματα του εργαστηρίου, και βρέθηκε αύξηση της pAkt μετά από επώαση με ινσουλίνη στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y. Αύξηση της pAkt βρέθηκε και στην κυτταρική σειρά SK-N-SH. Αντίθετα, στα κύτταρα SH-SY5Y/APP⁻ δεν παρατηρήθηκε η ίδια απόκριση, μετά από επώαση με ινσουλίνη. Έχοντας ως δεδομένο ότι η ινσουλίνη ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/Akt, ενισχύεται η άποψη ότι η APP συμμετέχει σε αυτήν την ενεργοποίηση. Η έλλειψή της φαίνεται να μειώνει την φωσφορυλίωση της Akt, επομένως ίσως η APP να είναι απαραίτητη σε αυτήν την διαδικασία. Η πρωτεΐνη STIM δεν φάνηκε να διαφοροποιείται υπό την επίδραση της ινσουλίνης, παρά μόνο εμφάνισε μικρή, αλλά στατιστικά μη σημαντική αύξηση. Δείχθηκε όμως αυξημένη ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα CREB στις κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την APP, κάτι που δεν ισχύει για τα κύτταρα SH-SY5Y/APP⁻. Το γεγονός αυτό αναμενόταν, καθώς η ενεργοποίηση του CREB (pCREB) αποτελεί καταρροϊκό στόχο της Akt. Μειωμένη εξ αρχής ενεργοποίηση της Akt είναι λογικό να ακολουθηθεί από μειωμένη ενεργοποίηση του CREB.

Επόμενο πειραματικό στόχο αποτέλεσε η σύγκριση της απόκρισης των 3 κυτταρικών σειρών σε συνθήκες στέρησης γλυκόζης, κατάσταση που λόγω της γενικότερης ελλειπούς ενέργειας, συναντάται στην νόσο του Alzheimer και στον διαβήτη. Από παλαιότερα πειράματα του εργαστηρίου είχε δειχθεί η αύξηση της pAkt μετά από προσομοίωση συνθηκών στέρησης γλυκόζης (2-DG) στα κύτταρα SH-SY5Y. Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύθηκαν και βρέθηκε ακόμη εντονότερη αύξηση της pAkt στην κυτταρική σειρά SK-N-SH υπό την επίδραση της 2-DG. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται λαμβάνοντας υπόψη ότι κατά την στέρηση γλυκόζης αυξάνεται ενδοκυτταρικά το ασβέστιο, γεγονός που οδηγεί σε ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt. Όπως ακριβώς συνέβει και στην περίπτωση της ινσουλίνης που αναφέρθηκε παραπάνω, έτσι και υπό την επίδραση 2-DG η pAkt δεν σημείωσε καμία αύξηση στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y/APP⁻, ενισχύοντας για άλλη μια φορά τη θεωρία της συμμετοχής της APP στο σηματοδοτικό αυτό μονοπάτι.

Τα ίδια ακριβώς δεδομένα προέκυψαν και με την επώαση των κυτταρικών σειρών με Thapsigargin (Tg). Η ουσία αυτή, τοξική σε μεγάλες συγκεντρώσεις, εκκενώνει το ενδοπλασματικό δίκτυο από ιόντα Ca²⁺ μέσω μη αντιστρεπτής αναστολής των SERCA ATPασών. Αποτέλεσμα αυτής της αναστολής είναι η μη εισοδος ιόντων μέσα στο ενδοπλασματικό και η επακόλουθη αύξησή τους στο κυτταρόπλασμα. Καθώς, όπως αναφέρθηκε, τα ιόντα Ca²⁺ αποτελούν ενεργοποιητή του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Akt, ήταν αναμενόμενη η αύξηση της pAkt υπό την επίδραση Tg. Όπως και σε παλαιότερα πειράματα, βρέθηκε πράγματι αύξηση της pAkt στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y. Βρέθηκε όμως ακόμη μεγαλύτερη αύξηση στα κύτταρα SK-N-SH, ενώ για ακόμη μία φορά καμία σχεδόν μεταβολή της pAkt, άρα και καμία ενίσχυση της σηματοδότησης μέσα από το συγκεκριμένο μονοπάτι, στα SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα. Το ίδιο πρότυπο ακολουθεί και η σύγκριση των κυτταρικών σειρών SK-N-SH και SH-SY5Y/APP⁻ υπό την επίδραση του χλωριούχου κοβαλτίου (προσομοίωση συνθηκών υποξίας).

Η πρωτεΐνη STIM εμφανίζει πολύ παρόμοιο πρότυπο διαφοροποίησης στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y/APP⁻ υπό την επίδραση τόσο της 2-DG όσο και της Tg. Συγκεκριμένα, ενώ τα επίπεδα της STIM παραμένουν σχετικά σταθερά υπό την επίδραση αυτών των παραγόντων στις δύο κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την APP, αυξάνονται στα κύτταρα SH-SY5Y/APP⁻. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική, και ενισχύει το συμπέρασμα ότι η APP διαμεσολαβεί τις κινήσεις του ασβεστίου. Λόγω πιθανής εμπλοκής της APP στην ομοιόσταση αυτή του ασβεστίου, ίσως να αυξάνεται περισσότερο από τις άλλες δύο κυτταρικές σειρές η συγκέντρωση των ιόντων Ca²⁺ στο κυτταρόπλασμα μετά από επώαση με αυτούς τους δύο παράγοντες. Άλλωστε, είχε ήδη δειχθεί η αύξηση της STIM με την έλλειψη της APP. Επομένως υπό την επίδραση παραγόντων που ούτως ή άλλως αυξάνουν το ενδοκυτταρικό ασβέστιο εκκενώνοντας το ενδοπλασματικό δίκτυο ή/και αυξημένη

εισορή από τον εξωκυττάριο χώρο, ίσως να εξηγείται γιατί η αύξηση της STIM να είναι εντονότερη.

Καθώς πολλές φορές έχει προταθεί πως η κρεατίνη λειτουργεί ως νευροπροστατευτικός παράγοντας, θελήσαμε να πραγματοποιήσουμε κάποια πειράματα με αυτήν. Σε προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριο, είχε πραγματοποιηθεί προεπώαση κυτταρικών σειρών με κρεατίνη για 30 λεπτά πριν την πρόσθεση τοξικών παραγόντων, όπως η 2-DG και η Tg. Με σκοπό να ενισχύσουμε την πιθανή νευροπροστατευτική δράση της κρεατίνης, οι 3 κυτταρικές σειρές προεπώασθησαν με αυτήν για 16-18 ώρες, αντί για 30 μόνο λεπτά. Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκαν και πειράματα με επώαση μόνο με κρεατίνη, ώστε να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές στα επίπεδα πρωτεϊνών, τόσο με τα controls, όσο και μεταξύ των 3 κυτταρικών σειρών. Βρέθηκε πως τα επίπεδα της pAkt ήταν μειωμένα υπό την επίδραση της κρεατίνης στις κυτταρικές σειρές SK-N-SH και SH-SY5Y, αλλά και πάλι σχεδόν καμία μείωση αυτής στα κύτταρα χωρίς την APP. Το δεδομένο αυτό υποδεικνύει πως ενώ η κρεατίνη επηρεάζει τα επίπεδα της pAkt στις δύο κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την APP, δεν φαίνεται να διαδραματίζει αυτόν τον ρόλο και στα SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα. Ο νευροπροστατευτικός ρόλος της κρεατίνης ίσως να έγκειται στην προστασία, την οποία παρέχει στα κύτταρα, από οποιαδήποτε στρεσογόνα κατάσταση, ώστε να μην απαιτείται η ίδια ενεργοποίηση του μονοπατιού επιβίωσης PI3K/Akt σε σχέση με τα controls. Όμως, λόγω της πιθανής εμπλοκής της APP στο εν λόγω μονοπάτι, η κρεατίνη στην κυτταρική σειρά χωρίς την APP ίσως να μην μπορεί να επιτελέσει αυτή της την λειτουργία.

Στην κρεατίνη αποκρίθηκε και ο μεταγραφικός παράγοντας pCREB. Συγκεκριμένα, και στις τρεις κυτταρικές σειρές βρέθηκε μείωση της ενεργοποίησής του, χωρίς όμως κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών τύπων κυττάρων. Είναι αναμενόμενο, η ενεργοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης του CREB να είναι χαμηλότερη υπό την επίδραση κρεατίνης, καθώς αποτελεί καταρροϊκό στόχο της pAkt, και αυτή είχε ήδη δειχθεί πως είναι μειωμένη.

Στην συνεπώαση των τοξικών παραγόντων με κρεατίνη παρατηρούμε ένα επίσης παρόμοιο πρότυπο. Η κρεατίνη μειώνει τα επίπεδα της pAkt στα κύτταρα SH-SY5Y που εκφράζουν APP κανονικά, ενώ και πάλι τα επίπεδα pAkt στην SH-SY5Y/APP⁻ παραμένουν σχεδόν αμετάβλητα. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της πρωτεΐνης μειώνονται ακόμη περισσότερο και από τα control δείγματα στα κύτταρα SH-SY5Y, υπό την συνεπώαση τόσο 2-DG όσο και Tg με κρεατίνη. Αντίθετα, στα SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα τα επίπεδα αυτά παραμένουν σχεδόν ίδια με τα επίπεδα pAkt που σημειώνονται στην επώαση μόνο με 2-DG ή Tg.

Καθώς τα τελευταία χρόνια έχουν αποδοθεί ολοένα και περισσότεροι ρόλοι στην μικρή ενδοκυτταρική περιοχή της APP, AICD, και μάλιστα πολλοί από αυτούς είναι

στενά συσχετισμένοι με την ομοιόσταση ασβεστίου, θεωρήθηκε δόκιμο να γίνει εισαγωγή αυτής στα κύτταρα SH-SY5Y/APP⁻. Επομένως, τα κύτταρα αυτά θα περιέχουν μόνο αυτό το τμήμα της APP, χωρίς την διαμεμβρανική και εξωκυτταρική της περιοχή. Η διαμόλυνση των κυττάρων αυτών ελέγχθηκε με ανοσοκυτταροχημία, και διαπιστώθηκε πως το ποσοστό των διαμολυσμένων σε σχέση με το σύνολο των κυττάρων ήταν πολύ ικανοποιητικό. Το AICD ήταν μεταφραστικά συντηγμένο με την φθορίζουσα χρωστική citrine, η οποία εκπέμπει στο κίτρινο-πράσινο φάσμα φωτός. Επίσης, έγινε προσπάθεια εντοπισμού των πρωτεϊνών STIM και Tau στα διαμολυσμένα κύτταρα, έτσι ώστε να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές στο πρότυπο κατανομής τους σε σχέση με τα controls (SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα χωρίς το AICD). Δυστυχώς όμως, η χρωστική που εκπέμπει στο κόκκινο φάσμα φωτός, με την οποία σημάνθηκαν οι δύο πρωτεΐνες αδυνατούσε να δώσει το επιθυμητό σήμα για τον λεπτομερή εντοπισμό των πρωτεϊνών στο μικροσκόπιο φθορισμού. Οι δύο πρωτεΐνες δεν μπορούσαν να σημειωθούν με πράσινη χρωστική, με την οποία από παλαιότερα πειράματα του εργαστηρίου γνωρίζουμε ότι δίνει σαφέστερα αποτελέσματα, καθώς το εκπεμπόμενο σήμα θα αλληλοεπικαλύπτεται με το σήμα της citrine. Στην περίπτωση μίας τέτοιας αλληλοεπικάλυψης δεν θα είναι εφικτό να γίνει ο διαχωρισμός μεταξύ διαμολυσμένων και μη διαμολυσμένων κυττάρων με το AICD, επομένως δεν θα μπορεί να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα. Επόμενος ερευνητικός στόχος, για τα πειράματα που θα ακολουθήσουν στο μέλλον, είναι η εύρεση ενός τρόπου σήμανσης των πρωτεϊνών ή σήμανσης του πλασμιδίου, που να μας επιτρέψει τον ταυτόχρονο διαχωρισμό των διαμολυσμένων κυττάρων και τον εντοπισμό των επιθυμητων πρωτεϊνών.

Στα διαμολυσμένα με AICD κύτταρα πραγματοποιήθηκε όμως και ποσοτικός προσδιορισμός με την μέθοδο Western των πρωτεϊνών pAkt και STIM. Βρέθηκε μείωση αυτών των πρωτεϊνών σε σχέση με τα controls (δηλαδή τα κύτταρα SH-SY5Y/APP⁻), στα οποία τα επίπεδα, όπως αναφέρθηκε αρχικά, ήταν αυξημένα, σε σχέση με τα προγονικά κύτταρα SH-SY5Y. Έτσι, είναι πιθανό το AICD να διαδραματίζει κάποιον ρόλο στη σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού PI3K/pAkt και στη διακίνηση του ασβεστίου, ώστε να επαναφέρονται σε χαμηλότερες σχετικά τιμές των δύο αυτών πρωτεϊνών.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν και πειράματα κυτταροτοξικότητας. Συγκεκριμένα, έγινε σύγκριση μεταξύ της βιωσιμότητας των τριών κυτταρικών σειρών μετά από 24-ωρη επώαση με τοξικούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί ήταν το γλουταμινικό οξύ, ισχυρός διεγερτικός νευροδιαβιβαστής, η 2-DG για προσομοίωση συνθηκών στέρησης γλυκόζης, η Tg για εκκένωση του ενδοπλασματικού δικτύου από ιόντα Ca²⁺ και τέλος το χλωριούχο κοβάλτιο, για προσομοίωση συνθηκών υποξίας. Τα SH-SY5Y/APP⁻ κύτταρα έδειξαν μία γενικότερη μειωμένη βιωσιμότητα σε σχέση και με τις δύο άλλες κυτταρικές σειρές, οι οποίες εκφράζουν φυσιολογικά APP. Η ένδειξη αυτή είναι ισχυρή, όσον αφορά τον ρόλο της APP για την επιβίωση

των κυττάρων. Η σχετική επιβίωση των κυττάρων κρίνεται από την τιμή IC_{50} , η οποία αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση του τοξικού παράγοντα, στην οποία επιβιώνει το 50% των κυττάρων.

Πιο συγκεκριμένα, στο γλουταμινικό οξύ η κυτταρική σειρά SH-SY5Y/APP⁻ δίνει τη μικρότερη τιμή IC_{50} , δηλαδή το 50% των κυττάρων επιβιώνει σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Αντίθετα, το 50% των δύο άλλων τύπων κυττάρων δείχνει να είναι πιο ανθεκτικό, επιβιώνοντας σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Το ίδιο πρότυπο ακολουθεί και η βιωσιμότητα υπό την επίδραση των συνθηκών στέρσης γλυκόζης. Εδώ όμως οι δύο κυτταρικές σειρές που εκφράζουν την APP ήταν τόσο ανθεκτικές που ακόμη και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις επέβιωσε μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων από το 50%. Επομένως, δεν μπορούσε να υπολογισθεί η τιμή IC_{50} , σε αντίθεση με τα SH-SY5Y/APP⁻ τα οποία θανατώνονταν κατά 50% περίπου στην συγκέντρωση των 35-40 mM, το ήμισυ δηλαδή της μέγιστης συγκέντρωσης των 100 mM, όπου οι άλλες δύο κυτταρικές σειρές επιβίωναν κατά άνω του 60%. Το ίδιο πρόβλημα υπήρξε και στις συνθήκες υποξίας, καθώς τα SK-N-SH κύτταρα ήταν αρκετά ανθεκτικά, και δεν παρουσίασαν IC_{50} . Όσον αφορά τις άλλες δύο κυτταρικές σειρές όμως, και πάλι τα SH-SY5Y/APP⁻ έδωσαν μικρότερο IC_{50} , περίπου 400 mM, ενώ η κυτταρική σειρά SH-SY5Y περίπου 500 mM. Σχετικά με την Tg, τα πειράματα κυτταροτοξικότητας πραγματοποιήθηκαν μόνο στις δύο κυτταρικές σειρές SH-SY5Y και SH-SY5Y/APP⁻, και δεν παρουσιάστηκε 50% βιωσιμότητα για καμία από τις δύο, καθώς επέδειξαν μεγαλύτερη βιωσιμότητα. Ίσως στο μέλλον να πραγματοποιηθούν πειράματα με μεγαλύτερη συγκέντρωση Tg, στην οποία να θανατώνεται το 50% των κυττάρων, ώστε να εξαχθεί ένα ασφαλές αποτέλεσμα. Τεχνικό πρόβλημα σε αυτό το σχέδιο ίσως αποτελέσει το γεγονός, ότι σε μεγάλες συγκεντρώσεις τα κύτταρα αποκολλώνται πολύ εύκολα από το υπόστρωμα, πράγμα που τελικώς δεν επιτρέπει την εύκολη φωτομέτρησή τους.

Συνοψίζοντας, είναι εμφανές από όσα πειράματα πραγματοποιήθηκαν, πως η APP παίζει κρίσιμο ρόλο στην βιωσιμότητα των κυττάρων, καθώς χωρίς αυτήν η θνησιμότητά τους αυξάνεται. Επίσης, ενισχύεται κατά πολύ η άποψη περί συμμετοχής της APP στην κυτταρική σηματοδότηση αλλά και στη διακίνηση του ασβεστίου. Ρόλο σε αυτές τις διαδικασίες ίσως να παίζει η ενδοκυτταρική περιοχή της APP, κάτι που είναι θεμιτό να επιβεβαιωθεί με περαιτέρω μελέτες. Οποιαδήποτε περαιτέρω μελέτη και αν πραγματοποιηθεί σε μελλοντικές εργασίες του τομέα, τόσο σχετικά με την ίδια την APP, όσο και με τη συμβολή της στη σηματοδότηση, θα έχει απώτερο σκοπό την αποσαφήνιση της λειτουργίας αυτής της πρωτεΐνης, που κατέχει τόσο μεγάλο ρόλο στην παθογένεση μίας από τις σοβαρότερες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, την νόσο του Alzheimer.

VI. Βιβλιογραφία

1. The EU Joint Programme – Neurodegenerative Disease Research (JPND).
2. Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V, 2003, Neurodegeneration: What is it and where are we?. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(1): 3 – 10
3. Schon EA, Manfredi G, 2003, Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(3): 303 – 312
4. Sandra Amor, Fabiola Puentes, David Baker, Paul van der Valk 2010, Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*, 192(2): 154 – 169
5. National Institute of Health – National Institute on Aging. <https://www.nia.nih.gov>
6. Alzheimer’s disease international. <https://www.alz.co.uk>
7. Thomas D Bird, 1999, Last Revision 2012. GeneReviews
8. Perl DP, 2010, Neuropathology of Alzheimer’s Disease. HHS Author Manuscripts, 77(1): 32 – 42
9. Schachter AS, Davis KL, 2000, Alzheimer’s disease. *Dialogues in clinical neuroscience*, 2(2): 91 – 100
10. O’Brien RJ, Wong PC, 2011, Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer’s Disease. HHS Author Manuscripts, 34: 185 – 204
11. Thinakaran G, Koo EH, 2008, Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*, 283(44): 29615 – 29619
12. Rik van der Kant, Goldstein LSB, 2015, Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein from Development to Dementia. *Developmental Cell*, 32(4): 502 – 515
13. Oh ES, Savonenko AV, King JF, Fangmark Tucker SM, Rudow GL, Xu G, Borchelt DR, Troncoso JC, 2009, Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. *Neurobiol Aging*, 30(8): 1238 – 1244
14. Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A, 1998, Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21): 12683 – 12688
15. Oh SY, Ellenstein A, Chen CD, Hinman JD, Berg EA, Costello CE, Yamin R, Neve RL, Abraham CR, 2005, Amyloid precursor protein interacts with notch receptors. *Journal of neuroscience research*, 82(1): 32 – 42
16. Nikolaev A, McLaughlin T, O’Leary DD, Tessier-Lavigne M, 2009, APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*, 457(7232): 981 – 989
17. Koo EH, Sisodia SS, Archer DR, Martin LJ, Weidemann A, Beyreuther K, Fischer P, Masters CL, Price DL, 1990, Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 87(4): 1561 – 1565
18. Schaeffer EL, Figueiro M, Gattaz WF, 2011, Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. *Clinics*, 66(S1): 45 – 54
 19. Strooper DB, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R, 1999, A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, 398(6727): 518 – 522
 20. Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T, 2003, The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature*, 422(6930): 438 – 441
 21. Shen J, Kelleher RJ 3rd, 2007, The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(2): 403 – 409
 22. https://www.nature.com/horizon/proteases/background/figs/ripping_f3.html
↓
 23. Kim W, Hecht MH, 2006, Generic hydrophobic residues are sufficient to promote aggregation of the Alzheimer's Ab42 peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(43): 15824 – 15829
 24. Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI, 1985, The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *The Journal of cell biology*, 101(4): 1371 – 1378
 25. Avila J, Jiménez JS, Sayas CL, Bolós M, Zabala JC, Rivas G, Hernández F, 2016, Tau structures. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8: 262
 26. Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L, 2011, The Many Faces of Tau. *HHS Author manuscripts*, 70(3): 410 – 426
 27. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW, 1975, A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5): 1858 – 62
 28. Kempf M, Clement A, Faissner A, Lee G, Brandt R, 1996, Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(18): 5583 – 5592
 29. Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N, 2000, Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *The Journal of cell biology*, 150(5): 989 – 1000
 30. LoPresti P, Szuchet S, Papasozomenos SC, Zinkowski RP, Binder LI, 1995, Functional implications for the microtubule-associated protein tau:

- localization in oligodendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(22): 10369 – 10373
31. Noble W, Hanger DP, Miller CCJ, Lovestone S, 2013, The importance of Tau Phosphorylation for Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Neurology*, 4: 83
 32. Islam K, Levy E, 1997, Carboxyl-terminal fragments of beta-amyloid precursor protein bind to microtubules and the associated protein tau. *The American Journal of Pathology*, 151(1): 265 – 271
 33. Iqbal K, Alonso AC, Gong CX, Khatoon S, Pei JJ, Wang JZ, Grundke-Iqbal I, 1998, Mechanisms of neurofibrillary degeneration and the formation of neurofibrillary tangles. *Journal of neural transmission. Supplementum.*, 53: 169 – 180
 34. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A, 2013, Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *HHS Author Manuscript*, 36(10): 587 – 597
 35. van Hall G, Strømstad M, Rasmussen P, Jans O, Zaar M, Gam C, Quistorff B, Secher NH, Nielsen HB, 2009, Blood lactate is an important energy source for the human brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 29(6): 1121 – 1129
 36. Lutas A, Yellen G, 2013, The ketogenic diet: metabolic influences on brain excitability and epilepsy, *Trends in Neuroscience*, 36(1): 32 – 40
 37. Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ, 2007, Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 27(11): 1766 – 1791
 38. Pellerin L, Magistretti PJ, 2012, Sweet sixteen for ANLS. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 32(7): 1152 – 1156
 39. Mergenthaler P, Kahl A, Kamitz A, van Laak V, Stohlmann K, Thomsen S, Klawitter H, Przesdzing I, Neeb L, Freyer D, Priller J, Collins TJ, Megow D, Dirnagl U, Andrews DW, Meisel A, 2012, Mitochondrial hexokinase II (HKII) and phosphoprotein enriched in astrocytes (PEA15) form a molecular switch governing cellular fate depending on the metabolic state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(5): 1518 – 1523 .
 40. Kapogiannis D, Mattson MP, 2011, Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology*, 10(2): 187 – 198
 41. Merlini M, Meyer EP, Ulmann-Schuler A, Nitsch RM, 2011, Vascular β -amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcA β mice. *Acta neuropathologica*, 122(3): 293 – 311

42. An Y, Varma VR, Varma S, Casanova R, Dammer E, Pletnikova O, Chia CW, Egan JM, Ferrucci L, Troncoso J, Levey AI, Lah J, Seyfried NT, Legido-Quigley C, O'Brien R, Thambisetty M, 2018, Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 14(3): 318 – 329
43. Barban S, Schulze H, 1961, The effects of 2-Deoxyglucose on the growth and metabolism of cultured human cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 236(7): 1 – 5
44. Zhong D, Liu X, Schafer-Hales K, Marcus AI, Khurri FR, Sun SY, Zhou W, 2008, 2-Deoxyglucose induces Akt phosphorylation via a mechanism independent of LKB1/AMP-activated protein kinase signaling activation or glycolysis inhibition. *Molecular cancer therapeutics*, 7(4): 809 – 817
45. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, 2013, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ. 5^η έκδοση, ελληνική έκδοση, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ
46. Vander, A., Sherman, J., Luciano, D. & Τσακόπουλος, Μ., 2001, Φυσιολογία του ανθρώπου: Μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού. Τόμος Ι & ΙΙ. 8^η Αγγλική έκδοση. 1^η Ελληνική έκδοση. Αθήνα. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
47. Lee J, Pilch PF, 1994, The insulin receptor: structure, function, and signaling. *The American journal of physiology*, 266(2 Pt 1): C319 – 334
48. Neth BJ, Craft S, 2017, Insulin Resistance and Alzheimer's Disease: Bioenergetic Linkages. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9: 345
49. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E, 1992, Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care*, 15(3): 318 – 368
50. Convit A, Wolf OT, Tarshish C, de Leon MJ, 2003, Reduced glucose tolerance is associated with poor memory performance and hippocampal atrophy among normal elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4): 2019 – 2022 .
51. Baker LD, Cross DJ, Minoshima S, Belongia D, Watson GS, Craft S, 2011, Insulin resistance and Alzheimer-like reductions in regional cerebral glucose metabolism for cognitively normal adults with prediabetes or early type 2 diabetes. *Archives of neurology*, 68(1): 51 – 7
52. Jackson K, Barisone GA, Diaz E, Jin LW, DeCarli C, Despa F, 2013, Amylin deposition in the brain: A second amyloid in Alzheimer disease? *Annals of neurology*, 74(4): 517 – 526
53. Devi L, Alldred MJ, Ginsberg SD, Ohno M, 2012, Mechanisms underlying insulin deficiency-induced acceleration of β -amyloidosis in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 7(3): e32792.
54. Kandimalla R, Thirumala V, Hemachandra Reddy P, 2016, Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. *Elsevier*, 1863(5): 1078 – 1089

55. Vekrellis K, Ye Z, Qiu WQ, Walsh D, Hartley D, Chesnau V, Rosner MR, Selkoe DJ, 2000, Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *The Journal of neuroscience*, 20: 1657 – 1665
56. Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR, 2008, Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Research Bulletin*, 76: 329 – 343
57. Genius J, Geiger J, Bender A, Moeller HJ, Klopstock T, Rujescu D, 2012, Creatine Protects against Excitotoxicity in an In Vitro Model of Neurodegeneration. *PLoS one*, 7(2): e30554
58. Rodríguez MJ, Adroer R, de Yebra L, Ramonet D, Mahy N, 2001, Calcium homeostasis in the central nervous system: adaptation to neurodegeneration. *Contributions to science*, 2(1): 43 – 61
59. Zündorf G, Reiser G, 2011, Calcium Dysregulation and Homeostasis of Neural Calcium in the Molecular Mechanisms of Neurodegenerative Diseases Provide Multiple Targets for Neuroprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(7): 1275 – 1288
60. Brini M, Carafoli E, 2009, Calcium pumps in health and disease. *Physiological reviews*, 89(4): 1341 – 1378
61. Κούρτη Μ, 2010, Διπλωματική Εργασία : «Διερεύνηση του ρόλου του ασβεστίου κατά την απόκριση νευρικών κυττάρων στην υποξία», Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
62. Verkhratsky A, 2005, Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiological Reviews*, 85(1): 201 – 79
63. Britzolaki A, Saurine J, Flaherty E, Thelen C, Pitychoutis PM, 2018, The SERCA2: A Gatekeeper of Neuronal Calcium Homeostasis in the Brain. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(5): 981 – 994
64. Manjarrés IM, Rodríguez-García A, Alonso MT, García-Sancho J, 2010, The sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) is the third element in capacitative calcium entry. *Elsevier*, 47(5): 412 – 418
65. Daskoulidou N, Zeng B, Berglund LM, Jiang H, Chen GL, Kotova O, Bhandari S, Ayoola J, Griffin S, Atkin SL, Gomez MF, Xu SZ, 2015, High glucose enhances store-operated calcium entry by upregulating ORAI/STIM via calcineurin-NFAT signaling. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 93(5): 511 – 521
66. Moccia F, Zuccolo E, Soda T, Tanzi F, Guerra G, Mapelli L, Lodola F, D'Angelo E., 2015, Stim and Orai proteins in neuronal Ca²⁺ signaling and excitability. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 24(9): 153

67. Shim AH, Tirado-Lee L, Prakriya M., 2015, Structural and functional mechanisms of CRAC channel regulation. *Journal of Molecular Biology*, 427(1): 77 – 93
68. Κούρτη Μ, 2010, Διπλωματική Εργασία : «Διερεύνηση του ρόλου του ασβεστίου κατά την απόκριση νευρικών κυττάρων στην υποξία», Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
69. Jones KT, Sharpe GR, 1994, Thapsigargin Raises Intracellular Free Calcium Levels in Human Keratinocytes and Inhibits the Coordinated Expression of Differentiation Markers. *Elsevier*, 210(1): 71 – 76
70. Lytton J, Weslin M, Hanley MR, 1991, Thapsigargin Inhibits the Sarcoplasmic or Endoplasmic Reticulum Ca-ATPase Family of Calcium Pumps*. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(Sep): 17067 – 17071
71. Bezprozvanny I, Mattson MP, 2008, Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends in Neuroscience*, 31(9): 454 – 63
72. Gazda K, Kuznicki J, Wegierski T, 2017, Knockdown of amyloid precursor protein increases calcium levels in the endoplasmic reticulum. *Scientific Reports*, 7: 14512
73. Zeiger W, Vetrivel KS, Buggia-Prevot V, Nguyen PD, Wagner SL, Villereal ML, Thinakaran G, 2013, Ca²⁺ influx through Store-operated Ca²⁺ channels Reduces Alzheimer Disease β-Amyloid Peptide Secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, 288: 26955 – 26966
74. Leissring MA, Murphy MP, Mead TR, Akbari Y, Sugarman MC, Jannatipour M, Anliker B, Müller U, Saftig P, Strooper BD, Wolfe MS, Golde TE, LaFerla FM, 2002, A physiologic signaling role for the γ-secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7): 4697 – 4702
75. Nensa FM, Neumann MHD, Schrötter A, Przyborski A, Mastalski T, Susdalezew S, Looße C, Helling S, Magraoui FE, Erdmann R, Meyer HE, Uszkoreit J, Eisenacher M, Suh J, Guénette SY, Röhner N, Kögel D, Theiss C, Marcus K, Müller T, 2014, Amyloid Beta A4 Precursor Protein-binding Family B Member 1 (FE65) Interactomics Revealed Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A (SV2A) and Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase 2 (SERCA2) as New Binding Proteins in the Human Brain. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(2): 475 – 488
76. Hamid R, Kilger E, Willem M, Vassallo N, Kostka M, Bornhoevd C, Reichert AS, Kretschmar HA, Haass C, Herms J, 2007, Amyloid precursor protein intracellular domain modulates cellular calcium homeostasis and ATP content. *Journal of Neurochemistry*, 102: 1264 – 1275
77. Chang Y, Tesco G, Jeong WJ, Lindsey L, Eckman EA, Eckman CB, Tanzi RE, Guenette SY, 2003, Generation of the β-Amyloid Peptide and the Amyloid

- Precursor Protein C-terminal Fragment γ Are Potentiated by FE65L1. The journal of biological chemistry, 278(61): 61100 – 61107
78. Μαργαρίτης ΛΧ, Γαλανόπουλος ΒΚ, Κεραμάρης ΚΕ, Μαρίνος ΕΣ, Παπασιδέρη ΙΣ, Στραβοπόδης ΔΙ, Τρουγκάκος ΙΠ, 2008, Βιολογία Κυττάρου. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 4^η έκδοση
 79. Hanada M, Feng J, Hemmings BA, 2004, Structure, regulation and function of PKB/AKT – a major therapeutic target. Biochimica et biophysica acta, 1696(1-2): 3 – 16
 80. Hemmings BA, Restuccia DF, 2012, PI3K-PKB/Akt Pathway. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 4(9): a011189
 81. Marchi S, Marinello M, Bononi A, Bonora M, Giorgi C, Rimessi A, Pinton P, 2012, Selective modulation of subtype III IP₃R by Akt regulates ER Ca²⁺ release and apoptosis. Cell Death & Disease, 3(5): e304
 82. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR, 2014, Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 6(1): a009191
 83. <https://www.mskcc.org/research-advantage/support/technology/tangible-material/human-neuroblastoma-cell-line-sk-n-sh>
 84. Gersbacher MT, Goodger ZV, Trutzel A, Bundschuh D, Nitsch RM, Konietzko U, 2013, Turnover of Amyloid Precursor Protein Family Members Determines Their Nuclear Signaling Capability. PLoS ONE 8 (7): e69363.
 85. LeBlanc AC, Kovacs DM, Chen HY, Villare F, Tykocinski M, Autilio-Gambetti L, Gambetti P, 1992, Role of Amyloid Precursor Protein (APP): Study With Antisense Transfection of Human Neuroblastoma Cells. Journal of Neuroscience Research, 31: 635 – 645
 86. <https://patents.google.com/patent/US7479573>
 87. <https://bitesizebio.com/580/how-sds-page-works/>
 88. <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/western-blot-principle>

